

การศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพเชื้อราจากการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่น

A study of duration and preservation of fungi by storing in distilled water

ชนิดาภา สัตตะบุรุษ

ชลธิชา จิตรภักดี

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

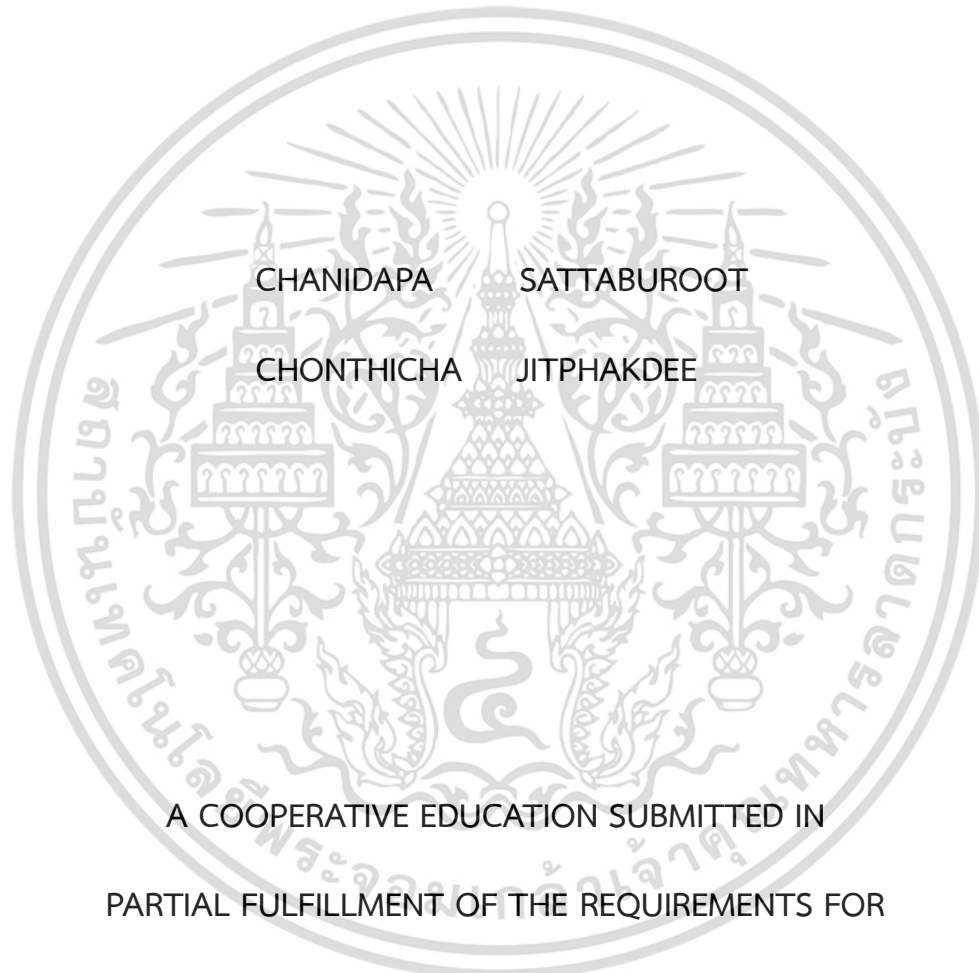
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A STUDY OF DURATION AND PRESERVATION OF FUNGI
BY STORING IN DISTILLED WATER



CHANIDAPA SATTABUROOT
CHONTHICHA JITPHAKDEE

A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา การศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพเชื้อราจากการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่น
A study of duration and preservation of fungi by storing in distilled water

ชื่อนักศึกษา นางสาวชนิดาภา สัตตะบุรุษ รหัสนักศึกษา 63050461
นางสาวชลธิชา จิตรภักดี รหัสนักศึกษา 63050464

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)


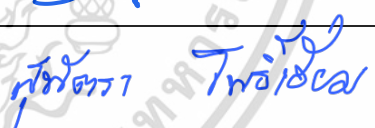
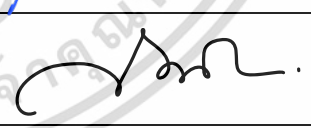
ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2566

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม นางสาวกัญญานันฐ์ ครองบุญ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.อนรรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
นางสาวกัญญานันฐ์ ครองบุญ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพเชื้อราจากการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่น A study of duration and preservation of fungi by storing in distilled water
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชนิดาภา สัตตะบุรุษ รหัสนักศึกษา 63050461 นางสาวชลธิชา จิตรภักดี รหัสนักศึกษา 63050464
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นางสาวกัญญาณัฐ ครองบุญ

บทคัดย่อ

เชื้อรา คือ จุลชีพชนิดหนึ่งที่สามารถก่อโรคได้ พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งสิ่งแวดล้อม อากาศ น้ำ ดิน รวมทั้งคนและสัตว์ โดยโรคที่เกิดจากเชื้อราเรียกว่าโรคเชื้อรา การเก็บรักษาเชื้อราก่อโรคจึงเป็นสิ่งสำคัญมากทั้งในทางการแพทย์ที่จะใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงเพื่อการนำไปศึกษาค้นคว้าต่อ ที่ผ่านมามีการวิจัยเกี่ยวกับการเก็บรักษาเชื้อราจำนวนมาก แต่การเก็บรักษาและคงสภาพเชื้อราในน้ำกลั่น เป็นวิธีการที่ง่ายและประหยัดงบประมาณกว่าวิธีอื่นๆ ทางสถาบันโรคผิวหนังจึงทำการเก็บรักษาและคงสภาพเชื้อราด้วยวิธีการนี้ โดยการศึกษาครั้งนี้คือต้องการศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพของเชื้อราจำนวน 46 ตัวอย่าง ที่ถูกเก็บไว้ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อที่รอดชีวิตและยังคงลักษณะเดิมจำนวน 19 ตัวอย่าง คิดเป็น 41.30% ของเชื้อตัวอย่างทั้งหมด การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อตัวอย่างเจริญเติบโตบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ได้ดีกว่าบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อที่จัดจำแนกตามกลุ่มพบว่า กลุ่มยีสต์มีเชื้อที่เจริญเติบโตและคงสภาพเดิมได้ดีที่สุด คิดเป็น 50% ตามด้วยกลุ่ม Dermatophytosis กลุ่ม Dematiaceous fungi และ กลุ่ม Non-dermatophytosis ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาของระยะเวลาการเก็บรักษาที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดจะอยู่ระหว่างปีที่ 3 และ 4 คิดอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการเก็บมากกว่าจะมีอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อที่ลดลง

คำสำคัญ : การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์, เชื้อราผิวหนัง, น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ, การระบุเชื้อ, การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	A study of duration and preservation of fungi by storing in distilled water
Students	Miss Chanidapa Sattaburoot Student ID 63050461 Miss Chonthicha Jitphakdee Student ID 63050464
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim
Co-advisor	Miss Kunyanat Krongboon

Abstract

Fungi are a type of microorganism that can cause diseases. Preserving fungal cultures is essential for medical purposes, as they serve as valuable resources for research and further study. Over the years, there have been numerous studies on the preservation of fungal cultures, and one cost-effective and straightforward method is the preservation of fungi in distilled water. Dermatology institution have employed this method to maintain and preserve fungal cultures. In this particular study, the focus was on understanding the survival and maintenance of 46 fungal samples preserved in distilled water. The results showed that 19 of the samples survived and retained their original characteristics, accounting for 41.30% of them. Comparing the growth of fungal samples on different media, it was observed that they grew better on PDA than on SDA. Analyzing the growth of fungal samples based on classification into groups, it was found that the yeast group had the highest successful preservation and growth rate, with 50% survival rate. This was followed by Dermatophytosis, Dematiaceous fungi, and Non-dermatophytosis groups, in decreasing order of success. The most efficient preservation duration was found between the 3rd and 4th years, with 100% survival rate. In the subsequent year, there was a decrease in the survival rate of preserved fungi.

Keywords : Preservation for fungi, Sterile distilled water, Identification, Microbial culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพเชื้อราจากการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่น สำเร็จลุล่วงได้ดีเนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม รวมถึงบุคลากรของสถาบันโรคผิวหนัง ที่ได้ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในงานวิจัยจนสำเร็จตามแผนที่วางไว้ ได้สอนเทคนิคและการใช้เครื่องมือต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ทำให้วิจัยฉบับนี้ได้เป็นฉบับที่สมบูรณ์ ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ และบุคลากรในสถาบันโรคผิวหนัง จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ รศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานการสอบ รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษา และนางสาวกัญญาณัฐ ครองบุญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำและความรู้ในการปฏิบัติสหกิจศึกษา ให้คำปรึกษาในการปรับปรุงงานวิจัยภายในเล่มด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างยิ่ง

ชนิดาภา สัตตะบุรุษ

ชลธิชา จิตรภักดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 เชื้อราผิวหนัง	3
2.2 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์	5
2.2.1 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้	5
2.2.2 การควบคุมคุณภาพจุลินทรีย์	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	7
3.1 อุปกรณ์	7
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	7
3.3 ที่มาของเชื้อตัวอย่าง	8
3.4 เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง	8
3.5 วิธีการทดลอง	10
3.5.1 การนำเชื้อรากลับมาเพาะเลี้ยงใหม่	10
3.5.2 การวิเคราะห์ผลการทดลอง	10
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	11
4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	11
4.2 ผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	32
4.3 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อที่จัดจำแนกตามกลุ่ม	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพของเชื้อราในน้ำกลั่น	33
4.5 อภิปรายผลการทดลอง	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	35
5.1 สรุปผลการวิจัย	35
5.2 ข้อเสนอแนะ	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	38
ภาคผนวก ก	39



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

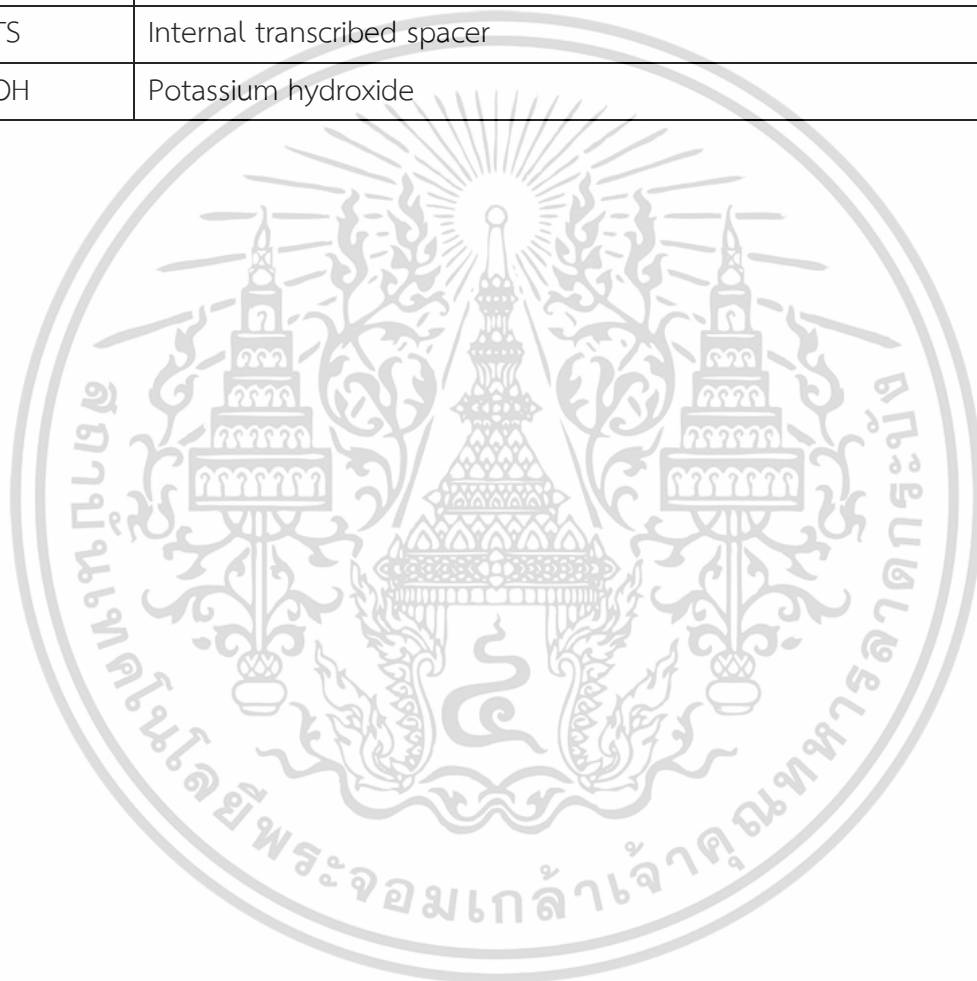
ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อรากล่อโรคมิวหนั	12
4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรากล่อโรคมิวหนั	16
4.3 การเจริญเติบโตของเชื้อตัวอย่างบนอาหาร PDA และอาหาร SDA	32
4.4 การเจริญเติบโตของเชื้อที่จัดจำแนกตามกลุ่ม	33
4.5 แสดงระยะเวลาและการมีชีวิตรอดของเชื้อรากล่อโรคมิวหนัทั้ง 46 ตัวอย่าง	34



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
PDA	Potato dextrose agar
SDA	Sabouraud dextrose agar
IgE	Immunoglobulin E
PCR	Polymerase chain reaction
ITS	Internal transcribed spacer
KOH	Potassium hydroxide



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อราคือจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถก่อโรคได้ สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งสิ่งแวดล้อม อากาศ น้ำ ดิน รวมทั้งคนและสัตว์ โดยโรคที่เกิดจากเชื้อราเรียกว่าโรคเชื้อรา (Mycosis หรือ Fungal infection) กลุ่มโรคเชื้อราที่พบบ่อย ได้แก่ โรคเกลื้อน (Pityriasis versicolor) โรคปมราดำ (Black Piedra) โรคปมราขาว (White Piedra) โรคกลาก (Dermatophytosis, ring worm, tinea) เป็นต้น โดยการเก็บตัวอย่างจะขึ้นอยู่กับบริเวณที่ผิดปกติ เช่น ผิดปกติที่ผิวหนังควรขูดบริเวณที่เป็นผื่น ผิดปกติบริเวณเล็บควรตัดเล็บหรือขูดบริเวณใต้เล็บ ผิดปกติบริเวณผมหรือรากผมควรถอนผม การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อราต้องใช้ยาที่จำเพาะและมีราคาค่อนข้างแพง อีกทั้งยังใช้ระยะเวลาในการรักษานาน

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์มีหลักการสำคัญ คือ การหยุดหรือลดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการควบคุมปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญ เชื้อต้องมีชีวิตอยู่รอดมากที่สุด มีลักษณะเหมือนเดิมที่สุดและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม การเก็บรักษารามีหลายวิธี เช่น การเก็บโดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บในน้ำมัน เก็บในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เก็บในสภาพแห้ง เก็บในกลีเซอรอล เป็นต้น การเก็บรักษาและคงสภาพเชื้อราในน้ำกลั่น เป็นวิธีการที่ง่ายและประหยัดงบประมาณกว่าวิธีอื่นๆ โดยมีงานวิจัยของ Hartung de Capriles, et al. (1989) ได้ทำการเก็บเชื้อราในน้ำกลั่นจำนวน 594 ตัวอย่าง เป็นเวลา 1-20 ปี พบว่ามีเชื้อที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนเดิมจำนวน 368 ตัวอย่าง คิดเป็น 62% และงานวิจัยของ Urdaneta and Lacaz (1965) ได้ทำการเก็บเชื้อราในน้ำกลั่นจำนวน 24 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อราที่ 3-9 เดือน ยังคงมีชีวิตรอดและอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ ที่ผ่านมามีการวิจัยเกี่ยวกับการเก็บรักษาเชื้อรามากมาย ทางสถาบันโรคผิวหนังจึงทำการเก็บรักษาและคงสภาพเชื้อราด้วยวิธีการนี้

ดังนั้นหัวข้อสหกิจศึกษาคณะครั้งนี้จึงสนใจทำการศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพเชื้อราของสถาบันโรคผิวหนังจากการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ โดยองค์ความรู้ใหม่ที่ได้ สามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้เพื่อประโยชน์ขององค์กร

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพของเชื้อราจากการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่น
- 2) เพื่อศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต
- 3) เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตจากการจัดจำแนกเชื้อราตามกลุ่ม

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) บ่งชี้และเพาะเลี้ยงเชื้อราทางโรคผิวหนัง
- 2) ศึกษาระยะเวลาของเชื้อราที่ถูกเก็บในน้ำกลั่น โดยเชื้อรานั้นยังคงสภาพเดิม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบถึงวิธีการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่นที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม สามารถเก็บเชื้อให้มีชีวิตรอดอยู่ได้เป็นระยะเวลาที่ยาวนาน สามารถนำมาใช้หรือนำมาศึกษาต่อโดยยังคงความบริสุทธิ์ ปราศจากการปนเปื้อน เพื่อเป็นประโยชน์ในด้านเป็นแหล่งข้อมูลแก่ผู้อื่นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อราผิวหนัง

การก่อโรคของเชื้อราในคน สามารถจัดจำแนกได้ 3 ประเภท คือ (พรพรรณ และคณะ, 2013)

2.1.1 Toxicogenic fungi คือ เชื้อราที่มีสารพิษอยู่ภายในหรือสารพิษที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อรา ซึ่งสารพิษนี้สามารถปล่อยออกมา ส่งผลต่อผู้ที่ได้รับสารพิษดังกล่าวทันที เมื่อได้รับในปริมาณมากหรือสะสมสารพิษดังกล่าวในปริมาณน้อยแต่สะสมเป็นระยะเวลานาน จนก่อให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะเป้าหมาย ในบางครั้งเชื้อราไม่ได้ปล่อยสารพิษแต่สารที่ปล่อยจากเชื้อรามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตามสิ่งแวดล้อมจนเกิดลักษณะที่เป็นพิษขึ้นได้เช่นกัน เรียกความผิดปกติของคนไข้ที่เกิดจากสารพิษของเชื้อรานี้ว่า mycotoxicosis และเรียกสารพิษก่อโรสดังกล่าว ว่า mycotoxin ซึ่งเชื้อราแต่ละชนิดจะปล่อยสารพิษในปริมาณและชนิดที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเชื้อรา ชนิดของแหล่งเจริญของเชื้อรา รวมถึงสิ่งที่มีมากระตุ้นให้เกิดการหลั่ง mycotoxin

2.1.2 Allergenic fungi คือ เชื้อราหรือส่วนของเชื้อราที่ทำหน้าที่คล้ายแอนติเจน (antigen) โดยไปส่งผลกระทบต่อร่างกายให้สร้างแอนติบอดี (antibody) ชนิด IgE ก่อให้เกิดความผิดปกติลักษณะคล้ายปฏิกิริยาภูมิไวเกิน (hypersensitivity reaction type I) หรืออาการแสดงของความผิดปกติคล้ายกับภาวะหอบหืด (asthmatic like symptoms) โดยเชื้อราในกลุ่มที่มีคุณสมบัติดังกล่าวเช่น *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* spp., *Ganoderma* spp., *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp.

2.1.3 Invasive fungi คือ เชื้อราที่สามารถบุกรุกเข้าไปเจริญอยู่ในร่างกายของคน อาจเจริญเฉพาะบริเวณผิวหนัง หรือเข้าสู่อวัยวะภายใน การติดเชื้อราในลักษณะดังกล่าว เรียกว่า mycoses หรือ mycosis ทั้งนี้สามารถแบ่งความรุนแรงของการเกิดโรคติดเชื้อราตามความลึกของการเจริญในร่างกายคน ออกได้เป็น 4 ชนิด คือ superficial mycoses, cutaneous mycoses, subcutaneous mycoses และ systemic (deep) mycoses

1) Superficial mycoses จัดเป็นการติดเชื้อราที่อยู่ตื้นที่สุด พบว่ามีพยาธิสภาพจำกัดอยู่แค่บริเวณขน ผม และ ผิวหนังชั้นนอกสุดคือชั้น Stratum corneum โดยเฉพาะบริเวณที่มี keratin ซึ่งจัดเป็นบริเวณของเซลล์ที่ตายแล้ว และไม่ค่อยมีปฏิกิริยาทางระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ความผิดปกติดังกล่าวไม่ส่งต่อในการกระตุ้นการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ไม่ค่อยพบการอักเสบที่ชัดเจนเหมือนชนิดอื่นๆ ที่มีการติดเชื้อลึกยิ่งขึ้น กลุ่มโรคติดเชื้อราชนิด superficial mycoses ที่พบบ่อยได้แก่ โรคเกลื้อน (Pityriasis versicolor) จัดเป็นกลุ่มโรคที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะกลุ่มผู้ที่มีเหงื่อออกปริมาณมากร่วมกับการดูแลความสะอาดที่ไม่เหมาะสม ลักษณะของโรคจะมีผื่นสีจาง (hypopigment) บางครั้งสามารถพบผื่นลักษณะสีเข้ม (hyperpigment) หรือสีแดง (erythema) ได้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบผื่นได้บ่อยบริเวณคอ หัวไหล่ หน้าอก และหลัง เชื้อก่อโรค คือ *Malassezia furfur* ซึ่งเจริญได้ดีที่ชั้น keratin ของผิวหนัง โรคปมราดำ (Black piedra) เป็นโรคติดเชื้อราที่พบบริเวณเส้นผม ไม่ค่อยพบที่บริเวณขนรักแร้และขน บริเวณหัวหน่าว จะพบลักษณะเป็นตุ่มแข็งเป็นมัน มีสีดำหรือน้ำตาลเข้มที่เส้นผม ไม่สามารถหลุดออกได้เหมือนไขเหา เชื้อก่อโรค คือ *Piedra hortae* โรคปมราขาว (White piedra) เป็นโรคที่พบได้น้อย จะพบลักษณะตุ่มสีขาว บริเวณรอบเส้นขน สามารถหลุดออกได้ คล้ายไขเหา เชื้อก่อโรค คือ *Trichosporon beigellii* ลักษณะของโรคนี้ บางครั้งคล้ายกับโรคติดเชื้อ *Corynebacterium* ที่เรียกว่า Trichomycosis axillaris โรครอยต่างดำ (Tinea nigra) เป็นโรคที่ผู้ป่วยไม่ค่อยมีอาการที่รุนแรง นอกจากพบลักษณะปื้นสีน้ำตาลเข้มดำ เชื้อก่อโรคคือ *Phaeoannellomyces werneckii*

2) **Cutaneous mycoses** คือเชื้อราที่บริเวณผม ขน เล็บ โดยพบว่าชั้นส่วนของเชื้อราสามารถ ลุกกลามจากชั้น Stratum corneum ไปอยู่ที่รูขุมขน ผม โคนเล็บ และข้างเล็บได้ เมื่อมีการติดเชื้อราในกลุ่มนี้ ร่างกายมักจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งจะมีการอักเสบ บวม แดง หรือความผิดปกติต่อโครงสร้างของ ผิวหนัง ผม และเล็บได้ กลุ่มโรคติดเชื้อราชนิด cutaneous mycoses ที่พบบ่อยนั้นแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มโรค คือ โรคที่เกิดจากเชื้อ Dermatophytes เรียกว่าโรคกลาก (dermatophytosis) จัดเป็นโรคติดเชื้อราที่พบได้บ่อย เชื้อ ที่เป็นสาเหตุก่อโรค คือ Trichophyton พบว่าเป็นสาเหตุในการติดเชื้อบริเวณผม ผิวหนัง และเล็บ Microsporiums พบว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อบริเวณผมและผิวหนังมากกว่าบริเวณเล็บ Epidermophyton พบได้บ่อยในการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเล็บ และ โรคที่เกิดจากเชื้อรากลุ่มอื่นๆ เรียกว่า dermatomycosis โดยเชื้อที่พบบ่อย คือเชื้อ *Candida albicans* ซึ่งมักจะเป็นสาเหตุของการติดเชื้อราบริเวณอวัยวะที่มีความชื้นสูงๆ เช่น บริเวณอวัยวะเพศ รอบๆ ทวารหนัก ขาหนีบ นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อราฉวยโอกาสตัวอื่นๆ ได้อีก เช่น เชื้อก่อโรคราดำ (*Hendersonula toruloidea*) โรคติดเชื้อราที่เล็บตัวอื่นๆ เช่น *Scytalidium hyalinum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus* spp.

3) **Subcutaneous mycoses** เป็นกลุ่มโรคติดเชื้อราที่มีพยาธิสภาพบริเวณผิวหนังและใต้ผิวหนัง บางชนิดสามารถลุกลามถึงอวัยวะข้างเคียง เช่น กระดูก หลอดเลือด และต่อมน้ำเหลืองได้ กลุ่มโรคติดเชื้อราชนิด subcutaneous mycoses ที่พบบ่อย ได้แก่ Chromoblastomycosis เป็นการติดเชื้อราที่ผู้ป่วยมักจะมีตุ่มนูนผิว ไม่เรียบ พบบ่อยที่บริเวณขา เมื่อตัดชิ้นเนื้อมาตรวจสอบจะพบลักษณะคล้ายกับเหรียญซ้อนกัน เรียกว่า copper pennies ส่วนมากความผิดปกติชนิดนี้มักไม่กระจายไปสู่กระดูก เอ็น และกล้ามเนื้อ เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคคือ *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta* เป็นต้น Eumycotic mycetoma ผู้ป่วยจะมีลักษณะตุ่มหนอง นูน พบมากบริเวณขา ความผิดปกตินี้สามารถแพร่กระจายเข้าไปสู่กระดูกและกล้ามเนื้อได้ เมื่อตัดชิ้นเนื้อไปตรวจสอบจะพบลักษณะของท่อทางเดินของหนอง (draining sinus tract) ร่วมกับกลุ่มเซลล์ลักษณะคล้ายตะกอน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สีต่างๆ เรียกว่า pigmented grains พบว่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุที่พบได้บ่อยๆ คือ *Pseudallescheria boydii* บางครั้งอาจพบเชื้อ แบคทีเรียที่สามารถก่อโรคคล้ายๆ กับเชื้อราได้ เรียกความผิดปกติที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียว่า Actinomycotic mycetoma โดย เชื้อก่อโรคคือ *Nocardia brasiliensis* และ Subcutaneous sporotrichosis โรคนี้มักจะมีประวัติของการได้รับอุบัติเหตุแล้วมีการทิ่มแทงสิ่งที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าสู่ร่างกาย เช่น หนามดอกไม้ตำ หรือกิ่งไม้แทงตา เป็นต้น โดยเชื้อก่อโรคนี้นี้มักจะแพร่กระจายไปตามท่อน้ำเหลือง เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค คือ *Sporothrix schenckii*

4) **Systemic (deep) mycoses** เป็นโรคติดเชื้อราที่เกิดกับอวัยวะภายใน บางครั้งอาจพบอาการของโรคที่ผิวหนังร่วมด้วย เชื้อราก่อโรคส่วนใหญ่มักเกิดจาก Dimorphic fungi ที่พบบ่อย ได้แก่ Histoplasmosis, Blastomycosis, Coccidioidomycosis, Paracoccidioidomycosis, Penicilliosis marneffei เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อฉวยโอกาสบางชนิด (opportunistic fungi) ที่สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติเหมือนกับ systemic (deep) mycoses ได้ เช่น *Cryptococcus neoformans*, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Zygomycetes* เป็นต้น

2.2 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

2.2.1 วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่นิยมทำในปัจจุบันมี 6 วิธี

1) การเก็บบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด และมักใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปข้อเสียคือต้องทำการถ่ายเชื้อไปสู่หลอดอาหารใหม่บ่อยครั้ง ไม่สามารถเก็บเชื้อได้ในระยะยาว อาจเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย โดยงานวิจัยของ Wang, et al. (2021) กล่าวว่าอาหาร PDA มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการสร้างเส้นใยของเชื้อ และในงานวิจัยของ Devi, et al. (2018) กล่าวว่าอาหาร PDA สามารถเพิ่มการสร้างสปอร์ของเชื้อราได้ดี ทำให้สามารถสังเกตลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ดียิ่งขึ้น

2) การเก็บในน้ำมันแร่หรือน้ำมันพาราฟิน สามารถเก็บเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes, Zygomycetes และ Basidiomycetes นานถึง 10 ปี แต่เชื้อราในกลุ่ม Oomycetes จะเก็บได้แค่ 2 ปี ข้อเสียคือไม่สะดวกเวลานำกลับมาใช้ เนื่องจากมีน้ำมันเททับ โดยงานวิจัยของ Smith and Onions (1983) กล่าวว่า มี 47 ไอโซเลตสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 32 ปี พบว่ามีเชื้อที่สามารถมีชีวิตรอดและยังคงสภาพเดิมได้มากกว่า 20 ปี เช่น *Aspergillus* และ *Penicillium* เป็นต้น

3) การเก็บในสภาพแห้ง เช่น เก็บบนกระดาษที่ปลอดเชื้อ มีงานวิจัยของ ฮารทพิย และคณะ (2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการเก็บรักษา *Colletotrichum* spp. บนกระดาษกรองนิ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 2-8 เดือน พบว่าที่ระยะเวลา 8 เดือน เชื้อรายังคงมีชีวิต วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายน้อย และสะดวกต่อการนำกลับมาใช้งาน ข้อเสียคือถ้ากระดาษกรองนิ่งฆ่าเชื้อไม่แห้งสนิท จะทำให้เกิดการปนเปื้อน

4) การเก็บในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ วิธีนี้สามารถเก็บสปอร์ในรูปสปอร์แขวนลอย (spore suspension) หรือเป็นชั้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ เชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์จะเก็บรักษาได้ดีในวิธีนี้ งานวิจัยของ Hartung de Capriles, et al. (1989) ได้ทำการเก็บเชื้อราในน้ำกลั่นจำนวน 594 ตัวอย่าง เป็นเวลา 1-20 ปี พบว่ามีเชื้อที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนเดิมจำนวน 368 ตัวอย่าง คิดเป็น 62% ในเกือบทุกปีมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 50% และพบการปนเปื้อนจำนวน 135 ตัวอย่าง คิดเป็น 22.8% ของสายพันธุ์ทั้งหมด การปนเปื้อนของเชื้อตัวอย่างส่วนมากเกิดจาก *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Cladosporium*

5) การเก็บในสภาพเย็นยิ่งยวด (cryopreservation) เก็บรักษาในกลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสหรือ -156 องศาเซลเซียส หรือเก็บในไนโตรเจนเหลวที่ -196 องศาเซลเซียส เก็บเชื้อได้นานถึง 10 ปี โดยงานวิจัยของ Kitamoto, et al. (2002) เก็บเชื้อราในกลีเซอรอล 10% ในสภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -85 องศาเซลเซียส พบว่าในระยะเวลา 5 ปี เชื้อราส่วนใหญ่ยังคงมีชีวิตรอด วิธีการนี้ใช้ได้กับจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด แต่ข้อเสียคือค่าใช้จ่ายสูง เครื่องมือและหลอดเก็บราคาแพง

6) เก็บในสภาพแห้งแบบสุญญากาศ (freeze dry or lyophilization) นิยมใช้กันมาก เหมาะกับเชื้อราที่สร้างสปอร์เยอะ เก็บได้นานถึง 10 ปี โดยงานวิจัยของ ธารทิพ และคณะ (2552) ทำการเก็บรักษาเชื้อราไว้ในสภาพแห้งแบบสุญญากาศ เป็นเวลา 8 เดือน เมื่อนำออกมาเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อไม่มีการเจริญเติบโต เกิดจากหลอด ampoule ไม่อยู่ในสภาพสุญญากาศ มีรอยรั่ว จึงทำให้ราไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ Malik (1992) กล่าวว่า วิธีนี้มีข้อดีคือไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร เหมาะกับการเก็บเชื้อจำนวนมาก ประหยัดพื้นที่ ข้อเสียคือขั้นตอนยุ่งยากซับซ้อน ต้องการผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญ

2.2.2 การควบคุมคุณภาพจุลินทรีย์ (Smith and Onions, 1994)

การควบคุมคุณภาพของจุลินทรีย์ในแหล่งจัดเก็บเป็นสิ่งสำคัญ การควบคุมคุณภาพที่ดีจะทำให้เชื้อมีชีวิตรอดแข็งแรง ไม่มีการปนเปื้อน ไม่เปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ต้องคำนึงถึง ความบริสุทธิ์ (purity), การมีชีวิตรอด (viability) และคงลักษณะทางพันธุกรรม (authenticity) บางเชื้อจำเป็นต้องมีการตรวจเพิ่มเติม เช่น คุณสมบัติทางอนุกรมวิธาน การผลิตสารต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. หลอดทดลองมีฝาปิด
2. น้ำกลั่น
3. Needle
4. เครื่องเผาloop หรือ Loop sterilizer
5. Autopipette
6. Dropper sterile
7. สไลด์และแผ่นปิดสไลด์
8. Vernier Calipers
9. ปากกาเขียนเครื่องแก้ว
10. แอลกอฮอล์ 95%
11. ตู้ปลอดเชื้อ หรือ Biological Safety Cabinet
12. ตู้บ่มเชื้อ หรือ incubator
13. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ หรือ autoclave
14. เครื่องผสมสาร หรือ Voltex mixer
15. ตู้เย็น
16. กล้องจุลทรรศน์
17. สีย้อม lactophenol cotton blue

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)
2. Sabouraud dextrose agar (SDA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ที่มาของเชื้อตัวอย่าง

เจ้าหน้าที่สถาบันโรคผิวหนังทำการเก็บตัวอย่างจากคนไข้โดยการขูดบริเวณที่มีความผิดปกติ ให้ได้ปริมาณอย่างน้อย 10 mg จากนั้นแบ่งตัวอย่างที่ได้ออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน ซึ่งตัวอย่างส่วนที่ 1 ใช้สำหรับ KOH preparation ส่วนที่ 2 ส่งไประบุเชื้อที่ห้อง PCR และส่วนที่ 3 ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราและการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่น โดยเชื้อราที่ถูกเก็บรักษาในน้ำกลั่นจะต้องผ่านการระบุเชื้อด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ที่ตำแหน่ง ITS ก่อน

การเก็บเชื้อราในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อทำได้โดย ปิเปตน้ำกลั่นใส่ลงในหลอดแก้ว 10 มิลลิลิตร แล้วปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากเอาออกจาก autoclave นำมาตั้งทิ้งไว้ให้น้ำกลั่นหายร้อน จากนั้นเขี่ยเชื้อตัวอย่างที่ทำการเพาะไว้ลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยวิธีการ aseptic technique เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (กัญญาณัฐ, 2560)

3.4 เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

1. กลุ่ม Dermatophytosis

- 1.1 *Epidermophyton floccosum*
- 1.2 *Microsporum canis*
- 1.3 *Microsporum ferrugineum*
- 1.4 *Microsporum gypseum*
- 1.5 *Microsporum nanum*
- 1.6 *Microsporum gallinae*
- 1.7 *Microsporum racemosum*
- 1.8 *Microsporum cookei*
- 1.9 *Trichophyton mentagrophytes*
- 1.10 *Trichophyton tonsurans*
- 1.11 *Trichophyton schoenleinii*
- 1.12 *Trichophyton concentricum*

2. กลุ่ม Non-dermatophytes

2.1 *Neoscytalidium hyalinum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2.2 *Fusarium soloni*
- 2.3 *Aspergillus flavus*
- 2.4 *Penicillium* spp.
- 2.5 *Fusarium* spp.
- 2.6 *Geotrichum candidum*
- 2.7 *Scopulariopsis brevicaulis*
- 2.8 *Basidiobolus ranarum*
- 2.9 *Penicillium marneffeii*
- 2.10 *Phaeoacremonium* spp.
- 2.11 *Scolebasidium* sp.
- 2.12 *Terabrattula globate*
- 2.13 *Phoma* spp.

3. กลุ่ม Dematiaceous

- 3.1 *Fonsecaea compacta*
- 3.2 *Fonsecaea pedrosoi*
- 3.3 *Cladosporium carrionii*
- 3.4 *Phialophora verrucosa*
- 3.5 *Phialophora richardsiae*
- 3.6 *Exophiala jeanselmei*
- 3.7 *Wangiella dermatitidis*
- 3.8 *Madurella mycetomatis*
- 3.9 *Cladosporium* spp.
- 3.10 *Alternaria* spp.
- 3.11 *Exophiala werneckii*
- 3.12 *Aspergillus niger*
- 3.13 *Neoscytalidium dimidiatum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.15 *Nigrospora* sp.

4. กลุ่ม yeast

4.1 *Cryptococcus neoformans*

4.2 *Candida tropicalis*

4.3 *Candida krusei*

4.4 *Rhodotorula* spp.

5. กลุ่ม *Prototheca* spp.

5.1 *Prototheca* spp.

5.2 *Prototheca wickerhamii*

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การนำเชื้อรากลับมาเพาะเลี้ยงใหม่

นำเชื้อที่ถูกเก็บไว้ในน้ำกลั่นมาเชื้อระยะเวลา 3-10 ปี จำนวนทั้งหมด 46 ตัวอย่าง ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา โดยการ cấyเชื้อที่อยู่ในหลอดน้ำกลั่นลงบนกลางอาหารทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ Potato dextrose agar (PDA) และ Sabouraud dextrose agar (SDA) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน ทำการบันทึกผลวันที่ 7 และ 14 โดยสังเกตลักษณะโคโลนิบนอาหาร (Macroscopic examination) และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเพื่อดูการเจริญเติบโตด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ ในวันที่ 14 ทำการสังเกตลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) ผู้วิจัยใช้เทคนิค Scotch tape preparation หรือ Tease slide technique ในการเตรียมและย้อมตัวอย่างเชื้อด้วย Lactophenol cotton blue และปิด Cover slip เพื่อดูลักษณะของสายรา และ Conidia ที่สำคัญเพื่อระบุชนิดของเชื้อรา

3.5.2 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา อัตราการปนเปื้อน และอัตราของเชื้อราที่ไม่สามารถระบุได้ โดยจัดจำแนกตามระยะเวลาของเชื้อที่ถูกเก็บ จำแนกตามประเภทอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกตามการจัดกลุ่มของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราจำนวน 46 ตัวอย่าง จัดจำแนกตามกลุ่มของเชื้อรา (สมคิด, 2552) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ SDA ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและสังเกตลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 7 และ 14 วัน พบว่ามีเชื้อที่รอดชีวิตทั้งหมดจำนวน 28 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ เชื้อที่บริสุทธิ์ ได้แก่ *E. floccosum*, *M. gypseum*, *M. racemosum*, *M. gallinae*, *T. mentagrophytes*, *F. soloni*, *A. flavus*, *Penicilium* spp., *B. ranarum*, *T. globata*, *A. niger*, *N. dimidiatum*, *F. pedrosoi*, *P. richardsiae*, *W. dermatitidis*, *Cladosporium* spp., *C. neoformans*, *C. tropicalis* และ *P. wickerhamii* และเชื้อที่ปนเปื้อน เช่น ปนเปื้อนแบคทีเรีย ปนเปื้อนเชื้อราอื่นๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ *M. ferrugineum*, *G. candidum*, *T. schoenleinii*, *Fusarium* spp., *N. hyalinum*, *P. marneffeii*, *P. verrucosa*, *E. werneckii* และ *C. krusei* เชื้อที่ระบุไม่ได้ เช่น ไม่พบลักษณะเส้นใยที่จำเพาะ จำนวน 7 ตัวอย่าง ได้แก่ *M. canis*, *T. tonsurans*, *S. brevicaulis*, *Phaeoacremonium* spp. และ *M. mycetomatis* และเชื้อที่ไม่เจริญเติบโตจำนวน 11 ตัวอย่าง ได้แก่ *M. nannum*, *M. cookei*, *T. concentricum*, *Scolecobasidium* sp., *Phoma* spp., *F. compacta*, *C. carrionii*, *E. jeanselmei*, *Alternaria* spp., *S. schenckii* และ *Nigrospora* sp. แสดงดังตารางที่ 4.1

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่ 14 วัน โดยใช้วิธี Tease slide technique และนำไปศึกษารูปร่างทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ เส้นใย ลักษณะโคนิเดีย ก้านชู ถุงหุ้มและสปอร์ ดังตารางที่ 4.2 พบว่ามีเชื้อที่มีลักษณะเส้นใยที่จำเพาะทำให้สามารถระบุเชื้อได้ชัดเจนจำนวน 19 ตัวอย่าง และมีเชื้อที่ไม่มีลักษณะเส้นใยจำเพาะทำให้ไม่สามารถระบุเชื้อได้อย่างชัดเจนจำนวน 7 ตัวอย่าง อาจต้องนำไปจำแนกเชื้อโดยใช้เทคนิคอื่นที่มีความแม่นยำสูง เช่น API test kit และ PCR ต่อไป











ตารางที่ 4.1 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคผิวหนัง

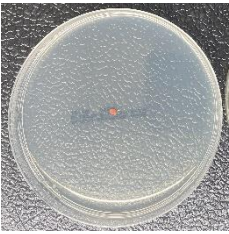
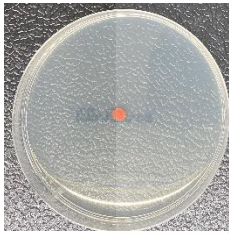
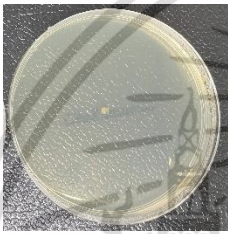
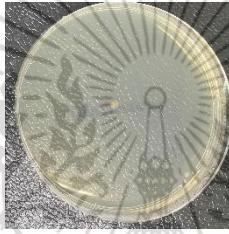
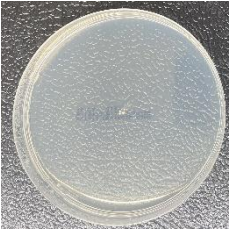

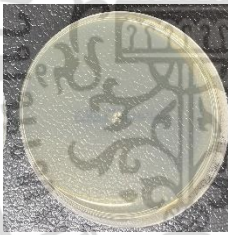
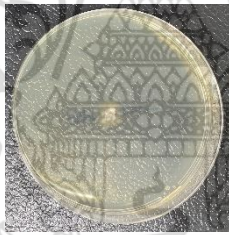
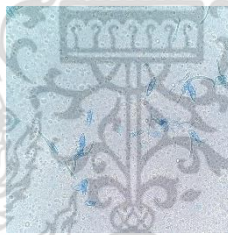

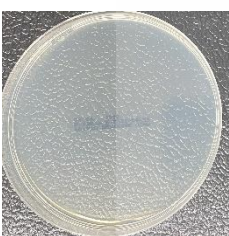


ชื่อเชื้อ	ระยะเวลาที่จัดเก็บ	ศึกษาการมีชีวิต					
		Macroscopic examination				Microscopic examination	
		เส้นผ่านศูนย์กลาง (mm) PDA		เส้นผ่านศูนย์กลาง (mm) SDA		ภาพไตกล้องจุลทรรศน์	
		7 วัน	14 วัน	7 วัน	14 วัน	ลักษณะเส้นใยจำเพาะ	ลักษณะเส้นใยไม่จำเพาะ
Dermatophytosis							
<i>E. floccosum</i>	3 ปี	0 mm	10 mm	0 mm	15 mm	✓	
<i>M. canis</i>	7 ปี	10 mm	23 mm	0 mm	0 mm		✓
<i>M. ferrugineum</i>	7 ปี	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated
<i>M. gypseum</i>	8 ปี	0.5 mm	10 mm	0.5 mm	12 mm	✓	
<i>M. nannum</i>	8 ปี	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	no growth	no growth
<i>M. racemosum</i>	8 ปี	6 mm	20 mm	9 mm	23 mm	✓	
<i>M. gallinae</i>	7 ปี	1 mm	14 mm	4 mm	20 mm	✓	
<i>M. cookei</i>	8 ปี	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	no growth	no growth
<i>T. mentagrophytes</i>	3 ปี	21 mm	49 mm	27 mm	52 mm	✓	
<i>T. tonsurans</i>	7 ปี	8 mm	24 mm	0 mm	16 mm		✓
<i>T. schoenleinii</i>	5 ปี	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated
<i>T. concentricum</i>	8 ปี	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	no growth	no growth











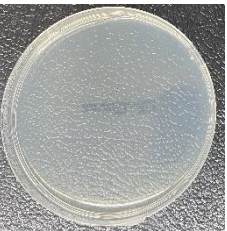
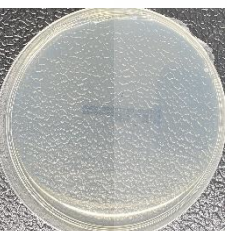
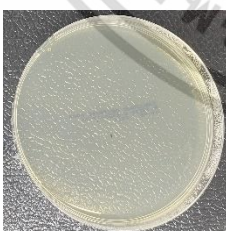

ชื่อเชื้อ	ระยะเวลาที่จัดเก็บ	ศึกษาการมีชีวิต					
		Macroscopic examination				Microscopic examination	
		เส้นผ่านศูนย์กลาง (mm) PDA		เส้นผ่านศูนย์กลาง (mm) SDA		ภาพใต้น้ำกล้องจุลทรรศน์	
		7 วัน	14 วัน	7 วัน	14 วัน	ลักษณะเส้นใยจำเพาะ	ลักษณะเส้นใยไม่จำเพาะ
Non-dermatophytes							
<i>N. hyalinum</i>	8 ปี	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated
<i>F. soloni</i>	8 ปี	14 mm	32 mm	24 mm	39 mm	✓	
<i>A. flavus</i>	7 ปี	60 mm	72 mm	45 mm	50 mm	✓	
<i>Penicillium spp.</i>	8 ปี	0 mm	7 mm	0 mm	18 mm	✓	
<i>Fusarium spp.</i>	8 ปี	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated
<i>G. candidum</i>	8 ปี	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated
<i>S. brevicaulis</i>	8 ปี	2 mm	7 mm	9 mm	21 mm		✓
<i>B. ranarum</i>	8 ปี	70 mm	77 mm	62 mm	73 mm	✓	
<i>P. marneffeii</i>	7 ปี	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated
<i>Phaeoacremonium spp.</i>	9 ปี	6 mm	12 mm	13 mm	15 mm		✓
<i>Scolecobasidium sp.</i>	10 ปี	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	no growth	no growth
<i>T. globata</i>	7 ปี	21 mm	30 mm	28 mm	35 mm	✓	
<i>Phoma spp.</i>	8 ปี	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	no growth	no growth





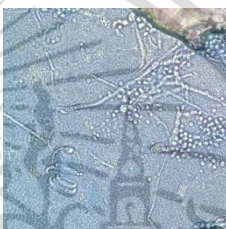


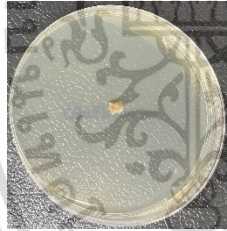
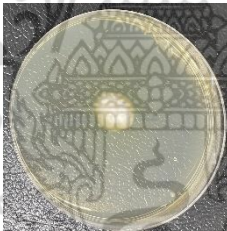
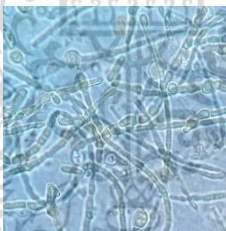





ชื่อเชื้อ	ระยะเวลา ที่จัดเก็บ	ศึกษาการมีชีวิตร					
		Macroscopic examination				Microscopic examination	
		เส้นผ่านศูนย์กลาง (mm) PDA		เส้นผ่านศูนย์กลาง (mm) SDA		ภาพใต้น้ำกล้องจุลทรรศน์	
		7 วัน	14 วัน	7 วัน	14 วัน	ลักษณะเส้นใยจำเพาะ	ลักษณะเส้นใยไม่จำเพาะ
Dematiaceous fungi							
<i>S. schenckii</i>	6 ปี	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	no growth	no growth
<i>Nigrospora</i> sp.	8 ปี	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	no growth	no growth
yeast							
<i>C. neoformans</i>	7 ปี	14 mm	22 mm	11 mm	12 mm	√	
<i>C. tropicalis</i>	7 ปี	34 mm	38 mm	28 mm	31 mm	√	
<i>C. krusei</i>	7 ปี	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated	contaminated
<i>Rhodotorula</i> spp.	7 ปี	0 mm	4 mm	0 mm	6 mm		√
<i>Prototheca</i> spp.							
<i>Prototheca</i> spp.	8 ปี	2 mm	4 mm	4 mm	6 mm		√
<i>P. wickerhamii</i>	7 ปี	14 mm	16 mm	18 mm	18 mm	√	



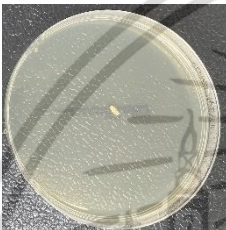
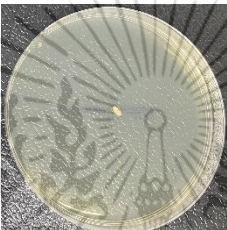




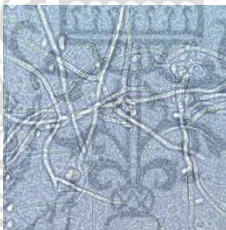

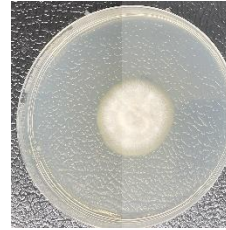


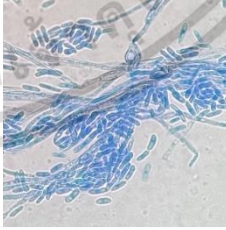
ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคผิวหนัง

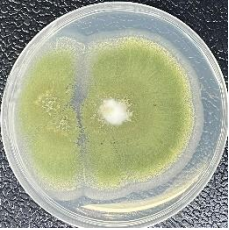

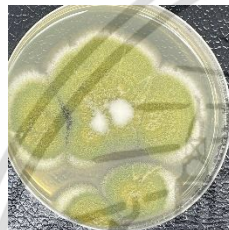
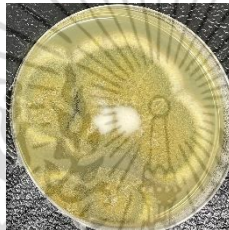
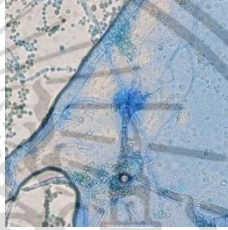




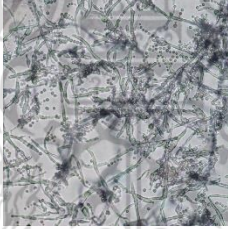

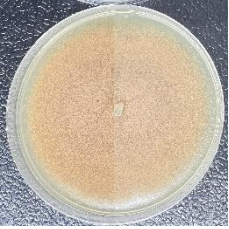



ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปใต้กล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ใต้กล้องจุลทรรศน์
Dermatophytosis						
<i>E. floccosum</i> 					เริ่มแรกจะแผ่กระจาย ต่อมาจะย่นและหยัก ผิวหนังเนียนคล้ายพรม สี เขียวมะกอกหรือสีกาเกี ด้านหลังไม่มีสี เกิดสายรา ขาวได้ง่าย	โคนินเดียวขนาดใหญ่ปลายมน คล้ายใบขนุน ผนังเรียบ ภายในมีผนังกันแบ่งเป็น 1-4 เซลล์ มักอยู่เป็นกลุ่ม ไม่สร้าง โคนินเดี่ยว เมื่อโคโลนีแก่จะพบ chlamydoconidia
<i>M. canis</i> 				 ระบุไม่ได้	โคโลนีฟู สีขาวหรือเหลือง ผิวหนังเนียนคล้ายไหมหรือ ขนแมว อาจมีร่องรัศมีแผ่ จากจุดกลาง ด้านหลัง โคโลนีมีสีเหลือง เกิดสายรา ขาวได้ง่าย	โคนินเดียวขนาดใหญ่ ผนังหนา ผิวหยาบ รูปกระสวย ปลาย ด้านหนึ่งงอคล้ายตะขอพบได้ มาก โคนินเดียวขนาดเล็กพบได้ น้อย รูปปรี ผิวเรียบอยู่ข้างๆ สายรา


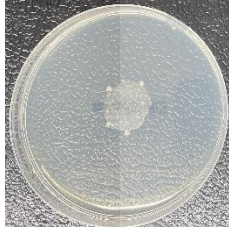









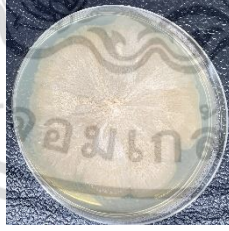
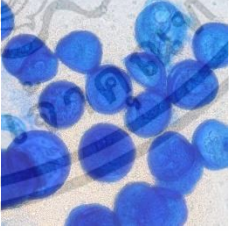
ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกล้องจุลทรรศน์
<i>M. ferrugineum</i> 				contaminated	โคโลนีเติบโตช้า มีสีครีมไปจนถึงสีน้ำตาลเข้ม	ไม่พบโคนินเดีย สายราแตกแขนง ไม่เป็นระเบียบ บางสายรามีผนังกัน เห็นชัดมองดูคล้ายไม้ไผ่
<i>M. gypsum</i> 					เป็นผลสีน้ำตาลอ่อน เกิดสายราสีขาวได้ง่าย	โคนินเดียขนาดใหญ่ รูปกระสวย ผนังบาง ผิวไม่เรียบ พบได้มาก โคนินเดียขนาดเล็ก รูปร้อยรูปร่างต่างๆ
<i>M. nannum</i> 				no growth	เส้นใยบางสีขาว ตรงกลางเป็นสีน้ำตาลอมเหลือง ด้านหลังเป็นสีน้ำตาลอมส้ม และมีสีน้ำตาลแดงตอนแก่	โคนินเดียขนาดใหญ่พบได้มาก มักพบ 2 เซลล์ ผนังบาง ผิวไม่เรียบ คล้ายลูกแพร์ โคนินตัด โคนินเดียขนาดเล็ก รูปร้อยรูปร่าง มีเซลล์เดี่ยว




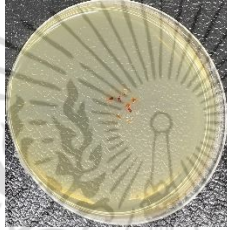



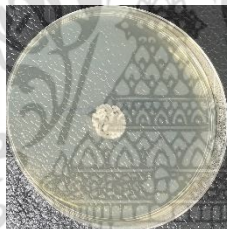

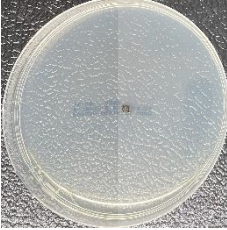

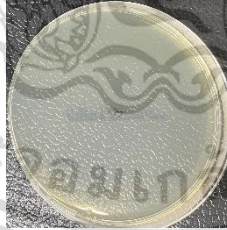
ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกล้องจุลทรรศน์
<p><i>M. racemosum</i></p> 					โคโลนีสีขาว เติบโตช้า	เป็นสายราสั้นๆ ความยาวประมาณ 15-25 ไมครอน โคนิเดียมีขนาดเล็ก รูปร่างกลมหรือท่อน
<p><i>M. gallinae</i></p> 					โคโลนีฟู มีหยักเล็กน้อย สีขาวถึงชมพู มีสารสีแดงชมพูกระจายในวุ้น	โคนิเดียขนาดใหญ่ ผิวไม่เรียบ รูปร่างคล้ายรวงเท้า ตะแคง โคนิเดียขนาดเล็กรูปรี ผิวเรียบ มีเซลล์เดี่ยว
<p><i>M. cookie</i></p> 				no growth	แบนและเป็นผง มีสีเหลือง ด้านหลังอาหารเป็นสีม่วงแดง	โคนิเดียขนาดใหญ่ ผิวไม่เรียบ ผนังหนา รูปร่างเป็นรูปกระสวย



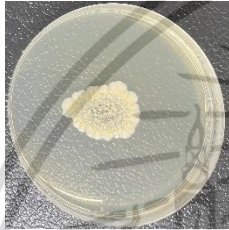
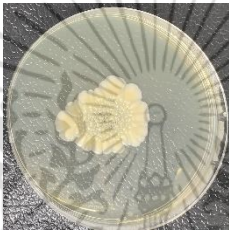
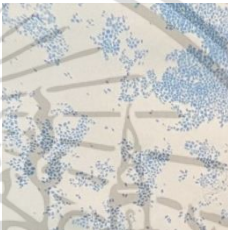


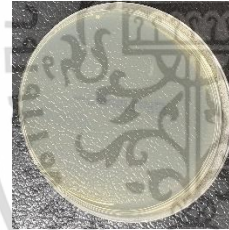






ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกล้องจุลทรรศน์
<p><i>T. mentagrophytes</i></p> 					<p>เป็นผงคล้ายทรายละเอียดหรือแป้งสีครีม ด้านหลังโคโลนีสีเหลืองหรือน้ำตาลครีม</p>	<p>มักพบแต่โคนิเดียขนาดเล็ก รูปกลมหรือรีอยู่เป็นกลุ่มหรือเกาะข้างสายรา โคนิเดียขนาดใหญ่และสายราขาดเกลียวไม่ค่อยพบ</p>
<p><i>T. tonsurans</i></p> 				 <p>ระบุไม่ได้</p>	<p>ผิวหน้าโคโลนีอาจเนียนหรือเป็นผง อาจมีริ้วมีแผ่จากจุดศูนย์กลาง อาจมีสีขาวหรือเหลืองกำมะถัน จนถึงน้ำตาลหรือม่วง ด้านหลังโคโลนีมีสีครีมหรือแดง สีอาจเข้มเข้าเนื้อวุ้น</p>	<p>มักพบโคนิเดียขนาดเล็ก รูปร่างแตกต่างกัน อาจรูปรี หยดน้ำตาลทรงยาวหรือพบเซลล์กลมขนาดใหญ่ โคนิเดียแก่พบ chlamydoconidia ภายในสายรา ไม่ค่อยพบโคนิเดียขนาดใหญ่</p>
<p><i>T. schoenleinii</i></p> 				 <p>contaminated</p>	<p>ผิวเนียน ย่น สีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อน</p>	<p>พบสายราแตกแขนงคล้ายเขากวาง ตรงปลายสายรามักพองออก</p>



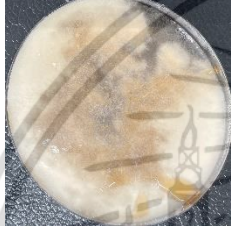

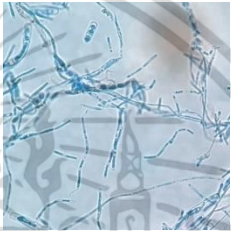



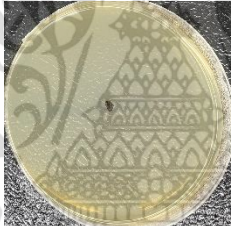

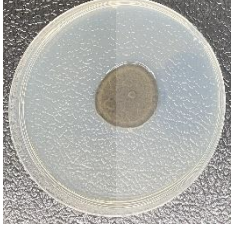



ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไต้กล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไต้กล้องจุลทรรศน์
<i>T. concentricum</i> 				no growth	เติบโตช้าเป็นเส้นใย ส่วนใหญ่เป็นสีขาวถึงสีครีม	พบแต่สายราที่มีผนังกันแตกแขนง
Non-dermatophytes						
<i>N. hyalinum</i> 					เป็นเส้นใย สีขาวครีม ด้านหลังอาหารเป็นสีเหลือง	เป็นสายรา โคนิเดียมักเป็นท่อนหรือทรงกลม มีสีเทาหรือสีขาว
<i>F. soloni</i> 					เริ่มแรกมีสีครีม ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเขียวน้ำเงินหรือน้ำตาลออกน้ำเงิน ด้านหลังไม่มีสี นานๆครั้งอาจเป็นสีม่วง	ก้านชูโคนิเดียพบการแตกกิ่ง โคนิเดียขนาดเล็กมีทรงกลมหรือรี โคนิเดียขนาดใหญ่เป็นรูปกระสวยปลายมน พบ chlamydoconidia เตี่ยวหรือเป็นคู่

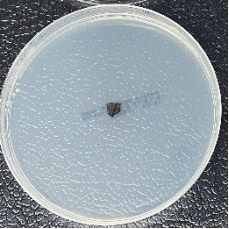









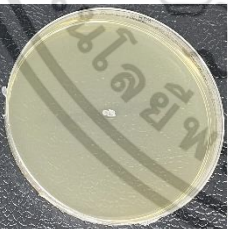


ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกล้องจุลทรรศน์
<i>A. flavus</i> 					โคโลนีมีสีเขียวอมเหลือง หรือน้ำตาล	ก้านชูสปอร์บาง ผิวหยาบ ปลาย พองออกเป็นกระเปาะ รูปกลม phialides มีชั้นเดียว เมื่อโคโลนีแก่มี 2 ชั้นเกาะอยู่ รอบๆ โคนิเดียรูปกลม ผิวไม่ เรียบต่อกันเป็นสาย
<i>Penicillium spp.</i> 					ผิวด้านหน้าเรียบ เป็นผงสี เขียว เขียวอมน้ำเงิน หรือ เขียวปนน้ำตาล อาจมีสีแดง เหลืองน้ำตาล และมีร่อง หยักแผ่เป็นรัศมี	สายรามิฟิנגกัน ปลายก้านชู มีตั้งรูปขวดหลายๆอัน เป็น รูปคล้ายแปรงหรือนิ้วมือ โคนิ เดียรูปกลมหรือรีต่อกันเป็น สายยาว
<i>Fusarium spp.</i> 				 contaminated	โคโลนีมีหลายสี เช่น ชมพู ม่วง และเหลือง	สายรามิฟิנגกัน โคนิเดีย ขนาดเล็กประกอบด้วยเซลล์ เดี่ยว เกิดเป็นกลุ่มที่ปลาย ก้านชูสั้นๆ โคนิเดียขนาดใหญ่ มีหลายเซลล์ รูปร่างยาว ปลายเรียวคล้ายพระจันทร์ เสี้ยว




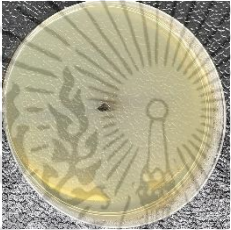


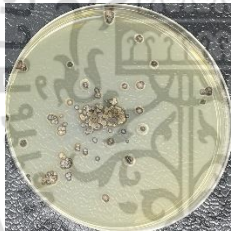
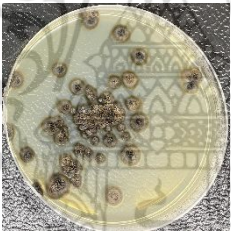
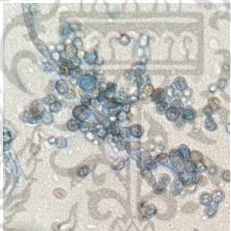
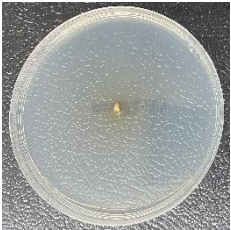
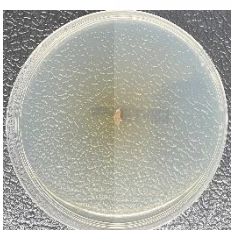


ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกล้องจุลทรรศน์
<p><i>G. candidum</i></p> 				contaminated	โคโลนีเจริญอย่างรวดเร็ว แบนราบกับผิวหน้าอาหาร เส้นใยสีขาว แห้ง	เป็นเส้นใยมีผนังกันแตกกิ่ง ก้าน สปอร์เป็นท่อนสั้น แตกหักจากเส้นใยเรียกว่า arthrospore หรือ arthroconidia
<p><i>S. brevicaulis</i></p> 				ระบุไม่ได้	โคโลนีเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยมีสีแตกต่างกันไปตั้งแต่ สีขาว ครีမ် สีเทา สีน้ำตาล อมเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาล และสีดำ แต่ส่วนใหญ่เป็นสี น้ำตาลอ่อน	สปอร์มีรูปร่างกลมสีขาว โคนิเดียเป็นสายรวมกันเป็น กลุ่มเล็กๆ อาจมีการสร้าง vesical ที่เป็นท่อนสั้นๆ
<p><i>B. ranarum</i></p> 					สีน้ำตาลอ่อนจนถึงเทา ยก ตัวสูง ขึ้น หรือ มี ร่อง เจริญเติบโตเร็ว	ปลายก้านชูพองเป็นรูปกลม พบ secondary adhesive conidia รูปรีตรงปลายสาย รา สามารถพบ zygosporae เป็นเซลล์รูปกลม ผนัง 2 ชั้น

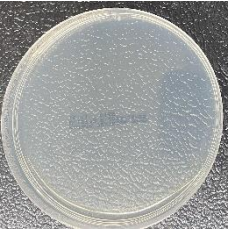
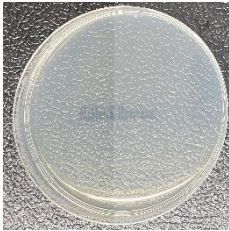
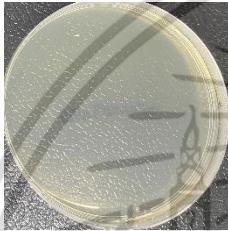




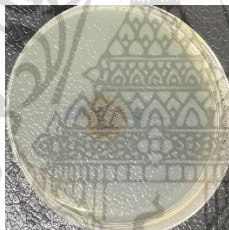
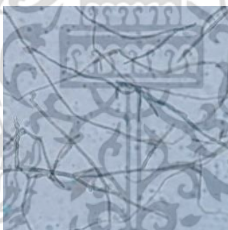

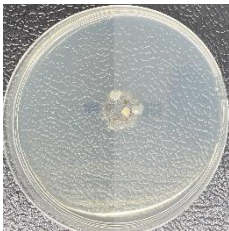


ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกล่อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกล่องจุลทรรศน์
<i>P. marneffe</i> 				contaminated	โคโลนีสีแดงถึงดำ	มีเส้นใยไฮยาลินที่มีกิ่งก้าน บางครั้งมีโคนเดียเป็นสายโซ่
<i>Phaeoacremonium</i> 				ระบุไม่ได้	สีขาว สีเหลืองหรือสีน้ำตาล สีเข้มที่ด้านหลัง	โคนเดียมีรูปร่างท่อนสั้นหรือ ทรงกลม สีน้ำตาลอ่อนถึงสี ดำ มักมีการแบ่งแยกเป็น กลุ่มเล็กๆ
<i>Scolecobasidium</i> 				no growth	เติบโตช้า และมีลักษณะ โคโลนีสีน้ำตาลถึงดำ	Conidiophores สั้น ไม่มี กิ่งก้านสาขา สีน้ำตาลหรือสี เขียว โคนเดียรูปร่างกลมรี หรือทรงกระบอกสีน้ำตาล หรือน้ำตาลอมเขียว ผิวเรียบ มีผนังกันชัดเจน





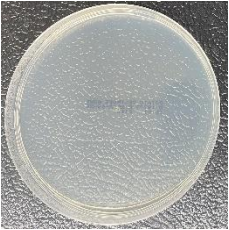
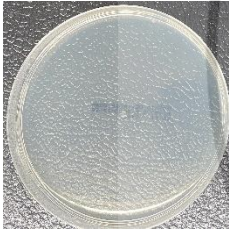





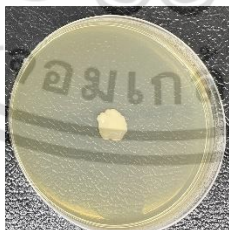
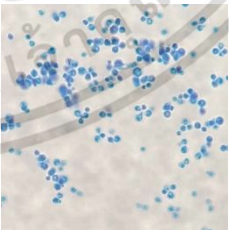
ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกล้องจุลทรรศน์
<i>T. globata</i> 					โคโลนีสีขาวครีม	โคโคนีเดียรูปร่างกลม มีขนาด เล็ก 30-60 ไมครอน
<i>Phoma</i> spp. 				no growth	มีลักษณะแบน แผ่กระจาย สีในตอนแรกจะเป็นสีขาว และต่อมากลายเป็นสีเทา มะกอกและมีสีชมพูอ่อนๆ บ้างเป็นครั้งคราว	ไมซีเลียมมีผนังกัน แตกแขนง และไม่มีสี conidiophores มีความยาว หยา และหลาย เซลล์
Dematiaceous fungi						
<i>A. niger</i> 					ผิวหน้าเป็นเม็ดเล็ก ๆ (granular) แรกมีสีขาว ต่อมาเปลี่ยนน้ำตาล ดำ ด้านหลังไม่มีสีหรือสีออก เหลือง	ก้านชูสปอร์ยาว ปลายพอง ออกเป็นรูปกระเปาะกลม phialides จะมีขึ้นเดี่ยว เมื่อ โคโลนีแก่มีสองชั้น โคโคนีเดีย รูปกลม สีน้ำตาลหรือดำ ผนัง หนาและขรุขระ




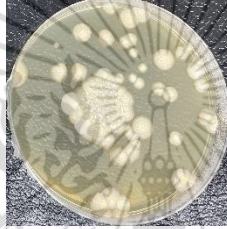


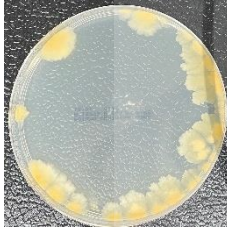

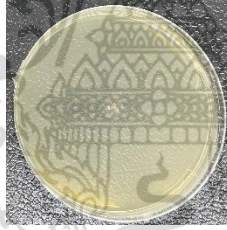


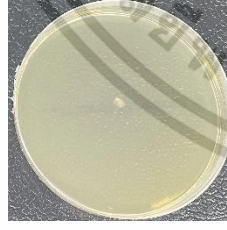

ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไต้กล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไต้กล้องจุลทรรศน์
<i>N. dimidiatum</i> 					ผิวหน้าฟู แรกขึ้นสีเทา ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีดำ ด้านหลังโคโลนีมีสีน้ำตาล หรือสีดำ	พบสายราสีน้ำตาลมีผนังกัน ผิวหยาบและ arthroconidia ต่อกันเป็นสาย อาจพบสาย ราที่ ขดเป็นเกลียวกลม เรียกว่า circular coils
<i>F. compacta</i> 				no growth	โคโลนีเติบโตช้า สีมะกอก ถึงดำมะกอก	โคินเดียมีลักษณะกลมและมี หัวที่กะทัดรัด มี phialides รูปทรงขวด
<i>F. pedrosoi</i> 					ผิวหน้าฟู อาจมีรอยย่นหรือ ริ้วมีแผ่นออกกลางโคโลนี สี ดำอมเขียว ดำน้ำตาล	พบการสร้างโคโลนีได้ 4 แบบ คือ phialophora, rhinocladiella, cladosporium และ fonsecaea










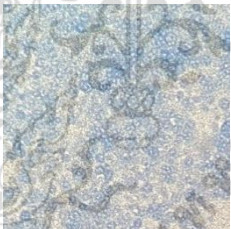
ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกล้องจุลทรรศน์
<i>C. carrionii</i> 				no growth	โคโลนีเติบโตช้า มีสีดำ	สปอร์รูปทรงวงรี มี conidiophores เป็นสายยาว มีโซ่ของโคนิเดียและผลิต phialides
<i>P. verrucosa</i> 				contaminated	โคโลนีเติบโตช้า มีสีมะกอก	มี phialides รูปแจกันที่มีคอลลาเรตรูปถ้วยน้ำตาลเข้ม Hyphae มีสีน้ำตาลรูปทรงกระบอกและผนังกันและผนังหนา hyphae ไม่สร้างโคนิเดีย
<i>P. richardsiae</i> 					โคโลนีฟู มีสีเทาออกน้ำตาล	ก้านชูโคนิเดียพบได้ 2 แบบ ก้านชูโคนิเดียไม่มีสีหรือสีน้ำตาลอ่อน ปลายเรียว โคนิเดียรูปรี ไม่มีสี ผนังบาง

ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกล้องจุลทรรศน์
<i>E. jeanselmei</i> 				no growth	โคโลนีเติบโตช้า มีสีเขียวดำ โดยส่วนใหญ่ลักษณะคล้าย ยีสต์	เส้นใยซึ่งเริ่มแรกจะมีสีใสไป จนมีสีน้ำตาลอ่อนถึงมะกอก โคนิเดียมีรูปร่างทรงรีแคบ เกาะกันเป็นกลุ่ม
<i>W. dermatitidis</i> 					เริ่มขึ้นจะเยิ้มคล้ายยีสต์ เมื่อแก่จะมีผิวเหนียวคล้าย กำมะหยี่ สีเทาอมเขียว มะกอก	พบก้านชูรูปแจกันแต่ไม่มี ขอบเป็นรูปท่อคล้ายสายรา ก้านชูผิวเรียบ สีน้ำตาลที่ ปลายมี phialoconidia รูป กลมหรือรี ผนังเรียบ
<i>M. mycetomatis</i> 				ระบุไม่ได้	โคโลนีเติบโตช้า เป็นเส้นใย มีสีขาวถึงน้ำตาลอมเหลือง	เส้นใยกว้าง มีผนังกัน และ แตกกิ่งก้าน โดยมีเซลล์ห้อย เป็นตุ่มที่ส่วนปลาย สี น้ำตาลหรือดำ

ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกล้องจุลทรรศน์
<i>Alternaria</i> spp. 				no growth	โคโลนีเติบโตอย่างรวดเร็ว มีสีดำถึงดำมะกอกหรือออก เทา	Conidiophores มีสีน้ำตาล มีผนังกันชัดเจน เส้นใยสี น้ำตาล โคนิเดียมีทั้งขนาด ใหญ่เดี่ยว และแบบกิ่งก้าน
<i>Cladosporium</i> spp. 					โคโลนีเติบโตช้า ส่วนใหญ่ เป็นสีน้ำตาลมะกอกถึง น้ำตาลดำ แต่บางครั้งก็เป็น สีเทา สีน้ำตาลอมเหลือง หรือสีน้ำตาล	เป็นสายราที่บางและยาว มี หลายสีตามสายพันธุ์และ สภาวะการเติบโต อาจเป็นสี ดำ, น้ำตาล, เทา หรือสีอื่นๆ
<i>E. werneckii</i> 				contaminated	เติบโตช้า เริ่มแรกมีเมือก คล้ายยีสต์ และมีสีดำเป็น มันเงา เมื่ออายุมากขึ้น ก็จะ พัฒนาเป็นเส้นใยและ กลายเป็นสีมะกอกเข้ม	เส้นใยมีผนังกันชัดเจน มีโค นิเดียคล้ายยีสต์ทั้งทรงกลม และทรงกระบอก

ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกล้องจุลทรรศน์
<i>S. schenckii</i> 				no growth	โคโลนีเรียบเนียนและมีรอย ย่น มีสีขาวหรือสีครีมใน ตอนแรก จากนั้นจะ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและดำ	มีโคนินเดียเกาะกันเป็นกลุ่ม เล็ก ๆ บนสายรา
<i>Nigrospora</i> 				no growth	สีของโคโลนีจะเป็นสีขาวใน ตอนแรกจากนั้นจะ กลายเป็นสีเทาและสีดำ จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ในที่สุดทั้งด้านหน้าและ ด้านหลัง	โคนินดีโอฟอร์ที่มีเม็ดสี เล็กน้อย ที่ปลายยอดโค นินเดียมีสีดำ เซลล์เดี่ยวแบน เล็กน้อย
yeast						
<i>C. neoformans</i> 					โคโลนีเมือกสีขาวครีม เป็น ทรงกลม	ไม่มีเส้นใย เป็นเซลล์ยีสต์ที่ แตกหน่อเป็นทรงกลมโดยมี แคปซูลล้อมรอบ

ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกล้อง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกล้องจุลทรรศน์
<i>C. tropicalis</i> 					ลักษณะเป็นยีสต์ สีขาวถึงสี ครีม นูน มีรอยหยัก	โคนเดี่ยวเป็นวงรี ส่วนมากเป็น สีขาวหรือเทา
<i>C. krusei</i> 				contaminated	ลักษณะเป็นยีสต์ สีขาวนวล	เป็นยีสต์รูปทรงรียาว รูปไข่
<i>Rhodotorula</i> 				ระบุไม่ได้	ส่วนมากจะมีลักษณะเป็น ยีสต์ สีส้มถึงแดง	เป็นเซลล์ยีสต์รูปร่างกลม

ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA 14วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 7 วัน	ภาพลักษณะโคโลนี บนอาหาร SDA 14 วัน	รูปไตกลิ้ง จุลทรรศน์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
					บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไตกลิ้งจุลทรรศน์
<i>Prototheca</i> spp.						
<i>Prototheca</i> spp. 				 ระบุไม่ได้	โคโลนีกลม มีลักษณะคล้าย ยีสต์	ลักษณะทรงกลมถึงรูปไข่ มีไฮยาสินมีผนังค่อนข้าง หนา
<i>P. wickerhamii</i> 					โคโลนีเรียบ ลักษณะคล้าย ยีสต์ สีขาวถึงสีครีม	โคโลนีกลมคล้ายยีสต์

4.2 ผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ SDA

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อจำนวน 46 ตัวอย่าง บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ PDA และ SDA พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA มีเชื้อที่เจริญเติบโตทั้งหมดจำนวน 34 ตัวอย่าง คิดเป็น 73.91% แบ่งเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 25 ตัวอย่าง คิดเป็น 54.35% และเชื้อที่ปนเปื้อนจำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 19.57% เชื้อที่ไม่เจริญเติบโตจำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็น 26.09% และการเพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA มีเชื้อที่เจริญเติบโตทั้งหมดจำนวน 33 ตัวอย่าง คิดเป็น 71.74% แบ่งเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 25 ตัวอย่าง คิดเป็น 54.35% และเชื้อที่ปนเปื้อนจำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 17.39% เชื้อที่ไม่เจริญเติบโตจำนวน 13 ตัวอย่าง คิดเป็น 28.26% (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 การเจริญเติบโตของเชื้อตัวอย่างบนอาหาร PDA และอาหาร SDA

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญเติบโต	จำนวนเชื้อตัวอย่าง	ร้อยละ
อาหาร PDA	เชื้อที่บริสุทธิ์	25	54.35
	เชื้อที่ปนเปื้อน	9	19.57
	เชื้อที่ไม่เจริญเติบโต	12	26.09
อาหาร SDA	เชื้อที่บริสุทธิ์	25	54.35
	เชื้อที่ปนเปื้อน	8	17.39
	เชื้อที่ไม่เจริญเติบโต	13	28.26

4.3 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อที่จัดจำแนกตามกลุ่ม

จากการจัดจำแนกเชื้อออกเป็น 5 กลุ่ม (ตารางที่ 4.1) ได้แก่ กลุ่ม Dermatophytosis มีเชื้อทั้งหมด 12 ตัวอย่าง พบว่ามีเชื้อที่เจริญเติบโตจำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 75% แบ่งออกเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 41.67% เชื้อที่เกิดการปนเปื้อนจำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 16.67% และเชื้อที่ระบุไม่ได้จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 16.67% เชื้อที่ไม่เจริญเติบโตจำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 25% กลุ่ม Non-dermatophytosis มีเชื้อทั้งหมด 13 ตัวอย่าง พบว่ามีเชื้อที่เจริญเติบโตจำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็น 84.62% แบ่งออกเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 38.46% เชื้อที่เกิดการปนเปื้อนจำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็น 30.77% และเชื้อที่ระบุไม่ได้จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 15.38% เชื้อที่ไม่เจริญเติบโตจำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 15.38% กลุ่ม Dematiaceous fungi มีเชื้อทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบว่ามีเชื้อที่เจริญเติบโตจำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 60% แบ่งออกเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็น 40% เชื้อที่เกิดการปนเปื้อนจำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 13.33%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเชื้อที่ระบุไม่ได้จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 6.67% เชื้อที่ไม่เจริญเติบโตจำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็น 40% กลุ่ม Yeast มีเชื้อทั้งหมด 4 ตัวอย่าง พบว่ามีเชื้อที่เจริญเติบโตจำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็น 100% แบ่งออกเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 50% เชื้อที่เกิดการปนเปื้อนจำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 25% และเชื้อที่ระบุไม่ได้จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 25% ไม่พบเชื้อที่ไม่เจริญเติบโต และ *Prototheca* spp. พบว่ามีเชื้อทั้งหมด 2 ตัวอย่าง พบว่ามีเชื้อที่เจริญเติบโตจำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 100% แบ่งออกเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 50% เชื้อที่ระบุไม่ได้จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 50% ไม่พบเชื้อที่เกิดการปนเปื้อนและเชื้อที่ไม่เจริญเติบโต แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 จำนวนการเจริญเติบโตของเชื้อที่จัดจำแนกตามกลุ่ม

จัดจำแนกตามกลุ่ม (n)	เชื้อบริสุทธิ์		เชื้อปนเปื้อน		เชื้อที่ไม่สามารถระบุได้		เชื้อที่ไม่เจริญเติบโต	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
Dermatophytosis (12)	5	41.67	2	16.67	2	16.67	3	25.00
Non-dermatophytosis (13)	5	38.46	4	30.77	2	15.38	2	15.38
Dematiaceous fungi (15)	6	40.00	2	13.33	1	6.67	6	40.00
Yeast (4)	2	50.00	1	25.00	1	25.00	-	-
<i>Prototheca</i> spp. (2)	1	50.00	-	-	1	50.00	-	-

4.4 ผลการศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพของเชื้อราในน้ำกลั่น

จากการทดลองการนำเชื้อราที่ถูกเก็บรักษาในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อเป็นระยะเวลา 3-10 ปี มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและคำนวณหาอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อ พบว่าเชื้อทั้งหมด 46 ตัวอย่าง มีชีวิตรอด 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 60.87% แบ่งเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 19 ตัวอย่าง คิดเป็น 41.30% และเชื้อที่เกิดการปนเปื้อน เช่น ปนเปื้อนแบคทีเรีย ปนเปื้อนเชื้อราตัวอื่น จำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 19.57% เชื้อที่ไม่สามารถระบุได้ เช่น ไม่พบลักษณะเส้นใยที่จำเพาะ จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็น 15.22% และเชื้อที่ไม่เจริญเติบโตจำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็น 23.91% ทำการจำแนกเชื้อตามระยะเวลาปีที่เก็บ ในระยะเวลา 3 ปี มีเชื้อจำนวน 2 ตัวอย่าง มีเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 100% ในระยะเวลา 4 ปี มีเชื้อจำนวน 1 ตัวอย่าง มีเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 100% ในระยะเวลา 5 ปี มีเชื้อจำนวน 2 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อที่มีชีวิตรอด คิดเป็น 0% ในระยะเวลา 6 ปี มีเชื้อจำนวน 1 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อที่มีชีวิตรอด คิดเป็น 0% ในระยะเวลา 7 ปี มีเชื้อจำนวน 14 ตัวอย่าง มีเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็น 50% ในระยะเวลา 8 ปี มีเชื้อจำนวน 22 ตัวอย่าง มีเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 40.91% ในระยะเวลา 9 ปี มีเชื้อจำนวน 3 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อที่มีชีวิตรอด คิดเป็น 0% และในระยะเวลา 10 ปี มีเชื้อจำนวน 1 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อที่มีชีวิตรอด คิดเป็น 0% แสดงตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงระยะเวลาและการมีชีวิตรอดของเชื้อราก่อโรคผิวหนังทั้ง 46 ตัวอย่าง

ระยะเวลาที่เก็บเชื้อรา	จำนวนเชื้อแต่ละปี	จำนวนเชื้อที่บริสุทธิ์	ร้อยละการเจริญ
3 ปี	2	2	100
4 ปี	1	1	100
5 ปี	2	0	0
6 ปี	1	0	0
7 ปี	14	7	50
8 ปี	22	9	40.91
9 ปี	3	0	0
10 ปี	1	0	0

4.5 อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพเชื้อราจากการเก็บรักษาเชื้อราจำนวน 46 ตัวอย่างในน้ำกลั่นเป็นระยะเวลา 3-10 ปี พบว่ามีเชื้อที่รอดชีวิตและคงลักษณะเดิมจำนวน 19 ตัวอย่าง มีเชื้อที่เกิดการปนเปื้อนจำนวน 9 ตัวอย่าง เชื้อที่ไม่สามารถระบุได้จำนวน 7 ตัวอย่าง และเชื้อที่ไม่เจริญเติบโตจำนวน 11 ตัวอย่าง ผลการวิจัยนี้คล้ายกับผลการวิจัยของ Hartung de Capriles, et al. (1989) ทำการเก็บเชื้อราในน้ำกลั่นจำนวน 594 ตัวอย่าง เป็นเวลา 1-20 ปี พบว่าเกือบทุกปี เชื้อตัวอย่างมีการเจริญมากกว่า 50% แต่ในผลการวิจัยของเราอาจมีคลาดเคลื่อนเนื่องจากเจ้าหน้าที่ของสถาบันโรคผิวหนังที่ทำกรเก็บรักษาเชื้อมีมากกว่า 1 คน ทำให้เทคนิคที่ใช้แตกต่างกัน รวมถึงสภาพแวดล้อม ณ เวลานั้นอาจแตกต่างกัน การเปลี่ยนถ่ายเชื้ออาจไม่สม่ำเสมอทำให้น้ำกลั่นในหลอดระเหยจนหมดจึงทำให้ไม่สามารถนำเชื้อกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ได้ จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราตัวอย่างบนอาหาร PDA และ SDA พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อตัวอย่างบนอาหารทั้ง 2 ชนิด ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อทำการสังเกตระยะของรัศมี สปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีความแตกต่างกัน การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร PDA ให้ผลดีกว่าบนอาหาร SDA เนื่องจากอาหาร PDA มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการสร้างเส้นใยของเชื้อรา ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang, et al. (2021) และอาหาร PDA สามารถเพิ่มการสร้างสปอร์ของเชื้อราได้ดี ทำให้เห็นลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ดียิ่งขึ้น (Devi, et al. 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพเชื้อราทั้ง 46 ตัวอย่าง การเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่น พบว่าการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 3-4 ปี เชื้อราสามารถเจริญเติบโตและคงสภาพเชื้อได้ คิดเป็น 100% โดยการสังเกตโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่ในการเก็บรักษาเชื้อราที่ 5-10 ปี เชื้อราสามารถคงสภาพและเจริญเติบโตได้ คิดเป็น 0-50% ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่นควรเก็บที่ระยะเวลาไม่เกิน 4 ปี ซึ่งจะมีประสิทธิภาพมากที่สุด การวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของเชื้อตัวอย่างบนอาหาร PDA และ SDA พบว่าเชื้อตัวอย่างมีการเจริญเติบโตและมีการสร้างสปอร์บนอาหาร PDA ได้ดีกว่าบนอาหาร SDA จากการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อตัวอย่างที่จัดจำแนกตามกลุ่มพบว่ากลุ่ม yeast และ *Prototheca* spp. มีเชื้อที่เจริญเติบโตและคงสภาพได้ดีที่สุด คิดเป็น 50% ตามด้วยกลุ่ม dermatophytosis กลุ่ม Dematiaceous fungi และ กลุ่ม non-dermatophytosis คิดเป็น 41.67%, 40% และ 38.46% ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการวิจัยนี้เชื้อตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละปีควรมีจำนวนเท่ากันและควรทำ 3 ซ้ำ เพื่อให้ผลที่ได้มีความแม่นยำมากขึ้น

5.2.2 หากต้องการให้อัตราการมีชีวิตรอดและคงสภาพเดิมของเชื้อมีประสิทธิภาพมากขึ้น ควรจะนำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาเพาะเลี้ยงและนำมาเก็บรักษาในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อใหม่ทุก 3-4 ปี

5.2.3 หากต้องการดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาควรเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยอาหาร PDA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กัญญาณัฐ ครอบงบุญ. 2561. การประเมินการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับการติดเชื้อราในเล็บที่มีสาเหตุจาก Dermatophytes และ Non Dermatophytes. เทคนิคการแพทย์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
- ธารทิพย์ ภาสบุตร, อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และ พรพิมล อธิปัญญาคม. 2552. เทคนิคการเก็บรักษา *Colletotrichum* spp. Preservation Technique for *Colletotrichum* spp. กรมวิจัยการเกษตร. 1547-1562.
- พรพรรณ ภูมิรัตน์, วิทวัส ต้นหยง และ นัฐเนศวร์ ลับเลิศลบ. 2556. เชื้อราทางการแพทย์. *Journal of Medicine and Health Sciences*. 2: 31-44.
- สุดารัตน์ ดีช่วย. 2556. เชื้อราดินและเศษซากพืชในพื้นที่ปกปักพันธุ์กรรมพืชเขื่อนรัชชประภา จ.สุราษฎร์ธานี และการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคน้ำพารา. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สมคิด คำเหลือ. 2552. การจำแนกชนิดของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ. สถาบันโรคผิวหนัง.
- Ahmed, A. A., van de Sande, W. and Fahal, A. H. 2017. Mycetoma laboratory diagnosis. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 11(8).
- Barros, M. B. D. L., de Almeida Paes, R. and Schubach, A. O. 2011. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 24: 633-654.
- Hartung de Capriles, C., Mata, S. and Middelveen, M. 1989. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*. 106: 73-79.
- Ciardo, D. E., Schar, G., Altwegg, M., Bottger, E. C. and Bosshard, P. P. 2007. Identification of moulds in the diagnostic laboratory-an algorithm implementing molecular and phenotypic methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 59: 49-60.
- Devi, K. S., Misra, D. K., Saha, J., Devi, P. S. and Sinha, B. 2018. Screening of suitable culture media for growth, cultural and morphological characters of Pycnidia forming fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7(08): 4207-4214.
- Gebala, B., and Sandle, T. 2013. Comparison of different fungal agar for the environmental monitoring of pharmaceutical-grade cleanrooms. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 67(6): 621-633.
- Kim, S. and Kim, S. J. 2016. A distribution of Keratinophilic fungi isolated from the soil of Haeundae beach in Korea. *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*. 48(4): 343-347.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kitamoto, Y., Suzuki, A., Shimada, S. and Yamanaka, K. 2002. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*. 43: 143-149.
- Kukhar, E., Samgulova, A. and Kiyan, V. 2020. Biological properties of *Phoma macrostoma* related to non-dermatophyte onychomycosis. *Medical Mycology Case Reports*. 27: 55-58
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. and Pedersen, J. 1997. PCR identification of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* dermatophytes with a random primer. *The Journal of Medical Microbiology*. 46(12): 1043-1046.
- Malik, K. A. 1992. Freeze-drying of microorganisms using a simple apparatus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8: 76-79.
- Monod, M., Bontems, O., Zaugg, C., Lechenne, B., Fratti, M. and Panizzon, R. 2006. Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *Journal of Medical Microbiology*. 55(9): 1211-1216.
- Pihet, M., Bourgeois, H., Maziere, J. Y., Berlioz-Arthaud, A., Bouchara, J. P. and Chabasse, D. 2008. Isolation of *Trichophyton concentricum* from chronic cutaneous lesions in patients from the Solomon Islands. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102(4): 389-393.
- Smith, D., and Onions, A. H. 1983. A comparison of some preservation techniques for fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. 81(3): 535-540.
- Song, S., L, M., Huang, J. E. and Liu, F. 2023. Two new species of *Scolecobasidium* Venturiales, Symptoventuriaceae associated with true mangrove plants and *S. terrestre* comb. nov. *Mycology*. 96: 113.
- Urdaneta, M. S. and Silva Lacaz, C. da S. 1965. Preservation of fungi in distilled water. Preliminary results. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*. 7(1): 24-26.
- Wang, L., Nysetvold, E., and Zhou, X. G. 2021. Culture media promoting sporulation of rice kernel smut fungus *Tilletia barclayana*. *European Journal of Plant Pathology*. 161(3): 629-635.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ส่วนประกอบและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม

ชั่งอาหาร PDA 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มโดยใช้ไฟอ่อนๆ จนอาหารละลายหมด จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Neopeptone	10	กรัม
Dextrose	40	กรัม
Agar	15	กรัม

ชั่งอาหาร SDA 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มโดยใช้ไฟอ่อนๆ จนอาหารละลายหมด จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

แบบขออนุมัติทำสหกิจศึกษา
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เรื่อง ขออนุมัติทำสหกิจศึกษา

เรียน คณะกรรมการพิจารณาโครงการทำสหกิจศึกษา

สิ่งที่ส่งมาด้วย โครงร่างโครงการพิเศษ จำนวน 1 ชุด

ข้าพเจ้า นางสาวชนิดาภา สัตตะบุรุษ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัสนักศึกษา 63050461

นางสาวชลธิชา จิตรภักดี นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัสนักศึกษา 63050464

มีความประสงค์ขอทำสหกิจศึกษา เรื่อง

(ภาษาไทย) การศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพเชื้อราจากการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่น

(ภาษาอังกฤษ) A study of duration and preservation of fungi by storing in distilled water

ดังรายละเอียดที่แนบมานี้

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติ

ขอแสดงความนับถืออย่างสูง

.....นางสาวชนิดาภา สัตตะบุรุษ

.....นางสาวชลธิชา จิตรภักดี

เสนอ คณะกรรมการพิจารณาโครงการสหกิจศึกษา

โครงร่างนี้ข้าพเจ้าได้พิจารณาแล้วเห็นชอบให้ดำเนินการได้

ลงนามอาจารย์ที่ปรึกษา.....*ศุภิสรา ทวีไธสง*.....(รศ.ดร.ศุภิสรา โพธิ์เอี่ยม)

ลงนามอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*[Signature]*.....(นางสาวกัญญาณัฐ ครองบุญ)

ลงนามอาจารย์นิเทศ.....*[Signature]*.....(รศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

แบบเสนอโครงร่างสหกิจศึกษา ปีการศึกษา 2566

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพเชื้อราจากการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่น
(ภาษาอังกฤษ) A study of duration and preservation of fungi by storing in distilled water

2. เสนอโดย

นางสาวชนิดาภา สัตตะบุรุษ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัสนักศึกษา 63050461

นางสาวชลธิชา จิตรภักดี นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัสนักศึกษา 63050464

3. อาจารย์ที่ปรึกษา

รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

4. ความสำคัญ/ที่มาของสหกิจศึกษา

เชื้อราคือจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถก่อโรคได้ สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งสิ่งแวดล้อม อากาศ น้ำ ดิน รวมทั้งคนและสัตว์ โดยโรคที่เกิดจากเชื้อราเรียกว่าโรคเชื้อรา (Mycosis หรือ Fungal infection) กลุ่มโรคเชื้อราที่พบบ่อย ได้แก่ โรคเกลื้อน (Pityriasis versicolor) โรคปมราดำ (Black Piedra) โรคปมราขาว (White Piedra) โรคกลาก (dermatophytosis, ring worm, tinea) เป็นต้น

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์มีหลักการสำคัญ คือ การหยุดหรือลดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการควบคุมปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญ เชื้อต้องมีชีวิตอยู่รอดมากที่สุด มีลักษณะเหมือนเดิมที่สุดและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม การเก็บรักษารามีหลายวิธี เช่น การเก็บโดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บในน้ำมัน เก็บในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เก็บในสภาพแห้ง เก็บในกลีเซอรอล เป็นต้น การเก็บรักษาและคงสภาพเชื้อราในน้ำกลั่น เป็นวิธีการที่ง่าย ใช้เวลาน้อยและประหยัดงบประมาณกว่าวิธีอื่นๆ ที่ผ่านมามีการวิจัยเกี่ยวกับการเก็บรักษาเชื้อรามากมาย แต่ยังไม่มีการวิจัยไหนที่บ่งชี้ได้แน่ชัดถึงระยะเวลาการเก็บรักษาและการคงสภาพของเชื้อราในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ทำให้ทางสถาบันโรคผิวหนังที่ทำการเก็บรักษาและคงสภาพเชื้อราด้วยวิธีการนี้ต้องนำเชื้อรามานำเพาะเลี้ยงบ่อยครั้ง

ดังนั้นหัวข้อสหกิจศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่ทำการศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพเชื้อราจากการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ โดยองค์ความรู้ใหม่ที่ได้ สามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้เพื่อประโยชน์ขององค์กร และแก้ปัญหาเชื้อราที่กลายพันธุ์ ไม่คงลักษณะเดิมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. วัตถุประสงค์ของสหกิจศึกษา

- 1) เพื่อศึกษาระยะเวลาและการคงสภาพของเชื้อราจากการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่น
- 2) เพื่อเก็บรักษาเชื้อราให้มีชีวิตรอดในระยะเวลาที่ยาวนาน โดยยังคงความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อน และคงลักษณะเดิมมากที่สุด
- 3) เพื่อเก็บตัวอย่างไว้ใช้เป็นสื่อการสอนและเป็นแหล่งให้เชื้อรากับสถาบันอื่น

6. ขอบเขตของสหกิจศึกษา

- 1) บ่งชี้และเพาะเลี้ยงเชื้อราทางโรคผิวหนัง
- 2) ศึกษาระยะเวลาของเชื้อราที่ถูกเก็บในน้ำกลั่น โดยเชื้อรานั้นยังคงสภาพเดิม

7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้ทราบถึงวิธีการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่นที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม
- 2) สามารถเก็บเชื้อให้มีชีวิตรอดอยู่ได้เป็นระยะเวลาที่ยาวนาน
- 3) สามารถนำมาใช้หรือนำมาศึกษาต่อโดยยังคงความบริสุทธิ์ ปราศจากการปนเปื้อน เพื่อเป็นประโยชน์ในด้านเป็นแหล่งข้อมูลแก่ผู้อื่นต่อไป

8. ขั้นตอนในการดำเนินงาน

8.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างโดยการขูดบริเวณที่มีความผิดปกติ ให้ได้ปริมาณอย่างน้อย 10 mg จากนั้นแบ่งตัวอย่างที่ได้ออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน ซึ่งตัวอย่างส่วนที่ 1 ใช้สำหรับ KOH preparation ส่วนที่ 2 ใช้สำหรับการเพาะเชื้อ และส่วนที่ 3 ใช้สำหรับการทดสอบ ITS-PCR

8.2 KOH Preparation

นำตัวอย่างวางบนสไลด์ จากนั้นหยด 30% KOH จำนวน 2 หยด ทำการผสมตัวอย่างกับ 30% KOH นำสไลด์ดังกล่าวผ่านเปลวไฟ 2-3 วินาที จากนั้นทำการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10x และ 40x ทำการบันทึกลักษณะที่พบลงในแบบบันทึก

8.3 การเพาะเชื้อ

สำหรับสิ่งส่งตรวจจากผิวหนัง ผม นำตัวอย่างมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabourauds dextrose agar (SDA) with chloramphenicol and cycloheximide 1 ขวด สำหรับสิ่งส่งตรวจจากเล็บนำตัวอย่างมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabourauds dextrose agar (SDA) with chloramphenicol and cycloheximide 1 ขวดและชนิด Sabourauds dextrose agar (SDA) with chloramphenicol 3 ขวด จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการสังเกตการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.4 ITS-PCR

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยชุด kit (GenUp gDNA extraction kit) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปแยกใน 2% agarose gel ใน 0.5X Tris-borate-EDTA (TBE) ด้วยวิธี gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นทำการย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide (1 µg/ml) ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นสังเกตภายใต้แสง Ultraviolet ด้วยเครื่อง BioSens SC 810 Gel documentation system (TecDev, Switzerland) เปรียบเทียบขนาดของแถบ DNA กับ Low molecular weight DNA ladder (New England Biolabs, England)

8.5 ITS1 sequencing

นำ ITS1 DNA ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบส ทำการเปรียบเทียบ DNA sequence กับฐานข้อมูล GENBANK ด้วย BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และระบุชนิดเชื้อที่ได้จากฐานข้อมูลที่มีโดยมีค่า similarity ไม่น้อยกว่า 95%

8.6 การเก็บเชื้อในน้ำกลั่น

ปิเปตน้ำกลั่นใส่ลงในหลอดแก้ว 10 มิลลิลิตร แล้วปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากเอาออกจาก autoclave นำมาตั้งทิ้งไว้ให้น้ำกลั่นหายร้อน จากนั้นเชื้อตัวอย่างที่ทำการเพาะไว้บนอาหาร SDA ลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยวิธีการ aseptic technique

8.7 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำเชื้อที่ถูกเก็บไว้ในน้ำกลั่นมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และอาหาร SDA บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกผลวันที่ 7 และ 14 เพื่อสังเกตลักษณะโคโลนี (Macroscopic examination) และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) บันทึกภาพโคโลนีและสายราใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพื่อดูการเจริญเติบโต เก็บข้อมูลปีที่ทำการเก็บเชื้อในน้ำกลั่นและผลการปนเปื้อนของเชื้อจากวิธีการเก็บดังกล่าวในตารางบันทึกผล และนำมาวิเคราะห์ผลการมีชีวิตอยู่ และร้อยละการปนเปื้อนตามระยะเวลาของการเก็บต่างๆด้วยสถิติจำนวนและร้อยละ

9. เอกสารอ้างอิง

กัญญาณัฐ ครอบบุญ. 2561. การประเมินการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับการติดเชื้อราในเล็บที่มีสาเหตุจาก Dermatophytes และ Non Dermatophytes. เทคนิคการแพทย์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ธารทิพย์ ภาสบุตร, อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และ พรพิมล อธิปัญญาคม. 2552. เทคนิคการเก็บรักษา *Colletotrichum* spp. Preservation Technique for *Colletotrichum* spp.. กรมวิจัยการเกษตร. 1547-1562.

พรพรรณ ภูมิตร์, วิทวัส ตันหยง และ นัฐเนศวร์ ลับเลิศลพ. 2556. เชื้อราทางการแพทย์. *Journal of Medicine and Health Sciences*. 2:31-44.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมคิด คำเหลือ. 2552. การจำแนกชนิดของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ. สถาบันโรคผิวหนัง

Ciardo DE, Schar G, Altwegg M, Bottger EC, Bosshard PP. Identification of moulds in the diagnostic laboratory-an algorithm implementing molecular and phenotypic methods. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2007; 59: 49-60.

Monod M, Bontems O, Zaugg C, Lechenne B, Fratti M, Panizzon R. Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *J Med Microbiol.* 2006;55(9):1211-6.

10. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสหกิจศึกษา

1. หลอดทดลองมีฝาปิด
2. น้ำกลั่น
3. needle
4. เครื่องเผาloop (Loop sterilizer)
5. Autopipette
6. Dropper sterile
7. สไลด์และแผ่นปิดสไลด์
8. Vernier Calipers
9. ปากกาเขียนเครื่องแก้ว
10. แอลกอฮอล์ 95%
11. ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet Class II)
12. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
13. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
14. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
15. ตู้เย็น 4-8 องศาเซลเซียส
16. กล้องจุลทรรศน์
17. สีย้อม lactophenol cotton blue

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)
2. Sabouraud dextrose agar (SDA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้