



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลาย Methyltestosterone เพื่อกำจัดสารกระตุ้น
ลักษณะเพศชายที่ตกค้างในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Development of Methyltestosterone degrading inoculums for androgenic activity
removal in residue waste from aqua-culturing ponds

ดร.ภริณดา ทยานุกูล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

พฤษภาคม พ.ศ. 2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลาย Methyltestosterone เพื่อกำจัดสารกระตุ้น
ลักษณะเพศชายที่ตกค้างในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Development of Methyltestosterone degrading inoculums for androgenic activity
removal in residue waste from aqua-culturing ponds

ดร.ภริณดา ทยานุกุล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5980134

ชื่อโครงการ : การพัฒนาหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลาย Methyltestosterone เพื่อกำจัดสารกระตุ้นลักษณะเพศชายที่ตกค้างในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ชื่อนักวิจัย : ดร.ภรินดา ทยานุกุล มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

E-mail Address: Parinda.tha@kmutt.ac.th, P.Thayanukul@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : พฤษภาคม 2559 - พฤษภาคม 2561

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายสาร 17α -methyltestosterone (MT) จากตะกอนจากบ่อแปลงเพศปลานิลได้เชื้อจุลินทรีย์สามชนิด คือ *Nocardiodides* sp. S303, *Acinetobacter* sp. S051 และ *Ochrobactrum* sp. B052 ซึ่งมีค่า Specific degradation rate ที่ 1 mg/L เท่ากับ 0.07, 0.04, และ 0.02 h⁻¹ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10 mg/L เท่ากับ 0.17, 0.18, และ 0.11 h⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นต่ำ *Nocardiodides* sp. S303 มีความเร็วในการย่อยสลาย MT ที่มากที่สุด ส่วนในความเข้มข้นสูงนั้นมีความสามารถพอกันกับ *Acinetobacter* sp. B051 แต่เนื่องจาก *Acinetobacter* spp. เป็นจุลินทรีย์เชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมกลุ่มที่ 2 จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้งาน ดังนั้น *Nocardiodides* sp. S303 จึงมีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อย่อยสลาย MT ซึ่งพบว่าเชื้อ 303 สามารถย่อยสลาย Testosterone (T) ด้วยได้ในประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ MT คือ 95.2% ที่ 10 mg/L แต่ย่อยสลายฮอร์โมนกลุ่มเอสโตรเจน คือ estrone (E1), 17β -estradiol (E2), และ 17α -ethylestradiol (EE2) ได้เพียง 11 – 18% เชื้อ S303 มีความสามารถในการย่อยฮอร์โมนเพศชายได้อย่างจำเพาะเจาะจง นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบที่ในสภาวะมีสารอาหารอื่นซึ่งในที่นี้คือกลูโคส (10 Mg-C/L) พบว่าเชื้อสามารถย่อยสลายจนหมดสิ้นภายใน 60 ชั่วโมง ในอัตราการย่อยสลายจำเพาะที่ใกล้เคียงกันคือประมาณ 0.34 และ 0.36 h⁻¹ สำหรับสภาวะที่ไม่มีกลูโคสและมิกูโคสตามลำดับในที่ที่มีอากาศ แต่ไม่สามารถย่อยสลายได้ในสภาวะไร้อากาศ ภายหลังจากที่ MT สลายหมดไปในช่วงเวลาประมาณ 60 – 114 ชั่วโมงยังคงมีความมีความมียูทรีแอนโดรเจนคงอยู่ ซึ่งตรวจพบสาร Methandrostenolone เกิดขึ้นช่วงเวลา 21.5 - 90 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสารหนึ่งที่เป็นสาเหตุของความมีความมียูทรีแอนโดรเจนนี้ เมื่อทดสอบวัดความสามารถที่ 50 และ 150 µg/L MT ที่อยู่ในช่วงที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมไม่พบว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้กำจัด MT ได้ในช่วงเวลา 200 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ดังนั้นความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดนี้ที่จะย่อย MT ในสภาวะแวดล้อมจริงจำเป็นจะต้องมีการศึกษาต่อไป

คำหลัก : 17α -methyltestosterone (MT); ปลานิลแปลงเพศ; Androgenic Activity;

Nocardiodides sp.; Specific degradation rate

Abstract

Project Code : MRG5980134

Project Title : Development of Methyltestosterone degrading inoculums for androgenic activity removal in residue waste from aqua-culturing ponds

Investigator : Dr.Parinda Thayanukul

E-mail Address : Parinda.tha@kmutt.ac.th, P.Thayanukul@gmail.com

Project Period : May 2016 – May 2018

This study isolated 17 α -methyltestosterone (MT) degrading microorganisms from masculinization ponds of Nile tilapia. *Nocardioides* sp. S303, *Acinetobacter* sp. S051, and *Ochrobactrum* sp. B052 were obtained which have the specific degradation rate at 1 mg/L as 0.07, 0.04, and 0.02 h⁻¹ and at 10 mg/L as 0.17, 0.18, 0.11 h⁻¹, respectively. *Nocardioides* sp. S303 was the most efficient degraders at low concentration. Its ability was comparable to *Acinetobacter* sp. B051 at high concentration; however, *Acinetobacter* spp was not able to use for bioremediation because it was in pathogenic risk group 2 organism. *Nocardioides* sp. S303 was the most appropriate organism. This strain was capable of degrading Testosterone at similar level with MT which was 95.2% at 10 mg/L but it has low efficiency with estrogenic substances including estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), and 17 α -ethylestradiol (EE2) which was 11 – 18%. This strain was quite specialized in androgenic hormone degradation. Moreover, S303 could degrade MT in the presence of other substrate here glucose at 10 Mg-C/L. It degraded MT with the specific degradation rates similarly between without and with MT at 0.34 and 0.36 h⁻¹, respectively, within 60 hours in aerobic condition. It could not degrade MT in anaerobic condition. After the MT was disappeared during 60 – 114 hours, androgenic activity was remained. Methandrostenolone was discovered at 21.5 – 90 hours which was also contributing to the androgenic activity. Degradation test was expanded closer to environmental level. The strain could not eliminate 50 and 150 μ g/L of MT in 200 and 24 hours, respectively. The ability to degrade MT in environment needs further confirmation.

Keywords 17 α - methyltestosterone (MT); Transgendered Tilapia, Androgenic Activity; *Nocardioides* sp.; Specific degradation rate

Executive Summary

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายสาร 17 α -methyltestosterone จากตะกอนและฟิล์มชีวภาพจากบ่อแปลงเพศลูกปลานิล ได้เชื้อจุลินทรีย์มาสามชนิด คือ *Nocardioides* sp. S303, *Acinetobacter* sp. S051 และ *Ochrobactrum* sp. B052 ซึ่งมีค่าความเร็วจำเพาะในการย่อยสลาย MT (Specific degradation rate) ที่ 1 mg/L เท่ากับ 0.07, 0.04, และ 0.02 h⁻¹ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10 mg/L เท่ากับ 0.17, 0.18, และ 0.11 h⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นต่ำ *Nocardioides* sp. S303 มีความเร็วในการย่อยสลาย MT ที่มากที่สุด ส่วนในความเข้มข้นสูงนั้นมีความสามารถพอกันกับ *Acinetobacter* sp. B051 แต่เนื่องจาก *Acinetobacter* spp. ถูกจัดว่าเป็นจุลินทรีย์เชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมกลุ่มที่ 2 ซึ่งไม่สามารถนำไปในการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนฮอร์โมนโดยเกษตรกรได้หากไม่ทำการแจ้งต่ออธิบดีก่อน จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้งานจริง ดังนั้น *Nocardioides* sp. S303 จึงมีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อย่อยสลาย MT

ซึ่งได้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายฮอร์โมนในสภาพแวดล้อมต่าง เช่น การย่อยสลายฮอร์โมนชนิดอื่น พบว่าเชื้อ 303 สามารถย่อยสลาย Testosterone (T) ได้ในประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ MT คือ จากความเข้มข้นประมาณ 10 mg/L ลดลงไป 95.2% และ 94.7% ตามลำดับ สำหรับฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ S303 มีความสามารถในการย่อยสลาย MT ในระดับที่ต่ำมาก โดยในฮอร์โมน estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), และ 17 α -ethylestradiol (EE2) เชื้อ S303 สามารถย่อยสลาย E1 ได้ 17.9%, 11.2%, และ 11.0% ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ S303 มีความสามารถในการย่อยสลายฮอร์โมนเพศชายอย่างจำเพาะเจาะจง ไม่สามารถนำไปใช้ในการย่อยสลายฮอร์โมนชนิดอื่นได้

และได้ทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย MT ที่ในสภาวะที่มีกลูโคส (10 Mg-C/L) เพื่อใช้เป็นตัวแทนสารอาหารย่อยสลายง่าย และได้ทดสอบในสภาวะไร้อากาศ พบว่าเชื้อ S303 สามารถย่อยสลาย MT ในอัตราการย่อยสลายจำเพาะที่ใกล้เคียงกันคือ 0.34 และ 0.36 h⁻¹ สำหรับสภาวะที่ไม่มีกลูโคสและมีกลูโคสตามลำดับในที่ที่มีอากาศได้ ในช่วงเวลาประมาณ 60 ชั่วโมง ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ S303 น่าจะสามารถทำงานในธรรมชาติที่มีสารอาหารอื่นมากมายหลายชนิดได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายได้ในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งได้ทำการติดตามด้วยการนับจำนวนเซลล์และการตรวจสอบความมีฤทธิ์แอนโดรเจน (Androgenetic Activity) พบว่าก็สอดคล้องกับการลดลงหรือคงที่ของปริมาณ MT โดยลำดับ โดบเซลล์การเพิ่มปริมาณขึ้นแสดงถึงการนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและสร้างพลังงาน และ Androgenetic Activity ก็ลดลงในช่วงเวลาเดียวกัน

เมื่อทำการศึกษาพบสาร Methandrostenolone เกิดขึ้นก่อนช่วงเวลา 21.5 ชั่วโมง และหายไปก่อน 90 ชั่วโมง ดังนั้นสารนี้น่าจะเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มี Androgenetic Activity หลงเหลือภายหลังจากที่ MT สลายไปแล้วในช่วงเวลา 60 – 114 ชั่วโมง แต่นอกจากสารนี้แล้วยังมีสาร metabolite ชนิดอื่นอีกที่ทำให้ยังมี Androgenetic Activity คงค้างในช่วง 90 – 114 นาที ที่ไม่สามารถวัดได้ด้วยวิธีการวัด HPLC ในการทดลองนี้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เมื่อทดสอบวัดความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดนี้ที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกับความเป็นจริงที่ 50 และ 150 µg/L ไม่พบว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้กำจัด MT ได้ในช่วงเวลา 200 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ดังนั้นความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดนี้ที่จะย่อย MT ในสภาวะแวดล้อมจริงควรมีการศึกษาต่อไป แต่เนื่องจาก Nocardioideae sp. สายพันธุ์ S303 ก็สามารถย่อยสลาย MT ที่ 10 mg/L ไปเป็นสารที่ไม่มี Androgenetic Activity ตกค้างอยู่ภายใน 5 วัน หลังจาก MT สลายไปหมดภายในเวลา 3 วัน จึงนับว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้ก็มี khả năngนำมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการบำบัดสารกระตุ้นลักษณะเพศชายที่ตกค้างในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างน้อยที่ความเข้มข้นในระดับ mg/L

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1. การแปลงเพศปลานิล	4
2.2 17 α -methyltestosterone	5
2.3 ความปลอดภัยต่อผู้บริโภคของการบริโภคปลาแปลงเพศ.....	6
2.4 ความปลอดภัยของการใช้ MT ต่อสิ่งแวดล้อม	6
2.5 การย่อยสลายสารสเตียรอยด์ฮอร์โมนโดยเชื้อจุลินทรีย์	7
2.6 ความมีฤทธิ์ทางแอนโดรเจน (Androgenic Activity).....	10
บทที่ 3 วิธีการทดลองและระเบียบวิธีวิจัย.....	13
3.1. แผนการดำเนินการวิจัย.....	13
3.2 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลาย MT	14
3.3. การคัดกรองสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย MT	15
3.4 การวัดความเข้มข้นของ MT	16
3.5 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ย่อยสลาย MT โดยการวิเคราะห์ 16S rRNA	17
3.7 การทดสอบการย่อยสลาย MT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....	17
3.8 การวัดความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอาหารชนิดอื่น	18
3.9 การทดสอบ Androgenic activity โดยใช้วิธี Yeast assay	19
3.10 Metabolites analysis with Liquid chromatography-mass spectrometry analysis	22
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	24
4.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์	24

4.2. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย 17 α -methyltestosterone (MT) ในเบื้องต้น.....	25
4.3. การตรวจสอบชนิดจุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีนส์ 16s rRNA.....	27
4.4. การตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายฮอร์โมนในหนึ่งสัปดาห์	30
4.5. การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของจุลินทรีย์ย่อยสลาย MT.....	31
4.6. การทดสอบหาความเร็วในการทำปฏิกิริยาในการย่อยสลาย 17 α -methyltestosterone (MT)	36
4.7 ความสามารถในการย่อยสลายฮอร์โมนชนิดอื่น	39
4.8 ความสามารถในการย่อยสลาย MT ในสภาวะที่มีกลูโคสและมีอากาศ	40
4.9 ความสามารถในการย่อยสลาย MT ในสภาวะที่มีกลูโคสและไร้อากาศ.....	43
4.10 การศึกษาสาร metamolite ในปฏิกิริยาการย่อยสลาย MT โดย <i>Nocardioide</i> sp S303	44
4.11 การย่อยสลาย MT ที่ความเข้มข้นต่ำ.....	46
บทที่5 สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	49
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.....	51
เอกสารอ้างอิง.....	52

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2. 1 คุณสมบัติของ 17 α -methyltestosterone	5
ตารางที่ 2. 2 เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารฮอร์โมนเพศชาย.....	9
ตารางที่ 2. 3 การวิเคราะห์ Androgenic Activity	10
ตารางที่ 4. 1 ลักษณะโคโลนีที่คัดเลือกเพื่อนำมาทดสอบการย่อยสลาย MT	24
ตารางที่ 4. 2 ลักษณะโคโลนีและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย MT ที่ 10 mg/L ได้ใน 7 วัน.....	26
ตารางที่ 4. 3 การระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จาก MT enrichment cultures	29
ตารางที่ 4. 4 ค่าอัตราเร็วในการย่อยสลาย MT ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 mg/L	38
ตารางที่ 4. 5 การทดสอบ cartridge ที่เหมาะสมในการวัดความเข้มข้น MT ที่ความเข้มข้นต่ำ	47

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 2. 1 โครงสร้างของ 17 α -methyltestosterone (MT) และ Testosterone (T)	5
ภาพที่ 3. 1 แผนการทดลองโดยรวม	13
ภาพที่ 3. 2 (a) บ่อดินแปลงเพศปลา, (b) ถังไฟเบอร์กลาสแปลงเพศปลา และ (c) จุดรับน้ำเสียจากถังไฟเบอร์กลาส	14
ภาพที่ 3. 3 (a) บ่อคอนกรีตแปลงเพศปลา, (b) ตาข่ายกะชังบ่อแปลงเพศปลาแบบดิน	15
ภาพที่ 4. 1 การย่อยสลายฮอร์โมน MT ที่ 10 mg/L ภายใน 7 วัน ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมา 20 ชนิด	27
ภาพที่ 4. 2 ตัวอย่างภาพ electrophoresis gel ของผลของปฏิกิริยา PCR กับ primer 519F and 1492R28	
ภาพที่ 4. 3 การลดลงของ MT ในหนึ่งสัปดาห์ที่ 10 mg/L ของจุลินทรีย์ที่ทำการคัดเลือกมา 8 ชนิด.....	30
ภาพที่ 4. 4 การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Acinetobacter</i> sp. B051 และ S051	32
ภาพที่ 4. 5 การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Ochrobactrum</i> sp. B052 และ S052	33
ภาพที่ 4. 6 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ย่อยสลาย MT ทั้ง 3 ชนิดกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในฐานข้อมูล	34
ภาพที่ 4. 7 ภาพถ่ายจาก เปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ <i>Nocardioides</i> sp. S303 จากงานวิจัยนี้และอ้างอิงงานวิจัยอื่น (ซ้าย) <i>Nocardioides</i> sp. S303 ที่กำลังขยาย 5000 เท่าจากกล้อง SEM (ขวา) <i>Nocardioides nitrophenolicus</i> Strain NSP41 ^T จากกล้อง TEM โตบน nutrient agar, 48 h ที่ 30°C. Bar ขนาด 0.5 μ m.....	34
ภาพที่ 4. 8 ภาพถ่ายจากกล้อง SEM เปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ <i>Acinetobacter</i> sp. จากงานวิจัยนี้และอ้างอิงงานวิจัยอื่น (ซ้าย) เชื้อจุลินทรีย์ <i>Acinetobacter</i> sp. B051 ที่กำลังขยาย 5000 เท่า (ขวา) <i>Acinetobacter</i> sp. DW-1 (Gu et al., 2016).....	35
ภาพที่ 4. 9 ภาพถ่ายจากกล้อง SEM เปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ <i>Ochrobactrum</i> sp. จากงานวิจัยนี้และอ้างอิงงานวิจัยอื่น (ซ้าย) เชื้อจุลินทรีย์ <i>Ochrobactrum</i> sp. B052 ที่กำลังขยาย 5000 เท่า (ขวา) <i>Ochrobactrum</i> sp. GDOS (Khadivinia et al., 2014) ภาพถ่ายจากกล้อง SEM ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ กำลังขยาย 25000 เท่า.....	35
ภาพที่ 4. 10 การย่อยสลาย MT ของเชื้อ <i>Acinetobacter</i> sp. B051 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (Left) และ จำนวนจุลินทรีย์ (Right). Error bars แสดง standard deviation (S.D.) ของการทดลองสามครั้ง.	37
ภาพที่ 4. 11 การย่อยสลาย MT ของเชื้อ <i>Ochrobactrum</i> sp. B052 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (Left) และ จำนวนจุลินทรีย์ (Right). Error bars แสดง standard deviation (S.D.) ของการทดลองสามครั้ง.	37
ภาพที่ 4. 12 การย่อยสลาย MT ของเชื้อ <i>Nocardioides</i> sp. S303 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (Left) และ จำนวนจุลินทรีย์ (Right). Error bars แสดง standard deviation (S.D.) ของการทดลองสามครั้ง.	38

ภาพที่ 4. 13 การย่อยสลายฮอร์โมน testosterone, estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) และ 17 α -ethylestradiol (EE2) เปรียบเทียบกับ MT ที่ 10 mg/L เป็นเวลา 7 วัน	40
ภาพที่ 4. 14 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฮอร์โมน 17 α -methyltestosterone ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ <i>Nocardioide</i> sp. S303 ในสภาวะมีอากาศในแหล่งอาหารที่มีการเติมกลูโคส (ปริมาณคาร์บอน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) และไม่มีการเติมกลูโคส	42
ภาพที่ 4. 15 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Nocardioide</i> sp. S303 สภาวะมีอากาศในแหล่งอาหาร (ซ้าย) ที่ไม่มีการเติมกลูโคส (ขวา) มีการเติมกลูโคส	42
ภาพที่ 4. 16 ความมีฤทธิ์ทาง Androgen ของการย่อยสลาย MT โดยเชื้อจุลินทรีย์ <i>Nocardioide</i> sp. สายพันธุ์ S303 ในสภาวะที่มีอากาศ	42
ภาพที่ 4. 17 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฮอร์โมน 17 α -methyltestosterone ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ <i>Nocardioide</i> sp. S303 ในสภาวะไร้อากาศในแหล่งอาหารที่มีการเติมกลูโคส (ปริมาณคาร์บอน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) และไม่มีการเติมกลูโคส	43
ภาพที่ 4. 18 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Nocardioide</i> sp. S303 สภาวะมีอากาศในแหล่งอาหาร (ซ้าย) ที่ไม่มีการเติมกลูโคส (ขวา) มีการเติมกลูโคส	44
ภาพที่ 4. 19 ความมีฤทธิ์ทาง Androgen ของการย่อยสลาย MT โดยเชื้อจุลินทรีย์ <i>Nocardioide</i> sp. สายพันธุ์ S303 ในสภาวะไร้อากาศ	44
ภาพที่ 4. 20 โครมาโตแกรมของการฉีด HPLC การย่อยสลาย MT โดยเชื้อจุลินทรีย์ <i>Nocardioide</i> sp. สายพันธุ์ S303 ในสภาวะมีอากาศ ของตัวอย่างในช่วงเวลาต่างๆ	45
ภาพที่ 4. 21 โครมาโตแกรมของการฉีด HPLC ของ Standard MT ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อลิตร	46
ภาพที่ 4. 22 Mass to charge pattern (m/z) ของ Metabolite peak	46
ภาพที่ 4. 23 การย่อยสลายฮอร์โมน 17 α -methyltestosterone โดยเชื้อจุลินทรีย์ <i>Nocardioide</i> sp. สายพันธุ์ S303 ในสภาวะมีอากาศที่ความเข้มข้น (ซ้าย) 100 μ g/L และ (ขวา) 200 μ g/L	47
ภาพที่ 4. 24 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Nocardioide</i> sp. สายพันธุ์ S303 ที่ย่อยสลาย 17 α -methyltestosterone ที่ความเข้มข้น (ซ้าย) 100 μ g/L และ (ขวา) 200 μ g/L	48
ภาพที่ 4. 25 ความมีฤทธิ์ทาง Androgen ของการย่อยสลาย MT 200 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยเชื้อจุลินทรีย์ <i>Nocardioide</i> sp. S303 ที่ความเข้มข้น (ซ้าย) 100 μ g/L และ (ขวา) 200 μ g/L	48

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลเป็นอุตสาหกรรมหลักของประเทศไทยอย่างหนึ่ง โดยในปี 2559 มีผลผลิตรวมทั้งสิ้น 178,265 ตัน (กรมเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) และมีการขยายตัวทางเศรษฐกิจอย่างมากในช่วงม.ค.ถึง ก.ย.ของปี พ.ศ. 2560 พบปริมาณการผลิตปลานิล 137,772 ตัน เพิ่มขึ้น +7.2% จากช่วงเดียวกันของปี พ.ศ. 2559 (กลุ่มเศรษฐกิจการประมง กรมประมง, 2560) ในการผลิตปลานิลนั้นปัญหาอย่างหนึ่งในการผลิตคือการที่มีประชากรมากเกิดไปที่เกิดจากการผสมพันธุ์ก่อนวัยอันเหมาะสมภายใต้สภาวะที่มีการเลี้ยงทั้งสองเพศร่วมกัน รวมทั้งผลิตภัณฑ์มักมีขนาดไม่สม่ำเสมอ เกษตรกรจึงต้องการเลี้ยงให้ได้เพียงเพศผู้ที่มีขนาดใหญ่กว่า ดังนั้นเกษตรกรมักแก้ปัญหาโดยการเลี้ยงแยกเพศ การปรับปรุงพันธุ์กรรม และการใช้ฮอร์โมน ซึ่งการใช้ฮอร์โมน 17 α -methyltestosterone (MT) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและราคาต่ำที่สุด (Megbowon et al., 2014)

แต่อย่างไรก็ตาม มีการพบว่า MT บางส่วนไม่ได้ถูกใช้ตกค้างอยู่ในบ่อซึ่งอาจหลุดรอดออกไปสู่สิ่งแวดล้อมและส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำได้ ซึ่งมีรายงานการตรวจพบ MT ในน้ำและดินก้นบ่อแปลงเพศปลา ระหว่าง 1 ถึง 617 $\mu\text{g/L}$ และ 0.9 ถึง 6.1 $\mu\text{g/kg}$ ตามลำดับ (Fitzpatrick et al., 1999, 2000; Phelps et al, 2000; Barbosa et al., 2013) MT สามารถคงค้างภายหลังหยุดการใช้ยาได้ 1 และ 8 สัปดาห์ในน้ำและดินตะกอนตามลำดับ (Fitzpatrick et al., 2000). เมื่อพิจารณาถึงระดับความเป็นพิษที่พบได้ในระดับต่ำถึง 4.5 ng/L ใน zebra fish (Anderson et al., 2006) หรือ 100 ng/L ใน mosquito fish, fathead minnow, และ mummichog (Sharpe et al., 2004; Pawlowski et al 2004; Raut 2009) MT ที่พบในบ่อปลาและอาจปนเปื้อนออกมาสู่ภายนอกมีโอกาสที่จะทำให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฟาร์มขนาดเล็กที่มีขนาดน้อยกว่า 16,000 m^2 ที่ไม่จำเป็นต้องมีระบบบำบัดน้ำเสียตามกฎหมาย (กรมควบคุมมลพิษ, 2011)

MT สามารถถูกบำบัดได้เองด้วยวิธีทางชีวภาพทั้งในสภาวะมีอากาศและไร้อากาศ (Homklin et al., 2011), การดูดซับดินตะกอน (Fitzpatrick et al., 2000; Ong et al., 2012) การดูดซับด้วยพืช (Adnan et al., 2016) และการสลายตัวด้วยแสง (Young et al., 2013) กระบวนการจุลินทรีย์บำบัดนั้นเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญอย่างมาก โดยจุลินทรีย์ที่สามารถทำการบำบัดได้ที่มีการรายงานเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้ เช่น *Rhodococcus equi*, *Nocardioide aromaticivorans* และ *Nocardioide nitophenolicus* ซึ่งสามารถย่อยสลาย MT ที่ความเข้มข้น 1.0 – 10 mg/L (Homklin et

al., 2012) นอกจากนี้มีรายงานอื่นที่พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์อันประกอบด้วย *Acinetobacter* sp., *Brevundimonas* sp., *Comamonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Rhodobacter* sp. และ *Stenotrophomonas* sp. สามารถกำจัด testosterone-ได้ที่ 3.0 mg/L (Yang et al., 2011) ซึ่งในปัจจุบันนี้ยังไม่มีหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่บำบัด MT ถูกนำมาใช้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนาหัวเชื้อดังกล่าวเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดน้ำและตะกอนในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การมีเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกมาจะช่วยทำให้เข้าใจกลไกการบำบัด MT ได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากในปัจจุบันนี้มีเพียงกลไกการเปลี่ยนแปลงของ testosterone ด้วยจุลินทรีย์เท่าที่มีการรายงาน เช่น *Bacillus stearothermophilus*, *Comamonas testosterone*, และ *Steroidobacter denitrificans* (Bhatti et al., 2012; Fahrbach et al., 2010; Horinouchi et al., 2012)

เป็นที่ยอมรับกันว่าสเตียรอยด์ฮอร์โมนสามารถเปลี่ยนไปเป็นสารผลิตภัณฑ์ตัวอื่นๆได้ ซึ่งสารบางอย่างนั้นอาจมีความเป็นพิษที่สูงกว่าสารตั้งต้น การวิเคราะห์เพียงแค่สารตั้งต้นจึงไม่เหมาะสม (Cwiertny et al., 2014) งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาความมีฤทธิ์แอนโดรเจนของกระบวนการย่อยสลาย MT ด้วยยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมให้สามารถรับทราบการมีอยู่ของฮอร์โมนเพศชายได้ (recombinant yeast androgenic screen, YAS) (Sohoni and Sumpter 1996; Kawanishi et al., 2004; Chen et al., 2016) และจะศึกษาสารในปฏิกิริยาที่ยังคงมีความมีฤทธิ์ทางฮอร์โมนด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ซึ่งขั้นตอนนี้จะทำให้ทราบถึงความปลอดภัยในการใช้หัวเชื้อนี้มากยิ่งขึ้น

กล่าวโดยย่องานวิจัยนี้ต้องการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายฮอร์โมน methyl testosterone (MT) จากบ่อแปลงเทศบาล และศึกษาความสามารถที่ความเข้มข้นหลากหลายรวมถึงที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกับสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้จะทำการติดตามสารในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นว่ายังคงมีความมีฤทธิ์ทางแอนโดรเจนหรือไม่ และเป็นสารชนิดใดด้วยเทคนิค Chromatography และ yeast assay เพื่อวิเคราะห์ความเหมาะสมในการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย MT

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อพัฒนาหัวเชื้อในการย่อยสลายฮอร์โมน 17α -methyltestosterone ที่สามารถใช้ได้ในสิ่งแวดล้อมและไม่มีสารผลิตภัณฑ์ที่มีความมีฤทธิ์ Androgen ตกค้าง

- 1) เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายฮอร์โมน 17α -methyltestosterone (MT) จากบ่อแปลงเทศบาลนิล
- 2) เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อย 17α -methyltestosterone ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกที่ความเข้มข้น และสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน

- 3) เพื่อประเมินความมีฤทธิ์แอนโดรเจนของสารในกระบวนการย่อยสลายฮอร์โมนของจุลินทรีย์ที่คัดแยก
- 4) เพื่อวิเคราะห์ชนิดของสารตัวกลางที่ก่อให้เกิดความมีฤทธิ์แอนโดรเจนในกระบวนการย่อยสลายฮอร์โมนของจุลินทรีย์ที่คัดแยก

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. การแปลงเพศปลานิล

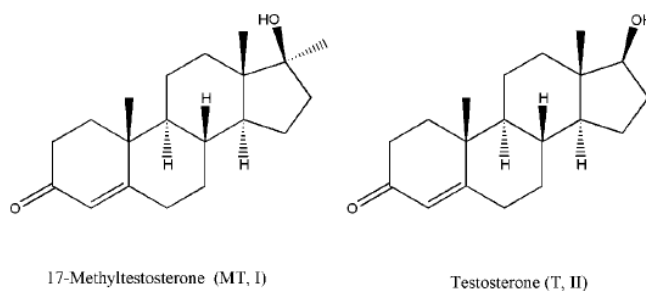
การทำให้ประชากรปลาเป็นเพศผู้ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากปลาเพศผู้มีขนาดมากกว่าปลาเพศเมีย และลดปัญหาการที่มีประชากรมากเกิดไป เกิดการแข่งขันแย่งอาหารกัน และผสมพันธุ์ก่อนวัยอันเหมาะสม ทำให้มีขนาดเล็กและขนาดไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นเกษตรกรจึงมักแก้ปัญหาโดยการเลี้ยงแยกเพศ การผสมข้ามสายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์กรรม และการใช้ฮอร์โมน ซึ่งการใช้ฮอร์โมน 17 α -methyltestosterone (MT) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและราคาต่ำที่สุด (Megbowon et al., 2014) ซึ่งในประเทศไทยกรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ก็มีการส่งเสริมให้มีการเลี้ยง และมีการผลิตลูกปลาเพื่อแจกจ่ายแก่เกษตรกรในหลายศูนย์วิจัยการประมงน้ำจืดทั่วประเทศ และนอกจากนี้ก็มีบริษัทเอกชนหลายรายที่ทำการจำหน่ายลูกปลานิลแปลงเพศ (กรมประมง, 2014; ไทยรัฐออนไลน์, 2017; Kaewjuntawee, P. 2017)

โดยฮอร์โมนที่มีการใช้ในการแปลงเพศปลานิลเป็นเพศผู้มีหลายชนิด เช่น 19-norethyltestosterone, fluoxymesterone, ethyltestosterone, 17 α -methyltestosterone (MT), mesterolone, androstenedione, trenbolonacetate (TBA), testosterone, 17 α -ethynyltestosterone, dihydrotestosterone (Pandian and Sheela 1995) แต่ตัวที่ได้รับความนิยมและใช้แพร่หลายในการแปลงเพศสัตว์น้ำมากที่สุดคือ 17 α -methyltestosterone (MT) ซึ่งง่ายต่อการใช้ มีราคาถูก และสามารถแปลงเพศปลาไปเป็นประชากรเพศผู้ได้ถึงมากถึง 95 - 100% (Megbowon and Mojekwu, 2014; Webster and Lim, 2006) ซึ่ง

โดยวิธีการใช้ที่กรมประมงไทยแนะนำคือ ผสมในอาหาร 60 – 80 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม หรือประมาณ 0.52 – 2.85 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กรัม ปริมาณฮอร์โมนที่มากเกินไป ไม่ได้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแปลงเพศ แต่ทำให้เกิดผลเสียเพราะเปอร์เซ็นต์ลูกปลาเพศผู้ที่ได้จะน้อยลง หรืออาจเกิดลักษณะ 2 เพศในตัวเดียวกันมากขึ้น ซึ่งจะให้อาหารผสม MT ในระยะที่ลูกปลาออกมาจากไข่ประมาณ 21 - 28 วัน โดยอาจเร็วช้าแล้วแต่อุณหภูมิและพัฒนาการของปลา โดยมากในสัปดาห์แรกของการเริ่มให้อาหารผสมฮอร์โมน จะให้ในปริมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว จากนั้นลดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ในสัปดาห์ที่ 2 และ 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวในสัปดาห์ที่ 3 และเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการผลิตลูกปลานิลแปลงเพศสูงสุด ควรให้อาหารวันละ 4 – 5 ครั้ง อาหารที่ใช้ผสมกับฮอร์โมนเพื่อการแปลงเพศ ควรมีปริมาณโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และอาจเพิ่มประสิทธิภาพโดยการเสริมวิตามินซีในอัตรา 800 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และควรมีส่วนประกอบของอาหารที่สำคัญคือรำและปลาป่น (การเลี้ยงปลานิลแปลงเพศ, กรมประมง)

2.2 17 α -methyltestosterone

17 α -methyltestosterone (MT) เป็นฮอร์โมนสังเคราะห์ในกลุ่มสเตียรอยด์ มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในทางการแพทย์ เช่น ใช้เป็นอาหารเสริม รักษาเพศชายที่มีฮอร์โมนเพศชายบกพร่อง การรักษา มะเร็งเต้านมหรือรักษาอาการของวัยหมดประจำเดือนในเพศหญิง และในด้านการเกษตร ใช้ในธุรกิจการเลี้ยง สัตว์ โดยการผสมในอาหารสัตว์ รวมทั้งการนำมาใช้เพื่อการแปลงเพศลูกพันธุ์สัตว์น้ำ ฮอร์โมนนี้มีลักษณะ โครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศชาย แต่ต่างกันว่า MT มีหมู่ methyl ตรง คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 (รูปที่ 2.1) และมีลักษณะทางเคมีกายภาพดังตารางที่ 2.1



ภาพที่ 2. 1 โครงสร้างของ 17 α -methyltestosterone (MT) และ Testosterone (T)

ตารางที่ 2. 1 คุณสมบัติของ 17 α -methyltestosterone

คุณสมบัติ	ข้อมูล
สูตรโครงสร้าง	C ₂₀ H ₃₀ O ₂
น้ำหนักโมเลกุล	302.45 g/mol
LOG K _{ow}	3.36 (Pubchem referred to Hans et al., 1995)
จุดหลอมเหลว	162-168°C (MP chemical, 2018)
ค่าการละลายน้ำ	3.4 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25 °C (Ong et al 2012) 3.39 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25 °C (Homklin et al 2012) 33.9 – 700 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25 °C (Yalkowsky et al., 2010) 30.8 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 30 °C (Yalkowsky et al., 2010) ≤ 500 มก./ล. (MP chemical, 2018) ในทางปฏิบัติแล้วไม่ค่อยละลาย (Guidechem, 2018) ละลายได้ใน methanol ,ethanol และสารละลายอินทรีย์อื่นๆ

2.3 ความปลอดภัยต่อผู้บริโภคของการบริโภคปลาแปลงเพศ

งานวิจัยของกรมประมงรายงานว่าหลังหยุดให้อาหารผสมฮอร์โมนระดับของ MT ได้ลดลง โดยอยู่ที่ 0.002 พีพีเอ็ม (2 µg/Kg) ในวันที่ 6 และไม่สามารถตรวจพบการตกค้างของ MT ได้ในวันที่ 8 หลังหยุดให้อาหารผสมฮอร์โมน โดยเครื่องมือที่ใช้คือเครื่อง LC-MS/MS นอกจากนี้ไม่พบการตกค้างของ MT ในตัวอย่างเนื้อปลานิลแปลงเพศอายุสามเดือนที่ได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิลแปลงเพศเต็มวัยเชิงพาณิชย์ (Baoprasertkul et al., 2013) นอกจากนี้งานวิจัยของ Green and Teichert-Coddington (2000) ได้ประเมิน Regression analysis กับผลการวิจัยที่ใช้เทคนิคทางรังสีวิทยาวิเคราะห์ปริมาณ MT ตกค้างในปลาและพบว่าหลังจาก 8 ถึง 40 วัน จะมีปริมาณ MT ตกค้างอยู่ในตัวปลาน้อยกว่า 100 pg/g ปลา (0.1 µg/Kg)

Green and Teichert-Coddington (2000) ได้ประมาณการว่าปลาที่ถูกเลี้ยงให้กิน MT 28 วัน จะมีปริมาณ MT ที่กินเข้าไปทั้งหมด 65.28 ถึง 101.01 µg Megbowon และ Mojekwu (2014) กล่าวว่าปริมาณ MT ที่ปลารับเข้าไปมีเพียง 0.0 – 0.2 mg MT/ปลา ซึ่งนับว่าน้อยกว่า 0.001% ของ MT ที่แพทย์สั่งให้กับผู้ป่วย (20 – 40 mg) และน้อยกว่า 0.00001 % ของการตกค้างในร่างกายมนุษย์ภายหลังจากการหยุดใช้ยา 1 สัปดาห์ มนุษย์ผลิต testosterone ในร่างกายประมาณ 15 mg ต่อวัน ดังนั้นการรับประทานปลาที่มีปริมาณ MT เพียงเท่านี้จึงนับว่าต่ำมาก MT จึงไม่เป็นอันตรายต่อคน

นอกจากนี้องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกากำหนดให้มีระยะเว้นการให้ฮอร์โมนในปลานิลก่อนวางขายไม่น้อยกว่า 120 วันในการเลี้ยงแบบเป็นรอบๆ (batch culture) หรือ 350 กรัมสำหรับการเลี้ยงแบบเก็บเกี่ยวบางส่วน (partial-harvest/restock culture) (Aquatic Animal Drug Approval Partnership, AADAP, INAD #11-236) และให้มีอาหารได้ไม่เกิน 0.8 พีพีบี (U.S. Food and Drug Organization, 2017) สำหรับในประเทศไทยไม่มีการกำหนดระยะหยุดยาที่แน่นอน เกษตรกรนิยมขายปลานิลขนาดประมาณ 400 – 500 กรัมขึ้นไป ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 – 4 เดือนแล้วแต่สายพันธุ์ปลาและการเลี้ยง แต่ก็มีเกษตรกรที่เลือกขายในระยะที่ตัวเล็กมากซึ่งก็มีความเสี่ยงการตกค้างในเนื้อปลา

2.4 ความปลอดภัยของการใช้ MT ต่อสิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาของ Fitzpatrick และคณะ (2000) พบ MT ในบ่อปลามีความเข้มข้นสูงสุดภายหลังจากสิ้นสุดกระบวนการแปลงเพศวันที่ 28 วัน โดยพบ MT ในน้ำ 3.6 ไมโครกรัมต่อลิตร และสลายหายไปภายใน 35 วัน หนึ่งอาทิตย์หลังหยุดการใช้ยา แต่คงค้างอยู่ 49 วันเมื่อไม่มีดิน และตกค้างในตะกอน 6.1 นาโนกรัมต่อกรัม ในวันที่ 28 และยังคงพบในดินได้ 2.8-2.9 นาโนกรัมต่อกรัม ตะกอนขนาดเล็ก 300 ng/g หลังจากผ่านกระบวนการแปลงเพศปลาเป็นเวลา 84 วัน (8 สัปดาห์หลังหยุดการใช้ยา) โดยงานวิจัยนี้วัดด้วยวิธี

radioisotope ดังนั้นการแพร่กระจายของ MT จึงน่าเป็นห่วงสำหรับการแพร่กระจายของตะกอนเพราะคงค้างได้ยาวนานกว่า

Baoprasertkul และคณะ (2013) รายงานว่าปริมาณ MT พบได้ในน้ำจากบ่อแปลงเพศปลา ภายหลังการหยุดใช้ที่ 2 – 7 วันที่ความเข้มข้น 2 – 20 µg/L ซึ่งวัดโดยวิธี HPLC-UV Yenpoeng et al (2013) รายงานว่าปริมาณ MT จะมีมากที่สุด คือประมาณ 0.1 – 0.5 µg/L ในช่วง 12-21 วัน ช่วงท้ายของระยะให้อาหารปลา 21 วัน และลดลงเหลือ 0.06 – 0.2 µg/L ภายหลังการหยุดการให้อาหาร 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระดับไม่แตกต่างกับน้ำดิบที่มาจากอ่างเก็บน้ำแก่งเสิงจาน และชุดการทดลองที่ไม่ใส่ MT ในการทดลองนี้ใช้วิธี Electrochemiluminescence Immunoassay ที่วัดค่าต่ำสุดได้ที่ 0.02 ng/mL ดังนั้นน้ำนี้จะมี การปนเปื้อน MT เพราะอยู่ในพื้นที่เกษตรและปศุสัตว์

Barbosa et al., (2013) ได้วิเคราะห์ปริมาณ MT ในบ่อเลี้ยงปลาและแหล่งน้ำรอบๆ พบ 6 ใน 26 จุดเก็บตัวอย่างที่มีความเข้มข้นมากกว่า LOQ (58.3 µg/L) และ LOD (19 µg/L) และอยู่ในช่วงระหว่าง 59.9 – 2000 µg/L วัดโดย HPLC-UV

นอกจากการเลี้ยงปลาแล้ว MT ยังสามารถปนเปื้อนมาจากฟาร์มสุกรได้ โดย Liu et al (2012) พบ MT ในอุจจาระของลูกหมูเพศผู้และแม่หมูที่ 2.3 – 4.7 ng/g และในน้ำล้างคอกของลูกหมูที่ 7.1 ng/L นอกจากนี้ยังพบได้ทั้งในน้ำจากบ่อรับน้ำเสียจากคอกแม่ลูกหมูและพ่อหมูที่ 11.4 และ 30.6 ng/L ตามลำดับ และหลังผ่าน anaerobic digester ของน้ำจากบ่อคอกพ่อหมูที่ 20.2 ng/L นอกจากนี้ยังสามารถตรวจได้ในน้ำในคลองรับน้ำที่ 1000 เมตรจากจุดปล่อยน้ำ ไม่สามารถตรวจวัดได้ที่น้ำใต้ดินลึก 20 เมตรด้านล่างของฟาร์ม และที่ particle, sludge, หรือ sediment ของระบบบำบัดและแหล่งรับน้ำ ซึ่ง MT เหล่านี้หมูไม่สามารถผลิตได้เอง ดังนั้นจึงมาจากการปนเปื้อนภายนอก

เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้น MT ที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมที่มีค่าต่ำถึง 4.5 ng/L ใน zebra fish (Anderson et al., 2006) หรือ 100 ng/L ใน mosquito fish, fathead minnow, และ mummichog (Sharpe et al., 2004; Pawlowski et al 2004; Raut 2009) ปริมาณ MT ที่อยู่ในน้ำหรือตะกอนจากบ่อปลาสามารถส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศได้ และสถานการณ์ยิ่งน่าเป็นห่วงสำหรับฟาร์มขนาดเล็ก (<16,000 m²) ที่ตามกฎหมายไม่ได้กำหนดให้ทำการบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยสู่ภายนอก (PCD 2011).

2.5 การย่อยสลายสารสเตียรอยด์ฮอร์โมนโดยเชื้อจุลินทรีย์

การศึกษาผลงานของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย MT ค่อนข้างมีข้อจำกัด จากการศึกษาของ Homklin และคณะ (2012) คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย MT จากตัวอย่างน้ำและตะกอนในบ่อแปลงเพศของปลานิลด้วยการเพิ่มจุลินทรีย์ด้วยความเข้มข้นที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแบคทีเรียที่คัดแยกได้คือ *Rhodococcus equi*

Nocardioide aromaticivorans และ *Nocardioide nitrophenolicus* อัตราการย่อยสลายจะเพิ่มสูงขึ้นในระดับความเข้มข้นเริ่มต้นในช่วงระดับ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้ามากกว่าระดับความเข้มข้นในช่วงนี้อัตราการย่อยสลายจะลดลง สายพันธุ์แบคทีเรีย *Rhodococcus* sp. ที่คัดแยกได้พบว่าสามารถที่จะมีความทนต่อความเข้มข้นของ MT สูง ๆ

Yang et al. (2011) จำแนกจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้บนอาหารที่มีฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจากตัวอย่างน้ำที่ได้จากฟาร์มเลี้ยงสุกร ทำการศึกษาพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้ในน้ำที่ได้จากฟาร์มสุกรได้แก่ *Acinetobacter* sp., *Brevundimonas* sp., *Comamonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Rhodobacter* sp. และ *Stenotrophomonas* sp. แต่แบคทีเรียกลุ่มไม่สามารถที่จะคัดแยกได้ ซึ่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนสามารถที่ย่อยสลายได้ภายในเวลา 29 ชั่วโมงในช่วงที่แบคทีเรียเข้าสู่ระยะ Log phase ใช้เวลาประมาณ 22 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเทสโทสเตอโรนได้มีการรายงานไว้ในการผลิตฮอร์โมนเพศชายสังเคราะห์ต่าง ๆ คือ androstadienedione (ADD) Dehydrotestosterone (DHT) และ Androstenedione (AD) โดยสาร Dehydrotestosterone (DHT) จะเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในระยะเวลา 48 ชั่วโมงแรก

นอกจากนี้ยังมีการรายงานเชื้ออื่น ๆ อีกมากมาย เช่น *Rhodococcus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ในการทำลายโครงสร้างของสารกลุ่มสเตียรอยด์จึงสามารถย่อยสลายเทสโทสเตอโรนได้ (Horinouchi et al, 2004) เชื้อในกลุ่ม *Nocardioide* sp. สามารถย่อยสลายสารจำพวก 17β -estradiol ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมน 17α -methyltestosterone (Yu et al, 2007) เชื้อ *Acinetobacter* sp., *Brevundimonas* sp., *Comamonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Rhodobacter* sp. ที่คัดแยกได้จากปุ๋ยมูลสุกรสามารถย่อยสลายฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนได้เป็น androstadienedione (ADD), dehydrotestosterone (DHT), *Comamonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Rhodobacter* sp. ที่คัดแยกได้จากปุ๋ยมูลสุกรสามารถย่อยสลายฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนได้เป็น androstadienedione (ADD), dehydrotestosterone (DHT), androstenedione (AD) (Yang et al., 2011)

และพบว่าเชื้อ *Steroidobacter denitrificans* สามารถย่อยสลาย testosterone ไปเป็น Δ^1 -dehydrotestosterone และมี androst-4-en-3,17-dione เป็นสารหลักจากการย่อยสลายจากนั้นเปลี่ยนรูปไปเป็น androsta-1,4-diene-3,17-dione (Chiang et al., 2010) และ *Comamonas testosteroni* TA441 สามารถย่อยสลาย testosterone โดยการเริ่มต้น dehydrogenation testosterone ที่ตำแหน่ง 17-hydroxyl group กลายมาเป็น 4-androstene-3,17-dione (4-AD) แล้ว dehydrogenation ต่อไปกลายเป็น 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) แล้วเกิด hydroxylation กลายเป็น 3-hydroxy-9,10-

secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione (3-HSA) แล้ว hydroxylate กลายเป็น 3,4-DHSA จากนั้นเกิดการแตกวงที่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่4 และ5 แล้วย่อยสลายกลายเป็น 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19- แล้วถูกย่อยสลาย โดย TesD กลายเป็นhexanorandrostan-5-oic acid and 2-hydroxyhexa-2,4-dienoic acid (Horinouchi et al.,2003)

Homklin et al. (2001) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของ MT ภายใต้สภาวะที่มีตัวรับอิเล็กตรอนต่างกันโดยใช้ตัวอย่างตะกอนจากบ่อแปลงเพศปลาและทำการเติม MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่า สภาวะที่มีอากาศ รูปที่ 2.7 และสภาวะ sulfate-reducing MT มีการย่อยสลายที่อัตราการย่อยสลาย 0.51 วัน⁻¹และ 0.53 วัน⁻¹ และหลังจากการย่อยสลายไม่พบความมีฤทธิ์ทาง androgen และที่สภาวะ methanogenic รูปที่ 2.8 MT มีอัตราการย่อยสลายที่ 0.69 วัน⁻¹ และหลังจากการย่อยสลายพบความมีฤทธิ์ทาง androgen ถึงแม้ว่าจะทำการย่อยเป็นเวลา 45 วัน ที่สภาวะ nitrate-reducing MT มีการย่อยสลายช้า ย่อยด้วยอัตราการย่อยสลาย 0.07 วัน⁻¹ และพบความมีฤทธิ์ทาง androgen และที่สภาวะ iron(III)-reducing MT มีการย่อยค่อนข้างยาก ย่อยสลายด้วยอัตรา 0.004 วัน⁻¹ และพบความมีฤทธิ์ทาง androgen การศึกษาเรื่องจุลินทรีย์ย่อยสลาย MT นอกจากจะศึกษาการลดลงของสารตั้งต้นแล้ว จำเป็นจะต้องมีการศึกษาสาร metabolite

ตารางที่ 2. 2 เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารฮอร์โมนเพศชาย

จุลินทรีย์	สารที่สามารถย่อยสลาย	อ้างอิง
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Testosterone	Yang et al., 2011
<i>Acinetobacter sp.</i>	Testosterone, 17 β -estradiol	Yang et al., 2011 Keet et al., 2007 Pimvarat et al., 2015
<i>Brevundimonas sp.</i>	Testosterone	Yang et al., 2011
<i>Comamonas sp.</i>	Testosterone	Yang et al., 2011
<i>Rhodococcus sp.</i>	17 α -methyltestosterone, 17 β -estradiol, Estrogen	Homklin et al., 2012 Kurusu et al., 2010
<i>Nocardiodes sp.</i>	17 α -methyltestosterone, 17 β -estradiol	Homklin et al., 2012 Yu et al., 2007
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Testosterone	Yang ., 2011
<i>Rhodobacter sp.</i>	Testosterone	Yang et al., 2011
<i>Comamonastestosteroni</i>	Testosterone	Horinouchi et al., 2012
<i>Steroidobacterdenitrificans</i>	Testosterone	Leu et al. (2011)

2.6 ความมีฤทธิ์ทางแอนโดรเจน (Androgenic Activity)

โดยทั่ว ๆ ไปแล้วผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมของการทดสอบจาก 2 ปัจจัยทั้งการทดสอบในหลอดทดลองและการทดสอบกับสิ่งมีชีวิตมีความคล้ายคลึงกัน การทดสอบในสิ่งมีชีวิตสำหรับการตรวจสอบหา Androgenic Activity โดยการสังเกตการเจริญของต่อมสืบพันธุ์หรือลักษณะความแตกต่างของเพศที่ปรากฏในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ซึ่งมีประโยชน์ในการบ่งชี้ของกิจกรรมของ Androgenic เป็นที่น่าเชื่อถือได้ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ในลักษณะทำนองนี้ค่อนข้างที่จะใช้ระยะเวลาในการสังเกตค่อนข้างนาน ซึ่งสารเคมีบางชนิดถูกยับยั้งโดยกิจกรรมมาเป็นประจำ โดยที่มากกว่าที่จะได้รับการตรวจสอบการกระตุ้นเป็นเวลานาน ยิ่งไปกว่านั้นการเลือกการทดสอบกับสิ่งมีชีวิตยังคงเป็นขั้นตอนที่ค่อนข้างยาก โดยส่วนมากสิ่งมีชีวิตจะมีความไวต่อการได้รับสาร โดยสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงได้ในแหล่งที่ต่างกัน

ในทางกลับกัน การทดสอบในหลอดทดลองจะมีให้ผลดีมากกว่าในการวิเคราะห์ในระยะเวลาอันสั้นและมีปัจจัยที่ควบคุมได้ ถึงแม้ว่าผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตทั่วไปยังคงเป็นที่สงสัย หลาย ๆ การวิเคราะห์ในหลอดทดลองและการวิเคราะห์ในสิ่งมีชีวิตถูกประยุกต์เข้าด้วยกันที่แสดงให้เห็นผลกระทบของ Androgenic ข้อเท็จจริงของการศึกษาการตรวจสอบหาการสลายของเป็นพิษของ MT ของความสามารถในการย่อยสลาย MT ที่ถูกคัดแยกได้ การวิเคราะห์ในหลอดทดลองจะถูกเลือกเป็นขั้นแรก มาใช้การหาค่าศักยภาพของ Androgenic ของการย่อยสลายทางชีวภาพของเมตาบอไลต์ในภายหลัง ความคล้ายคลึงกันนี้ถูกใช้ในวิจัยของ Homklin และคณะ (2012) พบว่า *Rhodococcus equi*, *Nocardioidees aromaticivorans* และ *Nocardioidees nitrophenolicus* ย่อยสลาย MT ในชั่วโมงที่ 50 ในระดับของความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 – 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ Androgenic Activity ลดลง รวมการวิเคราะห์ทางชีวภาพในหลอดทดลองสรุปได้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การวิเคราะห์ Androgenic Activity

การวิเคราะห์ ในหลอด ทดลอง	หลักการทดสอบ	ข้อจำกัดในการ ทดสอบ	ข้อพิจารณาอื่น ๆ	อ้างอิง
การคัดแยก Androgenic ในยีสต์ (YAS)	ฮอร์โมนแอนโดรเจนในมนุษย์จะมี ตัวรับและยีน <i>lacZ</i> gene (encoding β -Galactosidase) เคลื่อนย้ายเข้าไปในเซลล์ยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> สายพันธุ์ PGKhAR. การทำ ปฏิกิริยาของ chlorophenol red	ข้อจำกัดของการ ตรวจคือ 363 นา โนกรัมต่อลิตร (1.25 นาโนโมล) สำหรับ dihydrotestoste- rone	- รวดเร็ว - ให้ผลปลอม เนื่องจากการ ละลายสารผ่าน ผนังเซลล์และ รายงานผลลบ	Sohonu และ Sumpter, 1998

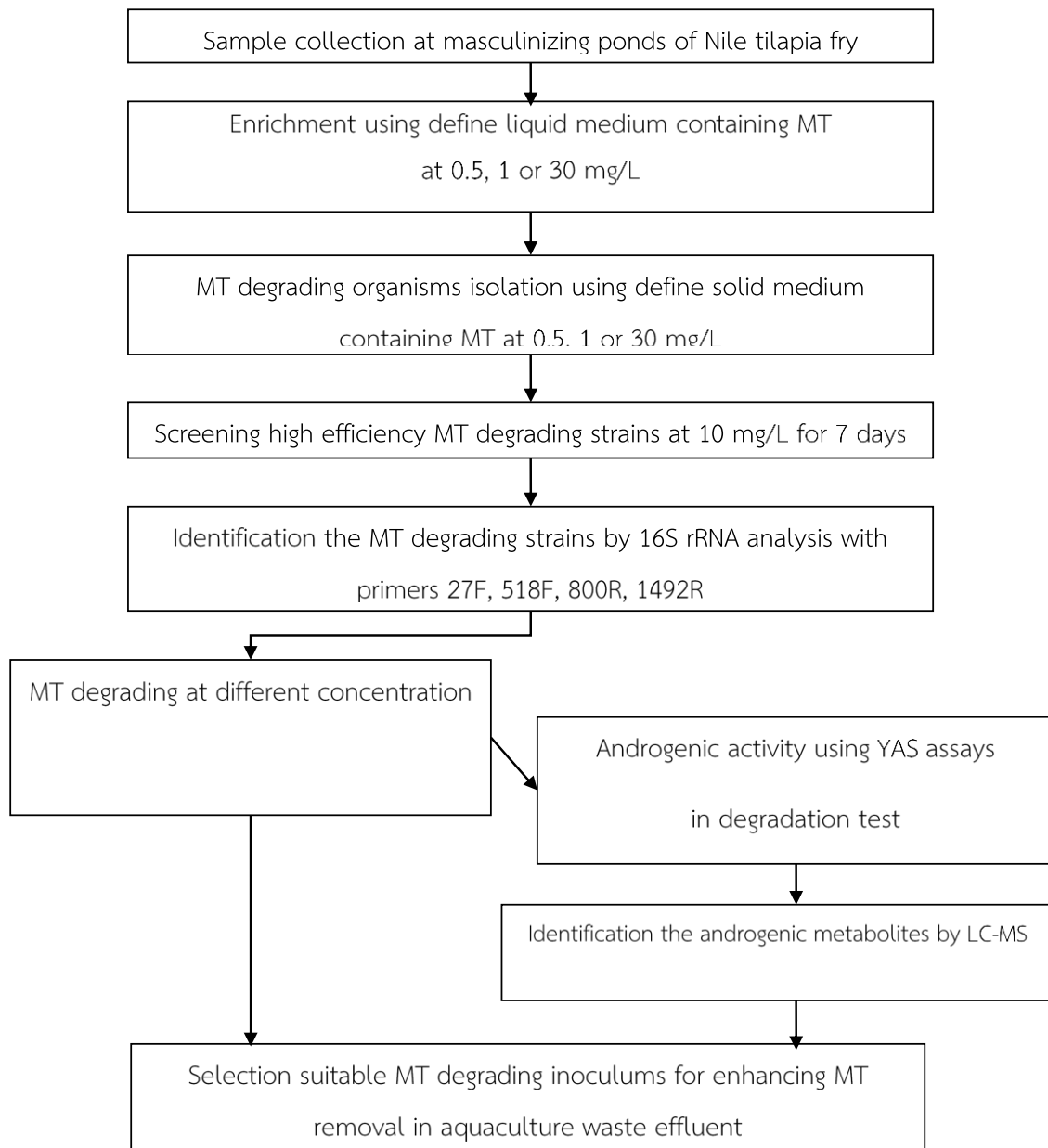
การวิเคราะห์ ในหลอด ทดลอง	หลักการทดสอบ	ข้อจำกัดในการ ทดสอบ	ข้อพิจารณาอื่น ๆ	อ้างอิง
	กับ β -D-galctopyranoside (CPRG) เปลี่ยนเป็นสีแดง (ความยาวคลื่น 540 nm)		ปลอม (Soto et al., 2006)	
การวิเคราะห์ ยีสต์แบบ Two-Hybrid	ยีสต์ สายพันธุ์ Y187 จะเคลื่อนย้าย กับพลาสมิด pGBT9 hRXR β และ พลาสมิด pGAD424 GRIP1/FL ที่มีตัวรับฮอร์โมนเอนโดรเจน และการแสดงออกของยีน β -galactosidase	ข้อจำกัดของการตรวจสอบ MT อยู่ที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Homklin, 2011)	- รวดเร็ว - การละลายสารผ่านผนังเซลล์	Li et al., 2008; Homklin, 2011
การวิเคราะห์ ยีสต์โดย Bioluminescent	ยีสต์ สายพันธุ์ BMA64-1A เคลื่อนย้าย กับ พลาสมิด YipAREluc ที่มีตัวรับฮอร์โมนเอนโดรเจน และพลาสมิด pGEM-luc-skl ที่มีส่วนประกอบยีนลูซิเฟอเรส	ข้อจำกัดในการตรวจสอบปริมาณ 145 นาโนกรัมต่อลิตร (0.5 นาโนโมลสำหรับ dihydrotestosterone	- รวดเร็ว - การละลายสารผ่านผนังเซลล์	Leskinen et al., 2005
การวิเคราะห์ ยีสต์โดย Bioluminescent	ยีสต์ สายพันธุ์ BMA64-1A เคลื่อนย้าย กับพลาสมิด YiplucARE มีตัวรับฮอร์โมนเอนโดรเจน และพลาสมิดและ pRS316-luc ที่มีส่วนประกอบยีนลูซิเฟอเรส	ข้อจำกัดในการตรวจสอบปริมาณ 2.9 นาโนกรัมต่อลิตร (0.1พิโคโมล) สำหรับ testosterone	- รวดเร็ว - การละลายสารผ่านผนังเซลล์	Michellini et al., 2005
A-Screen	เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ MCF-7 ที่มีตัวรับฮอร์โมนเอนโดรเจนในมนุษย์	ผลกระทบของ MT ครั้งหนึ่งในปริมาณ 124 นาโนกรัมต่อลิตร (4.3 พิโคโมล) (Korner et al., 2004)	-ไม่มีอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงเซลล์	Soto et al., 1998

การวิเคราะห์ ในหลอด ทดลอง	หลักการทดสอบ	ข้อจำกัดในการ ทดสอบ	ข้อพิจารณาอื่น ๆ	อ้างอิง
AR-LUX	เซลล์มะเร็งเต้านม T47D/Sutherland ถูกเคลื่อนย้าย กับพลาสมิด pBARE2tatalux+ เซลล์สามารถแสดงออกโดยการชัก นำลูซิเฟอเรสด้วย R1881 ซึ่ง ตรวจสอบได้ ด้วยluminometer	ตรวจวัด MT ที่ ความเข้มข้นที่ต่ำ ที่สุดที่อยู่ในระดับ 303 นาโนกรัมต่อ ลิตร(1 นาโนโมล)	-ไม่มีอุปสรรคใน การเพาะเลี้ยง เซลล์	Blankvoort et al., 2005
Rainbow trout brain assay	จำแนกด้วยการติดฉลากฮอร์โมน radio-labelled ที่เซลล์สมอง ซึ่งสกัดตัวรับเอนโดรเจนที่ ตรวจวัดโดย scintillation counter	แยกเทสโทสเตอ โรนที่ระดับความ เข้มข้น 118 นาโน กรัมต่อลิตร (0.41 นาโนโมล)	-ไม่มี ประสบการณ์ใน การสกัดตัวรับ ฮอร์โมน -ไม่มีอุปสรรค ในการ เพาะเลี้ยงเซลล์	Leusch et al., 2006

บทที่ 3 วิธีการทดลองและระเบียบวิธีวิจัย

3.1. แผนการดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างตะกอนและฟิล์มชีวภาพเก็บรวบรวมจากบ่อแปลงเพศปลานิล ใช้ระดับความเข้มข้นแรกเริ่มที่ต่างกันของ MT ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยเทคนิค Enrichment และ Isolation อัตราการย่อยสลาย MT ประเมินได้ที่ระดับความเข้มข้น ระหว่าง 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร จนถึงระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ย่อยสลาย MT ซึ่งสามารถย่อยสลายระดับความเข้มข้นของ MT ได้ในช่วงกว้าง ความมีฤทธิ์ทางเอนโดรเจนของสารผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา



ภาพที่ 3. 1 แผนการทดลองโดยรวม

การย่อยสลาย MT จะตรวจสอบได้โดยการใช้เทคนิค Yeast androgenic screen ในการทดสอบปฏิกิริยาการย่อยสลายที่ระดับ 5 ไมโครกรัมต่อลิตร 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร การแพร่กระจายของการย่อยสลาย metabolite ของ MT ซึ่งมีฤทธิ์ทางเอนโดรเจน จะนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectrophotometry โดยแผนงานวิจัยซึ่งได้สรุปไว้ในแผนภาพที่ 3.1

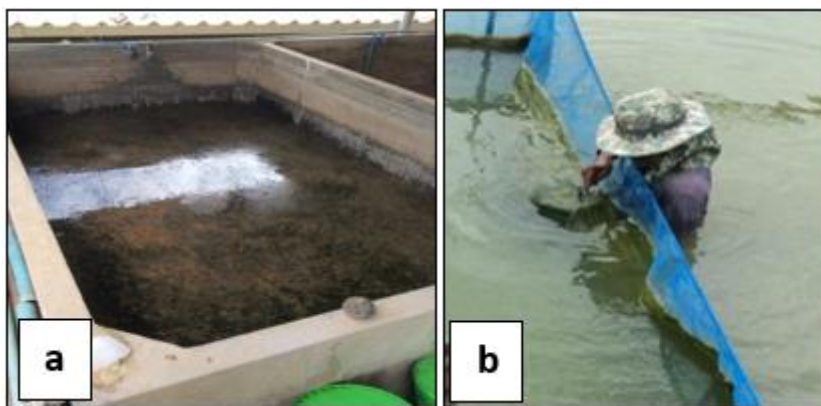
3.2 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลาย MT

เก็บตัวอย่างน้ำจากฟาร์มปลานิลแห่งหนึ่งในภาคกลางของประเทศไทยที่มีการแปลงเพศปลา โดยมีตัวอย่างสองชนิดคือ ตัวอย่างตะกอน (Sediment sample – S) เก็บจากบ่อแปลงเพศแบบบ่อดินและบ่อรับน้ำทิ้งจากบ่อแปลงเพศปลานิลแบบถังไฟเบอร์กลาส (ภาพที่ 3.2 a - c) ส่วนตัวอย่างอีกชนิดหนึ่งนั้นเก็บมาจากฟิล์มชีวภาพ (Biofilm sample - B) ที่ติดอยู่ที่ก้นบ่อแปลงเพศปลานิลแบบคอนกรีตและที่ตาข่ายกะชังในบ่อดิน (ภาพที่ 3.3 a - c) โดยผสมในอัตราส่วนที่เท่ากันโดยปริมาตร

เตรียม Fresh water medium (FWM) 1 ลิตร โดยปรับจาก Tourna et al. (2011) ซึ่งประกอบไปด้วย NaCl 1 g, KH_2PO_4 0.2 g, KCl 0.5 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g และ HEPES buffer 5 g (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) และมีการเติม 1 mL non-chelated trace element (HCl 25% 12.5 mL, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.1 g, H_3BO_3 30 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 190 mg, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 24 mg, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 144 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36 mg ใน 1 L), 1 mL Selenite-tungstate solution (NaOH 0.4 g, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6 mg, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8 mg ใน 1 L), 1 mL vitamin mixture (4-aminobenzoic acid 4 mg, D(+)-biotin 1 mg, Nicotinic acid 10 mg, Calcium D(+)-pantothenate 5 mg, Pyridoxine dihydrochloride 15 mg ใน 100 mL ของ 10 mM Sodium phosphate buffer at pH 7.1), 1 mL Thiamine solution (Thiamine chloride dihydrochloride 10 mg ใน 100 ml of 25 mM Sodiumphosphate buffer at pH 3.4), และ 1 mL ของสารละลาย vitamin B12 (Cyanocobalamine 5 mg ใน 100 mL)



ภาพที่ 3. 2 (a) บ่อดินแปลงเพศ, (b) ถังไฟเบอร์กลาสแปลงเพศ และ (c) จุดรับน้ำเสียจากถังไฟเบอร์กลาส



ภาพที่ 3.3 (a) บ่อคอนกรีตแปลงเพศปลา, (b) ตาข่ายกะชังบ่อแปลงเพศปลาแบบดิน

นำตัวอย่างตะกอน (S) และฟิล์มชีวภาพ (B) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (10%, v/v) ใส่ลงในอาหารสังเคราะห์ FWM medium 200 มิลลิลิตร เติม 17α -methyltestosterone (MT: >97% HPLC grade, ALDAMEX, Switzerland) เป็นแหล่งคาร์บอนเดียวที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 0.5, 5, และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทำละลายด้วยเมทานอล และระเหยออกจากพลาสติกก่อนเติม FWM medium) และได้เติมแอมพลิซิลินในความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย เพื่อต่อการเติบโตของอาเคียตามแบบ Tourn et al. (2011) ดังนั้นจึงมีชุดการทดลองทั้งสิ้น 12 ชุด เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องและมีการเติมอากาศด้วยการเขย่าความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที ตรวจวัดความเข้มข้น MT ด้วย HPLC-DAD (HPLC 1100 series, Agilent Technologies) เป็นระยะ เมื่อใดที่ความเข้มข้นลดลงต่ำกว่า 10% ของความเข้มข้นตั้งต้นจะทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเดิม 10% เพื่อเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น การทดลองดำเนินไป 10 รอบของการเปลี่ยนหัวเชื้อ จึงได้ทำการแยกเชื้อด้วยอาหารแข็ง FWM ที่มีสารละลาย MT ความเข้มข้นเท่าเดิมบนผิวหน้า ที่ได้ระเหยเมทานอลออกแล้ว คัดเลือกมาประมาณ 5 โคโลนีที่มีลักษณะทางกายภาพแตกต่างกันจากแต่ละเพลท จากการสังเกตลักษณะของโคโลนีทั้งสี โครงสร้าง ขนาด และนำไปทำการศึกษาในขั้นต่อไป

3.3. การคัดกรองสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย MT

เตรียมหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 16 มิลลิลิตร ที่มี MT ที่ระเหยแห้งแล้วและคำนวณปริมาณที่จะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิกรัมต่อลิตรใส่ในหลอด จากนั้นเติมอาหารเหลว Fresh Water Medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ จากเพลทอาหารแข็ง PCA ของแต่ละสายพันธุ์ ถ่ายลงในหลอดสำหรับเพาะเลี้ยง ยกเว้นหลอดที่เป็นผลควบลูบ การเพาะเลี้ยงจะให้ผลที่มีประสิทธิภาพได้ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ระดับความเข้มข้นของ MT จะวัดได้ทั้งก่อนและหลังจากระยะการทดสอบ 7

วัน จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงจะยืนยันผลได้ในแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนหลอดทดลองมากขึ้นที่จะประเมินค่าระยะการลดลงของ MT โดยหลอดทดลอง 1 หลอดใช้สำหรับตัวอย่างหนึ่งตัวอย่างเท่านั้น

3.4 การวัดความเข้มข้นของ MT

การวิเคราะห์ MT คือดำเนินการโดยใช้วิธีของ Homklin (2012) ทำการเติมตัวอย่าง 5 มิลลิตรลงในสารละลายเมทานอลปริมาตร 5 มิลลิตรและเขย่าเป็นเวลานาน 1 นาที กรองสารละลายผ่านเยื่อกรอง PTFE (National scientific, USA) ขนาด 0.22 ไมโครเมตรและเติมลงในขวด HPLC จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรฉีดเข้าไปในเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC 1100 series, Agilent Technologies) ติดตั้งโดยใช้รีเวิร์สเฟสคอลัม C18 (250mm×5mm×4.0μm, ODS Hypersil) และต่อเชื่อมกับตัวตรวจวัดสัญญาณที่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ติดตั้งไว้ที่ 245 นาโนเมตรและอุณหภูมิของคอลัมจะอยู่ที่ 40±0.5 องศาเซลเซียส เตรียม Gradient mobile phase โดยการใช้อะซิโตรไนไตรล์ (ACN, HPLC grade, RCI Labscan, Thailand) และน้ำปราศจากไอออน (18Ω, ELGA, UK) ตั้งอัตราส่วนไหลของ mobile phase ให้คงที่ที่ 1 มิลลิตรต่อนาทีโดยในการเริ่มต้นจะใช้อะซิโตรไนไตรล์ เป็นความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นก็ลด mobile phase ให้เหลือความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที และทำการวัดกราฟมาตรฐานในช่วงของ 17α-methyltestosterone ปริมาตร 0.1 – 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีการใช้เทสโทสเตอโรนเป็น surrogate ในการทดลองที่ความเข้มข้นต่ำ

หากมีการทำ solid phase extraction จะกระทำโดยนำตัวอย่างจากการทดลองย่อยสลาย MT ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.1, 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิตร มาผ่านคอลัม Cleanert SPE (บริษัท Agela technologies, USA) ขนาด 3 มิลลิตร 60 มิลลิกรัม ทำการเตรียมความพร้อมของหลอด cartridge โดยการเติมเมทานอล ปริมาตร 6 มิลลิตรเอธานอล ปริมาตร 3 มิลลิตร และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 6 มิลลิตรลงไป จากนั้นทำการเติมตัวอย่างน้ำที่ใช้ทดสอบลงไปปริมาตร 10 มิลลิตร แล้วทำการล้างด้วย น้ำปราศจากไอออนปริมาตร 10 มิลลิตร จากนั้นทำการชะด้วยอะซิโตรไนไตรล์ 5 มิลลิตร แล้วทำการระเหยด้วย dry water bath ตั้งอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเปิดแก๊สไนโตรเจนผ่านระเหยจนเหลือ ปริมาตรเล็กน้อยจากนั้นย้ายไปที่หลอด vial แล้วทำการระเหยด้วย dry baht ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อีกครั้งพร้อมทั้งเป่าแก๊สไนโตรเจนจนแห้งแล้วทำการปรับปริมาตรโดยการเติมอะซิโตรไนไตรล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วไปทำการวัดความเข้มข้นของ MT โดยเครื่อง HPLC ใช้ อะซิโตรไนไตรล์ กับน้ำ เป็น mobile phase ผสมที่อัตราส่วน 70:30 ตามลำดับ ทำการตั้ง flow rate ที่ 1.2 มิลลิตรต่อนาที และทำการตั้งอุณหภูมิคอลัมที่ 25 องศาเซลเซียส และใช้ปริมาตรในการฉีดตัวอย่าง 10

3.5 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ย่อยสลาย MT โดยการวิเคราะห์ 16S rRNA

จีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ถูกสกัดแล้วจะใช้เทคนิค Freezing and Thawing สำหรับ 5 รอบ โดยสรุปโคลนีสายพันธุ์บริสุทธิ์ 2 – 3 โคลนนี้จะถูกเลือกและถ่ายลงในสารละลาย DNase free water (Invitrogen, USA) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วตามด้วยขั้นตอนการนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ในตู้เย็นประมาณ 6 นาทีและขั้นตอนการละลายในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทำซ้ำเป็นจำนวน 10 รอบทำการเพิ่มปริมาณของ DNA Template โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สในการหาลำดับเบสแบบบางส่วนโดยใช้ Universal primers 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'), 518F (5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG 3'), 519F (5' CAG CMG CCG CGG TAA TWC 3'), 800R (5' TACCAGGGTATCTAATCC 3') และ 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (Wang et al., 2009; and Homklin et al., 2012) เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สโดยใช้ชุด Taq DNA polymerase จาก Fermentas (Thermo scientific, USA) ทำตามขั้นตอนตามชุดตรวจตัวอย่าง ตั้งอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สดังต่อไปนี้ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที รอบปฏิกิริยา 35 รอบที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สจะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับเบสโดยบริษัท Macrogen Inc., Korea ดำเนินการโดยใช้โปรแกรม DNA Baser Sequence Assembler เวอร์ชัน 4.14 (Hieracle BioSoft, Romania)

การจำแนกแบคทีเรียทำโดยเปรียบเทียบความเหมือนกันบนลำดับเบสโดยใช้ BLASTn ในฐานข้อมูลของ NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และทำแผนภูมิความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) ด้วยการใช้ clustalW และวิธีการ neighbor joining ทำโดยโปรแกรม Mega software (Tamura et al., 2013)

3.7 การทดสอบการย่อยสลาย MT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการแยกโคลนของเชื้อจุลินทรีย์จากเพลทอาหารแข็ง PCA มาทำการเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani broth ซึ่งลดความเข้มข้นของการเตรียมสารอาหารลงไปครึ่งหนึ่ง ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 18 ± 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วทำการเก็บเซลล์ของจุลินทรีย์โดยใช้เครื่องมือเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 3 ครั้ง แล้วถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงใน Fresh water medium ที่มี MT ความเข้มข้นต่างๆในช่วง 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรถึง 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์มีความคุ้นเคยต่อเอ็มที ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 35-37 องศาเซลเซียส เข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ± 1 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บเซลล์โดยใช้เครื่องมือ

เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการล้างด้วย 0.85 % NaCl จำนวน 3 รอบ แล้วปรับความเข้มข้นให้เชื้อจุลินทรีย์มีความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 10^6 cfu/ml ก่อนการทดลอง

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^6 cfu/ml ปริมาตร 1% V/V มาทำการเลี้ยงในขวดทดลอง สีชาขนาด 30 มิลลิลิตร ที่มีสารอาหาร Fresh water medium ปริมาตร 7 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องแล้วทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วทำการเก็บตัวอย่างขวดทดลอง 3 ข้างแต่ละช่วงเวลามาทำการหาปริมาณ MT ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการ Drop plate และหาความมีฤทธิ์ทาง Androgen ด้วยวิธี Yeast Essay หาชนิดของสารที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย 17α -methyltestosterone (intermediate metabolite) โดยใช้เครื่องมือ Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)

สำหรับการวัดการย่อยสลาย MT ที่ความเข้มข้นต่ำทำโดยนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^6 cfu/ml ปริมาตร 1% V/V มาทำการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารอาหาร Fresh water medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ทำการเติม MT ความเข้มข้น 100, 200 ไมโครกรัมต่อลิตร และมีขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารอาหาร Fresh water medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ทำการเติม MT ความเข้มข้น 100, 200 ไมโครกรัมต่อลิตรเป็นตัวควบคุม ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร 3 ข้างมาทำการผ่าน solid phase extraction แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณ MT ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography

การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์จะใช้วิธี drop plate โดยทำการเจือจางเชื้อ $10^1, 10^2, 10^3$ เท่าแล้วทำการดูดตัวอย่างที่จะทำการนับเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบน Plate Count Agar โดย dilution ละ 3 หยด บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมงแล้วทำการนับจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ในหน่วย cfu/ml

3.8 การวัดความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอาหารชนิดอื่น

สำหรับการคัดแยกลักษณะของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายจากฮอร์โมนชนิดอื่นที่มีการตรวจพบได้เช่นเดียวกันในสิ่งแวดล้อมและยังมีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกันกับโครงสร้างของ MT ฮอร์โมนเช่น เทสโทสเตอโรน เอสโตรเจน(E1) 17β -เอสตราไดออล(E2) และ 17α -เอthinilเอสตราไดออล(EE2) จะถูกคัดเลือกได้ ในการทดสอบการประสิทธิภาพการย่อยสลายจะความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ปริมาตร 10 มิลลิกรัมต่อลิตร การวิเคราะห์เชิงปริมาณของฮอร์โมนในกลุ่มอื่นจะใช้การวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ MT และนอกจากนั้นได้ทำการทดสอบการย่อยสลาย MT ในสภาวะมีกลูโคส เนื่องจากกลูโคสเป็นสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายง่าย จุลินทรีย์จำนวนมากสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ อาจส่งผลถึงความสามารถในการย่อยสลาย

MT ดังนั้นในระหว่างการทดลองการย่อยสลาย MT ที่ความเข้มข้น 10 mg/L บางชุดได้เติมกลูโคสความเข้มข้น 20 mg/L เข้าไปในหลอดทดลอง ซึ่งได้คำนวณแล้วว่ามีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ MT ในความเข้มข้นที่ทำการทดลอง และนอกจากนี้ได้ทดลองในสภาวะมีอากาศและไร้อากาศ

3.9 การทดสอบ Androgenic activity โดยใช้วิธี Yeast assay

ทำโดยการนำเชื้อยีสต์ปรับปรุงพันธุกรรมให้สามารถตรวจสอบความมีฤทธิ์ Androgenic ได้สายพันธุ์ AR ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก Professor Takashi Yagi มหาวิทยาลัย Osaka Prefecture ประเทศญี่ปุ่น ในการทดลองได้ใช้วิธีวิเคราะห์ที่ปรับปรุงจาก Shiizaki et al., 2010 และ Kawanishi et al., 2004 ซึ่งได้ทำการทดลองดังนี้ นำเชื้อที่เก็บใน - 80 องศาเซลเซียส มาทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง SDC ที่อุณหภูมิห้อง 35 - 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±1 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อโคลนของยีสต์ไปเลี้ยงที่อาหารเหลว SDC ที่อุณหภูมิห้อง 35 - 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18±1 ชั่วโมง ความเร็วรอบของการเขย่าเชื้อ 200 รอบต่อนาที แล้วทำการวัดความเข้มแสงในช่วงความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ปรับค่าความเข้มแสงของเชื้อให้เท่ากับ 1 โดยการเจือจางด้วยอาหารเหลว SDC จากนั้นนำเชื้อยีสต์ย้ายลงไป 96 well plate 10 ไมโครลิตร เติมน้ำอาหารเหลว SDC ปริมาตร 90 ไมโครลิตร เติมน้ำตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ 1 ไมโครลิตร ใช้สาร Dimethyl sulfoxide เป็น blank ปริมาตร 1 ไมโครลิตรในการทดสอบ แล้วทำการปิดฝา บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18±1 ชั่วโมง ย้ายตัวอย่างที่ทำการบ่ม 10 ไมโครลิตร ลงบน 96 well plate ใหม่ที่มีการเติมสารละลาย z buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำการวัดความเข้มแสงของตัวอย่างด้วยเครื่อง multiplate reader วัดที่ความยาวคลื่น 405 และ 595 นาโนเมตร ดังรูป 3.4 การคำนวณค่า Increase of induction สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\text{Increase of in duction} = \frac{OD_{405, \text{ตัวอย่าง}}}{OD_{595, \text{ตัวอย่าง}}} - \frac{OD_{405, \text{Blank}}}{OD_{595, \text{Blank}}}$$

การเตรียมสารละลายทำดังนี้

เตรียมอาหารเหลว SDC broth 3- กลูตามีน 2 เปอร์เซ็นต์ (ทริปโตเฟน ลูซีน ยูราซิล, กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมดังต่อไปนี้ แหล่งไนโตรเจนมีองค์ประกอบดังต่อไปนี้ Yeast Nitrogen based w/o amino acids and (NH₃)₂SO₄ ปริมาตร 1.7 g (NH₃)₂SO₄ ปริมาตร 5 g 5M NaOH 500 µL Dropout powder 3- ปริมาตร 1.19 g น้ำปราศจากไอออนปริมาตร 900 mL ฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำและความดันสูง แหล่งคาร์บอนจะเตรียมได้จาก กลูโคส 20 เปอร์เซ็นต์เตรียมแยกในขวดรูปชมพู่จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำและความดันสูง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนลงไปในอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน

ทำการเตรียมอาหารเหลว SGC broth 3- กาแลคโตส 2 เปอร์เซ็นต์ (ทริปโตเฟน ลูซีน ยูเรซิน กาแลคโตส 2 เปอร์เซ็นต์และวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมดังต่อไปนี้ แหล่งไนโตรเจนมีองค์ประกอบดังต่อไปนี้ Yeast Nitrogen based w/o amino acids and $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ ปริมาตร 1.7 g $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ ปริมาตร 5 g 5M NaOH 500 μL Dropout powder 3- ปริมาตร 1.19 g น้ำปราศจากไอออนปริมาตร 900 mL ฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำและความดันสูง แหล่งคาร์บอนจะเตรียมได้จาก กลูโคส 20 เปอร์เซ็นต์เตรียมแยกในขวดรูปชมพู่จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำและความดันสูง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนลงไปในการอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน

การเตรียม Dropout power ซึ่งผงกรดอะมิโน (3 กรดอะมิโน ทริปโตเฟน ลูซีน ยูเรซิล) เตรียมสารดังต่อไปนี้ กรดอะมิโนอะดีนีน 2.5 g กรดอะมิโนแอล-แอสพาราติก 6.0 g กรดอะมิโนแอล-ฮีสทีดีน 1.2 g กรดอะมิโนแอล-อาร์จินีน-กรดไฮโดรคลอริก 1.2 g กรดอะมิโนแอล-เมไทโอนีน 1.2 g กรดอะมิโนแอล-ไลซีน-กรดไฮโดรคลอริก 1.8 g กรดอะมิโนแอล-กลูตามิก 6.0 g กรดอะมิโนแอล-วาเลอีน 9.0 g กรดอะมิโนแอล-เซอรีน 22.5 g กรดอะมิโน กรดอะมิโนแอล-ทรีโอนีน 12.0 g กรดอะมิโนแอล-ไทโรซีน 1.8 g กรดอะมิโนแอล-เฟนิลอลานีน 3.0 g บดให้ละเอียดด้วยโกร่งจนเป็นผงละเอียดตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

เตรียมลิแกรนด์ใช้เป็นมาตรฐานหรือสำหรับการทดสอบตัวอย่าง ดังต่อไปนี้

ละลายสารเคมีมาตรฐานใน สาร Dimethyl Sulfoxide ที่ความเข้มข้นโดยประมาณ (ตัวอย่าง MT ปริมาตร 100 mM ปริมาตร 1.51 mg ใน 50 μL ไม่นำสาร Dimethyl Sulfoxide ไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการใช้ความดันไอน้ำสูง สำหรับสารละลายมาตรฐาน ทำการเตรียมระดับการเจือจาง 10 ระดับการเจือจางที่ระดับการเจือจาง $10^{-1} - 10^{-10}$ ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรในหลอดที่มีปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เมื่อทำการเติมสารปริมาตร 1 μL ในแต่ละระดับความเข้มข้นตั้งแต่ $10^{-2} - 10^{-10}$ ความเข้มข้นสุดท้ายที่ระดับการเจือจาง $10^{-4} - 10^{-10}$ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย O – Nitrophenol – β – D-galactopyranoside (ONPG) ทำการเตรียมสารดังต่อไปนี้ OPNG 0.1 g และน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร ละลายเข้าด้วยกัน ทำการเติมสารละลายส่วนใส ปริมาตร 1 mL ในหลอดที่มีปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรและเก็บรักษา -20 องศาเซลเซียส เตรียมสารละลาย N-Laurylsarcosin sodium salt ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ เตรียมสารละลายดังต่อไปนี้ Sarcosin ปริมาตร 10 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน 90 mL เขย่าให้เข้ากันและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เตรียมสารละลาย Dithiothreitol (DTT) ปริมาตร 200 mM ทำการเตรียมสารละลายดังต่อไปนี้ ละลาย DTT ปริมาตร 0.154 ในน้ำปราศจากไอออน 5 mL เขย่าให้เข้ากัน ทำการเติมส่วนใสปริมาตร 500 μL ลง

ในหลอดทดลอง 1.5 mL และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส การเตรียมสารละลาย Z buffer working เตรียมสารละลาย Z buffer ในสารละลายน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 500 mL เตรียมดังต่อไปนี้ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 11.94 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.47 g, KCl 0.41 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.14 g เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เตรียมละลาย working solution ประกอบด้วยสารเคมีดังต่อไปนี้ Z buffer 9 mL, 0.2M Dithiothreitol 100 μL ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส, 10 mg/mL ONPG 1 mL ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส, 10% N-Laurylsarcosine sodium salt 200 μL

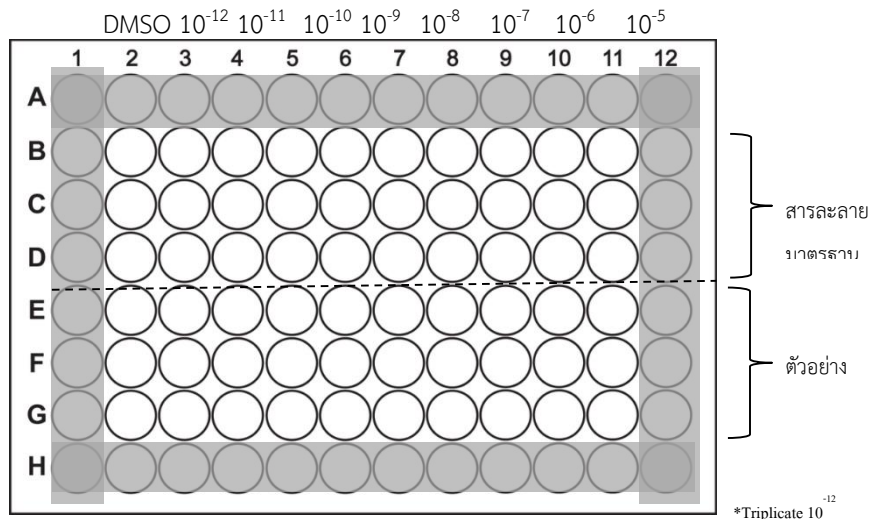
1. ก่อนทำการเพาะเลี้ยง

- 1 ทำการเชื้อเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากสต็อกเชื้อและทำการถ่ายลงบนอาหารแข็ง SDC ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วทำการ streak ลงบนอาหารแข็ง
- 2 ทำการเพาะเชื้อ 1 คืบเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 – 2 สัปดาห์
- 3 ทำการเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ บนจานเพาะเชื้อและถ่ายลงในอาหารเหลว SDC ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที นาน 18 ชั่วโมง
- 4 เจือจางเซลล์แขวนลอย 10 ครั้ง (เซลล์แขวนลอย 1350 μL และปริมาตรน้ำปราศจากไอออน 1500 μL) และใช้น้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1500 μL สำหรับเป็น Blank แล้วทำการวัดความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์ด้วย ค่าความเข้มข้นของแสงที่ 1.0 ด้วยสารละลาย SDC (3-) ปลอดเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามสมการดังต่อไปนี้

$$V \mu\text{L} = \frac{1000 \mu\text{LOD}}{\times 1.0}$$

2. ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา

1. เติมสารละลาย SGC broth ปริมาตร 90 มิลลิลิตรลงในเพลท 96 หลุม ดังรูป
2. เติมยีสต์ปริมาตร 10 μL ลงในหลุมทั้งหมด
3. เติมลิแกนด์ (สารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ) ปริมาตร 10 μL ลงในหลุมทั้งหมด จากนั้นเติม สาร DMSO ปริมาตร 1 μL ใน blank เคาะเบา ๆ เพื่อให้สารละลายผสมเข้ากัน
4. ปิดด้วยแผ่นปิดเพลท เพื่อป้องกันการระเหย
5. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ไม่ต้องเขย่า



3. ขั้นตอนการแสดงผล

1. ถ่ายเซลล์ที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยงปริมาตร 10 μ L ลงในเพลทใหม่ ทำการเคาะเบา ๆ ก่อนการถ่ายเพื่อป้องกันยีสต์ตกตะกอน
2. เติมสารละลาย Z buffer working ที่มีส่วนผสมของ ONPG ปริมาตร 100 μ L ระวังกการเกิดฟองขึ้น
3. บ่มไวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
4. วัดค่าการเจริญด้วยเครื่องวัดการกลืนแสง ค่าการความเข้มข้นของแสงที่ 405 นาโนเมตร สำหรับกิจกรรมของยีสต์และวัดค่าความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ที่ค่าความเข้มข้นของแสงที่ 595 นาโนเมตร ทุก ๆ 30 นาที ก่อนการวัดค่าความเข้มข้นของแสงเคาะเบา ๆ อย่างระมัดระวัง

4. ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ใช้โปรแกรม Excel 2013 ในการคำนวณด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Increase of induction} = \frac{OD_{405,lig}}{OD_{595,lig}} - \frac{OD_{405,DMSO}}{OD_{595,DMSO}}$$

2. ให้ระยะเวลาการเตรียม (Exposure time) เป็นค่าสูงสุดและใช้ค่าระยะเวลาการเตรียมเป็นค่าเปรียบเทียบ
3. ร่างกราฟมาตรฐานและหาสมการเส้นตรงทำการประมาณค่ากิจกรรมของเซลล์ยีสต์

3.10 Metabolites analysis with Liquid chromatography-mass spectrometry analysis

นำตัวอย่างที่กรองแล้วที่อยู่ในขวด vial สีชา ซึ่งปรากฏบริเวณพีคกราฟของสาร metabolite จากการวัด HPLC มาทำการฉีดตัวอย่างที่เครื่อง Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) ทำ

การวัดในช่วงความยาวคลื่นที่ 245 นาโนเมตรและตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์ตั้งที่ 40 ± 0.5 °C mobile phase ในการ
ทำจะเป็น acetonitrile ผสมกับน้ำปราศจากไอออน^(18Ω, ELGA, UK) ตั้งอัตราการไหลของ mobile phase ให้คงที่ที่
1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยในการเริ่มต้นจะใช้ acetonitrile เป็นความเข้มข้น 60% และเพิ่มเป็น 95% เป็นเวลา 6
นาที่ จากนั้นก็ลด mobile phase ให้เหลือความเข้มข้น 60% เป็นเวลา 3 นาที่ แล้วทำการวิเคราะห์ข้อมูล
ชนิดสารด้วยข้อมูลในแหล่งอ้างอิง

บทที่4 ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์

ได้ทำการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ย่อยสลาย MT ด้วยวิธี Enrichment ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FWM medium broth โดยแบ่งเป็น 12 ชุดการทดลอง หลังจากการเปลี่ยนอาหารถ่ายเชื้อเป็นเวลา 10 ครั้ง (Subculture) จึงทำการแยกเชื้อด้วยอาหารแข็ง FWM agar ที่เติม MT บนผิวหน้าในความเข้มข้นเดียวกับที่ทำ Enrichment จากการสังเกตลักษณะของโคโลนีทั้งสี โครงสร้าง ความหนา และขอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ได้ทำการคัดเลือกมาประมาณ 5 โคโลนีที่มีลักษณะทางกายภาพแบบเดียวกันจากแต่ละเพลท โดยรวมแล้วได้ทำการคัดแยกมา 130 โคโลนี

ตารางที่ 4. 1 ลักษณะโคโลนีที่คัดเลือกเพื่อนำมาทดสอบการย่อยสลาย MT

Source	Initial MT concentration	Colony morphology			
		Color	Form	Elevation	Margin
Sediment (S)	0.5 mg/L	White	Circular	Convex	Entire
		Transparent	Circular	Convex	Undulate
		Brown	Circular	Convex	Entire
	0.5 mg/L + Ampicillin (A)	Cream	Circular	Convex	Entire
		Brown	Irregular	Flat	Lobate
		White	Punctiform	Convex	Entire
		Brown	Circular	Convex	Entire
	5mg/L	White	Punctiform	Convex	Entire
		White	Circular	Convex	Entire
	5 mg/L + Ampicillin (A)	Cream	Circular	Convex	Undulate
		Brown	Circular	Convex	Entire
		White	Punctiform	Convex	Entire
	30 mg/L	White	Circular	Flat	Undulate
		White	Circular	Convex	Entire
		Brown	Circular	Convex	Entire

	30 mg/L + Ampicillin (A)	Yellow	Circular	Convex	Undulate
		White	Punctiform	Convex	Entire
Biofilm	0.5 mg/L	White	Punctiform	Convex	Entire
		White	Circular	Convex	Entire
	0.5 mg/L + Ampicillin (A)	Brown	Circular	Convex	Entire
		White	Circular	Convex	Entire
	5 mg/L	White	Punctiform	Convex	Entire
		Brown	Punctiform	Convex	Entire
	5 mg/L + Ampicillin (A)	White	Circular	Convex	Entire
		Yellow	Circular	Convex	Undulate
	30 mg/L	Brown	Circular	Convex	Entire
		White	Punctiform	Convex	Entire
		Cream	Circular	Convex	Undulate
	30 mg/L + Ampicillin (A)	White	Punctiform	Convex	Entire
		White	Circular	Convex	Entire
		Brown	Circular	Convex	Entire

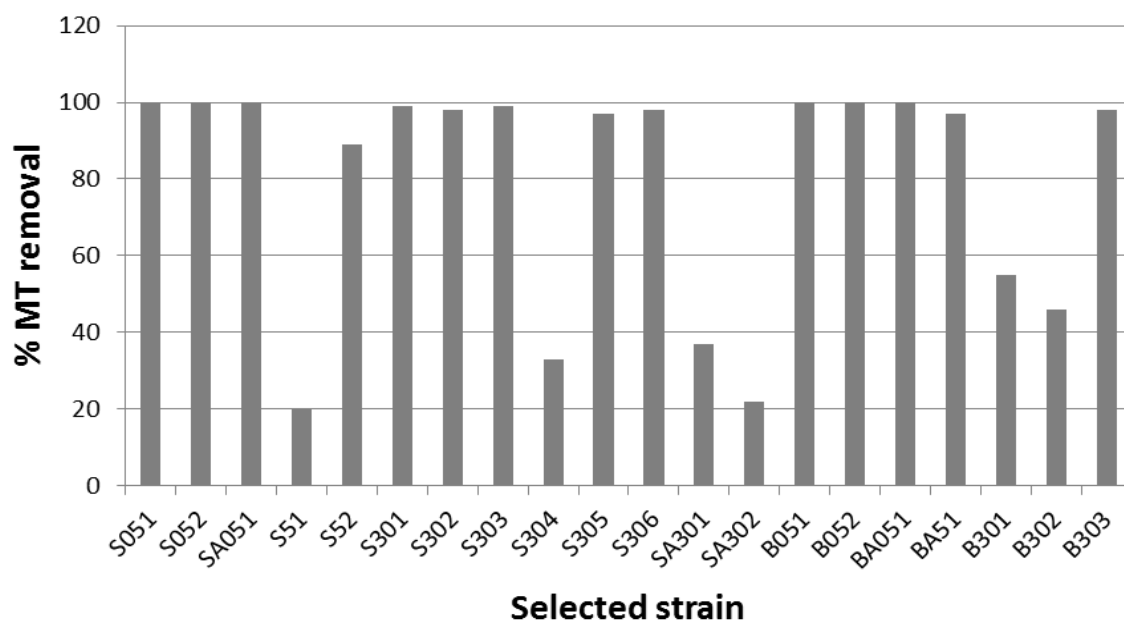
4.2. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย 17 α -methyltestosterone (MT) ในเบื้องต้น

จุลินทรีย์ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันทั้ง 130 โคโลนี ได้นำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายฮอร์โมน MT ในเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 10 mg/L เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า มีเพียง 14 โคโลนีที่ย่อยสลาย MT ได้มากกว่า 80% จากความเข้มข้นตั้งต้น ซึ่ง 9 โคโลนีในนั้นมาจากตัวอย่างตะกอน และอีก 5 โคโลนีในนั้นมาจากฟิล์มชีวภาพ จุลินทรีย์ทั้ง 14 ตัวนี้ได้ถูกนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย ฮอร์โมน MT เพิ่มเติม และนอกจากนี้ได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างถึงแม้จะมีความสามารถในการย่อยสลาย MT ที่ต่ำกว่าเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไปด้วย ภาพที่ 4.1 แสดงความสามารถของจุลินทรีย์ทั้ง 20 ชนิดในการย่อยสลายฮอร์โมน MT และตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะทางกายภาพรวมทั้งแหล่งที่มาของจุลินทรีย์เหล่านั้น

ตารางที่ 4. 2 ลักษณะโคโลนีและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย MT ที่ 10 mg/L ได้ใน 7 วัน

Selected strain	Colony characteristic				Source
	Color	Form	Elevation	Margin	
S051	Brown	Circular	Convex	Entire	Sediment, 0.5 mgMT/L, no ampicillin
S052	Brown	Circular	Convex	Entire	
SA051	Brown	Irregular	Flat	Lobate	Sediment, 0.5 mgMT/L, with ampicillin
S51	White	Punctiform	Convex	Entire	Sediment, 5 mgMT/L, no ampicillin
S52	White	Circular	Convex	Entire	
S301	White	Circular	Flat	Undulate	Sediment, 30 mgMT/L, no ampicillin
S302	White	Circular	Flat	Undulate	
S303	White	Circular	Flat	Undulate	
S304	White	Circular	Convex	Entire	
S305	White	Circular	Flat	Undulate	
S306	White	Circular	Flat	Undulate	
SA301	Cream	Irregular	Umbonate	Undulate	Sediment, 30 mgMT/L, with ampicillin
SA302	Cream	Irregular	Umbonate	Undulate	
B051	White	Punctiform	Convex	Entire	Biofilm, 0.5 mgMT/L, no ampicillin
B052	white	Circular	Convex	Entire	
BA051	White	Circular	Convex	Entire	Biofilm, 0.5 mgMT/L, with ampicillin

Selected strain	Colony characteristic				Source
	Color	Form	Elevation	Margin	
BA51	White	Circular	Convex	Entire	Biofilm, 5 mgMT/L, with ampicillin
B301	Brown	Circular	Convex	Entire	Biofilm, 30 mgMT/L, no ampicillin
B302	Brown	Circular	Convex	Entire	
B303	White	Punctiform	Convex	Entire	



ภาพที่ 4. 1 การย่อยสลายฮอร์โมน MT ที่ 10 mg/L ภายใน 7 วัน ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมา 20 ชนิด

4.3. การตรวจสอบชนิดจุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีนส์ 16s rRNA

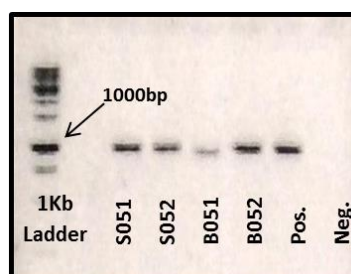
จุลินทรีย์ทั้ง 20 ชนิดที่สามารถย่อยสลาย MT ได้ค่อนข้างสูงจากการทดสอบในเบื้องต้นที่ 10 mg/L ภายในหนึ่งสัปดาห์นั้นถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Freeze thaw และเพิ่มปริมาณยีนส์ 16s rRNA ด้วย universal primer 519F และ 1492R ที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรียและอาร์เคีย (Wang et al., 2009) และทำการ sequencing ด้วยไพรเมอร์ 1492R เพียงด้านเดียว และจุลินทรีย์บางชนิด

ได้มีการทำ PCR กับไพรเมอร์ 27F และ 1492R จากนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 518F, 800R เป็นการเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลดีเอ็นเอเกือบทั้งเส้นความยาวของยีนส์ 16s rRNA แล้วจึงเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล BLAST

การทำ Freeze thaw และการทำ PCR นั้นจะต้องมีการปรับวิธีให้เหมาะสมในแต่ละตัวอย่างเพราะจุลินทรีย์มีความแตกต่างกันตามธรรมชาติ ซึ่งพบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยการทำให้แข็ง (freezing) โดยการแช่ตู้เย็น -80°C 3 นาทีและทำละลาย (thawing) ที่ dry-bath incubator 75°C 5 นาที ให้ผลการสกัดดีเอ็นเอที่ดี แต่บางตัวอย่างก็ยังมีปัญหาการทำ PCR อันเนื่องมาจากมีสารยับยั้งปฏิกิริยาในเซลล์ จึงต้องทำการเจือจางบางตัวอย่าง 10 เท่า หรือ 100 เท่าก่อนทำปฏิกิริยา PCR

ภาพที่ 4.2 แสดงตัวอย่าง electrophoresis เจลที่บ่งบอกผลของการสกัดดีเอ็นเอและทำ PCR กับไพรเมอร์ 519F และ 1492R หากมีเส้นแถบดีเอ็นเอเกิดที่ตำแหน่งประมาณ 1000 bp จะหมายถึงการมีอยู่ของดีเอ็นเอที่สามารถนำไปวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ต่อไปได้ ส่วนการทำ PCR กับไพรเมอร์ full length 16s rRNA gene คือ 27F และ 1492R จะพิจารณาที่ตำแหน่งเส้นดีเอ็นเอที่ประมาณ 1500 bp จากการปรับวิธีอยู่หลายครั้งก็ยังคงไม่สามารถทำ PCR เชื้อ B303 ได้ เชื้อชนิดนี้มีลักษณะโครงสร้างเซลล์ที่แข็งแรงเป็นพิเศษเนื่องจากมีเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย MT ได้ในระดับเดียวกันหลายชนิดแล้ว จึงไม่ได้ใช้เชื้อ B303 ในการทำการทดลองต่อไป

จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ มีผลที่ใช้ได้เพียง 8 โคลนเท่านั้น ส่วนที่เหลือมีปัญหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ อันอาจเกิดเพราะการใช้จุลินทรีย์หลายโคลนมาทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มากเพียงพอ เนื่องจากทั้ง 8 ตัวที่ได้ครอบคลุมจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย MT ได้ในปริมาณสูง จึงได้ทำการทดลองต่อกับเชื้อเพียง 8 ชนิดเท่านั้น



ภาพที่ 4.2 ตัวอย่างภาพ electrophoresis gel ของผลของปฏิกิริยา PCR กับ primer 519F and 1492R

ตารางที่ 4.3 การระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จาก MT enrichment cultures

Isolates	Closest matched sequences	Accession number	% similarity
B051	<i>Acinetobacter</i> sp. SCU-B268	KJ000864.1	99% (1301bp/1404bp)
B052	<i>Ochrobactrum</i> sp. C-1	KF479631.1	99% (1326bp/1447bp)
BA051	<i>Pseudacidovorax</i> sp. strain NH-1	HQ834240.1	99% (794bp/1493bp)
S051	<i>Acinetobacter</i> sp. U1369- 101122-SW178-2	JQ082154.1	99% (1311bp/1443bp)
S052	<i>Ochrobactrum</i> sp. FCp1	KJ009242.1	99% (1413bp/1429bp)
S303	<i>Nocardioides</i> sp. DF412	AB373748.1	99% (1307bp/1463bp)
S304	<i>Ensifer</i> sp. strain A6(2012)	JX941528.1	99% (721bp/1356bp)
SA301	<i>Pseudacidovorax</i> sp. strain NH-1	HQ834240.1	100% (721bp/1493bp)

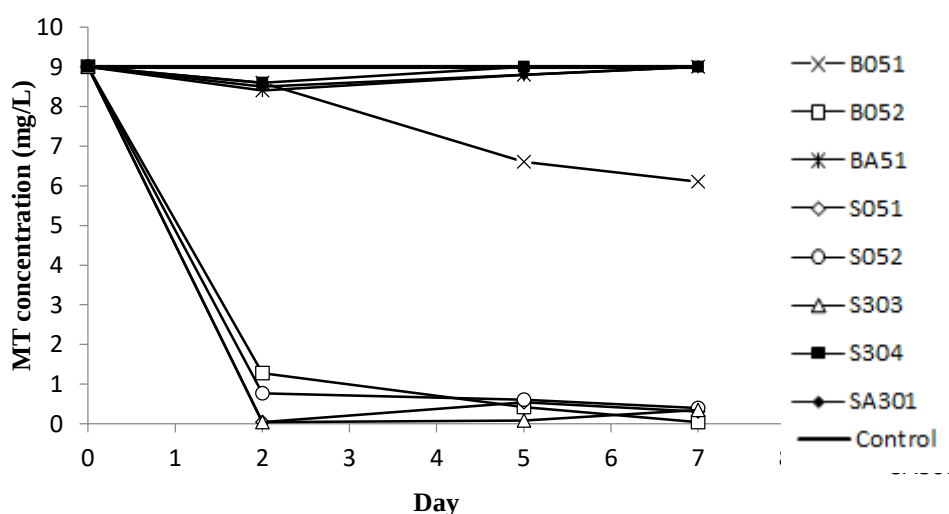
ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอเทียบกับโปรแกรม BLAST ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 คือ เชื้อ B051 ที่มาจากฟิล์มชีวภาพ และ S051 ที่มาจากตะกอนบ่อ มีลำดับดีเอ็นเอใกล้เคียงถึง 99% กับเชื้อ *Acinetobacter* sp. ในฐานข้อมูล ส่วนเชื้อ B052 ที่มาจากฟิล์มชีวภาพ และ S052 ที่มาจากตะกอน มีความใกล้เคียงกับ *Ochrobactrum* sp. ถึง 99% นอกจากนี้เชื้อ BA051, S303, S304, และ SA301 ใกล้เคียงกับ *Pseudacidovorax* sp., *Nocardioides* sp., *Ensifer* sp. และ *Pseudacidovorax* sp. ที่ระดับมากกว่า 99% ตามลำดับ จะเห็นว่าจากการทดลองไม่พบเชื้อจุลินทรีย์อาศัยเลย และในสภาวะที่ปฏิชีวนะเพื่อระงับการโตของแบคทีเรียก็กลับมีแบคทีเรียคือยา Ampicillin เกิดขึ้น จุลินทรีย์อาศัยอาจไม่มีบทบาทในการย่อยสลาย MT หรือไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่ทำการศึกษา

4.4. การตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายฮอร์โมนในหนึ่งสัปดาห์

เพื่อยืนยันความสามารถของจุลินทรีย์ 8 ชนิดนี้ในการย่อยสลาย MT จึงได้ทำการทดลองอีกครั้ง และเก็บตัวอย่างเป็นระยะๆ หลายครั้งภายในหนึ่งสัปดาห์ จากความเข้มข้น MT เริ่มต้นที่ 10 mg/L มีจุลินทรีย์เพียง 5 ชนิดเท่านั้นที่สามารถลด MT ได้อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 4.3) ซึ่งคือเชื้อ B051 และ B052 ที่คัดแยกจากฟิล์มชีวภาพในการเอนริชที่ 0.5 mg/L เชื้อ S051 และ S052 จากตะกอนบ่อที่ได้จากการเอนริชที่ 0.5 mg/L และเชื้อ S303 ที่ได้จากตะกอนในการเอนริชที่ 30 mg/L เชื้อทุกตัวสามารถ MT ลงเหลือความเข้มข้นต่ำกว่า 2 mg/L ภายใน 2 วัน ยกเว้นเชื้อ B051 ที่ย่อยสลาย MT ได้เหลือเพียง 6-7 mg/L ภายในเวลา 5 วัน

จุลินทรีย์ 3 ชนิดที่เหลือที่ไม่สามารถย่อยสลาย MT ได้ในการทดลองครั้งนี้ คือ BA51, SA301, และ S304 ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์เหล่านี้จะย่อยสลาย MT ได้ 97%, 37%, และ 33% ตามลำดับในการทดสอบครั้งแรก เนื่องจากการทดลองเบื้องต้นไม่ได้มีการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ ใช้เพียงหนึ่งโคโลนีในการเติมเชื้อซึ่งมีขนาดไม่เท่ากัน และไม่ได้มีการทำซ้ำ ดังนั้นจึงไม่สามารถเปรียบเทียบความสามารถเชิงปริมาณได้ชัดเจน

จากการวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ก่อนหน้านี้ด้วยการตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอของยีนส์ 16s rRNA เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ B052, S051, S052 และ S303 ที่ถูกระบุเป็นเชื้อ *Ochrobactrum* sp. C-1, *Acinetobacter* sp., *Ochrobactrum* sp. และ *Nocardioide* sp. ตามลำดับ ในการทดลองครั้งที่ 2 สามารถกำจัด MT ได้ 100% ภายใน 2 วัน ส่วนในการทดลองแรกสามารถกำจัดได้ 99% จึงสามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดว่าเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถย่อยสลาย MT ได้ ส่วนเชื้อ B051 หรือที่ถูกระบุเป็นเชื้อ *Acinetobacter* sp. ที่สามารถกำจัด MT ได้ 30% ในการทดลองที่ 2 และกำจัดได้ 100% ในการทดลองแรก ก็สามารถสรุปว่าเป็นเชื้อที่ย่อยสลาย MT ได้แต่ด้วยความสามารถที่อาจน้อยกว่า



ภาพที่ 4.3 การลดลงของ MT ในหนึ่งสัปดาห์ที่ 10 mg/L ของจุลินทรีย์ที่ทำการคัดเลือกมา 8 ชนิด

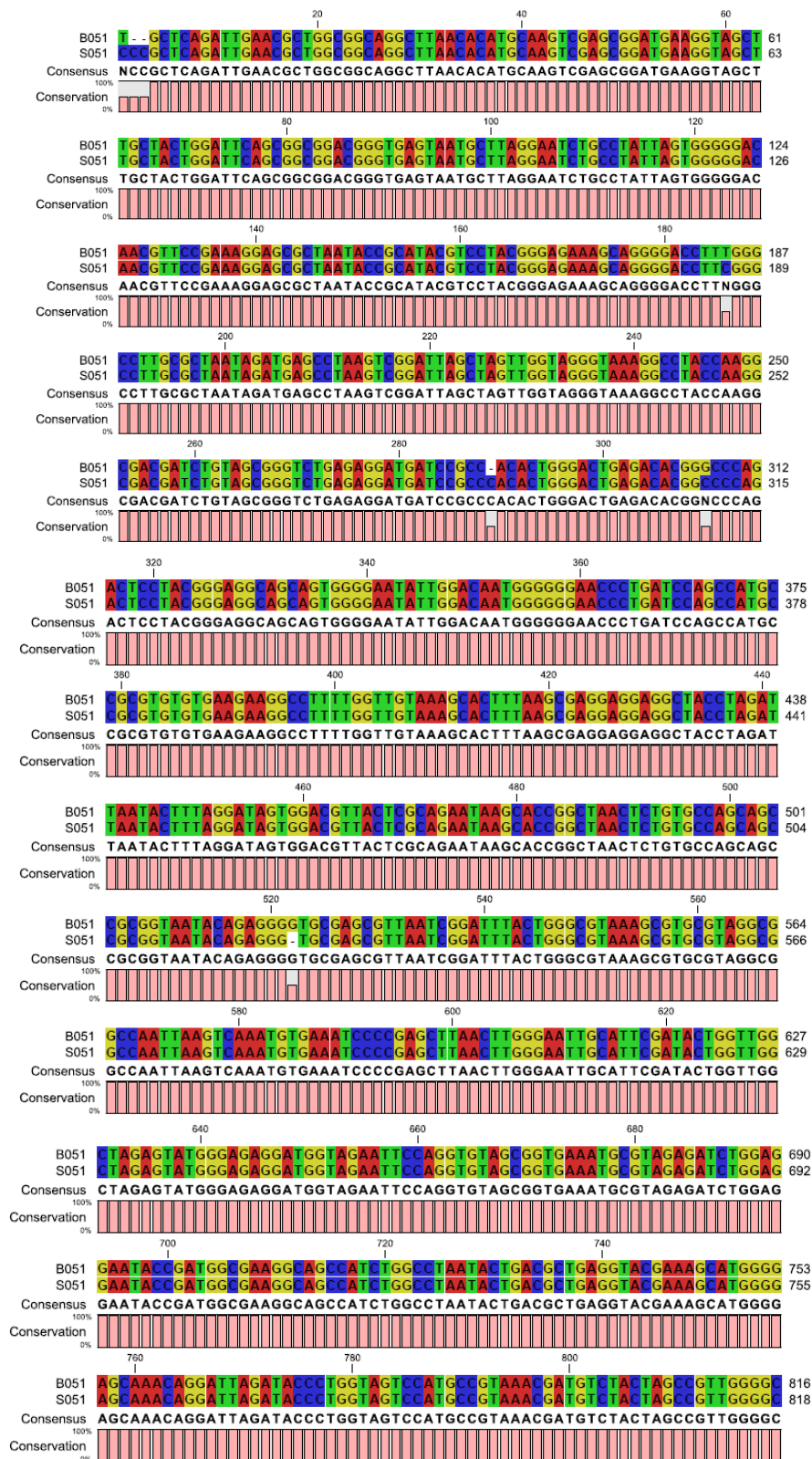
4.5. การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของจุลินทรีย์ย่อยสลาย MT

ภายในเชื้อจุลินทรีย์ 5 ชนิดที่ย่อยสลาย MT ได้ดีในการทดลองที่ 2 เนื่องจากมีจุลินทรีย์ที่อยู่ในจีนัสเดียวกันซ้ำซึ่งอาจเป็นชนิดเดียวกัน คือ เชื้อ B051 และ S051 ที่ถูกระบุเป็น *Acinetobacter* sp. และเชื้อ B052 และ S052 ที่ถูกระบุเป็น *Ochrobactrum* sp. จึงได้ทำการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอโดยละเอียดของยีนส์ 16s rRNA full length sequence การวิเคราะห์พบว่าเชื้อ B051 และ S051 มีความคล้ายคลึงกันถึง 99.8% และเชื้อ B052 และ S052 มีความคล้ายคลึงกันถึง 100% ดังแสดงในภาพที่ 4.4 – 4.5 Yarza และคณะ (2014) กล่าวว่าสิ่งมีชีวิตที่อยู่ใน Species เดียวกันมีความเหมือนของดีเอ็นเอมากกว่า 98.7% (Species cutoff) ดังนั้นจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาที่เหมือนกันสองชนิดดังกล่าวในทั้งสองกรณีจึงถูกเลือกมาเพียงชนิดเดียวเพื่อทำการทดลองต่อไป คือ *Acinetobacter* sp. (B051) และ *Ochrobactrum* sp. (B052) สรุปได้ว่าการทดลองโคเนติกจะทำกับจุลินทรีย์ 3 ชนิดคือ เชื้อ B051, B052, และ *Nocardioide* sp. (S303)

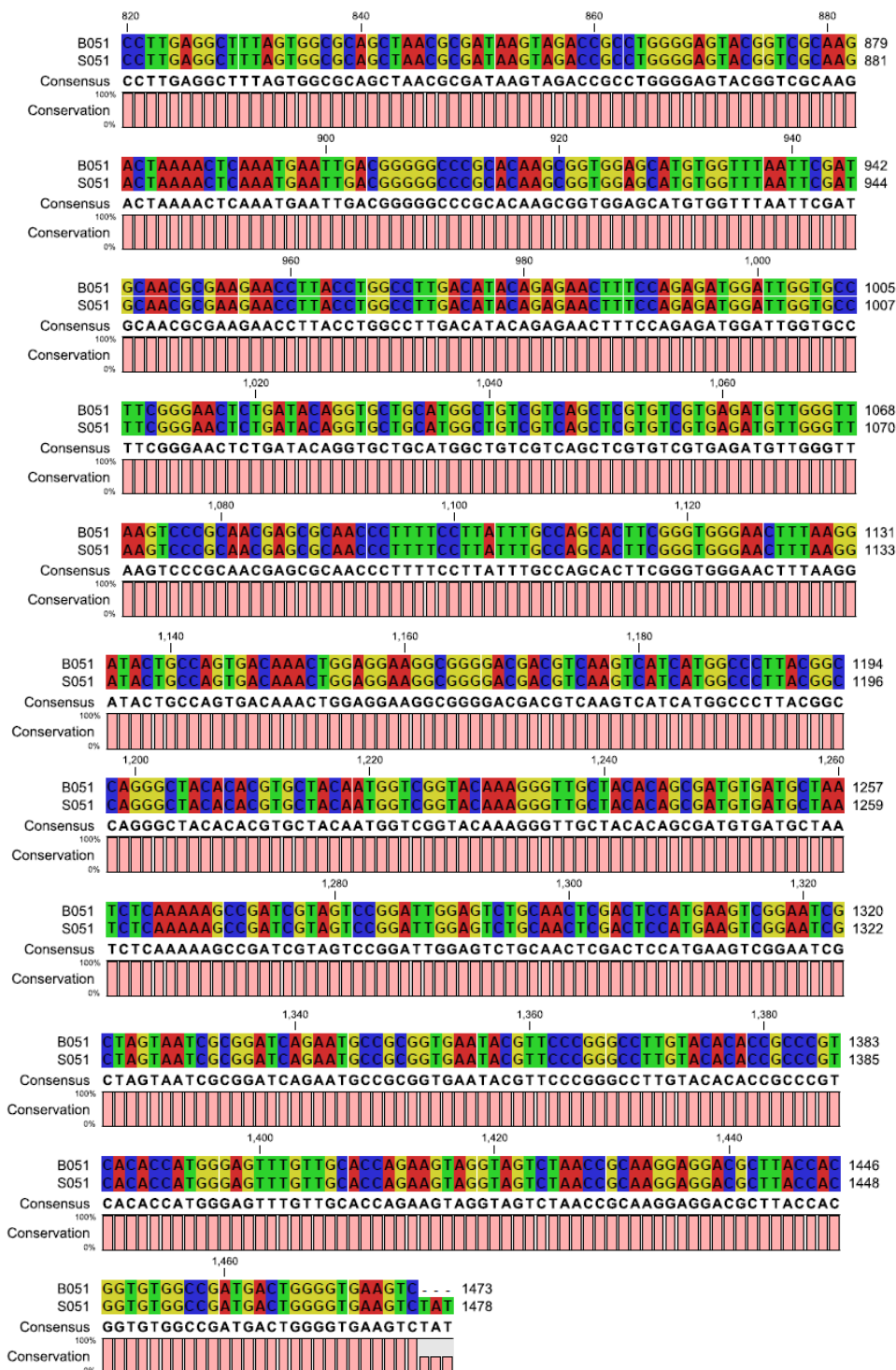
และได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ phylogenetic relationships ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดกับจุลินทรีย์อ้างอิงตัวอื่นๆในฐานข้อมูลเพื่อยืนยันเพิ่มเติมแสดงในภาพที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์สรุปได้ว่าเชื้อ S051 และ B051 มีความสัมพันธ์กับ *Acinetobacter* sp. และเชื้อ S052 และ B052 มีความสัมพันธ์กับ *Ochrobactrum* sp. ในฐานข้อมูล เช่นเดียวกันกับเชื้อ S303 กับ *Nocardioide* sp.

นอกจากนี้ได้ทำการยืนยันลักษณะเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการศึกษาภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเมื่อทำการวิเคราะห์ส่องกล้อง SEM เพื่อดูลักษณะโครงสร้างของเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioide* sp. สายพันธุ์ S303 ที่กำลังขยาย 5000 เท่าพบว่าเชื้อจุลินทรีย์มีขนาดประมาณ 1-2 ไมโครเมตร เชื้อมีลักษณะเป็นท่อนยาวรีทั้งสั้นและยาวดังแสดง รูปที่ 4.4 ซึ่งคล้ายกับ *Nocardioide nitrophenolicus* ที่ Yoon et al. (1999) และคณะระบุว่ามีลักษณะเป็นท่อนขนาดความกว้างประมาณ 0.5-0.8 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 1.0-3.0 ไมโครเมตร หลังจากการเลี้ยงใน nutrient agar 2 วัน Strain NSP41^T ที่ระบุว่าเป็นเชื้อ aerobic, non-spore-forming, nonacid-fast and motile, เป็นเชื้อ Gram-positive แต่สามารถ Gramvariable เมื่อเชื้อมีอายุมาก และมี single polar flagellum (ภาพที่ 4.7 ขวา) และมีลักษณะ rod-to-coccus morphogenesis ในช่วง Early Exponential phase จนถึง Stationary Growth Phase (Yoon et al., 1999; Yoon and Park, 2006) นอกจากนี้ยังมีการรายงานเชื้อจุลินทรีย์ในจีนัส *Nocardioideaceae* สามารถย่อยสลายสารที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติก ได้เช่นพบว่า *Nocardioide nitrophenolicus* สามารถย่อยสลาย p-nitrophenol ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติกซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของฮอร์โมนเทส

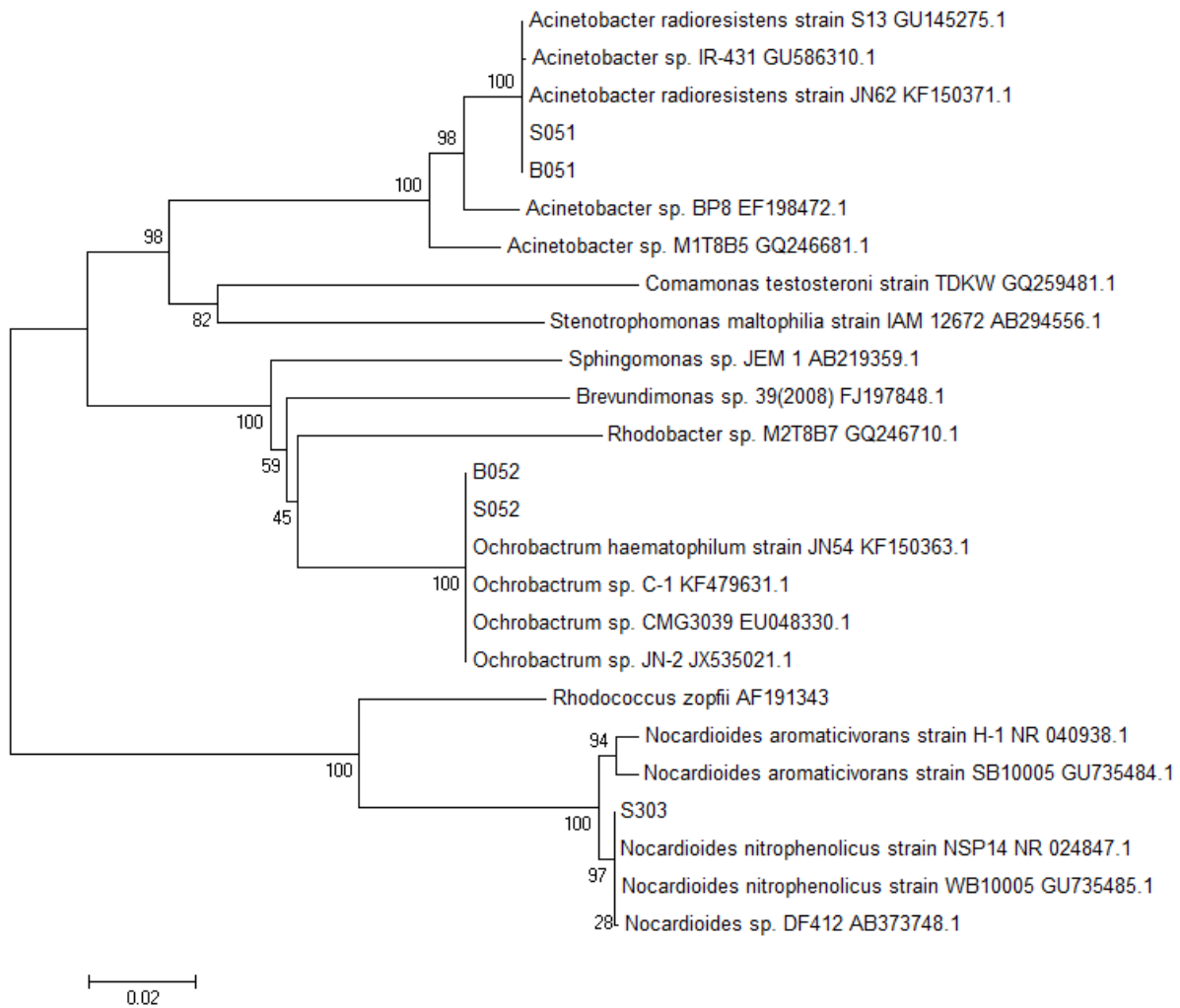
โทสเทอโรน (Yoon et al., 1999) หอมกลิ่นและคณะ (2012) ยังได้ค้นพบว่า *Nocardioides* sp. ที่คัดแยกจากตะกอนบ่อแปลงเพศสามารถย่อยสลาย MT ได้



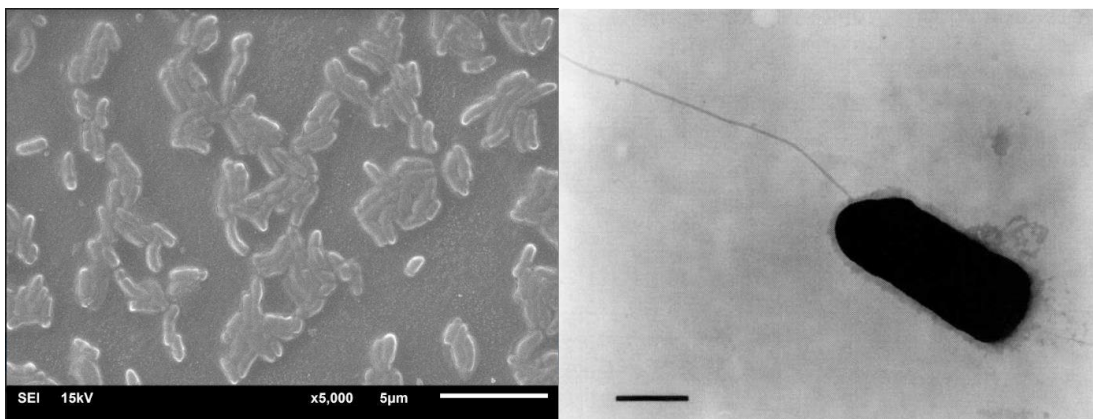
ภาพที่ 4. 4 การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของเชื้อ *Acinetobacter* sp. B051 และ S051



ภาพที่ 4. 5 การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของเชื้อ *Ochrobactrum* sp. B052 และ S052



ภาพที่ 4. 6 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ย่อยสลาย MT ทั้ง 3 ชนิดกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในฐานข้อมูล

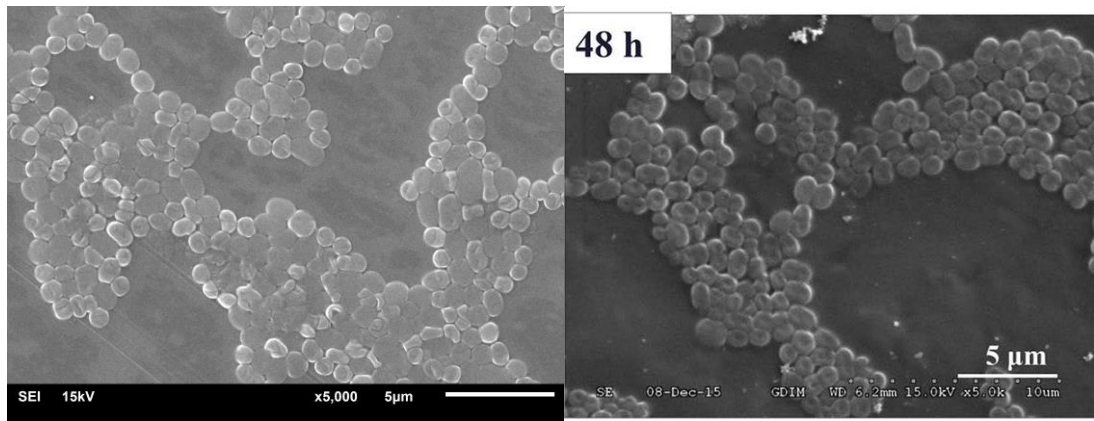


ภาพที่ 4.

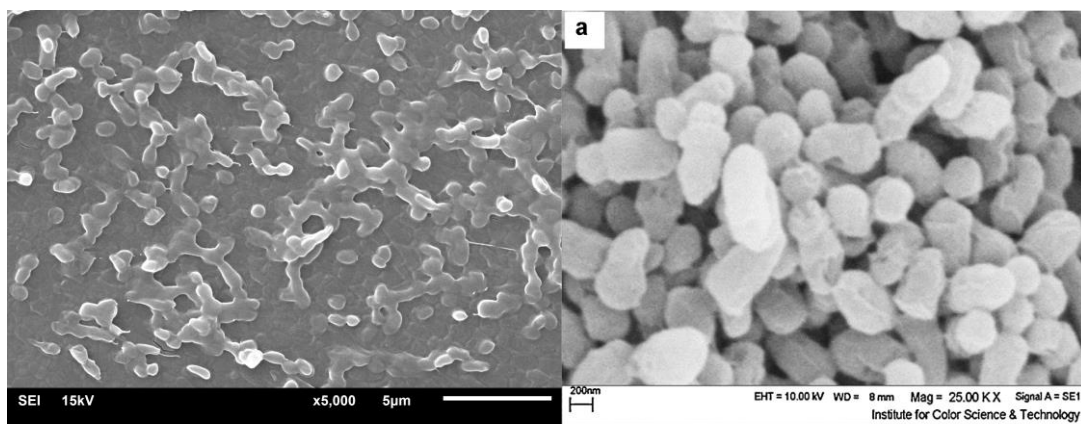
7 ภาพถ่ายจาก เปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioidees* sp. S303 จากงานวิจัยนี้และอ้างอิงงานวิจัยอื่น (ซ้าย)

Nocardioidees sp. S303 ที่กำลังขยาย 5000 เท่าจากกล้อง SEM (ขวา) *Nocardioidees nitrophenolicus*

Strain NSP41^T จากกล้อง TEM โดบน nutrient agar, 48 h ที่ 30°C. Bar ขนาด 0.5 pm.



ภาพที่ 4. 8 ภาพถ่ายจากกล้อง SEM เปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ *Acinetobacter sp.* จากงานวิจัยนี้และอ้างอิงงานวิจัยอื่น (ซ้าย) เชื้อจุลินทรีย์ *Acinetobacter sp. B051* ที่กำลังขยาย 5000 เท่า (ขวา) *Acinetobacter sp. DW-1* (Gu et al., 2016)



ภาพที่ 4. 9 ภาพถ่ายจากกล้อง SEM เปรียบเทียบเชื้อจุลินทรีย์ *Ochrobactrum sp.* จากงานวิจัยนี้และอ้างอิงงานวิจัยอื่น (ซ้าย) เชื้อจุลินทรีย์ *Ochrobactrum sp. B052* ที่กำลังขยาย 5000 เท่า (ขวา) *Ochrobactrum sp. GDOS* (Khadivinia et al., 2014) ภาพถ่ายจากกล้อง SEM ของเชื้อจุลินทรีย์ ที่กำลังขยาย 25000 เท่า

ภาพที่ 4.8 (ซ้าย) แสดงลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ *Acinetobacter sp. B051* เปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นทางขวา ซึ่งมีลักษณะเป็น Coccobacillus ตรงตามงานวิจัยของ Gu และคณะ (2018) ที่ศึกษาเชื้อสลาย phenol ที่เติบโตในลักษณะ immobilized บน polyhedron hollow polypropylene balls และนอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nishimura และคณะ (1988) ที่ได้ศึกษา *Acinetobacter radioresistens* และถูกใช้เป็น type strain (DSM 6976, ATCC 43998, IAM 13186) ที่ได้กล่าวว่า *Acinetobacter*

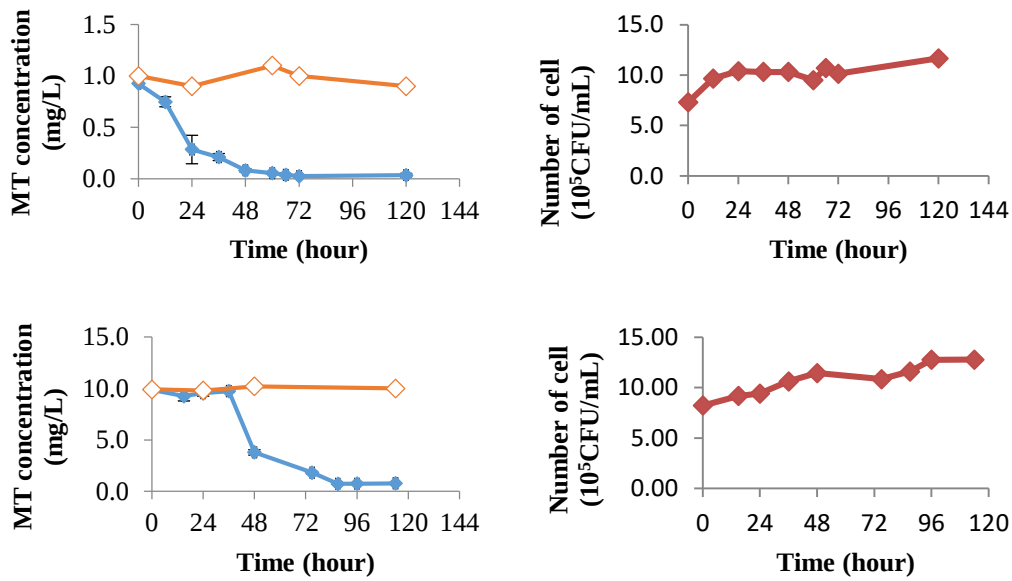
radioresistens gram-negative, nonsporeforming, aerobic, และ pleomorphic coccobacilli (variability in the size, shape or staining).

สำหรับเชื้อ *Ochrobactrum* sp. B052 จากภาพถ่าย SEM ทำให้ทราบว่าเชื้อมีลักษณะเป็น pleomorphic coccobacilli คือมีลักษณะแท่งสั้นจนเกือบเหมือนทรงกลมและมีขนาดและรูปร่างไม่สม่ำเสมอ ซึ่งเมื่อศึกษาจากภาพถ่าย SEM ของ *Ochrobactrum* sp. GDOS แบคทีเรียที่สามารถกำจัด glyphosate และดูดซับ cadmium (II) ions จากของเหลวได้ (Khadivinia et al., 2014) พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกัน และนอกจากนี้ยังคล้ายคลึงกับ *Ochrobactrum* sp. JAS2 แบคทีเรียที่สามารถย่อย chlorpyrifos ได้ (Abraham et al., 2016) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kampf และคณะ (2007) ที่ทำการแยกเชื้อ *Ochrobactrum haematophilum* (CCUG 38531^T, CIP 109452^T) มาจากเลือดของผู้ป่วยชายวัย 79 ปีที่สวีเดน และกล่าวว่า เชื้อจุลินทรีย์นี้มีลักษณะเป็นแบบแท่งขนาดประมาณ 2 μm ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ Gram-negative และดำรงชีพแบบ oxidative metabolism

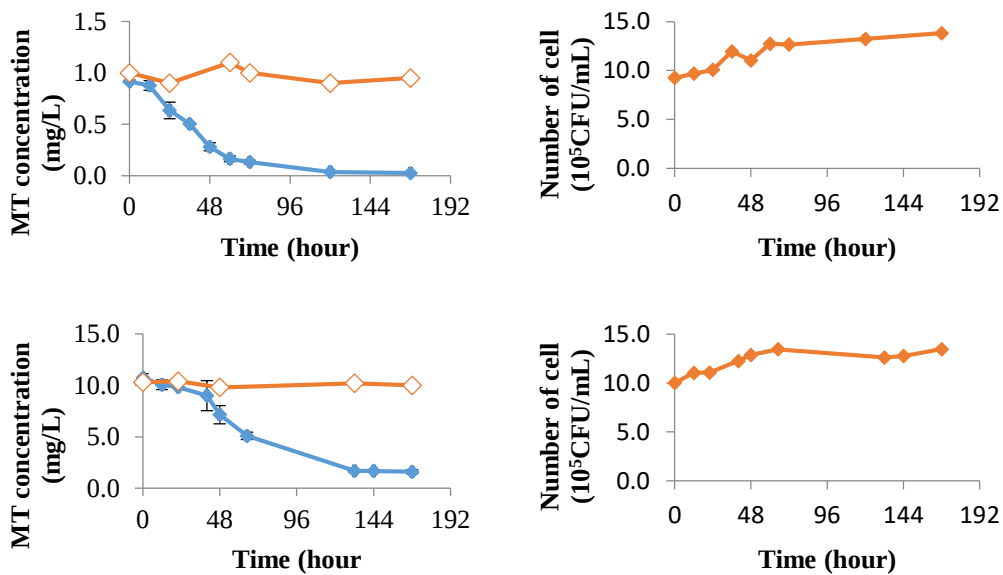
4.6. การทดสอบหาความเร็วในการทำปฏิกิริยาในการย่อยสลาย 17 α -methyltestosterone (MT)

การทดลองนี้มีเพื่อเปรียบเทียบความสามารถของจุลินทรีย์ *Acinetobacter* sp. B051, *Ochrobactrum* sp. B052 และ *Nocardioideis* sp. S303 ในการย่อยสลาย MT ที่ความเข้มข้นสูงและต่ำ เพื่อศึกษาความเร็วในการทำปฏิกิริยา โดยได้ทดสอบที่ความเข้มข้น 1 และ 10 mg/L ซึ่งต่ำกว่าความสามารถในการละลายน้ำที่ 30.8 มก./ล.ที่อุณหภูมิ 30°C (Yalkowsky et al., 2010) นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ด้วย Plate count technique เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่า Specific degradation rate ต่อไป

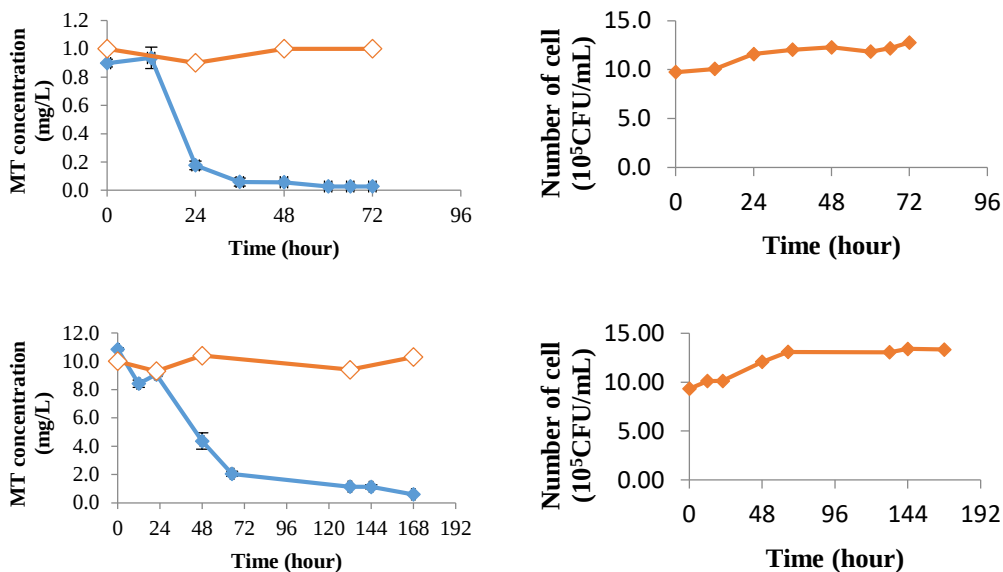
ผลการทดลองของเชื้อ *Acinetobacter* sp. B051, *Ochrobactrum* sp. B052 และ *Nocardioideis* sp. S303 แสดงในภาพที่ 4.10 – 4.12 การทดลองพบว่าจุลินทรีย์ทั้งสามชนิด คือ B051, B052 และ S303 สามารถย่อยสลาย MT ได้ที่ระดับความเข้มข้นที่ทำการศึกษา โดยมีระยะปรับตัวช่วง lag phase ประมาณ 24 ถึง 48 ชั่วโมงแรก และความสามารถในการย่อย MT มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นมากขึ้น นอกจากนี้แล้ว จุลินทรีย์ยังสามารถใช้ MT ในการเจริญเติบโตได้ด้วย ดังจะเห็นว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตประมาณ 1-2 เท่า โดยความเร็วในการย่อยสลายจะคำนวณจาก 3-4 จุดที่ทำการศึกษาแรกที่จุลินทรีย์เริ่มมีการลดลงอย่างฉับพลัน ซึ่งได้สรุปค่าการคำนวณในตารางที่ 4.4



ภาพที่ 4. 10 การย่อยสลาย MT ของเชื้อ *Acinetobacter* sp. B051 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (Left) และ จำนวนจุลินทรีย์ (Right). Error bars แสดง standard deviation (S.D.) ของการทดลองสามครั้ง



ภาพที่ 4. 11 การย่อยสลาย MT ของเชื้อ *Ochrobactrum* sp. B052 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (Left) และ จำนวนจุลินทรีย์ (Right). Error bars แสดง standard deviation (S.D.) ของการทดลองสามครั้ง



ภาพที่ 4. 12 การย่อยสลาย MT ของเชื้อ *Nocardioideis* sp. S303 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (Left) และ จำนวนจุลินทรีย์ (Right). Error bars แสดง standard deviation (S.D.) ของการทดลองสามครั้ง

ตารางที่ 4. 4 ค่าอัตราเร็วในการย่อยสลาย MT ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 mg/L

Strain	MT Concentration (mg/L)	Cell number (CFU/mL)	Degradation rate (mg/L·h)	Specific degradation rate (h ⁻¹)
<i>Nocardioideis</i> sp. S303	1	1.01×10^6	0.06	0.07
	10	1.01×10^6	0.16	0.17
<i>Acinetobacter</i> sp. B051	1	7.32×10^5	0.03	0.04
	10	1.06×10^6	0.18	0.18
<i>Ochrobactrum</i> sp. B052	1	9.68×10^5	0.02	0.02
	10	1.11×10^6	0.11	0.11

จากตารางที่ 4.4 ค่าความเร็วจำเพาะในการย่อยสลาย MT (Specific degradation rate) ที่ 1 mg/L ของ *Nocardioideis* sp. S303, *Acinetobacter* sp. B051, และ *Ochrobactrum* sp. B052 เท่ากับ 0.07, 0.04, และ 0.02 h⁻¹ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10 mg/L เชื้อทั้งสามชนิดนี้มีค่าความเร็วจำเพาะในการย่อยสลายเป็น 0.17, 0.18, และ 0.11 h⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นต่ำ *Nocardioideis* sp. S303

มีความเร็วในการย่อยสลาย MT ที่มากที่สุด ส่วนในความเข้มข้นสูงนั้นมีความสามารถพอกันกับ *Acinetobacter* sp. B051

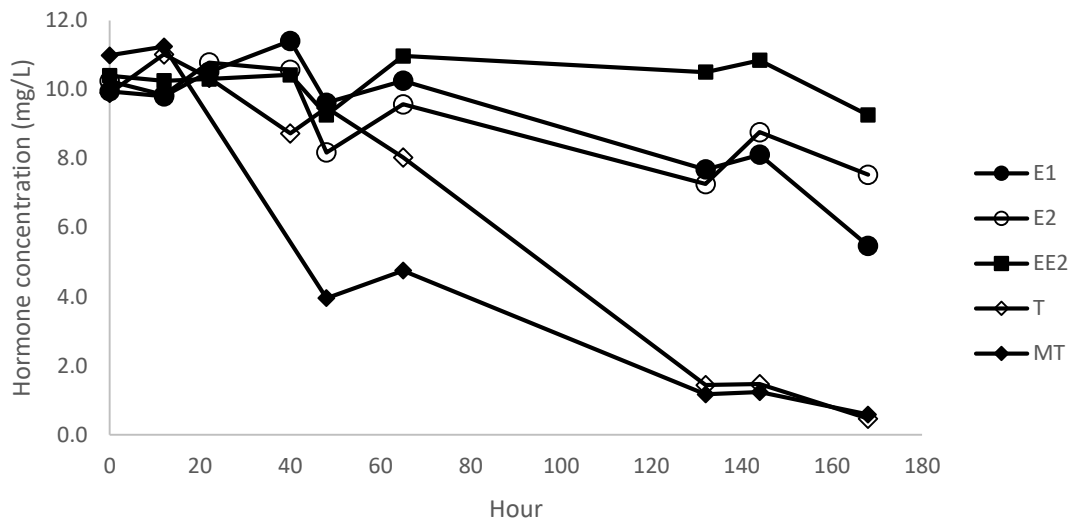
เมื่อพิจารณาว่า *Acinetobacter* sp. B051 นั้นจัดว่าเป็นจุลินทรีย์เชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมกลุ่มที่ 2 ตามมาตรา 18 พระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 ที่กำหนดให้ผู้ประสงค์จะผลิต นำเข้า ส่งออก ขาย นำผ่าน หรือมีไว้ในครอบครองเชื้อโรคกลุ่มที่ 2 ต้องแจ้งเป็นหนังสือต่ออธิบดีเพื่อขอรับหนังสือรับรองการแจ้ง ซึ่งจะไม่สามารถนำไปในการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนฮอร์โมนโดยเกษตรกรเองหากไม่ทำการแจ้งต่ออธิบดีก่อน จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้งานจริง ในส่วน *Ochrobactrum* sp. B052 นั้นมีความสามารถในการย่อยสลาย MT น้อยที่สุดในทั้งสองความเข้มข้น ดังนั้น *Nocardioideis* sp. S303 จึงมีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อย่อยสลาย MT ต่อไป

4.7 ความสามารถในการย่อยสลายฮอร์โมนชนิดอื่น

จากการทดลองต่อไปนี้เป็นต้นไปเป็นการรายงานผลการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioideis* sp. S303 เพียงเท่านั้น เนื่องจากมีความเหมาะสมในการใช้เป็นหัวเชื้อในการย่อยสลาย MT ที่สุด การทดลองนี้ต้องการศึกษาว่าเชื้อจุลินทรีย์ S303 จะสามารถย่อยสลายฮอร์โมนชนิดอื่นได้หรือไม่ เนื่องจากในฟาร์มปลาบางแห่งมีการใช้ฮอร์โมนเพศชายชนิดอื่น หรือบางครั้งมีการใช้ฮอร์โมนเพศหญิงเพื่อเหนี่ยวนำไข่ นอกจากนี้ยังอาจนำไปใช้ในฟาร์มปศุสัตว์ที่มักพบว่ามีการตกค้างโดยเฉพาะฮอร์โมนเพศเมีย ซึ่งอาจจะนำหัวเชื้อไปใช้งานได้ จึงได้ทำการทดสอบกับ testosterone, estrone (E1), 17β -estradiol (E2) และ 17α -ethylestradiol (EE2) เพิ่มเติม โดยทำการทดสอบที่ 10 mg/L เป็นเวลา 7 วัน ดังแสดงผลการทดลองในภาพที่ 4.13

ฮอร์โมน Testosterone (T) เป็นฮอร์โมนเพศชายเหมือนกับ MT จากความเข้มข้นตั้งต้นที่วัดได้คือ 9.9 mg/L ลดลงจนเหลือ 0.5 mg/L ภายใน 168 ชั่วโมง หรือคิดเป็น 95.2% ในขณะที่เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้มีความสามารถกลืน MT จากความเข้มข้น 11 ถึง 0.6 mg/L ซึ่งคิดเป็นประสิทธิภาพ 94.7% ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ S303 มีความสามารถในการย่อยสลาย testosterone ได้ในระดับเดียวกันกับ MT

สำหรับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่แสดงลักษณะเพศหญิง เชื้อจุลินทรีย์ S303 มีความสามารถในการย่อยสลาย MT ในระดับที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับฮอร์โมนเพศชาย โดยในฮอร์โมน estrone (E1) ฮอร์โมน MT ลดลงจากความเข้มข้น 9.9 mg/L เป็น 5.5 mg/L แต่เนื่องจากการทดลองนี้ E1 สลายไปในหลอดควบคุมที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ด้วยจาก 9.1 mg/L เป็น 6.7 mg/L จึงได้ทำการหักลบประสิทธิภาพที่ไม่ได้เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ และพบว่าเชื้อ S303 สามารถย่อยสลาย E1 ได้ 17.9% ส่วนฮอร์โมน 17β -estradiol (E2) นั้นเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลาย E2 จากความเข้มข้น 10.2 mg/L เป็น 7.5 mg/L แต่เนื่องจากการทดลองนี้ E2 สลาย



ภาพที่ 4. 13 การย่อยสลายฮอร์โมน testosterone, estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) และ 17 α -ethylestradiol (EE2) เปรียบเทียบกับ MT ที่ 10 mg/L เป็นเวลา 7 วัน

ไปในหลอดควบคุมที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ด้วยจาก 8.4 mg/L เป็น 7.2 mg/L จึงได้ทำการหักกลับประสิทธิภาพที่ไม่ได้เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ และพบว่าเชื้อ S303 สามารถย่อยสลาย E2 ได้ 11.2% นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการย่อยสลายฮอร์โมน 17 α -ethylestradiol (EE2) พบความเข้มข้นของฮอร์โมนมีการเปลี่ยนแปลงจาก 10.4 mg/L เป็น 9.3% ในขณะที่ไม่พบการหายไปของ MT ในชุดควบคุม ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถสลาย MT ได้ 11.0%

จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioide* sp. S303 มีความสามารถในการย่อยสลายฮอร์โมนเพศชาย ซึ่งหมายถึง testosterone ได้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ MT คือประมาณ 95% ในขณะที่มีความสามารถในการย่อยสลายฮอร์โมนเพศหญิงกลุ่มเอสโตรเจนได้น้อยมาก เพียงประมาณ 11 – 17% สำหรับ estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) และ 17 α -ethylestradiol (EE2) โดยสามารถย่อยสลาย E1 ได้มากที่สุด และมีการย่อยสลาย E2 และ EE2 ที่ใกล้เคียงกัน แต่ก็ถือว่าเป็นระดับที่น้อย ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ S303 มีความจำเพาะในการย่อยสลายฮอร์โมนเพศชายมาก

4.8 ความสามารถในการย่อยสลาย MT ในสถานะที่มีกลูโคสและมีอากาศ

งานวิจัยนี้ต้องการทำการศึกษเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ *Nocardioide* sp. สายพันธุ์ S303 ในการย่อยสลาย 17 α -methyltestosterone ในสถานะที่มีและไม่มีอากาศรวมทั้งในสถานะที่มีกลูโคส (20 mg/L มีปริมาณคาร์บอนใกล้เคียงกับ MT) และปราศจากกลูโคสเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไปใช้

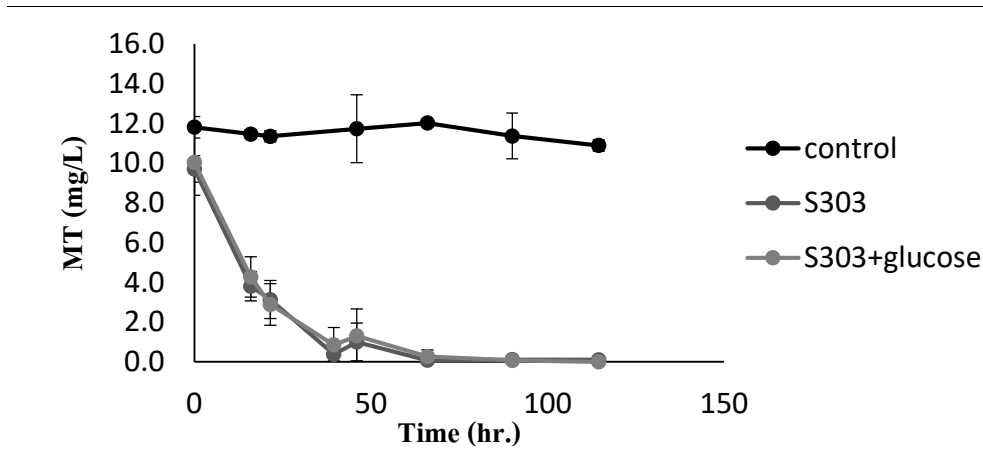
งานในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติที่มักมีสภาวะไร้อากาศที่ตะกอนใต้ท้องน้ำและการที่มีแหล่งอาหารคาร์บอนหลากหลาย

โดยทำการทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.14) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioidea* sp. สายพันธุ์ S303 ในสภาวะที่ไม่มีการเติมกลูโคสเริ่มมีการย่อยเกิดขึ้นที่ เวลา 16 ชั่วโมงโดยมีระดับความเข้มข้น MT ลดลงจากประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเหลือ 3.18 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่เวลา 40 ชั่วโมง ความเข้มข้นลดลงเป็น 0.37 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 66 ชั่วโมงพบว่าปริมาณ MT ถูกย่อยสลายจนหมดในขณะที่ control MT ยังอยู่ที่ระดับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการวัดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ รูปที่ 4.15 มีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงเวลา 0-40 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่ระดับ MT ลดลง แสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioidea* sp. สายพันธุ์ S303 มีการย่อย MT และใช้ MT ในการเจริญเติบโตและเมื่อทำการตรวจวัดความมีฤทธิ์ทาง Androgen โดยวิธี Yeast assay ดังรูปที่ 4.16 พบว่าในระหว่างที่มีการย่อย MT ในสภาวะที่มีอากาศระดับของความมีฤทธิ์ทาง Androgen มีการลดลงและที่เวลา 264 ชั่วโมง ไม่หลงเหลือความมีฤทธิ์ทาง Androgen ในขณะที่ control MT ซึ่งไม่มีการเติมเชื้อระดับความมีฤทธิ์ทาง Androgen ไม่ลดลง

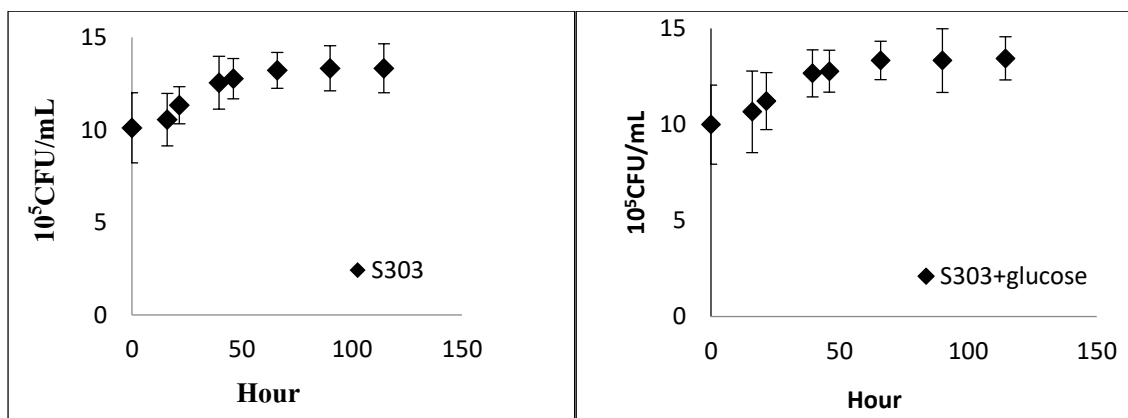
ในขณะที่การทดลองการย่อยสลาย MT ในสภาวะที่มีการเติมกลูโคส ดังรูปที่ 4.14 พบว่า MT เริ่มมีการย่อยสลายที่เวลา 16 ชั่วโมง ระดับ MT ลดลง 4.2 มิลลิกรัมต่อลิตรและลดลงเหลือ 0.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 40 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 66 ชั่วโมงพบว่าปริมาณ MT ถูกย่อยสลายจนหมดในขณะที่ control MT ยังอยู่ที่ระดับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีอัตราการย่อยสลายจำเพาะย่อย สลายที่ 0.34 และ 0.36 h^{-1} ในสภาวะที่ไม่มีการเติมกลูโคสและมีการเติมกลูโคสตามลำดับ ซึ่งแสดงว่ากลูโคสไม่มีผลต่ออัตราการย่อยสลาย MT

เมื่อทำการวัดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์พบว่าเชื้อจุลินทรีย์มีจำนวนเพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 0-40 ชั่วโมง จาก 10^6 CFU/ml เป็น $1.28 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ ทั้งสภาวะที่มีการเติมกลูโคสและไม่มีการเติมกลูโคส (รูปที่ 4.15) ซึ่งเป็นช่วงที่ระดับ MT ลดลงแสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioidea* sp. สายพันธุ์ S303 มีการย่อย MT และใช้ MT ในการเจริญเติบโต

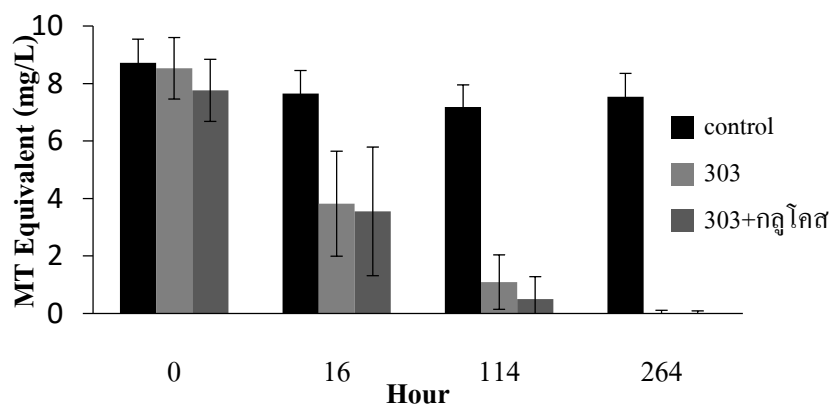
และเมื่อทำการตรวจวัดความมีฤทธิ์ทาง Androgen โดยวิธี Yeast assay พบว่าในระหว่างที่มีการย่อย MT ในสภาวะที่มีอากาศระดับของความมีฤทธิ์ทาง Androgen มีการลดลงและที่เวลา 220 ชั่วโมง ไม่พบความมีฤทธิ์ทาง Androgen หลงเหลือในขณะที่ control MT ซึ่งไม่มีการเติมเชื้อระดับความมีฤทธิ์ ทาง Androgen ไม่ลดลง ดังรูปที่ 4.16 จากงานวิจัยที่ศึกษาจะพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า ซึ่งพบว่าตะกอนของบ่อแปลงเพศปลาย่อยสลาย MT 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะมีอากาศไม่พบความมีฤทธิ์ทาง Androgen (Homklin et al., 2010)



ภาพที่ 4. 14 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฮอร์โมน 17α -methyltestosterone ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioides* sp. S303 ในสภาวะมีอากาศในแหล่งอาหารที่มีการเติมกลูโคส (ปริมาณคาร์บอน 10 มิลลิกรัม ต่อลิตร) และไม่มีการเติมกลูโคส



ภาพที่ 4. 15 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioides* sp. S303 สภาวะมีอากาศในแหล่งอาหาร (ซ้าย) ที่ไม่มีการเติมกลูโคส (ขวา) มีการเติมกลูโคส



ภาพที่ 4. 16 ความมีฤทธิ์ทาง Androgen ของการย่อยสลาย MT โดยเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ S303 ในสภาวะที่มีอากาศ

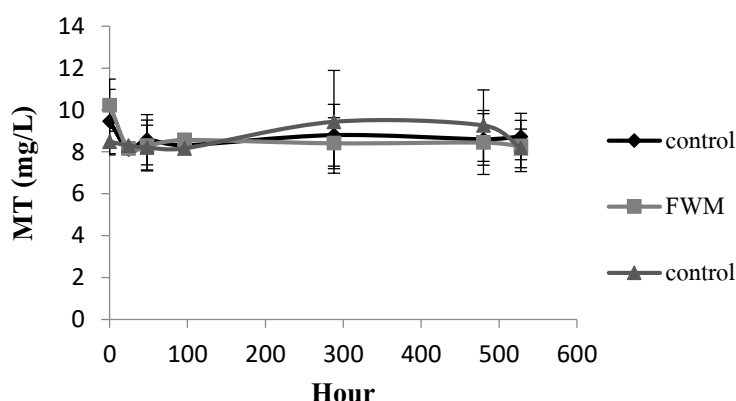
4.9 ความสามารถในการย่อยสลาย MT ในสภาวะที่มีกลูโคสและไร้อากาศ

จากผลการทดลองการย่อยสลาย 17α -methyltestosterone ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรในสภาวะไร้อากาศ โดย *Nocardoides* sp. สายพันธุ์ S303 ดังแสดงในภาพที่ 4.17 พบว่าจาก ระดับความเข้มข้น MT ตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นจนถึงเวลา 528 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีกลูโคสอยู่ที่ประมาณ 8.16-10.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่สภาวะที่มีกลูโคสวัดความเข้มข้นได้ประมาณ 8.16-9.43 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุด control วัดความเข้มข้นได้ประมาณ 8.11-8.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งดูจากแนวโน้มกราฟค่าความเข้มข้น MT ไม่มีการลดลงที่แตกต่างกับชุดควบคุม

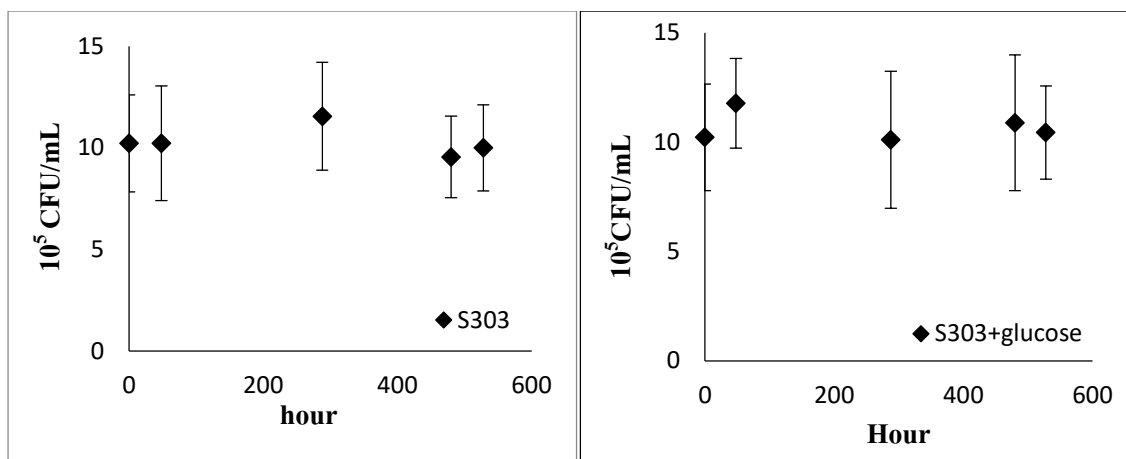
และเมื่อพิจารณาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์สภาวะที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคสและสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส ดังรูปที่ 4.18 พบว่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์จากทั้ง 2 สภาวะตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงเวลา 528 นาที่ มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 10^6 cfu/ml ซึ่งค่อนข้างคงที่เนื่องจากที่สภาวะไร้อากาศนี้เชื้อไม่สามารถย่อยสลายและใช้ MT เป็นสารอาหารได้

และเมื่อทำการวัดความมีฤทธิ์ทาง androgen ในรูปที่ 4.19 พบว่า ที่เวลา 0, 288 และ 528 ระดับ methyltestosterone equivalent (MTEQ) ของทั้ง 2 สภาวะค่อนข้างคงที่ อยู่ในช่วง 8.45-9.71 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับความอันตรายของ MT ไม่ลดลงในสภาวะไร้อากาศ

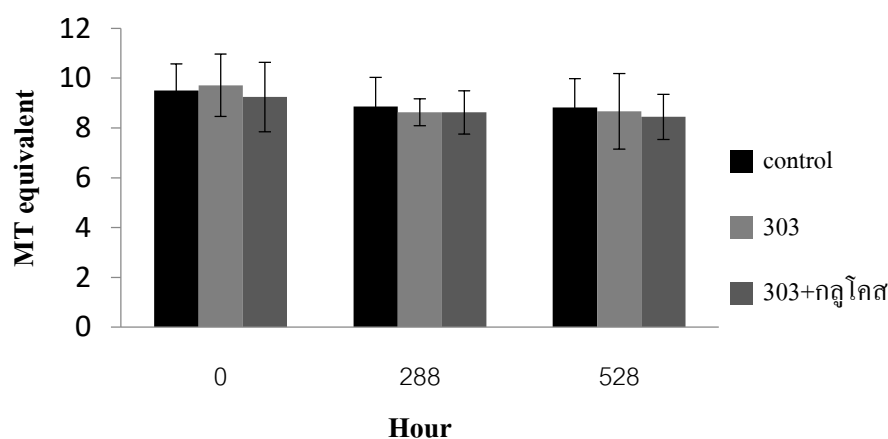
จากการที่ระดับของ MT ไม่ลดลงและเชื้อจุลินทรีย์ไม่มีการเพิ่มจำนวนขึ้นและความมีฤทธิ์ทาง androgen ไม่ลดลงแสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardoides* sp. สายพันธุ์ S303 ไม่สามารถใช้ MT เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต และจึงหลงเหลือความมีฤทธิ์ทาง androgen ซึ่งในการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศไม่พบความมีฤทธิ์ทาง androgen สอดคล้องกับที่ระบุโดย Yoon และ Park (2006) ว่า *Nocardoides* sp. เป็น aerobic bacteria คือต้องใช้อากาศในการดำรงชีพ



ภาพที่ 4. 17 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฮอร์โมน 17α -methyltestosterone ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardoides* sp. S303 ในสภาวะไร้อากาศในแหล่งอาหารที่มีการเติมกลูโคส (ปริมาณคาร์บอน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) และไม่มีการเติมกลูโคส



ภาพที่ 4. 18 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioideis* sp. S303 สภาวะมีอากาศในแหล่งอาหาร (ซ้าย) ที่ไม่มีการเติมกลูโคส (ขวา) มีการเติมกลูโคส

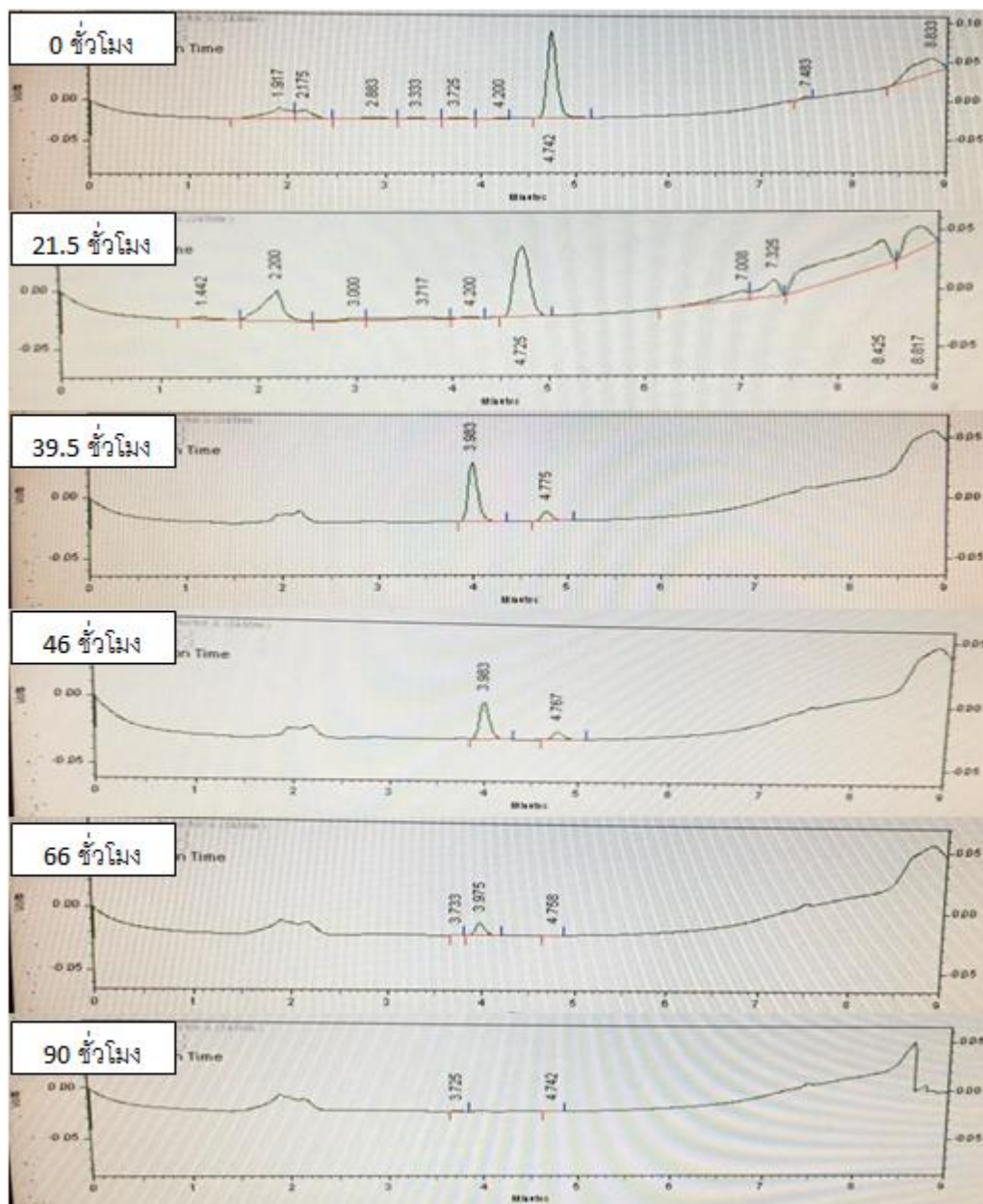


ภาพที่ 4. 19 ความมีฤทธิ์ทาง Androgen ของการย่อยสลาย MT โดยเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioideis* sp. สายพันธุ์ S303 ในสภาวะไร้อากาศ

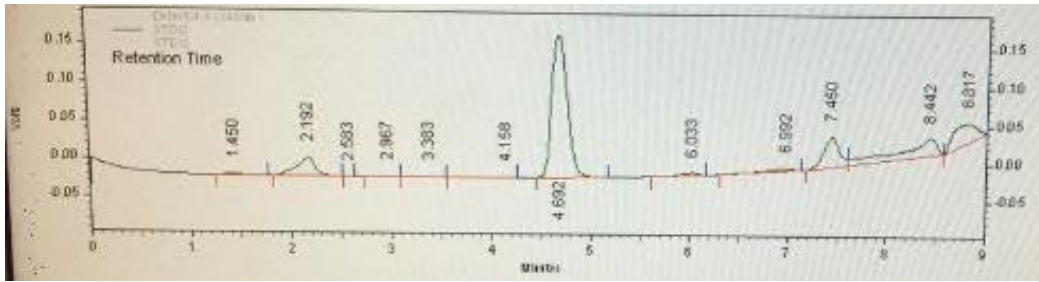
4.10 การศึกษาสาร metamolite ในปฏิกิริยาการย่อยสลาย MT โดย *Nocardioideis* sp S303

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างของการย่อยสลาย MT โดยเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioideis* sp. ในสภาวะมีอากาศไปทำการวัดด้วยเครื่อง HPLC จะพบว่าความเข้มข้นของ MT จะลดลงในระหว่างการย่อยสลาย และที่เวลา 39.5, 46, และ 66 ชั่วโมง พบพีคที่ปรากฏ 2 พีคที่ RT 3.983 นาที และ 4.776 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 4.20) ซึ่งเมื่อทำการฉีด Standard MT พบพีคที่ปรากฏช่วง 4.692-4.776 นาที คือพีคของ MT (รูปที่ 4.21) และ พีคที่ RT 3.983 คือพีคที่คาดว่าเป็นสาร metabolite ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย MT โดยเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นว่าพีคที่ปรากฏที่เวลา 39.5 ชั่วโมงจะค่อยๆ สลายตัวหลังจาก 90 ชั่วโมง และไม่พบสารดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงเชื้อจุลินทรีย์มีการย่อยสลายสารดังกล่าวได้

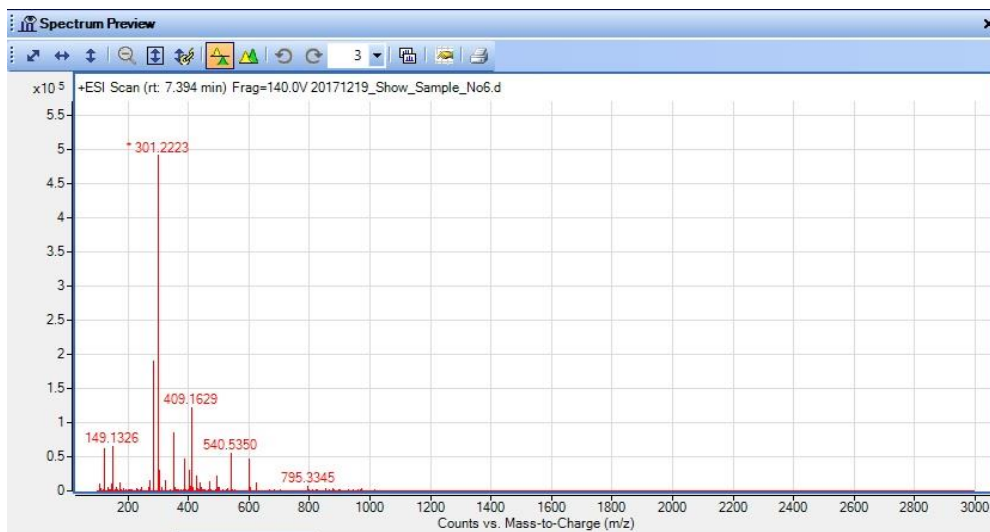
เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวที่ปรากฏพบ metabolite ไปทำการฉีดผ่านเครื่อง LC-MS/MS พบว่าพิกที่ เกิดขึ้นจากการวัดมีค่า Mother ion ที่ 301 (รูปที่ 4.22) จากนั้นทำการวิเคราะห์หา Daughter ion ของ m/z ที่สนใจโดยการ targeted MS/MS และวิเคราะห์ผล m/z ที่ได้โดยใช้ Metlin database พบว่า m/z ที่ 301.2 คือสาร Methandrostenolone อยู่ในอันดับที่ 1 ซึ่งเมื่อทำการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องมีการรายงานพบว่า Pimelobacter simplex VKPM Ac- 1632 สามารถเปลี่ยน 17α -methyltestosterone ไปเป็น Methandrostenolone ได้ (Druzhinina et al. 2008) อาจเป็นไปได้ว่า *Nocardioide* sp. ใช้กลไกเดียวกับ Pimelobacter ในการย่อยสลาย MT



ภาพที่ 4. 20 โครมาโตแกรมของการฉีด HPLC การย่อยสลาย MT โดยเชื้อโดยเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioide* sp. สายพันธุ์ S303 ในสภาวะมีอากาศ ของตัวอย่างที่ช่วงเวลาต่างๆ



ภาพที่ 4. 21 โครมาโตแกรมของการฉีด HPLC ของ Standard MT ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4. 22 Mass to charge pattern (m/z) ของ Metabolite peak

4.11 การย่อยสลาย MT ที่ความเข้มข้นต่ำ

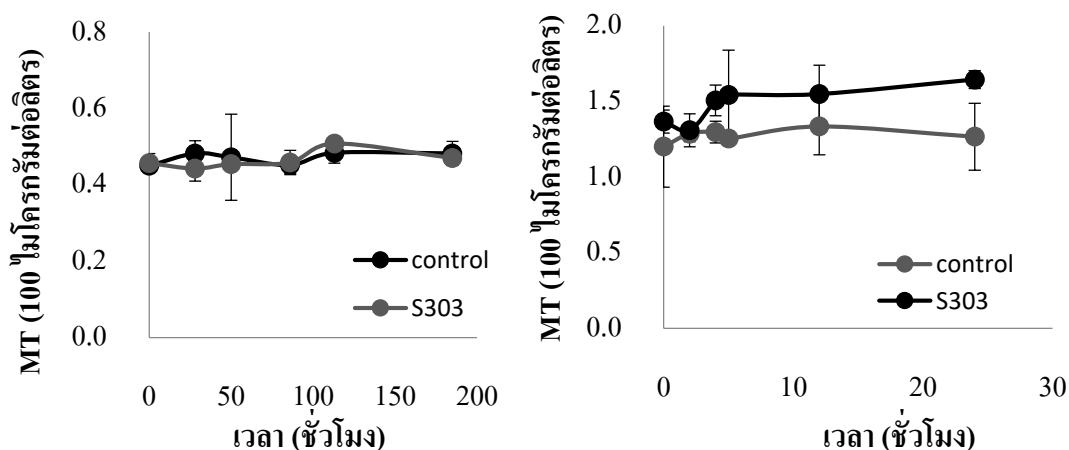
ในการวัดความเข้มข้น MT ที่ความเข้มข้นต่ำทดลองส่วนนี้จำเป็นต้องปรับวิธีการทดสอบให้เหมาะสมกับการวัดปริมาณสารในความเข้มข้นต่ำซึ่งได้ทดสอบประสิทธิภาพ cartridge ขนาด 3 mL 60 mg และขนาด 6 mL 200 mg เพื่อหาชนิดที่สามารถวัดความเข้มข้นได้สัดส่วนการคืนกลับ (Percent recovery) สูงที่สุดซึ่งได้แสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.5 โดยทดสอบกับความเข้มข้นเริ่มต้น ของ MT ที่ 1 mg/L ผลการทดลองแสดงว่า cartridge ขนาด 3 mL 60 mg มีค่า % recovery ที่สูงกว่า cartridge ขนาด 6 mL 200 mg จึงเหมาะสมสำหรับการใช้ทำ solid phase extraction (SPE) ที่ความเข้มข้นต่ำมากที่สุด

และเมื่อทำการทดลองการย่อยสลาย MT ที่ความเข้มข้นต่ำ 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.23) พบว่าเมื่อทำการทดลองการย่อยสลาย MT ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ระดับ MT เมื่อเปรียบเทียบกับ control ไม่ลดลงอยู่ที่ประมาณ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ดังนั้นไม่พบการย่อยของ MT ที่ความเข้มข้นจริงที่ 50 ไมโครกรัมต่อลิตรภายในระยะเวลาประมาณ 200 ชั่วโมง ส่วนที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ไมโครกรัมต่อลิตร ระดับ MT เมื่อเปรียบเทียบกับ control ไม่ลดลงอยู่ที่ 130 -160 ไมโครกรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง และจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในทั้งสองความเข้มข้นไม่มีการเพิ่มจำนวนและค่อนข้างคงที่ที่

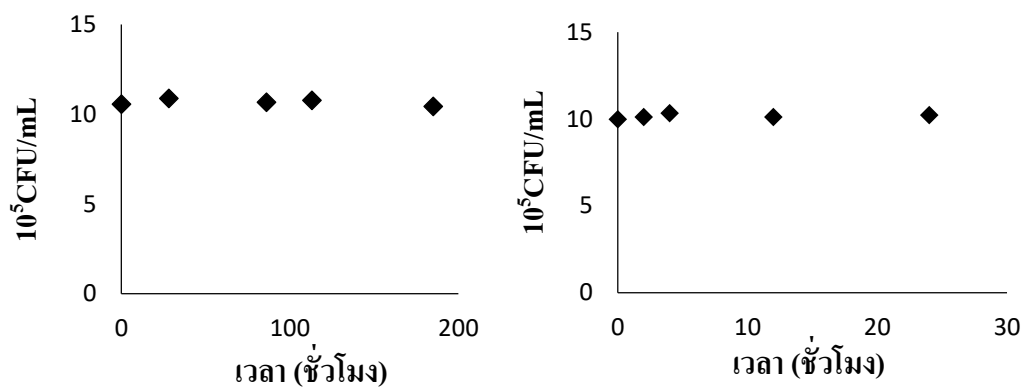
10⁶ cfu/ml (รูปที่ 4.24) ซึ่งแสดงว่าที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อลิตรเชื้อไม่สามารถย่อยสลาย MT ได้ ภายในช่วงเวลาที่ทำการทดลอง และเมื่อทำการวัดความมีฤทธิ์ทาง androgen ดังรูปที่ 4.25 พบว่ายังคงหลงเหลือความมีฤทธิ์ทาง androgen สอดคล้องกับความเข้มข้นของ MT ซึ่งการที่ MT ไม่ถูกย่อยสลายที่ความเข้มข้นต่ำอาจเป็นเพราะว่าระดับของ MT ซึ่งเป็นสารอาหารน้อยเกินไปทำให้จุลินทรีย์เลือกที่จะใช้พลังงานในการรักษาสภาพของเซลล์มากกว่าการใช้พลังงานในการย่อยสลายสารอาหารที่ความเข้มข้นต่ำ (Pirt, 1965) หรืออาจเป็นเพราะขาดสารอาหารบางอย่างทำให้ไม่สามารถทำงานได้ หรือมีอัตราการผลิตปฏิกิริยาที่ช้าไม่เพียงพอในรอบการทำทดลองนี้ ดังนั้นบทบาทของเชื้อจุลินทรีย์นี้ในการทำงานในสิ่งแวดล้อมจริงจึงยังคงคลุมเครืออยู่ จึงควรมีการทดสอบการรับสาร MT เข้ามาในเซลล์ด้วยเทคนิคอื่น เช่น Microautoradiography fluorescence in situ hybridization technique (MAR-FISH) หรือ Stable Isotope Probing (SIP) ต่อไป

ตารางที่ 4.5 การทดสอบ cartridge ที่เหมาะสมในการวัดความเข้มข้น MT ที่ความเข้มข้นต่ำ

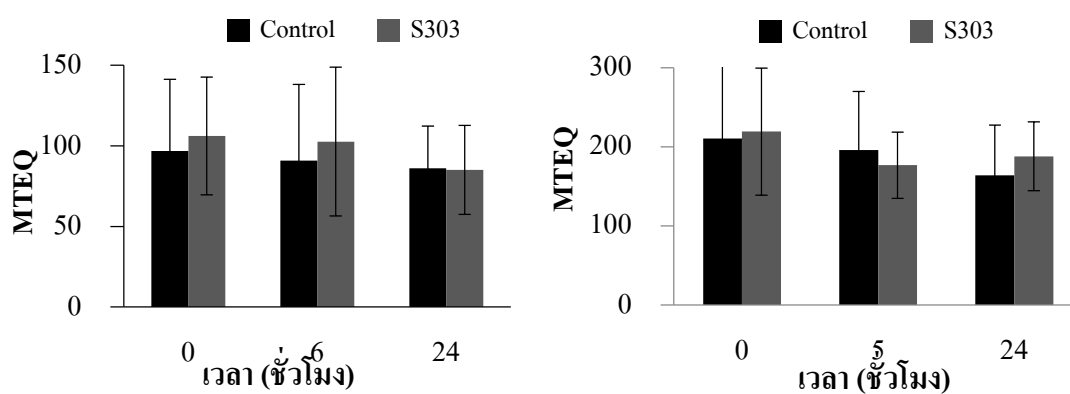
ขนาด cartridge	ความเข้มข้น MT เริ่มต้น	ปริมาตรตัวอย่าง	Elute	concentrate	ความเข้มข้น MT หลังผ่าน SPE	% recovery
3 mL, 60 mg	1 mg/L	10 mL	5 mL	2 เท่า	0.98 mg/L	98%
6 mL, 200 mg	1 mg/L	10 mL	5 mL	2 เท่า	0.52 mg/L	52%



ภาพที่ 4.23 การย่อยสลายฮอร์โมน 17α-methyltestosterone โดยเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioideis* sp. สายพันธุ์ S303 ในสภาวะมีอากาศที่ความเข้มข้น (ซ้าย) 100 μg/L และ (ขวา) 200 μg/L



ภาพที่ 4. 24 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardiodides* sp. สายพันธุ์ S303 ที่ย่อยสลาย 17 α -methyltestosterone ที่ความเข้มข้น (ซ้าย) 100 $\mu\text{g/L}$ และ (ขวา) 200 $\mu\text{g/L}$



ภาพที่ 4. 25 ความมีฤทธิ์ทาง Androgen ของการย่อยสลาย MT 200 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardiodides* sp. S303 ที่ความเข้มข้น (ซ้าย) 100 $\mu\text{g/L}$ และ (ขวา) 200 $\mu\text{g/L}$

บทที่ 5 สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายสาร 17 α -methyltestosterone จากตะกอนและฟิล์มชีวภาพจากบ่อแปลงเพศลูกปลานิล ได้เชื้อจุลินทรีย์มาสามชนิด คือ *Nocardioides* sp. S303, *Acinetobacter* sp. S051 และ *Ochrobactrum* sp. B052 ซึ่งมีค่าความเร็วจำเพาะในการย่อยสลาย MT (Specific degradation rate) ที่ 1 mg/L เท่ากับ 0.07, 0.04, และ 0.02 h⁻¹ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10 mg/L เท่ากับ 0.17, 0.18, และ 0.11 h⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นต่ำ *Nocardioides* sp. S303 มีความเร็วในการย่อยสลาย MT ที่มากที่สุด ส่วนในความเข้มข้นสูงนั้นมีความสามารถพอกันกับ *Acinetobacter* sp. B051 แต่เนื่องจาก *Acinetobacter* spp. ถูกจัดว่าเป็นจุลินทรีย์เชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมกลุ่มที่ 2 ตามมาตรา 18 พระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 ซึ่งจะไม่สามารถนำไปในการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนฮอร์โมนโดยเกษตรกรได้หากไม่ทำการแจ้งต่ออธิบดีก่อน จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้งานจริง ดังนั้น *Nocardioides* sp. S303 จึงมีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อย่อยสลาย MT

ซึ่งได้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายฮอร์โมนในสภาพแวดล้อมต่าง เช่น การย่อยสลายฮอร์โมนชนิดอื่น พบว่าเชื้อ 303 สามารถย่อยสลาย Testosterone (T) ได้ในประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ MT คือ จากความเข้มข้นประมาณ 10 mg/L ลดลงไป 95.2% และ 94.7% ตามลำดับ จนเกือบหมดสิ้นภายใน 168 ชั่วโมง สำหรับฮอร์โมนเอสโตรเจนพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ S303 มีความสามารถในการย่อยสลาย MT ในระดับที่ต่ำมาก โดยในฮอร์โมน estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), และ 17 α -ethylestradiol (EE2) เชื้อ S303 สามารถย่อยสลาย E1 ได้ 17.9%, 11.2%, และ 11.0% ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ S303 มีความสามารถในการย่อยสลายฮอร์โมนเพศชายอย่างจำเพาะเจาะจง ไม่สามารถนำไปใช้ในการย่อยสลายฮอร์โมนชนิดอื่นได้

นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย MT ที่ในสภาวะมีสารอาหารอื่นซึ่งในที่นี้คือกลูโคส (10 Mg-C/L) และในสภาวะไร้อากาศ พบว่าเชื้อ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ S303 สามารถย่อยสลาย MT ในอัตราการย่อยสลายจำเพาะที่ใกล้เคียงกันคือ 0.34 และ 0.36 h⁻¹ สำหรับสภาวะที่ไม่มีกลูโคส และมีกลูโคสตามลำดับในที่ที่มีอากาศได้ ในช่วงเวลาประมาณ 60 ชั่วโมง ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ S303 น่าจะสามารถทำงานในธรรมชาติที่มีสารอาหารอื่นมากมายหลายชนิดได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายได้ในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งได้ทำการติดตามด้วยการนับจำนวนเซลล์และการตรวจสอบความมีฤทธิ์แอนโดรเจน (Androgenetic Activity) พบว่าก็สอดคล้องกับการลดลงหรือคงที่ของปริมาณ MT โดยลำดับ โดบเซลล์การเพิ่มปริมาณขึ้นแสดงถึงการนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและสร้างพลังงาน และ Androgenetic Activity ก็

ลดลงในช่วงเวลาเดียวกัน แสดงว่า *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ S303 สามารถย่อยสลาย MT และไม่หลงเหลือสารที่มีฤทธิ์ความเป็นฮอร์โมนตกค้างในช่วงระหว่าง 114 – 264 ชั่วโมงเป็นต้นไป เหมาะสมแก่การนำไปใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการกำจัดฮอร์โมนในสภาวะมีอากาศ

เมื่อทำการศึกษาพบสาร Methandrostenolone เกิดขึ้นก่อนช่วงเวลา 21.5 ชั่วโมง และหายไปก่อน 90 ชั่วโมง ดังนั้นสารนี้น่าจะเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มี Androgenetic Activity หลงเหลือภายหลังจากที่ MT สลายไปแล้วในช่วงเวลา 60 – 114 ชั่วโมง แต่นอกจากสารนี้แล้วยังมีสาร metabolite ชนิดอื่นอีกที่ทำให้ยังมี Androgenetic Activity คงค้างในช่วง 90 – 114 นาที ที่ไม่สามารถวัดได้ด้วยวิธีการวัด HPLC ในการทดลองนี้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป แต่เนื่องจาก *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ S303 ก็สามารถย่อยสลาย 17 α -methyltestosterone ไปเป็นสารที่ไม่มี Androgenetic Activity ตกค้างอยู่ภายหลังจาก MT สลายหมดไปได้ไม่นาน จุลินทรีย์ชนิดนี้ก็มีความเหมาะสมในการมาใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการบำบัดสารกระตุ้นลักษณะเพศชายที่ตกค้างในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เมื่อทดสอบวัดความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดนี้ที่ความเข้มข้นจริง 50 และ 150 $\mu\text{g/L}$ ที่อยู่ในช่วงที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีอยู่ในระดับ ng ถึง 600 μg (Barbosa et al., 2013) ไม่พบว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้กำจัด MT ได้ในช่วงเวลา 200 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ดังนั้นความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดนี้ที่จะย่อย MT ในสภาวะแวดล้อมจริง และความคงอยู่ของจุลินทรีย์ชนิดนี้ในระบบเป็นสิ่งที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป แต่จากผลการทดลองครั้งนี้ทำให้ทราบว่าสามารถใช้เชื้อ 17 α -methyltestosterone ในการย่อยสลาย MT ที่ความเข้มข้นอย่างน้อย 1 – 10 mg/L

งานวิจัยนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ S303 จะสามารถย่อยสลาย MT ที่ความเข้มข้น ng ถึง 600 μg ที่พบในสิ่งแวดล้อมได้หรือไม่ และจะคงอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ยาวนานไหม อาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในห้องแล็บอาจไม่มีความเหมาะสมในการทำงานของจุลินทรีย์ที่มากเพียงพอ ซึ่งต้องมีการศึกษาในเชิงการนำไปใช้จริงต่อไป เพื่อพิสูจน์ความเหมาะสมในการนำไปเป็นหัวเชื้อกำจัดสารกระตุ้นลักษณะเพศชายในการเพาะเลี้ยงปลา

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ได้นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้

1. Boonyakit Niamhom, Parinda Thayanukul (2017) Study of 17 α -methyltestosterone degradation of Nocardioides sp. strain S303 isolated from masculinizing ponds of Nile tilapia, The 29th Annual meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2017) (November, 22-23, 2017, Bangkok, Thailand), EB-O-165
2. Parinda Thayanukul, Satoshi Matsumoto, Hareutai Sailoon, Jonkolnee Praditpong, Pimvarat Srikwan, Sudtida Pliankarom Thanasupsin (2016) Role of Acinetobacter sp. B 051 Inoculation on Enhancing 17 α -Methyltestosterone Degradation in Biofiltration System, International Symposium on Southeast Asian Water Environment (SEAWE) (November, 28-30, 2016, Hanoi, Vietnam), p.349-354
3. Pimvarat Srikwan, Parinda Thayanukul, Tawan Limpiyakorn (2015) Biodegradation of 17 α -methyltestosterone by microorganisms isolated from masculinizing ponds of Nile tilapia fry, The Water and Environment Technology Conference 2015 (August, 5-6, 2015, Tokyo, Japan) Best presentation award, p.41
4. Pimvarat Srikwan, Parinda Thayanukul, Tawan Limpiyakorn (2015) Isolation of 17 α -methyltestosterone degrading microorganisms from water and sediment samples of masculinizing ponds of Nile tilapia fry, Industrial and Hazardous Waste Conference (January 31, 2015, Bangkok, Thailand) P-11

เอกสารอ้างอิง

- Abraham, J. and S. Silambarasan (2016). "Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol using a novel bacterium *Ochrobactrum* sp. JAS2: A proposal of its metabolic pathway." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 126: 13-21.
- Administration, F. a. D. (2017). Chapter 04 – Pesticides and Chemical Contaminants - Chemotherapeutics in Aquaculture Seafood Compliance Program. FDA/ORA Regulatory Procedures Manual/Investigations Operations Manual
- Adnan, F. and S. P. Thanasupsin (2016). "Kinetic studies using a linear regression analysis for a sorption phenomenon of 17 α -methyltestosterone by *Salvinia cucullata* in an active plant reactor." *Environmental Engineering Research* 21(4): 384-392.
- Andersen, L., R. Goto-Kazeto, J. M. Trant, J. P. Nash, B. Korsgaard and P. Bjerregaard (2006). " Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). " *Aquatic Toxicology* 76(3–4): 343-352.
- Aquatic Animal Drug Approval Partnership (AADAP). (2018). "17 α -methyltestosterone INAD #11-236." Investigational New Animal Drugs (INADs) Retrieved 10 July 2018, from <https://www.fws.gov/fisheries/aadap/inads/17a-methyltestosterone-INAD-11-236.html>.
- Baoprasertkul, P., B. Somridhivej, S. Rangsiyapirom and T. Somsiri (2013). The Determination of 17 α -Methyltestosterone in Sex-reversed Tilapia, Inland Aquatic Animal Health Research Institute, Inland Fisheries Research and Development Bureau, Ministry of Agriculture and Cooperatives
- Barbosa, I. R., S. Lopes, R. Oliveira, I. Domingues, A. M. V. M. Soares and A. J. A. Nogueira (2013). "Determination of 17 α -Methyltestosterone in Freshwater Samples of Tilapia Farming by High Performance Liquid Chromatography." *American Journal of Analytical Chemistry* 04(04): 207-211.
- Bhatti, H. N. and R. A. Khera (2012). "Biological transformations of steroidal compounds: A review." *Steroids* 77(12): 1267-1290.

- Biomedicals, M. (2018). "METHYLTESTOSTERONE Properties (MP BIOMEDICALS, 05203844)."
Retrieved 6 June 2018, from
<https://www.mpbio.com/product.php?pid=05203844&country=222>.
- Chen, K.-Y. and P.-H. Chou (2016). "Detection of endocrine active substances in the aquatic environment in southern Taiwan using bioassays and LC–MS/MS." *Chemosphere* 152(Supplement C): 214-220.
- Coulter, A. W. and P. Talalay (1968). "Studies on the Microbiological Degradation of Steroid Ring A." *Journal of Biological Chemistry* 243(12): 3238-3247.
- Cwiertny, D. M., S. A. Snyder, D. Schlenk and E. P. Kolodziej (2014). "Environmental Designer Drugs: When Transformation May Not Eliminate Risk." *Environmental Science & Technology* 48(20): 11737-11745.
- Department of Fisheries Hormonal Sex-reversed Nile Tilapia Culture, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Department of Fisheries (2014). Cage Culture of Tilapia, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- El-Greisy, Z. A. and A. E. El-Gamal (2012). "Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 α -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment." *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 38(1): 59-66.
- Fahrbach, M., M. Krauss, A. Preiss, H.-P. E. Kohler and J. Hollender (2010). "Anaerobic testosterone degradation in *Steroidobacter denitrificans* – Identification of transformation products." *Environmental Pollution* 158(8): 2572-2581.
- Fitzpatrick, M. S. and W. M. Contreras Sánchez (2000). Fate of methyltestosterone in the pond environment: detection of mt in soil after treatment with mt food. Seventeenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP. D. B. K. McElwee, M. Niles, X. Cummings, and H. Egn. Corvallis, Oregon, Oregon State University: 109-112.
- Fitzpatrick, M. S., W. M. Contreras Sánchez, R. H. Milston, R. Hornick and G. W. Feist (1999). Detection of mt in aquarium water after treatment with mt food. Sixteenth Annual

- Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP. D. B. K. McElwee, M. Niles, and H. Egna Corvallis, Oregon, Oregon State University: 81-84.
- Green, B. W. and D. R. Teichert-Coddington (2000). "Human Food Safety and Environmental Assessment of the Use of 17 α -Methyltestosterone to Produce Male Tilapia in the United States." *Journal of the World Aquaculture Society* 31(3): 337-357.
- Gu, Q., Q. Wu, J. Zhang, W. Guo, H. Wu and M. Sun (2017). "Acinetobacter sp. DW-1 immobilized on polyhedron hollow polypropylene balls and analysis of transcriptome and proteome of the bacterium during phenol biodegradation process." *Scientific Reports* 7(1): 4863.
- Guidechem. (2018). "17 - methyltestosterone." Retrieved 6 June 2018, from <https://www.guidechem.com/reference/dic-212.html>.
- Homklin, S., S. K. Ong and T. Limpiyakorn (2011). "Biotransformation of 17 α -methyltestosterone in sediment under different electron acceptor conditions." *Chemosphere* 82(10): 1401-1407.
- Homklin, S., S. K. Ong and T. Limpiyakorn (2012). "Degradation of 17 α -methyltestosterone by *Rhodococcus* sp. and *Nocardioides* sp. isolated from a masculinizing pond of Nile tilapia fry." *Journal of Hazardous Materials* 221–222(0): 35-44.
- Horinouchi, M., T. Hayashi and T. Kudo (2012). "Steroid degradation in *Comamonas testosteroni*." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 129(1–2): 4-14.
- Jin, W., B. Huang, B. Wang, D.-W. Wang, S.-M. Zhao and X.-J. Pan (2013). "Simultaneous Determination of Androgens and Progestogen in Surface Water and Sediment by Gas Chromatography-Mass Spectrometry." *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 41(2): 205-209.
- Kaewjuntawee, P. (2017, 2 June 2017). "Culture of Transgendered Tilapia." Retrieved 25 June 2018, from <http://www3.rdi.ku.ac.th/?p=37042>.
- Kampfer, P., H. C. Scholz, B. Huber, E. Falsen and H.-J. Busse (2007). "Ochrobactrum haematophilum sp. nov. and Ochrobactrum pseudogrignonense sp. nov., isolated from human clinical specimens." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(11): 2513-2518.

Kawanishi, M., T. Takamura-Enya, R. Ermawati, C. Shimohara, M. Sakamoto, K. Matsukawa, T. Matsuda, T. Murahashi, S. Matsui, K. Wakabayashi, T. Watanabe, Y. Tashiro and T. Yagi (2004). "Detection of Genistein as an Estrogenic Contaminant of River Water in Osaka." *Environmental Science & Technology* 38(23): 6424-6429.

Khadivinia, E., H. Sharafi, F. Hadi, H. S. Zahiri, S. Modiri, A. Tohidi, A. Mousavi, A. H. Salmanian and K. A. Noghabi (2014). "Cadmium biosorption by a glyphosate-degrading bacterium, a novel biosorbent isolated from pesticide-contaminated agricultural soils." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20(6): 4304-4310.

Kirchnawy, C., J. Mertl, V. Osorio, H. Hausensteiner, M. Washüttl, J. Bergmair, M. Pyerin and M. Tacker (2014). "Detection and Identification of Oestrogen-Active Substances in Plastic Food Packaging Migrates." *Packaging Technology and Science* 27(6): 467-478.

Leu, Y. L., P. H. Wang, M. S. Shiao, W. Ismail and Y. R. Chiang (2011). "A novel testosterone catabolic pathway in bacteria." *J Bacteriol* 193(17): 4447-4455.

Leusch, F. D., H. F. Chapman, M. R. van den Heuvel, B. L. Tan, S. R. Gooneratne and L. A. Tremblay (2006). "Bioassay-derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand." *Ecotoxicol Environ Saf* 65(3): 403-411.

Li, J., M. Ma and Z. Wang (2008). "A two-hybrid yeast assay to quantify the effects of xenobiotics on retinoid X receptor-mediated gene expression." *Toxicol Lett* 176(3): 198-206.

Liu, S., G.-G. Ying, L.-J. Zhou, R.-Q. Zhang, Z.-F. Chen and H.-J. Lai (2012). "Steroids in a typical swine farm and their release into the environment." *Water Research* 46(12): 3754-3768.

Matysik, S. and G. Schmitz (2015). "Determination of steroid hormones in human plasma by GC–triple quadrupole MS." *Steroids* 99, Part B: 151-154.

Megbowon, I. and T. O. Mojekwu (2014). "Tilapia Sex Reversal Using Methyl Testosterone (MT) and its Effect on Fish, Man and Environment." *Biotechnology Advances*(13): 213-216.

Mertl, J., C. Kirchnawy, V. Osorio, A. Richter, J. Bergmair, M. Pyerin, M. Washu and M. Tacker "Characterization of Estrogen and Androgen Activity of Food Contact Materials by Different In Vitro Bioassays (YES, YAS, ERa and AR CALUX) and Chromatographic Analysis (GC-MS, HPLC-MS)." *PLOS One*.

- Mlalila, N., C. Mahika, L. Kalombo, H. Swai and A. Hilonga (2015). "Human food safety and environmental hazards associated with the use of methyltestosterone and other steroids in production of all-male tilapia." *Environmental Science and Pollution Research* 22(7): 4922-4931.
- Nishimura, Y., T. Ino and H. Iizuka (1988). "Acinetobacter radioresistens sp. nov. Isolated from Cotton and Soil." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 38(2): 209-211.
- Noorit, K. (2017). "Monthly Report in October 2017: Tilapia Products." from <https://www.fisheries.go.th/strategy/UserFiles/files/tilapia%2010-2-60.pdf>.
- Office of Agricultural Economics. (2018). "Information of Agriculture Production - Tilapia Fish." Retrieved 1 July 2018, from <http://www.oae.go.th>.
- Ong, S., P. Chotisukarn and T. Limpiyakorn (2012). "Sorption of 17 α -Methyltestosterone onto Soils and Sediment." *Water, Air, & Soil Pollution* 223(7): 3869-3875.
- Online, T. (2016). Fisheries Research Center encourages on culturing the transgendered tilapia fish as high market demands on big size. (ศูนย์วิจัยฯ หนุนเกษตรกร เลี้ยงปลานิลแปลงเพศ ชี้น้ำใหญ่-ตลาดต้องการ). Thairath.
- Pandian, T. J. and S. Kirankumar (2003). "Recent Advances in Hormonal Induction of Sex-Reversal in Fish." *Journal of Applied Aquaculture* 13(3-4): 205-230.
- Pandian, T. J. and S. G. Sheela (1995). "Hormonal induction of sex reversal in fish." *Aquaculture* 138(1-4): 1-22.
- Pawlowski, S., A. Sauer, J. A. Shears, C. R. Tyler and T. Braunbeck (2004). "Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17 α -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay." *Aquatic Toxicology* 68(3): 277-291.
- Phelps, R. P., M. S. Fitzpatrick, W. M. Contreras-Sánchez, R. L. Warrington and J. T. Arndt (2000). Detection of mt in pond water after treatment with mt food. Seventeenth Annual

- Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP. D. B. K. McElwee, M. Niles, and H. Egna Corvallis, Oregon, Oregon State University: 57-59.
- Pubchem. (2018). "Methyltestosterone." Retrieved 6 June 2018, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/methyltestosterone#section=Top>.
- Raut, S. (2009). Effects of Endocrine Disruptors on Biomarkers of Reproductive Function in the Western Mosquitofish, *Gambusia Affinis*. Doctor of Philosophy, The University of Alabama at Birmingham.
- Sharpe, R. L., D. L. MacLatchy, S. C. Courtenay and G. J. Van Der Kraak (2004). "Effects of a model androgen (methyl testosterone) and a model anti-androgen (cyproterone acetate) on reproductive endocrine endpoints in a short-term adult mummichog (*Fundulus heteroclitus*) bioassay." *Aquatic Toxicology* 67(3): 203-215.
- Sohoni, P. and J. Sumpter (1998). "Several environmental oestrogens are also anti-androgens." *Journal of Endocrinology* 158(3): 327-339.
- Soto, A. M., M. V. Maffini, C. M. Schaeberle and C. Sonnenschein (2006). "Strengths and weaknesses of in vitro assays for estrogenic and androgenic activity." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20(1): 15-33.
- Thomas, K. V., M. R. Hurst, P. Matthiessen, M. McHugh, A. Smith and M. J. Waldock (2002). "An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries." *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(7): 1456-1461.
- Thomas, K. V., J. E. Thain and M. J. Waldock (1999). "Identification of toxic substances in United Kingdom estuaries." *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(3): 401-411.
- Tourna, M., M. Stieglmeier, A. Spang, M. Könneke, A. Schintlmeister, T. Urich, M. Engel, M. Schlöter, M. Wagner, A. Richter and C. Schlepera (2011). "Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(20): 8420-8425.
- Wang, Y. and P.-Y. Qian (2009). "Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies." *PLoS ONE* 4(10): e7401.

- Webster, C. D. and C. Lim (2006). *Tilapia: Biology, Culture, and Nutrition*, Taylor & Francis.
- Yalkowsky, S., Y. He and P. Jain (2010). *Handbook of Aqueous Solubility Data*. Boca Raton, CRC Press.
- Yang, Y.-Y., L. P. Pereyra, R. B. Young, K. F. Reardon and T. Borch (2011). "Testosterone-Mineralizing Culture Enriched from Swine Manure: Characterization of Degradation Pathways and Microbial Community Composition." *Environmental Science & Technology* 45(16): 6879-6886.
- Yenpoeng, T., W. Prompakdee, S. Ngamvongchon and T. Wattanamahard (2013). Study on Hormone (17 α methyltestosterone) Residue Level of Sex Reversal Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linn.) Seed Production in the Water Recirculation System, Inland Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Yoon, J.-H., Y.-G. Cho, S. T. Lee, K.-i. Suzuki, T. Nakase and Y.-H. Park (1999). "Nocardioides nitrophenolicus sp. nov., a p-nitrophenol-degrading bacterium." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49(2): 675-680.
- Yoon, J.-H. and Y.-H. Park (2006). The Genus *Nocardioides*. *Prokaryotes*. Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer and WErko Stackebrandt. Singapore, Springer. 3: 1099-1113.
- Young, R. B., D. E. Latch, D. B. Mawhinney, T.-H. Nguyen, J. C. C. Davis and T. Borch (2013). "Direct Photodegradation of Androstenedione and Testosterone in Natural Sunlight: Inhibition by Dissolved Organic Matter and Reduction of Endocrine Disrupting Potential." *Environmental Science & Technology* 47(15): 8416-8424.
- Zeng, D.-p., C.-p. Lin, Z.-l. Zeng, X.-h. Huang and L.-m. He (2010). "Multi-Residue Determination of Eight Anabolic Steroids by GC-MS in Muscle Tissues from Pigs." *Agricultural Sciences in China* 9(2): 306-312.