

การย่อยสลายทางชีวภาพของแอทราซินโดยรา

นางสาว ศศิมามนตรี แสงสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIODEGRADATION 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
Academic Year 2006
Copyright of Chulalongkorn University

492113

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การย่อยสลายทางชีวภาพของแอทราซินโดยรา

โดย

นางสาว ศศิฉมาพันธ์ แสงสวัสดิ์

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

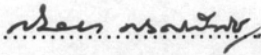
อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว

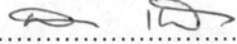
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

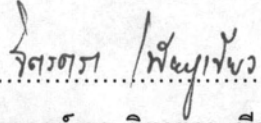
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อลิสสา วงไฉน

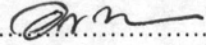
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

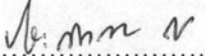
.....  คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. กัลยา ติงศภัทิย์)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

.....  อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อลิสสา วงไฉน)

.....  กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีนันทน์)

.....  กรรมการ
(นางสาว รัชนี สุวภาพ)

ศศิณามานตร์ แสงสวัสดิ์ : การย่อยสลายทางชีวภาพของแอทราซีนโดยรา (BIODEGRADATION OF ATRAZINE BY FUNGI) อ. ที่ปรึกษา: อาจารย์ ดร. จิตรรดา เพ็ญเขียว, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังโน , 74 หน้า.

แอทราซีนเป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มของ s-triazine ที่มีการนำมาใช้ในการเกษตรกรรมกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติที่มีความคงทนสูงทำให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม เมื่อมีการชะล้างตามธรรมชาติ อาจเกิดการแพร่กระจายและปนเปื้อน ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆในระบบนิเวศ รวมถึงมนุษย์ด้วย งานวิจัยนี้ ได้ศึกษาความสามารถของรากลุ่มต่างๆต่อการย่อยสลายแอทราซีนให้อยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษน้อยลง โดยราที่ศึกษา ได้แก่ ราเอนโดไฟต์ ราดิน ราและเห็ดที่ขึ้นบนเศษซากพืช รวมทั้งสิ้น 28 ไอโซเลต ซึ่งได้แบ่งผลการทดลองในขั้นปฐมภูมิ โดยการวิเคราะห์ Spectrophotometry พบว่า ภายหลังจากการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media เป็นเวลา 20 วัน ราไวต์รอดไอโซเลต W5 ซึ่งเป็นราไวต์รอดชนิด *Trametes versicolor* ไอโซเลต W5 มีความสามารถในการย่อยสลายแอทราซีนได้ดีที่สุด จึงได้เลือกเพื่อมาศึกษาในขั้นทุติยภูมิต่อ เป็นเวลา 42 วัน โดยการวิเคราะห์ Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งพบว่า รา W5 สามารถย่อยสลายแอทราซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ในการทดลองวันที่ 42 พบความเข้มข้นของแอทราซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพียง 2.66 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของรา ส่วนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแอทราซีน พบว่า ราไอโซเลต W5 มีอัตราการย่อยสลายแอทราซีนได้สูงที่สุดในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของแอทราซีน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอทราซีนได้ถึง 98.94 เปอร์เซ็นต์ และ ในขั้นตอนการศึกษาสารเมทาบอลไลท์ โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS) ได้พบสารที่เป็นเมทาบอลไลท์ 1 ชนิดคือ 2-hydrox-4-(isopropylamino)-6-(ethylamino)-s-triazine (OIET) ในการทดลองของวันที่ 35

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต..... ศศิณามานตร์ แสงสวัสดิ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... จิตรรดา เพ็ญเขียว
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... อลิสา วังโน

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 decreased 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 (OJET)

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 เพ็ญเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อลิสรา วังโน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ความเมตตา และกำลังใจ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือ เพื่อให้การทำวิทยานิพนธ์ดำเนินไปอย่างเรียบร้อยราบรื่น และสำเร็จ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตต์สินี สีहनนท์ และคุณรัชณี สุวภาพ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณ จุฑามาศ กิจจานุลักษณะ คุณสกุลรัตน์ พุกกะวรรณระ คุณ ปริญา รัตนา 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 แอทธราซิน.....	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 การแยกจากตัวอย่างพืช.....	30
4.2 การแยกจากดิน.....	33
4.3 ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารแอทธราซินโดยราที่แยกได้.....	34
4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแอทธราซินของราที่ใช้ทดสอบ.....	38
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	56

	๗
	หน้า
บทที่ 6 อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	58
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	67
ภาคผนวก ก อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ.....	68
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน.....	69
ภาคผนวก ค ค่ามาตรฐานปริมาณสารกำจัดวัชพืชที่ยอมรับให้มีได้ในน้ำใต้ดิน.....	70
ค่ามาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่อาศัยและเกษตรกรรม.....	71
ค่ามาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอื่นนอกเหนือจาก	
การอยู่อาศัยและเกษตร.....	72
ภาคผนวก ง กลไกการเกิดเมทาบอลไลท์ของแอมราซิน.....	73
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	74

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ข้อดีและข้อเสียของการใช้สารกำจัดวัชพืช.....	5
ตารางที่ 4.1 ผลของการเก็บตัวอย่างพืช.....	32
ตารางที่ 4.2 ผลการเก็บตัวอย่างดิน.....	33
ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมไพราซินของราไวต์รอดไอโซเลต W5 ภายหลังการบ่มเชื้อ 35 วัน	49
ตารางที่ 4.4 Retention Time ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ที่สภาวะต่างๆ	51
ตารางภาคผนวก	
ตารางที่ 1-ค ค่ามาตรฐานปริมาณสารกำจัดวัชพืชที่ยอมรับให้มีได้ในน้ำได้ดิน.....	70
ตารางที่ 2-ค ค่ามาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่และเกษตรกรรม.....	71
ตารางที่ 3-ค ค่ามาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอื่นนอกเหนือจากการอยู่อาศัย และเกษตร.....	72

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 2.1	สูตรโครงสร้างของสารแอสทราซิน.....	6
รูปที่ 2.2	แสดงการเปลี่ยนรูปของสารแอสทราซิน.....	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	อัตราการย่อยสลายสารแอสทราซินต่อน้ำหนักแห้งของราเอนโดไฟต์ไฮโซเลตต่างๆ ที่แยกได้ ณ วันที่ 20.....	35
รูปที่ 4.4	อัตราการย่อยสลายสารแอสทราซินต่อน้ำหนักแห้งของราดินไฮโซเลตต่าง ที่แยกได้ ณ วันที่ 20.....	35
รูปที่ 4.5	อัตราการย่อยสลายสารแอสทราซินต่อน้ำหนักแห้งของราไวต์รอดไฮโซเลตต่างๆ ณ วันที่ 20.....	36
รูปที่ 4.6	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ยของแอสทราซินกับระยะเวลาการบ่มเชื้อ.....	37
รูปที่ 4.7	น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอดไฮโซเลต W5 ในระหว่างการบ่มเชื้อ เป็นเวลา 42 วัน.....	38
รูปที่ 4.8	ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 42 วัน.....	38
รูปที่ 4.9	อัตราการย่อยสลายสารแอสทราซินต่อน้ำหนักแห้งของราไวต์รอดไฮโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่มี 1% และ 2% กลูโคส.....	41
รูปที่ 4.10	(ก) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอดไฮโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่ 1% และ 2% กลูโคส ที่มีแอสทราซิน (ข) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอดไฮโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่ 1% และ 2% กลูโคส ที่ไม่มีแอสทราซิน.....	42
รูปที่ 4.11	ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่ 1% และ 2% กลูโคส ชุดที่ใส่และไม่ใส่เชื้อทดสอบ.....	43
รูปที่ 4.12	อัตราการย่อยสลายสารแอสทราซินต่อน้ำหนักแห้งของราไวต์รอดไฮโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ 2% กลูโคส ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 5 และ 6 ในระหว่างที่ทดลองเป็นเวลา 35 วัน.....	43

รูปที่ 4.13	(ก) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอดไฮโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 4 5 และ 6 ที่มีแอมทราซิน (ข) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอดไฮโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 4 5 และ 6 ที่ไม่มีแอมทราซิน.....	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 6 ที่ไม่มีราที่ทดสอบ.....	45
รูปที่ 4.15	อัตราการย่อยสลายสารแอมทราซินต่อน้ำหนักแห้งของราไวต์รอดไฮโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ 2% กลูโคส ที่มี pH 5 ที่ความเข้มข้นแอมทราซินเท่ากับ 10 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระหว่างที่ทดลองเป็นเวลา 35 วัน.....	46
รูปที่ 4.16	(ก) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอดไฮโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 5 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีแอมทราซิน (ข) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอดไฮโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 5 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ไม่มีแอมทราซิน.....	48
รูปที่ 4.17	(ก) ค่าความเป็นกรด ต่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า (ข) ค่าความเป็นกรด ต่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 5 ที่ความเข้มข้นแอมทราซินเท่ากับ 10 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ไม่มีราที่ใช้ทดสอบ.....	52
รูปที่ 4.18	แสดงโครมาโตแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media.....	52
รูปที่ 4.19	แสดงโครมาโตแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลอง ชุดที่ใส่แอมทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอดไฮโซเลต W5 วันที่ 0.....	52
รูปที่ 4.20	แสดงโครมาโตแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลอง ชุดที่ใส่แอมทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอดไฮโซเลต W5 วันที่ 35 ของการทดลอง.....	52
รูปที่ 4.21	แสดงโครมาโตแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลองชุด ที่มีแอมทราซินและราไวต์รอดไฮโซเลต W5 วันที่ 0.....	53
รูปที่ 4.22	แสดงโครมาโตแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของชุดการทดลอง	

	ที่มีแอมพราซินและราไวด์รอดไอโซเลต W5 วันที่ 35 มีสารเมทาบอลไลท์ของ.....	53
รูปที่ 4.23	(ก) แสดงโครมาโตแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media วันที่ 0 ของชุดการทดลองที่มีแอมพราซินและราไวด์รอดไอโซเลต W5 (ข) แสดงโครมาโตแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media วันที่ 35 ของชุดการทดลองที่มีแอมพราซินและราไวด์รอดไอโซเลต W5 (ค) แสดงโครมาโตแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media วันที่ 35 ของชุดการทดลองที่มีแอมพราซินแต่ไม่ใส่ราไวด์รอดไอโซเลต W5 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS)	54
รูปที่ 4.24	แสดงโครมาโตแกรมของสารเมทาบอลไลท์จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS).....	55