บทที่ 4

การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการแยกและตรวจสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของรา ที่ก่อปัญหาในไม้ยางพาราโดยใช้อาหารวุ้นคาร์บอกซิเมธิลเซลลูโลส พบว่าราทุกสายพันธุ์ที่แยกได้มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และเมื่อนำตัวแทนราที่มีความสามารถสูงในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากราแต่ละกลุ่มที่แยกได้ อันได้แก่ Syncephalustrum sp. YA_7 Aspergillus sp. CX_2 Penicillium sp. YA_8 และ Trichoderma sp. Pol_1 มาตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์องค์ประกอบคือ เอคโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และ บีตา-กลูโคซิเดส ในอาหารเหลวตามสูตรอาหารของ Mandel และ Sternberg พบว่าตัวแทนราทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์และ Trichoderma sp. Pol_1 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์องค์ประกอบสูงที่สุดเมื่อเทียบกับตัวแทนราสายพันธุ์อื่น

การทำลายเนื้อไม้ที่เกิดโดยราส่วนใหญ่เกิดจากการที่เอนไซม์เซลลูเลส ที่สร้างจากสายใยราไปทำลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์ของพืช (7,18,19, 20) ดังนั้นหากสารประกอบดีบุกอินทรีย์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้ ย่อมสามารถป้องกันการทำลายเนื้อไม้โดยราได้ นอกจากนี้ยังมีผู้รายงานว่า การที่สารประกอบดีบุกอินทรีย์ป้องกันการทำลายเนื้อไม้เกิดโดยส่วน Tributyltin group จะไปสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ OH-group ที่อยู่ในสายใยเซลลูโลสในเนื้อไม้ (67,68,69) ทำให้เอนไซม์ที่สร้างจากสายใยราไม่สามารถย่อยสลายเนื้อไม้ได้ (70) จึงได้ทดลองนำสารประกอบดีบุกอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มาทดสอบผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ต่อการยับยั้งความสามารถ ในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ผลิตขายทางพาณิชย์ และที่สร้างจากตัวแทนราที่คัดเลือก

จากการนำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขายทางพาณิชย์ โดยบริษัทโนโว อันได้แก่ เอนไซม์ celluclast ซึ่งสร้างจากรา Trichoderma reesei โดยเอนไซม์นี้จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์เอคโซกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนสอยู่สำหรับเอนไซม์ บีตา-กลูโคซิเดสนั้นเป็นเอนไซม์ที่ผลิตโดยรา Aspergillus niger จากการที่เป็นเอนไซม์ที่ผลิตขายทางการค้า ดังนั้นเอนไซม์จึงถูกเตรียมให้อยู่ในสภาวะ ที่มีความสามารถในการทำงานสูง เช่น อยู่ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม มีการเติมสารป้องกันการสลายตัว (stabili-

zer) เป็นต้น ดังนั้นถ้าสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่นำมาทดสอบ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ แสดงว่าสารประกอบดีบุกอินทรีย์นั้นดี พบว่าสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และสารฆ่ารามีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตทางพาณิชย์ ในระดับค่อนข้างต่ำ โดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่าราเข้มข้น 100 ppm. ให้ผลการยับยั้งต่ำกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ และแม้ว่าจะทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารยับยั้ง ระยะเวลาที่บ่มกับเอนไซม์ และการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างของระบบการทำงาน ก็ยังให้ผลการยับยั้งต่ำอยู่ ซึ่งในกรณีนี้อาจเป็นไปได้ว่า สารป้องกันการเสียสภาพของเอนไซม์ช่วยป้องกันเอนไซม์จากการถูกยับยั้ง โดยสารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่าราได้

ดังนั้นจึงทำการทดสอบความสามารถของบิสไตรบิวทิลทินออกไซด์ (T.B.T.O.) ที่ความเข้มข้น 100 ppm. ต่อการยับยั้งความสามารถ ในการทำงานของเอนไซม์เอคโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และ บีตา-กลูโคซิเดส ที่สร้างจากตัวแทนราที่คัดเลือกได้ ซึ่งกรณีนี้เท่ากับไม่มีสาร stabilizer ที่อาจป้องกันเอนไซม์จากสารยับยั้งอยู่ พบว่า T.B.T.O. ก็ยังคงมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในเกณฑ์ต่ำ

ดังนั้นจากการทดลองนี้สรุปได้ว่า สารประกอบดีบุกอินทรีย์และสารฆ่ารา ที่นำมาทดสอบมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำ

สาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่ง ของการทำลายเนื้อไม้เกิดจากความสามารถในการเจริญและสร้างสายใยแทรกเข้าไปในเนื้อไม้ (1,8,16) และเนื่องจากการขยายพันธุ์ของราเกิดโดยการแพร่กระจายของสปอร์หรือชิ้นส่วนของสายใย (30,31) ดังนั้นหากสารประกอบดีบุกอินทรีย์สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ หรือยับยั้งการเจริญของสายใยได้ ก็จะสามารถขจัดปัญหาการสูญเสียนี้ได้เช่นกัน จึงได้ทำการศึกษาผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และสารฆ่าราบางกลุ่มต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ และการยับยั้งการเจริญของสายใย โดยใช้ตัวแทนราที่คัดเลือกจากไม้ยางพารา ที่มีปัญหาจากการทำลายของราเหล่านี้ พร้อมทั้งศึกษาหาข้อมูลเบื้องต้นของการยับยั้งนี้ เพื่อจะได้ข้อมูลและแนวทางสำหรับปรับปรุง คุณสมบัติของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และวิธีการที่จะนำไปใช้งานให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

จากการศึกษาผลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และสารฆ่าราต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ พบว่าสารประกอบดีบุกอินทรีย์ และสารฆ่าราทุกตัวที่นำมาทดลองสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ จากตัวแทนราที่คัดเลือกได้ และเมื่อพิจารณาความสามารถของสารที่นำมาทดสอบแต่ละตัวต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ในรา แต่ละสายพันธุ์ พบว่ามีค่า

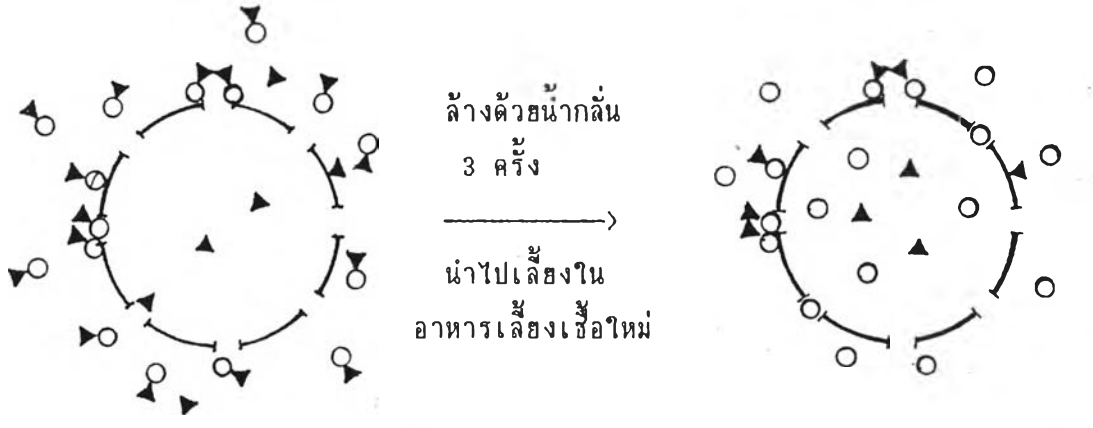
แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของโครงสร้าง และความหนาของผนังสปอร์ตลอดจนขนาดของสปอร์ ซึ่งแตกต่างกันไปในราแต่ละสายพันธุ์ (71,72)

จากการศึกษาผลของ T.B.T.O. ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ Trichoderma sp. Pol, สามารถจำแนกการยับยั้งการงอกของเชื้อราเป็น 3 พวกคือ Static effect Sublethal effect และ Cidal effect ทั้งนี้พบว่าเมื่อใช้สารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่ำ (2ppm.) จะพบว่าสปอร์ไม่สามารถงอกได้แม้ว่าจะบ่มไว้นานถึง 10 วัน (ขณะที่กลุ่ม control ใช้เวลาเพียง 7 ชม. ก็งอกได้) แต่เมื่อล้างเอาสารประกอบดีบุกอินทรีย์ออกแล้วเลี้ยงในอาหารใหม่จะงอกได้ซึ่งจัดเป็น Static effect ในกรณี Sublethal dose พบว่าหากบ่ม T.B.T.O. ที่ 5ppm. กับสปอร์นาน 24 ชม. โดยมีน้ำเป็นตัวทำละลายจะไม่มีการงอกของสปอร์และไม่สามารถ ทำให้สปอร์งอกถึงแม้จะล้าง T.B.T.O. ออกและใส่ในอาหารใหม่แต่หากบ่มสปอร์ร่วมกับ T.B.T.O. ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ผลจะคล้ายกับกรณีใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย แต่เมื่อเติมสารดีเทอร์เจนท์ Tween 80 ลงไปจะสามารถทำให้สปอร์งอกได้ แม้ว่าสปอร์จะยังอยู่ในระบบที่มี T.B.T.O. อยู่ หรือ ในระบบที่มีการล้าง T.B.T.O. ออก แต่หากเพิ่มเวลาของการบ่มเป็น 72 ชม.จะไม่สามารถทำให้สปอร์งอกใหม่ได้แม้จะเติมสาร Tween 80 ลงไปจึงจำแนกชนิดหลังให้เป็น Cidal effect

สำหรับกลไกการยับยั้งการงอกของสปอร์นอจะสันนิษฐานได้ว่า ในกรณีของ Static dose นั้น T.B.T.O. อาจจะจับกับสารอาหารหรือจับกับผิวสปอร์แล้วป้องกันไม่ให้สารอาหารเข้าสู่สปอร์ได้ Richmond รายงานว่าการนำโมเลกุลเข้าสู่สปอร์ขึ้นกับรูปร่าง (shape) และประจุที่กระจายอยู่บนโมเลกุลนั้นโดยเสนอว่าถ้ามีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่ารู (pore) ที่ผิวสปอร์สารนั้นก็จะผ่านเข้าสปอร์ไม่ได้ (72) และเนื่องจากสารอาหาร เช่น กลูโคส ฟอสเฟต และไนโตรเจนจำเป็นสำหรับการชักนำให้สปอร์งอก (33) Richardson รายงานว่า T.B.T.O. สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับปลาย -OH อิสระของโมเลกุล เซลลูโลสได้ (67) ฉะนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบชั่วคราวเกิดจากการที่ T.B.T.O. ไปจับกับโมเลกุลของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อดังนั้นเราจึงไม่พบการงอกของสปอร์ แต่พบว่าหากล้างสปอร์ ซึ่งเท่ากับเอา T.B.T.O. ที่ free หรือ T.B.T.O. ที่จับกับสารออก แล้วเติมสารอาหารใหม่จะเกิดการชักนำให้สปอร์งอกได้ (รูปที่ 43)

ในกรณีของ Sublethal dose นั้น เมื่อบ่มสปอร์ในน้ำที่มี T.B.T.O T.B.T.O. อาจจับที่ผิวสปอร์บางส่วน และบางส่วนเข้าสู่สปอร์เมื่อล้างแล้วเติมด้วยอาหารหรือใช้ Tween 80 ช่วยไม่สามารถ reverse ผลได้อาจเป็นไปได้ว่า T.B.T.O ที่เข้าสปอร์กรณีหลังอยู่ในปริมาณที่สูงทำให้สปอร์ตายได้หรือการจับของ T.B.T.O. ต่อผิวสปอร์นั้นขัดขวางการเข้าของสารอาหารสู่สปอร์ทำให้ไม่มีการชักนำให้เกิดการงอก และ

รูปที่ 43 กลไกการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบชั่วคราว (Static effect)



: มี T.B.T.O.สะสมภายในสปอร์ต่ำ

: ไม่มีสารอาหารผ่านเข้าไปชักนำให้สปอร์งอก

สารอาหารเข้าไปชักนำให้สปอร์งอก

↓

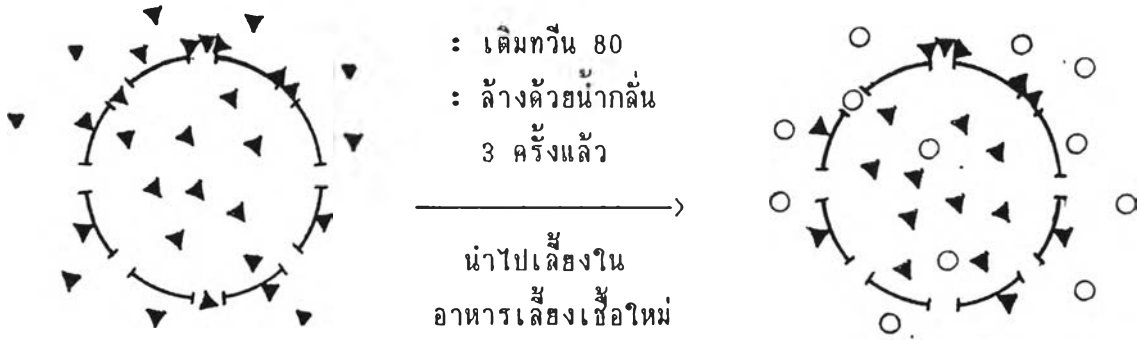
สปอร์งอก

○ = สารอาหาร

▲ = บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.)

⊣⊢ = รู (pore) บนผนังสปอร์

รูปที่ 44 กลไกการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า (Sublethal effect)



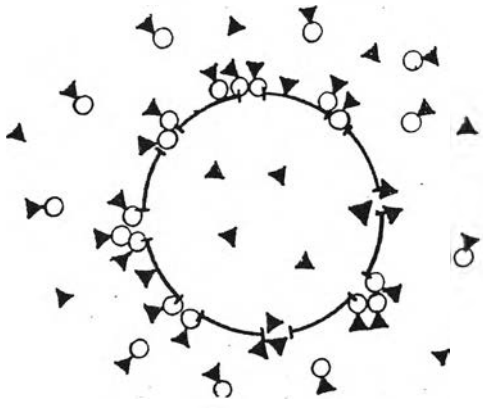
: มี T.B.T.O.สะสมภายในสปอร์ปริมาณสูง

ไม่พบการงอกของสปอร์

↓

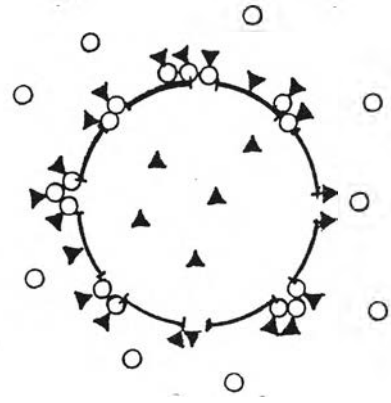
สปอร์ตายเนื่องจากมี T.B.T.O.สะสมปริมาณสูง

รูปที่ 44ก การยับยั้งการงอกของสปอร์ในน้ำกลั่น



ล้างด้วยน้ำกลั่น
3 ครั้ง

นำไปเลี้ยงในอาหาร
เลี้ยงเชื้อใหม่



: T.B.T.O. ที่จับกับสารอาหาร
ปิดกั้นรูบนผนังสปอร์
: มี T.B.T.O.สะสมภายในสปอร์ต่ำ

สารอาหารไม่สามารถ
เข้าไปชักนำการงอกของสปอร์

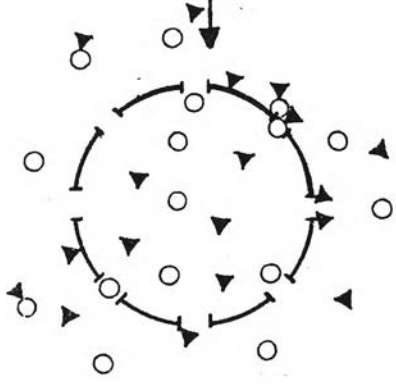
↓

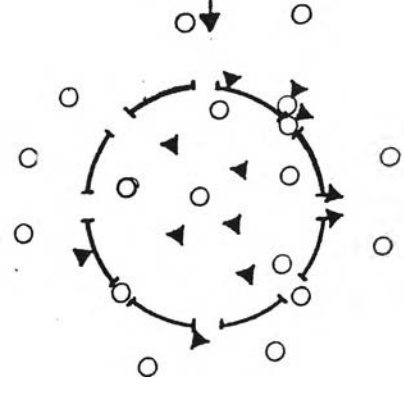
ไม่พบการงอกของสปอร์

เติมทวีน 80

ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่





ผลของ ทวีน 80

: ทำให้ T.B.T.O. ที่จับกับสารอาหารแล้วปิดกั้นรูบนผนังสปอร์
หลุดออกเป็นผลให้รูเปิด
: ทำให้ T.B.T.O. หลุดจากโมเลกุลของสารอาหารมีผลให้สาร
อาหารผ่านเข้าไปชักนำการงอกของสปอร์ได้
: เพิ่มการละลายของ T.B.T.O. ทำให้ T.B.T.O.จับกับผิวสปอร์
หรือผ่านเข้าในสปอร์ได้น้อย มีผลให้ปริมาณ T.B.T.O.สะสมใน
สปอร์ต่ำ

↓

สปอร์งอก

: มี T.B.T.O.สะสมใน
สปอร์ต่ำ
: สารอาหารใหม่เข้าไป
ชักนำการงอกของสปอร์

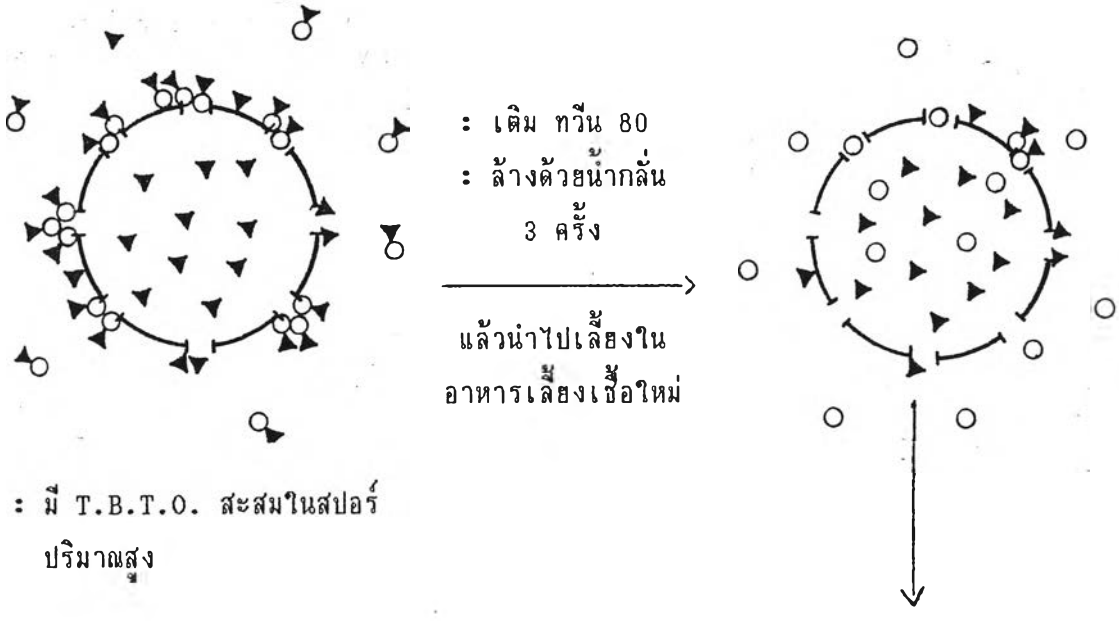
↓

สปอร์งอก

รูปที่ 44ข การยับยั้งการงอกของสปอร์ในอาหารเหลว

รูปที่ 45 กลไกการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่มีผลฆ่าสปอร์ (cidal effect)

เมื่อเพิ่มระยะเวลาบ่มสปอร์ในระบบการยับยั้งการงอกของสปอร์แบบกึ่งฆ่า จาก 24 ชม. เป็น 72 ชม. จะพบว่าสปอร์ตาย



○ = สารอาหาร

▲ = บิสไตรบิวทิลทินออกไซด์(T.B.T.O.)

⊣⊢ = รู (pore) บนผนังสปอร์

การจับตัวของ T.B.T.O. ต่อผิวสปอร์กรณีนี้ไม่สามารถชะออกด้วย Tween 80 (รูปที่ 44) การจับระหว่าง T.B.T.O. กับผิวสปอร์อาจจับกันด้วยพันธะไอออนิก เนื่องจากผิวสปอร์ของราส่วนใหญ่จะมีประจุเป็นลบ (73) และสารประกอบดีบุกอินทรีย์โดยทั่วไปเมื่ออยู่ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำจะมีประจุบวก (74)

ส่วนกรณีสุดท้าย Cidal dose นั้นผลคล้ายกับ Sublethal dose เพียงแต่ Tween 80 ไม่สามารถ revert effect ได้นั้นอาจเป็นไปได้ว่าการบ่ม T.B.T.O. เป็นระยะเวลานานทำให้มี T.B.T.O. ถูกนำเข้าสู่สปอร์สูงเกินกว่าที่สปอร์ทนได้จึงตายไปโดยปริยาย (รูปที่45) และ อาจเป็นไปได้ว่า T.B.T.O. ที่เข้าไปภายในสปอร์นั้นไปมีผลยับยั้งกระบวนการหายใจของสปอร์เนื่องจากมีรายงานว่า Triorganotin สามารถจับกัน sulfhydryl group ของโปรตีนได้ (45) และพบว่าเอนไซม์ที่ใช้ในระบบการหายใจส่วนใหญ่เป็น SH-activated enzyme (75) จึงเป็นสาเหตุให้สปอร์ตาย

ประเด็นที่น่าพิจารณาขณะนี้จะเห็นว่ามี 2 ประเด็นที่ทำให้สปอร์ไม่งอกคือ

1. การสะสมของ T.B.T.O. ในเซลล์จนถึงระดับหนึ่งสปอร์จะตายได้
2. การจับของ T.B.T.O. กับสารอาหารที่อยู่บนผิวสปอร์ซึ่งขัดขวางการนำเจ้าสารอาหารสู่เซลล์

ใน 2 ประเด็นนี้น่าจะเกิดในสภาวะการทดลองได้ ทั้งนี้หากพิจารณาประเด็นที่ 1 จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบ Static effect ซึ่งใช้ T.B.T.O. น้อย effect จะต่ำ ส่วนกรณี ของ Sublethal effect ใช้ปริมาณ T.B.T.O. ในระดับ excess เมื่อเปรียบเทียบ Sublethal ที่บ่มในอาหารกับ Sublethal ที่บ่มในน้ำ เนื่องจากในน้ำไม่มีสารอาหาร ปริมาณของ T.B.T.O. ที่เข้าสู่สปอร์ย่อมเข้าได้มากกว่ากรณีมีสารอาหารอยู่ด้วย จึงไม่พบการงอกแม้จะเติม Tween 80 ลงไปก็ตาม สำหรับข้อสนับสนุนกรณีนี้คือ Cidal effect ซึ่งเราใช้ T.B.T.O. เท่ากับ Sublethal แต่ปล่อยให้บ่มนานกว่าดังนั้นปริมาณของ T.B.T.O. ที่ถูกนำเข้าสู่สปอร์ย่อมสูงกว่ากรณีบ่มระยะสั้นจึงเกิดเป็น Cidal effect และจากผลการทดลองที่เราเห็นการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการสร้างเซลลูเลสและเอนไซม์องค์ประกอบ ,ความสามารถ ในการเจริญและการสร้างรงควัตถุตลอดจนผลการเปลี่ยนแปลงใน generation ต่อๆไป เมื่อ parent ถูกบ่มร่วมกับ T.B.T.O. นั้นเป็นเครื่องพิสูจน์ว่า T.B.T.O. เข้าสู่สปอร์จริง

ในประเด็นหลังที่ว่า T.B.T.O. จะจับกับสารอาหารที่เคลือบกับผิวสปอร์และขัดขวางไม่ให้สารอาหารเข้าสู่สปอร์นั้น ขณะนี้ไม่สามารถหาหลักฐานที่จะพิสูจน์โดยตรงว่ามีการจับของ T.B.T.O. ต่อสารอาหารที่เคลือบบนผิวเซลล์เนื่องจากยังไม่มีวิธีการหรือเครื่องมือใดที่มีความไวและละเอียดพอที่จะหาปริมาณของดีบุกอินทรีย์บนผิวเซลล์ในปริมาณต่ำ

มากๆ ได้ แต่จากการที่พบว่าการเกิด Sublethal ที่บ่มในอาหาร Tween 80 สามารถทำให้สปอร์งอกได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ ขณะที่ sublethal ที่บ่มในน้ำไม่พบการงอกก็อาจแสดงให้เห็นได้ว่ามีการจับระหว่าง T.B.T.O. กับสารอาหารแล้วขัดขวางการนำอาหารเข้าสู่สปอร์ การเติม Tween 80 จะทำให้ชั้นของอาหารที่มี T.B.T.O. จับอยู่หลุดไปสารอาหารจึงสามารถผ่านเข้าไปกระตุ้นการงอกของสปอร์ได้

จากการศึกษาผลของ T.B.T.O. ต่อการยับยั้งการเจริญของสายใยตัวแทนราที่คัดเลือกพบลักษณะการยับยั้งเป็น 3 แบบคือ Static effect Sublethal effect และ Cidal effect

พบว่า Static dose ของ T.B.T.O. มีผลยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ ด้วยแสดงให้เห็นว่ามีการนำ T.B.T.O. เข้าไปในเซลล์การยับยั้งการสร้างสปอร์อาจเกิดเนื่องจาก T.B.T.O. เข้าไปจับกับ SH-group ของโปรตีนบริเวณผนัง phialide ที่ควบคุมการสร้างสปอร์ (40,41) และที่ความเข้มข้นนี้มีผลฆ่าสายใยของราอายุ 12 ชม. ขณะที่สายใยที่มีอายุมากกว่ายังคงมีชีวิต แสดงว่าความสามารถในการฆ่าสายใยขึ้นกับอายุของเชื้อ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผนังเซลของราที่มีอายุมากแข็งแรงและซับซ้อน (complex) กว่าราที่มีอายุน้อย (76) ทำให้การผ่านของ T.B.T.O. เข้าสู่เซลล์สายใยอายุน้อยเกิดได้ง่ายกว่า

เมื่อเพิ่มปริมาณ T.B.T.O. ในระบบการยับยั้งการเจริญเมื่อเชื้อเจริญในระยะ mid-log จะพบการยับยั้งแบบ Sublethal effect และพบว่า Sublethal dose ของ T.B.T.O. ต่อราแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันเช่นเดียวกับที่พบในการยับยั้งการงอกของสปอร์ทั้งนี้เนื่องมากจากความแตกต่างของโครงสร้าง และองค์ประกอบของผนังเซลล์ (71,72) พบว่า Tween 80 สามารถ revert effect นี้ได้แสดงให้เห็นว่าการจับของ T.B.T.O. บนผนังเซลล์ของสายใยมีส่วนสำคัญต่อการยับยั้งการเจริญแบบ Sublethal effect ด้วย

จากการศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของตัวแทนรา Trichoderma sp.Pol$_1$ พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาบ่มสายใยใน T.B.T.O. หรือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ T.B.T.O. ขึ้นจาก Sublethal dose จะพบผลการยับยั้งแบบ Cidal effect แสดงให้เห็นว่าจะต้องมีการสะสมของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ระดับหนึ่งในเซลล์จึงจะสามารถฆ่าสายใยได้

จากงานวิจัยนี้พบว่าสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่นำมาทดสอบ มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำแต่พบว่าสารประกอบดีบุกอินทรีย์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของสายใยขณะเดียวกัน ก็มีผลต่อการฆ่าสปอร์และสายใยด้วย พบว่า T.B.T.O. ที่สังเคราะห์โดยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการงอกของสปอร์จากตัวแทนที่ราแยกจากไม้ยางพารา จากการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของการยับยั้งการงอกของสปอร์ และการเจริญของสายใยตัวแทนราโดย T.B.T.O. พบว่าการยับยั้งดังกล่าวมี 3 ระดับคือการยับยั้งแบบชั่วคราว การยับยั้งแบบกึ่งฆ่าและการยับยั้งที่ให้ผลฆ่า จากการศึกษาการยับยั้งการงอกของสปอร์พบว่าตัวกลางในระบบการยับยั้งมีส่วนสำคัญต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเช่น ขณะที่การยับยั้งการงอกสปอร์ในระบบการยับยั้งที่ตัวกลางเป็นอาหารเหลว PDB ให้ผลการยับยั้งแบบกึ่งฆ่านั้นการยับยั้งในระบบที่ตัวกลางเป็นน้ำกลั่นให้ผลฆ่าสปอร์แสดงให้เห็นว่าการที่ T.B.T.O. อยู่ในตัวกลางที่เป็นน้ำจะมีประสิทธิภาพในการทำงานสูงโดยอาจเป็นผลจาก T.B.T.O. สามารถจับกับ binding siteบนผนังเซลล์ราได้โดยตรงและอาจเกิดจากการละลายได้ในน้ำมีผลให้การนำ T.B.T.O เข้าภายในสปอร์เกิดได้ดีกว่าพบว่า Tween 80 มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของสายใยของ T.B.T.O. ต่ำลง