



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดกรองยีสต์จากธรรมชาติที่มีความสามารถในการต้าน
แบคทีเรียแกรมลบ

ชื่อนิสิต นางสาวพิมพ์ชนก พงศ์ทวีช รหัสประจำตัว 6032337523

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การคัดกรองยีสต์จากธรรมชาติที่มีความสามารถในการต้านแบคทีเรียแกรมลบ		
ชื่อนิสิต	นางสาวพิมพ์ชนก พงศ์ทวีช	เลขประจำตัว	6032337523
ภาควิชา	จุลชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2563		

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การคัดกรองยีสต์จากธรรมชาติที่มีความสามารถในการต้านแกรมลบ

Screening of yeasts from nature capable of inhibiting Gram-negative bacteria

นิสิตในโครงการ

นางสาวพิมพ์ชนก พงศ์ทวีช

รหัสประจำตัวนิสิต 6032337523

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การคัดกรองยีสต์จากธรรมชาติที่มีความสามารถในการต้านแบคทีเรียแกรมลบ

นิสิตในโครงการ นางสาวพิมพ์ชนก พงศ์ทวีช

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดกรองยีสต์จากธรรมชาติที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Escherichia coli* MSCU 0349 และ *Pseudomonas aeruginosa* MSCU 0359 ในเชิงคุณภาพโดยผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบด้วยวิธี agar overlay technique โดยใช้โคโลนีเดี่ยวของยีสต์ไอโซเลต พบว่า ไม่มียีสต์ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ได้ และมียีสต์ 3 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ได้แก่ ยีสต์ไอโซเลตที่ 34, 50 และ 53 ซึ่งยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลตนี้มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวรูปทรงแท่ง และคัดกรองได้จากน้ำทะเล และเมื่อทำการทดลองต่อไปโดยการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของ ส่วนน้ำใส, เซลล์มีชีวิต และ เซลล์ที่โซนิเคต ของยีสต์ไอโซเลตด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า ส่วนน้ำใส และ เซลล์ที่โซนิเคต ของยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลต ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ แต่เซลล์มีชีวิต ของยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลต นั้นสามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ ทั้งนี้จากผลการทดลองจึงทำให้พบยีสต์จากธรรมชาติที่สามารถต้าน *P. aeruginosa* จึงอาจจะเป็นทางเลือกใหม่ในอนาคตที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย แต่ทั้งนี้งานวิจัยนี้ยังจำเป็นต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความปลอดภัยในการใช้ยีสต์ดังกล่าวกับร่างกายมนุษย์ต่อไป

Project title Screening of yeasts from nature capable of inhibiting Gram-negative bacteria

Investigator Pimchanok Pongtawit

Advisor Assistant Professor Supat Chareonpornwattana, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

This research project purpose is to screen yeasts from nature that have ability to inhibit two species of Gram-negative bacteria that were *Escherichia coli* MSCU 0349 and *Pseudomonas aeruginosa* MSCU 0359 in term of quality. The test results for the inhibition of Gram-negative bacteria by the agar overlay technique using a single colony of isolate yeast found that no isolate yeast was able to inhibit *Escherichia coli* and there were three isolate yeast that could inhibit *Pseudomonas aeruginosa* that were 34th 50th and 53rd isolate yeast. These three isolate yeasts were single cell, rod-shaped and screenable from sea water. Research continues by compare ability to inhibit Gram-negative bacteria of supernatant, living cell and sonicated cell of isolate yeast using agar well diffusion method. It found that supernatant and sonicated cell of each three isolate yeast could not inhibit *P. aeruginosa*, but living cell of each three isolate yeast could inhibit *P. aeruginosa*. This experiment found natural yeasts that have ability to inhibit *P. aeruginosa*. This may be a new option of bacterial infections treatment in the future. But further research about the safety of using such yeast for the human body is needed to be done.

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยโครงการเสริมสร้างประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และแนวคิดต่าง ๆ ตลอดจนเป็นแรงผลักดันและกำลังใจที่ดีตลอดในการทำวิจัยนี้ รวมถึงปรับปรุงข้อบกพร่องต่าง ๆ ทำให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์ และบรรลุเป้าหมายตามวัตถุประสงค์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุก ๆ ท่าน ที่คอยให้คำแนะนำ และสนับสนุน ตลอดระยะเวลาการศึกษาและการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณห้องวิจัยของรองศาสตราจารย์จิราภรณ์ ธนียวัน และนิสิตภายในห้องวิจัย ที่ให้ยืมอุปกรณ์ต่าง ๆ พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่ดีการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ นายณัฐภัทร โตรัตน์ เพื่อนนิสิตร่วมโครงการที่คอยช่วยเหลือทั้งในเรื่องการทำงานวิจัย และช่วยผลักดันในยามหมดกำลังใจ

ขอขอบพระคุณทั้งรุ่นพี่ เพื่อน รุ่นน้องทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยาที่คอยรับฟังปัญหา ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณสมาชิกทุกคนในชมรมศาสนศึกษาแผนกคริสเตียน ที่คอยอธิษฐานอวยพร เป็นกำลังใจที่ดี รวมถึงการสนับสนุนสิ่งของต่าง ๆ และให้คำแนะนำตลอดการศึกษาและการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกทุกคนในครอบครัวทุกคนที่คอยให้กำลังใจ สนับสนุน และให้ความช่วยเหลือตลอดจนสำเร็จการศึกษา

และท้ายที่สุดขอขอบคุณพระเจ้าที่ทำให้ทุกอย่างสำเร็จลงได้ด้วยดี

นางสาวพิมพ์ชนก พงศ์ทวีช

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	11
บทที่ 4 ผลการทดลอง	15
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	21
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	30

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.3	ยีสต์ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้	16
4.5	ขนาดโชนยับยั้งของส่วน ส่วนน้ำใส, เซลล์มีชีวิต และ เซลล์ที่โชนิคต ของยีสต์ไอโซเลต ต่อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	กลไกการอักเสบของลำไส้ที่ติดเชื้อ Enterobacteriaceae	1
1.2	การส่งผ่านพลาสมิดที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะโดยวิธี Conjugation	4
4.2	การยับยั้ง <i>P. aeruginosa</i> ของยีสต์ไอโซเลตหมายเลข 34 49 50 51 53 และ 54	15
4.3	โซนยับยั้งของยีสต์ไอโซเลตที่ 34 50 และ 53 ที่มีต่อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
4.4	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X ของยีสต์ไอโซเลตที่ 34 50 และ 53 และภาพขยายเพื่อแสดงลักษณะเซลล์รูปทรงกระบอกของ ยีสต์ไอโซเลตที่ 34 50 และ 53	17
4.5	โซนยับยั้งของส่วน ส่วนน้ำใส, เซลล์มีชีวิต และ เซลล์ที่เซนนิเคต ของยีสต์ไอโซเลตที่ 34 50 และ 53 ต่อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19

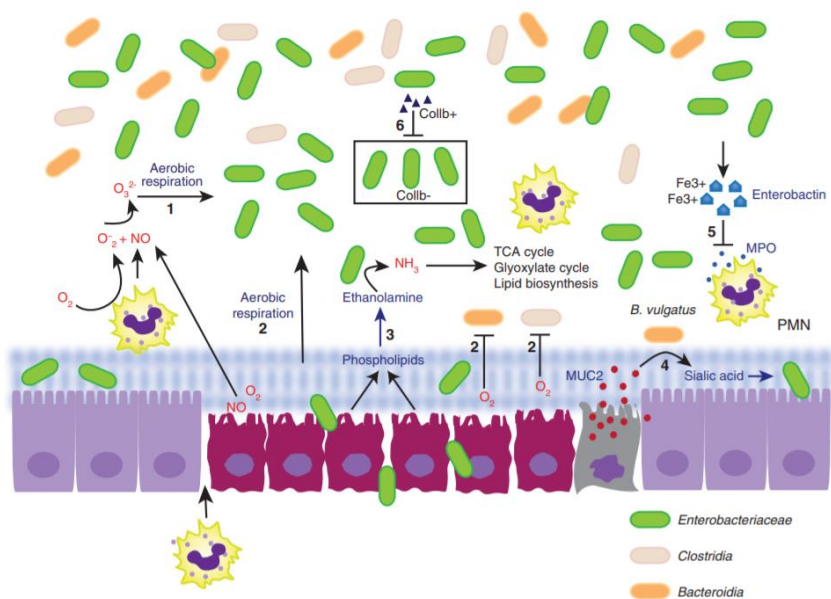
บทที่ 1

บทนำ

โรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย เกิดจากการที่ร่างกายติดเชื้อแบคทีเรียและแบคทีเรีนั่นก่อให้เกิดโรคขึ้นมา โดยความรุนแรงของการก่อโรคจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ปริมาณเชื้อที่ได้รับ ระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน และชนิดของแบคทีเรียก่อโรค (Doron, 2008) โดยแบคทีเรียก่อโรคนี้อาจก่อโรคให้แก่มนุษย์ได้ด้วยวิธีการหลายอย่างเช่น

1) การสร้างสารพิษ (Toxin) และสารพิษนั้นจะก่อให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ของมนุษย์ ตัวอย่างเช่น *Staphylococcus* จะสร้างสาร Coagulase ซึ่งจะส่งผลให้เลือดไม่แข็งตัว (Zell และคณะ, 2008 : Medical Microbiology 4th edition, 1996) และ *Escherichia coli* สามารถสร้างเอนโดทอกซิน (Endotoxin) และอาจทำให้เกิดภาวะช็อกได้ (Fueyo และคณะ, 2005)

2) กระตุ้นให้ภูมิคุ้มกันของร่างกายตอบสนองด้วยการอักเสบ ทำให้เกิดอาการปวด บวม แดง ร้อน ในบริเวณที่มีการติดเชื้อ ซึ่งผลของการอักเสบนี้ส่วนหนึ่งอาจจะทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปกติที่ไม่ได้ติดเชื้อที่อยู่ใกล้เคียงได้ (Nash และคณะ, 2015; Zeng และคณะ, 2017)



รูปที่ 1.1 กลไกการอักเสบของลำไส้ที่ติด Enterobacteriaceae (Zeng และคณะ, 2017)

3) แบคทีเรียก่อโรคบางชนิดสามารถแพร่กระจายไปทั่วร่างกายได้ โดยเมื่อแบคทีเรียเพิ่มปริมาณมากขึ้นในร่างกายของมนุษย์ แบคทีเรียจะสามารถไปยังส่วนอื่น ๆ ได้ ผ่านการติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) ซึ่งสามารถก่อให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้นและการทำลายอวัยวะอื่น ๆ จนเกิดภาวะช็อกจากการติดเชื้อ (Septic shock) และเป็นเหตุให้เสียชีวิตได้ (Bullock, 2020)

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่มคอคิลลiform รูปร่างเป็นท่อน (bacilli) สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่มักพบในลำไส้ส่วนล่างของสัตว์เลือดอุ่น (homeotherm) (Frick และคณะ, 2018) โดยส่วนมาก *Escherichia coli* จะไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ยกเว้นบางชนิดที่สามารถทำให้เกิดโรคคือ Enterovirulent *Escherichia coli* group (EEC group) โดยจะแบ่งออกเป็น 5 ประเภทคือ

1) Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในนักเดินทาง โดยการผลิต Enterotoxin ที่ทนต่อความร้อน โดย Enterotoxin จะเป็นพิษต่อเยื่อบุผิวของผนังลำไส้ ทำให้ร่างกายสูญเสียน้ำและคลอไรด์ ไอออนเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้เกิดอาการ ท้องร่วง ปวดท้อง ไข้ต่ำ ปวดหัว และปวดกล้ามเนื้อได้ (Meraz และคณะ, 2008)

2) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในทารกและเด็กอายุน้อยกว่า 1 ปี โดยมักเกิดในประเทศที่กำลังพัฒนา โดย EPEC จะเข้าเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กและทำให้เกิด Attaching and effacing lesion (A/E lesion) (Cleary และคณะ, 2004 : Knutton และคณะ, 1993) นอกจากนี้พบว่า EPEC บางสายพันธุ์มี EPEC adherence factor (EAF) plasmid ทำให้ EPEC เกาะแบบ Localized adherence กับเซลล์เพาะเลี้ยงได้อีกด้วย (Franke และคณะ, 1994)

3) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงรุนแรงเป็นเลือด (hemorrhagic colitis) โดยเชื้อกลุ่มนี้มีสมบัติในการสร้าง virulence factor ที่สำคัญคือการสร้างพิษ Shiga toxin ซึ่งสารพิษชนิดนี้จะสามารถเข้าสู่กระแสเลือดและเข้าไปทำลายเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนรุนแรงของกลุ่มอาการเม็ดเลือดแดงแตก รวมถึงทำลายเซลล์ไต ทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน (Hemolytic uremic syndrome) และเสียชีวิตได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในผู้ป่วยวัยเด็กหรือผู้สูงอายุ (ฉันทการย์ ศรีวรมาศ, 2555)

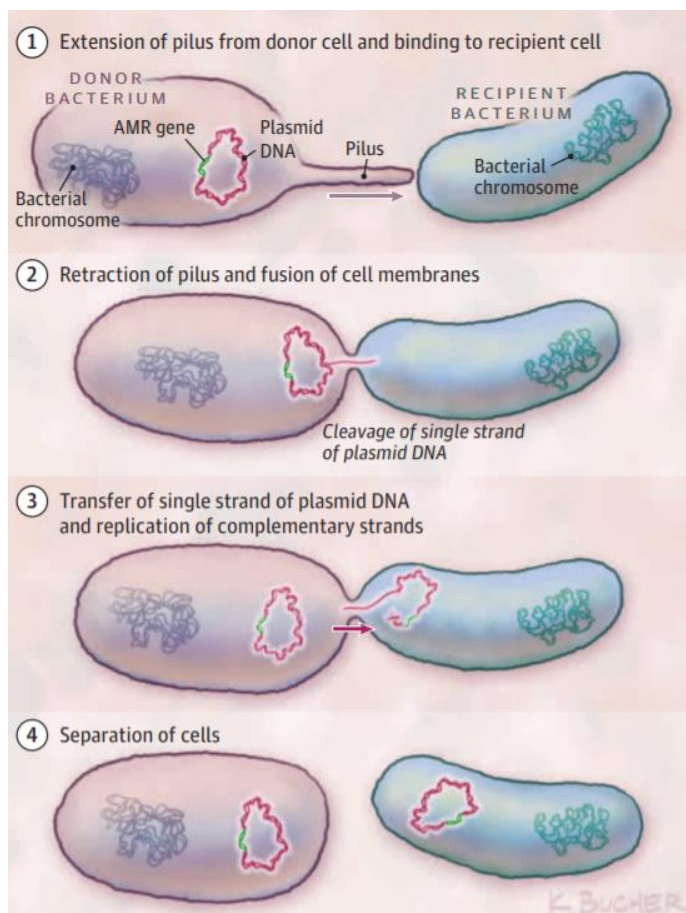
4) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ทำให้เกิดโรคแผลในลำไส้ โดยสายพันธุ์นี้ จะไม่มีการสร้าง Enterotoxin แต่จะทำลายเซลล์ของโฮสต์โดยการเข้าไปใน epithelial cell และกระจายตัวไปยังเซลล์ข้างเคียง โดยเมื่อติด EIEC จะอาจทำให้มีอาการท้องร่วงแบบมีเลือดปนได้ (Azer, 2021)

5) Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) เป็นสาเหตุของอาการท้องร่วงแบบเฉียบพลัน และยังสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะได้อีกด้วย (Nataro, 2006 : Hebbelstrup, 2014)

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน (bacilli) ไม่สร้างสปอร์ มีการดำรงชีวิตแบบใช้ออกซิเจน (obligate aerobe) พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปและสามารถเจริญได้แม้ในภาวะที่มีอาหารจำกัด โดย *P. aeruginosa* แบคทีเรียก่อโรคที่พบได้บ่อยในโรงพยาบาลเนื่องจากเชื้อจะโตได้ดีบนพื้นผิวที่มีความชื้นสูง (สุนทรีย์ เขียนทอง, 2546) จึงสามารถพบได้บนอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่มีความชื้น เช่น สายสำหรับสอดท่อ จึงทำให้เชื้อชนิดนี้เป็นปัญหาสำคัญในการติดเชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic infection) ของคนไข้ในโรงพยาบาล โดยเชื้อชนิดนี้สามารถเจริญได้ด้วยการใช้สารอินทรีย์ได้หลากหลาย ทำให้เมื่อเกิดการติดเชื้อเข้าสู่เลือดของมนุษย์แล้วจะสามารถเพิ่มจำนวนได้ง่ายในผู้มีภูมิคุ้มกันต่ำ (Balcht และคณะ, 1994) นอกจากนี้ *Pseudomonas aeruginosa* ยังมีการดื้อยาโดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) และยังสามารถในการรับสมบัตการดื้อยาจากภายนอกเซลล์ (acquired resistance) ได้ดี (Pang และคณะ, 2019) โดยกลไกการดื้อยาของเชื้อจะมีหลายรูปแบบ เช่น การสร้างเอนไซม์มาทำลายยา เช่น เอนไซม์ AmpC Beta-lactamase (Livermore และคณะ, 1997), การละทิ้ง Specific outer membrane porin protein OprD2 ซึ่งจะทำให้เชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดลดลง (Livermore และคณะ, 1997), การกลายพันธุ์ในโครโมโซมที่เป็นตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยา เช่น การเปลี่ยนแปลงของ DNA gyrase A subunit (Mouneimne และคณะ, 1999) เป็นต้น ทำให้ *P. aeruginosa* ค่อนข้างมีความอันตรายต่อผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ในเด็กหรือผู้สูงอายุ หรือผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน (Balcht และคณะ, 1994)

ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) เป็นยาที่มีฤทธิ์ในการฆ่า ทำลาย หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จึงถูกนำมาใช้ทางการแพทย์เพื่อป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยยาปฏิชีวนะแต่ละกลุ่มก็จะมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียต่างชนิดกัน (Aminov, 2017) แต่ในปัจจุบันเนื่องด้วยประสิทธิภาพที่ดีและการเข้าถึงยาปฏิชีวนะที่ง่าย ทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากและนำไปสู่การใช้ยาปฏิชีวนะในทางที่ผิดทำให้เกิดปัญหาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะลดลงเนื่องจากแบคทีเรียมีการปรับตัวให้มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้น อีกทั้งเชื้อยังสามารถส่งผ่านยีนที่มีสมบัตการดื้อยาปฏิชีวนะไปยังเชื้อตัวอื่น ๆ ได้ ส่งผลให้มีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาอย่างรวดเร็ว (Lerminiaux และ Cameron, 2019) ปัญหาดังกล่าวได้แพร่กระจายเป็นวงกว้างจนเป็นปัญหาสำคัญของระบบสาธารณสุขในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก จนองค์การอนามัยโลก (World Health Organization : WHO) ได้ประกาศให้ปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียเป็น "ปัญหาสำคัญเร่งด่วนที่สุดที่

เกิดขึ้นในทุกภูมิภาคทั่วโลกและทุกคนล้วนจะต้องได้รับผลกระทบจากปัญหานี้ไม่ว่าวัยใด หรือประเทศใดก็ตาม (World Health Organization, 2014)



รูปที่ 1.2 การส่งผ่านพลาสมิดที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะโดยวิธี Conjugation (Marston และคณะ, 2016)

นอกจากยาปฏิชีวนะจะก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียแล้ว ตัวยาปฏิชีวนะเองก็ยังสามารถก่อให้เกิดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์อีกหลายประการ (Singh และคณะ, 2014) โดยอาการไม่พึงประสงค์เหล่านี้อาจเกิดจากสมบัติทางเภสัชวิทยาของยานั้นเอง หรือเกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันไวเกิน หรือการแพ้ยา (Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food, 2012) โดยอาการไม่พึงประสงค์นี้สามารถพบได้ตั้งแต่อาการเล็กน้อยที่ไม่รุนแรง เช่น ไข้ ท้องเสีย เกิดผื่นคัน คลื่นไส้ และลมพิษ จนถึงอาการที่รุนแรงอย่างปฏิกิริยาการแพ้ยาได้ เช่น เกิดผื่นแพ้แสงแดด (photodermatitis) หรืออาการช็อกแอนาฟิแล็กซิส (anaphylactic shock) ซึ่งเกิดจากการแพ้ยาเพนิซิลิน (Farber และคณะ, 1954) แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจะรุนแรงมากหรือน้อย

ขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของยา ขนาดที่ได้รับ และวิธีรับยาปฏิชีวนะเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งจากปัญหาของยาปฏิชีวนะทั้งหมดที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ทั้งในแง่ของการเพิ่มเชื้อดื้อยาให้กับสิ่งแวดล้อมและในแง่ของความเสียหายที่ร่างกายจะได้รับจากการใช้ยาปฏิชีวนะ จึงควรถือว่าเรื่องนี้เป็นปัญหาที่ต้องได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วน ในปัจจุบันจึงเริ่มมีงานวิจัยที่ศึกษาเรื่องการใช้ยีสต์ปฏิชีวนะในการรักษาโรคที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย แทนการใช้ยาปฏิชีวนะ (Roussel และคณะ, 2018)

ยีสต์ เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นเซลล์แบบยูแคริโอต เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวในกลุ่มฟังไจ (Fungi) ในไฟลัม Ascomycota และ Basidiomycota ซึ่งพบทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งในอากาศ น้ำ และในร่างกายของสิ่งมีชีวิต และบางชนิดยังเป็นเชื้อประจำถิ่นในมนุษย์และในพืชอีกด้วย (Hatoum และคณะ 2012) ยีสต์มีความสำคัญในระบบนิเวศอย่างซับซ้อน และยังเป็นส่วนหนึ่งของสารตั้งต้นของอาหารในระบบนิเวศ อีกทั้งยีสต์ยังมีปฏิสัมพันธ์กับจุลินทรีย์อื่น ๆ ในระบบนิเวศในหลายรูปแบบ เช่น ภาวะสมานชีวิน (Symbiosis), ภาวะพึ่งพากัน (Mutualism), ภาวะปรสิต (Parasitism), ภาวะแข่งขัน (Competition) และ ภาวะหลังสารยับยั้งการเจริญ (Antibiosis) (Hatoum และคณะ, 2012) ซึ่งยีสต์บางชนิดจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ซึ่งยีสต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียนี้จะไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกตัว เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละกลุ่มมีลักษณะองค์ประกอบของผนังเซลล์ และความจำเพาะต่อสารที่ยีสต์สร้างขึ้นมาไม่เหมือนกัน (Younis และคณะ, 2017)

ในงานวิจัยนี้จะสนใจเกี่ยวกับการคัดกรองหายีสต์จากธรรมชาติ ได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งสาโท น้ำทะเล น้ำจืด ดิน เปลือกและใบจากผักและผลไม้ ลำไส้สดจากสัตว์ และหัวเชื้อของซาคคอมบูฉะ ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ โดยตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบในงานวิจัยนี้ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้ต่างพบว่ามีความสามารถในการก่อโรคในมนุษย์ทั้งสิ้น ซึ่งวิธีการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ได้รับความนิยมอย่างมากก็คือการใช้ยาปฏิชีวนะ แต่เนื่องจากยาปฏิชีวนะมีผลทำให้เกิดโทษทั้งกับร่างกายและสิ่งแวดล้อม การใช้ยีสต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก็อาจจะเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหานี้ได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1 เพื่อคัดกรองยีสต์จากธรรมชาติที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*

2 เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ

บทที่ 2

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบจากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. *Escherichia coli* MSCU 0349
2. *Pseudomonas aeruginosa* MSCU 0359

แหล่งตัวอย่างจากธรรมชาติที่ใช้ในการคัดแยกยีสต์ไอโซเลต

1. ลูกแป้งข้าวหมากจากจังหวัดร้อยเอ็ด, นนทบุรี, นราธิวาส และมหาสารคาม
2. ลูกแป้งสาโทจากจังหวัดร้อยเอ็ด, นนทบุรี, นราธิวาส และมหาสารคาม
3. น้ำทะเลบริเวณริมป่าชายเลน ได้แก่ สถานที่ตากอากาศบางปู อ.เมือง จ.สมุทรปราการ และ วัดอโศการาม อ.เมือง จ.สมุทรปราการ
4. ดินบริเวณริมป่าชายเลน ได้แก่ สถานที่ตากอากาศบางปู อ.เมือง จ.สมุทรปราการ และ วัดอโศการาม อ.เมือง จ.สมุทรปราการ
5. ดินจากพื้นที่ภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ ข้างอาคารมหาจุฬาลงกรณ์, ข้างสระน้ำภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และหน้าคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์
6. น้ำจากพื้นที่ภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ บ่อน้ำข้างโรงอาหารคณะวิศวกรรมศาสตร์, บ่อน้ำข้างตึกมหามกุฏ คณะวิทยาศาสตร์ และสระน้ำหน้าลานพระบรมรูปสองรัชกาล
7. เปลือกผักและผลไม้ ได้แก่ สับปะรด มะเขือเทศ กัลยง อุ่น พลัม มะม่วง ส้ม และอ้อย
8. ใบผักและผลไม้ ได้แก่ สับปะรดและข้าวโพด
9. ลำไส้เล็กสดของหมูและเป็ด
10. หัวเชื้อของชาคอมบูฉะ

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 16x100, 16x150 และ 25x150 บริษัท Pyrex ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. หลอดทดลองขนาด 16x100 บริษัท Kimax ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. กระบอกตวงขนาด 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร บริษัท Nalgene ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. ขวดดูแรนขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Scohtt ประเทศญี่ปุ่น
5. ขวดดูแรนขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Kimax ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. ขวดรูปขมพู่ (flask) ขนาด 50, 125, 500 และ 1,000 บริษัท Pyrex ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. ปีกเกอร์ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. ซ้อนตักสาร
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
10. ปากคีบ (Forceps)
11. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Bemis ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)
13. ไม้จิ้มฟัน
14. เทปกาวและเทปใส
15. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
16. แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)
17. สำลี
18. อลูมิเนียมฟอยล์
19. จานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก (Petri dish) ขนาด 94x16 มิลลิเมตร บริษัท Greiner Bio-On ประเทศออสเตรเลีย
20. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 20, 100 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส
21. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 10 มิลลิลิตร บริษัท BrandTech Scientific Inc. ประเทศอังกฤษ
22. ทิปขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท TreffLab ประเทศสวีตเซอร์แลนด์
23. ทิปขนาด 200 ไมโครลิตร บริษัท Thermo Scientific ประเทศฟินแลนด์
24. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวีตเซอร์แลนด์
25. เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวีตเซอร์แลนด์
26. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น InnovaTM 2300 บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
27. เครื่องนิ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ รุ่น ss-325 และ ES-315 บริษัท Tomy Digital Biology ประเทศญี่ปุ่น
28. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) บริษัท Contherm Scientific Limited ประเทศนิวซีแลนด์

29. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนขนาดเล็ก (Spin down) บริษัท Tomy Digital Biology ประเทศญี่ปุ่น
30. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
31. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Biomate-35 บริษัท Thermo Scientific ประเทศไทย
32. ตู้บ่มเพาะเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (Incubator) รุ่น INE500 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
33. ตู้บ่มเพาะเชื้อ 30 องศาเซลเซียส (Incubator) รุ่น BE600 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
34. ตู้เย็น (Refrigerator) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บริษัท Sharp ประเทศไทย
35. ตู้ลามินาร์โฟลว (Laminar flow carbinet) CLEAN model. V4 บริษัท Lab service ประเทศไทย
36. เครื่องโซนิเคเตอร์ Vibra-Cell™ บริษัท Sonics & Materials ประเทศสหรัฐอเมริกา
37. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (Eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมัน
38. เครื่องเขย่าผสมสารแบบหมุนวน รุ่น GREEN SSERIKER II บริษัท PNP SCIENCE ประเทศไทย
40. เตาความร้อน (Hot plate)
41. หัวกรองสำเร็จ (Syringe filter) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร บริษัท membrane solution ประเทศจีน
42. ถูพลาสติกใส่อาหารชนิดทนความร้อน ขนาด 12x18 เซนติเมตร
43. พลาสเจอร์ปีเปตต์

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar บริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar บริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. น้ำตาลกลูโคส บริษัท Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย
5. บีฟเอ็กซ์แทรกซ์ (beef extract) HiMedia Laboratories ประเทศอินเดีย
6. เพปโตน(peptone) HiMedia Laboratories ประเทศอินเดีย
7. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

8. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)
9. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)
10. ผงวุ้น (agar) ตรานางเงือก ประเทศไทย
11. phosphate buffered saline (PBS) บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. สีย้อมแลคโตฟีนอล คอทตอลบลู (lactophenol cotton blue)
13. เอทานอล 95% (95% Ethanol)
14. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric) 95% บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
15. แบเรียมคลอไรด์ (Barium Chloride) บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 การคัดกรองยีสต์ไอโซเลตจากธรรมชาติ

นำตัวอย่างจากธรรมชาติมาเจือจาง 10 เท่า ในสารละลาย NaCl 0.85% w/v โดยตัวอย่างที่เป็นของแข็ง ได้แก่ ลูกแป้ง ดิน เปลือกผักและผลไม้ ลำไส้สัตว์ และหัวเชื้อคอมบูชะ จะนำมาบดให้ละเอียด หรือตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และนำมาชั่งอย่างละ 10 กรัม และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ในสารละลาย NaCl 0.85% w/v 90 มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างที่เป็นของเหลว ได้แก่ น้ำทะเล และน้ำจากสระ จะนำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย NaCl 0.85% w/v 90 มิลลิลิตรและเขย่าให้เข้ากัน ต่อมาจึงนำตัวอย่างมาทำการเจือจางแบบอนุกรมครั้งละ 10 เท่า (Ten fold serial dilution) โดยปิเปตตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางใน NaCl 0.85% w/v 9 มิลลิลิตร ให้ความเข้มข้นที่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} จากนั้นจึงปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร มา spread plate บนอาหาร Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ต่อมาจะคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่คาดว่าจะเป็ยีสต์ คือ โคโลนีเดี่ยวที่ไม่มีการสร้างเส้นใยไฮฟา มาแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวโดยการนำมา streak plate บนอาหาร potatoes dextrose agar (PDA) (Roongrojmongkhon และคณะ, 2020) เพื่อนำมาทดลองในขั้นต่อไป

3.2 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบด้วยวิธี agar overlay technique

นำไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อสะกิดที่โคโลนีของยีสต์ไอโซเลตที่คัดกรองได้ และนำมาจุดลงบนอาหาร nutrient agar (NA) (Michael and Regina, 2018) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ต่อมาจะใช้หวงเขี่ยเขี่ยนำโคโลนีของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์คือ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่อยู่บนอาหาร NA มา 1 โคโลนีใส่ลงในอาหาร Lura-Bertani (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ต่อมาจะนำแบคทีเรียมาปรับความเข้มข้นเชื้อด้วยการนำไปวัดค่าความทึบแสงด้วยเครื่อง สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนอาหารมีความขุ่นมาตรฐานเท่ากับ 0.5 Mcfarland standard ซึ่งจะได้ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^8 ซีเอฟยู/มล. (Wayne, 2011) จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยแบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร ลงในวุ้น 0.6% w/v ขณะเหลว 3 มิลลิลิตร และนำมาเขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงบนอาหารแข็ง (Hockett

และคณะ, 2017 : Schmalz, 1998) ที่เลี้ยงยีสต์เอาไว้ก่อน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และคัดเลือกยีสต์ไอโซเลตที่เกิดโซนใส (inhibition zone) มาทดสอบยืนยันต่อไป

3.3 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบด้วยวิธี agar overlay technique โดยใช้โคโลนีเดี่ยวของยีสต์ไอโซเลต

ใช้ห้วงเชื้อเพื่อนำโคโลนีของยีสต์ไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast extract peptone dextrose (YPD) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง และนำยีสต์ที่เจริญแล้วมาหาความเข้มข้นของเซลล์โดยการนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์โดยการแขวนลอยยีสต์ด้วยสีย้อม lactophenol cotton blue ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำมาเจือจางแบบอนุกรมครั้งละ 10 เท่า โดยปิเปตตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางใน NaCl 0.85% w/v 9 มิลลิลิตร ให้ความเข้มข้นประมาณ 10^3 ซีเอฟยู/มล. จากนั้นจึงปิเปตสารแขวนลอยยีสต์ไอโซเลต 0.1 มิลลิลิตร มา spread plate บนอาหารแข็ง NA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ต่อมาจะใช้ห้วงเชื้อเพื่อนำโคโลนีของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์คือ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่อยู่บนอาหาร NA มา 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหาร Lura-Bertani (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ต่อมาจะนำแบคทีเรียมาปรับความเข้มข้นเชื้อด้วยการนำไปวัดค่าความทึบแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนอาหารมีความขุ่นมาตรฐานเท่ากับ 0.5 Mcfarland standard ซึ่งจะได้ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^8 ซีเอฟยู/มล. (Wayne, 2011) จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยแบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร ลงในวุ้น 0.6% w/v ขณะเหลว 3 มิลลิลิตร และนำมาเขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงบนอาหารแข็งที่ทำการเลี้ยงยีสต์เอาไว้ก่อน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และคัดเลือกยีสต์ไอโซเลตที่เกิดโซนใส มาใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 การศึกษาลักษณะเซลล์ของยีสต์ไอโซเลตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ใช้ห้วงเชื้อเพื่อสกัดโคโลนีของยีสต์ไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และนำมาย้อมด้วย lactophenol cotton blue แล้วส่องกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อยืนยันว่าเชื้อไอโซเลตที่ได้เป็นยีสต์จริง คือ เป็นเซลล์เดี่ยว และไม่สร้างเส้นใย

3.5 การเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของ ส่วนน้ำใส, เซลล์มีชีวิต และ เซลล์ที่โซนิเคต ของยีสต์ไอโซเลต

ใช้ห้วงเชื้อเชื้อนำโคโลนีของยีสต์ไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย 1 โคโลนี มาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง และแบ่งการเตรียมยีสต์ออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

- 1) ส่วนน้ำใส ปิเปตยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 1 มิลลิลิตรลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรและนำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 5,200xg ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบนมากรองผ่านเมมเบรนกรอง ขนาด 0.22 ไมครอน ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์อันใหม่
- 2) เซลล์มีชีวิต นำเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการตกตะกอนมาล้างด้วย Phosphate Buffer saline (PBS) โดยการนำมา resuspend ใน PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 5,200xg ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสข้างบนทิ้ง และทำซ้ำอีกรอบเพื่อให้มั่นใจว่าไม่เหลือ ส่วนน้ำใส หลงเหลืออยู่
- 3) เซลล์ที่โซนิเคต นำเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการตกตะกอนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 1 มิลลิลิตร มาล้างด้วย PBS จำนวน 2 รอบ แล้ว resuspend ใน PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำมา sonicate บนน้ำแข็ง โดยใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ที่ปรับคลื่น Pulse 45 - 50 และ แอมพลิจูด 40% นาน 30 วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 5,200xg ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

เตรียมแบคทีเรียโดยใช้ห้วงเชื้อเชื้อนำโคโลนีของ *E. coli* และ *P. aeruginosa* มา 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหาร Lura-Bertani (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียมาปรับความเข้มข้นเชื้อในสารละลาย NaCl 0.85% w/v ให้ได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ 10^7 ซีเอฟยู/มล. ด้วยการนำไปวัดค่าความทึบแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ต่อมาปิเปตสารแขวนลอยแบคทีเรีย 3 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารแข็ง YPD ขณะเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตร และนำมาผสมกันด้วยเครื่องผสมสาร ก่อนที่จะนำมา pour plate ในจานเพาะเชื้อพลาสติก เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้ว จะทำการเจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร บนวุ้น โดยใช้ส่วนบนของ Pasteur pipette แบบแก้ว และนำ ส่วนน้ำใส, เซลล์มีชีวิต และเซลล์ที่โซนิเคต มาผสมกับ YPD ในอัตราส่วน 1:2 และเติมให้เต็มหลุมที่เจาะเอาไว้ (Moens และคณะ, 2019) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และดูผลโดยการดูโซนยับยั้ง

3.6 แผนงานต่อไปในอนาคต : การทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในเชิงปริมาณ

นำไอโซเลตยีสต์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมและแบคทีเรีย *P. aeruginosa* มาบ่มร่วมกันในอาหาร YPD broth แล้วนำมาเจือจางแบบอนุกรมครั้งละ 10 เท่า และ spread plate ความเข้มข้นที่เหมาะสมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lura-Bertani (LB) agar cycloheximide (0.1 mg/ml) และนับจำนวนแบคทีเรียที่เจริญในอาหารในหน่วย ซีเอฟยู/มล. และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเพื่อดูการผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของยีสต์ไอโซเลตแบบเชิงปริมาณ (Andrea และคณะ, 2017)

บทที่ 4

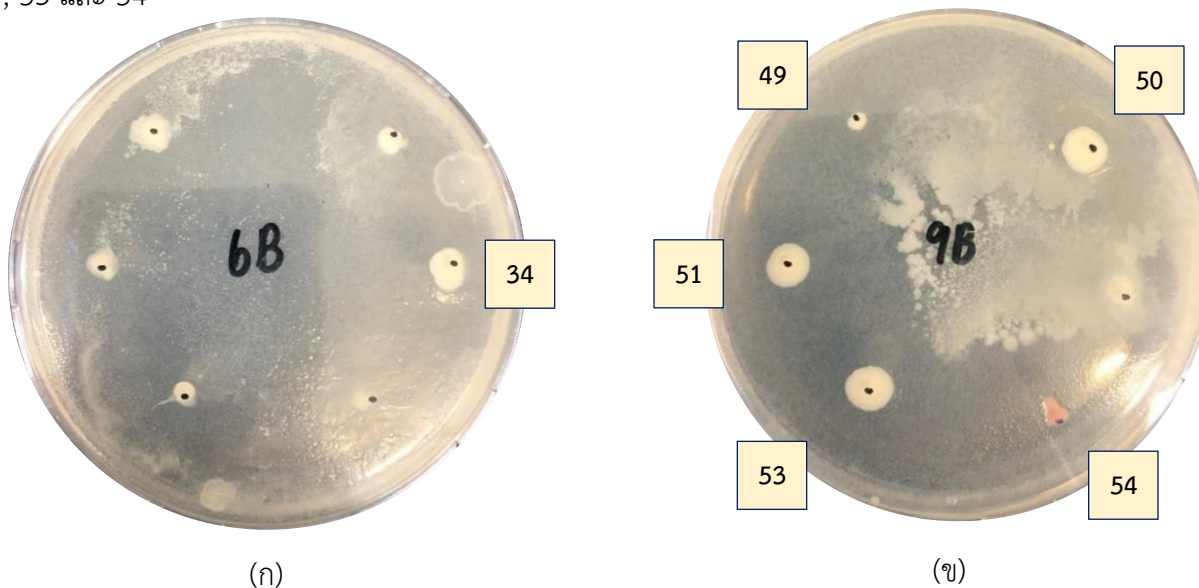
ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดกรองยีสต์ไอโซเลตจากธรรมชาติ

จากการคัดกรองหายีสต์ไอโซเลตจากตัวอย่าง ลูกแป้ง ดิน เปลือกผักและผลไม้ ลำไส้สัตว์ หัวเชื้อคอมบูชะ น้ำทะเล และน้ำจากสระ โดยนำมาเจือจางและ spread plate บนอาหาร Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) พบว่าได้ไอโซเลตที่คาดว่าจะเป็ยีสต์ทั้งหมด 132 ไอโซเลต โดยเลือกจากโคโลนีเดี่ยวที่ไม่สร้างเส้นใย

4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบด้วยวิธี agar overlay technique

จากการทดลองนำแบคทีเรียที่ผสมในอาหารแข็งขณะเหลว มาเทลงบนอาหารแข็งที่ได้ทำการบ่มยีสต์ไอโซเลตให้โตไว้ก่อนแล้ว พบว่า ไม่มียีสต์ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* และคาดว่ามียีสต์ทั้งหมด 6 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* คือยีสต์ไอโซเลตหมายเลข 34, 49, 50, 51, 53 และ 54



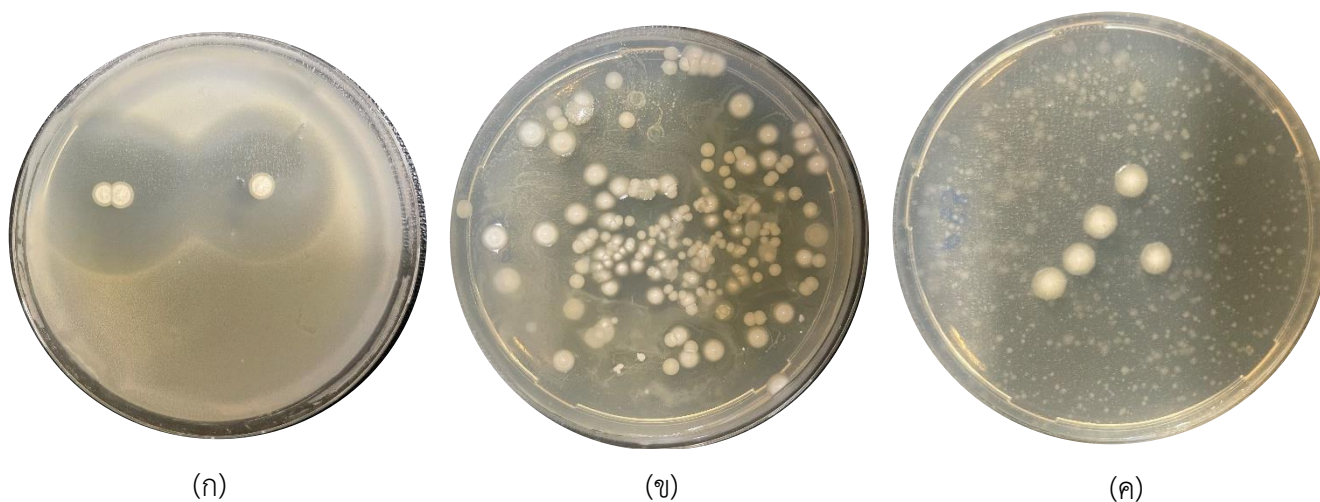
รูปที่ 4.2 การยับยั้ง *P. aeruginosa* ของยีสต์ไอโซเลตหมายเลข 34, (ก) 49, 50, 51, 53 และ 54 (ข)

4.3 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบด้วยวิธี agar overlay technique โดยใช้โคลนเดี่ยวของ ยีสต์ไอโซเลต

จากการทดลองนำยีสต์ไอโซเลตที่คาดว่ามีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย มาแยกเป็นโคลนเดี่ยวโดยการ spread plate บนอาหาร NA และเทวุ้นแข็งขณะเหลวที่ผสมแบคทีเรีย พบว่า ไม่มียีสต์ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *E. coli* และมียีสต์ 3 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* โดยยีสต์ไอโซเลตที่ 34 มีขนาดของโซนยับยั้ง 29 มิลลิเมตร, ไอโซเลตที่ 50 มีขนาดของโซนยับยั้ง 1 มิลลิเมตร และยีสต์ไอโซเลตที่ 53 มีขนาดของโซนยับยั้ง 12 มิลลิเมตร ซึ่งยีสต์แต่ละไอโซเลตนั้นได้คัดแยกมาจากที่ที่ต่างกัน ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ยีสต์ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

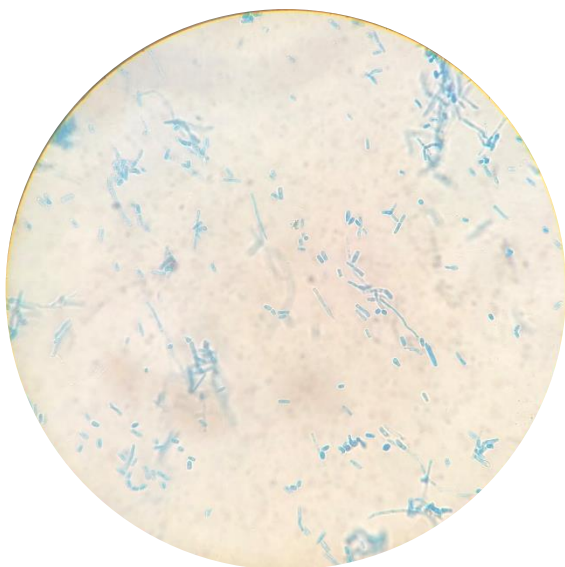
หมายเลข	แหล่งที่คัดแยกยีสต์ไอโซเลต	แบคทีเรียที่ยับยั้ง	ขนาดของโซนยับยั้ง
34	น้ำทะเลบริเวณริมป่าชายเลน สถานที่ตากอากาศบางปู	<i>P. aeruginosa</i>	29 มิลลิเมตร
50	น้ำทะเลบริเวณริมป่าชายเลน วัดอโศการาม	<i>P. aeruginosa</i>	1 มิลลิเมตร
53	น้ำทะเลบริเวณริมป่าชายเลน วัดอโศการาม	<i>P. aeruginosa</i>	12 มิลลิเมตร



รูปที่ 4.3 โซนยับยั้งของยีสต์ไอโซเลตที่ 34 (ก), 50 (ข) และ 53 (ค) ที่มีต่อ *Pseudomonas aeruginosa*

4.4 ผลการศึกษาลักษณะเซลล์ของยีสต์ไอโซเลตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการศึกษาลักษณะเซลล์ของยีสต์ไอโซเลตที่ 34, 50 และ 53 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ยีสต์ไอโซเลตที่ 34, 50 และ 53 มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวรูปทรงกระบอก



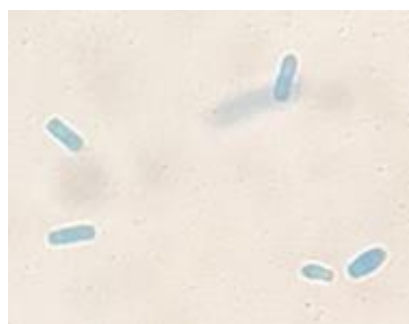
(ก)



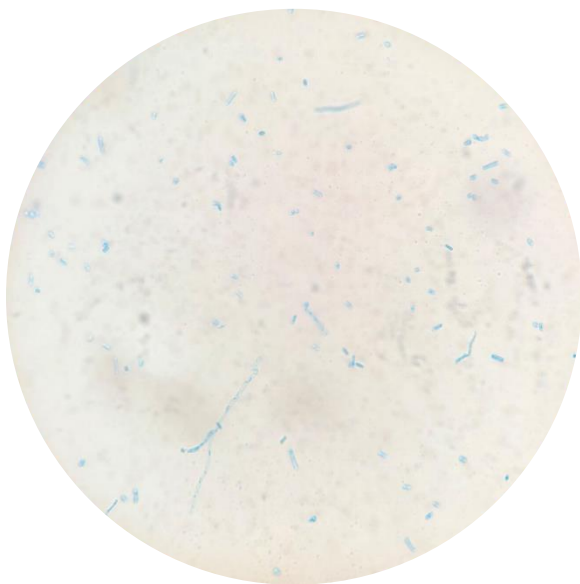
(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ค)

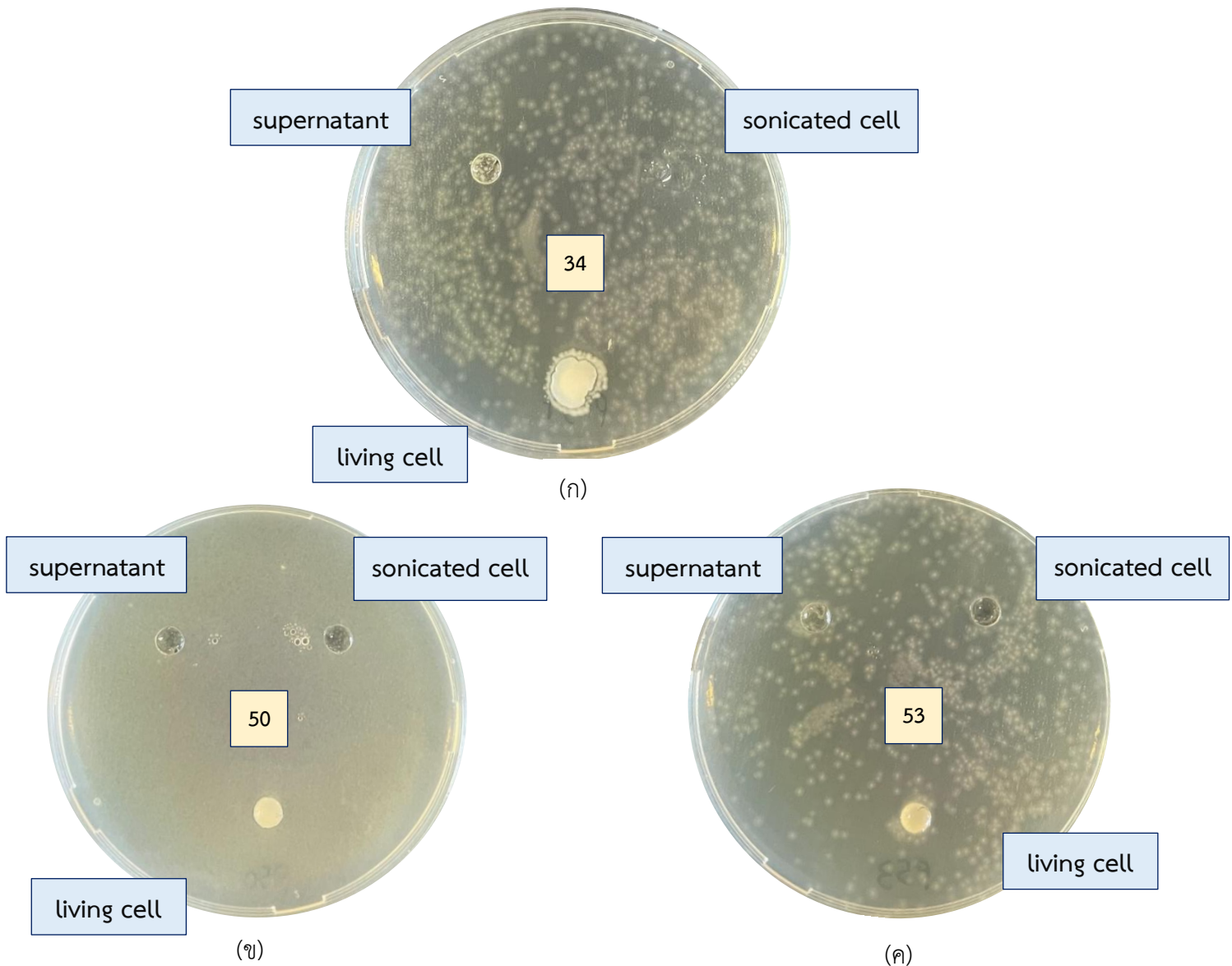
รูปที่ 4.4 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X ของยีสต์ไอโซเลตที่ 34 (ก), 50 (ค) และ 53 (จ) และภาพขยายเพื่อแสดงลักษณะเซลล์รูปทรงกระบอกของยีสต์ไอโซเลตที่ 34 (ข), 50 (ง) และ 53 (ฉ) หมายเหตุ ภาพขยาย (ข), (ง) และ (ฉ) แสดงลักษณะเซลล์ โดยไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดจริง

4.5 ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของ ส่วนน้ำใส, เซลล์มีชีวิต และ เซลล์ที่โซนิเคต ของยีสต์ไอโซเลตด้วยวิธี agar well diffusion

จากการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* ของ ส่วนน้ำใส, เซลล์มีชีวิต และ เซลล์ที่โซนิเคต ของยีสต์ไอโซเลต พบว่า ยีสต์ทุกไอโซเลตไม่มีโซนยับยั้งเมื่อใช้ส่วนของ ส่วนน้ำใส และ เซลล์ที่โซนิเคต โดย เซลล์มีชีวิต ของยีสต์ไอโซเลตที่ 34 มีขนาดโซนยับยั้ง 4.5 มิลลิเมตร, ไอโซเลตที่ 50 มีขนาดโซนยับยั้ง 0.5 มิลลิเมตร และไอโซเลตที่ 53 มีขนาดโซนยับยั้ง 0.5 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.5 ขนาดโซนยับยั้งของส่วน ส่วนน้ำใส, เซลล์มีชีวิต และ เซลล์ที่โซนิเคต ของยีสต์ไอโซเลต ต่อ *Pseudomonas aeruginosa*

ยีสต์ไอโซเลต	ส่วนน้ำใส	เซลล์มีชีวิต	เซลล์ที่โซนิเคต
34	ไม่พบการยับยั้ง	4.5 มิลลิเมตร	ไม่พบการยับยั้ง
50	ไม่พบการยับยั้ง	0.5 มิลลิเมตร	ไม่พบการยับยั้ง
53	ไม่พบการยับยั้ง	0.5 มิลลิเมตร	ไม่พบการยับยั้ง



รูปที่ 4.5 โซนยับยั้งของส่วน ส่วนน้ำใส, เซลล์มีชีวิต และ เซลล์ที่โซนิเคต ของยีสต์ไอโซเลตที่ 34 (ก), 50 (ข) และ 53 (ค) ต่อ *Pseudomonas aeruginosa*

4.6 ผลการทดลองแผนงานต่อไปในอนาคต : การทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในเชิงปริมาณ

จากแนวโน้มของการทดลองที่ผ่านมาคาดว่าในการทดลองนี้ยีสต์ไอโซเลตที่ 34 จะการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในเชิงปริมาณได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ โดยผลที่ได้จากการที่บ่มยีสต์ไอโซเลตที่ 34 ร่วมกับ *P. aeruginosa* จะเหลือจำนวนของ *P. aeruginosa* น้อยที่สุดในหน่วย ซีเอฟยู/มล.

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

Escherichia coli และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้สามารถปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและในอาหารได้ ซึ่งเมื่อมนุษย์ได้รับเชื้อเข้าไปอาจเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น *E. coli* สามารถทำให้เกิดโรคทางระบบทางเดินอาหาร (Meraz และคณะ, 2008) ตลอดจนถึงที่ก่อโรครุนแรง เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด (ธัญการกรย์ ศรีวรมาศ, 2555) ส่วน *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่โตได้ดีบนพื้นผิวเปียกแฉะ จึงสามารถพบได้บนอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่มีความชื้น เช่น สายสำหรับสอดท่อ (สุนทรี เขียนทอง, 2546) จึงทำให้เชื้อชนิดนี้เป็นปัญหาสำคัญในการติดเชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic infection) ของคนไข้ในโรงพยาบาล นอกจากนี้ *P. aeruginosa* ยังมีการดื้อต่อยาโดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) และยังมีความสามารถในการรับสมบัติการดื้อยาจากภายนอกเซลล์ (acquired resistance) ได้ดี (Pang และคณะ, 2019) ทำให้เชื้อค่อนข้างมีความอันตรายต่อผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือได้รับยากดภูมิคุ้มกัน แต่เนื่องจากปัจจุบันได้มีการรณรงค์ให้ลดการใช้ยาปฏิชีวนะโดยไม่จำเป็น เพื่อลดโอกาสที่จะเกิดเชื้อดื้อยาเพิ่มขึ้นในสิ่งแวดล้อม (World Health Organization, 2014) ทำให้เริ่มมีการศึกษาการรักษาโรคจากการติดเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ยีสต์ต้านแบคทีเรียเกิดขึ้น (Roussel และคณะ, 2018)

ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาการยับยั้งของยีสต์ไอโซเลตที่คัดแยกจากธรรมชาติ ได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งสาโท น้ำทะเล น้ำจืด ดิน เปลือกและใบจากผักและผลไม้ ลำไส้สดจากสัตว์ และหัวเชื้อของซาคคอมบูชะ ที่มีต่อแบคทีเรียแกรมลบสองสายพันธุ์ คือ *E. coli* MSCU 0349 และ *P. aeruginosa* MSCU 0359 เพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยไม่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะที่เป็นสาเหตุของการดื้อยา และมีผลข้างเคียงต่อสุขภาพ (Roussel และคณะ, 2018) โดยจากการทดลองนี้สามารถคัดแยกยีสต์ไอโซเลตได้ทั้งหมด 132 ไอโซเลต โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) ที่จำเพาะต่อยีสต์และรา (Smid และคณะ, 1990) และคัดเลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยวที่ไม่สร้างเส้นใย โดยยีสต์แต่ละไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีที่ต่างกัน โดยสังเกตได้จาก สี รูปร่าง ขอบ การยกตัว ขนาด และการสะท้อนกับแสงของโคโลนี

ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบด้วยวิธี agar overlay technique (Hockett และคณะ, 2017 : Schmalz, 1998) พบว่ามียีสต์ 6 ไอโซเลตที่คาดว่าสามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ คือยีสต์ไอโซเลตหมายเลข 34 49 50 51 53 และ 54 แต่ไม่พบยีสต์ไอโซเลตไหนที่สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ได้ สาเหตุที่

ยีสต์ที่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ ทั้ง ๆ ที่เป็นเชื้อแกรมลบที่มีองค์ประกอบของผนังเซลล์เหมือนกัน อาจจะเป็นเพราะยีสต์ได้สร้างสารบางอย่างที่จำเพาะเฉพาะกับ *P. aeruginosa* ซึ่งไม่ใช่ปัจจัยในเรื่องของผนังเซลล์ โดยมีความเป็นไปได้ว่าสารดังกล่าวอาจจะเป็นสารที่ไม่เสีรน้ำ จึงสลายตัวไปในระหว่างทำการทดลอง เช่นในขั้นตอนที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งขณะเหลวลงไปในส่วนใส ทำให้ผลการทดลองดังกล่าวจึงอาจมีความแม่นยำไม่มากนัก อีกทั้งโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นสามารถสังเกตได้ยาก และยังมีโซนยับยั้งบางโซนที่หลอมรวมกับโซนข้างเคียง

ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบด้วยวิธี agar overlay technique โดยใช้โคโลนีเดี่ยวของยีสต์ไอโซเลตพบว่า เหลือเพียงยีสต์ไอโซเลตที่ 34 50 และ 53 ที่พบว่ามีกรยับยั้ง *P. aeruginosa* โดยคาดว่าโซนยับยั้งจากยีสต์ไอโซเลตที่ 49 51 และ 54 ในการทดสอบที่แล้ว จะเกิดจากการที่เชื้อเจริญในแต่ละพื้นที่ของจานเพาะเชื้อไม่เท่ากันเท่านั้น และจากการทดลองนี้ทำให้เกิดการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของยีสต์ไอโซเลตได้อย่างคร่าว ๆ คือยีสต์ไอโซเลตที่ 34 มีขนาดโซนยับยั้งใหญ่ที่สุด คือ 29 มิลลิเมตร และยีสต์ไอโซเลตที่ 53 มีขนาดโซนยับยั้งรองลงมา คือ 12 มิลลิเมตร และยีสต์ไอโซเลตที่ยับยั้งได้น้อยที่สุดคือไอโซเลตที่ 50 คือ 1 มิลลิเมตร ภายใต้อุณหภูมิการบ่มและเวลาการบ่มที่เท่ากัน ทั้งนี้ในงานเพาะเชื้อที่ทำการทดลองไอโซเลตที่ 50 และ 53 พบว่า การเจริญของ *P. aeruginosa* เบบางกว่างานเพาะเชื้อที่ทดลองไอโซเลตที่ 34 อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสาเหตุอาจเกิดมาจากการที่สารที่สร้างจากยีสต์ไอโซเลตมีความสามารถแพร่กระจายในวงกว้าง แต่ทั้งนี้การวัดโซนยับยั้งได้ทำการวัดโดยดูจากโซนที่สังเกตการยับยั้งได้อย่างชัดเจน

ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของ ส่วนน้ำใส, เซลล์มีชีวิต และ เซลล์ที่โซนิเคต ของยีสต์ไอโซเลตด้วยวิธี agar well diffusion (Moens และคณะ, 2019) พบว่า ยีสต์ทุกไอโซเลตไม่มีโซนยับยั้งเมื่อในส่วนของ ส่วนน้ำใส และ เซลล์ที่โซนิเคต โดย เซลล์มีชีวิต ของยีสต์ไอโซเลตที่ 34 มีขนาดโซนยับยั้งมากที่สุดคือ 4.5 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลตที่ 50 และ 53 มีขนาดโซนยับยั้งเท่ากันคือ 0.5 มิลลิเมตร โดยสิ่งที่แตกต่างกันของการทดลองนี้และการทดลองอื่นคือ การทดลองอื่น ๆ จะนำยีสต์มาบ่มให้โตเอาไว้ก่อน แล้วจึงใส่แบคทีเรียลงไปให้เชื้อได้ยับยั้ง แต่การทดลองนี้ได้บ่มยีสต์กับแบคทีเรียไปพร้อมกันเนื่องจากรูปแบบการทดลองทำให้ยากต่อการบ่มเอาไว้ก่อน ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบการทดลองนี้โดยยึดจากวิธีในงานวิจัยที่เคยมีการศึกษาเอาไว้เป็นหลัก (Moens และคณะ, 2019) โดยผลการทดลองที่เกิดขึ้น คาดว่า ส่วนน้ำใส และ เซลล์ที่โซนิเคต ของยีสต์ไอโซเลตทั้งสามนี้ ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้จริง ๆ เนื่องจาก ส่วนน้ำใส และ เซลล์ที่โซนิเคต เป็นส่วนที่ไม่มีชีวิต การบ่มก่อนหรือบ่มพร้อมกันจึงไม่มีผลใด ๆ ต่อผลการทดลอง แต่ในส่วนของ เซลล์มีชีวิต คาดว่าเหตุผลที่โซนยับยั้งมีขนาดเล็กลงจากการทดลองที่ผ่านมา เนื่องจากการที่ยีสต์สามารถเจริญได้ช้ากว่าแบคทีเรีย

โดยสรุปแล้วสามารถกล่าวได้ว่ายีสต์ไอโซเลตที่ 34 มีความสามารถในการต้าน *P. aeruginosa* มากที่สุด แต่ถ้าหากจะนำไปต่อยอดทางด้านการใช้ยีสต์เพื่อรักษาอาการติดเชื้อจากแบคทีเรีย จะมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับชนิดของยีสต์ และความปลอดภัยที่จะนำมาใช้กับร่างกายมนุษย์

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- ฉันทยาการย์ ศรีวรมาศ. (2555). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): โรคอุจจาระร่วงรุนแรงกับภาวะ Hemolytic uremic syndrome. บทความปริทัศน์, วารสารวิจัยสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ปีที่ 5 ฉบับที่ 2 เดือนพฤษภาคม – สิงหาคม 2555
- ธนภัทร จรุงเกียรติคุณ. (2561). การเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศรีธยา ธาราแสง และคณะ. (2556). การศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรผลปลิงกาสาและเปลือกมังคุดเพื่อใช้เป็นสารกันบูดในผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอาง. รายงานการวิจัย, สถาบันวิจัยสมุนไพร และสำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.
- สุนทรี เขียนทอง. (2546). ปัจจัยเสี่ยงและผลการรักษาโรคติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ดื้อต่อยา Imipenem และความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อดังกล่าว. เภสัชศาสตร์มหาบัณฑิต (เภสัชกรรมคลินิก), มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

ภาษาอังกฤษ

- Aminov R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochem Pharmacol.* 2017;133:4-19. doi:10.1016/j.bcp.2016.10.001
- Balcht A, Smith R (1994). *Pseudomonas aeruginosa: Infections and Treatment.* Informa Health Care. pp. 83–84. ISBN 978-0-8247-9210-7.
- Cleary J, Lai LC, Shaw RK, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology (Reading).* 2004;150(Pt 3):527-538. doi:10.1099/mic.0.26740-0
- David, B.F. (2018). *Pocket Guide to Clinical Microbiology* (4th ed). Washington: ASM.
- Doron S, Gorbach SL. Bacterial Infections: Overview. *International Encyclopedia of Public Health.* 2008;273-282. doi:10.1016/B978-012373960-5.00596-7
- Faber JE, Ross J, Stephen G. Antibiotic anaphylaxis. *Calif Med.* 1954;81(1):9-11.

- Franke J, Franke S, Schmidt H, et al. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J Clin Microbiol.* 1994;32(10):2460-2463. doi:10.1128/JCM.32.10.2460-2463.1994
- Frick C, Vierheilig J, Linke R, et al. Poikilothermic Animals as a Previously Unrecognized Source of Fecal Indicator Bacteria in a Backwater Ecosystem of a Large River. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(16):e00715-18. Published 2018 Aug 1. doi:10.1128/AEM.00715-18
- Fueyo JM, Mendoza MC, Martín MC. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. *Microbes Infect.* 2005;7(2):187-194. doi:10.1016/j.micinf.2004.10.009
- Gamal, Y., Amal, A., Rehab, E. D., Nehal, E. Y. (2017). Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria. *Veterinary World*, 10(8), 979-983. doi: 10.14202/vetworld.2017.979-983.
- Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol.* 2012;3:421. Published 2012 Dec 19. doi:10.3389/fmicb.2012.00421
- Hebbelstrup Jensen B, Olsen KE, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):614-630. doi:10.1128/CMR.00112-13
- Hockett KL, Baltrus DA. Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. *J Vis Exp.* 2017;(119):55064. Published 2017 Jan 14. doi:10.3791/55064
- Hoiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T (November 2010). "Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis". *Future Microbiology.* 5 (11): 1663–74. doi:10.2217/fmb.10.125. PMID 21133688.
- Itah A, Essien J (2005). "Growth Profile and Hydrocarbonoclastic Potential of Microorganisms Isolated from Tarballs in the Bight of Bonny, Nigeria". *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 21 (6–7): 1317–22. doi:10.1007/s11274-004-6694-z. S2CID 84888286.

- Knudsen PK, Gammelsrud KW, Alfsnes K, Steinbakk M, Abrahamsen TG, Müller F, et al. Transfer of a blaCTX-M-1 - carrying plasmid between different Escherichia coli strains within the human gut explored by whole genome sequencing analyses. *Sci Rep*. 2018;8:280.
- Knutton S, Baldwin T, Williams P, Manjarrez-Hernandez A, Aitken A. The attaching and effacing virulence property of enteropathogenic Escherichia coli. *Zentralbl Bakteriol*. 1993;278(2-3):209-217. doi:10.1016/s0934-8840(11)80838-8
- Lerminiaux NA, Cameron ADS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol*. 2019;65(1):34-44. doi:10.1139/cjm-2018-0275
- Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36(9):2046-2048. doi:10.1128/aac.36.9.2046
- Lopes, C. A., Sangorin M. P. (2010). Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(4), 298-306.
- Marston D, Dennis M, Jane M, Tara N, Anthony S. (2016). Antimicrobial Resistance. *JAMA*. 316. 1193. 10.1001/jama.2016.11764.
- Meraz IM, Jiang ZD, Ericsson CD, et al. Enterotoxigenic Escherichia coli and diffusely adherent E. coli as likely causes of a proportion of pathogen-negative travelers' diarrhea--a PCR-based study. *J Travel Med*. 2008;15(6):412-418. doi:10.1111/j.1708-8305.2008.00249.x
- Mehlomakulu, N.N., Setati, M.E., Divol, B. (2014). Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-Saccharomyces yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 83–91.
- Michael, K., Regina, H.W. (2018). Quantitative Assessment of Antimicrobial Activity of PLGA Films Loaded with 4-Hexylresorcinol. *J Funct Biomater.*, 9(1), 4. doi: 10.3390/jfb9010004.
- Moens F, Duysburgh C, van den Abbeele P, Morera M, Marzorati M. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces cerevisiae* boulardii exert synergistic antipathogenic activity in vitro against enterotoxigenic Escherichia coli. *Benef Microbes*. 2019;10(8):923-935. doi:10.3920/BM2019.0064
- Mouneimné H, Robert J, Jarlier V, Cambau E. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(1):62-66. doi:10.1128/AAC.43.1.62

- Murray, P., Baron, E., Tenover F., Yolken, Eds. (1999). Manual of clinical microbiology (7th ed.). Washington: ASM.
- Nash AA, Dalziel RG, Fitzgerald JR. Mechanisms of Cell and Tissue Damage. Mims' Pathogenesis of Infectious Disease. 2015;171-231. doi:10.1016/B978-0-12-397188-3.00008-1
- Nataro JP, Mai V, Johnson J, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clin Infect Dis*. 2006;43(4):402-407. doi:10.1086/505867
- Nawaphorn, R., Nattawut, R., Tipachai, V., Duangjai, O. (2020). Isolation and Identification of Fungi with Glucoamylase Activity from Loog-pang-khao-mak (A Thai Traditional Fermentation starter). *Pure Appl. Microbiol.*, 14(1), 233-246.
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019;37:177-92.
- Rima, H., Steve, L., Ismail, F. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol.*, 19(3), 421. doi: 10.3389/fmicb.2012.00421.
- Roostita, L.B., Fleet, G.H., Wendry, S.P., Apon, Z.M., Gemilang, L.U. (2011). Determination of Yeasts Antimicrobial Activity in Milk and Meat Products. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(6), 442-445.
- Roostita, R. and Fleet, G.H. (1996). Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *Inter. J. Food Microbiol.*, 31, 205-219.
- Roussel C, Sivignon A, de Vallée A, et al. Anti-infectious properties of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 on enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strain H10407. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(14):6175-6189. doi:10.1007/s00253-018-9053-y
- Sakunyarak, K. and Satithorn, W. (2014). Evaluation of antagonistic bacteria inhibitory to *Colletotrichum musae* on banana. *International Journal of Agricultural Technology*, 10(2), 383-390.
- Susanne, A.K. Arthi, R. Gabriel, G.P. (2019). Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorganisms*. 7 (6) : 1 8 0 . doi: 10.3390/microorganisms7060180. PMID: 31234491
- Schmalz G. Agar overlay method. *Int Endod J*. 1988;21(2):59-66. doi:10.1111/j.1365-2591.1988.tb00956.x

- Singh R, Sripada L, Singh R. Side effects of antibiotics during bacterial infection: mitochondria, the main target in host cell. *Mitochondrion*. 2014;16:50-54. doi:10.1016/j.mito.2013.10.005
- Smid T, Schokkin E, Boleij JS, Heederik D. Enumeration of viable fungi in occupational environments: a comparison of samplers and media [published correction appears in *Am Ind Hyg Assoc J* 1990 May;51(5):296]. *Am Ind Hyg Assoc J*. 1989;50(5):235-239. doi:10.1080/15298668991374570
- Younis G, Awad A, Dawod RE, Yousef NE. Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria. *Vet World*. 2017;10(8):979-983. doi:10.14202/vetworld.2017.979-983
- Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel C, Götz F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *Int J Food Microbiol*. 2008;127(3):246-251. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.016
- Zeng, M., Inohara, N. & Nuñez, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol* 10, 18–26 (2017). <https://doi.org/10.1038/mi.2016.75>

เอกสารอื่น ๆ

- Antimicrobial resistance: global report on surveillance". The World Health Organization. April 2014. ISBN 978 92 4 156474 8.
- Azer SA, Tuma F. Infectious Colitis. [Updated 2020 Sep 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544325/>
- Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food. John Wiley & Sons, Inc. 2012. pp. 1–60. ISBN 9781449614591.
- Foster T. Staphylococcus. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>

Bullock B, Benham MD. Bacterial Sepsis. [Updated 2020 Jun 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537054/>

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar

อาหารสำเร็จรูป DRBC (บริษัทบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน) 31.6 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปลงในน้ำปราศจากไอออนปริมาณ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Potato Dextrose Agar (PDA) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

อาหารสำเร็จรูป Potato Dextrose agar (บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา) 39 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปลงในปราศจากไอออนปริมาณ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อ ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

บีฟเอกซ์แทรกซ์ 3 กรัม

เพปโตน 5 กรัม

ละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาณ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. Nutrient Agar (NA) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

อาหารสำเร็จรูป Nutrient agar (บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา)	23	กรัม
--	----	------

ละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. Luria-Bertani Broth (LB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ยีสต์เอกแทรกซ์	0.5	กรัม
ทริปโตน	1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	1	กรัม

ละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6. Yeast Peptone Dextrose (YPD) Broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

ยีสต์เอกแทรกซ์	2	กรัม
เพปโตน	4	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	4	กรัม

ละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7. Yeast Peptone Dextrose (YPD) Agar ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ยีสต์เอกแทรกซ์	5	กรัม
เพปโตน	10	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	10	กรัม
ผงวุ้น	10	กรัม

ละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข
วิธีการเตรียมสารเคมี

1. 0.5 Mcfaland standard

Barium chloride	1%
Sulfuric acid	1%

นำ 1% Sulfuric acid มา 9.95 มิลลิลิตร ผสมกับ Barium chloride 1% ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งควรมีค่าอยู่ที่ระหว่าง 0.08-0.1 จึงจะทำให้ได้ความหนาแน่นเซลล์ให้ที่ประมาณ 1×10^8 ซีเอฟยู/มล.