



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของสารสกัดจากแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อ *Pythium inisdiosum*

The effect of secreted bacterial substances upon the growth of *Pythium inisdiosum*

โดย รศ.ดร.จุฬารัตน์ ปรียชาติกุล หัวหน้าโครงการ

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

31 สิงหาคม 2554

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 รอยโรคมักมีลักษณะเป็นเนื้อเน่าตายเรื้อรัง (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 นำไปแยกต่อโดยระบบตัวพาเอธิลอะซิเตทในเฮกเซน 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*

Executive summary

ทุนวิจัยพื้นฐานแบบมุ่งเป้า สมุนไพร ยารักษาโรค สารเสริมสุขภาพและสารสำหรับการผลิตอาหารปลอดภัย

รหัสโครงการ DBG5080010

ชื่อโครงการ ผลของสารสกัดจากแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อ *Pythium insidiosum*

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

นักวิจัยและสถาบัน รศ.ดร.จุฬารัตน์ ปรีชาติกุล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

โรคธาลัสซีเมีย เป็นโรคโลหิตจางที่สำคัญและมีอุบัติการณ์สูงมากในประเทศไทย แพทย์จึงมักพบผู้ป่วยโรคนี้ได้เสมอ ผู้ป่วยอาจมาหาแพทย์ด้วยปัญหาโลหิตจาง หรือด้วยภาวะแทรกซ้อน ผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียโดยทั่วไปมีโอกาสเกิดแผลเรื้อรังได้โดยอาจมีสาเหตุทั้งจากโรคธาลัสซีเมียเองหรือจากโรคติดเชื้อ

การติดเชื้อ *Pythium insidiosum* เป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดแดงในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย เราเรียกโรคนี้ว่า Pythiosis ซึ่งเป็นโรคที่มีความจำเพาะกับโรคโลหิตจาง ธาลัสซีเมีย และเป็นอันตรายร้ายแรงถึงชีวิต จำเป็นต้องอาศัยความรวดเร็วในการวินิจฉัยและรักษาให้ทันการมิฉะนั้นผู้ป่วยจะเสียชีวิตหมด จากรายงานทั้งในและต่างประเทศ พบผู้ติดเชื้อในประเทศไทยมากที่สุด และผู้ป่วยเหล่านั้นล้วนเป็นโรคธาลัสซีเมียทั้งสิ้น พยาธิสภาพของโรคนี้เริ่มจากการอักเสบบริเวณรอบนอกผนังหลอดเลือดแดง ลูกกลมเข้าสู่ภายในจนเกิดลิ้มเลือดอุดตัน นอกจากนี้เชื้อยังแพร่กระจายไปตามความยาวของหลอดเลือดเริ่มจากส่วนปลายบริเวณที่มีการติดเชื้อเริ่มแรก แล้วลูกกลมไปยังส่วนต้นจนถึงหลอดเลือดแดงใหญ่ ทำให้หลอดเลือดแดงถูกทำลายและมีการอุดตันมากขึ้นจนทำให้เกิดภาวะเนื้อตายขยายออกไปมากขึ้นเรื่อย ๆ หากมีการลูกกลมถึงขนาดนั้นแล้วผู้ป่วยมักถึงแก่ความตาย ซึ่งผู้ป่วยส่วนมากต้องเสียชีวิตเพราะ การรักษายังเป็นปัญหาอยู่ เมื่อวินิจฉัยโดยการทำ biopsy และดูผลจากการย้อมชิ้นเนื้อจะพบลักษณะคล้ายสาหร่ายแบบ non septate แทรกอยู่ อาจทำให้แพทย์ไปรักษาด้วยยาที่ใช้รักษาเชื้อรา ซึ่งจะไม่ได้ทำให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น เนื่องจากเชื้อนี้เป็นเชื้อคล้ายเชื้อรา ในปัจจุบันไม่ถือว่าเป็นเชื้อราที่แท้จริง จัดอยู่ใน Kingdom Chromista, Phylum Pseudofungi. Class Oomycetes, Order Pythiales, Family Pythiaceae การรักษาด้วยยาจึงไม่ได้ผล ทั้งการให้ amphotericin B ยา กลุ่ม azol และ potassium iodide การติดเชื้อมี 3 รูปแบบคือ cutaneous/subcutaneous, systemic และ ophthalmic การรักษาที่ได้ผลคือ การตัดขา limb amputation ให้เพียงพอเหนือระดับของหลอดเลือดแดงที่มีเชื้อนี้อยู่ที่ผนังหลอดเลือดอย่างรวดเร็ว ก่อนที่เชื้อจะลูกกลมไปมากกว่านั้น ในกรณีที่เชื้อลูกกลมตามกระแสเลือดมากจนไม่อาจตัดอวัยวะได้ผู้ป่วยจะเสียชีวิตในที่สุด ซึ่งถ้าทำการผ่าตัดรักษาทันผู้ป่วยก็จะกลายเป็นผู้ป่วย การติดเชื้อที่ถูกตา ก็ทำให้ผู้ป่วยสูญเสียลูกตา จึงมีความจำเป็นที่จะต้องตระหนักถึงความรุนแรงและอันตรายจากโรคนี้ เพราะการใช้ยาสำหรับฆ่าเชื้อราไม่สามารถทำลายเชื้อ *P. insidiosum* ซึ่งเป็น organism like fungi ได้ จึงได้ทำการวิจัย screen ค้นหาสารชนิดใหม่ต่างๆ ที่สามารถฆ่าเชื้อชนิดนี้ได้ โดยไม่ทำลายเซลล์เนื้อเยื่อของผู้

ติดเชื้อ ในปีที่ 1 ส่วนปีที่ 2,3 จะเป็นการสกัดแยก และพิสูจน์ สูตรโครงสร้าง ของเชื้อชนิดนี้ จากการสังเกตของผู้วิจัยพบว่าเมื่อเพาะเชื้อ *P. insidiosum* จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่มี contaminate จากแบคทีเรียเชื้อ *P. insidiosum* จะตาย ดังนั้นการเพาะเชื้อ *P. insidiosum* ควรต้องใส่ chloramphenicol เพื่อ ทำลายแบคทีเรีย ดังนั้นงานวิจัยจึงเริ่มจากการ screen หาสารที่ต้องการจากแบคทีเรียที่เป็น contaminate เหล่านี้ ใช้วิธี standard microdilution antifungal susceptibility test พบสารสกัดจาก *Pseudomonas stutzeri* 1302 มีผลที่น่าพอใจจึงนำไปศึกษาต่อโดย การสกัดแยกสารด้วยตัวทำละลายอินทรีย์พบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี ผลการทำสารจุลชีพให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวพาเกลือเมทานอลในไดคลอโรมีเทนได้สารประกอบ P10 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum* ได้ นำไปแยกต่อโดยระบบตัวพาเอธิลอะซิเตทในเฮกเซนได้สารบริสุทธิ์ FS7 มีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่น แล้วนำไปแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึก จากการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารโดยเทคนิคสเปกโตรสโกปี infrared, ¹H NMR พบว่าสาร FS7 คือสารประกอบในกลุ่มเอสเทอร์ งานวิจัยนี้เป็นการรายงานการพบสาร FS7 เป็นครั้งแรกจากสารสกัดหายาจากเชื้อ *P. stutzeri* 1302 ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่าสารดังกล่าวเป็นสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum* ได้ จึงถือเป็นก้าวแรกของงานวิจัยในด้านการรักษาเพื่อพัฒนาในการนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคนี้ต่อไป

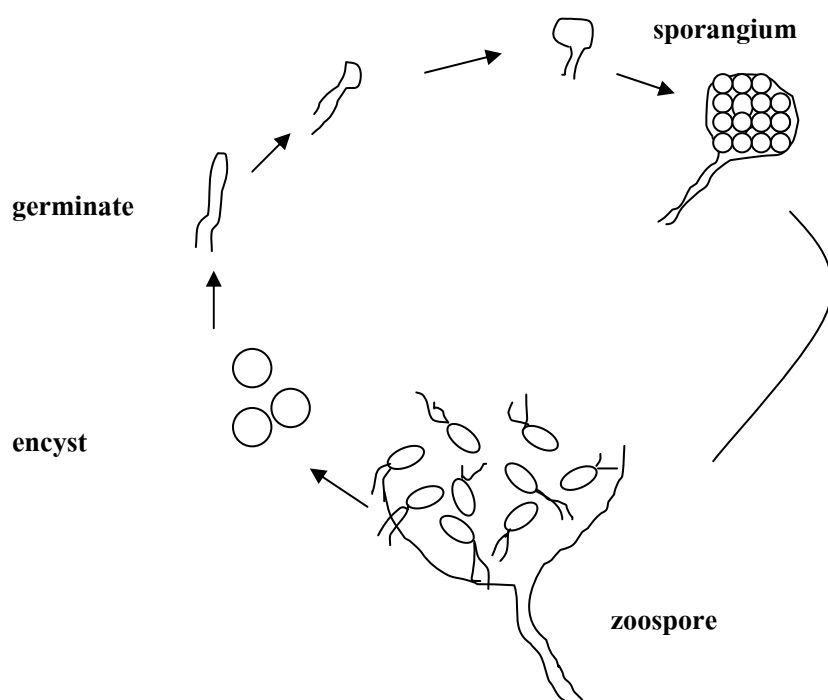
เนื้อหางานวิจัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เชื้อใน genus *Pythium* ประกอบด้วยเชื้อ 85 species โดยปกติเชื้อใน genus นี้ทำให้เกิดโรคในปลาและพืช โดยเฉพาะในพืช เชื้อนี้ทำความเสียหายให้อย่างมาก โดยการทำลายเมล็ด, ราก และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพืช แต่ *Pythium insidiosum* เป็นเพียงเชื้อ species เดียวของเชื้อใน genus นี้ที่สามารถก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ เราเรียกโรคนี้ว่า pyhiosis โดยพบโรคนี้ในแมว, สุนัข, วัว, ควาย, ม้า, หมู และคน ที่สำคัญคือ รายงานแรกที่พบในคนนั้นเป็นคนไข้จากประเทศไทยที่มาป่วย ณ โรงพยาบาลศิริราช ในปี พ.ศ. 2528 ซึ่ง นพ.เมระนี เทียนประสิทธิ์ ได้รายงานในเวลาต่อมา (1, 2, 3) คนไข้เป็นชายอายุ 23 ปี และ 26 ปี คนไข้ทั้ง 2 เป็นโรค thalassemia อยู่ก่อนแล้ว มารับการรักษาด้วยรอยโรคที่ผิวหนังชั้นลึก (painful subcutaneous granulomatous infiltrative lumps with ulcers) ที่แขนขาของผู้ป่วยรายที่ 1 และขาซ้ายของผู้ป่วยรายที่ 2 สามารถแยกเชื้อจากรอยโรคได้และส่งไปยืนยันที่ CDC (Center for Disease Control), Atlanta, Georgia ว่าเป็นเชื้อ *Pythium insidiosum* (1) ซึ่งถือว่าเป็นรายงานแรกของโลกที่พบว่าเชื้อนี้ทำให้เกิดโรคในคน หลังจากนั้นก็มีรายงานพบผู้ป่วยด้วยโรคนี้กันเพิ่มขึ้น จนถึงปัจจุบันไม่ต่ำกว่า 102 ราย (1-3, 5-15, 26-35) และส่วนมากเป็นรายงานจากประเทศไทยที่ผู้ป่วยมักมีโรคเดิม คือ thalassemia (2-4, 6,7,9-12,14,15) ดังนั้นโรคติดเชื้อชนิดนี้จึงมีความสัมพันธ์กับ Thalassemia

เชื้อ *P. insidiosum* จัดอยู่ใน Family Pythiaceae, Order Pythiales, Class Oomycetes, Phylum Pseudofungi, Kingdom Chromista ซึ่งเชื้อใน Phylum Pseudofungi นี้เคยถูกจัดอยู่ใน Kingdom Protoctista (16) แต่ภายหลังได้ถูกแยกออกมาเป็น Kingdom Chromista ในปี 1994 (17) เชื้อใน Kingdom Chromista ประกอบด้วยเชื้อใน Phylum Pseudofungi ได้แก่ Class Oomycetes และ Hyphochytridomycetes ลักษณะเชื้อ *P. insidiosum* จะมีสาขารูปร่างเหมือนเส้นใย ทำให้หลายคนอาจเข้าใจผิดว่าอยู่ใน Kingdom fungi แต่อย่างไรก็ดีเราไม่จัดว่าเชื้อนี้เป็นเชื้อรา แต่อาจเรียกว่า fungus-like organism ได้ เนื่องจากเชื้อจัดอยู่ใน Class Oomycetes จึงมีลักษณะเช่นเดียวกับเชื้ออื่น ๆ ใน Class นี้ คือ colony ไม่มีสีหรือสีขาว มีสาขารูปร่างคล้ายเส้นใย และเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้หลายชนิด ในลักษณะแผ่เป็นวงรัศมี ที่เรียก radiate pattern ลักษณะสาขารูปร่างของเชื้อมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-10 μm . ไม่มีผนังกัน แต่อาจพบผนังกันได้ไม่มากนักในสาขารูปร่างที่ยังอ่อนอยู่ สาขามีการแตกแขนงแบบตั้งฉาก เป็นเชื้อที่เจริญอยู่ในแหล่งน้ำ ที่มีอุณหภูมิพอเหมาะคือ 28°C – 37°C ร่วมกับมีพืชในน้ำ ตลอดจนสถานะแวดล้อมอื่น ๆ ที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้เชื้อมีวงจรชีวิตที่ครบสมบูรณ์ คือ เริ่มจากสาขามีการโป่งพองขึ้นเพื่อให้เชื้อสร้าง sporangium ที่มีลักษณะเป็นท่อ ปลายเป็นกระเปาะกลมหรือรี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 – 60 μm ใสไม่มีสี ภายใน sporangium จะมี zoospore จำนวนมาก ลักษณะ zoospore มีอวัยวะที่มีลักษณะเหมือนหาง สำหรับใช้ว่ายน้ำ 2 อัน เรียกว่า biflagellate zoospore ขึ้นออกมาจากบริเวณหัวกลม ๆ เมื่อได้ zoospore เต็มแล้ว ผนังกระเปาะของ sporangium จะแตกออก ทำให้ zoospore หลุดออกมา และ

ว่ายไปมาในแหล่งน้ำ ซึ่งถือว่าเป็นระยะ zoospore นี่เองที่เป็น infective stage ของเชื้อ *P. insidiosum* โดยที่ zoospore สามารถว่ายไปเกาะกับใบพืช ต้นพืชในแหล่งน้ำ แล้วเกิด encyst คือ มีการสลัดหางทั้ง 2 ทิ้ง ทำให้ zoospore มีลักษณะกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 8-12 μm มีการสร้างสารพวก glycoprotein รอบ ๆ ผนัง cell โดยสารนี้จะมีคุณสมบัติช่วยให้ cyst เกาะบนเนื้อเยื่อต่างๆ ของพืชในน้ำได้ดี หลังจากนั้น cyst จะเริ่ม germinate โดยงอกเป็นท่อเล็ก ๆ ออกมาก่อนที่เรียก germ tube จากนั้นจึงเจริญต่อไปเรื่อย ๆ และมีการแตกแขนง จนเป็นลักษณะ เช่นเดียวกับสาหร่าย แล้วสาหร่ายบางอันเมื่อถึงเวลาอันสมควร ก็จะเกิดการไหลของ cytoplasm ไปรวมกันที่ปลาย จนเป็นกระเปาะ ที่เรียก sporangium วนเวียนเช่นนี้เรื่อยไปดังวงจรชีวิตตามรูป



รูปที่ 1 วงจรชีวิตของ *Pythium insidiosum*

(ดัดแปลงจาก Mendoza C, Ajello L. Mc. Ginnis MR. Infections caused by the Oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. J Mycol Med 1996 ; 6 : 153)

คาดว่าคนจะได้รับเชื้อมาจากแหล่งน้ำโดยที่เชื้อในระยะ biflagellate zoospore ว่ายอยู่ในน้ำ เมื่อคนไปสัมผัสกับแหล่งน้ำนั้น ก็จะทำให้ biflagellate zoospore ว่ายไปหาและซ่อนไซเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณที่มีบาดแผลอยู่ก่อนแล้ว จากนั้น zoospore ที่เตรียมพร้อมจะ encyst เริ่มสร้างสารเหนียวบนผนัง cell ทำให้สามารถเกาะติดกับเนื้อเยื่อของคนได้ เชื้อที่เกาะติดสามารถ germinate เป็นสาหร่ายและทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ รวมทั้งแทรกเข้าไปจนถึงเส้นเลือดเกิดการอุดตันในกระแสเลือด ลักษณะอาการภายหลังการติดเชื้อเท่าที่มีรายงาน พอจะแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ คือ

1. รอยโรคที่ผิวหนัง ชั้น cutaneous และ subcutaneous พบ infiltration lesion ที่ผิวหนัง ลักษณะแข็ง โดยเริ่มแรกเป็นตุ่มเล็ก ๆ ต่อมาใหญ่ขึ้น เจ็บ แผลแตกเป็น ulcer พบ inflammatory infiltration ของเซลล์แพร่กระจาย เซลล์ส่วนใหญ่เป็น eosinophil มี granuloma ล้อมรอบเนื้อตายอยู่ ซึ่งใจกลางของเนื้อตายนั้นจะพบสายราของเชื้อนี้อยู่ด้วย (3)

2. รอยโรคแบบ arteritis พบบาดแผลที่บริเวณแขน, ขา แบบแผลเรื้อรังจากเนื้อตายขาดเลือด gangrenous ulcer และมีอาการปวด การอักเสบบริเวณหลอดเลือดเริ่มที่ small blood vessel จากบริเวณรอบนอกผนังหลอดเลือด ลุกกลามเข้าสู่ภายใน นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถแพร่กระจายไปตามความยาวของหลอดเลือด เริ่มจากส่วนปลายบริเวณที่มีการติดเชื้อเริ่มแรกแล้วลุกลามไปยังส่วนต้นจนถึงหลอดเลือดแดงใหญ่ มี arterial inflammation เกิด arteritis มี thrombus ทำให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือด พบผนังหลอดเลือดขรุขระหรือมีการโป่งพองของเส้นเลือด (aneurysm) ทำให้หลอดเลือดแดงถูกทำลาย และมีการอุดตันมากขึ้นจนเกิดภาวะเนื้อตายขยายออกไปมากขึ้นเรื่อย ๆ (6, 7, 10, 14)

3. รอยโรคแบบ ocular pythiosis มีแผลที่กระจกตา เนื้อเยื่อรอบตาบวม ตาแดง มีหนองในลูกตาและลุกลามมากขึ้นจนถึงกระจกตาทะลุได้ ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักสูญเสียดวงตา (5, 11, 12, 15) ผู้ป่วยมีประวัติโคนดินและโคลนจากในนากระเด็นเข้าตา (12, 15)

การวินิจฉัยเริ่มจากประวัติของผู้ป่วย มักมีอาชีพที่ต้องมีการสัมผัสกับแหล่งน้ำ เช่น ชาวนา ที่ต้องแช่ขาไว้ในน้ำนานๆ หรือมีประวัติการลงเล่นในแหล่งน้ำ, การถูกหญ้าบาด, และมีโรคเดิมคือ thalassemia ลักษณะเด่นทางคลินิก คือ แผลเรื้อรังบริเวณแขนหรือขาซึ่งเกิดจากการติดเชื้อมีการอักเสบของหลอดเลือดแดง เกิดการอุดตันของหลอดเลือด เกิดภาวะเนื้อตาย การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะทั่วไปหรือยาสำหรับฆ่าเชื้อราไม่ได้ผล ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยการดูสไลด์ด้วย 10% - 20% KOH จากสิ่งส่งตรวจ biopsy บริเวณหลอดเลือดแดงที่มีการอุดตัน หรือหนองในเนื้อเยื่อ จะพบสายราใหญ่ ขนาด 4.0 – 9.0 μm เป็นท่อนสั้นหรือยาว มักไม่เป็นท่อนตรงแต่หักงอไปมา สายรามีการแตกแขนงแบบตั้งฉาก บางที่อาจพบผนังกันสายรา (septate) ได้บ้าง การตรวจด้วยการย้อมขึ้นเนื้อด้วยวิธี Periodic Acid Schiff (PAS) หรือ Gomori Methenamine Silver (GMS) จะพบสายราไม่มีผนังกัน หรือมีผนังกันเพียงบางส่วน (sparsely septate) การเพาะเชื้อ เจริญได้ดีภายใน 1 - 3 วัน ที่ 25°C บน Sabouraud dextrose agar ที่ใส่ chloramphenicol 0.05 mg/ml พบเชื้อมีลักษณะสีขาวหรือครีม ไม่ฟู ไม่พบสปอร์ มีแต่สายราแตกแขนงแบบตั้งฉาก อาจพบผนังกันได้บ้าง การเพาะเชื้อไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น *P. insidiosum* จึงต้องมีการกระตุ้นให้เชื้อสร้าง zoospore (18) เพื่อคัดสัน โดยวิธีใช้ช็อคดอกหญ้ามาเลเซีย *Axonopus compressus* เป็นตัวกระตุ้น นอกจากนั้นการวินิจฉัยด้วยวิธีทาง serology ที่มีรายงานในการใช้วินิจฉัยในคน คือ วิธี immunodiffusion และ ELISA (20-23) จะให้ผลดีพอสมควรแต่มีข้อเสียคือวิธี immunodiffusion จะให้ผลลบกับผู้ป่วยทุกรายที่เป็น ocular pythiosis วิธี ELISA ให้ผลในด้าน sensitivity ดีแต่อาจมีปัญหาในการหาค่า cut off ของแต่ละห้องปฏิบัติการ

ยาด้านเชื้อราในปัจจุบัน คือ amphotericin B ออกฤทธิ์โดยการจับกับ sterol ที่ผนังของเชื้อรา และ ketoconazole, itraconazole, fluconazole ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสร้าง sterol ที่ผนังของเชื้อรา ยาดังกล่าว จะ

ไม่มีผลต่อการรักษาเชื้อ *P. insidiosum* เพราะเชื้อไม่สังเคราะห์ sterol และไม่ได้ใช้ sterol เพื่อการเจริญเติบโตเหมือนเชื้อราทั่วไป เนื่องจากเชื้อ *P. insidiosum* ไม่ใช่เชื้อราที่แท้จริง (25) ยาที่เคยใช้ได้ผลกับพืชหรือปลา เช่น malachite green, potassium permanganate, copper sulfate, acriflavin และ mercurochrome ก็ไม่สามารถนำมาใช้ได้ เพราะเป็นพิษกับคน ส่วน sodium iodide ที่ใช้ได้ผลดีในการรักษาม้า และ saturated solution of potassium iodide (SSKI) ที่เคยใช้ได้ผลดีกับ subcutaneous pythiosis ในคน (4) กลับใช้ไม่ได้ผลในการรักษาที่ตา (12) และรอยโรคแบบ arteritis (6, 7, 10)

ดังนั้นการรักษาจึงเหลือแต่เพียงการผ่าตัดเอาส่วนที่ติดเชื้อออกโดยการทำการ evisceration หรือ enucleation ของลูกตา หรือ limb amputation ของแขน, ขา ในช่วงที่เชื้อยังไม่ลุกลามจนถึงหลอดเลือดแดงใหญ่ในช่องท้อง ซึ่งจะต้องรีบกระทำโดยเร็ว มิฉะนั้น ผู้ป่วยจะเสียชีวิตทั้งหมด ในประเทศไทยมีผู้ป่วย thalassemia กว่า 5 แสนคน ผู้ป่วยเหล่านี้มีโอกาสเกิดแผลเรื้อรัง ลักษณะดังที่กล่าวมาในตอนต้นได้ โดยอาจเกิดจากโรค thalassemia เอง หรือจากการติดเชื้อ *P. insidiosum*

เนื่องจากการใช้ยาสำหรับฆ่าเชื้อไม่สามารถทำลายเชื้อ *Pythium insidiosum* ซึ่งเป็น organism like fungi ได้ จึงจำเป็นที่จะต้อง screen หาสารเคมีต่างๆ ที่สามารถฆ่าเชื้อชนิดนี้ได้ การรักษาในปัจจุบันของโรค pythiosis ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อนี้ ใช้วิธี Amputation ซึ่งทำให้ผู้ติดเชื้อพิการ ถ้าเป็นการติดเชื้อที่ลูกตา ก็ทำให้ผู้ป่วยสูญเสีย ลูกตา แต่ในกรณีที่เชื้อลุกลามตามกระแสเลือดมาก จนไม่อาจตัดอวัยวะได้ ผู้ป่วยจะเสียชีวิตในที่สุด ดังนั้นจึงต้องตระหนักถึงความสำคัญของโรคนี้ และการวิจัยที่หาสารชนิดใหม่ๆ ซึ่งสามารถทำลายเชื้อนี้ได้ โดยไม่ทำลายเซลล์เนื้อเยื่อของผู้ติดเชื้อ

เนื่องจากกลุ่มผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อนี้มาโดยตลอด ตั้งแต่ปี 2546 ซึ่งได้งบประมาณปี 2546 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นการหา basic knowledge เกี่ยวกับลำดับ base และจำนวน copy ของ 18 S rRNA gene และได้นำองค์ความรู้จากการวิจัยไปพัฒนาการตรวจหาโรคติดเชื้อได้อย่างรวดเร็วโดยวิธีทางอนุชีววิทยา โดยได้ทุนเมธีวิจัยสกว.ปีงบประมาณ 2547-2549 ดำเนินการวิจัยเสร็จแล้ว ส่งรูปเล่มฉบับสมบูรณ์แล้ว และได้พัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปโดยขอขึ้นจดสิทธิบัตร PATENT COOPERATION TREATY (PCT) โดยยื่นเรื่องผ่านทางสกว. หลังจากนั้นทางสกว.ได้ส่งเรื่องให้บริษัท Axis Associates International Co.,Ltd. ดำเนินการนำไปจดให้ที่ประเทศสิงคโปร์ เมื่อ 10 ตุลาคม 2549 โดยได้รับ New International (PCT) Patent Application No. PCT/SG2006/000300 ซึ่งการจดสิทธิบัตรแบบPCT ในประเทศสิงคโปร์นี้จะได้รับความคุ้มครองครอบคลุมทั้งหมด 131 ประเทศ ดังนั้นเพื่อให้การศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อโรคนี้อย่างครบวงจร ตั้งแต่การศึกษา basic knowledge, การตรวจ ตลอดไปจนถึงการรักษา ทางสกว.จึงเห็นความสำคัญที่จะสนับสนุนการวิจัยนี้เพื่อเป็นการวิจัยที่ครบวงจร สนับสนุนกลุ่มวิจัยที่ศึกษาในแนวทางที่ชัดเจนในเรื่องใดเรื่องหนึ่ง และเป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศ เพราะนักวิทยาศาสตร์ต่างชาติไม่มีโอกาสมากนักที่จะได้ศึกษา เนื่องจากรายงานผู้ป่วยในโลกพบในคนไทยที่เป็น thalassemia กว่าร้อยละ 80 (34) ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นการ screen หาสารที่น่าสนใจ ในปีนี้ 1 ส่วนปีที่ 2,3 จะเป็นการสกัดแยกและพิสูจน์สูตรโครงสร้าง

วัตถุประสงค์ ต้องการหาสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium insidiosum*

ระเบียบวิธีวิจัย

ปีที่ 1

screen หาสารที่มีผลในการฆ่าเชื้อ *P. insidiosum* จากแหล่งต่างๆ โดยเฉพาะจากน้ำเลี้ยงที่แบคทีเรียหลังออกมา เพราะจากประสบการณ์และการสังเกตของผู้วิจัยพบว่าเมื่อเพาะเชื้อ *P. insidiosum* จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่มี contaminate จากแบคทีเรียเชื้อ *P. insidiosum* จะตาย การเพาะเชื้อ *P. insidiosum* ควรต้องใส่ chloramphenicol เพื่อทำลายแบคทีเรีย ดังนั้นจึงจะ screen หาสารที่ต้องการจากแบคทีเรียที่เป็น contaminate เหล่านี้ ใช้วิธี standard microdilution antifungal susceptibility test

ปีที่ 2 และปีที่ 3

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้คุณสมบัติมาทำการสกัดแยกหาสารออกฤทธิ์ และพิสูจน์หาเอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้ รวมทั้งตรวจสอบฤทธิ์ของสารที่ได้ เพื่อทำการวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง รายละเอียดของวิธีวิจัยทั้งหมดมีดังนี้

1. การตรวจกรองแหล่งน้ำตามธรรมชาติเพื่อหาแบคทีเรียที่ผลิตสารต้านจุลชีพที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pythium insidiosum* จากจังหวัดขอนแก่น

1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ

ใช้ขวด Dhuran ขนาด 500 มิลลิลิตรในการเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ยกตัวอย่างเช่น สระน้ำ, บึง, คลองชลประทาน, บ่อบำบัดน้ำเสีย รอบอำเภอเมืองจังหวัดขอนแก่น โดยเก็บที่ระดับผิวน้ำของน้ำประมาณ 5-10 เซนติเมตร วัด pH และอุณหภูมิของน้ำขณะเก็บตัวอย่างน้ำแล้วนำกลับมาห้องปฏิบัติการภายในวันเดียวกันเพื่อทำการทดลองต่อไป

1.2 การเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียและการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pythium insidiosum* ในแหล่งน้ำ

คูน้ำที่เก็บจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติแต่ละแหล่งปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) แล้วใช้เทคนิค spread plate เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำแต่ละแหล่ง นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วันแล้วสังเกตลักษณะและจำนวนโคโลนีของเชื้อที่พบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บเอาโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะแตกต่างกันแต่ละแบบมาเก็บไว้ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ NA slant เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป จากนั้นนำเชื้อ *P. insidiosum* ที่เลี้ยงให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) เป็นเวลา 2-3 วัน โดยตัดชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีขนาด 1×1 เซนติเมตร ใส่ลงใน

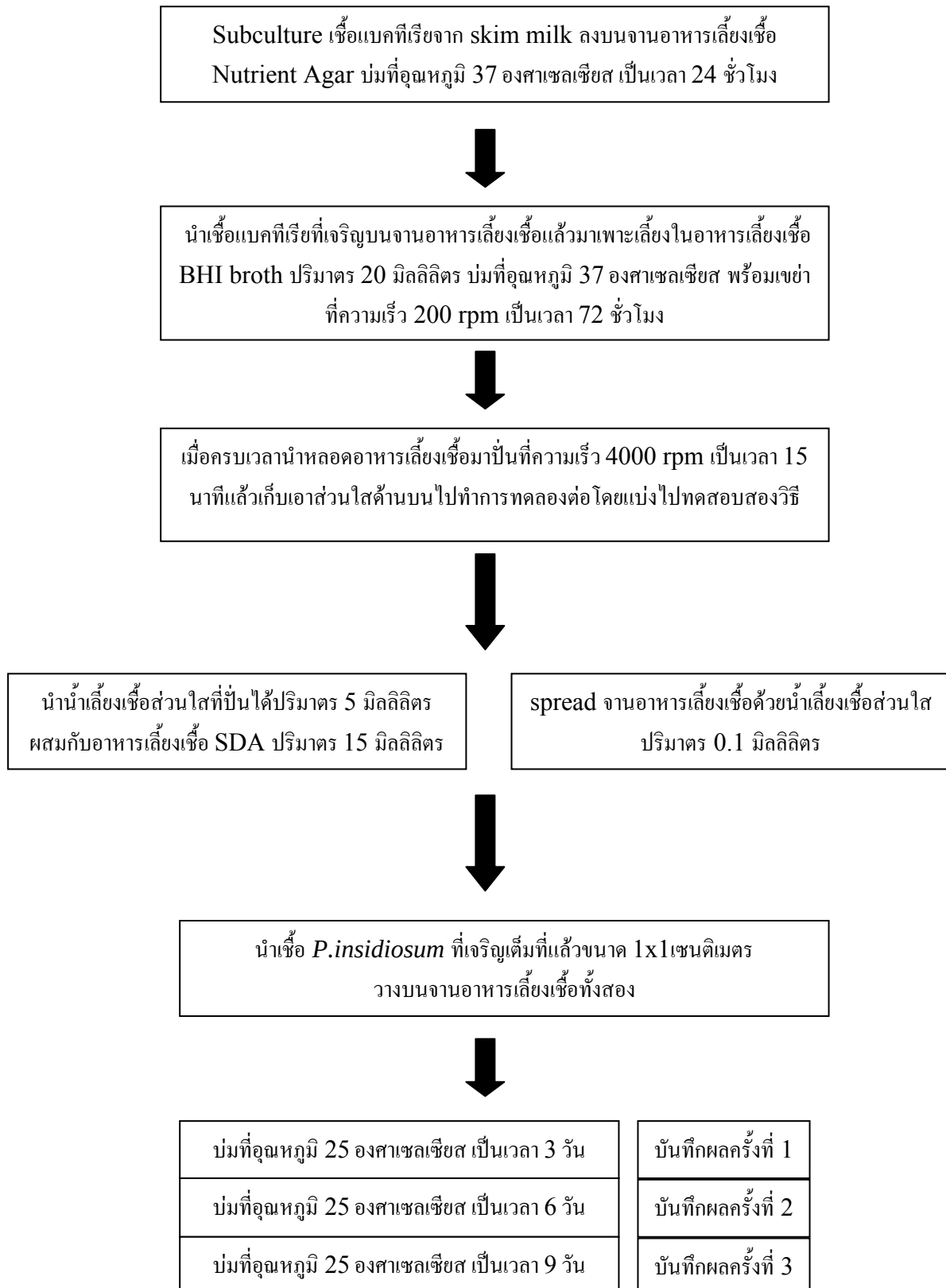
ขวดน้ำจากแหล่งต่างๆที่เก็บมาจำนวน 5-10 ชิ้น นำไปบ่มในตู้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลา นำเอาชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากขวดน้ำโดยวิธีปราศจากเชื้อมาเพาะลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ใหม่แล้วนำไปบ่มในตู้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตดูการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าพบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้จากตัวอย่างแหล่งน้ำใดก็จะคัดเลือกเอาเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำที่แยกโดยเทคนิค spread plate ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวและเก็บรักษาไว้ใน skim milk ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาใช้เป็นแหล่งของเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบต่อไป

2. การคัดกรองเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารต้านจุลชีพที่มีคุณสมบัติในการต้านการเจริญของเชื้อ *Pythium insidiosum*

2.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและตรวจกรองคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum*

การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อทำโดย นำเชื้อที่เก็บใน skim milk ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำเอาโคโลนีแยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion broth (BHI) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลานำมาปั่นโดยใช้ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสด้านบน (culture supernatant) เพื่อเอาไว้ใช้ในการทดสอบต่อไป

นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* โดยใช้เทคนิค mixed media คือการนำเอาน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และเทคนิค spread plate เป็นการนำน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว spread plate ให้ทั่วผิวน้ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และผิวน้ำแห้งซึ่งใช้เวลาไม่เกิน 30 นาที แล้วนำเชื้อ *P. insidiosum* ที่เจริญเต็มที่ ขนาด 1×1 เซนติเมตรวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3, 6 และ 9 วัน แล้วเฝ้าติดตามดูการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum*



รูปที่ 2. แผนผังการเตรียมตัวอย่างนํ้าเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและตรวจกรองคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum*

3. การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรีย

จากการตรวจกรองเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำทั้งสิ้น 88 สายพันธุ์ พบเชื้อจำนวน 17 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารต้านจุลชีพที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum* ได้ และส่งไปตรวจถึงระดับสปีชีส์ที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น โดยใช้เครื่อง VITEK 2 system

4. การแยกสารต้านจุลชีพที่ผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ 1302 ให้บริสุทธิ์

4.1 การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรีย

เตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อสกัดสารต้านจุลชีพ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion broth (BHI) ปริมาตร 1 ลิตรที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 1000 มิลลิลิตร ขวดละ 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บน้ำหมักมาแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นเพื่อนำไปสกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์สองวิธีคือ การทำให้เป็นผงแห้งโดยเครื่องระเหยแห้ง (lyophilizer) จนได้เป็นผงแห้ง และการนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการใช้เครื่องเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) โดยให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจากเดิมเป็นสิบเท่า (50 มิลลิลิตร)

4.2 การศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อการสกัดแยกสารต้านจุลชีพจากเชื้อ *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ 1302 ให้บริสุทธิ์

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ทำให้เข้มข้นจากเดิมทั้งสองวิธีมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อหาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านจุลชีพ โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ ไคลอโรโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และ บิวทานอล ตัวอย่างที่ทำให้เป็นผงแห้งจะใช้ผงน้ำเลี้ยงเชื้อแห้งจำนวน 0.1 กรัม ต่อตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างละ 500 ไมโครลิตร ส่วนตัวอย่างที่เตรียมให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยแห้งให้มีปริมาตรลดลงสิบเท่า จะใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายอินทรีย์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (โดยปริมาตร) จากนั้นนำไปแยกโดยใช้กรวยแยกแล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง เดิมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัด ปริมาณเล็กน้อยลงในสารสกัดเพื่อละลายสารที่สกัดได้ (1มก./มล.) แล้วนำสารสกัดอินทรีย์ที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างทั้งสองวิธีไปทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* โดยมีชุดควบคุม คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ ไคลอโรโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และ บิวทานอลที่หยดลงบนแผ่นกระดาษ (paper disc) แล้วทำให้ตัวทำละลายระเหยไป

4.3 การเตรียมตัวอย่างสารต้านจุลชีพจากแบคทีเรียและการทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography: CC)

จากการศึกษาในข้อ 4.2 พบว่าเมื่อสกัดสารต้านจุลชีพด้วยไดคลอโรมีเทนแล้วนำมาทดสอบกับเชื้อ *P.insidiosum* พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และ บิวทานอล ดังนั้นจึงใช้ไดคลอโรมีเทนเพื่อสกัดสารต้านจุลชีพต่อไป

4.3.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อ *Psuedomonas stutzeri* สายพันธุ์ 1302

การเตรียมตัวอย่างทำโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion broth (BHI) ปริมาตร 20 ลิตรที่บรรจุในขวดแก้วขวดละ 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บน้ำหมักมาแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) จนเหลือส่วนใสเข้มข้นประมาณ 2 ลิตร นำส่วนใสที่ทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแห้งมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ไดคลอโรมีเทน โดยใช้อัตราส่วนระหว่างส่วนใสและตัวทำละลายอินทรีย์อย่างละ 1 ต่อ 1 (โดยปริมาตร) นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วเก็บตัวอย่างไว้ในขวดสุญญากาศเพื่อให้นำมาแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป

4.3.2 การวิเคราะห์สารสกัดไดคลอโรมีเทนโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chromatography: TLC)

ละลายสารสกัดไดคลอโรมีเทนที่ได้จากข้อ 4.3.1 ในไดคลอโรมีเทน แล้วหยดลงบนแผ่น TLC โดยมีระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่ใช้เป็นตัวพาให้สารเคลื่อน โดยทำการปรับระบบเพื่อหาระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารต้านจุลชีพ ได้แก่

- Normal phase system

1.	Methanol : Ethyl acetate	40 : 60
2.	Methanol : Toluene	40 : 60
3.	Ethyl acetate : Methanol : Acetic acid	75 : 25 : 5
4.	Butanol : H ₂ O : Acetic acid	4 : 1 : 1

- Reverse phase system

1.	Methanol : H ₂ O : Acetic acid	20 : 80 : 1
2.	Methanol : H ₂ O : Acetic acid	30 : 70 : 1
3.	Methanol : H ₂ O : Acetic acid	40 : 60 : 1
4.	Methanol : H ₂ O : Acetic acid	50 : 50 : 1
5.	Methanol : H ₂ O : Acetic acid	80 : 20 : 1

6.	Dioxane : H ₂ O	20 : 80
7.	Dioxane : H ₂ O	50 : 50
8.	Dioxane : H ₂ O	80 : 20
9.	Ether : H ₂ O	20 : 80
10.	Ether : H ₂ O	50 : 50
11.	Ether : H ₂ O	80 : 20
12.	Acetonitrile : H ₂ O	20 : 80
13.	Acetonitrile : H ₂ O	30 : 70
14.	Acetonitrile : H ₂ O	40 : 60
15.	Acetonitrile : H ₂ O	50 : 50
16.	Acetonitrile : H ₂ O	80 : 20
17.	Acetonitrile : H ₂ O	20 : 80
18.	Acetonitrile : H ₂ O : Acetic acid	20 : 80 : 1
19.	Acetonitrile : H ₂ O : Acetic acid	30 : 70 : 1

จากนั้นตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้โดยการส่องดูด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร ถ้ามีสารบนแผ่น TLC จะมองเห็นจุดสีม่วงบนพื้นสีเขียว และสีม่วงเรืองแสงบนพื้นขาว ตามลำดับ

4.3.3 การแยกสารสกัดไคคลอโรมีเทนให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography: CC)

การเตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟี ทำโดยบรรจุคอลัมน์ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร) ด้วยผงซิลิกาขนาด 0.04-0.06 มม. โดยใช้ผงซิลิกา 50 กรัมต่อสารสกัด 1 กรัม ผสมผงซิลิกากับไคคลอโรมีเทนให้เข้ากัน ใช้สำลีอุดที่ปลายคอลัมน์เล็กน้อย เทซิลิกาใส่คอลัมน์ แล้วเคาะเบา ๆ ที่ข้างคอลัมน์เพื่อปรับผิวหน้าของผงซิลิกาให้เรียบเสมอกันและทำให้ผงซิลิกาบรรจุแน่นในคอลัมน์ นำสารสกัดไคคลอโรมีเทน 0.88 กรัม (จากส่วนใสเริ่มต้น 6 ลิตร) ที่คลุกกับผงซิลิกาแล้วใส่ลงในคอลัมน์ จากนั้นชะด้วยระบบตัวพาดังแสดงในตารางที่ 1 แล้วเก็บสารแต่ละส่วน (fraction) โดยปริมาตรที่เก็บในแต่ละครั้งเท่ากับ 50 มิลลิลิตรเมื่อแยกได้แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ นำมาทำตรวจเช็คโดยเทคนิค TLC แล้วส่องดูด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร นำส่วนที่มีจุดบนแผ่น TLC ที่ตำแหน่งเดียวกันมารวมกันแล้วทำให้ตัวทำละลายระเหยไป รวมเอาส่วนที่แยกได้ที่มีตำแหน่งบนแผ่น TLC ที่เหมือนกันไว้ในกลุ่มเดียวกันเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบ antifungal activity ต่อไป

ตารางที่ 1. แสดงระบบตัวพาที่ใช้ในการแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี แบ่งสารทั้งหมดออกเป็น 10 กลุ่ม ตามค่า R_f และผลการทดสอบการต้านการเจริญต่อเชื้อ *P. insidiosum* ของสารแต่ละกลุ่ม

Eluent	Fraction	Combined fraction	Group
CH_2Cl_2 1% MeOH : CH_2Cl_2	1-17	7-9	T1
	18-73	16-18	T2
		25-27	T3
		40-42	T4
		52-54	T5
2% MeOH : CH_2Cl_2	74-85	76-78	T6
3% MeOH : CH_2Cl_2	86-94	91-93	T7
4% MeOH : CH_2Cl_2	95-97		
5% MeOH : CH_2Cl_2	98-102		
10% MeOH : CH_2Cl_2	103-109	106-108	T8
20% MeOH : CH_2Cl_2	110-114		
30% MeOH : CH_2Cl_2	115-117		
40% MeOH : CH_2Cl_2	118-121		
50% MeOH : CH_2Cl_2	122-124	124-126	T9
60% MeOH : CH_2Cl_2	125-127		
70% MeOH : CH_2Cl_2	127-129		
80% MeOH : CH_2Cl_2	130-132		
100% MeOH : CH_2Cl_2	133-138		
1% GAA: MeOH	139-148	142-144	T10

5. การศึกษาลักษณะ คุณสมบัติของสารต้านจุลชีพโดยการวิเคราะห์ทางเคมี

5.1 Infrared spectroscopy (IR spectroscopy)

ศึกษา Infrared spectroscopy หรือ IR ที่ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยใช้เครื่อง โดยเตรียมตัวอย่างให้อยู่ในรูปของแผ่น KBr โดยผสมผลึกสารตัวอย่างกับผง KBr (อยู่ในสภาพแห้ง) บดละเอียดให้เข้ากันแล้วนำไปอัดเป็นแผ่นบางใสซึ่งแสงสามารถผ่านทะลุได้

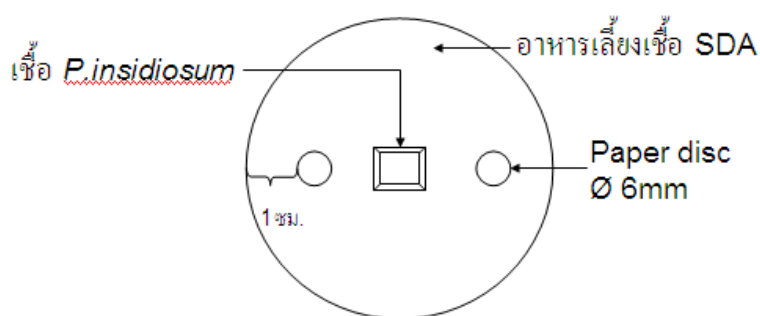
5.2 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR)

ศึกษา ^1H -NMR (400 MHz) ^{13}C -NMR (100 MHz) DEPT COSY HMQC และ HMBC NOESY spectra ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่โดยใช้เครื่อง Varience Model YH400 spectrometer และตัวทำละลาย (Deuterated solvents) ที่ใช้ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม-d : CDCl_3

6. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* ของสารต้านจุลชีพโดยวิธี paper disc diffusion

6.1 การเตรียมเชื้อ *P. insidiosum*

เลี้ยงเชื้อ *P.insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นนำเชื้อที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาตัดให้ได้ขนาด 1x1 เซนติเมตรนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA อันใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเมื่อเชื้อเจริญโดยไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพอื่นจึงนำไปใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* จากสารต้านจุลชีพที่ต้องการทดสอบ



รูปที่ 3 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.insidiosum* โดยสารต้านจุลชีพโดยวิธี paper disc diffusion

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. การคัดกรองแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการหลั่งสารต้านจุลชีพยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

P.insidiosum

จากการแยกจุลินทรีย์จากแหล่งน้ำเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สร้างสารต้านจุลชีพยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* โดยวิธี spread plate พบว่าแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 88 ไอโซเลต แต่มีเพียง 17 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* ได้ ผลการส่งตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการตรวจกรองไปตรวจถึงระดับสปีชีส์ที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น ผลการตรวจเป็นดังตารางที่ 2 แสดงผลการข้อมสีแกรมและการวินิจฉัยเชื้อถึงระดับสปีชีส์ พบเชื้อจำนวน 4 สายพันธุ์ (31.25%) ที่ให้ผลการตรวจเป็น Low discrimination และมี 1 สายพันธุ์ที่จำแนกโดยการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีการตรวจประจำทางห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 2 ผลการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum*

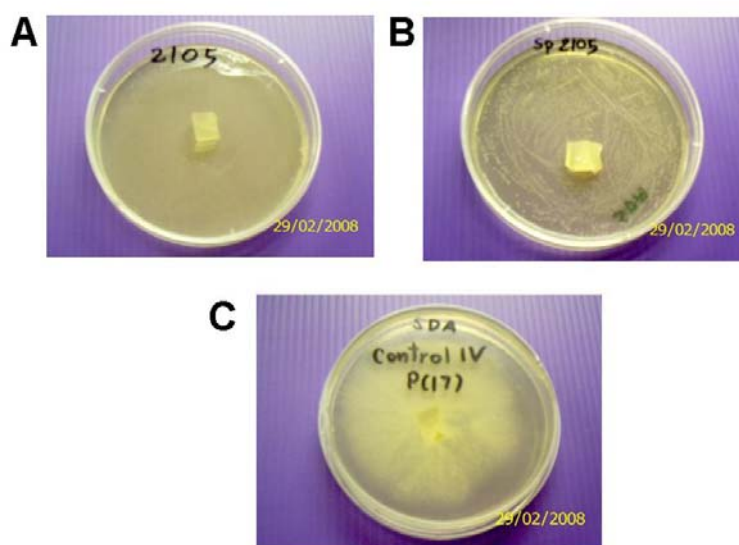
Bacterial NO.	Gram stain	Identification	VITEK 2 system confidence level
1. RR 2512	Gram negative coccobacilli	<i>Acenitobacter baumannii</i> complex	99%
2. RR 3601	Gram negative bacilli	<i>Enterobacter cloacae</i>	93%
3. RR 3604	Gram negative bacilli	<i>Enterobacter cloacae</i>	93%
4. RR 2501	Gram negative coccobacilli	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp pneumoniae	93%
5. RR 2503	Gram negative coccobacilli	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%
6. RR 2504	Gram negative coccobacilli	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%
7. RR 2401	Gram negative bacilli	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	99%
8. RR 2206	Gram negative bacilli	<i>Aeromonas sobria</i>	98%
9. RR 1302	Gram negative bacilli	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%
10. RR 40801	Gram negative coccobacilli	<i>Acenitobacter baumannii</i> complex	99%
11. RR 62302	Gram negative coccobacilli	<i>Acenitobacter baumannii</i> complex	99%

Bacterial NO.	Gram stain	Identification
12. RR 3602	Gram negative bacilli	Low discrimination
13. RR 2502	Gram negative bacilli	Low discrimination
14. RR 2201	Gram negative coccobacilli	Low discrimination
15. RR 40803	Gram negative coccobacilli	Low discrimination
16. RR 1301	Gram positive bacilli	suspected <i>Bacillus</i> spp. (Routine biochemical test)

จากผลการตรวจที่ได้พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวประกอบไปด้วยเชื้อสายพันธุ์ดังต่อไปนี้

<i>Acenitobacter baumannii</i> complex	3 สายพันธุ์	<i>Enterobacter cloacae</i>	4 สายพันธุ์
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>	1 สายพันธุ์	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1 สายพันธุ์
<i>Aeromonas sobria</i>	1 สายพันธุ์	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1 สายพันธุ์
<i>Bacillus</i> spp.	1 สายพันธุ์	Low discrimination	4 สายพันธุ์

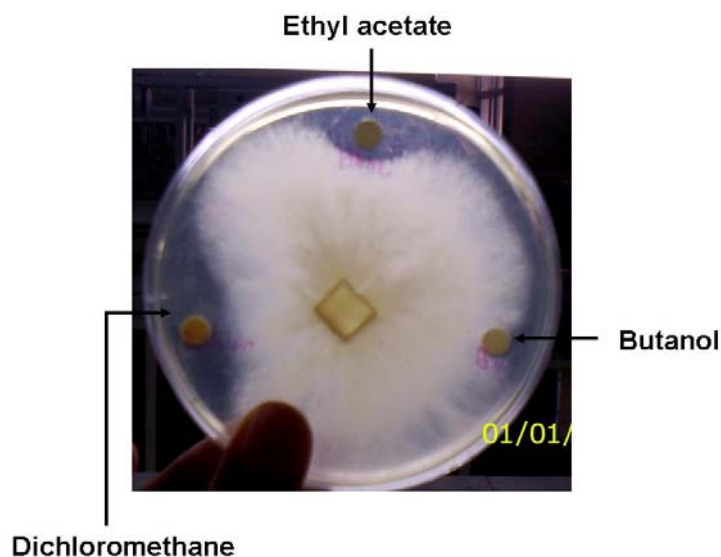
ตัวอย่างแสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย



รูปที่ 4. แสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย A: เทคนิค mixed media โดยการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ: อาหารเลี้ยงเชื้อ (อัตราส่วน 1:3) B: เทคนิค spread plate โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร C: เชื้อ *P.insidiosum* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA), ระยะเวลา 9 วัน

2. การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างและการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียที่ใช้สารอินทรีย์ในการแยกสารต้านจุลชีพที่ผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ 1302 ให้บริสุทธิ์

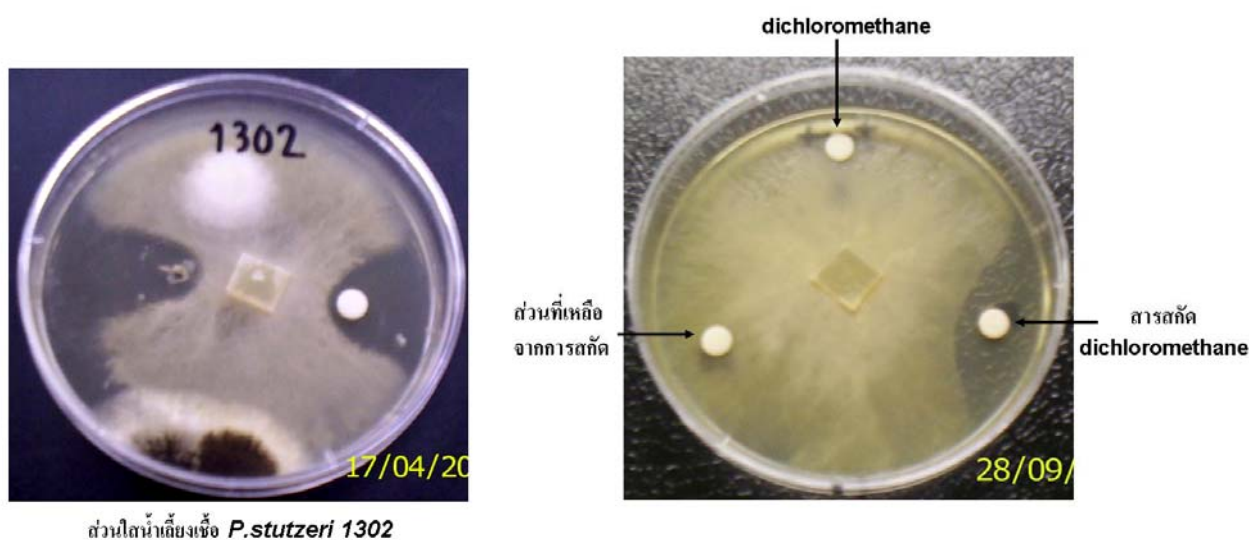
จากการเตรียมตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อให้เข้มข้นขึ้นสองวิธีโดยการนำไปทำให้เป็นผงแห้งจากการทำ freeze-dry และการทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่อง rotary evaporator แล้วนำตัวอย่างส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์พบว่าการเตรียมตัวอย่างโดยการทำให้เป็นผงแห้งมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แล้วสารที่สกัดได้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.insidiosum* ได้ ส่วนตัวอย่างที่ทำให้เข้มข้นขึ้นจากเดิมสิบเท่าโดยใช้เครื่อง rotary evaporator แล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และ บิวทานอล ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อสารละลายอินทรีย์เป็น 1:1 พบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนให้ผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* ได้ดีที่สุด



รูปที่ 5. แสดงผลจากการสกัดสารต้านจุลชีพด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิดคือ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum*

2.1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.insidiosum* ในส่วนใสและสารสกัดไดคลอโรมีเทน

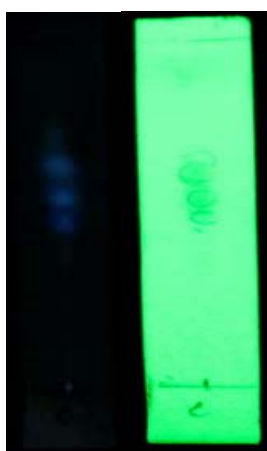
จากผลการศึกษาในข้อที่ 2 พบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* ได้ดีที่สุด จึงนำมาใช้เพื่อการแยกสารต้านจุลชีพที่ได้จากเชื้อ *P.stutzeri* 1302 ให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของสารต้านจุลชีพ เมื่อศึกษาผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* ระหว่างน้ำเลี้ยงเชื้อ, สารสกัดไดคลอโรมีเทนและส่วนใสที่เหลือจากการสกัด พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.insidiosum* ได้ ในขณะที่ส่วนใสที่เหลือจากการสกัดและสารละลายไดคลอโรมีเทน (สารละลายควบคุม) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.insidiosum* ได้



รูปที่ 6. แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* จากส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ *P.stutzeri* สายพันธุ์ 1302 และสารสกัดไดคลอโรมีเทน, ส่วนที่เหลือจากการสกัดและสารละลายไดคลอโรมีเทน (สารละลายควบคุม)

2.2 การแยกสารต้านจุลชีพที่ผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ 1302 ให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin-layer chromatography, TLC)

จากการนำสารสกัดไคคลอโรมีเทนมาวิเคราะห์โดยวิธี TLC ด้วยระบบตัวทำละลายต่าง ๆ ตามวิธีการทดลองข้อที่ 4.3.2 พบว่าเมื่อแยกสารสกัดโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น ไคคลอโรมีเทน: เอทิลอะซิเตท: เมทานอล (อัตราส่วน 70:25:5) สามารถแยกสารสกัดไคคลอโรมีเทนได้ดีกว่าระบบตัวทำละลายอื่น และเมื่อตรวจสอบโดยคู่มือด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร พบว่าแยกสารสกัดไคคลอโรมีเทนได้ 3 ตำแหน่ง มีค่า R_f เท่ากับ 0.66, 0.55 และ 0.50 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 7



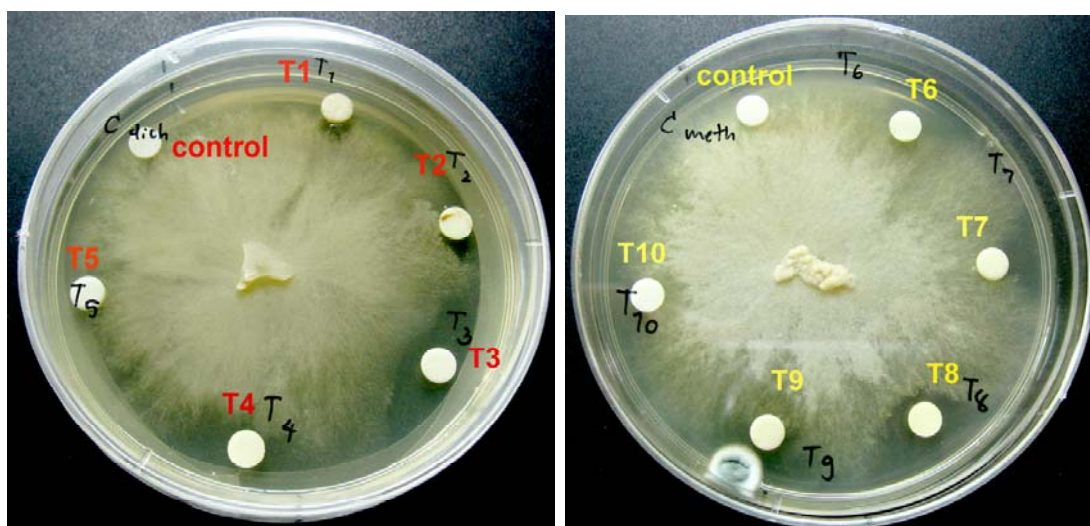
รูปที่ 7. โครมาโทแกรม TLC จากสารสกัดไคคลอโรมีเทนแยกโดยใช้ระบบตัวทำละลาย ไคคลอโรมีเทน: เอทิลอะซิเตท: เมทานอล (อัตราส่วน 70:25:5)

2.3 การแยกสารต้านจุลชีพที่ผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ 1302 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography, CC)

จากการวิเคราะห์สารสกัดไคคลอโรมีเทนด้วยวิธี TLC โดยใช้ระบบตัวพา ตามวิธีการทดลองข้อที่ 2.2 สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการเลือกกระบวนการชะสารจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี เช่น 100% ไคคลอโรมีเทนไม่สามารถแยกสารได้ ดังนั้นเมื่อชะคอลัมน์ให้เพิ่มความเข้มข้นของตัวชะให้สูงขึ้นได้ แต่ถ้าระบบตัวพานั้นแยกสารได้ดีให้ชะด้วยระบบตัวพานั้นมากกว่าระบบตัวพาอื่น และชะด้วยสารที่มีขั้วต่ำไปสูง ตามวิธีการทดลองข้อที่ 4.3.3 เมื่อแยกสารสกัดไคคลอโรมีเทน (0.88 กรัม จากตัวอย่างส่วนในน้ำเลี้ยงเชื้อ 6 ลิตร) ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 1.) และนำส่วนที่มีตำแหน่งบนแผ่น TLC ตำแหน่งเดียวกันมารวมกัน พบว่าแยกสารได้ทั้งหมด 10 ส่วน และนำส่วนที่แยกได้มาศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.insidiosum* ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อที่ 6 โดย ใช้ความเข้มข้น 1 มก./มล.

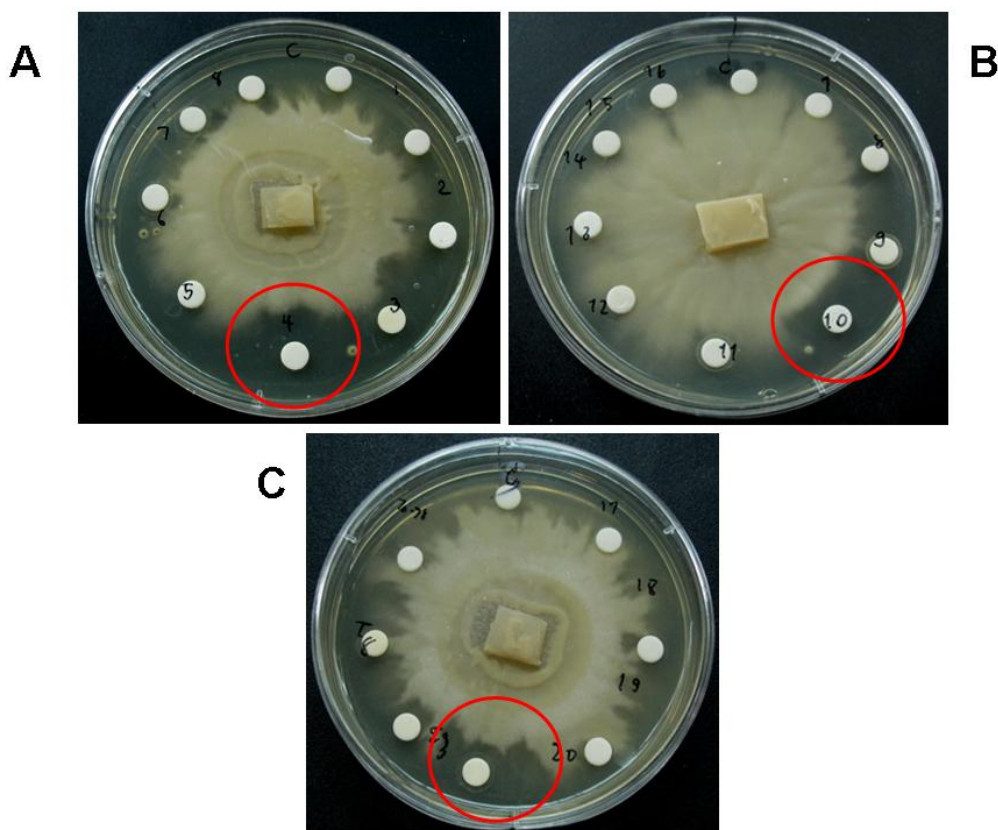
2.3.1 การศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* โดยส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟี

เมื่อนำส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีมาศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.insidiosum* ตามวิธีการทดลองข้อที่ 6 แยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ 2 ส่วน คือ สารกลุ่ม T3 ป็นสารที่ชะจากคอลัมน์ด้วย 1% เมทานอลในไคคลอโรมีเทน มีน้ำหนัก 27.4 มิลลิกรัม เมื่อทำให้ตัวทำละลายระเหยแห้งสารนี้มีลักษณะเป็นสีเหลืองเป็นมัน สารกลุ่ม T8 ซึ่งเป็นสารที่ชะจากคอลัมน์ด้วย 10% เมทานอลในไคคลอโรมีเทน มีน้ำหนัก 18.8 มิลลิกรัม เมื่อทำให้ตัวทำละลายระเหยแห้งสารนี้มีลักษณะเหลืองปนน้ำตาล เป็นมัน



รูปที่ 8. แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* โดยสารที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟี กลุ่ม T3 และ T8

เนื่องจากสารที่แยกได้มีปริมาณน้อยไม่สามารถนำไปศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของสารต้านจุลชีพโดยการวิเคราะห์ทางเคมีต่อไปได้ จึงได้เตรียมตัวอย่างจากน้ำเลี้ยงเชื้อตั้งต้น 20 ลิตร นำไปสกัดโดยตัวทำละลายตามวิธีในข้อ 4.3 ได้สารสกัดไดคลอโรมีเทนน้ำหนัก 1.301 กรัมและนำไปแยกให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 4.3.3 โดยใช้สารละลาย 1% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนชะสารออกจากคอลัมน์ แล้วเก็บสารครั้งละ 50 มิลลิลิตร ได้สารจากคอลัมน์ทั้งหมด 20 กลุ่ม (P1-20) นำส่วนที่แยกได้มาศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.insidiosum* โดยทดสอบตามวิธีการทดลองข้อที่ 6 ใช้ความเข้มข้นสาร 1 มก./มล. พบกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ 3 ส่วน คือ สารกลุ่ม P4 มีน้ำหนัก 132 มิลลิกรัม มีลักษณะขาวครีม, สารกลุ่ม P10 มีน้ำหนัก 133.4 มิลลิกรัม มีลักษณะขาวขุ่น และสารกลุ่ม P20 มีน้ำหนัก 60.5 มิลลิกรัม มีลักษณะขุ่นสีเหลืองเข้ม



รูปที่ 9. แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* โดยสารที่แยกได้จากคอลัมโครมาโทกราฟี

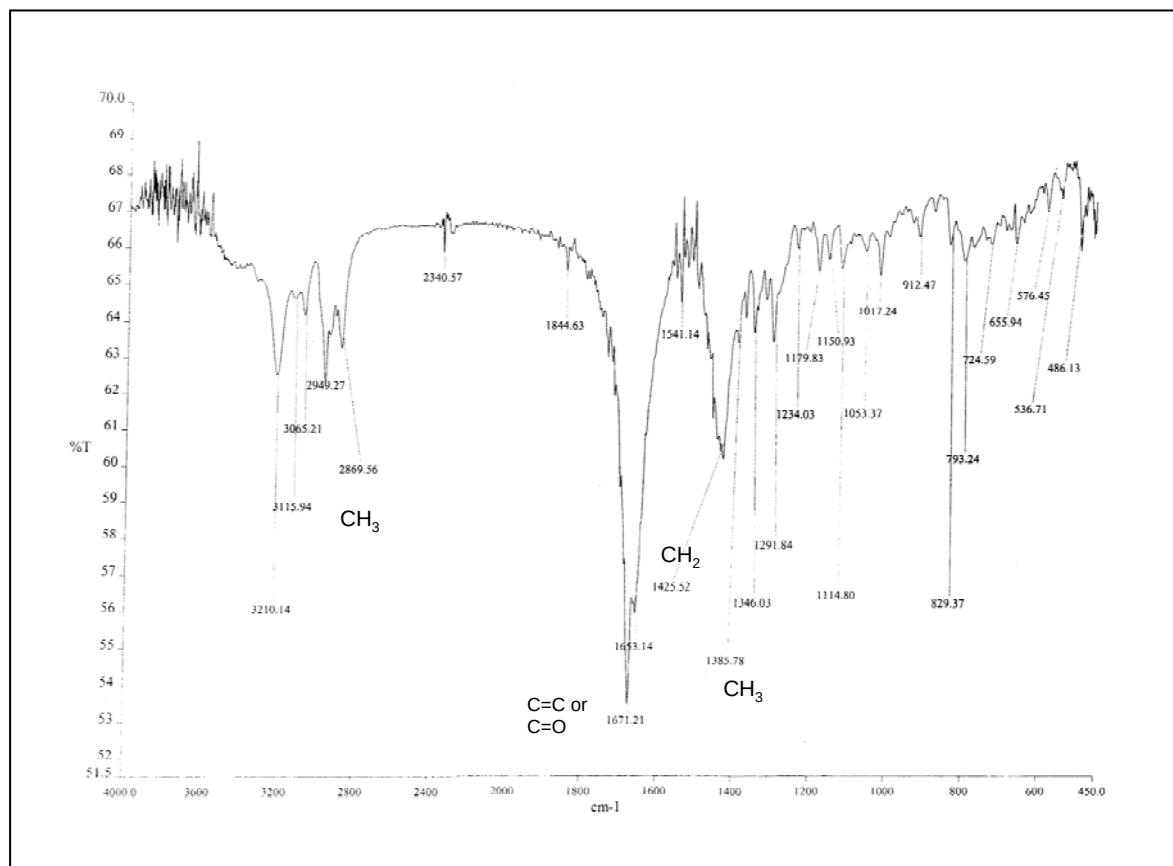
A: กลุ่ม P4, B: กลุ่ม P10 และ C: กลุ่ม P20

3. การศึกษาลักษณะ คุณสมบัติของสารต้านจุลชีพโดยการวิเคราะห์ทางเคมี

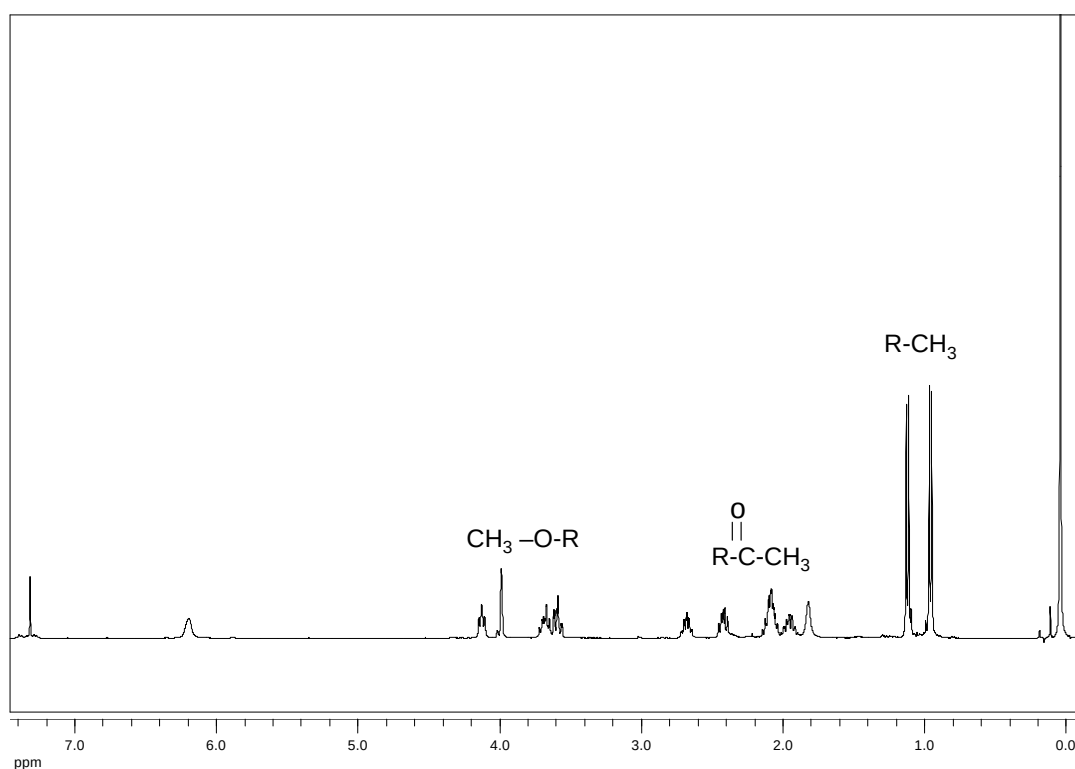
จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* โดยส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งจากทดสอบ คือ P4, 10 และ 20 จึงนำสารกลุ่ม P10 มาศึกษาสมบัติของสารต้านจุลชีพโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแยกได้สาร 8 กลุ่มสารกลุ่มที่มีความบริสุทธิ์ที่นำมาศึกษาต่อคือ FS7

สาร FS7

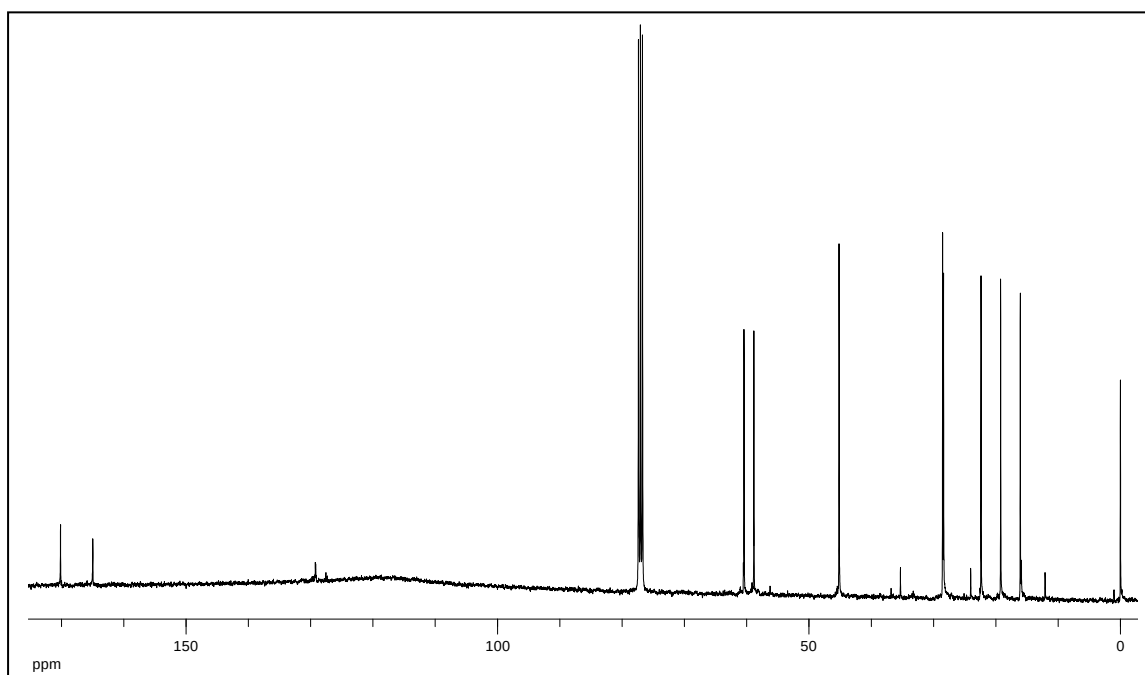
จากสัญญาณสเปกตรัม furrier transform infrared spectroscopy พบสัญญาณที่สำคัญ คือ FT-IR (KBr, cm^{-1}): พบสัญญาณที่แสดงเอกลักษณ์หมู่ฟังก์ชันที่สำคัญคือ 2962 (m, C-H str) และ 1674 (s, C=C str or C=O str), 1425 และ 1385 (w, CH_3 str) (รูปที่ 10) และเมื่อพิจารณาสเปกตรัม ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (400 MHz, CDCl_3) พบสัญญาณที่สำคัญคือ δ (ppm) : ตำแหน่ง 0.095 และ 1.13 แสดงถึงตำแหน่งของ H ของหมู่ alkyl group (รูปที่ 11) และจากสเปกตรัมของ ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) ประกอบไปด้วย C 10 อะตอมสาร FS7 ที่ได้น่าจะเป็นสารประกอบในกลุ่ม ester ($\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}-\text{R}$) (รูปที่ 12)



รูปที่ 10. furrier transform infrared spectroscopy ของสาร FS7



รูปที่ 11. สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร FS7



รูปที่ 12. สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร FS7

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร FS7 ด้วยวิธี ^1H -NMR พบว่ามี ^1H NMR spectrum resonance และจากวิธี heteronuclear multiple bond connectivity (gHMBC) สามารถอ่านผลการวิเคราะห์ได้ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ผลโดยวิธี ^{13}C NMR และ ^1H NMR ของสาร FS7

ตำแหน่ง	^{13}C NMR (ppm)	^1H NMR (ppm)
1	58.83	4.13, 1H, t (J=0.74)
2	60.41	3.99, 1H, d (J=11.42)
3	45.15	3.59, 2H, m
4	28.53	2.68, H, m
5	28.38	2.41, 2H, p
6	22.37	2.08, 2H, m
7	22.37	1.95, m
8	19.21	1.11, 3H, t (J=0.015)
9	16.06	0.97, 3H t (J=0.02)
10	164	
11	170	

สรุปผล

1. การคัดกรองเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำเพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งการ

เจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum*

ในงานวิจัยนี้คัดกรองเชื้อแบคทีเรียตามจำนวน 88 สายพันธุ์ แยกจากจากแหล่งน้ำในจังหวัดขอนแก่น เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI แล้วนำมาศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 17 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารต้านจุลชีพยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบได้ และได้เลือกเชื้อ *P.stutzeri* สายพันธุ์ 1302 ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำที่สามารถผลิตสารต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ

P.insidiosum

วิธีการจำแนกสปีชีส์ของแบคทีเรียมีหลายวิธี เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA นอกจากนี้แล้วในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องมือจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแบบอัตโนมัติขึ้นและได้นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบกันอย่างแพร่หลาย โดยงานวิจัยนี้จำแนกสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรียซึ่งแยกได้จากน้ำในจังหวัดขอนแก่นโดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติ Vitex2 system แล้วนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพบมีความเหมือน (identity) กับเชื้อ *Acenitobacter baumannii* complex, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus* spp. และอีก 4 สายพันธุ์ที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ (Low discrimination)

3. การทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพ

จากการทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน การวิเคราะห์ด้วย TLC และคอลัมน์โครมาโทกราฟีแล้วนำส่วนที่แยกได้มาศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.insidiosum* พบว่าสารที่ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อ *P.insidiosum* ได้มี 3 กลุ่มและได้เลือกเอากลุ่มที่มีปริมาณมาก (P10) มาทำการแยกศึกษาต่อได้สารที่น่าสนใจคือสาร FS7 ซึ่งเมื่อทำให้ตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยไปได้สารมีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่น มีสีครีมเล็กน้อย เมื่อนำมาวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลด้วยวิธี NMR พบว่าเป็นสารที่ประกอบไปด้วยคาร์บอน 10 อะตอมและไฮโดรเจน 17 อะตอมซึ่งคาดว่าจะจะเป็นสารประกอบในกลุ่ม monoterpene สรุปว่างานวิจัยนี้ได้พบสาร FS7 ที่ผลิตจากเชื้อ *P.stutzeri* สายพันธุ์ 1302 จากการเปรียบเทียบกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เท่าที่สืบค้นมาพบว่า แม้ *P.stutzeri* จะเคยมีรายงานการผลิตสารต้านจุลชีพแต่ก็ยังไม่เคยมีรายงานว่าผลิตสารต้านจุลชีพกลุ่ม monoterpene มาก่อน

(36) รายงานการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่มีการแยกสารต้านจุลชีพจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.insidiosum* นับว่าเป็นการศึกษานำร่องเพื่อใช้ในการพัฒนาการผลิตยาต้านเชื้อราชนิดใหม่เพื่อใช้ในการรักษาโรค pythiosis ต่อไปในอนาคตซึ่งในปัจจุบันนี้ยังไม่มียาด้านเชื้อราที่จะใช้ในการรักษาการติดเชื้อนี้ได้ผล

เอกสารอ้างอิง

1. De cock AWAM, Mendoza L, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. J Clin Microbiol 1987; 25:344-349.
2. Thianprasit M : Fungal infection in Thailand Jpn I Dermatol 96 : 1343-45, 1986
3. Thianprasit M : Cutaneous Pythiosis in human-being. Siriraj 100th Academic Meeting. Mahidol University, Bangkok, Thailand. 18-22th, April 1988, abstract, P 94.
4. Thianprasit M : Cutaneous pythiosis in human-being. 8th Regional Conference of Dermatology (Bali), 1988, June 16-20, Abstract 1988, P 238.
5. Rinaldi MG, Seidenfeld SM, Fotherbell AM, McGough BS. 1989, *Pythium insidiosum* causes severe disease in a healthy boy. Mycology Observer 1989 ; 9:7
6. Sathapatayavongs B, Lechachaikul P, Prachaktman R, Atichartakarn V, Sriphojanart T, Trairatvarakul P et al. Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. J Infect Dis 1989; 159 : 274-80
7. Chetchotisakd P, Porutaveevudhio O, Mairiag P, Patjanasoonorn B, Chaiprasert AK, Pairojkiel C et al. Human pythiosis in Srinagarind Hospital : One year experience. J Med Assoc Thailand 1992 ; 75 : 248-54.
8. Triscott JA, Weedon D, Cabana E. Human subcutaneous pythiosis. J Cut Pathol 1993 ; 20 : 267-71
9. Krajaejun T, Prachartam R, Sathapatayavongs B, Szabo K, et al. Current human pythiosis in Thailand. 10th International Congress of Mycology (Jul 27 th-Aug 1 st, Paris) 2002, 52
10. Wanachiwanawin W, Thiaprasit M, Fucharoen S, Chaiprasert A, Sudasna N, Ayudhya N. Fatal arteritis due to *Pythium insidiosum* in patients with thalassemia. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993 ; 87 : 296-8
11. Imwidthaya P. Mycotic keratitis in Thailand. J Med Vet Mycol 1995 ; 33 : 81-2
12. Kunavisarut S, Prawinwongwath K, Lerdvitayasakul R, Sathapatayavongs B. *Pythium* corneal ulcer ; case report. Thai J Ophthalmol 1988 ; 2 : 70-3
13. Parr DH, McKinney WP, Rogers K. Three unusual isolates from eye infections in New Zealand. XII Congress of the International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM). Adelaide, Australia, P. D-64, 1994
14. นิธิ พงศ์นันต์, สุขุมพร กรลักษ์ณ์, อุบลรัตน์ ทหิษ, ชาญชาย สมบูรณ์ศักดิ์กุล, *Pythium insidiosum* อุดมหลอดเลือดแดงในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย วารสารแพทยนาวิ 2540 ; 34(2) : 25-29

15. Tantisarasart T, Patchimkul P, Wongbunterng S, Rangsipanuratn W. Keratic pythiosis in Songklanagarind Hospital. Thai J Ophthalmol 1993 ; 7 : 39-45
16. Margulis L. Schwartz KV. Five Kingdoms : An illustrated guide to the phyla of life on earth. New York : WH Freeman and Company, 2nd ed., 1988
17. Corliss JO. An interim utilitarian (<< User friendly>>) hierarchical classification and characterization of the Protista. Acta Protozool 1994 ; 33 : 1-51
18. Chaiprasert A, Samerpitak K, Wanachiwanawin W, Thasnakorn P. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. Mycoses 1990 ; 33 : 317-23
19. Imwidthaya P, Srimung S. Immunodiffusion test for diagnosing human pythiosis. Mycopathologia 1989 ; 106 : 109-112
20. Prachartam R, Changtrakool P, Sathapatayavongs B, Jayanetra P, Ajello L. Immunodiffusion test for diagnosis and monitoring of human pythiosis insidiosi J Clin Microbiol 1991 ; 29 : 2661 – 2
21. Krajaejun T, Kunakorn M, Niemhom S, Chongtrakool P, Prachartam R. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. Clinical and Diagnostic laboratory Immunology 2002; 9: 378-82.
22. Miller RI, Campbell RSF. Immunological studies on equine phycomycosis. Aust Vet J 1982 ; 58 : 221-6.
23. Mendoza L, Nicholson V, Prescott JF. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. J Clin Microbiol 1992 ; 30 : 2980-3.
24. Grooters AM, Gee MK. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. J of Veterianary Internal Medicine/American College of Veterinary Internal Medicine 2002 : 16 147-52.
25. Deacon JW. Introduction to modern mycolgy. 2nd Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1984 : 14-5, 32-4, 37-8, 142-3, 218-28
26. Mendoza C, Ajello L. Mc. Ginnis MR. Infections caused by the Oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. J Mycol Med 1996 ; 6 : 151-64
27. Thitithanyanont A, Mendoza L, Chuansumrit A, Prachartam R, Loathamatas J, Sathapatayavongs B, et al. Use of an imunotheapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infeciton caused by *Pythium insidiosum* CID 1998;27: 1394-00
28. Mendoza L, Alfaro AA. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. Mycopathologia 1986; 94: 123-9
29. Miller RI. Gastrointestinal phycomycosis in 63 dogs J Am Vet Med Assoc 1985;186:473-8

30. Miller RI Olcott BM, Archer M. Cutaneous pythiosis in beef calves J Am Vet Med Assoc 1985; 186: 984-6
31. Murray DR, Ladds PW, Johnson RH, Pott BM. Metastatic phycomycosis in a horse J Am Vet Med Assoc 1978;172:834-6
32. Thianprasit M: Human pythiosis Top Dermatol 1990; 4: 1-4
33. Tanphaichitra D: Tropical disease in the immunocompromised host: Melioidosis and pythiosis Rev Infect Dis 1989; 11(suppl 7): 1629-43
34. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prajarktam R, Nitiyanant P et al. Clinical and Epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand . CID 2006;43:569-76
35. Bosco SMG, Bagagil E, Araujo JP, Candrias JMG et al. Human Pythiosis, Brazil . Emerging Infectious Disease 2005; 11: 715-8
36. Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, Garcí'a-Valde's E et al. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006, 20: 510–547

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

อยู่ในขั้นตอนเตรียม manuscript ยังไม่สามารถตีพิมพ์เผยแพร่ ทั้งหมดได้เพราะต้องการยื่นจดสิทธิบัตรก่อน ส่วนที่เผยแพร่ได้บางส่วนก็นำเสนอในที่ประชุมวิชาการซึ่งไม่เพียงพอต่อการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ แต่ได้เตรียมเรื่องที่จะตีพิมพ์ไว้ดังนี้

- Journal of Applied Microbiology (Impact factor 2009 : 2.098)

Effect of antifungal compounds produced by environmental bacteria on physiological activities of human pathogenic *Pythium insidiosum*

- Journal of Medical Microbiology (Impact factor 2009 : 2.272)

Isolation and partial characterization of antifungal compounds from environmental bacterias

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ นำผลงานไปใช้พัฒนาการเรียนการสอนทั้งในระดับปริญญาตรีและบัณฑิตศึกษาในหัวข้อ recent advance in medical mycology ของหลักสูตรเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น และทำให้เกิดการสร้างนักวิจัยใหม่ระดับปริญญาตรี 4 คน ระดับปริญญาเอก 1 คน

3. กิจกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

การไปเสนอผลงาน

1. Poster presentation; Screening for anti- *Pythium insidiosum* activity among bacteria Isolates from aquatic environment. Pariyachatigul, C. Togsee, Y. Aromdee, C. Puapermpoonsiri, S. : The 7th Conference of Medical Biochemistry 2010 "Insight into Molecular Biology : From Basic knowledge to Applications; 24 May, 2010 Lecture room 4, Faculty of Medicine, Khon Kaen
2. Poster presentation : Screening for anti-*Pythium insidiosum* activity among bacsolates teria isolates from aquatic environment . Pariyachatigul, C. Togsee, Y. Aromdee, C. Puapermpoonsiri, S. การประชุม The 7th CMB 2010 The conference of medical biochemistry - Insight into Molecular Biology: From Basic Knowledge to Application : 24th May, 2010 ; Lecture room 4, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.
3. Poster presentation : Rapid molecular diagnosis of human pathogenic *Pythium insidiosum* . Pariyachatigul, C. Togsee, Y. Aromdee, C. Puapermpoonsiri, S. การ

ประชุม The 1st Conference of Biomedical Science –A novel concurrence research : July 14th, 2010; 8th floor, Faculty of Associated medical sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen Thailand.

4. Poster presentation ; Effect of antifungal compounds produced by environmental bacteria on physiological activities of human pathogenic *Pythium insidiosum* . Pariyachatigul, C. Togsee, Y. Aromdee, C. Puapermpoonsiri, S. การประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 10 วันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 ณ โรงแรมฮอติเคย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
5. Poster presentation; Screening for anti- *Pythium insidiosum* activity among bacteria Isolates from aquatic environment. Pariyachatigul, C. Togsee, Y. Aromdee, C.การประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 9 วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 ณ โรงแรมฮอติเคย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
6. Oral presentation : Isolation and partial characterization of antifungal compounds from environmental bacteria. Togsee, Y. Pariyachatigul, C. Aromdee, C. Puapermpoonsiri, S. การประชุม The 1st Kamphaengsaen International Natural Products Symposium: The Relationship Between Living Organisms and Environment : 23-24 Oct, 2010 ; Swissotel Le Concorde Hotel, Bangkok, Thailand.

การจดสิทธิบัตร

เนื่องจากสารที่แยกได้เป็นสารใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.insidiosum* มาก่อน จึงอยากจะทำเรื่องของจดสิทธิบัตร แต่กระบวนการยังไม่แล้วเสร็จ เพราะต้องผ่านขั้นตอนขออนุสิทธิบัตรหลายฝ่ายก่อน

การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆทั้งในและต่างประเทศ

กำลังดำเนินเรื่องติดต่อกับ Prof. Petr Hamal ที่สาธารณรัฐเชคเนื่องจากมีนักศึกษาได้รับทุนคปท.จึงสามารถจัดสรรทุนให้สน. ปริญญาเอกที่จะไปต่างประเทศได้ซึ่งขณะนี้ กำลังพิจารณาตัดสินใจช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อไป

ปัญหาและอุปสรรค

เนื่องจากผู้วิจัยประสงค์จะส่งผลงานวิจัยเพื่อขอจดสิทธิบัตรก่อน ซึ่งมีขั้นตอนหลายขั้นตอน ก่อนการจดสิทธิบัตรนั้นจะเสนอข้อมูลสู่สาธารณะไม่ได้ ดังนั้นจึงยังไม่ได้ส่งผลงานไปตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ ส่วนที่ได้นำเสนอในแบบ poster และ oral นั้นไม่ใช่ข้อมูลสำคัญซึ่งถ้าจะเอาไปตีพิมพ์ก่อนก็อาจจะไม่ได้รับการตอบรับจากวารสาร จึงทำให้ยังไม่มีผลงานตีพิมพ์

ภาคผนวก

ร่าง manuscript (ยังไม่สมบูรณ์)

Isolation and partial characterization of anti -*Pythium insidiosum* compounds from environmental bacteria

ABSTRACT

Aims: A bacterial strain producing antifungal metabolites had antagonistic activity against human pathogenic fungus-like *Pythium insidiosum*.

Method and result: A total of 88 isolated aquatic bacteria belonging to of 7 genera, were isolated from water source collected in different area inside the northeastern part of Thailand. Two screening methods were performed for antifungal activity to *P.insidiosum*. , 16 isolated (18.18%) were speculated to produce the metabolites having antifungal activity. Among aquatic bacterial tested, the effect of *Pseudomonas stutzeri* ST1302 had the greatest beneficial characteristic to inhibit the growth of *P.insidiosum*. The antifungal metabolite by *P. stutzeri* ST1302 was extract, purified and characterized using ¹H-NMR, thin-layer and column chromatography were partially identified.

Conclusion: The antifungal metabolite produced by *P.stutzeri* ST1302 demonstrated significant activity against human pathogenic *P.insidiosum*. The compound has been identified as [...] on the basis of ¹H-NMR and MS data.

Significance and Impact of the Study: Since drug are not effective to cure pythiosis. This is the first time that *P.stutzeri* ST1302 has been report for anti-*P. insidiosum* activity. It is potential as antifungal producing strain that may be crucial for new strains of *Pseudomonas* spp. showing rich source of useful metabolites for developing novel antifungal drugs/or probiotics.

Keywords: antimicrobial screening, isolation and purification methods, antifungal compound, anti-*P.insidiosum* metabolites.

INTRODUCTION

Pythiosis is a granulomatous disease caused by *Pythium insidiosum*, a fungus-like organism classified in the kingdom Stramenopila, phylum Oomycota, Class Oomycetes, Order Pythiales and family Pythiaceae which typically occurs in tropical and subtropical regions of the world. [8] The genus *Pythium* comprised more than 200 species, and the majority of them are soil saprobes and plant pathogens. Only *P.insidiosum* is pathogenic to mammals.[9] Human pythiosis was first document from Thailand in 1985. [11] Four different forms of pythiosis were described: a) the subcutaneous form (infecting the face or limbs as a granulomatous and ulcering lesion), b) the vascular form (affecting arteries and resulting in arterial occlusion and aneurysm), c) the ocular and orbital forming which corneal ulcer were formed, d) pythiosis and infection of unusual placed (i.e. disseminated pythiosis and infection of internal organs) [3] Since *Pythium* is not a true fungus and does not utilized ergosterol as the main sterol in cellular membrane that the reason why conventional antifungal therapy are usually ineffective. [10] The high morbidity and mortality rate result also from short coming of the currently available therapeutic arsenal.[12] Consequently, developing natural alternatives that are environmentally friendly and have low mammalian toxicity are need. The work on bacterial species is emphasized for isolating less toxic bioactive metabolites including antifungals.[12,13] Bacterial of the genus *Pseudomonas* comprise a large group of the active strain as a result of their general ability to produce a diverse array of potent antifungal metabolites include simple metabolites such as 2,4-diacetylphloroglucinol, phenazine-1-carboxylic acid and pyrrolnitrin [3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl)-pyrrole], as well as the complex macrocyclic lactone, 2,3-de-epoxy-2,3-didehydra-rhizoxin and secondary metabolites such as siderophore, HCN and protease that showed antagonistic activity against *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, *Pythium* sp. and *Fusarium* sp. [14,15] Various products of *Pseudomonas* species were report to be active against different type of fungi, i.e. *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, and *Fusarium oxysporium*. [16] In the process of searching for useful natural products, screening of less-exploited microbes may increase the chance to obtain novel metabolites. We screened the bacterial strains isolated from the swampy area that were the habitat of *P. insidiosum* and investigated on the production of antimicrobial compounds that have the antifungal properties against *P. insidiosum*.

MATERIALS AND METHODS

Screening for antagonistic bacteria against the test fungi

Bacteria were isolate from surface of stagnant water source collected in the northeastern part of Thailand. The water samples were measured for temperature and pH before screening testing. Inoculate the water samples with *P. insidiosum* material plug (1×1 cm) from the edge of the SDA plate cultured for five days and co-culture in water samples at 25°C for 3 days in the dark. The material of *P. insidiosum* was re-cultured on SDA plate if it could not growth the bacterial isolated from samples were selected. One hundred µl of selected water samples were poured on the surface of NA plate and incubate at 37°C overnight for single colony isolation. The growing colonies on NA were re-subculture and kept at -20°C in skim milk additive with 5% glycerol used as a stock cultured. The selected bacterial isolates were examined for their ability to produce antifungal metabolites against human pathogenic fungi, *P. insidiosum*, were carried out according to agar-well diffusion and pour plate technique. The antagonistic bacterial isolates were selected for further study.

Pathogen

Clinical isolates of *P. insidiosum* stain SIMI 6666 [C-K], a control strain was obtained from Microbiology department, Mahidol University, Bangkok (Thailand). These fungi were cultured in the laboratory on Sabouraud dextrose agar plates.

Identification of bacterial isolates

The active bacterial isolates were subculture on Mac conkey (MAC) and Blood agar (BA) plate and incubate at 37°C overnight for isolation of a single colony. Morphological and gram stain were collected and all isolated colony and were subject to identified into species level according to identification with the VITEK 2 system. They were performed with ID-GNB cards, according to the manufacturer's instructions. The results were interpreted by the ID-GNB database after the incubation period of 3 h. The ID-GNB database contained 101 different taxa of gram-negative rods.[18]

Microorganism and culture conditions

.....

Antifungal assay

Antifungal assay was performed on 9-cm Petri plate contained 20 ml of SDA medium. A fungal plug (1×1cm) cut from the outer edges of a five day old cultured of *P.insidiosum* was placed in the centre of the plate. Aliquot 20 µl of the supernatant previously sterilized through a 0.45 µm pore-size membrane. Cell-free supernatant was applied on cellulose disc (6mm) on SDA plate previously inoculated with tested fungi. [6] For crude antifungal metabolites extracted from liquid cultures, a control considered of filter sterilized distilled water and of a 100% dichloromethane for the dichloromethane extracting residue. Plate were kept at RT for 2 h in the laminar flow cabinet to allow the diffusion of the sample, then were inverted and incubated at 25°C for 3,6 and 9 days. The results were reported as inhibited the mycelial growth of *P.insidiosum*. The experiment was repeated twice.[5]

Extraction, purification and characterization of antifungal metabolite

The strain *P. stutzeri* ST1302 was grown in Brain Heart Infusion broth (BHI, BBL) at 37°C for 72 h with agitation 200 rev min⁻¹. The fermented broth was centrifuge at 8000 g, 25°C for 15 min in order to remove the cells and sterilized by filtration. (0.45 µm pore-size membrane) The cell free supernatant (20 l) was extracted into equal volume of dichloromethane. The combine organic layer was concentrated under reduced pressure and the crude extract was test for antifungal activity against *P.insidiosum*. The crude extract was chromatographed over silica gel eluting with dichloromethane-methanol mixtures (2% MeoH) and finally with methanol. The purified fractions were tested antifungal activity following by the disc diffusion method. [ref 1986] Active fractions were pooled together and concentrated using evaporator at 50°C. The structured of antagonistic metabolite was establish by the study of nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectroscopy (MS). The ¹H-, DQCOSY- and NOESY-NMR spectra were recorded using a 600 MHz spectrometer [၇၃၅၃၅၅] ¹³C-NMR spectrum was record on 200 MHz NMR spectrometer. The MS data were recorded using [၇၃၅၃၅၅]

Sensitivity to enzyme, pH and heat

For enzyme stability, the partially purified dichloromethane crude extract was treated for 2 h with proteinase K (pH 8.5) enzyme at a final concentration of 1mg ml⁻¹. The mixture was then assayed for inhibitory activity against *P.insidiosum* by the disc diffusion method. pH stability was estimated in the dichloromethane crude extract after 4 h of storage 4°C in the following buffers, 50 mM citrate buffer; pH 3-5, phosphate buffer; pH 6-7; 50 mM Tris-HCl buffer; pH 8-9. To determine the effect of heat on antifungal activity, aliquots (100 µl) of the crude extract were incubated at various temperatures (40, 60, 80 and 100°C) for 30 min, or 121°C for 15 min. The residual activity was determined their ability of antifungal activity by the disc diffusion assay. All data were averaged from duplicate trials.

Solubility in organic solvents

Antifungal antibiotics were dissolved in diluted (75%) solutions of organic solvent. (acetone, acetonitrile, ethanol, and 2-propanol) Solution was kept at 25°C for 1 h. One ml of each solution was centrifuged at 8,000 ×g to removed insoluble fractions. The solution was then evaporated to dryness at 50°C in a water bath. Dried residues were reconstituted with 100 µl of distilled water and assayed for antifungal activity against mycelial growth of *P.insidiosum*. The disc diffusion test was used as described previously.

RESULTS

Isolation and screening the bacterial isolates for antagonistic activities against the test fungi

Eighty eight strains were isolated from water sample that could suppression the growth of *P.insidiosum*. Among 88 strains, only 16 strains show antagonistic ability by inhibit the growth from both screening method. According to the identification by a automated antibiogram, VITEK 2 system interpretation systems (bioMe'rieux Marcy-l'Etoile, France). [Sixteen of antagonistic bacterial isolates were identified to the genus *Acenitobacter baumannii* complex, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas stutzeri*, and one strain was suspected to genus *Bacillus* spp. (Table 1) Only one isolate, designated as ST1302 had a strongest inhibition from dual culture in both screening method and identified as *P. stutzeri* on the basis of morphological and biochemical test by VITEK 2 system.

Production, purification of the partially purified antifungal metabolite

Several purification step were required to purified the antifungal metabolites from crude dichloromethane extract (1.31 g) obtained from *P.stutzeri* ST1302 was yellowish in colour which purification through silica gel and each of purified fractions that contained antifungal activity was evaporated and used for chemical characterization, including spectroscopic analysis.

Structural analysis of the purified compound

pH and thermal stability

The study of sensitivity to pH showed that the partially purified antifungal metabolites of the crude dichloromethane extract were treated in the range of 3.0-9.0. The metabolites was relatively heat stable under heat treatment: the inhibitory activity were maintained in treatments of 40, 60 and 80°C but inactivated at 100°C for 30 min or at 121°C for 15 min (Table 2) The partially purified antifungal was soluble in polar solvents test. A complete loss of activity against *P.insidiosum* was obtained after treatment with proteinase K enzyme.

DISCUSSION

In this research, we obtained interesting and promising results for successful inhibited the mycelial growth of *P.insidiosum* using biological natural products from *P.stutzeri* ST1302. The antifungal activity was resistance to high temperature, a wide range of pH and action if hydrolytic enzyme. These characteristic indicated that the antifungal compound may belong to the [...] group of antibiotics. [ref] Production of antifungal metabolite has been known to be influenced by media components and cultural conditions, such as aeration, agitation, pH, temperature and glycerol concentration, which vary from organism to organism. [17]

In our earlier studies we observed that

Various types of the bacteria from *Pseudomonas* spp. is now well establish as a biological control underlying the ability to produce antifungal compound involving both the metabolites and enzyme. These include a range of secondary metabolites include pyoluteorin, pyrrolnitrin, 2,4- diacetylphloroglucinol, phenazines and mupirocin. [19] One of these, difference *Pseudomonas* isolates has also been attributed to the production of siderophores, pyridine-2,6-dithiocarboxylic acid (PDTC), produced by *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas putida*, can

complex different metals and has antimicrobial properties including antifungal activity against different types of fungi, i.e. *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* and *Fusarium oxysporium*. [20] In our study also, we revealed the significant activity of the supernatant of *Pseudomonas* against human pathogenic fungi, *P. insidiosum*. It has been report for the first time that the products recovered in supernatant of *P.stutzeri* ST1302 had potential activity against human pathogen. The active metabolites are characterized by the presence of [... structure description ...]

In summary, *P.stutzeri* ST1302 produced antifungal compounds inhibiting mycelial growth of pathogenic fungi, *P.insidiosum*. The compounds are heat stable and active over wide range of pH values.

Therefore, it is important to research further into the mass production and application techniques of these antifungal metabolites to complete chemical structure and the mechanism of these potentially metabolite which purpose to discover a new valuable anti-fungal drugs.

Acknowledgements

We are very grateful to Professor Petr Hamal for editing the English of the manuscript. This research work was supported by the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D Program (Grant no. PHD/0071/2551) to U.Y. and R.W.S., the Commission on Higher Education (CHE), Thailand, and the Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL) Faculty of Associated medical sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Table X. The bacterial strains that could inhibit the mycelial growth of *P.insidiosum*

Bacterial NO.	Gram stain	Identification	VITEK 2 system confidence level
1. 2512	Gram negative coccobacilli	<i>Acenitobacter baumannii</i> complex	99%
2. 3601	Gram negative bacilli	<i>Enterobacter cloacae</i>	93%
3. 3604	Gram negative bacilli	<i>Enterobacter cloacae</i>	93%
4. 2501	Gram negative coccobacilli	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp pneumoniae	93%
5. 2503	Gram negative coccobacilli	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%
6. 2504	Gram negative coccobacilli	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%
7. 2401	Gram negative bacilli	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	99%
8. 2206	Gram negative bacilli	<i>Aeromonas sobria</i>	98%
9. 1302	Gram negative bacilli	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%
10. 40801	Gram negative coccobacilli	<i>Acenitobacter baumannii</i> complex	99%
11. 62302	Gram negative coccobacilli	<i>Acenitobacter baumannii</i> complex	99%
12. 3602	Gram negative bacilli	Low discrimination	
13. 2502	Gram negative bacilli	Low discrimination	
14. 2201	Gram negative coccobacilli	Low discrimination	
15. 40803	Gram negative coccobacilli	Low discrimination	
16. 1301	Gram positive bacilli	suspected <i>Bacillus</i> spp. (Routine biochemical test)	

Table X. Stability of the antifungal metabolites extracted by *Pseudomonas stutzeri* ST1302 to heat, hydrolytic enzyme and pH treat against *Pythium insidiosum*

Treatment	Growth inhibition zone (GIZ)* (mm)
Temperature	
Control	NI
121°C for 15 min	NI
100°C	
80°C	
60°C	
40°C	
Enzyme	
Control	
Proteinase K	NI
pH	
pH 3-5	
pH 6-7	
pH 8-9	

*Diameter of clear zone around the disc inoculated with extracted antifungal metabolite.

NI, no inhibition.

Fig. X Proton nuclear magnetic resonance spectrum of metabolite by *Pseudomonas stutzeri* ST1302

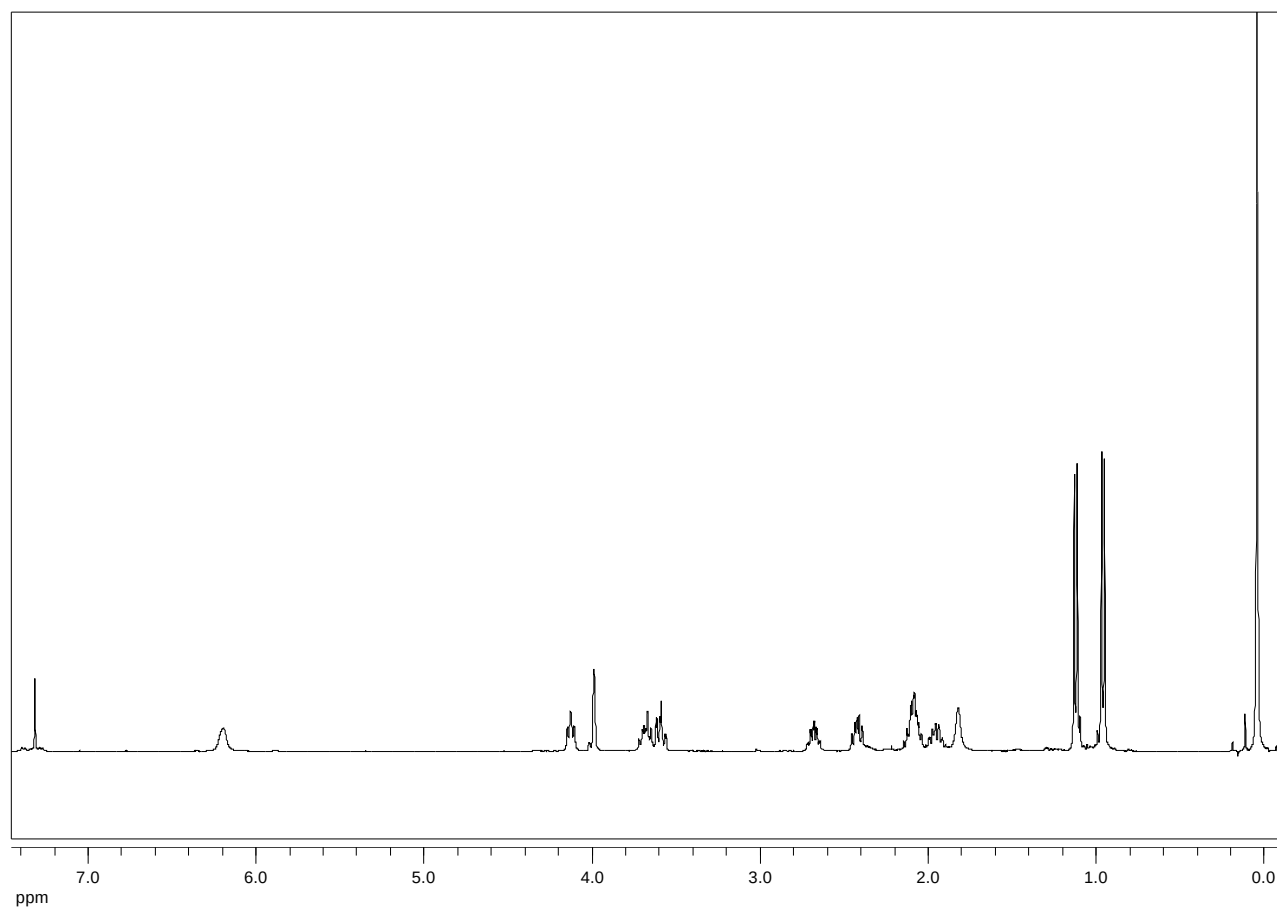


Fig. X ^{13}C nuclear magnetic resonance spectrum of metabolite by *Pseudomonas stutzeri* ST1302

