บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การแยกราจากตัวอย่างพืช

จากการเก็บตัวอย่างใบและรากพืชจากพื้นที่เกษตรกรรมที่มีประวัติการใช้สารแอทราซีน ได้แก่ รากข้าว ใบมันสำปะหลัง ใบอ้อย และพื้นที่ป่าธรรมชาติ ได้แก่ ใบพลวง และใบรัง นำมาคัดแยกราเอนโดไฟต์โดยวิธี Surface sterilization สามารถแยกราได้ทั้งสิ้นจำนวน 20 ไอโซเลต ลักษณะโคโลนีและอัตราการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะ และอัตราการเจริญของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบและรากของพืช

ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ
1 รากข้าว	จังหวัดนครราชสีมา	R1	เส้นใยสีขาว ฟูหนา	+++
		R2	เส้นใยสีขาว ฟูไม่มาก ไม่อัดแน่น	++++
		R3	เส้นใยสีขาว ฟูปานกลาง	+++
	จังหวัดปทุมธานี	R4	เส้นใยสีขาว ฟูปานกลาง	++++
		R5	เส้นใยสีขาว ลักษณะบาง ไม่อัดแน่น	++++
2 ใบมันสำปะหลัง	จังหวัดนครราชสีมา	C1	เส้นใยสีขาว ฟูปานกลาง	+++
		C2	เส้นใยสีน้ำตาลอ่อน ฟู	++++
		C3		+++
3 ใบอ้อย	จังหวัดนครราชสีมา	SU1	เส้นใยสีขาว ฟู เส้นใยสีม่วงอ่อน ฟูอัดแน่น	+++

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ
3 ใบอ้อย	จังหวัดนครราชสีมา	SU2	เส้นใยสีขาว อัดแน่นฟู	+++
		SU3	เส้นใยสีขาว น้ำตาลอ่อน ถึงเหลือง อัดแน่น ฟูมาก	++++
4 .[พลวง	จังหวัดตาก	P1	เส้นใยสีขาว ถึงน้ำตาลอ่อน ฟูไม่มาก	++
		P2	เส้นใยสีขาว ไม่อัดแน่น ไม่ฟู	+++
		P3	เส้นใยสีขาว อัดแน่น ฟู	++
		P4	เส้นใยสีขาว ไม่อัดแน่น ฟูปานกลาง	+++
5 ใบรัง	จังหวัดตาก	D1	เส้นใยสีขาว อัดแน่น ฟูปานกลาง	++
		D2	เส้นใยสีน้ำตาลอ่อนไม่ฟู	++
				++++
		D3	เส้นใยสีขาว ฟู	+++
		D4	เส้นใยสีขาว ฟู อัดแน่น	+++
		D5	เส้นใยสีน้ำตาลอ่อนไม่อัดแน่น ฟูไม่มาก	++

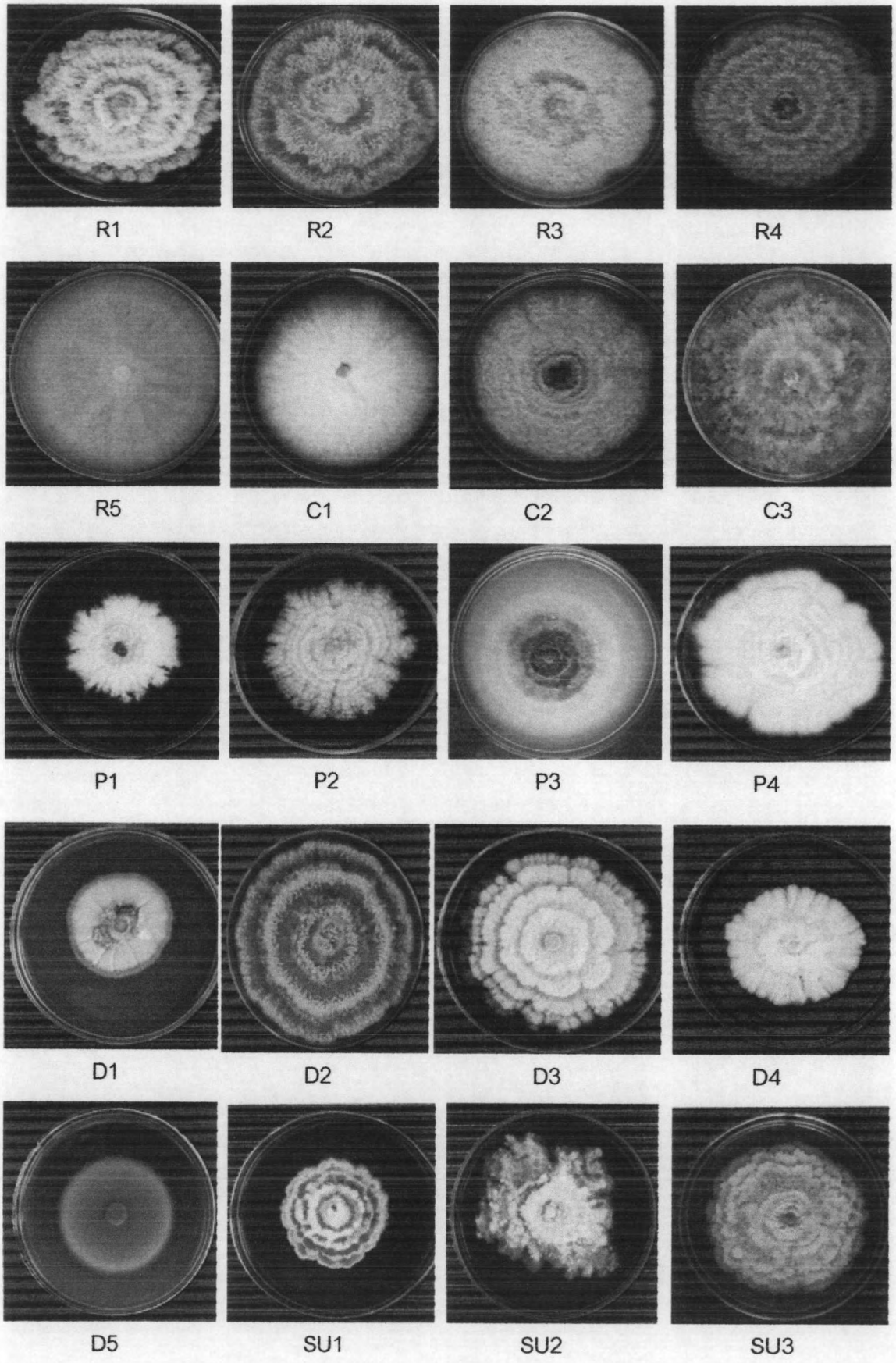
หมายเหตุ

ผลของการเจริญ

++++ หมายถึงสามารถเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ภายในเวลา 6 วัน

+++ หมายถึงสามารถเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ภายในเวลา 8 วัน

++ หมายถึงสามารถเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ภายในเวลา 9 วัน



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชต่างๆบนอาหาร PDA

4.2 การแยกราจากดิน

จากตัวอย่างดินในพื้นที่เกษตรกรรมที่มีประวัติการใช้สารแอทราซินจำนวน 1 แหล่ง สามารถแยกราได้ทั้งสิ้น 3 ไอโซเลต โดยมีลักษณะโคโลนีและอัตราการเจริญ ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะ และอัตราการเจริญของราดินที่เก็บจากพื้นที่เกษตรที่มีประวัติการใช้สารแอทราซิน

ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA	อัตราการเจริญ
ดิน	จังหวัดนครราชสีมา	S1	เส้นใยใยสีขาว แดง อัดแน่น ฟู	+++
		S2	สายใยสีขาว สปอร์เหลือง ฟูปานกลาง	++
		S3	สายใยขาว น้ำตาล อ่อน ไม่อัดแน่น ฟูไม่มาก	++++

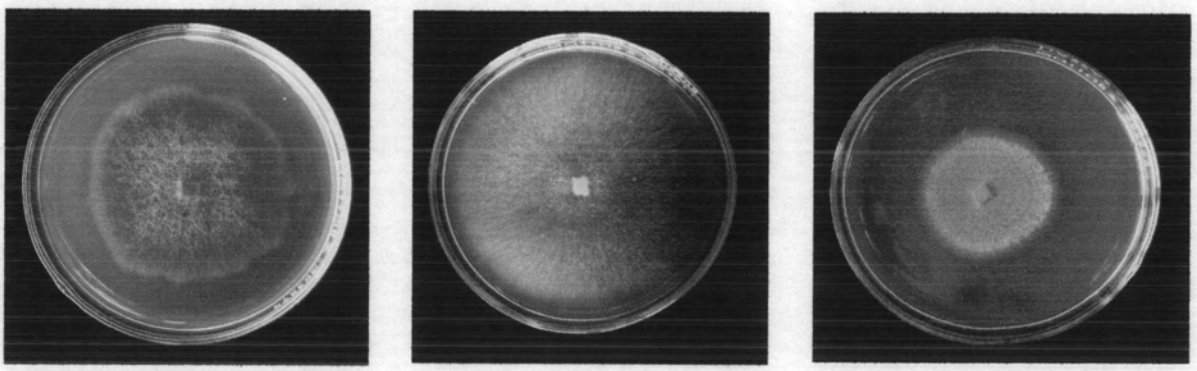
หมายเหตุ

ผลของการเจริญ

++++ หมายถึงสามารถเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ภายในเวลา 6 วัน

+++ หมายถึงสามารถเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ภายในเวลา 8 วัน

++ หมายถึงสามารถเจริญเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ภายในเวลา 9 วัน



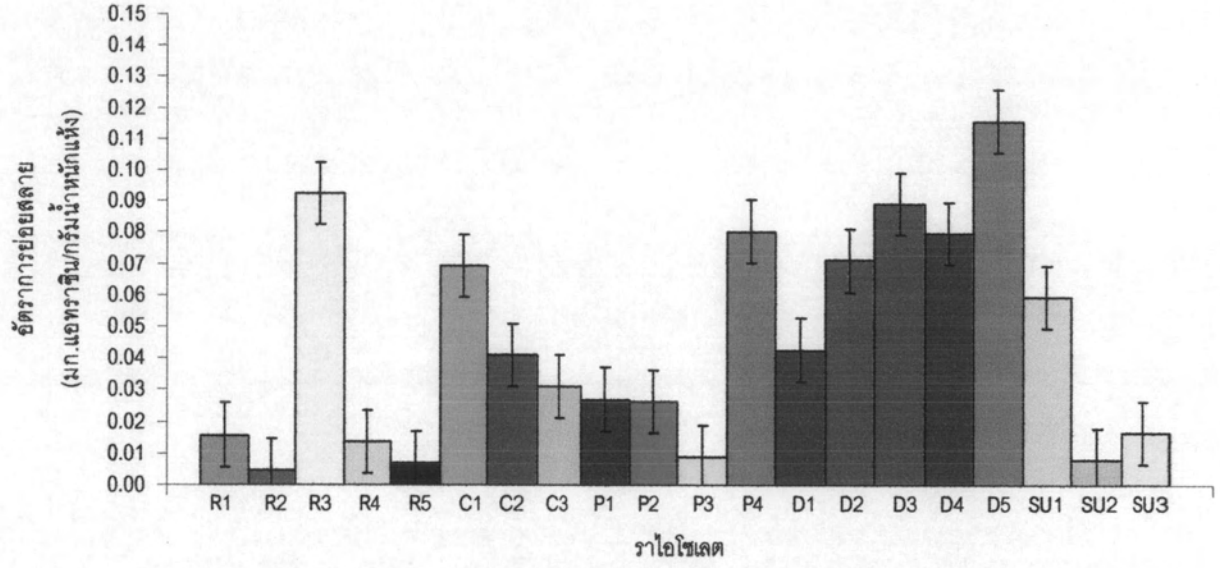
S1 S2 S3

รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของราที่แยกจากดินบนอาหาร PDA

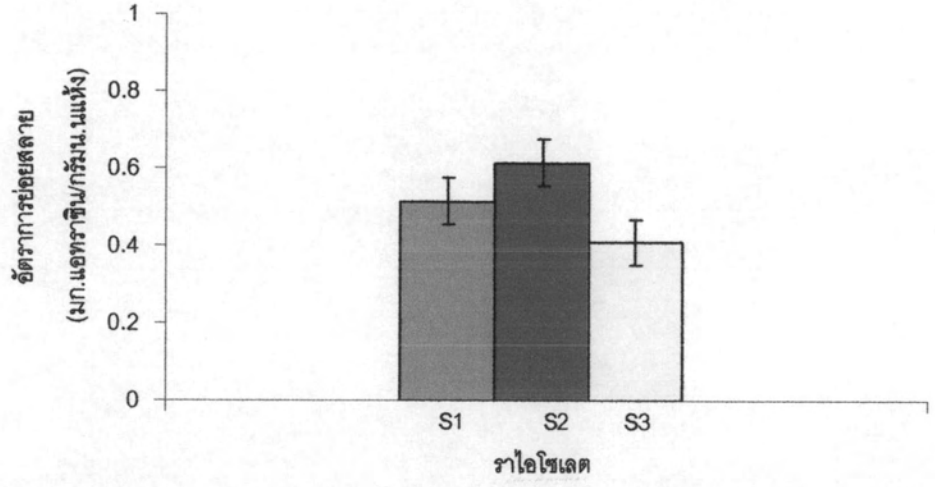
4.3 ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารแอทราซินโดยราที่แยกได้

4.3.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นปฐมภูมิ (Primary degradation test)

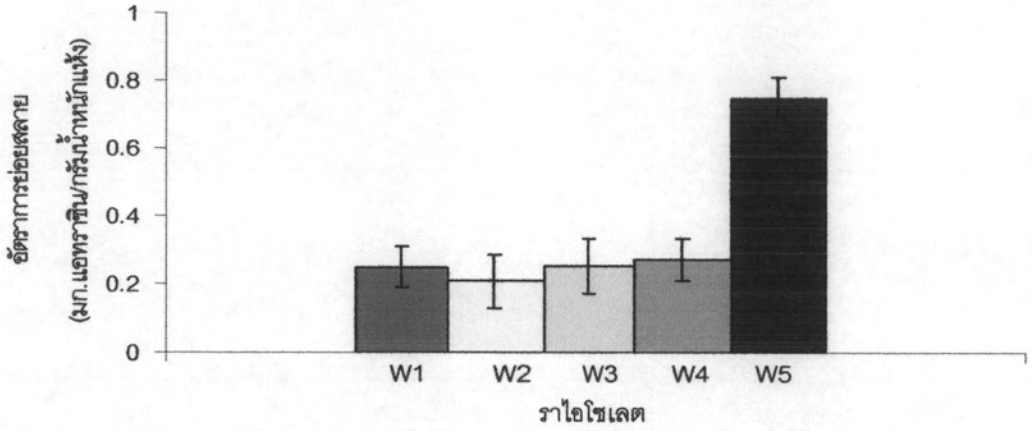
จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารแอทราซินขั้นปฐมภูมิของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบและรากพืชจำนวน 20 ไอโซเลต ราดินจำนวน 3 ไอโซเลต และราไวต์รอตที่ได้รับมาจำนวน 5 ไอโซเลต โดยใช้เทคนิค spectrophotometry เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารแอทราซินที่เหลือและคัดเลือกราที่มีอัตราการย่อยสลายสารแอทราซินที่ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Synthetic Medium ที่มีสารแอทราซินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 วัน พบว่า ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต D5 ที่แยกได้จากใบรังมีความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับราเอนโดไฟต์ไอโซเลตอื่นๆ (รูปที่ 4.3) โดยมีอัตราการย่อยสลายเท่ากับ 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนของราดินที่แยกได้จากดินในพื้นที่เกษตรกรรมที่เคยมีประวัติการใช้แอทราซินมาก่อน พบว่า ราดินไอโซเลต S2 มีความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับราดินไอโซเลตอื่นๆ (รูปที่ 4.4) โดยมีอัตราการย่อยสลายเท่ากับ 0.613 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และพบว่า ราไวต์รอตไอโซเลต W5 มีความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับราไวต์รอตไอโซเลตอื่นๆ (รูปที่ 4.5) โดยมีอัตราการย่อยสลายเท่ากับ 0.75 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง



รูปที่4.3 อัตราการย่อยสลายสารแอทราซีนต่อน้ำหนักแห้งของราเอนโดไฟต์ไอโซเลตต่างๆที่แยกได้ ณ วันที่ 20



รูปที่ 4.4 อัตราการย่อยสลายสารแอทราซีนต่อน้ำหนักแห้งของราดินไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้ ณ วันที่ 20



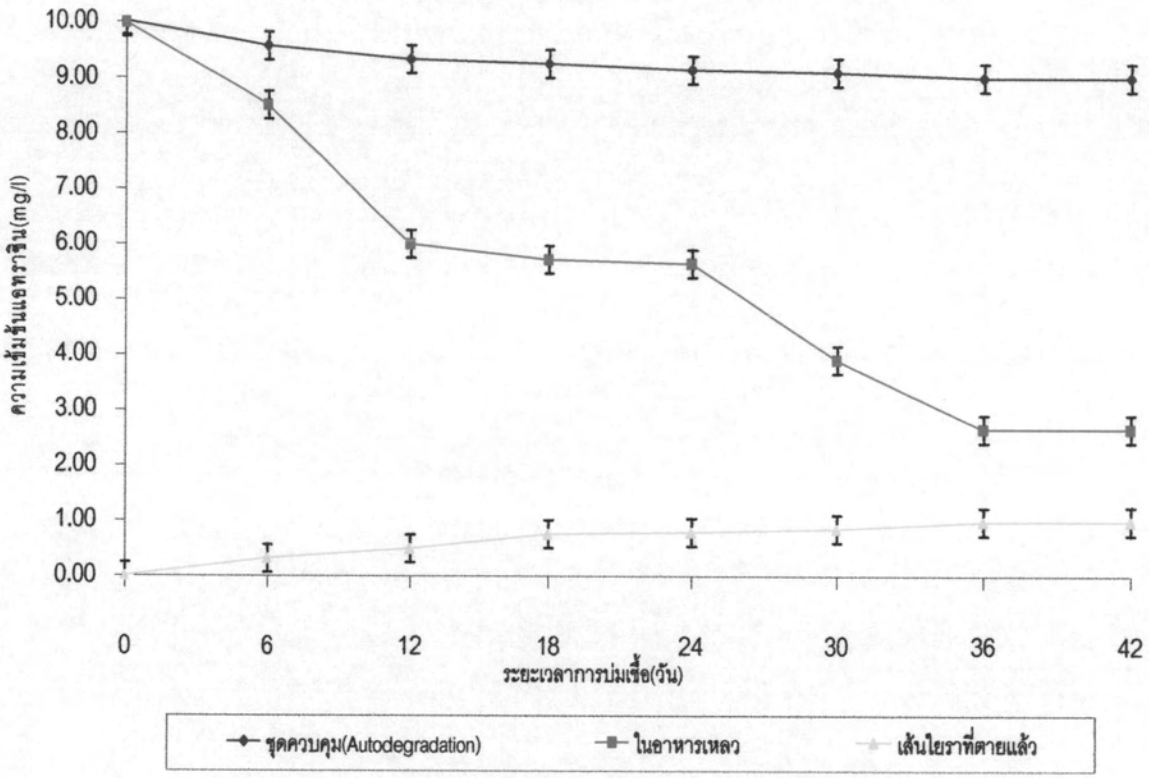
รูปที่ 4.5 อัตราการย่อยสลายสารแอทราซีนต่อน้ำหนักแห้งของราไวต์รอตไอโซเลตต่างๆ ณ วันที่ 20

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแอทราซีนขั้นปฐมภูมิ พบว่าราไวต์รอตไอโซเลต W5 ที่ได้รับมามีความสามารถในการย่อยสลายแอทราซีนได้ดีที่สุด ณ วันที่ 20 เมื่อเทียบกับราไอโซเลตอื่นๆ ที่ใช้ในการทดลอง โดยมีอัตราการย่อยสลายเท่ากับ 0.75 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ดังนั้นจึงได้คัดเลือกราไอโซเลต W5 เพื่อที่ใช้ในการทดลองขั้นทุติยภูมิต่อไป

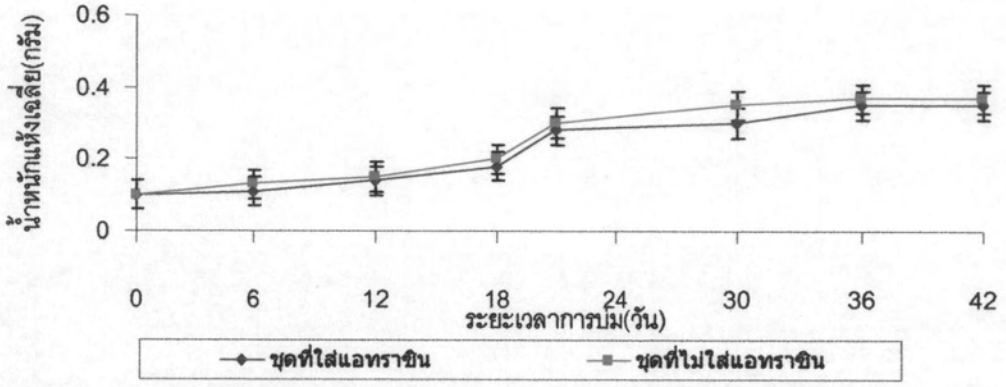
4.3.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นทุติยภูมิ (Secondary degradation test)

ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารแอทราซีนขั้นทุติยภูมิของราไอโซเลต W5 ที่คัดเลือกได้จากการทดลองขั้นก่อนหน้า โดยใช้เทคนิค Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) เมื่อนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารแอทราซีนที่เหลือ กับระยะเวลาในการบ่มเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Synthetic Medium (pH 5) ที่มีสารแอทราซีนความเข้มแอทราซีนจากความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการตรวจสอบความเข้มข้นของสารแอทราซีนทุกๆ 6 วัน พบว่ามีความเข้มข้นค่อยๆลดลงจาก 9.99 เป็น 8.51 6.00 5.72 5.65 3.91 และ 2.66 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ในชุดควบคุมเพื่อทดสอบการย่อยสลายตัวเองของแอทราซีน (autodegradation control) และชุดควบคุมเพื่อทดสอบการดูดซับแอทราซีนของเส้นใยรา (adsorption control) พบว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอทราซีนมีน้อยมาก (รูปที่ 4.6)

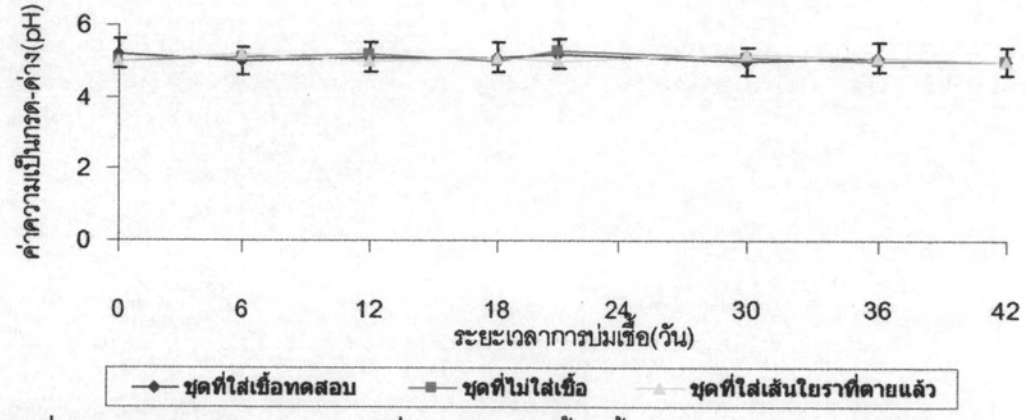
ผลการวัดอัตราการเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอต ไอโซเลต W5 พบว่า มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยค่อยๆเพิ่มขึ้นเรื่อยในช่วง12 วันแรกที่ทำการทดลอง จนกระทั่งเมื่อเข้าสู่วันที่ 30 น้ำหนักแห้งเฉลี่ยจะเร่มคงที่จนถึงวันสุดท้ายทีทำการบ่มเชื้อ(รูปที่ 4.7) ส่วนผลของการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ทั้ง 3 ชุด (รูปที่ 4.8) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เปลี่ยนแปลงน้อยมาก โดยในวันที่ 6 ของการบ่มเชื้อจนถึงวันที่ 42 ของการบ่มเชื้อค่า pH เฉลี่ยที่ตรวจวัดได้คือ 5.2 5.0 5.1 5.1 5.2 5.0 5.1 และ 5.0 ตามลำดับ ทั้งนี้ในชุดควบคุมทั้งสองมีค่า pH เฉลี่ยที่ตรวจสอบได้ มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยมากเช่นเดียวกัน



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ยของแอทราซีนกับระยะเวลาการบ่มเชื้อ



รูปที่ 4.7 น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 42 วัน



รูปที่ 4.8 ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ในระหว่างการบ่มเชื้อเป็นเวลา 42 วัน

4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแอทราซินของราที่ใช้ทดสอบ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายแอทราซินโดยราที่คัดเลือกมาได้คือ ราไวต์รอตไอโซเลต W5 นี้ ได้แบ่งการศึกษาออกเป็นสภาวะต่างๆ ดังนี้ คือ การศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการย่อยสลายแอทราซิน โดยการเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายแอทราซินในอาหาร Synthetic Medium (pH 5) ที่มีปริมาณกลูโคสแตกต่างกัน การศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายแอทราซินที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium มีค่า pH เท่ากับ 4 5 และ 6 ตามลำดับและการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่ความเข้มข้น 10 100 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองดังนี้

4.4.1 ปริมาณแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่เหมาะสมการย่อยสลายแอทราซีนของราที่ไวต์รอตไอโซเลต W5 ได้แก่ กลูโคสความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ราที่ไวต์รอตไอโซเลต W5 มีอัตราการย่อยสลายแอทราซีนในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร(2%) มีอัตราการย่อยสลายแอทราซีน เท่ากับ 0.7 มิลลิกรัมแอทราซีนต่อกรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 35 ของการทดลอง ซึ่งสูงกว่า อัตราการย่อยสลายแอทราซีนในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร(1%) มีอัตราการย่อยสลายแอทราซีน เท่ากับ 0.23 มิลลิกรัมแอทราซีนต่อกรัมน้ำหนักแห้งในวันที่ 35 ของการทดลอง (รูปที่ 4.9)

ผลการวัดการเจริญเติบโตของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) โดยการวัดน้ำหนักแห้งเฉลี่ย ที่มีความแตกต่างของปริมาณกลูโคส (รูปที่ 4.10) พบว่า น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2% กลูโคส มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากวันแรกที่ทำการทดลอง และมีการเพิ่มขึ้นมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 1% กลูโคส

ผลของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) (รูปที่ 4.11) ทั้งที่ 1% และ 2% กลูโคส พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยมาก

4.4.2 ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารแอทราซีน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่เลือกใช้ในการทดลอง คือ ที่ pH 4 5 และ 6 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีความเข้มข้นของกูลโคสที่ให้ผลการย่อยสลายแอทราซีนดีที่สุด คือ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (2%) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium จากผลการทดลองพบว่า อัตราการย่อยสลายแอทราซีนของราไวต์รอตไอโซเลต W5 มีความสามารถในการย่อยสลายแอทราซีนได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH5) โดยมีอัตราการย่อยสลายแอทราซีน ตั้งแต่วันที่ 5 ถึงวันที่ 35 ของการทดลองเป็นดังนี้ 0.04 0.10 0.34 0.46 0.57 0.68 และ 0.70 ตามลำดับ (รูปที่ 4.12)

ผลการวัดการเจริญเติบโตของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ พบว่า ในการวัดน้ำหนักแห้งเฉลี่ย ของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีค่า pH เท่ากับ 5 มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีค่ามากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต W5

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีค่า pH เท่ากับ 4และ 6 ส่วนในชุดการทดลองที่ไม่มีแอราซิน พบว่า การวัดการเจริญเติบโตของราไวต์รอตไอโซเลต W5 จากการวัดน้ำหนักแห้งมีความแตกต่างกันน้อยมากกับชุดที่ใส่แอทราซิน (รูปที่ 4.13)

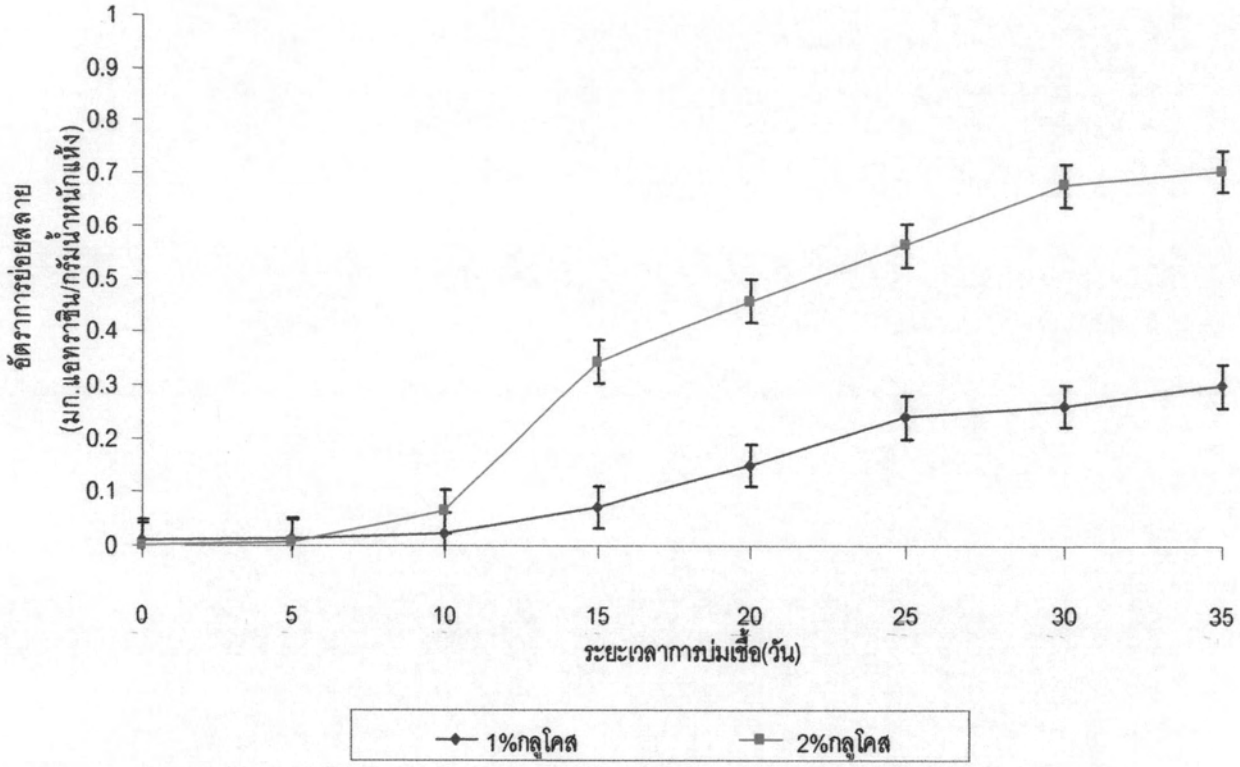
ผลของการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีค่า pH เท่ากับ 4 พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในแนวโน้มที่สูงขึ้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีค่า pH เท่ากับ 5 พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างเพียงเล็กน้อย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีค่า pH เท่ากับ 6 พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในแนวโน้มที่ต่ำลงประมาณpH เท่ากับ 5 ส่วนในชุดการทดลองที่ไม่มีผลการวัดการเจริญเติบโตของราไวต์รอตไอโซเลต W5 พบว่า แทบจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในทุกๆชุดการทดลอง (รูปที่ 4.14)

4.4.3 ความเข้มข้นของสารแอทราซิน

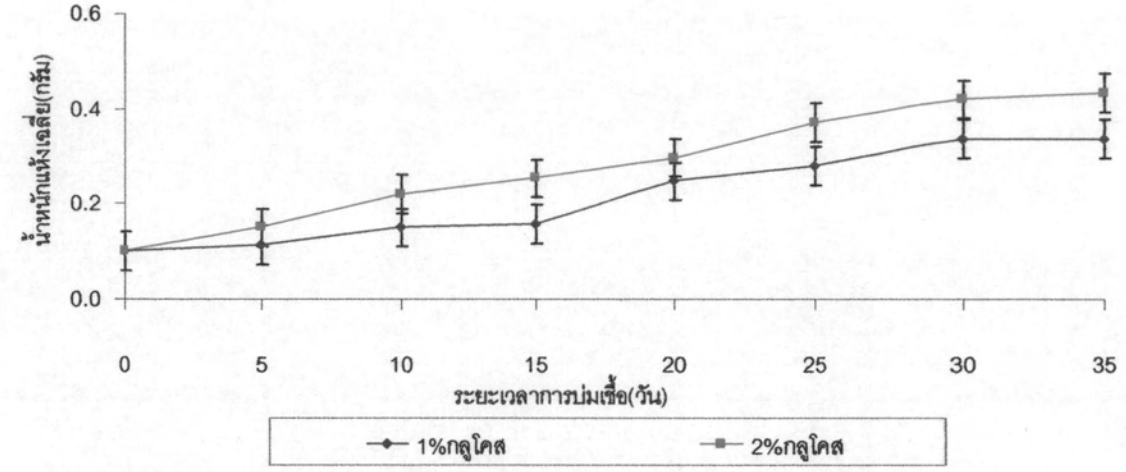
จากการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายแอทราซินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นที่ 10 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีความเข้มข้นของกูลโคส และความเป็นกรด-ด่างที่ให้ผลการย่อยสลายแอทราซินดีที่สุด พบว่า อัตราการย่อยสลายแอทราซินที่ดีที่สุดคือที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการย่อยสลายแอทราซิน ตั้งแต่วันที่ 5 ถึงวันที่ 35 ของการทดลองเป็นดังนี้ 0.05 0.09 0.24 0.43 0.67 0.70 และ 0.75 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับที่ ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.15)

ผลการวัดการเจริญเติบโตของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 โดยการวัดน้ำหนักแห้งเฉลี่ย ของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ที่ความเข้มข้นแอทราซินเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีค่ามากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีมีแอทราซินที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลองที่ไม่มีแอราซิน พบว่า การวัดการเจริญเติบโตของราไวต์รอตไอโซเลต W5 จากการวัดน้ำหนักแห้งมีความแตกต่างกันน้อยมากกับชุดที่ใส่แอทราซิน (รูปที่ 4.16)

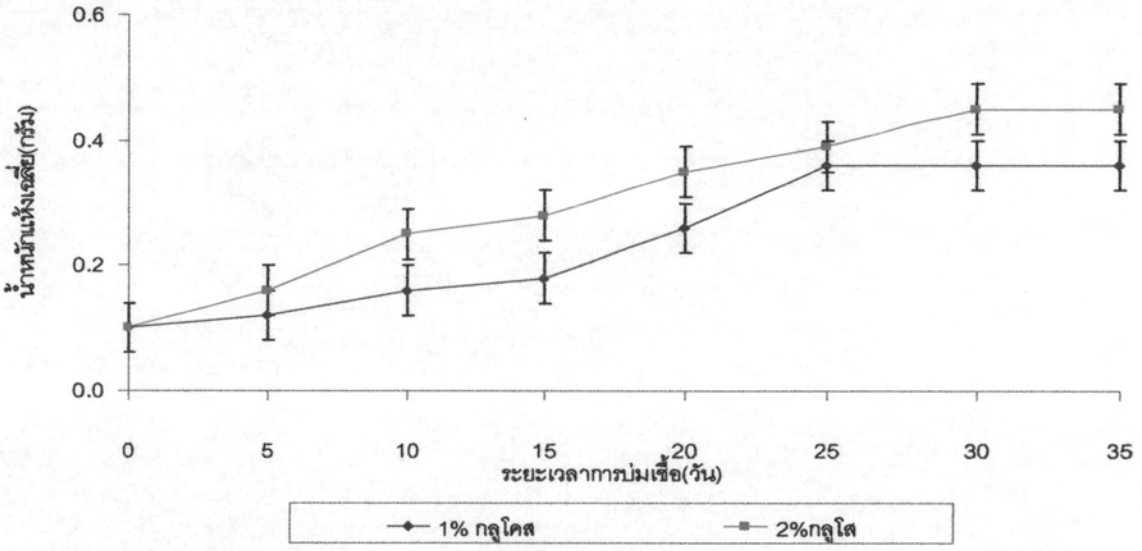
ผลของการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (2% pH 5) ในทุกๆความเข้มข้นแอทราซิน พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่างน้อยมากทั้งชุด และในชุดการทดลองที่ไม่ราไวต์รอตไอโซเลต W5 พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (2% pH 5) เลย (รูปที่ 4.17)



รูปที่ 4.9 อัตราการย่อยสลายสารแอทราซีนต่อน้ำหนักแห้งของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่มี 1% และ 2% กลูโคส

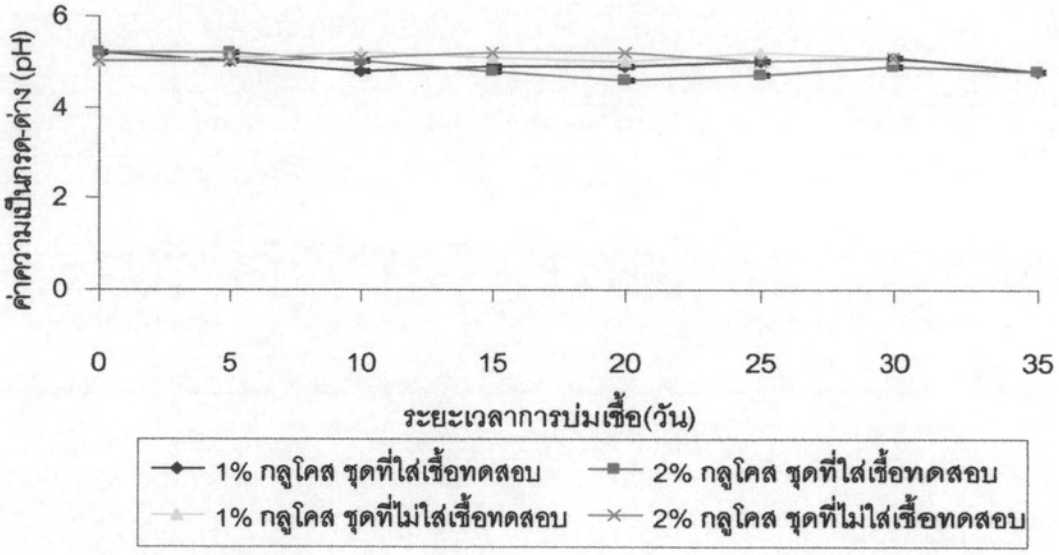


(ก)

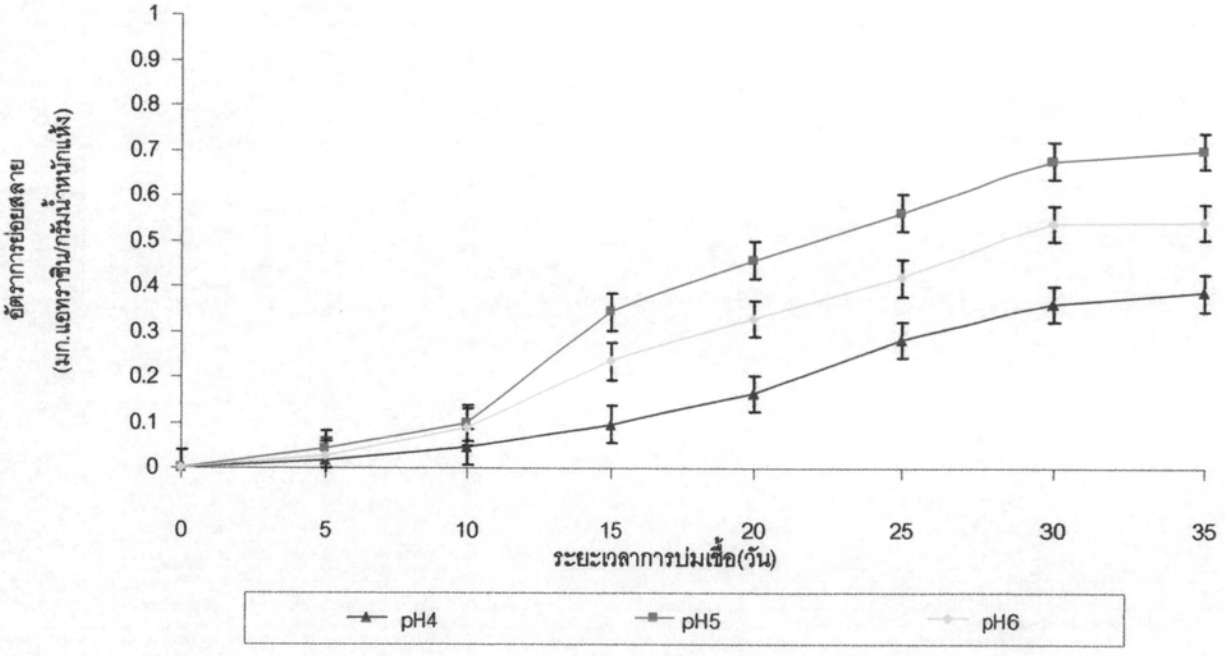


(ข)

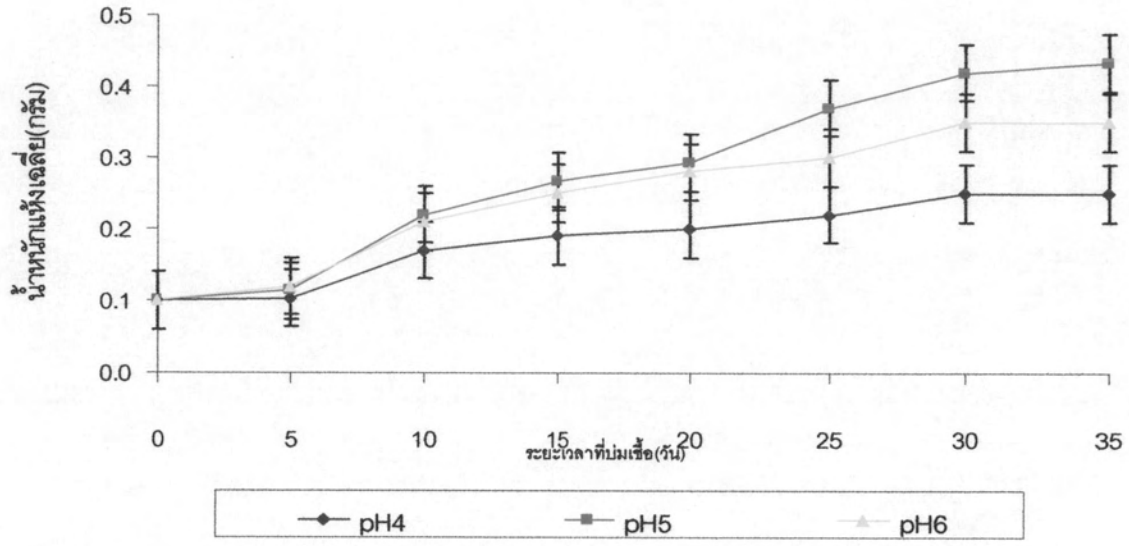
รูปที่ 4.10 (ก) **น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต** W5 **ในอาหารเลี้ยงเชื้อ** Synthetic Medium (pH 5) **ที่** 1%**และ** 2%**กลูโคส ที่มีแอทราซิน (ข) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต** W5 **ในอาหารเลี้ยงเชื้อ** Synthetic Medium (pH 5) **ที่** 1%**และ** 2%**กลูโคส ที่ไม่มีแอทราซิน**



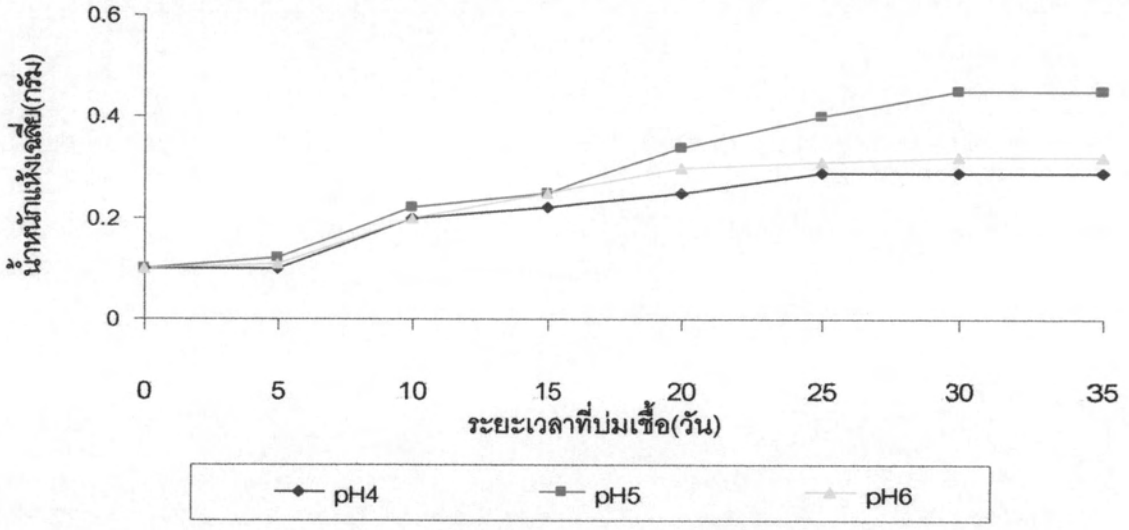
รูปที่ 4.11 ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium (pH 5) ที่ 1%และ 2% กลูโคส ชุดที่ใส่และไม่ใส่เชื้อทดสอบ



รูปที่ 4.12 อัตราการย่อยสลายสารแอทราซีนต่อน้ำหนักแห้งของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ 2% กลูโคส ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 5 และ 6 ในระหว่างที่ทดลองเป็นเวลา 35 วัน

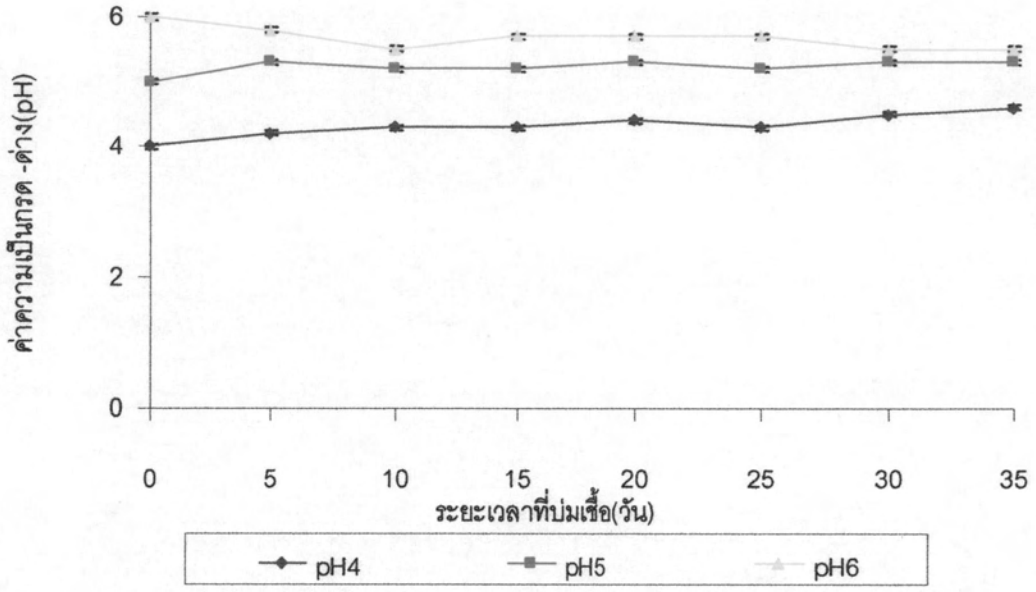


(ก)

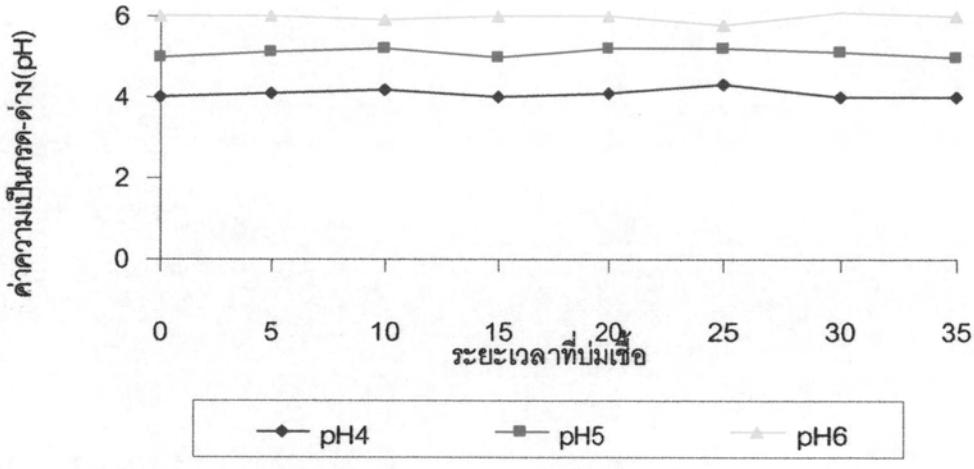


(ข)

รูปที่ 4.13 (ก) **น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต** W5 **ในอาหารเลี้ยงเชื้อ** Synthetic Medium 2% **กลูโคส ที่ค่า** pH **เท่ากับ** 4 5 **และ** 6 **ที่มีแอทราซิน (ข) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต** W5 **ในอาหารเลี้ยงเชื้อ** Synthetic Medium 2% **กลูโคส ที่ค่า** pH **เท่ากับ** 4 5 **และ** 6 **ที่ไม่มีแอทราซิน**

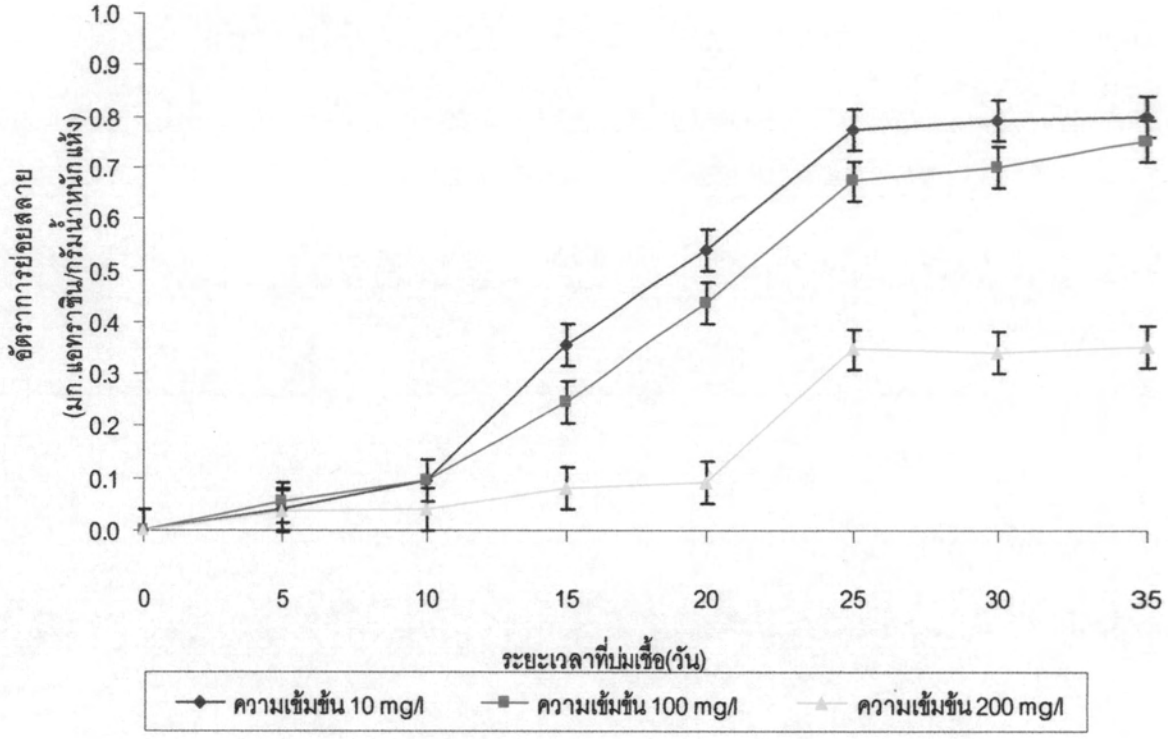


(ก)

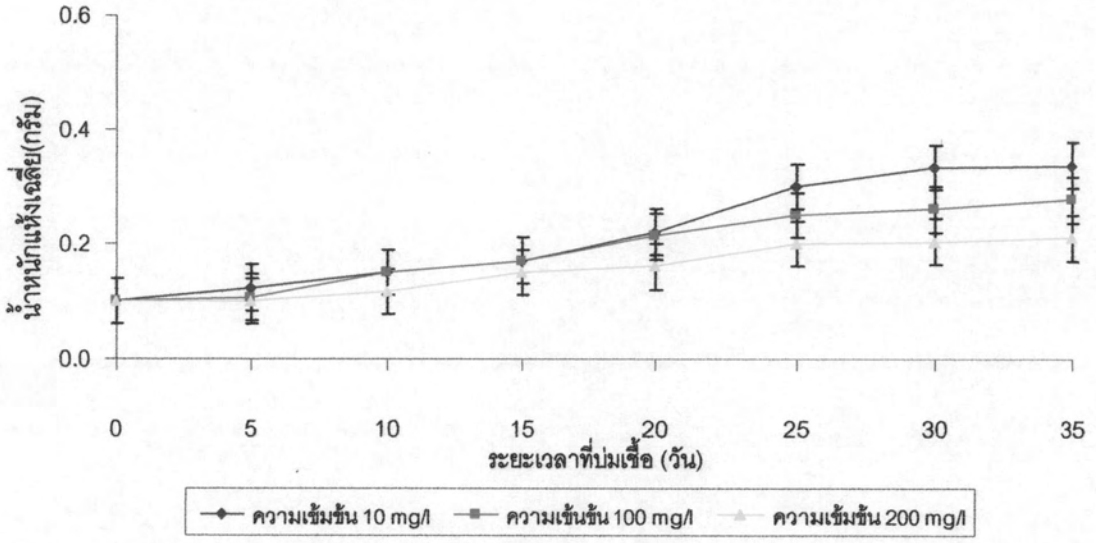


(ข)

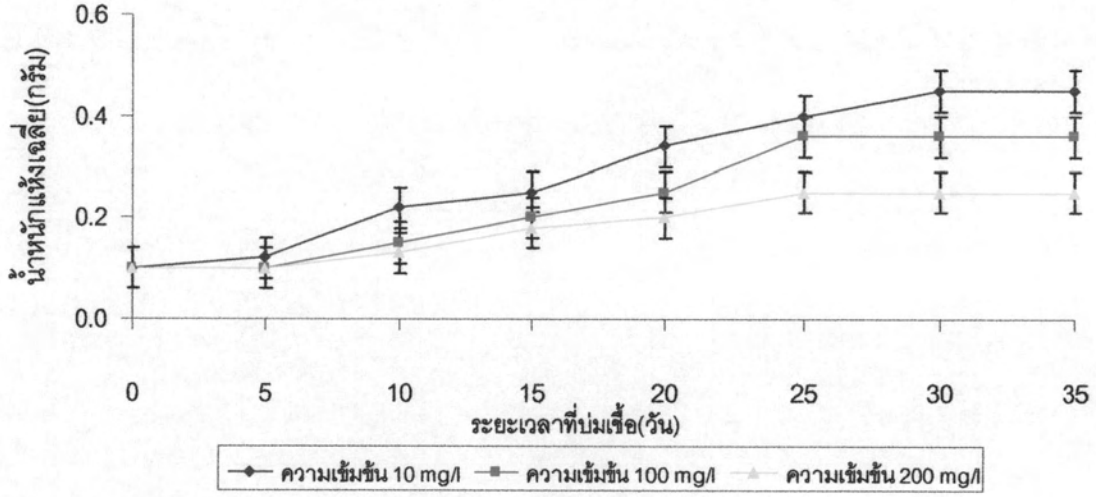
รูปที่ 4.14 (ก) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 4 5 และ 6 ที่มีราที่ทดสอบ (ข) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 4 5 และ 6 ที่ไม่มีราที่ทดสอบ



รูปที่ 4.15 **อัตราการย่อยสลายสารแอทราซีนต่อน้ำหนักแห้งของราไวต์รอตไอโซเลต** W5 **ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ ที่** 2% **กลูโคส ที่มี** pH 5 **ที่ความเข้มข้นแอทราซีนเท่ากับ** 10 100 **และ**200 **มิลลิกรัมต่อลิตร ในระหว่างที่ทดลองเป็นเวลา** 35 **วัน**

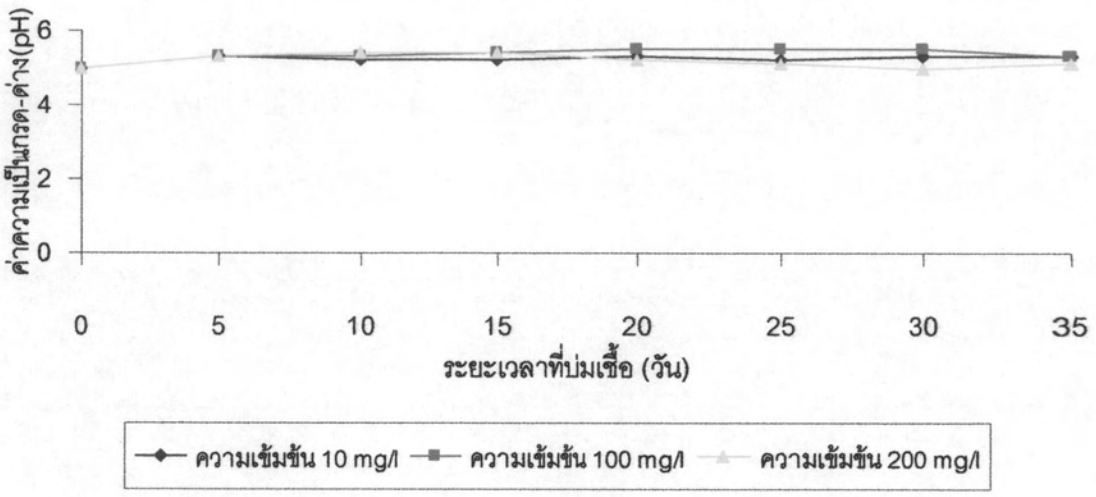


(ก)

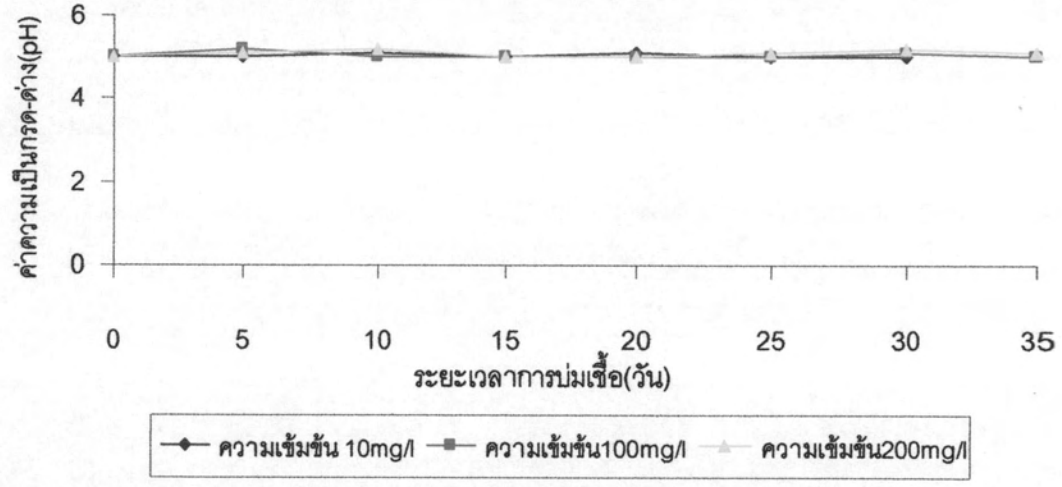


(ข)

รูปที่ 4.16 (ก) **น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต** W5 **ในอาหารเลี้ยงเชื้อ** Synthetic Medium 2% กลูโคส **ที่ค่า** pH **เท่ากับ** 5 **ที่ความเข้มข้นเท่ากับ** 10 100 **และ** 200**มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีแอทราซิน (ข) น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราไวต์รอตไอโซเลต** W5 **ในอาหารเลี้ยงเชื้อ** Synthetic Medium 2% กลูโคส **ที่ค่า** pH **เท่ากับ** 5 **ที่ความเข้มข้นเท่ากับ** 10 100 **และ** 200**มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ไม่มีแอทราซิน**



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.17 (ก) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส **ที่ค่า** pH เท่ากับ 5 **ที่ความเข้มข้นแอทราซินเท่ากับ** 10 100 และ 200**มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีราที่ใช้ทดสอบ** (ข) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium 2% กลูโคส ที่ค่า pH เท่ากับ 5 **ที่ความเข้มข้นแอทราซินเท่ากับ** 10 100 และ 200**มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ไม่มีราที่ใช้ทดสอบ**

ผลที่ได้จากสภาวะที่ทำการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ทั้ง 6 สภาวะ สามารถสรุปประสิทธิภาพของรา W5 ต่อการย่อยสลายแอทราซินในสภาวะต่างๆ ได้ ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอทราซีนของราไวต์รอตไอโซเลต W5 ภายหลังการบ่มเชื้อ 35 วัน

สภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media	อัตราการย่อยสลาย (มก.แอทราซีน/กรัมน้ำหนักแห้ง /วัน)	ความเข้มข้นของแอทราซีนที่ย่อยสลายได้ (มก./ล.)
Atz 10 mg/l,1%glucose, pH 5	0.05	6.33 (63.31%)
Atz 10 mg/l,2%glucose, pH 5	0.11	9.89 (98.92%)
Atz 10 mg/l,2%glucose, pH 4	0.02	7.59(75.88%)
Atz 10 mg/l,2%glucose, pH 5	0.11	9.89 (98.94%)
Atz 10 mg/l,2%glucose, pH 6	0.01	6.78(67.79%)
Atz 100 mg/l,2%glucose,pH 5	0.13	79.54(79.54%)
Atz 200 mg/l,2%glucose,pH 5	0.01	150.70(75.39%)

หมายเหตุ

Atz หมายถึง ความเข้มข้นของแอทราซีน

จากตารางที่ 4.3 สรุปได้ว่า สภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic Medium ที่มีความเหมาะสมที่ดีที่สุดต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารแอทราซีนของราไวต์รอต W5 ในระยะเวลา 35 วัน คือ สภาวะที่มีความเข้มข้นของแอทราซีน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (2 เปอร์เซนต์) และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 โดยสามารถย่อยสลายแอทราซีนได้ 9.89 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นประสิทธิภาพในการย่อยสลาย เท่ากับ 98.94 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สภาวะที่มีความเข้มข้นของแอทราซีน 100 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกูลโคส 2 เปอร์เซนต์ และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ย่อยสลายได้ 79.54 มิลลิกรัมต่อลิตร (79.54 เปอร์เซนต์) สภาวะที่มีความเข้มข้นของแอทราซีน 10 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกูลโคส 2 เปอร์เซนต์ และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 ย่อยสลายได้ 7.59 มิลลิกรัมต่อลิตร (75.88 เปอร์เซนต์) สภาวะที่มีความเข้มข้นของแอทราซีน 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกูลโคส 2 เปอร์เซนต์ และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ย่อยสลายได้ 150.70 มิลลิกรัมต่อลิตร (75.39 เปอร์เซนต์) สภาวะที่มีความเข้มข้นของแอทราซีน 10 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกูลโคส 2 เปอร์เซนต์ และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 ย่อยสลายได้ 6.78 มิลลิกรัมต่อลิตร (67.79 เปอร์เซนต์) สภาวะที่มีความเข้มข้นของแอทราซีน 10 มิลลิกรัมต่อลิตรใน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกูลโคส 1 เปอร์เซนต์ และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ย่อยสลายได้ 6.32 มิลลิกรัมต่อลิตร (63.31 เปอร์เซนต์) ตามลำดับ

4.5 การวิเคราะห์สารเมทาโบไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลายสารแอทราซิน

ศึกษาสารเมทาบอไลท์ของแอทราซินที่เกิดขึ้นโดยนำเอาอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ที่ไม่ใส่เชื้อทดสอบและไม่ใส่สารแอทราซิน อาหารเลี้ยงเชื้อของชุดการทดลองที่ใส่ราไวต์รอต W5 กับสารแอทราซิน และอาหารเลี้ยงเชื้อของชุดการทดลองที่ใส่สารแอทราซิน (autodegradation) ทีณวันแรกและวันที่ 35 ของการเลี้ยงเชื้อ ไปวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยเทคนิค Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ที่ไม่ใส่เชื้อทดสอบและไม่ใส่สารแอทราซิน มีพีคปรากฏขึ้นจำนวน 2 พีคด้วยกัน คือที่ Retention Time เท่ากับ 10.77 และ 14.28ตามลำดับ (รูปที่ 4.18) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลองชุดที่ใส่แอทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอตไอโซเลต W5 วันที่ 0 มีพีคปรากฏขึ้น จำนวน 2 พีคด้วยกัน คือที่ Retention Time เท่ากับ 10.71 และ 15.99 ตามลำดับ(รูปที่ 4.19) และในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลองชุดที่ใส่แอทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอตไอโซเลต W5 วันที่ 35 ของการทดลอง มีพีคปรากฏขึ้น จำนวน 5 พีคด้วยกัน คือที่ Retention Time เท่ากับ 10.67 11.57 12.67 14.23 และ15.92 ตามลำดับ(รูปที่ 4.20) ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลองชุดที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต W5 วันที่ 0 มีพีคปรากฏขึ้น จำนวน 5 พีคด้วยกัน คือที่ Retention Time เท่ากับ 10.71 11.72 12.73 14.28 และ15.95 ตามลำดับ(รูปที่ 4.21) และในอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลองชุดที่ใส่แอทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอตไอโซเลต W5 วันที่ 35 ของการทดลอง มีพีคปรากฏขึ้น จำนวน 8 พีคด้วยกัน คือที่ Retention Time เท่ากับ10.69 10.83 11.595 13.87 14.59 15.37 15.94 และ16.47 ตามลำดับ(รูปที่ 4.22) หลังจากนั้นได้ทำการเก็บ fraction ของตัวอย่างที่ Retention Time ต่างๆ มาวิเคราะห์ผลเพื่อหาสารเมทาบอไลท์ของแอทราซินด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS) โดยเลือกพีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ Retention Time ต่างๆในชุดทดลอง ที่ไม่ปรากฏในโครมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 Retention Time ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Height Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ที่สภาวะต่างๆ

สภาวะ	Retention Time ที่ปรากฏ	Retention Time ที่เลือกมาวิเคราะห์
อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media	10.71,15.99	-
Atz 10 mg/l,2%glucose,D0	10.71, 11.72 ,12.73,14.28,15.95	15.95
Atz 10 mg/l,2%glucose,D35	10.69, 10.83, 11.595, 13.87,14.59 15.37, 15.94 ,16.47	10.69, 10.83, 11.595, 13.87, 14.59 15.37, 15.94 ,16.47
Auto Atz 10 mg/l,2%glucose,D35	10.67, 11.57, 12.67, 14.23,15.92	15.92

หมายเหตุ

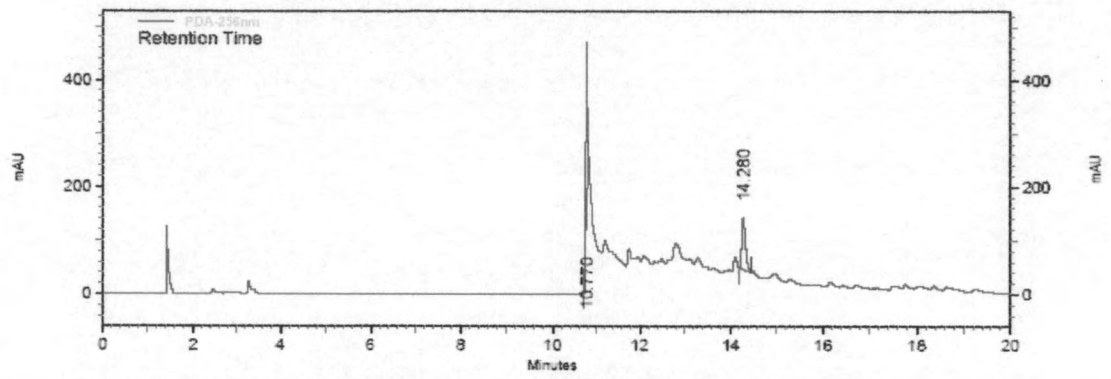
Atz หมายถึง ความเข้มข้นของแอทราซิน

D0 หมายถึง ระยะเวลาที่บ่มเชื้อ วันที่ 0

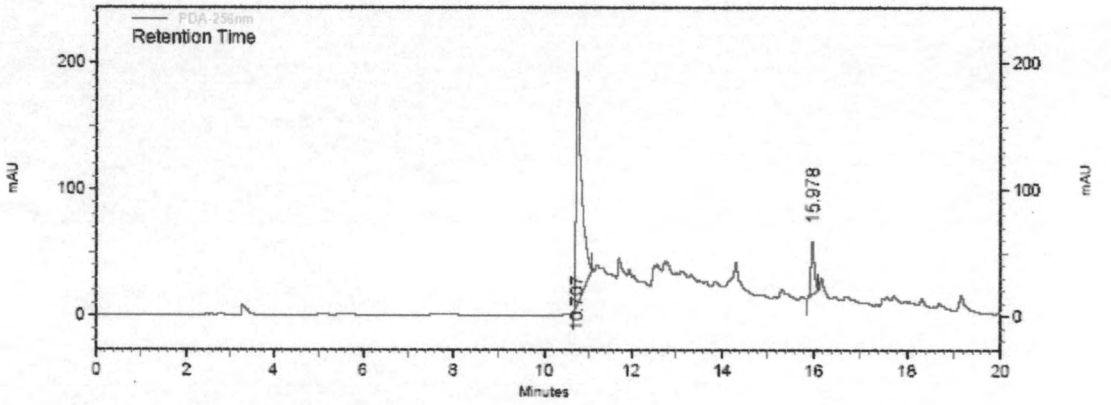
D35 หมายถึง ระยะเวลาที่บ่มเชื้อ วันที่ 35

Auto หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ที่มีแอทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอตไอโซเลต W5

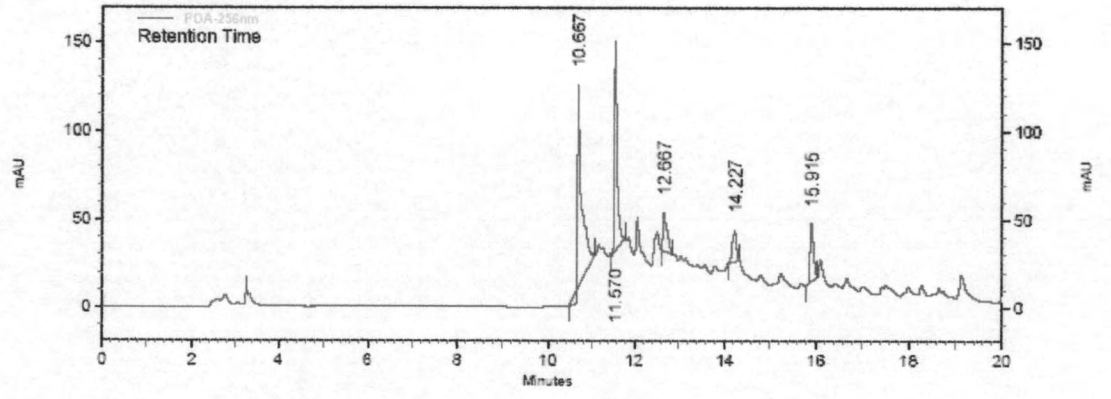
จากการวิเคราะห์ชนิดสารเมทาบอไลท์ของแอทราซินด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS) พบว่า ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media วันที่ 35 ของชุดการทดลองที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต W5 มีสารเมทาบอไลท์ของแอทราซินเกิดขึ้น 1 ชนิด คือ 2-hydrox-4-(isopropylamino)-6-(ethylamino)-s-triazine (OIET) (Topp, et al., 2000) (รูปที่ 4.23) ซึ่งตรงกับ Retention Time ที่ 13.87 ของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC รูปที่ 4.22)



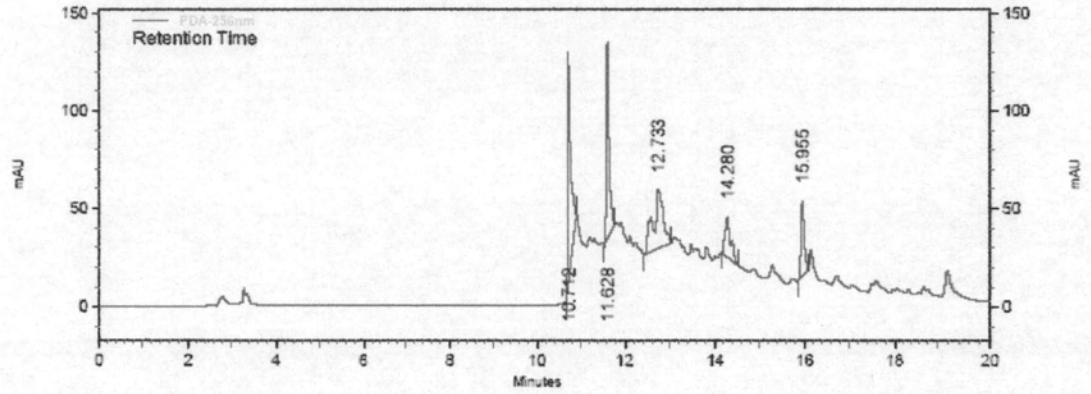
รูปที่ 4.18 แสดงโครมาโตรแกรมของอาการเลี้ยงเชื้อ Synthetic media



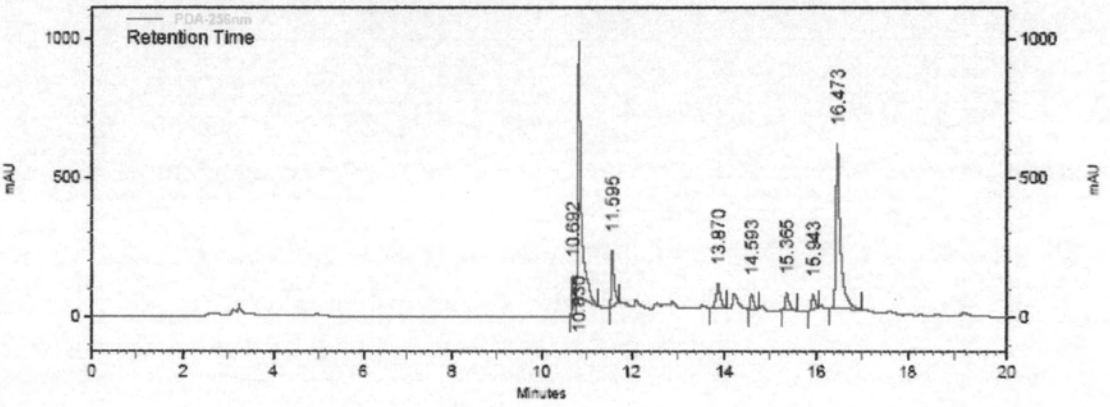
รูปที่ 4.19 แสดงโครมาโตรแกรมของอาการเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลองชุดที่ใส่แอทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอตไอโซเลต W5 วันที่ 0



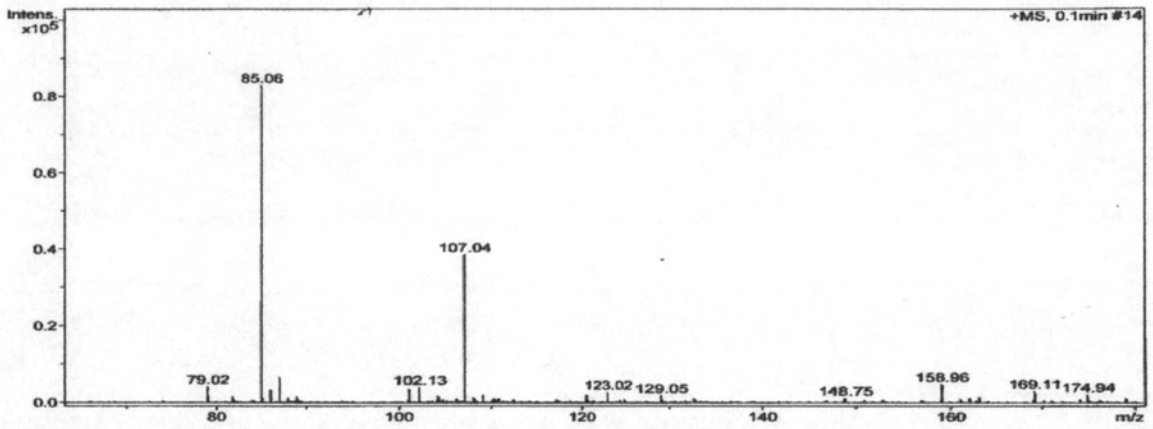
รูปที่ 4.20 แสดงโครมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Synthetic media ของการทดลองชุดที่ใส่แอทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอตไอโซเลต W5 วันที่ 35



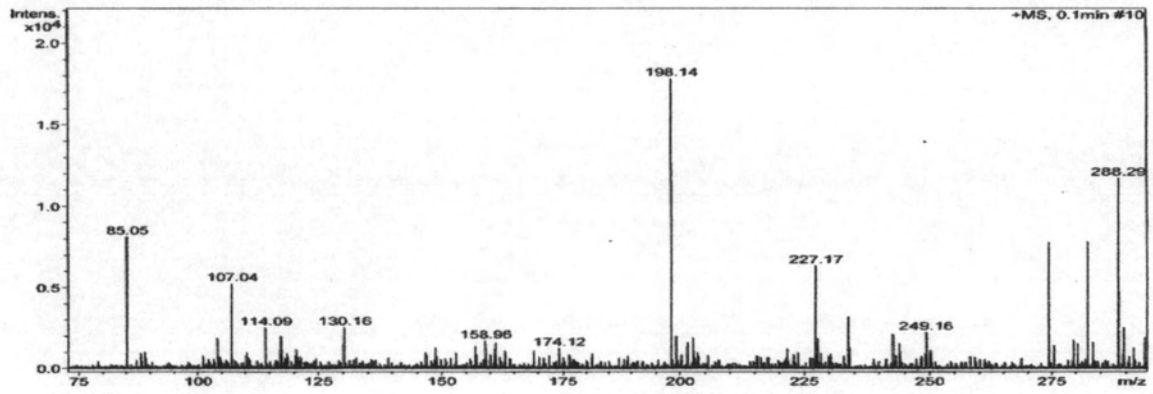
รูปที่ 4.21 **แสดงโครมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ** Synthetic media **ของการทดลองชุดที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต** W5 **วันที่** 0



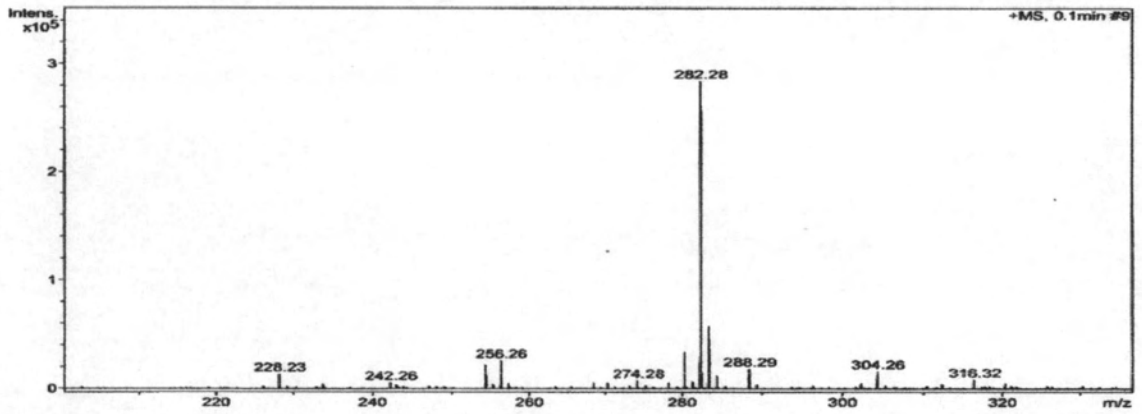
รูปที่ 4.22 **แสดงโคมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ** Synthetic media **ของชุดการทดลองที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต** W5 **วันที่** 35



(ก)

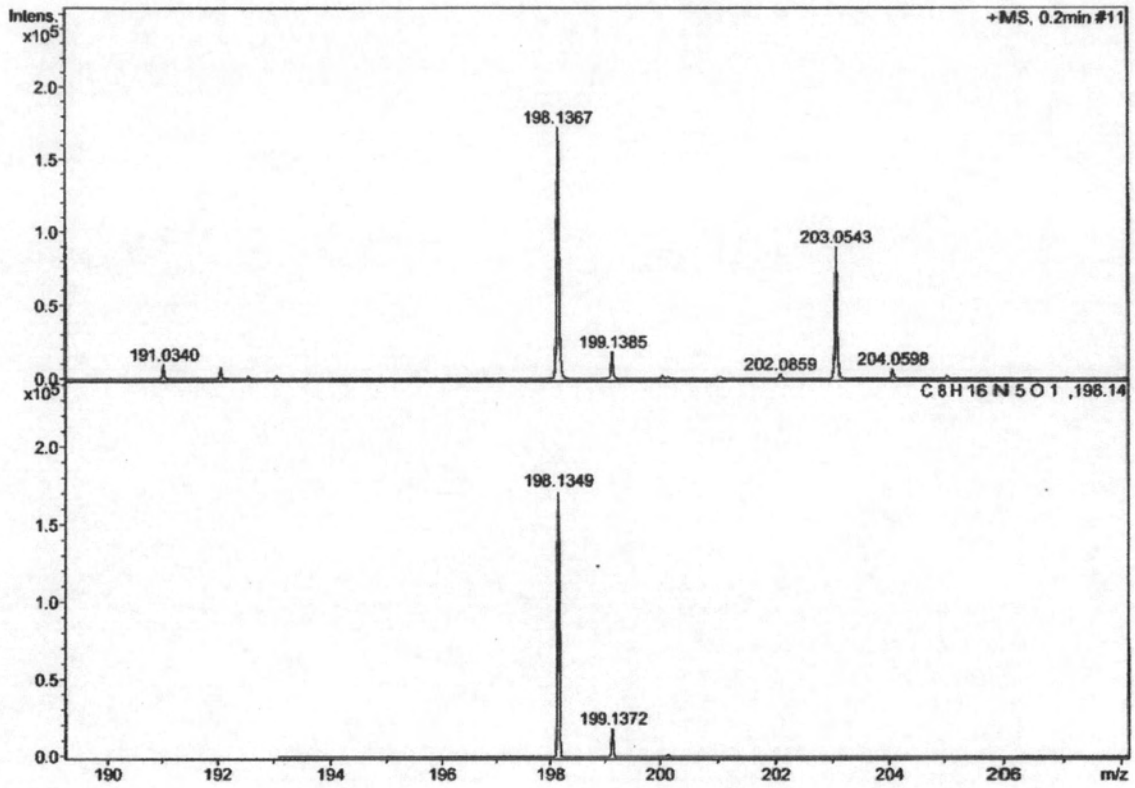


(ข)



(ค)

รูปที่ 4.23 (ก) **แสดงโครมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ** Synthetic media **วันที่ 0 ของชุดการทดลองที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต W5 (ข) แสดงโครมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ** Synthetic media **วันที่ 35 ของชุดการทดลองที่มีแอทราซินและราไวต์รอตไอโซเลต W5 (ค) แสดงโครมาโตรแกรมของอาหารเลี้ยงเชื้อ** Synthetic media **วันที่ 35 ของชุดการทดลองที่มีแอทราซินแต่ไม่ใส่ราไวต์รอตไอโซเลต W5 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค** Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS)



รูปที่ 4.24 แสงดงโครมาโตรแกรมของสารเมทาบอไลท์จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS)

จากการศึกษาขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าราไวต์รอตไอโซเลต W5 มีความสามารถในการเปลี่ยนแอทราซินให้ไปอยู่ในรูปของสารเมทาบอไลท์ขั้นที่ 1 (Primary intermediates) ได้ (Chan and Chu, 2005) (ภาคผนวก ง) 1 ชนิด คือ 2-hydrox-4-(isopropylamino)-6-(ethylamino)-s-triazine (OIET) ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 198 (Topp, et al., 2000) ในวันที่ 35 ของการทดลอง แต่แอทราซินยังมีสารที่เป็นเมทาบอไลท์อื่นๆอีก แต่ไม่พบในงานวิจัยนี้