บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างราจากแหล่งต่าง ๆ

4.1.1 ราในดิน

ตัวอย่างดินที่ได้เก็บเพื่อนำมาคัดแยกราจากพื้นที่ป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก และจากดินที่มีประวัติการใช้สารกำจัดแมลงเอ็นโดซัลแฟนในพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดปทุมธานี และนนทบุรี มีทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ดินป่าไผ่ อุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก

ตัวอย่างที่ 2 ดินป่าสน อุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก

ตัวอย่างที่ 3 ดินสวนคะน้า อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี

ตัวอย่างที่ 4 ดินสวนกวางตุ้ง อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี

ตัวอย่างที่ 5 ดินเลนนาข้าว อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี

4.1.2 ราที่ขึ้นบนซากพืช

ตัวอย่างกิ่งไม้ผุ และเห็ดที่ขึ้นบนเนื้อไม้ ที่ได้เก็บมาจากพื้นที่ป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ มีจำนวน 8 ตัวอย่าง และจากอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก มีจำนวน 5 ตัวอย่าง

4.1.3 ราเอนโดไฟต์

ตัวอย่างใบพืชจากป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก และจากพืชที่มีประวัติการใช้สารกำจัดแมลงเอ็นโดซัลแฟน ในพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดปทุมธานี และนนทบุรี สามารถจำแนกตามชนิดที่เก็บได้เป็น 6 ตัวอย่าง ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 พลวง อุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก

ตัวอย่างที่ 2 กล้วยป่า อุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก

ตัวอย่างที่ 3 ไผ่ อุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก

ตัวอย่างที่ 4 คะน้า สวนคะน้า อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี

ตัวอย่างที่ 5 กวางตุ้ง สวนกวางตุ้ง อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี

ตัวอย่างที่ 6 ข้าว นาข้าว อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี

4.2 การแยกเส้นใยราจากตัวอย่าง

4.2.1 การแยกราในดิน

จากตัวอย่างดินที่เก็บได้ทั้ง 5 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกราออกมาเป็นไอโซเลตที่บริสุทธิ์ได้ 27 ไอโซเลต โดยมีลักษณะ และอัตราการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะ และอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ในเวลา 7 วัน

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

ตารางที่ 4.1 ลักษณะ และอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ในเวลา 7 วัน (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บ	รหัสราที่แยกได้	ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ
3	สวนคะน้า อ. สามโคก จ. ปทุมธานี	S11	เส้นใยละเอียดมาก ฟู มีสีเหลืองอ่อน	+ +
		S12	เส้นใยหนาหยาบ สีขาว ขอบโคโลนีเจริญแตกแขนง	+ +
		S13	เส้นใยหนา เป็นวงสีขาวสลับม่วงอ่อน	+ +
		S14	เส้นใยฟู เป็นวงสีขาวสลับเหลือง	+ +
		S15	เส้นใยสีขาว ฟูปานกลาง ขึ้นเป็นวง	+ + +
		S16	เส้นใยสีเหลืองอ่อน ละเอียด ฟูปานกลาง และขึ้นเป็นวง	+ + +
4	สวนกวางตุ้ง อ. สามโคก จ. ปทุมธานี	S17	เส้นใยฟู ค่อนข้างหยาบ สีม่วงอมชมพู	+ + +
		S18	เส้นใยฟู ละเอียดมาก จากด้านในเป็นสีเหลือง ขาว และส้ม	+
		S19	เส้นใยหยาบ ฟู ขึ้นเป็นวงสีขาวสลับเทา	+ +
		S20	เส้นใยหยาบ มีสีขาว ยกเว้นด้านในสุดเป็นสีเขียวเข้ม	+ +
		S21	เส้นใยละเอียด ฟู สีขาว ด้านในสีเขียวเข้ม	+ +
		S22	เส้นใยเนื้อหยาบ หนาแน่น ไม่ฟู มีสีขาว	+ + +
		S23	เส้นใยเนื้อหยาบมาก ขึ้นแบบแตกแขนงเป็นวงสีขาว	+ + +

ตารางที่ 4.1 ลักษณะ และอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ในเวลา 7 วัน (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บ	รหัสราที่แยกได้	ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ
5	นาข้าว อ. บางบัวทอง จ. นนทบุรี	S24	เส้นใยเนื้อหยาบมาก ขึ้นแตกแขนงเป็นวงสีเหลืองสลับม่วง	+ +
		S25	เส้นใยเนื้อหยาบ สีขาว ขึ้นเป็นวง บางวงเป็นสีเทาเข้ม	+ + +
		S26	เส้นใยเนื้อหยาบสลับฟู สีขาว มีสีเทาขึ้นบางส่วน	+ + +
		S27	เส้นใยหยาบ ฟู สีขาว ขึ้นเป็นวง	+ + +

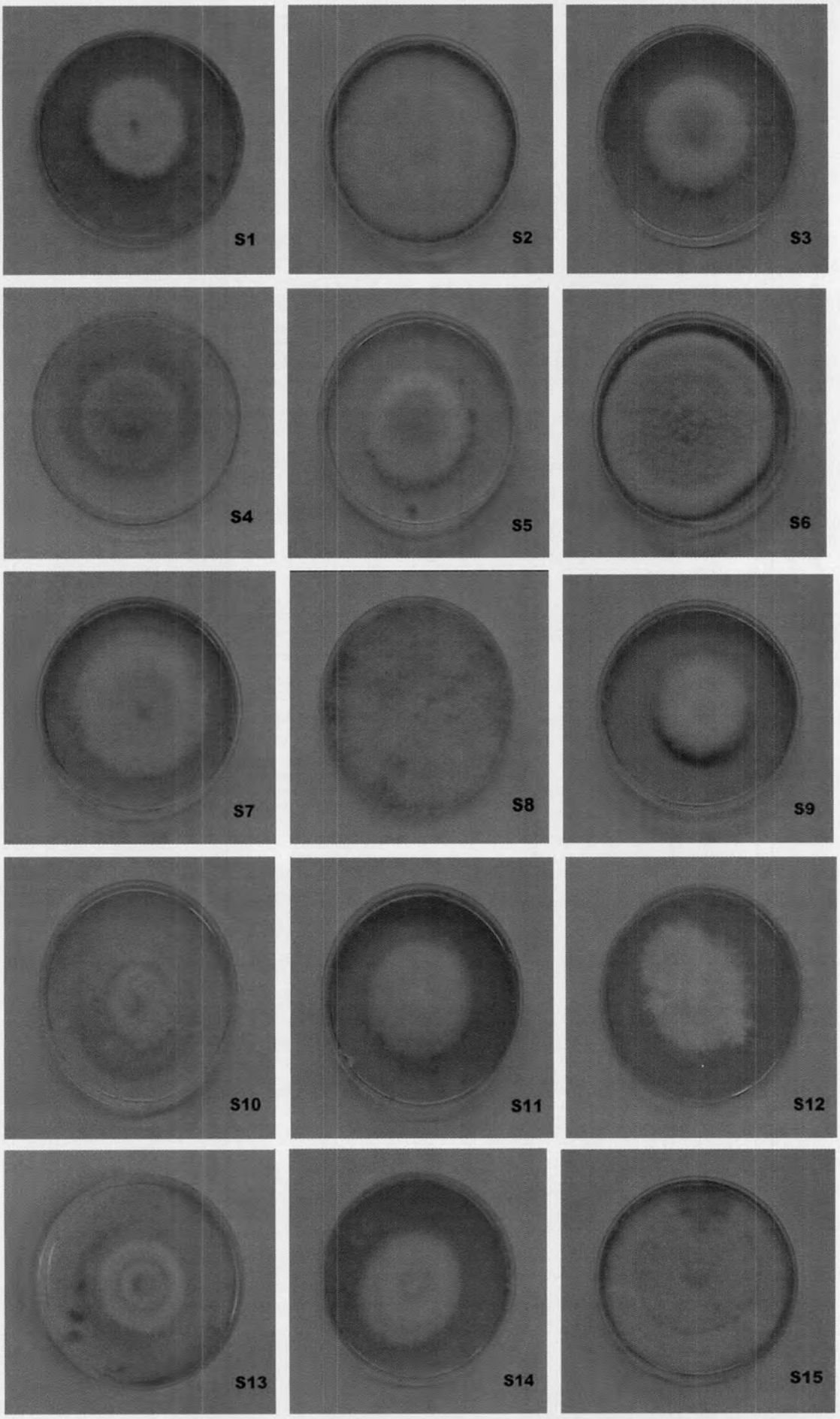
หมายเหตุ

อัตราการเจริญ

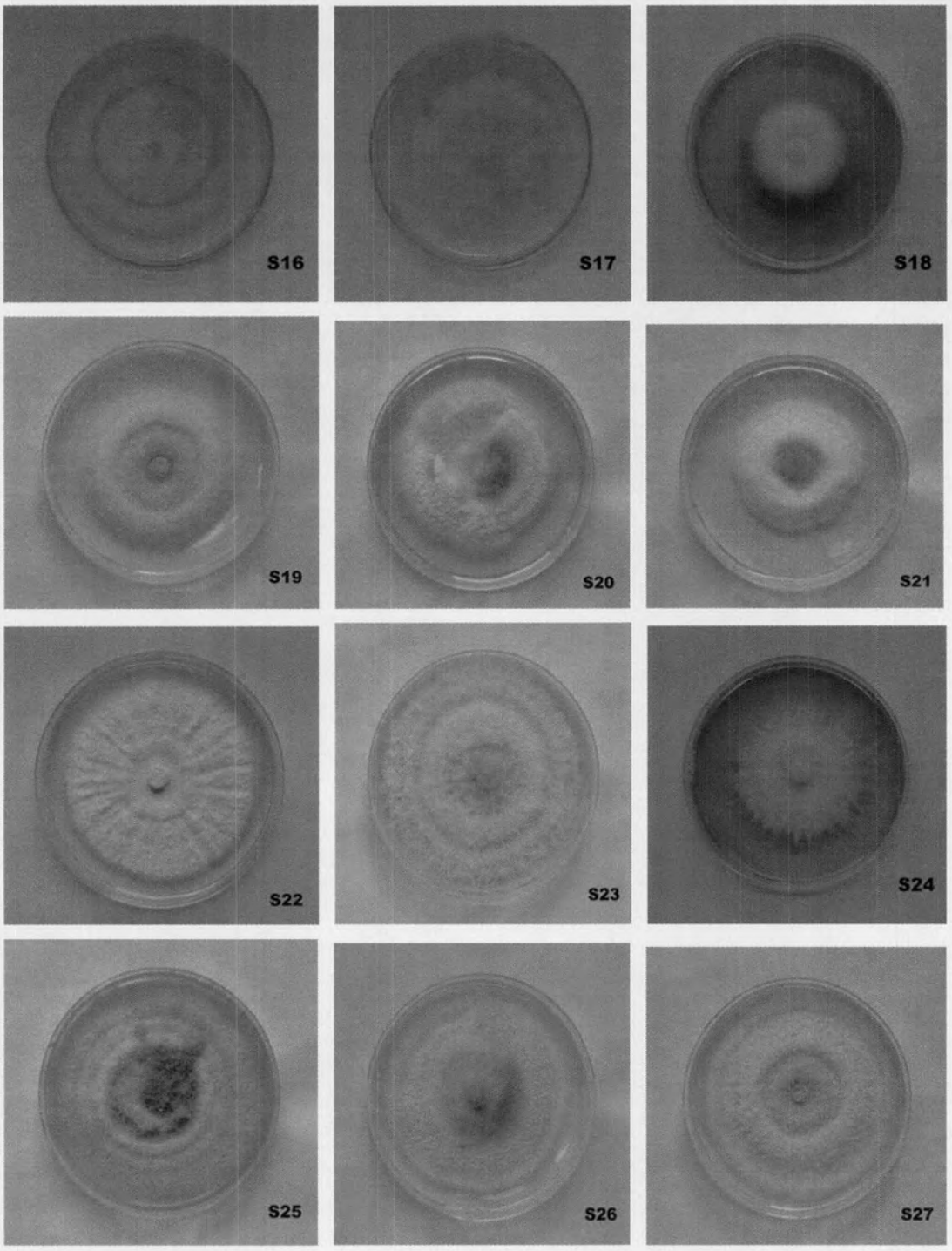
+ + + หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว

+ + หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตปานกลาง

+ หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตช้า



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของราดินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของราดินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)

4.2.2 การแยกราที่ขึ้นบนซากพืช

จากตัวอย่างกิ่งไม้ผุ และเห็ดที่ขึ้นบนเนื้อไม้ ที่ได้เก็บมาจากพื้นที่ป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ และอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก จำนวนทั้งสิ้น 13 ตัวอย่าง สามารถนำมาแยกเนื้อเยื่อด้านในมาเพาะเลี้ยงเป็นไอโซเลตที่บริสุทธิ์ โดยมีลักษณะและอัตราการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะ และอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากตัวอย่างกิ่งไม้ผุและเห็ด ในเวลา 7 วัน

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

ตารางที่ 4.2 ลักษณะ และอัตราการเจริญของราที่แยกได้จากกิ่งไม้ผุและเห็ด ในเวลา 7 วัน (ต่อ)

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

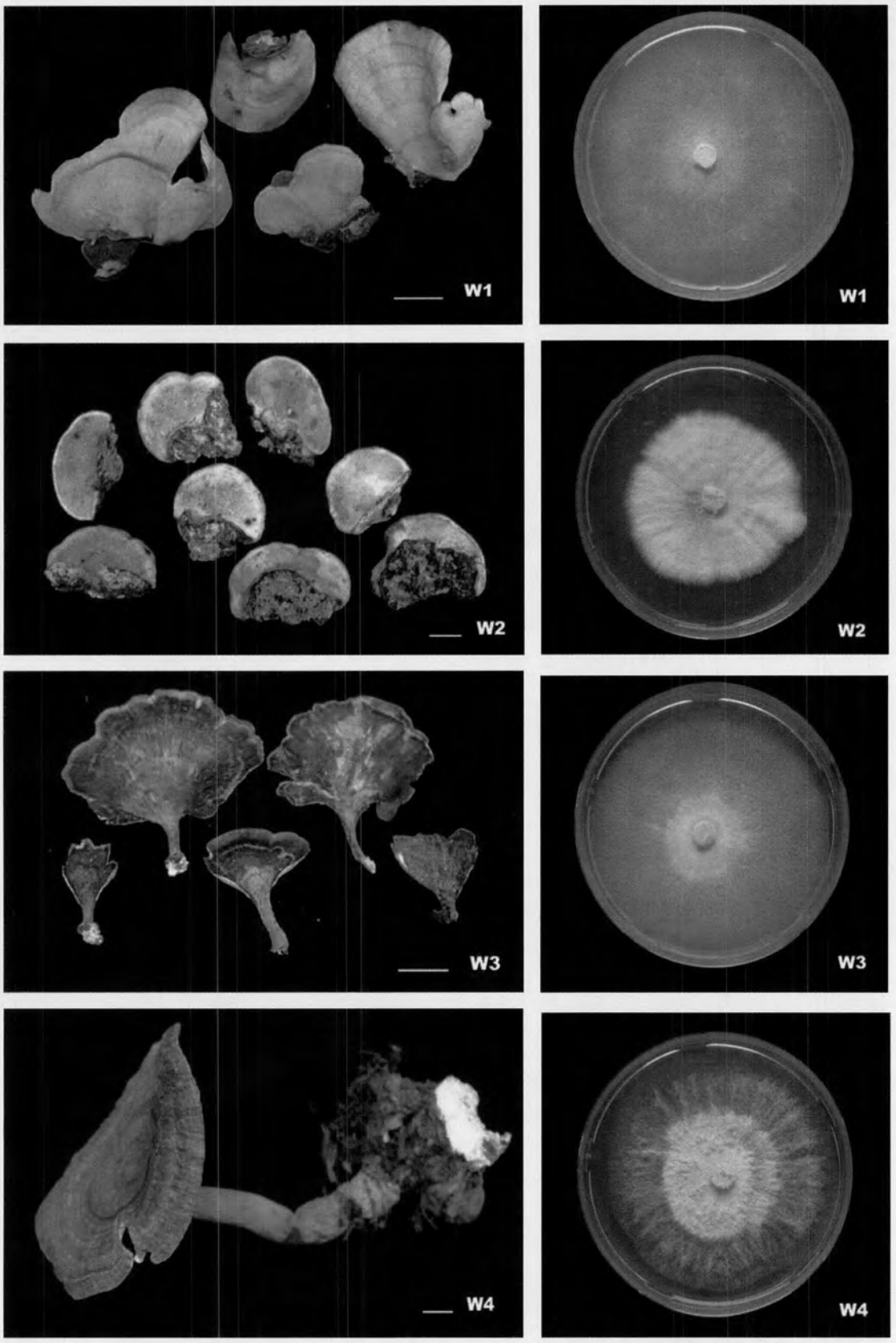
หมายเหตุ

อัตราการเจริญ

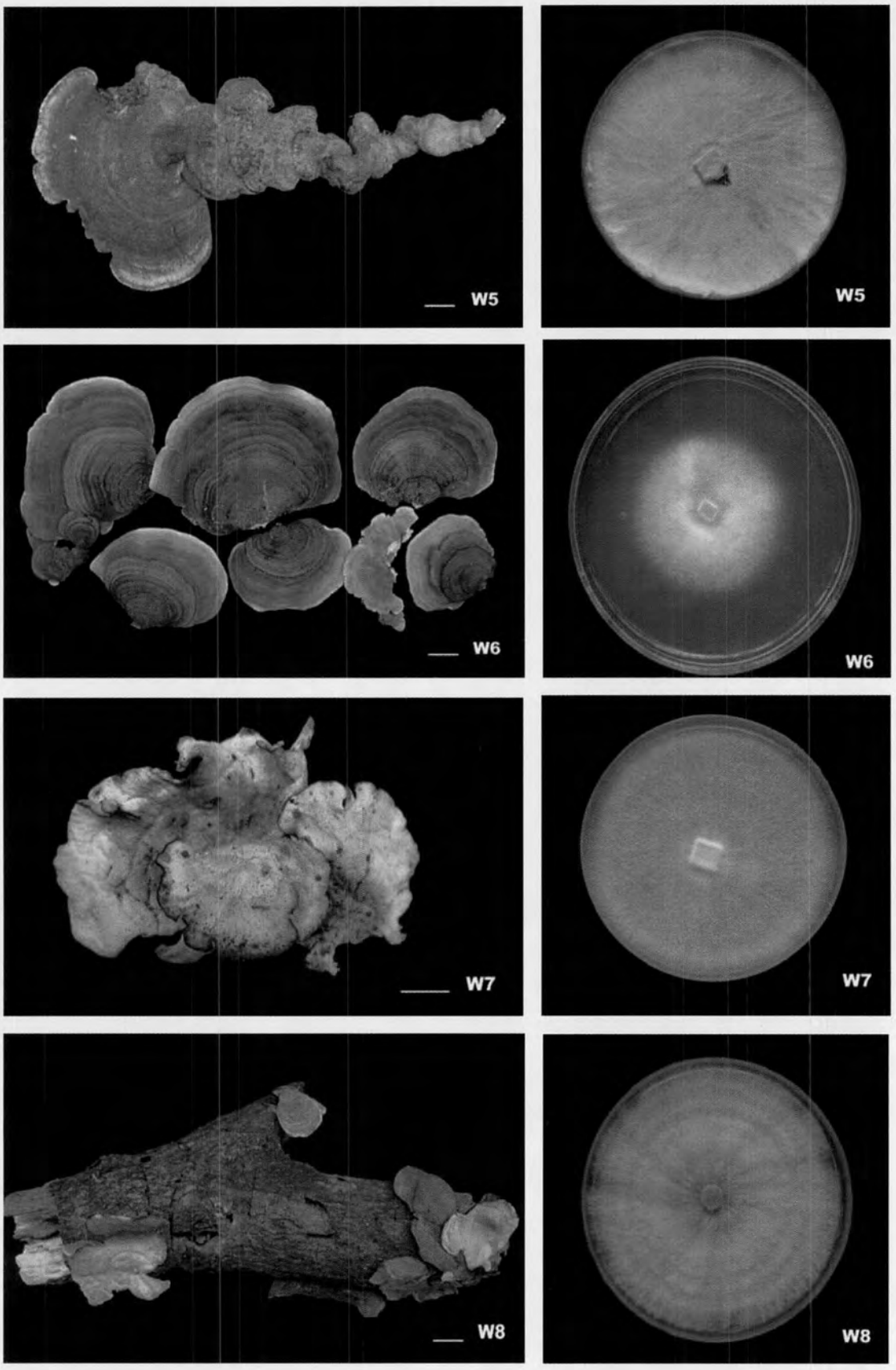
+ + + หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว

+ + หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตปานกลาง

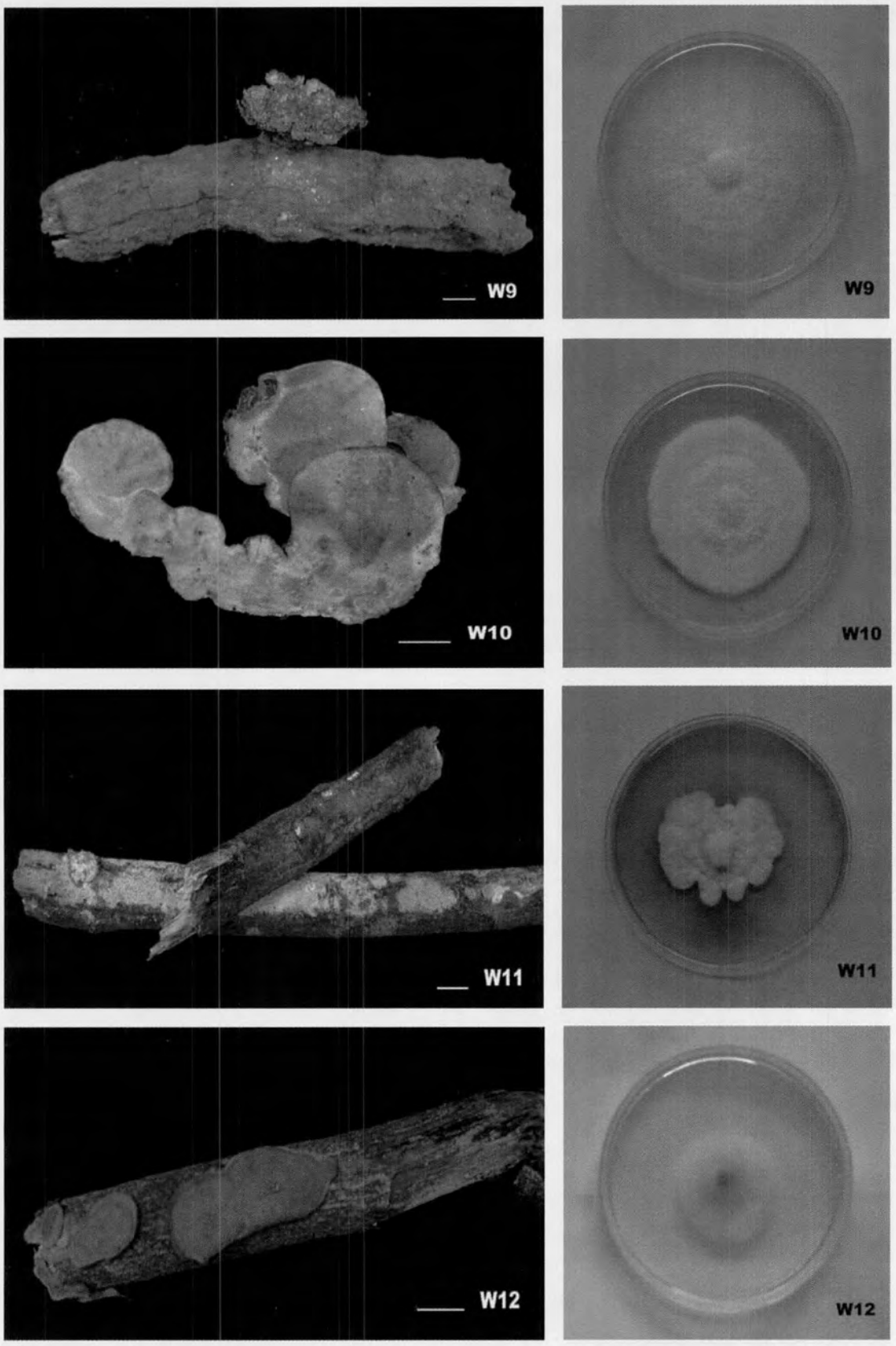
+ หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตช้า



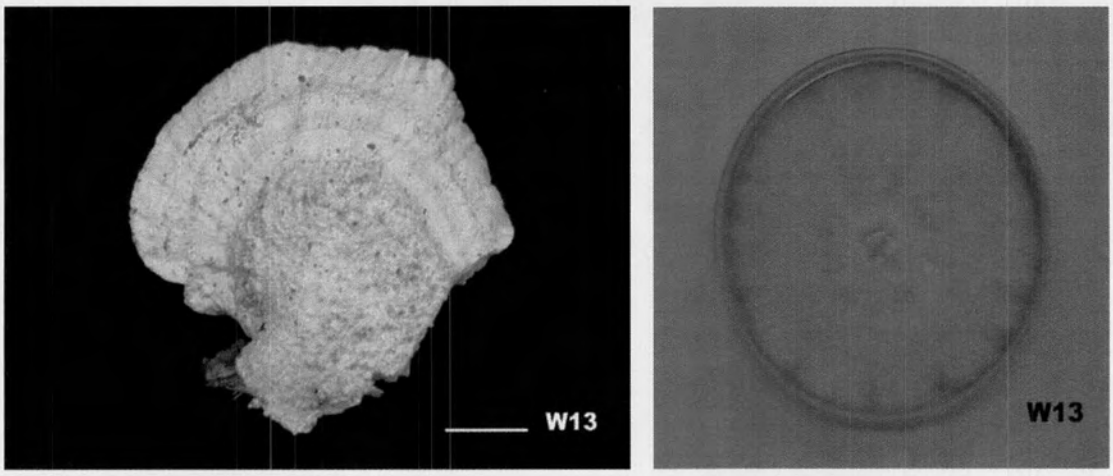
ภาพที่ 4.2 ลักษณะของเห็ดและกิ่งไม้ผุที่นำมาแยกเนื้อเยื่อ (ซ้าย) และลักษณะโคโลนีของรา ที่คัดแยกได้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ขวา)



ภาพที่ 4.2 ลักษณะของเห็ดและกิ่งไม้ผุที่นำมาแยกเนื้อเยื่อ (ซ้าย) และลักษณะโคโลนีของรา ที่คัดแยกได้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ขวา) (ต่อ)

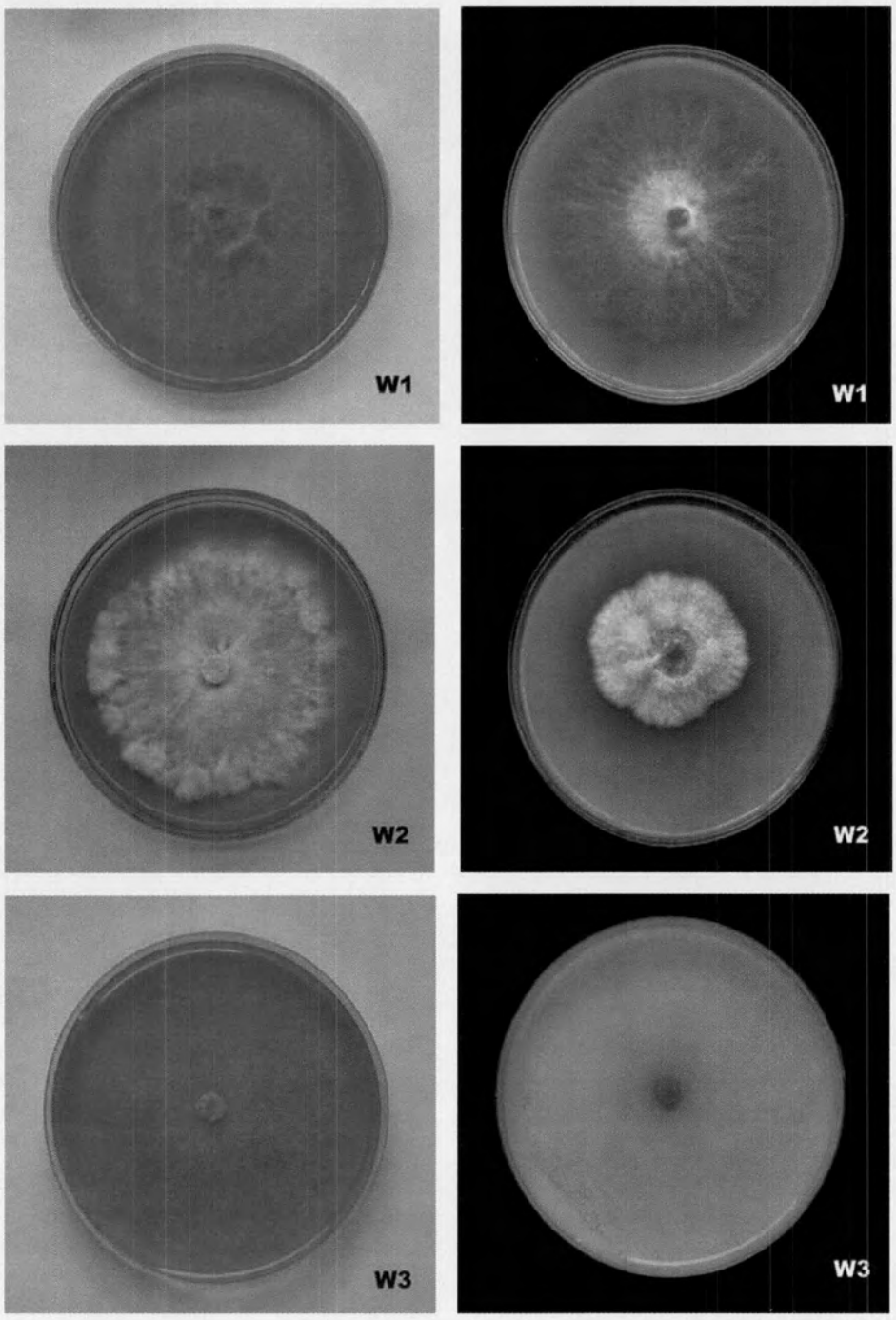


ภาพที่ 4.2 ลักษณะของเห็ดและกิ่งไม้ผุที่นำมาแยกเนื้อเยื่อ (ซ้าย) และลักษณะโคโลนีของรา ที่คัดแยกได้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ขวา) (ต่อ)

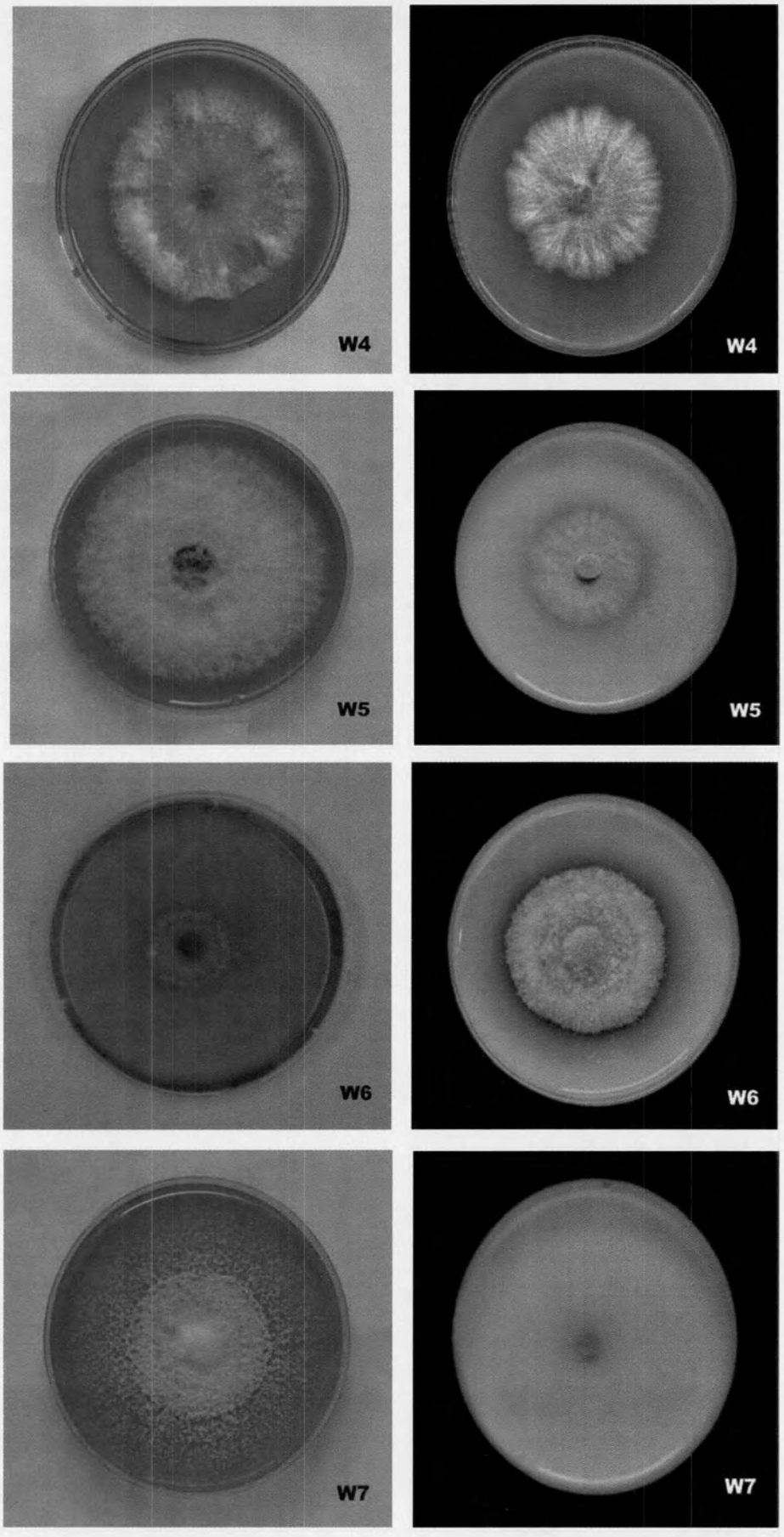


ภาพที่ 4.2 ลักษณะของเห็ดและกิ่งไม้ผุที่นำมาแยกเนื้อเยื่อ (ซ้าย) และลักษณะโคโลนีของรา ที่คัดแยกได้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ขวา) (ต่อ)

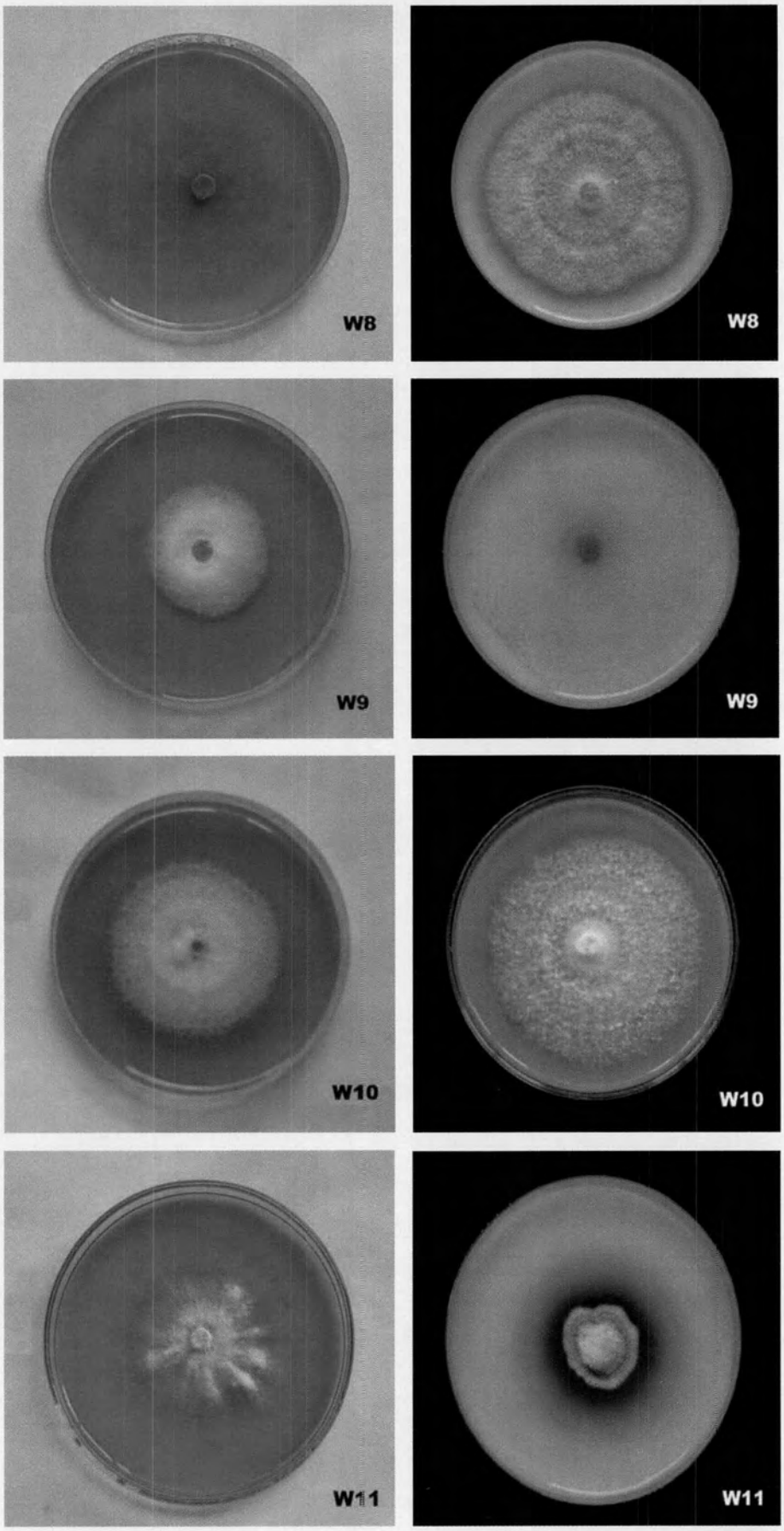
ราที่คัดแยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ผุ จำนวนทั้ง 13 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา และการย่อยสลาย Poly R-478 และ Tannic acid ได้ผลดังภาพที่ 4.3



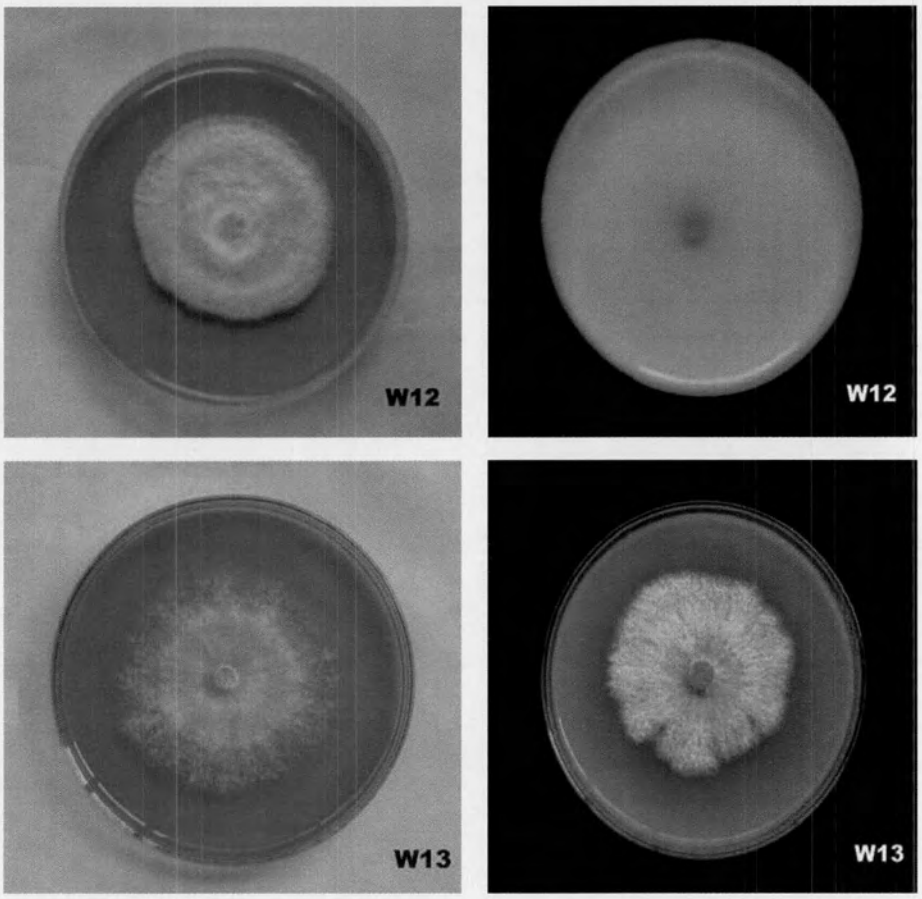
ภาพที่ 4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหาร Poly-R agar clearance และ Tannic acid agar ของราที่คัดแยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ผุ เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหาร Poly-R agar clearance และ Tannic acid agar ของราที่คัดแยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ผุ เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)



ภาพที่ 4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหาร Poly-R agar clearance และ Tannic acid agar ของราที่คัดแยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ผุ เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)



ภาพที่ 4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหาร Poly-R agar clearance และ Tannic acid agar ของราที่คัดแยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ผุ เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)

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

4.2.3 การแยกราเอนโดไฟต์จากพืช

จากการเก็บตัวอย่างพืชในป่าธรรมชาติ และในพื้นที่เกษตรกรรมทั้ง 6 ตัวอย่าง เพื่อนำมาคัดแยกราเอนโดไฟต์ โดยวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิว (Surface sterilization) สามารถคัดแยกราได้จำนวนทั้งหมด 24 ไอโซเลต โดยมีลักษณะและอัตราการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 ลักษณะ และอัตราการเจริญของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืช ในเวลา 7 วัน

ตัวอย่างพืช	สถานที่เก็บ	รหัสรา ที่แยกได้	ลักษณะเส้นใย บนอาหาร PDA	อัตรา การเจริญ
1 (พลวง)	อุทยานตากสินฯ จ. ตาก	E1	เส้นใยหยาบ ฟู และมีสีเทาอมเขียว	+ + +
		E2	เส้นใยหยาบ ฟู ขึ้นเป็นวง ชัดเจนสีขาวสลับเขียวอมเทา	+ + +
		E3	เส้นใยละเอียด เจริญอย่างหนาแน่นมาก และมีสีขาว	+ +
		E4	เส้นใยหยาบ ฟู มีสีขาวบางส่วนมีสีเขียวอมเทา	+ + +
2 (กล้วยป่า)	อุทยานตากสินฯ จ. ตาก	E5	เส้นใยละเอียดสลับหยาบเป็นวง สีขาวอมเทา	+ + +
		E6	เส้นใยละเอียด มีการกระจุกตัวเป็นจุดๆ สีขาว	+ + +
		E7	เส้นใยเจริญหนาแน่นจนเป็นแผ่นสีเขียว ขอบหยักสีขาว	+ +
		E8	เส้นใยละเอียด ฟู หนาแน่นเห็นเป็นวง สีขาว	+ +
		E9	เส้นใยหยาบ ฟู หนาแน่นเป็นวง มีสีขาว	+ + +

ตารางที่ 4.3 ลักษณะ และอัตราการเจริญของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืช ในเวลา 7 วัน (ต่อ)

ตัวอย่างพืช	สถานที่เก็บ	รหัสรา ที่แยกได้	ลักษณะเส้นใย บนอาหาร PDA	อัตรา การเจริญ
3 (ไผ่)	อุทยานตากสินฯ จ. ตาก	E10	เส้นใยขึ้นเป็นแผ่นหนาแน่น สีเขียวอมเทา มีสปอร์สีขาว	+ +
		E11	เส้นใยละเอียด เจริญอย่างหนาแน่น สีขาวอมเหลือง	+ + +
		E12	เส้นใยหนาแน่น หยาบ ฟู มีสีขาว เห็นเป็นวง	+ + +
4 (คะน้า)	สวนคะน้า อ. สามโคก จ. ปทุมธานี	E13	เส้นใยหนาแน่น เจริญเป็นแผ่นด้านในสีเขียว ขอบสีขาว	+ +
		E14	เส้นใยหยาบ ฟู หนาแน่น และมีสีขาวอมเทา	+ + +
		E15	เส้นใยหนาแน่นเป็นวงลอนชัดเจน ขอบหยัก สปอร์สีขาว	+ +
		E16	เส้นใยหยาบสีขาว หนาแน่นตรงกลางโคโลนี	+ +
		E17	เส้นใยหยาบหนาแน่น สีเขียวสลับขาว เจริญเป็นหยักลอน	+ + +
5 (กวางตุ้ง)	สวนกวางตุ้ง อ.สามโคก จ.ปทุมธานี	E18	เส้นใยเจริญหนาแน่นเป็นแผ่นสีเขียว ขอบสีขาว	+ +
		E19	เส้นใยละเอียด ฟู หนาแน่นมาก มีสีขาวอมเหลือง	+ + +
		E20	เส้นใยละเอียด หนาแน่นมาก ด้านในสีเขียว ขอบสีขาว	+
		E21	เส้นใยละเอียด เจริญเป็นวง ด้านในสีน้ำตาล ขอบสีขาว	+ +
6 (ข้าว)	นาข้าว อ. บางบัวทอง จ. นนทบุรี	E22	เส้นใยหนาแน่นเป็นแผ่นลอน สีเขียวเข้มเป็นวง ขอบสีขาว	+ +

ตารางที่ 4.3 ลักษณะ และอัตราการเจริญของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืช ในเวลา 7 วัน (ต่อ)

ตัวอย่างพืช	สถานที่เก็บ	รหัสรา ที่แยกได้	ลักษณะเส้นใย บนอาหาร PDA	อัตรา การเจริญ
6 (ข้าว)	นาข้าว อ. บางบัวทอง จ. นนทบุรี	E23	เส้นใยละเอียด ฟู เจริญอย่างหนาแน่น สีขาวอมเหลือง	+ + +
		E24	เส้นใยบาง เห็นเป็นวงจากสีเขียวของสปอร์ ขอบสีขาว	+ + +

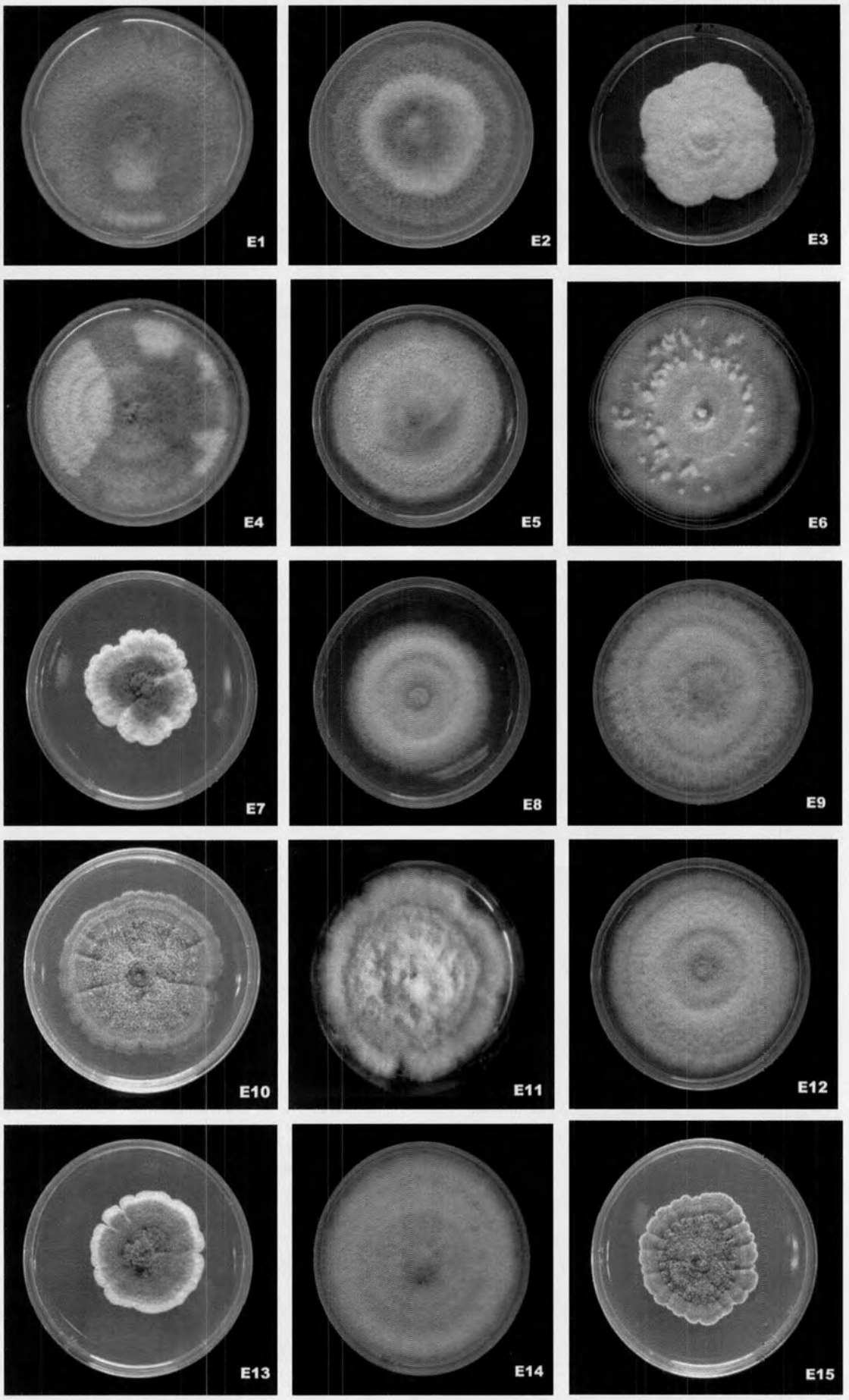
หมายเหตุ

อัตราการเจริญ

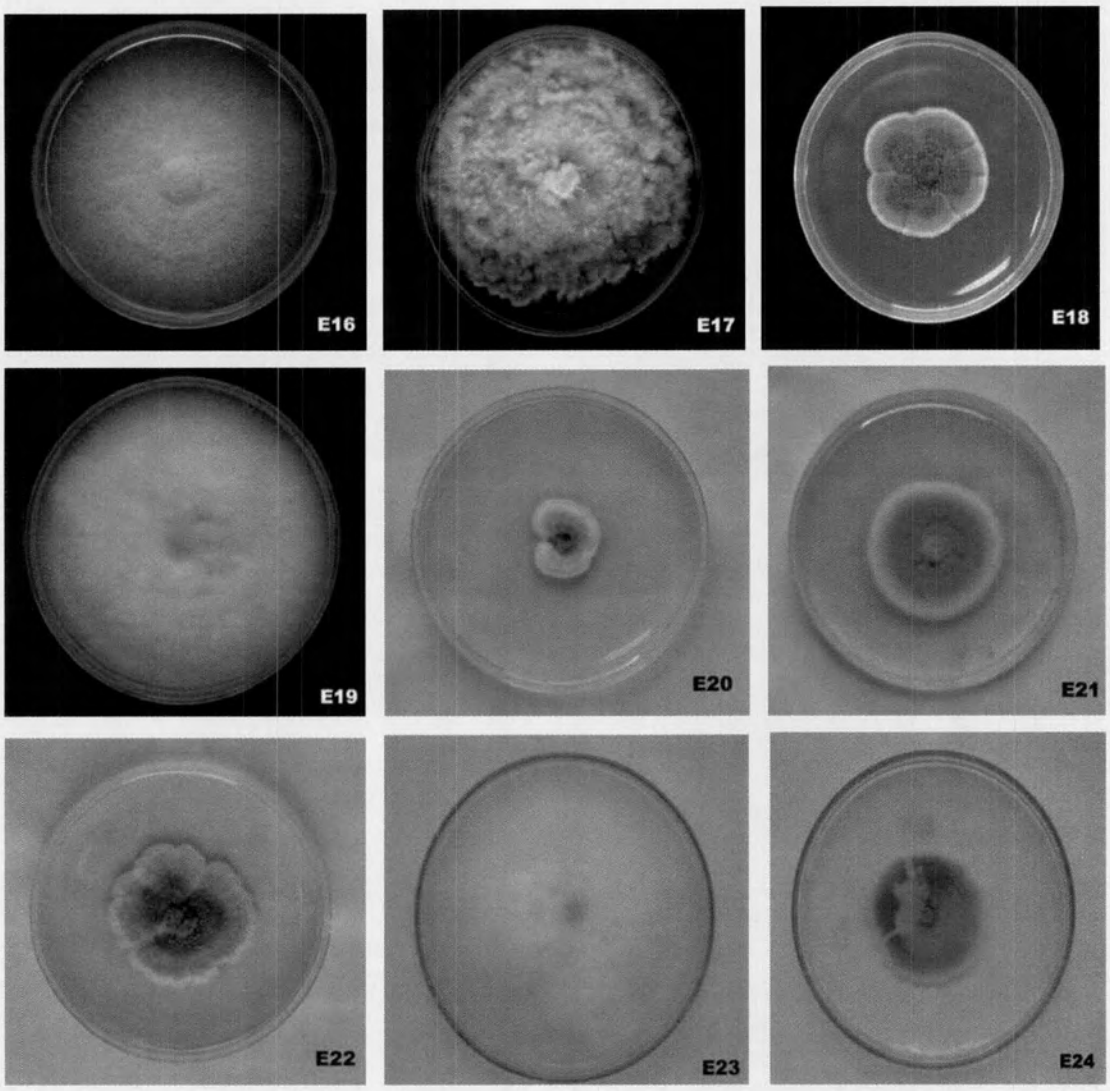
+ + + หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว

+ + หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตปานกลาง

+ หมายถึง รามีอัตราการเจริญเติบโตช้า



ภาพที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชในแหล่งต่างๆ บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน

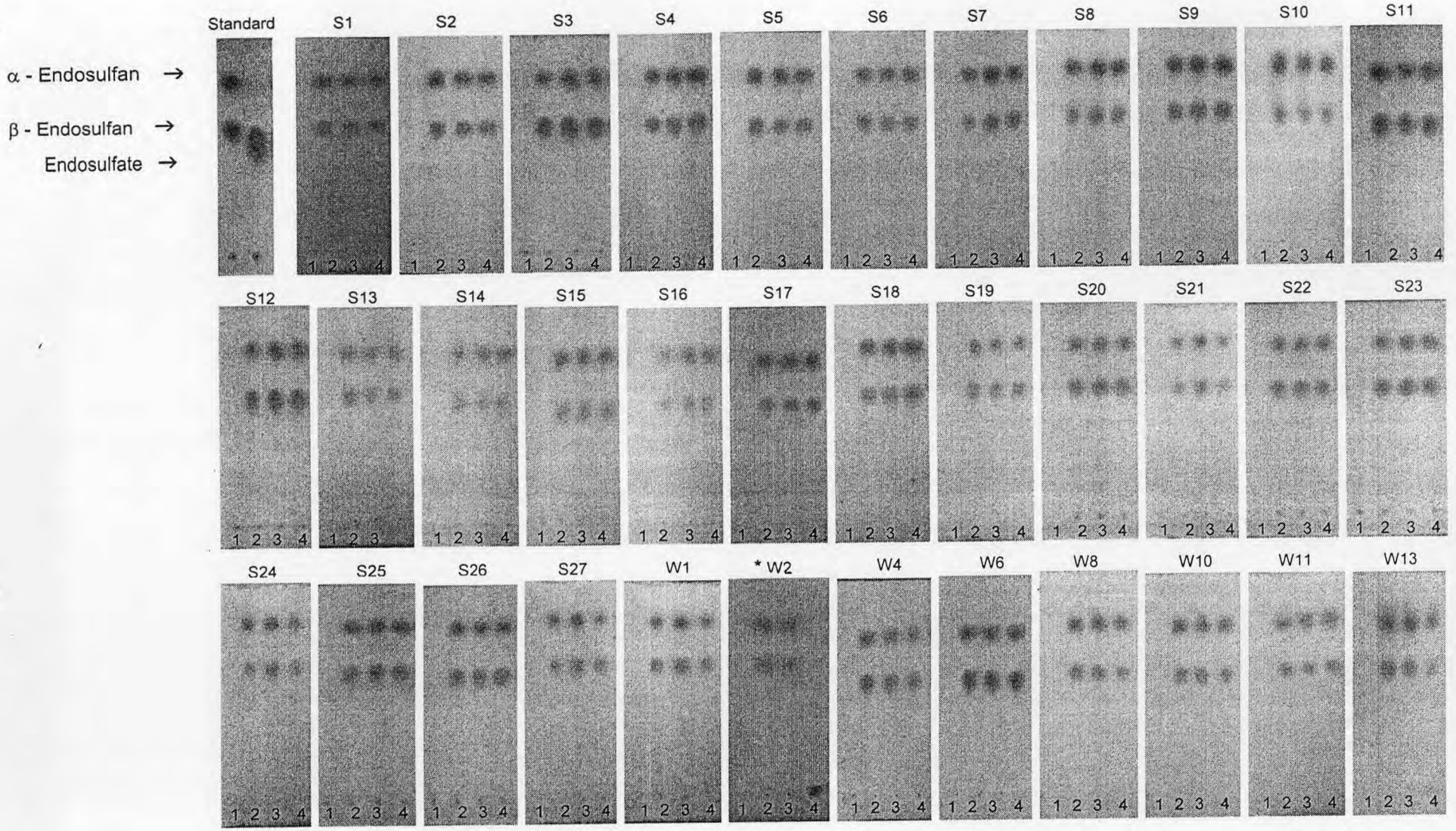


ภาพที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากพืชในแหล่งต่างๆ บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)

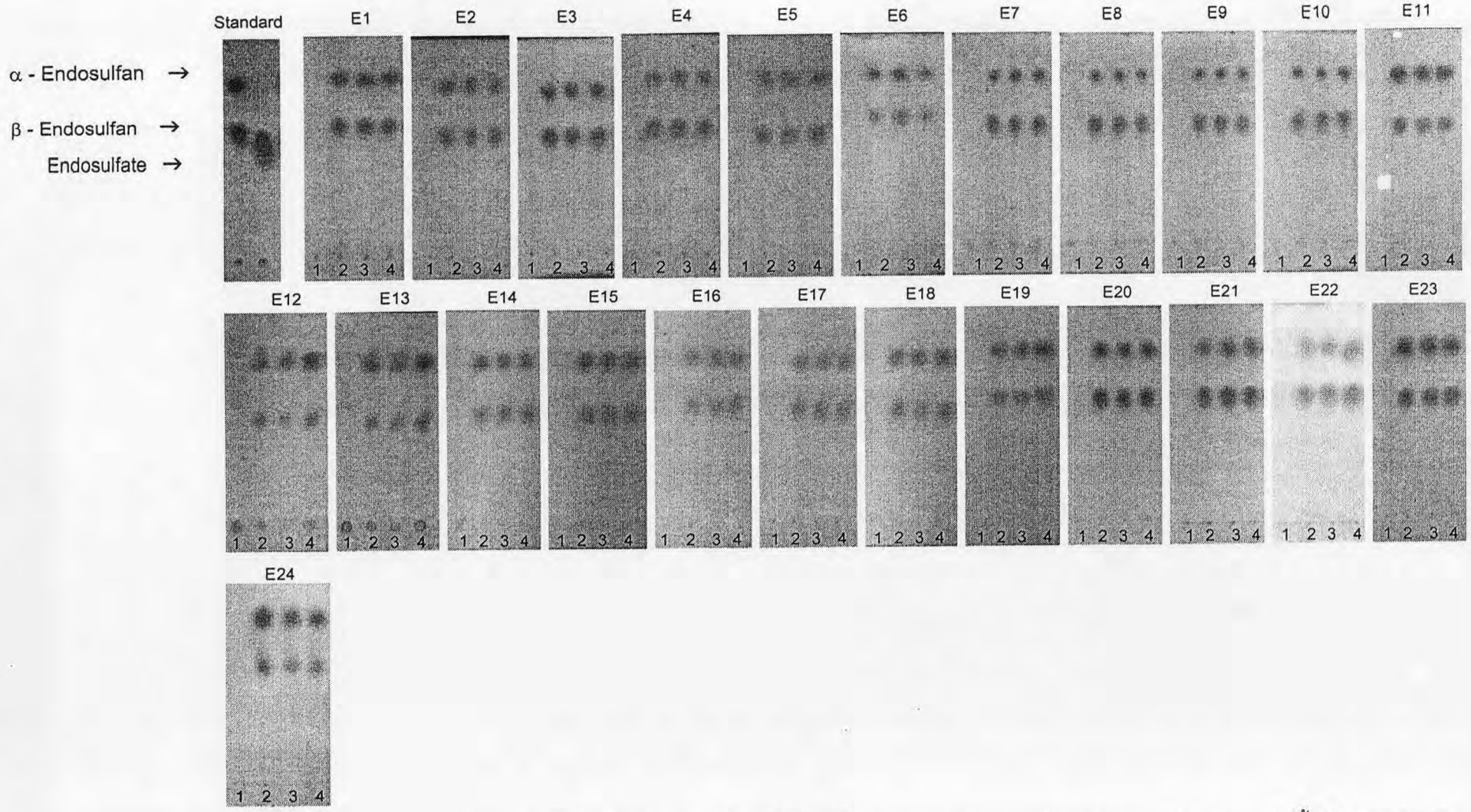
4.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่คัดแยกได้

4.3.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นปฐมภูมิ (Primary degradation test)

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารเอ็นโดซัลแฟนขั้นปฐมภูมิของราที่คัดแยกได้ทั้ง 59 ไอโซเลต ตามข้อ 4.2 โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) (ภาพที่ 4.5) เพื่อวิเคราะห์เชิงคุณภาพในการตรวจสอบหาสารเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้น ภายหลังจากการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน พบว่า มีราเพียงไอโซเลตเดียวคือ W2 ที่มีสามารถย่อยสลาย และเปลี่ยนโครงสร้างเอ็นโดซัลแฟนไปเป็นสารเมทาโบไลท์ชนิดอื่น โดยพิจารณาจากตำแหน่ง spot ที่ปรากฏขึ้นของสารที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่ใส่เชื้อทดสอบ มีความแตกต่างกับตำแหน่ง spot บนแผ่น TLC อ้างอิงของสารละลายมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟน และตำแหน่ง spot ที่ปรากฏขึ้นของชุดควบคุมทั้ง 3 ชุด (ชุดที่ไม่ใส่สาร ชุดที่ไม่ใส่เชื้อ และชุดที่ใส่เส้นใยราที่ตายแล้ว) และเมื่อพิจารณาจากค่า R_f (Retention factor) พบว่า ค่า R_f ของ spot สารเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้นใหม่นั้น มีค่าเท่ากับ 0.04 มีความแตกต่างกับ R_f ของสารเอ็นโดซัลแฟนมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วยอัลฟาและเบตาไอโซเมอร์ (α + β Endosulfan) ที่มีค่าเท่ากับ 0.78 และ 0.58 ตามลำดับ โดยค่า R_f ของสารเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้นใหม่นั้น พบว่า อาจจะเป็นค่า R_f ของสารเอ็นโดซัลแฟนไดออล (Endosulfan diol) ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานว่ามีค่า R_f ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารเมทาโบไลท์ชนิดอื่นๆ ของเอ็นโดซัลแฟน (Awasthi และคณะ, 1997; Awasthi และคณะ, 2000; Shetty และคณะ, 2000 และ Sutherland และคณะ, 2002)

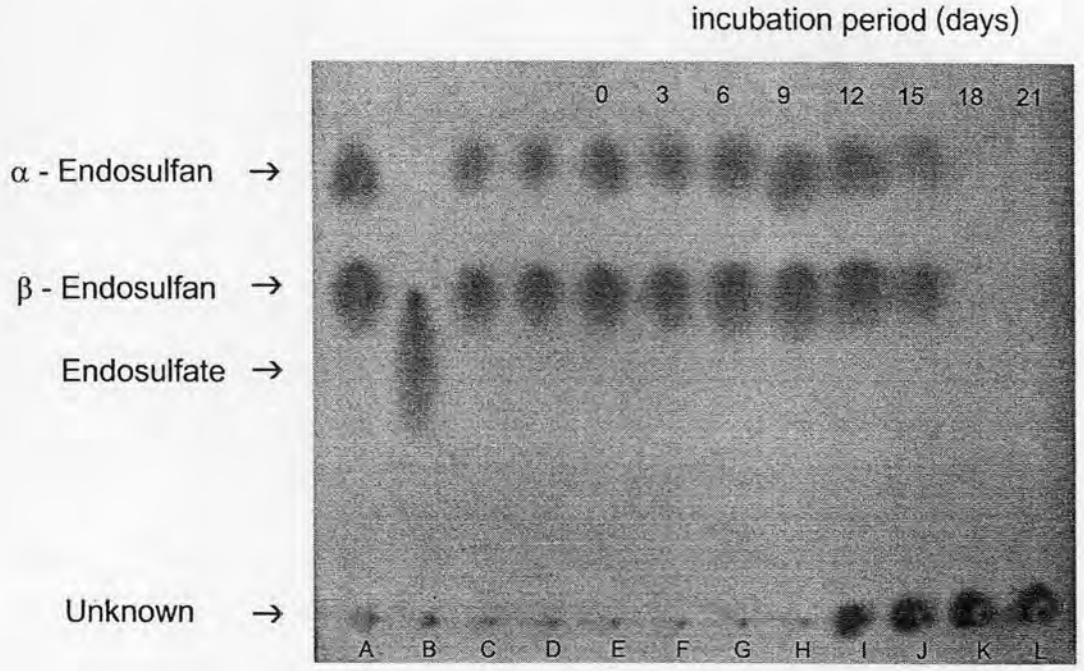


ภาพที่ 4.5 ผลทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่แยกได้ โดยวิธี Thin Layer Chromatography ภายหลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 20 วัน (1: ชุดควบคุมที่ไม่ใส่สาร 2: ชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ 3: ชุดควบคุมที่ใส่ราที่ตายแล้ว และ 4: ชุดทดลองที่ใส่เชื้อทดสอบ)



ภาพที่ 4.5 ผลทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่แยกได้ โดยวิธี Thin Layer Chromatography ภายหลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 20 วัน (1: ชุดควบคุมที่ไม่ใส่สาร 2: ชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ 3: ชุดควบคุมที่ใส่ราที่ตายแล้ว และ 4: ชุดทดลองที่ใส่เชื้อทดสอบ) (ต่อ)

นอกจากนี้ ได้ทำการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 ขั้นปฐมภูมิด้วยเทคนิค TLC อย่างละเอียดในสภาวะเดิมอีกครั้ง เพื่อยืนยันผล และตรวจสอบระยะเวลาที่ราเริ่มมีการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนเป็นเมทาโบไลท์รูปอื่น (Unknown) ที่คาดว่าเป็นเอ็นโดซัลแฟนไดออล โดยมีการเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบทุก 3 วัน จนครบกำหนด 21 วัน ได้ผลการทดสอบดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 ผลการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 โดยวิธี Thin Layer Chromatography ภายหลังจากการบ่มเชื้อ 21 วัน (A: สารเอ็นโดซัลแฟนมาตรฐาน B: สารเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟตมาตรฐาน C: ชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ D: ชุดควบคุมที่ใส่เส้นใยราที่ตายแล้ว E: วันที่ 0 ของการบ่มเชื้อ F: วันที่ 3 ของการบ่มเชื้อ G: วันที่ 6 ของการบ่มเชื้อ H: วันที่ 9 ของการบ่มเชื้อ I: วันที่ 12 ของการบ่มเชื้อ J: วันที่ 15 ของการบ่มเชื้อ K: วันที่ 18 ของการบ่มเชื้อ L: วันที่ 21 ของการบ่มเชื้อ)

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

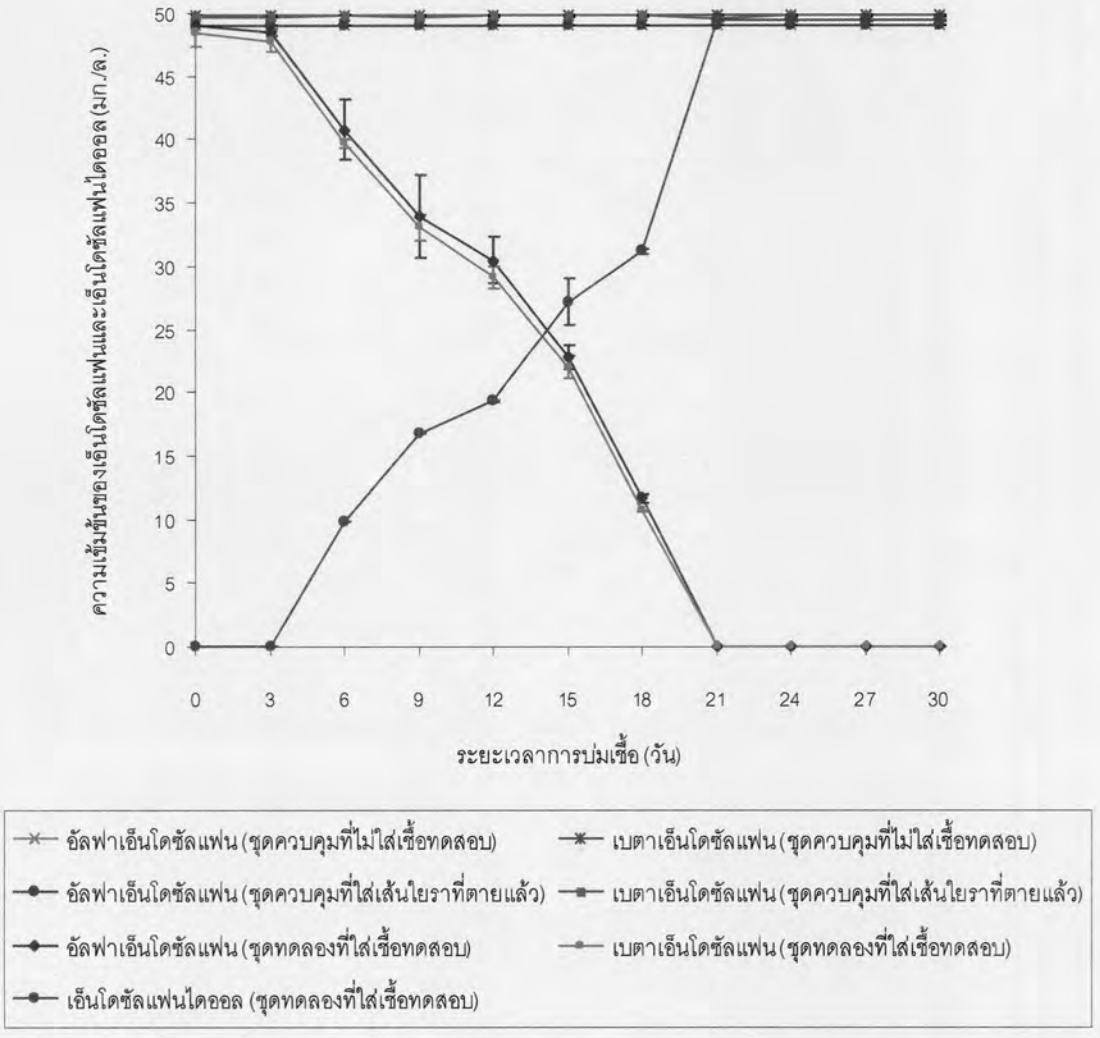
ผลการสกัดเส้นใยราที่ตายแล้วจากชุดทดลองของราทุกไอโซเลตที่คัดเลือกได้ เพื่อนำมาวิเคราะห์หาเอ็นโดซัลแฟนที่ตกค้างโดยเทคนิค TLC นั้น ปรากฏว่า ไม่พบ spot ของเอ็นโดซัลแฟนทั้งอัลฟาและเบตาไอโซเมอร์ และจากการตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ในทุกชุดการทดลอง ภายหลังจากการบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่อุณหภูมิห้องครบ 20 วัน ดังตารางที่ ค.1 (ภาคผนวก ค) พบว่า ในชุดการทดลองที่ใส่เชื้อทดสอบมีเพียงรา W2 ไอโซเลตเดียว ที่มีค่า pH เฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 8.54 นับจากวันเริ่มต้น (วันที่ 0) ของการบ่มเชื้อที่มีค่า pH เท่ากับ 7 ในขณะที่ราไอโซเลตอื่นๆ มีค่า pH เปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งสนับสนุนผลที่ได้จากการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนขั้นปฐมภูมิด้วยเทคนิค TLC ที่ตรวจสอบพบว่า รา W2 สามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนให้เอ็นโดซัลแฟนไดออลได้ ดังนั้น จึงคัดเลือกเฉพาะราไอโซเลต W2 มาทำการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในขั้นทุติยภูมิ (Secondary degradation test) เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณในการตรวจสอบหาความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนที่เหลือ และความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนไดออลที่เกิดขึ้นต่อไป

4.3.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นทุติยภูมิ (Secondary degradation test)

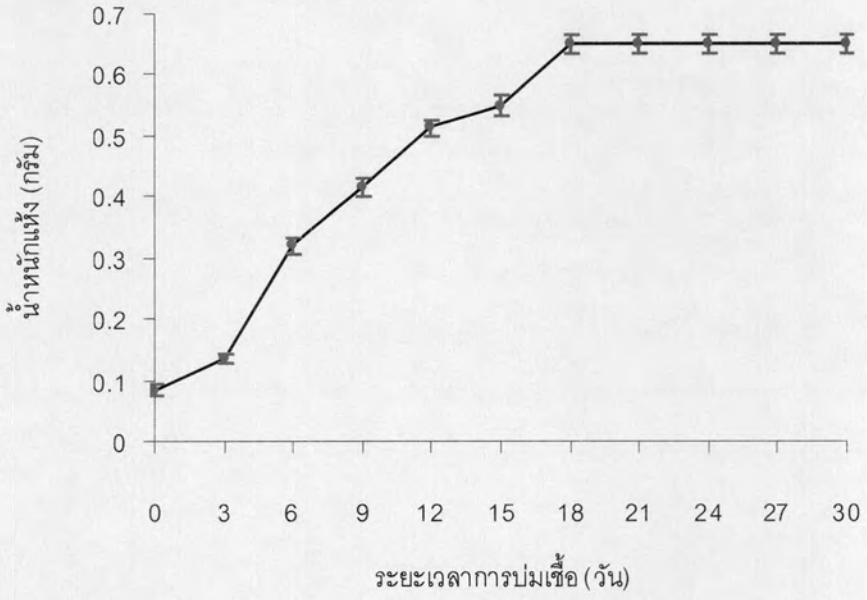
ผลทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนขั้นทุติยภูมิของราไอโซเลต W2 ด้วยเทคนิค Gas Chromatography (GC) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิด Electron Capture Detector (ECD) ซึ่งเอ็นโดซัลแฟนอัลฟาไอโซเมอร์ เอ็นโดซัลแฟนเบตาไอโซเมอร์ และเอ็นโดซัลแฟนไดออล มีค่า Retention time (R_t) เท่ากับ 14.910 16.089 และ 16.030 นาที ตามลำดับ เมื่อนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนและเอ็นโดซัลแฟนไดออล กับระยะเวลาการบ่มเชื้อ (ภาพที่ 4.7) พบว่า รา W2 สามารถย่อยสลายอัลฟาและเบตาเอ็นโดซัลแฟนจากความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้มีความเข้มข้นลดลงไปตามระยะเวลา 30 วันของการบ่มเชื้อ จนสามารถย่อยสลายได้หมดในวันที่ 21 ของการบ่มเชื้อ และเกิดการเปลี่ยนรูปเป็นสารเอ็นโดซัลแฟนไดออลหลังจากวันที่ 3 ของการบ่มเชื้อ โดยความเข้มข้นของอัลฟาเอ็นโดซัลแฟนจากการตรวจสอบทุก 3 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 18 คือ 48.48 40.79 33.90 30.41 22.75 และ 11.66 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของเบตาเอ็นโดซัลแฟนที่ตรวจพบคือ 47.82 39.75 33.06 29.12 22 และ 10.74 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของเอ็นโดซัลแฟนไดออลที่ตรวจพบทุก 3 วัน ตั้งแต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 30 ของการบ่มเชื้อ คือ 9.80 16.81 19.29 27.17 31.14 49.5 49.45 49.41 และ 49.42 ตามลำดับ ทั้งนี้ในชุดควบคุมเพื่อทดสอบการย่อยสลายตัวเองของเอ็นโดซัลแฟน (autodegradation control) และชุด

ควบคุมเพื่อทดสอบการดูดซับเอ็นโดซัลแฟนของเส้นใยรา (adsorption control) พบการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนทั้งอัลฟาและเบตาไอโซเมอร์ที่น้อยมาก

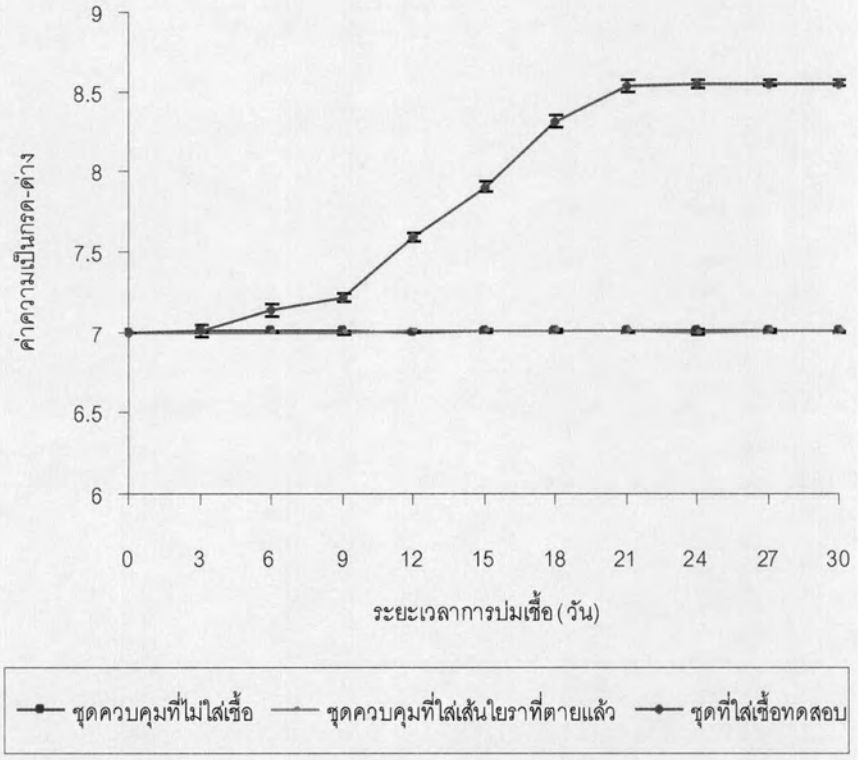
ผลจากการวัดอัตราการเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไอโซเลต W2 (ภาพที่ 4.8) พบว่า รามีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็นลำดับนับจากวันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 18 ของการบ่มเชื้อ หลังจากนั้น ไม่พบการเจริญเติบโตของรา W2 อีกเลยจนวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อ ส่วนผลจากการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชุด (ภาพที่ 4.9) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ในชุดที่ใส่เชื้อทดสอบ มีค่า pH เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้น นับจากวันแรกของการบ่มเชื้อที่มีค่า pH เท่ากับ 7 โดยในวันที่ 3 ของการบ่มเชื้อจนถึงวันที่ 30 ของการบ่มเชื้อ ค่า pH เฉลี่ยที่ตรวจวัดได้คือ 7.01 7.13 7.21 7.59 7.90 8.31 8.53 8.55 8.55 และ 8.55 ตามลำดับ ทั้งนี้ในชุดควบคุมทั้งสองชุดค่า pH เฉลี่ยที่ตรวจวัดได้ มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย



ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ยของเอ็นโดซัลแฟน (อัลฟาและเบตาไอโซเมอร์) และเอ็นโดซัลแฟนไดออล กับระยะเวลาการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 4.8 น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไอโซเลต W2 ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน



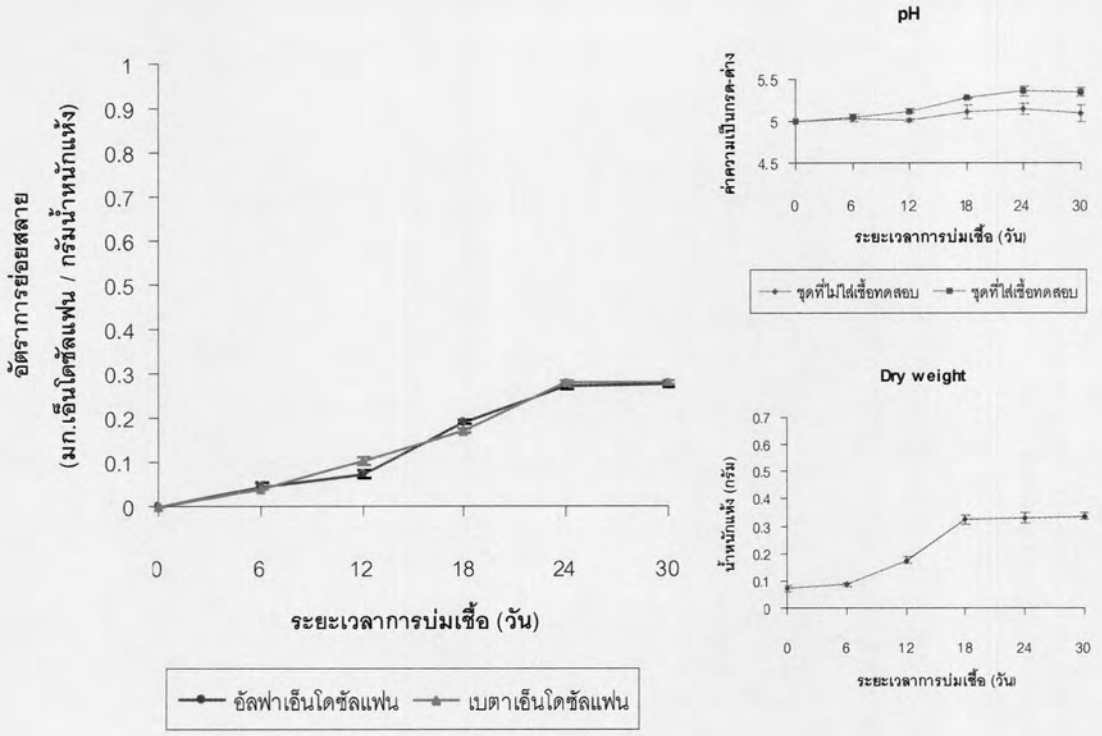
ภาพที่ 4.9 ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน

4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่แยกได้

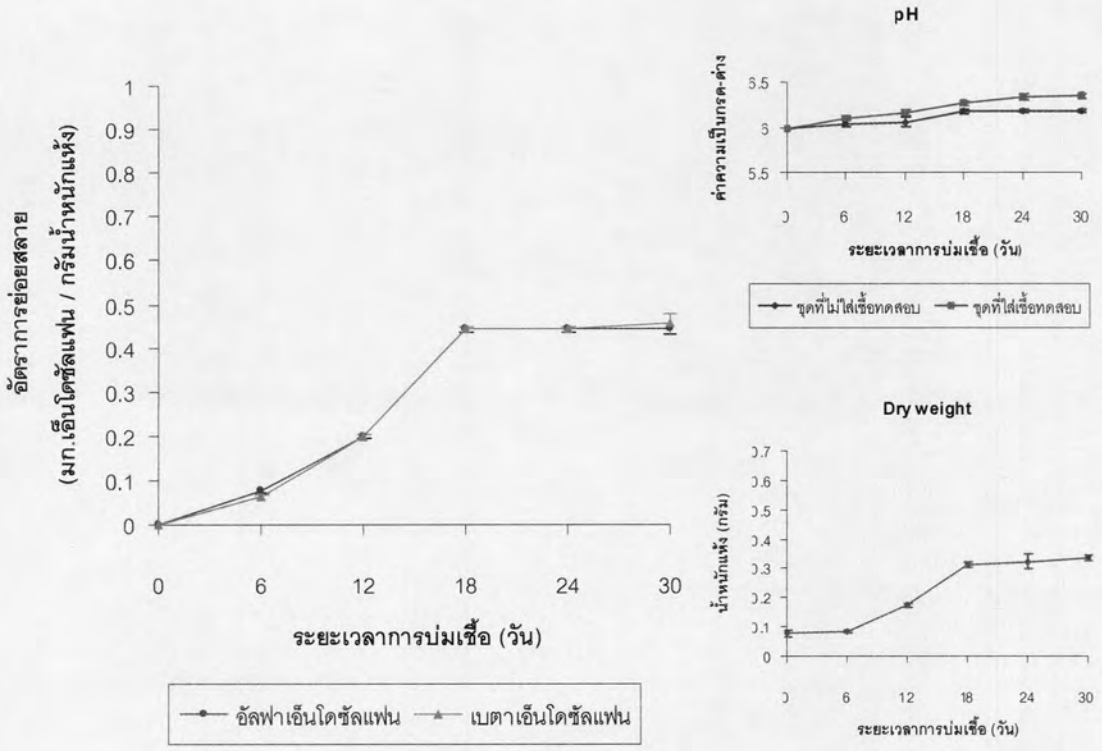
จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 ในสภาวะต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่กำหนดไว้ทั้งหมด 24 สภาวะตามตารางที่ 3.1 พบว่า ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน มีอยู่จำนวน 18 สภาวะ ที่ไม่พบการเจริญเติบโตของรา W2 ซึ่งตรวจสอบจากการชั่งน้ำหนักแห้ง (ภาคผนวก ช) ได้แก่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

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

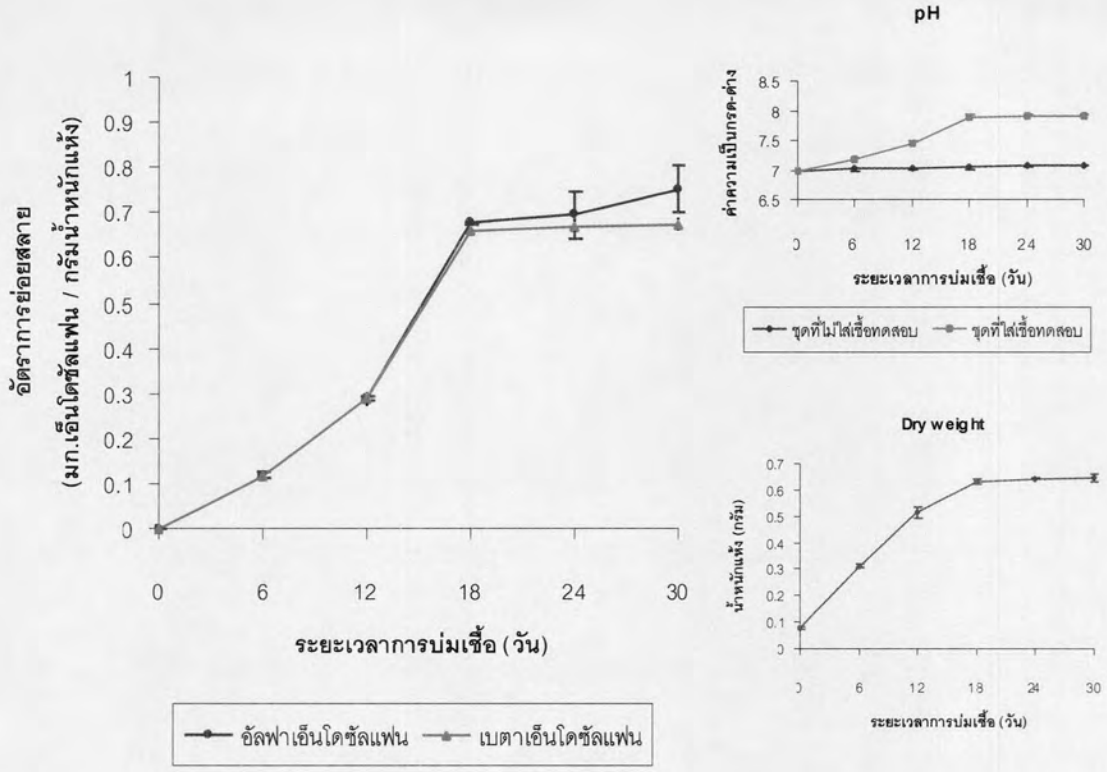
ผลจากการทดสอบการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของรา W2 ตามสภาวะต่างๆ ข้างต้น สามารถนำมาสร้างกราฟแสดงอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน ได้ดังภาพที่ 4.10 ถึง 4.15



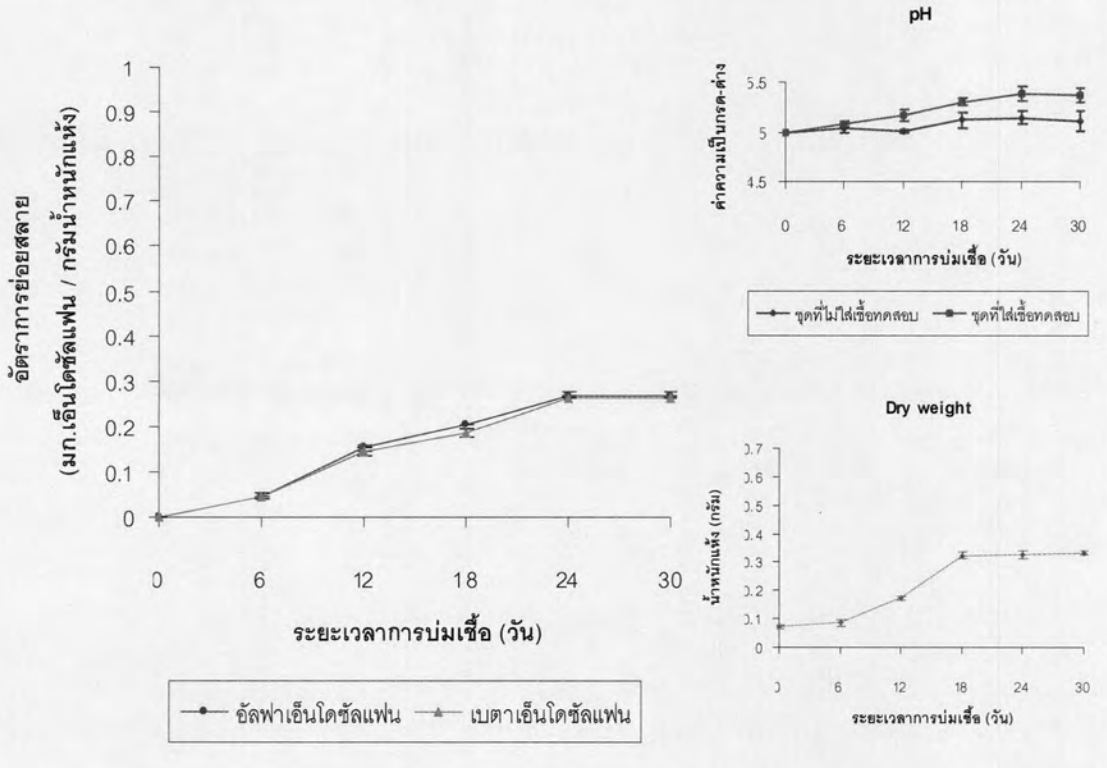
ภาพที่ 4.10 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 0.5% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5



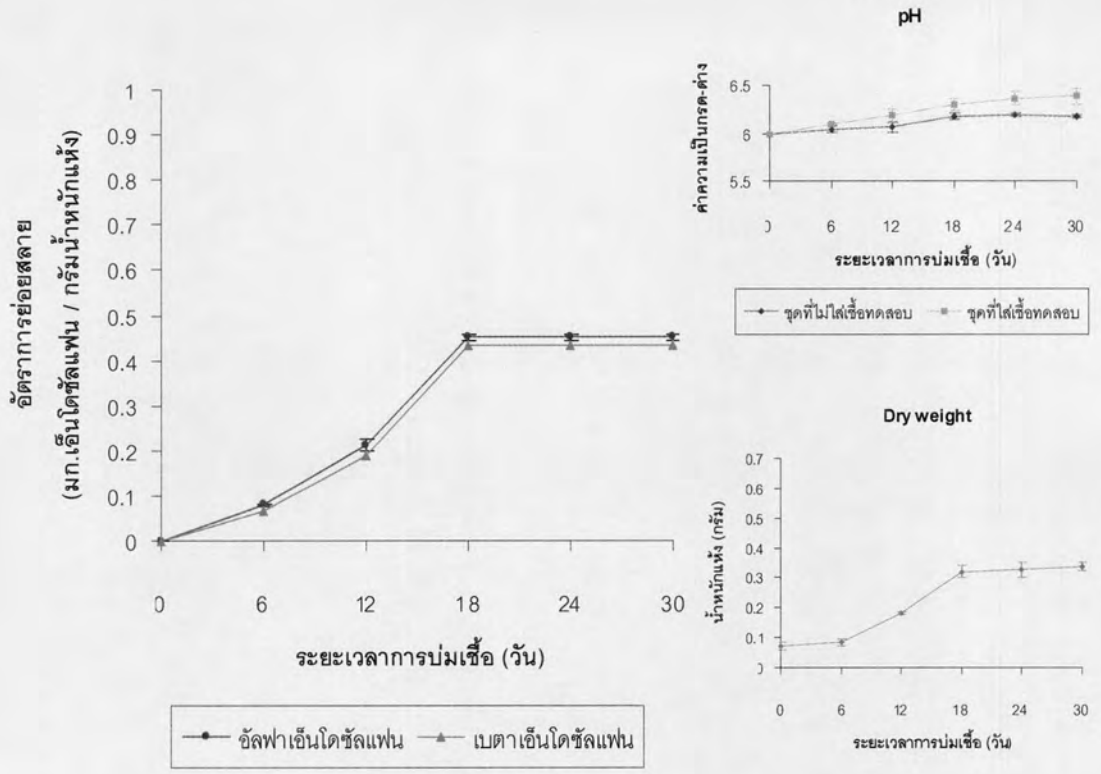
ภาพที่ 4.11 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 0.5% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6



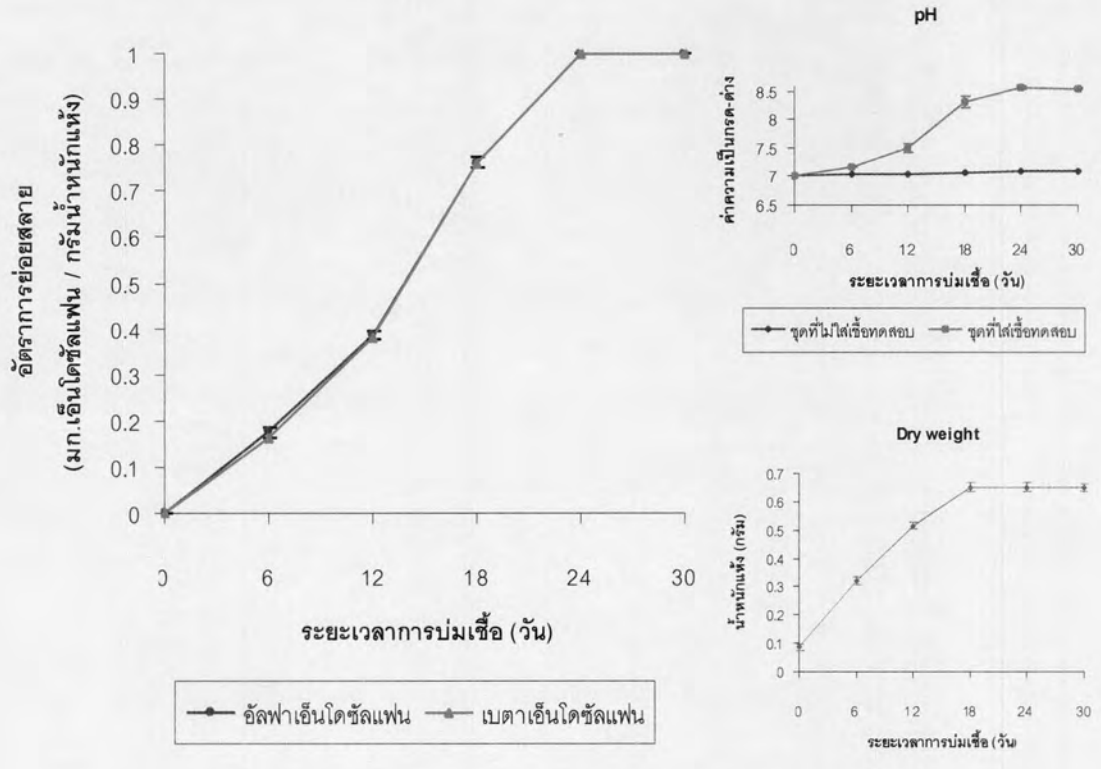
ภาพที่ 4.12 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 0.5% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7



ภาพที่ 4.13 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 2% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5



ภาพที่ 4.14 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 2% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6



ภาพที่ 4.15 อัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของรา W2 ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเอ็นโดซัลแฟนเข้มข้น 50 มก./ล. กลูโคส 2% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7

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

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

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

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

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

ผลที่ได้จากการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ทั้ง 6 สภาวะ สามารถสรุปประสิทธิภาพของรา W2 ต่อการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในสภาวะต่างๆ ได้ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 ภายหลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน

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

หมายเหตุ

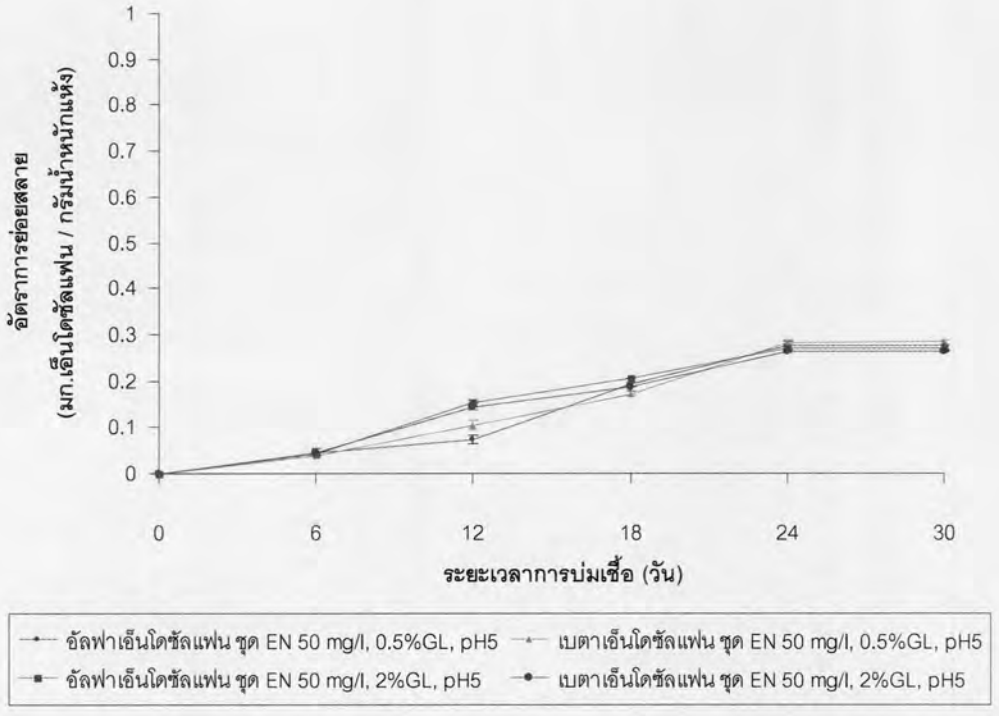
EN หมายถึง ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน

GL หมายถึง ความเข้มข้นของกลูโคส

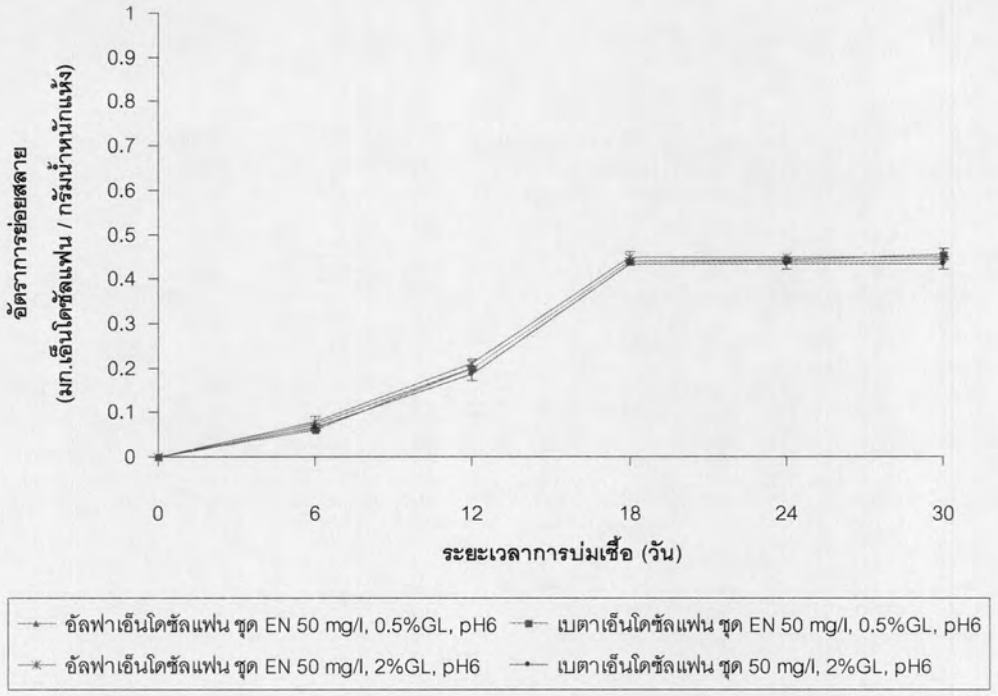
ผลจากตารางที่ 4.4 สามารถสรุปได้ว่า สภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่มีความเหมาะสมที่สุดต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 คือ สภาวะที่มีความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า pH เท่ากับ 7 โดยสามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน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

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

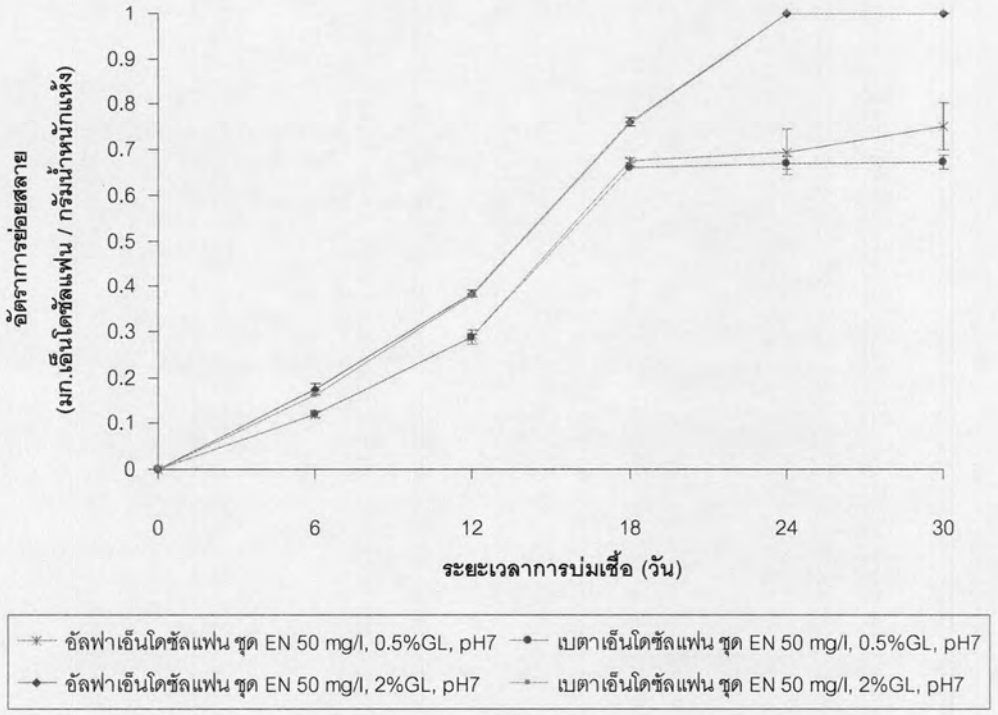
เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราไอโซเลต W2 ซึ่งจากการทดลองนี้ ได้แก่ ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์) และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH 5, 6 และ 7) พบว่า ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสที่ 2 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการเพิ่มอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของรา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



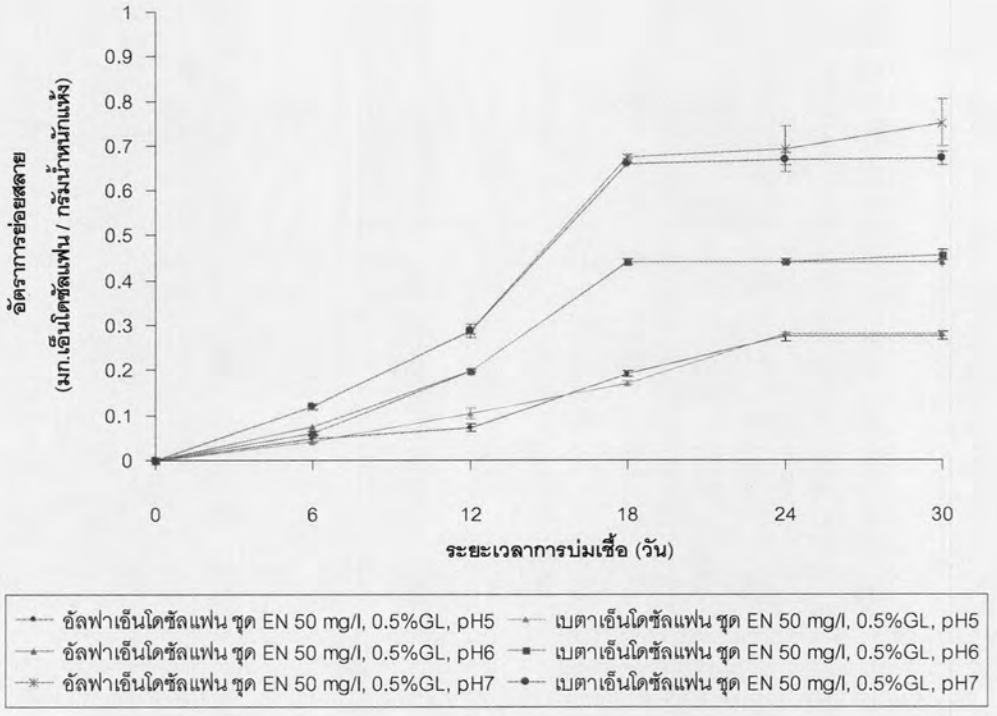
ภาพที่ 4.16 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5



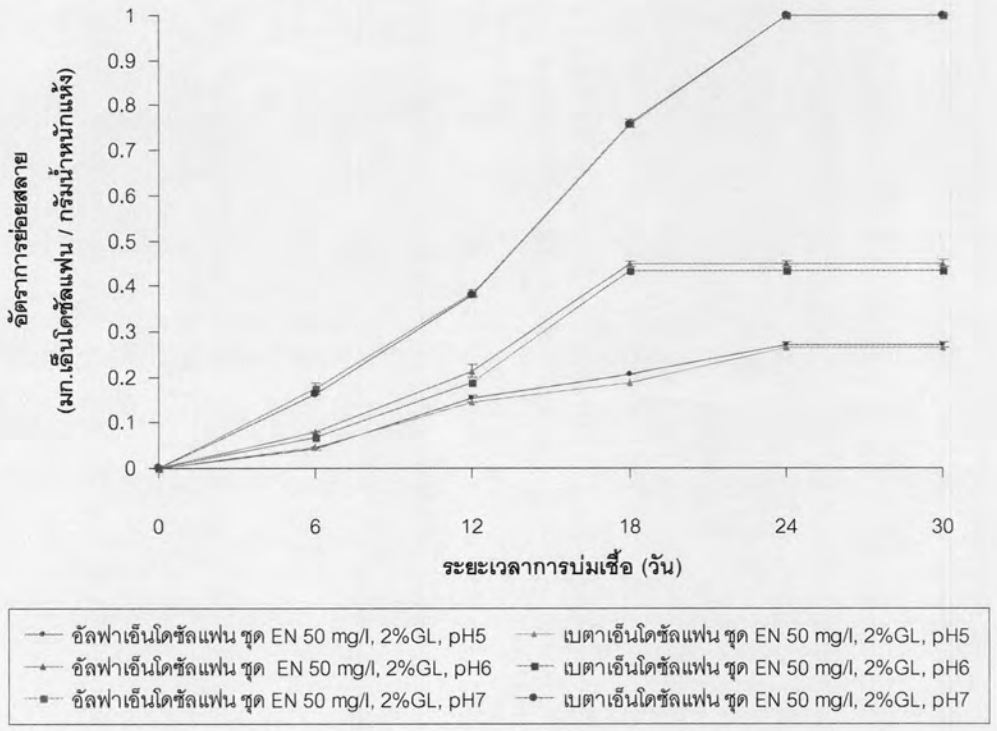
ภาพที่ 4.17 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6



ภาพที่ 4.18 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7



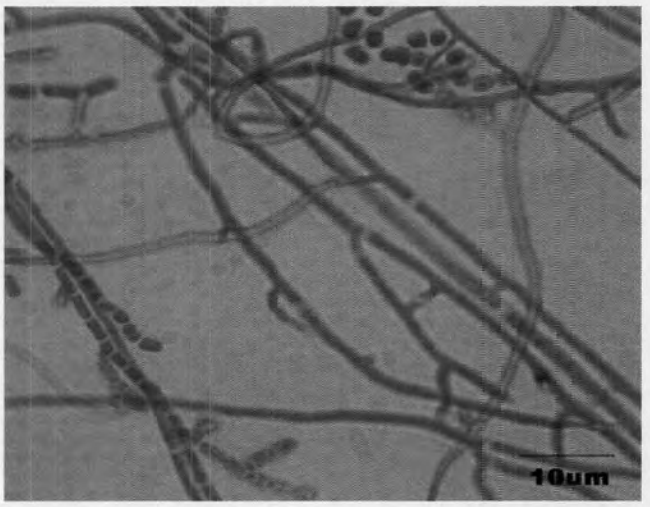
ภาพที่ 4.19 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 5 6 และ 7 ที่ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์



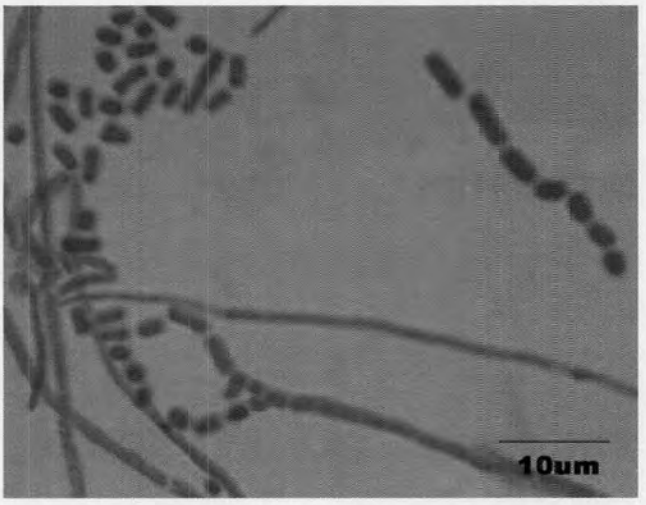
ภาพที่ 4.20 การเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 5 6 และ 7 ที่ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์

4.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดเลือกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค slide culture

จากผลการศึกษาความสามารถในการย่อยเอ็นโดซัลแฟนของรา ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Czapek's Dox Medium ซึ่งพบว่า ราไอโซเลต W2 ที่คัดแยกได้จากเห็ด มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ดีที่สุด จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค slide culture พบว่า ลักษณะเส้นใยของราเป็นชนิดที่มีผนังกั้น (septate hypha) ดังภาพที่ 4.21 และพบการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า arthospore หรือ oidia ซึ่งเกิดจากการแตก หรือขาดเป็นท่อนๆ ของเส้นใยดังภาพที่ 4.22



ภาพที่ 4.21 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา W2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า แสดงเส้นใยชนิดที่มีผนังกั้น (septate hypha)



ภาพที่ 4.22 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา W2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า แสดงสปอร์แบบไม่อาศัยเพศชนิด arthospore

4.6 การบ่งชี้ชนิดของราที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (Internal Transcribed Spacer)

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

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

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

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