

การคัดกรองหาที่มีความสามารถในการสลายสารผสมพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนสี่ชนิด



นางสาว กนกพรรณ จักรเพชร

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING FOR FUNGI CAPABLE OF DEGRADING 4-MIXED
POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS



Miss Kanokpan Juckpech

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

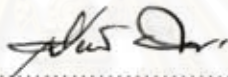
Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

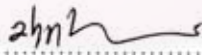
หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองยาที่มีความสามารถในการสลายสารผสม พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนสี่ชนิด
โดย	นางสาว กนกพรรณ จักรเพชร
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.ปาหนัน เจริญสำราญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....  คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมณะเศวต)

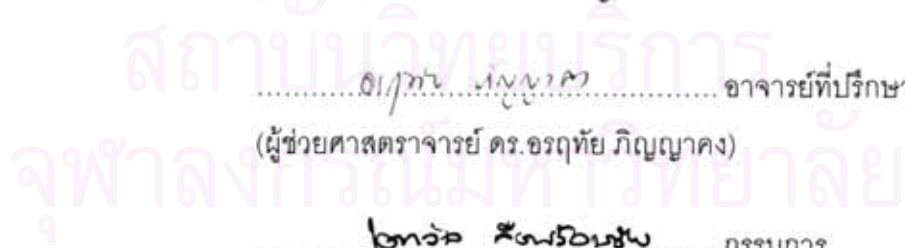
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....  ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร.ปาหนัน เจริญสำราญ)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง)

.....  กรรมการ
(อาจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย)



กนกพรรณ จักรเพชร : การคัดกรองราที่มีความสามารถในการสลายสารผสม
พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนสี่ชนิด. (SCREENING FOR FUNGI CAPABLE OF
DEGRADING 4-MIXED POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS) อ. ที่ปรึกษา :
อ.ดร.ปานัน เรืองสำราญ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.อรุณทัย ภิญญาคง, 112 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสายพันธุ์ราที่สามารถย่อยสลายพีเอเอชแบบผสมได้เนื่องจากในธรรมชาติมักปนเปื้อนพีเอเอชรวมกันหลายชนิด โดยแยกมาจากธรรมชาติได้ 52 สายพันธุ์ แล้วนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเบื้องต้นโดยการย่อยสี พบว่า 5 สายพันธุ์ที่ย่อยสลายสีทดสอบได้ครบทั้ง 3 ชนิด คือ guaiacol azureB และ phenol red เมื่อนำราทั้ง 5 สายพันธุ์และราอีก 3 สายพันธุ์จากดวงเดือน (2548) และสิริรัตน์ (2548) ไปทดสอบการเจริญบนอาหารแข็งที่มีพีเอเอชแบบผสมของฟลูออรีน พีแนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน พบว่าราทั้ง 8 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ จึงนำไปทดสอบการย่อยสลายพีเอเอชแบบผสมในอาหารเหลว พบว่ามีรา 4 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายพีเอเอชทั้ง 4 ชนิดได้ เมื่อนำราทั้ง 4 สายพันธุ์มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยพีเอเอชแบบแยกเดี่ยวโดยใช้ความเข้มข้น 100 ppm ทดลองเป็นเวลา 15 วัน พบว่าราสายพันธุ์ F18 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้เพียงชนิดเดียวแต่สามารถย่อยได้ถึง 90% T8 ย่อยสลายฟลูออรีน พีแนทรีน และ ฟลูออแรนธินได้ 72.95 และ 49.5% ตามลำดับ T20 ย่อยสลายฟลูออรีน พีแนทรีน และ ฟลูออแรนธินได้ 83.87 และ 31% ตามลำดับ และ S5 สามารถย่อยสลายฟลูออรีน พีแนทรีน และไพรีนได้ 60.86 และ 85% ตามลำดับ จากนั้นได้คัดเลือกราเพียง 2 สายพันธุ์คือ T8 และ T20 ไปทดสอบต่อไปเนื่องจากมีประสิทธิภาพการย่อยสลายที่ดีและเจริญได้รวดเร็ว จากการทดสอบปริมาณสายใยราต่อการลดลงของพีเอเอชพบว่าปริมาณสายใยไม่มีผลอย่างชัดเจนต่อการลดลงของพีเอเอช รา T8 และ T20 สามารถทนความเข้มข้นของพีเอเอชได้ถึง 500 ppm แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ 100 ppm เมื่อทดสอบสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา T20 โดยการวิเคราะห์ด้วย TLC HPLC GC-MS และ ¹H-NMR พบว่าสารมัธยันตร์หนึ่งที่เกิดขึ้น คือ 9-ฟลูออรีนอล สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา 4 สายพันธุ์ที่ทดสอบพบว่า T8 และ T20 มีสายวิวัฒนาการร่วมกับ *Phanerochaete* sp. S5 มีสายวิวัฒนาการร่วมกับ *Lentinus triginus* และ F18 คือ *Curvularia affinis*

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....กนกพรรณ จักรเพชร.....
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อ.ดร.ปานัน เรืองสำราญ.....
ปีการศึกษา.....2550..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....อ.ดร.อรุณทัย ภิญญาคง.....

4772203723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: mixed PAHs / fungi

KANOKPAN JUCKPECH : SCREENING FOR FUNGI CAPABLE OF DEGRADING 4-MIXED POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS. THESIS ADVISOR : PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, Ph.D., 112 pp.

By testing ability of the isolated fungi to decolorize 3 chromogenic substances by the enzyme peroxidase, 52 isolates were obtained. Among these, only 5 isolates could oxidize all chromogenic substances including guaiacol, azureB and phenol red. These 5 isolates along with other 3 isolates from Duangdoan (2548) and Sirirat (2548) were subjected to test for their abilities to grow on agar medium containing 4 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene. All isolates were able to grow on agar medium and tested further in liquid media containing mixture of these 4 PAHs. It was found that 4 isolates could degrade the mixture of these 4 PAHs. Degradation ability of these 4 fungi in 100 ppm of each PAH were evaluated for a period of 15 days. The result showed that F18 was able to degrade 90% of fluorene; T8 was able to degrade 72% of fluorene, 95% of phenanthrene and 49.5% of fluoranthene; T20 was able to degrade fluorene, phenanthrene and fluoranthene at 83, 87 and 31%, respectively; while, S5 was able to degrade fluorene, phenanthrene and pyrene at 60, 86 and 85%, respectively. T8 and T20 were selected for further analysis due to the rate of degradation and growth of these fungi. The reduction of PAHs by mycelial mass was investigated, however, it was found that the amount of mycelia did not significantly effect to the reduction of PAHs. T8 and T20 could survive upto 500 ppm of each PAH but grew the best in 100 ppm. The analyses of metabolite of fluorene by T20 by TLC, HPLC, GC-MS and ¹H-NMR revealed that one of the metabolites was 9-fluorenol. The results from fungal identification suggested that T8 and T20 had co-evolution with *Phanerochaete* sp., S5 had co-evolution with *Lentinus triginus* and F18 was *Curvularia affinis*.

Department.....Microbiology.....Student's signature.....*Kanokpan Juckpech*.....
 Field of study.....Industrial microbiology.....Advisor's signature.....*Panna Rerngsamran*.....
 Academic year...2007.....Co-advisor's signature.....*Onruthai Pinyakong*.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของอาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถชัย ภิัญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ฐนิยวัน ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพโรศิรศาล ที่กรุณาช่วยวิเคราะห์ NMR spectroscopy ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณโครงการแห่งชาติด้านสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตรายที่อำนวยความสะดวก GC-MS ในงานวิจัย

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อตระกูลเพิ่ม คุณแม่ชะบา จักรเพชร และคุณปิยนุตร วิเชียรเพริศ ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือ ตลอดจนความรัก ความห่วงใย และกำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

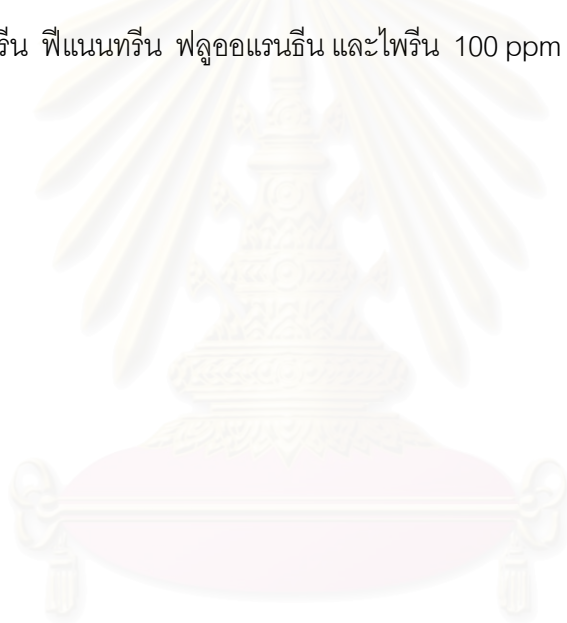
สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	35
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	35
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ.....	37
3.3 ตัวอย่างราและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์.....	38
3.4 การคัดกรองราที่สามารถผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส โดยการใช้สี่สามชนิด เป็นสารทดสอบ.....	38
3.5 การคัดกรองราที่สามารถสลายสารผสมพีเอเอสชนิดในอาหารแห้งได้.....	39
3.6 การทดสอบความสามารถในการสลายพีเอเอสในอาหารเหลว.....	39
3.7 ผลของปริมาณสายใยราต่อการลดลงของพีเอเอส.....	41
3.8 การทดสอบปริมาณพีเอเอสสูงสุดที่ราสามารถย่อยได้.....	41
3.9 การวิเคราะห์สารมัธยันตรีในระหว่างการสลายสารผสมพีเอเอสแต่ละชนิด แบบแยกเดี่ยว.....	42
3.10 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา.....	43
3.10.1 การเลี้ยงราเพื่อเตรียมสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ.....	43
3.10.2 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากรา.....	44
3.10.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (polymerase chain reaction, PCR).....	45
3.10.4 การสกัดแยกผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสให้บริสุทธิ์.....	46
3.10.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา.....	47
4. ผลการทดลอง.....	48

บทที่	หน้า
4.1 ตัวอย่างราและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์.....	48
4.2 การคัดกรองราที่สามารถผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส โดยการใช้สีสามชนิดเป็น สารทดสอบ.....	49
4.3 การคัดกรองราที่สามารถสลายสารผสมพีเอเอสชนิดในอาหารแข็งได้.....	52
4.4 การทดสอบความสามารถในการสลายพีเอเอสในอาหารเหลว.....	52
4.5 ผลของปริมาณสายใยราต่อการลดลงของพีเอเอส.....	69
4.6 การทดสอบปริมาณพีเอเอสสูงสุดที่ราสามารถอยู่รอดได้.....	71
4.7 การวิเคราะห์สารมัธยันตรีในระหว่างการสลายสารผสมพีเอเอสแต่ละชนิดแบบ แยกเดี่ยว.....	73
4.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา.....	79
4.8.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์.....	79
4.8.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา.....	83
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	91
รายการอ้างอิง.....	95
ภาคผนวก.....	105
ภาคผนวก ก.....	106
ภาคผนวก ข.....	108
ภาคผนวก ค.....	110
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	112

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงพีเอเอช 16 ชนิดที่ US-EPA ได้จัดเป็นสารอันตรายที่ควรให้ความสำคัญในลำดับต้น..	5
3.1 โอลิโนक्ลิโอไทด์ไพโรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	46
4.1 แสดงผลการเปลี่ยนสีของอาหารโดยราชนิดต่างๆ.....	49
4.2 แสดงปริมาณพีเอเอชที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายฟลูออรีน พีแนทรีน ฟลูออแรนธิน และ ไพรีนแบบแยกเดี่ยวชนิดละ 100 ppm ในวันที่ 15.....	68
4.3 แสดงปริมาณพีเอเอชที่ลดลงจากการเลี้ยงรา T8 ที่ได้หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วในพีเอเอช 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน 100 ppm ในวันที่ 15.....	70
4.4 แสดงปริมาณพีเอเอชที่ลดลงจากการเลี้ยงรา T20 ที่ได้หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วในพีเอเอช 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน 100 ppm ในวันที่ 15.....	71



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 แสดงวิธีการย่อยสลายพีเอเอชโดยจุลชีพชนิดต่างๆ.....	12
2.2 (ก) แสดงโครงสร้างสารตั้งต้นของลิกนิน (I) พารา-ไฮดรอกซีซินนามิลแอลกอฮอล์, (II) โคนิเฟรลแอลกอฮอล์และ (III) ไชนาพริลแอลกอฮอล์	15
(ข) โครงสร้างของลิกนิน.....	15
2.3 (ก) ภาพแสดงไม้ที่ถูกย่อยโดยราบราวด์รอกซึ่งไม่มีสีน้ำตาล และมีการแตกเป็นรูปลูกเต๋า.....	17
(ข) ภาพแสดงไม้ที่ถูกย่อยโดยราซอฟต์แวร์ซึ่งลักษณะจะคล้ายกับราบราวด์รอกมากบางครั้งทำให้เกิดการสับสนได้.....	17
(ค) ภาพตัดผ่าลำต้นของต้นสนที่ถูกย่อยสลายโดยราไวท์รอก <i>Phellinus pini</i> โดยบริเวณสีขาวเป็นบริเวณที่ลิกนินถูกย่อยสลาย.....	17
2.4 ปฏิกริยาการย่อยสลายลิกนินโดยเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส.....	19
2.5 ปฏิกริยาการย่อยสลายลิกนินโดยเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส.....	20
2.6 แสดงวิธีการย่อยสลายอะซีแนพทริน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi.....	22
2.7 แสดงวิธีการย่อยสลายฟลูออรีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi.....	22
2.8 แสดงวิธีการย่อยสลายไครซีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi.....	23
2.9 แสดงวิธีการย่อยสลายแอนทราซีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi.....	24
2.10 แสดงวิธีการย่อยสลายไพรีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi.....	25
2.11 แสดงวิธีการย่อยสลายฟลูออแรนธิน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi.....	26
2.12 แสดงวิธีการย่อยสลาย เบนโซ[เอ]แอนทราซีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi.	27
2.13 แสดงวิธีการย่อยสลายพีแนนทริน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi.....	28
2.14 แสดงวิธีการย่อยสลายแอนทราซีน โดยราในกลุ่ม ligninolytic fungi.....	30
2.15 แสดงวิธีการย่อยสลายไพรีน โดยราในกลุ่ม ligninolytic fungi.....	30
2.16 แสดงวิธีการย่อยสลายพีแนนทริน โดยราในกลุ่ม ligninolytic fungi.....	31
2.17 แสดงวิธีการย่อยสลายฟลูออรีน โดยราในกลุ่ม ligninolytic fungi.....	31
2.18 แสดงวิธีการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน ของราในกลุ่ม ligninolytic fungi.....	31
4.1 ภาพตัวอย่างเห็ดชนิดต่างๆ.....	48
4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์ของราที่สามารถเปลี่ยนสีอาหารชนิดต่างๆ.....	51

ภาพประกอบ	หน้า
4.3 โคโรมาโตแกรมของ HPLC ชุดทดลอง (ก) และชุดควบคุมที่หนึ่งฆ่าเชื้อ (ข) แสดงผลจากการเลี้ยงรา F18 ในอาหารเหลวไนโตรเจนจำกัดที่ผสมพีเอเอช 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนนทริน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm เป็นเวลา 15 วัน.....	53
4.4 โคโรมาโตแกรมของ HPLC ชุดทดลอง (ก) และชุดควบคุมที่หนึ่งฆ่าเชื้อ (ข) แสดงผลจากการเลี้ยงรา S5 ในอาหารเหลวไนโตรเจนจำกัดที่ผสมพีเอเอช 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนนทริน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm เป็นเวลา 15 วัน....	54
4.5 โคโรมาโตแกรมของ HPLC ชุดทดลอง (ก) และชุดควบคุมที่หนึ่งฆ่าเชื้อ (ข) แสดงผลจากการเลี้ยงรา T8 ในอาหารเหลวไนโตรเจนจำกัดที่ผสมพีเอเอช 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนนทริน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm เป็นเวลา 15 วัน.....	55
4.6 โคโรมาโตแกรมของ HPLC ชุดทดลอง (ก) และชุดควบคุมที่หนึ่งฆ่าเชื้อ (ข) แสดงผลจากการเลี้ยงรา T20 ในอาหารเหลวไนโตรเจนจำกัดที่ผสมพีเอเอช 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนนทริน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm เป็นเวลา 15 วัน...	56
4.7 แสดงโคโรมาโตแกรมจากการย่อยสลายฟลูออรีน โดยรา F18.....	58
4.8 แสดงโคโรมาโตแกรมจากการย่อยสลายฟลูออรีน โดยรา T8.....	59
4.9 แสดงโคโรมาโตแกรมจากการย่อยสลายพีแนนทริน โดยรา T8.....	60
4.10 แสดงโคโรมาโตแกรมจากการย่อยสลายฟลูออแรนธิน โดยรา T8.....	61
4.11 แสดงโคโรมาโตแกรมจากการย่อยสลายฟลูออรีน โดยรา T20.....	62
4.12 แสดงโคโรมาโตแกรมจากการย่อยสลายพีแนนทริน โดยรา T20.....	63
4.13 แสดงโคโรมาโตแกรมจากการย่อยสลายฟลูออแรนธิน โดยรา T20.....	64
4.14 แสดงโคโรมาโตแกรมจากการย่อยสลายฟลูออรีน โดยรา S5.....	65
4.15 แสดงโคโรมาโตแกรมจากการย่อยสลายพีแนนทริน โดยรา S5.....	66
4.16 แสดงโคโรมาโตแกรมจากการย่อยสลายไพรีน โดยรา S5.....	67
4.17 แสดงปริมาณพีเอเอชที่เหลืออยู่ในวันที่ 15 จากการย่อยสลายพีเอเอช 4 ชนิดแบบแยกเดี่ยวของรา 4 ชนิด.....	68
4.18 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ของพีเอเอชแต่ละชนิดที่ลดลงโดยรา T8 ที่นำไปหนึ่งฆ่าเชื้อ....	69
4.19 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ของพีเอเอชแต่ละชนิดที่ลดลงโดยรา T20 ที่นำไปหนึ่งฆ่าเชื้อ..	70
4.20 กราฟแสดงน้ำหนักแห้งของรา T8 ที่เจริญในฟลูออรีน (ก), พีแนนทริน (ข), ฟลูออแรนธิน (ค) และไพรีน (ง) ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300 และ 500 ppm.....	72

ภาพประกอบ	หน้า
4.21 กราฟแสดงน้ำหนักแห้งของรา T20 ที่เจริญในฟลูออรีน (ก), พีแนนทรีน (ข), ฟลูออแรนธิน (ค) และไพรีน (ง) ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300 และ 500 ppm.....	72
4.22 HPLC โคโรมาโตแกรมแสดงการย่อยสลายฟลูออรีนในวันที่ 24 โดยรา T8.....	73
4.23 โคโรมาโตแกรมแสดงการย่อยสลายฟลูออรีน ในวันที่ 3 โดยรา T20.....	74
4.24 โคโรมาโตแกรมแสดงการย่อยสลายฟลูออรีนในวันที่ 30 โดยรา T20.....	74
4.25 TLC โคโรมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา T20 (4) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (1) สารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอล (2) และสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีโนน (3).....	75
4.26 HPLC โคโรมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์และ retention time ของสารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา T20 (ก) เทียบกับสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอล (ข).	76
4.27 GC-MS โคโรมาโตแกรมแสดงการแตกตัวของสารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา T20 (ก) เทียบกับสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอล (ข).....	77
4.28 ¹ H-NMR สเปกตรัมของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา T20.....	78
4.29 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ของราสายพันธุ์ F18 จากปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอเรส เมื่อใช้คู่มือ ITS1 กับ ITS4.....	79
4.30 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ของราสายพันธุ์ S5 จากปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอเรส เมื่อใช้คู่มือ ITS1-F กับ ITS4.....	80
4.31 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ของราสายพันธุ์ T8 จากปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอเรสเมื่อใช้คู่มือ ITS1 กับ ITS4 และคู่มือ ITS1-F กับ ITS4.....	81
4.32 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ของราสายพันธุ์ T20 จากปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอเรส เมื่อใช้คู่มือ ITS1-F กับ ITS4.....	82
4.33 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ ITS จากคู่มือ ITS1 กับ ITS4 ของราสายพันธุ์ F18 กับ <i>Curvularia affinis</i> (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF071335).....	83
4.34 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ F18.....	84

ภาพประกอบ	หน้า
4.35 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ ITS จากคู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4 ของราสายพันธุ์ T20 กับ <i>Phanerochaete sordida</i> (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AB210078).....	85
4.36 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ T20.....	86
4.37 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ ITS จากคู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4 ของราสายพันธุ์ S5 กับ <i>Lentinus tiginus</i> (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF516518).....	87
4.38 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ S5.....	88
4.39 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ ITS จากคู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4 ของราสายพันธุ์ T8 กับ <i>Phanerochaete sordida</i> (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF475148).....	89
4.40 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ T8.....	90

บทที่ 1

บทนำ

จากอดีตถึงปัจจุบันประชากรโลกมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง เป็นผลให้ความต้องการใช้ทรัพยากรเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนาและประเทศที่พัฒนาแล้ว ได้มีการเพิ่มกำลังการผลิตทางอุตสาหกรรมเพื่อให้เพียงพอต่อการอุปโภคบริโภคของมนุษย์ ด้วยเหตุดังกล่าวนี้ทำให้ปริมาณของเสียต่างๆ ที่เกิดจากอุตสาหกรรมมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น และเกินระดับที่ธรรมชาติจะสามารถฟื้นฟูตัวเองได้ ทำให้เกิดภาวะมลพิษซึ่งในท้ายที่สุดปัญหาดังกล่าวก็จะส่งผลย้อนกลับมาสู่ตัวมนุษย์เองไม่ทางตรงก็ทางอ้อม จึงจำเป็นต้องมีการป้องกัน และแก้ไขปัญหามลพิษที่เกิดขึ้นอย่างจริงจัง

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon) หรือพีเอเอช (PAHs) เป็นสารอันตรายที่ถือว่าเป็นภัยร้ายแอบแฝงต่อมนุษย์อีกรูปแบบหนึ่งเนื่องจากผู้คนส่วนใหญ่ยังไม่ทราบถึงพิษภัยและที่มาของสารพิษชนิดนี้ โดยพีเอเอชเป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงเชื่อมต่อกัน เนื่องจากเป็นสารที่ไม่มีขั้วและไม่ค่อยละลายน้ำจึงจำกัดกิจกรรมการย่อยสลายโดยทางชีวภาพ (bioavailable) พีเอเอชถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามน้ำหนักโมเลกุลคือ พีเอเอชที่มีมวลโมเลกุลต่ำซึ่งมีวงเบนซีนน้อยกว่า 4 วง เช่น พีแนนทรีน และฟลูออรีน และพีเอเอชที่มีมวลโมเลกุลสูงซึ่งมีวงเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป เช่น ไพรีน และฟลูออแรนทีน ซึ่งแหล่งกำเนิดพีเอเอชจะแบ่งออกเป็น 2 แหล่งคือ แหล่งกำเนิดตามธรรมชาติ ได้แก่ ทรัพยากรธรรมชาติ (น้ำมันปิโตรเลียม และถ่านหิน) และปรากฏการณ์ธรรมชาติ (ไฟป่า และภูเขาไฟระเบิด) ส่วนแหล่งที่ 2 คือ แหล่งกำเนิดจากกิจกรรมของมนุษย์ได้แก่ ควันจากท่อไอเสียของรถยนต์ที่ใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมปิโตรเลียมและอุตสาหกรรมการผลิตสี เป็นต้น (CEPA, 1994; กรมควบคุมมลพิษ, 2547)

พีเอเอชสามารถสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้หลายแห่งโดยมีอากาศเป็นตัวกลางสำคัญในการเคลื่อนย้ายไปสู่แหล่งต่างๆ และพบว่าพีเอเอชสะสมอยู่มากในดินและน้ำใต้ดินเนื่องจากพีเอเอชที่สะสมอยู่ในตัวกลางเหล่านี้จะมีค่าครึ่งชีวิตที่สูงมากโดยเฉพาะพีเอเอชที่ยึดเกาะอยู่กับอนุภาคของดินจะกำจัดได้ยากมาก พีเอเอชมีสมบัติในการก่อมะเร็งและเป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ทั้งในมนุษย์และสัตว์ การบำบัดความปนเปื้อนของพีเอเอชมีหลายวิธี ได้แก่ การบำบัดโดยวิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ ถึงแม้การบำบัดโดยวิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมี จะเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพแต่ก็มีข้อเสียคือ ต้นทุนในการจัดซื้ออุปกรณ์มีราคา

สูง และในระหว่างการดำเนินการก็มีค่าใช้จ่ายที่มาก นอกจากนี้การย่อยสลายที่ไม่สมบูรณ์อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษที่มากขึ้นอีกด้วย การบำบัดโดยวิธีทางชีวภาพจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่จะนำมาใช้บำบัดพีเอเอช โดยเมื่อเทียบระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งหมดที่มีการนำมาใช้บำบัด ได้แก่ สาหร่าย แบคทีเรีย ฟีซ และรา พบว่ารามีความสามารถในการย่อยสลายพีเอเอชขนาดใหญ่ได้ดีกว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่ม ligninolytic ได้แก่ ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) และแลคเคส (laccase) ที่ราผลิตออกมานอกเซลล์มีความจำเพาะต่อซับสเตรทต่ำ และเส้นใยของราที่มีการยืดยาวทำให้สามารถเข้าถึงพีเอเอชที่ถูกดูดซับอยู่กับอนุภาคของดินได้ดี นอกจากนี้ร่ายังสามารถสลายพีเอเอชได้จนสมบูรณ์ และจากการที่รากล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยพีเอเอชโดยที่ไม่ได้นำเข้าไปย่อยในเซลล์แบบสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น แบคทีเรีย ทำให้ราสามารถที่จะทนอยู่ในบริเวณที่มีความเข้มข้นของพีเอเอชสูงได้ดีกว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นอีกด้วย (Cerniglia, 1997)

เมื่อแบ่งราตามการผลิตเอนไซม์สามารถจำแนกราได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ligninolytic fungi ที่สามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และ/หรือแลคเคสได้ ราในกลุ่ม ligninolytic fungi นี้พบอยู่ในคลาส Basidiomycetes ราอีกกลุ่มหนึ่งคือพวก non-ligninolytic fungi เป็นรากลุ่มที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ lignin peroxidase ได้ ราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi นี้พบอยู่ในทุกคลาสยกเว้น คลาส Basidiomycetes (Cerniglia และ Sutherland, 2001)

เมื่อแบ่งราตามลักษณะการย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ราไวท์รอตสามารถย่อยสลายลิกนินได้ดีโดยจะพบเนื้อไม้ที่ถูกย่อยมีสีขาวเนื่องจากเป็นสีของเซลล์ลูโลสที่เหลืออยู่ ในขณะที่รารวดรอตและราซอฟต์แวร์รอตสามารถย่อยสลายลิกนินได้เล็กน้อยจะพบเนื้อไม้ที่ถูกย่อยเป็นสีน้ำตาลเนื่องจากเป็นสีของลิกนินที่เหลืออยู่ งานวิจัยหลายงานได้แสดงว่าราที่สามารถย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้ได้สามารถที่จะย่อยสลายพีเอเอชได้ด้วย และราที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีเอเอชได้ดีที่สุดเป็นราในกลุ่มไวท์รอต ซึ่งพบส่วนมากเป็นเห็ดที่เจริญบนไม้ ได้แก่ *Phanerocheate* spp. *Plurotus* spp. และ *Trametes* spp. เป็นต้น (Cerniglia, 1993; กรมควบคุมมลพิษ, 2547)

จากรายงานสถานการณ์ความปนเปื้อนของพีเอเอชในประเทศไทย เช่น ในงานวิจัยของ Wattayakorn (2003), Oanh และคณะ (2000) และ Norramit และคณะ (2005) ได้แสดงถึงการปนเปื้อนของพีเอเอชในอากาศและน้ำโดย Wattayakorn (2003) พบพีเอเอชปนเปื้อนในแม่น้ำ

เจ้าพระยาหลายชนิด ได้แก่ แนนพาลี อะซีแนพาลี อะซีแนพาลี ฟลูออรีน พีแนนทรีน และ แอนทราซีน Oanh และคณะ (2000) วัดปริมาณพีเอเอชในอากาศที่ Asian Institute of Technology (AIT) พบเบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอร์ลิซีน และโคโลนีน ความเข้มข้นสูงบริเวณถนนด้าน พหลโยธิน Norramit และคณะ (2005) ได้วัดปริมาณพีเอเอชในอากาศเช่นกันโดยเก็บตัวอย่าง 6 จุดในกรุงเทพฯ ซึ่งพบทั้งพีเอเอชขนาดโมเลกุลใหญ่ และพีเอเอชขนาดโมเลกุลเล็กมากถึง 15 ชนิด พีเอเอชขนาดโมเลกุลใหญ่ที่พบ ได้แก่ เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอร์ลิซีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน ไพรีน เบนโซ[อี]ไพรีน อินดีโน[1,2,3]ไพรีน เบนโซ[เอ]ไพรีน เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน ไครซีน เบนโซ [เอ]แอนทราซีน และไดเบนซ์[เอ,เอช]แอนทราซีน และพีเอเอชขนาดโมเลกุลเล็ก ได้แก่ อะซีแนพาลี แนนพาลี ฟลูออรีน พีแนนทรีน และแอนทราซีน จากงานวิจัยทั้ง 3 นี้แสดงให้เห็นว่าพีเอเอชที่ ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมนั้นโดยมากไม่ได้มีเพียงแค่ชนิดเดียวแต่มักจะพบอยู่ร่วมกันหลายชนิดทำให้ยากต่อการบำบัด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องหาทางแก้ไขและลดปัญหาการปนเปื้อนของ พีเอเอชหลายชนิดดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อค้นหาที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารผสมของพีเอเอชและติดตาม ตรวจสอบสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลาย รวมทั้งพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร มัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายพีเอเอช

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ราที่สามารถย่อยสลายสารผสมของพีเอเอชได้ พร้อมทั้งทราบสมบัติของสารมัธยันตร์ จากการย่อยสลายพีเอเอชเมื่อเลี้ยงราในอาหารเหลว เพื่อเป็นแนวทางในการเตรียมราไปใช้ในการ บำบัดพีเอเอชในบริเวณที่ปนเปื้อนต่อไป

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง












พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbon)

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน หรือพีเอเอชเป็นสารอินทรีย์ที่เกิดจากอะตอมของคาร์บอนและอะตอมของไฮโดรเจนมารวมกันเป็นโครงสร้างวงเบนซีน ตั้งแต่ 2 วงเชื่อมต่อกัน โดยวงเบนซีน 2 วงที่อยู่ติดกันต้องใช้คาร์บอน 2 อะตอมร่วมกัน พีเอเอชเป็นสารไม่มีขั้ว มีการจัดเรียงตัวของวงเบนซีนได้หลายรูปแบบ เช่น เป็นเส้นตรง งอเป็นมุม หรือจับกันเป็นกลุ่ม (Muncnerova และ Augustin, 1994) พีเอเอชถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามขนาดของน้ำหนักโมเลกุลคือ พีเอเอชที่มีมวลโมเลกุลต่ำซึ่งมีวงเบนซีนน้อยกว่า 4 วง เช่น แนพทาลีน (naphthalene) แอนทราซีน (anthracene) ฟลูออรีน (fluorene) และ ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) เป็นต้น และพีเอเอชที่มีมวลโมเลกุลสูงซึ่งมีวงเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป เช่น ไครซีน (chrysene) เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[a]pyrene) และไพรีน (pyrene) เป็นต้น พีเอเอชเป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และสารก่อมะเร็ง (Boonchan และคณะ, 2000) ซึ่ง US-EPA ได้จัดพีเอเอช 16 ชนิดตามตารางที่ 2.1 ให้เป็นสารที่ควรให้ความสำคัญในลำดับต้น เพื่อการควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในสิ่งแวดล้อม พีเอเอชที่บริสุทธิ์จะเป็นผลึกของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ลักษณะทางกายภาพของพีเอเอชมีความผันแปรไปตามขนาดโมเลกุล และโครงสร้าง (CEPA, 1994) พีเอเอชที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากขึ้นมีแนวโน้มของค่าความดันไอ และการละลายน้ำลดลง นั่นคือระเหยเป็นไอได้ง่ายขึ้น และละลายน้ำได้น้อยลง ในขณะที่มีค่า $\log K_{ow}$ มากขึ้น ซึ่งทำให้สามารถละลายในชั้นไขมัน และดูดซึมเข้าสู่ร่างกายคนและสัตว์ได้ดี (Cerniglia, 1993; กรมควบคุมมลพิษ, 2547)

พีเอเอชมีแหล่งกำเนิดจากทั้งธรรมชาติ และจากการกระทำของมนุษย์ โดยแหล่งกำเนิดพีเอเอชในธรรมชาติมี 2 ทางคือ เกิดจากทรัพยากรธรรมชาติได้แก่ น้ำมันปิโตรเลียม และถ่านหิน และที่เกิดจากปรากฏการณ์ธรรมชาติได้แก่ การเกิดไฟไหม้ป่าและภูเขาไฟระเบิด พีเอเอชที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์แบ่งเป็นหัวข้อหลักได้ดังนี้ จากการเกษตร เช่น การเผาเพื่อเตรียมพื้นที่เพาะปลูกและการเผาเศษขยะในฟาร์ม จากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานถลุงแร่อลูมิเนียม อุตสาหกรรมในกลุ่มปิโตรเลียม อุตสาหกรรมที่ใช้ประโยชน์จากถ่านหิน โรงงานผลิตสี เป็นต้น จากอุบัติเหตุต่างๆ เช่น น้ำมันรั่วซึมจากแท่งเก็บน้ำมันใต้ดิน หรือเรือน้ำมันล่ม และสุดท้ายเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์เอง เช่น การทำอาหารด้วยการปิ้งย่าง รมควัน การใช้พาหนะที่ใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล หรือแม้แต่การสูบบุหรี่ก็เป็นการปลดปล่อยพีเอเอชออกมาอีกด้วย ทั้งนี้มีรายงานว่า

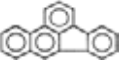


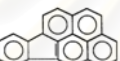
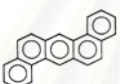
กิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์นี้เองได้ปล่อยพีเอเอชออกมาสู่สิ่งแวดล้อมมากที่สุด (NRCC, 1983) โดยเฉพาะการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ซึ่งเป็นการเผาไหม้ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด ทำให้สารประกอบอินทรีย์ของธาตุคาร์บอนไม่ถูกออกซิไดซ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ทั้งหมด และเกิดเป็นพีเอเอชได้แตกต่างกันหลายชนิด (กรมควบคุมมลพิษ, 2547)

ตารางที่ 2.1 แสดงพีเอเอช 16 ชนิดที่ US-EPA ได้จัดเป็นสารอันตรายที่ควรให้ความสำคัญในลำดับต้น (แหล่งที่มา: ดัดแปลงจากกรมควบคุมมลพิษ, 2547 และ Paliukhovich, 2005)

ชนิดของพีเอเอช	โครงสร้าง	น้ำหนักโมเลกุล	ความดันไอ (Pa)	การละลายน้ำ (ppb)	Log K_{ow}	การเป็นสารก่อมะเร็งในคน
แนพทาลิน		128	10	31700	3.37	+
อะซีแนพทิลีน		152	0.9	3930	4	-
อะซีแนพทีน		154	0.3	3930	3.92	-
ฟลูออรีน		166	0.09	1980	4.18	-
พีแนนทรีน		178	0.02	1290	4.57	-
แอนทราซีน		178	1×10^{-3}	73	4.54	-
ฟลูออแรนทีน		202	1.2×10^{-3}	260	5.22	-
ไพรีน		202	6×10^{-4}	135	5.18	-
เบนโซ[เอ]แอนทราซีน		228	2.8×10^{-5}	14	5.91	+
โครซีน		228	5.7×10^{-7}	2	5.91	+
เบนโซ[เอ]ไพรีน		252	7×10^{-7}	4	5.91	+

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงพีเอเอช 16 ชนิดที่ US-EPA ได้จัดเป็นสารอันตรายที่ควรให้ความสำคัญใน

ลำดับต้น (แหล่งที่มา: ดัดแปลงจากกรมควบคุมมลพิษ, 2547 และ Paliukhovich, 2005)

ชนิดของพีเอเอช	โครงสร้าง	น้ำหนักโมเลกุล	ความดันไอ (Pa)	การละลายน้ำ (ppb)	Log K _{ow}	การเป็นสารก่อมะเร็งในคน
เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน		252	n.d	n.d	5.8	+
เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน		252	5.2×10^{-8}	n.d	6	+
เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอร์ลิโน		276	1.4×10^{-8}	0.26	6.5	+
อินดีโน[1,2,3-ซี,ดี]ไพรีน		276	n.d	n.d	6.5	+
ไดเบนซี[เอ,เอช]แอนทราซีน		278	3.7×10^{-10}	0.5	6.75	+

n.d. หมายถึง ไม่มีข้อมูล, + หมายถึง น่าจะก่อมะเร็งในคน และอาจก่อมะเร็งในคน, - หมายถึง ไม่ก่อมะเร็งในคน

พีเอเอชหลายชนิดเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในทางอุตสาหกรรมโดยเฉพาะเนฟธาไลน์ที่ประเทศไทยมีการนำเข้าสูงมากประมาณ 17 ล้านกิโลกรัม ในช่วงปี 2538 ถึง 2542 เนฟธาไลน์ใช้ผลิต phthalic anhydride สี ตัวทำละลายซึ่งใช้ในการผลิตกระดาษสำเนาชนิดไม่ต้องใช้คาร์บอน และใช้เป็นสารไล่แมลง (ลูกเหม็น) ประโยชน์ของพีเอเอชชนิดอื่นๆ เช่น ไพรีน ก็ใช้ผลิตสีชนิด perinon pigment ฟลูออแรนทีนใช้ผลิตสีเรืองแสง เป็นต้น (กรมควบคุมมลพิษ, 2547)

พีเอเอชสามารถแพร่กระจายได้ทั้งทางอากาศ ทางดิน และทางน้ำ โดยอากาศเป็นตัวกลางสำคัญในการแพร่กระจายของพีเอเอชไปยังตัวกลางอื่น พีเอเอชที่อยู่ในอากาศส่วนใหญ่มักจะยึดเกาะอยู่กับอนุภาคขนาดเล็ก และสามารถกระจายไปสู่ดินและแหล่งน้ำได้โดยการชะของน้ำฝน และอิทธิพลของแรงดึงดูดของโลก พีเอเอชที่ถูกปล่อยลงสู่ดินจะไปยึดเกาะกับอนุภาคของดินทำให้มีความต้านทานต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ และเมื่อดินที่มีพีเอเอชไปยึดเกาะถูกชะไปกับน้ำฝนไหลลงสู่แหล่งน้ำ พีเอเอชก็จะจับตัวอยู่ในตะกอนดิน และบางส่วนก็ปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำ พีเอเอชถูกปล่อยไปสู่อากาศเป็นปริมาณมากที่สุด แต่แหล่งสะสมสุดท้ายส่วนใหญ่อยู่ในดินและน้ำใต้ดิน โดยค่าครึ่งชีวิตของพีเอเอช ที่มีโครงสร้างซับซ้อนกว่าจะมีค่าที่สูงกว่าพีเอเอชที่ไม่

ค่อยซับซ้อน ค่าครึ่งชีวิตของพีเอเอชที่อยู่ในดินและน้ำใต้ดินจะมีค่าสูงกว่าที่อยู่ในอากาศ ตัวอย่างเช่น พีแนนทรีน อยู่ในอากาศมีค่าครึ่งชีวิต 2.1 - 20.1 ชม. ในดิน 16 - 200 วัน ในน้ำใต้ดิน 32 วัน - 1.1 ปี ไครซีนมีค่าครึ่งชีวิตในอากาศ 0.802 - 8.02 ชม. ในดิน 1.02 - 2.72 ปี และในน้ำใต้ดิน 2.04 - 5.48 ปี เป็นต้น (CEPA, 1994; กรมควบคุมมลพิษ, 2547) เมื่อพีเอเอชตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลาอันยาวนานในขณะที่ยังคงปลดปล่อยพีเอเอชออกมา ในทุกวันก็จะทำให้พีเอเอชถูกสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ และก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อ คน สัตว์ และพืช ดังนี้

ในคนมีรายงานว่าพีเอเอชทำให้เกิดเนื้องอกที่ปอดและผิวหนังในกลุ่มประชากรที่มีอาชีพที่ต้องสัมผัส สูดดม สารที่มีพีเอเอชปนเปื้อน เช่น คนงานในโรงงานผลิตถ่านหิน คนงานในโรงงานถลุงอลูมิเนียม คนงานในโรงกลั่นน้ำมัน แม้แต่ตำรวจจราจรก็มีความเสี่ยงด้วย อย่างไรก็ตามไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณที่แน่นอนของพีเอเอชแต่ละชนิดที่ได้รับจนเกิดมะเร็งได้ เพราะมักจะมีสารก่อมะเร็งตัวอื่นๆ ร่วมอยู่ด้วย เช่น ในควันบุหรี่ ซิการ์ ไปป์ ในน้ำมันดิน เขม่าควันเสียจากเตาเผาถ่านหิน หรือจากท่อไอเสียรถยนต์ (กรมควบคุมมลพิษ, 2547) IARC ได้จัดกลุ่มพีเอเอชที่แสดงผลของการก่อมะเร็งในมนุษย์และสัตว์ทดลองเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 2A เป็นกลุ่มของพีเอเอชที่น่าจะก่อมะเร็งในคน (probably carcinogenic in humans) มีทั้งหมด 3 สาร ได้แก่ เบนโซ[เอ]แอนทราซีน (benzo[a]anthracene) เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[a]pyrene) และ ไดเบนซี[เอ,เอช]แอนทราซีน (dibenzo[a,h]anthracene) กลุ่มที่ 2B สารที่อาจก่อมะเร็งในคน (possibly carcinogenic to humans) มี 11 สาร ได้แก่ เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน (benzo[b]fluoranthrene) เบนโซ[เจ]ฟลูออแรนทีน (benzo[j]fluoranthrene) เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน (benzo[k]fluoranthrene) ไดเบนซี[เอ,อี]ไพรีน (dibenzo[a,e]pyrene) ไดเบนซี[เอ,เอช]ไพรีน (dibenzo[a,h]pyrene) ไดเบนซี[เอ,เจ]ไพรีน (dibenzo[a,j]pyrene) ไดเบนซี[เอ,แอล]ไพรีน (dibenzo[a,l]pyrene) ไดเบนซี[เอ,เจ]อะครีดีน (dibenzo[a,j]acridine) ไดเบนซี[เอ,เอช]อะครีดีน (dibenzo[a,h]acridine) อินดีโน [1,2,3-ซีดี]ไพรีน (indeno[1,2,3-cd]pyrene) และ แนพทาลีน (naphthalene) กลุ่มที่ 3 มี 23 สารจัดเป็นสารที่ไม่ก่อมะเร็งในคน (unclassifiable as to carcinogenicity to humans) (IARC, 1999) นอกจากความสามารถในการก่อมะเร็งแล้วพีเอเอชยังทำให้เกิดอาการอื่นๆ ขึ้นได้ เช่น แอนทราซีน ทำให้ร่างกายไวต่อแสงมากขึ้น (photosensitivity) เช่น ทำให้เกิดอาการแสบ ร้อน คัน บริเวณผิวหนัง และมีอาการระคายเคืองของเยื่อบุตาและหลอดลม (ITII, 1982) แนพทาลีน ทำให้เกิดภาวะโลหิตจางเนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic anemia) และต่อกระຈก โดยความผิดปกตินี้สามารถเกิดได้ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ทั้งนี้มีรายงานการตายของผู้ใหญ่ที่กินลูกเหม็นขนาด 5 กรัม และยังมีรายงาน

การตายของเด็กอายุ 6 ปีที่กินลูกเหม็นในขนาด 2 กรัมด้วย (U.S.EPA, 1998) เบนโซ[เอ]ไพรีนทำให้เกิดระคายเคืองทางผิวหนัง เช่น แสบร้อน ไรต์ต่อแสง มีตุ่มหนอง หรือเป็นหูดได้ โดยอาการจะรุนแรงขึ้นเมื่อได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต และทำให้เกิดการระคายเคืองของเยื่อทางเดินหายใจ เช่น มีอาการไอและหลอดลมอักเสบ (Cottini และ Mazzone, 1939) เบนโซ[เอ]แอนทราซีนทำให้เกิดการระคายเคืองของเยื่อทางเดินหายใจ ทำให้เกิดการบวมน้ำ มีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูโลไซต์ และโมโนนิวเคลียร์เซลล์ในเยื่อทางเดินหายใจ และมีการสร้างไฟโบรบลาสต์เพิ่มขึ้นด้วย (Topping และคณะ, 1978)

ความเป็นพิษในสัตว์มีการศึกษาในสัตว์น้ำมากกว่าสัตว์บก โดยการศึกษาครอบคลุมถึงเรื่องผลกระทบต่อการมีชีวิตรอด การเนื้อม้วนทำให้เกิดเนื้องอก การพัฒนาของตัวอ่อนและการสืบพันธุ์ (Germain และคณะ, 1993) แสงอัลตราไวโอเล็ตมีผลทำให้ความเป็นพิษของพีเอเอซรุนแรงมากขึ้น ซึ่งพบในฟลูออรีน ไพรีน และแอนทราซีน โดยมีพิษเพิ่มขึ้นในหอยสองฝา (*Mulinia laterlis*) และ mysid shrimp (*Mysidopsis babia*) (Spehar และคณะ, 1999; กรมควบคุมมลพิษ, 2547) ตัวอย่างความเป็นพิษต่อการมีชีวิตรอดของสัตว์น้ำ เช่น water flea (อาร์โธพอดขนาดเล็ก) ที่อายุน้อยกว่า 24 ชม. ที่ได้รับอะซีแนพทีน ในระยะ 48 ชม. มีค่า LC_{50} เท่ากับ 41 มิลลิกรัมต่อลิตร (LeBlanc, 1980) ไข่เดือนทะเลที่โตไม่เต็มซึ่งได้รับฟลูออรีนเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีค่า LC_{50} เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นต้น ผลต่อการเกิดเนื้องอกของสัตว์น้ำ เช่น ปลาฉี่จืดตัวเล็ก (guppies) ที่ได้รับเบนโซ[เอ]ไพรีนในปริมาณ 150 ถึง 240 นาโนกรัมต่อลิตร สัปดาห์ละ 2 ครั้ง ครั้งละ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 สัปดาห์ ทำให้ปลา 10 เปอร์เซ็นต์ จากปลาที่ทำการทดลองทั้งหมด เกิดเนื้องอกที่ตับ (Hawkins และคณะ, 1990) ตัวอย่างความเป็นพิษของพีเอเอซต่อการพัฒนาตัวอ่อนและการสืบพันธุ์ เช่น ในปลา largemouth bass (*Micropterus salmoides*) พบความพิการของตัวอ่อนถึง 6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับเนพทาลินความเข้มข้น 239 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน (Black และคณะ, 1983) นอกจากนี้ยังสามารถพบความผิดปกติของลูกตาของปลา rainbow trout โดย 7 เปอร์เซ็นต์ที่ได้รับเบนโซ[เอ]ไพรีนในปริมาณ 0.2 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 17 เปอร์เซ็นต์ที่ได้รับ 0.3 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 36 วัน มีลูกตาที่ผิดปกติ (CEPA, 1994) ในเม่นทะเลเกิด clastogenic (ดีเอ็นเอถูกทำลาย) และเกิด teratogenic (ระยะ gastrula ฝ่อ) ไม่ก่อเป็นไซ เมื่อได้รับเบนโซ[เอ]ไพรีนปริมาณ 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Hose, 1985)

ความเป็นพิษต่อสัตว์บกส่วนมากจะใช้หนู rat และหนู mouse เป็นตัวทดลองโดยจะทำการทดลองผ่านทางกรกิน สัมผัส และหายใจเข้าไป งานวิจัยเน้นไปที่ผลของพีเอเอซต่อการเกิดมะเร็งของหนู เพื่อที่จะนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของพีเอเอซที่ได้รับต่อการเป็นมะเร็งของคน

นอกจากความเป็นพิษต่อสัตว์แล้วพืชก็ได้รับผลกระทบเช่นเดียวกัน พีเอเอชที่สะสมได้ในพืชจะน้อยกว่าที่พบในดินบริเวณที่พืชขึ้นเนื่องจากพืชมีปริมาณไขมันที่ต่ำจึงดูดซับพีเอเอชขึ้นมาจากดินได้น้อย ซึ่งเป็นผลมาจากสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของพีเอเอช (กรมควบคุมมลพิษ, 2547) และพืชจะได้รับพีเอเอชจากทางอากาศมากกว่าในดิน โดยพืชที่มีใบใหญ่จะดูดซับพีเอเอชได้มากกว่าพืชที่มีขนาดเล็กด้วย ในส่วนผิวนอกของพืชเช่นเปลือกไม้จะมีปริมาณพีเอเอชสูงกว่าโครงสร้างที่อยู่ภายในต้นไม้ เมื่อพีเอเอชถูกพืชดูดซับเข้าไปแล้วจะมีการเคลื่อนที่ของสารภายในต้นพืชน้อยมาก (Edwards, 1983; Edwards, 1986) การเจริญของพืชที่ได้รับพีเอเอชอาจถูกกระตุ้น หรือยับยั้ง โดยขึ้นอยู่กับปริมาณที่ได้รับ เช่น เบนไซ[เอ]ไพรีนที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง กระตุ้นข้าวโพด ถั่วเหลือง และข้าวสาลีให้เจริญดีขึ้น แต่ถ้ามากกว่านี้จะยับยั้งการเจริญของพืชได้ (Slooff และคณะ, 1989)

ผลกระทบของพีเอเอชโยงโยไปถึงทุกสิ่งมีชีวิต และมนุษย์ก็เป็นผู้ที่กลัวต่อผลกระทบมากที่สุดจึงได้พยายามหาวิธีต่างๆ ที่จะนำมาใช้ลดความปนเปื้อนของพีเอเอชต่อสิ่งแวดล้อม วิธีที่ใช้ในการบำบัดแบ่งออกเป็น 3 แบบใหญ่ๆ คือ การบำบัดโดยวิธีทางกายภาพ (physical treatment) การบำบัดโดยการใช่วิธีทางเคมี (chemical treatment) และการบำบัดโดยวิธีทางชีวภาพ (biological treatment)

การบำบัดพีเอเอชโดยใช่วิธีทางกายภาพ

ได้แก่ การดูดซับ การกรอง การตกตะกอน การเจือจาง การใช้ความร้อนและรังสีในการบำบัดเป็นต้น ตัวอย่างเช่น

การใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave energy) ในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนพีเอเอช แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือดินที่บำบัดแล้วไม่สามารถใช้เพาะปลูกได้ เนื่องจากคลื่นไมโครเวฟจะไปทำลายจุลินทรีย์ในดินทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินลดลง (Abramovitch และคณะ, 1999)

การเผา (incineration) มีประสิทธิภาพในการทำลายพีเอเอชได้ดีสามารถใช้บำบัดสารพิษได้หลายชนิด แต่มีข้อเสียคือ ใช้ต้นทุนสูง อุณหภูมิที่ใช้ในการเผาสูงมาก และเมื่อเผาแล้วจะปล่อยซัลเฟอร์ไดออกไซด์และแก๊สพิษออกมาและต้องนำมาบำบัดต่อ นอกจากนี้ยังทำให้ดินที่ใช้ในการบำบัดเสื่อมคุณภาพไปด้วย (GAO/RCED-96-13, 1996)

In Situ Thermal desorption ใช้วิธีการเปลี่ยนรูปพีเอเอชให้อยู่ในรูปของแก๊ส วิธีนี้สามารถกำจัดสารพิษได้หลายชนิด แต่มีข้อเสียคือ ใช้อุณหภูมิที่สูง และมีกระบวนการบำบัดที่ช้า (Caruana, 1997)

การบำบัดพีเอเอชโดยใช้วิธีทางเคมี

มี 2 รูปแบบใหญ่ๆ ที่ใช้คือ ใช้การสกัด (extraction) และการออกซิเดชัน (oxidation) ตัวอย่างเช่น

การสกัดด้วยตัวทำละลายในรูปของเหลว (liquid solvent extraction) มีข้อดีคือ ประสิทธิภาพในการสกัดพีเอชออกมาได้สูง ใช้อุณหภูมิและความดันต่ำ และมีความสะดวก แต่มีข้อเสียคือ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดมีราคาแพงและต้องใช้เป็นจำนวนมากทำให้ต้นทุนสูง บางชนิดมีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้ยังต้องไปกำจัดพีเอชที่ละลายมาอยู่ในตัวทำละลายอีก ตัวทำละลายที่นิยมใช้กันมีหลายชนิด เช่น เอทานอล 2-โพรพานอล อะซีโตน 1-เพนทานอล รวมทั้งน้ำด้วย (Meckes และคณะ, 1997; Nardella และคณะ, 1999; Silva และคณะ, 2005) Nardella และคณะ (1999) ได้คิดค้นสารผสมของอะซีโตน เอธิลอะซีเตท และนำมาใช้ในการสกัดเนื่องจากสารเหล่านี้ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อมและผสมกันเป็นเนื้อเดียวกันได้ดี และ Silva และคณะ (2005) ได้นำส่วนผสมนี้ไปทดลองใช้สกัดพีเอช พบว่าเพียง 10 นาที ก็สามารถสกัดพีเอชออกมาได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์

supercritical fluid extraction และ supercritical water oxidation เป็นเทคโนโลยีที่สะอาดเนื่องจากใช้สารละลายที่เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำในการสกัด ใช้เวลาน้อยประมาณ 10-60 นาที ประสิทธิภาพในการสกัดสูง สามารถประยุกต์ใช้กับสารพิษอื่นๆ ได้อีกหลายชนิด แต่มีข้อเสียคือ เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง ต้องมีการขุดเจาะดินขึ้นมา ใช้อุณหภูมิ และความดันสูง (Tavlarides และคณะ, 2000)

chemical oxidation ใช้สารเคมีต่างๆ ไปทำปฏิกิริยากับพีเอชในดิน โดยสารที่นิยมใช้ได้แก่ โอโซน ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เพอร์แมงกานีส และ เพอร์ซัลเฟต เป็นต้น (ITRC, 2005) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคที่เรียกว่า advanced oxidation process คือการใช้สารหลายชนิดมาผสมกันนำไปสกัดเช่น สารละลายเฟนตัน (Fenton's reagent) แอคติเวตเต็ดเพอร์ซัลเฟต (activated persulfate) หรือเพอร์โอโซน (perozone) เป็นต้น (Ferrarese และคณะ, 2007) โดยในสารทั้งหมดที่กล่าวไปถ้าอยู่ในรูปของก๊าซ โอโซนจะดีที่สุด ถ้าเป็นน้ำสารละลาย เฟนตันจะดีที่สุด ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถทำได้รวดเร็วและกำจัดสารพิษได้ดี แต่ข้อเสียคือ สารมีราคาแพง และถ้าปฏิกิริยาเกิดไม่สมบูรณ์อาจเกิดผลผลิตพลอยได้ที่เป็นสารพิษ เช่นอัลดีไฮด์ หรือคีโตนได้ (Ferrarese และคณะ, 2007)

เมื่อมองโดยภาพรวมแล้ววิธีทางกายภาพ และทางเคมี เป็นวิธีที่สามารถบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เร็ว แต่เป็นวิธีที่รุนแรงซึ่งสารเคมี และความร้อนที่ใช้ในการบำบัดก็ยิ่งเพิ่มความบอบช้ำให้กับบริเวณที่ปนเปื้อนเพิ่มมากขึ้น บางวิธีทำให้ไม่สามารถนำดินบริเวณนั้นมาทำการเกษตรได้อีก นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีหลายชนิด ใช้เทคโนโลยีที่ซับซ้อน ต้นทุนมีราคาสูง วิธีการบำบัดทางชีวภาพซึ่งเป็นวิธีที่นุ่มนวลต่อสิ่งแวดล้อม และต้นทุนต่ำจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้บำบัดสารพิษได้

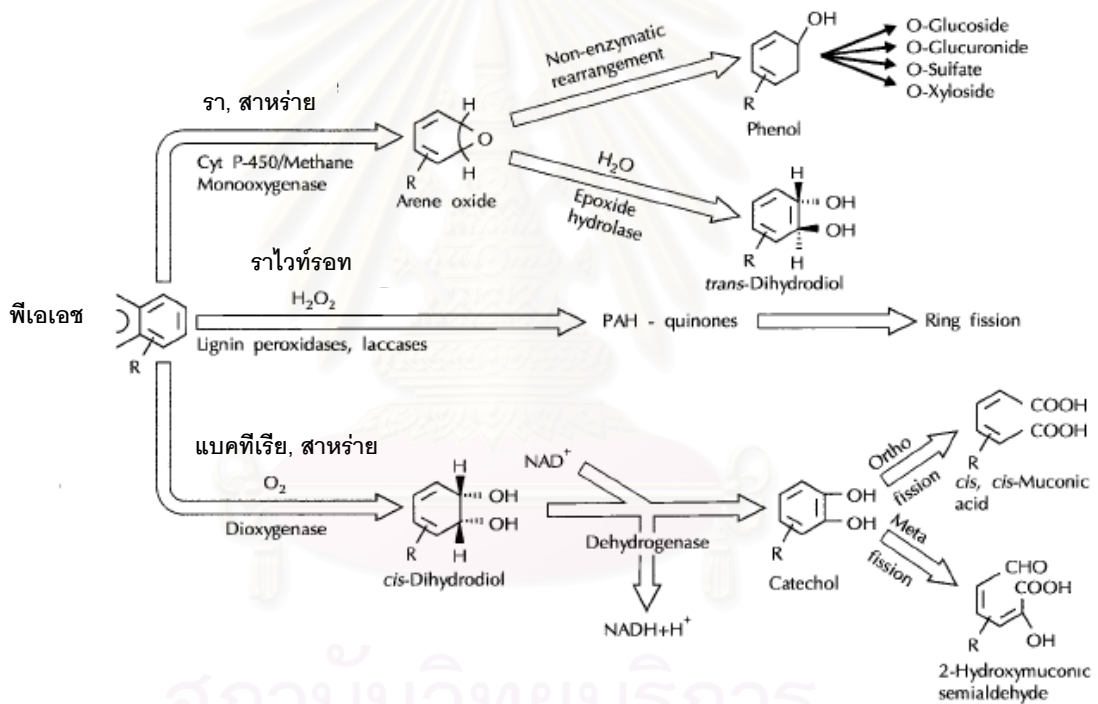
การบำบัดพีเอเอชโดยใช้วิธีทางชีวภาพ

การบำบัดโดยวิธีทางชีวภาพเป็นการนำสิ่งมีชีวิตมาช่วยในการกำจัด หรือลดสารพิษที่ปนเปื้อนในดิน อากาศ และน้ำ สิ่งมีชีวิตดังกล่าวที่นำมาใช้ได้แก่ พืช สาหร่าย แบคทีเรีย และรา ในบางครั้งจะใช้จุลชีพบริเวณที่ปนเปื้อนเองในการบำบัดแต่จะมีการเพิ่มสารบางอย่างลงไป เช่น เพิ่มแหล่งไนโตรเจน หรือสารลดแรงตึงผิวเพื่อส่งเสริมการเจริญและการย่อยสลายของจุลชีพวิธีนี้เรียกว่า biostimulation และในบางครั้งจะมีการเติมจุลชีพที่มีประสิทธิภาพที่คัดเลือกมาแล้วเติมลงไปในพื้นที่ที่ต้องการบำบัดซึ่งเรียกวิธีนี้ว่า bioaugmentation โดยนิยมทำในแหล่งที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน (Atlas และ Cerniglia, 1995) แต่อย่างไรก็ตามในการบำบัดทางชีวภาพยังคงพบปัญหาอยู่บ้าง เช่น จุลชีพไม่สามารถเข้าถึงพีเอเอชได้ เนื่องจากพีเอเอชไปยึดเกาะอย่างเหนียวแน่นอยู่กับอนุภาคของดิน นอกจากนี้ในการบำบัดโดยนำจุลชีพใหม่เติมลงไป บางครั้งจุลชีพที่เติมไม่สามารถทนอยู่ในสภาวะที่ต้องการ หรืออาจจะเจริญแข่งกับจุลชีพดั้งเดิมในบริเวณที่ปนเปื้อนไม่ได้ วิธีหนึ่งที่น่าสนใจแก้ปัญหานี้คือการนำจุลชีพดั้งเดิมในแหล่งปนเปื้อนมาพัฒนาศักยภาพในการย่อยสลายเสียเอง เนื่องจากในบริเวณที่ปนเปื้อนสารพิษเช่น น้ำมัน มักจะมีจุลชีพที่สามารถเจริญ และย่อยสลายน้ำมันได้อยู่แล้ว การย่อยสลายพีเอเอชด้วยสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ที่มีการศึกษาแล้วมีรายละเอียดดังนี้

การย่อยสลายพีเอเอชโดยสาหร่าย

มีรายงานถึงชนิดของสาหร่ายที่สลายพีเอเอชได้หลายชนิด เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อยู่ในทะเล *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 ที่สามารถย่อยสลายพีแนนนินได้โดยเปลี่ยนเป็นสารมัธยันตร์ได้แก่ ทรานซ์-9,10-ไดไฮดรอกซี-9,10-ไดไฮดรอกซีพีแนนนิน และ 1-เมทอกซีพีแนนนิน (Narro และคณะ, 1992) นอกจากนี้ Warshawsky และคณะ (1990) พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Selenastrum capricornutum* สามารถย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนได้ เกิดเป็น ซิส-

11,12-ไดไฮดรอกซี-11,12-ไดไฮโดรเบนโซ[เอ]ไพรีน และพบว่ามี การสร้าง ซิส-ไดไฮโดรไดออกดเล็กน้อย Cerniglia(1993) กล่าวว่าเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายพีเอเอชของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและรา มากกว่าในแบคทีเรีย ในขณะที่เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายพีเอเอชของสาหร่ายสีเขียวมีความคล้ายคลึงกับที่พบในพวกแบคทีเรียมากกว่าในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน รา และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การนำสาหร่ายไปใช้ในการกำจัดพีเอเอชมีข้อจำกัดอยู่บ้างคือต้องใช้น้ำบำบัดพีเอเอชที่ปนเปื้อนอยู่ในบริเวณที่มีความชื้นพอเพียงเท่านั้น และต้องอยู่ในสภาวะที่มีแสงด้วยจึงจะสามารถบำบัดได้ดี (Warshawsky และคณะ, 1990) แผนภูมิการย่อยสลายพีเอเอชโดยสาหร่ายเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงวิถีการย่อยสลายพีเอเอชโดยจุลชีพชนิดต่างๆ (แหล่งที่มา: ดัดแปลงจาก Cerniglia,1993)

การย่อยสลายพีเอเอชโดยพืช

การลดการปนเปื้อนของพีเอเอชที่เกิดขึ้นในพืชได้แก่ การย่อยสลาย (degradation) การดูดซับ (adsorption) การสะสม (accumulation) การระเหยเป็นไอ (volatilization) หรือการช่วยส่งเสริมกิจกรรมของจุลชีพในดินบริเวณรอบๆ ราก (soil rhizosphere activity) เพื่อกำจัดหรือลด

ความเป็นพิษในบริเวณดิน อากาศ น้ำใต้ดิน หรือน้ำผิวดิน โดยอาจใช้วิธีทางตรงหรืออ้อมก็ได้ ประสิทธิภาพของการกำจัดหรือลดความเป็นพิษขึ้นอยู่กับตัวกลาง เช่น เป็นดินหรือน้ำ ชนิดของพืช และสมบัติทางกายภาพของสารปนเปื้อน (Newman และ Reynolds, 2004) โดยส่วนใหญ่แล้ว การบำบัดโดยใช้พืชมักจะใช้ร่วมกันหลายชนิด ซึ่งที่นิยมใช้จะเป็นพืชตระกูลถั่วร่วมกับพืชที่ไม่ใช่ พืชตระกูลถั่ว เช่น หญ้า (Banks และคณะ, 2003; Siciliano และคณะ, 2003) ตัวอย่างของพืชที่มีการนำมาใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนของพีเอเอช ได้แก่ ข้าวฟ่าง อัลฟัลฟา ถั่วโคเวอร์ ข้าวไรน์ ต้นปอปลาร์ ต้นหลิว หญ้าเฟสคิว และ เถาพันดง เป็นต้น (Newman และ Reynolds, 2004) ข้อเสียของการบำบัดสารพิษด้วยวิธีนี้คือ ใช้ระยะเวลานานโดยเฉพาะถ้ามีการนำพืชลงไปปลูกใหม่ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณรากยังไม่สามารถทำงานได้ทันที (Godsy และคณะ, 2003)

การย่อยสลายพีเอเอชโดยแบคทีเรีย

ดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนพีเอเอชในปริมาณที่สูงจะพบแบคทีเรียมากกว่าดินที่มีการปนเปื้อนน้อย (Shiaris, 1989) นักวิจัยหลายคนนำแบคทีเรียที่อยู่ในบริเวณแหล่งปนเปื้อนมา พัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ และศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีเอเอชชนิดต่างๆ แล้วนำกลับไปบำบัดในบริเวณเดิมหรือบริเวณอื่นๆ แบคทีเรียหลายชนิดสามารถย่อยสลายพีเอเอชขนาดใหญ่ ได้แก่ ฟลูออแรนธิน ไพรีน ฟลูออรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน ได้ เช่น *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. *Beijerinckia* sp. *Mycobacterium* sp. *Staphylococcus* sp. และ *Arthobacter* sp. ในสภาวะที่ไม่มีอากาศแบคทีเรียก็สามารถย่อยสลายพีเอเอชได้ แต่ในอัตราที่ช้ากว่าในสภาวะที่มีอากาศ (Coates และคณะ, 1996A; Coates และคณะ, 1996B) ตัวอย่างแบคทีเรียที่ย่อยสลาย พีเอเอชขนาดใหญ่ได้ เช่น *Mycobacterium* sp. สามารถย่อยสลายพีเอเอชขนาดใหญ่กว่า 4 วงได้ เช่น เบนโซ[เอ]ไพรีน จุดเด่นของแบคทีเรียนี้คือ มีผิวนอกเซลล์เป็นแบบไม่ชอบน้ำ ทำให้สามารถไปยึดเกาะกับพีเอเอช และนำเข้าสู่เซลล์ได้ดี เมื่อเทียบการเจริญเติบโตกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ก็พบว่าสามารถเจริญได้ดีกว่าด้วยเมื่ออยู่ในพีเอเอช (Heitkamp และคณะ, 1988) *Sphingomonas paucimobilis* stain EPA 505 สามารถสลายและใช้ฟลูออแรนธินเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ และยังพบว่ามีความสามารถในการสลายพีเอเอชได้อีกหลายชนิด เช่น ไพรีน เบนซ์[เอ]แอนทราซีน ไดเบนซ์[เอ,เอช]แอนทราซีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนธิน เบนโซ[เอ]ไพรีน และไครซีน (Ye และคณะ, 1996) กระบวนการย่อยสลายพีเอเอชของแบคทีเรีย เริ่มต้นด้วยการทำงานของ เอนไซม์ไดออกซิจีเนส เกิดเป็น ซิส-ไดไฮโดรไดออกอล หลังจากนั้นเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส จะดึงน้ำออก กลายเป็นแคททีคอล และเกิดแตกวงได้ 2 ทางคือ เกิด *ortho* fission ได้เป็น ซิส-ซิส-มิวโคนิค เอซิด หรือ *meta* fission ได้เป็น 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิค เฮมิอัลดีไฮด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 การย่อยสลาย

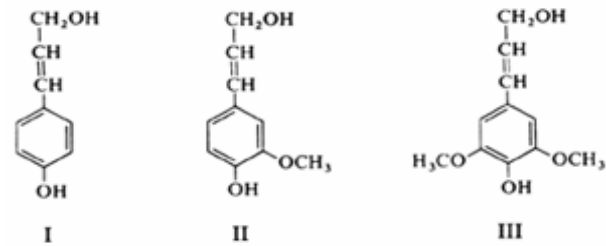
โดยแบคทีเรียมีข้อเสียคือ แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อยสลายพีเอเอชขนาดใหญ่ได้สมบูรณ์ โดยแบคทีเรียชนิดเดียว บางครั้งในการย่อยสลายพีเอเอชก็เกิดสารมัธยันตร์ที่เป็นพิษมากขึ้นด้วย (Cerniglia, 1993)

การย่อยสลายพีเอเอชโดยรา

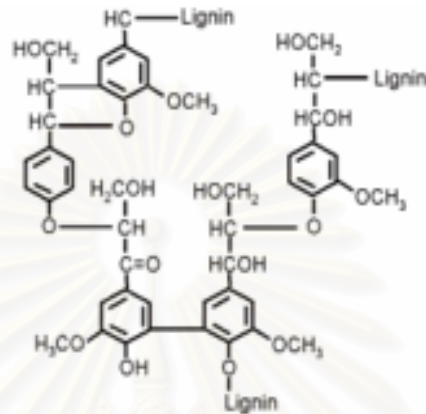
การย่อยสลายพีเอเอชโดยราเป็นการย่อยสลายแบบไม่จำเพาะเจาะจงโดยจะหลั่งเอนไซม์ ออกมานอกเซลล์ (Thurston, 1994) เอนไซม์หลัก 2 ชนิดที่เกี่ยวข้องในช่วงเริ่มต้นของการย่อยสลาย พีเอเอช คือ ไซโทโครม พี-450 โมโนออกซิจีเนส (cytochrome P-450 monooxygenase) และลิกนินเพอร์ออกซิเดสโดยขึ้นกับชนิดของรา (Cerniglia, 1993) ราไม่สามารถใช้พีเอเอชเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวได้ แต่ต้องใช้ร่วมกับแหล่งคาร์บอนอื่น ข้อดีของการบำบัดพีเอเอชโดยใช้ราคือ ราสามารถย่อยสลายพีเอเอชที่มีขนาดใหญ่ได้ และยังสามารถย่อยสลายพีเอเอชได้จนสมบูรณ์ นอกจากนี้สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายของราเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี ถึงแม้ว่าราจะสามารถย่อยสลายพีเอเอชได้ช้ากว่าแบคทีเรีย แต่ลักษณะพิเศษของสายใยราทำให้สามารถเจริญชอกซอนในดินเข้าหาพีเอเอชที่ยึดเกาะอยู่กับอนุภาคของดินได้ดีกว่าแบคทีเรียอีกด้วย (Cerniglia, 1997)

ลิกนินและพีเอเอชมีลักษณะโครงสร้างพื้นฐานคล้ายกัน คือเป็นวงเบนซีนต่อกันแต่ลิกนินจะมีขนาดที่ใหญ่กว่า ทั้งลิกนินและพีเอเอชเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ทำได้ยาก แต่รบบางกลุ่มสามารถย่อยสลายได้ โดยปฏิกิริยาขั้นแรกในการสลายพีเอเอชและลิกนินโดยราคือการเปิดวงแหวนเบนซีน โดยใช้เอนไซม์ที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ ความคล้ายคลึงกันของลิกนินและพีเอเอชทำให้มีงานวิจัยหลายงานที่สรุปได้ว่าราที่สลายลิกนินได้น่าจะสลายพีเอเอชได้เช่นกัน

ลิกนินเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชแบบทุติยภูมิ (secondary cell wall) โดยพบมากที่สุดในบริเวณ middle lamella โครงสร้างของลิกนินเป็นแบบสามมิติ เกิดจากการเชื่อมต่อกันอย่างไม่เป็นระเบียบของสารตั้งต้นสามชนิดได้แก่ โคนิเฟรลแอลกอฮอล์ ไชนาเฟรลแอลกอฮอล์ และ พารา-ไฮดรอกซีซินนามิลแอลกอฮอล์ ดังแสดงในรูปที่ 2.2(ก) และ 2.2(ข) (Hayatsu และคณะ, 1979; Martinez และคณะ, 2005) ลิกนินทำให้ลำต้นของพืชแข็งแรงงายต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์และทางเคมี โครงสร้างของลิกนินจะมีอัตราส่วนของสารตั้งต้นหลากหลายต่างกันไปตามกลุ่มของพืช ในไม้เนื้ออ่อนมีปริมาณลิกนินอยู่สูงที่สุด และประกอบด้วยโคนิเฟรลแอลกอฮอล์ เป็นส่วนใหญ่ และในไม้เนื้อแข็งประกอบไปด้วยไชนาเฟรลแอลกอฮอล์และโคนิเฟรลแอลกอฮอล์ เป็นส่วนใหญ่



ก



ข

รูปที่ 2.2 (ก) แสดงโครงสร้างสารตั้งต้นของลิกนิน (I) พารา-ไฮดรอกซีซินนามิลแอลกอฮอล์, (II) โคนิเฟรลแอลกอฮอล์ และ (III) ไชนาพรีลแอลกอฮอล์ (แหล่งที่มา: Hayatsu และคณะ, 1979) และ (ข) โครงสร้างของลิกนิน (แหล่งที่มา: Martinez และคณะ, 2005)

เมื่อแบ่งตามลักษณะการย่อยลิกนินในเนื้อไม้สามารถแบ่งราได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ราขาวรื้อรอก (Brown rot fungi) ราซอฟรื้อรอก (Soft rot fungi) และราไวรื้อรอก (White rot fungi) (Martinez และคณะ, 2005) ราในแต่ละกลุ่มมีรายละเอียดดังนี้

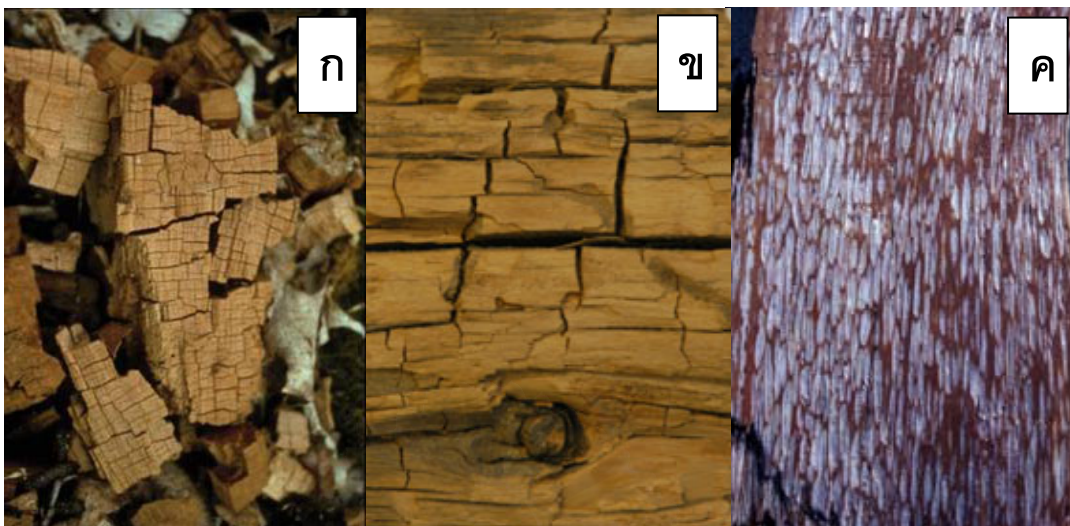
ราขาวรื้อรอกพบมากในไม้เนื้ออ่อน สามารถสลายเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสได้ดี และเปลี่ยนรูปลิกนินได้เล็กน้อย ลักษณะเนื้อไม้ที่ถูกย่อยสลายโดยรากลุ่มนี้จะมีสีน้ำตาล ซึ่งเป็นสีของลิกนินที่เหลืออยู่ เนื้อไม้มีลักษณะแห้ง เปราะ แตกง่าย ลักษณะเป็นผง โดยลักษณะการแตกของเนื้อไม้จะแตกเป็นลักษณะลูกบาศก์ ดังแสดงในรูปที่ 2.3(ก) (Blanchette และ Biggs, 1992; Eriksson และคณะ, 1990) ราในกลุ่มนี้อยู่ในคลาส Basidiomycetes เช่น *Gloeophyllum trabeum* *Laetiporus sulphureus* และ *Postia placenta* เป็นต้น (Martinez และคณะ, 2005)

ตัวอย่างงานวิจัยของราขาวรื้อรอกในการย่อยสลายพีเอเอชเช่น งานวิจัยของ Sack และคณะ (1997) ที่ใช้ *Laetiporus sulphureus* ย่อยสลายพีแนทรีนและไพรีนในอาหารแข็งที่ใช้ฟาง

โดยใช้พีเอเอชเริ่มต้นเป็น 50 ppm พบว่าสามารถสลายพีแนทรีนได้ 10.7 เปอร์เซ็นต์ และย่อยสลายไพรีนได้ 4.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 63 วัน ซึ่งพบว่าสลายได้น้อยมาก

ราซอฟต์แวร์พบมากในไม้เนื้อแข็ง ย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ดี แต่ย่อยสลายลิกนินได้น้อยมาก ราในกลุ่มนี้พบในคลาส Ascomycetes เช่น *Chaetomium globosum* และ *Ustilina deusta* และในคลาส Deuteromycetes เช่น *Alternaria alternate* *Thielavia terrestris* และ *Paecilomyces* spp. เป็นต้น ลักษณะเนื้อไม้ที่ถูกราในกลุ่มนี้ย่อยสลายจะมีลักษณะที่คล้ายกับที่ถูกย่อยโดยราขาวดำคือมีสีน้ำตาลและเปราะ ดังแสดงในรูปที่ 2.3(ข) (Blanchette และ Biggs., 1992; Eriksson และคณะ, 1990; Martinez และคณะ, 2005)

ราไวท์รอต สามารถพบได้ทั้งในไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง สามารถสลายลิกนินได้ดี และยังสามารถสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ด้วย ราในกลุ่มนี้อยู่ในคลาส Basidiomycetes เป็นส่วนใหญ่ เช่น *Trametes versicolor* *Phanerocheate chysosporium* และ *Pleurotus* spp. เป็นต้น และยังสามารถพบได้ในคลาส Ascomycetes เช่น *Xylaria hypoxylon* ในสภาวะที่เหมาะสมพบว่าราไวท์รอตสามารถสลายลิกนินได้มีประสิทธิภาพดีเท่ากับการสลายพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อราสลายลิกนินในเนื้อไม้แล้วจะพบเนื้อไม้เป็นลักษณะสีขาวซึ่งเป็นสีของเซลลูโลสที่เหลืออยู่จากการย่อยสลาย และไม้จะมีลักษณะเปราะ เบา เป็นรูพรุนคล้ายฟองน้ำ รูปภาพแสดงบริเวณที่ลิกนินถูกย่อยสลายและเหลือบริเวณสีขาวไว้ที่ต้นไม้แสดงดังรูปที่ 2.3(ค) (Blanchette และ Biggs., 1992; Eriksson และคณะ, 1990; Martinez และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.3 (ก) ภาพแสดงไม้ที่ถูกล่อยโดยราบราวด์รอกซึ่งไม้จะมีสีน้ำตาล และมีการแตกเป็นรูป ลูกเต๋า (ข) ภาพแสดงไม้ที่ถูกล่อยโดยราซอพท์รอกซึ่งลักษณะจะคล้ายกับราบราวด์รอก มากบางครั้งทำให้เกิดการสับสนได้ (ค) ภาพตัดผ่าลำต้นของต้นสนที่ถูกล่อยสลายโดย ราไวท์รอก *Phellinus pini* โดยบริเวณสีขาวเป็นบริเวณที่ลิกนินถูกล่อยสลาย (แหล่งที่มา: Blanchette และ Biggs., 1992; Eriksson และคณะ, 1990)

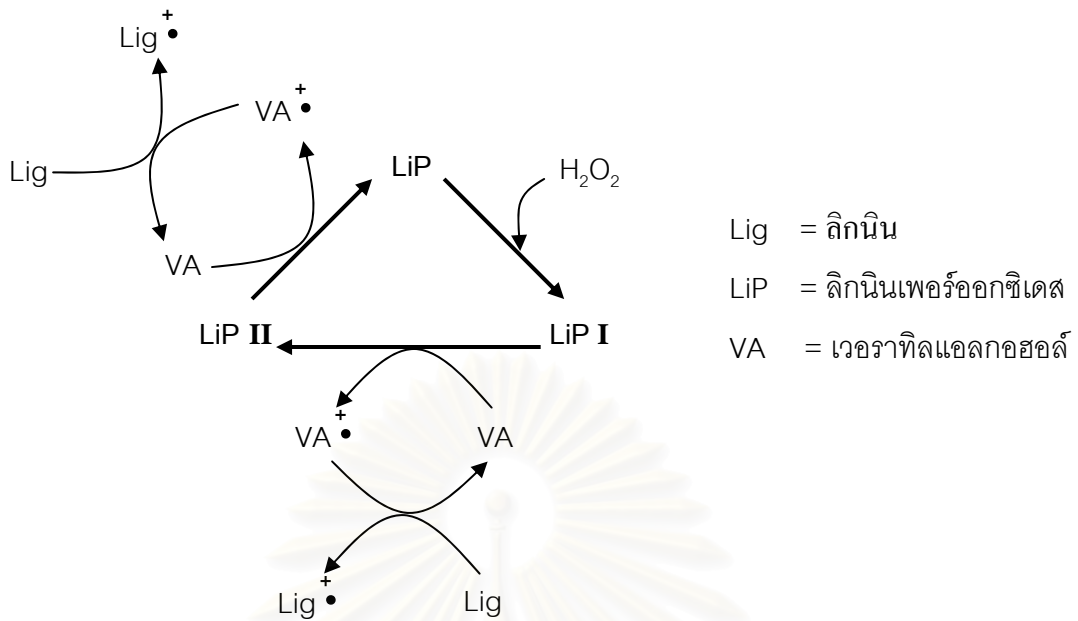
ราในกลุ่มไวท์รอกนี้มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายพีเอเอชมากที่สุด ตัวอย่างงานวิจัยที่ แสดงถึงความสามารถในการย่อยสลายพีเอเอชของรากกลุ่มนี้ เช่น งานวิจัยของ Eggen และ Andrzej (1998) แสดงให้เห็นว่าการใช้ *Pleurotus ostreatus* ในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนพีเอเอช หลายชนิดซึ่งมีปริมาณรวมกันมากถึง 258 ppm สามารถสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนที่ปนเปื้อนในดิน ความเข้มข้น 12.4 ppm ได้ 40 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำการทดลองไป 1 เดือน และย่อยสลายได้ 49 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำการทดลองต่อจนถึง 3 เดือน Han และคณะ (2004) นำรา *Trametes versicolor* ทดสอบการย่อยสลายพีแนทรีนในสภาวะต่างๆ พบว่าราที่เลี้ยงแบบไม่เขย่าสามารถ สลายพีแนทรีนความเข้มข้น 100 ppm ได้ 65 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่าแบบเขย่า 19 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อปมที่อุณหภูมิ 20-30°C จะย่อยสลายได้ดีกว่าที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้ พีเอเอชที่ เหมาะสมต่อการย่อยสลายอยู่ในช่วงที่เป็นกลาง จากผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสภาวะ ในการทดลองก็มีส่วนสำคัญในการย่อยสลายพีเอเอชด้วย นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Bumpus (1989) ที่ได้นำ *Phanerochaete chrysosporium* ไปใช้บำบัดดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนพีเอเอช หลายชนิดด้วย ซึ่งพีเอเอชที่พบมีมากถึง 22 ชนิด จากการเลี้ยงราในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด ที่มี ดินที่ปนเปื้อนพีเอเอชนี้อยู่ด้วยพบว่าพีเอเอชทุกชนิดถูกสลายไป 70-100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 27 วัน เป็นต้น

มีรายงานว่าราไวท์รอกสามารถสลายลิกนิน และพีเอเอชได้ดี เนื่องมาจากการผลิต เอนไซม์ที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ซึ่งมีคุณลักษณะพิเศษ คือสามารถย่อยสลายสารต่างๆ โดยไม่ จำเพาะเจาะจง เอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase, LiPs) แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase, MnPs) และแลคเคส (laccase) (Thurston, 1994) สมบัติต่างๆ ของเอนไซม์แต่ละชนิดมีดังนี้

ลิกนินเพอร์ออกซิเดส

เป็นเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่พบเป็นชนิดแรก โครงสร้างประกอบไปด้วย ferric heme เอนไซม์ชนิดนี้พบว่าเป็นตัวออกซิแดนซ์ที่ตีกว่าเพอร์ออกซิเดสชนิดอื่น โดยนอกจากจะออกซิไดซ์ ฟีนอลและอะนิลีนได้แล้ว ยังสามารถออกซิไดซ์โครงสร้างของลิกนินที่ไม่ได้เป็นวงแหวน เช่น บริเวณพันธะคาร์บอน-คาร์บอน (C-C) และพันธะคาร์บอน-ออกซิเจน-คาร์บอน (C-O-C) ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถออกซิไดซ์อะโรมาติกอีเธอร์อื่นๆ ได้ด้วย เอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส นี้ไม่ได้พบในราไวท์รอกทุกชนิด เช่นมีรายงานว่าสามารถพบได้ใน *Phanerochaete chrysosporium* และ *Trametes versicolor* แต่ไม่พบใน *Pleurotus ostreatus* และ *Dichomitus squalens* เป็นต้น (Hammel, 1997; Harvey และ Thurston, 2001; Martinez และคณะ, 2005)

การย่อยสลายลิกนินโดยลิกนินเพอร์ออกซิเดสต้องอาศัยเวอรากทิลแอลกอฮอล์เป็น mediator โดยเวอรากทิลแอลกอฮอล์จะออกซิไดซ์บริเวณ active site ของเอนไซม์ ทำให้ได้สาร มัธยันตร์ที่มีค่า oxidation state ที่สูงทำให้เข้าไปออกซิไดซ์ลิกนินที่ active site ได้ ปฏิกิริยาการ ย่อยสลายลิกนินแสดงดังรูปที่ 2.4 โดยปฏิกิริยาการเริ่มต้นจาก H_2O_2 ออกซิไดซ์เอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส (LiP) กลายเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในรูป 2-electron oxidized (LiP I) หลังจากนั้นจะเกิด single-electron reduction 2 ครั้งโดยมีเวอรากทิลแอลกอฮอล์เป็น mediator ให้แก่ลิกนิน กลายเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในรูป 1-electron oxidized (LiP II) และต่อจากนั้นเอนไซม์จะกลับเข้าสู่ สภาวะปกติ (LiP) (Hammel, 1997; Harvey และ Thurston, 2001)

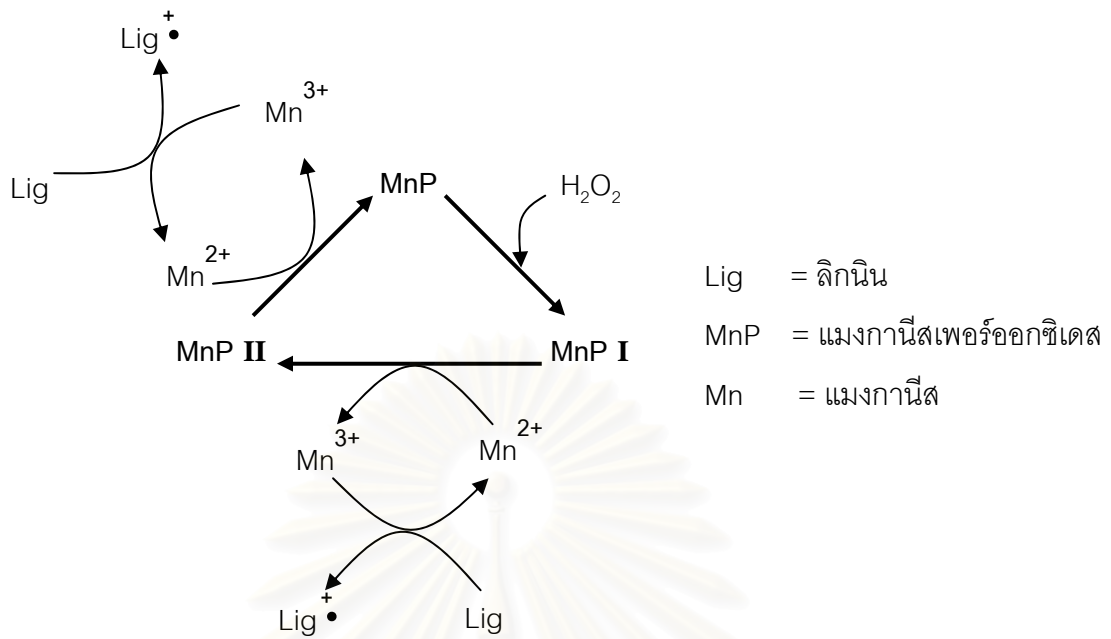


รูปที่ 2.4 ปฏิกริยาการย่อยสลายลิกนินโดยเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส

(แหล่งที่มา: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood5.html>)

แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส

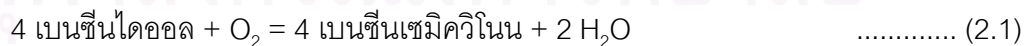
เป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างประกอบไปด้วยเฟอร์ริก ฮีม เช่นเดียวกับลิกนินเพอร์ออกซิเดส นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันด้วย แต่ในแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสมีพันธะไดซัลไฟต์ 5 พันธะ แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสจะออกซิไดซ์ Mn^{2+} เป็น Mn^{3+} ซึ่งสามารถออกซิไดซ์สารที่มีพินอลประกอบ เช่น ลิกนิน แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์สารอินทรีย์ที่มีค่า redox potential มากกว่า 1.12 V / SCE การสลายลิกนินของแมงกานีสเพอร์ออกซิเดสมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับลิกนินเพอร์ออกซิเดส ดังแสดงในรูปที่ 2.5 โดยจะมีความแตกต่างกับลิกนินเพอร์ออกซิเดสตรงที่จะออกซิไดซ์ Mn^{2+} แทนที่จะเป็นเวอราทิลแอลกอฮอล์ โดยปฏิกริยาการเริ่มต้นจาก H_2O_2 ออกซิไดซ์เอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (MnP) กลายเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในรูป 2-electron oxidized (MnP I) หลังจากนั้นจะเกิด single-electron reduction 2 ครั้งโดยมี Mn^{2+} เป็น mediator ให้แก่ลิกนิน กลายเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในรูป 1-electron oxidized (MnP II) และต่อจากนั้นเอนไซม์จะกลับเข้าสู่สภาวะปกติ (MnP) (Hammel, 1997; Harvey และ Thurston, 2001)



รูปที่ 2.5 ปฏิกริยาการย่อยสลายลิกนินโดยเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส
 (แหล่งที่มา: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood5.html>)

แลคเคส

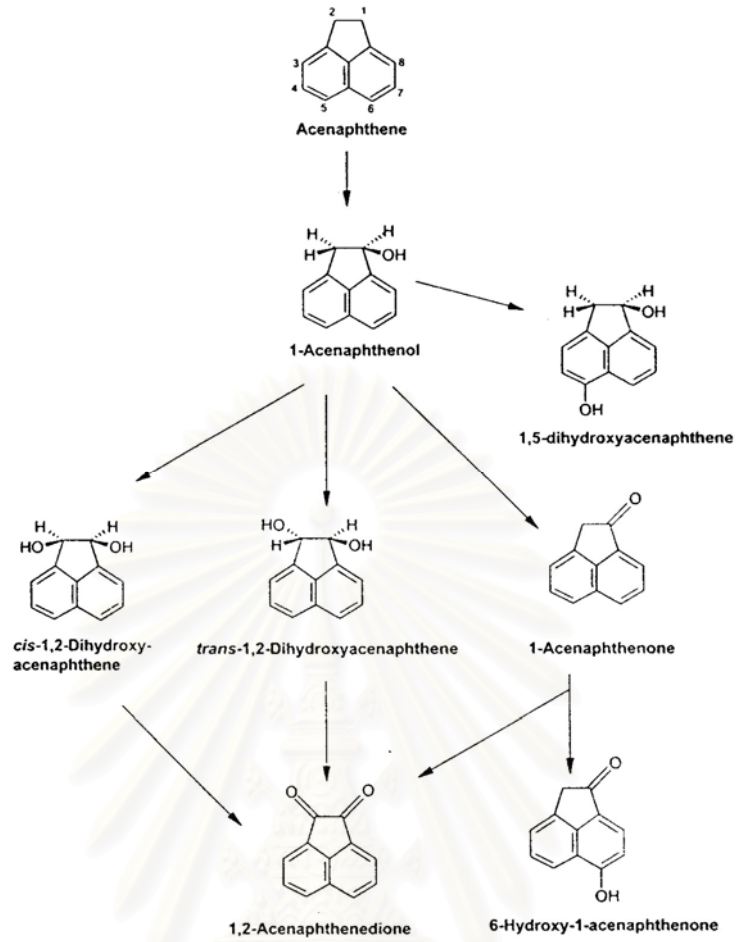
เอนไซม์แลคเคสสามารถพบได้ทั้งในราไวท์รอต และราบราวด์รอต เอนไซม์นี้เป็น blue copper oxidase ประกอบด้วยอะตอมคอปเปอร์ 3 ชนิด ชนิดที่ 1 ทำหน้าที่เกี่ยวกับออกซิเดชันและรีดักชัน ชนิดที่ 2 และ 3 ช่วยทำให้เกิดการรวมตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม แลคเคสมีความจำเพาะต่อซับสเตรทต่ำมากทำให้สามารถสลายสารได้หลายกลุ่ม สามารถออกซิไดซ์ได้ทั้ง ออร์โธ- และพารา-ควิโนน นอกจากนี้ยังออกซิไดซ์อะมิโนฟีนอลและฟีนอลไดเอมีนได้อีกด้วย แลคเคสมีอะตอมของคอปเปอร์ตั้งแต่ 4 อะตอมขึ้นไปและสามารถรีดิวซ์ไดออกซิเจนไปเป็นน้ำอย่างสมบูรณ์ ปฏิกริยาการย่อยสลายแสดงดังสมการที่ 2.1 (Hammel, 1997; Martinez และคณะ, 2005)



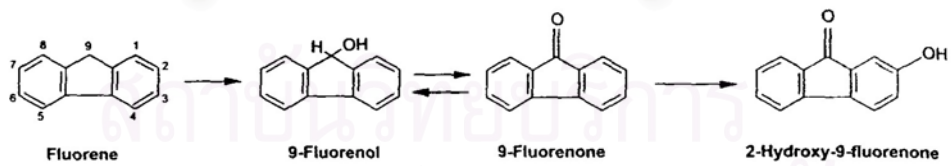
และเมื่อแบ่งชนิดของราตามชนิดของเอนไซม์ที่สร้าง สามารถแบ่งราได้เป็น 2 กลุ่มคือ พวกที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม ligninolytic (non-ligninolytic fungi) และพวกที่สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม ligninolytic (ligninolytic fungi)

Non-ligninolytic fungi

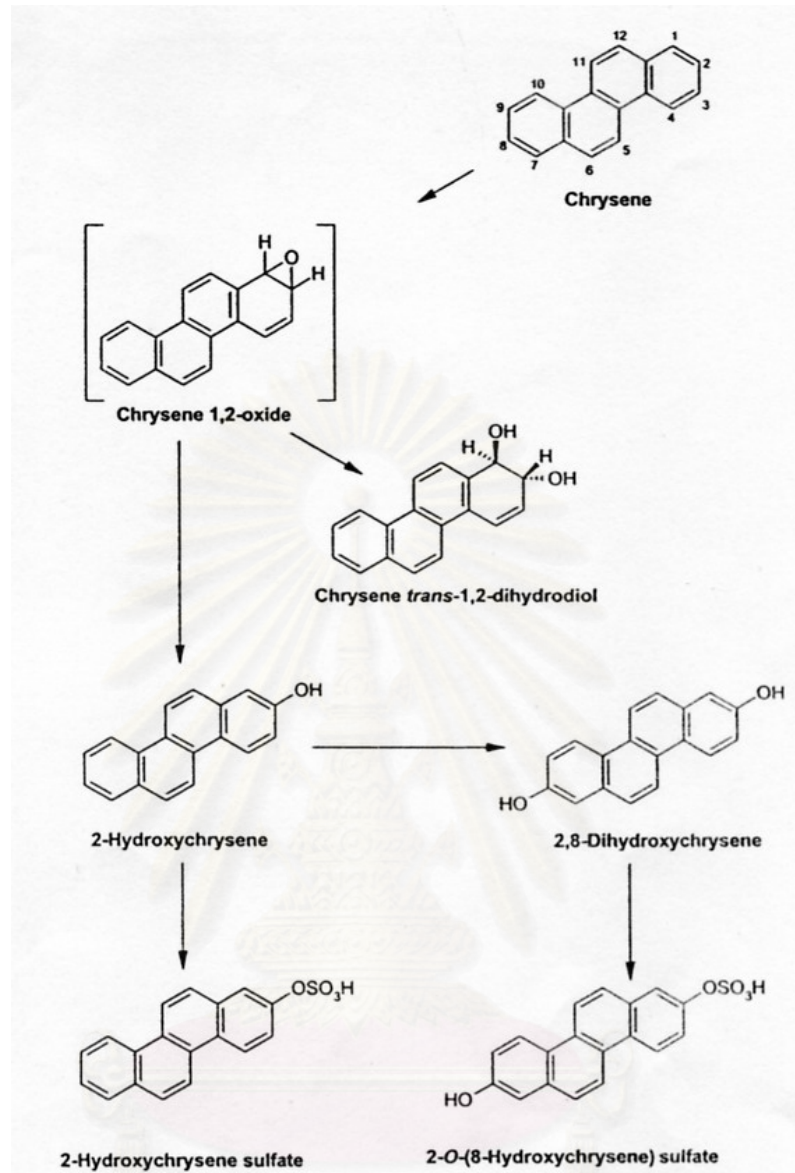
non-ligninolytic fungi เป็นราที่ไม่ได้เจริญบนไม้ ไม่สามารถผลิตลิกนินเพอร์ออกซิเดสได้ แต่พบว่ามีราบางชนิดในกลุ่มนี้มีความสามารถในการย่อยสลายพีเอเอช ซึ่งโดยส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้พีเอเอชเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้แต่จะเป็นได้เพียงแค่ตัวเสริมเมื่อเจริญบนชั้นเสตรทอื่น ดังนั้นพีเอเอชจึงไม่ได้ช่วยเพิ่มการเจริญของสายใยของรา แต่ราช่วยลดความเป็นพิษ ลดสมบัติการเป็นสารกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็งของพีเอเอชได้ ราในกลุ่มนี้พบได้ในทุกคลาส ยกเว้นในคลาส Basidiomycetes ตัวอย่างของราในกลุ่มนี้เช่น *Cunninghamella elegans* *Neurospora crassa* *Candida tropicalis* และ *Curvularia lunata* เป็นต้น ราในกลุ่มนี้ย่อยสลายพีเอเอชโดยเอนไซม์ไฮโดรไลติก 450 โมโนออกซิจีเนส เกิดเป็นแอรินออกไซด์หลังจากนั้นสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ 2 ทางคือ ถูกเติมน้ำโดยเอนไซม์อีพอกไซด์ไฮโดรเลสเกิดเป็น ทรานซ์-ไดไฮโดรไดออล หรือเกิดการจัดเรียงตัวใหม่โดยไม่ใช้เอนไซม์เกิดเป็นฟีนอล ราบางชนิดสามารถย่อยสลายทรานซ์-ไดไฮโดรไดออลและฟีนอลโดยการเกิดการเติมหมู่ซัลเฟต (sulfation) เติมหมู่เมทิล (methylation) หรือเกิดการรวมตัว (conjugation) กับกลูโคส ไฮโดร หรือ กลูโคนิกแอซิดได้ (Cerniglia และ Sutherland, 2001) ตัวอย่างวิธีการย่อยสลายพีเอเอชบางชนิด ได้แก่ อะซีแนพรีน ฟลูออรีน ไครซีน แอนทราซีน ไพรีน ฟลูออแรนธิน เบนโซ[เอ]แอนทราซีน และ พีแนนทรีน โดยราในกลุ่มนี้แสดงในรูปที่ 2.6 – 2.13 ตามลำดับ



รูปที่ 2.6 แสดงวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟทีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi (แหล่งที่มา: Cerniglia และ Sutherland, 2001)

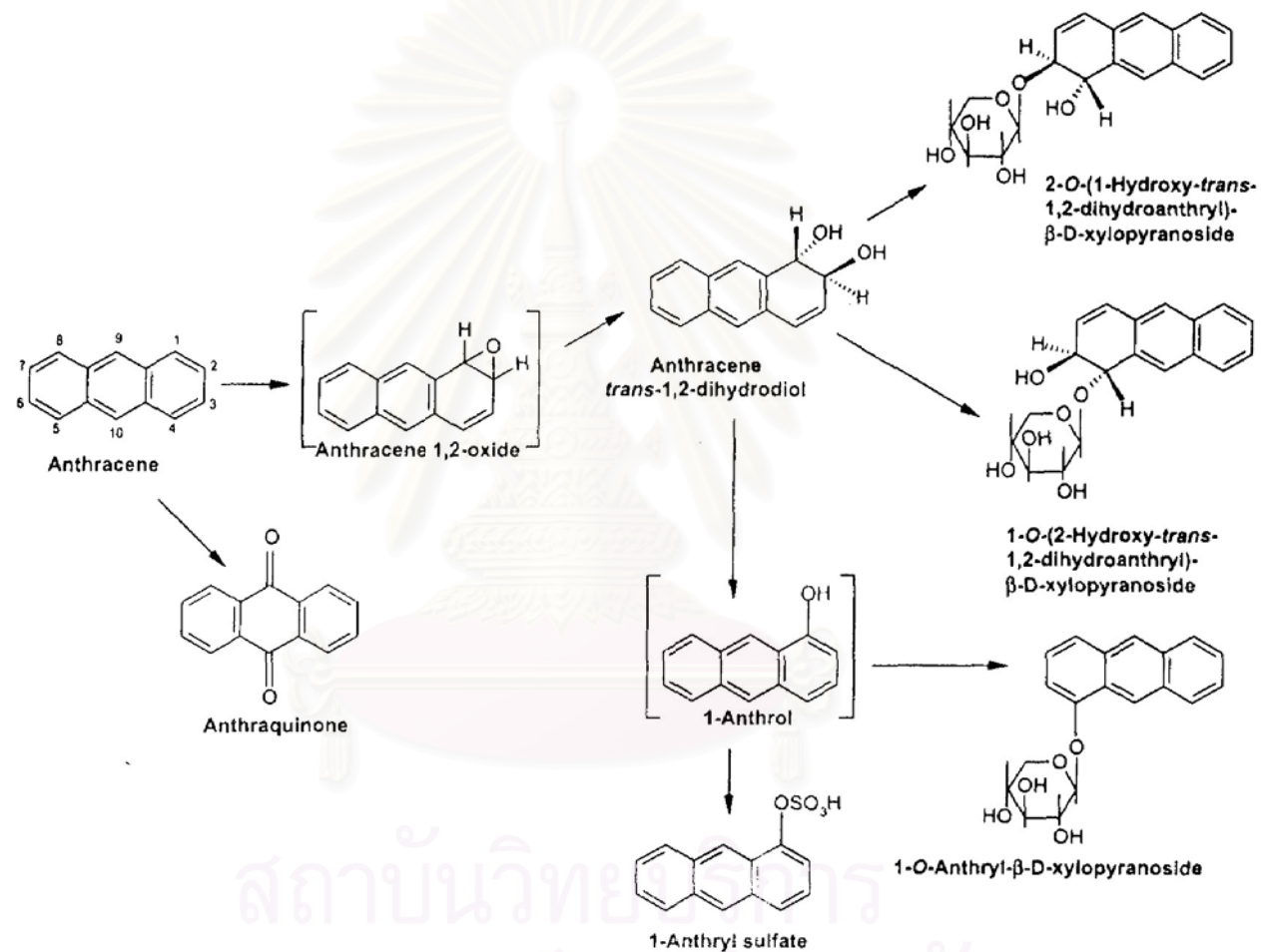


รูปที่ 2.7 แสดงวิถีการย่อยสลายฟลูออรีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi (แหล่งที่มา: Cerniglia และ Sutherland, 2001)

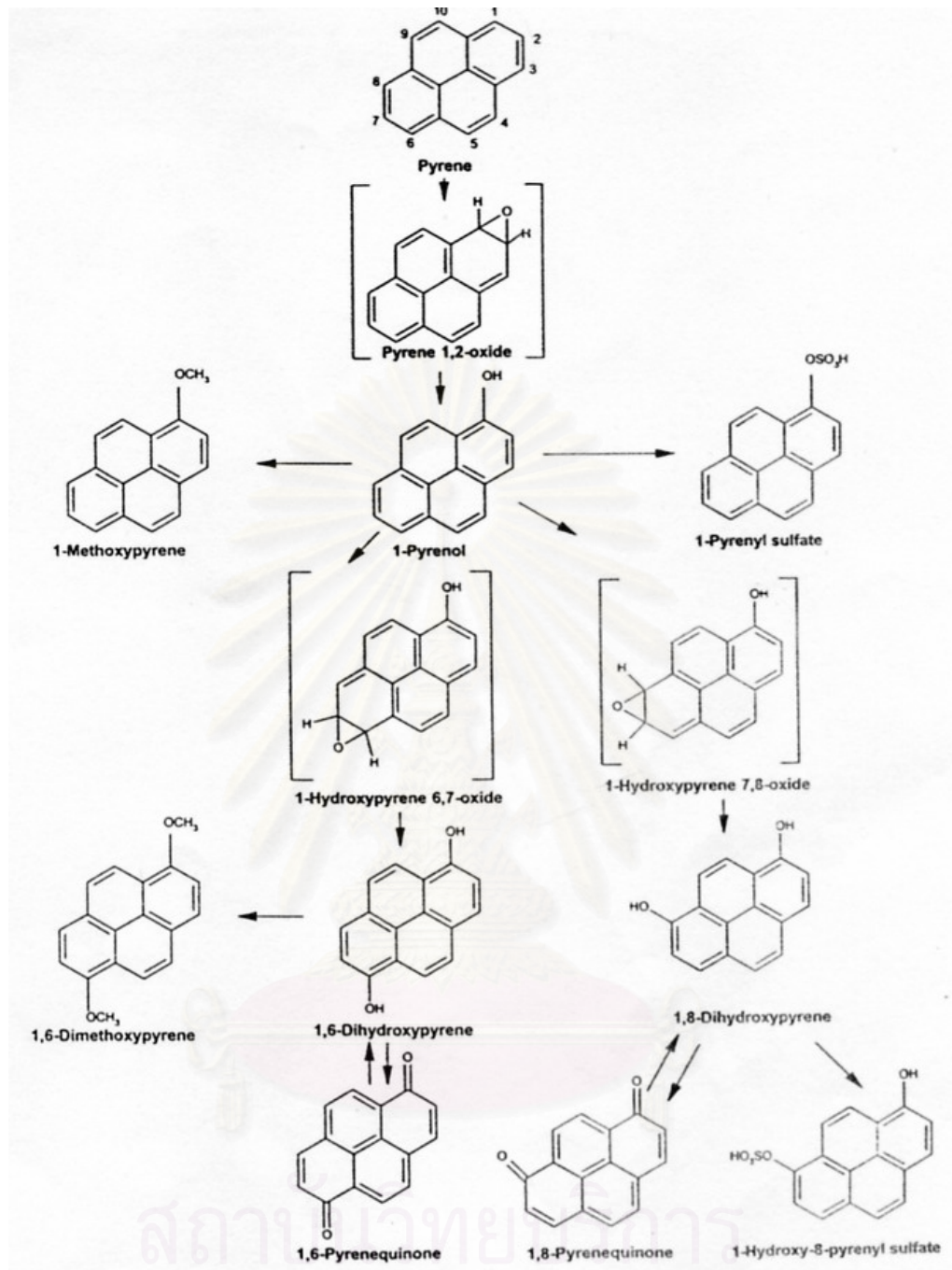


รูปที่ 2.8 แสดงวิถีการย่อยสลายไครซีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi (แหล่งที่มา: Cerniglia และ Sutherland, 2001)

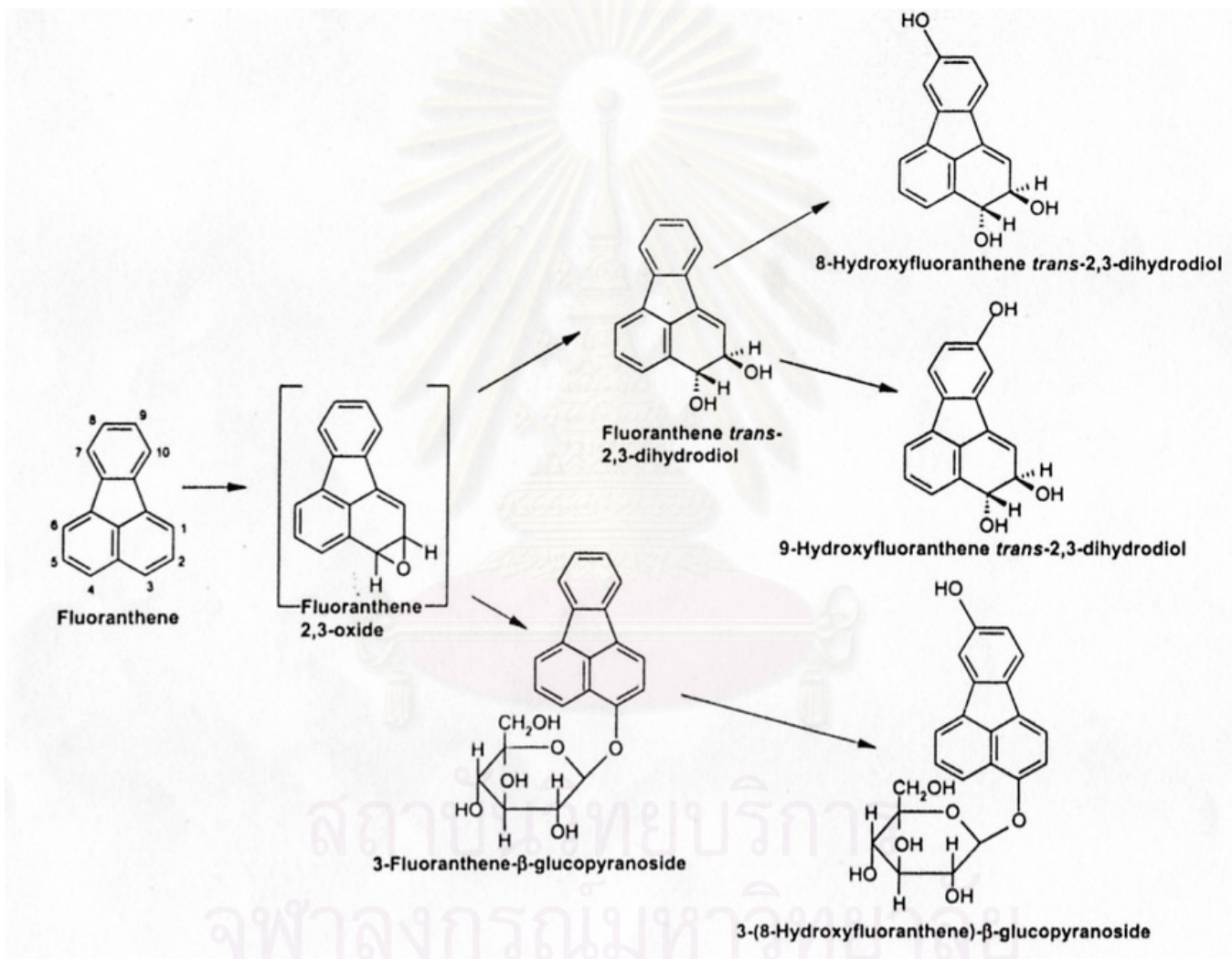
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



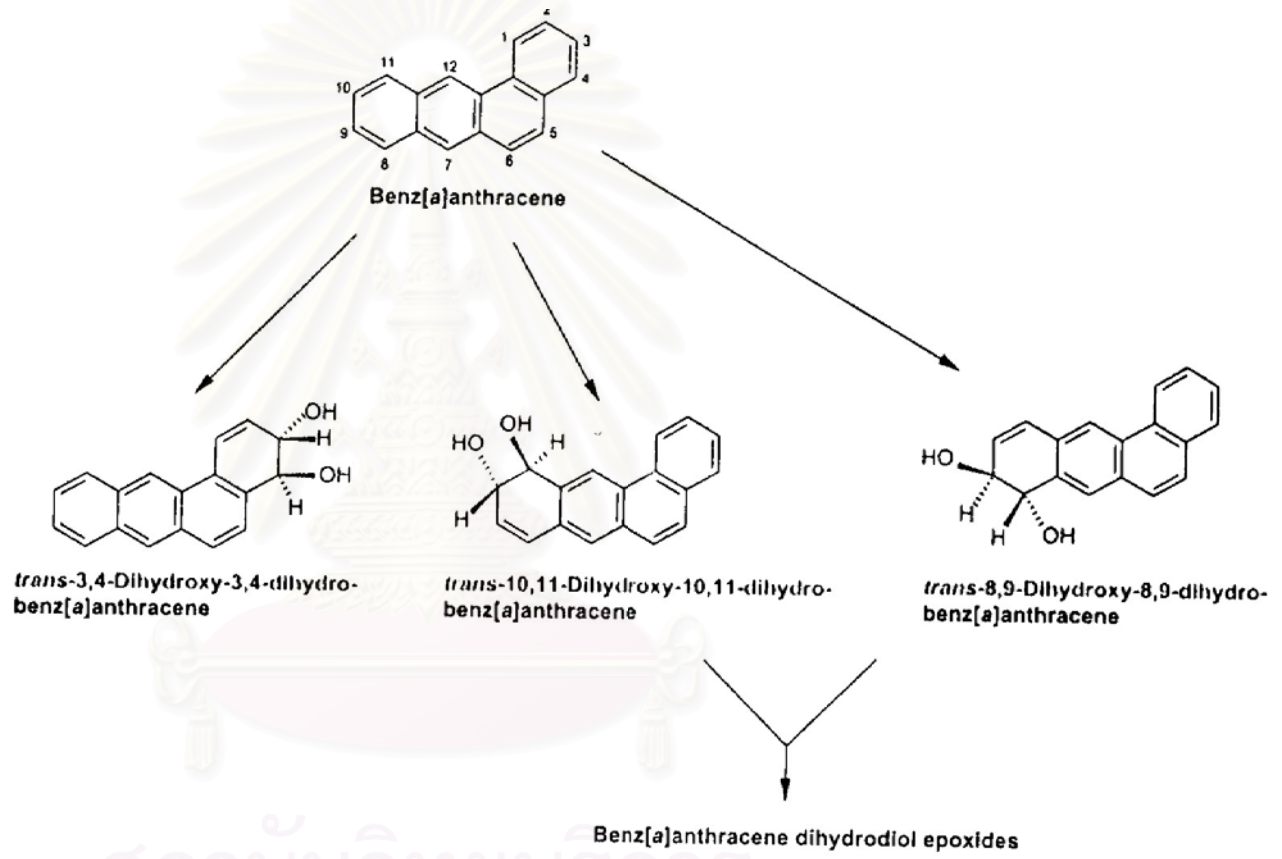
รูปที่ 2.9 แสดงวิถีการย่อยสลายแอนทราซีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi (แหล่งที่มา: Cerniglia และ Sutherland, 2001)



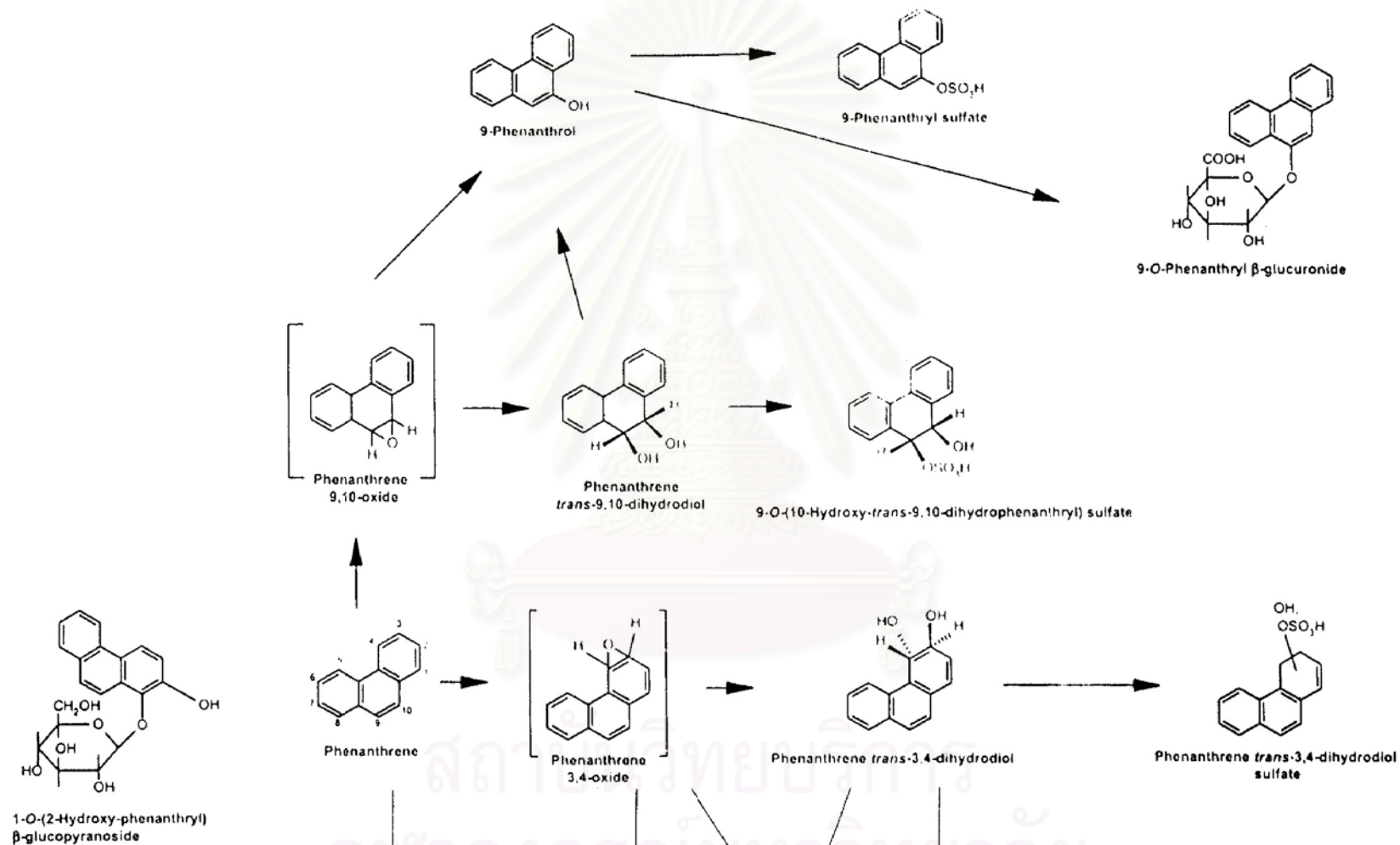
รูปที่ 2.10 แสดงวิถีการย่อยสลายไพรีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi
(แหล่งที่มา: Cerniglia และ Sutherland, 2001)



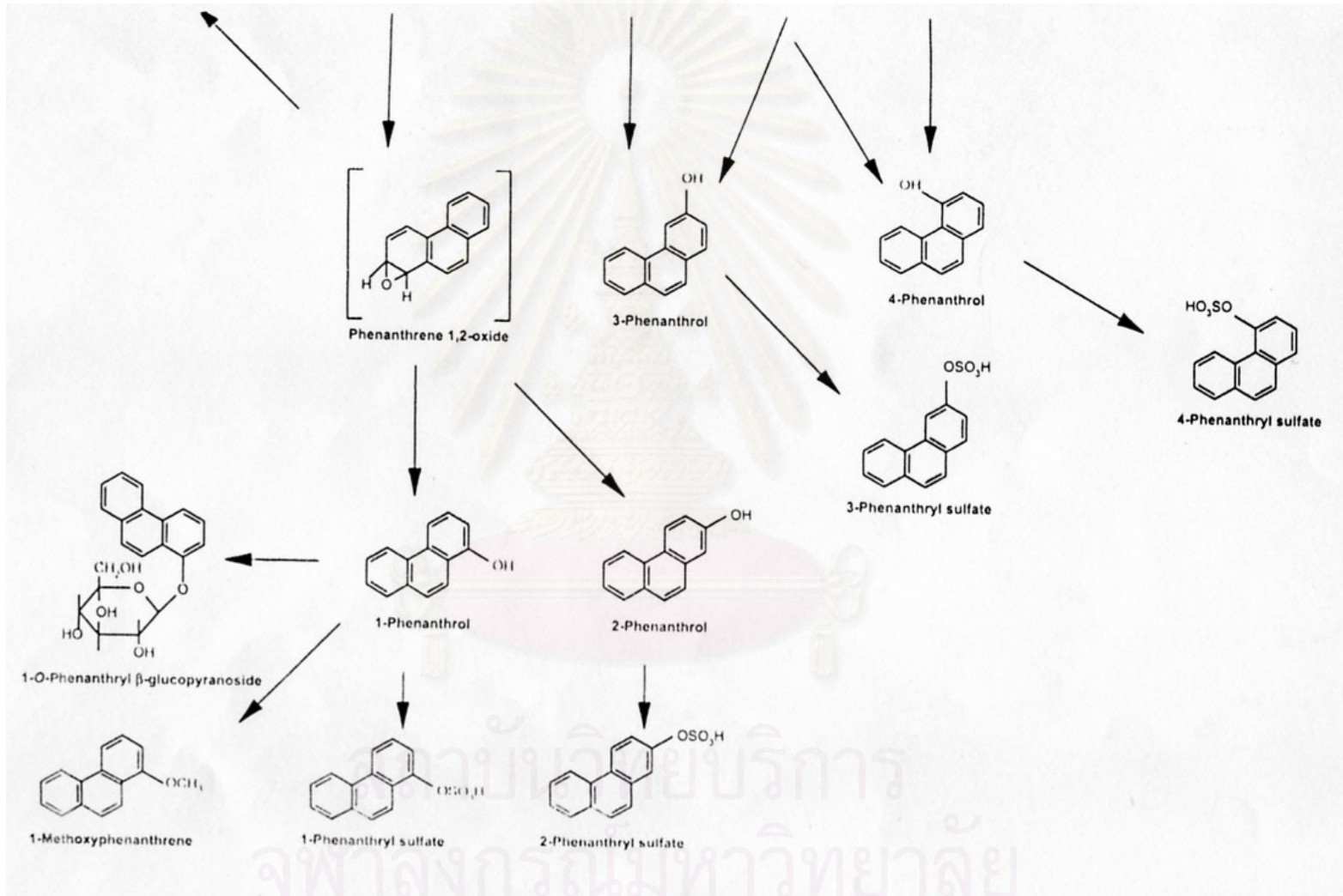
รูปที่ 2.11 แสดงวิถีการย่อยสลายฟลูออแรนทีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi (แหล่งที่มา: Cerniglia และ Sutherland, 2001)



รูปที่ 2.12 แสดงวิธีการย่อยสลาย เบนโซ[เอ]แอนทราซีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi (แหล่งที่มา: Cerniglia และ Sutherland, 2001)



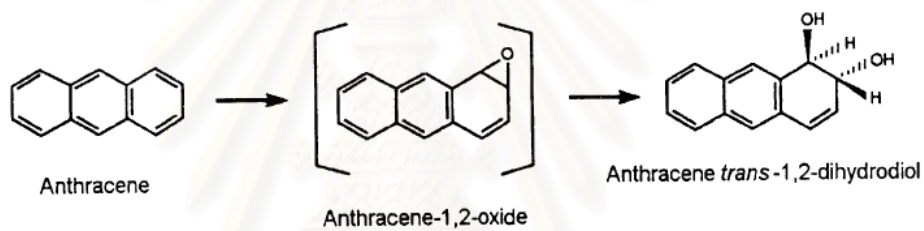
รูปที่ 2.13 แสดงวิธีการย่อยสลายฟีนแอนทรีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi
 (แหล่งที่มา: Cerniglia และ Sutherland, 2001)



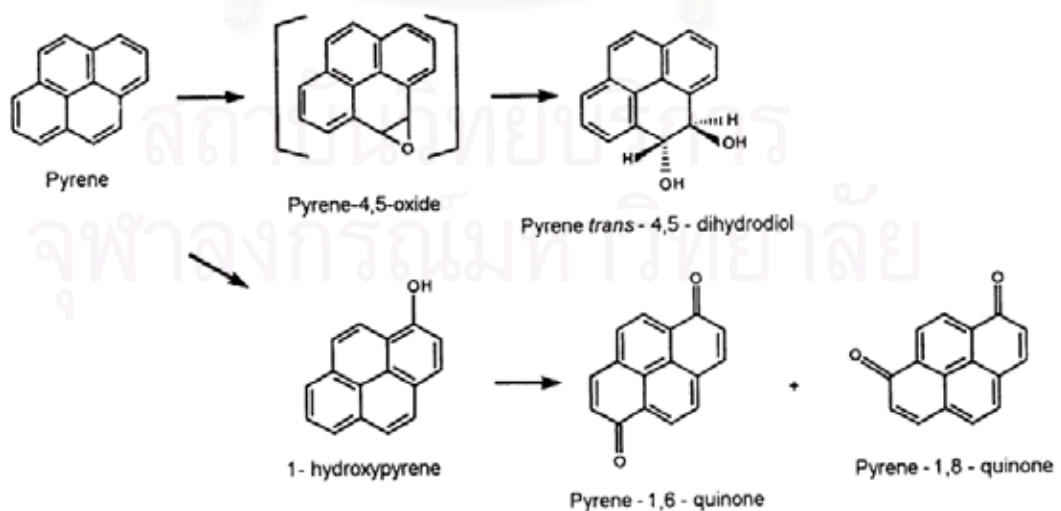
รูปที่ 2.13 (ต่อ) แสดงวิถีการย่อยสลายพีแนนทรีน โดยราในกลุ่ม non-ligninolytic fungi
(แหล่งที่มา: Cerniglia และ Sutherland, 2001)

ligninolytic fungi

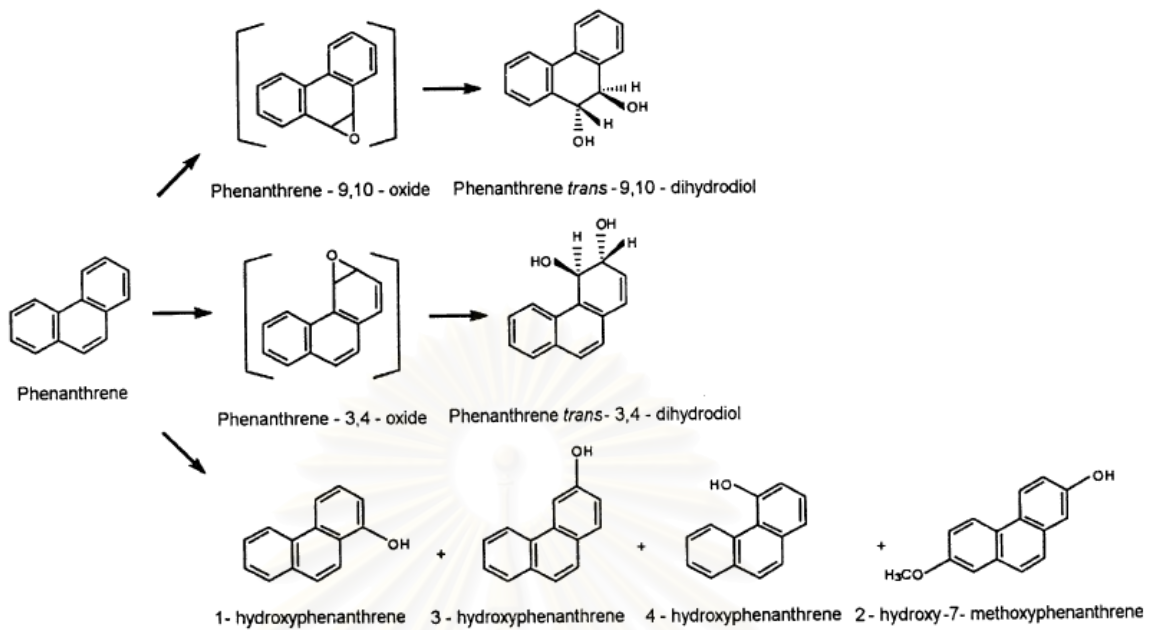
ligninolytic fungi พบเฉพาะในคลาส Basidiomycetes สามารถสร้างเอนไซม์ lignin peroxidase manganese peroxidase และ laccase ได้ สามารถย่อยสลายลิกนินในช่วง secondary metabolism ในสภาวะที่อาหารขาดแคลนโดยเฉพาะการขาดไนโตรเจน ซึ่งเมื่อนำราในกลุ่มนี้มาทดสอบการย่อยสลายพีเอเอชจึงต้องเลี้ยงในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด เพื่อกระตุ้นให้รามีการสร้างเอนไซม์ ราในกลุ่มนี้มีประโยชน์มากในการนำไปใช้บำบัดดินที่ปนเปื้อนพีเอเอช เนื่องจากดินจะมีคาร์บอนมาก ทำให้อัตราส่วนของไนโตรเจนต่ำจึงมีการกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์ได้ ราในกลุ่มนี้ที่มีสมบัติโดดเด่นมากในการบำบัดพีเอเอชได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium* *Trametes versicolor* และ *Pleurotus ostreatus* ตัวอย่างวิถีการย่อยสลาย แอนทราซีน ไพรีน พีแนนทรีน ฟลูออรีน เบนโซ[เอ]ไพรีน โดยราในกลุ่มนี้แสดงดังรูปที่ 2.14-2.18 (Cerniglia และ Sutherland, 2001; Silva และคณะ, 2005)



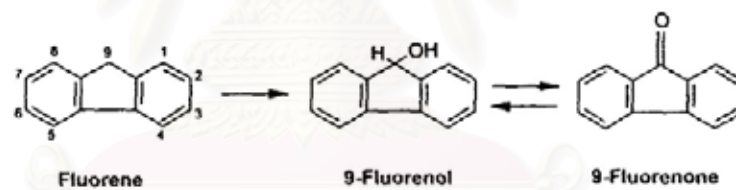
รูปที่ 2.14 แสดงวิถีการย่อยสลายแอนทราซีน โดยราในกลุ่ม ligninolytic fungi
(แหล่งที่มา: Silva และคณะ, 2005)



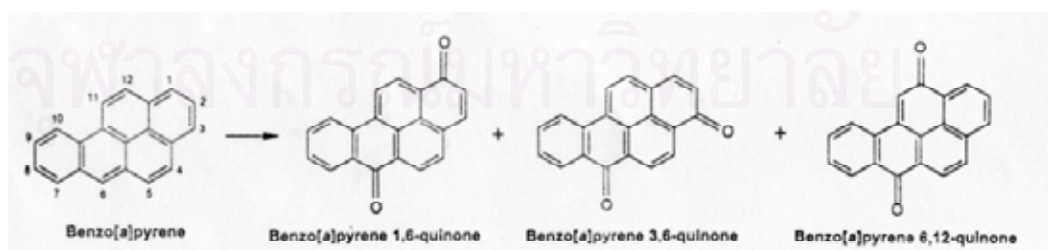
รูปที่ 2.15 แสดงวิถีการย่อยสลายไพรีน โดยราในกลุ่ม ligninolytic fungi
(แหล่งที่มา: Silva และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.16 แสดงวิถีการย่อยสลายพีแนนทริน โดยราในกลุ่ม ligninolytic fungi
(แหล่งที่มา: Silva และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.17 แสดงวิถีการย่อยสลายฟลูออรีน โดยราในกลุ่ม ligninolytic fungi
(แหล่งที่มา: Cerniglia และ Sutherland, 2001)



รูปที่ 2.18 แสดงวิถีการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน ของราในกลุ่ม ligninolytic fungi
(แหล่งที่มา: Cerniglia และ Sutherland, 2001)

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่าราที่สามารถสลายลิกนินได้ (ligninolytic fungi) มีคุณสมบัติที่น่าจะสลายพีเอเอชได้เช่นกัน จึงได้มีการคัดกรองรากลุ่มนี้เพื่อนำมาใช้ทดสอบการย่อยสลายพีเอเอชกันอย่างแพร่หลายโดยใช้ลิกนินเป็นต้นแบบเพื่อลดการใช้พีเอเอชในห้องทดลอง แต่การสกัดลิกนินทำได้ยากมากและมีราคาแพงจึงมีการใช้สารชนิดอื่นๆ เป็นสารทดสอบการย่อยสลายแทนลิกนิน โดยสารที่นิยมใช้กันมากมักเป็นสีที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเชื่อมต่อกันขนาดใหญ่คล้ายลิกนิน และสามารถสังเกตได้ง่ายเมื่อมีการย่อยสลายของสีโดยเอนไซม์จากรา โดยจะมีการเปลี่ยนสีให้เห็นได้อย่างชัดเจน ตัวอย่างสีที่มีการนำมาใช้ทดสอบการย่อยสลายพีเอเอช เช่น poly R-478 phenol red guaiacol และ azureB เป็นต้น (Eichlerova และคณะ, 2002; Eichlerova และคณะ, 2006; Moreira และคณะ, 2001; Ollikka และคณะ, 1993)

ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ศึกษาการย่อยสลายพีเอเอชโดยแบคทีเรียตั้งแต่ปี 2542 แต่เริ่มมีการนำราไวท์รอกมาใช้เมื่อปี 2547 โดยสิทธิ ใจสงฆ์ (2547) ซึ่งในงานวิจัยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างเห็ดมาจากที่ต่างๆ มาได้จำนวน 8 สายพันธุ์และทดสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ polyphenol oxidase และพบว่ามี 4 สายพันธุ์ที่มีแอกติวิตีดี จึงนำไปทดสอบการย่อยสลายพีเอเอช โดยมี 1 สายพันธุ์ได้แก่ RE88 ที่สามารถลดปริมาณไพรีน ฟลูออแรนธิน พีแนนทรีน และฟลูออรีน ได้ 80 73 17 และ 12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 28 วันโดยใช้พีเอเอชเริ่มต้น 100 ppm และยังพบอีกว่าราสายพันธุ์ RE88 เจริญในอาหาร Basal III ที่มีไพรีน หรือฟลูออแรนทรีน และกลูโคส ได้ดีกว่าที่เจริญในอาหาร Basal III ที่เติมกลูโคสอย่างเดียว

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ ดวงเดือน สุพรรณชนะบุรี (2548) ที่คัดแยกและเห็ดที่เจริญบนต้นไม้ได้จำนวน 50 ตัวอย่าง และสิริวิรัตน์ วิเศษคุปต์ (2548) ที่คัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน 11 แหล่ง ได้ราทั้งหมด 34 ตัวอย่างตามลำดับ มาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม ligninolytic ดวงเดือน สุพรรณชนะบุรี (2548) พบรา 6 สายพันธุ์ที่มีเอนไซม์ในกลุ่มเพอร์ออกซิเดส ซึ่งสามารถเปลี่ยนสีอาหารที่ผสม guaiacol phenol red และ azureB ได้ทั้ง 3 ชนิด และเมื่อนำราทั้ง 6 สายพันธุ์นี้ไปทดสอบการย่อยสลายพีแนนทรีน 100 ppm ในอาหารเหลวพบว่า มีรา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ T8 T20 และ T21(2) ที่สามารถลดปริมาณพีแนนทรีนได้ดีโดยสามารถลดได้ 87.25 76.85 และ 98.28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับในเวลา 28 วัน สิริวิรัตน์ วิเศษคุปต์ (2548) พบรา 8 สายพันธุ์ที่มีเอนไซม์ในกลุ่มเพอร์ออกซิเดส และเมื่อนำราทั้ง 8 สายพันธุ์นี้ไปทดสอบการย่อยสลายพีแนนทรีน 100 ppm ในอาหารเหลวพบว่า มีรา 4 สายพันธุ์ที่ลดปริมาณพีแนนทรีนได้ดี ได้แก่ S1 S5 S6 และ S7 โดยมีปริมาณลดลง 87.46 81.04 79.91 และ 43.89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับภายในเวลา 21 วัน

งานวิจัยของกิติวรรณ บุญญารักษ์ (2549) ได้นำรายสายพันธุ์ T8 T20 S5 และ F18 (คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้) มาทดสอบการมีเอ็นที่ประมาณร้อยละให้เอ็นไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส แอมกานีสเพอร์ออกซิเดส และแลคเคส โดยการทำให้ PCR (polymerase chain reaction) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเอ็นเหล่านี้ และพบว่า T8 T20 และ S5 ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ของเอ็นที่ประมาณร้อยละเอ็นไซม์ครบทั้ง 3 ชนิด แต่ F18 ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ของเอ็นที่ประมาณร้อยละ 2 เอ็นไซม์ได้แก่ แอมกานีสเพอร์ออกซิเดสและแลคเคส และเมื่อทดสอบแอกติวิตีของ ligninolytic เอ็นไซม์เหล่านี้ ในระหว่างการย่อยสลาย พีแนทรีน 100 ppm ในอาหารเหลวพบว่าราทั้ง 4 ชนิดมีแอกติวิตีของเอ็นไซม์ทั้ง 3 ชนิด โดยมีการทำงานของเอ็นไซม์ที่แตกต่างกัน รา F18 มีการทำงานร่วมกันของเอ็นไซม์ 3 ชนิด รา T8 มีเอ็นไซม์แลคเคสที่ทำงานเป็นหลัก รองลงมาเป็นลิกนินเพอร์ออกซิเดส และแอมกานีสเพอร์ออกซิเดส รา T20 มีแลคเคสที่ทำงานเป็นหลักเช่นเดียวกับรา T8 แต่รองลงมาเป็นลิกนินเพอร์ออกซิเดสและแอมกานีสเพอร์ออกซิเดสตามลำดับ และสุดท้ายรา S5 ก็มีแลคเคสที่ทำงานเป็นหลักเช่นเดียวกับรา T8 และ T20 รองลงมาเป็นลิกนินเพอร์ออกซิเดสและแอมกานีสเพอร์ออกซิเดสซึ่งมีแอกติวิตีน้อยมาก

สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับปริมาณพีเอเอชในประเทศไทยได้มีผู้ทำงานวิจัยวัดปริมาณพีเอเอชที่สะสมตามแหล่งต่างๆ ดังนี้

Oanh และคณะ (2000) ได้วัดปริมาณพีเอเอชในอากาศที่สถาบัน Asian Institute of Technology (AIT) พบว่าบริเวณใกล้ถนนด้านพหลโยธินพบพีเอเอชความเข้มข้นค่อนข้างสูงของเบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอร์ลิซีน และโคโลนิน และจะเบาบางลงเมื่อห่างออกจากถนน แสดงแนวโน้มที่เห็นได้ชัดว่าพีเอเอชเหล่านี้ถูกปล่อยมาจากท่อไอเสียของรถยนต์

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Norramit และคณะ (2005) ที่ได้วัดปริมาณพีเอเอชในอากาศของกรุงเทพฯ โดยเก็บตัวอย่าง 6 จุด แบ่งเป็นบริเวณที่จราจรไม่คับคั่ง 2 จุด การจราจรคับคั่ง 2 จุด และการจราจรคับคั่งมาก 2 จุด โดยทำการทดลองในช่วงฤดูแล้งเพื่อขจัดข้อผิดพลาดของการวัดปริมาณจากการถูกชะโดยน้ำฝน ผลจากการเก็บตัวอย่างพบว่า พีเอเอชที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เช่น แนพทาลีน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน พีแนทรีน และแอนทราซีน ตรวจพบได้ทุกที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง แต่ในปริมาณที่น้อย ในขณะที่พีเอเอชที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ได้แก่ เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอร์ลิซีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน เบนโซ[อี]ไพรีน อินดิโน[1,2,3]ไพรีน ไพรีน เบนโซ[เอ]ไพรีน ไดเบนซ์[เอ,เอช]แอนทราซีน เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน เบนโซ[เอ]แอนทราซีน และไครซีน ดูดซับอยู่กับอนุภาคเล็กๆ ที่คนสามารถหายใจเข้าได้

นอกจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวัดปริมาณพีเอเอชในอากาศแล้ว ยังมีงานวิจัยที่วัดปริมาณพีเอเอชในแหล่งน้ำด้วย Wattayakorn (2003) ได้ประยุกต์ใช้วัสดุของแข็งแบบแผ่น (Empore™ Extraction Disk ชนิด BAKEBOND C₁₈) ประกอบกับเทคนิค RP-HPLC มาใช้ในการวิเคราะห์หาสารพีเอเอชในบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยาและพบสารพีเอเอชหลายชนิด ได้แก่ แนพทาลีน อะซีแนพทีลีน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน พีแนนทรีน และแอนทราซีน โดยมีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วงน้อยกว่า 5-1,500 นาโนกรัมต่อลิตร และพบพีเอเอชในช่วงฤดูฝนมากกว่าในช่วงฤดูแล้ง

จากงานวิจัยที่กล่าวไปข้างต้นแสดงให้เห็นโดยชัดเจนว่าพีเอเอชที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมไม่ได้มีเพียงแค่ชนิดเดียวมักพบว่ามีอยู่ร่วมกันหลายชนิด ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อนรวมกันเหล่านี้โดยงานวิจัยนี้ได้มุ่งค้นหาวิธีการที่สามารถบำบัดพีเอเอชที่ผสมกันซึ่งน่าจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland
2. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan
4. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ "ISSCO" laminar flow รุ่น BVT - 124 ของบริษัท International Scientetific Supply, USA
5. ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น clean model V4 ของบริษัท LAB service, Thailand
6. ตู้อบแห้ง ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand
7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -70°C ของบริษัท Forma Scientific, USA
8. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -20°C ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของ บริษัท Kubota, Japan
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
11. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
12. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (water bath shaker) ของบริษัท Memmert, Germany
13. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan
14. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ และระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylabth Thermo-block SLTDB-120 ของบริษัท Seoulin Bioscience, Korea
15. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
16. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรเฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)
 - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan
 - Mini Sub-cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA

17. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
 - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA
18. ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) สำหรับตรวจสอบปริมาณของ PAHs
 - ลิกวิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan
 - คอลัมน์ (column) : Inertsill ODS-3 ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร ของบริษัท GL Science, Japan
 - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, Japan
 - เครื่องบันทึก (recorder) Chromatography รุ่น C-RIA ของบริษัท Shimadzu, Japan
19. ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ Mass spectrometry รุ่น Pegasus III ของบริษัท LECO, USA
20. ชุดเครื่องมือวิเคราะห์โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy) รุ่น Mercury plus 400 ของบริษัท Varian, France
21. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England
22. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 10 20 100 200 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France
23. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
24. หลอดแสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร (ultra violet) รุ่น UVGL-15 ของบริษัท UVP, USA
25. แผ่นอลูมิเนียมที่แอลซี (TLC aluminium sheet) เคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ ของบริษัท Merck, Germany
26. กรวยแยก ขนาด 500 มล. ของบริษัท Sibata, Japan
27. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
28. หัวกรอง ชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.20 และ 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan
29. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan.

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. azureB ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
2. phenol red ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
3. guaiacol ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
4. benomyl ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
5. fluorene ของบริษัท Wako Pure Chemical Industries, USA
6. phenanthrene ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
7. fluoranthene ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
8. pyrene ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
9. 9-fluorenone ของบริษัท Nacalai Tesque, Japan
10. 9-fluorenol ของบริษัท TCI. Japan
11. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
12. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England
13. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
14. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
15. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
16. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany
17. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, Germany
18. เอทิลอะซิเตท ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท Merck, Germany
19. ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ของบริษัท Merck, Germany
20. เปปโตน (peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
21. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
22. ผงสกัดจากมอลท์ (malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
23. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท Bio-Rad, USA
24. 1 Kb DNA ladder ของบริษัท BioExcellence, Thailand
25. 100 bp DNA ladder ของบริษัท BioExcellence, Thailand
26. Taq DNA polymerase ของบริษัท BioExcellence, Thailand
27. dATP dCTP dGTP และ dTTP ของบริษัท Sibsenzyme, Russia
28. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA
29. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อวิเคราะห์ (analytical grade)

3.3 ตัวอย่างราและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างเห็ดที่เจริญบนต้นไม้ กิ่งไม้ และราที่เจริญอยู่ในท่อนไม้ และเศษไม้ผุโดยเลือกเก็บเห็ดจากไม้ที่เกิดลักษณะสีขาวเนื่องจากเห็ดได้ย่อยลิกนินซึ่งเป็นสีน้ำตาลไป เหลือแต่เซลลูโลสที่มีสีขาวหลงเหลืออยู่ และเลือกท่อนไม้ กิ่งไม้ผุที่เปื่อยยุ่ย เนื้อไม้เป็นสีขาว เบา หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดย กรณีเป็นดอกเห็ดทำโดยนำเนื้อเยื่อด้านในของเห็ดที่ไม่ได้สัมผัสกับอากาศด้านนอกมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract agar (MEA)(ภาคผนวก ก1) ที่มีการผสม benomyl 3 มก.ต่อลิตร ลงไปเพื่อยับยั้งราชนิดที่โตเร็ว (Chiocchio และคณะ, 2000) เช่นกลุ่ม Ascomycetes เป็นต้น ในกรณีเป็นท่อนไม้ผุก็ปฏิบัติเช่นเดียวกันคือ นำบริเวณด้านในของไม้ที่ไม่สัมผัสอากาศด้านนอกมาเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่ใส่ benomyl เช่นกัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-7 วัน และแยกเชื้อจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป โดยเชื้อที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วจะเก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4⁰ซ และถ่ายลงอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน นอกจากนี้ยังได้นำรา T8 T20 S1 และ S5 ที่คัดแยกไว้โดย ดวงเดือน สุพรรณชนะบุรี (2548) และสิริรัตน์ วิเศษคุปต์ (2548) มาใช้ในการทดสอบการย่อยสลายพีเอเอซีในการทดลองต่อไปด้วย

3.4 การคัดกรองราที่สามารถผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส โดยการใช้สีสามชนิดเป็นสารทดสอบ

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์จากข้อ 3.3 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-7 วัน จนเจริญเกือบเต็มจานเพาะเชื้อ ตัดชิ้นวุ้นที่มีสายใยราด้วยแกนโลหะสำหรับเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร วางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อบนอาหาร minimal medium (MM)(ภาคผนวก ก2) 3 เพลท ที่มีสีทดสอบ 3 ชนิด คือ guaiacol phenol red หรือ azureB โดยใช้ 0.4 มก./ลิตร นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อทดสอบความสามารถของเอนไซม์ในการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีซึ่งจะแสดงผลโดย การเปลี่ยนสีของ phenol red จากสีเหลืองเป็นสีส้ม การเปลี่ยนสีของ guaiacol จากสีขาวขุ่นเปลี่ยนเป็นสีแดง และการเปลี่ยนสีของ azure B จากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง (Alcalde และคณะ, 2002; Kiiskinen และคณะ, 2004)

3.5 การคัดกรองราที่สามารถสลายสารผสมพีเอเอชสี่ชนิดในอาหารแห้งได้

คัดเลือกเฉพาะราที่ให้ผลบวกกับสี่ทั้ง 3 ชนิดจากข้อ 3.4 มาเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีสารผสมของพีเอเอช โดยเลือกใช้พีเอเอชที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ 2 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน และพีแนนทรีน และพีเอเอชที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง 2 ชนิด ได้แก่ ไพรีน และฟลูออแรนธิน ชนิดละ 25 ppm เพื่อรวมเป็น 100 ppm สังเกตการเจริญของราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใส่พีเอเอช เปรียบเทียบกับการเจริญของราในอาหาร MM ที่ไม่ได้ใส่พีเอเอช บันทึกผลการทดลองที่ได้และเก็บตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกโดยสามารถเจริญบนอาหารที่ผสมพีเอเอชได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งเยี่ยงที่อุณหภูมิห้องเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป และนำเชื้ออีกส่วนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเป็นคลังเชื้อ

3.6 การทดสอบความสามารถในการสลายพีเอเอชในอาหารเหลว

เตรียมหัวเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบโดยถ่ายราที่คัดกรองได้จากข้อ 3.5 จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งเยี่ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified glucose peptone yeast extract (Modified GPY) (ภาคผนวก ก3) ในจานเลี้ยงเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-7 วัน แล้วใช้แกนโลหะสำหรับเจาะ เจาะรอบบริเวณปลายสายใยราให้ได้ปริมาณ 5-6 ชิ้น นำไปใส่ในอาหารเหลว Modified GPY ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีลูกแก้วอยู่ประมาณ 5 ลูก หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-7 วัน ถ่ายเชื้อที่ได้ 10 มล. ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ขวดใหม่ขนาด 500 มล. ที่มีอาหารชนิดเดิมอยู่ 100 มล. พร้อมลูกแก้ว และบ่มที่สภาวะเดิมต่ออีก 5-7 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณของรา หลังจากนั้นเก็บสายใยของราด้วยการนำไปปั่นเหวี่ยง เทส่วนอาหารทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 2 รอบ เพื่อล้างอาหารที่ติดอยู่กับเส้นใยออกไป นำสายใยที่ปั่นได้ไปชั่งโดยใช้เชื้อสดปริมาณ 3 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนจำกัด (ภาคผนวก ก4) ปริมาตร 27 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 100 มล. พร้อมลูกแก้ว ในราแต่ละชนิดจะแบ่งเป็นชุดทดลองและชุดควบคุม ชุดละ 2 ขั้ว ซึ่งในชุดควบคุมจะฆ่าเชื้อก่อนด้วยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำไปใช้ต่อไป

จากนั้นนำขวดแก้วรูปชมพู่ทั้งหมดมาเติมพีเอเอช 4 ชนิด ได้แก่ พีแนนทรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm (ภาคผนวก ข1) เพื่อให้รวมเป็น 100 ppm ทุกขวด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C บนเครื่องเขย่าในที่มีดด้วยอัตราความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน

โดยเก็บตัวอย่าง ณ วันที่ 1 (วันที่มีการเติมพีเอเอช) และวันที่ 15 เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณพีเอเอชโดยการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยดูอาหารเหลวปริมาณ 5 มล. มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นนั้นนำไป sonicate 15 นาที แล้วเติมเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของอาหารเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสมที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ถ้าไม่แยกชั้นให้นำไปปั่นเหวี่ยงประมาณ 10 นาที จากนั้นแยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ สกัดอาหารเหลวอีกครั้งหนึ่งแล้วรวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดเข้าด้วยกัน กำจัดน้ำออกโดยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุนจนได้ตะกอนแห้ง เติมนอนอล 1 มล. ลงไปละลายตะกอนให้หมด แล้วนำสารละลายไปกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมครอนเมตร ใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็กสำหรับฉีด HPLC เก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณพีเอเอชที่เหลืออยู่และสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี HPLC ต่อไป

สภาวะต่างๆ ในระบบ HPLC เป็นดังนี้

คอลัมน์ (column)	inertsill [®] ODS ขนาด 4.6 x 150 มม.
ตัวชะสาร (Mobile phase)	เมธานอล 80%
อัตราไหล (Flow rate)	1 มล.ต่อนาที
อุณหภูมิคอลัมน์	40 °C
ความยาวคลื่นแสงอุลตราไวโอเลต	275 นาโนเมตร
ปริมาตรสารที่ฉีด	10 ไมครอลิตร

ราที่สามารถย่อยสลายพีเอเอชแบบผสมจะนำมาทดลองย่อยพีเอเอชแบบแยกเดี่ยวเพื่อทดสอบประสิทธิภาพและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้น โดยการเตรียมหัวเชื้อตั้งข้างต้น โดยในราแต่ละชนิดจะทดสอบการย่อยสลายพีเอเอชทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 100 ppm โดยทำการทดลอง 15 วัน เก็บตัวอย่าง ณ วันที่ 1 (วันที่มีการเติมพีเอเอช) และวันที่ 15 ไปสกัดด้วยเอธิลอะซีเตท และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดังที่กล่าวมาข้างต้น นอกจากนี้เพื่อเป็นการควบคุมประสิทธิภาพในการสกัดพีเอเอชได้เติมไพรีนหรือฟลูออรีนความเข้มข้น 100 ppm ลงในอาหารเหลวก่อนการสกัดด้วย บันทึกผลและนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์พีเอเอชที่ลดลงโดยเปรียบเทียบกับวันที่ 15 ของชุดควบคุม จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีเอเอชเพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.7 ผลของปริมาณสายใยราต่อการลดลงของพีเอเอช

เพื่อทดสอบผลของปริมาณสายใยราต่อการลดลงของพีเอเอชได้ออกแบบการทดลอง โดยแปรผันปริมาณสายใยของราเริ่มต้นด้วยการใช้ราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีเอเอชในอาหารเหลวได้ดี 2 สายพันธุ์ ดังนี้

เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.6 โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลองต่อเชื้อ คือ ชุดที่ 1 ใส่เชื้อสด 3 กรัม ชุดที่ 2 ใส่เชื้อสด 6 กรัม และชุดที่ 3 ใส่เชื้อสด 9 กรัม ในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด 27 มล. ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 100 มล. ที่บรรจุลูกแก้วไว้ 3 ลูก หลังจากเตรียมเชื้อเสร็จแล้วนำขวดแก้วรูปชมพู่ที่มีเชื้อทั้งหมดไปนิ่งฆ่าเชื้อ และเติมพีเอเอชลงไปขวดละ 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนนทริน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm โดยทำการทดลองชุดละ 2 ข้ำ จากนั้นนำไปเขย่าในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำมาเก็บตัวอย่างโดยดูดน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสายใยรา 5 มล. สกัด และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีในข้อ 3.6 ได้เป็นพีเอเอช ณ วันที่เริ่มต้น (วันที่ 0) หลังจากนั้นนำไปเขย่าในที่มืดต่ออีก 30 วัน จึงเก็บตัวอย่างนำไปสกัด และวิเคราะห์เช่นเดียวกัน บันทึกปริมาณพีเอเอชโดยเปรียบเทียบกับวันที่ 0

3.8 การทดสอบปริมาณพีเอเอชสูงสุดที่ราสามารถอยู่รอดได้

เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.6 เลือกราที่ย่อยพีเอเอชดีที่สุดมา 2 ชนิดแบ่งการทดลองเป็นเชื้อละ 20 การทดลอง โดยแยกทดสอบกับพีเอเอชแต่ละชนิดจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนนทริน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 25 50 100 300 และ 500 ppm โดยทำการทดลองละ 2 ข้ำ และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 วัน หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบการรอดชีวิตของราโดยหยดอาหารที่มีราเจริญอยู่ 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร MEA และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เพื่อทดสอบว่าเชื้อยังเจริญได้ไหมในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA ได้หรือไม่ ส่วนที่เหลือนำไปกรองด้วยชุดกรองโดยมีกระดาษกรองที่ซังน้ำหนักไว้ แล้วกรองล้างสายใยราด้วยน้ำกลั่นเพื่อล้างอาหารที่ติดอยู่กับเส้นใยออกไป หลังจากนั้นนำสายใยราบนกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 24 ชม. และนำไปเก็บในโถดูดความชื้นก่อนที่จะนำไปซังน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักแห้งในแต่ละการทดลองเพื่อทดสอบว่าราสามารถเพิ่มจำนวนได้ในขณะที่เจริญในอาหารที่มีพีเอเอช ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้หรือไม่

3.9 การวิเคราะห์สารมัธยันตร์ในระหว่างการสลายสารผสมพีเอเอชแต่ละชนิดแบบแยกเดี่ยว

เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.6 เลือกกราฟที่ย่อยพีเอเอชดีที่สุดมา 2 ชนิด มาทำการทดลองโดยใช้พีเอเอชแบบแยกเดี่ยวชนิดละ 100 ppm ในแต่ละการทดลองจะมีชุดควบคุมโดยหลังจากเติมหัวเชื้อแล้วนำไปนิ่งมาเชื้อที่ 121^oซ เป็นเวลา 15 นาที เพื่อฆ่ารา นำทุกขวดไปเขย่าที่อัตราความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในที่มีดเป็นเวลา 30 วัน ในระหว่างนี้จะมีการเก็บตัวอย่างปริมาณ 5 มล. ทุก 3 วัน เพื่อนำไปสกัด และวิเคราะห์หาปริมาณพีเอเอชที่ลดลงและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตท และวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยวิธีที่กล่าวไปแล้วดังข้อ 3.6 จากนั้นเลือกวันที่สารมัธยันตร์เกิดขึ้นมากที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อนำไปเลี้ยงในระดับที่ใหญ่ขึ้น เพื่อให้ได้สารมัธยันตร์ปริมาณมากพอที่จะนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างต่อไป

เมื่อได้วันที่ดีสุดในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บสารมัธยันตร์แล้วจึงเลี้ยงหัวเชื้อโดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.6 แล้วนำหัวเชื้อไปใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ที่มีอาหารในโตรเจนจำกัด ปริมาตร 100 มล. ที่ใส่ลูกแก้วไว้ 3 ลูก โดยทำการทดลองละ 3 ขวด นำไปเขย่าในที่มีดที่ 30^oซ เป็นเวลาตามที่กำหนด เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้วจึงนำไปสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทในกรวยแยกโดยใช้อัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อเอธิลอะซีเตทเป็น 1:1 โดยเฉพาะชั้นเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ สกัดซ้ำอีก 1 ครั้งนำชั้นเอธิลอะซีเตททั้งหมดรวมกันไว้และนำไประเหยแห้งทั้งหมด หลังจากนั้นค่อยๆ ใส่เอทานอลทีละน้อยเพื่อละลายตะกอนและนำไปใส่ในหลอดไมโครพีพิจ์ที่ทราบน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยสูญญากาศอีกครั้ง ซึ่งน้ำหนักตะกอนและบับที่กผล

ละลายตะกอนที่ได้ในเมทานอลให้ความเข้มข้นไม่เกิน 200 ppm นำไปวิเคราะห์ด้วย TLC โดยนำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ที่ผ่านการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทดังวิธีในข้อ 3.6 ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตรมาจุดลงบนแผ่น TLC ขนาดกว้าง 8x8.5 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (solvent system) เป็นโทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาสารมัธยันตร์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร และ วิเคราะห์ด้วย HPLC เทียบกับสารมัธยันตร์มาตรฐานโดยนำตะกอนที่เหลือไปละลายในเมทานอล และฉีด HPLC เก็บสารบริเวณ peak ที่เด่น นำไประเหยแห้งด้วยสูญญากาศอีกครั้งโดยตะกอนถูกนำมาแบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกนำไปละลายด้วยเมทานอลเพื่อนำไปวิเคราะห์ TLC และ HPLC เทียบกับสารมัธยันตร์มาตรฐานอีกครั้ง อีก 2 ส่วนนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H-NMR) ยี่ห้อ LECO รุ่น mercury 400 โดยนำสารมัธยันตร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วละลายในคลอโรฟอร์มดี (CDCl₃) ใช้ตัวรับสัญญาณคลื่นวิทยุความถี่ของโปรตอนขนาด 400 MHZ และ

วิเคราะห์การแตกตัวของโมเลกุลด้วย Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) โดยนำสารมัทธันตร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วละลายในเอทิลอะซีเตทความเข้มข้นไม่เกิน 200 ppm ส่งวิเคราะห์ที่โครงการศูนย์วิจัยแห่งชาติด้านสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย โดยวิเคราะห์ด้วยชุดเครื่อง Gas Chromatography With Time of Flight Mass Spectrometry ยี่ห้อ LECO รุ่น Pegasus III (บริษัทลิโก้อินสตรูเมนต์(ประเทศไทย)จำกัด) โดยใช้คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 50 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซนเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ หน้า 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Mass spectrometry (MS) วิเคราะห์ภายใต้ภาวะดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น 80°ซ

อุณหภูมิขั้นที่ 1 16°ซ ต่อหน้าที่ จนอุณหภูมิ 240°ซ คงไว้ 8 นาที โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราเร็ว 2 มิลลิลิตรต่อนาที

3.10 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา

3.10.1 การเลี้ยงราเพื่อเตรียมสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

ถ่ายราจากที่เก็บไว้ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเลี้ยงลงในจานเลี้ยงเชื้อ malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-7 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อแล้วใช้เข็มงอตัดชิ้นรูนขนาดเท่าๆ กัน บริเวณปลายเส้นใยปริมาณ 5-6 ชิ้น ใส่ในอาหารเหลว malt extract medium (MEA) ปริมาตร 100 มล. ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ที่มีลูกแก้วอยู่ประมาณ 5 ลูก หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-7 วัน

นำชุดกรวยกรองต่อเข้ากับเครื่องดูดสุญญากาศ จากนั้นวางกระดาษกรองลงบนกรวยกรองแล้วล้างกระดาษกรองด้วยเอทานอล 95% กรองแล้วล้างเส้นใยของราด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นเก็บเส้นใยไปไลโอไฟไลซ์เพื่อให้ได้เส้นใยที่แห้งพร้อมจะนำไปสกัด โครโมโซมอลดีเอ็นเอ

3.10.2 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากรา

วิธีการดัดแปลงมาจากวิธีของ Reader และ Broda (1985) ดังนี้ นำเส้นใยของราที่ผ่านการไลโอไฟไลซ์แล้วจากในข้อ 3.10.1 ปริมาณ 0.05 กรัม ใส่ในโกร่งที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติมนิโตรเจนเหลวลงไป บดเส้นใยให้เป็นผงละเอียด แล้วถ่ายใส่หลอดไมโครพิวจ์เติมสารละลาย extraction buffer (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์มปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4^oซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ่ายเฉพาะส่วนใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์มไปใส่ในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) แล้วเติม RNaseA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.05 เท่าของส่วนใส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^oซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์มในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรสุดท้าย ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4^oซ เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์มไปใส่ในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ และสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์มอีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นนำส่วนใสที่อยู่ในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่มาตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตตค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส และ absolute ethanol ที่เย็นปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4^oซ เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของโซเดียมอะซีเตตและเอทานอลทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70% ที่เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยการปั่นล้างที่อุณหภูมิ 4^oซ เป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสที่สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข3) โดยปริมาตรที่เพิ่มขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสซึ่งทำโดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศแล้วปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที จากนั้นวางอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแอมเบอร์ เทปบัฟเฟอร์ 1XTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตามให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า หยอดดีเอ็นเอ และหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิส Mupid-2 ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนเกือบสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้านหนึ่ง แล้วย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5-10 นาที

ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 (Biorad, USA)

3.10.3 ปฏิริยาถูกลูโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)

นำโครโมโซมอดีเอ็นเอของราที่สกัดได้จากข้อ 3.10.2 เป็นแม่แบบในปฏิริยาถูกลูโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ universal ITS ไพรมเมอร์ ซึ่งได้แก่ ITS1 ITS4 ITS1-F และ ITS4-B (ตารางที่ 3.1) ในการทำปฏิริยาถูกลูโซ่พอลิเมอเรส โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิริยาถูกลูโซ่พอลิเมอเรสเป็นดังนี้

- 10X Taq DNA polymerase buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X Taq DNA polymerase buffer)	5 ไมโครลิตร
- สารละลาย ITS primer ด้าน forward ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- สารละลาย ITS primer ด้าน reverse ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้นของแต่ละชนิด 10 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.8 มิลลิโมลาร์)	4 ไมโครลิตร
- สารละลาย MgCl ₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 4 มิลลิโมลาร์)	8 ไมโครลิตร
- เอนไซม์ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 หน่วย)	0.5 ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.9.2	5 ไมโครลิตร
- น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	25.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (แหล่งที่มา: Gardes และ Bruns, 1993)

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
ITS1 (forward)	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4 (reverse)	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
ITS1-F (forward)	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
ITS4-B (reverse)	5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3'

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นดังนี้

Hot start	ที่อุณหภูมิ 94 ^o ซ	เป็นเวลา 5 นาที	} 35 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 ^o ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ 48 ^o ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 ^o ซ	เป็นเวลา 2 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 ^o ซ	เป็นเวลา 7 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยวิธีเช่นเดียวกับในข้อ 3.10.2

3.10.4 การสกัดแยกผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์

แยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.10.3 จากอะกาโรสเจลด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดชิ้นอะกาโรสเจลให้ครอบคลุมแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจลนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50^oซ เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลสลายหมด จากนั้นเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล ผสมให้เข้ากันโดยการกวนไปมาแล้วถ่ายสารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำไล้ทิ้ง เติมน้ำล้างบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปหมุน

เหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้งก่อนที่จะหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใส่ที่เหลือติดคอแลมน์ จากนั้นย้ายคอแลมน์มายังหลอดไมโครพีพิจใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัพเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใส เก็บรักษาสารละลายของชิ้นดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C

3.10.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา

หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของผลิตภัณฑ์ PCR จากข้อ 3.10.4 โดยใช้บริการของบริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลี) และ 1st Base (ประเทศมาเลเซีย) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN เวอร์ชัน 2.2.15 แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยโปรแกรม PHYLIP เวอร์ชัน 3572C เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา

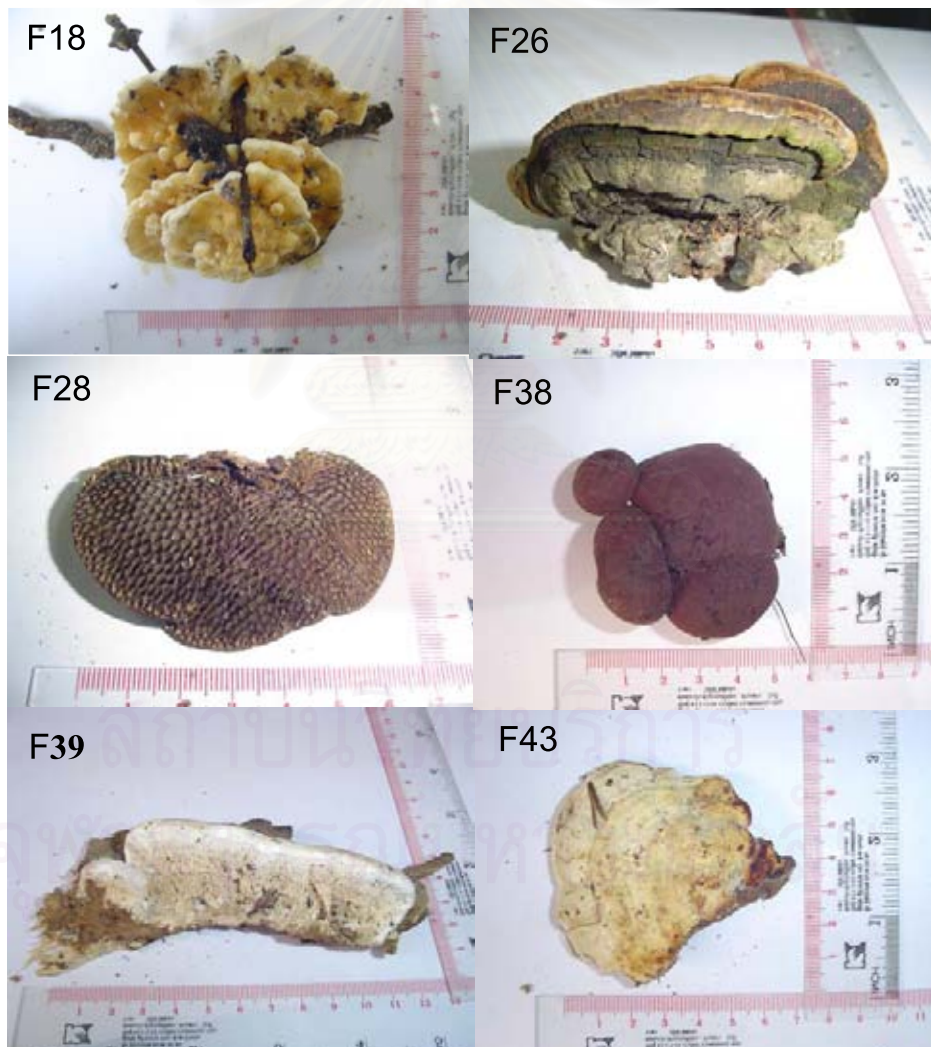
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ตัวอย่างราและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดที่เจริญบนท่อนไม้จากแหล่งต่างๆ ในจังหวัดชลบุรี ระยอง และ นครปฐม โดยเก็บตัวอย่างท่อนไม้ เศษไม้ที่มีลักษณะเปียกยุ่ย หรือมีเนื้อไม้สีขาวฟู เบา นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 52 ตัวอย่าง ภาพตัวอย่าง เห็ดชนิดต่างๆ ที่เก็บมาแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ภาพตัวอย่างเห็ดชนิดต่างๆ

4.2 การคัดกรองราที่สามารถผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส โดยการใช้สีสามชนิดเป็นสารทดสอบ

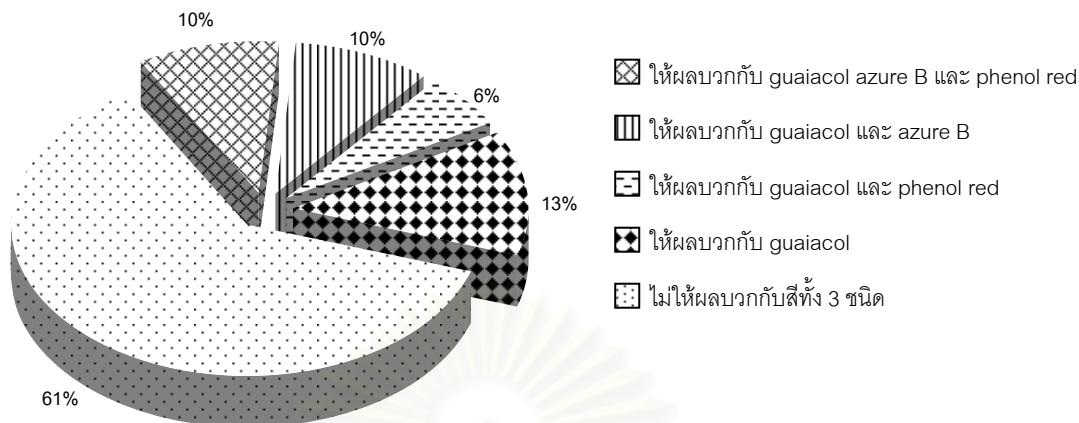
เมื่อนำราทั้ง 52 สายพันธุ์จากข้อ 4.1 มาเลี้ยงบนอาหาร MM ที่ผสมสีทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ guaiacol phenol red หรือ azureB ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่าสามารถแบ่งราตามผลการทดลองนี้ได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 สามารถเปลี่ยนสีอาหารได้ครบทั้ง 3 ชนิดมีจำนวน 5 สายพันธุ์คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 สามารถเปลี่ยนสีอาหารที่มี guaiacol และ azure B ได้มีจำนวน 5 สายพันธุ์คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 3 สามารถเปลี่ยนสี guaiacol และ phenol red ได้มี 3 สายพันธุ์คิดเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มที่ 4 สามารถเปลี่ยนสีของ guaiacol ได้เท่านั้น แต่ไม่สามารถเปลี่ยนสี azure B และ phenol red ได้ ซึ่งมีทั้งสิ้น 7 สายพันธุ์ คิดเป็น 13 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 5 ที่ไม่สามารถเปลี่ยนสีของอาหารชนิดใดได้เลยมีจำนวนทั้งสิ้น 32 สายพันธุ์คิดเป็น 61 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 สำหรับราในกลุ่มที่ 1 ซึ่งพบว่ามีราจำนวน 5 สายพันธุ์จาก 52 สายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนสีอาหารได้ครบทั้ง 3 สีได้ ได้แก่ ราสายพันธุ์ F8 F16 F18 F38 และ F52 ได้นำไปทดสอบการเจริญบนอาหารที่มีพีเอชต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการเปลี่ยนสีของอาหารโดยราชนิดต่างๆ (+ เปลี่ยนสี, - ไม่เปลี่ยนสี)

เชื้อตัวอย่าง	ผลการเปลี่ยนสีของสีทดสอบแต่ละชนิดในเวลา 3 วัน		
	guaiacol	phenol red	azureB
F1	-	-	-
F2	-	-	-
F3	-	-	-
F4	-	-	-
F5	+	-	-
F6	-	-	-
F7	-	-	-
F8	+	+	+
F9	-	-	-
F10	-	-	-
F11	-	-	-
F12	-	-	-
F13	-	-	-
F14	-	-	-
F15	-	-	-
F16	+	+	+
F17	-	-	-
F18	+	+	+
F19	-	-	-

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงผลการเปลี่ยนสีของอาหารโดยราชนิดต่างๆ (+ เปลี่ยนสี, - ไม่เปลี่ยนสี)

เชื้อตัวอย่าง	ผลการเปลี่ยนสีของสีทดสอบแต่ละชนิดในเวลา 3 วัน		
	guaiacol	phenol red	azureB
F20	-	-	-
F21	-	-	-
F22	+	-	-
F23	+	-	+
F24	-	-	-
F25	-	-	-
F26	-	-	-
F27	-	-	-
F28	+	+	-
F29	+	+	-
F30	-	-	-
F31	-	-	-
F32	-	-	-
F33	+	+	-
F34	+	-	-
F35	-	-	-
F36	-	-	-
F37	-	-	-
F38	+	+	+
F39	+	-	+
F40	-	-	-
F41	+	-	+
F42	+	+	+
F43	-	-	-
F44	-	-	-
F45	-	-	-
F46	+	-	-
F47	-	-	-
F48	+	-	-
F49	+	-	-
F50	+	-	+
F51	+	-	+
F52	+	-	-



รูปที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์ของราที่สามารถเปลี่ยนสีอาหารชนิดต่างๆ

นอกจากนี้จากรายงานโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของ ดวงเดือน สุพรรณชนะบุรี (2548) และสิริรัตน์ วิเศษคุปต์ (2548) ที่ได้ใช้วิธีเดียวกันนี้ในการคัดแยกราซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสได้ โดยดวงเดือนสามารถคัดแยกได้ทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ T8 T20 T21(2) T35 T51 และ T52 และสิริรัตน์สามารถคัดแยกได้ทั้งสิ้น 8 สายพันธุ์ ได้แก่ S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 และ S8 ซึ่งรา T8 T20 และ S5 ที่ผ่านการทดสอบการเปลี่ยนสีอาหารได้ครบทั้ง 3 สี และสามารถย่อยสลายพีแนนนทรีในได้นั้นได้ถูกนำมาร่วมทดสอบในขั้นต่อไปด้วย

4.3 การคัดกรองราที่สามารถสลายสารผสมพีเอเอชสี่ชนิดในอาหารแข็งได้

การทดลองในขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถเบื้องต้นในการเจริญของราในอาหารแข็ง MM ที่มีการเติมพีเอเอช โดยใช้ราทั้ง 5 สายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนสีของอาหารได้ครบทั้ง 3 สีจากการทดลองที่ผ่านมา พร้อมกับ T8 และ T20 (ดวงเดือน สุพรรณชนะบุรี, 2548) และ S5 (สิริรัตน์ วิเศษคุปต์, 2548) พบว่าเมื่อนำราทั้ง 8 สายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหาร MM ที่มีการใส่สารผสมพีเอเอชลงไป 4 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยฟลูออรีน พีแนนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm พบว่าราทั้ง 8 ชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ แต่จะมีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าที่เจริญอยู่บนอาหาร MEA โดยรา T8 F16 และ F18 ซึ่งจะเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง MEA ภายในเวลา 3 วัน แต่เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MM ที่มีพีเอเอชใช้เวลาในการเจริญมากกว่า 10 วัน ในขณะที่รา F28 F38 F52 T8 T20 และ S5 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MEA จะใช้เวลาในการเจริญประมาณ 7 วันจึงจะเต็มจานเพาะเชื้อ แต่เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MM ที่มีพีเอเอชก็ใช้เวลามากกว่า 10 วันเช่นกัน

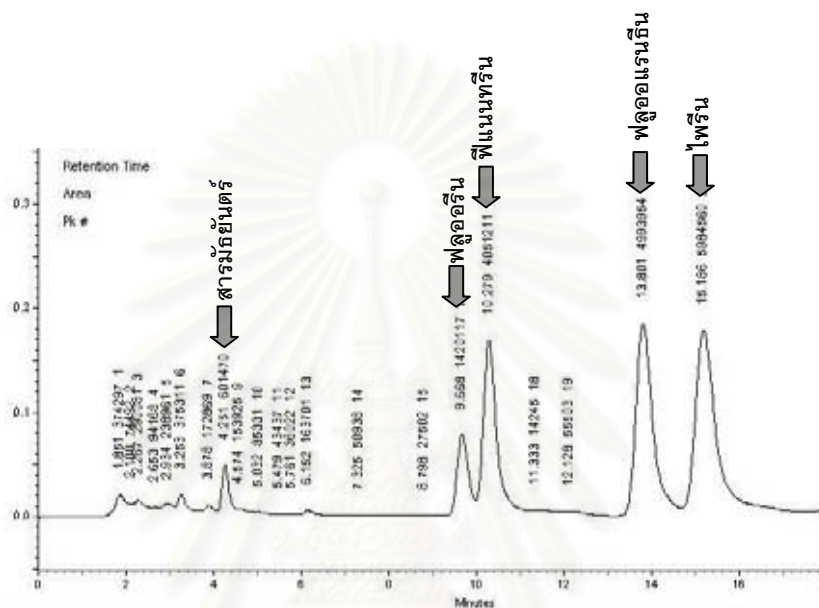
จากการทดลองนี้เนื่องจากราทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารแข็ง MM ที่มีพีเอเอชทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm รวมเป็น 100 ppm จึงได้นำราทั้ง 8 สายพันธุ์นี้ ได้แก่ F8 F16 F18 F38 F52 T8 T20 และ S5 ไปทดสอบความสามารถในการสลายพีเอเอชในอาหารเหลวต่อไป

4.4 การทดสอบความสามารถในการสลายพีเอเอชในอาหารเหลว

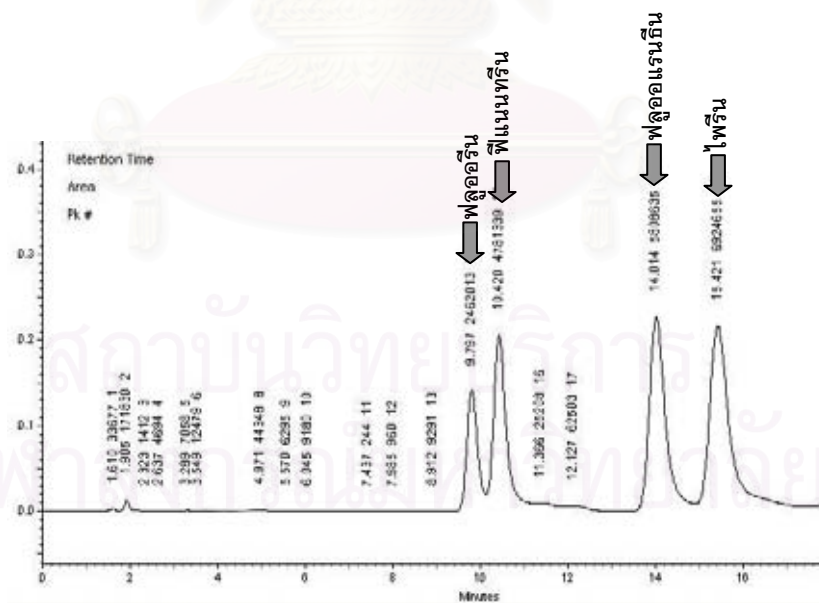
การทดลองในขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการย่อยสลายพีเอเอชแบบผสมในอาหารเหลวโดยรา 8 สายพันธุ์จากการทดลองในหัวข้อ 4.3 ซึ่ง ได้แก่ F8 F16 F18 F38 F52 T8 T20 และ S5 โดยใช้พีเอเอชแบบผสมซึ่งมีการเติมพีเอเอช 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm รวมเป็น 100 ppm ในสภาพเขย่าในที่มืดที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 15 วัน

จากการทดลองพบว่ามีรา 4 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายพีเอเอชได้ดีและสร้างสารมัคัยนตรีให้เห็นอย่างเด่นชัด ได้แก่ รา F18 S5 T8 และ T20 โดยมีรายละเอียดแสดงดังต่อไปนี้

จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน รา F18 สามารถย่อยสลายพีเอเอสแบบผสมปริมาณเริ่มต้นชนิดละ 25 ppm ได้ โดยสังเกตได้จากมี peak ของสารมัธยันตร์เกิดขึ้นมาให้เห็นเด่นชัดที่ retention time เท่ากับ 4.2 นาทีดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ก) และมี peak ขนาดเล็กเกิดขึ้นอีกหลาย peak ก่อน peak เด่นนี้ด้วย โดยที่สารพีเอเอสตั้งต้น ได้แก่ ฟลูออรีน ฟีนเนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ข) เท่ากับ 42.32 15.38 14.03 และ 13.58 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ



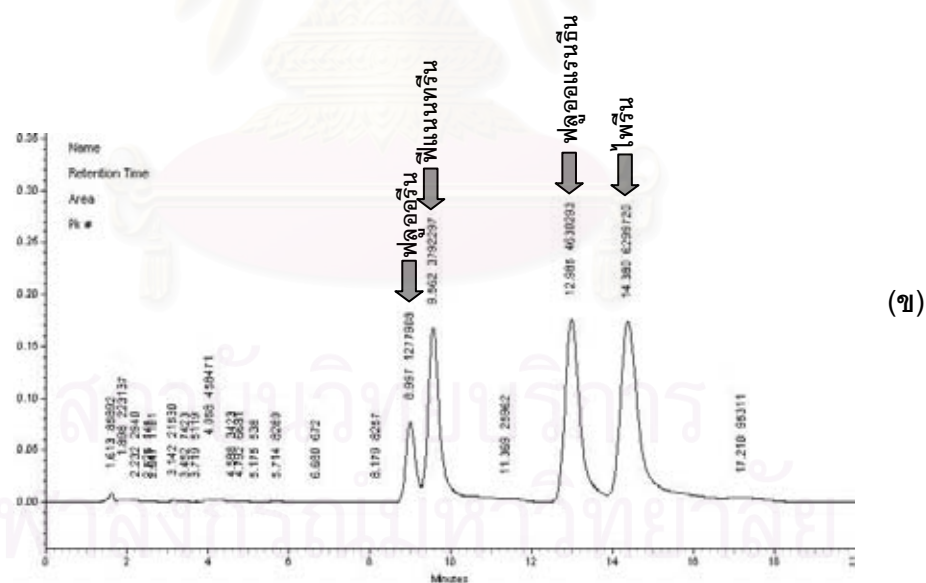
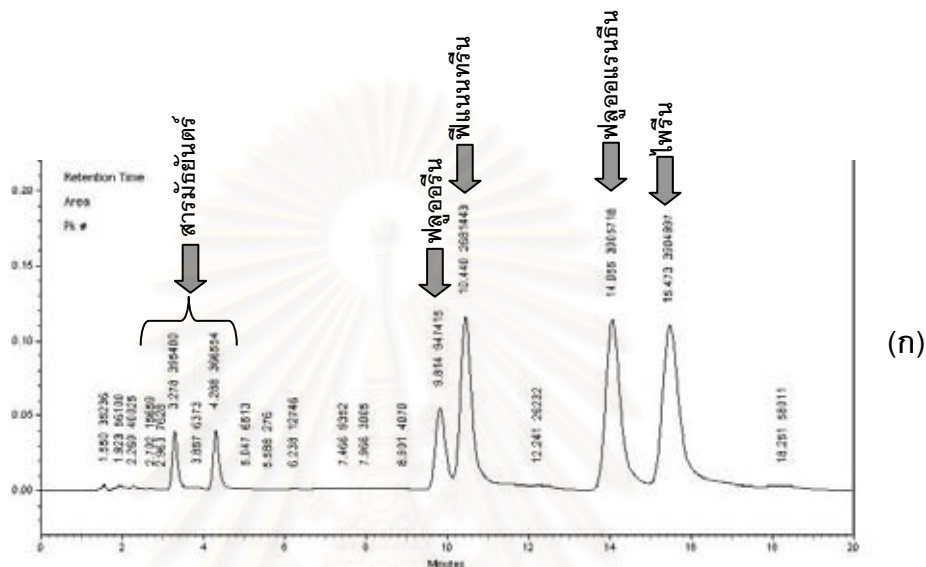
(ก)



(ข)

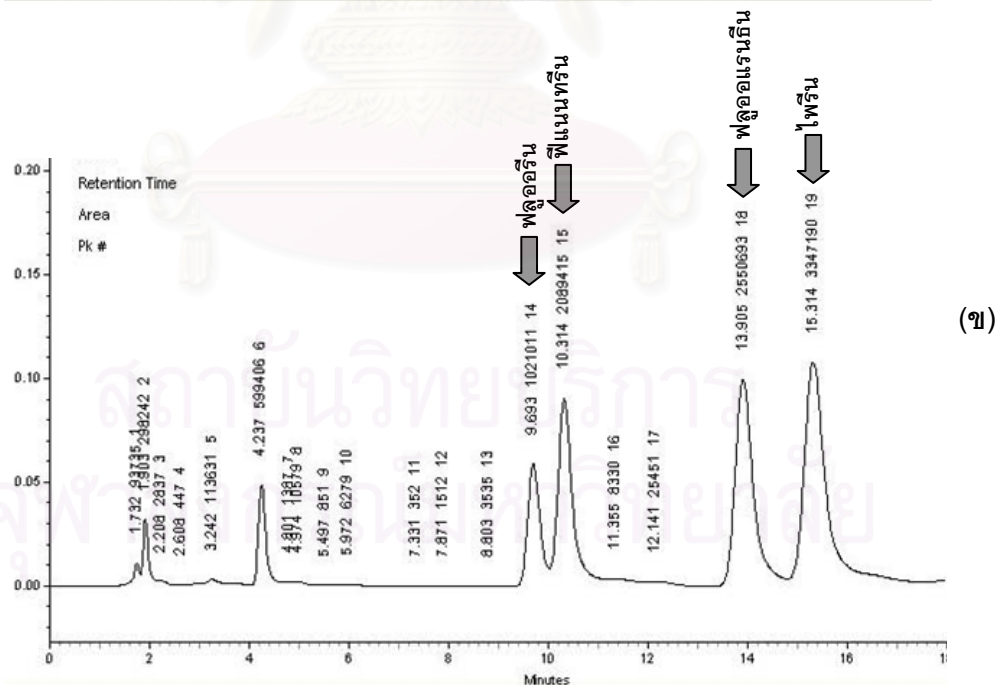
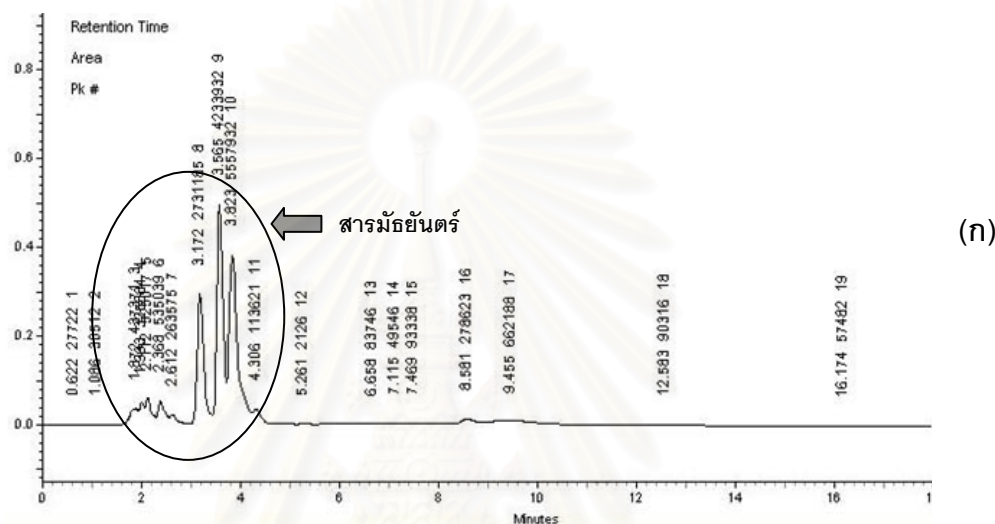
รูปที่ 4.3 โครมาโตแกรมของ HPLC ชุดทดลอง (ก) และชุดควบคุมที่หนึ่งฆ่าเชื้อ (ข) แสดงผลจากการเลี้ยงรา F18 ในอาหารเหลวไนโตรเจนจำกัดที่ผสมพีเอเอส 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน ฟีนเนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm เป็นเวลา 15 วัน

รา S5 สามารถย่อยสลายพีเอเอชแบบผสมได้ โดยมี peak ของสารมัธยันตร์เกิดขึ้นมาที่ retention time เท่ากับ 4.2 นาที และ 3.27 ดังแสดงในรูปที่ 4.4 (ก) โดยที่สารพีเอเอชตั้งต้น ได้แก่ ฟลูออรีน ฟีนเนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ข) เท่ากับ 25.87 29.30 35.09 และ 38.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากปริมาณพีเอเอชเริ่มต้นชนิดละ 25 ppm เมื่อทดลองเป็นเวลา 15 วัน



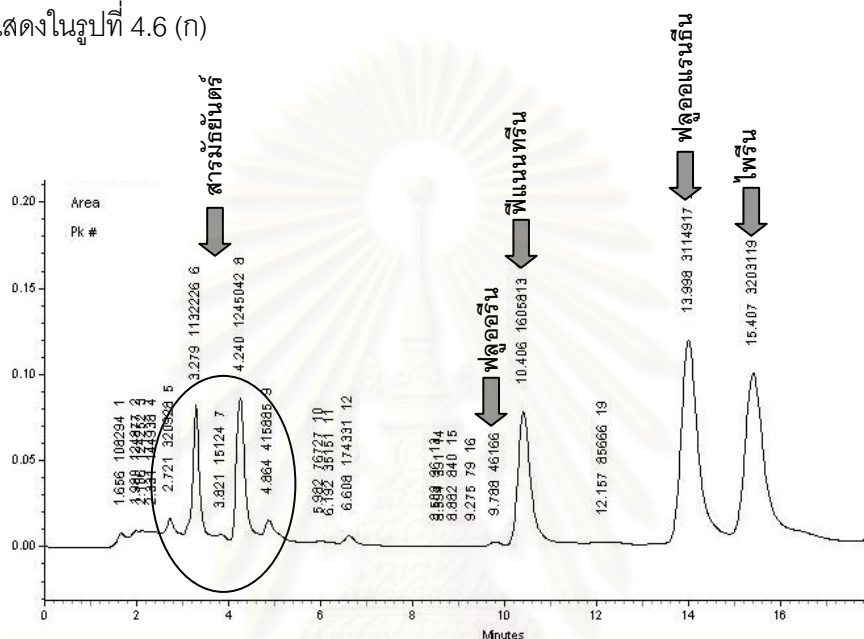
รูปที่ 4.4 โคโรมาโตแกรมของ HPLC ชุดทดลอง (ก) และชุดควบคุมที่หนึ่งฆ่าเชื้อ (ข) แสดงผลจากการเลี้ยงรา S5 ในอาหารเหลวไนโตรเจนจำกัดที่ผสมพีเอเอช 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน ฟีนเนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm เป็นเวลา 15 วัน

รา T8 สามารถย่อยสลายพีเอเอชแบบผสมได้ โดยมี peak ของสารมัยยันตร์ที่เด่นชัด 3 peak เกิดขึ้นมาที่ retention time เท่ากับ 3.1 3.5 และ 3.8 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.5 (ก) และยังมี peak เล็กๆ อีกหลาย peak ที่อยู่ก่อน peak เด่น 3 peak นี้ด้วย นอกจากนี้จากโครมาโตแกรมในรูปที่ 4.5 (ก) ก็ยังไม่พบสารพีเอเอชตั้งต้น ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน เหลืออยู่ด้วยนั่นคือปริมาณพีเอเอชทุกชนิดลดลง 100 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณพีเอเอชเริ่มต้นชนิดละ 25 ppm เมื่อทดลองเป็นเวลา 15 วัน ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีของเชื้อ T8 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมดังแสดงในรูปที่ 4.5 (ข)

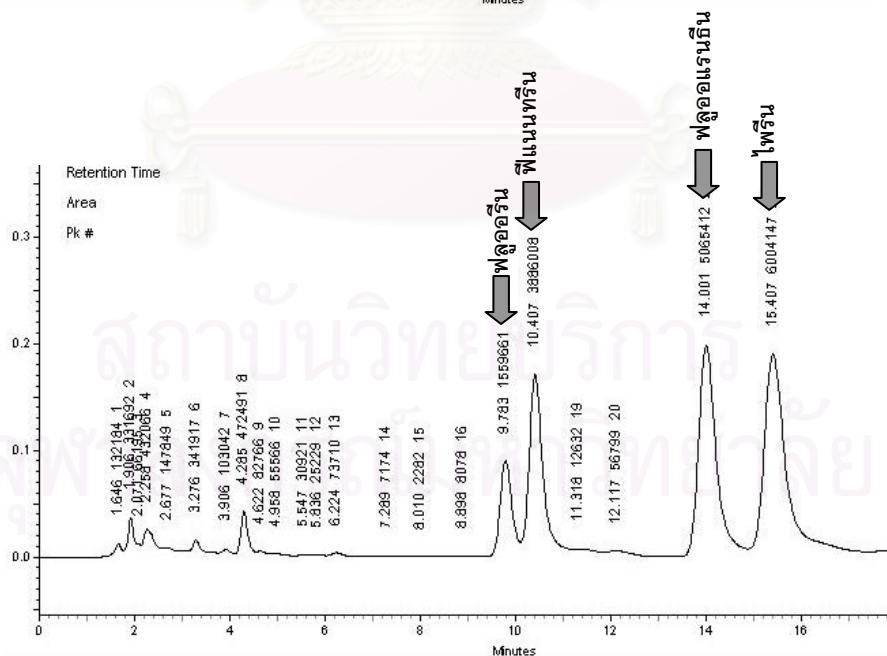


รูปที่ 4.5 โครมาโตแกรมของ HPLC ชุดทดลอง (ก) และชุดควบคุมที่นิ่งฆ่าเชื้อ (ข) แสดงผลจากการเลี้ยงรา T8 ในอาหารเหลวไนโตรเจนจำกัดที่ผสมพีเอเอช 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm เป็นเวลา 15 วัน

ส่วนรา T20 สามารถย่อยสลายพีเอชแบบผสมได้ โดยมี peak ของสารมัธยันตร์ที่เด่นชัด 2 peak เกิดขึ้นมาที่ retention time เท่ากับ 3.2 และ 4.2 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.6 (ก) นอกจากนี้ยังมี peak เล็กๆ อีกหลาย peak ที่อยู่ก่อนและหลัง peak เด่น 2 peak นี้ด้วย โดยที่สารพีเอชที่ตั้งต้น ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนนทริน ฟลูออแรนธิน และไพรีน มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมดังแสดงในรูปที่ 4.6 (ข) เท่ากับ 97.04 59.68 39.51 และ 47.64 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับจากปริมาณพีเอช เริ่มต้นชนิดละ 25 ppm เมื่อทดลองเป็นเวลา 15 วัน และพบว่าฟลูออรีนลดปริมาณลงมากอย่างเห็นได้ชัดดังแสดงในรูปที่ 4.6 (ก)



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.6 โคโรมาโตแกรมของ HPLC ชุดทดลอง (ก) และชุดควบคุมที่หนึ่งห้าเพื่อ (ข) แสดงผลจากการเลี้ยงรา T20 ในอาหารเหลวไนโตรเจนจำกัดที่ผสมพีเอช 4 ชนิด ได้แก่ฟลูออรีน พีแนนทริน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 25 ppm เป็นเวลา 15 วัน

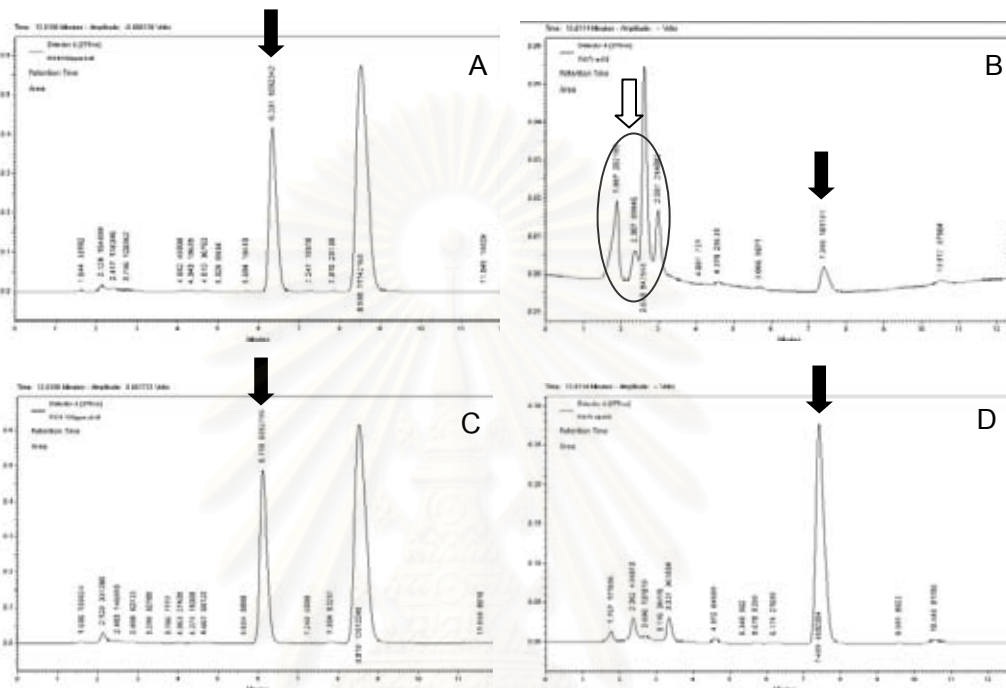
จากการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าราทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายพีเอเอชแบบผสม 4 ชนิดดังกล่าว ในเวลา 15 วันได้ ดังรูปที่ 4.3-4.6 โดยพบว่าจะเกิดสารมัธยันตรขึ้นมาหลายชนิดซึ่งยากที่จะบอกได้ว่าสารมัธยันตรที่เกิดขึ้นคืออะไรและเกิดจากการย่อยสลายพีเอเอชชนิดใด ดังนั้นเพื่อตรวจสอบสารมัธยันตรที่เกิดขึ้นโดยละเอียด จึงได้นำราทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ไปทดสอบการย่อยสลายพีเอเอชแบบแยกเดี่ยวในการทดลองขั้นต่อไป

เมื่อนำราทั้ง 4 ชนิดมาทดสอบการย่อยสลายพีเอเอชแบบแยกเดี่ยวของ ฟลูออรีน พีแนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ชนิดละ 100 ppm เป็นเวลา 15 วัน พบว่า S5 T8 และ T20 สามารถย่อยสลายพีเอเอชได้ 3 ชนิด โดยที่ S5 ไม่สามารถย่อยสลายฟลูออแรนธินได้ T8 และ T20 ไม่สามารถสลายไพรีนได้ ในขณะที่ F18 สามารถย่อยได้ชนิดเดียวคือฟลูออรีน ซึ่งรายละเอียดการย่อยสลายพีเอเอชของราแต่ละสายพันธุ์มีดังนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

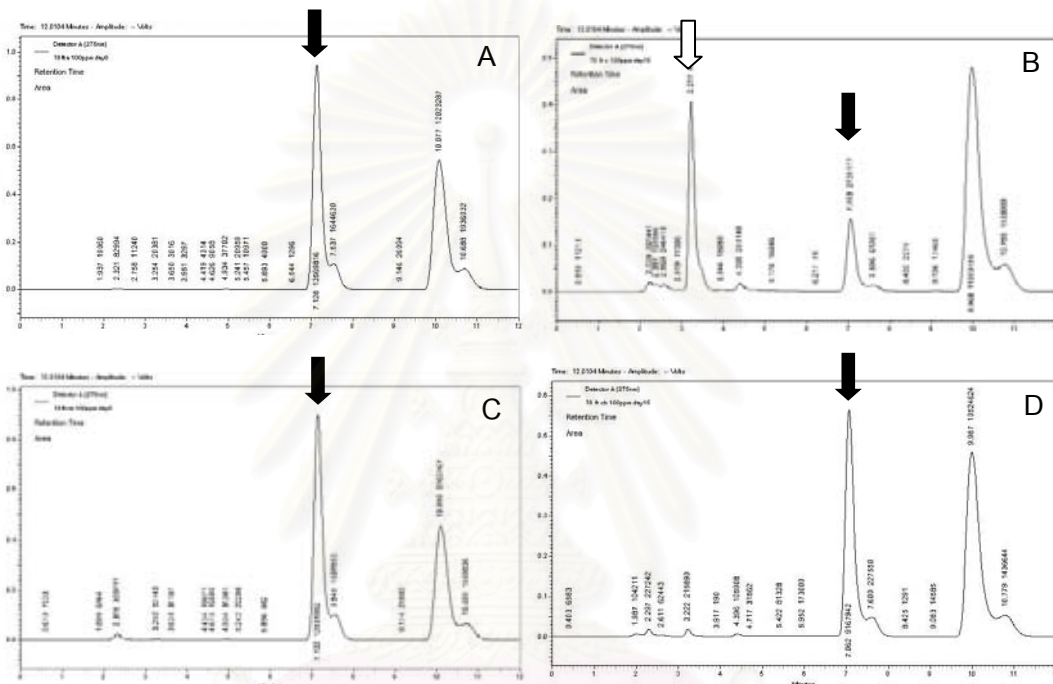
F18 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้ชนิดเดียวแต่ได้มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และมี peak ของสารมัธยันตร์เกิดขึ้น 4 peak ใหญ่ที่เห็นได้ชัดที่ retention time เท่ากับ 1.887 2.367 2.613 และ 2.981 นาที (ลูกศรสีขาวรูปที่ 4.7 B) โดยที่ฟลูออรีนมีค่า retention time เท่ากับ 7.4 นาที (peak ที่มี retention time เท่ากับ 8.5 เป็นไพรีนที่มีการไล่ลงไปเพื่อเทียบประสิทธิภาพของการสกัด) โดยโครมาโตแกรมของ HPLC แสดงดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงโครมาโตแกรมจากการย่อยสลายฟลูออรีน โดยรา F18 A=ชุดทดลองวันที่ 0, B=ชุดทดลองวันที่ 15, C=ชุดควบคุมวันที่ 0 และ D=ชุดควบคุมวันที่ 15 (ลูกศรสีดำชี้ peak ของฟลูออรีน และลูกศรสีขาวชี้ peak ของสารมัธยันตร์)

T8 สามารถย่อยสลายฟลูออรีน พีแนมทริน และ ฟลูออเรนีนได้ 72.95 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยโครมาโตแกรมของ HPLC แสดงดังรูปที่ 4.8 4.9 และ 4.10

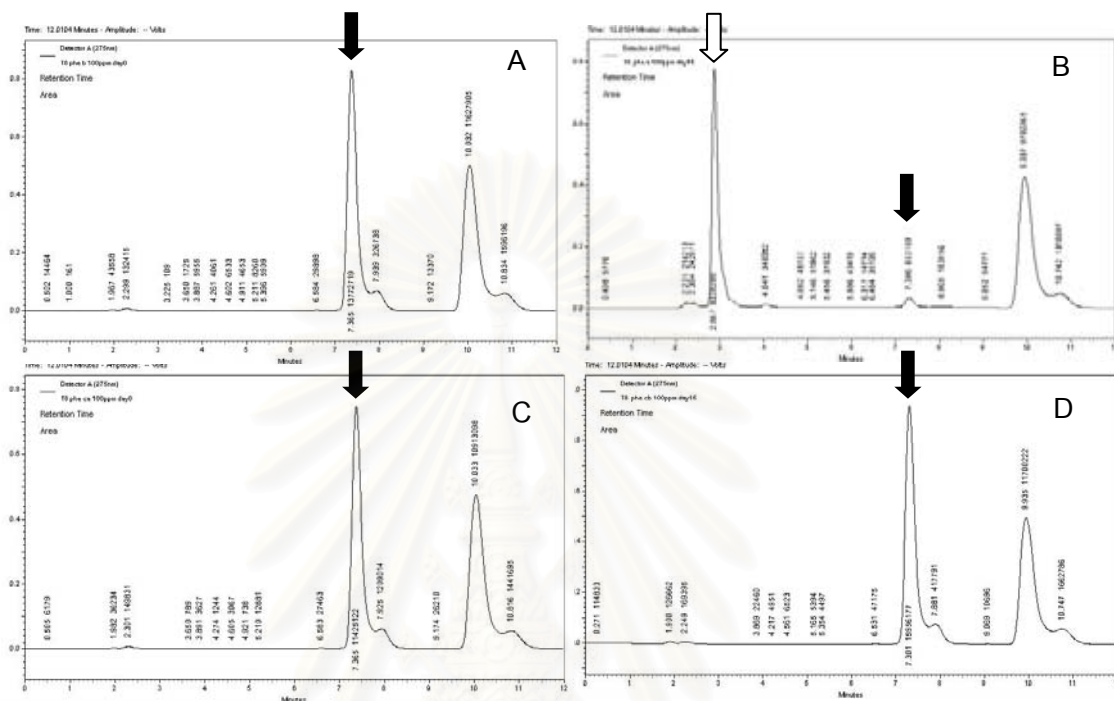
T8 ย่อยสลายฟลูออรีนเกิดสารมัธยันตร์เด่นชัดที่ retention time เท่ากับ 3.21 (ลูกศรสีขาวรูปที่ 4.8 B) และมี peak ต่ำๆ ของสารมัธยันตร์เกิดก่อนและหลัง peak เด่นนี้ด้วย โดยที่ฟลูออรีนมีค่า retention time เท่ากับ 7.13 นาที (ลูกศรสีดำ) ดังแสดงในรูปที่ 4.8 B (peak ที่มี retention time เท่ากับ 9.96 เป็นไพรีนที่มีการไล่ลงไปที่เทียบประสิทธิภาพของการสกัด)



รูปที่ 4.8 แสดงโครมาโตแกรมจากการย่อยสลายฟลูออรีน โดยรา T8 A=ชุดทดลองวันที่ 0, B=ชุดทดลองวันที่ 15, C=ชุดควบคุมวันที่ 0 และ D=ชุดควบคุมวันที่ 15 (ลูกศรสีดำชี้ peak ของฟลูออรีน และลูกศรสีขาวชี้ peak ของสารมัธยันตร์)

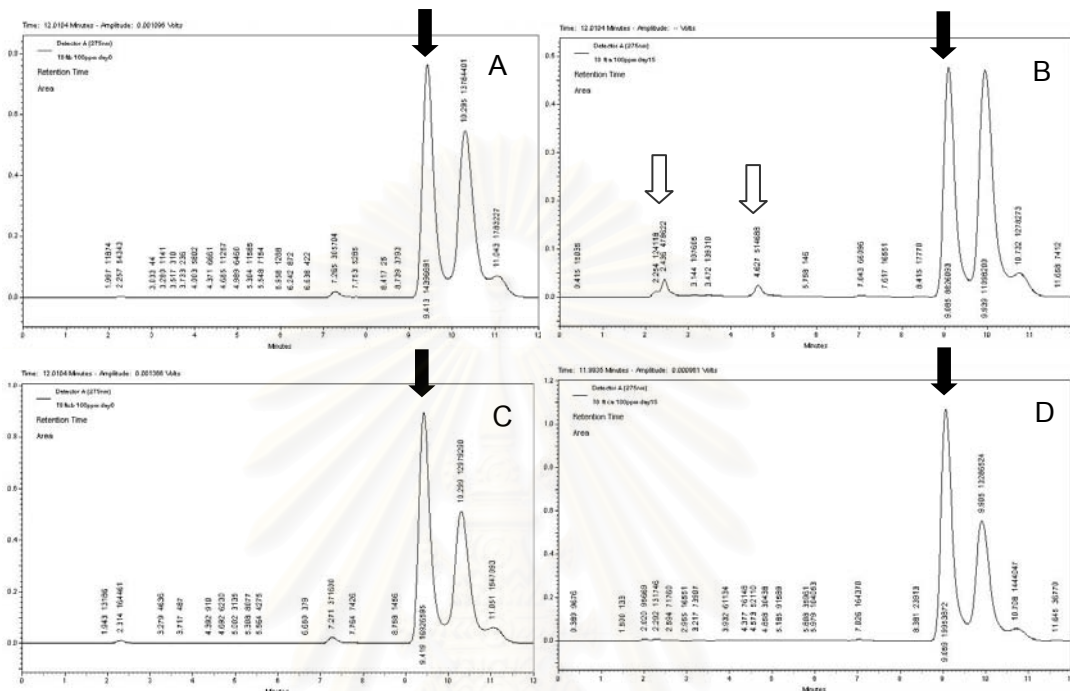
สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T8 ย่อยสลายพีแนทรีนเกิดสารมัธยันตร์เด่นชัด 1 peak ที่ retention time เท่ากับ 2.6 (ลูกศรสีขาวรูปที่ 4.9 B) โดยที่พีแนทรีนมีค่า retention time เท่ากับ 7.3 นาที (ลูกศรสีดำ) ดังแสดงในรูปที่ 4.9 B (peak ที่มี retention time เท่ากับ 10.03 เป็นไพรีนที่มีการไล่ลงไปเพื่อเทียบประสิทธิภาพของการสกัด)



รูปที่ 4.9 แสดงโครมาโตแกรมจากการย่อยสลายพีแนทรีน โดยเวลา T8 A=ชุดทดลองวันที่ 0, B=ชุดทดลองวันที่ 15, C=ชุดควบคุมวันที่ 0 และ D=ชุดควบคุมวันที่ 15 (ลูกศรสีดำชี้ peak ของพีแนทรีน และลูกศรสีขาวชี้ peak ของสารมัธยันตร์)

T8 ย่อยสลายฟลูออเรนธินได้และเกิดสารมัธยันตร์ 2 peak ที่มีค่า retention time เท่ากับ 2.4 และ 4.6 นาที (ลูกศรสีขาวรูปที่ 4.10 B) โดยที่ฟลูออเรนธินมีค่า retention time เท่ากับ 9.4 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.10 B (peak ที่มี retention time เท่ากับ 9.9 เป็นไพรีนที่มีการไล่ลงไปเพื่อเทียบประสิทธิภาพของการสกัด)

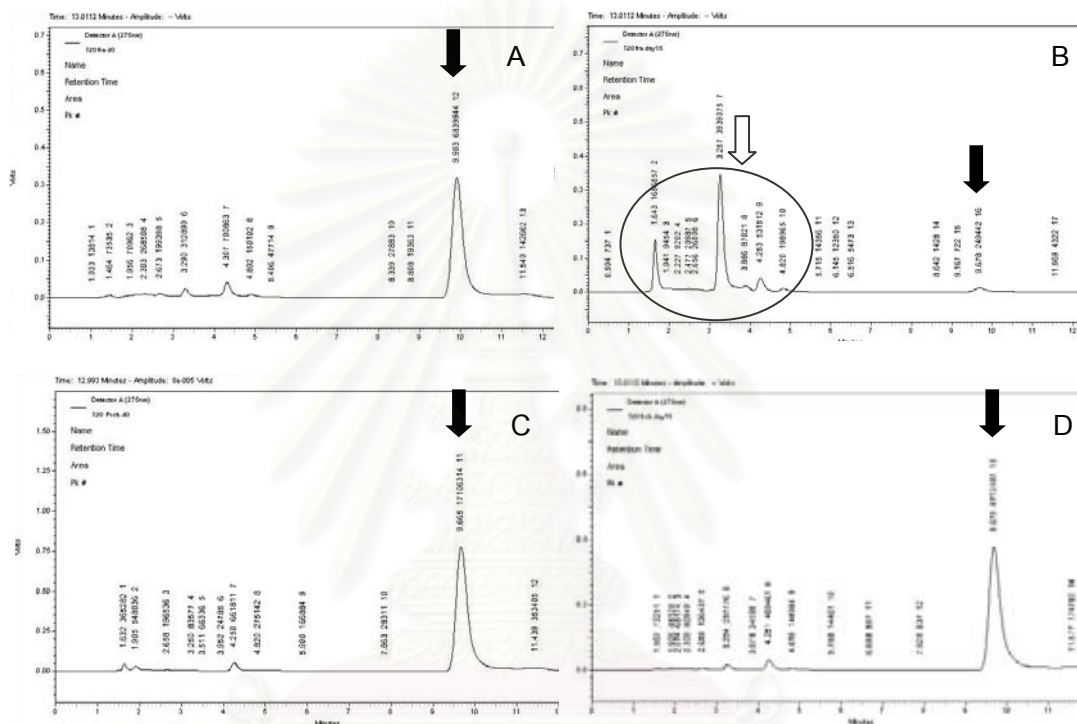


รูปที่ 4.10 แสดงโครมาโตแกรมจากการย่อยสลายฟลูออเรนธิน โดยรา T8 A=ชุดทดลองวันที่ 0, B=ชุดทดลองวันที่ 15, C=ชุดควบคุมวันที่ 0 และ D=ชุดควบคุมวันที่ 15 (ลูกศรสีดำชี้ peak ของฟลูออเรนธิน และลูกศรสีขาวชี้ peak ของสารมัธยันตร์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T20 สามารถย่อยสลายฟลูออรีน พีแนทรีน และฟลูออเรนีนได้ โดยมีปริมาณที่ลดลง 83 84 และ 31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยโครมาโตแกรมของ HPLC แสดงดังรูปที่ 4.11 4.12 และ 4.13

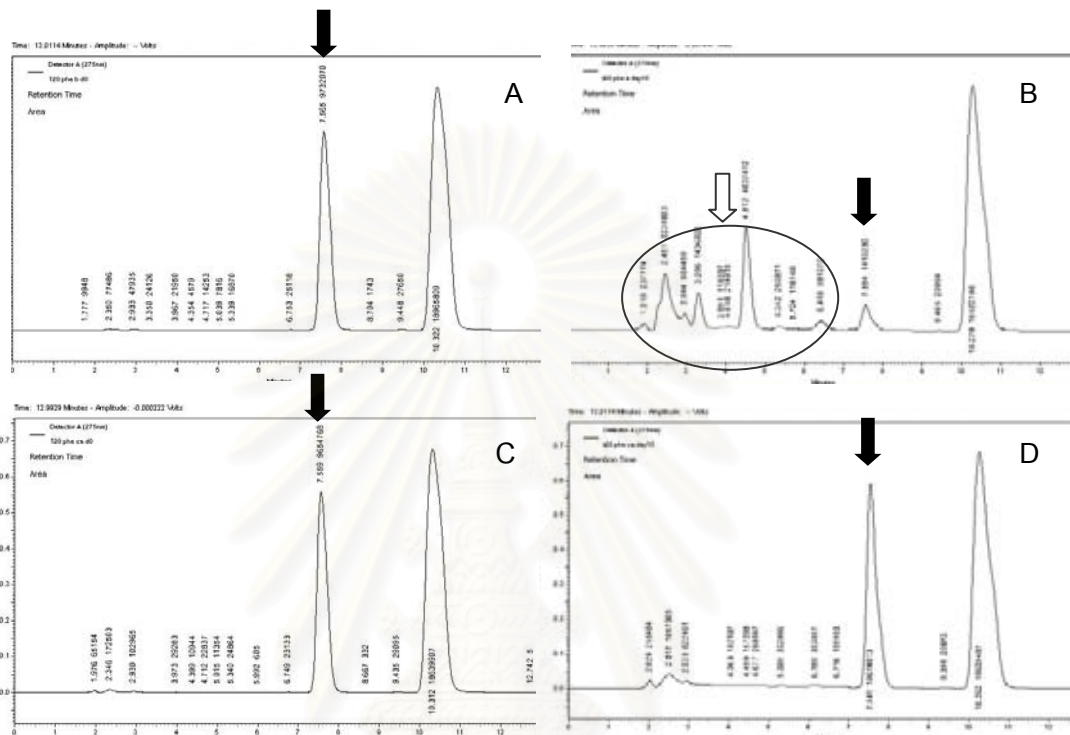
T20 ย่อยสลายฟลูออรีนได้และเกิดสารมัธยันตร์เด่นชัด 3 peak ที่ retention time เท่ากับ 1.6 3.2 และ 4.2 นาที (ลูกศรสีขาวรูปที่ 4.11 B) โดยที่ฟลูออรีน มีค่า retention time เท่ากับ 9.6 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.11 B



รูปที่ 4.11 แสดงโครมาโตแกรมจากการย่อยสลายฟลูออรีน โดยรา T20 A=ชุดทดลองวันที่ 0, B=ชุดทดลองวันที่ 15, C=ชุดควบคุมวันที่ 0 และ D=ชุดควบคุมวันที่ 15 (ลูกศรสีดำชี้ peak ของฟลูออรีน และลูกศรสีขาวชี้ peak ของสารมัธยันตร์)

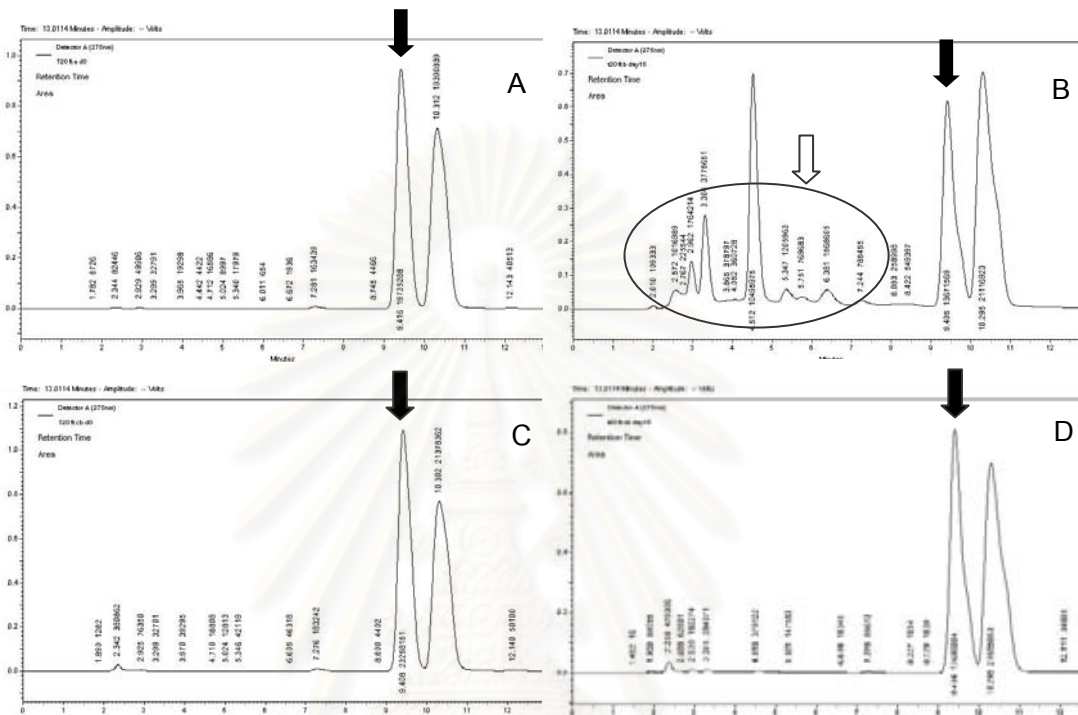
สถาบันวิจัยบวรการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T20 ย่อยสลายพีแนทรีนได้และเกิดสารมัธยันตร์เด่นชัด 6 peak ที่ retention time เท่ากับ 1.9 2.4 2.9 3.2 4.5 และ 6.4 (ลูกศรสีขาวรูปที่ 4.12 B) โดยที่พีแนทรีนมีค่า retention time เท่ากับ 10.2 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.12 B (peak ที่มี retention time เท่ากับ 9.9 เป็นไพร์นที่มีการไหลไปเพื่อเทียบประสิทธิภาพของการสกัด)



รูปที่ 4.12 แสดงโครมาโตแกรมจากการย่อยสลายพีแนทรีน โดยยา T20 A=ชุดทดลองวันที่ 0, B=ชุดทดลองวันที่ 15, C=ชุดควบคุมวันที่ 0 และ D=ชุดควบคุมวันที่ 15 (ลูกศรสีดำชี้ peak ของพีแนทรีน และลูกศรสีขาวชี้ peak ของสารมัธยันตร์)

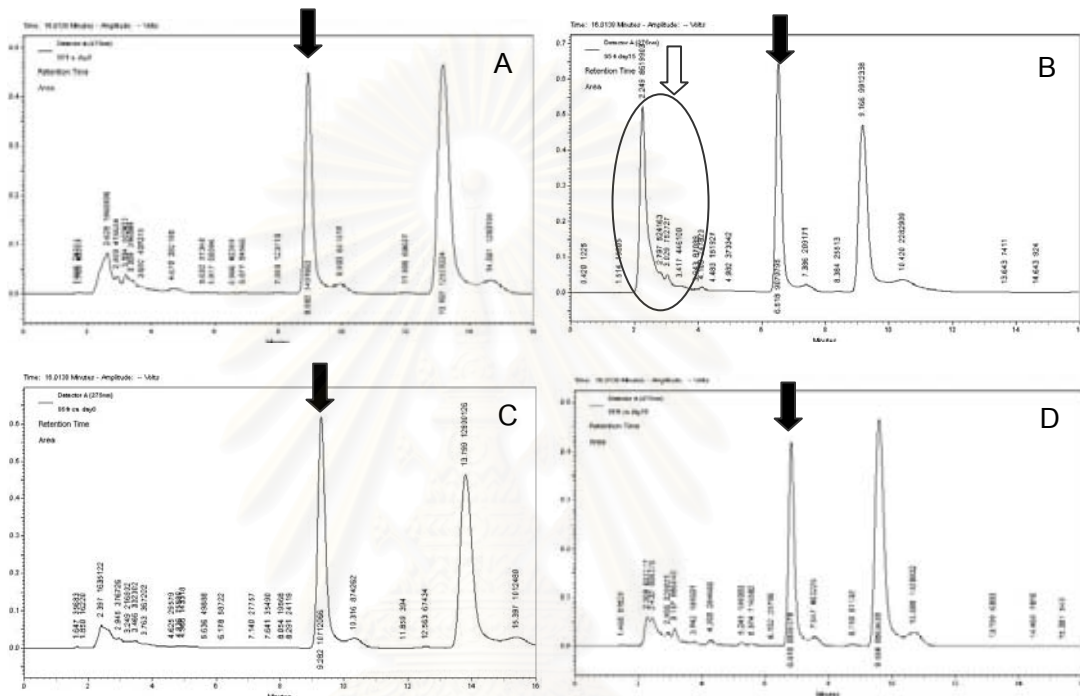
T20 ย่อยสลายฟลูออเรนธินเกิดสารมัธยันตร์ 8 peak ที่มีค่า retention time เท่ากับ 2.01 2.5 2.7 2.9 3.3 4.5 และ 4.6 นาที (ลูกศรสีขาวยุโรปที่ 4.13 B) โดยที่ฟลูออเรนธินมีค่า retention time เท่ากับ 9.4 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.13 B (peak ที่มี retention time เท่ากับ 10.2 เป็นไพร์นที่มีการไล่ลงไปเพื่อเทียบประสิทธิภาพของการสกัด)



รูปที่ 4.13 แสดงโครมาโตแกรมจากการย่อยสลายฟลูออเรนธิน โดยเวลา T20 A=ชุดทดลองวันที่ 0, B=ชุดทดลองวันที่ 15, C=ชุดควบคุมวันที่ 0 และ D=ชุดควบคุมวันที่ 15 (ลูกศรสีดำชี้ peak ของฟลูออเรนธิน และลูกศรสีขาวชี้ peak ของสารมัธยันตร์)

S5 สามารถย่อยสลายฟลูออรีน พีแนนทีน และไพรีนได้ 60 78 และ 85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยโครมาโตแกรมของ HPLC แสดงดังรูปที่ 4.14 4.15 และ 4.16

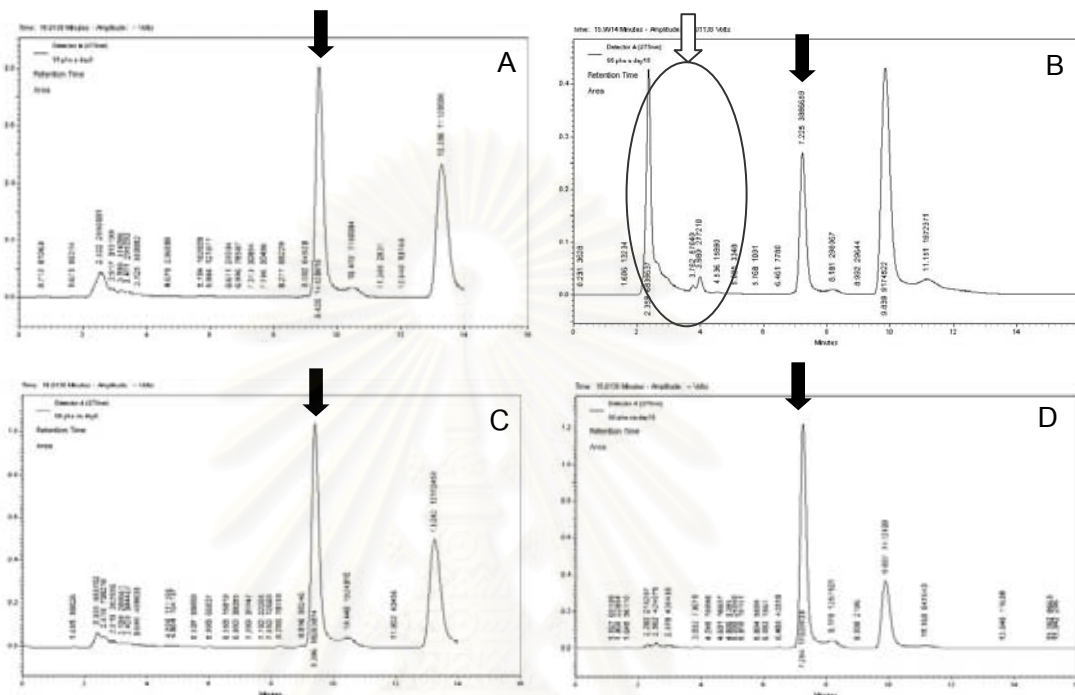
S5 ย่อยสลายฟลูออรีนเกิดสารมัธยันตร์เด่นชัดที่ retention time เท่ากับ 2.2 (ลูกศรสีขาวรูปที่ 4.14 B) โดยที่ฟลูออรีนมีค่า retention time เท่ากับ 6.5 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.14 B (peak ที่มี retention time เท่ากับ 9.1 เป็นไพรีนที่มีการไหลไปเพื่อเทียบประสิทธิภาพของการสกัด)



รูปที่ 4.14 แสดงโครมาโตแกรมจากการย่อยสลายฟลูออรีน โดยรา S5 A=ชุดทดลองวันที่ 0, B=ชุดทดลองวันที่ 15, C=ชุดควบคุมวันที่ 0 และ D=ชุดควบคุมวันที่ 15 (ลูกศรสีดำชี้ peak ของฟลูออรีน และลูกศรสีขาวชี้ peak ของสารมัธยันตร์)

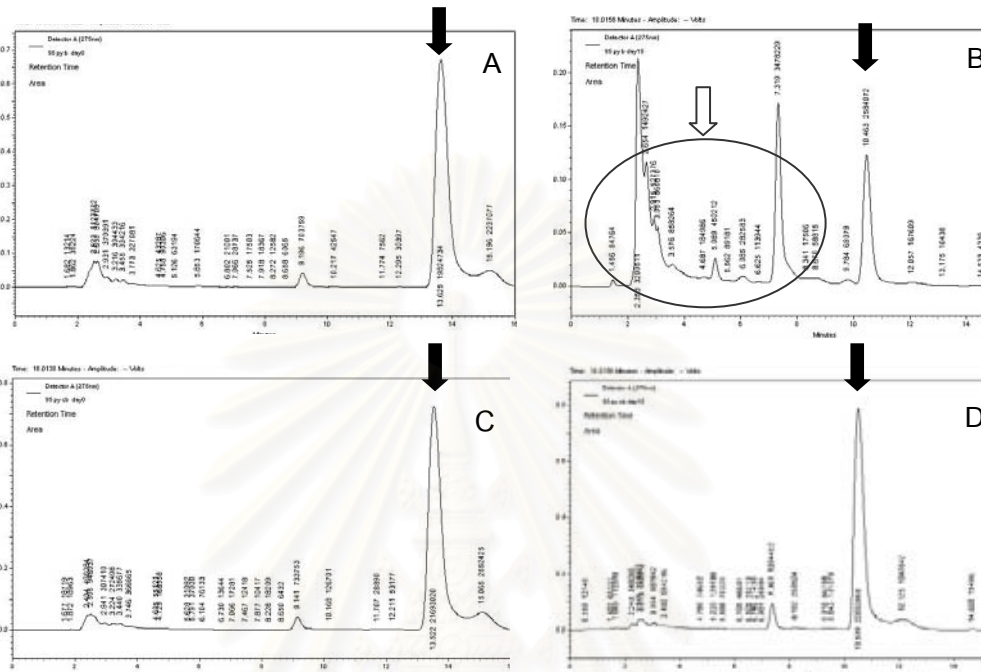
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

S5 ย่อยสลายพีแนนนทรินเกิดสารมัธยันตร์เด่นชัดที่ retention time เท่ากับ 2.3 (ลูกศรสีขาวรูปที่ 4.15 B) โดยที่พีแนนนทรินมีค่า retention time เท่ากับ 7.2 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.15 B (peak ที่มี retention time เท่ากับ 9.8 เป็นไพร์นที่มีการไล่ลงไปเพื่อเทียบประสิทธิภาพของการสกัด)



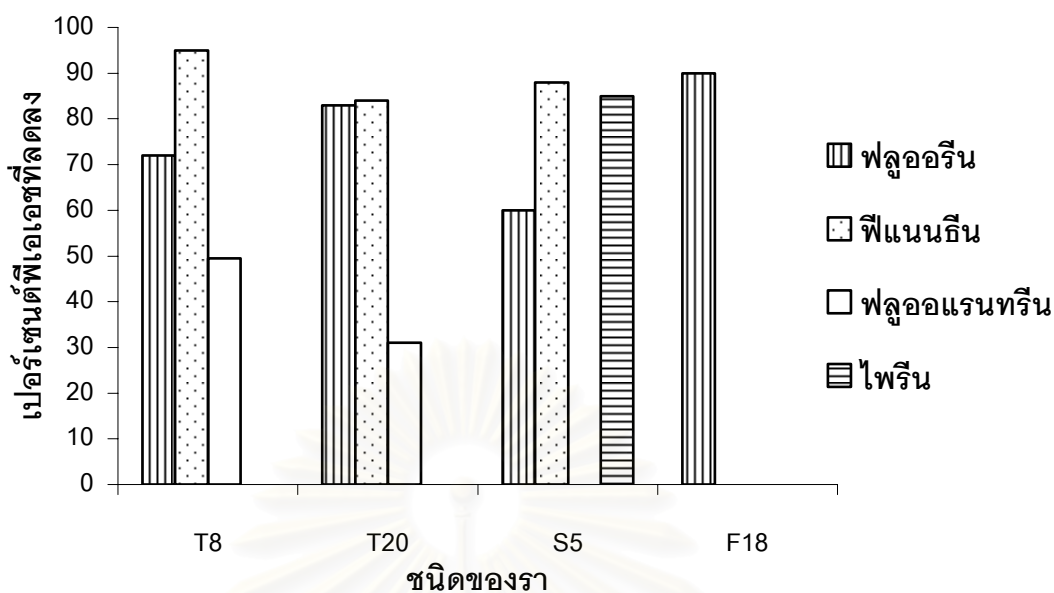
รูปที่ 4.15 แสดงโครมาโตแกรมจากการย่อยสลายพีแนนนทริน โดยรา S5 A=ชุดทดลองวันที่ 0, B=ชุดทดลองวันที่ 15, C=ชุดควบคุมวันที่ 0 และ D=ชุดควบคุมวันที่ 15 (ลูกศรสีขาวชี้ peak ของพีแนนนทริน และลูกศรสีดำชี้ peak ของสารมัธยันตร์)

S5 ย่อยสลายไฟรีนเกิดสารมัธยันตร์เด่นชัด 5 สารที่ retention time เท่ากับ 2.3 2.9 3.0 3.5 และ 5.08 (ลูกศรสีขาวรูปที่ 4.13 B) โดยที่ไฟรีนมีค่า retention time เท่ากับ 10.4 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.16 B (peak ที่มี retention time เท่ากับ 7.3 เป็นฟลูออรีนที่มีการไล่ลงไปเพื่อเทียบประสิทธิภาพของการสกัด)



รูปที่ 4.16 แสดงโครมาโตแกรมจากการย่อยสลายไฟรีน โดยรา S5 A=ชุดทดลองวันที่ 0, B=ชุดทดลองวันที่ 15, C=ชุดควบคุมวันที่ 0 และ D=ชุดควบคุมวันที่ 15 (ลูกศรสีดำชี้ peak ของไฟรีน และลูกศรสีขาวชี้ peak ของสารมัธยันตร์)

จากผลการทดลองย่อยสลายพีเอเอชแบบแยกเดี่ยวทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่ารา F18 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้เพียงชนิดเดียว แต่สามารถย่อยสลายได้ในปริมาณที่สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 15 วัน ในขณะที่ T8 T20 และ S5 สามารถย่อยสลายพีเอเอชได้ถึง 3 ชนิดจาก 4 ชนิดที่ได้ทำการทดลอง โดยที่ T8 และ T20 สามารถย่อยสลายฟลูออรีน พีแนทรีน และฟลูออแรนธิน ได้เหมือนกันแต่ย่อยสลายได้ในอัตราที่ต่างกันในขณะที่ S5 สามารถย่อยสลายฟลูออรีน พีแนทรีน และ ไฟรีนได้ แสดงดังรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 แสดงปริมาณฟิวเอเอซที่ลดลงในวันที่ 15 จากการย่อยสลายฟิวเอเอซ 4 ชนิด แบบแยกเดี่ยวของรา 4 ชนิด

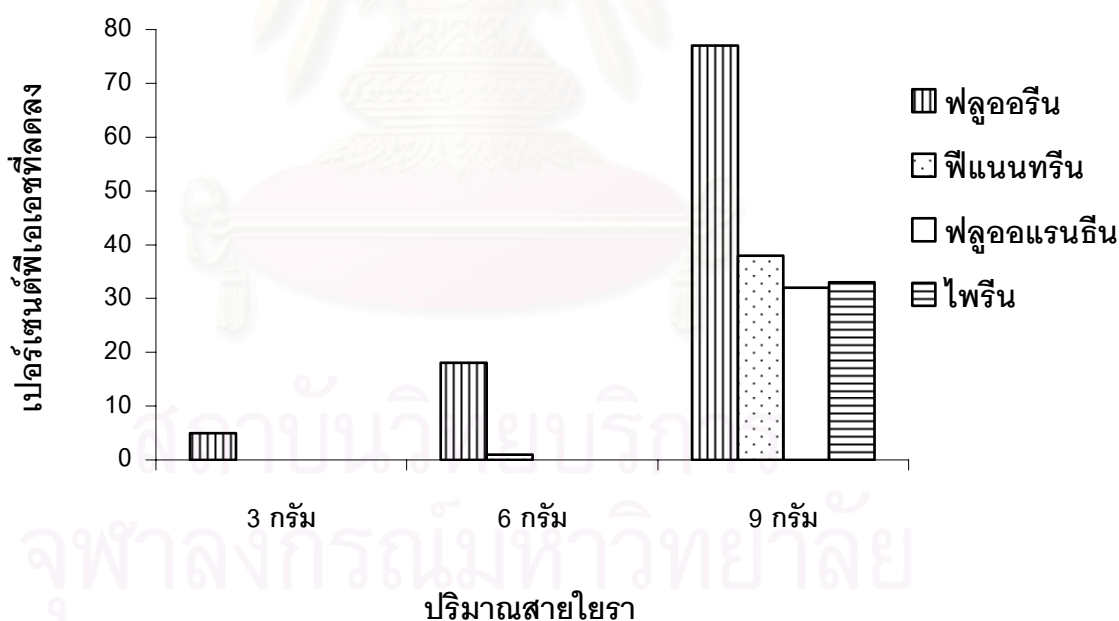
จากผลการทดลองเหล่านี้จะเห็นว่า ถึงแม้ F18 จะสามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้ดีที่สุดแต่เชื้อนี้ไม่สามารถย่อยสลายฟิวเอเอซชนิดอื่นๆ ได้เลย จึงไม่เลือกเชื้อนี้ไปทดสอบในขั้นต่อไป ส่วน T8 และ T20 สามารถย่อยสลาย ฟลูออรีน ฟีนนธรีน และฟลูออแรนธรีนได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ ในขณะที่เชื้อ S5 สามารถย่อยสลายฟลูออรีน ฟีนนธรีน และไพรีนได้ แต่ย่อยสลายฟลูออแรนธรีนไม่ได้ เชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้ก็อาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกันเพื่อย่อยสลายสารผสมฟิวเอเอซทั้งสี่ชนิดได้

4.5 ผลของปริมาณสายใยราต่อการลดลงของพีเอเอช

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของพีเอเอชในสภาพที่มีปริมาณสายใยราที่แตกต่างกันโดยใช้รา T8 และ T20 ที่ได้คัดเลือกมาจากการทดลองข้างต้น โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุดคือ ชุดที่ 1 ใส่เชื้อ 3 กรัม ชุดที่ 2 ใส่เชื้อ 6 กรัม และชุดที่ 3 ใส่เชื้อ 9 กรัม

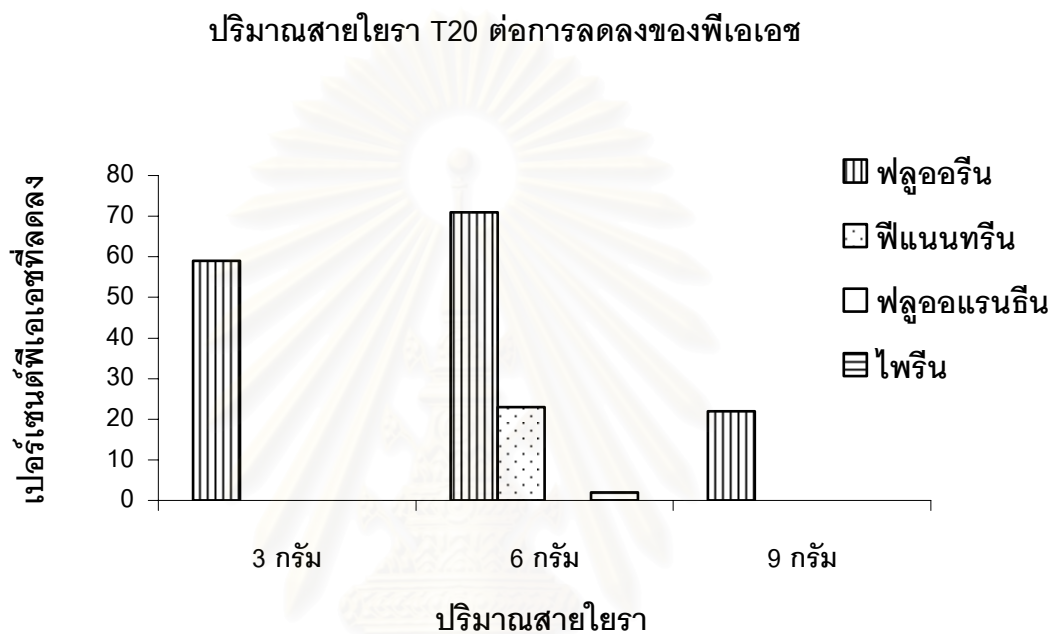
ผลการทดลองของรา T8 แสดงดังรูปที่ 4.18 ซึ่งพบว่า ในการทดลองชุดที่ 1 ที่ใส่เชื้อ 3 กรัม มีเปอร์เซ็นต์ของพีเอเอชลดลงน้อยที่สุดโดยมีฟลูออรีนเพียงชนิดเดียวที่ลดลงเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ชุดที่ 2 ที่ใส่เชื้อ 6 กรัม มีการลดลงของฟลูออรีน 18 เปอร์เซ็นต์ และ พีแนนทริน 1 เปอร์เซ็นต์ ชุดทดลองที่ 3 มีการลดลงของพีเอเอชทั้ง 4 ชนิด โดยมีเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงของฟลูออรีน พีแนนทริน ฟลูออแรนธิน และไพรีน เป็นปริมาณ 77 38 32 และ 33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อปริมาณสายใยรามากขึ้นปริมาณพีเอเอชมีแนวโน้มที่จะลดลงมากขึ้นด้วย

ปริมาณสายใยรา T8 ต่อการลดลงของพีเอเอช



รูปที่ 4.18 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ของพีเอเอชแต่ละชนิดที่ลดลงโดยรา T8 ที่นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สำหรับการทดลองของรา T20 แสดงดังรูปที่ 4.19 ซึ่งมีการลดลงของฟิเอเอชมากที่สุดในช่วงทดลองที่ใส่เชื้อ 6 กรัม โดยมีอัตราการลดลงของฟลูออรีน 70 เปอร์เซ็นต์ และฟิแนนทริน 23 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลการทดลองที่ใส่เชื้อปริมาณ 3 กรัม และ 9 กรัม พบว่ามีการลดลงของฟลูออรีนเพียงชนิดเดียว จากผลการทดลองเหล่านี้ไม่พบความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างปริมาณสายใยราต่อการลดลงของฟิเอเอช



รูปที่ 4.19 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ของฟิเอเอชแต่ละชนิดที่ลดลงโดยรา T20 ที่นำไปนั่งฆ่าเชื้อ

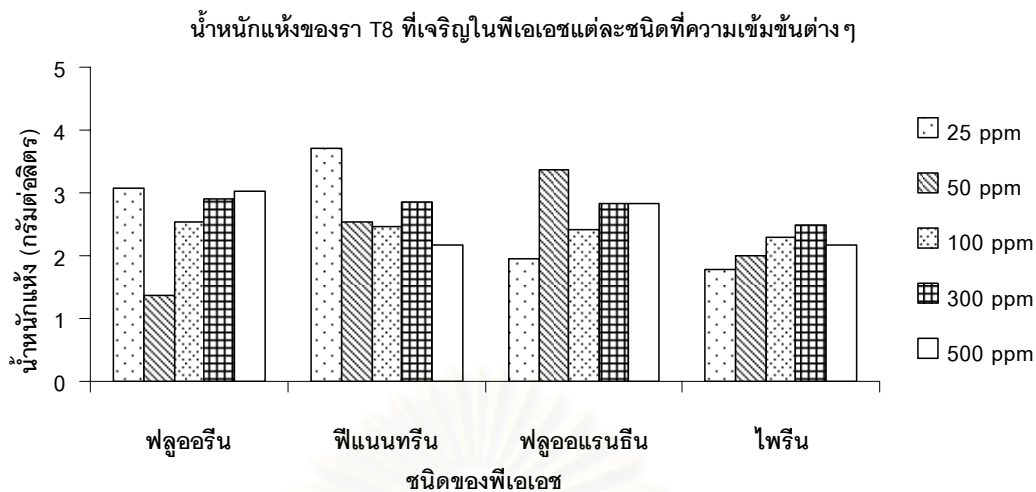
4.6 การทดสอบปริมาณพีเอเอชสูงสุดที่ราสามารถอยู่รอดได้

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณสูงสุดของพีเอเอชที่รา T8 และ T20 สามารถมีชีวิตอยู่และเจริญได้โดยใช้พีเอเอชแบบแยกเดี่ยว ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 50 100 300 และ 500 ppm

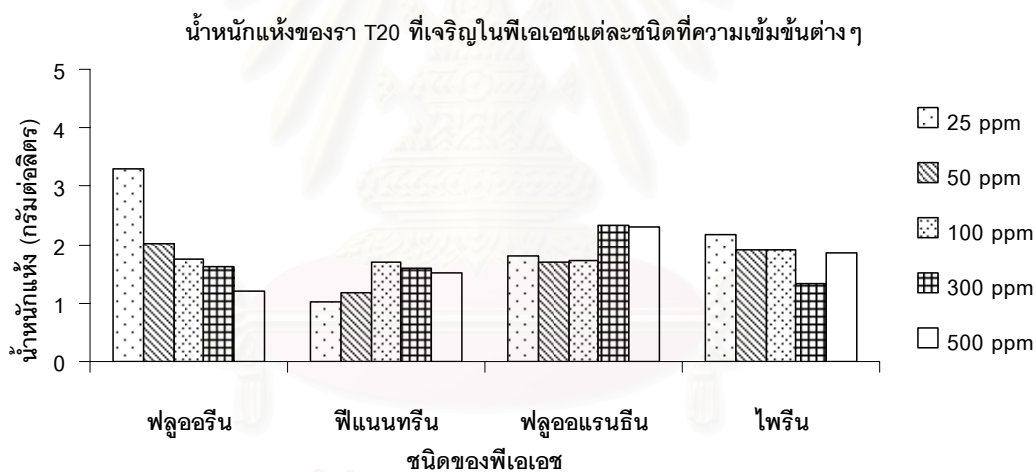
จากการทดลองหาการมีชีวิตรอดของราที่ทำโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อรา T8 และ T20 ที่เลี้ยงในพีเอเอชแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน มาหยดลงบนอาหาร MEA พบว่ารา T8 และ T20 สามารถเจริญได้จนถึงความเข้มข้นสูงสุดของพีเอเอชที่ทดสอบคือ 500 ppm ในทุกชนิดของพีเอเอชบนอาหาร MEA

เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือในแต่ละชนิดไปกรอง และอบแห้งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของรา พบว่าในรา T8 ให้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.20 ซึ่งเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในฟลูออรีน และพีแนนทรีน ที่ความเข้มข้น 25 ppm เมื่อเลี้ยงในฟลูออแรนธินเจริญได้ดีที่สุดในช่วง 50-100 ppm ส่วนในไพรีน เจริญได้ดีที่สุดในช่วงความเข้มข้น 100 ถึง 300 ppm

สำหรับรา T20 ในการทดลองที่เลี้ยงในฟลูออรีน ไพรีน พีแนนทรีน และฟลูออแรนธิน เจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 25 ppm 25ppm 100 ppm และ 300 ppm ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.20 กราฟแสดงน้ำหนักแห้งของรา T8 ที่เจริญในฟลูออรีน (ก), พีแนนทริน (ข), ฟลูออแรนธิน (ค) และไพรีน (ง) ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300 และ 500 ppm

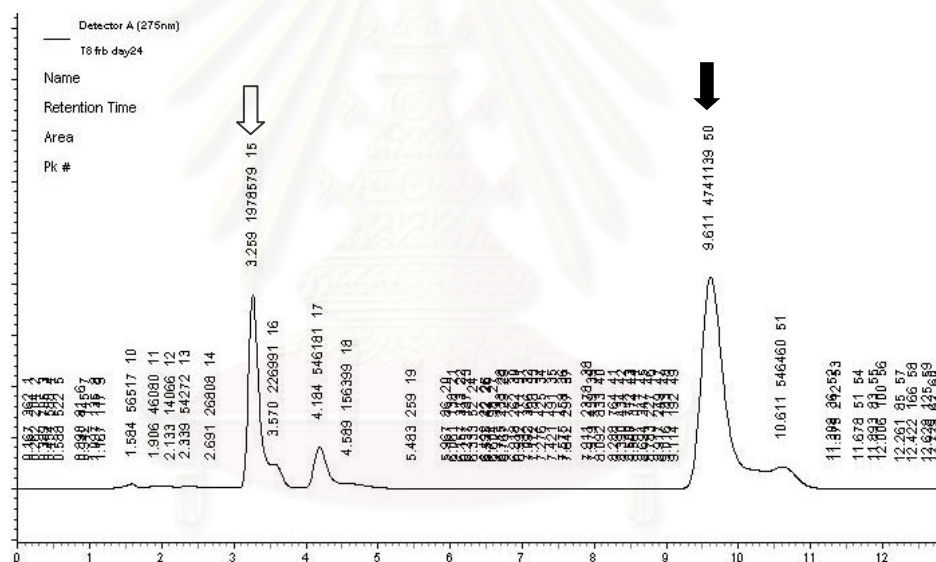


รูปที่ 4.21 กราฟแสดงน้ำหนักแห้งของรา T20 ที่เจริญในฟลูออรีน (ก), พีแนนทริน (ข), ฟลูออแรนธิน (ค) และไพรีน (ง) ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300 และ 500 ppm

4.7 การวิเคราะห์สารมัธยันตร์ในระหว่างการสลายสารผสมพีเอเอชแต่ละชนิดแบบแยกเดี่ยว

ในเบื้องต้นนี้ต้องการทดสอบสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายพีเอเอชโดยรา T8 และ T20 ว่าเป็นสารใด ในงานวิจัยนี้จึงเลือกที่จะทดสอบสารมัธยันตร์ของพีเอเอชเพียงชนิดเดียว ก่อนคือ ฟลูออรีน จากรูปที่ 4.8 B และ 4.11 B จะเห็น peak ของสารมัธยันตร์ที่เด่นชัด ซึ่งน่าจะเหมาะสมต่อการวิเคราะห์สารมัธยันตร์ในเบื้องต้นนี้ โดยในขั้นแรกได้เลี้ยงราทั้ง 2 สายพันธุ์นี้เพื่อหาวันที่เชื้อผลิตสารมัธยันตร์ได้มากที่สุดซึ่งได้ผลดังนี้

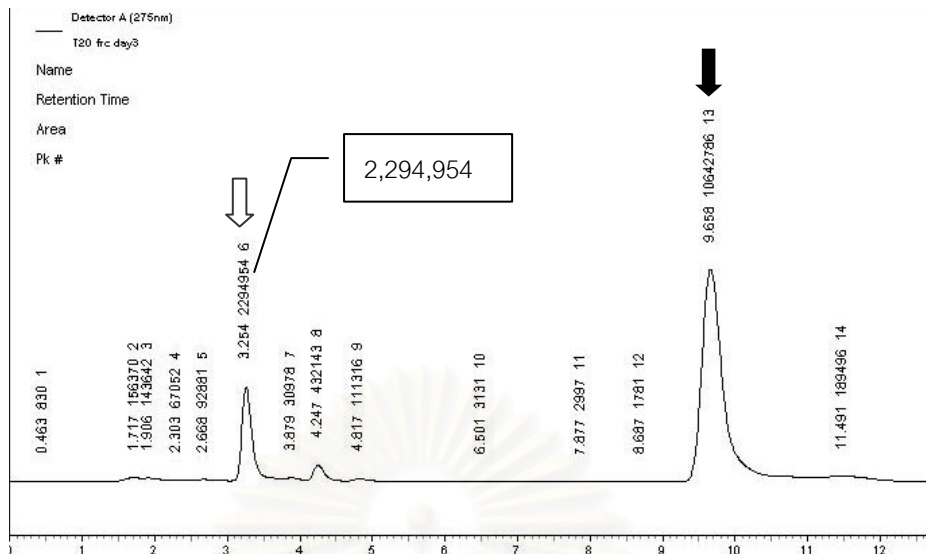
ผลจากโครมาโตแกรมของการย่อยสลายฟลูออรีนของรา T8 เริ่มพบสารมัธยันตร์ตั้งแต่วันที่ 6 แต่ปริมาณค่อนข้างน้อย และจะผลิตได้มากอย่างเด่นชัดในวันที่ 24 จากการเลี้ยงทั้งหมด 30 วัน ซึ่งเมื่อผ่านไป 30 วันก็ยังมีฟลูออรีนเหลืออยู่ โดยสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นมีค่า retention time ที่ 3.25 นาที และสารตั้งต้นฟลูออรีน มีค่า retention time ที่ 9.61 นาที แสดงดังรูปที่ 4.22



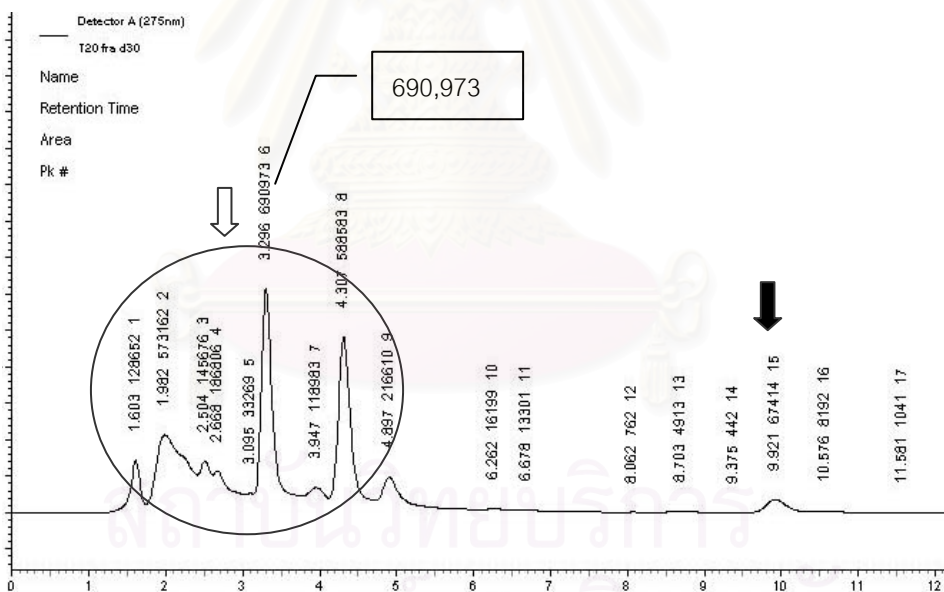
รูปที่ 4.22 HPLC โครมาโตแกรมแสดงการย่อยสลายฟลูออรีนในวันที่ 24 โดยรา T8

(ลูกศรสีดำชี้ peak ของฟลูออรีน และลูกศรสีขาวชี้ peak ของสารมัธยันตร์)

และจากโครมาโตแกรมของการย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา T20 เริ่มพบสารมัธยันตร์ 1 peak ที่เด่นชัดตั้งแต่วันที่ 3 โดยสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นมีค่า retention time ที่ 3.25 นาทีเช่นเดียวกับที่พบจากการย่อยสลายของรา T8 ดังรูปที่ 4.23 สารมัธยันตร์ที่ peak นี้มีปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อถึงวันที่ 21 ถึง 30 จะพบจำนวน peak ของสารมัธยันตร์เพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 30 มีสารมัธยันตร์เกิดประมาณ 8 peak ส่วนฟลูออรีนที่เป็นสารตั้งต้นเหลืออยู่ปริมาณน้อยมาก และ peak ที่เด่นชัด peak เดียวในวันที่ 3 ก็ลดปริมาณลงแสดงดังรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.23 โครมาโตแกรมแสดงการย่อยสลายฟลูออรีน ในวันที่ 3 โดยรา T20
(ลูกศรสีดำชี้ peak ของฟลูออรีนและลูกศรสีขาวชี้ peak ของสารมัธยันตร์)



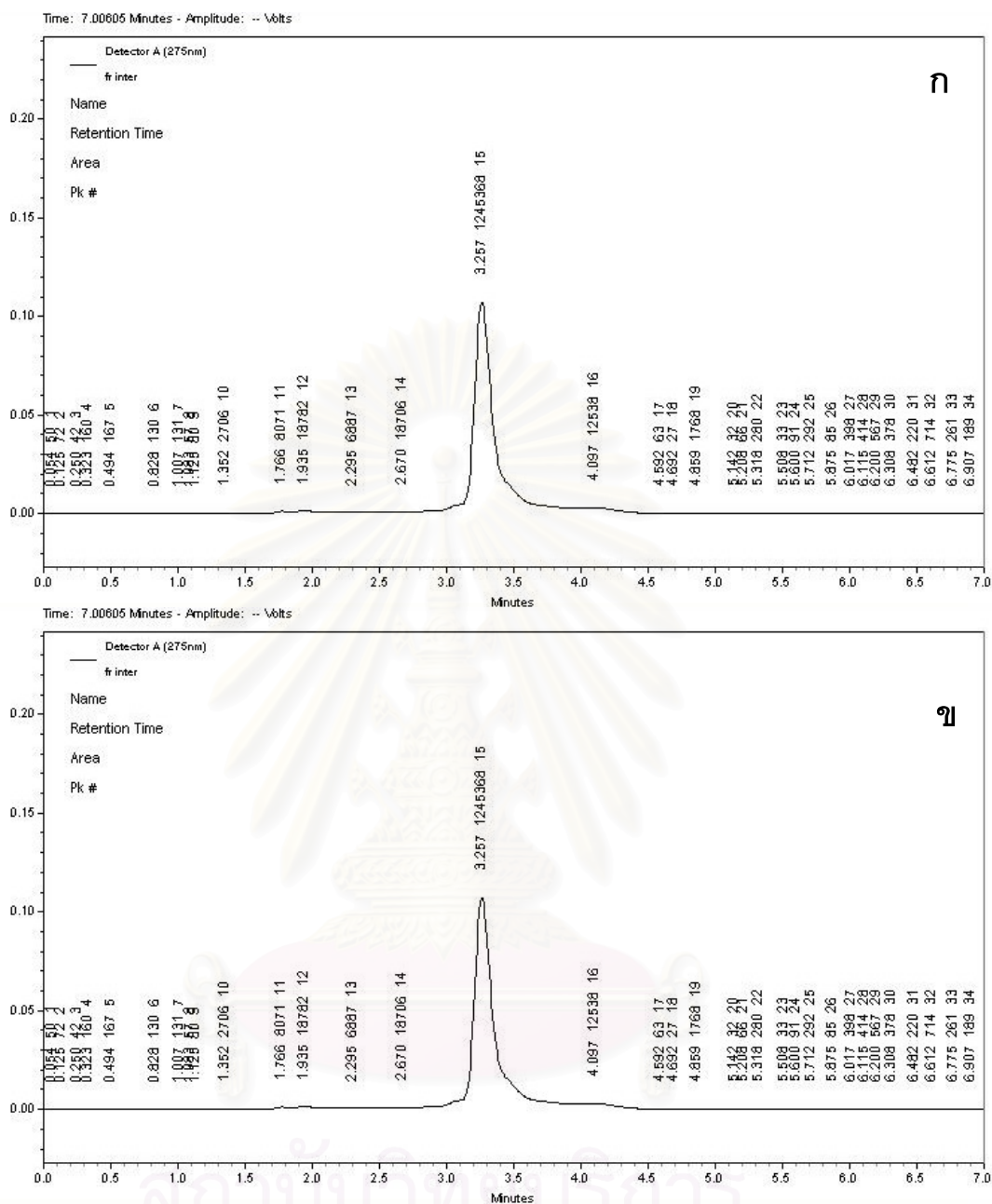
รูปที่ 4.24 โครมาโตแกรมแสดงการย่อยสลายฟลูออรีนในวันที่ 30 โดยรา T20
(ลูกศรสีดำชี้ peak ของฟลูออรีน และลูกศรสีขาวชี้ peak ของสารมัธยันตร์)

จากผลที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่ารา T20 สามารถย่อยสลายฟลูออรีน และเกิดสารมัธยันตร์ในระยะเวลาที่เร็วกว่ารา T8 จึงได้นำรา T20 ไปเลี้ยงขยายปริมาณเพื่อให้ได้สารมัธยันตร์ที่เพียงพอในการนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันตร์ โดยเลี้ยงรา T20 ในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่มีการผสมฟลูออรีน 100 ppm ลงไป เป็นเวลา 3 วัน และนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดมาสกัดด้วยเอธิลอะซิเตท หลังจากนั้นได้นำสารที่สกัดได้ทั้งหมดมาแยกโดย HPLC เฉพาะ peak ของสารมัธยันตร์ที่เด่นชัดเพียง peak เดียวคือ peak ที่มี retention time 3.25 และนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์อีกครั้งด้วย TLC และ HPLC เปรียบเทียบกับพีเอเอชมาตรฐานซึ่งได้แก่ 9-ฟลูออรีนอล และ 9-ฟลูออรีโนน ซึ่งมีรายงานไว้ว่าเป็นสารมัธยันตร์ที่พบในวิถีการย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา (Garon และคณะ, 2000; Cerniglia และ Sutherland, 2001) ผลจากการวิเคราะห์ด้วย TLC แสดงแถบของสารมัธยันตร์ที่สกัดได้เพียงแถบเดียวโดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.71 ดังแสดงในรูปที่ 4.25(4) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานได้แก่ 9-ฟลูออรีโนน และ 9-ฟลูออรีนอล พบว่าสารมัธยันตร์มีค่า Rf ที่เท่ากับสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอล ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.71 เช่นกันดังแสดงในรูปที่ 4.25(2) และเมื่อนำสารมัธยันตร์ไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานดังกล่าวด้วย HPLC ก็พบว่าสารมัธยันตร์ที่สกัดได้ให้ peak หลักเพียง peak เดียวที่ retention time เท่ากับ 3.25 ดังแสดงในรูปที่ 4.26(ก) ซึ่งมีค่า retention time เท่ากับ 9-ฟลูออรีนอล ดังแสดงในรูปที่ 4.26(ข) จากผลการทดลองนี้เสนอแนะได้ว่าสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา T20 น่าจะเป็น 9-ฟลูออรีนอล



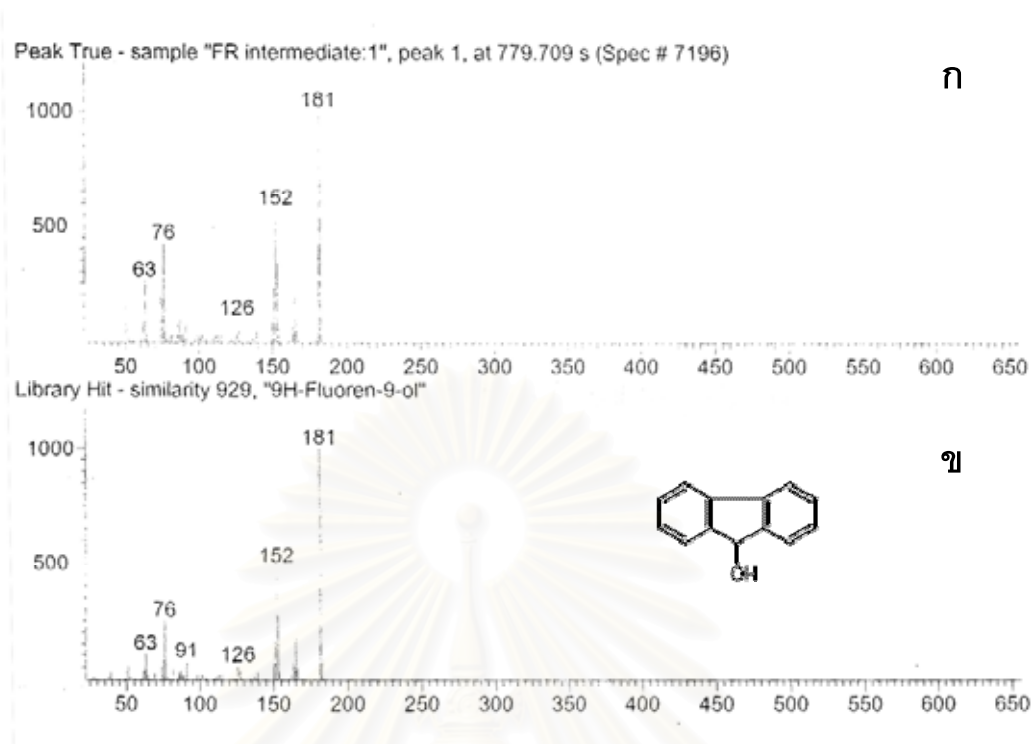
ระบบตัวทำละลาย : โทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น
: 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)

รูปที่ 4.25 TLC โครมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยสลายฟลูออรีน โดยรา T20 (4) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (1) สารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอล (2) และสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีโนน (3)



รูปที่ 4.26 HPLC โคโรมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์และ retention time ของสารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยวา T20 (ก) เทียบกับสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอล (ข)

เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์โดย TLC และ HPLC จึงได้วิเคราะห์สารมัธยันตร์เพิ่มเติมด้วยวิธี GC-MS เพื่อวิเคราะห์ลักษณะการแตกตัวและน้ำหนักโมเลกุลที่เกิดขึ้นของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยวา T20 และจากผลการทดลองพบว่าสารมัธยันตร์ที่ได้ดังรูปที่ 4.27 (ก) มีการแตกตัวที่เหมือนกับสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอล ดังแสดงในรูปที่ 4.27 (ข) โดยมีค่า m/z เท่ากับ 63 76 91 126 152 และ 181

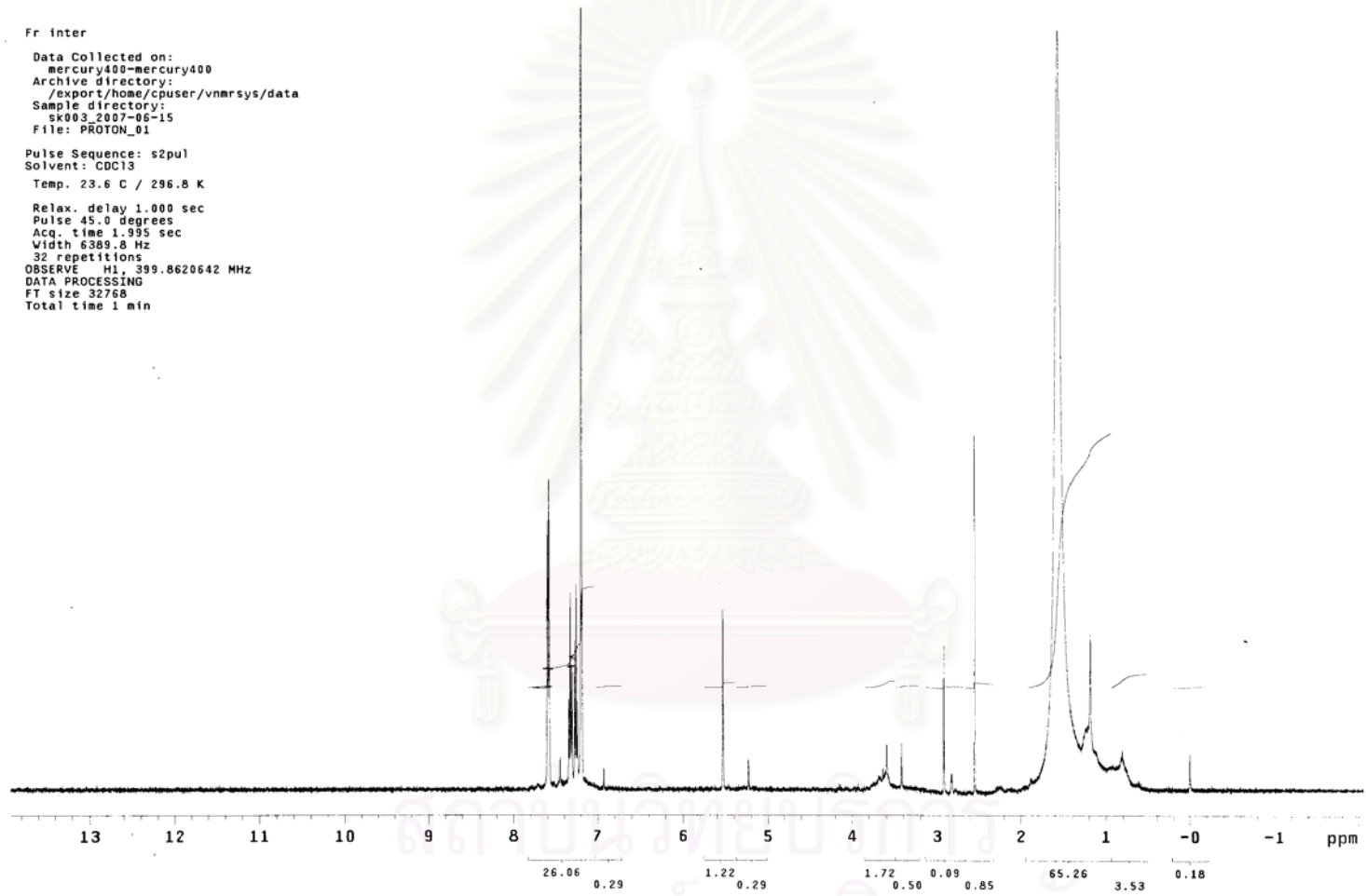


รูปที่ 4.27 GC-MS โครมาโตแกรมแสดงการแตกตัวของสารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา T20 (ก) เทียบกับสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอล (ข)

นอกจากนี้ในลำดับต่อมาได้ใช้นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy) วิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลของสารมัธยันตร์โดยการเกิดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงคลื่นวิทยุกับนิวเคลียสที่เกาะอยู่ที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุลขณะวางอยู่ในสนามแม่เหล็ก โดยอาศัยหลักการที่ว่านิวเคลียสมีสมบัติทางสนามแม่เหล็กต่างกัน เนื่องจากมีสถานะแวดล้อมทางเคมีต่างกัน สเปกตรัมซึ่งเป็นผลของการดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่ต่างๆ ซึ่งผลจากการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 4.28 จากผลของสเปกตรัมสามารถยืนยันได้ว่าสารมัธยันตร์ที่เกิดมีโครงสร้างเป็น 9-ฟลูออรีนอล โดย peak ที่เกิดในช่วง 7-8 แสดงถึงตำแหน่งของไฮโดรเจนที่ติดอยู่กับวงอะโรมาติก ส่วน peak ที่เกิดในช่วง 5-6 แสดงถึง benzylic ไฮโดรเจนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิล เนื่องจากอยู่ในช่วงที่กว้างมากคือ 0.5-5.0 เพราะไฮโดรเจนสามารถเปลี่ยนตำแหน่งที่เกาะไปตามความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้

จากผลการวิเคราะห์สารมัธยันตร์ด้วยวิธีต่างๆ คือ TLC HPLC GC-MS และ NMR ให้ผลที่สนับสนุนกันว่าสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา T20 เป็น 9-ฟลูออรีนอล

Fr inter
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrSYS/data
Sample directory:
sk003_2007-06-15
File: PROTON_01
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Temp. 23.6 C / 296.8 K
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1, 399.8620642 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min



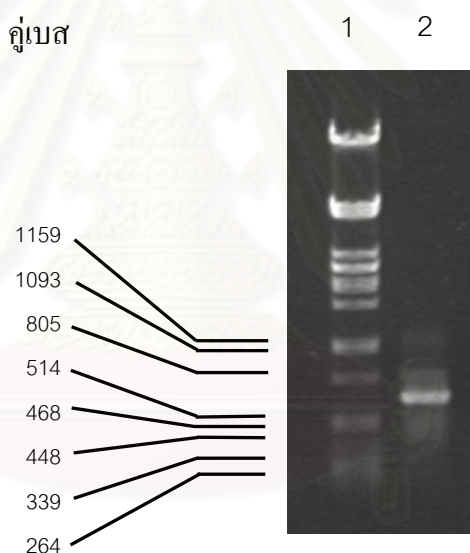
รูปที่ 4.28 ¹H-NMR สเปกตรัมของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยอะ T20

4.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา

4.8.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การทดลองนี้ได้นำรา 4 สายพันธุ์ที่ได้ทดสอบการย่อยสลายฟิเอเชกแบบผสมในอาหารเหลวจากการทดลองที่ 4.4 มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS ของราเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเหล่านี้

สำหรับสายพันธุ์ F18 ได้ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 (ตารางที่ 3.1) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.10.3 หลังดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.29 จากรูปพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ช่องที่ 2)



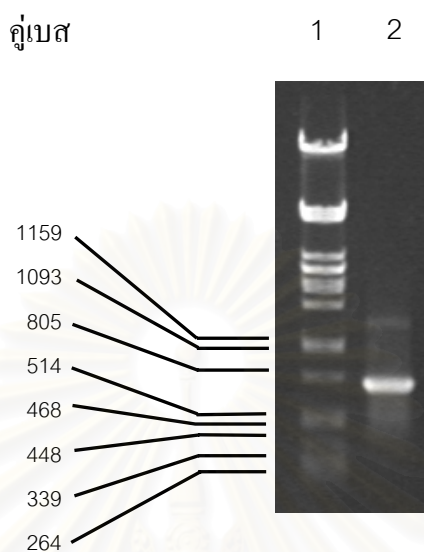
รูปที่ 4.29 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ของสายพันธุ์ F18

จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4

ช่องที่ 1 Lambda DNA/PstI Marker

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของสายพันธุ์ F18 เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4

สายพันธุ์ S5 ได้ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4 (ตารางที่ 3.1) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.30 จากรูปพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส (ช่องที่ 2)

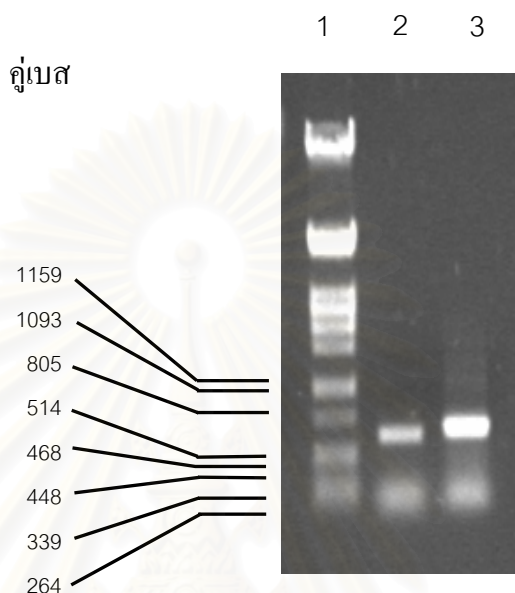


รูปที่ 4.30 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ของสายพันธุ์ S5 จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4

ช่องที่ 1 Lambda DNA/PstI Marker

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมอดีเอ็นเอของสายพันธุ์ S5 เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4

สายพันธุ์ T8 ได้ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 และคู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4 (ตารางที่ 3.1) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.31 จากรูปพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส จากคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 (ช่องที่ 2) และประมาณ 800 คู่เบสจากคู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4 (ช่องที่ 3)



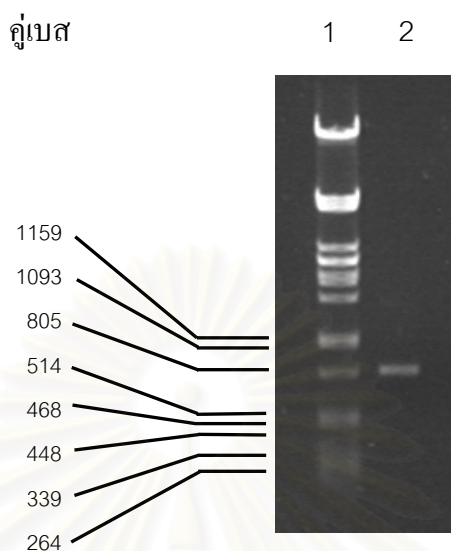
รูปที่ 4.31 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ของสายพันธุ์ T8 จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 และคู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4

ช่องที่ 1 Lambda DNA/PstI Marker

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T8 เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T8 เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4

สายพันธุ์ T20 ได้ใช้ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4 (ตารางที่ 3.1) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.32 จากรูปพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส (ช่องที่ 2)



รูปที่ 4.32 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ของสายพันธุ์ T20 จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์ส เมื่อใช้ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4

ช่องที่ 1 Lambda DNA/PstI Marker

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T20 เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4

4.8.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ F18 (ภาคผนวก ค1) จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BlastN แสดงดังรูปที่ 4.33 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวของรา F18 มีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์กับ *Curvularia affinis* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF071335)

>gb|AF071335.1|AF071335 *Curvularia affinis* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=527, Score = 951 bits (1054), Expect = 0.0

Identities = 527/527 (100%), Gaps = 0/527 (0%)

```

Query 26  AGGGATCATTACACAATAAACATATGAAGGCTGCACCGCCAACAGGCGGCAAGGCTGGAG 85
          |||
Sbjct 1   AGGGATCATTACACAATAAACATATGAAGGCTGCACCGCCAACAGGCGGCAAGGCTGGAG 60

Query 86  TATTTTATTACCCTTGTCTTTTGCAGCACTTGTGTTTCTGGGCGGGTTCGCCCAGCCTCC 145
          |||
Sbjct 61  TATTTTATTACCCTTGTCTTTTGCAGCACTTGTGTTTCTGGGCGGGTTCGCCCAGCCTCC 120

Query 146  AGGACCACATGATAAACCTTTTTTATGCAAGTTCGCAATCAGCGTCAGTACAACAAATGTAA 205
          |||
Sbjct 121  AGGACCACATGATAAACCTTTTTTATGCAAGTTCGCAATCAGCGTCAGTACAACAAATGTAA 180

Query 206  ATCATTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA 265
          |||
Sbjct 181  ATCATTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA 240

Query 266  AATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT 325
          |||
Sbjct 241  AATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT 300

Query 326  TGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTCAAGCTT 385
          |||
Sbjct 301  TGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTCAAGCTT 360

Query 386  TGCTTGGTGTGGGCGTTTTTTGTCTTTGGTTTTGTCCAAAGACTCGCCTTAAAACGATT 445
          |||
Sbjct 361  TGCTTGGTGTGGGCGTTTTTTGTCTTTGGTTTTGTCCAAAGACTCGCCTTAAAACGATT 420

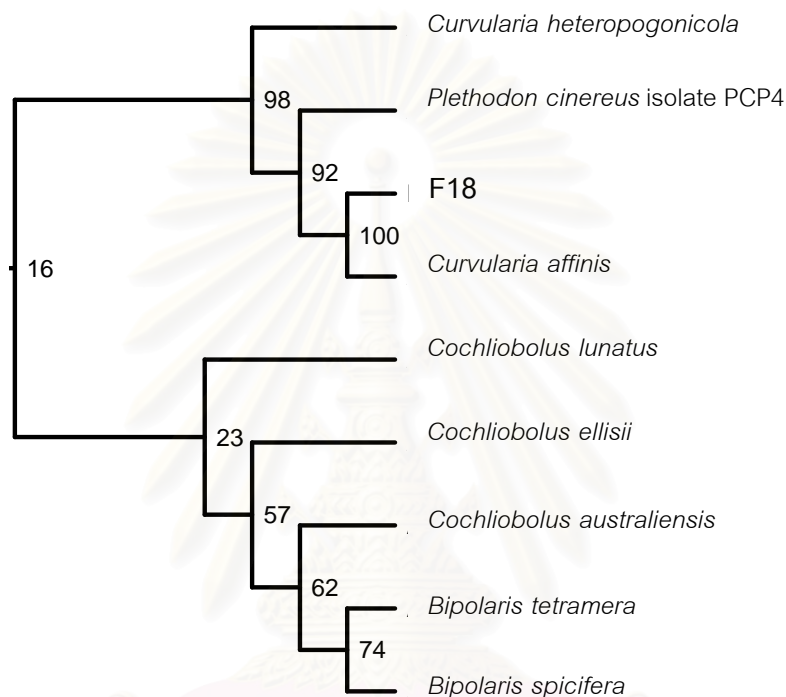
Query 446  GGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGAGCGCAGCACATTTTTCGCTTGCAATCAGCAAAAAGA 505
          |||
Sbjct 421  GGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGAGCGCAGCACATTTTTCGCTTGCAATCAGCAAAAAGA 480

Query 506  GGACGGCACTCCATCAAGACTCTATATCACTTTTGACCTCGGATCAG 552
          |||
Sbjct 481  GGACGGCACTCCATCAAGACTCTATATCACTTTTGACCTCGGATCAG 527

```

รูปที่ 4.33 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ ITS จากคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ของราสายพันธุ์ F18 กับ *Curvularia affinis* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF071335)

และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ F18 มาสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราที่สุ่มเลือกมา โดยใช้โปรแกรม PHYLIP เวอร์ชัน 3572c (SEQBOOT, NEIGHBOR และ CONSENSE) ได้ผลการสร้าง phylogenetic tree ดังแสดงในรูปที่ 4.34 ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ F18 มีความเหมือนกับรา *Curvularia affinis* ที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเชื่อมั่นที่ 100 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าราสายพันธุ์ F18 น่าจะเป็น *Curvularia affinis*



รูปที่ 4.34 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ F18

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ T20 (ภาคผนวก ค2) จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4 มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BlastN แสดงดังรูปที่ 4.35 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวของรา T20 มีความเหมือน 90 เปอร์เซ็นต์กับ *Phanerochaete sordida* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AB210078)

>[dbj|AB210078.1](#) | *Phanerochaete sordida* genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, 25S ribosomal RNA, partial and complete sequence, strain:TMIC34892

Length=756, Score = 996 bits (1104), Expect = 0.0

Identities = 677/748 (90%), Gaps = 23/748 (3%)

```

Query 18  CTGCGGA-GGATCATTAAACGAGTTAATTGAACGGGTTGTTGCTGGTATCATTCTATCAAA 76
          |||||
Sbjct 23  CTGCGGAAGGATCATTAAACGAGT-AACTGAACGGGTTGTAGCTGGCCTC-----TCG-- 73

Query 77  GGGTGTACATGTGCACGCCTGGCTCATCCACTCTTCAACCTCTGTGCACTTATTGTAGG 136
          |||||
Sbjct 74  GGG-----CATGTGCACACCTGGCTCATCCACTCTTCAACCTCTGTGCACTTGTGTAGG 128

Query 137 CTGGTGGAAAGGGTAAGCTTTCGGGCTTACTTGGAAGCCTTCCTATGTTTTACTACAAACG 196
          |||||
Sbjct 129 TCGGCAGAAGGGCGAGTCTAACAGCTCGCTTGGAAGCCTTCCTATGTTTTACTACAAACG 188

Query 197 CTTAGTTTAAGAATGTAATCTCTGCGTATAACGCATCTATATAACAACCTTCAGCAACGG 256
          |||||
Sbjct 189 CTTAGTTTAAGAATGTAACCT-TGCGTATAACGCATCTTATAACAACCTTCAGCAACGG 247

Query 257 ATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC 316
          |||||
Sbjct 248 ATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC 307

Query 317 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCCTGGTATTCCGGGGAG 376
          |||||
Sbjct 308 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCCTGGTATTCCGGGGAG 367

Query 377 CATGCCTGTTTGAGTGTGATGGTATCCTCAACCTTCATAACTTTTGTATCGAAGGCTTG 436
          |||||
Sbjct 368 CATGCCTGTTTGAGTGTGATGGTATTCTCATCCTTCATAACTTTTGTATCGAAGGCTTG 427

Query 437 GACTTGGAGGCTTGCTGGCTCTTCATTGAGTCGGCTCCTCTGAAATATATTAGCGTGA 496
          |||||
Sbjct 428 GACTTGGAGG-TCGTGCTGGTTTCCTCGTGAATCGGCTCCTCTTAAATGTATTAGCGTGA 486

Query 497 GTGTAACGGATCGCTTCGGTGTGATAATTATCTGCGCCGTGGTTCGTGAAGTAACATAAGC 556
          |||||
Sbjct 487 GTGTAACGGATCGCTTCGGTGTGATAATTATCTGCGCCGTGGTTCGTGAAGTAACATAAGC 546

Query 557 TTGCGCTTCTAATCGTCCTTCAGTTGGACAA-TAACCTTTTGACATCTGACCTCAAATCA 615
          |||||
Sbjct 547 TTGCGCTTCTAACCCTCCTTAAGTTGGACAANTTAC--TTTGACATCTGACCTCAAATCA 604

Query 616 GGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACCAAGG 675
          |||||
Sbjct 605 GGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACCAAGG 664

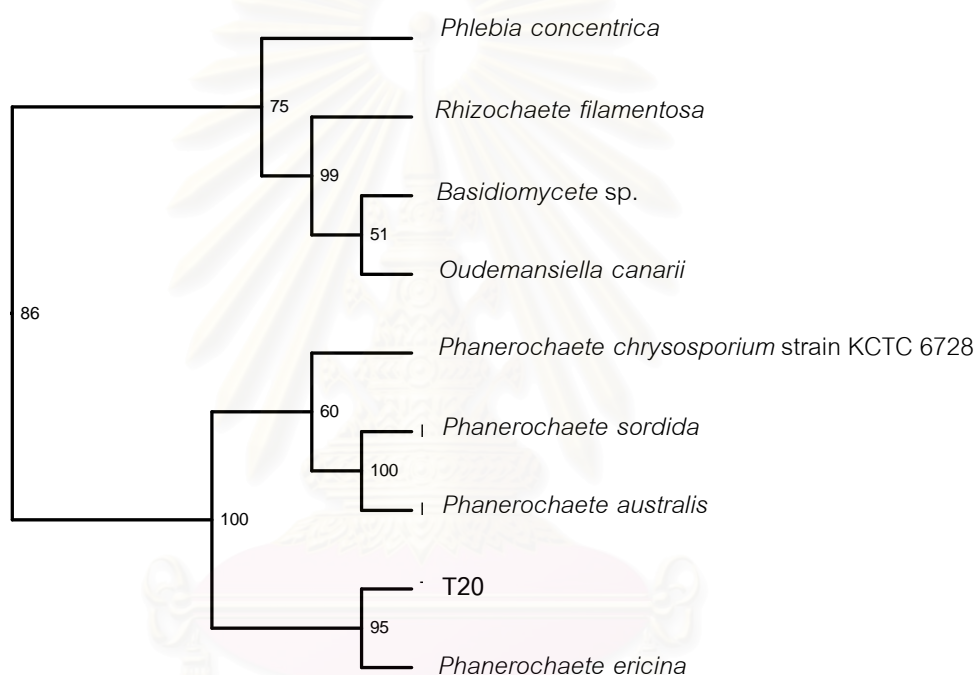
Query 676 ATTCCCTAGTTACTGCCATTGAAGCGGAAAAACCCCAAATTTAAAAATCTGGCCAGTCAT 735
          |||||
Sbjct 665 ATTCCCTAGTAACTGCGAGTGAACCGGAAAAGCTCAAATTTAAAAATCTGG-CAG-CCT 722

Query 736 TGGCTGACCCAGTTGATACTCTGGAAAA 763
          |||||
Sbjct 723 TGGCTGTCCGAGTTG-TAATCTGGAGAA 749

```

รูปที่ 4.35 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ ITS จากคู่มือ ITS1-F กับ ITS4 ของราสายพันธุ์ T20 กับ *Phanerochaete sordida* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AB210078)

และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ T20 มาสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราที่สุ่มเลือกมา โดยใช้โปรแกรม PHYLIP เวอร์ชัน 3572c (SEQBOOT, NEIGHBOR และ CONSENSE) ได้ผลการสร้าง phylogenetic tree ดังแสดงในรูปที่ 4.36 ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ T20 มีความเหมือนกับรา *Phanerochaete ericina* ที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถคาดเดาได้ว่า T20 มีสายวิวัฒนาการเช่นเดียวกับเชื้อในสกุล *Phanerochaete* sp. ซึ่งจัดอยู่ในราไวท์รอกที่สามารถสร้างเอนไซม์ ligninolytic ได้



รูปที่ 4.36 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ T20

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ S5 (ภาคผนวก ค3) จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BlastN แสดงดังรูปที่ 4.37 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวของรา S5 มีความเหมือน 91 เปอร์เซ็นต์กับ *Lentinus tiginus* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF516518)

>[gb|AF516518.1](#) *Lentinus tigrinus* LE(BIN)0861 SBI 5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1021, Score = 924 bits (1024), Expect = 0.0

Identities = 614/673 (91%), Gaps = 34/673 (5%)

```

Query 19  GGGAGGATCATTATCGAGTTTTGAAACGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACG 78
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 325  GGAAGGATCATTATCGAGTTTTGAAACGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACG 384

Query 79  CCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTTCAGGAGCTTCGAAAGCGA 138
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 385  CCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTTCAGGAGCTTC----- 436

Query 139 GGAAGGGGCCCTTCACGGGCTTTTTTCTT--GCCT-AGTTGTTACTGGGCCTACGTTTCAC 195
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 437  --AAGGG-----CG-----TTTCTTACGCCGGAGTTGTGACTGGGCCTACGTTT-AC 480

Query 196 TACAAACACTTATAAAGTATCAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACCTT 255
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Query 256 TCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 315
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 540  TCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA 599

Query 316 TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTTCGCTCCTTGGA 375
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 600  TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTTCGCTCCTTGGA 659

Query 376 TTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGGAGTGCATGAAATCTCAACCTAACGGGTTCTTAACGG 435
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 660  TTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGGAGTGCATGAAATCTCAACCTAACGGGTTCTTAACGG 719

Query 436 GACTTGCCTTAGGCTTGGACTTGGAGGTTCTTGTGCGGCTTGCCTTCAATGTCAACTCGGCT 495
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 720  GACTTGC-ITAGGCTTGGACTTGGAGGCTCTTGTGCGGCTTGCCTT-TCGTCAAGTCGACT 776

Query 496 CCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCTGTGCGGAT-CGGCTCACGGTGTGATAAATTGTCT 554
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 777  CCTCTCAAATGCATTAGCTTGGTT-CTTGTGCGGATCCGGCTCACGGTGTGATAAATTGTCT 835

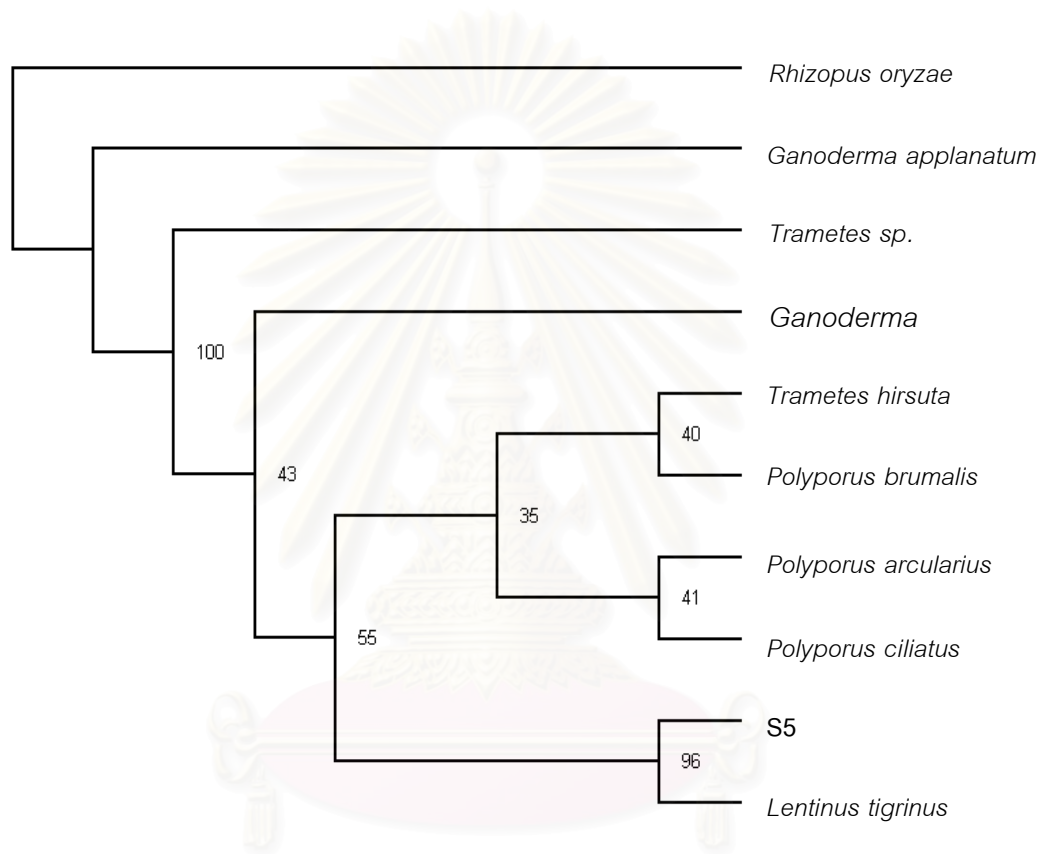
Query 555 ACGCCGCGACCGTTGAAGCGTTTTTATAGG-CCAGCTTCTAGTCGTCTCTTTACGAGACA 613
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 836  ACGCCGCGACCGTTGAAGCGTTTTAATGGGACTAGCTTCTAACCGTCTCCTCGCGAGACA 895

Query 614 ATAATCATCGAACTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA 673
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 896  GCATTCATCGAACTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA 955

Query 674 ATAAGCGGAGGAA 686
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 956  ATAAGCGGAGGAA 968
  
```

รูปที่ 4.37 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ ITS จากคู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4 ของสายพันธุ์ S5 กับ *Lentinus tigrinus* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF516518)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ S5 มาสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราที่สุ่มเลือกมาโดยใช้โปรแกรม PHYLIP เวอร์ชัน 3572c (SEQBOOT, NEIGHBOR และ CONSENSE) ได้ผลการสร้าง phylogenetic tree ดังแสดงในรูปที่ 4.38 ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ S5 มีความเหมือนกับราในสกุล *Lentinus* มากที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 91 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.38 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ S5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ T8 (ภาคผนวก ค4) จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BlastN แสดงดังรูปที่ 4.39 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวของ รา T8 มีความเหมือน 98 เปอร์เซ็นต์กับ *Phanerochaete sordida* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF475148)

>[gb|AF475148.1](#)| *Phanerochaete sordida* strain KCTC 6713 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=644, Score = 1077 bits (1194), Expect = 0.0

Identities = 621/632 (98%), Gaps = 5/632 (0%)

```

Query 22  ACATGCGGAAGGA-CATTAACGAGTAACTGAACAGGTTGTAGCTGGCCTCTCGGGGCATG 80
      |||
Sbjct 14  ACCTGCGGAAGGATCATTAAACGAGTAACTGAACAGGTTGTAGCTGGCCTCTCGGGGCATG 73

Query 81  TGCACACCTGGCTCATCCACTCTTCAACCTCTGTGCACTTATTGTAGTTCGG--CAGAAG 138
      |||
Sbjct 74  TGCACGCCTGGCTCATCCACTCTTCAACCACTGTGCACTTATTGTAGTTCGGTTCAGAAG 133

Query 139  GGCGAGTCTAACAGCTCGCTCGGAAG-CCTTCCTATGTTTTATTACAAACGCTTCAGTTT 197
      |||
Sbjct 134  GGCGAGTGTAACAGCTCGCTCGGAAGGCCTTCCTATGTTTTATTACAAACGCTTCAGTTT 193

Query 198  AAGAATGTAAACCTGCGTATAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGCC 257
      |||
Sbjct 194  AAGAATGTAAACCTGCGTATAACGCATCTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGCC 253

Query 258  TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 317
      |||
Sbjct 254  TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT 313

Query 318  GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCCTGGTATTCGGGGAGCATGCCTGTT 377
      |||
Sbjct 314  GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCCTGGTATTCGGGGAGCATGCCTGTT 373

Query 378  TGAGTGTTCATGGTATTCTCATCCTTCATAACTTTTGTATCGAAGGCATGGACTTGGAGG 437
      |||
Sbjct 374  TGAGTGTTCATGGTATTCTCATCCTTCATAACTTTTGTATCGAAGGCATGGACTTGGAGG 433

Query 438  TCGTGCTGGTTCCTCGTTGAATCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCGTGAGTGTAACGGAT 497
      |||
Sbjct 434  TCGTGCTGGTTCCTCGTTGAATCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCGTGAGTGTAACGGAT 493

Query 498  CGCTTCGGTGTGATAATTATCTGCGCCGTGGTTCGTGAAGTAAACATAAGCTTGCCTTCTA 557
      |||
Sbjct 494  CGCTTCGGTGTGATAATTATCTGCGCCGTGGTTCGTGAAGTAAACATAAGCTTGCCTTCTA 553

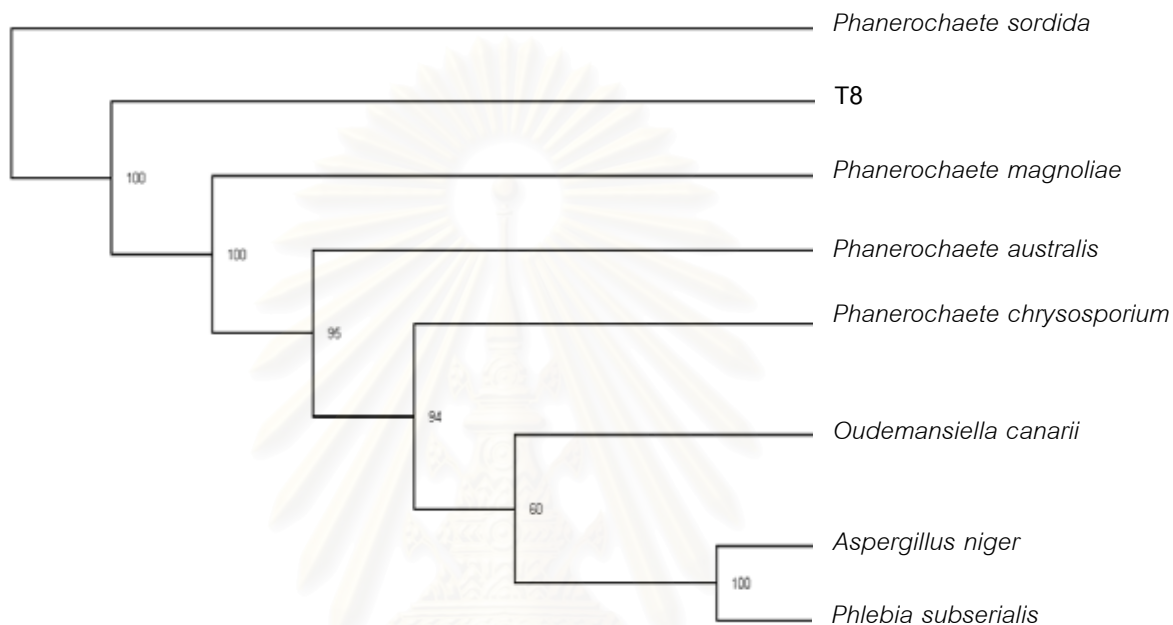
Query 558  ACCGTCCTTAAGTTGGACAACCTTACTTTGACATCTGACCTCAAATCAGGCAGGACTACCC 617
      |||
Sbjct 554  ACCGTCCTTAAGCTGGACAACCTTACTTTGACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC 613

Query 618  GCTGAACTTAAGCATAATCAATAAGGCGGAGGA 649
      |||
Sbjct 614  GCTGAACTTAAGCATAATCAATAA-GCGGAGGA 644

```

รูปที่ 4.39 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ ITS จากคู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4 ของราสายพันธุ์ T8 กับ *Phanerochaete sordida* (หมายเลขเข้าถึงของ GenBank AF475148)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ T8 มาสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราที่สุ่มเลือกมาโดยใช้โปรแกรม PHYLIP เวอร์ชัน 3572c (SEQBOOT, NEIGHBOR และ CONSENSE) ได้ผลการสร้าง phylogenetic tree ดังแสดงในรูปที่ 4.38 ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ T8 มีความเหมือนกับราในสกุล *Phanerochaete* sp. มากที่สุดโดยมีค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.40 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ T8

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสายพันธุ์ของราที่สามารถย่อยสลายพีเอเอชแบบผสมได้ โดยในขั้นแรกได้คัดแยกจากธรรมชาติ แล้วนำไปทดสอบการเจริญได้บนอาหารแข็งที่ผสมสีซึ่งมีโครงสร้างคล้ายพีเอเอช และอาหารแข็งที่มีพีเอเอชแบบผสม 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนทรีน ฟลูออเรนธิน และไพรีนชนิดละ 25 ppm เชื้อที่ผ่านการทดสอบในขั้นต้นได้นำไปทดสอบการย่อยสลายพีเอเอชในอาหารเหลวที่มีพีเอเอชแบบผสม 4 ชนิดเช่นกัน และจากนั้นนำไปทดสอบการย่อยสลายพีเอเอชแบบแยกเดี่ยวเพื่อใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายของราโดยใช้ TLC HPLC GC-MS และ ¹H-NMR นอกจากนี้มีการทดสอบผลของปริมาณสายใยราต่อการลดลงของพีเอเอช และทดสอบปริมาณสูงสุดที่ราสามารถทนได้ รวมทั้งได้พิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่ใช้ในการทดสอบด้วย

ในขั้นแรกซึ่งเป็นการคัดแยกราที่น่าจะมีความสามารถในการย่อยสลายพีเอเอช โดยอาศัยหลักการที่ว่าพีเอเอชมีโครงสร้างโมเลกุลที่คล้ายคลึงกับลิกนิน และราที่สามารถสลายลิกนินได้ก็น่าจะสลายพีเอเอชได้เช่นกัน ในการพิจารณาเชื้อราที่ต้องการนำมาทดลองในเบื้องต้นใช้การพิจารณาจากการสังเกตลักษณะของไม้ที่มีรานั้นๆ อยู่ต้องมีลักษณะเปราะ เบา และเป็นสีขาว เนื่องจากสภาพดังกล่าวของไม้เกิดจากการที่ลิกนินถูกย่อยสลายไป ซึ่งในการทดลองนี้สามารถคัดแยกได้ทั้งสิ้น 52 สายพันธุ์

จากนั้นราทั้ง 52 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ ได้นำมาทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนสีอาหาร (chromogenic substance) เพื่อหาสายพันธุ์ราที่มีความสามารถเปลี่ยนสีทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ guaiacol azureB และ phenol red ได้ เนื่องจากมีรายงานวิจัยว่าราที่เปลี่ยนสี guaiacol มีความสัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์แลคเคส (Xiao และคณะ, 2004) ราที่เปลี่ยนสี azureB มีความสัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส และราที่สามารถเปลี่ยนสี phenol red มีความสัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (Koker และคณะ, 2000) ซึ่งถ้าราสามารถที่จะเปลี่ยนสีได้ทั้ง 3 ชนิดก็น่าจะผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม ligninolytic นี้ได้ครบ เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่ราผลิตออกมาออกเซลล์ และไม่ค่อยมีความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรทสามารถย่อยสลายสารพิษได้หลายชนิด (Thurston, 1994) ทำให้เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความเกี่ยวข้องและสำคัญต่อการย่อยสลายพีเอเอชด้วย

ผลการทดลองพบว่าจากรา 52 สายพันธุ์นั้นมีเพียง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ F8 F16 F18 F28 และ F52 ที่สามารถเปลี่ยนสีได้ทั้ง 3 ชนิด นอกจากนั้นได้นำรา T8 และ T20 จากดวงเดือน (2548) และ S5 จากสิริรัตน์ (2548) ที่ได้ทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการเปลี่ยนสีได้ 3 ชนิดมาร่วมทดสอบการเจริญเติบโตเบื้องต้นในอาหารแข็งที่มีการผสมพีเอเอช 4 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน และ ฟีนเนทรีนซึ่งเป็นตัวแทนของพีเอเอชมวลโมเลกุลขนาดเล็ก ฟลูออแรนธิน และไพรีนซึ่งเป็นตัวแทนของพีเอเอชมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ ชนิดละ 25 ppm โดยพีเอเอชทั้ง 4 ชนิดที่นำมาทดลองนี้พบว่าการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมมาก จากผลการทดลองพบว่าทั้ง 8 สายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ในอาหารแข็ง MM ที่ผสมพีเอเอชซึ่งแสดงว่าพีเอเอชที่เติมลงไปนั้นไม่มีความเป็นพิษต่อราทั้ง 8 สายพันธุ์ดังกล่าว

เมื่อทดสอบแล้วว่าราทั้ง 8 สายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารแข็งที่ผสมพีเอเอช ต่อมาจึงนำมาทดสอบการย่อยสลายพีเอเอชแบบผสมในอาหารเหลว โดยอาหารที่ใช้เป็นอาหารในโตรเจนจำกัดที่มีการเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีงานวิจัยที่รายงานว่าภาวะเหมาะสมที่เอนไซม์ในกลุ่ม ligninolytic สามารถทำงานได้ดีจะเกิดเมื่อราเจริญอยู่ในภาวะที่มีอาหารจำกัด เช่น การขาดไนโตรเจน (Cerniglia และ Sutherland, 2001) ผลการทดลองพบว่ามีรา 4 สายพันธุ์เท่านั้นจากทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อยสลายพีเอเอชแบบผสมได้และสร้างสารมัธยันตร์ให้เห็นอย่างเด่นชัด รา 4 สายพันธุ์นี้ ได้แก่ สายพันธุ์ T8 (*Phanerochaete* sp.) T20 (*Phanerochaete* sp.) S5 (*Lentinus* sp.) และ F18 (*Curvularia affinis*) จากนั้นเมื่อทดสอบการย่อยสลายพีเอเอชแบบแยกเดี่ยวโดยราเหล่านี้พบว่า T8 และ T20 สามารถย่อยสลายพีเอเอชได้ 3 ชนิด คือ ฟลูออรีน ฟีนเนทรีน และฟลูออแรนธินแต่ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ ในขณะที่ราสายพันธุ์ S5 สามารถย่อยสลายพีเอเอชได้ 3 ชนิด คือ ฟลูออรีน ฟีนเนทรีน และไพรีนแต่ไม่สามารถย่อยสลายฟลูออแรนธินได้ ส่วน F18 ย่อยสลายพีเอเอชได้เพียงชนิดเดียวคือฟลูออรีน โดยที่ T8 ย่อยสลายฟลูออรีน ฟีนเนทรีน และฟลูออแรนธินได้ 72 95 และ 49.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ T20 ย่อยสลายฟลูออรีน ฟีนเนทรีน และฟลูออแรนธินได้ 83 87 และ 31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ S5 สามารถย่อยสลายฟลูออรีน ฟีนเนทรีน และไพรีนได้ 60 86 และ 85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ F18 ย่อยสลายฟลูออรีนได้เพียงชนิดเดียวแต่สามารถย่อยสลายได้สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองเหล่านี้เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อทดลองย่อยสลายสารผสมของพีเอเอช 4 ชนิด ชนิดละ 25 ppm ในอาหารเหลวนั้นราทุกชนิดสามารถย่อยสลายพีเอเอชและผลิตสารมัธยันตร์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง T8 ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นได้ทั้งหมดทุกชนิด (รูปที่ 4.5 (ก)) แต่เมื่อนำมาทดสอบการย่อยสลายพีเอเอชแบบแยกเดี่ยวชนิดละ 100 ppm พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายไม่ดีเท่ากับเมื่อทดสอบในพีเอเอชแบบผสมหรือไม่สามารถย่อยสลายพีเอเอชบางชนิดได้ ทั้งนี้อาจ

เกิดจากการทำงานเสริมกันของเมตาบอไลต์ของสารแต่ละชนิด และปริมาณพีเอเอชเริ่มต้นของทั้ง 2 การทดลองที่แตกต่างกัน รา T8 T20 และ S5 เป็นราในกลุ่ม ligninolytic ซึ่งจากผลการหาเอ็นและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีเอเอชโดยกิติวรณ (2549) พบว่าได้มีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่ม ligninolytic ทั้ง 3 ชนิด คือ ลิกนินเพอร์ออกซิเดส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และแลคเคส แต่ในปริมาณที่แตกต่างกันในขณะที่รา F18 จัดอยู่ในกลุ่ม non-ligninolytic และไม่มีทั้งเอ็นและแอกติวิตีของลิกนินเพอร์ออกซิเดส (กิติวรณ, 2549) จากคุณสมบัติเหล่านี้จึงมีผลทำให้รา T8 T20 และ S5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีเอเอชได้ดีกว่ารา F18

และเนื่องจากปริมาณของสายใยราที่เติมลงไปอาจมีผลต่อการลดลงของปริมาณพีเอเอช จึงได้ทดสอบแปรผันปริมาณสายใยราที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วในปริมาณ 3 กรัม 6 กรัม และ 9 กรัม เติมลงในชุดการทดลอง 3 ชุด โดยราที่เลือกนำมาใช้คือ T8 และ T20 เนื่องจากสามารถสลายพีเอเอชได้ถึง 3 ชนิดและเป็นชนิดเดียวกัน ส่วนรา S5 เจริญเติบโตช้าจึงไม่ได้เลือกมาทดสอบ ซึ่งผลการทดลองพบว่ารา T8 เมื่อมีการเพิ่มปริมาณสายใยราจะพบว่าปริมาณพีเอเอชมีแนวโน้มที่ลดลงซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าพีเอเอชมีการดูดซับได้ดีอยู่กับสายใยรา T8 ซึ่งทำให้ไม่สามารถสกัดพีเอเอชออกมาจากสายใยราได้อย่างสมบูรณ์ แต่ในรา T20 ไม่มีผลแตกต่างอย่างเด่นชัด นอกจากนี้ยังเป็นไปได้ว่าลักษณะ ชนิด และปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ของเส้นใยราแต่ละชนิดที่แตกต่างกันอาจส่งผลต่อการดูดซับและการสกัดพีเอเอชดังที่มีรายงานไว้โดย Raghukumar และคณะ (2006)

ขั้นต่อมาเป็นการหาช่วงความเข้มข้นของพีเอเอชที่ราสามารถอยู่รอดได้ ซึ่งพบว่าราทั้งสองสายพันธุ์สามารถอยู่รอดได้ถึงพีเอเอชสูงสุดคือ 500 ppm และพบว่าที่ความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละพีเอเอชของรา T8 และ T20 มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน โดยที่รา T8 มีการเจริญในพีเอเอชชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ได้ดีกว่ารา T20

เมื่อนำรา T8 และ T20 มาวิเคราะห์สารมัธยันตร์เพื่อหาวิธีการย่อยสลายของพีเอเอชซึ่งในขั้นต้นได้ทดลองกับฟลูออรีนเนื่องจากเกิดสารมัธยันตร์ที่สามารถเห็นได้ชัดเจนจากโครมาโตแกรมของ HPLC ดังรูปที่ 4.8 และ 4.13 โดยรา T8 ใช้เวลาในการย่อยสลายฟลูออรีนและสะสมสารมัธยันตร์นานกว่าคือประมาณ 24 วัน ในขณะที่รา T20 ใช้เวลาแค่ 3 วันก็พบ peak ของสารมัธยันตร์ที่เด่นชัดและมีค่า retention time ที่เท่ากับที่พบในรา T8 จึงได้เลือกรา T20 ไปเลี้ยงและเก็บสารมัธยันตร์ไปวิเคราะห์ ซึ่งจากผลของ TLC HPLC GC-MS และ ¹H-NMR ให้ผลที่สนับสนุนกันว่าสาร 9-ฟลูออรีนอลเป็นสารมัธยันตร์หนึ่งที่ได้จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา T20 ซึ่งเป็นสารที่พบในวิธีการย่อยสลายของราในกลุ่ม ligninolytic และ non-ligninolytic โดยสาร

มัยยัณตร์ 9-ฟลูออรีนอลเป็นสารมัยยัณตร์แรกที่ถูกพบอยู่ในวิถีการย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา (Cerniglia และ Sutherland, 2001) นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Garon และคณะ (2000) ที่ทดสอบการย่อยฟลูออรีนโดยราในคลาส Ascomycetes Basidiomycetes และ Deuteromycetes ทั้งหมดรวม 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus terreus* *Bjerkandera adusta* *Ceriporiopsis subvermispota* *Colletotrichum dematiu* *Cryphonectria parasitica* *Cunninghamella blakesleeana* *C. echinulata* *Drechslera spicifera* *Embellisia annulata* *Rhizoctonia solani* และ *Sporormiella australis* พบสารมัยยัณตร์ 2 ชนิด ชนิดแรกที่เกิดขึ้นคือ 9-ฟลูออรีนอล และชนิดที่สองที่เกิดขึ้นคือ 9-ฟลูออรีโนน โดยสาร 9-ฟลูออรีนอล และ 9-ฟลูออรีโนนเป็นสารมัยยัณตร์ที่เกิดจากการ hydroxylated ของฟลูออรีนดังรูปที่ 2.7 และ 2.17 ทั้งนี้มีรายงานว่าสารทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษน้อยกว่าฟลูออรีนด้วย (Garon และคณะ, 2000)

จากผลการทดลองพบว่ารา T20 (*Phanerochaete* sp.) มีประสิทธิภาพดีเนื่องจากสามารถบำบัดพีเอเอชได้หลายชนิดดังแสดงในรูปที่ 4.6 และจากการทดสอบสารมัยยัณตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนก็พบว่าสามารถสลายฟลูออรีนได้รวดเร็วโดยเพียงแค่ 3 วันก็พบสารมัยยัณตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนแล้ว และไม่เกิดสารที่มีพิษมากขึ้นกว่าสารตั้งต้น นอกจากนี้เมื่อผ่านไป 30 วัน รา T20 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้เกือบทั้งหมด และให้สารมัยยัณตร์ที่นอกเหนือจาก 9-ฟลูออรีนอล เกิดขึ้นด้วย ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น 9-ฟลูออรีโนน นอกจากนี้ในการย่อยสลายพีเอเอชแบบผสมยังเกิดสารมัยยัณตร์อีกหลายชนิดจึงต้องมีการทดสอบต่อไปว่าสารมัยยัณตร์เหล่านี้คืออะไร และมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมมากขึ้นหรือไม่ก่อนนำไปใช้ต่อไป หากความเป็นพิษของสารมัยยัณตร์ลดลงกว่าสารตั้งต้นก็น่าจะเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการบำบัดบริเวณที่ปนเปื้อนพีเอเอชหลายชนิดได้ ทั้งนี้ก็ยังคงต้องมีการศึกษาสารมัยยัณตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายพีเอเอชชนิดอื่นโดยรานี้ต่อไปด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ (2547). พีเอเอช (โพลีไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ไอเดีย สแควร์, 92 หน้า.

กิติวรรณ บุญญารักษ์ (2549). การย่อยสลายพีแนทรีนในแบบจำลองดินโดยราที่คัดแยกในประเทศไทย และยีสและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยพีแนทรีนในอาหารเหลว. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ปริญญาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดวงเดือน สุพรรณชนะบุรี (2548). การคัดแยกราที่สามารถเจริญได้บนไม้ เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพีแนทรีน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ปริญญาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สิทธิ ใจสงฆ์ (2547). การคัดแยกราไวท์รอตที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและพีแนทรีน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ปริญญาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สิริรัตน์ วิเศษคุปต์ (2548). การคัดแยกราที่มีความสามารถในการย่อยสลายพีแนทรีนจากดินปนเปื้อนน้ำมัน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ปริญญาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Abramovitch, R. A., Bangzhou, H., Abramovitch, D. A. and Jiangao, S. (1999). In situ decomposition of PAHs in soil and desorption of organic solvents using microwave energy. *Chemosphere* **39**, 81-87.
- Alcalde, M., Bulter, T. and Arnold, F. H. (2002). Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *Journal of Biomolecular Screening* **7**, 547-553.
- Atlas, R. M. and Cerniglia, C. E. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants. *Bioscience* **45**, 332-339.
- Banks, M. K., Schwab, P., Liu, B., Kulakow, P. A., Smith, J. S. and Kim, R. (2003). The effect of plants on the degradation and toxicity of petroleum contaminants in soil: a field assessment. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **78**, 75-96.
- Black, J. A., Birge, W. J., Westerman, A. G. and Francis, P. C. (1983). Comparative aquatic toxicology of aromatic hydrocarbons. *Fundamental and Applied Toxicology* **3**, 353-358.
- Blanchette, R. A. and Biggs., A. R. (1992). Defense mechanisms of woody plants against fungi. pp. 458. Berlin, New York: Springer-Verlag.
- Boonchan, S., Britz, M. L. and Stanley, G. A. (2000). Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1007-1019.
- Bumpus, J. A. (1989). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 154-158.

- Capotorti, G., Digianvincenzo, P., Cesti, P., Bernardi, A. and Guglielmetti, G. (2004). Pyrene and benzo[a]pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. *Biodegradation* **15**, 79-85.
- Caruana, C. M. (1997). New processes tackle PCBs. *Chemical Engineering Progress* **93**, 11-16.
- CEPA (1994). Priority substances list assessment report. In *Polycyclic aromatic hydrocarbon*, pp. 61: Minister of Supply and Services. Canada.
- Cerniglia, C. E. and Sutherland, J. B. (2001). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. In G.M. Gadd (ed.). *Fungi in bioremediation.*, pp. 136-187. Cambridge university press. England.
- Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **4**, 331-338.
- Cerniglia, C. E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**, 324-333.
- Chiocchio, V., Venedikian, N., Martinez, A. E., Menendez, A., Ocampo, J. A. and Godeas, A. (2000). Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *International Microbiology* **3**, 173-175.
- Coates, J. D., Anderson, R. T. and Lovley, D. R. (1996A). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1099-1101.

- Coates, J. D., Anderson, R. T., Woodward, J. C. and Phillips, E. (1996B). Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum contaminated harbor sediments under sulfate-reducing and artificially imposed iron-reducing conditions. *Environmental Science and Technology* **30**, 2784-2789.
- Cottini, G. B. and Mazzone, G. B. (1939). The effects of 3,4-benzo[a]pyrene on human skin. *American Journal of Cancer* **37**, 186-195.
- Department of Chemistry, University of Maine, Orono. (2006). [Online] Available from: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood5.html> [2007, July 15].
- Edwards, N. T. (1983). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial environment-a review. *Journal of Environmental Quality* **12**, 427-441.
- Edwards, N. T. (1986). Uptake, translocation and metabolism of anthracene in bush bean *Phaseolus vulgaris*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **5**, 659-665.
- Eggen, T. and Andrzej, M. (1998). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation* **41**, 111-117.
- Eichlerova, I., Homolka, L. and Nerud, F. (2002). Decolorization of synthetic dyes by *Pleurotus ostreatus* isolates differing in ligninolytic properties. *Folia Microbiology (Praha)* **47**, 691-695.
- Eichlerova, I., Homolka, L. and Nerud, F. (2006). Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Bioresource Technology* **97**, 2153-2159.
- Eriksson, K. E. L., Blanchette, R. A. and Ander, P. (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. pp. 407: Springer-Verlag New York.

- Ferrarese, E., Andreottola, G. and Aura, I. (2007). Remediation of PAH-contaminated sediments by chemical oxidation. *Journal of Hazardous Materials*. (accepted manuscript).
- GAO/RCED-96-13 (1996). Superfund: EPA has identified limited alternatives to incineration for cleaning up PCB and dioxin contamination. (n.p.). Washington.
- 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.
- Garon, D., Krivobok, S. และ murandi, F. S. (2000). Fungal degradation of fluorene. *Chemosphere* 40, 91-97.
- Germain, A., Perron, F. and Coillie, R. V. (1993). PAHs in the environment: fate, ecotoxicity and regulations. (n.p.). Montreal, Que.
- Godsy, E. M., Warren, E. and Paganelli, V. V. (2003). The role of microbial reductive dechlorination of TCE at a phytoremediation site. *International Journal of Phytoremediation* 5, 73-88.
- Hammel, K. E. (1997). Fungal degradation of lignin. In G. Cadisch and K. E. Giller (eds.). *Driven by nature: plant litter quality and decomposition*. CAB International: 33-45.
- Han, M. J., Choi, H. T. and Song, H. G. (2004). Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *Journal of Microbiology* 42, 94-98.
- Harvey, P. J. and Thurston, C. F. (2001). The biochemistry of ligninolytic fungi. In *Fungi in bioremediation*. In G.M. Gadd (ed.). *Fungi in bioremediation.*, pp. 27-51. Cambridge university press. England.

- Hawkins, W. E., Walker, W. W., Overstreet, R. M., Lyttle, J. C. and Lyttle, T. F. (1990). Carcinogenic effects of some polycyclic aromatic hydrocarbons on the Japanese medaka and guppy in waterborne exposure. *Science of the Total Environment* **94**, 155-167.
- Hayatsu, R., Wlinans, R. E., Mcbeth, R. L., Scott, R. G., Moore, L. P. and Studier, M. H. (1979). Lignin-like polymers in coals. *Nature* **278**, 41-43.
- Heitkamp, M. A., Freeman, J. P., Miller, D. W. and Cerniglia, C. E. (1988). Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 2556-2565.
- Hose, J. E. (1985). Potential use of sea urchin embryos for identifying toxic chemicals: description of a bioassay incorporating cytologic, cytogenic and embryologic endpoints. *Journal of Applied Toxicology* **5**, 245-254.
- IARC (1999). Overall evaluations of carcinogenicity of humans. [Online] Available from: <http://193.51.164.11/momoeval/erthall.html>. [2007, July 15].
- ITII (1982). *Toxic and hazardous industrial chemicals safety manual.*, p. 46. The International Technical Information Institute. Tokyo.
- ITRC (2005). Intersate technology regulatory council. In ITRC, ISCO Team (eds.). *Technical and Regulatory Guidance for In Situ Chemical Oxidation of Contaminated soil and Groundwater*. Washington D.C.
- Kiiskinen, L. L., Ratto, M. and Kruus, K. (2004). Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 640-646.

- Koker, T. H. d., Zhao, J., Allsop, S. F. and Janse, B. J. H. (2000). Isolation and enzymic characteriation of South Africa white-rot fungi. *Mycological Research* 104, 820-824.
- LeBlane, G. A. (1980). Acute toxicity of priority pollutants to water flea (*Daphnia magna*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 24, 684-691.
- Martinez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M. J., Gutierrez, A. and del Rio, J. C. (2005). Biodegradation of lignocellulosic: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8, 195-204.
- Meckes, M. C., Tilman, J., Dress, L. and Saylor, E. (1997). Removal of PCBs from a contaminated soil using CF-systems solvent extraction process. *Journal of the Air and Waste Management Association* 47, 1119-1124.
- Moreira, M. T., Palma, C., Mielgo, I., Feijoo, G. and Lema, J. M. (2001). In vitro degradation of a polymeric dye (Poly R-478) by manganese peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering* 75, 362-368.
- Muncnerova, D. and Augustin, J. (1994). Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbon: A review. *Bioresource Technology* 48, 97-106.
- Nardella, A., Massetti, F. and Tomaciello, R. (1999). Clean up of polluted wet soils by solvent extraction. *Environmental progress* 18, 243-249.
- Narro, M. L., Cerniglia, C. E., Van, B. C. and Gibson, D. T. (1992). Metabolism of phenanthrene by the marine Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* stain PR-6. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1351-1359.

- Newman, L. A. and Reynolds, C. M. (2004). Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 225-230.
- Norramit, P., Cheevaporn, V., Itoh, N. and Tanaka, K. (2005). Characterization and carcinogenic risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the respirable fraction of airborne particles in the Bangkok metropolitan area. *Journal of Health Science* 51, 437-446.
- NRCC (1983). *Polycyclic aromatic hydrocarbon in the aquatic environment: formation, sources, fate and effects on aquatic biota*. 209 p. NRC Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality. Ottawa, Ont.
- Oanh, N. T. K., Reutergradh, L. B., Dung, N. T., Yu, M. H., Yao, W. X. and Co, H. X. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the airborne particulate matter at a location 40 km north of Bangkok, Thailand. *Atmospheric Environment* 34, 4557-4563.
- Ollikka, P., Alhonmaki, K., Leppanen, V. M., Glumoff, T., Rajjola, T. and Suominen, I. (1993). Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase lisoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4010-4016.
- Paliukhovich, I. (2005). Indoor air pollution of POPs from a lorry and bus production facility. In *Department of Science*. pp. 48. Umea university, Sweden.
- Raghukumar, C., Shailaja, M. S., Parameswaran, P. S. and Singh, S. K. (2006). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous media by the marine fungus NIOCC # 312: involvement of lignin-degrading enzymes and exopolysaccharides. *Indian Journal of Marine Sciences* 35, 373-379.

- Reader, U. and Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1, 17–20.
- Sack, U., Heinze, T. M., deck, J., Cerniglia, C. E., Martens, R., Zadrazil, F. and Fritsche, F. (1997). Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Environmental Microbiology* 63, 3919-3925.
- Shiaris, M. P. (1989). Seasonal biotransformation of naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene in superficial estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1391-1399.
- Siciliano, S. D., Germida, J. J., Banks, K. and Greer, C. W. (2003). Changes in microbial community composition and function during a polycyclic aromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 483-489.
- Silva, A., Delerue-Matos, C. and Fiuza, A. (2005). Use of solvent extraction to remediate soils contaminated with hydrocarbon. *Journal of Hazardous Materials B124*, 224-229.
- Slooff, W., Janus, J. A., Matthijsen, A. J. C. M., Montizaan, G. K. and Ros, J. P. M. (1989). *Integrated criteria document PAHs*. National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM). Bilthoven, Netherlands.
- Spehar, R. L., Poucher, S., Brooke, L. T., Hansen, D. J., Champlin, D. and Cox, D. A. (1999). Comparative toxicity of fluoranthene to freshwater and saltwater species under fluorescent and ultraviolet light. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 496-502.
- Tavlarides, L. L., Zhou, W. and Anitescu, G. (2000). Supercritical fluid technology for remediation of PCB/PAH-contaminated soils/sediments, pp. 239-255.

Department of chemical engineering and materials science, 411 Link Hall,
Syracuse University, Syracuse, NY 13244.

- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**, 19-26.
- Topping, D. C., Pal, B. C., Martin, D. H., Nelson, F. R. and Nettesheim, P. (1978). Pathologic changes induced in respiratory tract mucosa by polycyclic hydrocarbons differing carcinogenic activity. *American Journal of Pathology* **93**, 311-324.
- Warshawsky, D., Keenan, T. M., Reilman, R., Cody, T. E. and Radike, M.J. (1990). Conjugation of benzo[*a*]pyrene metabolites by the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Chemico-Biological Interactions* **73**, 93-105.
- Wattayakorn, G. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the Chao Phraya Estuary, Thailand. *Journal of Scientific Research Chulalongkorn University* **28**, 15-27.
- Xiao, Y. Z., Chen, Q., Hang, J., Shi, Y. Y., Wu, J., Hong, Y. Z. and Wang, Y. P. (2004). Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia* **96**, 26-35.
- U.S. EPA (1998). Toxicological review of naphthalene. [Online] Available from: <http://www.epa.gov/iris/> [2007, July 1].
- Ye, D., Siddigi, M. A., Maccubbin, A. E., Kumer, S. and Sikka, H. C. (1996). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environmental Science and Technology* **30**, 136-142.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ 2% Malt extract agar (MEA) ต่อลิตร

มอลท์สกัด (Malt extract)	20 กรัม
วุ้นผง (Agar)	15 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม benomyl ก่อนเทเพลท

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium (MM) ต่อลิตร

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.5 กรัม
แมงกานีสซัลเฟต (MnSO_4)	0.5 กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	0.1 กรัม
วุ้นผง (Agar)	18 กรัม
Trace element	200 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

การเตรียม Trace element

ละลาย Na_2EDTA ปริมาณ 5 กรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 หลังจากนั้นเติม FeCl_3 ZnCl_2 CuCl_2 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ H_3BO_3 และ MnCl_2 ปริมาณ 0.5 0.05 0.01 0.01 0.01 และ 1.6 กรัมตามลำดับ และปรับปริมาตรรวมให้เป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหหลวง Modified glucose peptone yeast extract (mGPY) ต่อลิตร

กลูโคส (Glucose)	10 กรัม
แบคโตเพปโตน (Bacto peptone)	3 กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	2 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 กรัม

โซเดียมทาร์เทรต (Na-tartrate)	0.4 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนจำกัด (N-limited medium) ต่อลิตร (ความเข้มข้น 100 เท่า)

กลูโคส (Glucose)	10 กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	0.1 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 กรัม
เฟอร์ริกซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.001 กรัม
แมงกานีสซัลเฟต (MnSO_4)	0.001 กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.001 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข

สารละลายและวิธีการเตรียม

1. สกัดสารละลายมาตรฐานของพีเอเอชชนิดต่างๆ 10,000 ppm

ชั่งพีเอเอช 500 มิลลิกรัมละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์จนผลึกพีเอเอชละลายหมด ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปรับความเข้มข้นเป็นปริมาณที่ต้องการก่อนนำไปใช้

2. สารละลาย Extraction buffer

Tris-HCl ความเป็นกรด-ด่าง 8.0	200 มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	250 มิลลิโมลาร์
EDTA ความเป็นกรด-ด่าง 8.0	25 มิลลิโมลาร์
SDS	5 เปอร์เซ็นต์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่าง 8.0

Tris-HCl ความเป็นกรด-ด่าง 8.0	10 มิลลิโมลาร์
EDTA ความเป็นกรด-ด่าง 8.0	1 มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0

Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1 กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl)	42 มิลลิลิตร

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนให้เข้ากัน รอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5. สารละลาย โซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 1 โมลาร์

ละลาย โซเดียมคลอไรด์ 2.9 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	20 กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนให้เข้ากัน รอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

7. สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ F18

CCATTAGGCTCGTAGTGACCTGCGGAGGGATCATTACACAATAAACATATGAA
 GGCTGCACCCGCCAACAGGCGGCAAGGCTGGAGTATTTTATTACCCTTGTCTTT
 TGCGCACTTGTGTTTCTTGGGCGGGTTCGCCCCCTCCAGGACCACATGATA
 AACCTTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTACAACAAATGTAAATCATTT
 ACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
 AATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
 CGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTT
 GTACCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTTTTGTCTTTGGTTTTGTCCA
 AAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTTGCAGCGCAGCA
 CATTTTTGCGCTTGAATCAGCAAAGAGGACGGCACTCCATCAAGACTCTAT
 ATCACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
 ATAAGCGGAGGAAA

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ T20

TTATAGCTTCGTAGTGAAGTGCAGGAGGATCATTAAACGAGTTAATTGAACGGGTT
 GTTGCTGGTATCATTCTATCAAAGGGTGTACATGTGCACGCCTGGCTCATCC
 ACTCTTCAACCTCTGTGCACTTATTGTAGGCTGGTGGAAAGGTAAGCTTTCGG
 GCTTACTTGGAAGCCTTCCTATGTTTTACTACAAACGCTTCAGTTTTAAGAATG
 TAATCTCTGCGTATAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGG
 CTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCCTGGTATTCCG
 GGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTGATGGTATCCTCAACCTTCATAACTTTTTGTT
 ATCGAAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGCTGGCTCTTCATTGAGTCGGCTCCT
 CTGAAATATATTAGCGTGAGTGTAACGGATCGCTTCGGTGTGATAATTATCTG
 CGCCGTGGTTCGTGAAGTAACATAAGCTTGCGCTTCTAATCGTCCCTCAGTTGG
 ACAATAACCTTTTTGACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACT
 TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTTAC
 TGCCATTGAAGCGGAAAAACCCCAAATTTAAAATCTGGCCAGTCATTGGCTGA
 CCCAGTTGATACTCTGGAAAAAACCTTCCCTCCCTAGAGCCAGGCACAAAGC
 TTTCCGCCCTCTTACAATCTCGATTACTAGCAAAAATCTCCTAA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ S5

AATAGTTCGTAGTGACCTGGGAGGATCATTATCGAGTTTTGAAACGGGTTGTAGCTGGCCTT
 CCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTCAGG
 AGCTTCGAAAGCGAGGAAGGGGCCTTACGGGCTTTTTTCTTGCTAGTTGTTACTGGGCCT
 ACGTTTCACTACAAACTTATAAAGTATCAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATA
 CAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
 GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCCTCCTTGG
 TATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTGCATGAAATCTCAACCTAACGGGTTCTTAACGG
 GACTTGCTTTAGGCTTGGACTTGGAGTTCTTGTCCGGCTTGCTTCAATGTCAACTCGGCTCC
 TCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTGTGCGGATCGGCTCACGGTGTGATAATTGTCTACGCC
 GCGACCGTTGAAGCGTTTTTATAGGCCAGCTTCTAGTCGTCTCTTTACGAGACAATAATCATC
 GAACTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG
 AA

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราสายพันธุ์ T8

AAGAGTGCATCAGAAGAGACATGCGGAAGGACATTAACGAGTAACTGAACAGG
 TTGTAGCTGGCCTCTCGGGCATGTGCACACCTGGCTCATCCACTCTTCAACC
 TCTGTGCACTTATTGTAGGTCGGCAGAAGGGCGAGTCTAACAGCTCGCTCGGA
 AGCCTTCCTATGTTTTATTACAAACGCTTCAGTTTAAGAATGTAACCTGCGT
 ATAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGA
 TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
 CATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCCTCCCTGGTATTCCGGGGAGCATGCCT
 GTTTGAGTGTGCATGGTATTCTCATCCTTCATAACTTTTGTATCGAAGGCATG
 GACTTGGAGGTCGTGCTGGTTCCTCGTTGAATCGGCTCCTCTTAAATGCATTA
 GCGTGAGTGTAACGGATCGCTTCGGTGTGATAATTATCTGCGCCGTGGTCTGTG
 AAGTAACATAAGCTTGGCCTTCTAACCGTCTTAAAGTTGGACAACCTTACTTTG
 ACATCTGACCTCAAATCAGGCAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
 AGGCGGAGGAA

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกนกพรรณ จักรเพชร เกิดเมื่อวันที่ 24 พฤษภาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปี 2546 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตร์ สาขา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย