บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการแยกราเอนโดไฟต์จากใบและรากพืชจากพื้นที่เกษตรกรรมที่มีประวัติการใช้สารแอทราซิ ในจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และพื้นที่ป่าธรรมชาติอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก โดยวิธี Surface sterilization บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สามารถแยกราได้ทั้งสิ้นจำนวน 20 ไอโซเลต (R1-R5 C1-C3 SU1-SU3 P1-P4 และ D1-D5) และแยกราจากดินในพื้นที่เกษตรกรรมที่มีประวัติการใช้สารแอทราซินในจังหวัดนครราชสีมาสามารถแยกราได้ทั้งสิ้น 3 ไอโซเลต (S1-S3)

การศึกษาความสามารถการย่อยสลายแอทราซินของราเอนโดไฟต์และราดินแยกได้รวมทั้งราไวต์รอต (W1-W5) ที่ได้รับมา รวมทั้งสิ้น 28 ไอโซเลต โดยเลี้ยงราทั้ง 28 ไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่ใส่สารแอทราซินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินขั้นปฐมภูมิ (Primary degradation test) โดยใช้เทคนิค Spectrophotometry พบว่า ราทุกไอโซเลตที่ใช้ทดสอบมีความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินได้ โดยกลุ่มราไวต์รอตมีอัตราการย่อยสลายสารแอทราซินได้ดี รองลงมาเป็นกลุ่มราดิน และราเอนโดไฟต์มีอัตราการย่อยสลายต่ำที่สุด ราไวต์รอตไอโซเลต W5 มีอัตราการย่อยสลายสูงสุดเมื่อเทียบกับราไอโซเลตอื่นโดยมีอัตราการย่อยสลายเท่ากับ 0.75 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

เมื่อนำราไวต์รอตไอโซเลต W5 มาศึกษาความสามารถในการย่อยสลายขั้นทุติยภูมิ (Secondary degradation test) โดยใช้เทคนิค Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารแอทราซินที่ลดลงทุกๆ 6 วัน เป็นเวลา 42 วัน พบว่า ความเข้มข้นของแอทราซินค่อยๆลดลงตั้งแต่วันที่ 6 ของการทดลอง จนถึงวันที่ 36 หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ พบว่า ความเข้มข้นของแอทราซินในการทดลองวันที่ 42 เท่ากับ 2.66 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นได้ทำการศึกษาต่อในเรื่องของสภาวะที่เหมาะสมกับการย่อยสลายแอทราซิน โดยมีเป้าหมายเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ที่ทำให้ราไวต์รอตไอโซเลต W5 มีอัตราการย่อยสลายแอทราซินได้ดีที่สุด โดยในการศึกษาได้แบ่งออกเป็น การศึกษาแหล่งพลังงานคาร์บอน ซึ่งแหล่งพลังงานคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองคือ กลูโคสที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium จากผลการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนปริมาณของกลูโคสที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อ อัตราการย่อยสลายแอทราซินของราไวต์รอตไอโซเลต W5 โดยเมื่อมีการใช้กลูโคส 20 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Synthetic Medium มีอัตราการย่อยสลายแอทราซินมากกว่า ที่ใส่กลูโคส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium มีอัตราการย่อยสลายแอทราซิน เท่ากับ 0.11 มิลลิกรัม แอทราซินต่อกรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน หรือคิดเป็นประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 98.92 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองวันที่ 35 ดังนั้นจึงเลือกใช้กลูโคส 20 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายแอทราซิน ของราไวต์รอต ไอโซเลต W5 โดยใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 4 5 และ 6 จากผลการศึกษาพบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 มีอัตราการย่อยสลายแอทราซินได้ดีที่สุด คือ 0.11 มิลลิกรัมแอทราซินต่อกรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน (98.94%)ในการทดลองวันที่ 35

ในการศึกษาอัตราการย่อยสลายแอทราซินที่ความเข้มข้น 10 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ใช้สภาวะที่เลือกได้จากการศึกษาก่อนหน้า โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีปริมาณกลูโคสเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ในการศึกษาอัตราการย่อยสลายที่ความเข้มข้นแอทราซิน เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ราไวต์รอตไอโซเลต W5 มีอัตราการย่อยสลายแอทราซิน ได้เท่ากับ 0.11 มิลลิกรัมแอทราซินต่อกรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน (98.94%) ในการทดลองวันที่ 35 ซึ่งมีอัตราการย่อยสลายแอทราซินได้สูงกว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการย่อยสลายแอทราซิน ได้เท่ากับ 0.13 มิลลิกรัมแอทราซินต่อกรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน (79.54%) และ 0.01 มิลลิกรัมแอทราซินต่อกรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน (75.39%) ตามลำดับ

การศึกษาสารเมทาบอไลท์ของแอทราซิน โดยการเลือกสภาวะที่ราไวต์รอตไอโซเลต W5 มีอัตราการย่อยสลายแอทราซินได้ดีที่สุด มาทำการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LCMS) โดย พบว่า ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media วันที่ 35 ของชุดการทดลองที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต W5 มีสารเมทาบอไลท์ของแอทราซินเกิดขึ้น 1 ชนิด คือ 2-hydrox-4-(isopropylamino)-6-(ethylamino)-s-triazine (OIET) ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 198 จากการศึกษาขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าราไวต์รอตไอโซเลต W5 มีความสามารถในการเปลี่ยนแอทราซินให้ไปอยู่ในรูปของสารเมทาบอไลท์ขั้นที่ 1 (Primary intermediates) ได้ (Chan and Chu, 2005) (ภาคผนวก ง) ในวันที่ 35 ของการทดลอง แต่ในกลไกการเปลี่ยนรูปของแอทราซิน ยังมีสารที่เป็นเมทาบอไลท์อีกหลายชนิด ซึ่งยังไม่สามารถพบได้ในงานวิจัยนี้