บทความวิจัย (Research Article)

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการงอกของสปอร์และความไวต่อสภาวะเครียดของ *Talaromyces marneffei*

ณรงค์ นวลเมือง[1], ปัญจพร นิ่มมณี[2], พงศธร ชัยพันธ์[1], สุภิสรา มีสกุล[1], นงนุช วณิตย์ธนาคม[3], อักษรากร คำมาสุข[1*]

Optimal conditions for spore germination and stress susceptibility in *Talaromyces marneffei*

Narong Nuanmuang[1], Panjaphorn Nimmanee[2], Pongsatorn Chaipan[1], Supisara Meesakul[1], Nongnuch Vanittanakom[3], Aksarakorn Kummasook[1*]

[1] Division of Clinical Microbiology and Medical Parasitology, Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, University of Phayao, Phayao Province 56000

[2] Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University Bangna-Trad Rd. Bang Phi, Samut Prakan Province 10540

[3] Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Province 50200

* Correspondence to E-mail: aksarakorn.ku@up.ac.th

Naresuan Phayao J. 2019;12(3):31-37.

Received: 22 October 2019; Revised: 13 December 2019; Accepted: 25 December 2019

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการงอกของสปอร์และการทดสอบความไวต่อความเครียดของ *Talaromyces marneffei* ผลการทดสอบพบว่าเมื่อบ่มที่สภาวะอุณภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบการงอกของสปอร์ได้ดีกว่าสภาวะที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งอัตราการงอกจะคงที่เมื่อบ่มนาน 16 และ 20 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 99.7 และ 72.7 ตามลำดับ การทดสอบหาความเข้มข้นในระดับที่มากที่สุดที่ยังไม่ทำให้จุลชีพตาย หรือ sublethal dose ในสภาวะราสายและยีสต์ พบว่าสารที่มี sublethal dose เท่ากันในทั้ง 2 สภาวะประกอบด้วย แคลเซียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ น้ำตาลซอร์บิทอล 0.75 โมลาร์ menadione 62.5 ไมโครโมลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ และ sodium dodecyl sulphate (SDS) ร้อยละ 0.005 ยกเว้นสาร *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) ซึ่งพบว่าในสภาวะที่เป็นราสายจะใช้ความเข้มข้นสูงกว่าสภาวะยีสต์ คือ 1.5 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ทดสอบความไวของจุลชีพสายพันธุ์ปกติเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ของ *T. marneffei* ได้

คำสำคัญ: ราฉวยโอกาส, การงอกของสปอร์, การตอบสนองต่อความเครียด

---

[1] แขนงวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

[2] คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ถนนเทพรัตน (บางนา-ตราด) กม.18 ตำบลบางโฉลง อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ 10540

[3] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

Abstract

This study aims to investigate the optimal conditions for spore germination and susceptibility to stress of *Talaromyces marneffei*. The results revealed that an incubation temperature of 25°C was more favorable for spore germination than at 37°C. The germination rate was found to be constant between 16 and 20 hours at either temperature; 25°C yielded 99.7 germination, while 37°C showed 72.7% germination. To simulate stress response, the highest dose concentration of several compounds found to be insufficient to cause death (sublethal dose) was determined in both mycelium and yeast phases. Both phases of *T. marneffei* were found to have the following sublethal dose tolerance rates: $CaCl_2$ (200 mM), NaCl (0.5M), sorbitol (0.75M), menadione (62.5 μM), H_2O_2 (2.5 mM), and sodium dodecyl sulphate (SDS, 0.005 %). Meanwhile, the sublethal dose of *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) in mycelium and yeast phases were 1.5 and 0.5mM, respectively. The results of this optimal conditions study could be further applied for fungal stress susceptibility testing comparing wild type and mutant strains of *T. marneffei*.

Keywords: Opportunistic fungi, spore germination, stress response

คำนำ

Talaromyces marneffei (*T. marneffei*) เป็นจุลชีพก่อโรคฉวยโอกาสในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยเอดส์ โดยเฉพาะในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย ในการศึกษาแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลชีพนี้นักวิทยาศาสตร์คาดว่าน่าจะอาศัยอยู่ในดิน แต่การแยกจุลชีพส่วนใหญ่สามารถแยกได้จากอวัยวะภายในของสัตว์ในตระกูลอ้น แต่อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์ยังเชื่อว่าจุลชีพนี้น่าจะอาศัยอยู่ในดินที่ชื้น และผู้ป่วยได้รับผ่านทางการหายใจ จุลชีพนี้จัดเป็นราสองรูปที่สามารถเจริญในรูปราสายที่สภาวะอุณหภูมิห้อง และสามารถเปลี่ยนรูปร่างเป็นยีสต์โดยแบ่งเซลล์แบบการแตกหน่อที่สภาวะอุณหภูมิในร่างกายมนุษย์ ซึ่งจัดเป็นรูปแบบที่สามารถก่อโรคได้ [1,2] ในการเจริญและมีชีวิตอยู่ทั้งในสิ่งแวดล้อมและภายในร่างกายของคน จุลชีพจะต้องมีการปรับตัวต่อสภาวะเครียด (stress) ต่างๆ ได้แก่ ความร้อน ความดันออสโมติก สภาวะออกซิเดทีฟ รังสียูวี และการขาดแคลนอาหาร โดยเฉพาะการเจริญเติบโตในเซลล์แมคโครฟาจ จุลชีพจะพบกับการเกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นหลัก [3]

แต่อย่างไรก็ตามความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับยีนที่ควบคุมการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและความเครียดต่างๆ ยังมีรายงานน้อย [3,4] ซึ่งการศึกษาบทบาทของยีนเหล่านั้นจะอาศัยสภาวะการเพาะเลี้ยงจุลชีพที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้เป็นสภาวะที่สามารถเปรียบเทียบความไวของจุลชีพต่อสารที่ก่อให้เกิดความเครียดชนิดต่างๆ ซึ่งความเข้มข้นของสารที่ก่อให้เกิดความเครียดที่เหมาะสมคือความเข้มข้นสูงสุดที่จุลชีพยังสามารถเจริญเติบโตได้ หากเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้จุลชีพไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ เรียกความเข้มข้นนี้ว่า sublethal dose ในการทดสอบเปรียบเทียบจุลชีพสายพันธุ์ปกติกับจุลชีพที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีนใดยีนหนึ่ง เมื่อใช้สภาวะที่เป็น sublethal dose หากยีนนั้นเป็นยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะความเครียด จะส่งผลให้ความไวต่อสารที่ก่อให้เกิดความเครียดมากขึ้น ทำให้จุลชีพกลายพันธุ์นั้นๆ ตาย แต่จุลชีพสายพันธุ์ปกติยังสามารถเจริญได้ โดยการทดสอบทั่วไปในหลอดทดลองจะทดสอบสภาวะต่างๆ ได้แก่ สภาวะเครียดจากความดันออสโมติก จะใช้น้ำตาลซอร์บิทอล และเกลือโซเดียมคลอไรด์ สภาวะเครียดจากออกซิเดทีฟ จะใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ menadione และ *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) สภาวะเครียดต่อผนังเซลล์ จะใช้ calcofluor white (CW) และ sodium dodecyl sulphate (SDS) และสภาวะเครียดจากความร้อนจะทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 39 และ 42 องศาเซลเซียส [3]

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยงและเตรียม *Talaromyces marneffei*

เพาะเลี้ยง *T. marneffei* F4 (*T. marneffei* CBS119456)[5] ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน โดยนำมาเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จะได้เป็นสปอร์จำนวนมาก แล้วนำมาเตรียมเป็นสปอร์เดี่ยวๆ ด้วยการขูดเอาสปอร์จากโคโลนีมากระจายลงในน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วกรองด้วย glass wool จากนั้นนำไปนับความเข้มข้นของสปอร์ด้วย hemocytometer

การทดสอบการงอกของสปอร์

ดูดสปอร์ที่เตรียมด้วยน้ำเกลือ (ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อไมโครลิตร) แล้วใส่ลงในอาหารเหลว minimal medium (MM: อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย NH_4Cl 2 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัม KCl 0.5 กรัม NaCl 0.5 กรัม KH_2PO_4 1 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม $FeSO_4.7H_2O$ 0.02 กรัม และ กลูโคส 10 กรัม)[6] โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสปอร์เท่ากับ 10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหาร MM ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 25 และ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตรวจดูลักษณะการงอกของสปอร์ที่ระยะเวลา 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง โดยตรวจนับจำนวนสปอร์และสปอร์ที่มีการงอก (germ tube) ทำการทดลองซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

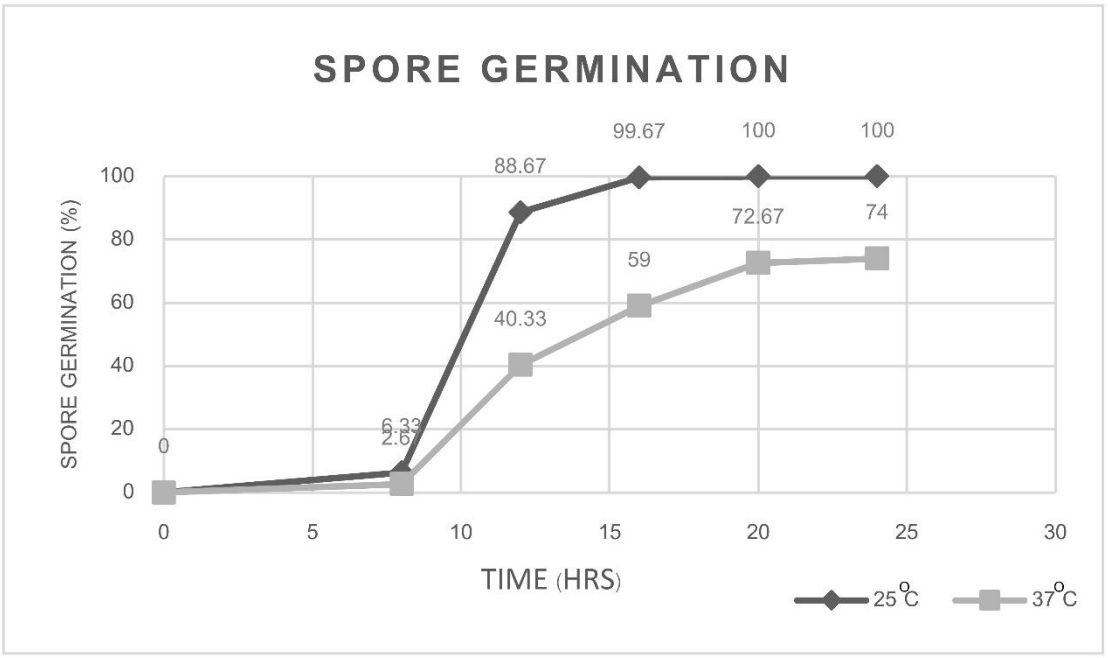
การตอบสนองของต่อสภาวะเครียด

สารที่ทำให้ราเกิดความเครียดที่นำมาทดสอบมี 7 ชนิด โดยนำสารต่างๆ เหล่านั้นมาเตรียมให้มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันและผสมลงในอาหาร MM agar โดยมีช่วงความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ (50,100, 200, 300, 400 มิลลิโมลาร์) โซเดียมคลอไรด์ (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 โมลาร์) menadione (1.25, 2.5, 5, 10 ไมโครโมลาร์) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (0.75, 1.5, 2, 2.5, 3, 5 มิลลิโมลาร์) ซอร์บิทอล (0.375, 0.75, 1.5, 3 โมลาร์), *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH; 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 มิลลิโมลาร์) sodium dodecyl sulphate (SDS; ร้อยละ 0.00125, 0.0025, 0.005, 0.01) จากนั้นทำการเจือจางสปอร์ของราให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^4-10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วหยดลงในอาหาร MM ที่ผสมสารที่ทำให้เกิดความเครียด หยดละ 5 ไมโครลิตร แบ่งเพลทเป็น 2 ชุด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส อย่างละ 1 ชุด อ่านผลความไวของจุลชีพต่อสารที่ทำให้เกิดความเครียดเมื่อบ่มครบเวลา 4 วัน จากนั้นสังเกตลักษณะการเจริญเติบโตและบันทึกภาพ

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการงอกของสปอร์ของ *T. marneffei* F4

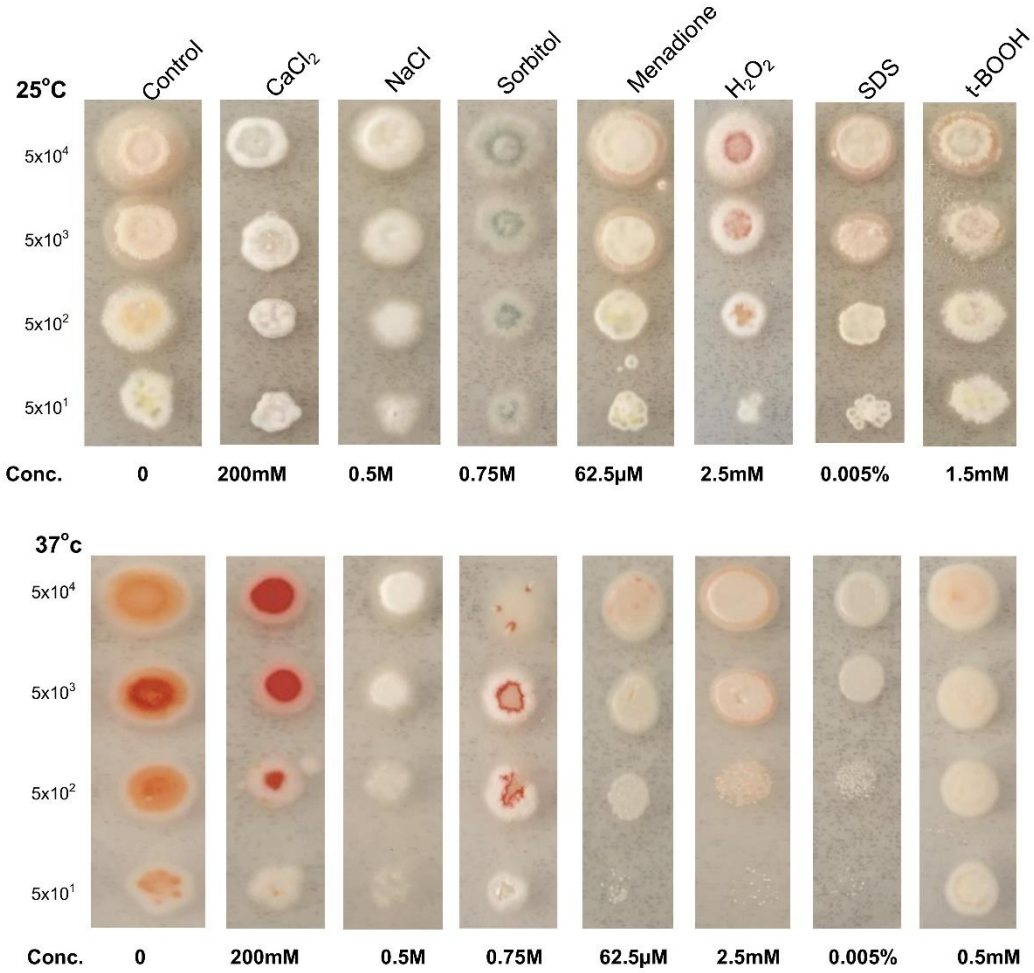
จากการศึกษาการเจริญเติบโตของ *T. marneffei* F4 ที่เพาะเลี้ยงใน minimal medium ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง ที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมงยังไม่พบการงอกของ *T. marneffei* โดยจะเริ่มพบการงอกที่เวลา 8 ชั่วโมง และพบร้อยละการงอกของสปอร์มากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยพบว่าสปอร์ของทั้งหมดสามารถงอกได้ภายในเวลา 16 ชั่วโมง ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการงอกของ *T. marneffei* ในสภาวะราสายคือ ช่วง 8 – 16 ชั่วโมง สำหรับการงอกของ *T. marneffei* ในสภาวะยีสต์พบว่ามีระยะเวลาที่ยาวนานกว่า และร้อยละของการงอกจะต่ำกว่าในสภาวะที่ 25 องศาเซลเซียส สปอร์จะเริ่มงอกที่เวลา 8 ชั่วโมง แต่การงอกจะเริ่มคงที่เวลา 20 ชั่วโมง ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการงอกของ *T. marneffei* ในสภาวะยีสต์คือ ช่วงเวลา 8-20 ชั่วโมง **(รูป 1)**



รูป 1 แสดงอัตราการงอกของสปอร์ของ *T. marneffei* เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง

ผลการทดสอบการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของ *T. marneffei* F4

จากการศึกษาการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของ *T. marneffei* ที่เพาะเลี้ยงใน minimal medium ร่วมกับสารก่อความเครียดในช่วงความเข้มข้นต่างๆ พบว่าจุลชีพนี้ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่ที่มีความเข้มข้นของสารก่อความเครียดสูงได้ แต่เมื่อมีความเข้มข้นของสารก่อความเครียดลดลงจะพบการเจริญของ *T. marneffei* ได้มากขึ้น โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบความทนต่อสภาวะความเครียดใน *T. marneffei* คือ ความเข้มข้นที่มากที่สุดของสารที่ก่อให้เกิดความเครียดที่จุลชีพยังเจริญได้ หากเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้จุลชีพไม่เจริญ หรือเรียกว่า sublethal dose โดยพบว่าสารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นที่เป็น sublethal dose ที่แตกต่างกัน โดยสารที่มีความเข้มข้นของ sublethal dose เท่ากันทั้งในสภาวะราสายและยีสต์ประกอบด้วยแคลเซียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอรไรด์ 0.5 โมลาร์ ซอร์บิทอล 0.75 โมลาร์ menadione 62.5 ไมโครโมลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ และ SDS ร้อยละ 0.005 ยกเว้นสาร *t*-BOOH ซึ่งพบว่าในสภาวะที่เป็นราสายจะใช้ความเข้มข้นสูงกว่าสภาวะยีสต์ คือ 1.5 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ **(รูป 2)**



รูป 2 แสดงลักษณะการเจริญบนอาหาร minimal medium ที่ผสมกับสารที่ทำให้เกิดความเครียดชนิดต่าง ๆ ในความเข้มข้นที่เป็น sublethal dose เมื่อนำมาเลี้ยงที่สภาวะ 25 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส

วิจารณ์

T. marneffei จัดเป็นราสองรูปโดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของจุลชีพนี้มีผลมาจากปัจจัยหลักคืออุณหภูมิ ในสภาวะราสายสามารถเพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะยีสต์สามารถเพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อาหารเลี้ยงราทั่ว ๆ ไปจะนิยมใช้ Sabouraud's dextrose agar (SDA), potato dextrose agar (PDA) และ malt extract agar (MEA) [4] ซึ่งส่วนประกอบของสารอาหารที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่ผลิต สำหรับการทดสอบคุณลักษณะของจุลชีพสายพันธุ์ปกติเปรียบเทียบกับจุลชีพที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลชีพจึงต้องหาสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลชีพที่สามารถควบคุมปริมาณสารอาหารได้ ซึ่งในการทดสอบนี้ได้เลือก minimal medium เนื่องจากมีปริมาณส่วนประกอบของสารอาหารที่ชัดเจน และมีการควบคุมปริมาณของจุลชีพ ระยะเวลาในการบ่มตลอดจนอุณหภูมิที่ใช้บ่ม เพื่อให้ได้เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการงอกของจุลชีพ โดยการทดสอบพบว่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการงอกของ *T. marneffei* ในสภาวะราสายและสภาวะยีสต์ คือ ช่วง 8-16 และ 8-20 ชั่วโมง ตามลำดับ ดั้งนั้นหากต้องการทราบว่าจุลชีพที่ทำให้เกิดกลายพันธุ์โดยการนำยีนใดยีนหนึ่งออกไปมีผลต่อการงอกของจุลชีพหรือไม่สามารถเลือกใช้สภาวะที่ได้นี้ไปตรวจกรองได้ เช่น การเปรียบเทียบการงอกของจุลชีพสายพันธุ์ปกติกับสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์สามารถเลือกช่วงเวลาเพียง

เวลาเดียวคือ 10 ชั่วโมงเนื่องจากเป็นเวลาที่เหมาะสมของการงอกทั้งสองสภาวะ จะทำให้ตรวจสอบได้ว่าจุลชีพกลายพันธุ์มีการงอกเร็วขึ้นหรือช้าลงได้ เป็นต้น

การมีชีวิตรอดของจุลชีพเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมหรือเข้าไปในร่างกายมนุษย์จะขึ้นอยู่กับกลไกควบคุมภายในต่อการตอบสนองของสิ่งแวดล้อมหรือสภาวะเครียดต่างๆ ในการศึกษาทั่วไปจึงนิยมทดสอบการตอบสนองของยีนต่อสภาวะเครียดต่างๆ เช่น การใช้ menadione เป็นตัวสร้าง superoxide ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของรา แต่รามียีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน superoxide dismutases (SODs) เพื่อเปลี่ยน superoxide เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และก๊าซออกซิเจน และในรายังมีการสร้างโปรตีนกลุ่ม catalase, peroxidase และ peroxiredoxins เพื่อเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็น น้ำ และก๊าซออกซิเจน ทำให้หมดความเป็นพิษต่อเซลล์ [7,8] ในการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองความเครียดแบบออกซิเดชันจะใช้ความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดความเครียดที่เหมาะสมที่ยังให้จุลชีพสามารถมีชีวิตรอดได้คือ sublethoal dose โดยผลการทดสอบในครั้งนี้พบว่า sublethal dose ของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ menadione เท่ากับ 2.5 มิลลิโมลาร์ และ 62.5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาใน *T. marneffei* [9, 10] นอกจากนี้ในการทดสอบการตอบสนองความเครียดแบบออกซิเดชันยังนิยมใช้สาร *t*-BOOH โดยเอนไซม์ที่จะมาทำลายสารนี้เป็นกลุ่มเดียวกับที่ทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ [11] ในการทดสอบครั้งนี้พบว่าปริมาณของ *t*-BOOH ที่เป็น sublethal dose เมื่อจุลชีพอยู่ในสภาวะราสายจะมากกว่าในสภาวะยีสต์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าในสภาวะราสายจุลชีพได้สร้างเอนไซม์ต่างๆ เพื่อมาทำลายสาร *t*-BOOH ได้มากกว่าในสภาวะยีสต์ ทำให้มีความทนทานต่อสภาวะความเครียดที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องเหล่านี้ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีนต่อไป

ในการปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมจุลชีพจะมีการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์เพื่อเปลี่ยนจากสภาวะราสายเป็นยีสต์ ซึ่งจะมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณและชนิดของไคตินและกลูแคนที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ของรา [12] หากจุลชีพสามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงภายนอกได้ดีจะทำให้สามารถมีชีวิตรอดได้ ในการทดสอบความไวของผนังเซลล์และแรงดันออสโมติกของราจะนิยมใช้ CW SDS Congo Red โซเดียมคลอไรด์ โปแทสเซียมคลอไรด์ และซอร์บิทอล ซึ่งการทดสอบครั้งนี้ได้เลือกสาร SDS โซเดียมคลอไรด์ และซอบิทอล เนื่องจากเป็นสารที่หาได้ง่าย มีราคาถูก โดยความเข้มข้น sublethal dose ของโซเดียมคลอไรด์ และ SDS เท่ากับ 0.5 โมลาร์ และ ร้อยละ 0.005 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบใน *Histoplasma capsulatum* [13] ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มราสองรูปเหมือนกับเชื้อ *T. marneffei* นอกจากนี้ในการทดสอบกับซอร์บิทอล พบว่า *T. marneffei* มี sublethal dose เท่ากับ 0.75 โมลาร์ โดยการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวเนื่องจากสภาวะเครียดจากออสโมติกประกอบด้วย *madsA* [14] ซึ่งพบว่าเมื่อมีการตัดต่อยีนนี้ออกไปจะทำให้จุลชีพมีความทนทานต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากขึ้นเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ นอกจากนี้ผลการศึกษายีน *ssKA* [15] พบว่ายีนนี้มีความสำคัญต่อการปรับตัวในสภาวะออกสโมติกและยังมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของจุลชีพนี้อีกด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทราบความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบการตอบสนองต่อความเครียดของ *T. marneffei* หลายๆ ชนิด ทั้งความเครียดจากสภาวะออกซิเดชันและความเครียดจากสภาวะออสโมติก ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการทดสอบเปรียบเทียบความสามารถในการปรับตัวให้อยู่รอดของ *T. marneffei* สายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ได้ ทำให้สามารถศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยพะเยา สัญญาเลขที่ RD60092 ขอขอบคุณ Ms Karen Stangl ที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้องของบทคัดย่อภาษาอังกฤษ

เอกสารอ้างอิง

1. Vanittanakom N, Cooper CR Jr, Fisher MC, Sirisanthana T. *Penicillium marneffei* infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):95-110.
2. Cooper CR, Vanittanakom N. Insights into the pathogenicity of *Penicillium marneffei*. Future Microbiol. 2008;3(1):43-55.
3. Pongpom M, Vanittanakom P, Nimmanee P, Cooper CR Jr, Vanittanakom N. Adaptation to macrophage killing by *Talaromyces marneffei*. Future Sci OA. 2017;3(3):FSO215.
4. Kummasook A. Current status on biology and pathogenesis of *Penicillium marneffei*. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci. 2014; 47(2): 85-96.
5. Pongpom P, Cooper CR Jr, Vanittanakom N. Isolation and characterization of a catalase-peroxidase gene from the pathogenic fungus, *Penicillium marneffei*. Med Mycol. 2005;43(5):403-411.
6. Jin FJ, Maruyama J, Juvvadi PR, Arioka M, Kitamoto K. Adenine auxotrophic mutants of *Aspergillus oryzae*: development of a novel transformation system with triple auxotrophic hosts. Biosci Biotechnol Biochem. 2004;68(3): 656-662.
7. Gessler NN, Aver'yanov AA, Belozerskaya TA. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. Biochemistry (Mosc). 2007;72 (10):1091-1109.
8. Hamilton AJ, Holdom MD. Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. Med Mycol. 1999;37(6):375-389.
9. Nimmanee P, Woo PC, Kummasook A, Vanittanakom N. Characterization of *sakA* gene from pathogenic dimorphic fungus *Penicillium marneffei*. Int J Med Microbiol. 2015;305(1):65-74.
10. Dankai W, Pongpom M, Youngchim S, Cooper CR Jr, Vanittanakom N. The *yapA* encodes bZIP transcription factor involved in stress tolerance in pathogenic fungus *Talaromyces marneffei*. PLoS One. 2016;11(10):e0163778.
11. Gazdag Z, Máté G, Certik M, Türmer K, Virág E, Pócsi I, et al. tert- Butyl hydroperoxide-induced differing plasma membrane and oxidative stress processes in yeast strains BY4741 and *erg5Δ*. J Basic Microbiol. 2014;54 Suppl 1:S50-62.
12. Tomazett PK, Castro Nda S, Lenzi HL, de Almeida Soares CM, Pereira M. Response of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 to stressor agents and cell wall osmoregulators. Fungal Biol. 2011;115(1):62-9.
13. Longo LVG, Ray SC, Puccia R, Rappleye CA. Characterization of the APSES- family transcriptional regulators of *Histoplasma capsulatum*. FEMS Yeast Res. 2018;18(8)
14. Wang Q, Du M, Wang S, Liu L, Xiao L, Wang L, et al. MADS-Box transcription factor MadsA regulates dimorphic transition, conidiation, and germination of *Talaromyces marneffei*. Front Microbiol. 2018;9:1781.
15. Boyce KJ, Cao C, Andrianopoulos A. Two-component signaling regulates osmotic stress adaptation via *SskA* and the high-osmolarity glycerol MAPK pathway in the human pathogen *Talaromyces marneffei*. mSphere. 2016;1(1). pii: e00086-15.