บทที่ 2

วิธีดำเนินงานวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

เห็ดราในเขตพื้นที่ป่าชุมชน อำเภอวชิรบารมี จังหวัดพิจิตร และป่าชุมชนในแถบจังหวัดพิษณุโลก

เชื้อมาตรฐาน *Phanerochete chysosporium* NBRC 31249 และ *Trametes versicolor* NBRC 6482

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเห็ดรา

ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดราในเขตพื้นที่ป่าชุมชน อ.วชิรบารมี จ. พิจิตร และป่าชุมชนในแถบจังหวัดพิษณุโลก จากนั้นถ่ายภาพเห็ดและบันทึกลักษณะบริเวณที่พบเห็ด สังเกตชนิดของดิน โดยรอบ ลักษณะการเกิดของเห็ด เป็นแบบดอกเดี่ยว กลุ่ม หรือขึ้นบนต้นไม้ และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด ลงบนแบบสำรวจเห็ด แล้วเก็บตัวอย่างเห็ดที่สมบูรณ์ทุกระยะ ถ้าเป็นเห็ดราที่ขึ้นบนดินให้ตักเอาดินมาด้วยวางใส่กล่องพลาสติกใส กรณีเห็ดที่ขึ้นบนไม้ให้ตัดเอาทั้งขอนไม้ เพื่อคงสภาพเห็ดราให้สมบูรณ์ที่สุด และใส่หมายเลข รหัส ของเห็ดที่เก็บมา เช่น รหัสเป็นสถานที่ วัน เดือน ปี ที่เก็บ และทำการเลือกดอกเห็ดที่สมบูรณ์และแห้งที่ยังไม่ปล่อยสปอร์ออกหมด ใช้มีดตัดเอาเฉพาะส่วนหมวกเห็ด และวางระหว่างกึ่งกลางกระดาษที่มีสีขาวและสีดำย่างละครึ่งที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยให้ครีบอยู่ด้านล่าง ครอบเห็ดและกระดาษด้วยฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วตรวจดูลักษณะของรอยพิมพ์สีของสปอร์บนกระดาษ เพื่อนำไปใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเห็ดรา และทำการเก็บกระดาษสปอร์ใส่ถุงที่ปราศจากความชื้น

2. การคัดแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

โดยนำเห็ดตัวอย่างที่ทำความสะอาดโดยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) กรณีเป็น fruiting body ให้ตัดเอาเนื้อเยื่อเส้นใยที่ก้านดอก แต่กรณีการแยกเชื้อเห็ดที่ขึ้นบนเนื้อไม้จะต้องตัดอาส่วนของเส้นใยจากเนื้อไม้ที่สะอาดที่สุด มาชุบด้วย Chloral hydrate ($NaCO_3$) เพื่อฆ่าเชื้อแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA (ภาคผนวก ก) ที่ผสม chloramphenical (34 mg/ml) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน และจึงถ่ายเส้นใยลงบนอาหารแข็งสูตร PDA อีก 2 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ เมื่อเส้นใยเจริญ

จึงทำการถ่ายเส้นใยลงในอาหารวุ้นเอียงสูตร PDA ทำอย่างละ 2 ซ้ำ โดยหลอดที่ 1 ใช้เป็นหัวเชื้อและหลอดที่ 2 ใช้ในการทดสอบการสร้าง ligninolytic enzymes และทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ต่อไป

3. การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อเห็ดรา

โดยการตัดเอาส่วนของครีบดอก โดยใช้มีด และใช้ปากคีบเอาชิ้นส่วนมาวางบนสไลด์หยดน้ำกลั่น หรือย้อมสีด้วย Melzer's reagent (ภาคผนวก ข) แล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์หรือทำเทคนิค slide culture โดยนำเส้นใยของเชื้อเห็ดราที่ผ่านการคัดแยกให้บริสุทธิ์บนอาหาร PDA แล้วมาเลี้ยงบนสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อ รอให้เย็นสักครู่ ตัดวุ้นในจานอาหารขนาดเล็ก ให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 0.5 X 0.5 ซม. วางลงตรงกลางสไลด์ที่วางอยู่บนแท่งแก้วรูปตัววีในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อเห็ดรามาแตะที่บริเวณกึ่งกลางด้านข้างของชิ้นวุ้นทั้งสี่ด้าน ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ 95% ลนไฟฆ่าเชื้อ คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ ปิดลงบนชิ้นวุ้นโดยให้ชิ้นวุ้นอยู่กลางแผ่นแก้วปิดสไลด์พอดี วางสำลีที่ชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อพอชื้นลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 ก้อน เพื่อช่วยไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-4 วัน จากนั้นตรวจเชื้อที่เพาะบนสไลด์โดยการเตรียมสไลด์กึ่งถาวร โดยหยด lactophenol cotton blue (ภาคผนวก ข) บนแผ่นสไลด์ที่มีเส้นใย แล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ จากนั้นทาขอบแผ่นแก้วด้วยน้ำยาทาเล็บอย่างใส นำสไลด์มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ เพื่อดูรายละเอียดต่างๆในการใช้จำแนก เช่น เส้นใย เบสิเดียม และสปอร์ เป็นต้น และบันทึกลักษณะของเห็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของตัวอย่างเห็ดโดยใช้ลักษณะและข้อมูลที่สำรวจไว้มาเทียบอ้างอิงกับอนุกรมวิธานของเห็ด เช่น หนังสือเรื่องเห็ดเมืองไทย (อนงค์ จันทร์ศรีกุล,2539) หนังสือคู่มือเห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย (เกษม สร้อยทอง,2537)หนังสือคู่มือเห็ดและราในประเทศไทย (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ,2543) เห็ดกินได้และเห็ดพิษในประเทศไทย(ราชบัณฑิตยสถาน,2539) Mushrooms and Toadstools (Geoffrey, 2009) และ How to identified mushrooms (David and Daniel, 1977ab) และงานวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง เป็นต้น

3. การคัดกรองเชื้อเห็ดราจากแหล่งธรรมชาติที่สามารถสร้าง ligninolytic enzymes โดยการย่อยสลายสีสังเคราะห์

โดยนำเส้นใยเชื้อเห็ดราที่บริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 วัน จากนั้นนำ cork borer เบอร์ 2 (0.5 ซม.) มาตัดที่ปลายของเส้นใย 1 ชิ้น แล้วนำมาวางตรงกลางของจานเพาะเลี้ยงอาหารคัดกรอง (screening medium) ที่ประกอบด้วยอาหารทดสอบ 2 ชนิดคือ อาหารแข็งที่มีแหล่งของไนโตรเจนสูง (high nitrogen) และต่ำ (low nitrogen) ซึ่งผสมสีสังเคราะห์ 3 ชนิด คือ Azuer B, Phenol red, remazol brilliant blue R (RBBR) (ภาคผนวก ก) เพื่อคัดกรองเชื้อเห็ดราที่สามารถสร้างเอนไซม์ 3 ชนิด คือ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) แมกานิสเปอร์ออกซิเดส (MnP) และ แลกเคส (Laccse) ตามลำดับ ตามวิธีการของ Koker และคณะ (2000) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน บันทึกผลการย่อยสลายสีสังเคราะห์แต่ละชนิดโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) ทุกวัน เป็นเวลา 15 วัน แล้วทำการคัดเลือกเชื้อเห็ดราที่ให้ผลบวกกับอาหารคัดกรองที่ดีที่สุดไปย่อยสารประกอบ 2,4- PCB ต่อไป

4. การทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ในอาหาร production medium

ทำการคัดเลือกเชื้อเห็ดราที่ให้ผลบวกกับอาหารคัดกรองที่ดีที่สุดมาทำการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ตามวิธีของ Premjet และคณะ (2009) โดยนำ cork borer เบอร์ 2 (0.5 ซม.) ตัดที่ปลายของเส้นใยเชื้อเห็ดราที่บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 5 ชิ้น มาเพาะเลี้ยงในอาหาร production medium 2 ชนิด (ภาคผนวก ก) เพื่อคัดกรองเชื้อเห็ดราที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ 0.25 mM 2,4-PCB ในขั้นต้น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่เขย่า เป็นเวลา 6 วัน (วางแผนการทดลองแบบ CRD) และหลังจากวันที่ 6 ทำการเติมสารละลาย 2,4-PCB ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25 mM แล้วให้ออกซิเจนบริสุทธิ์ (99% O_2) ด้วยอัตราการไหล 50 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน โดยทำการเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *Phanerochete chysosporium* 31249 และ *Trametes versicolor* ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 15 และ 30 หลังจากเติมสารละลาย 2,4-PCB แล้วนำไปทำการสกัดและวิเคราะห์อัตราการย่อยสลายต่อไป ตามวิธี Premjet และคณะ (2009) ด้วย Conc.H_2SO_4 ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร และสกัดต่อด้วย mixture solution (hexane: acetone ในอัตราส่วน 7:3) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นทำการแยกระหว่าง solvent และ aqueous phase ที่มีเส้นใยเห็ดราออกด้วยกรวยแยกสาร และสกัด aqueous phase ซ้ำอีกครั้งด้วย mixture solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปสกัดให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator

แล้วเติม solvent ให้ได้ปริมาณสาร 5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์การย่อยสลายสาร 2,4-PCB ของเชื้อเห็ดรา ด้วยเครื่อง Gas Chromatography Mass spectrometer (GC/MS) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม ANOVA

5. การเก็บรักษาตัวอย่างเห็ดรา

นำตัวอย่างเห็ดมาทำการอบแห้ง โดยอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชม. หรือนานกว่านี้แล้วแต่ชนิดและลักษณะของเห็ด จากนั้นเก็บเห็ดไว้ในกล่องพลาสติกหรือถุงพลาสติกโดยใส่การบูรเพื่อป้องกันแมลงและใส่ซิลิกาเจลเพื่อป้องกันความ ชื้น หรือการเก็บเส้นใยของเห็ดโดยการทำ Freeze dry โดยการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเชื้อเห็ดในอาหารเหลวน้ำข้าวฟ่างบด ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 15-21 วัน เมื่อเส้นใยเจริญทำการเก็บเส้นใยแล้วชุบด้วย 10 % skim milk เพื่อรักษาสภาพเส้นใย คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วเขี่ยเส้นใยใส่ขวดขนาด 5 มิลลิลิตร ใส่สำลีปลอดเชื้อแล้วปิดฝานำไปแช่ตู้ Freeze ที่ -80 องศาเซลเซียส ประมาณ 10-15 นาที แล้วนำไปทำการ Freeze dye จนกว่าจะแห้ง และนำไปเก็บในที่ปราศจากความชื้น

6. การวางแผนการทดลอง

การทดลองทั้งหมดวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.5 วิเคราะห์ผลแบบ one way anova แล้วเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)