การย่อยสลายทางชีวภาพของแอทราซีนโดยรา

นางสาว ศศิฌามนตร์ แสงสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIODEGRADIATION OF ATRAZINE BY FUNGI

Miss Sasichamon Sangsawat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

For the Degree of Master of Science Program in Environment Science

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Acadamic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492113

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การย่อยสลายทางชีวภาพของแอทราซีนโดยรา
โดย	นางสาว ศศิฌามนตร์ แสงสวัสดิ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังใน

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. กัลยา ติงศภัทิย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังใน)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

..... กรรมการ
(นางสาว รัชนี สุวภาพ)

ศศิฌามนตร์ แสงสวัสดิ์ : การย่อยสลายทางชีวภาพของแอทราซินโดยรา (BIODEGRADIATION OF ATRAZINE BY FUNGI) อ. ที่ปรึกษา: อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังใน , 74 หน้า.

แอทราซินเป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มของ s-triazine ที่มีการนำมาใช้ในการเกษตรกรรมกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติที่มีความคงทนสูงทำ ให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม เมื่อมีการชะล้างตามธรรมชาติ อาจเกิดการแพร่กระจายและปนเปื้อน ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆในระบบนิเวศ รวมถึงมนุษย์ด้วย งานวิจัยนี้ ได้ศึกษาความสามารถของรากลุ่มต่างๆต่อการย่อยสลายแอทราซินให้อยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษน้อยลง โดยราที่ศึกษา ได้แก่ ราเอนโดไฟต์ ราดิน ราและเห็ดที่ขึ้นบนเศษซากพืช รวมทั้งสิ้น 28 ไอโซเลต ซึ่งได้แบ่งผลการทดลองในขั้นปฐมภูมิ โดยการวิเคราะห์ Spectrophotometry พบว่า ภายหลังจากการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media เป็นเวลา 20 วัน ราไวต์รอตไอโซเลต W5 ซึ่งเป็นราไวต์รอตชนิด *Trametes versicolor* ไอโซเลต W5 มีความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินได้ดีที่สุด จึงได้เลือกเพื่อมาศึกษาในขั้นทุติยภูมิต่อ เป็นเวลา 42 วัน โดยการวิเคราะห์ Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งพบว่า รา W5 สามารถย่อยสลายแอทราซินในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ในการทดลองวันที่ 42 พบความเข้มข้นของแอทราซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพียง 2.66 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของรา ส่วนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแอทราซิน พบว่า ราไอโซเลต W5 มีอัตราการย่อยสลายแอทราซินได้สูงที่สุดในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของแอทราซิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอทราซินได้ถึง 98.94 เปอร์เซ็นต์ และ ในขั้นตอนการศึกษาสารเมทาบอไลท์ โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS) ได้พบสารที่เป็นเมทาบอไลท์ 1 ชนิดคือ 2-hydrox-4-(isopropylamino)-6-(ethylamino)-s-triazine (OIET) ในการทดลองของวันที่ 35

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....ศศิฌามนตร์ แสงสวัสดิ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....จิตรตรา เพียภูเขียว
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4689178520 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEY WORD: BIODEGRADATION / ATRAZINE / FUNGI

SASICHAMON SANGSAWAT : BIODEGRADATION OF ATRAZINE BY FUNGI. THESIS ADVISOR : JITTRA PIAPUKIEW, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. ALISA VANGNAI, Ph.D., 74 pp.

Atrazine [2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-*s*-triazine] is one of the most widely used herbicides in the world for the control of annual grasses and broadleaf weeds in corn and sorghum. It is also used as a nonselective herbicide for vegetation control in non crop land. This research investigates the fungi capable of the biodegradation of atrazine into the less toxic metabolite. Twenty-eight isolates of the endophytic fungi, soil fungi and white-rot fungi were screened for their degradation ability in synthetic medium using spectrophotometry analysis. The fungus isolate W5, *Trametes versicolor* had the highest degradation rate of atrazine (0.75 milligrams per grams dry weight) after 20 days. The secondary degradation test was carried out with a Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis as a quantitative measurement of atrazine degradation for 42 days of incubation. The results showed that atrazine concentration decreasd gradually and atrazine concentration was 2.66 milligrams per liter on day 42. The result of degradation test related to the growth of the fungus. The optimum growing and degrading condition for the fungus isolate W5 were achieved using atrazine concentration 10 milligrams per liter of and glucose concentration 20 milligrams per liter of at pH 5 at 98.94 percentage of degradation efficiency. The metabolite of degraded atrazine detected by Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS) on day 35 was 2-hydrox-4-(isopropylamino)-6-(ethylamino)-s-triazine (OIET)

Field of study Environmental Science

Academic year 2006

Student's signature Sasichamon Sangsawat

Advisor's signature Jittra Piapukiew

Co-advisor's signature Alisa Vangnai

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือ และความกรุณาอย่างสูงจากบุคคลที่เกี่ยวข้องหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อลิสา วังใน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ความเมตตา และกำลังใจ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือ เพื่อให้การทำวิทยานิพนธ์ดำเนินไปอย่างเรียบร้อย ราบรื่น และสำเร็จ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ และคุณรัชนี สุวภาพ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณ จุฑามาศ กิจจานุลักษณ์ คุณสกุลรัตน์ พุกกะวรรณะ คุณ ปริญารัตนา และเพื่อนๆหลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ ร่วมเรียนรู้ และเป็นกำลังใจเสมอมา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม และเจ้าหน้าที่สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ตลอดจนขอขอบพระคุณทุกๆท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ แต่ไม่สามารถเอ่ยนามมา ณ ที่นี้ได้ สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลืออย่างมากในด้านต่างๆ และเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญรูป ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 สมมติฐาน 2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 สารกำจัดวัชพืช 4
2.2 แอทราซีน 5
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 19
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 19
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 20
3.3 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง 20
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย 21
บทที่ 4 ผลการวิจัย 30
4.1 การแยกราจากตัวอย่างพืช 30
4.2 การแยกราจากดิน 33
4.3 ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารแอทราซีนโดยราที่แยกได้ 34
4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแอทราซีนของราที่ใช้ทดสอบ 38
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 56

หน้า

บทที่ 6 อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 58
รายการอ้างอิง 62
ภาคผนวก 67
ภาคผนวก ก อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ 68
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน 69
ภาคผนวก ค ค่ามาตรฐานปริมาณสารกำจัดวัชพืชที่ยอมรับให้มีได้ในน้ำใต้ดิน 70
ค่ามาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่และเกษตรกรรม 71
ค่ามาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอื่นนอกเหนือจาก
การอยู่อาศัยและเกษตร 72
ภาคผนวก ง กลไกการเกิดเมทาบอไลท์ของแอทราซีน 73
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 74

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ข้อดีและข้อเสียของการใช้สารกำจัดวัชพืช 5
ตารางที่ 4.1 ผลของการเก็บตัวอย่างพืช 32
ตารางที่ 4.2 ผลการเก็บตัวอย่างดิน 33
ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอทราซีนของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ภายหลังการบ่มเชื้อ 35 วัน 49
ตารางที่ 4.4 Retention Time ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ที่สภาวะต่างๆ 51
ตารางภาคผนวก
ตารางที่1-ค ค่ามาตรฐานปริมาณสารกำจัดวัชพืชที่ยอมรับให้มีได้ในน้ำใต้ดิน 70
ตารางที่2-ค ค่ามาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่และเกษตรกรรม 71
ตารางที่3-ค ค่ามาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอื่นนอกเหนือจากการอยู่อาศัยและเกษตร 72

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของสารแอทราซิน 6
รูปที่ 2.2 แสดงการเปลี่ยนรูปของสารแอทราซิน. 9
รูปที่ 3.1 แสดงรูปของรา รหัสต่างๆ ที่ได้จากเศษซากพืชจำนวน 5 isolate 22
รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชต่างๆบนอาหาร PDA 32
รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของราดินที่แยกได้จากพืชต่างๆบนอาหาร PDA 33
รูปที่ 4.3 อัตราการย่อยสลายสารแอทราซินต่อน้ำหนักแห้งของราเอนโดไฟต์ไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้ ณ วันที่ 20 35
รูปที่ 4.4 อัตราการย่อยสลายสารแอทราซินต่อน้ำหนักแห้งของราดินไอโซเลตต่าง ที่แยกได้ ณ วันที่ 20 35
รูปที่ 4.5 อัตราการย่อยสลายสารแอทราซินต่อน้ำหนักแห้งของราไวต์รอตไอโซเลตต่างๆ ณ วันที่ 20 36
รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ยของแอทราซินกับระยะเวลาการบ่มเชื้อ 37
รูปที่ 4.7 น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในระหว่างการบ่มเชื้อ เป็นเวลา 42 วัน 38
รูปที่ 4.8 ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 42 วัน 38
รูปที่ 4.9 อัตราการย่อยสลายสารแอทราซินต่อน้ำหนักแห้งของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่มี 1% และ 2% กลูโคส 41
รูปที่ 4.10 (ก) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่ 1%และ 2%กลูโคส ที่มีแอทราซิน (ข) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่ 1%และ 2%กลูโคส ที่ไม่มีแอทราซิน 42
รูปที่ 4.11 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่ 1%และ 2%กลูโคส ชุดที่ใส่และไม่ใส่เชื้อทดสอบ 43
รูปที่ 4.12 อัตราการย่อยสลายสารแอทราซินต่อน้ำหนักแห้งของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ 2% กลูโคส ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 5 และ 6 ในระหว่างที่ทดลองเป็นเวลา 35 วัน 43

หน้า

รูปที่ 4.13 (ก) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 4 5 และ 6 ที่มีแอทราซิน (ข) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 4 5 และ 6 ที่ไม่มีแอทราซิน 44

รูปที่ 4.14 (ก) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 4 5 และ 6 ที่มีราที่ทดสอบ (ข) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 4 5 และ 6ที่ไม่มีราที่ทดสอบ 45

รูปที่ 4.15 อัตราการย่อยสลายสารแอทราซินต่อน้ำหนักแห้งของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ 2% กลูโคส ที่มี pH 5 ที่ความเข้มข้นแอทราซินเท่ากับ 10 100 และ200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระหว่างที่ทดลองเป็นเวลา 35 วัน 46

รูปที่ 4.16 (ก) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 5 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 100 และ 200มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีแอทราซิน (ข) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 5 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 100 และ 200มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ไม่มีแอทราซิน 48

รูปที่ 4.17 (ก) ค่าความเป็นกรด ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า (ข) ค่าความเป็นกรด ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 5 ที่ความเข้มข้นแอทราซินเท่ากับ 10 100 และ 200มิลลิกรัมต่อลิตรที่ไม่มีราที่ใช้ทดสอบ 52

รูปที่ 4.18 แสดงโครมาโตรแกรมของอาการเลี้ยงเชื้อ Synthetic media 52

รูปที่ 4.19 แสดงโครมาโตรแกรมของอาการเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลองชุดที่ใส่แอทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอตไอโซเลต W5 วันที่ 0 52

รูปที่ 4.20 แสดงโครมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลองชุดที่ใส่แอทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอตไอโซเลต W5 วันที่ 35 ของการทดลอง 52

รูปที่ 4.21 แสดงโครมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลองชุดที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต W5 วันที่ 0 53

รูปที่ 4.22 แสดงโคมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของชุดการทดลอง

ที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต W5 วันที่ 35มีสารเมทาบอไลท์ของ 53

รูปที่ 4.23 (ก) แสดงโครมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media
วันที่ 0 ของชุดการทดลองที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต W5
(ข) แสดงโครมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media
วันที่ 35 ของชุดการทดลองที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต W5
(ค) แสดงโครมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media
วันที่ 35 ของชุดการทดลองที่มีแอทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอตไอโซเลต W5
จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectroscopy
(LC-MS) 54

รูปที่ 4.24 แสงดงโครมาโตรแกรมของสารเมทาบอไลท์จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค
Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS) 55