บทที่ 6

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารแอทราซีนโดยราไอโซเลตต่างๆทั้ง 3 กลุ่ม คือ ราเอ็นโดไฟต์ ราดิน และราไวต์รอต พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายแอทราซีนได้ทุกไอโซเลตแต่มีอัตราการย่อยสลายแอทราซีนได้แตกต่างกัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับหลายๆ งานวิจัยที่พบว่าราหลายกลุ่มมีความสามารถในการย่อยสลายสารแอทราซีนได้ เช่น กลุ่มราดิน ได้แก่ ราในสกุล *Asspergillus Rhizopus, Fusarium Penicillium* และ *Trichoderma* (Strand,1993) กลุ่มราเอคโตไมคอร์ไรซา ได้แก่ *Hymenoscyphus ericae Rhizopogon vinnicolor Sclerogaster pacificus* (Donnelly, 1993) และกลุ่มราไวต์รอต ได้แก่ *Trametas versicolor Phanerochaete chysosporium* เป็นต้น และจากงานวิจัยนี้ พบว่าราไวต์รอตไอโซ-เลต W5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอทราซีนได้ดีที่สุด ซึ่งราไวต์รอตไอโซเลต W5 เป็นราไวต์รอตชนิด *T. versicolor* (ณัฐยา สมจิตร, 2549) โดยพบว่ามีอัตราการย่อยสลายแอทราซีนได้ถึง 0.984 มิลลิกรัมแอทราซีนต่อน้ำหนักแห้ง ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ในวันที่ 35 ของการทดลอง นอกจาก *T. versicolor* ยังมีรากลุ่มไวต์รอตชนิดอื่นที่มีความสามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชได้อีก เช่น *Hypholoma fasciculare* และ *Stereum hissutum* ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย ไดยูรอน แอทราซีน และ เทอบิวทิวราซีน ได้มากกว่า 86% ในวันที่ 42 ของการทดลอง (Bending, 2002) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า ราไวต์รอตมีลักษณะพิเศษที่ทำให้สามารถย่อยสลายสารที่มีมวลโมเลกุลสูงและมีโครงสร้างซับซ้อนได้ เนื่องจากราไวต์รอตมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม Ligninolytic peroxidases Manganese peroxidase และ Laccase ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารลิกนินซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างวงแหวนที่ค่อนข้างซับซ้อนได้ โดยพบว่าความสามารถในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชนั้นขึ้นกับความแตกต่างของระบบการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายสารลิกนิน ได้มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาราไวต์รอตสกุล *Polyporaceae* ได้แก่ *Coriolus versicolor Dichotomitus squalens* และ *Phanerochaete velutina* พบว่า *C. versicolor* ที่มีการผลิตเอนไซม์ lignin peroxidase และ manganese peroxidase มีความสามารถในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชได้ดีมากกว่า *D. squalens* และ *P. velutina* ที่ผลิตเอนไซม์ manganese peroxidase และ laccase และเนื่องจากในธรรมชาติพบว่าราในสกุล *Polyporaceae* มีการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายลิกนินและสารประกอบที่ได้จากการสังเคราะห์ได้ดี ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ราในกลุ่มนี้น่าจะมี

ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารพิษที่เกิดจากสังเคราะห์ขึ้น ได้ด้วย (Bending, 2002)

ผลจากการศึกษาการทดสอบการย่อยสลายของรา *T. versicolor* W5 ในขั้นทุติยภูมิยังพบว่าความเข้มข้นของแอทราซินวันที่ 6 ถึงวันที่ 36 ของการทดลองมีแนวโน้มที่จะลดลงเรื่อยๆ และความเข้มข้นเริ่มที่จะคงที่จนถึงวันที่ 42 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง ในขณะเดียวกันก็พบว่า การเจริญเติบโตของราไวต์รอต *T. versicolor* W5 (จากการวัดน้ำหนักแห้งเฉลี่ย) วันที่ 6 ถึงวันที่ 36 ของการทดลองมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเริ่มคงที่จนถึงวันที่ 42 เช่นเดียวกัน และจากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของราไวต์รอต *T. versicolor* W5 ในชุดการทดลองที่ใส่สารแอทราซินกับชุดทดลองที่ไม่ใส่สารแอทราซิน พบว่ามีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันมากและมีทิศทางเดียวกัน แสดงให้เห็นราไวต์รอต *T. versicolor* W5 อาจสร้างเอนไซม์มาย่อยสลายสารแอทราซินแต่มิได้นำสารแอทราซินมาใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อกระบวนเจริญเติบโตของเซลล์

นอกจากนี้ ผลจากการวิจัยยังทำให้ทราบว่า ราไวต์รอต *T. versicolor* W5 มีความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งพลังงานคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณความเข้มข้นสารแอทราซิน เป็นต้น

ปัจจัยเรื่องความแตกต่างของปริมาณแหล่งพลังงานคาร์บอน จากผลการวิจัย พบว่า *T. Versicolor* W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ที่มีปริมาณกลูโคส 20 มิลลิกรัมต่อลิตรมีอัตราการย่อยสลายแอทราซินได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ที่มีปริมาณกลูโคส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของรา พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ที่มีปริมาณกลูโคส 20 มิลลิกรัมต่อลิตรมีการเจริญเติบโตมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ที่มีปริมาณกลูโคส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจาก กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนที่ง่ายต่อการเอาไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของรา และนำไปสู่การสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายแอทราซิน ดังนั้นสภาวะที่มีกลูโคสสูงกว่าย่อมส่งผลถึงการเจริญเติบโต การผลิตเอนไซม์ และเพิ่มโอกาสในการที่ราจะย่อยสลายแอทราซินได้ในอัตราที่สูงเช่นเดียวกัน (Chulalaksananukul, et al., 2006)

ปัจจัยเรื่องค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย พบว่า ทีสภาวะ pH 4 นั้น รามีอัตราการย่อยสลายแอทราซินได้น้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของราในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media (pH 4) ที่มีการเจริญน้อยที่สุดเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่า ในสภาวะที่เป็นกรดสูงเกินไป ราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดี ดังนั้นจึงมีการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายแอทราซินในปริมาณน้อย ซึ่งส่งผลทำให้อัตราการย่อยสลายแอทราซินเกิดได้น้อยเช่นเดียวกัน ส่วนที่สภาวะในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 พบว่า *T. versicolor* มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด รวมทั้งมีอัตราการย่อยสลายแอทราซินได้ดีที่สุดด้วย อาจอธิบายได้ว่า

โดยทั่วไปรามีความสามารถในเจริญเติบโตได้ดีที่สภาวะความเป็นกรดอ่อนๆ คือ ค่า pH ประมาณ 5-6 และค่า pH ที่เหมาะสม คือ 5.6 (กัณฑรีย์ ศรีพงศ์พันธุ์, 2540)

ในส่วนของปัจจัยความเข้มข้นของแอทราซินที่ใช้ในงานวิจัย พบว่าราไวต์รอต *T. versicolor* W5 มีความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินได้ทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลอง คือ ที่ 10 (0.05 mM) 100 (0.5 mM) และ 200 (1 mM) มิลลิกรัมต่อลิตร แต่มีอัตราการย่อยสลายแอทราซินได้แตกต่างกัน โดยชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของแอทราซินเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบอัตราการย่อยสลายแอทราซินสูงที่สุด รองลงมาคือที่ 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโต โดยราไวต์รอต *T. versicolor* W5 มีอัตราการเจริญดีที่สุดที่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอทราซินเท่ากับ 10 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของแอทราซินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปริมาณสูงอาจเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ สอดคล้องกับการทดลองของ Donnelly (1993) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแอทราซิน ของรา 9 ชนิด ได้แก่ *Phanerochaete chysosporium, Hymenoscyphus ericae Rhizopogon vinnicolo Sclerogaster pacificus Oidiodendron griseum Gautieria crispa Gautieria othii Radiigera atrogleba Trappea darkeri* พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายสาร แอทราซินได้ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1 mM ขึ้นไป แต่ไม่สามารถย่อยสลายสารแอทราซินได้ที่ความเข้มข้นแอทราซินเท่ากับ 4 mM และพบว่าไม่มีราชนิดใดที่สามารถเจริญเติบโตได้เลย ทั้งนี้เนื่องจากที่ความเข้มข้นของแอทราซินสูงก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อรานั้นเอง

จากงานวิจัยนี้ได้พบว่าในสภาวะที่ดีที่สุด(20 มิลลิกรัมต่อลิตรของกลูโคส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5ในอาหารเลี้ยงเชื้อ) มีอัตราการย่อยสลายแอทราซินได้ถึง 98.94% ในวันที่ 35 ของการทดลอง ซึ่งดีกว่า การทดลองของ Bending (2002) ที่ได้ศึกษาอัตราการย่อยสลายแอทราซินของ ราไวต์รอต 9 สายพันธุ์ คือ *Agrocybe semiorbicularis Auricularia auricola Coriolus versicolor Dichotomitus squalens Flammulina velupites Hypholoma fasciculare, Phanerochaere velutina Pleurotus ostreatus* และ *Stereum hirstum* พบว่า *H. fasciculare* และ *S. hissutum* มีอัตราการย่อยสลายแอทราซินได้เพียง 86% ในวันที่ 42 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอทราซินเดียวกัน

การศึกษาสารเมทาบอไลท์ของแอทราซินด้วยเทคนิคHPLC และ LC-MS พบว่า มีการเปลี่ยนรูปสารแอทราซินที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในวันที่ 35 ของการทดลอง ไปอยู่ในรูปของสาร 2-hydrox-4-(isopropylamino)-6-(ethylamino)-s-triazine (OIET) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 198 ซึ่งจัดเป็นสารเมทาบอไลท์ขั้นที่ 1 (Primary intermediates) ที่เกิดจากการนำเอาคลอรีนออกจากโครงสร้างของแอทราซินและเติมกลุ่ม

ไฮดรอกซีโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ และสาร OIETสามารถเปลี่ยนรูปไปอยู่ในรูปสารเมทาบอไลท์อื่นอีกได้ เช่น 2-hydrox-4-(ethylamino)-6-amino-s-triazine (OEAT) โดยปฏิกิริยา N-dealkylation เมื่อมีการนำเอา กลุ่มอัลคิลออกจากโครงสร้าง นอกจากนี้ แอทราซินยังสามารถมีการเปลี่ยนรูปไปอยู่ในรูปของสารเมทาบอไลท์ขั้นที่ 2 และ 3 ได้อีก (Chan and Chu, 2005) แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลการย่อยสลายแอทราซินเพียงระยะเวลา 35 วัน ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาต่อไปถึงการเปลี่ยนแปลงรูปของสารแอทราซินจากสารเมทาบอไลท์ OIET ไปอยู่ในรูปของสารเมทาบอไลท์อื่นๆหรือไม่เมื่อมีการเพิ่มระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อมากกว่า 35วัน การเปลี่ยนแปลงรูปของสารแอทราซินไปอยู่ในรูปสาร OIET นั้นได้มีรายงานพบว่าใน เชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Nocardioides* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Rhodococcus corallinus* มีความสามารถในการเปลี่ยนสารแอทราซินให้อยู่ในรูปสารเมทาบอไลท์นี้ได้เช่นกัน (Topp, et al., 2000) ในกลุ่มราไวต์รอต พบว่า *P. chysosporium* มีความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.05 mM) ไปเป็น OIET ได้ 85 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองวันที่ 42 (Donnelly,1993)

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายแอทราซินโดยราไวต์รอต *T. versicolor* และจากงานวิจัยได้พบว่า แอทราซินได้มีการเปลี่ยนรูปไปเป็นสารเมทาบอไลท์ ได้แก่ OIET แต่แอทราซินยังมีความสามารถเปลี่ยนไปเป็นสารเมทาบอไลท์อื่นได้อีก ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาต่อในเรื่องของการเปลี่ยนรูปของแอทราซินไปเป็นสารเมทาบอไลท์ชนิดอื่นๆ เพื่อใช้ในการศึกษากลไลการย่อยสลายแอทราซินที่แน่นอน