การเจริญของ *Exophiala* sp. บนฟีนอล

Growth of *Exophiala* sp. on Phenol

ศิริประภา จันทะบุญ (Siriprapa Juntaboon)* ดร.ศิริลักษณ์ สันพา (Dr.Sirilak Sanpa)**
ดร.สุชัญญา ทองเครือ(Dr.Suchanya Tongkrua)*** ดร.กานต์รวี ขยัน (Dr.Kantarawee Khayhan)****

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของฟีนอลสำหรับการเจริญของ *Exophiala* sp. UPBY01 ที่แยกได้จากท่อไอเสียรถจักรยานยนต์ การวัดการเจริญของ *Exophiala* sp. UPBY01 ทำด้วยวิธี agar diffusion โดยใช้อาหาร water agar ที่ผสมฟีนอลความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 100, 200, 400, 600, 800, 1,000, 1,200, 1,400 และ 1,600 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี พบว่าเชื้อทดสอบสามารถเจริญบนอาหาร water agar ที่ผสมฟีนอลความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ABSTRACT

A present study aims to determine appropriate concentration of phenol for growth of *Exophiala* sp. UPBY01 isolated from motorcycle exhausts. Using agar diffusion method with water agar supplemented with phenol at various concentrations, including 100, 200, 400, 600, 800, 1,000, 1,200, 1,400 and 1,600 mg/L, growth of *Exophiala* sp. UPBY01 were measured. A measurement of colony diameter showed that the isolate could grow on water agar supplemented with phenol at concentration of 100 and 200 mg/L.

คำสำคัญ: แบล็คยีสต์ *Exophiala* sp. ฟีนอล

Keywords: Black yeast, *Exophiala* sp., Phenol

* *นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา*
** *อาจารย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา*
*** *อาจารย์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา*
**** *Fungal Biodiversity Centre (CBS-KNAW), Department of Basidiomycete and Yeast, Utrecht, The Netherlands*

บทนำ

ฟีนอล (phenol) เป็นสารประกอบอินทรีย์กลุ่มอะโรมาติกที่ย่อยสลายได้ยาก มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) เชื่อมต่อกับวงแหวนเบนซีน มีสูตรโมเลกุลคือ C_6H_5OH ฟีนอลมีสีใส เมื่อสัมผัสกับอากาศจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างช้าๆ มีกลิ่นคล้ายกับน้ำมันดิบ มีความสามารถในการดูดความชื้น ละลายน้ำได้ดี (จุฑามาศ, 2556) สำหรับการนำฟีนอลไปใช้ประโยชน์นั้นสามารถใช้การผลิตพลาสติก และใช้ในการผลิตสารเคมีและยาต่างๆ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารทำความสะอาดหรือสารฆ่าเชื้อ (disinfectants) อีกด้วย (เกศ, 2555) โดยสารฟีนอลเมื่อมีการจัดการที่ไม่เหมาะสมอาจปล่อยฟีนอลปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้ โดยฟีนอลเป็นสารอันตรายที่ทำให้เกิดการระคายเคืองและเป็นพิษต่อตับ และเป็นสารก่อมะเร็ง (ธนพล และคณะ, 2557)

แบล็คยีสต์ (black yeast) เป็นกลุ่มเชื้อราที่พบตามธรรมชาติ ดำรงชีวิตเป็น saprobe มีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer) ที่สำคัญในห่วงโซ่อาหารเหมือนกับจุลินทรีย์ทั่วไป ก่อนหน้านี้แบล็คยีสต์ถูกจัดรวมไว้ในกลุ่มของราดำ (dematiaceous fungi) มีทั้งประโยชน์และโทษ เช่น ใช้ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม หรือการก่อโรคกับคน แบล็คยีสต์มีคุณสมบัติในการสร้างเมลานิน ทำให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Butler and Day, 1998) เช่น *Moniliella*, *Aureobasidium*, *Hormonema*, *Hortaea* และ *Exophiala* (กิตติพันธุ์, 2550) จากการรายงานก่อนหน้านี้สามารถแยกเชื้อแบล็คยีสต์จากอุตสาหกรรมที่มีการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นสารตั้งต้นในการผลิต เช่น น้ำเสีย และดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Seyedmousavi et al., 2015) นอกจากนี้ยังถูกตรวจพบได้ในถังน้ำมันของเครื่องยนต์ เครื่องซักผ้า และหมอนรองรถไฟที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน (Isola et al., 2013; Zalar et al., 2011; Zhao et al., 2010) ในปี 2008 Satow และคณะ และ Vicente และคณะ (2008) พบว่า *E. xenobiotica* มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ระเหยง่าย เช่น โทลูอีน นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการใช้สารหนู (arsenic) สำหรับการเจริญอีกด้วย ในปัจจุบันจึงได้มีการนำเอาแบล็คยีสต์มาประยุกต์ใช้ในการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ (bioremediation) โดยเฉพาะสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น โทลูอีน ฟีนอล mineral oil n-hexadecane alkylbenzenes (Badali et al. 2011; Dos Santos et al., 2009; Satow et al., 2008; Badali et al., 2011)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะคัดแยกเชื้อแบล็คยีสต์จากท่อไอเสียรถ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารฟีนอล แล้วนำมาศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเจริญบนสารฟีนอล เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการ บำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) ต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารฟีนอลที่ *Exophiala* sp. สามารถเจริญได้

วิธีการวิจัย

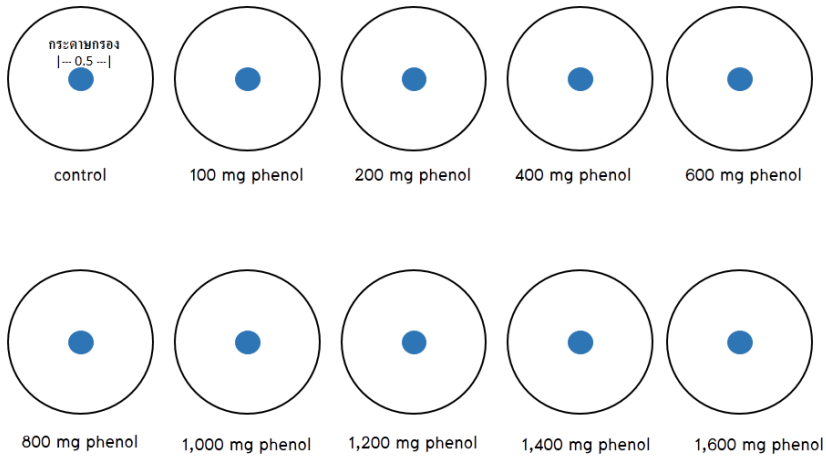
1. เชื้อทดสอบและการเตรียมเชื้อสำหรับการทดลอง

ทำการแยกเชื้อแบล็คยีสต์จากท่อไอเสียรถจักรยานยานต์ และพิสูจน์เชื้อด้วยวิธีการสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (macroscopic examination) และลักษณะโครงสร้างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) รวมถึงการพิสูจน์เชื้อด้วยวิธี ITS sequencing พบว่า เชื้อที่แยกได้ดังกล่าว (ไอโซเลต UPBY01) จัดอยู่ในจีนัส *Exophiala* จากนั้นนำเชื้อ *Exophiala* sp. UPBY01 ทำการเพาะเชื้อเลี้ยงบนอาหาร Malt Extract Agar slant แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เติมด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้ท่วมบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เข้ากันด้วย vortex นำ cell suspension ที่ได้ไปปรับความเข้มข้นของเซลล์ทดสอบ

ให้มีค่าประมาณ 4.15 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.100

2. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารฟีนอลที่ *Exophiala* sp. สามารถใช้สำหรับการเจริญได้

การทดสอบความสามารถของเชื้อที่เจริญบนสารฟีนอล โดยจะใช้วิธี agar diffusion โดยการเติม cell suspension ของเชื้อทดสอบ ที่มีความเข้มข้นประมาณ 4.15 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร บนอาหาร water agar (1.5% agar) ที่ผสมฟีนอลความเข้มข้นต่างๆ ดังต่อไปนี้ 100, 200, 400, 600, 800, 1,000, 1,200, 1,400, และ 1,600 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูป 1 โดยใช้ water agar ปราศจากฟีนอลเป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน บันทึกผลการทดลอง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุกๆวันที่ 1, 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA โดยใช้ GraphPad Prism version 7.00 (http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/)



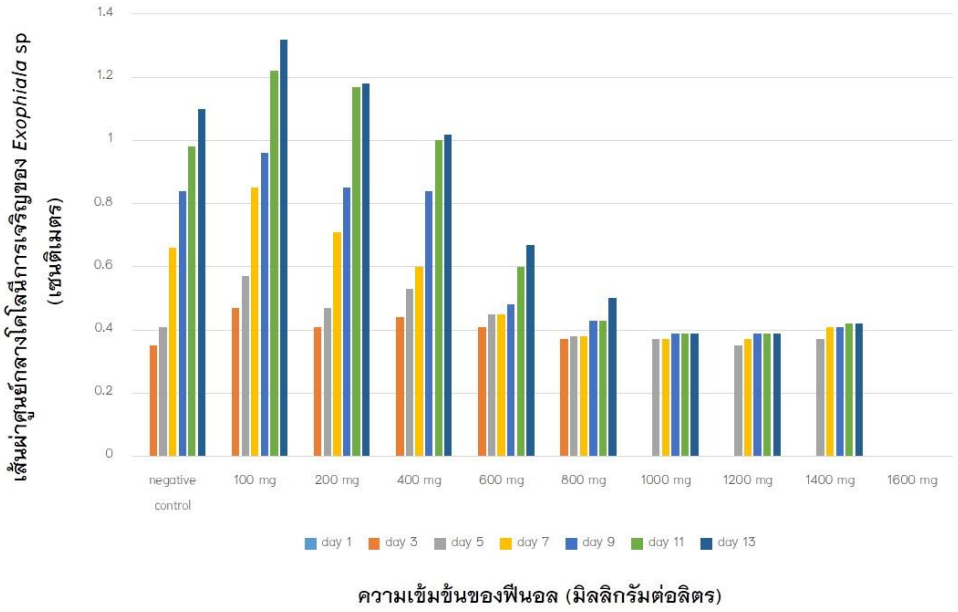
ภาพที่ 1 ชุดทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อโดยใช้วิธี agar diffusion

ผลการวิจัย

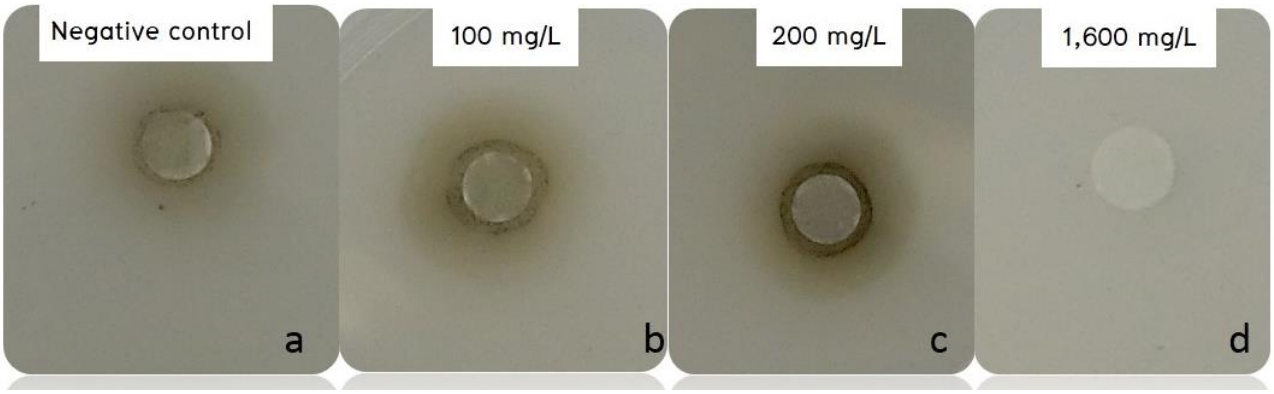
1. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารฟีนอลที่ *Exophiala* sp. สามารถใช้สำหรับการเจริญได้

จากการเจริญของ *Exophiala* sp. UPBY01 บนอาหารวุ้นที่ผสมฟีนอลความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800, 1,000, 1,200, 1,400, และ 1,600 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 13 วัน พบว่า ในวันที่ 3 *Exophiala* sp. UPBY01 สามารถเจริญบน water agar ที่ผสมฟีนอลความเข้มข้น 100-800 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 เชื้อสามารถเจริญได้บน water agar ที่ผสมฟีนอลในความเข้มข้น 100-1,400 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นบนอาหารที่ผสมฟีนอลความเข้มข้น 100-800 มิลลิกรัมต่อลิตร จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง (รูป 2) โดยขนาดเฉลี่ยของโคโลนีของ *Exophiala* sp. UPBY01 บนอาหารวุ้นที่ผสมฟีนอลความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800, 1,000, 1,200, 1,400, และ 1,600 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 เท่ากับ 1.39, 1.24, 0.98, 0.64, 0.50, 0.44, 0.43, 0.42 และ 0.00 เซนติเมตร ตามลำดับ โคโลนีของเชื้อทดสอบบนอาหาร water agar ชุดควบคุม ที่ไม่ได้ผสมฟีนอล มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 1.11 เซนติเมตร (รูป 3) จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$ โดยเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อทดสอบบนอาหาร water agar ที่

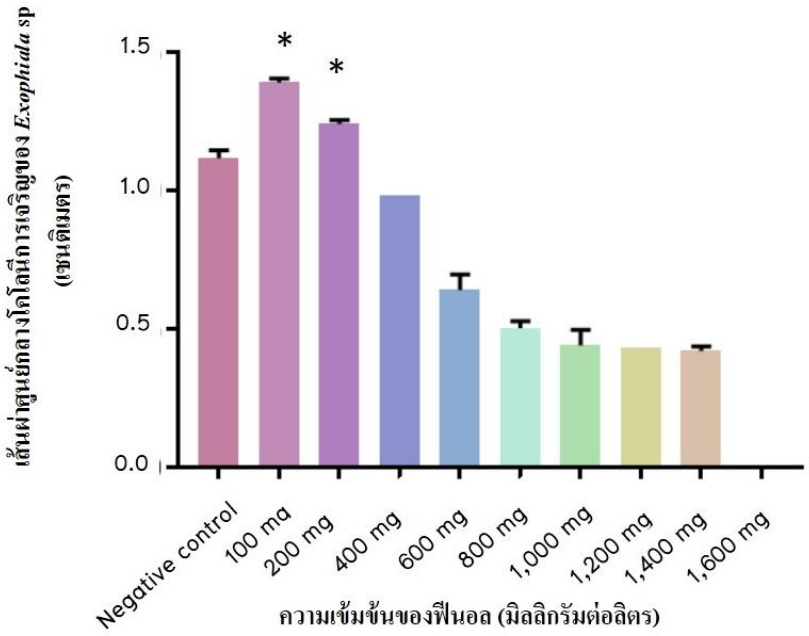
ผสมฟีนอลความเข้มข้นต่าง ๆ กับชุดควบคุม พบว่า *Exophiala* sp. UPBY01 สามารถเจริญบนสารฟีนอล ได้ที่ 100 (p= 0.0001) และ 200 (p=0.0015) มิลลิกรัมต่อลิตร ((รูป 4)



ภาพที่ 2 ขนาดเฉลี่ยของโคโลนีของ *Exophiala* sp. UPBY01 บนอาหาร water agar ที่ผสมฟีนอลความเข้มข้นต่างๆ และชุดควบคุม เป็นเวลา 13 วัน



ภาพที่ 3 โคโลนีของ *Exophiala* sp. UPBY01 บนอาหาร water agar ปราศจาก ฟีนอล a), water agar ที่ผสมฟีนอลความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร b), water agar ที่ผสมฟีนอลความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร c), และ water agar ที่ผสมฟีนอลความเข้มข้น 1,600 มิลลิกรัมต่อลิตร d)



ภาพที่ 4 ขนาดเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของ *Exophiala* sp UPBY01 กับสารฟีนอลที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800, 1,000, 1,200, 1,400, และ 1,600 มิลลิกรัมต่อลิตร * $p \leq 0.005$

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาหาความเข้มข้นของฟีนอลเหมาะสมสำหรับการเจริญ *Exophiala* sp UPBY01 พบว่า *Exophiala* sp UPBY01 สามารถเจริญได้ในสารฟีนอลที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 1.39 และ 1.24 เซนติเมตร ความสามารถในการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนสำหรับการเจริญของ *Exophiala* sp UPBY01 ซึ่งเป็นเชื้อราในกลุ่มแบล็คยีสต์นี้ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Isola และคณะ (2013) โดยทำการแยกเชื้อรากลุ่มแบล็คยีสต์มาจากท่อไอเสียรถ เครื่องซักผ้า และตัวถังน้ำมัน พบว่า เชื้อแบล็คยีสต์ที่แยกได้สามารถใช้โทลูอีนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ โดยโทลูอีนเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเช่นเดียวกับฟีนอล ในปี 2010 Zhao และคณะ ได้แยกเชื้อรากลุ่มแบล็คยีสต์และเชื้อรากลุ่มใกล้เคียงจากพืช ดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน และไม้หมอนรถไฟ และนำมาทำการทดสอบการย่อยสลายกับสารเบนซีน, โทลูอีน,ไซลีน และแนฟทาลีน พบว่า *Exophiala* sp. บางสปีชีย์สามารถใช้สารเบนซีน, โทลูอีน,ไซลีน และแนฟทาลีน เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ รวมถึงการศึกษาของ Dos Santos และคณะ (2009) พบว่า สามารถแยกเชื้อ *Aureobasidium pullulans* FE13 ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมและมีสามารถในการใช้ฟีนอลในการเจริญได้ ซึ่งเชื้อ *A. pullulans* จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อรากลุ่มแบล็คยีสต์ แสดงให้เห็นว่าเชื้อรากลุ่มแบล็คยีสต์สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนบางตัวใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาว ปิย์วรา วัฒนะ และนางสาวปวิณดา รวมสุข ที่ช่วยผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างและทำการแยกเชื้อ ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ช่วยสนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

กิตติพันธุ์ เสมอพิทักษ์. แบล็คยีสต์และเชื้อราใกล้เคียง: ลักษณะทั่วไปและความสำคัญทางการแพทย์. ศรีนครินทร์เวชสาร 2550. 22(3), 316-320.

เกศ สัตยพงศ์. ฟีนอล [ออนไลน์] 2555. [อ้างเมื่อ 10 กรกฎาคม 2559]. จาก http://www.summacheeva.org/index_thaitox_phenol.htm

จุฑามาศ ปัดภัย. การกำจัดฟีนอลด้วยเอนไซม์แลคเคสหยาบตรึง [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม]. อุบลราชธานี: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี; 2556.

ธนพล เพ็ญรัตน์, ทิพย์วรรณ ทองบุศย์ และ ธัญญทิตย์ อิ่มเที่ยง. การสลายสารฟีนอล ปนเปื้อนในน้ำใต้ดินบ่อตื้นเพื่อการอุปโภค-บริโภคของชาวบ้านตำบลหนองแหน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยใช้โอโซน [ออนไลน์] 2558 [อ้างอิงเมื่อ 22 มิถุนายน 2559]. จาก web.eng.nu.ac.th/eng2012/enmis/doc/.../tanapon_budget57.pdf

Badali H, Prenafeta-Boldu FX, Guarro J, Klaassen CH, Meis JF, and de Hoog GS. *Cladophialophora psammophila*, a novel species of Chaetothyriales with a potential use in the bioremediation of volatile aromatic hydrocarbons. Fungal Biology 2011; 115: 1019-1029.

Butler MJ and Day AW. Fungal melanins: a review. Cannadian Journal of Microbiology 1998; 115: 1019-1029.

Caesar-Tonthat T, Van Ommen Kloeke F, Geesey GG, and Henson JM. Melanin production by a filamentous soil fungus in relation to copper and localization of copper sulfide by sulfide silver staining. Applied Environmental Micrology 1995; 61: 1968-1975.

Dos Santos VL, Monteiro Ade S, Braga DT, and Santoro MM. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. Journal of Hazardous Materials 2009; 161: 1413–1420.

Goncalves AB, Paterson RR, and Lima N. Survay and signify-cance of filamentous fungi from tap water. International Journal of Hygiene and Environmental Health 2006; 64: 209-257.

Isola D, Selbmann L, de Hoog GS, Fenice M, Onofri S, Prenafeta-Boldu´ FX, et al. (2013). Isolation and Screening of Black Fungi as Degraders of Volatile Aromatic Hydrocarbons. Mycopathologia 2013; 175: 369–379.

Satow MM, Attili-Angelis D, de Hoog GS, Angelis DF, and Vicente VA. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. Studies in Mycology 2008; 61: 157–163.

Seyedmousavi S, Netea MG, Mouton JW, Melchers WJ, Verweij PE, and de Hoog GS. Black yeasts and their filamentous relatives: principles of pathogenesis and host defense. Clinical Microbiology Review 2014; 27(3): 527-542.

Sterflinger K. Tempreature and NaCl-tolerance of rock-habiting meristematic fungi. Antonie van Leeuwemhoek 1998; 74: .271-281.

Vicente VA, Attili-Angelis D, Pie MR, Queiroz-Telles F, Cruz LM, Najafzadeh MJ, et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. Studies in Mycology 2008; 61: 137–144.

Wheeler MH. and Bell AA. Melanins and their importance in pathogenic fungi. Current Topics in Medical Mycology 1998; 2: 338-387.

Zalar P, Novak M, de Hoog GS, and Gunde-Cimerman N. Dish washers-a-man-made Ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. Fungal Biology 2010; 115: .997-1007.

Zhao J, Zeng J, de Hoog GS, Attili-Angeli D, and Prenafeta-Boldú FX. Isolation and Identification of Black Yeasts by Enrichment on Atmospheres of Monoaromatic Hydrocarbons. Microbial Ecology 2010; 60: 149–156.