

ความเข้มข้นที่เหมาะสมขององค์ประกอบน้ำยาพรมศพเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อรา
จากร่างอาจารย์ใหญ่

Optimal Component Concentration of Preserving Agents for Control of Fungi Growth
from Formalin-Fixed Human Cadavers

โตมร นุ่นแก้ว*, ดานิส หะยีสาละห์, ชารีฟ ก้อเต็ม, ศุภชัย ภัทรพฤกษา และอรรกวาร์ อัลมูมินีน
Tomorn Nunkaew*, Danis Hayeesalaeh, Chareef Kordem, Supphachai Phattharapruksa
and Akwar Almunineen

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนราธิวาส 96000
Faculty of Medicine, Princess of Naradhiwas University, Mueang, Narathiwat 96000, Thailand

*Corresponding author, e-mail: Tomorn.n@pnu.ac.th

(Received: Sep 8, 2020; Revised: Dec 16, 2020; Accepted: Jan 7, 2021)

บทคัดย่อ

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ ตั้งอยู่ทางภาคใต้ของประเทศไทยที่มีลักษณะภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ส่งผลให้มีการเจริญของเชื้อราบนร่างอาจารย์ใหญ่ที่ใช้สำหรับการเรียนของนักศึกษาแพทย์ แม้ผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อราแล้วก็ยังคงพบการปนเปื้อน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดของเชื้อราซึ่งนำไปสู่การปรับองค์ประกอบของน้ำยาพรมศพให้มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา จากการทดลองสามารถระบุชนิดของเชื้อราที่เกิดขึ้น รวม 7 สกุล ได้แก่ *Penicillium* sp. *Cladosporium* sp. *Aspergillus* sp. *Aureobasidium* sp. *Chrysosporium* sp. *Sepedonium* sp. และ *Alternaria* sp. โดยพบว่า *Cladosporium* sp. B2 คือสายพันธุ์ที่พบจำนวนมากที่สุดบนร่างอาจารย์ใหญ่ จากนั้นนำมาทดสอบด้วยสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้แก่ Carbolic acid และ Glycerin เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของสารในแต่ละชนิด ออกแบบการทดลองโดยศึกษาปัจจัยร่วมของสารทั้งสองชนิดโดยวิธี Central Composite Design (CCD) พบว่า Carbolic acid ที่ความเข้มข้น 8% (v/v) และ Glycerin ที่ความเข้มข้น 35% (v/v) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium* sp. B2 มากที่สุด (39.43%) อย่างไรก็ตาม Carbolic acid ที่ความเข้มข้น 8% ยังคงเป็นระดับที่ทำให้เกิดพิษต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงานในระยะยาวได้ ดังนั้นสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Carbolic acid และ Glycerin ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราซึ่งได้จากการศึกษาทดลองนี้จึงมีความสำคัญ เพื่อนำไปสู่การคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม เพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและสามารถลดความเป็นพิษจาก Carbolic acid ได้

คำสำคัญ : เชื้อรา อาจารย์ใหญ่ น้ำยาพรมศพ ห้องปฏิบัติการมหากายวิภาคศาสตร์

Abstract

Faculty of Medicine, Princess of Naradhiwas University located in the south of Thailand with tropical climate. As a result of human cadavers that used for teaching has been contaminated by fungi. Even after the formalin preservation process. Later on at the end of every section class, the body were coated with preserving agents but they still contaminated with fungi. This study aims to identify the genus of fungi that grows on formalin-fixed human cadavers in the gross anatomy laboratory and to evaluate the optimal component concentration of preserving agents for control fungal growth. Seven fungal genera were identified in laboratory and on formalin-fixed human cadavers: *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Aureobasidium* sp., *Chrysosporium* sp., *Sepedonium* sp. and *Alternaria* sp. The *Cladosporium* sp. isolate B2, which most found on formalin-fixed human cadavers, was selected for the carbolic and glycerin in term of antifungal ability. The Central Composite Design (CCD) in composition of

carbolic acid at 8% (v/v) and glycerin at 35% (v/v) showed the highest inhibition on *Cladosporium* sp. isolate B2 (39.43%). However carbolic acid at 8% concentration can cause toxicity for long term exposure. Therefore, the regression equation between carbolic acid and glycerin are important for predict the ability of fungi inhibition and minimize toxicity of carbolic acid.

Keywords: Fungi, Formalin-fixed human cadavers, Preserving agents, Gross anatomy laboratory

บทนำ

ร่างอาจารย์ใหญ่คือร่างของผู้ที่ได้แสดงเจตนาบริจาคร่างไว้ก่อนที่จะเสียชีวิต เพื่อใช้ในการศึกษาทางการแพทย์ โดยต้องไม่เสียชีวิตด้วยโรคร้ายแรง และต้องมีอวัยวะของร่างกายครบถ้วน ซึ่งสามารถทำได้โดยเมื่อบุคคลนั้นเสียชีวิตลงศพจะถูกฉีดยาตายดองศพด้วยฟอร์มาลิน (Formalin) เป็นส่วนประกอบหลักเข้าทางเส้นเลือด หลังจากนั้นนำไปแช่น้ำยาตายดองศพเป็นเวลา 1 ปี จึงสามารถนำร่างอาจารย์ใหญ่มาศึกษาในห้องปฏิบัติการมหากายวิภาคศาสตร์ โดยร่างอาจารย์ใหญ่ 1 ร่างสามารถใช้ศึกษาได้ 1 ปีการศึกษา โดยระหว่างที่ศึกษาในห้องปฏิบัติการจะเก็บรักษาศพด้วยน้ำยาพรมศพ ทาทั่วบริเวณผิวทุกครั้งหลังจากใช้ในการเรียนเสร็จสิ้น ส่วนผสมประกอบด้วยกรดคาร์บอลิก (Carbolic acid) มีคุณสมบัติป้องกันการเจริญของเชื้อราและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นที่จะทำให้ร่างอาจารย์ใหญ่เสื่อมสภาพ และกลีเซอริน (Glycerin) มีคุณสมบัติป้องกันการสูญเสียน้ำซึ่งจะทำให้ร่างอาจารย์ใหญ่ไม่แห้ง (Brenner, 2014, pp. 330-332)

เชื้อราเป็นบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบนิเวศหลายชนิด อีกทั้งยังเป็นปรสิตในมนุษย์และสัตว์ อย่างไรก็ตามเชื้อราในอากาศนั้นมีส่วนเกี่ยวข้องในการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ เช่น *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria* sp. และ *Cladosporium* sp. พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับอาการทางเดินหายใจของผู้ป่วยโรคหอบหืด (Zhang et al., 2016, p. 91) และสภาพแวดล้อมที่เป็นอาคารหรือในร่มมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อราได้ง่ายเนื่องจากความชื้นเพียงพอที่จะกระตุ้นการงอกสปอร์และผลิตสปอร์เชื้อราจำนวนมากโดยปกติเชื้อราในอากาศเจริญเติบโตได้ในวงกว้างและมีการกระจายอยู่ทั่วโลก (Sun et al., 2019, p. 352)

สำหรับรายวิชาปฏิบัติการมหากายวิภาคศาสตร์เป็นรายวิชาหนึ่งในหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ซึ่งเป็นการศึกษาโครงสร้างในร่างกายของมนุษย์ โดยใช้ร่างอาจารย์ใหญ่ที่ผ่านการรักษาสภาพศพมาแล้ว และเนื่องด้วยคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ ตั้งอยู่ทางภาคใต้ของประเทศไทยที่มีลักษณะภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ส่งผลให้ร่างอาจารย์ใหญ่ที่ใช้สำหรับการเรียนการสอนประสบปัญหาการเจริญของเชื้อราบนร่างอาจารย์ใหญ่ในบ่อยครั้ง แม้จะผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อราแล้วแต่ก็ยังคงประสบปัญหาเดิมอยู่ จึงมีความจำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดเชื้อรามากขึ้น ซึ่งอาจส่งผลต่อสุขภาพของคณาจารย์และนักศึกษา ดังนั้นความเข้มข้นของส่วนประกอบน้ำยาพรมศพที่เหมาะสมสำหรับการยับยั้งเชื้อราอย่างมีประสิทธิภาพและมีความเป็นพิษต่ำต่อผู้ปฏิบัติงานจึงเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อระบุชนิดของเชื้อราและศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของส่วนประกอบน้ำยาพรมศพต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากร่างอาจารย์ใหญ่

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและระบุชนิดของเชื้อราจากห้องปฏิบัติการมหากายวิภาคศาสตร์

1.1 การเก็บเชื้อราในอากาศ

เก็บเชื้อราในอากาศแบบ Random โดยใช้วิธี Non-volumetric (Sri-indrasutdhi (2015 as cited in Gams, 1987, p. 730) ในห้องปฏิบัติการมหากายวิภาคศาสตร์ ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ ขนาด 50 ตารางเมตรโดยการนำจานอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco, Detroit, Mich., U.S.A.) ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol 0.25 mg/L วางกระจายเต็มพื้นที่ จำนวน 50 จานอาหาร (1 จานอาหาร/1 ตารางเมตร) นาน 15 นาที จากนั้นปิดฝาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Flannigan, 1997, pp. 384-385) สังเกตโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนจานอาหาร จากนั้นนำโคโลนีเชื้อราที่มีลักษณะแตกต่างกันไปเลี้ยงในอาหาร PDA ใหม่ จนได้โคโลนีเดี่ยว แล้วนำไปเก็บใน PDA slant เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

1.2 การเก็บเชื้อราบนร่างอาจารย์ใหญ่

เก็บเชื้อราจากร่างอาจารย์ใหญ่ โดยใช้ Sterile cotton swab เก็บเส้นใยและสปอร์บนร่างอาจารย์ใหญ่บริเวณ ศีรษะ แขน ลำตัว และขา รวม 6 จุด จากจำนวน 6 ร่าง นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol 0.25 mg/L แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Sri-indrasudhi *et al.*, 2015, p. 730) สังเกตโคโลนีเชื้อรา จากนั้นนำโคโลนีเชื้อราที่มีลักษณะแตกต่างกันไปเลี้ยงในอาหาร PDA ใหม่ จนได้โคโลนีเดี่ยว แล้วจึงนำไปเก็บใน PDA slant เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

1.3 การจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การระบุชนิดของเชื้อราแต่ละชนิดโดยวิธีการ Slide culture technique แล้วย้อมด้วย Lactophenol cotton blue และศึกษาลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น เส้นใย (Fungal hyphae) ก้านชูสปอร์ (Conidiophores) และสปอร์ (Spores) นอกจากนี้ศึกษาลักษณะสัณฐานของโคโลนี เช่น รูปร่าง ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง ลักษณะพื้นผิว และสี เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการเปรียบเทียบ (Malloch, 1981, pp. 1-97)

2. การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากร่างอาจารย์ใหญ่

2.1 การเตรียมเชื้อราทดสอบ

นำเชื้อราที่แยกได้จากร่างอาจารย์ใหญ่ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA slant เป็นเวลา 7 วัน บ่มในอุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บ Conidia ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปใน PDA slant และใช้แท่งแก้วชุบให้ Conidia หลุดออกมา แล้วนำส่วนที่ได้นำไปกรองเพื่อกำจัดเส้นใยที่ติดมาด้วย จากนั้นนำไปหาปริมาณสปอร์ (Spore) ด้วยการนับจำนวนใน Hemocytometer แล้วปรับความเข้มข้นสารละลายสปอร์เชื้อรา (Spore suspension) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^6 Spores/mL (El-Katatny & Emam, 2020, p. 1509) เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

2.2 การคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของส่วนประกอบน้ำยาพรมศพต่อ การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากร่างอาจารย์ใหญ่ โดยใช้ Central Composite Design (CCD)

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Carbolic acid และ Glycerin ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากร่างอาจารย์ใหญ่ คัดเลือกได้โดยใช้ระดับที่แตกต่างกันของสารที่มีผลในการยับยั้งเชื้อรา คือ Carbolic acid (% v/v): X_1 Glycerin (% v/v): X_2 แล้วนำสารเหล่านี้ใช้ในการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการ Response Surface Methodology (RSM) กำหนดรูปแบบเป็น CCD ที่มีปัจจัยศึกษา 2 ปัจจัย (X_1 และ X_2) แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ ซึ่งกำหนดรหัสแต่ละระดับ -1, 0, +1 (Myers *et al.*, 2016, p. 48) ดังแสดงในตารางที่ 1 จากการออกแบบการทดลองด้วย CCD ได้ชุดการทดลองทั้งหมด 13 ชุดทดลอง เพื่อพยากรณ์สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 2) ที่เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ และส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อรามากที่สุด

สภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา แสดงออกมารูปสมการถดถอย (Regression equations) และวิเคราะห์โดยกราฟพื้นที่ตอบสนอง (Response surface contour plots) โดยโปรแกรม Design-Expert 8.0.2 Trial version ซึ่งค่าที่ได้ตรวจสอบความน่าเชื่อถือของผลการทดลองโดยค่า Coefficient (R^2)

การทดลองข้างต้นทุกชุดการทดลอง ทดสอบบนอาหาร PDA ที่ได้เกลี่ยสารยับยั้งเชื้อราปริมาตร 0.1 mL จากการออกแบบในชุดทดลองต่าง ๆ จนแห้ง หลังจากนั้นเติมเชื้อราทดสอบตามวิธีของ Xu *et al.* (2008, p. 251) โดยนำ Spore suspension ปริมาตร 10 μ L ที่เตรียมไว้ตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น หยดลงบนอาหารทดสอบ 3 จุด ของอาหารแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นให้นำไปบ่มที่ในสภาวะมืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดนำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราด้วย Vernier caliper แล้วหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราแต่ละชุดการทดลอง และนำมาคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (% Fungal inhibition) ดังนี้

$$\% \text{ Fungal inhibition} = \left[\frac{(D_c - D_f)}{D_c} \right] \times 100\%$$

เมื่อ % Fungal inhibition

คือ ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

D_c

คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารยับยั้ง

D_f

คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารยับยั้ง

ผลการวิจัย

1. เชื้อราจากห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัย

จากการเก็บตัวอย่างเชื้อราในอากาศห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัย แล้วนำมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และนำไประบุชนิดของเชื้อราโดยลักษณะสัณฐานของโคโลนีและลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบจำนวนเชื้อรา 5 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus* sp. *Sepedonium* sp. *Penicillium* sp. *Cladosporium* sp. และ *Alternaria* sp. ขณะที่จากการเก็บตัวอย่าง เชื้อราที่แยกได้จากโรงอาหารใหญ่ในห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัย พบจำนวนเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Cladosporium* sp. *Chrysosporium* sp. และ *Aureobasidium* sp. จากการแยกเชื้อราจากโรงอาหารใหญ่พบว่า *Cladosporium* sp. สายพันธุ์ B2 ที่แยกได้มีการแพร่กระจายบนร่างมากที่สุด จึงเลือกเป็นเชื้อราสำหรับการทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสารต่าง ๆ ต่อไป

2. การยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยสารเคมีปัจจัยเดียว

จากผลทดสอบความสามารถของ Carbolic acid และ Glycerin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cladosporium* sp. B2 ซึ่งแยกจากโรงอาหารใหญ่ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน แยกทดสอบแต่ละปัจจัยเดี่ยว ๆ โดยทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เกลี่ยสารยับยั้งเชื้อรา แล้วเติมเชื้อราทดสอบตามวิธีของ Xu et al. (2008, p. 251) พบว่า Carbolic acid ที่ความเข้มข้น 8% มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรามากที่สุด ที่ 22.19% ขณะที่ Glycerin ที่ความเข้มข้น 30% มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรามากที่สุด ที่ 17.30% จากผลดังกล่าวนำไปสู่การเลือกใช้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองผลความเข้มข้นที่เหมาะสมของส่วนประกอบน้ำยาพรมศพต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากโรงอาหารใหญ่ ซึ่งเลือกใช้ Glycerin ที่ความเข้มข้น 30% เป็นค่ากลางในการออกแบบ ขณะที่ใช้ Carbolic acid ที่ความเข้มข้น 7% เป็นค่ากลางเนื่องจากสารดังกล่าวละลายได้สูงสุดที่ 8% ซึ่งระดับความเข้มข้นของส่วนประกอบน้ำยาพรมศพแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปัจจัยในสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อเจริญของเชื้อราจากโรงอาหารใหญ่

Variable name	Coded	Levels		
		-1	0	1
Carbolic acid (% v/v)	X ₁	6	7	8
Glycerin (% v/v)	X ₂	25	30	35

3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของส่วนประกอบน้ำยาพรมศพต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากโรงอาหารใหญ่

จากผลทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบนร่างอาจารย์ใหญ่ เมื่อนำ Carbolic acid และ Glycerin มาผสมในความเข้มข้นที่แตกต่างกันตามตารางที่ 2 พบว่าในชุดการทดลองที่ 4 Carbolic acid ที่ความเข้มข้น 8% และ Glycerin ที่ความเข้มข้น 35% มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากที่สุด โดยการพยากรณ์ของวิธีการ RSM โดยใช้รูปแบบ CCD ที่คำนวณว่าชุดการทดลองดังกล่าวจะยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium* sp. B2 ได้ 39.43 % ขณะที่การทดลองจริงสามารถยับยั้งเชื้อราดังกล่าวได้ 41.64% ซึ่งได้เห็นว่าโมเดลที่ได้จากการออกแบบการทดลองมีความคลาดเคลื่อนเพียง 4.87%

โปรแกรม Design Expert ถูกใช้เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัย Carbolic acid และ Glycerin พบว่าปัจจัยดังกล่าวมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ($\alpha=0.05$) อีกทั้ง P -value ของโมเดล Quadratic มี $P<0.05$ ซึ่งแสดงให้เห็นโมเดลที่ถูกสร้างจากความเข้มข้นของปัจจัยทั้งสองที่เลือกใช้ในการทดลองนี้มีความเหมาะสม ซึ่งผลการวิเคราะห์ค่าคงที่และตัวแปรที่สัมพันธ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา จึงได้สมการถดถอยคือ Fungal inhibition (%) = $22.03+10A+5.11B+1.54A^2+3.92B^2-3.17AB$ เมื่อ A คือ ความเข้มข้นของ Carbolic acid และ B คือ ความเข้มข้นของ Glycerin

การวิเคราะห์หาค่า P -value ของแต่ละตัวแปรที่แสดงถึงความสัมพันธ์ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยจากตารางที่ 3 ตัวแปร A, B, B^2 และ AB เป็นตัวแปรที่มีค่า P -value < 0.05 แสดงถึงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ส่วนตัวแปร A^2 เป็นตัวแปรที่มีค่า P -value > 0.05 แสดงถึงความสัมพันธ์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา จึงได้สมการแท้จริงคือ Fungal inhibition (%) = $22.03 + 10A + 5.11B + 3.92B^2 - 3.17AB$ จากสมการดังกล่าวทำให้สร้างรูปสามมิติที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งคู่ (ภาพที่ 1) แสดงให้เห็นว่า Carbolic acid มีผลต่อการการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cladosporium* sp. B2 มากกว่า Glycerin

ตารางที่ 2 ผลการทดลองทั้งหมด 13 ชุด เพื่อศึกษาปัจจัยในสถานะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium* sp. B2

ชุดการทดลอง	Carbolic acid (% v/v) ; X_1	Glycerin (% v/v) ; X_2	% Fungal inhibition	
			Actual	Predicted
1	6.00	25.00	10.41	9.15
2	8.00	25.00	35.04	35.05
3	6.00	35.00	23.92	25.78
4	8.00	35.00	41.64	39.43
5	5.59	30.00	10.91	10.98
6	8.41	30.00	35.86	39.26
7	7.00	22.93	21.64	22.54
8	7.00	37.07	40.43	37.08
9	7.00	30.00	22.03	22.03
10	7.00	30.00	22.03	22.03
11	7.00	30.00	22.03	22.03
12	7.00	30.00	22.03	22.03
13	7.00	30.00	22.03	22.03

ตารางที่ 3 ค่าคงที่และตัวแปรที่สัมพันธ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium* sp. B2

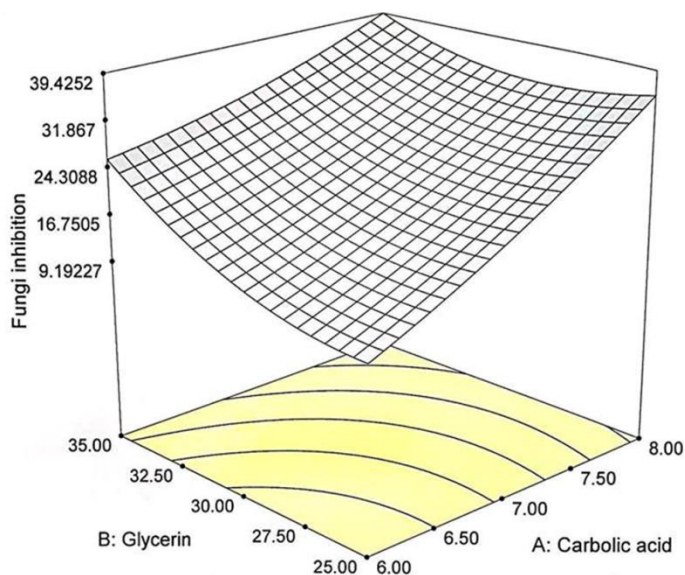
ตัวแปร	ค่าคงที่	P -value
	22.03	
A	10.00	<0.0001
B	5.11	0.0004
A^2	1.54	0.1159
B^2	3.92	0.0026
AB	-3.17	0.0261

อภิปรายผลการวิจัย

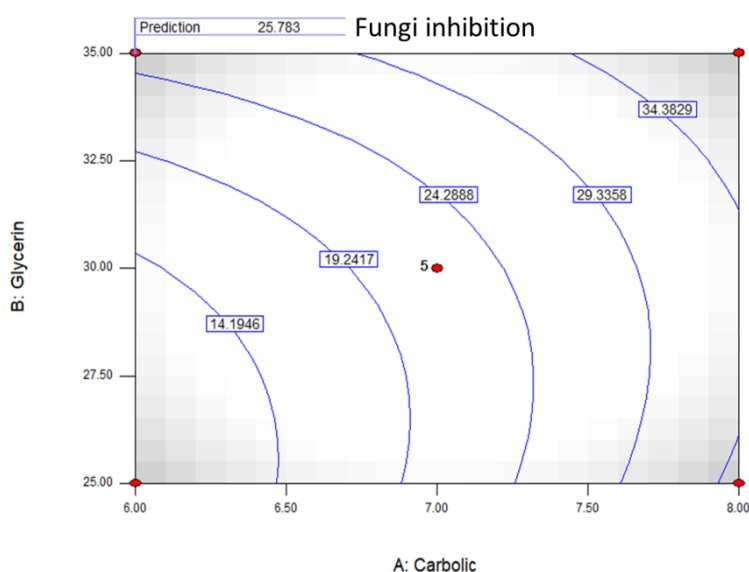
มีเชื้อราอยู่หลายชนิดในห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ ซึ่งมีทั้งเชื้อราที่ขึ้นบนร่างกายมนุษย์และเชื้อราในอากาศ เชื้อราที่อยู่ในอากาศสามารถเจริญได้บนร่างกายมนุษย์ โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาชนิดของเชื้อราบนร่างกายมนุษย์ที่สัมพันธ์กับเชื้อราในอากาศ ซึ่งมีหลายปัจจัยที่เชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีบนร่างกายมนุษย์ในห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์ เช่น ความชื้น จำนวนสปอร์ของเชื้อราที่อยู่ในอากาศ และระยะเวลาที่เชื้อราเจริญบนร่างกายมนุษย์ เป็นต้น ทำให้เกิดปัญหาในการเรียนการสอนของรายวิชามหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์ อีกทั้งยังเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาเชื้อราที่พบในห้องเรียนมหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์ที่ผ่านมาของ Sri-indrasutdhi *et al.* (2015, p. 731) พบเชื้อชนิดเดียวกันในห้องเรียนมหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ ได้แก่ *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. และ *Aspergillus* sp. นอกจากนี้ยังพบเชื้อราที่แตกต่างกัน กับการศึกษาที่ผ่านมา ได้แก่ *Aureobasidium* sp., *Chrysosporium* sp., *Sepedonium* sp. และ *Alternaria* sp. แต่อย่างไรก็ตามเชื้อรากลุ่มดังกล่าวก็เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในภูมิอากาศของประเทศไทย (Reanprayoon & Yoonaiwong, 2012, p. 54) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่ขึ้นบนร่างกายมนุษย์อาจมาจากอากาศในห้องปฏิบัติการที่ใช้เก็บร่าง หรือจากขั้นตอนการขนย้ายร่าง และจากการศึกษาของ Segers *et al.* (2016, p. 5093) พบว่า *Cladosporium* sp. มีความสามารถอยู่รอดในสภาวะของการเปลี่ยนแปลงความชื้นในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่า *Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ *Cladosporium* sp. เจริญได้ดีบนร่างกายมนุษย์ที่มีความชื้นต่ำ และขณะที่ *Aureobasidium* sp., *Chrysosporium* sp. เป็นเชื้อราชนิด Keratinophilic ที่มักพบผิวหนังและเล็บของศพ (Fu *et al.*, 2019, p. 2) จึงอาจเป็นเหตุผลที่ไม่พบเชื้อราดังกล่าวในอากาศห้องปฏิบัติการ

Carbolic acid หรือ Phenol เป็นสารฆ่าเชื้อ (Disinfectant) ที่มีกลไกในการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โปรตีนตกตะกอน ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ได้ มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส จึงเป็นที่นิยมนำมาใช้เพื่อเป็นน้ำยาพรมร่างกายมนุษย์ เพื่อป้องกันเชื้อราในระหว่างเก็บรักษา (Brenner, 2014, p. 330) แต่พบว่าความเข้มข้นที่ห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์ใช้ยังไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตเชื้อราได้ จึงจำเป็นต้องศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยใช้ความเข้มข้นสูงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา จากผลการวิจัยพบว่าความเข้มข้นของ Carbolic acid และ Glycerin จะส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เพิ่มขึ้นไปในทิศทางเดียวกัน อย่างไรก็ตาม Carbolic acid มีข้อจำกัดคือ สามารถละลายน้ำได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 8% เท่านั้น จึงไม่สามารถหาค่ามากที่สุดของการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ รวมทั้งการใช้ความเข้มข้นของ Carbolic acid ที่มากขึ้นจะส่งผลกระทบต่อร่างกายผู้ปฏิบัติงาน สามารถจำแนกเป็น 2 ลักษณะ ตามระยะเวลาการสัมผัส ได้แก่ การสัมผัสแบบเฉียบพลัน (Acute exposure) ที่เกิดขึ้นจากการสูดดม ทำให้ระคายเคืองทางเดินหายใจส่วนบน และระคายเคืองต่อผนังทางเดินอาหาร การสัมผัสที่ผิวหนังหรือตา ทำให้เกิดการอักเสบแดง บางรายอาจมีผิวหนังเปลี่ยนสี หลังจากนั้นมีการกุดกร่อน ไหม้รุนแรง และมีเนื้อตายเกิดขึ้น (Giri *et al.*, 2016, p. 668) ขณะที่การสัมผัสแบบเรื้อรัง (Chronic exposure) มีรายงานว่าทำให้เพิ่มโอกาสการเป็นโรคมะเร็ง (Bhuyan & Basu, 2017, p. 45) ดังนั้น สารที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ดีควรมีความเข้มข้นที่เหมาะสม และส่งผลกระทบต่อร่างกายน้อยที่สุด จึงได้นำสมการถดถอยที่ได้จากการทดลองนี้ มาคำนวณเพื่อลดระดับความเข้มข้นของ Carbolic acid ในการทดลองปัจจัยร่วมจาก 8% เป็น 6% และยังคงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราอีกทั้งลดความเป็นพิษของ Carbolic acid ได้ พบว่าผลการคำนวณความสามารถยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium* sp. B2 ได้ 25.78% (ภาพที่ 2) ซึ่งผลดังกล่าวยังคงสูงกว่าการทดลอง Carbolic acid เพียงอย่างเดียวที่ระดับ 8% ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 22.19% เท่านั้น



ภาพที่ 1 แสดงการตอบสนองแบบสามมิติสำหรับการพยากรณ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium* sp B2 ของการทดลองปัจจัยร่วมกันของ Carbolic acid และ Glycerin ที่ระดับต่าง ๆ ตามการออกแบบในตาราง 2 ด้วยวิธี Central Composite Design (CCD)



ภาพที่ 2 แสดงการตอบสนองแบบ Contour plot สำหรับการพยากรณ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium* sp B2 จากการทดลองปัจจัยร่วมกันของ Carbolic acid และ Glycerin ที่ระดับ 6.00 และ 35.00 % (v/v) ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Carbolic acid และ Glycerin ที่ระดับ 6.00 และ 35.00 % (v/v) ตามลำดับ ที่ใช้ร่วมกันในการยับยั้งเชื้อราจากห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์ที่ส่งผลให้การยับยั้งเชื้อรา มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้น และลดความเป็นพิษของน้ำยาพรมศพ ซึ่งส่งผลต่อปัญหาสุขภาพในระยะยาวของผู้ปฏิบัติงานได้อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ศึกษาชนิดของเชื้อราเพียงชนิดเดียวจากห้องปฏิบัติการการกายวิทยาศาสตร์และทดลองเฉพาะในงานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดไม่เท่ากัน และสภาวะแวดล้อมไม่เหมือนกับการทดลองบนร่างอาจารย์ใหญ่ ซึ่งประเด็นดังกล่าวควรมีศึกษาต่อไปในอนาคต



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับทุนวิจัยสนับสนุนจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

เอกสารอ้างอิง

- Bhuyan, D.J., & Basu, A. (2017). *Phenolic compounds: potential health benefits and toxicity, Utilization of bioactive compounds from agricultural and food production waste*. U.S.A.: CRC Press.
- Brenner, E. (2014). Human body preservation—old and new techniques. *Journal of Anatomy*, 224 (3), 316-344.
- El-Katatny, M.H., & Emam, A.S. (2020). Control of postharvest tomato rot by spore suspension and antifungal metabolites of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(5), 1505-1528.
- Flannigan, B. (1997). Air sampling for fungi in indoor environments. *Journal of Aerosol Science*, 28(3), 381-392.
- Fu, X., Guo, J., Finkelbergs, D., He, J., Zha, L., Guo, Y., & Cai, J. (2019). Fungal succession during mammalian cadaver decomposition and potential forensic implications. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.
- Gams, W., Van der Aa, H.A., Van der Plaats-Niterink, A.J., Samson, R.A., & Stalpers, J.A. (1987). *CBS course of mycology* (3th ed.). Baarn: Centraalbureau voor schimmelcultures.
- Giri, P.P., Sinha, R., Sikka, S., & Meur, S. (2016). Acute carbolic acid poisoning: A report of four cases. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 20(11), 668-670.
- Malloch, D. (1981). *Moulds, their isolation, cultivation, and identification*. Toronto: University of Toronto Press.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C. & Anderson-Cook, C.M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments* (4th ed.). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Reanprayoon, P. & Yoonaiwong, W. (2012). Airborne concentrations of bacteria and fungi in Thailand border market. *Aerobiologia*, 28(1), 49-60.
- Segers, F. J., van Laarhoven, K.A., Huinink, H.P., Adan, O.C., Wösten, H.A., & Dijksterhuis, J. (2016). The indoor fungus *Cladosporium halotolerans* survives humidity dynamics markedly better than *Aspergillus niger* and *Penicillium rubens* despite less growth at lowered steady-state water activity. *Applied and environmental microbiology*, 82(17), 5089-5098.
- Sri-Indrasutdhi, V., Ueapattanakit, J., & Sommatas, A. (2015). Investigation of airborne fungi and their ability to grow on formalin-fixed human cadavers. *Mycosphere*, 6(06), 729-736.
- Sun, J.Z., Liu, X.Z., McKenzie, E.H., Jeewon, R., Liu, J.K.J., Zhang, X.L., Zhao, Q. & Hyde, K.D. (2019). Fungicolous fungi: terminology, diversity, distribution, evolution, and species checklist. *Fungal Diversity*, 95, 337-430.
- Xu, Y., Hall iij, C. & WolfHall, C. (2008). Fungistatic activity of heat treated flaxseed determined by response surface methodology. *Journal of Food Science*, 73(6), 250-256.
- Zhang, Z., Reponen, T., & Hershey, G. K.K. (2016). Fungal exposure and asthma: IgE and non-IgE-mediated mechanisms. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(12), 86-98.