บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

วิถีทางการเกษตรที่ใช้นวัตกรรม และเทคโนโลยีใหม่มาอำนวยความสะดวก เช่น ใช้ปุ๋ยเคมีและ สารกำจัดศัตรูพืช ได้ทิ้งปัญหาทางด้านสุขภาพไว้มากมายเนื่องจากอาหารไม่ปลอดภัย ทั้งสารพิษตกค้างเหล่านั้นยังสามารถถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหารเป็นเวลายาวนานเนื่องจากการสลายตัวของสารเกิดขึ้นในอัตราที่ช้า เกษตรอินทรีย์เป็นระบบการเกษตรที่ให้ผลผลิตที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค แต่จากการใช้สารเคมีมากมายในอดีตพื้นที่เพาะปลูกจึงยังมีสารพิษค้างอยู่มากโดยเฉพาะสาร Chlorinated Hydrocarbon Compounds เช่น DDT ดีสดรินและออลดริน (สำนักงานมาตรฐานเกษตรอินทรีย์, 2546)

สารคลอริเนเตดไฮโดรคาร์บอน (Chlorinated Hydrocarbon Compounds) เป็นสารเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ (Organic synthesis) ที่ใช้ในการกำจัดศัตรูพืชและวัชพืชทางการเกษตร โดยทั่วไปแล้วสารพิษในกลุ่มนี้มีความพิษที่รุนแรงโดยเฉพาะสารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน หรือคลอริเนเตดไฮโดรคาร์บอนเป็นสารประกอบที่มีความเป็นพิษรุนแรงที่สุด เนื่องจากโมเลกุลโครงสร้างของสารประกอบเหล่านี้ มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ สารพิษในกลุ่มนี้ ได้แก ยาฆ่าแมลง (Insecticide) ยาฆ่าหอย (Mollusicides) ยากำจัดหนู (Rodenticides) ยาปราบวัชพืช (Herbicides) เช่น DDT เป็นต้น และนอกจากนี้แล้วสาร Chlorinated Hydrocarbon Compounds สามารถตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้มากกมาย เช่น สารไดออกซิน (Dioxins) สารฟูแรน (Furans) สารไบฟีนิล (Biphenyl) สารเฮปตะคลอร์ (Heptachloride) เป็นต้น (พาลาภ, 2535) จากการสำรวจข้อมูลการนำเข้าของสารพิษทางการเกษตรกลุ่มนี้พบว่า มีการนำเข้ามาใช้ในประเทศไทยมากกว่า 100 ชนิด และนำมาผสมเป็นยาฆ่าแมลงมากกว่า 1,000 สูตร และนอกจากนี้ ปริมาณการนำเข้าสารพิษนี้ยังเพิ่มมากขึ้นทุกปีอีกด้วย (สุธรรม, 2528 ; Nagae, 1982) จากสภาพการใช้สารเคมีดังกล่าว จึงทำให้สารพิษตกค้าง และสะสมอยู่ในบริเวณพื้นที่ทำการเกษตรมากมาย จึงทำให้เกิดผลกระทบหลายด้าน ได้แก่

1) ทำให้การทำเกษตรอินทรีย์ของประเทศไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรเพราะการทำเกษตรอินทรีย์นั้นจำเป็นต้องทำให้พื้นที่เพาะปลูกไม่มีสารปนเปื้อน เช่น ยาฆ่าแมลงและปราบศัตรูพืช จึงทำให้ประเทศไม่สามารถส่งพืชผลทางเกษตรไปขายยังต่างประเทศได้ตามที่ต้องการ

2) การตกค้างของสารพิษนี้ส่งผลให้เกิดอันตรายอย่างร้านแรงในระยะยาวต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม โดยการผ่านทางห่วงโซ่อาหารนั่นเอง (Aleeva, et al., 1972; Paustenbach, 1989)

3) มีผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรเอง และเศรษฐกิจของเกษตรที่ต้องเสียเงินไปกับค่ารักษาพยาบาลตนเองและครอบครัว เพราะกรมควบคุมมลพิษของประเทศไทยได้รายงานว่าเกษตรกรในแถบภาคเหนือรวมถึงภาคเหนือตอนล่าง มีอาการป่วยอันเนื่องมาจากสารพิษทางเกษตรมากถึง 57 % ของผู้ป่วยทั้งหมด (รายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย, 2544) เพราะความเป็นพิษของสาร Chlorinated Hydrocarbon Compounds นั้นเมื่อเกิดการสะสมอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเซลล์ทำให้เกิดเป็นโรคมะเร็ง (Cancer) ต่ออวัยวะต่างๆ ของร่างกายที่ได้รับสารพิษเข้าไป และ 4) ผลที่ตามมาอีกประการหนึ่งก็คือ มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ของสิ่งดำรงชีวิตและทารกที่อยู่ในครรภ์มารดา นอกจากนี้แล้วยังผลกระทบถึงสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ทั้งแหล่งดินแหล่งน้ำและอากาศที่เสื่อมโทรมลง และส่งต่อมายังผลผลิตทางการเกษตรอีกด้วย (Poland and Knutson, 1982 ; Denson, et al., 1986) จากที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นได้ประการหนึ่งว่าการตกค้างของสารพิษกำลังทวีความรุนแรงมากขึ้นทุกที

ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งในการหาวิธีการมากำจัดสารพิษตกค้างเหล่านี้ให้หมดไปหรือเหลือน้อยที่สุดวิธีการกำจัดสารพิษตกค้างเหล่านี้ สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่วิธีการทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ หรือเรียกว่า Biodegradation วิธีนี้เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมสูงเนื่องจากมีความสะดวก ใช้ค่าใช้จ่ายต่ำ และไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษตามมา (วิมล ชื่อชอบ , 1998) โดยในการย่อยสลายนั้นมักใช้จุลินทรีย์ เช่น เห็ดรา แบคทีเรีย สาหร่าย เป็นต้น มาใช้ในการย่อยสลายสารพิษเหล่านี้ ในกรณีประเทศไทยจะได้เปรียบมากเพราะมีความหลากหลายทางด้านชีวภาพของเห็ดราเป็นอย่างมากโดยเฉพาะมหาวิทยาลัยนเรศวรมีโอกาสมากเพราะอยู่ใกล้กับแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพจึงทำให้มีโอกาสสูงมากในการคัดแยกหาเห็ดราที่เหมาะสมมาใช้ย่อยสลายสารพิษที่ตกค้างในดินและนำมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์ต่อการเกษตรอินทรีย์ในแถบภาคเหนือตอนล่างต่อไป

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อรวบรวมและคัดแยกชนิดของเห็ดราเขตบริเวณพื้นที่ป่าชุมชนอำเภอ วชิรบารมี จังหวัดพิจิตร และป่าชุมชนจังหวัดพิษณุโลก

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารในกลุ่ม Chlorinated Hydrocarbon compounds (2,4 PCB) ของเห็ดในระดับห้องปฏิบัติการ

ขอบเขตของงานวิจัย

1. รวบรวมสายพันธุ์เห็ดรา สำรวจพื้นที่และกำหนดจุดที่จะเก็บตัวอย่างเห็ดรา ทำการเก็บตัวอย่างทำการคัดแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ในห้องปฏิบัติการทำการ คัดแยกซ้ำขั้นที่ 2 ในอาหารเฉพาะ (Selective medium)

2. คัดแยกเอาเฉพาะเชื้อที่ให้ผลบวกกับอาหารคัดแยกขั้นต้นศึกษาลักษณะการเจริญ การสร้างสปอร์ และศึกษารูปร่างลักษณะของสปอร์และ fruiting body

3. คัดเลือกเชื้อที่ให้ผลบวกกับอาหารคัดแยกขั้นต้นที่ดีที่สุดไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่สาร Chlorinated Hydrocarbon Compounds: (2,4 PCB) เป็นส่วนประกอบ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพิษ ทดสอบและวิเคราะห์หาปริมาณ Chlorinated Hydrocarbon Compounds ที่เหลืออยู่ ในอาหารเหลวด้วยเครื่อง GC/MS โดยการเปรียบเทียบกับอัตราการย่อยสลายสารพิษกับเชื้อมาตรฐาน *Pharmerochaete chrysosporium*

ทฤษฎี

ความหลากหลายทางชีวภาพ. (Biodiversity) หมายถึงความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่สามารถพบได้บนโลก เช่น พืช สัตว์ ราและจุลินทรีย์ โดยทั่วไปนักชีววิทยาแบ่งความหลากหลายทางชีวภาพออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้ ดังนี้คือ 1) ความหลากหลายของชนิดหรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต หรือ species diversity เป็นความแตกต่างของจำนวนชนิดและจำนวนประชากรของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด 2) ความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือ genetic diversity เป็นความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน และต่างชนิด 3) ความหลากหลายของระบบนิเวศ (ecological diversity) เป็นความแตกต่างกันระบบนิเวศแต่ละระบบเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เพราะภายในระบบนิเวศแต่ละแห่งจะมีปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพที่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ในระบบนิเวศเชื้อเห็ดราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความ สำคัญอย่างมาก เพราะมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์หรือซากอินทรียวัตถุให้กลายเป็นอนินทรียสารที่พืชสามารถนำกลับไปใช้ประโยชน์ได้อีกครั้งหนึ่ง เกิดเป็นห่วงโซ่อาหาร (food chians หรือ food webs) ขึ้นหมุนเวียนในระบบนิเวศ เชื้อเห็ดราเหล่านี้ จะสร้างเอนไซม์ที่เรียกว่า extracellular enzyme หรือ exoenzyme ออกมาย่อยโมเลกุลของซากพืชที่มีขนาดใหญ่ให้เล็กลงแล้วดูดซึมผ่านผนังเซลล์ (กิตติมา และคณะ , 2453)

สารตกค้างที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม จะเป็นประกอบคาร์บอนที่มีโครงสร้างซับซ้อนที่ยากต่อการย่อยสลายด้วยกระบวนการทางธรรมชาติอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าต้องการให้สารประกอบคาร์บอนเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว สามารถทำได้ด้วยกระบวนการทางเคมี โดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและรีดักชั่น (oxidation and reduction) เท่านั้น ซึ่งเป็นการยากที่จะนำสารพิษต่างๆ ที่ตกค้างอยู่ในธรรมชาติที่อยู่ในดิน มาบำบัดด้วยกระบวนการทางเคมี ถ้าหากทำได้ก็ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมากนอกจากนี้แล้วในการทำปฏิกิริยาเคมีอาจทำให้เกิดสารอื่นที่ไม่ต้องการขึ้นมาอีกก็เป็นได้ และเมื่อเป็นดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัยนี้ก็คือ

1) ประเทศไทยโดยเฉพาะในแถบภาคเหนือตอนล่าง ซึ่งเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากมาย จะต้องมีเชื้อเห็ดราสายพันธุ์ต่างๆ มากมายและในกลุ่มเชื้อเห็ดราเหล่านี้จะมีเชื้อเห็ดราบางสายพันธุ์ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ลิกโนไลติก ซึ่งเป็นดัชนีบ่งตัวแรกที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อเห็ดราชนิดนั้นๆ มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบคาร์บอน หรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารประกอบคาร์บอนที่เป็นพิษ ให้เกิดการเปลี่ยนเป็นสารประกอบคาร์บอนที่ไม่เป็นพิษตกค้างต่อสิ่งล้อม

2) ต้องการค้นหาเชื้อเห็ดราแต่ละชนิดที่เหมาะต่อการย่อยสลายสารพิษตกค้างแต่ละกลุ่มที่แตกต่างกัน ในธรรมชาติ

3) ต้องการพัฒนาและสร้างเทคโนโลยีการฟื้นฟูปรับสภาพดินให้ดีขึ้นด้วยการวิธีการทางชีวภาพจากเชื้อเห็ดราที่ค้นพบและพัฒนาขึ้นเองภายในประเทศไทย

สมมติฐานของการวิจัย

1) จะคัดแยกเชื้อเห็ดราที่สามารถสร้างเอนไซม์ Lignin peroxidase Manganese-dependent peroxidase และ Laccase เพื่อย่อยสลายสารพิษที่ต้องการได้หรือไม่

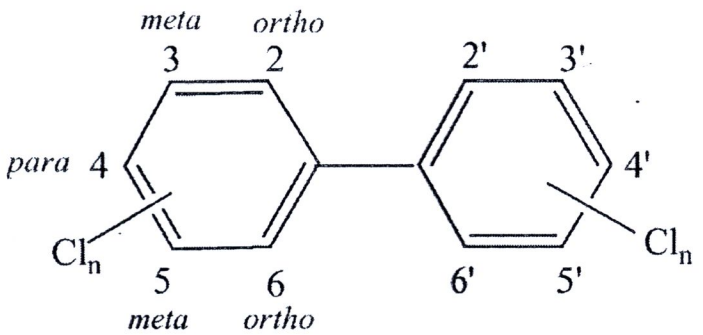
2) เห็ดแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดออกมาย่อยสลายสารพิษต่างชนิดในธรรม ได้แตกต่างกันหรือไม่

3) จะมีการค้นพบเชื้อเห็ดราชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการนำไปย่อยสลายสารพิษตกค้างแต่ละชนิดในธรรมชาติ ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ หรือไม่

ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

สารประกอบโพลีคลอริเนเตด ไบฟีนิล (Polychlorinated Biphenyls: PCBs)

โพลีคลอริเนเตด ไบฟีนิล (Polychlorinated Biphenyls: PCBs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ไฮโดรคาร์บอนที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ (chlorinated hydrocarbon) ซึ่งประกอบด้วยคลอรีนตั้งแต่ 1 ถึง 10 อะตอม อยู่ในวงของ biphenyl โดยสูตรโครงสร้างทั่วไป คือ $C_{12}H_{10-x}Cl_x$ ส่วนใหญ่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น หรือเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ Polyhalogenated Aromatic Hydrocarbons (PHAHs) ที่ถูกนำมาใช้ในวงการอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง ซึ่ง PCBs ถูกผลิตขึ้นในระหว่างปี พ.ศ. 2473-2513 จากปฏิกิริยาการเติมคลอรีน (chlorination) ของสารไบฟีนิล (biphenyl) กับสารละลายคลอรีนที่ปราศจากน้ำ (anhydrous chlorine) โดยมีเหล็ก (iron) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (กรมควบคุมมลพิษ, 2551; Connell, 2005) ซึ่งโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง ดังภาพ 1



ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของ PCBs (Borja *et al.*, 2005)

สมบัติทางกายภาพและเคมี

มีคุณลักษณะเป็นของเหลวที่มีคุณสมบัติทางไฟฟ้าดีมาก คงสภาพทางเคมีสูง (Extreme Chemical Stability) ทนต่อความร้อน นำความร้อนสม่ำเสมอและคงที่ ไม่ไวไฟ เป็นฉนวนไฟฟ้าที่ดี ละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อยประมาณ 25-200 ppb และละลายได้น้อยลงเมื่ออนุพันธ์มีจำนวนคลอรีน อะตอมเพิ่มมากขึ้น คงรูปได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 8000 ° C อีกทั้งยังทนต่อกรด ด่าง ปฏิกิริยาออกซิเดชัน และมีอัตราการสลายตัวและการระเหยต่ำ มีจุดติดไฟสูงมาก ไม่ทำปฏิกิริยา Oxidation เมื่อใช้งานที่อุณหภูมิสูง ถึงแม้ว่าจะมีตัว Metallic Catalyst อยู่ด้วยก็ตาม หากนำสาร PCBs ไปเผาที่อุณหภูมิ 250-450 องศาเซลเซียส จะก่อให้เกิดสารฟิวแรน ซึ่งเป็นสารมลพิษที่ตกค้างยาวนานประเภทปลดปล่อยโดยไม่จงใจที่มีอันตรายมากกว่า (การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย, 2550; กรมควบคุมมลพิษ, 2551; Borja, *et al.*, 2005)

ความเป็นพิษของสารประกอบโพลีคลอริเนเตด ไบฟีนิล ต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

สาร PCBs สามารถก่อความเป็นพิษได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ สำหรับพิษของสาร PCBs ต่อมนุษย์สามารถเข้าสู่ร่างกายได้โดยการหายใจ ทางผิวหนัง และการกิน โดยเฉพาะในคนงานที่ปฏิบัติงานเกี่ยวข้องกับการให้บริการแยกส่วนประกอบหม้อแปลงไฟฟ้าและตัวเก็บประจุไฟฟ้า คนงานในศูนย์ กำจัดของเสียอันตราย ระบบบำบัดน้ำเสีย และเจ้าหน้าที่ดับเพลิง บุคคลเหล่านี้มีความเสี่ยงสูงกว่าในการได้รับสาร PCBs เข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากสาร PCBs ไม่มีพิษเฉียบพลันแต่มีพิษในระยะยาว โดยปกติระยะในการเกิดมะเร็งในมนุษย์ประมาณ 10 ปี ถ้าหากร่างการสะสมสาร PCBs ไว้มากเป็นชนิดเรื้อรังจะทำลายสภาพของยีนซึ่งมีผลต่อกรรมพันธุ์ สำหรับเด็กที่เกิดจากมารดาที่ได้รับสาร PCBs จะมีน้ำหนักน้อยและเม็ดสีในร่างกายผิดปกติ แสดงให้เห็นว่าสารพิษชนิดนี้สามารถผ่านทางรกจากแม่สู่เด็กในครรภ์ได้ (กรมควบคุมมลพิษ, 2551; Connell, 2005) และมีรายงานการได้รับสารพิษจากพีซีบีที่ปนเปื้อนในน้ำมันรำข้าวเป็นครั้งแรกที่เกาะคิวชู ในประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี พ.ศ. 2511 โดยชาวญี่ปุ่นจำนวนกว่า 1,057 คน เกิดอาการผิดปกติของผิวหนัง คือ ผิวหนังและเล็บคล้ำ ผิวหนังหนาและหยาบกร้าน ตาบวม โดยเกิดขึ้นบริเวณใบหน้า ลำคอ และลำตัวท่อนบน ปวดศีรษะ และท้องร่วง และอาจเกิดฝีหรือตุ่มเล็ก ๆ เรียกว่า "Chloracne" สำหรับสัตว์แล้วสาร PCBs ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน แต่อาการจะเกิดขึ้นเมื่อรับสาร PCBs เข้าไปสะสมไว้นาน โดยจะแสดงอาการ เช่น น้ำหนักลด ตับโต ก่อให้เกิดมะเร็งในตับของหนูเมื่อหนูได้รับสาร PCBs ทางการกินวันละ 4.3-11.6 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Borja, *et al.*, 2005; Vasilyeva, *et al.*, 2007) และสำหรับความเป็นพิษของสาร PCBs ต่อสิ่งแวดล้อมเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างยิ่งที่ต้องเร่งป้องกันและแก้ไข เนื่องจากสาร PCBs มีคุณสมบัติคงสภาพหรือสลายตัวออกจากสิ่งแวดล้อมได้ช้ามาก โดยสามารถปะปนไปกับน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม หรือรั่วไหลออกจากอุปกรณ์ไฟฟ้าและผลิตภัณฑ์อื่นๆ ตลอดจนก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศจากการเผาขยะ และท้ายที่สุดสาร PCBs เหล่านี้จะสะสมอยู่ในตะกอนดินตามแหล่งน้ำต่างๆ โดยทั่วไปจะพบ PCBs ในปริมาณความเข้มข้นสูงในดินตะกอนของแหล่งปนเปื้อนทั้งในรูปของสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ และมักพบในรูปของสารผสมเชิงซ้อน เช่น Aroclors 1242, 1254 และ 1260 (กรมควบคุมมลพิษ, 2551; Hamid, *et al.*, 2005; Hopf, *et al.*, 2009) และสามารถเกิดการระเหยขึ้นสู่ชั้นบรรยากาศ (evaporation) แล้วเกิดการควบแน่นตกลงสู่ ยังพื้นที่ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสม นอกจากนี้ PCBs ที่สะสมอยู่ในดินตะกอนยังสามารถเกิดการถ่ายโอนไปสู่มนุษย์ได้โดยการกินอาหาร เช่น พืช ผัก และสัตว์น้ำในแหล่งน้ำที่ปนเปื้อน PCBs ซึ่งปริมาณของ PCBs จะถูกถ่ายทอดแบบทวีคูณไปตามลำดับของห่วงโซ่อาหารในลักษณะที่เรียกว่า "biomagnification" โดยผู้ที่ได้รับผลกระทบมากที่สุดก็คือ "มนุษย์" (Borja, *et al.*, 2005; Hamid, *et al.*, 2005)

การย่อยสลายสารพิษทางชีวภาพ

Biodegradation เป็นกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการ Bioremediation ที่อาศัยความสามารถของสิ่งมีชีวิตที่เป็นจุลินทรีย์ เช่น เห็ด รา แบคทีเรีย สาหร่าย เป็นต้น ในการย่อยสลายสารพิษให้มีความเป็นพิษน้อยลงหรือหมดความเป็นพิษ และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เป็นวิธีการที่เหมาะสำหรับการกำจัดสารพิษที่มีการปนเปื้อนต่ำและปนเปื้อนในบริเวณที่กว้าง เช่น บริเวณที่ทำการเกษตรที่ปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืช หรือบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารประกอบคลอริเนเตด ไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น (Bennet, *et al.*, 2002; Hamid, *et al.*, 2005) เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวก ประหยัดค่าใช้จ่าย และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยกระบวนการย่อยสลายสารพิษทางชีวภาพอาจทำได้หลายลักษณะตามความเหมาะสม เช่น การย่อยสลายแบบ Biotransformation เป็นการเปลี่ยนรูปสารมลพิษที่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมให้มีความเป็นพิษน้อยลงหรือไม่มีเลย (Detoxification) หรือการย่อยสลายแบบ Mineralization เป็นการย่อยสลายสารพิษจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และสารอนินทรีย์ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (อลิสา วังใน, 2550; Reddy and Mathew, 2001)

นิเวศวิทยาของเห็ดรา

ในระบบนิเวศเชื้อเห็ดราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญอย่างมาก โดยปกติในธรรมชาติจะเป็นผู้ย่อยสลายย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์หรือซากอินทรียวัตถุ รวมถึง lignocellulose เช่น ฟาง ข้าว ชานอ้อย และขี้เลื่อย เป็นต้น ให้กลายเป็นอนินทรีย์สารที่พืชสามารถนำกลับไปใช้ประโยชน์ได้อีก (Rimko, 2001; Bennet, *et al.*, 2002) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราที่อยู่ในกลุ่มของ White-rot fungi ซึ่งจัดอยู่ในชั้น Basidiounycete และเป็นที่สนใจนำมาทำการศึกษาในปัจจุบัน อีกทั้งยังมีความสำคัญในเชิงเศรษฐกิจ เนื่องจากพวกมันมีการเจริญเติบโตและทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เป็นอย่างดี รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซน์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สามารถย่อยสลายลิกนินและสารพิษที่ตกค้างในธรรมชาติที่มีความคงตัวได้เป็นอย่างดี โดยเชื้อเห็ดราเหล่านี้จะสร้างเอนไซม์ที่เรียกว่า extracellular enzyme ออกมาย่อยโมเลกุลของซากต่างๆ ที่มีขนาดใหญ่ให้เล็กลงแล้วดูดซึมผ่านผนังเซลล์ ซึ่งการย่อยสลายลิกนินของเชื้อเห็ดราจะเกิดขึ้นในขณะที่เกิดกระบวนการ secondary metabolism ในสภาวะที่มีไนโตรเจนและคาร์บอนจำกัด เพื่อเปลี่ยนลิกนินให้เป็นแหล่งพลังงาน และเชื้อเห็ดราจะทำการย่อยลิกนินที่อยู่รอบเซลลูโลสออกไปก่อนที่จะนำเซลลูโลสไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน (Christine and John, 2001; Rimko and Pauline, 2001; Sarah, 2004) เช่น การศึกษาที่พิสูจน์ให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อเห็ดราจำพวก White-rot fungi ใน

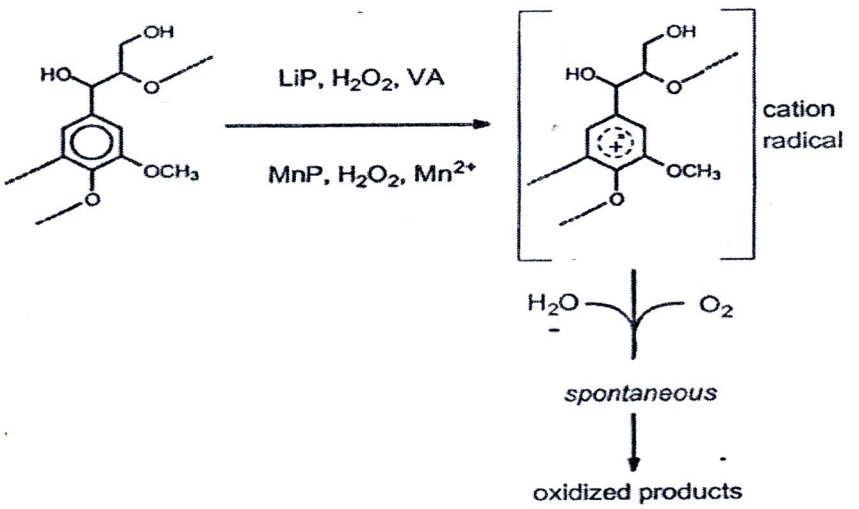
การย่อยสลายลิกนินที่เป็นของเสียจากการเกษตรและอุตสาหกรรม อาทิ ฟางข้าว ซางข้าวโพด ขี้เลื่อย และซานอ้อย เช่นการใช้เชื้อเห็ดรา *Daedalea elegans*, *Polyporus giganteus* และ *Lenzites betulina* พบว่า White-rot fungi ทุกตัวสามารถย่อยสลายวัตถุดิบที่มีองค์ประกบของลิกนินได้มากกว่า 60% โดยเชื้อรา *Daedalea elegans* สามารถย่อยสลายลิกนินที่เป็นของเสียจากการเกษตรและอุตสาหกรรมได้ดีที่สุด 92.9% ใน 90 วัน เมื่อเทียบกับเชื้อตัวอื่น แสดงให้เห็นว่าเชื้อใช้วัตถุดิบเหล่านี้เป็นสารตั้งต้นได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีเชื้อเห็ดราสายพันธุ์อื่นที่เกี่ยวข้องที่สามารถย่อยสลายสับสเตรทที่เป็นลิกโนเซลูโลสได้เป็นอย่างดี เช่น กลุ่ม *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* เป็นต้น (Christine and John, 2001; Fasidi, *et al.*, 2009)

กลไกการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบโพลีคลอริเนเตต ไบฟีนิล โดยเห็ดรา

จากกลไกการย่อยสลายลิกนินของเชื้อเห็ดราที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ เป็นตัวบ่งชี้ถึงศักยภาพที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายสารพิษที่ตกค้างในธรรมชาติรวมถึงสารโพลิเมอร์สังเคราะห์ หรือสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนิน เช่น โพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs)และสารประกอบพวกฟีโนลิก เป็นต้น (Kadhim, *et al.*,1999; Baldrian, 2008, Field, 2003) โดยหลักการที่ว่า เอนไซม์ของเชื้อราจะเข้าทำการย่อยสลายลิกนินหรือสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนินแบบไม่เฉพาะเจาะจง (nonspecific) กับชนิดของสับสเตรท หน้าที่หลักของเอนไซม์เหล่านี้คือการสร้างสาร free radicals ที่สามารถเข้าทำลายโมเลกุลของสารอินทรีย์ได้อย่างกว้างขวางไม่จำกัดชนิด เช่นเอนไซม์ peroxidases จะใช้ H_2O_2 และ Laccase (polyphenol oxidase) จะใช้สารประกอบที่เกิดจาก O_2 เป็นเอนไซม์เข้าทำลายลิกนิน (Christine and John, 2001; Patricia and Christopher, 2001)

จากการสำรวจข้อมูลโดยทั่วไปมีรายงานการย่อยสลาย PCBs โดยกระบวนการทางชีวภาพ โดยเชื้อแบคทีเรียซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ อาทิ *Pseudomonas*, *Achromobacter* และ *Comamonas* (Pieper, 2005) และแบคทีเรียแกรมบวก อาทิ *Bacillus* และ *Microbacterium* (Sakai, 2005; Sierra, 2003) เป็นต้น มักจะใช้วิธีการย่อยสลายในสภาวะมีออกซิเจน โดยการย่อยสลายด้วยวิธีนี้เกิดขึ้นโดยแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) ซึ่งวิถีในการย่อยสลายจะต้องใช้ $NADH_2$ และปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ จะได้ CO_2 และ chlorobenzoate เป็นผลิตผลสุดท้าย (Francova, *et al.*, 2004)

แต่สำหรับกลไกการย่อยสลายโดยเห็ดราที่นำมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบ Chlorinated Hydrocarbon Compound หลายชนิด รวมทั้งสารปราบวัชพืชและศัตรูพืชที่ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม อาศัยหลักการของการย่อยสลายลิกนินโดย white rot fungi ที่มีระบบ Ligninolytic enzyme คือ เอนไซม์ Manganese peroxidase (MnP), Lignin peroxidase (LiP) และ Laccase โดยเฉพาะ Lignin peroxidase เป็นเอนไซม์แรกที่เข้าทำลายสารประกอบชนิดลิกนิน ที่แยกได้จากเชื้อ *P. chcrysoporium* (Tien and kirk, 1988; Koller, *et al.*, 2000; Field, 2003) เอนไซม์ peroxidases มีส่วนประกอบของสารฮีโมโกบิน ซึ่งมีศักยปฏิกิริยามากกว่าปกติ และมี glycosylated สูง จึงหลั่งเอนไซม์ออกมามากสำหรับการกระทำภายนอกเซลล์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีเชื้อราไม่กี่ชนิดที่จะผลิตได้ จึงมีคุณสมบัติในการ oxidize สารและทำให้เกิดการแทนที่หมู่ methoxyl ที่อยู่บนวงแหวนของสาร aromatic ที่ไม่ใช่สารประกอบ phenolic เพื่อให้เกิด cation radicals ที่จะผ่านเข้าสู่ปฏิกิริยาขั้นต่อไป ซึ่งทั้ง LiP และ MnP ต้องการ hydrogen peroxide (H_2O_2) ในการเกิดปฏิกิริยา oxidation โดยใช้เป็นตัวคะตาไลต์ในการเกิดปฏิกิริยา oxidation ขั้นที่ 2 เพื่อปลดปล่อยอิเล็กตรอนนออกไป 1 ตัว (ภาพ 2) แต่เอนไซม์ Laccase ไม่จำเป็นต้องใช้ H_2O_2 และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น CO_2 และ สารประกอบอื่นที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจจะมีหลายกระบวนการที่ใช้ในการย่อยสลาย เช่น depolymerization, demethoxylation, decarboxylation, hydroxylation และ การเปิดวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring opening) (Tien and kirk, 1988; Patricia and Christopher, 2001; Hamid, *et al.*, 2005)



ภาพ 2 กลไกการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ ligninolytic enzymes (Fiėld, 2003)

white rot fungi โดยส่วนใหญ่จะมีระบบ ligninolytic enzymes เช่น *T.versicolor* และ *P.ostreatus* เป็นต้น (Patricia and Christopher, 2001) โดย white rot fungi ต่างชนิดกันอาจจะผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดโดยมีทั้ง Laccase ,LiP และ MnP ขึ้นอยู่กับสับสเตรตที่ใช้เพาะเลี้ยง ตัวอย่างเช่น เชื้อ *P.chrysosporium* ส่วนใหญ่จะหลั่งเอนไซม์ LiP และ MnP , *Phlebia radiata* ส่วนใหญ่จะหลั่งเอนไซม์ Laccase และ MnP และเชื้อ *T. versicolor* สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ได้ทั้ง 3 ชนิด (Kadhim, 1999; Koller, *et al.*, 2000; Patricia and Christopher, 2001; Hamid, *et al.*, 2005) ด้วยระบบการทำงานของเอนไซม์ที่ซับซ้อนจึงทำให้เอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายสารตกค้างที่อยู่ในธรรมชาติได้หลายชนิด เนื่องจากจะต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารพิษ ซึ่งเอนไซม์เพียงชนิดเดียวไม่สามารถทำได้ เพราะสารพิษเหล่านี้มีโครงสร้างที่ซับซ้อน จึงเป็นคุณสมบัติพิเศษของเชื้อเห็ดราในกลุ่มนี้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากหลักการนี้ได้มีผู้นำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบ Chlorinated Hydrocarbon Compounds หลายชนิดรวมทั้งสารปราบวัชพืชและศัตรูพืชที่ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ดังเช่นในปี ค.ศ. 1985 Bumpus และคณะศึกษาการย่อยสลายอาหาร DDT และสาร Polychlorinated biphenyls (PCB) ได้แก่ 3,4,3,4 – tetrachloro biphenyl และ 2,4,5,2,4,5-hexachloro biphenyls แล้วพบว่า สามารถย่อยสลายสาร PCB ได้มากกว่า DDT จากการศึกษาการย่อยสลายสารพิษตกค้างชนิดอื่นๆ เช่น Lindane (1,2,3,4,5,6-hexachlorohexane), Chlordane (1,2,3,4,5,6,7,8-octachloro-3a,4,7,7a-metanoindane), Polychlorinated biphenyls (PCB) , Polychlorinated dibenzodi-chloro –p-dioxin (PCDD), 3,4-dichloroaniline และ Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) ในการย่อยสลายสารประกอบเหล่านี้แล้วโดยส่วนใหญ่ใช้เห็ดราในตระกูล Phanerocheate (Takada, et al., 1996 ; Arisoy, 1998 ; Klecka and Gibson, 1980 ; Hammel, 1986 ; Kotterman, et al., 1994) จากแนวความคิดเกี่ยวกับระบบเอ็นไซม์ลิกโนไลติกในการย่อยสลาย PAH จึงเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ในการย่อยสารพิษที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม เช่น ยาปราบศัตรูพืช ยาปราบวัชพืช ยากำจัดเชื้อเห็ดรา และยาฆ่าแมลง รวมทั้งของเสียที่เกิดขึ้นจากการเกษตร เป็นต้น (Stoner,1994) โดยเฉพาะการนำ *P. chrysosprium* มาย่อยสลายสารประกอบไดออกซินซึ่งได้มีการศึกษาไว้ดังนี้ Bumpus และคณะ (1995) พบว่า *P. chrysosprium* โดยพบว่ากลไกการออกซิเดชันโดยเอนไซม์ LiP ได้สารตัวกลางในการออกซิเดชันของไดเบนโซพาราไดออกซิน คือ ไดเบนโซพาราไดออกซิน แคทไอออนเรดิคอล (dibenzo-p-dioxin cation radical) กลไกของแคทไอออน เรดิคอล (cation radical) ของ LiP ไม่เพียงทำปฏิกิริยากับลิกนินเท่านั้นแต่ยังใช้กับสารประกอบอะโรมาติกอื่นๆ ในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย นอกจากนี้ Valli และคณะ (1992) ศึกษาการย่อยสลาย 2,7-ไดคลอโรไดเบนโซพาราไดออกซิน (2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin, (2,7-DCDD)) โดย *P. chrysosprium* พบว่าสารดังกล่าวนี้ถูกย่อยสลายได้ในกระบวนการ secondary metaboloism ของฟังไจ โดยการออกดิเดชันของเอนไซม์ LiP,MnP และเอนไซม์อื่นๆอีกภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดขึ้นหลายขั้นตอน ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาจะมีสารตัวกลาง (intermediates metabolite) เกิดขึ้น แล้วปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ออกมา นอกจากนี้แล้วจะมีการออกซิเดชันพันธะ C-O-C ใน 2,7-DCDD โดย LiP เกิดสารประกอบควิโนน 4-คลอโร-1,2-เบนโซควิโนน (4-chloro-1,2-benzozuinone) และ 2-ไฮดรอกซี- 1,4-เบนโซควิโนน (2-hydroxy-1, 4-benzoquinone) Satoshi และคณะ (1996) ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PCDD และ PCDF โดย *P.sordidar* YK 624 ในการวิจัยใช้กลุ่มของ PCDD ได้แก่ 2,3,7,8,-TateaCDD, 1,2,3,7,8,-

PentaCDD, 1,2,3,4,7,8-HexaCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD และ 1,2,3,4,6,7,8,9-OctaCDD และสารในกลุ่ม PCDF ได้แก่ 2,3,7,8-TetraCDF, 1,2,3,7,8-PentaCDF, 1,2,3,4,7,8-HexaCDF, 1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF และ 1,2,3,4,6,7,8,9-OctaCDF พบว่า *P.sordida* YK 624 สามารถย่อยสลายสารประกอบทั้ง 2 กลุ่มได้ในสภาวะของอาหารที่มีไนโตรเจนต่ำ ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PCDD และ PCDF อยู่ในช่วงประมาณ 40% (tetrachloro-) ถึง 76%(hexachloro-) และ 45%(tetrachloro-) ถึง 70%(hexachloro-) ตามลำดับ นอกจากนี้แล้ว Klecka และ Gibson (1980) ทำการศึกษากลไกการย่อยสลายไดเบนโซพาราไดออกซิน และโพลิคลอรเนต ไดเบนโซพาราไดออกซิน โดย *Bjertandera sp.* พบว่ามีความสามารถในการออกซิเดชันอนุพันธ์ของสารประกอบไดออกซินหลายชนิด ได้แก่ ไดเบนโซพาราไดออกซิน (dibenzo-p-dioxin), 1-คลอโรไดเบนโซพาราไดออกซิน (1-chlorodibenzo-p-dioxin, 2-คลอโรไดเบนโซพาราไดออกซิน (2-chlorodibenzo-p-dioxin, 2,3-ไดคลอโรไดเบนโซพาราไดออกซิน (2,3-dichlorodibenzo-p-dioxin) ,2,7-ไดคลอโรไดเบนโซพาราไดออกซิน (2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin) ,2,8-ไดคลอโรไดเบนโซพาราไดออกซิน (2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin) และ 1,2,4-ไตรคลอโรไดเบนโซพาราไดออกซิน (1,2,4-trichlorodibenzo-p-dioxin)

Akira และคณะ (2002) ได้ศึกษาการย่อยสลาย 2,7-dichlorodibenzo-pdioxin (2,7-DCDD) โดยใช้เชื้อเห็ดราที่สามารถย่อยสลายสี Remazol brilliant blue R (RBBR) เป็นตัวชี้วัดในการย่อยสลายสารประกอบไดออกซิน จากสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือก 11 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *Panellus stypticus* strain 99-334 สามารถย่อยสลาย 2,7-DCDD ได้ดีที่สุดเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลัง 40 วันที่ทำการทดลองย่อยสลาย 2,7-DCDD และในปี 2006 Ichiro และคณะ ได้ทำการทดลองย่อยสลายอนุพันธ์ของสารประกอบ polychlorinated biphenyl (PCB) เช่น 4,4'-dichlorobiphenyl (4,4'-DCB) โดยเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* โดยการย่อยสลายเกิดขึ้นได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด ซึ่งกลไกการย่อยสลายของเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* นั้นจะเปลี่ยน 4,4'-DCB ไปเป็น 3-hydroxy-4,4'-DCB และ 4-hydroxy-3,4'-DCB โดยที่ 3- Hydroxy-4,4'-DCB จะเปลี่ยนไปเป็น 3-methoxy-4,4'-DCB , 4-chlorobenzoic acid; 4-chlorobenzaldehyde และ 4-chlorobenzyl alcohol ในอาหาร ซึ่งในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัดนั้นจำเป็นสำหรับการสร้าง 4-chlorobenzoic acid, 4-chlorobenzaldehyde และ 4-chlorobenzyl alcohol จาก 3-hydroxy-4,4'-DCB ที่มีการแสดงออกร่วมกันของ secondary metabolism นอกจากเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* แล้วยังมีเชื้อ *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes* เป็นต้น ที่สามารถย่อยสลาย polychlorinated

biphenyl (PCB) ชนิดอื่นๆอีก เช่น Delor 103 ,105 และ Aroclor 1242 , 1254 ,1242, 1248, and 1260 โดยให้ผลการย่อยสลายสารพิษอยู่ในช่วง 34 ถึง 73 เปอร์เซ็นต์ (Krcmar and Ulrich,1998; Kubatova, 2001;Graciela, *et al.*, 2002; Hamid, *et al.*, 2005; Monika, *et al.*, 2005;) ต่อมา Jiang และคณะ 2008 ได้ศึกษาการย่อยสลาย hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) โดยใช้เชื้อ *Trametes versicolor* และ *Pleurotus ostreatus* พบว่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แลกเคสออกมาย่อยสลาย OH-PCBs ที่ประกอบด้วย 2-hydroxybiphenyl , 4-hydroxy-3-PCB , 3-hydroxy-20,50-PCB , 4-hydroxy-20,3,30,40,5,50-PCB ได้เป็นอย่างดี (Li, *et al.*, 2004) และยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องโดย Premjet และคณะ (2009) ได้คัดกรองเชื้อเห็ดราจากธรรมชาติจำนวน 296 ไอโซเลต เพื่อทดสอบการสร้างลิกนินโนไลติกเอนไซม์โดยการย่อยสลายสี RBBR เป็นเวลา 15 วัน พบว่ามีเพียง 47 ไอโซเลต ที่สามารถย่อยสลายสีได้ และได้คัดเลือกเห็ดราที่มีศักยภาพสูงมา จำนวน 5 ไอโซเลต ซึ่งจำแนกได้ 3 ไอโซเลตคือ *Trametes* sp., *Polyporus* sp. และ *Nigroporus* sp. มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ Polychlorinated Hydrocarbons ชนิด 2,8-DCDD (2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin) และ DDT (Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane) ในอาหารเหลว ซึ่งพบว่าทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถย่อยสลาย 2,8-DCDD ได้มากกว่า 90% ในเวลา 30 วัน แต่ย่อยสลาย DDT ได้น้อยกว่า 50% นอกจากนี้ยังได้นำเห็ดราดังกล่าวทั้ง 5 ไอโซเลต มาทำการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ anthracene (polyaromatic hydrocarbon) ในอาหารเหลว พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถย่อยสลาย anthracene ได้มากกว่า 90% ภายในเวลา 30 วัน

จากศักยภาพดังกล่าวของเชื้อเห็ดราในกลุ่ม white rot fungi แสดงให้เห็นว่ามันมีประสิทธิภาพมากและเหมาะที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการช่วยบำบัดและย่อยสลายสารมลพิษต่างๆ ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดียิ่งหากเราศึกษาและเข้าใจกลไกการการย่อยสลายของเชื้อเหล่านี้และจากการศึกษาดังกล่าวพบว่า สารประกอบ Polychlorinated Biphenyls (PCBs) เป็นสารที่มีคลอรีน และเบนซินเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งสามารถย่อยสลายได้โดยเห็ดราที่มีระบบลิกนิโนไลติกเอนไซม์ (Ligninolytic enzyme) เช่น แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ได้เช่นเดียวกัน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 27 พ.ย. 2555
เลขทะเบียน 250200
เลขเรียกหนังสือ