สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ จุลินทรีย์ก่อโรคในมูลนกบุกรุกในมหาวิทยาลัยนเรศวร

Pathogenic Microorganisms in Invasive Birds Dropping at Naresuan University

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 06 มิ.ย. 2564
เลขทะเบียน 1031749
เลขเรียกหนังสือ จ QR
201
ต721ร
2561

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ธันวาคม 2561

สัญญาเลขที่ R2559C242

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ จุลินทรีย์ก่อโรคในมูลนกบุกรุกในมหาวิทยาลัยนเรศวร

Pathogenic Microorganisms in Invasive Birds Dropping at Naresuan University

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ

หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วาสนา ฉัตรดำรง ผู้ร่วมโครงการวิจัย

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดย

งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

Executive Summary

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อให้ชุมชนมหาวิทยาลัยนเรศวรทราบและตระหนักถึงความสำคัญของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในมูลนก เพื่อจักได้เพิ่มการป้องกันและรักษาความสะอาดของอาคาร สถานที่ที่มีนกอาศัยอยู่ และดำเนินการปรับ เปลี่ยนสถานที่ให้ไม่เอื้อต่อนก หรือใช้กระบวนการไล่นกด้วยวิธีการอื่น เช่น เสียง เป็นต้น

วิธีการศึกษาวิจัย

1. การสำรวจแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งมูลนกบุกรุก

สำรวจสถานที่ที่มีนกบุกรุกอาศัยและถ่ายมูลสะสมไว้ตามสถานที่ต่างๆในหาวิทยาลัยนเรศวร เช่น หอพักนักศึกษา อาคารเรียน สำนักงาน โรงพยาบาล และต้นไม้ จากนั้นเลือกบริเวณที่พบนกบุกรุกและมีการถ่ายมูลสะสมไว้ในบริเวณเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน เพื่อเป็นตัวแทนของแหล่งตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่าง 5 แหล่งต่อนกหนึ่งชนิด โดยเลือกสถานที่ที่มีผู้คนอยู่อาศัยและผ่านไปมาอย่างสม่ำเสมอ หรือเป็นสถานที่ที่ใช้ในการจัดกิจกรรมต่าง ๆ เป็นประจำ เนื่องจากสถานที่เหล่านี้อาจเป็นจุดที่มีความเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจากมูลนก

2. การเก็บตัวอย่างมูลนก

เก็บตัวอย่างมูลนก 5 จุดต่อนก 1 ชนิด รวม 20 จุด เก็บตัวอย่างมูลนกจุดละไม่น้อยกว่า 10 กรัม โดยการใช้ช้อนสแตนเลสตักมูลนกบุกรุกใส่ลงในถุงพลาสติกใสซิปล็อค ปิดปากถุงให้มิดชิดและระบุรหัสตัวอย่างบนถุงให้ชัดเจน จดบันทึกอุณหภูมิ (°C) และความชื้น (%RH) ณ.จุดที่เก็บตัวอย่าง โดยผู้เก็บจะต้องสวมถุงมือและหน้ากากอนามัยทุกครั้ง เพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายของมูลนกบุกรุก ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูกาลต่างๆ 3 ฤดู ได้แก่ ตัวแทนในช่วงฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว

3. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากมูลนกบุกรุก

ชั่งตัวอย่างมูลนก 10 กรัม ใส่ในสารละลาย 0.1% Peptone water ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการเจือจางจนได้ระดับที่ต้องการ นำสารสะลายเจือจางมูลนกไปเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Spread plate ตรวจนับจุลินทรีย์ วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช

4. การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลนกบุกรุก

ดูดตัวอย่างสารละลายมูลนกที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมสารละลายมูลนก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) เกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจานอาหาร นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญและนับจำนวนโคโลนีที่อยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทำการ Cross streak บนอาหาร Nutrient Agar (NA) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

5. การแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างมูลนกบุกรุก

ดูดตัวอย่างสารละลายมูลนกปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) ทำการ spread plate เพื่อให้เชื้อกระจายดี บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4-7 วัน โดยทำการตรวจเช็คผลทุกวัน เมื่อพบเชื้อเจริญ นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญ และทำการเขี่ยเชื้อที่มีลักษณะทึบแสง ขอบเรียบ สีขาวครีม และเป็นเมือกมาย้อมด้วย Nigrosin หรือ India ink เพื่อดูการสร้างแคปซูลซึ่งเป็นลักษณะเด่นของยีสต์ที่สนใจคือ *Cryptococcus neoformans* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อทดสอบทางชีวเคมี โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์ phenoloxidase ในอาหาร caffeic acid agar การสร้างเอนไซม์ urease บนอาหาร urea base agar และความสามารถในการหมักน้ำตาล เช่น lactose, glucose, maltose, sucrose, galactose และ raffinose ทำการยืนยันชนิดยีสต์ อีกครั้งโดยวิธีทางอณูชีววิธี โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน D1/D2 ของ 26s rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR สกัดดีเอ็นเอของยีสต์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ KOD FX Neo ของบริษัท TOYOBO และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ NL1 (5'-CATATCAATAAGCGG AGGAAAAG-3') และ NL4 (5'- GTCCGTGTTTCAAGACGG3') ตรวจสอบ PCR ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ที่ผสม RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution ของบริษัท INtRON Biotechnology เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง DNA sequencing ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีสต์ โดยทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำ Multiple sequences alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal W และเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อกับฐานข้อมูลใน NCBI ด้วยวิธี BLASTN search เพื่อตรวจสอบความเหมือนกัน (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.05

6. การแยกเชื้อราจากตัวอย่างมูลนกบุกรุก

ดูดตัวอย่างสารละลายมูลนกปริมาตร 0.1 มิลลิตร ใส่ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) ทำการแยกเชื้อโดยใช้วิธี Spread plate นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อราบนอาหาร และนับจำนวน

โคโลนีที่อยู่ระหว่าง 15-150 โคโลนี เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกกันไปทำให้บริสุทธิ์ เขี่ยเชื้อราที่แยกได้มาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยดูลักษณะการเจริญบนจานอาหาร และการดูลักษณะเส้นใย สปอร์ โดยการทำ slide culture

ผลการศึกษาวิจัย

1. ผลการสำรวจแหล่งที่อยู่อาศัย แหล่งมูลนก และลักษณะทางกายภาพของบริเวณที่เก็บ

จากการสำรวจแหล่งที่อยู่อาศัยของนกบุกรุกที่พบในปริมาณมากภายในมหาวิทยานเรศวร พบนกบุกรุก 4 ชนิดใหญ่ พบว่านกพิราบป่า นกเขาไฟ และนกกระจอกมีลักษณะการอยู่อาศัยตามอาคารสิ่งก่อสร้าง ส่วนนกเอี้ยงพบอยิอาศัยเป็นกลุ่มตามตนไม้โดยเฉพาะบริเวณรอบโรงพยาลมหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน พบว่าอุณหภูมิในฤดูฝน และฤดูร้อน อยู่ในช่วง 27-34 องศาเซลเซียส และ 29-34 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนฤดูหนาวมีอุณหภูมิต่ำที่สุด คือ 24-27 องศาเซลเซียส แต่ทั้ง 3 ฤดู จัดว่าเป็นอุณหภูมิที่อยู่ในระดับปานกลางเหมาะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่ม mesophiles ที่สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส ส่วนความชื้นสัมพัทธ์ของทั้ง 3 ฤดู พบว่า ฤดูฝน และฤดูหนาว มีความชื้นสัมพัทธ์ที่ใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วงร้อยละ 62-85 และ 61-83 ตามลำดับ ส่วนฤดูร้อนมีค่าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุด คือ อยู่ในช่วงร้อยละ 56-74 ซึ่งความชื้นที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้อยู่ในช่วงร้อยละ 60-80 และความชื้นสัมพัทธ์ของทั้ง 3 ฤดู พบว่าอยู่ในช่วงที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมูลนกของทั้ง 3 ฤดู พบว่า อยู่ในช่วงที่เป็นกรดอ่อนถึงกลาง คืออยู่ในช่วง 4-7 ซึ่งแบคทีเรียจะสามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.50-7.0 ส่วนยีสต์และเชื้อราสามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย คือ อยู่ในช่วงที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0-6.0

2. ผลการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ แบคทีเรีย ยีสต์และรา

เปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด พบว่า จำนวนของเชื้อแบคทีเรียในฤดูหนาว และฤดูร้อน มีจำนวนใกล้เคียงกัน โดยจำนวนแบคทีเรียในมูลนกกระจอกมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในมูลนกอีก 3 ชนิด คือ นกพิราบ นกเขาไฟ และนกเอี้ยง นั้นมีจำนวนที่ใกล้เคียงกัน ส่วนฤดูฝนจะมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด โดยเฉพาะในมูลนกเอี้ยง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเก็บตัวอย่างมูลนกเอี้ยงนั้นเป็นบริเวณโล่งแจ้ง จึงทำให้มูลนกสัมผัสกับน้ำฝนได้โดยตรง ส่งผลให้ตัวอย่างมีนกเอี้ยงมีความชื้นมากกว่าตัวอย่างมูลนกชนิดอื่น จากการเปรียบ เทียบความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกทั้ง 3 ฤดู ได้แก่ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน

สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสกุลได้ 6 สกุล ได้แก่ *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. และ*Enterobacter* spp โดยเชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุดและสามารถพบได้ทั้ง 3 ฤดู คือ *Corynebacterium xerosis* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้บริเวณผิวหนัง โพรงจมูก และเยื่อบุต่างๆ ภายในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อบริเวณผิวหนัง และก่อให้เกิดโรคติดเชื้อร่วมกันระหว่างคนกับสัตว์เลี้ยงหรือสัตว์ป่า รองลงมาคือ *Serratia liquefaciens* และ *Escherichia coli* ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในลำไส้ของคน และสัตว์ โดย *Escherichia coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นภายในลำไส้ใหญ่ ปกติจะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะทำให้กิดโรคได้ถ้าอยู่นอกลำไส้ใหญ่ เช่น ท่อปัสสาวะอักเสบ และบางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในคนและสัตว์ สำหรับเชื้อ *Serratia liquefaciens* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ในธรรมชาติโดยเชื้อจะแพร่กระจายอยู่ในดิน น้ำ พืช และสัตว์ นอกจากนี้ยังพบ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้บริเวณผิวหนังของคนและสัตว์

การแยกเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะสงสัยว่าเป็นยีสต์ *C. neoformans* ในแต่ละฤดูกาล โดยดูจากความสามารถในการสร้างแคปซูล ความสามารถในการเจริญและเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางเคมีบนจานอาหาร Caffeic acid agar, Urea agar base และการหมักน้ำตาล 6 ชนิดคือ Sucrose, Lactose, Galactose, Raffinose, Glucose และ Maltose และทำการยืนยันชนิดยีสต์ที่สงสัยด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา พบว่าจากการศึกษาในครั้งนี้ ตรวจไม่พบยีสต์ที่คาดว่าจะเป็นยีสต์ *C. neoformans* โดยยีสต์ที่ตรวจพบจัดจำแนกได้เป็นยีสต์ *Candida tropicalis, Pichia kudriavzevii, Trichosporon asahii, Tricosporon* spp., *Candida albicans, Candida carpophila* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น ส่วนสาเหตุที่ทำให้ไม่พบเชื้อ *C. neoformans* อาจมีปัจจัยตามธรรมชาติหลายประการที่ช่วยทำลายเชื้อ *C. neoformans* เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis* เชื้อโปรตัวซัว เช่น *Acanthamoeba palestinensis, A. polyphega,* แมลงเล็กๆ เช่น *Metoponorthus pruinosus* อย่างไรก็ตามเชื้อยีสต์ชนิดนี้นอกจากเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสที่ทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ซึ่งพบบ่อยในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือผู้ป่วยโรคเอดส์แล้วนั้น อาจก่อให้เกิดโรคได้ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง โรคเรื้อรังอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อพบได้ในเด็กเล็กและผู้สูงอายุได้ โดยการติดเกิดจากการที่ผู้ป่วยหายใจเอาสปอร์หรือเซลล์แห้งของเชื้อที่มีน้ำหนักเบาและสามารถฟุ้งกระจายในอากาศได้ง่ายจากแหล่งธรรมชาติเข้าไปในปอด

ส่วนการศึกษาชนิดของเชื้อราในมูลนกบุกรุกโดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อบนจานอาหาร การทำ slide culture จำแนกเชื้อได้ 16 สกุล ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Curvalaria* spp., *Mucor* spp., *Fusarium* spp., *Paecilomyces* spp. *Trichoderma* sp., *Rhizopus* spp., *Pythium* spp. *Cladosporium* spp., *Acremonium* spp., *Absidia* spp., *Leptoxyphium* spp., *Geotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp. และ *Phialophora* spp. โดยชนิดเชื้อราที่พบมากที่สุดและพบได้ทั้ง 3 ฤดูกาลในปริมาณใกล้เคียงกัน คือ *Aspergillus* spp. เนื่องจากเป็นเชื้อราที่สามารถพบได้ในธรรมชาติโดยทั่วไป ทั้งในดิน น้ำ และในเศษใบไม้ที่สะสมทั่วไป เป็นเชื้อราที่ก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ คนอาจได้รับเชื้อนี้ได้จากการหายใจรับสปอร์เชื้อเข้าไป รองลงมาคือ เชื้อ *Penicillium* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ และอาจเป็นเชื้อราฉวยโอกาสที่ก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเช่นกัน

จากการศึกษาจุลินทรีย์ในมูลนกบุกรุกภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร สามารถตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจก่อโรคได้หลายชนิด โดยเฉพาะพบมากในมูลนกพิราบและนกกระจอก ที่มาอาศัยทำรังตามอาคารสถานที่ต่างๆภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร จึงควรมีการเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดโรคจากเชื้อจุลินทรีย์ในมูลนกเหล่านี้ ซึ่งอาจทำได้โดยการติดตั้งตาข่ายตามระเบียงอาคารต่างๆ เพื่อป้องกันไม่ให้นกมาอาศัยทำรังอยู่บริเวณที่มีคนอาศัยอยู่ หรือหมั่นทำความสะอาดบริเวณที่มีมูลนกสะสมตามพื้นคอนกรีต ทางเดิน ขอบหน้าต่าง ระเบียง เนื่องจากมูลนกมีสปอร์ และยังมีเซลล์แห้งที่มีน้ำหนักเบาจึงสามารถติดต่อได้โดยการหายใจ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจุลินทรีย์ในมูลนกบุกรุก 4 ชนิด ได้แก่ นกพิราบ นกเขาไฟ นกกระจอกบ้าน และนกเอี้ยง ซึ่งอาจมีแบคทีเรีย ราและยีสต์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคและเป็นอันตรายต่อสุขภาพของบุคลากรภายในมหาวิทยาลัยนเรศวรที่อาจสัมผัสมูลนกทั้งทางตรงและทางอ้อม ในช่วงฤดูฝน หนาว และร้อน โดยทำการสำรวจแหล่งสะสมและสุ่มเก็บตัวอย่างมูลนก 5 แห่ง ต่อนก 1 ชนิด รวม 20 ตัวอย่างต่อฤดูกาล ผลการศึกษาพบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียและจัดจำแนกชนิดโดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีได้รวม 18 สกุล 39 สปีชีส์ โดยพบ *Corynebacterium xerosis* มากที่สุด รองลงมาคือ *Escherichia coli Serratia liquefaciens* และ *Staphylococcus aureus* ตามลำดับทั้งสามฤดูกาล และแยกเชื้อราได้ 21 สกุล 33 สปีชีส์ โดยพบเชื้อราในสกุล *Aspergillus* spp., และ *Penicillium* spp. มากที่สุดตามลำดับ ส่วนเชื้อยีสต์จะเน้นการตรวจหายีสต์ *Cryptococcus neoformans* เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีการปนเปื้อนอยู่ในมูลสัตว์ปีกก่อโรคไข้สมองอักเสบ และปอดกับผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ โดยคัดเลือกเชื้อที่สร้างแคปซูล เจริญให้โคโลนีสีดำบนอาหาร caffeic acid agar และสร้างเอนไซม์ urease บนอาหาร urea agar base ได้ และยืนยันผลการจัดแนกโดยวิธีทางอณูชีววิทยา พบว่ายีสต์ที่คัดเลือกจัดจำแนกแล้วไม่พบ *C. neoformans* ในการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ดีจุลินทรีย์ที่พบในมูลนกสามารถก่อโรคติดต่อระหว่างสัตว์สู่คนหรือเป็นเชื้อฉวยโอกาสได้ดัง นั้นจึงควรป้องกันตนเองจากอันตรายที่อาจเกิดจากมูลนกในสภาวะที่ร่างกายไม่แข็งแรง หรือมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หากสัมผัสมูลนกควรล้างมือให้สะอาด สวมหน้ากากอนามัยเพื่อป้องกันการสูดดมละอองมูลนกหรือสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ร่างกาย และป้องกัน ทำความสะอาดเพื่อไม่ให้เป็นแหล่งสะสมมูลนก

คำสำคัญ : มูลนกบุกรุก แบคทีเรีย รา ยีสต์ *Cryptococcus neoformans*

Abstract

The objective of this study was the detection of microorganisms in dropping of species of invasive birds: Pigeon, Red Turtle Dove, Eurasian Tree Sparrow and Mynas. We wished to determine the bacteria fungi and yeast during different seasons: rainy, Winter and Summer. Microorganisms can be the cause of pathogenicity to humans in Naresuan University, through direct and indirect contract. We surveyed the reservoir through random sampling of 5 collected specimens per bird per season, totaling 20 samples. The results showed that, 18 genera with 39 species of bacteria were identified by biochemical tests in every eason, *Corynebacterium xerosis* was the most common, followed in order, by *Escherichia coli*, *Serratia liquefaciens* and *Staphylococcus aureus*. Similarly, 21 genera with 33 species of fungi were identified by morphological characteristics. The most common was the group of *Aspergillus* spp., and *Penicillium* spp. For yeast, only one strain of *Cryptococcus neoformans* was detected. It is a contaminant in birds' feces and a cause of meningitis with immune deficiency. For identification, the yeast capsule was isolated and cultured in caffeic acid agar which showed a black colony and urease test in urea agar base; it did not ferment in sugar test. Finally, molecular techniques confirmed our result. The result of yeast *C. neoformans* isolation was not detected. Microorganisms contaminating invasive birds' dropping can be the cause of zoonosis and opportunistic diseases. The good practice should be hand washing and using of a mask for preventing aerosol and spores of microorganisms in bird dropping areas and to clean the sources of them.

Key words : Invasive Birds' dropping, bacteria, fungi, yeast, *Cryptococcus neoformans*

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ		ก
บทสรุปผู้บริหาร		ข
สารบัญ		ค
สารบัญตาราง		ง
สารบัญภาพ		จ
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการทำวิจัย	1
	1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
	1.3 วัตถุประสงค์และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2	อุปกรณ์และวิธีการศึกษาวิจัย	10
	2.1 อุปกรณ์การวิจัย	10
	2.2 วิธีการศึกษาวิจัย	12
บทที่ 3	ผลและวิจารณ์ผลการศึกษาวิจัย	15
บทที่ 4	สรุปผลการศึกษาวิจัยและข้อเสนอแนะ	63
บทที่ 5	เอกสารอ้างอิง	64
ภาคผนวก	ภาคผนวก ก	69
	ภาคผนวก ข	76

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ภาพตัวอย่างแหล่งที่อยู่อาศัยของนกบุกรุกภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร	15
2	ตัวแทนสถานที่เก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกในฤดูฝน	24
3	ตัวแทนสถานที่เก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกในฤดูหนาว	25
4	ตัวแทนสถานที่เก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกในฤดูร้อน	26
5	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในมูลนกบุกรุกแต่ละชนิดในช่วงฤดูกาลต่างๆ	28
6	จำนวนเชื้อยีสต์ทั้งหมดที่พบในมูลนกบุกรุกแต่ละชนิดในช่วงฤดูกาลต่างๆ	29
7	จำนวนเชื้อราทั้งหมดที่พบในมูลนกบุกรุกแต่ละชนิดในช่วงฤดูกาลต่างๆ	29
8	ชนิดเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างมูลกนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด ใน 3 ฤดูกาล	31
9	ชนิดเชื้อราที่พบในตัวอย่างมูลกนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด ใน 3 ฤดูกาล	44
10	ชนิดแบคทีเรียที่พบในมูลนกบุกรุก ที่อาจก่อโรคในคน	67
11	ชนิดเชื้อราที่พบในมูลนกบุกรุกที่อาจจะก่อโรคในคน	68
12	ชนิดยีสต์ที่พบในมูลนกบุกรุกที่อาจก่อโรคในคน	69

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะการเจริญของยีสต์ *C. neoformans* บนอาหาร Caffeic acid agar และ Urea agar base	35
2	ผลการตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในฤดูฝนด้วย 1% agarose gel electrophoresis	36
3	แผนภาพวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในฤดูฝน	37
4	ผลการตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในฤดูหนาวด้วย 1% agarose gel electrophoresis	39
5	แผนภาพวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในฤดูหนาว	40
6	ผลการตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในฤดูร้อนด้วย 1% agarose gel electrophoresis	41
7	แผนภาพวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในฤดูร้อน	42
8	ลักษณะของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp.	46
9	ลักษณะของเชื้อรา *Penicillium corylophium*	47
10	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Curvularria lunata* Boedijn	48
11	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Rhizopus spp.*	49
12	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Cephaliophora tropica* Thaxter	50
13	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Trichoderma spp.*	51
14	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Pythium* spp.	52
15	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Mucor microstorus*	53
16	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Fusarium* spp.	54
17	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Phialophora* spp.	55
18	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Cephaliophora tropica* Thaxter	56
19	ลักษณะของเชื้อราในกลุ่ม Mycelia Sterilia	57
20	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Cladosporium* spp.	57
21	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Paecilomyces* spp.	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Acremonium* spp.	59
23	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Absidia* spp.	60
24	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Leptoxyphium* spp.	61
24	ลักษณะของเชื้อราสกุล *Alternaria alternate*	62

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากรายงานการวิจัยของผู้วิจัยและนักดูนกอิสระ ระหว่างปีพ.ศ. 2547-2552 ถึงบัญชีความหลากหลายของนกในมหาวิทยาลัย มีประมาณ 140-170 ชนิดพันธุ์ จัดอยู่ใน 60 แฟมิลี 20 ออเดอร์ ในจำนวนนี้ ประมาณ 50 % จะเป็นนกที่อาศัยได้ในเมือง ดังเช่น นกพิราบ (Rock Pigeon) นกกระจอก (Eurasian Tree Sparrow) นกเอี้ยงสาริกา (Common Myna) นกเอี้ยงด่าง (Asian Pied Starling) นกเอี้ยงหงอน (White-vented Myna) นกเขาไฟ (Red Turtle Dove) ซึ่งนกเหล่านี้อาศัยได้ดีและแพร่พันธุ์ได้ในเมืองต่างๆ จึงถูกเรียกว่า นกเมือง "city birds" ซึ่งส่วนใหญ่มีสถานะ "เป็นนกประจำถิ่น (residents)"

ในปี พ.ศ. 2557 มีการวิจัยถึงโครงสร้างสังคมของนกกับความเป็นเมืองในมหาวิทยาลัยนเรศวร ทำให้พบว่า นกในป่าประมาณ 50 % นั้นมีจำนวนน้อยลงไปเรื่อยๆ สัดส่วนของนกป่าและนกเมืองเปลี่ยนไป นกเมืองมีประชากรเพิ่มขึ้น โดยพบว่านกที่ชุกชุมสูงสุดคือนกเขาไฟ ซึ่งอาศัยตลอดปีในมหาวิทยาลัย แต่นกเขาไฟนั้น ไม่ได้สร้างความเดือดร้อนอย่างชัดเจนเหมือนนกชนิดอื่น ส่วนนกที่สร้างความรำคาญและความเสียหายให้กับมนุษย์อย่างชัดเจน คือกลุ่มนกเอี้ยง (Mynas) โดยเฉพาะนกเอี้ยงหงอน นกเอี้ยงสาลิกา เนื่องจากนกพวกนี้จะรวมฝูงกันเกาะนอนในพุ่มไม้และสายไฟในเวลากลางคืน ในบริเวณชุมชนทั้งในเมืองและชานเมือง ทำให้บริเวณที่นกมาเกาะนอนได้รับผลกระทบอย่างมากจากการถ่ายมูลและกลิ่นของมูล ฝุ่นไรและปรสิตที่มีอยู่ในมูลและตัวของนก อีกทั้งในมูลนกอาจมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ได้

มูลนกที่ขับถ่ายออกมาจำนวนมากและสะสมในพื้นที่ มักส่งกลิ่นเหม็น สร้างความสกปรกและอาจมีเชื้อโรคปะปนด้วย ทำให้พื้นที่ที่นกเกาะนอนเป็นประจำสร้างปัญหาด้านสุขภาวะและสุขภาพให้กับคนในสังคมเมืองได้ เราจึงเรียกนกกลุ่มที่สร้างความเดือร้อนว่า **นกบุกรุก (invasive birds)** เช่น ในต่างประเทศนกในกลุ่มนกเอี้ยง คือ Indian Myna เป็นนกบุกรุกในยุโรป อเมริกา และประเทศในเอเชียบางพื้นที่ ในประเทศไทย มีนกในกลุ่มนกเอี้ยงที่สร้างความเดือดร้อน คือ นกเอี้ยงหงอนและนกเอี้ยงสาลิกา เนื่องจากมีจำนวนประชากรมากมาย ซึ่งในที่นี้จะเรียกว่า "กลุ่มนกเอี้ยง" สำหรับในมหาวิทยาลัย

นเรศวร พบว่ากลุ่มนกเอี้ยงมักเกาะนอนในบริเวณชุมชน หรือต้นไม้ใกล้อาคาร ซึ่งได้แก่ โรงพยาบาล อาคารเรียน สถานที่ใกล้หอพักนิสิตและหอพักอาจารย์ เป็นต้น

มูลนกเป็นปัญหาทั้งทางด้านความสะอาดของอาคารและสถานที่ รวมไปถึงด้านสุขภาพอนามัย มูลนกมักมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อยู่ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถก่อให้เกิดโรคจึงเป็นปัญหาทางด้านสุขภาพที่สำคัญ เนื่องจากมูลนกที่พบภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร มักจะพบในบริเวณที่มีประชาชนพลุกพล่าน จึงเป็นปัจจัยเสี่ยงที่อาจทำให้เกิดการติดเชื้อได้ จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในมูลนกได้แก่ *Escherichai coli, Salmonella, Llisteria, Campylobacter, Cryptococcus* และ *Candida* (OSH, 2012) นอกจากนี้อธิบดีกรมอนามัย (พรเทพ, 2557) กล่าวว่า ภายในมูลนกหลายชนิดเป็นแหล่งเพาะเชื้อรา โดยเฉพาะเชื้อราคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนส์ (*Cryptococcus neoformans*) ซึ่งพบมากในมูลนกตระกูลนกพิราบ และนกอื่นๆ ประชาชนสามารถรับเชื้อนี้ได้ด้วยการหายใจเอาสปอร์ หรือตัวเชื้อราเข้าไปในปอด โดยทั่วไปเชื้อราและสปอร์จะมีน้ำหนักเบา และถูกพัดพาให้กระจายไปในอากาศได้ง่าย หากเข้าใกล้บริเวณที่มีรังนก หรือเป็นโรงเรือนเลี้ยงนก หรืออยู่ใกล้กรงนกที่ไม่ได้ทำความสะอาด มีมูลนกสะสมจำนวนมาก ก็อาจมีโอกาสเสี่ยงที่จะหายใจเอาเชื้อรา หรือสปอร์ของเชื้อราเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจได้ เมื่อได้รับเชื้อจะมีผลที่ปอดและลามไปสู่ส่วนต่างๆ ของร่างกายผ่านกระแสเลือด การเกิดโรคจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ คนที่ได้รับเชื้อนี้เข้าไปจะมีอาการปวดศีรษะเป็นพักๆและอาการปวดจะเพิ่มขึ้นร่วมกับอาการหน้ามืด วิงเวียน ปวดขมับ เบ้าตา บางครั้งอาจถึงอาเจียน ไอ และมีเสมหะปนเลือด มีไข้ต่ำ น้ำหนักลด อาจมีหลอดลมอักเสบร่วมด้วย ในบางรายจะไม่แสดงอาการ แต่เชื้อจะฟักตัวในร่างกายเป็นเวลาหลายปี จนเมื่อร่างกายอ่อนแอหรือภูมิคุ้มกันบกพร่องจะแสดงอาการออกมา โดยเชื้ออาจพบได้มากในกลุ่มเด็กเล็ก ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยโรคมะเร็ง หรือผู้ที่มีภูมิต้านทานต่ำ ซึ่งจะมีอาการรุนแรงกว่าคนปกติและรักษาได้ยากกว่า และยังอาจจะพบการติดเชื้อฉวยโอกาสต่างๆที่สามารถพบได้ในมูลนกอีกด้วย

เนื่องจากบริเวณภายในมหาวิทยาลัยนเรศวรมีนกบุกรุกอาศัยอยู่จำนวนมาก ซึ่งนอกจากจะสร้างความรำคาญแก่ผู้ใช้พื้นที่บริเวณดังกล่าวแล้ว ยังอาจก่อให้เกิดโรคได้ ถ้าได้รับเชื้อจุลินททรีย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม คณะผู้วิจัยจึงเห็นถึงความสำคัญจากการที่มีนกอยู่อาศัยและมีการถ่ายมูลออกมาสะสมอยู่ในบริเวณดังกล่าวจำนวนมาก งานวิจัยครั้งนี้จึงมีความสนใจศึกษาหาจุลินทรีย์ ที่อาจก่อให้เกิดโรคในมูลนกบุกรุก ได้แก่ นกเอี้ยง นกกระจอก นกเขา และนกพิราบ ในมหาวิทยาลัยนเรศวร โดยทำการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา ในมูลนกบุกรุก ที่อาจก่อให้เกิดโรคแก่ผู้เกี่ยวข้องได้ และเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการป้องกันและการดูแลสุขภาพอนามัยจากการติดเชื้อฉวยโอกาส

ที่อาจพบได้ในมูลนก ตลอดจนนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ออกเผยแพร่แก่บุคลากร และนักศึกษาในมหาวิทยาลัยนเรศวรต่อไป

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความหลากหลายของนกลดต่ำลงในสังคมเมือง แต่จำนวนประชากรของนกบางชนิดเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Ortega-Alvarez and MacGregor-Fors (2009) ที่รายงานความหลากชนิดของนกลดลงและความชุกชุมเพิ่มขึ้นในสภาพความเป็นเมือง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงเป็นเมืองนั้น ได้ทำลายถิ่นอาศัยที่เป็นลักษณะเดิมของนกไป ทำให้พื้นที่เมืองไม่เหมาะสมกับนกทุกชนิดที่เคยอาศัยอยู่ในพื้นที่นั้นมาก่อน (Melles, Glenn and Martin, 2003) แต่เมืองจะเหมาะสมกับนกบางชนิดที่สามารถปรับตัวได้ และสร้างรังสืบพันธุ์ได้ เรียกนกเมือง (city birds) ซึ่งการเพิ่มจำนวนมากขึ้นนี้ได้ก่อความรำคาญและสร้างมลภาวะต่อสุขภาพให้กับมนุษย์มากขึ้น

นกเมือง ที่มีจำนวนมากจนสร้างความเดือดร้อนให้กับมนุษย์ จะถูกเรียกว่า "นกบุกรุก หรือ invasive birds" โดยนกบางชนิดพันธุ์ในกลุ่มนกเอี้ยง (อันดับ Aeridotheres และอันดับ Sturnus) เป็นนกที่สร้างปัญหามากให้กับโลก (Lowe et al, 2000) นกบุกรุกของแต่ละประเทศต่างชนิดกันไป เช่นที่ยุโรปและอเมริกา มีรายงานนกบุกรุกคือ นกกิ้งโครง (European starling, Sturnus vulgaris) (Wikipedia, 2015) สำหรับในประเทศไทย มีรายงานสิ่งมีชีวิตบุกรุกโดย Global invasive species database (nd) ว่ามีนกบุกรุกสามชนิดคือ นกพิราบ (Columba livia) อีกา House crow และนกแว่นตาขาว Japanese White-eye และจัดลำดับ 100 ชนิดสัตว์บุกรุกที่เลวร้ายที่สุดในโลก ได้แก่ นกปรอด Red-vented bulbul (Pycnonotus cafer) และนกกิ้งโครงพันธุ์ยุโรป (common starling, Sturnus vulgaris) แต่พบว่านกดังกล่าว ไม่ได้สร้างความเดือดร้อนให้กับชุมชนในประเทศไทย หรือพบน้อยตัวมากแบบพัดหลงมา (vagant) แต่ประเทศไทยจะพบว่ามีนกเอี้ยงหงอน (White-vented Mynah) และนกเอี้ยงสาลิกา (Common Myna, Acridotheres tristis) เป็นจำนวนมากมายหลายพันตัวในแต่ละพื้นที่ นกสองชนิดนี้พบอาศัยได้ตั้งแต่ชนบท จนถึงในเมือง พบว่า นกอยู่อาศัยตามสายไฟฟ้า ต้นไม้ในเมืองใหญ่หรือถนนหลวง ในการหากินและเกาะนอน

การเกาะนอนเป็นช่วงเวลาที่นกจะมีการถ่ายมูลซึ่งมีกลิ่นเหม็น และปล่อยฝุ่นละออง ทำให้ชุมชนเมืองได้รับผลกระทบ และกังวลใจว่าในมูลนกอาจมีเชื้อจุลินทรีย์หรือปรสิตที่สามารถก่อโรคต่อมนุษย์ได้ กลุ่มนกเอี้ยงมีพฤติกรรมรวมฝูงกันก่อนเวลาของการจับคู่สร้างรัง (breeding time) นกที่ยังไม่มีคู่จึงรวมฝูงกันทำกิจกรรมประจำวันได้แก่ การหากิน (กลุ่มเล็กๆ ประมาณ 5-20 ตัว) และการ

เกาะนอนในเวลาค่ำคืน (กลุ่มใหญ่มากกว่า 50 ตัวขึ้นไปถึงเป็นพันตัว) ในช่วงการเกาะนอน นกจะมีการขับถ่ายของเสียออกมาด้วย มูลของนกจำนวนมากนี้จะสะสมและส่งกลิ่นเหม็นและอาจมีเชื้อ *Histoplasma capsulatum* สะสมอยู่ (Dodge,1965)

นกกลุ่มนกเอี้ยง ที่เข้าเกาะนอนจัดเป็นนกบุกรุกในมหาวิทยาลัย นอกจากนี้ ยังมีนกบุกรุกอีกสองชนิดคือ นกกระจอก และนกพิราบ ที่พบว่าสร้างรังและอาศัยประจำถิ่น นกที่อาศัยใกล้ชิดกับมนุษย์มักจะถ่ายมูลทำให้มนุษย์มีโอกาสสัมผัสได้เสมอ จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ในมูลนกบางชนิด โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งมีรายงานการพบไวรัสและเชื้อยีสต์ *Cryptococcus neoformanns* ในมูลนกพิราบ (rock pigeon) จำนวนมาก รวมถึงนกกระจอก (sparrow) และพบจุลินทรีย์อื่นๆ ในมูลนกเขาและนกหงษ์หยกด้วย เนื่องจากมูลนกมีสารที่เรียกว่า creatinine ที่จุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อราสามารถใช้สารนี้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (http://www.nokkhao. com/birddrop.ht) เชื้อจะมีชีวิตและอยู่ได้ในมูลนกนานนับปี คนได้รับเชื้อยีสต์ *C. neoformanns* ได้ โดยการหายใจเอาสปอร์หรือตัวเชื้อเข้าไป และอาจมีอาการติดเชื้อภายในระบบหายใจได้ ก่อให้เกิดโรค Cryptococcosis และแพร่กระจายไปยังระบบประสาทส่วนกลาง นอกจากนี้ ยังอาจพบแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ เช่น แบคทีเรียที่พบในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น เช่น *E. coli* และเชื้อที่พบได้ในฝุ่นละออง และตามพื้นดิน เช่น *Streptococcus* และ *Clostridium* ซึ่งพบในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและนก (จินตนา, 2549) จึงนับว่านกที่อาศัยใกล้ชิดกับคนนั้นอาจมีโอกาสก่อให้เกิดโรคต่อคน

การเกิดโรคจากมูลนก อาจเกิดได้จากแบคทีเรียที่สำคัญ เช่น *E. coli, Salmonella, Listeria, Campylobacter,* และ *Chlamydia psittaci* โดยเชื้อ *Listeria* จะเป็นสาเหตุของโรค *listeriosis* เชื้อ *Salmonella, E. coli* และ *Campylobacter* เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง และ *Chlamydia psittaci* ก่อโรค psittacosis ส่วนราและยีสต์ที่พบในมูลนกได้แก่ *Cryptococcus* ซึ่งก่อโรค Cryptococcosis และ *Histoplasma capsulatum* เป็นสาเหตุของโรค histoplasmosis รวมทั้ง *Candida* ที่ก่อโรค candidiasis ส่วนเชื้อไวรัสที่พบจะก่อให้เกิดโรค meningitis และ Newcastle disease นอกจากนี้ยังพบโปรโตซัวซึ่งก่อให้เกิดโรค toxoplasmosis และ trichomoniasis ด้วย (Suphan et al., 2002)

Cryptococcus neoformans เป็นราก่อโรคที่สามารถเจริญในสมองของมนุษย์และสัตว์ (Rippon, 1988) พบแพร่กระจายในทั่วโลก แบ่งได้เป็น 2 varieties 5 serotypes คือ *C. neoformans* var. *neoformans* serotypes A, D และ AD และ *C. neoformans* var. *gatti* serotypes B และ C (Kown-Chung and Bennett, 1984; Ikeda, et.al., 1982) แหล่งสำคัญของเชื้อ *C. neoformans* var.

neoformans คือ สารคัดหลั่งต่างๆ จากนกพิราบ และดินที่ปนเปื้อนสารต่างๆ เหล่านี้จากสัตว์ปีก (Swinne Desgain, 1975; Schonheyder and Stenderup, 1982) เชื้อ *C. eoformans* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญ โดยเป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อโรคโดยเฉพาะในกลุ่มคนที่มีภูมิต้านทานร่างกายอ่อนแอ (Suphan et. al., 2006)

Haag-Wackernagel and Moch, (2004) ได้รายงานเกี่ยวกับระบาดวิทยาและการติดต่อของโรคที่เกิดจากมูลนกพิราบสู่มนุษย์ และได้ทำการสืบสวนเอกสารจำนวน 176 ฉบับ ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของผู้ป่วยที่มาจากมูลนกพิราบสู่มนุษย์ ที่มีรายงานระหว่างปี 1941 และ2003 พบว่าในมูลของนกพิราบมีการเกิดของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 60 ชนิด แต่มีเพียง 7 ชนิดที่สามารถแพร่เชื้อสู่มนุษย์ได้ คือ เชื้อ *Salmonella enteric, Chlamydophila psittaci ,Histoplasma capsulatum, Aspergillus* spp., *Candida parapsilosis, Cryptococcus neoformans* และ *Toxoplasma*

Pedroso, et al., (2007) ได้ทำการศึกษา ตรวจคัดแยกเชื้อในสกุล *Cryptococcus neoformans* ในอากาศและมูลนกในประเทศบราซิล นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการสร้างแคปซูลด้วย โดยได้ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมทั้งหมด 86 ตัวอย่าง (เป็นตัวอย่างมูลนก 54 ตัวอย่าง และในอากาศ 32 ตัวอย่าง) สามารถคัดแยกเชื้อได้ 41 เชื้อ เป็น *C. neoformans* var. neoformans จำนวน 15 ตัวอย่าง (มูลนก 12 ตัวอย่าง และอากาศ 3 ตัวอย่าง), *C. albidus* จำนวน 15 ตัวอย่าง (มูลนก 12 ตัวอย่าง และอากาศ 3 ตัวอย่าง), *C. laurentii* จำนวน 9 ตัวอย่าง (มูลนก 7 ตัวอย่าง และอากาศ 2 ตัวอย่าง), และ *C. uniguttulatus* จำนวน 2 ตัวอย่าง (จากมูลนกเท่านั้น) และนอกจากนี้ยังพบการสร้างแคปซูลโดย *C. neoformans* var. *neoformans* พบร้อยละ 66.7, *C. albidus* พบร้อยละ 88.9, *C. laurentii* และ *C. uniguttulatus* พบร้อยละ 50 จากการศึกษาพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในสกุลคริปโตค็อคคัส หลายชนิดอยู่ร่วมกันในระบบนิเวศเดียวกันและแต่ละชนิดสามารถที่จะสร้างผลผลิตที่มีปัจจัยความรุนแรงต่อมนุษย์และสัตว์ได้

Suwannee, et al., (2008) ทำการสำรวจแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกที่เก็บในจังหวัดเชียงใหม่ และจากมูลนกในสวนสัตว์เชียงใหม่ เป็นตัวอย่าง มูลนกเอี้ยง นกพิราบ นกเขา และมูลไก่บ้าน จำนวน 360 ตัวอย่าง โดยเก็บในเขต 7 อำเภอของจังหวัดเชียงใหม่ 263 ตัวอย่าง และเป็นตัวอย่างมูลนกในสวนสัตว์เชียงใหม่จำนวน 97 ตัวอย่าง แยกเชื้อ *C. neoformans* ในมูลนกพิราบได้ร้อยละ 26.2 มูลนกเขา ได้ร้อยละ 20.0 มูลไก่บ้านได้ร้อยละ 0.5 ตัวอย่างมูลนกในสวนสัตว์เชียงใหม่ 97 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากมูลนกจำนวน 27 สปีชีส์แยกเชื้อ *C. neoformans* ได้จากมูลนกเงือกปากแดง (red-

billed hornbill) ร้อยละ 11.1 แหล่งในธรรมชาติของเชื้อ *C. neoformans* ในจังหวัดเชียงใหม่ คือ มูลนกพิราบ และนกเขา และในการแยกเชื้อราชนิดนี้ในมูลนกจำนวน 27 สปีชีส์ของสวนสัตว์เชียงใหม่ พบว่ามูลนกเงือกปากแดง ให้ผลเป็นบวก

ANDRADE-SILVA, et al., (2010) รายงานพบเชื้อ *Cryptococcus* จากพื้นที่บริเวณรอบนอกของโรงพยาบาล ใน Minas Gerais State ประเทศบราซิล จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 73 ตัวอย่าง โดย 62 ตัวอย่างเป็นตัวอย่างจากมูลนก และ 11 ตัวอย่างเป็นตัวอย่างจากเศษซากกิ่งไม้จากพื้นที่รอบนอกโรงพยาบาลทำการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อคัดแยกเชื้อ พบว่า จากตัวอย่างที่ทำการคัดแยกทั้งหมดนั้นเป็นเชื้อ *Cryptococcus* สปีชีส์ *Cryptococcus neoformans* 43.8 % และ *Cryptococcus laurentii* 23.3 % และเชื้อราที่สามารถพบได้ในธรรมชาติทั่วไป 10.9 % ในที่นี้เชื้อ *Cryptococcus* สปีชีส์ *Cryptococcus laurentii* สามารถพบได้ในตัวอย่างเศษซากกิ่งไม้ โดยเฉพาะต้นยูคาลิปตัส

ธันยาการย์และธารินี (2554) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกภายในบริเวณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เนื่องจากเป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (cryptococcosis) โดยเฉพาะในผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซึ่งอาจได้รับเชื้อได้โดยการหายใจเอาสปอร์ของเชื้อจากธรรมชาติซึ่งมีอยู่ในมูลของสัตว์ปีกเข้าไปในปอด ซึ่งพบมากในมูลนกพิราบ โดยเก็บตัวอย่างมูลนกจาก 25 อาคาร ได้ตัวอย่างมูลนกทั้งหมด 53 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างจากมูลนกพิราบ นกเอี้ยง นกกระจอกบ้าน และค้างคาว ทำการแยกเชื้อในสารละลายมูลนกที่ผสมยาปฏิชีวนะและเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) และ Littman oxgall agar (LOA) พิสูจน์ชนิดโดยอาศัยลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากการย้อมด้วย India ink และทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี พบว่าแยกเชื้อ *C. neoformans* ได้จากมูลนกพิราบมากที่สุด 20 จาก 37 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 54.05 มูลนกกระจอกบ้าน 1 จาก 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.66 จากผลการทดลอง อาจกล่าวได้ว่า ภายในมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีสามารถตรวจพบเชื้อรา *C. neoformans* ได้จากมูลนก โดยเฉพาะมูลนกนกพิราบ จึงควรมีการให้ความรู้ในเรื่องการป้องกันและควบคุมโรคที่อาจติดจากเชื้อนี้

Maryam et al., (2013) ได้ทำการแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* และเชื้อราฉวยโอกาสอื่นๆ ในมูลนกพิราบ โดยเก็บตัวอย่างมูลนกพิราบจำนวน 120 ตัวอย่าง จากอาคารต่างๆ ในเมืองอิสฟาฮาน (Isfahan) ประเทศอิหร่าน ในระยะเวลา 9 เดือน (กันยายน 2010-พฤษภาคม 2011) จากนั้นนำตัวอย่างมูลนกมาแยกเชื้อโดยเจือจางในน้ำเกลือ 1:10 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ทำการคัดเลือกตัวอย่างที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Cryptococcus neoformans* มา

เพาะเลี้ยงต่อลงบนอาหาร Bird seed agar ทดสอบการสร้าง Capsule โดยการย้อมด้วย India ink และทดสอบการสร้างเอนไซม์ Urease บนอาหาร Urea ระบุชนิดของเชื้อ *Candida* โดยสังเกตลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหาร CHROM agar candida ส่วนการตรวจหาเชื้อราชนิดอื่น ๆ จะขึ้นอยู่กับการศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะทางชีวเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาพบว่าสามารถแยก *Cryptococcus neoformans* ได้จำนวน 3 ไอโซเลท, *Candida albicans* 8 ไอโซเลท, *Candida tropicalis* 5 ไอโซเลท, *Candida parasilosis* 5 ไอโซเลท, *Candida guiliermondii* 4 ไอโซเลท *Trichosporon beigelii* 1 ไอโซเลท, *Penicillium* spp. 30 ไอโซเลท, *Aspergillus* spp. 25 ไอโซเลท, *Mucor* spp. 18 ไอโซเลท, *Rhizopus* spp. 14 ไอโซเลท, *Fusarium* spp. 4 ไอโซเลท, *Cladosporium* spp 2 ไอโซเลท และ *Paecilomyces* spp. 11 ไอโซเลท

Nweze et al., (2015) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับโรค Cryptococcosis ที่เกิดจากเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสในการก่อโรคที่พบได้บ่อย และเมื่อติดเชื้อแล้วมีอาการทางคลินิกที่ร้ายแรงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ติดเชื้อเอชไอวีหรือเอดส์ และผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องอื่น ๆ เนื่องจากในประเทศไนจีเรียการติดเชื้อเอชไอวีหรือเอดส์มีความเสี่ยงสูง จึงทำการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *Cryptococcus neoformans* หรือ *C. gattii* ในมูลนกพิราบที่ได้จากภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไนจีเรีย โดยเก็บตัวอย่างมูลนกพิราบทั้งหมด 177 ตัวอย่าง จาก 6 สถานที่ครอบคลุม 10 เมือง 5 รัฐ และทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างมูลนก พบว่าสามารถแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ได้ 39 ไอโซเลท จาก 177 ตัวอย่าง คิดเป็น 22% โดยตรวจไม่พบเชื้อ *C. gattii* กลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่คิดเป็น 32.4% ได้มาจากเรือนนกพิราบ เป็นตัวอย่างจากตลาด คิดเป็น 31.8% และน้อยที่สุดได้จากโบสถ์คิดเป็น 4% ส่วนเมืองที่พบเชื้อ *Cryptococcus neoformans* มากที่สุดคือเมือง Enugu-Ezike แยกเชื้อจากพื้นที่อื่น ๆ ได้ 9.1% การศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกพิราบในประเทศไนจีเรีย เพื่อให้ทราบถึงความสำคัญทางนิเวศวิทยาและระบาดวิทยาของเชื้อชนิดนี้

Hussei et al., (2015) ได้รายงานไว้เป็นที่แรกเกี่ยวกับการแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* และเชื้อราอื่นๆจากมูลนกพิราบในเมืองเมกกะ ประเทศซาอุดิอาระเบีย โดยเก็บตัวอย่างมูลนกพิราบจำนวน 112 ตัวอย่าง จาก 12 อำเภอ โดยทำการเจือจางแล้วเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Sabouraud dextrose agar, Urea agar และอาหาร esculin agar ทำการตรวจสอบลักษณะของโคโลนีที่คาดว่าน่าจะเป็นเชื้อ *Cryptococcus neoformans* โดยนำมายืนยันผลด้วยการย้อมด้วย India ink ดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตการสร้างเอนไซม์ Urease และโคโลนีสีน้ำตาลบนอาหาร esculin

agar นอกจากนี้ยังศึกษารูปแบบความไวของยีสต์ 5 ชนิดและรา 4 ชนิด ต่อยาต้านเชื้อรา 5 ชนิด โดยใช้วิธี agar disk diffusion พบเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จาก 38 ตัวอย่าง คิดเป็น 34% จากการทดสอบความไวต่อยาต้านเชื้อรา พบว่า เชื้อราที่ผ่านการทดสอบแล้ว 9 ชนิดมีความไวต่อยา Mycosat® ในขณะที่ยา Fungican® ยับยั้งเชื้อได้เพียง 4 ชนิดเท่านั้น จากการทดสอบพบว่า *C. neoformans* มีความไวปานกลางต่อสารประกอบที่ได้รับการทดสอบทั้งหมด แต่เชื้อสามารถต้านทานยา Flucoral® ได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าในมูลนกพิราบอาจเป็นแหล่งสะสมของยีสต์ในกลุ่ม basidiomycetous นอกเหนือจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ ในภูมิภาคนี้

นุรอัยนี และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาโดยการเก็บตัวอย่างมูลนกและไก่ในพื้นที่ 5 ตำบล อำเภอเมือง จังหวัดยะลา ได้แก่ ตำบลสะเตง สะเตงนอก บือนังสาเรง ลำใหม่ และท่าสาป เพื่อตรวจหาเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* โดยเก็บทั้งหมด 120 ตัวอย่าง แบ่งเป็นมูลนกพิราบ นกเขา ไก่บ้าน และไก่เนื้อ ชนิดละ 30 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึง พฤศจิกายน 2558 ซึ่งครอบคลุมทั้งฤดูร้อนและฤดูฝน จากการศึกษาพบว่าในมูลนกพิราบมีการปนเปื้อนของเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* มากที่สุด (20%) ส่วนในนกเขาและไก่บ้านพบรองลงมา (10%) และการแพร่กระจายของเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* มากที่สุดในฤดูฝน (75%) โดยพบมากที่สุดในมูลนกพิราบ (33.33%)รองลงมาคือไก่บ้าน(25%)

Maysoon et.al., (2017) ศึกษาและจัดจำแนกยีสต์และราจากมูลนกในเมืองแบกแดด โดยทำการเก็บตัวอย่างจากมูลนกจำนวน 100 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นนก 3 ชนิด ได้แก่ นกพิราบ (70) นกเลี้ยง (25) และไก่ (5) แยกเชื้อและเพาะเลี้ยงบนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) จากการศึกษาสามารถจำแนกได้เป็นยีสต์ 25% และเป็นรา 63% โดยจัดจำแนกชนิดของเชื้อราได้เชื้อ *Penicillum* 19% , *Cryptococcus* spp. 13%, *Mucor* 9%, *Geotricum* 8%, *Rizopus* 7%, *Candida* spp. 6%, *Aspergillus niger* 6%, *Aspergillus fumigatus* 5%, *Aspergillus flavus* 4%, *Cladosporium* 3% และ *Alternerria* 2% จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ามูลนกพิราบ นกเลี้ยง และไก่ เป็นแหล่งสะสมของเชื้อราและยีสต์ซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์ได้

การวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาจุลินทรีย์ในมูลนกพิราบ นกเอี้ยงและนกกระจอก ซึ่งเก็บตัวอย่างจากในมหาวิทยาลัยด้วยเช่นกัน

1.3 วัตถุประสงค์และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบชนิดจุลินทรีย์ก่อโรคหรือไม่ก่อโรคที่อาจพบในมูลนกบุกรุกกลุ่มนกเอี้ยง นกกระจอก นกเขาและนกพิราบ สำหรับเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังอันตรายที่อาจเกิดจากมูลนก ในชุมชนมหาวิทยาลัยนเรศวร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อให้ชุมชนมหาวิทยาลัยนเรศวรทราบและตระหนักถึงความสำคัญของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในมูลนก เพื่อจักได้เพิ่มการป้องกันและรักษาความสะอาดของอาคาร สถานที่ที่มีนกอาศัยอยู่ และดำเนินการปรับเปลี่ยนสถานที่ให้ไม่เอื้อต่อนก หรือใช้กระบวนการไล่นกด้วยวิธีการต่างๆ เช่น เสียง และสิ่งเร้าอื่นๆ ต่อไป

บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีการศึกษาวิจัย

2.1 อุปกรณ์การวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างมูลนก

1. ถุงมือ
2. หน้ากากอนามัย
3. ช้อนสแตนเลส
4. ถุงซิปล็อค
5. แอลกอฮอล์ 70%
6. ปากกาเขียนเครื่องแก้ว
7. เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ Alarm-Hygrometer

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. หม้อนึ่งความดันไอ(Autoclave)
2. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
3. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) 30 °C และ 37 °C
4. Laminar Air Flow
5. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
6. เครื่องชั่งสาร
7. กล้องจุลทรรศน์
8. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)
9. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)
10. ไมโครปิเปต (Auto pipette)
11. Pipette tip
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์
13. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
14. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
15. จานเพาะเชื้อ (Plate)
16. หลอดทดลอง (Test tube)
17. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
18. กระบอกตวง (Cylinder)
19. แผ่นสไลด์ (Slide)
20. กระจกปิดสไลด์ (Cover slip)
21. ปากคีบ (Forceps)
22. PCR tube
23. Parafilm

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สีคริสตัลไวโอเลต (Crytal violet)
2. สีซาฟรานิน-โอ (Safranin-O)
3. สารละลายไอโอดีน (Iodine)
4. แอลกอฮอล์ 70% และ 90%

5. สีมาลาไคท์ กรีน (Malachite green)
6. สีนิโกรซิน (Nigrosin)
7. สารลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2)
8. สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)
9. สารละลาย 0.1% Peptone water
10. McFaland No 0.5
11. PYR Reagent
12. α-naphthol
13. Sulfanilic acid
14. α-naphthylamine
15. 1% Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride
16. Kovac's reagent
17. Methyl red
18. พาราฟินเหลว
19. น้ำยาทาเล็บ
20. สี Lactophenon cotton blue
21. 1XTBE buffer
21. PCR reaction kit (KOD Fx Neo)
22. 0.8% Agarose gel ใน 0.5X TBE buffer
23. น้ำกลั่น

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง (ภาคผนวก ข)

1. Trypticase soy agar (*TSA*)
2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)
3. Dichloran Rose- Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)
4. Nutrient Agar (NA)
5. Potato Dextrose Agar (PDA)
6. Manitol Salt Agar (MSA)
7. Blood Agar
8. Bile Esculin Agar
9. PYR Agar
10. Starch Agar
11. Ornithine decarboxylase broth
12. 6.5%NaCl Agar
13. Macconkey agar
14. Urease agar
15. Simmon's Critrate agar
16. Sulfide, Indole, Motility (SIM) medium
17. Caffeic acid agar
18.Glucose broth
19. Lactose broth
20. Sucrose broth
21. Galactose broth
22. Maltose broth
23. Raffinose broth
24. Arabinose broth
25. Sorbitol broth
26.MR-VP broth
27. Nitrate broth
28. Lysine decarboxylase broth
29. Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) agar

2.2 วิธีการศึกษาวิจัย

2.2.1 การสำรวจแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งมูลนกบุกรุก

สำรวจสถานที่ต่าง ๆ ที่มีนกบุกรุกอาศัยอยู่และถ่ายมูลสะสมไว้ภายในหาวิทยาลัยนเรศวร เช่น หอพักนักศึกษา อาคารเรียน สำนักงาน โรงพยาบาล และต้นไม้ การสังเกตว่ามีนกบุกรุกอาศัยอยู่หรือไม่ โดยดูจากการเกาะนอนและการสร้างรังของนกเพื่อใช้ในการระบุว่ามูลนกที่พบในแต่ละสถานที่นั้นเป็นมูลของนกชนิดใด จากนั้นทำการเลือกบริเวณที่พบนกบุกรุกและมีการถ่ายมูลสะสมไว้ในบริเวณเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน เพื่อเป็นตัวแทนของแหล่งตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่าง 5 แหล่งต่อนกหนึ่งชนิด การเลือกสถานที่ในการเก็บตัวอย่างต้องพิจารณาจากความสำคัญของสถานที่นั้น ๆ เช่น เป็นสถานที่ที่มีผู้คนอยู่อาศัยและผ่านไปมาอย่างสม่ำเสมอ หรือเป็นสถานที่ที่ใช้ในการจัดกิจกรรมต่าง ๆ เป็นประจำ เนื่องจากสถานที่เหล่านี้อาจเป็นจุดที่มีความเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากมูลนก

2.2.2 การเก็บตัวอย่างมูลนก

ทำการเก็บตัวอย่างมูลนก 5 จุดต่อนก 1 ชนิด รวมทั้งหมด 20 จุด เก็บตัวอย่างมูลนกปริมาณจุดละไม่น้อยกว่า 10 กรัม การเก็บตัวอย่างทำได้โดยการใช้ช้อนสแตนเลสตักมูลนกบุกรุกใส่ลงในถุงพลาสติกใสซิปล็อค ปิดปากถุงให้มิดชิดและระบุรหัสตัวอย่างบนถุงให้ชัดเจน ทำการจดบันทึกอุณหภูมิ (°C) และความชื้น (%RH) ณ.จุดที่เก็บตัวอย่างทุกจุด ขณะเก็บตัวอย่างผู้เก็บจะต้องสวมถุงมือและหน้ากากอนามัยทุกครั้ง เพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายของมูลนกบุกรุกซึ่งอาจมีเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพผู้เก็บตัวอย่าง และทำการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูกาลต่างๆ 3 ฤดู ได้แก่ ตัวแทนในช่วงฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว

2.3 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากมูลนกบุกรุก

การเตรียมสารละลายมูลนก

ชั่งตัวอย่างมูลนก 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารละลาย 0.1% Peptone water ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าให้มูลนกกระจายดี และตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที จะได้ตัวอย่างมูลนกที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางต่อแบบ 10 เท่า จนได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ นำสารสะลายเจือจางมูลนกที่เหมาะสมไปเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Spread plate และทำการตรวจนับจุลินทรีย์ พร้อมตรวจค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมูลนกด้วยเครื่องวัดพีเอช

การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลนกบุกรุก

ดูดตัวอย่างสารละลายมูลนกที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมสารละลายมูลนก ปริมาตรตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) โดยทำความเจือจางละ3 ซ้ำ ใช้แท่งแก้วรูปตัววี จุ่มในแอลกอฮอล์ 95% และลนไฟเพื่อทำการฆ่าเชื้อ พักไว้ให้เย็นนำมาเกลี่ยตัวอย่างสารสะลายมูลนกให้กระจายทั่วจานอาหาร ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร นับจำนวนโคโลนีที่เหมาะสมที่อยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน จากจานอาหารมาทำการ Cross streak บนอาหาร Nutrient Agar (NA) เพื่อทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างมูลนกบุกรุก

ดูดตัวอย่างสารละลายมูลนกที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมสารละลายมูลนก ปริมาตรตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) ทำการ spread plate เพื่อให้เชื้อกระจายดี บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4-7 วัน โดยทำการตรวจเช็คผลทุกวัน เมื่อพบเชื้อเจริญ นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญ และทำการเขี่ยเชื้อที่มีลักษณะทีบแสง ขอบเรียบ สีขาวครีม และเป็นเมือก มาย้อมด้วย nigrosin หรือ India ink และตรวจสอบดูลักษณะว่าเป็นเชื้อยีสต์ที่สร้างแคปซูลหรือไม่ โดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะคล้ายสร้างแดปซุลมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์อีกครั้ง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อทดสอบทางชีวเคมี และเทคนิคทางโมเลกุลต่อไป

การทดสอบทางชีวเคมีว่าเป็นเชื้อ *C. neoformans* โดยการทดสอบการสร้างเอนไซม์ phenoloxidase ในอาหาร caffeic acid agar การสร้างเอนไซม์ urease บนอาหาร urea base agar และความสามารถในการใช้และหมักน้ำตาลบางชนิด เช่น lactose, glucose, maltose, sucrose, galactose และ raffinose (ธันยาการย์ และ ธาริณี, 2554)

ทำการศึกษายืนยันชนิดยีสต์ *C. neoformans* อีกครั้งโดยวิธีทางอณูชีววิธี โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน D1/D2 ของ 26s rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR โดยคัดเลือกโคโลนียีสต์ที่มีลักษณะคล้ายสร้างแคปซูล มาเพาะเลี้ยงให้เจริญ แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอของยีสต์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ KOD FX Neo ของบริษัท TOYOBO และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วน D1/D2 ของ 26s rRNA gene โดยใช้ไพรเมอร์ NL1 (5'-CATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') และ NL4 (5'- GTCCGTGTTTCAAGACGG3')

ปรับสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำ PCR ตามวิธีการที่กำหนดในคู่มือ ตรวจสอบ PCR ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ที่ผสม RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution ของบริษัท INtRON Biotechnology เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน สกัดแยกดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) และหาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง DNA sequencing ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม Lasergene software (Madison, WI, USA) และทำ Multiple sequences alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal W (Thompson et al., 1994) และเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ด้วยวิธี BLASTN search เพื่อตรวจสอบความเหมือนกัน (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.05 (Tamura et al., 2011)

การแยกเชื้อราจากตัวอย่างมูลนกบุกรุก

ดูดตัวอย่างสารละลายมูลนก ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาตร 0.1 มิลลิตร ใส่ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) ทำการแยกเชื้อโดยใช้วิธี Spread plate นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร และนับจำนวนโคโลนีที่อยู่ระหว่าง 15-150 โคโลนี เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกกันไปทำให้บริสุทธิ์ โดยนำเข็มเขี่ยเชื้อลนไฟให้ร้อนแดง พักไว้ให้เย็น จากนั้นนำเข็มเขี่ยมาเขี่ยเชื้อราที่แยกได้โดยตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆแล้วนำมาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูลแบ่งเป็น

1. จำนวนตัวอย่างมูลนก โดยศึกษาจากจำนวนอาคารที่มีนกอาศัยและมีมูลนกอยู่
2. ชนิดของนกที่พบตามอาคาร และสถานที่ ที่ทำการสำรวจ
3. ชนิดจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ที่ตรวจพบในมูลนกชนิดต่างๆในแต่ละฤดูกาล

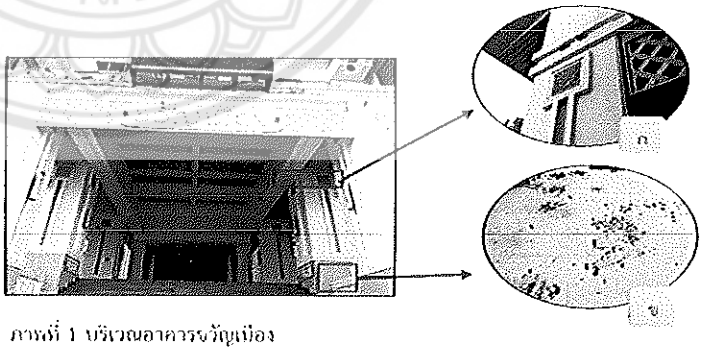
บทที่ 3
ผลและวิจารณ์ผลการศึกษาวิจัย

นกบุกรุก คือ นกที่มีการอพยพออกจากถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติเข้ามาอาศัยอยู่ในเมือง ซึ่งอาจเข้ามาเนื่องจากถูกมนุษย์รุกรานถิ่นที่อยู่อาศัยเดิมหรือเข้ามาโดยบังเอิญ เมื่อเข้ามาอาศัยอยู่ในเมืองแล้วสามารถแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็วนอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และมูลของนกเหล่านี้อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ (Kazuhiro and Hitoha, 2004) จากรายงานการศึกษาของศุภลักษณ์และเกตุจันทร์ (2556) พบนกบุกรุก 4 ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่ นกพิราบป่า นกเขาไฟ นกกระจอก และนกเอี้ยง ที่สร้างความเดือดร้อนให้กับบุคลกรภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร เนื่องจากการปล่อยมูลออกมาจำนวนมาก การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกสถานที่ที่มีผู้อาศัยอยู่หรือเป็นสถานที่มีการใช้การงานเป็นประจำ แต่พบมูลนกบุรุกในปริมาณค่อนข้างมาก มาศึกษาชนิดจุลินทรีย์ที่อาจก่อโรคได้เพื่อใช้เป็นตัวแทนกลุ่มตัวอย่าง ได้ผลการศึกษาคือ

3.1 ผลการสำรวจแหล่งที่อยู่อาศัยของนกบุกรุก

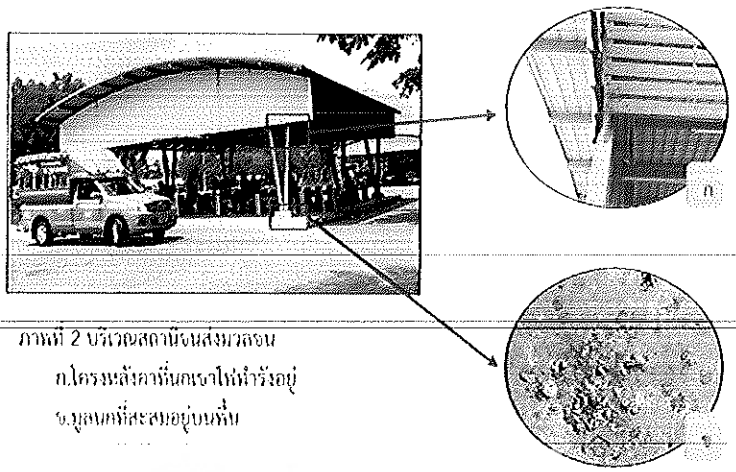
จากการสำรวจแหล่งที่อยู่อาศัยของนกบุกรุกภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร โดยสังเกตจากบริเวณการเกาะนอนของนกเพื่อใช้ในการยืนยันว่าเป็นนกชนิดใด และมีการถ่ายมูลสะสมทิ้งไว้ตามสถานที่ต่าง ๆ ตัวอย่างสถานที่ที่พบมูลนกแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ภาพตัวอย่างแหล่งที่อยู่อาศัยของนกบุกรุกภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร

สถานที่	ภาพแสดงบริเวณที่พบมูลนกสะสม
อาคารขวัญเมือง	

ภาพที่ 1 บริเวณอาคารขวัญเมือง
ก.จายคาที่นกพิราบอาศัยเกาะนอน
ข.มูลนกพิราบที่สะสมบนพื้นอาคาร

สถานีขนส่งมวลชน

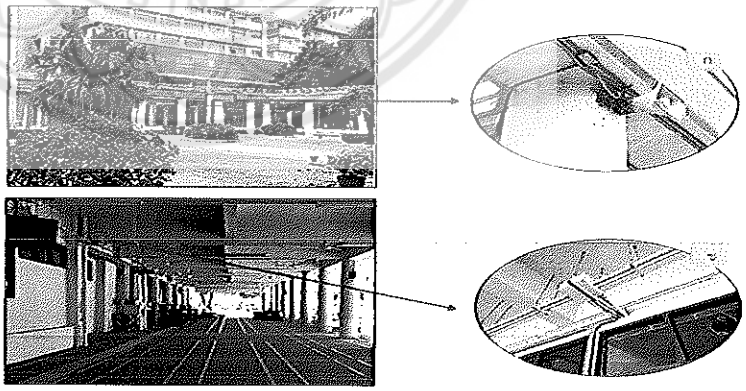


ภาพที่ 2 บริเวณสถานีขนส่งมวลชน
ก.โครงหลังคาที่นกเจาไฟทำรังอยู่
ข.มูลนกที่สะสมอยู่บนพื้น

อาคารโภชนาการ

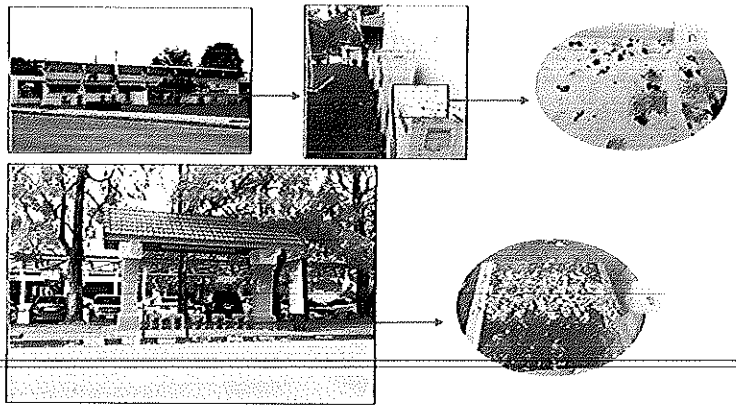
ภาพที่ 3 บริเวณอาคารโภชนาการ
ก.ภายในอาคารที่มีมูลนกสะสมอยู่
ข.บันไดทางขึ้นก่อนเข้าตัวอาคาร

คณะวิศวกรรมศาสตร์



ภาพที่ 4 บริเวณคณะวิศวกรรมศาสตร์
ก.วัวของนกเจาไฟบนสำหรับ
ข.วัวของนกเจาไฟบนทางเดินลานไฟ

คณะวิทยาศาสตร์

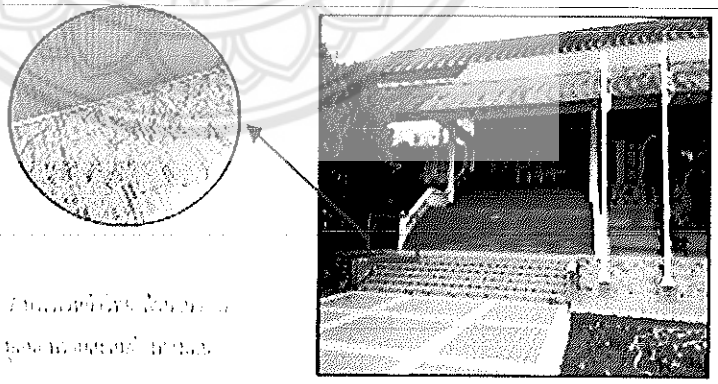


ภาพที่ 5 บรรยากาศบริเวณคณะวิทยาศาสตร์
ก) มุมมองสิ่งแวดล้อมโดยรอบ
ข) จุดที่ติดตั้งไฟฟ้าเข้าอาคารวิจัยวิทยาศาสตร์คอมพิวเตอร์และเทคโนโลยีสารสนเทศ

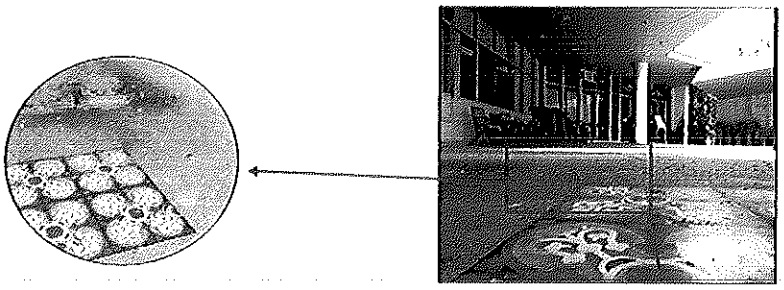
คณะวิทยาศาสตร์

ภาพที่ 6 บริเวณคณะวิทยาศาสตร์ภาควิชาฟิสิกส์
ก) มุมมองกระจกสะท้อน
ข) ระยะใกล้ที่มีมุมกระจกอาคารอยู่

วิทยาลัยนานาชาติ

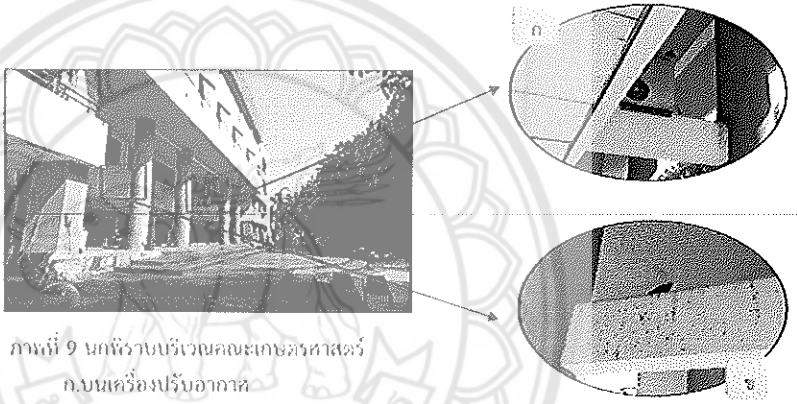


หอสมุดกลาง



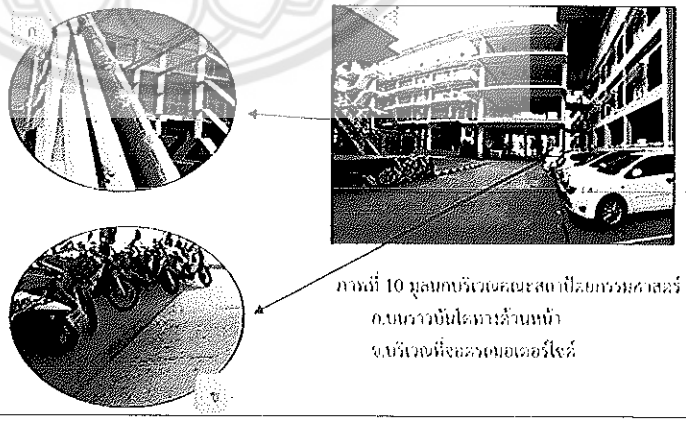
ภาพที่ 7 บริเวณหอสมุดกลาง
ก.มุมมองบริเวณหน้าร้านกาแฟ

คณะเกษตรศาสตร์



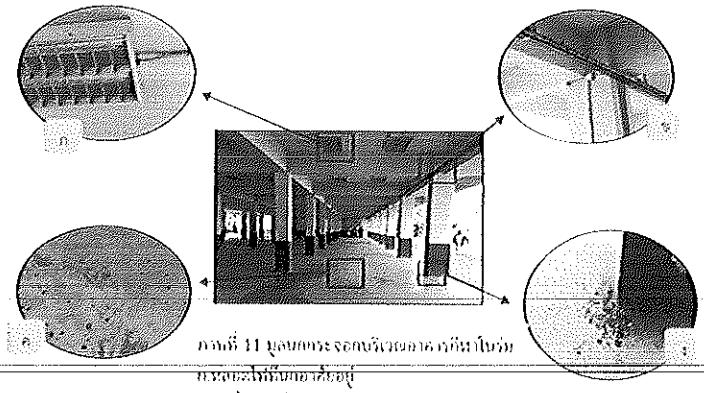
ภาพที่ 9 มุมมองบริเวณคณะเกษตรศาสตร์
ก.บนเครื่องปรับอากาศ
ข.บนฉากรองฝึก

คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์



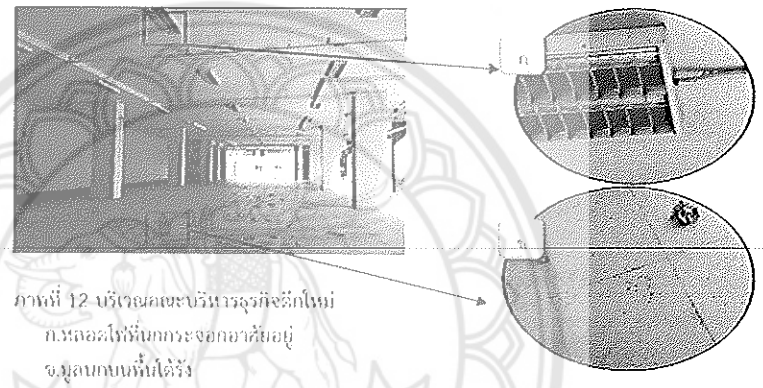
ภาพที่ 10 มุมมองบริเวณคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์
ก.บนราวบันไดทางด้านหน้า
ข.บริเวณที่จอดรถมอเตอร์ไซค์

อาคารกีฬาในร่ม



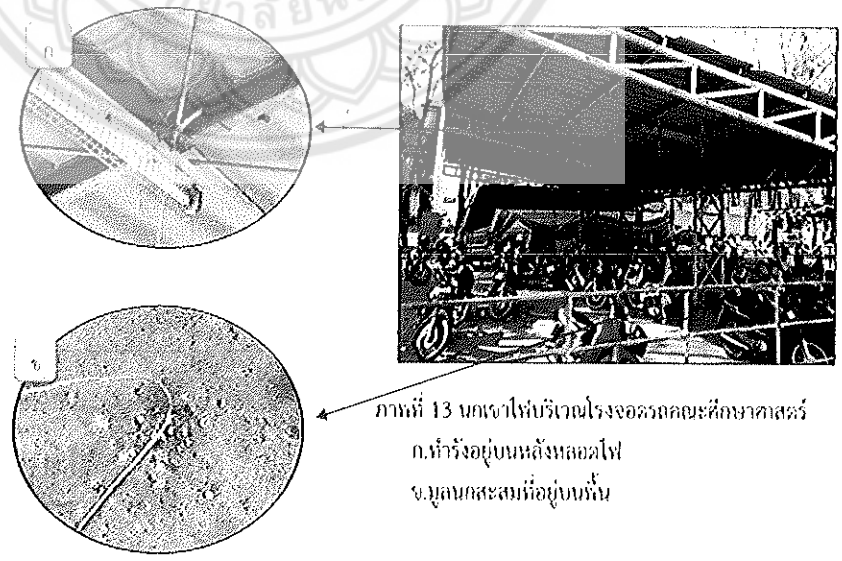
ภาพที่ 11 มุมมองกระจกบริเวณอาคารกีฬาในร่ม
ก.หลอดไฟที่ยึดกับกระจกอาคารอยู่
ข.ท่อน้ำจ่ายที่ยึดกับกระบอก
ค.และ ง. มุมมองกระจกอาคารกีฬา

คณะบริหารธุรกิจ



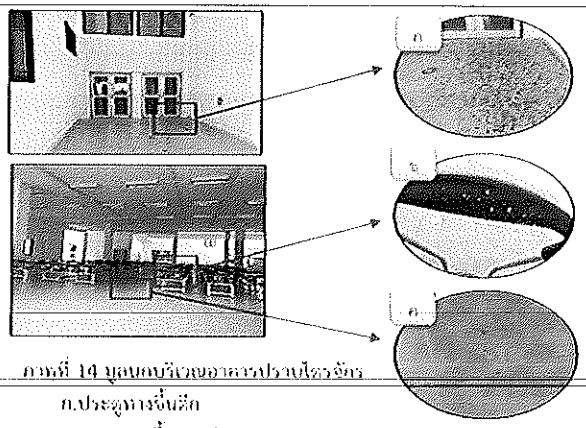
ภาพที่ 12 บริเวณคณะบริหารธุรกิจอีกใหม่
ก.หลอดไฟที่ยึดกับกระจกอาคารอยู่
ข.มุมมองบนพื้นใต้ถุน

คณะศึกษาสาสตร์



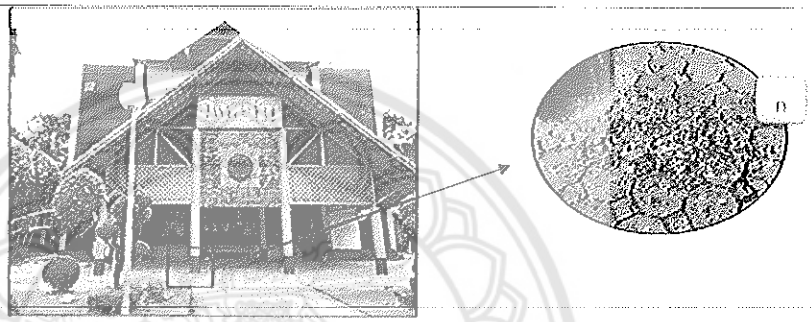
ภาพที่ 13 มุมมองไฟบริเวณโรงจอดรถคณะศึกษาศาสตร์
ก.ทำรังอยู่บนหลังหลอดไฟ
ข.มุมมองสะสมที่อยู่บนพื้น

อาคารปราบไตรจักร



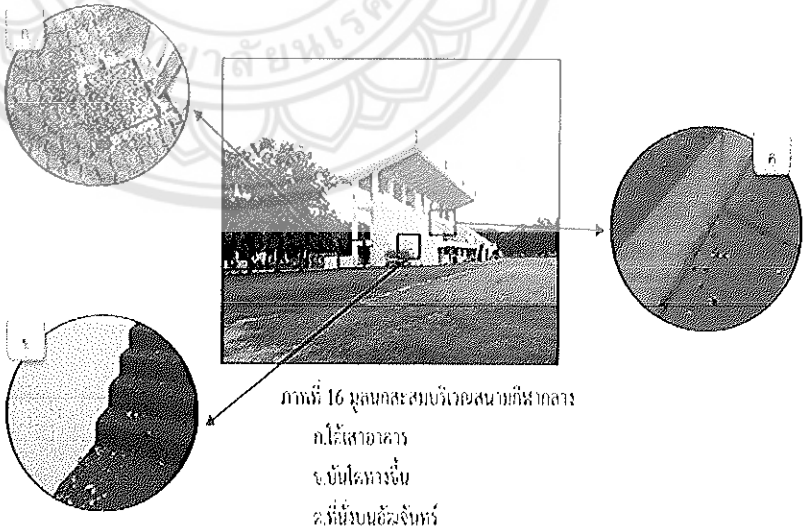
ภาพที่ 14 มุลนกบริเวณอาคารปราบไตรจักร
ก.ประตูทางขึ้นอีก
ข.มุลนกบนพื้นทางเดิน

อาคารมิ่งขวัญ



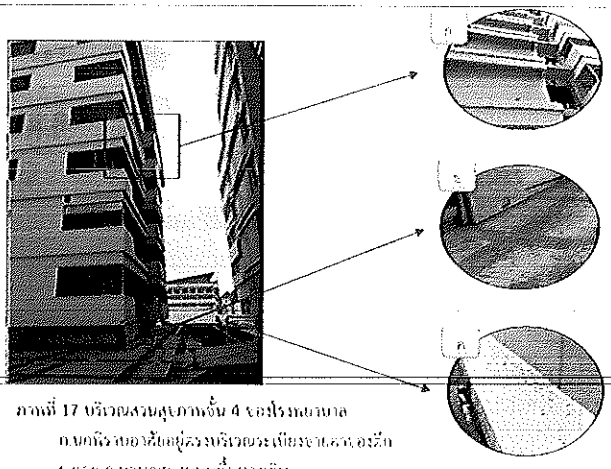
ภาพที่ 15 มูลนกพิราบบริเวณอาคารมิ่งขวัญ
ก.มูลนกสะสมตรงโคนเสาของอาคาร

สนามกีฬากลาง



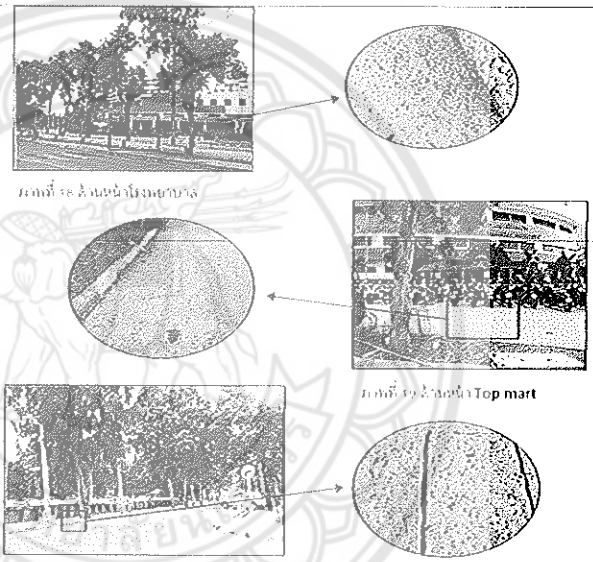
ภาพที่ 16 มูลนกสะสมบริเวณสนามกีฬากลาง
ก.โล้เสาอาคาร
ข.บันไดทางขึ้น
ค.พื้นรับนอัฒจันทร์

โรงพยาบาล
มหาวิทยาลัยนเรศวร



ภาพที่ 17 บริเวณลานสนุกภายนอก 4 ของโรงพยาบาล
ก. บุคลากรและนักศึกษาอยู่ร่วมกันบริเวณระเบียงทางเดินของตึก
ข. และ ค. บุคลากรและนักศึกษาพักผ่อนในช่วงเวลาพัก

โรงพยาบาล
มหาวิทยาลัยนเรศวร

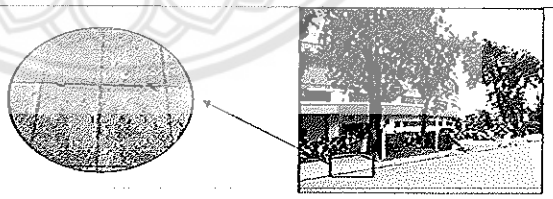


ภาพที่ 18 ด้านหน้าโรงพยาบาล

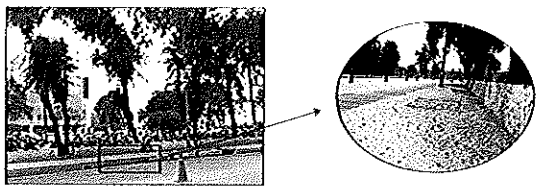
ภาพที่ 19 ด้านหน้า Top mart

ภาพที่ 20 ทางเข้าโรงพยาบาล

โรงพยาบาล
มหาวิทยาลัยนเรศวร



ภาพที่ 21 ด้านหลัง Top mart



ภาพที่ 22 ด้านหน้าศาลกระทรวง

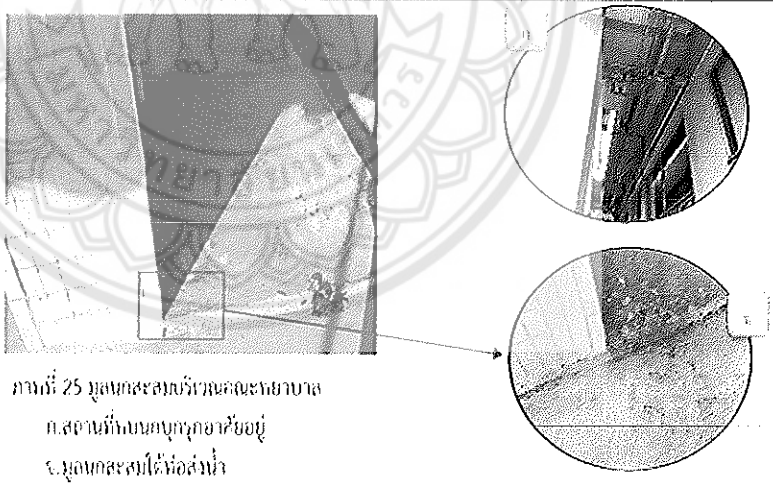
คณะเภสัชศาสตร์

ภาพที่ 23 มุมมองสะสมบริเวณคณะเภสัชศาสตร์
ก.บนเครื่องปรับอากาศ
ข.บนพื้นทางเดิน

โรงพยาบาลทันตกรรม

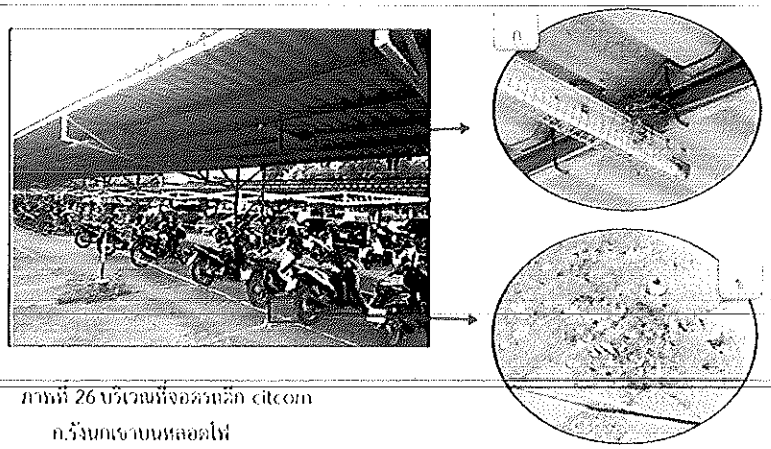
ภาพที่ 24 บริเวณโรงพยาบาลทันตกรรม
ก.มุมมองกระจกบนม้านั่ง
ข.ร่องยางกระจกบนหลอดไฟ
ค.มุมมองกระจกบนพื้นอาคาร

คณะพยาบาล



ภาพที่ 25 มุมมองสะสมบริเวณคณะพยาบาล
ก.สถานที่บนบนบุกรุกอาศัยอยู่
ข.มุมมองสะสมใต้ท่อส่งน้ำ

ตึก citcom



ภาพที่ 26 บริเวณที่จอดรถตึก citcom
ก.รังนกเขาบนหลอดไฟ
ข.มูลนกสะสมบนพื้น

อาคารเรียนรวม QS

ภาพที่ 27 มูลนกสะสมบริเวณอาคารเรียนรวม QS
ก.บริเวณล้านบนท่อระบายอากาศ
ข.บริเวณขอบหลาอาคาร
ค.และ ง. บริเวณพื้นทางเดินอาคาร

ในการเก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกในสถานที่ที่พบนกมาทำรังอาศัยอยู่และถ่ายมูลสะสมทิ้งไว้นั้น จะทำการเลือกตัวแทนจากสถานที่ที่ทำการสำรวจมา 5 แห่งต่อนก 1 ชนิด โดยในการเลือกสถานที่เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างมูลนกนั้นจะพิจารณาถึงความสำคัญของสถานที่ เช่น เป็นบริเวณที่มีผู้คนอาศัยอยู่ มีคนผ่านไปมาเป็นประจำ หรือเป็นสถานที่ที่ใช้งานอยู่เป็นประจำ เพราะโอกาสที่ผู้อาศัยจะได้รับจุลินทรีย์ที่อยู่ในมูลนกจะสูงมากกว่าบริเวณอื่นๆ โดยสถานที่ที่เป็นตัวแทนจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างมูลนกในแต่ละฤดูกาลแสดงดังตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2 ตัวแทนสถานที่เก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกในฤดูฝน

สถานที่	ชนิดนกบุกรุก			
	นกพิราบ	นกเขาไฟ	นกกระจอก	นกเอี้ยง
1.อาคารเรียน				
1.1 อาคารเรียนรวม (QS)	✓	✓		
1.2 อาคารเรียนคณะวิทยาศาสตร์	✓			
1.3 อาคารเรียนคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์			✓	
1.4 อาคารเรียนคณะวิศวกรรมศาสตร์		✓		
1.5 NULC		✓		
1.6 อาคารกีฬาในร่ม			✓	
1.7 อาคารเรียนปราบไตรจักร			✓	
1.8 อาคารเรียนคณะสหเวชศาสตร์			✓	
2.สำนักงาน				
2.1 อาคารมิ่งขวัญ	✓			
3.โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร	✓		✓	
3.1 ต้นไม้ด้านหน้าโรงพยาบาล (จุดจอดรถจักรยานยนต์)				✓
3.2 ต้นไม้ด้านข้างโรงพยาบาล				✓
3.3ต้นไม้ด้านหน้า Top mart				✓
3.4 ต้นไม้ด้านหลังโรงพยาบาล (จุดรอรถโดยสาร)				✓
3.5 ต้นไม้หน้าทางเข้าคณะทันตแพทย์				✓
4.หอพัก				
4.1 หอพักอาจารย์ประตู4	✓			
5. สนามกีฬากลาง (บริเวณอัฒจรรย์)		✓		
6.สถานีขนส่งของมหาวิทยาลัย(หอใน)		✓		

ตารางที่ 3 ตัวแทนสถานที่เก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกในฤดูหนาว

สถานที่	ชนิดนกบุกรุก			
	นกพิราบ	นกเขาไฟ	นกเอี้ยงหงอน	นกกระจอก
1.อาคารเรียนรวม (QS)	✓	✓		
2.คณะวิทยาศาสตร์	✓	✓		✓
3.สถานพัฒนาวิชาการด้านภาษา (NULC)		✓		
4.คณะบริหารธุรกิจ เศรษฐศาสตร์และการสื่อสาร (BEC)				✓
5.คณะเกษตรศาสตร์				
6.คณะเภสัชศาสตร์		✓		
7.สนามกีฬาในร่ม				✓
8.อาคารปราบไตรจักร				✓
9.อาคารมิ่งขวัญ	✓			
10.โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร	✓			✓
11.ทางแยกหน้าโรงพยาบาล			✓	
12.ด้านหน้าโรงพยาบาล			✓	
13.ด้านข้างโรงพยาบาล			✓	
14.ด้านหลังโรงพยาบาล			✓	
15.หน้าร้านสะดวกซื้อท็อปมาร์ทโรงพยาบาล			✓	
16.สถานีขนส่งมวลชน มหาวิทยาลัยนเรศวร		✓		
17.หอพักนิสิตมหาวิทยาลัยนเรศวร (NU-Dorm)	✓			

ตารางที่ 4 ตัวแทนสถานที่เก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกในฤดูร้อน

สถานที่	ชนิดนกบุกรุก			
	นกพิราบ	นกเขาไฟ	นกกระจอก	นกเอี้ยง
1.อาคารขวัญเมือง	✓			
2.สถานีขนส่งมวลชน		✓		
3.อาคารโภชนาการ				
4.คณะวิศวกรรมศาสตร์				
5.คณะวิทยาศาสตร์	✓		✓	
6.หอสมุด				
7.วิทยาลัยนานาชาติ				
8.คณะเกษตรศาสตร์		✓		
9.คณะสถาปัตย์			✓	
10.อาคารกีฬาในร่ม			✓	
11.คณะบริหารธุรกิจ		✓	✓	
12.คณะศึกษาศาสตร์				
13.อาคารปราบไตรจักร				
14.อาคารมิ่งขวัญ				
15.สนามกีฬา	✓			
16.โรงพยาบาลนเรศวร	✓			
ต้นไม้หน้าโรงพยาบาล				✓
ต้นไม้หน้าTop mart				✓
ต้นไม้ด้านข้างทางออกโรงพยาบาล				✓
ต้นไม้ด้านหลัง Top mart				✓
ต้นไม้ด้านหน้าศาลพระพรหม				✓
17.คณะเภสัชศาสตร์		✓		
18.โรงพยาบาลทันตกรรม			✓	
19.คณะพยาบาล				
20.ตึก citcom		✓		
21.อาคารเรียนQS	✓			

3.2 ลักษณะสิ่งแวดล้อมบริเวณที่เก็บมูลนกในแต่ละฤดูกาล

ทำการเก็บตัวอย่างมูลนก 3 ฤดูคือ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเช้า ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง คือ 6.00-11.00 น. เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่นกเกาะนอนกลางคืนและมีการถ่ายมูลทิ้งไว้ ซึ่งจะทำให้ได้มูลนกที่ใหม่ เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาจุลินทรีย์ในมูลนก ในการเก็บตัวอย่างมูลนก จะทำการศึกษาภาวะแวดล้อมของมูลนกแต่ละชนิด ได้แก่ อุณหภูมิในระหว่างเก็บ ความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศโดยรอบบริเวณที่เก็บ และเมื่อนำตัวอย่างมูลนกมาศึกษาในห้องปฏิบัติการจะทำการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง ของมูลนกที่เก็บมาด้วย โดยลักษณะสิ่งแวดล้อมบริเวณที่เก็บมูลนกในแต่ละฤดูกาล คือ

ลักษณะสิ่งแวดล้อมบริเวณที่เก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิดในช่วงฤดูฝน ซึ่งทำการศึกษาในช่วงเดือนกรกฎาคม-พฤศจิกายน พ.ศ.2559 มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 27-34 องศาเซลเซียส ค่าความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วงร้อยละ 65-86 และค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมูลนกอยู่ในช่วง 5.91-7.09

ลักษณะสิ่งแวดล้อมบริเวณของบริเวณที่เก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกในช่วงฤดูหนาว ซึ่งทำการศึกษาในช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม พ.ศ. 2560 มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24-27 องศาเซลเซียส ค่าความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วงร้อยละ 61-83 และค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมูลนกอยู่ในช่วง 5.0-6.50

ลักษณะสิ่งแวดล้อมบริเวณของสถานที่ที่เก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกในช่วงฤดูร้อน ในช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม พ.ศ. 2560พบว่ามีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 29-34 องศาเซลเซียส โดยความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดได้จากการสถานที่เก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด มีค่าใกล้เคียงกันคือ อยู่ในช่วงร้อยละ 56-74 ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายตัวอย่างมูลนกบุกรุกมีค่าอยู่ในช่วง 5.0-6.50

เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อนซึ่งทำการศึกษาในช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม พ.ศ. 2560 พบว่า อุณหภูมิในฤดูฝน และฤดูร้อน อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน คือ 27-34 องศาเซลเซียส และ 29-34 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนฤดูหนาวมีอุณหภูมิต่ำที่สุด คือ 24-27 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามอุณภูมิทั้ง 3 ฤดู จัดว่าเป็นอุณหภูมิที่อยู่ในระดับปานกลางไม่สูงมาก เหมาะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่ม mesophiles ที่สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ เช่น แบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ซึ่งมีความสำคัญทางการแพทย์ ได้แก่ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* (ภัทรชัย, 2551) สำหรับความชื้นสัมพัทธ์ของทั้ง 3 ฤดู พบว่า ฤดูฝน และฤดูหนาว มีความชื้นสัมพัทธ์ที่ใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วงร้อยละ 62-85 และ 61-83 ตามลำดับ ส่วนฤดูร้อนมีค่าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุด คือ อยู่ในช่วงร้อยละ 56-74 ซึ่งความชื้นที่จุลินทรีย์

สามารถเจริญได้อยู่ในช่วงร้อยละ 60-80 (ภัทรชัย,2551) และความชื้นสัมพัทธ์ของทั้ง 3 ฤดู พบว่าอยู่ในช่วงที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ โดยในฤดูฝน และฤดูหนาว อาจจะมีความเหมาะสมในการเจริญมากกว่าฤดูร้อน และสำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมูลนกของทั้ง 3 ฤดู พบว่า อยู่ในช่วงที่เป็นกรดอ่อนถึงกลาง คืออยู่ในช่วง 4-7 ซึ่งแบคทีเรียจะสามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.50-7.0 (ภัทรชัย, 2551) ส่วนยีสต์และเชื้อราสามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย คือ อยู่ในช่วงที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0-6.0 (นุกูล,2551)

3.3 ผลการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างมูลนก

จากการเก็บตัวอย่างมูลนกในช่วงฤดูฝนช่วงเดือน กรกฎาคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2559 ฤดูหนาวช่วงเดือน มกราคม-มีนาคม พ.ศ. 2560 และฤดูร้อนในช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม พ.ศ. 2560 เมื่อนำมาศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกแต่ละชนิดในแต่ละฤดูกาลแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในมูลนกบุกรุกแต่ละชนิดในช่วงฤดูกาลต่างๆ

ฤดูกาล	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในมูลนกชนิดต่างๆตามฤดูกาล (cfu/g)			
	นกพิราบ	นกเขาไฟ	นกกระจอก	นกเอี้ยง
ฤดูฝน	4.0×10^{8}- 4.0×10^{9}	2.04×10^{8}- 4.6×10^{9}	6.3×10^{8}- 8.9×10^{8}	4.2×10^{8}- 1.26×10^{10}
ฤดูหนาว	1.59×10^{8}- 2.95×10^{8}	1.65×10^{6}- 4.9×10^{6}	4.6×10^{6}-3.00×10^{7}	1.39×10^{6}- 1.66×10^{7}
ฤดูร้อน	9.3×10^{6}- 4.7×10^{9}	3.0×10^{5}- 3.0×10^{10}	4.9×10^{7}-3.0×10^{10}	3.6×10^{6}- 2.4×10^{8}

เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด พบว่าจำนวนของเชื้อแบคทีเรียของฤดูหนาว และฤดูร้อน มีจำนวนใกล้เคียงกัน โดยจำนวนแบคทีเรียในมูลนกกระจอกมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในมูลนกอีก 3 ชนิด คือ นกพิราบ นกเขาไฟ และ นกเอี้ยง นั้นมีจำนวนที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากลักษณะทางกายภาพของบริเวณที่เก็บตัวอย่างมูลนกทั้ง 2 ฤดูกาลนั้นมีความใกล้เคียงกัน จึงส่งผลให้จำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกไม่แตกต่างกันมากนัก สำหรับฤดูฝนจะมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด โดยในมูลนกเอี้ยงมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างมูลนกอีก 3 ชนิด ได้แก่ นกพิราบ นกเขาไฟ และนกกระจอก มีจำนวนใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสถานที่ที่เลือกเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างมูลนกเอี้ยงนั้นเป็นบริเวณโล่งแจ้ง จึงทำให้มูลนกสัมผัสกับน้ำฝนได้โดยตรง ส่งผลให้ตัวอย่างมีนกเอี้ยงมีความชื้น

มากกว่าตัวอย่างมูลนกชนิดอื่น ที่เก็บในสถานที่ที่อยู่ในร่มเป็นอาคารทำให้มูลนกอีก 3 ชนิด ไม่ได้สัมผัสกับน้ำฝนโดยตรง

3.4 ผลการตรวจนับเชื้อยีสต์ทั้งหมดในตัวอย่างมูลนก

การแยกเชื้อยีสต์จากการเก็บตัวอย่างมูลนกในช่วงฤดูฝนช่วงเดือน กรกฎาคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2559 ฤดูหนาวช่วงเดือน มกราคม-มีนาคม พ.ศ. 2560 และฤดูร้อนในช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม พ.ศ. 2560 เมื่อนำมาศึกษาจำนวนยีสต์ทั้งหมด พบว่า จำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกแต่ละชนิดในแต่ละฤดูกาล แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 จำนวนเชื้อยีสต์ทั้งหมดที่พบในมูลนกบุกรุกแต่ละชนิดในช่วงฤดูกาลต่างๆ

ฤดูกาล	จำนวนเชื้อยีสต์ทั้งหมดในมูลนกชนิดต่างๆตามฤดูกาล (cfu/g)			
	นกพิราบ	นกเขาไฟ	นกกระจอก	นกเอี้ยง
ฤดูฝน	$1.29x10^8$-$3.50x10^8$	$1.48x10^8$-$1.23x10^9$	$7.4x10^5$-$2.12x10^7$	$9.3x10^7$-$1.07x10^9$
ฤดูหนาว	$2.59x10^8$-$1.5x10^9$	$5.7x10^5$-$2.61x10^7$	$2.41x10^7$-$1.28x10^8$	$1.23x10^6$-$1.28x10^8$
ฤดูร้อน	$3.0x10^5$-$2.0x10^{10}$	$3.0x10^5$-$1.2x10^7$	$3.0x10^5$-$2.7x10^9$	$3.6x10^6$-$3.0x10^9$

เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนเชื้อยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกทั้ง 4 ชนิด ทั้ง 3 ฤดู ได้แก่ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน พบว่าจำนวนเชื้อยีสต์ทั้งหมดของทั้ง 3 ฤดู มีจำนวนค่อนข้างใกล้เคียงกัน

3.5 ผลการตรวจนับเชื้อราทั้งหมดในตัวอย่างมูลนก

ในการแยกเชื้อราจากการเก็บตัวอย่างมูลนกในช่วงฤดูฝนช่วงเดือน กรกฎาคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2559 ฤดูหนาวช่วงเดือน มกราคม-มีนาคม พ.ศ. 2560 และฤดูร้อนในช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม พ.ศ. 2560 เมื่อนำมาศึกษาจำนวนเชื้อราทั้งหมด พบว่า จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกแต่ละชนิดในแต่ละฤดูกาล แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จำนวนเชื้อราทั้งหมดที่พบในมูลนกบุกรุกแต่ละชนิดในช่วงฤดูกาลต่างๆ

ฤดูกาล	จำนวนเชื้อราทั้งหมดในมูลนกชนิดต่างๆตามฤดูกาล (cfu/g)			
	นกพิราบ	นกเขาไฟ	นกกระจอก	นกเอี้ยง
ฤดูฝน	$4.7x10^5$ - $5.8x10^6$	$6.2x10^5$ - $1.23x10^7$	$6.20x10^4$-$2.72x\ 1.07^5$	$1.09x10^6$- $9.0x10^6$
ฤดูหนาว	$2x10^5$ - $1.2\ x10^6$	$2.76x10^4$ - $7.83x10^4$	$9.23x10^4$- $2.99x10^6$	$1.83x10^4$ -$1.29x10^5$
ฤดูร้อน	$2.55x10^6$ -$3.0x10^7$	$1.07x10^5$ - $3.0x10^6$	$1.09x10^5$- $2.16x10^7$	$7.13x10^6$ -$8.74x10^7$

เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกทั้ง 4 ชนิด ทั้ง 3 ฤดู ได้แก่ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน พบว่ามีจำนวนใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถได้ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิ 10- 40 องศาเซลเซียส และสามารถทนต่อความเป็นกรด-ด่างได้เล็กน้อย (นุกูล, 2553) จึงทำให้จำนวนเชื้อราทั้ง 3 ฤดูไม่แตกต่างกันมากนัก

4. ผลการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

4.1 ผลการจัดจำแนกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TSA และทำการเลือกโคโลนีที่มีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยา ในแต่ละระดับความเจือจางของตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด โดยทำให้มีความบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Cross streak ก่อนที่จะนำเชื้อมาทำการย้อมสีแกรมเพื่อศึกษาการติดสีแกรม รูปร่างลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้ดังนี้

ในช่วงฤดูฝน พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จากตัวอย่างมูลนกได้ทั้งหมด 228 ไอโซเลท จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 115 ไอโซเลท และแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 113 ไอโซเลท

ในฤดูหนาว สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลนกบุกรุกได้ 466 ไอโซเลท จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 223 ไอโซเลท แบ่งเป็นรูปร่างกลม 82 ไอโซเลท รูปร่างท่อน 141 ไอโซเลท และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน 243 ไอโซเลท โดยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลนกเอี้ยงได้จำนวนมากที่สุด คือ 149 ไอโซเลท รองลงมาคือมูลนกกระจอกแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 124 ไอโซเลท มูลนกพิราบแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 114 ไอโซเลท และมูลนกเขาไฟแยกเชื้อแบคทีเรียได้น้อยที่สุด คือ 79 ไอโซเลท

ส่วนฤดูร้อน แยกเชื้อแบคทีเรียได้ 164 ไอโซเลท จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 84 ไอโซเลท จำแนกเป็นรูปร่างกลม 43 ไอโซเลท รูปร่างท่อน 41 ไอโซเลท และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน 80 ไอโซเลท โดยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลนกทั้ง 4 ชนิดใกล้เคียงกันเรียงตามลำดับคือ มูลนกกระจอกแยกได้จำนวนมากที่สุด คือ 47 ไอโซเลท รองลงมาคือมูลนกเขาไฟแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 41 ไอโซเลท มูลนกพิราบ 39 ไอโซเลท และมูลนกเขาเอี้ยงแยกแบคทีเรียได้น้อยที่สุด คือ 37 ไอโซเลท

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ตัวอย่างมูลนกทั้ง 4 ชนิด ทั้ง 3 ฤดูกาล พบว่า ฤดูหนาวมีจำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่ามีความแตกต่างกันมากที่สุดจำนวน 466 ไอโซเลท รองลงมาคือ ฤดูฝน และฤดูร้อน ซึ่งมีจำนวน 228 ไอโซเลท และ 164 ไอโซเลท ตามลำดับ

4.2.1 ผลการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

จากการศึกษาการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด ที่เก็บในฤดูกาลต่างๆ เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียสามารถจัดจำแนกได้ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ชนิดเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างมูลกนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด ใน 3 ฤดูกาล

ชนิดแบคทีเรีย	จำนวนไอโซเลท/ฤดูกาล		
	ฤดูฝน	ฤดูหนาว	ฤดูร้อน
Bacillus macquariensis	0	0	2
Bacillus subtilis	0	0	4
Bacillus pasteurii	1	6	8
Bacillus sphaericus	1	0	4
Bacillus marinus	0	3	0
Bacillus insolitus	0	1	0
Bacillus spp.	11	11	0
Corynebacterium kutsceri	3	5	2
Corynebacterium xerosis	73	66	15
Lactobacillus casei	2	26	3
Lactobacillus delbrueckii	5	19	3
Lactobacillus fermenti	0	2	0
Micrococcus varians	0	2	3
Micrococcus luteus	0	1	4
Streptococcus mitis	0	3	18
Streptococcus spp.	1	0	4
Streptococcus pyogenes Group A	0	0	3
Streptococcus spp. Group B	0	11	0
Enterococcus spp.	5	5	0

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ชนิดแบคทีเรีย	จำนวนไอโซเลท/ฤดูกาล		
	ฤดูฝน	ฤดูหนาว	ฤดูร้อน
Aeromonas spp.	3	1	0
Pseudomonas spp.	3	1	2
Staphylococcus aureus	11	17	4
Staphylococcus epidermidis	1	10	7
Staphylococcus saprophyticus	0	33	0
Vibrio cholerae	3	0	0
0Vibrio fischeri	0	0	10
Vibrio orientalis	0	0	5
Enterobacter intermedius	2	19	5
Enterobacter cloacae	0	0	4
Enterobacter amigonus	0	0	6
Enterobacter aerogenes	13	3	0
Enterobacter spp.	14	2	0
Escherichia coli	32	65	6
Klebsiella oxytoca	1	19	3
Klebsiella pneumoniae subsp. *ozaenae*	0	4	0
Citrobacter diversus	3	14	0
Citrobacte freundii	0	1	0
Providincia stuartii	2	1	6
Morganella morganii	14	5	0
Proteus penneri	5	6	3
Proteus mirabilis	6	1	0
Yersinia pestis	0	4	0
Yesinia pseudotuberculosis	0	1	0
Serratia liquefaciens	9	80	18
Serratia fonticola	3	16	12
รวม	228	466	164

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกทั้ง 3 ฤดู ได้แก่ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกทั้ง 4 ชนิด มีจำนวน 858 ไอโซเลท และผลจากการศึกษา สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสกุลได้ 18 สกุล ได้แก่ *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus Enterobacter* spp., *Escherichia, Klebsiella, Citrobacter, Providincia., Morganella., Proteus., Yesinia และ Serratia* และระดับสปีชีส์ 39 สปีชีส์ ได้แก่ *Bacillus macquariensis, Bacillus subtilis, Bacillus pasteurii, Bacillus sphaericus, Bacillus marinus, Bacillus insolitus, Corynebacterium kutsceri, Corynebacterium xerosis, Lactobacillus casei, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus fermenti, Micrococcus varians, Micrococcus luteus, Streptococcus mitis, Streptococcus pyogenes* Group A, *Streptococcus spp. Group B, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, Vibrio cholerae, Vibrio fischeri, Vibrio orientalis, Enterobacter intermedius, Enterobacter cloacae, Enterobacter amigonus, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae subsp. Ozaenae, Citrobacter diversus, Citrobacte freundii, Providincia stuartii, Morganella morganii, Proteus penneri, Proteus mirabilis, Yersinia pestis, Yesinia pseudotuberculosis, Serratia liquefaciens และ Serratia fonticola* **โดยเชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุดและสามารถพบได้ทั้ง 3 ฤดู คือ *Corynebacterium xerosis* พบจำนวน 154 ไอโซเลท (ร้อยละ 17.94/858)** ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้บริเวณผิวหนัง โพรงจมูก **และเยื่อบุต่างๆ ภายในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อบริเวณผิวหนัง และก่อให้เกิดโรคติดเชื้อร่วมกันระหว่าง**คนกับสัตว์เลี้ยงหรือสัตว์ป่า(Zoonotic microorganisms) (Fernando,et al, 2016) รองลงมาคือ *Serratia liquefaciens* จำนวน 107 ไอโซเลท (ร้อยละ12.47/858) และ *Escherichia coli* จำนวน 103 ไอโซเลท (ร้อยละ 12/858) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์ โดย *Escherichia coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นภายในลำไส้ใหญ่ ปกติจะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะทำให้กิดโรคได้ถ้าอยู่นอกลำไส้ใหญ่ เช่น ท่อปัสสาวะอักเสบ และบางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในคนและสัตว์ สำหรับเชื้อ *Serratia liquefaciens* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ในธรรมชาติโดยเชื้อเชื้อจะแพร่กระจายอยู่ในดิน น้ำ พืชและสัตว์ นอกจากนี้ยังพบ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้บริเวณผิวหนังของคนและสัตว์ (นงลักษณ์, 2551)

4.2 ผลการจัดจำแนกยีสต์ที่คาดว่าเป็นยีสต์ *Cryptococcus neoformans*

จากการเก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิดภายในมหาวิทยาลัยนเรศวรนั้น เมื่อทำการศึกษายีสต์โดยเน้นทำการตรวจหายีสต์ *Cryptococcus neoformans* เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้เป็นเชื้อที่มีการปนเปื้อนอยู่ในมูลสัตว์ปีกต่างๆ ได้แก่ มูลนกพิราบ มูลนกเขา มูลนกหงห์หยก และมูลไก่ เป็นต้น และจะพบมากในตระกูลนกพิราบ โดยลักษณะของยีสต์ชนิดนี้ คือ มีรูปร่างกลม และสร้างแคปซูล ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเชื้อ นอกจากนี้เชื้อ *C. neoformans* ยังก่อให้เกิดโรคที่สมองและปอดในผู้ป่วยโรคเอดส์ หรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันของร่างกายอ่อนแอ (พิไลพันธ์, 2541) เชื้อมีความทนทานและมีชีวิตอยู่ในมูลนกได้นานเป็นปี เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างแคปซูลห่อหุ้มเซลล์ได้หนาถึง 30 ไมครอน จึงทำให้โคโลนีของเชื้อยีสต์ *C. neoformans* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA นั้นมีลักษณะเฉพาะ คือ เป็น mucoid ซึ่งแสดงถึงการสร้าง polysaccharide capsule โดยแคปซูลที่เชื้อสร้างขึ้นมานี้ จะส่งผลให้เชื้อสามารถมีชีวิตรอดอยู่ในหลอดอาหารและลำไส้ของนก โดยไม่ทำให้เกิดโรคกับนก แต่ก่อโรคในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด เช่น แมว เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อยีสต์ *C. neoformans* นั้นอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส และเชื้อสามารถทนความร้อนได้ถึง 40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิในร่างกายของนกนั้นสูงถึง 41.5-43.3 ซึ่งไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อ แต่สามารถเจริญได้ในร่างกายของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด เพราะมีอุณหภูมิร่างกาย 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้ (นงนุช, 2540)

ลักษณะที่ใช้ในการคัดเลือกยีสต์ *C. neoformans* เบื้องต้น ได้แก่ ความสามารถในการสร้างแคปซูลเมื่อทำการย้อมด้วยสี nigrosin ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ phenoloxidase เมื่อทดสอบการเจริญบนอาหาร caffeic acid ซึ่งจะให้โคโลนีสีน้ำตาล ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการผลิตเมลานิน โดยกรด caffeic ที่มีอยู่ในอาหารและ caffeic acid จะเป็นตัวกระตุ้นให้เอนไซม์ phenoloxidase ทำงาน ทำให้โคโลนีที่เจริญบนอาหารมีสีน้ำตาล ความาสมารถในการสร้างเอนไซม์ urease เมื่อเจริญบนอาหาร urease agar base ยีสต์ *C. neoformans* จะสร้างเอนไซม์ urease มาย่อยยูเรียให้ได้แอมโมเนียทำให้พีเอชเพิ่มขึ้น มีผลทำให้สีของอาหารเปลี่ยนจากสีส้มอ่อนเป็นสีชมพู (นันทนา, 2537) ส่วนความสามารถในการหมักน้ำตาลทั้ง 6 ชนิด พบว่าเชื้อยีสต์ *C. neoformans* จะหมักน้ำตาลได้เพียง 1 ชนิด คือ กลูโคส

ผลการแยกยีสต์ที่คาดว่าเป็นยีสต์ *C. neoformans* จากตัวอย่างมูลนกในแต่ละฤดูกาล ได้ผลการศึกษาดังนี้

4.1 ผลการแยกยีสต์ *C. neoformans* ในช่วงฤดูฝน

ผลการเก็บตัวอย่างมูลนกในช่วงฤดูฝน (กรกฎาคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2559) จากตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิดภายในมหาวิทยาลัยนเรศวรคือ นกพิราบ นกเขาไฟ นกกระจอก และนกเอี้ยง ได้ยีสต์จำนวน 358 ไอโซเลท นำมาทำให้บริสุทธิ์และย้อมด้วย nigrosin เพื่อดูความสามารถในการสร้าง capsule ซึ่งเป็นการคัดแยกเชื้อเบื้องต้นเทียบกับเชื้อ *C. neoformans* อ้างอิง พบเชื้อที่มีลักษณะคล้ายการสร้าง capsule ใกล้เคียงกับเชื้อ *C. neoformans* อ้างอิง จำนวน 8 ไอโซเลท โดยเป็นยีสต์ที่แยกได้จากมูลนกพิราบจำนวน 2 ไอโซเลท คือรหัส Pw1, PP8 จากมูลนกเขาไฟ 1 ไอโซเลท คือ FKn10 จากมูลนกเอี้ยง 1 ไอโซเลท คือ Wn7 และมูลนก กระจอก 4 ไอโซเลท คือ BA7, BX14, BRn9 และ BRn14

เมื่อนำยีสต์ทั้ง 8 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ phenoloxidase บนอาหาร caffeic acid ซึ่งจะต้องให้โคโลนีสีน้ำตาล (Roy, 1997) และการเจริญบนอาหาร Urea agar base เชื้อจะเจริญและเปลี่ยนสีอาหารจากสีเหลืองเป็นสีชมพู (Canteros, 1996) ซึ่งจากการทดสอบพบว่าเชื้อที่ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกับยีสต์ *C. neoformans* ซึ่งเป็นเชื้ออ้างอิงคือไอโซเลท PP8 ลักษณะการเจริญของยีสต์อ้างอิง *C. neoformans* บนอาหาร Caffeic acid agar และ Urea agar base แสดงดังภาพที่ 1

การเจริญบนอาหาร Caffeic acid agar การเจริญบนอาหาร Urea agar base

ภาพที่ 1 ลักษณะการเจริญของยีสต์ *C. neoformans* บนอาหาร Caffeic acid agar และ Urea agar base

เมื่อศึกษาความสามารถในการเจริญและหมักน้ำตาล 6 ชนิด ได้แก่ Sucrose, Lactose, Galactose, Raffinose, Glucose และ Maltose พบว่ายีสต์ไอเลท PP8 ให้ผลเช่นเดียวกับ *C. neoformans* อ้างอิง คือ ไม่สร้างแก๊สและไม่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์เช่นเดียวกัน

ผลการจัดจำแนกเชื้อยีสต์ด้วยวิธีอณูชีววิทยา

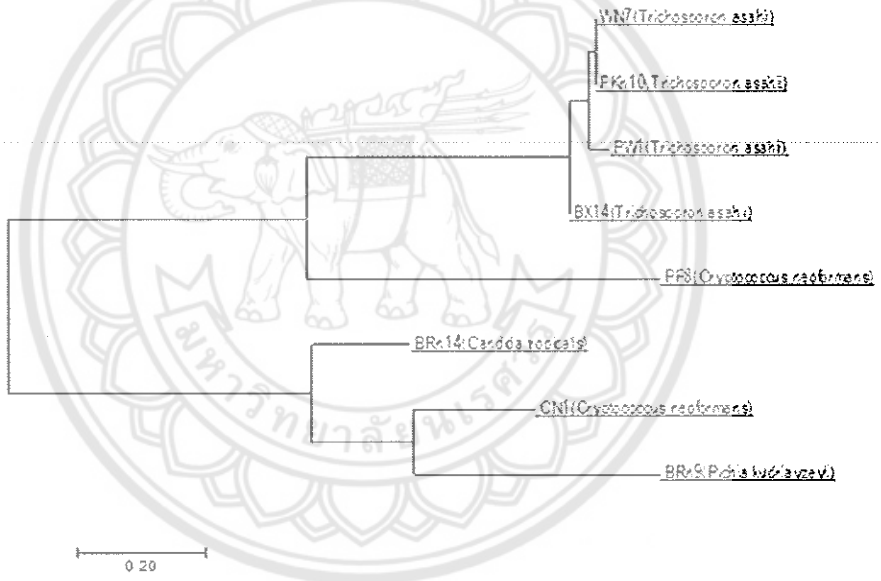
อย่างไรก็ดี แม้ยีสต์ที่ที่คัดเลือกได้จะให้ผลคล้ายการสร้าง capsule 8 ไอโซเลท แต่เมื่อนำไปทดสอบการเจริญบนอาหาร Caffeic acid agar, Urea agar base และทดสอบการหมักน้ำตาล 6 ชนิด พบว่ามีเพียงไอโซเลท PP8 ที่ให้ผลใกล้เคียงยีสต์ *C. neoformans* อ้างอิง แต่ทำการศึกษายืนยันผลด้วยการทดสอบทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิค PCR กับยีสต์ทั้ง 8 ไอโซเลทอีกครั้ง โดยใช้ primer NL1 และ NL4 เมื่อทดสอบขนาด DNA ด้วย gel electrophoresis พบว่าเชื้อให้ขนาดแถบ DNA ประมาณ 600 bp เกิดขึ้นจำนวน 6 ตัวอย่าง แสดงผลดังภาพที่ 2

ภาพที่ 2 การตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในฤดูฝน ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

M= Marker	1 = *C. neoformans*	2 = BX14
3 = BA7	4 = FKn10	5 = BRn9
6 = BRn14	7 = Wn7	8 = PP8
9 = น้ำกลั่น		

ผลการทดลองที่ได้พบว่ามีแถบ DNA ที่ใกล้เคียงกับเชื้อ *C. neoformans* ขนาดประมาณ 600 bp จำนวน 6 ไอโซเลท จากผลการวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาโดยใช้ข้อมูลที่นำไปวิเคราะห์ในโปรแกรม blastn พบว่าไอโซเลท PP8 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. neoformans* มีเปอร์เซ็นต์ identity เท่ากับ 94% ส่วนไอโซเลทอื่นๆมีความเหมือนยีสต์ *Candida tropicalis* มีเปอร์เซ็นต์ identity เท่ากับ 100 % จำนวน 1 ไอโซเลท

คือ BRn14 เหมือน *Pichia kudriavzevii* 99 % จำนวน 1 ไอโซเลท คือ BRn9, และเหมือน *Trichosporon asahii* 100 % จำนวน 4 ไอโซเลท คือ Wn7, BX14, FKn10 และ Pw1 เมื่อนำมาสร้าง Phylogenetic tree ดังภาพที่ 3 โดยวิธี Maximum likelihood method เพื่อดูสายวิวัฒนาการ พบว่ายีสต์ไอโซเลต PP8 ที่คาดว่าจะเป็น *C. neoformans* จากการนำไปเทียบกับฐานข้อมูล blastn ควรจะมีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีสต์ *C. neoformans* อ้างอิง แต่พบว่ายีสต์ไอโซเลท PP8 กลับมีความใกล้เคียงกับยีสต์ไอโซเลท Pw1, FKn10, Wn7 และ BX14 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อ *Tricosporon* spp. แต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าเกิดโคโลนีสีดำบนอาหาร caffeic acid มีการสร้างเอนไซม์ urease บนอาหาร urea agar base และจากการทดสอบการหมักน้ำตาลพบว่าเชื้อไม่มีการหมักน้ำตาลทั้ง 6 ชนิดเช่นเดียวกับ *C. neoformans* อาจเป็นเพราะ *Tricosporon* spp. มีการสร้าง capsule และ Antigen บนผิวแคปซูลของเชื้อ ใกล้เคียงกับ *C. neoformans* (



ภาพที่ 3 แผนภาพวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในช่วงฤดูฝน

จากการศึกษาการแยกยีสต์จากมูลนกบุกรุกในช่วงฤดูฝน พบว่ายีสต์ที่คาดว่ามีการสร้าง capsule จากการทดสอบเบื้องต้นด้วย nigrosin และนำมาทดสอบทางชีวเคมีบนอาหาร Caffeic acid agar, Urea agar base ทดสอบการหมักน้ำตาล และนำมาศึกษาสายวิวัฒนาการ ไม่พบยีสต์ที่เหมือน *C. neoformans*

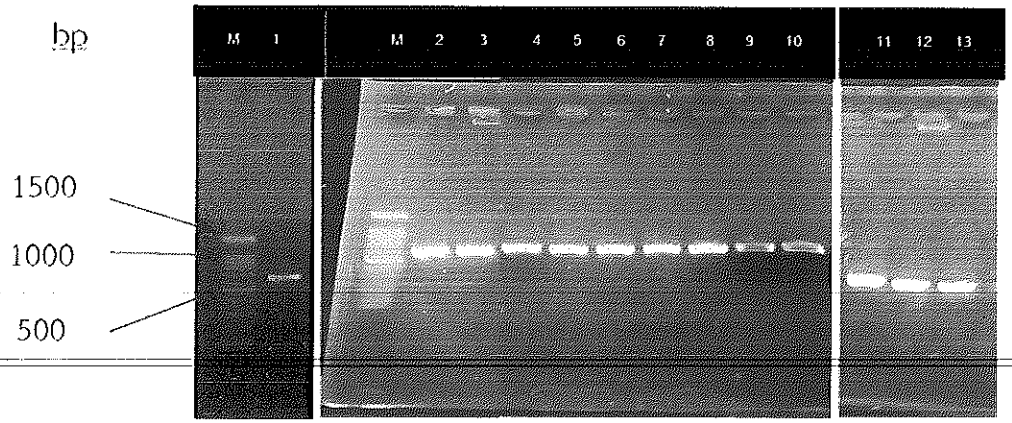
4.2 ผลการแยกยีสต์ในช่วงฤดูหนาว

ผลการศึกษาและจัดจำแนกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด ภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร คือ นกพิราบป่า นกเขาไฟ นกกระจอก และนกเอี้ยงหงอน ในช่วงฤดูหนาว คัดเลือกโคโลนีของเชื้อยีสต์ที่มีโคโลนีคล้าย *C. neoformans* จำนวน 291 ไอโซเลท จากนั้นนำมาย้อมด้วย Nigrosin เพื่อดูความสามารถในการสร้าง Capsule เทียบกับเชื้อ *C. neoformans* อ้างอิง พบเชื้อที่คาดว่ามีการสร้าง Capsule 12 ไอโซเลท ได้แก่ตัวอย่างมูลนกที่แยกได้จากนกกระจอก 8 ไอโซเลท, นกเขาไฟ 1 ไอโซเลท, นกพิราบป่า 1 ไอโซเลท และนกเอี้ยง 2 ไอโซเลท

นำยีสต์ทั้ง 12 ไอโซเลท มาทดสอบการเจริญบนอาหาร Caffeic acid agar ซึ่งจะให้โคโลนีสีน้ำตาล และ Urea agar base เปลี่ยนสีอาหารจากเหลืองเป็นชมพูบนอาหาร Urea agar base พบว่าเชื้อยีสต์ที่ให้ผลบวกบนอาหาร Caffeic acid agar และ Urea agar base คล้ายกับ *C. neofermans* อ้างอิง เพียง 1 ไอโซเลทคือ PS28 และเมื่อทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล 6 ชนิด คือ Sucrose Lactose Galactose Raffinose Glucose และ Maltose ไม่สามารถหมักน้ำตาลได้ จึงทำการศึกษาการจัดจำแนกยีสต์โดยวิธีอณูชีววิทยา

ผลการจัดจำแนกเชื้อยีสต์ด้วยวิธีอณูชีววิทยา

นำตัวอย่างยีสต์ทั้ง 12 ไอโซเลท คือ BB4, BS2, BS12, BS13, BT1, BT2, BT7, BT12, FV2, PS28, WHf2 และ WHt8 มาสกัดและเพิ่มปริมาณ DNA นำ DNA ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของบน 1% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ *C. neoformans* อ้างอิง ผลแสดงดังภาพที่ 4



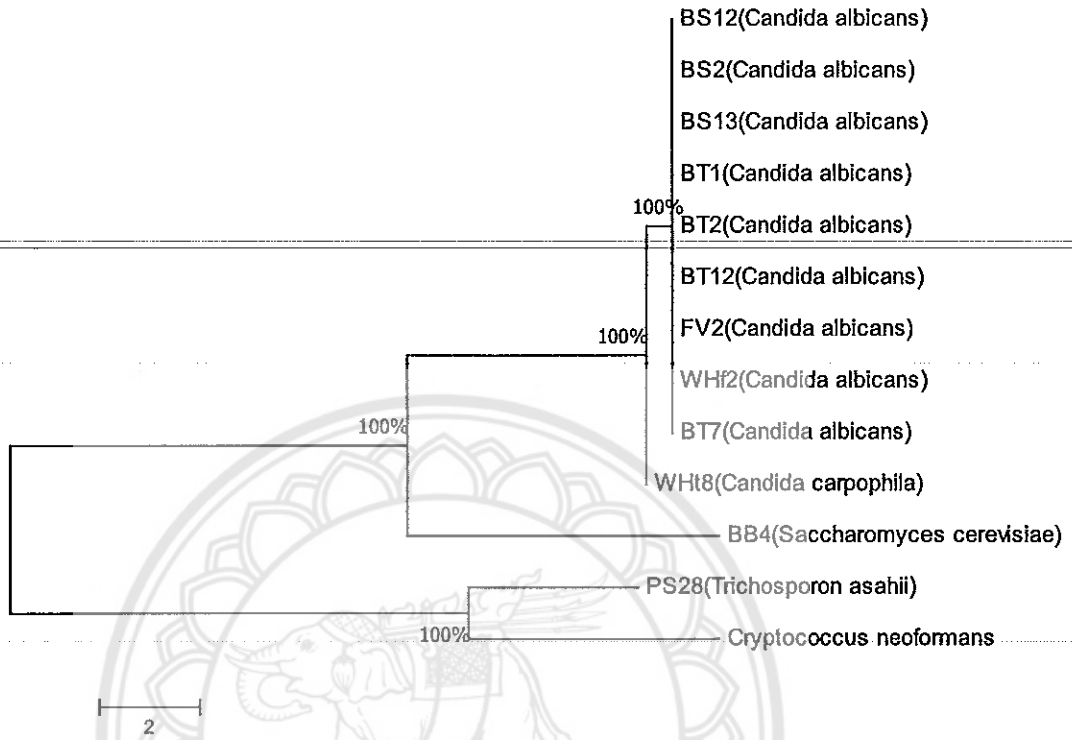
ภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในฤดูหนาว ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

M = Marker
1= *C. neofermans*
2= BB4
3= BS2
4= BS12
5= BS13
6= BT1
7= BT2
8= BT7
9= BT12
10= FV2
11= PS28
12= WHf2
13= WHt8

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *C. neoformans* มีแถบ DNA ขนาดประมาณ 600 bp และจากการนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ในโปรแกรม blastn พบว่าตัวอย่างที่นำมาทดสอบก็ไม่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. neoformans* ที่ได้จากการทดสอบทางชีวเคมี โดยเชื้อที่นำมาทดสอบส่วนใหญ่แล้วเป็นเชื้อ *Candida albicans* 9 ไอโซเลท *Candida carpophila* 1 ไอโซเลท *Saccharomyces cerevisiae* 1 ไอโซเลท และ *Trichosporon asahii* 1 ไอโซเลท

เมื่อนำมาสร้าง Phylogenetic tree ดังภาพที่ 5 โดยวิธี Neighbor-Joining method เพื่อดูสายวิวัฒนาการ พบว่ายีสต์ *C. neoformans* มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการกับยีสต์ไอโซเลท PS28 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อ *Trichosporon asahii* และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าเกิดโคโลนีสีดำบนอาหาร caffeic acid มีการสร้างเอนไซม์ urease บนอาหาร urea agar base แต่จากการทดสอบการหมักน้ำตาลทั้ง 6 ชนิดพบว่าผลไม่ตรงกันกับ *C. neoformans* อาจเป็นเพราะเชื้อ *Trichosporon asahii* มีการสร้าง capsule และการสร้างเอนไซม์ของเชื้อใกล้เคียงกับ *C. neoformans* และจากเปอร์เซ็นความเหมือนที่เป็น 100% นั้น อาจเป็นเพราะว่า Sequence ที่ใช้ทำ Phylogenetic tree เป็นเพียงสายสั้นๆ

คือ 468 bp จึงเป็นความเหมือนของสาย Sequence สั้นๆเท่านั้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่จะทำให้เชื้อทั้งสองมีความใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 5 แผนภาพวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในช่วงฤดูหนาว

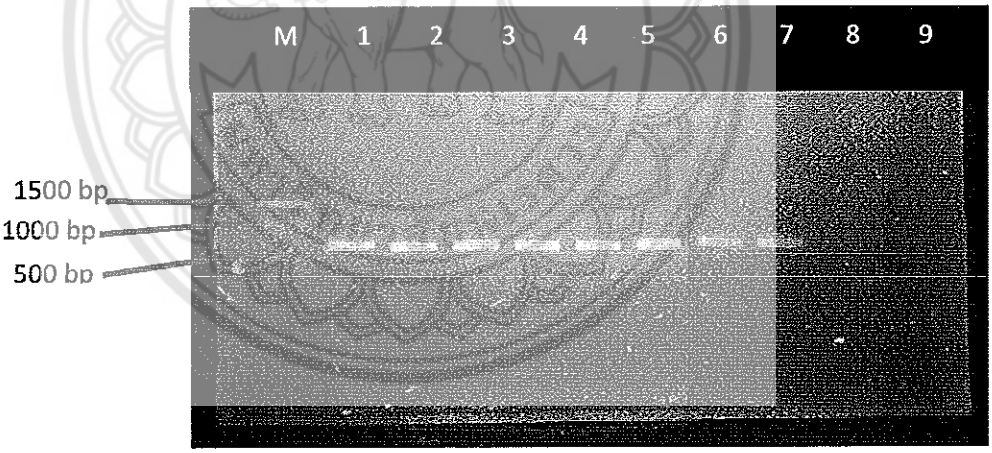
4.3 ผลการแยกยีสต์ในช่วงฤดร้อน

ในช่วงฤดูร้อน (เมษายน-พฤษภาคม พ.ศ. 2560) เนื่องจากอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมที่เก็บตัวอย่างค่อนข้างสูงทำให้ได้ยีสต์จำนวนน้อยมาก จึงทำการเก็บตัวอย่างมากขึ้นโดยการเก็บตัวอย่างในทุกจุดที่พบมูลนก ดังนั้นเมื่อทำการแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด ที่พบในมหาวิทยาลัยนเรศวร คือ นกพิราบ นกเขาไฟ นกกระจอก และนกเอี้ยง และทำการเลือกลักษณะโคโลนีที่คล้ายกับโคโลนีของเชื้อยีสต์ ได้ยีสต์รวมทั้งหมด 532 ไอโซเลท นำมาทำการทดสอบการสร้าง capsule เทียบกับเชื้อ *C. neoformans* อ้างอิง พบยีสต์เพียง 12 ไอโซเลท ที่มีลักษณะคล้ายการสร้างแคปซูล โดยเป็นตัวอย่างที่พบในมูลนกพิราบ 8 ไอโซเลท นกกระจอก 3 ไอโซเลท และนกเขาไฟ 1 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อยีสต์ทั้ง 12 ไอโซเลท มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ Phenoloxidase โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Caffeic acid ทดสอบการสร้างเอนไซม์ Urease ด้วยอาหาร Urea agar base และทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล 6 ชนิด คือ Glucose, Lactose, Sucrose, Galactose, Moltose และ Raffinose

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะคล้ายการสร้างแคปซูลของยีสต์ 12 ไอโซเลท ที่แยกได้ลงบนอาหาร caffeic acid และอาหาร urea agar base เทียบกับการเจริญของยีสต์ *C. neoformans* ซึ่งเป็นเชื้ออ้างอิงพบว่ายีสต์ *C. neoformans* ที่เจริญบนอาหาร caffeic acid จะให้โคโลนีสีน้ำตาล เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ phenoloxidase ได้ เมื่อทดสอบการเจริญบนอาหาร urea agar base เชื้อยีสต์ *C. neoformans* จะสร้างเอนไซม์ urease มาย่อยยูเรียให้ได้แอมโมเนียทำให้พีเอชเพิ่มขึ้น มีผลทำให้สีของอาหารเปลี่ยนจากสีส้มอ่อนเป็นสีชมพู (นันทนา, 2537) และไม่สามารถหมักน้ำตาลทั้ง 6 ชนิดได้ เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อยีสต์ทั้ง 12 ไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนก พบว่ามีเชื้อยีสต์ จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ BT7, BT8 BT13, PL12, PL16, PM22 และ PN5 ที่ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกับเชื้อ *C. neoformans* อ้างอิง จึงนำเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลท ไปทำการยืนยันผลการทดสอบด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาอีกครั้ง

ผลการจัดจำแนกเชื้อยีสต์ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

เพื่อยืนยันผลการจัดจำแนกชนิดว่าเป็นยีสต์ที่สนใจหรือไม่ จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ของตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ NL1 และ NL4 ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และนำมาตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอ บน 1% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ *C. neoformans* อ้างอิง ผลแสดงดังภาพที่ 6

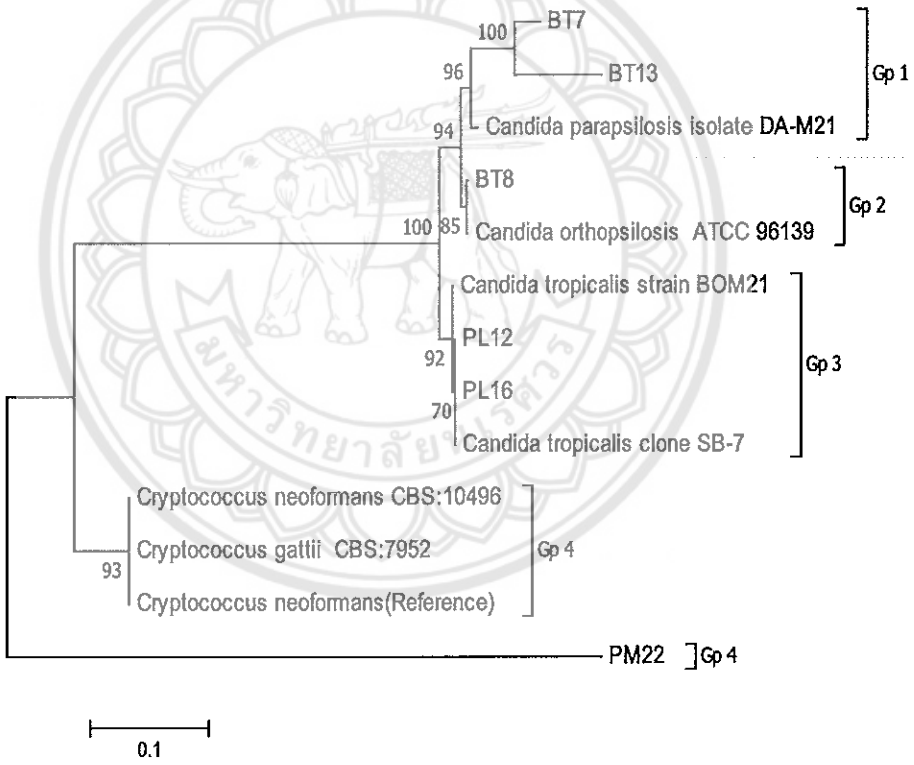


ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในฤดูร้อน ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

M= Marker	1 = *C. neoformans*	2 = BT7	3 = BT8
4 = BT13	5 = PL12	6 = PL16	7 = PM22
8 = PN5	9 = Negative		

จากการตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอบน 1% agarose gel electrophoresis พบว่าแถบดีเอ็นเอของ *C. neoformans* อ้างอิง มีขนาดประมาณ 600 bp และจากการนำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI blastn

จากผลการทำ Blastn ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 26s rDNA บริเวณ D1/D2 ของเชื้อยีสต์ จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด พบว่าเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกทั้ง 4 ชนิด ไม่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. neoformans* โดยเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Candida parapsilosis* 2 ไอโซเลท *Candida orthopsilosis* 1 ไอโซเลท *Candida tropicalis* 2 ไอโซเลท และไม่คล้ายยีสต์ใด 1 ไอโซเลท เมื่อนำมาสร้าง Phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor-joining method เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ สามารถแสดงได้ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แผนภาพวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในช่วงฤดูร้อน

5. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้จากมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด

เมื่อทำการศึกษาชนิดเชื้อราในมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด ทั้ง 3 ฤดู ได้แก่ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน พบว่าจำนวนเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกทั้ง 4 ชนิด มีจำนวน 775 ไอโซเลท ทำการจัดจำแนกในระดับสกุลโดยการทำ slide culture จำแนกเชื้อได้ 16 สกุล ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Curvalaria* spp., *Mucor* spp., *Fusarium* spp., *Paecilomyces* spp. *Trichoderma* sp., *Rhizopus* spp., *Pythium* spp. *Cladosporium* spp., *Acremonium* spp., *Absidia* spp., *Leptoxyphium* spp., *Geotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp. *Phialophora* spp. และระดับสปีชีส์ 23 สปีชีส์ ได้แก่ *Aspergillus parasiticus, Aspergillus niger, Aspergillus wentii, Aspergillus fumigatus, Aspergillus nudulans, Penicillium corylophium, Penicillium nigricans, Penicillium lanosum, Penicillium janthinellum, Curvalaria lunata, Curvalaria pallescens Boedijn, Curvalaria clavata, Mucor microspores, Mucor hachijoensis, Fusarium roseum, Fusarium solani, Paecilomyces victoriae, Rhizopus Ehren, Cephaliophora tropica Thaxter, Alternaria alternate, Bispora sacchari, Colletotrichum coccodes, Humicola taitanensis*

โดยชนิดเชื้อราที่พบมากที่สุดและพบได้ทั้ง 3 ฤดูกาล ในปริมาณใกล้เคียงกัน คือ *Aspergillus* spp. พบจำนวน 110 ไอโซเลท (ร้อยละ 14.19/775) เนื่องจาก *Aspergillus* จัดเป็นเชื้อราที่สามารถพบได้ในธรรมชาติโดยทั่วไป ทั้งในดิน น้ำ และในเศษใบไม้ที่สะสมทั่วไป เป็นเชื้อราที่ก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ อาจได้รับเชื้อนี้ได้จากการหายใจ และเชื้อ *Penicillium* spp. จำนวน 109 ไอโซเลท (ร้อยละ 14.06/775) ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ และอาจเป็นเชื้อราฉวยโอกาสที่ก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเช่นกัน (พรรณิกร, 2542) ส่วนจำนวนและชนิดเชื้อราชนิดอื่นที่แยกและจัดจำแนกได้จากทั้ง 3 ฤดูกาล แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ชนิดเชื้อราที่พบในตัวอย่างมูลกนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด ใน 3 ฤดูกาล

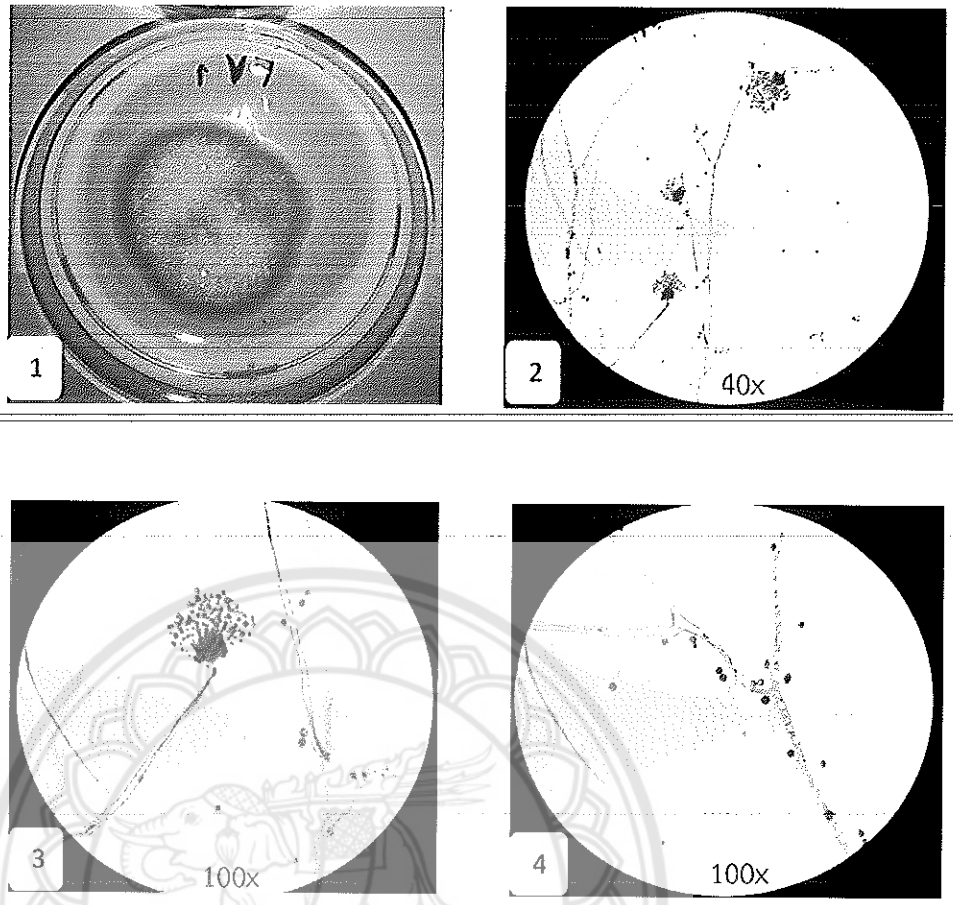
เชื้อรา	จำนวนไอโซเลท/ฤดูกาล		
	ฤดูฝน	ฤดูหนาว	ฤดูร้อน
Aspergillus spp.	63	40	7
Aspergillus parasiticus	3	3	5
Aspergillus niger	0	4	21
Aspergillus wentii	0	4	0
Aspergillus sp.Sect Clavati	0	3	7
Aspergillus fumigatus	0	0	1
Aspergillus nudulans	0	0	4
Penicillium spp.	22	84	3
Penicillium corylophium	9	2	7
Penicillium nigricans	0	6	2
Penicillium lanosum	0	30	9
Penicillium janthinellum	0	0	4
Curvalaria spp.	19	0	0
Curvalaria lunata	1	9	2
Curvalaria pallescens Boedijn	2	0	0
Curvalaria clavata	0	2	7
Mucor spp.	5	4	3
Mucor microspores	1	0	0
Mucor hachijoensis	0	1	0
Fusarium spp.	10	15	1
Fusarium roseum	0	1	5
Fusarium solani	0	1	0
Paecilomyces spp.	0	1	0
Paecilomyces victoriae	0	1	0
Trichoderma sp.	3	1	1
Rhizopus spp.	2	0	1
Rhizopus Ehren	0	0	2
Cephaliophora tropica Thaxter	1	0	0
Pythium spp.		1	

เชื้อรา	จำนวนไอโซเลท/ฤดูกาล		
	ฤดูฝน	ฤดูหนาว	ฤดูร้อน
Cladosporium spp.	0	120	0
Acremonium spp.	0	16	0
Absidia spp.	0	5	1
Alternaria alternata	0	1	0
Leptoxyphium spp.	0	1	0
Geotrichum sp.	0	0	9
Bispora sacchari	0	0	1
Rhizoctonia sp.	0	0	10
Colletotrichum coccodes	0	0	5
Humicola taitanensis	0	0	3
Phialophora spp.	1	0	0
unknown	37	14	3
Mycelia sterilia	18	41	5
Chlamydospore	17	24	0
รวม	214	435	129

ตัวอย่างลักษณะรูปร่างเชื้อราที่พบในมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด เช่น

***Aspergillus* spp.**

เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* เป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไป ในดิน น้ำ และในเศษใบไม้**ที่สะสม มีลักษณะที่สำคัญ คือ เส้นใยมีการ**แตกแขนงเป็นมุม 45 องศา และมีรูปร่างของสปอร์คล้ายกับดอกไม้ **ก่อโรคทั้งในคนและในสัตว์** โดยจะก่อโรค**ในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เมื่อได้รับเชื้อนี้จะทำให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินหายใจ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิห้อง มีสี**ของโคโลนีที่ต่างกัน โดยคุณสมบัติของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* คือ **เส้นใยมีผนังกั้น** (Septate hypha) **ไม่มีสี ก้านชูสปอร์** (Conidiophore) งอกมาจาก vegetative hypha บริเวณตำแหน่ง foot-cell ปลายก้านชูสปอร์จะมีลักษณะเป็นกระเปาะ (vesicle) บนปลายก้านชูสปอร์ มีติ่ง (Phialide) ซึ่งอาจจะมีชั้นเดียว (Uniseriate) หรือสองชั้น (Biseriate) (พรรณิกร, 2542) ดังภาพที่ 8



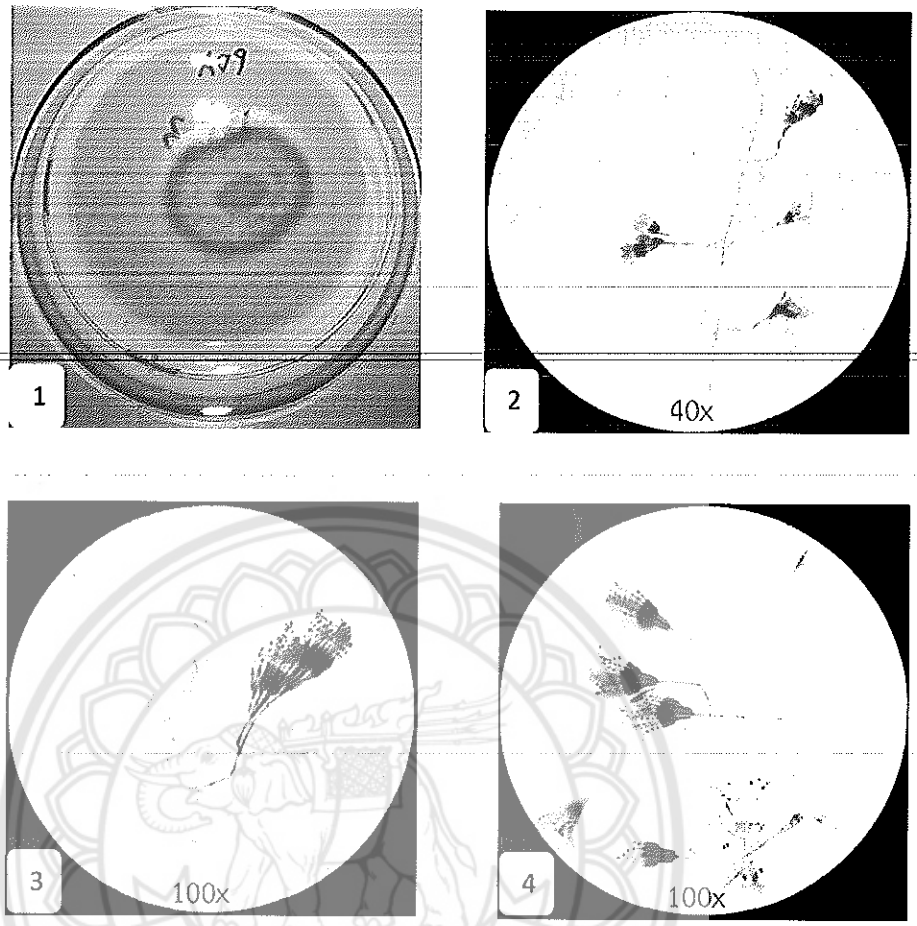
ภาพที่ 8 ลักษณะของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. (Watanabe, 1937)

1.ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 2.และ 4. ลักษณะของเส้นใย

3.ลักษณะของเส้นใยและก้านชูสปอร์ (Conidiophore)

Penicillium

เชื้อราในกลุ่มนี้เป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไป อาจจะเรียกว่า green mold และ blue mold ตามสีสปอร์ของรา สามารถก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ซึ่งเชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียแกรมบวกได้ จึงมีการนำราชนิดนี้มาสกัดเป็น ยาเพนิซิลิน ซึ่งถือว่าเป็นยาปฏิชีวนะตัวแรกของโลก คุณสมบัติของเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* คือ เป็นเชื้อราเส้นสายมีผนังกั้น (Septate hypha) ไม่มีสี สร้างโคนิเดียมบนก้านชู (Phialide) รวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่า สปอโดเชียม ก้านชูสปอร์ (Conidiophore) มีการแตกแขนงมีรูปร่างใต้กล้องคล้ายแปรง (brush-like spore-bearing structures) ดังภาพที่ 9



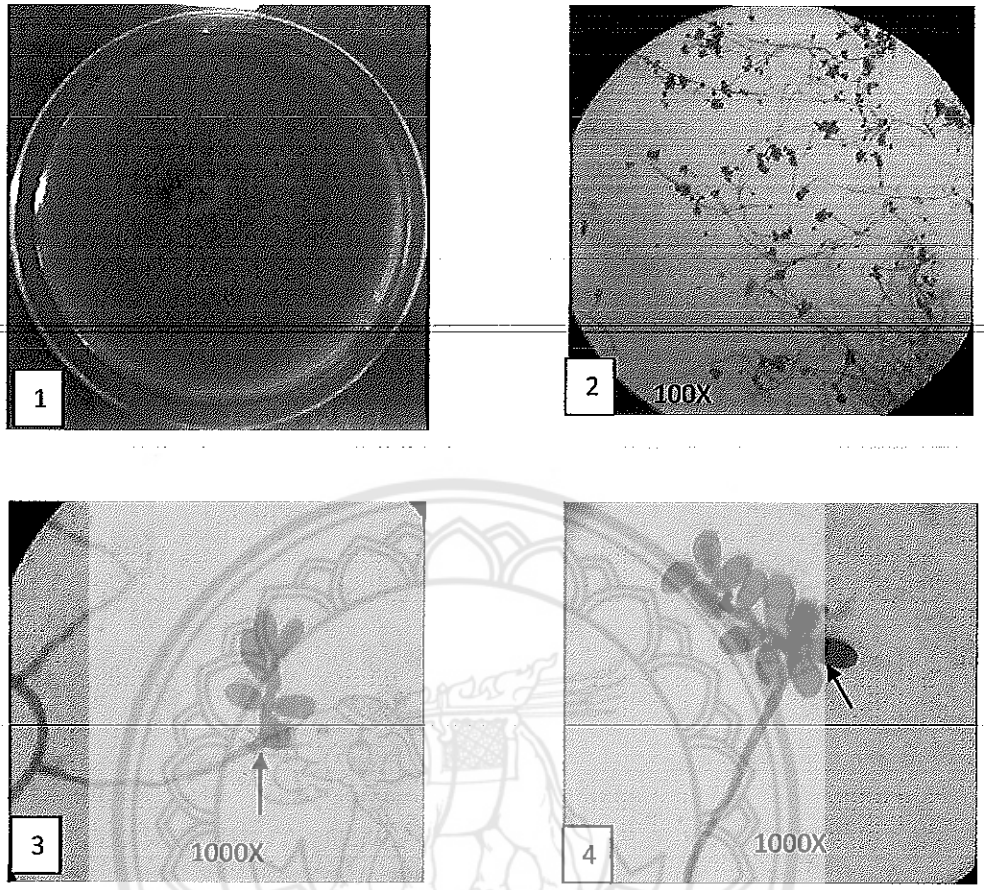
ภาพที่ 9 ลักษณะของเชื้อรา *Penicillium corylophium* (Watanabe, 1937)

1.ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 2.ลักษณะของเส้นใย

3.ลักษณะของก้านชูสปอร์ (Conidiophore) 4.ลักษณะของ Conidia

Curvularia

เชื้อราสกุล *Curvularia* เจริญเติบโตเร็ว ลักษณะคล้ายสกุล *Alternaria* สายรามีผนังกั้นสีดำ โคนิเดียมีสีดำ มักอยู่เป็นกระจุกที่ปลายก้านชู ภายในโคนิเดียมีผนังกั้นตามขวางเท่านั้น สายพันธุ์ที่พบได้ทั่วโลก และพบได้บ่อยคือ *C. lunata* มีผนังกั้นตามขวาง 3 อัน ส่วน *C. geniculata* มีผนังกั้นตามขวาง 5 อัน จัดเป็นราฉวยโอกาสที่ก่อโรคได้กว้างขวาง เช่น ก่อโรคที่กระจกตา เล็บ ผิวหนัง และอวัยวะภายใน (พรรณกร, 2535) ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Curvularria lunata* Boedijn

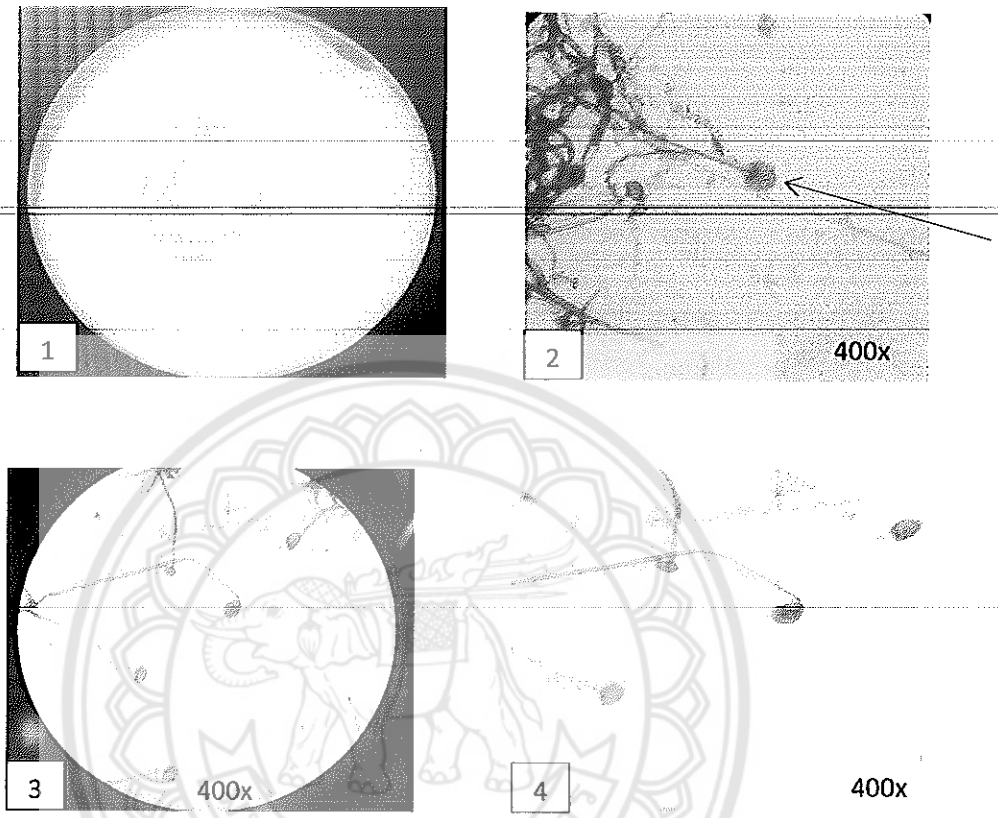
1.ลักษณะเส้นใยและสปอร์บนอาหาร PDA 2.ลักษณะเส้นใย

3.เส้นใยมีผนังกั้น 4.ภายในโคนิเดียมีผนังกั้นตามขวาง

Rhizopus

ลักษณะสำคัญของราใน genus *Rhizopus* ก็คือ มีการสร้าง nutritive hypha (rhizoid) ตรงบริเวณที่สร้าง sporangiophore ซึ่งมักเกิดรวมกันเป็นกลุ่ม แต่ละกลุ่มเชื่อมโยงกันด้วย stolon มีการสร้าง sporangium เป็นแบบ columellate มีรูปร่างเกือบกลม เกิดที่ปลายก้าน sporangiophore มี apophysis การสืบพันธุ์แบบใช้เพศเป็นแบบ homothallic หรือ heterothallic และเป็น isogamous คือ suspensor และ gametangium มีรูปร่างและขนาดเท่ากัน สร้าง zygosporangium อยู่ระหว่าง opposed suspensors ราใน genus *Rhizopus* มีประมาณ 14 species พบทั่วไปในดิน และยังเป็นสาเหตุโรคเน่าเละของหัวมันเทศ

ตลอดจนผลไม้ต่างๆ บางพวกเป็นสาเหตุโรค zygomycosis (mucormycosis) ของคนและสัตว์บาง species (พรรณกร, 2535) ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Rhizopus spp.* (Watanabe, 1973)

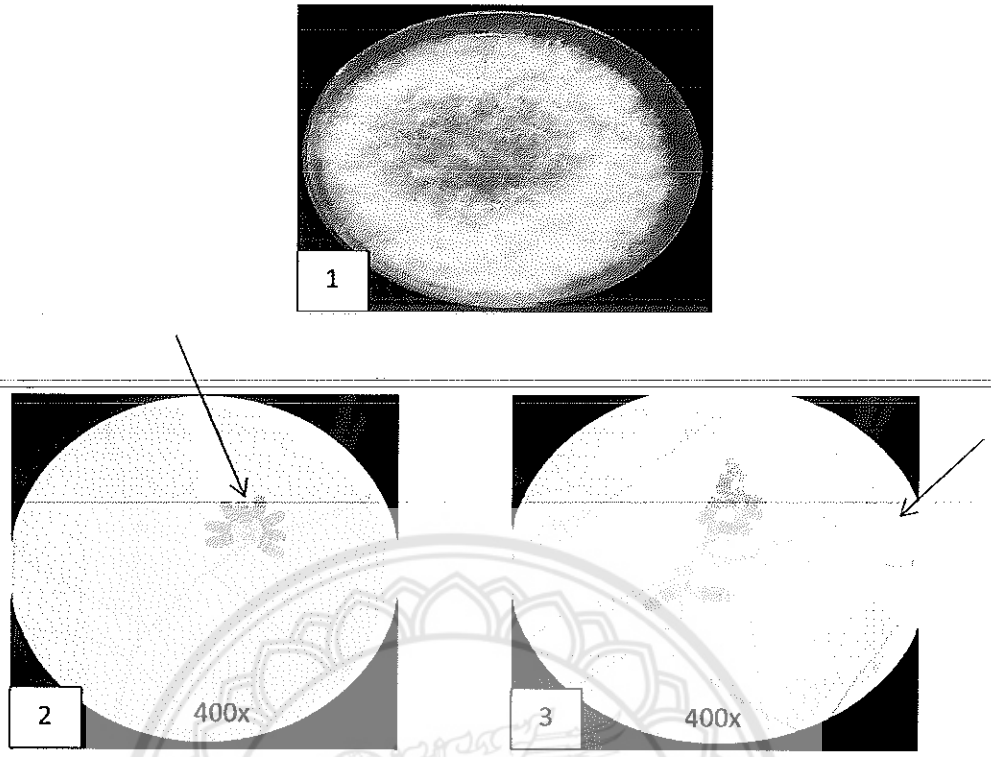
1.ลักษณะสปอร์และเส้นใยบนอาหาร PDA 2. Sporangium โครงสร้างคล้ายถุงภายในบรรจุสปอร์

3.ลักษณะ Columella โครงสร้างส่วนปลายที่อยู่ใน sporangium

4.ลักษณะ Sporangiophore ก้านชู sporangium

Cephaliophora

โคโลนีของราเจริญรวดเร็วบนอาหาร PDA มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เส้นใยเมื่ออ่อนไม่มีสี จากนั้นจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล conidiophore ลักษณะสั้น conidium รูปไข่จนถึงทรงกระบอก มีผนังกั้น 3-5 เซลล์ ไม่มีสี ผนังเรียบ ขนาด 27.5-45.5 x 14.0-20.5 µm จากนั้นเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน เมื่ออายุมากขึ้น ผนังเรียบและหนา Domsch et al. (1983) ดังภาพที่ 12



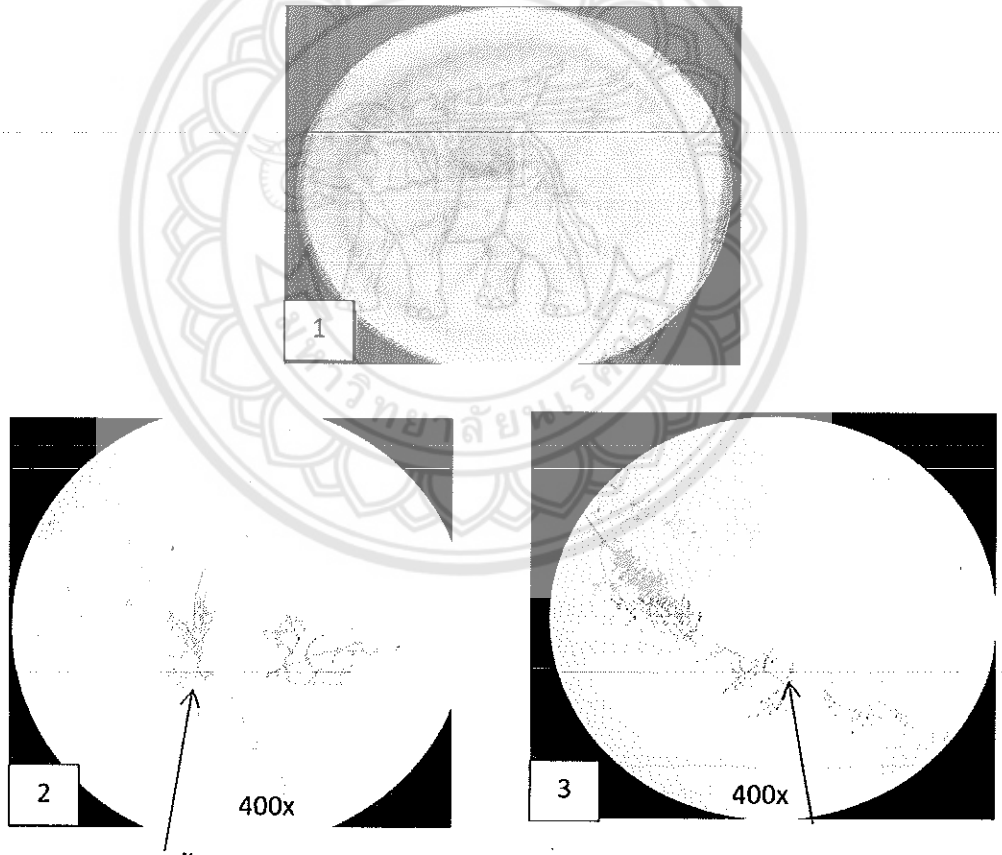
ภาพที่ 12 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Cephaliophora tropica* Thaxter

1. ลักษณะสปอร์และเส้นใยบนอาหาร PDA
2. ลักษณะสปอร์รูปไข่หรือทรงกระบอก มีผนังกั้น 3-5 เซลล์
3. ลักษณะเส้นใยไม่มีผนังกั้น (Watanabe, 1973)

Trichoderma

เป็นราชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์ จัดเป็น soil saprophyte และเป็น mycoparasite โดยใช้เส้นใยขดเป็นวงรอบๆ เส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากนั้นเข้าไปเจริญในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ โดยการย่อยผนังเซลล์ แล้วใช้อาหารจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช เจริญได้ดีในดินที่มีความชื้นแต่ไม่แฉะ สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินธรรมชาติได้ง่าย ขยายพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ นำมาเพาะเลี้ยงจะเห็นเส้นใยและสปอร์สีเขียว อยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน เป็นเชื้อราที่เจริญรวดเร็วบนอาหารหลายชนิด สร้าง conidiophore ที่แตกกิ่งก้านสาขา โดยที่ปลาย conidiophore มีโครงสร้างกำเนิด conidium หรือ spore เรียกว่า phialide รูปร่างคล้ายลูกโบว์ลิ่ง conidium ซึ่งเกิดจากปลาย phialide จะรวมกันเป็นกลุ่มก้อน (slime head) เห็นเป็นสีเขียวหรือใส (hyaline) ส่วนระยะสมบูรณ์เพศ หรือ teleomoph ของเชื้อรา *Trichoderma* คือเชื้อราในจีนัส *Hypocrea* หรือจีนัสอื่นๆ ที่ใกล้เคียงกัน สามารถพบได้ทั่วไปในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีอินทรีย์วัตถุ อาศัยเศษซากพืชและสัตว์เป็น

แหล่งอาหาร พบว่าในดินที่ปราศจากแหล่งอาหาร เชื้อราชนิดนี้สามารถอยู่รอดได้นานกว่า 130 วัน เชื้อรา *Trichoderma* จัดเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการเจริญแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช เนื่องจากมีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว และสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในที่มีอุณหภูมิเย็นจัดประมาณ 10-12 องศา colony เชื้อรา *Trichoderma spp.* มีการสร้างเส้นใยเจริญเติบโตเร็ว เริ่มแรกโคโลนีมีผิวหน้าเรียบ ไม่มีสี (translucent) หรือสีขาว (watery white) ต่อมาโคโลนีมีลักษณะเป็นแบบปุยฝ้ายฟูอย่างหลวม ๆ (loosely floccose) หรือเป็นกระจุกหนาแน่น (compactly tuft) หรือมีลักษณะทั้งสองแบบในโคโลนีเดียวกัน หรือมีลักษณะอยู่ระหว่างทั้ง 2 แบบ การเกาะกันเป็นกระจุกของโคโลนีมีส่วนเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของก้านชูสปอร์ การสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma spp.* ที่สำคัญคือบริเวณที่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นวงรอบหรือเป็นวงแหวน (ring-like zone) ซึ่งเกิดจากอิทธิพลของแสง และเมื่อโคโลนีมีอายุมากขึ้นจะมีการสร้าง conidiophore ขึ้นมาใหม่อีกบริเวณรอบนอกที่สร้างสปอร์ทำให้เห็นการเกิดวงรอบ หรือ zonation (พรรณกร, 2535) ดังภาพที่ 13

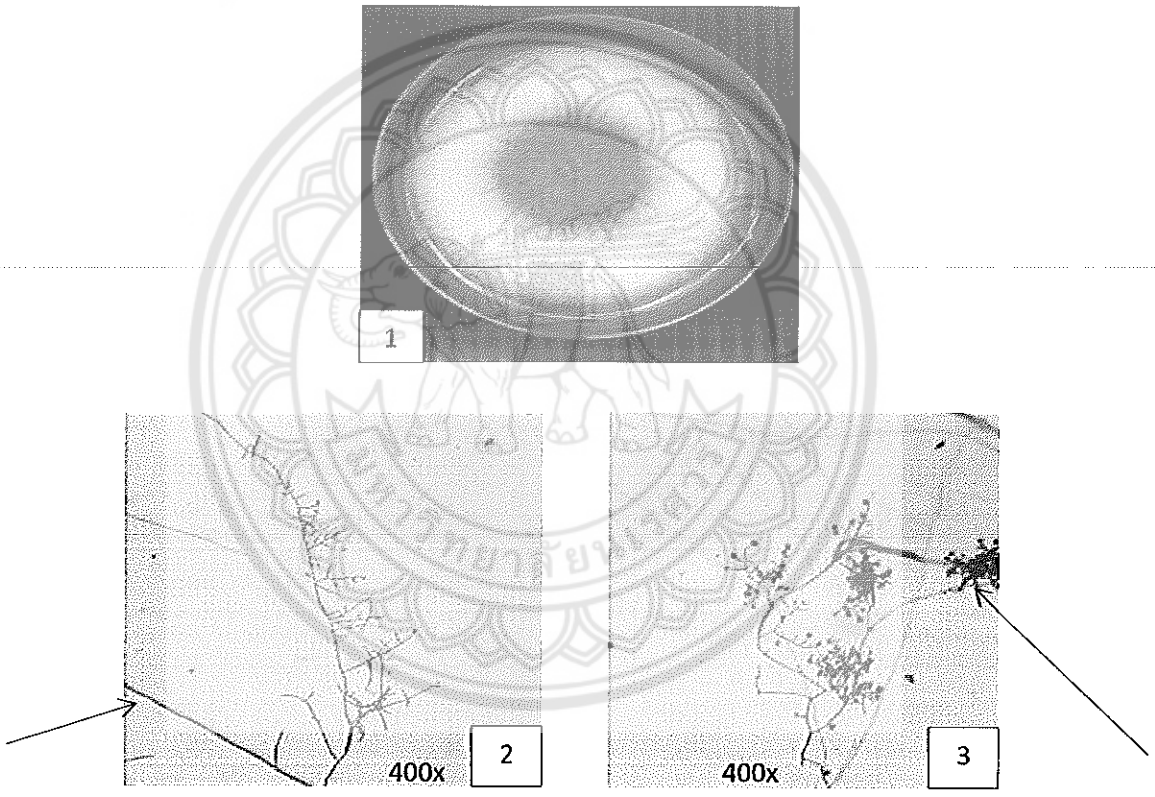


ภาพที่ 13 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Trichoderma spp.* (Watanabe, 1973)

1. ลักษณะสปอร์และเส้นใยบนอาหาร PDA 2. ลักษณะ conidiophore ที่แตกกิ่งก้านสาขา
3. ลักษณะ phialide รูปร่างคล้ายลูกโบว์ลิ่งเกิดจากปลาย phialide จะรวมกันเป็นกลุ่มก้อน

Pythium

Pythium spp. มีเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้น สร้างสปอร์ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual spores) มีผนังหนา และสปอร์ที่เกิดแบบสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spores) เป็นสปอร์รูปร่างต่างๆ กัน อาจมีรูปร่างกลม หรือเป็นเส้นยาว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด (species) สปอร์งอกเส้นใย 1-2 วัน หรืออาจสร้างสปอร์มีหางว่ายน้ำได้ภายในถุงที่แยกออกมาจากสปอร์ (vesicle) ราพวกนี้ส่วนมากสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยตัวเอง (homothallic fungi) เกิด oospores อยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชที่มันเข้าทำลาย หรือบนอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด บางครั้งพบสปอร์ผนังหนา รูปร่างกลม เมื่อทำการศึกษา พบความแตกต่างของรา *Pythium* spp. หลายชนิด (พรรณกร, 2535) ดังภาพที่ 14



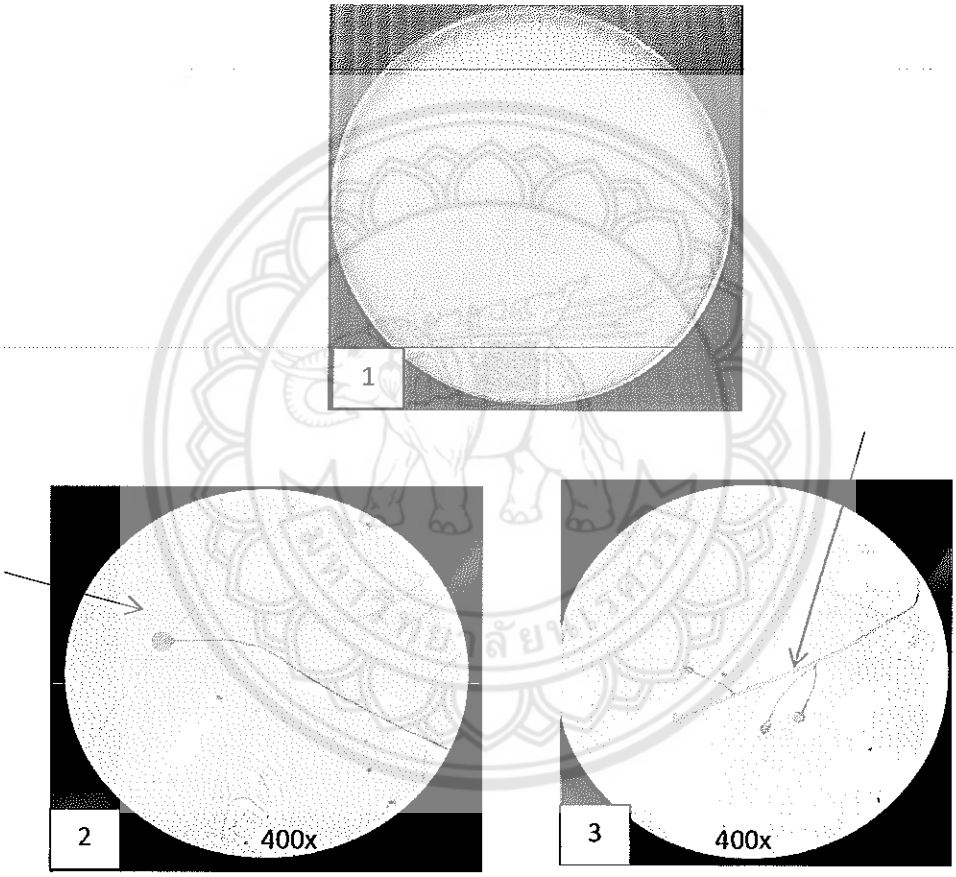
ภาพที่ 14 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Pythium* spp.

1. ลักษณะสปอร์และเส้นใยบนอาหาร PDA 2. เส้นใยที่ไม่มีผนังกั้น

3. ลักษณะสปอร์มีผนังหนา รูปร่างหลากหลาย (Watanabe, 1973)

Mucor

เชื้อราที่จัดอยู่ในสกุลนี้มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศ สร้างก้านชูอับสปอร์ซึ่งไม่ยาว งอกจากสายราชนิดไม่มีผนังกั้น ก้านชูอาจมีอันเดียวหรือหลายอันก็ได้ ตรงปลายก้านชูพองออกเป็น columella และมีอับสปอร์ ซึ่งมีรูปกลมหรือรี ภายในมีสปอร์รูปกลมหรือรีหลายสปอร์ เวลาที่อับสปอร์แตกเปลือกสปอร์อาจหลุดออกหมดหรือเหลือบางส่วนติดกับก้านชูไว้ อาจพบโคนิเดียป่อง ไม่พบ stolon, rhizoid หรือ apophysis การสืบพันธุ์แบบผสมเพศสร้าง zygospore โดยปกติไม่พบ zygospore ในเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนคือ *Mucor circinelloides* และ *Mucor ramosissimus* (พรรณกร, 2535) ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Mucor microstorus* (Watanabe, 1973)

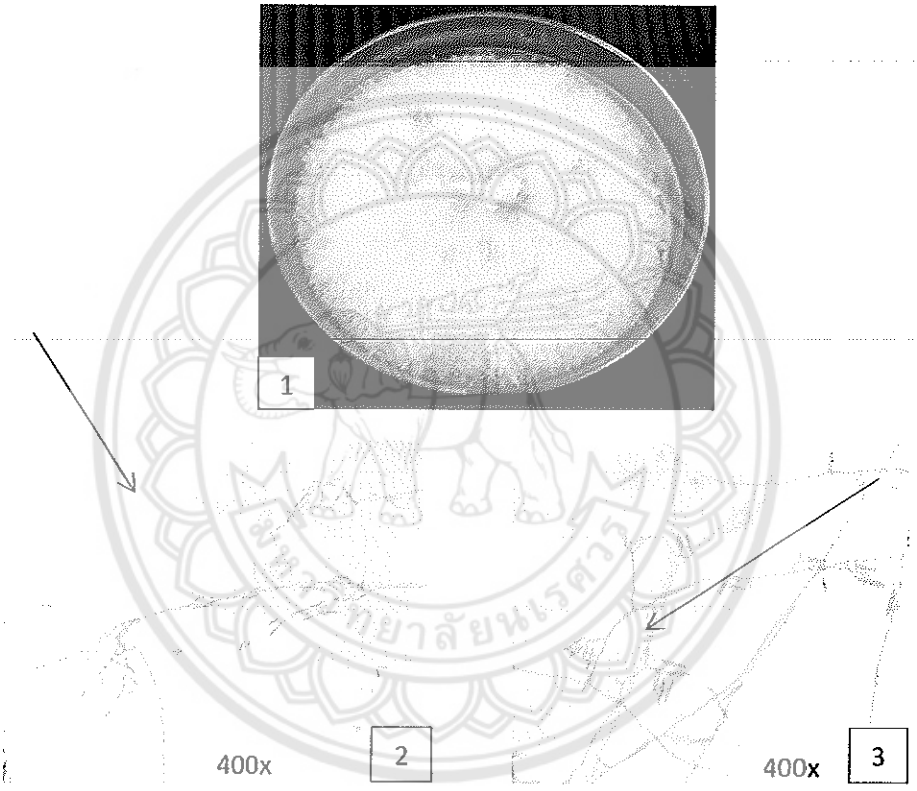
1.ลักษณะสปอร์และเส้นใยบนอาหาร PDA

2.ลักษณะสปอร์รูปร่างกลมหรือรีหลายสปอร์ใน columella

3.ลักษณะเส้นใยไม่มีผนังกั้น

Fusarium

เชื้อสกุล *Fusarium* โคโลนีมีสีต่างๆกัน ก่อโรคแบบเชื้อราฉวยโอกาสทั่วไป เป็นสาเหตุสำคัญของกระจกตาอักเสบ (mycotic keratitis) เนื่องจากมีเอนไซม์ย่อยโปรตีน จึงฝังตัวที่กระจกตา (cornea) ได้ดี จัดเป็นเชื้อราชนิดที่มีผนังกั้น สายราไม่มีสี โคโลนีมีสีต่างกัน เช่น ชมพู ม่วงหรือเหลือง มีการสร้างทั้งโคนิเดียขนาดใหญ่ (macroconidia) และโคโลนีขนาดเล็ก (microconidia) โคนิเดียขนาดเล็กประกอบด้วยเซลล์เดียว เกิดเป็นกลุ่มที่ปลายก้านชูสั้นๆ (short phialides) คล้ายกับเชื้อ *Acremonium* โคนิเดียขนาดใหญ่มีหลายเซลล์ อาจมีรูปร่างยาวปลายมนคล้ายกล้วยหอม รูปไม่ยาวปลายมนคล้ายเมล็ดถั่วลิสง หรือรูปยาวปลายเรียวคล้ายเคียวหรือพระจันทร์เสี้ยว (sickle-shaped) (พรรณกร, 2535) ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Fusarium* spp. (Watanabe, 1973)

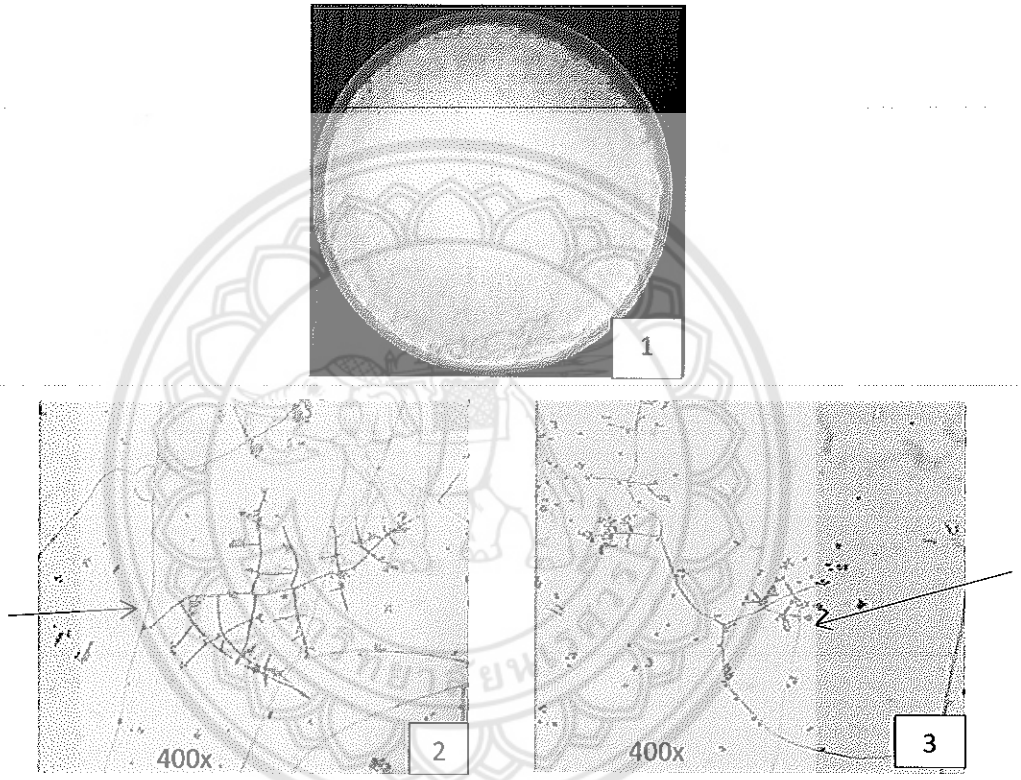
1.ลักษณะสปอร์และเส้นใยบนอาหาร PDA

2.ลักษณะเส้นใยมีผนังกั้น

3.ลักษณะ Conidia รูปร่างยาวปลายมนคล้ายกล้วยหอมหรือเรียวยาวคล้ายพระจันทร์เสี้ยว

Phialophora

เชื้อราสกุล *Phialophora* สร้างก้านชูสปอร์รูปแจกัน ซึ่งอาจมีขอบสวยงามหรือไม่มีขอบก็ได้ สายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนได้แก่ *P. parasitica*, *P. richardsiae* และ *P. repens* เป็นสาเหตุโรค subcutaneous *P. verrucosa* เป็นสาเหตุก่อโรค chromoblastomycosis ตามธรรมชาติมักก่อโรคราน้ำเงินในไม้ซุง (พรรณกร, 2535) ดังภาพที่ 17



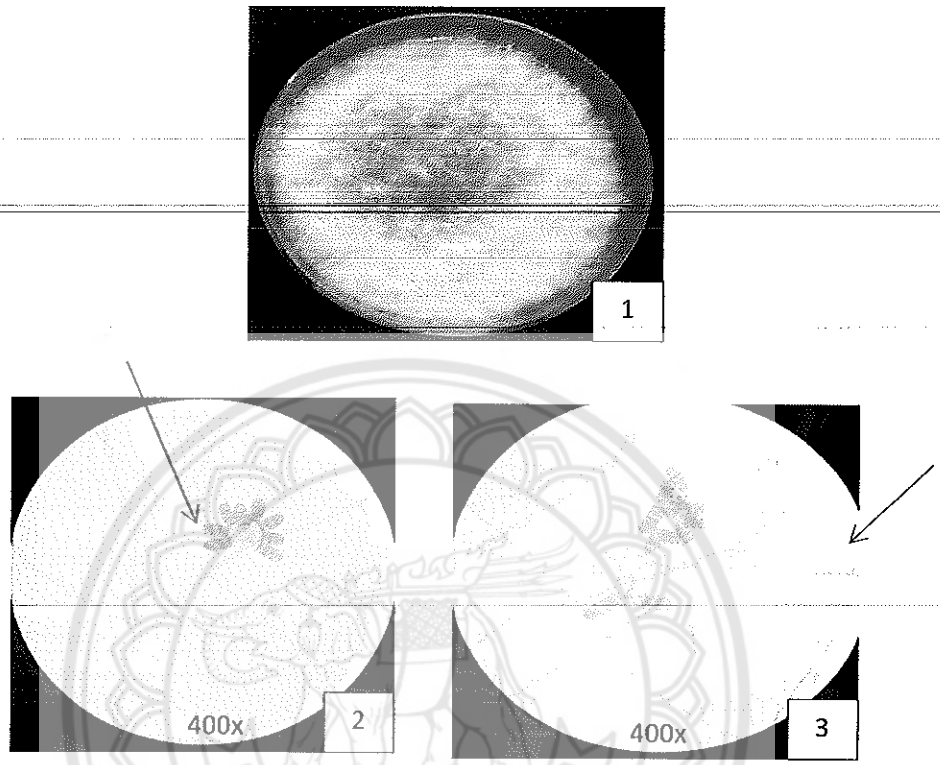
ภาพที่ 17 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Phialophora* spp. (Watanabe, 1973)

1. ลักษณะสปอร์และเส้นใยบนอาหาร PDA
2. ลักษณะก้านชู Conidia เป็นรูปแจกัน
3. ลักษณะ Conidia โค้งหรือรูปรี

Cephaliophora

โคโลนีของราเจริญรวดเร็วบนอาหาร PDA มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เส้นใยเมื่ออ่อนไม่มีสี จากนั้นจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล conidiophore

ลักษณะสั้น conidium รูปไข่จนถึงทรงกระบอก มีผนังกั้น 3-5 เซลล์ ไม่มีสี ผนังเรียบ ขนาด 27.5-45.5 x 14.0-20.5 µm จากนั้นเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน เมื่ออายุมากขึ้น ผนังเรียบและหนา (Domsch et al., 1983) ดังภาพที่ 18

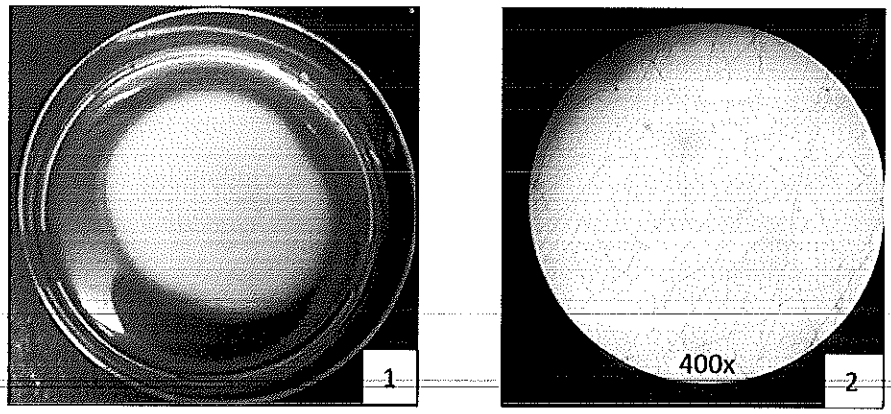


ภาพที่ 18 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Cephaliophora tropica* Thaxter (Watanabe, 1973)

1. ลักษณะสปอร์และเส้นใยบนอาหาร PDA
2. ลักษณะสปอร์รูปไข่หรือทรงกระบอก มีผนังกั้น 3-5 เซลล์
3. ลักษณะเส้นใยไม่มีผนังกั้น

Mycelia Sterilia

Myceliales หรือ Mycelia Sterilia (sterile fungi) เป็นเชื้อราที่ไม่พบการสร้าง asexual spores ที่มีลักษณะต่างไปจากเส้นใยปกติ การอยู่ข้ามฤดูจะสร้างโครงสร้างพิเศษเรียกว่า sclerotia ซึ่งเกิดจากกลุ่มเส้นใยที่มาอัดตัวกันแน่นลักษณะคลายเมล็ดผักกาด ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Sclerotium* สาเหตุโรครากและโคนเน่าของพืชหลายชนิด เชื้อ *Rhizoctonia* สาเหตุโรคโคนเน่า เป็นต้น (สิริพงศ์, 2508) ดังภาพที่ 19

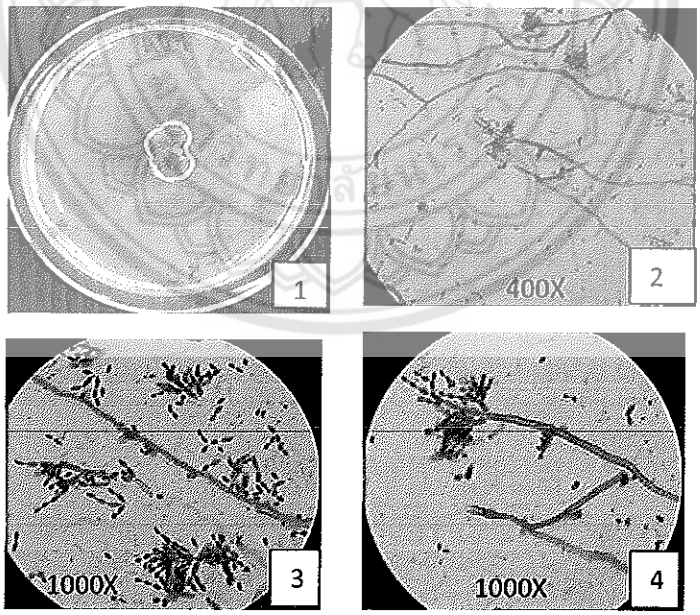


ภาพที่ 19 ลักษณะเชื้อราในกลุ่ม Mycelia Sterilia (Watanabe, 1973)

1. ลักษณะสปอร์และเส้นใยบนอาหาร PDA 2. ลักษณะเส้นใย Mycelia Sterilia

Cladosporium

เชื้อราสกุล *Cladosporium* มีการสร้างโคนิเดียแบบ Cladosporium ชัดเจน โคโลนีเจริญช้า ปรากฏโคโลนีในสัปดาห์ที่สอง (ประมาณ 10 วัน) มีรอยหยัก สีดำอมเขียว ตรวจทางจุลสัณฐานวิทยา พบสายโคนิเดียต่อกันยาว (พรรณกร, 2535) ดังภาพที่ 20

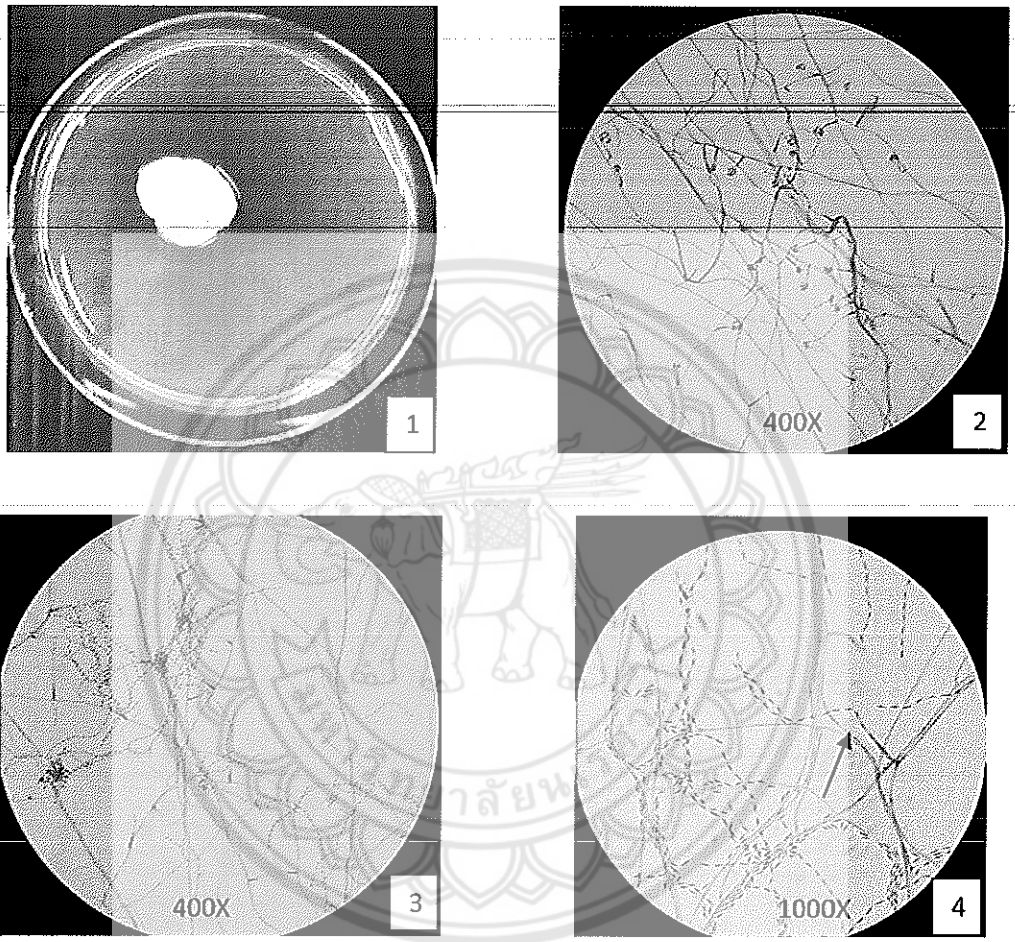


ภาพที่ 20 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Cladosporium* spp.

1. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PD 2,4. ลักษณะเส้นใย 3. ลักษณะสปอร์

Paecilomyces

เชื้อ *Paecilomyces* สามารถก่อโรคในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ ลักษณะคล้ายกับเชื้อ *Penicillium* โคโลนีมีสีนวล ติ่งอยู่เป็นกลุ่มคล้ายแปรง ลักษณะยาวเรียว (tapering) ปลายเป็นจุด (ending in a sharp point) โคนิเดียขนาดเล็ก รูปกลมหรือรี ต่อกันเป็นสายยาว (พรรณกร, 2535) ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Paecilomyces* spp.

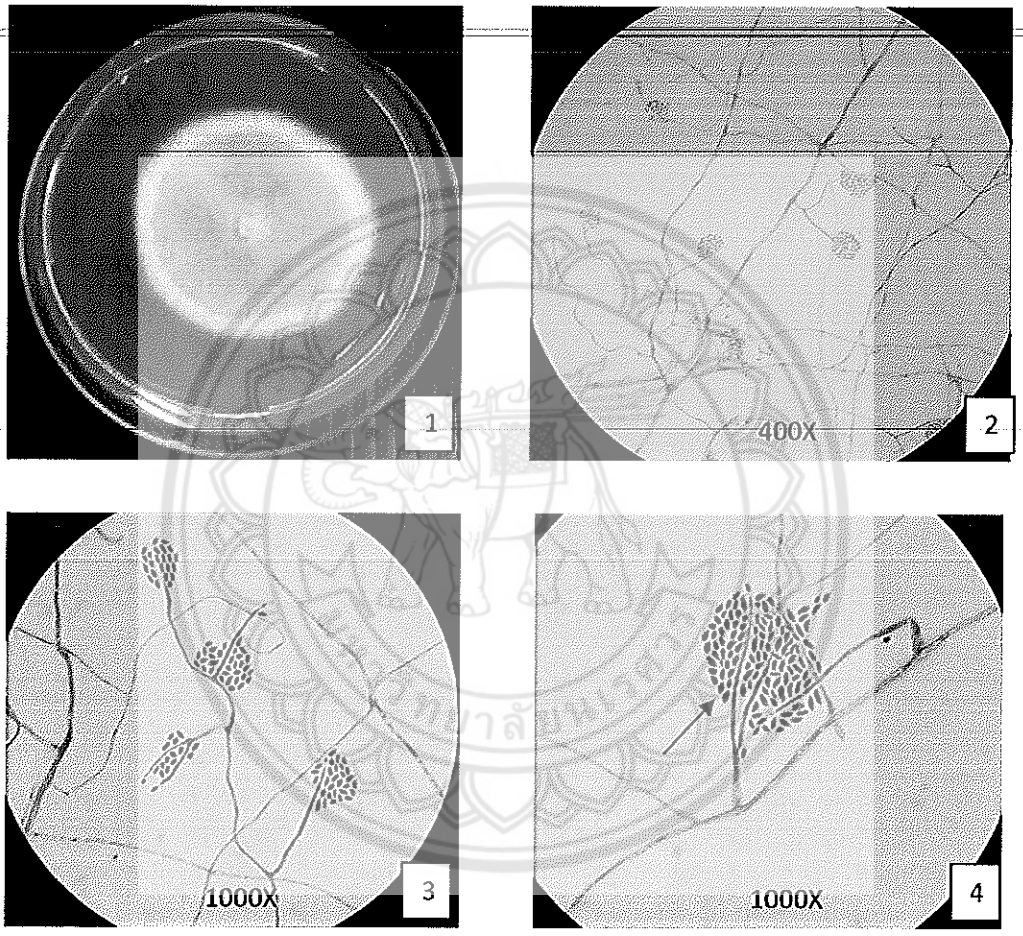
1. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA

2,3. ลักษณะเส้นใย

4. โคนิเดียเป็นสายยาว

Acremonium

เชื้อสกุล *Acremonium* มีโคนิเดียอยู่เป็นกลุ่มที่ปลายก้านชู (head spores) มักก่อโรคมัยเซโตมา จัดเป็นเชื้อราที่มีผนังกั้น สายราไม่มีสี โคโลนีมีสีขาว อาจมีสีชมพูหรือสีเหลือง ลักษณะสำคัญคือ ก้านชูยาว เรียว (delicate) คล้ายเส้นผม โคนิเดียมีเซลล์เดียว รูปรี หรือรูปไข่อยู่เป็นกลุ่มที่ปลายก้านชู (พรรณกร, 2535) ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Acremonium* spp.

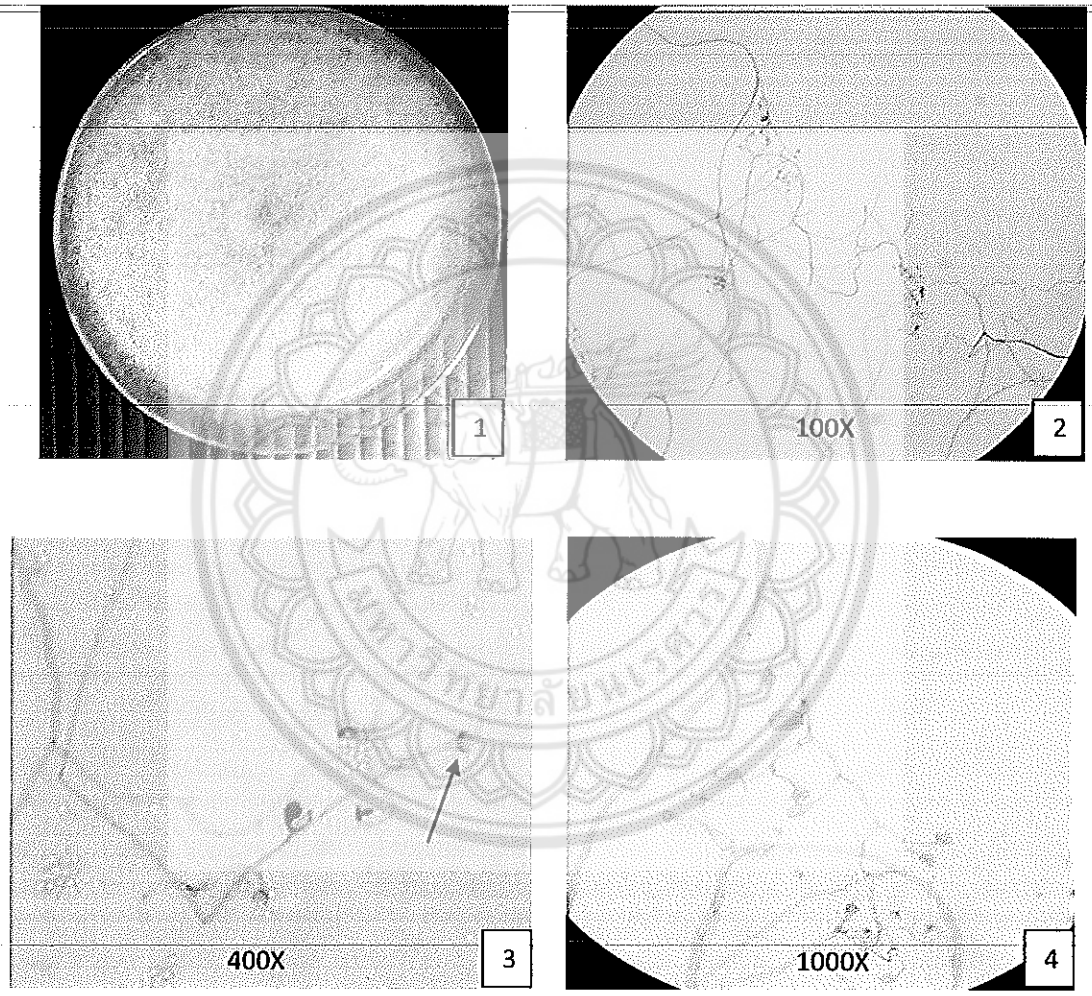
1. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA

2,3 ลักษณะเส้นใย

4. สปอร์เกาะกลุ่มกัน

Absidia

เชื้อราในสกุลนี้สร้างก้านชูอับสปอร์จากสโตลอน (stolon) ซึ่งเชื่อมระหว่าง 2 ไรซอยด์ ก้านชูอับสปอร์มักงอกเป็นกลุ่ม 3-5 ก้าน บางครั้งก้านชูอับสปอร์งอกจากสายรา ปลายก้านชูอับสปอร์กางออกเป็นรูปกรวยเพื่อรองรับสปอร์รูปลูกแพร ปลายก้านชูอับสอร์จึงทำมุมกับอับสปอร์ เกิดเป็น apophysis สปอร์ผิวเรียบหรือหยาบ ไม่มีสีหรือสีดำ รูปกลมหรือรี ภาวะที่ผสมเพศสร้างซัยโกสปอร์เป็นเชื้อก่อโรคในคน (พรรณกร, 2535) ดังภาพที่ 23



ภาพที่ 23 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Absidia* spp.

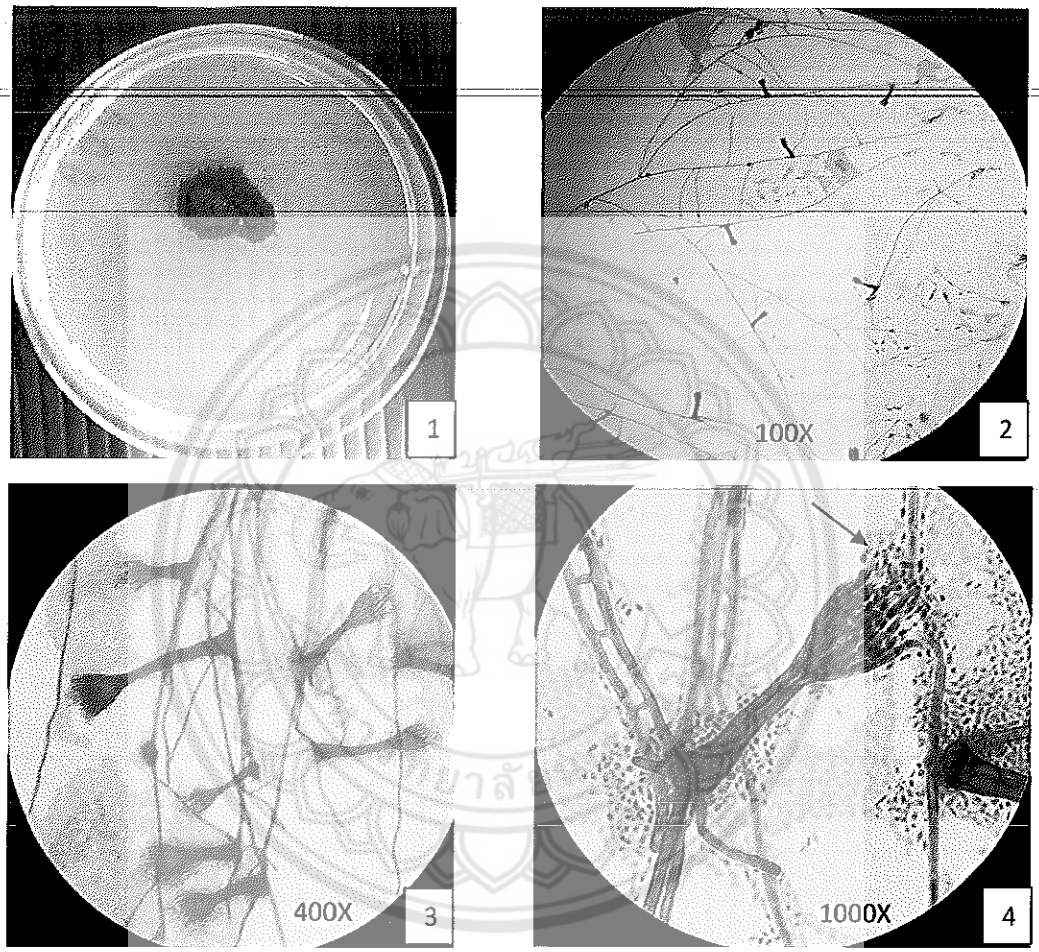
1. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA

2,4. ลักษณะเส้นใย

2. ปลายก้านชูอับสปอร์กางออกเป็นรูปกรวย

Leptoxyphium

จัดเป็นกลุ่ม sooty mold เป็น saprophyte มีลักษณะเป็นผงสีดำ เส้นใยแตกแขนงไม่สม่ำเสมอมีสีน้ำตาลเทาถึงน้ำตาล มีผนังกั้น ขึ้นปกคลุมใบพืช ผลไม้และในสิ่งแวดล้อม เป็นราที่รู้จักค่อนข้างน้อย มักสร้างสารเหนียวออกมาปกคลุมพื้นผิวที่อาศัย (Hui, et.al, n.d.) ดังภาพที่ 24



ภาพที่ 24 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Leptoxyphium* spp.

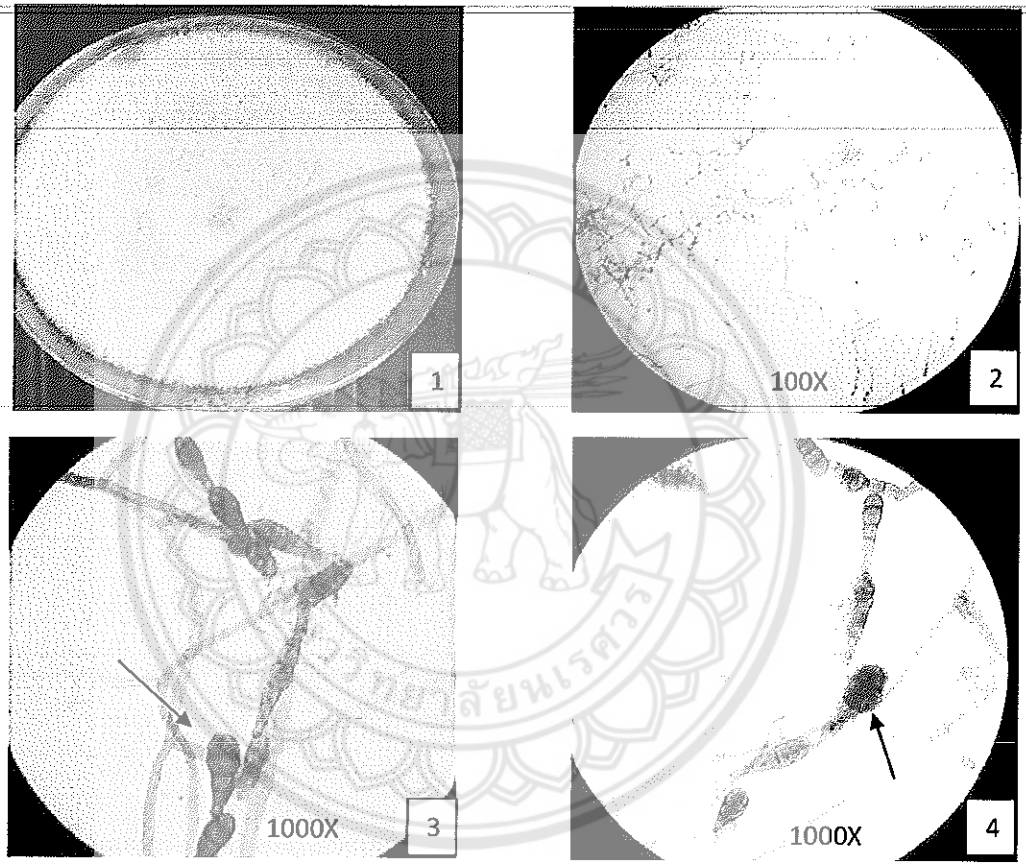
1. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA

2,3. ลักษณะเส้นใย

4. ลักษณะสปอร์

Alternaria

เชื้อราสกุล *Alternaria* เจริญได้เร็ว ปรากฏโคโลนีชัดเจนภายในหนึ่งสัปดาห์ โคโลนีฟู สีเทา ดำ สายรามีผนังกั้นสีดำ ก้านชูโคนิเดียดำ ก้านชูโคนิเดียอาจมีการแตกแขนง โคนิเดียอาจต่อกันเป็นสาย โคนิเดียอ่อนอยู่ปลาย โคนิเดียมีสีดำ มีผนังกั้นตามขวางและตามยาว เกิดเป็นหลายเซลล์ คล้ายลูกระเบิด ผิวโคนิเดียเรียบหรือขรุขระ ปลายโคนิเดียจะแหลมกว่าส่วนโคน สายพันธุ์ที่พบบ่อยและพบทั่วโลกคือ Alternaria alternate ก่อโรคได้กว้างขวาง เช่น ก่อโรคที่กระจกตา เล็บ ผิวหนัง และอวัยวะภายใน (พรรณกร, 2535) ดังภาพที่ 25



ภาพที่ 25 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Alternaria alternate*

1. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA

2. ลักษณะเส้นใย

3,4. โคนิเดียมีผนังกั้นตามขวางและตามยาว

บทที่ 7

สรุปผลการศึกษาวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยถึงโครงสร้างสังคมของนกกับความเป็นเมืองในมหาวิทยาลัยนเรศวร ทำให้พบว่า นกในป่าประมาณ 50% นั้นมีจำนวนน้อยลงไปเรื่อยๆ สัดส่วนของนกป่าและนกเมืองเปลี่ยนไป นกเมืองมีประชากรเพิ่มขึ้น โดยพบว่านกที่ชุกชุมสูงสุดคือนกเขาไฟ ซึ่งอาศัยตลอดปีในมหาวิทยาลัย และกลุ่มนกเอี้ยง (Mynas) โดยเฉพาะนกเอี้ยงหงอน นกเอี้ยงสาลิกา เป็นกลุ่มที่สร้างความเดือดร้อนมากที่สุด เนื่องจากนกพวกนี้จะรวมฝูงกันเกาะนอนในพุ่มไม้และสายไฟในเวลากลางคืน ในบริเวณชุมชนทั้งในเมืองและชานเมือง ทำให้ได้รับผลกระทบอย่างมากจากการถ่ายมูลและกลิ่นของมูล ฝุ่นไร และปรสิตที่มีอยู่ในมูลและตัวของนก มูลนกที่ขับถ่ายออกมาจำนวนมากและสะสมในพื้นที่ มักส่งกลิ่นเหม็น สร้างความสกปรกและอาจมีเชื้อโรคปะปนด้วย ทำให้พื้นที่ที่นกเกาะนอนเป็นประจำสร้างปัญหาด้านสุขภาวะและสุขภาพให้กับคนในสังคมเมืองได้ เราจึงเรียกนกกลุ่มที่สร้างความเดือร้อนว่า **นกบุกรุก** (invasive birds) มูลนกเป็นปัญหาทั้งทางด้านความสะอาดของอาคารและสถานที่ รวมไปถึงด้านสุขภาพอนามัย มูลนกมักมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อยู่ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถก่อให้เกิดโรคจึงเป็นปัญหาทางด้านสุขภาพที่สำคัญ เนื่องจากมูลนกที่พบภายในมหาวิทยาลัยนเรศวรมักจะพบในบริเวณที่มีประชาชนพลุกพล่าน จึงเป็นปัจจัยเสี่ยงที่อาจทำให้เกิดการติดเชื้อได้ จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในมูลนกได้แก่ *Escherichai coli*, *Salmonella*, *Llisteria*, *Campylobacter*, *Cryptococcus* และ *Candida* (OSH, 2012) นอกจากนี้อธิบดีกรมอนามัย (พรเทพ, 2557) กล่าวว่า ภายในมูลนกหลายชนิดเป็นแหล่งเพาะเชื้อรา โดยเฉพาะเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ซึ่งพบมากในมูลนกตระกูลนกพิราบ และนกอื่นๆ ประชาชนสามารถรับเชื้อนี้ได้ด้วยการหายใจเอาสปอร์ หรือตัวเชื้อราเข้าไปในปอด โดยทั่วไปเชื้อราและสปอร์จะมีน้ำหนักเบา และถูกพัดพาให้กระจายไปในอากาศได้ง่าย เนื่องจากบริเวณภายในมหาวิทยาลัยนเรศวรมีนกบุกรุกอาศัยอยู่จำนวนมาก ซึ่งนอกจากจะสร้างความรำคาญแล้วยังอาจก่อให้เกิดโรคได้ถ้าได้รับเชื้อจุลินททรีย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม จากการเก็บตัวอย่างมูลนกบุกรุกที่พบในมหาวิทยาลัยนเรศวรตามฤดูกาลต่างๆทั้งในฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นแก่บุคคลที่อาจเกี่ยวข้องหรือสัมผัสมูลนกทั้งโดยทางตรงและทางอ้อมในการป้องกันและการดูแลสุขภาพอนามัยจากการติดเชื้อฉวยโอกาสที่อาจพบได้ในมูลนก

จากการศึกษาจุลินทรีย์ในมูลกนกบุกรุกที่พบในมหาวิทยาลัยนเรศวร 4 ชนิด ได้แก่ นกพิราบป่า นกเขาไฟ นกกระจอกบ้าน และนกเอี้ยงหงอน โดยทำการสำรวจแหล่งที่อยู่อาศัย และแหล่งที่พบมูลนกสะสม จากนั้นทำการเลือกสถานที่เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างมูลนก โดยเลือกสถานที่ 5 แห่ง ต่อนก 1 ชนิด รวม 20 ตัวอย่าง ในแต่ละฤดูกาล พร้อมศึกษาลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และค่าความเป็นกรดด่าง จากบริเวณสถานที่เลือกเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างมูลนก 3 ฤดูคือ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเช้า ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง คือ 6.00-11.00 น. เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่นกเกาะนอนกลางคืนและมีการถ่ายมูลทิ้งไว้ ซึ่งจะทำให้ได้มูลนกที่ใหม่ เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาจุลินทรีย์ในมูลนก เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน พบว่า อุณหภูมิในฤดูฝน และฤดูร้อน อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน คือ 27-34 องศาเซลเซียส และ 29-34 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนฤดูหนาวมีอุณหภูมิต่ำที่สุด คือ 24-27 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามอุณภูมิทั้ง 3 ฤดู จัดว่าเป็นอุณหภูมิที่อยู่ในระดับปานกลางไม่สูงมาก เหมาะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่ม mesophiles ที่สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส

สำหรับความชื้นสัมพัทธ์ของทั้ง 3 ฤดู พบว่า ฤดูฝน และฤดูหนาว มีความชื้นสัมพัทธ์ที่ใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วงร้อยละ 62-85 และ 61-83 ตามลำดับ ส่วนฤดูร้อนมีค่าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุด คือ อยู่ในช่วงร้อยละ 56-74 ซึ่งความชื้นที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้อยู่ในช่วงร้อยละ 60-80 (ภัทรชัย,2551) และความชื้นสัมพัทธ์ของทั้ง 3 ฤดู พบว่าอยู่ในช่วงที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้

ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมูลนกของทั้ง 3 ฤดู พบว่า อยู่ในช่วงที่เป็นกรดอ่อนถึงกลาง คืออยู่ในช่วง 4-7 ซึ่งแบคทีเรียจะสามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.50-7.0 ส่วนยีสต์และเชื้อราสามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย คือ อยู่ในช่วงที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0-6.0

เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด พบว่า จำนวนของเชื้อแบคทีเรียในฤดูหนาว และฤดูร้อน มีจำนวนใกล้เคียงกัน โดยจำนวนแบคทีเรียในมูลนกกระจอกมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในมูลนกอีก 3 ชนิด คือ นกพิราบ นกเขาไฟ และ นกเอี้ยง นั้นมีจำนวนที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากลักษณะทางกายภาพของบริเวณที่เก็บตัวอย่างมูลนกทั้ง 2 ฤดูกาลนั้นมีความใกล้เคียงกัน จึงส่งผลให้จำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกไม่แตกต่างกันมากนัก สำหรับฤดูฝนจะมีจำนวนเชื้อ

แบคทีเรียมากที่สุด โดยในมูลนกเอี้ยงมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างมูลนกอีก 3 ชนิด ได้แก่ นกพิราบ นกเขาไฟ และนกกระจอก มีจำนวนใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสถานที่ที่เลือกเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างมูลนกเอี้ยงนั้นเป็นบริเวณโล่งแจ้ง จึงทำให้มูลนกสัมผัสกับน้ำฝนได้โดยตรง ส่งผลให้ตัวอย่างมีนกเอี้ยงมีความชื้นมากกว่าตัวอย่างมูลนกชนิดอื่นที่เก็บในสถานที่ที่อยู่ในร่มเป็นอาคารทำให้มูลนกอีก 3 ชนิด ไม่ได้สัมผัสกับน้ำฝนโดยตรง จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างมูลนกทั้ง 3 ฤดู ได้แก่ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสกุลได้ 18 สกุล เช่น *Bacillus* spp., *Corynebacterium.*, *Streptococcus* spp. , *Enterococcus* spp. , *Aeromonas* spp. , *Pseudomonas* spp. และ*Enterobacter* spp **โดยเชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุดและสามารถพบได้ทั้ง 3 ฤดู คือ *Corynebacterium xerosis* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้บริเวณผิวหนัง โพรงจมูก และเยื่อบุต่างๆ ภายในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อบริเวณผิวหนัง และก่อให้เกิดโรคติดเชื้อร่วมกันระหว่างคนกับสัตว์เลี้ยงหรือสัตว์ป่า** (Zoonotic microorganisms) (Fernando,et al,2016) รองลงมาคือ *Serratia liquefaciens* และ *Escherichia coli* ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในลำไส้ของคน และสัตว์ โดย *Escherichia coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นภายในลำไส้ใหญ่ ปกติจะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะทำให้กิดโรคได้ถ้าอยู่นอกลำไส้ใหญ่ เช่น ท่อปัสสาวะอักเสบ และบางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในคนและสัตว์ สำหรับเชื้อ *Serratia liquefaciens* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ในธรรมชาติโดยเชื้อจะแพร่กระจายอยู่ในดิน น้ำ พืช และสัตว์ นอกจากนี้ยังพบ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้บริเวณผิวหนังของคนและสัตว์ (นงลักษณ์, 2551)

ทำการศึกษายีสต์ในมูลนก โดยเน้นการตรวจหายีสต์ *C. neoformans* เนื่องจากเป็นยีสต์ที่มีการปนเปื้อนอยู่ในมูลสัตว์ปีกต่างๆ ได้แก่ มูลนกพิราบ มูลนกเขา มูลนกหงห์หยก และมูลไก่ เป็นต้น และจะพบมากในตระกูลนกพิราบ ก่อให้เกิดโรคที่สมองและปอดในผู้ป่วยโรคเอดส์ หรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันของร่างกายอ่อนแอ (พิไลพันธ์, 2541 ; กรมควบคุมโรค, 2012) เชื้อมีความทนทานและมีชีวิตอยู่ในมูลนกได้นานเป็นปี เนื่องจากเชื้อสามารถสร้าง capsule ห่อหุ้ม โดย capsule ที่สร้างขึ้นมานี้ จะส่งผลให้เชื้อสามารถมีชีวิตรอดอยู่ในหลอดอาหารและลำไส้ของนก โดยไม่ทำให้เกิดโรคกับนก แต่ก่อโรคในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด

จากการแยกเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะสงสัยว่าเป็นยีสต์ *C. neoformans* ในแต่ละฤดูกาล โดยดูจากความสามารถในการสร้าง capsule ความสามารถในการเจริญและเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางเคมีบนจานอาหาร Caffeic acid agar, Urea agar base และการหมักน้ำตาล 6 ชนิดคือ Sucrose, Lactose, Galactose, Raffinose, Glucose และ Maltose และทำการยืนยันชนิดยีสต์ที่สงสัยด้วย

เทคนิคทางอณูชีววิทยา พบว่าจากการศึกษาในครั้งนี้ ตรวจไม่พบยีสต์ที่คาดว่าจะเป็นยีสต์ *C. neoformans* โดยยีสต์ที่ตรวจพบจัดจำแนกได้เป็นยีสต์ *Candida tropicalis, Pichia kudriavzevii, Trichosporon asahii, Tricosporon* spp., *Candida albicans, Candida carpophila* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น ส่วนสาเหตุที่ทำให้ไม่พบเชื้อ *C. neoformans* อาจมีปัจจัยตามธรรมชาติหลายประการที่ช่วยทำลายเชื้อ *C. neoformans* เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis* เชื้อโปรตัวซัว เช่น *Acanthamoeba palestinensis, A.polyphega,* แมลงเล็กๆ เช่น *Metoponorthus pruinosus* (Ruiz A, 1982) อย่างไรก็ตามเชื้อยีสต์ชนิดนี้นอกจากเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสที่ทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ซึ่งพบบ่อยในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือผู้ป่วยโรคเอดส์แล้วนั้น อาจก่อให้เกิดโรคได้ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง โรคเรื้อรังอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อพบได้ในเด็กเล็กและผู้สูงอายุได้ โดยการติดเกิดจากการที่ผู้ป่วยหายใจเอาสปอร์หรือเซลล์แห้งของเชื้อที่มีน้ำหนักเบาและสามารถฟุ้งกระจายในอากาศได้ง่ายจากแหล่งธรรมชาติเข้าไปในปอด (นงนุช, 2542)

ส่วนการศึกษาชนิดของเชื้อราในมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด ใน 3 ฤดูกาล จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยการทำ slide culture จำแนกเชื้อได้ 21 สกุล เช่น *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Curvalaria* spp., *Mucor* spp., *Fusarium* spp., *Paecilomyces* spp. *Trichoderma* sp., *Rhizopus* spp., *Pythium* spp. *Cladosporium* spp., *Acremonium* spp., *Absidia* spp., *Leptoxyphium* spp., *Geotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp. *Phialophora* spp. โดยชนิดเชื้อราที่พบมากที่สุดและพบได้ทั้ง 3 ฤดูกาล ในปริมาณใกล้เคียงกัน คือ *Aspergillus* spp. เนื่องจาก *Aspergillus* จัดเป็นเชื้อราที่สามารถพบได้ในธรรมชาติโดยทั่วไป ทั้งในดิน น้ำ และในเศษใบไม้ที่สะสมทั่วไป เป็นเชื้อราที่ก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ อาจได้รับเชื้อนี้ได้จากการหายใจ รองลงมาคือเชื้อ *Penicillium* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ และอาจเป็นเชื้อราฉวยโอกาสที่ก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเช่นกัน (พรรณิกร, 2542)

จากการศึกษาจุลินทรีย์ในมูลนกบุกรุกภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร สามารถตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจก่อโรคได้หลายชนิด โดยเฉพาะพบมากในมูลนกพิราบและนกกระจอก ที่มาอาศัยทำรังตามอาคารสถานที่ต่างๆภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งเป็นสัญญาณให้ควรมีการเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดโรคจากเชื้อจุลินทรีย์ในมูลนกเหล่านี้ อาจทำได้โดยการติดตั้งตาข่ายตามระเบียงอาคารต่างๆ เพื่อป้องกันไม่ให้นกมาอาศัยทำรังอยู่บริเวณที่มีคนอาศัยอยู่เป็น หรือหมั่นทำความสะอาด

บริเวณที่มีมูลนกสะสม ตามพื้นคอนกรีต ทางเดิน ขอบหน้าต่าง ระเบียง เนื่องจากมูลนกมีสปอร์ และยังมีเซลล์แห้งที่มีน้ำหนักเบาจึงสามารถติดต่อได้โดยการหายใจเข้าไป

ข้อเสนอแนะ

เชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่พบในมูลนกบุกรุกทั้ง 4 ชนิด มีความสำคัญทางการแพทย์ คือเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรคในคนปกติ เป็นเชื้อฉวยโอกาสในคน (Opportunistic pathogen) ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง และก่อโรคในอาหารได้ อีกทั้งยังสามารถติดเชื้อเข้าทางบาดแผล โดยตัวอย่างโรคที่อาจเกิดจากแบคทีเรีย รา และยีสต์ แสดงดังตารางที่ 10, 11 และ 12

ตารางที่10 ชนิดแบคทีเรียที่พบในมูลนกบุกรุก ที่อาจก่อโรคในคน

ชนิดแบคทีเรีย	การก่อโรคในคน
Bacillus spp.	เช่นBacillus cereus แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Foodborne intoxication)
Corynebacterium xerosis	โรคทางผิวหนัง
Staphylococcus aureus	-โรคอาหารเป็นพิษ (Foodborne intoxication), โรคท้องเสียในเดินทาง (Travelers' diarrhea), โรค Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS) และโรค Toxic Shock Syndrome (TSS)
Staphylococcus epidermidis	-โรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ, การติดเชื้อในผู้ป่วยที่ใส่สายสวนปัสสาวะ (foley urine catheters), เยื่อบุหัวใจอักเสบ(Bacterial endocarditis)
Enterococcus spp.	การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ, เยื่อบุหัวใจอักเสบ
Streptococcus spp.	เช่น Streptococcus pyogenes ก่อให้เกิดโรคออักเสบ (pharyngitis), ไข้ดำแดง(scarlet fever) และ ไฟลามทุ่ง(Erysipelas)
Aeromonas spp.	เช่น Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน(Acute diarrhoea) ,โรคNecrotizing fasciitis
Pseudomonas spp.	เช่น Pseudomonas aeruginosa เชื้อฉวยโอกาสในคน (Opportunistic pathogen), โรคปอดบวม
Escherichia coli	EEC group: โรคบิดมีตัว (bacillary dysentery), โรคอาหารเป็นพิษ (Foodborne intoxication)
Enterobacter aerogenes	เชื้อฉวยโอกาสในคน (Opportunistic pathogen)
Enterobacter intermedius	เชื้อฉวยโอกาสในคน (Opportunistic pathogen)

Enterobacter spp.	เชื้อฉวยโอกาสในคน (Opportunistic pathogen)
Klebsiella oxytoca	โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ
Citrobacter diversus	โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ
Providencia stuartii	โรคติดเชื้อทางเดินอาหาร โรคติดเชื้อในระบบหายใจฯลฯ
Morganella morganii	โรคอาหารเป็นพิษจากฮีสตามีน และไทรามีน
Proteus mirabilis	โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ, เชื้อฉวยโอกาสในคน (Opportunistic pathogen)
Serratia liquefaciens	โรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร อุจจาระร่วง
Yersinia pestis	กาฬโรค

ตารางที่ 11 ชนิดเชื้อราที่พบในมูลนกบุกรุกที่อาจจะก่อโรคในคน

เชื้อรา	การก่อโรคในคน
Aspergillus spp.	*Aspergillus niger* ก่อโรคปอดติดเชื้อเรื้อรัง (aspergillosis) *Aspergillus flavus* สร้างสารพิษ อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง และอยู่ในอาหารประเภทถั่ว *Aspergillus fumigatus* ก่อโรคภูมิแพ้ในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง
Penicillium spp.	โรคติดเชื้อราฉวยโอกาส มักจะติดในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันร่างกายต่ำ เช่น ผู้ป่วย HIV มีอาการได้หลายระบบทั่วร่างกาย บริเวณผิวหนังบริเวณต่อมน้ำเหลืองและที่กระดูกและข้อ
Candida spp.	ก่อโรคบริเวณเยื่อบุภายใน (Candidiasis)พบได้บ่อยบริเวณ ลิ้น เพดานปาก ในช่องคลอด และรอบทวารหนัก ก่อโรคผิวหนัง ตามรอยพับของร่างกายที่เป็นที่อับชื้น เช่น รักแร้ ขาหนีบ บริเวณราวนม ซอกทวารหนัก ง่ามมือและง่ามเท้า
Fusarium spp.	โรคเหี่ยว (Fusarium wilt) ในผัก
Absidia spp. *Mucor* spp. *Rhizopus* spp.	ทำให้เกิดโรค Mucormycosis เป็นโรคเชื้อราชนิดลึกที่เกิดขึ้นทั้งในคนและสัตว์ เกิดขึ้นในร่างกายได้ที่อวัยวะหลายระบบ ตั้งแต่มีอาการเล็กน้อยที่ผิวหนังจนถึงเป็นชนิดแพร่กระจายทั่วทั้งตัว เชื้อเข้าไปก่อโรคในร่างกายได้โดยถูกหายใจ หรือกินเข้าไป หรือเข้าไปทางแผลบาดเจ็บที่ผิวหนั/
Curvularia spp.	ก่อโรคในพืชสวนและพืชไร่หลายชนิด เช่น *Curvularia lunata* ก่อให้เกิดโรคใบจุด

ตารางที่ 12 ชนิดยีสต์ที่พบในมูลนกบุกรุกที่อาจก่อโรคในคน

เชื้อรา	การก่อโรคในคน
Candida spp.	ก่อโรคบริเวณเยื่อบุภายใน (Candidiasis)พบได้บ่อยบริเวณ ลิ้น เพดานปาก ในช่องคลอด และรอบทวารหนัก ก่อโรคผิวหนัง ตามรอยพับของร่างกายที่เป็นที่อับชื้น เช่น รักแร้ ขาหนีบ บริเวณราวนม ซอกทวารหนัก ง่ามมือและง่ามเท้า
Cryptococcus neoformans, และ *Candida* spp.	เชื้อฉวยโอกาส (opportunistic fungi) ที่สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติได้ โดยการก่อโรคของเชื้อราในกลุ่มนี้มักจะมีความสัมพันธ์กับ ระบบภูมิคุ้มกันที่ลดน้อยลงจากสาเหตุต่างๆได้แก่ ปลูกถ่ายอวัยวะ รับยากดภูมิคุ้มกัน รับยากลุ่มสเตียรอยด์ชนิดกินเป็นเวลานาน ผู้ป่วยเบาหวาน และผู้ติดเชื้อเอชไอวี

ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันตนเองจากอันตรายที่อาจเกิดจากมูลนก ในสภาที่ร่างกายไม่แข็งแรง หรือมีภูมคุ้มกันบกพร่อง หากสัมผัสกับมูลนกควรล้างมือให้สะอาด และสวมหน้ากากอนามัยเพื่อป้องกันการสูดดมละอองมูลนกหรือสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ร่างกาย และรับประทานอาหารที่ ปรุงสุก และดื่มน้ำสะอาดอย่างสม่ำเสมอ

เอกสารอ้างอิง

จินตนา อาจสันเที๊ยะ. 2549. จุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยาสำหรับพยาบาล. พิมพ์ครั้งที่ 1. ห้างหุ้นส่วนจำกัด บางกอกบล๊อก. กรุงเทพฯ

ดวงพร คันธโชติ. (2537). **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ (ครั้งที่ 1)**.กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮาส์.

ธันยาภาร์ย์ ศรีวรมาศ และ ธารินี ไชยวงศ์. (2554). การตรวจเชื้อรา Cryptococcus Neoformans จากมูลนกภายในมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. **วารสารวิททยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.** 13(4), 14-21.

นันทนา อรุณฤทธิ์. (2537).การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์ = Classification of Aerobic bacteria. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

นุกูล อินทระสังขา. วิทยาเชื้อรา : MYCOLOGY. สงขลา: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ.2553

นงนุช วณิตย์ธนาคม. (2540). **วิทยาเชื้อราการแพทย์.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: พี.บี.ฟอเรน บุ๊คส์ เซ็นเตอร์.

นุรอัยนี และคณะ. (2559).การตรวจหาเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกและไก่ในเขตจังหวัดยะลา.*วารสารวิทยาศาสตร์ คชสาส์น.* 38 (1),48-59.

พรรณกร อิ่มวิทยา. (2535). **เชื้อราก่อโรคในคน.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ:บริษัท สารมวลชน จำกัด.

พิไลพันธ์ พุทธวัฒนะ และคณะ. (2541). **เอชไอวีและจุลชีพฉวยโอกาส.** กรุงเทพฯ: อักษรสมัย.

ภัทรชัย กีรติสิน. (2551). **ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์ :** Textbook of medical bacteriology. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ. และ เกตุจันทร์ จำปาไชยศรี. (2556). **รายงานการวิจัย: โครงสร้างทางสังคมของนกกับความเป็นเมืองในมหาวิทยาลัยนเรศวร.** คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยนเรศวร. 1-33.

Brochier B., Vangeluwe D. and Berg T. (2010). Alien invasive birds. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.** 29 (2), 217-226.

Cristina, E C, Laura. R, Maria C R & Graciela D. (1996). A rapid urease test for presumptive identification of *Cryptococcus Neoformans.* **Mycopathologia.** 136: 21-23.

Dodge, H. J., Ajello, L., & Engelke, O. K. (1965). The association of a bird-roosting site with infection of school children by Histoplasma capsulatum.***American Journal of Public Health and the Nations Health.*** *55*(8), 1203-1211.

Fernando Hernandez.et al.(2016) Identification and molecular characterization of *Corynebacterium xerosis* isolated from a sheep cutaneous abscess: first case report in Mexico. Hernandez-Leon *et al. BMC Res Notes 9:358.*

Ferreira-Paim, K., Andrade-Silva, L., Mora, D. J., Pedrosa, A. L., Rodrigues V. and Silva-Vergara M. L. (2010). Genotyping of Cryptococcus neoformans isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Mycoses 54, 294–300.

Fogarty L.R., Haack S.K., Wolcott M.J., and Whitman R.L. (2003). Abundance and characteristics of the recreational water quality indicator bacteria Escherichia coli and enterococci in gull faeces. **Journal of Applied Microbiology.** 94(1), 865-878.

Hui, Y. et.al. (n.d.). The genus Leptoxyphium (Capnodiaceae) from China. From http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.176.1.17Phytotaxa 176 (1): 174–183 www.mapress.com/phytotaxa/

Foster and Smith. (n.d.). Bird Droppings: The Importance of Daily Observation in Early Identification of Problems. Retrieved December 19th, 2016, from http://www.peteducation.com/ article.cf m?c=15+1829&aid=2973

Gonzalez-Hein, G. et al. (2010). Isolation of *Cvyptococcus neoformans* in Dry Droppings of Captive Birds in Santiago, Chile. **Journal of Avian Medicine and Surgery.** 24(3), 227-236.

Haag- Wackern D. and Moch H. (2004). Health hazards posed by feral pigeons. **Journal of Infection.** 48(1), 307-313.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ninth ed.** Williams and Wilkins,

Baltimore, USA

Hussein Hasan Abulreesh. (2015). First report of environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* and other fungi from pigeon dropping in Makkah,Saudi Arabia and in vitro susceptibility testing. **Asian Pac J Trop Dis.** 5(8),622-62

Kazuhiro EGUCHI and Hitoha E. AMANO (2004). Invasive Birds in Japan. ***Global Environmental Research***: 8(1)/2004: 29-39.

Keerativasee, S. et al. (2008). Isolation of Cryptococcus neoformans from avian Droppings in Chiang Mai from December 2005 to May 2006. **Chiang Mai Medical Journal.** 47(4), 149-54.

Khosravi, A. R. (1997). Isolation of Cryptococcus neoformans from pigeon (Coumba livia) droppings in northern Iran. **Mycopathologia.** 139, 93-95.

Knight, R.L. and Kawashima, J.Y. (1993). Responses of raven and red-tailed hawk populations to linear right-of-ways, **J Wildlife Manage.** 57, 266-271.

Lim H. C., Sodhi, S. N., Brook, Barry W., and Soh, M. C. et al. (2003). Undesirable aliens: Factors determining the distribution of three invasive bird species in Singgapore. **Journal of Tropical Ecology,** 19, 685-695.

Linus C., Maria B., Karin G., Mikael T., Karine L., Jonas W., Eliasson I. Olsen B. and Herrmann B. (2010). A novel Chlamydiaceae-like bacterium found in faecal specimens from sea birds from Bering Sea. **Environmental Microbiology Report.** 2(4), 605-610.

Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., & De Poorter, M. (2000). 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database (p. 12).
Auckland, New Zealand: Invasive Species Specialist Group. Online. Available from: http:www.iosg.org/booklet.pdf.

Maryam S, Mansour B, Seyed J. H, Mohammadali Z and Nader P. (2013). Isolation of *Cryptococcus neoformans* and other opportunistic fungi from pigeon droppings. **J Res Med Sci.** 18(1),56-60

Maysoon S Abbas,Shaimaa N Yassein and Jenan M khalaf.(2017).Isolation and identification of some important mycological isolates from dropping of bird in Baghdad. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. 5(3),671-67

Melles, S., Glenn, S., & Martin, K. (2003). Urban bird diversity and landscape complexity: species-environment associations along a multiscale habitat gradient. *Conservation Ecology*. 7(1), 5.

Moller A. P. (2012). High urban population density of birds reflects their timing of urbanization. **Oecologia,** 170, 867-875.

Noelle T. (2015). **Four Conditions for Bacterial Growth.** Retrieved December 11th, 2016, from http://www.livestrong.com/article/126073-four-conditions-bacterial-growth/

NWEZE.E.I, KECHIA.F.A, DIBUA.U.E, EZE.C.C and ONOJA.U.S.(2015) Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environmental samples collected in Southeastern Nigeria. Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo,57(4),295-298

OSH. (2002). Hazard Alert-Bird Droppings. Retrieved June 26th, 2016, from https://cdn.shopify.com/s/files/1/0311/2753/files/OSH_healthi_014.pdf

Pains-wanderer. (2014). นกป่าสัปดาห์ละตัว: นกพิราบป่า. สืบค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2559. แหล่งที่มา: http://oknation.nationtv.tv/blog/plains-wanderer/2014/07/27/entry-1

Pedroso , R.S., Ferreira, J.C. and Candido, R.C. (2009). The isolation and characterization of virulence factors of Cryptococcus spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. **Microbiological Research.** 164, 221-227.

Rippon, J.W. 1988. Medical mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes 3rd eds. Philadelphia. W.B. Saunder. 582-605. In Khosravi, A.R. 1997. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in Northern Iran. **Mycopathologia**. 139: 93-95

Rosario, I. et al. (2005). Isolation of Cryptococcus species including C. neoformans from cloaca of pigeons. **Journal Compilation,** 48, 421–424.

Soltani, M. et al. (2013). Isolation of *Cryptococcus neoformans* and other

opportunistic fungi from pigeon droppings. **Journal of Research in Medical Sciences**. 56-60.

Suphan, S. Viroj, W. Attakorn, P, Paweena, P, Jamsai, S, Thamaporn, L and Tusrin, M. 2002. Hazard Alert - Bird Droppings. OSH 3910.14 (August No. 14). Retrieved Mrach 18, 2011, from http://www.osh.dol.govt.nz/order/catalogue/pdfs/healthi014.pdf http://www.nokkhao.com/birddrop.htm .

Suphan, S. Viroj, W. Attakorn, P, Paweena, P, Jamsai, S, Thamaporn, L and Tusrin, M. 2006. Research Note "Detection of *Cryptococcus neoformans* in bird excreta. http://www.tm.mahidol.ac.th/ seameo/2006_37_4/23-3697.pdf. 02/03/09. Vol. 37 No. 4 July 2006

Suwannee *et al.*, (2008). Isolation of *Cryptococcus neoformans* from avian dropping in Chiang Mai. **Chiang Mai Medical Journal**. 47(4), 149-154

Tharavichitkul, P. et al. (1973). Occurrence of Cryptococcus neoformans in dove excreta. **Chiang Mai Med Bull**. 12(2), 91-97.

Watanabe, T., (1937). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and key to Species. Tokyo. Japan.

Zarrin, M. et al. (2010). Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings inAhwaz, Iran. **Turk J Med Sci**, 40 (2), 313-316.

http://www.nokkhao. com/birddrop.ht

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการชั่งส่วนประกอบทั้งหมดตามสูตรอาหาร จากนั้นละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนในหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1. Trypticase soy agar (TSA)

Ingredients	Gms / Litre
Pancreatic Digest of Casein	15.0 g
Papaic Digest of Soybean.	5.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	15.0g
Final pH (at 25°C)	7.3±0.2

2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Ingredients	Gms / Litre
Dextrose	40.0 g
Mycological, peptone	10.0 g
Agar	15.0 g
Final pH (at 25°C)	5.6±0.2

3. Nutrient agar (NA)

Ingredients	Gms / Litre
Beef exteact	3.0 g
Peptone	5.0 g
Agar	15.0 g
Final pH (at 25°C)	6.9± 0.2

4. Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC Agar)

Ingredients	Gms / Litre
Peptic digest of animal tissue	5.0 g
Dextrose	10.0 g
Monopotassium phosphate	1.0 g
Magnesium sulphate	0.5 g
Rose Bengal	0.025 g
Chloramphenicol	0.1 g
Dichloran	0.002 g
Agar	15.0 g
Final pH (at 25°C)	5.6±0.2

5. Phenol Red Carbohydrate Broth

Ingredients	Gms / Litre
Trypticase or proteose peptone	10.0 g
Sodium Chloride (NaCl)	5.0 g
Beef extract (optional)	1.0 g
Phenol red	0.018 g
(7.2 ml of 0.25% phenol red solution)	10.0 g
Carbohydrate source	

หมายเหตุ: Carbohydrate source จะเปลี่ยนไปตามวัตถุประสงค์ในการทดสอบการใช้น้ำตาล (Glucose, Lactose, Maltose, Mannitol, Sucrose) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนใน**หม้อนึ่งความดันไอ** (Autoclave) ที่อุณหภูมิ110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 12 **นาที**

6. MR-VP Medium (Glucose Phosphate Broth)

Ingredients	Gms / Litre
Buffered peptone	7.0 g
Dextrose	5.0 g
Dipotassium phosphate	5.0 g
Final pH (at 25°C)	6.9± 0.2

7. Starch agar

Ingredients	Gms / Litre

Beef exteact	3.0g
Peptone	5.0 g
Potato starch	10.0 g
Agar	15.0 g
Final pH (at 25°C)	6.9± 0.2

8. **Manitol salt agar (MSA)**

Ingredients	Gms / Litre
Beef exteact	1.0 g
Protrose Peptone	10.0 g
Sodium Chloride	15.0 g
D-Manitol	10.0 g
Phenol red	0.025 g
Agar	15.0 g

9. Nitrate broth

Ingredients	Gms / Litre
Peptic digest of animal tissue	5.0 g
Beef exteact	3.0 g
Sodium Chloride	15.0 g
Potassium nitrate	1.0 g
Final pH (at 25°C)	7.0± 0.2

10.Bile esculin agar

Ingredients	Gms / Litre
Oxbile(Oxgall	40.0 g
Pancreatic digest of gelatin	5.0 g
Beef exteact	3.0 g
Ferric citrate	0.5 g
Agar	15.0 g

11. **Blood agar**

Ingredients	Gms / Litre
Enzymatic Digaest of Casein	15.0 g
Enzymatic Digaest of animal tissue	4.0 g
Yeast exteact	2.0 g
com starch	1.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	15.0 g
Final pH (at 25°C)	7.0± 0.2

หมายเหตุ:หลังจากที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยให้อาหารเย็นลงเหลือประมาณ 45 องศาเซลเซียส เติมเลือดแกะที่ปราศจากเชื้อ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

12. Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar

Ingredients	Gms / Litre
Proteose peptone	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
Sodium thiosulphate	10.0 g
Sodium citrate	10.0 g
Oxgall	8.0 g
Sucrose	20.0 g
Sodium chloride	10.0 g
Ferric citrate	1.0 g
Bromo thymol blue	0.04 g
Thymol blue	0.04 g
Agar	15.0 g
Final pH (at 25°C)	8.6±0.2

13. MacConkey agar

Ingredients	Gms / Litre
Peptones (meat and casein)	3.0 g
Pancreatic digest of gelatin	17.0 g
Lactose monohydrate	10.0 g
Bile salts	1.5 g

Sodium chloride	5.0 g
Crystal violet	0.001 g
Neutral red	0.03 g
Agar	15.0 g
pH after sterilization (at 25°C)	7.1±0.2

14. Simmons Citrate Agar

Ingredients	Gms / Litre
Magnesium sulphate	0.2 g
Ammonium dihydrogen phosphate	1.0 g
Dipotassium phosphate	1.0 g
Sodium citrate	2.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Bromothymol blue	0.08 g
Agar	15.0 g
Final pH (at 25°C)	6.8±0.2

15. Urea Agar Base

Ingredients	Gms / Litre
Peptic digest of animal tissue	1.0 g
Dextrose	1.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Disodium phosphate	1.2 g
Monopotassium phosphate	0.8 g
Phenol red	0.012 g
Agar	15.0 g
Final pH (at 25°C)	6.8±0.2

หมายเหตุ: ชั่งอาหารมาตามสูตรมา 29 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการกรอง ผสมลงในวุ้นอาหาร 900 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

16. Decarboxylase broth

Ingredients	Gms / Litre
Peptic digest of animal tissue	5.0 g

Dextrose	0.5 g
Beef extract	5.0 g
Bromocresol purple	0.01 g
Cresol red	0.005 g
Pyridoxal	0.005 g

หมายเหตุ: ในการทดสอบ OD ให้ชั่งสาร L-Ornithine mono hydrochloride มา 5.0 g ผสมกับอาหารตามสูตร และ ในการทดสอบ LD ให้ชั่งสาร L-Lysine hydrochloride มา 5.0 g ผสมกับอาหารตามสูตร

---

17. Potato Dextrose Agar

Ingredients	Gms / Litre
Potatoes	200.0 g
Dextrose	20.0 g
Agar	15.0 g
Final pH (at 25°C)	5.6±0.2

18. Caffeic acid agar

Ingredients	Gms / Litre
Ammonium Sulfate	5.0 g
Glucose	5.0 g
Yeast extract	2.0 g
Dipotassium Phosphate	0.3 g
Magnisium sulfate	0.7 g
Caffeic acid	0.18 g
Chloramphenical	0.05 g
Ferric Citrase	0.05 g
agar	20 g

19. 2% Sugar fermentation สำหรับทดสอบการหมักน้ำตาลของยีสต์

Ingredients	Gms / Litre
Yeast extract	4.5
peptone	7.5

ต้มให้ละลาย เติม Bromthymol blue 4 มิลลิตร ต่อ 100 มิลลิตร จากนั้นเตรียมน้ำตาลที่จะนำมาทดสอบให้มีความเข้มข้น 2 % W/V นำทั้งสองส่วนมาผสมกันในอัตรส่วน 2:1 (น้ำตาลที่จะใช้ทดสอบ : fermentation medium) ดูดใส่หลอดทดลองที่มีหลอกดักแก๊ซ หลอดละ 7 มิลลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ภาคผนวก ข

1. การเผยแพร่ผลงานแบบ Proceeding 2 ครั้ง คือ
   1.1 อนุสรา พวงศรี, ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ และวาสนา ฉัตรดำรง. (2560). การศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่พบในมูลนกบุกรุกในมหาวิทยาลัยนเรศวร. ใน งานประชุมวิชาการ นเรศวรวิจัยครั้งที่ 13. (น 565-570). ได้รางวัล Poster presentation ดีเด่น
   1.2 ฐิติพร อินทร์ต๊ะกอง, อนุสรา พวงศรี, ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ, อัญชลี ฐานวิสัย และวาสนา ฉัตรดำรง. (2561) การศึกษาชนิดราและยีสต์ในมูลนกบุกรุกในมหาวิทยาลัยนเรศวร. ใน งานประชุมวิชาการ พะเยาวิจัย ครั้งที่ 7. (น 41-49).
2. บูรณาการผลการศึกษาวิจัยกับงานบริการวิชาการในงานสัปดาห์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ ปี 2560 ณ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ม. นเรศวร
3.

	ผลที่ได้
เพื่อตรวจสอบชนิดจุลินทรีย์ก่อโรคหรือไม่ก่อโรคที่อาจพบในมูลนกบุกรุกกลุ่มนกเอี้ยง นกกระจอก นกเขาและนกพิราบ ในมหาวิทยาลัยนเรศวรสำหรับเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวัง อันตรายที่อาจเกิดจากจุลินทรีย์ในมูลนก	ทราบถึงชนิดจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ในมูลนกบุกรุกที่พบสะสมตามอาคาร สถานที่ต่างๆในมหาวิทยาลัยนเรศวร ในฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน ในช่วงปี 2559-2560 โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่สามารถพบได้ตามธรรมชาติ แต่หลายชนิดอาจเป็นเชื้อฉวยโอกาส สามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งจากการสัมผัสโดยตรงและทางอ้อม โดยเฉพาะคนที่มีร่างกายอ่อนแอ