จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การย่อยสลายทางชีวภาพของเอ็นโดซัลแฟนโดยรา

โดย
จิตรตรา เพียภูเขียว

ตุลาคม 2551

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การย่อยสลายทางชีวภาพของเอ็นโดซัลแฟนโดยรา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

จิตรตรา เพียภูเขียว

ตุลาคม 2551

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2549 และขอขอบคุณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้การเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การย่อยสลายทางชีวภาพของเอ็นโดซัลแฟนโดยรา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว
กันยายน 2550

บทคัดย่อ

เอ็นโดซัลแฟน เป็นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชในกลุ่มคลอรีนอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษ และมีความคงทนสูงในสิ่งแวดล้อม เมื่อเกิดการปนเปื้อนหรือแพร่กระจาย ย่อมก่อให้เกิดภัยต่อมนุษย์ รวมถึงสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในระบบนิเวศ งานวิจัยนี้ จึงเป็นการศึกษาถึงการคัดแยกราในธรรมชาติที่มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนให้อยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษน้อยลง โดยราที่คัดแยกมาศึกษา ได้แก่ ราในดิน ราและเห็ดที่ขึ้นบนซากพืช รวมทั้งสิ้น 57 ไอโซเลต ซึ่งผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นปฐมภูมิด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่าภายหลังจากการบ่มเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Czapek's Dox Medium เป็นเวลา 20 วัน ราไอโซเลต W2 ซึ่งเป็นราที่คัดแยกมาจากดอกเห็ดในอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ สามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนให้เป็นเอ็นโดซัลแฟนไดออล ซึ่งเป็นสารเมทาโบไลท์ที่มีความเป็นพิษ และคงทนในสิ่งแวดล้อมน้อยลง จึงได้นำราไอโซเลต W2 มาทำการทดสอบการย่อยสลายขั้นทุติยภูมิต่อไป เป็นเวลา 30 วัน โดยวิธี Gas Chromatography (GC) ซึ่งพบว่า รา W2 สามารถย่อยสลายเอ็นซัลแฟนได้หมดในวันที่ 21 ของการบ่มเชื้อ ในขณะที่ทำให้เกิดการสร้าง เอ็นโดซัลแฟนไดออลหลังจากวันที่ 3 ของการบ่มเชื้อ โดยผลทดสอบการย่อยสลายนั้น มีความสอดคล้องกับอัตราการเจริญเติบโตของรา ส่วนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย เอ็นโดซัลแฟนของรา พบว่า ราไอโซเลต W2 มีอัตราการย่อยสลายสูงสุดในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 โดยรา W2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน 98.88 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ของรา W2 พบว่า มีความคล้ายคลึงกับราในสกุล *Trametes* 93-95 เปอร์เซ็นต์

BIODEGRADATION OF ENDOSULFAN BY FUNGI

ASST. PROF. JITTRA PIAPUKIEW, Ph.D

SEPTEMBER, 2007

Abstract

Endosulfan is an organochlorine insecticide whose persistence and toxicity pose a serious environmental threat to humans and other living organisms in the ecosystem. This research investigates the isolation of natural fungi capable of biodegrading endosulfan into a less-toxic metabolite. Fifty-seven isolates of soil fungi and white-rot fungi were screened for their degradation ability using thin layer chromatography (TLC) analysis as a qualitative measurement for the primary degradation test. It was found that after 20 days of incubation in Czapek's Dox medium, the fungus isolate W2, which was isolated from a basidiocarp from Doi Suthep-Pui National Park in Chiangmai Province, yielded positive results by transforming endosulfan into the less- toxic metabolite, endosulfan diol. The secondary degradation test, performed with a gas chromatography (GC) analysis as a quantitative measurement of endosulfan degradation for 30 days of incubation, indicated that endosulfan concentration decreased gradually after spiking into the medium with the fungus isolate W2. The disappearance of endosulfan occurred after 21 days of incubation, with the formation of endosulfan diol after 3 days of incubation. The result of degradation test related directly to the growth of the fungus. The optimum growing and degrading condition for the fungus isolate W2 were attained at 98.88 percent of degradation efficiency using a solution of 50 milligrams per liter of endosulfan and 2 percent glucose at pH 7. Morphological study and internal transcribed spacer (rRNA) gene sequencing analysis indicated that fungus isolate W2 revealed a high sequence similarity (93-95 percent) with the genus *Trametes.*

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... i
บทคัดย่อภาษาไทย..... ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ iii
สารบัญ..... iv
สารบัญตาราง..... vi
สารบัญภาพ..... vii
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
2.1 สารกำจัดแมลงศัตรูพืช..... 3
2.2 เอ็นโดซัลแฟน..... 4
2.4 ราในธรรมชาติ..... 15
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 23
3.1 การเก็บตัวอย่างราจากแหล่งต่างๆ..... 23
3.2 การแยกเส้นใยราจากตัวอย่าง..... 23
3.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่คัดแยกได้..... 25
3.3.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นปฐมภูมิ (Primary degradation test)..... 25
3.3.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นทุติยภูมิ (Secondary degradation test)..... 27
3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของรา ที่คัดเลือกได้..... 28
3.4.1 การกำหนดสภาวะต่างๆ ในการทดสอบการย่อยสลาย..... 28
3.4.2 การทดสอบในสภาวะต่างๆ ที่กำหนด..... 29

หน้า

3.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดเลือกได้ภายใต้
กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค slide culture……..…..... 31
3.6 การบ่งชี้ชนิดของราที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (Internal Transcribed Spacer).....32
บทที่ 4 ผลการวิจัย…….. 35
4.1 การเก็บตัวอย่างราจากแหล่งต่างๆ……..35
4.2 การแยกเส้นใยจากราตัวอย่าง……... 35
4.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่แยกได้…….. 53
4.3.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นปฐมภูมิ
(Primary degradation test).....53
4.3.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นทุติยภูมิ
(Secondary degradation test)……..57
4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่แยกได้.....60
4.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดเลือกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ด้วยเทคนิค slide culture…….....……..... 69
4.6 การบ่งชี้ชนิดของราที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน
ที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (Internal Transcribed Spacer)……70
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย.....72
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย……..…….....……..... 74
บทที่ 7 ข้อเสนอแนะ……..77
รายการอ้างอิง..... 78
ภาคผนวก..... 85
ภาคผนวก ก……86
ภาคผนวก ข……..89
ภาคผนวก ค……..90
ภาคผนวก ง……..... 92
ภาคผนวก จ……..99
การเผยแพร่ผลงานวิจัย……... 101

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายของจุลินทรีย์..... 15
ตารางที่ 3.1 สภาวะต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่นำมาทดสอบ..... 30
ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR).....33
ตารางที่ 4.1 ลักษณะและอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากตัวอย่างดินในเวลา 7 วัน.....36
ตารางที่ 4.2 ลักษณะและอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากตัวอย่างกิ่งไม้ผุและเห็ด
ในเวลา 7 วัน.....43
ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2
ภายหลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน.....65
ตารางที่ ก.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ วันที่ 20 ของการบ่มเชื้อ..... 86
ตารางที่ จ.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงความแตกต่างของอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน
ระหว่างสภาวะที่มีปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5% และ 2%..... 99
ตารางที่ จ.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงความแปรปรวนของอัตราการย่อยสลาย
เอ็นโดซัลแฟนในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 6 และ 7.....100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเอ็นโดซัลแฟน..... 4
ภาพที่ 2.2 วิถีการย่อยสลายของเอ็นโดซัลแฟนในดินและน้ำ.....13
ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของราดินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน..... 40
ภาพที่ 4.2 ลักษณะของเห็ดและกิ่งไม้ผุที่นำมาแยกเนื้อเยื่อ และลักษณะโคโลนีของรา ที่คัดแยกได้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน.....45
ภาพที่ 4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหาร Poly-R agar clearance และ Tannic acid agar ของราที่คัดแยกได้จากเห็ดและกิ่งไม้ผุ เป็นเวลา 7 วัน.....49
ภาพที่ 4.4 ผลทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่แยกได้ โดยวิธี Thin Layer Chromatography ภายหลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 20 วัน.....54
ภาพที่ 4.5 ผลการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 โดยวิธี Thin Layer Chromatography ภายหลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 21 วัน.....56
ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ยของเอ็นโดซัลแฟน และเอ็นโดซัลแฟนไดออล กับระยะเวลาการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน..... 58
ภาพที่ 4.7 น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไอโซเลต W2 ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน..... 59
ภาพที่ 4.8 ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน..... 59
ภาพที่ 4.9 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่ อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 0.5% และ pH 5..... 61
ภาพที่ 4.10 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่ อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 0.5% และ pH 6..... 61
ภาพที่ 4.11 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่ อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 0.5% และ pH 7..... 62
ภาพที่ 4.12 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่ อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ลิตร กลูโคส 2% และ pH 5..... 62
ภาพที่ 4.13 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่ อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ลิตร กลูโคส 2% และ pH 6..... 63

หน้า

ภาพที่ 4.14 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่
อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ลิตร กลูโคส 2% และ pH 7..... 63
ภาพที่ 4.15 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างปริมาณ
ความเข้มข้นของกลูโคส 0.5% และ 2% ที่ pH 5..... 66
ภาพที่ 4.16 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างปริมาณ
ความเข้มข้นของกลูโคส 0.5% และ 2% ที่ pH 6..... 67
ภาพที่ 4.17 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างปริมาณ
ความเข้มข้นของกลูโคส 0.5% และ 2% ที่ค่า pH 7..... 67
ภาพที่ 4.18 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างค่า pH 5 6 และ 7
ที่ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 0.5% 68
ภาพที่ 4.19 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างค่า pH 5 6 และ 7
ที่ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 2%.....68
ภาพที่ 4.20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา W2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงเส้นใย
ชนิดที่มีผนังกั้น (septate hypha)..... 69
ภาพที่ 4.21 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา W2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงสปอร์
แบบไม่อาศัยเพศชนิด arthospore.....69
ภาพที่ ข.1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟน.....89
ภาพที่ ข.2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟนไดออล.....89
ภาพที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของอัลฟาเอ็นโดซัลแฟน.....90
ภาพที่ ค.2 กราฟมาตรฐานของเบตาเอ็นโดซัลแฟน.....91
ภาพที่ จ.3 กราฟมาตรฐานของเอ็นโดซัลแฟนไดออล.....91
ภาพที่ ง.1-1 น้ำหนักแห้งของรา W2 ที่บ่มในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 200 มก./ล.
กลูโคส 0.5% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน.....92
ภาพที่ ง.1-2 น้ำหนักแห้งของรา W2 ที่บ่มในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 200 มก./ล.
กลูโคส 2% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน.....92
ภาพที่ ง.1-3 น้ำหนักแห้งของรา W2 ที่บ่มในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 100 มก./ล.
กลูโคส 0.5% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน.....93
ภาพที่ ง.1-4 น้ำหนักแห้งของรา W2 ที่บ่มในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 100 มก./ล.
กลูโคส 2% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน.....93

หน้า

ภาพที่ ง.1-5 น้ำหนักแห้งของรา W2 ที่บ่มในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 50 มก./ล.
กลูโคส 0.5% และ 2% ค่า pH เท่ากับ 4 เป็นเวลา 30 วัน.....94
ภาพที่ ง.2-1 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการบ่มรา W2 ในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน
200 มก./ล. กลูโคส 0.5% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน..... 95
ภาพที่ ง.2-2 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการบ่มรา W2 ในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน
200 มก./ล. กลูโคส 2% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน.....95
ภาพที่ ง.2-3 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการบ่มรา W2 ในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน
100 มก./ล. กลูโคส 0.5% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน.....96
ภาพที่ ง.2-4 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการบ่มรา W2 ในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน
100 มก./ล. กลูโคส 2% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน.....96
ภาพที่ ง.2-5 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการบ่มรา W2 ในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน
50 มก./ล. กลูโคส 0.5% และ 2% และ pH เท่ากับ 4 เป็นเวลา 30 วัน.....97
ภาพที่ ง.3 ผลทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 ในสภาวะต่างๆ ที่กำหนด
ด้วยวิธี TLC ภายหลัง 30 วันของการบ่มเชื้อ.....98

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมอีกแห่งหนึ่งที่ได้มีการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมาเป็นเวลานานแล้ว โดยในระยะแรกของการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืช ส่วนใหญ่เป็นสารกำจัดแมลง (insecticide) เพื่อนำมาใช้รักษาผลผลิตมิให้เสียหาย และมีปริมาณเพียงพอแก่ประชากรที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในแต่ละปีจึงมีการนำเข้าสารกำจัดแมลงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะสารในกลุ่มคลอรีนอินทรีย์ (organochlorine) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์การทำลายล้าง ในวงกว้าง สลายตัวได้ช้า มีความคงทนสูงในสิ่งแวดล้อม และมีการนำเข้าเพื่อใช้ในประเทศเป็นปริมาณมาก ซึ่งสารกำจัดแมลงในกลุ่มนี้ที่มีการนำเข้าสูงสุดคือ เอ็นโดซัลแฟน (Endosulfan) โดยในปี พ.ศ.2546 มีปริมาณเอ็นโดซัลแฟนที่นำเข้าเพื่อใช้ในการเกษตรสูงถึง 1,764.6 ตัน รวมมูลค่าทั้งสิ้น 356,045,120 บาท (กรมวิชาการเกษตร, 2547) ในปัจจุบันถึงแม้ว่า สารกำจัดแมลงดังกล่าว จะถูกห้ามใช้ ผลิต นำเข้า ส่งออก หรือมีไว้ในครอบครอง ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2547 (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2547) แต่เนื่องจากมีสภาพความคงทนสูงในสิ่งแวดล้อม ประกอบกับการนำมาใช้ในปริมาณมากกับพื้นที่ทางการเกษตรหลายๆ พื้นที่ในปีที่ผ่านมา สารนี้จึงมีการสะสมปนเปื้อนลงสู่ดิน และอาจไม่เกิดการย่อยสลาย หรือเกิดการย่อยสลายน้อยมาก ก่อให้เกิดผลกระทบไม่เพียงแต่สิ่งมีชีวิตที่เป็นแมลงศัตรูพืชกลุ่มเป้าหมายเท่านั้น ยังส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตกลุ่มนอกเป้าหมายในดิน รวมทั้งระบบนิเวศอื่นๆ นำไปสู่การสะสมพิษในสิ่งมีชีวิตไปตามห่วงโซ่อาหาร และผลสุดท้ายคือ อันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค นอกจากนี้ ในกรณีที่แมลงศัตรูพืชเคลื่อนย้ายออกจากดิน ก็ย่อมแพร่กระจายสู่สภาพแวดล้อม และเกิดผลกระทบได้ในวงกว้างเช่นกัน ซึ่งนับเป็นเรื่องที่น่าเป็นห่วงอย่างยิ่งในด้านความปลอดภัยของมนุษย์ และสิ่งแวดล้อม

จากผลกระทบดังกล่าวที่อาจเกิดขึ้นต่อสิ่งแวดล้อม และระบบนิเวศ จึงได้มีการพยายามศึกษาวิจัยถึงวิธีในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนสารกำจัดแมลงอย่างเอ็นโดซัลแฟน โดยหลักการหนึ่งที่ได้นำมาใช้ คือ การทำให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) ของเอ็นโดซัลแฟน ซึ่งหมายถึง การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารดังกล่าว จนทำให้เสียสภาพโมเลกุลเดิมโดยชีวปัจจัย (ยงยุทธ โอสถสภา และคณะ, 2541) การย่อยสลายนี้เกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของสารกำจัดแมลง โดยใช้จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมที่มีความสามารถในการใช้ส่วนที่เป็นสารประกอบอินทรีย์

ของสารกำจัดแมลงนั้น เช่น แหล่งคาร์บอนเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน (Baker และ Herson, 1994) โดยการย่อยทำลายอาจเกิดได้ช้าในระยะแรก เนื่องจากการปรับตัวของจุลินทรีย์ หลังจากนั้น จุลินทรีย์จะมีวิวัฒนาการในการเข้าย่อยทำลายสารดังกล่าว

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่แยกและคัดเลือกราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ซึ่งเป็นสารกำจัดแมลงที่เกษตรกรไทยนิยมใช้กันมาก และมีการตกค้างคงทนอยู่ในดินเป็นเวลานาน โดยเหตุผลในการเลือกใช้ราในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนนั้น เนื่องจากราเป็นจุลินทรีย์ที่มีการดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมทั่วไปอยู่แล้วในรูปแบบที่หลากหลาย เช่น ราไวต์รอต (white rot fungi) และราที่อาศัยอยู่ในดิน (soil fungi) ซึ่งราต่างๆ เหล่านี้มีความทนทานแม้ในสภาวะที่เป็นกรดได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ รวมทั้งลักษณะทางสรีรวิทยาของราที่มีเส้นใยมัยซีเลียม (mycelium) ยาวแตกแขนงอย่างไม่จำกัด ทำให้สามารถเข้าถึงแหล่งที่มีการตกค้างของสารพิษได้ดี รวมทั้งศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเอ็นโดซัลเฟนของราที่แยกได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแยก และคัดเลือกราสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลเฟน
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่แยกได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารกำจัดแมลงศัตรูพืช

สารกำจัดแมลงศัตรูพืช (insecticides) มีคุณสมบัติในการป้องกัน และกำจัดแมลง โดยสารกำจัดแมลงทั้งหมดที่ใช้ในปัจจุบัน เป็นสารที่ก่อให้เกิดพิษกับระบบประสาท โดยจะทำลายระบบ ประสาทส่วนกลางของแมลงเป้าหมาย ทั้งนี้ สามารถจำแนกตามลักษณะทางเคมีที่สำคัญได้ 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มคลอรีนอินทรีย์ (organochlorines) สารเคมีกลุ่มนี้ ประกอบด้วยกลุ่มย่อย 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มดีดีที กลุ่มไอโซเมอร์ของเบนซินเฮกซาคลอไรด์ (BHC) และกลุ่มสารประกอบไซโคลไดอีน สารในกลุ่มนี้ใช้กำจัดแมลงได้ในวงกว้าง (broad-spectrum) มีความคงทน (persistence) ในดินและสภาพแวดล้อมได้นานมาก ทำให้เป็นพิษต่อนก และปลาที่กินแมลง โดยพิษจะสะสมในนกและปลามากขึ้นจนถึงจุดเป็นพิษต่อคนที่บริโภคสัตว์เหล่านี้ได้

2. กลุ่มฟอสเฟตอินทรีย์ (organophosphates) สารกลุ่มนี้จัดเป็นกลุ่มที่เป็นพิษที่สุดต่อทั้งแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่สลายตัวได้เร็วกว่ากลุ่มคลอรีนอินทรีย์ เริ่มได้รับความนิยมหลังจากที่แมลงเริ่มดื้อต่อสารดีดีที และสารอื่นในกลุ่มคลอรีนอินทรีย์ โดยกลุ่มย่อยที่ได้รับความนิยมอย่างสูงได้แก่ กลุ่มย่อยฟอสฟอโรไทโอเอต (phosphorothioate)

3. กลุ่มคาร์บาเมต (carbamates) สารกลุ่มนี้ เป็นอนุพันธ์ของกรดคาร์บามิก เกิดขึ้นหลังกลุ่มคลอรีนอินทรีย์ และกลุ่มฟอสเฟตอินทรีย์ ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำกว่ากลุ่มฟอสเฟตอินทรีย์มาก โดยที่ความเป็นพิษของสารในกลุ่มนี้ ไม่สะสมในสัตว์ และมีผลตกค้างในดินต่ำ

นอกจากสารกำจัดแมลง 3 กลุ่มสำคัญดังกล่าว ยังมีสารกำจัดแมลงประเภทไพรีทรอยด์ (pyrethroid insecticides) ซึ่งสังเคราะห์เลียนแบบโครงสร้างของสาร Pyrethrin ที่สกัดจากพืช pyrethrum หรือ chrysanthemum flower สารนี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นครั้งแรกในปี 1980 มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทของแมลง โดยไปรบกวนการส่งกระแสประสาท ตัวอย่างสารกำจัดแมลงในกลุ่มนี้คือ Permethrin และ Cypermethrin เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสารกำจัดแมลงจากพืช (botanical insecticides) ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากพืช โดยมีฤทธิ์ร้ายแรงต่อแมลง ตัวอย่างสารกำจัดแมลงในกลุ่มนี้ ได้แก่ Nicotine และ Rotenoids เป็นต้น (Klaassen, Amdur และ Doull, 1996)

สารกำจัดแมลงศัตรูพืชเหล่านี้อาจใส่ลงไปในดินโดยตรง เพื่อฆ่าแมลงที่อาศัยในดิน หรือการฉีดพ่นให้แก่พืช แต่สุดท้ายก็ย่อมตกลงสู่ดิน ในการใส่ลงดินนั้นมีอยู่หลายวิธี เช่น หว่านแล้วไถกลบ

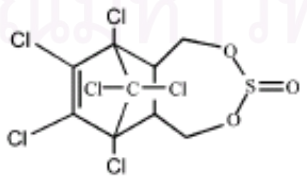
วิธีนี้อาจมีการใส่ด้วยอัตราที่มากเกินความจำเป็น ทำให้มีผลต่อกลุ่มนอกเป้าหมายได้มาก ในบางกรณีใช้คลุกเมล็ดพืชหรือใส่เฉพาะบริเวณที่มีแมลงระบาด นอกจากนี้ อาจให้ในรูปผิวหน้าเม็ดที่ละลายช้า (inert granule) หรือจากแคบซูลขนาดเล็ก (microcapsule) เป็นต้น ทั้งนี้สารกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตรกลุ่มที่มีการตกค้างในสิ่งแวดล้อมยาวนานที่สุด (2 – 30 ปี) คือ คลอรีนอินทรีย์ ซึ่งเป็นกลุ่มของสารกำจัดแมลงที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์แบบเฉียบพลัน หมายถึง การได้รับสารพิษในระยะเวลาสั้นประมาณน้อยกว่า หรือในเวลา 24 ชั่วโมง โดยการได้รับเพียงครั้งเดียว หรือหลายครั้ง แล้วแสดงอาการเป็นพิษให้เห็นภายในเวลา 2 – 3 วันต่อมา (ยงยุทธ โอสถสภา และคณะ, 2541; ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2545)

2.2 เอ็นโดซัลแฟน

เอ็นโดซัลแฟน (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiopin-3-oxide) เป็นหนึ่งในสารกำจัดแมลงกลุ่มคลอรีนอินทรีย์ ประเภทไม่ดูดซึม ในกลุ่มย่อยของสารประกอบของไซโคลไดอีน (cyclodiene compound) ที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชได้ในวงกว้าง ถูกผลิตขึ้นครั้งแรกในยุคปี ค.ศ.1950 (Maier-Bode, 1968) โดยบริษัท Hoechst AG ประเทศเยอรมนี ส่วนในสหรัฐอเมริกาถูกผลิตขึ้นในปี ค.ศ. 1974 โดยบริษัท FMC Corporation ซึ่งบริษัทผู้ผลิตที่มีความสำคัญมากที่สุดก่อนที่สารนี้จะถูกประกาศห้ามใช้คือ บริษัท AgeEvo โดยผลิตสารนี้ขึ้นเพื่อนำมาใช้กำจัดแมลงศัตรูพืช แมลงในบ้านเรือน รวมทั้งเพื่อรักษาเนื้อไม้ไม่ให้มอดทำลาย (The British Crop Protection Council, 2001)

2.2.1 สมบัติทางกายภาพและเคมี

1) โครงสร้างทางเคมี:



ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเอ็นโดซัลแฟน (International Programme on Chemical Safety, 1984)

2) สูตรโมเลกุล: $C_9H_6Cl_6O_3S$

3) น้ำหนักโมเลกุล: 406.96

4) องค์ประกอบทางเคมี: เอ็นโดซัลแฟนประกอบด้วยไอโซเมอร์ 2 ชนิด คือ อัลฟา และเบตาไอโซเมอร์ (α- & β-isomers) ผสมกันอยู่ในอัตราส่วน 7:3

5) ลักษณะทางกายภาพ: เอ็นโดซัลแฟนบริสุทธิ์จะมีลักษณะเป็นผงสีขาว ส่วนเทคนิคัลเกรดเอ็นโดซัลแฟน จะเป็นผงสีน้ำตาล

6) ความสามารถในการละลายน้ำ: 0.32 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

7) ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย: เอธิลอะซิเตต (Ethyl acetate) และไดคลอโรมีเธน (Dichloromethane) 200 กรัมต่อลิตร เอธานอล (Ethanol) 65 กรัมต่อลิตร และเฮกเซน (Hexane) 24 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

8) จุดหลอมเหลว: 70-100 องศาเซลเซียส

9) ความดันไอ: 0.83 มิลลิปาสคาล ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

10) ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ: 12,400 (Oregon State University, 1996; The British Crop Protection Council, 2001)

2.2.2 ชื่อทางการค้า

A.B. Fan, Afidan, Aggrodan, Agridan, Bensocarb, Bensodan, Beosit, Brook, Clement, Cyclodan, Devisulfan, Dew Dan, Dior-35, Dofan, Dori, Dumper-san, EC Sulfan, Egodan, Endan, Endew, Endocel, Endocide, Endo crop, Endodan, Endosol, Endyne, Etonic, Exxo-z, Famcodan, Fantom, FMC 5462, Fortune, Freedan, Gardner, Golden Leaf Tobacco Spray, Gycin, Hexasulfan, Hildan, Hoe 2671, Hor Mush, Hydrodan, Insectophene, Jack Dum, J-teedan, Kasidan, Lordjim, L.P.Dan, Malix, Manyoo, Master, Metrodan, Mortero, Newcodan, Nockdye, Ox Xa, Parrysulfan, Patodan, Pestdye, Phaser, Pro-d-dan, R Sulfa, Sandan, Shevanex, Simadan, Sonydan, Sulfanex, Summer, Tanadan, Teophos, Thanyacarp, Thimul, Thiodan, Thiofor, Thiomul, Thionate, Thionex, Torpidan, Trysulphone, Urofen, Wephos, Zumic (Oregon State University, 1996; Pesticide Action Network – Asia and the Pacific, 1999; The British Crop Protection Council, 2001)

2.2.3 ลักษณะที่นำมาใช้

ชนิดของเหลวสูตรผสม (EC.) 32 เปอร์เซ็นต์ ULV (ultra-low volume) 25 เปอร์เซ็นต์ ฝุ่น ผงละลายน้ำ (WP.) 4-5 เปอร์เซ็นต์ เม็ด และชนิดควัน (smoke tablets) โดยสามารถนำมาผสมกับสารเคมีได้หลายชนิด เช่น ไดเมทโธเอท (Dimethoate) เมทโธมิล (Methomyl) โมโนโครโตฟอส (Monocrotophos) ไพริไมคาร์บ (Pirimicarb) ไทราโซฟอส (Triazophos) ปิโตรเลียมออยล์ (Petroleum oils) ฟีโนพรอพ (Fenoprop) ออกซีน-คอปเปอร์ (Oxine-Copper) มาลาไธออน (Malathion) และพาราไธออน-เมธิล (Parathion-methyl) เป็นต้น (Oregon State University, 1996; German Federal Environment Agency, 2004)

2.2.4 การใช้ประโยชน์ทางการเกษตร

เนื่องจากเอ็นโดซัลแฟน เป็นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชที่มีฤทธิ์กำจัดแมลงได้ในวงกว้าง (broad-spectrum) จึงพบว่า มีการนำมาใช้ในพื้นที่ทำการเกษตร สวน ไร่ นา ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย อาทิ สวนคะน้า กวางตุ้ง กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก คื่นฉ่าย มะเขือ มะเขือเทศ ฟักทองหอม แตง ข้าว ข้าวโพด ฝ้าย มันฝรั่ง อ้อย ชา ยาสูบ โกโก้ ถั่วเหลือง ส้ม ทานตะวัน และไม้ดอกไม้ประดับทั่วไป (Food and Agriculture Organization, 1993) โดยถูกนำมาใช้เพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืชต่างๆ ได้แก่ มอดเจาะผลกาแฟ ด้วงงวงเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยจั๊กจั่นฝ้าย เพลี้ยอ่อนฝ้าย เพลี้ยไฟ เพลี้ยกระโดด มวนโกโก้ มวนเขียว มวนแดง หนอนดอกส้ม หนอนแก้วส้ม หนอนกระทู้ผัก หนอนห่อใบงา หนอนใยผัก หนอนคืบ หนอนเจาะสมอ หนอนเจาะลำต้น หนอนทรายยางพารา แมลงดำหนาม แมลงหวี่ขาว แมลงปีกแข็งต่างๆ เป็นต้น (Meister และคณะ, 1984) ทั้งนี้ ปริมาณการใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่ปลูก ชนิดของแมลงศัตรูพืช รวมทั้งลักษณะของเอ็นโดซัลแฟนที่นำมาใช้ ตัวอย่างเช่น การนำมาใช้ในไร่ฝ้าย เพื่อกำจัดเพลี้ยจักจั่นฝ้าย หรือเพลี้ยอ่อนฝ้าย จะใช้ในรูปของเหลวผสมน้ำในอัตรา 30 - 40 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร แล้วฉีดพ่นให้ทั่วต้นพืช หรือรูปเม็ดใช้ในอัตรา 2 – 6 กิโลกรัม ต่อไร่ หว่านหรือโรยระหว่างช่องให้ทั่วพื้นที่ปลูก การนำมาใช้เพื่อกำจัดมอดเจาะผลกาแฟ จะใช้ปริมาณ 40-50 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร ในไร่ข้าวโพด ไร่อ้อยจะใช้ในปริมาณ 250-400 ซีซี ต่อไร่ ส่วนในนาข้าวอาจใช้ในรูปเม็ดปริมาณ 250 กรัม ต่อไร่ หรือในรูปของเหลว 250-320 ซีซีต่อไร่ เป็นต้น ทั้งนี้ ระยะเวลาที่ใช้ก่อนการเก็บเกี่ยวจะอยู่ที่ 7 – 14 วัน (บริษัท พาซาน่า จำกัด, 2546)

2.2.5 ความเป็นพิษ

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization) ได้จัดระดับความเป็นพิษของเอ็นโดซัลแฟนอยู่ใน Class II – Moderately hazardous หรือมีความเป็นพิษปานกลาง ขณะที่ The U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) ได้จัดเอ็นโดซัลแฟนอยู่ในสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม Ib – Highly hazardous หรือมีความเป็นพิษสูง (International Programme on Chemical Safety, 1984) ซึ่งค่าความเป็นพิษที่ยอมรับได้ต่อวัน (Acceptable Daily Intakes: ADI) มีค่าเท่ากับ 0.006 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน โดยจากการทดสอบความเป็นพิษแบบต่างๆ กับสัตว์ทดลอง ได้ผลดังนี้

1) พิษเฉียบพลัน (acutetoxicity): พิษจากการกินเข้าไปในหนูขนาดเล็ก มีค่า LD50 ประมาณ 18-160 มิลลิกรัม พิษจากการซึมผ่านทางผิวหนังมีค่า LD50 78-359 มิลลิกรัม และมีความเป็นพิษต่ำจากการหายใจเข้าไป เมื่อสารเอ็นโดซัลแฟนเข้าสู่ร่างกาย จะออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้หายใจลำบาก สูญเสียการทรงตัว ท้องร่วง และหมดสติในที่สุด มีรายงานว่า ในวัว แกะ และสุกร ที่กินหญ้าที่ฉีดพ่นเอ็นโดซัลแฟนเข้าไป มีอาการกล้ามเนื้อกระตุก และตาบอด

2) พิษเรื้อรัง (chronic toxicity): ในหนูทดลองที่ให้กินเอ็นโดซัลแฟนเข้าไป ในอัตรา 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ติดต่อกันถึง 15 วัน มีอัตราการตายสูง แต่ถ้ากินในอัตรา 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ในระยะเวลาที่เท่ากัน จะมีสาเหตุทำให้ตับโตผิดปกติ มีอาการเจ็บป่วย การเจริญเติบโต และการรอดชีวิตลดลง ไตผิดปกติ คุณสมบัติทางเคมีของเลือดเปลี่ยนแปลงไป

3) พิษต่อการสืบพันธุ์ (reproductive effects): ในหนูทดลองที่กินเอ็นโดซัลแฟนในอัตรา 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ไม่สามารถสังเกตเห็นความผิดปกติในการขยายพันธุ์ใน 3 ชั่วอายุ แต่ถ้ากินปริมาณ 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน จะส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของลูกหนู หนูเพศเมียที่กินเอ็นโดซัลแฟนปริมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันติดต่อกัน 78 สัปดาห์ และหนูเพศผู้ในอัตรา 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ติดต่อกัน 15 วัน จะมีผลต่ออวัยวะที่เกี่ยวข้องกับสืบพันธุ์

4) พิษที่เกิดขึ้นกับพัฒนาการของทารกในครรภ์ (teratogenic effects): ในหนูทดลองที่ให้สารเอ็นโดซัลแฟนในปริมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ไม่มีผลต่อลูกที่เกิดขึ้นในช่วง 3 ชั่วอายุ แต่ถ้ากินในปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน จะส่งผลให้ลูกที่เกิดมามีความพิการ การพัฒนาการเจริญเติบโตทางกระดูกผิดปกติ

5) พิษที่ก่อให้เกิดการผ่าเหล่า (mutagenic effects): เอ็นโดซัลแฟนก่อให้เกิดการผ่าเหล่าในเซลล์ของแบคทีเรียและยีสต์ ในขบวนการทำปฏิกิริยาของเอ็นโดซัลแฟนก่อให้เกิดความผิดปกติในผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการผ่าเหล่าของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิดด้วย ซึ่งเหตุการณ์เช่นนี้ จะเกิดกับมนุษย์ได้ หากได้รับเอ็นโดซัลแฟนในปริมาณที่มาก

6) พิษที่ก่อให้เกิดเซลล์มะเร็ง (carcinogenic effects): จากผลการศึกษาเป็นระยะเวลานานในหนูขนาดใหญ่ และเล็กเพศเมีย พบว่า แม้จะให้เอ็นโดซัลแฟนในอัตราสูงถึง 23 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เป็นระยะเวลานานถึง 78 สัปดาห์ หรือนานกว่านั้น ก็ไม่พบว่ามีผลต่อการเกิดเนื้องอก หรือเซลล์มะเร็งแต่ประการใด แต่มีผลต่อคุณสมบัติทางเคมีของเลือด เป็นสาเหตุของโรคมะเร็งในเม็ดเลือด (Leukemia)

7) พิษที่เกิดกับต่อมหรืออวัยวะต่างๆ (organ toxicity): ผลจากการศึกษาพบว่าเอ็นโดซัลแฟนมีพิษต่อต่อม หรืออวัยวะต่างๆ ของสัตว์ทดลอง เช่น ไต ตับ เลือด ต่อมพาราไทรอยด์ (Parathyroid) แต่สามารถถูกขจัด หรือลดปริมาณลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับว่า องค์ประกอบของสารเป็นชนิดเบตาหรืออัลฟาเอ็นโดซัลแฟน โดยเบตาเอ็นโดซัลแฟน จะลดปริมาณลงได้รวดเร็วกว่าอัลฟาเอ็นโดซัลแฟน (ศักดา ศรีนิเวศน์, 2547)

2.2.6 การตกค้างปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

1) ดิน

ดินสามารถดูดซับเอ็นโดซัลแฟนได้เป็นอย่างดี (Goerlitz และ Eyrich, 1987) ขึ้นอยู่กับสภาพความเป็นกรดด่างของดิน โดยจะตกค้างอยู่ในดินที่มีคุณสมบัติเป็นกรดได้นานกว่า ทั้งนี้ภายใต้สภาวะมีอากาศ (aerobic condition) ครึ่งชีวิตของเอ็นโดซัลแฟนในดินที่เป็นกรดถึงเป็นกลางจะอยู่ที่ 9 เดือน ถึง 6 ปี (United States Environmental Protection Agency, 2002) ส่วนในสภาพดินอับอากาศ (anaerobic condition) เช่น ดินที่มีน้ำท่วมขัง เอ็นโดซัลแฟนจะมีครึ่งชีวิตอยู่ที่ 430 วัน (Sethunathan และคณะ, 2002) นอกจากนี้การสลายตัวโดยแสงของเอ็นโดซัลแฟนบนผิวดินเกิดขึ้นอย่างไม่สม่ำเสมอ ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ (Gildemeister และ Jordan, 1983) และจากการศึกษาของ Stewart และ Cairns (1974) พบว่า สภาวะปกติในดิน อัลฟาไอโซเมอร์ จะสลายตัวได้เร็วกว่าเบตาไอโซเมอร์ การย่อยสลายของเอ็นโดซัลแฟนในดิน เป็นผลให้เกิดเมทาโบไลท์ (metabolite) หลายชนิด ทั้งนี้ สารเมทาโบไลท์ที่พบบ่อยที่สุด คือ เอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต (Endosulfan sulfate) (Byers, Woodham และ Bowman, 1965)

2) ตะกอน

ในสภาวะมีออกซิเจน เอ็นโดซัลแฟนจะถูกชะจากบรรยากาศ น้ำฝน ดิน และแหล่งน้ำผิวดิน ลงสู่ตะกอนดินอย่างรวดเร็ว โดยตะกอนทรายที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และตะกอนดินเหนียวซึ่งมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่ 3.2 เปอร์เซ็นต์ เอ็นโดซัลแฟนจะมีการสลายตัวออกจากส่วนที่เป็นน้ำของตะกอนโดยมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 35.1 และ 3.6 วัน ตามลำดับ ทั้งนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำเหนือตะกอน จะเป็นตัวกำหนดชนิด และ

ปริมาณของสารเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้นในตะกอน โดยทั้งในตะกอนดินทราย และดินเหนียว นอกจากจะเกิดการย่อยเอ็นโดซัลแฟน เป็นเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต และเอ็นโดซัลแฟนไดออล (Endosulfan diol) แล้ว ยังอาจทำให้เกิดเมทาโบไลท์อีกชนิดหนึ่ง คือ เอ็นโดซัลแฟนไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิกแอซิด (Endosulfan hydroxyl carboxylic acid) ได้อีกด้วย (Stumpf, 1990) ส่วนในสภาวะไร้ออกซิเจนของดินตะกอนที่อยู่ลึกลงไป อาจทำให้มีการตกค้างของเอ็นโดซัลแฟนซึ่งมีค่าครึ่งชีวิตได้มากกว่า 200 วัน แตกต่างจากส่วนบนของตะกอนซึ่งมีช่องว่างระบายอากาศ ทำให้การย่อยสลายเกิดขึ้นได้เร็วกว่า (Guerin, 2001)

3) น้ำ

เอ็นโดซัลแฟนสามารถคงอยู่ในสภาพที่น้ำเป็นกรดมากกว่าสภาพเป็นกลางถึง 5 เดือน โดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอ็นโดซัลแฟนในน้ำ จะมีประสิทธิภาพสูงเมื่อค่า pH มากกว่าหรือเท่ากับ 7 ในขณะเดียวกันถ้าค่า pH ในน้ำต่ำกว่า 7 จะทำให้เอ็นโดซัลแฟนมีความคงตัวสูงยิ่งขึ้น (German Federal Environment Agency, 2004) แต่ในสภาพที่น้ำเป็นด่างจะเสื่อมสลายได้เร็วที่สุด น้ำฝนในสภาพภูมิอากาศปัจจุบัน มักจะมีความเป็นกรดอยู่ระหว่าง pH 4.6-5.6 จึงทำให้การย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนเกิดขึ้นน้อยมาก ด้วยเหตุนี้จึงพบว่า ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอ็นโดซัลแฟนในน้ำทะเล ซึ่งมีค่า pH สูง จึงเป็นกระบวนการหลักในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนทางธรรมชาติ และจากกระบวนการนี้จะได้เอ็นโดซัลแฟนไดออลเป็นสารเมทาโบไลท์ที่สำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่า เอ็นโดซัลแฟนปนเปื้อนในน้ำที่อยู่ใกล้บริเวณที่ใช้สารเคมีในปริมาณความเข้มข้นที่สูง หรือพบว่ามีปริมาณน้อยแพร่กระจายอยู่ในแหล่งน้ำทุกแหล่งทั่วประเทศ แสดงให้เห็นว่า น้ำเป็นปัจจัยที่สำคัญในการแพร่กระจายสารเอ็นโดซัลแฟนได้อย่างรวดเร็ว และกว้างขวาง (Greve และ Wit, 1971)

4) ผลผลิตทางการเกษตร

เอ็นโดซัลแฟนจะลดปริมาณการตกค้างในผลผลิตได้อย่างรวดเร็ว ส่วนใหญ่สารตกค้างจะลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 3-7 วัน และเมื่อปี ค.ศ. 1999 – 2000 สหรัฐอเมริกาได้ตรวจสอบพบว่า มีเอ็นโดซัลแฟนตกค้างอยู่ในยาสูบ 0.0005-0.013 ppm ในอาหารทะเลสด 0.2 ppt - 1.7 ppb และรวมทั้งพบการตกค้างในน้ำนมวัว (ศักดา ศรีนิเวศน์, 2547)

2.2.7 ผลกระทบที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ

การใช้เอ็นโดซัลแฟนเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืชแต่ละครั้ง ไม่เพียงจะเป็นการทำลายแมลงกลุ่มเป้าหมายเท่านั้น แต่ยังมีผลต่อสิ่งมีชีวิตกลุ่มนอกเป้าหมายอีกด้วย ในกรณีที่สารกำจัดแมลงดังกล่าวมีการแพร่กระจายสู่ระบบนิเวศที่มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน และมีการส่งต่อพลังงาน

กันเป็นทอดๆ จึงเป็นที่แน่นอนว่า เมื่อใดก็ตามที่สิ่งมีชีวิตหนึ่งได้รับพิษจากสารเอ็นโดซัลแฟน ก็จะมีการส่งต่อพิษไปยังผู้บริโภคลำดับสุดท้าย ซึ่งในหลายกรณีก็คือ มนุษย์ จากการศึกษาทางด้านพิษวิทยาในระบบนิเวศ พบว่า เอ็นโดซัลแฟน เป็นพิษต่อนกต่างๆ ในระดับปานกลาง มีความเป็นพิษสูงต่อปลา และสัตว์น้ำต่างๆ ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrates) นอกจากนี้ พบว่า มีความเป็นพิษต่อผึ้งในระดับปานกลาง ทั้งนี้ ถ้ามีการใช้มากกว่า 260 ซีซีต่อไร่ ระดับความเป็นพิษจะเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม เอ็นโดซัลแฟนจะมีความเป็นพิษน้อยต่อแมลงที่เป็นประโยชน์ (beneficial insects) เช่น แตนเบียน แมลงเต่าทอง และไรบางชนิด สำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เอ็นโดซัลแฟนจะเกิดการสะสมในไตมากกว่าในไขมันโดยร่างกายจะมีกลไกการขับถ่ายสารนี้ออกจากไตหลังจากที่ได้รับพิษสะสมเป็นเวลานานแล้ว โดยจะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็ว และมีการลดพิษลงเมื่ออยู่ในร่างกายไปเป็นสารเมทาโบไลท์ที่มีขั้ว และถูกขับถ่ายออกไปในที่สุด (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000)

มีรายงานจากประเทศสาธารณรัฐเบนิน แอฟริกาตะวันตก เมื่อปี ค.ศ. 1999 ว่า มีผู้เสียชีวิตในพื้นที่ทางตอนเหนือของจังหวัดบอร์กู (Borgou) จากการใช้เอ็นโดซัลแฟนฉีดพ่นในไร่ฝ้ายเป็นจำนวน 37 คน และอีก 36 คน ป่วยหนักจนต้องได้รับการรักษาที่โรงพยาบาล สาเหตุเนื่องมาจากการใช้เอ็นโดซัลแฟนที่ไม่ถูกต้อง หรือใช้ในปริมาณที่มากเกินความจำเป็น เกษตรกรรายหนึ่งเล่าให้ฟังว่า ไส้เดือนที่เคยพบในดินได้ถูกพิษของเอ็นโดซัลแฟนตายลงเป็นจำนวนมาก นกที่กินไส้เดือนตายเข้าไปเป็นอาหารก็ตายตามไปเป็นจำนวนมากเช่นกัน นอกจากนี้ ยังสังเกตว่าหลังจากฉีดพ่นเอ็นโดซัลแฟน 2 – 3 วันเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช ไร่นาแห่งนั้น ก็คละคลุ้งไปด้วยกลิ่นเหม็นเน่าของซากสัตว์ต่างๆ ที่ถูกพิษของเอ็นโดซัลแฟนตายตามไปด้วย เกษตรกรอีกรายหนึ่งที่อาศัยอยู่ในเมืองบานิโครา (Banikoara) ได้กล่าวถึงการทำลายห่วงโซ่อาหารในธรรมชาติโดยเอ็นโดซัลแฟนจากที่เขาเห็นว่า ปลวกในไร่ฝ้ายที่ได้รับพิษของเอ็นโดซัลแฟนตายลงไป กบที่กินปลวกก็มีอาการมึนงง หยุดนิ่งไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ หลังจากนั้นไม่นาน นกเค้าแมวได้จับกบตัวนั้นไปกินบนคบไม้ สิบนาทีต่อมานกเค้าแมวก็ร่วงหล่นลงมา และตายในที่สุด และรายสุดท้ายได้ให้ความเห็นว่า เอ็นโดซัลแฟนเป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพมาก สามารถทำลายล้างสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิดไม่เว้นแม้กระทั่งงู และไส้เดือนที่เคยมีเป็นจำนวนมาก ก็ตายหมดภายหลังจากการฉีดพ่นสารนี้ในเวลาไม่นาน รวมถึงปลาในหนองน้ำและลำธารก็ตาย เนื่องจากน้ำที่ไหลจากบริเวณไร่ฝ้ายที่มีการฉีดพ่นเอ็นโดซัลแฟนไหลลงไป (Pesticide Action Network UK, 2000)

2.2.8 เหตุการณ์สำคัญที่เกี่ยวข้อง

ช่วงกลางปี พ.ศ.2525 – 2526 ประเทศไทยได้มีการสนับสนุนการเพาะเลี้ยงหอยเชอรี่ (golden apple snail) เพื่อให้เป็นสัตว์เศรษฐกิจ เนื่องจากสามารถนำมาปรุงเป็นอาหารที่ให้โปรตีนสูง และมีรสชาติอร่อย แต่ในช่วงเวลาดังกล่าวการเพาะเลี้ยงหอยเชอรี่ไม่ได้รับความนิยมมากนัก จึงเงียบหายไป จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2531 เริ่มมีการพบเห็นหอยเชอรี่แถบชานเมืองด้านตะวันออกของกรุงเทพฯ แถวมีนบุรี หนองจอก แต่ยังไม่เป็นปัญหาแต่อย่างใด กลับได้รับความนิยมในการนำมาประกอบอาหารตามร้านอาหารต่างๆ จึงทำให้หอยเชอรี่มีการแพร่กระจายไปทั่วทุกภาคของประเทศ จากกรุงเทพฯ ไปยังแหล่งน้ำสำคัญต่างๆ ตั้งแต่ กว๊านพะเยา บึงสีไฟ บึงบอระเพ็ด หนองหาร ทะเลสาบสงขลา แม้กระทั่งอ่างเก็บน้ำที่อยู่บนยอดเขา จากอ่างเก็บน้ำ หอยชนิดนี้ได้แพร่พันธุ์ไปตามคูคลองสาธารณะ โดยเฉพาะคลองชลประทานในภาคกลาง ซึ่งเป็นแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทย จากนั้นไม่นานชาวนาก็ได้พบว่า ข้าวกล้าที่หว่านถูกทำลายในเวลาชั่วคืน นับเป็นความเสียหายที่ร้ายแรงสำหรับชาวนาในช่วงเวลานั้น

ในปี พ.ศ. 2535 – 2536 การระบาดของหอยเชอรี่จากภาคกลาง เริ่มระบาดไปภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และสุดท้ายที่ภาคใต้ รวมทั้งสิ้น 43 จังหวัด (United Nations, 2006) ส่วนราชการต่างๆ ได้เริ่มศึกษา และค้นคว้าวิธีการกำจัดหอยเชอรี่อย่างเร่งด่วน มีการแนะนำการป้องกันกำจัดหอยเชอรี่ด้วยวิธีต่างๆ ทั้งวิธีกล และการใช้สารเคมีหลายชนิด อาทิ เหยื่อพิษชนิดต่างๆ สารไบลูไซด์ คอปเปอร์ซัลเฟต หรือแม้กระทั่งสารสมุนไพรต่างๆ แต่ความพยายามต่างๆ ของหน่วยราชการ ไม่ทันกับความตื่นตระหนก และความรู้เท่าไม่ถึงการณ์ของชาวนาที่ได้รับคำแนะนำจากผู้ประกอบการค้าสารเคมีเกษตรที่ให้ใช้สารเคมีชนิดหนึ่งคือ เอ็นโดซัลแฟน ที่สามารถกำจัดหอยเชอรี่ได้เป็นอย่างดี ความนิยมในการใช้เอ็นโดซัลแฟนได้แพร่หลายไปทั่วจนเป็นที่รู้จักและเรียกกันว่า ยาหยอดหอย ด้วยเหตุผลว่า ใช้แล้วได้ผลดี ใส่ลงไปหอยลอยขึ้นมาตายทันที แต่สิ่งที่ลอยตามหอยขึ้นมาคือ ปลาต่างๆ ในนา รวมทั้งกบ เขียด และสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ นับเป็นความเสียหายอย่างใหญ่หลวงต่อระบบนิเวศในนา และเมื่อน้ำในนาถูกระบายลงลำธาร คู คลองต่างๆ สารเอ็นโดซัลแฟนยังออกฤทธิ์ต่อสัตว์น้ำนั้นอีกด้วย

ชาวนาหลายรายเห็นถึงพิษภัยของเอ็นโดซัลแฟนแล้ว แต่ยังจำเป็นต้องใช้ เพราะราคาถูกเมื่อเทียบกับสารตัวอื่นๆ และคิดว่าถ้าไม่หยอดยากำจัดหอย ก็จะไม่ได้ข้าว นอกจากปลาในแหล่งน้ำแล้ว ประชาชนสองฝั่งแม่น้ำที่ไหลผ่านแหล่งเพราะปลูก ไม่มีทางทราบเลยว่ามีสารพิษอะไรบ้างที่ไหลลงมาในสายน้ำ และเมื่อต้นปี พ.ศ. 2543 ที่ผ่านมา แม่น้ำท่าจีน ซึ่งถือเป็นเส้นเลือดหลักฝั่งตะวันตก เกิดเน่าเสียอย่างหนัก แม่น้ำสายรองทั้งหลายตั้งแต่พื้นที่ของอำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี ผ่านนครปฐม สมุทรสาคร เน่าเสียตลอดทั้งสาย สร้างความเสียหายอย่างใหญ่หลวง

ที่สำคัญเมื่อน้ำไปตรวจพบว่า มีสารเอ็นโดซัลแฟนปนเปื้อนอยู่ ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของแหล่งน้ำสายสำคัญดังกล่าว รวมทั้งการสูญเสียระบบนิเวศที่มีความเชื่อมโยงกับแหล่งน้ำนั้นด้วย (ศักดา ศรีนิเวศน์, 2547)

2.2.9 การสลายตัวในสิ่งแวดล้อม

เอ็นโดซัลแฟนที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม มักจะเกิดการเปลี่ยนรูปโดยกระบวนการทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ ให้เป็นสารเมทาโบไลท์รูปต่างๆ โดยการฟอร์มตัวจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ทั้งนี้เอ็นโดซัลแฟนเบตาไอโซเมอร์ จะมีความคงตัวในสิ่งแวดล้อมมากกว่าอัลฟาไอโซเมอร์ ซึ่งระเหยได้ง่าย และสลายตัวเร็วกว่า (Goebel และคณะ, 1982)

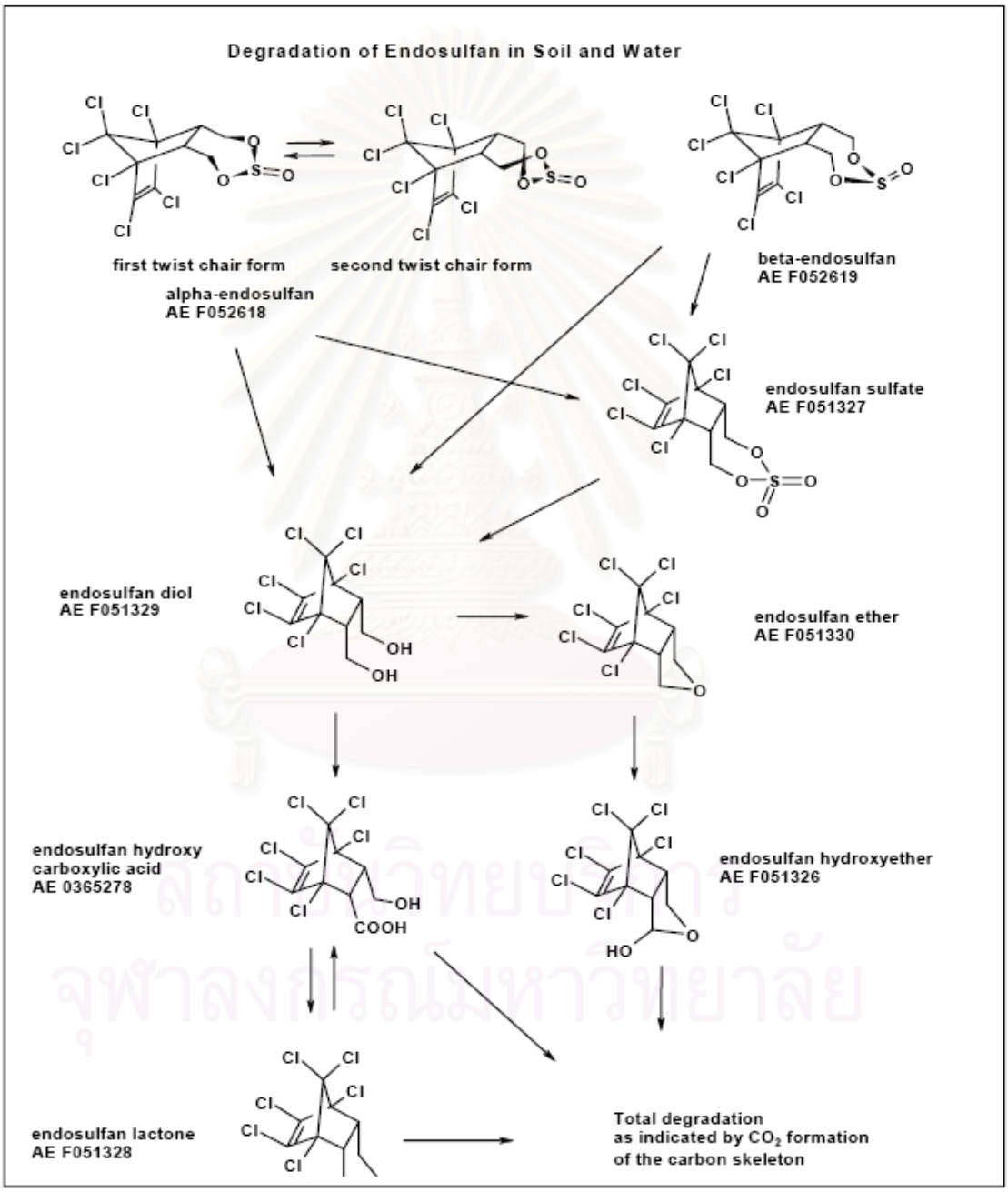
1) การย่อยสลายทางกายภาพ

การสลายตัวโดยแสง (photodecomposition) นับเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดรวมทั้งเอ็นโดซัลแฟน แต่ปริมาณที่สลายตัวอาจไม่มาก เนื่องจากเกิดขึ้นได้เฉพาะส่วนที่อยู่ผิวดินที่มิได้คลุกเคล้าเข้ากับดิน และส่วนที่เคลื่อนขึ้นสู่ผิวดินโดยแรงดึงดูดของน้ำ (capillary) ในฤดูแล้ง นอกจากนี้ เอ็นโดซัลแฟนเป็นสารเคมีที่ไม่ได้มีการดูดซับพลังงานแสงจากดวงอาทิตย์เพื่อย่อยสลายตัวมันเองมากนัก ทั้งนี้หากมีการสลายตัวของเอ็นโดซัลแฟนโดยแสงมักเกิดจากรังสีเหนือม่วง (ultraviolet) เป็นสำคัญ โดยจะถูกสลายภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ถ้าแหล่งน้ำมีสภาพเป็นกรด เอ็นโดซัลแฟนจะถูกย่อยสลายภายในระยะเวลา 5 เดือน ซึ่งช้ากว่าในสภาวะที่น้ำเป็นกลางที่ใช้เวลาเพียง 5 สัปดาห์ โดยกลไกการสลายตัวโดยแสงจะเริ่มจากพลังงานจากรังสีจะถูกดูดซับโดยโมเลกุลของสารทำให้อิเล็กตรอนอยู่ในสถานะกระตุ้น (excited state) จนเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลได้ ซึ่งทำให้เอ็นโดซัลแฟนมีโครงสร้างซับซ้อนน้อยลง ส่งผลให้มีการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ติดตามมา

2) การย่อยสลายทางเคมี

ปฏิกิริยาทางเคมีที่มีผลต่อการสลายตัวของเอ็นโดซัลแฟนเป็นสารเมทาโบไลท์รูปอื่นๆ ที่สำคัญมีอยู่ 2 ชนิด คือ ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative reaction) และปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolytic reaction) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นการออกซิไดซ์เอ็นโดซัลแฟนซึ่งเป็นสารตั้งต้นให้เปลี่ยนรูปไปเป็นเมทาโบไลท์หลักคือ เอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต ซึ่งเป็นเมทาโบไลท์ที่มีความเป็นพิษ และความคงตัวในสิ่งแวดล้อมสูงกว่าเอ็นโดซัลแฟนมาก ในทางตรงกันข้ามปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำ จะเป็นการเปลี่ยนรูปของเอ็นโดซัลแฟนให้เป็นเมทาโบไลท์ที่มีพิษและมีความคงตัวในสิ่งแวดล้อมน้อยลง ซึ่งก็คือ เอ็นโดซัลแฟนไดออล ทั้งนี้ ปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำของเอ็นโดซัลแฟนจะมีแนวโน้มสูงขึ้น เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เพิ่มขึ้น โดยครึ่งชีวิต

ของเอ็นโดซัลแฟนจะอยู่ที่ 10-20 วัน เมื่อมีค่า pH เท่ากับ 7 ในขณะที่ครึ่งชีวิตจะมีค่าประมาณ 0.2 วัน เมื่อมี pH เท่ากับ 9 ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำจึงนับว่าเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในกระบวนการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน เมื่อนำมาพิจารณาร่วมกับค่า pH โดยจะได้เอ็นโดซัลแฟนไดออลเป็นสารเมทาโบไลท์หลักที่สำคัญของการย่อยสลายโดยปฏิกิริยาดังกล่าว



ภาพที่ 2.2 วิถีการย่อยสลายของเอ็นโดซัลแฟนในดินและน้ำ (German Federal Environment Agency, 2004)

3) การย่อยสลายทางชีวภาพ

การย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) คือ กระบวนการทางชีวเคมีในการทำให้เกิดการแตกสลายของสารอินทรีย์ต้นแบบที่มีโครงสร้างซับซ้อน ไปเป็นสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลเล็กลง โดยอาศัยสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ ซึ่งอาจสารที่มีความเป็นพิษมากขึ้นหรือลดลง (Arienti และคณะ, 1988) ทั้งนี้ในการย่อยสลายทางชีวภาพของสารพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งเอ็นโดซัลแฟน มักเกิดขึ้นโดยปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ ซึ่งมีดังต่อไปนี้ (กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา, 2543)

ก. สภาพแวดล้อมของการเจริญของจุลินทรีย์

ปัจจัยเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นแหล่งพลังงาน แหล่งธาตุคาร์บอน แหล่งวิตามิน-เกลือแร่ อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญ เป็นต้น

ข. การเคยสัมผัสกับสารแปลกปลอม

การที่จุลินทรีย์เคยสัมผัสกับสารแปลกปลอมนั้นๆ มาก่อน จะเป็นการลดระยะเวลาในการปรับตัวที่เรียกว่า metabolic adaptation ในระยะ lag phase โดยทำให้การผลิตเอนไซม์ที่จะใช้เพื่อการย่อยสลายดำเนินไปได้ดี และเป็นการเร่งอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพให้เร็วขึ้น

ค. ปริมาณเริ่มต้นของจุลินทรีย์ที่จำเพาะต่อการย่อยสลาย

หากปริมาณเริ่มต้นของจุลินทรีย์ที่จำเพาะการย่อยสลายมีมาก ก็จะทำให้มีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่มาก และอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพก็จะเกิดขึ้นได้ดี

ง. ระดับความเข้มข้นของสารแปลกปลอม

จุลินทรีย์แต่ละชนิด จะมีระดับความเข้มข้นของสารแปลกปลอมที่ยอมรับได้ ระดับความเข้มข้นของสารแปลกปลอมที่สูงกว่าระดับที่ยอมรับได้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ แต่ในทางตรงกันข้ามหากระดับความเข้มข้นของสารแปลกปลอมต่ำเกินไป การปรับตัวของจุลินทรีย์ต่อสารแปลกปลอมนั้นๆ ก็จะไม่เกิดขึ้น

จ. ลักษณะสมบัติของสารแปลกปลอม

ลักษณะสำคัญของสารแปลกปลอมที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายทางเคมีและทางกายภาพ ได้แก่ โครงสร้างโมเลกุล และการละลายน้ำ โดยสารแปลกปลอมที่โครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับสารที่มีอยู่ในธรรมชาติ จะเกิดการย่อยสลายได้ง่ายกว่าสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน จะมีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพที่ช้ากว่าอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน ด้านสมบัติการละลายน้ำ สารแปลกปลอมที่ละลายน้ำได้ดีกว่าจะมีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพที่สูงกว่า เนื่องจากสามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายเช่นเดียวกับสารอาหารที่ละลายอยู่รอบๆ เซลล์

ตารางที่ 2.1 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายของจุลินทรีย์ (Vidali, 2001)

Parameters	Condition required for microbial growth/activity
Soil moisture	25-28% of water holding capacity
Soil pH	5.5-8.8
Oxygen content	Aerobic, minimum air-filled pore space of 10%
Nutrient content	N and P for microbial growth
Temperature (°C)	15-45
Contaminants	Not too toxic
Heavy metals	Total content 2000 ppm
Type of soil	Low clay or silt content

2.3 ราในธรรมชาติ

ราเป็นจุลินทรีย์ที่มีการดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมในสภาวะที่หลากหลาย เช่น สภาวะการเป็นปรสิต (parasitism) สภาวะการอยู่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (mutualism หรือ symbiosis) หรือสภาวะการเป็นผู้ย่อยสลาย (saprophytic) (อนุเทพ ภาสุระ, 2541) ซึ่งทั้งหมดต้องการแหล่งพลังงาน และคาร์บอนจากสารอินทรีย์ จึงทำให้ในธรรมชาติพบการดำรงอยู่ของราหลากหลายรูปแบบ

ดินนับว่าเป็นแหล่งอาศัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งราได้เป็นอย่างดี ราดินพบมากบริเวณผิวหน้าดิน ส่วนดินชั้นล่างปริมาณจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายๆ อย่าง เช่น ความชื้นของดิน การหมุนเวียนของอากาศในดิน ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ รวมไปถึงสารอินทรีย์ที่อยู่ในดิน โดยราที่อาศัยอยู่ในดินส่วนใหญ่มีการเจริญอยู่ในรูปของเส้นใย (hypha) อาจพบในสภาพที่มีการสร้างสปอร์ (spore) หรือสภาพที่มีการเจริญเป็นเซลล์เดียว เช่น ยีสต์ (yeast) เป็นต้น ดังนั้น ราที่พบในดินจึงมีสายพันธุ์ที่หลากหลาย ตั้งแต่ราชั้นต่ำพวกราเมือก (slime mold) ไปจนถึงราชั้นสูงกลุ่ม Eumycota (true fungi) ถึงแม้ว่าราในดินจะพบในจำนวนที่น้อยกว่า

แบคทีเรีย (bacteria) และแอกทิโนมัยซีท (actinomycetes) โดยปริมาณที่พบในดิน 1 กรัม มีประมาณ 10^5 – 10^6 เซลล์ แต่ปริมาณชีวมวลของราปกติจะมีมากที่สุด (500 – 5,000 กิโลกรัม ต่อเฮกตาร์) เนื่องจากการมีเส้นใยขนาดใหญ่ที่เติบโต และแผ่ขยายออกไปสู่แหล่งอาหารใหม่ได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ รามีความสามารถในการเจริญในดินที่มีสภาพเป็นกรดได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จึงนับว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นผู้ย่อยสลายสารในดิน และยังสามารถย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน เพื่อเปลี่ยนให้เป็นองค์ประกอบของเซลล์ได้ (ยงยุทธ โอสถสภา และคณะ, 2541) ทั้งนี้ ราในดินที่มีรายงานว่า สามารถย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนอย่างเอ็นโดซัลแฟนได้ ได้แก่ ราในสกุล *Trichoderma* (Katayama และ Matsumura, 1993), *Aspergillus* (Mukherjee และ Gopal, 1994), *Mucor* (Shetty และคณะ, 2000), *Fusarium* (Siddique และคณะ, 2003) และ *Cladosporium* (Mukherjee และ Mittal, 2005)

กลุ่มของราและเห็ดบนซากพืชในป่าธรรมชาติ ที่มีความสามารถในการย่อยมวลสารโมเลกุลสูงได้ ได้แก่ ราไวต์รอต (white rot fungi) เป็นราที่จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota และ Ascomycota (Akhtah, Kirk และ Blanchette, 1999) รากลุ่มนี้ในธรรมชาติต้องสลายลิกนิน เพื่อนำเอาเซลลูโลสที่อยู่ในเนื้อไม้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยสามารถสลายลิกนินได้สมบูรณ์ซึ่งแตกต่างจากราในกลุ่มบราวน์รอต (brown rot fungi) และแบคทีเรีย ที่ไม่สามารถสลายลิกนินได้สมบูรณ์ ด้วยเหตุนี้ จึงมีการนำราไวต์รอตมาใช้ในการเปลี่ยนสภาพสารประกอบบางชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับลิกนิน เพื่อไม่ให้เป็นอันตรายกับสิ่งแวดล้อม เช่น สารปรุงแต่งเชื้อเพลิง (fuel additives) กลุ่มสารเบนซิน (Benzene) PAH (Polycyclic aromatic hydrocarbon) สีย้อมสังเคราะห์ (synthetic dyes) รวมทั้งสารกำจัดแมลงในกลุ่มคลอรีนอินทรีย์ และฟอสเฟตอินทรีย์ เป็นต้น (Pointing, 2001) โดยในส่วนของการใช้ราไวต์รอตเพื่อย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนนั้น มีรายงานว่า ราไวต์รอตในสกุล *Phanerochaete* (Kullman และ Matsumura, 1996) และ *Pleurotus* (Hernandez-Rodrigues และคณะ, 2006) มีความสามารถในการย่อยสลายสารดังกล่าวได้ ทั้งนี้ ในการคัดเลือกกลุ่มของราไวต์รอตที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินออกจากกลุ่มราอื่นๆ ในธรรมชาติ อาจใช้วิธีการใช้กรดแทนนิก (Tannic acid) ซึ่งถูกริเริ่มโดย Bavendamm (1928) ที่ค้นพบว่า ราจะสร้างโซนสีน้ำตาลในวุ้นอาหารที่เติมกรดแทนนิก 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ phenollic acid (Freitag และ Morrell, 1992) ต่อมาในช่วงปีค.ศ.1960 ได้พัฒนาการใช้สารคาร์บอนที่ทำการติดฉลากด้วยไอโซโทป ^{14}C label lignin (Crawford, Crawford และ Pometto, 1985) เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายลิกนินมาย่อยสลาย ^{14}C label lignin ไปเป็น $^{14}CO_2$ ซึ่งการวิเคราะห์โดยใช้สารคาร์บอนที่ทำการติดฉลากด้วยสารรังสีนี้ ถึงแม้ว่าจะติดตามผลได้ค่อนข้างรวดเร็ว แต่ขั้นตอนการเตรียมคาร์บอนที่ติดฉลากด้วยสารรังสีนั้นมีความยุ่งยากซับซ้อน และมีราคาแพง จึงได้มีการคิดค้น

วิธีใหม่โดยใช้สีย้อมสังเคราะห์ประเภทโพลีเมอริกเป็นสารตั้งต้น (Glenn และ Gold, 1983) ซึ่งโครงสร้างประกอบไปด้วยวงแหวนอะโรมาติกหลายๆ วงต่อกัน ซึ่งเตรียมให้อยู่ในรูปที่มีความบริสุทธิ์ได้ง่ายกว่า มีความคงตัวสูง ความเป็นพิษต่ำ ละลายน้ำได้ดี มีราคาไม่แพง และตรวจวัดติดตามผลได้ง่าย โดยวัดจากการดูดกลืนแสง (Gold, Glenn และ Alic, 1988) และตรวจวัดโซนของสีที่เปลี่ยนไปบนอาหารที่ผสมด้วยสีย้อมโพลีเมอริก ซึ่งแบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่ Poly B, Poly R และ Poly Y ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกัน แต่การเรียงตัวเลข และแขนงที่มาต่อกับวงแหวนอะโรมาติกแตกต่างกัน สีย้อมชนิด Poly B เมื่อถูกย่อยสลาย จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองทอง สีย้อมชนิด Poly R เมื่อถูกย่อยสลายจะเปลี่ยนจากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง และสีย้อมชนิด Poly Y เมื่อถูกย่อยสลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียวอมเหลือง (Glenn และ Gold, 1983)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการนำหลักการเรื่องการย่อยสลายทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้กับการแก้ปัญหาสารพิษต่างๆ ที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งเอ็นโดซัลแฟน ได้ทำให้เกิดงานวิจัยต่างๆ ที่มีวัตถุประสงค์ร่วมกันในการที่จะทำให้เอ็นโดซัลแฟนเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็นสารเมทาโบไลท์ที่มีความคงตัวในสิ่งแวดล้อมและมีพิษน้อยลง ซึ่งจากงานวิจัยต่างๆตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันพบว่า ราหลากหลายสายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งจุลินทรีย์บางชนิด มีความสามารถในการย่อยสลายสารดังกล่าว ดังปรากฏในงานวิจัยต่อไปนี้

Martens (1976) ได้คัดเลือกราในดิน และตะกอน 16 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ ^{14}C – labeled material เพื่อตรวจสอบการฟอร์มตัวของ $^{14}CO_2$ และปริมาณของสารเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้น โดยราดินทั้ง 16 ชนิด สามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยสารเมทาโบไลท์หลัก (major metabolite) ที่เกิดขึ้น ได้แก่ เอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ซัลไฟท์ (sulfite group) และเอ็นโดซัลแฟนไดออล ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในพันธะเอสเทอร์ (ester bond) นอกจากนี้ยังมีการฟอร์มตัวของเอ็นโดไฮดรอกซีอีเธอร์ (Endohydroxyether) เกิดขึ้นเล็กน้อย และ $^{14}CO_2$ ที่ตรวจพบ มีปริมาณน้อยมาก ซึ่งแสดงถึงสภาวะในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนที่ยังไม่สมบูรณ์

จากงานวิจัยต่อมา พบว่า ราสายพันธุ์ *Trichoderma harzianum* ซึ่งเป็นราในดิน สามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ โดยเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไปเป็นเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต และเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสต่อไปเป็นเอ็นโดซัลแฟนไดออล ซึ่งเป็นรูปที่มีความเป็นพิษ และทนทานในสิ่งแวดล้อมน้อยลง (Katayama และ Matsumura, 1993) เช่นเดียวกับรา *Aspergillus niger* ที่สามารถย่อย

เอ็นโดซัลแฟนเบตาไอโซเมอร์ได้ถึง 98.6 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 15 วัน โดยเบตาไอโซเมอร์นี้ มีความคงทนในสิ่งแวดล้อม และมีครึ่งชีวิตยาวนานกว่าอัลฟาไอโซเมอร์มาก (Mukherjee และ Gopal, 1994)

Kullman และ Matsumura (1996) ได้ศึกษาถึงการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยราไวต์รอต *Phanerochaete chysosporium* โดยพิจารณาจากสารเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้น และวิถีในการเปลี่ยนรูป (pathway) ซึ่งพบว่า ราดังกล่าวมีวิถีในการย่อยสลายที่แตกต่างกัน 2 ทาง คือ oxidative pathway ที่มีการเปลี่ยนเอ็นโดซัลแฟน เป็นเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต ซึ่งเป็นสารที่มีความคงทนในสิ่งแวดล้อม และเป็นพิษมากกว่าเอ็นโดซัลแฟน ทั้งนี้ จึงได้มีการเติม 100 ไมโครกรัมของ Piperonyl butoxide ซึ่งเป็น cytochrome P-450 inhibitor ชนิดหนึ่งลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไปเป็นเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต และทำให้เกิดวิถีการย่อยสลายทางที่ 2 คือ hydolytic pathway ที่มีการเปลี่ยนเอ็นโดซัลแฟนไปเป็นเอ็นโดซัลแฟนไดออล และสารเมทาโบไลท์รูปอื่นที่มีความเป็นพิษน้อยลง

Awasthi, Manickam และ Kumar (1997) ได้ศึกษาการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของแบคทีเรียเจริญร่วม (coculture) พบว่า เกือบ 50 เปอร์เซ็นต์ของเอ็นโดซัลแฟนถูกย่อยสลายลง ณ วันที่ 7 ของการบ่มเชื้อ และเมื่อถึงวันที่ 15 เอ็นโดซัลแฟนถูกย่อยเกือบทั้งหมด พร้อมๆ กับมวลที่เพิ่มขึ้นของแบคทีเรียเมื่อเวลาผ่านไป การย่อยสลายเบตาเอ็นโดซัลแฟนเกิดขึ้นช้ากว่าอัลฟาเอ็นโดซัลแฟน โดยการย่อยสลายนั้น เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดีฮาโลจิเนชัน (dehalogination) ซึ่งตรวจสอบจากคลอไรด์ไอออนที่ถูกปลดปล่อยออกมา โดยเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายซึ่งทดสอบโดยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) คือ เอ็นโดซัลแฟนไดออล และเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต ทั้งนี้ปริมาณของเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟตมีน้อยมาก นอกจากนี้ยังพบว่า กลูโคส (glucose) ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการย่อยเอ็นโดซัลแฟนแต่อย่างใด ในขณะที่ซัคซิเนต (succinate) จะเป็นตัวยับยั้งการย่อยได้เกือบ 50 เปอร์เซ็นต์

Guerin (1999) ได้ศึกษาการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในสภาพอับอากาศโดยแบคทีเรียท้องถิ่นที่อาศัยในดิน และในตะกอนที่มีปริมาณออกซิเจนน้อย จากหลุมหมักของเสียเคมีทางการเกษตรในไร่ฝ้าย พบว่า การใช้แบคทีเรียร่วมกันหลายสายพันธุ์ (mixed culture) สามารถย่อยสลายอัลฟาเอ็นโดซัลแฟนให้เป็นเอ็นโดซัลแฟนไดออล ซึ่งเป็นเมทาโบไลท์ที่มีความเป็นพิษน้อยลง ภายใต้สภาวะอับอากาศ และสภาวะก๊าซมีเธน (methanogenic condition) ภายในระยะเวลา 30 วัน เชื้อสามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ 85 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้มีการควบคุมสภาวะของชุดทดลองให้เป็นแบบอับอากาศโดยใช้ Teflon-lined butyl rubber เป็นตัวผนึกกันอากาศ เนื่องจากวัสดุชนิดนี้จะไม่ดูดซับ และป้องกันการระเหยของสารที่สามารถระเหยได้จากการทดลอง นอกจากนี้การใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแบบไร้ออกซิเจนจะช่วยลดการสูญเสียทางชีวภาพ

จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นระหว่างการทดลอง ซึ่งทำให้การย่อยสลายทางชีวภาพเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ที่สุด

Awasthi, Ahuja และ Kumar (2000) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนที่ตกค้างในดิน โดยแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนของเอ็นโดซัลแฟน พบว่า ปัจจัยต่างๆ ดังกล่าว ได้แก่ การเพิ่มปริมาณของแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ปริมาณความชื้นในดิน และปริมาณความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน โดยที่การย่อยสลายจะเกิดเร็วขึ้นในดินเปียกหรือดินที่มีความชื้นสูง และจะถูกยับยั้งจากการเพิ่มแหล่งคาร์บอนชนิดโซเดียมอะซิเตตและโซเดียมซัคซิเนต ไม่พบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในสภาวะที่เป็นกรดสูง และอัตราการย่อยสลายจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้น เมื่อ pH เพิ่มขึ้น โดยค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดต่อการย่อยจากการทดลองนี้คือ 8.5 และจะทำให้เอ็นโดซัลแฟนจะเปลี่ยนรูปไปเป็นเอ็นโดซัลแฟนไดออล นอกจากนี้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอ็นซัลแฟนสูงถึง 5 มิลลิกรัมต่อกรัมของดิน พบว่า แบคทีเรียมีอัตราการย่อยสูงที่สุด ทั้งนี้เมื่อได้ทดลองเพิ่มการจำนวนเชื้อ ก็มิได้เพิ่มอัตราการย่อยสลายแต่อย่างใด

Shetty และคณะ (2000) ได้ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของเอ็นโดซัลแฟน โดยรา *Mucor thermohyalospora* MTCC 1384 ซึ่งทดลองเลี้ยงในอาหาร Czapek-Dox nutrient medium ที่ควบคุมปริมาณแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์เมทาโบไลท์โดยใช้ Thin Layer Chromatography (TLC) และ Gas Chromatography - Electron Capture Detector (GC - ECD) พบว่า ราดังกล่าวสามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ 78 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 20 วัน โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปของเอ็นโดซัลแฟนไปเป็นสารเมทาโบไลท์ 2 ชนิด คือ เอ็นโดซัลแฟนไดออล และเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต ที่ 80 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้ ปริมาณของเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟตที่เกิดขึ้นไม่มีนัยสำคัญแต่อย่างใด

Sutherland และคณะ (2000) ได้ศึกษาถึงการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนโดยแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่คัดแยกมาจากดินที่มีประวัติการใช้เอ็นโดซัลแฟน โดยใช้เอ็นโดซัลแฟนเป็นแหล่งซัลเฟอร์ จากผลการศึกษา ไม่พบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมเอ็นโดซัลแฟน โดยการย่อยเอ็นโดซัลแฟนมีความสัมพันธ์กับการเจริญของแบคทีเรีย สารประกอบที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายมีทั้งที่มาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและไฮโดรไลซิส ทั้งนี้ ปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เกิดขึ้นกับการย่อยอัลฟาเอ็นโดซัลแฟน ทำให้ได้เอ็นโดซัลแฟนซัลเฟตเป็นเมทาโบไลท์สุดท้าย ในขณะที่ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะได้เอ็นโดซัลแฟนโมโนอัลดีไฮด์ (Endosulfan monoaldehyde) ซึ่งตรวจสอบจาก Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) และเมื่อบ่มเชื้อในสภาวะเดิม โมโนอัลดีไฮด์จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นเอ็นโดซัลแฟนไฮดรอกซีอีเธอร์ และเมทาโบไลท์อื่นที่มีขั้ว ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยลง จากการศึกษาต่อมาพบว่า การใช้ cytochrome P-450 ไม่สามารถช่วยยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอ็นโดซัลแฟนไปเป็นเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟตได้เลย

Kwon และคณะ (2002) ได้คัดแยกแบคทีเรียในดินจากแหล่งต่างๆ โดยใช้เอ็นโดซัลแฟนเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสามารถแยกได้ 40 สายพันธุ์ โดย *Klebsiella pneumoniae* KE-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน โดยมีอัตราการย่อยอยู่ที่ 8.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อวัน และเมื่อบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 93.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน พบว่า แบคทีเรียดังกล่าวไม่มีการเปลี่ยนรูปเป็นเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟตแต่อย่างใด ซึ่งหมายถึง เชื้อไม่ได้มีวิถีการย่อยแบบออกซิเดทิฟ (non-oxidative pathway)

Awasthi และคณะ (2003) ได้ศึกษาการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนโดยแบคทีเรีย *Bacillus* สองสายพันธุ์ร่วมกัน โดยได้มีการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนอัลฟา และเบตาไอโซเมอร์ทั้งแบบแยกการย่อยสลายของแต่ละไอโซเมอร์ และแบบที่ได้ทดลองการย่อยร่วมกันทั้งสองไอโซเมอร์ พบว่า ได้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนทั้งสองไอโซเมอร์ จะเกิดการเปลี่ยนรูปเป็นเอ็นโดซัลแฟนไดออล และเอ็นโดซัลแฟนแลกโตน (Endosulfan lactone) นอกจากนี้ จากการทดลองไม่สามารถสังเกตเห็นการสะสมของเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต

Lee และคณะ (2003) ได้ศึกษาบทบาทของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 2 สายพันธุ์คือ *Anabaena* sp. PCC 7120 และ *Anabaena flos-aquae* ที่มีผลต่อการเปลี่ยนรูปของเอ็นโดซัลแฟนที่มีการตกค้างในดิน โดย *Anabaena* sp. PCC 7120 สามารถเปลี่ยนรูปเอ็นโดซัลแฟน เป็นสารประกอบเมทาโบไลท์หลัก คือ เอ็นโดซัลแฟนไดออลได้มากที่สุด ตรวจพบการเปลี่ยนรูปเป็นเอ็นโดซัลแฟนไฮดรอกซีอีเธอร์ และเอ็นโดซัลแฟนแลกโตนในปริมาณเล็กน้อย และตรวจพบเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟตปริมาณน้อยมาก ในขณะที่ *Anabaena flos-aquae* ก็สามารถเปลี่ยนรูปเอ็นโดซัลแฟนไปเป็นเอ็นโดซัลแฟนไดออล และเกิดสารเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟตขึ้นเพียงเล็กน้อยเช่นเดียวกัน จากการศึกษาต่อไปพบว่า ถ้ามีการควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ที่ 7.2 จะทำให้สภาวะการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

Siddique และคณะ (2003) พบว่า รา *Fusarium ventricosum* ที่ได้คัดแยกได้จากดินสามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งอัลฟา และเบตาไอโซเมอร์ได้หมดภายในระยะเวลา 12 วันของการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยค่าคงที่ของอัตราการย่อยสลายที่ 14.22 และ 6.60 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ โดยราดังกล่าวสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในองค์ประกอบของเอ็นโดซัลแฟนเป็นแหล่งพลังงาน จนสามารถเปลี่ยนเป็นรูปที่มีความเป็นพิษน้อยลงได้ ได้แก่ เอ็นโดซัลแฟนไดออล และเอ็นโดซัลแฟนอีเธอร์ (Endosulfan ether) ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการบำบัดเอ็นโดซัลแฟนที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้

Al-Hassan, Bashour และ Kawar (2004) ได้ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของอัลฟาและเบตาเอ็นโดซัลแฟน ที่ตกค้างในดินที่มีการใช้สารอินทรีย์ในการปรับปรุงคุณภาพดินชนิดต่างๆ ได้แก่ สารอินทรีย์ส่วนเหลือจากการผลิตอาหารสัตว์ปีก ปุ๋ยคอกมูลสัตว์ปีก ปุ๋ยคอกมูลสัตว์ใน

ฟาร์ม และของเสียเทศบาล โดยนำมาผสมกับดินในอัตรา 2 เปอร์เซ็นต์ และใส่เอ็นโดซัลแฟนความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมลงไป หลังจากนั้นจึงเก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาตรวจสอบหาเอ็นโดซัลแฟนที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ ณ วันที่ 1 8 15 22 29 43 และ 57 ของการทดลองพบว่า ครึ่งชีวิตของอัลฟาเอ็นโดซัลแฟนในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์จากการผลิตอาหารสัตว์ปีกมีค่าเท่ากับ 10 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับดินที่ใส่สารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 22 วัน ส่วนครึ่งชีวิตของเบตาเอ็นโดซัลแฟนในดินที่ใส่สารอินทรีย์จากการผลิตอาหารสัตว์ปีก มีค่าเท่ากับ 22 วัน ในขณะที่ในดินที่ใส่ของเสียเทศบาล และปุ๋ยมูลสัตว์มีค่าเท่ากับ 57 และ 115 วันตามลำดับ

Sethunathan และคณะ (2004) ได้ศึกษาความสามารถของสาหร่ายในการย่อยสลายอัลฟาเอ็นโดซัลแฟน และเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและในดิน ทั้งในสภาพมีแสงและไม่มีแสง พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorococcum* sp. หรือ *Scenedesmus* sp. สามารถลดความคงทนของเอ็นโดซัลแฟนในดิน และเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟตในสภาพมีแสงได้ดีกว่าไม่มีแสง โดยสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโต นอกจากนี้ได้นำสาหร่ายสายพันธุ์ดังกล่าวมาทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว พบว่า มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนให้เป็นเมทาโบไลท์รูปอื่นๆ ได้อีก คือ เอ็นโดซัลแฟนอีเธอร์ และเอ็นโดซัลแฟนอัลดีไฮด์ อย่างไรก็ตาม เมื่อสกัดเซลล์ของสาหร่ายออกมาวิเคราะห์ ทำให้พบการตกค้างของเอ็นโดซัลแฟนและเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต จึงสรุปได้ว่า ทั้งกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ (biotransformation) และการดูดซับทางชีวภาพ (biosorption) ของสาหร่าย มีผลต่อการการบำบัดฟื้นฟูดินที่ได้รับมลพิษจากการปนเปื้อนของสารกำจัดแมลงเอ็นโดซัลแฟน

Kwon, Sohn และ Shin (2005) ได้คัดแยกแบคทีเรียในดินที่มีการปนเปื้อนของเอ็นโดซัลแฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salt medium ที่มีเอ็นโดซัลแฟน และเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบว่า แบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* KE-8 สามารถย่อยสลายได้ทั้งเอ็นโดซัลแฟน และเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต โดยเมื่อนำมาทดสอบการย่อยเอ็นโดซัลแฟนที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟตที่ความเข้มข้น 173 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามวลชีวภาพของเชื้อมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยตรวจสอบจากค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 1.9 ภายในเวลา 4 วัน และค่าคงที่การย่อยสลายของอัลฟา-เบตาเอ็นโดซัลแฟน และเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต มีค่าเท่ากับ 0.3084 0.2983 และ 0.2456 ต่อวันตามลำดับ

Mukherjee และ Mittal (2005) ได้ศึกษาถึงการบำบัดทางชีวภาพของเอ็นโดซัลแฟนโดยราดินสองสายพันธุ์ คือ *Aspergillus terreus* และ *Cladosporium oxysporum* พบว่า ราทั้งสองสายพันธุ์นี้ เริ่มมีการสร้างสารเมทาโบไลท์หลังจากบ่มเชื้อไปได้ 5 – 10 วัน ทั้งนี้ ณ วันที่ 15 ของการบ่มเชื้อ *A. terreus* และ *C. oxysporum* สามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ 91 และ 89

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่ *A. terreus* จะมีการอัตราการย่อยที่เร็วกว่า *C. oxysporum* โดยสังเกตจากระยะการทดสอบการย่อยสลาย ณ วันที่ 1 ถึงวันที่ 7

Hernandez-Rodriguez และคณะ (2006) ได้ศึกษาถึงการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในระหว่างการเพาะเลี้ยง *Pleurotus pulmonarius* โดย 96.25 เปอร์เซ็นต์ของอัลฟาไอโซเมอร์ และ 97 เปอร์เซ็นต์ของเบตาไอโซเมอร์ถูกย่อยสลายภายในระยะเวลา 15 วัน และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการทดลองออกไปจนถึง 35 วัน พบว่า เชื้อได้ย่อยสลายอัลฟาและเบตาไอโซเมอร์ได้ 99.78 เปอร์เซ็นต์ และ 99.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Kumar และ Philip (2006) ได้ศึกษาถึงการบำบัดฟื้นฟูทางชีวภาพของดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนของเอ็นโดซัลแฟน โดยการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Staphylococcus* sp., *Bacillus circulans*-สายพันธุ์ 1 และ สายพันธุ์ 2 คัดแยกจากดินบริเวณใกล้เคียงกับโรงงานผลิตสารเอ็นโดซัลแฟน โดยหลังจากการบ่มแบคทีเรียผสมทั้งสามชนิดในถังบำบัดเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า เชื้อสามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ 71.58 และ 75.88 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะมีอากาศและอับอากาศ ตามลำดับ การเติมแหล่งคาร์บอนที่มาจากเดกซ์โทรส (dextrose) ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายได้ทั้งสองสภาวะ โดยปริมาณเดกซ์โทรสที่เหมาะสมคือ 1 กรัมต่อลิตร การย่อยสลายอัลฟาเอ็นโดซัลแฟนเกิดขึ้นได้มากกว่าเบตาเอ็นโดซัลแฟนในทุกการทดลอง และจากการทดสอบประสิทธิภาพของการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในดินนั้น พบว่า เกิดขึ้นในดินทรายมากที่สุด รองลงมาคือ ดินแดง ดินหมัก และดินเหนียว ตามลำดับ

Shivaramaiah และ Kennedy (2006) ได้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน ซึ่งคัดแยกมาจากดินในไร่ฝ้าย พบว่าเชื้อสามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนเป็นเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟตโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 3 วันของการบ่มเชื้อ ทั้งนี้ได้ตรวจสอบปริมาณสารเมทาโบไลท์โดยเทคนิค Gas Chromatography

Verma และคณะ (2006) ได้ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของแบคทีเรีย *Rhodococcus* MTCC 6716 ที่คัดแยกมาจากลำไส้ของไส้เดือนดิน *Metaphire posthuma* โดยเอ็นโดซัลแฟนความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ และถูกย่อยสลายถึง 92.58 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 15 วัน นอกจากนี้ยังพบว่า การย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญของเชื้อ และการเพิ่มของคลอไรด์ไอออนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อมีความทนทานต่ออุณหภูมิที่สูงถึง 45 องศาเซลเซียส ซึ่งยังคงรักษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้เหมือนเดิม

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างราจากแหล่งต่าง ๆ

3.1.1 ราในดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก และจากพื้นที่เกษตรกรรมมีประวัติการใช้สารกำจัดแมลงเอ็นโดซัลแฟนในจังหวัดปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม จันทบุรี กาญจนบุรี สระแก้ว และนครราชสีมา โดยใส่ในถุงพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำคัดมาแยกราให้บริสุทธิ์

3.1.2 ราที่ขึ้นบนซากพืช

เก็บตัวอย่างกิ่งไม้ผุที่มีลักษณะยุ่ย น้ำหนักเบา มีเนื้อไม้สีขาว และเห็ดที่ขึ้นบนเนื้อไม้ ในถุงพลาสติกที่บรรจุซิลิกาเจล แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำเนื้อเยื่อด้านในส่วนที่ไม่ได้สัมผัสกับอากาศออกมาเพาะเลี้ยง และคัดแยกราให้บริสุทธิ์ โดยกิ่งไม้ผุและเห็ดดังกล่าว เก็บมาจากพื้นที่ป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ และอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก

3.2 การแยกเส้นใยจากราตัวอย่าง

3.2.1 การแยกราในดิน

การคัดแยกราที่อาศัยอยู่ในดินจากแหล่งต่างๆ เริ่มจากการนำตัวอย่างดินน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium (pH 7) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อความดันไอน้ำ เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นใส่เอ็นโดซัลแฟนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนด ใช้ไปเปตต์อัตโนมัติดูดสารละลายดิน 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมที่เตรียมใหม่โดยใส่เอ็นโดซัลแฟนความเข้มข้นเท่าเดิม แล้วใช้เครื่องเขย่าที่สภาวะเดิมต่ออีก 5 วัน ทั้งนี้จะทำการเลี้ยงเชื้อใน

อาหารที่เตรียมใหม่ และเขย่าที่สภาวะเดิมรวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง จากนั้นเตรียม Czapek's Dox Agar ที่มีส่วนผสมของเอ็นโดซัลแฟนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วดูดสารละลายดินจากการเขย่าครั้งที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทอาหารที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายดิน 1 มิลลิลิตร อยู่ตามลงไป หมุนวนให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายดิน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 – 3 วัน สังเกตชนิดของราที่ขึ้น แล้วทำการแยกโคโลนีเดี่ยวออกมาจนกว่าจะได้ราที่บริสุทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) จากนั้นจึงศึกษาลักษณะภายนอกของราที่แยกได้ ได้แก่ ลักษณะของเส้นใย และสีของโคโลนี แล้วเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผิวหน้าเอียง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2.2 การแยกราที่ขึ้นบนซากพืช

นำตัวอย่างเห็ด และกิ่งไม้ผุมาคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้เนื้อเยื่อด้านใน ส่วนที่ไม่ได้สัมผัสกับอากาศมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 7 วัน สังเกตการเจริญเติบโต ลักษณะภายนอกของรา ได้แก่ ลักษณะของเส้นใย และสีของโคโลนี แล้วนำราที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน หรือทดสอบความเป็นราไวต์รอต โดยเพาะเลี้ยงราดังกล่าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสี หรือสารเพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย ซึ่งได้ทำการทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่

1) การทดสอบกับอาหาร Poly-R agar clearance

นำราที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น จากนั้นใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนเส้นใยบริเวณขอบนอกของโคโลนี วางลงบนอาหาร Poly-R agar clearance บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน และสังเกตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบๆ โคโลนี ถ้าเชื้อมีแนวโน้มในการย่อยสลายได้ดี สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง

2) การทดสอบกับอาหาร Tannic acid agar

นำราที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น จากนั้นใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนเส้นใยบริเวณขอบนอกของโคโลนี วางลงบนอาหาร Tannic acid agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน และสังเกตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบๆ โคโลนี ถ้าเชื้อมีแนวโน้มในการย่อยสลายได้ดี สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลเข้ม ทำการคัดเลือกรา โดยสังเกตจากบริเวณที่เกิดการย่อยสี Poly R-478 บนอาหาร Poly-R agar clearance หรือบริเวณที่มี

การสร้างโซนสีน้ำตาลบนอาหาร Tannic acid agar แล้วเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผิวหน้าเอียง ณ อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่คัดแยกได้

3.3.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นปฐมภูมิ (Primary degradation test)

1) เตรียมเชื้อตั้งต้นสำหรับใช้ทดสอบ โดยเพาะเลี้ยงราแต่ละไอโซเลตตามที่คัดแยกได้ในข้อ 3.3.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อนำมาใช้ในการทดสอบ จะใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย

2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium (pH 7) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ดังนี้

- ชุดที่ 1: อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่ชิ้นวุ้นของเส้นใยราที่คัดแยกได้ จำนวน 5 ชิ้น
- ชุดที่ 2: อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่เอ็นโดซัลแฟน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดที่ 3: อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่เอ็นโดซัลแฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเส้นใยของราที่ตายแล้วจากการเตรียมโดยใส่ชิ้นวุ้นเส้นใยราจำนวน 5 ชิ้น ลงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) (ภาคผนวก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 20 นาที เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน (Juhasz และคณะ, 2002) แล้วนำมากรองเอาเส้นใยที่ตายแล้วมาใช้ในการทดลองชุดดังกล่าวนี้
- ชุดที่ 4: อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่เอ็นโดซัลแฟน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และชิ้นวุ้นเส้นใยของราไอโซเลตที่แยกได้จำนวน 5 ชิ้น

3) นำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน เมื่อครบกำหนด ตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง และดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากทุกชุดการทดลอง เก็บไว้

ในหลอดแก้วมีฝาเกลียวปิดที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส พร้อมกับกรองเส้นใยของราที่ตายแล้วในชุดที่ 3 นำไปสกัด และวิเคราะห์หาเอ็นโดซัลแฟนที่เหลือ รวมทั้งสารเมทาโบไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลาย โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

<u>วิธีการสกัดเอ็นโดซัลแฟน และเมทาโบไลท์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ / เส้นใยรา</u>

(ดัดแปลงจาก Sutherland และคณะ, 2000)

นำสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราที่เก็บไว้ มาใส่ในกรวยแก้วแยกสาร ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วใส่เอธิลอะซิเตตลงไปในอัตราส่วน 1:1 เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัด เขย่าให้เข้ากันประมาณ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น นำของเหลวส่วนล่างที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดอีกครั้งโดยใช้เอธิลอะซิเตตในอัตราส่วนเดิม โดยทำการสกัดทั้งหมด 5 ครั้ง จากนั้น นำสารละลาย เอธิลอะซีเตตที่ได้จากขั้นตอนการสกัดทั้งหมด มาระเหยเอาส่วนที่เป็นของเหลวออกโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน แล้วล้าง (rinse) ส่วนที่เป็นผงสีขาวก้นขวดออกด้วยเฮกเซนเก็บไว้ เพื่อนำสารที่สกัดได้นั้นไปทดสอบหาเอ็นโดซัลแฟน และเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้น โดยเทคนิค TLC

<u>วิธีการวิเคราะห์เอ็นโดซัลแฟน และเมทาโบไลท์ที่สกัดได้ โดยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)</u> (ดัดแปลงจาก Awasthi, Ahuja และ Kumar, 2000; Sutherland และคณะ, 2000)

ตัดแผ่น TLC ชนิด Aluminium Oxide60 F_{254} neutral ที่มีขนาด 20 x 20 ตารางเซนติเมตร ให้มีขนาดเล็กลง โดยแผ่นแรก ซึ่งใช้เป็นแผ่นอ้างอิง ตัดให้มีขนาด 2 x 5 ตารางเซนติเมตร แบ่งเลน (lane) ตามแนวกว้างให้แต่ละเลนมีระยะห่างจากกัน 0.5 เซนติเมตร จากนั้นหยดสารละลายมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ในเฮกเซน) ณ จุดเริ่มต้นของเลนแรก และสารละลายมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ในเฮกเซน) ณ จุดเริ่มต้นของเลนที่สอง เตรียมแผ่น TLC แผ่นต่อๆ มา โดยตัดให้มีขนาด 3 x 5 ตารางเซนติเมตร แบ่งเลนให้มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตรเช่นเดียวกัน เพื่อหยดสารที่ผ่านการสกัดแล้ว ลงบนจุดเริ่มต้นของแต่ละเลนถัดมา โดยเริ่มจากสารสกัดของชุดการทดลองที่ 1 2 3 และ 4 ของราแต่ละไอโซเลต ตามลำดับ เมื่อหยดสารสกัดครบทุกชุดการทดลองแล้ว นำแผ่น TLC ใส่ลงในโหลแก้วมีฝาปิดที่บรรจุสารละลายอิ่มตัวเฮกเซน-คลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:1 เมื่อแผ่น TLC ดูดซับสารละลายเฮกเซน-คลอโรฟอร์มขึ้นมาถึงขอบบนแล้ว นำแผ่น TLC ออก ผึ่งให้แห้ง แล้วนำมาพ่นด้วยสารละลายอิ่มตัวของซิลเวอร์ไนเตรตในเมธานอล ทิ้งไว้ให้แห้งภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร จนสามารถมองเห็นจุด (spot) ที่เกิดขึ้นบนแต่ละเลน บันทึกผล และคัดเลือกราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในขั้นปฐมภูมิ เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นทุติยภูมิต่อไป โดยพิจารณาจากตำแหน่ง spot ของสารสกัดที่ปรากฏบนแผ่น TLC เปรียบเทียบกับตำแหน่ง spot อ้างอิงของสารเอ็นโดซัลแฟนมาตรฐาน หรือพิจารณาจากค่า R_f (Retention factor) ซึ่งเป็นค่า

อัตราส่วนระหว่างระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่หยดสารถึงจุดกึ่งกลางของ spot ที่ปรากฏขึ้น ต่อระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่หยดสารถึงขอบบนของแผ่น TLC (University of Colorado at Boulder, Department of Chemistry and BioChemistry, 2006) ซึ่งแสดงเป็นสมการได้ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{Distance traveled by the compound (X)}}{\text{Distance traveled by the solvent front (Y)}}$$

3.3.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นทุติยภูมิ (Secondary degradation test)

1) เตรียมเชื้อตั้งต้นสำหรับใช้ทดสอบ โดยนำราที่ได้จากการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อนำมาใช้ในการทดสอบ จะใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย

2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium (pH 7) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ดังนี้

- ชุดที่ 1: อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่เอ็นโดซัลแฟนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดที่ 2: อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่เอ็นโดซัลแฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเส้นใยของราที่ตายแล้วจากการเตรียมโดยใส่ชิ้นวุ้นเส้นใยราจำนวน 13 ชิ้น ลงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 20 นาที เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน (Juhasz และคณะ, 2002) แล้วนำมากรองเอาเส้นใยที่ตายแล้วมาใช้ในการทดลองชุดดังกล่าวนี้
- ชุดที่ 3: อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่เอ็นโดซัลแฟน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และชิ้นวุ้นเส้นใยของรา จำนวน 13 ชิ้น

3) นำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 วัน ทั้งนี้ จะมีการเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 3 วัน ในระหว่างการบ่มเชื้อจนครบกำหนด โดยเก็บไว้ในหลอดแก้วมีฝาเกลียวปิดที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัด (วิธีการเดียวกันกับสกัดเพื่อวิเคราะห์ด้วย

เทคนิค TLC) และวิเคราะห์ความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปของเอ็นโดซัลแฟน และสารเมทาโบไลท์ โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC) นอกจากนี้ มีการตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชุด และตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในชุดที่ 3 จากน้ำหนักแห้ง ทุก 3 วันเช่นกัน

วิธีการวิเคราะห์เอ็นโดซัลแฟน และเมทาโบไลท์ที่สกัดได้โดยเทคนิค Gas Chromatography (GC)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟนในเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสารที่ผ่านการสกัดแล้วทุกชุด ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำมาฉีดวิเคราะห์ลงในเครื่อง Gas Chromatography รุ่น GC2010 ของบริษัท Shimadzu Corporation ที่มี autosampler ชนิด AOC-5000 และเครื่องตรวจวัดชนิด Electron Capture Detector (ECD) โดยคอลัมน์ที่ใช้เป็นแบบ fused silica capillary column ชนิด Rtx-5MS (stationary phase: 5% diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane) มีความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร และความหนาของฟิล์มหุ้ม 0.25 μm film การฉีดวิเคราะห์เป็นแบบ splitless โดยมีการตั้งค่าโปรแกรมอุณหภูมิดังนี้ อุณหภูมิของ injector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ detector เท่ากับ 320 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์อยู่ที่ 120 องศาเซลเซียส รักษาอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 300 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราเพิ่มอุณหภูมิเป็น 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และรักษาอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 1 นาที ใช้ฮีเลียมเป็น carrier gas(mobile phase) โดยมีอัตราไหลเท่ากับ 1.36 มิลลิลิตรต่อนาที มีโปรแกรมเวลาทั้งหมด 21 นาที เมื่อได้โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟน และสารเมทาโบไลท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ นำมาสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) แล้วเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์จากสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อที่ จะสามารถหาความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนที่ยังคงเหลือ และสารเมทาโบไลท์เอ็นโดซัลแฟนไดออลจากการย่อยสลายของราที่คัดเลือกได้

3.4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราคัดเลือกได้

3.4.1 การกำหนดสภาวะต่าง ๆ ในการทดสอบการย่อยสลาย

3.4.1.1 ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน

ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Czapek's Dox Medium ที่นำมาทดสอบได้แก่ ความเข้มข้นที่ 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.1.2 ปริมาณแหล่งอาหารคาร์บอน

ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Czapek's Dox Medium โดยแปรผันปริมาณของกลูโคสไว้ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์

3.4.1.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบคือ 4 5 6 และ 7 ซึ่งได้ใช้ไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นสารปรับค่า pH

3.4.2 การทดสอบในสภาวะต่าง ๆ ที่กำหนด

1) เตรียมเชื้อตั้งต้นสำหรับใช้ทดสอบ โดยนำราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนที่ผ่านการทดสอบในข้อ 3.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อนำมาใช้ในการทดสอบ จะใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย

2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีการผันแปรสภาวะต่างๆ ตามที่กำหนดในข้อ 4.1 ซึ่งสรุปได้ดังตารางต่อไปนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 สภาวะต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่นำมาทดสอบ

EN 50 mg/l, 0.5%GL, pH 4	EN 100 mg/l, 0.5%GL, pH 4	EN 200 mg/l, 0.5%GL, pH 4
EN 50 mg/l, 0.5%GL, pH 5	EN 100 mg/l, 0.5%GL, pH 5	EN 200 mg/l, 0.5%GL, pH 5
EN 50 mg/l, 0.5%GL, pH 6	EN 100 mg/l, 0.5%GL, pH 6	EN 200 mg/l, 0.5%GL, pH 6
EN 50 mg/l, 0.5%GL, pH 7	EN 100 mg/l, 0.5%GL, pH 7	EN 200 mg/l, 0.5%GL, pH 7
EN 50 mg/l, 2%GL, pH 4	EN 100 mg/l, 2%GL, pH 4	EN 200 mg/l, 2%GL, pH 4
EN 50 mg/l, 2%GL, pH 5	EN 100 mg/l, 2%GL, pH 5	EN 200 mg/l, 2%GL, pH 5
EN 50 mg/l, 2%GL, pH6	EN 100 mg/l, 2%GL, pH 6	EN 200 mg/l, 2%GL, pH 6
EN 50 mg/l, 2%GL, pH 7	EN 100 mg/l, 2%GL, pH 7	EN 200 mg/l, 2%GL, pH 7

<u>หมายเหตุ</u>

EN หมายถึง ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน

GL หมายถึง ความเข้มข้นของกลูโคส

3) แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ดังนี้

- ชุดที่ 1 (ชุดควบคุม): อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ตามตารางที่ 3.1 ที่ไม่ได้ใส่เชื้อทดสอบ

- ชุดที่ 2 (ชุดทดลอง): อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ตามตารางที่ 3.1 ที่ใส่ชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของราจำนวน 13 ชิ้น

4) นำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 วัน ทั้งนี้ จะมีการเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 6 วัน ในระหว่างการบ่มเชื้อจนครบกำหนด โดยเก็บไว้ในหลอดแก้วมีฝาเกลียวปิดที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปของเอ็นโดซัลแฟน โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC) ตามข้อที่ 3.3.3.2 นอกจากนี้ มีการตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชุด และตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในชุดที่ 2 จากน้ำหนักแห้ง ทุก 6 วันเช่นกัน

5) เปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในแต่ละชุดการทดลอง เพื่อประเมินสภาวะที่ราสามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ดีที่สุด

3.5. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดเลือกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค slide culture

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ทำโดยใช้เทคนิค slide culture เริ่มจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เทลงในจานเพาะเชื้อให้ระดับอาหารสูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นใช้มีดผ่าตัดจุ่มเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟ เพื่อฆ่าเชื้อ แล้วกรีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างด้านละ 5 มิลลิเมตร ยกชิ้นวุ้นที่ตัด มาวางลงตรงกลางกระจกสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบนแท่งแก้วงอในจานเพาะเชื้อ จากนั้น ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยราที่คัดเลือกไว้มาแตะบนชิ้นวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อบนกระจกสไลด์ แล้วใช้ปากคีบ คีบแผ่นปิดสไลด์จุ่มเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นำไปเผาไฟ แล้วค่อยๆ วางปิดบนชิ้นวุ้น เทน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไปในจานเพาะเชื้อ ให้มีระดับสูงประมาณครึ่งหนึ่งของแท่งแก้วงอ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเส้นใยของราเจริญจนถึงขอบแผ่นปิดสไลด์ ให้ยกแผ่นปิดสไลด์ขึ้น แล้ววางลงบนสีย้อมสไลด์ Lacto-phenol cotton blue ซึ่งหยดอยู่ตรงกลางกระจกสไลด์แผ่นใหม่ เขี่ยชิ้นวุ้นที่วางอยู่บนกระจกสไลด์แผ่นเก่าออกไป แล้วหยดสีย้อมสไลด์ Lacto-phenol cotton blue ลงไปตรงกลางกระจกสไลด์แทน ปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์แผ่นใหม่ นำสไลด์ทั้งสองแผ่นไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.6. การบ่งชี้ชนิดของราที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (Internal Transcribed Spacer)

3.6.1 การสกัดจีโนมิก DNA ของรา

นำเส้นใยของราที่คัดเลือกได้มาสกัด DNA โดยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ของ Zhou, Miwa และ Hogetsu (1999) เริ่มจากการนำเส้นใยไปบดให้ละเอียดโดยใช้โกร่ง เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงซ้ำ เพื่อล้างตัวอย่างจนของเหลวส่วนบนใส เติมสารละลาย 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แตก เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร เพื่อกำจัดโปรตีน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ลงในหลอด ไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ เติม

สารละลายคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร อีกครั้ง ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย ไอโซโพรพานอล ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แช่ในน้ำเข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนกรดนิวคลีอิก เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างตะกอนของกรดนิวคลีอิก เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัด RNA เติมสารละลาย PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือตะกอนของ DNA เติมเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างตะกอน DNA ดูดสารละลายออก ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน DNA เก็บตัวอย่าง DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.6.2 การเพิ่มจำนวน DNA ของราที่ตำแหน่ง ITS ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำ DNA ที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 ไปทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) ที่มีลำดับเบสเป็น ITS1-F (forward) และ ITS4 (reverse) ได้แก่ 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' และ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White และคณะ, 1990; Gardes และ Bruns, 1993) ตามลำดับ ทำสารละลาย PCR ให้มีปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังแสดงใน ตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X PCR buffer without $MgCl_2$	1X	1.0
2 mM dNTP mixed	0.2 mM	1.0
5u/µl *Taq* DNA polymerase	0.5 units/10µl	0.1
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	1.0
20 µM Primer I (ITS1-F)	1 µM	0.5
20 µM Primer II (ITS4)	1 µM	0.5
DNA template	-	1.0
Sterilized distilled water	-	4.9
ปริมาตรรวม		**10**

เมื่อได้ส่วนผสมทั้งหมดที่มีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร นำไปดำเนินปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง ITS ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA อัตโนมัติ (Authorized DNA thermal cycler) โดยได้กำหนดสภาวะไว้ดังต่อไปนี้

Initial denaturation	94	องศาเซลเซียส	5 นาที	
Amplification				
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	38 รอบ
Annealing	51	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72	องศาเซลเซียส	5 นาที	
Hold	4	องศาเซลเซียส		

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธีอิเลคโทรโฟเรซิส (Electrophoreses) โดยการแยกขนาดชิ้นส่วน DNA บนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตร ต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และใช้ชิ้นส่วน DNA มาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน DNA ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

ทำการโคลนชิ้นส่วน ITS โดยใช้ PCR-Script™ Amp Cloning Kit และสกัดพลาสมิดโดยใช้ FastPlasmid™ Mini Kit แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน ITS ในพลาสมิด โดยส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ ด้วยเครื่อง ABI 3730 xl automatic sequencer (Applied Biosystems, USA) ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับ ITS ของราชนิดอื่นๆ ที่ได้มีรายงานไว้ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST version 2.1 ที่จัดทำโดย The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างราจากแหล่งต่าง ๆ

4.1.1 ราในดิน

ตัวอย่างดินที่ได้เก็บเพื่อนำมาคัดแยกราจากพื้นที่ป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก และจากดินที่มีประวัติการใช้สารกำจัดแมลงเอ็นโดซัลแฟนในพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดปทุมธานี และนนทบุรี มีทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ดินป่าไผ่ อุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก
ตัวอย่างที่ 2 ดินป่าสน อุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก
ตัวอย่างที่ 3 ดินสวนคะน้า อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี
ตัวอย่างที่ 4 ดินสวนกวางตุ้ง อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี
ตัวอย่างที่ 5 ดินเลนนาข้าว อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี
ตัวอย่างที่ 6 ดินเลนนาข้าว อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
ตัวอย่างที่ 7 ดินเลนนาข้าว อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม
ตัวอย่างที่ 8 ดินสวนไม้ผล อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี
ตัวอย่างที่ 9 ดินจากป่า อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี
ตัวอย่างที่ 10 ดินเลนนาข้าว อำเภอวังสมบูรณ์ จังหวักสระแก้ว
ตัวอย่างที่ 11 ดินจากไร่สุวรรณ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

4.1.2 ราที่ขึ้นบนซากพืช

ตัวอย่างกิ่งไม้ผุ และเห็ดที่ขึ้นบนเนื้อไม้ ที่ได้เก็บมาจากพื้นที่ป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ มีจำนวน 8 ตัวอย่าง และจากอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก มีจำนวน 5 ตัวอย่าง

4.2. การแยกเส้นใยจากราตัวอย่าง

4.2.1 การแยกราในดิน

จากตัวอย่างดินที่เก็บได้ทั้ง 11 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกราออกมาเป็นไอโซเลตที่บริสุทธิ์ได้ 44 ไอโซเลต โดยมีลักษณะ และอัตราการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะและอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ในเวลา 7 วัน

ตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บ	รหัสราที่แยกได้	ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ
1	ป่าไผ่ อุทยานตากสินฯ จ. ตาก	S1	เส้นใยฟู หนาแน่น ขึ้นเป็นวง สีขาว และเหลืองอ่อน	+
		S2	เส้นใยฟู ละเอียด สีขาวอมเหลือง	+ + +
		S3	เส้นใยละเอียด ฟู ขึ้นเป็นวงสีขาวสลับม่วง	+ +
		S4	เส้นใยเนื้อหยาบ บาง ขึ้นเป็นวงสีม่วงเข้มสลับม่วงอ่อน	+ +
		S5	เส้นใยหยาบ หนาแน่น สีขาวสลับม่วง	+ +
2	ป่าสน อุทยานตากสินฯ จ. ตาก	S6	เส้นใยหยาบ หนาแน่น เป็นวงจากด้านในมีสีม่วง เหลือง ขาว	+ + +
		S7	เส้นใยค่อนข้างหยาบ ฟู ขอบแตกแขนง สีม่วง และขาว	+ +
		S8	เส้นใยหยาบ บาง กระจาย และมีสีขาว	+ + +
		S9	เส้นใยละเอียดมาก ฟู และมีสีเหลืองอ่อน	+
		S10	เส้นใยหยาบ ฟู เจริญเป็นวงสีขาวสลับส้มเหลือง	+ +
3	สวนคะน้า อ. สามโคก จ. ปทุมธานี	S11	เส้นใยละเอียดมาก ฟู มีสีเหลืองอ่อน	+ +
		S12	เส้นใยหนาหยาบ สีขาว ขอบโคโลนีเจริญแตกแขนง	+ +

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บ	รหัสราที่แยกได้	ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ
		S13	เส้นใยหนา เป็นวงสีขาวสลับม่วงอ่อน	++
		S14	เส้นใยฟู เป็นวงสีขาวสลับเหลือง	++
		S15	เส้นใยสีขาว ฟูปานกลาง ขึ้นเป็นวง	+ + +
		S16	เส้นใยสีเหลืองอ่อน ละเอียด ฟูปานกลาง และขึ้นเป็นวง	+ + +
4	สวนกวางตุ้ง อ. สามโคก จ. ปทุมธานี	S17	เส้นใยฟู ค่อนข้างหยาบ สีม่วงอมชมพู	+ + +
		S18	เส้นใยฟู ละเอียดมาก จากด้านในเป็นสีเหลือง ขาว และส้ม	+
		S19	เส้นใยหยาบ ฟู ขึ้นเป็นวงสีขาวสลับเทา	+ +
		S20	เส้นใยหยาบ มีสีขาว ยกเว้นด้านในสุดเป็นสีเขียวเข้ม	+ +
		S21	เส้นใยละเอียด ฟู สีขาว ด้านในสีเขียวเข้ม	+ +
		S22	เส้นใยเนื้อหยาบ หนาแน่น ไม่ฟู มีสีขาว	+ + +
		S23	เส้นใยเนื้อหยาบมาก ขึ้นแบบแตกแขนงเป็นวงสีขาว	+ + +
5	นาข้าว อ. บางบัวทอง จ. นนทบุรี	S24	เส้นใยเนื้อหยาบมาก ขึ้นแตกแขนงเป็นวงสีเหลืองสลับม่วง	+ +
		S25	เส้นใยเนื้อหยาบ สีขาว ขึ้นเป็นวง บางวงเป็นสีเทาเข้ม	+ + +
		S26	เส้นใยเนื้อหยาบสลับฟู สีขาว มีสีเทาขึ้นบางส่วน	+ + +
		S27	เส้นใยหยาบ ฟู สีขาวขึ้นเป็นวง	+ + +

ตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บ	รหัสราที่แยกได้	ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ
6	อ. กำแพงแสน	S28	เส้นใยส่วนล่างละเอียดสีขาว	+ + +
	จ. นครปฐม	S29	ส่วนบนขึ้นเป็นกระจุกสีเขียว	
			เส้นใยเนื้อละเอียด ฟู สีขาว	+ + +
		S30	เจริญอย่างหนาแน่น	
			เส้นใยขอบนอกสีขาว ด้านใน	+ +
		S31	สร้างสปอร์สีน้ำตาล	
			เส้นใยบางสีขาว กลางโคโลนี	+ + +
7	อ. บางเลน จ.นครปฐม	S32	ขึ้นเป็นกระจุกสีเขียว	
			เส้นใยเนื้อละเอียดสีขาว เจริญ	+ +
		S33	หนาแน่นปานกลาง	
			เส้นใยบาง สร้างสปอร์สีเขียว	+
8	อ. โป่งน้ำร้อน จ. จันทบุรี	S34	เหลืองกลางโคโลนี	
			เส้นใยละเอียด ฟู เจริญอย่าง	+ + +
		S35	หนาแน่นมาก สีขาวปนเหลือง	
			เส้นใยค่อนข้างหยาบ สีขาว	+ + +
		S36	เจริญขึ้นฟูไม่เป็นระเบียบ	
			เส้นใยเนื้อละเอียด สีขาว เจริญ	+ + +
9	อ. ศรีสวัสดิ์	S37	ขึ้นฟูอย่างหนาแน่น	
	จ. กาญจนบุรี		เส้นใยเนื้อค่อนข้างละเอียด	+ +
		S38	เจริญอย่างหนาแน่น สีขาว	
			เส้นใยเนื้อละเอียด บาง ฟู	+ + +
10	อ. วังสมบูรณ์	S39	มีสีขาวเส้นใยบางมาก มีการ	
	จ. สระแก้ว		สร้างสปอร์สีเขียวอย่างเด่นชัด	+
		S40	เส้นใยเนื้อละเอียด เจริญอย่าง	
			หนาแน่น สีขาวปนเหลือง	+ + +
		S41	เส้นใยฟูมาก เนื้อค่อนข้าง	
			หยาบ สีเขียวอ่อน	

ตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บ	รหัสราที่แยกได้	ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ
11	ไร่สุวรรณ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	S42	เส้นใยเนื้อค่อนข้างหยาบหนาแน่น สีขาวปนเหลือง	+
		S43	เส้นใยละเอียด บาง สีเหลือง มีการสร้างสปอร์	+
		S44	เส้นใยบาง เนื้อละเอียด มีสีขาว	+ +

<u>หมายเหตุ</u>

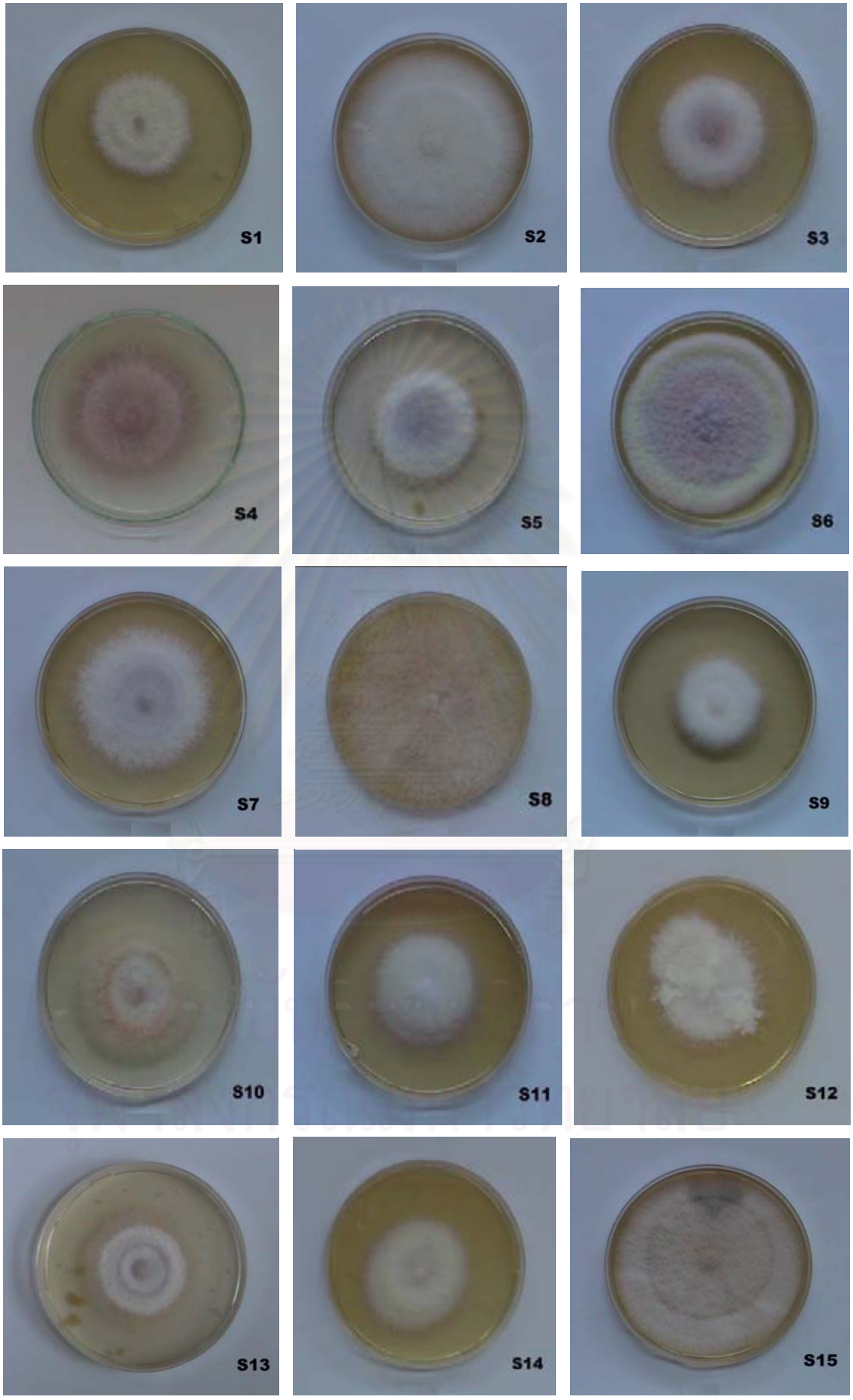
อัตราการเจริญ

+ + + หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว

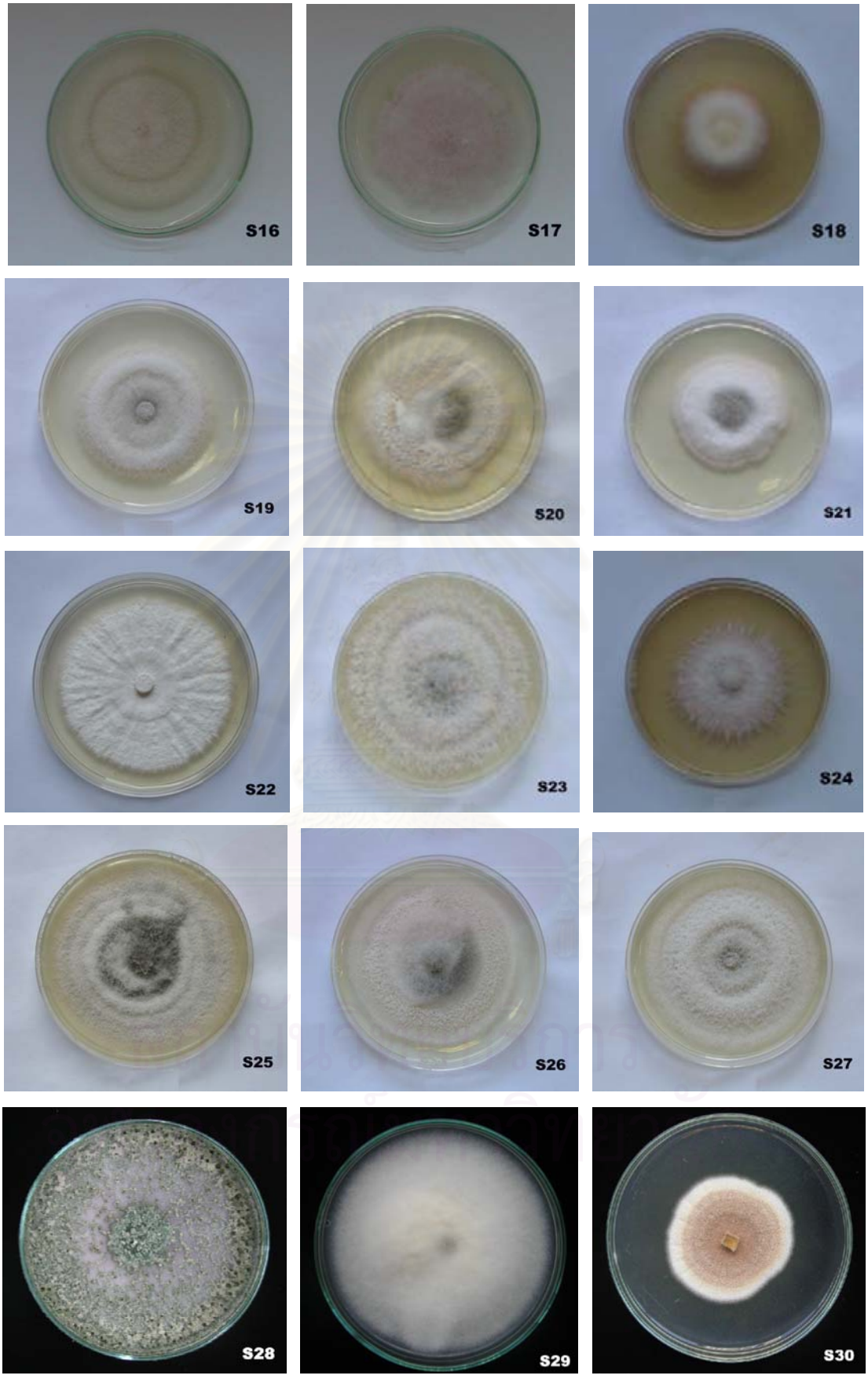
+ + หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตปานกลาง

+ หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตช้า

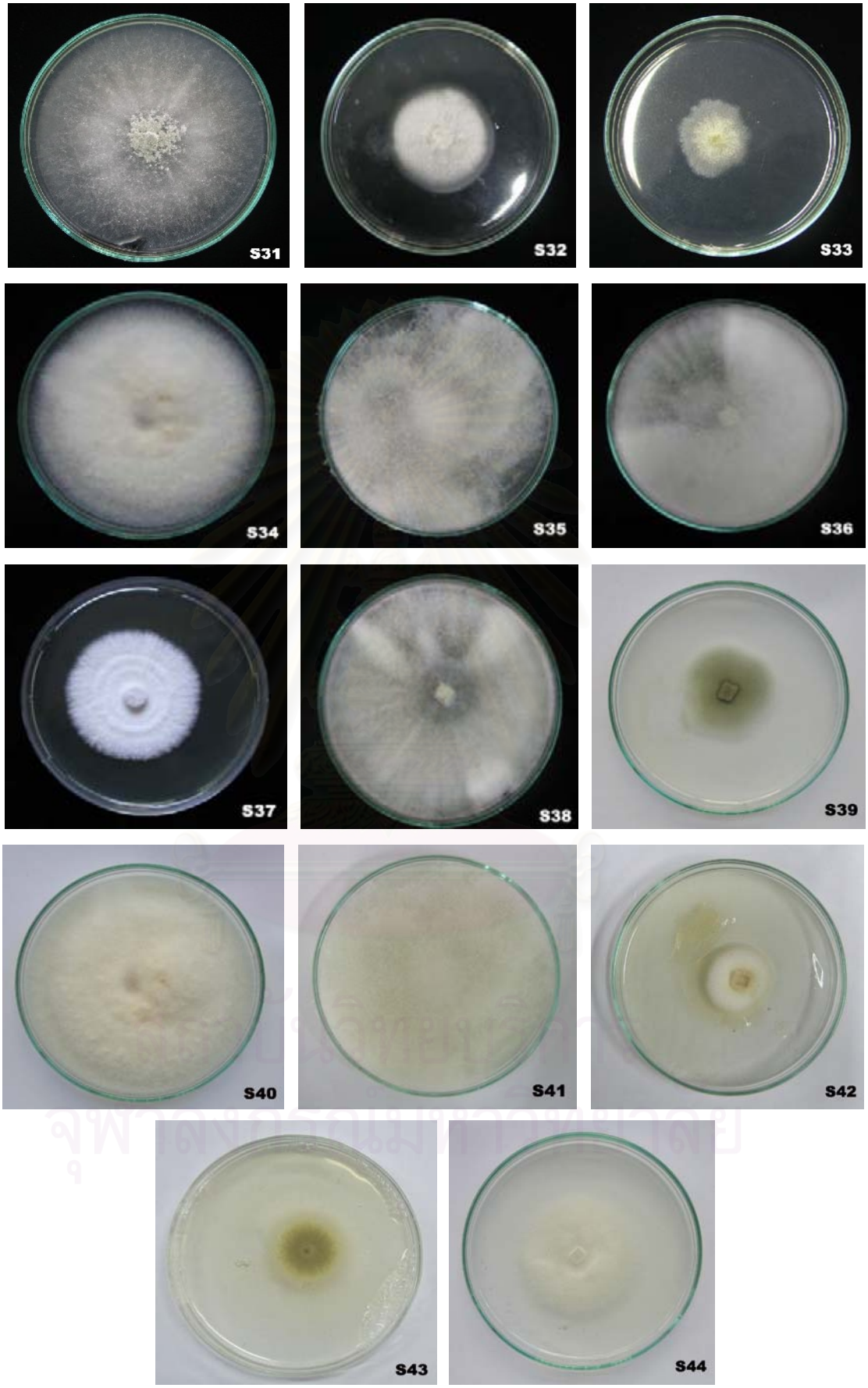
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของราดินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ บนอาหาร PDA



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของราดินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ บนอาหาร PDA (ต่อ)



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของราดินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ บนอาหาร PDA (ต่อ)

4.2.2 การแยกราที่ขึ้นบนซากพืช

จากตัวอย่างกิ่งไม้ผุ และเห็ดที่ขึ้นบนเนื้อไม้ ที่ได้เก็บมาจากพื้นที่ป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ และอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก จำนวนทั้งสิ้น 13 ตัวอย่าง สามารถนำมาแยกเนื้อเยื่อด้านในมาเพาะเลี้ยงเป็นไอโซเลตที่บริสุทธิ์ โดยมีลักษณะและอัตราการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะและอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากตัวอย่างกิ่งไม้ผุและเห็ด ในเวลา 7 วัน

ตัวอย่าง กิ่งไม้ผุ/เห็ด	สถานที่เก็บ	รหัสรา ที่แยกได้	ลักษณะเส้นใย บนอาหาร PDA	อัตรา การเจริญ
1	อุทยานดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่	W1	เส้นใยขึ้นบางๆ ละเอียด และมีสีขาว	+ + +
2	อุทยานดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่	W2	เส้นใยละเอียด ขึ้นอย่างหนาแน่นเป็นวงสีขาว	+ +
3	อุทยานดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่	W3	เส้นใยบาง สีขาว ด้านในเจริญหนาแน่นกว่าด้านนอก	+ + +
4	อุทยานดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่	W4	เส้นใยหยาบ สีขาว ด้านในหนาแน่นกว่าด้านนอกมาก	+ +
5	อุทยานดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่	W5	เส้นใยละเอียด สีขาว เจริญอย่างหนาแน่นสม่ำเสมอ	+ + +
6	อุทยานดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่	W6	เส้นใยหยาบ สีขาว เจริญหนาแน่นด้านใน	+ +
7	อุทยานดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่	W7	เส้นใยละเอียด สีขาวอมเหลือง	+ + +
8	อุทยานดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่	W8	เส้นใยหยาบ สีขาว เจริญหนาแน่นเป็นวง	+ + +
9	อุทยานตากสินฯ จ. ตาก	W9	เส้นใยค่อนข้างหยาบ สีขาว เจริญเป็นกระจุกด้านใน	+ +
10	อุทยานตากสินฯ จ. ตาก	W10	เส้นใยหนา ละเอียด และมีสีขาว	+ +

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ตัวอย่าง กิ่งไม้ผุ/เห็ด	สถานที่เก็บ	รหัสรา ที่แยกได้	ลักษณะเส้นใย บนอาหาร PDA	อัตรา การเจริญ
11	อุทยานตากสินฯ จ. ตาก	W11	เส้นใยลักษณะย่น หนา มีสีขาว	+
12	อุทยานตากสินฯ จ. ตาก	W12	เส้นใยละเอียด บาง ฟู ด้านในสีน้ำตาล ด้านนอกสีขาว	+
13	อุทยานตากสินฯ จ. ตาก	W13	เส้นใยละเอียด ค่อนข้างหนา มีสีขาว	+ + +

<u>หมายเหตุ</u>

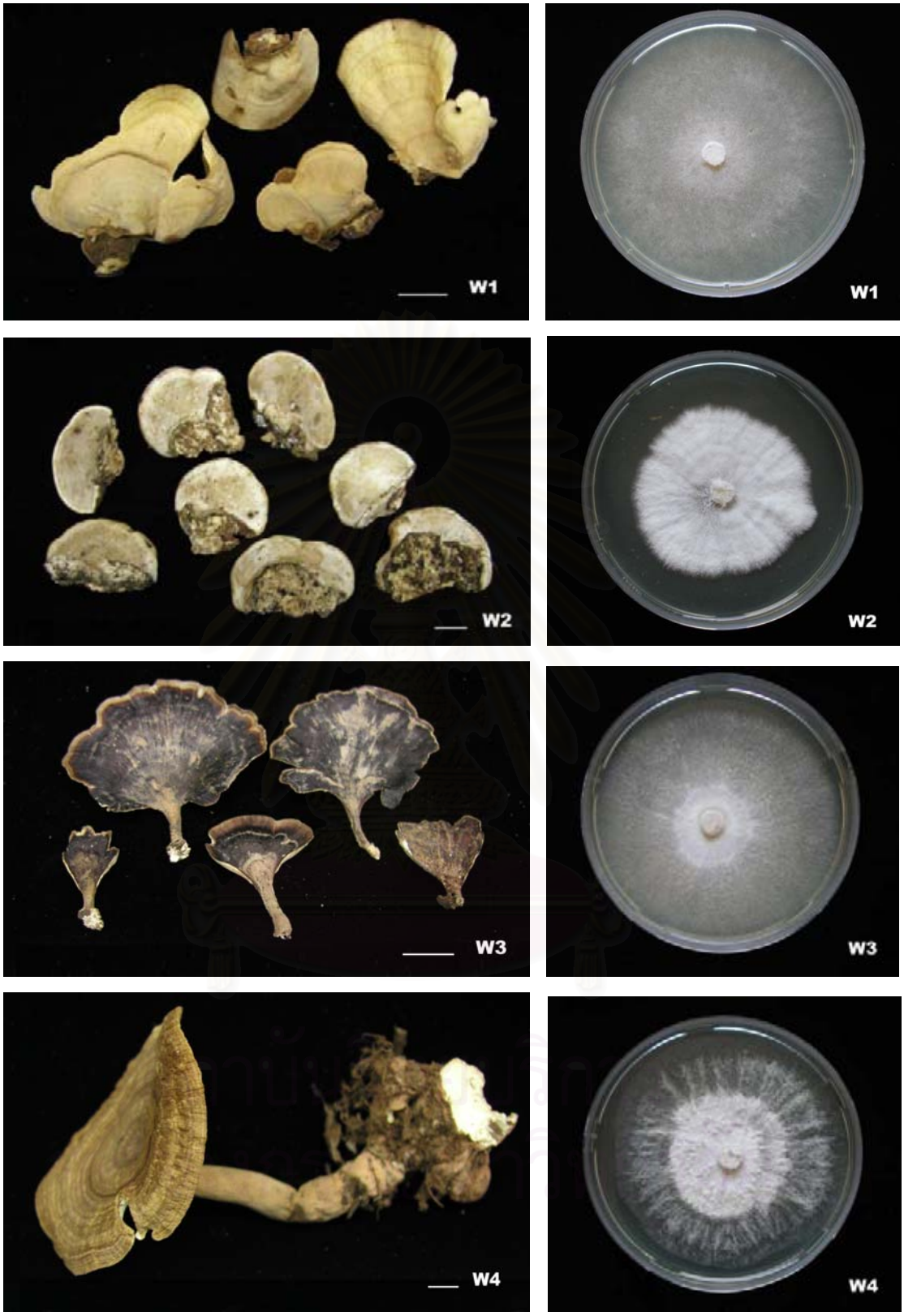
อัตราการเจริญ

+ + + หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว

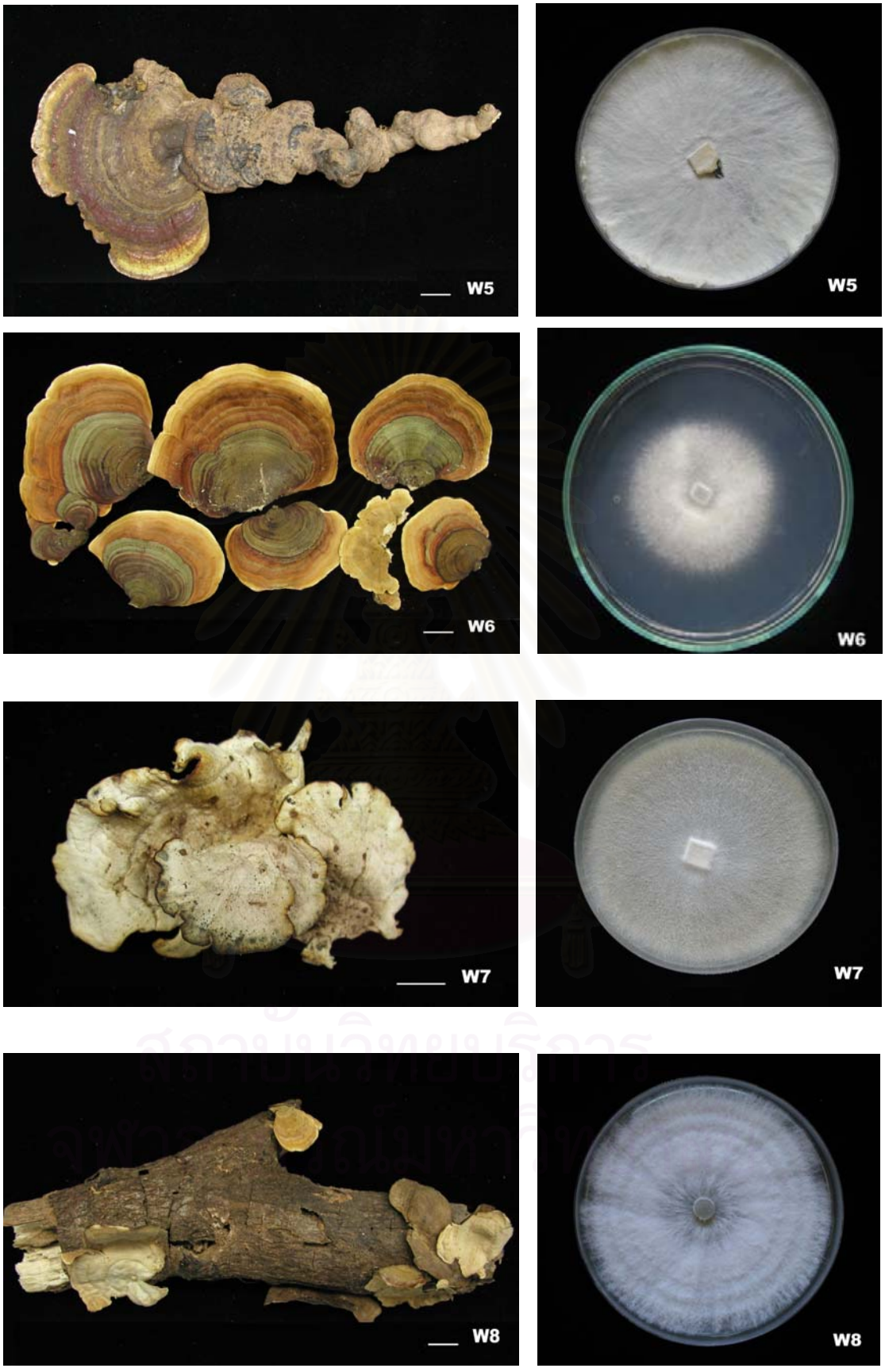
+ + หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตปานกลาง

+ หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตช้า

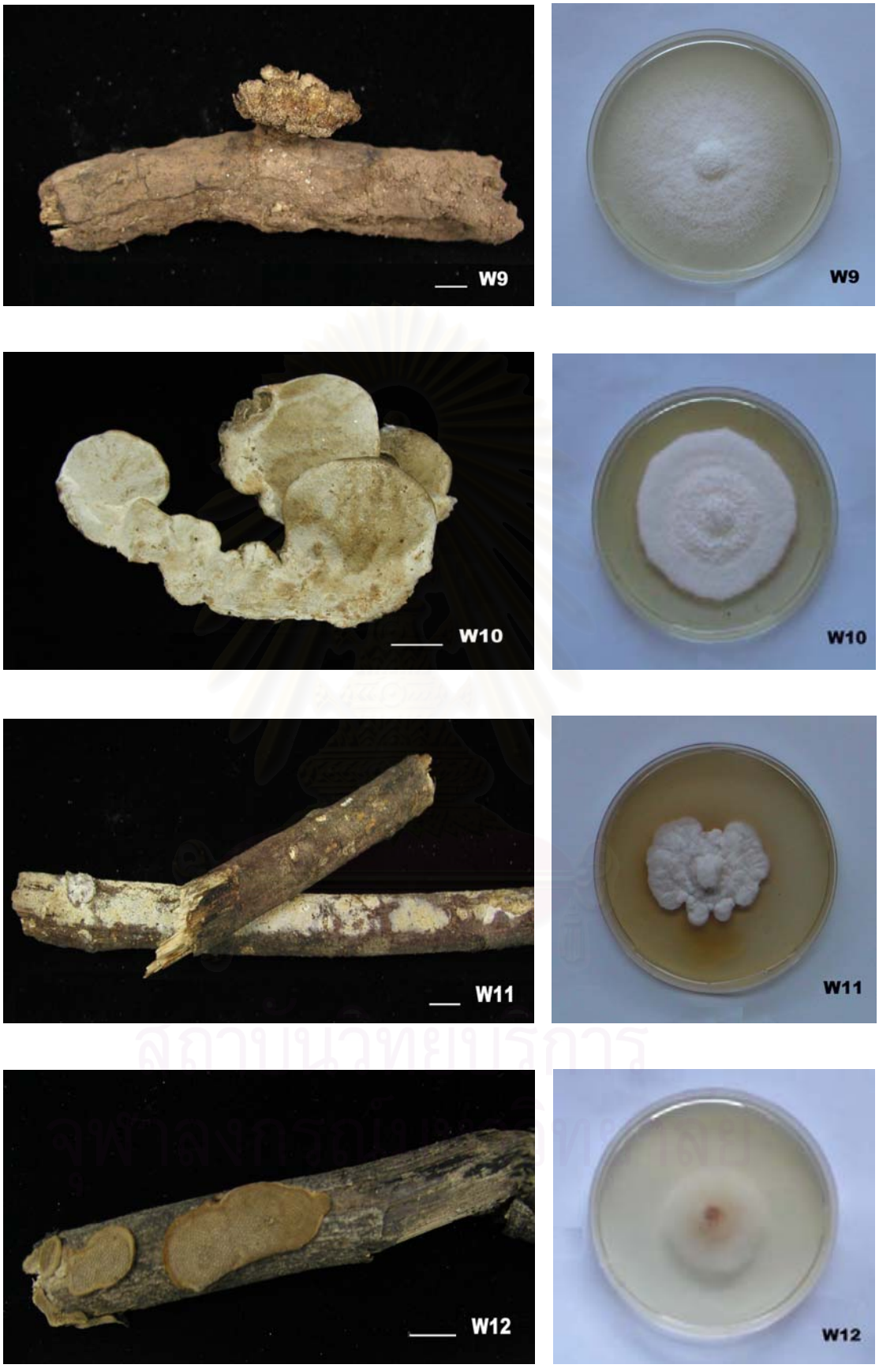
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.2 ลักษณะของเห็ด/กิ่งไม้ผุที่นำมาแยกเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยง (ซ้าย) และลักษณะโคโลนีของราที่คัดแยกได้บนอาหาร PDA (ขวา)



ภาพที่ 4.2 (ต่อ)



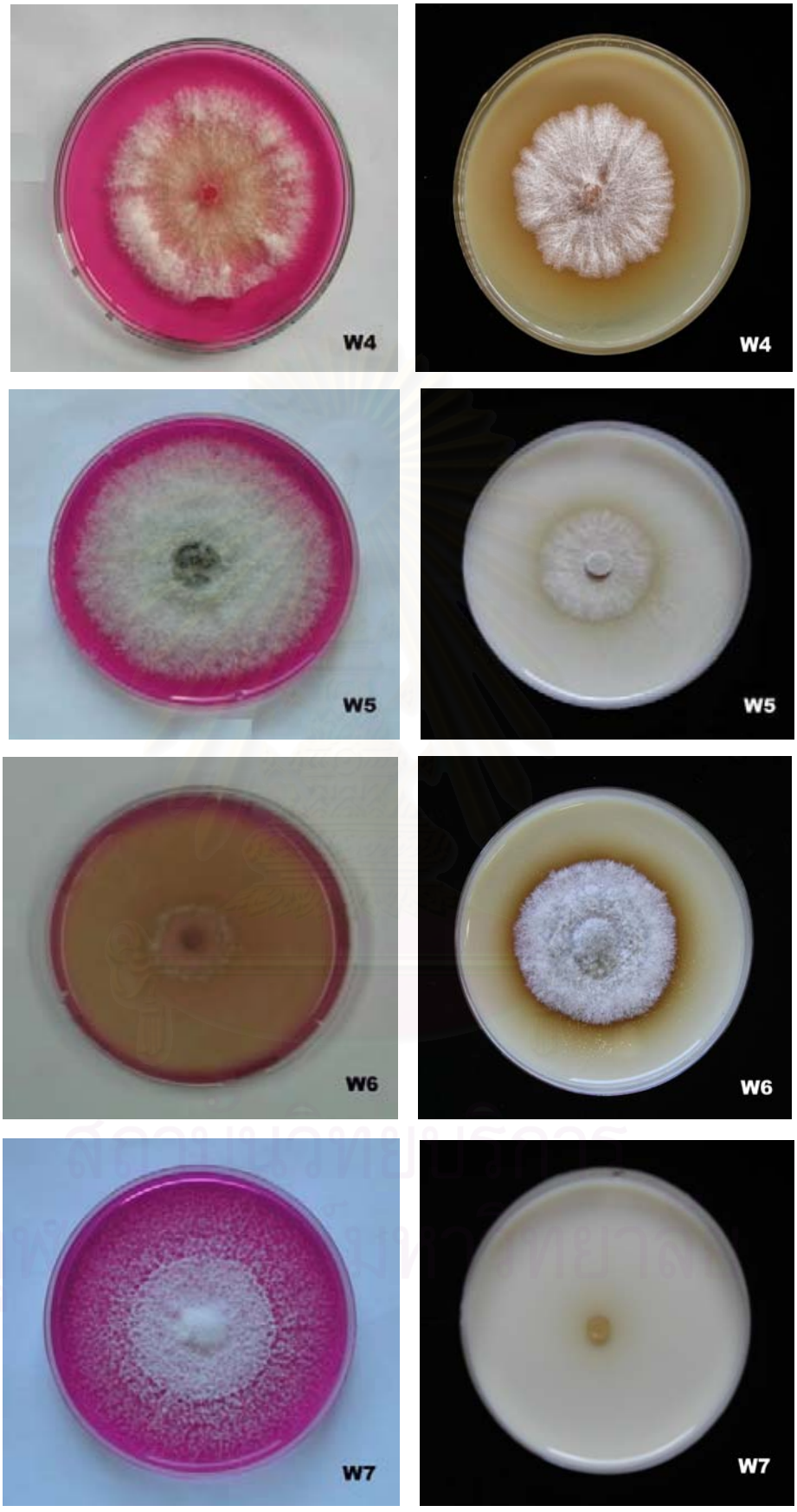
ภาพที่ 4.2 (ต่อ)

ภาพที่ 4.2 (ต่อ)

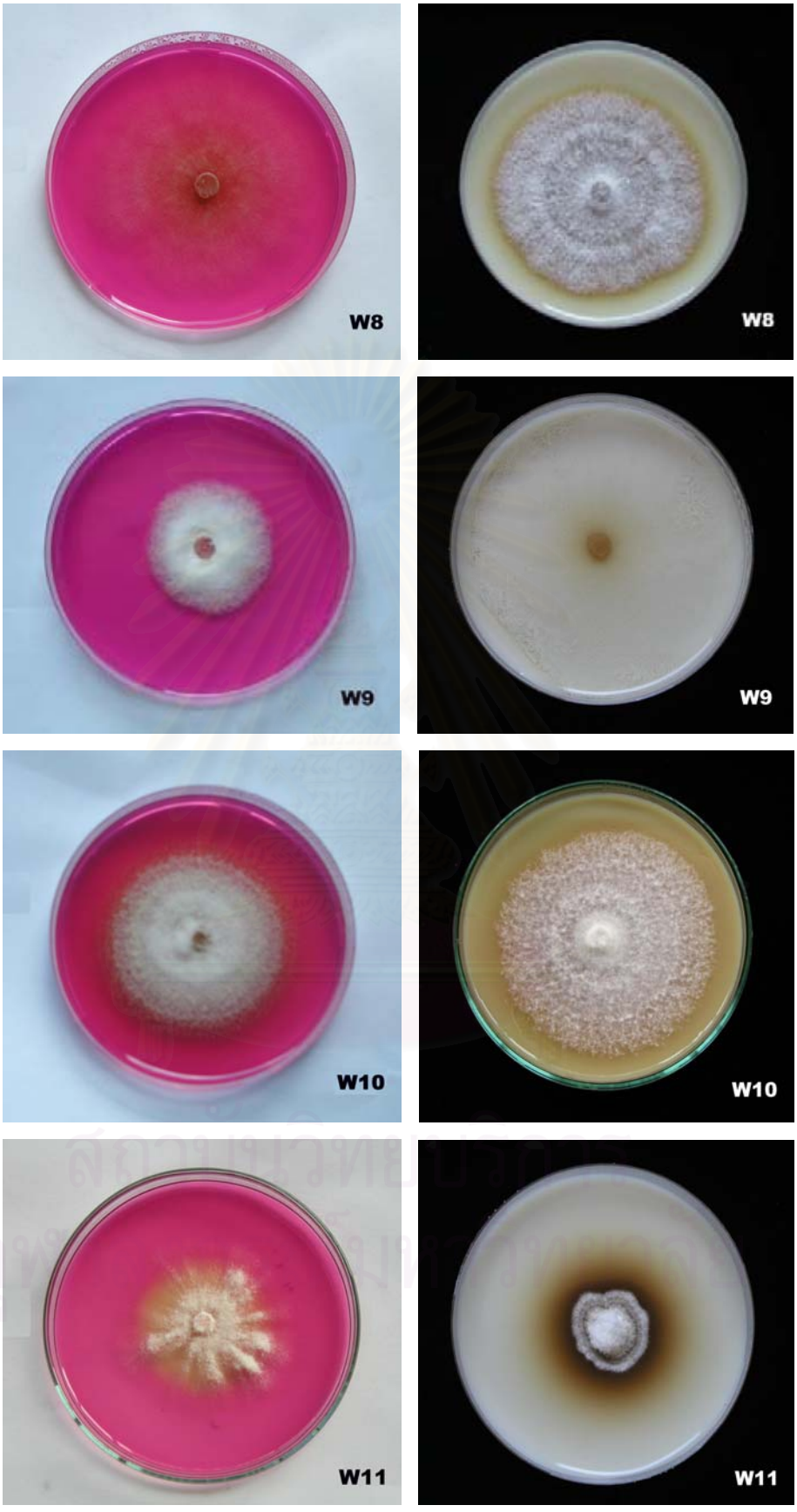
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ราที่คัดแยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ผุ จำนวนทั้ง 13 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา และการย่อยสลาย Poly R-478 และ Tannic acid ได้ผลดังภาพที่ 4.3

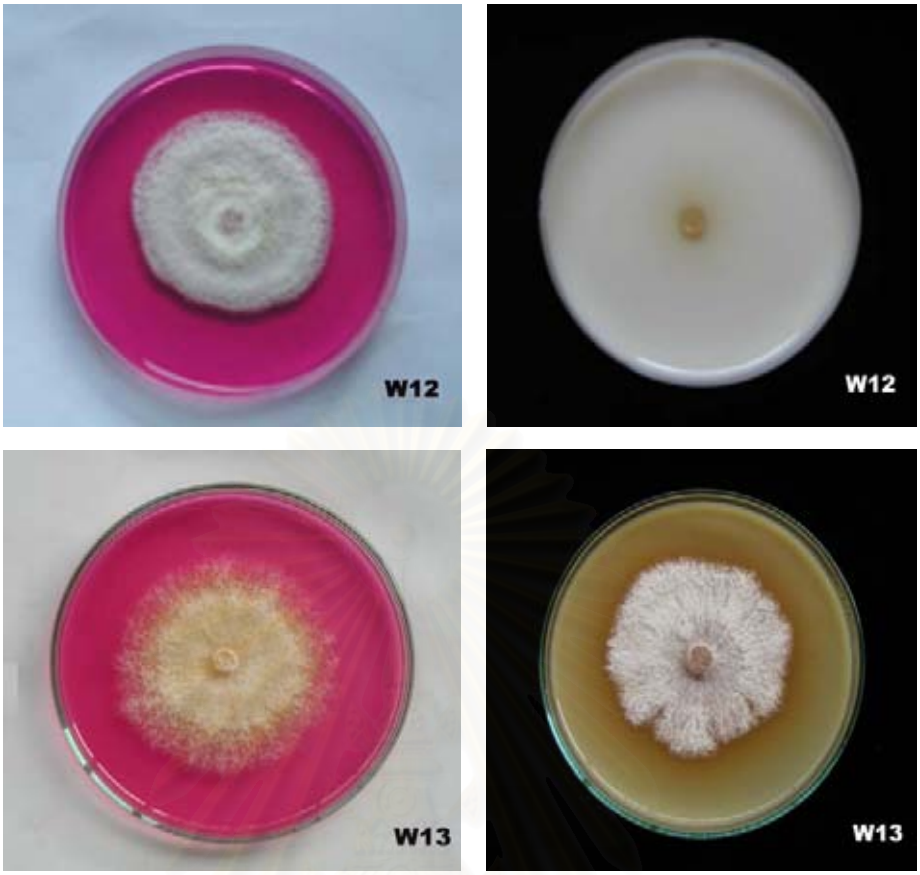
ภาพที่ 4.3 ลักษณะการเปลี่ยนสีบนอาหาร Poly-R agar clearance และการสร้างโซนสีน้ำตาลบนอาหาร Tannic acid agar ของราที่คัดแยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ผุ



ภาพที่ 4.3 (ต่อ)



ภาพที่ 4.3 (ต่อ)



ภาพที่ 4.3 ลักษณะการเปลี่ยนสีบนอาหาร Poly-R agar clearance และการสร้างโซนสีน้ำตาลบนอาหาร Tannic acid agar ของราที่คัดแยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ผุ (ต่อ)

จากภาพที่ 4.3 ราที่คัดแยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ผุจำนวนทั้ง 13 ไอโซเลต พบว่า มีอยู่จำนวน 8 ไอโซเลตที่สามารถเปลี่ยนสีของ Poly-R 478 จากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง และสามารถสร้างโซนสีน้ำตาลบนอาหาร Tannic acid agar ได้แก่ ราไอโซเลต W1 W2 W4 W6 W8 W10 W11 และ W13 ซึ่งจะนำราทั้ง 8 ไอโซเลตดังกล่าวมาทำการทดลองในขั้นต่อไป

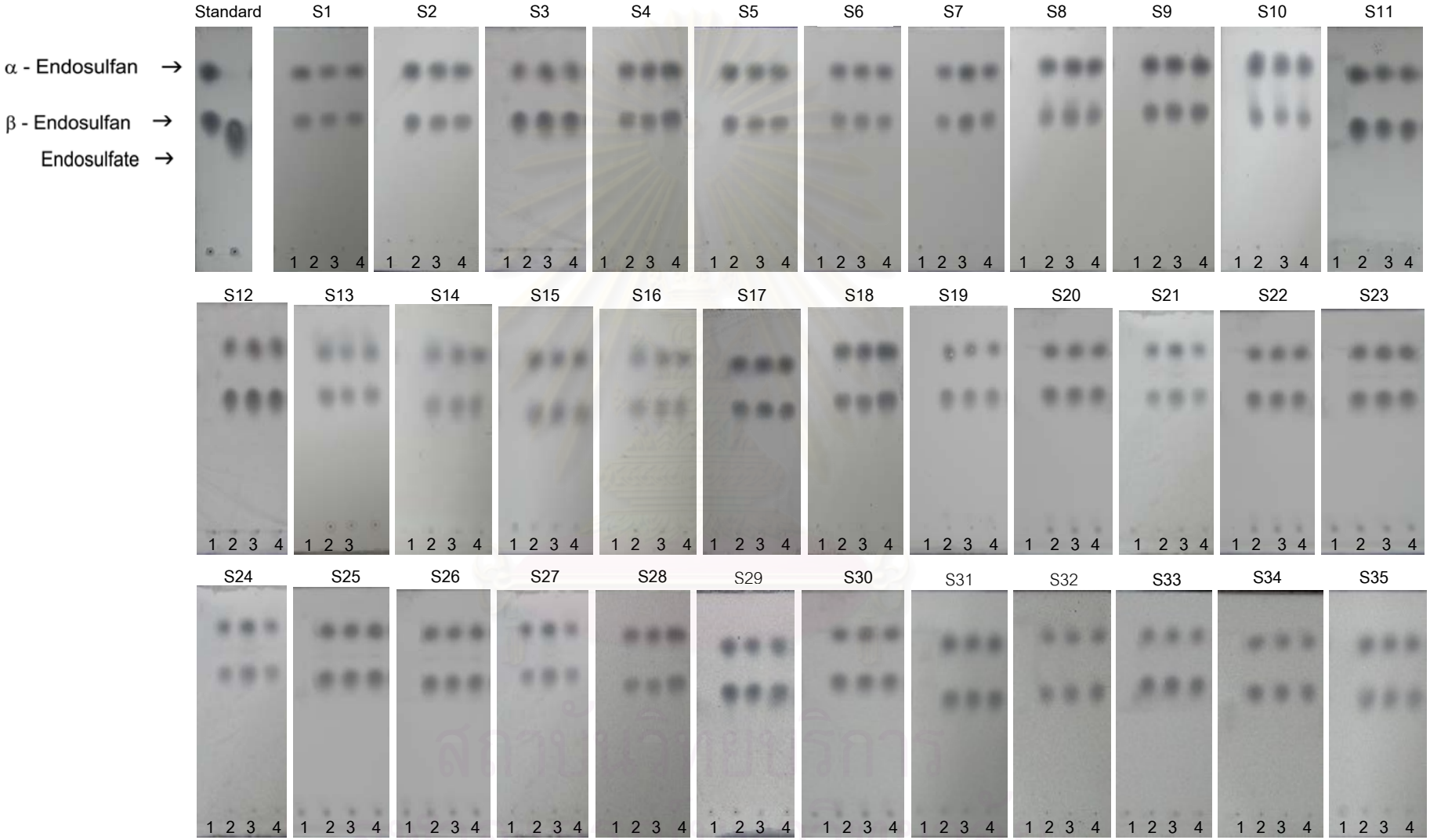
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่คัดแยกได้

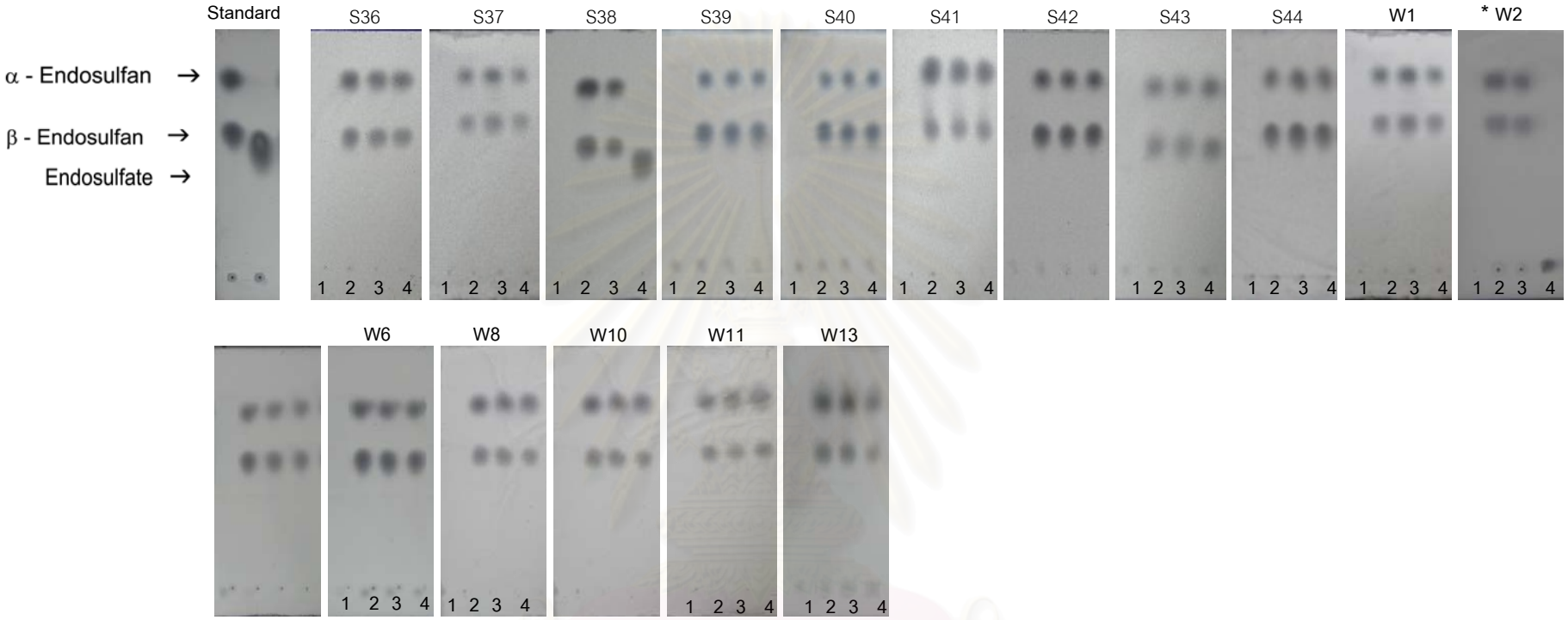
4.3.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นปฐมภูมิ (Primary degradation test)

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารเอ็นโดซัลแฟนขั้นปฐมภูมิของราที่คัดแยกได้ทั้ง 57 ไอโซเลต โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) (ภาพที่ 4.4) เพื่อวิเคราะห์เชิงคุณภาพในการตรวจสอบหาสารเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้น ภายหลังจากการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน พบว่า มีราเพียง 2 ไอโซเลตคือ S38 และ W2 ที่มีการย่อยสลาย และเปลี่ยนรูปเอ็นโดซัลแฟนไปเป็นสารเมทาโบไลท์ชนิดอื่น โดยพิจารณาจากตำแหน่ง spot ที่ปรากฏขึ้นของสารที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่ใส่เชื้อทดสอบ มีความแตกต่างกับตำแหน่ง spot บนแผ่น TLC อ้างอิงของสารละลายมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟน และตำแหน่ง spot ที่ปรากฏขึ้นของชุดควบคุมทั้ง 3 ชุด (ชุดที่ไม่ใส่สาร ชุดที่ไม่ใส่เชื้อ และชุดที่ใส่เส้นใยราที่ตายแล้ว) โดย S38 มีการเปลี่ยนรูปเอ็นโดซัลแฟนไปเป็นเอนโดซัลเฟตเมื่อเทียบกับ spot ของสารเอนโดซัลเฟตมาตรฐาน และส่วนไอโซเลต W2 เมื่อพิจารณาจากค่า R_f (Retention factor) พบว่า ค่า R_f ของ spot สารเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้นใหม่นั้น มีค่าเท่ากับ 0.04 มีความแตกต่างกับ R_f ของสารเอ็นโดซัลแฟนมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วยอัลฟาและเบตาไอโซเมอร์ ($\alpha + \beta$ Endosulfan) ที่มีค่าเท่ากับ 0.78 และ 0.58 ตามลำดับ โดยค่า R_f ของสารเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้นใหม่นั้น พบว่า อาจจะเป็นค่า R_f ของสารเอ็นโดซัลแฟนไดออล (Endosulfan diol) ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานว่ามีค่า R_f ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารเมทาโบไลท์ชนิดอื่นๆ ของเอ็นโดซัลแฟน (Awasthi และคณะ, 1997; Awasthi และคณะ, 2000; Shetty และคณะ, 2000 และ Sutherland และคณะ, 2002) เนื่องจากราไอโซเลต W2 มีการเปลี่ยนรูปเอ็นโดซัลแฟนไปเป็นเอนโดซัลเฟตไดออลซึ่งอยู่ในรูปที่เป็นสารที่มีพิษตกค้างน้อยกว่าเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต ดังนั้นจึงทำการเลือกราไอโซเลต W2 มาทำการทดลองศึกษาในขั้นต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



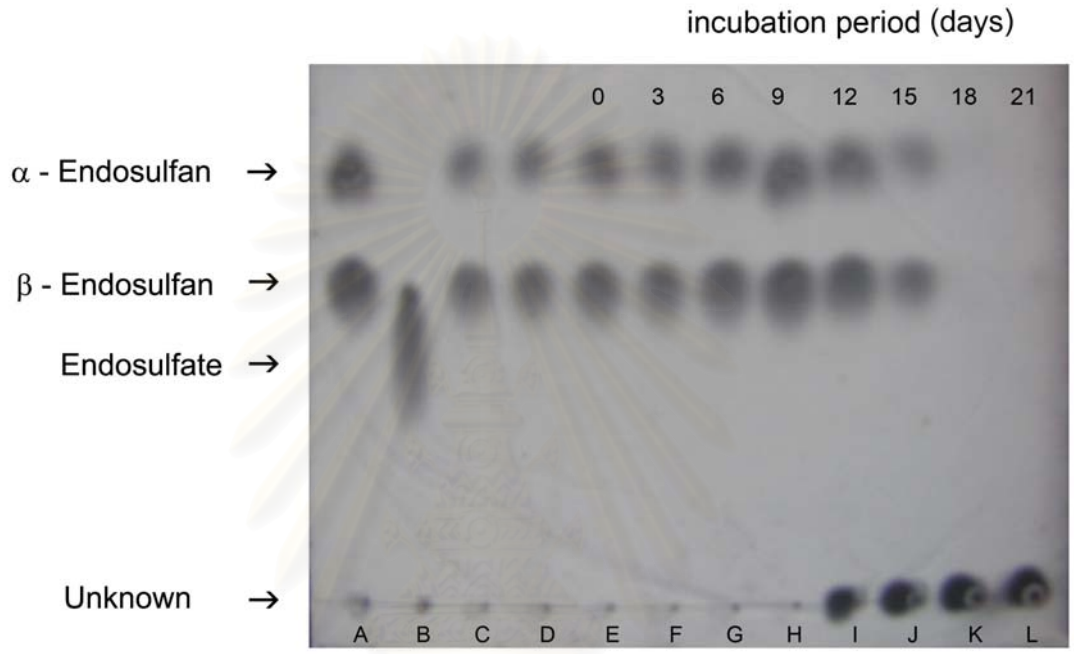
ภาพที่ 4.4 ผลทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่แยกได้ โดยวิธี Thin Layer Chromatography ภายหลังจากการบ่มเชื้อ 20 วัน (1: ชุดที่ไม่ใส่สาร 2: ชุดที่ไม่ใส่เชื้อ 3: ชุดที่ใส่ราที่ตายแล้ว และ 4: ชุดที่ใส่เชื้อทดสอบ)



ภาพที่ 4.4 (ต่อ) ผลทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่แยกได้ โดยวิธี Thin Layer Chromatography ภายหลังจากการบ่มเชื้อ 20 วัน (1: ชุดที่ไม่ใส่สาร 2: ชุดที่ไม่ใส่เชื้อ 3: ชุดที่ใส่ราที่ตายแล้ว และ 4: ชุดที่ใส่เชื้อทดสอบ) * ตรวจพบสารเมทาบอไลท์อีกหนึ่งชนิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้ ได้ทำการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 ขั้นปฐมภูมิด้วยเทคนิค TLC อย่างละเอียดในสภาวะเดิมอีกครั้ง เพื่อยืนยันผล และตรวจสอบระยะเวลาที่ราเริ่มมีการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนเป็นเมทาโบไลท์รูปอื่น (Unknown) ที่อาจจะเป็นเอ็นโดซัลแฟนไดออล โดยมีการเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบทุก 3 วัน จนครบกำหนด 21 วัน ได้ผลการทดสอบดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ผลการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 โดยวิธี Thin Layer Chromatography ภายหลังจากการบ่มเชื้อ 21 วัน (A: สารเอ็นโดซัลแฟนมาตรฐาน B: สารเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟตมาตรฐาน C: ชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ D: ชุดควบคุมที่ใส่เส้นใยราที่ตายแล้ว E: วันที่ 0 ของการบ่มเชื้อ F: วันที่ 3 ของการบ่มเชื้อ G: วันที่ 6 ของการบ่มเชื้อ H: วันที่ 9 ของการบ่มเชื้อ I: วันที่ 12 ของการบ่มเชื้อ J: วันที่ 15 ของการบ่มเชื้อ K: วันที่ 18 ของการบ่มเชื้อ L: วันที่ 21 ของการบ่มเชื้อ)

จากผลการทดสอบโดยเทคนิค TLC ดังภาพที่ 4.6 พบว่า ราไอโซเลต W2 สามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนทั้งอัลฟาและเบตาไอโซเมอร์ ได้หมดภายในระยะเวลา 18 วันของการบ่มเชื้อ และทำให้เกิดการสร้างเอ็นโดซัลแฟนไดออล (ได้ทำการทดสอบการ spot สารละลายมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟนไดออลเปรียบเทียบภายหลัง เพื่อยืนยันผลแล้ว) ณ วันที่ 12 ของการบ่มเชื้อ นอกจากนี้ ไม่พบการสร้างสารเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต ซึ่งเป็นสารเมทาโบไลท์ที่มีความเป็นพิษรุนแรงมากกว่าเอ็นโดซัลแฟน เมื่อเปรียบเทียบกับ spot ของสารมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต

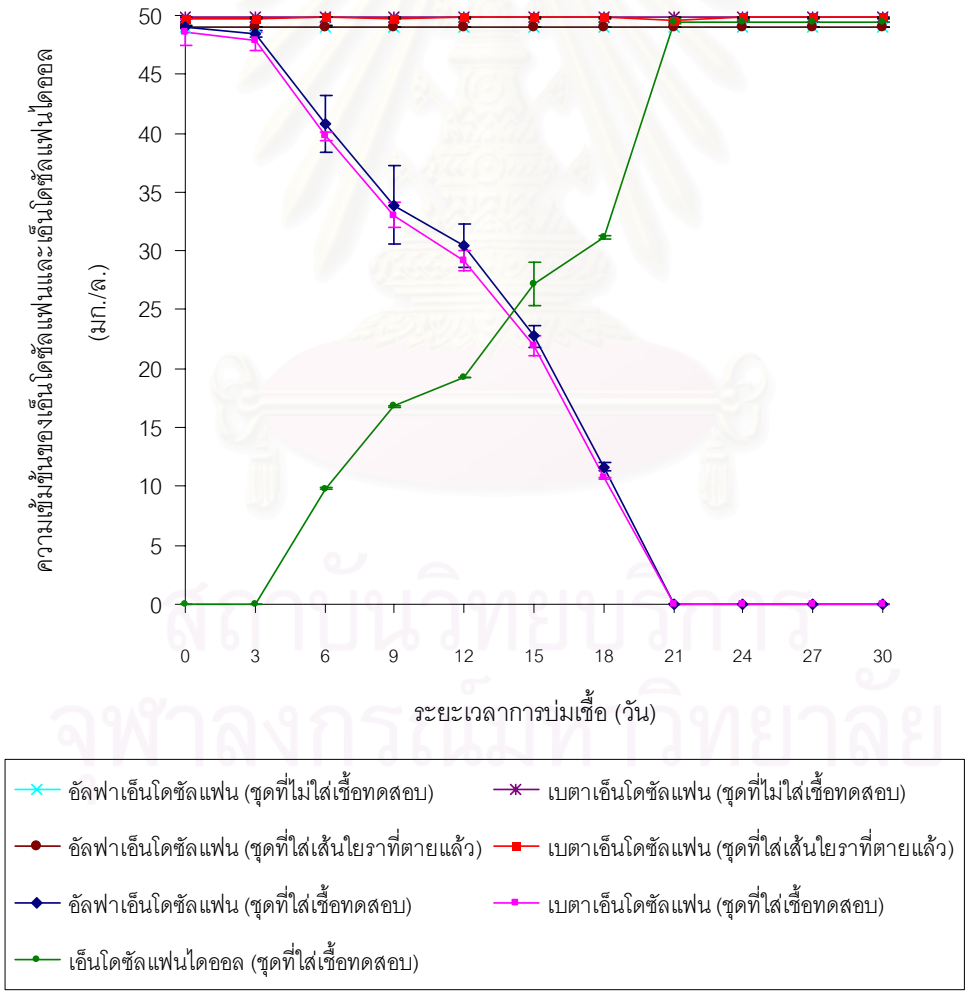
ผลการสกัดเส้นใยราที่ตายแล้วจากชุดการทดลองที่ 3 ของราทุกไอโซเลตที่คัดเลือกได้ เพื่อนำมาวิเคราะห์หาเอ็นโดซัลแฟนที่ตกค้างโดยเทคนิค TLC นั้น ปรากฏว่า ไม่พบ spot ของเอ็นโดซัลแฟนทั้งอัลฟาและเบตาไอโซเมอร์ และจากการตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ในทุกชุดการทดลอง ภายหลังจากการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่อุณหภูมิห้อง ครบ 20 วัน พบว่า ในชุดการทดลองที่ใส่เชื้อทดสอบ มีเพียงรา W2 ไอโซเลตเดียว ที่มีค่า pH เฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 8.54 นับจากวันเริ่มต้น (วันที่ 0) ของการบ่มเชื้อที่มีค่า pH เท่ากับ 7 ในขณะที่ราไอโซเลตอื่นๆ มีค่า pH เปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ภาคผนวก ก) ซึ่งสนับสนุนผลที่ได้จากการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนขั้นปฐมภูมิด้วยเทคนิค TLC ที่ตรวจสอบพบว่า รา W2 สามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนให้เอ็นโดซัลแฟนไดออล ได้ ดังนั้น จึงคัดเลือกเฉพาะราไอโซเลต W2 มาทำการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในขั้นทุติยภูมิ (Secondary degradation test) เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณในการตรวจสอบหาความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนที่เหลือ และความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนไดออลที่เกิดขึ้นต่อไป

4.3.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นทุติยภูมิ (Secondary degradation test)

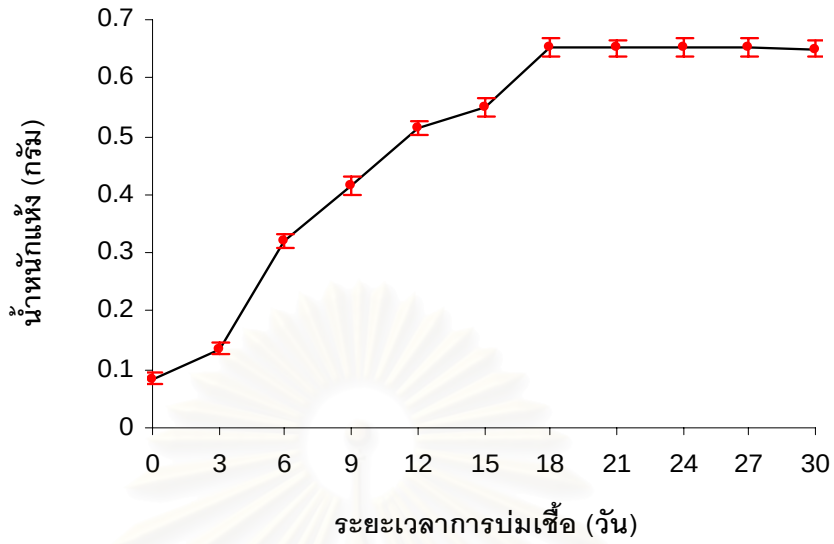
ผลทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนขั้นทุติภูมิของราไอโซเลต W2 ด้วยเทคนิค Gas Chromatography (GC) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิด Electron Capture Detector (ECD) ซึ่งเอ็นโดซัลแฟนอัลฟาไอโซเมอร์ เอ็นโดซัลแฟนเบตาไอโซเมอร์ และเอ็นโดซัลแฟนไดออล มีค่า Retention time (R_t) เท่ากับ 14.91, 16.09 และ 16.03 นาที ตามลำดับ (ภาคผนวก ข) เมื่อนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนและเอ็นโดซัลแฟนไดออลกับระยะ เวลาการบ่มเชื้อ (ภาพที่ 4.6) พบว่า รา W2 สามารถย่อยสลายอัลฟาและเบตาเอ็นโดซัลแฟนจากความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้มีความเข้มข้นลดลงไปตามระยะเวลา 30 วันของการบ่มเชื้อ จนสามารถย่อยสลายได้หมดในวันที่ 21 ของการบ่มเชื้อ และเกิดการเปลี่ยนรูปเป็นสารเอ็นโดซัลแฟนไดออลหลังจากวันที่ 3 ของการบ่มเชื้อ โดยความเข้มข้นของอัลฟาเอ็นโดซัลแฟนจากการตรวจสอบทุก 3 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 18 คือ 48.48 40.79 33.90 30.41 22.75 และ 11.66 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของเบตาเอ็นโดซัลแฟนที่ตรวจพบคือ 47.82 39.75 33.06 29.12 22 และ 10.74 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของเอ็นโดซัลแฟนไดออลที่ตรวจพบทุก 3 วัน ตั้งแต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 30 ของการบ่มเชื้อ คือ 9.80 16.81 19.29 27.17 31.14 49.5 49.45 49.41 และ 49.42 ตามลำดับ ทั้งนี้ในชุดควบคุมเพื่อทดสอบการย่อยสลายตัวเองของเอ็นโดซัลแฟน

(autodegradation control) และชุดควบคุมเพื่อทดสอบการดูดซับเอ็นโดซัลแฟนของเส้นใยรา (adsorption control) พบการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนทั้งอัลฟาและเบตาไอโซเมอร์ที่น้อยมาก

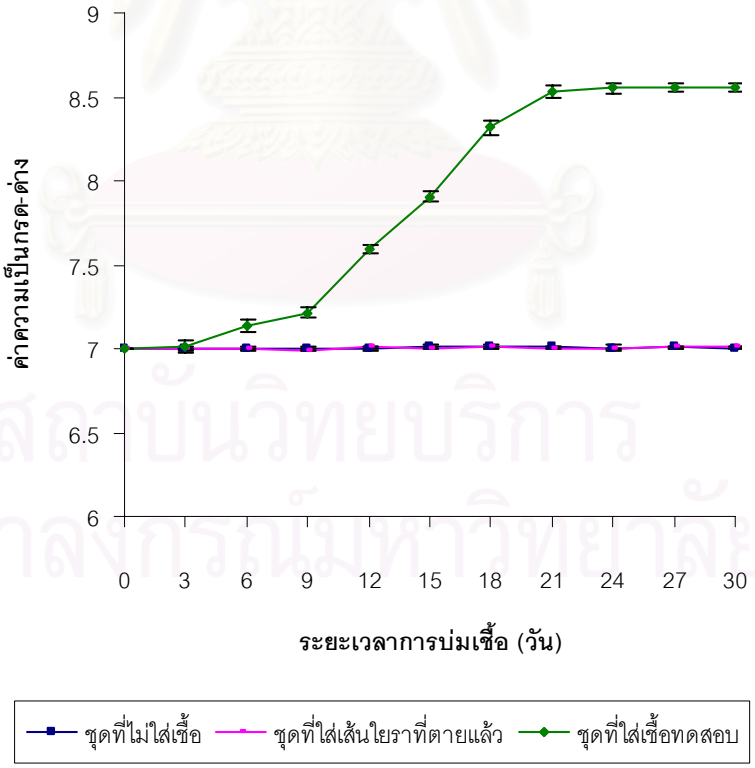
ผลจากการวัดอัตราการเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไอโซเลต W2 (ภาพที่ 4.7) พบว่า รามีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็นลำดับนับจากวันเริ่มต้น จนถึงวันที่ 18 ของการบ่มเชื้อ หลังจากนั้น ไม่พบการเจริญเติบโตของรา W2 อีกเลยจนวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อ ส่วนผลจากการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชุด (ภาพที่ 4.8) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ในชุดที่ใส่เชื้อทดสอบ มีค่า pH เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้น นับจากวันแรกของการบ่มเชื้อที่มีค่า pH เท่ากับ 7 โดยในวันที่ 3 ของการบ่มเชื้อจนถึงวันที่ 30 ของการบ่มเชื้อ ค่า pH เฉลี่ยที่ตรวจวัดได้คือ 7.01 7.13 7.21 7.59 7.90 8.31 8.53 8.55 8.55 และ 8.55 ตามลำดับ ทั้งนี้ในชุดควบคุมทั้งสองชุดค่า pH เฉลี่ยที่ตรวจวัดได้ มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย



ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ยของเอ็นโดซัลแฟน (อัลฟาและเบตาไอโซเมอร์) และเอ็นโดซัลแฟนไดออล กับระยะเวลาการบ่มเชื้อ



ภาพที่ 4.7 น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไอโซเลต W2 ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน



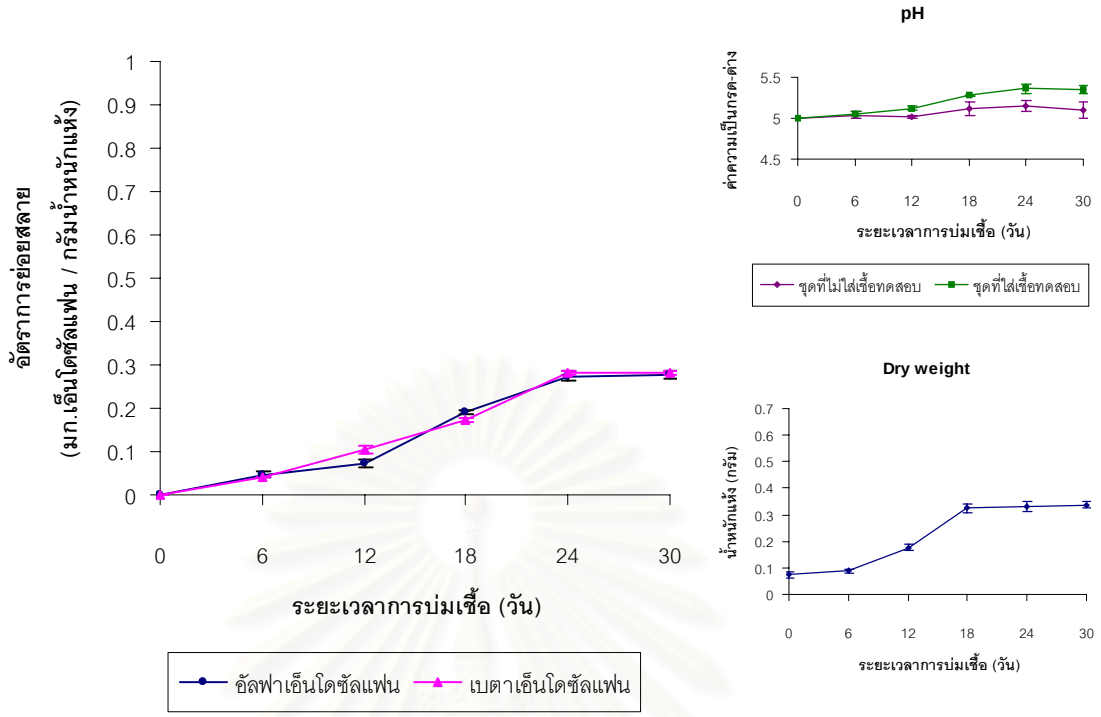
ภาพที่ 4.8 ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน

4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่แยกได้

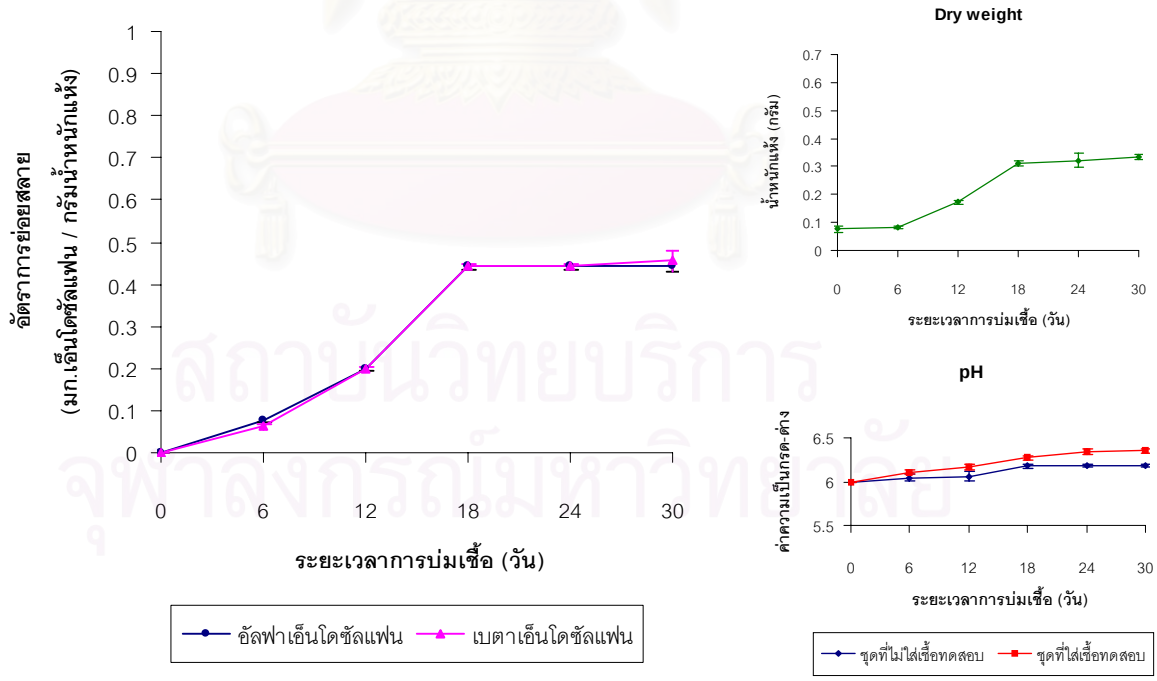
จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 ในสภาวะต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่กำหนดไว้ทั้งหมด 24 สภาวะตามตารางที่ 3.1 พบว่า ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน มีอยู่จำนวน 18 สภาวะ ที่ไม่พบการเจริญเติบโตของรา W2 ซึ่งตรวจสอบจากการชั่งน้ำหนักแห้ง (ภาคผนวก ง) ได้แก่ สภาวะความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกปริมาณความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอน (กลูโคส 0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์) และทุกค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH 4 5 6 และ 7) รวมทั้งสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 นอกจากนี้ผลการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่กล่าวมาทั้งหมดยังพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ภาคผนวก ง) จึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนเบื้องต้นด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งผลปรากฏว่า ราไอโซเลต W2 ที่บ่มในสภาวะต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น ไม่สามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนให้เป็นเอ็นโดซัลแฟนไดออล หรือสารเมทาโบไลท์รูปอื่นๆได้ (ภาคผนวก ง) ดังนั้น จึงสามารถสรุปสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่เหลือทั้ง 6 สภาวะ ซึ่งได้นำมาทำการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนโดยเทคนิค Gas Chromatography (GC) ต่อไปได้ดังนี้

- ความเข้มข้นเอ็นโดซัลแฟน 50 มก./ล. ปริมาณกลูโคส 0.5% pH 5
- ความเข้มข้นเอ็นโดซัลแฟน 50 มก./ล. ปริมาณกลูโคส 0.5% pH 6
- ความเข้มข้นเอ็นโดซัลแฟน 50 มก./ล. ปริมาณกลูโคส 0.5% pH 7
- ความเข้มข้นเอ็นโดซัลแฟน 50 มก./ล. ปริมาณกลูโคส 2% pH 5
- ความเข้มข้นเอ็นโดซัลแฟน 50 มก./ล. ปริมาณกลูโคส 2% pH 6
- ความเข้มข้นเอ็นโดซัลแฟน 50 มก./ล. ปริมาณกลูโคส 2% pH 7

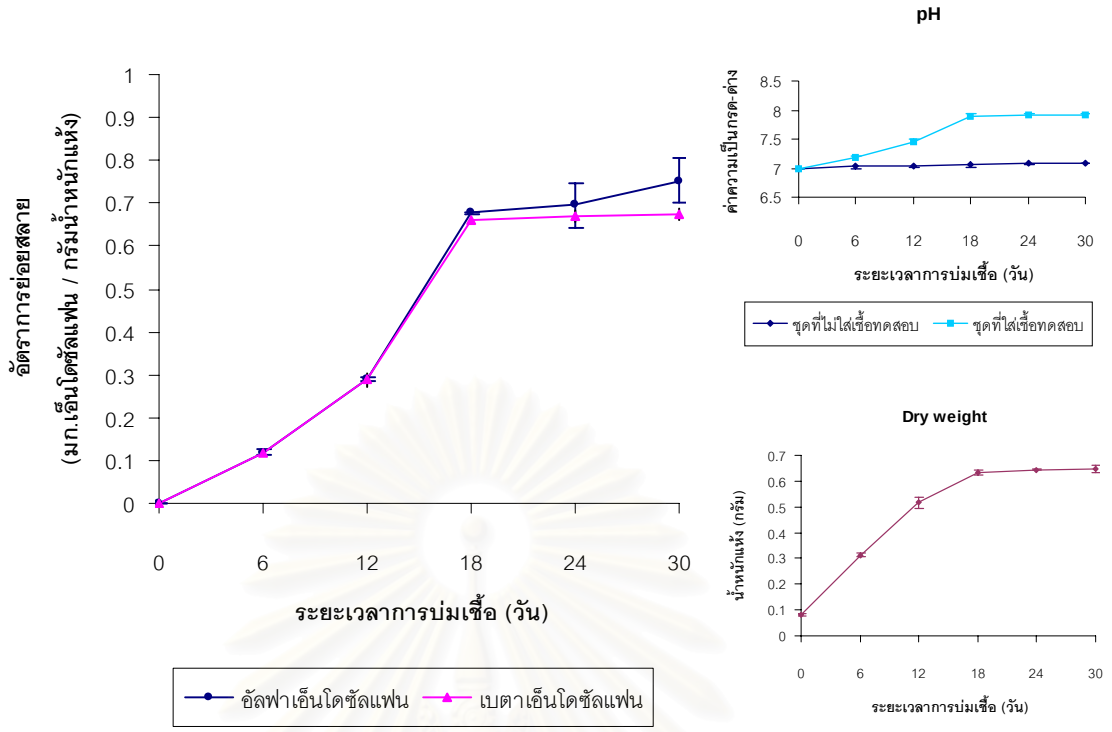
ผลจากการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของรา W2 ตามสภาวะต่างๆ ข้างต้น สามารถนำมาสร้างกราฟแสดงอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน ได้ดังภาพที่ 4.9 ถึง 4.19



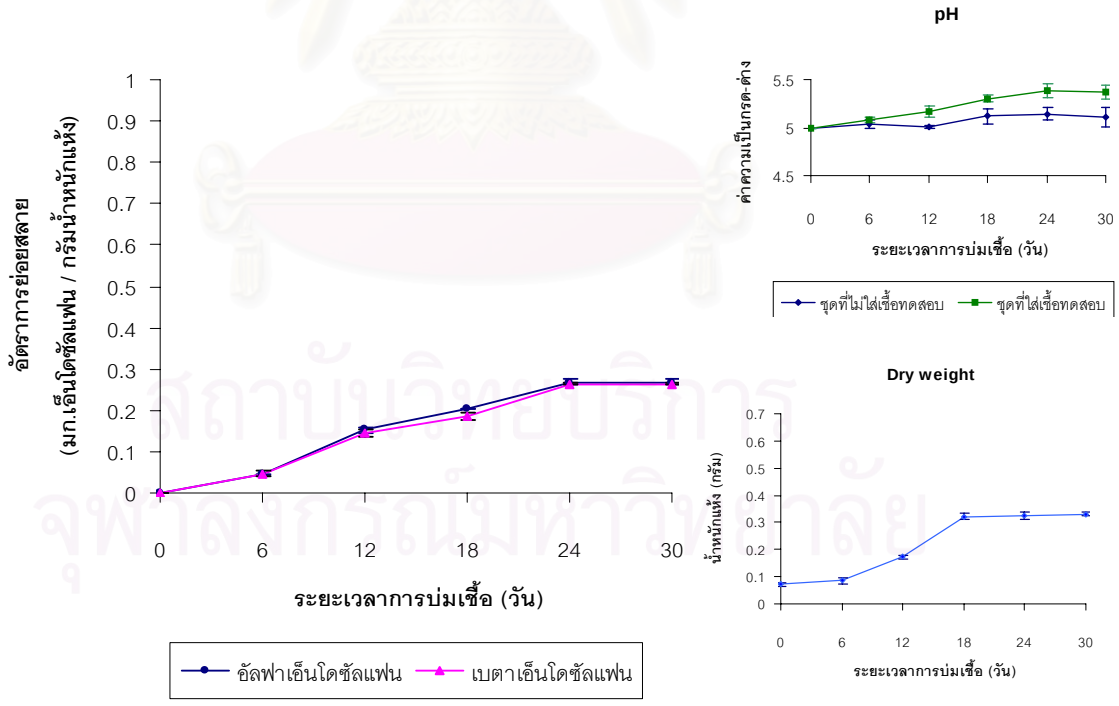
ภาพที่ 4.9 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อ มีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 0.5% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5



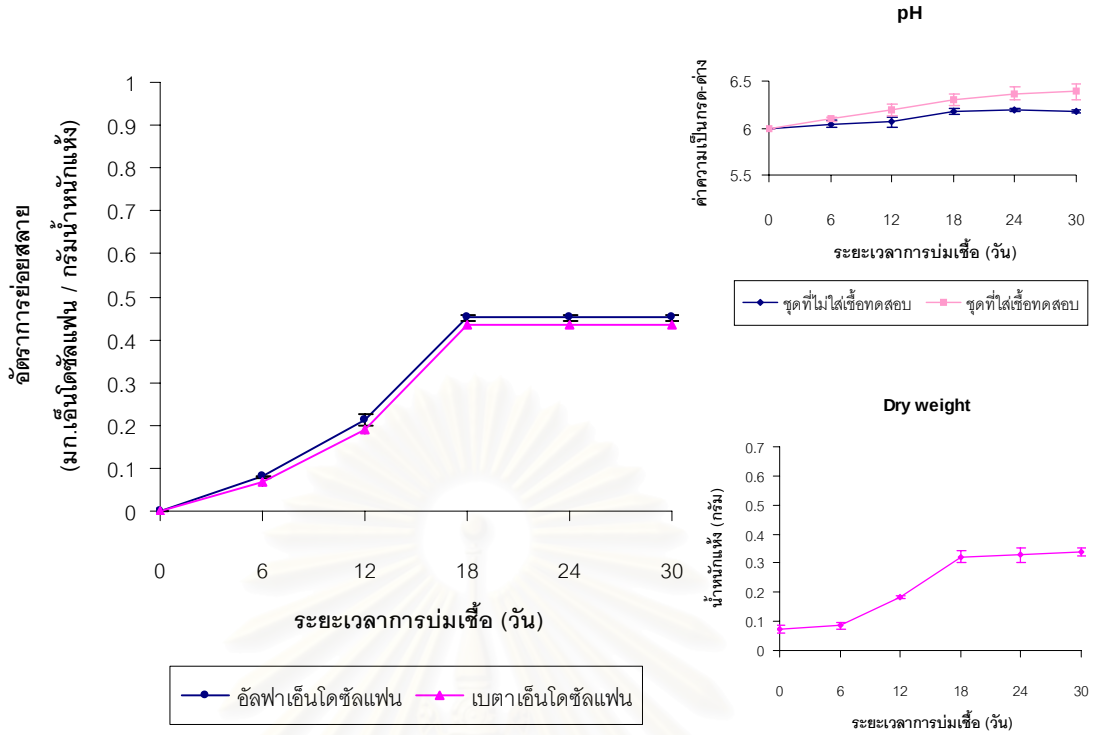
ภาพที่ 4.10 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 0.5% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6



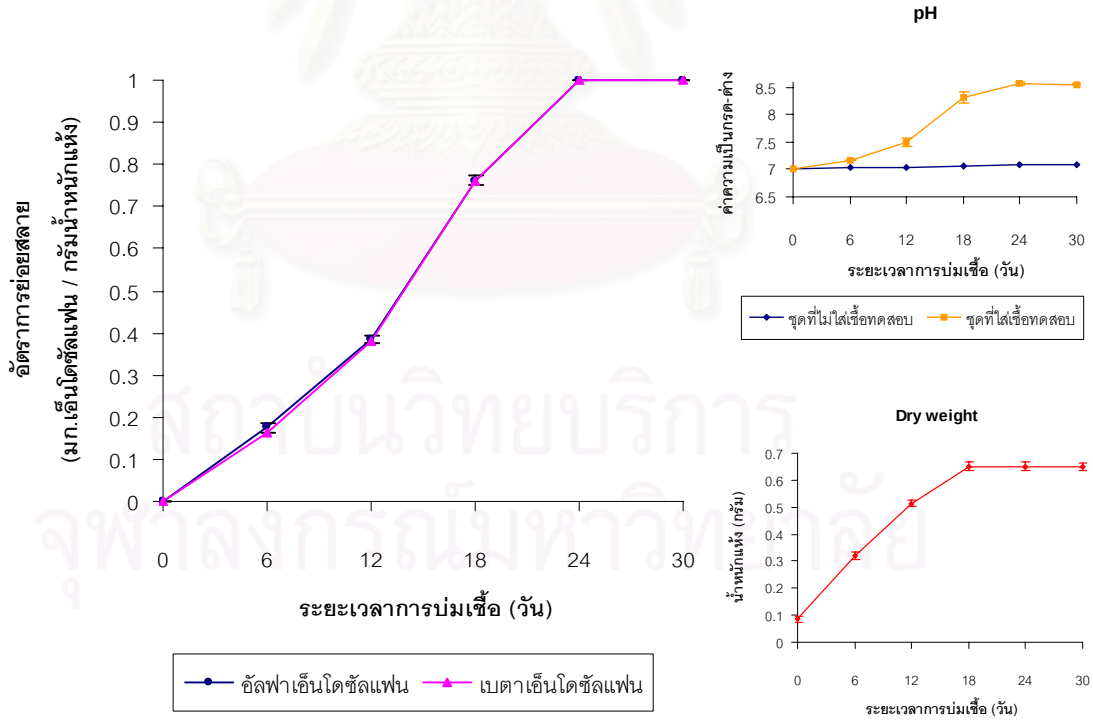
ภาพที่ 4.11 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 0.5% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7



ภาพที่ 4.12 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 2% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5



ภาพที่ 4.13 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 2% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6



ภาพที่ 4.14 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 2% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7

เมื่อพิจารณาจากอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 ตลอดระยะเวลา 30 วันของการบ่มเชื้อ พบว่า ในแต่ละสภาวะของการทดลองโดยรวม เอ็นโดซัลแฟนทั้งสองไอโซเมอร์มีอัตราการสลายตัวที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ก็มีแนวโน้มสูงขึ้นตามไปด้วย

ในชุดทดลองที่มีสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่า pH 5 ปริมาณกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และชุดที่มี pH 5 ปริมาณกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า รา W2 มีอัตราการย่อยสลายที่ใกล้เคียงกัน โดยในวันที่ 30 ของการบ่มเชื้อ รามีอัตราการย่อยสลายเฉลี่ย 0.2795 และ 0.2645 มก.เอ็นโดซัลแฟนต่อกรัมน้ำหนักแห้งของรา (27.95 และ 26.45 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ และมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันเริ่มต้นที่ pH 5 เป็น pH 5.35 และ 5.37 เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตของรา W2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสภาวะดังกล่าว พบว่า มีอัตราใกล้เคียงกัน โดยรามีระยะการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ในช่วงระหว่างวันที่ 12 ถึง 18 ของการบ่มเชื้อ และเข้าสู่ระยะ stationary phase ภายหลังจากวันที่ 18 ของการบ่มเชื้อ ทั้งนี้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราทั้ง 2 สภาวะ ณ วันสุดท้ายของการบ่มเชื้อเท่ากับ 0.338 และ 0.3313 กรัม ตามลำดับ

ชุดทดลองที่มีสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ pH 6 ปริมาณกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และชุดที่ pH 6 ปริมาณกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า รา W 2 มีอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนที่ใกล้เคียงกัน โดยในวันที่ 30 ของการบ่มเชื้อ รามีอัตราการย่อยสลายเฉลี่ย 0.4494 และ 0.4433 มก.เอ็นโดซัลแฟนต่อกรัมน้ำหนักแห้งของรา (44.94 และ 44.33 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ และมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันเริ่มต้นที่ pH 6 เป็น pH 6.35 และ 6.39 เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตของรา W2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสภาวะดังกล่าว พบว่า มีอัตราใกล้เคียงกัน โดยรามีระยะการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ในช่วงระหว่างวันที่ 12 ถึง 18 ของการบ่มเชื้อ และเริ่มมีอัตราการเจริญช้าลงจนเข้าสู่ระยะ stationary phase ภายหลังจากวันที่ 18 ของการบ่มเชื้อ ทั้งนี้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราทั้งสองสภาวะในวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อเท่ากับ 0.0034 และ 0.338 กรัม ตามลำดับ

ชุดทดลองที่มีสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ pH 7 ปริมาณกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และชุดที่ pH 7 ปริมาณกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า รา W 2 มีอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนที่แตกต่างกัน โดยในวันที่ 30 ของการบ่มเชื้อ ราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตรายอยสลายเฉลี่ย 0.7127 มก.เอ็นโดซัลแฟน ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของรา (71.27 เปอร์เซ็นต์) ส่วนราที่บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 2 เปอร์เซ็นต์ มีอัตรายอยสลายเฉลี่ย 0.9887 มก.เอ็นโดซัลแฟนต่อกรัมน้ำหนักแห้งของรา (98.87 เปอร์เซ็นต์) และทั้งสองชุดมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันเริ่มต้นที่ pH 7 เป็น pH 7.92 และ 8.56 เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตของรา W2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสภาวะดังกล่าว พบว่า มีอัตราใกล้เคียงกัน โดยสังเกตพบการ

เจริญเติบโตอย่างชัดเจนภายหลังจากวันที่ 6 ของการบ่มเชื้อ จนเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 18 หลังจากนั้น รามีการอัตราการเจริญคงที่ในระยะ stationary phase ตลอดจนถึงวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อ ทั้งนี้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราทั้งสองสภาวะในวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อเท่ากับ 0.6471 และ 0.6501 กรัม ตามลำดับ

ผลที่ได้จากการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ทั้ง 6 สภาวะ สามารถสรุปประสิทธิภาพของรา W2 ต่อการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในสภาวะต่างๆ ได้ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 ภายหลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน

สภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium	**อัตราการย่อยสลาย (มก.เอ็นโดซัลแฟน/ กรัมน้ำหนักแห้ง/วัน)**	**ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน ที่ย่อยสลายได้ (มก/ล.)**
EN 50 mg/l, 0.5%GL, pH 5	0.01	13.42 (26.84%)
EN 50 mg/l, 0.5%GL, pH 6	0.017	21.6 (43.2%)
EN 50 mg/l, 0.5%GL, pH 7	0.0273	36.02 (72.04%)
EN 50 mg/l, 2%GL, pH 5	0.0103	13.52 (27.04%)
EN 50 mg/l, 2%GL, pH 6	0.0177	21.9 (43.8%)
EN 50 mg/l, 2%GL, pH 7	0.0373	49.44 (98.88%)

หมายเหตุ

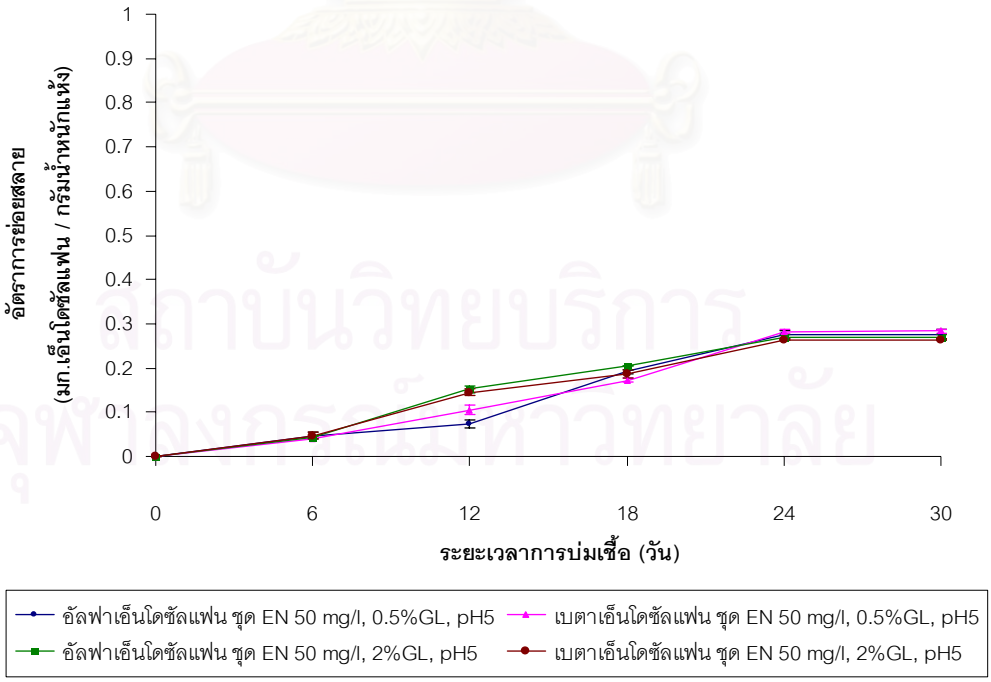
EN หมายถึง ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน

GL หมายถึง ความเข้มข้นของกลูโคส

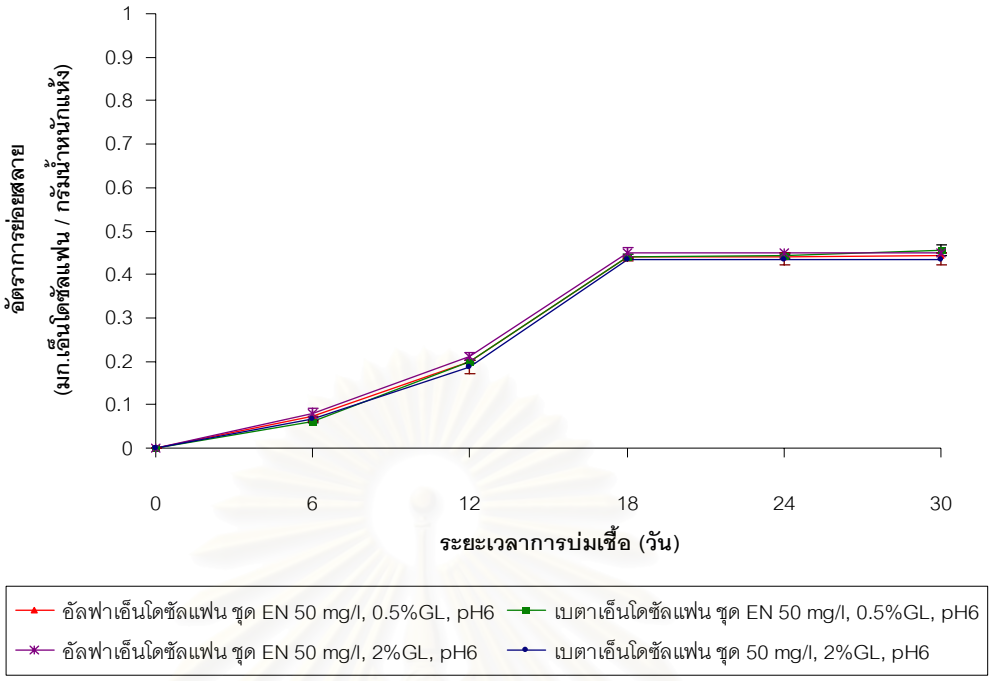
ผลจากตารางที่ 4.4 สามารถสรุปได้ว่า สภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่มีความเหมาะสมที่สุดต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 คือ สภาวะที่มีความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า pH เท่ากับ 7 โดยสามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ได้ 49.44 มิลลิกรัมต่อลิตร (98.88 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH เท่ากับ 7 ย่อยสลายได้ 36.02 มิลลิกรัมต่อลิตร (72.04 เปอร์เซ็นต์) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH เท่ากับ 6 ย่อยสลายได้ 21.9 มิลลิกรัมต่อลิตร (43.8 เปอร์เซ็นต์)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH เท่ากับ 6 ย่อยสลายได้ 21.6มิลลิกรัมต่อลิตร (43.2 เปอร์เซ็นต์) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH เท่ากับ 5 ย่อยสลายได้ 13.52 มิลลิกรัมต่อลิตร (27.04 เปอร์เซ็นต์) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH เท่ากับ 5 ย่อยสลายได้ 13.42 มิลลิกรัมต่อลิตร (26.84 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ

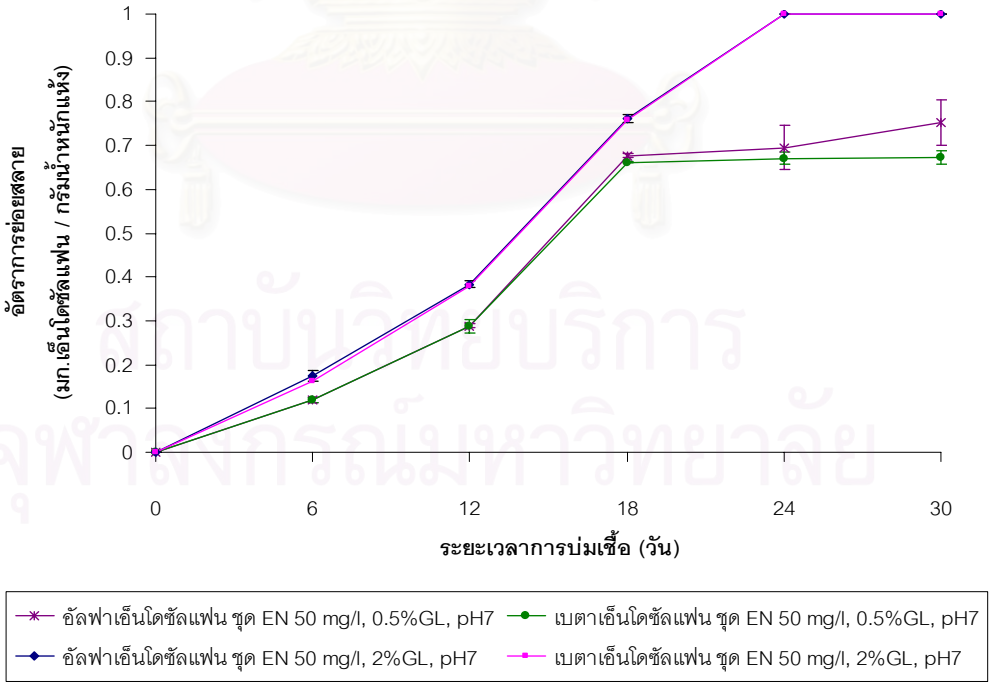
เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 ซึ่งจากการทดลองนี้ ได้แก่ ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์) และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH 5, 6 และ 7) พบว่า ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสที่ 2 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการเพิ่มอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของรา W2 มากกว่าปริมาณความเข้มข้นที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก จ) ส่วนสภาวะความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการทดสอบทางสถิติพบว่า สภาวะที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเป็น 5 และ 6 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เป็น 7 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก จ) ซึ่งสนับสนุนผลการวิจัยดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า สภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เท่ากับ 7 และมีองค์ประกอบเป็นกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นสภาวะที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพต่อการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 สูงสุด



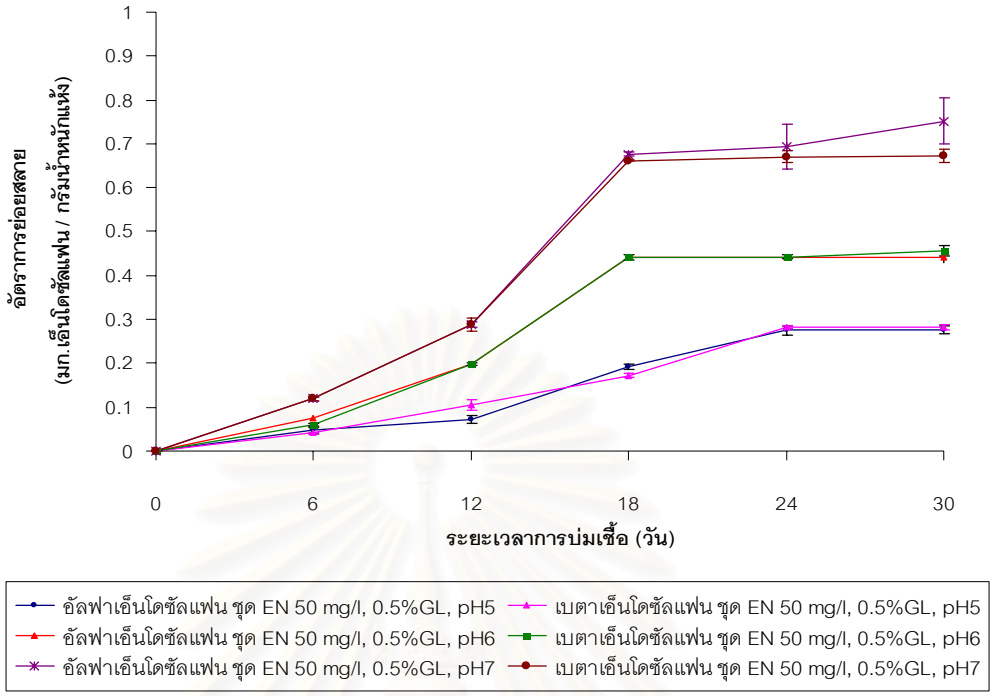
ภาพที่ 4.15 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5



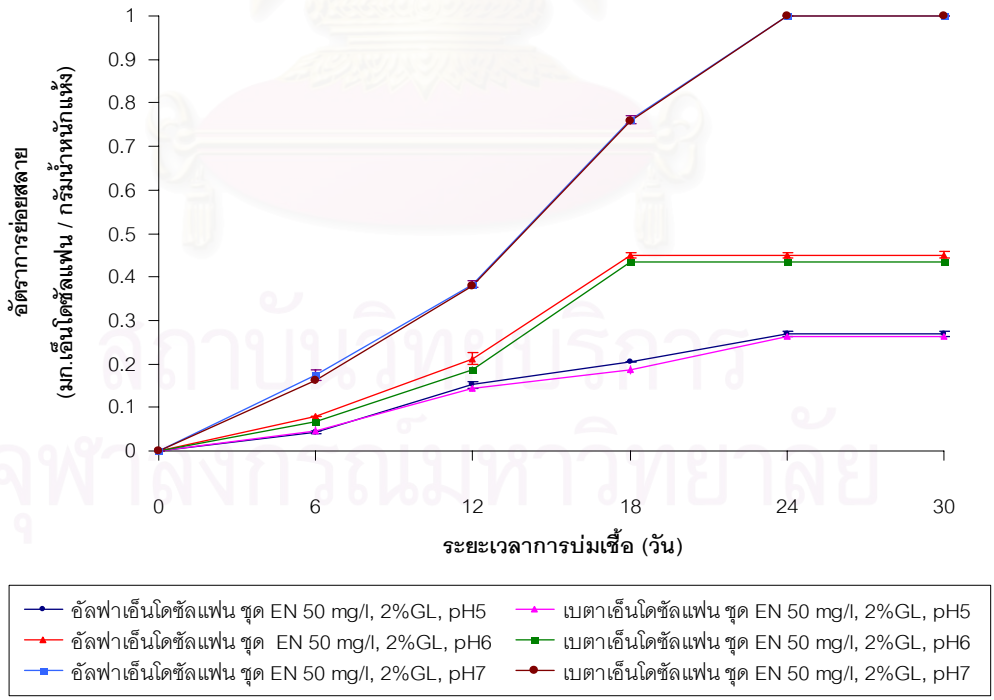
ภาพที่ 4.16 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6



ภาพที่ 4.17 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7



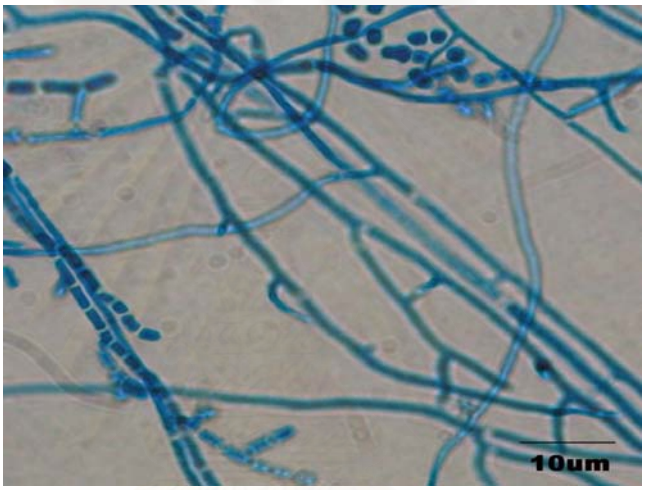
ภาพที่ 4.18 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 5 6 และ 7 ที่ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์



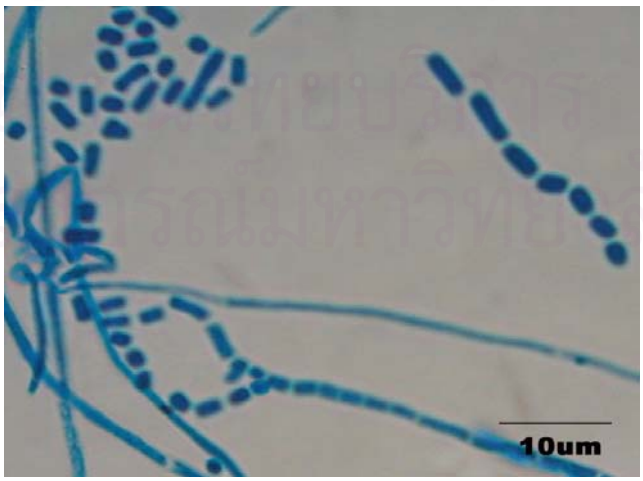
ภาพที่ 4.19 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 5 6 และ 7 ที่ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์

4.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดเลือกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค slide culture

จากผลการศึกษาความสามารถในการย่อยเอ็นโดซัลแฟนของรา ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Czapek's Dox Medium ซึ่งพบว่า ราไอโซเลต W2 ที่คัดแยกได้จากเห็ด มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ดีที่สุด จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค slide culture พบว่า ลักษณะเส้นใยของราเป็นชนิดที่มีผนังกั้น (septate hypha) ดังภาพที่ 4.20 และพบการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า arthospore หรือ oidia ซึ่งเกิดจากการแตก หรือขาดเป็นท่อนๆ ของเส้นใยดังภาพที่ 4.21



ภาพที่ 4.20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา W2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า แสดงเส้นใยชนิดที่มีผนังกั้น (septate hypha)



ภาพที่ 4.21 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา W2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า แสดงสปอร์แบบไม่อาศัยเพศชนิด arthospore

4.6 การบ่งชี้ชนิดของราที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (Internal Transcribed Spacer)

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1-F และ ITS4 พบว่า รา W2 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 697 bp ซึ่งประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1 ถึง 68 เป็นบางส่วนของ 18S rRNA ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 69 ถึง 275 เป็นส่วนของ ITS1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 276 ถึง 435 เป็นส่วนของ 5.8S rRNA และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 436 ถึง 639 เป็นส่วนของ ITS2 และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 640 ถึง 697 เป็นบางส่วนของ 28S rRNA โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดแสดงได้ดังต่อไปนี้

10	20	30	40	50
5' CTTGGTCATT	TAGAGGAAGT	AAAAGTCGTA	ACAAGGTTTC	CGTAGGTGAA
60	70	80	90	100
CCTGCGGAAG	GATCATTAAC	GAGTTTTGAA	AGGGGTTGTA	GCTGGCCTTC
110	120	130	140	150
AGGGGCATGT	GCACACCTTG	CTCATCCACT	CTACACCTGT	GCACTTACTG
160	170	180	190	200
TAGGTTGGTG	TAAGTCTTTC	TGGCTGCCTT	TAAGGTGGTT	GCAAAGGCAT
210	220	230	240	250
TCTGCCAGCC	TATGTATGTT	TACACAAACT	CCAATGAATG	TTAATAGAAT
260	270	280	290	300
GGAAACGCGT	CTAACGCATT	TTAATACAAC	TTTCAGCAAC	GGATCTCTTG
310	320	330	340	350
GCTCTCGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
360	370	380	390	400
GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACCTTG	CGCTCCTTGG
410	420	430	440	450
TATTCCAAGG	AGCATGCCTG	TTTGAGTGTC	ATGAAATTCT	CAACTCATAA
460	470	480	490	500
ATCTTTTTGG	TTTATGAGCT	TGGATTTTGG	AGGCTTGTTG	AGTCCTTGTA
510	520	530	540	550
ATATGGGTCT	TAGCTCCTCT	TGAATGCATT	AGCTTGATTC	CGTGCGGATC
560	570	580	590	600
GGCTCTCAGT	GTGATAATTA	TCTATGCTGT	GGTCGTGAAG	TGTTTGGCAG
610	620	630	640	650
GCTTCTAATT	GTCCTCTCAA	AGGGACAACA	CTCTGACATC	TGACCTCAAA
660	670	680	690	700
TCAGGTAGGA	CTACCCGCTG	AACTTAAGCA	TATCAATAAG	CGGAGGA 3'

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนที่ประมวลรหัสตำแหน่ง ITS ของราไอโซเลต W2 กับฐานข้อมูลที่มีรายงานไว้ใน GenBank พบว่า ราไอโซเลต W2 มีความคล้ายคลึงกับราในสกุล *Trametes* 93-95% และได้ถูกบันทึกไว้ใน GenBank ด้วย Accession number ที่ AB259860 โดยรา W2 ถูกจัดจำแนกอยู่ในหมวดหมู่ ดังนี้

Division	Basidiomycota
Class	Hymenomycetes
Order	Aphyllophorales
Family	Coriolaceae
Genus	*Trametes*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการวิจัยที่สรุปว่า ราไอโซเลต W2 เป็นราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเอ็นโดซัลแฟน ซึ่งเมื่อนำมาบ่งชี้ชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนที่ประมวลรหัสตำแหน่ง ITS พบว่า เป็นราไวต์รอตที่มีความคล้ายคลึงกับราในสกุล *Trametes* โดยราในสกุลดังกล่าว รวมทั้งในสกุลอื่นๆ ที่อยู่ในกลุ่มของราไวต์รอตนั้น มีความสามารถในการย่อยสลายมวลสารโมเลกุลสูง และสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ (Akhtar, Kirk และ Blanchette, 1999) ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำราไวต์รอตมาใช้ในการเปลี่ยนโครงสร้างสารประกอบบางชนิดเพื่อไม่ให้เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดยราไวต์รอตที่ได้รับความสนใจเพื่อนำมาศึกษาถึงการใช้ประโยชน์ในการบำบัดฟื้นฟูทางชีวภาพ (bioremediation) ได้แก่ *Trametes versicolor, Trametes trogii, Trametes hirsute*, *Phanerochaete chrysosporium* และ *Pleurotus pulmonarius* (Boopathy, 2000; Mechichi, Mhiri และ Sayadi, 2006; Abadulla และคณะ, 2000) ทั้งนี้ ลักษณะพิเศษที่ทำให้ราไวต์รอตสามารถย่อยสลายมวลสารโมเลกุลสูงได้ เนื่องจากสามารถผลิต extracellular enzyme ที่เข้าไปทำลายโครงสร้างที่ซับซ้อนของสาร โดยเอนไซม์ดังกล่าว ได้แก่ Lignin peroxidase, Manganese peroxidase และ Laccase (Hatakka, 1994)

ในงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนโดยราไวต์รอต แล้วพบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดี ได้แก่ การใช้ราสายพันธุ์ *Phanerochaete chysosporium* (Kullman และ Matsumura, 1996) และ *Pleurotus pulmonarius* (Hernandez-Rodriguez และคณะ, 2006) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ที่มีการพบว่า ราไวต์รอตไอโซเลต W2 ซึ่งเป็นราในกลุ่ม *Trametes* มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้เช่นกัน จึงนับว่าข้อมูลใหม่เป็นซึ่งอาจมีประโยชน์ในการศึกษาเชิงลึกต่อไป ทั้งนี้ นอกจากราในกลุ่มไวต์รอต ยังมีราสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ ได้แก่ *Trichoderma harzianum* (Katayama และ Matsumura, 1993), *Aspergillus niger* (Mukherjee และ Gopal, 1994), *Mucor thermohyalospora* MTCC 1384 (Shetty และคณะ, 2000), *Fusarium ventricosum* (Siddique และคณะ, 2003), *Aspergillus terreus* และ *Cladosporium oxysporum* (Mukherjee และ Mittal, 2005) ซึ่งราแต่ละชนิด ต่างก็มีข้อจำกัดในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในอัตราที่มากน้อยแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณความเข้มข้นของสาร แหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่างของสิ่งแวดล้อมหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (Awasthi, Ahuja และ Kumar, 2000) ทั้งนี้ จากการศึกษาข้อจำกัดของราไอโซเลต W2 พบว่า ไม่สามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากความเข้มข้นของสาร

ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณสูงเกินกว่าระดับที่รา W2 จะยอมรับได้ จนอาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ หรืออาจเกิดจากคุณสมบัติทางกายภาพของเอ็นโดซัลแฟน ซึ่งเป็นสารที่มีสภาพการละลายน้ำได้ในระดับต่ำ (0.32 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Oregon State University, 1996) เมื่อนำมาทดสอบในปริมาณความเข้มข้นที่สูง ราจึงมีการนำเอ็นโดซัลแฟนไปใช้ได้อย่างไม่เต็มที่ หรืออาจเกิดจากระยะเวลาที่รา W2 ต้องการใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะที่มีสารแปลกปลอมอย่างเอ็นโดซัลแฟนที่มีความเข้มข้นสูงนั้น นานกว่า 30 วัน ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทำการสังเกตผลภายในระยะเวลา 30 วัน จึงอาจทำให้ไม่เห็นผลภายในระยะเวลาที่กำหนด

ปัจจัยเรื่องค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังที่ได้ผลว่า สภาวะที่มีค่า pH 4 นั้น ราไอโซเลต W2 ไม่เกิดการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติเฉพาะของราที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงเกินไป เป็นผลให้ไม่เกิดการสร้างเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายสาร (กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา, 2543) นอกจากนี้ อาจเป็นเพราะคุณสมบัติเฉพาะอีกประการหนึ่งของเอ็นโดซัลแฟน ที่มีความคงทนในสภาพที่เป็นกรดสูงมากกว่าสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นเบส (German Federal Environment Agency, 2004) ดังนั้น ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เท่ากับ 4 จึงช่วยสนับสนุนให้เอ็นโดซัลแฟนมีคงทนได้นาน และไม่ถูกย่อยสลายโดยรา W2

ส่วนปัจจัยที่เกิดจากความแตกต่างของปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสที่ให้ผลว่า ระดับความเข้มข้นของกลูโคสที่ 2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิดอัตราการย่อยสลายได้สูงกว่าที่ระดับกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ อาจอธิบายได้ว่า ตามปกติกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกรานำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อสร้างการเจริญเติบโต และนำไปสู่การสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน (Tanzer และคณะ, 2003) ดังนั้น ณ ระดับหนึ่ง ที่มีสภาวะความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมากกว่าย่อมสนับสนุนให้รามีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่า ซึ่งเป็นผลต่อโอกาสที่ราจะสามารถย่อยสลายสารได้ในอัตราที่สูงกว่าเช่นกัน (Chualaksananukul และคณะ, 2006)

ผลจากการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox medium ณ วันสุดท้ายของการบ่มเชื้อที่พบว่า มีค่าสูงขึ้นเป็น 8.5 นับจากค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เท่ากับ 7 นั้น อาจเนื่องมาจากรา W2 มีการใช้ซัลเฟอร์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอ็นโดซัลแฟนเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน จนทำให้โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นวงแหวนของเอ็นโดซัลแฟนแตกออก และสนับสนุนให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นตามมา ซึ่งนำมาสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอ็นโดซัลแฟนไปเป็นสารเมทาโบไลท์รูปเอ็นโดซัลแฟนไดออล ที่มีคุณสมบัติเป็นเบสและส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะดังกล่าว (Greve และ Wit, 1971)

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกราออกเป็นไอโซเลตที่บริสุทธิ์จากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ราดิน จากป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี และจากพื้นที่ทำการเกษตรที่มีประวัติการใช้เอ็นโดซัลแฟน ในจังหวัดปทุมธานี นครปฐม จันทบุรี สระแก้ว นครราชสีมา และนนทบุรี พบว่า มีจำนวนไอโซเลตที่คัดแยกได้ทั้งหมด 44 ไอโซเลต (S1-S44) ราที่คัดแยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ผุ ที่ได้เก็บตัวอย่างในอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก และอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ มีทั้งหมด 13 ไอโซเลต (W1-W13) ซึ่งเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นวงแหวน หรือการทดสอบ ความเป็นราไวต์รอต (white rot fungi) โดยนำมาทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผสมสารสีสองชนิด คือ Tannic acid agar และ Poly-R agar clearance ผลการทดสอบปรากฏว่า มีรา 8 ไอโซเลต ที่สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด (W1 W2 W4 W6 W8 W10 W11 และ W13) จึงได้นำราดังกล่าวมาศึกษาขั้นต่อไป

จากจำนวนราทั้งหมด 57 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้ นำมาบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Czapek's Dox Medium (pH 7) บนเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนขั้นปฐมภูมิ (Primary degradation test) โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่า มีราไอโซเลต S38 ที่แยกได้มาจากดินป่าธรรมชาติ อำเภอศรสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี และ ราไอโซเลต W2 ซึ่งคัดแยกมาจากตัวอย่างเห็ดที่ขึ้นบนกิ่งไม้ผุ ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ให้เป็นสารเมทาโบไลท์ชนิดหนึ่ง โดยราไอโซเลต S38 ความสามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนให้เป็นเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต ซึ่งเป็นเมทาโบไลท์ของเอ็นโดซัลแฟนที่มีความคงทนสูงและเป็นพิษมากกว่า ส่วนราไอโซเลต W2 สามารถย่อยเอ็นโดซัลแฟนให้เป็นเมทาโบไลท์ในวันที่ 12 ของการบ่มเชื้อ และสามารถย่อยเอ็นโดซัลแฟนได้หมด ภายในระยะเวลา 18 วันของการบ่มเชื้อ ซึ่งสารเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนโดยรา W2 นี้ มีค่า Retention factor (R_f) เท่ากับ 0.04 สอดคล้องกับ R_f ของเอ็นโดซัลแฟนไดออล ซึ่งเป็นเมทาโบไลท์ที่มีความคงตัวในสิ่งแวดล้อมต่ำและมีความเป็นพิษน้อยกว่าเอ็นโดซัลแฟน (Awasthi และคณะ, 1997; Awasthi และคณะ, 2000; Shetty และคณะ, 2000 และ Sutherland และคณะ, 2002) จากการตรวจสอบค่าความเป็นกรด-

ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อในวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อ พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงจาก 7 เป็น 8.54 ซึ่งแตกต่างจากราไอโซเลตอื่นๆ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อย

เมื่อนำราไอโซเลต W2 มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนขั้นปฐมภูมิ โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC) ที่มีเครื่องตรวจวัดเป็นแบบ Electron Capture Detector ตรวจสอบปริมาณการย่อยสลาย หรือปริมาณความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนที่ลดลง ทุก 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่า รา W2 สามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ทั้งอัลฟาและเบตาไอโซเมอร์ ได้หมดภายในระยะเวลา 21 วันของการบ่มเชื้อ และทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปของเอ็นโดซัลแฟนเป็นเอ็นโดซัลแฟนไดออล หลังจากวันที่ 3 ของการบ่มเชื้อ และเมื่อพิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในระหว่างการทดสอบการย่อยสลายพบว่า ราไอโซเลต W2 มีระยะปรับตัว (lag phase) ในช่วง 3 วันแรกของการบ่มเชื้อ ซึ่งเป็นช่วงเริ่มต้นที่มีการย้ายราไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้น รา เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) จนถึงวันที่ 18 ของการบ่มเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการลดลงของเอ็นโดซัลแฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอัตราการเพิ่มขึ้นของเอ็นโดซัลแฟนไดออล ทั้งนี้ในระยะดังกล่าว ได้สังเกตเห็นขนาดเซลล์ราในอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาดเล็กลง เนื่องจากรามีอาหารสะสมอยู่ในเซลล์เต็มที่ และมีการแบ่งตัว (อนุเทพ ภาสุระ, 2541) ภายหลังจากวันที่ 18 จนถึงวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อ ราได้เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ซึ่งไม่พบการเจริญเติบโตของรา และเมื่อพิจารณาจากอัตราการย่อยสลายพบว่า ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อค่อยๆ ลดลงและคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อ ทั้งนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ตรวจวัดได้ในวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 8.55

การศึกษาต่อมาถึงสภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนโดยราไอโซเลต W2 ซึ่งได้กำหนดสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่มีการผันแปรของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน (50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์) และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH 4 5 6 และ 7) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลการย่อยสลายควบคู่ไปกับการตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตของรา และการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากการสังเกตเบื้องต้นพบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชุดที่มีความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งชุดที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 ไม่พบการเจริญเติบโตของรา W2 และมีค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อนำมาทดสอบการย่อยสลายเบื้องต้นด้วยวิธี TLC พบว่า ไม่เกิดการสร้างสารเอ็นโดซัลแฟนไดออล หรือเมทาโบไลท์รูปอื่นๆ

เมื่อพิจารณาผลจากการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนทั้ง 6 สภาวะที่เหลือ ซึ่งทั้งหมดมีค่าความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนเป็น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแบ่งออกเป็นชุดที่มีปริมาณกลูโคสเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 5 6

และ 7 ชุดที่มีปริมาณกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 5 6 และ 7 วัดอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของราต่อวัน ซึ่งผลปรากฏว่า ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ราไอโซเลต W2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ดีที่สุด โดยมีอัตราการย่อยสลายอยู่ที่ 0.0373 มิลลิกรัมเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของราต่อวัน หรือคิดเป็นประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 98.88 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สภาวะที่มีปริมาณกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ pH 7 (72.04 เปอร์เซ็นต์) สภาวะที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ pH 6 (43.8 เปอร์เซ็นต์) สภาวะที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ pH 6 (43.2 เปอร์เซ็นต์) สภาวะที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ pH 5 (27.04 เปอร์เซ็นต์) และสภาวะที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ pH 5 (26.84 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ทั้งนี้ จากการวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในทุกสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5 และ 6 พบว่า มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ ราเริ่มมีการเจริญเติบโตหลังจากวันที่ 6 ของการบ่มเชื้อ เจริญสูงสุดในวันที่ 18 ของการบ่มเชื้อ และเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase จนถึงวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อ ส่วนในชุดที่มีสภาวะความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 มีแนวโน้มในการเจริญเติบที่แตกต่างออกไป คือ เริ่มสังเกตเห็นการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วก่อนวันที่ 6 ของการบ่มเชื้อ และเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 18 ของการบ่มเชื้อเช่นเดียวกับชุดอื่นๆ และผลจากการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ในการทดลองทุกสภาวะมีแนวโน้มเปลี่ยนไปในทำนองเดียวกัน คือ มีค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้น

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราไอโซเลต W2 ซึ่งเป็นราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ดีที่สุด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า รา W2 มีเส้นใยที่มีผนังกั้นและสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศแบบ arthospore หรือ oidia เมื่อทำการบ่งชี้ลักษณะโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลที่มีรายงานไว้ใน GenBank พบว่า รา W2 มีความคล้ายคลึงกับราในสกุล *Trametes* 93-95% และได้ถูกบันทึกไว้ใน GenBank ด้วย Accession number ที่ AB259860

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 7

ข้อเสนอแนะ

แนวทางการวิจัยนี้ เป็นการนำเสนอวิธีทางชีวภาพมาใช้ในการบำบัดการตกค้างปนเปื้อนของเอ็นโดซัลแฟน ซึ่งถือเป็นทางเลือกที่คำนึงถึงสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตาม สมควรที่จะต้องพิจารณาถึงเหตุผลทางด้านเศรษฐศาสตร์ ความคุ้มค่าในการใช้ประโยชน์ ควบคู่ไปกับความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้จริงในสิ่งแวดล้อม โดยอาจวางแผนการทดลองทดสอบความสามารถในการย่อยสลายในดินที่มีการปนเปื้อนของเอ็นโดซัลแฟน เพื่อการศึกษาถึงสภาวะอื่นๆ ที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลาย หรืออาจนำราที่คัดเลือกได้มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคโนโลยีอื่นๆ ด้านวิศวกรรม เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด และใช้เวลาในการบำบัดได้รวดเร็วขึ้น ในส่วนของงานวิจัยควรมีการศึกษาในเชิงลึก ถึงกลไกการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของรา เช่น การศึกษาถึงชนิดเอนไซม์ที่ราผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน หรืออาจมีการนำราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ไปย่อยสลายมวลสารโมเลกุลสูงหรือสารกำจัดแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆ ที่ตกค้างปนเปื้อน และมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา. 2543. จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครราชสีมา: โคราช ออฟเซ็ทการพิมพ์.

คณะกรรมการอาหารและยา, สำนักงาน. 2547. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2547 / บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย (ตามบัญชีท้ายประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม พ.ศ.2546 พ.ศ.2547 และ พ.ศ.2548)[Online]. กรุงเทพมหานคร: กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย สำนักควบคุมเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. แหล่งที่มา: http://www.fda.moph.go.th/psiond/index.html[25 พฤษภาคม 2548]

บริษัท พาซาน่า (ประเทศไทย) จำกัด. 2546. เอ็นโดซัลแฟน 35[Online]. กรุงเทพมหานคร: บริษัท พาซาน่า (ประเทศไทย) จำกัด. แหล่งที่มา: http://www.pasana.net[28 กันยายน 2547]

ยงยุทธ โอสถสภา, ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, อรรถศิษฐ์ วงศ์มณีโรจน์ และ ชัยสิทธิ์ ทองจู. 2541. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. 3,000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 8. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชาการเกษตร, กรม. 2547. ข้อมูลนำเข้าวัตถุอันตราย ปี 2546 (ด่านท่าเรือกรุงเทพฯ ด่านลาดกระบัง และด่านท่าเรือแหลมฉบัง)[Online]. กรุงเทพมหานคร: กรมวิชาการเกษตร. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/toxic/toxic-46.pdf[28 กันยายน 2547]

ศักดา ศรีนิเวศน์. 2547. ยาฆ่าหอยเชอร์รี่ยอดฮิตของเกษตรกร[Online]. กรุงเทพมหานคร: กรมส่งเสริมการเกษตร. แหล่งที่มา: http://www.agric-prod.mju.ac.th/web-veg/article/new003.htm [1 ตุลาคม 2547]

ศักดา ศรีนิเวศน์. 2547. เอ็นโดซัลแฟน ภัยตัวใหม่ในสายน้ำ[Online]. กรุงเทพมหานคร: กรมส่งเสริมการเกษตร. แหล่งที่มา: http://suphanburi.doae.go.th/news06.htm[1 ตุลาคม 2547]

ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา. 2545. ภาวะมลพิษของดินจากการใช้สารเคมี. 1,000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนุเทพ ภาสุระ. 2541. เอกสารประกอบการสอน 305302 ไมคอลโลยี (Mycology). ชลบุรี: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. (อัดสำเนา)

ภาษาอังกฤษ

Abadulla, E., et al. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. Applied and Environmental Microbiology 66(8): 3357–3362.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2000. Toxicological Profile For Endosulfan[Online]. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Available from: http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp41.html[2004, 24 May]

Akhtar, M., Kirk, T. K., and Blanchette, R. A. 1999. Advances in Applied and Fundamental Research. Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry pp. 189-192.

Al-Hassan, R. M., Bashour, I. I., and Kawar, N. S. 2004. Biodegradation of alpha and beta endosulfan in soil as influenced by application of different organic materials. Journal of Environmental Science and Health 39(5-6): 757-764.

Arienti, M., Wilk, L., Jansinski, M., and Prominski, N. 1988. Dioxin-Containing Wastes: Treatment Technology. New Jersey: Noyes Data Corporation.

Awasthi, N., Ahuja, R., and Kumar, A. 2000. Factors influencing the degradation of soil-applied endosulfan isomers. Soil Biology and Biochemistry 32: 1697-1705.

Awasthi, N., Manickam, N., and Kumar, A. 1997. Biodegradation of endosulfan by a bacterial coculture. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 59: 928-934.

Awasthi, N., Singh, A. K., Jain, R. K., and Khangarot, B. S. 2003. Degradation and detoxification of endosulfan isomer by a defined co-culture of two *Bacillus* strains. Applied Microbiology and Biotechnology 62: 279-283.

Baker, K. H., and Herson, D. S. 1994. Bioremediation. New York: McGraw–Hill.

Beyers, R. A., Woodham, D. W., and Bowman, M. C. G. 1965. Residues on coastal Bermuda grass, trash and soil treated with endosulfan. Journal of Economic Entomology 58: 160-161.

Boopathy, R. 2000. Bioremediation of explosives contaminated soil. International Biodeterioration and Biodegradation 46: 29-36.

Chulalaksananukul, S., et al. 2006. Biodegradation of benzo(a)pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. FEMS Microbiology Letter 262: 99-106.

Crawford, D. L., Crawford, R. L., and Pometto, A. L. 1985. Preparation of specifically labeled ^{14}C-(lignin)- and ^{14}C-(cellulose)-lignocelluloses and their decomposition by the microflora of soil. Applied and Environmental Microbiology 33: 1247-1251.

Food and Agriculture Organization. 1993. FAO Pesticide Management: FAO PESTICIDEs for Plant Production Products[Online]. Rome: FAO. Available from: http://www.fao.org/ag/agp/agpp/pesticid/jmpr/Download/93/endosulf.pdf[2004, 25 May]

Freitag, M., and Morrell, J. J. 1992. Decolorization of the polymeric dye Poly R-478 by wood-inhabiting fungi. Canadian Journal of Microbiology 38: 811-822.

Gardes, M., and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2: 113-118.

German Federal Environment Agency. 2004. Endosulfan. Endosulfan to Be Considered as a Candidate for Inclusion in the UN-ECE LRTAP Protoco; on Persistent Organic Pollutants: 33.

Gildemeister, H., and Jordan, H. J. 1983. Photolytic degradation of the insecticide endosulfan on soil covered thin layer plates under simulated sunlight. Berlin: AgrEvo Doc. No. A25805. (Unpublished report)

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: 1741-1747.

Goebel, H., Gorbach, S., Knauf, W., Rimpau, R. H., and Huttenbach, H. 1982. Properties, effects, residues, and analytics of the insecticide endosulfan. Residue Reviews 83: 1-165.

Goerlitz, G., and Eyrich, U. 1987. Endosulfan adsorption/desorption on the system soil/water. Part I: alpha-endosulfan, beta-endosulfan. Berlin: AgrEvo Doc. No. A37591. (Unpublished report)

Gold, M. H., Glenn, J. K., and Alic, M. 1988. Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. Methods in Enzymology 161: 74-78.

Greve, P. A., and Wit, S. L. 1971. Endosulfan in the Rhine river. Journal of the Water Pollution Control Federation 43: 2338-2348.

Guerin, T. F. 1999. The anaerobic degradation of endosulfan by indigenous microorganism from low-oxygen soils and sediments. Environmental Pollution 106: 13-21.

Guerin, T. F. 2001. Abiological loss of endosulfan and related chlorinated organic compounds from aqueous systems in the presence and absence of oxygen. Environmental Pollution 115: 219-230.

Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Review 13: 125-135.

Hernandez-Rodriguez, D., Sanchez, J. E., Nieto, M. G., and Marquez-Rocha, F. J. 2006. Degradation of endosulfan during substrate preparation and cultivation of *Pleurotus pulmonarius*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22(7): 753-760.

International Programme on Chemical Safety. 1984. Endosulfan[Online]. Ontario: International Programme on Chemical Safety. Available from: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc40.htm[2004, May 25]

Juhasz, A. L., Smith, E., Smith, J., and Naidu, R. 2002. Biosorption of organochlorine pesticides using fungal biomass. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 29: 163-169.

Katayama, A., and Matsumura, F. 1993. Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan by *Trichoderma harzianum.* Environmental Toxicology and Chemistry 12: 1059-1065.

Klaassen, D. C., Amdur, O. M., and Doull, J. 1996. Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. 5th ed. New York: McGraw-Hill.

Kullman, S. W., and Matsumura, F. 1996. Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. Applied and Environmental Microbiology 62(2): 593-600.

Kumar, M., and Philip, L. 2006. Bioremediation of endosulfan contaminated soil and water – Optimization of operation conditions in laboratory scale reactors. Journal of Hazardous Materials B136: 354-364.

Kwon, G. S., et al. 2002. *Klebsiella pneumoniae* KE-1 degrades endosulfan without formation of the toxic metabolite, endosulfan sulfate. FEMS Microbiology Letters 215: 255-259.

Kwon, G. S., Sohn, H. Y., and Shin, K, S. 2005. Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8. Applied Microbiology and Biotechnology 67: 845-850.

Lee, S. E., et al. 2003. Biotransformation of an organochlorine insecticide, endosulfan, by *Anabaena* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 1336-1340.

Maier-Bode, H. 1968. Properties, effects, residues and analytics of insecticide endosulfan. Residue Reviews 22: 1-44.

Martens, R. 1976. Degradation of [8,9 -^{14}C] endosulfan by soil microorganisms. Applied and Environmental Microbiology 31(6): 853-858.

Mechichi, T., Mhiri, N., and และ Sayadi, S. 2006. Remazol brilliant blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. Chemosphere (article in press): 1-8.

Meister, R. T., Berg, G. L., Sine, C., Meister, S., and Poplyk, J. 1984. Farm Chemicals Handbook. 70th ed. Ohio: Meister Publishing Co.

Mukherjee, I., and Gopal, M. 1994. Degradation of β - endosulfan by *Aspergillus niger.* Toxicological and Environmental Chemistry 46: 217-221.

Mukherjee, I., and Mittal, A. 2005. Bioremediation of endosulfan using *Aspergillus terrus* and *Cladosporium oxysporum*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 75: 1034-1040.

Oregon State University. 1996. Extension toxicology network pesticide information profiles: Endosulfan[Online]. Oregon: Oregon State University. Available from: http://extoxnet.orst.edu/pips/endosulf.htm[2004, February 22]

Pesticide Action Network – Asia and the Pacific. 1999. Endosulfan: summary[Online]. Penang: Pesticide Action Network – Asia and the Pacific. Available from: http://www.poptel.org.uk/panap/pest/pe-end.htm[2004, February 14]

Pesticide Action Network UK. 2000. Endosulfan deaths and poisonings in Benin[Online]. London: Pesticide Action Network UK. Available from: http://www.pan-uk.org/pestnews/Issue/pn47/pn47p12.htm[2005, January 15]

Pointing, S. B. 1999. Lignin modifying enzyme assays. Fungal Diversity 2: 25-33.

Pointing, S. B. 2001. Exploiting the versatile ligninolytic system of white-rot fungi. Fungal Diversity Research 6: 253-290.

Richard, T. H., and Miguel, U. Atlas of Introductory Mycology. 2nd ed. USA.

Sethunathan, N., et al. 2002. Persistence of endosulfan and endosulfan sulfate in soil as affected by moisture regime and organic matter addition. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 68: 725-731.

Sethunathan, N., et al. 2004. Algal degradation of a known endocrine disrupting insecticide, alpha-endosulfan, and its metabolites, endosulfan sulfate, in liquid medium and soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(10): 3030-3035.

Shetty P. K., et al. 2000. Biodegradation of cyclodiene insecticide endosulfan by *Mucor thermohyalospora* MTCC 1384. Current Science 79(9): 1381-1383.

Shivaramaiah, H. M., and Kennedy I, R. 2006. Biodegradation of endosulfan by a soil bacterium. Journal of Environmental Science and Health 41(6): 895-950.

Siddique, T., Okeke, B. C., Arshad, M., and Frankenberger, W. T., Jr. 2003. Biodegradation kinetics of endosulfan by *Fusarium ventricosum* and a *Pandoraea* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 8015-8019.

Siddique, T., Okeke, B. C., Arshad, M., and Frankenberger, W. T., Jr. 2003. Enrichment and Isolation of endosulfan-degrading microorganisms. Journal of Environmental Quality 32: 47-54.

Stewart, D. K. R., and Cairns, K. G. 1974. Endosulfan persistence in soil and uptake by potato tubers. Journal of Agricultural and Food Chemistry 22: 984-986.

Stumpf, K. 1990. Comments regarding the dutch hazard assessment of endosulfan concerning the bioavailability in water/sediment systems. Frankfurt: Hoechst Doc. No. A44231. (Unpublished report)

Sutherland, T. D., et al. 2000. Enrichment of an endosulfan-degrading mixed bacterial culture. Applied and Environmental Microbiology 66(7): 2822-2828.

Sutherland, T. D., et al. 2002. Enrichment of a microbial culture capable of degrading endosulfansulphate, the toxic metabolite of endosulfan. Journal of Applied Microbiology 92: 541-548.

Sutherland, T. D., et al. 2000. Enrichment of an endosulfan-degrading mixed bacterial culture. Applied and Environmental Microbiology 66(7): 2822-2828.

Tanzer, M. M., Arst, H. N., Skalchunes, A. R., Coffin, M., Darveaux, B. A., Heiniger, R. W., and Shuster, J. R. 2003. Global nutritional profiling for mutant and chemical mode-of-action analysis in filamentous fungi. Functional Integration Genomics 3: 160–170.

The British Crop Protection Council. 2001. The e-pesticide manual (twelfth edition) version 2.1: Endosulfan[Computer software]. Hertforshire: Wise and Loveys Information Services Limited.

United Nations. 2006. Survey on the use of endosulfan fro controlling golden apple snail in the paddy fields. Inclusion of Chemicals in Annex III of the Rotterdam Convention: Review of Notifications of Final Regulatory Actions to Ban or Severely Restrict a Chemical: Endosulfan pp. 4.

United States Environmental Protection Agency. 2002. EPA 738-R-02-013[Online]. Washington, D.C.: United States Environmental Protection Agency. Available from: http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/endosulfan/finalefed_riskassess.pdf [2004, July 7]

University of Colorado at Boulder. 2006. TLC - Retention factor (Rf)[Online]. Colorado: University of Colorado at Boulder, Department of Chemistry and Biochemistry. Available from: http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/TLC/TLCrf.html[2007, March 15]

Verma, K., Agrawal, N., Farooq, M., Misra, R. B., and Hans, R. K. 2006. Endosulfan degradation by a *Rhodococcus* strain isolated from earth worm gut. Ecotoxicology and Environmental Safety 64: 377-381.

Vidali, M. 2001. Bioremediation – An overview. Pure Applied Chemistry 73(7): 1163-1172.

White, T., Bruns, T., Lee, S., and Tayler, J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics, PCR Protocal: A Guide to Methods and Application. California: Academic Press.

Zhou, Z., Miwa, M., and Hogetsu, T. 1999. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). New Phytologist 144: 55-63.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดสอบขั้นปฐมภูมิ

ตารางที่ ก.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ วันที่ 20 ของการบ่มเชื้อ

รหัสรา ที่ทดสอบ	ชุดควบคุม ที่ไม่ใส่สาร	ชุดควบคุม ที่ไม่ใส่เชื้อ	ชุดที่ใส่เส้นใย ราที่ตายแล้ว	ชุดทดลอง ที่ใส่เชื้อ
S1	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01
S2	7.01±0.01	7.00±0.0	7.00±0	7.00±0
S3	7.02±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01	7.02±0.01
S4	7.00±0.01	7.00±0	7.00±0.01	7.00±0.01
S5	7.00±0	7.00±0	7.00±0.02	7.00±0.01
S6	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0.02	7.01±0.01
S7	7.00±0	7.00±0.01	7.00±0.02	7.01±0.01
S8	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0	7.02±0.01
S9	7.01±0.01	7.00±0	7.00±0	7.00±0.01
S10	7.02±0.01	6.99±0.01	7.01±0.02	7.01±0.01
S11	7.00±0.01	7.00±0	7.00±0.02	6.99±0.02
S12	7.00±0	7.00±0	7.00±0	6.99±0.01
S13	7.01±0.01	7.00±0.01	7.01±0	7.00±0.01
S14	7.00±0	7.00±0.01	7.00±0.01	7.01±0.01
S15	7.02±0.01	7.00±0.01	7.02±0.02	7.00±0.01
S16	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0.02	6.98±0.01
S17	6.99±0.01	7.00±0.01	7.00±0.02	6.99±0.02
S18	6.97±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01	6.98±0.01
S19	6.98±0.01	7.00±0.01	6.99±.01	6.99±0.01
S20	7.00±0	7.00±0.01	7.00±0	7.00±0
S21	7.00±0.01	7.00±0	7.00±0.01	6.99±0.01
S22	7.00±0.01	7.00±0	7.00±0.02	6.99±0.01
S23	7.02±0.01	6.99±0.01	7.01±0.01	7.00±0.01

ตารางที่ ก.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ วันที่ 20 ของการบ่มเชื้อ (ต่อ)

รหัสรา ที่ทดสอบ	ชุดควบคุม ที่ไม่ใส่สาร	ชุดควบคุม ที่ไม่ใส่เชื้อ	ชุดที่ใส่เส้นใย ราที่ตายแล้ว	ชุดทดลอง ที่ใส่เชื้อ
S24	7.00±0	7.00±0.02	7.00±0.01	7.01±0.01
S25	7.01±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01
S26	7.01±0.01	7.00±0.01	7.01±0.01	7.01±0.01
S27	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01
W1	7.02±0	7.00±0.02	7.00±0.02	7.00±0.01
***W2**	**7.00±0.01**	**7.00±0.01**	**7.00±0**	**8.54±0.01**
W4	7.01±0	6.99±0.01	7.00±0.02	7.01±0.01
W6	7.00±0	7.00±0	7.00±0	7.00±0.01
W8	7.01±0.01	7.00±0.01	7.00±0	7.02±0.01
W10	7.03±0.01	7.00±0	7.00±0.02	7.02±0.01
W11	7.01±0.01	6.99±0	7.00±0.02	7.00±0.02
W13	7.00±0	7.00±0.01	7.00±0	6.99±0.01
E1	7.01±0.01	7.00±0.01	7.00±0	6.99±0.01
E2	6.98±0	7.00±0.01	7.00±0.01	6.99±0.01
E3	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01
E4	7.01±0.01	7.00±0.01	7.00±0.02	7.00±0.01
E5	7.03±0.01	7.00±0.01	7.00±0.02	7.02±0.02
E6	7.01±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01	7.01±0.01
E7	7.02±0.01	7.01±0	7.01±0.01	7.00±0.01
E8	7.00±0	7.00±0	7.00±0	7.00±0.01
E9	6.97±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01	6.98±0.01
E10	7.02±0.01	7.00±0.01	7.01±0.02	7.00±0.01
E11	7.01±0.1	7.00±0.01	7.00±0.01	7.01±0.01
E12	7.03±0.01	6.99±0.01	7.00±0.01	7.02±0.01
E13	7.02±0.01	7.00±0.02	7.00±0.01	7.01±0.02
E14	7.01±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0.02

ตารางที่ ก.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ วันที่ 20 ของการบ่มเชื้อ (ต่อ)

รหัสรา ที่ทดสอบ	ชุดควบคุม ที่ไม่ใส่สาร	ชุดควบคุม ที่ไม่ใส่เชื้อ	ชุดที่ใส่เส้นใย ราที่ตายแล้ว	ชุดทดลอง ที่ใส่เชื้อ
E15	7.01±0.01	6.99±0	7.00±0.02	7.00±0.01
E16	7.00±0	7.00±0.01	7.00±0	6.99±0.02
E17	7.01±0.01	7.00±0.01	7.00±0	6.99±0.01
E18	6.99±0	7.00±0.01	7.00±0.01	6.99±0.01
E19	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01
E20	7.01±0.01	7.00±0.01	7.00±0.02	7.00±0.01
E21	7.03±0.01	7.00±0.01	7.00±0.02	7.02±0.01
E22	7.01±0.01	7.00±0.01	7.00±0.01	7.01±0.02
E23	7.02±0.01	7.01±0	7.01±0.01	7.00±0.01
E24	7.00±0	7.00±0	7.00±0	7.00±0.01

หมายเหตุ

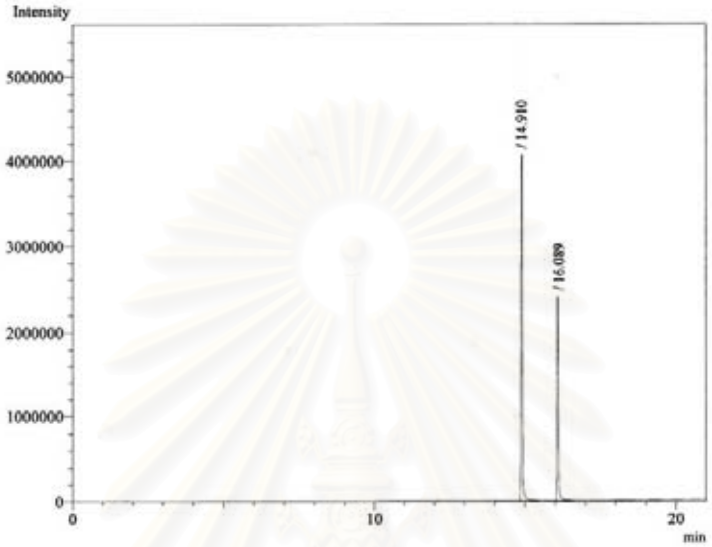
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้น ณ วันที่ 0 ของการบ่มเชื้อ มีค่าเท่ากับ 7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

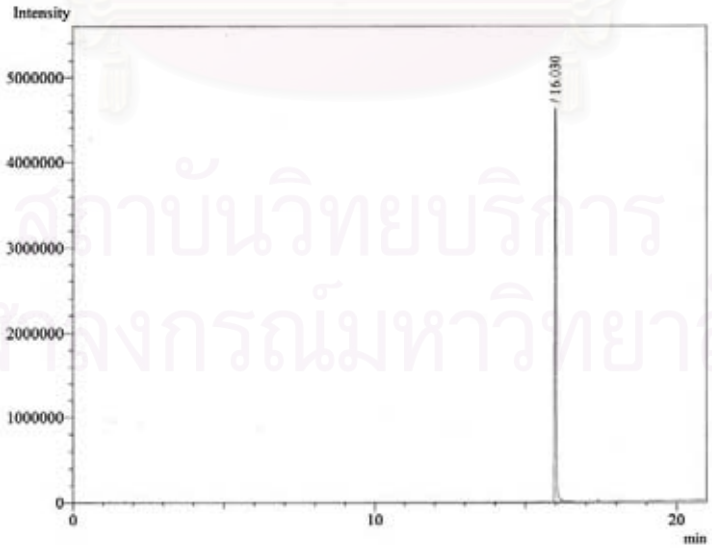
โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟน และเอ็นโดซัลแฟนไดออล

1. โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟน (อัลฟาและเบตาไอโซเมอร์)



ภาพที่ ข.1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟน โดยอัลฟา และเบตาไอโซเมอร์มี Rentention time (R_t) เท่ากับ 14.910 และ 16.089 นาที ตามลำดับ

2. โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟนไดออล

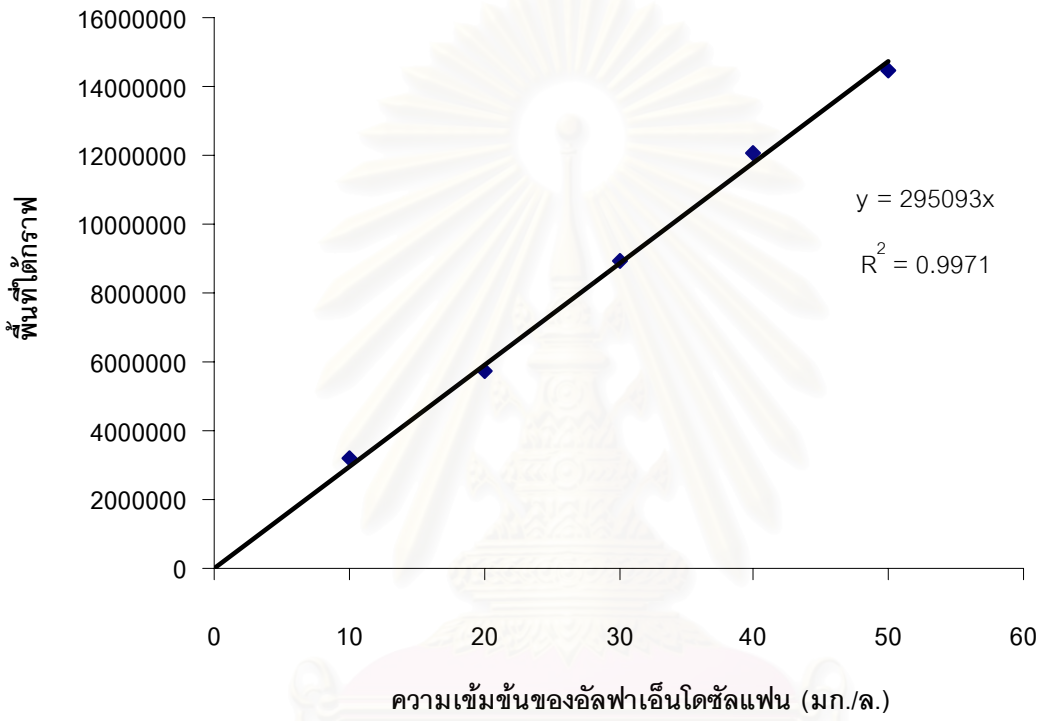


ภาพที่ ข.2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟนไดออล โดยมี Rentention time (R_t) เท่ากับ 16.03 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

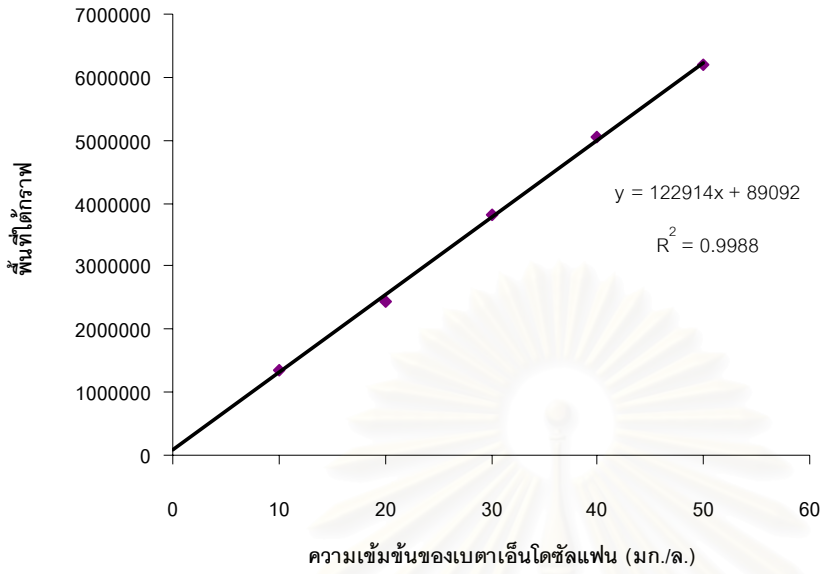
1. กราฟมาตรฐานของอัลฟาเอ็นโดซัลแฟน



ภาพที่ ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของอัลฟาเอ็นโดซัลแฟนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gas Chromatography (GC)

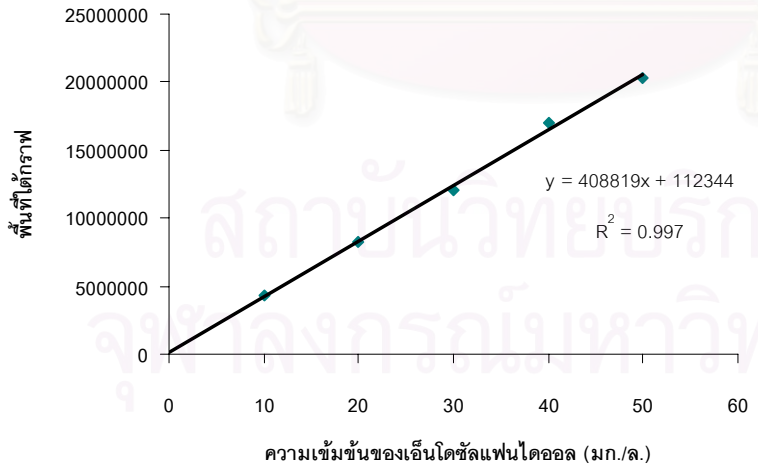
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. **กราฟมาตรฐานของเบตาเอ็นโดซัลแฟน**



ภาพที่ ค.2 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเบตาเอ็นโดซัลแฟน กับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gas Chromatography (GC)

3. **กราฟมาตรฐานของเอ็นโดซัลแฟนไดออล**

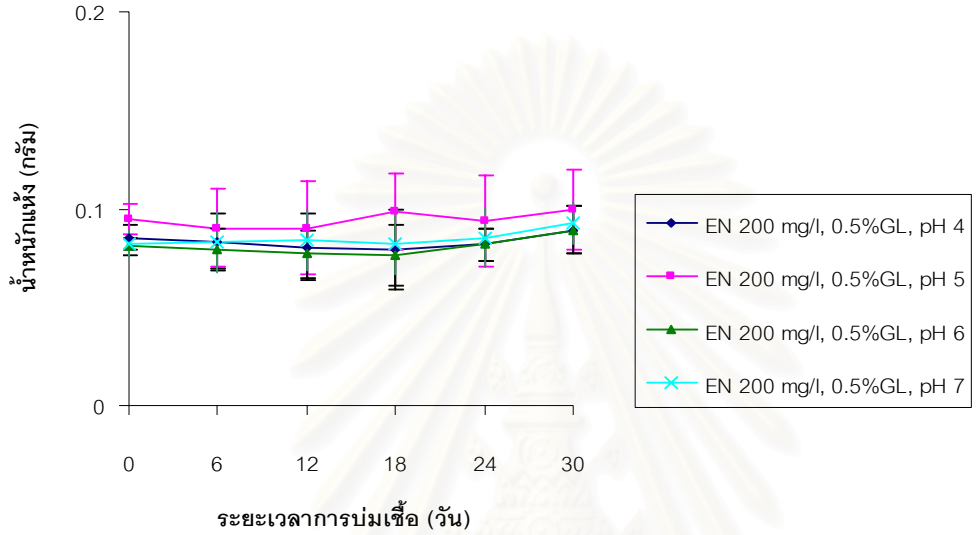


ภาพที่ ค.3 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนไดออล กับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จาก การวิเคราะห์ด้วยวิธี Gas Chromatography (GC)

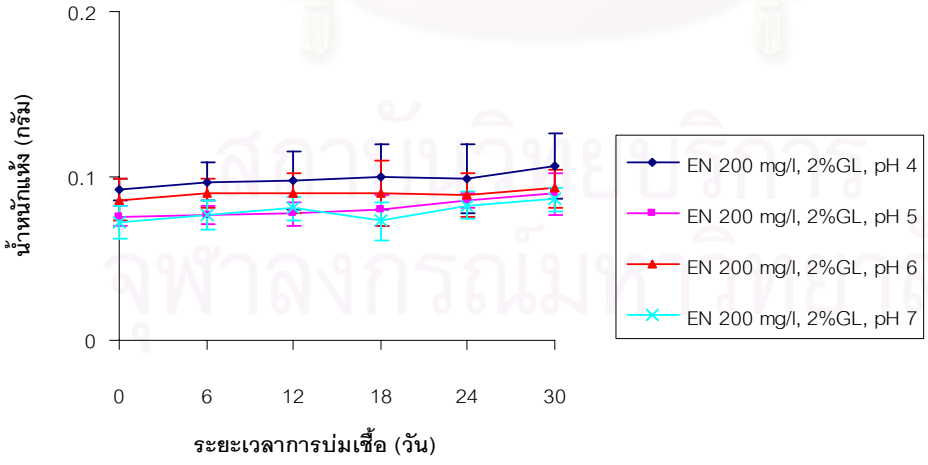
ภาคผนวก ง

ผลทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนที่สภาวะต่าง ๆ

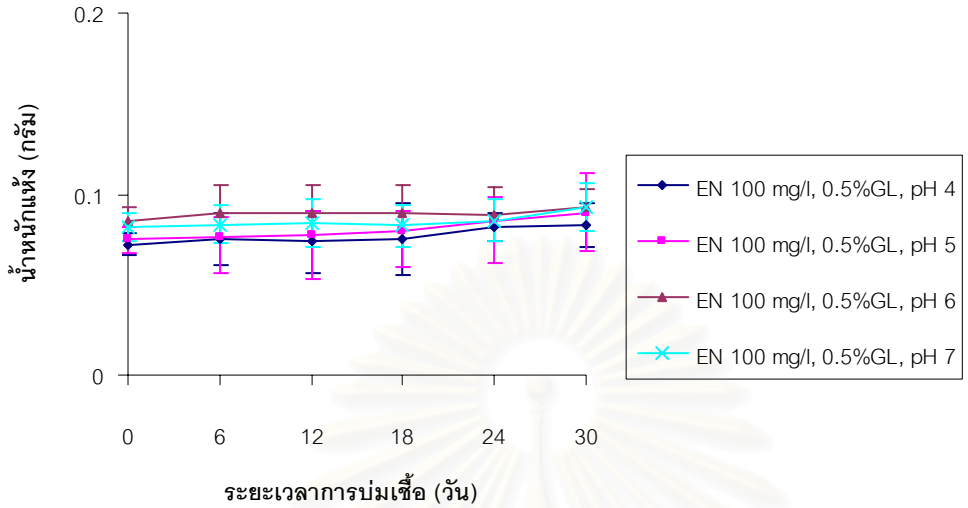
1. ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของราไอโซเลต W2 กับระยะเวลาการบ่มเชื้อ



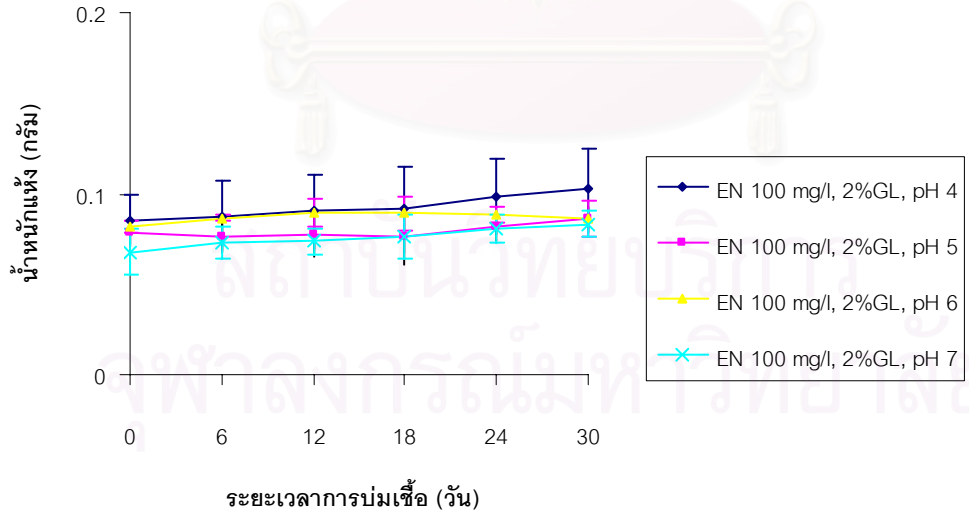
ภาพที่ ง.1-1 น้ำหนักแห้งของรา W2 ที่บ่มในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 200 มก./ล. กลูโคส 0.5% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน



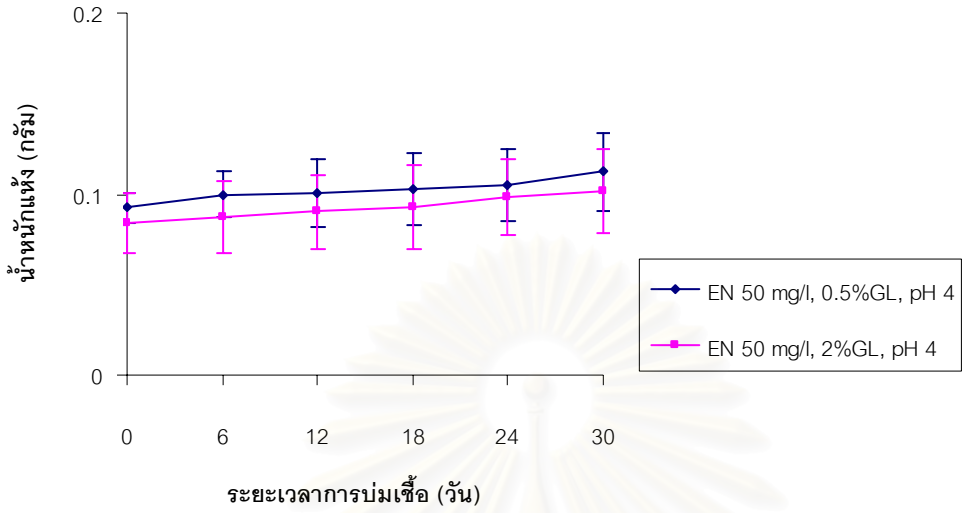
ภาพที่ ง.1-2 น้ำหนักแห้งของรา W2 ที่บ่มในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 200 มก./ล. กลูโคส 2% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ ง.1-3 น้ำหนักแห้งของรา W2 ที่บ่มในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 100 มก./ล. กลูโคส 0.5% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ ง.1-4 น้ำหนักแห้งของรา W2 ที่บ่มในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 100 มก./ล. กลูโคส 2% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ ง.1-5 น้ำหนักแห้งของรา W2 ที่บ่มในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 50 มก./ล. กลูโคส 0.5 และ 2% ค่า pH เท่ากับ 4 เป็นเวลา 30 วัน

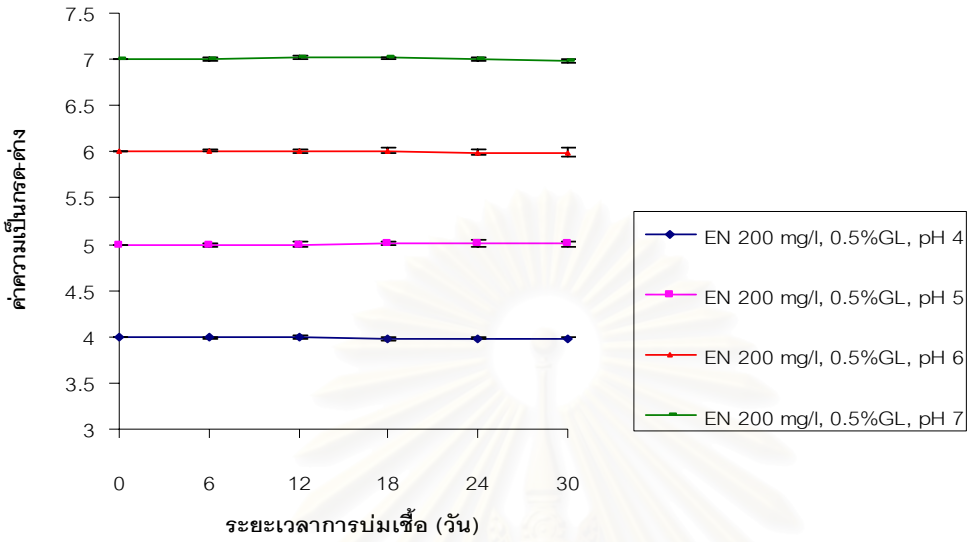
หมายเหตุ

EN หมายถึง ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน

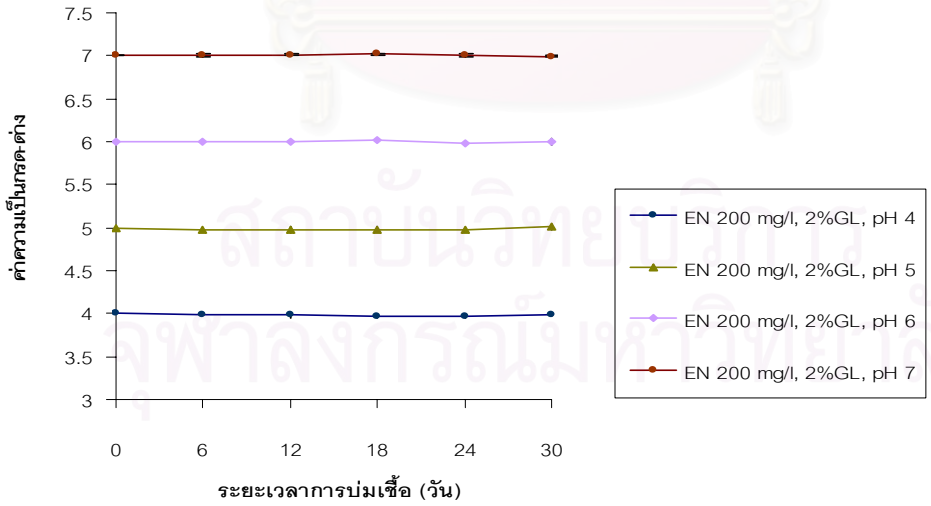
GL หมายถึง ความเข้มข้นของกลูโคส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

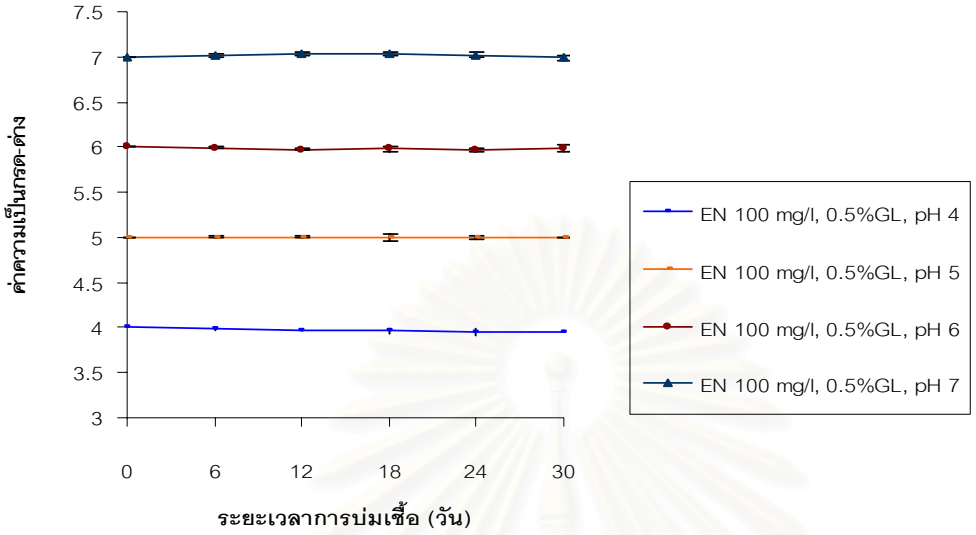
2. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium กับระยะเวลาการบ่มเชื้อ



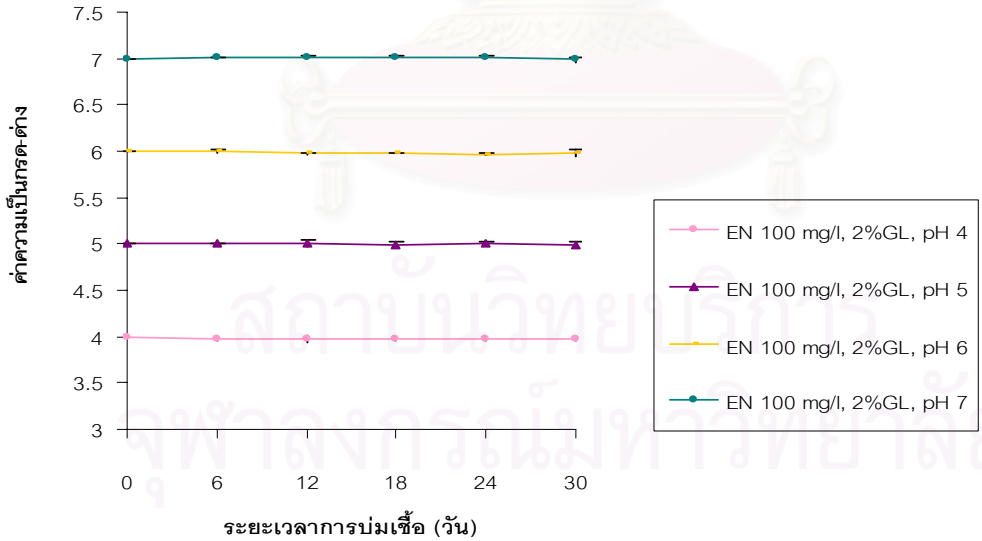
ภาพที่ ง. 2-1 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการบ่มรา W2 ในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 200 มก./ล. กลูโคส 0.5% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน



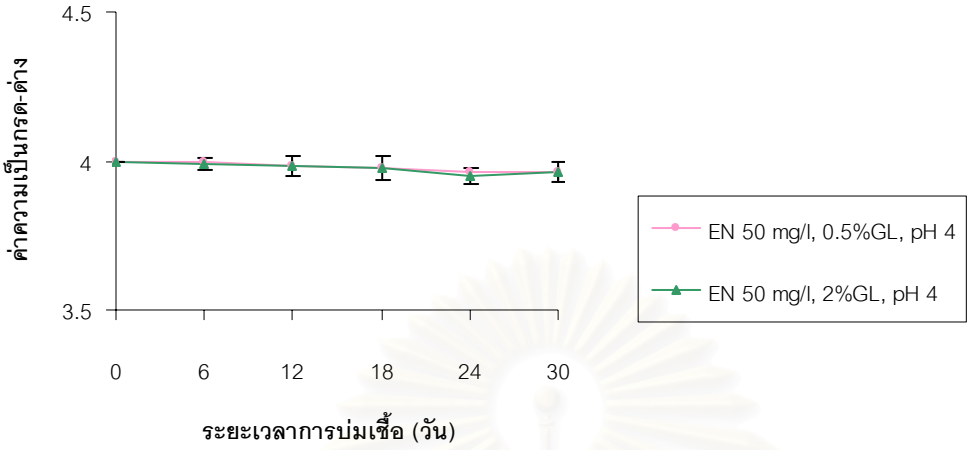
ภาพที่ ง. 2-2 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการบ่มรา W2 ในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 200 มก./ล. กลูโคส 2% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ ง. 2-3 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการบ่มรา W2 ในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 100 มก./ล. กลูโคส 0.5% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ ง. 2-4 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการบ่มรา W2 ในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 100 มก./ล. กลูโคส 2% และ pH เท่ากับ 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ ง. 2-5 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการบ่มรา W2 ในสภาวะที่มีเอ็นโดซัลแฟน 50 มก./ล. กลูโคส 0.5 และ 2% ค่า pH เท่ากับ 4 เป็นเวลา 30 วัน

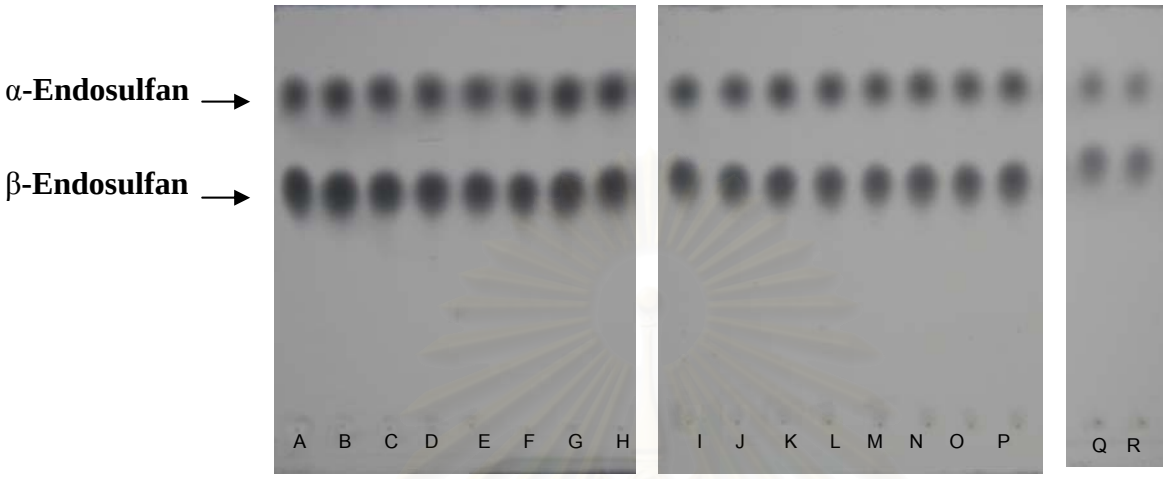
หมายเหตุ

EN หมายถึง ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน

GL หมายถึง ความเข้มข้นของกลูโคส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 ที่บ่มในสภาวะต่างๆ ด้วยเทคนิค TLC



ภาพที่ ง.3 ผลทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 ในสภาวะต่างๆ ที่กำหนด ด้วยวิธี TLC ภายหลัง 30 วันของการบ่มเชื้อ (A: EN 200 mg/l, 0.5%GL, pH4, B: EN 200 mg/l, 0.5%GL, pH5, C: EN 200 mg/l, 0.5%GL, pH6, D: EN 200 mg/l, 0.5%GL, pH7, E: EN 200 mg/l, 2%GL, pH4, F: EN 200 mg/l, 2%GL, pH5, G; EN 200 mg/l, 2%GL, pH 6, H: EN 200 mg/l, 2%GL, pH7, I: EN 100 mg/l, 0.5%GL, pH4, J: EN 100 mg/l, 0.5%GL, pH5 K: EN 100 mg/l, 0.5%GL, pH6, L: EN 100 mg/l, 0.5%GL, pH7, M: EN 100 mg/l, 2%GL, pH4, N: EN 100 mg/l, 2%GL, pH5, O: EN 100 mg/l, 2%GL, pH6, P: EN 100 mg/l, 2%GL, pH7, Q: EN 50 mg/l, 0.5%GL, pH4, R: EN 50 mg/l, 2%GL, pH4)

หมายเหตุ

EN หมายถึง ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน

GL หมายถึง ความเข้มข้นของกลูโคส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การวิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนระหว่างสภาวะที่มีปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ จ.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงความแตกต่างของอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนระหว่างสภาวะที่มีปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์

T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	glucose0.5	.500000	3	.0000000	.0000000
	rate0.5	.018100	3	.0087023	.0050243
Pair 2	glucose2	2.000000	3	.0000000	.0000000
	rate2	.021767	3	.0139518	.0080551

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	glucose0.5 & rate0.5	3	.	.
Pair 2	glucose2 & rate2	3	.	.

Paired Samples Test

		Paired Differences				
					95% Confidence Interval of the Difference	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper
Pair 1	glucose0.5 - rate0.5	.4819000	.0087023	.0050243	.4602823	.5035177
Pair 2	glucose2 - rate2	1.9782333	.0139518	.0080551	1.94358	2.01289

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	glucose0.5 - rate0.5	95.914	2	.000
Pair 2	glucose2 - rate2	245.588	2	.000

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 6 และ 7

ตารางที่ จ.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงความแปรปรวนของอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 6 และ 7

ANOVA

rate

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	2	.000	15.231	.027
Within Groups	.000	3	.000		
Total	.001	5			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

rate

Duncan[a]

		Subset for alpha = .05	
pH	N	1	2
5.0000	2	.010150	
6.0000	2	.017350	
7.0000	2		.032300
Sig.		.177	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยนี้คาดว่าจะทำการตีพิมพ์เผยแพร่ในหัวข้อเรื่อง Biodegradation of endosunfan by white-rot fungus Trametes sp.ในวารสารระดับนานาชาติ FEMS Microbiology Letter ภายในปี 2551

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย