

การทดสอบคัดตราเพื่อใช้ในการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรน



นางสาวสิริกุล วัฒนานนทิกิจ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5045-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FUNGAL SCREENING FOR DIBENZOFURAN DEGRADATION



Miss Sirikun Watthananonkit

สถาบันวิทยบริการ

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Environmental Science (Inter-Department)

Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2003
ISBN 974-17-5045-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทดสอบคัดตราเพื่อใช้ในการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรน
โดย	นางสาวสิริกุล วัฒนานนท์กิจ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยระดับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. สุชาติดา กิระนันท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อรทัย ชวาลภาฤทธิ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

สิริกุล วัฒนานนท์กิจ : การทดสอบคัดสรรเพื่อใช้ในการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรน.
(FUNGAL SCREENING FOR DIBENZOFURAN DEGRADATION) อ. ที่ปรึกษา : ผู้
ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, 104 หน้า. ISBN 974-17-5045-5.

จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น Czapek Dox agar และ malt extract agar ซึ่งมีสี Remazol Brilliant Blue R (RBBR) เป็นอินดิเคเตอร์ ในการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินจำนวน 5 ตัวอย่างได้คัดเลือกรว 13 สายพันธุ์มาทดสอบเบื้องต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium (MM) ได้รว 5 สายพันธุ์ ได้แก่ A3 C8 C10 L1 และ L10 โดยวันที่ 7 รว A3 C8 และ L10 สามารถย่อยสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ได้ 40.25% 62.99% และ 96.20% ตามลำดับเมื่อเทียบกับสีตั้งต้น ส่วนรว C10 และ L1 สามารถย่อยสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium (LN) ในวันที่ 7 ได้ 96.87% และ 92.84% ตามลำดับเมื่อเทียบกับสีตั้งต้น เมื่อนำรวทั้ง 5 สายพันธุ์มาทดสอบในอาหารเดิมโดยใช้ไดเบนโซฟูแรนแทนสี พบว่าในวันที่ 7 มีรว A3 C8 และ C10 เท่านั้นที่สามารถย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนได้ 44.30% 66.41% และ 56.07% ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของรว A3 และ C10 พบสารมัยครันที่มีสีเหลืองเกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่พบการสะสมของสารมัยครันในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของรว C8 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (Internal Transcribed Spacer) ของรว C8 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Trametes* sp. C30 95%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2546

4389106020: MAJOR INTER-DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEY WORD: FUNGI / REMAZOL BRILLIANT BLUE R / DIBENZOURAN / DIOXIN / DEGRADATION / BIODEGRADATION / *Trametes* sp. C30

SIRIKUN WATTHANANONKIT : FUNGAL SCREENING FOR DIBENZOFURAN DEGRADATION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D., 104 pp. ISBN 974-17-5045-5.

Using double layers agar with Remazol Brilliant Blue R (RBBR) containing Czapek Dox agar and malt extract agar, 13 fungal isolates were obtained from 5 soil samples. These isolates were primarily tested by using Mineral Salt Medium (MM) A3, C8, C10, L1 and L10 showed efficiency in RBBR degradation. After incubation of A3, C8 and L10 for 7 days in MM RBBR was degraded 40.25%, 62.99% and 96.20% of the initial concentration respectively. For C10 and L1 in Low-Nitrogen Basal III Medium (LN) RBBR was degraded 96.87% and 92.84% of the initial RBBR in 7 days. Each strains were tested further for their ability in degrading dibenzofuran using the appropriate method. The result showed that only A3, C8 and C10 could degrade dibenzofuran at 44.30%, 66.41% and 56.07% of the control respectively in 7 days. During incubation culture medium of A3 and C10, yellow color intermediate appeared. In case of C8, no intermediate was detected. From morphology and ITS sequence comparison, the C8 95% was similar to *Trametes* sp. C30.

Inter-department of Environmental science

Student's signature.....

Field of study Environmental science

Advisor's signature.....

Academic year 2003

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โสมชิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและคำปรึกษาแนวทางในการทำงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขจนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา ประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึงรองศาสตราจารย์ อรทัย ชวาลภาฤทธิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ที่กรุณาสละเวลามาร่วมเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ช่วยทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมูลนิธิชิน โสภณพนิช ที่ให้ทุนในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ในการวิจัย รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ในการให้ใช้อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ห้องครัวในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน รวมถึงขอขอบคุณพี่อิวเจ้าหน้าที่สหสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมที่คอยให้ความสะดวกในด้านต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ คุณสุนันท์ และคุณรุจิพร เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณวิวัฒน์ จิระประเสริฐกุล และคุณบัทมาพร ประชุมรัตน์ เพื่อนร่วมทุกข์ร่วมสุข ที่คอยให้ความช่วยเหลือทุกด้าน ให้คำปรึกษาแนะนำ ให้กำลังใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนในห้อง 453 ภาควิชาจุลชีววิทยาที่คอยแนะนำให้ ความช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา รวมทั้งขอขอบคุณเพื่อน ๆ ในสหสาขา ฯ และในภาควิชาจุลชีววิทยาหลาย ๆ ท่านที่ไม่อาจกล่าวได้หมด ณ ที่นี้ ที่ได้ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา เป็นอย่างสูง และขอบคุณพี่น้องที่คอยให้ความสนับสนุนในด้านกำลังใจและกำลังใจทรัพย์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
คำย่อ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สารไดออกซิน.....	3
2.2 สมบัติของ 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin.....	4
2.3 ความคงตัวของสารไดออกซิน.....	5
2.4 แหล่งกำเนิดของสารไดออกซิน.....	5
2.5 การปลดปล่อยสารไดออกซินออกสู่สิ่งแวดล้อม.....	7
2.6 การรับสารไดออกซินของมนุษย์.....	8
2.7 ความเป็นพิษของสารไดออกซิน.....	9
2.8 ผลของสารไดออกซินต่อมนุษย์และสัตว์.....	11
2.9 เหตุการณ์ที่เกี่ยวข้องกับสารไดออกซิน.....	13
2.10 กฎหมายที่ควบคุมสารไดออกซิน.....	15
2.11 มาตรการควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนสารไดออกซินระดับโลก.....	17
2.12 การบำบัดสารไดออกซิน.....	18
2.13 การย่อยสลายทางชีวภาพ.....	22
2.14 การย่อยสลายสารไดออกซินโดยจุลินทรีย์.....	24
2.15 การย่อยสลายสารไดเบนโซฟูแรนโดยจุลินทรีย์.....	26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.16	สารเคมีสำคัญที่ใช้ในการทดลอง.....	29
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
3.1	การเก็บตัวอย่างดิน.....	36
3.2	การแยกจากตัวอย่างดิน.....	36
3.3	การเก็บรักษาเชื้อ.....	37
3.4	การคัดเลือกราที่สามารถเจริญเติบโตและมีความสามารถสูงในการ ย่อยสี Remazol Brilliant Blue R ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น.....	37
3.5	การคัดเลือกราเบื้องต้นที่มีความสามารถสูงในการย่อยสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium.....	37
3.6	การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของราที่คัดเลือก ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium.....	38
3.7	การศึกษารูปแบบการย่อยสี RBBR ของราที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium.....	39
3.8	การประเมินความสามารถของราในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium.....	40
3.9	การประเมินความสามารถของราในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium.....	42
3.10	การศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา ที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบต่าง ๆ.....	42
3.10.1	การศึกษาลักษณะการเจริญของรบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แบบต่าง ๆ.....	42
3.10.2	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของร่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยเทคนิค slide culture.....	43
3.10.3	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของร่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	44
3.11	ปั้งซีชนิดของราที่คัดเลือกโดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส ของตำแหน่ง ITS (Internal Transcribed Spacer).....	44

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล.....	47
4.1 การแยกจากตัวอย่างดิน.....	47
4.2 การคัดเลือกที่สามารถเจริญเติบโตและมีความสามารถสูงในการ ย่อยสี Remazol Brilliant Blue R ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น.....	48
4.3 การคัดเลือกเบื้องต้นที่มีความสามารถสูงในการย่อยสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium.....	59
4.4 การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของราที่คัดเลือก ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium.....	60
4.5 การศึกษารูปแบบการย่อยสี RBBR ของราที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium.....	64
4.6 การประเมินความสามารถของราในการย่อยสลายไคเบนโซฟูแรน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium.....	66
4.7 การประเมินความสามารถของราในการย่อยสลายไคเบนโซฟูแรน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium.....	68
4.8 การศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา ที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบต่าง ๆ.....	71
4.8.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของรบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แบบต่าง ๆ.....	71
4.8.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรกายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยเทคนิค slide culture.....	73
4.8.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรกายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	74
4.9 บ่งชี้ชนิดของราที่คัดเลือกโดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส ของตำแหน่ง ITS (Internal Transcribed Spacer).....	75
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	78
รายการอ้างอิง.....	81
ภาคผนวก.....	89
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	90

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	95
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.....	99
ภาคผนวก ง การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์.....	102
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	104



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 จำนวน congeners ในแต่ละ homologue ของ chlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins และ chlorinated dibenzofurans.....	4
ตารางที่ 2.2 ค่า I-TEF ของไอโซเมอร์สารไดออกซิน.....	10
ตารางที่ 2.3 ความเป็นพิษในสัตว์ทดลองของสาร 2,3,7,8-TCDD.....	11
ตารางที่ 2.4 ค่ามาตรฐาน PCDDs/PCDFs จากเตาเผาอุณหภูมิสูงของประเทศต่าง ๆ.....	16
ตารางที่ 2.5 เทคโนโลยีการบำบัดสารไดออกซินโดยใช้ความร้อน.....	20
ตารางที่ 2.6 เทคโนโลยีการบำบัดสารไดออกซินโดยไม่ใช้ความร้อน.....	21
ตารางที่ 2.7 สายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถย่อยได้เบนโซฟูแรน.....	27
ตารางที่ 4.1 จำนวนราที่พบในตัวอย่างดินต่าง ๆ และจำนวนราที่มีความสามารถในการย่อยสลาย RBBR.....	47
ตารางที่ 4.2 จำนวนราที่มีความสามารถในการย่อยสลาย จำนวนราและรหัสราที่ย่อยสลายได้อย่างชัดเจนในวันที่ 14.....	48
ตารางที่ 4.3 ลักษณะการย่อยสลายของราทั้ง 13 สายพันธุ์.....	54
ตารางที่ 4.4 ลักษณะการเจริญของราในวันที่ 14 ของราทั้ง 13 สายพันธุ์.....	55
ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการย่อยสลายได้เบนโซฟูแรนของราแต่ละสายพันธุ์ในวันที่ 7.....	69
ตารางที่ 4.6 การย่อยสลายได้เบนโซฟูแรนของรา C8.....	70
ตารางที่ 4.7 รายละเอียดลักษณะการเจริญของรา C8 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบต่าง ๆ.....	71

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1	สูตรโครงสร้างของ (1) dibenzo- <i>p</i> -dioxin และ (2) dibenzofuran.....	3
รูปที่ 2.2	สูตรโครงสร้างของ 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin.....	4
รูปที่ 2.3	ปริมาณสารไดออกซินที่คนในทวีปอเมริกาเหนือได้รับในแต่ละวัน.....	9
รูปที่ 2.4	สูตรโครงสร้างของ Remazol Brilliant Blue R.....	30
รูปที่ 3.1	จุดเก็บตัวอย่างดินเส้นทาง ที่ทำการ-มอสิงโต.....	36
รูปที่ 4.1	รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของรา A3, A7, B5 และ B7 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสี RBBR.....	49
รูปที่ 4.2	รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของรา B8, B9, C8 และ C10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสี RBBR.....	50
รูปที่ 4.3	การเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของรา D3, D9, E1, L1 และ L10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสี RBBR.....	51
รูปที่ 4.4	ลักษณะการเจริญของรา A3, A7, B5 และ B7 ในวันที่ 14 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสี RBBR.....	56
รูปที่ 4.5	ลักษณะการเจริญของรา B8, B9, C8 และ C10 ในวันที่ 14 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสี RBBR.....	57
รูปที่ 4.6	ลักษณะการเจริญของรา D3, D9, E1, L1 และ L10 ในวันที่ 14 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสี RBBR และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น ที่เติมสี RBBR ซึ่งไม่มีการเพาะเชื้อ.....	58
รูปที่ 4.7	เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการย่อยสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium ในวันที่ 7 ของราทั้ง 13 สายพันธุ์.....	59
รูปที่ 4.8	รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของรา A3 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....	61
รูปที่ 4.9	รูปแบบในการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของรา C8 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....	61
รูปที่ 4.10	รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของรา C10 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....	62
รูปที่ 4.11	รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของรา L1 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....	62

สารบัญญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.12 รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสลาย RBBR ของรา L10 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....	63
รูปที่ 4.13 สรุปรูปเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการย่อยสลาย RBBR ในวันที่ 7.....	63
รูปที่ 4.14 รูปแบบในการย่อยสลาย RBBR ของรา C10 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....	64
รูปที่ 4.15 รูปแบบในการย่อยสลาย RBBR ของรา L1 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....	65
รูปที่ 4.16 สรุปรูปเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการย่อยสลาย RBBR ในวันที่ 7.....	65
รูปที่ 4.17 HPLC โคโรมาโตแกรมที่เกิดจากการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนของรา A3 ในวันที่ 7.....	66
รูปที่ 4.18 สีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM วันที่ 0 (ซ้าย) และสีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนของรา A3 ในวันที่ 7 (ขวา).....	67
รูปที่ 4.19 HPLC โคโรมาโตแกรมที่เกิดจากการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนของรา C8 ในวันที่ 7.....	67
รูปที่ 4.20 HPLC โคโรมาโตแกรมที่เกิดจากการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนของรา C10 ในวันที่ 7.....	68
รูปที่ 4.21 รูปแบบการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนของรา C8.....	70
รูปที่ 4.22 ลักษณะการเจริญของรา C8 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบต่าง ๆ.....	72
รูปที่ 4.23 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา C8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	73
รูปที่ 4.24 ลักษณะสปอร์ของรา C8 ที่กำลังขยาย 7,500 เท่า.....	74
รูปที่ 4.25 ลักษณะสปอร์ของรา C8 ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า.....	74
รูปที่ 4.26 <i>Trametes versicolor</i>	76
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสี RBBR กับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร.....	99
รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร.....	100
รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นไดเบนโซฟูแรนกับพื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	101

คำย่อ

DD	=	dibenzo- <i>p</i> -dioxin
DF	=	dibenzofuran
CDD	=	chlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
CDF	=	chlorodibenzofuran
DCDD	=	dichlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
DCDF	=	dichlorodibenzofuran
TCDD	=	tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
PCDDs	=	polychlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins
PCDFs	=	polychlorinated dibenzofurans
RBBR	=	Remazol Brilliant Blue R
MM	=	Mineral Salt Medium
LN	=	Low-Nitrogen Basal III Medium



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การพัฒนาประเทศและการขยายตัวทางด้านอุตสาหกรรมจากอดีตสู่ปัจจุบัน ได้ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมด้านต่าง ๆ ได้ออกซินที่ปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมเป็นผลพวงอย่างหนึ่งที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้คลอรีนในกระบวนการผลิต เช่น โรงงานผลิตพลาสติกจำพวก PVC ซึ่งปัจจุบันเป็นที่นิยมใช้กันมาก เกิดจากโรงงานผลิตกระดาษที่ใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนในกระบวนการฟอกกระดาษ ซึ่งสารดังกล่าวสามารถทำปฏิกิริยากับลิกนินในเยื่อไม้เกิดสารไดออกซินขึ้น และเกิดจากโรงงานผลิตสารเคมีพวกสารคลอรีเนต เช่น phenols และ PCBs เป็นต้น ไดออกซินยังเกิดจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงไม่ว่าจะเป็นเชื้อเพลิงประเภทน้ำมันหรือถ่านหิน และส่วนที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนไดออกซินสู่สิ่งแวดล้อมมากที่สุด คือ การเผาไหม้ขยะที่มีคลอรีนเป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ไดออกซินยังเกิดจากปรากฏการณ์ธรรมชาติ เช่น ภูเขาไฟระเบิด หรือไฟป่าอีกด้วย (กฤษณา ชัชพงศ์, 2542; กรมควบคุมมลพิษ, 2542)

สารไดออกซินมักใช้เรียกรวม 2 กลุ่มคือ polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) และ polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) ส่วนสารไดออกซินตัวที่มักกล่าวถึงและมีความสำคัญซึ่งมีความเป็นพิษร้ายแรงที่สุดในสารกลุ่มเดียวกันมีชื่อเรียกว่า 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) สารไดออกซินมีความคงตัวอย่างยิ่งในสิ่งแวดล้อม แม้ละลายน้ำได้เล็กน้อย แต่ละลายได้ดีในไขมัน ดังนั้นหากสารนี้ปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำ ดินและอากาศ รวมถึงปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ก็แพร่เข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้ดี

เมื่อมนุษย์ได้รับสารไดออกซินเข้าสู่ร่างกาย สารนี้จะสะสมอยู่ในกระแสเลือดและเนื้อเยื่อไขมัน สามารถก่อให้เกิดทั้งพิษเฉียบพลันและเรื้อรัง การได้รับในปริมาณสูงช่วงระยะแรก ๆ จะเกิดการทำลายที่ผิวหนัง เช่น เป็นผื่นและไหม้ดำ มีผลกระทบต่อตับที่ทำหน้าที่หนักในการกำจัดสารพิษ การได้รับในปริมาณเล็กน้อยก็อาจส่งผลให้เกิดภาวะระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายล้มเหลวได้ นอกจากนี้การได้รับไดออกซินอาจก่อให้เกิดโรค chloracne โดยจะมีอาการผิวหนังแตก เกิดถุงน้ำ ตุ่มหนองคล้ายสิว เจ็บปวดทั่วร่างกาย และไดออกซินยังทำให้เกิดการลดลงของฮอร์โมนเพศชาย มีผลต่อจำนวนอสุจิและเกิดภาวะเยื่อผนังมดลูกอักเสบ กระตุ้นให้เกิดมะเร็ง มีผลต่อสภาพจิตใจ รวมทั้งมีผลต่อพฤติกรรมและการเรียนรู้ของทารก เป็นต้น (จตุรงค์ ตันติมงคลสุข, นรินทร์ วรภูมิจิ และสุชัย สุเทพารักษ์, 2543; ปราณี เกียรติสุระยานนท์, 2542)

ในการบำบัดไดออกซินทำได้หลายวิธี เช่น การเผาในเตาเผา (incineration) อุณหภูมิสูงกว่า 1,000 องศาเซลเซียส ทำให้ต้องใช้พลังงานจำนวนมากต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง และอาจมีผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษเกิดขึ้นจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ และปลดปล่อยสารพิษอื่น ๆ ออกมา วิธีที่ย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) เป็นการบำบัดไดออกซินวิธีหนึ่งที่ไม่ต้องใช้ความร้อนและพลังงานจำนวนมาก ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน วิธีการนี้เมื่อมีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ไม่เป็นพิษ สามารถนำไปใช้บำบัดในพื้นที่ (in-situ) ที่มีการปนเปื้อนไดออกซินได้ รวมทั้งยังสามารถใช้บำบัดร่วมกับวิธีการอื่นเพื่อให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นได้ (Arienti และคณะ, 1988)

อย่างไรก็ตามการจะบำบัดไดออกซินโดยใช้การย่อยสลายทางชีวภาพมาใช้จริงในประเทศไทยควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยคัดเลือกจุลินทรีย์จากในท้องถิ่นซึ่งน่าจะมีประสิทธิภาพและมีความเป็นไปได้เมื่อนำไปใช้จริงในสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศของประเทศไทยเอง แต่เนื่องจากไดออกซินมีพิษสูงมาก การทดลองต้องทำในห้องทดลองที่มีการป้องกันอย่างเข้มงวดซึ่งไม่สามารถทำได้ การศึกษาครั้งนี้จึงได้แยกมาจากธรรมชาติ และนำมาใช้ในการย่อยไดเบนโซฟิวแรนซึ่งมีโมเลกุลคล้ายกับไดออกซินแทน โดยคาดว่าราที่สามารถย่อยไดเบนโซฟิวแรนได้น่าจะสามารถย่อยไดออกซินได้ด้วย ซึ่งต้องพิสูจน์ในขั้นต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกราที่สามารถย่อยสลายไดเบนโซฟิวแรนได้จากธรรมชาติ
2. เพื่อศึกษาความสามารถของราที่คัดเลือกได้ในการย่อยสลายไดเบนโซฟิวแรน

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1. ใช้ตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่เส้นทาง ที่ทำการ-มอสิงโต
2. ใช้สารไดเบนโซฟิวแรนซึ่งเป็น analogue ของไดออกซินเป็นวัตถุบิในการย่อย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับความสามารถของราที่คัดเลือกได้ในการย่อยสลายไดเบนโซฟิวแรน ซึ่งข้อมูลที่ได้ก็นำไปใช้ประโยชน์ในการจัดการปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการปนเปื้อนไดออกซินชนิดต่าง ๆ ได้

บทที่ 2

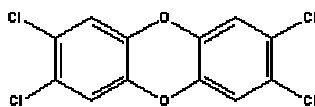
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารไดออกซิน

สารไดออกซินเป็นกลุ่มสารประเภท polychlorinated aromatic hydrocarbon ที่มีโครงสร้างทางเคมีที่มีลักษณะพิเศษ คือ จะประกอบด้วย 3 วง (tricyclic member ring) และจัดระเบียบโมเลกุลเป็นแบบ planar สารไดออกซินมักใช้เรียกดioxin 2 กลุ่มคือ polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) และ polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) สารทั้งสองกลุ่มมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันคือ PCDDs มีวง (member ring) ที่อยู่ตำแหน่งตรงกลางในโมเลกุลเป็นหกเหลี่ยมที่มีอะตอมออกซิเจนอยู่ 2 อะตอม ขณะที่ PCDFs มีวงที่อยู่ตำแหน่งตรงกลางในโมเลกุลเป็นวงห้าเหลี่ยมและมีอะตอมออกซิเจนอยู่เพียง 1 อะตอม (วิทยา สังข์ทอง, 2545) อะตอมของไฮโดรเจนของสารทั้ง 2 กลุ่มนี้ สามารถถูกแทนที่ด้วยอะตอมของคลอรีนหรือโบรมีนได้ตั้งแต่ 1-8 อะตอม ดังแสดงในรูปที่ 2.1 การแทนที่โดยอะตอมของคลอรีนทำให้ได้กลุ่มอนุพันธ์ที่เรียกว่า homologue สำหรับโครงสร้าง dibenzo-*p*-dioxin และ dibenzofuran มี homologue ได้ 8 homologues ตามจำนวนอะตอมคลอรีนหรือโบรมีนใน 1 โมเลกุล (กรมควบคุมมลพิษ, 2542) โดยมีจำนวน congeners ในแต่ละ homologue ดังแสดงในตารางที่ 2.1 สารไดออกซินที่มักกล่าวถึงและมีความสำคัญซึ่งมีความเป็นพิษร้ายแรงที่สุดในสารกลุ่มเดียวกัน ในโมเลกุลประกอบด้วยอะตอมคลอรีน 4 อะตอม เกาะอยู่ที่ตำแหน่ง 2,3,7 และ 8 มีชื่อเรียกว่า 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) (World Health Organization, 1989) ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของ (1) dibenzo-*p*-dioxin และ (2) dibenzofuran



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

ตารางที่ 2.1 จำนวน congeners ในแต่ละ homologue ของ chlorinated dibenzo-*p*-dioxins และ chlorinated dibenzofurans

จำนวนอะตอมคลอรีน ในโมเลกุล	จำนวน congeners	
	chlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins	chlorinated dibenzofurans
1	2	4
2	10	16
3	14	28
4	22	38
5	14	28
6	10	16
7	2	4
8	1	11
รวม	75	135

ที่มา: U.S. Environmental Protection Agency, 1994

2.2 สมบัติของ 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (กรมควบคุมมลพิษ, 2542)

ชื่อสามัญ	TCDD
ชื่อเคมี	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin หรือ 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo[b,e](1,4) dioxin
สูตรโมเลกุล	$C_{12}H_4Cl_4O_2$

น้ำหนักโมเลกุล	321.96
จุดหลอมเหลว	305-306 °ซ
ความดันไอ	7.40×10^{-10} มม.ปรอทที่ 25 °ซ
การละลาย	ละลายในน้ำ 1.9×10^{-5} มก./ลิตร ละลายใน methanol 10 มก./ลิตร ละลายใน acetone 110 มก./ลิตร ละลายใน benzene 570 มก./ลิตร
ลักษณะทางกายภาพ	ผลึกสีขาวรูปเข็ม

2.3 ความคงตัวของสารไดออกซิน

ไดออกซินเป็นสารที่มีความคงตัวสูงมาก เมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมจะถูกทำลายโดยแสงแดด เรียกกระบวนการนี้ว่า photodegradation หากอยู่ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต ไดออกซินจะมีครึ่งอายุ (half-life) ประมาณ 1-3 ปี แต่หากอยู่ใต้ผิวดินจะมีครึ่งอายุนานกว่า 10 ปี เนื่องจากไดออกซินมีความคงตัวสูงและละลายได้ดีในไขมัน ทำให้ไดออกซินสามารถสะสมในร่างกายของสิ่งมีชีวิตและถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหาร ไดออกซินในร่างกายมนุษย์มีครึ่งชีวิตเฉลี่ยประมาณ 7.1 ปี (5.8-9.6 ปี) (จากรูวรรณ วิริยะหิรัญไพบูลย์, 2542)

2.4 แหล่งกำเนิดของสารไดออกซิน

สารไดออกซินเกิดตามธรรมชาติได้น้อยมาก ส่วนใหญ่เกิดจากการกระทำของมนุษย์โดยเป็นผลจากระบวนการผลิตที่มีคลอรีนเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งมีดังนี้ (กรมควบคุมมลพิษ, 2542; จากรูวรรณ วิริยะหิรัญไพบูลย์, 2542; สุชาติ อุดมโสภกิจ และไพโรจน์ หลวงพิทักษ์, 2542b)

1. เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้คลอรีนในกระบวนการผลิต เช่น โรงงานผลิตพลาสติก พีวีซี และโรงงานผลิตกระดาษ

ในโรงงานผลิตกระดาษ คลอรีนและสารประกอบคลอรีนที่ใช้กระบวนการฟอกกระดาษสามารถทำปฏิกิริยากับลิกนินในเยื่อไม้ทำให้เกิดสารไดออกซิน โดยปริมาณของสารไดออกซินในกระดาษนั้นขึ้นอยู่กับการฟอก กระดาษสีน้ำตาลที่ผ่านการฟอกขาวเพียงเล็กน้อยจะมีปริมาณไดออกซินน้อยกว่ากระดาษขาว นอกจากนี้ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตกระดาษก็มีสารไดออกซินปนเปื้อนด้วย

โรงงานที่มีการตัดเหล็ก กิ่งเหล็ก ที่ใช้ตัวทำละลายที่มีคลอรีนเป็นส่วนประกอบ น้ำมันที่ใช้ในการตัดเหล็กและพลาสติกต่าง ๆ ซึ่งล้วนแต่ต้องสัมผัสกับอุณหภูมิสูง ๆ เป็นแหล่งที่พบไดออกซินได้เช่นกัน และโรงเลื่อยไม้ก็เป็นแหล่งหนึ่งที่ผลิตของไดออกซิน เนื่องจากมีการใช้สาร pentachlorophenol เพื่อรักษาเนื้อไม้

2. เกิดจากกระบวนการผลิตสารเคมีกลุ่ม chlorinated hydrocarbon

นอกเหนือจาก 2,4,5-trichloroethane แล้ว การผลิตสารประกอบ chlorinated hydrocarbon หลายชนิด เช่น pentachlorophenol, hexachlorobenzene และ polychlorinated biphenyls (PCBs) อาจมีไดออกซินปนเปื้อน นอกจากนี้ในการผลิตสารเคมีหลายชนิดถึงแม้จะไม่ทำให้เกิดไดออกซินแต่เมื่อใช้สารเหล่านี้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารอื่นอาจทำให้เกิดสารไดออกซินขึ้นได้ สารเหล่านี้รวมเรียกว่า precursor chemical substances

3. เกิดจากการเผาไหม้เชื้อเพลิง ไม่ว่าจะเป็นเชื้อเพลิงประเภทน้ำมันหรือถ่านหิน

รถยนต์ที่ใช้น้ำมันเบนซินที่เติมสารประกอบ tetraethyl lead เพื่อป้องกันเครื่องยนต์จะต้องผสมสารประกอบคลอรีนคือ 1,2-dichloroethane เพื่อช่วยกำจัดตะกั่ว ดังนั้นรถยนต์ที่ใช้เชื้อเพลิงประเภทนี้จึงเป็นแหล่งของไดออกซินด้วย รถยนต์ที่ใช้น้ำมันเบนซินไร้สารตะกั่วจะปล่อยไดออกซิน 1.2-1.3 พิโคกรัมต่อการวิ่งระยะทาง 1 กิโลเมตร ซึ่งน้อยกว่ารถที่ใช้น้ำมันเบนซินแบบมีสารตะกั่ว (3.3-7.7 พิโคกรัมต่อการวิ่งระยะทาง 1 กิโลเมตร)

4. เกิดจากการเผาขยะแบบไม่สมบูรณ์

เนื่องจากขยะประกอบด้วยสารอินทรีย์ต่าง ๆ มากมายรวมทั้งสารเคมีซึ่งมี benzene ring และคลอรีนเป็นองค์ประกอบ โดยอุณหภูมิระหว่าง 200-400 °C เป็นช่วงที่ทำให้เกิดสารไดออกซินได้ดี ไดออกซินมีความคงตัวต่ออุณหภูมิแต่จะสลายได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 800 °C ดังนั้นการเผาขยะแบบสมบูรณ์จึงไม่ก่อให้เกิดไดออกซิน นอกจากนี้มีการประมาณการว่าไดออกซินในธรรมชาติส่วนใหญ่ (95%) มาจากการเผาไหม้ขยะที่มีคลอรีนเป็นส่วนประกอบ

5. เกิดจากปรากฏการณ์ธรรมชาติ เช่น ภูเขาไฟระเบิด หรือไฟป่า

ไฟป่าก่อให้เกิดไดออกซินเนื่องจากควันจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือเตาเผาอุณหภูมิสูงตกลงบนใบพืช ชากพืชทำให้เกิดการปนเปื้อนบนใบและชากพืช (กฤษณา ชัชพงศ์, 2542)

2.5 การปลดปล่อยสารไดออกซินออกสู่สิ่งแวดล้อม (จารุพงศ์ บุญ-หลง, 2544)

1. การปลดปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ

ไดออกซินเข้าสู่แหล่งน้ำได้จากการปล่อยน้ำเสีย การชะล้างจากบริเวณปนเปื้อนหรือจากผลิตภัณฑ์ปนเปื้อน เช่น การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ประเภทออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) การทิ้งกาก ของเสีย ฯลฯ การปล่อยน้ำเสียจากอุตสาหกรรมที่มีกระบวนการเกี่ยวกับการสร้างไดออกซิน ได้แก่

- 1) น้ำเสียจากกระบวนการผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษ (pulp and paper) ที่มีการใช้สารคลอรีนในการฟอกสี
- 2) น้ำเสียจากกระบวนการผลิตเคมีภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสารคลอรีน
- 3) น้ำเสียจากอุตสาหกรรมฟอกย้อม เส้นใย หนัง ไม้ ที่ใช้สีย้อมหรือน้ำยารักษาคุณภาพของวัตถุดิบที่มีไดออกซินเจือปนอยู่
- 4) น้ำเสียจากบ้านเรือนทั่วไป เช่น เครื่องซักผ้า และเครื่องล้างชาม เป็นต้น
- 5) น้ำเสียจากกิจกรรมการผลิต และสถานที่ของกิจกรรมที่มีการใช้วัตถุดิบที่ปนเปื้อนด้วยไดออกซิน เช่น สถานที่ผลิตและใช้สารคลอโรฟีนอล (chlorophenol) โรงเลื่อย สุสานรถยนต์โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีน้ำมันทรอดอยู่ น้ำเสียจากเตาเผาขยะ เป็นต้น

2. การปลดปล่อยลงสู่ดิน

สารไดออกซินถูกปลดปล่อยไปสู่ดินได้ โดยการทิ้งหรือการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ที่มีไดออกซินปนเปื้อนอยู่โดยตรง หรือสารนี้สะสมตัวอยู่ในดินโดยผ่านสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น จากอากาศสู่ดินดังที่กล่าวแล้ว และสารที่สะสมอยู่ในดินก็จะผ่านเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร (food chain) และถูกดูดซึมเข้าสู่พืชและสัตว์ต่อไป สารไดออกซินในดินส่วนใหญ่เกิดขึ้นโดยตรงจากผลิตภัณฑ์หรือกากของเสียจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ สารรักษาเนื้อไม้ที่มีไดออกซินปนเปื้อน การนำเอากากของเสียไปใช้ในพื้นที่เกษตร และการนำกากของเสียที่มีไดออกซินปนเปื้อนไปกองทิ้งไว้ เป็นต้น

3. การปลดปล่อยออกสู่อากาศ

สารไดออกซินเข้าสู่บรรยากาศจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งที่เป็นแหล่งคงที่ซึ่งมักเกี่ยวข้องกับ การอุตสาหกรรม หรือแหล่งที่ไม่คงที่ซึ่งเกี่ยวข้องกับการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีสารไดออกซินเจือปนอยู่ สารไดออกซินจากทั้งสองแหล่งนี้สามารถอยู่คงที่หรือเคลื่อนย้ายไปได้เป็นระยะทางไกลมาก ดังนั้นจึงสามารถตรวจวัดได้ทั่วไปแม้แต่จากแหล่งต่าง ๆ ซึ่งอยู่ห่างไกลมากจากแหล่งที่ปลดปล่อย

ตัวอย่างของกระบวนการที่ปลดปล่อยไดออกซินไปสู่อากาศ เช่น กระบวนการเผาไหม้ กระบวนการผลิตโลหะและหลอมโลหะ กระบวนการปิ้งหรือย่าง ตู้อบควัน อุตสาหกรรมที่ใช้ความร้อนสูง เป็นต้น โอกาสที่จะมีการสร้างและปลดปล่อยสารไดออกซินสู่บรรยากาศสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะใดสภาวะหนึ่งหรือหลาย ๆ สภาวะร่วมกันคือ 1) กระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 200 องศาเซลเซียส 2) มีสารพวกอินทรีย์คาร์บอน 3) มีสารคลอรีน และ 4) ผลิตภัณฑ์ที่มีสาร PCDDs/PCDFs ปะปนอยู่

4. การปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์

การปนเปื้อนสารไดออกซินในผลิตภัณฑ์นั้นจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารประกอบประเภทออร์กาโนคลอรีนโดยตรงและผลิตภัณฑ์ที่ใช้คลอรีนในกระบวนการ เช่น กระดาษและเยื่อกระดาษ ผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนสูงเช่น พวงคลอรีนเตเตท ฟีนอล และอนุพันธ์ เช่น pentachlorophenol (PCP), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) และ PCBs ที่ใช้ในหม้อแปลงไฟฟ้า และตัวเก็บประจุไฟฟ้า ในประเทศเยอรมนีได้ทำการศึกษาและวิเคราะห์ปริมาณสาร PCDDs/PCDFs ในผลิตภัณฑ์เคมีและผลิตภัณฑ์สิ่งทอหลายชนิด พบว่าผลิตภัณฑ์เคมี pentachlorophenol เป็นสารที่มีการปนเปื้อน PCDDs/PCDFs สูงถึง 2,320 µg.I-TEQ/kgของผลิตภัณฑ์เคมี

2.6 การรับสารไดออกซินของมนุษย์

ไดออกซินสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 3 ทาง คือ (กรมควบคุมมลพิษ, 2542; จารุวรรณ วิริยะหิรัญไพบูลย์, 2542)

1. โดยการสัมผัสกับไดออกซินโดยตรงทางผิวหนัง
2. โดยการหายใจ

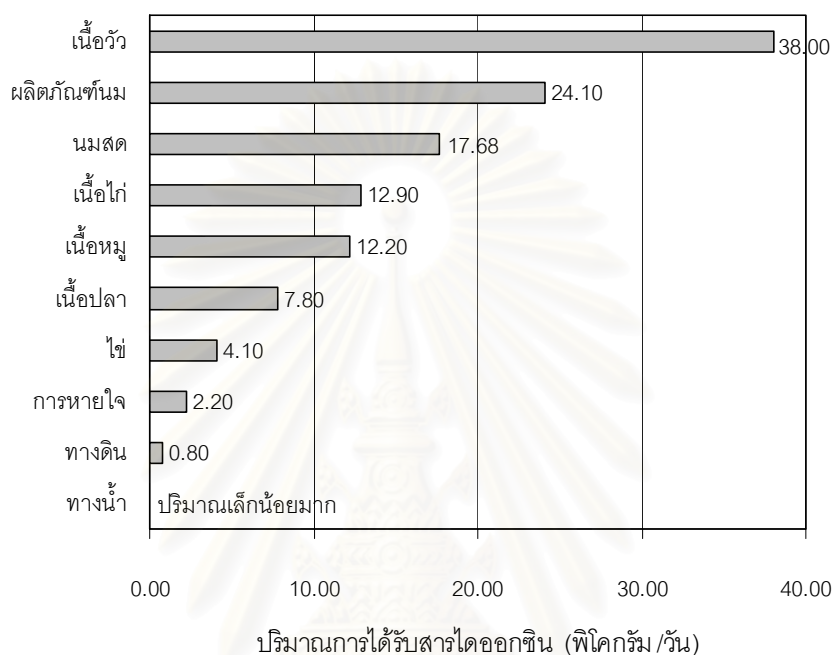
-โดยหายใจเอาไอหรือแก๊สจากการเผาไหม้ของสารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมที่มีคลอรีน (จตุรงค์ ดันติมงคลสุข, นรินทร์ วรวิมล และสุชัย สุเทพารักษ์, 2543)

-คนงานโรงงานอุตสาหกรรมที่กระบวนการผลิตมีการปนเปื้อนของไดออกซิน หรือผู้ที่ต้องใช้สารเคมีที่อาจมีการปนเปื้อนของไดออกซิน เช่น เกษตรกรมักจะได้รับไดออกซินโดยทางผิวหนังและทางลมหายใจ

3. โดยการบริโภค

สารไดออกซินเป็นสารที่คงตัวในสิ่งแวดล้อม สามารถละลายได้ดีในไขมันจึงสะสมได้ในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะสัตว์ที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบมากกว่าพืช เมื่อคนเราบริโภคพืชและสัตว์ก็จะทำให้ได้รับไดออกซินเข้าสู่ร่างกาย ร้อยละ 97.5 ของไดออกซินที่คนทั่วไปได้รับมา

จากอาหารประจำวันที่ได้รับประทานเข้าไป โดยปริมาณไดออกซินที่คนเราได้รับในแต่ละวันขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่แต่ละคนบริโภคและปริมาณของไดออกซินในอาหารแต่ละชนิด จากตัวอย่างในรูปที่ 2.3 คนในทวีปอเมริกาเหนือได้รับไดออกซินในแต่ละวันประมาณ 120 พิโคกรัม โดยได้รับจากเนื้อโคสูงที่สุด คือ 38 พิโคกรัม/วัน



รูปที่ 2.3 ปริมาณสารไดออกซินที่คนในทวีปอเมริกาเหนือได้รับในแต่ละวัน (ชนิษฐา ทวีถาวร สวัสดิ์, 2543)

2.7 ความเป็นพิษของสารไดออกซิน

กลุ่มสารไดออกซินประกอบด้วยสารที่เป็นไอโซเมอร์จำนวนมาก แต่ไอโซเมอร์ที่มีความเป็นพิษมากที่สุดคือ 2,3,7,8-TCDD ส่วนไอโซเมอร์อื่น ๆ อีก 16 ไอโซเมอร์มีความเป็นพิษเช่นเดียวกันแต่จัดว่าน้อยกว่า 2,3,7,8-TCDD เนื่องจากการประมาณความเป็นพิษของแต่ละไอโซเมอร์ไม่สามารถบอกปริมาณเป็นการเฉพาะแต่ละตัวได้ จึงได้บอกค่าความเป็นพิษของสารแต่ละไอโซเมอร์ได้ในรูปความสัมพันธ์กับไอโซเมอร์ 2,3,7,8-TCDD โดยให้ถือว่า 2,3,7,8-TCDD ซึ่งมีความเป็นพิษสูงสุดมีค่าเท่ากับ 1 โดย International Toxicity Equivalency Factors (I-TEF) ได้กำหนดค่าความเป็นพิษสำหรับไอโซเมอร์หรือ congener ต่าง ๆ (วิทยา สังข์ทอง, 2545) ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ค่า I-TEF ของไอโซเมอร์สารไดออกซิน

Congener	I-TEF
2,3,7,8-TetraCDD	1
1,2,3,7,8-PentaCDD	0.5
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	0.1
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	0.1
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	0.01
OctaCDD	0.001
2,3,7,8-TetraCDF	0.1
1,2,3,7,8-PentaCDF	0.05
2,3,4,7,8-PentaCDF	0.5
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	0.1
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	0.1
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	0.1
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	0.01
OctaCDF	0.001

ที่มา: จารุพงศ์ บุญ-หลง, 2544

สำนักงานวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer, IARC) ซึ่งเป็นหน่วยงานหนึ่งขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้จัดสาร 2,3,7,8-TCDD เป็นสารก่อมะเร็งโดยจัดอยู่ใน Class 1 (สูชาติ อุดมโสภกิจ และไพโรจน์ หลวงพิทักษ์, 2542a) นอกจากนี้มีการศึกษาทดลองความเป็นพิษของกลุ่มสารดังกล่าวโดยใช้สัตว์ทดลองหลายชนิด พบว่าความเป็นพิษขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ด้วยดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ความเป็นพิษในสัตว์ทดลองของสาร 2,3,7,8-TCDD

ความเป็นพิษ (ปริมาณที่ทำให้เกิด LD ₅₀ /ED ₅₀)	ชนิด	LD ₅₀ /ED ₅₀ ของ 2,3,7,8-TCDD
ความเป็นพิษเฉียบพลัน		
LD ₅₀ (ไมโครกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	หนูตะเภา	0.6-2.0
	mouse	114-284
	rat	22-45
ความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง		
น้ำหนักตัวลดลง (ไมโครกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	rat	0.05
	หนูตะเภา	0.0056
thymic atrophy (ไมโครกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	rat	0.09
immunotoxicity (นาโนโมล/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	mouse	0.65,0.77
teratogenicity (ไมโครกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	mouse	3.4

ที่มา: safe(1990 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542: 78)

2.8 ผลของสารไดออกซินต่อมนุษย์และสัตว์

ไดออกซินสามารถก่อให้เกิดผลทั้งพิษเรื้อรังและเฉียบพลัน ดังนี้ (ถัญญา ลือตระกูล, 2542; สุขชาติ อุดมโสภกิจ และไพโรจน์ หลวงพิทักษ์, 2542a; จตุรงค์ ตันติมงคลสุข และคณะ, 2543)

1. พิษเฉียบพลันทำให้เบื่ออาหาร น้ำหนักลด แผลในกระเพาะอาหาร ตับอักเสบ และอาจรุนแรงจนเสียชีวิตในที่สุด

2. พิษเรื้อรังทำให้เกิดโรคหรือความผิดปกติแก่ร่างกายดังต่อไปนี้

2.1 Chloracne ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2440 เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการทำงานและถือเป็นโรคที่เกิดจากการสัมผัสกับไดออกซินชนิดแรกที่ถูกค้นพบ โดยพบในกลุ่มคนงาน

ที่ปฏิบัติงานในโรงงานผลิตยาฆ่าแมลงและโรงงานที่ผลิตสารเคมีจำพวกพีซีบี อย่างไรก็ตามยังไม่
มีใครพบสาเหตุของโรคนี้ จนกระทั่งในราวปี พ.ศ. 2503 พบว่าไดออกซินเป็นสารปนเปื้อนในยาฆ่า
แมลงและพีซีบี อาการของโรคนี้คือ ผิวน้ำแตก (skin eruptions) เกิดถุงน้ำ (cysts) และตุ่มหนอง
(pustules) คล้ายสิว มักเกิดตามใบหน้าและลำตัวโดยเป็นอย่างรุนแรง บริเวณลำตัวรอยโรคมักมี
ลักษณะเป็นบาดแผล ผู้ที่ป่วยด้วยโรคนี้จะมีอาการเจ็บปวดไปทั่วร่างกาย จากการศึกษาในสัตว์
ทดลองพบว่าอาการของโรคนี้เกิดขึ้นได้แม้จะมีไดออกซินอยู่ในตัวหนูเพียง 23 ng/kg ส่วนปริมาณ
สารไดออกซินในร่างกายที่ทำให้เกิด chloracne อาจมีขนาดน้อยกว่า 96 ng/kg หรืออาจสูงเกิน
กว่า 3,000 ng/kg แต่ค่าเฉลี่ยในผู้ป่วยมักมีปริมาณ 7 เท่าของค่าเฉลี่ยสารไดออกซินในพลเมือง
ของประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2 อุบัติการณ์ของโรคเบาหวาน (diabetes) เพิ่มขึ้น มีรายงานการศึกษา 3 ราย
งานในทหารอเมริกันที่ทำการรบในประเทศเวียดนามพบว่า มีอุบัติการณ์โรคเบาหวานเพิ่มสูงกว่า
ปกติและตรวจพบปริมาณสารไดออกซินในร่างกายตั้งแต่ 99 ถึง 140 ng/kg หรือเฉลี่ย 8 เท่าของ
ค่าเฉลี่ยของสารไดออกซินในประชากรอเมริกัน

2.3 ผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune system) การศึกษาในลิงมาร์โม
เซท (marmoset monkeys) พบว่าเมื่อมีไดออกซินอยู่ในร่างกายประมาณ 10 ng/kg จะทำให้
ปริมาณเม็ดเลือดขาวที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันลดลงไป 25 % และการศึกษาในหนูก็ให้ผลใน
ทำนองเดียวกัน

2.4 ผลต่อระบบอวัยวะสืบพันธุ์และฮอร์โมน ในเพศชายทำให้ขนาดอวัยวะลดลง
และจำนวนเชื้ออสุจิลดลง นักวิจัยแห่งสถาบันสุขภาพอาชีพอาชีวอนามัยและความปลอดภัยในการ
ทำงานแห่งชาติ (The National Institute of Occupational Safety and Health, NIOSH) ของ
สหรัฐอเมริกา พบว่าผู้ชายที่ทำงานและมีไดออกซินอยู่ในกระแสเลือด จะมีระดับเทสโตสเตอโรนซึ่งเป็น
ฮอร์โมนเพศชายลดลง รวมทั้งฮอร์โมนเพศชายชนิดอื่น ๆ ด้วย อย่างไรก็ตาม แม้ระดับของเทส
โตสเตอโรนจะลดลงแต่ก็ยังถือว่าอยู่ในระดับปกติ

2.5 ภาวะเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบ (endometriosis) พบว่าลิงรีซัส (rhesus
monkeys) เพศเมียที่มีไดออกซินในร่างกายสูงกว่าค่าเฉลี่ยในคนอเมริกัน 5 เท่า จะมีอาการปวด
ท้องอันเกิดจากเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบ ความผิดปกติดังกล่าวนี้พบในสตรีชาวอเมริกันถึง 5 ล้าน
คน

2.6 ความพิการของทารก พุทธิกรรมและการเรียนรู้ผิดปกติ จากการศึกษาของบุตร
ของทหารอเมริกันที่ทำการรบในสงครามเวียดนาม พบว่ามีการเพิ่มอุบัติการณ์ของความผิดปกติ
แต่กำเนิดในระบบประสาท หัวใจ ไต ผิวน้ำ และช่องปาก (ริมฝีปากแหว่งและเพดานโหว่) ใน

ทารกแรกเกิด มีการศึกษาในลูกลิงพบว่าปริมาณสารไดออกซินเพียง 42 ng/kg มีผลทำให้การเจริญรูปร่างผิดปกติ

2.7 กระตุ้นให้เกิดมะเร็งบางชนิดในมนุษย์และสัตว์ทดลอง เช่น มะเร็งของเนื้อเยื่ออ่อน มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งเม็ดโลหิตขาว เป็นต้น มีรายงานผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็ง 5 รายที่เกิดจากการสัมผัสกับไดออกซิน ไม่ว่าจะโดยอุบัติเหตุหรือโดยการปฏิบัติหน้าที่เป็นประจำ รายงานเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า แม้ว่าจะมีไดออกซินอยู่ในร่างกายเพียง 109 ng/kg มีการคาดคะเนว่าสารไดออกซินทำให้โอกาสเกิดมะเร็งเต้านมในเพศหญิงเพิ่มขึ้นโดยในปี พ.ศ. 2503 1 ใน 20 คนของผู้หญิงอเมริกันมีโอกาสที่จะเป็นโรคมะเร็งเต้านม แต่ปัจจุบันนี้อัตราการเกิดมะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้นเป็น 1 ใน 8 คน สำหรับกลไกในการเกิดมะเร็งในมนุษย์ยังไม่ทราบแน่นอน มีการศึกษาในสัตว์ทดลองยืนยันแน่นอนแล้วว่าสาร 2,3,7,8-TCDD ทำให้เกิดมะเร็งได้ในสัตว์ โดย 2,3,7,8-TCDD ไม่จับและไม่ทำลายดีเอ็นเอแต่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเน่าสลายของเซลล์ กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์และส่งเสริมให้เกิดมะเร็ง (tumor promotion)

2.8 ผลต่อสภาพจิตใจ จากการทดสอบสภาพจิตใจพบว่าในกลุ่มที่สัมผัสกับสารไดออกซินมีความอ่อนล้า ความโกรธ และพฤติกรรมแยกตัวเองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญมากกว่ากลุ่มควบคุม

2.9 เหตุการณ์ที่เกี่ยวข้องกับสารไดออกซิน

ปี ค.ศ. 1962-1971 ทหารอเมริกันในสงครามเวียดนามใช้สารสีส้ม (agent orange) มากกว่า 12 ล้านแกลลอน ไปรยจากเฮลิคอปเตอร์ลงพื้นที่ป่าของเวียดนาม ในการทำลายใบไม้และต้นไม้เพื่อเปิดป่าให้เห็นทัศนวิสัย ป้องกันการซุ่มโจมตี และเปิดช่องทางก้ำบังของทหารเวียดนาม ซึ่งสารเคมีดังกล่าวประกอบด้วย 2,4,5-T, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ 2,3,7,8-TCDD (จตุรงค์ ตันติมงคลสุข และคณะ, 2543) ผลจากปฏิบัติการครั้งนี้ทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของทหารอเมริกันที่คลุกอยู่กับสารพิษดังกล่าว และทำให้เกิดการทำลายสภาพแวดล้อมอย่างรุนแรงโดยเฉพาะการตกค้างและปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ปี ค.ศ. 1976 เกิดอุบัติเหตุระเบิดที่โรงงานเคมีชื่อ Hoffman-La Roche ที่เมืองเซวิโซ (Seveso) ประเทศอิตาลี เหตุการณ์ครั้งนั้นเกิดมีกลุ่มควันของสารเคมีปกคลุมพื้นที่เป็นบริเวณกว้าง (นิตยา วีระกุล, 2542) ทำให้มีการปนเปื้อนของไดออกซินในพื้นที่ประมาณ 3 ตารางไมล์ (7.8 ตารางกิโลเมตร) มีสัตว์ตายจำนวนมาก ประชาชนที่อยู่ในพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบ 36,000 คนรอดชีวิตแต่พบว่ามี 193 รายเกิดโรค chloracne (O'Neill, 1993) และพบว่ามี 2,3,7,8-TCDD ปนเปื้อนในผักผลไม้ถึงระดับ 50 ไมโครกรัม/กรัม (วิทยา สังข์ทอง, 2545)

ปี ค.ศ. 1979 ที่ประเทศไต้หวัน มีประชาชน 1,843 ราย เจ็บป่วยจากการบริโภคน้ำมันที่ปนเปื้อนด้วย PCDFs (จากรวรรณ วิริยะศิริกุล, 2542)

ปี ค.ศ. 1999 - มีการขุดพบสารพิษจากการทำการปรับปรุงทางวิ่ง (run way) ในบริเวณท่าอากาศยานหัวหินหรือสนามบินบ่อฝ้าย โดยได้ใช้รถตักดินเพื่อขุดลอกหน้าดินออกจนถึงระดับดินดาน ระหว่างทำการขุดจนมาถึงบริเวณทางขับ (taxi way) คนงานของบริษัทที่ได้รับการว่าจ้างขุดพบถึงบรรจุสารเคมีขนาดประมาณ 15 ลิตร ฝังอยู่ใต้ดินที่ระดับความลึก 1.2 เมตร จำนวน 5 ถัง ซึ่งถังมีสภาพฉีกขาด และยังมีถังโลหะผุพังขนาด 200 ลิตรอยู่ข้างเคียง ไม่พบสารเคมีใด ๆ หลงเหลืออยู่ในถัง แต่พบว่าดินบริเวณนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงส่งกลิ่นเหม็นรุนแรงฟุ้งกระจายเป็นบริเวณกว้าง ทางกรมควบคุมมลพิษได้เปิดเผยว่าสหรัฐฯเคยใช้สนามบินบ่อฝ้ายเป็นที่ผสมสารเคมีในการวิจัยปฏิบัติงานในการใช้สารทำลายใบไม้ระหว่างปี พ.ศ. 2507-2508 เพื่อใช้ในสงครามเวียดนาม และผลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างดินปนเปื้อนระดับ 2.7-5.0 เมตร พบว่ามีสาร dibutyl disulfide ปริมาณ 540 ppm สาร s,s,s-tributylphosphorotrithioate ปริมาณ 3,900 ppm สารที่เป็นอนุพันธ์ของ 2,4-D ปริมาณ 35 ppm สารที่เป็นอนุพันธ์ของ 2,4,5-T ปริมาณ 14 ppm สาร 2,4-dichlorophenol 11 ppm และสาร trichlorophenol 10 ppm และผลจากการตรวจตัวอย่างดินจากห้องปฏิบัติการเอกชนในสหรัฐอเมริกา ตรวจพบ 2,3,7,8-TCDD ในระดับ 1.04 ppt (สุภัทรา ภิญญิตติกุล, 2542; สุมล ปวีตวานนท์, 2542)

- พบสารไดออกซินปนเปื้อนในอาหารและผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อสัตว์ นม ไข่จากประเทศเบลเยียม ฝรั่งเศส และเนเธอร์แลนด์ โดยสาเหตุเกิดจากการปนเปื้อนของไดออกซินในไขมันที่นำมาผลิตอาหารสัตว์ของบริษัทในประเทศเบลเยียม ซึ่งทางบริษัทได้ขายส่วนผสมไขมันที่มีการปนเปื้อนไดออกซินให้กับโรงงานผลิตอาหารสัตว์ภายในประเทศเบลเยียมเอง 10 แห่ง ฝรั่งเศส 1 แห่ง และเนเธอร์แลนด์ 1 แห่ง โดยทางโรงงานอาหารสัตว์เหล่านี้ได้จำหน่ายอาหารสัตว์ที่ปนเปื้อนไดออกซินให้แก่ฟาร์มไก่ หมู โคเนื้อ และโคนม รวมแล้วกว่า 1,000 แห่ง ทำให้มีการปนเปื้อนของสารไดออกซินในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไก่ หมู และโคกระจายออกไปสู่ภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลก (จตุรงค์ ตันติมงคลสุข และคณะ, 2543) ซึ่งสารไดออกซินดังกล่าวนี้ทางสถาบันสาธารณสุขสหรัฐฯได้กำหนดค่าไดออกซินที่ร่างกายมนุษย์สามารถรับได้ไม่เกินวันละ 0.001 ไมโครกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัมต่อวัน ขณะที่เบลเยียมได้กำหนดค่าของสารไดออกซินให้มีในอาหารสัตว์ไม่เกิน 5 พิโคกรัมต่อปริมาณไขมัน 1 กรัม แต่จากผลการตรวจพบไดออกซินในผลิตภัณฑ์จากไก่ที่ผลิตในเบลเยียม ปรากฏว่ามีไดออกซินปนเปื้อนสูงถึง 2,400 พิโคกรัมต่อปริมาณไขมัน 1 กรัม และในไข่ไก่พบไดออกซินปนเปื้อนสูงถึง 265-773 พิโคกรัมต่อปริมาณไขมัน 1 กรัม (ปรีชา กันทรากรกิติ, 2542) ทำให้ขณะนั้นหลายชาติในเอเชียรวมถึงประเทศไทยได้ระงับการนำเข้าหรือจำหน่ายเนื้อสัตว์ นม ไข่ และผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนจากประเทศดังกล่าว

2.10 กฎหมายที่ควบคุมสารไดออกซิน

ประเทศต่าง ๆ ได้มีการกำหนดกฎเกณฑ์และมาตรฐานเพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมสารไดออกซินดังนี้ (จารุพงศ์ บุญ-หลง, 2544)

- ประเทศเนเธอร์แลนด์ ได้กำหนดไว้ให้มนุษย์สามารถรับสาร PCDDs/PCDFs ในแต่ละวันได้ไม่เกิน 0.04 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม
- ประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดความเข้มข้นสูงสุดในน้ำดื่มที่ 0.03 นาโนกรัมต่อลิตร
- ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี กำหนดความเข้มข้นในน้ำมันไม่เกิน 0.9 นาโนกรัม (ng.I-TEQ) ต่อปริมาณไขมัน 1 กิโลกรัม และถ้าพบว่ามีค่าเกิน 5.0 ng.I-TEQ ก็จะไม่อนุญาตให้มีการจำหน่ายและทำลายผลิตภัณฑ์นมนั้น ๆ เสีย

เนื่องจากเตาเผาอุณหภูมิสูงเกือบทุกชนิดเป็นแหล่งกำเนิดไดออกซินที่สำคัญที่สุด ดังนั้นประเทศต่าง ๆ ที่เจริญแล้วทั่วโลก จึงมีมาตรฐานการปลดปล่อยสารสู่บรรยากาศ โดยได้มีการกำหนดค่ามาตรฐานการปลดปล่อย PCDDs/PCDFs ไว้เป็นปริมาณ “นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตรของปริมาตรอากาศ” (ดังตารางที่ 2.4) การกำหนดมาตรฐานส่วนใหญ่จะใช้หน่วยเดียวกันคือ นาโนกรัม โดยเป็นผลจากการวัดสาร PCDDs และ PCDFs แต่ละตัว แล้วนำค่าที่วัดได้ไปคูณด้วยค่าเปรียบเทียบความเป็นพิษหรือ ค่า I-TEF (ตารางที่ 2.2) แล้วนำผลบวกของแต่ละค่าออกมาเป็นปริมาณ PCDDs/PCDFs ทั้งหมดต่อปริมาตรอากาศ 1 ลูกบาศก์เมตรหรือ Nm^3 (Normalized cubic meter) และเรียกค่านี้ว่า “ng.I-TEQ/ Nm^3 ” สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกามีการตรวจวัดและกำหนดค่ามาตรฐานเป็นค่ารวม (total) ทั้งหมดของ PCDDs และ PCDFs ที่วัดจริงโดยมิได้นำค่าเปรียบเทียบความเป็นพิษ (I-TEF) มาคูณ ค่าที่ออกมาจึงสูงกว่าค่ามาตรฐานของประเทศต่างๆ ในยุโรปและเอเชียบางประเทศ ค่ามาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกาเรียกว่า “ng.total/ Nm^3 ” ซึ่งประเทศไทยได้นำระบบของประเทศสหรัฐอเมริกามาใช้เป็นค่ามาตรฐานสำหรับเตาเผาขยะชุมชนในปัจจุบันนี้เช่นกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.4 ค่ามาตรฐาน PCDDs/PCDFs จากเตาเผาอุณหภูมิสูงของประเทศต่าง ๆ

ประเทศ	ค่ามาตรฐาน	หมายเหตุ
ออสเตรเลีย	0.1 ng.I-TEQ/Nm ³	เตาเผาทุกขนาด
แคนาดา	0.1 ng.I-TEQ/Nm ³	เตาเผาทุกขนาด
เดนมาร์ก	0.1 ng.I-TEQ/Nm ³	เตาเผาทุกขนาด
สหภาพยุโรป	0.1 ng.I-TEQ/Nm ³	เตาเผาทุกขนาด
เยอรมันนี	0.1 ng.I-TEQ/Nm ³	เตาเผาทุกขนาด
อังกฤษ	0.1 ng.I-TEQ/Nm ³	เตาเผาทุกขนาด
ญี่ปุ่น (มาตรฐานเก่า)	0.5 ng.I-TEQ/Nm ³	เตาเผาขนาดใหญ่
ญี่ปุ่น (มาตรฐานใหม่)	0.1 ng.I-TEQ/Nm ³	เตาเผาขนาดใหญ่
เนเธอร์แลนด์	0.1 ng.I-TEQ/Nm ³	เตาเผาทุกขนาด
สวีตเซอร์แลนด์	0.1 ng.I-TEQ/Nm ³	เตาเผาทุกขนาด
ไต้หวัน	1.0 ng.I-TEQ/Nm ³	เตาเผาทุกขนาด
สหรัฐอเมริกา (มาตรฐานเก่า)	30 ng.total/Nm ^{3*}	เตาเผาขนาดใหญ่***
สหรัฐอเมริกา (มาตรฐานใหม่)	13 ng.total/Nm ^{3**}	เตาเผาขนาดใหญ่

หมายเหตุ * 30 ng.total/Nm³ เท่ากับประมาณ 0.5 ng. I-TEQ/Nm³

** 13 ng.total/Nm³ เท่ากับประมาณ 0.2 ng. I-TEQ/Nm³

*** เตาขนาดใหญ่ของสหรัฐอเมริกา หมายถึงเตาเผาขนาดตั้งแต่ 250 ตัน/วัน

ที่มา: จารุพงศ์ บุญ-หลง, 2544

ประเทศไทยมีกฎหมายที่ควบคุมสารไดออกซินเพียงฉบับเดียว คือ ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม พ.ศ.2540 เรื่องกำหนดมาตรฐานควบคุมการปล่อยทิ้งอากาศเสียจากเตาเผามูลฝอย ซึ่งกำหนดให้อากาศเสียที่ปล่อยทิ้งจากเตาเผามูลฝอยที่กำหนดมูลฝอยได้ตั้งแต่ 1 ตันแต่ไม่เกิน 50 ตันต่อวัน ต้องมีค่าสารประกอบไดออกซิน (dioxins as total chlorinated PCDD plus PCDF) ไม่เกิน 30 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร โดยวิธีการตรวจวัดสารประกอบไดออกซินให้ใช้วิธี Determination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans from stationary sources ที่องค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งประเทศสหรัฐอเมริกาคำหนดไว้หรือวิธีอื่นที่ทางกรมควบคุมมลพิษเห็นชอบเท่านั้น (กรมควบคุมมลพิษ, 2542; ขนิษฐา ทวีถาวรสวัสดิ์, 2543)

2.11 มาตรการควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนสารไดออกซินระดับโลก (จารุพงศ์ บุญ-หลง, 2544; วิทยา สังข์ทอง, 2545)

สืบเนื่องจากคณะมนตรีประศาสน์การโครงการสิ่งแวดล้อมแห่งสหประชาชาติ (UNEP Governing Council) เมื่อเดือนพฤษภาคม 2538 มีมติให้องค์การระหว่างชาติ Inter- Organization Programme on the Sound Management of Chemical (IOMC) ร่วมกับ Intergovernmental Forum of Chemical Safety (IFCS) ดำเนินการพิจารณา แนวนโยบาย มาตรการและแผนปฏิบัติในการจัดการสารเคมีอย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อสุขภาพมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ตามแผนปฏิบัติเพื่อพิทักษ์สิ่งแวดล้อมโลกในศตวรรษที่ 21 (Agenda 21) โดยหนึ่งในแผนปฏิบัติได้กำหนดกลไกทางกฎหมายระหว่างประเทศ เพื่อลดความเสี่ยงต่อสุขภาพมนุษย์และสิ่งแวดล้อมจากการปลดปล่อยสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน (Persistent Organic Pollutants : POPs) เบื้องต้น 12 ชนิด ทำให้กิจกรรมระหว่างประเทศและองค์การระหว่างประเทศ ตลอดจนการดำเนินการตามอนุสัญญาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องได้ให้ความสำคัญต่อสารในกลุ่ม POPs มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PCDDs และ PCDFs โดยโครงการสิ่งแวดล้อมแห่งสหประชาชาติ (UNEP) และองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้มีความเห็นสอดคล้องกันคือ ต้องการให้มีกลไกทางกฎหมายระหว่างประเทศเพื่อควบคุมการปลดปล่อยสาร POPs เบื้องต้น 12 ชนิดดังกล่าว โดยร่วมกับรัฐบาลประเทศต่าง ๆ จัดให้มีการประชุมคณะกรรมการ การเจรจาระหว่างรัฐบาล เพื่อเตรียมกลไกทางกฎหมายระหว่างประเทศบังคับใช้

กลไกทางกฎหมายนี้ได้มีการพิจารณาและเจรจาต่อรองระหว่างรัฐบาลของประเทศต่าง ๆ รวม 135 ประเทศ ตั้งแต่ พ.ศ. 2541-2543 การประชุมเสร็จสิ้นสมบูรณ์แล้ว และได้ประกาศใช้เป็นอนุสัญญาเรียกว่า อนุสัญญากรุงสตอกโฮล์มว่าด้วยสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน (Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants)

จุดมุ่งหมายของอนุสัญญา คือ เพื่อคุ้มครองสุขภาพของมนุษย์และสิ่งแวดล้อมจาก POPs เบื้องต้น 12 ชนิด คือ aldrin, chlordane, DDT, dieldrin, endrin, heptachlor, hexachlorobenzene (HCB), mirex, toxaphene, PCB, PCDDs และ PCDFs ซึ่งสารเหล่านี้เป็นกลุ่มสารอินทรีย์ซึ่งถูกย่อยสลายยากโดยแสงอาทิตย์ หรือสารเคมี หรือโดยชีวภาพ ทำให้เกิดการตกค้างเป็นเวลานานและสามารถเคลื่อนย้ายได้ไกลมาก มีคุณสมบัติละลายน้ำได้น้อยมาก แต่ละลายได้ดีในไขมัน จึงเป็นผลให้สะสมในไขมันของสิ่งมีชีวิต มีความเป็นพิษสูง เป็นสาเหตุของการเสียชีวิต การเจ็บป่วย และความพิการแต่กำเนิด เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง อากาศแพ้ และระบบประสาทไวต่อความรู้สึก ระบบประสาทส่วนกลางและรอบนอกถูกทำลาย ระบบการสืบพันธุ์

บกพร่อง สาร POPs บางชนิดสามารถเปลี่ยนแปลงระบบฮอร์โมน ทำลายระบบการสืบพันธุ์ และระบบภูมิคุ้มกัน

สำหรับประเทศไทยเมื่อวันที่ 14 พฤษภาคม 2545 มีมติคณะรัฐมนตรีเห็นชอบให้ประเทศไทยลงนามเข้าเป็นภาคีในอนุสัญญากรุงสตอกโฮล์มว่าด้วยสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน โดยให้กระทรวงการต่างประเทศ เป็นผู้ดำเนินการลงนาม ณ สำนักงานใหญ่ สหประชาชาติ นครนิวยอร์ก ประเทศสหรัฐอเมริกา ภายในวันที่ 22 พฤษภาคม 2545 และเห็นชอบในหลักการกับการให้สัตยาบัน (Ratify) ต่อนอนุสัญญาดังกล่าว แต่ในการให้สัตยาบัน เพื่อให้ประเทศไทยเป็นภาคีสมาชิกในอนุสัญญาฯ นี้ โดยสมบรูณ์ให้กระทำต่อเมื่อประเทศไทยมีความพร้อมในทางปฏิบัติ และให้กรมควบคุมมลพิษประสานงานกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องของพิจารณาศึกษา และเตรียมความพร้อมโดยให้มีคณะกรรมการเพื่อจัดทำแผนปฏิบัติการตามข้อกำหนดและพันธกรณี รวมถึงเพื่อกำหนดหน้าที่ของหน่วยงานต่าง ๆ ในการปฏิบัติตามข้อบัญญัติของอนุสัญญา เพื่อการเป็นภาคีสมาชิกโดยสมบรูณ์ต่อไป และได้มีการเตรียมความพร้อมในเรื่องกฎหมายที่จะรองรับการปฏิบัติตามพันธกรณีของอนุสัญญาฯ ได้แก่

1. พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535
2. พระราชบัญญัติโรงงาน พ.ศ. 2535
3. พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535
4. พระราชบัญญัติศุลกากร พ.ศ. 2469
5. พระราชบัญญัติศุลกากร (ฉบับที่ 9) พ.ศ. 2482
6. พระราชบัญญัติการส่งออกป้อนอกและการนำเข้ามาในราชอาณาจักรซึ่งสินค้า พ.ศ. 2522
7. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2540) ออกตามความในพระราชบัญญัติโรงงาน พ.ศ. 2535 เรื่อง การกำจัดสิ่งปฏิกูลหรือวัสดุที่ไม่ใช้แล้ว

2.12 การบำบัดสารไดออกซิน

Arienti และคณะ (1988) ได้แบ่งเทคโนโลยีที่ใช้ในการบำบัดไดออกซินไว้ 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. เทคโนโลยีในการบำบัดโดยใช้ความร้อน (Thermal technology) เป็นการทำลายไดออกซินโดยใช้ความร้อนหรือการออกซิเดชันที่อุณหภูมิมากกว่า 1,000 องศาเซลเซียส ได้แก่
 - Stationary rotary kiln incineration
 - Mobile rotary kiln incineration
 - Liquid injection incineration

- Fluidized-bed incineration
- Infrared incinerator
- High temperature fluid wall destruction
- Plasma arc pyrolysis
- Molten salt destruction
- In situ vitrification
- Supercritical water oxidation

อย่างไรก็ตามมี 3 เทคโนโลยีที่ใช้ความร้อนสำหรับบำบัดไดออกซินที่ประสบความสำเร็จ ได้แก่ EPA mobile rotary kiln incineration, Huber' s high temperature fluid wall reactor, Shirco' s infrared incinerator และที่เทคโนโลยีน่าเป็นไปได้ คือ Modar's supercritical water oxidation ซึ่งแสดงรายละเอียดไว้ดังตารางที่ 2.5

2. เทคโนโลยีในการบำบัดโดยไม่ใช้ความร้อน (Nonthermal technology) ได้แก่

- Chemical dechlorination
- Ultraviolet (UV) photolysis
- Solvent extraction
- Biodegradation
- Stabilization/fixation
- Chemical degradation using ruthenium tetroxide
- Chemical degradation using chloroiodides
- Gamma ray radiolysis

ตัวอย่างเทคโนโลยีในการบำบัดไดออกซินโดยไม่ใช้ความร้อนที่น่าสนใจแสดงไว้ในตาราง

ที่ 2.6

สถาบันนวัตกรรมการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.5 เทคโนโลยีการบำบัดสารไดออกซินโดยใช้ความร้อน

Process name	Applicable waste streams	Residuals generated
Mobile Rotary Kiln Incineration	Solids, liquids, sludges	Treated waste material (ash), scrubber wastewater, particulate from air filters, gaseous products of combustion
High Temperature Fluid Wall (Huber AER)	Primarily for granular contaminated solids, but may also handle liquids	Treat waste solids (converted to glass beads), particulates from baghouse, gaseous effluent (primarily nitrogen)
Infrared Incinerator (Shirco)	Contaminated solids/sludges	Treated material (ash); particulates captured by scrubber (separated from scrubber water)
Supercritical Water Oxidation	Aqueous solutions or slurries with less than 20 percent organics can be handled	High purity water, inorganic salts, carbondioxide, nitrogen

ที่มา: Arienti และคณะ, 1988

ตารางที่ 2.6 เทคโนโลยีการบำบัดสารไดออกซินโดยไม่ใช้ความร้อน

Process name	Applicable waste streams	Residuals generated
Chemical Dechlorination APEC processes	Contaminate soil (other variations of the process used to treat PCB-contaminated oils)	Treated soil containing chloride salts (reagent is recovered in the slurry process)
UV Photolysis	Liquids, still bottoms, and soils can be treated if dioxin is first extracted or desorbed into liquid	Solvent extraction/UV process generated treated still bottoms, a solvent extract stream, and an aqueous salt stream; thermal desorption/UV generates a treated soil stream and a solvent extract stream
Solvent Extraction	Solids, still bottoms	Treated waste material (solid, organic, liquid); solvent extract with concentrated TCDD
Biological Degradation- primarily in situ addition of microbes	Research has been directed toward in situ treatment of contaminated soil – liquids are also possible	Treat waste medium such as soil or water with TCDD metabolites depending on microorganisms

2.13 การย่อยสลายทางชีวภาพ

การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) คือ กระบวนการทางชีวเคมีในการทำให้เกิดการแตกสลายของสารอินทรีย์ต้นแบบที่มีโครงสร้างซับซ้อนไปเป็นสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลเล็กลงโดยอาศัยสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ ซึ่งอาจได้สารที่มีความเป็นพิษมากขึ้นหรือลดลง (Arienti, 1988) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์มีดังนี้ (กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา, 2543)

1. สภาพแวดล้อมของการเจริญของจุลินทรีย์

ปัจจัยเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์เช่น สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นแหล่งพลังงาน แหล่งธาตุคาร์บอน แหล่งธาตุไนโตรเจน แหล่งเกลือแร่ แหล่งวิตามิน แหล่งสารส่งเสริมการเจริญ ก๊าซต่าง ๆ อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ เป็นต้น ทั้งนี้ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมของการเจริญที่สำคัญยิ่งได้แก่

1) ปริมาณออกซิเจน

โดยทั่วไปอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจะเกิดขึ้นในอัตราที่เร็วกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ยกเว้นการย่อยสลายแบบกลดอม (xenobiotic compound) บางชนิด ดังนั้นการเติมอากาศหรือเพิ่มปริมาณออกซิเจนจึงสามารถเร่งอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพได้

2) ปริมาณสารอินทรีย์

ในสภาพแวดล้อมที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูงก็จะพบจุลินทรีย์ในปริมาณที่สูง ยังผลให้มีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพที่สูง เนื่องจากจุลินทรีย์ได้รับสารอาหารในการเจริญอย่างเพียงพอ

3) ปริมาณไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารอีกชนิดหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การที่มีปริมาณอย่างเพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จะเป็นการช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ ในการย่อยสลายทางชีวภาพของสารอินทรีย์มักมีปัญหาในด้านการขาดธาตุไนโตรเจน ดังนั้นการเติมปุ๋ยไนโตรเจนจะสามารถเร่งอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษา *Phanerochaete chrysosporium* ในการย่อยสลายสารไดออกซิน พบว่าการจำกัดแหล่งไนโตรเจนในอาหารทำให้เกิดการย่อยสลายสารไดออกซินได้ดีกว่า (Bumpus และคณะ, 1985; Valli, Wariishi และGold, 1992)

2. การเคยสัมผัสกับสารแปลกปลอม

การที่จุลินทรีย์เคยสัมผัสกับสารแปลกปลอมนั้น ๆ มาก่อนเป็นการลดระยะเวลาในการปรับตัวที่เรียกว่า metabolic adaptation ในระยะ lag phase โดยการเปลี่ยนแปลงซึ่งจะทำให้การผลิตเอนไซม์ที่จะใช้เพื่อการย่อยสลายดำเนินไปได้ดี และเป็นการเร่งอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพให้เร็วขึ้น

3. ปริมาณเริ่มต้นของจุลินทรีย์ที่จำเพาะต่อการย่อยสลาย

หากปริมาณเริ่มต้นของจุลินทรีย์ที่จำเพาะต่อการย่อยสลายมีมาก จะทำให้มีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่มาก และอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพก็จะเกิดขึ้นได้ดี

4. การมีแหล่งคาร์บอนที่ย่อยสลายได้ง่าย

ในสภาพแวดล้อมอย่างเดียวกัน จุลินทรีย์จะเลือกย่อยสลายสิ่งที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่าก่อน ดังนั้นการที่มีแหล่งคาร์บอนที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่าอยู่ด้วยจะทำให้จุลินทรีย์มีการปรับตัวให้เข้ากับสารแปลกปลอมนั้น ๆ ได้ช้าลง การผลิตเอนไซม์ที่จำเพาะต่อการย่อยสลายจึงช้าลง และทำให้อัตราการย่อยสลายสารแปลกปลอมเกิดขึ้นได้ช้ากว่าที่ควร

5. ระดับความเข้มข้นของสารแปลกปลอม

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีระดับความเข้มข้นของสารแปลกปลอมที่ยอมรับได้ ระดับความเข้มข้นของสารแปลกปลอมที่สูงกว่าระดับที่ยอมรับได้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ แต่ในทางตรงกันข้ามหากระดับความเข้มข้นของสารแปลกปลอมต่ำเกินไป การปรับตัวของจุลินทรีย์ต่อสารแปลกปลอมนั้น ๆ ก็จะไม่เกิดขึ้น

6. ลักษณะสมบัติของสารแปลกปลอม

ลักษณะสมบัติของสารแปลกปลอมที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลาย คือลักษณะสมบัติทางเคมี เช่น โครงสร้างโมเลกุล และมวลโมเลกุล เป็นต้น และลักษณะสมบัติทางกายภาพ เช่น การละลายน้ำ การระเหย และความสามารถในการถูกดูดซับโดยของแข็ง เป็นต้น ทั้งนี้ลักษณะสมบัติที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายคือ โครงสร้างทางเคมี และการละลายน้ำ

สารแปลกปลอมที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับสารที่มีอยู่ในธรรมชาติ จะเกิดการย่อยสลายได้ง่าย และสารแปลกปลอมที่มีโครงสร้างซับซ้อนอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพจะช้ากว่าชนิดที่มีโครงสร้างง่าย ๆ เช่น สารแอมโรแมติกไฮโดรคาร์บอนจะมีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพที่ช้ากว่าแอลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน ด้านสมบัติการละลายน้ำ สารแปลกปลอมที่ละลายน้ำได้ดี

กว่าจะมีอัตราการย่อยทางชีวภาพที่สูงกว่า เนื่องจากสารอาหารที่นำเข้าสู่เซลล์ก็มาจากสารที่ละลายอยู่ในน้ำรอบ ๆ เซลล์ ดังนั้นสารที่ละลายน้ำได้น้อยจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ได้น้อยกว่า

2.14 การย่อยสลายสารไดออกซินโดยจุลินทรีย์

Bumpus และคณะ (1985) พบว่าราไวท์รอต (white rot) *Phanerochaete chrysosporium* สามารถย่อย 2,3,7,8-TCDD ได้ช้า ๆ จนได้ CO₂ ภายใต้สภาวะขาดไนโตรเจน โดยที่ราชนิดนี้จะขับเอนไซม์ย่อยลิกนินออกมาย่อยสาร 2,3,7,8-TCDD Valli และคณะ (1992) ก็ได้ศึกษาราสายพันธุ์นี้ในการย่อย 2,7-dichloro dibenzo-*p*-dioxin (2,7-DCDD) โดยเอนไซม์ lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) และ crude intracellular cell-free extracts จากการศึกษาค้นคว้าได้เสนอกระบวนการย่อยสลายสารนี้ไว้ ซึ่งการย่อยสารดังกล่าวจะผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน รีดักชัน และ เมทิลเลชัน ให้สารมัธยันตร์ (intermediate) ที่สำคัญคือ 1,2,4-trihydroxybenzene เมื่อสาร 1,2,4-trihydroxybenzene ได้แตกวงออกหลังจากเกิดปฏิกิริยา รีดักชันได้ β -keto adipic acid ในปี 1994 Joshi และ Gold ได้ศึกษาราสายพันธุ์นี้เช่นกัน โดยศึกษาการออกซิเดชันของ dibenzo-*p*-dioxin (DD) โดยเอนไซม์ LiP ทำให้เกิดสาร catechol, dibenzo-*p*-dioxin-2,3-quinone, 2-hydroxy-5-(2-hydroxyphenoxy)-1,4-benzo quinone, 4,5-dihydroxy-1,2-benzoquinone, 2-(2-hydroxy phenoxy)-1,4-benzoquinone, 4-hydroxy-1,2-benzoquinone และ 1,2-benzoquinone

Takada และคณะ (1996) ศึกษาราไวท์รอตเช่นกัน คือ *Phanerochaete sordida* YK-624 ในการย่อยส่วนผสมของสาร 10 ชนิด คือ tetra- ถึง octachlorodibenzo-*p*-dioxins และ tetra- ถึง octachlorodibenzofurans โดยใช้อาหารเหลวที่มีไนโตรเจนต่ำและคงที่ พบว่าราสายพันธุ์นี้ย่อย PCDDs ได้ประมาณ 40% (tetrachloro-) ถึง 76% (hexachloro-) และย่อย PCDFs ได้ประมาณ 45% (tetrachloro-) ถึง 70% (hexachloro-) สารที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อย tetra- และ octaCDD คือ 4,5-dichlorocatechol และ tetrachlorocatechol ตามลำดับ

Wittich และคณะ (1992) ศึกษาแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ RW1 ที่แยกจากตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำ Elbe พบว่าแบคทีเรียนี้สามารถเจริญและใช้ DD และ dibenzofuran (DF) เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และได้เสนอกระบวนการย่อยสลายของ DD พบว่าเกิด 2,2',3-trihydroxydiphenyl ether จากนั้นเมื่อเกิดการแตกวงจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ catechol Wilkes และคณะ (1996) ศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เพิ่มเติมพบว่าสามารถย่อย mono- และ dichlorinated dibenzofurans และ dibenzo-*p*-dioxins แต่ไม่สามารถย่อย CDD และ CDF ที่มีอะตอมคลอรีนจำนวนมากได้ โดยส่วนใหญ่ mono- และ dichlorinated dibenzofurans จะถูก

ย่อยได้ mono- และ dichlorinated salicylates และ salicylate ส่วน mono- และ dichlorinated dibenzo-*p*-dioxins จะถูกย่อยได้ mono- และ dichlorinated catechols และ catechol

Kimura และ Urushigawa (2001) ศึกษาแบคทีเรีย *Rhodococcus opacus* SAO 101 ที่แยกจากตัวอย่างดินป่า ในการย่อย DD และ PCDDs พบว่าความสามารถในการย่อยสลายขึ้นกับจำนวนอะตอมคลอรีน และตำแหน่งของการแทนที่ของอะตอมคลอรีน ในการศึกษาการย่อยของ DD พบว่าเกิด dihydrodiol, 2,2',3'-trihydroxybiphenyl ether และสารประกอบ meta-cleavage ของ 2,2',3'-trihydroxybiphenyl ether รวมทั้งเกิดการสะสมของสารประกอบ ไดไฮดรอกซี (dihydroxy)

Mori และ Kondo (2002a) คัดคว้า 136 สายพันธุ์เพื่อการย่อย DD พบว่า 8 สายพันธุ์ที่ลด DD ได้มากกว่า 20 % หลังการบ่ม 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมี 3 สายพันธุ์ได้แก่ MZ-227, *Phlebia* sp. MG-60 และ *Phlebia lindtneri* มีการอัตราการเกิด $^{14}\text{CO}_2$ สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ

Mori และ Kondo (2002b) ศึกษาการย่อยสลาย 2,7-DCDD และ 2,8-DCDF โดยใช้ราไวท์รอก *Phlebia lindtneri* พบว่าหลังการบ่ม 20 วัน เหลือ 2,7-DCDD 45% และสารที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อยเมื่อทำการบ่มเป็นระยะเวลา 5 วัน ของ 2,7-DCDD และ 2,8-DCDF คือ hydroxy-diCDD และ hydroxy-diCDF ตามลำดับ

Sato และคณะ (2002) คัดเลือกราก *Panellus stypticus* strain 99-334 ที่ได้คัดกรองเบื้องต้นโดยใช้สี remazol brilliant blue r เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อย 2,7-DCDD ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 μM พบว่าราสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสารตั้งต้นได้ทั้งหมด ภายในระยะเวลา 40 วัน และตรวจพบสารมัธยันตร์ 1-chloro-3,4-dihydroxybenzene

Rosenbrock และคณะ (1997) ศึกษาการ mineralization ของ DD ในตัวอย่างดินเกษตร 3 ชนิดที่แตกต่างกันที่ปนเปื้อนด้วย PCDDs และ PCDFs จากกิจกรรมอุตสาหกรรม โดยได้ทดสอบอิทธิพลของการเติมฟางข้าว บัว และ การเติมด้วย lignolytic fungi พบว่า การ mineralize ที่ดีที่สุดคือการเติมราไวท์รอกทลงไป ซึ่งได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus* sp. Florida, *Dichomitus squalens* และราที่ไม่สามารถระบุได้ที่แยกจากดินที่ปนเปื้อน โดยราแต่ละชนิดมีผลต่อการ mineralize ไม่เท่ากัน

2.15 การย่อยสลายสารไดเบนโซฟูแรนโดยจุลินทรีย์

1. การย่อยสลายสารไดเบนโซฟูแรนโดยแบคทีเรีย

Fortnagel และคณะ(1990) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. HH69 และ mix culture HH27 ที่แยกจากตัวอย่างดิน สามารถใช้ DF เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ และพบว่ามีสาร salicylic acid และ gentisic acid ในอาหารของสายพันธุ์ HH69 โดยผลการทดลองนี้คล้ายกับผลของ Monna, Omori และKodama (1993) ซึ่งศึกษา *Staphylococcus auriculans* DBF63 แล้วพบการสะสมของสารทั้ง 2 ชนิดในอาหาร และยังคงคล้ายกับ Hong และคณะ (2000) ซึ่งรายงานว่า *Pseudomonas putida* PH-01 ก็ใช้ DF เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเช่นกัน ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ขณะการบ่มวันแรก ๆ คือ salicylic acid, catechol, gentisic acid และสารอื่น ๆ ที่ไม่สามารถระบุได้อีกเล็กน้อย หลังจาก 6 วันของการบ่มพบว่ามี catechol อยู่ในอาหารเป็นส่วนใหญ่

Becher และคณะ (2000) ศึกษาเชื้อ *Ralstonia* sp.SBUG 290 ในการโคออกซิไดซ์ DF เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไบฟีนิล (biphenyl) เป็นแหล่งที่ใช้ในการเจริญ ซึ่งสารที่ได้หลังการย่อยคือ 1,2-dihydroxydibenzofuran และมีการแตกวง (meta cleavage) ของสารนี้ได้สาร 2-hydroxy-4-(3'-oxo-3'-*H*-benzofuran-2'-yliden) but-2-enoic acid เมื่อการย่อยสลายสมบูรณ์จะได้สาร salicylic acid

Ishiguro และคณะ (2000) รายงานว่า *Pseudomonas aeruginosa* และ *Xanthomonas maltophilia* ที่แยกได้จากกากตะกอนของโรงบำบัดน้ำเสียของโรงงานกระดาษ สามารถย่อย DF ได้ โดยที่ *Ps. aeruginosa* มีอัตราการเจริญเติบโตโดยมี DF และ DD เป็นแหล่งคาร์บอนได้สูง ขณะที่เมื่อมี 1-CDD, 2-CDD และ 2,8-DCDF เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถเจริญเติบโตได้ปานกลาง และเมื่อมี 2,6-DCDD และ 1,2,3,4-TCDD เจริญเติบโตได้น้อย แต่ไม่สามารถเจริญได้ใน octaCDF ดังนั้นจากผลจึงพบว่าอัตราการเจริญของเชื้อนี้โดยการใช้ไดออกซินเป็นแหล่งคาร์บอนจะลดลงเมื่อมีการะดับการแทนที่อะตอมคลอรีนบนไดออกซินเพิ่มมากขึ้น ในการศึกษาพบว่า *Ps. aeruginosa* ย่อย DF, DD และ 1-CDD ได้สูง แต่ย่อย 2,8-DCDF, 3,6-DCDF, 2-CDD และ 2,6-DCDD ได้ต่ำ และพบว่าอัตราการเจริญเติบโตมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการย่อยไดออกซิน ยกเว้น 1,2,3,4-TCDD ซึ่งเชื้อสามารถย่อยได้สูงแต่มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อย DF คือ hydroxydibenzofuran, 2-hydroxy-3-allyl-benzofuran และ 2-(carboxyvinyl) phenylacetic acid

lida และคณะ (2002) ทำการแยกเชื้อพบแอคติโนมัยซีท 16 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสกุล *Rhodococcus*, *Microbacterium* และ *Terrabacter* ซึ่งสามารถใช้ DF เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน และเป็นรายงานแรกที่พบว่า *Microbacterium* สามารถย่อย DF ได้นอกจากนี้ Bressler และ Fedorak (2000) ได้รวบรวมข้อมูลสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง DF หรือใช้ DF เพื่อการเจริญไว้ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 สายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถย่อยไดเบนโซฟูแรน (Bressler และ Fedorak, 2000)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	อ้างอิง
<i>Brevibacterium</i> DPO1361 ^G	Engesser และคณะ (1989)
<i>Sphingomonas</i> RW1 ^G	Bünz และ Cook(1993); Arfmann และคณะ(1997)
<i>Pseudomonas</i> CA10 ^T	Sato และคณะ (1997)
<i>Pseudomonas</i> HL7b ^T	Foght และ Westlake (1988)
<i>E. coli</i> JM109(pUCARA) ^T	Nojiri และคณะ (1999)
<i>Pseudomonas</i> HH 69 ^G	Harm และคณะ (1991)

^G สามารถใช้ DF เพื่อการเจริญ

^T เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง DF

2. การย่อยสลายสารไดเบนโซฟูแรนโดยยีสต์

Hammer และคณะ(1998) ศึกษายีสต์ *Trichosporon mucoides* SBUG 801 ในการย่อย DF ซึ่งรายงานว่ายีสต์ชนิดนี้สามารถย่อย DF ได้มากกว่า 50% ในเวลา 8 ชั่วโมง ระหว่างการบ่มพบสารมัธยันตร์หลัก 6 ชนิด ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม monohydroxylated dibenzofurans 4 ชนิด ผลจากการออกซิเดชันเกิด 2,3-dihydroxydibenzofuran โดยเมื่อสารดังกล่าวเกิดการแตกวง (ortho cleavage) ได้ 2-(1-carboxy methylidene)-2,3-dihydrobenzo[b]furanylidene glycolic acid

3. การย่อยสลายสารไดเบนโซฟูแรนโดยสาหร่าย

Todd, Cain และSchmidt (2002) ได้รายงานเป็นครั้งแรกว่า green microalgae สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง(biotransformation) สารในกลุ่ม diaryl ethers ได้โดย green microalgae

Ankistrodesmus SI2 สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DF ทำให้เกิดสารอย่างเช่น mono hydroxydibenzofuran และ *Scenedesmus* SI1 สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DD ได้สารอย่างเช่น 2-hydroxydibenzodioxin เป็นต้น

4. การย่อยสลายสารไดเบนโซฟูแรนโดยรา

Cerniglia, Morgan และ Gibson (1979) ศึกษาการออกซิไดซ์ DF โดยใช้รา *Cunninghamella elegans* และแบคทีเรีย *Beijerinckia* กลายพันธุ์ (B8/36) ได้สาร 2,3-dihydroxy-2,3-dihydrodibenzofuran ซึ่งกลไกในการเริ่มต้นการออกซิเดชันของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกัน โดยเริ่มต้นราออกซิไดซ์ DF ได้ dibenzofuran 2,3-epoxide และสารดังกล่าวจะเปลี่ยนเป็น trans-2,3-dihydroxy-2,3-dihydrodibenzofuran ในเวลาต่อมา ส่วนแบคทีเรียออกซิไดซ์ DF ได้ส่วนผสมของ cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrodibenzofuran และ cis-2,3-dihydroxy-2,3-dihydrodibenzofuran

Hofmann และคณะ รายงานสายพันธุ์ของราที่สามารถย่อย DF ได้ ซึ่งได้แก่ราในสกุล *Mucor*, *Chaetomium*, *Phoma*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Papulaspora*, *Inonotus*, *Lentinus*, *Phanerochaete*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Schizophyllum* และ *Trametes* และได้แสดงว่ารา *Fusarium redolens* สามารถย่อย 3-chlorodibenzofuran, mono- และ dichloro dibenzodioxins ได้อีกด้วย (1992 อ้างถึงใน U.S. Environmental Protection Agency, 1994: 2-37) นอกจากนี้ราสกุล *Fusarium* ยังสามารถใช้ DF เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงอย่างเดียว (1992 อ้างถึงใน Wittich, 1998: 495)

Hammer และ Schauer (1997) ศึกษา 47 สายพันธุ์จาก 14 สกุล ที่แยกจากดินและเศษไม้ ได้แก่ราในสกุล *Circinella*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Papulaspora*, *Penicillium*, *Phaeostilbella*, *Trichoderma* พบว่ามีรา 30 สายพันธุ์ที่ย่อยสารแล้วเกิดไอโซเมอร์ของ monohydroxydibenzofuran 1 หรือมากกว่า 1 ไอโซเมอร์ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ระบบการทำงานของเอนไซม์ monooxygenase ที่พบได้ในราสาย (filamentous fungi) ทั่วไป ส่วนการเกิด dihydroxydibenzofuran พบในปริมาณต่ำมากและพบในราบางสายพันธุ์เท่านั้น มีรา 8 สายพันธุ์พบสารมัธยันตร์ที่มีสมบัติละลายน้ำได้ดีเกิดขึ้น มีรา 9 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง DF ได้ นอกจากนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง DF ในแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน

Mori และ Kondo (2002c) ศึกษาการไวท์รอต *Phlebia lindtneri* ในการย่อย DD, DF, biphenyl และ diphenyl ether โดยปมเชื้อในอาหารเหลว low-nitrogen basal III medium ก่อน 5 วัน จากนั้นเติมสารตั้งต้น 0.1 mM แล้วปมต่อพบว่าหลังการปม 1 วัน เชื้อดังกล่าวสามารถย่อย DD และ DF ได้ 87% และ 66 %ตามลำดับ และจากการศึกษาการออกซิเดชันของ DD เกิด 2-hydroxydibenzo-*p*-dioxin ส่วน DF เกิด 2- และ 3-hydroxydibenzofuran นอกจากนี้พบว่า การเริ่มต้นออกซิโดลีสสารตั้งต้นเกิดโดยเอนไซม์ cytochrome P-450 monooxygenase และยังมี การตรวจพบการทำงานของเอนไซม์ laccase, MnP และ phenol oxidase แต่ไม่พบเอนไซม์ LiP

2.16 สารเคมีสำคัญที่ใช้ในการทดลอง

1. Remazol Brilliant Blue R (RBBR)

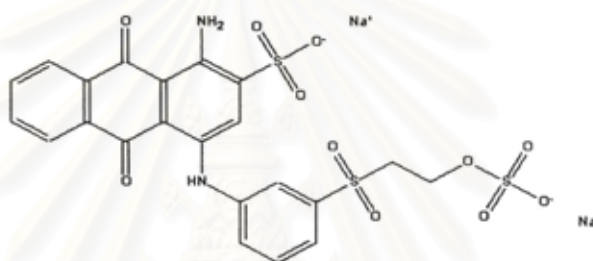
RBBR มีชื่อเรียกหลายชื่อ ได้แก่ 1-amino-9,10-dihydro-4-(m-((2-hydroxyethyl) sulfonyl)anilino)-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonic acid, hydrogen sulfate(ester), disodium salt; 1-amino-9,10-dihydro-9,10-dioxo-4((3-((2-(sulfooxy)ethyl)sulfonyl) phenyl)-amino)-2-anthracenesulfonic acid, disodium salt; brilliant blue r; cavalite brilliant blue r; celmazol brilliant blue r; reactive blue 19; C.I. 61200; C.I. reactive blue 19; C.I. reactive blue 19, disodium salt; ostazin brilliant blue ur; primazin brilliant blue r; reactive blue 19; remalan brilliant blue r; remazol brilliant blue; remazol brilliant blue m; sumifix brilliant blue r; sumifix brilliant blue r(b); sumifix brilliant blue r special

สมบัติของ Remazol Brilliant Blue R

สูตรโมเลกุล	$C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$
น้ำหนักโมเลกุล	626.5
การละลาย	ละลายในน้ำ 10-50 มก./ลิตรที่ 21 °ซ
ลักษณะทางกายภาพ	เนื้อละเอียดคล้ายผงแป้ง มีสีน้ำเงินเข้ม

RBBR เป็นสีย้อมที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม เป็นสารอนุพันธ์ของ sulfonated anthracene และมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ polycyclic aromatic compound (PAH) (Chroma, 2002) ดังสูตรโครงสร้างรูปที่ 2.4 การใช้สีย้อมโพลีเมอริก (polymeric dyes) มีความสะดวกในการใช้คัดกรองจำนวนมากสำหรับการทดสอบการย่อย lignin (Gold, Glenn และ Alic,

1988) เนื่องจากสีย้อมเหล่านี้คล้ายคลึงกับโครงสร้างของลิกนิน (Soares, Amorim และ Costa-Ferreira, 2001) และการใช้สีย้อมมีความสะดวก รวดเร็ว สามารถวัดได้ง่ายโดยใช้ spectrophotometer (Glenn และ Gold, 1983) ได้มีการศึกษาถึงเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยลิกนิน (ligninolytic enzymes) โดยใช้สี RBBR (Vyas และ Molitoris, 1995; Shin, Oh และ Kim, 1997) ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยลิกนินนั้น ยังสามารถย่อยสารมลพิษที่มีโครงสร้างบางส่วนคล้ายลิกนินได้อย่างกว้างขวางด้วย เช่น สามารถย่อย PAHs, chlorinated phenols, PCBs, dioxins, pesticides และสีย้อมได้ (Pointing, 2001) ในการศึกษาของ Sato และคณะ, 2002 ก็ได้ใช้สี RBBR เป็นอินดิเคเตอร์ เพื่อคัดกรองราชันต์นมากกว่า 1500 สายพันธุ์ พบว่ารา 200 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการลดสีอย่างชัดเจน จากนั้นจึงนำราที่คัดไปใช้ย่อยสลาย 2,7-DCDD



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ Remazol Brilliant Blue R

2. ไตเบนโซฟูแรน (DF)

DF มีชื่อเรียกหลายชื่อได้แก่ (1,1'-biphenyl)-2,2'-diyl oxide; dibenzo(b,d)furan; diphenylene oxide; 2,2'-biphenylene oxide; 2,2'-biphenylene oxide

สมบัติของไตเบนโซฟูแรน

สูตรโมเลกุล	$C_{12}H_8O$
น้ำหนักโมเลกุล	168.2
จุดเดือด	287 °ซ
จุดหลอมเหลว	86-87 °ซ
การละลาย	ละลายในน้ำ 3.1 มก./ลิตร ที่ 25°ซ ละลายใน dimethylsulfoxide ≥ 100 มก./มล.ที่ 20°ซ
ลักษณะทางกายภาพ	ผลึกสีขาว

ไดเบนโซฟูแรนจัดอยู่ในสารกลุ่ม D คือ ไม่จัดอยู่ในกลุ่มก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ และขณะนี้ยังไม่มีข้อมูลซึ่งก่อให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันหรือเรื้อรัง รวมถึงข้อมูลการก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์หรือสัตว์ (U.S. Environmental Protection Agency, 1990)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (shaker) รุ่น Innova™ 2350 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc. USA.
- เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy Seiko, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Werk Nr. ของบริษัท Hettich ZENTRIFUGEN, Germany
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Biofuge Stratos ของบริษัท Kendro Laboratory Products, Germany
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA.
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan pH2000 ของบริษัท Corning, USA.
- เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด (analytical balance) รุ่น L2200p ของบริษัท Sartorius, Germany
- เครื่องชั่งน้ำหนักหยาบ (laboratory balance) รุ่น PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA.
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น VSM-3 ของบริษัท Shelton Scientific, USA.
- เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) รุ่น Sonorex RK100 ของบริษัท Bandelin Electronic, Germany
- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan
 - คอลัมน์ (column) : Lichrocart-C₁₈ ขนาด 4.0x125 มิลลิเมตร ของบริษัท Merck, Germany
 - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น 4100 ของบริษัท LDC, USA.
 - เครื่องบันทึก (recorder) รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan

- เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน (vacuum rotary evaporator) ของบริษัท Eyela, Japan
- เครื่อง critical point dryer รุ่น CPD 020 ของบริษัท Balzers, Liechtenstein
- เครื่อง ion-sputter รุ่น SCD 040 ของบริษัท Balzers, Liechtenstein
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2004 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส รุ่น Mini sub-cell GT ของบริษัท Bio-Rad, USA.
- ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น HS124 ของบริษัท ISSCO, USA.
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE600 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้อบแห้ง (dryer) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้เยือกแข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส (freezer) รุ่น MDF-U332 ของบริษัท Sanyo, Japan
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) รุ่น EcoTempTW20 ของบริษัท Julabo, Germany
- กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus Optical Co., Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) รุ่น JSM-541OLV บริษัท JEOL, Japan
- กล้องถ่ายภาพดิจิทัล (digital camera) รุ่น Marvica ของบริษัท Sony, Japan
- ตัวกรองชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.2 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร รุ่น Millex[®]-FG ของบริษัท Millipore Corporation, USA.
- กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
- ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 10, 20, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France
- กรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 500 มิลลิลิตร
- เครื่องแก้วต่าง ๆ

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
- โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Carlo Erba, Spain

- โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) ของบริษัท Unilab, Australia
- เฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
- โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
- แคลเซียมซัลเฟต ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Unilab, Australia
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ของบริษัท Merck, Germany
- แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Mallinckrodt, France
- แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Riedel-de Haën, Switzerland
- แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Riedel-de Haën, Switzerland
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
- โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท May & Baker, England
- ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท May & Baker, England
- คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
- อลูมิเนียมโปแตสเซียมซัลเฟต ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Unilab, Australia
- กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท Merck, Germany
- โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท May & Baker, England
- ไนโตรโลไนโตรอะซีเตต ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_6$) ของบริษัท Fluka Chemie, Switzerland
- แอมโมเนียมทาร์เทต ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) ของบริษัท Merck, Germany
- โซเดียมอะซีเตต ($\text{NaCH}_3\text{CO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
- ผงมอลต์สกัด (malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
- ผงยีสต์สกัด (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
- เปปโตน (peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
- คอร์น มีล อาการ์ (corn meal agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
- โปเตโต เดกซ์โทรส อาการ์ (potato dextrose agar) ของบริษัท Scharlau, Spain
- ซาโบรูด เดกซ์โทรส บรอต (sabouraud dextrose broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
- ซูโครส (sucrose) ของบริษัท Merck, Germany
- กลูโคส (glucose) ของบริษัท Merck, Germany
- ฟู่นฝง ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
- สิริมาซอล บริลเลียนท์ บลู อาร์ (Remazol Brilliant Blue R) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

- สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250 (comassie brilliant blue G-250) ของบริษัท Fluka Chemie, Switzerland
- โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
- อลูมินา (alumina) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
- เอทิลแอลกอฮอล์ (C_2H_5OH) ของบริษัท Merck, Germany
- กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ของบริษัท Carlo Erba, Spain
- ไดเบนโซฟูแรน ($C_{12}H_8O$) ความบริสุทธิ์ $\geq 99\%$ ของบริษัท Fluka Chemie, Switzerland
- ไดมethylซัลโฟไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Fluka Chemie, Switzerland
- เอทิลอะซิเตต ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท Lab-scan, Ireland
- เมทานอล (CH_3OH) HPLC grade ของบริษัท Lab-scan, Ireland
- โซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรอส ($anhydrous Na_2SO_4$) ของบริษัท Merck, Germany
- กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Merck, Germany
- ทริสมาเบส (Trizma base, $C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
- ไดโซเดียมเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก แอซิด (EDTA, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
- โซเดียมลอริลซัลเฟต (SDS, $C_{12}H_{25}OSO_3Na$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
- โปรตีนเนสเค (proteinase K) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
- ซีติลไตรเมทิลแอมโมเนียม โบรไมด์ (CTAB, $C_{16}H_{32}N(CH_3)_3Br$) ของบริษัท TCI-EP, Japan
- ไรโบนิวคลีเอส เอ (RNase A) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
- สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka Chemie, Switzerland
- *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, USA.
- อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUI, Japan
- 1kb DNA ladder ของบริษัท Promega, USA.

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่เส้นทาง ที่ทำการ-มอสิงโต ซึ่งจุดเก็บแสดง ดังรูปที่ 3.1 โดยเก็บตัวอย่างดินที่ผิวดินบริเวณที่มีซากต้นไม้ล้มซึ่งคาดว่าจะพบราที่สามารถย่อยสลายเนื้อไม้ได้ และน่าจะมีความหลากหลายของเชื้อสูง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการได้ทำการเก็บรักษา ตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาแยกเชื้อ



รูปที่ 3.1 จุดเก็บตัวอย่างดินเส้นทาง ที่ทำการ-มอสิงโต

3.2 การแยกราจากตัวอย่างดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยทำการเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำมาเกลี่ย (spread) ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น ประกอบด้วยอาหาร Czapek Dox agar และ malt extract agar โดยใช้สี Remazol Brilliant Blue R (RBBR) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างบางส่วนคล้ายไดออกซินเป็นตัวบ่งชี้คุณสมบัติของราที่ต้องการ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เมื่อพบว่าเชื้อมีการเจริญขึ้นมาแล้วจึงทำการเขี่ยราที่มีการย่อยสี RBBR และมีลักษณะแตกต่างกันลงในอาหารใหม่ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ลงในอาหารใหม่หลาย ๆ ครั้ง จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

3.3 การเก็บรักษาเชื้อ

เชื้อราโดยใช้เข็มเย็บเชื้อถ่ายใส่หลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง malt extract (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.2) ผิวหน้าเอียง บ่มเชื้อและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ ทุก ๆ 1-3 เดือน หรือเก็บรักษาเชื้อโดยการถ่ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง malt extract ผิวหน้าเอียงแล้วบ่มเชื้อให้เจริญเต็มที่ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทรอดทับผิวหน้าอาหารด้วย 10% กลีเซอรอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) เก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4 การคัดเลือกราที่สามารถเจริญเติบโตและมีความสามารถสูงในการย่อยสี Remazol Brilliant Blue R ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น

1. นำราที่แยกได้จากตัวอย่างดินและราบริสุทธิ์ที่ได้จากไม้ผุมาเลี้ยง (point inoculation) บนจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น Czapek Dox malt extract ที่เติมสี RBBR
2. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน วัดค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณอาหารที่ถูกย่อยทุกวัน โดยหาค่าเฉลี่ยจากเส้นผ่านศูนย์กลางของ 2 ด้านที่ตั้งฉากกัน (Chapman, 1974) ซึ่งวัดจากใต้โคโลนี รวมทั้งบันทึกลักษณะการเจริญของรา และลักษณะการย่อยสีของรา
3. คัดเลือกราที่สามารถเจริญเติบโตและมีความสามารถสูงในการย่อยสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

3.5 การคัดเลือกราเบื้องต้นที่มีความสามารถสูงในการย่อยสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium

1. เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น Czapek Dox - malt extract ที่เติมสี RBBR บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน
2. ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2)
3. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน
4. ถ่ายเชื้อจาก PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะริมขอบโคโลนีของรา จำนวน 5 cork ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium (MM) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

5. ใส่สารละลายสี RBBR ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ให้มีความเข้มข้นสี 0.02 % (0.2mg/ml ของอาหารเลี้ยงเชื้อ MM)
6. วัดความเข้มข้นสี RBBR เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสี RBBR ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (Chroma และคณะ, 2002)
7. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 7 วัน
8. เมื่อครบกำหนด 7 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 15 นาที นำส่วนน้ำไปวัดความเข้มข้นสี RBBR และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการย่อยสี RBBR ของเชื้อโดยเทียบกับความเข้มข้นสีตั้งต้น
9. คัดเลือกกราฟที่มีความสามารถสูงในการย่อยสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

3.6 การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของราที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium

1. เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น Czapek Dox - malt extract ที่เติมสี RBBR บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน
2. ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่ปูทับผิวหน้าอาหารด้วยกระดาษเซลโลเฟนปราศจากเชื้อ
3. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน
4. ถ่ายเชื้อจาก PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะริมขอบโคโลนีของรา จำนวน 5 cork แล้วเขี่ยเส้นใยบนผิวกระดาษเซลโลเฟน ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
5. ใส่สารละลายสี RBBR ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ให้มีความเข้มข้นสี 0.02 %
6. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 7 วัน
7. วัดการเจริญเติบโตจากปริมาณโปรตีน และวัดความเข้มข้นสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นและทุกวันเป็นเวลา 7 วัน โดยการกรองแยกส่วนเชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากกัน นำส่วนที่เป็นเชื้อไปหาปริมาณโปรตีน และนำส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไปหาความเข้มข้นสี โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสี RBBR (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1. เตรียมสารสกัดจากเซลล์ โดยนำเชื้อมาทำการบดเพื่อให้เซลล์แตกด้วยอลูมินา ในอัตราส่วน 1:1 บดเป็นเวลานาน 5 นาทีโดยทำบนน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพของโปรตีน ใส่น้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย จากนั้นนำไปปั่นแยกกากเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ส่วนน้ำใสที่ได้คือสารสกัดจากเซลล์

2. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) โดยใส่สารสกัดจากเซลล์ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในสารละลายแบรดฟอร์ด (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ปริมาตร 2.5 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 2 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

สร้างกราฟมาตรฐานโปรตีนโดยใช้โบวายน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

3.7 การศึกษารูปแบบการย่อยสี RBBR ของราที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium

1. เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น Czapek Dox - malt extract ที่เติมสี RBBR บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน

2. ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA

3. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

4. ถ่ายเชื้อจาก PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะริมขอบโคโลนีของรา จำนวน 2 cork ใสลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium (LN) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

5. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 5 วัน

6. เมื่อครบกำหนด 5 วันใส่สารละลายสี RBBR ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LN ให้มีความเข้มข้นสี 0.02 %

7. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 7 วัน

8. วัดความเข้มข้นสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นและทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

3.8 การประเมินความสามารถของราในการย่อยสลายไคเบนโซฟูแรนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว Mineral Salt Medium

1. เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น Czapek Dox - malt extract ที่เติมสี RBBR บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน
2. ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่มีการป้อนผิวหน้าอาหารด้วยกระดาษเซลโลเฟนปราศจากเชื้อ
3. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน
4. ถ่ายเชื้อจาก PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะริมขอบโคโลนีของรา จำนวน 5 cork แล้วเขี่ยเส้นใยบนผิวกระดาษเซลโลเฟน ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
5. เติมไคเบนโซฟูแรนในรูปสารละลายไคเบนโซฟูแรนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิกรัม/ลิตร
6. ทำชุดควบคุมการลดลงของไคเบนโซฟูแรนที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายของรา ซึ่งเตรียมจากการใช้อาหารเหลวที่มีการเติมไคเบนโซฟูแรนแต่ไม่ได้เติมเชื้อ
7. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 7 วัน
8. เมื่อครบกำหนด 7 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมเชื้อซึ่งเป็นชุดทดลอง และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชุดควบคุมการลดลงของไคเบนโซฟูแรนที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายของรา ไปสกัดหาปริมาณไคเบนโซฟูแรนที่มีเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของไคเบนโซฟูแรนโดยการย่อยสลายของรา ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การลดลงของไคเบนโซฟูแรน} = \frac{(A-B) \times 100}{A}$$

โดยการย่อยสลายของราในวันที่ 7

เมื่อ A คือ ความเข้มข้นไคเบนโซฟูแรนในชุดควบคุมในวันที่ 7
B คือ ความเข้มข้นไคเบนโซฟูแรนในชุดทดลองในวันที่ 7

การวิเคราะห์ปริมาณไดเบนโซฟูแรน

1. วิธีการสกัดสาร (Mori และ Kondo, 2002b)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาปรับค่าความเป็นกรดต่างให้อยู่ในช่วง 2-3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล จากนั้นนำไปสกัดโดยใช้กรวยแยก เติมเอทิลอะซีเตตปริมาตร 40 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากันนาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอทิลอะซีเตตเก็บไว้ นำส่วนที่เป็นอาหารเหลวไปทำการสกัดโดยวิธีเดิมอีก 2 ครั้ง โดยใช้เอทิลอะซีเตตปริมาตร 40 และ 20 มิลลิลิตรตามลำดับ จากนั้นรวมส่วนเอทิลอะซีเตตที่สกัดได้ทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำส่วนที่เหลืออยู่ จากนั้นระเหยเอทิลอะซีเตตจนแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน เติมเมทานอลปริมาตร 5.0 มิลลิลิตรลงไปละลายไดเบนโซฟูแรนในขวดลดปริมาตร แล้วกรองสารละลายที่ได้ผ่านตัวกรองชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร ใส่ในขวดแก้วขนาดเล็ก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ปริมาณไดเบนโซฟูแรนโดยใช้วิธี HPLC

2. การวิเคราะห์ปริมาณไดเบนโซฟูแรนโดยวิธี HPLC

ใช้คอลัมน์ Lichrocart-C₁₈ ขนาด 4.0x125 มิลลิเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส ใช้สารละลาย 75% เมทานอลในน้ำ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงของไดเบนโซฟูแรนที่มีความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร สามารถหาความเข้มข้นไดเบนโซฟูแรนที่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเหลว โดยการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC กับกราฟมาตรฐานของไดเบนโซฟูแรน (ภาคผนวก ค หมายเลข 3)

สร้างกราฟมาตรฐานของไดเบนโซฟูแรน โดยเติมสารละลายไดเบนโซฟูแรนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ลงในอาหารเหลว MM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการสกัดโดยวิธีตามข้อ 1 แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณไดเบนโซฟูแรนโดยใช้วิธี HPLC

3.9 การประเมินความสามารถของราในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium

1. เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น Czapek Dox - malt extract ที่เติมสี RBBR บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน
2. ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA
3. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน
4. ถ่ายเชื้อจาก PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะริมขอบโคโลนีของรา จำนวน 2 cork ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium (LN) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
5. เติมไโดเบนโซฟูแรนในรูปสารละลายไโดเบนโซฟูแรนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิกรัม/ลิตร
6. ทำชุดควบคุมการลดลงของไโดเบนโซฟูแรนที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายของรา ซึ่งเตรียมจากการใช้อาหารเหลวที่มีการเติมไโดเบนโซฟูแรนแต่ไม่ได้เติมเชื้อ
7. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 7 วัน
8. เมื่อครบกำหนด 7 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมเชื้อซึ่งเป็นชุดทดลอง และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชุดควบคุมการลดลงของไโดเบนโซฟูแรนที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายของรา ไปสกัดหาปริมาณไโดเบนโซฟูแรนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของไโดเบนโซฟูแรนโดยการย่อยสลายของรา
9. ศึกษาการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ของราที่มีความสามารถในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนในวันที่ 7 ได้ดีที่สุด 1 สายพันธุ์ (เปรียบเทียบผลจากการทดลองในข้อ 3.8 และ ข้อ 3.9)

3.10 การศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบต่าง ๆ

3.10.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของรบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบต่าง ๆ

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5 ชนิด ได้แก่
 - Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2)
 - Yeast Extract Sucrose Agar (YEA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 5)
 - Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 6)

- Corn meal Malt Extract Agar (CMA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 7)
 - Malt Extract Agar (MEA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 8)
2. ถ่ายเชื้อราที่คัดเลือกแล้วว่าสามารถย่อยสลายไคเบนโซฟูแรนในอาหารเหลวได้ดีที่สุดจำนวน 1 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทั้ง 5 ชนิด
 3. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 14 วัน
 4. เมื่อครบกำหนด ถ่ายรูปลักษณะเชื้อเก็บไว้

3.10.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค slide culture

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ PDA, YEA, SDA, CMA และ MEA
2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดลงในจานเพาะเชื้อให้ระดับอาหารสูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้เย็นและผิวหน้าอาหารแห้ง
3. ใช้มีดหรือมีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อ แล้วจึงกรีดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดออกเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีความกว้างด้านละ 6 มิลลิเมตร
4. ใช้ปากคีบ คีบสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95% แล้วเผาไฟ 2 ครั้ง แล้ววางลงบนแท่งแก้วซึ่งงอเป็นข้อศอกในจานเพาะเชื้อ เตรียมไว้ทั้งหมด 5 จาน
5. ใช้มีดยกชิ้นส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแต่ละชนิดที่ตัดไว้ มาวางลงตรงกลางสไลด์ในจานเพาะเชื้อแต่ละจานที่เตรียมไว้ในข้อ 4
6. ใช้เข็มเขี่ย เชื้อราที่คัดเลือกมาแต่ละที่ส่วนหน้าทั้ง 4 ด้านของชิ้นส่วนของอาหาร
7. นำกระจกปิดสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95% และเผาไฟแล้วค่อยๆ วางปิดบนชิ้นส่วนของอาหาร
8. วางสำลีปราศจากเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อแล้วเทน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไป
9. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเส้นใยของราเจริญจนถึงขอบกระจกปิดสไลด์
10. ยกกระจกปิดสไลด์ขึ้นแล้วหยดแอลกอฮอล์ 95% ลงไปที่ตรงกลางของกระจกปิดสไลด์ด้านในซึ่งมีเส้นใยเชื้อราเจริญอยู่เพื่อให้แอลกอฮอล์กระจายเข้าสู่เส้นใยรา
11. ก่อนที่แอลกอฮอล์จะแห้ง นำกระจกปิดสไลด์วางลงบนน้ำยา lactophenol aniline blue (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) ซึ่งหยดอยู่ตรงกลางสไลด์แผ่นใหม่
12. เขี่ยชิ้นส่วนของเชื้อราออกไป และหยดแอลกอฮอล์ 95% ลงบนแผ่นสไลด์แล้วหยดน้ำยา lactophenol ลงไปตรงกลางแผ่นสไลด์ก่อนแอลกอฮอล์แห้งสนิท ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์แผ่นใหม่
13. นำสไลด์ที่มีกระจกปิดสไลด์ประกบติดทั้งสองแผ่นไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.10.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

1. ตัดชิ้นส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีราให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 5 มม. x 5 มม. x 3 มม.
2. อังตัวอย่างด้วยไอของ 2%OsO₄(osmium tetroxide) เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง
3. ขจัดน้ำออก (dehydration) โดยแช่ตัวอย่างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำไปจนถึงความเข้มข้นสูงคือ 30, 50, 70, 90% แต่ละความเข้มข้นใช้เวลาประมาณ 10-15 นาที และที่ความเข้มข้น 100% อีก 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 10-15 นาที
4. ทำตัวอย่างให้แห้ง (drying) ด้วยเครื่อง critical point dryer
5. ฉาบตัวอย่าง (coating) นำตัวอย่างที่แห้งแล้วมาติดบน stub ด้วยเทปสองหน้าหรือกาว จากนั้นฉาบทองด้วยเครื่อง ion-sputter 4-5 นาที
6. นำตัวอย่างที่เตรียมเรียบร้อยแล้วไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(scanning electron microscope)

3.11 บังชี้ชนิดของราที่คัดเลือกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (Internal Transcribed Spacer) (Makimura และคณะ, 2000 ดัดแปลงโดย ปัทมาพร ประชุมรัตน์, 2546)

3.11.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของรา

1. เลี้ยงราที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน
2. เชื้อเส้นใยราไปบด โดยเติม lysis buffer 0.5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) และอลูมินาเล็กน้อย บดเป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
3. ดูดส่วนน้ำใสไปใส่หลอดไมโครพิพจีใหม่ เติมนิวคลีโอโปรตีนเนสเค (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) ปริมาตร 24 ไมโครลิตร นำไปบดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เติมนิวคลีโอโปรตีนเนสเค (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร นำไปบดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
5. เติมนิวคลีโอโปรตีนเนสเค/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 12) อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันจนได้สารละลายขุ่น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6. ดูดส่วนน้ำไลชั้นบนใสหลอดไมโครพิวจ์อันใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 13) อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

7. ดูดส่วนน้ำไลชั้นบนใสหลอดไมโครพิวจ์อันใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 0.6 เท่าของส่วนน้ำไล ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งเห็นตะกอนสีขาวของดีเอ็นเอ จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

8. ปั่นล้างดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70 % เอทานอลที่เย็นจัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง เมื่อดีเอ็นเอแห้งจึงเติมน้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย RNase A (ภาคผนวก ข หมายเลข 14) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

3.11.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.11.1 ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยา และโพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ออกแบบตามวิธีของ Jasalavich, Ostrofsky และ Jellison (2000) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละตัวเป็นดังนี้

- สารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์
- 1X *Taq* DNA polymerase buffer (pH 8.5)
- *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 2 หน่วย

- สารละลายไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณปลายทั้ง 2 ด้านของสายดีเอ็นเอแม่แบบ forward primer ITS1-F 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' และ reverse primer ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

- ดีเอ็นเอแม่แบบ (Template) ที่ได้จากข้อ 3.11.1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

ส่วนผสมทั้งหมดที่ได้มีปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปดำเนินปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) ซึ่งตั้งโปรแกรมดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 95 °ซ เป็นเวลา 35 วินาที	} 35 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 1 นาที 25 วินาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 55 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 1 นาที	
final extension	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 10 นาที	

3.11.3 การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใส่ที่ได้จากข้อ 3.11.2 มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ดังนี้

1. เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 % ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข หมายเลข 15) เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่โดยระวังการเกิดฟองอากาศ แล้วปล่อยให้เจลแข็งตัว
2. วางอะกาโรสเจลที่ได้ในแทมเบอร์ เทปเฟลอร์ TAE ให้ท่วมเหนือเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร
3. หยอดดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผสมกับสีติดตาม (loading dye) (ภาคผนวก ข หมายเลข 16) ปริมาตร 2 ไมโครลิตรในช่องวิ่งแรก และหยอดดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบที่ผสมกับสีติดตามแล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตรในช่องวิ่งถัดไป
4. ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีน้ำเงินของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่มาเกือบถึงขอบเจลอีกด้าน จากนั้นนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข หมายเลข 17) เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่นอีก 30 นาที นำเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.11.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใส่ที่ได้จากข้อ 3.11.2 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS ด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเออัตโนมัติโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) รวบรวมและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการรายงานไว้ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN version 2.2.7

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 การแยกกราฟจากตัวอย่างดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่เส้นทาง ที่ทำการ-มอสิงโต จำนวน 5 ตัวอย่าง นำมาแยกกราฟตามวิธีข้อ 3.2 พบกราฟที่สามารถเจริญได้และมีลักษณะแตกต่างกัน 59 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวน 59 สายพันธุ์พบกราฟที่มีความสามารถในการย่อยสลาย RBBR จำนวน 19 สายพันธุ์ จำแนกตามตัวอย่างดิน A, B, C, D และ E ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนกราฟที่พบในตัวอย่างดินต่าง ๆ และจำนวนกราฟที่มีความสามารถในการย่อยสลาย RBBR

ตัวอย่างดิน	จำนวนกราฟที่พบในตัวอย่างดิน	จำนวนกราฟที่มีความสามารถในการย่อยสลาย RBBR
A	8	2
B	15	6
C	14	5
D	10	3
E	12	3
รวม	59	19

4.2 การคัดเลือกกราฟที่สามารถเจริญเติบโตและมีความสามารถสูงในการย่อยสี Remazol Brilliant Blue R ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น

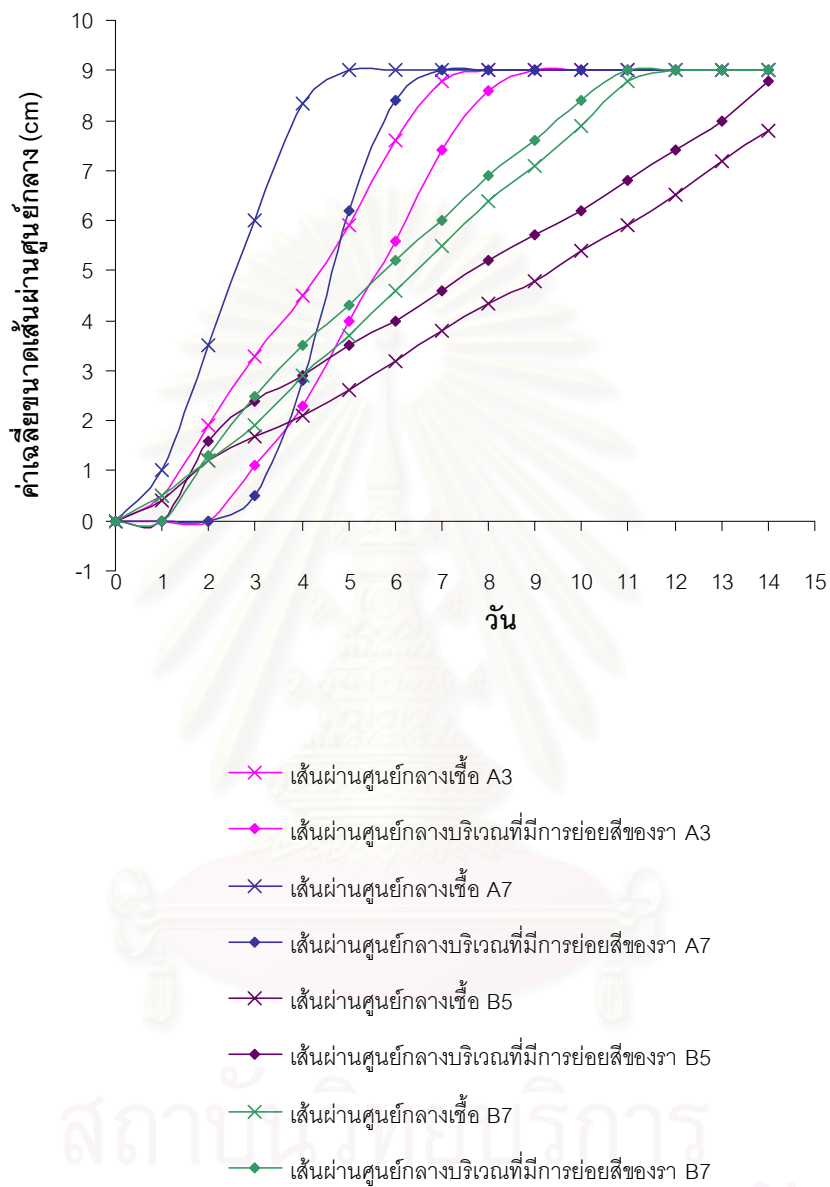
เมื่อนำกราฟที่มีความสามารถในการย่อยสี RBBR ทั้ง 19 สายพันธุ์ และราบริสุทธิ์ที่ได้จากไม้ผุ 2 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น ที่มีการเติม RBBR เป็นอินดิเคเตอร์ พบว่าสามารถย่อยสีได้อย่างชัดเจนในวันที่ 14 กล่าวคือสามารถย่อยสี RBBR จากสีน้ำเงินไปเป็นสีฟ้าอ่อนใส หรือเป็นสีอื่นที่ไม่ใช่สีแดงในวันที่ 14 ของการบ่มเชื้อ จำนวน 13 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 จำนวนกราฟที่มีความสามารถในการย่อยสี จำนวนราและรหัสกราฟที่ย่อยสีได้อย่างชัดเจนในวันที่ 14

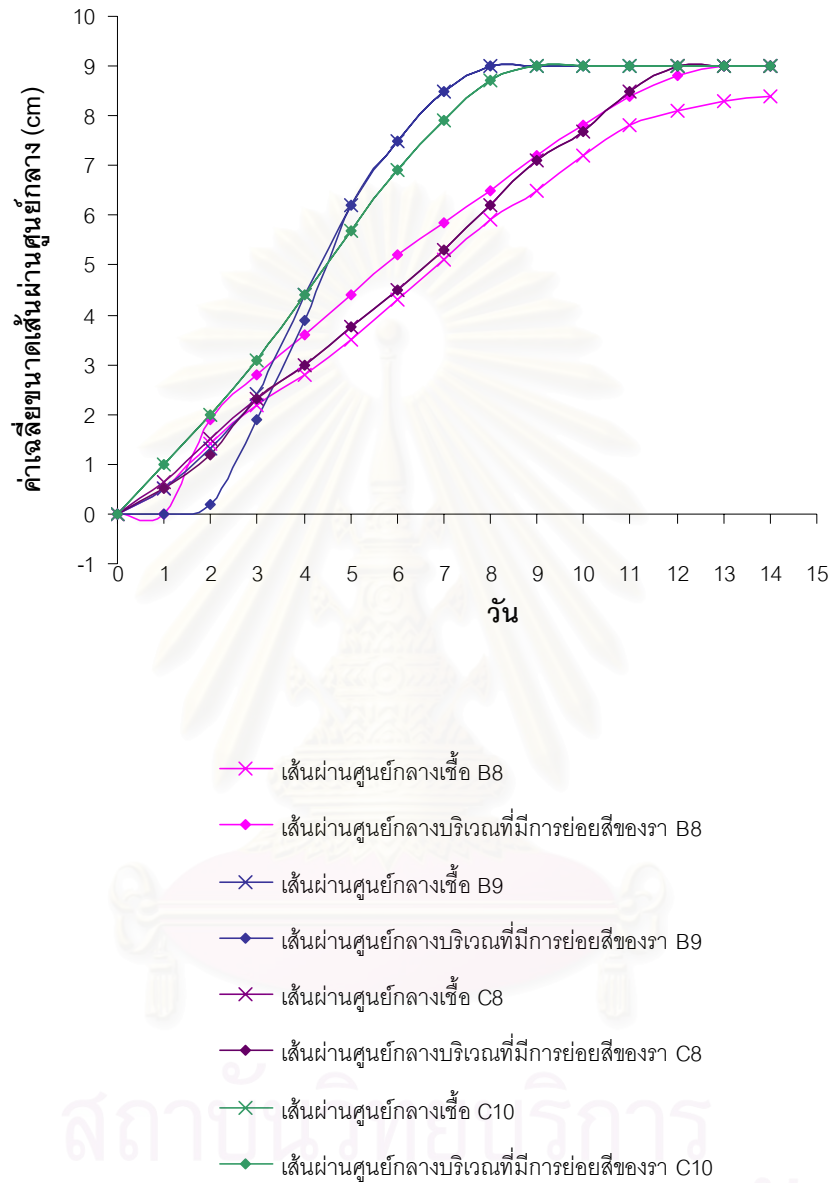
ตัวอย่างดิน	จำนวนกราฟที่มีความสามารถในการย่อยสี	จำนวนกราฟที่ย่อยสีได้อย่างชัดเจนในวันที่ 14	รหัสกราฟที่ย่อยสีได้อย่างชัดเจนในวันที่ 14
A	2	2	A3,A7
B	6	4	B5,B7,B8,B9
C	5	2	C8,C10
D	3	2	D3,D9
E	3	1	E1
ราที่ได้จากไม้ผุ	-	2	L1,L10
รวม	19	13	-

รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของกราฟที่ย่อยสีได้อย่างชัดเจนทั้ง 13 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสี RBBR ที่บ่มเป็นเวลานาน 14 วันแสดงดังรูปที่ 4.1-4.3

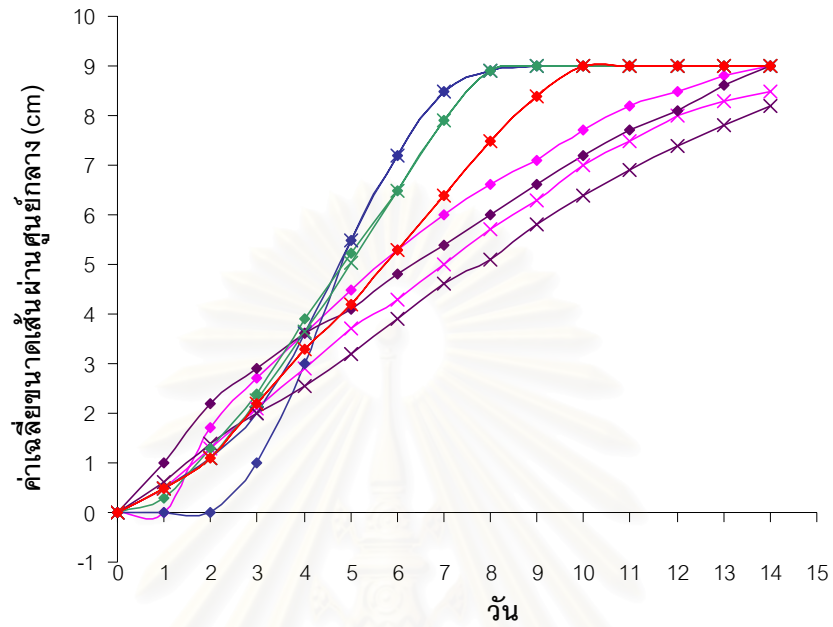
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสลาย RBBR ของรา A3, A7, B5 และ B7 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสีย RBBR



รูปที่ 4.2 รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสลาย RBBR ของรา B8, B9, C8 และ C10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสปี RBBR



- × เส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อ D3
- ♦ เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่มีการย่อยสลายของรา D3
- × เส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อ D9
- ♦ เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่มีการย่อยสลายของรา D9
- × เส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อ E1
- ♦ เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่มีการย่อยสลายของรา E1
- × เส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อ L1
- ♦ เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่มีการย่อยสลายของรา L1
- × เส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อ L10
- ♦ เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่มีการย่อยสลายของรา L10

รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโตและการย่อยสลาย RBBR ของรา D3, D9, E1, L1 และ L10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสีย RBBR

จากรูปที่ 4.3 รา D3 มีการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นตั้งแต่วันแรกของการบ่มและค่อย ๆ เจริญเติบโตจนกระทั่งวันที่ 14 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร พบว่ารา D3 เริ่มต้นย่อยสีในวันที่ 2 และย่อยได้มากขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อครบกำหนด 14 วันสามารถย่อยสีอาหารจนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนใส

รา D9 มีการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นตั้งแต่วันแรกของการบ่มและค่อย ๆ เจริญเติบโตจนกระทั่งเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อในวันที่ 8 พบว่ารา D9 เริ่มต้นย่อยสีในวันที่ 3 และย่อยได้มากขึ้นจนกระทั่ง 8 วันจึงสามารถย่อยสีได้ทั้งหมด เมื่อครบกำหนด 14 วันสามารถย่อยสีอาหารจนเปลี่ยนเป็นสีส้มใส

รา E1 มีการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นตั้งแต่วันแรกของการบ่มและค่อย ๆ เจริญเติบโตจนกระทั่งวันที่ 14 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.2 เซนติเมตร พบว่ารา E1 เริ่มต้นย่อยสีในวันแรก และย่อยได้มากขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อครบกำหนด 14 วันสามารถย่อยสีอาหารจนเปลี่ยนเป็นสีฟ้าอ่อนใส

รา L1 มีการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นตั้งแต่วันแรกของการบ่มและค่อย ๆ เจริญเติบโตจนกระทั่งเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อในวันที่ 8 พบว่ารา L1 เริ่มต้นย่อยสีในวันแรก และย่อยได้มากขึ้นจนกระทั่ง 8 วันจึงสามารถย่อยสีได้ทั้งหมด เมื่อครบกำหนด 14 วันสามารถย่อยสีอาหารจนเปลี่ยนเป็นสีส้มใส

รา L10 มีการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นตั้งแต่วันแรกของการบ่มและค่อย ๆ เจริญเติบโตจนกระทั่งเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อในวันที่ 10 พบว่ารา L10 เริ่มต้นย่อยสีในวันแรก และย่อยได้มากขึ้นจนกระทั่ง 10 วันจึงสามารถย่อยสีได้ทั้งหมด เมื่อครบกำหนด 14 วันสามารถย่อยสีอาหารจนเปลี่ยนเป็นสีส้มใส

จากรูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 พบว่าราทั้ง 13 สายพันธุ์มีลักษณะการย่อยสีแตกต่างกันมีข้อนำสังเกตสรุปดังตารางที่ 4.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ลักษณะการย่อยสลายของราทั้ง 13 สายพันธุ์

รหัสรา	วันที่เริ่มย่อยสลาย	วันที่ราเต็มจานเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะการย่อยสลาย		สีอาหารในวันที่ 14
			ย่อยสลายออกมารอบ ๆ โคลินี้	ย่อยสลายภายในตัวโคลินี้	
A3	3	8		✓	สีส้มใส
A7	3	5		✓	สีส้มอ่อนใส
B5	2	>14	✓		สีฟ้าอ่อนใส
B7	2	12	✓		สีเหลืองอ่อนใส
B8	2	>14	✓		สีฟ้าอ่อนใส
B9	2	8		✓	สีส้มใส
C8	1	12		✓	สีส้มใส
C10	1	9		✓	สีส้มใส
D3	2	>14	✓		สีเหลืองอ่อนใส
D9	3	8		✓	สีส้มใส
E1	1	>14	✓		สีฟ้าอ่อนใส
L1	1	8	✓*		สีส้มใส
L10	1	10		✓	สีส้มใส

* ย่อยสลายออกมารอบ ๆ โคลินี้ในวันแรก ๆ ของการบ่มเท่านั้น

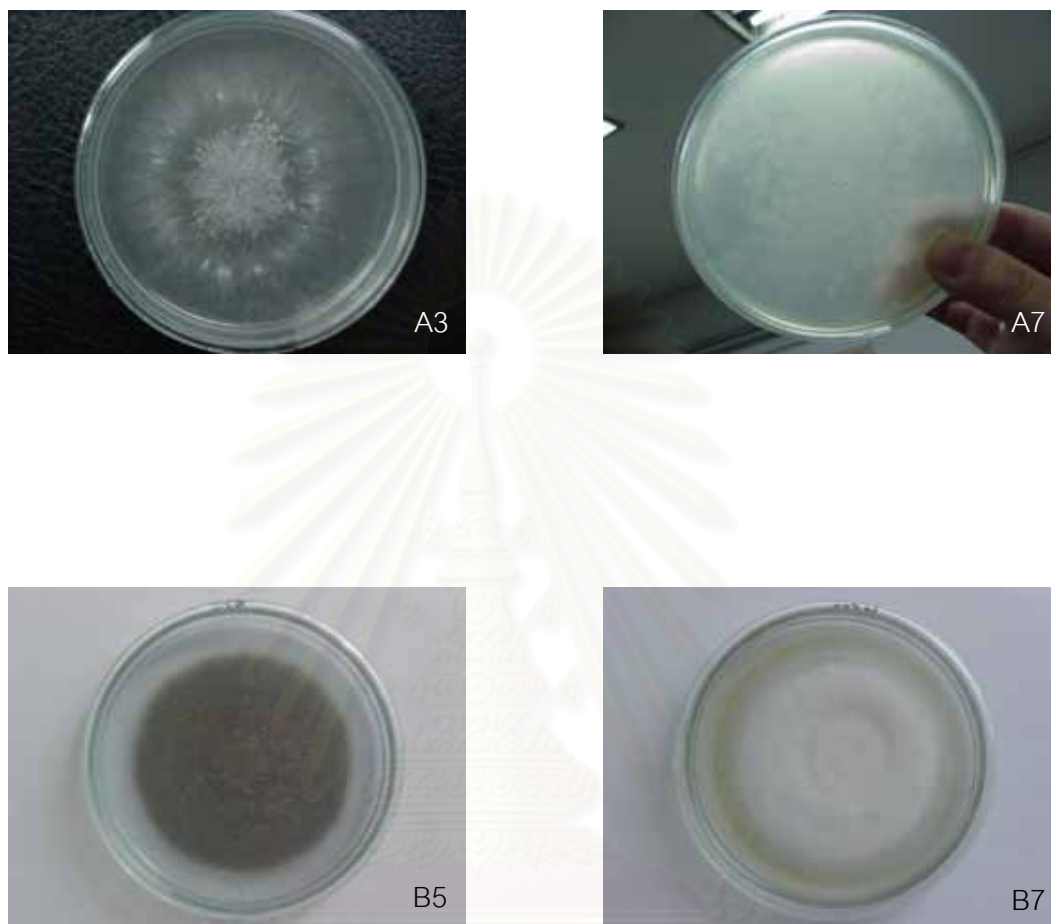
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสี RBBR สรุปไว้ดังตารางที่ 4.4 และแสดงดังในรูปที่ 4.4 - 4.6

ตารางที่ 4.4 ลักษณะการเจริญของราในวันที่ 14 ของร่าทั้ง 13 สายพันธุ์

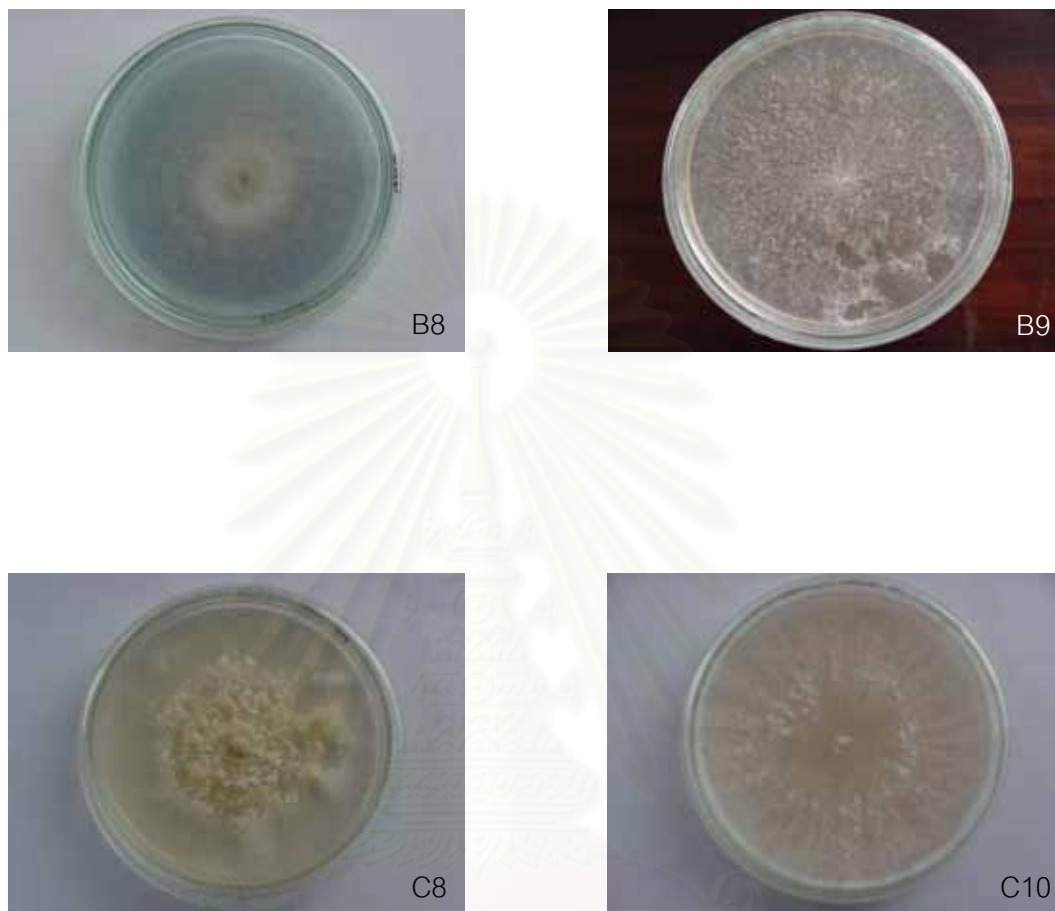
รหัสรา	ลักษณะการเจริญของราในวันที่ 14
A3	เส้นใยเป็นเส้น ๆ คล้ายขนมีสีขาว ไม่พันกันแน่น
A7	เส้นใยบาง ๆ สีขาวเจริญอยู่ในเนื้อวุ้น
B5	โคโลนีมีสีเขียวสด สร้างเม็ดแข็ง
B7	โคโลนีมีสีขาวและแน่น ขอบสีเหลือง
B8	โคโลนีมีสีฟ้าอมเทา พูเล็กน้อย
B9	เส้นใยมีสีขาวเป็นขุย ๆ ทั้ง plate
C8	เส้นใยมีสีขาวอมส้มเล็กน้อย เหนียว และแน่น
C10	เส้นใยมีสีขาวฟูเกือบทั้ง plate
D3	โคโลนีมีสีขาวอมฟ้า พูเล็กน้อย
D9	เส้นใยมีสีขาวฟูแน่น คล้ายลำลี
E1	โคโลนีมีสีน้ำตาลเทาอมเขียว ขอบสีขาว
L1	เส้นใยมีสีขาวบางส่วนมีสีน้ำตาลไหม้ เส้นใยฟูมาก พันกันแน่นและเหนียว
L10	เส้นใยสีขาวฟูและแน่นปานกลาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



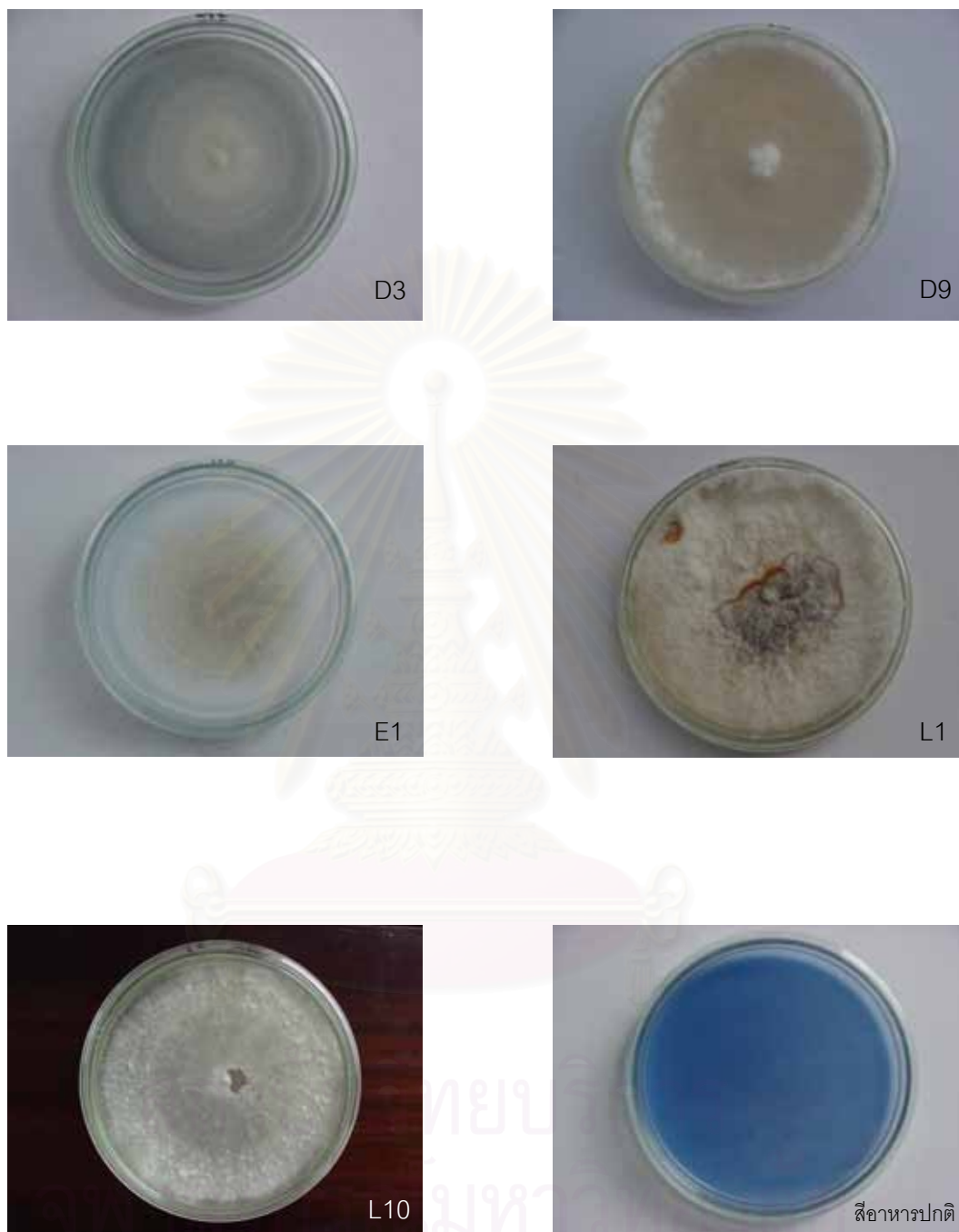
รูปที่ 4.4 ลักษณะการเจริญของรา A3, A7, B5 และ B7 ในวันที่ 14 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น
ที่เติมดี RBBR

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 ลักษณะการเจริญของรา B8, B9, C8 และ C10 ในวันที่ 14 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น
ที่เติมสี RBBR

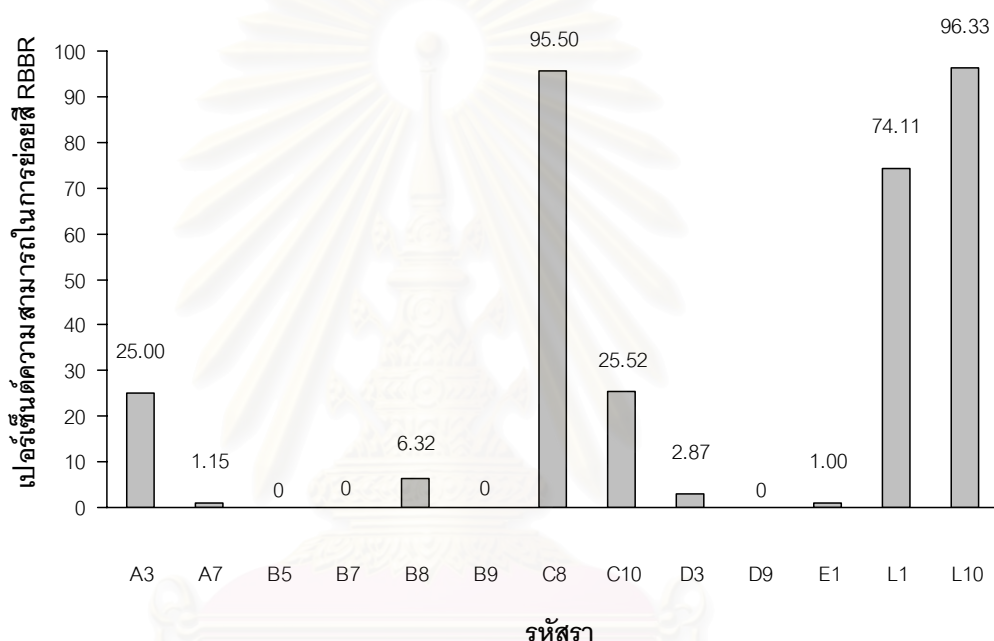
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.6 ลักษณะการเจริญของรา D3, D9, E1, L1 และ L10 ในวันที่ 14 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสี RBBR และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้นที่เติมสี RBBR ซึ่งไม่มีการเพาะเชื้อ

4.3 การคัดเลือกกราเบื้องต้นที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลาย RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium

เพื่อประเมินความสามารถในการย่อยสลายเชิงปริมาณ จึงได้นำราที่คัดเลือกได้บนอาหารเชื้อแข็ง 2 ชั้น จำนวน 13 สายพันธุ์มาทดลองย่อยสลาย RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium (MM) ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการย่อยสลาย RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium ในวันที่ 7 ของราทั้ง 13 สายพันธุ์

จากผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลาย RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM พบว่าในวันที่ 7 รา L10 และ C8 สามารถย่อยสลายได้ดีที่สุดคือ 96.33% และ 95.50% ตามลำดับเมื่อเทียบกับสืตั้งต้น รองลงมาคือ รา L1 สามารถย่อยสลายได้ 74.11% เมื่อเทียบกับสืตั้งต้น รา A3 และ C10 สามารถย่อยสลายได้ใกล้เคียงกันคือประมาณ 25% เมื่อเทียบกับสืตั้งต้น ส่วนราที่เหลืออีก 8 สายพันธุ์แทบไม่มีหรือไม่มีความสามารถในการย่อยสลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM

ดังนั้นได้คัดเลือกกราที่มีความสามารถในการย่อยสลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 25 % เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไปซึ่งได้แก่ รา A3, C8, C10, L1 และ L10

4.4 การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสรี RBBR ของราที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium

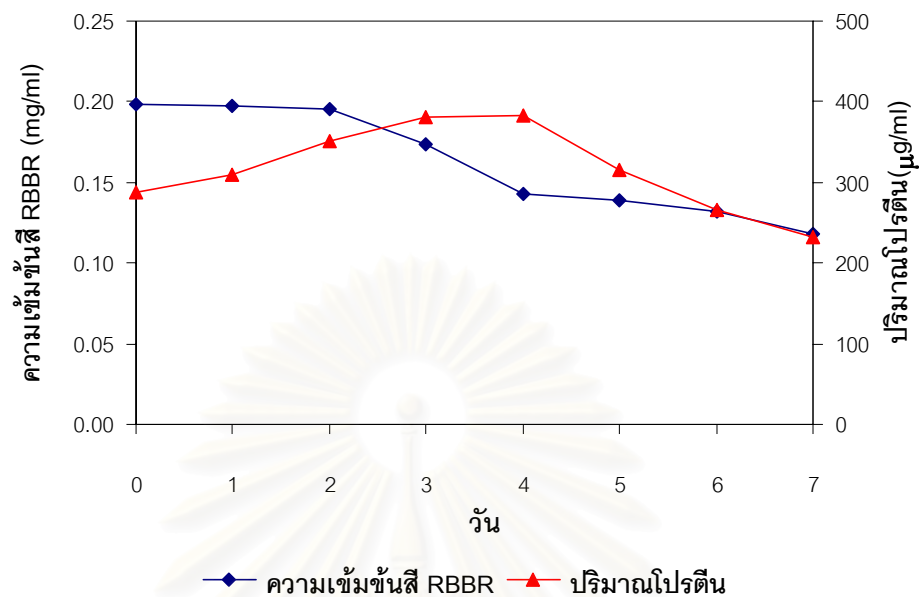
การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสรี RBBR ของรา A3, C8, C10, L1 และ L10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ได้มีการใช้กระดาษเซลโลเฟนบุทึบผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA เพื่อไม่ให้มีฝุ่นที่สามารถติดมาเมื่อทำการเจาะโคโลนีของรา เพราะฝุ่นที่ติดมาจะมีผลต่อการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อที่ไม่ได้เกิดจากการใช้สีเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวได้ ซึ่งรูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสรี RBBR ของราทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM เป็นระยะเวลา 7 วันให้ผลดังนี้

รา A3 ค่อย ๆ เจริญเติบโตตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงเชื้อและเจริญสูงสุดในวันที่ 4 จากนั้นเชื้อเริ่มมีปริมาณโปรตีนลดลง ส่วนการย่อยสรีพบว่ารา A3 มีค่อย ๆ ย่อยสรีในวันแรก ๆ อย่างช้า ๆ จนกระทั่งในวันที่ 3-4 ย่อยสรีได้อย่างรวดเร็ว จากนั้นอัตราการย่อยสรีเริ่มช้าลง ซึ่งเมื่อครบ 7 วันรา A3 สามารถย่อยสรีได้ 40.25% เมื่อเทียบกับสีตั้งต้น ดังแสดงในรูปที่ 4.8 และ 4.13

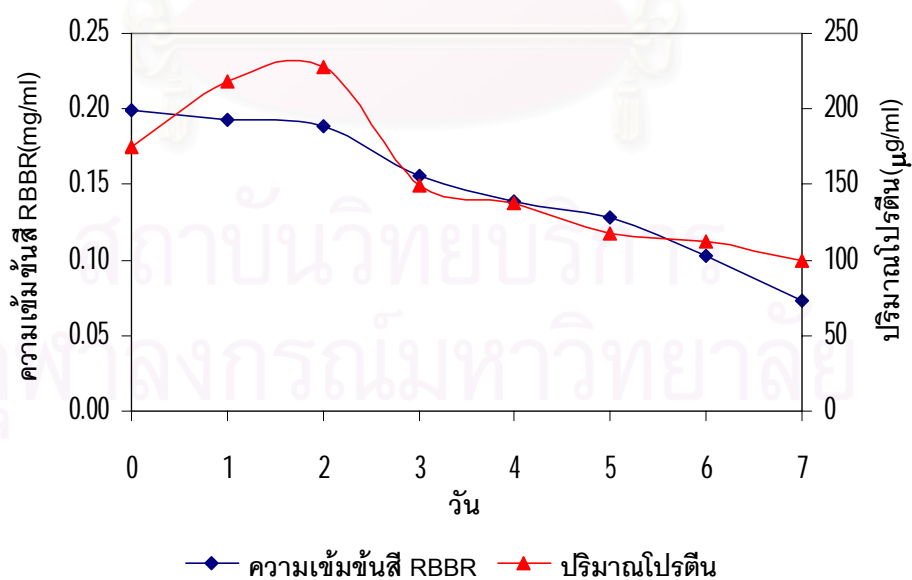
รา C8 เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรก ๆ ของการเลี้ยงเชื้อและเจริญสูงสุดในวันที่ 2 จากนั้นเชื้อเริ่มมีปริมาณโปรตีนเริ่มลดลง ส่วนการย่อยสรีพบว่ารา C8 ค่อย ๆ ย่อยสรีอย่างช้า ๆ ตั้งแต่วันแรกจนเมื่อครบ 7 วัน สามารถย่อยสรีได้ 62.99% เมื่อเทียบกับสีตั้งต้น ดังแสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.13

รา C10 และ L1 พบว่ามีการลดลงของปริมาณโปรตีนตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 7 แสดงว่ารา C10 และ L1 ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสีเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวได้ และพบว่าในวันที่ 7 รา C10 และ L1 สามารถย่อยสรีได้เพียง 4.49% และ 0.55% ตามลำดับเมื่อเทียบกับสีตั้งต้น ดังแสดงในรูปที่ 4.10, 4.11 และ 4.13

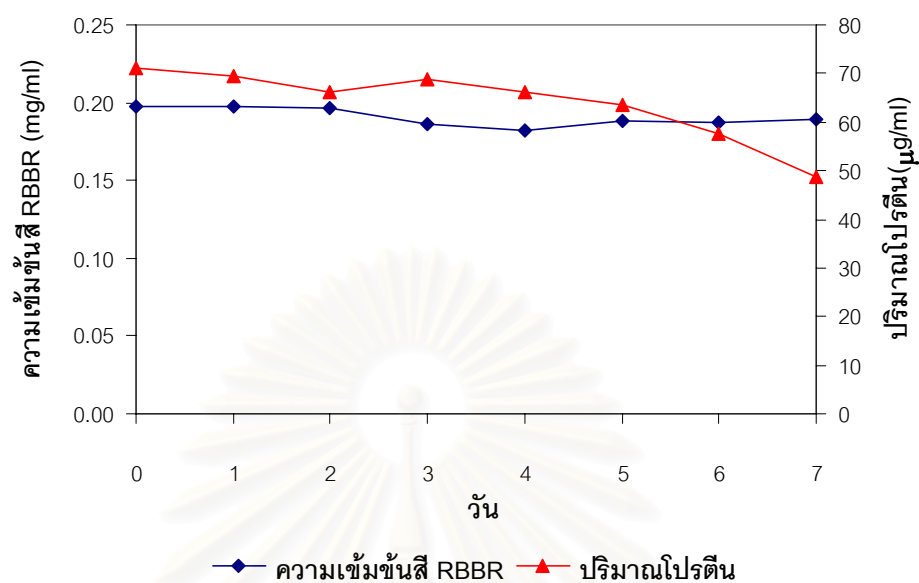
รา L10 เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเชื้อเริ่มมีปริมาณโปรตีนลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งถึงวันที่ 7 แต่พบว่ารา L10 ยังสามารถย่อยสรีอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 1 จนถึงวันที่ 3 จากนั้นการย่อยสรีเริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 5 จนเมื่อครบ 7 วัน สามารถย่อยสรีได้ 96.20% เมื่อเทียบกับสีตั้งต้น ดังแสดงในรูปที่ 4.12 และ 4.13



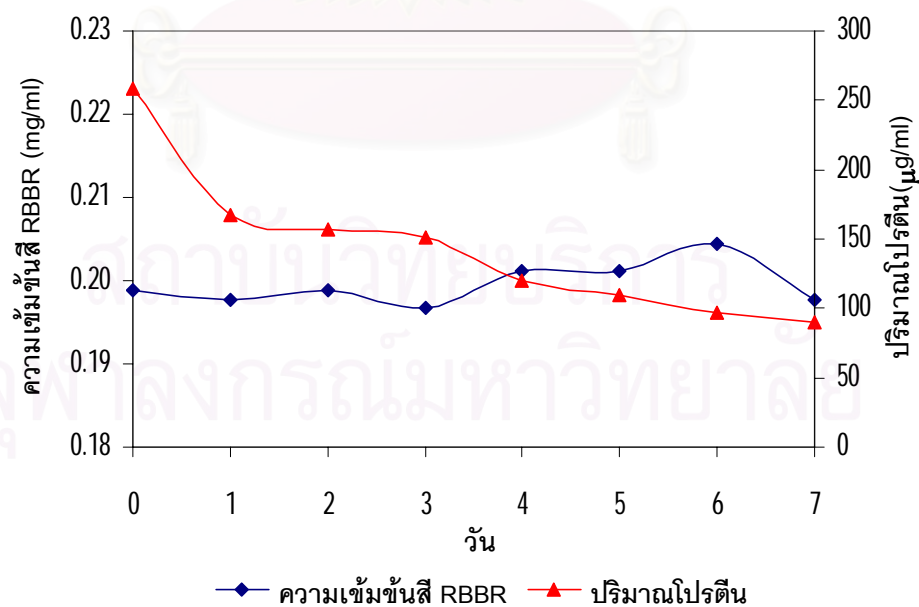
รูปที่ 4.8 รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของรา A3 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน



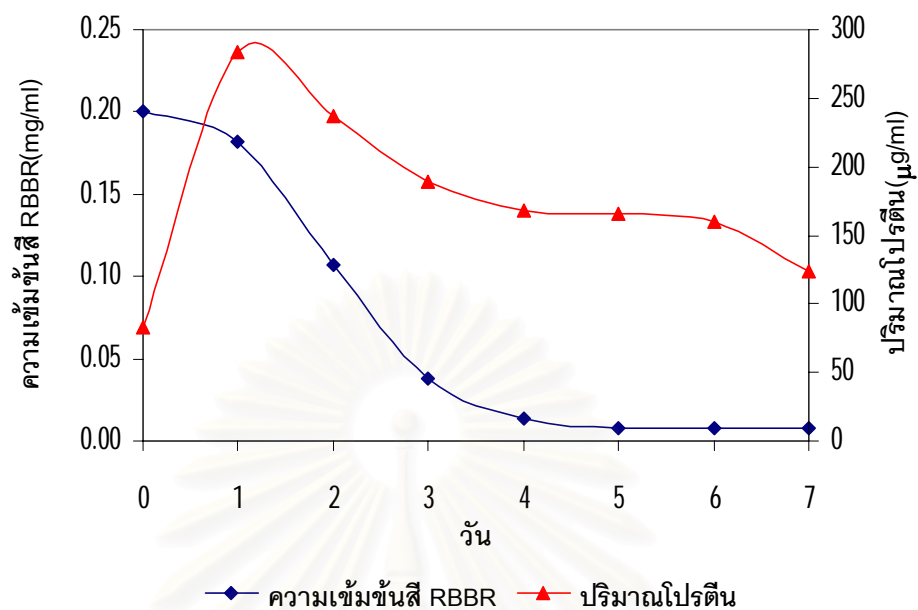
รูปที่ 4.9 รูปแบบในการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของรา C8 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน



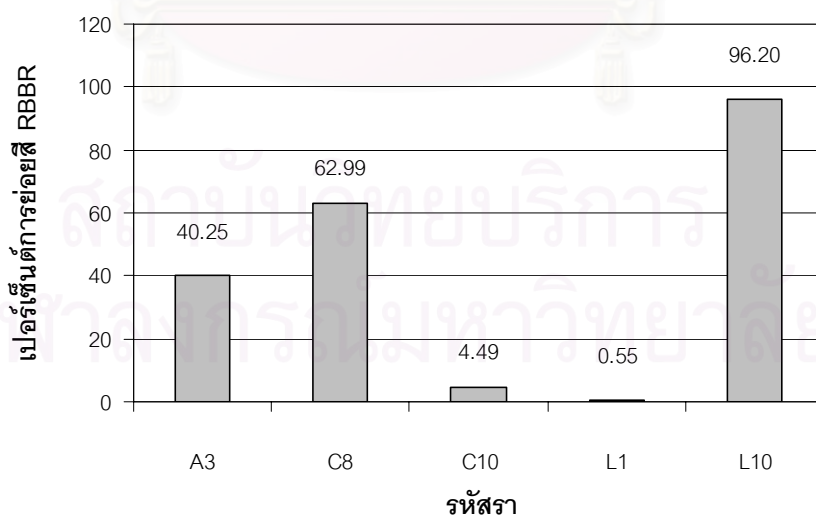
รูปที่ 4.10 รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของรา C10 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.11 รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของรา L1 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.12 รูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสี RBBR ของรา L10 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

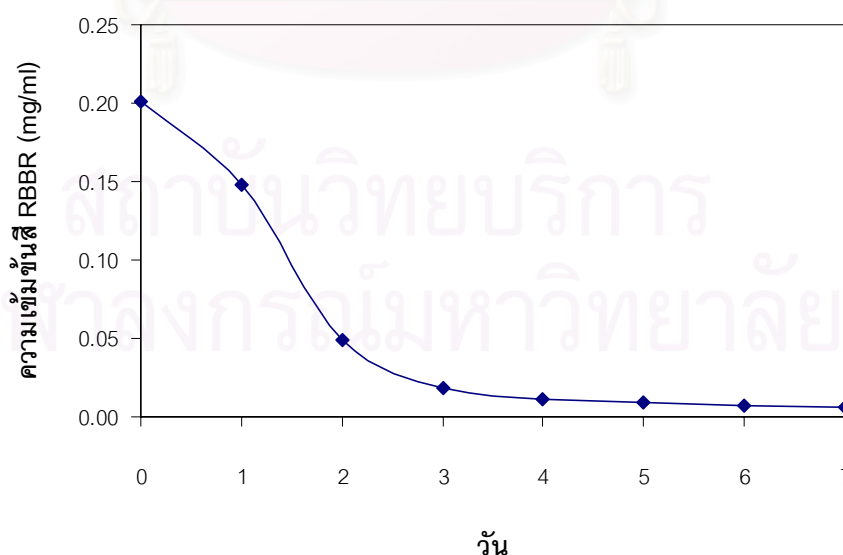


รูปที่ 4.13 สรุปรูปเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการย่อยสี RBBR ในวันที่ 7

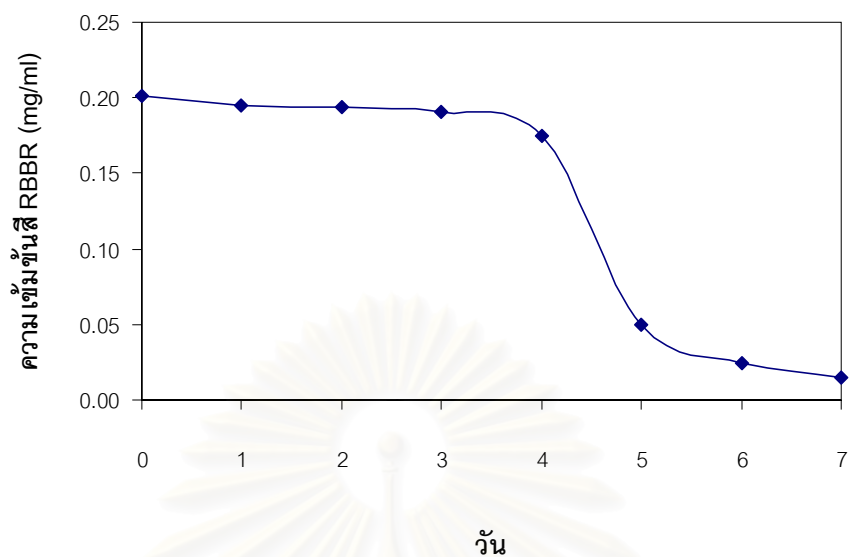
จากผลการศึกษาข้างต้นพบว่า มีรา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ A3, C8 และ L10 สามารถย่อยสลาย RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM โดยในวันที่ 7 ของการเลี้ยง รา L10 สามารถย่อยสลายได้ดีที่สุด คือ 96.20% เมื่อเทียบกับสปีดตั้งต้น รองลงมาคือ C8 และ A3 สามารถย่อยสลายได้ 62.99% และ 40.25% ตามลำดับเมื่อเทียบกับสปีดตั้งต้น แต่พบว่ารา C10 และ L1 แทบไม่สามารถย่อยสลายและไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสปีด RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเดียวได้เลย ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองในข้อ 4.3 ที่รา C10 และ L1 สามารถย่อยสลายได้ 25.52% และ 74.11% ตามลำดับเมื่อเทียบกับสปีดตั้งต้น ซึ่งอาจเกิดจากการทดลองในข้อ 4.3 มีการเจาะเชื้อที่ติดวุ้นอาหาร PDA มาด้วย แสดงว่ารา C10 และ L1 อาจต้องการแหล่งคาร์บอนอื่นในการเจริญ ดังนั้นจึงนำรา C10 และ L1 มาทดสอบต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium (LN)

4.5 การศึกษารูปแบบการย่อยสลาย RBBR ของราที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium

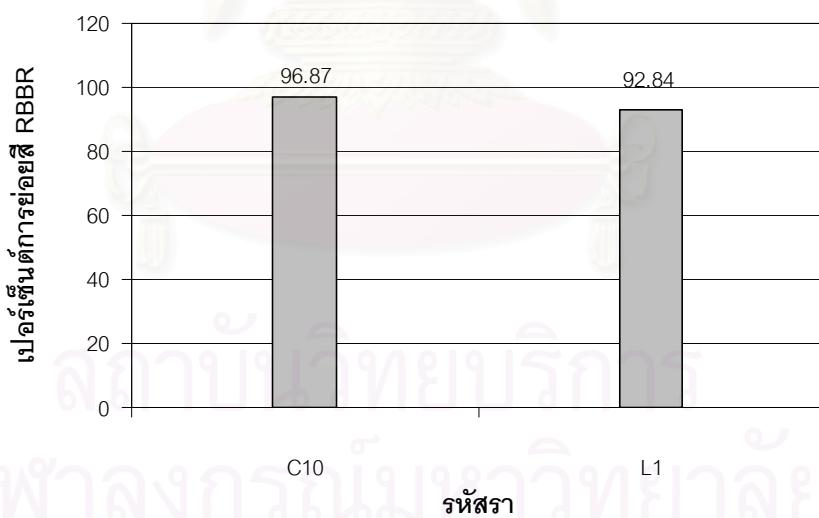
จากการศึกษารูปแบบการย่อยสลาย RBBR ของรา C10 และ L1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LN ในระยะเวลา 7 วัน พบว่ารา C10 สามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรกถึงวันที่ 3 จากนั้นอัตราการย่อยสลายเริ่มลดลงจนเมื่อครบ 7 วัน สามารถย่อยสลายได้ 96.87% ส่วนรา L1 สามารถย่อยสลายได้อย่างช้า ๆ ในวันแรก ๆ จนเมื่อถึงวันที่ 4 อัตราการย่อยสลายจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนเมื่อครบ 7 วัน สามารถย่อยสลายได้ 92.84% ดังแสดงในรูปที่ 4.14 - 4.16



รูปที่ 4.14 รูปแบบในการย่อยสลาย RBBR ของรา C10 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.15 รูปแบบในการย่อยสี RBBR ของรา L1 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.16 สรุปเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการย่อยสี RBBR ในวันที่ 7

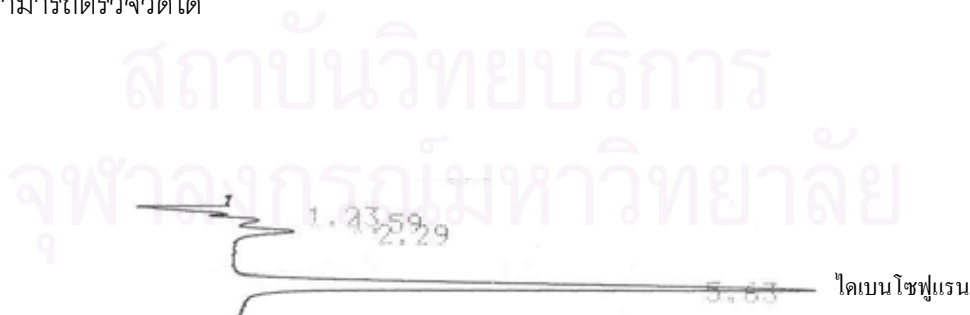
จากผลการทดลองในข้อ 4.4 และ 4.5 ได้ทำการทดลองต่อโดยทดสอบรา A3, C8 และ L10 ในการย่อยสลายไคเบนโซฟูแรนแทนสี RBBR โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM และทดสอบรา C10 และ L1 ในการย่อยสลายไคเบนโซฟูแรนโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LN

4.6 การประเมินความสามารถของราในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium

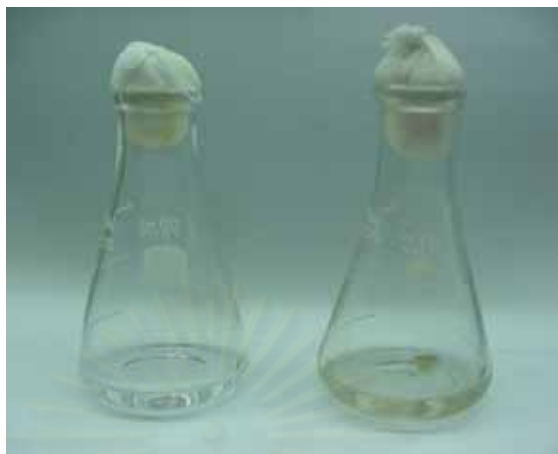
จากการเลี้ยงรา A3, C8 และ L10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่เติมไโดเบนโซฟูแรนเป็นแหล่งคาร์บอนเดียวพบว่าในวันที่ 7 รา A3 และ C8 สามารถย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้ 44.30 % และ 66.41 % ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่รา L10 ไม่สามารถย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้ซึ่งอาจเกิดจากโครงสร้างไโดเบนโซฟูแรนต่างจากสี RBBR ดังนั้นเอนไซม์ที่จุลินทรีย์มีอาจมีความเหมาะสมกับสีมากกว่าไโดเบนโซฟูแรน จึงเป็นไปได้ว่าราบางสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสี แต่ไม่สามารถย่อยไโดเบนโซฟูแรนได้

จากโครมาโตแกรมการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนโดยรา A3 ในวันที่ 7 พบว่ามีการสะสมของสารมัธยันตร์หลักอยู่ 2 ชนิด ซึ่งมีค่า retention time เท่ากับ 1.59 และ 2.29 นาที (รูปที่ 4.17) แสดงว่าสารมัธยันตร์ทั้งสองมีขั้วมากกว่าไโดเบนโซฟูแรนเนื่องจากออกมาจากคอลัมน์อย่างรวดเร็วและออกมาก่อน นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM จากไม่มีสีเป็นสีเหลือง ดังรูปที่ 4.18

จากโครมาโตแกรมการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนโดยรา C8 ในวันที่ 7 ไม่พบว่ามี การสะสมของสารมัธยันตร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 4.19) ทั้งนี้อาจเกิดจากรา C8 ย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้สารมัธยันตร์ที่มีสมบัติการละลายน้ำได้ดี ดังนั้นเมื่อทำการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต สารมัธยันตร์จึงไม่ละลายอยู่ในชั้นของตัวทำละลาย ทำให้ไม่สามารถตรวจพบสารกลุ่มนี้ได้ หรืออาจเกิดจากสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ทำการวิเคราะห์คือ 275 นาโนเมตร หรืออาจเกิดจากรา C8 ย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนควบคู่กับการย่อยสลายสารมัธยันตร์ จึงทำให้ไม่พบการสะสมของสารมัธยันตร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือมีสารมัธยันตร์เกิดขึ้นในปริมาณน้อยมากจึงไม่สามารถตรวจวัดได้



รูปที่ 4.17 HPLC โครมาโตแกรมที่เกิดจากการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนของรา A3 ในวันที่ 7



รูปที่ 4.18 สีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM วันที่ 0 (ซ้าย) และสีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายไดเบนไซฟูแรนของรา A3 ในวันที่ 7 (ขวา)



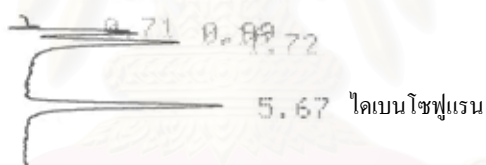
รูปที่ 4.19 HPLC โคโรมาโตแกรมที่เกิดจากการย่อยสลายไดเบนไซฟูแรนของรา C8 ในวันที่ 7

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 การประเมินความสามารถของราในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium

จากการเลี้ยงรา C10 และ L1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LN พบว่ารา C10 สามารถย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้ โดยวันที่ 7 สามารถย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้ 56.07 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่รา L1 ไม่สามารถย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้ อาจเกิดจากเอนไซม์ที่จุลินทรีย์มีอาจมีความเหมาะสมกับสปี RBBR มากกว่าไโดเบนโซฟูแรน หรืออาจเกิดจากการที่ในอาหารมีแหล่งคาร์บอนที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่าอยู่ด้วย คือ กลูโคส ทำให้จุลินทรีย์ไม่มีการปรับตัวหรือปรับตัวต่อการย่อยสารได้ช้า (กวรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา, 2543)

จากโครมาโตแกรมการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนโดยรา C10 ในวันที่ 7 พบว่ามีการสะสมของสารมัธยันตร์หลักอยู่ 3 ชนิด ซึ่งมีค่า retention time เท่ากับ 0.99, 1.16 และ 1.72 นาที (รูปที่ 4.20) แสดงว่าสารมัธยันตร์ทั้งสามมีขั้วมากกว่าไโดเบนโซฟูแรน นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LN จากไม่มีสีเป็นสีเหลืองตั้งแต่วันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.20 HPLC โครมาโตแกรมที่เกิดจากการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนของรา C10 ในวันที่ 7

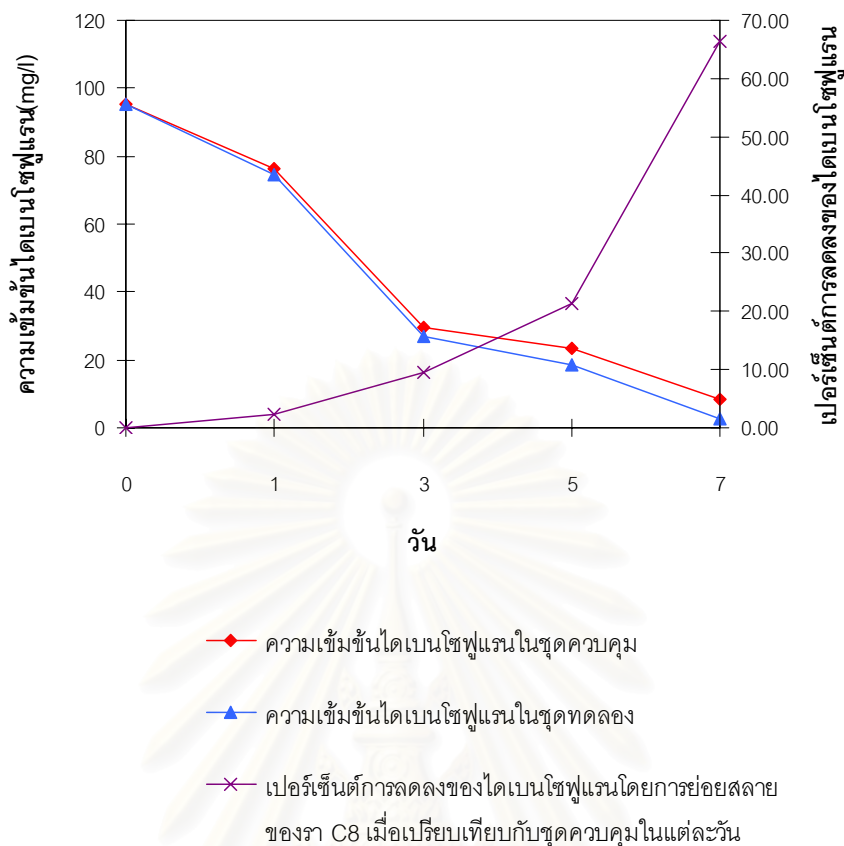
จากผลการศึกษาพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของรา A3 และ C10 มีการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสีของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้น โดยเมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรมการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนของราทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ พบว่ามีสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นที่มีค่า retention time ใกล้เคียงกันที่เวลา 1.59 นาที (สำหรับรา A3) และ 1.72 นาที (สำหรับรา C10) ซึ่งน่าจะเป็นสารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว สำหรับการเกิดสีเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอาจเกิดจากการแตกวงของสารมัธยันตร์ ซึ่งพบในการศึกษาของ Strubel และคณะ (1991) และ Hong และคณะ (2000) ผลการแตกวง meta cleavage ได้สาร 2-hydroxy-6-(2-hydroxyphenyl)-6-oxo-2,4-hexadienoic acid ในการศึกษาของ Becher และคณะ (2000) ผลการแตกวง meta cleavage ได้สาร 2-hydroxy-4-(3'-oxo-3'H-benzofuran-2'-

yliden) but-2-enoic acid และในการศึกษาของ Hammer และคณะ(1998) ผลแตกวง ortho cleavage ได้สาร 2-(1-carboxy methylidene)-2,3-dihydrobenzo[b]furanlydene glycolic acid

จากผลการทดลองในข้อ 4.6 - 4.7 พบว่ารา A3, C8 และ C10 สามารถย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้ภายใน 7 วัน โดยรา C8 สามารถย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้ดีที่สุดในวันที่ 7 (ตารางที่ 4.5) ดังนั้นจึงได้ศึกษารูปแบบการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนของรา C8 ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.21 และตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนของราแต่ละสายพันธุ์ในวันที่ 7

รหัสรา	อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถในการย่อยสลาย DF ในวันที่ 7 (%)
A3	MM	44.30
C8	MM	66.41
C10	LN	56.07
L1	LN	0
L10	MM	0



รูปที่ 4.21 รูปแบบการย่อยสลายไดเบนโซฟลูออเรนของรา C8

ตารางที่ 4.6 การย่อยสลายไดเบนโซฟลูออเรนของรา C8

วันที่	ความเข้มข้น DF ในชุดควบคุม	ความเข้มข้น DF ในชุดทดลอง	การลดลงของ DF โดยการย่อยสลายของรา C8 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในแต่ละวัน (%)
0	95.28	95.28	0
1	76.30	74.58	2.26
3	29.70	26.89	9.47
5	23.26	18.31	21.26
7	8.29	2.78	66.41

4.8 การศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบต่าง ๆ

4.8.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของรบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบต่าง ๆ

จากผลการศึกษาความสามารถของราในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ได้คัดเลือกรา C8 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้ดีที่สุดมาศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5 แบบ แสดงรายละเอียดลักษณะการเจริญดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.22

ตารางที่ 4.7 รายละเอียดลักษณะการเจริญของรา C8 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบต่าง ๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะการเจริญ
Potato Dextrose Agar (PDA)	เมื่อราเจริญเต็มที่เส้นใยตรงกลางมีสีน้ำตาลเทาและรอบ ๆ สีขาว
Yeast Extract Sucrose Agar (YEA)	เมื่อราเจริญเต็มที่เส้นใยมีสีขาวอมเหลืองทั้งจานเลี้ยงเชื้อ เส้นใยแน่น ใต้โคโลนีมีสีเหลือง
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	รา C8 เจริญในอาหาร SDA ได้ช้ากว่าอาหารอีก 4 แบบ โดยเมื่อเจริญเต็มที่เส้นใยมีสีขาวและน้ำตาล ใต้โคโลนีมีสีเหลือง
Corn meal Malt Extract Agar (CMA)	เมื่อราเจริญเต็มที่เส้นใยมีสีน้ำตาลอ่อนอมส้ม เส้นใยไม่แน่นมาก
Malt Extract Agar (MEA)	เมื่อราเจริญเต็มที่เส้นใยมีสีเหลืองสดออกน้ำตาล และมีสีขาวปน ฟู พั่นกันแน่นและเหนียวมาก



อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA



อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YEA



อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SDA



อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA

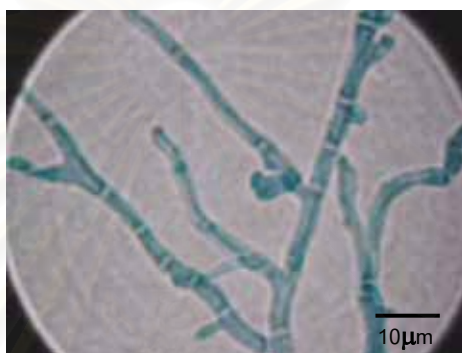


อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA

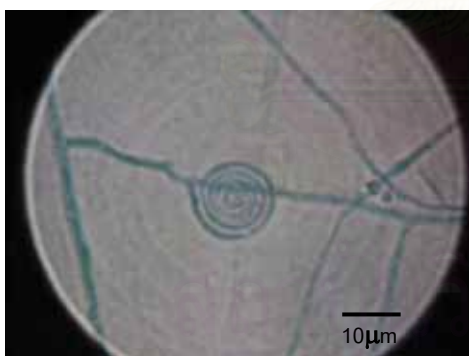
รูปที่ 4.22 ลักษณะการเจริญของรา C8 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบต่าง ๆ

4.8.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค slide culture

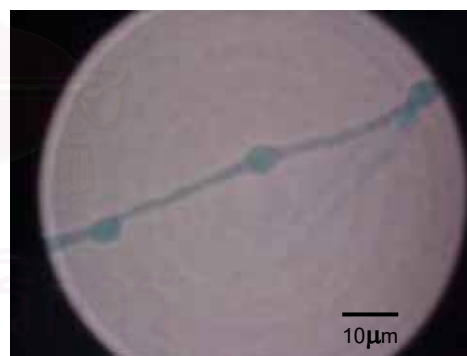
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา C8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลักษณะเส้นใยเป็นชนิดที่มีผนังกัน (septate hypha) ดังรูปที่ 4.23(ก) พบการสร้างเส้นใยในลักษณะขดเป็นเกลียว (spiral hypha) ดังรูปที่ 4.23(ข) และพบการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า chlamydospore ดังรูปที่ 4.23(ค)



(ก)



(ข)



(ค)

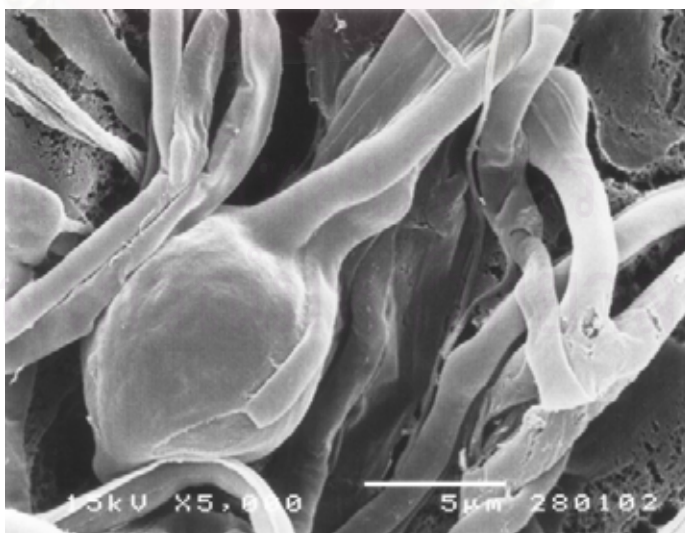
รูปที่ 4.23 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา C8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.8.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)

ลักษณะการสร้างสปอร์ chlamyospore ของรา C8 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงดังรูปที่ 4.24 และ 4.25



รูปที่ 4.24 ลักษณะสปอร์ของรา C8 ที่กำลังขยาย 7,500 เท่า



รูปที่ 4.25 ลักษณะสปอร์ของรา C8 ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

4.9 บังชี้ชนิดของราที่คัดเลือกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (internal transcribed spacer)

จากการนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยหน่วยบริการชีวภาพ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA รา C8 ดังนี้

```

          10           20           30           40           50
5' CCTGCGGAAG GATCATTATC GAGTTTTGAA ATGGGTTGTA GCTGGCCTCT
3' GGACGCCTTC CTAGTAATAG CTCAAAACCTT TACCCAACAT CGACCGGAGA
          60           70           80           90           100
   CCGGAGGCAT GTGCACGCC   TGNCTCATCC ACTCTACACC TGTGCACTTA
   GGCTCCGTA  CACGTGCGGG   ACNGAGTAGG TGAGATGTGG ACACGTGAAT
          110          120          130          140          150
   CTGTGGGTAT CGGAAGGCGT AGCGTCGTTT ATTCGGCGAG GCGTTGACCG
   GACACCCATA GCCTTCCGCA TCGCAGCAA   TAAGCCGCTC CGCAACTGGC
          160          170          180          190          200
   TGCCTACGTT TTACCACAAA CGCTTCAGTA TCAGAATGTG TATTGCGATG
   ACGGATGCAA AATGGTGTTT GCGAAGTCAT AGTCTTACAC ATAACGCTAC
          210          220          230          240          250
   TAACGCATCT ATATACAAC   TTCAGCAACG GATCTCTTGG CTCTCGCATC
   ATTGCGTAGA TATATGTTGA AAGTCGTTGC CTAGAGAACC GAGAGCGTAG
          260          270          280          290          300
   GATGAAGAAC GCAGCGAAAT GCGATAAGTA ATGTGAATTG CAGAATTGAG
   CTACTTCTTG CGTCGCTTTA CGCTATTCAT TACTTAAAC GTCTTAAAGTC
          310          320          330          340          350
   TGAATCATCG AATCTTTGAA CGCACCTTGC GCTCCTTGGT ATTCCGAGGA
   ACTTAGTAGC TTAGAAACTT GCGTGGAACG CGAGGAACCA TAAGGCTCCT
          360          370          380          390          400
   GCATGCCTGT TTGAGTGTCA TGAAATTCTC AAACCCATTA GTCTTTGCGG
   CGTACGGACA AACTCACAGT ACTTTAAGAG TTTGGGTAAT CAGAAACGCC
          410          420          430          440          450
   TCTAGTGGGC TTTGGACTTG GAGGCTTGTC GGTGACTGCA AAGTCATCGA
   AGATCACCCG AAACCTGAAC CTCCGAACAG CCACTGACGT TTCAGTAGCT
          460          470          480          490          500
   CTCTCTCAA  ATGCATTAGC TTGATTCTT  GNCGGATCGG CTCTCGGTGT
   GAGGAGAGTT TACGTAATCG AACTAAGGAA CNGCCTAGCC GAGAGCCACA
          510          520          530          540          550
   GATAATTGTC TACGCCGTGA CCGTGAAGCG TTTNGGCAAG CTTCTAATCG
   CTATTAACAG ATGCGGCACT GGCACCTCGC AAANCCGTTT GAAGATTAGC
          560          570          580          590          600
   TCTCTTGCGA GACAGCTTAC ATTGACCTCT GACCTCNAAT CAGGTAGGAC
   AGAGAACGCT CTGTGCAATG TAACTGGAGA CTGGAGNTTA GTCCATCCTG
          610          620          630
   TACCCGCTGA ACTTAAGCAT ATCAATAA 3'
   ATGGGCGACT TGAATTCGTA TAGTTATT 5'

```

จากผลการศึกษานิตของรา C8 โดยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์
 รา C8 กับฐานข้อมูลที่มีการรายงานไว้ใน GenBank พบว่ารา C8 มีความคล้ายคลึงกับ *Trametes*
 sp.C30 95% (Klonowska และคณะ, 2003) (ภาคผนวก ง) ซึ่งจัดอยู่ใน

Division	Basidiomycota
Class	Basidiomycetes
Order	Aphyllorphales
Family	Polyporaceae
Genus	<i>Trametes</i>

ราสกุลเดียวกันที่กล่าวถึงมากคือ *Trametes versicolor* เป็นราในกลุ่มย่อยสลายเนื้อไม้
 (wood-rotting fungi) ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยได้แก่ soft rot, white rot และ brown rot fungi รา
Trametes versicolor จัดเป็นรากลุ่ม white rot ซึ่งสามารถย่อยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน
 ทำให้ไม่มีสีซีดลง (Lepp, 2004) โครงสร้างของรามีลักษณะคล้ายหิ้ง (shelf-like) ขณะอ่อนจะ
 เหนียวมาก เมื่อแก่จะแข็ง ค่อนข้างบาง ไม่มีก้าน ด้านบนมีสีน้ำตาลอ่อนปนเหลือง มีบริเวณเป็น
 ขอบเขตเป็นวงซ้อนกันหลายชั้นชัดเจน ผิวค่อนข้างเรียบ บริเวณขอบจะมีสีเหลืองอ่อน มักจะเกิด
 เรียงซ้อนกัน ด้านล่างมีสีขาว เมื่อแก่มีสีน้ำตาล สปอร์มีสีใส พบขึ้นบนท่อนไม้ผุพังบนพื้นดิน
 (เกษม สร้อยทอง, 2537) แสดงดังรูปที่ 4.26



รูปที่ 4.26 *Trametes versicolor*

ที่มา: Lepp, 2004

ราในสกุล *Trametes* เคยมีการนำไปใช้ศึกษาการย่อยสารพิษสิ่งแวดล้อมโดยการศึกษาของ Majcherczyk, Johannes และ Hüttermann (1998) ได้ใช้เอนไซม์ laccase ของรา *Trametes versicolor* ในการย่อยสารกลุ่ม PAHs ได้ 11 ชนิด จากทั้งหมด 14 ชนิดภายหลังการบ่ม 72 ชั่วโมง ซึ่งสาร PAHs ทั้ง 11 ชนิด ได้แก่ acenaphthylene, acenaphthene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene และ perylene ในการศึกษาของ Levin, Viale และ Forchiassin (2003) ได้ใช้รา *Trametes trogii* BAFC 463 ในการย่อย nitrobenzene และ anthracene ความเข้มข้น 250-500 ppm ซึ่งภายใน 12-24 วันสามารถย่อยสารได้มากกว่า 90%



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

การแยกจากตัวอย่างดินจำนวน 5 ตัวอย่าง ที่ได้จากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่เส้นทางที่ทำการ-มอสิงโต บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น ที่ประกอบด้วยอาหาร Czapek Dox agar และ malt extract agar โดยใช้สี Remazol Brilliant Blue R (RBBR) เป็นอินดิเคเตอร์ เนื่องจากมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับสารในกลุ่มไดออกซิน พบราที่สามารถเจริญได้และมีลักษณะแตกต่างกัน 59 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวน 59 สายพันธุ์พบราที่มีความสามารถในการย่อยสี RBBR จำนวน 19 สายพันธุ์ แต่พบราที่สามารถย่อยสีได้อย่างชัดเจนในวันที่ 14 จำนวน 11 สายพันธุ์ และราที่ได้จากไม้ผุอีก 2 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้น 13 สายพันธุ์ ซึ่งพบว่าลักษณะการย่อยสีมีทั้งย่อยออกมารอบ ๆ โคลินีและย่อยอยู่ภายในโคลินี

เมื่อนำราทั้ง 13 สายพันธุ์มาทดสอบการย่อยสี RBBR เบื้องต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium (MM) เป็นเวลานาน 7 วัน พบว่า รา L10 และ C8 สามารถย่อยสีได้ดีที่สุดคือ 96.33% และ 95.50% ตามลำดับ รองลงมาคือ รา L1 สามารถย่อยสีได้ 74.11% รา A3 และ C10 สามารถย่อยสีได้ใกล้เคียงกันคือประมาณ 25% ส่วนราที่เหลืออีก 8 สายพันธุ์แทบไม่มีหรือไม่มีความสามารถในการย่อยสีได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ดังนั้นได้คัดเลือกราที่มีความสามารถในการย่อยสีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 25 % เพื่อนำไปทำการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM

การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการย่อยสีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM พบว่า รา A3, C8 และ L10 สามารถย่อยสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM โดยในวันที่ 7 ของการเลี้ยง รา L10 สามารถย่อยสีได้ดีที่สุดคือ 96.20% เมื่อเทียบกับสีตั้งต้น รองลงมาคือ C8 และ A3 สามารถย่อยสีได้ 62.99% และ 40.25% ตามลำดับเมื่อเทียบกับสีตั้งต้น แต่พบว่ารา C10 และ L1 แทบไม่สามารถย่อยสีและไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเดียวได้เลย ซึ่งคาดว่ารา C10 และ L1 อาจต้องการแหล่งคาร์บอนอื่นในการเจริญ ดังนั้นจึงนำรา C10 และ L1 ไปทดสอบต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium (LN) ซึ่งก็พบว่ารา C10 และ L1 สามารถย่อยสีได้ 96.87% และ 92.84% ตามลำดับเมื่อเทียบกับสีตั้งต้น

เมื่อนำราแต่ละสายพันธุ์ไปทดสอบการย่อยไโดเบนโซฟูแรนแทนสี ในอาหารที่เหมาะสมต่อการย่อยสารตั้งต้น พบว่ารา A3 และ C8 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM เป็นระยะเวลา 7 วัน สามารถย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้ 44.30 % และ 66.41 % ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่รา L10 ไม่สามารถย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้ ส่วนรา C10 และ L1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LN เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่ารา C10 สามารถย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้ 56.07 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่รา L1 ไม่สามารถย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้ นอกจากนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของรา A3 และ C10 ยังพบสารมัยขังที่มีขั้วมากกว่าไโดเบนโซฟูแรน และพบการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง แต่ไม่พบการสะสมของสารมัยขังในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของรา C8

การศึกษาลักษณะการเจริญ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา C8 ซึ่งเป็นราที่มีความสามารถในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้สูงที่สุด พบว่ารา C8 มีลักษณะการเจริญในอาหารทั้ง 5 แบบได้แก่ PDA, YEA, SDA, CMA และ MEA แตกต่างกัน และเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา C8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยรามีผนังกันและสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า chlamydospore เมื่อมีการบ่งชี้ราโดยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ารา C8 มีความคล้ายคลึงกับ *Trametes* sp.C30 95%

ดังนั้นในการศึกษารังนี้สามารถคัดราที่มีความสามารถในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ A3, C8 และ C10 โดยพบว่ารา C8 มีความน่าสนใจที่อาจนำไปใช้ในการศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจาก 1) มีความสามารถในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนได้สูงที่สุด 2) ยังไม่พบว่ามีสารสะสมของสารมัยขังในอาหารเหลว นั่นคืออาจเป็นไปได้ว่ารา C8 สามารถย่อยไโดเบนโซฟูแรนได้หมดจนเกิดเป็น CO₂ ไม่เกิดสารที่อาจเป็นพิษจากการย่อยสลาย 3) ยังไม่พบการรายงานถึงรา *Trametes* sp.C30 ในการทดสอบการนำไปย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนของรา C8 เพิ่มเติม เช่น ปริมาณสารตั้งต้น ธาตุอาหาร และ pH

2. สามารถนำราที่มีความสามารถในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนที่ได้ ไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารในกลุ่มไดออกซิน โดยอาจทำการทดลองกับสารไดออกซินที่มีความ

เป็นพิษต่ำ ๆ ก่อน หรือมีจำนวนอะตอมคลอรีนในโครงสร้างน้อยก่อนเพื่อดูแนวโน้มความเป็นไปได้ที่จะนำไปทดสอบกับการย่อยสาร 2,3,7,8-TCDD ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่อไป

3. อาจมีการศึกษาในแนวลึกในเรื่องกลไกการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารของรา

4. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้จริงในสิ่งแวดล้อม โดยอาจลองทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารในดินที่มีการปนเปื้อนของสารไดออกซิน เพื่อดูปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจมีผลต่อการย่อยสลายสาร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา. 2543. จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครราชสีมา: โคราซ ออฟเซ็ทการพิมพ์.
- กฤษณา ชัชพงศ์. 2542. ความเป็นพิษของไดออกซินและ PCBs. ข่าวสารวัดภูมิพิษ 26(2): 76-78.
- เกษม สร้อยทอง. 2537. เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. อุบลราชธานี: โรงพิมพ์ศิริธรรม ออฟเซ็ท.
- ชนิษฐา ทวีถาวรสวัสดิ์. 2543. อันตรายจากไดออกซิน. วารสารสิ่งแวดล้อม 4(16): 51-54.
- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2542. ไดออกซิน. กรุงเทพมหานคร: ศรีเมืองการพิมพ์.
- จตุรงค์ ตันติมงคลสุข, นรินทร์ วรภูมิ และสุชัย สุเทพารักษ์. 2543. ไดออกซิน: สารก่อมะเร็ง. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 44(2): 75-84.
- จารุพงศ์ บุญ-หลง. 2544. มหันตภัยไดออกซิน [Online]. แหล่งที่มา: <http://www.pcd.go.th> [12 ตุลาคม 2546]
- จารุวรรณ วิริยะหิรัญไพบุลย์. 2542. ไดออกซิน. พิษวิทยาสาร 9(3): 9-12.
- ณัญจนา ลือตระกูล. 2542. ไดออกซินกับสุขภาพ. ข่าวสารวัดภูมิพิษ 26(2): 84-85.
- นิตยา วีระกุล. 2542. ไดออกซิน. ข่าวสารวัดภูมิพิษ 26(1): 33-35.
- ปราณี เกียรติสุระยานนท์. 2542. Dioxin. ข่าวสารด้านยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ 2(2): 20-22.
- ปรีชา กันทรากรกิติ, บรรณานิการ. 2542. ไดออกซินสารก่อมะเร็งในผู้บริโภค. ธุรกิจอาหารสัตว์ 16(65): 34-35.
- ปัทมาพร ประชุมรัตน์. 2546. การคัดกรองรายย่อยไดเบนโซพีวแรนจากดินเพื่อศักยภาพในการย่อยสลายไดออกซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิทยา สังข์ทอง. 2545. ไดออกซินและฟูแรน สารพิษอันตรายใกล้ตัว. LAB.TODAY 1(3): 41-47.
- สุชาติ อุดมโสภกิจ และไพโรจน์ หลวงพิทักษ์. 2542a. มหันตภัยไดออกซิน. For quality 6(33): 31-35.

สุชาติ อุดมโสภกิจ และไพโรจน์ หลวงพิทักษ์. 2542b. มหันตภัยไดออกซิน. For quality 6(34): 40-43.

สุภัทรา ภิญญิตติกุล. 2542. ฝังกอบสารพิษสนามบินบ่อฝ้ายใครรับกรรม. วิศวกรรมสาร 52 (10): 35-38.

สุมล ปวีตรานนท์. 2542. เหตุเกิดที่บ่อฝ้าย อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์. พิษวิทยาสาร 9(2): 6-7.

ภาษาอังกฤษ

Arfmann, H.-A., Timmis, K. N., and Wittich, R.-M. 1997. Mineralization of 4-chloro dibenzofuran by a consortium consisting of *Sphingomonas* sp. strain RW1 and *Burkholderia* sp. strain JWS. Applied and Environmental Microbiology 63(9): 3458-3462. Cited in Bressler, D. C., and Fedorak, P. M. 2000. Bacterial metabolism of fluorine, dibenzofuran, dibenzothiophene, and carbazole. Canadian Journal of Microbiology 46(5): 397-409.

Arienti, M., Wilk, L., Jasinski, M., and Prominski, N. 1988. Dioxin-containing wastes: treatment technologies. NJ: Noyes Data Corporation.

Becher, D., Specht, M., Hammer, E., Francke, W., and Schauer, F. 2000. Cometabolic degradation of dibenzofuran by biphenyl-cultivated *Ralstonia* sp. Strain SBUG 290. Applied and Environmental Microbiology 66(10): 4528-4531.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Bressler, D. C., and Fedorak, P. M. 2000. Bacterial metabolism of fluorine, dibenzofuran, dibenzothiophene, and carbazole. Canadian Journal of Microbiology 46(5): 397-409.

Bumpus, J. A., Tien, M., Wright, D., and Aust, S. D. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. Science 228: 1434-1436.

Bünz, P. V., and Cook, A. M. 1993. Dibenzofuran 4,4a-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW1: Angular dioxygenation by a three-component enzyme system. Journal of Bacteriology 175: 6467-6475. Cited in Bressler, D.

- C., and Fedorak, P. M. 2000. Bacterial metabolism of fluorine, dibenzofuran, dibenzothiophene, and carbazole. Canadian Journal of Microbiology 46(5): 397-409.
- Cerniglia, C. E., Morgan, J. C., and Gibson, D. T. 1979. Bacterial and fungal oxidation of dibenzofuran. Biochemical Journal 180: 175-185.
- Chapman, E. S. 1974. Effect of temperature on growth rate of seven thermophilic fungi. Mycologia 66: 542-546.
- Chroma, L., Macek, T., Demnerova, K., and Mackova, M. 2002. Decolorization of RBBR by plant cells and correlation with the transformation of PCBs. Chemosphere 49: 739-748.
- Engesser, K.-H., Strubel, V., Christoglou, K., Fischer, P., and Rast, H. G. 1989. Dioxygenolytic cleavage of aryl ether bonds: 1,10-dihydro-1,10-dihydroxy fluorene-9-one, a novel arene dihydrodiol as evidence for angular dioxygenation of dibenzofuran. FEMS Microbiology Letters 65: 205-210. Cited in Bressler, D. C., and Fedorak, P. M. 2000. Bacterial metabolism of fluorine, dibenzofuran, dibenzothiophene, and carbazole. Canadian Journal of Microbiology 46(5): 397-409.
- Foght, J. M., and Westlake, D. W. S. 1988. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocycles by a *pseudomonas* species. Canadian Journal of Microbiology 34: 1135-1141. Cited in Bressler, D. C., and Fedorak, P. M. 2000. Bacterial metabolism of fluorine, dibenzofuran, dibenzothiophene, and carbazole. Canadian Journal of Microbiology 46(5): 397-409.
- Fortnagel, P., et al. 1990. Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. strain HH69 and the mixed culture HH 27. Applied and Environmental Microbiology 56(4): 1148-1156.
- Glenn, J. K., and Gold, M. H. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology 45(6): 1741-1747.

- Gold, M. H., Glenn, J. K., and Alic, M. 1988. Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. Methods in Enzymology 161: 74-78.
- Hammer, E., and Schauer, F. 1997. Fungal hydroxylation of dibenzofuran. Mycological Research 101(4): 433-436.
- Hammer, E., et al. 1998. Isolation and characterization of a dibenzofuran-degrading yeast: Identification of oxidation and ring cleavage products. Applied and Environmental Microbiology 64(6): 2215-2219.
- Harms, H., et al. 1991. Transformation of 3-chlorodibenzofuran by *Pseudomonas* sp. HH69. FEMS Microbiology Letters 81: 25-30. Cited in Bressler, D. C., and Fedorak, P. M. 2000. Bacterial metabolism of fluorine, dibenzofuran, dibenzothiophene, and carbazole. Canadian Journal of Microbiology 46(5): 397-409.
- Hofmann, K. H., Polnisch, E., Kreisel, H., Mach, H., and Schubert, M. 1992. Degradation of dibenzofuran and dibenzodioxins by fungi. Proceedings of the 12th International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds, pp. 93-96. Finland. Cited in U.S. Environmental Protection Agency. 1994. Estimating exposure to dioxin-like compounds Volume II: properties, sources, occurrence and background exposures. Washington D.C.: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. EPA/600/6-88/005Cb.
- Hofmann, K. H., Polnisch, E., Kreisel, H., Mach, H., and Schubert, M. 1992. Degradation of dibenzofuran and dibenzodioxins by fungi. Proceedings of the 12th International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds, pp. 93-96. Finland. Cited in Wittich, R.-M. 1998. Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology 49: 489-499.
- Hong, H. B., Chang, Y. S., Choi, S. D., and Park, Y. H. 2000. Degradation of dibenzofuran by *Pseudomonas putida* PH-01. Water Research 34(8): 2404-2407.
- Iida, T., Mukouzaka, Y., Nakamura, K., Yamaguchi, I., and Kudo, T. 2002. Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading actinomycetes: Analysis of multiple

- extradiol dioxygenase genes in dibenzofuran-degrading *Rhodococcus* species. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 66(7): 1462-1472.
- Ishiguro, T., et al. 2000. Biodegradation of dibenzofuran and dioxins by *Pseudomonas aeruginosa* and *Xanthomonas maltophilia*. Environmental Technology 21: 1309-1316.
- Jasalavich, C. A., Ostrofsky, A., and Jellison, J. 2000. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. Applied and Environmental Microbiology 66(11): 4725-4734.
- Joshi, D. K., and Gold, M. H. 1994. Oxidation of dibenzo-*p*-dioxin by lignin peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemistry 33: 10969-10976.
- Kaufman, D. D., and Blake, J. 1973. Microbial degradation of several acetamide, acylanilide, carbamate, toluidine and urea pesticides. Soil Biology and Biochemistry 5: 297-308.
- Kimura, N., and Urushigawa, Y. 2001. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin and chlorinated dibenzo-*p*-dioxin by a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101. Journal of Bioscience and Bioengineering 92(2): 138-143.
- Klonowska, A., Gaudin, C., Ruzzi, M., Colao, M. C., and Tron, T. 2003. Ribosomal DNA sequence analysis shows that the basidiomycetes C30 belongs to the genus *Trametes*. Research in Microbiology 154: 25-28.
- Lepp, H. 2004. Wood rotting fungi [Online]. Available from: <http://www.anbg.gov.au/fungi/ecology-woodrot.html> [2004, April 29]
- Levin, L., Viale, A., and Forchiassin, A. 2003. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycetes *Trametes trogii*. International Biodeterioration & Biodegradation 52: 1-5.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., and Hüttermann, A. 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. Enzyme and Microbial Technology 22: 335-341.

- Makimura, K., et al. 2000. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. Journal of Medical Microbiology 49: 29-35.
- Monna, L., Omori, T., and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-*p*-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63. Applied and Environmental Microbiology 59(1): 285-289.
- Mori, T., and Kondo, R. 2002a. Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin by wood-rotting fungi, screened by dioxin degrading ability. FEMS Microbiology Letters 213: 127-131.
- Mori, T., and Kondo, R. 2002b. Oxidation of chlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran by white-rot fungus, *Phlebia lindtneri*. FEMS Microbiology Letters 216: 223-227.
- Mori, T., and Kondo, R. 2002c. Oxidation of dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and diphenyl ether by white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. Applied Microbiology and Biotechnology 60: 200-205.
- Nojiri, H., et al. 1999. Diverse oxygenations catalyzed by carbazole 1,9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10. Journal of Bacteriology 181: 3105-3113. Cited in Bressler, D. C., and Fedorak, P. M. 2000. Bacterial metabolism of fluorine, dibenzofuran, dibenzothiophene, and carbazole. Canadian Journal of Microbiology 46(5): 397-409.
- O'Neill, P. 1993. Environmental chemistry. 2nd ed. London: Chapman & Hall.
- Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology 57: 20-33.
- Rosenbrock, P., Martens, R., Buscot, F., Zadrazil, F., and Munch, J. C. 1997. Enhancing the mineralization of [U-¹⁴C]dibenzo-*p*-dioxin in three different soils by addition of organic substrate or inoculation with white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology 48: 665-670.
- Safe, S. 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and

- mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factor (TEF). CRC Crit. Rev. Toxicol. 21: 51-88. อ้างถึงใน ควบคุมมลพิษ, กรม. 2542. ไดออกซิน. กรุงเทพมหานคร: ศรีเมืองการพิมพ์.
- Sato, A., Watanabe, T., Watanabe, Y., Harazono, K., and Fukatsu, T. 2002. Screening for basidiomycetous fungi capable of degrading 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin. FEMS Microbiology Letters 213: 213-217.
- Sato, S.-I., et al. 1997. Cloning of genes involved in carbazole degradation of *Pseudomonas* sp. strain CA10: Nucleotide sequences of genes and characterization of meta-cleavage enzymes and hydrolase. Journal of Bacteriology 179: 4841-4849. Cited in Bressler, D. C., and Fedorak, P. M. 2000. Bacterial metabolism of fluorine, dibenzofuran, dibenzothiophene, and carbazole. Canadian Journal of Microbiology 46(5): 397-409.
- Shin, K.-S., Oh, I.-K., and Kim, C.-J. 1997. Production and purification of Remazol Brilliant Blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 63(5): 1744-1748.
- Soares, G. M. B., Amorim, M. T. P., and Costa-Ferreira, M. 2001. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. Journal of Biotechnology 89: 123-129.
- Strubel, V., Engesser, K.-H., Fischer, P., and Knackmuss, H.-J. 3-(2-hydroxyphenyl) catechol as substrate for proximal *meta* ring cleavage in dibenzofuran degradation by *Brevibacterium* sp. strain DPO 1361. Journal of Bacteriology 173(6): 1932-1937.
- Takada, S., Nakamura, M., Matsueda, T., Kondo, R., and Sakai, K. 1996. Degradation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. Applied and Environmental Microbiology 62(12): 4323-4328.
- Tien, M., and Kirk T. K. 1988. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods in Enzymology 161: 238-249.
- Todd, S. J., Cain, R. B., and Schmidt, S. 2002. Biotransformation of naphthalene and diaryl ethers by green microalgae. Biodegradation 13(4): 229-238.

- U.S. Environmental Protection Agency. 1990. Integrated Risk Information System [Online]. Available from: <http://www.epa.gov/iris/subst/0429.htm> [2002, April 4]
- U.S. Environmental Protection Agency. 1994. Estimating exposure to dioxin-like compounds Volume II: properties, sources, occurrence and background exposures. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. EPA/600/6-88/005Cb.
- Valli, K., Wariishi, H., and Gold, M. H. 1992. Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Bacteriology 174 (7): 2131-2137.
- Vyas, B. R. M., and Molitoris, H. P. 1995. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R. Applied and Environmental Microbiology 61(11): 3919-3927.
- Wilkes, H., Wittich, R.-M., Timmis, K. N., Fortnagel, P., and Francke, W. 1996. Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1. Applied and Environmental Microbiology 62(2): 367-371.
- Wittich, R.-M., Wilkes, H., Shinnwell, V., Francke, W., and Fortnagel, P. 1992. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1. Applied and Environmental Microbiology 58(3): 1005-1010.
- World Health Organization. 1989. Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and dibenzofurans. Geneva: World Health Organization.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น ประกอบด้วยอาหาร Czapek Dox agar และ malt extract agar โดยใช้สี Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (Sato และคณะ, 2002) เตรียมโดยเทอาหารชั้นล่างคืออาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek Dox agar ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ที่ไว้จนอาหารแข็ง แล้วเททับหน้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง malt extract agar ที่เติมสี RBBR โดยอาหารทั้ง 2 ชั้นมีส่วนประกอบดังนี้

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek Dox agar

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	2	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
ซูโครส	10	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง malt extract agar

ผงมอลต์สกัด (malt extract)	10	กรัม
วุ้นผง	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

เมื่ออุณหภูมิอาหารประมาณ 50 องศาเซลเซียสเติมสีย้อม Remazol Brilliant Blue R (RBBR) ลงไป 0.2 กรัม/ลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco Laboratories, USA.)

ส่วนประกอบของอาหารใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

Potato extract	4.0	กรัม
กลูโคส(glucose)	20.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 39 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที (ค่า pH เท่ากับ 5.6 ± 0.2)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium(MM) (Kaufman และ Blake, 1973)

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.8	กรัม
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
แคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$)	0.1	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	5	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$)	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-Nitrogen Basal III Medium (LN) (Tien และ Kirk, 1988; Mori และ Kondo, 2002b) ประกอบด้วย

4.1 Basal III medium

โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10.23	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	1.32	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 700 มิลลิลิตร

4.2 สารละลาย Trace element

แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	6.14	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.56	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.18	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.16	กรัม
อลูมิเนียมโปแตสเซียมซัลเฟต ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	0.01	กรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
ไนโตรโลไตรอะซิเตต ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_6$)	1.5	กรัม

ละลายไนโตรโลไตรอะซิเตตในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.5 ด้วย 1 นอร์มัลโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) จากนั้นเติมสารอื่น ๆ ลงไปแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

4.3 สารละลายกลูโคส: ชั่งกลูโคส 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 10 นาที

4.4 สารละลายแอมโมเนียมทาร์เทต ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) 0.1 โมลาร์: ละลายแอมโมเนียมทาร์เทต 0.92 กรัมในน้ำ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

4.5 สารละลายโซเดียมอะซิเตต ($\text{NaCH}_3\text{CO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 1 โมลาร์: ละลายโซเดียมอะซิเตต 6.8 กรัมในน้ำ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

วิธีการเตรียม Low-nitrogen Basal III medium

เติมสารละลาย Trace element 100 มิลลิลิตร ลงใน Basal III medium 700 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร เติมสาร

ละลายกลูโคส 100 มิลลิกรัม (เพื่อให้ได้ 1% กลูโคส) เติมสารละลายแอมโมเนียมทาร์เทต 12 มิลลิกรัม (เพื่อให้ได้ 1.2 มิลลิโมลาร์แอมโมเนียมทาร์เทต) และเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตต 20 มิลลิกรัม (เพื่อให้ได้ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซิเตต) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ 1 ลิตร

5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast Extract Sucrose Agar (YEA)

ผงยีสต์สกัด (yeast extract)	20	กรัม
ซูโครส (sucrose)	15	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Broth (Difco Laboratories, USA.) 30 กรัม และวุ้นผง 15 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

7. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Corn meal Malt Extract Agar (CMA)

คอร์นมีล อาการ์	17	กรัม
ผงมอลต์สกัด	20	กรัม
ผงยีสต์สกัด	2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

8. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt Extract Agar (MEA)

ผงมอลต์สกัด	20	กรัม
เปปโติน(peptone)	1	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

น้ำกลั่น

1 ลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. 10% กลีเซอรอล

ปิเปตกลีเซอรอล 87% ปริมาตร 11.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้ง

2. สารละลายแบรดฟอร์ด

comassie brilliant blue G-250	100	มิลลิกรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	50	มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชา

3. สารละลายไดเบนโซฟูแรนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

ชั่งไดเบนโซฟูแรน 0.1 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนกระทั่งไดเบนโซฟูแรนละลายหมด นำมากรองผ่านตัวกรองปราศจากเชื้อ PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร เก็บไว้ในขวด vial ปราศจากเชื้อแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

4. สารละลาย 75% เมทานอลในน้ำ

นำน้ำ DDW (Deionized Distilled Water) มากรองด้วยมิลลิพอร์ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วดูดอากาศ (degas) จนกว่าจะไม่พบฟองอากาศ โดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ร่วมกับเครื่องสูบลม (pump) และนำเมทานอล (HPLC grade) มาดูดอากาศจนกว่าจะไม่พบฟองอากาศ ตั้งอัตราส่วนเมทานอลและน้ำเป็น 75:25 จาก pump ของเครื่อง HPLC

5. น้ำยา lactophenol aniline blue

lactic acid	20	มิลลิลิตร
phenol crystals	20	กรัม
กลีเซอรอล	40	มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
----------	----	-----------

aniline blue (cotton blue)	0.05	กรัม
----------------------------	------	------

ละลาย phenol ใน lactic acid กลีเซอรอล และน้ำกลั่นโดยให้ความร้อนเล็กน้อย จากนั้นจึงเติม aniline blue ลงไป

6. สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ pH 8.0

ละลายทริสมาเบส 121.1 กรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 42 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

7. สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0

ละลาย EDTA 186.1 กรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

8. lysis buffer (Tris-HCl 200 mM, SDS 0.5% w/v, EDTA 25 mM, NaCl 250mM)

สารละลายข้อ 6	20	มิลลิลิตร
---------------	----	-----------

SDS	0.5	กรัม
-----	-----	------

สารละลายข้อ 7	5	มิลลิลิตร
---------------	---	-----------

โซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์	25	มิลลิลิตร
-------------------------	----	-----------

ละลายส่วนผสมทั้งหมดแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อให้เป็น 100 มิลลิลิตร

9. สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K)

ละลายโปรตีนเนสเค 20 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

10. สารละลาย CTAB / NaCl solution

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วจึงปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

11. สารละลายฟีนอล

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวในน้ำอุ่นที่ 68 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมผง Hydroxyquinoline ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 % แล้วเติม Tris-HCl 0.5 โมลาร์ pH 8.0 ใช้ magnetic stirrer ค่อย ๆ คนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง เติม Tris-HCl 0.1 โมลาร์ pH 8.0 ลงไปอีกครั้ง ค่อย ๆ คนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งสารละลายมี pH มากกว่า 7.8 สุดท้ายเติม Tris-HCl 0.1 โมลาร์ pH 8.0 ที่ผสม β -mercaptoethanol ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายที่ได้ เก็บไว้ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานประมาณ 1 เดือน

12. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลที่อิมิตัวด้วย Tris-HCl (ข้อ 11) เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 25:24:1 (v/v/v) เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

13. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 24:1 (v/v) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

14. สารละลาย RNase A

ละลาย RNase A 10 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

15. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร
สารละลายข้อ 7	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

16. Loading dye

บรอมฟินอลบลู	0.025	เปอร์เซ็นต์
ซูโครส	40	เปอร์เซ็นต์

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

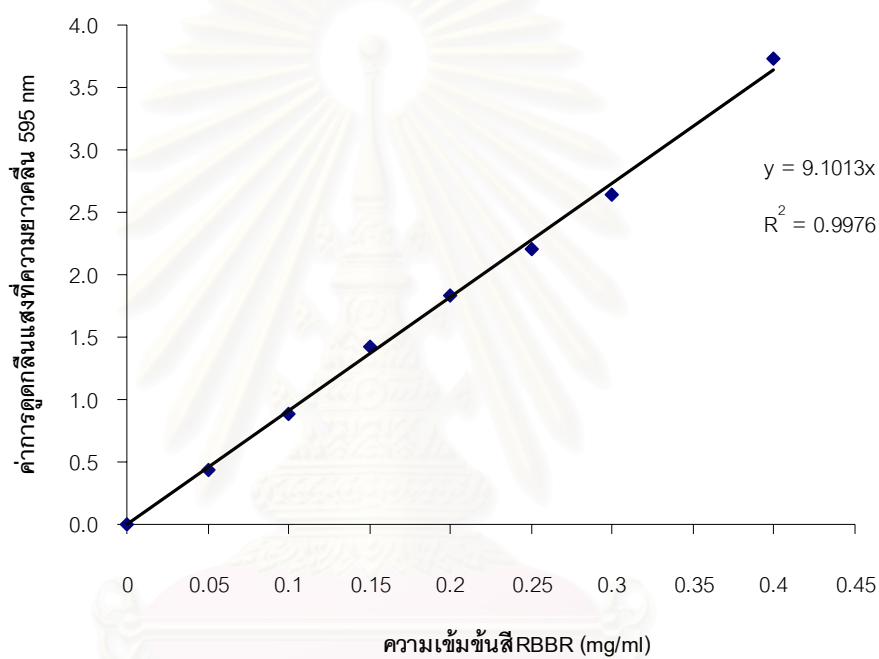
17. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

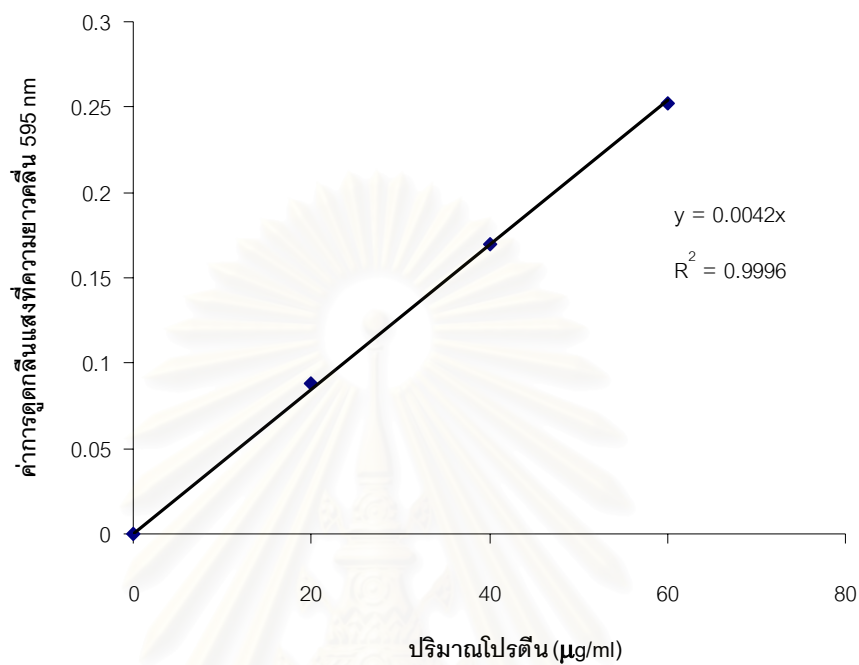
1. กราฟมาตรฐานของสี Remazol Brilliant Blue R (RBBR)



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสี RBBR กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

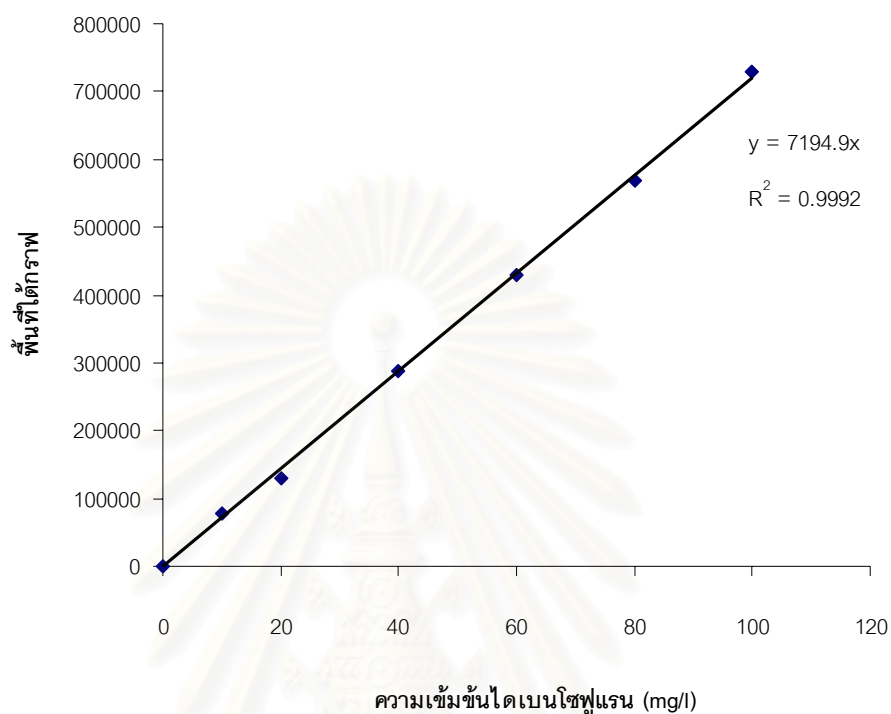
2. กราฟมาตรฐานของโบวายน ซีรัม อัลบูมิน



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. กราฟมาตรฐานของไดเบนซิฟูแรน



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นไดเบนซิฟูแรนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสิริกุล วัฒนานนทิกิจ เกิดวันที่ 27 ธันวาคม พ.ศ. 2521 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2542 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2543

ผลงานทางวิชาการที่เข้าร่วมประชุม

Prachomrat, P., Watthananonkit, S., Limprasert, K., and Kositanont, C. 2002. Screening for potentially dioxin microorganisms from Thai soil samples. Poster presented at 7th Biological Science Graduate Congress. 9-11 December, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. Abstracts book. p.BIOT 5-P40.

Watthananonkit, S., Prachomrat, P., and Kositanont, C. 2004. High efficient dibenzofuran degrading fungi isolated from Thai soils. Poster presented at The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology on “Sustainable Development of SMEs Through Biotechnology” and JSPS-NRCT Symposium on “The Forefront of Bioinformatics Application”. 3-6 February, Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand. Abstracts book. p.1-5.

สิริกุล วัฒนานนทิกิจ, ปัทมาพร ประชุมรัตน์ และ ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์. 2547. ราย่อยไต่เบนไซฟูแรนประสิทธิภาพสูงที่แยกจากดินในประเทศไทย. เสนอผลงานวิชาการแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 12. 18-19 มีนาคม, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บทคัดย่อหน้า 109.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย