

การคัดแยกกรายย่อยสลายพาราควอตและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION OF PARAQUAT DEGRADING FUNGI AND RELATED ENZYMES

Miss Thitapha Chuaykhongthong



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial

Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกสายย่อยสลายพาราควอตและเอโนไซม์ที่เกี่ยวข้อง
โดย	นางสาวฐิตาภา ช่วยคงทอง
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ กาญจนทัต

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ กาญจนทัต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ประกิตต์สินี สีहनันทน์)

ฐิตาภา ช่วยคงทอง : การคัดแยกรายย่อยสลายพาราควอตและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (ISOLATION OF PARAQUAT DEGRADING FUNGI AND RELATED ENZYMES) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: ผศ. ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.อภิชาติ กาญจนทัต, 95
หน้า.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การคัดแยกราที่มีความสามารถในการย่อยสลายพาราควอต โดย
เก็บตัวอย่างราจากดิน เศษไม้ หรือตัวอย่างเห็ด ผลการทดลองสามารถคัดแยกราได้ทั้งหมด 79 ไอโซ
เลต เมื่อพิจารณาความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์
ร่วมกับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลติก อันได้แก่ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์
ออกซิเดส และแลคเคส บนอาหารแข็งที่มีสารทดสอบที่บ่งบอกถึงชนิดของเอนไซม์ที่ราผลิตแล้ว พบว่ารา 17
ไอโซเลตมีความสามารถเหล่านี้ นำรากลุ่มนี้มาทดสอบโดยการเพิ่มความเข้มข้นของพาราควอตให้มากขึ้น
เป็น 0.4, 0.5 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ามีรา 5 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการทนพาราควอตได้สูงถึง
0.6 เปอร์เซ็นต์ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบว่ารา
ที่แยกได้ ได้แก่ PQ3, PQ5, PQ6, A319 และ P279 มีความคล้ายคลึงกับราต่างๆ ได้แก่ *Nodulisporium*
sp., *Neosartorya fischeri*, *Hypoxyton fragiforme*, *Phoma sp.* และ *Setosphaeria rostrate*
ตามลำดับ ที่ระดับความเหมือน 99-100 เปอร์เซ็นต์ รา 2 ไอโซเลตที่แยกได้ แสดงความสามารถในการ
ย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลวได้ดีที่สุด นั่นคือ ราไอโซเลต PQ5 ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน ราสามารถ
ย่อยสลายพาราควอตได้ประมาณ 37 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพาราควอตเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์
โดยพบกิจกรรมของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสสูงที่สุดที่ 34.28 และ 22.39 ยูนิต/ลิตร
ตามลำดับ ไอโซเลต A319 สามารถย่อยสลายพาราควอตได้ประมาณ 37 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี
พาราควอตเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ และพบกิจกรรมของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสสูงที่สุดที่
117.76 และ 214.52 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบการย่อยสลายพาราควอตในดินพบว่า ไอโซเลต
A319 สามารถเจริญในดินทดสอบที่มีพาราควอตได้ แต่ไม่พบการลดลงของพาราควอตในดิน ส่วนไอโซเลต
PQ5 สามารถย่อยพาราควอตที่ความเข้มข้น 250 ppm ในดินปลอดเชื้อได้ 12.25 เปอร์เซ็นต์ แต่ราและ
กิจกรรมในการย่อยสลายพาราควอตอาจถูกยับยั้งโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีอยู่ในดิน *Neosartorya*
fischeri PQ5 ที่แยกได้ซึ่งมีศักยภาพในการลดปริมาณพาราควอตได้ดีควรมีการศึกษากลไกการย่อยสลาย
พาราควอตเพิ่มเติมเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายพาราควอตในสภาพธรรมชาติต่อไป

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5672159023 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: PARAQUAT / LIGNINOLYTIC ENZYME / BIODEGRADATION / FUNGI

THITAPHA CHUAYKHONGTHONG: ISOLATION OF PARAQUAT DEGRADING FUNGI AND RELATED ENZYMES. ADVISOR: ASST. PROF. PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. APHICHART KARNCHANATAT, Ph.D., 95 pp.

The aim of this study is to isolate paraquat degrading fungi from soil, piece of wood, or mushroom samples. Seventy-nine isolates were obtained. Considering the ability to grow on agar plate containing 0.3% paraquat and to produce ligninolytic enzymes i.e. lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase when growing on agar medium containing chromogenic substances, it was found that 17 isolates had these abilities. These fungal isolates were further tested with increasing amount of paraquat at 0.4%, 0.5%, and 0.6%. The Results showed that 5 isolates could tolerate up to 0.6% paraquat. Identification based on morphological characteristics and ITS nucleotide sequences revealed that isolate PQ3, PQ5, PQ6, A319 and P279 had close similarity to *Nodulisporium* sp., *Neosartorya fischeri*, *Hypoxyton fragiforme*, *Phoma* sp. and *Setosphaeria rostrate*, respectively, with 99-100% identity. Two isolates, PQ5 and A319, showed high paraquat degradation ability in liquid culture. Isolate PQ5 showed 37% degradation of 0.02% paraquat in 30 days with the presence of manganese peroxidase and laccase activity at 34.28 and 22.39 Unit/liter, respectively. Isolate A319 showed 37% degradation of 0.01% paraquat in 30 days with the presence of manganese peroxidase and laccase activity at 117.76 and 214.52 Unit/liter, respectively. Investigating of paraquat degradation in soil illustrated that isolate A319 was able to grow well in paraquat-bearing soil, but unable to reduce the paraquat. Isolate PQ5 showed potential to degrade 250 ppm of paraquat in sterile soil at 12.25 %; however, the fungus and its enzyme activity might be inhibited by native microorganisms in non-sterile soil. *Neosartorya fischeri* PQ5 that obtained from this study which have potential to reduce paraquat should be further studied for their optimal conditions in order to degrade paraquat in an actual environment condition.

Department: Microbiology Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Microbial Advisor's Signature

Technology Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ กาญจนทัต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา กำลังใจและช่วยเหลือเป็นอย่างดี รวมถึงคอยให้คำแนะนำด้วยความปรารถนาดีเสมอมา จนสามารถทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช เป็นอย่างสูงที่กรุณาเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ประกิตต์สิน สีहनนท์ และรองศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย เป็นอย่างสูงที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำ และอบรมสั่งสอนซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยของข้าพเจ้าเป็นอย่างมาก รวมทั้งบุคลากรภายในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ รวมทั้งคอยอำนวยความสะดวกทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ข้าพเจ้าขอขอบคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษาที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาและวิจัย

ข้าพเจ้าขอขอบคุณพี่ๆน้องๆรวมทั้งเพื่อนๆในภาควิชา ในห้องวิจัย1904/15 และห้องวิจัย 704 ทุกท่านเป็นอย่างมากที่คอยให้คำปรึกษา แนะนำ รวมทั้งเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยเรื่อยมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัว ช่วยคองทอง ที่คอยเป็นกำลังใจ คำแนะนำ รวมทั้งสนับสนุนในทุกด้านให้ข้าพเจ้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป	ญ
สารบัญตาราง.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ปรัชศน์วรรณกรรม.....	4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	24
3.1 อุปกรณ์.....	24
3.2 เคมีภัณฑ์.....	26
3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์	27
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
3.4.1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์	28
3.4.2. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินไลติก	29
3.4.3 การทดสอบความสามารถของราในการเจริญบนอาหารที่มีพาราควอต.....	30
3.4.4 การทดสอบความสามารถของราในการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลว	30
3.4.4.1 การตรวจสอบปริมาณพาราควอตที่เหลืออยู่.....	30
3.4.4.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินไลติก	31
3.4.4.3 การตรวจสอบการเจริญของราสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลว	32
3.4.5 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตในดิน	33
3.4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา	34

3.4.6.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอแม่แบบ	34
3.4.6.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ	34
3.4.6.3 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	35
3.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	35
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	36
4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์	36
4.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินไลติก.....	36
4.3 การทดสอบความสามารถของราในการเจริญบนอาหารที่มีพาราควอต	37
4.4 การทดสอบความสามารถของราในการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลว	43
4.4.1 ผลของราไอโซเลต A319.....	44
4.4.2 ผลของราไอโซเลต P279.....	47
4.4.3 ผลของราไอโซเลต PQ5	49
4.4.4 ผลของราไอโซเลต PQ6	52
4.5 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตในดิน.....	55
4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่คัดเลือก	58
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	60
รายการอ้างอิง	68
ภาคผนวก.....	80
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	81
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี.....	83
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน	85
ภาคผนวก ง ลำดับนิวคลีโอไทด์	87
ภาคผนวก จ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	93

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 95



สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 สถิติการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชระหว่าง พ.ศ. 2551–2558	4
รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของพาราควอต	5
รูปที่ 2.3 การเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในระบบแสง I ถูกขัดขวางโดยพาราควอต	7
รูปที่ 2.4 สารตัวกลางซึ่งเกิดจากการสลายตัวของพาราควอตโดยแสงแดดและจุลินทรีย์	10
รูปที่ 2.5 เทคโนโลยีที่ใช้บำบัดสารมลพิษต่างๆ	14
รูปที่ 2.6 กลไกการทำงานของแลคเคส (a) ไม่ใช้สารตัวกลาง (b) ใช้สารตัวกลาง.....	17
รูปที่ 2.7 สมการปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยลิกนินเปอร์ออกซิเดส.....	18
รูปที่ 2.8 กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยลิกนินเปอร์ออกซิเดส	18
รูปที่ 2.9 ปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยลิกนินเปอร์ออกซิเดสโดยมีเวราทริลแอกอฮอลเป็นสารตั้งต้น.....	19
รูปที่ 2.10 สมการปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส.....	20
รูปที่ 2.11 ปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยลิกนินเปอร์ออกซิเดส.....	20
รูปที่ 2.12 กลไกการทำงานของลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	21
รูปที่ 4.1 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Basal medium ที่มีส่วนผสมของ สารทดสอบชนิดต่างๆ หลังจากบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน	37
รูปที่ 4.2 ตัวอย่างการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium ที่มีส่วนผสมของพารา ควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v)	38
รูปที่ 4.3 กิจกรรมของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของ ราไอโซเลต A319	45
รูปที่ 4.4 กิจกรรมของแลคเคสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของราไอโซเลต A319.....	45
รูปที่ 4.5 กิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของรา ไอโซเลต A319.....	46
รูปที่ 4.6 การเจริญของราไอโซเลต A319 ในระหว่างการย่อยสลายพาราควอตในเวลา 30 วัน	46

รูปที่ 4.7 กิจกรรมของแอมแกนีสเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของ ราไอโซเลต P279	48
รูปที่ 4.8 การเจริญของราไอโซเลต P279 ในระหว่างการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลวที่ ความเข้มข้นต่างๆ.....	48
รูปที่ 4.9 กิจกรรมของแลคเคสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของราไอโซเลต PQ5 .	50
รูปที่ 4.10 กิจกรรมของแอมแกนีสเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วัน ของราไอโซเลต PQ5.....	50
รูปที่ 4.11 กิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของ ราไอโซเลต PQ5	51
รูปที่ 4.12 การเจริญของราไอโซเลต PQ5 ในระหว่างการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลวที่ ความเข้มข้นต่างๆ.....	52
รูปที่ 4.13 กิจกรรมของแอมแกนีสเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วัน ของราไอโซเลต PQ6.....	53
รูปที่ 4.14 กิจกรรมของแลคเคสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของราไอโซเลต PQ6	53
รูปที่ 4.15 การเจริญของราไอโซเลต PQ6 ในระหว่างการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลวที่ ความเข้มข้นต่างๆ.....	54
รูปที่ 4.16 การย่อยสลายพาราควอตที่ความเข้มข้น 250 ppm โดยราไอโซเลต PQ5 และ A319 โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด คือ (1) ดินปลอดเชื้อ ไม่ใส่รา (2) ดินปลอดเชื้อ ใส่รา (3) ดินไม่ ปลอดเชื้อ ไม่ใส่รา (4) ดินไม่ปลอดเชื้อ ใส่รา และเก็บผลทุกๆ 10 วัน เป็นเวลา 30 วัน.....	57
รูปที่ 4.17 การเจริญของราในชุดทดสอบ 2 (ดินปลอดเชื้อ ใส่รา) ของ (ก) ราไอโซเลต PQ5, (ข) ราไอโซเลต A319 ที่เวลา 10 วัน.....	58
รูปที่ 4.18 การเจริญของราในชุดทดสอบ 4 (ดินไม่ปลอดเชื้อ ใส่รา) ของ (ก) ราไอโซเลต PQ5, (ข) ราไอโซเลต A319 ที่เวลา 10 วัน.....	58
รูปที่ 4.19 อะกาโรสเจลอิลเล็กโทรโพลีซิสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ เมอเรสของราไอโซเลตต่างๆ หมายเลข 1 = PQ3, หมายเลข 2 = PQ5, หมายเลข 3 = PQ6, หมายเลข 4 = A319 และ หมายเลข 5 = P279	59

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพาราควอต	6
ตารางที่ 2.2 สรุปการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติก.....	21
ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติกในเบื้องต้น รวมทั้ง ความสามารถในการทนต่อพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	38
ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีพาราควอตที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	42
ตารางที่ 4.3 ความสามารถของราไอโซเลต A319 ในการย่อยพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 10, 20 และ 30 วัน.....	44
ตารางที่ 4.4 ความสามารถของราไอโซเลต P279 ในการย่อยพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ ความเข้มข้นต่างๆ.....	47
ตารางที่ 4.5 ความสามารถของราไอโซเลต PQ5 ในการย่อยพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความ เข้มข้นต่างๆ	49
ตารางที่ 4.6 ความสามารถของราไอโซเลต PQ6 ในการย่อยพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความ เข้มข้นต่างๆ	52
ตารางที่ 4.7 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาทดลอง	55
ตารางที่ ค.1 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับค่าการ ดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร.....	85

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมและสามารถเพาะปลูกพืชได้ตลอดทั้งปี ทำให้การใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชเป็นที่นิยมและใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันเพราะใช้ง่าย สะดวก และเห็นผลรวดเร็ว โดยไม่คำนึงถึงผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม พาราควอต (paraquat) เป็นหนึ่งในสารเคมีกำจัดวัชพืชที่นิยมใช้ ซึ่งจากรายงานปริมาณการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชของประเทศไทยใน พ.ศ. 2555 พบว่ามีการนำเข้าพาราควอต เป็นอันดับสองของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีปริมาณการนำเข้าสูงสุด โดยมีมูลค่ามากกว่าสองพันล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร, 2555) ในประเทศไทยพาราควอตเป็นที่รู้จักในชื่อทางการค้าคือ กรั่มม็อกโซน (Gramoxone) ในหลายประเทศในยุโรปและในประเทศญี่ปุ่นได้มีการระงับการใช้พาราควอตเป็นสารกำจัดวัชพืชแล้ว แต่อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังมีการใช้อย่างต่อเนื่อง (Pan และคณะ, 2004)

พาราควอตเป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชในกลุ่มสารประกอบไนโตรเจนชนิดจตุรภูมิ (quarternary nitrogen compound) ซึ่งในประเทศไทยนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง พาราควอตเป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชที่มีพิษทำลายแบบไม่เลือก เป็นสารเคมีที่ใช้บริเวณใบโดยเฉพาะ เพราะออกฤทธิ์กับเนื้อเยื่อสีเขียวของพืช ไม่ส่งผลกระทบต่อรากพืช โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ไปยับยั้งการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนในการสังเคราะห์แสงของพืช ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น และอนุมูลอิสระนี้จะไปทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของวัชพืชทำให้เซลล์แตก และเกิดการตายของวัชพืชในที่สุด (Bromilow, 2004) เนื่องจากพาราควอตเป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชที่มีประสิทธิภาพสูง มีสมบัติที่ดีกว่าสารเคมีกำจัดวัชพืชชนิดอื่นเพราะออกฤทธิ์เร็ว ละลายน้ำได้ดี สลายตัวได้เมื่อถูกแสงแดด และมีค่า LD₅₀ สูงกว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชหลายชนิด ดังนั้นพาราควอตจึงเป็นพิษน้อยต่อสัตว์น้ำ แต่หากเกิดการสะสมในปริมาณมากก็อาจก่อพิษได้ (นภาพร เลียดประถม, 2556) พาราควอตยังมีสมบัติในการดูดซับอยู่ในดินตะกอน แร่ดินเหนียว (mineral clay) และอินทรีย์วัตถุต่างๆในดินได้เป็นอย่างดีทำให้เกิดการสะสมของสารนี้ในปริมาณสูงในอนุภาคของดิน (Singh และ Singh, 2014) นอกจากนี้พาราควอตยังเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่พบปนเปื้อนอยู่ในแม่น้ำหลายสายของประเทศไทย เช่น แม่น้ำสงครามในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งพบปริมาณพาราควอตอยู่ที่ 2.3-87 ไมโครกรัมต่อลิตร และพบการปนเปื้อนในแม่น้ำจันทบุรี 0.1-13 ไมโครกรัมต่อลิตร (นภาพร เลียดประถม, 2556) ทั้งนี้ปริมาณของพาราควอตตกค้างสูงสุดที่ยอมรับได้ในผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อสัตว์ ผัก และผลไม้ ได้รับการกำหนดไว้ไม่เกิน 0.005-0.05 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัมของอาหาร โดยขึ้นกับชนิดของอาหาร (ราชกิจจานุเบกษา, 2554) การรับพาราควอตเข้าสู่ร่างกายจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เกิดพิษต่อ

เซลล์ โดยเฉพาะบริเวณตับ (WHO/IPCS, 1984) และหากได้รับพาราควอตเข้าสู่ร่างกาย พาราควอต จะถูกดูดซึมเข้าไปในเลือด ในระบบทางเดินอาหาร หลังจากนั้นจะกระจายไปอยู่ตามเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ตับ ไต และปอด เป็นต้น และถ้าผิวหนังมีแผลจะสามารถดูดซึมพาราควอตได้มากขึ้น จนทำให้เกิดการ เป็นพิษได้ (ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี, 2558)

การเปลี่ยนแปลงของพาราควอตในดินเกิดได้จากหลายกลไก เช่น การสลายโดยใช้แสง การย่อยสลายโดยกระบวนการทางเคมี และการย่อยสลายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ ซึ่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย สารอินทรีย์เหล่านี้มักเกิดขึ้นแค่บริเวณผิวดิน โดยการสลายโดยใช้แสงจะขึ้นอยู่กับความเข้มของรังสี อัลตราไวโอเล็ตและมีความยาวคลื่นอยู่ในช่วงระหว่าง 285-310 นาโนเมตร (Funderburk, 1988)

การย่อยสลายทางชีวภาพของพาราควอตโดยจุลินทรีย์ถือเป็นกระบวนการสำคัญต่อการลด ปริมาณพาราควอตที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน โดยเฉพาะราและแบคทีเรีย ถือเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายสารเคมีกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตร ทั้งนี้เรา ได้รับรายงานว่า เป็นผู้ย่อยสลายที่มีความสามารถสูงในการเปลี่ยนแปลงและย่อยสลายสารมลพิษต่างๆ โดยผ่านการทำงานของเอนไซม์ และโดยการเจริญเพิ่มชีวมวลที่รวดเร็ว รวมทั้งลักษณะของเส้นใยที่ เข้าถึงสิ่งแวดล้อมได้ดี ก็ช่วยทำให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีขึ้นด้วย (Ashoka และคณะ, 2002)

เรามีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษต่างๆผ่านระบบเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายนอก เซลล์ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นกลไกที่เราใช้ในการย่อยสลายสารมลพิษต่างๆในสิ่งแวดล้อม เช่น เอนไซม์ ในกลุ่มลิกนินโอไลติก (ligninolytic enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยลิกนินได้ และเป็นเอนไซม์ ที่ไม่จำเพาะ (Adenipekun และ Lawal, 2012) จึงมีรายงานมากมายเกี่ยวกับการนำราที่มีสมบัติใน การผลิตเอนไซม์เหล่านี้มาใช้เปลี่ยนสภาพสารประกอบบางชนิดที่มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุล คล้ายคลึงกับลิกนิน เพื่อลดความเป็นพิษและการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างงานวิจัยที่ เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษโดยราและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง เช่น งานวิจัยของ Fragoeiro (2005) ได้ใช้ราไวท์รอตในการย่อยสลายสารเคมีกำจัดศัตรูพืช คือ simazine, trifluralin และ dieldrin ทั้ง แบบสารผสมและแยกเดี่ยว พบว่า *Trametes versicolor* และ *Pleurotus ostreatus* สามารถทน ต่อความเป็นพิษของสารเหล่านี้ได้ และมีความสามารถในการย่อยสลายสารเคมีเหล่านี้ได้ดีที่สุด ร่วมกับการผลิตเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ Maalej-Kammoun และคณะ (2009) ได้ ศึกษาความสามารถของแลคเคสจากราไวท์รอต *Trametes* sp. ในการย่อยสลายสี้อมสังเคราะห์ มาลาโคท์กรีน และพบว่าแลคเคสที่ 0.1 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร สามารถย่อยมาลาโคท์กรีนได้ถึง 97 เปอร์เซ็นต์ จากความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร Mohamed และคณะ (2012) ได้คัดแยก ราจากดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และพบว่ารา ตัวอย่างที่แยกได้มีกิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยพบว่า

Aspergillus terreus สามารถย่อยสลายเนพทาลีนและแอนทราซีนได้ 98.5 เปอร์เซ็นต์ และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีการผลิตเอนไซม์เหล่านี้ในปริมาณสูง

ในด้านการใช้ราเพื่อย่อยสลายสารเคมีกำจัดวัชพืชกลุ่มพาราควอตนั้น มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังเช่น และ Smith และคณะ (1976) ศึกษาการสลายตัวของสารเคมีกำจัดวัชพืชกลุ่มพาราควอตและไดควอตโดยรา 4 ชนิดในดิน พบว่าราแต่ละชนิดมีความไวต่อสารพิษแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงราทั้ง 4 ชนิดในอาหารที่มีพาราควอตและไดควอตที่ติดฉลากคาร์บอน ^{14}C ผสมอยู่ หลังจากเวลาผ่านไป 1 วัน พบว่า *Aspergillus niger* และ *Penicillium frequentans* มีการปลดปล่อย $^{14}\text{CO}_2$ ออกมาจากอาหารที่มีพาราควอตผสมอยู่ และสรุปว่าราทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถย่อยสลายพาราควอตได้สมบูรณ์

งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษารามีความสามารถย่อยสลายพาราควอตหรือใช้พาราควอตเป็นสารกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดที่มีผลต่อการย่อยสลายสารพิษได้ โดยคัดแยกมาจากทั้งเห็ดที่เจริญบนท่อนไม้และจากดินที่มีการปนเปื้อนสารเคมีกำจัดวัชพืช และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ของราตัวอย่างที่คัดแยกได้ โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้ราที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรและด้านสิ่งแวดล้อมต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

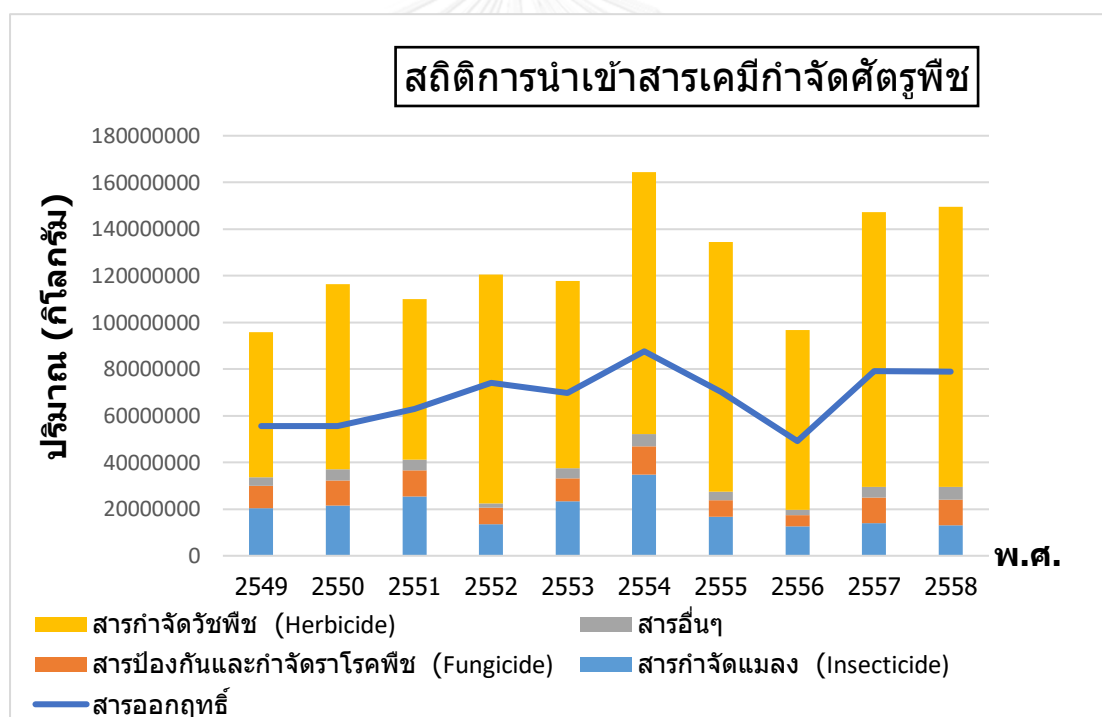
เพื่อคัดแยกราที่มีความสามารถในการย่อยสลายพาราควอต รวมทั้งตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ และทดสอบความสามารถในการย่อยพาราควอตในดินของราที่คัดเลือกได้

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ความเป็นมาและสภาพปัญหา

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ประเทศไทยซึ่งมีประชากรส่วนใหญ่ของประเทศประกอบอาชีพด้านเกษตรกรรมและเป็นที่รู้จักไปทั่วโลกในฐานะผู้ผลิตและส่งออกสินค้าเกษตรที่สำคัญนั้น ยังต้องประสบกับปัญหาความไม่แน่นอนของสภาพดินฟ้าอากาศที่ส่งผลกระทบต่อผลิตผลทางการเกษตร ทำให้เกษตรกรมีแนวโน้มที่จะพึ่งพาสารเคมีต่างๆมาช่วยเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น เช่น ปุ๋ยเคมี และสารเคมีกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น และจากสถิติของสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ในช่วงระหว่างเวลา 10 ปีที่ผ่านมา ตั้งแต่ พ.ศ. 2549 จนถึงปัจจุบัน พบว่า ปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชของประเทศไทยในแต่ละปีมีแนวโน้มสูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2559)



รูปที่ 2.1 สถิติการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชระหว่าง พ.ศ. 2551-2558

ที่มา : (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2559)

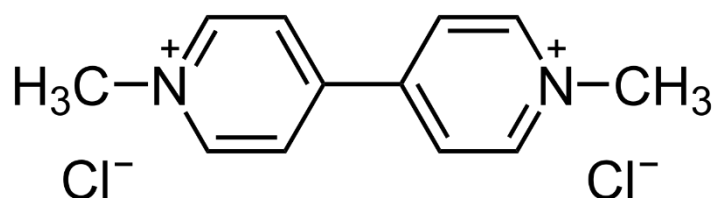
เมื่อพิจารณาจากข้อมูลทางสถิติของการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชของไทย พบว่าใน พ.ศ. 2558 มีการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพิ่มมากขึ้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับข้อมูล พ.ศ. 2548 และเมื่อนำปริมาณสารออกฤทธิ์มาพิจารณา พบว่าสัดส่วนการนำเข้าสารกำจัดวัชพืช (herbicide) มีปริมาณมากที่สุดคือ สูงถึงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสารป้องกันและกำจัด

ราโรคพืช (fungicide) ประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ สารกำจัดแมลง (insecticide) ประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ และสารอื่นๆประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์

ในประเทศไทย การใช้สารกำจัดวัชพืชนั้นเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางและนับว่าเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพ เพราะไม่ต้องใช้เทคโนโลยีซับซ้อน สามารถใช้ได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก และเห็นผลอย่างรวดเร็ว ด้วยเหตุนี้หากมีการใช้เกินความจำเป็นจะนำไปสู่ปัญหาการปนเปื้อนของสารเคมี ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม สุขภาพของประชากรและเศรษฐกิจ ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ปัจจุบันสถิติการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทยตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะสารกำจัดวัชพืช จากข้อมูลของสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตรใน พ.ศ. 2558 พบว่ามีปริมาณและมูลค่าการนำเข้าพาราควอตสูงสุดเป็นอันดับ 2 รองจากไกลโฟเสต โดยมีปริมาณ 30,440 ตัน และมีมูลค่าถึง 2,693 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2559b)

2.2 ข้อมูลทั่วไปของพาราควอต (paraquat)

พาราควอตเป็นสารสังเคราะห์ทางเคมีที่ใช้เป็นสารกำจัดวัชพืช โดยพาราควอตเป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มสารประกอบไนโตรเจนชนิดจตุรภูมิ (quarternary nitrogen herbicide) มีชื่อทางเคมีว่า 1,1'-ไดเมทิล-4,4'-ไบไพริดีเนียมไดคลอไรด์ (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) และมีชื่อทางการค้าที่รู้จักกันดีว่า กรัสม็อกโซน (Gramoxone) พาราควอตมีโครงสร้างโมเลกุลดังรูปที่ 2.2 โดยมีการผลิตขึ้นตั้งแต่ ค.ศ. 1882 แต่เริ่มใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืชใน ค.ศ. 1959 (Ecobichon, 2001) องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ได้จำแนกความเป็นอันตรายของพาราควอตอยู่ใน Class II คือมีอันตรายปานกลาง (Moderately hazardous) (WHO, 2009)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของพาราควอต

ที่มา : (Fuke และคณะ, 2002)

พาราควอตมีลักษณะภายนอกเป็นผลึกของแข็งสีขาวใสหรือเป็นผงสีขาวค่อนข้างเหลือง พาราควอตที่อยู่ในรูปประจุบวก ($C_{12}H_{14}N_2$) มีน้ำหนักโมเลกุล 186.261 กรัม/โมเลกุล พาราควอตที่อยู่รูปเกลือไดคลอไรด์ ($C_{12}H_{14}Cl_2N_2$) มีน้ำหนักโมเลกุล 257.2 กรัม/โมเลกุล พาราควอตมีสมบัติการละลายน้ำได้ดีมากที่อุณหภูมิ 20 °C และไม่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ (organic solvent) มีจุดหลอมเหลวและจุดเดือดอยู่ที่ 340 องศาเซลเซียส ค่าความดันไออยู่ที่ $<10^{-4}$ กิโลปาสคาล จึงทำให้พาราควอตมีโอกาสระเหยสู่อากาศได้น้อย พาราควอตมีสมบัติในการดูดซับกับดินได้ดีโดยค่าคงที่ของการดูดซับ K_{oc} ของพาราควอต อยู่ที่ 8400-40,000,000 และการสะสมทางชีวภาพพิจารณาจากค่าคงที่การละลายน้ำ/ออกทานอล (log K_{ow}) ซึ่งมีค่าเท่ากับ -4.5 แสดงว่าพาราควอตมีโอกาสสะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิตได้น้อย สมบัติเหล่านี้ของพาราควอตสรุปไว้ในตารางที่ 2.1

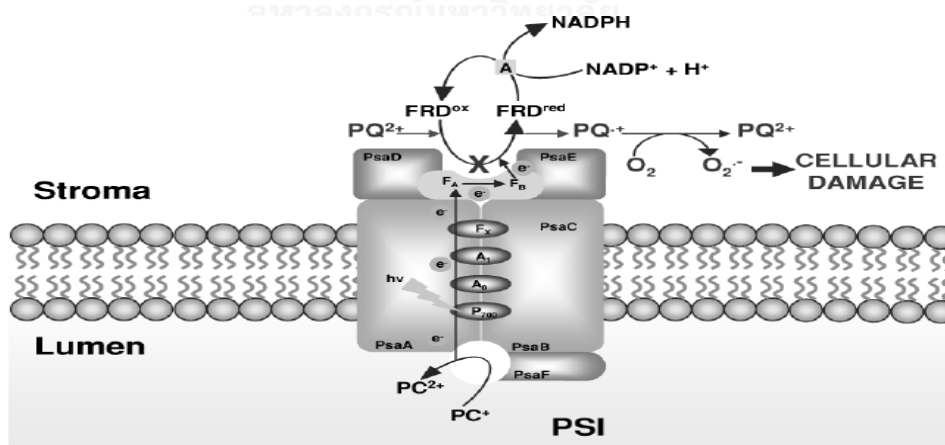
ตารางที่ 2.1 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพาราควอต (Amondham และคณะ, 2006; FAO, 2003; WHO/IPCS, 1984)

ชื่อสามัญ	พาราควอต (Paraquat)
ชื่อทางเคมี	IUPAC : 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride
CAS No.	1910-42-5
สูตรโมเลกุล	$C_{12}H_{14}Cl_2N_2$
น้ำหนักโมเลกุล	257.2
ลักษณะภายนอก	ผลึกของแข็งสีขาวใสหรือเป็นผงสีขาวค่อนข้างเหลือง ไม่มีกลิ่น
สมบัติการละลายน้ำที่ 20 °C	620 กรัม/ลิตร
จุดหลอมเหลว, จุดเดือด	340 องศาเซลเซียส
ค่าความดันไอที่ 25 °C	น้อยกว่า 10^{-4} กิโลปาสคาล
ค่าคงที่ในการดูดซับในดิน (K_{oc})	8400-40,000,000
ค่าคงที่การละลายน้ำ/ออกทานอล (log K_{ow}) ที่ 25 °C	-4.5
ความถ่วงจำเพาะที่ 20 °C	1.24-1.26

พาราควอตเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มไบไพริไดเลียม (bipyridylum) ที่ออกฤทธิ์เร็ว กำจัดวัชพืชแบบไม่เลือกทำลาย (non-selective herbicide) และเป็นสารกำจัดวัชพืชประเภทสัมผัสตาย (contact herbicides) หรือทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (contact membrane disrupter) โดยทำให้เกิดการแตกสลายของเซลล์ พาราควอตเป็นสารประเภทที่เหมาะสมสำหรับฉีดทางใบ และออกฤทธิ์เฉพาะส่วนที่เป็นสีเขียวของพืช ไม่เคลื่อนย้ายในต้นพืช โดยใช้ฉีดในพื้นที่ทำการเกษตรก่อนหรือหลังวัชพืชงอก (pre- หรือ post-emergence) และพื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตรเพื่อกำจัดวัชพืชที่งอกจากเมล็ดและส่วนที่มีสีเขียวเหนือดิน โดยไม่ทำลายส่วนสีน้ำตาลของพืช จึงสามารถใช้ฉีดพ่นได้รอบๆ โคนต้นพืชหลักได้ ทำให้ส่วนของพืชที่สัมผัสกับสารเขียวแห้งตายหรือถูกทำลายไป (Bromilow, 2004)

2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของพาราควอตในวัชพืช

พาราควอตเป็นสารที่ออกฤทธิ์ทำลายเนื้อเยื่อของพืช โดยทำให้เกิดการแตกสลายของเซลล์ กลไกการออกฤทธิ์จะเกิดขึ้นเมื่อมีแสงสว่างและเกิดภายในคลอโรพลาสต์ในกระบวนการการสังเคราะห์แสงของพืช โดยการเข้าไปขัดขวางการเคลื่อนย้ายของอิเล็กตรอนในระบบแสง I (photosystem I, PS I) ในขั้นตอนของการเปลี่ยน NADP^+ ไปเป็น NADPH ซึ่งส่งผลให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์ เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Super oxide anion), H_2O_2 , $^1\text{O}_2$ และ OH^- จากนั้นอนุมูลอิสระเหล่านี้จะไปทำปฏิกิริยากับไขมันไม่อิ่มตัวที่อยู่ในโมเลกุลของฟอสโฟลิพิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (lipid peroxidation) ทำให้เซลล์แตก นำไปสู่การแห้งของใบอย่างรวดเร็วและเกิดการตายของเซลล์ในที่สุด ดังรูปที่ 2.3 (Qian และคณะ, 2009; Suntres, 2002)



รูปที่ 2.3 การเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในระบบแสง I ถูกขัดขวางโดยพาราควอต

ที่มา : (Dinis-Oliveira และคณะ, 2008)

2.4 ความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์

พาราควอตเป็นสารเคมีที่มีอันตรายมากชนิดหนึ่ง มีพิษต่อทั้งต่อมนุษย์และสัตว์ ส่งผลต่ออวัยวะต่างๆของร่างกายที่สัมผัส เช่น ตา จมูก ปาก ผิวหนัง รวมถึงอวัยวะภายใน เช่น ปอด หัวใจ ตับ ไต สมอง และระบบประสาทส่วนกลาง (Murray และ Gibson, 1972) พาราควอตอาจก่อให้เกิดไตวาย และระบบทางเดินหายใจล้มเหลวภายใน 24 ชั่วโมงได้ ความเป็นพิษของพาราควอตเกิดจากการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องตามมา ส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหาย โดยเฉพาะอวัยวะภายในที่สำคัญ ซึ่งอวัยวะเป้าหมาย คือ ตับและปอด (Safaei Asl และ Dadashzadeh, 2016; WHO/IPCS, 1984) ตับจะเสื่อมสภาพจนอาจทำให้เกิดโรคตับเรื้อรังและอาจเกิดโรคไตช้ำได้ (Wu และคณะ, 2013) ความเป็นพิษต่อผิวหนังจะก่อให้เกิดการระคายเคือง ผิวหนังแตกเป็นร่อง ลอกเป็นสะเก็ด ไหม้ ในที่สุดเซลล์บริเวณนั้นก็จะตาย และนอกจากนี้อาจทำให้เกิดเป็นแผลพุพอง และถ้าพาราควอตสัมผัสกับตาก็จะทำให้ตาแดงและอักเสบ (PANAP, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าการได้รับพาราควอตหรือการรับพาราควอตร่วมกับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชบางชนิดอย่างต่อเนื่องอาจนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งปอดได้ (Costello และคณะ, 2009; Tanner และคณะ, 2011)

ระยะแรกที่ได้รับพิษจากพาราควอต จะมีลักษณะอาการคือ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เวียนศีรษะ อาจมีเลือดออกภายในระบบทางเดินอาหาร ลำไส้บวมและเกิดแผลขึ้น แสบคอ ริมฝีปากแห้ง และต่อมามีอาการไข้ตัวร้อนจัด (ชินเจนทาครอบ, 2547)

สำหรับระยะเรื้อรังต่อมานั้น มีรายงานว่าพาราควอตเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะเกิดพังผืดในปอด (pulmonary fibrosis) ทำให้ขัดขวางการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนตามปกติของปอด นำไปสู่การอักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic inflammation) ทำให้หายใจลำบาก หอบ สูดหายใจมีอาการตัวเขียว เพราะร่างกายขาดออกซิเจน อาจหมดสติและนำไปสู่การเสียชีวิตได้ และสามารถพบภาวะนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น มนุษย์ สุนัข ลิง และหนู (Murray และ Gibson, 1972; Qian และคณะ, 2009; WHO/IPCS, 1984) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อสัตว์ได้รับพาราควอตเข้าไปอาจก่อให้เกิดภาวะปอดบวมน้ำ (pulmonary edema) และไตทำงานผิดปกติ (WHO/IPCS, 1984) เมื่อพิจารณาความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ โดยประเมินจากค่า LC_{50} (Lethal Concentration 50) ซึ่งหมายถึงค่าความเข้มข้นของสารเมื่อสัตว์รับเข้าสู่ร่างกายแล้วทำให้สัตว์เสียชีวิตไปเป็นจำนวนครึ่งหนึ่งของสัตว์ทั้งหมดในกลุ่มที่ทำการทดลอง พบว่าความเป็นพิษขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ เช่น สัตว์น้ำประเภทกุ้งปู (Crustacean) มีค่า LC_{50} อยู่ในระดับความเป็นพิษปานกลาง คือ อยู่ระหว่าง 1000-10000 $\mu\text{g/L}$ ส่วนสัตว์น้ำประเภทปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ แผลงตอนพืชและสัตว์ มีค่า LC_{50} อยู่ที่ 10000-100000 $\mu\text{g/L}$ ซึ่งจัดว่าอยู่ในระดับความเป็นพิษค่อนข้างสูง (นภาพร เลียดประดม, 2556)

2.5 พาราควอตในประเทศไทย

ในประเทศไทยพาราควอตจัดเป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีสถิติการนำเข้าและจำหน่ายสูงสุดเป็นอันดับสองรองจากไกลโฟเสต (ฝ่ายข้อมูลเครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช, 2555) การนำเข้าพาราควอตในรูปพาราควอตไดคลอไรด์ (paraquat dichloride) ใน พ.ศ. 2558 มีจำนวนทั้งสิ้น 30,440,671 กิโลกรัม โดยเป็นสารออกฤทธิ์จำนวน 12,044,502 กิโลกรัม รวมเป็นมูลค่าทั้งสิ้นประมาณ 2,692 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2559b) ในประเทศไทยมีการใช้พาราควอตมาเป็นเวลานานและมีการใช้ทั้งในพืชไร่ เช่น ข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง และไม้ยืนต้น เช่น ยางพารา ปาล์มน้ำมัน และไม้ผลหลายชนิด (Amondham และคณะ, 2006; PANAP, 2011) พาราควอตมีชื่อทางการค้ามากมาย แต่ที่นิยมใช้และเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลาย คือ กรัสม็อกโซน (Gramoxone) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท ซินเจนทา (Syngenta) ในประเทศไทยโดยทั่วไปแล้วพาราควอตที่ใช้จะอยู่ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นประมาณ 27.6 เปอร์เซ็นต์ w/v (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2559a)

2.6 การสะสมและแพร่กระจายของพาราควอตในสิ่งแวดล้อม

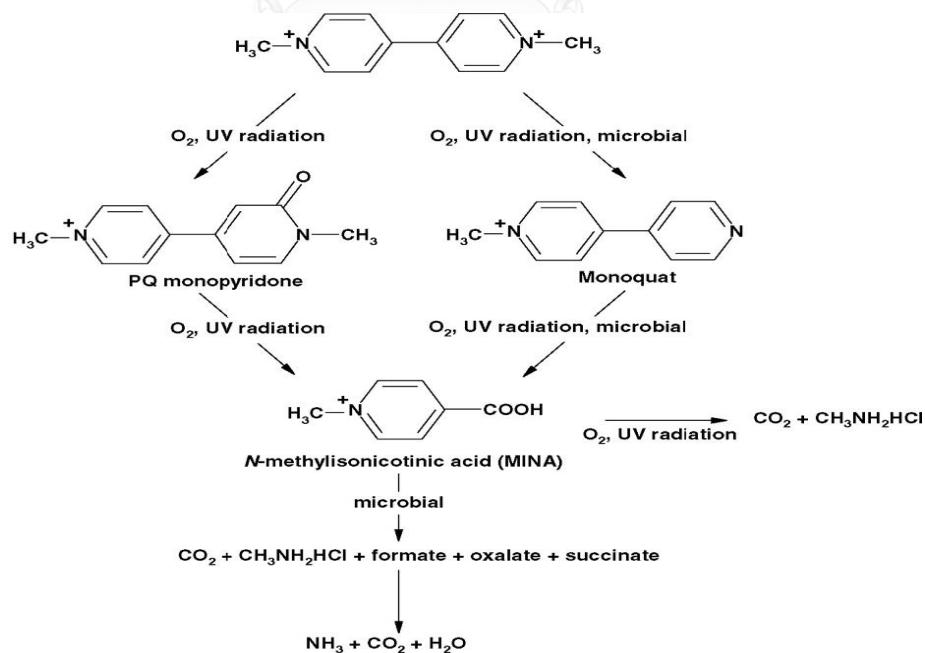
ปัญหาการตกค้างของสารเคมีกำจัดวัชพืชในสิ่งแวดล้อมมีสาเหตุมาจากการใช้สารเคมีเหล่านี้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน และการใช้ในปริมาณสูงเกินกำหนดทำให้เพิ่มโอกาสเกิดการแพร่กระจายของสารเคมี โดยบางส่วนเกิดขึ้นในระหว่างการผลิตพ่น บางส่วนระเหยอยู่ในอากาศ บางส่วนกระจายจากบริเวณที่ฉีดพ่นลงสู่ดิน และบางส่วนกระจายลงสู่แหล่งน้ำ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อพืชและสัตว์ในธรรมชาติได้ภายหลัง (WHO/IPCS, 1984)

การสะสมและแพร่กระจายของพาราควอตในดิน

เนื่องจากพาราควอตเป็นสารที่มีประจุบวกและมีค่าคงที่ในการดูดซับในดิน (K_{oc}) สูงที่ 8400-40,000,000 ซึ่งแสดงว่ามีสมบัติในการดูดซับกับอนุภาคของดินซึ่งเป็นประจุลบได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะดินเหนียว (ทศพล พรพรหม, 2554) เช่น ดินเหนียว Montmorillonite ซึ่งเป็นชนิดที่มีความเหนียวสูงมาก สามารถดูดซับกับพาราควอตได้มากกว่าดินเหนียว Kaolinite หรืออินทรีย์วัตถุในดิน (Tsai และคณะ, 2003) ส่วนค่า DT_{50} (Dissipation Time 50) หรือค่าครึ่งชีวิตของพาราควอตในดินมีค่าอยู่ระหว่าง 1-20 ปี โดยขึ้นอยู่กับชนิดของดิน (Amondham และคณะ, 2006; ทศพล พรพรหม, 2554) พาราควอตจึงสลายตัวได้ช้ามากเมื่อสะสมในดิน (Bromilow, 2004) ซึ่งถ้ามีการใช้อย่างต่อเนื่องเป็นประจำจนถึงจุดอิ่มตัวในการดูดซับของดิน อาจทำให้เกิดอันตรายขึ้นได้ (Amondham และคณะ, 2006) มีงานวิจัยศึกษาการตกค้างของพาราควอตและความสามารถของดินในการดูดซับพาราควอต โดยเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ทำการเกษตร 6 แหล่งที่มีประวัติการใช้พารา

ควอตมาเป็นเวลานาน พบว่า ในตัวอย่างดินที่เป็นแหล่งปลูกไม้ผลซึ่งเป็นดินทรายที่มีปริมาณดินเหนียวปนอยู่ 9-38 เปอร์เซ็นต์ จะมีการตกค้างของพาราควอตสูงถึง 1.71-8.48 ppm ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างดินจากแหล่งเพาะปลูกข้าวโพด อ้อย และมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นดินที่มีดินเหนียวเป็นส่วนประกอบน้อยกว่าดินปลูกไม้ผล แต่ก็ยังไม่สูงพอจะเป็นอันตรายต่อพืช เพราะในดินมีความสามารถในการดูดซับพาราควอตสูงถึง 83.5 ppm (พวงรัตน์ ขจิตวิทยานุกูล, 2557)

การย่อยสลายพาราควอตเกิดได้โดยแสงและจุลินทรีย์ กล่าวคือ เมื่อพาราควอตตกลงสู่พื้นดิน หากสะสมบริเวณผิวดินพาราควอตอาจสลายตัวได้ด้วยแสงในช่วงความยาวคลื่นของรังสีอัลตราไวโอเล็ต คืออยู่ระหว่าง 285-310 นาโนเมตร (Funderburk, 1988) และยังสามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ในดินหลายชนิด เช่น *Lipomyces starkeyi*, *Corynebacterium fascians*, และ *Clostridium pasteurianum* (Ricketts, 1999) ดังรูปที่ 2.4 โดยเริ่มจากการที่พาราควอตถูกดึงหมู่เมทิลออก (demethylation) หรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของวงแหวนไพริดีน ทำให้วงแหวนเปิดออก 1 วง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแตกวงคือ N-methyl isonicotinic acid และต่อมาเกิดสารอื่นๆ เช่น เมทิลามีน อนุพันธ์ของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ รวมทั้งคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามการย่อยสลายพาราควอตโดยจุลินทรีย์ในดินมีจำกัดเพราะพาราควอตส่วนหนึ่งถูกดูดซับโดยอนุภาคดินเหนียวหลังจากพาราควอตตกถึงพื้นดิน ทำให้จุลินทรีย์ย่อยสลายได้ยากขึ้น (Burns และ Audus, 1970)



รูปที่ 2.4 สารตัวกลางซึ่งเกิดจากการสลายตัวของพาราควอตโดยแสงแดดและจุลินทรีย์

ที่มา : (Ricketts, 1999)

การสะสมและแพร่กระจายของพาราควอตในอากาศและในน้ำ

เนื่องจากพาราควอตมีความดันไอน้อยกว่า 10^{-4} กิโลปาสคาล จึงเป็นสารที่ไม่ระเหย (FAO, 2003) ทำให้มีการกระจายอยู่ในอากาศในสภาพที่เป็นละอองเล็กๆหลังการฉีดพ่น โดยการกระจายตัวของละอองของสารจะขึ้นกับลักษณะการฉีดพ่น เครื่องมือที่ใช้ในการฉีดพ่น สภาพหญ้า และสภาพภูมิอากาศ (พวงรัตน์ ขจิตวิษยานุกูล, 2557) สำหรับในน้ำนั้น เมื่อมีการแพร่กระจายของพาราควอตลงในแหล่งน้ำ ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ควบคุมวัชพืชที่ลอยน้ำ วัชพืชที่ไหลพ่นน้ำ หรือละอองที่ปลิวมาจากบริเวณใกล้เคียงแล้ว พบว่าพาราควอตส่วนหนึ่งจะถูกดูดซับไว้ด้วยอนุภาคที่แขวนลอย (suspended matter) และตะกอนดิน (sediment) (ทศพล พรพรหม, 2554) จากรายงานพบว่า แม่น้ำหลายสายในประเทศไทยมีการปนเปื้อนของพาราควอต เช่น แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำสงคราม แม่น้ำปากพนัง และแม่น้ำจันทบุรี (Pataranawatab และคณะ, 2012) พาราควอตสามารถละลายน้ำได้ดีและมีการใช้อย่างแพร่หลายในประเทศไทย ซึ่งแม้ว่าการแพร่กระจายของพาราควอตในแหล่งน้ำจะไม่อันตรายต่อสัตว์น้ำอย่างเฉียบพลัน แต่ถ้ามีปริมาณการปนเปื้อนพาราควอตในแหล่งน้ำสูง ก็อาจมีอันตรายต่อสัตว์น้ำได้ (นภาพร เลียดประถม, 2556)

การสะสมและแพร่กระจายในพืช

เนื่องจากพาราควอตเป็นสารกำจัดวัชพืชประเภทสัมผัสผิวดิน เมื่อพาราควอตตกค้างบริเวณส่วนใดของพืช จะสามารถซึมเข้าสู่ในเซลล์พืชได้อย่างรวดเร็ว และอาจมีส่วนหนึ่งเหลืออยู่ที่ใบพืช ทำให้ใบพืชบริเวณนั้นแห้งตาย และอาจเกิดการย่อยสลายด้วยแสง (photochemical degradation) ในสภาพที่มีแสงแดดจัด ทำให้พาราควอตที่ตกค้างในพืชสลายตัวประมาณ 25-50 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3 สัปดาห์ (Roberts และคณะ, 2002; WHO/IPCS, 1984)

2.7 การบำบัดพาราควอตที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

การบำบัดพาราควอตสามารถทำได้ทั้งวิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมี ตัวอย่างเช่น การตรึง (immobilization) โดยใช้เมมเบรนในการตรึงพาราควอตจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Cocenza และคณะ (2012) ที่ใช้การตรึงพาราควอตบนตัวพุงที่เตรียมจากอัลจินตพอลิแอนไอออน (alginate polyanion) ซึ่งมีสมบัติเป็นพอลิเมอร์ประจุลบ ไคโตซานพอลิแคตไอออน (chitosan polycation) ซึ่งมีสมบัติเป็นพอลิเมอร์ประจุบวก และอัลจินต/ไคโตซาน โดยใช้หลักการที่ประจุต่างกันจะดึงดูดกัน โดยพบว่าความสามารถในการดูดซับพาราควอตได้ดีเกิดจากการใช้เมมเบรนที่เตรียมจากอัลจินตและอัลจินต/ไคโตซานเป็นตัวพุง งานวิจัยของ Hamadi และคณะ (2004) ใช้วิธีการดูดซับ (adsorption) เพื่อบำบัดพาราควอตจากน้ำทิ้งโดยใช้ถ่านกัมมันต์ (activated carbon) เป็นสารดูดซับ และตัวอย่างงานวิจัยของ Dhaouadi และคณะ (2009) ที่ศึกษาการบำบัด

การปนเปื้อนของพาราควอตในน้ำทิ้ง โดยใช้กระบวนการแอดวานซออกซิเดชัน (advanced oxidation process) อันได้แก่ กระบวนการแอนโอดิกออกซิเดชัน (anodic oxidation) และ กระบวนการเฟนตัน (Fenton) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้เป็นการบำบัดน้ำเสียทางเคมี โดยพบว่าวิธีการต่างๆไม่สามารถย่อยสลายพาราควอตได้ทั้งหมด แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทำให้เกิดสารตัวกลางที่มีโครงสร้างเป็นสารในกลุ่มของกรดคาร์บอกซิลิก ปฏิกิริยาทางเคมีส่วนใหญ่มักมีความรุนแรง และคาดเดาสารตัวกลางที่อาจเกิดขึ้นได้ยาก ซึ่งอาจมีความเป็นพิษเพิ่มขึ้นและเกิดการตกค้างได้ จึงอาจเป็นการเพิ่มปริมาณของสารมลพิษที่ต้องบำบัด (Iimura และคณะ, 2002)

2.8 การบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation)

การบำบัดทางชีวภาพเป็นกระบวนการย่อยสลาย กำจัด หรือเปลี่ยนรูปของสารมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ทำให้สารมลพิษหมดไปหรือทำให้มีความเป็นพิษลดน้อยลงหรือหมดไป ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้อาจเป็นได้ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย (Adams และคณะ, 2015) การบำบัดทางชีวภาพเป็นวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เป็นที่ยอมรับจากประชาชนในพื้นที่ มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำกว่าวิธีการใช้สารเคมี และวิธีการเผาซึ่งเป็นวิธีทางกายภาพ (Perelo, 2010) แต่อาจใช้เวลามากกว่าการบำบัดด้วยวิธีอื่น การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพต้องอาศัยความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆของจุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นสารอาหาร แหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตและการดำรงชีพอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษต่างๆได้ทั้งในดิน น้ำ และอากาศ (Adams และคณะ, 2015; Wilson และ Jones, 1993)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการบำบัดทางชีวภาพ (Boopathy, 2000) ได้แก่

1. จุลินทรีย์และสมบัติของจุลินทรีย์ เช่น อัตราการเจริญเติบโต การผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายสาร ปริมาณ และความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ และปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ เช่น การแก่งแย่ง เป็นต้น
2. ลักษณะของสารมลพิษที่ปนเปื้อน เช่น ชนิดของสาร โครงสร้างทางเคมี ปริมาณ หรือระดับความเข้มข้นของสาร ความเป็นพิษของสาร และสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารนั้นๆ และสมบัติการละลาย เป็นต้น
3. สภาพแวดล้อม ได้แก่ ปริมาณของออกซิเจน ความชื้น สารอาหาร อุณหภูมิ ความเป็นกรดเบส ความเข้มของแสง และความสามารถในการเข้าถึงสารของจุลินทรีย์ เป็นต้น

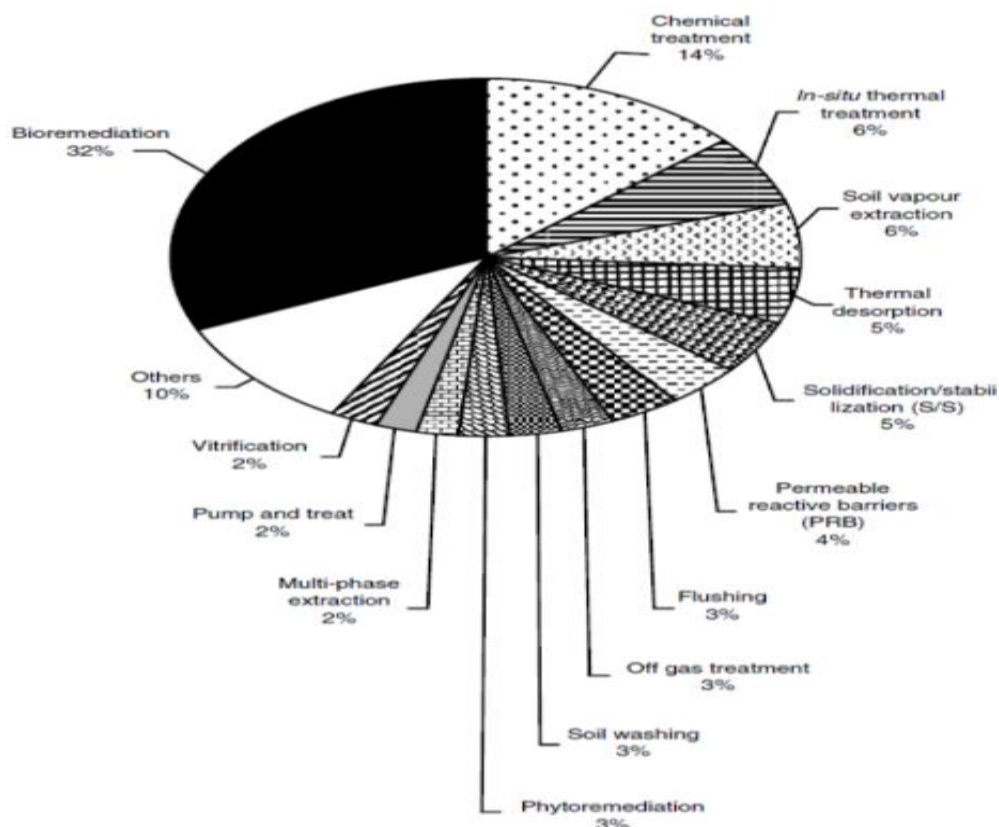
วิธีการบำบัดทางชีวภาพสามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 ประเภท (Adenipekun และ Lawal, 2012) ได้แก่

1. *Ex situ* bioremediation ซึ่งเป็นการบำบัดพื้นฟูพื้นที่โดยการนำสารมลพิษไปบำบัดนอกพื้นที่ปนเปื้อน เช่น การเอาดินที่ปนเปื้อนไปบำบัดที่อื่น
2. *In situ* bioremediation ซึ่งเป็นการบำบัดพื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนโดยไม่มีการเคลื่อนย้ายสารมลพิษออกนอกพื้นที่ หรือเป็นการเติมจุลินทรีย์เพื่อการบำบัดสารมลพิษลงในแหล่งปนเปื้อนโดยตรง

นอกจากนี้การบำบัดทางชีวภาพสามารถแบ่งได้ตามลักษณะของการเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัด (Vidali, 2001) ได้แก่

1. biostimulation คือ การเติมสารอาหารหรือการปรับภาวะเพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติและมีความสามารถในการย่อยสลายมลพิษ ให้สามารถเติบโตหรือเพิ่มจำนวนได้ เช่น การเติมสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ หรือการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารมลพิษ รวมทั้งการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารมลพิษ เช่น การให้ออกซิเจน การปรับค่าความเป็นกรดเบส การควบคุมอุณหภูมิ เพื่อทำให้เกิดการบำบัดสารมลพิษต่างๆขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด
2. bioaugmentation คือ การเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการบำบัดมลพิษลงไปในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน ใช้ได้ทั้งในกรณีของการเติมจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในพื้นที่หรือจุลินทรีย์จากต่างถิ่น โดยเมื่อเติมลงไปแล้วจะทำให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ bioaugmentation ร่วมกับ biostimulation เพื่อก่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการบำบัดมลพิษอีกด้วย (Vogel, 1996)

ในปัจจุบันปัญหาการปนเปื้อนสารมลพิษก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก ดังนั้นการเลือกใช้เทคโนโลยีในการบำบัดสารมลพิษจึงจำเป็นอย่างมาก โดยปัจจุบันมีหลากหลายวิธีการ ทั้งเทคโนโลยีการบำบัดทางกายภาพ การบำบัดโดยใช้พืช การบำบัดทางเคมี โดยจากข้อมูลของ EPA REACH IT (Malik และ Grohmann, 2012) ดังรูปที่ 2.5 นั้น แสดงว่าวิธีการบำบัดทางชีวภาพเป็นหนึ่งในเทคโนโลยีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้วิธีการบำบัดทางชีวภาพยังเป็นที่สนใจ และมีประสิทธิภาพมากพอต่อการบำบัดสารมลพิษในปัจจุบัน



รูปที่ 2.5 เทคโนโลยีที่ใช้บำบัดสารมลพิษต่างๆ

ที่มา : (Malik และ Grohmann, 2012)

2.9 การบำบัดทางชีวภาพด้วยรา

ราเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆในระบบนิเวศ มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากสิ่งมีชีวิตต่างๆ เจริญได้บนพื้นผิวที่ชื้นอยู่อาศัย และช่วยในการหมุนเวียนธาตุอาหาร (Alexander, 1994) เราได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางทั่วโลกว่ามีความสามารถในการกำจัดหรือเปลี่ยนสารมลพิษต่างๆในสิ่งแวดล้อมได้หลากหลายชนิด โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างแล้วปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เส้นใยของราสามารถแผ่ขยายได้กว้างและเข้าถึงสารมลพิษต่างๆ รวมทั้งมีความสามารถในการทนต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี และทนต่อความเข้มข้นของสารมลพิษได้ดี (Ashoka และคณะ, 2002) ทั้งนี้ มีรายงานการใช้ราเพื่อการบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อมโดยวิธีทางชีวภาพ โดยใช้ย่อยสลายสารพิษชนิดต่างๆ เช่น สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) สารเคมีกำจัดศัตรูพืช และสีย้อม เป็นต้น (Adenipekun และ Lawal, 2012)

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้ราเพื่อบำบัดสารมลพิษต่างๆทางชีวภาพ มีดังนี้

Rouillon และคณะ (1989) ศึกษาความสามารถของไมคอร์ไรซาในการย่อยสลาย chlorpropham ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืชชนิดหนึ่ง พบว่าราสามารถย่อยสลายชนิดนี้ได้ และได้ผลิตภัณท์ที่เกิดจากการย่อยสลายคือ 3-chloroaniline ซึ่งมีความเป็นพิษลดน้อยลงเมื่อพิจารณาจากค่า LD₅₀ ที่ได้

Ravelet และคณะ (2000) คัดแยกราจากดินตะกอนที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAH) พบราที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนถึง 41 สายพันธุ์ และมีถึง 10 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยไพรีนได้มากกว่า 2.4 มิลลิกรัม/กรัม โดยพบว่า *Mucor racemosus* สามารถย่อยสลายไพรีนได้ดีที่สุด

Matsubara และคณะ (2006) นำราในกลุ่มไวท์รอต (white rot fungi) และรากกลุ่มอื่น ได้แก่ *Coriolus versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus coccineus*, *Irpex lacteus*, *Bjerkandera adusta*, *Coprinus cinereus*, *Ganoderma lucidum* และ *Trichoderma harzianum* มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีแนนทรีนและไพรีน พบว่าราแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยพีแนนทรีนได้ดีกว่าไพรีน โดย *T. harzianum* มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการย่อยพีแนนทรีน นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณพีแนนทรีนมีผลต่อการเจริญของราด้วย

Murugesan และคณะ (2007) ศึกษาประสิทธิภาพของแลคเคสที่ผลิตจาก *G. lucidum* KMK2 ในการย่อยสลายสีย้อมสังเคราะห์ พบว่าแลคเคสจากราสามารถย่อยสลายสี Remazol Black-5 (RB-5) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 77.4 เปอร์เซ็นต์ภายใน 2 ชั่วโมง และยังสามารถย่อยสลายสี Remazol Brilliant Blue R (RBBR) ได้ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 90 เปอร์เซ็นต์ภายใน 2 ชั่วโมง

Čvančarová และคณะ (2012) ศึกษาความสามารถของราในกลุ่มไวท์รอตในการย่อยสลายสารพอลิคลอรีเนตไบฟีนิลหรือพีซีบี (polychlorinated biphenyl, PCB) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ พบว่าหลังจากเลี้ยงราในอาหารเหลว 6 สัปดาห์ ราทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายพีซีบี โดยเฉพาะ *P. ostreatus* สามารถย่อยสลายพีซีบีได้ถึง 99.6 เปอร์เซ็นต์ในการทดลองที่ใช้พีซีบีแบบผสม และ *P. ostreatus* ยังสามารถเปลี่ยนรูปของเพนตะคลอรีเนตไบฟีนิลและเฮกซะคลอรีเนตไบฟีนิลได้ เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารตัวกลางที่ถูกผลิตขึ้นระหว่างการย่อยสลายพีซีบีของรา พบว่าราทุกสายพันธุ์ทำให้สารตัวกลางที่ได้มีความเป็นพิษลดน้อยลง และพบว่าเอนไซม์ในกลุ่ม P450 โมโนออกซิจีเนส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และลิพินโนไลติกมีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีซีบีของราในกลุ่มนี้

2.10 เอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโนไลติก (ligninolytic enzyme)

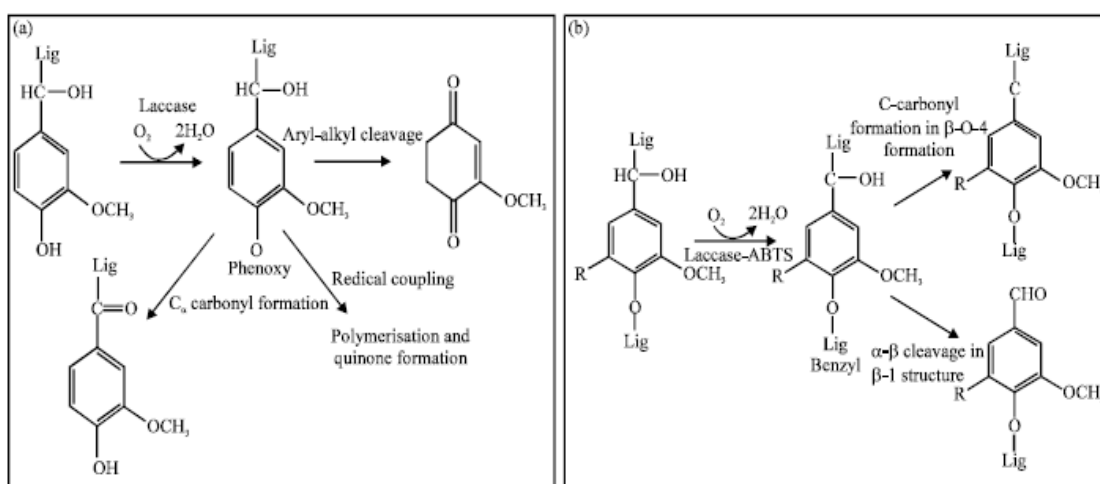
เอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโนไลติกเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายลิกนินซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเนื้อไม้ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเอนไซม์สำคัญ ได้แก่ แลคเคส (laccase), ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ จัดเป็นเอนไซม์ประเภทออกซิโดรีดักเทสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน (Gadd, 2001) เอนไซม์แต่ละชนิดมีกลไกในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน และนอกจากสามารถย่อยลิกนินแล้ว ยังมีรายงานว่าสามารถย่อยสลายหรือเปลี่ยนรูปสารประกอบเคมีอื่น ๆ ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) เช่นเดียวกับลิกนินได้ เช่น สีย้อมสังเคราะห์ พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และสารประกอบเคมีสังเคราะห์ชนิดอื่น ซึ่งปัจจุบันสารเหล่านี้เป็นปัญหาสำคัญของการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Wu และคณะ, 2005) และการย่อยลิกนินของกลุ่มเอนไซม์เหล่านี้มีความพิเศษคือ มีกลไกแบบไม่จำเพาะ (Hatakka, 2005; Wesenberg และคณะ, 2003) ทำให้เป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาสมบัติการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดและความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารมลพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม

มีรายงานที่แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการย่อยและเปลี่ยนสีของสีสังเคราะห์โดยราขึ้นเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโนไลติก ซึ่งได้แก่ แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส โดยมักเริ่มจากการทดสอบความสามารถในการฟอกสีย้อมชนิดต่างๆ เช่น azure B, phenol red, congo red, RBBR หรือ poly R-478 เป็นต้น รวมทั้งสารสังเคราะห์ต่างๆ เช่น ABTS, syringaldazine หรือ guaiacol (Ang และคณะ, 2011; De Jong และคณะ, 1992; Hao และคณะ, 2006) จากงานวิจัยของ de Koker และคณะ (2000) ได้คัดแยกและศึกษาความสามารถของราไวท์รอตที่แยกได้ในการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลิกนิน เช่น แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยใช้การเปลี่ยนสีของสารทดสอบ เช่น azure B และ phenol red ในการตรวจสอบหาความสามารถในการผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส รวมทั้งไซลาเนส และเปอร์ออกซิเดสอื่นๆ โดยพบว่าราหลายสายพันธุ์ที่แยกได้มีความสามารถในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกกระดาษ

แลคเคส (laccase)

แลคเคส หรือ benzenediol : oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตส (oxidoreductase) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาโดยให้อิเล็กตรอน และมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลของทองแดง (Cu^{+2}) เป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างโมเลกุล หรือที่เรียกว่า มัลติคอปเปอร์เอนไซม์ (Madhavi และ Lele, 2009) แลคเคสมีกิจกรรมการทำงานแตกต่างจากเปอร์ออกซิเดสอื่น โดยแลคเคสมีความสามารถในการใช้สับสเตรตได้หลากหลาย

(Hatakka, 2005) อาจจะทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารประกอบฟีนอลที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก (phenolic aromatic compound) ดังรูปที่ 2.6a หรือสารประกอบฟีนอลที่ไม่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก (non-phenolic aromatic compound) ซึ่งต้องการสารตัวกลาง (mediator compound) ที่ทำหน้าที่เป็นสับสเตรตร่วม ดังรูปที่ 2.6b สารตัวกลางที่เป็นที่รู้จักดี และมักใช้เป็นสับสเตรตในการตรวจสอบกิจกรรมของแลคเคส ได้แก่ ABTS (2,2'-azinobis-(3)-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) และ 1-hydroxybenzotriazole (HBT) (Bourbonnais และ Paice, 1990; Christopher และคณะ, 2014)



รูปที่ 2.6 กลไกการทำงานของแลคเคส (a) ไม่ใช้สารตัวกลาง (b) ใช้สารตัวกลาง

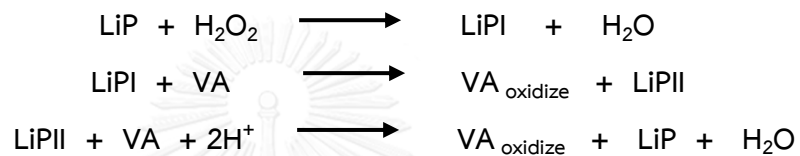
ที่มา : (Breen และ Singleton, 1999)

มีรายงานการคัดแยกราที่ผลิตแลคเคสได้จากราชั้นสูง เช่น ราในไฟลัม Basidiomycota และ Ascomycota (Assavanig และคณะ, 1992) ขณะที่แลคเคสของราไฟลัม Ascomycota ไม่ได้ได้รับความสนใจเท่ากับราในไฟลัม Basidiomycota ซึ่งใน Basidiomycota ส่วนมากจะพบว่าเป็นราในกลุ่มราไทรอเทปเป็นส่วนใหญ่ เช่น *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Trametes ochracea*, *Trametes hirsute*, *Pleurotus eryngii* และ *Lentinus tigrinus* (Morozova และคณะ, 2007)

ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase, LiP)

ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (EC 1.11.10.14) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตส (oxidoreductase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน โดยมีรายงานการแยกลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ครั้งแรกจากราไทรอเทป *Phanerochaete chrysosporium* (Aust, 1990) ลิกนินเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างเป็นเฟอร์ริกฮีม (ferric heme) สามารถรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจน

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และซูเปอร์ออกไซด์ (super oxide) ได้ ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีค่าออกซิเดชันโพเทนเชียล -1.35 V ซึ่งสูงกว่าแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่มีค่าเท่ากับ -0.8 V จึงเป็นตัวออกซิไดส์ที่แรง กระบวนการทำงานของ LiP เริ่มจากเอนไซม์ถูกออกซิไดส์โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เปลี่ยนเป็นสารที่ไม่คงตัว (LiPI) จึงต้องดึงอิเล็กตรอนจากสับสเตรตเพื่อเปลี่ยนรูปไปเป็น (LiPII) เพื่อให้อยู่ในภาวะที่เสถียร แล้วในที่สุดก็เปลี่ยนรูปกลับมาเป็นปกติ (Wesenberg และคณะ, 2003) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 และ 2.8 เนื่องจากลิกนินเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวออกซิไดส์ที่แรงจึงเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีควมจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดใดชนิดหนึ่ง จึงมีความสามารถในการย่อยสลายสารทั้งพวกสารประกอบฟีนอลที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก และโครงสร้างที่ไม่ได้เป็นวงแหวนอะโรมาติก (Evans และคณะ, 2001; Tien และ Kirk, 1988)



รูปที่ 2.7 สมการปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยลิกนินเปอร์ออกซิเดส

ที่มา : (Schoemaker และ Piontek, 1996)

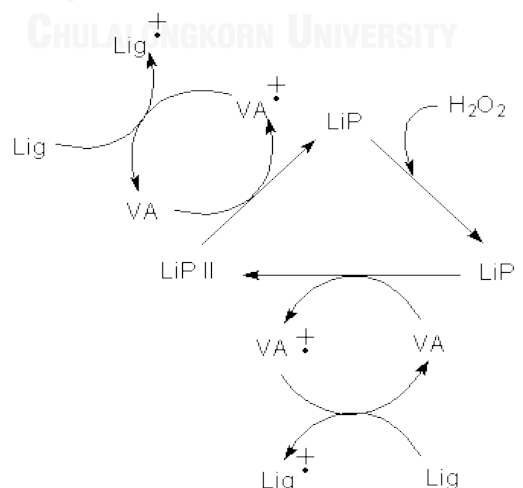
หมายเหตุ

LiPI = Lignin peroxidase compound I

LiPII = Lignin peroxidase compound II

VA = เวนาทรอลแอลกอฮอล์

Lig = ลิกนิน

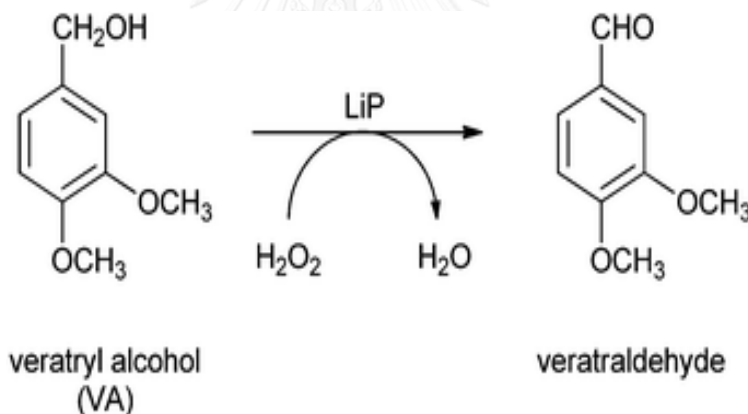


รูปที่ 2.8 กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยลิกนินเปอร์ออกซิเดส

ที่มา : (Aust, 1990)

ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอินทรีย์หลายชนิดโดยอาศัยสารตัวกลาง (mediator compound) เช่น เวกาทรอลแอลกอฮอล์ (veratryl alcohol) ดังรูปที่ 2.8 โดยเริ่มจากเมื่อลิกนินเปอร์ออกซิเดสถูกออกซิไดส์โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และเมื่อเวกาทรอลแอลกอฮอล์รับอิเล็กตรอนจากลิกนินเปอร์ออกซิเดสแล้วจะอยู่ในภาวะออกซิไดส์ เป็นออกซิแดนซ์ที่มีความสามารถสูง สามารถออกซิไดส์สารตั้งต้นอื่นๆ ทำให้สารเปลี่ยนโครงสร้างหรือนำไปสู่การย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralization) ได้

แอกทิวิตีของลิกนินเปอร์ออกซิเดสสามารถตรวจสอบได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการออกซิไดส์เวกาทรอลแอลกอฮอล์ได้เป็นเวกาทรอลดีไฮด์ (veratraldehyde) ในภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังที่แสดงในรูปที่ 2.9 (Tien และ Kirk, 1988) ตัวอย่างราที่พบความสามารถในการผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดส เช่น *B. adusta*, *P. chrysosporium*, *Phlebia ochraceofulva*, *Phlebia radiata*, *P. eryngii*, *T. versicolor* และ *Trametes trogii* (Hatakka, 2005; Wesenberg และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.9 ปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยลิกนินเปอร์ออกซิเดสโดยมีเวกาทรอลแอลกอฮอล์เป็นสารตั้งต้น

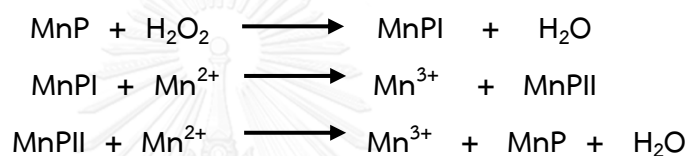
ที่มา : (Franssen และคณะ, 2013)

แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase, MnP)

แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.13) มีโครงสร้างประกอบด้วยเฟอร์ริกฮีมเช่นเดียวกับลิกนินเปอร์ออกซิเดส มีกลไกการเร่งปฏิกิริยาเหมือนกับลิกนินเปอร์ออกซิเดส แต่แตกต่างกันที่แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีไอออนของแมงกานีสช่วยรับส่งอิเล็กตรอนหรือเป็นเมดิเอเตอร์ และยังต้องการ H_2O_2 เพื่อช่วยทำปฏิกิริยาด้วย

สมการในรูปที่ 2.10 แสดงกลไกการทำปฏิกิริยาที่เริ่มจาก MnP ถูกออกซิไดส์โดย H_2O_2 ทำให้เกิด iron peroxide complex ที่อยู่ในภาวะที่ไม่เสถียร หรือเรียกว่า MnP compound I ต่อมา

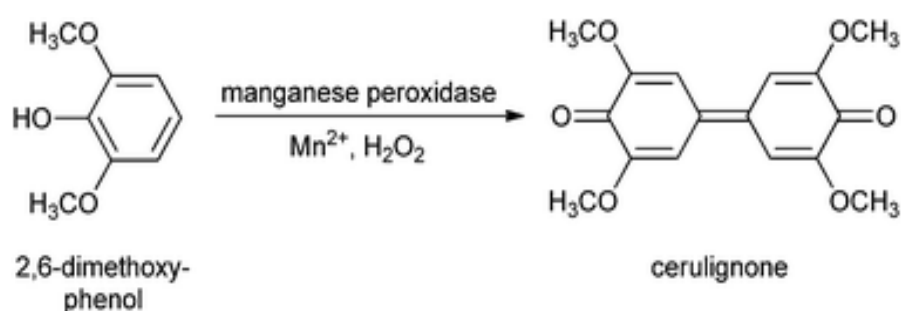
MnP compound I ให้อิเล็กตรอนแก่แมงกานีสอิสระ (Mn^{2+}) หลังจากให้อิเล็กตรอนแล้ว MnP compound I จะเปลี่ยนรูปไปเป็น MnP compound II เมื่อ Mn^{2+} ให้อิเล็กตรอนจะเปลี่ยนรูปเป็น Mn^{3+} ซึ่งอยู่ในรูปออกไซด์ ซึ่ง Mn^{3+} สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับ chelator ที่เป็นกรดอินทรีย์ เช่น ออกซาเลต แล็กเตต และมาโลเนต เกิดเป็น chelator-MnP(III) ทำให้มีความสามารถไปออกซิไดส์สารอินทรีย์ที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ เช่น ลิกนิน และ PAH เป็นต้น (Hofrichter, 2002) มีรายงานการคัดแยกราที่สามารถผลิตแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้จากราในไฟลัม Basidiomycota ซึ่งส่วนมากจะพบความสามารถในการผลิตในกลุ่มราไวท์รอตเป็นส่วนใหญ่ เช่น *Abortiporus biennis*, *Agaricus bisporus*, *B. adusta*, *P. chrysosporium*, *G. lucidum*, *Irpex lacteus*, *Phlebia radiata*, *P. ostreatus*, *Trametes hirsute*, *T. versicolor* และ *Lentinus tigrinus* (Hofrichter, 2002; Wesenberg และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.10 สมการปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

ที่มา : ดัดแปลงจาก (Peng และคณะ, 2008)

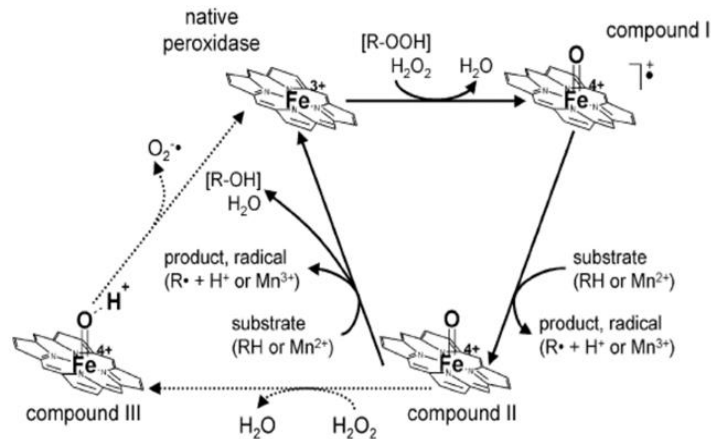
การตรวจสอบแอกทิวิตีของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสามารถปฏิบัติได้โดยใช้ 2,6-dimethoxy phenol เป็นสับสเตรต จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ในภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และมาโลเนตบัฟเฟอร์ ซึ่งจะให้อิเล็กตรอนแก่แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส คือ สารประกอบประเภทควิโนนไดเมออร์ เช่น เซรูลิกโนน (cerulignone) ซึ่งเป็นสารที่มีสี ดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 ปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยลิกนินเปอร์ออกซิเดส

ที่มา : (Franssen และคณะ, 2013)

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่ากลไกการย่อยสลายลิกนินมีความคล้ายคลึงกันทั้งโดยลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แต่แตกต่างกันที่มีเมดิเอเตอร์หรือสารที่ช่วยในการรับส่งอิเล็กตรอนที่ต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 กลไกการทำงานของลิกนินเปอร์ออกซิเดสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
ที่มา : (Wesenberg และคณะ, 2003)

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดข้างต้น โดยสรุปแล้วมีความแตกต่างกันในด้านโคแฟกเตอร์ เมดิเอเตอร์ และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ดังสรุปไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สรุปการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลิติก (Hatakka, 2005)

เอนไซม์	โคแฟกเตอร์	เมดิเอเตอร์	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น
ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP)	ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	เวราทริล แอลกอฮอล์	วงแหวนอะโรมาติกถูกออกซิไดส์ไปเป็นอนุมูลแคตไอออน
แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP)	ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	แมงกานีส	Mn ²⁺ ถูกออกซิไดส์ไปเป็น Mn ³⁺ Mn ²⁺ ออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลิกไปเป็นอนุมูลฟีนอลิก
แลคเคส (Lac)	ออกซิเจน	ไฮดรอกซิลเบนโซไทรอะโซน หรือ ABTS	ฟีนอลถูกออกซิไดส์ไปเป็นอนุมูลฟีนอกซิลและออกซิไดส์สารที่ไม่มีหมู่ฟีนอล ปฏิกิริยามีเมดิเอเตอร์บางชนิดร่วมด้วย

ดังนั้นจึงมักมีการใช้ความสามารถของราในการผลิตเอนไซม์ที่กล่าวมาในข้างต้นนี้เพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกและคัดกรองหาที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มนี้ในเบื้องต้น เพื่อนำราดังกล่าวไปใช้ในการย่อยสลายสารมลพิษต่างๆในสิ่งแวดล้อม เช่น สีย้อมสังเคราะห์, สารเคมีกำจัดศัตรูพืช, พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ต่อไป

สารมลพิษกลุ่มหนึ่งที่เป็นปัญหาในปัจจุบัน เช่น สารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ เมื่อมีการใช้สารเหล่านี้ในพื้นที่ทำการเกษตร จึงเป็นการง่ายที่จะเกิดการปนเปื้อนในดิน และแหล่งน้ำ และเนื่องจากดินเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง จึงมักพบว่าจุลินทรีย์ในดิน เช่น รา มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายสารเคมีทางการเกษตรหลายชนิด (Carr และคณะ, 1985) ดังเช่นงานวิจัยของ Briceno และคณะ (Briceño และคณะ, 2007) พบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดในดินมีความสามารถในการย่อยสลายหรือกำจัดสารกำจัดวัชพืชได้หลายชนิด และการเติมวัสดุปรับปรุงดินปุ๋ยหรือธาตุอาหารต่างๆ ก็มีผลต่อการดูดซับ การเคลื่อนที่ และการย่อยสลายของสารกำจัดศัตรูพืชในดินเช่นกัน

Ricketts (1999) ศึกษาการย่อยสลายพาราควอตโดยจุลินทรีย์ในดิน พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 3 สัปดาห์ พาราควอตปริมาณร้อยละ 50 ถูกย่อยสลายโดยสมบูรณ์และเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น และพบว่าสารที่พบจากการทดลอง มากกว่าร้อยละ 85 คือ กรดออกซาลิก และไม่พบพาราควอตหลงเหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

นอกจากนี้ มีรายงานการใช้ราเพื่อย่อยสลายสารเคมีกำจัดวัชพืชชนิดต่างๆ ดังนี้

Castro และคณะ (2007) ศึกษาความสามารถของ *Fusarium oxysporum* ในการย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตบนอาหารแข็ง พบว่าราสามารถใช้ไกลโฟเสตเป็นแหล่งฟอสฟอรัสได้ ส่วนการเจริญในอาหารเหลว 2 ภาวะ คือการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า และการเพาะเลี้ยงในถังหมัก พบว่าในชุดที่มีการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า *F. oxysporum* สามารถลดปริมาณไกลโฟเสตได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 20 วัน ส่วนในถังหมักพบว่าราสามารถลดปริมาณไกลโฟเสตได้ 41 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาเพียง 5 วัน

da Silva Coelho และคณะ (2010) ศึกษาผลของสารเคมีกำจัดวัชพืช bentazon และ diuron ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติกของ *G. lucidum* พบว่ารามีความทนทานต่อสารทั้งสองชนิด แต่มีระดับความทนทานที่แตกต่างกัน กล่าวคือ สามารถทนต่อ bentazon ได้ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และทนต่อ diuron ได้ที่ความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญที่เพิ่มขึ้นของรามีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของแลคเคส และเมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นก็พบว่ารามีความสามารถในการย่อยสลายสารเคมีทั้งสองชนิดได้

Peng และคณะ (2012) ได้คัดแยกราจากดินที่มีประวัติการปนเปื้อนของสาร bensulphuron-methyl พบว่าราที่คัดแยกได้ คือ *Penicillium pinophilum* ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายสารชนิดนี้ได้สูงถึง 87 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเวลาผ่านไป 60 ชั่วโมง

Purnomo และคณะ (2014) ศึกษาความสามารถของราไวท์รอกในการเปลี่ยนรูปสารเคมีกำจัดวัชพืช heptachlor epoxide และ heptachlor ในดิน พบว่าหลังการทดลอง 28 วัน *P. otreatus* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเปลี่ยนรูปสารทั้งสองชนิดให้มีความเป็นพิษน้อยลงได้ถึง 32 เปอร์เซ็นต์ และ 89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Rodrigues และคณะ (2016) ศึกษาความสามารถของราที่แยกได้จากเหรียญหัวหอมในทะเล พบว่า *Penicillium citrinum* (DL4M3), *P. citrinum* (DL9M3) และ *Fusarium proliferatum* (DL11A) สามารถเจริญบนอาหารที่มีเมทิลพาราไรธอน (methyl parathion) ซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตเป็นส่วนผสมที่มีความเข้มข้น 120, 240 และ 360 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ และเมื่อนำราทั้ง 3 สายพันธุ์ไปเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่าทั้งหมดสามารถย่อยสลายเมทิลพาราไรธอนได้ภายในเวลา 20 วัน โดย *F. proliferatum* (DL11A) สามารถเปลี่ยนรูป p-nitrophenol ซึ่งเป็นสารตัวกลางหลักที่เกิดจากการย่อยสลายเมทิลพาราไรธอนได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 30 วัน

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้ราเพื่อย่อยสลายสารเคมีกำจัดวัชพืชพาราควอต เช่น Smith และคณะ (1976) ศึกษาการสลายตัวของสารเคมีกำจัดวัชพืชพาราควอตและไดควอตโดยรา 4 ชนิดในดิน พบว่าราแต่ละชนิดมีความไวต่อสารพิษแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงราทั้ง 4 ชนิดในอาหารที่มีพาราควอตและไดควอตที่ติดฉลากคาร์บอน ^{14}C ผสมอยู่ หลังจากเวลาผ่านไป 1 วัน พบว่า *A. niger* และ *P. frequentans* มีการปลดปล่อย $^{14}\text{CO}_2$ ออกมาจากอาหารที่มีพาราควอตผสมอยู่ และสรุปว่าราทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถย่อยสลายพาราควอตได้อย่างสมบูรณ์

Ratanagreetakul และคณะ (1991) คัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืช โดยแยกจากดินบริเวณไร่อ้อย พบว่า *A. niger* และ *Penicillium* ssp. 4 ไอโซเลตมีความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตได้ โดยเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน พบว่าพาราควอตลดลง 20.64, 17.67, 24.63, 21.14, และ 14.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Zhao และคณะ (2009b) ศึกษาผลของพาราควอตต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ใน *C. versicolor* โดยพบว่าการเติมพาราควอตปริมาณ 30 ไมโครโมลต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถกระตุ้นให้แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส มีกิจกรรมเพิ่มขึ้น 7, 2.5 และ 1.3 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าพาราควอตมีผลต่อกิจกรรมของซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) และคะตะเลส (CAT) ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำงานในกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระของเซลล์

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. กระจกทรงขนาดความกว้างรู 11 ไมโครเมตร ของบริษัท Whatmann, USA
2. กระจกทรงชนิด PTFE ขนาดความกว้างรู 0.2 ไมโครเมตร ของบริษัท Sartorius Stedim, USA
3. กระจกทรงชนิด CA ขนาดความกว้างรู 0.2 ไมโครเมตร ของบริษัท Sartorius Stedim, USA
4. กระจกบอกรีตยาพลาสติก ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
5. กล่องพลาสติกใส่ super lock ขนาด 13.5 x 19 x 6 เซนติเมตร ความจุ 850 มิลลิลิตร ของบริษัท J.C.P. Plastic Ltd, Thailand
6. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) รุ่น UNILUX-12 ของบริษัท Kyowa Tokyo, Japan
7. คอร์กบอเรีย (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
8. เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex, USA
9. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA
10. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermos-block) รุ่น MylabTH Thermo-block SLTDB-120 ของบริษัท Seoulin Bioscience, Korea
11. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA
12. เครื่องนาโนดรอป 2000 (Nanodrop 2000 spectrophotometer) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
13. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
14. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer instruments, USA
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Backman, Germany
16. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries instruments, USA
17. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น PHM-83 ของบริษัท Radiometer, Denmark

18. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (microplate spectrophotometer) รุ่น Multiskan™ GO ของบริษัท Thermo Scientific, USA
19. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N – 100 ของบริษัท Eyela, Japan
20. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบสุญญากาศ (speed vacuum) รุ่น Centrivap Eppendorf Concentration 5301 ของบริษัท Eppendorf, Germany
21. จานเพาะเชื้อพลาสติก (petri dish) ขนาด 90x15 มิลลิเมตร ของบริษัท Hycon plastic, USA
22. ชุดเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography, HPLC) รุ่น SpectraSystem ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
23. ชุดอุปกรณ์ทำ agarose gel electrophoresis และเครื่องจ่ายไฟ ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan
24. ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล (gel documentation) และโปรแกรม Quantity one 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
25. ตู้เขี่ยเชื้อ laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, Thailand และรุ่น J2-21 ของบริษัท ISSCO, USA
26. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan
27. ตู้ดูดอากาศ รุ่น Airone 1200-GS ของบริษัท Safelab Systems, UK
28. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
29. ตู้อบแห้ง (hot air oven) รุ่น UE600 ของบริษัท Memmert, Germany
30. ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) รุ่น Pipetteman ของบริษัท Gilson, France
31. หัวกรอง (syringe filter) ชนิด nylon สำหรับหลอดฉีดยาขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore, USA

3.2 เคมีภัณฑ์

1. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
2. 2,6-ไดเมทอกซีฟีโนล (2,6-dimethoxy phenol หรือ 2,6-DMP) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
3. Azure B ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
4. กรั่มม็อกโซน (paraquat dichloride 27.6%) (W/V)
5. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Merck, Germany
6. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
7. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Sigma, USA
8. กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท Carlo ERBA, France
9. กรดไนโตรโลไนโตรอะซิดิก ($C_6H_9NO_6$) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
10. กรดอะซิดิกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท Merck, Germany
11. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
12. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
13. โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
14. ชุดสำเร็จรูป GeneJET PCR Purification Kit ของบริษัท Thermo Scientific, USA
15. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
16. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
17. โซเดียมทาร์เทรต ($Na_2C_4H_4O_6$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
18. โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
19. โซเดียมแอซิเตท (sodium acetate) ของบริษัท Sigma, USA
20. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
21. ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
22. ผงสกัดจากมอลท์ (malt extract) ของบริษัท Merck, Germany
23. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
24. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
25. เพป्टอน (peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
26. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand

27. ฟีนอลเรด (phenol red) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
28. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
29. เมธานอล (methanol-HPLC grade) ของบริษัท Merck, Germany
30. เมล็ดข้าวฟ่าง ของบริษัท ดาริชกรีน จำกัด
31. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
32. แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
33. เวอราทิลแอลกอฮอล์ (veratryl alcohol) ของบริษัท Sigma Aldrich, USA
34. สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ของบริษัท Sigma, USA
35. อะลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟตไดไฮเดรต ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
36. อาหารสำเร็จรูป PDB (potato dextrose broth) ของบริษัท HiMedia, India
37. เอทานอล (ethanol) ของบริษัท Katayama Chem, Japan
38. เอทีเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ของบริษัท Sigma Aldrich, USA
39. แอซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) ของบริษัท Merck, Germany
40. แอมโมเนียมทาร์เทรต ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
41. ไอร์ออน(II)ซัลเฟต $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ของบริษัท Sigma Aldrich, USA
42. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของบริษัท Merck, Germany

3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'----->3'	Tm (องศาเซลเซียส)	เอกสารอ้างอิง
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	56	Gardes และ Bruns (1993)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	56	White และคณะ (1990)

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง คือ ตัวอย่างเห็ด (sporocarps) ท่อนไม้หรือเศษไม้ผุ และดิน โดยตัวอย่างเห็ดจะเลือกเก็บเห็ดที่ขึ้นบริเวณไม้ หรือเมื่อเจริญบนไม้แล้ว ทำให้ไม้มีลักษณะสีขาวซึ่งอาจเป็นกลุ่มราไวท์รอตที่มีความสามารถในการย่อยลิกนิน เลือกเก็บดอกเห็ดที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีการฉีกขาดเพราะหากตัวอย่างเห็ดฉีกขาดอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายนอกได้ สำหรับท่อนไม้ เลือกท่อนไม้ที่ผุหรือมีเนื้อไม้เป็นสีขาว และตัวอย่างดิน ได้เก็บตัวอย่างดินบริเวณสวนผักและสวนผลไม้ที่มีประวัติการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช จากจังหวัดต่างๆ ได้แก่ นนทบุรี นครสวรรค์ และสมุทรปราการ

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

การแยกเส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ด

เก็บตัวอย่างเห็ดที่เจริญอยู่ตามส่วนต่างๆของต้นไม้ นำมาแยกให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์โดยการฉีกดอกเห็ดให้แยกออก โดยใช้ forcep ที่ปราศจากเชื้อคืบเนื้อเยื่อเห็ดที่อยู่ด้านในและไม่สัมผัสกับอากาศ ขนาด 2-3 มิลลิเมตร วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt Extract Agar (MEA) (ภาคผนวก ก1) ที่ผสมยาปฏิชีวนะสเตรปโทมัยซิน (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน หรือจนเส้นใยราเจริญออกจากเนื้อเยื่อดอกเห็ด แล้วถ่ายเชื้อต่อช่วง (subculture) เพื่อให้ได้เส้นใยที่บริสุทธิ์

การแยกราจากท่อนไม้

นำกิ่งไม้หรือท่อนไม้มาบ่มในกล่องพลาสติกที่มีการควบคุมความชื้น (moisture chamber) ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-7 วัน เมื่อเส้นใยราเจริญบนกิ่งไม้หรือท่อนไม้ จึงแยกราโดยใช้ forcep ที่ปราศจากเชื้อคืบเศษไม้ขนาด 2-3 มิลลิเมตร วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA ที่ผสมยาปฏิชีวนะสเตรปโทมัยซิน (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) บ่มเพลทที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตการเจริญของเส้นใยที่งอกออกจากเศษไม้ แล้วถ่ายเชื้อต่อช่วงเพื่อให้ได้เส้นใยที่บริสุทธิ์

การแยกราจากดิน

แยกราจากตัวอย่างดินโดยใช้เทคนิคการเจือจางและเทคนิค enrichment

- แยกราจากดินด้วยเทคนิคการเจือจาง

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ผสมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วเจือจาง 10^{-1} - 10^{-5} เท่า ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ในแต่ละความเจือจาง แล้วเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar) (ภาคผนวก ก2) ที่มียาปฏิชีวนะสเตรปโทมัยซิน (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และคลอแรมเฟนิคอล (25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ผสมอยู่ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน หรือจนกระทั่งพบการเจริญของรา แล้วถ่ายเชื้อต่อช่วงเพื่อให้ได้เส้นใยราที่บริสุทธิ์

- แยกราจากดินด้วยเทคนิค enrichment

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงในสารละลายพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แช่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเจือจาง 10^{-2} - 10^{-4} เท่า แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ในแต่ละความเจือจาง เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่มียาปฏิชีวนะสเตรปโทมัยซินและคลอแรมเฟนิคอลผสมอยู่ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน หรือจนกระทั่งพบการเจริญของรา แล้วถ่ายเชื้อต่อช่วงเพื่อให้ได้เส้นใยราที่บริสุทธิ์

3.4.2. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลติก

การคัดกรองในเบื้องต้นเพื่อหาว่ามีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลติก โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนสีของสารที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนินเมื่อผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำตัวอย่างรากทุกไอโซเลตที่แยกได้ในขั้นตอนที่ผ่านมา มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 5-7 วัน ใช้คอร์กบอเรีย (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ปราศจากเชื้อ เจาะลงบนเส้นใยบริเวณขอบรอบนอกของโคโลนีจำนวนหนึ่งชิ้น และนำไปวางตรงจุดกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ Basal Medium (Kirk และคณะ, 1978) (ภาคผนวก ก3) ซึ่งมีส่วนผสมของ 0.1% (w/v) ABTS, 0.0025% (w/v) Azure B หรือ 0.0025% (w/v) phenol red เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการตรวจสอบการผลิตแลคเคส, ลิกนินเปอร์ออกซิเดส, หรือแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ตามลำดับ (Alfarra และคณะ, 2013; Archibald, 1992; Kuwahara และคณะ, 1984) บ่มจานเพาะเชื้อในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ถ้ามีการสร้างแลคเคสจะมีโซนเขียวเกิดขึ้น และถ้ามีการสร้างลิกนินเปอร์ออกซิเดสจะมีโซนส้มแดงเกิดขึ้นรอบโคโลนีของรา ส่วนแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส จะมีโซนใสเกิดขึ้นรอบโคโลนีของรา

3.4.3 การทดสอบความสามารถของราในการเจริญบนอาหารที่มีพาราควอต

นำตัวอย่างราทุกไอโซเลตที่แยกได้จากข้อ 3.4.1 มาทดสอบความสามารถในการเจริญได้บนอาหารที่มีพาราควอต (ยกเว้นราในกลุ่มที่แยกจากดินที่ผ่านการแช่พาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์) โดยนำรามาลีบบนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 5-7 วัน ใช้คอร์กบอเรียร์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะลงบนเส้นใยบริเวณขอบรอบนอกของโคโลนีจำนวนหนึ่งชิ้น และนำไปวางตรงจุดกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ Basal Medium ซึ่งผสมพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยมีชุดควบคุมคือ Basal Medium ที่ไม่ผสมพาราควอต ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน สังเกตการเจริญของรา คัดเลือกรามีการเจริญบนอาหารที่ผสมพาราควอตได้ดีเพื่อนำไปทดลองในขั้นต่อไป

นำตัวอย่างราทุกไอโซเลตที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ผสมอยู่ มาทดสอบการเจริญบน Basal Medium ที่พาราควอตผสมอยู่ในปริมาณที่สูงขึ้น คือ 0.4, 0.5 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยมีชุดควบคุมคือ Basal Medium ที่ไม่ผสมพาราควอต ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน สังเกตการเจริญของราโดยพิจารณาความกว้างของโคโลนี คัดเลือกรามีการเจริญบนอาหารที่ผสมพาราควอตได้ดีที่สุดโดยพิจารณาจากความกว้างของโคโลนีและ/หรือปริมาณเส้นใยที่สร้างขึ้นเพื่อนำไปทดลองในขั้นต่อไป

3.4.4 การทดสอบความสามารถของราในการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลว

คัดเลือกรามีการเจริญบนอาหารที่ผสมพาราควอตในการที่ทดลองที่ 3.4.3 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 5-7 วัน ใช้คอร์กบอเรียร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะลงบนเส้นใยบริเวณขอบรอบนอกของโคโลนีจำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงไปในอาหาร LME Basal Medium (ภาคผนวก ก4) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมพาราควอตลงไปให้มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.01, 0.015, 0.02, 0.025 และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ (ขึ้นกับชนิดของรา) เป็นชุดทดสอบ ส่วนชุดควบคุมชุดที่หนึ่งไม่ใส่ราและชุดที่สองไม่ใส่พาราควอต แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 10, 20 และ 30 วัน เพื่อตรวจสอบปริมาณของพาราควอตต่อเวลาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พร้อมทั้งตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินไลติก และตรวจสอบการเจริญของรา

3.4.4.1 การตรวจสอบปริมาณพาราควอตที่เหลืออยู่

นำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการกรองราออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 มาใส่ในหลอดไมโครพิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณพารา

ควอดเปรียบเทียบกับพาราควอดมาตรฐานด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ Wibawa (2013) โดยการฉีดสารตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร ไปยังคอลัมน์ C18 reverse phase (5 ไมโครเมตร, 250 × 4.6 มิลลิเมตร) ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิตรต่อนาที โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นโซเดียมคลอไรด์ในน้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง และ 95% อะซิโตนไนไตรล์ ในอัตราส่วน (60 : 40) (ภาคผนวก ข7) และวิเคราะห์ผลที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณปริมาณพาราควอดที่เหลือดังสมการต่อไปนี้

ปริมาณพาราควอดที่เหลือ (%)

$$= (\text{ความเข้มข้นพาราควอดวันที่เก็บตัวอย่าง} / \text{ความเข้มข้นพาราควอดเริ่มต้น (วันที่ 0)}) \times 100 \%$$

3.4.4.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินไลติก

1) กิจกรรมของแลคเคส โดยใช้ ABTS เป็นสารตั้งต้นตามวิธีของ Murugesan และคณะ (2007) ซึ่งในปฏิกิริยา 1 มิลลิตร ประกอบด้วย

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0	880 ไมโครลิตร
1 มิลลิโมลาร์ ABTS	100 ไมโครลิตร
น้ำเลี้ยงเชื้อ	20 ไมโครลิตร

ตรวจวัดค่าด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร หลังการเติม ABTS 1 นาที ซึ่งจะปรากฏสีเขียวแกมน้ำเงินเกิดขึ้น และคำนวณแอกทิวิตีของเอนไซม์ดังนี้

1 หน่วยของแอกทิวิตีของเอนไซม์คำนวณจากการออกซิไดส์ 1 ไมโครโมลของ ABTS ใน 1 นาที ($\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ภายใต้ภาวะมาตรฐาน

2) กิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดส วิเคราะห์ตามวิธีของ Tien และ Kirk (1988) ซึ่งในปฏิกิริยา 1 มิลลิตร ประกอบด้วย

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมทาร์เทรตบัฟเฟอร์ pH 3	700 ไมโครลิตร
2 มิลลิโมลาร์ เวอราทริลแอลกอฮอล์	100 ไมโครลิตร
1 มิลลิโมลาร์ ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	100 ไมโครลิตร
น้ำเลี้ยงเชื้อ	100 ไมโครลิตร

โดยปฏิกิริยาเริ่มจากการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ตรวจวัดเวอราทริลไฮดรอกไซด์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร และคำนวณแอกทิวิตีของเอนไซม์ดังนี้

1 หน่วยของแอกทิวิตีของเอนไซม์คำนวณจากการออกซิไดส์ 1 ไมโครโมลของเวอราทริลไฮดรอกไซด์ ใน 1 นาที ($\epsilon_{310} = 9,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ภายใต้ภาวะมาตรฐาน

3) กิจกรรมของแมงกานีสเปอร์ออกไซด์ส ตรวจสอบวัดได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 2,6 dimethoxy phenol (2,6-DMP) ตามวิธีของ Heinfling และคณะ (1998) ซึ่งในปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมทาร์เทรตบัพเฟอร์ pH 4.5	100 ไมโครลิตร
1 มิลลิโมลาร์ แมงกานีสซัลเฟต	200 ไมโครลิตร
1 มิลลิโมลาร์ 2,6 DMP	100 ไมโครลิตร
0.1 มิลลิโมลาร์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	100 ไมโครลิตร
น้ำเลี้ยงเชื้อ	200 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	300 ไมโครลิตร

ตรวจวัด Mn^{3+} ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 469 นาโนเมตร และคำนวณแอกทิวิตีของเอนไซม์ดังนี้

1 หน่วยของแอกทิวิตีของเอนไซม์คำนวณจากการออกซิไดส์ 1 ไมโครโมล ของ 2,6-DMP ใน 1 นาที ($\epsilon_{469} = 27,500 M^{-1} cm^{-1}$) ภายใต้ภาวะมาตรฐาน

4) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) เริ่มจากเติม Bradford's reagent ปริมาตร 800 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข8) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของราตัวอย่างในข้อ 3.4.4 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยคำนวณโดยใช้กราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมินตั้งแต่ 0.1-1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค1)

3.4.4.3 การตรวจสอบการเจริญของราสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลว

วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของรา โดยนำเซลล์ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.4.4 มากรองแยกน้ำเลี้ยงเชื้อและเซลล์ออกจากกัน โดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ทราบน้ำหนักคงที่ แล้วอบเซลล์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองที่มีเซลล์อยู่ห้กลับกับน้ำหนักกระดาษกรองเปล่า เพื่อคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.4.5 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตในดิน

การเตรียมหัวเชื้อ

ใช้เมล็ดข้าวฟ่างเป็นวัสดุสำหรับใช้ทำหัวเชื้อ โดยใส่เมล็ดข้าวฟ่าง 20 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที แล้วใส่ชิ้นส่วนของราที่เลือกไว้ที่ตัดมาด้วยคอร์กบอเรียร์ใส่ลงไป 10 ชิ้น บ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หรือจนกว่าราจะเจริญคลุมเมล็ดข้าวฟ่าง

เก็บตัวอย่างดินที่ไม่เคยมีประวัติการปนเปื้อนสารเคมีกำจัดวัชพืชที่มีความลึกประมาณ 15 เซนติเมตร เพื่อป้องกันการปนเปื้อนสารเคมี แยกเศษหินและใบไม้ออก แล้วนำตัวอย่างดินไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของดิน เช่น ชนิด องค์ประกอบ ความเป็นกรดเบส ความชื้น ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ค่าความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออน อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน และอินทรีย์วัตถุในดิน เป็นต้น โดยใช้บริการการวิเคราะห์ที่โครงการพัฒนามหาวิชาการดิน ปุ๋ย และสิ่งแวดล้อม ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แล้วเก็บรักษาดินไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ทำการทดลอง

นำดินมากรองด้วยตะแกรงที่ความกว้าง 2 มิลลิเมตร แล้วบรรจุตัวอย่างดินปริมาณ 5 กรัมลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดที่ 1 ดินปลอดเชื้อ ไม่ใส่รา

ชุดที่ 2 ดินปลอดเชื้อ ใส่รา

ชุดที่ 3 ดินไม่ปลอดเชื้อ ไม่ใส่รา

ชุดที่ 4 ดินไม่ปลอดเชื้อ ใส่รา

สำหรับชุดที่ปลอดเชื้อ หลังจากกรองดินแล้ว นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ต่อเนื่องกันเป็นเวลาสามวัน นำดินตัวอย่างทั้ง 4 ชุด มาเติมพาราควอตให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 250 ppm โดยปรับความชื้นด้วยสารละลายของ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดจากยีสต์และ 1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส ให้ได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ในทุกชุด การทดลอง (Das และ Dey, 2012) แล้วนำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีราเจริญอยู่มาใส่ประมาณ 20 เมล็ดโดยวางลงบนผิวดิน บ่มทุกชุดทดลองไว้ในที่มืด ปรับความชื้นให้คงที่ด้วยด้วยสารละลายของ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดจากยีสต์และ 1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส ทุกๆ 3 วัน เก็บตัวอย่างทั้งหมดทุกๆ 10 วัน เป็นเวลา 30 วัน แล้วนำไปสกัดพาราควอตออกมาจากดินด้วยวิธีของ Wong และคณะ (2013) ดังนี้ เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Na_2SO_4) ประมาณ 1 กรัม ผสมลงไปดินตัวอย่าง 5 กรัมในแต่ละหลอดทดลอง จากนั้นเติมเมทานอล 100 มิลลิลิตร ลงไปในดินตัวอย่างแต่ละชุด เพื่อละลาย

พาราควอตออกมาจากดิน นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm เป็นเวลา 45 นาที เพื่อแยกดินออกจากเมธานอลที่มีพาราควอตละลายอยู่ นำส่วนเมธานอลออกมาใส่หลอดทดลองใหม่ เติมนเมธานอลแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำส่วนน้ำใสทั้งหมดจากการทำซ้ำทั้ง 3 ครั้งไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำส่วนใสที่ได้จากการกรองไประเหยเมธานอลออกจากพาราควอตหรือจากผลิตภัณฑ์ที่เหลือที่ต้องการวิเคราะห์ เติมนเมธานอลปริมาตร 1 มิลลิเมตร แล้วนำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้เมธานอลระเหยออกจนหมดด้วยเครื่อง speed vacuum เพื่อเตรียมนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

3.4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา

พิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่แสดงประสิทธิภาพในการทนต่อพาราควอตบนอาหารแข็งได้ โดยข้อมูลระดับชีวโมเลกุล โดยเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1 และ ITS4 ตามขั้นตอนดังนี้

3.4.6.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอแม่แบบ

เลี้ยงรบนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำตัวอย่างสายใยราที่ผิวหน้าอาหารประมาณ 1 มิลลิกรัม มาใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนดรอป 2000 (Thermo Scientific, USA)

3.4.6.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

นำส่วนน้ำใสไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนบริเวณ ITS โดยใช้ ITS1-F (Gardes และ Bruns, 1993) และ ITS4 (White และคณะ, 1990) เป็นไพรเมอร์ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะผสมส่วนผสมต่างๆ ให้มีปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร ซึ่งในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย

GoTaq Green PCR Master Mix (2X)	25 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ ITS1-F, 10 μ M	2 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ ITS4, 10 μ M	2 ไมโครลิตร
DNA แม่แบบ	1-5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อปรับปริมาตรให้ได้	50 ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Perkin Elmer instruments, USA) โดยตั้งโปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ดังนี้

Pre-denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	3 นาที	} 35 รอบ
Denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	10 นาที	
Store	ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส			

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ใน 1% อะกาโรสเจล โดยย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเจลไปแช่น้ำกลั่นเพื่อล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออก 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง gel documentation และโปรแกรม Quantity one เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad Laboratories

3.4.6.3 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยชุดสำเร็จรูป GeneJET PCR Purification Kit ของบริษัท Thermo Scientific แล้วส่งตัวอย่างไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st Base จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปสืบค้นเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่คัดเลือก

3.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้โปรแกรม SPSS เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA) และใช้โปรแกรม Microsoft Excel ในการคำนวณทางสถิติทั้งหมด

บทที่ 4

ผลการวิจัย

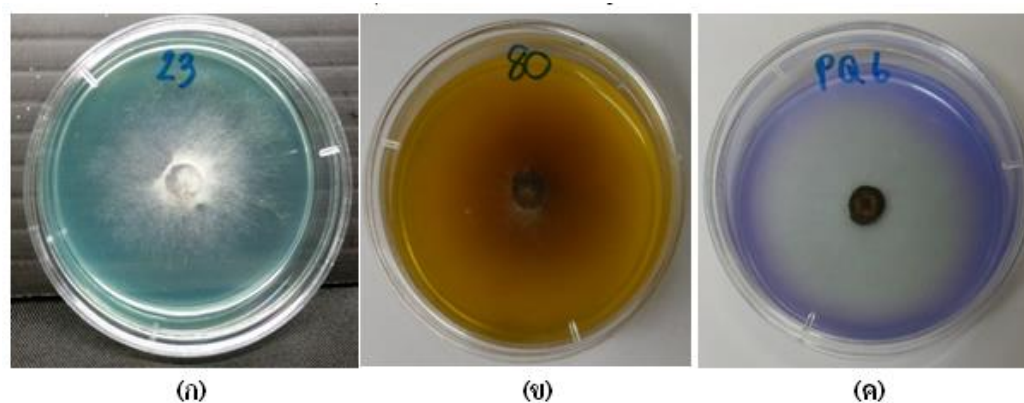
4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

ผลจากการเก็บตัวอย่างเห็ด (sporocarp) ท่อนไม้ หรือเศษไม้จากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย เช่น กรุงเทพมหานคร ชลบุรี นนทบุรี นครราชสีมา และระยอง พบว่าเมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 17 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยแบ่งเป็นไอโซเลตที่มาจากตัวอย่างเห็ดจำนวน 9 ไอโซเลต (ลำดับที่ 67-75) และจากตัวอย่างท่อนไม้หรือเศษไม้จำนวน 8 ไอโซเลต (ลำดับที่ 11-18) ส่วนตัวอย่างดินที่เก็บตัวอย่างมาจากบริเวณสวนผักและสวนผลไม้ที่มีประวัติการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชจากจังหวัดต่างๆ ได้แก่ นนทบุรี นครสวรรค์ และสมุทรปราการ โดยนำตัวอย่างดินจำนวน 20 ตัวอย่างมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคการเจือจาง และเทคนิค enrichment ที่มีสารละลายพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าสามารถแยกเชื้อจากดินตัวอย่างได้ทั้งหมด 58 ไอโซเลต แบ่งเป็นไอโซเลตที่มาจากเทคนิคการเจือจาง จำนวน 48 ไอโซเลต (ลำดับที่ 19-66) และเทคนิค enrichment จำนวน 10 ไอโซเลต (ลำดับที่ 1-10) และตัวอย่างรา 4 ตัวอย่าง (ลำดับที่ 76-79) ได้มาจากห้องปฏิบัติการเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติก

เมื่อนำไอโซเลตทั้งหมดที่แยกได้ทั้ง 79 ไอโซเลต จากตารางที่ 4.1 มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติก โดยพิจารณาจากปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสับสเตรตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Basal medium ที่มีส่วนผสมของ ABTS สำหรับทดสอบการผลิตแลคเคส (Alfarra และคณะ, 2013), azure B สำหรับทดสอบการผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Archibald, 1992) และ phenol red สำหรับทดสอบการผลิตแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Kuwahara และคณะ, 1984) ผลการทดสอบพบว่า ราจำนวน 31 ไอโซเลตสามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ABTS เป็นสารทดสอบทำให้เกิดโซนสีเขียวรอบโคโลนี, ราจำนวน 20 ไอโซเลตสามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี phenol red เป็นสารทดสอบทำให้เกิดโซนสีส้มแดง, ราจำนวน 16 ไอโซเลตสามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี azure B เป็นสารทดสอบทำให้เกิดโซนใสรอบโคโลนี, ราจำนวน 40 ไอโซเลตไม่สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และราจำนวน 7 ไอโซเลตสามารถเปลี่ยนสีของสารทดสอบได้ทั้ง 3 ชนิด โดยพบว่าราที่มีแนวโน้มในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติกได้ส่วนใหญ่

จะเป็นราที่แยกได้จากตัวอย่างเห็ด ตัวอย่างการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารทดสอบชนิดต่างๆโดยการทำงานของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโอไลติก แสดงดังรูปที่ 4.1

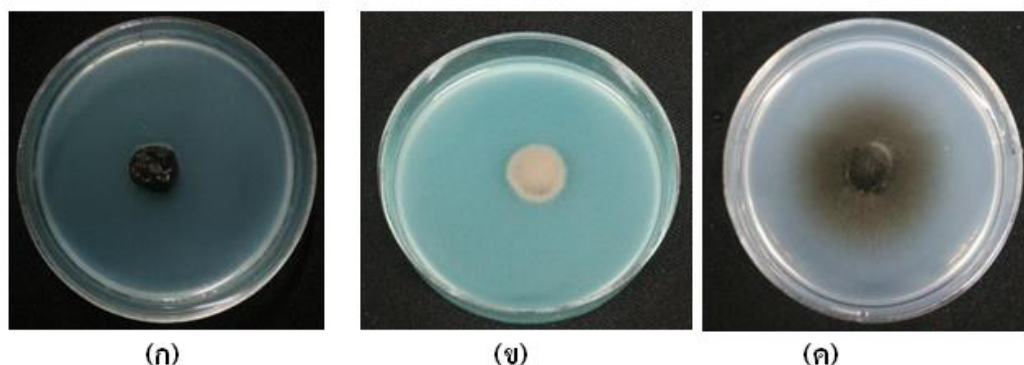


รูปที่ 4.1 ปฏิกริยาการเปลี่ยนแปลงสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Basal medium ที่มีส่วนผสมของสารทดสอบชนิดต่างๆ หลังจากบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

- (ก) การสร้างโซนสีเขียวบนอาหารที่ผสม ABTS แสดงการผลิตแลคเคส
- (ข) การสร้างโซนสีส้มแดงบนอาหารที่ผสม phenol red แสดงการผลิตแมนแกนีสเปอร์ออกซิเดส
- (ค) การสร้างโซนสีบนอาหารที่ผสม azure B แสดงการผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดส

4.3 การทดสอบความสามารถของราในการเจริญบนอาหารที่มีพาราควอต

นำตัวอย่างราทุกไอโซเลตที่ทดสอบในข้อ 4.2 (ยกเว้นราในกลุ่มที่แยกได้จากดินด้วยเทคนิค enrichment) มาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีพาราควอตความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่าราบางไอโซเลตไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีพาราควอตความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.2 ก) สำหรับไอโซเลตที่เจริญได้บนอาหารที่มีพาราควอตความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการเจริญน้อยกว่าราชุดควบคุมที่เจริญบนอาหารที่ไม่มีการผสมพาราควอต (รูปที่ 4.2 ข และ 4.2 ค ตามลำดับ) จึงคัดเลือก 7 ไอโซเลตที่พบการเจริญของราโดยมีความสามารถในการทนพาราควอตที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ได้ดี ได้แก่ ไอโซเลต A319, T236, B528, P279, 53, 18 และ 23 รวมทั้งราที่แยกได้จากดินด้วยเทคนิค enrichment จำนวนอีก 10 ไอโซเลตไปทดลองในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.2 ตัวอย่างการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium ที่มีส่วนผสมของพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

- (ก) ไม่พบการเจริญของราในชุดทดสอบที่มีส่วนผสมพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v)
- (ข) การเจริญของราในชุดทดสอบที่มีส่วนผสมพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v)
- (ค) การเจริญของราในชุดควบคุมที่ไม่มีการผสมพาราควอต

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติกในเบื้องต้น รวมทั้งความสามารถในการทนต่อพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตัวอย่าง	ลำดับ	ไอโซเลต	ความสามารถในการเจริญบน Basal medium ผสมสารทดสอบ			ความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v)
			ABTS	phenol red	azure B	
ดิน	1	PQ1	+	-	-	+
	2	PQ2	-	-	-	+
	3	PQ3	+	-	-	+
	4	PQ4	-	-	-	+
	5	PQ5	-	+	-	+
	6	PQ6	+	+	+	+
	7	PQ7	-	-	-	+
	8	PQ8	-	-	-	+
	9	PQ9	-	-	-	+
	10	PQ10	-	+	+	+

ท่อนไม้ผุ	11	1*	+	-	-	-
	12	2*	-	-	-	-
	13	5*	+	+	-	-
	14	7*	-	-	-	-
	15	8*	+	-	+	-
	16	9*	+	-	-	-
	17	10*	-	-	-	-
	18	12*	-	-	-	-
ดิน	19	A14	+	-	-	-
	20	A15	+	-	+	-
	21	A28	+	-	-	-
	22	A29	-	-	-	-
	23	A217	-	-	-	-
	24	A318	+	+	-	-
	25	B232	-	-	-	-
	26	T227	+	-	-	-
	27	B522	-	-	-	-
	28	A319	+	+	+	+
	29	T230	-	-	-	-
	30	T236	-	+	+	+
	31	T329	-	-	-	-
	32	B437	+	-	-	-
	33	B528	+	-	+	+
	34	1110	-	-	-	-
	35	B334	-	-	-	-
	36	38	-	+	-	-
	37	B242	-	-	-	-
	38	43	-	+	+	-
	39	T245	-	+	+	-

	40	49	-	-	-	-
	41	50	-	-	-	-
	42	51	-	-	-	-
	43	52	-	-	-	-
	44	53	-	-	-	+
	45	56	-	-	-	-
	46	57	-	-	-	-
	47	59	-	-	-	-
	48	60	-	-	-	-
	49	62	+	-	-	-
	50	63	-	-	-	-
	51	64	-	-	-	-
	52	65	-	-	-	-
	53	66	-	-	-	-
	54	67	-	-	+	-
	55	68	+	-	-	-
	56	2270	-	-	-	-
	57	2275	-	-	-	-
	59	P279	+	+	-	+
	60	80	+	+	+	-
	61	81	-	-	-	-
	62	82	-	-	-	-
	63	83	-	-	-	-
	64	84	-	-	-	-
	65	B335	-	+	-	-
	66	73	-	-	-	-
เพื่อ	67	13	+	+	+	-
	68	14	-	-	-	-
	69	15	+	+	+	-
	70	16	+	+	-	-

	71	18	+	+	+	+
	72	20	+	-	-	-
	73	22	+	-	-	-
	74	23	+	+	+	+
	75	X1	+	-	-	-
	76	T20	+	+	-	-
	77	S1	+	-	+	-
	78	T8	+	+	-	-
	79	T21	+	-	-	-

หมายเหตุ

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์หลังจากบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

- + คือ มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารทดสอบ
- คือ สีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การทดสอบความสามารถในการเจริญได้บนอาหารที่มีพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

- + คือ ราเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพาราควอต
- คือ ไม่พบการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพาราควอต

เมื่อนำตัวอย่างราจำนวน 17 ไอโซเลตจากผลการทดลองที่ผ่านมา มาทดสอบการเจริญบนอาหารที่มีพาราควอตผสมอยู่ในปริมาณที่สูงขึ้น คือ 0.4, 0.5 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยมีชุดควบคุมคือ Basal medium ที่ไม่ผสมพาราควอต หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วันแล้ว พบว่า มีจำนวน 5 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต PQ3, PQ5, PQ6, A319 และ P279 ที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมพาราควอตถึง 0.6 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีพาราควอตที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตัวอย่าง	ไอโซเลต	พาราควอต	พาราควอต	พาราควอต	พาราควอต
		0.3 เปอร์เซ็นต์	0.4 เปอร์เซ็นต์	0.5 เปอร์เซ็นต์	0.6 เปอร์เซ็นต์
ดิน	PQ1	+	-	-	-
	PQ2	+	-	-	-
	PQ3	+	+	+	+
	PQ4	+	-	-	-
	PQ5	+	+	+	+
	PQ6	+	+	+	+
	PQ7	+	-	-	-
	PQ8	+	-	-	-
	PQ9	+	-	-	-
	PQ10	+	-	-	-
	A319	+	+	+	+
	T236	+	-	-	-
	B528	+	+	-	-
	P279	+	+	+	+
	53	+	+	-	-
เห็ด	18	+	+	-	-
	23	+	-	-	-

หมายเหตุ

+ คือ ราเจริญได้

- คือ ไม่พบการเจริญของรา

4.4 การทดสอบความสามารถของราในการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลว

นาราทิให้ผลบวกทั้ง 5 ไอโซเลต คือไอโซเลต PQ3, PQ5, PQ6, A319 และ P279 ซึ่งผ่านการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลีติกบนอาหารแข็ง และมีความสามารถในการทนต่อพาราควอตที่ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์บนอาหารแข็ง มาทดสอบเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเจริญในอาหารเหลวที่มีพาราควอตที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ พบว่าราแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการเจริญในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของพาราควอตที่แตกต่างกัน ดังนี้

ไอโซเลต PQ3 เจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของพาราควอต ไม่เกิน 0.01 เปอร์เซ็นต์

ไอโซเลต PQ5 เจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของพาราควอต ไม่เกิน 0.03 เปอร์เซ็นต์

ไอโซเลต PQ6 เจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของพาราควอต ไม่เกิน 0.03 เปอร์เซ็นต์

ไอโซเลต A319 เจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของพาราควอต ไม่เกิน 0.01 เปอร์เซ็นต์

ไอโซเลต P279 เจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของพาราควอต ไม่เกิน 0.01 เปอร์เซ็นต์

จึงแบ่งกลุ่มราออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

รากลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลต PQ3, A319 และ P279 นำไปทดสอบในอาหารเหลวที่เติมพาราควอตที่ความเข้มข้น 0.01, 0.015 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดทดสอบ

รากลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลต PQ5 และ PQ6 นำไปทดสอบในอาหารเหลวที่เติมพาราควอตที่ความเข้มข้น 0.02, 0.03 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดทดสอบ

โดยเลี้ยงราใน LME Basal medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่เติมพาราควอตให้มีความเข้มข้นต่างๆตามกำหนดข้างต้น ส่วนชุดควบคุมชุดที่หนึ่งไม่ใส่ราและชุดควบคุมชุดที่สองไม่ใส่พาราควอต จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และเก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 10, 20 และ 30 วัน เพื่อตรวจสอบปริมาณของพาราควอตด้วยเทคนิค HPLC พร้อมทั้งตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลีติก และตรวจสอบการเจริญของรา

จากการทดลองพบว่า เมื่อตรวจสอบการเจริญของราสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลวแล้วพบการเจริญของรา 4 ไอโซเลต คือไอโซเลต PQ5, PQ6, A319 และ P279 ในอาหารเหลวที่เติมพาราควอตในความเข้มข้นต่างๆ ส่วนราไอโซเลต PQ3 ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีพาราควอตผสมอยู่ที่ทุกความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จึงนำรา 4 ไอโซเลตไปตรวจสอบปริมาณพาราควอตที่เหลืออยู่ พร้อมทั้งตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลีติก และตรวจสอบการเจริญของราแต่ละสายพันธุ์ โดยผลการทดลองเป็นดังนี้

4.4.1 ผลของราไอโซเลต A319

จากตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน ปริมาณพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อของราไอโซเลต A319 ลดลงเหลือเพียง 62.74 เปอร์เซ็นต์ และ 84.08 เปอร์เซ็นต์ ในชุดทดสอบที่มีปริมาณพาราควอตเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

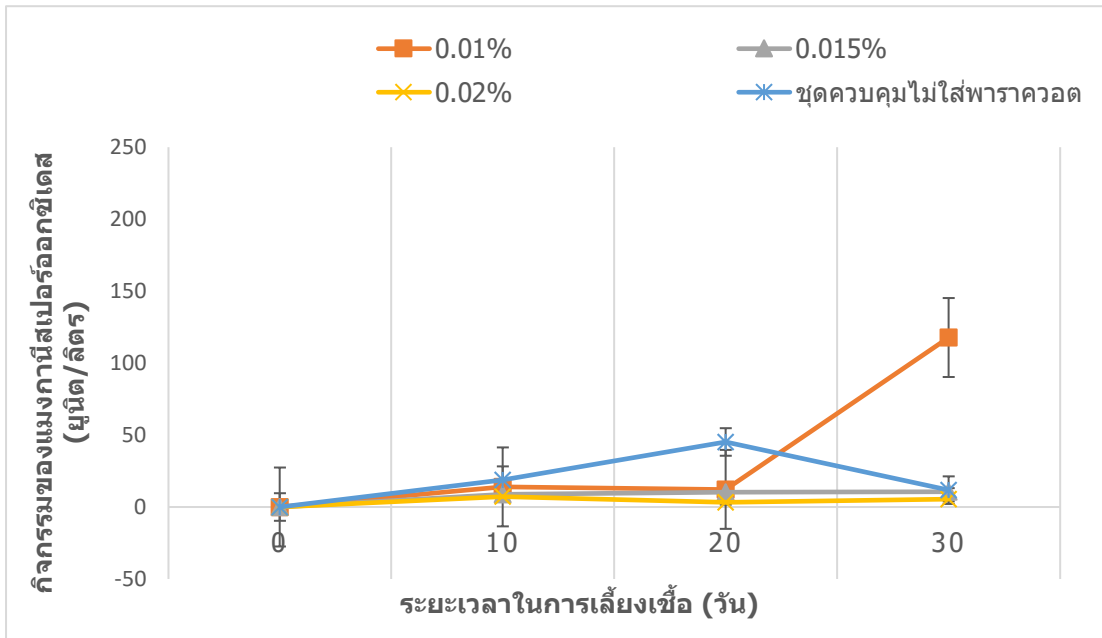
ตารางที่ 4.3 ความสามารถของราไอโซเลต A319 ในการย่อยพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 10, 20 และ 30 วัน

ไอโซเลต	ความเข้มข้นพาราควอตเริ่มต้น	พาราควอตที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)		
		10 วัน	20 วัน	30 วัน
A319	0.01 เปอร์เซ็นต์	96.79±0.95 ^c	82.99±0.74 ^b	62.74±0.21 ^a
	0.015 เปอร์เซ็นต์	100.00±0 ^c	100.00±0 ^c	97.07±2.32 ^c
	0.02 เปอร์เซ็นต์	85.83±2.84 ^b	84.33±1.59 ^b	84.08±0.95 ^b
	ชุดควบคุม (0.03 เปอร์เซ็นต์)	99.46±0.13 ^c	98.84±0.08 ^c	97.44±0.31 ^c

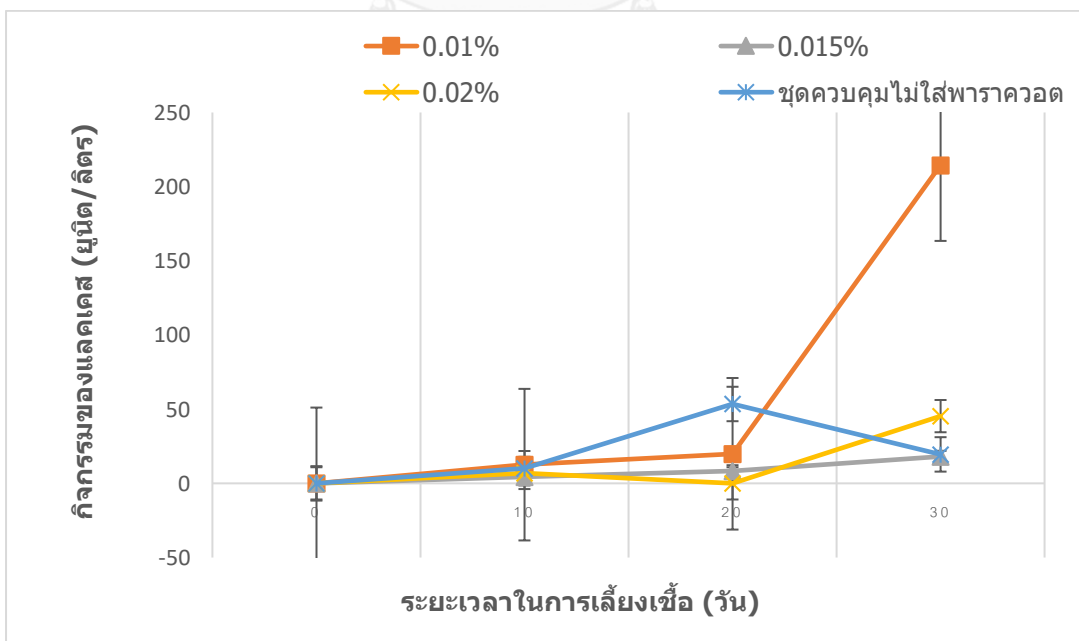
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส ที่สร้างขึ้นในระหว่างการย่อยสลายพาราควอต หลังจากเลี้ยงราไอโซเลต A319 ใน LBM ที่มีส่วนผสมของพาราควอตที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยมีสาร ABTS เป็นสารตั้งต้นสำหรับตรวจสอบกิจกรรมของแลคเคส 2,6 dimethoxy phenol (2,6-DMP) สำหรับตรวจสอบกิจกรรมแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และเวราทริลแอลกอฮอล์สำหรับการตรวจสอบกิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดสแล้ว พบว่าเรามีกิจกรรมของเอนไซม์สองชนิดสูงที่สุดในวันที่ 30 ของเวลาในการเลี้ยงเชื้อ คือ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส ซึ่งสอดคล้องกับการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลวที่พบว่าพาราควอตถูกย่อยและเหลือเพียง 62.74 เปอร์เซ็นต์ ในชุดทดสอบที่มีพาราควอตความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากิจกรรมของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับในช่วงเวลาอื่นคือ 117.76 หน่วย/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.3 แลคเคสมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ 214.52 หน่วย/ลิตร ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดตลอดการทดลองในเวลา 30 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ส่วนลิกนินเปอร์ออกซิเดสมี

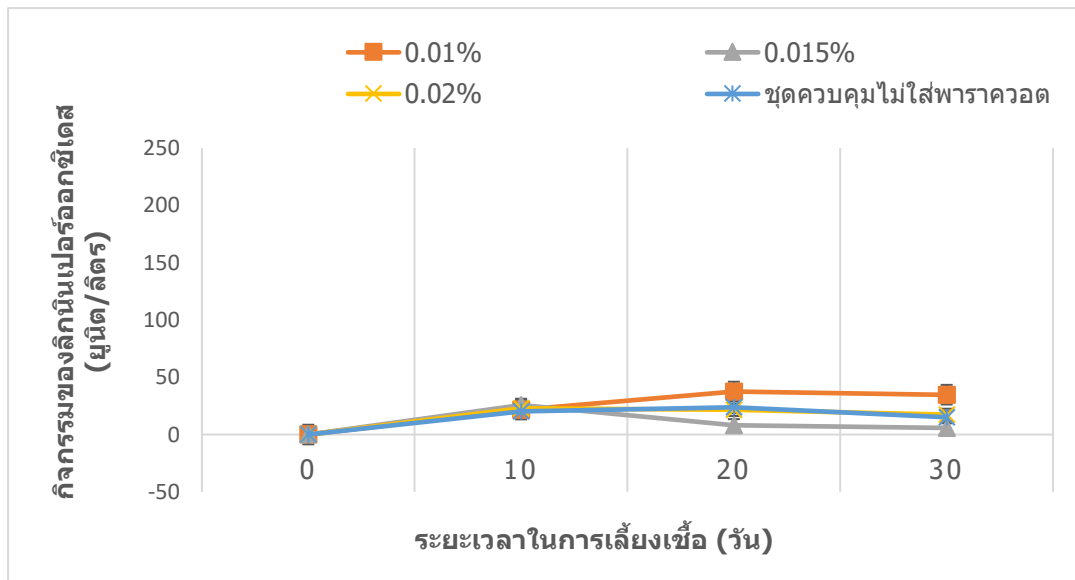
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 20 ในชุดทดสอบที่มีพาราควอตความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีพาราควอตเหลืออยู่ 82.99 % ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.3 กิจกรรมของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของราไอโซเลต A319

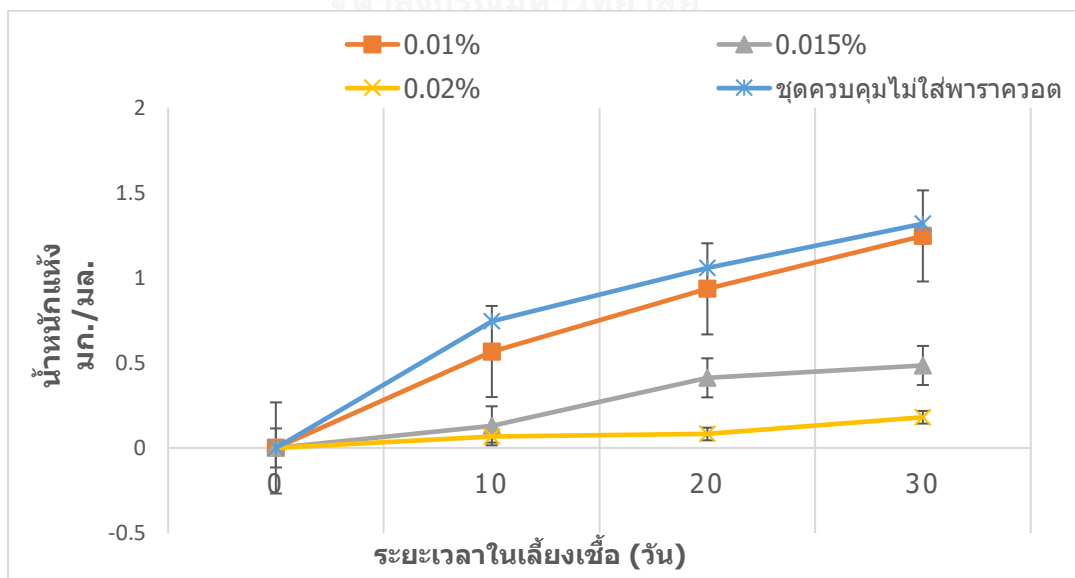


รูปที่ 4.4 กิจกรรมของแลคเคสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของราไอโซเลต A319



รูปที่ 4.5 กิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของราไอโซเลต A319

จากการตรวจสอบการเจริญของราไอโซเลต A319 โดยการหาน้ำหนักแห้ง พบว่าราเจริญได้ดีที่สุดในชุดควบคุมที่ไม่มีพาราควอต แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับในชุดทดสอบที่มีความเข้มข้นของพาราควอตในอาหารเหลวเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่ายิ่งปริมาณพาราควอตเพิ่มมากขึ้น ความสามารถในการเจริญของราจะลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 การเจริญของราไอโซเลต A319 ในระหว่างการย่อยสลายพาราควอตในเวลา 30 วัน

4.4.2 ผลของราไอโซเลต P279

จากตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ปริมาณพาราควอตที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อของราไอโซเลต P279 ที่มีความเข้มข้นพาราควอต 0.015 เปอร์เซ็นต์ และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณลดลงเหลือ 83.45 เปอร์เซ็นต์ และ 89.60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 20 และ 30 วัน ปริมาณพาราควอตในทั้ง 2 ชุดทดสอบกลับสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามปริมาณที่สูงขึ้นนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

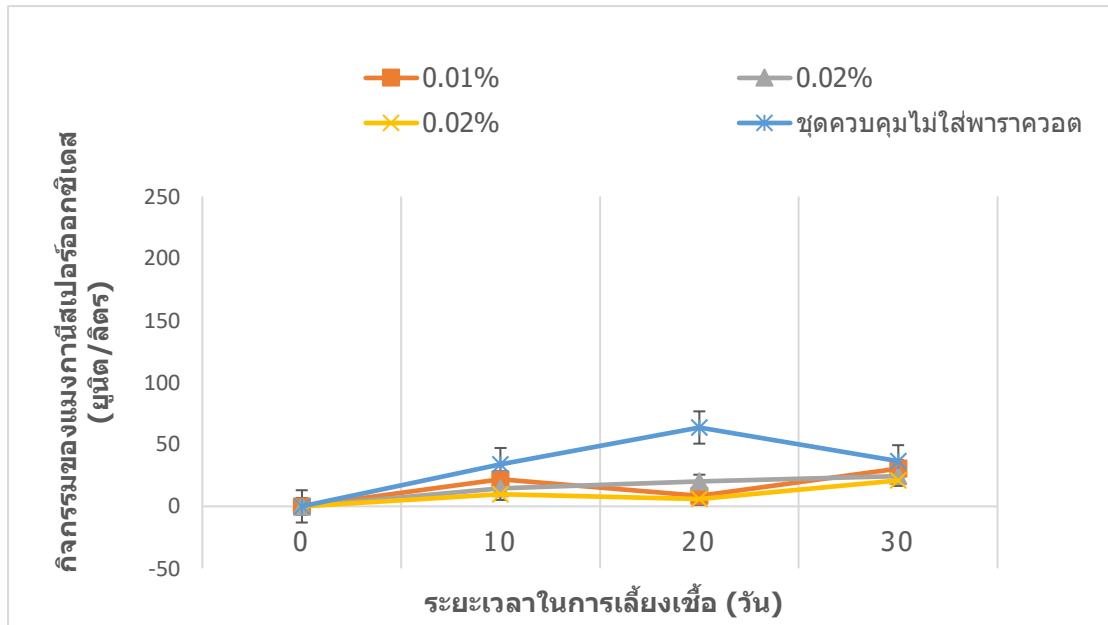
ตารางที่ 4.4 ความสามารถของราไอโซเลต P279 ในการย่อยพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ

ไอโซเลต	ความเข้มข้นพาราควอตเริ่มต้น	พาราควอตที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)		
		10	20	30
P279	0.01 เปอร์เซ็นต์	90.33±5.37 ^{bcd}	90.89±1.94 ^{cde}	68.51±2.89 ^a
	0.015 เปอร์เซ็นต์	89.60±3.53 ^{bcd}	95.72±1.01 ^{def}	98.03±0.60 ^f
	0.02 เปอร์เซ็นต์	83.45±0.25 ^b	84.87±1.14 ^{bc}	88.84±1.48 ^{bcd}
	ชุดควบคุม (0.03 เปอร์เซ็นต์)	99.46±0.13 ^f	98.84±0.08 ^f	97.44±0.31 ^{ef}

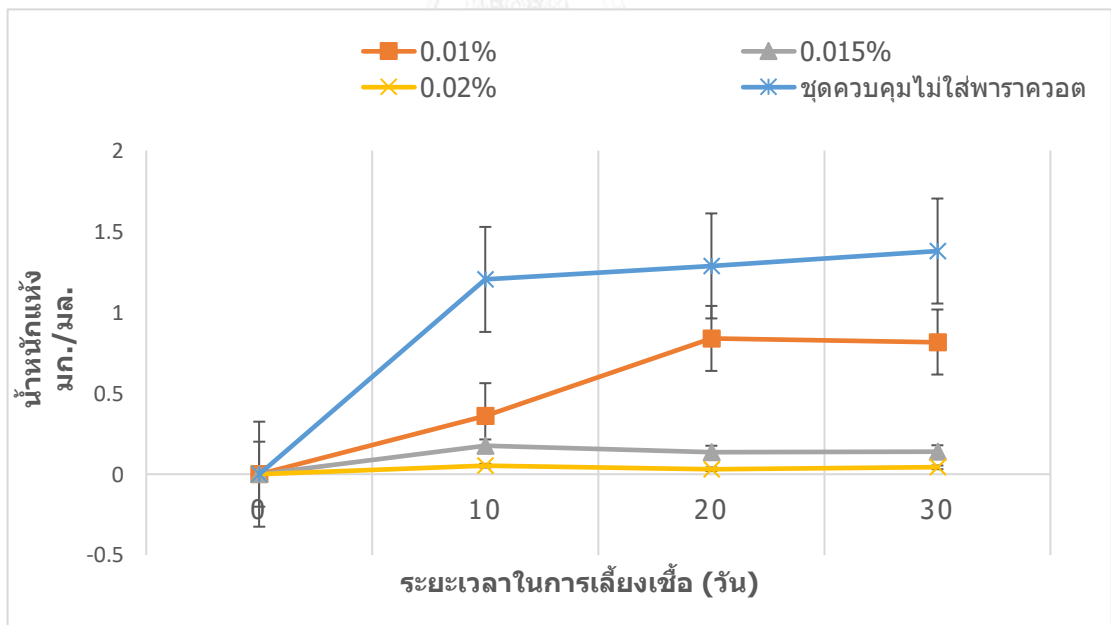
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติกระหว่างการย่อยพาราควอตในอาหารเหล่านั้นพบว่ากิจกรรมแลคเคสมีค่าน้อยมาก (ไม่ได้แสดงผล) และค่ากิจกรรมแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของรา มีค่าสูงสุดในชุดควบคุมในวันที่ 20 ดังแสดงในรูปที่ 4.7 ส่วนลิกนินเปอร์ออกซิเดสไม่พบตลอดการทดลอง (ไม่ได้แสดงผล)

การเจริญของราไอโซเลต P279 ในระหว่างการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลว ดังแสดงในรูปที่ 4.8 พบว่ารามีการเจริญได้ดีที่สุดในชุดควบคุม ในวันที่ 30 ส่วนในชุดทดสอบที่มีความเข้มข้นพาราควอต 0.01 เปอร์เซ็นต์ พบว่าราเจริญได้ดีที่สุดที่ 20 วัน และเริ่มคงที่ และยิ่งปริมาณพาราควอตเพิ่มมากขึ้น ความสามารถในการย่อยสลายและการเจริญของราจะลดลง



รูปที่ 4.7 กิจกรรมของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของราไอโซเลต P279



รูปที่ 4.8 การเจริญของราไอโซเลต P279 ในระหว่างการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลวที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.4.3 ผลของราไอโซเลต PQ5

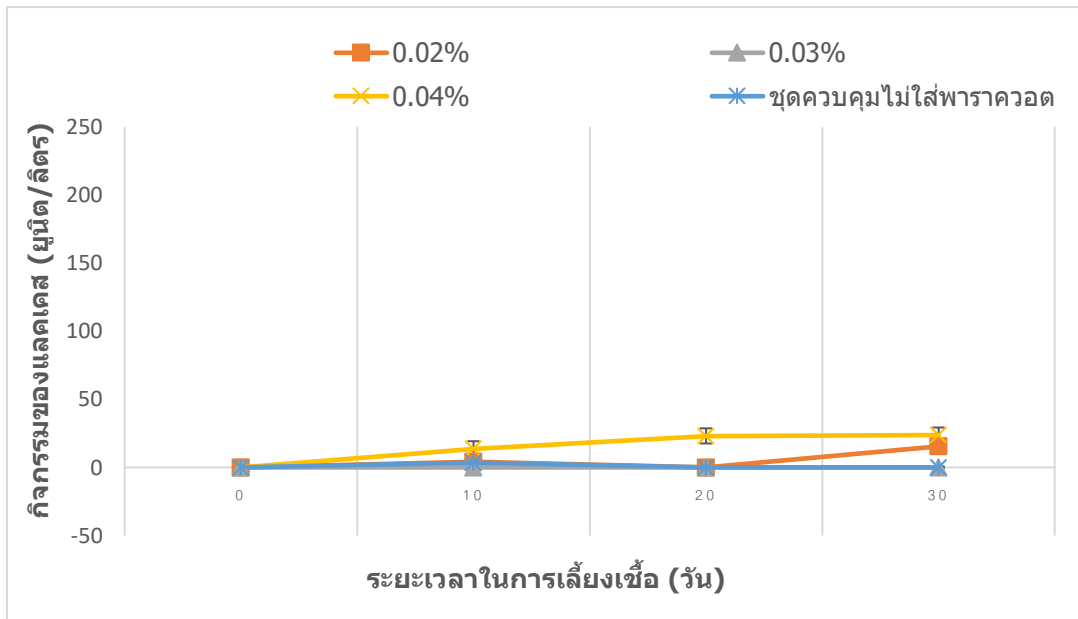
จากตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ปริมาณพาราควอตที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อของราไอโซเลต PQ5 ที่มีพาราควอตเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณลดลงเหลือ 89.47 เปอร์เซ็นต์ และเหลือเพียง 70.91 เปอร์เซ็นต์ และ 62.80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 20 และ 30 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้จะเห็นว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพาราควอตเข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณพาราควอตไม่ลดลงโดยยังคงมีพาราควอตเหลืออยู่ถึง 90.86 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.5 ความสามารถของราไอโซเลต PQ5 ในการย่อยพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ

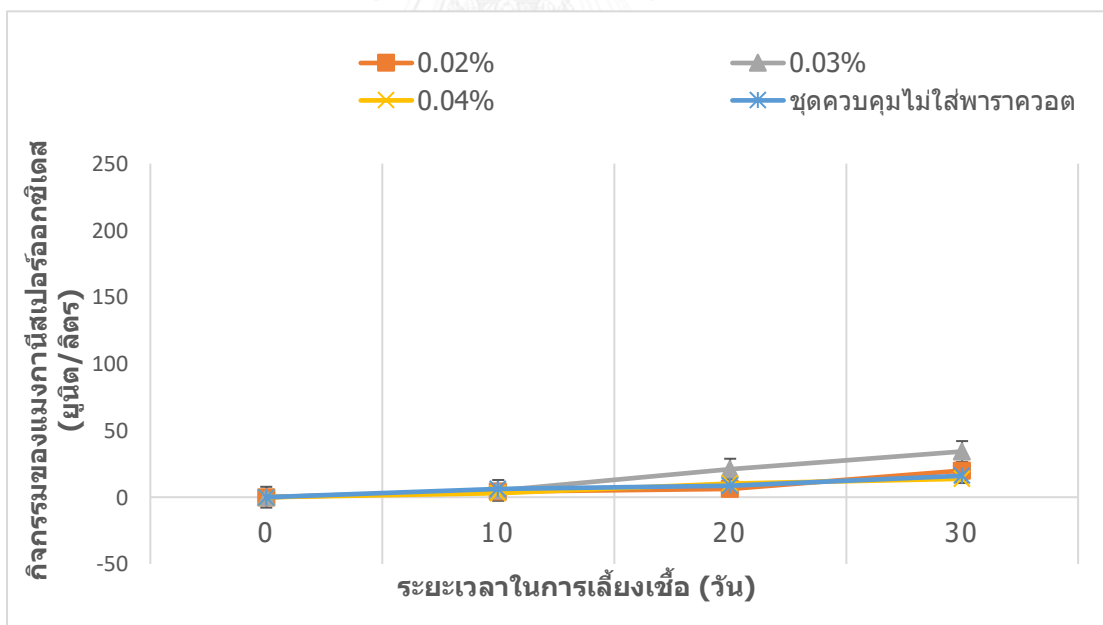
ไอโซเลต	ความเข้มข้นพาราควอตเริ่มต้น	พาราควอตที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)		
		10 วัน	20 วัน	30 วัน
PQ5	0.02 เปอร์เซ็นต์	89.47±3.68 ^c	70.91±2.17 ^b	62.80±2.5 ^a
	0.03 เปอร์เซ็นต์	98.50±1.07 ^f	91.98±0.43 ^{cde}	90.86±1.01 ^{cd}
	0.04 เปอร์เซ็นต์	98.33±0.38 ^f	96.32±0.35 ^{ef}	95.26±0.36 ^{def}
	ชุดควบคุม (0.03 เปอร์เซ็นต์)	99.46±0.13 ^f	98.84±0.08 ^f	97.44±0.31 ^f

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

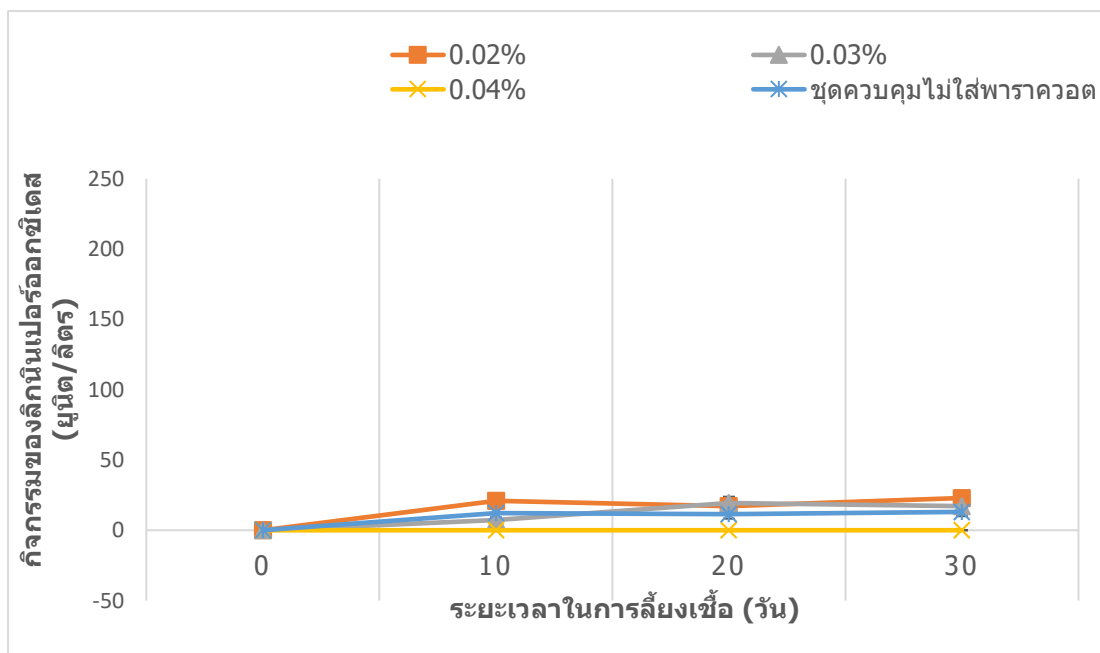
ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลิติกระหว่างการย่อยพาราควอตโดยราไอโซเลต PQ5 ในอาหารเหล่านั้น พบว่าเรามีกิจกรรมของเอนไซม์ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ที่พบไม่สัมพันธ์กับการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลว ดังแสดงในรูปที่ 4.9-4.11 สำหรับกิจกรรมของแลคเคสแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส ตามลำดับ กล่าวคือ ในวันที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีการย่อยพาราควอตเหลือน้อยที่สุดนั้น กิจกรรมของทุกเอนไซม์ ณ ภาชนะนี้ไม่ได้ให้ค่าสูงที่สุด



รูปที่ 4.9 กิจกรรมของแลคเตสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของราไอโซเลต PQ5

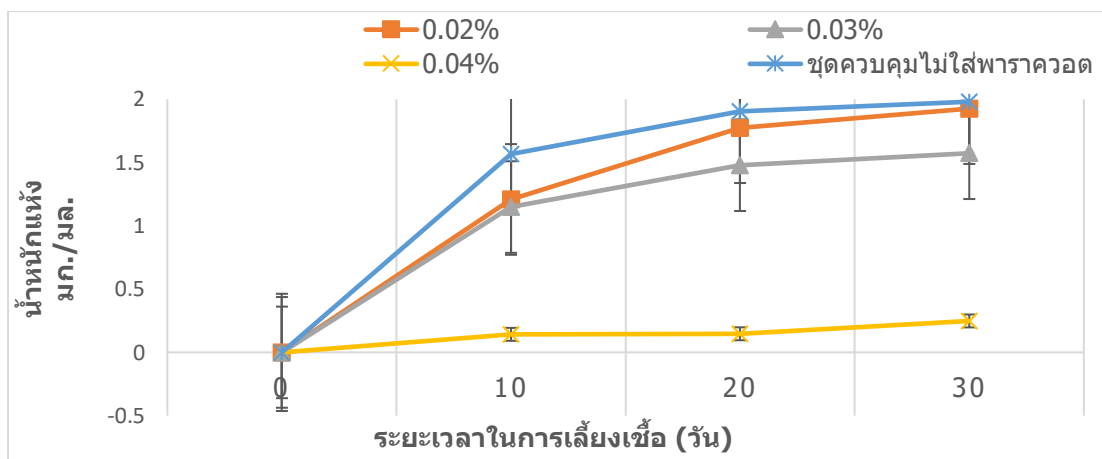


รูปที่ 4.10 กิจกรรมของแอมกานีสเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของราไอโซเลต PQ5



รูปที่ 4.11 กิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของราไอโซเลต PQ5

เมื่อตรวจสอบการเจริญของราไอโซเลต PQ5 ในอาหารเหลวที่มีพาราควอตผสมอยู่ที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์, 0.03 เปอร์เซ็นต์ และ 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดจากน้ำหนักแห้งของรา ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.12 ซึ่งพบการเจริญสูงสุดของชุดทดสอบที่มีพาราควอตเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 30 โดยพบว่ามือน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.89 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม การเจริญของราในชุดทดสอบทั้งในอาหารเหลวที่มีพาราควอตความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ นั้น เราสามารถเจริญได้น้อยกว่าการเจริญของราในชุดควบคุม ส่วนในชุดทดสอบที่มีพาราควอตผสมอยู่ที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์นั้น เราเจริญได้น้อยมาก นอกจากนี้ยังพบว่าราในทุกชุดทดลองเริ่มมีการเจริญคงที่เมื่อเวลาผ่านไปมากกว่า 20 วัน



รูปที่ 4.12 การเจริญของราไอโซเลต PQ5 ในระหว่างการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลวที่ความชื้นชั้นต่างๆ

4.4.4 ผลของราไอโซเลต PQ6

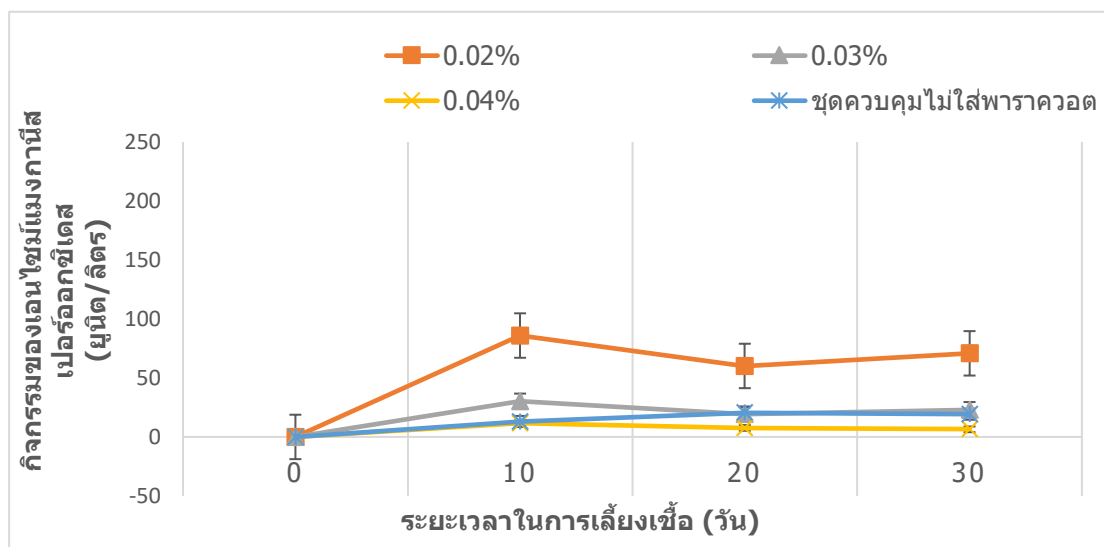
จากตารางที่ 4.6 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ปริมาณพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อของราไอโซเลต PQ6 ที่มีความชื้นพาราควอต 0.02 เปอร์เซ็นต์ และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณลดลงเหลือ 75.11 เปอร์เซ็นต์ และ 75.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 20 และ 30 วัน ปริมาณพาราควอตในทั้ง 2 ชุดทดสอบกลับสูงขึ้น โดยสูงขึ้นเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในชุดทดสอบที่มีความชื้นพาราควอต 0.04 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.6 ความสามารถของราไอโซเลต PQ6 ในการย่อยพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความชื้นชั้นต่างๆ

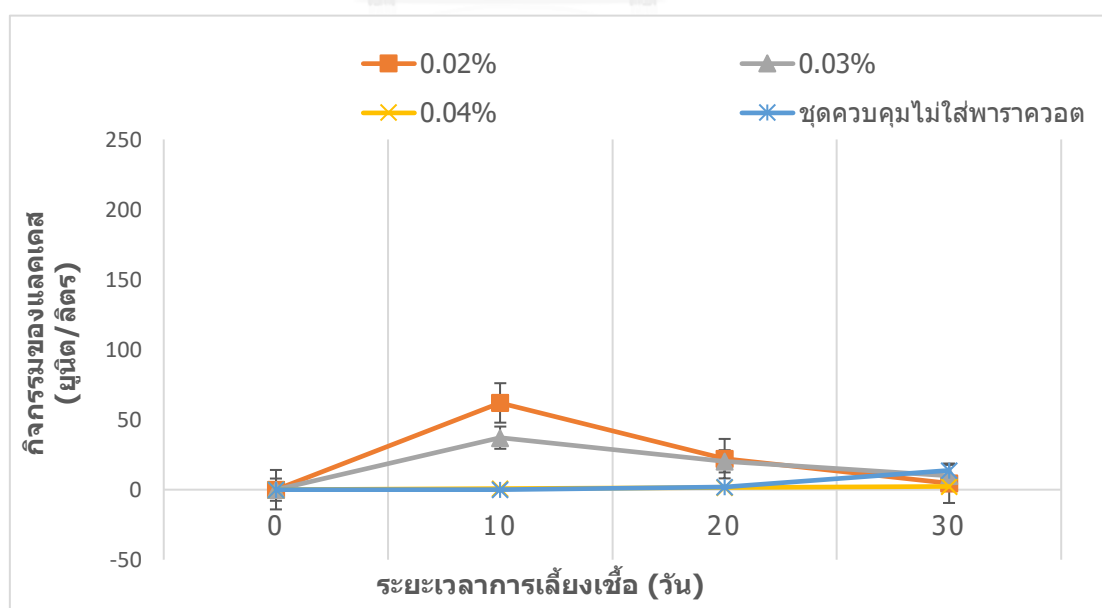
ไอโซเลต	ความชื้นพาราควอตเริ่มต้น	พาราควอตที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)		
		10 วัน	20 วัน	30 วัน
PQ6	0.02 เปอร์เซ็นต์	75.11±2.60 ^a	75.89±1.75 ^a	87.12±3.23 ^b
	0.03 เปอร์เซ็นต์	75.89±2.07 ^a	87.08±1.47 ^b	94.77±2.94 ^{ce}
	0.04 เปอร์เซ็นต์	91.78±1.26 ^{bc}	87.24±1.40 ^b	99.42±0.17 ^e
	ชุดควบคุม (0.03 เปอร์เซ็นต์)	99.46±0.13 ^e	98.84±0.08 ^e	97.44±0.31 ^e

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลีติระหว่างการย่อยพาราควอตในอาหารเหลวของราไอโซเลต PQ6 นั้น พบว่ารามีกิจกรรมของเอนไซม์สองชนิด คือ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นพาราควอต 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 10 เท่านั้น (รูปที่ 4.13 และ 4.14) และมีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับในช่วงเวลาอื่น ส่วนลิกนินเปอร์ออกซิเดสตรวจไม่พบตลอดการทดลอง (ไม่ได้แสดงผล)

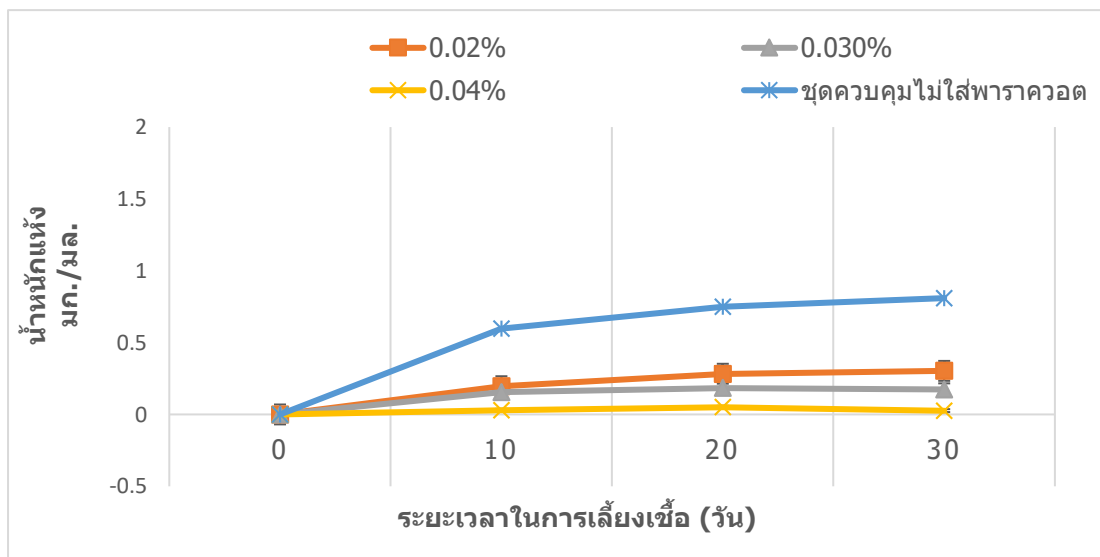


รูปที่ 4.13 กิจกรรมของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของราไอโซเลต PQ6



รูปที่ 4.14 กิจกรรมของแลคเคสในระหว่างการย่อยพาราควอตในเวลา 30 วันของราไอโซเลต PQ6

การเจริญของราไอโซเลต PQ6 ในระหว่างการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลว ดังแสดงในรูปที่ 4.15 พบว่าในวันที่ 30 รมีการเจริญได้ดีที่สุดในชุดควบคุม ส่วนในอาหารเหลวที่มีพาราควอตนั้นพบว่ายิ่งปริมาณพาราควอตเพิ่มมากขึ้น ความสามารถในการเจริญของราจะยิ่งลดลง



รูปที่ 4.15 การเจริญของราไอโซเลต PQ6 ในระหว่างการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลวที่ความเข้มข้นต่างๆ

โดยรวมแล้ว จากการวิเคราะห์ปริมาณพาราควอตที่เหลืออยู่เปรียบเทียบกับค่า retention time และพื้นที่ใต้กราฟกับสารละลายพาราควอตมาตรฐานด้วย HPLC พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน ราไอโซเลต PQ5 และ A319 มีความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตได้ดีที่สุด โดยพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของพาราควอต 0.02 เปอร์เซ็นต์ ของราไอโซเลต PQ5 เมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน ปริมาณพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเหลือเพียง 62.80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ราไอโซเลต A319 มีปริมาณของพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเหลือเพียง 62.74 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณพาราควอตเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปริมาณพาราควอตที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อของราไอโซเลต PQ6 และไอโซเลต P279 กลับมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 20 และ 30 วัน ตามลำดับ ส่วนในชุดควบคุมพบว่าปริมาณพาราควอตเกือบคงที่ตลอดการทดลองและไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 4.3-4.6

ในแง่การเจริญของราในอาหารเหลวที่มีพาราควอตผสมอยู่ที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์, 0.03 เปอร์เซ็นต์ และ 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดจากน้ำหนักแห้งของรานั้น พบว่าเมื่อความเข้มข้นของพาราควอตเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้การเจริญของราลดต่ำลง

ส่วนผลของกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลิติกนั้นพบว่าสัมพันธ์กับการเจริญกล้าคือ เมื่อความเข้มข้นของพาราควอตเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้การเจริญของรากดต่ำลง และส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลิติกลดลง

เมื่อพิจารณาจากทั้งความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลว ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลิติก และการเจริญของรากข้างต้น จึงได้เลือกราไอโซเลต PQ5 และราไอโซเลต A319 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4.5 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตในดิน

ดินที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นดินจากสนามหญ้าในบริเวณที่พักอาศัย โดยเก็บลึกลงจากผิวดิน ประมาณ 15 เซนติเมตร ก่อนนำไปใช้ทดสอบได้นำดินตัวอย่างไปสกัดและวิเคราะห์ปริมาณพาราควอตที่อาจตกค้างมาก่อนในดิน และพบว่าไม่มีการตกค้างของพาราควอต (ไม่ได้แสดงผล) เมื่อส่งตัวอย่างดินไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่โครงการพัฒนาวิชาการดิน ปุ๋ย และสิ่งแวดล้อม ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.7 ดังนี้

ตารางที่ 4.7 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาทดลอง

สมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน	ค่าที่ได้
เนื้อดิน	ดินเหนียว
ความเป็นกรดเบส	เบสเล็กน้อย (pH=7.6)
ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)	0.19
ปริมาณฟอสฟอรัส (เปอร์เซ็นต์)	0.15
ปริมาณแคลเซียม (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	6748
ปริมาณโพแทสเซียม (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	1242
ปริมาณแมกนีเซียม (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	757
ค่าความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออน (CEC) (cmol _c /kg)	38.20
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio)	36.89
ปริมาณอินทรีย์วัตถุ	12.09
ความชื้นเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	33.44

เมื่อนำเราไปเพาะบนเมล็ดข้าวฟ่าง พบว่าเราสร้างเส้นใยคลุมเมล็ดข้าวฟ่างโดยสมบูรณ์โดยใช้เวลาประมาณ 10 วัน และใช้เมล็ดข้าวฟ่างที่มีราเจริญอยู่นี้เป็นหัวเชื้อสำหรับการทดสอบการย่อยสลายพาราควอตในดิน สำหรับดินตัวอย่าง นำดินมากรองด้วยตะแกรงที่ความกว้าง 2 มิลลิเมตร แล้วบรรจุตัวอย่างดินปริมาณ 5 กรัมลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดที่ 1 ดินปลอดเชื้อ ไม่ใส่รา เพื่อศึกษาการลดลงของพาราควอตที่ขึ้นกับปัจจัยทางกายภาพ

ชุดที่ 2 ดินปลอดเชื้อ ใส่รา (ไอโซเลต PQ5 หรือไอโซเลต A319) เพื่อศึกษาการย่อยสลายพาราควอตของเรา

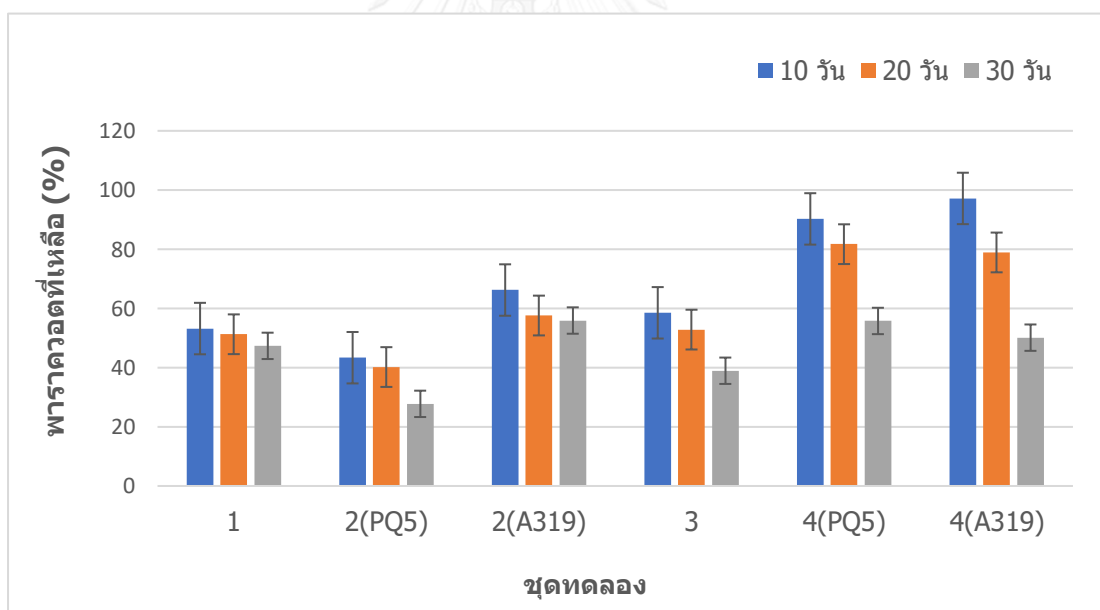
ชุดที่ 3 ดินไม่ปลอดเชื้อ ไม่ใส่รา เพื่อศึกษาการลดลงของพาราควอตตามปัจจัยทางชีวภาพ เช่น การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดิน

ชุดที่ 4 ดินไม่ปลอดเชื้อ ใส่รา (ไอโซเลต PQ5 หรือไอโซเลต A319) เพื่อศึกษาการย่อยสลายของพาราควอตโดยรวมกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินตามธรรมชาติ

จากการทดลองในชุดที่ไม่ใส่รานั้น พบว่าในชุดที่ 1 คือดินปลอดเชื้อที่เป็นชุดควบคุม พาราควอตมีการลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วง 10 วันแรก แต่เมื่อเวลาผ่านไปในวันที่ 20 และ 30 วัน พบว่าการลดลงของพาราควอตค่อนข้างคงที่โดยไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งในวันที่ 30 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การลดลงของพาราควอตประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.16 ซึ่งการลดลงที่เกิดขึ้นนั้นอาจเกิดจากปัจจัยทางกายภาพต่างๆ เช่น ชนิดของดิน ความสามารถในการยึดติดกับอนุภาคของดิน การสลายตัวของสาร เป็นต้น ส่วนชุดที่ 3 ซึ่งเป็นชุดดินไม่ปลอดเชื้อ พบว่าการลดลงของพาราควอตลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป 30 วันพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การลดลงของพาราควอตมากที่สุดโดยมีพาราควอตเหลืออยู่เพียง 26.07 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเทียบกับชุดที่ 1 แล้ว แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินมีผลทำให้พาราควอตลดลงได้

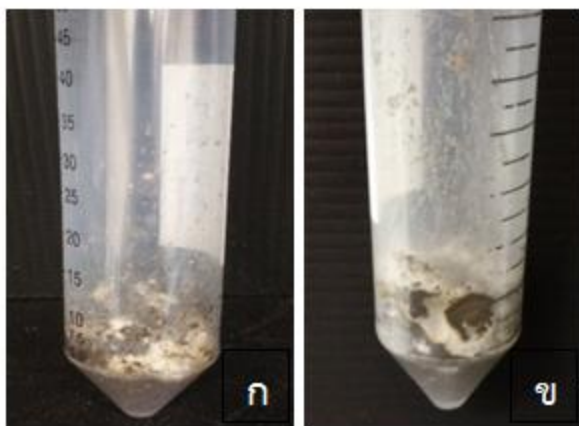
ในชุดที่ 2 ซึ่งเป็นดินปลอดเชื้อที่ใส่ราทดสอบลงไปนั้น กรณีของเราไอโซเลต PQ5 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปในวันที่ 10 และ 20 วัน เราสามารถเจริญในดินได้ดี (รูปที่ 4.17 ก) โดยพบปริมาณพาราควอตลดลงใกล้เคียงและน้อยกว่าในชุดที่ 1 แต่เมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน ปริมาณของพาราควอตลดลงมากกว่าในชุดที่ 1 โดยมีพาราควอตเหลือเพียง 27.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการลดลงของพาราควอตที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากความสามารถของเราไอโซเลต PQ5 ส่วนกรณีของเราไอโซเลต A319 นั้น พบว่าการใส่ราไอโซเลต A319 ลงในดินที่ปลอดเชื้อ ไม่ได้ช่วยลดปริมาณพาราควอตในดิน แม้ว่าจะพบว่าเราสามารถเจริญได้ดีในหลอดทดสอบ (รูปที่ 4.17 ข) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะภาวะที่ใช้ในการทดสอบการย่อยสลายในดินนี้ไม่เหมาะสมสำหรับราไอโซเลต A319

สำหรับผลการทดลองในชุดที่ 4 ซึ่งเป็นการศึกษาการย่อยสลายพาราควอตของราตัวอย่างร่วมกับจุลินทรีย์ในดินตามธรรมชาติ พบว่าชุดการทดลองที่ 4 ของทั้งไอโซเลต PQ5 และ A319 (รูปที่ 4.16) มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายของพาราควอตได้น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ 3 ซึ่งเป็นดินไม่ปลอดเชื้อและไม่ใส่ราตัวอย่าง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใส่ราตัวอย่างลงไปดินตามธรรมชาติ นั้น ราอาจมีกิจกรรมบางอย่างที่ส่งผลยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินตามธรรมชาติ ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายพาราควอตของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติลดลง นอกจากนี้เมื่อสังเกตการเจริญของราทั้งสองชนิดในขวดทดสอบพบว่าราไอโซเลต PQ5 สามารถเจริญได้ทั้งใน 2 ชุดทดสอบ (ชุดที่ 2 (รูปที่ 4.17 ก) และชุดที่ 4 (รูปที่ 4.18 ก) คือ เมื่อเวลาผ่านไป 10 วันจะเห็นการเจริญของรามากขึ้น และเพิ่มมากขึ้นตามเวลา ดังแสดงในรูปที่ 4.18 แต่กรณีของราไอโซเลต A319 ในการทดลองชุดที่ 2 ซึ่งเป็นดินปลอดเชื่อนั้น ราสามารถเจริญได้ แต่ในชุดทดลองที่ 4 ซึ่งเป็นดินไม่ปลอดเชื้อ พบว่าราไอโซเลต A319 ไม่สามารถเจริญได้ และพบการเจริญของราชนิดอื่นที่มีตามธรรมชาติ ดังแสดงในรูป 4.18 ข ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในดินมีจุลินทรีย์ธรรมชาติหลากหลายชนิด และจุลินทรีย์บางชนิดอาจมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราไอโซเลต A319 ทำให้ราไม่สามารถเจริญได้ตลอดช่วงการทดลอง

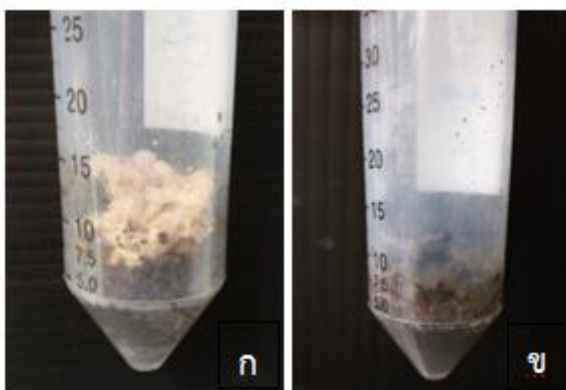


รูปที่ 4.16 การย่อยสลายพาราควอตที่ความเข้มข้น 250 ppm โดยราไอโซเลต PQ5 และ A319 โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด คือ (1) ดินปลอดเชื้อ ไม่ใส่รา (2) ดินปลอดเชื้อ ใส่รา (3) ดินไม่ปลอดเชื้อ ไม่ใส่รา (4) ดินไม่ปลอดเชื้อ ใส่รา และเก็บผลทุกๆ 10 วัน เป็นเวลา 30 วัน

หมายเหตุ เส้นเหนือแท่งกราฟแสดงช่วงความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง 3 ซ้ำ



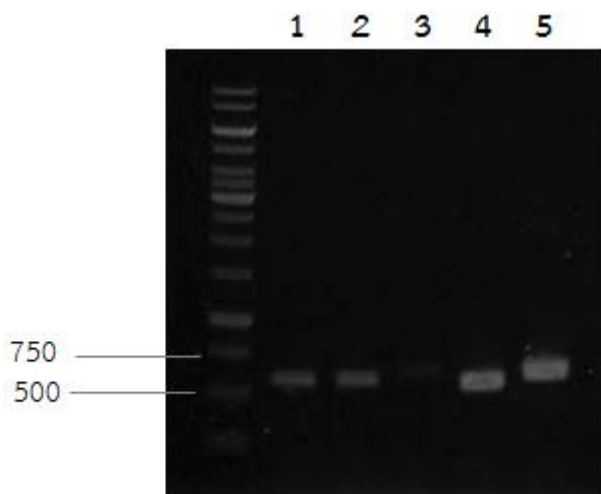
รูปที่ 4.17 การเจริญของราในชุดทดสอบ 2 (ดินปลอดเชื้อ ใส่รา) ของ (ก) ราไอโซเลต PQ5, (ข) ราไอโซเลต A319 ที่เวลา 10 วัน



รูปที่ 4.18 การเจริญของราในชุดทดสอบ 4 (ดินไม่ปลอดเชื้อ ใส่รา) ของ (ก) ราไอโซเลต PQ5, (ข) ราไอโซเลต A319 ที่เวลา 10 วัน

4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่คัดเลือก

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่แสดงประสิทธิภาพในการทนต่อพาราควอตบนอาหารแห้งได้ โดยวิเคราะห์ข้อมูลระดับชีวโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1 และ ITS4 โดยเริ่มจากการนำรา 5 ไอโซเลตที่คัดเลือกไว้ ได้แก่ ไอโซเลต PQ3, PQ5, PQ6, A319 และ P279 มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR) แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลการทดลองพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความยาวอยู่ระหว่าง 500-750 คู่เบส ดังรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS จากปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของราไอโซเลตต่างๆ หมายเลข 1 = PQ3, หมายเลข 2 = PQ5, หมายเลข 3 = PQ6, หมายเลข 4 = A319 และ หมายเลข 5 = P279

เมื่อส่งชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของราได้ผลดังแสดงไว้ในภาคผนวก ง และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของราไอโซเลต PQ3 มีความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ กับ *Nodulisporium* sp. SCAU-F-143 หมายเลขเข้าถึง KF881785.1, ไอโซเลต PQ5 มีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ กับ *Neosartorya fischeri* หมายเลขเข้าถึง AB674772.2, ไอโซเลต PQ6 มีความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ กับ *Hypoxyylon fragiforme* หมายเลขเข้าถึง JN564001.1, ไอโซเลต A319 มีความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ กับ *Phoma* sp. S4S207 หมายเลขเข้าถึง KM516291.1 และไอโซเลต P279 มีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ กับ *Setosphaeria rostrate* หมายเลขเข้าถึง KP340119.1 ดังผลการเทียบที่แสดงไว้ในภาคผนวก ง

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้คัดแยกและศึกษาความสามารถของราที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายพาราควอตซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืชชนิดหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยเริ่มงานวิจัยด้วยการคัดแยกราจากธรรมชาติทั้งจากดิน จากตัวอย่างเห็ด และราจำพวกที่ขึ้นตามซากไม้ ซึ่งราจำพวกนี้มักมีเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายเนื้อไม้ หรือย่อยส่วนของลิกนินที่อยู่ในสภาพกดินนั้นย่อยได้ยากเพราะด้วยโครงสร้างของลิกนินที่มีความซับซ้อนซึ่งเป็นลักษณะแบบโครงสร้างวงแหวน (Breen และ Singleton, 1999) จึงมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับโครงสร้างของลิกนินหรือโครงสร้างวงแหวนเหล่านี้ (Arora และคณะ, 2002; Christopher และคณะ, 2014; De Jong และคณะ, 1992) และเนื่องจากในธรรมชาตินั้นมีสารมลพิษหลากหลายชนิดที่มีโครงสร้างที่เป็นวงแหวนคล้ายลิกนิน (Acevedo และคณะ, 2011; Alexander, 1994; Aust, 1990; Verdin และคณะ, 2005) ด้วยเหตุนี้จึงมีแนวคิดนำมาใช้กับการหาหาที่มีเอนไซม์ในกลุ่มที่ช่วยย่อยสลายเนื้อไม้ซึ่งพบว่า คือเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลติก มาประยุกต์ใช้กับการหาหาสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนซึ่งปนเปื้อนอยู่ในแหล่งต่างๆตามธรรมชาติ แล้วคัดเลือกโดยพิจารณาจากความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งที่มีพาราควอตผสมอยู่ แล้วนำไปทดลองการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลว รวมทั้งการเจริญของรา และการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลติก จากนั้นนำราที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้างต้นไปศึกษาถึงการย่อยพาราควอตในดินรวมทั้งพิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่คัดแยกได้

จากการเก็บตัวอย่างราและการคัดแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ พบว่าได้รา 79 ไอโซเลตที่แยกได้มาจากดินเป็นส่วนใหญ่ เมื่อนำทุกไอโซเลตมาเลี้ยงบนอาหารที่มีส่วนผสมของพาราควอต 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบรา 17 ไอโซเลตมีความสามารถในการทนต่อพาราควอตได้ โดยเป็นราที่แยกได้จากดิน 15 ไอโซเลต และจากตัวอย่างเห็ด 2 ไอโซเลต ซึ่งการที่พบว่าราจากตัวอย่างดินทนพาราควอตได้มากกว่าราที่แยกได้จากตัวอย่างอื่น อาจเป็นเพราะตัวอย่างดินที่นำมาใช้นั้น เป็นดินที่ผ่านการใช้สารกำจัดวัชพืชมา ทำให้ราเหล่านี้ปรับตัวให้ทนต่อพาราควอตได้ดี นอกจากนี้เมื่อนำราที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โดยใช้ ABTS, azure B หรือ phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ในการตรวจสอบการผลิตแลคเคส, ลิกนินเปอร์ออกซิเดส, หรือแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส พบว่ามีราจำนวนหนึ่งที่ไม่พบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้ เมื่อนำราไปทดสอบการเจริญบนอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของพาราควอตจนถึง 0.6 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลต ได้แก่ PQ3, PQ5, PQ6, A319 และ P279 ที่สามารถเจริญได้ ซึ่งการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของพาราควอตแสดง

ให้เห็นว่าความเข้มข้นของพาราควอตส่งผลโดยตรงต่อการเจริญของรา โดยยิ่งความเข้มข้นสูงมากขึ้น จะทำให้ราเจริญได้น้อยลง ทั้งนี้มีรายงานว่าที่ความเข้มข้นของพาราควอตต่ำๆนั้น ราหรือจุลินทรีย์ บางสายพันธุ์อาจใช้พาราควอตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (Ricketts, 1999) แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นจะ ก่อให้เกิดอันตรายกับเซลล์ อันเนื่องมาจากการที่พาราควอตมีสมบัติเป็นสารที่ก่อให้เกิด ROS หรือรี แอคทีฟออกซิเจนภายในเซลล์ กระตุ้นให้เซลล์เกิดความเครียด (Angelova และคณะ, 2005) และทำ ให้เซลล์เกิดความเสียหายมากขึ้น การทดลองในขั้นนี้จึงแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการทนต่อ พาราควอตของราที่คัดแยกได้ แต่อย่างไรก็ตามการทนต่อพาราควอตบนอาหารแข็ง ก็ยังไม่สามารถ บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการย่อยสลายพาราควอตได้ จึงมีการทดลองขั้นต่อมาคือ การทดสอบ ความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลวที่ความเข้มข้นต่างๆ และพบว่าในชุดทดสอบ ราไอโซเลต PQ3 ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีพาราควอตผสมอยู่ได้ สามารถเจริญได้แค่ในชุดควบคุม ที่ไม่มีพาราควอตเท่านั้น แตกต่างกับผลการทดลองบนอาหารแข็ง และที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นคือสูงถึง 0.04 เปอร์เซ็นต์แทบไม่พบการเจริญของราในแต่ละไอโซเลต จึงเป็นสิ่งที่บ่งบอกได้ว่า ความเข้มข้น พาราควอตที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลต่อการเจริญของราทุกๆไอโซเลต และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญบนอาหาร กับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลิติกบนอาหารแข็ง พบว่ารา 5 ไอโซเลต ที่นำมา ศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อย่างน้อย 1 ชนิดหรือมากกว่า บ่งบอกว่าเอนไซม์เหล่านี้ อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการย่อยพาราควอต แต่อย่างไรก็ตามมีราจำนวนมากที่ไม่พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ ใดๆ แต่สามารถทนต่อความเข้มข้นของพาราควอตที่สูงขึ้นได้ อาจเป็นไปได้ว่าการทนต่อพาราควอตเกิด จากการทำงานของเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น P450 โมโนออกซิจีเนส, ซุปเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเทส และ คคะเตเลส เป็นต้น (Jaszek และคณะ, 2006) นอกจากนี้ จะเห็นว่ามีราบางไอโซเลตที่มีความสามารถ ในการผลิตเอนไซม์แต่กลับไม่มีความสามารถในการทนพาราควอตมากกว่า 0.3 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจ เป็นกลุ่มของราที่มีรายงานว่าไม่พบความเกี่ยวข้องกันระหว่างการย่อยสลายพาราควอตกับกิจกรรม ของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลิติก (Bending และคณะ, 2002)

อย่างไรก็ตาม มีรายงานโดย Zhao และคณะ (2009a) ที่ศึกษาถึงผลของพาราควอตต่อการ ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลิติก และพบว่ามีความสัมพันธ์กัน กล่าวคือ เมื่อเติมสารละลายพารา ควอตลงไปในการเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของ *C. versicolor* อยู่ พาราควอตจะเหนี่ยวนำให้กิจกรรม ของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโพลิติกเพิ่มสูงขึ้น ทั้งแลคเคส, ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ ออกซิเดส และนอกจากนี้ยังพบว่ามีการทำงานของซุปเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเทสและคคะเตเลสซึ่งเป็นกลุ่ม เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นกลไกการป้องกันความเสียหายของเซลล์จากการทำปฏิกิริยาที่เกิดจาก reactive oxygen species (ROS) อีกด้วย

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา 5 ไอโซเลตดังกล่าวซึ่งได้แก่ PQ3, PQ5, PQ6, A319 และ P279 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับราต่างๆ ได้แก่ *Nodulisporium* sp., *Neosartorya fischeri*, *Hypoxyton fragiforme*, *Phoma* sp. และ *Setosphaeria rostrate* ตามลำดับ ที่ระดับความเหมือน 99-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการย่อยพาราควอตในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาการย่อยพาราควอตในอาหารเหลวพบว่าราไอโซเลต PQ3 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Nodulisporium* sp. SCAU-F-143 (GenBank: KF881785.1) ไม่สามารถเจริญในอาหารเหลวที่มีพาราควอตได้เลย ทำให้ไม่พบการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลว รวมทั้งการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินไลติกด้วย *Nodulisporium* sp. เป็นราที่อยู่ในคลาส Sordariomycetes ในไฟลัม Ascomycota ที่มักพบได้ในธรรมชาติโดยเป็นเอนโดไฟต์ที่อยู่ร่วมกับพืชโดยไม่ทำให้พืชแสดงอาการของโรคและสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด (Dai และคณะ, 2006) ราในกลุ่มนี้ยังเป็นที่สนใจในแง่ที่มีรายงานถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเนื้อไม้ ดังงานวิจัยของ Nsolomo และคณะ (2000) ที่ศึกษาความสามารถของราที่คัดแยกได้จากเนื้อไม้จากต้น *Ocotea* และพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 4 เดือน *Nodulisporium* sp. สามารถย่อยสลายเนื้อไม้จากต้น *Ocotea* ได้ 2 เปอร์เซ็นต์ และพบกิจกรรมของแลคเคสระหว่างการย่อยสลายด้วย นอกจากนี้รากลุ่มนี้มียางานว่ามีประสิทธิภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญของราก่อโรคซึ่งเป็นสารระเหย (volatile organic compound, VOC) เช่น งานวิจัยของ Park และคณะ (2010) พบว่า *Nodulisporium* sp. CF016 ซึ่งเป็นราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นอบเชยมีการผลิตสารระเหยที่สามารถใช้ควบคุมการก่อโรคของ *Botrytis cinerea* ซึ่งเป็นราก่อโรค gray mold ที่เกิดหลังการเก็บเกี่ยวผลไม้ และโรคของ *Penicillium expansum* ซึ่งก่อโรค blue mold ของแอปเปิ้ล โดยสามารถยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิด

เมื่อพิจารณาการย่อยพาราควอตในอาหารเหลวพบว่าราไอโซเลต PQ5 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Neosartorya fischeri* (GenBank: AB674772.2) สามารถย่อยพาราควอตได้สูงที่สุดโดยพาราควอตที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพาราควอตเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณลดลงเหลือ 89.47 เปอร์เซ็นต์ และเหลือเพียง 70.91 เปอร์เซ็นต์ และ 62.80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 20 และ 30 วันตามลำดับ *N. fischeri* เป็นชื่อในระยะอาศัยเพศ (teleomorph) ของ *Aspergillus fischerianus* (Nielsen และคณะ, 1988) จัดเป็นราในไฟลัม Ascomycota ซึ่งราชนิดนี้ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลาย พบได้ตามธรรมชาติ โดยมีรายงานความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลซับซ้อน (recalcitrant material) เช่น ถ่านหิน สารปิโตรเลียมได้โดยอาศัยการทำงานของแลคเคส (Uribe-Alvarez และคณะ, 2011) ขณะที่ Hernández-López และคณะ

(2016) ได้รายงานความสามารถของ *N. fischeri* ในการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ และพบว่าการเปลี่ยนรูปของสารที่เกิดขึ้นนั้นเกิดผ่านการทำงานของระบบเอนไซม์ฟลาวิโนคอนเทนนิ่งโมโนออกซิจีเนส (Flavin-containing monooxygenase system) และสรุปว่าไซโตโครม P450 มีส่วนสำคัญในการเปลี่ยนรูปสารประกอบดังกล่าว นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้ *Aspergillus* sp. ในการย่อยสลายสารพิษชนิดต่างๆมากมาย และพบว่ารากลุ่มนี้มีความสามารถในการทนต่อสารพิษได้ดี รวมทั้งพาราควอตด้วย ดังเช่นงานวิจัยของ Ratanagreetakul และคณะ (1991) ได้คัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชพาราควอตและอะทราซีน โดยแยกจากดินบริเวณไร่อ้อย พบว่า *Aspergillus niger* และ *Penicillium* spp. 4 ไอโซเลต มีความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตได้ โดยเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน พบว่าพาราควอตลดลง 20.64, 17.67, 24.63, 21.14, และ 14.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นราไอโซเลต PQ5 นอกจากจะสามารถย่อยสลายพาราควอตจากทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลติกและกลุ่มเอนไซม์ไซโตโครม P450 แล้ว อาจจะสามารถย่อยสลายสารพิษกลุ่มอื่นได้อีกด้วย

ราไอโซเลต PQ6 มีความคล้ายคลึงกับ *Hypoxyylon fragiforme* (GenBank: JN564001.1) ราชชนิดนี้เป็นราในแฟมิลี Xylariaceae ราที่อยู่ในคลาส Sordariomycetes ในไฟลัม Ascomycota เป็นราที่มักพบในธรรมชาติทั้งในภาวะเอนโดไฟต์ที่อยู่ร่วมกับพืชและผู้ย่อยสลาย (saprophyte) ราในกลุ่มนี้เป็นที่สนใจในแง่ที่มีรายงานถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเนื้อไม้ ซึ่งมักมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลติก (Qi-He และคณะ, 2011) เมื่อพิจารณาการย่อยพาราควอตในอาหารเหลวพบว่าราไอโซเลต PQ6 สามารถทนต่อความเข้มข้นพาราควอตในระดับ 0.02 เปอร์เซ็นต์ คือเราสามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มีพาราควอตเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณพาราควอตกลับเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากเส้นใยมีความสามารถในการดูดซับพาราควอตในระยะแรกและหลุดออกมาเมื่อเวลาผ่านไป ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Ulčnik และคณะ (2012) ที่ศึกษาความสามารถของรา 4 ชนิด คือ *Trametes versicolor*, *H. fragiforme*, *Chondrostereum purpureum*, และ *Pleurotus ostreatus* ในการย่อยสลายลินเดน (lindane) ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดแมลงประเภทออร์แกโนคลอรีน พบว่าราทั้ง 4 ชนิด มีความสามารถในการย่อยสลายลินเดนได้ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลา 21 วัน แต่หลังจาก 21 วันแล้วพบว่าปริมาณลินเดนในอาหารเลี้ยงเชื้อของราบางชนิดกลับไม่ลดลง ซึ่งการลดลงของลินเดนในช่วงแรกนั้นเกิดจากการดูดซับของรา และเมื่อถึงจุดหนึ่งราไม่สามารถดูดซับได้อีกต่อไป

กรณีการดูดซับพาราควอตของรานั้น กลไกการดูดซับเป็นการสะสมสารพิษไว้บนเส้นใยของรา โดยเฉพาะราในกลุ่มที่สร้าง sporocarp ที่พบว่าเส้นใยของรากลุ่มนี้มักมีความสามารถในการ

สะสมสารพิษได้ในปริมาณสูง โดยประสิทธิภาพการดูดซับนั้นจะขึ้นกับองค์ประกอบของไคตินบนเส้นใย โดยมีรายงานว่ารากกลุ่มนี้มีสมบัติในการจับกับหมู่ฟังก์ชันต่างๆ เช่น หมู่คาร์บอกซิล หมู่เอมีน ได้ ซึ่งสมบัตินี้ทำให้กลไกการดูดซับและสะสมสารพิษไว้บนเส้นใยเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว (Campos และคณะ, 2009) นอกจากนี้งานวิจัยของ Smith และ Lyon (1976) พบว่าการสะสมของพาราควอตในเส้นใยของรามีมีความเกี่ยวข้องกับความเร็วต่อพาราควอต โดยราที่ไวต่อพาราควอตมากกว่าจะมีความสามารถในการดูดซับพาราควอตเข้ามาสะสมในเส้นใยได้มากกว่า ซึ่งในกรณีที่พาราควอตลดลงจากกลไกการดูดซับนี้ มีข้อดีในแง่ที่เป็นการรวมพาราควอตที่กระจายในธรรมชาติมาไว้บนเส้นใยรา และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่ออาศัยกลไกอื่นมาทำให้พาราควอตลดลงต่อไป

เมื่อพิจารณาการย่อยพาราควอตในอาหารเหลวพบว่าราไอโซเลต A319 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Phoma* sp. S4S207 (GenBank: KM516291.1) มีความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตได้ ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน ปริมาณพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเหลือเพียง 62.74 เปอร์เซ็นต์ และ 84.08 เปอร์เซ็นต์ ในชุดทดสอบที่มีปริมาณพาราควอตเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยการย่อยสลายของพาราควอตสัมพันธ์กับการเจริญของรา เมื่อความเข้มข้นไม่เกิน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ราสามารถเจริญได้ แต่เมื่อความเข้มข้นมากขึ้นกลับไม่พบการเจริญของรา *Phoma* จัดอยู่ในคลาส Dothideomycetes ในไฟลัม Ascomycota เป็นราที่พบได้ทั่วไปในดิน มีลักษณะเส้นใยสีดำ หลากหลายสีสัเป็นราก่อโรคพืช มักพบว่าจะอยู่ตามส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ ราก ใบ ลำต้นใต้ดิน เป็นต้น (Yang และคณะ, 1994) นอกจากนี้มีรายงานว่าหลายสปีชีส์มีบทบาทเป็นราที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth-promoting fungi) และเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชโดยชีวภาพ (Saldajeno และคณะ, 2012) เช่นกัน งานวิจัยของ Libardi Junior และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตแลคเคสของ *Phoma* sp. โดยใช้เปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่าแลคเคสที่ผลิตได้มีความเสถียรทั้งต่ออุณหภูมิและ pH นอกจากนี้แลคเคสที่ได้ยังสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลและ endocrine disruptor ได้อีกด้วย ในกรณีของไอโซเลต A319 ซึ่งคล้ายกับ *Phoma* sp. S4S207 นั้น พบว่าค่าของกิจกรรมแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นอย่างมากในชุดการทดลองที่พบการเจริญของราสูงสุดและเปอร์เซ็นต์การลดลงของพาราควอตมีมากที่สุด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าพาราควอตมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ในกลุ่มนี้เพิ่มขึ้นหลังจากถูกกระตุ้น

เมื่อพิจารณาการย่อยพาราควอตในอาหารเหลวพบว่าราไอโซเลต P279 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Setosphaeria rostrate* (GenBank: KP340119.1) สามารถย่อยพาราควอตให้ลดลงได้ในช่วงแรกของการเจริญ แต่เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณพาราควอตกลับเพิ่มขึ้นในภายหลัง ซึ่งอาจเกิดจากการดูดซับและการหลุดออกจากผนังเซลล์ของราเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้สำหรับราไอโซเลต PQ6 ข้างต้น *S. rostrate* พบได้ทั่วไปในดิน เป็นราก่อโรคพืช เช่น โรคใบจุดและโรครากเน่า (Wu และ

Turgeon, 2013) *S. rostrata* เป็นราที่ทนร้อนได้ดี (thermophilic) มีอีกชื่อหนึ่งคือ *Exserohilum rostratum* ซึ่งมีรายงานว่ามีความสามารถในการผลิตเซลลูเลส อะไมเลส การย่อยสลายน้ำยางจากยางพาราและสีย้อมสังเคราะห์ได้ (Ismail และคณะ, 2013; Nikhath และคณะ, 2000) ในทางอนุกรมวิธานจัดเป็นราที่อยู่ในไฟลัม Ascomycota

เมื่อพิจารณาการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลิติกของราแต่ละไอโซเลตระหว่างการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและการย่อยพาราควอตในอาหารเหลว พบว่า มีความแตกต่างกันในบางชนิดของเอนไซม์ เช่น ในราไอโซเลต PQ6 พบว่าให้ผลบวกกับ azure B แต่กลับไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารเหลว ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีของสารทดสอบ azure B ในรากลุ่มไวท์รอตแต่ละสายพันธุ์อาจเกิดได้จากเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ตามที่งานวิจัยของ Svobodová และคณะ (2006) พบว่าราบางสายพันธุ์ไม่ผลิตลิกนินเปอร์ออกซิเดส แต่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ azure B ซึ่งเกิดจากการทำงานของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสหรือเกิดจากแลคเคส

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลิติกในระหว่างการย่อยพาราควอตในอาหารเหลวนั้น พบว่าราทั้ง 4 ชนิด คือ PQ5, PQ6, A319 และ P279 มีการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์คือ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส ในช่วงที่มีการลดลงของพาราควอต แต่ในบางภาวะเช่น ในชุดทดลองของราไอโซเลต PQ5 ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพาราควอตเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าการเจริญของราเกิดได้น้อยมาก แต่ยังสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ได้อย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ในชุดทดสอบที่พบการเจริญของราตามปกติ ซึ่งในภาวะเช่นนี้แทบไม่พบการลดลงของพาราควอตเลย ถึงแม้จะตรวจพบกิจกรรมของแลคเคสก็ตาม จากข้อมูลข้างต้นนี้พอจะสรุปได้ว่า การลดลงของพาราควอตนั้น ขึ้นอยู่กับการเจริญของราเป็นสำคัญ โดยไม่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของลิกนินโกลิติกเอนไซม์ แต่อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการดูดซับหรือกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มอื่น (Smith และคณะ, 1976; Zhao และคณะ, 2009a)

รา 5 ไอโซเลตที่ได้จากการทดลองนี้ ซึ่งได้แก่ PQ3, PQ5, PQ6, A319 และ P279 ล้วนแยกได้จากตัวอย่างดินทั้งสิ้น บ่งบอกว่าเชื้อในดินมีแนวโน้มในการทนต่อความเข้มข้นของพาราควอตได้มากกว่าเชื้อที่แยกจากตัวอย่างเห็ดหรือซากไม้ ทั้งนี้เนื่องมาจากพาราควอตเป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้อย่างแพร่หลาย และใช้ในพื้นที่เพาะปลูกพืชไร่ หรือพืชสวนได้โดยทั่วไป และดินที่เก็บตัวอย่างมาก็เป็นดินที่ผ่านการใช้สารกำจัดวัชพืชมาแล้ว นอกจากนี้ยังพบว่าการแยกและคัดเลือกราที่สามารถย่อยสลายพาราควอตด้วยวิธี enrichment ทำให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพาราควอตได้ดีและตรงกับความต้องการได้มากกว่าเทคนิค soil dilution ดังเช่น ราไอโซเลต PQ5 ซึ่งมีประสิทธิภาพดี ก็แยกได้จากดินโดยเทคนิค enrichment

ราที่ใช้ในการทดลองย่อยพาราควอตในดิน คือไอโซเลต PQ5 และ A319 โดยเลือกโดยการพิจารณาจากความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตในอาหารเหลวซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด และมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้在地หรือในสิ่งแวดล้อมจริงๆ จากการทดลองพบว่าราไอโซเลต PQ5 สามารถเจริญได้ดีในทั้งสองชุดทดสอบ และพบว่าในชุดที่ใช้ดินปลอดเชื้อราสามารถย่อยสลายพาราควอตได้ดี และดีกว่าในชุดที่เป็นดินไม่ปลอดเชื้อ และเมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุมกับชุดทดสอบที่เป็นดินไม่ปลอดเชื้อทั้งคู่ กลับพบว่าในชุดควบคุมมีปริมาณการลดลงของพาราควอตสูงกว่าในระยะเวลาที่เท่ากัน แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ว่าจะมีความสามารถในการย่อยสลายพาราควอตได้ แต่หากจะนำไปใช้ในสถานที่จริง จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมให้มากขึ้นในส่วนของกลไกในการย่อยสลายพาราควอต เช่นระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพาราควอต ซึ่งจากการทดลองไม่พบความเกี่ยวข้องของกิจกรรมของลิกนินโกลิติกเอนไซม์ของเรา จึงควรทดสอบความเกี่ยวข้องของเอนไซม์กลุ่มอื่น เช่น ไฮโดรโคโรม P450 ซึ่งเป็นระบบเอนไซม์อีกกลุ่มที่มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องในระหว่างการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชหลายชนิด (da Silva Coelho-Moreira และคณะ, 2013) ในหลายๆงานวิจัยมักใช้วิธีการเติมสารยับยั้ง (cytochrome P450 inhibitor) เช่น ไพเพอร์โรนิล บิวท็อกไซด์ (piperonyl butoxide) และ 1-อะมิโนเบนโซโทรอะโซล (1-aminobenzotriazole) เพื่อตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ เช่น งานวิจัยของ Hiratsuka และคณะ (2001) ที่ศึกษาความสามารถของราไวท์รอต *C. versicolor* ในการย่อยสลาย chloronitrofen และ nitrofen ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืช จากการทดลองพบว่าไฮโดรโคโรม P450 มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารทั้งสองชนิด ตรวจสอบโดยใช้สารยับยั้งการทำงานของไฮโดรโคโรม P450 คือ piperonyl butoxide โดยไม่พบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลาย chloronitrofen และ nitrofen ในชุดทดลองที่มีการใส่สารยับยั้งลงไป ในขณะที่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลิติกทั้งแลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และจากงานวิจัยของ Xiao และคณะ (2011) ที่ศึกษาการย่อยสลายคลอร์เดน (chlordane) ซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชชนิดออร์แกโนคลอรีน โดยราไวท์รอต *Phlebia lindtneri*, *Phlebia brevispora* และ *Phlebia aurea* พบว่าราที่มีความสามารถในการย่อยสลายคลอร์เดนผ่านระบบเอนไซม์ไฮโดรโคโรม P450 นอกจากนี้ภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายพาราควอตในดินก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยจากการศึกษาพฤติกรรมของพาราควอตในดินพบว่า ขึ้นกับหลายๆปัจจัย ทั้งทางกายภาพ เช่น การยึดกับอนุภาคดิน ความสามารถในการละลายน้ำ การสลายโดยแสงแดด ปัจจัยทางเคมี เช่น การสะสมของไอออนของธาตุบางชนิด ความเป็นกรดเบส และปัจจัยทางชีวภาพ คือเกิดจากการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในดิน (ทศพล พรพรหม, 2554) ดังนั้นการนำราที่แยกได้ไปใช้ในสภาพธรรมชาติจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมสำหรับปัจจัยที่ส่งผลต่อการสลายพาราควอตเหล่านี้ที่สัมพันธ์กับรา ส่วนกรณีของราไอโซเลต A319 พบว่าในชุดทดสอบที่มีดินไม่ปลอดเชื้อ ราไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งอาจเกิดจากการที่ราไอโซเลต A319 ไม่สามารถทนต่อภาวะต่างๆในดินที่มีเชื้อจากธรรมชาติปะปนอยู่ได้

เนื่องจากผลการทดลองในอาหารเหลวพบว่า รามีความสามารถในการย่อยสลายพาราควอต แต่เมื่อมาทดลองในดินหรือในธรรมชาติจริงกลับพบว่าผลการทดลองไม่สอดคล้องกัน ด้วยปัจจัยต่างๆ ในธรรมชาติ ทำให้ยังไม่ได้ผลที่ต้องการ แต่ก็เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยที่ต้องการแยกราที่มีความสามารถในการย่อยสลายพาราควอต โดยราที่แยกได้เป็นกลุ่มราที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่า สามารถย่อยสลายพาราควอตได้ จากการทดลองทั้งหมดพบว่าราแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นพาราควอตต่างกัน ไอโซเลตที่คัดเลือกมาใช้ทดลองในดิน เช่น *Neosartorya fischeri* PQ5 สามารถทนต่อพาราควอตได้มาก ขึ้นต่อไปอาจต้องศึกษาต่อถึงกลไกหรือเอนไซม์ที่มีผลต่อการย่อยสลายพาราควอตของราที่ทำให้พาราควอตลดลงได้ และศึกษาการผลิตเอนไซม์ของราเพื่อทดลองนำไปใช้จริง และในส่วนของ *Phoma* sp. A319 ที่ถึงแม้ว่าผลที่ได้จากการย่อยสลายพาราควอตยังไม่ดีนัก แต่ก็พบว่ารามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ซึ่งหากในดินตัวอย่างไม่มีจุลินทรีย์ที่ยับยั้งการทำงานของ *Phoma* sp. A319 ก็อาจเห็นผลการย่อยสลายพาราควอตได้ชัดเจนยิ่งขึ้น นอกจากนี้ ราที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้ที่สามารถเจริญได้ในพาราควอต โดยเฉพาะกลุ่มที่ไม่ผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนินโพลติก ยังเป็นกลุ่มที่น่าจะมีศักยภาพในการบำบัดพาราควอตได้และควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

รายการอ้างอิง

- Acevedo, F., Pizzul, L., Castillo, M. d. P., Cuevas, R., Diez, M. C., 2011. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthraco-phyl-lum discolor*. *Journal of Hazardous Materials* 185, 212-219.
- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., Ehinomen, I., 2015. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: A review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation* 3, 28-39.
- Adenipekun, C. O., Lawal, R., 2012. Uses of mushrooms in bioremediation: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 7, 62-68.
- Alexander, M., 1994. *Biodegradation and Bioremediation*, 2 ed. Academic press, San Diego.
- Alfarra, H. Y., Hasali, N. H. M., Omar, M. N., 2013. A lignolytic fungi with laccase activity isolated from Malaysian local environment for phytochemical transformation purposes. *International Research Journal of Biological Sciences* 2, 51-54.
- Amondham, W., Parkpian, P., Polprasert, C., DeLaune, R. D., Jugsujinda, A., 2006. Paraquat adsorption, degradation, and remobilization in tropical soils of Thailand. *Journal of environmental science and health. Part B.* 41, 485-507.
- Ang, T. N., Ngho, G. C., Chua, A. S. M., 2011. A quantitative method for fungal ligninolytic enzyme screening studies. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 6, 589-595.
- Angelova, M. B., Pashova, S. B., Spasova, B. K., Vassilev, S. V., Slokoska, L. S., 2005. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycological Research* 109, 150-158.
- Archibald, F. S., 1992. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3110-3116.
- Arora, D. S., Chander, M., Gill, P. K., 2002. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation* 50, 115-120.

- Ashoka, G., Geetha, M.S., Sullia, S.B., 2002. Bioleaching of composite textile dye effluent using bacteria consortia. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences* 4, 65-68.
- Assavanig, A., Amornikitticharoen, B., Ekpaisal, N., Meevootisom, V., Flegel, T.W., 1992. Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 198-202.
- Aust, S. D. , 1990. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbial Ecology* 20, 197-209.
- Bending, G.D., Friloux, M., Walker, A., 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters* 212, 59-63.
- Boopathy, R. , 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74, 63-67.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267, 99-102.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Breen, A., Singleton, F.L., 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 252-258.
- Briceño, G., Palma, G., Durán, N., 2007. Influence of organic amendment on the biodegradation and movement of pesticides. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 37, 233-271.
- Bromilow, R.H., 2004. Paraquat and sustainable agriculture. *Pest Management Science* 60, 340-349.
- Burns, R.G., Audus, L.J., 1970. Distribution and breakdown of paraquat in soil *Weed Research* 10, 49-58.
- Campos, J.A., Tejera, N.A., Sánchez, C.J., 2009. Substrate role in the accumulation of heavy metals in sporocarps of wild fungi. *BioMetals* 22, 835-841.
- Carr, R.J., Bilton, R.F., Atkinson, T., 1985. Mechanism of biodegradation of paraquat by *Lipomyces starkeyi*. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1290-1294.

- Castro, J.V., Peralba, M.C.R., Ayub, M.A.Z., 2007. Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform shaker and batch bioreactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 42, 883-886.
- Christopher, L.P., Yao, B., Ji, Y., 2014. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in Energy Research* 2, 1-13.
- Cocenza, D.S., de Moraes, M.A., Beppu, M.M., Fraceto, L.F., 2012. Use of biopolymeric membranes for adsorption of paraquat herbicide from water. *Water, Air, & Soil Pollution* 223, 3093-3104.
- Costello, S., Cockburn, M., Bronstein, J., Zhang, X., Ritz, B., 2009. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *American Journal of Epidemiology* 169, 919-926.
- Čvančarová, M., Křesinová, Z., Filipová, A., Covino, S., Cajthaml, T., 2012. Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere* 88, 1317-1323.
- da Silva Coelho-Moreira, J., Maciel, G.M., Castoldi, R., da Silva Mariano, S., Inácio, F.D., Bracht, A., Peralta, R.M., 2013. Involvement of lignin-modifying enzymes in the degradation of herbicides, in: Andrew, J., Jessica, A. (Eds.), *Herbicides-Advances in Research*. InTechOpen, pp. 166-187.
- da Silva Coelho, J., de Oliveira, A.L., Marques de Souza, C.G., Bracht, A., Peralta, R.M., 2010. Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64, 156-161.
- Dai, J., Krohn, K., Flörke, U., Draeger, S., Schulz, B., Kiss-Szikszai, A., Antus, S., Kurtán, T., van Ree, T., 2006. Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*. *European Journal of Organic Chemistry* 25, 3498-3506.
- Das, A.C., Dey, S., 2012. Effect of herbicides on microbial biomass in relation to availability of plant nutrients in soil. *Journal of Crop and Weed* 8, 129-132.
- De Jong, E., De Vries, F.P., Field, J.A., van der Zwan, R.P., de Bont, J.A.M., 1992. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity. *Mycological Research* 96, 1098-1104.

- de Koker, T.H., Zhao, J., Allsop, S.F., Janse, B.J.H., 2000. Isolation and enzymic characterisation of South African white-rot fungi. *Mycological Research* 104, 820-824.
- Dhaouadi, A., Adhoum, N., 2009. Degradation of paraquat herbicide by electrochemical advanced oxidation methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 637, 33-42.
- Dinis-Oliveira, R.J., Duarte, J.A., Sánchez-Navarro, A., Remião, F., Bastos, M.L., Carvalho, F., 2008. Paraquat poisonings: Mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. *Critical Reviews in Toxicology* 38, 13-71.
- Ecobichon, D.J., 2001. Pesticide use in developing countries. *Toxicology* 160, 27-33.
- Evans, C.S., Hedger, J.N., Evans, C.S., Hedger, J.N., 2001. Degradation of plant cell wall polymers: Fungi in Bioremediation. Cambridge University Press.
- FAO, FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Paraquat08.pdf, 13 มีนาคม 2559.
- Fragoero, S., 2005. Use of fungi in bioremediation of pesticides, Applied Mycology Group Institute of Bioscience and Technology. Cranfield University, p. 241.
- Franssen, M.C.R., Steunenbergh, P., Scott, E.L., Zuilhof, H., Sanders, J.P.M., 2013. Immobilised enzymes in biorenewables production. *Chemical Society Reviews* 42, 6491-6533.
- Fuke, C., Arai, T., Morinaga, Y., Takaesu, H., Ameno, K., Miyazaki, T., 2002. Analysis of paraquat, diquat and two diquat metabolites in biological materials by high-performance liquid chromatography. *Legal Medicine* 4, 156-163.
- Funderburk, J.H.H., 1988. Diquat and paraquat, in: Kearney, P.C., Kaufman, D.D. (Eds.), *Herbicides: Chemistry, degradation, and mode of action*. Marcel Dekker, New York, pp. 283-298.
- Gadd, G.M., 2001. *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press, Cambridge
- Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118.

- Hamadi, N.K., Sri, S., Chen, X.D., 2004. Adsorption of paraquat dichloride from aqueous solution by activated carbon derived from used tires. *Journal of Hazardous Materials* 112, 133-141.
- Hao, J., Song, F., Huang, F., Yang, C., Zhang, Z., Zheng, Y., Tian, X., 2006. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34, 233-240.
- Hatakka, A., 2005. Biodegradation of lignin, *Biopolymers Online*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M., Szewzyk, U., 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2788-2793.
- Hernández-López, E.L., Perezgasga, L., Huerta-Saquero, A., Mouriño-Pérez, R., Vazquez-Duhalt, R., 2016. Biotransformation of petroleum asphaltene and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Neosartorya fischeri*. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 10773-10784.
- Hiratsuka, N., Wariishi, H., Tanaka, H., 2001. Degradation of diphenyl ether herbicides by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 563-571.
- Hofrichter, M., 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30, 454-466.
- Iimura, Y., Ikeda, S., Sonoki, T., Hayakawa, T., Kajita, S., Kimbara, K., Tatsumi, K., Katayama, Y., 2002. Expression of a gene for Mn-peroxidase from *Coriolus versicolor* in transgenic tobacco generates potential tools for phytoremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 246-251.
- Ismail, M.A., Mohamed, N.H., Shoreit, A.A.M., 2013. Degradation of *Ficus elastica* rubber latex by *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* and *Myceliophthora thermophila*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 78, 82-88.
- Jaszek, M., Grzywnowicz, K., Malarczyk, E., Leonowicz, A., 2006. Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes*

- versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat- caused oxidative stress conditions. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85, 147-154.
- Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F., Zeikus, J.G., 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology* 117, 277-285.
- Kuwahara, M. , Glenn, J. K. , Morgan, M. A. , Gold, M. H. , 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidase from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium* *FEBS Letters* 169, 247-250.
- Libardi Junior, N., Gern, R.M.M., Furlan, S.A., Schlosser, D., 2012. Laccase production by the aquatic Ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03 and the white rot Basidiomycete *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 during submerged cultivation on banana peels and enzyme applicability for the removal of endocrine-disrupting chemicals. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, 1144-1156.
- Maalej-Kammoun, M. , Zouari-Mechichi, H. , Belbahri, L. , Woodward, S. , Mechichi, T. , 2009. Malachite green decolourization and detoxification by the laccase from a newly isolated strain of *Trametes* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 600-606.
- Madhavi, V., Lele, S.S., 2009. Laccase: Properties and applications. *BioResources* 4, 1694-1713.
- Malik, A. , Grohmann, E. , 2012. Environmental protection strategies for sustainable development. Springer Netherlands.
- Matsubara, M. , Lynch, J.M. , De Leij, F.A.A.M. , 2006. A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1365-1372.
- Mohamed, I.A.A., 2012. Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Microbiology Research* 6, 3783-3790.
- Morozova, O. V. , Shumakovich, G. P. , Gorbacheva, M. A. , Shleev, S. V. , Yaropolov, A. I. , 2007. "Blue" laccases. *Biochemistry. Biokhimiia* 72, 1136-1150.
- Murray, R.E. , Gibson, J.E. , 1972. A comparative study of paraquat intoxication in rats, guinea pigs and monkeys. *Experimental and Molecular Pathology* 17, 317-325.

- Murugesan, K., Nam, I.-H., Kim, Y.-M., Chang, Y.-S., 2007. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1662-1672.
- Nielsen, P.V., Beuchat, L.R., Frisvad, J.C., 1988. Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1504-1510.
- Nikhath, K., Seshikala, D., Charya, M.A.S., 2000. Decolourisation of textile dyes by fungi. *Indian Journal of Microbiology* 40, 191-197.
- Nsolomo, v.r., Venn, K., Solheim, H., 2000. The ability of some fungi to cause decay in the East African camphor tree, *Ocotea usambarensis*. *Mycological Research* 104, 1473-1479.
- Pan, L., LoBrutto, R., Kazakevich, Y.V., Thompson, R., 2004. Influence of inorganic mobile phase additives on the retention, efficiency and peak symmetry of protonated basic compounds in reversed- phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A* 1049, 63-73.
- PANAP, Paraquat, <http://www.panap.net/sites/default/files/pesticides-factsheet-hhps-paraquat.pdf>, 1 พฤศจิกายน 2559.
- Park, M.-S., Ahn, J.-Y., Choi, G.-J., Choi, Y.-H., Jang, K.-S., Kim, J.-C., 2010. Potential of the volatile-producing fungus *Nodulisporium* sp. CF016 for the control of postharvest diseases of apple. *The Plant Pathology Journal* 26, 253-259.
- Pataranawatab, P., Kitkaewab, D., Suppaudomab, K., 2012. Paraquat contaminations in the Chanthaburi river and vicinity areas, Chanthaburi province, Thailand. *Journal of Science, Technology and Humanities* 10, 17-24.
- Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.-S., Yao, Q.-H., 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 927-955.
- Peng, X., Huang, J., Liu, C., Xiang, Z., Zhou, J., Zhong, G., 2012. Biodegradation of bensulphuron-methyl by a novel *Penicillium pinophilum* strain, BP-H-02. *Journal of Hazardous Materials* 213-214, 216-221.
- Perelo, L.W., 2010. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials* 177, 81-89.

- Pointing, S., 1999. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity* 2, 17-33.
- Purnomo, A.S., Putra, S.R., Shimizu, K., Kondo, R., 2014. Biodegradation of heptachlor and heptachlor epoxide- contaminated soils by white- rot fungal inocula. *Environmental Science and Pollution Research International* 21, 11305-11312.
- Qi-He, C., Krügener, S., Hirth, T., Rupp, S., Zibek, S., 2011. Co-cultured production of lignin- modifying enzymes with white- rot fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165, 700-718.
- Qian, H., Chen, W., Sun, L., Jin, Y., Liu, W., Fu, Z., 2009. Inhibitory effects of paraquat on photosynthesis and the response to oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology* 18, 537-543.
- Ratanagreetakul, C., Wicharn, S., Korpraditskul, V., 1991. Biodegradation of herbicide in sugarcane field by soil microorganisms. *Kasetsart* 25, 63-68.
- Ravelet, C., Krivobok, S., Sage, L., Steiman, R., 2000. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere* 40, 557-563.
- Ricketts, D.C., 1999. The microbial biodegradation of paraquat in soil. *Pesticide Science* 55, 596-598.
- Roberts, T.R., Dyson, J.S., Lane, M.C.G., 2002. Deactivation of the biological activity of paraquat in the soil environment: A review of long-term environmental fate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3623-3631.
- Rodrigues, G. N., Alvarenga, N., Vacondio, B., de Vasconcellos, S. P., Passarini, M. R. Z., Selegim, M.H.R., Porto, A.L.M., 2016. Biotransformation of methyl parathion by marine-derived fungi isolated from ascidian *Didemnum ligulum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 7, 24-30.
- Rouillon, R., Poulain, C., Bastride, J., Coste, C.M., 1989. Degradation of herbicide chlorpropham by some ectomycorrhiza fungi in pure culture. *Agriculture, Ecosystem and Environment* 28, 421-424.
- Safaei Asl, A., Dadashzadeh, P., 2016. Acute kidney injury in patients with paraquat intoxication; a case report and review of the literature. *Journal of Renal Injury Prevention* 5, 203-206.

- Saldajeno, M.G.B., Ito, M., Hyakumachi, M., 2012. Interaction between the plant growth-promoting fungus *Phoma* sp. GS8-2 and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: Impact on biocontrol of soil-borne diseases, microbial population, and plant growth. *Australasian Plant Pathology* 41, 271-281.
- Schoemaker, H.E., Piontek, K., 1996. On the interaction of lignin peroxidase with lignin. *Pure and Applied Chemistry* 68, 2089-2096.
- Singh, B., Singh, K., 2014. Microbial degradation of herbicides. *Critical Reviews in Microbiology* 27, 1-17.
- Smith, S.N., Lyon, A.J.E., 1976. The uptake of paraquat by soil fungi. *The New Phytologist* 76, 479-484.
- Smith, S.N., Lyon, A.J.E., Sahid, I.B., 1976. The breakdown of paraquat and diquat by soil fungi. *New Phytologist* 77, 735-740.
- Suntres, Z.E., 2002. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 180, 65-77.
- Svobodová, K., Erbanová, P., Sklenář, J., Novotný, Č., 2006. The role of Mn-dependent peroxidase in dye decolorization by static and agitated cultures of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiologica* 51, 573-578.
- Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R., Comyns, K., Richards, M.B., Meng, C., Priestley, B., Fernandez, H.H., Cambi, F., Umbach, D.M., Blair, A., Sandler, D.P., Langston, J.W., 2011. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental Health Perspectives* 119, 866-872.
- Tien, M., Kirk, T.K., 1988. Lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology* 161, 229-238.
- Tsai, W.T., Lai, C.W., Hsien, K.J., 2003. Effect of particle size of activated clay on the adsorption of paraquat from aqueous solution. *Colloid and Interface Science* 263, 29-34.
- Ulčnik, A., Cigić, I.K., Kralj, L.Z., Tavzes, Č., Pohleven, F., 2012. Bioremediation of lindane by wood-decaying fungi. *Drvna Industrija* 63, 271-276.
- Uribe-Alvarez, C., Ayala, M., Perezgasga, L., Naranjo, L., Urbina, H., Vazquez Duhalt, R., 2011. First evidence of mineralization of petroleum asphaltene by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microbial Biotechnology* 4, 663-672.

- Verdin, A., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Newsam, R., Robinson, G., Durand, R., 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environmental Pollution* 133, 283-291.
- Vidali, M., 2001. Bioremediation: An overview. *Pure and Applied Chemistry* 73, 1163-1172.
- Vogel, T.M., 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology* 7, 311-316.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N., 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22, 161-187.
- White, T.J., Brans, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York.
- WHO, The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009, http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf, 13 มีนาคม 2559.
- WHO/IPCS, 1984. Paraquat and diquat, *Environmental Health Criteria*, Geneva.
- Wibawa, W., 2013. Development of method for residue analysis of three herbicides in the soil by high performance liquid chromatography (HPLC). *Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 5, 220-226.
- Wilson, S.C., Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution* 81, 229-249.
- Wong, Y.C., Norsyamimi, N., Wan-Nurdiyana, W.A., 2013. Determination of paraquat (herbicide) residue level in sandy clay loam soil using high performance liquid chromatography. *Journal of Basic & Applied Sciences* 9, 566-577.
- Wu, B., Song, B., Yang, H., Huang, B., Chi, B., Guo, Y., Liu, H., 2013. Central nervous system damage due to acute paraquat poisoning: An experimental study with rat model. *Neurotoxicology* 35, 62-70.
- Wu, D., Turgeon, B.G., 2013. *Setosphaeria rostrata*: Insights from the sequenced genome of *Setosphaeria turcica*. *Fungal Genetics and Biology* 61, 158-163.
- Wu, J., Xiao, Y.-Z., Yu, H.-Q., 2005. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresource Technology* 96, 1357-1363.

- Xiao, P., Mori, T., Kondo, R., 2011. Biotransformation of the organochlorine pesticide trans-chlordane by wood-rot fungi. *New Biotechnology* 29, 107-115.
- Yang, X., Strobel, G., Stierle, A., Hess, W.M., Lee, J., Clardy, J., 1994. A fungal endophyte-tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*. *Plant Science* 102, 1-9.
- Zhao, Y., Li, J., Chen, Y., Hang, H., 2009a. Response to oxidative stress of *Coriolum versicolor* induced by exogenous hydrogen peroxide and paraquat. *Annals of Microbiology* 59, 221-227.
- Zhao, Y., Li, J., Chen, Y., Huang, H., Yu, Z., 2009b. Impact of exogenous paraquat on enzyme exudation and biochemical changes of lignin degradation fungi. *Chinese Journal of Biotechnology* 25, 1144-1150.
- ชินเจนทาครอป, แนวทางการวินิจฉัย การปฐมพยาบาล และการดูแลรักษา ภาวะเป็นพิษจากพาราควอท
PARAQUAT POISONING <http://www.srisangwon.go.th/depart/pharmacy/download/%E0%B9%81%E0%B8%99%E0%B8%A7%E0%B8%97%E0%B8%B2%E0%B8%87%E0%B9%81%E0%B8%81%E0%B9%89%E0%B8%9F%E0%B8%B4%E0%B8%A9%20Paraquat.pdf>, 25 พฤษภาคม 2559.
- ทศพล พรพรหม, 2554. สารป้องกันกำจัดวัชพืช หลักการและกลไกการทำลายพืช (HERBICIDES: PRINCIPLES AND MODE OF ACTION). สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นภาพร เลียดประดม, 2556. ความเป็นพิษของพาราควอทต่อสัตว์น้ำ. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า* 31, 95-101.
- ฝ่ายข้อมูลเครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช, ข้อมูลพื้นฐานสารเคมีกำจัดศัตรูพืช
www.thaipan.org/sites/default/files/conference2555/conference2555_0_01.pdf, 6 มิถุนายน 2559.
- พวงรัตน์ ขจิตวิษยานุกุล, จ.อ., ธนพล เพ็ญรัตน์, 2557. โครงการ การย่อยสลายพาราควอทในดินด้วยทรายซิลิกา-แลคเคส และประยุกต์ใช้กับถังกรองในระบบผลิตน้ำสะอาด คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, p. 60p.
- ราชกิจจานุเบกษา, ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง, <http://elib.fda.moph.go.th/>, 11 กุมภาพันธ์ 2558.
- ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี, ความเป็นพิษจาก paraquat, <http://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/pois-cov/PQ>, 11 กุมภาพันธ์ 2558.
- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร ปี พ.ศ. 2558
[http://www.doa.go.th/ard/FileUpload/hazzard/4.2/Profile%20Import%20of%20Hazardous%20\(B.E.%202558\).pdf](http://www.doa.go.th/ard/FileUpload/hazzard/4.2/Profile%20Import%20of%20Hazardous%20(B.E.%202558).pdf), 5 มิถุนายน 2559.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, วัตถุอันตรายที่มีการนำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรกในปี 2558,

[http://www.doa.go.th/ard/FileUpload/hazzard/4.2/Top%2010%20Import%20of%20Hazardous%20\(B.E.%202558\).pdf](http://www.doa.go.th/ard/FileUpload/hazzard/4.2/Top%2010%20Import%20of%20Hazardous%20(B.E.%202558).pdf), 9 กุมภาพันธ์ 2559.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร, วัตถุอันตรายที่มีการนำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรกในปี 2555, [http://](http://www.doa.go.th/ard/FileUpload/StatisticsHazardTop%2010%2055.pdf)

www.doa.go.th/ard/FileUpload/StatisticsHazardTop%2010%2055.pdf, 16 กุมภาพันธ์ 2558.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร, ข้อมูลสถิติ พรบ. วัตถุอันตราย 2535, [http://www.doa.go.th/](http://www.doa.go.th/ard/index.php?option=com_content&view=article&id=22:stat2535&catid=29:stat&Itemid=104)

[ard/index.php?option=com_content&view=article&id=22:stat2535&catid=29:stat&Itemid=104](http://www.doa.go.th/ard/index.php?option=com_content&view=article&id=22:stat2535&catid=29:stat&Itemid=104), 30 ตุลาคม 2559.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (malt extract agar)

สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	20 กรัม
เพป्टอน (peptone)	5 กรัม
กลูโคส (glucose)	20 กรัม
วุ้น (agar)	15 กรัม

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (potato dextrose agar)

อาหารสำเร็จรูป PDB	24 กรัม
วุ้น (agar)	15 กรัม

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. Basal medium

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	20 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4)	5 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1 กรัม
Trace elements	100 มิลลิลิตร
วุ้น (agar)	20 กรัม
น้ำกลั่น	1000 กรัม
Trace elements ประกอบด้วย	
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4)	3 กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1 กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 กรัม
โคบอลต์คลอไรด์ (CoCl_2)	0.1 กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 กรัม

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.1 กรัม
อะลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟตไดไฮเดรต ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	10 มิลลิกรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	10 มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	10 มิลลิกรัม
ไนโตรโลอะซิดิกแอซิด ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_6$)	1.5 กรัม

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-เบสให้เป็น 4.5 ปรับปริมาตรรวมให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. LME basal medium (LBM) (Pointing, 1999)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1 กรัม
แอมโมเนียมคาร์เทรต ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$)	0.5 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.01 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.01 กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.001 กรัม
ไอร์ออนซัลเฟต $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.001 กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.001 กรัม
กลูโคส (glucose)	4 กรัม
น้ำกลั่น	1000 กรัม

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. กลีเซอรอล 80 %

กลีเซอรอล 87%	92 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	8 มิลลิลิตร

ผสมกลีเซอรอลและน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส 15 นาที วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้ง

2. อะกาโรสเจลเข้มข้น 1 %

1X TAE บัฟเฟอร์	100 มิลลิลิตร
อะกาโรสเจล	1 กรัม

ละลายอะกาโรสเจลในบัฟเฟอร์ ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงเป็นพิมพ์อย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งไว้จนกว่าจะแข็งตัว

3. 1X TAE บัฟเฟอร์

Trizma base	121 กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	28.55 กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50 มิลลิลิตร

ละลายทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนได้ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

4. สีติดตาม (6X loading dye)

บรอมฟินอลบลู	0.025 %
ซูโครส	40 %

ละลายผสมกันด้วยน้ำปลอดประจุ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. สารละลายเอทีเดียมโบรไมด์

ละลายผงเอทีเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิท

6. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานผสมสีติดตาม

1 kb DNA ladder	3	ไมโครลิตร
6X loading dye	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุ	2	ไมโครลิตร
ผสมให้เข้ากัน		

7. เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
น้ำปลอดประจุ	600	มิลลิลิตร
อะซิโตนไนไตรล์	400	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุ ปรับ pH เป็น 3.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วกรองผ่านชุดกรองเมมเบรนโดยใช้ PTFE เมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ส่วนอะซิโตนไนไตรล์กรองผ่าน CA เมมเบรน หลังจากผสมกันแล้ว นำไปไล่ฟองอากาศออกประมาณ 20 นาที

8. Bradford stock solution

Serva Blue G	350	กรัม
95% เอทานอล	150	มิลลิลิตร
85% กรดฟอสฟอริก	300	มิลลิลิตร
Bradford working buffer		
น้ำกลั่นปลอดประจุ	425	มิลลิลิตร
95% เอทานอล	15	มิลลิลิตร
88% กรดฟอสฟอริก	30	มิลลิลิตร
Bradford stock solution	30	มิลลิลิตร

ผสมทุกอย่างให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 เก็บใส่ขวดสีชา หากยังไม่ใช้งานทันที ควรกรองซ้ำก่อนใช้

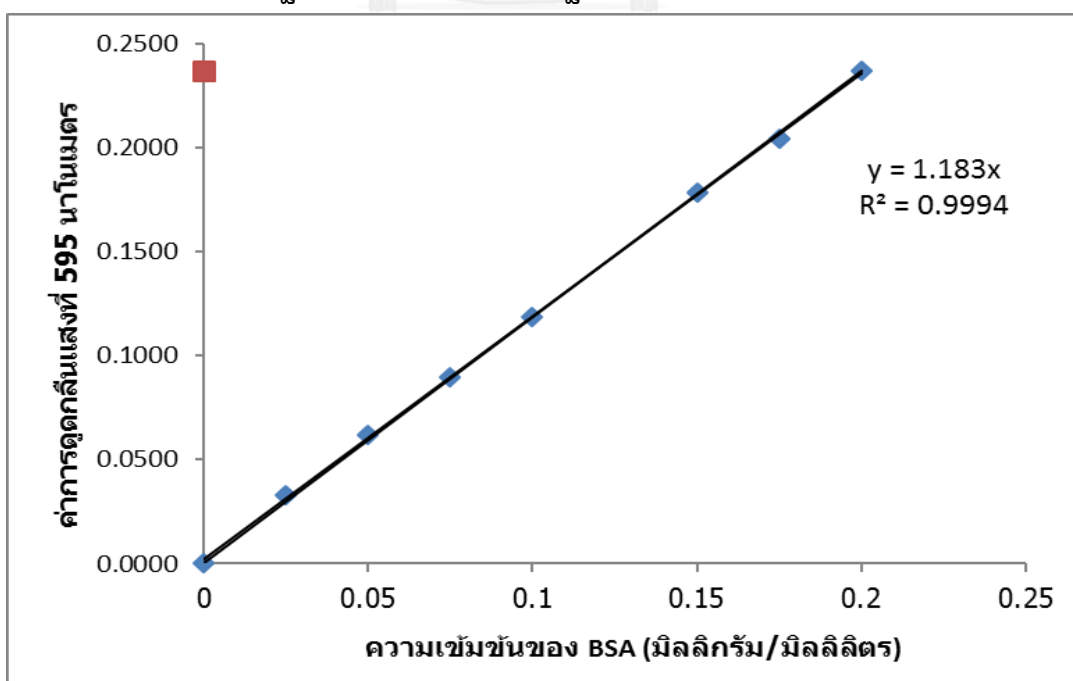
ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA)

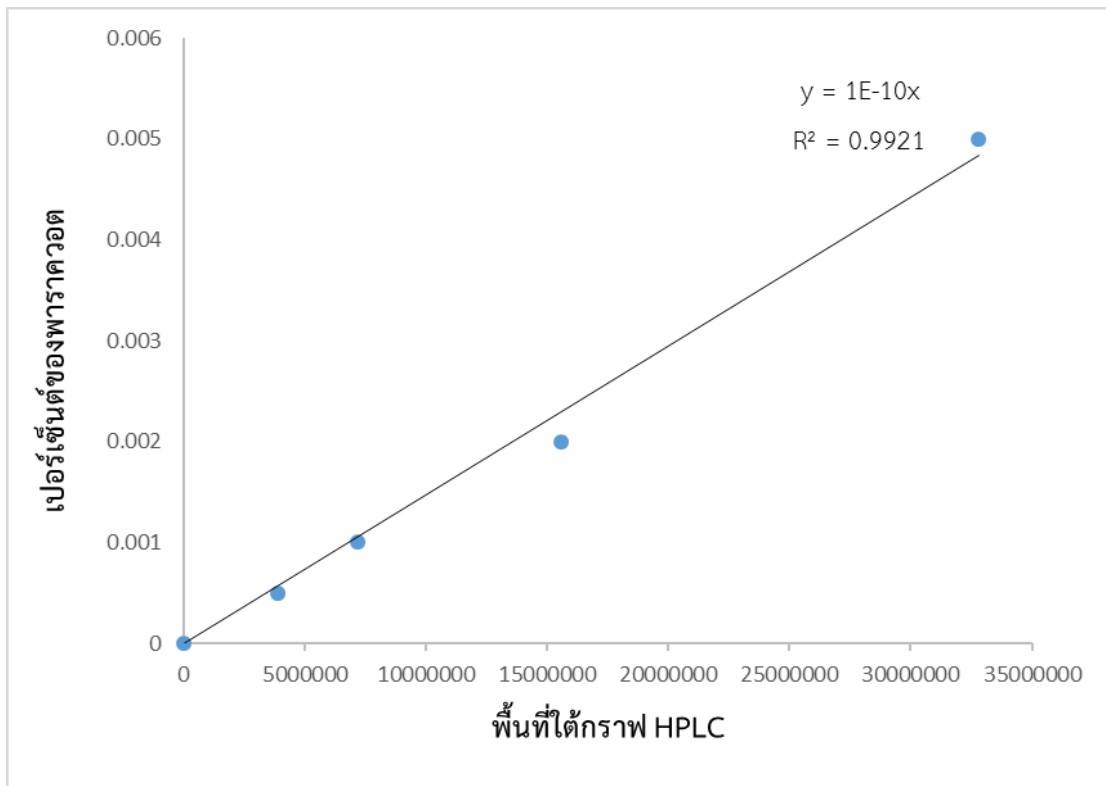
ตารางที่ ค.1 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ BSA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร
0	0.00
2.5	0.03
5	0.06
7.5	0.09
10	0.12
15	0.18
17.5	0.20
20	0.24

กราฟที่ ค1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA)



กราฟที่ ค2 กราฟมาตรฐานของสารละลายพาราควอต วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



ภาคผนวก ง
ลำดับนิวคลีโอไทด์

1. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเรา โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสบริเวณ ITS1 และ ITS4

1.1 Isolate PQ3

CTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTGCGAGAATGGG
GTGTTTTACGGCAGGGGACTGGTCCGACCCGGGGCAGCTGACTGAACTACTACGCCGGGGTGC
GGCCGGCTCCGCCACTAACTTTGAGGAGCTACGGCGGGCCGTAGGCTCCCAACGCTAAGCAACAGG
GGCTTAAGGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGC
GTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAATTCGCAATTCACATTAATTCGCATTCGCTGCGTTCT
TCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTTAATTTCCCTACATGCGGGCT
CAGAATTCAGTGACGACAGGGTTTGTCTGGGCCCGCCGGCAGGTCCCAGCCGCGCCCCCTGGGGT
GCGCGCGCTAGGCGCGTCTGGGGCTGCCGAGGCAACGTATGGTATGTTACATGGGGTTTTGCGG
GAGTTTTTTTAGGCTCTCTTTAATGATCCCTCCGCAGGTCACCCCTACGGAA

1.2 Isolate PQ5

ATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAAATAAGTTGG
GTGTGGGCTGGCGCCGGCCGGGCTACAGAGCGGGTGACGAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGAC
GCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCGTCCCCGGGGGAGAAACCGGGGACGGCGGCCAACACACA
AGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAAT
GTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACCTGAATTCGCAATTCACATTAATTCGCATTCGCTGCG
TTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTATGATAATCAACT
CAGACTGCATACTTTCAGAACAGCGTTCATGTTGGGGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCGCG
AGGCCTCCCCGGCGGCCGTGAAACGGCGGGCCCCGCCGAAGCAAC

1.3 Isolate PQ6

ATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTTACCTAATTCGAGGTCAACCACTAGAAAATATAGGG
GTTTTAACGGCTAGCAGCCAAGGCCACCACACGAGCGAGAGATATTACTACGCTGAGAGTGTACCC
TAACTCCGCCACTAACTTTAAGGAACTACGCCGTAGATTTCCCAACACTAAGCAACAAGGGCTTAGG
GGTCGAAATGACGCTCGAATAGGCATGCCCACTAGAAATACTAATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA
TTTCGATGATTCACCTGAATTCGCAATTCACATTAATTCGCATTCGCTGCGTTCTTCATCGATG
CCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTTATTTTAGTTTATAATTCAGAATAACAGCA
ATAAAAACAAGAGTTTAGCGGTCTTCGGCGGGCCATAAGCCGTCTACAAGGTAGCTCCAGGGTAC
CTATAGGGTAGCTGCAGGGTAACTATAGGGTAGCTATAGGGTAGCTCCAGGGTAACTACAGGGTAG
CCGTAGCTCACGCCGAGGCAACGACGGTAAGGTTACATAGGGTTTGGAGTTTTAATAACTCATTA
ATGATCCCTCCGCAGGTAC

1.4 Isolate A319

TATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACGCAAGAATAAAAGGC
TTGCTGGACGCTCGACATTCAAGAATGGAAGCAACAATTTGTGCTGCGCTCCCAGGCTTATGCCGGC
TGCCAATTGCTTTGAGGGCAGTCCACGCGCAACGGCGGGACAAACACCCAACCAAGCAGAGCTT
GAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCATGGAAATACCAAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAA
AGATTCGATGATTCACCTGAATTCGCAATTCACACTACTTTTCGCATTCGCTGCGTTCTTCATCG
ATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAACTATTATAGTTTTTTCTGACGCTGATTGC
AACTACGAAGGGTTTTATGAATGTCTATCGGCGGGCGAACCCGCCGAGGAAACATACAGTACGCAA
AAGACAAGGGTTGCAGACAGGAGGACACCCGAGGGCGCTCCGCTGTAACCTTGATAATGATCCTTC
CGCAGGTTCCCCCTTACGGAA

1.5 Isolate P279

TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAATGTGGATTTGTTATAGA
 AAACAAAGGCTTGCTGGATGCCGCCCCGTGGATTGGAAGGCGCAAATTTGTGCTGCGCTCCGAAAA
 CCAGTAGGTCGGCTGCCAATCGTTTTAAGGCGAGTCTCCCCAACAAAGGGGAGAGACAAAAAGACG
 CCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAA
 AGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAATTTCTGCAATTCACACTACGTATCGCA
 TTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATAAATGAA
 TTATTATACTGACGCTGATTGCAACTGCATAAAAAAAGGTTTATGGTTGGGTCCTGGTGGCGAGCG
 AACTCGCCCAGGAAACAAAAAGTGCGCAAAAGACATGGGTGAAAAATACTTGGGGCGGACGCTGTT
 GCCAGCAAACCACACCCTCATATTTTGTGTGTGAATGATCCCTCCGAGGTTACCCCTACGGA

2. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

2.1 PQ3

Nodulisporium sp.SCAU-F-143 18S ribosomal RNA gene, partial
 sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,
 and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S
 ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KF881785.1](#)

Length = 577 , Strand = PlusMinus, Score = 994 bits(1102)

Expect = 0.0, Identities = 563/567 (99%), Gaps = 3/567 (0%)

```

Query 5      TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTGCAGAGAATG 64
          |||
Sbjct 577     TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTGCAGAGAATG 518

Query 65     GGGTGTTTTACGGCAGGGGACTGGTCCGACCGGGCGAGCTGACTGAACTACTACGCCT 124
          |||
Sbjct 517     GGGTGTTTTACGGCAGGGGACTGGTCCGACCGGGCGAGCTGACTGAACTACTACGCCT 458

Query 125    GGGGTGCGGGCCGGCTCCGCCACTAACTTTGAGGAGCTACGGCGGGCCGTAGGCTCCCAA 184
          |||
Sbjct 457     GGGGTGCGGGCCGGCTCCGCCACTAACTTTGAGGAGCTACGGCGGGCCGTAGGCTCCCAA 398

Query 185    CGCTAAGCAACAGGGGCTTAAGGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAA 244
          |||
Sbjct 397     CGCTAAGCAACAGGGGCTTAAGGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAA 338

Query 245    TACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAATTTCTGCAATTCACA 304
          |||
Sbjct 337     TACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAATTTCTGCAATTCACA 278

Query 305    TTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGA 364
          |||
Sbjct 277     TTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGA 218

Query 365    AAGTTTTTAACTTAATTTCCCTACATGCGGGCTCAGAATTCAGTGACGACAGGGTTTGCTT 424
          |||
Sbjct 217     AAG-TTTTAACTTAATTTCCCTACATGCGGGCTCAGAATTCAGTGACGACAGGGTTTGCTT 159

Query 425    GGGCCGCCGGCAGGTCCAGCCGCG-CCCCCTGGGGGTGCGCGCGCTAGGCGCGTCTGG 483
          |||
Sbjct 158     GGGCCGCCGGCAGGTCCAGCCGCGCCCCCTGGGGGTGCGCGCGCTAGGCGCGTCTGG 99

Query 484    GGCTGCCGAGGCAACGTATGGTATGTTACATGGGGTTTTGCGGGAGTTTTTTAGGCTC 543
          |||
Sbjct 98      GGCTGCCGAGGCAACGTATGGTATGTTACATGGGGTTTTGCGGGAGTTTTTTAGGCTC 39

Query 544    TCTTTAATGATCCCTCCGAGGTCACC 570
          |||
Sbjct 38      TCTTTAATG-TCCCTCCGCTGGTCACC
  
```

2.2 PQ5

Neosartorya fischeri genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain:KKU-2NK4-2

Sequence ID:[AB674772.2](#)

Length = 598, Strand = PlusMinus, Score = 1043 bits(1156)

Expect=0.0, Identities=578/578(100%), Gaps = 0/578(0%)

```

Query 1   ATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAATAA 60
          |||
Sbjct 592 ATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAATAA 533

Query 61  AGTTGGGTGTCGGCTGGCGCCGGCCCGGCTACAGAGCGGGTACGAAGCCCCATACGCT 120
          |||
Sbjct 532 AGTTGGGTGTCGGCTGGCGCCGGCCCGGCTACAGAGCGGGTACGAAGCCCCATACGCT 473

Query 121 CGAGGACCGGACGCGGTGCCGCGCTGCCTTTTCGGGCCCGTCCCGGGGGAGAACCAGGG 180
          |||
Sbjct 472 CGAGGACCGGACGCGGTGCCGCGCTGCCTTTTCGGGCCCGTCCCGGGGGAGAACCAGGG 413

Query 181 ACGGCGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCC 240
          |||
Sbjct 412 ACGGCGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCC 353

Query 241 CCCCAGGAATACCAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGC 300
          |||
Sbjct 352 CCCCAGGAATACCAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGC 293

Query 301 AATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCC 360
          |||
Sbjct 292 AATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCC 233

Query 361 GTTGTGAAAGTTTTAACTGATTATGATAATCAACTCAGACTGCATACTTTCAGAACAGC 420
          |||
Sbjct 232 GTTGTGAAAGTTTTAACTGATTATGATAATCAACTCAGACTGCATACTTTCAGAACAGC 173

Query 421 GTTCATGTTGGGGTCTTcggggggcgcgggcccgggggcgcgaggcctccccggcgggcg 480
          |||
Sbjct 172 GTTCATGTTGGGGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCGCGAGGCCTCCCCGGCGGGCG 113

Query 481 tcgaaacggcgggcccgccgAAGCAACAAGGTACAATAGACACGGGTGGGAGGTTGGACC 540
          |||
Sbjct 112 TCGAAACGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAAGGTACAATAGACACGGGTGGGAGGTTGGACC 53

Query 541 CAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTT 578
          |||
Sbjct 52 CAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTT 15

```

2.3 PQ6

Hypoxylon fragiforme 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [JN564001.1](#)

Length = 631, Strand = PlusMinus, Score = 1067 bits(1182)

Expect=0.0, Identities=604/611(99%), Gaps = 1/611(0%)

```

Query 1   ATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTTACCTAATTCGAGGTCAACCCTAGAAAAAT 60
          |||
Sbjct 621  ATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTTACCTAATTCGAGGTCAACCCTAAAAAAT 562

Query 61   ATAGGGGTTTTAACGGCTAGCAGCCAAGGCCACCACACGAGCGAGAGATATTACTACGCT 120
          |||
Sbjct 561  ATAGGGGTTTTAACGGCTAGCAGCCAGGGCCACCACACGAGCGAGAGATATTACTACGCT 502

Query 121  GAGAGTGTACCCTAACTCCGCCACTAACTTTAAGGAACTACGCCGTAGATTCCCAACACT 180
          |||
Sbjct 501  GAGAGTGAACCCTAACTCCGCCACTAACTTTAAGGAACTACGCCGTAGATTCCCAACACT 442

Query 181  AAGCAACAAGGGCTTAGGGGTCGAAATGACGCTCGAATAGGCATGCCCACTAGAATACTA 240
          |||
Sbjct 441  AAGCAACAAGGGCTTAGGGGTCGAAATGACGCTCGAATAGGCATGCCCACTAGAATACTA 382

Query 241  ATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACT 300
          |||
Sbjct 381  ATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACT 322

Query 301  TATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT 360
          |||
Sbjct 321  TATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT 262

Query 361  TTAACTTATTTTAGTTTATAAATTCAGAATAACAGCAATAAAAAACAAGAGTTTAGCGGTCC 420
          |||
Sbjct 261  TTAACTTATTTTAGTTTATAAATTCAGAATAACAGCAATAAAAAACAAGAGTTTAGCGGTCC 202

Query 421  TTCGGCGGGCCATAAGCCGTCTACAAGGTAGCTCCAGGGTACCTATAGGGTAGCTGCAGG 480
          |||
Sbjct 201  TTCGGCGGGCCATAAGCCGTCTACAAGGTAGCTCCAGGGTACCTATAGGGTAGCTGTAGG 142

Query 481  GTAACTATAGGGTAGCTATAGGGTAGCTCCAGGGTAACTACAGGGTAGCCGTAGCTCACG 540
          |||
Sbjct 141  GTACTACAGGGTAGCTATAGGGTAGCTCCAGGGTAACTACAGGGTAGCCGTAGCTCACG 83

Query 541  CCGAGGCAACGACGGTAAGGTTACATAGGGTTTGGAGTTTTAATAACTCATTAATGATC 600
          |||
Sbjct 82   CCGAGGCAACGACGGTAAGGTTACATAGGGTTTGGAGTTTTAATAACTCATTAATGATC 23

Query 601  CCTCCGAGGT 611
          |||
Sbjct 22   CCTCCGAGGT 12

```

2.4 A319

Phoma sp.S4S207 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KM516291.1](#)

Length = 559, Strand = PlusMinus, Score = 976 bits(1082)

Expect=0.0, Identities=546/548(99%), Gaps = 1/548(0%)

```

Query 1      TATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAACGCAAGAATA 60
            |
Sbjct 549    TATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAACGCAAGAATA 490

Query 61     AAAGGCTTGCTGGACGCTCGACATTCAAGAATGGAAGCAACAATTGTGCTGCGCTCCCAG 120
            |
Sbjct 489     AAAGGCTTGCTGGACGCTCGACATTCAAGAATGGAAGCAACAATTGTGCTGCGCTCCCAG 430

Query 121    GCTTATGCCGGCTGCCAATTGCTTTGAGGCGAGTCCACGCGCAACGGCGGGACAAACACC 180
            |
Sbjct 429    GCTTATGCCGGCTGCCAATTGCTTTGAGGCGAGTCCACGCGCAACGGCGGGACAAACACC 370

Query 181    CAACACCAAGCAGAGCTTGAAGGTACAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATA 240
            |
Sbjct 369    CAACACCAAGCAGAGCTTGAAGGTACAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATA 310

Query 241    CCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACT 300
            |
Sbjct 309    CCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACT 250

Query 301    ACTTTTCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAA 360
            |
Sbjct 249    ACTTTTCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAA 190

Query 361    GTTGTAAC TATTATAGTTTTTTCTGACGCTGATTGCAACTACGAAGGGTTTATGAATGTC 420
            |
Sbjct 189    GTTGTAAC TATTATAGTTTTTTCTGACGCTGATTGCAACTACGAAGGGTTTATGAATGTC 130

Query 421    CTATCGGCGGGCGAACCCGCCGAGGAAACATACAGTACGCAAAAGACAAGGGTTGCAGAC 480
            |
Sbjct 129    CTATCGGCGGGCGAACCCGCCGAGGAAACATACAGTACGCAAAAGACAAGGGTTGCAGAC 70

Query 481    AGGAGGACACCCGAGGGCGCCTCCGCTGTAAC TTGATAATGATCCTTCCGCAGGTTCCCC 540
            |
Sbjct 69     AGGAGGACACCCGAGGGCGCCTCCGCTGTAAC TTGATAATGATCCTTCCGCAGGTTCCACC 10

Query 541    TTACGGAA 548
            |
Sbjct 9     -TACGGAA 3

```

2.5 P279

Setosphaeria rostrata strain UPM830 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KP340119.1](#)

Length = 595, Strand = PlusMinus, Score = 1061 bits(1176)

Expect = 0.0, Identities = 588/588(100%), Gaps = 0/588(0%)

```

Query 1      TTGATATGCTTAAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAATGTGGATTTGT 60
|||||
Sbjct 592     TTGATATGCTTAAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAATGTGGATTTGT 533

Query 61     TATAGAAAACAAAGGCTTGCTGGATGCCGCCCCGTGGATTGGAAGGCGCAAATTTGTGCT 120
|||||
Sbjct 532     TATAGAAAACAAAGGCTTGCTGGATGCCGCCCCGTGGATTGGAAGGCGCAAATTTGTGCT 473

Query 121    GCGCTCCGAAAACCAAGTAGGTCGGCTGCCAATCGTTTTAAGGCGAGTCTCCCCAACAAAG 180
|||||
Sbjct 472     GCGCTCCGAAAACCAAGTAGGTCGGCTGCCAATCGTTTTAAGGCGAGTCTCCCCAACAAAG 413

Query 181    GGGAGAGACAAAAGACGCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAA 240
|||||
Sbjct 412     GGGAGAGACAAAAGACGCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAA 353

Query 241    CAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCAC 300
|||||
Sbjct 352     CAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCAC 293

Query 301    TGAATTCGCAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAAC 360
|||||
Sbjct 292     TGAATTCGCAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAAC 233

Query 361    CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATAAAATTGAATTATTATACTGACGCTGATTGCAA 420
|||||
Sbjct 232     CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATAAAATTGAATTATTATACTGACGCTGATTGCAA 173

Query 421    CTGCATaaaaaaaaGGTTTATGGTTGGGTCCTGGTGGCGAGCGAACTCGCCCAGGAAACAA 480
|||||
Sbjct 172     CTGCATAAAAAAAGGTTTATGGTTGGGTCCTGGTGGCGAGCGAACTCGCCCAGGAAACAA 113

Query 481    AAAGTGCGCAAAAGACATGGGTGAAAAATACTTGGGGCGGACGCTGTTGCCAGCAAACCA 540
|||||
Sbjct 112     AAAGTGCGCAAAAGACATGGGTGAAAAATACTTGGGGCGGACGCTGTTGCCAGCAAACCA 53

Query 541    CACCCTCATATTTTTGTTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCCTAC 588
|||||
Sbjct 52     CACCCTCATATTTTTGTTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCCTAC 5

```


ภาคผนวก จ
วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของข้อมูลการย่อยสลายพาราควอตในดินของราไอโซเลต PQ5 และ A319

Test of Homogeneity of Variances

percent

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.138	17	36	.027

ANOVA

percent

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21171.305	17	1245.371	77.590	.000
Within Groups	577.825	36	16.051		
Total	21749.130	53			

Post Hoc Test

Homogeneous Subsets

Percent paraquat

Duncan^a

samples	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
330	3	26.0653						
5230	3	27.7538						
130	3		39.5191					
120	3		39.6449					
5220	3		41.3190					
110	3		41.5557					
5210	3		43.3443					
9430	3			50.1197				
320	3			52.8433	52.8433			
5430	3			55.7631	55.7631			
9230	3			55.9074	55.9074			
9220	3				57.6006			
310	3				58.5177			
9210	3					66.2102		
9420	3						78.9140	
5420	3						81.7089	
5410	3							90.6743
9410	3							97.1619
Sig.		.609	.306	.114	.130	1.000	.399	.055

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฐิตาภา ช่วยคงทอง เกิดเมื่อวันที่ 24 มีนาคม พ.ศ.2534 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิตภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทบัณฑิตที่ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติในงาน The 27 th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference - INNOVATIVE BIOTECHNOLOGY - TSB2015. ระหว่างวันที่ 17 - 20 พฤศจิกายน 2558 ณ โรงแรมแมนดาริน กรุงเทพมหานคร ในหัวข้อเรื่อง "Screening for ligninolytic enzymes from novel isolates of fungi and their potential to degrade paraquat"