



การศึกษาการคงอยู่ของสปอร์ *Rhizopus oligosporus* บนพื้นรองเท้าที่เดินบนพื้น และระยะทางที่แตกต่างกัน

Investigation of Spores of *Rhizopus oligosporus* Remaining on Shoe Outsoles after Walking on Different Surfaces for Different Distances

กนกวรรณ เนตรชันษ์^{1*} และ จิติ มหาเจริญ¹

¹คณะนิติวิทยาศาสตร์ โรงเรียนนายร้อยตำรวจ นครปฐม 73110

Kanokwan Netkhan^{1*} and Thiti Mahacharoen¹

¹Faculty of Forensic Science, Royal Police Cadet Academy, Nakhon Pathom 73110 Thailand

*Corresponding Author, E-mail: bkk06.kanokwan@gmail.com

Received: 18 May 2021 | Revised: 3 August 2021 | Accepted: 13 August 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการตรวจหาการคงอยู่ของสปอร์ *Rhizopus oligosporus* ในดินที่ติดอยู่ที่พื้นรองเท้าที่เดินเข้าไปบนพื้นที่มีลักษณะแตกต่างกันเป็นระยะทางที่แตกต่างกัน โดยผสมสปอร์ในดินเหนียว ดินร่วน และดินทราย ให้สปอร์ยึดเกาะกับเม็ดดินซึ่งเป็นตัวแทนของดินในธรรมชาติ จากนั้นผู้ทดลองใช้รองเท้าเหยียบดินผสมสปอร์แล้วเดินไปบนพื้นดินลูกรัง พื้นหญ้าและพื้นคอนกรีตเป็นระยะทาง 500 และ 1,000 เมตร แล้วนำไปนับจำนวนสปอร์ที่เหลืออยู่ที่พื้นรองเท้า จากการทดลองพบว่าสปอร์มีการยึดเกาะกับดินเหนียวและดินร่วนดีกว่าดินทรายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเดินเข้าไปบนพื้นที่แตกต่างกัน คือ พื้นดินลูกรัง พื้นหญ้า และพื้นคอนกรีต ทั้งในดินเหนียวและดินร่วนพบว่าจำนวนสปอร์คงเหลือเฉลี่ยหลังเดินเข้าไปบนพื้นดินลูกรังและพื้นคอนกรีตให้ผลแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่การเดินเข้าไปบนพื้นดินลูกรังและพื้นคอนกรีตมีจำนวนสปอร์คงเหลือมากกว่าการเดินเข้าไปบนพื้นหญ้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ และเมื่อเดินเข้าไปเป็นระยะทางที่แตกต่างกันคือ 500 และ 1,000 เมตร พบว่าจำนวนสปอร์คงเหลือในดินเหนียวและดินร่วนหลังเดินเข้าไปบนพื้นดินลูกรัง พื้นหญ้า และพื้นคอนกรีตให้ผลแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

ABSTRACT

This research investigates the adhesion and spores of *Rhizopus oligosporus* remaining on shoe outsoles after walking on different surfaces for different distances. The spores were mixed in clay, loam and sand to adhere to soil particles representing natural soils. The experiment was conducted by wearing shoes and pacing on one of the soil mixtures then walking on gravel, grass and concrete surfaces for distances of 500 and 1,000 meters. The spores remaining on the shoe outsoles were then conducted. It was found that spore adhesion in clay and loam were not different, but they were significantly different from spore adhesion in sand at the statistically significant level of 0.05.

The experiment did not test spores mixed with sand. The spores remaining on shoe outsoles after walking on gravel and concrete were not different. However spores remaining after walking on gravel and concrete were significantly different from walking on grass at the significance level of 0.05. After walking on different surfaces for 500 and 1,000 meters, the results of spores remaining on the outsole of the shoes were not different. Additionally, it was observed that the concentration of spores in the soil mixture were proportional to the detectable spores on the shoe outsoles.

คำสำคัญ: สปอร์ สปอร์คงเหลือ โคลนี พื้นรองเท้า

Keywords: Spores, Remaining Spores, Colony, Shoe Outsoles

บทนำ

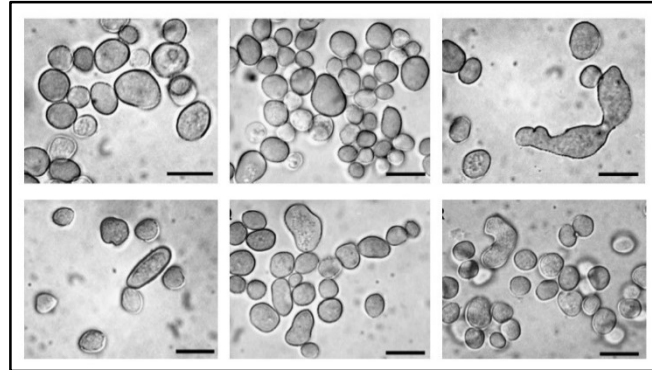
พืชหรือเชื้อราบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในพื้นที่เฉพาะ (Specific area) เช่น พืชน้ำชนิดต่าง ๆ ที่เจริญในน้ำที่มีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน หรือเชื้อราบางชนิด เช่น *Microthyrium inconspicuum* ที่มักพบบนวัสดุที่กำลังย่อยสลาย (Hawksworth et al., 2016) โดยละอองเรณูของพืชหรือสปอร์ราที่จำเพาะนี้เป็นหลักฐานที่ยืนยันการมีอยู่ของมันในสถานที่นั้น ๆ หากมีการพบเห็นสปอร์ราเหล่านี้ไปปรากฏขึ้นยังสถานที่อื่นหรือบนวัตถุอื่นที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของมัน ก็จะต้องชี้ได้ว่าสปอร์นั้นอาจจะถูกนำพาไป (Wiltshire et al., 2015) ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงความเชื่อมโยงระหว่างพยานหลักฐานนี้กับผู้ต้องสงสัย ซึ่งการพิจารณาคดีในศาลของหลาย ๆ ประเทศก็ได้มีการรับพิจารณาพยานหลักฐานประเภทนี้ ทำให้ผู้กระทำความผิดยอมรับสารภาพ เพราะจำนนต่อหลักฐาน อันได้แก่ สปอร์ราหรือละอองเรณูของพืชและนำผู้กระทำความผิดมาลงโทษทางกฎหมายได้ ซึ่งการศึกษาทางด้านนิติพิษวิทยาในประเทศไทยยังอยู่ในวงแคบแม้แต่ในต่างประเทศเองก็ยังมีผู้ศึกษาน้อย ทั้งนี้เนื่องจากเจ้าหน้าที่ของหน่วยงานภาครัฐที่ปฏิบัติหน้าที่เกี่ยวกับการค้นหาพยานหลักฐานยังมีความรู้ความเข้าใจในทางพิษวิทยาไม่มากนัก ทำให้พยานหลักฐานเหล่านี้ไม่เกิดคุณค่าในทางคดี (Margiotta et al., 2015) โดยการศึกษาวิทยาเห็ดราจะเน้นศึกษาทางด้านเห็ดและเชื้อรา ส่วนการศึกษาเรณูวิทยา จะเน้นศึกษาเกี่ยวกับเรณูและสปอร์พืช ทั้งสองส่วนนี้เป็นส่วนย่อยของสาขาวิชาพิษวิทยา การนำความรู้ทางพิษวิทยามาใช้ในกระบวนการยุติธรรมจึงถูกเรียกว่า นิติพิษวิทยา มีรายงานของต่างประเทศจำนวนมากที่มีการนำพยานหลักฐานทางพิษวิทยาไปใช้ในชั้นศาล ตัวอย่างเช่น หากมีการตรวจพบสปอร์เชื้อราที่พื้นรองเท้า แม้ว่าจะมีการเดินย่ำไปบริเวณต่าง ๆ บนพื้นผิวลักษณะแตกต่างกัน ในระยะทางที่แตกต่างกันด้วย ก็จะเป็นอีกหนึ่งหลักฐานที่จะช่วยให้

ยืนยันได้ว่ามีการเดินทางไปยังพื้นที่เกิดเหตุ และได้นำพยานหลักฐานที่มองไม่เห็นติดกลับมาด้วยนั่นเอง (Wiltshire et al., 2015) ทำให้ผู้กระทำความผิดยอมรับสารภาพและได้รับการลงโทษตามกฎหมายในท้ายที่สุด ขณะเดียวกันในประเทศไทยเองซึ่งอุดมสมบูรณ์ไปด้วยพืชพรรณอันนำมาซึ่งความหลากหลายของราและพืชนั้น กลับมีการนำความรู้ทางด้านนี้ไปประยุกต์ใช้ในทางกฎหมายค่อนข้างน้อย ซึ่งอาจจะทำให้หลาย ๆ คดีไม่สามารถคลี่คลายได้ จนอาจจะนำไปสู่การถูกยกฟ้องในชั้นศาลได้ เนื่องจากไม่มีพยานหลักฐานเพียงพอ ดังนั้นการศึกษาทางด้านนิติพิษวิทยาในประเทศไทยจึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก

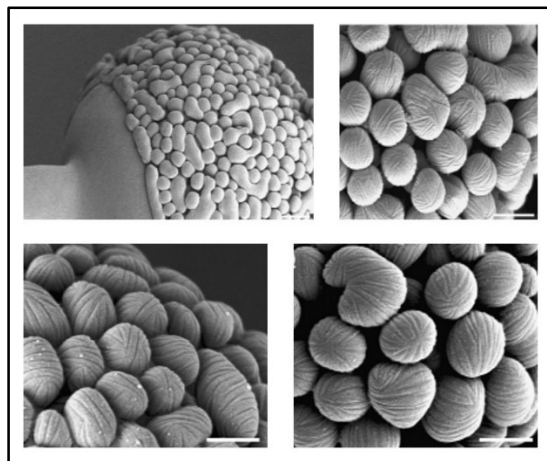
งานวิจัยนี้จึงศึกษาการคงอยู่ของสปอร์ราที่พื้นรองเท้าที่มีการเดินย่ำไปบนพื้นลักษณะต่าง ๆ ในระยะทางการเดินเดินย่ำที่แตกต่างกัน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงผลของระยะทางและลักษณะของพื้นที่เดินย่ำต่อการคงอยู่ของสปอร์ที่พื้นรองเท้า โดยระยะทางที่ใช้ในการศึกษาคือ 500 และ 1,000 เมตร เนื่องจากเป็นระยะทางที่ไม่ไกลเกินไปที่คนจะนิยมเดินมากกว่าการใช้นานพาหนะ และสปอร์ราที่เลือกใช้คือสปอร์ของ *Rhizopus* sp. เนื่องจากราสายพันธุ์นี้พบเห็นได้ง่ายในธรรมชาติ สามารถเจริญได้บนอาหารที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นขนมปัง ผัก หรือผลไม้ที่กำลังย่อยสลาย รวมถึงราสกุลนี้ก็ยังคงถูกนำไปใช้ในหลาย ๆ อุตสาหกรรม และถึงแม้จะเป็นราสกุลเดียวกันแต่ต่างสปีชีส์ รูปร่างสปอร์ก็จะแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ด้วย งานวิจัยนี้ผู้วิจัยเลือกใช้สปอร์ของ *Rhizopus oligosporus* เนื่องจากมีลักษณะพิเศษที่แตกต่างจาก *Rhizopus* ตัวอื่นคือสปอร์ของมัน 10 - 31 % เป็นสปอร์ที่มีขนาดใหญ่และมีรูปร่างผิดปกติ ซึ่งคาดว่าเป็นธรรมชาติของการสร้างสปอร์ของราสปีชีส์นี้ (Jennessen et al., 2008) (รูปที่ 1 และ 2) จึงสามารถแยก *R. oligosporus* ออกจาก *Rhizopus* ตัวอื่นได้ง่าย

งานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการพิจารณาการหา
พยานหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ได้ โดยมุ่งหวังว่าผลงานวิจัยนี้จะ
เป็นประโยชน์ต่องานด้านนิติพิษศาสตร์ในประเทศไทยต่อไป

อีกทั้งเกิดวิธีการที่เป็นทางเลือกใหม่ในการตรวจหาพยาน
หลักฐานที่มีคุณค่าในกระบวนการยุติธรรมได้



รูปที่ 1 รูปร่างสปอร์ *R. oligosporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แสดงให้เห็นขนาดและรูปร่างที่ต่างกัน (bar = 10 ไมโครเมตร) (Jennessen et al., 2008)



รูปที่ 2 รูปร่างสปอร์ *R. oligosporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงให้เห็นขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกันแบบ 3 มิติ (bar = 5 ไมโครเมตร) (Jennessen et al., 2008)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เตรียมดินปลอดเชื้อ

ดินที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ดินเหนียว ดินร่วน และดิน
ทราย ซึ่งดินแต่ละชนิดจำเป็นต้องกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่
เนื้อดินนั้น ๆ ออกและทำให้ปลอดเชื้อก่อนจึงจะนำไปผสมกับ
สปอร์ที่จะใช้ในการทดลองนี้ได้ ซึ่งมีขั้นตอนคือ นำดินแต่ละชนิด
มาร้อนผ่านมุ้งตาข่ายในลอนเพื่อกำจัดกรวดและเศษวัสดุที่ไม่ใช่
ดินออก ให้เหลือแต่เพียงอนุภาคดินที่ต้องการแล้วใส่กะละมังแยก
ชนิดดินไว้ จากนั้นนำดินแต่ละชนิดไปซั้งใส่ถุงพลาสติกถุงละ 100
กรัม แล้วนำถุงใส่ดินทั้งหมดใส่ลงในถุงพลาสติกอีก 1 ชั้น เป็น
การซ้อนถุง จากนั้นไล่อากาศออกจากถุงให้หมดหรือให้มีอากาศ

คงเหลืออยู่ปริมาณน้อยที่สุดแล้วมัดปากถุงให้สนิท (ต้องไล่
อากาศออกจากถุงพลาสติกทุกครั้ง เนื่องจากเมื่อนำดินไปนึ่งฆ่า
เชื้อ ความร้อนจะทำให้ถุงพองขยายขึ้นและอาจจะทำให้เกิดการ
ระเบิดในขณะนึ่งจนทำให้ดินรั่วออกมาจากถุงพลาสติกได้) นำถุง
ใส่ดินไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ
121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา
20 นาที พักดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน
24 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์ของจุลินทรีย์ในดินที่ทนต่อความร้อนและ
ไม่ถูกทำลายจากการนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกนั้นได้เจริญออกมา นำดิน
ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วครั้งแรกไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดจุลินทรีย์
ที่ยังตกค้างอยู่ในดิน

2. เตรียมสารแขวนลอยสปอร์

สารแขวนลอยสปอร์จะถูกนำไปผสมกับดินเพื่อเป็นตัวแทนของสปอร์ในธรรมชาติ สปอร์ที่ใช้ในการทดลองเป็นของ *R. oligosporus* ที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะ Hygromycin ซึ่งได้รับมาจาก Assoc. Prof. Dr. Thongchai Taechowisan, Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn University. ใช้ในการคัดเลือก *R. oligosporus* ที่ใช้ทดลองออกจาก *R. oligosporus* ในธรรมชาติ

ขั้นตอนการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์คือ นำเชื้อราตั้งต้นมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (หรือจนกว่าเชื้อราจะสร้างสปอร์ที่มีลักษณะเป็นสีดำ) จากนั้นเติม Tween 80 เข้มข้น 0.1% ใส่ลงในจานอาหารที่เชื้อราเจริญอยู่ นำลูปหรือเข็มเย็บเย็บที่ปลอดเชื้อขูดสปอร์สีดำให้หลุดออกมาระบายในสารละลาย แล้วถ่ายสารใส่ในหลอดทดลองปลอดเชื้อให้ได้ประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วทำให้ยับสปอร์แตกโดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Vortex mixer) เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารแขวนลอยสปอร์ จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้ไปนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ ปรับความเข้มข้นด้วย Tween 80 เข้มข้น 0.1% ให้ได้ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หากสารแขวนลอยมีความเจือจางมากเกินไป ให้ตั้งหลอดทดลองพักไว้ให้สปอร์ตกตะกอนแล้วถ่ายส่วนใสออก หากเข้มข้นมากเกินไปให้เติม Tween 80 เข้มข้น 0.1% ลงไปอีก ต้องเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ให้เพียงพอที่จะใช้ผสมกับดิน

3. เตรียมดินผสมสปอร์

นำสารแขวนลอยสปอร์ไปผสมกับดินที่เตรียมไว้ โดยดิน 100 กรัม ผสมกับสารแขวนลอยสปอร์ 10 มิลลิลิตร

4. การเตรียมร่องเท้าปลอดเชื้อ

ร่องเท้าที่ใช้ในการทดลองเป็นร่องเท้าแตะที่ทำจากโพลีพลาสติกขนาดตามมาตรฐาน US คือ 10.5 สามารถหาซื้อได้ทั่วไปตามท้องตลาดและร้านสะดวกซื้อ นำมาทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดลองโดยผู้ทดลองคนเดิม ร่องเท้า 2 คู่ ขนาดและยี่ห้อเดียวกัน

5. วิธีการทดลอง

นำถุงพลาสติกห่อภาตสดแนลส แล้วเทดินที่ผสมสปอร์ลงในภาต จากนั้นผู้ทดลองสวมรองเท้าปลอดเชื้อย่างบนดินนั้นประมาณ 1 นาที จนแน่ใจว่าดินติดทั่วพื้นรองเท้าแล้วเดินย่ำไปบนพื้นที่มีลักษณะแตกต่างกันเป็นระยะทาง 500 และ 1,000 เมตร ถอดรองเท้าออก นำก้านสำลีปลอดเชื้อชุบน้ำกลั่นปลอดเชื้อเช็ดเก็บดินที่พื้นรองเท้าให้ทั่วรวมถึงขอบและซอกรองเท้าด้วย ตัดหัวสำลีใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ แขนงสำลีให้คลายตัวแล้วปั่นด้วย Vortex mixer เพื่อให้สปอร์หลุดออกจากหัวสำลี นำไปนับจำนวนสปอร์ของ *R. oligosporus* ที่คงเหลือด้วยวิธี Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การทดลองนี้แยกขาดจากกันในแต่ละตัวแปร ต้องทำการย่ำดินผสมสปอร์ใหม่ทุกครั้งเมื่อมีการเปลี่ยนตัวแปร ผู้ทดลองเป็นบุคคลคนเดียวตลอดการทดลอง เพศหญิง อายุ 26 ปี ส่วนสูง 165 เซนติเมตร น้ำหนัก 57 กิโลกรัม

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 20 โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One - Way ANOVA)

ผลการวิจัย

1. ผลของชนิดดินต่อการคงอยู่ของสปอร์ที่พื้นรองเท้า

เมื่อชั่งน้ำหนักดินที่ผสมสปอร์ของ *R. oligosporus* ปริมาณ 1 กรัม ไปนับจำนวนสปอร์ แล้วนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าการยึดเกาะของสปอร์ในดินทรายแตกต่างจากในดินเหนียวและดินร่วนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (p -value = 0.027 และ 0.022 ตามลำดับ) ส่วนการยึดเกาะของสปอร์ในดินเหนียวและดินร่วนไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1)

ในการทดลองเดินย่ำบนพื้นที่มีลักษณะแตกต่างกันเป็นระยะทางที่ต่างกันจึงไม่ได้ทดลองในดินทราย เนื่องจากสปอร์ที่ยึดเกาะกับอนุภาคของดินทรายมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับดินร่วนและดินเหนียว อาจทำให้มีสปอร์คงเหลือที่พื้นรองเท้าน้อยจนไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี spread plate ได้

ตารางที่ 1 จำนวนสปอร์คงเหลือที่พื้นรองเท้าในดินแต่ละชนิด

ชนิดดิน	สปอร์คงเหลือเฉลี่ย (cfu/ml)
ดินเหนียว	18,666 ± 6429 ^A
ดินร่วน	19,333 ± 6506 ^A
ดินทราย	6,000 ± 1000 ^B

หมายเหตุ สปอร์คงเหลือที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวสดมภ์ หมายความว่า แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2. ผลของลักษณะพื้นที่เดินย่ำต่อการคงอยู่ของสปอร์ที่พื้นรองเท้า

ผลของลักษณะพื้นที่เดินย่ำต่อการคงอยู่ของสปอร์ในดินเหนียวที่พื้นรองเท้าพบว่าที่ระยะทางการเดินย่ำ 500 เมตร สปอร์ที่คงเหลือจากการเดินย่ำไปบนพื้นหญ้าแตกต่างจากการเดินย่ำไปบนพื้นดินลูกรังและพื้นคอนกรีตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (p - value = 0.033 และ 0.006 ตามลำดับ) ส่วนสปอร์ที่คงเหลือจากการเดินย่ำไปบนพื้นดินลูกรังและพื้นคอนกรีตไม่แตกต่างกัน ที่ระยะทางการเดินย่ำ 1,000 เมตร ให้ผลเช่นเดียวกัน คือ สปอร์ที่คงเหลือจากการเดินย่ำไปบนพื้นหญ้าแตกต่างจากการเดินย่ำไปบนพื้นดินลูกรังและพื้นคอนกรีตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (p - value = 0.036 และ 0.013 ตามลำดับ) (ตารางที่ 2)

ผลของลักษณะพื้นที่เดินย่ำต่อการคงอยู่ของสปอร์ในดินร่วนที่พื้นรองเท้าพบว่าที่ระยะทางการเดินย่ำ 500 เมตร สปอร์ที่คงเหลือจากการเดินย่ำไปบนพื้นดินลูกรังและพื้นหญ้าไม่แตกต่างกัน สปอร์ที่คงเหลือจากการเดินย่ำไปบนพื้นหญ้าและ พื้นคอนกรีต

ไม่แตกต่างกัน แต่สปอร์ที่คงเหลือจากการเดินย่ำไปบนพื้นคอนกรีตแตกต่างจากการเดินย่ำไปบนพื้นดินลูกรังอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (p - value = 0.041) ที่ระยะทางการเดินย่ำ 1,000 เมตร ให้ผลต่างออกไป คือ สปอร์ที่คงเหลือจากการเดินย่ำไปบนพื้นดินลูกรังแตกต่างจากการเดินย่ำไปบนพื้นหญ้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (p - value = 0.037) สปอร์ที่คงเหลือจากการเดินย่ำไปบนพื้นหญ้าและพื้นคอนกรีตไม่แตกต่างกัน และสปอร์ที่คงเหลือจากการเดินย่ำไปบนพื้นคอนกรีตและพื้นดินลูกรังก็ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

3. ผลของระยะทางต่อการคงอยู่ของสปอร์ที่พื้นรองเท้า

ผลของระยะทางต่อการคงอยู่ของสปอร์ในดินที่พื้นรองเท้าภายหลังเดินย่ำไปบนพื้นที่มีลักษณะแตกต่างกัน พบว่าจำนวนสปอร์ในดินเหนียวที่พื้นรองเท้าภายหลังเดินย่ำไปบนพื้นดินลูกรัง พื้นหญ้า และพื้นคอนกรีต เป็นระยะทาง 500 และ 1,000 เมตร คงเหลือแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สปอร์คงเหลือในดินร่วนที่พื้นรองเทาก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลของลักษณะพื้นที่เดินย่ำต่อการคงอยู่ของสปอร์ในดินที่พื้นรองเท้า

ชนิดดินที่ผสมสปอร์	ระยะทาง	ลักษณะพื้นที่เดินย่ำ	สปอร์คงเหลือเฉลี่ย (cfu/ml)
ดินเหนียว	500 เมตร	พื้นดิน	625 ± 247 ^A
		พื้นหญ้า	75 ± 35 ^B
		พื้นคอนกรีต	1075 ± 35 ^A
	1,000 เมตร	พื้นดิน	450 ± 141 ^a
		พื้นหญ้า	25 ± 35 ^b
		พื้นคอนกรีต	650 ± 141 ^a
ดินร่วน	500 เมตร	พื้นดิน	375 ± 106 ^A
		พื้นหญ้า	100 ± 0 ^{AB}
		พื้นคอนกรีต	75 ± 106 ^B
	1,000 เมตร	พื้นดิน	425 ± 176 ^a
		พื้นหญ้า	50 ± 0 ^b
		พื้นคอนกรีต	375 ± 35 ^a

หมายเหตุ สปอร์คงเหลือที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวสดมภ์ หมายความว่า แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 3 ผลของระยะทางต่อการคงอยู่ของสปอร์ในดินที่พื้นรองเท้า

ชนิดดินที่ผสมสปอร์	ลักษณะพื้นที่เดินยา	ระยะทาง (เมตร)	สปอร์คงเหลือเฉลี่ย (cfu/ml)	
ดินเหนียว	พื้นดินลูกรัง	500	625 ± 247 ^A	
		1,000	450 ± 141 ^A	
	พื้นหญ้า	500	75 ± 35 ^B	
		1,000	25 ± 35 ^B	
ดินร่วน	พื้นดินลูกรัง	500	1075 ± 35 ^C	
		1,000	650 ± 141 ^C	
	พื้นหญ้า	500	375 ± 106 ^a	
		1,000	425 ± 176 ^a	
	พื้นคอนกรีต	500	100 ± 0 ^b	
		1,000	50 ± 0 ^b	
		พื้นคอนกรีต	500	75 ± 106 ^c
			1,000	375 ± 35 ^c

หมายเหตุ สปอร์คงเหลือที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวสดมภ์ หมายความว่า แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

วิจารณ์ผลการวิจัย

1 ชนิดดินต่อการคงอยู่ของสปอร์ที่พื้นรองเท้า

อนุภาคของดินแต่ละชนิดนั้นมีขนาดต่างกัน ในดินปริมาณเท่ากัน ดินที่มีอนุภาคขนาดเล็กกว่าจะมีพื้นที่ผิวรวมกันมากกว่า ดินเหนียวและดินร่วนนั้นมีอนุภาคที่เล็กกว่าดินทราย อนุภาคทราย มีขนาด 0.05 - 2.0 มิลลิเมตร ขณะที่ดินเหนียวมีขนาดประมาณ 0.002 มิลลิเมตร (Kalev and Toor, 2018) ส่วนดินร่วนมีส่วนประกอบที่เป็นดินเหนียวในปริมาณที่สูงและเศษซากอินทรีย์วัตถุ จึงมีเนื้อละเอียด และมีขนาดใกล้เคียงกับดินเหนียว (สำนักสำรวจและวิจัยทรัพยากรดิน, ม.ป.ป.) ดังนั้น ในปริมาณที่เท่ากัน ดินที่มีอนุภาคขนาดใหญ่กว่าจะมีพื้นที่ผิวของอนุภาครวมกันน้อยกว่าดินที่มีอนุภาคเล็กกว่า การยึดเกาะของสปอร์ *R. oligosporus* ในดินทรายจึงมีน้อยกว่าในดินเหนียวและดินร่วน หากเดินยาไปบนดินทราย โอกาสที่จะพบสปอร์คงเหลือที่พื้นรองเท้าจึงน้อยกว่าการเดินยาไปบนดินเหนียวและดินร่วน

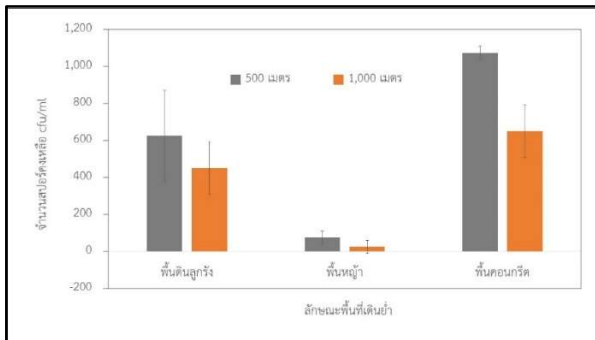
2. ลักษณะพื้นที่เดินยาต่อการคงอยู่ของสปอร์ที่พื้นรองเท้า

จำนวนสปอร์คงเหลือที่พื้นรองเท้าภายหลังเดินยาไปบนพื้นที่มีลักษณะแตกต่างกันมีค่าที่ไม่คงที่ แต่เมื่อนำไปสร้างแผนภูมิจะพบว่าจำนวนสปอร์คงเหลือภายหลังการเดินยาไปบนพื้นดินและพื้นคอนกรีตนั้นมีมากกว่าพื้นหญ้าอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 3) เมื่อนำผลทางสถิติมาพิจารณาพร้อมกับแผนภูมิเปรียบเทียบจึงสามารถสรุปได้ว่า โอกาสที่จะพบสปอร์คงเหลือที่พื้นรองเท้าภายหลังเดินยาไปบนพื้นหญ้านั้นมีน้อยกว่าเมื่อเดินยา

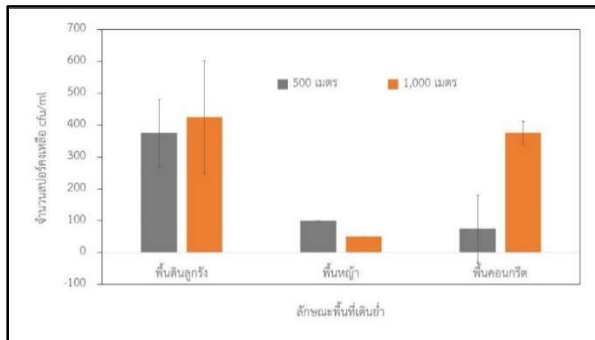
ไปบนพื้นดินลูกรังและพื้นคอนกรีต ส่วนการที่จะพบสปอร์คงเหลือที่พื้นรองเท้าภายหลังเดินยาไปบนพื้นดินลูกรังและพื้นคอนกรีตมีโอกาสพอ ๆ กัน สามารถอธิบายได้ว่า หญ้าเป็นพืชที่มีความยืดหยุ่นและมีใบเรียวยาวแหลม (พืชเกษตร, 2559) การเดินยาไปบนพื้นหญ้าจึงทำให้เกิดการเสียดสีที่มากกว่าการเดินยาไปบนพื้นดินลูกรังและพื้นคอนกรีต เนื่องจากใบที่เรียวยาวแหลมนั้นสามารถทิ่มแทงเข้าไปยังจุดที่ลึกกว่าได้ นอกจากนี้ลำต้นหญ้าก็เสียดสีกับขอบรองเท้าเมื่อมีการเดินยา ทำให้ใบหญ้านั้นพาเอาดินที่มีสปอร์ที่ติดอยู่กับพื้นรองเท้าหลุดออกไปได้ง่ายนั่นเอง นอกจากนี้กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์พืชยังทำให้เกิดการระเหยหรือการคายน้ำออกมาทางใบ (อักษร, 2529) ทำให้ใบหญ้านั้นมีความชื้นอยู่ ความชื้นเพียงเล็กน้อยนี้ก็สามารถที่จะชะดินที่มีสปอร์ให้หลุดจากพื้นรองเท้าได้เช่นกัน ซึ่งผลการทดลองทั้งหมดนี้สอดคล้องกับคดีหลาย ๆ คดี ยกตัวอย่าง การนำสปอร์ราและละอองเรณูมาคลี่คลายคดีลึกลับทรัพย์ (Hawksworth and Wiltshire, 2015) ชายสูงอายุและภรรยาถูกทำร้ายจนตาย เหตุเกิดที่บ้านของพวกเขาเองที่เมืองลิงคอล์นเชอร์ รัฐอิลลินอยส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา ในสถานที่เกิดเหตุพบสปอร์รา 29 ชนิด ซึ่ง 28 ใน 29 ชนิดนี้พบที่รองเท้าบูทของผู้ต้องสงสัยและรถยนต์ที่ใช้หลบหนี ผู้ต้องสงสัยจึงยอมรับสารภาพ นั่นคือสปอร์ราที่ติดไปกับรองเท้ายังสามารถตรวจพบได้อยู่ และอีกคดีคือคดีฆาตกรรมหญิงสาวที่วังเวียนในเมืองดันดี ประเทศสกอตแลนด์ (Wiltshire et al., 2015) เมื่อพบว่าหญิงสาวหายตัวไปและพบเป็นศพอยู่ในป่า

ติดกับวงเวียนในตัวเมือง และคนที่ถูกสงสัยคือเพื่อนหนุ่มของเธอ ที่พบกันในไนท์คลับแห่งหนึ่งที่อยู่ไม่ไกลจากสถานที่เกิดเหตุ ละอองเรณูและสปอร์ราจากเสื้อผ้าของศพ สถานที่เกิดเหตุ และรองเท้าของผู้ต้องสงสัยถูกนำมาทำรายการเปรียบเทียบ แม้ว่ารองเท้าที่เขาสวมใส่ในคืนนั้นจะมีการเดินย่ำต่อไปบนทางเท้าแล้ว ขึ้นรถไปจนถึงที่พัก และไม่มีการสวมใส่อีกเลย พบว่ารองเท้า นั้นยังสามารถตรวจพบละอองเรณูและสปอร์ราที่สอดคล้องกันกับ

เสื้อผ้าของศพและสถานที่เกิดเหตุ ศาลได้พิจารณาพยานหลักฐานนี้และตัดสินจำคุกตลอดชีวิต ดังนั้น แม้ว่าผู้กระทำผิดจะเดินเท้าไปเป็นระยะทางไกลหรือเดินย่ำไปบนพื้นที่มีลักษณะแตกต่างกัน ก็ยังมีโอกาสที่จะพบสปอร์หรือละอองเรณูอันเป็นพยานหลักฐานขนาดเล็กและมองไม่เห็นนี้ได้ มันเป็นพยานหลักฐานที่แม้แต่ผู้กระทำผิดเองก็คาดไม่ถึง



(A)



(B)

รูปที่ 3 แผนภูมิจำนวนสปอร์คงเหลือเฉลี่ย (cfu/ml) ในดินเหนียว (A) และดินร่วน (B) ที่พื้นรองเท้าภายหลังเดินย่ำไปบนพื้นดินลูกรัง พื้นหญ้า และพื้นคอนกรีต เป็นระยะทาง 500 และ 1,000 เมตร

3 ระยะทางต่อการคงอยู่ของสปอร์ที่พื้นรองเท้า

ระยะทางที่ต่างกันแต่จำนวนสปอร์คงเหลือไม่แตกต่างกันนั้นสามารถอธิบายได้ว่าสปอร์ที่ผสมกับดินที่พื้นรองเท้านั้นได้ถูกเสียดสีออกไปหมดแล้วก่อนจะเดินย่ำไปถึงระยะทาง 500 เมตร แต่สปอร์ที่คงเหลืออยู่เป็นสปอร์ที่อยู่พันตำแหน่งที่ถูกเสียดสีกับพื้น อันได้แก่ บริเวณซอกลิคหรือบริเวณขอบรองเท้า ทำให้ยังคงมีสปอร์หลงเหลือให้ตรวจสอบได้พบ ดังนั้นการตรวจสอบหาสปอร์ที่พื้นรองเท้า นอกจากบริเวณพื้นรองเท้าโดยตรงแล้ว บริเวณอื่นที่ติดสามารถพาสปอร์ไปติดค้างอยู่ได้นั้นก็เป็นจุดที่น่าสนใจ เช่น ซอกลิคต่าง ๆ ขอบรองเท้า ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

สรุปผลการวิจัย

สปอร์ของ *R. oligosporus* มีการยึดเกาะกับอนุภาคดินเหนียวและดินร่วนดีกว่าอนุภาคของดินทราย ดังนั้นโอกาสที่จะพบสปอร์ที่พื้นรองเท้าจากการเดินย่ำไปบนดินทรายจึงเป็นไปได้น้อยกว่าดินชนิดอื่น

ลักษณะพื้นที่เดินย่ำและระยะทางมีผลต่อการคงอยู่ของสปอร์ *R. oligosporus* ที่พื้นรองเท้า การเดินย่ำไปบนพื้นดินลูกรังและพื้นคอนกรีตมีสปอร์คงเหลือที่พื้นรองเท้าไม่แตกต่างกัน

แต่มีสปอร์คงเหลือมากกว่าการเดินย่ำไปบนพื้นหญ้า และที่ระยะทางการเดินย่ำที่ 500 และ 1,000 เมตร มีสปอร์คงเหลือไม่แตกต่างกัน โอกาสจะพบสปอร์คงเหลือมากขึ้นจึงต้องเป็นระยะทางการเดินย่ำที่น้อยกว่า 500 เมตร และจุดที่ไม่ควรมองข้ามคือบริเวณที่อยู่ลึกเข้าไปหรือซอกรองเท้าที่พื้นจะพาสปอร์ไปติดอยู่และไม่หลุดออกไปขณะเดิน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการและสถานที่ทำการวิจัย รวมถึงอาจารย์และเจ้าหน้าที่ที่ได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลือตลอดการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

พิชเกษตร. (2559). ฐานานวลน้อย ประโยชน์ และการปลูกหญ้านวลน้อย. แหล่งข้อมูล : <https://puechkaset.com/ฐานานวลน้อย>. ค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2563.
 อักษร ศรีเปล่ง. (2521). พฤษศาสตร์ทั่วไป. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- สำนักสำรวจและวิจัยทรัพยากรดิน. (ม.ป.ป.). ความรู้เรื่องดินสำหรับเยาวชน. กรมพัฒนาที่ดิน, แหล่งข้อมูล : http://oss101.ldd.go.th/web_soils_for_youth/pdf/D_easypoils_editvol2.pdf. ค้นเมื่อ 15 มิถุนายน 2564.
- Hawksworth, D. L., and Wiltshire, P. E. J. (2015). Forensic mycology: current perspectives. *Research and Reports in Forensic Medical Science* 5: 75-83.
- Hawksworth, D. L., Wiltshire P. E. J., and Webb, J. A. (2016). Rarely reported fungal spores and structures: an overlooked source of probative trace evidence in criminal investigations. *Forensic Science International* (264): 41-46.
- Jennessen, J., Schnurer, J., Olsson, J., Samson, R. A., and Dijksterhuis, J. (2008). Morphological characteristics of sporangiospores of the temperate fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group. *Mycological research* 112: 547-563.
- Kalev, S. D., and Toor, G. S. (2018). The Composition of Soils and Sediments. *Green Chemistry An Inclusive Approach* 339-357.
- Margiotta, G., Bacaro, G., Carnevali, E., Severini, S., Bacci, M., and Gabbriellini, M. (2015). Forensic botany as a useful tool in the crime scene: Report of a case. *Journal of Forensic and Legal Medicine* (34): 24-28.
- Wiltshire, P. E. J., Hawksworth, D. L., Webb, J. A., and Edwards, K. J. (2015). Two sources and two kinds of trace evidence: enhancing the links between clothing, footwear and crime scene. *Forensic Science International* (254): 231-242.

