

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: DBG5080010
 ชื่อโครงการ: ผลของสารสกัดจากแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อ *Pythium insidiosum*
 ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : รศ.ดร. จุฬารัตน์ ปรีชาดิกุล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 E-mail : chupra@kku.ac.th
 ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

โรค ไพทีโอซิส (Pythiosis) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Pythium insidiosum* ซึ่งจัดเป็น Pseudofungi คือมีลักษณะเป็นสาหร่ายแต่ส่วนประกอบของผนังเซลล์ต่างกับสาหร่ายทั่วไป สามารถก่อโรคได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สุนัข, แมว, ม้า และวัว และที่สำคัญคือการพบการติดเชื้อในคน ลักษณะอาการทางคลินิกแบ่งออกได้เป็น 3 แบบคือ (1) การติดเชื้อบริเวณผิวหนังและชั้นใต้ผิวหนัง พบการติดเชื้อบริเวณแขนและขา รอยโรคมีลักษณะเป็นเนื้อเน่าตายเรื้อรัง (2) การติดเชื้อที่บริเวณผิวหนังรอบดวงตา เป็นรอยแผลที่กระจกตาและแก้วตา (3) การติดเชื้อที่เนื้อเยื่อรอบๆ หลอดเลือดและบริเวณผนังหลอดเลือด เป็นสาเหตุของการอุดตันของหลอดเลือดและเส้นเลือดโป่งพองเนื่องจากเชื้อ *P. insidiosum* ไม่สังเคราะห์สาร sterol ที่ผนังเซลล์และไม่ได้ใช้ sterol เพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อเช่นเชื้อราอื่นๆ โดยทั่วไปจึงทำให้การรักษาโรค pythiosis โดยการใช้ยารักษาเชื้อราโดยทั่วไป เช่น amphotericin B, Itraconazol, Imidazole ในการรักษาโรคนี้ไม่ได้ผล การรักษาส่วนมากยังต้องอาศัยการผ่าตัดแต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานการกลับมาเป็นโรคใหม่ในผู้ป่วยและเป็นสาเหตุในการตายในผู้ป่วยที่ไม่สามารถทำการผ่าตัดเอาส่วนที่มีการติดเชื้อออกไปได้ การติดเชื้อจากการได้รับระยะ Infective stage ของเชื้อ คือ biflagellate zoospore จากแหล่งน้ำเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผลเปิดที่ผิวหนังเนื่องจากเชื้อสามารถเจริญได้ดีในแหล่งน้ำโดยทั่วไป จึงเป็นวัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่หลังจากเชื้อแบคทีเรียที่จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum* โดยการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียจำนวน 88 สายพันธุ์จากแหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum* โดยวิธี coculture พบว่ามีเชื้อจำนวน 17 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ ST1302 ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีมาทำการทดสอบต่อไป การวินิจฉัยเชื้อจากลักษณะของเชื้อและการวิเคราะห์โดยเครื่อง vitex2 system พบว่าเชื้อนี้คือ *Pseudomonas stutzeri* ส่วนไอของเชื้อ ST1302 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum* ได้ การสกัดแยกสารด้านจุลชีพด้วยตัวทำละลายอินทรีย์พบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี ผลการทำสารจุลชีพให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวพา คือ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ได้สารประกอบ P10 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum* ได้ นำไปแยกต่อโดยระบบตัวพาเอธิลอะซิเตทในแฮกเซน ได้สารบริสุทธิ์ FS7 มีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่น แล้วนำไปแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกจากการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารโดยเทคนิคสเปกโตรสโกปี infrared, ¹H NMR พบว่าสาร FS7 คือสารประกอบในกลุ่มเอสเทอร์ งานวิจัยนี้เป็นการรายงานการพบสาร FS7 เป็นครั้งแรกจากสารสกัด

หายาบจากเชื้อ *P. stutzeri* ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่าสารดังกล่าวเป็นสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum* ได้

คำหลัก: สารต้านจุลชีพ, เชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำ, เชื้อ *Pythium insidiosum*

Abstract

Project Code: DBG5080010

Project Title: The effect of secreted bacterial substances upon the growth of *Pythium insidiosum*

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Chularut Prariyachatigul

Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

E-mail Address: chupra@kku.ac.th

Project Period: 3 years

Pythiosis is a disease caused by *Pythium insidiosum*, a pseudofungi that has hyphae but the component of cell membrane is different from other fungi. The infections occur in many kinds of mammal such as dogs, cats, horses, cattle and especially in humans. The clinical features of pythiosis are classified into 3 forms (1) cutaneous and subcutaneous form causing granulomatous infections in the skin (2) ophthalmic form with eye infections such as keratitis, corneal ulcers and cutaneous or subcutaneous involvement (3) vascularitis form affecting vascular tissue and resulting in arterial occlusions or aneurysms leading to gangrene or vascular rupture, respectively. Because of it do not used and synthesize sterols in the cytoplasmic membrane as do members of the kingdom Fungi, treatment of pythiosis with the usual battery of antifungal agents such as amphotericin B, Itraconazol, Imidazole is unaffected. Most surgery has been frequently used, but reports of failure or relapses with these procedures are common. In nature, *P. insidiosum* inhabits swampy areas and the infective stage is biflagellated zoospores that can swim to attach and invade host tissue. According to this, our aim of the study was to screen biological activity of bacterial metabolites which isolated from aquatic environment to inhibit the growth of *P. insidiosum*. A total of 88 bacterial strains were obtained from aquatic environment after co-cultured with a human pathogenic fungi, *P. insidiosum*. Among these, 17 isolates exhibiting an inhibition effect and one strain with a strongly activity as ST1302 was selected for further study. This isolate was identified as *Pseudomonas stutzeri* based on a morphological, cultural, physiological, biochemical characteristics and confirmed with VITEX2 system analyzer. Culture filtrates of the ST1302 inhibited the growth of *P. insidiosum*, whereas bacterial cells are unaffected. It mainly reduced hyphal extension compared with control strain. The antifungal compounds were extracted with dichloromethane and detected by disc diffusion assay against *P. insidiosum*. Purification was performed by column chromatography and eluted with methanol in dichloromethane. A complex fraction called P10 showed interesting antifungal activity. It was selected and purified by column chromatography, elution with ethyl acetate in hexane. The deep white and powderly compound designated as FS7 was purified, and further purification by crystallization. Based on a spectroscopy technique, furrier transform infrared (IR) spectroscopy and ¹H NMR analysis, FS7 consider to a group of ester compound. This is the first report to

describe an antifungal property of a crude extract from *Pseudomonas stutzeri* among aquatic microorganism against *P.insidiosum*. The result indicated that the *P.stutzeri* strain 1302 might have the potential possibility to be used as a source of probiotic of a novel antifungal agent in the future.

Key words; antifungal compounds, aquatic microorganism, *Pythium insidisoum*