บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

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

สารคลอริเนเตตไฮโดรคาร์บอน (Chlorinated Hydrocarbon Compounds) เป็นสารเคมีอนินทรีย์สังเคราะห์ (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) ต้องการพัฒนาและสร้างเทคโนโลยีการพื้นฟูปรับสภาพดินให้ดีขึ้นด้วยการวิธีการทางชีวภาพจากเชื้อเห็ดราที่ค้นพบและพัฒนาขึ้นเองภายในประเทศไทย

สมมติฐานของการวิจัย

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

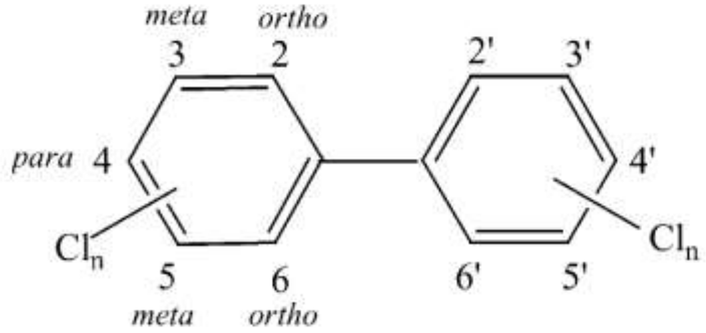
2) เห็ดแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดออกมาย่อยสลายสารพิษต่างชนิดในธรรม ได้แตกต่างกันหรือไม่

3) จะมีการค้นพบเชื้อเห็ดราชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการนำไปย่อยสลายสารพิษตกค้างแต่ละชนิดในธรรมชาติ ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ หรือไม่

ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

สารประกอบโพลีคลอริเนเตต ไบฟีนิล (Polychlorinated Biphenyls: PCBs)

โพลีคลอริเนเตต 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)

ความเป็นพิษของสารประกอบโพลีคลอริเนเตต 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 ฟางข้าว 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

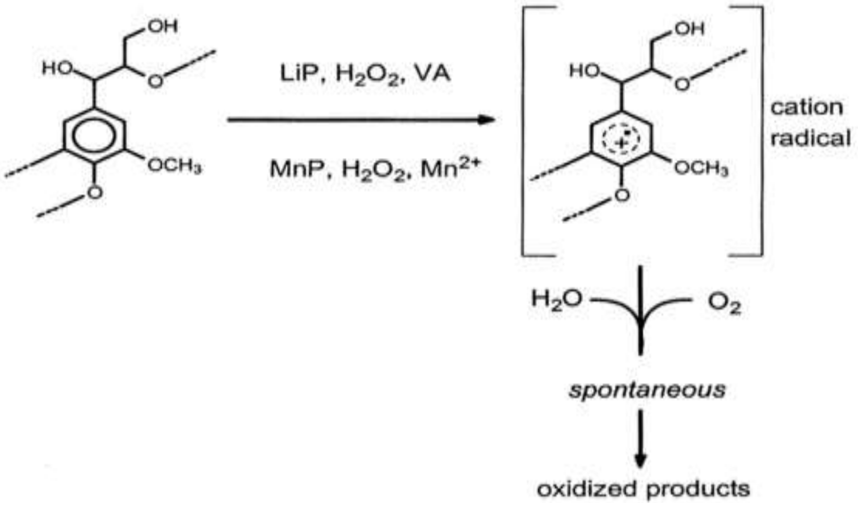
การย่อยสลายลิกนินที่เป็นของเสียจากการเกษตรและอุตสาหกรรม อาทิ ฟางข้าว ซางข้าวโพด ขี้เลื่อย และชานอ้อย เช่นการใช้เชื้อเห็ดรา *Daedalea elegans*, *Polyporus giganteus* และ *Lenzites betulina* พบว่า White-rot fungi ทุกตัวสามารถย่อยสลายวัตถุดิบที่มีองค์ประกบของลิกนินได้มากกว่า 60% โดยเชื้อรา *Daedalea elegans* 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 (Field, 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 ขึ้นอยู่กับสับสเตรดที่ใช้เพาะเลี้ยง 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 ของฟังใจ 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 เพื่อทดสอบการสร้างลิกนิโนไลติกเอนไซม์โดยการย่อยสลายสี 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

บทที่ 2

วิธีดำเนินงานวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

เห็ดราในเขตพื้นที่ป่าชุมชน อำเภอวชิรบารมี จังหวัดพิจิตร และป่าชุมชนในแถบจังหวัดพิษณุโลก

เชื้อมาตรฐาน *Phanerochete chysosporium* NBRC 31249 และ *Trametes versicolor* NBRC 6482

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเห็ดรา

ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดราในเขตพื้นที่ป่าชุมชน อ.วชิรบารมี จ. พิจิตร และป่าชุมชนในแถบจังหวัดพิษณุโลก จากนั้นถ่ายภาพเห็ดและบันทึกลักษณะบริเวณที่พบเห็ด สังเกตชนิดของดินโดยรอบ ลักษณะการเกิดของเห็ด เป็นแบบดอกเดี่ยว กลุ่ม หรือขึ้นบนต้นไม้ และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด ลงบนแบบสำรวจเห็ด แล้วเก็บตัวอย่างเห็ดที่สมบูรณ์ทุกระยะ ถ้าเป็นเห็ดราที่ขึ้นบนดินให้ตักเอาดินมาด้วยวางใส่กล่องพลาสติกใส กรณีเห็ดที่ขึ้นบนไม้ให้ตัดเอาทั้งขอนไม้ เพื่อคงสภาพเห็ดราให้สมบูรณ์ที่สุด และใส่หมายเลข รหัส ของเห็ดที่เก็บมา เช่น รหัสเป็นสถานที่ วัน เดือน ปี ที่เก็บ และทำการเลือกดอกเห็ดที่สมบูรณ์และแห้งที่ยังไม่ปล่อยสปอร์ออกหมด ใช้มีดตัดเอาเฉพาะส่วนหมวกเห็ด และวางระหว่างกึ่งกลางกระดาษที่มีสีขาวและสีดำอย่างละครึ่งที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยให้ครีบอยู่ด้านล่าง ครอบเห็ดและกระดาษด้วยฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วตรวจดูลักษณะของรอยพิมพ์สีของสปอร์บนกระดาษ เพื่อนำไปใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเห็ดรา และทำการเก็บกระดาษสปอร์ใส่ถุงที่ปราศจากความชื้น

2. การคัดแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

โดยนำเห็ดตัวอย่างที่ทำความสะอาดโดยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) กรณีเป็น fruiting body ให้ตัดเอาเนื้อเยื่อเส้นใยที่ก้านดอก แต่กรณีการแยกเชื้อเห็ดที่ขึ้นบนเนื้อไม้จะต้องตัดอาส่วนของเส้นใยจากเนื้อไม้ที่สะอาดที่สุด มาชุบด้วย Chloral hydrate ($NaCO_3$) เพื่อฆ่าเชื้อแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA (ภาคผนวก ก) ที่ผสม chloramphenical (34 mg/ml) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน และจึงถ่ายเส้นใยลงบนอาหารแข็งสูตร PDA อีก 2 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ เมื่อเส้นใยเจริญ

จึงทำการถ่ายเส้นใยลงในอาหารวุ้นเอียงสูตร PDA ทำอย่างละ 2 ซ้ำ โดยหลอดที่ 1 ใช้เป็นหัวเชื้อ และหลอดที่ 2 ใช้ในการทดสอบการสร้าง ligninolytic enzymes และทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ต่อไป

3. การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อเห็ดรา

โดยการตัดเอาส่วนของครีบดอก โดยใช้มีด และใช้ปากคีบเอาชิ้นส่วนมาวางบนสไลด์ หยดน้ำกลั่น หรือย้อมสีด้วย Melzer's reagent (ภาคผนวก ข) แล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์หรือทำเทคนิค slide culture โดยนำเส้นใยของเชื้อเห็ดราที่ผ่านการคัดแยกให้บริสุทธิ์บนอาหาร PDA แล้วมาเลี้ยงบนสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อ รอให้เย็นสักครู่ ตัดวุ้นในจานอาหารขนาดเล็ก ให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 0.5 X 0.5 ซม. วางลงตรงกลางสไลด์ที่วางอยู่บนแท่งแก้วรูปตัววีในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อเห็ดรามาแตะที่บริเวณกึ่งกลางด้านข้างของชิ้นวุ้นทั้งสี่ด้าน ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ 95% ลนไฟฆ่าเชื้อ คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ ปิดลงบนชิ้นวุ้นโดยให้ชิ้นวุ้นอยู่กลางแผ่นแก้วปิดสไลด์พอดี วางสำลีที่ชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อพอชื้นลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 ก้อน เพื่อช่วยไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-4 วัน จากนั้นตรวจเชื้อที่เพาะบนสไลด์โดยการเตรียมสไลด์กึ่งถาวร โดยหยด lactophenol cotton blue (ภาคผนวก ข) บนแผ่นสไลด์ที่มีเส้นใย แล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ จากนั้นทาขอบแผ่นแก้วด้วยน้ำยาทาเล็บอย่างใส นำสไลด์มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ เพื่อดูรายละเอียดต่างๆในการใช้จำแนก เช่น เส้นใย เบสิเดียม และสปอร์ เป็นต้น และบันทึกลักษณะของเห็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของตัวอย่างเห็ดโดยใช้ลักษณะและข้อมูลที่สำรวจไว้มาเทียบอ้างอิงกับอนุกรมวิธานของเห็ด เช่น หนังสือเรื่องเห็ดเมืองไทย (อนงค์ จันทร์ศรีกุล,2539) หนังสือคู่มือเห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย (เกษม สร้อยทอง,2537)หนังสือคู่มือเห็ดและราในประเทศไทย (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ,2543) เห็ดกินได้และเห็ดพิษในประเทศไทย(ราชบัณฑิตยสถาน,2539) Mushrooms and Toadstools (Geoffrey, 2009) และ How to identified mushrooms (David and Daniel, 1977ab) และงานวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง เป็นต้น

3. การคัดกรองเชื้อเห็ดราจากแหล่งธรรมชาติที่สามารถสร้าง ligninolytic enzymes โดยการย่อยสลายสีสังเคราะห์

โดยนำเส้นใยเชื้อเห็ดราที่บริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 วัน จากนั้นนำ cork borer เบอร์ 2 (0.5 ซม.) มาตัดที่ปลายของเส้นใย 1 ชิ้น แล้วนำมาวางตรงกลางของจานเพาะเลี้ยงอาหารคัดกรอง (screening medium) ที่ประกอบด้วยอาหารทดสอบ 2 ชนิดคือ อาหารแข็งที่มีแหล่งของไนโตรเจนสูง (high nitrogen) และต่ำ (low nitrogen) ซึ่งผสมสีสังเคราะห์ 3 ชนิด คือ Azuer B, Phenol red, remazol brilliant blue R (RBBR) (ภาคผนวก ก) เพื่อคัดกรองเชื้อเห็ดราที่สามารถสร้างเอนไซม์ 3 ชนิด คือ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) แมกานิสเปอร์ออกซิเดส (MnP) และ แลกเคส (Laccse) ตามลำดับ ตามวิธีการของ Koker และคณะ (2000) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน บันทึกผลการย่อยสลายสีสังเคราะห์แต่ละชนิดโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) ทุกวัน เป็นเวลา 15 วัน แล้วทำการคัดเลือกเชื้อเห็ดราที่ให้ผลบวกกับอาหารคัดกรองที่ดีที่สุดไปย่อยสารประกอบ 2,4- PCB ต่อไป

4. การทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ในอาหาร production medium

ทำการคัดเลือกเชื้อเห็ดราที่ให้ผลบวกกับอาหารคัดกรองที่ดีที่สุดมาทำการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ตามวิธีของ Premjet และคณะ (2009) โดยนำ cork borer เบอร์ 2 (0.5 ซม.) ตัดที่ปลายของเส้นใยเชื้อเห็ดราที่บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 5 ชิ้น มาเพาะเลี้ยงในอาหาร production medium 2 ชนิด (ภาคผนวก ก) เพื่อคัดกรองเชื้อเห็ดราที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ 0.25 mM 2,4-PCB ในขั้นต้น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่เขย่า เป็นเวลา 6 วัน (วางแผนการทดลองแบบ CRD) และหลังจากวันที่ 6 ทำการเติมสารละลาย 2,4-PCB ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25 mM แล้วให้ออกซิเจนบริสุทธิ์ (99% O_2) ด้วยอัตราการไหล 50 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน โดยทำการเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *Phanerochete chysosporium* 31249 และ *Trametes versicolor* ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 15 และ 30 หลังจากเติมสารละลาย 2,4-PCB แล้วนำไปทำการสกัดและวิเคราะห์อัตราการย่อยสลายต่อไป ตามวิธี Premjet และคณะ (2009) ด้วย Conc.H_2SO_4 ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร และสกัดต่อด้วย mixture solution (hexane: acetone ในอัตราส่วน 7:3) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นทำการแยกระหว่าง solvent และ aqueous phase ที่มีเส้นใยเห็ดราออกด้วยกรวยแยกสาร และสกัด aqueous phase ซ้ำอีกครั้งด้วย mixture solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปสกัดให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator

แล้วเติม solvent ให้ได้ปริมาณสาร 5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์การย่อยสลายสาร 2,4-PCB ของเชื้อเห็ดรา ด้วยเครื่อง Gas Chromatography Mass spectrometer (GC/MS) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม ANOVA

5. การเก็บรักษาตัวอย่างเห็ดรา

นำตัวอย่างเห็ดมาทำการอบแห้ง โดยอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชม. หรือนานกว่านี้แล้วแต่ชนิดและลักษณะของเห็ด จากนั้นเก็บเห็ดไว้ในกล่องพลาสติกหรือถุงพลาสติกโดยใส่การบูรเพื่อป้องกันแมลงและใส่ซิลิกาเจลเพื่อป้องกันความ ชื้น หรือการเก็บเส้นใยของเห็ดโดยการทำ Freeze dry โดยการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเชื้อเห็ดในอาหารเหลวน้ำข้าวฟ่างบด ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 15-21 วัน เมื่อเส้นใยเจริญทำการเก็บเส้นใยแล้วชุบด้วย 10 % skim milk เพื่อรักษาสภาพเส้นใย คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วเขี่ยเส้นใยใส่ขวดขนาด 5 มิลลิลิตร ใส่สำลีปลอดเชื้อแล้วปิดฝานำไปแช่ตู้ Freeze ที่ -80 องศาเซลเซียส ประมาณ 10-15 นาที แล้วนำไปทำการ Freeze dye จนกว่าจะแห้ง และนำไปเก็บในที่ปราศจากความชื้น

6. การวางแผนการทดลอง

การทดลองทั้งหมดวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.5 วิเคราะห์ผลแบบ one way anova แล้วเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s multiple range test ($P \leq 0.05$)

บทที่ 3

ผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างเห็ดราและคัดแยกเชื้อเห็ดราที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ

ในการเก็บตัวอย่างเห็ดราจากแหล่งธรรมชาติได้ทำการสำรวจและทำการเก็บตัวอย่างเห็ดราจากบริเวณพื้นที่ป่าชุมชนจังหวัดพิจิตรและเขตพื้นที่แถบอำเภอนครไทย จังหวัดพิษณุโลก เนื่องจากเป็นแหล่งธรรมชาติที่ได้ทำการสำรวจแล้วพบว่ามีความหลากหลายของเห็ดราหลายชนิด จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดราจากแหล่งดังกล่าวโดยทำการเก็บตัวอย่างเห็ดราที่เป็นดอกเห็ด (Fruiting body) ทั้งที่เจริญบนดิน และบนเนื้อไม้ ซึ่งได้ทำการออกเก็บตัวอย่างเห็ดราเดือนละ 1 ครั้ง ตลอดระยะเวลาในช่วงฤดูฝน และในฤดูกาลอื่นๆ ตามความเหมาะสม ซึ่งก็พบว่ามีความหลากหลายของเห็ดราน้อยมากเมื่อเทียบกับฤดูฝน

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดราจากแหล่งธรรมชาติของแต่ละพื้นที่นั้น สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างได้จำนวนทั้งสิ้น 239 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาคัดแยกเชื้อบนอาหารแข็งสูตร PDA ผลการคัดแยกพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อเห็ดราได้จำนวนทั้งหมด 125 ไอโซเลต ซึ่งคิดเป็น 52.3% (ตาราง 3.1.1) โดยเป็นเห็ดราที่แยกได้จากดอกเห็ด (fruiting body) จำนวน 125 ไอโซเลต ซึ่งแบ่งเป็นเชื้อเห็ดราที่เจริญบนดินจำนวน 52 ไอโซเลต เชื้อเห็ดราที่เจริญบนไม้จำนวน 73 ไอโซเลต ส่วนใหญ่ร้อยละ 90 ของตัวอย่างเห็ดราที่เก็บได้นั้นมาจากเขตพื้นที่แถบจังหวัดพิษณุโลก ส่วนตัวอย่างเห็ดราที่เก็บได้จากบริเวณพื้นที่ป่าชุมชนจังหวัดพิจิตรนั้นจะเป็นตัวอย่างเห็ดราที่เจริญบนขอนไม้มากกว่าเจริญบนดิน

ตาราง 1 แสดงผลการคัดแยกและร้อยละไอโซเลตของเห็ดราที่ได้จากแหล่งธรรมชาติโดยสรุป

สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างเห็ด		จำนวนไอโซเลตที่แยกได้		ร้อยละไอโซเลตที่แยกได้ (%)	
	ที่ขึ้นบนดิน	ที่ขึ้นบนไม้	บนดิน	บนไม้	บนดิน	บนไม้
ป่าชุมชน จังหวัดพิจิตร	11	20	5	9	45.5	45.0
(รหัส PRK)						
เขตพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก						
- อำเภอนครไทย	69	104	32	57	46.4	54.8
(รหัส PH)	6	9	5	6	87.5	78.5
- บริเวณวัดในพิษณุโลก						
(รหัส TM,VJ)	15	5	10	1	66.7	20.0
- บริเวณมหาวิทยาลัย						
นเรศวร (รหัส NKS)						
รวมทั้งสิ้น	101	138	52	73	61.5	49.5
	239 ตัวอย่าง		125 ไอโซเลต		52 %	

หมายเหตุ: PH หมายถึง ตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้จากอำเภอนครไทย, TM หมายถึง ตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้จากวัดธรรมจักร, VJ หมายถึง ตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้จากวัดจันทร์ตะวันออก, NKS หมายถึง ตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้จาก ม.นเรศวร และ PRK หมายถึง ตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้จากป่าชุมชน จ.พิจิตร

การจัดจำแนกชนิดของเห็ดราที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

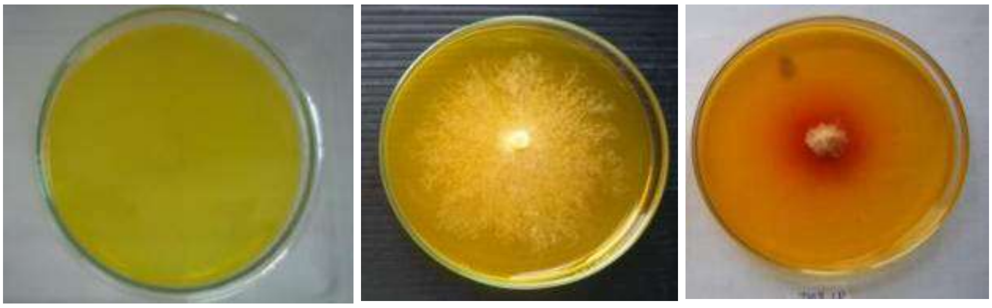
การจัดจำแนกชนิดของเห็ดราที่คัดแยกได้ทั้งหมด 125 ไอโซเลต โดยศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยา สปอร์และเส้นใย เทียบกับหนังสือจัดจำแนกเห็ดรา สามารถจำแนกได้เป็น 13 ออเดอร์ 38 แฟมิลี 71 จีนัส และ 93 สปีชีย์ โดยมี 27 ไอโซเลต ที่จัดจำแนกได้เพียงระดับจีนัส ส่วนอีก 5 ไอโซเลตนั้นไม่สามารถระบุชนิดได้ โดยส่วนมากที่จัดจำแนกได้จะอยู่ใน ออร์เดอร์ Agaricales มากที่สุด จำนวน 54 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 43.2 ของเห็ดราทั้งหมด รองลงมาคือ ออร์เดอร์ Polyporales จำนวน 33 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 26.4 ของเห็ดราทั้งหมด ซึ่งร้อยละ 90 ที่คัดแยกได้มาจากจังหวัดพิษณุโลกคือ อ.นครไทย บริเวณวัด และรอบมหาวิทยาลัยนเรศวร จะอยู่ใน ออร์เดอร์ Agaricales รองลงมาคือ Polyporales

การคัดกรองเชื้อเห็ดราจากแหล่งธรรมชาติที่สามารถสร้าง ligninolytic enzymes **ในขั้นต้นโดยการย่อยสลายสีสังเคราะห์**

จากการคัดแยกเชื้อเห็ดราจำนวน 125 ไอโซเลต เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสีสังเคราะห์แต่ละชนิดบนอาหารคัดแยกเฉพาะ (screening medium) ในขั้นต้น ซึ่งประกอบด้วยอาหารทดสอบที่มีแหล่งของไนโตรเจนสูง และที่ใช้ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดของเชื้อเห็ดรา โดยมีอัตราส่วนของ Remazol brilliant blue R (RBBR) 0.04 % (w/v) ทดสอบการสร้างเอนไซม์แลกเคส (Laccase), Azuer B 0.02 % (w/v) ทดสอบการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP), Phenol- red 0.02 % (w/v) ทดสอบการสร้างเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) (Koker, *et al*., 2000; Levin, *et al.,* 2004)

ชุดควบคุม ไม่เกิดวงใส เกิดวงใส

ภาพ 3 แสดงปฏิกิริยาออกซิเดชันของเห็ดราต่ออาหารทดสอบที่มีสี Azure-B **ที่ใช้ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์** Lignin peroxidase (LiP)



ชุดควบคุม ไม่เกิดวงใส เกิดวงใส

ภาพ 4 แสดงปฏิกิริยาออกซิเดชันของเห็ดราต่ออาหารทดสอบที่มีสี Phenol red **ที่ใช้ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์** Manganese peroxidase (MnP)

ชุดควบคุม ไม่เกิดวงใส เกิดวงใส

ภาพ 5 แสดงปฏิกิริยาออกซิเดชันของเห็ดราต่ออาหารทดสอบที่มีสี RBBR **ที่ใช้ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์** Laccase

ผลการทดสอบพบว่ามีเชื้อเห็ดราที่สามารถสร้าง ligninolytic enzymes ได้เพียง 71 ไอโซเลต คิดเป็น 59.2% ที่สามารถย่อยสลายสีสังเคราะห์แต่ละชนิด แล้วทำให้เกิดวงใสบนอาหารคัดแยกเฉพาะแต่ละชนิดและให้ขนาด clear zone ratio ที่แตกต่างกันในระยะเวลา 15 วัน โดยเชื้อเห็ดราที่ผลิตเอนไซม์ LiP จะสามารถย่อยสลายสี Azuer B แล้วทำให้เกิด clear zone สีชมพูอมม่วง ส่วนเชื้อเห็ดราที่ผลิตเอนไซม์ MnP จะสามารถย่อยสลายสี Phenol red แล้วทำให้เกิด clear zone สีส้มแดงหรือส้มอ่อน และเชื้อเห็ดราที่ผลิตเอนไซม์ Laccase จะสามารถย่อยสลายสี RBBR แล้วทำให้เกิด clear zone สีส้มอมชมพู (ภาพ 3.3.1-3.3.3) สำหรับเชื้อที่สร้างเอนไซม์ได้ดีจะสร้าง clear zone ได้กว้างตามการเจริญของเส้นใย ซึ่งลักษณะการย่อยสลายสีสังเคราะห์ทั้ง 3 ชนิด ของเชื้อเห็ดราบนอาหารทดสอบทั้ง 2 ชนิด เป็นการบ่งชี้ในขั้นต้นว่าเชื้อสามารถสร้าง ligninolytic enzymes ออกมาย่อยสลายสีสังเคราะห์ได้ปริมาณมากหรือน้อย และจากการทดสอบพบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการย่อยสลายได้แตกต่างกัน ซึ่งเชื้อเห็ดราบางไอโซเลตสามารถย่อยสลายได้ในอาหารทดสอบทั้ง 2 ชนิด ที่มีแหล่งไนโตรเจนสูง และต่ำ ได้แตกต่างกัน หรือชนิดใดชนิดหนึ่งตามความต้องการแหล่งไนโตรเจนของเชื้อ โดยเชื้อเห็ดราส่วนใหญ่จะเริ่มต้นย่อยสลายสีตั้งแต่วันที่ 3 และ 4 ของการบ่มเชื้อ โดยเชื้อเห็ดราที่สามารถย่อยสลายสีสังเคราะห์แต่ละชนิดได้ดีจะเริ่มย่อยสลายสีตั้งแต่วันที่ 1 และ 2 ของการบ่มเชื้อ ทั้งในอาหารที่มีแหล่งของไนโตรเจนสูงและต่ำ และหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 15 วัน เชื้อสามารถย่อยสลายสีสังเคราะห์บนอาหารทดสอบแต่ละชนิดแล้วให้ขนาด clear zone ratio ที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0.2- 4.1

ตาราง 2 แสดงจำนวนเห็ดราที่สามารถย่อยสลายสีสังเคราะห์แต่ละชนิดบนอาหารทดสอบที่มีแหล่งไนโตรเจนสูงและต่ำโดยสรุป

การย่อยสลายสีสังเคราะห์	**จำนวนเห็ดราที่สามารถย่อยสลายสีได้**		
	บนอาหารทดสอบที่มีแหล่งไนโตรเจนสูงอย่างเดียว	บนอาหารทดสอบที่มีแหล่งไนโตรเจนต่ำอย่างเดียว	บนอาหารทดสอบที่มีแหล่งไนโตรเจนสูงและต่ำ
ย่อยสลายสีสังเคราะห์เพียง 1 ชนิด			
- Azure-B	-	1	7
- Phenol red	9	2	4
- RBBR	1	2	16
ย่อยสลายสีสังเคราะห์ได้ 2 ชนิด			
- Azure-B และ Phenol red	1	2	3
- Azure-B และ RBBR	-	2	-
- Phenol red และ RBBR	-	3	13
ย่อยสลายสีสังเคราะห์ได้ 3 ชนิด			
- Azure-B, Phenol red และ RBBR	3	3	1

เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ข้อมูล สามารถแบ่งการย่อยสลายสีของเห็ดราได้เป็น 3 กลุ่มหลัก (ตาราง 3.1.1) คือ 1) กลุ่มที่สามารถย่อยสีสังเคราะห์ได้เพียง 1 ชนิด ประกอบด้วย Azure-B หรือ Phenol red หรือ RBBR เท่านั้น 2) กลุ่มที่สามารถย่อยสีสังเคราะห์ได้ 2 ชนิด ประกอบด้วย Azure-B และ Phenol red หรือ Azure-B และ RBBR หรือ Phenol red และ RBBR และ 3) กลุ่มที่สามารถย่อยสีสังเคราะห์ได้ทั้ง 3 ชนิด ประกอบด้วย Azure-B , Phenol red และ RBBR โดยจะเห็นว่าเชื้อเห็ดราส่วนใหญ่ ซึ่งมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับเชื้อทั้งหมด สามารถย่อยสลายสีสังเคราะห์ได้บนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนสูงและต่ำ และเป็นส่วนน้อยที่จะย่อยเฉพาะแหล่งที่มีไนโตรเจนสูงหรือต่ำเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าในจำนวนเชื้อเห็ดราทั้งหมดสามารถย่อยสลายสี RBBR ได้มากที่สุดในอาหารทดสอบทั้ง 2 ชนิด รองลงมาคือ เชื้อที่สามารถย่อยสลายสี Phenol red และ RBBR พบในอัตราส่วนที่มากกว่า 45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเชื้อทั้งหมด ส่วนเชื้อที่สามารถย่อยสลายสี Azure B หรือย่อยสลายสีอื่นที่มีสี Azure B รวมด้วยนั้นจะพบได้เป็นส่วนน้อย

เช่น เชื้อที่ย่อยสลายสี Azure B และ Phenol red ซึ่งจะย่อยสลายสีได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนต่ำ พบเพียง 2 สายพันธุ์ คือเชื้อ *Stereum guaspartum* (VJ 6) และ *Megacollybia platyphylla* (PRK 16) และพบเชื้อที่ย่อยสลายสีได้ทั้ง 3 ชนิด ได้น้อยที่สุดโดยเฉพาะเชื้อที่ย่อยสลายได้ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ซึ่งมีเพียง 1 สายพันธุ์ และให้ขนาด Clear zone ratio สูงที่สุด คือ *Microporus xanthopus* (PH 104) เช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐาน *T. versicolor* NBRC 6482 จากการทดลองดังกล่าวจึงทำการคัดเลือกเห็ดราซึ่งเป็นตัวแทนของทั้ง 3 กลุ่มที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสีสังเคราะห์เร็วและให้ clear zone ratio สูงที่สุดกลุ่มละ 1 สายพันธุ์ ซึ่งมีจำนวน 7 สายพันธุ์ (ตาราง 3.3.2) เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *P. chrysosporium* NBRC 31249 และ *T. versicolor* NBRC 6482 โดยจะนำไปทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB medium เป็นเลา 15 และ 30 วัน

ตาราง 3 แสดงค่า Clear zone ratio **ของเห็ดราซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มที่ถูกคัดเลือกจำนวน 7 สายพันธุ์ที่มีการสร้าง** ligninolytic enzymes **จากการย่อยสลายสีสังเคราะห์แต่ละชนิด ทั้งในอาหารทดสอบที่มีแหล่งไนโตรเจนสูง และหรือต่ำ**

สายพันธุ์	Phenol-red (czr)*		RBBR (czr)		Azure-B (czr)	
	HN**	LN***	HN	LN	HN	LN
Scytinopogon sp.	0.97	0.93	-	-	-	-
Coprinus cinereus	-	-	1.0	1.0	-	-
Lentinus similis	-	-	-	-	1.0	1.13
Grifola gigantea	1.0	1.0	1.0	1.0	-	-
Hygrocybe calyptraefoemis	1.6	1.6	-	-	1.0	1.3
Megacollybia platyphylla	-	-	1.0	1.0	-	0.4
Microporus xanthopus	0.97	0.95	1.1	1.1	1.0	1.0
Trametes versicolor	1.0	1.0	1.0	1.0	-	0.95
P. chrysosporium	-	1.0	-	1.0	-	-

หมายเหตุ: czr*: clear zone ratio; HN**: High nitrogen (แหล่งไนโตรเจนสูง); LN***: Low nitrogen (แหล่งไนโตรเจนต่ำ)

การทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ในอาหาร production medium

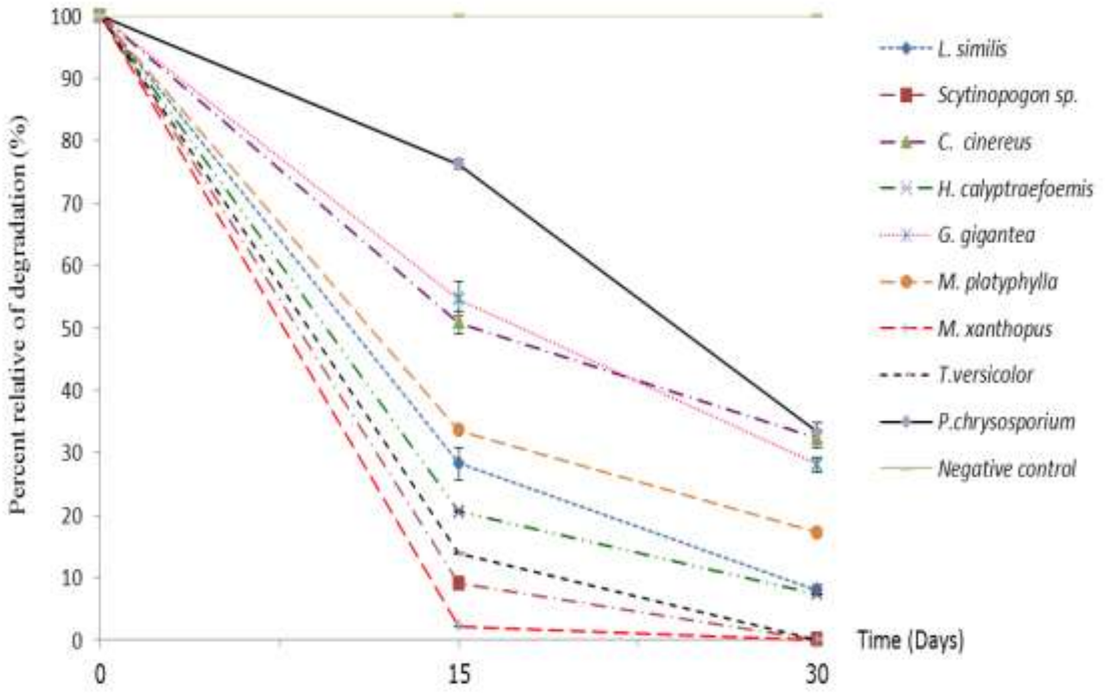
การทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB โดยนำเห็ดราที่ถูกคัดเลือกจากการย่อยสลายสีสังเคราะห์ในขั้นต้นที่ดีที่สุดจำนวน 7 สายพันธุ์ มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ที่ความเข้มข้น 0.25 mM เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *P. chrysosporium* NBRC 31249 และ *T. versicolor* NBRC 6482 ในอาหาร Production medium 2 ชนิด คือ Basal medium และ YMPG medium ซึ่งเป็นอาหารชนิดเดียวกับที่ใช้ผลิตเอนไซม์ เพื่อเป็นการบ่งชี้ว่าปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้สอดคล้องกับการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB หรือไม่ พบว่าในช่วงเวลา 15 วัน เห็ดราแต่ละชนิดสามารถย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ในอาหาร production medium ทั้ง 2 ชนิด ได้แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ (ตาราง 3.4.1) กล่าวคือ ในการย่อยสลายพบว่าเห็ดราทุกสายพันธุ์ให้อัตราการย่อยสลายสูงกว่าเชื้อ *P. chrysosporium* ทั้งในอาหาร Basal medium และ YMPG medium แต่มีเห็ดราจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Scytinopogon* sp., *C. cinereus*, *H. calyptraefoemis*, *M. platyphylla* และ *M. xanthopus* ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสลาย 2,4-PCB ในอาหาร YMPG medium สูงกว่าเชื้อมาตรฐาน *T. versicolor* โดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายตั้งแต่ 79 ถึง 92 % และยังพบว่าเชื้อ *M. xanthopus* สามารถย่อยสลายได้สูงที่สุด 92.56 % หรือเหลือความเข้มข้นของสารเพียง 0.019 mM ภายในเวลา 15 วัน สำหรับการย่อยสลาย 2,4-PCB ในอาหาร Basal medium พบว่าเห็ดราแต่ละชนิดมีศักยภาพในการย่อยสลาย 2,4-PCB ได้แตกต่างกัน โดยมีเชื้อเห็ดราอยู่ 2 สายพันธุ์ คือ *M. xanthopus* ที่สามารถย่อยสลายได้สูงสุด 97.78 % รองลงมาคือเชื้อ *Scytinopogon* sp. สามารถย่อยสลายได้ 90.92 % ซึ่งมีศักยภาพในการย่อยสลายสลาย 2,4-PCB สูงกว่าเชื้อมาตรฐาน *P. chrysosporium* และ *T. versicolor* ที่ให้อัตราการย่อยสลายเท่ากับ 66.73 % และ 86.15 % ตามลำดับ

ตาราง 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายสาร 2,4-PCB โดยเชื้อเห็ดราชนิดต่างๆ ในอาหาร Production medium 2 ชนิด เป็นเวลา 15 และ 30 วัน

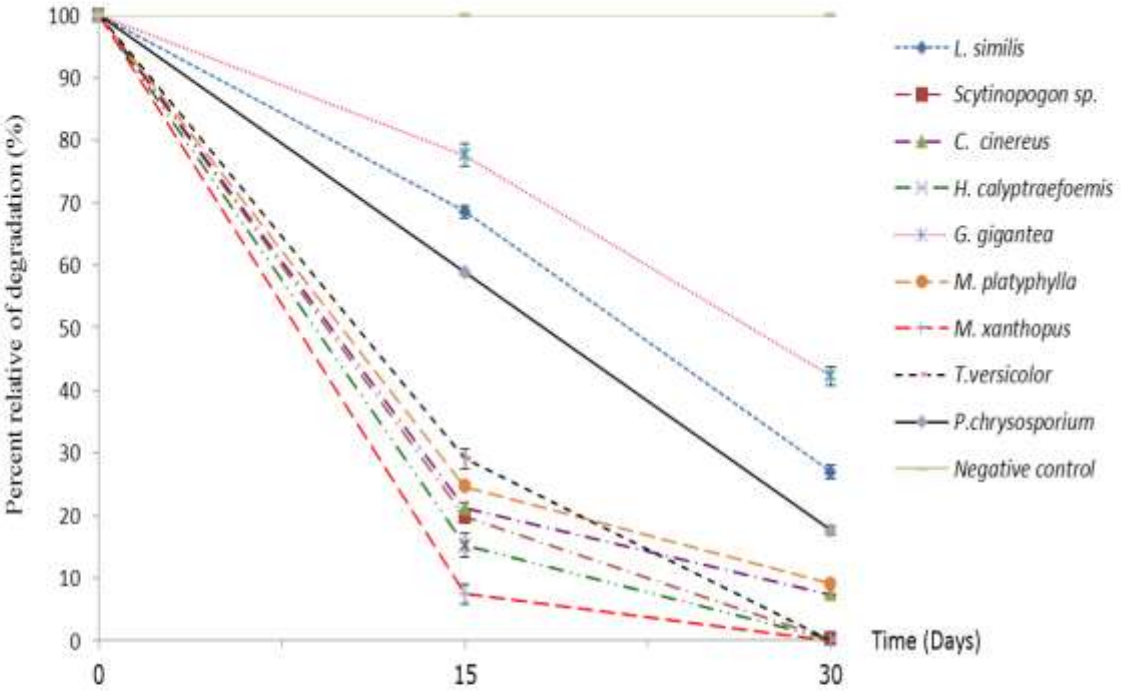
	ปริมาณของ 2,4-PCB ที่ถูกย่อยสลายไป			
	อาหาร YMPG medium (%)		อาหาร Basal medium (%)	
สายพันธุ์	**15 วัน**	**30 วัน**	**15 วัน**	**15 วัน**
L. similis	31.41 ± 1.02 [f]	73.06 ± 1.13 [e]	71.73 ± 2.58 [e]	92.01 ± 0.76 [b]
Scytinopogon sp.	80.18 ± 0.10 [c]	99.74 ± 0.09 [b]	90.92 ± 0.99 [b]	100.00 ± 0.00 [a]
C. cinereus	78.81 ± 1.12 [c]	92.65 ± 0.02 [c]	49.19 ± 1.80 [g]	67.68 ± 1.38 [e]
H. calyptraefoemis	84.77 ± 0.92 [b]	99.75 ± 0.00 [b]	79.45 ± 0.09 [d]	92.63 ± 0.01 [b]
G. gigantea	22.35 ± 1.83 [g]	57.71 ± 1.51 [f]	45.40 ± 1.75 [h]	71.92 ± 1.15 [d]
M. platyphylla	75.40 ± 1.75 [d]	90.96 ± 0.04 [d]	66.45 ± 0.23 [f]	82.76 ± 0.51 [c]
M. xanthopus	92.56 ± 0.12 [a]	100.00 ± 0.00 [a]	97.78 ± 0.06 [a]	100.00 ± 0.00 [a]
T. versicolor	70.91 ± 1.57 [e]	100.00 ± 0.00 [a]	86.15 ± 1.30 [c]	100.00 ± 0.00 [a]
P. chrysosporium	23.76 ± 0.83 [h]	41.16 ± 0.36 [g]	66.73 ± 1.57 [i]	82.40 ± 0.71 [f]
Negative control*	0.00 ± 0.00 [i]	0.00 ± 0.00 [h]	0.00 ± 0.00 [j]	0.00 ± 0.00 [g]

อัตราการย่อยสลายสาร 0.25 mM 2,4-PCB แสดงค่าเป็น เปอร์เซ็นต์ (%) ± standard deviation (SD) เปรียบเทียมค่าความแตกต่างโดยวิธี Duncan's multiple range test (n = 3, P ≤ 0.05)

หมายเหตุ * หมายถึง อาหารเหลวที่ผสม 0.25 mM 2,4-PCB โดยปราศจากเชื้อเห็ดรา



ภาพ 6 แสดงอัตราการย่อยสลาย 2,4-PCB ในอาหาร YMPG medium เป็นเวลา 15 และ 30 วัน



ภาพ 7 แสดงอัตราการย่อยสลาย 2,4-PCB ในอาหาร Basal medium เป็นเวลา 15 และ 30 วัน

จากการย่อยสลาย 2,4-PCB ของเชื้อเห็ดราที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในการย่อยสลาย 2,4-PCB โดยรวมแล้วเชื้อส่วนมากมีศักยภาพในการย่อยสลายสูงกว่าหรือเทียบเท่ากับเชื้อมาตรฐาน *P. chrysosporium* และ *T. versicolor* ทั้งในอาหาร YMPG medium และ Basal medium ที่แตกต่างกัน โดยเชื้อบางสายพันธุ์ย่อยสลายได้ดีในอาหาร YMPG medium มีอยู่ 2 สายพันธุ์ คือ *C. cinereus* และ *H. calyptraefoemis* แต่โดยส่วนใหญ่แล้วเชื้อสามารถย่อยสลายได้ดีในอาหาร Basal medium รวมทั้งเชื้อมาตรฐาน *P. chrysosporium* และ *T. versicolor* ด้วย และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายกับทั้ง 2 อาหาร พบว่าในวันที่ 15 ของการย่อยสลายเชื้อที่สามารถย่อยสลายได้สูงกว่าหรือเทียบเท่ากับเชื้อมาตรฐานโดยรวมแล้วมีอยู่ 3 สายพันธุ์ คือ *H. calyptraefoemis*, *Scytinopogon* sp. และ *M. xanthopus* ซึ่งให้อัตราการย่อยสลายสูงกว่า 80 % ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ในขณะเดียวกันเชื้อ *M. xanthopus* ก็ให้อัตราการย่อยสลายสูงสุดทั้งอาหาร YMPG medium และ Basal medium เมื่อเทียบกับเชื้อทั้งหมด คือ 92.56 % และ 97.78 % ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเป็น 30 วัน พบว่าอัตราการย่อยสลายสาร 2,4-PCB ของเชื้อแต่ละชนิดก็เพิ่มขึ้นด้วย โดยเชื้อทุกสายพันธุ์ให้อัตราการย่อยสลายสูงกว่าเชื้อ *P. chrysosporium* ในอาหาร YMPG medium และพบว่าเชื้อ *M. xanthopus* และ *T. versicolor* ให้อัตราการย่อยสลายสูงสุด 100% ทั้งอาหาร YMPG medium และ Basal medium รองลงมาคือเชื้อ *Scytinopogon* sp. ให้อัตราการย่อยสลาย 99.74% และ 100% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีเชื้อ *H. calyptraefoemis* ที่ให้อัตราการย่อยสลายได้ในอาหาร YMPG medium และ Basal medium ไม่แตกต่างกัน คือ 99.75% และ 92.63% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB สอดคล้องกับผลของการย่อยสลายสีสังเคราะห์ กล่าวคือ เห็ดราที่ย่อยสลายสีสังเคราะห์ได้ 1 ชนิด และหรือ 2 ชนิดนั้นประสิทธิภาพการย่อยสลายจะน้อยกว่าเชื้อที่สามารถย่อยสลายสีสังเคราะห์ได้ทั้ง 3 ชนิด คือ เชื้อ *M. xanthopus* ที่ให้อัตราการย่อยสลายสูงสุด และยังพบว่าเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายมากที่สุดคือ เอนไซม์ LiP และ MnP โดยสังเกตจากอัตราการย่อยสลายเทียบกับผลของย่อยสลายสีสังเคราะห์ที่ได้ ทั้งนี้ทั้งนั้นเอนไซม์ Lac เองก็มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมให้การย่อยสลายสูงขึ้นเช่นกัน จะเห็นได้ว่าในการย่อยสลาย 2,4-PCB นั้น ligninolytic enzymes ทั้ง 3 ชนิดมีบทบาทในกลไกการย่อยสลายที่แตกต่างกันจึงจะทำให้การย่อยสลายมีประสิทธิภาพแตกต่างกันด้วย

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างเห็ดรา การคัดแยก และการจัดจำแนกชนิดของเห็ดราที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ

ในการเก็บตัวอย่างเห็ดราโดยเลือกเก็บบริเวณป่าชุมชนอำเภอนครไทย จังหวัดพิษณุโลก และป่าชุมชนจังหวัดพิจิตรนั้น เนื่องจากได้มีการสำรวจแล้วพบว่ามีเห็ดราขึ้นตลอดทั้งปีและจะมีมากในช่วงฤดูฝน อีกทั้งยังเป็นป่าธรรมชาติที่อนุรักษ์ไว้ในท้องถิ่น จากการออกเก็บตัวอย่างพบว่าโดยส่วนใหญ่ร้อยละ 90 ของตัวอย่างเห็ดราที่เก็บได้นั้นมาจากเขตพื้นที่แถบจังหวัดพิษณุโลก ส่วนตัวอย่างเห็ดราที่เก็บได้จากบริเวณพื้นที่ป่าชุมชนจังหวัดพิจิตรนั้นจะเป็นตัวอย่างเห็ดราที่เจริญบนขอนไม้มากกว่าเจริญบนดิน เนื่องจากบริเวณพื้นที่ป่าชุมชนจังหวัดพิจิตร ในฤดูฝนนั้นฝนไม่ตกต้องตามฤดูกาล จึงก่อให้เกิดความแห้งแล้งและมีความชื้นน้อยมาก ส่งผลให้ความหลากหลายของเห็ดรามีน้อยมาก จึงพบเฉพาะเห็ดราที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่แห้งแล้งหรือเป็นเห็ดราที่ทนร้อนได้เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของอรพินท์ บุญทอง (2546) ที่เก็บตัวอย่างจากป่าชุมชนอำเภอนครไทยได้มากกว่าป่าชุมชนจังหวัดพิจิตร ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 239 ตัวอย่าง และคัดแยกได้มีจำนวนทั้งสิ้น 125 ไอโซเลต ซึ่งลักษณะของเส้นใยที่ได้แต่ละไอโซเลตนั้นแตกต่างกันไปตามชนิดและสภาวะแวดล้อมที่เห็ดราเจริญ โดยแบ่งเป็นเห็ดราที่เจริญบนดินจำนวน 52 ไอโซเลต เห็ดราที่เจริญบนไม้จำนวน 73 ไอโซเลต ทั้งนี้เส้นใยเห็ดราที่สามารถคัดแยกได้มีจำนวนน้อยอาจเนื่องมาจากเห็ดที่เก็บมามีสภาพไม่สมบูรณ์ เช่น มีหนอนเจาะภายในเนื้อเยื่อ มีรอยกัดแทะของแมลง เป็นต้น

ในการจัดจำแนกชนิดเห็ดราทั้ง 125 ชนิดนั้นสามารถจำแนกได้เป็น 13 ออเดอร์ 38 แฟมิลี 71 จีนัส และ 93 สปีชีย์ โดยมี 27 ไอโซเลต ที่จัดจำแนกได้เพียงระดับจีนัส และอีก 5 ไอโซเลตนั้นไม่สามารถระบุชนิดได้ โดยส่วนมากที่จัดจำแนกได้จะอยู่ในออเดอร์ Agaricales มากที่สุด จำนวน 53 สายพันธุ์ รองลงมาคือ ออเดอร์ Polyporales จำนวน 33 สายพันธุ์ ซึ่งถือว่ามีจำนวนไม่น้อยเมื่อเทียบกับจำนวนเห็ดราทั้งหมดในประเทศไทยที่รวบรวมโดยบัณฑิตยสถานในปี 2550 และ เกษม (2537) ที่พบประมาณ 82 ชนิด และ 94 ชนิด ตามลำดับ และพบว่ามีเกือบทุกชนิดเมื่อเทียบกับการศึกษาของอนงค์ ในปี 2544 แต่มี 5 ไอโซเลต ดังกล่าวที่ไม่สามารถระบุได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ

สภาพภูมิอากาศที่อาจจะมีผลต่อสัณฐานวิทยาของเห็ด ซึ่งมีผู้ศึกษาพบว่าเห็ดราที่พบต่างสถานที่กันนั้นอาจเป็นจีนัสเดียวกันเพียงแต่รูปร่างได้เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพภูมิศาสตร์ ซึ่งถ้านำไปวิเคราะห์ระดับโมเลกุลอาจเป็นชนิดเดียวกันก็ได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาถึงระดับโมเลกุล ซึ่งจะช่วยเพิ่มความถูกต้องในการระบุชนิดเห็ดรา (Petersen and Greilhuber, 1996)

การคัดกรองเห็ดราจากแหล่งธรรมชาติที่สามารถสร้าง ligninolytic enzymes **ในขั้นต้นโดยการย่อยสลายสีสังเคราะห์**

ในการทดสอบความสามารถของเห็ดราในการย่อยสลายสีสังเคราะห์แต่ละชนิด แล้วทำให้เกิดวงใสบนอาหารคัดแยกเฉพาะที่แตกต่างกันในระยะเวลา 15 วัน ทั้งนี้เป็นผลมาจากการทำปฏิกิริยา oxidation ระหว่างสีสังเคราะห์กับเอนไซม์ที่หลั่งออกมาโดยเห็ดราบนอาหารคัดแยกเฉพาะ (Premjet *et al.*, 2009) นอกจากนี้แล้วเห็ดราจะหลั่ง ligninolytic enzymes ออกมาย่อยสลายสีสังเคราะห์ควบคู่กับการสร้างระบบ H_2O_2-generating system จึงสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรทได้ อย่างไม่เฉพาะเจาะจง (Akira *et al.*, 2002) โดยเชื้อเห็ดราแต่ละชนิดนั้นมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้แตกต่างกันด้วย ซึ่ง Hatvani และคณะ (2002) รายงานว่าความสามารถในการสร้าง ligninolytic enzymes ของเห็ดราจะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อและปริมาณสารอาหารที่ได้รับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารอาหารในกลุ่มไนโตรเจน (N) และ microelements ที่ใช้เป็นสับสเตรทในการเจริญ รวมถึงสภาวะในการเพาะเลี้ยง และอาจเนื่องมาจากปฏิกิริยารีดักชันที่เกี่ยวข้องกับไนโตรเจนในอาหารและในสีสังเคราะห์ (Palmieria *et al.*, 2005; Pelaez *et al.*, 2005; Radha *et al.*, 2005; Marjina *et al.*, 2006) จึงเป็นผลที่สนับสนุนว่าทำไมเห็ดราแต่ละชนิดจึงมีความสามารถในการย่อยสลายสีได้แตกต่างกัน นอกจากนี้แล้วยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Cinthia และคณะ (2004) ที่กล่าวว่ามีเห็ดราบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถสร้าง ligninolytic enzymes ได้ทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่เห็ดราส่วนใหญ่ผลิตได้เฉพาะ 1 หรือ 2 เอนไซม์เท่านั้น (Leonowicz *et al.*, 2001)

ซึ่งในการทดสอบการย่อยสลายสีสังเคราะห์ RBBR Azuer-B และ Phenol red นั้นให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Koker และคณะ (2000) ที่ทำการคัดกรองเห็ดราที่สร้าง ligninolytic enzymes โดยการย่อยสลายสีดังกล่าวในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนสูงและต่ำ จำนวน 600 ไอโซเลต ซึ่งมีเพียง 48 % ที่ย่อยสีได้ และส่วนมากจะย่อยสลายสี RBBR ได้ ซึ่งในการทดสอบก็พบว่าเชื้อเห็ดราส่วนมากสามารถย่อยสลายสี RBBR ได้ เพราะว่าเชื้อส่วนใหญ่จะสร้างเอนไซม์ Laccase เป็นเอนไซม์หลักในระหว่างกระบวนการย่อยสลายสีสังเคราะห์ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ชนิด multicoper enzyme ที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน กับสีสังเคราะห์โดยไม่จำเป็นต้อง

ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในการเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรท (Palmieria *et al*., 2005; Emrah *et al*., 2007)

การทดสอบการย่อยสลายสารสารประกอบ 2,4-PCB ในอาหาร production medium

การทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ 0.25 mM 2,4-PCB โดยเชื้อเห็ดรา 7 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายสีสังเคราะห์ Azure-B Phenol red และ RBBR ได้ดีกว่าหรือเทียบเท่ากับเชื้อมาตรฐาน *P. chrysosporium* และ *T. versicolor* ที่เป็นตัวบ่งชี้การสร้าง ligninolytic enzymes ในขั้นต้น (Koker *et al*., 2000) ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีแนวโน้มในการย่อยสลายสารพิษที่ตกค้างในธรรมชาติรวมถึงสารโพลิเมอร์สังเคราะห์ หรือสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนิน เช่น สีสังเคราะห์ต่างๆ โพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) และสารประกอบโพลีคลอริเนเตดไบฟีนิล (PCBs) (Kadhim *et al.*,1999; Baldrian, 2008, Field, 2003)

จากการทดสอบย่อยสลายสารประกอบ 0.25 mM 2,4-PCB ของเชื้อเห็ดราแล้วเชื้อสามารถย่อยสลายสารประกอบได้แตกต่างกัน ทั้งนี้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพิษนั้นขึ้นอยู่กันชนิดของสารพิษและชนิดของเห็ดราที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลาย และโดยเฉพาะสารพิษที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น PAHs และ PCBs ที่มีจำนวนคลอรีนอะตอมสูง (Field, 2003; Liliana and Maria , 2004; Field and Reyes, 2008) ซึ่งการย่อยสลายที่เกิดขึ้นพบว่าเชื้อที่สร้างเอนไซม์ LiP, Laccase และ MnP สามารถย่อยสลายได้ดีกว่าเชื้อที่สร้างเอนไซม์ได้เพียงเอนไซม์เดียว หรือสองเอนไซม์ หรือเชื้อที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ LiP หรือ MnP ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Liliana และ Maria (2004) พบว่าในการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ที่มีคลอรีนอะตอมตั้งแต่ 1 ถึง 6 อะตอม เอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการที่จะย่อยสลายสารพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพคือเอนไซม์ LiP และ MnP โดยเชื้อที่นิยมใช้ในการศึกษาได้แก่เชื้อ *Coriolopsis polyzona, Pleurotus ostreatus* และ *T. versicolor* แต่สำหรับเอนไซม์ Laccase จะมีบทบาทมากในกระบวนการย่อยสลาย PAHs และ สีสังเคราะห์ต่างๆ ซึ่งเชื้อที่มักใช้ในกระบวนการได้แก่เชื้อ *P. chrysosporium, T. versicolor* และ *Pycnoporus sanguineis* ซึ่งการศึกษาดังกล่าวสนับสนุนผลการย่อยสลาย 2,4-PCB ของเชื้อ *T. versicolor* ที่ให้อัตราการย่อยสลายได้ดีกว่าเชื้อ *P. chrysosporium* (Krumar and Ulrich, 1998; Novotny *et al.,* 2004)

ในกรณีของอาหารก็มีผลต่อการย่อยสลายสาร 2,4-PCB เช่นกัน เนื่องจากเชื้อบางชนิดย่อยได้ดีในอาหาร YMPG medium ที่มีเฉพาะแหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุเพียงแมงกานีสอย่างเดียว แต่เชื้อเกือบทั้งหมดย่อยสลายได้ดีกว่าในอาหาร Basal medium ซึ่งมีทั้งแหล่งไนโตรเจนจำกัด แร่ธาตุ และสารอาหารที่เหมาะสม ซึ่งสนับสนุกการวิจัยของ Krumar และ Ulrich (1998) ที่

ได้ทำการทดลองย่อยสาร PCBs ผสมคือ Delor 103 และ Delor 105 โดยเชื้อ *P. chrysosporium* ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนสูงและต่ำ พบว่าเชื้อไม่สามารถย่อยสลายได้ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนสูง เนื่องจากในสภาวะที่มีไนโตรเจนไม่จำกัดเอนไซม์ LiP และ MnP จะไม่ถูกชักนำในการย่อยสลาย ซึ่งก็เป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้เชื้อ *P. chrysosporium* ที่ใช้ในการทดลองให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่ต่ำในอาหาร YMPG medium ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อเช่นกัน (Graciela *et al.*, 2002)

อีกประการหนึ่งที่เชื้อทุกสายพันธุ์สามารถย่อยสลายสาร 2,4-PCB นอกจากการมี ligninolytic enzymes มาเกี่ยวข้องแล้ว อาจเป็นผลเนื่องมาจากมีการให้ออกซิเจนทุกวันประกอบกับปริมาณความเข้มข้นของ 2,4-PCB ที่มีความเหมาะสมต่อการย่อยสลาย จึงส่งผลให้เชื้อสามารถย่อยสลายได้เร็วขึ้นเพียงระยะเวลาแค่ 15 วัน และเนื่องมาจากมีจำนวนคลอรีนอะตอมเพียง 2 อะตอม และความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย ทำให้เชื้อย่อยสลายได้เร็วภายในเวลา 15 วัน โดย Satoshi และคณะ (1996) กล่าวว่าความสามารถในการย่อยสลายสาร PCBs จะลดลงเมื่อจำนวนคลอรีนอะตอมที่อยู่ในวงไบฟีนิลเพิ่มมากขึ้น นั่นก็คือยิ่งมีจำนวนคลอรีนอะตอมมากเท่าใดความสามารถในการย่อยสลายของเชื้อเห็ดราก็จะลดลงด้วยเช่นกัน (Satoshi *et al.*, 1996; Ashrafosadat *et al.*, 2009) อีกทั้งระยะเวลายังมีผลต่อการย่อยสลายสาร 2,4-PCB ของเชื้อเห็ดรา ซึ่งเมื่อระยะเวลาการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เชื้อทุกชนิดมีอัตราการย่อยสลายที่สูงขึ้นด้วย (Premjet *et al.*, 2009)

สรุปผลการวิจัย

คัดแยกเชื้อเห็ดราได้จำนวนทั้งสิ้น 125 ไอโซเลต จาก 239 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นเชื้อเห็ดราที่เจริญบนดินจำนวน 52 ไอโซเลต เชื้อเห็ดราที่เจริญบนไม้จำนวน 73 ไอโซเลต และสามารถจำแนกได้เป็น 13 ออเดอร์ 38 แฟมิลี 71 จีนัส และ 93 สายพันธุ์ โดยมี 27 ไอโซเลต ที่จัดจำแนกได้เพียงระดับ จีนัส ส่วนอีก 5 ไอโซเลตนั้นไม่สามารถระบุชนิดได้ โดยส่วนมากที่จัดจำแนกได้จะอยู่ในออเดอร์ Agaricales มากที่สุด รองลงมาคือ Polyporales จากเชื้อเห็ดที่คัดแยกได้จำนวน 125 ชนิด พบว่ามีเชื้อเห็ด 71 สายพันธุ์ ที่มีการสร้าง ligninolytic enzymes จากการย่อยสลายสีสังเคราะห์แต่ละชนิด ในอาหารทดสอบที่มีแหล่งไนโตรเจนสูง และหรือต่ำ ได้แตกต่างกันตามความต้องการไนโตรเจนของเชื้อแต่ละชนิด โดยเชื้อเห็ดราส่วนมากซึ่งคิดเป็นร้อยละ 50 สามารถย่อยสลายสีสังเคราะห์ RBBR อย่างเดียว และหรือย่อยสลายสีสังเคราะห์ Phenol red รวมด้วย ทั้งในอาหารทดสอบทั้ง 2 ชนิด ซึ่งจะพบมากที่สุดใน ออเดอร์ Agaricales และ Polyporales โดยมี 7 สายพันธุ์ที่ให้อัตราการย่อยสลายสีสังเคราะห์สูงที่สุด

ในการย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ในอาหาร production medium 2 ชนิด เป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่า มีเชื้อเห็ดรา 3 สายพันธุ์คือ เชื้อ *Scytinopogon* sp., *H. calyptraefoemis* และ *M. xanthopus* ที่ให้ค่าเฉลี่ยในการย่อยสลายสูงกว่าหรือใกล้เคียงกับเชื้อมาตรฐาน *P. chrysosporium* และ *T. versicolor* ทั้งในอาหาร Basal medium และ YMPG medium โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายในอาหาร Basal medium เท่ากับ 80.18, 84.77 และ 92.56 % และ YMPG medium เท่ากับ 90.92, 79.45 และ 97.78 % ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเป็น 30 วัน พบว่าอัตราการย่อยสลายของเชื้อเห็ดราแต่ละสายพันธุ์ก็เพิ่มขึ้นด้วย โดยเชื้อ *M. xanthopus* ที่และเชื้อ *T. versicolor* ให้อัตราการย่อยสลายสูงสุด 100 % ทั้งใน อาหาร Basal medium และ YMPG medium ผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นว่าเชื้อที่มีอัตราการย่อยสลายสูงเอนไซม์ LiP, MnP และ Laccase มีบทบาทสำคัญที่สุดในกระบวนการออกซิเดชันสาร 2,4-PCB ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเห็ดรา ปริมาณเอนไซม์ ชนิดของอาหาร และระยะเวลาในการย่อยสลาย

จากผลการศึกษาทั้งหมดพบว่าเชื้อเห็ดราที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติคือ ป่าชุมชนจังหวัดพิจิตร และป่าชุมชนบางแห่งในจังหวัดพิษณุโลก ที่คัดเลือกมานั้นส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายสารประกอบ 2,4-PCB ได้มากกว่า 80 % ซึ่งเห็ดราที่มีศักยภาพเหล่านี้จะนำไปพัฒนาใช้ย่อยสลายสารพิษอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2551). แนวทางการจัดการสารพีซีบี (PCBs Management Handbook). (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพมหานคร.

การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ฝ่ายบำรุงรักษาระบบส่ง. (2550). POLYCHLORINATED BIPHENYLS (PCBs). สืบค้นเมื่อ 10 มกราคม 2553, จาก http://www.pcd. go.th / info_serv/air_PCBsThai.htm

กิตติมา รามัญวงษ์ วินันท์ดา หิมะมาน จันจิรา อายะวงศ์ สมโภชน์ มณีรัตน์. (2453) การสำรวจเบื้องต้นเกี่ยวกับราในดินบริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งใหญ่นเรศวร ด้านตะวันออก วารสารวิชาการป่าไม้ ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 หน้า 117-124.

เกษม สร้อยทอง. (2537). เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. ศิริธรรมออฟเซ็ต: อุบลฯ.

พาลาภ สิงหเสนี. (2535). พิษของยาฆ่าแมลงต่อผู้ใช้ และสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ :สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 147 หน้า

ราชบัณฑิตยสถาน. (2550). เห็ดในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: ทีฟิล์ม จำกัด.

รายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย. (2544). การจัดการสารอันตราย กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

วิมล ชื่อชอบ. (1998). การย่อยสลายสารพิษตกค้างด้วยจุลชีพ. Thai Environmental Engineering 12, 42-45.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. (2544). หนังสือคู่มือเห็ดและราในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

สุธรรม สิทธิชัยเกษม. (2528). ยาปราบศัตรูพืชในแหล่งน้ำ. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน, กรุงเทพฯ. 57 หน้า.

สุมณฑา พรหมบุญ และคณะ โครงการวิจัยฯ ชุดพัฒนาการวิจัย (เล่ม 2) ความหลากหลายทางชีวภาพ จาก http://www.swu.ac.th/royal/book2/b2c11t3.html.

สำนักงานมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ (มกท.). (2546). มาตรฐานเกษตรอินทรีย์ 2003

สำนักงานมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ (มกท.). (2003). มาตรฐานเกษตรอินทรีย์ (IFOAM Accredited), นนทบุรี 41 หน้า

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. (2544). เห็ดเมืองไทย. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพมหานคร: ไทยวัฒนาพานิช.

อรพินท์ บุญทอง. (2546). การคัดเลือกเห็ดราที่สามารถย่อยสลาย 2,8-Dichlorodibenzo-p-dioxin (2,8-DCDD). วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

อลิสา วังใน. (2550). หลักการเบื้องต้นของการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ Basic concepts in bioremediation. ใน การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ (หน้า 85-157). กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Akira Sato, T. W., Yoshiowatanabe, Harazono K.,T. and Fukatsu. (2002). Screening for basidiomycetous fungi capable of degrading 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin. FEMS Microbiology Letters, 213, 213-217.

Aleeva, I.V. et al., (1972). On the effect of Agricultural on Reproduction of Hares (*Lepus enropaeus*). Westn. Zool. 6:58 – 61.

Andrew, JS. (1992). Polychlorodibenzo-p-dioxin and Polychlodibenzofuran. Hazadous Material Toxicology. Maryland: Willium and Wilkins, 756 – 761.

Arisoy, M. (1998). Biodegradation of chlorinated Organic Compounds by White rot Fungi. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60;872 – 876.

Ashrafosadat, H., Seyed, A.S., Ebrahim, V.F. Saman, H. and Abdolrahman, E. (2009). Extensive biodegradation of highly chlorinated biphenyl and Aroclor 1242 by *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 isolated from contaminated soils. International Biodeterioration and Biodegradation, 63, 788–794.

Aust, S.D. and Benson, J.D. (1993). The Fungus among Us: Use of the White Rot Fungi to Biodegrade Environmental Pollutants. Envieronmental Health Perspectives. 101 (3).

Aust, S.D. & Stahl,J.D. (1998). Biodegradation of Dioxin and Dioxin-Like Compounds by White rot fungi, from http://www.ftns.wau.nl/imb/research/wrf/chloro.html.

Baldrian, P. (2008). Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. Fungal Ecology, 1, 4-12.

Barr, D.P. and Aust, S.D. (1994). Mecanism of White rot Fungi use to degrade pollutants. Environ. Sci. Techno., 268,241-244.

Barr, D.P. and Aust, S.D. (1999). Pollutants degradation by White rot fungi. Review of Environmental Contamination and Toxicology, New: Spring Verlag; 49-72.

Bumpus, J.A. & Aust, S.D. (1986). Biodegradation of environmental pollutants by the White rot fungus *Pharnerochaete chrysosporium*; Involvement of lignin

degrading system. Bioassay, 6,166-170.

Bennet, J. W. Wunch, K. G. and Faison, B. D. (2002). Use of Fungi Biodegradation. (*2nd*). ASM Press Washington, D.C.960-971.

Borja, J., Taleon, D.M., Auresenia, J. and Gallardo, S. (2005). Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. Process Biochemistry, 40, 1999-2013.

Cinthia, G.B., Larissa, O., Cristina, G. M. and Rosane, M. P. (2004). Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. Bioresource Technology, 94, 107–112.

Connell, D. W. (2005). Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Dioxins. (*2nd*). Basic Concepts of Environmental Chemistry. CRC Press.

Christine, S. E. and John, N.H. (2001). Degradation of plant cell wall polymers. Fungi in bioremediation. G. M. Gadd Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.

David, L.L. and Daniel, E.S. (1977a). How to identify mushrooms to genus I: macroscopic features. The University of Michigan, Mad River Press.

David, L.L. and Daniel, E.S. (1977b). How to identify mushrooms to genus III: macroscopic features. The University of Michigan, Mad River Press.

Denson, MS., et al. (1986). Ah receptor for 2,3,7,8 – tetrachlorodibenzo-p-dioxin comparative studies in mammalian and non – mammalian species. Chemosphere, 15:1665-1672.

Emrah, A.E., Ali U., Halil, K. (2007). Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. Process Biochemistry, 42, 1429–1435.

EPA Method. Spectrum Laboratories: EPA Method 8151, from http://www.speclab.com/compound/m8151.htm.

Fasidi O., Oluseyi D.A. and Isola. (2009). Biodegradation of agro-wastes by some nigerian white-rot fungi. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 8, 711-719.

Field, J.A. et al. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. Appl. Environ. Microbiol, 58(7), 2219-2226.

Field, J. A. (2003). Biodegradation of chlorinated compounds by white rot fungi. Microbial Processes and Environmental Applications, University of Arizona:Tucson, AZ, USA, 159-204.

Field, J. A. and Reyes, S. (2008). Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. Environmental Pollution, 155, 1-12.

Francova, K., Mackova, M., Macek, T. and Sylvestre M. (2004). Ability of bacterial biphenyl dioxygenases from *Burkholderia* sp.LB400 and *Comamonas testosteroni* B-356 to catalyse oxygenation of ortho-hydroxychlorobiphenyls formed from PCBs by plants. Environmental Pollution, 127, 41–48.

Geoffrey, K. (2009). Mushrooms and Toadstools of Britain and northern Europe. (*1st*). An Hachette UK Company. London.

Graciela M.L., Ruiz-Aguilar, J.M., Fernandez, S., Refugio, R., and Hector, P.V. (2002). Degradation by white-rot fungi of high Concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. Advances in Environmental Research, 6, 559-568.

Grant, B.F. and Nehrle, P.M. (1970). Chronic Endrin Poisoning in Goldfish. Carassius auratus. J.Fish. Res. Bd. Can. 27:2225 – 2232.

Hamid, B., Don, W. and Susan D.(2005). Bioremediation of polychlorinated biphenyl and petroleum contaminate soil. Proceedings of Environmental Science and Technology, 502-507.

Hammel, K.E. et al. (1986). Oxidation of Polycyclic aromatic hydrocarbons and Dubenzo-p-dioxins by *Phanerocheate chrysosoprium* Ligninase. Journal of_bacteriology, 261, 16448-16952.

Hatvani, N. and Imre M.(2002). Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. Enzyme and Microbial Technology, 30, 381–386.

Hopf, N.B., Ruder, A.M. and Succop, P. (2009). Background levels of polychlorinated biphenyls in the U.S. population. Science of the Total Environment, 407, 6109-6119.

Ichiro K., Riichiro K. and Ryuichiro K. (2006). Metabolism of 4,4'-dichlorobiphenyl by white-rot fungi Phanerochaete chrysosporium and Phanerochaete sp. MZ142. Applied Microbiology and Biotechnology, 72, 566-575.

Jiang G.X., Niu J.F., Zhang S.P., Zhang Z.Y. and Xie B. (2008). Prediction of Biodegradation Rate Constants of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls by Fungal Laccases from *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 81, 1-6.

Kadhim,H.,Graham,C.,Barratt,P.,Evens,C.s. and Rastall,R.A. (1999). Removal of phenolic compound in water uising *Coriolus versicolor* grown on wheat bran. Enzyme and Microbial Technology, 24, 303-307.

Klecka, G.M. & Gibson, D.T. (1980). Metabolism of Dibenzo-p-dioxin and Chlorinated dibenzo-p-dioxin by *Bjerkandera species*. Appl. Environ. Microbiol, 39(2), 288-296.

Kocher, C.W. et al. (1978). Toxical. Bull. Environ. Contain, 19,229-236.

Koker, L.,Ratto,M. and Jane,B.J.H.(2000). Isolation and enzymic characterization of south African white-rot fungi. Mycological Research, 104(7), 820-824.

Koller,,G., Moder, M. and Czihal, K. (2000). Peroxidative degradation of selected PCB: a mechanistic study. Chemosphere, 41, 1827-1834.

Kotterman, M.J.J. et al. (1994). The physiology of anthracene biobegradation by the White rot fungus *Bjerbandera sp*. Strain Bos55. Abstract, 42, 179-186.

Krumar, P. and Ulrich, R. (1998). Degradation of Polychlorinated Biphenyl Mixtures by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Folia Microbiology, 43, 79-84.

Kubatova, A.,Erbanova, P.,Eichlerova, I.,Homolka, L.,Nerud, F. and Sasek, V. (2001). PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. Chemosphere, 43, 207-215.

Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas, M., Matuszewska, ,A., Hofrichter, M., Wesenberg,D. and Rogalski, J. (2001). Fungal laccase :properties and activity on lignin. Journal of Basic Microbiology, 41, 185–227.

Levin, L., Papinutti, L. and Forchiassin, F.(2004). Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. Bioresource Technology, 94, 169–176.

Li, Q.X. and Young, S.K. (2004). Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. Chemosphere, 56, 23-30.

Liliana, G., and Maria, A. R. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. Enzyme and Microbial Technology, 35, 339–354.

Mirjana, S., Limor, P., Dana, F., Yitzhak, H.,,Solomon, P. W., Eviatar, N. and Jelena, V. (2006). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. Enzyme and Microbial Technology, 38, 65-73.

Monika M., Cajthaml, T., Koeller, G., Erbanova, P. and Sasek, V. (2005). Structure selectivity in degradation and translocation of polychlorinated biphenyls (Delor 103) with a Pleurotus ostreatus (oyster mushroom) culture. Chemosphere, 61, 1370-1378.

Novotny, C., Svobodova, K.., Erbanova, P., Cajthaml, T., Aparna, K. and Elke, L. (2004). Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. Soil Biology and Biochemistry, 36, 1545-1551.

Palmieri, G., Cennamob, G., and Sannia, G. (2005). Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. Enzyme and Microbial Technology, 36, 17–24.

Patricia, J.H. and Christopher, F.T. (2001). The biochemistry of ligninolytic fungi. Fungi in bioremediation. G. M. Gadd Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.

Paustenbach, D.J. (1989). The Risk of Environmental nad Human Health Hazards. A Textbook of case studies. New: John Wiley & Sons.

Pelaez, F.,Martinez, M.J. and Martinea, A.T. (2005). Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. Mycological Research, 99 (1), 37-42.

Petersen, R.H. and Greilhuber, I.K. (1996). An epitype specimen for *Pleurotus ostreatus*.

Mycological Research, 100(2), 229-235.

Petroff, B.K. et al. (2000). A Review of mechanism controlling ovulation with implication for the anovulatory effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in rodents. Toxicology, 158, 91-107.

Pieper, D.H. (2005). Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. Applied Microbiology and Biotechnology, 67, 170-191.

Pointing, S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 57, 20–33.

Poland, A. and Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8 – tetrahlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons. Examination of the mechanism of toxicology, Ann. Rev. Phamarcol. Toxicol. 22: 517 – 554.

Premjet, S., Bunthong, O. and Premjet, D. (2009). The Ability of Five Fungal Isolates fromNature to Degrade of Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Culture Media. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(3), 1076-1082.

Radha, K.V., Regupathi, I., Arunagiri, A. and Murugesan. T. (2005). Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. Process Biochemistry, 40, 3337–3345.

Reddy, C.A. and Mathew, Z. (2001). Bioremediation potential of white rot fungi. Fungi in bioremediation. G. M. Gadd Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.

Rimko ten, H. and Pauline, J.M. (2001). Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi. Chemical Reviews, 101, 3397-3413.

Sakai, M., Ezaki, S., Suzuki, N. and Kurane, R. (2005). Isolation and characterization of a novel polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Paenibacillus* sp. KBC101. Applied Microbiology and Biotechnology, 68, 111-116.

Sarah, H. (2004). Bioremediation capabilities of white rot fungi. Doctoral dissertation: review article. Ph.D., Ecology, Colorado State University, United States.

Satoshi, T., Matoyoshi, N., Takahiko, M., Ryuichiro, K. and Kokki, S. (1996). Degradation of Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans by the

White Rot Fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. Applied Microbiology and Biotechnology, 62 (12), 4323- 4328.

Sierra, I., Valera, J.L., Marina, M.L. and Laborda, F. (2003). Study of the biodegradation process of polychlorinated biphenyls in liquid medium and soil by new isolated aerobic bacterium *Janibacter* sp. Chemosphere, 53, 609-618.

Stoner, D.L. (1994). Biotechnology for the Treatment of Hazardous wasre. CRC Press Inc. United states of America.

Tachibana, S. et al. (1996). Biodegradation by Wood-Rotting fungi (I) – Screening of fungi for degradation of dioxins and degradation of 2,7-Dichlorodibenzo-p-dioxin by some fungi separated by the screening and by some wood-rotting fungi. Appl. Environ. Microbiol, 12(50), 1806-1815.

Takada, S. et al. (1996). Degradation of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Polychlorinated dibenzofuran by White Rot Fungus *Phanerocheate chrysorium* YK-624. Appl. Environ. Microbial, 4323-4328.

Tien, M. and Kirk, T.K. (1988). Ligninperoxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Method in Enzymology, 161, 238-249.

Valli, K. & Gold, M.H. (1991). Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-gegraling fungus *Phanerocheate chrysorium*. Journal of Baoterology, 173,345-352.

Valli, K. et al. (1992). Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the Lignin – degrading Basidioycete *Phanerocheate chrysorium.* Journal of_Bacteriology, 174,2131-2137.

Vasilyeva, G. K. and Strijakova, E. R. (2007). Bioremediation of Soils and Sediments Contaminated by Polychlorinated Biphenyls. Microbiology, 76(6), 639–653.

World Health Organization. (1976). DDT (PDS)"DATA SHEETS ON PESTICIDES from http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest21_e.htm.

Yadav, J.S. et al.(1995). Degradation of Polychlorinated Biphenyl Mixture (aroclors 1242, 1254 and 1260) by the White Rot Fungus *Phanerocheate chrysorium* as Evidenced by Congener-Specific Analysis. Appl. Environ. Microbiol, (61) 2560-2565.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)

PDB (Himedia)	26.5	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH	5.5	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และปรับ pH ให้ได้ 5.5 เทใส่ใน ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

กรณีใช้เป็นอาหารสำหรับคัดแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์จะต้องผสม chloramphenical (34 mg/ml) ลงไปในอาหารที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียสก่อนจะทำการเทอาหาร

2. การเตรียมอาหารคัดกรอง (Screening medium)

2.1 High Nitrogen (กรัมต่อลิตร)

Glucose 10 กรัม

24 mM L-asparagine

24 mM $NH_4 NO_3$

2.2 Low Nitrogen (กรัมต่อลิตร)

Glucose 10 กรัม

2.4 mM L-asparagine

2.4 mM $NH_4 NO_3$

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรและปรับ pH ให้ได้ 5.5 และเติมวุ้น 20 กรัม ลงในอาหาร แล้วละลายวุ้นให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนอุณหภูมิลดลงเหลือ 50-60 องศาเซลเซียส จึงเติมสีสังเคราะห์ลงในอาหารคัดกรองปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยมีอัตราส่วนของสีสังเคราะห์ Remazol brilliant blue R (RBBR) 0.04% ทดสอบการผลิตเอนไซม์แลกเคส (Laccase), Azuer B 0.02 % อาหารทดสอบการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) และ Phenol red 0.02 % ทดสอบการผลิตเอนไซม์แมกานิสเปอร์ออกซิเดส (MnP)

3. การเตรียมอาหารทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ 2, 4-PCB

3.1 YMPG medium (Yeast extract Malt extract Peptone Glucose medium) (กรัมต่อลิตร)

Yeast extract	1.0	กรัม
Malt extract	10.0	กรัม
Peptone	2.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.0	กรัม
L-asparagine	1.0	กรัม

pH 4.5

3.2 Basal medium (กรัมต่อลิตร)

Glucose	10	กรัม
Malt extract	2.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
K_2HPO_4	2.0	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.16	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	1.0	มิลลิกรัม
KCl	0.5	กรัม
$NH_4\ NO_3$	1.75	กรัม
$CoCl_2.\ 6H_2O$	0.29	มิลลิกรัม
$CaCl_2$	0.01	กรัม

$CuSO_4$. $5H_2O$	2.0	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
L-asparagine	1.0	กรัม

pH 4.5

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และปรับ pH ให้ได้ 5.5 เทใส่ในฟลาสก์ขนาด 150 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม Lactophenol cotton blue

1.1 เตรียม Lactophenol

Phenol crystal	20 g
Lactic acid	20 g
Glycerol	40 g
Distill water	20 ml

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ละลายโดยใช้ไฟอ่อนๆ

1.2 เตรียม Lactophenol cotton blue

Lactophenol	100 ml
cotton blue	0.05 g

ละลายสารละลายในข้อ 2.1 เข้ากับข้อ 2.2 แล้วคนให้เข้ากัน

2. Melzer's reagent

I	0.5	กรัม
KI	1	กรัม
น้ำกลั่น	20	มิลลิกรัม

ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม chloral hydrate 20 กรัม ก่อนใช้ จากนั้นทำการกรองปลอดเชื้อด้วย filter sterile และเก็บไว้ในที่มืดและเย็น

3. การเตรียมสารละลายสีทดสอบการผลิต ligninolytic enzymes

6.1 สารละลายสี Remazol brilliant blue R (RBBR) เข้มข้น 0.04%

ชั่งสี Remazol brilliant blue R มา 0.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกรองปลอดเชื้อ ด้วย filter sterile ใส่หลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 150 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในที่มืดและเย็น

6.2 สารละลายสี Azuer B เข้มข้น 0.02 %

ชั่งสี Azuer B มา 0.3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกรองปลอดเชื้อ ด้วย filter sterile ใส่หลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 150 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในที่มืดและเย็น

6.3 สารละลายสี Phenol red เข้มข้น 0.02 %

ชั่งสี Phenol red มา 0.3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกรองปลอดเชื้อ ด้วย filter sterile ใส่หลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 150 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในที่มืดและเย็น

7. การเตรียม 0.25 mM 2,4-PCB

ชั่ง 2,4-PCB 1.11 มิลลิลิตร(ต่ออาหาร 20 มิลลิลิตร) แล้วละลายใน N,N-dimethylformamide ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วละลายเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน

ภาคผนวก ค แสดงการจัดจำแนกเห็ดราที่คัดเลือกมาใช้ในการย่อยสลายสาร 2,4-PCB

Lentinus similis

Order: Polyporales

Family: Polyporaceae

Scientific name: *Lentinus similis*

Common Name: กรวยจีบ

(1) **ลักษณะของหมวกเห็ด**

ขนาด ϕ 3 – 15 cm. สูง 4 – 6 cm. รูปร่าง คล้ายรูปกรวยลึก

เมื่อมองจากทางด้านบน เป็นร่องลึกตรงกลางดอก คล้ายจาน ลักษณะดอกมีขนอ่อนตรงกลางหมวก เมื่อแก่ผิวเรียบ มีร่องเล็กๆเรียงเป็นรัศมีไปถึงกลางหมวก ขอบม้วนงอเข้าหาก้านเล็กน้อย ดอกสีน้ำตาลอมเหลืองไปจนถึงน้ำตาลแดง ดอกอ่อนสีอมม่วง ดอกเหนียว

(2) **ลักษณะของครีบ**

ครีบติดก้าน เรียวยาวลงไปติดก้าน แคบ เรียงถี่

(3) **ลักษณะของก้าน**

ก้านยาว 3-10 cm. กว้าง 0.2-0.5 cm. ทรงกระบอก แข็ง มีขนอ่อนสีเดียวกับหมวก เนื้อบาง เหนียว สีขาว

(4) **ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์**

เป็นแบบมีผนังกั้น (Simple septa) ชัดเจน ผนังบาง

(5) **ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์**

สีของสปอร์บนกระดาษเป็น สีขาว รูปร่างภายใต้กล้อง ทรงรีสี่เหลี่ยม เรียบ ผนังบาง มีปุ่มใสทางด้านปลาย การทำปฏิกิริยากับสี Melzer'reagent: Amyloid

(6) **ลักษณะการติดของดอกเห็ดบนท่อนไม้**

ฐานก้านยึดติดกับก้อนเนื้อไม้ ชูเป็นดอก

(7) **ลักษณะการเจริญของดอกเห็ด**

เจริญเป็นดอกเดี่ยว จากก้อนเส้นใยเทียมสีขาวอยู่ใต้ดิน

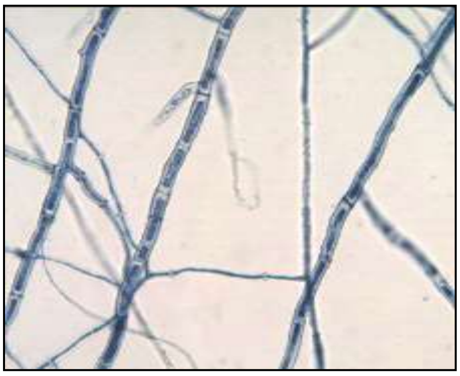
(8) **ที่อยู่อาศัย** บนเนื้อไม้ที่ตายแล้ว

(9) **ข้อมูลการกินได้** ไม่มีข้อมูลว่ากินได้

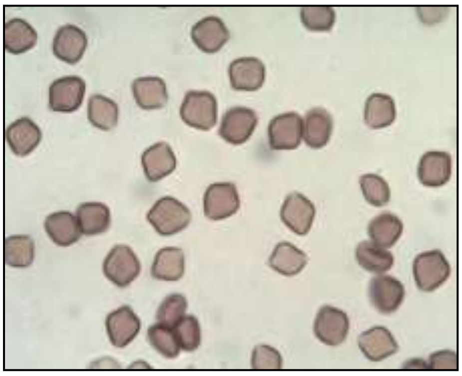
(1) ลักษณะของหมวกเห็ด

(2) ลักษณะครีบ (3) ลักษณะก้าน

ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA เป็นสีขาวฟู



(4) ลักษณะเส้นใย (40X) แบบ simple septa



(5) ลักษณะสปอร์ (100X) และการทำปฏิกิริยากับ Melzer’reagent: amyloid

ภาพ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด ***Lentinus similis***

Scytinopogon sp.

Order: Agaricales

Family: Clavariaceae

Scientific name: *Scytinopogon* sp.

Common Name: -

(1) **ลักษณะของหมวกเห็ด**

ขนาด ϕ 3 – 5 cm. สูง 6 – 10 cm. รูปร่าง คล้ายปะการัง

เมื่อมองจากทางด้านบน เป็นแฉก แหลม คล้ายพุ่มหญ้า ลักษณะดอกเป็นกิ่งก้านแตกแขนง แต่ละแขนงจะแตกเป็น 2 แฉกสั้นๆ ปลายแหลม คล้ายง่าม ดอกแข็งและเหนียว

(2) **ลักษณะของครีบ** ไม่มีครีบ

(3) **ลักษณะของก้าน** ไม่มีก้าน

(4) **ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์**

เป็นแบบมีผนังกั้น (Simple septa) ผนังบางใส แคบ

(5) **ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์**

-

(6) **ลักษณะการติดของดอกเห็ดบนท่อนไม้**

ฐานก้านยึดติดกับเปลือกไม้ ชูเป็นพุ่ม

(7) **ลักษณะการเจริญของดอกเห็ด**

เจริญเป็นดอกเดี่ยว กระจายกันอยู่ หรือกลุ่ม

(8) **ที่อยู่อาศัย** บนเปลือกไม้ที่ตายแล้ว

(9) **ข้อมูลการกินได้** ไม่มีข้อมูลว่ากินได้

(1) ลักษณะของหมวกเห็ด

(1) ลักษณะของแฉก ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA เป็นแฉกเทาดำ

(4) ลักษณะเส้นใย (100X) เป็นแบบ simple septa

ภาพ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด *Scytinopogon* sp.

Coprinus cinereus

Order: Agaricales Family: Coprinaceae

Scientific name: *Coprinus cinereus* Common Name: เห็ดถั่วเหลือง

(1) **ลักษณะของหมวกเห็ด**

ขนาด ϕ 1 – 2 cm. รูปร่าง คล้ายร่ม เมื่อมองจากทางด้านบน แหลม ตรงกลางดอกสีเข้มกว่าขอบดอกผิวขอบหมวกสีขาวอมเทา เรียบ ผิวของหมวกสีขาวอมเทา เรียบ แห้ง สีเดียวกันทั้งดอก มีรัศมีเป็นเส้นบาง ๆ รอบดอก ขอบเรียบ ดอกค่อนข้างหนา ดอกแก่จะกลายเป็นสีดำที่เกิดจากการย่อยสลายตัวเอง แล้วทำให้ขอบม้วนงอขึ้นด้านบน

(2) **ลักษณะของครีบ**

ค่อนข้างเรียงถี่ ลักษณะ ร่องตื้น เป็นเส้น สีขาว และดำเปียกเมื่อย่อยสลายตัวเอง ระยะห่างระหว่างครีบ 0.01-0.02 cm.

(3) **ลักษณะของก้าน**

ขนาด กว้าง 0.1 – 0.2 x ยาว 1– 4 cm. การติดของก้านกับหมวกเห็ด ก้านอยู่กลางดอก รูปร่างของก้าน ก้านยาวและทรงกระบอก สีขาว ผิวของก้าน สีขาว หรือสีเดียวกับดอก เนื้อในของก้าน สีขาว เปราะ กลวง

(4) **ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์**

เป็นแบบมี clamps connection ผนังบาง แคบ แตกแขนงเล็กน้อย 1-2 แขนง

(5) **ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์**

สีของสปอร์บนกระดาษ สีสีน้ำตาลเข้ม หรือสีดำ รูปร่าง ผนังบาง มีปุ่ม (node) 1 ปุ่มทางด้านปลายขนาด รูปไข่ (Ovate) เรียบ (Smooth) มีรูงอก (Germ pore) กว้าง 7-10 x ยาว 4-5 μm การทำปฏิกิริยากับสี Melzer'reagent : dextinoid

(6) **ลักษณะการติดของดอกเห็ดบนท่อนไม้**

ดอกชูขึ้นเหนือขอนไม้

(7) **ลักษณะการเจริญของดอกเห็ด**

เจริญเป็นกลุ่ม ขึ้นซ้อนกัน

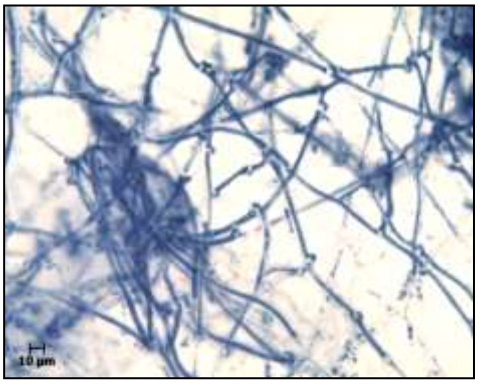
(8) **ที่อยู่อาศัย** บนไม้เนื้อที่ตายแล้ว

(9) **ข้อมูลการกินได้** มีข้อมูลว่ากินได้

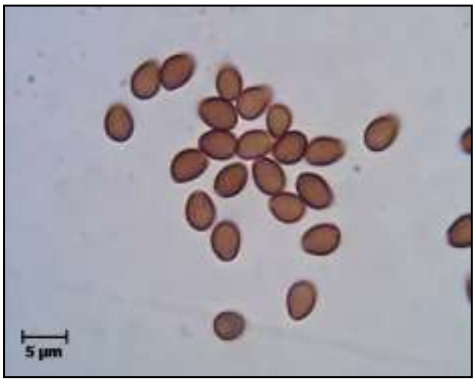
(1) ลักษณะของหมวกเห็ด

(2) ลักษณะของครีบ และ (3) ก้าน

ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA เป็นสีเทาฟู



(4) ลักษณะเส้นใย (40X) clamps connection



(5) ลักษณะสปอร์ (100X) และการทำปฏิกิริยากับ Melzer’reagent: dextinoid

ภาพ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด *Coprinus cinereus*

Hygrocybe calyptraefoemis

Order: Agaricales

Family: Tricholomataceae

Scientific name: *Hygrocybe calyptraefoemis*

Common Name: หมวกชมพู

(1) ลักษณะของหมวกเห็ด

ขนาด ϕ 1.5-2 cm. ดอกนูนและโค้งงอเป็นถ้วยคว่ำ สีแดงชมพู ดอกแก่สีเริ่มซีดจางเป็นสีชมพูเมื่อบานขอบดอกสีชัดกว่ากลางดอก ผิวเรียบ ขอบเป็นคลื่น

(2) ลักษณะของครีบ

การติดของครีบกับก้าน ครีบติดก้าน ขอบของครีบ ขอบเรียบ สีขาว ครีบสีขาวเหลืองอ่อน ระยะห่างระหว่างครีบ 0.5-1 mm. รูปแบบของครีบ ครีบเรียงค่อนข้างถี่เป็นร่องลึก

(3) ลักษณะของก้าน

ขนาดกว้าง 0.5-0.8 ยาว 1-1.5 cm. การติดของก้านกับหมวกเห็ด ตรงกลางดอก รูปร่างของก้านก้านอวบเรียงจากต้นปลายส่วนโคนก้านอวบ สีขาวเหลืองอ่อน ผิวก้านเรียบ เนื้อในกลวง

(4) ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เป็นแบบมีผนังกั้น (Simple septa) ผนังบาง แคบ แตกแขนงเล็กน้อย 1-2 แขนง

(5) ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สีของสปอร์บนกระดาษเป็น สีขาว รูปร่างภายใต้กล้อง ทรงกลม (Globose) มีปุ่มนูน (verrucase) มีขั่ว (Hilar appendage) ขนาด กว้าง 7.5-9.5 µm

การทำปฏิกิริยากับสี Melzer'reagent: Amyloid

(6) ลักษณะการเจริญของดอกเห็ด

เจริญเป็นดอกเดี่ยว

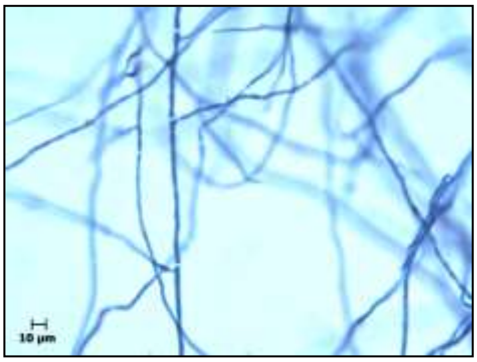
(7) ที่อยู่อาศัย บนชั้นดินที่มีซากฮิวมัส

(8) ข้อมูลการกินได้ มีข้อมูลว่ากินได้

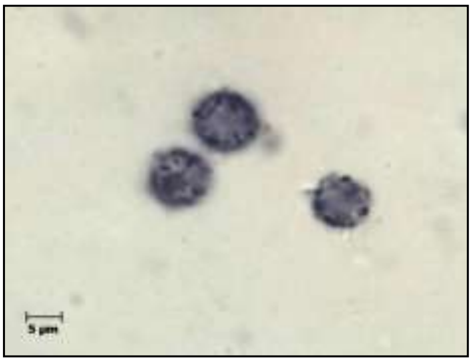
(1) ลักษณะของหมวกเห็ด

(2) ลักษณะของครีบ และ (3) ก้าน

ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA เป็นสีขาวฟู



(4) ลักษณะเส้นใย (40X) แบบ simple septa



(5) ลักษณะสปอร์ (100X) และการทำปฏิกิริยากับ Melzer'reagent: Amyloid

ภาพ 11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด *Hygrocybe calyptraefoemis*

Grifola gigantea

Order: Polyporales

Family: Polyporaceae

Scientific name: *Grifola gigantea*

Common Name: เห็ดกุหลาบ

(1) **ลักษณะของหมวกเห็ด**

ขนาด ϕ 6 – 15 cm. สูง 3 – 6 cm. รูปร่าง คล้ายพุ่มดอกไม้

เมื่อมองจากทางด้านบน คล้ายดอกกุหลาบ ขึ้นซ้อนกัน ผิวขอบหมวก ไม่เรียบ บาง สีน้ำตาลแดง ผิวของหมวกหมวก สีน้ำตาลแดงปนขาว เรียบ บางและเหนียว

(2) **ลักษณะของครีบ**

รูปแบบของครีบ เรียบเป็นเนื้อเดียวกันสีเดียวกับดอก

(3) **ลักษณะของก้าน** ไม่มีก้าน

(4) **ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์**

เป็นแบบมี clamps connection ชัดเจน ผนังบาง แตกแขนงเล็กน้อย 1-2 แขนง

(5) **ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์**

สีของสปอร์บนกระดาษเป็น สีขาว รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทรงรีกว้าง (Broadly ellipsoid) เรียบ (Smooth) ขนาด กว้าง 3-5 ยาว 5-7 μm

การทำปฏิกิริยากับสี Melzer'reagent: inamyloid

(6) **ลักษณะการติดของดอกเห็ดบนท่อนไม้**

ฐานดอกยึดติดกับเนื้อไม้หรือพื้นดินที่มีซากใบไม้ต่างๆ

(7) **ลักษณะการเจริญของดอกเห็ด**

เจริญเป็นดอกเดี่ยว ขึ้นซ้อนกัน

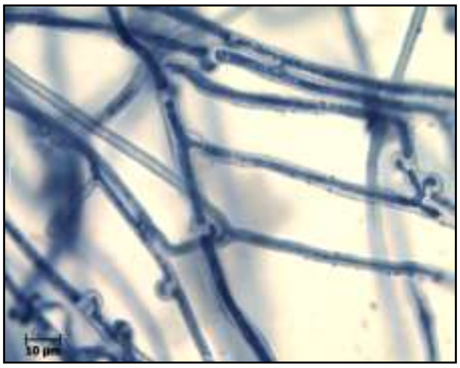
(8) **ที่อยู่อาศัย** บนเนื้อไม้หรือพื้นดินที่มีซากใบไม้ต่างๆ

(9) **ข้อมูลการกินได้** ไม่มีข้อมูลว่ากินได้

(1) ลักษณะของหมวกเห็ด

(2) ลักษณะของครีบ

ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA เป็นสีขาวฟู



(4) ลักษณะเส้นใย (40X)
แบบ clamps connectio

(5) ลักษณะสปอร์ (100X) และการทำ
ปฏิกิริยากับ Melzer'reagent: inamyloid

ภาพ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด *Grifola gigantea*

Megacollybia platyphylla

Order: Agaricales Family: Tricholomataceae

Scientific name: *Megacollybia platyphylla* Common Name: -

(1) ลักษณะของหมวกเห็ด

ขนาด ϕ 2 – 5 cm. รูปร่าง แบนคล้ายพัดรูปทรงไม่แน่นอน เมื่อมองจากทางด้านบน เรียบแบน ตรงกลางดอกสีเข้มกว่าขอบดอก ผิวดอกนุ่มเรียบ คล้ายกำมะหยี่ เปียกชื้น สีเดียวกันทั้งดอก มีรัศมีเป็นเส้นบาง ๆ รอบดอก ขอบเรียบ ดอกค่อนข้างหนา ดอกแก่ตรงกลางดอกจะเป็นแอ่งเว้าลงไป ผิวดอกเป็นลายตาข่ายบาง ดอกอ่อนสีเทาเข้ม

(2) ลักษณะของครีบ

การติดของครีบกับก้าน ครีบติดก้าน ขอบของครีบ ขอบเรียบ สีขาว ระยะห่างระหว่างครีบ 2-3 mm. รูปแบบของครีบ ค่อนข้างห่างและหนา ครีบสลับสั้นยาว คล้ายซ้อม

(3) ลักษณะของก้าน

ขนาด กว้าง 0.1 – 0.2 ยาว 0.3 – 0.4 cm. การติดของก้านกับหมวกเห็ด ติดกลางดอก รูปร่างของก้าน ก้านสั้นและแบน ผิวของก้าน สีน้ำตาลเข้ม เนื้อในของก้าน สีน้ำตาล

(4) ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เป็นแบบมีผนังกั้น (Simple septa) ผนังบาง แคบ แตกแขนงเล็กน้อย 1-2 แขนง

(5) ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สีของสปอร์บนกระดาษเป็น สีขาว รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รูปร่าง ทรงกลม (Globose) เรียบ (Smooth) มีขั่ว (Hilar appendage) ขนาด กว้าง 9–12 ยาว 10–13 µm การทำปฏิกิริยากับสี Melzer'reagent: inamyloid

(6) ลักษณะการติดของดอกเห็ดบนท่อนไม้

ดอกชูขึ้นเหนือขอนไม้

(7) ลักษณะการเจริญของดอกเห็ด

เจริญเป็นดอกเดี่ยว

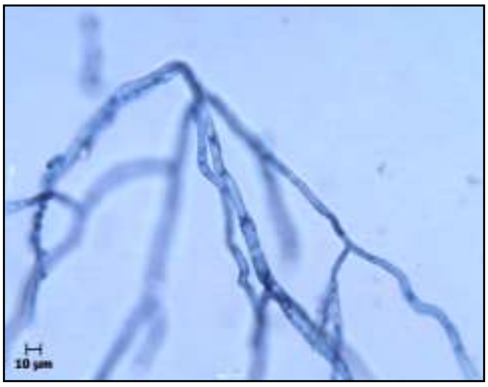
(8) ที่อยู่อาศัย บนไม้เนื้อแข็ง

(9) ข้อมูลการกินได้ ไม่มีข้อมูลว่ากินได้

(1) ลักษณะของหมวกเห็ด

(2) ลักษณะของครีบ และ (3) ก้าน

ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA เป็นสีน้ำตาลฟู



(4) ลักษณะเส้นใย (40X) เป็นแบบ simple septa

(5) ลักษณะสปอร์ (100X) และการทำปฏิกิริยากับ Melzer'reagent: inamyloid

ภาพ 13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด *Megacollybia platyphylla*

Microporus xanthopus

Order: Polyporales

Family: Polyporacea

Scientific name: *Microporus xanthopus*

Common Name: กรวยทองตะกู

(1) ลักษณะของหมวกเห็ด

ขนาด ϕ 2-4 cm. หนา 2-3 mm. รูปร่างคล้ายถ้วยก้นแบนหรือกรวย ปากกว้าง เมื่อมองจากทางด้านบน กลมแบนตรงกลางเป็นหลุม ผิวขอบหมวก เป็นรอยหยักหรือคลื่น ขอบสีขาว มีรัศมีละเอียดรอบดอก ผิวของหมวก เรียบ บาง เหนียว มีรัศมีเป็นชั้นสีน้ำตาลเข้มและน้ำตาลอ่อน

(2) ลักษณะของรูสปอร์

รู ยาว 0.5 – 1 mm. สีขาวหม่น รูเล็กละเอียด

(3) ลักษณะของก้าน

ขนาด 0.1 – 0.2 ยาว 0.3 – 0.4 cm. การติดของก้านกับหมวกเห็ด รูปร่างของก้าน ก้านทรงกระบอก สั้น โคนแผ่เป็นแป้นวงกลมเล็ก ๆ ผิวของก้าน แห้ง เรียบ เนื้อในของก้านเนื้อเหนียวขาว

(4) ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เป็นแบบมี clamps connection ผนังบาง แตกแขนงเล็กน้อย 1-2 แขนง

(5) ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

-

(6) ลักษณะการติดของดอกเห็ดบนท่อนไม้

ก้านชูดอกขึ้นเหนือขอนไม้

(7) ลักษณะการเจริญของดอกเห็ด

เดี่ยวหรือกลุ่ม

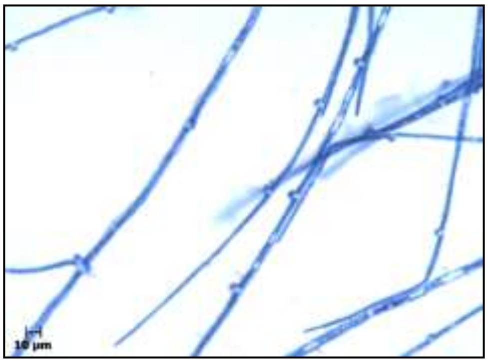
(8) ที่อยู่อาศัย กิ่งไม้แห้งหรือขอนไม้

(9) ข้อมูลการกินได้ ไม่มีข้อมูลว่ากินได้

(1) ลักษณะของหมวกเห็ด

(2) ลักษณะของรู และ (3) ก้าน

ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA เป็นสีขาวฟู



(4) ลักษณะเส้นใย (40X) แบบ clamps connection

ภาพ 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด ***Microporus xanthopus***