บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

การอนุรักษ์ทรัพยากรป่าไม้และความสำคัญของความหลากหลายทางพันธุกรรม

การฟื้นฟูทรัพยากรป่าไม้

ป่าชื้นเขตร้อน (tropical rain forest) เป็นแหล่งที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีสิ่งมีชีวิตไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 ของสิ่งชีวิตทั้งหมดในโลกอาศัยอยู่ ซึ่งประเทศไทยก็ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นที่เป็นแหล่งที่อุดมด้วยทรัพยากรทางชีวภาพนี้ด้วยเช่นกัน พื้นที่ป่าในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2538 เหลืออยู่เพียงร้อยละ 26 ของพื้นที่ (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2538) คาดว่าในปัจจุบันพื้นที่ป่าน่าจะลดลงอีกเนื่องจากสาเหตุหลายประการ แต่ที่สำคัญคือ ปัญหาการลักลอบตัดไม้ทำลายป่า ปัญหาการใช้ทรัพยากรป่าไม้และการเก็บของป่าอย่างไม่ถูกต้องและขาดความเข้าใจ ปัญหาการต้องการพื้นที่ทำกิน พื้นที่สำหรับการเพาะปลูก และปัญหาการใช้พื้นที่เป็นพื้นที่เก็บกักน้ำ เช่น การสร้างเขื่อน อ่างเก็บน้ำเพื่อบรรเทาปัญหาภัยแล้ง ซึ่งปัญหาเหล่านี้ล้วนมาจากการกระทำของมนุษย์ทั้งสิ้น การสูญเสียพื้นที่ป่าอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการสูญเสียทรัพยากรทางชีวภาพ โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่นับวันก็ใกล้จะสูญพันธุ์เข้าไปทุกที ทำให้ขาดโอกาสที่จะศึกษาและเรียนรู้การใช้ประโยชน์จากธรรมชาติอย่างถูกต้อง และไม่สามารถอนุรักษ์ทรัพยากรอันมีค่าเหล่านี้ไว้ได้

การฟื้นฟูสภาพป่าไม้ที่เสื่อมโทรมจนสูญเสียสภาพป่าไปนั้น โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริ และป่าพันธุกรรมพืช อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา สยามบรมราชกุมารีฯ เป็นโครงการที่มีลักษณะศึกษา ค้นคว้า และทดลองเพื่อเป็นการเก็บรวบรวมข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ไขปัญหาการใช้ทรัพยากรป่าไม้ที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน ทางโครงการได้ดำเนินการปลูกกล้าไม้ทดแทนในพื้นที่ที่เคยเป็นป่าเสื่อมโทรม และเก็บรวบรวมสายพันธุ์พืชเพื่อการอนุรักษ์ ซึ่งเป็นการช่วยให้ป่าสามารถฟื้นสภาพป่าที่เสื่อมโทรมได้โดยเร็วกว่าการปล่อยให้เกิดการฟื้นสภาพเองตามธรรมชาติ (secondary succession) ซึ่งอาจกินเวลาเป็นร้อยปีหรือมากกว่านั้น (Finegan, 1996) จึงจะได้ป่าที่มีสภาพใกล้เคียงกันกลับมา แต่ในสถานะการณ์ปัจจุบันย่อมเป็นไปได้ยากที่จะเกิด

เหตุการณ์เช่นนั้น นอกจากจะเป็นการฟื้นฟูสภาพป่าแล้ว งานของโครงการฯ ยังสามารถช่วยให้เกิดการอนุรักษ์ทรัพยากรทางชีวภาพและความหลากหลายทางชีวภาพอีกด้วย

การขุดคันดินกั้นน้ำเป็นอีกวิธีหนึ่งในการอนุรักษ์และฟื้นฟูสภาพป่า ทำให้ชะลอการไหลของน้ำฝนที่เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเกิดแหล่งน้ำ ทำให้ดินมีความชุ่มชื้นเพียงพอที่จะทำให้กล้าไม้เจริญเติบโตและผ่านช่วงฤดูแล้งไปได้ และการปลูกหญ้าแฝก (*Veteveria sp.*) ซึ่งเป็นพืชที่มีระบบรากฝอย ค่อนข้างยาว สามารถชอนไชและแทรกเข้าไปในเนื้อดิน ช่วยในการดูดซับน้ำหน้าดิน นอกจากนี้ยังช่วยพยุงหน้าดินไว้ไม่ให้ถูกชะล้างไป (วิฑูร ชินพันธุ์, 2537 และ Erskine, 1992) ทั้งหมดนี้เป็นพระมหากรุณาธิคุณที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช ได้ทรงพระราชทานเพื่อเป็นแนวทางในการอนุรักษ์ทรัพยากรป่าไม้ให้แก่ราษฎรไทย

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2538)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม เป็นส่วนหนึ่งของความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งมีความหมายว่าเป็นสภาพโดยรวมของสิ่งมีชีวิตและพันธุกรรมทั้งหมด มีความหมายกว้างขวางครอบคลุมถึงทุกสิ่งทุกอย่างที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตในโลก ไม่ว่าจะเป็นภายในหน่วยของสิ่งมีชีวิตเอง ระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันเอง ระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดที่อยู่ร่วมกันในกลุ่มประชากรเดียวกันหรือในกลุ่มประชากรที่แตกต่างกัน ตลอดจนถึงสิ่งแวดล้อมที่อยู่โดยรอบทั้งที่มีชีวิตและที่ไม่มีชีวิต สามารถสรุปออกมาได้เป็น 3 ประเด็น คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ความหลากหลายของชนิดหรือ species (species diversity) และความหลากหลายทางนิเวศวิทยา (ecological diversity)

ดังนั้นความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงหมายถึงหน่วยพันธุกรรม หรือยีน (gene) ที่มีความแตกต่างกัน ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันมากหรือน้อยไม่เท่ากันขึ้นกับอยู่สิ่งมีชีวิตนั่นเอง ซึ่งถูกกำหนดโดยรหัสทางพันธุกรรม (genetic code) ในสารพันธุกรรม (genetic material) ส่วนประกอบของสารพันธุกรรมทั้งหมดที่อยู่ภายในแต่ละเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเรียกรวมกันว่า genome ความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมในหน่วยสิ่งมีชีวิตแต่ละหน่วยนั้นมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เรียกว่า การกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งจะหมายความว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้จะสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลานได้ และทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างไปจากเดิม อาจเกิดขึ้นในระดับยีนหรือโครโมโซม และอาจเกิดขึ้นร่วมกับการสืบพันธุ์แบบอาศัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เพศของสิ่งมีชีวิต ที่ต้องอาศัยกลไกการแบ่งนิวเคลียสแบบ meiosis ซึ่งเอื้ออำนวยให้เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมโดยเรียกกลไกที่เกิดขึ้นว่า crossing over เป็นผลให้เกิดการสลับสับเปลี่ยนสารพันธุกรรมขึ้นเมื่อมีการให้กำเนิดสิ่งมีชีวิตรุ่นต่อไป (gene recombination)

ประชากรของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งซึ่งอยู่เป็นหมู่เหล่า และผสมพันธุ์กันภายในกลุ่มเผ่าพันธุ์ของตัวเองทำให้การถ่ายทอดยีนเกิดขึ้นเฉพาะภายในประชากรของ species เดียวกันเท่านั้น กลุ่มยีนของประชากรสิ่งมีชีวิตเดียวกันเรียกว่าแหล่งทางพันธุกรรม (gene pool) ซึ่งสามารถวัดค่าโดยการคำนวณหาค่าความถี่ยีน (gene frequency) และความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) ที่มีอยู่ในประชากรนั้น gene pool ของประชากรในแต่ละรุ่นที่ถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่ไปสู่รุ่นถูกต่อไปเรื่อยๆ เป็นเวลายาวนาน โดยที่การถ่ายทอดยีนแต่ละรุ่นจะต้องประสบกับพลังกดดันทางกระบวนการวิวัฒนาการ (evolutionary forces) ต่างๆ กัน เช่น การคัดเลือกโดยธรรมชาติ (natural selection) การอพยพ (migration) ความผกผันทางพันธุกรรม (genetic drift) เป็นต้น ทำให้แหล่งทางพันธุกรรม ของประชากรในแต่ละรุ่นเปลี่ยนแปลงแปรผันไปได้นั่นคือกระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการทีละเล็กทีละน้อยที่เรียกว่า จุลวิวัฒนาการ (microevolution) ก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรต่างๆ ของ species ยีนบางยีนอาจมีรูปแบบที่ค่อนข้างจะคงที่ เพราะยีนนั้นควบคุมลักษณะสำคัญของการดำรงชีวิต อย่างเช่นยีนที่ควบคุมการสร้างสาร cytochrome ที่มีความสำคัญยิ่งในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ แต่ก็มียีนอีกจำนวนมากที่มีรูปแบบหลากหลาย และมีส่วนทำให้เกิดความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมของประชากร และความหลากหลายทางพันธุกรรมของ species ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต เพื่อเป็นการเตรียมพร้อมในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะที่อยู่รอบตัว ทั้งนี้ก็เพื่อความอยู่รอดของเผ่าพันธุ์ตนเอง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเป็นอยู่และความอยู่รอดของมนุษย์ เพราะความหลากหลายทางชีวภาพเป็นทรัยากรธรรมชาติอย่างหนึ่งซึ่งเป็นที่พึ่งพาอาศัยของมนุษย์ โดยเป็นปัจจัยสี่ (อาหาร เครื่องนุ่งห่ม ที่อยู่อาศัย และยารักษาโรค) สำหรับการดำรงชีวิตทั้งทางตรงและทางอ้อม คุณค่าและประโยชน์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมพอสรุปได้ดังนี้

1. การเกษตรกรรม มีพืชจำนวนไม่น้อยกว่า 5,000 ชนิดที่ใช้เป็นอาหาร และมีไม่น้อยกว่า 150 ชนิดที่มนุษย์นำมาเพาะปลูกเป็นอาหารสำหรับคนและสัตว์เลี้ยง ความหลากหลายทาง

พันธุกรรมของพืชชนิดต่างๆ ที่มนุษย์นำมาใช้เป็นอาหารเป็นแหล่งวัตถุดิบ ซึ่งจะถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงคัดสายพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น

2. การแพทย์ ในปัจจุบันประมาณร้อยละ 40 ของยารักษาโรคต่างๆ ที่ใช้กันอยู่ ได้มาจากตัวยาสมุนไพรหรือไม่ก็ได้มาจากการศึกษาสารเคมีที่มีต้นกำเนิดมาจากสารสกัดจากพืชสมุนไพรในป่าธรรมชาติทั้งสิ้น ในป่าชื้นเขตร้อนอย่างเช่นประเทศไทย เชื่อว่าน่าจะมีพันธุ์พืชสมุนไพรที่มีคุณค่าอีกมากมายที่ยังไม่ถูกค้นพบและนำเอามาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างจริงจัง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา และ เชื้อแอคติโนมัยสีท ที่แยกได้จากดินในป่า มาใช้ในการทดลองยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอีกด้วย

3. การอุตสาหกรรม เทคโนโลยีกระบวนการหมัก (fermentation technology) ของจุลินทรีย์หลายชนิด ถูกนำมาใช้ทดแทนการสกัดสารจากพืชและสัตว์โดยตรง เช่น การผลิตเอนไซม์ วิตามิน กรดอินทรีย์ ยาปฏิชีวนะ สีผสมอาหาร เป็นต้น ทำให้สามารถผลิตสารต่างๆ ได้จำนวนมาก ในเวลารวดเร็ว และใช้เนื้อที่ในการผลิตลดลงอย่างมาก การใช้จุลินทรีย์ในการผลิตสารที่มีราคาแพงต่างๆ นี้เป็นผลมาจากการคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในธรรมชาติ ประกอบกับความรู้ความก้าวหน้าของเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ทำให้จุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิตสารที่มนุษย์ต้องการได้

การศึกษาจุลินทรีย์ในดิน

ชนิดความสำคัญของจุลินทรีย์ในดิน

ดินเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด ประกอบด้วย แบคทีเรีย, เชื้อรา, เชื้อแอคติโนมัยสีท, สาหร่าย, โปรโตซัว และไวรัส เรียงตามลำดับจำนวนที่พบในดิน ซึ่งนอกจากจุลินทรีย์แล้วยังมีสัตว์หน้าดิน และแมลงหน้าดินต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กันเป็นระบบนิเวศในดินซึ่งมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืช มนุษย์ และสัตว์ ซึ่งเมื่อพิจารณาส่วนประกอบของดินจะพบว่า ดินประกอบด้วย แร่ธาตุ (mineral) ประมาณ 45 % อินทรียวัตถุ (organic matter) ประมาณ 5 % อากาศ (air) 25 % น้ำ (water) 25 % และสิ่งมีชีวิตในดิน (soil organism) มีประมาณไม่เกิน 1 % ส่วนใหญ่ดินเกิดขึ้นจากการสลายตัวและผุพังของแร่หินต่างๆ โดยอิทธิพลจากธรรม

ชาติ เช่น ความร้อน ความเย็น กระแสน้ำ และการทับถมของซากสิ่งมีชีวิตที่เน่าเปื่อยผุพัง ซึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน

จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในดิน สามารถแบ่งออกตามแหล่งพลังงานที่ได้รับเป็นพวก heterotroph ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับพลังงานจากขบวนการ oxidation สารอินทรีย์ และพวก autotroph ที่เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับพลังงานจากขบวนการ photosynthesis

แบคทีเรีย เป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่เป็นทั้ง heterotroph (eubacteria) และ autotroph (cyanobacteria) พบจำนวนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แบคทีเรียที่พบในดินโดยทั่วไปมีขนาดตั้งแต่ 0.5-5 ไมครอน มีรูปร่าง 3 แบบคือ แบบกลม (coccus) แบบแท่ง (bacillus) และแบบเกลียว (spirillium) แบคทีเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในดินที่มีอินทรียวัตถุ มีความชื้นพอสมควร และค่า pH ของดินประมาณ 5.5-9 ในบริเวณใกล้รากพืชจะพบแบคทีเรียมากกว่าในบริเวณที่ไกลออกไป (ปทุมพร เมืองพระ และ อรุณี สมมณี, 2532) แบคทีเรียที่พบในดินส่วนใหญ่ได้แก่ *Pseudomonas sp., Rhizobium sp., Acromobacter sp., Bacillus sp., Clostridium sp.* และ *Mycobacterium sp.* กิจกรรมของแบคทีเรียในดินมีมากมายแต่ที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศคือ การเป็นผู้ย่อยสลายอินทรียวัตถุในดินทำให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ (nitrification) และทำให้เกิดกระบวนการตรึงไนโตรเจนในดิน (nitrogen fixation) เป็นต้น

เชื้อรา เป็นจุลินทรีย์ที่พบรองลงมาจากแบคทีเรีย ดำรงชีวิตเป็น heterotroph โดยการดูดซึมสารอินทรีย์จากการย่อยภายนอกเซลล์ มีรูปร่างเป็นเส้นใย (filamentous) หรือเป็นเซลล์เดียว (unicellular) มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 5-30 ไมครอน หรือมากกว่านั้นตามแต่ชนิด เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต (aerobic microorganism) เชื้อราแทบทุกชนิดเจริญเติบโตได้ดีในดินที่เป็นกรด เชื้อราที่พบในดินส่วนมากได้แก่ *Mucor sp., Chaetomium sp., Trichoderma sp., Aspergillus sp., Penicillium sp.* และ *Fusarium sp.* (Alexander, 1967)

เชื้อแอคติโนมัยสิท เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะสารพันธุกรรมคล้ายแบคทีเรียและมีลักษณะของผนังเซลล์เชื้อรา ในการจัดจำแนกยังคงจัดเป็นแบคทีเรียพวก heterotroph ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ มีขนาดเซลล์เล็กกว่า 1 ไมครอน แต่มักอยู่รวมกันเป็นเส้นสาย (filamentous) สามารถเจริญเติบโตได้ในดินที่เป็นกรดถึงเป็นด่าง pH ประมาณ 5.5-10 ย่อยสลายสารที่แบคทีเรียและเชื้อราย่อยสลายได้ยาก เช่น ไขมัน ไคติน (chitin) ได้ แอคติ

ในมัยสิทบางชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราได้ ที่พบในดินส่วนมากได้แก่ *Streptomyces sp.*

โปรโตซัว เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว (unicellular) ที่มีลักษณะคล้ายทั้งสัตว์และพืช เป็นพวก heterotroph ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต มีการเคลื่อนที่โดยการใช้เท้าเทียม (pseudopodium) หรือใช้ flagellum หรือ cilia โปรโตซัวเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่มีความสมบูรณ์แห่งการดำรงชีวิตอยู่ภายในเซลล์หนึ่งเซลล์ เซลล์ของโปรโตซัวจึงมีลักษณะโครงสร้างและลักษณะทางสรีระวิทยาที่พิเศษกว่าเซลล์โดยทั่วไป ขนาดของโปรโตซัวแตกต่างกันมาก โดยจะวัดขนาดเป็นไมโครมิเตอร์ ซึ่งเท่ากับ 1/1,000 มิลลิเมตร (บพิธ จารุพันธุ์ และ นันทพร จารุพันธุ์, 2539) โปรโตซัวมักอยู่ในแหล่งน้ำ ดังนั้นในดินที่ชื้นแฉะ โคลน ดินเหนียวที่มีน้ำท่วมขังจึงมีจำนวนโปรโตซัวมากกว่าในดินที่แห้งแข็ง ส่วนมากในดินจะพบโปรโตซัวพวก *Mayorella sp., Acanthamoeba sp., Oicomonas sp., Bodo sp., Crytolophosis sp., Colpoda sp., Phryganella sp., Trinema sp.* และ *Euglypha sp.* (Bamforth, 1980)

สาหร่าย เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ มีลักษณะคล้ายพืชคือเป็น autotroph มีรูปร่าง 3 แบบคือ sphere rod และ spirals มักอยู่ในแหล่งน้ำ ในดินที่ชื้นแฉะ โคลน หรือดินเหนียวที่มีน้ำท่วมขัง บางชนิดสามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยการใช้ flagellum บางชนิดไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เนื่องจากสามารถสังเคราะห์แสงได้จึงช่วยเพิ่มออกซิเจนให้แก่ดินได้ บางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศทำให้ดินมีธาตุไนโตรเจนเพิ่มมากขึ้น เช่น *Anabaena sp.* และ *Nostoc sp.*

ไวรัส เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ค่อยมีบทบาทหน้าที่ในดินมากนัก แต่มีความสำคัญในการควบคุมจำนวนแบคทีเรีย เช่น bacteriophage

การได้มาซึ่งอาหารของจุลินทรีย์ในดินมีบทบาทและความสำคัญเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในระบบนิเวศ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กรณีดังนี้

1 การเป็นผู้ย่อยสลาย (Saprophytic microorganism)

การเป็นผู้ย่อยสลายในธรรมชาติ (decomposer) จุลินทรีย์จะย่อยสลายโมเลกุลสารอินทรีย์ขนาดใหญ่ ให้กลายเป็นโมเลกุลขนาดเล็กและสารอนินทรีย์ที่พืชและสิ่งมีชีวิตอื่นสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารได้ โดยแบคทีเรียจะสามารถย่อยสลายอินทรียสารที่ได้จากการทับถมของซากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อย่างรวดเร็ว Christensen (1989) อธิบายว่าการย่อยสลายของเชื้อราในธรรม

ชาตินั้นจะทำให้แบ่งเชื้อราออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็น primary decomposer ซึ่งจะย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายยาก เช่น biopolymer (cellulose, hemi-cellulose, lignin) หรือ complex organic compound จากซากพืชที่ทับถมในดินคิดเป็น 80-90 % ของแหล่งอินทรียสารทั้งหมดในดิน และเมื่อผ่านขั้นตอนการย่อยสลายแล้วจะทำให้เกิดผลผลิตคิดเป็น 90-100 % ของปริมาณสารเริ่มต้นในห่วงโซ่อาหาร (food web) และกลุ่มที่สองเป็น secondary decomposer ซึ่งจะย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็น simple organic compound เช่น น้ำตาล, กรดอะมิโน, โปรตีน และไขมัน เป็นต้น ในระบบนิเวศที่เป็นทุ่งหญ้าพบว่าอินทรียสารในดิน 78-90 % มาจากการย่อยสลายของเชื้อรา (Kjoller และ Struwe, 1979 อ้างโดย Christensen, 1989)

2 การเป็นปรสิต (Parasitic microorganism)

จุลินทรีย์ในดินหลายชนิดสามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในพืช มนุษย์และสัตว์ โดยความรุนแรงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่เป็นปรสิต ในมนุษย์พบว่ามีกลุ่มอาการของโรคผิวหนังเป็นส่วนใหญ่ สำหรับในพืชมีโรคหลายชนิดที่เกิดจากแบคทีเรียและเชื้อรา ทำให้เกิดความเสียหายมากมาย

3 การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์กับสิ่งมีชีวิตอื่น (Symbiosis)

3.1 ไลเคนส์ (Lichens) เป็นการอยู่ร่วมกันของเชื้อรากับสาหร่าย โดยที่เชื้อราจะช่วยในการดูดซึมฟอสฟอรัสให้กับสาหร่าย และสาหร่ายจะทำหน้าที่สังเคราะห์แสงเพื่อสร้างอาหารให้กับตัวเองและเชื้อรา ในปัจจุบันการศึกษาและการจัดจำแนกไลเคนส์อาศัยการจัดจำแนกจากกลุ่มของเชื้อราที่มีความจำเพาะกับสาหร่ายที่จะ form รูปแบบเป็นไลเคนส์ชนิดต่างๆ

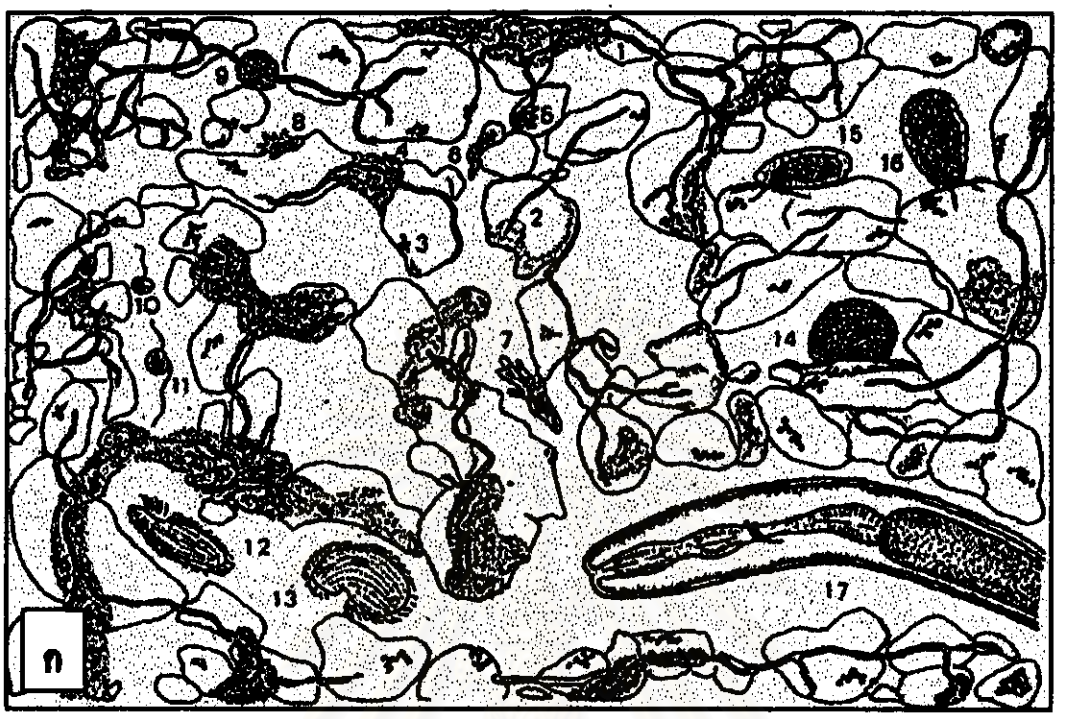
3.2 ไมคอไรซา (Mycorrhiza) เป็นกลุ่มเชื้อราที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืช โดยไมคอไรซาจะดูดซึมสารอาหารจากปลายรากของพืชแต่จะช่วยพืชในการดูดซึมธาตุอาหารที่อยู่ในดิน พบว่าเชื้อไมคอไรซามีความสำคัญต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ และพืชในกลุ่มสนบางชนิด

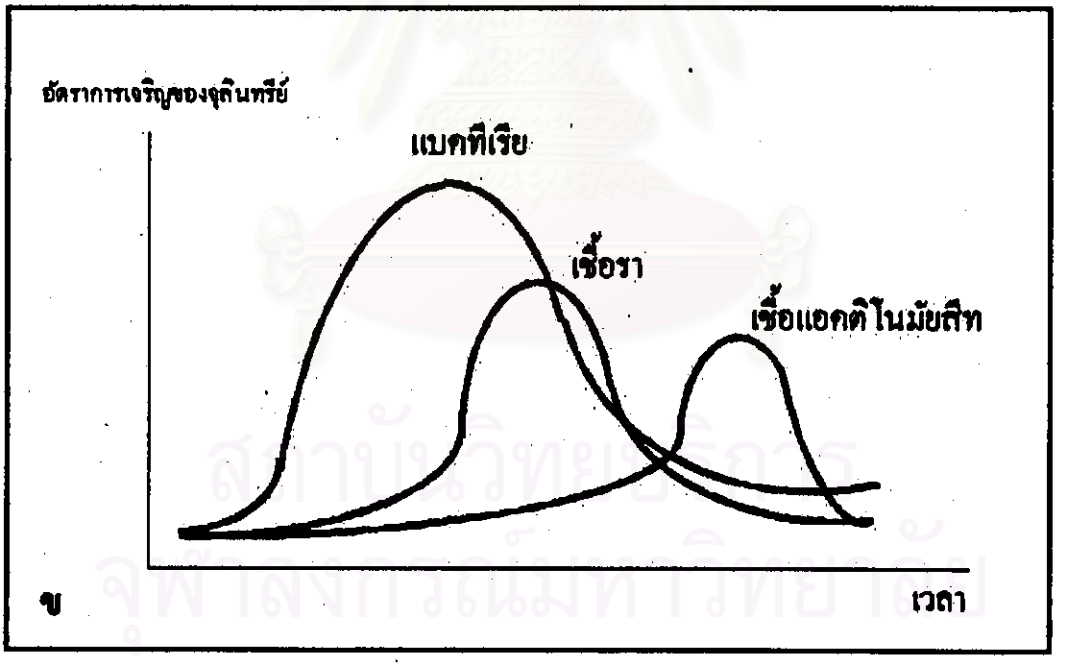
3.3 ไรโซเบียม (rhizobium) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชตระกูลถั่ว โดยแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมจะดูดซึมสารอาหารและทำให้เกิดปมขึ้นที่ปลายรากของพืช แต่จะช่วยให้พืชตระกูลถั่วสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้

ความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในดิน (ประกิตต์สิน สีหนนท์, 2540)

สาหร่ายเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอาหารเองได้ โดยส่วนใหญ่เมื่อตายลงก็จะทับถมเป็นแหล่งอินทรียวัตถุในดิน แบคทีเรียส่วนใหญ่และเชื้อราเป็นจุลินทรีย์พวก aerobic microorganism ดังนั้นจึงพบแบคทีเรียและเชื้อราในบริเวณผิวหน้าดินมากกว่าบริเวณอื่นๆ ที่ลึกลงไปในดิน เส้นใยของเชื้อราจะแทรกอยู่ตามอนุภาคของดินและเจริญเติบโตโดยการดูดซึมอาหารที่ย่อยสลายจากอินทรียวัตถุที่ทับถมอยู่ในดิน ในขณะที่แบคทีเรียจะเจริญเป็นกลุ่มก้อนรวมกันเรียกว่า colony แทรกอยู่บนผิวหน้าของชิ้นอินทรียวัตถุ ทั้งแบคทีเรียและเชื้อราจะได้มาซึ่งแหล่งอาหารจากการใช้เอนไซม์ที่ขับออกมาภายนอกเซลล์ย่อยสลายโมเลกุลขนาดใหญ่ของสารอินทรีย์เหล่านั้น และเมื่อได้เป็นสารอินทรีย์โมเลกุลขนาดเล็กแบคทีเรียและเชื้อราจะดูดซึมเข้าสู่เซลล์ โดยที่บางส่วนของสารที่เชื้อราย่อยสลายนั้นจะถูกกลุ่มจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น สาหร่าย โปรโตซัวที่กินซาก และแอคติโนมัยสีทบางชนิดนำไปใช้ได้ เมื่อมีแหล่งอินทรียวัตถุแบคทีเรียจะสามารถย่อยสลายสารประกอบที่ย่อยสลายได้ง่ายและเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว จนในที่สุดสารประกอบที่ย่อยสลายได้ง่ายจะหมดไป ทำให้เกิดการแข่งขันกับเชื้อราที่กำลังเพิ่มจำนวนขึ้นและมีความสามารถในการย่อยสลายอินทรียวัตถุมาก จะทำให้เกิดแหล่งอาหารให้กับแบคทีเรียขึ้นมาใหม่ แต่เมื่อแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ก็จะเกิดการแข่งขันในการแย่งชิงแหล่งอาหารกันอีก ทำให้จำนวนเชื้อราลดน้อยลง และเมื่อแหล่งอาหารนั้นถูกใช้หมดไปจำนวนแบคทีเรียก็จะลดลง โดยที่เชื้อราจะเริ่มการย่อยสลายอินทรียวัตถุและทำให้เกิดแหล่งอาหารใหม่เป็นเช่นนี้สลับกันไป นอกจากในดินจะมีกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทอย่างมากเช่นเชื้อราและแบคทีเรียแล้ว ยังมีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารที่เชื้อราและแบคทีเรียย่อยสลายได้ยาก ทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ยังหลงเหลืออยู่ โดยที่โปรโตซัวและไวรัสจะทำหน้าที่ในการควบคุมจำนวนของแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อแอคติโนมัยสีทในดิน ความสัมพันธ์ในระบบนิเวศของจุลินทรีย์ในดินแสดงไว้ดังภาพที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาพที่ 1 (ก) การดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ในดินที่มีความสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (1) เชื้อราบริเวณผิวดิน, (2) เชื้อแอคติโนมัยสีท, (3) สารอินทรีย์ที่แทรกอยู่ระหว่างอนุภาคดิน, (4) เส้นใยของเชื้อราที่ย่อยสลายสารอินทรีย์, (5) Amoeba, (6-16) โปรโตซัวชนิดต่างๆ , (17) Nematodes (ที่มา; ดัดแปลงจาก Bamforth, 1980) (ข) อัตราการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดในดิน (ประกิตต์สิน สีหนนท์, 2540)

ปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนจุลินทรีย์

ปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนจุลินทรีย์ ได้แก่ ปริมาณอินทรียวัตถุ ความเป็นกรด-ด่างของดิน ความชื้นทั้งในดินและอากาศ อุณหภูมิในดิน ปริมาณก๊าซออกซิเจนในดิน และฤดูกาล ทำให้จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ และในแต่ละฤดูกาลที่หมุนเวียนไปตลอดปี (ประกิตต์สิน สีหนนท์, 2540., Kjoller และ Struwe, 1979., Vardavakis, 1990., Carreio และ Koske, 1992., และ Jha, Shama และ Mishara, 1992.)

1. ปริมาณอินทรียวัตถุภายในดิน การที่จุลินทรีย์ย่อยสลายอินทรียวัตถุก็เนื่องจากต้องการพลังงานและสารตั้งต้นในการสร้างเซลล์ใหม่ ซึ่งอาจรวมเป็นสารประกอบภายในเซลล์หรืออาจต้องการเพียงช่วยกระตุ้นหรือเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบในเซลล์เท่านั้น ดังนั้นการที่จุลินทรีย์จะสร้างเซลล์หรือมีกิจกรรมมากน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับปริมาณอินทรียวัตถุภายในดินด้วย

2. ความเป็นกรด-ด่างของดิน (pH) เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อกระบวนการย่อยสลายอินทรียวัตถุเป็นอย่างมาก เนื่องจากระดับ pH ของดินมีความสัมพันธ์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลางคือประมาณ 6.8-7 เชื้อราสามารถเจริญได้ดีในดินที่มี pH เป็นกรดตั้งแต่ 2 จนถึงดินที่มี pH เป็นด่างอ่อนๆ ส่วนเชื้อแอคติโนมัยสิทมักเจริญได้ดีในดินที่เป็นด่าง

3. ความชื้นภายในดิน เนื่องจากน้ำเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ protoplasm ดังนั้นการมีปริมาณน้ำที่เพียงพอจึงจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะชอบความชื้นที่ระดับ 60-80 % ของความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน

4. อุณหภูมิของดิน เป็นปัจจัยที่ควบคุมกระบวนการทางชีววิทยา ดังนั้นอุณหภูมิจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อจุลินทรีย์ดิน แบคทีเรียและเชื้อราชนิดต่างๆ จะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่ต่างกันแต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียและเชื้อราส่วนใหญ่คือ 25-30 องศาเซลเซียส

5. ปริมาณออกซิเจนภายในดิน ออกซิเจนเป็นสิ่งจำเป็นต่อจุลินทรีย์กลุ่ม Aerobic microorganism ที่เป็นประชากรกลุ่มใหญ่ที่สุดของจุลินทรีย์ในดิน โดยออกซิเจนเป็นตัวส่งถ่าย

อิเลคตรอนในระบบหายใจในเซลล์ ดังนั้นในสภาพที่ปริมาณออกซิเจนเพียงพอ กระบวนการย่อยสลายอินทรียวัตถุจะมีประสิทธิภาพดีและเกิดขึ้นได้โดยสมบูรณ์ (ในที่นี้หมายถึงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ) แต่หากปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอ จุลินทรีย์ที่สามารถดำรงชีพอยู่ได้จะเป็นพวก Anaerobic microorganism หรือ Facultative anaerobic microorganism สำหรับแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดจะคงอยู่ได้ด้วยการสร้างสปอร์ที่มีความต้านต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้

6. C/N ratio จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายอินทรียวัตถุในดินได้รวดเร็วและสมบูรณ์เมื่อมีระดับ C/N ratio ที่10:1 ในการย่อยสลายอินทรียวัตถุจุลินทรีย์จะดึงเอาคาร์บอนไปใช้อย่างรวดเร็ว หากปริมาณไนโตรเจนมีจำกัดจุลินทรีย์จะเจริญได้ถึงระดับหนึ่ง เมื่อไนโตรเจนหมดก็จะหยุดเจริญและมีการตาย จากการเปรียบเทียบการสลายตัวโดยใช้ C/N ratio เป็นเกณฑ์ พบว่าอินทรียวัตถุ มีอัตราการสลายตัวสูงขึ้นเมื่อ C/N ratio แคบ และมีอัตราการสลายตัวต่ำเมื่อ C/N ratio กว้าง

7. ความลึก เป็นปัจจัยที่มีผลต่อปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับจำนวนของจุลินทรีย์ในดิน เช่น ปริมาณออกซิเจนซึ่งหากความลึกมากก็จะทำให้พบจำนวนจุลินทรีย์น้อยลงเรื่อยๆ บริเวณที่พบจุลินทรีย์มากที่สุดคือที่ระดับความลึกประมาณ 3-25 เซนติเมตร

8. ค่า cation exchange capacity (CEC) คือค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างธาตุอาหารที่เป็นประจุบวกกับอนุภาคและองค์ประกอบอื่นๆ ของดินที่มีประจุลบ และเมื่อดินมีปริมาณอินทรียวัตถุมาก จะทำให้สามารถเก็บไอออนของธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ให้กับจุลินทรีย์ในดิน เนื่องจากอนุภาคของอินทรียวัตถุมีประจุเป็นลบ ทำให้มีการยึดเหนี่ยวกับไอออนที่เป็นประจุบวกได้ดี ซึ่งธาตุอาหารที่มีประจุเป็นบวกนั้นมีสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดินที่มีปริมาณอินทรียวัตถุอยู่มากมักมีค่า CEC สูง ส่วนดินที่มีปริมาณอินทรียวัตถุน้อย เช่น ดินทรายจะมีค่า CEC ต่ำ

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อจำนวนจุลินทรีย์อีกเช่น อนุภาคของดิน ความเค็มของดิน ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชและมลภาวะในดิน จำนวนโปรโตซัว และ Nematode ในดินที่เป็นผู้ล่าแบคทีเรียและเชื้อราในดินเป็นอาหาร เป็นต้น

การใช้จุลินทรีย์ในดินเป็นดัชนีบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของดิน

การฟื้นฟูสภาพสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสร้างป่านั้น เป็นการยากที่จะตัดสินว่าป่าจะมีความอุดมสมบูรณ์หรือไม่ เพราะป่าส่วนใหญ่ในประเทศไทยไม่ว่าจะเป็นป่าสมบูรณ์หรือป่าเสื่อมโทรมยังขาดการสำรวจและศึกษาวิจัยอย่างละเอียด ดังนั้นในการฟื้นฟูสภาพป่า อาจเป็นเพียงการคาดคะเนว่าป่าที่ฟื้นฟูให้เกิดความสมบูรณ์นั้นควรเป็นอย่างไร การศึกษาชนิดพันธุ์ของพืชที่ขึ้นในป่าเป็นสิ่งที่ทำได้ง่ายที่สุด แต่จะเป็นการยืนยันถึงสภาพที่แท้จริงของป่าได้หรือไม่นั้น คงยังไม่เพียงพอที่จะสรุปได้ว่าป่ามีความสมบูรณ์อย่างแท้จริง จึงต้องมีการศึกษากลุ่มสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน จึงจะเพียงพอที่จะประเมินได้ว่าสภาพป่านั้นเป็นอย่างไร จุลินทรีย์ในดินเป็นสิ่งมีชีวิตที่สำคัญต่อระบบนิเวศอย่างยิ่ง และมีความสัมพันธ์กับพืชโดยตรง ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ในดิน จึงน่าจะเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงคุณสมบัติของดินได้เป็นอย่างดี ร่วมกับการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินแล้ว น่าจะเพียงพอที่จะพิสูจน์ได้ถึงความอุดมสมบูรณ์ของดินในป่าที่กำลังได้รับการฟื้นฟูว่าน่าจะมีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปในทางที่ดียิ่งขึ้นได้หรือไม่ แนวความคิดที่จะใช้จุลินทรีย์เป็นตัวบ่งชี้ถึงสภาพของสิ่งแวดล้อมนั้นๆ มีการศึกษากันมานานแล้ว เช่น การใช้จุลินทรีย์เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงคุณภาพน้ำ (Foissner และ Berger, 1996) ทำให้เกิดแนวความคิดว่าการศึกษาคุณภาพของดินโดยดูจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินนั้นมีความเป็นไปได้เป็นอย่างยิ่ง

การศึกษาเชื้อรา

การจัดจำแนกเชื้อราในระบบนิเวศ

การจัดจำแนกเชื้อราในปัจจุบันนั้นยังคงเป็นงานที่ศึกษาการทำต่อเนื่องกันไป โดย Alexopoulos, Mims, and Blackwell (1996) ได้ทำการจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อราไว้ดังนี้

Kingdom Fungi

Division Gymnomycota (ราเมือก หรือ slime mold) โดยองค์ประกอบในเซลล์ทั่วไปมีลักษณะคล้ายเซลล์สัตว์มากกว่าใน fungi กลุ่มอื่นๆ คือมี centriole ช่วงหนึ่งของวงชีวิตมีการเคลื่อนที่แบบ amoeba หรือมีการสร้าง flagella สำหรับการเคลื่อนที่ แต่มีการสร้าง fruiting body คล้ายเชื้อรา ส่วนใหญ่จะพบในบริเวณที่เย็นมีร่มเงาทั่วไปในป่า บนอินทรียสารที่มีความชื้น ดำรง

ชีวิตโดยการกินแบคทีเรีย และโปรโตซัวที่มีขนาดเล็กเป็นอาหาร มักไม่ค่อยมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเท่ากับ fungi ในกลุ่มอื่น

Division Mastigomycota แบ่งออกเป็น 2 subdivission ดังนี้

1. Subdivision Haplomastigomycotina เป็น fungi ที่มีวงชีวิตเป็นแบบ haplontic ชนิด hapliod (n) มีการสร้าง flagella สำหรับใช้ในการเคลื่อนที่ ดำรงชีวิตโดยการดูดซึมอาหารที่ผ่านการย่อยจากภายนอกเซลล์ บางชนิดมีการสร้างเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้น (coelocytic) คล้ายเชื้อรา เป็นราชั้นต่ำที่มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ที่สำคัญได้แก่ Class Crytridiomycetes ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษา Morphogenesis ส่วนใหญ่พบในดิน มักไม่ค่อยมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากส่วนใหญ่เป็นเชื้อโรคพืช

2. Subdivision Diplomastigomycotina (Phycomycetes) เป็น fungi ที่มีวงชีวิตเป็นแบบ haplontic ชนิด dipliod (2n) จึงมีการแบ่งนิวเคลียสแบบ meiosis สามารถสร้างได้ทั้งเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยวิธี oogamous ซึ่งมีการผสมกันระหว่าง heterogametangial สร้าง zooospore ที่มีการสร้าง flagella สำหรับใช้ในการเคลื่อนที่ มีเพียง class เดียวคือ Class Oomycetes (water mould) ส่วนใหญ่เป็นเชื้อโรคพืช genera ที่สำคัญได้แก่ Phythophthora และ Pythium

Division Mastigomycota ไม่มีการสร้างเซลล์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ แบ่งออกเป็น 2 subdivission ดังนี้

1. Subdivision Zygomycotina มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศภายในถุง sporangium เรียกว่า sporangiospore บางชนิดสามารถสร้าง chlamydospore หรือเกิด budding ได้ในบางสภาวะ สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเรียกว่า zygospore ดำรงชีวิตโดยการเป็น saprophyte บางชนิดอาจเป็นปรสิตในพืชและสัตว์ มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารหมักบางชนิด ในการผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์ต่างๆ กลุ่มที่สำคัญคือ Family Mucorales สำหรับ genus ที่พบมากได้แก่ *Absidia, Cunninghameella, Mortierella, Zygorhynchus, Mucur* และ *Rhizopus*

2. Subdivision Ascomycotina เป็น fungi ที่พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ หรือในน้ำทะเล มีทั้งอยู่ในรูปของเชื้อรา และยีสต์ เส้นใยมีผนังกั้น (septate) มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศภายในถุง ascus เรียกว่า ascospore สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า conidiospore ดำรง

ชีวิตโดยการเป็น saprophyte บางชนิดอาจเป็นปรสิตในพืชและสัตว์ บางชนิดมีการสร้าง fruiting body ขนาดใหญ่ เรียกว่า เห็ด เช่น เห็ดถ้วย มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร หมักบางชนิด การผลิตแอลกอฮอล์ การผลิตเอนไซม์ กรดอินทรีย์ต่างๆ และยาปฏิชีวนะ เชื้อรา genus ที่พบมากได้แก่ *Chaetomium, Sordaria* และ *Neurospora* สำหรับยีสต์ species ที่สำคัญ ได้แก่ *Saccharomyces cereviceae*

3. Subdivision Basidiomycotina เป็น fungi ที่มีการสร้าง fruiting body ขนาดใหญ่ สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เรียกว่า เห็ด (mushroom) เส้นใยมีผนังกั้น (septate) มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศบน basidium เรียกว่า basidiospore ไม่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดำรงชีวิตโดยการเป็น saprophyte บางชนิดอาจเป็นปรสิตในพืชและสัตว์ มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยส่วนใหญ่เป็นอาหาร บางชนิดสร้างสารพิษที่เป็นอันตราย

4. Subdivision Deuteromycotina เป็น fungi ที่ไม่พบลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ มีเพียง 1 class คือ form-class Deuteromycetes โดยทั่วไปจะเรียก fungi imperfecti สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า conidia เส้นใยมีผนังกั้น ส่วนใหญ่เป็น terestrail fungi มีเพียงส่วนน้อยที่พบในน้ำหรือในน้ำทะเล ดำรงชีวิตโดยกการเป็น saprophyte หรือเป็นปรสิต มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร อุตสาหกรรมการหมัก การผลิตเอนไซม์ กรดอินทรีย์ และสารปฏิชีวนะ เป็นต้น กลุ่มที่มีสำคัญคือ

Family Moniliaceae genus ที่พบมากได้แก่ *Acrostalagmus, Aspergillus, Botrytis, Cephalosporium, Monilia, Penicillium, Scopulariopsis, Spicaria, Trichothecium, Verticillium*

Family Dematiaceae genus ที่พบมากได้แก่ *Alternaria* และ *Cladosporium*

Family Tuperculariaceae genus ที่พบมากได้แก่ *Cylindrocarpon* และ *Fusarium*

บทบาทและหน้าที่ของเชื้อราในระบบนิเวศ (Christensen, 1989)

1. ทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรียวัตถุ มีผลต่อการเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน และออกซิเจน ทำให้เกิดการแตกหักของชิ้นส่วนอินทรียวัตถุและมีขนาดเล็กลง เพิ่มความเป็นเนื้อเดียวกันของดิน รวมทั้งเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปที่จุลินทรีย์นำไปใช้ได้

2. ปลดปล่อยธาตุอาหารที่มีปริมาณน้อยในดินจากแหล่งอินทรียวัตถุและอนินทรียวัตถุ โดยทั่วไปเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลาย เช่น ไนโตรเจน,ฟอสฟอรัส,โปตัสเซียม, ซัลเฟอร์ และไอออนของธาตุอื่นๆ

3. เก็บกักธาตุอาหารลดการถูกชะล้างไป เนื่องจากการเก็บธาตุอาหารใน cytoplasm ของเซลล์จุลินทรีย์ ช่วยลดปัญหาการถูกชะล้าง แต่จากการเก็บกักธาตุอาหารทำให้เกิดการขาดแคลนธาตุอาหารในดิน

4. สนับสนุนให้มีการลำเลียงธาตุอาหารและน้ำในดินเข้าสู่ปลายรากพืช (ข้อที่4-6 เป็นบทบาทที่พบเฉพาะใน mycorrhiza)

5. มีความเป็นไปได้ในการสนับสนุนให้มีการส่งผ่านธาตุอาหารและคาร์โบไฮเดรทระหว่างพืชกับพืช

6. เร่งอัตราการเคลื่อนย้ายไอออนไปยังส่วนที่อยู่สูงขึ้นไปในต้นพืช

7. ลดการสะสมความเป็นพิษของแหล่งวัตถุดิบต่างๆ ในดิน

8. เพิ่มการดูดซับน้ำให้กับดินและส่งเสริมให้เนื้อดินจับตัวเป็นก้อน

9. เพิ่มอัตราการแลกเปลี่ยนของประจุไอออนและการยึดเหนี่ยวของโมเลกุลของน้ำในดิน

10. กำจัดความเป็นพิษของดิน โดยทำให้เกิดการสลายตัว การกลายเป็นไอ หรือแยกออก ซึ่งความเป็นพิษที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากสารเคมีหรือการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

11. สังเคราะห์องค์ประกอบของฮิวมิค (humic)

12. มีส่วนร่วมในขบวนการย่อยสลายในธรรมชาติ (saprophyte)

13. กระตุ้นการเกิด parasitic symbiosis

14. การตุ้นการเกิด mutualistic symbiosis การอยู่ร่วมกันเช่นนี้ได้แก่ mycorrhiza lichen และความสัมพันธ์เช่นนี้ของเชื้อรากับใบของพืชหรือต้นพืช และสัตว์

15. การเป็นผู้ล่า เช่น พวก rotifer และ nematode บางชนิดที่เป็นเหยื่อของเชื้อราบางสายพันธุ์

16. สามารถผลิตสารเคมีบางชนิดในสิ่งแวดล้อม เช่น antibiotic และ immunosuppresants เป็นตัวอย่างของผลผลิตที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง metabolism ของเชื้อรา

17. ช่วยกระตุ้นให้เกิดการงอกของเมล็ดโดยการกัดกร่อนเปลือกหุ้มเมล็ด

18. มีการเลี้ยงเชื้อราบางชนิดในธรรมชาติเพื่อให้ผลิตเอนไซม์หรือเป็นอาหาร เช่น มดและแมลงบางชนิด สามารถเลี้ยงเชื้อรา เพื่อให้ผลิตอาหารหรือสารที่มีความจำเพาะกับพวกมัน

19. สนับสุนนและเปลี่ยนแปลงบทบาทของสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมหนึ่งให้มีการเปลี่ยนแปลงไป ตัวอย่างเช่น pathogenic fungi สามารถลดจำนวนหรือกำจัดสิ่งมีชีวิต species หนึ่งในบริเวณใดบริเวณหนึ่ง หรือในช่วงระยะเวลาหนึ่ง

20. เป็นตัวเริ่มต้นการเปลี่ยนแปลง โดยเชื้อรามีความเกี่ยวเนื่องกับการเกิดอนุภาคของดิน ซึ่งสามารถส่งเสริมการรับไอออนเข้าสู่ระบบสิ่งมีชีวิต

วิธีการที่ใช้ในการศึกษาเชื้อราในดิน

วิธีการแยกเชื้อรามีหลายวิธี แต่ละวิธีจะมีความเหมาะสมต่อชนิดของราแตกต่างกัน ราแต่ละชนิดรวมทั้งอาหารที่ใช้ก็จะมีความเฉพาะสำหรับราแต่ละชนิด วิธีการแยกเชื้อราจากดิน น้ำ มูลสัตว์ และเศษซากพืช ได้แก่ วิธีต่างๆดังต่อไปนี้

1. Soil dilution plate method (เถขา มาโนช และคณะ, 2535)

ชั่งดิน 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 ml. (หรือใช้ 0.15% water agar) เขย่าให้เข้ากัน ใช้ pipette ดูดสารละลายดินเข้มข้น 10^{-1} ปริมาตร 10 ml ใส่ขวดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 ml. ดูดสารละลายความเข้มข้น 10^{-2} มา 10 ml. ใส่ในขวดน้ำกลั่นปริมาตร 90 ml. ทำเป็น series ไปจนได้สารละลายปริมาตร 10^{-4} และ 10^{-5}

ใช้ pipette ดูดสารละลายแต่ละความเข้มข้นของอนุภาคดินใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อจานละ 1 ml. ทำ 5 ซ้ำ (10^{-4}, 10^{-5})1 เทอาหาร glucose ammonium nitrate agar GAN แล้วนำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อลง slant PAD เพื่อเก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์ไว้ใช้ศึกษาต่อไป เหมาะสมกับการใช้แยกและนับจำนวนเชื้อราหรือแบคทีเรียหลายประเภทโดยไม่จำเพาะเจาะจง

2 . Soil plate method (เลขา มาโนช และคณะ, 2535)

ใช้ microspatula ตักดินประมาณ 0.0005-0.015 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อแล้วเทอาหาร GAN ลงในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน โคโลนีของราเจริญใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยเชื้อราทุกโคโลนีใส่ลงบน slant PDA เพื่อเก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์ เช่น เดียวกันในข้อ 1 เหมาะกับการแยกเชื้อที่พบเป็นจำนวนน้อยๆ

3. Alcohol treatment method (เลขา มาโนช และคณะ, 2535)

ชั่งดิน 0.3 กรัม ใส่ในหลอดทดสอบที่อบฆ่าเชื้อแล้วเติม ethyl alcohol 65% ลงไปประมาณ 2 ใน 3 ของหลอดทดสอบ เขย่าให้เม็ดดินกระจาย ตั้งทิ้งไว้ 10-15 นาที ริน alcohol ทิ้งใช้ microspatula ตักดินใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ 15 จาน เทวุ้นอาหาร GAN แล้วนำไปบ่มในที่มืดเมื่อโคโลนีของราเจริญทำการย้ายเชื้อใส่ slant PDA เช่นเดียวกับในข้อ 1 เหมาะกับการแยกเชื้อราที่เกิดจาก spore เนื่องจากส่วนของเส้นใยจะตายเนื่องจากการใช้แอลกอฮอล์

4. Heat treatment method (เลขา มาโนช และคณะ, 2535)

ชั่งดิน 0.3 กรัม ใส่ในหลอดทดสอบที่อบฆ่าเชื้อแล้วใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วนำไปใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที รินน้ำทิ้ง แล้วดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3 เหมาะกับการแยกเชื้อราที่ spore มีผนังหนา ต้องอาศัยความร้อนช่วยกระตุ้นให้เกิดการงอก

5. วิธีการแยกราจากมูลสัตว์ (coprophilous or dung fungi) (เถขา มาไนช และคณะ, 2535)

เก็บมูลสัตว์ป่ามาผึ่งให้แห้ง แล้ววางในโหลแก้วหรือจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองใส่น้ำให้ความชื้น (moist chamber) วางไว้ใกล้หน้าต่าง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จะพบรา Mucorales เจริญบนมูลสัตว์เก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA อีก 5-7 วัน ต่อมาจะพบรา Hypomycetes และ Ascomycetes ใช้เข็มเขี่ยย้าย fruiting body ของราใส่บนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อหรือ mount บนแผ่นสไลด์ ตรวจดูได้กล้องจุลทรรศน์ stereomicroscope ในระยะสุดท้ายประมาณ 2-3 สัปดาห์ จะพบเห็ดพวก Coprinus (inky mushroom) และเห็ดอื่นๆเจริญอยู่บนมูลสัตว์

6. วิธีการร่อนดินแบบเปียก (wet sieving and decanting) (สุมาลี เหลืองสกุล และ น้ำผึ้ง ดุงโคกกรวด, 2539)

นำดินตัวอย่างที่เก็บมาประมาณ 100 กรัมใส่ลงในน้ำ 500 มิลลิลิตร กวนให้เม็ดดินแตกกระจาย ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที เพื่อให้เศษดินตกตะกอน ส่วนที่เป็นของเหลวนำไปร่อนบนตะแกรงขนาด 500ไมครอน เทเศษซากพืชและตะกอนดินที่ติดบนตะแกรงชั้นนี้ออกไป เก็บสารละลายดินที่ผ่านตะแกรงชั้นนี้ไว้ แล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 63 ไมครอน นำตะกอนที่ค้างอยู่บนตะแกรงแยกใส่กระจกนาฬิกา นำตะกอนดินที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 500 ไมครอน มาทำซ้ำใหม่อีก 2 ครั้ง นำตะกอนที่อยู่ในกระจกนาฬิกามารวมกันแล้วตรวจหาชิ้นส่วนของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นวิธีที่ใช้ได้ดีกับการศึกษาไมคอไรซา

7. การใช้เหยื่อล่อ (Baiting technique) (นิยม สุดเพราะ และคณะ, 2542)

ชั่งดินตัวอย่าง 1-5 กรัม ผสมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วใส่เหยื่อล่อ เช่น ใบพืช เมล็ดพืช กระดาษกรอง (ขึ้นกับชนิดของเชื้อรา) ลงไปลอยบนผิวหน้า บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน นำออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที ซับให้แห้งแล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อมีเส้นใยของเชื้อราเจริญขึ้น ใช้เข็มเขี่ยปลายเส้นใยบริเวณขอบโคโลนี นำไปเลี้ยงบนอาหารจำเพาะ (selective medium) อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสำรวจและเก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อราในประเทศไทย

Groombridge (1992) (อ้างถึงใน Porter และ Fox, 1993) ซึ่งกล่าวว่ามีเชื้อราและยีสต์เป็นจำนวนมากที่ยังไม่ถูกค้นพบและตรวจสอบ ดังนั้นการอนุรักษ์ป่าซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรทางชีวภาพจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างมาก ในการรักษาความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตเอาไว้ด้วย

จากรายงานภายในประเทศไทยได้มีการศึกษา terestrial fungi ซึ่งมีการแพร่กระจายอยู่ในดินและมีการแพร่กระจายอยู่ในน้ำ หรืออาจมีสปอร์ฟุ้งในอากาศ Poonpilai Wongseenin และ Malee Sudhagul (1973) ได้ทำการศึกษาเชื้อราในดินในป่าดิบแล้งสะแกราช โดยการเปรียบเทียบกลุ่มประชากรในดินบริเวณ rhizosphere และ non-rhizosphere โดยสรุปว่ากลุ่มประชากรเชื้อราทั้ง 2 บริเวณนั้นมีองค์ประกอบไม่แตกต่างกัน แต่จำนวนประชากรนั้นจะขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารที่มีอยู่ในดิน ซึ่งกลุ่มประชากรที่พบมากได้แก่ *Penicillium, Aspergillus, Trichoderma, Gliocladium, Gongronella* และ *Scoppulariopsis*

จินดนา ชะนะ (2517) ได้ทำการสำรวจชนิดของเชื้อราในดินที่ทำการปลูกข้าว และในดินปลูกพืชพวกไม้ผลต่างๆ จากดินในภาคกลาง 10 จังหวัด พบว่าเชื้อราที่แยกได้มีเชื้อราใหม่ๆ ถึง 21 genera ที่ไม่มีรายงานว่าพบในประเทศไทยมาก่อน และพบว่ามีเชื้อรา 8 species ที่มีรายงานจากต่างประเทศว่าเป็น species ใหม่

สมศิริ จิ๋วสกุล (2517) ทำการแยกราจากดินในพื้นที่จังหวัดลำปาง พบเชื้อราใน genus *Talaromyces, Sartorya, Aspergillus, Penicillium, Nigrospora, Paecilomyces, Chrysosporium, Curvularia* และ Mycelia Sterilie

ประสิทธิ์ ประคองศรี (2518) ได้ทำการศึกษาเชื้อราในดินป่าเชียงใหม่ เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณลุ่มแม่น้ำสาละวิน แล้วใช้วิธี alcohol treatment technique ในการแยกเชื้อราจากดินนั้น ซึ่งเชื้อราที่พบได้แก่ *Talaromyces, Sartorya, Penicillium, Nigrospora, Paecilomyces, Chrysosporium, Curvularia* และ Mycelia Sterilie

ศุภลักษณ์ เจนถนอมม้า (2524) ทำการศึกษาเชื้อราในดินบริเวณป่าดิบแล้งและป่าเต็งรังในจังหวัดกาญจนบุรี พบว่าเชื้อราในดินจากป่าทั้งสองมีชนิดใกล้เคียงกันมาก และส่วนมากเป็น

เชื้อราที่พบอยู่ทั่วไปในดิน เช่น *Aspergillus Penicillium* และ *Sartorya* ส่วนเชื้อราที่พบเฉพาะในป่าเต็งรังได้แก่ *Spegazzinia tessarthra* และ *Dictyoarthrinium sacchari*

สุภาพร ธรรมสุระกุล (2528) ได้ศึกษาเชื้อราในดินไร่ ดินสวน และดินป่าในภาคตะวันออกของประเทศไทยพบว่า เชื้อราที่พบเฉพาะในดินป่ามี 4 genera ได้แก่ *Chrysosporium pruinosum*, *Cervularia eragrostidis*, *Geotricum spp.* และ *Scoppulariosis carbonaria* เชื้อราที่พบในดินไร่และดินป่ามีเพียง 2 genera คือ *Aspergillus spp.* และ *Cladosporium cladosporriodes* เชื้อราที่พบทั้งในดินไร่และดินสวนมีเพียง 1 genus คือ *Sartorya fumigata* และเชื้อราที่พบทั้งในดินไร่ ดินสวน และดินป่ามี 5 genera ได้แก่ *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Gongronella vutleri*, *Penicillium verruculosum*, *Pennicillium spp.*, *Talaromyces vermiculatus*, *Tricoderma hamatum*, *T. hazianum* และ *T. koningii*

วิมล พานิชยการ วิชัย เชิดชีวศาสตร์ และสุมาลี พิชญางกูร (2523) ได้ทำการสำรวจเชื้อราที่แพร่กระจายในอากาศจากบริเวณชุมชนเขาวราช โดยการดักสปอร์ของเชื้อราในอากาศด้วยอาหาร potato dextrose agar และ sabouraud dextrose agar พบว่ามี terestrial fungi ที่เป็น dominant genus คือ *Penicillium* และ *Aspergillus*

สุมาลี พิชญางกูร (2526) ทำการศึกษาเชื้อราในน้ำทิ้งคลอง โดยใช้วิธี baiting technique สามารถแยกเชื้อราที่เป็น terestrial fungi ได้ 18 genera โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อราในกลุ่ม fungi imperfecti

เกษม สร้อยทอง (2534) ได้ทดลองแยกเชื้อราในดินบริเวณรอบรากพืชเพื่อทดสอบคุณสมบัติในการย่อยสลายเซลลูโลส สามารถจัดจำแนกได้ 23 species และพบว่าเชื้อรา *Chaetomium spp.* มีแนวโน้มว่าจะสามารถนำเชื้อราชนิดนี้มาใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการทำปุ๋ยหมักได้

เลขา มาโนช (2535) ทำการศึกษาเชื้อราในกลุ่ม Phytiaceae, Zygomycetes, Ascomycetes และ Hyphomycetes บางชนิดจากดินในประเทศไทยสามารถจัดจำแนกได้ 38 genera ซึ่งประกอบด้วย Phytiaceae 3 species, Zygomycetes 5 genera, Ascomycetes 15 genera และ

Hyphomycetes 15 genera และแนะนำว่าเชื้อราที่แยกได้จากดินนั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร การแพทย์ และอุตสาหกรรมได้

กรรณิการ์ ว่องวุฒิญาณ (2536) ได้ศึกษาผลกระทบทางจุลชีววิทยาของดินในป่าเบญจพรรณที่ผ่านการทำไม้ บริเวณห้วยถิ่นถิ่น จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าการทำไม้ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณของเชื้อราในดินแต่จะส่งผลในระยะยาวต่อความอุดมสมบูรณ์ในดินและทำให้ดินมีค่า pH สูงขึ้นโดยพบเชื้อราในพื้นที่ศึกษา 11 genera และพบว่า *Aspergillus* เป็นเชื้อราที่พบมากในแต่ละพื้นที่ที่ศึกษา

เสขา มาโนช และคณะ (2540ก) ได้รวบรวมสายพันธุ์เชื้อรา Ascomycetes และ Deuteromycetes จากดิน และพืช พบว่า genus *Aspergillus* เป็น genus ที่พบจำนวน species มากที่สุด ได้แก่ *Aspergillus candidus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus giganteus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sclerotiorum*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, และ *Aspergillus spp*

เสขา มาโนช และคณะ (2540ข) ได้รวบรวมเชื้อรา Hyphomycetes ราเมือก และรามูลสัตว์จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ซึ่งสามารถแยกเชื้อราที่พบในดินได้ 28 species โดย genus ที่พบได้แก่ *Absidia*, *Aspergillus*, *Eupenicillium*, *Gliomatrix*, *Humigera*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Thielavia*, และ *Trichoderma*

นิยม สุดเพราะ และคณะ (2542) ได้ทำการแยกราในดินปลูกข้าวโพด งา ถั่วพุ่ม ปอแก้ว มันสำปะหลัง และอ้อย ที่สถานีทดลองพืชไร่ จังหวัดสกลนคร พบเชื้อราทั้งหมด 44 genera 102 species และราที่จำแนกชนิดไม่ได้จำนวน 1 isolate ได้แก่ *Acremonium*, *Acrophialophora*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Conidiocarpus*, *Cuninghamella*, *Curvularia*, *Emericella*, *Eupenicillium*, *Eurotium*, *Exserohilum*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Gongronella*, *Gonytrichum*, *Humicola*, *Metarhizium*, *Monodictys*, *Myrothecium*, *Nectria*, *Neocosmospora*, *Nigeospora*, *Paecilomyces*, *Papulaspora*, *Penicillium*, *Periconia*, *Pestalotiopsis*, *Phialophora*, *Phoma*, *Pyrenochaeta*, *Pythium*, *Rhinocladiella*, *Rhizopus*, *Sclerotium*, *Scolecobasidium*, *Stachybotrys*, *Syncephalastrum*, *Talaromyces*, *Thielavia*, *Torula*, *Trichoderma* และ *Westerdykella*

สุจิตรา โกศล และคณะ (2542) ได้ศึกษาเชื้อราในป่าจาก ส่วนใหญ่ที่พบเป็นราชั้นสูงในกลุ่ม Ascomycetes และ Mitosporic fungi โดยพบ Ascomycetes 68 ชนิด Mitosporic fungi 27 ชนิด โดยมีเชื้อรา *Linocarpon appendiculatum, L. nipae, Astrosphaeriella striataspora* และ *Trichocladium inderi* เป็นเชื้อราที่พบเป็นหลัก ซึ่งพบกระจายในแหล่งต่าง ๆ แทบทุกแหล่ง และพบเชื้อรา *L. appendiculatum, L. nipae,* และ *A. striataspora* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีรายงานว่าพบบ่อยในการแยกเชื้อราจากต้นจากในประเทศบรูไนและประเทศไทย ส่วนเชื้อรา *Trichocladium linderi* ยังไม่พบว่ามีรายงานว่ามีการพบในป่าจาก

อภิรดี ปิลันธนภาคย์ และ วาสนา ศรีบุญธรรม (2542) ทำการแยกเชื้อราจากดิน น้ำ ใบสัก และซากพืชได้จำนวน 42 genera 101 species จัดเป็นราในกลุ่ม Ascomycetes, Coelomycetes, Hyphomycetes, Zygomycetes, unidentified species และ sterile hyphae จำนวน 9, 2, 52, 5, 28, และ 5 ชนิด ตามลำดับ เชื้อราที่พบในดินมีจำนวนและปริมาณมากที่สุด รองลงไป ได้แก่ เศษซากพืช ใบสัก และน้ำ ตามลำดับ เชื้อราที่พบมากที่สุดในดินจัดเป็นราในกลุ่ม Hyphomycetes โดยเชื้อราที่พบมากที่สุดคือราในสกุล *Aspergillus, Penicillium, Acermonium, Trichroderma, Paecilomyces* และ *Fusarium* ตามลำดับ เชื้อราที่แพร่กระจายในน้ำส่วนใหญ่เป็นราที่สร้างสปอร์ภายในเมือก (slimy) ได้แก่ รา *Acremonium, Gliocladium, Myeothecium* และ *Pestalotiopsis* เป็นต้น ส่วนใบสักและซากพืชเชื้อราที่พบส่วนใหญ่เป็นราที่สร้างเฉพาะเส้นใย (sterile hyphae) และ *Cladosporium sp.*

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราโดยการใช้แบบแผนไอโซไซม์

ในปัจจุบันการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการศึกษาด้านพันธุกรรม เพราะสามารถนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถแยกออกได้ด้วยตาเปล่าโดยเฉพาะจุลินทรีย์ เชื้อราบางชนิดยากที่จะ identify เนื่องจากไม่สามารถค้นหา หรือกระตุ้นให้เกิดลักษณะโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์ที่จะใช้เป็นข้อมูลในการศึกษา บางชนิดเป็นปรสิตที่จำเพาะเจาะจงกับ host ทำให้เกิดความยุ่งยากในการที่จะ identify การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่นการศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาเชื้อราเหล่านั้น แต่นอก

จากการศึกษาที่จะ identify แล้ว การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ยังช่วยทำให้เกิดประโยชน์ในการศึกษาด้าน อนุกรมวิธาน, วิวัฒนาการ, clonal identification, introgression, linkage studies, gene flow, inbreeding studies และการคัดเลือกทางธรรมชาติ (สุจิตรา จางตระกูล และคณะ, 2530)

การศึกษาความแตกต่างสายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา เริ่มต้นจากการศึกษาแบบแผนของโปรตีนทั้งหมด (soluble protein) โดย Chang และ Steward (1962) ได้ใช้เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิส ในการแยก soluble protein ที่สกัดจากเชื้อรา *Neurospora sp.* โดยเป็นการเปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนจากใช้สารค้ำจุน 2 ชนิด คือ กระดาษ และ polyacrylamide และเปรียบเทียบระหว่าง *N. crassa.*, *N. sitophila.*, *N intermedia.*, และ wild type ที่สามารถผสมกับ *N. crassa* ได้ พบว่าแบบแผนที่ปรากฏมีความแตกต่างกัน

Clare (1963) ใช้ starch gel ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อใช้ในการแก้ปัญหาการจัดจำแนกเชื้อราที่ต้องใช้การพิจารณาจากโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เช่น เชื้อรา Pythim sp. โดยการเปรียบเทียบระหว่าง 6 สายพันธุ์พบว่าเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สะดวกในการจัดจำแนก

Durbin (1966) ศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนของเชื้อ *Septoria sp.* ซึ่งเป็นปรสิตของพืชตระกูลหญ้าโดยเริ่มมีการนำ chromatoscan มาใช้ในการอ่านผล

Bent (1967) ได้ศึกษาถึงผลกระทบที่ทำให้ความเข้มของแถบสีของ soluble protein ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Penicillium* 3 species มีความหลากหลาย โดยศึกษาอายุของการเลี้ยงเซลล์ สภาวะที่นำมาใช้ในการเลี้ยง การใช้แหล่งไนโตรเจน ผลของการสกัดโปรตีนโดยใช้วิธี ultracentrifuge และผลการการสร้างสปอร์ของเส้นใยของเชื้อรา เปรียบเทียบกับเส้นใยที่ไม่สร้างสปอร์ เพื่อนำข้อมูลจากการศึกษามาใช้เป็นพื้นฐานในการพิจารณาการจัดกลุ่มของเชื้อรา

Glynn และ Ried (1969) ได้ศึกษาความแตกต่างของแบบแผนโปรตีนที่สกัดจากเชื้อรา *Fusarium spp.* ที่เป็นทั้งต่าง species และต่าง variety โดยการเก็บรวบรวมจากแหล่งต่างๆ กัน พร้อมกันนี้ได้พบว่านอกจากความแตกต่างด้านพันธุกรรมแล้ว ปัจจัยอื่นๆ เช่น อายุของตัวอย่างที่ใช้ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง มีผลให้เกิดความแตกต่างของแบบแผนโปรตีน

Kulik และ Brooks (1970) ทำการศึกษาแบบแผนของ soluble protein ของเชื้อรา *Aspergills spp.* ทั้งหมด 7 species โดยแต่ละ species มีอย่างละ 3 strains พบว่าในแต่ละ species ให้จำนวนแถบของโปรตีนไม่เท่ากัน โดยผลการวิเคราะห์แบบแผนทั้งหมดพบว่าทั้ง 7 species มีเพียง 2 แถบสีที่พบได้ในทุกๆ ตัวอย่าง และพบความแตกต่างระหว่าง *A. flavus* กับ *A. fumigatus* และ *A. ocheraceus*

Nasuno (1972) ได้ศึกษาความแตกต่างระหว่าง *Aspergillus sojae* ที่แยกออกมาเป็น species ใหม่จาก *A. oryzae* โดยใช้ polyacrylamide gel disc eletrophoresis ตรวจสอบจากเอนไซม์ alkaline proteinase ซึ่งพบว่าความแตกต่างของแบบแผนเอนไซม์ไม่ได้ขึ้นกับอายุและสภาวะในการเลี้ยง แต่จากผลการศึกษาสามารถยืนยันถึงความแตกต่างระหว่างเชื้อทั้งสอง

Cruickshank และ Pitt (1987) ได้ศึกษาไอโซไซม์ของเชื้อรา *Penicillium* และ Subgenus *Penicillium* โดยการใช้ extracellular enzyme ได้แก่ polygalacturonase, pectinesterase, amylase และ ribonuclease พบว่าแบบแผนของเอนไซม์ที่ศึกษา สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มได้เป็นอย่างดี ต่อมาในปี 1990 ได้ทดลองศึกษาการใช้แบบแผนไอโซไซม์ในการจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และกลุ่มที่มีความเกี่ยวเนื่องกันทางพันธุกรรม โดยพบว่าแบบแผนไอโซไซม์ให้ความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ที่เลี้ยงไว้กับสายพันธุ์ที่แยกได้จากธรรมชาติ

Leuchtmann, Petrini, และ Samuels (1996) ศึกษาไอโซไซม์ของเชื้อรา Trichoderma ใน section Longibrachiatum ทั้งหมด 78 ไอโซเลท ที่เก็บรวบรวมได้จากประเทศต่างๆ โดยใช้การศึกษาเปรียบเทียบของแบบแผนไอโซไซม์ 10 ระบบ ซึ่งให้ผลในการจัดจำแนกกลุ่มสอดคล้องกับการจัดจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และสามารถนำมาสร้างความสัมพันธ์ของสายพันธุ์เชื้อราชนิดนี้ได้

Vagvolgyi, Papp, Palagyi และ Michalides (1996) ศึกษา polymorphism ของไอโซไซม์ของเชื้อรา *Mucor piriformis* 59 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผลไม้ โดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ 6 ระบบ ได้แก่ catalase, α-esterase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogense และ superoxide dismutase และพบว่าสามารถใช้ผลของแบบแผนไอโซไซม์เป็น biochemical marker ในการศึกษา mating type ของเชื้อราชนิดนี้ได้

Banke, Frisvad, และ Rosendahl (1997) ได้ทำการจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อรา *Penicillium chrysogenum* เชื้อรา xerophile ที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 87 ไอโซเลท โดยใช้การวิเคราะห์แบบแผนไอโซไซม์ ซึ่งสามารถจัดแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ นอกจากนี้สามารถแยกความแตกต่างของ alleles และ loci ของเชื้อรา นอกจากนี้ยังได้เสนอระบบของเอนไซม์ที่ให้ผลที่ดีในการวิเคราะห์อีกด้วย

เทคนิคการวิเคราะห์แบบแผนไอโซไซม์เป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นวิธีหนึ่งในการจำแนกเชื้อรา (identify) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชื้อรากลุ่มที่เป็นโรคพืช เนื่องจากสายพันธุ์เชื้อรามีความจำเพาะเจาะจงกับ host และแต่ละสายพันธุ์ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคไม่เท่ากัน (Bonde, Micales และ Peterson, 1993) เช่น *Phytophthora sp.* (Bielenin, Jeffers, Wilcox และ Jones, 1988., Mchau และ Coffey, 1994), *Pythium sp.* (Barr, Warwick และ Desaulniers, 1997., Chen, Hoy, และ Schneider, 1991), *Rhizoctonia solani* (Macnish และ Sweeetingham, 1993), Fusarium sp. (Bosland และ Williams, 1986., Elias และ Schneider, 1992., Huss, Campbell, Jennings และ Leslie,1996)

หลักการและเทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537)

อิเลคโตรโฟรีซีสเป็นเทคนิคในการแยกวิเคราะห์สารหรือโมเลกุลที่มีประจุ โดยให้สารเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าระหว่างขั้วบวกและขั้วลบ อัตราการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุ ซึ่งเป็นอัตราส่วนของประจุต่อน้ำหนักของสารหรือโมเลกุลนั้น ยิ่งมีความหนาแน่นของประจุสูงสารก็จะเคลื่อนที่ได้เร็ว โดยสารแต่ละอย่างจะเคลื่อนที่ในตัวพาหะด้วยอัตราเร็วต่างกัน สารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วอิเลคโทรด (electrode) บวก และจะค่อยๆ แยกออกจากกันเป็นแถบเมื่อมีระยะการเคลื่อนที่พอเหมาะเทคนิคนี้สามารถใช้ได้ดีในการแยกสารทางชีวเคมี ได้แก่ กรดอะมิโน โปรตีน และกรดนิวคลิอิก เป็นต้น

โดยทั่วไปการแยกจะเกิดขึ้นในสารละลายบัฟเฟอร์บนสารค้ำจุนที่เป็นแผ่นหรือแท่ง (supporting medium) เพื่อช่วยลดผลกระทบจากความร้อนที่มักทำให้แถบตัวอย่างโค้ง และผลกระทบจากการแพร่ทั้งระหว่างการแยกและเมื่อสิ้นสุดแล้ว สารค้ำจุนที่ใช้กันมาก ได้แก่ กระดาษ cellulose acetate, polyacrylamide gel, starch gel และ agarose gel สารค้ำจุนประเภทเจล หรือวุ้นยังสามารถมีส่วนช่วยเสริมการแยก โดยอาศัยหลักการกรองโมเลกุล (molecular sieving effect) ซึ่ง

จะช่วยให้โมเลกุลขนาดต่างกันแยกออกจากกันได้ดีขึ้น เพราะเจลเหล่านี้จะมีลักษณะเป็นรูพรุน ซึ่งการเลือกชนิดของเจลซึ่งมีขนาดของรูพรุนให้ใกล้เคียงเหมาะกับขนาดโมเลกุลสารตัวอย่างจะเป็นผลดีต่อการแยกโดยจะทำให้สารที่โมเลกุลใหญ่เคลื่อนที่ได้ช้าลงเทียบกับสารโมเลกุลเล็ก เช่น การใช้ starch หรือ polyacrylamide gel ซึ่งมีขนาดรูพรุนใกล้เคียงกับสารโปรตีนทั่วไป จึงนิยมใช้ในการแยกโปรตีน ส่วน agarose gel มีขนาดรูพรุนใหญ่เกินไปสำหรับโปรตีน แต่จะเหมาะในการแยกกรดนิวคลีอิก สำหรับ polyacrylamide gel นั้น ปัจจุบันนิยมใช้กันมากในการแยกโปรตีน เนื่องจากการเตรียมเจลซึ่งเป็นโพลิเมอร์สังเคราะห์จาก acrylamide monomer สามารถทำให้ได้รูพรุนที่สม่ำเสมอ โดยคงสภาพ polymerization ให้คงที่ มีข้อดี คือ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้ง่ายมีความคงตัวในช่วงกว้างต่อสภาพ pH อุณหภูมิและ ionic strength และมีเนื้อเจลใส ข้อเสียคือ สารละลาย acrylamide monomer หรือผง acrylamide เป็นพิษต่อสมองและอาจก่อมะเร็งด้วย

ปฏิกิริยา polymerization ในการเตรียม polyacrylamide gel

เป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดโพลิเมอร์ของ acrylamide monomer ต่อกันเป็นร่างแหสามมิติที่มีรูพรุนขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปฏิกิริยา polymerization ที่เกิดขึ้นโดยใช้สาร N,N'-methylene bisacrylamide หรือ bisacrylamide เป็นตัวเชื่อม ปฏิกิริยาจะเกิดได้ต้องมีการกระตุ้นเริ่มต้นโดยสาร ammomium persulphate หรืออาจใช้ riboflavin นอกจากนี้ยังต้องเติมสาร N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine (TEMED) เป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยา โดยทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) จาก persulphate ซึ่งอนุมูลอิสระนี้จะไปเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาการเกิดโพลิเมอร์ ปฏิกิริยานี้ถูกยับยั้งหรือทำให้ช้าลงได้โดยออกซิเจนและสภาพ pH ต่ำซึ่งทำให้ TEMED ไม่อยู่ในสภาพ free base การเพิ่มความเข้มข้นของ TEMED หรือ ammonium persulphate ในปฏิกิริยาจะช่วยเร่งการเกิดโพลิเมอร์

การใช้เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสในการศึกษาสิ่งมีชีวิตจากการใช้โปรตีน แบ่งเป็น 2 วิธีดังนี้

1. Non-denaturing หรือ Non-dissociating buffer system วิธีการนี้เป็นการทำอิเล็คโตรโฟรีซิสโดยไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ คือไม่ทำให้โมเลกุลโปรตีนตามธรรมชาติ (Native protein) แยกตัวออกจากกันเป็นหน่วยโพลีเปปไทด์ย่อยๆ วิธีนี้เหมาะในการแยกเอนไซม์ที่ต้องการย้อมสีด้วยหลักปฏิกิริยาเอนไซม์จำเพาะ หรือ Activity staining ซึ่งใช้กันมากในการทำ isozyme patterns อีกในกรณีหนึ่งใช้เพื่อต้องการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในสภาพ native protein หรือเป็น oligomer เป็นต้น

2. Denaturing หรือ Dissociating buffer system วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันมากในการแยกโปรตีนโดยทั่วไปโดยให้โมเลกุลโปรตีนแยกตัวออกเป็นหน่วยโพลีเปปไทด์ย่อย สารที่ใช้กันมากที่สุดเพื่อให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ (dissociating agent) คือ sodium dodecyl (SDS) ซึ่งเป็น ionic detergent สารอื่นๆ ที่ใช้กันอีก เช่น cetyltrimethlammonium bromide (CTAB) เป็น cationic detergent urea ใช้ทำลายพันธะไฮโดรเจนเป็นต้น วิธีการทั่วไปทำโดยให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนที่ 100 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มี SDS อยู่มากเกินพอและมีสาร thiol reagent เช่น mercaptoethanol หรือ dithiothreitol ทำหน้าที่ตัดพันธะไดซัลไฟล์ในสภาพเช่นนี้โพลีเปปไทด์ส่วนใหญ่จะจับกับ SDS ในอัตราส่วนน้ำหนักที่คงที่ (1.4 กรัม SDS ต่อ 1 กรัม โพลีเปปไทด์) SDS เป็นโมเลกุลที่มีประจุลบจำนวนมาก เมื่อจับกับโพลีเปปไทด์จะทำให้ค่าประจุบนโพลีเปปไทด์หมดความหมายเมื่อเทียบกับประจุของ SDS จึงถือว่าโพลีเปปไทด์ SDS ชนิดต่างๆ ที่ผสมกันอยู่มีความหนาแน่นประจุเหมือนกัน การแยกบนสนามไฟฟ้าจึงขึ้นอยู่กับขนาดของโพลีเปปไทด์เท่านั้น ในการแยกโปรตีนในสภาพธรรมชาติ (Non-denaturing gel electrophoresis) ไม่สามารถแยกโปรตีนตามความแตกต่างของรูปร่างและขนาดได้ ใช้ได้เพียงแยกโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากกันโดยความแตกต่างของประจุเป็นหลัก แต่การแยกโปรตีนในสภาพเสียธรรมชาติ (Denaturing gel electrophoresis) สามารถใช้แยกโปรตีนตามขนาดและใช้ประโยชน์ในการหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน

การใช้แบบแผนของไอโซไซม์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

Isozyme คือ เอนไซม์ชนิดเดียวกันที่มี gene ต้นแบบมากกว่าหนึ่ง gene ทำให้มีโมเลกุลที่ต่างกัน (เนื่องจากการเรียงตัวของ subunits ที่ต่างกัน) หรือเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่ต่างรูปทำให้ได้เอนไซม์ที่มีองค์ประกอบต่างกัน คุณสมบัติทางไฟฟ้าและโครงสร้างจะต่างกัน แต่มีปฏิกิริยาทางเคมีแบบเดียวกัน เอนไซม์ต่างๆ สามารถสกัดได้จากส่วนต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยเทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) ซึ่งสามารถศึกษาตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกัน หรือจำแนกสายพันธุ์ได้จากแบบแผนของไอโซไซม์ (isozyme pattern) ทั้งนี้เอนไซม์หลายชนิดที่อยู่ภายในเซลล์ หลังจากที่สร้างขึ้นแล้วอาจเกิดขบวนการทางเคมีบางอย่างเช่น methylation หรือ phosphorylation ทำให้เอนไซม์ถูกเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะ side chain ของกรดอะมิโนในโมเลกุลของเอนไซม์ระหว่างการเจริญเติบโตหรือขบวนการต่างๆ ทางชีวเคมีได้ ดังนั้นการศึกษาเทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีส

เพื่อการจำแนกพันธุ์โดยใช้ isozyme pattern จำเป็นต้องคำนึงถึงประเภทของเอนไซม์ที่จะใช้เป็น genetic marker ประเภทของเอนไซม์สามารถแยกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. specific enzyme ได้แก่ amylase (AMY), malate dehydrogenase (MDH), alcohol dehydrogenase (ADH), phosphoglucomutase (PER)

2. non-specific enzyme ได้แก่ esterase (EST), peroxidase (PER), catalase (CAT), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (ALP)

การสกัดเอนไซม์ด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์

การสกัดตัวอย่าง เส้นใยของเชื้อราจะถูกเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสม แล้วสกัดด้วยสัดส่วนระหว่างเส้นใยของเชื้อรากับปริมาณสารละลายบัฟเฟอร์ต้องเหมาะสม อาจจะมีส่วนผสมของสารละลายเสริมคุณภาพ ได้แก่ 2 -mercaptoethanol , triton X 100 หรือ tween 80 , polyvinylpolypyrrolidone (PVP) soluble type ทำให้การสกัดโปรตีนจากเส้นใยของเชื้อราได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็น surfactant ทำให้โปรตีนละลายได้ดีในสารละลายบัฟเฟอร์ สำหรับสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มีหลายชนิด ได้แก่ tris HCL และ phosphate buffer และสิ่งที่สำคัญอย่างยิ่งคือการรักษาอุณหภูมิในขณะที่ทำการสกัด เพื่อป้องกันไม่ให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพได้

กลไกการย้อมสีไอโซไซม์

การทำปฏิกิริยาของไอโซไซม์ เกิดจากการแช่เจลในสารละลายที่ประกอบด้วย สารตั้งต้น (substrate), coenzyme และสีย้อม (dye) ที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบ ควรจัดสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารละลายกับเอนไซม์ที่แยกได้บนเจล เช่น incubate ไว้ในสภาพกรดหรือด่าง ในอุณหภูมิสูงหรือต่ำเป็นช่วงเวลาหนึ่ง โดยทั่วไปมักจะแนะนำให้วางในอุณหภูมิห้อง ไม่ให้มีแสง และมีการเขย่าเบาๆ เพื่อเร่งปฏิกิริยาจะทำปฏิกิริยาจนเห็นแถบสีได้คมชัดที่สุด

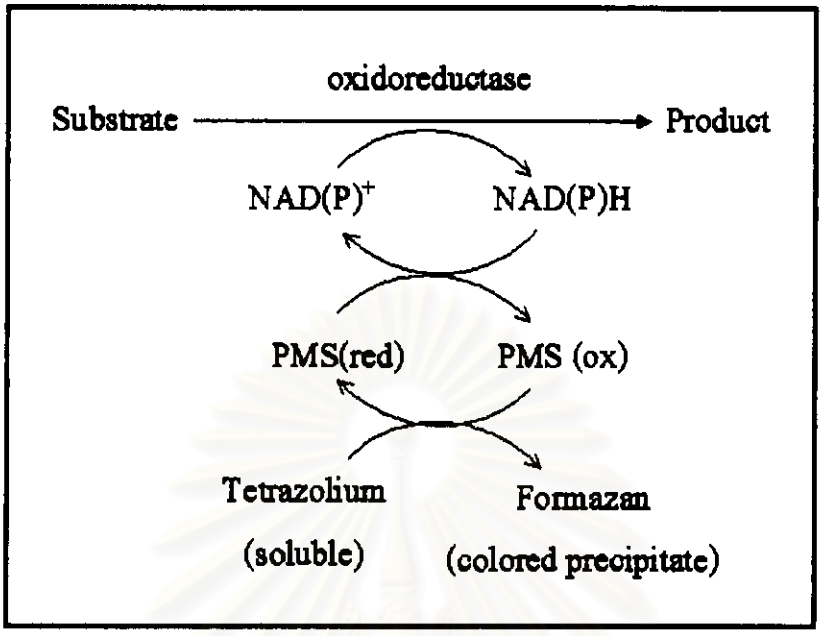
การย้อมด้วยเอนไซม์เป็นการตรวจวัดโปรตีนที่จำเพาะโดยใช้ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง หรือเป็นการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ หลังจากที่ทำการแยกโปรตีนโดยใช้วิธีอิเลคโตรโฟรีซิส เพราะฉะนั้นจึงต้องระมัดระวังเพื่อไม่ให้เกิดการสูญเสียแอกติวิตีในระหว่างการทำอิเลคโตรโฟรีซิส เช่น เมื่อใช้ระบบบัฟเฟอร์ที่เหมือนกันต้องทำ pre-electrophoresis เพื่อจำกัดมอโน

เมอร์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา และกำจัดเพอร์ซัลเฟตออกไป ต้องเลือกค่า pH ที่ทำให้เอนไซม์เสถียรและควรทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่อุณหภูมิต่ำ

การย้อมด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับสีย้อมที่สามารถถ่ายทอดอิเล็กตรอนโดยปฏิกิริยาที่ใช้ในการย้อมสีไอโซไซม์มีดังนี้

1. ระบบ azo coupling เป็นระบบที่ใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่สามารถ hydrolyzed สารในกลุ่ม napthylphosphate แล้วเกิดเป็นสารในกลุ่ม diazonium ที่มีสีและตกตะกอน เรียกว่า azo dye การใช้ระบบการตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ระบบนี้ ปัจจุบันดัดแปลงใช้กับการตรวจสอบเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น acid phosphatase, esterase, sulfatase, aminopeptidase และ glucosidase การเกิด diasonium มักไม่ค่อยเสถียรในสารละลาย ต้องมีการควบคุมปัจจัยอื่นๆ เช่น เกลือที่ละลายในบัฟเฟอร์ pH และอุณหภูมิในช่วงที่เกิดปฏิกิริยา จึงจะทำให้การย้อมสีเอนไซม์ให้ผลที่ดี

2. ระบบ tetrazolium เป็นระบบที่นิยมใช้มาก เนื่องจาก tetrazolium salt มีความเสถียรสูงทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและด่าง ทำให้สามารถตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ได้หลายชนิด โดยปฏิกิริยาในระบบนี้เกิดขึ้นจาก nitroblue tetrazolium หรือ NBT และ methyl thiazolyl tetrazolium หรือ MTT สีย้อมพวกนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย เมื่อถูกรีดิวซ์โดยตัวให้อิเล็กตรอนแล้ว จะเกิดเป็น formazan ที่ไม่ละลายและมีสีน้ำเงินเข้ม ปฏิกิริยานี้มี phenazine methosulfate หรือ PMS ทำหน้าที่เป็นพาหะ (carrier) ของไฮไดรด์-ไอออน (hydride-ion) ระหว่างโคเอนไซม์รูปรีดิวซ์ (reduced coenzyme) หรือหมู่พรอสเธติก (prosthetic group) ของเอนไซม์และเกลือ tetrazolium เมื่อมี activity ของเอนไซม์จะทำให้เกิดรูปรีดิวซ์ ของโคเอนไซม์ NAD^+ หรือ $NADP^+$ (nicotinamide adenine dinucleotide หรือ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) ตัวอย่างเช่น การตรวจหา activity ของเอนไซม์ในกลุ่ม dehydrogenase แต่เนื่องจาก tetrazolium salt มีความไวต่อแสงจึงต้องทำในที่มืด วิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการย้อมเอนไซม์ตัวอื่น ๆ ได้ ซึ่งสามารถเกิดคู่ควบ (couple) กับปฏิกิริยา 2 ปฏิกิริยา หรือมากกว่าที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา reduction ของ NAD^+ หรือ $NADP^+$ ไปเป็น $NADH+H^+$ หรือ $NADPH+H^+$ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 กลไกการย้อมสี isozyme โดยใช้ระบบ tetrazolium (ที่มา Tanksley และ Orton, 1983)

3. ระบบ starch-iodine เป็นระบบที่ใช้หลักการในการใช้ iodine ในการตรวจสอบแป้ง (amylose และ amylopectin) แล้วเกิดเป็นสารสีน้ำเงิน หรือเป็นสีม่วงจนถึงแดง ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความยาวของจำนวน unit ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกัน ระบบนี้ใช้ตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ amylase phosphorylase และ catalase

4. การใช้ redox dye เป็นระบบที่พัฒนามาจากพื้นฐานของระบบ tetrazolium salt ใช้หลักการในการเกิดปฏิกิริยา redox ของสารที่ใช้เป็นสีย้อม ได้แก่ 3-amino-9-ethylcarbazole (3-A-9-EC) และ 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMBZ) ใช้สำหรับการตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ peroxidase เป็นต้น

5. การใช้วิธีตกตะกอนด้วยโลหะ เป็นระบบที่ใช้หลักการของ insoluble metallic salt chromophores ใช้สำหรับการตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ glutamine synthetase แต่ไม่สามารถใช้กับการตรวจสอบ เอนไซม์ acid phosphatase

6. การใช้การเกิดปฏิกิริยาจาก reductive groups เช่น หมู่คีโตน(-CO-), หมู่อัลดีไฮด์ (-CHO) และหมู่ไทออล (-SH) กับสารในกลุ่ม 2-hydroxy-3-naphthoic acid hydrazine โดยการเติมสาร tetrazolium salt หรือ 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) ในการทำไช้เกิดสีสำหรับตรวจสอบ activity ของเอนไซม์

7. การใช้สี fluorescens สีในกลุ่ม fluorochromes มีความ sensitive ต่อ activity ของเอนไซม์ carbonic anhydrase

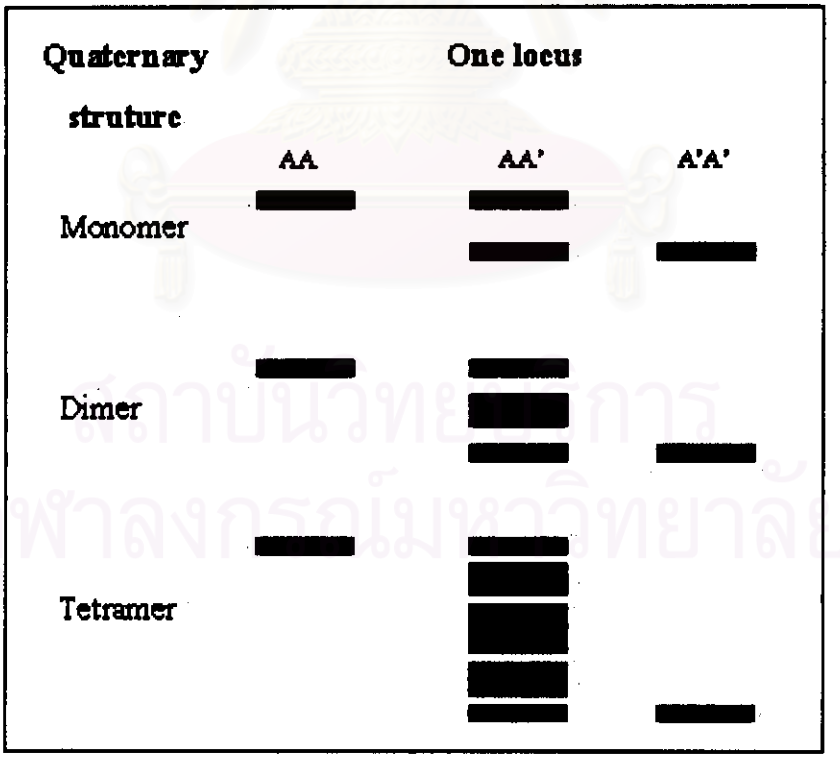
การตรวจสอบโดยวิธีการย้อมด้วยเอนไซม์นี้จะขึ้นอยู่กับการรักษา activity ของเอนไซม์ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสได้มากน้อยแค่ไหน เพราะฉะนั้นจึงต้องหาค่า pH และส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่จะรักษาแอกติวิตีของเอนไซม์ที่สนใจให้คงอยู่ไม่ให้สูญเสียไป

การวิเคราะห์ผลจากไซโมแกรม

ไซโมแกรมคือแถบสีที่เกิดขึ้นจากการย้อมสีที่มีความจำเพาะเอนไซม์ในระบบเอนไซม์นั้นๆ การตรวจดูแถบสีที่เกิดขึ้นภายหลังการย้อมแผ่น polyacrylamide gel นั้น สิ่งสำคัญคือการแปรผลของไซโมแกรม โดยก่อนอื่นต้องทราบลักษณะโมเลกุลพื้นฐานของไอโซไซม์เพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์ผล เพราะไอโซไซม์เกิดจากความแตกต่างของชนิดและจำนวนของหน่วยย่อย (subunit) โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ส่วนมากประกอบด้วยสาย polypeptide ตั้งแต่ 2 สายขึ้นไป เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีลักษณะการจัดรูปแบบโครงสร้างของโมเลกุลในระดับ quaternary structure แตกต่างกันไป(ตารางที่ 1 และภาพที่ 3) เช่นเอนไซม์ Diaphorase (DIA) มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบ monomer และเอนไซม์ Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบ dimer เป็นต้น

ตารางที่ 1 ระบบไอโซไซม์บางชนิดใช้ในการศึกษา (Soltis และ Soltis, 1989)

เอนไซม์	จำนวนไอโซไซม์	ตำแหน่งที่อยู่	โครงสร้างดติยภูมิ
Acid phosphatase	2-4	various	monomer, dimer
Alcohol dehydrogenase	1-3	cytosol	dimer
Esterase	2-10	cytosol	monomer, dimer
Malate dehydrogenase	3	cytosol, mitochondrial, microbody	dimer
Peroxidase	2-13	cytosol, cell wall	monomer, dimer
Phosphogluconate dehydrogenase	2	cytosol	dimer
Shikimate dehydrogenase	1-2	cytosol	dimer



ภาพที่ 3 ตัวอย่างไซโมแกรมที่ได้จากการย้อมสีไอโซไซม์ (Micales et al., 1986)

เชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส

เซลลูโลส

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีวัสดุเหลือทิ้งที่เกิดจากผลิตผลทางการเกษตรอยู่มากมายเซลลูโลสที่ได้จากการผลิตพืชจัดว่าเป็นแหล่งคาร์บอน (C) ราคาถูกที่ได้รับความสนใจมานานจากอุตสาหกรรมการผลิตอื่นๆ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาแนวทางการแปรรูปเซลลูโลสให้อยู่ในรูปที่สามารถนำไปใช้ได้ง่ายและเปลี่ยนเป็นผลิตผลที่มีราคา เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ D-glucose ในรูป β-D-glucopyranose เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β-1,4-glucosidie ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ในโมเลกุลถัดไป เป็นสายตรงไม่มีแขนงย่อย (unbranched polymer) มีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{12}O_5)_n$ หนึ่งโมเลกุลเซลลูโลสจะประกอบด้วย D-glucose ตั้งแต่ 15 หน่วยจนถึงประมาณ 10,000-14,000 หน่วย มีค่าน้ำหนักโมเลกุล $0.2\text{-}2\times10^6$ Dalton (น้ำหนักโมเลกุลของ glucose เท่ากับ 180.16 Dalton) ความยาวของหน่วยย่อย D-glucose 0.515 nm และความยาวทั้งหมดของโมเลกุลเซลลูโลส มีค่ามากกว่า 5 μm โดยธรรมชาติของเซลลูโลสจะไม่อยู่ในรูปเซลลูโลสอิสระ แต่จะเชื่อมอยู่กับ polysaccharide อื่นๆ เช่น pectin, hemicellulose, starch และ phenolic polymer ของลิกนิน

เอนไซม์เซลลูเลส (บัณฑิต ฝั่งสินธุ์, 2538)

เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดด้วยกัน (multicomponent enzyme) โดยมีองค์ประกอบของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด มาทำงานร่วมกันอันได้แก่

1. Exo β-1,4-glucan allobiohydrolase หรือ exoglucanase หรือ C_1 (E.C. 3.2.1.9.1) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส จากปลายด้าน nonreducing end ได้เซลโลไบโอสและเซลลูโลสสายสั้นๆ

2. Endo β-1,4-glucan gulcanohydrolase หรือ endoglucanase หรือ C_x (E.C. 3.2.1.4) การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ตัดพันธะ β-1,4-glucosidic ภายในสายเซลลูโลสในบริเวณที่เป็น amorphous หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น carboxymethyl cellulose, walseth cellulose และ cell-oligomers เอนไซม์นี้จะตัดพันธะอย่างสุ่ม (random) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ กลูโคส β-configuration และ cellobiose โดยจะให้ cellobiose เป็นผลิตภัณฑ์หลัก

3. β-glucosidase หรือ cellobiose (E.C. 3.2.1.2.1) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย cellobiose และ cellodextrins ให้เป็นกลูโคส สามารถย่อยสลาย cellobionic acid ให้เป็น glucanolactone และกลูโคส

เชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

ในธรรมชาติ มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลายเซลลูโลส เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และเชื้อแอคติโนมัยสีท ในจำนวนนี้เชื้อราเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่มากกว่า และขับออกจากเซลล์ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สะดวกต่อการแยกสกัดเอนไซม์ จึงมีผู้ให้ความสนใจศึกษา และนำมาผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม อาทิเช่น เชื้อรา *Trichoderma reesei* อย่างไรก็ตามเชื้อราและจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ ก็ได้รับความสนใจเช่นกัน (ตารางที่ 2) (Mandels and Sternberg, 1976 ; Ryu and Mandels, 1980 ; Margaritis and Merchhant, 1983 ; Macris, 1984 อ้างถึงใน พรเทพ ถนนแก้ว, 2538)

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Margaritis และ Merchant , 1983 อ้างถึงใน พรเทพ ถนนแก้ว, 2538)

เชื้อรา	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแอคติโนมัยสีท
Alternaria sp.	*Bacillus sp.*	*Micromonospora sp.*
Aspergillus sp.	*Cellulomonas sp.*	*Nocardia sp.*
Chaetomium sp.	*Clostridium sp.*	*Streptomyces sp.*
Fusarium sp.	*Corynebacterium sp.*	*Streotasporangium sp.*
Penicillium sp.	*Cytophaga sp.*	
Thielavia sp.	*Polyangium sp.*	
Trichothecium sp.	*Sporocytophaga sp.*	
Trichoderma sp.	*Vibrio sp.*	
Verticillium sp.		

น้อย เกษมสุขสกุล (2530) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่แยกได้จากดิน ที่มีการทับถมของอินทรียวัตถุพบว่า *Aspergillus fumigatus* (Fresenes) มีความสามารถสูงสุดใน การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อเลี้ยงบนฟางข้าว

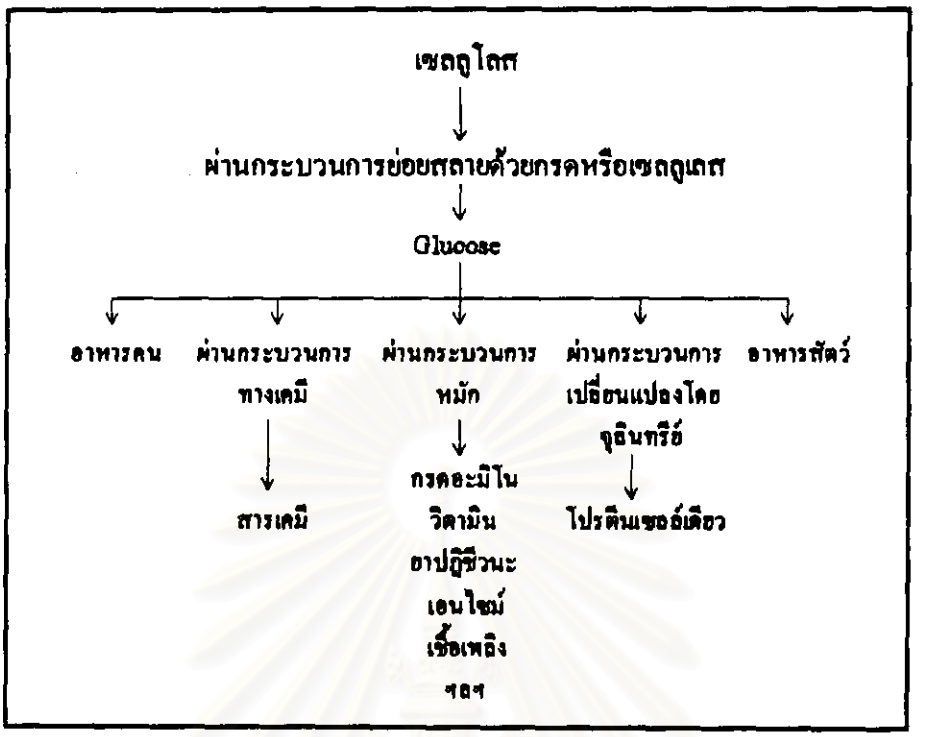
มานะ กาญจนมณีเสถียร (2531) ทำการแยกเชื้อราที่เจริญในที่อุณหภูมิสูง และเชื้อรา ทนความร้อนจากดิน มูลสัตว์ และเศษวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร พบเชื้อราที่สามารถย่อยสลาย walseth cellulose ได้แก่ *Chaetomium thermophile* No.1 และ *Emericella nidulans*

เกษม สร้อยทอง (2534) ได้ทดลองแยกเชื้อราในดินบริเวณรอบรากพืชเพื่อทดสอบ คุณสมบัติในการย่อยสลายเซลลูโลส สามารจัดจำแนกได้ 23 ชนิด และพบว่าเชื้อรา *Chaetomium spp.*มีแนวโน้มว่าจะสามารถนำเชื้อราชนิดนี้มาใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการทำปุ๋ยหมักได้

มนต์นภา พฤกษ์บำรุง (2537) ได้ทดลองแยกเชื้อราจากดินในป่าเขาใหญ่ และได้ ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยการย่อยสลายฟางข้าว พบว่ามีเชื้อรา *Aspergillus sp.* 4 สายพันธุ์ และเชื้อรา *Fusarium sp.*อีก 1 สายพันธุ์

ประโยชน์และความสำคัญของเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส

โดยหน้าที่ทางธรรมชาติของเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสนั้น ทำให้เกิดการ หมุนเวียนของวัฏจักรคาร์บอน ทำให้เกิดแหล่งคาร์บอนกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แต่ในปัจจุบันที่ เทคโนโลยีชีวภาพกำลังได้รับความสนใจ การศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อราในกลุ่มนี้มีเพิ่มมาก ขึ้น เช่น ทางด้านเกษตรกรรมที่มีการผลิตหัวเชื้อสำหรับการผลิตปุ๋ยหมักให้ได้ในระยะเวลาอันสั้น และมีคุณภาพดี (เกษม สร้อยทอง, 2534) การผลิตอาหารสำหรับปศุสัตว์ด้วยการหมักฟางข้าว ทาง ด้านอุตสาหกรรม มีการนำเอาเชื้อรากลุ่มนี้มาใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่สามารถนำไปใช้ ในอุตสาหกรรมหลายประเภท การใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถก่อให้เกิดประโยชน์ มากมายสรุปดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แนวทางการผลิตสารต่างๆ ที่สามารถใช้เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้น (ที่มา ปราณี อ่านเปรื่อง, 2534)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย