

การคัดกรองรายย่อยไดเบนโซพิวแรนจากดินเพื่อศักยภาพในการย่อยสลายไดออกซิน



นางสาวปัทมาพร ประชุมรัตน์

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5259-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING OF DIBENZOFURAN-DEGRADING FUNGI FROM SOIL FOR POTENTIAL USE OF
DIOXIN DEGRADATION



Miss Pattamaporn Prachomrat

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-5259-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองรายย่อยไโคเบนโซฟีวแรนจากดินเพื่อศักยภาพในการย่อยสลายไดออกซิน
โดย	นางสาวปัทมาพร ประชุมรัตน์
สาขาวิชา	จุลชีวินวิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สงศรี กุลปรีชา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

ปัทมาพร ประชุมรัตน์ : การคัดกรองรายย่อยไดเบนโซฟูแรนจากดินเพื่อศักยภาพในการย่อยสลายไดออกซิน (SCREENING OF DIBENZOFURAN-DEGRADING FUNGI FROM SOIL FOR POTENTIAL USE OF DIOXIN DEGRADATION) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ จำนวนหน้า 102 หน้า. ISBN 974-17-5259-8.

รายย่อยสลายไดเบนโซฟูแรน 5 สายพันธุ์ ถูกคัดแยกจากตัวอย่างดินที่เก็บจากป่าบริเวณต่างๆ ในประเทศไทย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek-Dox agar เททับด้วย malt extract agar ที่มีการเติมสี Remazol Brilliant Blue R (RBBR) และ Benomyl นำราทั้ง 5 สายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการใช้สี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว minimal salt medium (MM) พบว่าราทั้ง 5 สายพันธุ์ไม่สามารถเจริญและใช้สี RBBR ในอาหาร MM ได้ จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Low nitrogen basal III medium (LN) โดยเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส พบว่าราทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยสี RBBR ในอาหาร LN ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ บ่งชี้ชนิดของราโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุศาสตร์ การพิสูจน์เอกลักษณ์ราโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) พบว่าราที่คัดแยกได้ทั้งหมดเป็นราในกลุ่ม white rot fungi ได้แก่ *Marasmius cladophyllus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinus tigrinus*, *Polyporus tricholoma* และ *Athelia pellicularis* จากนั้นนำราทั้ง 5 สายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนในอาหาร LN โดยใช้ HPLC *Polyporus tricholoma* พบว่าราสายพันธุ์ *P. tricholoma* สามารถย่อยไดเบนโซฟูแรนได้สูงสุดคือ 78.7 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาสารมัธยंत्रที่เกิดขึ้นในการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนโดยรา *P. tricholoma* โดยวิธี TLC และ HPLC พบว่าสารมัธยंत्रที่เกิดขึ้นมีจำนวนมากกว่า 2 ชนิดและเป็นสารที่มีคุณสมบัติมีขั้วสูง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2546

##4472515223 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: Dibenzofuran, Remazol Brilliant Blue R, degradation, fungi.

PATTAMAPORN PRACHOMRAT: SCREENING OF DIBENZOFURAN-DEGRADING FUNGI FROM SOIL FOR POTENTIAL USE OF DIOXIN DEGRADATION. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. DR. CHARNWIT KOSITANONT, 102 pp. ISBN 974-17-5259-8

Five strains of dibenzofuran — degradation fungi were isolated from forested soil samples in Thailand by using double layers agar with Remazol Brilliant Blue R (RBBR) and Benomyl containing malt extract agar on top of Czapek-Dox agar. The fungi were tested for their ability of RBBR decolorization in mineral salt medium (MM) using dye as a sole carbon source and Low nitrogen basal III medium (LN) for testing lignin peroxidase activity. It was found that the fungi could not utilize RBBR as the sole carbon source in MM but in LN its could degrade RBBR more than 80 percent. Morphological study and internal transcribed spacer (ITS) sequencing analysis indicated that there were five different strain of white rot fungi , *Marasmius cladophyllus* , *Phanerochaete crysosporium*, *Lentinus tigrinus*, *Polyporus tricholoma* and *Athelia pellicularis* . After that the isolated fungi were tested for dibenzofuran degrading ability by using HPLC for analysing the 7 days culture supernatant . Among these isolates, *Phanerochaete crysosporium* , *Polyporus tricholoma* and *Athelia pellicularis* could degrade dibenzofuran more than 50 percent . *Polyporus tricholoma* was the most effective strain (78.7 %degradation). Metabolite analysis of dibenzofuran degradation by using TLC and HPLC shown that there were at least two metabolic compounds during dibenzofuran degradation by *Polyporus tricholoma*.

Department Microbiology

Student's signature.....

Field of study Industrial Microbiology

Advisor's signature.....

Academic year 2003

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดีด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ ไชยิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและแนวทางต่างๆในงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา ที่กรุณารับเป็นประธานในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชกร และ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้คำแนะนำต่างแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณทบวงมหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณพี่ๆเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

ขอขอบคุณรุ่นพี่ และรุ่นน้องในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคนสำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

ขอขอบคุณคุณสิริกุล วัฒนานนท์ สำหรับความร่วมมือในงานวิจัย คุณกฤษมา เตชะเดช , คุณดวงกมล ฐปมงคล, คุณชนิษฐา วงษ์นิกร คุณบำรุงศักดิ์ บุรีไล , คุณปฎิมา เพิ่มพูนพัฒนา และคุณสิริภัทร พุกฤษไพบูลย์ ที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในงานวิจัย ขอขอบคุณคุณวิชุดา เหล่าเรืองธนา, คุณศิริเพ็ญ สังข์ชัย, คุณเวฬุรีย์ ทองคำ, คุณปวีณา รัตนมาศ, คุณศิริโรจน์ ศรีสรากรณ์, คุณปรีชฎางค์ วงศ์ปราชญ์ คุณจันทรนาถ พลขำนิ และคุณวัชรี ชูณกุล ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และขอขอบคุณคุณขวัญัญญา ประชุมรัตน์ และ คุณวสันต์ ประชุมรัตน์ ที่เป็นกำลังใจที่ดีให้ตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์.....	7
2.1 การศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารกลุ่มไดออกซิน.....	7
2.2 วิธีการคัดแยกราย่อยสลายสารกลุ่มไดออกซินจากดิน.....	16
2.3 การจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของรา.....	18
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	20
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	20
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	22
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
4. ผลการทดลอง.....	32
4.1 การคัดแยกราย่อยสลายไดเบนโซฟีวแรนจากตัวอย่างดิน.....	32
4.2 การทดสอบความสามารถของราที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว.....	34
4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดแยกได้.....	47
4.4 การบ่งชี้ชนิดของราที่คัดแยกได้โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ ประมวลรหัสของตำแหน่ง internal transcribe spacer (ITS).....	58
4.5 การทดสอบการย่อยสลายไดเบนโซฟีวแรนในอาหารเหลว LN.....	67
5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	72
รายการอ้างอิง.....	76
ภาคผนวก ก.....	82

สารบัญ (ต่อ)

ภาคผนวก ข.....	87
ภาคผนวก ค.....	92
ภาคผนวก ง.....	95
ประวัติผู้เขียน.....	102



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงความแรงของ PCDD ที่มีคลอรีนที่ตำแหน่ง 2,3,7,8 ทั้ง 7 สาร และการกำหนดค่า toxic equivalent factor (TEF) โดย NATO/CCMS และ Nordic	3
2 แสดงการคัดแยกgrayย่อยสลายไดเบนโซฟิวแรนจากดินที่เก็บจากบริเวณต่างๆ	32



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1	ลักษณะโครงสร้างของสาร dioxin (DD) dibenzofuran (DF) และ diphenylether (DE).....1
2	ตำแหน่งบนโครงสร้างสารกลุ่มไดออกซินที่มีหมู่คลอรีนเข้ามาจับกับโมเลกุลในตำแหน่งต่างๆ..9
3	ลักษณะการย่อยสลายแบบ mineralization ของสารในกลุ่มไดออกซินโดยแบคทีเรีย.....11
4	สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายสาร 2,7- DCDD (A) และ 2,7- DCDF (D)16
5	สูตรโครงสร้างของลิกนิน16
6a	สูตรโครงสร้างของสี Remazol brilliant blue R(RBBR) 17
6b	สูตรโครงสร้างของสาร Benomyl18
7	บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และตำแหน่งจับของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรมเมอร์ ITS 1 (forward primer) และ ITS 4 (reverse primer).....19
8	ลักษณะการย่อยสี RBBR บนอาหารแข็งโดยราชนิดต่างๆ A รา N3 บ่มเป็นเวลา 7 วัน, B รา G1 บ่มเป็นเวลา 6 วัน, C รา N4 บ่มเป็นเวลา 6 วัน , D รา T3 บ่มเป็น เวลา 6 วัน และ E รา N2 บ่มเป็นเวลา 4 วัน.....33
9	ลักษณะการย่อยสี RBBR ในอาหารเหลว โดยราที่คัดแยกได้.....35
10a	กราฟแสดงการเจริญของรา N2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBR.....35
10b	กราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในอาหาร MM โดยรา N236
10c	กราฟแสดงการเจริญของรา N3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBRเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว.....36
10d	กราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในอาหาร MMโดยราN2.....37
10e	กราฟแสดงการเจริญของรา N4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว37
10f	กราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในอาหาร MM โดยรา N4.....38
10g	กราฟแสดงการเจริญของรา G1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มี สี RBBR เป็น แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว.....39
10h	กราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในอาหาร MM โดยรา G1.....39
10i	กราฟแสดงการเจริญของรา T3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว.....40

10j	กราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในอาหาร MM โดยรา T3.....	40
11	แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การลดลงของสี RBBR โดย รา N2, N3, N4, G1 และ T3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MM ที่มีสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว เป็นเวลา 7 วัน.....	41
12a	กราฟแสดงการเจริญของรา T3 ที่ไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBR เป็น แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว.....	42
12b	กราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในอาหาร MM โดยรา T3 ที่ไม่มีอาหารแข็ง.....	42
13a	กราฟแสดงการย่อยสี RBBR ในอาหาร LN โดยรา N2	43
13b	กราฟแสดงการย่อยสี RBBR ในอาหาร LN โดยรา N3	44
13c	กราฟแสดงการย่อยสี RBBR ในอาหาร LN โดยรา N4.....	44
13d	กราฟแสดงการย่อยสี RBBR ในอาหาร LN โดยรา G1.....	45
13e	กราฟแสดงการย่อยสี RBBR ในอาหาร LN โดยรา T3.....	45
14	แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การลดลงของสี RBBR โดย รา N2, N3, N4, G1 และ T3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร LN ที่มีสี RBBR	46
15	ลักษณะการเจริญของรา N2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน.....	47
16	ลักษณะการเจริญของรา N3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน.....	48
17	ลักษณะการเจริญของรา N4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน.....	49
18	ลักษณะการเจริญของรา G1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน.....	50
19	ลักษณะการเจริญของรา T3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน.....	51
19a	ลักษณะสปอร์ของรา N2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Yeast extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า.....	52
19b	ลักษณะสปอร์ของรา N3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Yeast extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า.....	52

19c	ลักษณะสปอร์ของรา N4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Yeast extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า.....	53
19d	ลักษณะสปอร์ของรา G1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Potata dextrose agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า.....	53
19e	ลักษณะ clamp connectionของรา T3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Malt extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า.....	53
19f	ลักษณะสปอร์ของรา N2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Yeast extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 2,000 เท่า.....	54
19g	ลักษณะสปอร์ของรา N2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Yeast extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 3,500 เท่า.....	54
19h	ลักษณะสปอร์ของรา N3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 2,000 เท่า.....	55
19i	ลักษณะเส้นใยของรา N4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า.....	55
19j	ลักษณะสปอร์ของรา G1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วันจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 10,000 เท่า.....	56
19k	ลักษณะสปอร์ของรา G1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 10,000 เท่า.....	56
19l	ลักษณะสปอร์ของรา T3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร malt extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 3,500 เท่า.....	57
19m	ลักษณะของรา T3 ที่เกิด clamp connection เมื่อเลี้ยงในอาหาร malt extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 10,000 เท่า.....	57
20	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของรา N2 และ T3 บนอะกาโรส เจล 1.2 เปอร์เซ็นต์...58	
21	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของรา G1 บนอะกาโรส เจล 1.2 เปอร์เซ็นต์.....59	
22	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของรา N3 และ N4บนอะกาโรส เจล 1.2 เปอร์เซ็นต์..59	

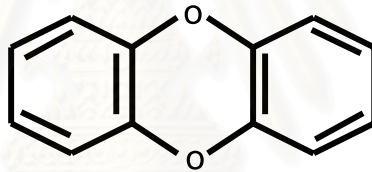
23a ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของรา N2 ที่เพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction ,PCR).....	60
23b ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของรา N3 ที่เพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction ,PCR)	61
23c ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของรา N4 ที่เพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction ,PCR)	62
23d ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของรา G1 ที่เพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction ,PCR)	63
23e ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของรา T3 ที่เพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction ,PCR)	64
24a HPLC โคโรมาโตแกรม ของชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมราลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	67
24b HPLC โคโรมาโตแกรม แสดงการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนโดยรา N2 ในเวลา 7 วัน.....	67
24c HPLC โคโรมาโตแกรม แสดงการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนโดยรา N3 ในเวลา 7 วัน.....	68
24d HPLC โคโรมาโตแกรม แสดงการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนโดยรา N4 ในเวลา 7 วัน.....	68
24e HPLC โคโรมาโตแกรม แสดงการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนโดยรา G1 ในเวลา 7 วัน.....	68
24f HPLC โคโรมาโตแกรม แสดงการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนโดยรา T3 ในเวลา 7 วัน.....	68
25 แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การลดลงของไโดเบนโซฟูแรน โดย รา N2, N3, N4, G1 และ T3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร LN ที่มีสี RBBR.....	69
26 TLC โคโรมาโตแกรม แสดงสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรน เป็นเวลา 7 วัน.....	70
27 HPLC โคโรมาโตแกรม แสดงการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนโดยรา G1 ในเวลา 7 วันโดยการ gradient อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลกับน้ำ.....	70

บทที่ 1

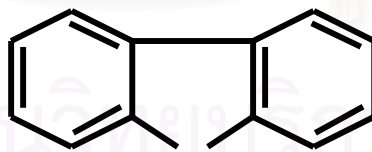
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

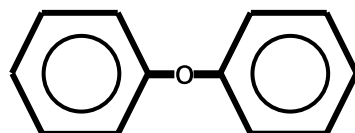
ปัจจุบันนี้ปัญหาสิ่งแวดล้อมโลกเป็นปัญหาที่มีความรุนแรงมากขึ้น อันเนื่องมาจากหลายสาเหตุซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมต่างๆที่มนุษย์ทำขึ้นและมีสารพิษต่างๆที่ถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งในจำนวนนี้มีสารพิษในกลุ่มสารอินทรีย์ที่มีพิษตกค้างยาวนาน (Persistent Organic Pollutants) สารกลุ่มนี้พบสะสมในร่างกายของสิ่งมีชีวิต สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ ไดออกซิน เป็นสารที่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มคลอริเนตเตทอะโรมาติกประกอบด้วย 3 วง (tricyclic member ring) ที่มีออกซิเจนและคลอรีนเป็นองค์ประกอบ 1 ถึง 8 อะตอม จัดระเบียบโมเลกุลแบบ planar สารเหล่านี้ถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามคุณสมบัติทางชีวภาพและโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกันได้แก่



Dioxin (DD)



Dibenzofuran (DF)



Diphenyl ether (DE)

รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของสาร Dioxins (DD) Dibenzofurans (DF) และ Diphenyl ether (DE)

โดยที่วงที่อยู่ตำแหน่งตรงกลางของสารแตกต่างกันในแต่ละชนิด ของไดออกซินเป็น หกเหลี่ยมที่มีออกซิเจนอยู่ 2 อะตอม ในขณะที่กลุ่มสารฟูแรนมีลักษณะเป็นวงห้าเหลี่ยม และมี ออกซิเจนอยู่ 1 อะตอม ส่วนกลุ่มสาร diphenyl ether ไม่มีวงเชื่อมระหว่าง 2 วง มีออกซิเจน 1 อะตอม ด้านข้างของทั้ง 3 กลุ่ม จะเปิดโอกาสให้อะตอมคลอรีน (chlorine atom) หรือโบรมีน (bromine atom) สามารถเลือกเกาะอยู่บนตำแหน่งต่างๆได้ ทำให้สารกลุ่มนี้เกิดเป็นสารไอโซ เมอร์เป็นจำนวนมาก โดยที่ไดออกซินมีทั้งหมด 75 ชนิด และไดเบนโซฟูแรนมี 135 ชนิด ซึ่งสารทั้ง หมด 210 ชนิดนี้ส่วนใหญ่ไม่มีผลร้ายต่อสุขภาพมนุษย์มากนักมีเพียง 17 ชนิดเท่านั้นที่มีรายงาน ว่ามีพิษร้ายแรงและเป็นอันตรายต่อสุขภาพมนุษย์ และชนิดที่มีพิษร้ายแรงที่สุดคือ 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) เนื่องจากการประมาณความเป็นพิษของแต่ละ ไอโซเมอร์ไม่สามารถบอกปริมาณเป็นการเฉพาะแต่ละตัวได้ International Toxicology Equivalency Factors (I-TEF) จึงจำแนกค่าความเป็นพิษของสารแต่ละไอโซเมอร์ได้ในรูปความ สัมพันธ์กับไอโซเมอร์ 2,3,7,8-TCDD โดยให้ถือว่า 2,3,7,8-TCDD ซึ่งมีค่าความเป็นพิษเท่ากับ 1 ส่วนไอโซเมอร์อื่นๆที่มีความเป็นพิษต่ำกว่าจะเรียงตามลำดับกันไป

เนื่องจากความแรงของการเกิดพิษและผลทางชีวเคมีของ PCDD ทั้ง 7 สารนี้ไม่เท่ากัน จึง ทำให้มีการเสนอแนวความคิดเรื่อง toxic equivalent factor (TEF) เพื่อแสดงความแรงสัมพัทธ์ เมื่อเปรียบเทียบ 2,3,7,8- TCDD ซึ่งถูกกำหนดให้เป็นสารอ้างอิงมีค่า TEF เท่ากับ 1 ค่า TFE เป็น ค่าที่ได้จากการกำหนด (assigned) ให้กับ PCDD ทั้ง 6 สาร โดยพิจารณาจากอัตราส่วนของ ปริมาณหรือความเข้มข้นระหว่าง PCDD และ 2,3,7,8- TCDD ที่ทำให้เกิดผลทางพิษวิทยาหรือชีว เคมีขึ้นได้ใน 50% ของสัตว์ทดลองหรือ cell culture (EC₅₀) ความเป็นพิษและผลทางชีวเคมีของ PCDD ที่มีคลอรีนที่ตำแหน่ง 2,3,7,8 แสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ การกำหนดค่า TEF ให้ กับ PCDD ทั้ง 6 ชนิด โดยเปรียบเทียบกับ 2,3,7,8- TCDD แสดงในตารางที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ความแรงของ PCDD ที่มีคลอรีนที่ตำแหน่ง 2,3,7,8 ทั้ง 7 สาร และการกำหนดค่า toxic equivalent factor (TEF) โดย NATO/CCMS และ Nordic (Safe , 1990)

congener	ความแรงสัมพัทธ์*		TEF NATO/CCMS	TEF Nordic
	ความเป็นพิษ	ผลจาก cell culture		
2,3,7,8 TCDD *	1	1	1	1
1,2,3,7,8-PentaCDD	0.59-0.053	0.64-0.07	0.5	0.5
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	0.24-0.013	0.13-0.05	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	0.16-0.0152	0.5-0.005	0.1	0.1
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	0.14-0.016	0.009	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	0.0076	0.003	0.01	0.01
OCDD	>0.0013	0.0006	0.001	0.001

การแสดงผลรวมทั้งหมดของสาร PCDD ที่วิเคราะห์ตัวอย่างซึ่งแสดงในรูปของ toxic equivalent (TEQ) ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$TEQ = \sum (a_i \times TEF_i)$$

โดย a_i เป็นปริมาณของสาร (congener $_i$) ในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้
 TEF_i เป็น toxic equivalent factor ของ congener $_i$

ดังนั้นค่า TEQ ของตัวอย่างหนึ่งก็คือค่าน้ำหนักสมมูลของ 2,3,7,8- TCDD นั่นเอง นอกจากนี้ The International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดสาร 2,3,7,8-TCDD เป็นสารก่อมะเร็งโดยจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 และได้มีการศึกษาทดสอบความเป็นพิษของกลุ่มสารดังกล่าวโดยใช้สัตว์ทดลองหลายชนิด พบว่าความเป็นพิษขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ด้วย เช่น ผลการทดลอง LD₅₀ ใน guinea pigs สำหรับสาร 2,3,7,8-TCDD เท่ากับ 0.6 mg/kg ของน้ำหนักตัว ส่วนใน mice เท่ากับ 300 mg/kg ของน้ำหนักตัว

LD₅₀ (median lethal dose) หมายถึงปริมาณ (dose) ของสารเคมีซึ่งคาดว่าจะทำให้สัตว์ทดลองที่ได้รับสารนั้นเพียงครั้งเดียวตายไปเป็นจำนวนครึ่งหนึ่ง (50%) ของจำนวนเริ่มต้น LD₅₀ เป็นค่าที่คำนวณได้จากผลการศึกษาซึ่งให้สัตว์ทดลองจำนวนหลายกลุ่มได้รับสารเคมีที่ปริมาณต่าง ๆ กัน ระยะเวลาที่เฝ้าสังเกตการตายของสัตว์ประมาณ 2-3 วัน แต่ไม่เกิน 2 สัปดาห์ เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารเคมีในสัตว์ต่างชนิดที่มีน้ำหนักตัวแตกต่างกัน จึงราย

งานค่า LD₅₀ ของน้ำหนักร่างกายของสารเคมีต่อน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองเช่น LD₅₀ (oral) ของ benzene ในหนู (rat) เท่ากับ 4,900 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

สำหรับการประเมินความเสี่ยงมีหลายประเทศจัดทำค่า Toxic daily intake (TDI) เช่น ประเทศเนเธอร์แลนด์ เท่ากับ 4pg/kg/day และญี่ปุ่น เท่ากับ 10 pg/kg/day นอกจากนี้หน่วยงาน U.S. EPA ได้เสนอค่า TDI ที่ต่ำกว่า 0.006 pg/kg/day อย่างไรก็ตาม The Scientific Committee for Food (SCF) ได้กำหนดค่า Tolerable Weekly Intake (TWI) เท่ากับ 14 pg/kg ของน้ำหนักร่างกาย รวมทั้งองค์การ JECFA ได้กำหนดค่า Tolerable Monthly Intake (TMI) เท่ากับ 70 pg/kg

ผลของสารในกลุ่มไดออกซินต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์

ผลของสารในกลุ่มไดออกซินก่อให้เกิดโรค หรือความผิดปกติต่อมนุษย์และสัตว์คือ เป็นพิษต่อตัวอ่อนในครรภ์ (fetotoxicity) เกิดความผิดปกติของลูก (teratogenicity) ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogenicity) เกิดความผิดปกติของไต (kidney abnormalities) และเกิดความผิดปกติของระบบประสาท ระบบภูมิคุ้มกัน และระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารในกลุ่มนี้คือก่อให้เกิดอาการของโรคผิวหนังที่เรียกว่า chloracne ลักษณะคล้ายสิ่วหัวช้างบริเวณจมูก แก้ม คอ หลัง ไบหู หน้าอก หลัง อวัยวะสืบพันธุ์ ขา ทำให้เกิดผื่นคันตามผิวหนัง (skin rash) รอยไหม้บนผิวหนัง (burn like skin lesions) ข้ออักเสบ ปวดข้อ (arthritis)

แหล่งที่มาของสารกลุ่มไดออกซิน

สารกลุ่มนี้สามารถเกิดได้จากกระบวนการในธรรมชาติและที่มนุษย์สร้างขึ้นโดยไม่ตั้งใจ แหล่งที่มาสำคัญมีดังนี้

โรงงานผลิตยาฆ่าวัชพืช (herbicide) เกิดขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ หรือสารเจือปน (by product or impurity substance) ในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ยาฆ่าวัชพืช 2,4,5-Trichlorophenol หรือ phenoxy herbicides โดย จะมีสารในกลุ่มไดออกซิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิด 2,3,7,8-TCDD เป็นสารปนเปื้อนอยู่ในยาฆ่าวัชพืชดังกล่าวอยู่เสมอ ในปี ค.ศ. 1962-1971 ขณะที่อยู่ในช่วงของสงครามมหาเอเชียบูรพา ฝ่ายประเทศสหรัฐอเมริกาได้ใช้ยาฆ่าวัชพืชกลุ่มนี้ เพื่อทำลายแหล่งหลบซ่อนของฝ่ายตรงข้ามโดยได้โปรยสารดังกล่าวลงทางเครื่องบินประมาณ 48,000 ตัน ซึ่งเรียกกันทั่วไปว่า ผ่นเหลือง (agent orange) ซึ่งมีส่วนผสมของ 2,3,7,8-TCDD อยู่ประมาณ 50 µg/g

โรงงานอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ ที่มีการใช้สารฟอกขาวประเภทคลอรีนเป็นองค์ประกอบ หรือมีการใช้สารกลุ่ม pentachlorophenol โดยสารอินทรีย์บางชนิดที่มีอยู่ในพืชที่นำมาทำกระดาษ โอกาสที่สารดังกล่าวจะทำปฏิกิริยาทางเคมีกันและเกิดเป็นสารในกลุ่มไดออกซินได้

โรงงานอุตสาหกรรมอื่นๆที่ใช้ chlorophenol เช่นสารป้องกันเนื้อไม้ โรงงานที่ผลิตสารฆ่าหรือยับยั้งรา ยาฆ่าเชื้อโรค ยาฆ่าแมลง สี กาว เป็นต้น ซึ่งมีโอกาสเกิดสารกลุ่มไดออกซินได้มากในกระบวนการผลิตสารดังกล่าว

การเผาขยะที่พบเห็นได้ทั่วไปและใช้เตาเผา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อขยะดังกล่าวมีพลาสติกประเภทพีวีซี (polyvinylchloride, PVC) หรือยาฆ่าหญ้า และยาฆ่าแมลงจะมีโอกาสเกิดสารกลุ่มไดออกซินสูง มีรายงานการพบสารกลุ่มไดออกซินที่เกิดจากการเผาขยะจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ประเทศสวีตเซอร์แลนด์สูงถึง 0.6 $\mu\text{g/g}$

ของเสียประเภทน้ำมันที่ผ่านกระบวนการที่มีความร้อนสูง เช่นน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ซึ่งมีสาร PCBs ที่สามารถเปลี่ยนเป็น PCDDs/PCDFs ได้

ภูเขาไฟ ทำให้มีโอกาสพบสารไดออกซินได้ในหินที่มีอยู่ในธรรมชาติได้

เนื่องจากสารในกลุ่มไดออกซินพบอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมเช่นในดิน น้ำ อากาศ อาหาร เป็นต้น สารในกลุ่มนี้มีความคงตัวทางเคมีสูง สลายตัวยาก ละลายได้ดีในไขมัน จึงเป็นผลให้สะสมในไขมันของสิ่งมีชีวิต แหล่งสำคัญที่มนุษย์ได้รับสารนี้คืออาหาร การดูดซึมทางผิวหนังพบว่าการดูดซึมได้น้อยกว่าทางปาก ส่วนการหายใจจะได้รับสารนี้จากเตาเผาชนิดต่างๆที่ปล่อยอนุภาคที่มีสารนี้ปนเปื้อนอยู่ ดังนั้นการสูดอากาศที่มีการปนเปื้อนของสารนี้อยู่จึงเป็นสาเหตุให้ร่างกายรับสารนี้เข้าไป สารกลุ่มไดออกซินที่อยู่ในลำไส้จะถูกดูดซึมผ่านทางระบบน้ำเหลืองเข้าสู่กระแสเลือด และเข้าสู่เซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกาย สารในกลุ่มนี้สามารถสะสมอยู่ในร่างกายของมนุษย์และสัตว์เป็นเวลานาน

การพบสารกลุ่มไดออกซินในประเทศต่างๆ มีรายงานการพบในประเทศต่างๆทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มประเทศพัฒนาแล้ว เช่นทุกประเทศในกลุ่มสมาคมยุโรป สหรัฐอเมริกา แคนาดา ญี่ปุ่น เป็นต้น ส่วนในประเทศไทยโดยส่วนมากยังไม่มีรายงานการวิเคราะห์ แต่ปัจจุบันมีหลายหน่วยงานให้ความสนใจทั้งด้านสาธารณสุข สิ่งแวดล้อมและด้านการเกษตร กำลังดำเนินการวิเคราะห์ตรวจสอบเพื่อเก็บข้อมูลเพื่อดำเนินมาตรการแก้ไขต่อไป

เหตุการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของไดออกซินสู่สิ่งแวดล้อม

- ปี ค.ศ.1960 ไข้ในสงครามเวียดนาม
- ปี ค.ศ.1976 เกิดอุบัติเหตุที่โรงงานผลิต trichlorophenol ที่เมือง เซวิโซ ประเทศอิตาลี ทำให้พบ 2,3,7,8-TCDD ในผักผลไม้ถึงระดับ 50 $\mu\text{g/g}$

- ปี ค.ศ.1979 เกิดการปนเปื้อนสารไดออกซินที่น้ำตกในแองการา
- ปี ค.ศ.1981 พบไดออกซินจากเหตุไฟไหม้ในนิวยอร์ก
- ปี ค.ศ.1971, 1982-83 พบ 2,3,7,8-TCDD สูงถึง 30 ppm ที่รัฐมิสซูรี เกิดจากการใช้น้ำมันที่ทิ้งแล้วมาควบคุมฝุ่น
- ปี ค.ศ.1979 ทำให้เกิดโรค Yusho ที่ประเทศญี่ปุ่นและไต้หวัน
- ปี ค.ศ. 2000 พบการปนเปื้อนสารกลุ่มไดออกซินในสินค้าอุปโภคบริโภคในประเทศเบลเยียมในระดับที่สูง เหตุการณ์ครั้งนี้ทำให้ประเทศไทยระงับการนำเข้าผลิตภัณฑ์ทั้งหมดเข้าประเทศไทย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

คัดกรองสารที่มีคุณสมบัติย่อยสลายสารที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายไดออกซินจากดิน ศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและบ่งชี้ชนิดของของราที่คัดแยกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ร่าที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายไดออกซิน พร้อมทั้งบ่งชี้ชนิดของเชื้อรานั้นเพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้บำบัดสารพิษปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

แนวคิดและทฤษฎี

เนื่องจากสารกลุ่มไดออกซินเป็นสารที่มีความคงตัวทางเคมีสูง มีครึ่งชีวิตนานถึง 7 ปี ซึ่งถูกย่อยสลายยาก ในการกำจัดสารกลุ่มนี้มีทั้งวิธีทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ โดยที่วิธีทางกายภาพที่ใช้คือการเผาไหม้ซึ่งเป็นวิธีเดียวที่จะทำลายสารกลุ่มนี้ได้หมด ซึ่งต้องใช้ความร้อนสูงถึง 820 ถึง 1000 องศาเซลเซียส เป็นวิธีที่ใช้พลังงานสูงและเป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนสูงมาก ส่วนวิธีทางชีวภาพนั้นจุลินทรีย์โดยทั่วไปไม่สามารถย่อยสลายสารในกลุ่มนี้ได้หรือย่อยได้ช้ามาก แต่วิธีทางชีวภาพก็เป็นทางเลือกที่ดีในการย่อยสลายสารกลุ่มไดออกซินเพราะเมื่อพิจารณาจากต้นทุนที่ต้องใช้วิธีการทางชีวภาพเป็นทางเลือกที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงเพื่อใช้ในการย่อยสลายสารกลุ่มนี้ ในกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์โดยจุลินทรีย์นั้นราและแบคทีเรียนั้นมีบทบาทสำคัญในวัฏจักรคาร์บอนของโลก จากศักยภาพของจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มนี้จึงมีการนำไปใช้ในกระบวนการบำบัดและกำจัดของเสีย ขยะอันตรายที่มีพิษกับสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากกระบวนการในการผลิตอุตสาหกรรมต่างๆ เช่นน้ำมันที่รั่วลงทะเล ตัวทำละลายที่มีหมู่ฮาโลเจนเป็นส่วนประกอบ และสารในกลุ่มไดออกซินที่ก่อให้เกิดวิกฤตในสภาวะแวดล้อม

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. การศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารกลุ่มไดออกซิน

จากการศึกษาการย่อยสลายสารไดออกซินโดยจุลินทรีย์พบได้ทั้งในแบคทีเรีย รา และยีสต์ แต่ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางที่สุดคือแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียมีความสามารถในการเจริญได้เร็วและสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ง่ายกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น

การศึกษาเรื่องการย่อยสลาย 2,3,7,8- TCDD โดยจุลินทรีย์เริ่มโดย Kearny และคณะในปี 1972 , Matsumura และ Benezet (1973) Ward และ Matsumura ในปี 1978 โดยเริ่มต้นก่อนการระเบิดของโรงงานในเมือง Seveso ในประเทศอิตาลีที่ส่งผลให้มีสารไดออกซิน (2,3,7,8-TCDD) ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเป็นปริมาณมาก จากการศึกษาของ Phillippi และคณะ (1981) และ Quensen และ Matsumura พบว่าสาร 2,3,7,8- TCDD ถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่พบในดินบริเวณที่เกิดการระเบิดของโรงงาน

Phillippi และคณะ (1982) ได้ศึกษาสารมัธยันตร์ (metabolite) ที่เกิดจากการย่อยสลาย 2,3,7,8- TCDD โดยแบคทีเรียเป็นครั้งแรก พบว่าสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยเป็นสารที่มีชีวมากกว่าสาร 2,3,7,8 - TCDD และจากการทำ Thin layer chromatography (TLC) และพบ

ว่าเป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยา hydroxylation ของสาร 2,3,7,8 - TCDD จากการพบวิเคราะห์โดย GC - MS พบว่าเป็นสาร 1-hydroxy -2,3,7,8- TCDD แม้ว่าสารมัธยันตร์ที่พบมีจำนวนน้อยและมีความคงตัวในสิ่งแวดล้อมแต่ก็พบว่าสารชนิดนี้มีความไวต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์

Cerniglia และคณะ (1979) ศึกษาการย่อยสลายสารไดเบนโซฟีวแรนโดยแบคทีเรียและรา พบว่า การย่อยสลายสารไดเบนโซฟีวแรนในราและแบคทีเรียแตกต่างกันคือ แบคทีเรียย่อยได้สารที่ไม่มีความคงตัวและให้สารมัธยันตร์ที่เป็นพิษหลายชนิด ส่วนการย่อยสลายสารโดยราทำให้สารตัวกลางที่มีความคงตัวสูงและสามารถเปลี่ยนเป็นสารอื่นที่ไม่มีความเป็นพิษ ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายสารพิษในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

รา *Cunninghamella elegans* และ *Beijerinckia* B8/36 (mutant strain) ออกซิไดส์ไดเบนโซฟีวแรนไปเป็น 2,3 - dihydroxydibenzofuran และ 2,3 - dihydrodibenzofuran แต่จะแตกต่างกันคือการย่อยโดยแบคทีเรียจะให้ *cis*- isomer ของ 2,3 - dihydroxydibenzofuran ซึ่งเป็นสารที่ไม่คงตัวเป็นอย่างมาก และเปลี่ยนเป็นสารผสมระหว่าง 2 - hydrodibenzofuran และ 3-hydrodibenzofuran อย่างรวดเร็ว และยังให้สารอนุพันธ์ของ isopropylidene แต่สำหรับการย่อยสลายจากรา *C.elegans* จะให้ *trans* - isomer ของ 2,3 - dihydroxydibenzofuran ซึ่งเป็นสารที่มีความคงตัวสูงและให้สารมัธยันตร์เฉพาะ 2,3 - dihydroxydibenzofuran เมื่อให้ความร้อนสูงในสภาวะที่เป็นกรด จากการทดลองนี้เป็นได้ว่ามีวิธีการย่อยสลายไดเบนโซฟีวแรนที่แตกต่างกันในแบคทีเรียและรา

2.1.1 การย่อยสลายสารกลุ่มไดออกซินโดยแบคทีเรีย

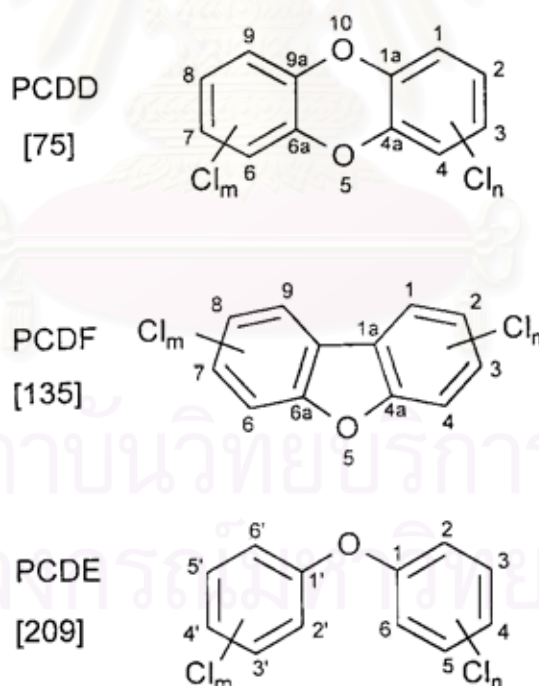
2.1.1.1 การย่อยสลายสารกลุ่มไดออกซินแบบ co- oxidation โดยแบคทีเรีย

จากการศึกษาของ Cerniglia และคณะ (1979) และ Klecka และ Gibson (1979,1980) โดยแบคทีเรียย่อยสลายเนฟธาไลน์ *Pseudomonas* sp. และแบคทีเรียการย่อยสลาย Biphenyl *Beijerinckia* (ต่อมาก็คือ *Sphingomonas*) ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไดออกซิน ไดเบนโซฟีวแรนและสารอนุพันธ์ที่เป็น monochlorinated อีกหลายชนิด ในการย่อยสลายสารเหล่านี้ทุกชนิดเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์และ dead- end product เพิ่มมากขึ้น แบคทีเรียจะโจมตีบริเวณตำแหน่ง 1,2 และ 2,3 ของวงแหวนอะโรมาติก สารผลิตภัณฑ์ที่พบเป็นตัวเริ่มต้น ได้แก่ *cis*- 1,2 - dihydrodiol ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นเหมือนกับการย่อยสลายเบนซีน โทลูอีน และ biphenyl และสารประกอบอะโรมาติกอื่นๆ สำหรับสาร dihydrodiol dehydrogenase ที่พบในสารเลี้ยงเซลล์ของ *Pseudomonas* sp. NCIB 9816 (Cerniglia และคณะ 1979) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายเนฟธาไลน์ โดยที่เอนไซม์จากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดสามารถแตกวงแหวนอะโรมาติกแล้วให้สารสี่เหลี่ยมจาก *meta* - cleavage product ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้โครงสร้างของ 2- hydroxyruconate semialdehyde

2.1.1.2 การย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างคล้ายไดออกซินโดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย DD,DF,DE แบบ mineralization

การย่อยสลายสารที่ไม่มีการเติมหมู่ฮาโลเจนบนคาร์บอนหลัก เริ่มจากการศึกษาการย่อยสลาย DF โดยจุลินทรีย์ในสารรักษาเนื้อไม้ ซึ่งมี PAHs อื่นๆผสมอยู่ด้วย ซึ่งรายงานโดย Lee และคณะ (1983) และ Foght และ Westlake (1988) การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย mineralization สารกลุ่มไดออกซินชนิดใหม่เป็นการค้นพบตัวแทนของรูปแบบการย่อยสลายสารจำพวก non-halogenated ที่สมบูรณ์มากขึ้น รวมไปถึงสารอนุพันธ์ที่มีหมู่คลอรีนบางชนิด

แบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นแกรมบวกในจีเนส *Brevibacterium* (Strubel และคณะ 1989,1991) หลังจากนั้นถูกจัดจำแนกใหม่เป็นแบคทีเรียจีเนสใหม่ *Terra bacter* โดย Schmid และคณะ (1997) นอกจากนี้แบคทีเรียย่อยสลายสายพันธุ์เดิมที่ถูกจัดเป็นกลุ่ม *Pseudomonas* (Fortnagel และคณะ 1989 a,b,1990) ถูกจัดกลุ่มใหม่เป็น *Sphingomonas* โดยใช้วิธี 16s r DNA sequence analyses (Moore และคณะ 1993)



รูป 2 แสดงตำแหน่งบนโครงสร้างสารกลุ่มไดออกซินที่มีหมู่คลอรีนเข้ามาจับกับโมเลกุลในตำแหน่งต่างๆ (Wittich ,1998)

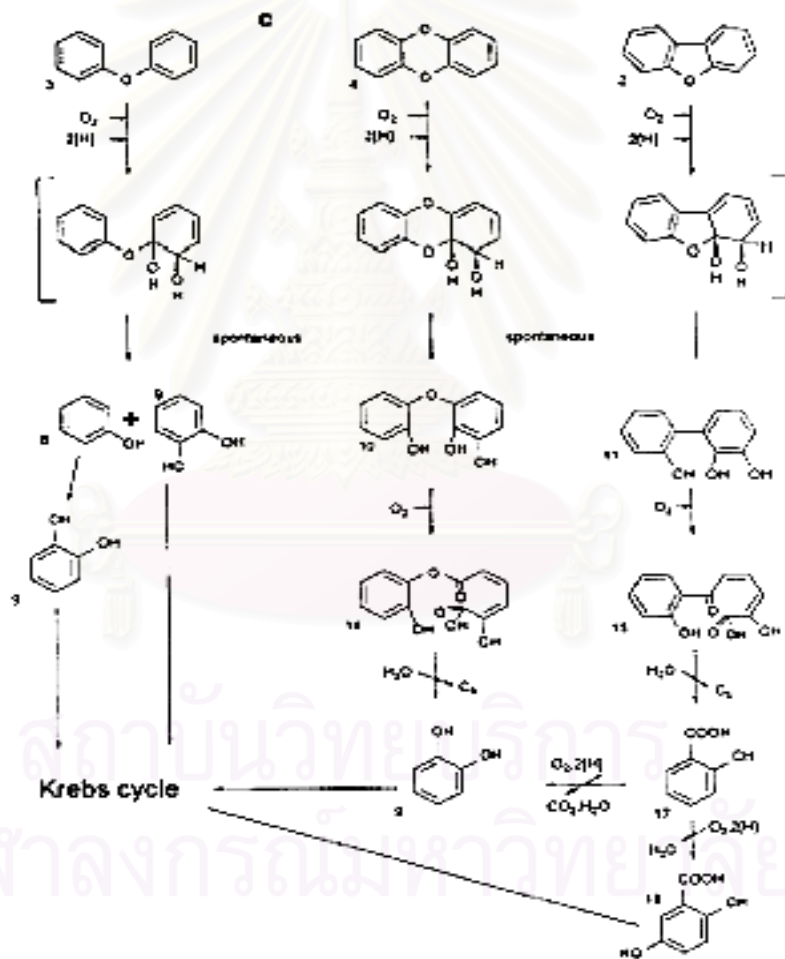
การอธิบายวิธีการย่อยสลายกลุ่มไดออกซิน ที่ชัดเจนเกี่ยวกับวิถีเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบใหม่ที่จำเพาะต่อตำแหน่งแขนทั้งสองข้างของอะตอมคาร์บอนที่เป็นอะตอมหลักไปจนถึงสะพานอีเทอร์ จาก DD,DF,DE 3- carboxy และ 4- carboxydiphenyl ether สาร hemiacetal ที่ไม่เสถียร จะเกิดจากปฏิกิริยานี้ ซึ่งจะถูกละลายเป็น 2,2, 3- trihydroxybiphenyl, 2,2', 3- trihydroxydiphenyl ether ,phenol และ catechol หรือ phenol และ protocatechuate ในกรณีของ carboxylated diphenyl ether

การเกิด dihydroxylated ของ วงแหวนอะโรมาติกของ trihydroxy intermediates (รูป 2C) เกิดจาก meta – cleavage คือการโจมตีคาร์บอนบริเวณที่เป็นตำแหน่ง meta ของวงแหวนอะโรมาติก ภายใต้ปฏิกิริยา hydrolysis ของ side chain พบว่ามีสาร salicylate และ catechol เกิดขึ้นตามลำดับ ในระหว่างการย่อยสลาย DF ตามปกติ จะมีปฏิกิริยา hydrolysis เกิดขึ้นด้วยการเติม phenolic OH เข้าไปในพันธะคู่ของสาย aliphatic ทำให้เกิด by product เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีปฏิกิริยาอื่นที่เกิดที่นำไปสู่ dead- end product ที่เพิ่มมากขึ้น โดยเกิด ortho-cleavage วงแหวนอะโรมาติกแบบไม่ตั้งใจ ก่อให้เกิดสารอนุพันธ์ muconic ของ 2,2,3- trihydroxydiphenyl ether

สำหรับวิธีการย่อยสลายในรูปที่ 3 ถูกนำเสนอเพื่ออธิบายการเกิดการแตกตัวของสารประกอบ diaryl ether (Enagesser และคณะ 1989,1990;Fortnagel และคณะ 1989a,b,1990; Harm และคณะ 1990; Schmidt และคณะ 1992 a.; Strubel และคณะ 1991; Wittich และคณะ 1990,1992 อ้างถึงใน R.M.Wittich ,1998) สำหรับการย่อยสลาย 3-methyldiphenyl ether โดยทั่วไปเป็นไปตามการย่อยสลายสารมัธยันตร์ที่เป็น phenol และ 4- methycatechol ซึ่งการย่อยสลายเกิดโดยวิถีของ ortho- cleavage ที่ผิดปกติ (Schmidt และคณะ 1992b) จากการตรวจสอบกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยใช้ $^{18}\text{O}_2$ ให้ผลชัดเจนว่าเกิดจาก angular dioxygenation ของ diaryl ether (Wilkes และคณะ 1992) สำหรับสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็น analoge ของสารกลุ่มไดออกซินซึ่งมีอะตอมของสารอื่นเช่น N,S จะถูกโจมตีโดย angular dioxygenase แบบเดียวกัน ผลบางส่วนที่ได้จากข้างต้นที่กล่าวมาถูกยืนยันโดย Monna และคณะ (1993) ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายไดเบนโซพิวแรนได้และบ่งชี้ว่าเป็น *Staphylococcus auricalans* ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถโจมตีสารไดออกซิน และสารกลุ่มที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันได้แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตบนสารเหล่านี้ได้

สำหรับการย่อยสลาย DE จะคล้ายกับวิถี catabolic ในช่วงเริ่มต้น ซึ่งถูกรายงานโดย Pfeifer และคณะ (1989) ภายใต้ปฏิกิริยา dioxygenation , dihydrogenation ของ dinydrodiol และ meta - cleavage ที่เกิดขึ้นในภายหลังของ 2,3- dihydroxydiphenyl ether ระหว่าง

ตำแหน่ง C1 และ C2 ทำให้เกิด ester ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาพบว่า มี phenol และ dead-end product 2-pyrone-6-carboxylic acid เกิดขึ้น (Pfeifer และคณะ ,1993) Phenol เป็นสารที่ถูกบ่งชี้ว่าเป็นสารมัธยันตร์ตัวหนึ่งในการย่อยสลาย DE โดยแบคทีเรีย *Pseudomonas cruciviae* โดยที่แบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะปล่อยสาร 2-phynoxymuconic acid ออกมาในระหว่างการเจริญ ซึ่งสารนี้เป็น ortho-cleavage product ของ 2,3-dihydroxydiphynanyl ether (Takase และคณะ,1986) กระบวนการย่อยสลายที่เกิดโดยแบคทีเรียกลุ่ม 3-carboxydiphynanyl ether, *Pseudomonas* ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็น phenol ซึ่งเป็น dead-end product (Topp และ Akntar ,1990,1991) ที่ยังคงต้องกำจัดต่อไป



รูป3 ลักษณะการย่อยสลายแบบ mineralization ของสารในกลุ่มไดออกซินโดยแบคทีเรีย (Wittich ,1998)

ระบบเอนไซม์ที่สำคัญของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารกลุ่ม DD ของแบคทีเรียได้แก่ dioxygenase ซึ่งระบบ dioxin dioxygenase ของแบคทีเรียย่อยสลาย DD และ DF สายพันธุ์ *Sphingomonas* sp. RW1 – containing reducease ซึ่งจะขนส่งอิเล็กตรอนจาก NADH ผ่านทาง ferredoxin ไปยัง terminal heterotetrameric oxidase ซึ่ง oxygenase ชนิดนี้จะจับกับ aromatic substrate และ dioxygen

Fortnagel และคณะ (1990) ศึกษาการย่อยสลายไดเบนโซพิวแรนโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ HH 69 และ mixed culture HH 27 ซึ่งเชื้อเหล่านี้ถูกแยกมาจากตัวอย่างดิน พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม DF เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียวในสภาวะที่มีอากาศ กระบวนการย่อยสลายเกิดขึ้นผ่านทาง salicylic acid ซึ่งแตกแขนงเป็น gentisic acid และวิถี catechol ทั้ง salicylic acid และ gentisic acid สะสมอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ HH69 และกรดที่เกิดขึ้นจะค่อยๆถูกเมตาโบไลต์ไปหลังจากหยุดการเจริญ นอกจากนี้ยังพบ 2,3 - trihydroxydiphynanyl จากอาหารเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ mutant ของ HH69 ซึ่งไม่สามารถเจริญบน DF ได้นาน

Ishiguro และคณะ (2000) ได้ศึกษาการย่อยสลาย DF และ DD โดย *Pseudomonas acruiginosa* และ *Xanthomonas maltophilia* วัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อคัดกรองว่ามีความสามารถในการย่อยสลาย DD เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ ในการกำจัดสาร DD ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งในการทดลองนี้ได้นำเอาสาร DD ใช้เป็นสารทดสอบในการคัดกรองเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลาย DD พบว่าเชื้อ *P. acruiginosa* และ *X. maltophilia* สามารถย่อยสลาย DF ได้ ซึ่งเชื้อทั้งสองถูกแยกมาจากโรงงานบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ สำหรับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมของการย่อยสลาย DF ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH 7 สำหรับ *P. acruiginosa* ซึ่งมีอัตราการเจริญสูงในอาหารที่มี DF เป็นแหล่งคาร์บอน แสดงความสามารถในการเจริญสูงใน dibenzo-p-dioxin เจริญได้ปานกลางใน 1-chlorodibenzo-p-dioxin, 2-CDD และ 2,8-DCDD และเจริญได้น้อยใน 2,6-DCDD และ 1,2,3,4-TCDD และไม่เจริญใน octachlorodibenzo-p-dioxin จากผลที่ได้แสดงว่าการลดลงของความสามารถในการย่อยสลาย DD เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของอะตอมคลอรีนของ DD นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการย่อยสลายยังขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของเชื้อ อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 1,2,3,4-TCDD ของเชื้อมีสูงถึงแม้ว่ามีอัตราการเจริญต่ำ สำหรับการย่อยสลาย DF พบว่า hydroxy DF, 2-hydroxy-3-allyl-benzofuran และ 2-carboxyvinylloxyphenyl acetic acid ซึ่งตรวจสอบโดย GC-MS เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลาย DF โดย *P. acruiginosa* ซึ่งอาจใช้เป็นแนวทางในการค้นหาวิธีการย่อยสลาย DD ต่อไป

2.1.2 การย่อยสลายสารไดออกซินโดยรา

2.1.2.1 การย่อยสลาย diaryl ethers โดยเอนไซม์ระบบ P-450 monooxygenase

เราสามารถเติมหมู่ไฮดรอกซีให้กับสารประกอบอะโรมาติก ได้โดยตรงหรือภายใต้ปฏิกิริยา hydrolysis ของ epoxides ที่เกิดโดยระบบเอนไซม์ cytochrome P - 450 oxidase ซึ่งเป็น haemoprotein เป็นระบบที่สิ่งมีชีวิตชั้นสูง (eukaryote) โดยทั่วไปมีในการกำจัดสารพิษประเภท สารประกอบอะโรมาติกและ xenobiotic นอกจากนี้ยังใช้ในการสังเคราะห์สารประเภท steroids การใช้ประโยชน์จากระบบ cytochrome P-450 ของจุลินทรีย์ในการกำจัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม ถูกศึกษาโดย Guengerich (1995)

Kellner และคณะ (1997) ได้สรุปศักยภาพของเอนไซม์ชนิดนี้สำหรับวัตถุประสงค์ในการ ใช้ประโยชน์เพื่อกำจัดสารที่เป็นพิษในสิ่งแวดล้อมเพื่อพัฒนาในด้าน protein engineering นอกจากนี้ Ohe และคณะ(1994) ได้นำรูปแบบการย่อยสลาย DE โดยใช้ระบบเอนไซม์ P-450 mediated cleavage และสารอนุพันธ์

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DF โดย *Cunninghamella elegans* ให้ผลสาร 2,3-dihydrodiol ซึ่งมีความเสถียรที่อยู่ในรูปของ Trans -2,3- dihydrodiol ภายใต้สภาวะของแข็งทำให้สารประกอบย่อยสลายไปเป็น 2- hydroxy- และ 3-hydroxydibenzofuran และน้ำ สารสกัด จากเซลล์ยังสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ trans-dihydrodiol ไปเป็น 2,3-dihydroxydibenzofuran

การรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ระบบ cytochrome P-450 monooxygenase ยังไม่ชัดเจน มากนักคาดว่าจะมีความเกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารพิษต่างๆ เนื่องจากพบระบบเอนไซม์นี้ในสายพันธุ์ต่างๆของจีนัส *Aspergillus* *Cunninghamella* และ *Trichosporon* ซึ่งสามารถเติมหมู่ไฮดรอกซีให้กับสารประกอบอะโรมาติกได้เหมือนกัน

Sariaslani (1991) ได้รวบรวมระบบเอนไซม์ P-450 ที่เกี่ยวข้องกับกรย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ

สำหรับการศึกษากการย่อยสลาย DE ในยีสต์ พบว่ายีสต์ *Trichospon beigellii* สามารถย่อยสลาย DE ให้กลุ่มของผลิตภัณฑ์ เกิดจากปฏิกิริยา hydroxylation ที่แตกต่างกันเนื่องจากความจำเพาะต่อตำแหน่งของสารตั้งต้นที่ย่อยสลาย (Schauer อ้างถึงใน Wittich, 1998) นอกจากนี้ยังพบการย่อยสลาย DE โดยยีสต์ *Cryptococcus humiculus* SBUG 517 (Schauer และคณะ ,1993) ซึ่งเมื่อย่อยสลาย DE จะให้สารผลิตภัณฑ์ที่เป็นฟีนอล

Hofmam และคณะ (1992) ศึกษาการย่อยสลายไดเบนฟูแรนโดยราในจีนัส *Fusarium* โดยสามารถใช้ DF เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ ซึ่งตำแหน่งของการถูกย่อยบนวงแหวนอะโรมาติก และกระบวนการเกิดการแตกวงของวงแหวนอะโรมาติกเป็นตัวแทนที่น่าสนใจใน

การศึกษาการเกิด catabolism ของสารประกอบที่มี heteroaromatics โดยราต่อไป ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DF โดยปฏิกิริยา hydroxylation นั้นเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางโดยราและยีสต์ (Hammer และ Schhauer, 1997)

2.1.2.2 การย่อยสลายสารกลุ่มไดออกซินโดยระบบเอนไซม์ peroxidase ของราในกลุ่ม white rot fungi

ระบบเอนไซม์ที่สำคัญที่เกิดขึ้นใน white rot fungi คือ free-radical oxidation system ซึ่งมีความแตกต่างกับระบบเอนไซม์ P-450 monooxygenase โดยราในระบบเอนไซม์ peroxidase ใน white rot fungi นี้ไม่มีความจำเพาะต่อโครงสร้างทางเคมีของสารอินทรีย์ที่เป็นสารตั้งต้นบทบาทสำคัญของระบบเอนไซม์นี้ที่มีต่อวงจรชีวิตของ white rot fungi คือการ oxidation และ depolymerisation ของลิกนินพอลิเมอร์ เพื่อที่จะเพิ่มจำนวนของเซลล์ให้มากขึ้น ซึ่งราสามารถใช้เซลล์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตมวลชีวภาพให้เพิ่มมากขึ้นการปลดปล่อย CO₂ จากการย่อยสลายลิกนินมีค่า เนื่องจากคุณสมบัติที่ไม่จำเพาะต่อสารประกอบอินทรีย์ ทำให้เอนไซม์ peroxidase ของรา white rot fungi สามารถย่อยสลายสารกลุ่ม xenobiotics เช่นยาฆ่าแมลงชนิดต่างๆ สารกลุ่ม aliphatic และ aromatic เช่น PCDD/DF

การย่อยสลาย 2,3,7,8- TCDD peroxidase โดยราในกลุ่ม white rot *Phanerochaete chrysosporium* ถูกศึกษาเป็นครั้งแรกโดย Bumpas และคณะ (1985) ซึ่งพบว่าการเกิด CO₂ จากการย่อยสลาย 2,3,7,8- TCDD มีน้อยกว่า 2.5% เมื่อเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารตั้งต้น

สำหรับการศึกษารายละเอียดของระบบการทำงานของ lignin peroxidase (ligninase) ของราถูกนำเสนอโดย Hammel และคณะ (1986) พบว่ามี cationic radical เกิดขึ้นจาก DD นอกจากนี้ยังพบว่า 2-CDD ถูกย่อยโดยการเกิด oxidation บริเวณวงแหวนอะโรมาติก

ในระบบที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน (nitrogen-limited) ของการเลี้ยงรา *P.cryosporium* เพื่อย่อยสลายสาร PAHs หลายชนิดพบว่า ระบบของ ligninase ที่ใช้ในการย่อยสลาย DD มีการแตกพันธะอีเธอร์และเกิด hydroxylation บริเวณด้านข้างซึ่งนำไปสู่การเกิด catechol และ higher hydroxylated derivatives (Bumpus และคณะ, 1989)

จากการศึกษาของ Valli และคณะ (1992) โดยใช้สาร 2,7-DCDD ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำกว่า 2,3,7,8- TCDD มาเป็นแบบในการอธิบายวิธีการกำจัดคลอรีน 1 อะตอมออกจากสารตั้งต้นซึ่งเกิดขึ้นพร้อมกับการเกิดสาร 4-chlorocatechol นอกจากนี้ยังพบ dimethyl ether เป็นสารมัธยันตร์จากสาร 4-chlorocatechol ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยา demethylated อีกครั้ง โดย lignin peroxidase หรือ manganese-dependent peroxidase ของ *P.cryosporium* ซึ่งปฏิกิริยานี้จะก่อให้เกิด 4-chlorocatechol อีกครั้ง นอกจากนี้ยังพบ chloroquinone จำนวนเล็กน้อย และ

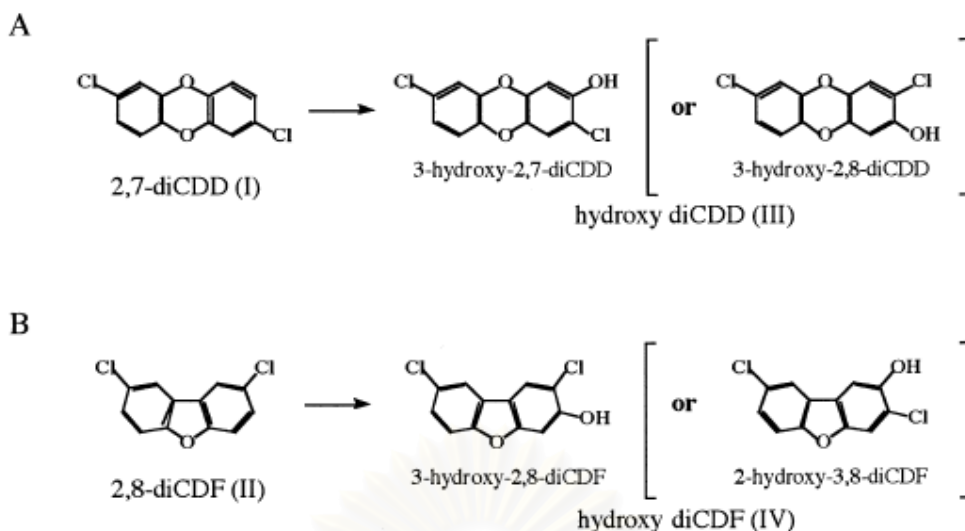
1,2,4- trihydroxybenzene monomethyl ether

Klecka และ Gibson ,1979 ได้ศึกษาถึงวิธีการย่อยสลายสารไดออกซินของแบคทีเรียพบว่าการย่อยสลายสารประกอบที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ สารผลิตภัณฑ์บางอย่างที่ได้มีความเป็นพิษสูง ดังนั้นจึงมีการสนใจศึกษาการย่อยสลายสารไดออกซินโดยเชื้อรา ซึ่งการศึกษาการย่อยสลายสารไดออกซินโดยเชื้อรามีการศึกษาไม่มากนัก มีการศึกษาการย่อย 2,3,7,8-TCDD ครั้งแรกโดยเชื้อรา *Phanerochaete cryosporium* ซึ่งจัดเป็นเชื้อราในกลุ่ม white rot fungus โดย Bumpus และคณะ (1985) ซึ่งจากการศึกษาในเวลาต่อมาพบว่าเชื้อรามีความสามารถในการย่อยสลายสารไดออกซินได้สมบูรณ์กว่าการย่อยโดยแบคทีเรีย และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้ก็ไม่มีความเป็นพิษเหมือนในแบคทีเรีย แต่จะใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนานกว่า จากการศึกษาของ Takada และคณะ (1996) โดยทดลองใช้ 2,3,7,8-TCDD , DF และสารประกอบ DF, DD ที่มีหมู่ฮาโลเจนแตกต่างกันเป็นสารตั้งต้นให้เชื้อ *Phanerochaete sordida* ย่อยสลาย พบว่าเชื้อราใช้เวลา 7 วันในการย่อยสลาย 10-60% ของสารตั้งต้น ซึ่งอัตราการย่อยสลายนี้นับกับปริมาณและชนิดของสารที่ย่อยสลาย

Mori และ Kondo (2002) ศึกษาการย่อยสลายสาร DD และ DF ที่มีหมู่ฮาโลเจนเข้ามาจับโดยใช้รา *Phlebia lindetneri* ซึ่งเป็นราในกลุ่ม white rot fungi พบว่าราสามารถย่อยสาร 2,7-DCDD ได้ 16.5 เปอร์เซ็นต์ และย่อย 2,7-DCDF ได้ 5.8 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 5 วัน โดยสารมีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 25 μM และจากการศึกษาสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ GC-MS พบว่าสารมีปริมาณน้อยมาก และบ่งชี้ชนิดของสารว่าเป็น hydroxy - DCDD และ hydroxy - DCDF ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการเติมหมู่ hydroxy ให้กับสาร 2,7-DCDD และ 2,7-DCDF โดยรา *P. lindetneri*

ดังรูปที่4

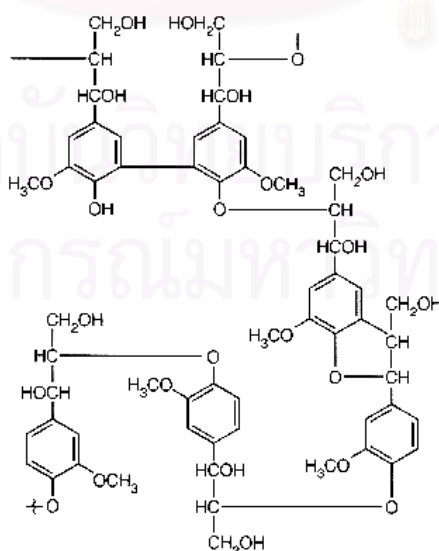
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่4 สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายสาร 2,7-DCDD (A) และ 2,7-DCDF (B) (Mori และ Kondo ,2002)

2.2. วิธีการคัดแยกกราย่อยสลายสารกลุ่มไดออกซินจากดิน

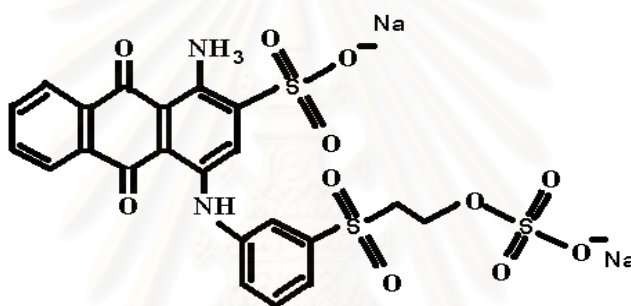
ในการศึกษาการย่อยสลายสารไดออกซินของเชื้อราในเบื้องต้น เนื่องจากสารกลุ่มไดออกซินเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง จึงใช้สารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็น analog ของไดออกซิน เต็มลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อจากดินตัวอย่าง ซึ่งดินตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อส่วนใหญ่ถูกเก็บจากบริเวณป่า หรือบริเวณที่มีซากพืชทับถมกันเป็นเวลานาน เนื่องจากในดินนั้น จะมีการสะสมของลิกนินที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์พืช ซึ่งลิกนินมีลักษณะโครงสร้างที่เป็นวงแหวนอะโรมาติกคล้ายสารไดออกซิน จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ดินบริเวณนั้นจะมีเชื้อราที่มีเอนไซม์ย่อยสลายประกอบอะโรมาติกได้



รูปที่5 สูตรโครงสร้างของลิกนิน (Lignin)

จากการศึกษาของ Sato และคณะ (2000) โดยทำการคัดแยกสายย่อยสลายไดออกซินโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek Dox agar กับ Malt extract agar ที่มีสี Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (รูปที่ 6a) และสารฆ่ารา Benomyl (รูปที่ 6b) ผสมอยู่ เททับกันเป็น 2 ชั้น เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดกรองราในเบื้องต้น จากนั้นจึงนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยไคเบนโซพิวแรนและไดออกซิน ต่อไป พบว่าราที่คัดแยกได้มีความสามารถในการย่อยสลาย 2,7-DCDD ได้

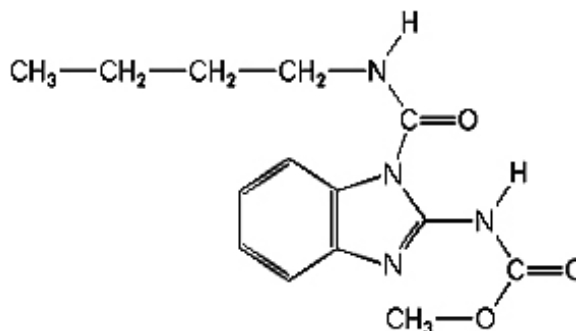
สำหรับสี RBBR ที่ใช้ในการคัดกรองสายย่อยสลายสารไคเบนโซพิวแรนและไดออกซิน ในเบื้องต้นนั้นเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกคล้ายไดออกซิน และเป็นสารที่มีสีน้ำเงิน ดังนั้นจึงสามารถสังเกตผลการย่อยได้ง่าย เมื่อมีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่6a สูตรโครงสร้างของสี Remazol brilliant blue R (RBBR)

Ulmer และคณะ (1984) ได้ทดลองใช้สี RBBR เป็นสารตั้งต้นในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่ม lignin peroxidase ที่ได้จากรา นอกจากนี้ Pasti และคณะ (1991) ได้รายงานถึงความสัมพันธ์กันของการย่อย lignocellulose และการย่อยสลายสี RBBR ของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยลิกนินของ *Streptomyces* นอกจากนี้ Shin และคณะ (1997) ทำการผลิตและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ peroxidase ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Pleurotus ostreatus* ซึ่งเป็นราในกลุ่ม white rot fungi โดยใช้สี RBBR เป็นสารตั้งต้นของการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

Benomyl เป็นสารฆ่าราที่มีการรายงานครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1968 มีความเป็นพิษต่อราและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ถูกใช้เป็นสารปราบศัตรูพืชเพื่อป้องกันแมลงและราก่อโรคพืช โดยที่สารชนิดนี้มีสูตรโครงสร้างที่มีวงแหวนอะโรมาติก ซึ่งเมื่อเติมสารนี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยกสายย่อยไคเบนโซพิวแรนจะกำจัดราชนิดอื่นที่ไม่สามารถทนต่อสารฆ่าราชนิดนี้ได้ ซึ่งสายย่อยไคเบนโซพิวแรนที่ต้องการคัดแยกนั้นมีโอกาสที่จะโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารฆ่าราชนิดนี้ได้สูงเนื่องจากมีระบบเอนไซม์ที่สามารถย่อยสารที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกได้



รูปที่6b สูตรโครงสร้างของสาร Benomyl

2.3. การจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของรา

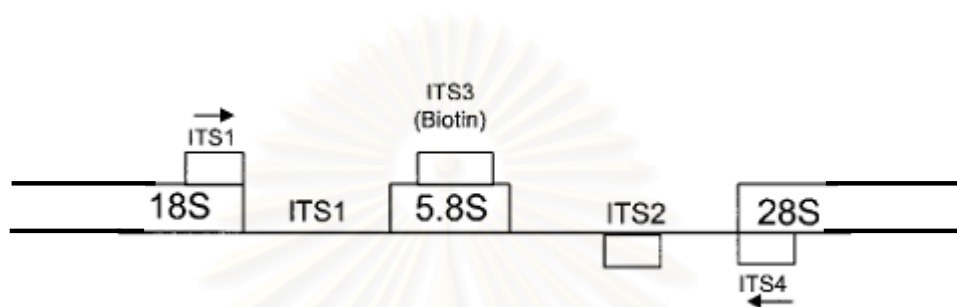
ในปัจจุบันราถูกจัดแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆมากมาย ในการจัดจำแนกและบ่งชี้ราแต่ละชนิดจะมีการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางพันธุศาสตร์ ความไวต่อสารเคมีและสารยับยั้งราชนิดต่างๆ การทดสอบทางกายภาพและทางชีวเคมี ส่วนประกอบของผนังเซลล์ และส่วนประกอบของโปรตีน ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรานั้นสามารถบ่งชี้ราได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆตามลักษณะเส้นใย สปอร์และลักษณะพิเศษบางอย่างที่สร้างขึ้น วิธีการพันธุศาสตร์เป็นวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้สามารถบ่งชี้ชนิดของราได้อย่างสะดวกและรวดเร็วขึ้น

2.3.1 การบ่งชี้ชนิดของราในระดับสปีชีส์โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัส ของตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS)

การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ประมวลรหัสของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอในการจัดจำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นบริเวณที่ประกอบด้วยบริเวณอนุรักษ์และบริเวณที่มีความแปรผันทางพันธุกรรม ซึ่งมีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้ประกอบด้วยยีนประมวลรหัสของ large subunit และ small subunit ของไรโบโซม และมีบริเวณช่องว่างระหว่างสอง subunit (spacer regions) ซึ่งเรียกว่า internal transcribed spacers (ITS)

ITS ประกอบด้วย 2 บริเวณที่ไม่ประมวลรหัสใดๆและมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ในอาร์ดีเอ็นเอ (rDNA) ระหว่าง small subunit และ 5.8S subunit และ

large subunit ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์สูง บริเวณ ITS นี้ก็นิยมนำมาใช้ในการจำแนกลักษณะของราเนื่องจากเป็นบริเวณที่มีขนาดเล็กประมาณ 500-800 เบส สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้คู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer และบริเวณ ITS นี้เป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันอย่างชัดเจนในแต่ละสปีชีส์ (Bridge และคณะ, 1998)



รูปที่ 7 แสดงบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และตำแหน่งจับของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ ITS1 (forward primer) และ ITS4 (reverse primer) (Lindsley และ คณะ ,2001)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico CO.,Ltd.,Japan.
2. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และ A200S บริษัท Sartorius, U.S.A.
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 บริษัท Spectronic Instrument, U.S.A.
4. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น VSM-3 บริษัท Snelton Scientific Inc., U.S.A.
5. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (digital pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 บริษัท Eutech Cybernetics, Singapore.
6. ตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 บริษัท Sanyo Electric Co.,Ltd., Japan.
7. เครื่องเขย่า (rotary shaker) รุ่น G10 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
8. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freeze) อุณหภูมิ -20° C ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
9. เครื่องเขย่า (gyrotory shaker) รุ่น G10 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งพื้น (centrifuge) รุ่น ของบริษัท Kubota, Japan
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
13. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.
14. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
15. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
16. กรวยแยก (seporatory funnel) ขนาด 500 มล. ของบริษัท Sibata, Japan
17. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1, 5 และ 10 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.

- 18.ชุดกรองสำรับรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
- 19.แผ่นอลูมิเนียมที่แอลซี (TLC aluminium sheet) เคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 20 X20 ซม. ของบริษัท E. Merck, Germany.
- 20.เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
- 21.ชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) (สำหรับตรวจสอบปริมาณ PAHs ที่เหลือและตรวจสอบสารมัธยันตร์)
 - ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography)
 - คอลัมน์ (column) : HiQ Sil
 - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector)
 - เครื่องบันทึก (recorder)
- 22.เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
- 23.อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
 - กล้องถ่ายภาพโพลาไรซ์ ของบริษัท Polaroid, USA
 - แผ่นกรองสีแดง
 - ฟิล์มโพลาไรซ์ขาวดำ ความไวแสง 3000 (ISO 3000)
- 24.กล้องจุลทรรศน์ Olympus ,USA

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ไดเบนโซฟูแรน (dibenzofuran) ของบริษัท Fluka , Switzerland
2. ไดเมทิลซัลโฟลไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
3. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
4. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
5. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท May & Baker, England
6. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
7. ผงมอลต์สกัด (malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
8. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E. Merck, Germany.
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck, Germany.
10. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia
11. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท Labscan, Ireland
12. เอทิลอะซิเตต ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) ของบริษัท Labscan, Ireland
13. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ($\text{anhydrous Na}_2\text{SO}_4$) ของบริษัท Merck, Germany.
14. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท Merck, Germany
15. โทลูอีน ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
16. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merck, Germany
17. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Sigma, USA.
18. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), $[(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}(\text{CH}_3)_3)\text{Br}]$ ของบริษัท TCI-EP, Japan
19. 1 kb DNA ladder ของบริษัท Promega, USA.
20. Taq DNA polymerase ของบริษัท Promega, USA.
21. Ribonuclease A (Rnase A) ของบริษัท Sigma, USA.
22. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA.
23. แอมโมเนียมทาร์เทรต ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) ของบริษัท Merck, Germany
24. โซเดียมอะซิเตต ($\text{NaCH}_3\text{CO}_2 \bullet 3\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
25. bovine serum albumin ของบริษัท Sigma Chemical , USA
26. comassie brilliant blue G250 ของบริษัท Fluka , Switzerland
27. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ($\text{anhydrous Na}_2\text{SO}_4$) ของบริษัท Merck, Germany

28. กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ของบริษัท Carlo Erba, Spain
29. ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
30. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
31. โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Carlo Erba, Spain
32. โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท Unilab , Australia
33. เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
34. ภู่นม ของบริษัท Difco Laboratories, USA
35. Remazol Brilliant Blue R (RBBR) ของบริษัท Sigma, USA
36. Benomyl ของบริษัท Fluka , Switzerland
37. ผงมอลต์สกัด (malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
38. ผงยีสต์สกัด (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
39. corn meal agar ของบริษัท Difco Laboratories, USA
40. เปปโตเน (peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
41. potato dextrose agar ของบริษัท Scharlau, Spain
42. Sabouraud dextrose broth ของบริษัท Difco Laboratories, USA
43. โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
44. แคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$) ของบริษัท Unilab , Australia
45. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท Merck, Germany
46. แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) ของบริษัท Mallckrodt, France

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. คัดกรองราที่สามารถย่อยสลายสี Remazol Brilliant Blue R (RBBR) จากดิน

1.1 เก็บตัวอย่างดินเพื่อแยกสายยีส RBBR

เก็บตัวอย่างดินจากป่าบริเวณที่มีการทับถมกันของใบไม้และต้นไม้ผุๆ ละบริเวณที่มีการเผาขยะบริเวณแหล่งชุมชน นำตัวอย่างดินที่เก็บมาปริมาณ 1 กรัม เติมนลงในน้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (vortex) วางทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสม่า 0.5 มิลลิลิตรเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง Czapek Dox และ malt extract ที่มีการเติมสี RBBR และสารยับยั้งรา Benomyl เททับกันเป็น 2 ชั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของราและการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีสีน้ำเงินเป็นเวลา 2 สัปดาห์

1.2 การคัดเลือกราที่สามารถย่อยสลายสี RBBR

จากการสังเกตการเจริญของราและการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกราที่สามารถเจริญและเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในเวลา 2 สัปดาห์ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยราที่ต้องการไปวางบนอาหารแข็ง Czapek Dox และ malt extract โดยวางบริเวณตรงกลางของจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะของราที่เจริญและการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวัดขนาดของบริเวณที่อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นใสไม่มีสี

2. การเก็บรักษาราคัดแยกได้

เพาะเลี้ยงราที่คัดแยกได้ในอาหารแข็งเลี้ยง Potato dextrose (PDA) เก็บที่อุณหภูมิห้อง ทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆ 1 เดือน

3. การเตรียมราเพื่อทดสอบการย่อยสี RBBR ในอาหารเหลว Minimal salt medium

3.1 การเตรียมราที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งติดอยู่กับเส้นใยราเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เลือกราที่มีความสามารถในการย่อยสี RBBR บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้ดีที่สุดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราเจริญอยู่ โดยเลือกบริเวณที่เจาะเป็นวัคมี่จากกลางจานเพาะเชื้อที่ใกล้เคียงกัน

3.2 การเตรียมราที่ไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งติดอยู่กับเส้นใยราเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

นำราแต่ละชนิดที่คัดเลือกไว้ในข้อ 3.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่มีการวางกระดาษเซลโลเฟนที่ตัดเป็นรูปร่างกลมขนาดเท่าจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะลงบนเส้นใยราที่เจริญอยู่บนกระดาษเซลโลเฟน ใช้เข็มเขี่ยเชื้อลอกเอาเส้นใยราออกมา

4. การทดสอบความสามารถของราในการใช้สี RBBR เป็นแหล่งแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

4.1 การทดสอบความสามารถของราในการใช้สี RBBR เป็นแหล่งแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวโดยใช้ราที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งติดมากับเส้นใยรา

4.1.1 การเพาะเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว minimal salt medium (MM) ที่มีการเติมสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

นำราที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว minimal salt medium (MM) ที่มีการเติมสี RBBR ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 มก.ต่อลิตร ปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. โดยเติมราขวดละ 5 cork โดยราแต่ละชนิดจะทำซ้ำจำนวน 8 ซ้ำ และมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเฉพาะสี RBBR แต่ไม่มีการเติมราลงไปที่เป็นชุดควบคุม นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อวัดการเจริญของราโดยการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและการลดลงของสี RBBR โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยเริ่มนับวันที่เริ่มลงเชื้อเป็น d_0

4.1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

จากการเก็บตัวอย่างจากข้อ 4.1.1 ทุกวัน นำมากรองเอาส่วนที่เป็นเส้นใยรามารวบรวมไว้ วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยการบดด้วยโกร่งที่มีการเติมผงอะลูมินาระหว่างการบด หลังจากบดเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูดส่วนที่เป็นของเหลวทั้งหมดใส่หลอดไมโครพิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมนลงในสารละลาย Bradford (Bradford และคณะ, 1976) ปริมาตร 2 มล. ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย Bradford ที่มีการเติมน้ำกลั่นเป็นแบลด์ค์

คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของโปรตีนของราชชนิดต่างๆภายในเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ค)

4.1.3 การวัดการลดลงของสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

นำส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากการกรองในข้อ 4.1.2 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ถ้าหากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่ามากกว่า 1 ต้องทำการเจือจางอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่า 1 แล้วจึงวัด

คำนวณค่าความเข้มข้นของสีจากกราฟมาตรฐานสี RBBR ความเข้มข้น 0-200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในเวลา 7 วันโดยราชชนิดต่างๆที่คัดแยกได้

4.2 การทดสอบความสามารถของราในการใช้สี RBBR เป็นแหล่งแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวโดยใช้ราที่ไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งติดมากับเส้นใยรา

4.2.1 การเพาะเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว minimal salt medium (MM) ที่มีการเติมสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

นำราที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว minimal salt medium (MM) ที่มีการเติมสี RBBR ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดลองแบบเดียวกับข้อ 4.1.1, 4.1.2 และ 4.1.3

4.3 การทดสอบความสามารถของราในการใช้สี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low nitrogen Basal III medium (LN)

4.3.1 การเพาะเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LN ที่มี RBBR

นำราที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.1 มาเลี้ยงในอาหาร LN ที่มีการเติม 1% กลูโคส ปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มล.เป็นเวลา 5 วัน โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบไม่ควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเติมสี RBBR ความเข้มข้น 200 มก.ต่อมล. เลี้ยงเชื้อต่ออีก 7 วันที่สภาวะเดิม โดยเก็บตัวอย่างทุกวัน

4.3.2 การวัดการลดลงของสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

นำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละวันไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นำส่วนที่เป็นอาหารเหลวไปวัดการลดลงของสี RBBR โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานสี RBBR คำนวณค่าความเข้มข้นของสี RBBR นำไปเขียนกราฟแสดงการลดลงของสีในเวลา 7 วัน ของราแต่ละชนิด

5. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไโดเบนโซฟูแรนของราที่คัดแยกได้

5.1 การทดสอบความสามารถในการเจริญของราบนอาหารแข็งที่มีการเติมเกล็ดไโดเบนโซฟูแรน

เลี้ยงราบนอาหารแข็ง PDA ที่มีการวางเกล็ดไโดเบนโซฟูแรนบนฝาของจานเพาะเชื้อ คิวว่า จานเพาะเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญของรา และการหายไปของเกล็ดไโดเบนโซฟูแรน

5.2 การทดสอบการย่อยสลายสารไโดเบนโซฟูแรนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LN

5.2.1 การเพาะเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LN ที่มีไโดเบนโซฟูแรน

นำราที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.1 มาเลี้ยงในอาหาร LN ที่มีการเติม 1% กลูโคส ปริมาตร 20 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. เป็นเวลา 5 วัน โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบไม่ควบคุม อุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเติมไโดเบนโซฟูแรน ในไโดเมทิลซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อต่ออีก 7 วันที่สภาวะเดิม โดยมีชุดการทดลองที่ไม่มีการเติม ราลงไปเป็นชุดควบคุม

5.2.2 การสกัดสารไโดเบนโซฟูแรนจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ตามวิธีของ Mori และ Kondo (2002)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 โดยการเติม กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอทิลอะซีเตทปริมาตร 2 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อ นำไปใส่ใน กรวยแยก (separatory funnel) เขย่าเพื่อสกัดแยกสารเป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยก ส่วนเอทิลอะซีเตทเก็บไว้ สกัดซ้ำด้วยเอทิลอะซีเตทปริมาตร 2 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีเดิม สกัดซ้ำด้วยเอทิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อ รวมส่วน เอทิลอะซีเตทที่ได้ เติม แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตเพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ จากนั้นแยกส่วนเอทิลอะซีเตท โดยนำไป ระเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนได้สารที่แห้งสนิท เติมเมทานอล ปริมาตร 5 มล. ลงไปละลายสารในขวดลดปริมาตร กรองสารละลายที่ได้ผ่านชุดกรองสำเร็จรูป ชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

5.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณไโดเบนโซฟูแรน โดยวิธี HPLC

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี รุ่น LC-3A (Shimadzu, Japan) ใช้คอลัมน์ HiQ Sil C18 ใช้ สารละลาย 75% เมทานอล เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.2 มล.ต่อนาที

ตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงของไดเบนโซฟูแรน ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร คัดสารละลายมาตรฐานของไดเบนโซฟูแรน จากนั้นคัดสารที่ต้องการหาปริมาณสาร 50 ไมโครลิตร โดยใช้กระบอกจีดขนาดเล็กรุ่น MS-R50 วิเคราะห์หาปริมาณไดเบนโซฟูแรนที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายของราในชุดทดลอง โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟกับชุดการทดลองควบคุม

สร้างกราฟมาตรฐานของไดเบนโซฟูแรน โดยเติมสารไดเบนโซฟูแรน ในโดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่มีความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 มก.ต่อมล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LN ตามลำดับ ทำการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท โดยใช้วิธีการเดียวกับการสกัดไดเบนโซฟูแรนในชุดทดลอง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารโดยใช้วิธี HPLC จากนั้นนำมาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของไดเบนโซฟูแรนกับพื้นที่ใต้กราฟ (ภาคผนวก ค)

7. การวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนด้วยวิธี analytical Thin Layer Chromatography (TLC) (Nojiri และคณะ ,2000)

นำสารสกัดที่ละลายในเมทานอล ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาจุดบนแผ่น TLC กว้าง 8x8 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำละลายประกอบด้วย โทลูอีน : ไดออกเซน ในอัตราส่วน 18 : 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจสอบจุดเปกตรัมของอะซีแนพธินและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร จากนั้นเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลายเพื่อตรวจสอบสารมัธยันตร์ ชนิดอื่นๆที่เกิดขึ้น

7. การจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของราที่ตัดแยกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์

7.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

7.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากับอาหารแข็งและภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)

นำสายพันธุ์ N2, N3, N4, G1 และ T3 มาศึกษาลักษณะเส้นใยบนอาหารแข็งและสมบัติทางสรีรวิทยา (physiological characteristics) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ Slide Culture Technique โดยเลี้ยงราที่ต้องการศึกษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ถูกตัดเป็นรูปลูกบาศก์ขนาด 1 ลบ.ซม. วางบนแผ่นสไลด์ที่วางอยู่บนแท่งแก้วในจานเพาะเชื้อ ใช้ปากคีบคีบ coverslip จุ่ม 95 %แอลกอฮอล์ ลนไฟ ปล่อยให้เย็น ปิดบนแท่งวุ้นที่มีเส้นใยรา เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไปบนลำสีที่ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน นำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยเขี่ยวุ้นบนสไลด์ทิ้งไป หยดสี Lactophenol cotton blue (LPCB) 1 หยดบนสไลด์ที่มีสายราเกาะอยู่ ศึกษาลักษณะเส้นใย การสร้างสปอร์ ลักษณะของสปอร์ และลักษณะพิเศษต่างๆ จากนั้นเปลี่ยนชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาการสร้างสปอร์ของราแต่ละชนิดในอาหารต่างชนิดกัน โดยเปลี่ยนชนิดของอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ อาหารแข็ง malt extract, อาหาร

แห้ง yeast extract, อาหารแห้ง Sabouraud dextrose, อาหารแห้ง Cornmeal และอาหารแห้ง Potato Dextrose

7.1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

เลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งชนิดต่างๆที่ราแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสปอร์ได้ เป็นเวลา 5-7 วัน นำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ที่ศูนย์เครื่องมือและวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการเตรียมตัวอย่างดังนี้

ตัดตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 5 มม. x 5 มม. X 3 มม. อังตัวอย่างด้วยไอระเหยของ 2% Osmium tetroxide เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นดึงน้ำออกจากตัวอย่างโดยใช้ลำดับส่วนของเอทิลแอลกอฮอล์ ดังนี้ 30% 50% 70% 90% และ 100% ตามลำดับ โดยทำซ้ำอัตราส่วนละ 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที นำไปทำแห้ง ณ จุดวิกฤต ด้วยเครื่อง Critical point Dryer ติดตัวอย่างบน stub ด้วยเทปกาวสองหน้า ฉาบทองด้วยเครื่อง Sputter นาน 4-5 นาที นำไปส่องดูด้วยเครื่อง SEM เพื่อศึกษาลักษณะ ขนาดของเส้นใยและสปอร์ ลักษณะพิเศษต่างๆ

7.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ราโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (internal transcribed spacer)

7.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของราสายพันธุ์ N2, N3, N4, G1 และ T3

เลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Potato Dextrose broth เป็นเวลา 3-5 วัน กรองเส้นใยราผ่านกระดาษกรอง What man เบอร์ 1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของราโดยประยุกต์จากวิธีของ Makimura และคณะ (2000) โดยนำเส้นใยราที่ได้ไปบดในโกร่งที่มีการเติมไลซิสบัฟเฟอร์ ปริมาตร 0.5 มล. และผงอะลูมินา เป็นเวลา 5 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดไมโครพิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนใส่ในหลอดไมโครพิวจ์ใหม่เติมเอนไซม์โปรตีนเนสเค (ภาคผนวกข) ความเข้มข้น 20 มก.ต่อมล. ปริมาตร 24 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม. เติม cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ใน 2% โซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวกข) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) (อัตราส่วนปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสชั้นบนใส่หลอดไมโครพิวจ์อันใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข)

ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงให้แยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสชั้นบนใส่หลอดไมโครพิวเจอร์ใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของน้ำส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งเห็นตะกอนสีขาวของดีเอ็นเอปรากฏ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาล้างด้วยสารละลายเอทานอล 70 % ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แขนวลงยตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำ DI ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย RNase เข้มข้น 10 มก.ต่อมล. (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} โดยหากอัตราส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง แต่ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

7.2.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction ,PCR)

นำดีเอ็นเอ ที่สกัดตามวิธีในข้อ 7.2.1 ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยา และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ออกแบบตามวิธีของ Jasalovich และคณะ(2000) โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาของสารแต่ละชนิดเป็นดังนี้

สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1x *Taq* DNA polymerase buffer (pH 8.5) *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 2 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณปลายทั้ง 2 ด้านของสายดีเอ็นเอแม่แบบ forward primer ITS1-F 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' และ reverse primer ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3' ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้ในข้อ 7.2.1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและควรเก็บส่วนผสมทั้งหมดในน้ำแข็ง หลังจากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermol Cycler) (Perkin Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 95 ° ซ เป็นเวลา 35 วินาที	} 35 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 ° ซ เป็นเวลา 1 นาที 25 วินาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ 55 ° ซ เป็นเวลา 55 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 ° ซ เป็นเวลา 1 นาที	
final extension	ที่อุณหภูมิ 72 ° ซ เป็นเวลา 10 นาที	

7.2.3 การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกไซท์ได้จากข้อ 7.2.3 มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาย ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 % ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหัวเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทปฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมเหนืออะกาโรสเจล 2-3 มม. ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม หยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งแรกจะหยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผสมกับสีติดตามแล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ชุดทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสรุ่น Mini sub-cell GT ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมไฟนอลบลู เคลื่อนที่มาเกือบถึง ขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์ TAE เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในน้ำกลั่นอีก 30 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

7.2.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (internal transcribed spacer)

ส่งผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกไซท์ได้จากข้อ 7.2.3 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (internal transcribed spacer) ด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเออัตโนมัติโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (internal transcribed spacer) ของราสายพันธุ์ N2, N3, N4, G1 และ T3 มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส รวมรวมและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการรายงานไว้ใน GenBank. โดยใช้โปรแกรม BlastN

บทที่ 4

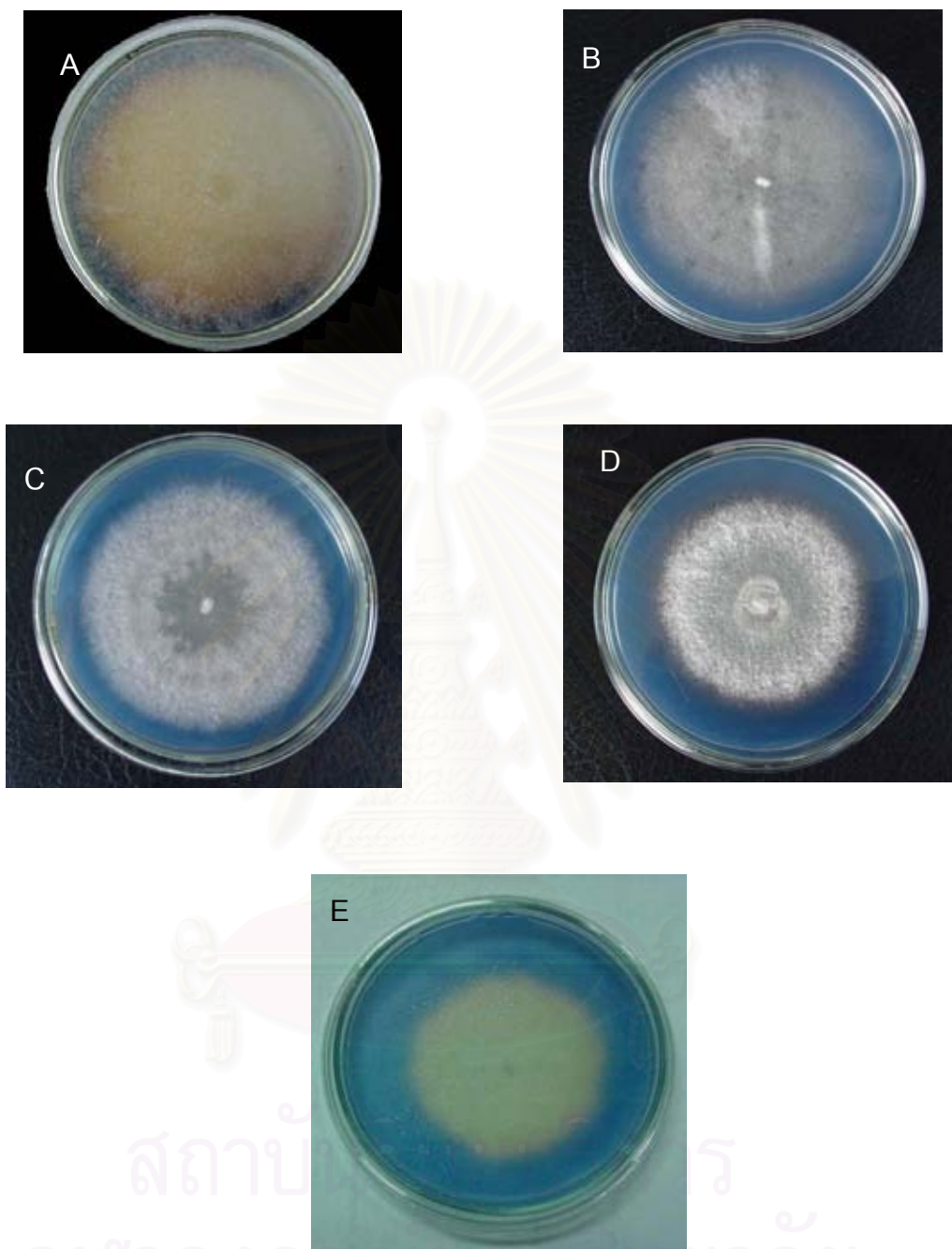
ผลการวิจัย

4.1. การคัดแยกกร่ายย่อยสลายไดเบนโซฟีวแรนจากตัวอย่างดิน

จากการทดลองคัดแยกจากตัวอย่างดินในเบื้องต้นโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek Dox agar และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง malt extract ที่มีการเติม สี RBBR และ Benomyl ตามวิธีการทดลองในข้อ 1 ซึ่งคัดเลือกเชื้อจากความสามารถในการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีน้ำเงินเป็นใสไม่มีสี โดยดูจากบริเวณสีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง สามารถคัดแยกได้ตามตารางที่ 2 ภาแต่ละชนิดที่คัดแยกได้มีลักษณะของเส้นใย และความสามารถในการเปลี่ยนสีของอาหารที่แตกต่างกัน คัดเลือกที่สามารถเปลี่ยนสีอาหารได้หมดภายใน 14 วัน เพื่อทดสอบในขั้นต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงการคัดแยกกร่ายย่อยสลายสี RBBR จากดินที่เก็บจากบริเวณต่างๆ

บริเวณที่เก็บตัวอย่างดิน	จำนวนราที่แยกได้	รหัสรา	ลักษณะราที่แยกได้	จำนวนวันที่ย่อยสีหมด
ป่าเบญจพรรณ	3	N1	เส้นใยสีขาวสั้น สปอร์สีดำเป็นกลุ่ม	>14
		N2	เส้นใยสีขาว พู แผ่อกไม่พบสปอร์	6
		N3	เส้นใยสีขาวเล็กมาก พบสปอร์เป็นจุดเล็กๆจำนวนมาก	5
ป่าสนป่าซาก	2	T3	เส้นใยสีขาวแน่น เหนียว ผึ่งในเนื้อวุ้น	8
		T4	เส้นใยสีขาว มีสปอร์สีเขียว	>14
ป่าในจ.บุรีรัมย์	1	S1	เส้นใยสีขาวสั้น มีสปอร์สีเขียวเป็นกลุ่ม	>14
ป่าในจ.เพชรบูรณ์	1	B5	เส้นใยสีขาวฟู สปอร์สีเหลือง	>14
สวนยางพารา ในจ.สุราษฎร์ธานี	2	N4	เส้นใยสีขาว ค่อนข้างฟู ไม่พบสปอร์	10
		N5	เส้นใยสีน้ำตาล สปอร์สีน้ำตาล	>14
ป่าในอุทยานแห่งชาติไทรโยค	2	G1	เส้นใยสีขาวไม่ฟู ไม่พบสปอร์	7
		G2	เส้นใยสีน้ำตาลอ่อน สปอร์สีดำ	>14
ป่าในจ.สงขลา	1	S3	เส้นใยสีขาวฟู แผ่อกข้าง ไม่พบสปอร์	>14



รูปที่ 8 ลักษณะการย่อยสี RBBR บนอาหารแข็งโดยราชนิดต่างๆ A รา N3 บ่มเป็นเวลา 7 วัน, B รา G1 บ่มเป็นเวลา 6 วัน, C รา N4 บ่มเป็นเวลา 6 วัน, D รา T3 บ่มเป็นเวลา 6 วัน และ E รา N2 บ่มเป็นเวลา 4 วัน

จากตัวอย่างดินที่นำมาคัดแยกทั้งหมด 20 ตัวอย่างพบว่าที่สามารถย่อยสลายสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำนวน 12 ชนิดจากตัวอย่างดินจำนวน 7 ตัวอย่าง จากนั้นนำราที่สามารถย่อยสีได้หมดภายใน 14 วันไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่เพื่อดูลักษณะการย่อยสลายสีของราแต่ละชนิด ได้ผลดังแสดงในรูป 8

4.2. การทดสอบความสามารถของราที่คัดแยกได้ในการย่อยสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

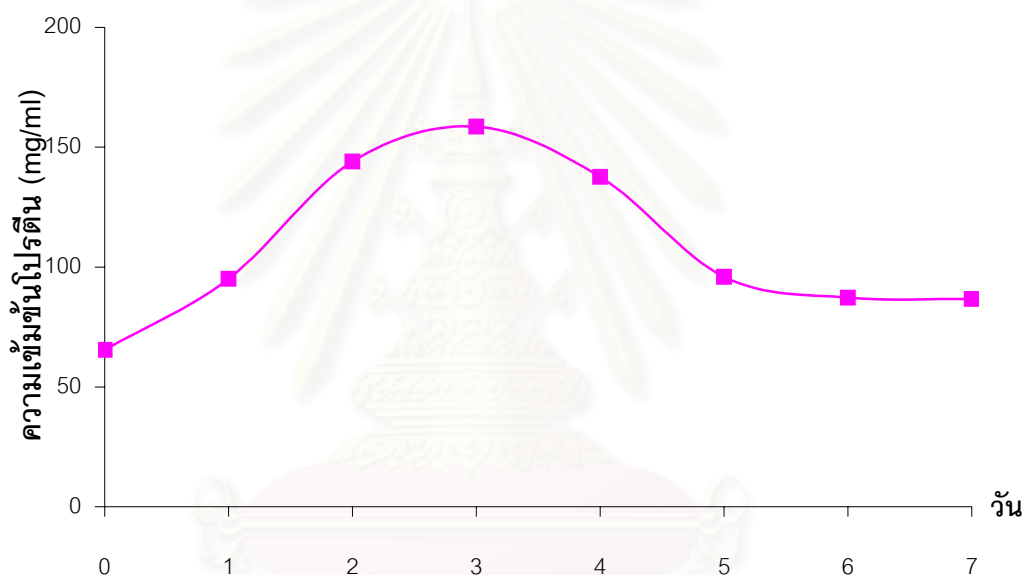
4.2.1 การทดสอบการเจริญและใช้สี RBBR ของราในอาหารเหลว Minimal salt medium (MM) ที่มีสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสีของราที่คัดเลือกได้จากผลการทดลองในข้อที่ 1 จำนวน 5 สายพันธุ์คือ N2, N3, N4, G1 และ T3 ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.1 โดยเลี้ยงราในอาหารเหลว MM ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 1,2,3,4 และ 5

จากผลที่ได้ในการเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal salt medium (MM) ที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนอื่นนอกจากสี Remazol Brilliant Blue R (RBBR) โดยสีที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 mg/ml เพื่อทดสอบความสามารถของราในการย่อยสี RBBR และทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อโดยการวัดปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นโดยวิธีของ Bradford พบว่ามีเฉพาะรา T3 ที่สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีน้ำเงินเข้มเป็นสีน้ำตาลอ่อน และมีการเจริญของเชื้อสูงสุดในวันที่ 4 หลังจากนั้นพบว่าปริมาณโปรตีนลดลงในขณะที่สีก็มีการลดลงมากในวันที่ 4 เช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับราอีก 4 สายพันธุ์ที่ทำการทดลอง(รูปที่ 11) ซึ่งผลการทดลองของราอีก 4 สายพันธุ์พบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นในช่วง 2-3 วันแรกจากนั้นโปรตีนที่วัดได้ก็ลดลง ส่วนการลดลงของสีนั้นมีน้อยมากซึ่งจากผลที่ได้นี้คาดว่า การเพิ่มขึ้นของโปรตีนในช่วงแรกนั้นอาจเกิดจากการเจริญของราโดยใช้ PDA ที่ติดมาจากการเจาะรูขึ้นมาไม่ได้เจริญจากการใช้สี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นในระหว่างการทดลองจึงได้เพิ่มชุดควบคุมอีก 1 ชุดการทดลองโดยการเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่ไม่มีการเติมสี RBBR หรือแหล่งคาร์บอนอื่น พบว่ารามีการเจริญเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 3 และ 4 โดยเฉพาะรา T3 เนื่องจากราสายพันธุ์นี้ลักษณะเส้นใยที่อัดตัวกันแน่นมาก เมื่อเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเส้นใยติดอยู่จึงได้ปริมาณเชื้อที่มากกว่าราชนิดอื่นเห็นได้จากโปรตีนเริ่มต้นของรา T3 ที่สูงกว่าราชนิดอื่น

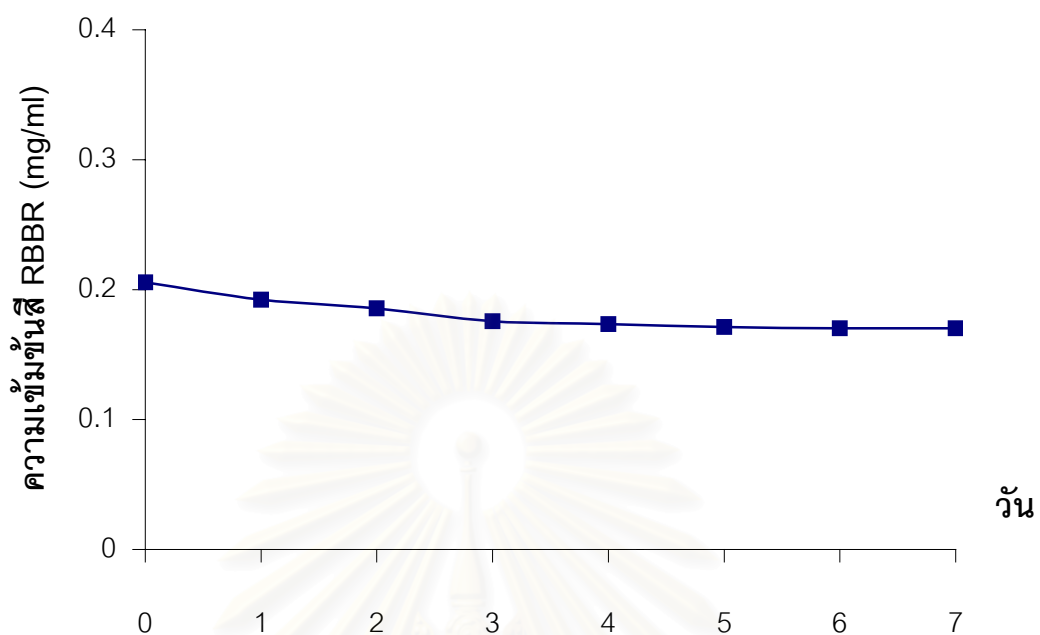


รูปที่ 9 ลักษณะการย่อยสี RBBR ในอาหารเหลว โดยราที่คัดแยกได้

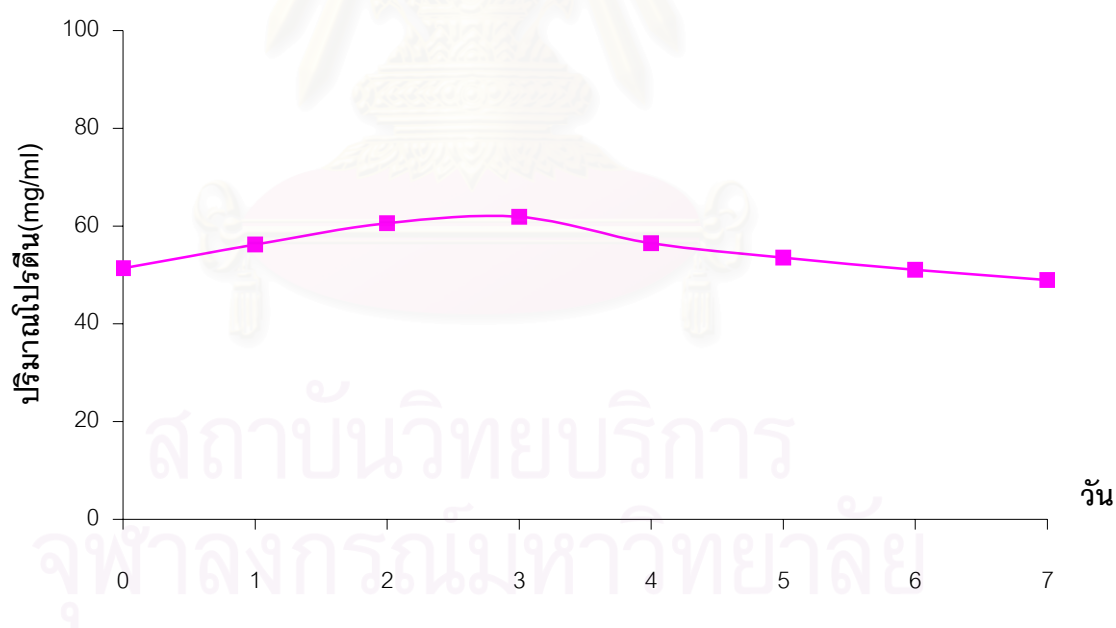


รูปที่10a กราฟแสดงการเจริญของรา N2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

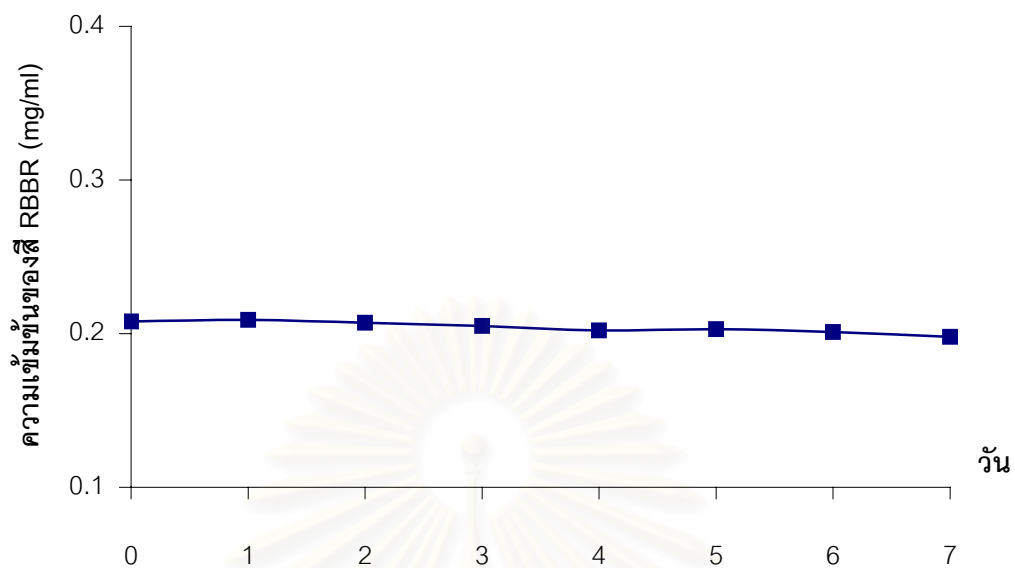
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



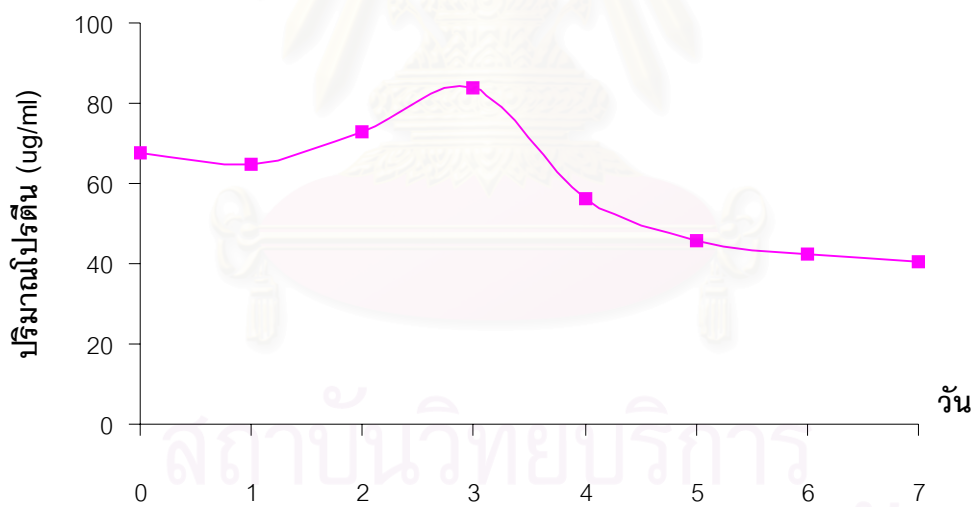
รูปที่10b กราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในอาหาร MM โดยรา N2



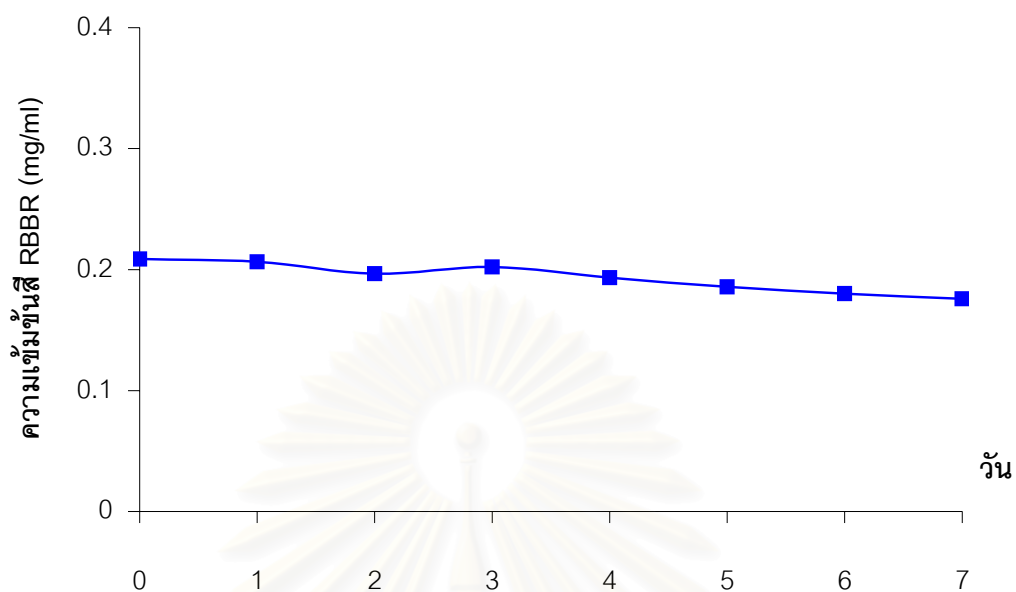
รูปที่ 10c กราฟแสดงการเจริญของรา N3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว



รูปที่ 10d กราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในอาหาร MM โดยรา N3

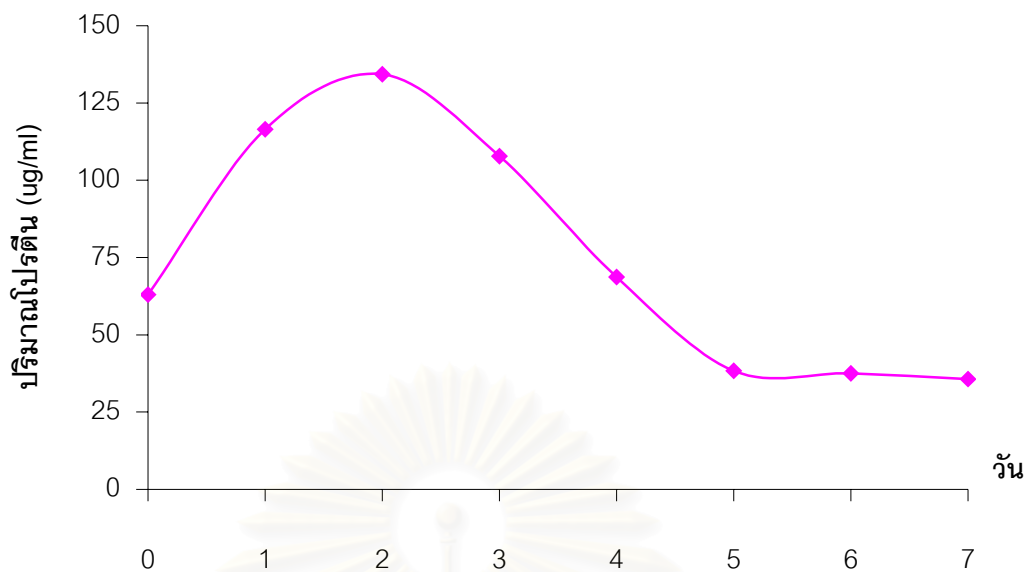


รูปที่ 10e กราฟแสดงการเจริญของรา N4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

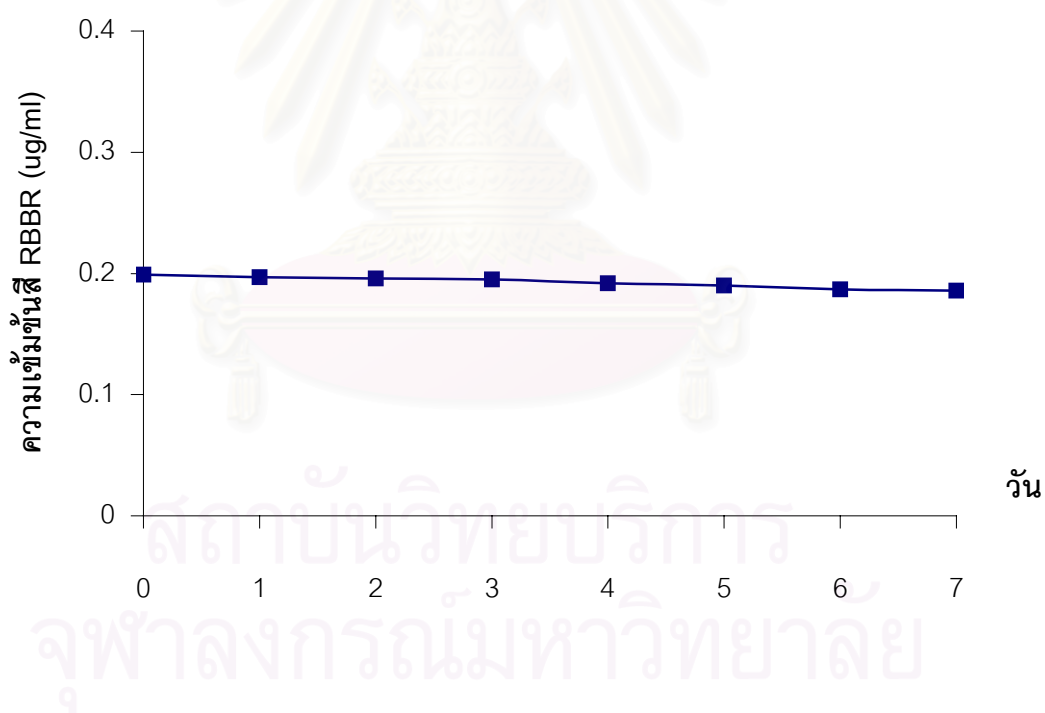


รูปที่10f กราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในอาหาร MM โดยรา N4

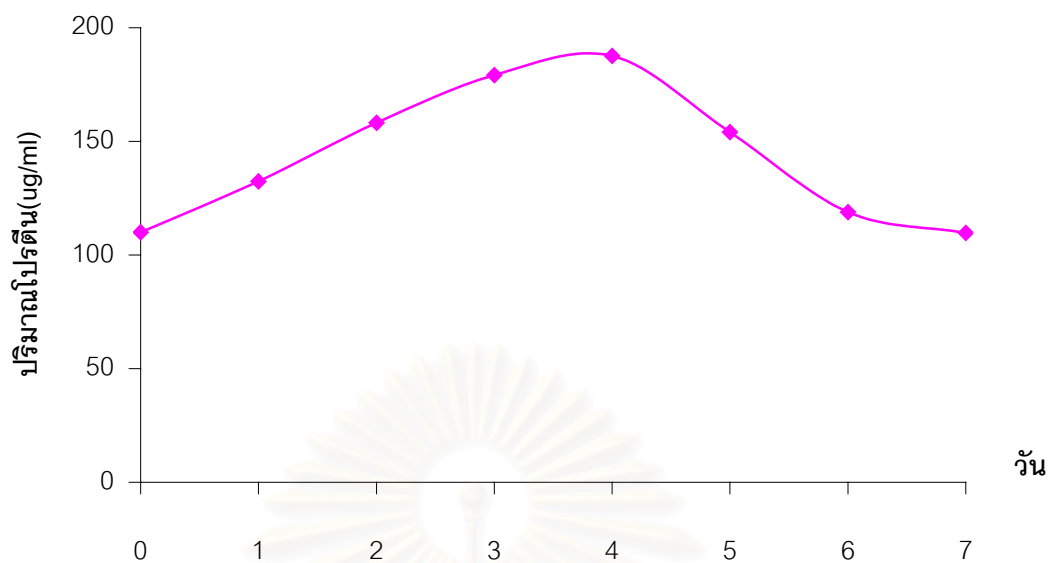
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



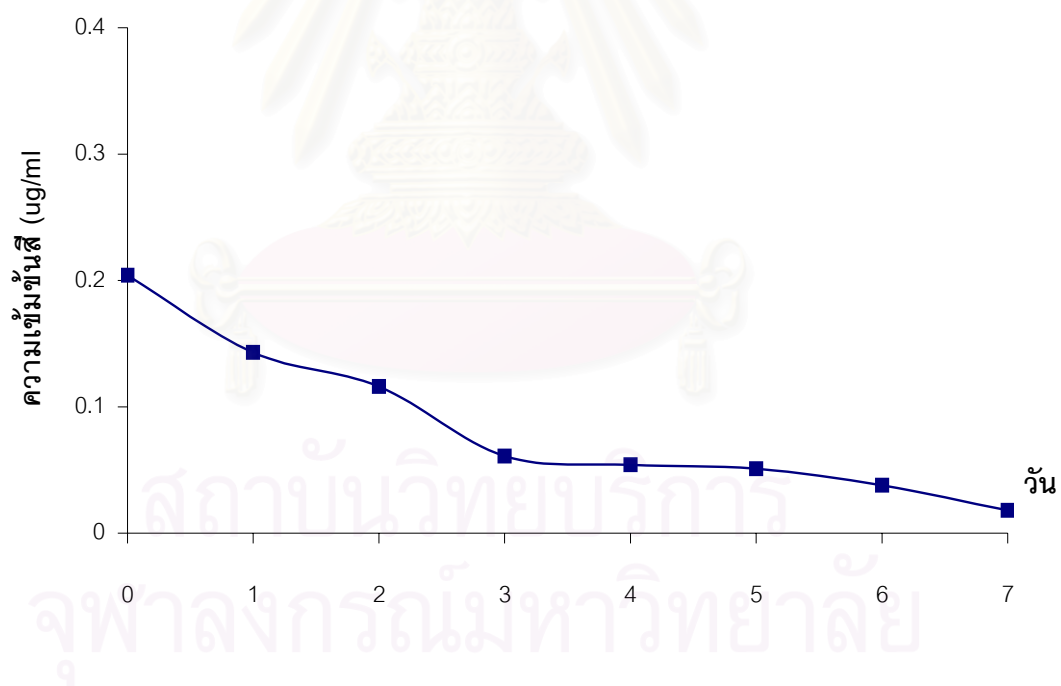
รูปที่ 10g กราฟแสดงการเจริญของรา G1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มี
 สีส RBBR เป็น แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว



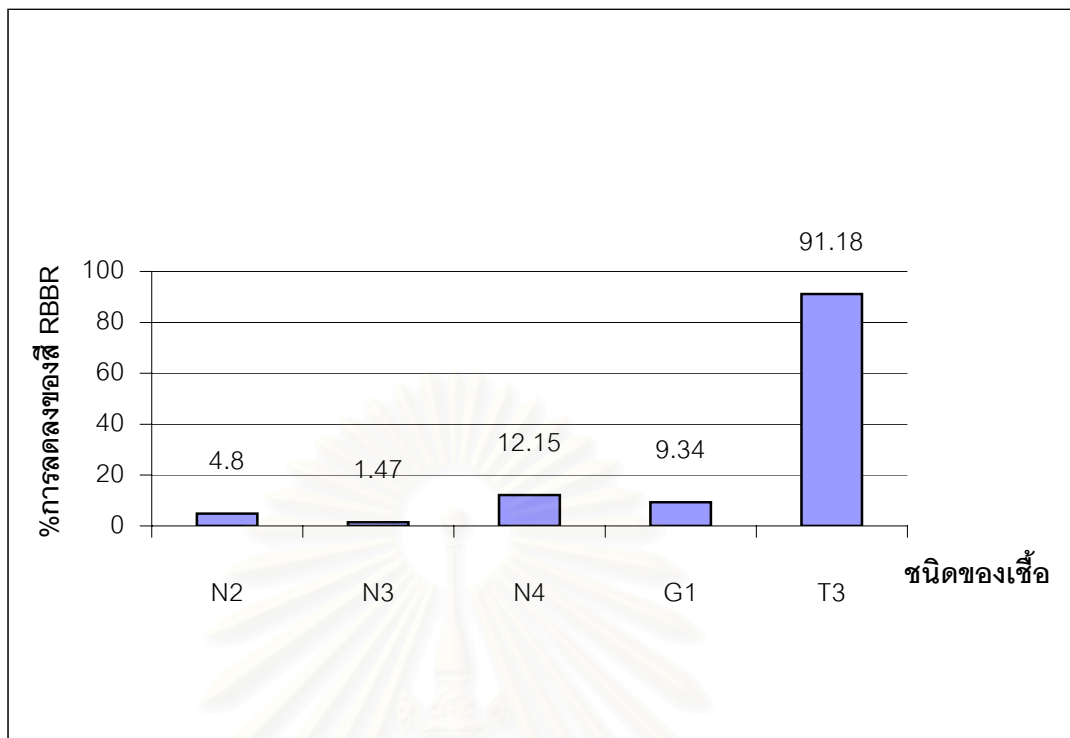
รูปที่ 10h กราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในอาหาร MM โดยรา G1



รูปที่ 10i กราฟแสดงการเจริญของรา T3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

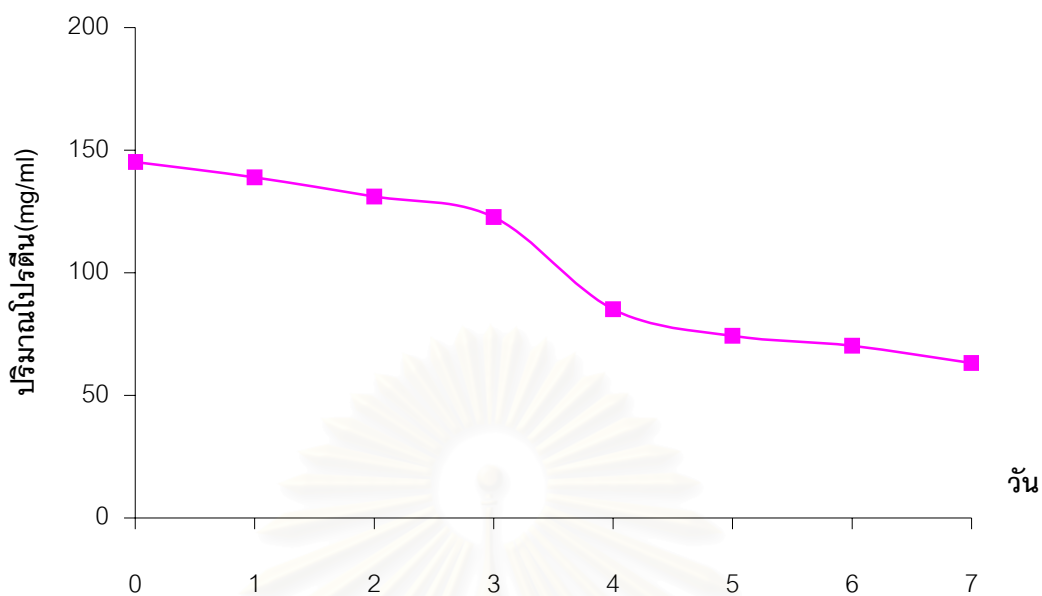


รูปที่ 10j กราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในอาหาร MM โดยรา T3



รูปที่ 11 แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การลดลงของสี RBBR โดย รา N2, N3, N4, G1 และ T3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MM ที่มีสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว เป็นเวลา 7 วัน

จากผลการทดลองที่ได้จากชุดควบคุมที่เลี้ยงราในอาหารเหลว MM ที่ไม่มีการเติมสี RBBR ให้เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วพบว่ารามีการเจริญเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 3 และ 4 ซึ่งคาดว่าเกิดจากการที่ราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ติดมากับเส้นใย ดังนั้นจึงทำการทดสอบการเจริญและใช้สี RBBR ของรา T3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวอีกครั้ง โดยการทดลองในครั้งนี้เตรียมเส้นใยตามวิธีการทดลองข้อ 3.2 พบว่ารา T3 ไม่สามารถเจริญและย่อยสี RBBR ได้ ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 12a กราฟแสดงการเจริญของรา T3 ที่ไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBR เป็น แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

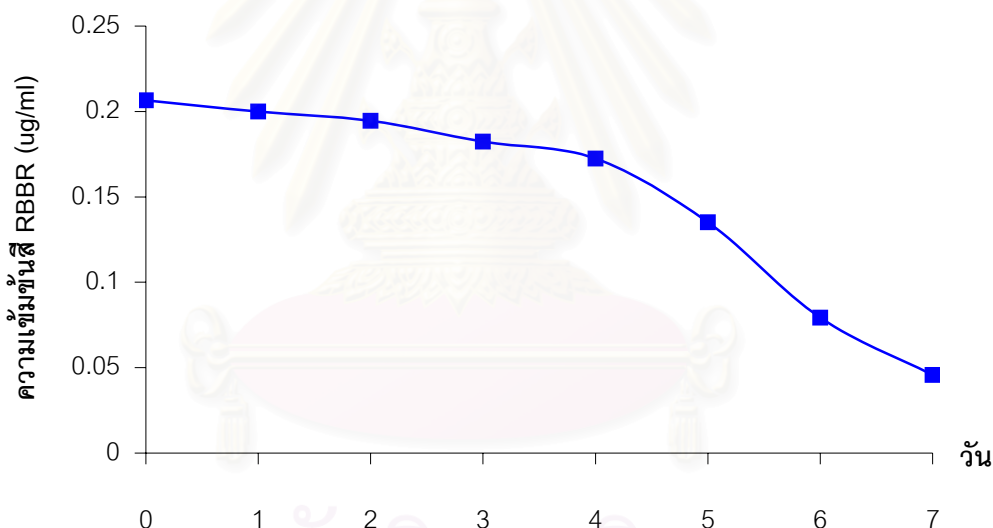


รูปที่ 12b กราฟแสดงการลดลงของสี RBBR ในอาหาร MM โดยรา T3 ที่ไม่มีอาหารแข็ง

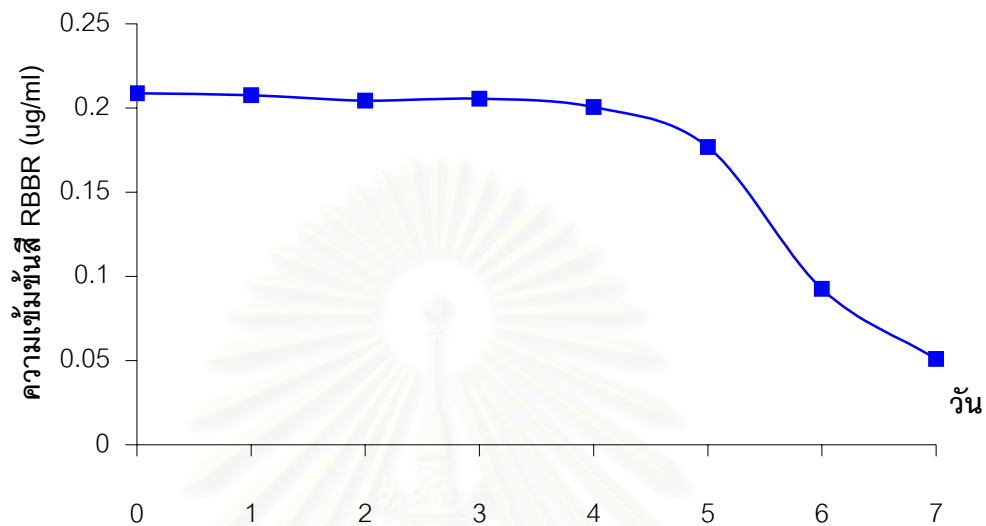
4.2.2 การทดสอบการย่อยสี RBBR ของราในอาหารเหลว Low nitrogen Basal III medium (LN)

จากผลการทดลองในข้อ 2.1 พบว่าราที่คัดแยกได้ไม่สามารถใช้สี RBBR ในอาหาร MM เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวได้ จึงทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 4.3 โดยเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LN ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด เพื่อทดสอบการย่อยสี RBBR ของราที่คัดแยกได้ ซึ่งได้ผลการทดลองตามรูปที่ 13a – 13e

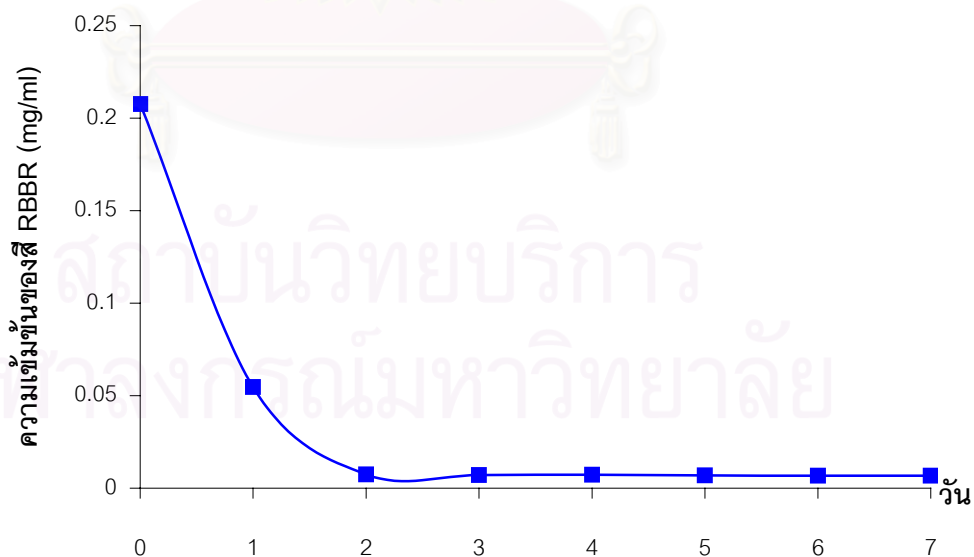
จากการทดลองพบว่าราทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยสี RBBR ได้ ภายในเวลา 7 วัน ซึ่งเปอร์เซ็นต์การลดลงของสี RBBR แตกต่างกันในแต่ละเชื้อ โดยเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อในสภาวะเดียวกัน



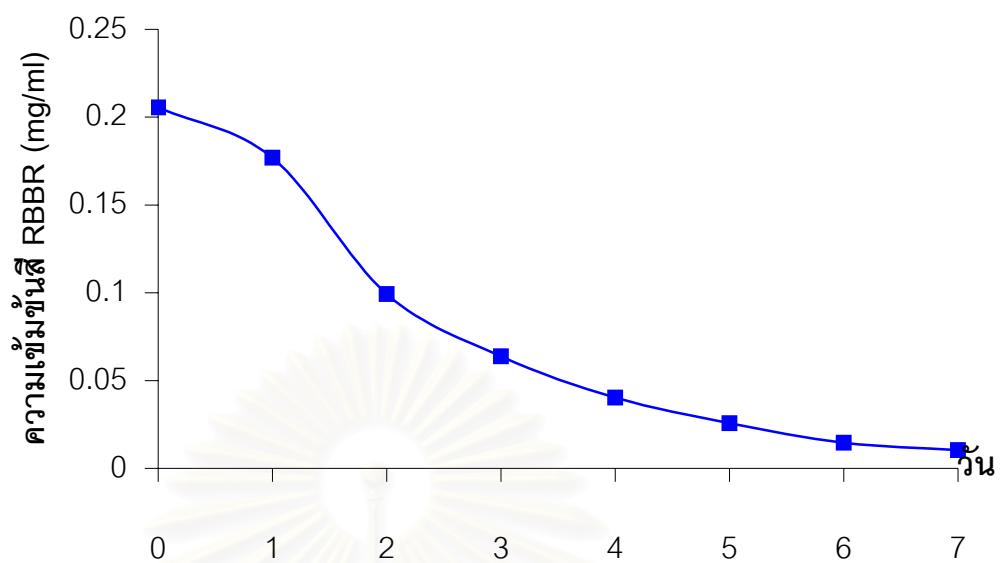
รูปที่ 13a กราฟแสดงการย่อยสี RBBR ในอาหาร LN โดยรา N2



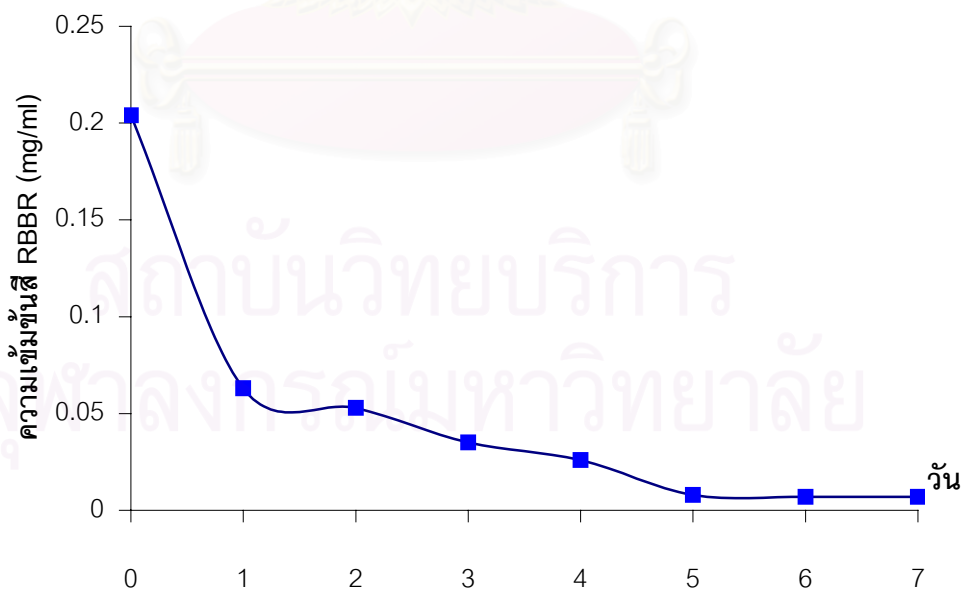
รูปที่ 13b กราฟแสดงการย่อยสี RBBR ในอาหาร LN โดยรา N3



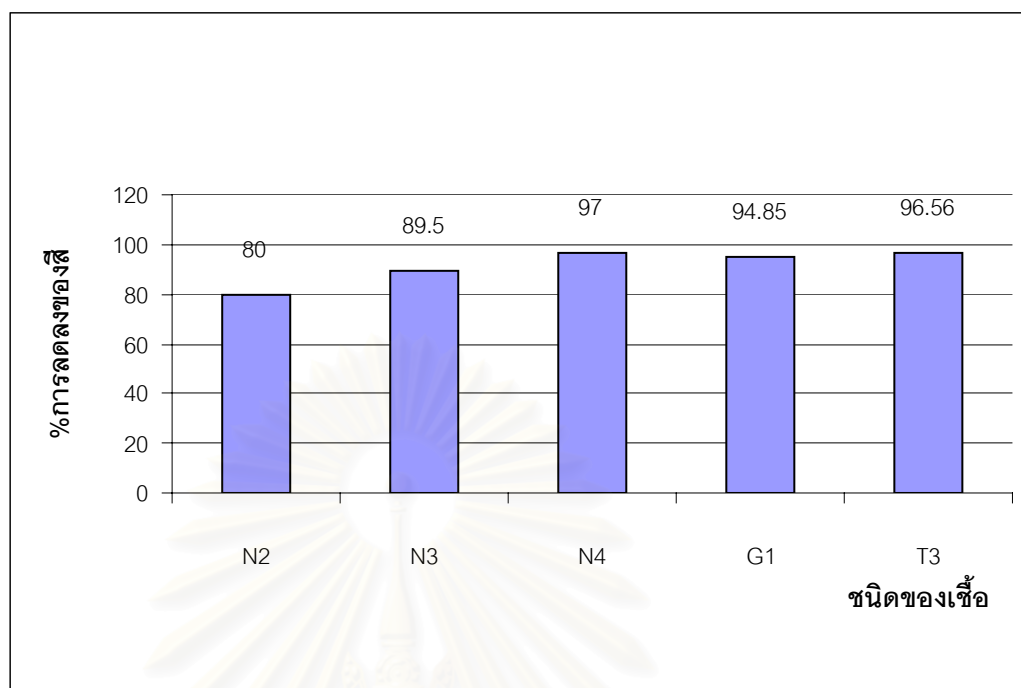
รูปที่ 13c กราฟแสดงการย่อยสี RBBR ในอาหาร LN โดยรา N4



รูปที่ 13d กราฟแสดงการย่อยสี RBBR ในอาหาร LN โดยรา G1



รูปที่ 13e กราฟแสดงการย่อยสี RBBR ในอาหาร LN โดยรา T3



รูปที่ 14 แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การลดลงของสี RBBR โดย รา N2, N3, N4, G1 และ T3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร LN ที่มีสี RBBR

จากผลการทดลองเลี้ยงราในอาหารเหลว LN ที่มีสี RBBR พบว่าราทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายสี RBBR ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 13) โดยรา N4 สามารถย่อยสลายสีได้มากที่สุดคือ 97เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือรา T3, G1, N3 และ N2 ย่อยสีได้ 96.56, 94.85, 89.5 และ 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์

4.3.1 การศึกษาลักษณะการเจริญ การสร้างสปอร์ และลักษณะพิเศษต่างๆบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ



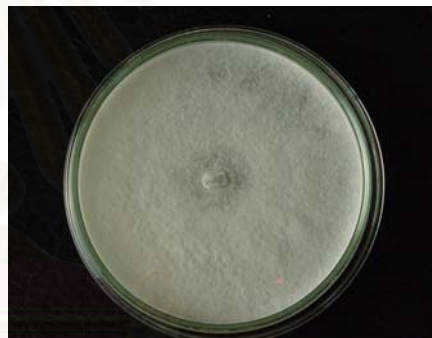
Cornmeal agar



Malt extract agar



Potato Dextrose agar



Sabour Dextrose agar

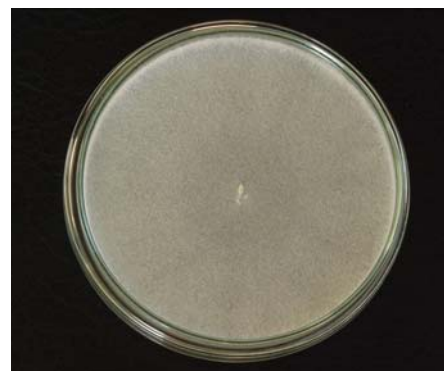


Yeast Extract agar

รูปที่ 15 ลักษณะการเจริญของรา N2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน



Cornmeal agar



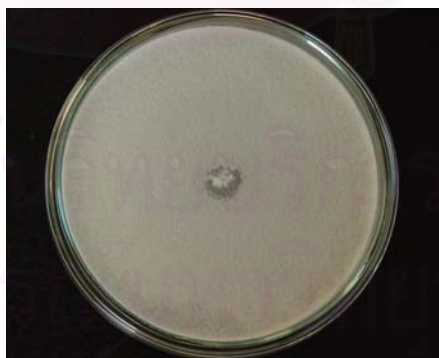
Malt extract agar



Potato Dextrose agar



Sabour Dextrose agar



Yeast Extract agar

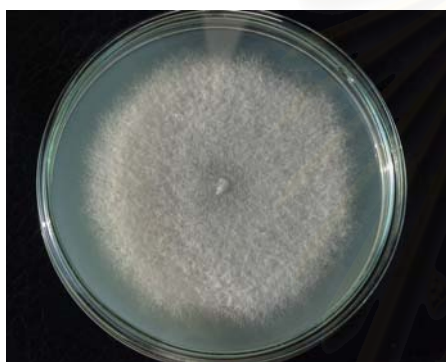
รูปที่ 16 ลักษณะการเจริญของรา N3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน



Cornmeal agar



Malt extract agar



Potato Dextrose agar



Sabour dextrose agar



Yeast Extract agar

รูปที่ 17 ลักษณะการเจริญของรา N4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน



Cornmeal agar



Malt extract agar



Potato Dextrose agar



Sabour Dextrose agar



Yeast Extract agar

รูปที่ 17 ลักษณะการเจริญของรา G1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน



Cornmeal agar



Malt extract agar



Potato Dextrose agar



Sabour Dextrose agar



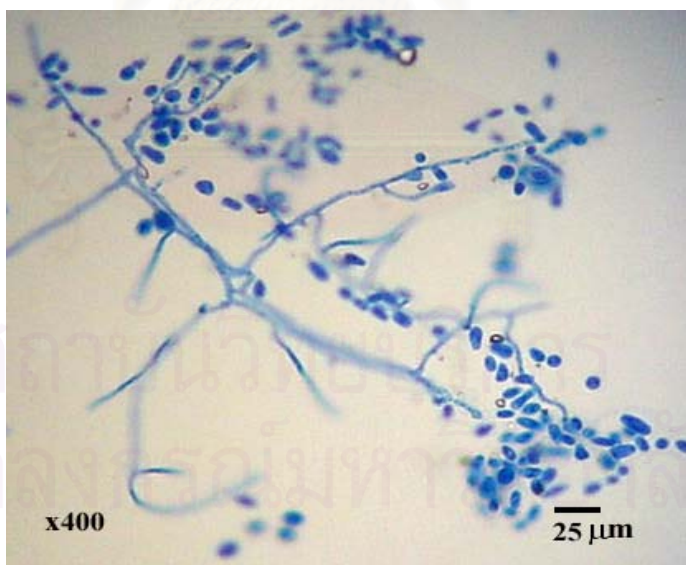
Yeast Extract agar

รูปที่ 18 ลักษณะการเจริญของรา T3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

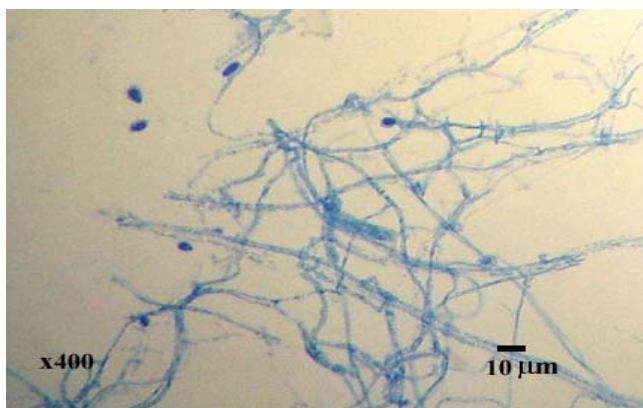
4.3.2 การศึกษาลักษณะเส้นใย สปอร์ และลักษณะพิเศษต่างๆของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์



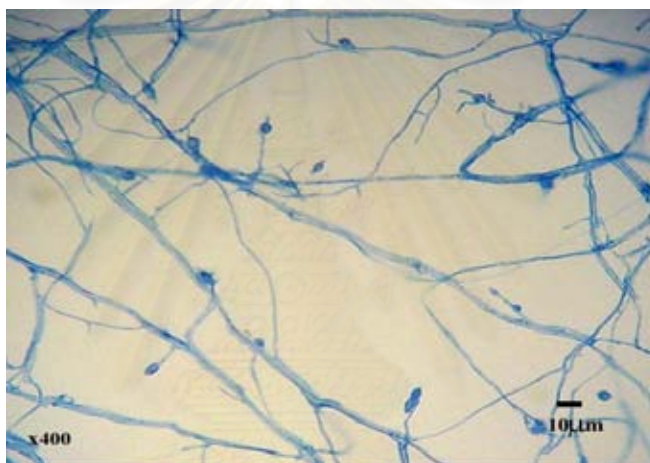
รูปที่ 19a ลักษณะสปอร์ของรา N2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Yeast extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า



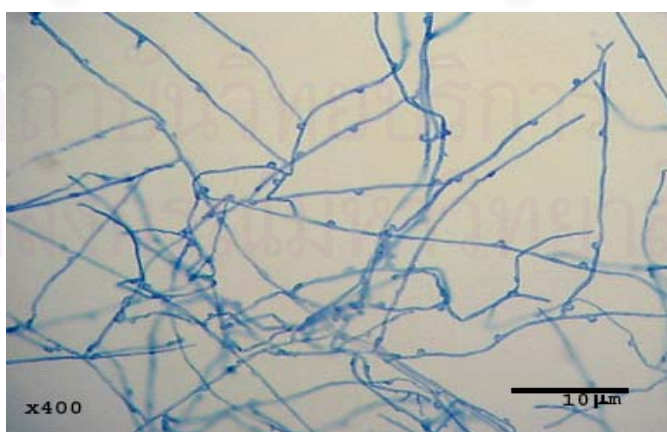
รูปที่ 19b ลักษณะสปอร์ของรา N3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Yeast extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 19c ลักษณะสปอร์ของรา N4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Yeast extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 19d ลักษณะสปอร์ของรา G1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Potata dextrose agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 19e ลักษณะ clamp connection ของรา T3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Malt extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า



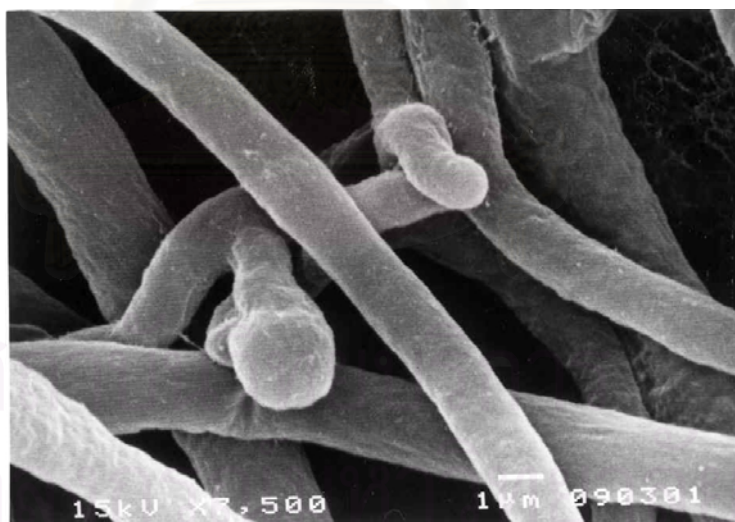
รูปที่ 19f ลักษณะสปอร์ของรา N2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Yeast extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 2,000 เท่า



รูปที่ 19g ลักษณะสปอร์ของรา N2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Yeast extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 3,500 เท่า



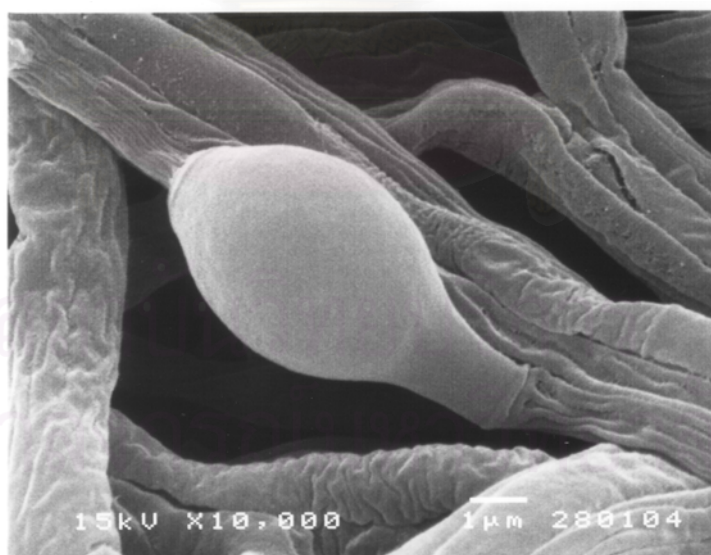
รูปที่ 19h ลักษณะสปอร์ของรา N3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 2,000 เท่า



รูปที่ 19i ลักษณะเส้นใยของรา N4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า



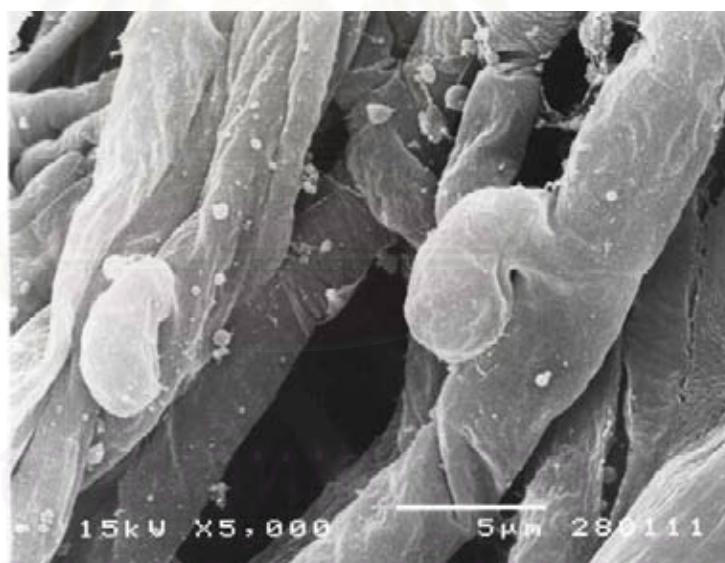
รูปที่ 13j ลักษณะสปอร์ของรา G1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 10,000 เท่า



รูปที่ 19k ลักษณะสปอร์ของรา G1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 10,000 เท่า



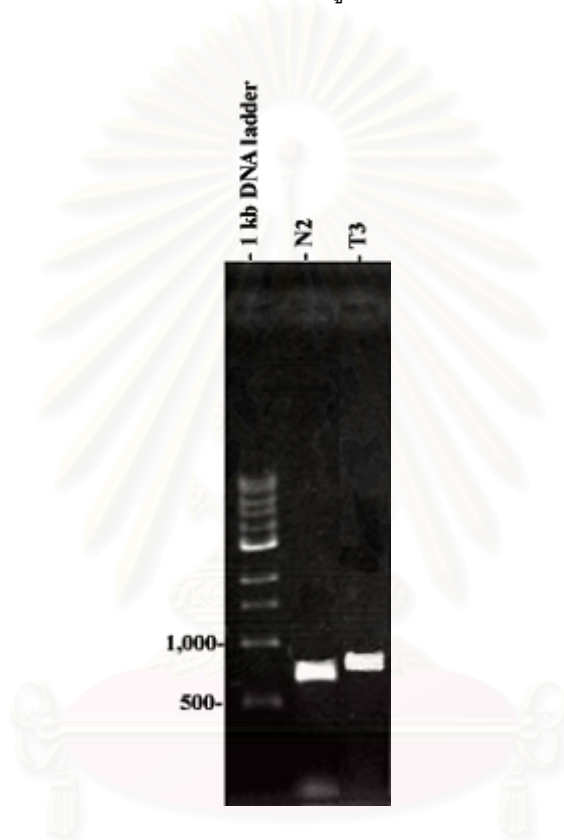
รูปที่ 19l ลักษณะสปอร์ของรา T3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร malt extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 3,500 เท่า



รูปที่ 19m ลักษณะของรา T3 ที่เกิด clamp connection เมื่อเลี้ยงในอาหาร malt extract agar เป็นเวลา 7 วัน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 10,000 เท่า

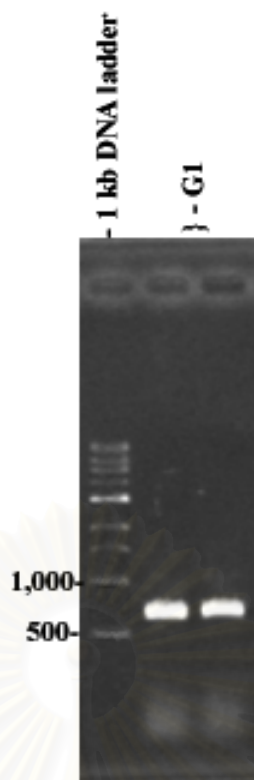
4.4 การบ่งชี้ชนิดของราที่ตัดแยกได้โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS)

จากการนำดีเอ็นเอของราทั้ง 5 ชนิดที่สกัดได้ตามวิธีการทดลองข้อ 7.2.1 ไปทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีการทดลองข้อ 7.2.2 แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ 1kb ladder เป็นขั้นดีเอ็นเอติดตาม พบว่าขั้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มีขนาดประมาณ 600-700 เบส แตกต่างกันในแต่ละชนิดของรา (รูปที่ 20,21,22)



รูปที่ 20 ผลิตรากันท์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของรา N2 และ T3 บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 ผลิตรหัสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของรา G1 บนอะกาโรส เจล 1.2 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 22 ผลิตรหัสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของรา N3 และ N4 บนอะกาโรส เจล 1.2 เปอร์เซ็นต์

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของสารพันธุกรรมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ
ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction ,PCR)

จากการนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยหน่วย
บริการชีวภาพ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเข้าโปรแกรม DNAsis ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ
ราทั้ง 5 สายพันธุ์ดังนี้

10	20	30	40	50
5' AAGTAAAAAGT	CGTAAACAAG	GTTTCCGTAG	GTGAACCTGC	GGAAGGATCA
3' TTCATTTTCA	GCATTTGTTC	CAAAGGCATC	CACTTGGACG	CCTTCCTAGT
60	70	80	90	100
TTAACGAGTT	TTGAAACGGG	TTGTAGCTGG	CCTTCCGAGG	CATGTGCACG
AATTGCTCAA	AACTTTGCCC	AACATCGACC	GGAAGGCTCC	GTACACGTGC
110	120	130	140	150
CCCTGCTCAT	CCACTCTTAC	CCCCGTGCA	CTTACTGTAG	GCTTCAGGCG
GGGACGAGTA	GGTGAGAATG	GGGGACACGT	GAATGACATC	CGAAGTCCGC
160	170	180	190	200
CGCCGCGGCT	TTCAACGCCG	TGACGTTACT	GGGTCTACGT	TTTACTACCA
GCGGCGCCGA	AAGTTGCGGC	ACTGCAATGA	CCCAGATGCA	AAATGATGGT
210	220	230	240	250
ACTACAAAGT	ATCAGAAATGT	GTATTGCGAT	GTAACGCATC	TATATACAAC
TGATGTTTCA	TAGTCTTACA	CATAACGCTA	CATTGCGTAG	ATATATGTTG
260	270	280	290	300
TTTCAGCAAC	GGATCTCTTG	GCTCTCGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA
AAAGTCGTTG	CCTAGAGAAC	CGAGAGCGTA	GCTACTTCTT	GCGTCGCTTT
310	320	330	340	350
TGCGATAAGT	AATGTGAATT	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA
ACGCTATTCA	TTACACTTAA	CGTCTTAAGT	CACTTAGTAG	CTTAGAAACT
360	370	380	390	400
ACGCACCTTG	CGCTCCTTGG	TATTCCGAGG	AGCATGCCTG	TTTGAGTGTC
TGCGTGGAAC	GCGAGGAACC	ATAAGGCTCC	TCGTACGGAC	AAACTCACAG
410	420	430	440	450
ATGAAAATTCT	CAACCTACAA	ATCTTTGCGG	GTTTGTAGGC	TTGGACTTGG
TACTTTAAGA	GTTGGATGTT	TAGAAACGCC	CAAACATCCG	AACCTGAACC
460	470	480	490	500
AGGTTTTTGT	TGGCTTCTCG	CAAGTCGGCT	CCTCTTAAAT	GCATTAGCCT
TCCAAAAACA	ACCGAAGAGC	GTTCAGCCGA	GGAGAATTTA	CGTAATCGGA
510	520	530	540	550
GTTTCCCTTG	GGATCGGCTC	TCGGTGTGAT	AATTATCTGC	GCCGCGACCG
CAAAGGAACG	CCTAGCCGAG	AGCCACACTA	TTAATAGACG	CGGCGCTGGC
560	570	580	590	
TGAAGCGTTT	GGCTGGCTTC	TAATCGTCTC	GCTCAAGAGA	3'
ACTTCGCAAA	CCGACCGAAG	ATTAGCAGAG	CGAGTTCTCT	5'

รูปที่ 23a ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของรา N2 ที่เพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ
เมอร์ (Polymerase Chain Reaction ,PCR)

	10	20	30	40	50
5'	CNGTAGGTGA	ACCTGCGGAA	GGATCATTAA	CGAGTAACTG	AACAGGTTGT
3'	GNCATCCACT	TGGACGCCTT	CCTAGTAATT	GCTCATTGAC	TTGTCCAACA
	60	70	80	90	100
	AGCTGGCCTT	TCGGGGCATG	TGCACACCTG	GCTCATCCAC	TCTTCAACCT
	TCGACCGGAA	AGCCCCGTAC	ACGTGTGGAC	CGAGTAGGTG	AGAAGTTGGA
	110	120	130	140	150
	CTGTGCACTT	GTTGTAGGTC	GGTAGAAGAG	CGAGCATTTA	ATGCTTGCTT
	GACACGTGAA	CAACATCCAG	CCATCTTCTC	GCTCGTAAAT	TACGAACGAA
	160	170	180	190	200
	GGAAGCCTTC	CTATGTTTTA	CTACAAAACGC	TTCAGTTTTAA	GAATGTTTTAC
	CCTTCGGGAA	GATACAAAAT	GATGTTTGCG	AAGTCAAAT	CTTACAAATG
	210	220	230	240	250
	CTGCGTATAA	CGCATTTATA	TACAACTTTC	AGCAACGGAT	CTCTTGGCTC
	GACGCATATT	GCGTAAATAT	ATGTTGAAAAG	TCGTTGCCA	GAGAACCGAG
	260	270	280	290	300
	TCGCATCGAT	GAAGAACGCA	GCGAAAATGCG	ATAAGTAATG	TGAATTGCAG
	AGCGTAGCTA	CTTCTTGCGT	CGCTTTACGC	TATTCATTAC	ACTTAAACGTC
	310	320	330	340	350
	AATTCAGTGA	ATCATCGAAT	CTTTGAACGC	ACCTTGCGCT	CCCTGGNTAT
	TTAAGTCACT	TAGTAGCTTA	GAAACTTGCG	TGGAACGCGA	GGGACCNATA
	360	370	380	390	400
	TCCGGGGAGC	ATGCCTGTTT	GAGTGTCAATG	GTATTCTCAA	CCTTCATAAC
	AGGCCCTCG	TACGGACAAA	CTCACAGTAC	CATAAGAGTT	GGAAGTATTG
	410	420	430	440	450
	TTTTGTTATC	GAAGGCTTGG	ACTTGGAGGT	TGTGCTGGCT	TCTAGTTAAG
	AAAACAATAG	CTTCCGAACC	TGAACCTCCA	ACACGACCGA	AGATCAATTC
	460	470	480	490	500
	TCGGCTCCTC	TTAAATGTAT	TAGCGTGAGT	GTAACGGATC	GCTTCGGTGT
	AGCCGAGGAG	AATTTACATA	ATCGCACTCA	CATTGCCTAG	CGAAGCCACA
	510	520	530	540	550
	GATAATTATC	TGCGCCGTGG	TCGTGAAGTA	ACATAAGCTT	GCGCTTCTAA
	CTATTAATAG	ACGCGGCACC	AGCACTTCAT	TGTATTCGAA	CGCGAAGATT
	560	570	580	590	600
	CCGTCCTTCA	GTTGGACAAT	TACTTTGACA	TCTGACCTCA	AATCAGGTAG
	GGCAGGAAGT	CAACCTGTTA	ATGAAACTGT	AGACTGGAGT	TTAGTCCATC
	610	620	630	640	650
	→GACTACCCGC	TGAACTTAAG	CATATCATAA	GCNGGGAGGA	A 3'
	CTGATGGGCG	ACTTGAATTC	GTATAGTATT	CGNCCCTTCC	T 5'

รูปที่ 23b ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของรา N3 ที่เพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ
เมอเรส (Polymerase Chain Reaction ,PCR)

```

          10          20          30          40          50
5' TTAGAGGAAG TAAAAGTCGT AANCAAGGTT TCCGTAGGTG AACCTGCGGA
3' AATCTCCTTC ATTTTCAGCA TTNGTTCCAA AGGCATCCAC TTGGACGCCT

          60          70          80          90          100
AGGATCATT TCGAGTTATT GAAACGGGTT GTAGCTGGCC TTAACGAGGC
TCCTAGTAAT AGCTCAATAA CTTTGCCCAA CATCGACCGG AATTGCTCCG

          110         120         130         140         150
ATGTGCACGC CCTGCTCATC CACTCTACAC CTGTGCACTT ACTGTGGGTT
TACACGTGCG GGACGAGTAG GTGAGATGTG GACACGTGAA TGACACCCAA

          160         170         180         190         200
TCAGGAGCTT CGAAAGCGGA GGGCCTTTGC GGGCTTTTCG TTATTAGTTG
AGTCTCTCGAA GCTTTCGCCT CCCGAAAACG CCCGAAAAGC AATAATCAAC

          210         220         230         240         250
TGAATGGGCT CATGTCCACT ACAAACTCTT ATAAAGTAAC AGAATGTGTA
ACTGACCCGA GTACAGGTGA TGTFTGAGAA TATTTTCATTG TCTTACACAT

          260         270         280         290         300
TTGCGATGTA ACGCATCTAT ATACAACCTT CAGCAACGGA TCTCTTGGCT
AACGCTACAT TCGGTAGATA TATGTTGAAA GTCGTTGCCT AGAGAACCGA

          310         320         330         340         350
CTCGCATCGA TGAAGAACGC AGCGAAAATGC GATAAGTAAT GTGAATTGCA
GAGCGTAGCT ACTTCTTGCG TCGCTTTACG CTATTCATTA CACTTAACGT

          360         370         380         390         400
GAATTCAGTG AATCATCGAA TCTTTGAACG CACCTTGCGC TCCTTGGTAT
CTTAAGTCAC TTAGTAGCTT AGAAACTTGC GTGGAACGCG AGGAACCATA

          410         420         430         440         450
TCCGAGGAGC ATGCCTGTTT GAGTGTCTATG AAATTCTCAA CCTGACGGGT
AGGCTCCTCG TACGGACAAA CTCACAGTAC TTTAAGAGTT GGAAGTCCCA

          460         470         480         490         500
TCTTAANCGG AGCTTGGTTC AGGCTTGGAC TTGGAGGCTT GTCGGCTTGC
AGAATTNGCC TCGAACCAAG TCCGAACCTG AACCTCCGAA CAGCCGAACG

          510         520         530         540         550
TTTGTGCGAGT CGGCTCCTCT CAAATGCATT AGCTTGGTTC TTTGCGGATC
AAACAGCTCA GCCGAGGAGA GTTTACGTAA TCGAACCAAG AAACGCCTAG

          560         570         580         590         600
GGCTCACGGT GTGATAATTG TCTACGCCGC GACCGTTGAA GCGTTTGAAT
CCGAGTGCCA CACTATTAAC AGATGCGGCG CTGGCAACTT CGCAAACCTA

          610         620         630         640         650
GGGCCAGCTT ATAGTCGTCT CCATCGCGAG ACAACATTTT ATCGAACTCT
CCCGGTGCGA TATCAGCAGA GGTAGCGCTC TGTTGTAAAG TAGCTTGAGA

          660         670         680
→ GACCTCAAAT CAGGTAGACT ACCCGCTG 3'
CTGGAGTTTA GTCCATCTGA TGGGCGAC 5'

```

รูปที่23c ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของรา N4 ที่เพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ
 เมอเรส (Polymerase Chain Reaction ,PCR)

```

      10          20          30          40          50
5' NTAAAGCCGT ANTATGGNTT TCCNGTAGGT GAACCCCTGCG GAAGGATCAT
3' NATTTTCGGCA TNATACCNAA AGGNCATCCA CTTGGGACGC CTTCCCTAGTA
      60          70          80          90          100
TAACGAGTTT TGAAAGGGTT GTAGCTGGTC TCAATCTGAG GCATGTGCAC
ATTGCTCAAA ACTTTCCCAA CATCGACCAG AGTTAGACTC CGTACACGTG
      110         120         130         140         150
GCCCTACTCA TCCACTCTCA ACCTCTGTGC ACTTACTGTA GGTCCGGTGAA
CGGGATGAGT AGGTGAGAGT TGGAGACACG TGAATGACAT CCAGCCACTT
      160         170         180         190         200
AGGTTTCGCTC TGCAGCTGG AAGCCTTCCT ATGTTTCACT ACAAACACTT
TCCAAGCGAG ACGCTCGACC TTCGGAAGGA TACAAAGTGA TGTTTGTGAA
      210         220         230         240         250
CAGTTTTAGA ATGTAACCTT GCGTATAACG CATCTATATA CAACTTTCAG
GTCAAAATCT TACATTGGAA CGCATATTGC GTAGATATAT GTTAAAAGTC
      260         270         280         290         300
CAACGGATCT CTTGGCTCTC GCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT
GTTGCCTAGA GAACCGAGAG CGTAGCTACT TCTTGCGTCC CTTTACGCTA
      310         320         330         340         350
AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT CATCGAATCT TTGAACGCAC
TTCATTACAC TTAACGTCTT AAGTCACTTA GTAGCTTAGA AACTTGCCTG
      360         370         380         390         400
CTTGCGCTCC CTGGTATTCC GGGGAGCACG CCTGTTTGGAG TGTTCATGGTA
GAACGCGAGG GACCATAAAG CCCCTCGTGC GGACAAATC ACAGTACCAT
      410         420         430         440         450
TTCTCAACCT TCATAACTTT TGTATATCGAA GGCTTGGATT TGGAGGTTGT
AAGAGTTGGA AGTATTGAAA ACAATAGCTT CCGAACCTAA ACCTCCAACA
      460         470         480         490         500
GCTGGCTCTC GTTAGTCGGC TCCTCTTAAA TGCATTAGCG TGAACGTTTG
CGACCGAGAG CAATCAGCCG AGGAGAATTT ACGTAATCGC ACTTGCAAAC
      510         520         530         540         550
CCGATCGCTA TCAGTGTGAT AATTATCTGC GCTGTTAGTG TTGAAGCATC
GGCTAGCGAT AGTCACACTA TTAATAGACG CGACAATCAC AACTTCGTAG
      560         570         580         590         600
ATTAGTGTCTG CGCTTCTAAC CGTCTTCAC AGGACAATTT ACTTTGACAT
TAATCACAGC GCGAAGATTG GCAGGAAGTG TCCTGTTAAA TGAAACTGTA
      610         620         630         640         650
CTGACCTCAA ATCAGGCGGG ACTACCCGCT GAACTTAAGC ATATCAATAA
GACTGGAGTT TAGTCCGCCC TGATGGGCGA CTTGAATTCG TATAGTTATT
      660
→ GCGGAGGA 3'
   CGCCTCCT 5'

```

รูปที่ 23d ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของรา G1 ที่เพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ
 เมอเรส (Polymerase Chain Reaction ,PCR)

```

          10          20          30          40          50
5' ANTATGGNTT TCCNGTAGGT GAACCCTGCG GAAGGATCAT TAACGAGTTT
3' TNATACCNAAGGNCATCCA CTTGGGACGC CTTCCCTAGTA ATTGCTCAAA
          60          70          80          90          100
TGAAAGGGTT GTAGCTGGTC TCAATCTGAG GCATGTGCAC GCCCTACTCA
ACTTTCCCAA CATCGACCAG AGTTAGACTC CGTACACGTG CGGGATGAGT
          110          120          130          140          150
TCCACTCTCA ACCTCTGTGC ACTTACTGTA GGTCGGTGAA AGGTTTCGCTC
AGGTGAGAGT TGGAGACACG TGAATGACAT CCAGCCACTT TCCAAGCGAG
          160          170          180          190          200
TGCGAGCTGG AAGCCTTCCT ATGTTTCACT ACAAACACTT CAGTTTTAGA
ACGCTCGACC TTCGGAAGGA TACAAAAGTGA TGTTTGTGAA GTCAAAATCT
          210          220          230          240          250
ATGTAACCTT GCGTATAACG CATCTATATA CAACTTTCAG CAACGGATCT
TACATTGGAA CGCATATTGC GTAGATATAT GTTGAAAGTC GTTGCCTAGA
          260          270          280          290          300
CTTGGCTCTC GCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT AAGTAATGTG
GAACCGAGAG CGTAGCTACT TCTTGCCTCG CTTTACGCTA TTCATTACAC
          310          320          330          340          350
AATTGCAGAA TTCAGTGAAT CATCGAATCT TTGAACGCAC CTTGCGCTCC
TTAACGTCTT AAGTCACTTA GTAGCTTAGA AACTTGCGTG GAACGCGAGG
          360          370          380          390          400
CTGGTATTCC GGGGAGCACG CCTGTTTGAG TGTCATGGTA TTCTCAACCT
GACCATAAGG CCCCTCGTGC GGACAAACTC ACAGTACCAT AAGAGTTGGA
          410          420          430          440          450
TCATAACTTT TGTATATCGAA GGCTTGGATT TGGAGGTTGT GCTGGCTCTC
AGTATTGAAA ACAATAGCTT CCGAACCTAA ACCTCCAACA CGACCGAGAG
          460          470          480          490          500
GTTAGTCGGC TCCTCTTAAA TGCATTAGCG TGAACGTTTG CCGATCGCTA
CAATCAGCCG AGGAGAATTT ACGTAATCGC ACTTGCAAAC GGCTAGCGAT
          510          520          530          540          550
TCAGTGTGAT AATTATCTGC GCTGTTAGTG TTGAAGCATC ATTAGTGTCG
AGTCACACTA TTAATAGACG CGACAATCAC AACTTCGTAG TAATCACAGC
          560          570          580          590          600
CGCTTCTAAC CGTCCTTAC AGGACAATTT ACTTTGACAT CTGACCTCAA
GCGAAGATTG GCAGGAAGTG TCCTGTTAAA TGAAACTGTA GACTGGAGTT
          610          620          630          640          650
→ ATCAGGCGGG ACTACCCGCT GAACTTAAGC ATATCAATAA GCGGAGGA 3'
TAGTCCGCC TGATGGCGGA CTTGAATTCG TATAGTTATT CGCCTCCT 5'

```

รูปที่23e ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของรา T3 ที่เพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ
 เมอเรส (Polymerase Chain Reaction ,PCR)

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS ของราทั้ง 5 สายพันธุ์ นำไปเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสใน GenBank DNA database โดยใช้โปรแกรม BlastN พบว่า

- รา N2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับรา *Marasmius cladophyllus* มี %homology เท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค)

Phylum Basidiomycota
 Class Hymenomycetes
 Subclass Homobasidiomycetes
 Order Agaricales
 Family Tricholomataceae
 Genus Marasmius

- รา N3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับรา *Phanerochaete cryosporium* สายพันธุ์ KCTC 6728 มี %homology เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค)

Phylum Basidiomycota
 Class Hymenomycetes
 Subclass Homobasidiomycetes
 Order Aphyllphorales
 Family Corticiaceae
 Genus Phanerochaete

- รา N4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับรา *Lentinus tigrinus* LE(BIN) 0861 SBI5 มี %homology เท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค)

Phylum Basidiomycota
 Class Hymenomycetes
 Subclass Homobasidiomycetes
 Order Aphyllphorales
 Family Lentinaceae
 Genus Lentinus

- รา G1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับรา *Polyporus tricholoma* CuITENN9579 SBI2 มี %homology เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค)

Phylum Basidiomycota
 Class Hymenomycetes
 Subclass Homobasidiomycetes
 Order Aphyllophorales
 Family Polyporaceae
 Genus Polyporus

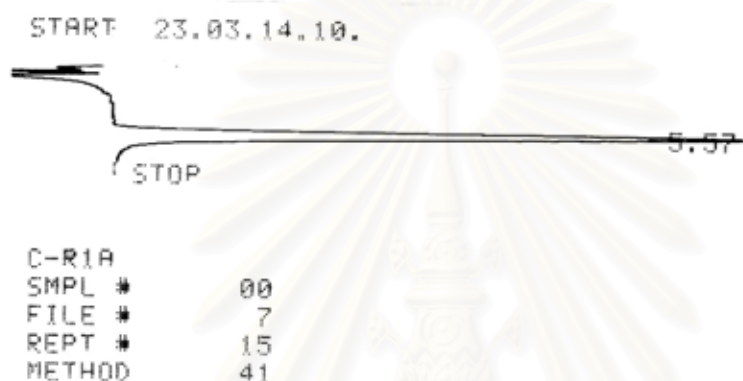
- รา T3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับรา *Athelia pellicularis* มี %homology เท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค)

Phylum Basidiomycota
 Class Hymenomycetes
 Subclass Homobasidiomycetes
 Order Aphyllophorales
 Family Corticiaceae
 Genus Athelia

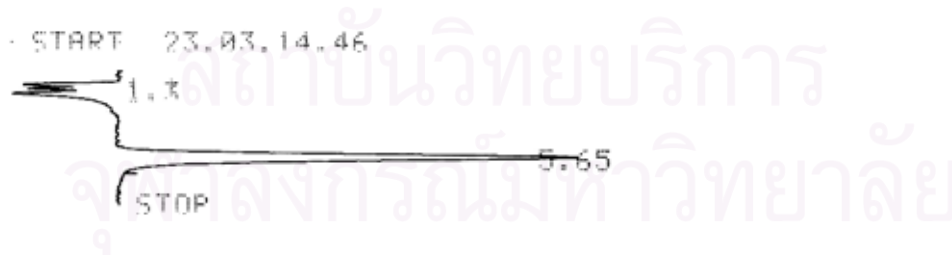
สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การทดสอบการย่อยสลายไดเบนไซฟิวแรนในอาหารเหลว LN

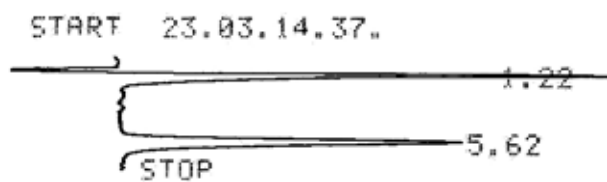
การทดสอบความสามารถของราในการย่อยสลายไดเบนไซฟิวแรนทำตามวิธีการทดลอง
 ข้อหลังจากเติมไดเบนไซฟิวแรนแล้วเลี้ยงเชื้อต่อเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปสกัดไดเบนไซฟิวแรน
 ตามวิธีการทดลองข้อ 5 แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไดเบนไซฟิวแรนที่หายไปด้วยเครื่อง
 HPLC โดยเทียบกับชุดการทดลองควบคุมได้ผลดังรูปที่ 24a – 24f



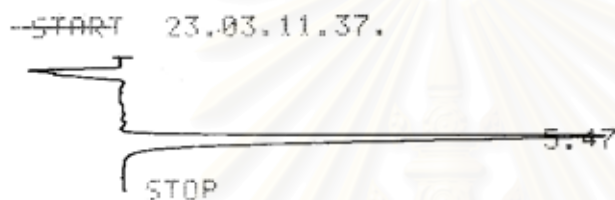
รูปที่ 24a HPLC โครมาโตแกรม ของชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมราลงไปใน
 อาหารเลี้ยงเชื้อ



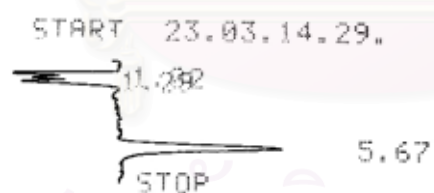
รูปที่ 24b HPLC โครมาโตแกรม แสดงการย่อยสลายไดเบนไซฟิวแรนโดยรา N2
 ในเวลา 7 วัน



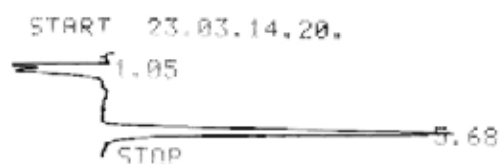
รูปที่ 24c HPLC โครมาโตแกรม แสดงการย่อยสลายไดเบนไซฟิวแรนโดยรา N3
ในเวลา 7 วัน



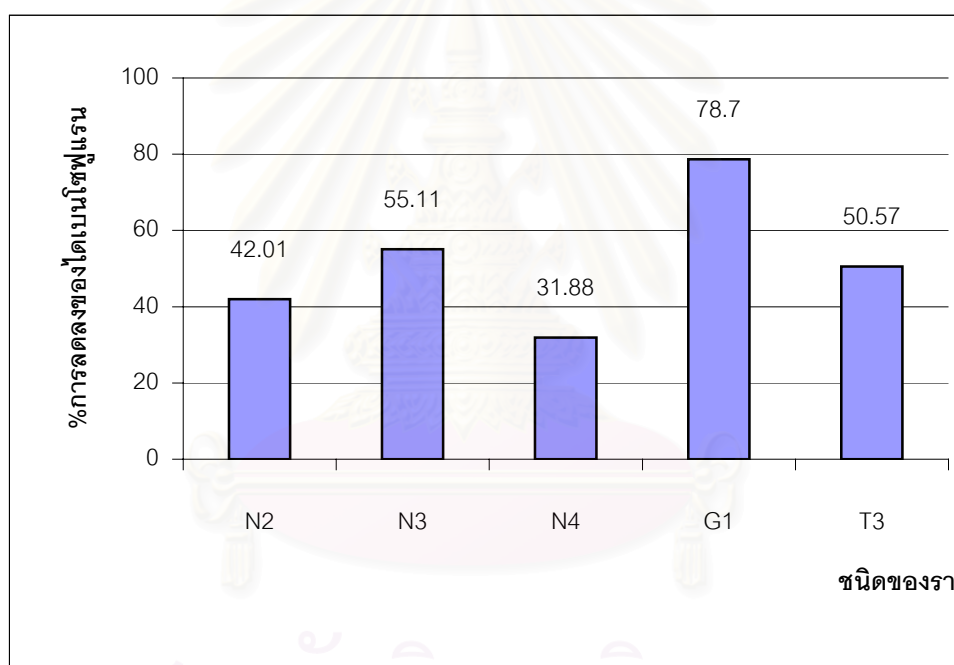
รูปที่ 24d HPLC โครมาโตแกรม แสดงการย่อยสลายไดเบนไซฟิวแรนโดยรา N4
ในเวลา 7 วัน



รูปที่ 24e HPLC โครมาโตแกรม แสดงการย่อยสลายไดเบนไซฟิวแรนโดยรา G1
ในเวลา 7 วัน



รูปที่ 24f HPLC โคโรมาโตแกรม แสดงการย่อยสลายไดเบนไซฟิวแรนโดยรา T3
ในเวลา 7 วัน

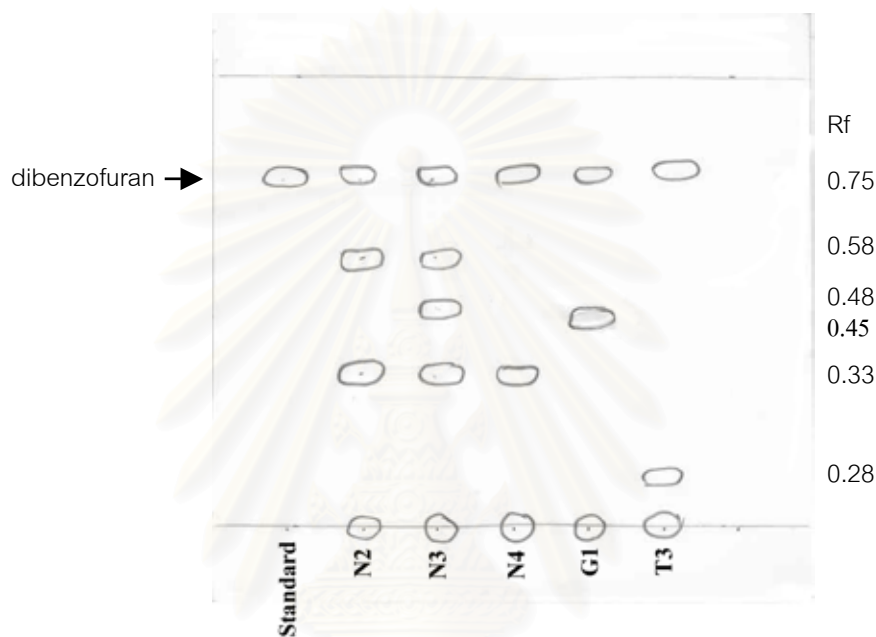


รูปที่ 25 แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การลดลงของไดเบนไซฟิวแรน โดย รา N2, N3, N4, G1 และ T3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร LN ที่มีสี RBBR

จากการทดสอบการย่อยสลายไดเบนไซฟิวแรนโดยราที่คัดแยกได้ทั้ง 5 ชนิด พบว่ารา G1 สามารถย่อยสลายไดเบนไซฟิวแรนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้สูงสุดคือ 78.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือรา N3 T3 N2 และ N4 โดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยไดเบนไซฟิวแรนเท่ากับ 55.11 , 50.57, 42.01 และ 31.88 ตามลำดับ

การตรวจสอบชนิดของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไดเบนโซฟีวแรน

ผลการศึกษาการย่อยสลายไดเบนโซฟีวแรนโดยราที่คัดแยกได้ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี TLC โดยมีระบบตัวทำละลายประกอบด้วย โทลูอีน : ไดออกเซน อัตราส่วน 5 : 18 พบสารมัธยันตร์ดังแสดงในรูป 20



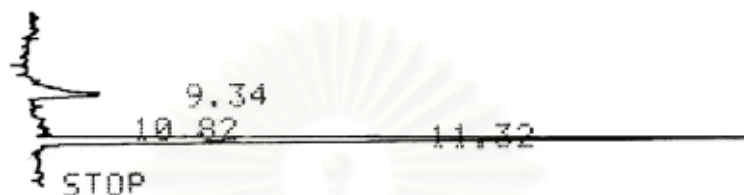
รูปที่ 26 TLC โครมาโตแกรม แสดงสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายไดเบนโซฟีวแรน

เป็นเวลา 7 วัน

การย่อยสลายไดเบนโซฟีวแรนโดยรา 5 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ให้สารมัธยันตร์ที่แตกต่างกัน โดยที่รา N3 พบสารมัธยันตร์มากที่สุดโดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.33 0.48 0.58 และ 0.75 ซึ่งค่า Rf เท่ากับ 0.75 คือสารไดเบนโซฟีวแรนที่เหลืออยู่เมื่อเทียบกับสารไดเบนโซฟีวแรนมาตรฐาน ส่วนราชนิดอื่นให้จำนวนสารมัธยันตร์แตกต่างกันคือ N2 มีค่า Rf เท่ากับ 0.33 0.58 0.75 รา N4 มีค่า Rf เท่ากับ 0.33 0.75 รา G1 มีค่า Rf เท่ากับ 0.53 0.75 และรา T3 มีค่า Rf เท่ากับ 0.28 0.75

การตรวจสอบสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายไดเบนไซฟิวแรนโดย HPLC

START 09.26.13.31.



รูปที่ 27 HPLC โครมาโตแกรม แสดงการย่อยสลายไดเบนไซฟิวแรนโดยรา G1 ในเวลา 7 วันโดยการ gradient อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลกับน้ำ

เนื่องจากรา G1 สามารถย่อยสลายไดเบนไซฟิวแรนได้มากที่สุดจากการเปรียบเทียบกับราที่คัดแยกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์จึงทำการวิเคราะห์หาสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยไดเบนไซฟิวแรนภายใน 7 วันโดยวิธี TLC และ HPLC ของราพบว่า สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นเป็นสารที่มีขั้วสูงกว่าไดเบนไซฟิวแรน เนื่องจากเมื่อเปลี่ยนตัวทำละลายให้มีขั้วสูงขึ้นสารมัธยันตร์มีการเคลื่อนที่เพิ่มมากขึ้นพบสารที่เกิดขึ้นอย่างน้อย 2 ชนิดดังรูปที่ 26 ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลายโทลูอีนและไดออกเซน อัตราส่วน 5:18 ซึ่งไดออกเซนเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง สำหรับการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC เนื่องจากวิเคราะห์โดยใช้เฟสเคลื่อนที่มีอัตราส่วนระหว่างเมทานอลกับน้ำเท่ากับ 75:25 ไม่พบพีกของสารมัธยันตร์เกิดขึ้นซึ่งอาจเกิดจากสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์โดยการเปลี่ยน (gradient) อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่พีกของสารมัธยันตร์ดังรูปที่ 27 ซึ่งลักษณะของพีกที่ได้ไม่สามารถบอกได้ว่ามีสารกี่ชนิด แต่จากการพิจารณาผลร่วมกันจากทั้ง 2 วิธีสามารถบอกได้ว่าสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นเป็นสารที่มีขั้วสูงมากกว่าไดเบนไซฟิวแรนและมีจำนวนอย่างน้อย 2 ชนิด

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายสารพิษกลุ่มไดออกซิน ซึ่งเป็นสารที่ย่อยสลายยาก และมีความคงตัวสูง ได้มีการศึกษาทดลองโดยใช้วิธีที่ต่างกันหลายวิธี ในการทดลองนี้คัดแยก ราเบื้องต้นตามวิธีของ Sato และคณะ (2002) งานวิจัยนี้ได้คัดแยกรา ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายไดออกซิน จากตัวอย่างดินในป่าบริเวณต่างๆในประเทศไทย จำนวน 16 ตัวอย่าง โดยวิธีการทดลองข้อ 1 พบราที่สามารถเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งภายในเวลา 14 วัน จำนวน 5 เชื้อ จากดินตัวอย่างทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) ซึ่งมีลักษณะในการย่อยสลายสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ต่างกันดังรูปที่ 8 โดยที่รา N2 และ N3 มีการเจริญที่เร็วและมีเส้นใยเต็มจานเพาะเชื้อแล้วจึงมีการย่อยสีเกิดขึ้น แต่รา T3 เจริญได้ช้าและมีเส้นใยที่อัดกันแน่น มองเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการย่อยสีอยู่นอกการเจริญของเส้นใย (รูป 8D) ส่วนรา N4 และ G1 มีการเจริญและการย่อยสีเกิดขึ้นพร้อมๆกัน ซึ่งลักษณะการย่อยสีที่ต่างกันนี้อาจเกิดจากราแต่ละชนิดมีการสร้างเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ซึ่งต้องมีการทดลองเพื่อศึกษาลักษณะการสร้างเอนไซม์ของราแต่ละชนิดต่อไป

จากนั้นนำไปทดสอบการย่อยสี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ชั้นแรกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM ที่มีสี RBBR ตามวิธีการทดลองข้อ 3 เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว พบว่าราที่คัดแยกได้ในขั้นตอนแรกคือ N2, N3, N4, G1 และ T3 ไม่สามารถเจริญและใช้สี RBBR ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM เป็นแหล่งคาร์บอนได้ มีเพียงรา T3 ที่สามารถเจริญและย่อยสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ได้ แต่ในการทดลองนี้มีชุดทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM พบว่ารา T3 สามารถเจริญเติบโตในช่วง 1-3 วันแรก ซึ่งผลที่ได้เกิดจากที่รา T3 มีเส้นใยที่อัดตัวกันแน่นมากกว่าราอีก 4 ชนิด (รูปที่ 19) ทำให้ปริมาณเชื้อที่ใช้ในการทดลองติดมากับวุ้นของอาหารแข็ง PDA ที่ใช้ cock borer จะมากกว่าราชนิดอื่นๆ ราอาจเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ติดมาจึงมีปริมาณมากพอที่จะย่อยสลายสี RBBR ได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 4.2 เพื่อทดสอบว่าหากไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งติดมากับเส้นใยแล้ว รา T3 ยังสามารถย่อยสีได้หรือไม่ ซึ่งผลการทดลองนี้ได้พบว่า รา T3 ไม่สามารถย่อยสลายสี RBBR ได้ ในการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 4.2 ได้ทำการเปลี่ยนชนิดของวัสดุที่ใช้วางบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งก่อนเลี้ยงรา โดยทดลองใช้กระดาษกรองชนิดต่างๆ กระดาษทิชชู และกระดาษเซลโลเฟน พบว่ากระดาษเซลโลเฟนเป็นกระดาษที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ เนื่องจากราสามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มีการวางกระดาษเซลโลเฟนและยังสามารถใช้ cock borer เจาะเอาเส้นใยราออกมาใช้ได้โดยไม่ติดอาหารเลี้ยงเชื้อมากับเส้นใยด้วย ผลการทดลองนี้พบว่า รา T3 ไม่สามารถย่อยสลายสี RBBR ได้

สิริกุล วัฒนานนท์กิจ (2547) ได้ทดลองนำราที่คัดแยกได้จากวิธีการข้างต้นทดสอบความสามารถในการใช้สี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพบรา 2 ชนิดที่สามารถใช้สี RBBR เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวได้ แต่จากการทดลองนี้ไม่พบราที่สามารถใช้สี RBBR ใน MM เป็น แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองต่อโดยใช้อาหาร LN ที่มีการเติมสี RBBR ซึ่งได้ผลตามรูปที่ 14 คือราทั้ง 5 ชนิด สามารถย่อยสีได้มากกว่า 80 % จึงคาดว่าราที่คัดแยกได้มีระบบการย่อยสี RBBR โดยใช้ระบบเอนไซม์ lignin peroxidase (Mori และ Kondo, 2002)

จากนั้นนำราที่ได้ทั้ง 5 ชนิดโดยวิธีทางพันธุศาสตร์โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยศึกษาลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของรากับอาหารเลี้ยงเชื้อรา 5 ชนิดดังแสดงในรูปที่ 15-19 ซึ่งพบว่าราแต่ละชนิดเจริญได้ดีและสร้างสปอร์ในอาหารต่างชนิดกัน แต่เชื้อส่วนมากโตได้ดีและสร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar medium จากนั้นศึกษาลักษณะเส้นใยและลักษณะสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดดังแสดงในรูปที่ 19 พบการเกิด clamp connection ซึ่งเป็นลักษณะของราในกลุ่ม Basidiomycetes และมีการสร้างสปอร์ที่มีลักษณะไม่แตกต่างกันมากนัก จากการพิจารณาผลร่วมกันระหว่างการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุศาสตร์สามารถบ่งชี้ชนิดของราที่คัดแยกได้คือ *Marasmius cladophyllus* , *Phanerochaete crysosporium* , *Lentinus tigrinus* , *Polyporus tricholoma* และ *Athelia pellicularis* ราทั้งหมดเป็นราในกลุ่ม white rot fungi จากนั้นเมื่อนำราทั้ง 5 ชนิดไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไคเบนโซฟูแรน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LN พบว่าราแต่ละชนิดย่อยสลายไคเบนโซฟูแรนได้แตกต่างกัน ซึ่งตรงกับที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีการรายงานว่าราในกลุ่ม white rot fungi สามารถย่อยสลายสารกลุ่มไดออกซินได้ (Bumpus และคณะ, 1985 , Hammel และคณะ , 1986 ,Mori และ Kondo, 2002) โดยที่รา G1 ซึ่งถูกบ่งชี้ชนิดว่าเป็นสายพันธุ์ *Polyporus tricholoma* สามารถย่อยสลายไคเบนโซฟูแรนได้สูงที่สุดคือ 78 % ภายในเวลา 7 วัน โดยจากรายงานก่อนหน้านี้ยังไม่มีมีการพบการย่อยสลายไคเบนโซฟูแรนในราชนิดดังกล่าว พบเฉพาะราสายพันธุ์อื่นๆที่อยู่ในกลุ่ม white rot fungi เหมือนกัน ซึ่งจากผลการทดลองนี้ในราชนิดอื่น พบรา N3 ซึ่งถูกบ่งชี้ว่าเป็น *P. crysosporium* ที่ย่อยสลายไคเบนโซฟูแรนได้มากกว่า 50 % ภายในเวลา 7 วัน ซึ่งตรงกับรายงานก่อนหน้านี้หลายรายงาน ที่พบว่าราสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลายสารกลุ่มไดออกซินได้ และเมื่อนำไปทดสอบการย่อยสลายไดออกซินและสารอนุพันธ์ที่มีคลอรีน พบว่าราสายพันธุ์นี้สามารถย่อย 2,3,7,8-TCDD ซึ่งเป็นสารไดออกซินชนิดที่มีพิษสูงที่สุดได้ (Bumpus และคณะ, 1985)

สำหรับการศึกษาสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้น ในระหว่างการย่อยสลายไคเบนฟูแรนของราทั้ง 5 ชนิด ถูกศึกษาโดยใช้วิธี TLC ซึ่งระบบตัวทำละลายที่ใช้ในครั้งแรกทำตามวิธีของ Nojiri และคณะ (1999) คือใช้อัตราส่วนของ โทลูอิน : ไดออกเซน เท่ากับ 15 : 8 พบว่ามีเพียงสารไคเบนโซฟูแรนเท่านั้นที่สามารถเคลื่อนที่ไปกับเฟสเคลื่อนที่ได้ ดังนั้นจึงปรับเปลี่ยนระบบตัวทำละลายให้มีขั้วมากขึ้นโดยเพิ่มปริมาณของไดออกเซนเนื่องจากไดออกเซนเป็นสารที่มีขั้วสูงกว่าโทลูอิน พบว่าสารมัธยันตร์มีการเคลื่อนที่เพิ่มมากขึ้น จนได้อัตราส่วนระหว่างโทลูอิน : ไดออกเซน เท่ากับ 8:15 จากรูปที่ 26 ซึ่งเป็นโครมาโตแกรมของ TLC พบว่าสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไคเบนโซฟูแรนของราแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่มีขั้วสูงกว่าไคเบนโซฟูแรน เนื่องจากแผ่นซิลิกาที่ใช้เป็น stationary phase นั้นเป็นสารมีขั้วจึงต้องใช้ตัวทำละลายที่เป็น mobile phase ซึ่งมีขั้วมากกว่าในการดึงให้สารเคลื่อนที่ ดังนั้นสารที่มีค่า Rf สูงจึงมีขั้วน้อยกว่าสารที่มีค่า Rf ต่ำ ซึ่งการศึกษาโครงสร้างของสารและบ่งชี้ชนิดของสารโดยใช้วิธี GC-MS และ NMR ของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นยังต้องมีการศึกษาต่อไป แต่จากการศึกษาที่มีรายงานก่อนหน้านี้ Mori และ Kondo (2002) ได้ศึกษาสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายสารไคเบนฟูแรนโดยรา *Phlebia lindtneri* ซึ่งเป็นราในกลุ่ม white rot fungi พบสาร 2- hydroxy dibenzofuran เป็นสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นซึ่งตรงกับรายงานก่อนหน้านี้ที่มีการศึกษาสารที่เกิดจากการย่อยสลายสารไคเบนฟูแรนพบว่าสารที่ได้เกิดจากปฏิกิริยา oxidation แล้วเติมหมู่ไฮดรอกซีให้กับวงแหวนอะโรมาติก ไคเบนฟูแรนทำให้สารที่ได้เป็นสารที่มีขั้วสูงขึ้น

ในการทดลองสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอของราทั้ง 5 ชนิด ขึ้นแรกตามวิธีของ Makimura และคณะ (2000) โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้คือนำเส้นใยราผสมกับ lysis buffer (ภาคผนวก ข) แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อีก 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g 5 นาที เมื่อนำส่วนใสที่ได้ไปสกัดด้วยวิธี ฟีนอลคลอโรฟอร์ม แล้วนำส่วนที่คาดว่าเป็นสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นบนแผ่นอะกาโรสเจล สภาวะที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีนี้ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอจากราทั้ง 5 ชนิดได้

จากการศึกษาวิธีสกัดดีเอ็นเอของราโดยวิธีอื่นพบวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการเติมไนโตรเจนเหลวลงในเส้นใยราให้เส้นใยแข็ง (Jasalavich และคณะ, 2000) หรือใช้เครื่องไลโอไฟไลซ์ทำให้เส้นใยราแข็ง แล้วใช้โกร่งบดเส้นใยราให้แตกแล้วจึงนำไปสกัดด้วยวิธี ฟีนอลคลอโรฟอร์มต่อไป แต่การใช้ไนโตรเจนเหลวเป็นวิธีการที่ไม่สะดวกและต้องมีความระมัดระวังเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงทำการประยุกต์วิธีของ Makimura และคณะ (2000) โดยใช้ lysis buffer จากวิธีนี้เติมลงไปผสมกับเส้นใยราแล้วจึงนำไปบดโดยใช้โกร่งโดยมีการเติมผงอะลูมินาลงไปเพื่อให้เส้นใยราแตกได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีการเติม CTAB ลงไปในระหว่างการสกัดทำให้ได้ปริมาณ DNA มากขึ้น

จากการทดลองสกัดดีเอ็นเอของราของ Jasalavich และคณะ (2000) ได้ใช้ CTAB เป็นส่วนหนึ่งในการสกัดดีเอ็นเอรา เนื่องจาก CTAB มีคุณสมบัติในการจับกับสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ เมื่อนำดีเอ็นเอของราที่สกัดได้ไปเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตาแหน่ง ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1-F เป็น forward primer และ ITS4 เป็น reverse primer พบว่าขึ้นดีเอ็นเอที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้ มีขนาดประมาณ 600-700 คู่เบส เมื่อเทียบกับขึ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์หาลำดับเบส แล้วเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการรายงานไว้ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN พบว่าราทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้เป็นราในกลุ่ม white rot fungi ซึ่งอยู่ในไฟลัม Basidiomycota จากการพิจารณาผลการบ่งชี้ชนิดของราที่คัดแยกได้ร่วมกับผลการย่อยสลายสี RBBR และโคเบนโซฟูแรนในอาหาร LN จึงคาดว่าราทั้ง 5 สายพันธุ์มีระบบเอนไซม์ lignin peroxidase ที่ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกที่มีลักษณะคล้ายลิกนิน

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

1. ในการทดลองนี้สามารถคัดแยกรา 3 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายโคเบนโซฟูแรนได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อไปถึงสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายว่าเป็นสารชนิดใด มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมหรือไม่ และควรมีการนำไปทดสอบการย่อยสลายสารไดออกซินและสารพิษที่มีโครงสร้างคล้ายไดออกซินที่เป็นอันตรายในสิ่งแวดล้อม เพื่อสามารถประยุกต์ใช้ในการกำจัดสารพิษเหล่านั้นได้ต่อไป

2. วิธีการสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอของราในการทดลองนี้เป็นวิธีที่มีการประยุกต์จาก 2 วิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน เพื่อให้ทำได้ง่ายขึ้นในห้องทดลองทั่วไป ดังนั้นวิธีดังกล่าวจึงเหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้กับการทดลองที่ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อนและมีราคาแพง

3. จากการใช้สารฆ่ารา benomyl เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดกรองรายย่อยสลายโคเบนโซฟูแรนในเบื้องต้นแล้วสามารถคัดแยกราที่โตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว จึงอาจเป็นไปได้ว่าราสามารถย่อยสลาย benomyl ได้เนื่องจากสารฆ่าราชนิดนี้มีโครงสร้างที่เป็นวงแหวนอะโรมาติก ซึ่งเอนไซม์ lignin peroxidase ของรากลุ่ม white rot fungi สามารถย่อยสลายได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2542. ไดออกซิน. ฝ่ายศูนย์ข้อมูลสารอันตรายและอนุสัญญา กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย. กรุงเทพฯ: ศรีเมืองการพิมพ์.
- ปราณี เกียรติสุระยานนท์ , 2542. Dioxin. ข่าวสารด้านยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ. กองวิชาการ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด , 2536. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.
- วิทยา สังข์ทอง , 2545. ไดออกซินและฟูเรน. แล็บทูเดย์. มกราคม-กุมภาพันธ์ 2545 : 41-47.

ภาษาอังกฤษ

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. 4th ed. New York: Wiley.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann. Biochem. 72:248-254.
- Bridge, P.D. and Arora, D.K. . 1998. Interpretation of PCR methods for species defenition. Applications of PCR in mycology. pp. 63-84. New York : CAB International.
- Bumpus , J.A. , Tein, M. , Wright, D., and Aust, S.D.1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. Science. 228: 1434-1436.
- Consuelo, F. , Francisca, C. , Susana ,F., Emilia ,M., Jose, L.A. , and Jorge, L.A.. 2001. Detection and identification of fungi pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S rDNA typing in ocular infections. J. Clin. Microbiol. 39: 2873-2879.
- Claudia, A.J. , Andrea, O., and Jody, J.. 2000. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4725-4734.

- Foght, J.M., and Westlake, D.W.S. 1988. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocycles by a *Pseudomonas* species. *Can. J. Microbiol.* 34: 1135-1141.
- Fortnagel, P., Harms, H., Wittich R-M., Krohn, S., Meyer H. Sinnwell, V., Willks, H. and Francke, W.1990. Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. Strain HH69 and the mixed culture HH27. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 1148-1156
- Hammel, K.E., Kalyanaraman, B., and Kirk, T.K. 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo-*p*-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 261: 16948-16952.
- Hammel, E., and Schauer, F. 1997. Fungal hydroxylation of dibenzofuran. *Mycol. Res.* 101: 433-436.
- Jasalavich, C.A., Ostrofsky, A., and Jellison, J. 2000. Detection and Identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4725-4734.
- Kearny, P.C., Woolson, E.A., Ellington, C.P. Jr. 1972. Persistence and metabolism of chlorodioxins in soils. *Environ. Sci. Technol.* 6: 1017-1019.
- Klecka, G.M. and Gibson, D.T.1979. Metabolism of dibenzo(1,4)dioxin. *J. Biochem.* 180 (3):639-645.Kondo, R., Harazono, K. and Sakai, K. 1994. Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase secrete from *Phanerochaete sordida* YK-624 *Appl. Environ. Microbiol.*60:4359-4363.
- Lindsley, M.D., Steven, F.H., Naureen, J.I. and Christine, J.M. 2001. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes.*J. of Cli. Microbiol.* 39: 3505-3511.
- Makimura, K., Tamura, Y., Kudo, M., Uchida, K., Saito, H., and Yamaguchi, H. 2000. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J. Med. Microbiol.* 49: 29-35.
- Matsumura, F., Quensen, J., Tsushimoto, G.,.1983. Microbial degradation of TCDD in a model ecosystem. *Environ. Sci. Res.* 26:191-219.

- Monna, L., Omori, T., and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-*p*-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63. Appl. Environ. Microbiol. 59: 285-289.
- Moore, E.R.B., Wittich, R.-M., Fortnagel, P., and Timmis, K.N. 1993. 16S ribosomal RNA gene sequence characterization and phylogenetic analysis of a dibenzo-*p*-dioxin-degrading isolate within the new genus *Sphingomonas*. Lett. Appl. Microbiol. 17: 115-118.
- Mori, T., and Kondo, R. 2002. Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin by wood-rotting fungi, screened by dioxin degrading ability. FEMS Microbiol. Lett. 213:127-131.
- Nobuta, K. and Yoshikuni, U.. 2001. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin and chlorinated dibenzo-*p*-dioxin by a gram-positive bacterium *Rhodococcus opacus* SAO101. J. Biosci. Bioeng. 92: 138-143.
- Nojiri, H., Nam, J.-W., Kosaka, M., Morii, K.-I., Takamura, T., Furihata, K., Yamane, H. and Mori, T. 1999. Diverse oxygenations by carbazole 1,9a-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain CA10. J. Bacteriol. 181: 3105-3113.
- Ohe, T., Mashino, T., and Hirobe, M. 1994. Novel metabolic pathway of arylethers by cytochrome P450: cleavage of the oxygen-aromatic ring bond accompanying *ipso*-substitution by the oxygen atom of the active species in cytochrome P450 models and cytochrome P450. Arch. Biochem. Biophys. 310: 402-409.
- Parsons, J.R., and Storms, M.C.M. 1989. Biodegradation of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins in batch and continuous cultures of strain JB1. Chemosphere. 19: 1297-1308.
- Pfeifer, F., Schacht, S., Klein, J., and Truper, H.G. 1989. Degradation of diphenyl ether by *Pseudomonas cepacia*. Arch. Microbiol. 152: 515-519.
- Philippi, M., Schmid, J., Wipf, H.-K., and Hutter, R. 1982. A microbial metabolite of TCDD. Experientia. 38: 659-661.
- Quensen, J.F., and Matsumura, F. 1983. Oxidative degradation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by microorganisms. Environ. Toxicol. Chem. 2: 261-268.

- Sariaslani, F.S. 1991. Microbial cytochromes *P*-450 and xenobiotic metabolism. Adv. Appl. microbiol. 36: 133-178.
- Safe, S. 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factor (TEF). CRC Crit. Rev. Toxicol. 21: 51-88.
- Sato, A., Watanabe, T., Watanabe, Y., Harozono, K., and Fukatsu. 2002. Screening for basidiomycetous fungi capable of degrading 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin. FEMS Microbiol. Lett. 213:213-217.
- Satoshi, T., Nakamura, M., Masueda, T., Kondo, R., and Sakai, K. 1996. Degradation of polychlorinated dibenzofurans by white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. Appl. Environ. Microbiol. 62:4323-4328.
- Schmidt, S., Wittich, R.-M., Erdmann, D., Wilkes, H., Francke, W., and Fortnagel, P. 1992a. Biodegradation of diphenyl ether and its monohalogenated derivatives by *Sphingomonas* sp. strain SS3. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2744-2750.
- Schmidt, S., Wittich, R.-M., Fortnagel, P., Erdmann, D., and Francke, W. 1992b. Metabolism of 3-methyldiphenyl ether by *Sphingomonas* sp. SS31. FEMS Microbiol. Lett. 96: 253-258.
- Schmidt, S., Fortnagel, P., and Wittich, R.-M. 1993. Biodegradation and transformation of 4,4'- and 2,4-dihalodiphenyl ethers by *Sphingomonas* sp. strain SS33. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3931-3933.
- Shin, K.S., Oh, I.K., and Kim, C.J. 1997. Production and purification of Remazol brilliant blue r decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1744-1748.
- Strubel, V., Rast, H.G., Fietz, W., Knackmuss, H.-J., and Engesser, K.H. 1989. Enrichment of dibenzofuran utilizing bacteria with high co-metabolic potential towards dibenzodioxin and other anellated aromatics. FEMS Microbiol. Lett. 58:233-238.

- Strubel, V., Engesser, K.H., Fischer, P., and Knackmuss, H.-J. 1991. 3-(2-Hydroxy-phenyl) catechol as substrate for proximal *meta* ring cleavage in dibenzofuran degradation by *Brevibacterium* sp. strain DPO 1361. J. Bacteriol. 173: 1932-1937.
- Takase, I., Omori, T., and Minoda, Y. 1986. Microbiol degradation products from biphenyl-related compounds. Agric. Biol. Chem. 50: 681-686.
- Topp, E., and Akhtar, H. 1990. Mineralization of 3-phenoxybenzoate by a two-membered bacterial co-culture. Can. J. Microbiol. 36: 495-499.
- Topp, E., and Akhtar, H. 1991. Identification and characterization of a *Pseudomonas* strain capable of mineralizing phenoxybenzoates. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1294-1300.
- Valli, K., Wariishi, H. , and Gold, M.H. .1992. Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete crysosporium*. J. Bacteriol. 174: 2131-2137.
- Wilkes, H., Wittich, R.-M., Timmis, K.N., Fornagel, P. and Francke, W. 1996. Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1. Appl. Environ. Microbiol. 62:367-371
- William, G.W., Susan, M.B. , Dale, A.P. , and Davis, J.L. .1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Appl. J. Bacteriol. 173:697-703.
- Wittich, R.M., H. Wikes, V. Sinnwell, W. Francke and P. Fortnagel. 1992. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1005-1010.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชั้น ประกอบด้วยอาหาร Czapek Dox agar และ malt extract agar โดยใช้สี Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (Sato และคณะ, 2002) เตรียมโดยเทอาหารชั้นล่างคืออาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek Dox agar ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้จนอาหารแข็ง แล้วเททับหน้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง malt extract agar ที่เติมสี RBBR โดยอาหารทั้ง 2 ชั้นมีส่วนประกอบดังนี้

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek Dox agar

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	2	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
ซูโครส	10	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง malt extract agar

ผงมอลต์สกัด (malt extract)	1	กรัม
วุ้นผง	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที เติมสีย้อม Remazol Brilliant Blue R (RBBR) ลงไป 0.2 กรัม/ลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง malt extract agar

ผงมอลต์สกัด (malt extract)	1	กรัม
วุ้นผง	1	กรัม

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek Dox agar ที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน

เตรียมในลักษณะเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Czapek Dox agar (ข้อ 1.1) แต่ไม่ได้ชูโครสลงไป

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่งปอกและหั่น	200	กรัม
เดกซ์โตรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.6 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Salt Medium (MM) (Kaufman and Blake, 1973)

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.8	กรัม
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
แคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$)	0.1	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	5	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$)	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Low-nitrogen basal III medium (Tien and Kirk, 1988; Mori and Kondo, 2002) ประกอบด้วย

6.1 Basal III medium

โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4)	5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)	1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 700 มิลลิลิตร		

6.2 สารละลาย Trace element

แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4)	3	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต (MnSO_2)	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์ (CoCl_2)	0.1	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4)	0.1	กรัม
อลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟต ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	0.01	กรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
ไนโตรโลไตรอะซิเตต ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_6$)	1.5	กรัม

ละลายไนโตรโลไตรอะซิเตตในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.5 ด้วย 1 นอร์มัล โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) จากนั้นเติมสารอื่น ๆ ลงไปแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

6.3 สารละลายกลูโคส: ชั่งกลูโคส 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 10 นาที

6.4 สารละลายแอมโมเนียมคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ ละลายแอมโมเนียมคาร์บอเนต 0.92 กรัมในน้ำ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

6.5 สารละลายโซเดียมอะซิเตต ($\text{NaCH}_3\text{CO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 1 โมลาร์ ละลายโซเดียมอะซิเตต 13.6 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

วิธีการเตรียม Low-nitrogen Basal III medium

เติมสารละลาย Trace element 100 มิลลิลิตร ลงใน Basal III medium 700 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร เติมสารละลายกลูโคส 100 มิลลิลิตร (เพื่อให้ได้ 1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส) เติมสารละลายแอมโมเนียมคาร์บอเนต 12 มิลลิลิตร (เพื่อให้ได้ 1.2 มิลลิโมลาร์แอมโมเนียมคาร์บอเนต) และเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตต 20 มิลลิลิตร (เพื่อให้ได้ 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซิเตต) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ 1 ลิตร

7. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast Extract Sucrose Agar (YEA)

ผงยีสต์สกัด (yeast extract)	20	กรัม
ซูโครส (sucrose)	15	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

8. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Broth (Difco Laboratories, USA.) 30 กรัม และวุ้นผง 15 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

9. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Corn meal Malt Extract Agar (CMA)

คอร์นมีล อาการ์	17	กรัม
ผงมอลต์สกัด	20	กรัม
ผงยีสต์สกัด	2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

10. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt Extract Agar (MEA)

ผงมอลต์สกัด	20	กรัม
เปปโติน(peptone)	1	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายไดเบนโซฟูแรนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

ซึ่งไดเบนโซฟูแรน 100 ไมโครกรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนอะซีแนพทินละลายหมด ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิด เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. สารละลายเมทานอลเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

กรองเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ผ่านเยื่อกรองชนิด FH ที่มีขนาดรูกว้าง 0.5 ไมโครเมตร กำจัดอากาศออกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง จากนั้นผสมเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นที่กรองและกำจัดอากาศออกแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปกำจัดอากาศออกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงอีกครั้งจนไม่เหลือฟองอากาศ

3. สารละลาย 10เปอร์เซ็นต์ SDS

ซึ่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตรเมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเพราะสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

4. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1 กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42 มิลลิลิตร

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก

เข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

7. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

8. สารละลาย CTAB/NaCl (10เปอร์เซ็นต์CTAB ใน 0.7 M NaCl)

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

9. สารละลายฟีนอล (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวในน้ำอุ่นที่ 68 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมผง Hydroxy quinoline ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1เปอร์เซ็นต์แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ใช้ magnetic stirrer ค่อยๆคนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง เติม Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ลงไปอีกครั้ง ค่อยๆคนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งได้สารละลายที่ ความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 7.8 (ใช้ pH paper วัด) สุดท้ายเติม Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ที่ผสม β -mercaptoethanol ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายที่ได้ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่นได้ประมาณ 1 เดือน

10. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์ม และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12. Loading dye

Bromphenolblue	0.025 เปอร์เซ็นต์
ซูโคส	40 เปอร์เซ็นต์

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

13. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

14. สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinaseK) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตรเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

15. สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตรเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

16. การเตรียม lysis buffer

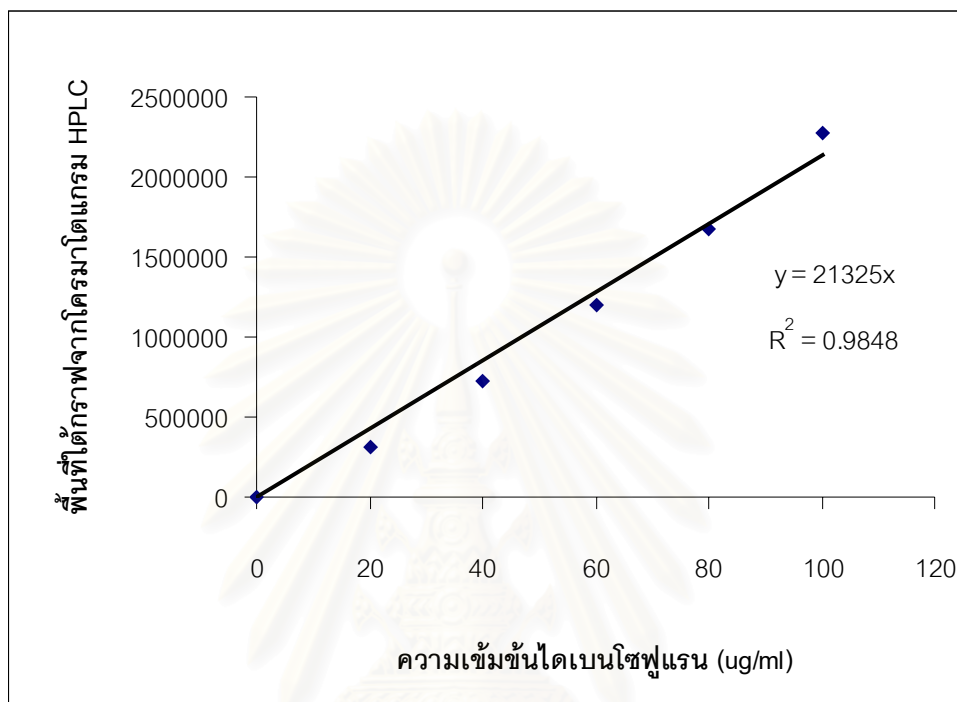
- เติม Tris HCl 1M ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 mM)
 - เติม SDS 0.5 กรัม (0.5% w/v)
 - เติม EDTA 0.5 M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 25 mM)
 - เติม NaCl 1 M ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 250 mM)
- ปรับปริมาตรโดยใช้น้ำ DI ที่ปราศจากเชื้อให้เป็น 100 มิลลิลิตร



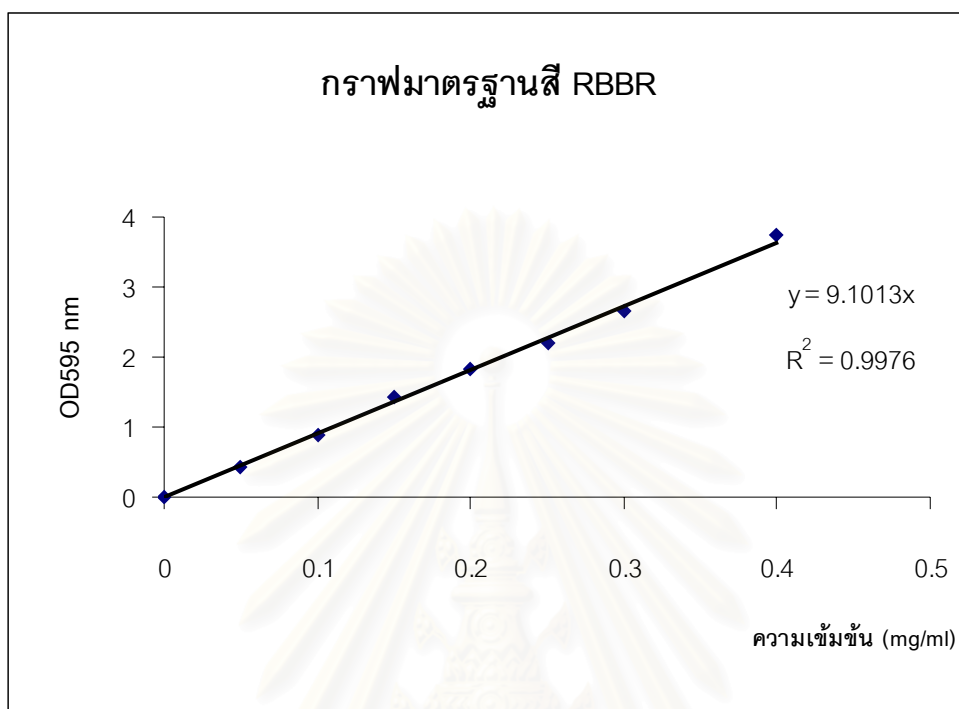
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

1. กราฟมาตรฐานของไดเบนไซฟูแรน

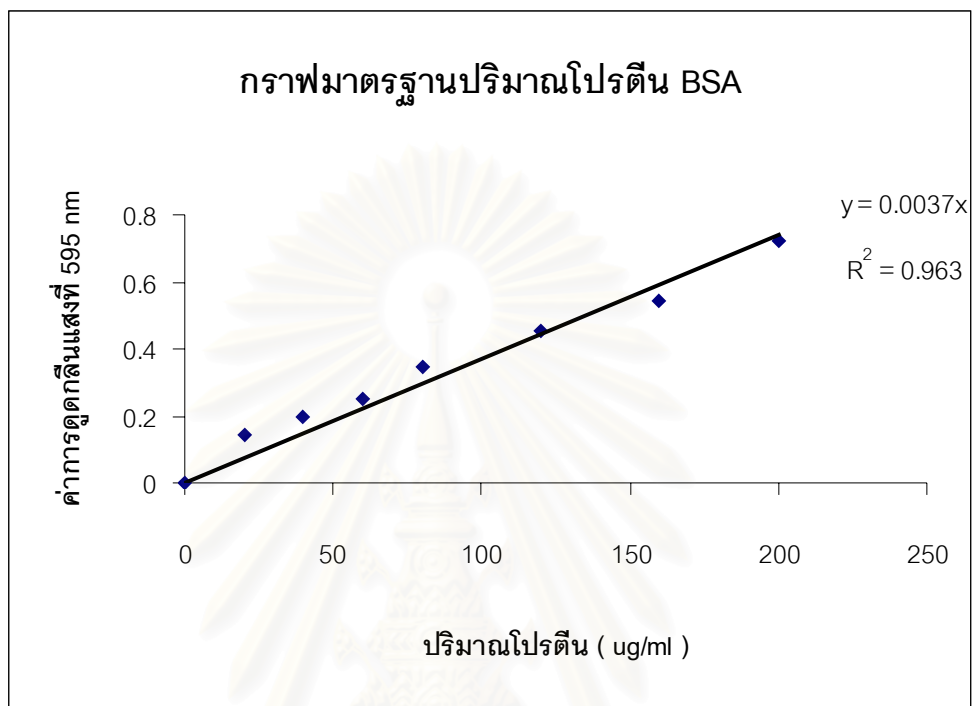


2. กราฟมาตรฐานของสี Remazol brilliant blue R (RBBR)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. กราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) วิเคราะห์โดยวิธีของ Bradford และคณะ (1976)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์
โดยโปรแกรม BlastN version 2.2.7

Query หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์ในงานวิจัยนี้
Sbjct หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปรียบเทียบใน GenBank

1. ผลจากการเทียบความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ของรา N2

[gi|29373924|gb|AY216475.1|](#) Marasmius cladophyllus 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Length = 632

Score = 509 bits (257), Expect = e-141
Identities = 349/375 (93%), Gaps = 6/375 (1%)
Strand = Plus / Plus

```

Query: 208 agtatcagaatgtgtattgCGatgtaac-gcatctatatacaactttcagcaacggatct 266
          |||
Sbjct: 183 agtatcagaatgtgtatcgcgatgtaaccgcacatctatatacaactttcagcaacggatct 242

Query: 267 cttggctctcgcatcgatgaagaacgcagcgaatgCGataagtaatgtgaattgcagaa 326
          |||
Sbjct: 243 cttggctctcgcatcgatgaagaacgcagcgaatgCGataagtaatgtgaattgcagaa 302

Query: 327 ttcagtgaatcatcgaatctttgaacgcaccttgcgctccttgggtattccgaggagcat 386
          |||
Sbjct: 303 ttcagtgaatcatcgaatctttgaacgcaccttgcgctcctt-ggtattccgaggagcat 361

Query: 387 gcctgtttgagtgtcatgaaattctcaacctataaatcttgcgggtttgtaggcttgga 446
          |||
Sbjct: 362 gcctgtttgagtgtcatgtaattctcaacctataaatccttg-tggttttttaggcttgga 420

Query: 447 cttggagggtttttgttggtctctcgcaagtcggctcctcttaaagcattagcctgtttc 506
          |||
Sbjct: 421 cttggagggtttttgctggctttac---cgtcggctcctcttaaagcattagccttgattc 477

Query: 507 cttgcggatcggctctcgggtgtgataattatctgcgccgcgaccgtgaagcgtttggctg 566
          |||
Sbjct: 478 cttgcggatcggctctcagtgtgataattatctgcgctgtgaccgtgaagcgtttggcga 537

```

Query: 567 gcttctaactcgtctc 581
 |||
 Sbjct: 538 gcttctaaccgtctc 552

Score = 119 bits (60), Expect = 7e-24
 Identities = 63/64 (98%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 602 tgacctctgacctcaaatcaggtaggactacccgctgaacttaagcatatcaataagcgg 661
 |||
 Sbjct: 569 tgacatctgacctcaaatcaggtaggactacccgctgaacttaagcatatcaataagcgg 628

Query: 662 agga 665
 |||
 Sbjct: 629 agga 632

Score = 73.8 bits (37), Expect = 4e-10
 Identities = 97/112 (86%), Gaps = 5/112 (4%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 27 taggtgaaccctgcggaaggatcattaacgagttttgaaacgggtttagctggccttc 86
 |||
 Sbjct: 17 taggtgaacc-tgcgga-ggatcattaacgagtt--gaacgggtttagctggccttc 72

Query: 87 cgaggcatgtgcacgccctgctcatccactcttaccctgtgcacttactgt 138
 |||
 Sbjct: 73 acgggcatgtgcacacctcactcatccactc-tacacctgtgcacttactgt 123

2. ผลจากการเทียบความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ของราน3

[gi|28190538](#)[|gb|AF475147.1](#) Phanerochaete chrysosporium strain KCTC 6728
 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
 Length = 647

Score = 1088 bits (549), Expect = 0.0
 Identities = 615/631 (97%), Gaps = 7/631 (1%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 19 gtaggtgaacctgcggaaggatcattaacgagtaactgaacaggtttagctggcctttc 78
 |||
 Sbjct: 6 gtaggtgaacctgcggaaggatcattaacgagtaactgaacaggtttagctggcctctc 65

```

Query: 79  ggggcatgtgcacacctgggctcatccactcttcaacctctgtgcacttgtttaggtcgg 138
          |||
Sbjct: 66  ggggcatgtgcacgcctgggctcatccactcttcaacctctgtgcacttgtttaggtcgg 125

Query: 139  tagaagagcgagcatt---taatgctt-gcttgggaagccttcctatgttttactacaaac 194
          |||
Sbjct: 126  tagaagagcgagcatcctctgatgctttgcttgggaagccttcctatgttttactacaaac 185

Query: 195  gcttcagtttaagaatgtttacctgcgtataacgcatttatatacaactttcagcaacgg 254
          |||
Sbjct: 186  gcttcagtttaagaatgtctacctgcgtataacgcatttatatacaactttcagcaacgg 245

Query: 255  atctcttggctctcgcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgc 314
          |||
Sbjct: 246  atctcttggctctcgcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgc 305

Query: 315  agaattcagtgaaatcatcgaatctttgaacgcaccttgcgctcctggntattccgggga 374
          |||
Sbjct: 306  agaattcagtgaaatcatcgaatctttgaacgcaccttgcgctcctgg-tattccgggga 364

Query: 375  gcatgcctgtttgagtgtcatggtattctcaaccttcataac-ttttgttatcgaaggct 433
          |||
Sbjct: 365  gcatgcctgtttgagtgtcatggtattctcaaccttcataactttttgttatcgaaggct 424

Query: 434  tggacttggaggttgtgctggcttctagttaagtcggctcctcttaaagtattagcgtg 493
          |||
Sbjct: 425  tggacttggaggttgtgctggcttctagtcgagtcggctcctcttaaagtattagcgtg 484

Query: 494  agtgtaacggatcgcttcgggtgtgataattatctgcgccgtggtcgtgaagtaacataag 553
          |||
Sbjct: 485  agtgtaacggatcgcttcgggtgtgataattatctgcgccgtggtcgtgaagtaacataag 544

Query: 554  cttgcgcttctaaccgctccttcagttggacaattacttt-gacatctgacctcaaatcag 612
          |||
Sbjct: 545  cttgcgcttctaaccgctccttcagttggacaacttactttgacatctgacctcaaatcag 604

Query: 613  gtaggactaccgctgaacttaagcatatca 643
          |||
Sbjct: 605  gtaggactaccgctgaacttaagcatatca 635

```

3. ผลจากการเทียบความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ของราน4

[gi|33325273|gb|AF516518.1|](#) Lentinus tigrinus LE(BIN)0861 SBI 5 18S
 ribosomal RNA gene, partial
 sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal


```

Query: 1   tgcacttactgtggggtttcaggagcttc 28
          |||
Sbjct: 409 tgcacttactgtggggtttcaggagcttc 436

```

4. ผลจากการเทียบความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ของรา G1

[gi|33325309|gb|AF516554.1|](#) Polyporus tricholoma CultENN9579 SBI 2 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
Length = 627

Score = 1063 bits (536), Expect = 0.0
Identities = 595/613 (97%), Gaps = 3/613 (0%)
Strand = Plus / Plus

```

Query: 47   cattatcgagttttgaaatgggtttagctggccttccgaggcatgtgcacgccctgctc 106
          |||
Sbjct: 7    cattatcgaghtttgaaatggghttagctggccttccgaggcatghgcacgccctgctc 66

```

```

Query: 107  atccactctacacctgtgcacttactgtggggtttcaggagcttctcgggctgtcattagt 166
          |||
Sbjct: 67  atccactctacacctgtgcacttactgtagggtttcaggagcttcacgggctttcattagt 126

```

```

Query: 167  ctgggttgtaactgggcctacgtttatcacaactccttgntaaagtatcagaatgtgtat 226
          |||
Sbjct: 127 ccgggttgtaactgggccttacgtttactacaaactcct-ataaagtatcagaatgtgtat 185

```

```

Query: 227  tgcgatataacgcacatctatatacaactttcagcaacggatctcttggctctcgcacgat 286
          |||
Sbjct: 186 tgcgatgtaacgcacatctatatacaactttcagcaacggatctcttggctctcgcacgat 245

```

```

Query: 287  gaagaacgcagcgaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgaatcatcgaat 346
          |||
Sbjct: 246 gaagaacgcagcgaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgaatcatcgaat 305

```

```

Query: 347  ctttgaacgcaccttgcgctccttgggtattccgaggagcatgcctgtttgagtgtcatga 406
          |||
Sbjct: 306 ctttgaacgcaccttgcgctccttgggtattccgaggagcatgcctgtttgagtgtcatga 365

```


Query: 407 aattctcaacctaacaagtttgtaacgagcttgcttaggcttggacttggaggcttgtcg 466
 ||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 366 aactctcaacctaacaagtttgtaacgagcttgcttaggcttggacttggaggcttgcgcg 425

Query: 467 gctgttta-ccagtcgactcctctcaaatgcattagcttggttccttgnccaatcggtc 525
 ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 426 gctgtttaccagtcgactcctctcaaatgcattagcttggttccttg-cgaatcggtc 484

Query: 526 acggtgtgataattgtctacgccgcgaccgtgaagcgtttattggccagcttctaactcg 585
 ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 485 acggtgtgatagttgtctacgccgcgaccgtgaagcgtttattggccagcttctaactcg 544

Query: 586 ctcttgcgagacaattacttcgaactctgacctcaaactcaggtaggactaccgctgaac 645
 ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 545 ctcttgcgagacaattacttcgaactctgacctcaaactcaggtaggactaccgctgaac 604

Query: 646 ttaagcatatcaa 658
 |||||||||
 Sbjct: 605 ttaagcatatcaa 617

5. ผลจากการเทียบความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ของรา T3

[gi|4235186](#)|[gb|U85799.1](#)|[APU85799](#) Athelia pellicularis internal transcribed
 spacer 1, 5.8S ribosomal
 RNA gene; and internal transcribed spacer 2, complete
 sequence
 Length = 683

Score = 674 bits (340), Expect = 0.0
 Identities = 459/492 (93%), Gaps = 5/492 (1%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 166 ctggaagccttcctatgtttcactacaaacacttcagttttagaatgtaaccttgcgtat 225
 ||||||| ||||||||||||||||||| | ||||||| ||||||||| ||||||||| ||| |||||||||
 Sbjct: 195 ctggaaaccttcctatgttttattacaaacgcttcagttaagaatgttactctgcgtat 254

Query: 226 aacgcatctatatacaactttcagcaacggatctcttggctctcgcatcgatgaagaacg 285
 ||||||||| ||||||||||||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
 Sbjct: 255 aacgcatctatatacaactttcagcaacggatctcttggctctcgcatcgatgaagaacg 314

Query: 286 cagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaac 345
 ||||||||| ||||||||||||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
 Sbjct: 315 cagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaac 374

Query: 346 gcaccttgcgctccctgggtattccggggagcacgcctggttgagtgtcatggtattctca 405
 ||||||||| ||||||||||||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||

Sbjct: 375 gcaccttgcgctccctgggtattccggggagcacgcccgtttgagtgtcatggattctca 434

Query: 406 accttcataacttttgttatcgaaggcttggatttggagggttgctggctctcgtagt 465
 ||||| |||||||||||||||| | ||||||||||| |||||||||||||||||||

Sbjct: 435 acctctataacttttgтта-ctgaggcttggacttggagggttgctggctctcgtagt 493

Query: 466 cggctcctcttaaatagcatttagcgtgaacgtttgccgatcgctatcagtgtgataaattat 525
 |||||||||||||||||||||||||||| | | |||||||||||||||||||||||

Sbjct: 494 cggctcctcttaaatagcatttagcgtgaacg-ttacggatcgctatcagtgtgataaattat 552

Query: 526 ctgctgctgtagtggtgaagcatcattagtgctgcgcttctaaccgtccttca-caggac 584
 |||||||||||| ||||||| || | || | || ||||||||||||||||||| |||||

Sbjct: 553 ctgctgctgtag-gttgaagtat-agtaagcttgcgcttctaaccgtccttcaagttaggac 610

Query: 585 aatttactttgacatctgacctcaaatacggcgggactaccgctgaacttaagcatatc 644
 || ||||| ||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||

Sbjct: 611 aacttactctgacatctgacctcaaatacggcgggactaccgctgaacttaagcatatc 670

Query: 645 aataagcggagg 656

|||||||||||

Sbjct: 671 aataagcggagg 682

Score = 133 bits (67), Expect = 5e-28
 Identities = 112/123 (91%), Gaps = 3/123 (2%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 24 gtaggtgaaccctgcggaaggatcattaacgagttttgaaa-gggttgtagctggctctca 82
 ||||||||| ||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||| |||||

Sbjct: 41 gtaggtgaa-cctgcggaaggatcattaacgagtttgaaaaggggttgtagctggcttca 99

Query: 83 atctgaggcatgtgcacgccctactcatccactctcaacctctgtgcacttactgtaggt 142
 | | |||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||| |||||||||

Sbjct: 100 aac-gaggcatgtgcacaccctgctcatccactctcaacctctgtgcacttgtttaggt 158

Query: 143 cgg 145

|||

Sbjct: 159 cgg 161

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปัทมาพร ประชุมรัตน์ เกิดเมื่อวันที่ 21 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2522 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในปีการศึกษา 2543 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับ ปริญญาโทวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544

ผลงานทางวิชาการที่เข้าร่วมประชุม

Pattamaporn Prachoomrat¹ , Sirikun Watthananonkit², Kitiphath Limprasert¹ and Charnwit Kositanont¹ .2002. Screening for potentially dioxin degradable microorganisms from Thai soil samples. 7th Biological Science Graduate Congress. 9-11 December, Chulalongkorn University. Bangkok, Thailand. Abstract book. P. BIOT 5-P40.

Wattananonkit, S., Prachomrat, P., and Kositanont , C. 2004. High efficient dibenzofuran degrading fungi isolated from Thai soils. Poster presented at The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology on “Sustainable Development of SMEs Through Biotechnology” and JSPS-NRCT Symposium on “The Forefront of Bioinformatics Application” . 3-6 February, Pang Suan Kaew Hotel , Chiang Mai , Thailand. Abstract book . p.1-5.

สิริกกุล วัฒนานนท์กิจ, ปัทมาพร ประชุมรัตน์ และ ชาญวิทย์ โสมชิตานนท์ . 2547. รายชื่อได้ เบนไซฟิวแรนประสิทธิภาพสูงที่แยกจากดินในประเทศไทย. เสนอผลงานวิชาการแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 12. 18-19 มีนาคม , คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บทคัดย่อ หน้า 109.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย