แบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคที่ปะปนในมูลค้างคาวอาศัยในถ้ำ จังหวัดกาญจนบุรี

วัชรมาศ ม่วงแก้ว[1] ฐิตารีย์ ดวงดัน[2] จันทิมา เอี่ยมพรชัย[2] รัตน์ติภรณ์ ทิพประเสริฐ[2] ริศา เคนพันธ์[2] มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร[2] สุภัทร ประสพศิลป์[3] ยุทธนา สามัง[4] ปัญญวัฒน์ บุญถนอม[5] ณัฐภาณินี ถนอมศรีเดชชัย[2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

[2]สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[3]งานปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เพื่อการศึกษา มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี

[4]ภาควิชากีฏวิทยาการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

[5]งานเทคโนโลยีและศิลปกรรม สำนักงานคณบดี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

Received: February 10, 2024
Revised: April 7, 2024
Accepted: April 11, 2024

บทคัดย่อ

ค้างคาวเป็นพาหะของเชื้อจุลชีพหลายชนิด โดยมีมูลค้างคาวเป็นแหล่งสะสมของเชื้อชนิดต่างๆ ที่สามารถแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมและนำไปสู่การก่อโรคติดเชื้อโรคในมนุษย์ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาแบคทีเรียและเชื้อราที่ปะปนในมูลค้างคาว ซึ่งตัวอย่างมูลค้างคาวนั้นทำการเก็บจากพื้นที่ถ้ำที่มีการจำกัดการเข้าถึง จากนั้นทำการเจือจางด้วยวิธีเจือจางตัวอย่างลงครั้งละ 10 เท่า (10-fold dilutions) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในเบื้องต้นผู้วิจัยมุ่งเน้นศึกษาเชื้อราที่พบในมูลค้างคาวจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar ที่ใส่ยาคลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีและเพาะเลี้ยงเชื้อให้ได้โคโลนีบริสุทธิ์ นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จากการศึกษาไม่พบการเจริญของเชื้อในค่าการเจือจางที่ 10^{-4} ถึง 10^{-7} แต่พบการเจริญของเชื้อในค่าการเจือจางที่ 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} เท่า นอกจากนี้ ได้ทำการเพิ่มความหลากหลายของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Sabouraud Dextrose Agar, Potato dextrose agar และ Malt extract agar ซึ่งผสมยาคลอแรมเฟนิคอล และเพิ่มสภาวะการบ่มที่ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่าจากโคโลนีที่ทำการคัดเลือกหลังการเพาะเลี้ยง มีทั้งหมด 28 ไอโซเลท แบ่งได้เป็นเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ระบุเชื้อได้เพียง 9 ไอโซเลท กลุ่มแบคทีเรีย 8 เชื้อ ได้แก่ *Providencia stuartii, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Alcaligenes faecalis, Proteus mirabilis, Ochrobactrum intermedium, Achromobacter xylosoxidans* และ *Stenotrophomonas maltophilia* และกลุ่มราพบ 1 เชื้อ คือ *Aspergillus versicolor* ส่วนโคโลนีที่ไม่สามารถระบุชนิดได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ได้คัดเลือกไปทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNA sequencing และได้ผลเพิ่มเติมเป็นเชื้อ *Cladosporium perangustum* ซึ่งเป็นเชื้อราสาย จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อจุลชีพส่วนใหญ่ที่พบเป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบในธรรมชาติ และบางเชื้อพบมีรายงานก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในมนุษย์ ผลจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปต่อยอด และนำข้อมูลที่ได้ไปสู่การเฝ้าระวังหรือใช้เตือนภัยสำหรับผู้ที่มีความเสี่ยงในการสัมผัสมูลค้างคาวได้

คำสำคัญ: มูลค้างคาว; มัลดิทอฟแมสสเปคโตรเมทรี; แบคทีเรีย; เชื้อรา; ถ้ำ; จังหวัดกาญจนบุรี

ผู้นิพนธ์ประสานงาน:
ณัฐภาณินี ถนอมศรีเดชชัย
สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
169 ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131
อีเมล: natthapaninee@go.buu.ac.th

Pathogenic bacteria and fungi from bat guano in restricted access caves, Kanchanaburi Province

Watcharamat Muangkaew[1], Thitaree Doungdun[2], Juntima Iampornchai[2], Rattiporn Tipprasert[2], Risa Kenpun[2], Marut Tangwattanachuleeporn[2], Suphat Prasopsin[3], Yudthana Samung[4], Panyawat Boontanom[5], Natthapaninee Thanomsridetchai[2]

[1]Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University
[2]Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University
[3]Research Academic Supports Division, Mahidol University, Kanchanaburi Campus
[4]Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University
[5]Educational Technology and Art Unit, Dean Office, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

Abstract

Bats serve as carriers for various pathogens, with bat guano acting as a reservoir for microorganisms that can spread to the environment and cause infectious diseases in humans. This study aims to investigate the bacteria and fungi present in bat guano. Samples of bat guano were collected from restricted access cave areas and diluted using 10-fold dilutions into culture media. Initially, the researchers focused on studying fungi in bat guano, using Sabouraud Dextrose Agar supplemented with Chloramphenicol, and incubating at 37°C for 48-72 hours. Colonies were isolated, and pure cultures were obtained for analysis using MALDI-TOF MS. No fungal growth was observed at dilutions of 10^{-4} to 10^{-7}, but growth occurred at dilutions of 10^{-1}, 10^{-2}, and 10^{-3}. Additionally, the variety of culture media was expanded to include Sabouraud Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, and Malt Extract Agar, supplemented with Chloramphenicol, and incubated at 25 and 37°C. Analysis revealed 28 isolates after selective culturing, comprising both bacteria and fungi. MALDI-TOF MS identified 9 bacterial isolates, including *Providencia stuartii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Alcaligenes faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Ochrobactrum intermedium*, *Achromobacter xylosoxidans*, and *Stenotrophomonas maltophilia*. One fungal isolate was identified as *Aspergillus versicolor*. Unidentified isolates underwent DNA sequencing, revealing *Cladosporium perangustum*. This study highlights that the majority of microorganisms present in bat guano are naturally occurring bacteria, some of which are known to cause infectious diseases in humans. These findings contribute to further research and can be used to warn individuals at risk of bat guano exposure.

Keywords: bat guano; MALDI-TOF MS; bacteria; fungi; cave; Kanchanaburi province

Corresponding Author:
Natthapaninee Thanomsridetchai
Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University
169 Long Hard Bangsaen Road, Sansuk Sub-district, Muang District, Chonburi 20131, Thailand
E-mail: natthapaninee@go.buu.ac.th

บทนำ

ค้างคาว (Order: Chiroptera) เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายสูงเป็นกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีมากกว่า 1,400 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน โดยคิดเป็นร้อยละ 25 ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งหมด มีความสามารถในการอาศัยอยู่ในโพรงนิเวศและสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย[1,2] ค้างคาวใช้เวลาทั้งหมดประมาณครึ่งหนึ่งของชีวิตอยู่ในถ้ำ ทำให้ที่อยู่อาศัยนี้มีผลต่อชีววิทยาและระบบนิเวศของค้างคาวเป็นอย่างมาก ค้างคาวที่อาศัยอยู่ในถ้ำจะนำทรัพยากรอินทรีย์มาสู่สิ่งแวดล้อมผ่านมูลค้างคาวหรือจากซากของตัวค้างคาวเอง ในถ้ำหนึ่งแห่งอาจพบค้างคาวได้หลายชนิด ตั้งแต่ค้างคาวที่กินน้ำหวานไปจนถึงค้างคาวกินผลไม้ กินแมลง และค้างคาวกินเลือด ดังนั้น มูลค้างคาวที่พบในถ้ำจึงมีลักษณะทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างกันจึงตอกย้ำความสำคัญทางนิเวศวิทยาของค้างคาวในถ้ำ[3] แม้ว่าค้างคาวจะมีการแพร่หลายทางภูมิศาสตร์ แต่ในทางนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์และบทบาทที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพและพฤติกรรมของค้างคาวนั้นยังมีการศึกษาไม่มากนัก โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในมูลค้างคาว ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการแพร่เชื้อโรคสู่มนุษย์[4]

เป็นที่ทราบกันว่าค้างคาวเป็นแหล่งสะสมของเชื้อจุลชีพต่างๆ ทั้ง แบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรามากมาย เชื้อไวรัสที่มีค้างคาวเป็นพาหะ เช่น SARS-CoV, ไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า (Rabies virus), ไวรัสอีโบลา (Ebola virus) และไวรัสนิปาห์ (Nipah virus) เป็นต้น[5] ซึ่งเชื้อไวรัสเหล่านี้บางชนิดถูกจัดอยู่ในโรคติดต่อที่ต้องเฝ้าระวัง และโรคติดต่ออันตราย เนื่องจากเชื้อก่อให้เกิดโรคที่มีความรุนแรงและบางชนิดสามารถแพร่กระจายได้ง่าย อีกทั้งเชื้อไวรัสบางชนิดยังไม่มียารักษาหรือวัคซีนป้องกัน ทำให้เมื่อเกิดการติดเชื้อและเกิดการแพร่ระบาดก็จะทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงที่ยากต่อการควบคุมและอาจส่งผลให้เกิดความเสียหายในระยะยาวซึ่งยากต่อการฟื้นฟูได้ จากการศึกษาอื่นๆ ยังแสดงให้เห็นว่าในมูลค้างคาวอาจมีแบคทีเรียก่อโรคได้ เช่น *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Francisella*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Campylobacter* และ *Rickettsia*[6,8,11-14]

นอกจากเชื้อไวรัสและเชื้อแบคทีเรีย ในมูลค้างคาวยังสามารถพบเชื้อราได้ โดยเชื้อราที่พบก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Histoplasma capsulatum* ซึ่งเป็นเชื้อราชนิดไดมอร์ฟิค ทำให้เกิดโรค Histoplasmosis โดยเกิดจากการสูดหายใจนำเอาสปอร์ของเชื้อเข้าไปในระบบทางเดินหายใจ ทำให้เกิดการติดเชื้อที่บริเวณปอดและอาจแพร่กระจายสู่อวัยวะอื่นได้ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง[7] เชื้อชนิดนี้พบได้ในดินที่มีการปนเปื้อนของมูลค้างคาว เนื่องจากดินที่มีส่วนผสมของมูลค้างคาวจะมีไนโตรเจนสูง ซึ่งเหมาะกับการเจริญของเชื้อ อีกทั้งยังมีการรายงานการพบเชื้อราอื่นๆ ในมูลค้างคาวได้ เช่น *Coccidioides, Blastomyces dermatitidis, Cryptococcus neoformans* และพบเชื้อราก่อโรคฉวยโอกาสจากจำพวก *Candida, Meyerozima, Trichophyton, Trichosporon, Microsporum, Sporotrix, Chrysosporium, Geomyces, Aspergillus, Penicillium* และ *Fusarium*[8–11]

แสดงให้เห็นว่ามูลค้างคาวอาจเป็นแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ก่อโรคที่อาจเป็นอันตรายสำหรับมนุษย์และสัตว์ ค้างคาวหลายชนิดมักมีการอพยพย้ายถิ่นเพื่อหาแหล่งอาหารตามฤดูกาล ซึ่งการอพยพของค้างคาวในระยะทางไกลอาจส่งผลทำให้เพิ่มโอกาสในการแพร่กระจายเชื้อไปยังพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันและเพิ่มโอกาสในการติดเชื้อหรือการแพร่ระบาดของโรคต่างถิ่น

ในหลายภูมิภาคของโลก มูลค้างคาวโดยเฉพาะอย่างยิ่งมูลค้างคาวสดถูกนำมาใช้ในการเกษตร ในฐานะปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพเพื่อปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดินที่ใช้ในการปลูกพืช ทำให้ได้พืชผลทางการเกษตรที่มีปริมาณและคุณภาพที่มากขึ้น[9] อย่างไรก็ตาม ในพื้นที่ที่มีการใช้มูลค้างคาวเป็นปุ๋ยอินทรีย์ในปริมาณมาก

คนงานภาคเกษตรอาจมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นจากการสัมผัสกับเชื้อโรคที่อยู่ในผลผลิตที่มีมูลค้างคาวปะปน ซึ่งอาจทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้มีการปนเปื้อนหรืออาจส่งผลให้มีการติดเชื้อในปศุสัตว์ได้ เนื่องจากเชื้อสามารถแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมได้ผ่านการมีปฏิสัมพันธ์กับสัตว์ การทานอาหารดิบ การปนเปื้อนในน้ำ และจากการติดเชื้อในมนุษย์[10]

มูลค้างคาว (Bat guano) จัดเป็นหนึ่งในแหล่งกักเก็บหรือพาหะของจุลชีพหลากหลายชนิดที่ส่งผลกระทบและก่อโรคในคนได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม สำหรับประเทศไทยยังมีการศึกษาจุลชีพก่อโรคในคนที่ปะปนมากับมูลค้างคาวไม่มากนัก โดยเฉพาะค้างคาวที่อยู่ในถ้ำระบบปิด ซึ่งจัดเป็นถ้ำที่จำกัดบุคคลเข้าออกอย่างเคร่งครัด การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาจุลชีพที่ปะปนในมูลค้างคาว โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ที่ได้รับอนุญาตให้จัดเก็บจากถ้ำที่ได้รับการควบคุมการเข้าออกถ้ำอย่างเคร่งครัด คือ ถ้ำแดนมหามงคล และถ้ำโปร่งฟ้า ในอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ประเทศไทย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาจุลชีพโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มเชื้อราที่ปะปนในมูลค้างคาว ที่ได้รับอนุญาตให้จัดเก็บจากถ้ำที่ได้รับการควบคุมการเข้าออกถ้ำอย่างเคร่งครัด ได้แก่ ถ้ำแดนมหามงคล และถ้ำโปร่งฟ้า ในอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ประเทศไทย โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS และการหาลำดับเบส

วิธีการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่างมูลค้างคาว

ตัวอย่างมูลค้างคาวถูกเก็บจากถ้ำที่ได้รับการควบคุมการเข้าออกถ้ำอย่างเคร่งครัด ได้แก่ ถ้ำแดนมหามงคล และถ้ำโปร่งฟ้า ในอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ประเทศไทย ในระหว่าง 6-10 ธันวาคม 2565 ทำการเก็บมูลค้างคาวโดยคัดเลือกบริเวณที่มีมูลค้างคาวกองบนพื้นมากที่สุด ทำการวางแท่นเก็บมูลค้างคาวบริเวณรอบจุดที่พบปริมาณมูลมากที่สุด จำนวน 12 จุด โดยด้านบนของแท่นมีฟอยล์เพื่อรองรับมูลของค้างคาวที่ปล่อยออกมาทางด้านบนของถ้ำ รอเวลาและหลังจากนั้นนำมูลที่เก็บได้จากทั้ง 12 จุด มารวมกันบรรจุลงถุงซิปล็อคปราศจากเชื้อ จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพในงานวิจัยตามรหัสการวิจัย IBC 003/2566 และ Documentary Proof of Ethical Clearance by the Faculty of Tropical Medicine - Animal Care and Use Committee รหัสการวิจัย 16-2021E

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างมูลค้างคาวในห้องปฏิบัติการ

ชั่งตัวอย่างจำนวน 5 กรัม ใส่ลงในหลอดเซนติฟิว (Centrifuge Tube) ที่บรรจุสารละลาย NSS 0.85% ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ปั่นให้มูลค้างคาวละลายให้ทั่วหลอด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที เพื่อให้มูลค้างคาวตกตะกอน จากนั้นทำการเจือจางด้วยวิธีเจือจางตัวอย่างลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ค่าการเจือจางที่ 10^{-4} ถึง 10^{-7} ดูดสารละลายของแต่ละค่าการเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA, HImedia, India) ที่เติมยาคลอแรมเฟนิคอล (50 mg/L) pH = 5.6±0.2 จากนั้นทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อ (Spread plate) จนกระทั่งเพลทแห้ง นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันทุกไอโซเลท จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงอีกครั้งบนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar ให้ได้โคโลนีบริสุทธิ์ จากการศึกษาพบว่าค่าการเจือจางที่ 10^{-4} ถึง 10^{-7} ไม่พบการเจริญของเชื้อ จึงเพิ่มค่าการเจือจางให้สูงขึ้นเป็น 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}

นอกจากนี้ได้ทำการเพิ่มความหลากหลายของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Sabouraud Dextrose Agar, Potato dextrose agar และ Malt extract agar ซึ่งผสมยาคลอแรมเฟนิคอลและเพิ่มสภาวะการบ่มที่ 25 และ 37 องศาเซลเซียส[12]

3. การตรวจหาชนิดของจุลชีพด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

การจำแนกเชื้อด้วย MALDI-TOF MS จะใช้วิธีการทดสอบแบบ Extraction method ทำได้โดยเพาะเชื้อบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลท บนอาหาร SDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเชื้อ 1 ไมโครลิตร inoculation loop ใส่ใน HPLC-grade water 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอทานอล 900 ไมโครลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000-15,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วใช้ปิเปตต์แยกส่วน supernatant ออก ทำการปั่นเหวี่ยงและแยกส่วน supernatant ออกซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำมาผึ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที เติม 70% formic acid 25 ไมโครลิตร แล้วใช้ปิเปตต์ผสมสาร จากนั้นเติม 100% Acetonitrile 25 ไมโครลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000-15,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำส่วน supernatant 1 ไมโครลิตร หยดลงบน MALDI target plate ผึ่งที่อุณหภูมิห้องจนแห้งแล้วจึงหยด HCCA matrix solution 1 ไมโครลิตร รอให้สารแห้ง จึงนำไปวิเคราะห์เอกลักษณ์ของเชื้อด้วยเครื่อง MALDI Biotyper® (MBT) software based on MALDI-TOF MS (Bruker, Germany)

4. การตรวจหาชนิดเชื้อราด้วย DNA sequencing

คัดเลือกโคโลนีที่ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS แล้วได้ผลไม่สามารถระบุได้ (Unidentified) มาทำการส่งวิเคราะห์ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS (internal transcribed spacer) ด้วยเทคนิค DNA sequencing ของบริษัท Macrogen ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

ผลการศึกษา

1. ลักษณะตัวอย่างมูลค้างคาวถ้ำ

มูลค้างคาวมีสีน้ำตาลถึงดำ มีลักษณะเป็นผงขนาดเล็ก มีกลิ่นฉุนชื้น จำนวน 1 ถุง ซึ่งเก็บจากตำแหน่งทั่วพื้นที่ของถ้ำจำนวน 50 ตำแหน่ง จากนั้นทำการแบ่งตัวอย่างสำหรับบรรจุในหลอดเซนติฟิวเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

2. ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างมูลค้างคาว

2.1 ผลการแยกเชื้อจากมูลค้างคาว

อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่มีส่วนผสมของยาคลอแรมเฟนิคอลบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ค่าการเจือจางที่ 10^{-4} ถึง 10^{-7} เป็นระยะเวลา 7 วัน ไม่พบการเจริญของเชื้อ จึงได้ทำการทดสอบซ้ำ โดยเปลี่ยนค่าการเจือจางให้สูงขึ้น ซึ่งค่าที่ใช้ทดสอบที่ค่าการเจือจางที่ 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} นอกจากนี้ได้ทำการเพิ่มความหลากหลายของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ SDA, Potato dextrose agar (PDA, HImedia, India) และ Malt extract agar (MEA, HImedia, India) ซึ่งผสมยาคลอแรมเฟนิคอลตลอดจนทำการเพิ่มสภาวะการบ่มให้มีอุณหภูมิแตกต่างกัน อาทิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเริ่มมีโคโลนีปรากฏในวันที่ 7 บนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และไม่พบการเจริญของอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะอื่นๆ จึงทำการบ่มต่อ จากนั้นจึงพบการเจริญของเชื้อ PDA ที่ 25 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 10 วัน สำหรับอาหาร MEA ปรากฏการเจริญของเชื้อเฉพาะที่ค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-1} เมื่อทำการบ่มอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 18 วันจึงมีโคโลนีปรากฏในค่าการเจือจางที่ 10^{-2} และ 10^{-3} ปรากฏโคโลนีเล็กน้อย และไม่พบการเจริญที่ค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-4} ผลการเจริญของเชื้อภายหลังการบ่มเป็นระยะเวลา 19 วัน อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าขณะบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

2.2 ผลการคัดเลือกโคโลนี

ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีความแตกต่างกันเพื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อได้ทั้งหมด 28 ไอโซเลท ซึ่งสามารถระบุลักษณะได้ดังต่อไปนี้ ราสายสีขาว โคโลนีขนาด 1 เซนติเมตร ซึ่งพบมากที่สุด ราสายสีดำ จำนวน 1 โคโลนี ส่วนกลุ่มต่อมาเป็นโคโลนีที่มีลักษณะ กลม นูน สีครีม ขาว ส้มอ่อน เป็นต้น

3. ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

หลังจากการทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการอ่านผลการเจริญพบว่าเชื้อกลุ่มที่เป็นโคโลนีขาว ขุ่น และมีลักษณะมันวาว สามารถเจริญได้ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มที่เป็นราสายใช้ระยะเวลายาวนานถึง 7-14 วัน และมีบางส่วนที่ไม่สามารถเจริญได้ ทำให้จำนวนของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกนั้นลดลง จากนั้นจำแนกชนิดด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ผลพบว่าเชื้อมีเพียง 9 ไอโซเลท โดยจุลชีพที่พบ ได้แก่ ราสาย ได้แก่ *Aspergillus versicolor* ดังตารางที่ 1 (Table 1) พบแบคทีเรีย ได้แก่ *Providencia stuartii, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Alcaligenes faecalis, Proteus mirabilis, Ochrobactrum intermedium, Achromobacter xylosoxidans* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ดังตารางที่ 3 (Table 3)

ในการอ่านผลจากเครื่องแถบสีเขียว หรือมีค่า score value อยู่ในช่วง 2.00-3.00 สามารถแปลผลได้ว่าผลที่ได้มีความเชื่อมั่นสูง แถบสีเหลือง หรือมีค่า score value อยู่ในช่วง 1.70-1.99 สามารถแปลผลได้ว่าผลที่ได้มีความเชื่อมั่นต่ำ และแถบสีแดง หรือมีค่า score value อยู่ในช่วง 0.00-1.69 สามารถแปลผลได้ว่าผลที่ได้ไม่มีความเชื่อมั่นในการวิเคราะห์ โดยในการระบุชนิดของเชื้อจะทำการเลือกเฉพาะเชื้อที่มีแถบสีเขียวและเหลือง หรือมีค่า score value อยู่ในช่วง 2.00-3.00 หรือ 1.70-1.99 ดังตารางที่ 1 (Table 1)

Table 1 Bacteria and fungi identified by MALDI-TOF MS

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
E8 (+)(B)	PDA-2(2)25c iso3 (Standard)	*Bacillus amyloliquefaciens* spp. *plantarum*	1.95	*Bacillus amyloliquefaciens* spp. *plantarum*	1.83
E9 (+)(B)	MEA-2(3)25c iso1 (Standard)	*Stenotrophomonas maltophilia*	1.75	*Stenotrophomonas maltophilia*	1.75
E9 (+)(B)	PDA-1(2)25c iso2 (Standard)	*Stenotrophomonas maltophilia*	1.9	*Stenotrophomonas maltophilia*	1.84
E11 (+++)(A)	PDA-1(1)37c iso1 (Standard)	*Alcaligenes faecalis*	2.08	*Alcaligenes faecalis*	2.07
E12 (+++)(A)	PDA-2(3)25c iso3 (Standard)	*Proteus mirabilis*	2.33	*Proteus mirabilis*	2.24
F1 (+)(B)	SDA-1(3)25c iso7 (Standard)	*Providencia stualtii*	1.73	*NO Organism Identification Possible*	1.65
F3 (+++)(B)	SDA-1(3)25c iso1 (Standard)	*Bacillus amyloliquefaciens*	2.07	*Bacillus amyloliquefaciens* spp. *plantarum*	2.07

Table 1 Continued

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
F4 (+++)(B)	SDA-1(3)25c iso1 (Standard)	*Bacillus amyloliquefaciens* spp. *plantarum*	2.15	*Bacillus amyloliquefaciens*	2.03
F5 (+++)(A)	SDA-1(2)25c iso2 (Standard)	*Ochrobactrum intermedium*	2.48	*Ochrobactrum intermedium*	2.31
F6 (+)(B)	PDA-1(1)25c iso2 (Standard)	*Bacillus subtilis*	1.75	*Bacillus subtilis*	1.74
F8 (+++)(A)	PDA-2(1)25c iso3 (Standard)	*Bacillus subtilis*	2.15	*Bacillus subtilis*	2.07
F9 (+++)(A)	PDA-1(1)25c iso1 (Standard)	*Achromobacter xylosoxidans*	2.14	*Achromobacter xylosoxidans*	2.01
C11 (-)(C)	PDA-1(3)25c iso1 (Standard)	*Aspergillus versicolor*	2.08	*Aspergillus versicolor*	2.01

Table 2 Colonies and fungi stained with Lactophenol Cotton Blue

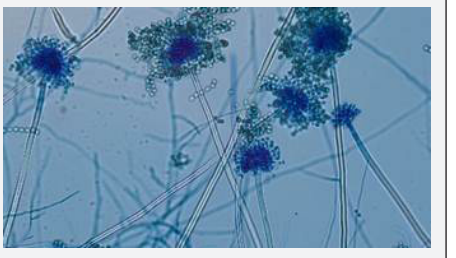
Fungi	Colony on SDA	Microscopic (40x)
Aspergillus versicolor	Colony dense fluffy fiber gray	 Long septate and hyaline hyphae Conidial heads are biseriate and loosely radiate

Table 3 Colony and Gram staining of bacteria

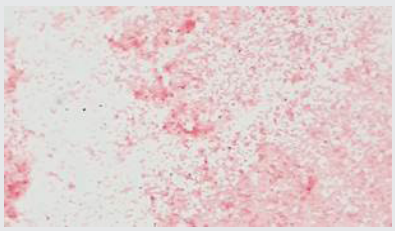
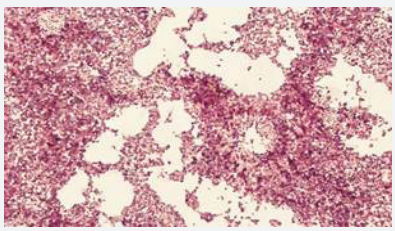
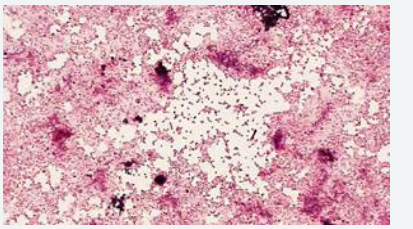
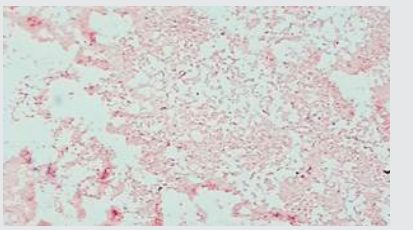
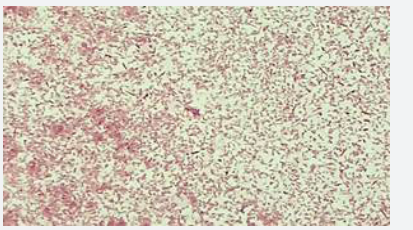
Bacteria	Colony on SDA	Microscopic (100x)
Providencia stuartii	Irregulars undulate dry opaque colony	Gram negative bacilli
Bacillus subtilis	Irregulars undulate dry opaque colony	Gram positive bacilli
Bacillus amyloliquefaciens	Irregulars undulate dry opaque colony	Gram positive bacilli
Alcaligenes faecalis	Irregulars undulate dry opaque colony	 Gram negative bacilli
Proteus mirabilis	Irregulars entire smooth clear colony	 Gram negative bacilli

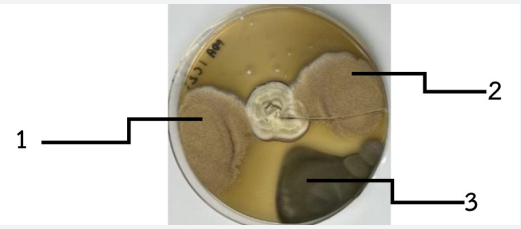
Table 3 Continued

Bacteria	Colony on SDA	Microscopic (100x)
Ochrobactrum intermedium	Circular undulate dry opaque colony	 Gram negative bacilli
Achromobacter xylosoxidans	Circular entire smooth opaque colony	 Gram negative bacilli
Stenotrophomonas maltophilia	Circular entire smooth clear colony	 Gram negative bacilli

4. ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วยวิธี sequencing

จากการตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 28 ไอโซเลท สามารถระบุชนิดและแบ่งออกได้เป็นเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท และเชื้อราสาย 1 ไอโซเลท เนื่องจากวิธีนี้มีฐานข้อมูลที่จำกัดจุลชีพที่เป็นเชื้อราจึงมีความแม่นยำและความสามารถในกาวิเคราะห์ต่ำ ดังนั้น จึงคัดเลือกโคโลนีของเชื้อราสายที่มีลักษณะแตกต่างกันส่งตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DNA sequencing โดยโคโลนีที่คัดเลือกมีลักษณะดังนี้ ตัวอย่างที่ 1 โคโลนีมีลักษณะเส้นใยฟูแน่น สีเทาดำ ตัวอย่างที่ 2 โคโลนีมีลักษณะแผ่ขยายเป็นชั้น สีเหลือง และตัวอย่างที่ 3 โคโลนีมีลักษณะผิวหน้าคล้ายผง สีเบจ บริเวณขอบโคโลนีมีสีขาว จากนั้นนำโคโลนีที่คัดเลือกส่งต่อให้บริษัท Macrogen ทำการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ได้ผลเพิ่มเติมคือ ตัวอย่างที่ 1 ไม่สามารถจำแนกเชื้อได้ โดยจาก Phylogenetic tree พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Onygenaceae sp.* ดังแสดงในรูปภาพที่ 1 (Figure 1) ตัวอย่างที่ 2 ไม่สามารถจำแนกเชื้อได้ โดยจาก Phylogenetic tree พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Onygenaceae sp.* ดังแสดงในรูปภาพที่ 2 (Figure 2) และตัวอย่างที่ 3 จำแนกได้เป็นเชื้อ *Cladosporium perangustum* ซึ่งเป็นราสาย

Table 4 Submission results analyzed by DNA sequencing

Colony	Identified
	1. Unidentified 2. Unidentified 3. *Cladosporium perangustum*

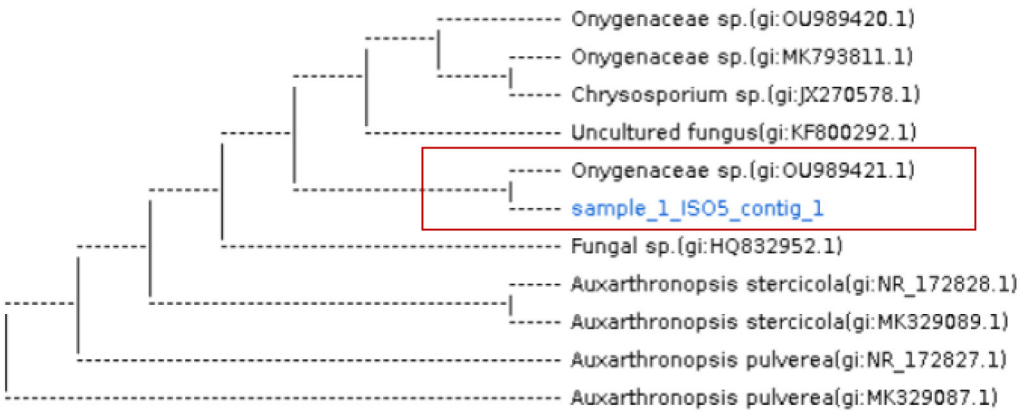


Figure 1 Phylogenetic tree of sample 1

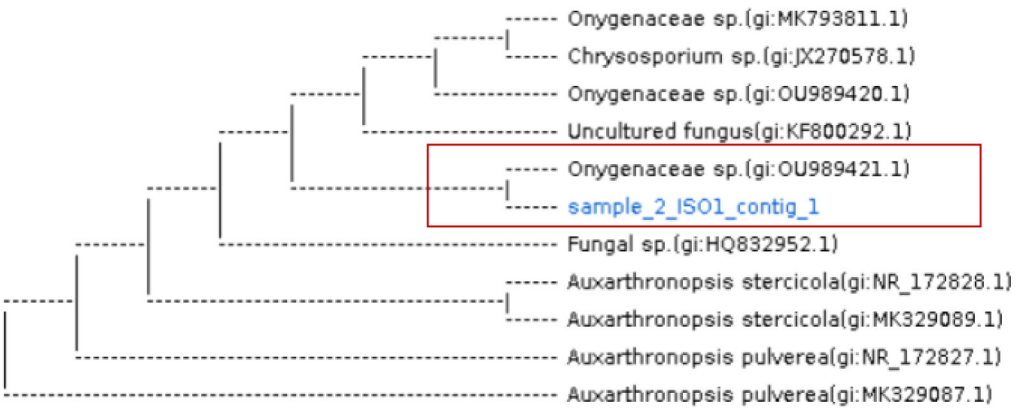


Figure 2 Phylogenetic tree of sample 2

อภิปรายผล

ค้างคาวเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในถ้ำ มูลค้างคาวที่ผลิตได้จัดเป็นหนึ่งในแหล่งกักเก็บหรือพาหะของจุลชีพหลากหลายชนิดทั้งไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อรา[1] มูลค้างคาวถูกนำมาใช้ในการเกษตร ในฐานะปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพเพื่อปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดินที่ใช้ในการปลูกพืช ทำให้ได้พืชผลทางการเกษตรที่มีปริมาณและคุณภาพที่มากขึ้น[9] อย่างไรก็ตาม ในพื้นที่ที่มีการใช้มูลค้างคาวเป็นปุ๋ยอินทรีย์ในปริมาณมาก คนงานภาคเกษตรอาจมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นจากการสัมผัสกับเชื้อโรคที่อยู่ในอาหารซึ่งมีมูลค้างคาว ซึ่งอาจทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารปนเปื้อนหรือเกิดการติดเชื้อในปศุสัตว์ได้ เนื่องจากเชื้อสามารถแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมได้ ผ่านการมีปฏิสัมพันธ์กับสัตว์ การทานอาหารดิบ และจากการติดเชื้อในมนุษย์ ซึ่งในประเทศไทยยังมีการศึกษาจุลชีพก่อโรคในคนที่ปะปนในมูลค้างคาวไม่มากนัก งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาจุลชีพที่ปะปนในมูลค้างคาวในถ้ำปิด โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS และการหาลำดับเบส

จากการทดสอบนำมูลค้างคาวที่เก็บได้จากถ้ำแดนมหามงคล และถ้ำโปร่งฟ้า ซึ่งมีลักษณะเป็นถ้ำระบบปิด เนื่องจากมีการจำกัดการเข้าถึงของบุคคลที่จะเข้าไปในถ้ำ ที่อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ประเทศไทย มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเชื้อและตรวจหาชนิดของเชื้อด้วย MALDI-TOF MS ครั้งนี้จากการคัดโคโลนีเพื่อเลือกมาเพาะเลี้ยงให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ พบโคโลนีสายราสีขาวและดำ รวมทั้งกลุ่มโคโลนีที่มีลักษณะกลม นูน สีครีม ขาว หรือส้มอ่อน คัดเลือกเชื้อมาทั้งหมด 28 ไอโซเลทเพื่อนำมาระบุและจำแนกชนิดด้วยวิธี MALDI-TOF MS ผลการวิเคราะห์พบว่าเชื้อมีเพียง 9 ไอโซเลท โดยจุลชีพที่พบ ได้แก่ ราสาย ได้แก่ *Aspergillus versicolor* พบแบคทีเรีย ได้แก่ *Providencia stuartii, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Alcaligenes faecalis, Proteus mirabilis, Ochrobactrum intermedium, Achromobacter xylosoxidans* และ *Stenotrophomonas maltophilia* เชื้อที่พบนั้นแตกต่างจากถ้ำในประเทศใกล้เคียง เช่น ถ้ำจากประเทศฟิลิปปินส์ที่พบเชื้อในกลุ่ม *Lactococcus, Enterococcus, Enterobacter, Bacillus และ Leuconostoc*[9] เชื้อที่พบมีความแตกต่างกัน อาจเป็นเพราะสภาพภูมิประเทศและชนิดของค้างคาวที่ต่างกัน

เมื่อแบ่งเชื้อที่พบตามกลุ่มระดับความเสี่ยงจุลินทรีย์ต่อมนุษย์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตาม มาตรา 18 พ.ศ. 2560 พบว่าเชื้อที่พบส่วนใหญ่จะมีระดับความเสี่ยงที่กลุ่ม 1 และ 2 โดยแบ่งได้ดังนี้ ระดับความเสี่ยงกลุ่มที่ 1 ได้แก่ *Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Aspergillus versicolor* และ *Cladosporium perangustum* ระดับความเสี่ยงกลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Providencia stuartii, Alcaligenes faecalis, Proteus mirabilis, Ochrobactrum intermedium, Achromobacter xylosoxidans* และ *Stenotrophomonas maltophilia* โดยพบว่าเชื้อที่พบส่วนมากมักพบว่ามีการก่อโรคในพืชและในสัตว์ บางชนิดสามารถก่อโรคได้ในมนุษย์โดยเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส[15] และบางชนิดสามารถติดต่อได้ผ่านทางการแพร่กระจายทางอากาศ[16] การสัมผัสและผ่านทางแผลเปิดได้[17]

เนื่องด้วยจุดประสงค์หลักของการทดลองต้องการศึกษาเชื้อรา จึงใส่ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) เพื่อลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม และ Saprophytic fungi ซึ่งถ้าเชื้อสามารถโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนี้ อาจแสดงให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวเป็นกลุ่มที่ไม่ถูกยับยั้งการเจริญจากยากลุ่มคลอแรมเฟนิคอล เบื้องต้นอาจมีความเป็นไปได้เนื่องจากเชื้อสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีส่วนประกอบของคลอแรมเฟนิคอล แต่ทั้งนี้คงต้องตรวจสอบการตอบสนองต่อยาโดยละเอียดอีกครั้ง อีกทั้งยังเป็นไปได้ว่าการที่ไม่พบการเจริญของเชื้อในค่าการเจือจางที่ 10^{-4} ถึง 10^{-7} แต่พบการเจริญของเชื้อ

ในค่าการเจือจางที่ 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} เท่า อาจเกิดจากการยับยั้งการเจริญของยาปฏิชีวนะที่ใส่ไปทำให้จุลชีพที่พบออกมาน้อยกว่าที่คาดหมาย

สรุปผล

จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่ามูลค้างคาวจากถ้ำระบบปิดมีการตรวจพบกลุ่มจุลชีพปนเปื้อน โดยพบแบคทีเรีย 8 ชนิด และเชื้อรา 1 ชนิด กลุ่มแบคทีเรียที่พบเป็นแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และหลายชนิดจัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคในคน ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปสู่การขยายงานวิจัยทั้งในห้องปฏิบัติการคือ การทดสอบการดื้อยา ความรุนแรงของเชื้อ และพยาธิกำเนิดของเชื้อ รวมถึงการขยายงานวิจัยสู่ถ้ำอื่นๆ ที่มีการจำกัดการเข้าถึงในจังหวัดกาญจนบุรี เพื่อนำข้อมูลงานวิจัยไปสู่การเฝ้าระวังและป้องกันกลุ่มประชากรที่เสี่ยงต่อการสัมผัสหรือเข้าปฏิบัติงานในถ้ำในจังหวัดกาญจนบุรีต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ในการชี้แนะจุดเก็บตัวอย่างมูลค้างคาวในถ้ำ จังหวัดกาญจนบุรี จนงานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์จากคุณภัทร ประสพศิลป์ สังกัดงานปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เพื่อการศึกษา มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี ตำบลลุ่มสุ่ม อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี

เอกสารอ้างอิง

1. Rapin N, Johns K, Martin L, et al. Activation of innate immune-response genes in little brown bats (*Myotis Lucifugus*) infected with the fungus pseudogymnoascus destructans. PLoS One 2014;9.
2. Jones G, Jacobs DS, Kunz TH, et al. Carpe noctem: The importance of bats as bioindicators. Endang Species Res 2009;8: 93-115.
3. Ferreira RL. Guano communities. In: White WB, editor. Encyclopedia of caves. 3rd ed. Cambridge (US): Academic Press; 2019. p. 474-84.
4. Dietrich M, Markotter W. Studying the microbiota of bats: accuracy of direct and indirect samplings. Ecol Evol 2019;9: 1730-5.
5. Rodhain E. Chauves-souris et virus: des relations complexes. Bull la Soc Pathol Exot 2015;doi:10.1007/S13149-015-0448-z.
6. Banskar S, Bhute SS, Suryavanshi MV., et al. Microbiome analysis reveals the abundance of bacterial pathogens in *Rousettus leschenaultii* guano. Sci Rep 2016;6:36948. doi:10.1038/srep36948.
7. Norkaew T, Ohno H, Sriburee P, et al. Detection of environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand, by Nested PCR. Mycopathologia. 2013;176:395-402. doi:10.1007/s11046-013-9701-9.
8. Dimkić I, Stanković S, Kabić J, et al. Bat guano-dwelling microbes and antimicrobial properties of the pygidial gland secretion of a troglophilic ground beetle against them. Appl Microbiol Biotechnol 2020; 104:4109-26.
9. Cordero RJB, Liedke SC, Araújo GRDS, et al. Enhanced virulence of *Histoplasma capsulatum* through transfer and surface incorporation of glycans from *Cryptococcus neoformans* during co-infection. Sci Rep 2016;6:21765. doi:10.1038/srep21765.

10. Oltean HN, Springer M, Bowers JR, et al. Suspected locally acquired coccidioidomycosis in human, Spokane, Washington, USA. Emerg Infect Dis 2020;26:606-9.
11. Sugita T, Kikuchi K, Makimura K, et al. *Trichosporon* species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. Appl Environ Microbiol 2005;71:7626-9.
12. Nualmalang R., Thanomsridetchai N., Teethaisong Y., et al. (2023). Identification of pathogenic and opportunistic yeasts in pigeon excreta by MALDI-TOF mass spectrometry and their prevalence in Chon Buri Province, Thailand. Int J Environ Res Public Health 2023;20:3191. doi:10.3390/ijerph20043191.
13. De Leon MP, Montecillo AD, Pinili DS, et al. Bacterial diversity of bat guano from cabalyorisa cave, mabini, pangasinan, philippines: A first report on the metagenome of philippine bat guano. PLoS One 2018;13:e0200095. doi:10.1371/journal.pone.0200095.
14. Wolkers-Rooijackers JCM, Rebmann K, Bosch T, et al. Fecal bacterial communities in insectivorous bats from the Netherlands and their role as a possible vector for foodborne diseases. Acta Chiropterologica 2018;20:475-83.
15. Brooke JS. 2021. Advances in the Microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin Microbiol Rev 34:10.1128/cmr.00030-19. doi:10.1128/cmr.00030-19.
16. Hafiz TA, Aldawood E, Albloshi A, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* epidemiology, resistance characteristics, and clinical outcomes: Understanding of the recent three years' trends. Microorganisms. 2022;10:2506. doi:10.3390/microorganisms10122506.
17. Kasimova AR, Gordina EM, Toropov SS, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* infection in trauma and orthopedic patients: Clinical experience and review. Traumatol Orthop Russia 2023;29:84-94. doi:10.17816/2311-2905-2027.