

การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราสำหรับการเรียนการสอนทางห้องปฏิบัติการ

กิตติพันธ์ เสมอพิทักษ์, อรัญญา คงถาวร, กฤษณา ตรีการไทย, กัญญลักษณ์ ชัยคำภา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

Development of Fungal Media for using in Laboratory Learning

Kittipan Samerpitak, Aranya Kongthaworn, Krissana Trakarathai, Kunyaluk Chaicumpar

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 40002

หลักการและเหตุผล: เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการมีราคาแพง โดยธรรมชาติของเชื้อราที่เจริญเติบโตได้ง่ายร่วมกับผลผลิตทางการเกษตรที่หลากหลายของประเทศ ก่อให้เกิดความเป็นไปได้ในการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อราที่มีราคาถูกกว่าสำหรับใช้ในการเรียนการสอน

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดใหม่สำหรับใช้ในการเรียนการสอนทางห้องปฏิบัติการ

วิธีการ: ทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อราสายที่ใช้ในการเรียนการสอนบนอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบทางการเกษตร ได้แก่ มันเทศ ฟักทอง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วแดง จากนั้นคัดเลือกวัตถุดิบที่ให้ผลการเจริญของเชื้อราดีที่สุดโดยเปรียบเทียบจากการเจริญเติบโตทางสถิติด้วย Paired t-test แล้วนำมาพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราโดยเปรียบเทียบกับอาหารที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดลอง: จากวัตถุดิบที่ทดสอบสามารถนำมาพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราได้ 4 สูตร คือ รุ้นฟักทองน้ำตาลทราย (PKSA) รุ้นฟักทองเด็กโทรส (PKDA) รุ้นถั่วแดงฟักทองน้ำตาลทราย (RPSA) และรุ้นถั่วแดงฟักทองเด็กโทรส (RPDA) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการเจริญของเชื้อรา 7 ชนิด กับอาหารรุ้นมันฝรั่งเด็กโทรส (Potato dextrose agar, PDA) พบว่าอาหารทั้ง 4 สูตรให้ผลดีกว่าในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา 4 ชนิด ให้ผลไม่ต่างกันในเชื้อรา 1 ชนิด และให้ผลน้อยกว่า PDA ในเชื้อรา 2 ชนิด ($p < 0.05$)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง: แม้อาหารที่พัฒนาขึ้นมา ยังไม่สามารถใช้ทดแทนได้ PDA ได้เต็มที่ แต่ก็ให้ผลในระดับที่น่าพอใจ สามารถนำไปใช้ได้เนื่องจากต้นทุนที่ถูกกว่า และโดยเฉพาะข้อดีที่ทำให้การเจริญของเชื้อบางชนิดง่ายต่อการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษา อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการปรับปรุงขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตรต่างๆ เหล่านี้ให้

Background: Because common fungal media used in laboratory learning are expensive, and the nature of fungi in easily growing and the plenty of agricultural products in our country, can make it be possible to perform the experiment to prove the hypothesis and develop the cheaper media.

Objective: To develop the new fungal media for laboratory learning.

Methods: Cultivate molds in the media each prepared from sweet potato, pumpkin, soy bean, mung bean and red bean, then select the one that yields the best fungal growth to develop the media formular for assessment of fungal growth comparing to the standard media.

Results: Four formulae of the new fungal media containing pumpkin sucrose agar (PKSA), pumpkin dextrose agar PKDA), red bean-pumpkin sucrose agar (RPSA), red bean-pumpkin dextrose agar (RPDA), were developed and tested to cultivate 7 molds compared with those of potato dextrose agar (PDA). Four species showed better growth in the 4 formulae and 2 species showed better growth in PDA, while 1 species showed no difference among all media ($p < 0.05$)

Discussion and conclusion: Though the four developed fungal media cannot absolutely defeat PDA, their lower costs could be accepted. Furthermore, some characters appearing on developed media revealed more advantage of specimens-preparation. However, the preparation method of these media have to be further improved for routine performing.

Key word : fungal media, microbiological media, laboratory learning

สะดวกต่อการปฏิบัติงานต่อไป

คำสำคัญ: อาหารเลี้ยงเชื้อรา, อาหารเลี้ยงเชื้อทางจุลชีววิทยา, การเรียนการสอนทางห้องปฏิบัติการ

ศรีนครินทร์เวชสาร 2550; 22(4): 394-400 • Srinagarind Med J 2007; 22(4): 394-400

บทนำ

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการเรียนการสอนทั่วไป เช่น อาหารวุ้นมันฝรั่งเด็กโทรส (Potato dextrose agar, PDA), Sabouraud dextrose agar (SDA), Malt extract agar, Lactose-yeast extract agar ฯลฯ เหล่านี้ล้วนแต่มีราคาแพง ซึ่งในการเรียนการสอนปฏิบัติการในส่วนของวิทยาเชื้อราจะมุ่งเน้นการศึกษารูปร่างโครงสร้างของเชื้อราเป็นหลัก ไม่ได้เน้นการศึกษาวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมีหรือการวิเคราะห์ทางเคมีเหมือนแบคทีเรีย ไม่มีความจำเป็นต้องใช้สารที่เป็นส่วนประกอบของอาหารที่มีโครงสร้าง และส่วนประกอบทางเคมีชัดเจนในระดับวิเคราะห์อย่างที่ใช้ทั่วไป การพยายามลดค่าใช้จ่ายในการเรียนการสอนด้านนี้โดยใช้สารที่ราคาถูกกว่าแต่ให้ผลที่ไม่ต่างกัน สามารถนำมาใช้เตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราหรือทดแทนอาหารที่ใช้ประจำที่มีราคาแพง จึงเป็นสิ่งที่ควรพิจารณา มีรายงานการประยุกต์ใช้วุ้นทำขนมตามท้องตลาดซึ่งราคาถูกกว่ามาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรียพบว่าอาหารดังกล่าวให้ผลการเพาะเลี้ยงได้เป็นที่น่าพอใจไม่แตกต่างจากวุ้นราคาแพงที่ใช้ในงานประจำ^{1,2}

จากความรู้พื้นฐานที่เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ง่าย เนื่องจากเป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer) ที่สำคัญของห่วงโซ่อาหาร มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด³⁻⁸ ทำให้สามารถใช้วัตถุดิบในธรรมชาติได้หลากหลาย แม้กระทั่งเซลลูโลส เชื้อราก็ใช้เป็นแหล่งอาหารได้ดี ดังนั้นวัตถุดิบพืชที่ประเทศไทยผลิตได้เป็นจำนวนมาก เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด พืชผักผลไม้ รวมทั้งถั่วต่างๆ หรือผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น แป้งมัน แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว น้ำตาลทราย ฯลฯ เชื้อราก็น่าจะใช้ในการเจริญเติบโตให้โครงสร้างและรูปร่างที่สมบูรณ์ได้ดี และที่สำคัญได้มีการพัฒนาใช้วัตถุดิบเหล่านี้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราแล้ว แต่เพื่อวัตถุประสงค์เฉพาะทาง เช่น Corn meal agar หรือ Glutinous rice tween agar ซึ่งมีส่วนประกอบจากแป้งข้าวโพดและแป้งข้าวเหนียว ตามลำดับ ใช้ในการกระตุ้นการสร้าง chlamydo-spore ของ *Candida albicans*^{3,4,9,10}

วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้ เพื่อหาวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรในประเทศ ซึ่งได้แก่ มันเทศ, ฟักทอง ถั่วเหลือง ถั่วแดง ถั่วเขียวปอกเปลือก ถั่วเขียว และ

น้ำตาลทราย จากนั้นคัดเลือกวัตถุดิบที่ศักยภาพสูงสุดสำหรับนำมาพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราเพื่อใช้ทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อราสำเร็จรูปที่ใช้ในการเรียนการสอน

วิธีการทดลอง

เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อราสาย 10 ชนิด ประกอบด้วย *Aspergillus niger* 2 สายพันธุ์ *Aspergillus flavus* 1 สายพันธุ์ *Aspergillus fumigatus* 2 สายพันธุ์ *Penicillium sp.* 1 สายพันธุ์ *Rhizopus sp.* 2 สายพันธุ์ *Cladosporium sp.* 2 สายพันธุ์ *Trichophyton rubrum* 1 สายพันธุ์ *Trichophyton mentagrophytes* 2 สายพันธุ์ *Microsporium gypseum* 2 สายพันธุ์ *Epidermophyton floccosum* 2 สายพันธุ์

การทดลองที่ 1 การทดสอบหาวัตถุดิบทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา

การเตรียมเชื้อสำหรับใช้ทดสอบการเจริญเติบโตในอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบทางการเกษตร

เตรียมเชื้อราสายทั้ง 17 สายพันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงบนจานอาหารวุ้นมันฝรั่ง (Potato dextrose agar, PDA ตรา Difco) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์ ซึ่งจะใช้เป็นส่วนของเพาะเลี้ยงบนอาหาร (inoculum) สำหรับเชื้อราสายชนิดที่สร้างสปอร์น้อย จะเตรียม inoculum โดยใช้ท่อสเตนเลส เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร เจาะวุ้นบริเวณขอบของโคโลนีให้ได้เป็นชั้นวุ้นรูปทรงกระบอกที่มีสายราอยู่บนผิวหน้า และ/หรือภายในเนื้อวุ้น

การเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบทางการเกษตร

นำเข็มเย็บเชื้อราแตะ inoculum ซึ่งเป็นสปอร์ หรือชั้นวุ้นจากโคโลนีของราสายทั้ง 17 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA plate และอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบทางการเกษตร 6 ชนิด คือ อาหารวุ้นมันเทศ (Sweet potato Agar SPA : 20%W/V มันเทศ 1.5% วุ้นทำขนมตราโทรสค์พท์) อาหารวุ้นฟักทอง (Pumpkin agar, PA : 20%W/V ฟักทอง 1.5% วุ้นทำขนมตราโทรสค์พท์) อาหารวุ้นถั่วเหลือง (Soy bean agar, SBA)(20%W/V ถั่วเหลือง 1.5% วุ้นทำขนมตราโทรสค์พท์) อาหารวุ้นถั่วแดง

(Red bean agar, RBA : 20%W/W ถั่วแดง, 1.5% วุ้นทำขนม ตราโทรศัพท์), อาหารวุ้นถั่วเขียว (Mung bean agar 1, MBA1 : 20%W/W ถั่วเขียวมีเปลือก 1.5% วุ้นทำขนมตราโทรศัพท์) อาหารวุ้นถั่วเขียวปอกเปลือก (Mung bean agar 2, MBA2 : 20%W/W ถั่วเขียวปอกเปลือก 1.5% วุ้นทำขนมตราโทรศัพท์) โดยใช้เทคนิค point inoculation ซึ่งจะวางหรือแตะ inoculum ลงตรงกลางจานอาหาร และการเพาะเลี้ยงเชื้อราในการ ทดลองจะใช้จำนวนอาหารชนิดละ 5 จานสำหรับเลี้ยงเชื้อรา 1 สายพันธุ์ จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบทางการเกษตร

โดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาย แต่ละชนิด ตามระยะเวลาที่กำหนด คำนวณหาค่าเฉลี่ยจาก อาหารทั้ง 5 จาน แล้วเปรียบเทียบขนาดของโคโลนีระหว่าง อาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบทางการเกษตรแต่ละชนิด กับ อาหาร PDA ซึ่งการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทาง สถิติใช้การทดสอบ Paired t-test และกำหนดการปฏิเสธ สมมุติฐานที่ $p < 0.05$

ใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจดูลักษณะจุลสังฐานที่ใช้ในการ ระบุราสายแต่ละชนิด เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของเชื้อรา ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบทางการ เกษตร กับอาหาร PDA โดยดูลักษณะสายรา และลักษณะ การสร้างสปอร์ จากตัวอย่างราสายแต่ละชนิดที่เตรียม โดยวิธี Tease mount technique หรือ Slide culture technique แล้ว ย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue^{4,11,12}

การทดลองที่ 2 การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราจาก วัตถุดิบที่ผ่านการคัดเลือก

นำวัตถุดิบทางการเกษตรที่ผ่านการคัดเลือกจากการ ทดลองที่ 1 มาพัฒนาสูตรเพื่อเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา แล้วนำมาทดสอบโดยเพาะเลี้ยงเชื้อราสาย 7 ชนิด คือ *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypseum* และ *Epidermophyton floccosum* เปรียบเทียบกับอาหาร PDA โดย การเพาะเลี้ยงจะใช้อาหาร 5 จานต่อเชื้อรา 1 ชนิด จากนั้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วบันทึกผลเปรียบเทียบ การเจริญเติบโตของเชื้อราโดยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลอง ที่ 1

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การทดสอบหาวัตถุดิบทางการเกษตร เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของขนาดค่า

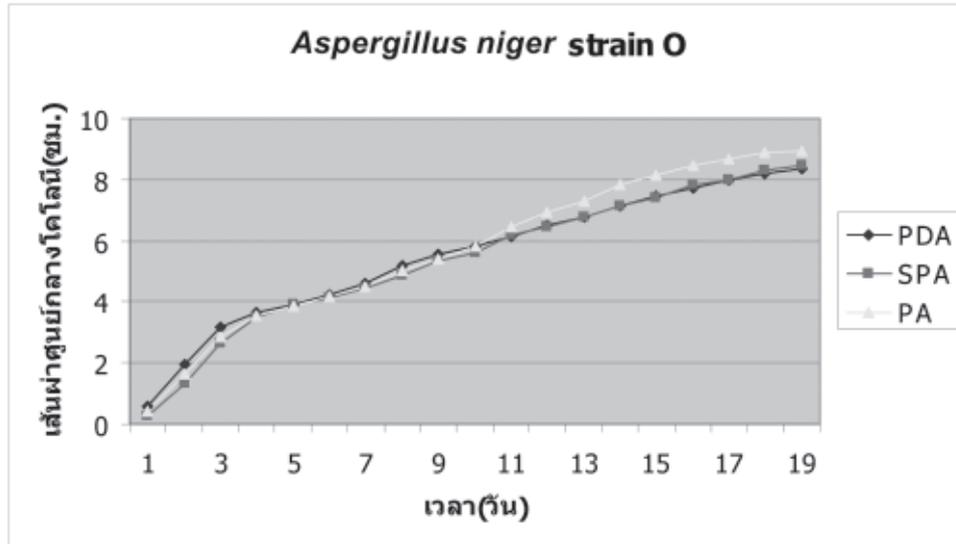
เฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของราสาย 17 สายพันธุ์ที่เลี้ยง บนอาหาร PDA และอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบทางการเกษตร โดย Paired t-test สำหรับกลุ่มอาหารที่ส่วนประกอบหลัก เป็นคาร์โบไฮเดรตคือ อาหารวุ้นมันเทศ (SPA) และอาหาร วุ้นฟักทอง (PA) พบว่า 9 สายพันธุ์ เติบโตบนอาหาร PDA ได้ ดีกว่าทั้งอาหาร SPA และ PA ส่วนที่เหลือพบว่า มี 6 สาย พันธุ์เติบโตบนอาหารทั้งสองชนิดได้ดีกว่า PDA ซึ่งในกลุ่มนี้ 5 สายพันธุ์คือ *A. niger* strain N และ O (รูปที่ 1) *A. fumigatus* strain O, *Penicillium sp.* strain O และ *T. rubrum* strain O เติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PA ส่วนอีก 1 สายพันธุ์ คือ *A. fumigatus* strain N เติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร SPA และ ยัง พบว่า *A. flavus* เติบโตบนอาหาร PA ได้ดีเท่าๆ กับบนอาหาร PDA (ตารางที่ 1) ส่วนลักษณะจุลสังฐานวิทยาที่เกี่ยวข้อง กับการระบุเชื้อราทั้ง 17 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารทั้ง PDA, SPA และ PA ให้ลักษณะโดยรวมที่ไม่แตกต่างกัน

ส่วนการทดสอบการเติบโตของเชื้อราสาย ในอาหารวุ้นที่ เตรียมจากวัตถุดิบทางการเกษตรกลุ่มที่มีโปรตีนสูง ได้แก่ เมล็ดถั่ว 4 ชนิด คือ อาหารวุ้นถั่วเหลือง (SBA) อาหารวุ้นถั่ว แดง (RBA) อาหารวุ้นถั่วเขียว (MBA1) และอาหารวุ้นถั่วเขียว ปอกเปลือก (MBA2) เมื่อเปรียบเทียบขนาดค่าเฉลี่ยเส้นผ่า ศูนย์กลางโคโลนีของราสายทั้ง 17 สายพันธุ์ กับที่ได้จากอาหาร PDA ได้พบว่า 10 สายพันธุ์ เติบโตบนอาหาร PDA ได้ดีที่สุด มีเฉพาะ 1 สายพันธุ์ คือ *Penicillium sp.* strain O ที่เติบโต บนอาหารวุ้นถั่วทั้ง 4 ชนิดได้ดีกว่าบน PDA ส่วนอีก 3 สาย พันธุ์คือ *A. flavus* strain O และ *A. niger* strain N และ O เติบโตบนอาหารวุ้นจากถั่วทุกชนิดได้ไม่แตกต่างจาก PDA และอีก 3 สายพันธุ์ คือ *A. fumigatus* strain N, *T. rubrum* และ *M. gypseum* strain N ที่เจริญบนอาหารถั่วบางชนิดได้ไม่ แตกต่างจาก PDA (ตารางที่ 1)

ส่วนลักษณะจุลสังฐานวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการระบุ เชื้อราทั้ง 17 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร วุ้นถั่วทั้ง 4 ชนิด โดยเฉพาะวุ้นถั่วแดงพบแนวโน้มการสร้าง macroconidia ใน *T. rubrum* ได้ดี

การทดลองที่ 2 การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา จาก วัตถุดิบที่ผ่านการคัดเลือก

วัตถุดิบที่ผ่านการคัดเลือกเพื่อพัฒนาสูตรอาหาร ได้แก่ ฟักทอง ถั่วแดง ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้ใช้ฟักทองเป็นหลักใน การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา โดยใช้ทั้งเดี่ยวๆ และใช้ ผสมกับถั่วแดง พร้อมทั้งเพิ่มแหล่งคาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำตาล ททราย (ซูโครส) กับน้ำตาลเด็กโทรส และใช้วุ้นทำขนมตาม ท้องตลาด นำมาเตรียมเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา 4 ชนิด (รูปที่ 2) ได้แก่ อาหารวุ้นถั่วแดงฟักทองน้ำตาลทราย (Red



รูปที่ 1 ตัวอย่างกราฟเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *A. niger* strain O บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA), Pumpkin agar (PA) และ Sweet potato agar (SPA) โดยผลที่ได้พบว่า PA>SPA>PDA (Paired t-test, p<0.05)

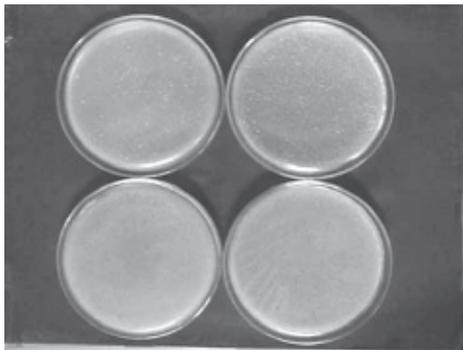
ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการเจริญเติบโตของเชื้อราสาย 17 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ (Paired t-test, p<0.05)

เชื้อรา	บนอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต	บนอาหารกลุ่มถั่วต่างๆ
<i>Aspergillus niger</i> O	PA>SPA>PDA	All=PDA
<i>A. niger</i> N	PA>SPA>PDA	All=PDA
<i>A. flavus</i> O	PA=PDA>SPA	All=PDA
<i>A. fumigatus</i> O	PA>SPA>PDA	PDA>All
<i>A. fumigatus</i> N	SPA>PA>PDA	MBA2,RBA=PDA>MDA1,SBA
<i>Penicillium</i> sp.	PA>SPA=PDA	All>PDA
<i>Rhizopus</i> sp. O	PDA>SPA=PA	PDA>All
<i>Rhizopus</i> sp. N	PDA>SPA>PA	PDA>All
<i>Cladosporium</i> sp. O	PDA>PA>SPA	PDA>All
<i>Cladosporium</i> sp. N	PDA>PA>SPA	PDA>All
<i>Trichophyton rubrum</i>	PA>PDA>SPA	MBA1,MBA2=PDA>SBA,RBA
<i>T. mentagrophytes</i> O	PDA>SPA>PA	PDA>All
<i>T. mentagrophytes</i> N	PDA>PA>SPA	PDA>All
<i>Microsporium gymseum</i> O	PDA>PA>SPA	PDA>All
<i>M. gypseum</i> N	PDA>PA>SPA	SBA,MBA1,MBA2=PDA>RBA
<i>Epidermophyton floccosum</i> O	PDA>PA>SPA	PDA>All
<i>E. floccosum</i> N	PDA>PA>SPA	PDA>All

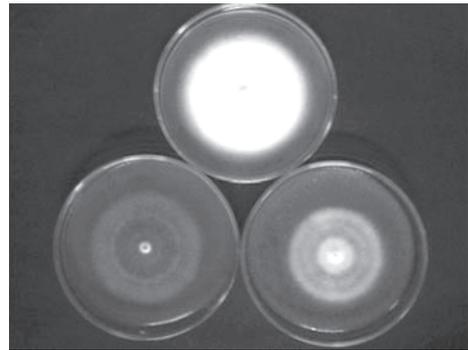
PDA;Potato dextrose agar, PA;Pumpkin agar, SPA;Sweet potato agar, MBA;Mung bean agar, RBA;Red bean agar, SBA; Soy bean agar, = ; no significant difference, > or < ; more or less significant difference

bean-pumpkin sucrose agar, RPSA) อาหารวุ้นถั่วแดงฟักทอง เด็กโทรส (Red bean-pumpkin dextrose agar, RPDA) อาหารวุ้นฟักทองน้ำตาลทราย (Pumpkin sucrose agar, PKSA) และอาหารวุ้นฟักทองเด็กโทรส (Pumpkin dextrose agar, PKDA) โดยลักษณะของอาหารที่เตรียมได้มีลักษณะทั่วไปที่ใกล้เคียงกับอาหาร PDA โดยเฉพาะอาหาร PKSA) และอาหาร PKDA ผลการทดลองเมื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อพบว่า 2 สายพันธุ์ คือ *E. floccosum* strain O (รูปที่ 3) และ *M. gypseum* strain O เติบโตได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้น PDA อีก 4 สายพันธุ์เติบโตได้

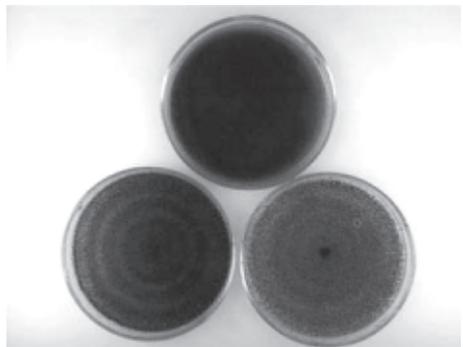
ดีในอาหารอื่นโดย *A. niger* strain O เติบโตได้ดีบนอาหารวุ้น RPDA และ PKDA (รูปที่ 4), *Penicillium sp.* strain O (รูปที่ 5) และ *Cladosporium sp.* strain O (รูปที่ 6) เติบโตได้ดีบนอาหารวุ้น PKSA และ *T. rubrum* strain O เติบโตได้ดีบนอาหารวุ้น RPSA ส่วน *Rhizopus sp.* strain O เติบโตได้ไม่ต่างกันในอาหารทั้ง 5 ชนิด (ตารางที่ 2) ส่วนลักษณะจุลสัณฐานวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการระบุเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นทั้ง 5 ชนิด



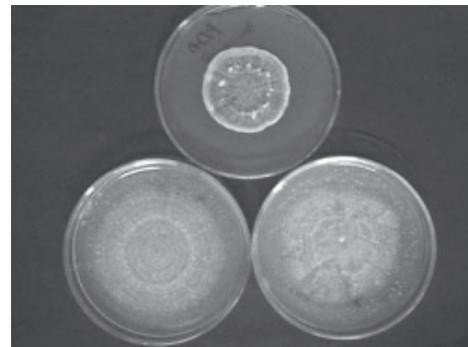
รูปที่ 2 ลักษณะอาหาร PKDA (บนซ้าย), PKSA (บนขวา) RPDA (ล่างซ้าย) RPSA (ล่างขวา)



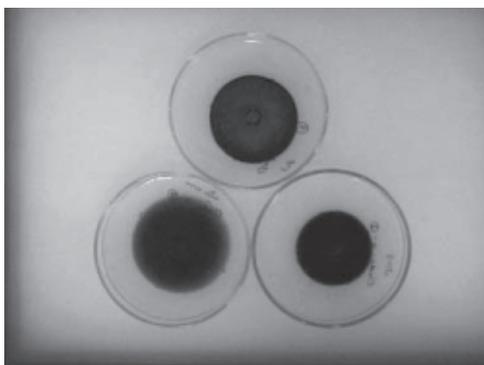
รูปที่ 3 โคโลนีของ *E. floccosum* บนอาหาร PDA (บน), RPSA (ล่างซ้าย) และ RPDA (ล่างขวา)



รูปที่ 4 โคโลนีของ *A. niger* บนอาหาร PDA (บน), RPSA (ล่างซ้าย) และ RPDA (ล่างขวา)



รูปที่ 5 โคโลนีของ *Penicillium sp.* บนอาหาร PDA (บน), PKSA (ล่างซ้าย) และ PKDA (ล่างขวา)



รูปที่ 6 โคโลนีของ *Cladosporium sp.* บนอาหาร PDA (บน) PKSA (ล่างซ้าย) และ PKDA (ล่างขวา)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการเจริญเติบโตของเชื้อราสาย 7 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ (Paired t-test, $p < 0.05$)

เชื้อรา	ผลการเจริญบนอาหารสูตรต่างๆ
<i>Aspergillus niger</i> O	RPDA=PKDA>RPSA=PKSA>PDA
<i>Penicillium</i> sp.	PKSA>PKDA>PDA>RPSA>RPDA
<i>Rhizopus</i> sp.O	RPSA=RPDA=PDA=PKSA=PKDA
<i>Cladosporium</i> sp. O	PKSA>PKDA=PDA=RPSA=RPDA
<i>Trichophyton rubrum</i> O	RPSA>PDA=RPDA=PKDA>PKSA
<i>Microsporium gypseum</i> O	PDA>RPSA=RPDA>PKSA=PKDA
<i>Epidermophyton floccusum</i> O	PDA>RPSA=RPDA>PKDA>PKSA

PDA;Potato dextrose agar, RPDA;Red bean-pumpkin dextrose agar, RPSA;Red bean-pumpkin sucrose agar, PKDA;Pumpkin dextrose agar, PKSA;Pumpkin sucrose agar,

=; no significant difference, > or < ; more or less significant difference

วิจารณ์

ในการทดสอบหาว่าวัตถุดิบทางการเกษตรเพื่อใช้ในการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา พบว่าทั้งฟักทอง มันเทศและถั่วทั้ง 4 ชนิด ต่างก็มีสารอาหารที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้เป็นที่น่าพอใจ แม้ว่าแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อรา ซึ่งเชื้อราแต่ละชนิดที่นำมาใช้ทดสอบก็มีธรรมชาติในการชอบสารอาหารที่ต่างกัน เชื้อราในกลุ่มที่ชอบคาร์โบไฮเดรตเช่น *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*^{4,5,6,7} มีแนวโน้มที่เติบโตได้ดีในอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบทั้ง 6 ชนิด ในขณะที่เชื้อราพวกที่ชอบโปรตีน เช่น dermatophytes^{3,5,9} ทั้ง *Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton* ก็มีแนวโน้มที่จะเติบโตได้น้อยกว่าในอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบดังกล่าว อย่างไรก็ตามในกลุ่มวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักฟักทองให้การเจริญเติบโตที่น่าพอใจกับเชื้อราที่ทดสอบ ส่วนกลุ่มของถั่วจะให้ผลที่ใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกันที่โครงสร้างสำคัญที่ใช้ในการระบุชนิดของเชื้อราทั้งหมดที่ใช้ทดสอบไม่พบความแตกต่างจากที่เลี้ยงบนอาหารPDAแต่ที่น่าสนใจคืออาหารที่เตรียมจากถั่วแดงมีแนวโน้มที่จะพบการสร้าง macroconidia ของ *Trichophyton rubrum* ซึ่งโดยทั่วไปมักจะไม่นพบการสร้างเมื่อเลี้ยงเชื้อราสกุลนี้ในอาหาร PDA หรือ Sabouraud dextrose agar

ส่วนผลที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อราสาย 7 ชนิดบนอาหารทั้ง 4 สูตร ก็เป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากราสาย 4 ชนิดเติบโตบนอาหารที่เตรียมจากฟักทอง และร่วนทำขนมตามท้องตลาดได้ดีกว่าบนอาหาร PDA โดยเฉพาะในการเลี้ยง *Penicillium* sp. บนอาหาร PKDA และ PKSA จะให้ลักษณะโคโลนีที่โตเร็ว

ค่อนข้างหลวม ต่างจากลักษณะโคโลนีที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ PDA (รูปที่ 4) ซึ่งลักษณะเช่นนี้ทำให้ง่ายต่อการเตรียมตัวอย่างเชื้อราเพื่อการศึกษารูปร่างและโครงสร้างโดยกล้องจุลทรรศน์ ด้วยวิธีการแยกเชื้อราจากโคโลนีโดยตรง (Tease mount technique)

ในกรณีของเชื้อราสายพันธุ์ที่เติบโตได้น้อยกว่า PDA โดยเฉพาะกลุ่ม dermatophytes แม้ขนาดและลักษณะของโคโลนีจะแตกต่างจาก PDA (รูปที่ 5) แต่สามารถนำไปใช้ในการเรียนการสอนในภาคปฏิบัติการได้ เนื่องจากรูปร่างโครงสร้างจากกล้องจุลทรรศน์ไม่แตกต่างกัน

สรุป

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะสร้างสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดใหม่ จากวัตถุดิบทางการเกษตร โดยเฉพาะการใช้ฟักทองร่วมกับใช้ร่วนทำขนมตามท้องตลาด ในการเตรียมอาหารเพื่อใช้ในการเรียนการสอนที่ต้องใช้อาหารเป็นจำนวนมาก ความได้เปรียบในด้านที่เป็นวัตถุดิบราคาถูกมากเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในปัจจุบันเป็นสิ่งที่ควรพิจารณา อย่างไรก็ตามการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวจำเป็นต้องมีการดำเนินการต่อไปเพื่อให้สามารถใช้เชื้อราที่ใช้ในการเรียนการสอนทั้ง 7 สายพันธุ์ให้เติบโตได้ดีมากกว่าหรืออย่างน้อยก็ต้องเท่ากับที่เติบโตบน PDA รวมไปถึงขั้นตอนการเตรียมอาหารต้องง่าย สะดวก รวดเร็ว และที่สำคัญคือการควบคุมคุณภาพของอาหารให้มีลักษณะที่เหมาะสมและให้ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่สม่ำเสมอในทุกๆ ครั้ง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับสนับสนุนทุนในการวิจัย และขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์เชื้อรา

เอกสารอ้างอิง

1. กิตติพันธุ์ เสมอพิทักษ์, อรัญญา คงถาวร, กฤษณา ตระการไทย และ กัญญลักษณ์ ชัยคำภา. การประยุกต์ใช้วัฒนธรรมเชื้อราสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา. การประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ครั้งที่ 27 : การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการสู่การประยุกต์ใช้ทางคลินิก (Laboratory Investigation from lab to Clinical use). สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย. 2546 : 241.
2. เพลินพิศ หานนท์, อรัญญา คงถาวร, กิตติพันธุ์ เสมอพิทักษ์ และ กฤษณา ตระการไทย. การประยุกต์ใช้วัฒนธรรมเชื้อราสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย. การประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ครั้งที่ 27 : การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการสู่การประยุกต์ใช้ทางคลินิก (Laboratory Investigation from lab to Clinical use). สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย. 2546 : 242.

3. ประหยัด ทัศนากรณ์. กิณวิทยาการแพทย์ เชื้อราตัวก่อโรค. โครงการตำราวิทยาศาสตร์อุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ, 2532.
4. กิตติพันธุ์ เสมอพิทักษ์. วิทยาเชื้อราพื้นฐาน : Basic Mycology. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น, 2546.
5. Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. Introductory Mycology 4th edition. Wiley&Sons. New York, 1996.
6. Garaway MO, Evan RC. Fungal nutrition and Physiology. New York : John Wiley & Son, 1984.
7. Griffin DH. Fungal Physiology 2nd ed. New York : Wiley-Liss, 1993.
8. Moore-Landecker E. The Fundamentals of the fungi 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996.
9. สมณีย์ ศุขรุ่งเรือง. เชื้อราก่อโรคและโรคเชื้อรา. สารมวลชน. กรุงเทพฯ. 2529.
10. Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A. Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology 14th ed. New York : Churchill Livingstone, 1996.
11. มณฑการติ วัชรภักย์. คู่มือปฏิบัติการวิชาเห็ดรา. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ, 2525.
12. de Hoog GS, Guarro J, Gene J and Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira I Virgili 2000.

