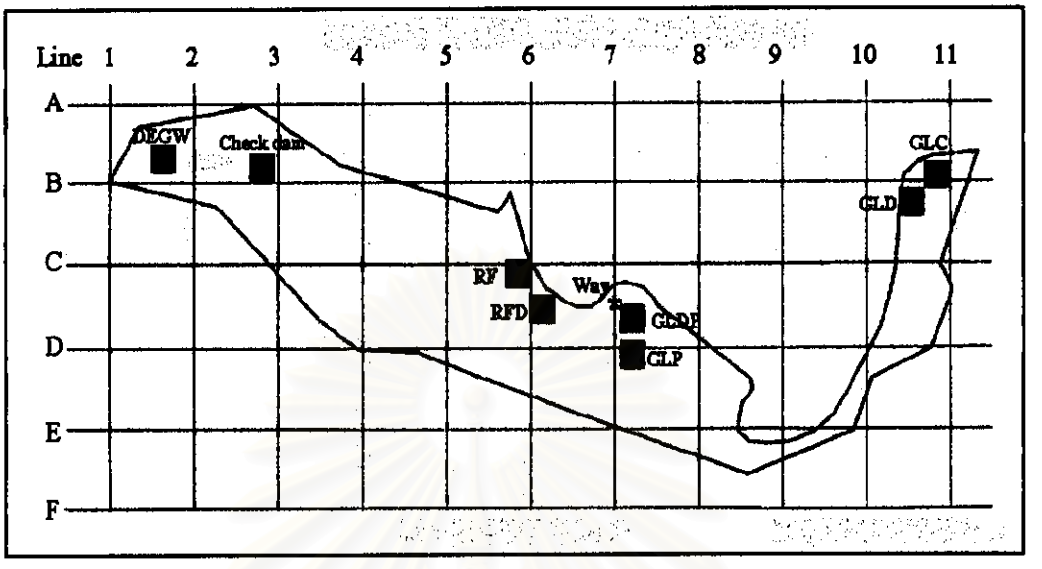
บทที่ 4

วิธีดำเนินการศึกษา

ลักษณะทั่วไปของพื้นที่

พื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริ และป่าพันธุกรรมพืช อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา มีลักษณะที่ประกอบด้วยป่า 3 แบบคือ ป่าดิบแล้ง ป่าที่กำลังอยู่ในช่วง secondary succession (ป่าฟื้นสภาพ) และป่าหญ้าหรือทุ่งหญ้า (ภาพที่ 5) พื้นที่อยู่ติดกับเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน รอบนอกของพื้นที่โครงการส่วนใหญ่เป็นป่าเต็งรัง จึงเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายของพันธุ์พืช พื้นที่โครงการทั้งหมดจะถูกแบ่งออกตามแนวเส้นแวง มีทั้งหมด 11 แนว และตามแนวเส้นรุ้ง 6 แนว เป็นพิกัดที่ครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมดของโครงการ จะมีการวางแปลงทดลองตามแนวเส้นแวงที่ลากผ่านป่าชนิดต่างๆ ดังภาพที่ 6

ภาพที่ 5 พื้นที่ป่าในโครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริ และป่าพันธุกรรมพืช อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา (ก) ป่าดิบแล้ง (ข) ป่าทุ่งหญ้า (ค) ป่าฟื้นสภาพ



ภาพที่ 6 แผนที่โครงการสร้างสร้างป่าตามแนวพระราชดำริ และป่าพันธุกรรมพืช อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา

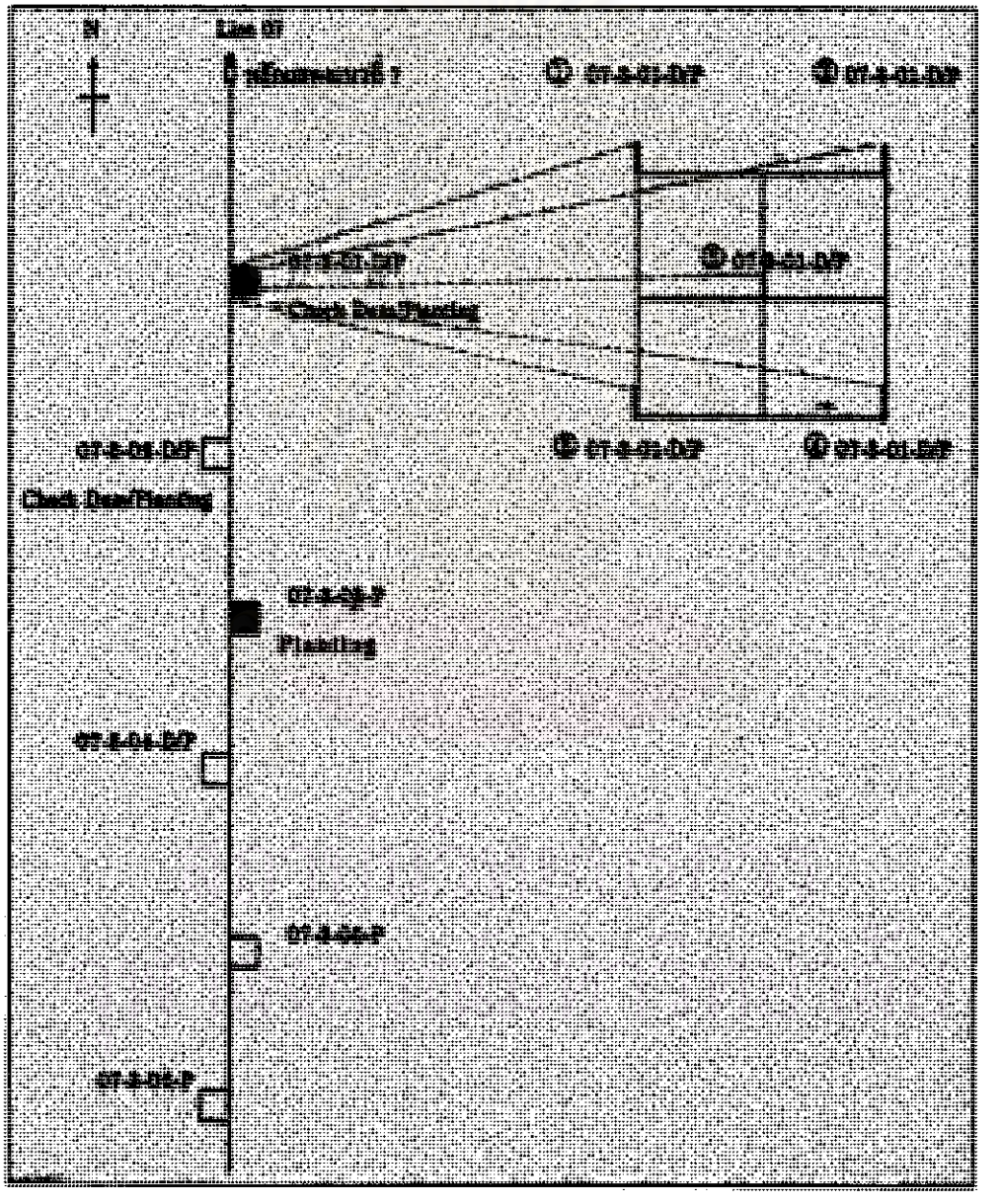
■ : แสดงตำแหน่งแปลงทดลองที่ศึกษา

* : แสดงจุดเก็บดินนอกแปลงศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การกำหนดแปลงศึกษา

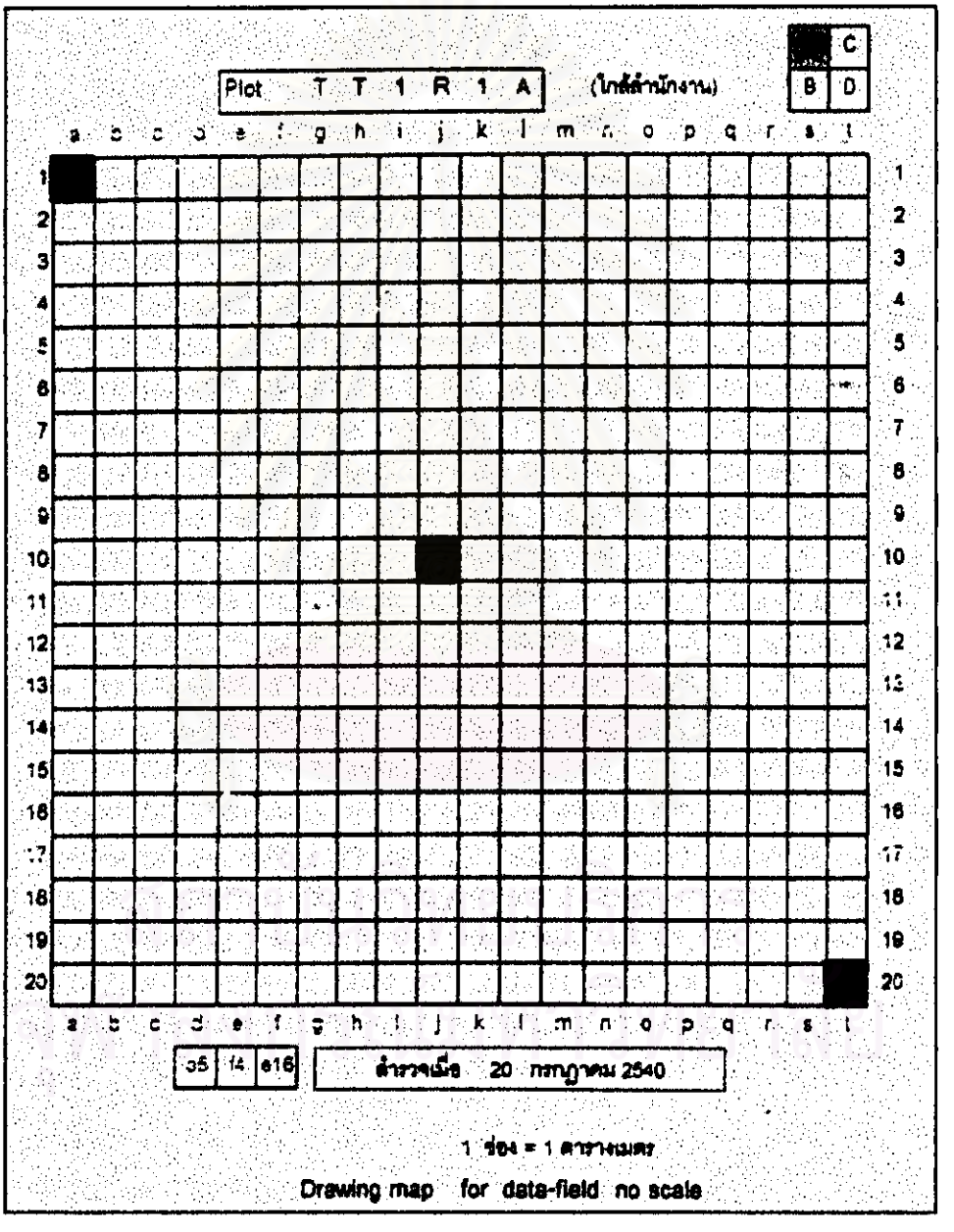
ในแต่ละแนวเส้นแวง จะมีการกำหนดแปลงศึกษาเป็นจำนวนอย่างน้อย 3 ซ้ำ ดังแสดงในภาพที่ 7 ในแต่ละวิธีทดลอง อันได้แก่ การปลูกกล้าไม้ การขุดคันดินกั้นน้ำ การปลูกกล้าไม้ร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ และเฉพาะแนวที่ 10-11 มีการกำหนดเป็นแปลงควบคุมที่ปล่อยให้เปลี่ยนแปลงตามธรรมชาติ



ภาพที่ 7 ตัวอย่างแผนผังการวางแปลงศึกษาในแนวที่ 7

2. การกำหนดแปลงทดลอง

วางแปลงกำหนดพื้นที่ในการศึกษาขนาด 20x20 ตารางเมตร แบ่งออกเป็นแปลงย่อย ขนาด 1x1 ตารางเมตร สุ่มเก็บตัวอย่างจาก 3 แปลงย่อยในแนวทะแยงมุม โดยเก็บดินที่ความลึก 1-20 เซนติเมตร ทำการเก็บตัวอย่างดินทุก 3 เดือนตลอดระยะเวลา 1 ปี (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การเก็บตัวอย่างดินจากแปลงศึกษาในแนวทะแยงมุม

พื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริ และป่าพันธุกรรมพืช อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมาแบ่งการเก็บตัวอย่างดินออกเป็น 8 แปลงกับอีก 1 จุด ซึ่งแต่ละแปลงจะถูกกำหนดตามเส้นแบ่งเขตพื้นที่ที่มีทั้งหมด 11 แนว

รายละเอียดเกี่ยวกับแต่ละแปลงมีดังนี้

1. ระหว่างแนวที่ 1 และ 2 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าดิบแล้งที่มีแหล่งน้ำธรรมชาติ (DEGW) รหัสแปลงศึกษา 02-1-01 (02=แนวที่ 2, 1=ป่าดิบแล้ง, 01=แปลงที่ 1) ลักษณะทั่วไปมีความอุดมสมบูรณ์ตามธรรมชาติ ภายในแปลงประกอบด้วยต้นไม้ขนาดใหญ่จำนวนมาก สังคมพืชมีความหลากหลาย แสงแดดสามารถส่องผ่านลงมาที่พื้นดินได้ ดินมีสีค่อนข้างดำดูเหมือนมีปริมาณอินทรียวัตถุสูง บริเวณกลางแปลงมีลำห้วยธรรมชาติไหลผ่านให้ความชุ่มชื้นได้เป็นอย่างดี (ภาพที่ 9)

2. แนวที่ 3 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นคันดินกั้นน้ำขนาดใหญ่ (Checkdam) รหัสแปลงศึกษา 03-3-01-D/P (03=แนวที่ 3, 3=ป่าทุ่งหญ้า, 01=แปลงที่ 1, D/P=ขุดคันดินกั้นน้ำและปลูกกล้าไม้ทดแทน) เป็นแปลงที่มีการปลูกกล้าไม้รอบแนวคันดินกั้นน้ำ ภายในแปลงประกอบด้วยหญ้าแฝกจำนวนมากเพื่อเก็บกักน้ำในคันดินกั้นน้ำขนาดใหญ่ที่ขุดขึ้นตรงกลางแปลง ดินมีสีค่อนข้างแดง และมีส่วนประกอบของทรายสูง คันดินกั้นน้ำให้ความชุ่มชื้นกับแปลงได้หากมีฝนตกเป็นระยะ พบว่ามีสัตว์ป่าแวะเวียนมากินน้ำ และมีการวางไข่ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและตัวอ่อนของแมลงที่ต้องเจริญเติบโตในน้ำ (ภาพที่ 10)

3. แนวที่ 6 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าฟื้นสภาพที่ต่อไปจะกลายสภาพเป็นป่าเบญจพรรณ (RF) รหัสแปลงศึกษา 06-2-01 (06=แนวที่ 6, 2=ป่าเบญจพรรณ, 01=แปลงที่ 1) มีความอุดมสมบูรณ์ตามธรรมชาติ ภายในแปลงประกอบด้วยต้นไม้พุ่มและลูกไม้ที่ขึ้นเองตามธรรมชาติจำนวนมาก ดินมีสีดำ อนุภาคดินมีขนาดเล็กดูเหมือนเป็นดินที่อุดมสมบูรณ์ มีซากพืชทับถมกันเป็นจำนวนมาก ดินมีความชุ่มชื้นดี สังเกตได้จากซากไม้ที่มีตะไคร่ และเห็ดขึ้นอยู่ (ภาพที่ 11ก)

4. แนวที่ 6 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าฟื้นสภาพที่ต่อไปจะกลายสภาพเป็นป่าเบญจพรรณและมีการขุดคันดินกั้นน้ำ (RFD) รหัสแปลงศึกษา 06-2-02-D (06=แนวที่ 6, 2=ป่าเบญจพรรณ, 02=แปลงที่ 2, D=ขุดคันดินกั้นน้ำ) มีความอุดมสมบูรณ์เหมือนกับข้อ 3 แต่การขุดคันดินกั้นน้ำในแปลงศึกษานี้พบว่าไม่สามารถเก็บกักน้ำไว้ได้ (ภาพที่ 11ข-ค)

ภาพที่ 9 แปลงศึกษาที่เป็นป่าดิบแล้งที่มีลำห้วยธรรมชาติไหลผ่าน (DEGW) (ก) ลักษณะทั่วไปของป่าดิบแล้ง (ข) ลำห้วยธรรมชาติในฤดูฝนช่วงเดือนกันยายน (ค) ลำห้วยธรรมชาติในฤดูแล้งช่วงเดือนมกราคม

ภาพที่ 10 แปลงศึกษาที่เป็นคันดินกันน้ำขนาดใหญ่ (Check dam) (ก) ลักษณะทั่วไปในฤดูแล้งช่วงเดือนมกราคม (ข) ลักษณะทั่วไปในฤดูฝนช่วงเดือนมิถุนายน (ค) คันดินกั้นน้ำหลังฝนตก และมีน้ำขัง

ภาพที่ 11 แปลงศึกษาที่เป็นป่าฟื้นสภาพ (RF และ RFD) (ก) ลักษณะป่าฟื้นสภาพทั่วไป (ข) ลักษณะป่าฟื้นสภาพที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (ค) คันดินกั้นน้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. แนวที่ 7 เป็นจุดศึกษาที่มีลักษณะเป็นทางที่ใช้ในการสัญจร (way) เป็นเส้นทางที่ใช้ในการเดินทางเข้าสู่แปลงในเส้นที่ 7 ของโครงการ มีลักษณะเป็นป่าหญ้าทั้งสองข้างทาง ดินเป็นดินเหนียวมีสีแดง ไม่มีความอุดมสมบูรณ์ เนื้อดินแข็งมากในฤดูแล้งแต่อ่อนตัวเหนียวมากในฤดูฝน (ภาพที่ 12)

6. แนวที่ 7 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้และมีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) รหัสแปลงศึกษา 07-3-01-D/P (07=แนวที่ 7, 3=ป่าทุ่งหญ้า, 01=แปลงที่ 1, D/P=ขุดคันดินกั้นน้ำและปลูกกล้าไม้ทดแทน) ภายในแปลงมีลักษณะเป็นป่าหญ้า ดินมีสีแดง ดูเหมือนเป็นดินที่ไม่ค่อยมีความอุดมสมบูรณ์ มีซากหญ้าทับถมกันเป็นจำนวนมาก ดินมีความชุ่มชื้นดีหลังฝนตก แปลงนี้มีการปลูกกล้าไม้ที่เพาะขึ้นตามโครงการ มีการปลูกถั่วมะแฮะเป็นพืชพี่เลี้ยง ซึ่งช่วยในการตรึงไนโตรเจนเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์แก่ดิน และมีการขุดคันดินกั้นน้ำ (ภาพที่ 13)

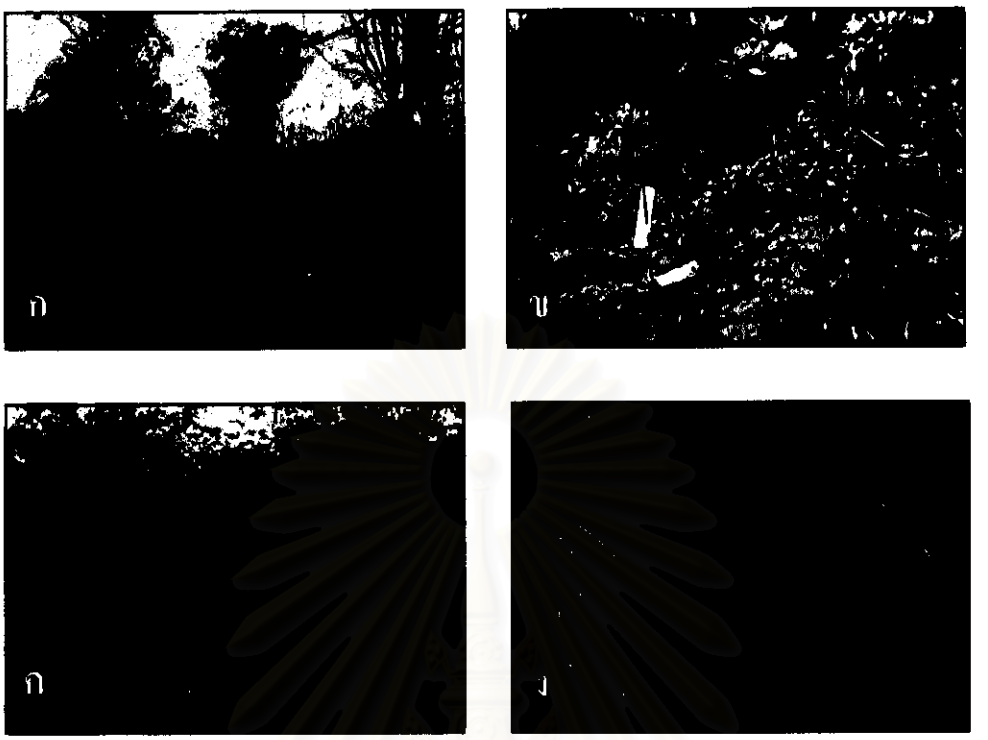
7. แนวที่ 7 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP) รหัสแปลงศึกษา 07-3-03-P (07=แนวที่ 7, 3=ป่าทุ่งหญ้า, 03=แปลงที่ 3, P=ปลูกกล้าไม้ทดแทน) ภายในแปลงมีลักษณะเป็นป่าหญ้า ดินมีสีแดง ดูเหมือนเป็นดินที่ไม่ค่อยอุดมสมบูรณ์ แปลงทดลองนี้มีเฉพาะการปลูกกล้าไม้ โดยมีการปลูกถั่วมะแฮะเป็นพืชพี่เลี้ยงเช่นเดียวกันกับข้อ 6 (ภาพที่ 14)

8. แนวที่ 10 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD) รหัสแปลงศึกษา Ex-3-10-D/P (Ex=แปลงทดลองพิเศษแนวที่ 10, 3=ป่าทุ่งหญ้า, 10=แปลงที่ 10, D=ขุดคันดินกั้นน้ำ) ภายในแปลงมีลักษณะเป็นป่าหญ้า ดินมีสีแดง อนุภาค ดูเหมือนเป็นดินที่ไม่ค่อยอุดมสมบูรณ์ มีซากหญ้าทับถมกันเป็นจำนวนมาก ดินมีความชุ่มชื้นดีหลังฝนตก แปลงนี้มีการขุดคันดินกั้นน้ำ ซึ่งพบว่าสามารถเก็บกักน้ำไว้ได้พอสมควร (ภาพที่ 15)

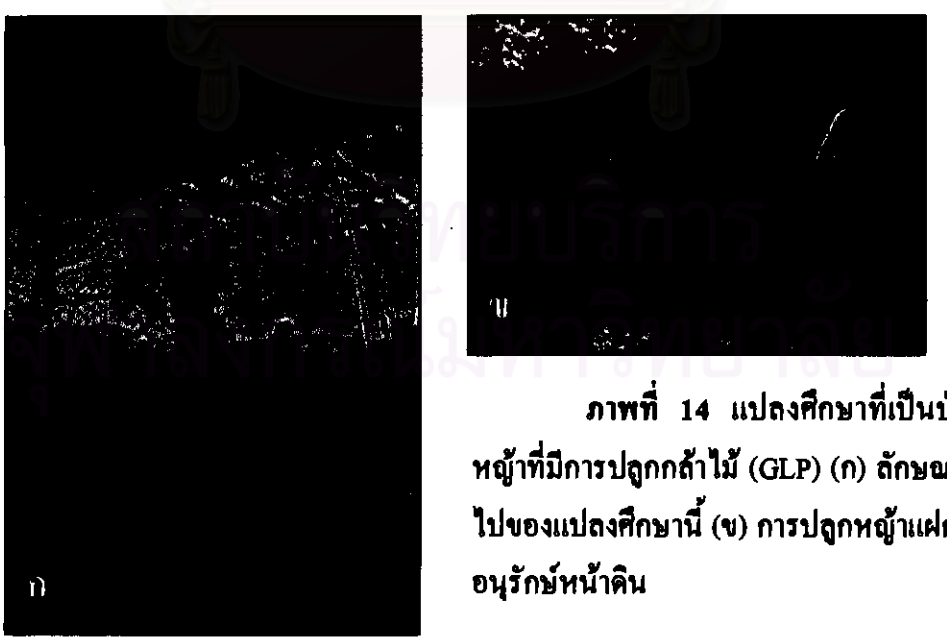
9. ระหว่างแนวที่ 10-11 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้า (GLC) รหัสแปลงศึกษา 11-3-09 (11=แนวที่ 11, 3=ป่าทุ่งหญ้า, 09=แปลงที่ 9) ภายในแปลงมีลักษณะเป็นป่าหญ้า ดินมีสีแดง อนุภาค ดูเหมือนเป็นดินที่ไม่ค่อยอุดมสมบูรณ์ มีซากหญ้าทับถมกันเป็นจำนวนมาก ดินมีความชุ่มชื้นดีหลังฝนตก แปลงนี้ไม่มีการปลูกกล้าไม้หรือขุดคันดินกั้นน้ำเลย ซึ่งใช้เป็นแปลงควบคุมให้มีการเปลี่ยนแปลงเองโดยธรรมชาติ (ภาพที่ 16)

ภาพที่ 12 จุดศึกษาที่เป็นเส้นทางที่ใช้สัญจร (way) (ก) ลักษณะทั่วไปในฤดูแล้งช่วงเดือนมกราคม (ข) ลักษณะทั่วไปในฤดูฝนช่วงเดือนมิถุนายน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 13 แปลงศึกษาที่เป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) (ก) ลักษณะทั่วไปของป่าทุ่งหญ้า (ข) การปลูกกล้าไม้ (ค) การปลูกถั่วมะแฮะเป็นพืชพี่เลี้ยง (ง) คันดินกั้นน้ำในฤดูฝนช่วงเดือนกันยายน



ภาพที่ 14 แปลงศึกษาที่เป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP) (ก) ลักษณะทั่วไปของแปลงศึกษานี้ (ข) การปลูกหญ้าแฝกเพื่ออนุรักษ์หน้าดิน

ภาพที่ 15 แปลงศึกษาที่เป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD) (ก) ลักษณะทั่วไป (ข) คันดินกั้นน้ำ

ภาพที่ 16 แปลงศึกษาที่เป็นป่าทุ่งหญ้าที่ปล่อยให้มีการฟื้นสภาพเองตามธรรมชาติ (GLC)

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดิน

การเก็บตัวอย่างดินในแปลงทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 จุด ในแต่ละแปลง ที่ระดับชั้นความลึก 0-20 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างดินด้วยการใช้เสียมที่สะอาดขุดดินลึกลงไปประมาณ 20 เซนติเมตร หลังจากนั้นใช้เสียมแซะเอาตัวอย่างดินออกมาประมาณครึ่งกิโลกรัม บรรจุลงในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ รัดยางให้แน่นแล้วนำตัวอย่างดินมาที่ห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาด้านจุลชีววิทยา และวิเคราะห์ด้านคุณสมบัติทางเคมีของดิน

2. การตรวจวิเคราะห์ด้านคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตัวอย่างดิน

2.1. การวัดความชื้นในดิน

ชั่งดิน 20 กรัม ใส่ใน moisture can อบด้วยความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน desiccator นำมาชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \left(\frac{(\text{ดินเปียก+ภาชนะ})-(\text{ดินแห้ง+ภาชนะ})}{(\text{ดินเปียก-ภาชนะ})} \right) \times 100$$

2.2. การหาปริมาณอินทรียวัตถุในดิน

นำดินจากข้อ 2.1 ใส่ลงในถ้วยกระเบื้อง (Crucible porcelain) มาเผาไฟที่ความร้อน 500-600 องศาเซลเซียส จนดินร้อนเป็นสีแดง ทิ้งให้เย็นใน desiccator นำมาชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุ} = \left(\frac{(\text{ดินก่อนเผา+ภาชนะ})-(\text{ดินหลังเผา+ภาชนะ})}{(\text{ดินก่อนเผา-ภาชนะ})} \right) \times 100$$

2.3. การวัดความเป็นกรด-ด่างในดิน (pH)

โดยชั่งดิน 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นอัตราส่วน 1:5 (ดินต่อน้ำ) นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ย

3. การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

ทำการศึกษาและแยกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจากตัวอย่างดินโดยวิธี Soil dilution plate method อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือ Nutrient agar และแยกเชื้อราทั้งหมดจากตัวอย่างดินโดยวิธี Soil dilution plate method เช่นเดียวกัน อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือ Glucose Ammonium nitrate Agar (GAN) ที่มีการเติม Streptomycin เป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และเติม Rose bengal เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และไม่ให้โคโลนีของเชื้อราเจริญแผ่กว้างมากเกินไป (วิธีเตรียมอาหารแสดงในภาคผนวก ก)

3.1. ขั้นตอนการทำ Soil dilution plate method สำหรับแยกแบคทีเรียทั้งหมดจากตัวอย่างดิน

ผสมตัวอย่างดินแต่ละตัวอย่าง 10 กรัม ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} หลังจากนั้นใช้ปิเปตที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายจากระดับความเจือจางที่ 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร จะได้ระดับความเจือจาง 10^{-2} ทำระดับความเจือจางต่อๆ ไปในทำนองเดียวกันให้ได้ความเจือจางที่ต้องการ คือ 10^{-6}, 10^{-7}, และ 10^{-8} แล้วนำตัวอย่างดินเจือจางอย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว (แต่ละระดับความเจือจางทำ 3 ซ้ำ) หลังจากนั้นเทอาหาร Nutrient Agar ที่หลอมแล้วลงไป แล้วรีบวนจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปซ้ายขวา และขึ้นลงประมาณ 10 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-5 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีคำนวณจากจำนวนของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะทยอยขึ้นต่อตัวอย่างดิน 1 กรัม โดยโคโลนีของแบคทีเรียจะขึ้นทั้งหมดภายใน 48 ชั่วโมง โดยใช้สูตรคำนวณต่อไปนี้

$$\text{จำนวนแบคทีเรียต่อตัวอย่างดิน 1 กรัม} = \text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ยต่อจาน} \times \frac{1}{\text{ความเจือจาง}} \text{ CFU/ กรัมดิน}$$

3.2. ขั้นตอนการทำ Soil dilution plate method สำหรับแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน

ผสมตัวอย่างดินแต่ละตัวอย่าง 10 กรัม ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} หลังจากนั้นใช้ปิเปตที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายจากระดับความเจือจางที่ 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร จะได้ระดับความเจือจาง 10^{-2} ทำระดับความเจือจางต่อๆ ไปในทำนองเดียวกันให้ได้ความเจือจางที่ต้องการ คือ 10^{-2}, 10^{-3}, และ 10^{-4} แล้วนำตัวอย่างดินเจือจางอย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว (แต่ละระดับความเจือจางทำ 3 ซ้ำ) หลังจากนั้นเทอาหาร Glucose

Ammonium nitrate Agar ที่หลอมแล้วลงไป แล้วรีบวนจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปซ้ายขวา และขึ้นลง ประมาณ 10 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีคำนวณจากจำนวนของเชื้อราต่อตัวอย่างดิน 1 กรัม โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$\text{จำนวนเชื้อราต่อตัวอย่างดิน 1 กรัม} = \text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ยต่อจาน} \times \frac{1}{\text{ความเจือจาง}} \text{ CFU/กรัมดิน}$$

การจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยการแยกเชื้อบริสุทธิ์ จากการเลือกเก็บเชื้อราจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีของเชื้อราขึ้นกระจายอยู่ และย้ายด้วยเข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยบริเวณปลายของเชื้อราทุกโคโลนีที่แตกต่างกันลงเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) (วิธีเตรียมอาหารแสดงในภาคผนวก ก) เพื่อเก็บไว้เป็นเชื้อบริสุทธิ์และนำไปจัดจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป โดยศึกษาจากลักษณะ ขนาด รูปร่าง สีของโคโลนี และสีที่สร้างลงในอาหารแข็งศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ตลอดจนโครงสร้างอื่นๆ โดยเขี่ยเชื้อรามาวางบนสไลด์ หยดด้วย Lactophenol blue solution แล้วปิดด้วย cover glass นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บางครั้งอาจจำเป็นต้องทำ slide culture เพื่อช่วยให้ดูลักษณะการเกิดของสปอร์ (ภาคผนวก ข) จดบันทึกลักษณะสำคัญต่างๆ และนำไปจำแนกตามหลักการจำแนกเชื้อราแต่ละชนิดต่อไป

4. การจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อราในดิน

การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อราในดินทำการศึกษาโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยนำเชื้อรามาทำการศึกษา โดยใช้วิธีการ Slide culture technique

ใช้เข็มเขี่ยเอาเส้นใยของเชื้อราที่ได้ทำการคัดเลือกไว้แล้วในข้อ 4 วางที่บริเวณโดยรอบของวุ้นอาหาร PDA ซึ่งตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร วางบนแผ่นสไลด์ นำเอาไปวางในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ซึ่งภายในมีสภาพเป็น moist chamber นำเอาไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน จึงนำมา mount slide นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) เพื่อศึกษาโครงสร้างต่างๆ ของเชื้อราดังนี้

4.1. สีของโคโลนีบนอาหารวุ้นและการเปลี่ยนสี (reverse side)

4.2. การเปลี่ยนสีอาหาร

4.3. ลักษณะผิวโคโลนี

4.4. หยดน้ำที่เกาะบนโคโลนี (water droplet)

4.5. ลักษณะเส้นใยที่เจริญลงในอาหาร (Submerged mycelium)

4.6. ลักษณะโครงสร้างการสืบพันธุ์ที่เจริญเต็มที่

4.7. สี ขนาด และรูปร่างของโครงสร้างการสืบพันธุ์ที่เจริญเต็มที่

4.8. รายละเอียดของโครงสร้างการสืบพันธุ์

4.9. รายละเอียดที่สมบูรณ์ของสปอร์

5. การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส

นำเชื้อราที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบของโคโลนี จากนั้นใช้เข็มเขี่ยมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร CMC ที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน แล้วราดทับด้วย 0.1 % congo red ทิ้งไว้ 10นาที ล้างออกด้วย 1 M NaCl บันทึกผลที่ปรากฏเป็นวงใส (clear zone) รอบโคโลนี (Teacher และ Wood, 1982) นำมาคำนวณค่าความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้จากสูตร

ความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส = ความกว้างบริเวณวงใส / ความกว้างโคโลนี

6. การวิเคราะห์แบบแผนไอโซเอนไซม์ของเชื้อราที่คัดเลือกมาได้ 10 สายพันธุ์

ขั้นตอนการเตรียมเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วันใช้ cork boror เจาะบริเวณปลายขอบโคโลนีของเชื้อรา ใช้เข็มเขี่ยชิ้นวุ้นใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ growth medium (ตามวิธีของ Banke, Frisvad และ Rosendahl, 1997 วิธีเตรียมอาหารแสดงในภาคผนวก ก) ในflask ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพนิ่งเป็นเวลา 5 วัน

ขั้นตอนการเตรียม crude extracts

กรองเส้นใยของเชื้อราด้วยกระดาษกรอง whatman NO. 1 ล้างเส้นใยของเชื้อราด้วย 0.1 M Tris HCL pH 7.5 นำเส้นใยที่กรองได้มา 1 กรัมใส่ในครกบดยาที่แช่เย็น -20 องศาเซลเซียสค้างคืน เติม liquid nitrogen จนท่วมเส้นใย แล้วบดให้เป็นผงละเอียด เมื่อผงเส้นใยของเชื้อราเริ่มละลายเทบัฟเฟอร์ 0.1 M. Tris HCI pH 7.5 ที่เติม 1% PVP (polyvinylpyroridine) บดให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวเทของเหลวทั้งหมดลงในหลอด centrifuge นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีแยกส่วนใสใส่ในหลอด centrifuge หลอดที่ 2 นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 15 นาที นำมาเติม 10% marker dye solution (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ข) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษาในขั้นต่อไป

ขั้นตอนการเตรียม polyacrylamide gel electrophoresis (วิธีเตรียมสารเคมีแสดงในภาคผนวก ข)

เตรียม polyacrylamide gel ชนิด seperating gel ใช้ความเข้มข้นของเจล 7.5% โดยใช้สารละลาย A 15 มิลลิลิตร สารละลาย B 15 มิลลิลิตร 10% สารละลาย ammonium persulfate 300 ไมโครลิตร TEMED 30 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 29 มิลลิลิตร นำมาหยอดลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกจนกระทั่งสารละลายสูงห่างจากขอบ 15 เซนติเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศและควรทำด้วยความรวดเร็ว หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้า เจล เบาๆอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบและป้องกันออกซิเจนที่เป็นตัวยับยั้งกระบวนการ polymerized ตั้งทิ้งไว้จนแข็ง (ประมาณ 1 ชั่วโมง) จะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำกลั่นอย่างชัดเจน เทน้ำกลั่นออกให้หมดและซับน้ำออกจนหมด เตรียม stacking gel ใช้ความเข้มข้นของเจล 4% โดยใช้สารละลาย A 26 มิลลิลิตร สารละลาย B 2.5 มิลลิลิตร 10% สารละลาย ammonium persulfate 200 ไมโครลิตร TEMED 30 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 13.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หยอดลงบนช่องว่างบน runnig gel ให้สูงขึ้นมาประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วเสียบหวี (comb) ก่อนที่เจลจะแข็งตัว เพื่อให้เกิดช่องสำหรับหยอดตัวอย่าง ตั้งเจลทิ้งไว้ให้แข็งตัว แล้วดึงหวีออกเมื่อจะหยอดตัวอย่างและ run gel

ขั้นตอนการทำอิเลคโตรโฟรีซีส

นำ polyacrylamide gel ที่เตรียมไว้ใส่ลงในอ่างบัฟเฟอร์ จากนั้นรินสารละลาย Electrode buffer ชนิด 0.1 M Tris-glycine pH 8.3 (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ข) ลงในอ่างบัฟเฟอร์ให้ท่วมแผ่น polyacrylamide gel ไล่ฟองอากาศออกให้หมด แล้วหยอดสารสกัดเอนไซม์ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ใส่ในช่องเจล โดยใส่ 1 ช่องต่อ 1 สายพันธุ์ จนครบทุกตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองต่อขั้วกระแสไฟฟ้าให้ครบวงจร แล้วเปิดเครื่องป้อนกระแสไฟฟ้ากระแสตรงโดยใช้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ ทิ้งไว้ให้สารสกัดเอนไซม์เคลื่อนที่มาถึงปลายด้านของแผ่นเจลโดยห่างจากปลายด้านประมาณ 1 เซนติเมตร

ขั้นตอนการย้อมสี polyacrylamide gel

ย้ายเจลที่ผ่านการทำอิเลคโตรโฟรีซีทออกจากกระจก ตัด stacking gel ออกตัดมุม เจล ทำเครื่องหมายในการอ่านเจล นำไปใส่ในกล่องย้อมสีเอนไซม์แต่ละชนิด (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ข) เมื่อครบกำหนดเวลาให้เทสีย้อมเอนไซม์ออกแล้วล้างด้วยน้ำไหลช้าๆ จนเจลค่อนข้างใส

นำไปแช่ใน 1% acetic acid จนเจลใส หรือเห็นแถบสีได้ชัดเจน เก็บเจลในสภาพชื้นด้วยการแช่ใน 7% acetic acid ผสมกับ 10% glycerol บันทึก zymogram ที่ได้โดยการถ่ายรูป พร้อมทั้งวาดแผนภาพที่ปรากฏลงบนกระดาษ

ขั้นตอนการทำให้เจลแห้ง

ใช้กระดาษเซลโลเฟนแช่น้ำสะอาด นำกระจกสะอาดที่มีขนาดใหญ่กว่าแผ่นเจลเล็กน้อย นำกระดาษเซลโลเฟนที่แช่น้ำไว้ปูลงบนกระจกให้เรียบ นำเจลที่ย้อมสีและเห็นแถบไอโซไซม์แล้ววางลงบนกระดาษเซลโลเฟน ใช้กระดาษเซลโลเฟนแช่น้ำอีกแผ่นหนึ่งวางประกบบนแผ่น เจล ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จัดตำแหน่งเจลให้สวยงาม ไล่ฟองอากาศออกให้หมด พับกระดาษเซลโลเฟนที่เหลือไปด้านหลังกระจก แล้วใช้ตัวหนีบปากเป็ดหนีบทั้ง 4 ด้าน ตั้งทิ้งไว้จนแผ่นเจลแห้งสนิท เมื่อแห้งสนิทตัดขอบและตกแต่งให้สวยงาม เก็บไว้สำหรับวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์ไซโมแกรม

นำไซโมแกรมที่ได้มาประเมินผลเปรียบเทียบแถบสีที่ปรากฏโดยคำนวณหาค่า Rf (relative fraction) ซึ่งเป็นค่าคงที่เฉพาะแถบไอโซไซม์ของแต่ละชนิด ซึ่งมีสูตรคำนวณดังนี้

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางเคลื่อนที่ของไอโซไซม์}}{\text{ระยะทางทั้งหมดที่สารสกัดเคลื่อนที่}}$$

นำค่า Rf ที่ได้บันทึกลงในแถบไซโมแกรมไว้เพื่อนำมาจัดหาลำดับ เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย