อ.สัญ
TCI 1

วารสารวิชาการ

สมาคมสถาบันอุดมศึกษาเอกชนแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

APHEIT JOURNAL

ISSN : 2286-9514 ปีที่ 8 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2562 Vol. 8 No. 2 JULY - DECEMBER 2019

การแสดงออกของยีน *atzA* และประสิทธิภาพในการย่อยสลายอาทราซีนของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่คัดแยกจากดินเพาะปลูกพืช

The *atzA* gene Expression and Atrazine Degrading Efficiency of *Trichoderma* spp. Isolates from Agricultural Soil

กัญ อนันตสมบูรณ์[1] , **อินทิรา แถมพยัคฆ์**[2]

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต[1,2]

Gun Anantasomboon[1], Intira Tampayak[2]

Faculty of Science, Rangsit University[1,2]

E-mail: gun.a@rsu.ac.th[1]

E-mail: intira.t@rsu.ac.th[2]

Received: June 14, 2019; Revised: November 12, 2019; Accepted: November 14, 2019

บทคัดย่อ

ราไตรโคเดอร์มาเป็นเชื้อราผิวดินที่พบในเขตร้อนชื้น มักถูกนำไปใช้ทางชีวภาพเพื่อควบคุมเชื้อราชนิดอื่นที่ทำให้เกิดโรคในพืชเศรษฐกิจและยังใช้ย่อยสลายสารเคมีทางการเกษตรหลายชนิด อาทราซีนเป็นยาปราบวัชพืชที่นิยมนำมาใช้ในไร่เพาะปลูกอ้อย ข้าวโพดและข้าวฟ่าง ซึ่งทำให้เกิดปัญหาพิษตกค้างและการปนเปื้อนสารอาทราซีนในสิ่งแวดล้อม การศึกษาวิธีบำบัดทางชีวภาพโดยใช้จุลชีพต่าง ๆ เพื่อกำจัดอาทราซีนที่ปนเปื้อนในดินและน้ำยังคงมีรายงานศึกษาอย่างต่อเนื่อง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *atzA* ของราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินเพาะปลูกพืชไร่และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายอาทราซีนของตัวอย่างราที่คัดแยกได้เปรียบเทียบกับราที่ไม่ทนทานอาทราซีน จากการแยกเชื้อราในตัวอย่างดินเพาะปลูกข้าวโพดในเขตจังหวัดนครปฐมและกาญจนบุรีจำนวน 40 ไอโซเลตนำมาเพาะเลี้ยงในวุ้นเลี้ยงเชื้อราดัดแปลงเติมอาทราซีน (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 14 วัน พบว่ามีราจำนวน 8 ไอโซเลตรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ดี จึงนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *atzA* โดยวิธี RT-PCR และประสิทธิภาพในการย่อยสลายอาทราซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อรา Czapek-dox Broth และวิธี HPLC ตามลำดับ ผลการศึกษาโดยวิธี RT-PCR พบการแสดงออกของยีน *atzA* ในตัวอย่างราที่คัดเลือกมาจำนวน 6 ไอโซเลต จากนั้นทดสอบคุณสมบัติการย่อยอาทราซีนในหลอดทดลองเป็นเวลา 30 วัน พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายอาทราซีนของรา 6 ไอโซเลตที่ถูกคัดเลือกเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 28.26 แตกต่างจากรา 2 ไอโซเลตซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 9.43 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กล่าวโดยสรุป ความสามารถในการย่อยสลายอาทราซีนของราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากการวิจัยนี้อาจเป็นประโยชน์ต่อภาคเกษตรกรรมและสิ่งแวดล้อมสำหรับการนำไปใช้ลดหรือย่อยสลายอาทราซีนในดินที่ปนเปื้อน

คำสำคัญ: เชื้อรา ไตรโคเดอร์มา อาทราซีน ยีน *atzA*

ABSTRACT

Trichoderma species (*Trichoderma* spp.) are tropical fungi currently used as biological control agent due to their ability to antagonize other plant pathogenic fungi, as well as to degrade some agrochemicals. Among herbicides, atrazine, is intensively used in sugarcane, corn and sorghum fields. Due to the toxicity and persistence of atrazine in the environment, bioremediation using microorganisms has been studied to remove atrazine from contaminated soil and water. This study aimed to investigate the expression of *atzA* gene in *Trichoderma* spp. isolated from soil and examine the unique capability in atrazine degradation or toleration compared to intolerant fungi. Fourty isolates of fungal strain from corn fields in Nakornpathom and Karnjanaburi provinces were cultured in modified medium agar containing 50 mg/L of atrazine for 14 days. The expression of *atzA* gene and atrazine degrading efficiency of eight survival isolates were then determined by using RT-PCR and Czapek dox Broth culture followed by HPLC, respectively. According to RT-PCR analysis, *atzA* gene was expressed in six fungus isolates. All isolates were then measured in terms of the atrazine degradation efficiency *in vitro* for 30 days. The results showed that six selected isolates significantly degraded atrazine by 28.26% compared with another 2 isolates (9.43%) ($p<0.05$). In conclusion, the atrazine degradation ability of *Trichoderma* spp. isolated from this study could have benefits for agriculture and global environment to reduce or degrade atrazine in contaminated soil.

KEYWORDS: fungus, Trichoderma, atrazine, *atzA* gene

บทนำ

เกษตรกรรมในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีสำหรับกำจัดวัชพืชและแมลงศัตรูพืชเป็นปริมาณมาก ก่อให้เกิดปัญหาสารเคมีตกค้างและปนเปื้อนในดินตลอดจนผลผลิตพืชซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ยังลดความสามารถของราในดินที่ใช้ควบคุมการเกิดโรคพืช (Biocontrol) ในพื้นที่การเกษตร สารเคมีกำจัดวัชพืชที่ใช้กันมากในพื้นที่การเกษตรของประเทศไทยได้แก่ อาทราซีน (Atrazine, 2-chloro-4-(ethylamino-6-(isopropylamino-s-triazine) (National Center for Biotechnology Information, 2019) ซึ่งพบตกค้างและปนเปื้อนอยู่ในน้ำใต้ดินและน้ำดื่ม มีผลต่อเด็กแรกเกิดทำให้

ตัวเล็ก น้ำหนักคลอดต่ำกว่าเกณฑ์ มีผลต่อระบบต่อมไร้ท่อ และอาจเป็นสารก่อมะเร็ง (Hayes et al., 2002) ผลกระทบต่อสุขภาพที่ร้ายแรงเหล่านี้ทำให้อาทราซีนถูกห้ามใช้ในภาคเกษตรกรรมของหลายประเทศในทวีปยุโรป จากข้อมูลของกรมวิชาการเกษตร (2550) (การนำเข้าสารอาทราซีนในปี 2550) ระบุว่าประเทศไทยได้นำเข้าสารกำจัดวัชพืชในปริมาณที่มีมูลค่าสูง โดยอาทราซีนมีปริมาณการนำเข้าเพิ่มสูงขึ้นทุกปีติดอันดับหนึ่งในสิบของโลก จึงจำเป็นต้องหาวิธีการกำจัดหรือย่อยสลายสารอาทราซีน โดยอาจใช้ประโยชน์จากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินซึ่งช่วยกำจัดสารอาทราซีนได้เร็วขึ้น จากรายงานของ Alabouvette, Olivain, and Steinberg (2006) พบว่าจุลินทรีย์บางกลุ่มสามารถย่อยสลายสารตกค้างเหล่านี้ได้ โดยมีทั้งที่เป็นราและแบคทีเรียซึ่งพบในเขตภูมิอากาศอบอุ่นแถบยุโรป เช่น Aspergillus, Rhizopus, Fusarium, Pseudomonas, Agrobacterium, Clavibacter, Arthrobacter และ *Escherichia coli* จากรายงานวิจัยของ Solomon, Kumar, and Santhi (2013) ทั้งนี้ยังขาดข้อมูลด้านชนิดและสายพันธุ์ราที่พบในเขตร้อนชื้นที่มีคุณสมบัติย่อยสารเคมีตกค้างทางการเกษตรกรรม รายงานของ Cai, Han, Liu, Ren, and Jiang (2003) ได้ทำการแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในย่อยสลายสารอาทราซีนในน้ำทิ้งจากโรงงานที่ผลิตสารอาทราซีนในประเทศจีนพบว่า Arthrobacter sp. มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารอาทราซีนโดยใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจน นอกจากนี้ยังพบว่า *atrazine chlorohydrolase* gene (*atzA*) ของ Arthrobacter sp. ต่างกับที่พบใน Pseudomonas sp. จำนวนหนึ่งนิวคลิโอไทด์และยังพบว่ายีนนี้ตั้งอยู่บนโครโมโซมไม่ใช่พลาสมิดตามที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

ในปี ค.ศ. 2010 Sene, Converti, Secchi, and Simão (2010) ได้รายงานวิธีการย่อยสลายสารอาทราซีนในแบคทีเรียซึ่งโดยปกติจะเริ่มจากขบวนการ Hydrolytic Dechlorination โดยใช้เอนไซม์ atrazine chlorohydrolase (AtzA) ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน *atzA* จากนั้นจะเกิดขบวนการ Hydrolytic Deamination อีก 2 ขั้นตอนโดยใช้เอนไซม์ Hydroxyl-atrazineethylamino-hydrolase (AtzB) และ N-isopropyl-ammelide isopropyl–amino-hydrolase (AtzC) ซึ่งควบคุมโดยยีน *atzB* (*trzB*), *atzC* (*trzC*) ตามลำดับ ทำให้เกิดการเปลี่ยนสารอาทราซีนเป็นสาร cyanuric acid ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปอีกโดยอาศัยเอนไซม์ hydrolase อีก 3 ชนิด คือ cyanuric acid amidohydrolase (AtzD, biulet aminohydrolase (AtzE) และ allophanate hydrolase (AtzF) ได้เป็น CO_2 กับ NH_3 ซึ่งถือว่าไม่มีพิษตกค้าง

รายงานตีพิมพ์เกี่ยวกับเชื้อราสำคัญที่ใช้ควบคุมเชื้อก่อโรคในพืชเศรษฐกิจได้แก่ *Trichoderma* spp. กล่าวถึงรา *T. viridae* ซึ่งเป็นราในเขตอากาศอบอุ่นสามารถย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชอาทราซีนได้ (Muthuselvam & Arunkumar, 2009) ดังนั้นการคัดแยกสายพันธุ์รา *Trichoderma* spp. ที่สามารถย่อยสลายหรือทนทานต่ออาทราซีนที่ตกค้างในดินหรือการพัฒนาสายพันธุ์รา *Trichoderma* spp. ใหม่จากสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากพื้นที่เกษตรกรรมของประเทศที่มีภูมิอากาศในเขตร้อนชื้นอาจทำให้ได้สายพันธุ์ราที่สามารถทนทานและเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ปนเปื้อนอาทราซีนของประเทศไทยจึงเป็นที่มาของการทำการศึกษาวิจัยนี้

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *atzA* ของราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินเพาะปลูกพืชไร่เขตภาคกลางของประเทศไทย และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายอาทราซีนของตัวอย่างราที่คัดแยกได้เปรียบเทียบกับราที่ไม่ทนทานอาทราซีน

ประโยชน์ที่ได้รับ

สามารถอธิบายคุณสมบัติของราเขตร้อนชื้นสายพันธุ์ไตรโคเดอร์มาที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินที่ปนเปื้อนหรือเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาทราซีนปริมาณสูง และเป็นพื้นฐานนำไปสู่การคัดเลือกสายพันธุ์ราที่ใช้เร่งการย่อยสลายสารอาทราซีนที่ตกค้างในดินเกษตรกรรม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บและเตรียมตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินซึ่งนำมาใช้คัดแยกเชื้อราเก็บจากแปลงเพาะปลูกข้าวโพดในอำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม อำเภอท่าม่วงและอำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งมีประวัติการใช้สารกำจัดวัชพืชอาทราซีนต่อเนื่องกันมากกว่า 5 ปี รวม 6 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินจากพื้นที่ที่ไม่มีประวัติการใช้อาทราซีนเลยเป็นดินกลุ่มควบคุม ตัวอย่างดินแต่ละแห่งจะเก็บประมาณ 1 กิโลกรัม โดยเก็บจากผิวหน้าดินลึกลงไปไม่เกิน 10 เซนติเมตร นำมาผสมและคลุกเคล้าให้เข้ากันอย่างดี กรองด้วยตะแกรงรูเล็กประมาณ 2 มิลลิเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. การคัดแยกรา *Trichoderma* spp. จากดิน

นำดินประมาณ 50 กรัมจากแต่ละแหล่ง (7 ตัวอย่าง) มาเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 25 มิลลิลิตร เพื่อปรับความชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันก่อนนำไปคัดแยกราโดยวิธี Dilution Plate Technique (เกลี่ยสารละลายดินปริมาตร 0.5, $0.5x10^{-1}$, $0.5x10^{-2}$ มิลลิลิตร) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Martins'agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันจนราเจริญเติบโต

จำแนกสกุลรา *Trichoderma* spp. เบื้องต้น ตามลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น รูปร่าง ขนาด และสีของโคโลนีเปรียบเทียบกับราสกุล *Trichoderma* spp. ที่ได้แยกเพาะเลี้ยง (Pure Culture) เพื่อเป็นสายพันธุ์อ้างอิงซึ่งมีสีขาว ขาวอมเหลือง เขียวเข้มหรือเทา (Howell, 2003) ที่เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันและมีอายุใกล้เคียงกัน

3. การคัดเลือกรา *Trichoderma* spp. ที่ทนต่ออาทราซีน

คัดเลือกรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตซึ่งมีความทนทานต่อสารอาทราซีน โดยเขี่ยเส้นใยไว้ตรงกลางบนอาหารแข็ง Czapek-dox (ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาล D-glucose 1%; w/v) ผสมด้วยอาทราซีนในปริมาณ 0 (Control) และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเป็นปริมาณที่สูงซึ่งใช้คัดกรองราที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารแข็ง บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน

4. การสกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อรา

นำเส้นใยเชื้อราที่เจริญเติบโตดีบนอาหารแข็ง โดยการเขี่ยด้วยปลายไปเปตทิปปริมาณเท่าๆ กันใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม

Liquid Nitrogen บดให้เป็นผงละเอียด เติม Lysis Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ DNase (เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บดให้เข้ากันอีกครั้ง เทส่วนผสมทั้งหมดลงใน micro-tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการสกัด total RNA ด้วยวิธี phenol/chloroform extraction (Chomczynski & Sacchi, 1987) เก็บสารสกัด RNA ที่ -70 องศาเซลเซียส

5. การตรวจวิเคราะห์ยีน *atzA* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายอาทราซีน

ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *atzA* ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ชุดตรวจสอบปฏิกิริยาเพิ่มสารพันธุกรรมจากสารสกัด RNA: SuperScript III One-Step RT-PCR commercial kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), oligodT primer และ primers จำเพาะสำหรับยีน *atzA* (อ้างอิงจากงานวิจัยของ De Souza, Seffernick, Martinez, Sadowsky, and Wackett (1998) และงานวิจัยของ De Souza, Wackett, and Sadowsky (1998) สำหรับขั้นตอน PCR และ PCR condition ที่ใช้กำหนดตามที่ระบุไว้ในผลงานตีพิมพ์โดย Arbeli and Fuentes (2010) และเลือกใช้จำนวนรอบทำปฏิกิริยา PCR 40 รอบ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง specific primers ที่ออกแบบจำเพาะต่อยีน *atzA* สำหรับใช้ตรวจสอบตัวอย่างราที่เจริญได้ดีบนอาหารที่มีอาทราซีน

atzA-F primer: 5' CCATGTGAACCAGATCCT 3'
atzA-R primer: 5' TGAAGCGTCCACATTACC 3'

6. การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายอาทราซีนในหลอดทดลอง

ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายอาทราซีนของราไตรโคเดอร์มาที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา Czapek Dox Broth (เตรียม Czapek Dox Broth ปริมาตร 2.5 ลิตร) ทำการเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อราวันที่ 0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (Control day0) จากนั้นทำการเขี่ยเชื้อราไตรโคเดอร์มาในดินจำนวน 8 ไอโซเลตที่มีความทนทานต่ออาทราซีนซึ่งคัดแยกได้จากขั้นตอนที่ 2 และ 3 ด้วยลวดเขี่ยเชื้อปริมาณเท่าๆ กันแยกใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา Czapek Dox Broth ปริมาตร 250 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสวางบนเครื่องเขย่าขวดเพาะเลี้ยงเชื้อ เขย่าอย่างเบาตลอดเวลาที่ทำการทดสอบ เติมสารอาทราซีนในวันที่ 3 ภายหลังจากลงเชื้อราตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 35 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเป็นปริมาณที่พบว่าสารประกอบอาทราซีนที่ใช้ในการทดสอบจะสามารถละลายได้หมดเป็นเนื้อเดียวกับอาหารเหลว ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราต่อจนครบ 30 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อราไอโซเลตที่เจริญเติบโตได้ดีที่วันที่ 30 ของการทดลอง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองแยกเอาเฉพาะอาหารเหลวส่วนใส ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณอาทราซีนที่เหลือโดยวิธี Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในคอลัมน์ (ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร) ส่วนตัวทำละลาย (Mobile Phase) ประกอบด้วย acetonitrile และน้ำกลั่น อัตราส่วน 55 : 45 โดย

ปริมาตร อัตราการไหลผ่าน (Elution Rate) ที่ใช้เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับอาหารเหลวแต่ละตัวอย่างจะผสมกับ Acetonitrile ให้ได้อัตราส่วน 45 : 55 โดยปริมาตรก่อนนำมาวิเคราะห์ ทำการวัดค่าซ้ำ 3 ครั้งสำหรับแต่ละตัวอย่างโดยใช้สารละลายอาทราซีนมาตรฐานความเข้มข้น 1, 0.1, และ 0.01 มิลลิโมลาร์ (mM) ใน acetonitrile และน้ำกลั่น อัตราส่วน 55 : 45 เป็นตัวตรวจสอบเปรียบเทียบตามที่ระบุไว้ในผลงานตีพิมพ์โดย Khromonygina, Saltykova, Vasil chenko, Kozlov, and Rabinovich (2003)

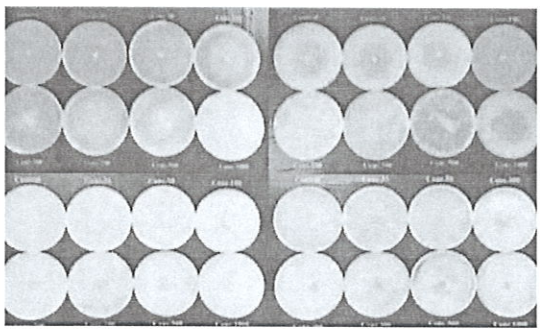
7. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลปริมาณอาทราซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ตรวจวัดได้ไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean, SD, SEM) พร้อมกับวิเคราะห์ผลทางสถิติ สำหรับการเปรียบเทียบปริมาณสารอาทราซีนที่ตรวจวัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อราก่อนและหลังการทดลองกับเชื้อราไตรโคเดอร์มาแต่ละไอโซเลตใช้การทดสอบทีแบบจับคู่ (Paired t-test) ส่วนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการย่อยสลายสารอาทราซีน (ร้อยละ) ของเชื้อรากลุ่มที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *atzA* เปรียบเทียบกับเชื้อรากลุ่มที่ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีน *atzA* ใช้การทดสอบทีแบบกลุ่มตัวอย่างอิสระกัน (Independent Sample t-test)

ผลการวิจัย

1. ผลการคัดแยกราจากดินพื้นที่ทำการเกษตรกรรมที่ปนเปื้อนอาทราซีน

จากการคัดแยกเชื้อราในตัวอย่างดินจากไร่ข้าวโพดที่มีประวัติปนเปื้อนอาทราซีนเป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 5 ปี จำนวน 6 แหล่ง สามารถคัดแยกเชื้อราได้ 40 ไอโซเลตที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Martins'agar ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ดังภาพที่ 1



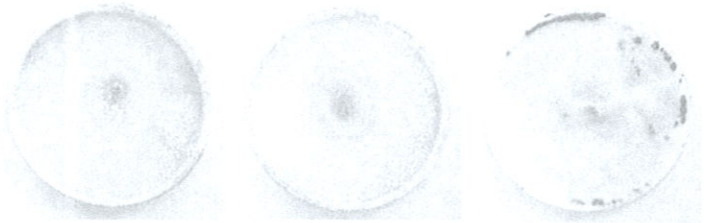
ภาพที่ 1 แสดงราจำนวน 32 ไอโซเลตจาก 40 ไอโซเลตที่สามารถคัดแยกได้จากตัวอย่างดินเพาะปลูกข้าวโพดที่มีประวัติปนเปื้อนสารอาทราซีนในงานวิจัยนี้

ที่มา: จากผู้เขียน

2. การคัดเลือกราที่ทนต่ออาทราซีน

การคัดเลือกเชื้อราที่แยกได้จากขั้นตอนแรกด้วยวิธี Enrichment Culture เมื่อครบ 14 วัน สามารถคัดแยกราจำนวน 8 ไอโซเลตซึ่งเจริญเติบโตได้ดี มีความทนทานต่อสารอาทราซีนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมลิตรบนอาหารแข็ง

Czapek-dox ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเส้นใยของราทั้ง 8 ไอโซเลตที่คัดแยกได้มีความเหมือนกันทางด้านรูปร่างภายนอกกับ *Trichoderma* spp. ที่แยกเพาะเลี้ยง (Pure Culture) ไว้ใช้อ้างอิงเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังภาพที่ 2

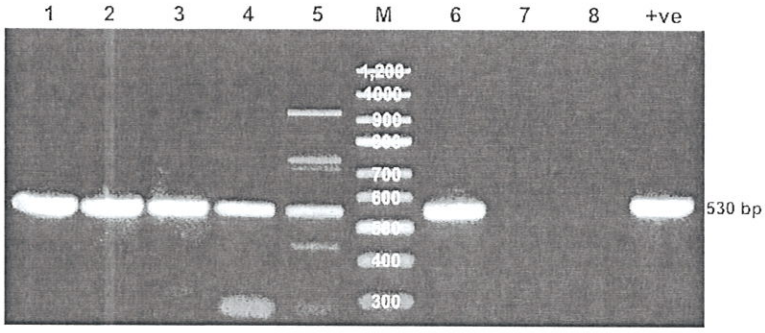


ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของตัวอย่างราที่มีความทนทานอาทราซีนบนอาหารแข็ง Czapek-dox ซึ่งมีอาทราซีนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ณ วันที่ 14 ของการทดสอบ

ที่มา: จากผู้เขียน

3. การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *atzA* ในราโซเลตที่มีความทนทานต่ออาทราซีน

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *atzA* ในตัวอย่างเชื้อราที่คัดเลือกทั้ง 8 ไอโซเลตที่ทนต่ออาทราซีนซึ่งคัดแยกได้จากขั้นตอนก่อนหน้าด้วยวิธี RT-PCR และ Agrarose Gel Electrophoresis ตรวจพบแถบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR Product) ขนาด 530 คู่เบส ในตัวอย่างเชื้อราไอโซเลตที่ 1-6 โดยไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวในตัวอย่างเชื้อราไอโซเลตที่ 7 และ 8 ดังแสดงในภาพที่ 3 แสดงให้ทราบว่ามีการแสดงออกของยีน *atzA* เฉพาะในตัวอย่างเชื้อราไอโซเลตที่ 1-6



ภาพที่ 3 แสดงผลการแยกแถบชิ้นส่วนยีน *atzA* ด้วยกระแสไฟฟ้ากับตัวอย่างราที่คัดแยกได้ซึ่งมีความทนทานต่ออาทราซีนทั้ง 8 ไอโซเลต โดยพบแถบผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 530 bp เฉพาะกับตัวอย่างราที่ 1-6 (ช่องหมายเลข 1-6, ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, ช่อง +ve คือ Recombinant Plasmid ใน *E. coli*)

ที่มา: จากผู้เขียน

4. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายอาทราซีน

ภายหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้จำนวน 8 ไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อรา Czapek Dox Broth ซึ่งมีอาทราซีน ความเข้มข้นเริ่มต้น 35.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 30 ของการทดลองไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอาทราซีนที่เหลืออยู่เปรียบเทียบกับตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เก็บก่อนลงเชื้อ (วันที่ 0) ด้วยวิธี HPLC จากการเปรียบเทียบปริมาณสารอาทราซีนที่ตรวจวัดได้หลังการทดลอง (วันที่ 30) โดยใช้ Paired t-test พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อราไตรโคเดอร์มาไอโซเลตทั้ง 8 ไอโซเลตมีปริมาณสารอาทราซีนลดลงเมื่อเทียบกับปริมาณเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการย่อยสลายสารอาทราซีนเป็นร้อยละของเชื้อรากลุ่มที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *atzA* (ไอโซเลตที่ 1-6) เปรียบเทียบกับเชื้อรากลุ่มที่ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีน *atzA* (ราไอโซเลตที่ 7 และ 8) โดยใช้ Independent Sample t-test พบว่าราไตรโคเดอร์มาจำนวน 6 จาก 8 ไอโซเลต (ตัวอย่างที่ 1 ถึง 6 ซึ่งตรวจพบการแสดงออกของยีน *atzA*) มีอัตราการย่อยสลายอาทราซีนได้เฉลี่ยร้อยละ 28.26 เมื่อเทียบกับปริมาณเริ่มต้น (วันที่ 0) และมีความสามารถย่อยสลายอาทราซีนได้ดีกว่าราไอโซเลตที่ 7 และ 8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งสามารถย่อยสลายสารอาทราซีนได้เฉลี่ยเพียงร้อยละ 9.43 ทั้งนี้ผู้วิจัยได้เก็บแยกอาหารเลี้ยงเชื้อราก่อนลงเชื้อ (วันที่ 0) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วันก่อนนำมาวิเคราะห์หาปริมาณของอาทราซีนที่หลงเหลืออยู่พร้อมกับตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เก็บหลังจากการบ่มเพาะเชื้อครบ 30 วัน พบว่าสารอาทราซีนที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา (วันที่ 0) ยังคงมีค่าเท่ากับ 35.0 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยไม่มีการย่อยสลายในสารละลาย Czapek Dox Broth ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 4

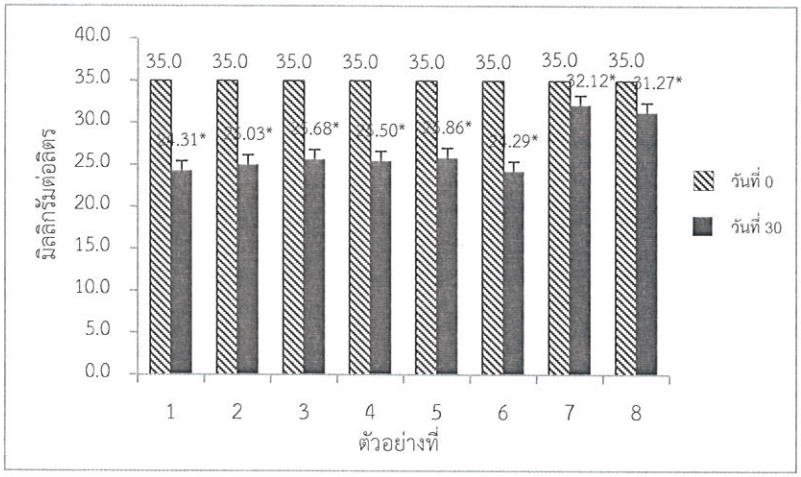
ตารางที่ 2 แสดงปริมาณอาทราซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินทำการเกษตรทั้ง 8 ไอโซเลต โดยวิธี HPLC เปรียบเทียบระหว่างวันแรก (วันที่ 0) และวันที่ 30 ของการทดลอง (หน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร)

ตัวอย่างที่ 1-6 ตรวจพบยีน *atzA*	วันที่ 0	วันที่ 30			ค่าเฉลี่ย	SD
		#1	#2	#3		
1	35.00	24.52	24.13	24.28	24.31*	0.20
2	35.00	25.11	25.04	24.93	25.03*	0.09
3	35.00	25.52	25.87	25.64	25.68*	0.18
4	35.00	25.48	25.62	25.41	25.50*	0.11
5	35.00	25.74	25.89	25.96	25.86*	0.12
6	35.00	24.23	24.34	24.31	24.29*	0.06

ตัวอย่างที่ 1-6 ตรวจพบยีน *atzA*	วันที่ 0	วันที่ 30			ค่าเฉลี่ย	SD
		#1	#2	#3		
		ค่าเฉลี่ยรวม			25.11*	
		คิดเป็นร้อยละการย่อยสลาย			28.26**	
ตัวอย่างที่ 7 และ 8 ตรวจไม่พบยีน *atzA*						
7	35.00	32.05	32.51	31.82	32.12*	0.35
8	35.00	31.01	31.87	30.93	31.27*	0.52
		ค่าเฉลี่ยรวม			31.69*	
		คิดเป็นร้อยละการย่อยสลาย			9.43	

*พบความแตกต่างของปริมาณสารอาทราซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อราเปรียบเทียบระหว่างหลังการทดสอบวันที่ 30 และก่อนการทดสอบ (วันที่ 0) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**พบความแตกต่างของการย่อยสลายสารอาทราซีน (ร้อยละ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อราเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างรากลุ่มที่พบการแสดงออกของยีน *atzA* (ตัวอย่างที่ 1-6) และรากลุ่มที่ไม่พบการแสดงออกของยีน *atzA* (ตัวอย่างที่ 7 และ 8) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

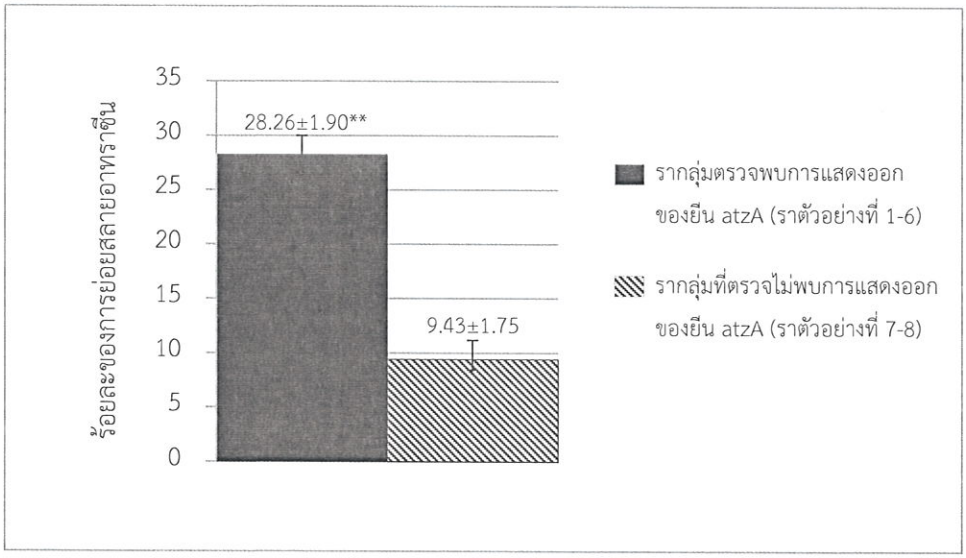


ภาพที่ 4 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณอาทราซีนที่ตรวจวัดได้ (Mean ± SEM) ในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่นำมาทดสอบจำนวน 8 ไอโซเลต เปรียบเทียบระหว่างก่อนการทดสอบ (วันที่ 0) และภายหลังใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 30 วัน (วันที่ 30)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ของชิ้นส่วนยีน *atzA* จากราเขตร้อนจำนวน 6 ไอโซเลตซึ่งแยกได้จากดินไร่ข้าวโพดในจังหวัดนครปฐมและกาญจนบุรีซึ่งปนเปื้อนสารอาทราซีนเป็นเวลานานและมีความทนทานเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อราที่มีอาทราซีนปริมาณสูง (50 มิลลิกรัม/ลิตร) โดยราทั้ง 6 ไอโซเลตมีลักษณะ

รูปร่างภายนอกและสีของเส้นใยตรงกับราสายพันธุ์ *Trichoderma* sp. จากการทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายอาทราซีนในหลอดทดลองพบว่าราทั้ง 6 ไอโซเลตมีความสามารถใช้หรือย่อยสลายอาทราซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 28.26 แตกต่างจากรา อีก 2 ไอโซเลตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งมีความสามารถใช้หรือย่อยสลายอาทราซีนได้เพียงร้อยละ 9.43 และเป็นตัวอย่างราไตรโคเดอร์มากลุ่มที่ตรวจไม่พบชิ้นส่วนยีน *atzA* ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวสอดคล้องกับวิธีการย่อยสลายสารอาทราซีนในแบคทีเรียซึ่งโดยปกติจะเริ่มจากขบวนการ Hydrolytic Dechlorination โดยใช้เอนไซม์ Atrazine Chlorohydrolase (AtzA) ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน *atzA* จากนั้นจะเกิดขบวนการ Hydrolytic Deamination ต่อเนื่องอีก 2 ขั้นตอน จนทำให้เกิดการเปลี่ยนสารอาทราซีนเป็นสาร Cyanuric Acid ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปอีกจนท้ายสุดได้เป็นน้ำ (CO_2) และแอมโมเนีย (NH_3) จึงจะถือว่าไม่มีพิษตกค้างในดิน (Sene et al., 2010) ผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถอธิบายคุณสมบัติของสายพันธุ์ราเขตร้อนชื้นที่คัดเลือกได้จากดินเพาะปลูกข้าวโพดในเขตจังหวัดนครปฐมและกาญจนบุรีซึ่งมีความทนทานและสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาทราซีนปริมาณสูงในขั้นการทดลอง ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละของการย่อยสลายอาทราซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อรา (Mean ± SD) ที่คัดแยกได้ในหลอดทดลองเป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบระหว่างรากลุ่มที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *atzA* (ตัวอย่างที่ 1-6) และกลุ่มที่ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ (ตัวอย่างที่ 7-8)

ข้อเสนอแนะ

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานผลวิจัยนี้นำไปสู่การคัดเลือกสายพันธุ์ราสกุลเดี่ยวกลุ่มไตรโคเดอร์มาที่มีคุณสมบัติพิเศษสามารถนำไปใช้ควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช (Howell, 2003) รวมถึงใช้เร่งการย่อยสลายสารอาทราซีนที่ตกค้างในดินพื้นที่ทำเกษตรกรรมได้ (Pelcastre et al., 2013) ทั้งนี้ควรทำการศึกษาวิจัยต่อเนื่องเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมกระบวนการย่อยสลายสารอาทราซีนในขั้นตอนต่อเนื่องจากเอ็นไซม์ AtzA

ได้แก่ยีน *atzB* และ *atzC* ซึ่งควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ Hydroxyl-atrazineethylamino-hydrolase (AtzB) และ N-isopropyl-ammelide isopropyl-amino-hydrolase (AtzC) ตามลำดับ (Sene et al., 2010) เพื่อติดตามความสมบูรณ์ของกระบวนการกำจัดสารอาทราซีนในดินหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปนเปื้อนของราไตรโคเดอร์มาที่คัดแยกได้จากงานวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

งานศึกษาวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำงานวิจัยจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต รหัสโครงการวิจัยเลขที่ 7/54 ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. (2550). การนำเข้าสารอาทราซีนในปี 2550. สืบค้นเมื่อ 10 เมษายน 2562 จาก http://digi.library.tu.ac.th/thesis/st/0326/10CHAPTER_2.pdf.

Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: The European situation. *European Journal of Plant Pathology, 114*(3), 329-341.

Arbeli, Z., & Fuentes, C. (2010). Prevalence of the gene trzN and biogeographic patterns among atrazine-degrading bacteria isolated from 13 Colombian agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology, 73*(3), 611-623.

Cai, B., Han, Y., Liu, B., Ren, Y., & Jiang, S. (2003). Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China. *Letters in Applied Microbiology, 36*(5), 272-276

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry, 162*(1), 156-159.

De Souza, M. L., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (1998). The atrazine catabolism genes atzABC are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology, 180*(7), 1951-1954.

De Souza, M. L., Wackett, L. P., & Sadowsky, M. J. (1998). The atzABC genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology, 64*(6), 2323-2326.

Hayes, T. B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. A., & Vonk, A. (2002). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences, 99(8), 5476-5480.

Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease. 87*(1), 4-10.

Khromonygina, V. V., Saltykova, A. I., Vasil chenko, L. G., Kozlov, Iu. P., & Rabinovich, M. L. (2004). Degeneration of the herbicide atrazine by the soil Mycelial fungus INBI 2-26 (-), a producer of cellobiose dehydrogenase. *Applied Biochemistry and Microbiology, 40*(3), 285-290.

Muthuselvam, M., & Arunkumar, S. (2009). Biological degradation of herbicide (atrazine using Pseudomonas aeruginosa and Trichoderma viridae. *Journal of Pure and Applied Microbiology, 3*(2), 661-666.

National Center for Biotechnology Information. (2019). Atrazine. สืบค้นเมื่อ 13 มิถุนายน 2562 จาก https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atrazine.

Pelcastre, M. I., Ibarra, J. R. V., Navarrete, A. M., Rosas, J. C., Ramirez, C. A. G., & Sandoval, O. A. A. (2013). Bioremediation perspectives using autochthonous species of Trichoderma sp. for degradation of atrazine in agricultural soil form the Tulancingo valley, Hidalgo, Maxico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems, 16*(2), 265-276.

Sene, L., Converti, A., Secchi, G. A. R., & Simão, R. D. C. G. (2010). New aspects on atrazine biodegradation. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 53*(2), 487-496.

Solomon, R. D. J., Kumar, A., & Santhi, V. S. (2013). Atrazine biodegradation efficiency, metabolite detection, and trzD gene expression by enrichment bacterial cultures from agricultural soil. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 14*(12), 1162-1172.