บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยประกอบด้วยงานหลัก 2 เรื่องคือ 1) การศึกษาการใช้ถ่านเป็นสารปรับปรุงดินโดยทำการศึกษาอิทธิพลของถ่านต่อการเจริญเติบโตของพืช และคุณสมบัติดินหลังปลูก (หลังใส่ถ่าน) และ 2) การศึกษาระยะยาวของอิทธิพลของการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพต่อการเปลี่ยนแปลงและการสะสมอินทรียวัตถุในดินทราย ในรายงานปีนี้จะเป็นการศึกษาหน้าที่และโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ โดยเน้นที่เชื้อราที่ทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างคุณภาพ

3.1 การศึกษาการใช้ถ่านเป็นสารปรับปรุงดิน

3.1.1 แผนการทดลอง กรรมวิธีการทดลอง และวิธีการทดลอง

ดินที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบด้วยดิน 2 ชนิด ที่มีคุณสมบัติทางแร่วิทยาที่แตกต่างกัน คือชุดดินโคราช (Khorat series: isohyperthermic, Typic (Oxyaquic) Kandiustults) และชุดดินวาเฮียวา (Wahiawa series: clayey, kaolinitic, isohyperthermic, Tropeptic Eutrustox) โดยเก็บชุดดินโคราชที่ระดับความลึก0– 15 เซนติเมตร ในหมวดไม้ผล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในขณะที่ชุดดินวาเฮียวาเก็บที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร จากสถานีทดลองพัวโมโฮ (Poamoho Research Station)รัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา

ถ่านที่ใช้ประกอบด้วยถ่านที่ผลิตโดยวิธีพื้นบ้านในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (TK-BC) และถ่านที่ถูกผลิตด้วยวิธี flash carbonization techniques (FC-BC) ถ่านชนิดแรกคัดเลือกจากการวิเคราะห์ข้อเด่นข้อด้อยด้วยวิธี SWOT (Pahl and Richter, 2007) จากถ่านทั้งหมด 8 แหล่ง โดยถ่านที่ได้รับการคัดเลือกนั้นผลิตโดยกลุ่มผู้เผาถ่านที่เป็นสมาชิกของสวนป่ามัญจาคีรี อำเภอ มัญจาคีรี จังหวัดขอนแก่น เป็นถ่านที่ผลิตจากส่วนปลายของไม้ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*) ที่เหลือจากการตัดส่งโรงงานทำกระดาษ ส่วนชนิดที่สองเป็นถ่านที่ผลิตด้วยเทคนิคพิเศษที่เรียกว่า Flash carbonization technique ซึ่งเป็นวิธีการเผาที่ให้ความร้อนอย่างรวดเร็ว โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25^{0}C/min จนถึงอุณหภูมิ 350^{0}C โดยให้คงอุณหภูมิไว้ที่ 350^{0}C เป็นเวลา 1.4 นาที (Antal et al., 2003) ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ Hawaii Natural Energy Institute มหาวิทยาลัยฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา วัสดุที่ใช้ในการเผาเป็นไม้ยูคาลิปตัสจากแหล่งเดียวกันกับถ่านชนิดแรก

ดำเนินแผนการทดลองแบบ factorial in 0RCBD (randomized complete block design) ประกอบด้วย 3 ปัจจัยการทดลอง คือ

1. ดิน (2 ชนิด คือ ชุดดินโคราชและวาเฮียวา)
2. ถ่าน (2 ชนิด คือ TK-biochar และ FC-biochar)

3. อัตราถ่าน (5 ระดับ คือ 1)ไม่ใส่ถ่านและไม่ใส่ปุ๋ย 2)ไม่ใส่ถ่านแต่ใส่ปุ๋ย 3)ใส่ถ่าน 1% 4)ใส่ถ่าน 2% และ 5)ใส่ถ่าน 4% ของน้ำหนักดิน) โดยทุกกรรมวิธีที่ใส่ถ่านจะใส่ปุ๋ยร่วมด้วย (ภาพที่ 3.1)

โดยมี 3 ซ้ำ ดำเนินการทดลอง ณ โรงเรือนทดลองมากูน (Magoon Research and Instruction Facilities) มหาวิทยาลัยฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา

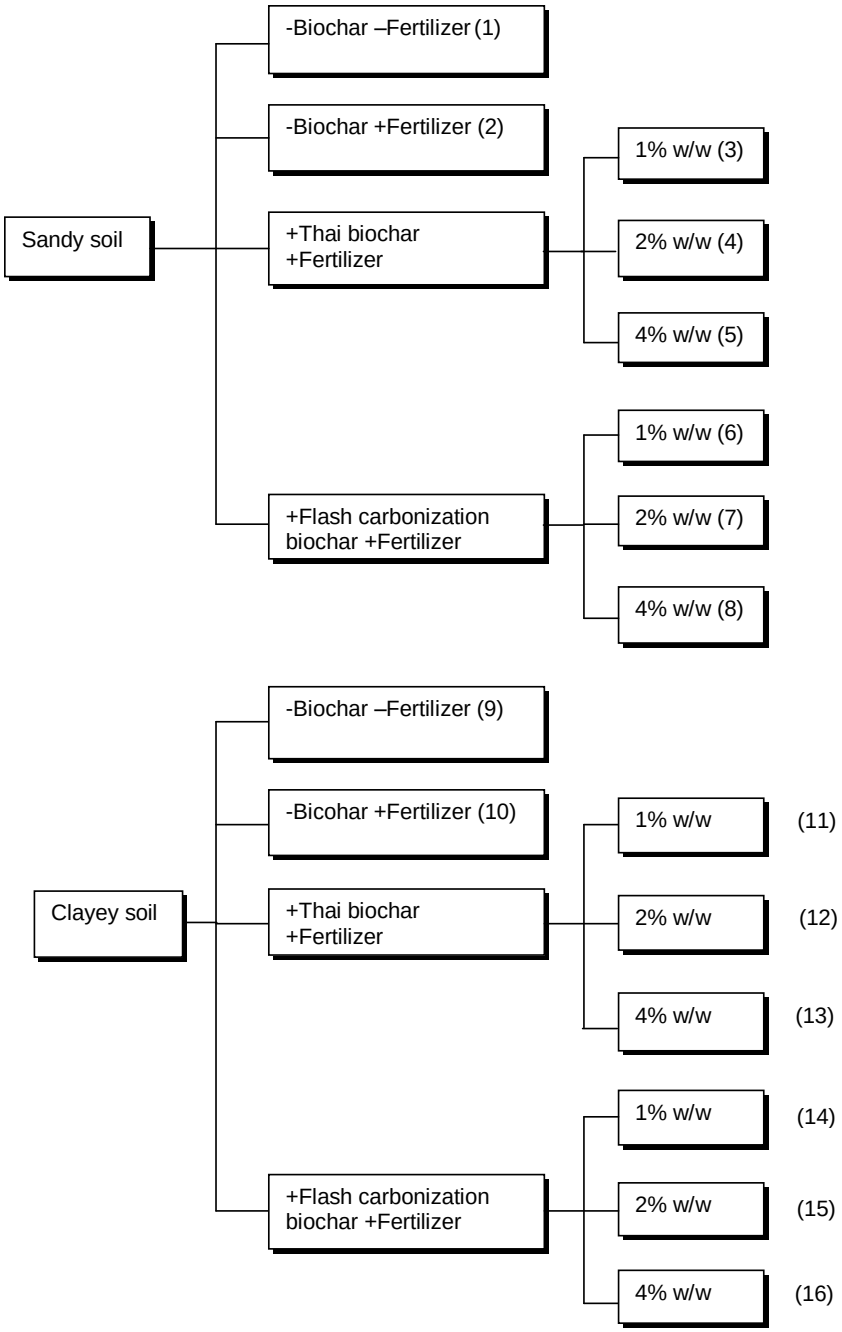
ดำเนินการทดลองโดยบรรจุดินน้ำหนัก 2 กิโลกรัม ที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ลงในกระถางพลาสติกขนาด 2.25 ลิตร ปรับความชื้นดินให้เป็น 70 เปอร์เซ็นต์ของความจุความชื้นสนาม ปลูกข้าวโพดหวานพันธุ์ Hawaiian Supersweet #9 จำนวน 6-7 เมล็ดลงในแต่ละกระถาง ถอนแยกข้าวโพดให้เหลือ 2 ต้น/กระถาง เมื่อข้าวโพดอายุ 10 วันหลังปลูก และทำการเก็บตัวอย่างดินและเก็บเกี่ยวข้าวโพด เมื่อมีอายุ 39 วันหลังปลูก

ทำการปลูกข้าวโพดพันธุ์ Hawaiian Supersweet #9 ซ้ำในดินของกระถางเดิม โดยปลูกข้าวโพดจำนวน 6-7 เมล็ดลงในแต่ละกระถาง เมื่อข้าวโพดอายุ 10 วันหลังปลูก ถอนแยกให้เหลือ 2 ต้น/กระถาง ทำการเก็บตัวอย่างดินและเก็บเกี่ยวข้าวโพดเมื่อมีอายุ 39 วันหลังปลูก (ภาพผนวกที่ 1)

3.1.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน ถ่าน และพืช

ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของดิน ถ่าน และพืช (ภาพผนวกที่ 2) ดังนี้ วิเคราะห์ค่า pH ของดินและถ่าน โดยใช้อัตราส่วนระหว่างดินต่อน้ำเป็น 1 : 5 และในการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารพืชในดิน สกัด อนินทรีย์ไนโตรเจน (NH_4^+ และ NO_3^-) ด้วย 2 *M* KCl (Maynard et al., 2008) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี colorimety ด้วยเครื่อง Easy Chem Discrete Analyzer วิเคราะห์ฟอสฟอรัสด้วยวิธี Bray II (Jones, 2001) ส่วนธาตุประจุบวกที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable cations) เช่น โพแทสเซียม, แมกนีเซียม, แคลเซียม และโซเดียม สกัดด้วย 1 *M* NH_4OAc ที่ปรับ pH เป็น 7 (Pansu and Gautheyrou, 2006) แล้ววิเคราะห์ด้วย inductive coupled plasma mass spectrometry โดยใช้เครื่อง Thermo Jarrell Ash (Franklin, MA) Atom Scan 16 instrument และวิเคราะห์ปริมาณอะลูมินัมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable Al) โดยสกัดด้วย 1 *M* KCl แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Atomic Absorption and Inductively Couple Plasma Optical Emission Spectroscopy (Bertsch and Bloom, 1996) วิเคราะห์ปริมาณแมงกานีสโดยการสกัดด้วย Mehlich III (Amacher, 1996)

วิเคราะห์คุณลักษณะประจุ (charge fingerprint) ซึ่งประกอบด้วยความจุในการแลกเปลี่ยนไอออนประจุบวก (cation exchange capacity; CEC), ความจุในการแลกเปลี่ยนไอออนประจุลบ (anion exchange capacity; AEC) และ pH_0 ของดินและถ่านตามวิธีของ Gillman (2007) และวิเคราะห์องค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีของถ่านด้วยวิธี Gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS)



ภาพที่ 3.1 กรรมวิธีการทดลองของการศึกษาอิทธิพลของถ่านต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน

3.2 การศึกษาระยะยาวของอิทธิพลของการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพต่อการเปลี่ยนแปลงและการสะสมอินทรียวัตถุในดินทราย: การศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของจุลินทรีย์ โดยเน้นที่เชื้อราที่ทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างคุณภาพ

การดำเนินการศึกษาระยะยาวของอิทธิพลของการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพต่อการเปลี่ยนแปลงและการสะสมอินทรียวัตถุในดินทราย ในการศึกษาในโครงการนี้จะศึกษาเรื่องหน้าที่และโครงสร้างของจุลินทรีย์ โดยเน้นที่เชื้อราที่ทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างคุณภาพ ซึ่งเริ่มใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพมาตั้งแต่ปี 2538 (ปีที่ทำการศึกษาในโครงการนี้ครอบคลุม 2 ปี คือ 2552-2553 เป็นปีที่ 15-16) ซึ่งดำเนินการศึกษาในสถานีทดลองที่สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดขอนแก่น อ. ท่าพระ จ.ขอนแก่น ซึ่งเป็นดินทรายชุดโคราชงานส่วนนี้ประกอบไปด้วย

ทำการใส่สารอินทรีย์ที่มีคุณภาพหรือองค์ประกอบทางเคมีต่างกันปีละครั้ง ทุกปี เริ่มมาตั้งแต่ปี 2538 ในช่วงระหว่างปลายเดือนเมษายน และต้นเดือนพฤษภาคมของทุกปี โดยปีที่ 17 ใส่สารอินทรีย์เมื่อวันที่ 1 พฤษภาคม พ.ศ. 2554

กรรมวิธีทดลองมีทั้งหมด 5 กรรมวิธีทดลอง (ตารางที่ 3.1) ดังมีรายละเอียดและวิธีการปฏิบัติแสดงในตารางที่ 4 ซากต้นใบถั่วลิสง (groundnut stover) ซึ่งจัดว่ามีคุณภาพสูง กล่าวคือมี N สูงแต่มีลิกนินและโพฟีนอลต่ำ, ใบ (+ก้าน) มะขามร่วง (tamarind) จัดว่ามีคุณภาพปานกลาง (มี N ลิกนินและโพลีฟีนอลปานกลาง), ใบพลวงร่วง (dipterocarp) จัดว่ามีคุณภาพต่ำ (มี N ต่ำ แต่มีลิกนินและโพลีฟีนอลสูง) และฟางข้าว (rice straw) ซึ่งมีคุณภาพที่แตกต่างออกไป กล่าวคือ มีองค์ประกอบทั้งสามต่ำ แต่มีเซลลูโลสสูงที่สุด สารอินทรีย์ที่ใช้เหล่านี้หาได้ในท้องถิ่น โดยจะทำการเก็บใบพลวง และใบ (+ก้าน) มะขามที่ร่วงหล่นตามฤดูกาล ส่วนฟางข้าวและซากต้นถั่วลิสงได้จากเศษเหลือหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต นำมาตากแห้งแล้วสับเป็นท่อนเล็ก ๆ ให้มีขนาด 5-10 เซนติเมตร ส่วนใบพลวงนำมาตัดให้มีขนาดสี่เหลี่ยม กว้าง x ยาว เท่ากับ 3 x 5 เซนติเมตร สุ่มตัวอย่างสารอินทรีย์วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น เพื่อนำมาคำนวณน้ำหนักแห้งที่แท้จริงของสารอินทรีย์ที่ต้องใส่ในแต่ละกรรมวิธีทดลอง

ตารางที่ 3.1 กรรมวิธีทดลองของการทดลองภาคสนามในสถานีทดลอง

กรรมวิธีทดลอง	การทดลองสภาพไร่	อัตรา (ตัน นน. แห้ง ต่อเฮกตาร์ ต่อปี)
1	ไม่ใส่สารอินทรีย์	0
2	ฟางข้าว	10
3	ซากต้นใบถั่วลิสง	10
4	ซากใบพลวง (*Dipterocarpus tuberculatus*)	10
5	ซากใบมะขาม (*Tamarindus indica*)	10

3.2.1 การศึกษาหน้าที่ของจุลินทรีย์โดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างคุณภาพภายใต้สภาวะการบ่ม (incubation study)

ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของสารอินทรีย์และการหมุนเวียนคาร์บอนในดินจากการทดลองปีที่ 15 (เก็บดินเมื่อวันที่ 28 ธันวาคม พ.ศ. 2552) เอนไซม์ที่ทำการศึกษา ได้แก่ invertase, β-glucosidase, phenoloxidase และ peroxidase ดำเนินการทดลองบ่มดินในขวดบ่ม (incubation jar) โดยทำที่ห้องบ่ม (incubation room) ของสาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทำการเฝ้าติดตามวัดอุณหภูมิห้องตลอดการทดลอง โดยรายละเอียดของการทดลองมีดังนี้คือ

นำตัวอย่างดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์มาก่อน (control treatment) นับถึงปีที่ 15 (และ ปีที่ 16 การที่ต้องใช้ดินจาก 2 ปีมารวมกันเนื่องจากมีดินปีที่ 15 ไม่เพียงพอ) เรียกดินนี้ว่า control soil (หรือ C soil) นำดิน C soil มาใส่สารอินทรีย์ที่มีคุณภาพแตกต่างกัน 4 ชนิดลงไปใหม่ได้แก่ฟางข้าว (rice straw; เรียกว่า C+RS), ซากถั่วลิสง (groundnut; C+GN), ใบพลวง (dipterocarp; C+DP) และใบมะขาม (tamarind; C+TM)

จากนั้นนำตัวอย่างดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์คุณภาพแตกต่างกันต่อเนื่องมา 15 ปี (native soil หรือ N soil) โดยใช้ดินในปีการทดลองที่ 15 (และ ปีที่ 16 การที่ต้องใช้ดินจาก 2 ปีมารวมกันเนื่องจากมีดินปีที่ 15 ไม่เพียงพอ) จำนวน 4 ชนิด นำมาใส่สารอินทรีย์ลงไปใหม่ได้แก่ ดินที่มีการใส่ฟางข้าวต่อเนื่องมา 15 ปี แล้วใส่ฟางข้าวใหม่เพิ่มเข้าไป เรียกว่า native rice straw soil + rice straw (NRS+RS) เช่นเดียวกับดินจากสารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ native groundnut soil + groundnut (NGN+GN), native dipterocarp soil + dipterocarp (NDP+DP) และ native tamarind soil + tamarind (NTM+TM) กรรมวิธีทดลองมีทั้งสิ้นจำนวน 13 กรรมวิธีทดลอง (ตารางที่ 3.2) จำนวนครั้งที่สุ่มเก็บตัวอย่าง 6 ครั้ง ในวันที่ 0, 3, 7, 14, 28 และ 56 วัน หลังการใส่สารอินทรีย์ มีซ้ำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำการทดลอง คิดเป็นจำนวนหน่วยทดลองทั้งสิ้น 234 หน่วยทดลอง ในแต่ละหน่วยทดลองทำการบ่มดินปริมาณ 600 กรัม ซึ่งเป็นดินตากแห้ง (air dried soil)

ร่วมกับสารอินทรีย์แต่ละชนิดในอัตรา 10 ตันต่อเฮกตาร์ (ภาพผนวกที่ 3)วางแผนการทดลอง randomized complete block design (RCBD) จำนวน 3 block ทำการเก็บตัวอย่างดิน (หน่วยทดลอง) แต่ละช่วงการบ่ม นำมาวัดหากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activities) ได้แก่ เอนไซม์ invertase, β-glucosidase, phenoloxidase และ peroxidase

ตารางที่ 3.2 กรรมวิธีทดลองบทบาทของจุลินทรีย์ดินในการสะสมและแลกเปลี่ยนอินทรียวัตถุในดิน: การศึกษาผลของสารอินทรีย์ต่างคุณภาพในดินทรายภายใต้สภาวะการบ่ม

ลำดับ	กรรมวิธีทดลอง[1/]
1	ดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (C)
2	ดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ + ฟางข้าว (C+RS)
3	ดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ + ซากต้นใบถั่วลิสง (C+GN)
4	ดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ + ซากใบพลวง (C+DP)
5	ดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ + ซากใบมะขาม (C+TM)
6	ดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่ฟางข้าว (NRS)
7	ดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่ฟางข้าว + ฟางข้าว (NRS+RS)
8	ดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่ซากต้นใบถั่วลิสง (NGN)
9	ดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่ซากต้นใบถั่วลิสง + ซากต้นใบถั่วลิสง (NGN+GN)
10	ดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่ซากใบพลวง (NDP)
11	ดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่ซากใบพลวง + ซากใบพลวง (NRDP+DP)
12	ดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่ซากใบมะขาม (NTM)
13	ดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่ซากใบมะขาม + ซากใบมะขาม (NTM+TM)

[1/]C = control soil (C soil), RS = rice straw, GN = groundnut, DP = dipterocarp, TM = tamarind และ N = native soil (N soil)

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในดินจากกรรมวิธีทดลองต่างๆ ทำ 3 ซ้ำ โดยเอนไซม์ที่วิเคราะห์เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสลายตัวและหมุนเวียนคาร์บอน ได้แก่

เอนไซม์ β-glucosidase วัดโดยวิธีของ Tabatabai (1982); Eivazi and Tabatabai (1988) อ้างตาม Alef and Nammipieri,(1995) ทำได้โดยการเติม substrate คือ *p*-nitrophenyl-β-D-glucoside ลงในดินภายใต้สภาวะการบ่มที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดผลผลิตที่เกิดขึ้นคือ *p*-nitrophenol (*p*NP) ซึ่งมีสีเหลืองโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 400 นาโนเมตร

โดยความเข้มของสีขึ้นอยู่กับผลผลิตที่เกิดขึ้น การทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ในการย่อย substrate คือ *p*-nitrophenol

เอนไซม์ invertase การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ invertase ในดินได้รับการศึกษาโดย Ross (1983) และวิธีของ Schinner and Von mersi (1990) อ้างถึงโดย Stemmer et al. (1999) ที่ทำการบ่มดินร่วมกับ substrate คือซูโครส จากนั้นวัดผลผลิตคือน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นซึ่งมีหลายวิธีได้แก่ Molybdenum blue method (Somogyi-Nelson method) หรือ Berliner blue reaction (Schiner and Von mersi, 1990) จากนั้นวัดสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) โดยกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอเตสหนึ่งหน่วยคือจำนวนมิลลิกรัมสมมูลย์ของกลูโคสที่เกิดขึ้นต่อกรัมของ substrate ต่อหน่วยเวลาภายใต้สภาวะการบ่ม (incubated) ที่กำหนด

เอนไซม์ phenoloxidase และ peroxidase การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ในการทดลองนี้ใช้วิธีของ Hendel et al. (2005) ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีความถูกต้อง โดยใช้ substrate คือ L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) เป็นตัวรับอิเลคตรอน (electron-donating substrate) L-DOPA มีคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้และพร้อมที่จะถูกออกซิไดส์ จึงเป็น substrate ที่นิยมใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ในตัวอย่างที่ได้จากสิ่งแวดล้อม เช่น ซากพืช อินทรียวัตถุในดิน หรือน้ำทะเล เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase มีสีแดง โดยสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับผลิตภัณฑ์และสามารถวัดคุณสมบัติของการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร ขณะเดียวกันกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase สามารถทำควบคู่กันกับกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase โดยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) เพื่อเป็น substrate ของ peroxidase

3.2.2 การศึกษาประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

คัดเลือกตัวอย่างดินจำนวน 5 ตัวอย่างจากแปลงทดลองระยะยาว ได้แก่ ดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์มาเป็นระยะเวลา 16 ปี (control soil หรือ C-soil) และดินที่มีการใส่สารอินทรีย์อย่างต่อเนื่องปีละครั้งมาเป็นระยะเวลา 16 ปี ได้แก่ 1) native rice straw (NRS) 2) native groundnut (NGN) 3) native dipterocarp (NDP) และ 4) native tamarind (NTM) นำมาสกัด DNA โดยใช้ชุด kit (Fast DNA Spin Kit) (ภาพผนวกที่ 4) จากนั้นวัดปริมาณของ DNA ที่สกัดได้โดยใช้เครื่อง nanodrop (ภาพผนวกที่ 5) จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนที่สนใจคือ 18s rDNA ที่พบในกลุ่ม fungi mushroom และ actinomycetes โดยใช้ primer forward คือ FF390 และ primer reverse คือ FR1 ซึ่งมีลำดับเบสคือ FF390: cgataacgaacgagacct, rev: aggtctcgttcgttatcg; FR1: aIccattcaatcggtaIt, rev: aItaccgattgaatggIt เพิ่มจำนวนชิ้นยีนโดยใช้เทคนิค RT-PCR ในการเพิ่มชิ้นยีน (ภาพผนวกที่ 6) โดยสภาวะที่ใช้คือ denaturation step: 94ºc/30sec; annealing step: 50ºc/30sec; elongation step: 70ºc/min จำนวน 45 cycle ใช้ SYBR เป็น fluorescent label (ภาพผนวกที่ 5) จากนั้นทำการ

เปรียบเทียบปริมาณ gene copies (log_{10} copies g^{-1} soil DW) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกรรมวิธีการทดลอง

วิเคราะห์โครงสร้างประชากรรา (fungal community structure)โดยใช้เทคนิค terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) ในการบอกความแตกต่างของ community โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 2 ชนิด คือ HAE III และ MSP I ในการตัดลำดับเบสของ PCR product ในตำแหน่งลำดับเบส C | CGG และ GG|CC สำหรับเอนไซม์ HAE III และ MSP I ตามลำดับ จากนั้นเปรียบเทียบ community pattern โดยการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมทางสถิติสำหรับงานทางชีวโมเลกุลได้แก่ Peak Scanner V1.0 และ Primer เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทั้งชนิดและปริมาณของ fungal community ระหว่างกรรมวิธีการทดลอง โดยคำนวณความสูงและพื้นที่ใต้ peak และวิเคราะห์ความคล้ายคลึง (similarities) ของ fungal community ในกรรมวิธีที่ใส่สารอินทรีย์ชนิดเดียวกัน และระหว่างกรรมวิธีที่ใส่สารอินทรีย์ต่างชนิดกันโดยใช้เทคนิค Bray-Curtis และ non-metric multi dimentional scaling