

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกราออกเป็นไอโซเลตที่บริสุทธิ์จากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ราดิน จากป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก และจากพื้นที่ทำการเกษตรที่มีประวัติการใช้เอ็นโดซัลแฟนในจังหวัดปทุมธานี และนนทบุรี พบว่า มีจำนวนไอโซเลตที่คัดแยกได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลต (S1-S27) ราที่คัดแยกได้จากเห็ด และกิ่งไม้ผุ ที่ได้เก็บตัวอย่างในอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก และอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ มีทั้งหมด 13 ไอโซเลต (W1-W13) ซึ่งเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นวงแหวน หรือการทดสอบความเป็นราไวต์รอต (white rot fungi) โดยนำมาทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผสมสารสีสองชนิด คือ Tannic acid agar และ Poly-R agar clearance ผลการทดสอบปรากฏว่า มีรา 8 ไอโซเลต ที่สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด (W1 W2 W4 W6 W8 W10 W11 และ W13) จึงได้นำราดังกล่าวมาศึกษาขั้นต่อไป ส่วนราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกโดยวิธี Surface sterilization จากพืชในป่าธรรมชาติ ภายในอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก และพืชที่มีประวัติการใช้สารกำจัดแมลงชนิดเอ็นโดซัลแฟนในพื้นที่ทำการเกษตรในจังหวัดปทุมธานี และนนทบุรี สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต

จากจำนวนราทั้งหมด 59 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้ นำมาบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Czapek's Dox Medium (pH 7) บนเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนขั้นปฐมภูมิ (Primary degradation test) โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่า มีเพียงราไอโซเลต W2 ซึ่งคัดแยกมาจากเห็ดที่ขึ้นบนกิ่งไม้ผุ ในอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ให้เป็นสารเมทาโบไลต์ชนิดหนึ่ง ในวันที่ 12 ของการบ่มเชื้อ และสามารถย่อยเอ็นโดซัลแฟนได้หมดภายในระยะเวลา 18 วันของการบ่มเชื้อ โดยไม่ก่อให้เกิดการสร้างเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต ซึ่งเป็นเมทาโบไลต์ที่มีความคงทนสูงและเป็นพิษมากกว่า ทั้งนี้เมทาโบไลต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนโดยรา W2 นี้ มีค่า Retention factor (R_f) เท่ากับ 0.04 สอดคล้องกับ R_f ของสารเอ็นโดซัลแฟนไดออกซิล ซึ่งเป็นเมทาโบไลต์ที่มีความคงทนในสิ่งแวดล้อมต่ำ และมีความเป็นพิษน้อยกว่าเอ็นโดซัลแฟน (Awasthi และคณะ, 1997; Awasthi และคณะ, 2000; Shetty และคณะ, 2000 และ Sutherland และคณะ, 2002) จากการตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อในวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อ พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงจาก 7 เป็น 8.54 ซึ่งแตกต่างจากราไอโซเลตอื่นๆ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อย

เมื่อนำราไฮโซเลต W2 มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนขั้นทุติยภูมิ (Secondary degradation test) โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC) ที่มีเครื่องตรวจวัดเป็นแบบ Electron Capture Detector ตรวจสอบปริมาณการย่อยสลาย หรือปริมาณความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนที่ลดลง ทุก 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่า รา W2 สามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ทั้งอัลฟาและเบตาไฮโซเมอร์ ได้หมดภายในระยะเวลา 21 วันของการบ่มเชื้อ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอ็นโดซัลแฟนเป็นเอ็นโดซัลแฟนไดออกอล หลังจากวันที่ 3 ของการบ่มเชื้อ และเมื่อพิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในระหว่างการทดสอบการย่อยสลายพบว่า รา W2 มีระยะปรับตัว (lag phase) ในช่วง 3 วันแรกของการบ่มเชื้อ ซึ่งเป็นช่วงเริ่มต้นที่มีการย้ายร่าไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้น จึงเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) จนถึงวันที่ 18 ของการบ่มเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการลดลงของเอ็นโดซัลแฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอัตราการเพิ่มขึ้นของเอ็นโดซัลแฟนไดออกอล ทั้งนี้ในระยะดังกล่าว ได้สังเกตเห็นขนาดเซลล์ร่าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาดเล็กลง เนื่องจากรามีอาหารสะสมอยู่ในเซลล์เต็มที่ และมีการแบ่งตัว (อนุเทพ ภาสุระ, 2541) ภายหลังจากวันที่ 18 จนถึงวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อ ราได้เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ซึ่งไม่พบการเจริญเติบโตของรา และเมื่อพิจารณาจากอัตราการย่อยสลายพบว่า ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อค่อยๆ ลดลง และคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อ ทั้งนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ตรวจวัดได้ในวันสุดท้ายของการบ่มเชื้อมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 8.55

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

เมื่อพิจารณาผลจากการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนทั้ง 6 สภาวะที่เหลือ ซึ่งทั้งหมดมีค่าความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนเป็น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแบ่งออกเป็นชุดที่มีปริมาณกลูโคสเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 5 6 และ 7 ชุดที่มีปริมาณกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 5 6 และ 7 วัดอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนต่อน้ำหนักแห้งของราต่อวัน ซึ่งผลปรากฏว่า ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน

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

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