

การจำแนกราด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์และ ความสามารถในการบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141 Identification of Reactive Red 141 Degradable Fungi by ITS-PCR Method and Decolorization Ability

ปิยวรรณ กลมเกลี้ยง, วีระชัย ธนานันต์ และนิรมล ศากยวงศ์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

স্যาน্থ สมฤทธิ์ผล

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Piyawan Klomklieng, Theerachai Thanananta and Niramol Sakkayawong*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Sayanh Somrithipol

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park,

Phahonyothin Road, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

สีย้อมกลุ่มรีแอคทีฟนิยมนำใช้ในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมสิ่งทอ แต่สีย้อมเหล่านี้สามารถละลายน้ำ และมีโครงสร้างทนต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ ทำให้ตกค้างในสิ่งแวดล้อมและก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศ ซึ่งวิธีการบำบัดทางชีวภาพที่เลือกมาใช้ คือ การใช้ราที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเชิงซ้อนและสีย้อมได้ การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการคัดเลือกราดจากดินและเห็ดที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดสี reactive 141 (RR141) ผลการคัดเลือกเบื้องต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง พบราที่สามารถบำบัดสี RR141 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มี 14 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสี RR141 ในอาหารเหลวที่ ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบรา AP6, AP8 และ BP1 เป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการบำบัดสี RR141 ได้สูงสุดเท่ากับ 100, 100 และ 98.97 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการบำบัดสีเฉลี่ยเท่ากับ 297.62, 297.62 และ 294.55 ไมโครกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในระยะเวลา 7 วัน โดยรา AP8 แสดงประสิทธิภาพการบำบัดสูงสุดสามารถบำบัดสี RR141 ความเข้มข้น 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 4 วัน เมื่อระบุชนิดราทั้ง 3 ไอโซเลต ด้วยวิธี

*ผู้รับผิดชอบบทความ : bunyason@hotmail.com

ไอทีเอสพีซีอาร์ พบว่าราที่คัดแยกได้ คือ *Aspergillus awamori* (AP6, 97 % identity), *Lentinus tigrinus* (AP8, 98 % identity) และ *Gongronella butleri* (BP1, 95 % identity)

คำสำคัญ : ราบำบัดสี; สีรีแอคทีฟ; อุตสาหกรรมสิ่งทอ; การจำแนก; ไอทีเอสพีซีอาร์

Abstract

Reactive dyes are widely used in production process of textile industries. But these dyes dissolve well in water, resistant to biodegradation, and persist in the environment. Biodegradable fungi were selected to be biotechnological treatment for various complex compounds, including synthetic reactive dyes. This study focused on screening and identification potent soil fungi and mushrooms that were able to decolorize reactive dyes. The primary screening in agar plate showed that 14 isolates of fungi were able to decolorize reactive red 141 (RR141) at a concentration of 50 mg/L. The efficiency isolate AP6, AP8 and BP1 were investigated decolorization of 50 mg/L of reactive red in potato dextrose broth. Maximum decolorizations of three isolates were 100, 100 and 98.97 % and average decolorization rates were 297.62, 297.62 and 294.55 $\mu\text{g L}^{-1}/\text{h.}$, respectively. They were achieved on a week. AP8 had shown the most efficient for decolorization. The optimum values of initial dye concentration were found 50 and 75 mg/L for 100 % decolorization on 4 days. Three isolates were identified by ITS-PCR method showed that these fungi were *Aspergillus awamori* (AP6, 97 % identity), *Lentinus tigrinus* (AP8, 96 % identity) and *Gongronella butleri* (BP1, 96 % identity).

Keywords: decolorization fungi; reactive dye; textile industry; identification; ITS-PCR

1. บทนำ

เราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญในฐานะผู้ย่อยสลายของระบบนิเวศ มีการดำรงชีวิตแบบการย่อยสลายและดูดซึมสารอาหารจากสิ่งมีชีวิตอื่น ซึ่งลักษณะการดำรงชีวิตเช่นนี้ทำให้สามารถนำเราไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย ทั้งทางอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และสิ่งแวดล้อม พบว่าเราสามารถกำจัดสารพิษออกจากสิ่งแวดล้อมได้หลายชนิด ทั้งสารประกอบพอลิไซคลิก อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกนอคลอรีน และสีย้อม [1] เราจึงเป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจในการนำมาบำบัดน้ำเสียจากโรงงานฟอกย้อม มีรายงานถึงการนำเรามาใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งจาก

โรงงาน ตัวอย่างราที่มีสมบัติการลดสี เช่น รา *Pleurotus sajorcaju* และราหน่อร่อน *Daedaleopsis* sp., *Schizophyllum commune* PT และ *Schizophyllum commune* SL ซึ่งสามารถบำบัดสีย้อมจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตเยื่อกระดาษทำให้คุณภาพน้ำดีขึ้น [2,3] รา *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. สามารถลดความเข้มของสีในน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกเยื่อได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 1 สัปดาห์ รา *Trametes versicolor* สามารถลดความเข้มสีของน้ำทิ้งจากโรงงานเยื่อจากของเหลือทิ้งจากการเกษตร ได้ 50-62 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 4 ถึง 7 วัน [4,5] นอกจากนี้ยังมีรา *Aspergillus fumigatus* XC6

สามารถบำบัดสีย้อมรีแอคทีฟและรากลุ่มไทรออต *Phanerochaete chrysosporium* สามารถบำบัดสีย้อมกลุ่มอะโซในน้ำทั้งได้ 98 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3 วัน [6,7] โดยกลไกที่ราใช้ในการบำบัดมีทั้งการดูดซับไว้กับโครงสร้างของผนังเซลล์และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่หลั่งออกมาออกเซลล์ [8,9]

การระบุชนิดของราในระดับสปีชีส์ (species) หรือสายพันธุ์ (strain) ทำได้ด้วยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) และวิธีทางโมเลกุล (molecular method) ปัจจุบันมีวิธีทางโมเลกุลหลายวิธีที่สามารถระบุชนิดของรา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของยีนดีเอ็นเอบางตำแหน่งที่มีในฐานข้อมูลสากลแล้ว ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เลือกใช้นั้นประกอบด้วยส่วนที่มีวิวัฒนาการในอัตราต่างกัน ซึ่งจะทำให้มีความสามารถในการคัดแยกต่างกัน ทั้งนี้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดการสร้างอาร์เอ็นเอไรโบโซม (ribosomal RNA gene, rRNA gene) ที่เรียกว่าดีเอ็นเอไรโบโซมหรืออาร์ดีเอ็นเอ (rDNA, ribosomal DNA) นิยมใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากไรโบโซมพบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและมีจุดเริ่มต้นของวิวัฒนาการร่วมกัน แม้ว่าแต่ละเซลล์มีไรโบโซมหลายชุด แต่ทุกชุดจะมีวิวัฒนาการเช่นเดียวกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอไรโบโซมมีทั้งส่วนที่มีวิวัฒนาการน้อยหรือบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และส่วนที่มีวิวัฒนาการมากหรือวิวัฒนาการเร็วที่เรียกว่าบริเวณผันแปร (variable region) หรือบริเวณอนุรักษ์น้อย (less conserved region) ซึ่งสามารถใช้บริเวณอนุรักษ์นี้เป็นจุดอ้างอิงสำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างของบริเวณผันแปร [10,11] ทั้งนี้ยีนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างดีเอ็นเอไรโบโซม (spacer) นั้นมีหลายตำแหน่งที่สามารถใช้ เช่น ไอทีเอส (ITS, internal transcribed spacer) ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างปลาย 3' กับปลาย 5' ของยีน

กำหนดการสร้างหน่วยย่อยเล็กของไรโบโซม ไอทีเอส ประกอบด้วย ITS1 ซึ่งอยู่ระหว่าง 18S rDNA กับ 5.8S rDNA และ ITS2 ที่อยู่ระหว่าง 5.8S rDNA กับ 26S rDNA โดยใช้ศึกษาอนุกรมวิธานของราและพืช ซึ่งสามารถระบุชนิดของรา นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาดีเอ็นเอไรโบโซมบริเวณ ITS1, 5.8S rDNA และ ITS2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) ITS1 และ ITS4 โดยสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ของราเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (template DNA) สำหรับตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) ต่อรา [12] และมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของราที่แยกจากแมลงและดินในประเทศไทย โดยเพิ่มยีนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 [13-15] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกราที่มีสมบัติลดสีย้อมจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมและระบุชนิดของราโดยใช้วิธีไอทีเอสพีซีอาร์ (ITS-PCR) ซึ่งงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกรามีประสิทธิภาพบำบัดสีที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การคัดแยกราที่มีประสิทธิภาพย่อยสลายสี RR141

เก็บตัวอย่างจาก 3 แหล่ง คือ บริเวณโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม จังหวัดสมุทรปราการ สนามหญ้าหน้าอาคารบรรยายรวม 5 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จังหวัดปทุมธานี และอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ คัดแยกจากตัวอย่างดินที่เก็บมาโดยชั่งตัวอย่างดินจำนวน 1 กรัม ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร บ่มและเขย่าด้วย shaker (New Brunswick Scientific, Innova 4340, USA) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการเจือจางสารละลายดินด้วยวิธี dilution method ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-5} แล้ว spread plate บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสี reactive red 141 (RR141) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (Binder, ED240, Germany) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-15 วัน เมื่อราเจริญบนจานอาหารจึงแยกโคโลนีของราที่ทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อสีแดงจางลงมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นอกจากนี้นำตัวอย่างเห็ดที่ได้ไปคัดแยกโดยตัดเนื้อเยื่อตัวอย่างเห็ดสดเป็นชิ้นเล็ก ๆ วางบนอาหารเลี้ยง PDA ที่ผสมสี RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-15 วัน คัดเลือกโคโลนีที่ทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจางลงมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง

2.2 การศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสี

RR141 ของรา

ทดสอบประสิทธิภาพของราในการบำบัดสี RR141 ทำได้โดยนำราที่แยกได้จากขั้นตอนที่ 2.1 มาเลี้ยงในฟลาस्कที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว potato dextrose broth (PDB) ผสมกับสี RR141 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นจำเพาะที่เวลาเริ่มต้นและกำหนดค่าเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ดังสมการที่ 1 และคำนวณอัตราการบำบัดสีเฉลี่ยดังสมการที่ (2) เลือกราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการบำบัดสี นำไปศึกษาความเข้มข้นของสีย้อมที่เหมาะสมในอาหารเหลว PDB ที่มีสี RR141 ความเข้มข้น 50, 75, 100 และ 125 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าด้วย shaker ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงของสีทุกวันเพื่อดูการลดลงของสี วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu, UV-1601, Japan) ที่ความยาวคลื่น

จำเพาะ 544 นาโนเมตร จากนั้นนำข้อมูลการบำบัดสีของราที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อคัดเลือกรามีประสิทธิภาพสูงสุดในการบำบัดสี RR141 ไประบุชนิดด้วยเทคนิคด้านโมเลกุลต่อไป

สมการที่ 1 :

$$\text{เปอร์เซ็นต์การบำบัดสี} = \frac{(A_{\text{before}} - A_{\text{after}}) \times 100}{A_{\text{before}}}$$

เมื่อ A_{before} คือ ค่าดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับสี RR141 ก่อนบำบัด

A_{after} คือ ค่าดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับสี RR141 หลังบำบัด

สมการที่ 2 :

$$\text{อัตราการบำบัดสีเฉลี่ย} = \frac{C \times \% D \times 1000}{100 \times T}$$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของสี RR141 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

% D คือ เปอร์เซ็นต์การบำบัดสี

T คือ ระยะเวลา (ชั่วโมง)

2.3 การจำแนกและระบุชนิดของราทางสัณฐานวิทยา

ระบุชนิดของราโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาของรา โดยเฉพาะเลี้ยงราด้วยเทคนิค slide culture และย้อมสไลด์ด้วย lactophenol cotton blue ควบคุมกับการเพาะเลี้ยงรบบนอาหาร Czapek dox agar (CZA) และ potato dextrose (PDA) เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของโคโลนีร่วมกับลักษณะส่วนต่าง ๆ ของรารายได้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, CX31, Japan) [16]

2.4 การเพิ่มชิ้นส่วนไอทีเอสของราที่แยกได้ด้วยปฏิกิริยา PCR โพลีเมอร์

สกัดแยกดีเอ็นเอราด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธี CTAB method เมื่อราเจริญเต็มที่เขี่ยเอาเส้นใยหรือสปอร์มาบดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว นำ

ตัวอย่างที่บดละเอียดประมาณ 1 กรัม ลงในหลอดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม CTAB buffer จำนวน 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มใน water bath (Fisher Scientific, Isotemp 210, USA) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นานประมาณ 20 นาที จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาณ 1 เท่าของปริมาณเริ่มต้น นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแยกสาร (Iwaki, TCF-12, Japan) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ทำซ้ำโดยเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายด้านบนใส่หลอดใหม่แล้วนำไปเติม isopropanol ในปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้งล้างด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งไปละลายตะกอนที่ได้ใน TE buffer ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส [17] ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 1 เปอร์เซ็นต์ [18] นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์สากล 1 คู่ คือ ITS1 (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3' และ ITS4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC- 3') โดยปฏิกิริยาพอลิเมอเรส มีสภาวะดังนี้ ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

5 นาที ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ ตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ [19]

2.5 การวิเคราะห์ผลทางโมเลกุลและการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

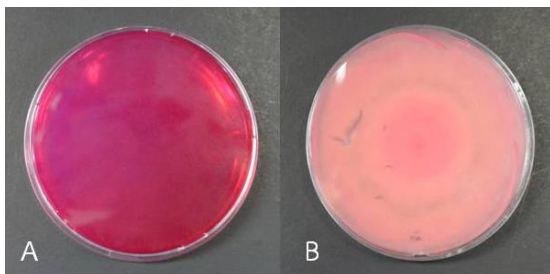
ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยบริษัท SolGent Co., Ltd. ประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งบริษัทจะส่งผลลำดับนิวคลีโอไทด์กลับมาในรูปแบบไฟล์ข้อมูล หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ใส่ในโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เพื่อระบุชนิดของรา นอกจากนี้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราจากการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ BioEdit version 7.0.5.3 [20] เพื่อ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้และใช้โปรแกรม MEGA 6.05 เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการคำนวณแบบ neighbor-joining แล้ววิเคราะห์ค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ แล้วจึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของร่าบัพัตที่คัดแยกได้ [21-23]

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

3.1 คัดเลือกร่าบัพัต

เก็บตัวอย่างดินและเห็ดใน 3 แหล่ง คือ (1) บริเวณแหล่งปล่อยน้ำทิ้งรอบนิคมอุตสาหกรรมฟอกย้อม จังหวัดสมุทรปราการ (2) สนามหญ้าหน้า

อาคารบรรยายรวม 5 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จังหวัดปทุมธานี และ (3) อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ สามารถคัดแยกได้จากแหล่งที่ 1 ได้ทั้งหมด 42 ไอโซเลต แหล่งที่ 2 จำนวน 19 ไอโซเลต และแหล่งที่ 3 จำนวน 12 ไอโซเลต โดยนำมาคัดแยกกราฟที่มีความสามารถในการบำบัดสี reactive red 141 (RR141) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ผสมในอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) (รูปที่ 1) พบจำนวน 14 ไอโซเลต สามารถเปลี่ยนสีของอาหารแข็งจากสีแดงให้จางลง โดยแบ่งเป็นราบำบัดสีที่ได้จากแหล่งที่ 1 จำนวน 9 ไอโซเลต คือ AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP8, BP1 และ BP4 จากแหล่งที่ 2 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ TP1, TP2, TP5 และ TP6 และแหล่งที่ 3 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ KP1

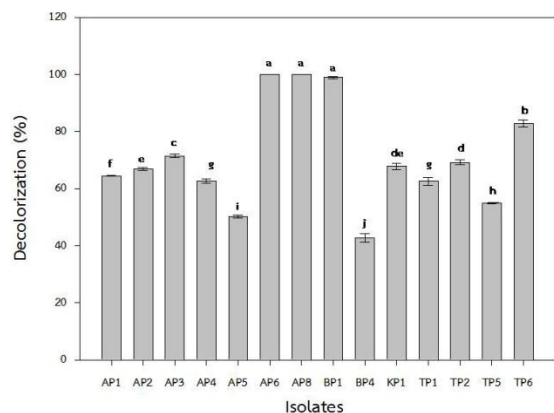


รูปที่ 1 ตัวอย่างคัดเลือกราดำบำบัดสีบนอาหารแข็ง PDA ผสมสี RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) คือ อาหารแข็ง PDA ผสมสี RR141 ก่อนบำบัด และ (B) คือ อาหารแข็ง PDA ผสมสี RR141 หลังบำบัดด้วยรา AP8 นาน 15 วัน

3.2 ศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสีรีแอกทีฟของรา

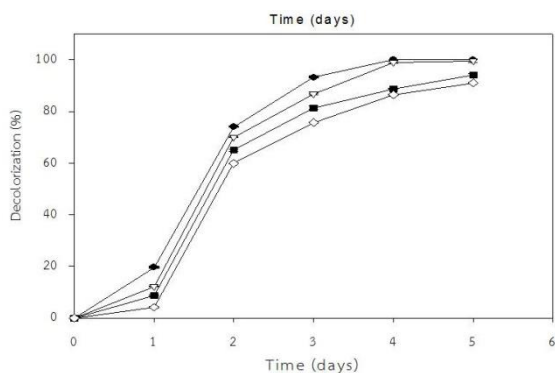
ทดสอบความสามารถในการบำบัดสีของราที่คัดเลือกได้ทั้งหมดในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ที่ผสมสี RR141 และจัดกลุ่มราบำบัดสีที่ได้จากประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมในอาหารเหลว (รูปที่ 2) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS วิเคราะห์

ข้อมูลทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Tukey's สามารถแบ่งกลุ่มราบำบัดสีได้ 10 กลุ่ม คือ a-j เรียงตามประสิทธิภาพในการบำบัดสี โดยกลุ่ม a แสดงความสามารถในการบำบัดสี RR141 ได้สูงสุด 100, 100 และ 98.97 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการบำบัดสีเฉลี่ยเท่ากับ 297.62, 297.62 และ 294.55 ไมโครกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในเวลา 7 วัน จากนั้นเลือกรา AP8 ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุดในการบำบัดสีศึกษาความเข้มข้นของสี RR141 ที่เหมาะสมต่อการบำบัดสีด้วยรา AP8 พบว่าความเข้มข้นของสีย้อมที่เหมาะสมคือ 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการบำบัดสีอย่างสมบูรณ์ภายใน 4 วัน และความเข้มข้นที่ 100 และ 125 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถบำบัดสีได้ 94.22 และ 91.15 ตามลำดับ ในเวลา 5 วัน (รูปที่ 3) เห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นสีสูง เราจะใช้ระยะเวลาในการบำบัดนานกว่าความเข้มข้นสีต่ำ เนื่องจากความเข้มข้นของสีที่เพิ่มขึ้นเป็นพิษต่อเซลล์ราอาจขัดขวางการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของรา [24]



abc เปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดสีจากมากไปน้อยโดยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ด้วยวิธี Tukey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงประสิทธิภาพการบำบัดสี RR141 ของราทั้ง 14 ไอโซเลต ในอาหารเหลว PDB ที่ผสมสี RR141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 7 วัน



รูปที่ 3 ผลของการบำบัดน้ำสี RR141 (เปอร์เซ็นต์) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของรา AP8 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (●) ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อลิตร (▽) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (■) และความเข้มข้น 125 มิลลิกรัมต่อลิตร (◇) ภายในเวลา 5 วัน

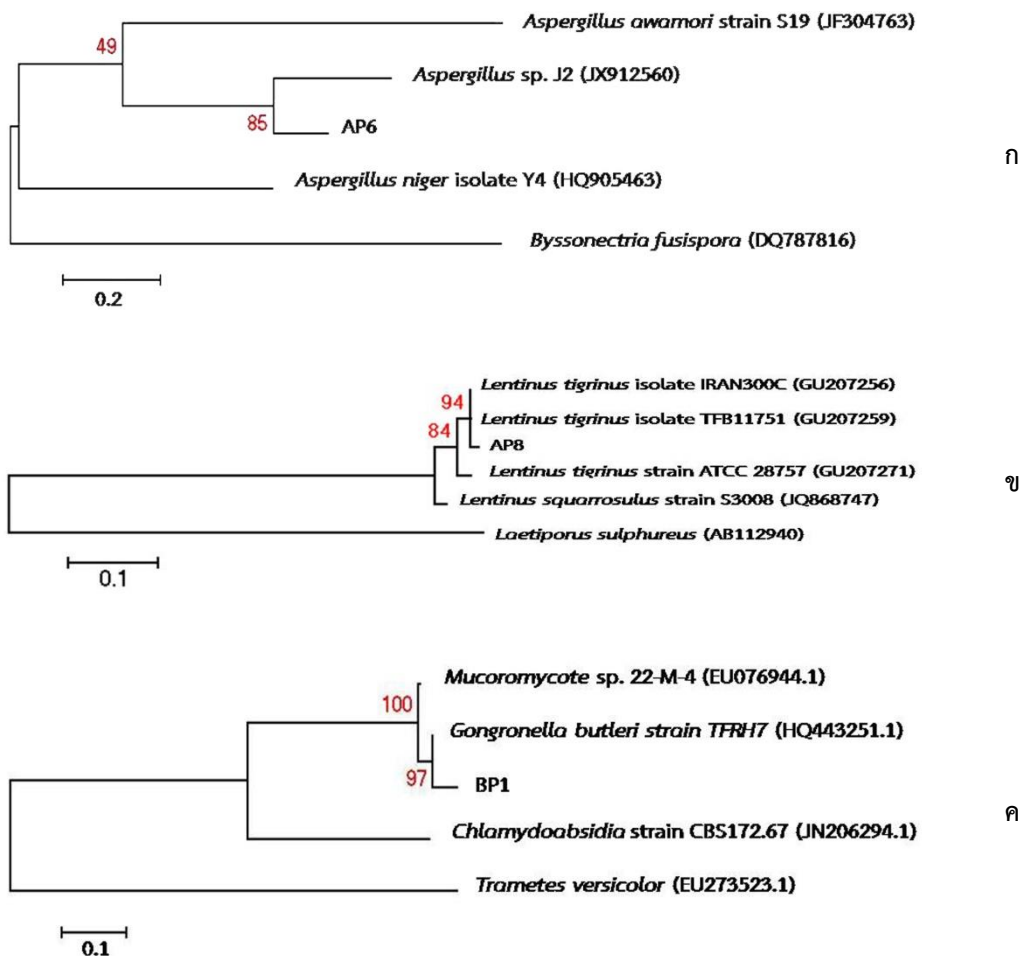
3.3 ระบุชนิดของราด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์ และลักษณะสัณฐานวิทยา

เมื่อระบุชนิดราในกลุ่ม a (AP6, AP8 และ BP1) ด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (รูปที่ 4) เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างราที่คัดแยกได้กับสมาชิกของสายพันธุ์ พบว่าสามารถจำแนกชนิดของราดังแสดงในตารางที่ 1 คือ *Aspergillus awamori*, *Lentinus tigrinus* และ *Gongronella butleri* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identity) เท่ากับ 97, 98 และ 95 ตามลำดับ ทั้งนี้ % identity ที่สูงสามารถบ่งชี้ได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่คัดเลือกได้เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของราในฐานข้อมูลมีตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันสูง จึงทำนายได้ว่าจะเป็นราชนิดนั้น ตัวอย่าง เช่น ถ้า % identity ที่ได้เท่ากับ 100 แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่ได้เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของราในฐานข้อมูลนั้นทุกตำแหน่ง เมื่อพิจารณาความละเอียด

ในการระบุชนิดของรา จะเห็นได้ว่าวิธีไอทีเอสพีซีอาร์สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ แต่วิธีนี้ไม่สามารถระบุชนิดของราได้อย่างชัดเจน จึงควรมีการศึกษาทางสัณฐานวิทยาพร้อมด้วยโดยการย้อมสไลด์เพื่อแสดงโครงสร้างลักษณะเส้นใยของราได้อย่างชัดเจน [25] นิยมใช้กับราที่มีสปอร์ พบว่ารา AP6 มีสปอร์สีน้ำตาลหนาแน่น เส้นใยรามีผนังกัน (septum) conidiophores ผนังหนา ส่วนปลายโป่งเป็นทรงกลม (vesicle) มีเซลล์ผลิตสปอร์เกิดขึ้นโดยรอบ เซลล์ผลิตสปอร์มี 2 ชั้น ชั้นแรก (sterigmata) รูปทรงค่อนข้างยาว มีขนาด 17.0-20.0 x 7.5-10.0 ไมโครเมตร ชั้นที่สอง (phialide) สั้นกว่า มีขนาด 5.0-7.5 x 2.5-5.0 ไมโครเมตร สปอร์เป็นทรงกลม ผนังขรุขระ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-3.8 ไมโครเมตร ใกล้เคียงกับสปอร์ของรา *Aspergillus awamori* ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5-5.0 ไมโครเมตร เวลิกเคิลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 25.0-35.0 ไมโครเมตร ใกล้เคียงกับเวลิกเคิลของรา *A. awamori* อีกเช่นกัน จากลักษณะสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกราชนิดนี้เป็นสกุล *Aspergillus* และเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดที่ใกล้เคียงพบว่าใกล้เคียง *Aspergillus awamori* มากที่สุด (ตารางที่ 2) และรา BP1 มีโคโลนีสีขาวฟู เส้นใยราไม่มีผนังกัน sporangiophores ผนังหนาใสไม่มีมีส่วนปลายประกอบด้วยอับสปอร์ (sporangium) คอลิวเมลลา (columella) และก้านชูอับสปอร์ (sporangiospores) โดยมีคอลิวเมลล่ายูภายใน sporangium เพียงครั้งเดียวด้านบน จากลักษณะสัณฐานวิทยาจำแนกราชนิดนี้ได้เป็น *Gongronella butleri* ในกรณีของรา AP8 ที่คัดแยกจากเห็ด จะดูลักษณะการเจริญของเส้นใยในอาหารเลี้ยง PDA และดูลักษณะของดอกเห็ด (รูปที่ 5) แสดงได้ดอกเห็ดบริเวณที่เกิดสปอร์มีลักษณะเป็นครีบลักษณะสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับวิธีไอทีเอสพีซีอาร์ที่จำแนกดอกเห็ดชนิด

นี้เป็น *Lentinus tigrinus* จากการจำแนกทั้ง 3 ไอโซเลต ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาที่มีความสอดคล้องกับการจำแนกชนิดราด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์ [26] ทั้งนี้การศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของดีเอ็นเอโครโมโซมมีความน่าสนใจ

เนื่องจากมีบริเวณอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และมีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) สูงลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอื่น ทำให้สามารถจำแนกชนิดของราสปีชีส์เดียวกันออกเป็นหลายสายพันธุ์ได้



รูปที่ 4 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสมาชิกของ (ก) สายพันธุ์ *Aspergillus* และ AP6 โดยมีสายพันธุ์ *Byssonectria fusispora* เป็น out group (ข) สายพันธุ์ *Lentinus* และ AP8 มีสายพันธุ์ *Laetiporus sulphureus* เป็น out group และ (ค) สายพันธุ์ *Gongronella* และ BP1 มีสายพันธุ์ *Trametes versicolor* เป็น out group โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จากฐานข้อมูล NCBI และใช้โปรแกรม MEGA 6.05 สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการคำนวณแบบ neighbor-joining แล้ววิเคราะห์ค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

ตารางที่ 1 ชนิดของราที่ระบุได้จากวิธีไอทีเอสพีซีอาร์

รหัสราที่คัดแยกได้ (Accession number of GenBank)	สายพันธุ์รา	Identity (%)
AP6 (KJ197232)	<i>Aspergillus awamori</i> (JF304763)	97
AP8 (KJ197231)	<i>Lentinus tigrinus</i> (GU207256)	98
BP1 (KF860878)	<i>Gongronella butleri</i> (HQ443251)	95

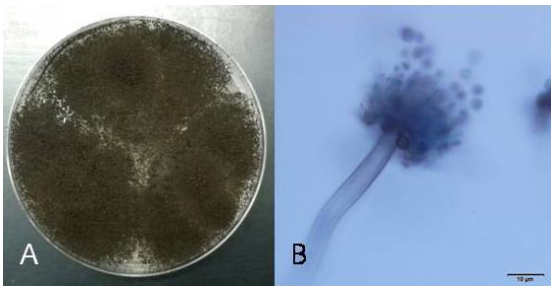
ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาที่สำคัญของรา AP6 กับรา *Aspergillus* ชนิดที่ใกล้เคียง

ลักษณะที่ศึกษา	รา AP6	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Aspergillus niger</i>
โคโลนี (colony)	น้ำตาลดำ	น้ำตาลเข้ม	ดำ
สปอร์ (conidia)	2.5-3.8 ไมโครเมตร	3.5-5.0 ไมโครเมตร	>5.0 ไมโครเมตร
เวสิเคิล (vesicle)	25.0-35.0 ไมโครเมตร	25.0-50.0 ไมโครเมตร	45.0-75.0 ไมโครเมตร
ก้านรองเซลล์สร้างสปอร์ (sterigmata)	17.0-20.0 x 7.5-10.0 ไมโครเมตร	10.0-20.0 x 4.5-7.0 ไมโครเมตร	20.0-30.0 x 5.0-6.0 ไมโครเมตร
เซลล์สร้างสปอร์ (phialides)	5.0-7.5 x 2.5-5.0 ไมโครเมตร	5.0-10.0 x 3.0-4.0 ไมโครเมตร	7.0-10.0 x 3.0-4.0 ไมโครเมตร

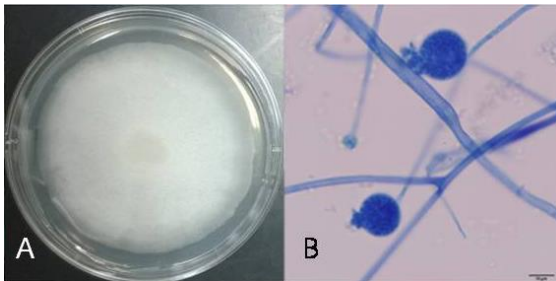
4. สรุป

เมื่อคัดแยกราจากดินและเห็ดที่มีความสามารถในการบำบัดสี reactive red 141 (RR141) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) พบราที่มีความสามารถบำบัดสี 14 ไอโซเลต คือ AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP8, BP1, BP4, TP1, TP2, TP5, TP6 และ KP1 และทดสอบความสามารถในการบำบัดสี RR141 ของราที่คัดเลือกได้ทั้งหมดในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) พบว่ารา AP6, AP8 และ BP1 สามารถบำบัดสี RR141 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวได้สูงสุด คือ 100, 100 และ 98.97 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการบำบัดสีเฉลี่ยเท่ากับ 297.62, 297.62 และ 294.55 ไมโครกรัมต่อ

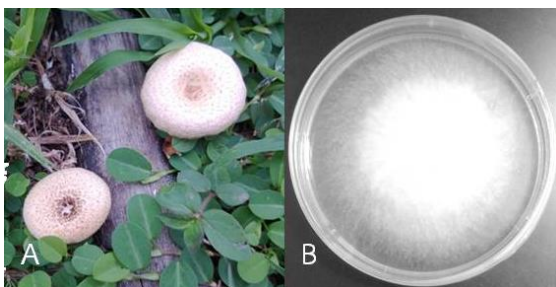
ลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ภายในเวลา 7 วัน รา AP8 มีประสิทธิภาพสูงสุดสามารถบำบัดสี RR141 ที่ความเข้มข้น 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 4 วัน จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของราบำบัดสี จำนวน 3 ไอโซเลต โดยอาศัยความหลากหลายในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของดีเอ็นเอไรโบโซม พบว่ารา AP6 มีความเหมือนกับรา *Aspergillus awamori* เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ รา AP8 มีความเหมือนกับรา *Lentinus tigrinus* เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ และรา BP1 มีความเหมือนกับรา *Gongronella butleri* เท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าการจำแนกราบำบัดสีทั้ง 3 ไอโซเลต ด้วยข้อมูลทางสัณฐานวิทยามีความสอดคล้องกับผลการจำแนกชนิดราด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์อีกด้วย



รูปที่ 5ก (A) โคโลนีของ *Aspergillus awamori* บนอาหาร CZA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน และ (B) conidiophores ที่ด้านล่างปลายโป่งเป็น vesicle และ conidiogenous cells



รูปที่ 5ข (A) โคโลนีของ *Gongronella butleri* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน และ (B) sporangiophore และ sporangium



รูปที่ 5ค (A) ดอกเห็ด *Lentinus tigrinus* และ (B) โคโลนีของ *Lentinus tigrinus* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ตามสัญญาเลขที่ ทน 51/2557 และทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2557 (เลขที่สัญญา 011/2557) สำหรับค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Knapp, J.S., Zhang, F. and Tapley N.K., 1997, Decolourization of Orange II by a wood-rotting fungus, J. Chem. Tech. Biotechnol. 69: 289-296.
- [2] Yadav, M. and Yadav, K.S., 2008, Decolorization of pulp paper mill effluent by *Pleurotes sajorajau*, J. Environ. Sci. Eng. 50: 89-92.
- [3] Sehanat, P., Pongtharin, L., Tsuyoshi, I. and Hunsu, P., 2009, Decolourization of pulp mill wastewater using thermo-tolerant white rot fungi, SciAsia 35: 37-41.
- [4] Tono, T., Tani, Y. and Ono, K., 1968, Microbial treatment of agricultural wastes I: Adsorption of lignin and clarification of lignin containing liquor by moulds, J. Ferment. Tech. 46: 569-576.
- [5] Mehna, A., Bajpai, P. and Bajpai, P.K., 1995, Studies on decolorization of effluent from a small pulp mill utilizing agriresidues with *Trametes versicolor*, Enzyme Microb. Tech. 17: 18-22.
- [6] Xian, C.J., Gao, Q.L., Zheng, H.X. and Wen, Y.T., 2007, Decolorization of a dye

- industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6, Appl. Microbiol. Biotechnol. 74: 239-243.
- [7] Senthilkumar, S., Perumalsamy, M. and Janardhana, P.H., 2011, Decolourization potential of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on synthetic dye bath effluent containing amido black 10B, J. Saudi. Chem. Soc. (in press)
- [8] Brodkorb, T.S. and Legge, R.L., 1992, Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Environ. Microbiol. 58: 3117-3121.
- [9] Heinfling, A., Bergbauer, M. and Szewzyk, U., 1997, Biodegradation of azo and phthalocyanin dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 261-266.
- [10] Kurtzman, C.P., 1993, Systematics of the ascomycetous yeasts assessed from ribosomal RNA sequence divergence, Antonie van Leeuwenhoek 63: 165-174.
- [11] Nishida, H., Blanz, P.A. and Sugiyama, J., 1993, The higher fungus *Protomyces inouyei* has two group I introns in the 18S rRNA gene, J. Mol. Evol. 37: 25-28.
- [12] พนิดา ปรีเปรมโมทย์, ขวลิต ฮงประยูร, คณิน นิตย์ เจริญวรการ และธงชัย มาลา, 2547, การพัฒนาไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบเชื้อ *Acaulospora scrobiculata*, วิทยาศาสตร์ กำแพงแสน 2: 82-87.
- [13] Ersek, T., Schoelz, J.E. and English, J.T., 1994, PCR amplification of species-specific DNA distinguish among *Phytophthora* species, Appl. Environ. Microbiol. 60: 2616-2621.
- [14] de Muro, M.A., Mehta, S. and Moore, D., 2003, The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries and their correlation with host and geographical origin, FEMS Microbiol. Lett. 229: 249-257.
- [15] Neuvéglise, C., 1994, Biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects, Mycol. Res. 98: 322-328.
- [16] Watanabe, T., 2002, Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi-morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton.
- [17] O' Donnell, P., Lavín, A., Enquist, L.W., Grace, A.A. and Card, J.P., 1997, Molecular Method and Species Concept-DNA Extraction and Molecular Markers, pp. 288-290, In Misra, J.K., Tewari, J.P. and Deshmukh, S.K. (Eds.), Systematics and Evolution of fungi, New York.
- [18] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- [19] White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. and Taylor, J., 1990, Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics, pp. 315-322, In Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T. (Eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego.
- [20] Hall, T.A., 1999, BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95-98.
- [21] Saitou, N. and Nei, M., 1987, The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
- [22] Felsenstein, J., 1985, Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, Evolution 39: 783-791.
- [23] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013, MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, Mol. Biol. Evol. 30: 2725-2729.
- [24] Radha, K.V., Regupathi, I., Arunagiri, A. and Murugesan, T., 2005, Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics, Proc. Biochem. 40: 3337-3345.
- [25] Flavia Cristina, J.P., Daniel, B.L., Bruna, C.A., Cibelle, B.D., Maria, F.S., Márcio, C., Debora, B., Cyntia, M.T. and Tania, M.B., 2012, Morphological and molecular identification of filamentous fungi isolated from cosmetic powders, Braz. Arch. Biol. Tech. 55: 897-901.
- [26] Olinto, L.P., Maria, C.M.K., Arnaldo, C.B. and Elza, F.A., 2005, Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil, Can. J. Bot. 83: 54-65.