



สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก *Pseudomonas aeruginosa* SWUC02
และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* จากครัวเรือน
OPTIMIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS PRODUCTION FROM *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA SWUC02 AND ITS GENOME SEQUENCES ANALYSIS FOR HOUSEHOLD
STAPHYLOCOCCUS AUREUS INHIBITION

กชชณัฏฐ์ ศรีแสงจันทร์

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก *Pseudomonas aeruginosa*
SWUC02 และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อการใช้อยับยั้ง *Staphylococcus aureus*
จากครีวเว็อน



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

OPTIMIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS PRODUCTION FROM *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA SWUC02 AND ITS GENOME SEQUENCES ANALYSIS FOR HOUSEHOLD
STAPHYLOCOCCUS AUREUS INHIBITION



KOTCHANAT SRISANGCHUN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Applied Microbiology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2022

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก *Pseudomonas aeruginosa* SWUC02 และ
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อการใช้ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* จากคร้วเรือน

ของ

กชชณัญญ์ ศรีแสงจันทร์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริรักษ์ ศรฉนวนรักษ์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริงสุลกะ) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขวัญนันทน์ นันทวิสัย)

ชื่อเรื่อง	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SWUC02 และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อการใช้อย่าง <i>Staphylococcus aureus</i> จากครีวเรื้อน
ผู้วิจัย	กชชณัฐ ศรีแสงจันทร์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริวิรัช ศรวงษ์นิยารักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคฉวยโอกาส ที่มีความสามารถในการก่อโรคได้หลากหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีปัญหาการดื้อยาของเชื้อในกลุ่ม methicillin-resistance *S. aureus* (MRSA) จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีในการจัดการกับปัญหาเหล่านี้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยง *P. aeruginosa* สำหรับการผลิตน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการประยุกต์ใช้ยับยั้ง MRSA สายพันธุ์ที่พบในครีวเรื้อน จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 พบว่า *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลากหลายชนิด และน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *Bacillus cereus* ได้ดีที่สุด ผลจากการวิเคราะห์โดยวิธี whole-genome sequencing พบว่า *P. aeruginosa* SWUC02 มีกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแบคทีริโอซิน, สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ, และซิเดอรอฟอริน ทั้งหมด 16 กลุ่มยีน การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *P. aeruginosa* SWUC02 เพื่อใช้ในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี one-factor at a time พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *P. aeruginosa* SWUC02 เพื่อผลิตสารปฏิบัคษ์คือเลี้ยงด้วยอาหาร LB หรือ TSB ที่มี 0.01% CuCl_2 , pH 7, มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 1×10^5 CFU.ml⁻¹, เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm และอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน โดยพบว่าลักษณะของสารออกฤทธิ์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีความสามารถในการทนต่อ pepsin proteinase K และความร้อน สารออกฤทธิ์ดังกล่าวถูกสกัดด้วย dichloromethane ได้มากที่สุด ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และทำลาย (MBC) *S. aureus* ได้ของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ คือ 0.098%, 0.391% และ 3.91, 3.91 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งไบโอฟิล์ม (MBIC) ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อคือ 15.625 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อนำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบกับ MRSA 7 สายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA ได้โดยมี MIC อยู่ในช่วง 3.91-15.63 $\mu\text{g/mL}$ การประยุกต์ใช้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* ที่พื้นผิวบนอ่างล้างมือครีวเรื้อน พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่ม staphylococcal ได้ จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง MRSA อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ซึ่งแสดงถึงความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้หรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับยับยั้งจุลินทรีย์

คำสำคัญ : *Pseudomonas aeruginosa*, สารยับยั้งจุลินทรีย์, ไบโอฟิล์ม, whole-genome sequencing, MRSA

Title	OPTIMIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS PRODUCTION FROM <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> SWUC02 AND ITS GENOME SEQUENCES ANALYSIS FOR HOUSEHOLD <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> INHIBITION
Author	KOTCHANAT SRISANGCHUN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2022
Thesis Advisor	Assistant Professor Siriruk Sarawareeyaruk , Ph.D.
Co Advisor	Associate Professor Onanong Pringsulaka , Ph.D.

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen that can cause a variety of diseases. There is also the problem of antibiotic resistance in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) group, which is necessary to manage these problems. *Pseudomonas aeruginosa* produces various types of antimicrobial substances. Therefore, the objective of this research is to optimize conditions to produce antimicrobial compounds from *P. aeruginosa* SWUC02 for inhibiting *S. aureus*, it also aims to study the characteristics of antimicrobial compounds from *P. aeruginosa* SWUC02. This study also aims to evaluate the efficacy of the extract from *P. aeruginosa* SWUC02 in inhibiting household MRSA. With dual culture and well-diffusion assays, *P. aeruginosa* SWUC02 inhibited the growth of various common pathogenic bacterial strains. Furthermore, the cell-free culture of *P. aeruginosa* SWUC02 exhibited the highest inhibition against both *S. aureus* and *Bacillus cereus*. According to whole-genome sequencing analysis, *P. aeruginosa* SWUC02 had 16 gene clusters related to the production of antimicrobial compounds, classified into three groups: bacteriocins, metabolites, and siderophores. The one-factor-at-a-time method was used to optimize the culture conditions for *P. aeruginosa*. This was achieved by culturing the bacteria in LB or TSB nutrient media supplemented with 0.01% CuCl_2 , starting with an initial inoculum size of 1×10^5 CFU.ml⁻¹, at a pH of 7, shaking at 100 rpm, and incubating at 32°C for 12 days. The antimicrobial compounds in the cell-free culture of *P. aeruginosa* SWUC02 were tolerant to pepsin, proteinase K, and heat and could be extracted using dichloromethane. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the cell-free culture and the extract against *S. aureus* were 0.098%, 0.391%, and 3.91, 3.91 µg/mL, respectively. The minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) of the extract was 15.625 µg/mL. The MIC of the extract against MRSA isolates ranged from 3.91 to 15.63 µg/mL. The application of the extract on household wash basin reduced total bacteria. However, this study is not able to inhibit the growth of Staphylococcal group. This demonstrates the efficacy of the culture and extract derived from *P. aeruginosa* SWUC02 in inhibiting bacteria and suggests the potential of the extract for further development into a product for inhibiting bacteria.

Keyword : *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrobial compounds, Biofilm, whole-genome sequencing, MRSA

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริวัชร ศรวณียารักษ์ ที่ปรึกษาหลัก และ รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ ที่ปรึกษาร่วม ผู้ซึ่งเสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการจัดทำงานวิจัย ทำให้ งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี รวมทั้ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ ที่ร่วมเป็นประธาน กรรมการในการสอบ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขวัญนันท นันทวิสัย ที่ร่วมเป็นกรรมการในการ สอบ และ ความอนุเคราะห์สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ ผู้วิจัยขอกราบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คมวิทย์ สุรชาติ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐฐิกา สุวรรณาศรัย รองศาสตราจารย์ ดร.สิริธร สโมสร์ และ อาจารย์ ดร.กุลวดี ดลโสภณ สำหรับความอนุเคราะห์ในการทำวิจัยในครั้งนี้ และ ขอกราบขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดเวลาการศึกษา ซึ่งทำให้ผู้วิจัยนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการจัดทำงานวิจัย ครั้งนี้ และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาประเทศ ตามเจตนารมณ์ การศึกษาตามหลักสูตรจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยต่อไป

ท้ายที่สุดขอโน้มรำลึกถึงคุณบิดามารดาและขอบคุณที่ ๆ นื่อง ๆ ที่ให้กำลังใจ ให้การ สนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณผู้มีพระคุณท่านอื่น ๆ ที่มีได้กล่าว นามในที่นี้ที่ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

กชชณัฏฐ์ ศรีแสงจันทร์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ด
บทที่ 1 บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตการวิจัย.....	3
กรอบแนวคิดการวิจัย.....	5
ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	6
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	7
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.1 <i>S. aureus</i>	7
1.2 ปัญหาของ <i>S. aureus</i>	7
1.3 การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของ <i>S. aureus</i>	8
1.4 กลไกก่อโรคของ <i>S. aureus</i>	9
1.4.1 การติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน (skin and soft tissue infections, SSTIs).....	9
1.4.2 อาการอาหารเป็นพิษจากเชื้อในกลุ่ม Staphylococci (Staphylococci food-borne disease; SFD).....	10

2. ปัญหาการดื้อยา.....	11
2.1. แบคทีเรียดื้อยา	11
2.1.1 การควบคุมการนำยาเข้าสู่เซลล์ (Limiting uptake of a drug)	12
2.1.2 การเปลี่ยนแปลงบริเวณโครงสร้างเป้าหมายของยา (Modification of drug targets)	12
2.1.3. การยับยั้งความสามารถของยา (Drug inactivation).....	12
2.1.3.1. การทำให้ยาสลายตัว	12
2.1.3.2. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยา.....	12
2.1.4. การขับยาออกจากเซลล์ (Drug efflux)	13
2.2 Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	13
3. ปัญหาไบโอฟิล์มของ <i>S. aureus</i>	14
4. การป้องกันและการรักษาการติดเชื้อไบโอฟิล์มที่เกิดจาก <i>S. aureus</i>	15
4.1 การใช้สารปฏิชีวนะ.....	16
4.2 การกำจัดไบโอฟิล์มด้วยวิธีทางกายภาพ.....	16
4.3 การกำจัดไบโอฟิล์มด้วยสารชีวภาพ.....	17
4.4 การเคลือบสารยับยั้งแบคทีเรีย	17
4.5 การใช้สารลดแรงตึงผิว	17
5. การป้องกันการปนเปื้อน <i>S. aureus</i> ในอุตสาหกรรมอาหาร	18
5.1 การใช้จุลินทรีย์ และสารจากจุลินทรีย์	18
5.2 Metal and metal oxide nanoparticles	18
6. <i>P. aeruginosa</i> และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จาก <i>P. aeruginosa</i>	19
6.1 <i>Pseudomonas</i> spp.	19
6.2 <i>P. aeruginosa</i>	19

6.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จาก <i>P. aeruginosa</i>	20
6.4 <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	21
7. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การใช้และกลไกของสารในการยับยั้งเชื้อก่อโรค	21
7.1 แอมโมเนีย (ammonia)	21
7.2 ไลเปส (lipase)	22
7.3 โปรติเอส (protease)	22
7.4 β -1,3-glucanase.....	23
7.5 ไคติเนส (chitinase).....	23
8. การหาสภาวะการเจริญที่เหมาะสมของ <i>P. aeruginosa</i>	24
9. การศึกษาพันธุศาสตร์ด้วยเทคนิค whole-genome sequencing	25
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย	27
อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	27
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	29
1. ศึกษาผลความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ต่อเชื้อก่อโรคในมนุษย์ โดยใช้วิธี dual culture assay และ well-diffusion assay.....	29
1.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ.....	29
1.2 การศึกษาความสามารถของ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค	30
1.3 การศึกษาความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค	30
2. ศึกษาการสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	31
2.1 การสร้างแอมโมเนีย	31
2.2 การผลิต lipase.....	31

2.3 การผลิต Protease	31
2.4 การผลิต β -1,3-glucanase.....	31
2.5 การผลิต chitinase	31
3. การศึกษาลักษณะของสารในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i>	31
3.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	31
3.2 ศึกษาการทนต่ออุณหภูมิ.....	32
3.3 การศึกษาการทนต่อเอนไซม์	32
4. ศึกษาอื่นที่เกี่ยวกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 โดยใช้เทคนิค whole-genome sequencing	32
4.1 สกัด genomic DNA จาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 และการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในจีโนม	32
4.2 ศึกษาลำดับ genomic DNA จาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป.....	33
5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02.....	35
5.1 ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02.....	35
5.2 ความเข้มข้นของ CuCl_2 ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02.....	35
5.3 ปริมาณการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02.....	35
5.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	36
5.5 ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02.....	36

5.6 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	36
5.7 อาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	36
6. การแยกและการสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	37
7. การศึกษาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อและทำลาย <i>S. aureus</i>	37
7.1 ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> (MIC)	37
7.2 ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการทำลายเชื้อ <i>S. aureus</i> (MBC)	38
8. การศึกษาการยับยั้งไบโอฟิล์มของ <i>S. aureus</i> โดยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ	38
8.1. การศึกษาการป้องกันเกิดไบโอฟิล์มด้วยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	38
8.2. การศึกษาการทำลายไบโอฟิล์มด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	39
9. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> สายพันธุ์ที่พบในครัวเรือนและสายพันธุ์ที่ดื้อยา	41
9.1 การทดสอบการดื้อยาของ <i>S. aureus</i> ที่คัดแยกได้จากผิวอ่างล้างมือในครัวเรือน	41
9.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> สายพันธุ์ที่พบในครัวเรือนและสายพันธุ์ที่ดื้อยา	41

10. การทดสอบประสิทธิภาพการประยุกต์ใช้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้อากาศ และเชื้อในกลุ่มStaphylococci ที่พื้นผิวบนอ่างล้างมือครัวเรือน	42
11. การวิเคราะห์ทางสถิติ	42
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	43
1. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ต่อเชื้อก่อโรคในมนุษย์	43
2. การศึกษาองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02.....	44
3. ลักษณะของสารในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i>	44
4. การศึกษาเกี่ยวกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 โดยใช้เทคนิค whole-genome sequencing	45
5. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จาก <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	49
6. การแยกและการสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02.....	52
7. การศึกษาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อและทำลาย <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	53
8. การศึกษาการยับยั้งไบโอฟิล์มของ <i>S. aureus</i> ATCC 25923 โดยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	53
9. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> สายพันธุ์ที่พบในครัวเรือนและสายพันธุ์ที่ดื้อยา.....	54
9.1 การทดสอบการดื้อยาของ <i>S. aureus</i> ที่คัดแยกได้จากผิวอ่างล้างมือในครัวเรือน.....	54
9.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> สายพันธุ์ที่พบในครัวเรือนและสายพันธุ์ที่ดื้อยา	55
10. การทดสอบประสิทธิภาพการประยุกต์ใช้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ที่พื้นผิวบนอ่างล้างมือครัวเรือน	56

บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	58
1. ความสามารถของเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	58
2. ลักษณะจีโนมของ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02.....	61
3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากในน้ำเลี้ยงเชื้อของ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	63
4. การประยุกต์ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> สายพันธุ์ที่พบในครัวเรือนและสายพันธุ์ที่ดื้อยา และยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์ม <i>S. aureus</i>	65
บรรณานุกรม.....	68
ภาคผนวก.....	83
ภาคผนวก ก.....	84
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	85
สูตรอาหาร.....	85
1. Tryptic Soya Broth	85
2. 4% Peptone Broth.....	85
3. Nutrient Broth	85
4. King's B medium	86
5. Miller's Luria–Bertani Broth	86
6. Skim milk agar	86
7. Mineral salt medium laminarin	87
8. Colloidal chitin agar	87
ภาคผนวก ข.....	88
ภาคผนวก ข วิธีการคำนวณและการทดลองการหาค่า MIC.....	89
ภาคผนวก ค	90

ภาคผนวก ค วิธีการยืนยันสายพันธุ์ MRSA ตามมาตรฐาน CLSI.....	91
ประวัติผู้เขียน.....	91



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	27
ตาราง 2 อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	28
ตาราง 3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย.....	29
ตาราง 4 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ต่อเชื้อก่อโรค ...	43
ตาราง 5 การศึกษาองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02	44
ตาราง 6 แสดงลักษณะของสารในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i>	45
ตาราง 7 ภาพรวมจีโนมของ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 โดย RAST version 2.0.....	46
ตาราง 8 แสดงยีนดื้อยาที่พบบนจีโนมของ <i>P. aeruginosa</i> จากฐานข้อมูล CARD และที่พบใน <i>P. aeruginosa</i> SWUC02.....	47
ตาราง 9 แสดงยีนต้านยาปฏิชีวนะของ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 โดยใช้ฐานข้อมูล ResFinder โดย “*” แสดงเลขประจำรหัสข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในฐานข้อมูล Genbank.....	48
ตาราง 10 แสดงผลการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยฐานข้อมูล (a) RAST, (b) BAGEL4, (c) AntiSMASH และ (d) Prokka.....	49
ตาราง 11 แสดงผลการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	50
ตาราง 12 แสดงผลของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	52
ตาราง 13 แสดงระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อ (MIC) และทำลาย (MBC) <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	53
ตาราง 14 แสดงระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 ในการยับยั้ง (MBIC) และทำลายไบโอฟิล์ม (MBEC) ของ <i>S. aureus</i> ATCC25923 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$).....	54

ตาราง 15 *S. aureus* ที่มีความสามารถในการติดต่อยาปฏิชีวนะ cefoxitin.....55

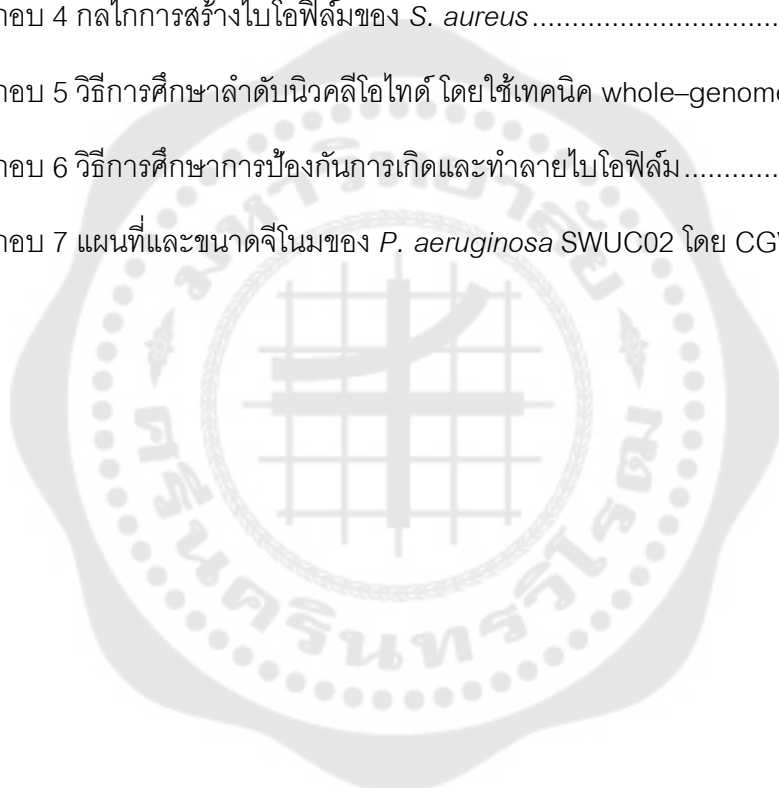
ตาราง 16 แสดงระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง (MIC) MRSA ที่พบในครัวเรือน56

ตาราง 17 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการประยุกต์ใช้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* ที่พื้นผิวบนอ่างล้างมือครัวเรือน57



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 กระบวนการก่อให้เกิดฝีหนอง.....	10
ภาพประกอบ 2 กลไกการดื้อยาทั่วไปของแบคทีเรีย	11
ภาพประกอบ 3 กลไกการดื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactams	13
ภาพประกอบ 4 กลไกการสร้างไบโอฟิล์มของ <i>S. aureus</i>	15
ภาพประกอบ 5 วิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เทคนิค whole-genome sequencing..	34
ภาพประกอบ 6 วิธีการศึกษาการป้องกันการเกิดและทำลายไบโอฟิล์ม.....	40
ภาพประกอบ 7 แผนที่และขนาดจีโนมของ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02 โดย CGView Server	46



บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหางานวิจัย

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปทั้งในร่างกายและเป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคบนผิวหนัง เช่น โรคต่อมขน (folliculitis) โรคตุ่มพุงพอง (impetigo) และฝี (abscesses) เป็นต้น การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายในการรักษาส่งผลให้เชื้อมีการพัฒนาให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ตัวอย่างเช่น methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) และ vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) ทำให้การรักษาการติดเชื้อที่ผิวหนัง และเนื้อเยื่ออ่อน (skin and soft tissue infections, SSTIs) ทำได้ยากขึ้น นอกจากนี้ *S. aureus* จะเป็นสาเหตุของโรคผิวหนังของมนุษย์แล้วหากผู้ประกอบการมีสุขอนามัยที่ไม่ดีอาจมีการปนเปื้อนสายพันธุ์ที่ดื้อยาเหล่านี้จากผิวหนังสู่อาหาร ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษอีกด้วย

การระบาดของ *S. aureus* จนกระทั่งก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษพบได้เป็นระยะในปัจจุบัน สำหรับในประเทศไทย จากรายงาน Kokaew และคนอื่น ๆ, (2020) ในปี พ.ศ. 2560 พบว่ามีผู้ป่วยจากอาหารเป็นพิษจำนวน 53,968 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วยที่มีสาเหตุจาก *Staphylococcus* จำนวน 98 ราย ซึ่งจากการสำรวจอาหารพร้อมบริโภคจากตลาดและร้านค้า เช่น อาหารจานเดียว อาหารประเภทเส้น และกับข้าว บริเวณภาคกลางมีการปนเปื้อนของเชื้อที่เกินมาตรฐานโดยที่เชื้อก่อโรคที่พบมากที่สุดคือ *S. aureus* นอกจากนี้ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อ และพาหะนำโรค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รายงานถึงสาเหตุโรคอุจจาระร่วง ตั้งแต่ พ.ศ. 2543 จนถึง พ.ศ. 2548 โดยข้อมูลจากโรงพยาบาล 28 แห่ง ตรวจพบ *S. aureus* สาเหตุโรคอาหารเป็นพิษ และฝีหนองซึ่งเป็นกลุ่มดื้อยาจำนวน 11,000–13,000 สายพันธุ์ ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อ MRSA 24–27% เป็นเชื้อที่ดื้อต่อ clindamycin (37–69%), erythromycin (94–97%), fosfomycin (7.7–17%), teicoplanin (0.2–1.3%) และ vancomycin (0.1–0.8%) (Tishyadhigama และคนอื่น ๆ, 2011) นอกจากนี้ในประเทศเวียดนามได้มีการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค *S. aureus* ในอาหาร โดยในช่วงปี ค.ศ. 2014–2018 พบว่ามี การระบาดของ *S. aureus* และ Staphylococci toxins มากกว่า 70 ครั้ง ทำให้มีผู้ป่วยต้องเข้ารับการรักษา กว่า 3,800 คน (Le และคนอื่น ๆ, 2021)

อย่างไรก็ตาม *S. aureus* ยังมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm) ซึ่งเป็นโครงสร้าง exopolysaccharide ที่มีโครงสร้างซับซ้อนช่วยให้เชื้อสามารถเกาะกับพื้นผิว และยังสามารถส่งผลให้การทำลายด้วยยาปฏิชีวนะทำได้ยากมากขึ้นอีกด้วย จากรายงานของ Cheung และคนอื่นๆ, (2021) พบว่าไบโอฟิล์มของ *S. aureus* เป็นสาเหตุของโรค Staphylococci toxic shock syndrome (TSS) ซึ่งอาจส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการช็อกและอวัยวะหยุดทำงานเฉียบพลันได้

Pseudomonas เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างหลากหลาย ตัวอย่างเช่น iron-chelating compounds และ 2R,3R-butenediol เป็นต้น สารที่มีฤทธิ์ในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา ตัวอย่างเช่น pyoluteorin, pyrrolnitrin, phenazine-1-carboxylic acid และ bacteriocins เป็นต้น (Preston, 2004 ; Santoyo และคนอื่นๆ, 2012) จากงานวิจัยของ Navarro และคนอื่นๆ, (2020) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ LV สามารถทำลายเชื้อก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบทั้งที่เป็นเชื้อดื้อยาและเชื้อปกติได้ ตัวอย่างจากการวิจัย Raji El Feghali และ Nawas, (2018) พบว่า pyocyanin ที่ถูกสร้างโดย *P. aeruginosa* มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด โดยสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคแกรมบวก *S. aureus*, *S. saprophyticus* และ *Enterococcus faecalis* ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ และยังพบอีกว่า pyocyanin สามารถยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรค *S. saprophyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* และ *Escherichia coli* ได้ ซึ่งเชื้อก่อโรคเหล่านี้สามารถพบได้ทั่วไปทั้งบนอาหารและพื้นผิวต่าง ๆ ที่อาจไม่ถูกสุขลักษณะ และเชื้อส่วนใหญ่เหล่านี้ยังมีรายงานการเป็นเชื้อก่อโรคดื้อยาอีกด้วย

จากงานวิจัยก่อนหน้าของคณะผู้วิจัย Sudyong และคนอื่นๆ, (2020) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ SWUC02 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเติม CuCl_2 ความเข้มข้น 0.01% (w/v) สามารถใช้ในการกำจัด *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในพืชมะนาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่ง *X. citri* subsp. *citri* คัดแยกได้จากใบมะนาวที่อยู่ในแปลงเพาะปลูกที่ใช้สารเคมีควบคุมโรคพืชมาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งกล่าวได้ว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *P. aeruginosa* SWUC02 มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่กำจัดได้ยากในสภาพแวดล้อมจริงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาผลของการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยใช้ น้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus* ทั้งสายพันธุ์ที่พบได้ทั่วไปในครัวเรือนและสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการดื้อยา

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยง *P. aeruginosa* SWUC02 สำหรับการผลิตน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus*
2. เพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อ, น้ำเลี้ยงเชื้อ และข้อมูลสารพันธุกรรมทั้งหมดในจีโนม *P. aeruginosa* SWUC02 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์
3. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* สายพันธุ์ที่พบในครัวเรือนและสายพันธุ์ดื้อยา
4. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการลดปริมาณ *S. aureus* ที่พบบนอ่างล้างมือในครัวเรือน

ขอบเขตการวิจัย

การทดสอบความสามารถของเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Salmonella* sp. และ *Shigella* sp. และความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของ *P. aeruginosa* SWUC02 ได้แก่ การสร้างแอมโมเนีย การผลิต extracellular enzyme ประเภท lipases, protease, glucanase และ chitinase

การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *P. aeruginosa* SWUC02 โดยกำหนดตัวแปรในการศึกษา ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณความเข้มข้นของ CuCl_2 อุณหภูมิ ค่า pH ปริมาณหัวเชื้อ การให้อากาศและระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ และการทดสอบลักษณะของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 โดยกำหนดตัวแปร ได้แก่ การทนความร้อน การทนต่อเอนไซม์ การละลายในตัวทำละลาย

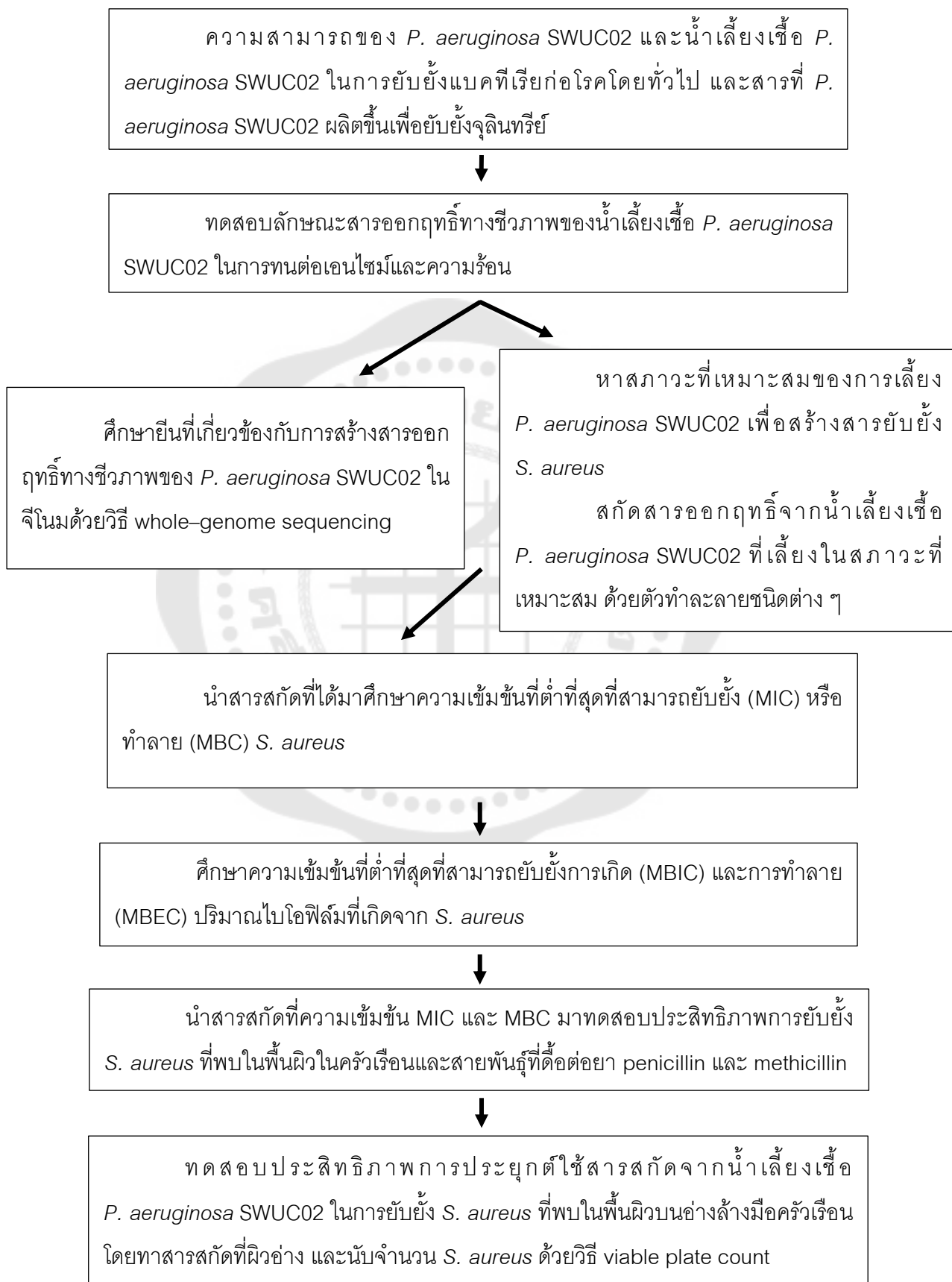
ศึกษาจีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02 โดยวิธี whole-genome sequencing

ศึกษาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งหรือทำลาย *S. aureus* โดยใช้สารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 และทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ต่อการยับยั้งการเกิดและลดปริมาณไบโอฟิล์มที่เกิดจาก *S. aureus*

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง MRSA สายพันธุ์ที่พบในคร้วเรือนโดยวิธี broth dilution และทดสอบประสิทธิภาพการประยุกต์ใช้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* ที่พบในพื้นที่ผิวนอวล้างมือคร้วเรือนโดยทาสารสกัดที่ผิวอวล และนับจำนวน *S. aureus* ด้วยวิธี viable plate count



กรอบแนวคิดการวิจัย



ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหรือป้องกันการปนเปื้อน *S. aureus* ที่พบในครัวเรือน
2. แนวทางในการควบคุมหรือป้องกันการปนเปื้อน *S. aureus* โดยใช้สารที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้



บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. *Staphylococcus aureus*

1.1 *S. aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวกันเป็นกลุ่มลักษณะคล้ายพวงองุ่น สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ที่อุณหภูมิระหว่าง 18–40 องศาเซลเซียส และทนเกลือได้ถึง 10% โคโลนีมีลักษณะสีเหลือง ผลการยีนย่นลักษณะทางชีวเคมีประกอบไปด้วย catalase, coagulase ให้ผลเป็นบวก, ไวต่อยา novobiocin และสามารถใช้น้ำตาล mannitol ได้

S. aureus สามารถพบได้ทั่วไปบนผิวหนัง เยื่อเมือกต่าง ๆ และพบมากที่สุดที่บริเวณหลังโพรงจมูกของมนุษย์ โดยตรวจพบเชื้อในประชากรวัยผู้ใหญ่มากกว่าประชากรวัยอื่น เชื้อส่วนใหญ่ยังพบในผู้ที่ทำงานด้านสาธารณสุข ผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องใช้เข็มเป็นประจำ ผู้ป่วยในโรงพยาบาล และผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ นอกจากนี้เชื้อยังสามารถติดต่อจากคนสู่คนผ่านการสัมผัสหรือผ่านวัตถุที่ปนเปื้อนได้อีกด้วย (Frank และคนอื่น ๆ, 2010)

1.2 ปัญหาของ *S. aureus*

จากการรายงานของ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า ในปี ค.ศ. 2017 มีผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อ *S. aureus* เกือบ 20,000 คน และมีผู้ป่วยติดเชื้อกว่า 119,000 คน โดยทั่วไปแล้วเชื้อนี้จะไม่ก่อให้เกิดอันตราย แต่มักจะก่อโรคฉวยโอกาสกับผู้มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง การติดเชื้อมีตั้งแต่ระดับที่ไม่รุนแรง เช่น การติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน หนอง ผื่น และเนื้อเยื่ออักเสบ จนถึงการติดเชื้อระดับที่รุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต เช่น ติดเชื้อในกระแสเลือด ปอดบวม ลิ้นหัวใจติดเชื้อและกระดูกติดเชื้อ เป็นต้น (CDC, 2019b)

S. aureus เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ (Staphylococci food-borne disease; SFD) ที่พบได้มาก ซึ่งเป็นผลมาจากการปนเปื้อนสารพิษ enterotoxin จากการรายงานในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า มีผู้ป่วยจากอาการอาหารเป็นพิษราว 241,000 รายต่อปี จากการศึกษาการเจริญของ *S. aureus* ในอาหารพบว่า เชื้อนี้มักมีการปนเปื้อนในอาหารได้หลากหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ไข่ นม สลัด ขนมปัง เค้ก แขนดวีส อาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อเหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามพฤติกรรมในการบริโภคของแต่ละประเทศ (Scallan และคนอื่น ๆ, 2011)

การกำจัดหรือควบคุมปริมาณ *S. aureus* ทำได้ยาก สาเหตุส่วนหนึ่งเป็นเพราะเชื้อมีความสามารถสร้างไบโอฟิล์ม โดยไบโอฟิล์มคือโครงสร้างที่เกิดจากสารต่าง ๆ ที่สร้างจากแบคทีเรียที่เรียกว่า extracellular polymeric substances (EPS) ซึ่งประกอบไปด้วย โปรตีน ดีเอ็นเอ และพอลิแซ็กคาไรด์ ไบโอฟิล์มเหล่านี้สามารถช่วยแบคทีเรียหลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (host) และช่วยให้ทนต่อการถูกทำลายด้วยยาปฏิชีวนะได้ (Bhattacharya และคนอื่น ๆ, 2015)

การพัฒนาของไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ประกอบไปด้วย 4 ระยะ ได้แก่ การเกาะติดเพิ่มจำนวน เจริญเต็มที่ และหลุดออก โดยกลไกในระยะแรกนั้นพื้นผิวที่เชื้อเกาะติดจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อหากเป็นพื้นผิวที่ไม่มีชีวิตเช่น แก้ว โลหะ และพลาสติก จะเป็นการเกาะติดที่ไม่จำเพาะ ซึ่งสามารถเกาะติดกันได้ด้วยแรง Van der Waals, ไฟฟ้าสถิต และ steric interactions ส่วนพื้นผิวที่มีชีวิต เชื้อจะมีการเกาะติดแบบจำเพาะผ่านการสร้างโปรตีนที่ใช้จับกับโปรตีนของโฮสต์ เช่น fibrinogen fibronectin และ collagen เป็นต้น ทำให้เมื่อมีการติดเชื้อและเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์ม การกำจัดไบโอฟิล์มของเชื้อในโฮสต์จึงกำจัดได้ยากกว่า (Foster และคนอื่น ๆ, 2014)

1.3 การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของ *S. aureus*

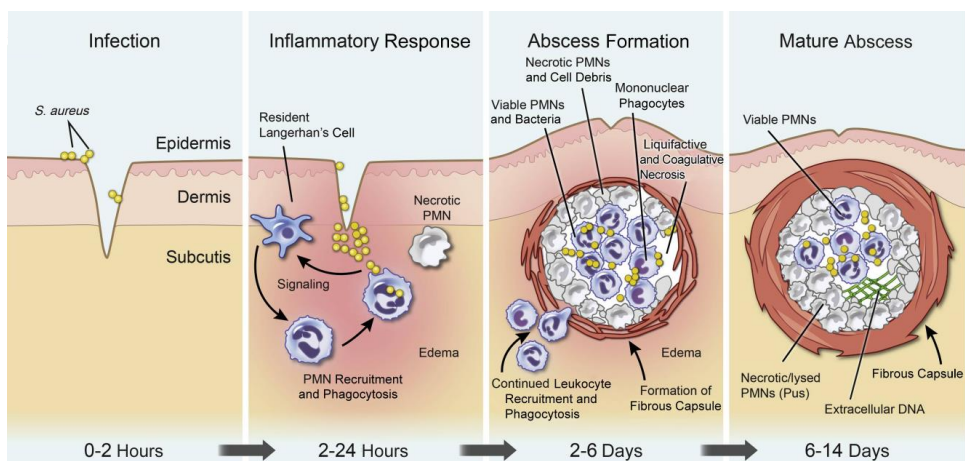
S. aureus สามารถเป็นสาเหตุของการตายจากโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ เนื่องจากเชื้อก่อโรคนี้สามารถก่อโรคได้หลากหลายโรคตั้งแต่สร้างความเสียหายทั่วไปที่ผิวหนัง จนถึงระดับอันตรายต่ออวัยวะภายใน เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด และปอดบวม เป็นต้น ความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity) ของเชื้อ *S. aureus* เพื่อที่จะสามารถต้านทานต่อการทำลายของระบบภูมิคุ้มกัน เชื้อจึงมีการพัฒนาความสามารถในด้านต่าง ๆ โพรเจกต์เป็นจุดที่มี *S. aureus* อยู่มากที่สุดและยังสามารถพบในที่อื่น ๆ ได้อีกตั้งแต่ผิวหนังจนถึงลำไส้ การติดเชื้อ *S. aureus* สามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาขึ้นอยู่กับว่าเชื้อจะผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนังได้หรือไม่ ยกตัวอย่างเช่น การติดเชื้อที่ผิวหนังจากแผลถลอกเป็นต้น อย่างไรก็ตาม *S. aureus* ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการทำลายของผิวหนังได้ ผ่านการหลั่ง α -toxin ซึ่งเป็นสารพิษที่มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ metalloproteinase ทำให้เกิดการแตกออกของโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการยึดเนื้อเยื่อ (E-cadherin) ด้วยกลไกนี้ส่งผลต่อการเกิดการทำให้การยึดเกาะกันของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังมีในกรณีของการติดเชื้อผ่านทางเครื่องมือแพทย์ที่อาจมีการปนเปื้อนของไบโอฟิล์ม ซึ่งไบโอฟิล์มนี้ยังอาจเป็นสาเหตุของโรค Staphylococci toxic shock syndrome (TSS) ได้อีกด้วย โดยโรค TSS นี้เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. aureus* ซึ่งมีการหลั่งสารพิษที่ทำหน้าที่เป็น superantigens ทำให้

เกิดการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ T-cells แล้วส่งผลต่อการหลั่ง cytokine ในปริมาณมากผลที่ได้คือ ทำให้เป็นไข้ ผื่น ช็อค และตามด้วยอวัยวะส่วนใหญ่หยุดทำงานอย่างรวดเร็ว (rapidly progressive multiple organ failure) ต่อมาเป็นการติดเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ มนุษย์สามารถติดเชื้อ *S. aureus* จากการกินอาหารที่มีการปนเปื้อน Staphylococci enterotoxins (SEs) อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าทำไม SEs ถึงเป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ แต่พบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการเกิดการหลั่งของสารก่อภูมิแพ้ (histamine) จากเซลล์ในลำไส้ทำหน้าที่เหมือนกับ superantigens ซึ่งส่งผลต่อการกระตุ้นการหลั่ง cytokine ในปริมาณมากเช่นกัน (Cheung และคนอื่น ๆ, 2021)

1.4 กลไกก่อโรคของ *S. aureus*

1.4.1 การติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน (skin and soft tissue infections, SSTIs)

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่สำคัญในการป้องกันเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย ประกอบไปด้วย เซลล์ผิวหนัง (keratinocytes) ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันเชื้อโรคเข้าสู่เนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย เมื่อเกิดบาดแผลที่ผิวหนังและจุลินทรีย์ต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันจะเริ่มทำงานตอบสนองต่อการเกิดบาดแผลและการติดเชื้อ การติดเชื้อ SSTIs ที่เกิดจากแบคทีเรียมีหลากหลายอาการตั้งแต่น้อยจนถึงรุนแรง โดยเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุหลักคือ *S. aureus* เมื่อติดเชื้อจะก่อให้เกิดอาการผิวหนังอักเสบและเป็นฝีหนอง โดยแบคทีเรียจะบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นใน เช่น กล้ามเนื้อใต้ผิวหนัง จากนั้นเชื้อจะเพิ่มจำนวนในบริเวณที่มีแผลส่งผลให้ร่างกายเกิดการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบและระบบภูมิคุ้มกันจะเริ่มมีการสร้างเม็ดเลือดขาวและสารต่าง ๆ เพื่อมาทำลายเชื้อ เช่น antimicrobial peptides ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อโดยตรง โดยหนองประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ เช่น เม็ดเลือดขาว เนื้อเยื่อที่เสียหาย fibrin และแบคทีเรียที่มีชีวิต เมื่อมีการสร้างเม็ดเลือดขาวจำนวนมากก็จะเริ่มสุก ซึ่งเกิดจากการก่อตัวของ fibroblastic และการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อที่บริเวณขอบของหนองเกิดก่อตัวเป็นแคปซูล (ภาพประกอบ 1) อาการติดเชื้อ SSTIs ก่อให้เกิดหนองที่มีแบคทีเรียอยู่บริเวณผิวหนังกำพวด ผิวหนังชั้นนอกหรือผิวหนังชั้นใน ซึ่งมักทำให้เกิดอาการผิวหนังอักเสบร่วมด้วย การเกิดหนองนั้นเป็นกลไกที่โฮสต์ตอบสนองเพื่อทำลายเชื้อโรค ซึ่งบางครั้งอาการ SSTIs สามารถหายเองได้โดยไม่ต้องมีการรักษาผ่านการทำงานของเม็ดเลือดขาว



ภาพประกอบ 1 กระบวนการก่อให้เกิดฝีหนอง

ที่มา (Kobayashi และคนอื่น ๆ, 2015). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Abscesses. *The American Journal of Pathology*, 185(6), 1518-1527.

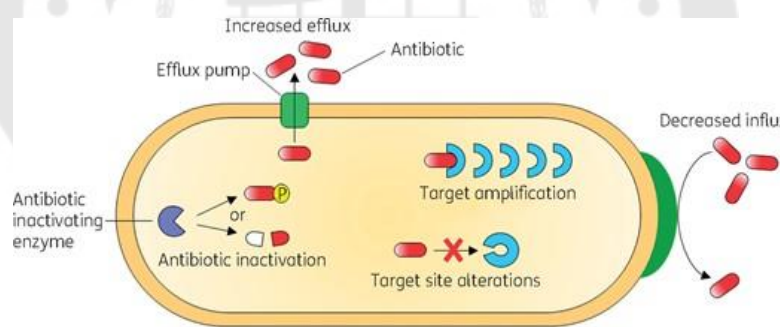
1.4.2 อาการอาหารเป็นพิษจากเชื้อในกลุ่ม Staphylococci (Staphylococci food-borne disease; SFD)

SFD เป็นหนึ่งในโรคอาหารเป็นพิษที่พบได้มากที่สุดชนิดหนึ่งทั่วโลก (Hennekinne และคนอื่น ๆ, 2012) เกิดจากสารพิษ Staphylococci enterotoxins (SEs) ซึ่งเป็นสารพิษที่ถูกสร้างจากเชื้อในกลุ่ม enterotoxigenic strains of coagulase-positive staphylococci โดยเชื้อที่พบหลักคือ *S. aureus* อาการทั่วไปของ SFD จะเริ่มหลังจากทานอาหารที่ปนเปื้อนไปแล้วเป็นเวลาประมาณ 3-5 ชั่วโมง ซึ่งอาจจะเกิดจากการสร้างสารพิษของแบคทีเรียขณะกำลังเจริญในอุณหภูมิที่เหมาะสมหรือการได้รับสารพิษจากเชื้อโดยตรง จากการศึกษาวิจัยมีรายงานว่า นมที่มีการปนเปื้อน SEs ความเข้มข้นปริมาณ 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสาเหตุของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษครั้งใหญ่ในประเทศสหรัฐอเมริกา (Evenson และคนอื่น ๆ, 1988)

อาการของโรค SFD จะประกอบไปด้วย มีน้ำลายมาก, คลื่นไส้, อาเจียน และปวดท้องเกร็ง อาจมีอาการท้องเสียร่วมด้วย หากมีการสูญเสียน้ำจะส่งผลให้เกิดอาการขาดน้ำและความดันต่ำ (Argudín และคนอื่น ๆ, 2010; Balaban และ Rasooly, 2000) อาการสามารถหายเองได้ภายใน 24-48 ชั่วโมง แต่หากเป็นทารก ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องอาการจะรุนแรงขึ้น (Scallan และคนอื่น ๆ, 2006) มีเพียงประมาณ 10% ของผู้ป่วยที่จะเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล กรณีที่มีอาการรุนแรงถึงชีวิตส่วนใหญ่จะเป็นผู้ป่วยสูงอายุ

2. ปัญหาการดื้อยา

การดื้อยา หมายถึง ความสามารถของเชื้อก่อโรคที่สามารถป้องกันการทำลายจากยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นปัญหาในการรักษาสุขภาพหนึ่งที่เผชิญกันอยู่ทั่วโลก ยาปฏิชีวนะถือเป็นเครื่องมือหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการจัดการกับปัญหาของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจากแบคทีเรีย แต่ด้วยปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้ในปัจจุบันมีผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่ไม่สามารถรักษาได้ ความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อดื้อยามีได้หลายทาง เช่น ตามสถานพยาบาล อุตสาหกรรมด้านอาหาร และอื่น ๆ การป้องกันการเกิดและชะลอการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อดื้อยาที่ดีที่สุดคือการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างถูกวิธี นอกจากนี้จะสามารถทำลายเชื้อและหยุดการกระจายยังช่วยหยุดการพัฒนาของเชื้อสายพันธุ์ดื้อยาได้อีกด้วย จากการรายงานของ CDC ในปี 2019 พบว่ามีประชากรในประเทศสหรัฐอเมริกาอย่างน้อย 2,600,000 ราย ที่มีการติดเชื้อดื้อยาและมีผู้เสียชีวิตอย่างน้อย 44,000 ราย (CDC, 2019b) ส่วนปัญหาการดื้อยาในประเทศไทย จากข้อมูลประมาณการเบื้องต้น คาดการณ์ว่ามีการติดเชื้อดื้อยาประมาณปีละ 87,751 ราย และเสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาประมาณ 38,481 ราย (Pumart และคนอื่น ๆ, 2012)



ภาพประกอบ 2 กลไกการดื้อยาทั่วไปของแบคทีเรีย

ที่ มา (Alav และ คน อื่น ๆ , 2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(8), 2003-2020.

2.1. แบคทีเรียดื้อยา

แบคทีเรียดื้อยา หมายถึง เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มีความสามารถหรือกลไกในการทนต่อการยับยั้งหรือทำลายของยาปฏิชีวนะ ซึ่งเกิดจากการที่แบคทีเรียได้วิวัฒนาการกลไกเพื่อทำให้เชื่อนั้น ๆ สามารถอยู่รอดได้ (Reygaert, 2018) กลไกการดื้อยาของแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 4 วิธีหลัก ๆ ด้วยกัน ได้แก่ (ภาพประกอบ 2)

2.1.1 การควบคุมการนำยาเข้าสู่เซลล์ (Limiting uptake of a drug)

เป็นกลไกทั่วไปของแบคทีเรียในธรรมชาติ ยกตัวอย่างในแบคทีเรียแกรมลบ จะอาศัยโครงสร้างของชั้นลิโปโพลีแซคคาไรด์ในการป้องกันโมเลกุลของยาเข้าสู่เซลล์ (Blair และคนอื่น ๆ, 2014) หรือในเชื้อแบคทีเรียที่ไม่มีผนังเซลล์ เช่น *Mycoplasma* spp. หรือเชื้ออื่น ๆ ที่มีลักษณะเดียวกัน เชื้อเหล่านี้สามารถทนต่อยาที่มีผลต่อผนังเซลล์เช่น β -lactams และไกลโคเปปไทด์ได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้เชื้อที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบไปด้วยลิพิดที่สูงมาก ๆ เช่น *Mycobacterium* spp. สามารถทนต่อยาที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) ได้อย่างดีด้วยเช่นกัน (Kumar และ Schweizer, 2005; Lambert, 2002)

2.1.2 การเปลี่ยนแปลงบริเวณโครงสร้างเป้าหมายของยา (Modification of drug targets)

โดยปกติแล้วยาปฏิชีวนะจะถูกออกแบบให้สอดคล้องกับกลไกการอยู่รอดของแบคทีเรียตั้งแต่การสร้างผนังเซลล์ไปจนถึงการสังเคราะห์ DNA ทำให้มีเป้าหมายในการทำลายของยาที่แน่นอน แต่ทว่าแบคทีเรียก็สามารถปรับตัวได้เช่นกันโดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในระดับโมเลกุลให้ยานั้นไม่สามารถทำลายเป้าหมายอีกต่อไปได้ ยกตัวอย่างเช่น กลไกการต่อยาในกลุ่ม β -lactams มีกลไกในการทำลายการสร้างผนังเซลล์ โดยจะจับกับ Transpeptidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเชื่อมส่วนของโครงสร้างผนังเซลล์เข้าด้วยกัน ตัวอย่างในเชื้อ MRSA เชื้อได้มีกลไกการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Penicillin Binding Proteins: PBPs ที่ยาจะเข้าจับ จาก PBPs เป็น PBP2a ส่งผลให้ความสามารถในการจับของยาหมดไป

2.1.3. การยับยั้งความสามารถของยา (Drug inactivation)

กลไกในการยับยั้งความสามารถของยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียประกอบไปด้วย 2 กลไกหลักด้วยกัน ได้แก่

2.1.3.1. การทำให้ยาสลายตัว

ยกตัวอย่างเช่น ในยากกลุ่ม β -lactams จะถูกทำลายโดยเอนไซม์ β -lactamases ที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้น หรือในยากกลุ่ม tetracycline ก็สามารถถูกทำลายโดยเอนไซม์ที่สร้างจากยีน *tetX* ด้วยเช่นกัน (Blair และคนอื่น ๆ, 2014)

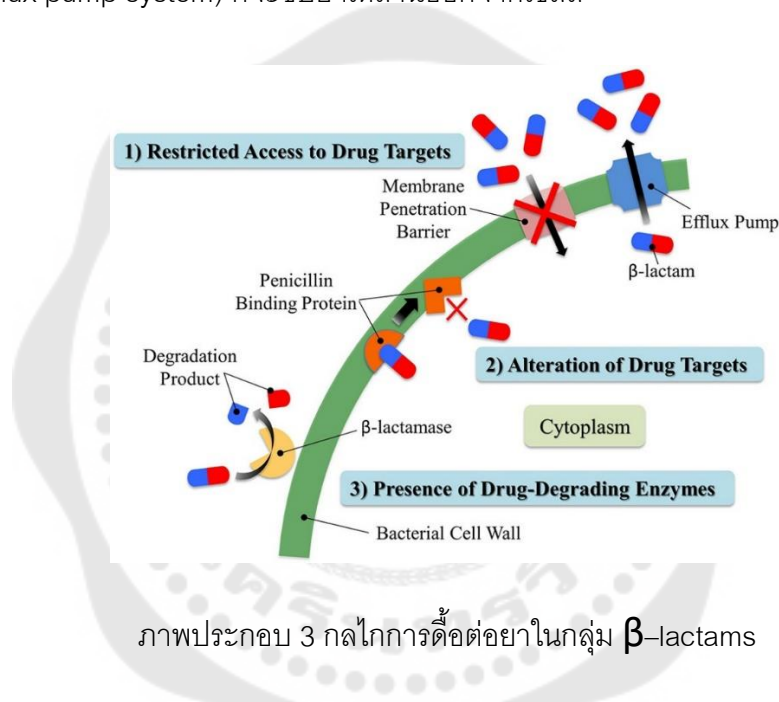
2.1.3.2. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยา

โดยทั่วไปโครงสร้างโมเลกุลของยาจะมีหมู่ฟังก์ชันทางเคมีที่จะส่งผลทำให้ยามีความเสถียรหรือส่งเสริมประสิทธิภาพการทำงานของยา แบคทีเรียจึงมีการปรับตัวทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์กลุ่ม transferases ทำให้หมู่ฟังก์ชันของยาเกิดการเปลี่ยนแปลงสลับตำแหน่งใน

โมเลกุลซึ่งจะส่งผลให้ยานั้นมีประสิทธิภาพในการทำลายที่ลดลงหรือทำให้โครงสร้างโมเลกุลของยาขาดความเสถียรจนไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ (Robicsek และคนอื่น ๆ, 2006)

2.1.4. การขับยาออกจากเซลล์ (Drug efflux)

แบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถในการควบคุมการเข้าออกของสารโดยใช้โครงสร้างที่ผิวเซลล์ที่ทำงานร่วมกันมีหน้าที่เหมือนปั๊มเพื่อควบคุมความสมดุลภายในเซลล์ เช่น ATP-binding cassette family, the multidrug and toxic compound extrusion family และ small drug resistance family เป็นต้น ซึ่งหากมียาในเซลล์ของแบคทีเรียระบบปั๊มสารที่อยู่ผิวเซลล์ (efflux pump system) ก็จะขับยาเหล่านี้ออกจากเซลล์



ที่มา (Gao และคนอื่น ๆ, 2017). Fungal Lactamases: Their Occurrence and Function. *Frontiers in Microbiology*, 8.

2.2 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

ยา penicillin ถูกใช้ครั้งแรกกับการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรียซึ่งรวมถึง *S. aureus* ด้วย ซึ่งในช่วงแรกนั้นสามารถใช้ยับยั้งได้ดี แต่ทว่าในเวลาไม่นานก็มีการเกิดขึ้นของ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา penicillin โดยจากการศึกษาพบว่าเกิดจากการที่เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ β -lactamases ทำให้การใช้ยา penicillin ไม่ได้ผล (ภาพประกอบ 3) ทางนักวิจัยจึงได้มีการพัฒนายาในกลุ่มของ β -lactams ขึ้นอีกเช่น ampicillin และ methicillin ซึ่งส่งผลให้แบคทีเรีย

เกิดการพัฒนาคัดลอกยาตามมาโดยการเปลี่ยนโครงสร้าง (penicillin binding protein; PBP) ที่ยาจะเข้าจับ ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยา (Mulligan และคนอื่น ๆ, 1993)

MRSA จะมียีน *mec* อยู่ในโครโมโซมของเชื้อ ซึ่งยีนนี้จะอยู่ในบริเวณที่เรียกว่า Staphylococci chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) เป็นบริเวณที่ทำให้เกิดการดื้อยาได้หลายชนิด ยีน *mec* ถูกใช้ในการสังเคราะห์ penicillin binding protein 2a (PBP-2a) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยคุณสมบัติของ PBP-2a คือยาในกลุ่ม beta-lactams สามารถเข้าจับกับโมเลกุลนี้ได้ยาก เป็นผลให้ *S. aureus* ที่สังเคราะห์ PBP-2a สามารถเจริญแม้จะมียาปฏิชีวนะ (Peacock และ Paterson, 2015)

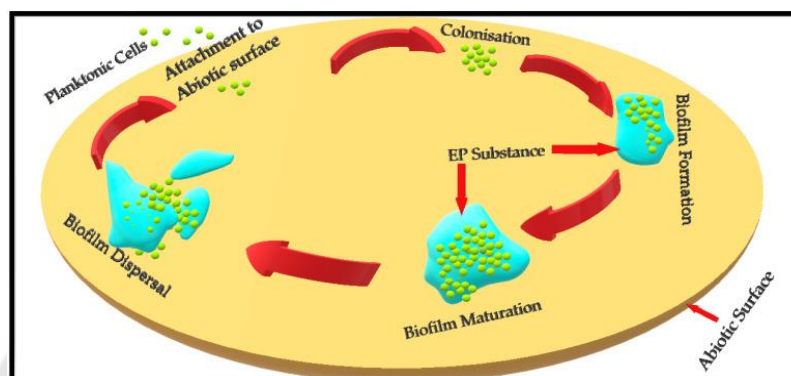
ในการศึกษาการแพร่กระจายของ MRSA ในปัจจุบันมีการใช้ยา cefoxitin แทนการใช้ยา methicillin ในการทดสอบ MRSA เนื่องจากยา cefoxitin สามารถการกระตุ้นการทำงานของยีน *mecA* ได้ดีกว่าและมีความแม่นยำมากกว่ายา oxacillin และ methicillin โดย cefoxitin มีความสามารถในการจับกับบริเวณจับจำเพาะของ *mecA* repressor protein ส่งผลให้ *mecA* repressor protein หยุดทำงาน แล้วทำให้ *mecA* เกิดการสังเคราะห์ PBP-2a ซึ่งเป็นสิ่งที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการทนต่อยา methicillin หรือยาในกลุ่ม β -lactams นั้นเอง (Becker และ Eiff, 2011) ทั้งนี้อ้างอิงจากมาตรฐาน CLSI และ CDC ได้กล่าวถึงการทดสอบ MRSA ไว้หลายวิธี ยกตัวอย่างเช่น การตรวจหายีน *mecA* ด้วยวิธี PCR หรือวิธี phenotypic methods ที่พิจารณาจากวิธีหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) โดยนำ *S. aureus* มาวัดค่า MIC ต่อยา cefoxitin หาก *S. aureus* มีค่า MIC มากกว่าเท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะกำหนดให้ *S. aureus* เป็น MRSA (CDC, 2019a; CLSI, 2021)

3. ปัญหาไบโอฟิล์มของ *S. aureus*

ไบโอฟิล์มของแบคทีเรียประกอบไปด้วยสารสองชนิดหลัก ๆ ด้วยกันได้แก่ น้ำ และสารอินทรีย์อื่น ๆ เช่น extracellular polymeric substance (EPS) ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่เกาะกลุ่มกันอยู่ภายนอกเซลล์ยกตัวอย่างเช่น กรดนิวคลีอิก โปรตีน และพอลิแซคคาไรด์และบางครั้งอาจมีเชื้อที่มีขนาดเล็ก ๆ microcolonies เป็นต้น โดยในไบโอฟิล์ม *S. aureus* จะประกอบไปด้วยพอลิแซคคาไรด์เป็นหลักใน EPS ซึ่งมีคุณสมบัติในการยึดเกาะระหว่างเซลล์ได้ดี (polysaccharide intercellular adhesin) เนื่องจากมีโครงสร้างที่เป็นประจุลบตามทำธรรมชาติ และด้วยสารประกอบเหล่านี้เองจึงทำให้ไบโอฟิล์มของ *S. aureus* มีส่วนสำคัญในการช่วยการเข้าเกาะ การสร้างไบโอฟิล์ม การติดเชื้ที่เกี่ยวข้องกับไบโอฟิล์ม การหลบจากระบบภูมิคุ้มกัน การทนต่อ

สารทำลายจุลินทรีย์ และการจับกินของเม็ดเลือดขาว (phagocytosis) (Idrees และคนอื่น ๆ, 2021) การเกิดไบโอฟิล์มของ MRSA ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนด้วยกัน ได้แก่ (ภาพประกอบ 4)

1. การเข้าเกาะของเซลล์ที่ลอยเป็นอิสระกับพื้นผิว
2. การเพิ่มจำนวนและการสร้างไบโอฟิล์ม
3. การเจริญเต็มที่ของไบโอฟิล์ม
4. การหลุดของไบโอฟิล์ม



ภาพประกอบ 4 กลไกการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus*

ที่มา (Idrees และคนอื่น ๆ, 2021). *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *International journal of environmental research and public health*, 18(14), 7602.

4. การป้องกันและการรักษาการติดเชื้อไบโอฟิล์มที่เกิดจาก *S. aureus*

ไบโอฟิล์มเป็นปัญหาทั้งทางด้านสุขภาพ การแพทย์ และอุตสาหกรรมต่าง ๆ ดังนั้นการป้องกันการเกิดและการทำลายไบโอฟิล์มจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อเป็นการจัดการกับไบโอฟิล์มเหล่านี้ โดยปกติการจัดการกับไบโอฟิล์มจะใช้สารปฏิชีวนะเป็นหลัก นอกจากนี้ยังมีแนวทางอื่นในการกำจัดไบโอฟิล์ม เช่น การกำจัดไบโอฟิล์มด้วยวิธีทางกายภาพ การกำจัดไบโอฟิล์มด้วยสารชีวภาพ การใช้เปปไทด์หรือลิพิดที่มีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ (antimicrobial peptide & antimicrobial lipid) เอนไซม์ การเคลือบสารยับยั้งแบคทีเรีย การใช้สารเพื่อลดการเกาะของเชื้อบนพื้นผิววัสดุ (Srinivasan และคนอื่น ๆ, 2021) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

4.1 การใช้สารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะ หมายถึง สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ โดยอาจแบ่งสารปฏิชีวนะได้ตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งเช่น antibacterial, antifungal และ antiparasitic เป็นต้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารปฏิชีวนะหลายชนิดเป็นสารจากธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น ในสังคัมจุลินทรีย์ดินมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลากหลายชนิด ซึ่งความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะที่หลากหลายนี้นี้ เป็นข้อได้เปรียบในการมีชีวิตรอด และสามารถแข่งขันการใช้ทรัพยากรเพื่อการดำรงชีวิตโดยการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ทั้งในรูปแบบที่เป็นการยับยั้ง (bacteriostatic) และการทำลาย (bactericide) (Newman และ Cragg, 2007) สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นส่วนใหญ่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรคในคน สัตว์ หรือพืชได้ และมีการนำสารเหล่านั้นมาพัฒนาต่อยอดให้มีความสามารถในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ให้ดียิ่งขึ้น (Tortorella และคนอื่น ๆ, 2018)

การรักษาติดเชื้อ *S. aureus* ที่มีการสร้างไบโอฟิล์มมักนิยมใช้ vancomycin มากที่สุด โดยการรักษาจะคล้ายกับการรักษาเซลล์ที่ลอยเป็นอิสระ (planktonic) ทั่วไปแต่จะเพิ่มความเข้มข้นของยาให้สูงกว่า และหากทราบว่าเป็นเชื้อที่ติดต่อยา vancomycin ก็จะมีการใช้ยาปฏิชีวนะอื่นร่วมกันในการรักษา เช่น rifampin และ linezolid เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะก็ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากไม่สามารถรักษาการติดเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มได้ทั้งหมด จึงมีการศึกษาหาวิธีใหม่ เช่น การใช้ anti-infective surfaces หรือการบำบัดร่วมกับวิธีอื่น ๆ เพื่อให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด ยกตัวอย่างเช่น localized delivery ซึ่งเป็นการรักษาโดยใช้ยา vancomycin และ/หรือ tobramycin ร่วมกับ calcium sulfate beads ในการรักษาแบบที่เรียกว่าลอยเป็นอิสระ และป้องกันการเกิดไบโอฟิล์มที่เกิดจากการติดเชื้อจากการศัลยกรรมกระดูก (Howlin และคนอื่น ๆ, 2015)

4.2 การกำจัดไบโอฟิล์มด้วยวิธีทางกายภาพ

การรักษาอาการติดเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างไบโอฟิล์มอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพคือการผ่าตัดเพื่อกำจัดบริเวณที่มีการติดเชื้อ โดยอาจจะเป็นการตัดเด็มและ/หรือร่วมกับการล้างแผล แต่อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดต่าง ๆ เช่น ผู้ป่วยที่รับการรักษาด้วยวิธีผ่าตัดไม่ได้หรือวิธีการผ่าตัดไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องจากการปนเปื้อนเชื้อระหว่างการทำผ่าตัด ตัวอย่างเช่น รายงานของ (Urish และคนอื่น ๆ, 2014) กล่าวว่าวิธีการรักษาการติดเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธีผ่าตัดเปลี่ยนหัวเข้าประกอบกับการล้างผ่านอุปกรณ์ pulse lavage irrigation ไม่สามารถกำจัดเชื้อได้

เนื่องจากอุปกรณ์แม้จะสามารถช่วยกำจัดไบโอฟิล์มส่วนใหญ่ได้แต่ยังไม่สามารถกำจัดไบโอฟิล์มได้ทั้งหมดทำให้เชื้อกลับมาเจริญและเกิดการสร้างไบโอฟิล์มอีกครั้ง

4.3 การกำจัดไบโอฟิล์มด้วยสารชีวภาพ

การศึกษาการใช้ RN3(5–17P22–36) peptide ซึ่งเป็น antimicrobial peptide ที่ได้จากเม็ดเลือดขาว เพื่อใช้ในการยับยั้ง *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 พบว่าโปรตีนชนิดนี้มีความสามารถในการทำลายไบโอฟิล์มได้สูง โดยมีส่วนในการเข้าจับกับ exopolysaccharide ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของไบโอฟิล์มของแบคทีเรียส่งผลทำให้เกิดการหลุดของไบโอฟิล์ม นอกจากนี้โปรตีนนี้ยังมีคุณสมบัติมีประจุบวกสูงและเป็นสารที่มีทั้งด้านชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ (amphipathicity) ซึ่งช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเกิดความไม่เสถียรอีกด้วย ส่งผลให้สารนี้ไม่เพียงแต่ทำลายไบโอฟิล์มแต่ยังสามารถทำลายเซลล์ที่ลอยเป็นอิสระได้ (Pulido และคนอื่น ๆ, 2016)

4.4 การเคลือบสารยับยั้งแบคทีเรีย

เป็นวิธีที่อาศัยสารยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียในการเคลือบพื้นผิวต่าง ๆ เช่น silver nanoparticle จากการศึกษาพบว่า silver nanoparticle มีความสามารถในการป้องกันการเกาะติดของเซลล์ *S. aureus* ได้ โดยจากผลการทดสอบแบบ *in vitro* สารที่ใช้สามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีข้อกังวลเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารต่อเซลล์และร่างกายผู้รับสารนี้อยู่เช่นกัน เนื่องจากสารนี้มีส่วนในการเร่งการก่อตัวของ thrombin และกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดซึ่งอาจมีความเสี่ยงต่อการส่งผลให้เกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน (Stevens และคนอื่น ๆ, 2009)

4.5 การใช้สารลดแรงตึงผิว

อีกแนวทางในการลดการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนพื้นผิวคือการใช้สารลดแรงตึงผิว ซึ่งอาจจะร่วมกับยาปฏิชีวนะ โดยวัตถุประสงค์หลักของวิธีนี้คือการป้องกันแบคทีเรียที่ลอยเป็นอิสระ ไม่ให้เกิดการเกาะติดกับพื้นผิวพร้อมกับการทำลายเซลล์ด้วยยาปฏิชีวนะ การลดการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนพื้นผิวจะอาศัยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของพื้นผิว เช่น สมบัติการไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity)/สมบัติการชอบน้ำ (hydrophilicity) ลักษณะพื้นผิว ประจุและความหยาบของพื้นผิว ซึ่งจะทำให้การเกาะติดของเชื้อเกิดขึ้นได้ยากมากยิ่งขึ้น (Bhattacharya และคนอื่น ๆ, 2015) จากการศึกษาของ Gristina และคนอื่น ๆ, (1988) ได้มีการเคลือบอวัยวะเทียมด้วยเซลล์ของไฮสท์ ซึ่งทำให้ป้องกันและลดความเสี่ยงในการติดเชื้อจากพื้นผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5. การป้องกันการปนเปื้อน *S. aureus* ในอุตสาหกรรมอาหาร

5.1 การใช้จุลินทรีย์ และสารจากจุลินทรีย์

S. aureus เป็นเชื้อหนึ่งที่เป็นสาเหตุของปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารซึ่งทำให้เกิดอาหารเน่าเสียและโรคอาหารเป็นพิษ การใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เพื่อควบคุมการเจริญของ *S. aureus* ในอาหารเป็นอีกวิธีที่ได้รับความนิยม (Kang และคนอื่น ๆ, 2020) พบว่าในอุตสาหกรรมนมมีการปนเปื้อนของไบโอฟิล์มที่สร้างจาก *S. aureus* เนื่องจากไบโอฟิล์มสามารถก่อตัวได้ง่ายบนพื้นผิวต่าง ๆ และงานวิจัยดังกล่าวได้ศึกษาการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ lactobionic acid ในการลดปัญหาการปนเปื้อน *S. aureus* ในอุตสาหกรรมนม โดย lactobionic acid เป็นสารในกลุ่ม polyhydroxy organic acid ที่พบได้ทั่วไปในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวและโยเกิร์ต มีฤทธิ์ในการทำละลายเชื้อจุลินทรีย์

5.2 Metal and metal oxide nanoparticles

การผสมผสานการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับการใช้โลหะและสารประเภท metal oxide nanoparticles ที่มีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการทำละลายเชื้อดื้อยาได้ดีมากยิ่งขึ้น โดยตัวอย่างโลหะและ metal oxide nanoparticles ที่มีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ได้แก่ เงิน (Ag) ทองแดง (Cu), ทอง (Au) ไทเทเนียม (Ti) และสังกะสี (Zn) (Bhattacharya และคนอื่น ๆ; Naseem และ Durrani, 2021) โดยกลไกที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของโลหะและ metal oxide nanoparticles ประกอบไปด้วย 2 กลไกหลักด้วยกันได้แก่ ไอออนของโลหะอิสระไปรบกวนการทำงานของผิวเซลล์ และไอออนของโลหะก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress ผ่านการส่งเสริมการสร้าง reactive oxygen species (ROS) บนผิวของโลหะ (Besinis และคนอื่น ๆ, 2014) ตัวอย่างการศึกษาการใช้ Cu และ CuO nanoparticles โดยศึกษาการใช้ Cu-chitosan nanoparticles ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ MRSA, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella Choleraesuis* และ *Candida albicans* จากการศึกษาพบว่า Cu nanoparticles มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยังสามารถยับยั้งเชื้อราได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นของ chitosan และขนาดของอนุภาคมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งอีกด้วย (Dizaj และคนอื่น ๆ, 2014; Usman และคนอื่น ๆ, 2013)

สำหรับการกำจัดการปนเปื้อน *S. aureus* ในส่วนอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ พบว่าสารประเภท metal oxide nanoparticle เช่น ZnO₂ – nanoparticle มีประสิทธิภาพในการลดจำนวน *S. aureus* เชื้อปกติ และเชื้อที่ดื้อยา รวมถึงยังสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้อีกด้วย (Ali และคนอื่น ๆ, 2021)

6. *P. aeruginosa* และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จาก *P. aeruginosa*

6.1 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ด้วย polar หรือ peritrichous flagella ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้เฉพาะที่มีอากาศ ผลการยืนยันลักษณะทางชีวเคมีประกอบไปด้วย oxidase ให้ผลเป็นบวกและไม่หมักน้ำตาล lactose สามารถพบได้ตามดินและน้ำในระบบนิเวศ นอกจากนี้เชื้อในจีนัสนี้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญหลายชนิดด้วยกัน ยกตัวอย่างเช่น *P. fluorescens* และ *P. putida* เป็นเชื้อก่อโรคที่มักปนเปื้อนในอาหารที่เก็บในตู้เย็น และยังมีสมาชิกอื่น ๆ อีกเช่น *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. fulva* และ *P. monteilii* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการก่อโรคติดเชื้อในมนุษย์ (Behzadi และคนอื่น ๆ, 2021) และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. aeruginosa* เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสในมนุษย์ ซึ่งมีรายงานออกมามากมายเกี่ยวกับการก่อโรคในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำอีกทั้งยังมีปัญหาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและการติดเชื้อในโรงพยาบาลอีกด้วย (Azam และ Khan, 2019) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าเชื้อในจีนัส *Pseudomonas* มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะหลากหลายชนิด เช่น 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), pyrrolnitrin และ phenazine (Raaijmakers และ Mazzola, 2011) การสร้างสารปฏิชีวนะหลายชนิดขึ้นอยู่กับปัจจัยที่หลากหลาย ตัวอย่างเช่น การสร้าง phenazine ของแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* จะขึ้นอยู่กับจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ หรือที่รู้จักกันในรูปแบบ quorum-sensing หรือรูปแบบการชักนำการสร้างสารของจุลินทรีย์โดยการสื่อสารในกลุ่มประชากรแบคทีเรีย (Köhl และคนอื่น ๆ, 2019)

6.2 *P. aeruginosa*

P. aeruginosa เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* ที่สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น แหล่งน้ำ ดิน และสิ่งมีชีวิตในแหล่งธรรมชาติทั้งพืชและสัตว์ อีกทั้งยังเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม และทนอุณหภูมิได้ตั้งแต่ 4–40 องศาเซลเซียส มีกลิ่น ให้ผล β -hemolysis บนอาหาร blood agar มีความสามารถในการสร้างสารสีได้หลากหลายชนิด เช่น pyoverdine ที่มีสีเหลืองแกมเขียวมีความสามารถในการเป็นซิดอร์โรเฟอร์ (siderophore) ในสภาวะที่มีไอออนของโลหะน้อยและยังสามารถสร้างสารสีเรืองแสงเช่น pyocyanin ที่มีสีเขียวแกมสีน้ำเงินมีบทบาทในกระบวนการ metabolism เพื่อควบคุมความสมดุลของปฏิกิริยา redox รอบ ๆ เซลล์ การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถคัดแยกได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ cetrimide agar, King-A และ King-B (Lamont และ Martin, 2003; Peix และคนอื่น ๆ, 2009)

6.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จาก *P. aeruginosa*

P. aeruginosa มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลากหลายชนิด ยกตัวอย่างการศึกษาใน *P. aeruginosa* สายพันธุ์ LV ที่เลี้ยงใน CuCl_2 พบว่าสามารถสร้างสารประกอบ organometallic compound ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลาย *K. pneumoniae* cabapenamase และ MRSA ซึ่งเป็นแบคทีเรียดื้อยาได้ นอกจากนี้เชื้อเดียวกันนี้ยังสามารถผลิต phenazine-1-carboxylic acid ในปริมาณน้อยแต่ยังคงสามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Viviane F. Cardozo และคนอื่น ๆ, 2013; Kerbauy และคนอื่น ๆ, 2016) ทั้งนี้ *P. aeruginosa* ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มี CuCl_2 จะถูกกระตุ้นให้ผลิตสารปฏิชีวนะได้มากยิ่งขึ้น (Simionato และคนอื่น ๆ, 2017) และจากการศึกษาการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี RNA sequencing ใน *P. aeruginosa* สายพันธุ์ LV ที่เลี้ยงในอาหารที่มี CuCl_2 พบว่า *P. aeruginosa* จะมีการกำจัด Cu^{2+} ส่วนเกินผ่านกลไกต่าง ๆ โดยกลไกแรกคือการผลัดไอออนออกจากเซลล์ผ่าน efflux systems และกลไกที่สองคือการรับ Cu^{2+} เข้ามาในเซลล์เพื่อเป็นการบำบัด Cu^{2+} ในสิ่งแวดล้อม ผ่านกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและผลของสารที่ผลิตออกมานี้ก็มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย (Gionco และคนอื่น ๆ, 2017)

นอกจากนี้ จากรายงานในปี 2010 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp สายพันธุ์ W3 มาใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งได้แก่ *Vibrio harveyi* PSU 2015, *V. harveyi* AAHRC1, *V. harveyi* AAHRC2, *V. parahaemolyticus* AAHRC1, *V. cholerae* PSSCMI 0062 ผ่านการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion จากการศึกษาพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 มีประสิทธิภาพในการทำลาย *V. harveyi* PSU 2015 ไม่เพียงแต่เซลล์ที่มีชีวิตแต่ยังสามารถทำลายเซลล์ที่ไม่มีชีวิตของเชื้อก่อโรคได้อีกด้วย จากการศึกษา *Pseudomonas* sp. W3 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ alkaline protease และสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ ทั้งยังไม่ส่งผลกระทบต่อกุ้งอีกด้วย (Rattanachuy และคนอื่น ๆ, 2010)

P. aeruginosa สามารถลดปัญหาการติดเชื้อและไบโอฟิล์มได้ ซึ่งก็เป็นปัญหาต่อการรักษาโรคติดเชื้อเช่นกัน จากการศึกษาโดย Bandara และคนอื่น ๆ, (2010) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* และ *C. dubliniensis* ด้วย *P. aeruginosa* ด้วยการทดสอบแบบ dual culture test จากการศึกษาพบว่า *P. aeruginosa* สามารถลดการเจริญของ *Candida* spp. ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเชื้อราเหล่านี้เป็นเชื้อก่อโรคสำคัญที่ก่อโรค candidiasis ซึ่งเป็นอาการ

ของโรคที่เกิดบนผิวหนังจากการเจริญของ *Candida* spp. นอกจากนี้เชื้อยังสามารถเข้าสู่ร่างกาย ก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดและการอักเสบของอวัยวะ

6.4 *P. aeruginosa* SWUC02

จากงานวิจัยก่อนหน้าของคณะผู้วิจัยได้ทำการคัดแยก *P. aeruginosa* SWUC02 จากใบและกิ่งของมะนาวแป้น (*C. aurantifolia* cultivar Pan) ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลลักษณะของ โคลินี้ ลักษณะของเซลล์และการติดสีแกรม และการยีนยีนสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *P. aeruginosa* ถึง 100% การทดสอบเกี่ยวกับลักษณะของเชื้อพบว่า *P. aeruginosa* SWUC02 มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN), siderophore, indole acetic acid (IAA) และ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC deaminase) มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และการละลายธาตุ ฟอสเฟต และเมื่อนำ *P. aeruginosa* SWUC02 มาทดสอบกับ *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคแคงเกอร์ในมะนาวแป้นด้วยวิธี dual-culture พบว่า *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถยับยั้ง Xcc ได้ นอกจากนี้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถใช้ยับยั้ง Xcc ได้ในการทดลองแบบ *in vitro* และทั้ง *P. aeruginosa* SWUC02 และน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถใช้เพื่อลดอัตราการเกิดโรคแคงเกอร์ในต้นมะนาวอันมีสาเหตุเนื่องมาจากการติดเชื้อ Xcc ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Sudyoung และคนอื่น ๆ, 2020)

7. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การใช้และกลไกของสารในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตสารเมแทบอลิไทท์ที่หลากหลาย ที่มีความสามารถในการ ทำลายจุลินทรีย์อื่น ๆ ยกตัวอย่างเช่น

7.1 แอมโมเนีย (ammonia)

แอมโมเนีย เป็นสารอนินทรีย์ที่อยู่ในสถานะแก๊สมีความเป็นพิษหากมีความเข้มข้นสูง สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติทั้งในอากาศ น้ำ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินซึ่งเกิดจากการใช้ แหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรีย จากการศึกษาในปี 2022 ได้นำ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium มาบ่มร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนีย เพื่อศึกษาผลของแอมโมเนียต่อการ ลดลงของเชื้อพบว่าแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 0.04 M มีผลต่อการลดลงของเชื้อโดยลดลง ประมาณ 7 log CFU/mL ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อนำ *Corynebacterium urealyticum* มา เลี้ยงร่วมกับ *Salmonella* Typhimurium ในอาหารที่มีการเติม 1% ยูเรีย พบว่า *C. urealyticum* จะเปลี่ยนยูเรียเป็นแอมโมเนียด้วยเอนไซม์ส่งผลให้มีปริมาณแอมโมเนียสูงขึ้น และทำให้ประชากร

ของ *Salmonella* Typhimurium ลดลงภายใน 12 ชั่วโมง การลดลงของ *Salmonella* Typhimurium เป็นผลมาจาก pH ที่เปลี่ยนแปลงไปจากการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนียซึ่งมีผลรบกวนกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ของเชื้อ (Gutierrez และคนอื่น ๆ, 2022) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่นำ *Streptomyces* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตแอมโมเนียในปริมาณสูงมาทดสอบร่วมกับ *B. subtilis* และ *E. coli* โดยพบว่า *Streptomyces* spp. ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมกรดอะมิโน glycine (สารตั้งต้นในการผลิตแอมโมเนีย) ส่งผลให้เชื้อมีการผลิตแอมโมเนียในปริมาณที่สูงขึ้น และยังทำให้จำนวนประชากรของ *B. subtilis* และ *E. coli* ลดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากที่แอมโมเนียมีส่วนช่วยในการละลายให้สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิเข้าสู่เซลล์ได้ดียิ่งขึ้น อีกทั้งความเป็นพิษของแอมโมเนียที่อาจจะไปมีผลต่อเซลล์ของ *B. subtilis* และ *E. coli* โดยตรง (Avalos และคนอื่น ๆ, 2020)

7.2 ไลเปส (lipase)

ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาในการตัดพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของลิพิด ซึ่งรวมไปถึง phospholipid และสารโมเลกุลไม่ชอบน้ำอื่น ๆ จึงทำให้เอนไซม์นี้มีผลในการยับยั้งหรือทำลายโครงสร้างภายนอกของแบคทีเรีย โดยจะไปมีผลในการทำลายทั้ง lipopolysaccharide ที่อยู่ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบและใน exopolysaccharide ที่อยู่ในไบโอฟิล์ม (Prabhawathi และคนอื่น ๆ, 2014) ในปี 2021 ได้มีการศึกษาการใช้สารสกัดเอนไซม์ต่าง ๆ จากเชื้อราพร้อมกับไบโอฟิล์มของ *S. aureus* เพื่อประเมินความสามารถของเอนไซม์ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *S. aureus* โดยนำไลเปสที่สกัดได้จาก *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ไปบ่มกับไบโอฟิล์มของ *S. aureus* พบว่าไลเปสสามารถทำลายได้ไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ได้ (Matias และคนอื่น ๆ, 2021)

7.3 โปรติเอส (protease)

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการตัดพันธะเปปไทด์ในโปรตีน มักถูกใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอสนี้ยังมีความสามารถในการทำลายไบโอฟิล์มได้ ซึ่งมีผลจากการศึกษาหลายงานด้วยกัน ตัวอย่างเช่น การนำโปรติเอสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 มาบ่มร่วมกับไบโอฟิล์มของ *S. aureus* เพื่อประเมินผลและศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องในการทำลายไบโอฟิล์ม พบว่าโปรติเอสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 สามารถยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มได้มากกว่า 90% และด้วยความสามารถของโปรติเอสที่มีประสิทธิภาพสูงจึงทำให้สามารถช่วยยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มและการยึดเกาะบนพื้นผิวของไบโอฟิล์ม *S. aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Park และคนอื่น ๆ, 2012)

7.4 β -1,3-glucanase

β -1,3-glucanase หรือ laminarinase เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อย β -glucan ผ่านการตัดพันธะ glycosidic ที่ตำแหน่ง β -1,3-glucosyl โดยมากเอนไซม์นี้ถูกใช้เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค เนื่องจากโครงสร้างหลักของผนังเซลล์ของเชื้อราถูกเชื่อมกันอยู่ด้วย β -1,3-linked glucan เป็นหลัก แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* และ *Pseudomonas* ส่วนใหญ่สามารถสร้าง β -1,3-glucanase ได้ทำให้แบคทีเรียดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการควบคุมเชื้อราในดิน (Dimkić และคนอื่น ๆ, 2022) จากการศึกษาโดย Tan และคนอื่น ๆ, (2018) ได้มีการนำ β -1,3-glucanase มาบ่มร่วมกับไบโอฟิล์มของเชื้อราก่อโรค *Candida albicans* เพื่อประเมินผลการยับยั้งและการทำลายไบโอฟิล์มของ *C. albicans* (โดยไบโอฟิล์มของ *C. albicans* มี polysaccharide β -1,3-glucan เป็นส่วนประกอบสำคัญของโครงสร้างไบโอฟิล์มที่ช่วยป้องกันเชื้อจากการถูกทำลายโดยยาฆ่าเชื้อรา) ซึ่งผลการศึกษาพบว่า β -1,3-glucanase สามารถทำลายไบโอฟิล์มของ *C. albicans* ได้ถึง 55.96% และหากมีการใช้ยาฆ่าเชื้อราพร้อมกับ β -1,3-glucanase ด้วย จะทำให้การรักษาหรือการยับยั้งเชื้อจะเกิดได้ขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้น

7.5 ไคตินเนส (chitinase)

ไคตินเนส คือ เอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยไคติน โดยจะทำหน้าที่ในการไปตัดพันธะ glycosidic ในโมเลกุล ไคตินเป็นโปรตีนที่สามารถพบได้ทั้งในผนังเซลล์ของเชื้อรา เปลือกของสัตว์ในชั้น crustaceans และเปลือกของแมลง นอกจากนี้เอนไซม์นี้กำลังได้รับความสนใจทั้งในด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมเกษตร อาหาร และยา สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมายรวมถึงยังสามารถนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคได้อีกด้วย (Oyeleye และ Normi, 2018) การศึกษาในปี 2019 ได้นำ *Lactobacillus rhamnosus* สายพันธุ์ GG มาทำการบ่มร่วมกับ *C. albicans* เพื่อศึกษากลไกในการยับยั้งของเชื้อในกลุ่ม lactobacilli ต่อโครงสร้างเส้นใยของ *C. albicans* จากการศึกษาพบว่ากลไกหลักของ *L. rhamnosus* ที่เกิดขึ้นในการทำลายเส้นใยของ *C. albicans* เกิดจากความสามารถของไคตินเนสที่สร้างจาก *L. rhamnosus* มีผลต่อการทำลายโครงสร้างไคตินในผนังเซลล์ของเชื้อรา (Allonsius และคนอื่น ๆ, 2019) ส่วนการศึกษากการใช้ไคตินเนสใน *Pseudomonas* spp. นั้นยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากในการใช้ยับยั้งหรือทำลายเชื้อราก่อโรค แต่มักจะมีการศึกษาในรูปแบบการยับยั้งเชื้อราเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคทางการเกษตรเป็นหลัก ยกตัวอย่างการศึกษาในปี 2022 ได้มีการนำ *Pseudomonas* spp. ที่แยกได้จากดินมาเลี้ยงร่วมกับเชื้อราก่อโรค *Penicillium digitatum* พบว่า

Pseudomonas spp. บางสายพันธุ์มีความสามารถลดการเจริญเส้นใยและสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *P. digitatum* ได้ซึ่งเมื่อศึกษาต่อไปพบว่าความสามารถที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากการที่เชื้อมีการผลิตโคตินเนส ส่วน *Pseudomonas* sp. ที่ไม่สามารถยับยั้งได้นั้นเมื่อศึกษาต่อไปพบว่าเชื้อไม่มีการผลิตโคตินเนส ทำให้เป็นที่ชัดเจนว่าเชื้อที่สามารถสร้างโคตินเนสได้สามารถนำไปใช้พัฒนาเพื่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดได้ (Qessaoui และคนอื่น ๆ, 2022)

8. การหาสภาวะการเจริญที่เหมาะสมของ *P. aeruginosa*

การผลิตสารเมแทบอลิท์จากจุลินทรีย์เป็นวิธีการที่แพร่หลายทั้งในด้านอุตสาหกรรมเคมีอาหาร และการแพทย์ แต่โดยปกติแล้วการผลิตสารเมแทบอลิท์เหล่านี้ในธรรมชาติมีการผลิตที่จำกัดและได้ปริมาณน้อย ดังนั้นจึงต้องมีวิธีเพื่อให้สามารถผลิตสารให้ได้ในปริมาณมากที่สุด วิธีที่ใช้ส่งเสริมการผลิตสารเมแทบอลิท์มีหลายวิธีด้วยกันเช่น การใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ในการตัดต่อสารพันธุกรรมจุลินทรีย์ดั้งเดิมเพื่อให้มีการผลิตสารที่เพิ่มมากขึ้น, การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสูง และการส่งเสริมจากการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อส่งเสริมให้มีการผลิตสูงขึ้น

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่จะช่วยให้ปรับปรุงและส่งเสริมให้มีผลผลิตที่มากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น แหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนของจุลินทรีย์ การให้อากาศ อุณหภูมิ ระยะเวลา ค่า pH ที่ใช้เพาะเลี้ยง และปริมาณความเข้มข้นของสารเติมแต่ง เป็นต้น ซึ่งการหาสภาวะที่เหมาะสมนี้จะมาพร้อมกับการออกแบบการทดลองซึ่งช่วยให้หาปัจจัยที่เกี่ยวข้องรวมถึงอำนวยความสะดวกที่อาจจะช่วยลดชุดการทดลองได้อีกด้วย ยกตัวอย่างเช่น Box–Behnken design (BBD), response surface methodology (RSM), central composite designs (CCD), factorial designs with central points และ one–factor at a time (OFAT) เป็นต้น

การศึกษาด้วยวิธี OFAT เป็นวิธีการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมที่แพร่หลายวิธีหนึ่ง โดยเป็นการศึกษาทีละปัจจัยเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในปัจจัยที่ศึกษาแล้ว การศึกษาปัจจัยต่อไปจะยึดค่าปัจจัยที่เหมาะสมก่อนหน้าไว้แล้วหาสภาวะที่เหมาะสมในปัจจัยต่อไป เป็นเช่นนี้ไปจนครบทุกปัจจัย ข้อดีของวิธี OFAT คือเป็นวิธีที่ศึกษาได้ง่าย เหมาะกับการศึกษาที่มีตัวแปรมาก ๆ มีค่าความผิดพลาดของข้อมูลน้อย และสามารถหาข้อผิดพลาดในปัจจัยในการทดลองได้ชัดเจน เนื่องจากข้อมูลในแต่ละปัจจัยเป็นอิสระจากกัน อย่างไรก็ตามวิธี OFAT เป็นวิธีที่ใช้เวลามากและ

ไม่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยได้ (Fellermann และคนอื่น ๆ, 2019; Gilman และคนอื่น ๆ, 2021; Witek-Krowiak และคนอื่น ๆ, 2014)

ในการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (biosurfactant) โดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ LM19 ผู้วิจัยได้ใช้วิธี OFAT ร่วมกับวิธี factorial screening by Plackett–Burman design (PBD) และ RSM โดยกำหนดปัจจัยได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของหัวเชื้อ ความเข้มข้นของกรดไขมันปาล์ม แห้งไนโตรเจน และความเข้มข้นของแห้งไนโตรเจน จากผลการศึกษาพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวประกอบไปด้วย กรดไขมันปาล์ม 1.148% (v/v), KH_2PO_4 4.054 g/L, yeast extract 1.30 g/L, sodium–EDTA 0.023 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.057 g/L, K_2HPO_4 0.75 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.20 g/L และ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.080 g/L สามารถเพิ่มปริมาณการผลิต biosurfactant ได้สูงกว่าสูตรดั้งเดิมถึง 3.33 เท่า (Nurfarahin และคนอื่น ๆ, 2019)

การศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสาร bioactive metabolites จาก *P. aeruginosa* LV ได้แก่ phenazine–1–carboxylic acid (PCA), phenazine–1–carboxamide (PCN), 2–carboxy–2–heptano–indol–3–one (IDC) และ fluopsin C (Watrous และคนอื่น ๆ) ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบการทดลองโดยวิธี OFAT ร่วมกับ BBD และ CCD กำหนดปัจจัยในการศึกษา ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ค่า pH เริ่มต้น, อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเลี้ยง ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสาร bioactive metabolites คือการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส, pH 6.8, ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย (% w/v): soybean protein 1.4, glucose 0.60, yeast extract 0.04, KH_2PO_4 0.03, meat extract 0.05, peptone 0.15 และใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงนาน 8 วัน สามารถทำให้ *P. aeruginosa* LV ผลิตสาร IDC และ PCA ได้ถึง 42 และ 38 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรปกติก่อนการหาสภาวะที่เหมาะสม โดยปริมาณความเข้มข้น $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารด้วยการออกแบบการทดลองสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตของสารที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Bedoya และคนอื่น ๆ, 2019)

9. การศึกษาที่น่าสนใจด้วยเทคนิค whole–genome sequencing

เนื่องจาก *P. aeruginosa* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารเมแทบอลิไทต์ได้อย่างมากมาย วิธีที่รวดเร็วที่สุดจะศึกษาเกี่ยวกับสารเมแทบอลิไทต์ที่สนใจนั้นคือวิธี whole–

genome sequencing เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และมีประสิทธิภาพ ทำโดยนำจีโนมหรือลำดับรหัสพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตที่สนใจไปทำการอ่านลำดับพันธุกรรมด้วยเครื่องมืออ่านลำดับพันธุกรรมสมัยใหม่ (next-generation sequencer) เช่น Illumina NovaSeq, Ion Torrent (316 chip)/Life, PacBio/Pacific Biosciences และ BGISEQ-500 เป็นต้น ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลลำดับพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต จากนั้นจะนำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ต่อไปโดยนำไปเทียบกับฐานข้อมูลต่าง ๆ ที่สนใจเพื่อที่จะนำมาตรวจสอบว่าสิ่งมีชีวิตที่สนใจนั้นมีข้อมูลที่น่าสนใจหรือไม่ ยิ่งไปกว่านั้นวิธีนี้ยังอาจจะยังช่วยให้สามารถนำไปสู่การค้นพบใหม่ ๆ ได้อีกด้วย ไม่ว่าจะเป็นยีนที่ผลิตสารที่ไม่เคยถูกค้นพบมาก่อนและยังสามารถช่วยในการยืนยันสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ได้อีกด้วยการศึกษาใน *Pseudomonas* sp. ด้วยวิธี whole-genome sequencing จึงได้รับความสนใจเช่นกัน

งานวิจัยในปี 2021 ได้มีการศึกษา *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TAE6080 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งไบโอฟิล์มที่เกิดจาก *S. epidermidis* โดยใช้เทคนิค whole-genome sequencing เพื่อศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* จากการศึกษาพบว่ากลุ่มของยีนที่ผลิตสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิและสารที่เกี่ยวข้องกับการทำลายไบโอฟิล์มและการทำลายจุลินทรีย์อยู่หลายชนิด เช่น terpenes, bacteriocins, lipopeptides และ non-ribosomal peptides อื่น ๆ อีกหลายชนิด (Riccardi และคนอื่น ๆ, 2021)

งานวิจัยในปี 2022 ได้มีการศึกษาความสามารถของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ FG106 ในการเป็นเชื้อส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth-promoting activity) และการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับการยับยั้งเชื้อก่อโรคในมันฝรั่ง มะเขือเทศ และเผือก โดยผู้วิจัยได้ศึกษาผลของเชื้อในการยับยั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* การผลิตสารเมแทบอลิท์และสารที่ส่งเสริมการเจริญของพืช ผู้วิจัยยังมีการศึกษาด้วยเทคนิค whole-genome sequencing อีกด้วย จากผลการศึกษาพบว่า *P. aeruginosa* FG106 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้งในการทดลองแบบ *in vitro* และ *in vivo* นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการสร้างสารเมแทบอลิท์ที่หลากหลายทั้งที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารที่ส่งเสริมการเจริญของพืช นอกจากนี้ข้อมูลลำดับพันธุกรรมที่ได้จากเทคนิค whole-genome sequencing ยังแสดงให้เห็นถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น phenazine, pyoverdine pyochelin และ HCN อีกทั้งยังมียีนที่สร้างสารหรือโครงสร้างเกี่ยวข้องกับกลไกที่ส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น ACC deaminase, IAA เป็นต้น (Farideh Ghadamgahi และคนอื่น ๆ, 2022)

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

ตาราง 1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ	บริษัท	ประเทศ
เข็มฉีดยาปลอดเชื้อ	Nipro	Japan
เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ	Forma Scientific	USA
เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)	Scientific Industries	USA
เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (dry bath incubator)	Major Science	USA
เครื่องชั่งสาร	Sartorius	Germany
เครื่องถ่ายภาพเจล	Bio-Rad	USA
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ	Tomy	Japan
เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์	Shimadzu	Japan
เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (NanoDrop™)	Thermo Scientific™	USA
เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Denver Instrument	USA
เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)	Bio-Rad	USA
ตู้บ่มเชื้อ	Shel Lab	USA
ตู้ปลอดเชื้อ	NuAire	USA
ตู้อบลมร้อน	Memmert	Germany
พาราฟิล์ม	Bemis	USA
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	Tomy	Japan
จุกกรอง Polyethersulfone ขนาดรูกรอง 0.45 µm	FilterBio	China

ตาราง 2 อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

อาหารและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Copper (II) Chloride Anhydrous (CuCl ₂)	Ajax Finechem	Australia
Tween 80	Ajax Finechem	Australia
D (+)-Glucose Anhydrous	Elago Enterprises	Australia
King's B Medium	Shanghai Richem International	China
GRAM'S CRYSTAL VIOLET SOLUTION	Sigma-Aldrich	Germany
Agar	Himedia	India
Mueller-Hinton Broth	Himedia	India
Nutrient Broth	Himedia	India
Peptone	Himedia	India
Skim Milk Agar	Himedia	India
Soyabean Casein Digest Medium (Tryptone Soya Broth)	Himedia	India
Pepsin	Himedia	India
Proteinase K	Bioneer	Korea
AccuPrep [®] Genomic DNA Extraction Kit	Bioneer	Korea
Vancomycin	Lek Pharmaceuticals d.d.	Slovenia
Cefoxitin	Glentham Life Sciences	United Kingdom
Miller's Luria-Bertani Broth	FORMEDIUM	United Kingdom
King B medium	Becton, Dickinson and Company	USA

ตาราง 2 (ต่อ)

อาหารและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Penicillin disk	Becton, Dickinson and Company	USA

ตาราง 3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง
<i>Acinetobacter baumannii</i> *
<i>Bacillus cereus</i> *
<i>Escherichia coli</i> *
<i>Enterobacter sp.</i> *
<i>Klebsiella pneumoniae</i> *
<i>Salmonella sp.</i> *
<i>Shigella sp.</i> *
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SWUC02**

ที่มาของจุลินทรีย์;

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

** Sudyong และคนอื่นๆ, (2020)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาผลความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ต่อเชื้อก่อโรคในมนุษย์ โดยใช้วิธี dual culture assay และ well-diffusion assay

1.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ

นำ *P. aeruginosa* SWUC02 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ที่มี 0.01% CuCl_2 มาใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อ โดยนำเซลล์มาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เวลา 5 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาล้างและปรับให้มีความหนาแน่นเซลล์เป็น 1×10^8 CFU/ml ($\text{OD}_{600} = 0.100$) ด้วยอาหาร TSB จากนั้นปิเปตเซลล์แขวนลอยลงในอาหาร TSB ที่เติม CuCl_2

ความเข้มข้น 0.01% บ่มเชื้อโดยเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปกรองด้วยเยื่อกรองชนิด Polyethersulfone (da Silva Vasconcellos และคนอื่น ๆ, 2014) ฐกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บส่วนที่กรองไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่านำมาใช้งาน

1.2 การศึกษาความสามารถของ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

การเตรียมแบคทีเรียก่อโรค ทำโดยนำแบคทีเรีย *A. baumannii*, *B. cereus*, *E. coli*, *Enterobacter* sp., *K. pneumoniae*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. และ *S. aureus* ATCC 25923 (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ) มาขีดเชื้อลงบนอาหาร TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อจากอาหาร TSA ลงในอาหาร TSB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาล้างและปรับความหนาแน่นเซลล์ด้วยอาหาร TSB โดยวิธีเช่นเดียวกับการทดลอง 1.1

นำไม้พินสำลีมาจุ่มกับเชื้อแขวนลอยแบคทีเรียก่อโรคที่ปรับความหนาแน่นเซลล์แล้วตามการทดลองข้อ 1.1 มาเกลี่ยเชื้อลงบนอาหาร TSA จนทั่วผิวน้ำอาหาร จากนั้นปล่อยให้แห้งแล้วเจาะรูอาหารด้วย cork borer ขนาดเบอร์ 5 ให้เป็นหลุมสำหรับการใส่เชื้อ (เส้นผ่านศูนย์กลางหลุมขนาด 10 มิลลิเมตร) แล้วนำ *P. aeruginosa* SWUC02 ที่ปรับความหนาแน่นเซลล์แล้ว (จากการทดลอง 1.1) มาหยอดลงไปในแต่ละหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{ขนาดบริเวณยับยั้ง (มม.)} = \text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่วัดได้} - \text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมที่ถูกเจาะด้วย cork borer}$$

1.3 การศึกษาความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.2 กล่าวคือนำไม้พินสำลีมาจุ่มกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปรับความหนาแน่นเซลล์แล้วมาเกลี่ยเชื้อลงบนอาหาร TSA จนทั่วผิวน้ำอาหาร จากนั้นปล่อยให้แห้งแล้วเจาะรูอาหารด้วย cork borer ขนาดเบอร์ 5 ให้เป็นหลุมสำหรับการใส่น้ำเลี้ยงเชื้อ หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นบันทึกขนาดบริเวณยับยั้งหลังจากการบ่ม

2. ศึกษาการสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของ *P. aeruginosa* SWUC02

2.1 การสร้างแอมโมเนีย

เชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ลงในอาหาร 4% peptone broth (รายละเอียดในภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หยดสารละลาย Nessler's และสังเกตตะกอนสีน้ำตาลส้ม หากปรากฏแสดงว่าเชื้อสามารถผลิตแอมโมเนียได้

2.2 การผลิต lipase

เชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ลงบนอาหาร TSA (รายละเอียดในภาคผนวก ก) ที่เติม 1% Tween 80 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากปรากฏตะกอนขุ่นรอบโคโลนีแสดงว่าเกิดการผลิต Lipase

2.3 การผลิต Protease

เชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ลงบนอาหาร skim milk agar (รายละเอียดในภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากปรากฏไฮนไฮรอบโคโลนีแสดงว่าเกิดการผลิต protease

2.4 การผลิต β -1,3-glucanase

เชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ลงบนอาหาร mineral salt medium (รายละเอียดในภาคผนวก ก) ที่มีผสม laminarin บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ย้อมสีอาหารด้วยสี congo red หากปรากฏไฮนไฮรอบโคโลนีไฮแสดงว่าเกิดการผลิต β -1,3-glucanase

2.5 การผลิต chitinase

เชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ลงบนอาหาร colloidal chitin agar plate (รายละเอียดในภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หากปรากฏไฮนไฮรอบโคโลนีแสดงว่ามีการผลิต chitinase

3. การศึกษาลักษณะของสารในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus*

3.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02

เตรียม *P. aeruginosa* SWUC02 ดังวิธีในการทดลอง 1.1 แล้วบีบเปิด *P. aeruginosa* SWUC02 ให้มีความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายเป็น 1×10^5 CFU.mL⁻¹ ลงในอาหาร LB ที่เติม CuCl₂ ความเข้มข้น 0.01%(w/v) ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 บ่มค่าความเร็วรอบความเขย่า 100 รอบต่ออนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000×g, อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 ศึกษาการทนต่ออุณหภูมิ

นำน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40, 60, 80, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้ง *S. aureus* ดังวิธีในข้อ 1.3

3.3 การศึกษาการทนต่อเอนไซม์

นำน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.1 มาทดสอบการทนต่อเอนไซม์ ได้แก่ pepsin และ proteinase K โดยนำเอนไซม์แต่ละชนิดมาผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้ง *S. aureus* ดังวิธีในข้อ 1.3

4. ศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน *P. aeruginosa* SWUC02 โดยใช้เทคนิค whole-genome sequencing

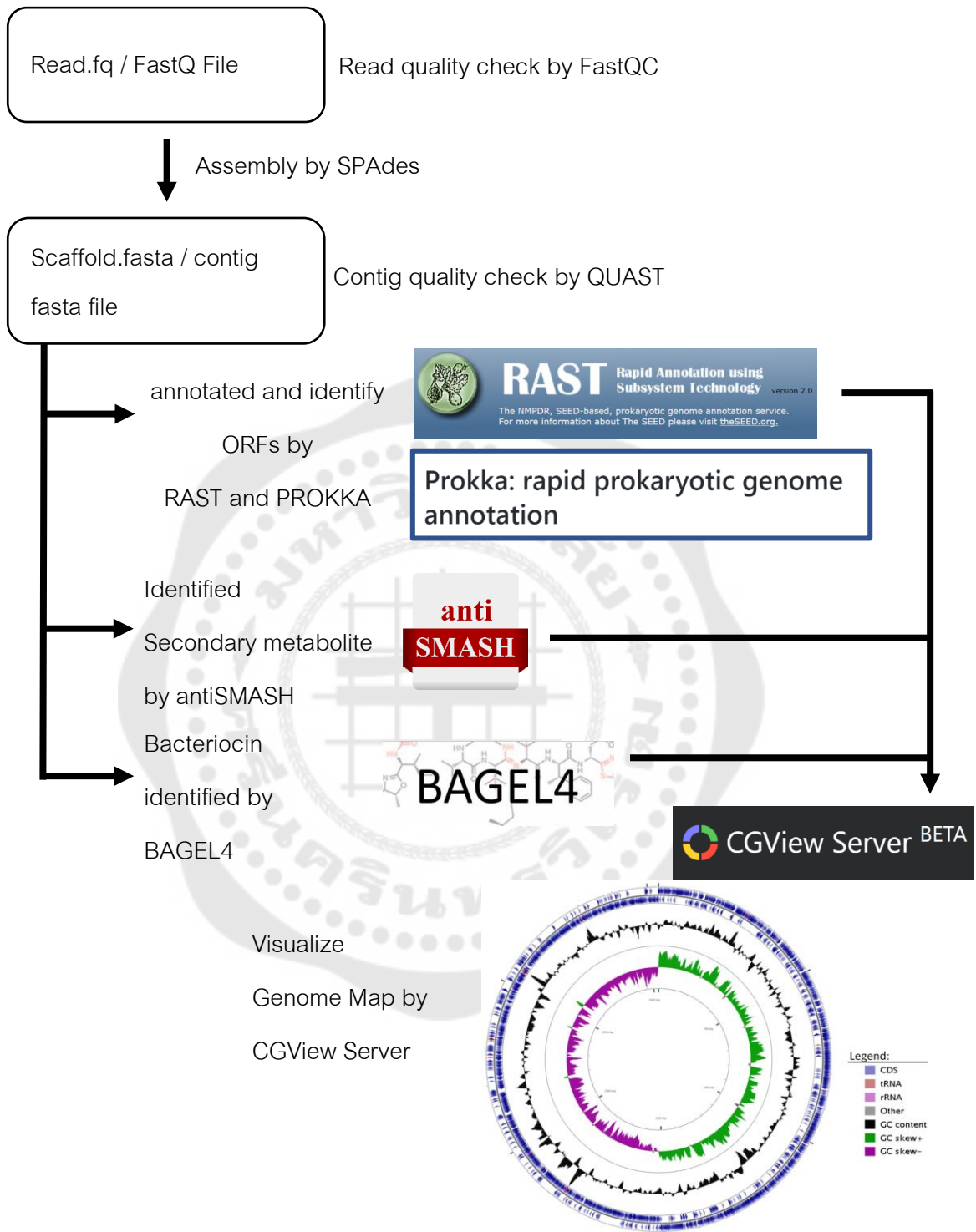
4.1 สกัด genomic DNA จาก *P. aeruginosa* SWUC02 และการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในจีโนม

เตรียม *P. aeruginosa* SWUC02 ในอาหาร LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมง จากนั้นสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัดทางการค้า AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit. ทำการสกัดตามคู่มือ กล่าวคือ นำตัวอย่างเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาบ่มร่วมกับเอนไซม์ proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ binding buffer (GC) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตกตะกอน DNA ด้วย isopropanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างระมัดระวัง และเพื่อชะล้างที่ไม่ใช่ DNA ออกจากตัวอย่าง หลังจากเติม isopropanol แล้วจะบีบอัดสารผสมทั้งหมดลงในหลอด binding column ที่ใส่อยู่ในหลอดรองรับขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $6000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งส่วนน้ำที่อยู่ในหลอดรองรับ จากนั้นบีบอัด washing buffer 1 (W1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน binding column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $6000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งส่วนน้ำที่อยู่ในหลอดรองรับเช่นเดียวกับก่อนหน้านี้ ต่อมาบีบอัด washing buffer 2 (W2) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน binding column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $6000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งส่วนน้ำที่อยู่ในหลอดรองรับอีกครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $13,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ binding column แห้ง จากนั้นจะทำการชะ DNA

ออกจาก binding column เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้ว นำ binding column ย้ายมาใส่ในหลอดรองรับใหม่ ปิเปิด elution buffer (EL) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน binding column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000×g เป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บส่วนน้ำ (ส่วนที่มี DNA) จากหลอดรองรับที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน จากนั้นวัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง NanoDrop™ Spectrophotometer และตรวจความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นส่งตัวอย่าง DNA ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในจีโนมโดยบริษัท BGI ด้วยวิธี BGISEQ-500 (Shenzhen, China)

4.2 ศึกษาลำดับ genomic DNA จาก *P. aeruginosa* SWUC02 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

นำไฟล์ FastQ มาตรวจสอบคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละ read ด้วยโปรแกรม FastQC version 0.11.9 จากนั้นนำมาแปลงเป็นไฟล์ FASTA และ assembly ให้ได้เป็น contig ด้วยโปรแกรม SPAdes version 3.13.0 (Prijbelski และคนอื่น ๆ, 2020) โดยตั้งค่า cutoff quality เป็นค่าเริ่มต้นจากโปรแกรม โดยค่า cutoff quality หรือ cutoff of k-mer coverage จะเป็นค่าที่โปรแกรมคำนวณขึ้นมาเพื่อกรอง read ที่มีคุณภาพต่ำออกก่อนการทำ assembly จากนั้นนำ contig มาตรวจสอบคุณภาพของ contig หลัง assembly ด้วยโปรแกรม QUAST version 5.0.2 (Gurevich และคนอื่น ๆ, 2013) ทำการระบุ open reading frames (ORFs) หรือกลุ่มยีน ด้วยโปรแกรม Rapid Annotation using Subsystem Technology (Gebhardt และคนอื่น ๆ) เซิร์ฟเวอร์ version 2.0 และโปรแกรม Prokka: rapid prokaryotic genome annotation version 1.13 (Aziz และคนอื่น ๆ, 2008; Seemann, 2014) นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสารเมแทบอลิซึมด้วยโปรแกรม antiSMASH version 6.0.1 (Blin และคนอื่น ๆ, 2021) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Bacteriocin ด้วยโปรแกรม BAGEL4 (van Heel และคนอื่น ๆ, 2018) จากนั้นสร้างแผนที่จีโนมด้วยโปรแกรม CGview Server (Grant และ Stothard, 2008) (ภาพประกอบ 5)



ภาพประกอบ 5 วิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เทคนิค whole-genome sequencing

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *P.*

aeruginosa SWUC02

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมนี้จะใช้การออกแบบการทดลองแบบ one factor at a time โดยเป็นการออกแบบการทดลองโดยเป็นการศึกษาที่ละปัจจัย เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วก็จะยึดสภาวะที่เหมาะสมนั้นในการศึกษาปัจจัยในลำดับต่อไป ซึ่งทำเช่นนี้จนกระทั่งถึงการศึกษปัจจัยในลำดับสุดท้าย

5.1 ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก

P. aeruginosa SWUC02

เตรียม *P. aeruginosa* SWUC02 ดังวิธีในการทดลอง 1.1 แล้วปิเปิด *P. aeruginosa* SWUC02 ให้มีความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายเป็น 1×10^3 , 1×10^4 และ 1×10^5 CFU.mL⁻¹ ลงในอาหาร LB ที่เติม CuCl₂ ความเข้มข้น 0.01% (w/v) ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 บ่มที่ค่าความเร็วรอบความเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน หลังจากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อดังวิธีในข้อการทดลอง 1.1 และทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้ง *S. aureus* ดังวิธีในการทดลอง 1.3

5.2 ความเข้มข้นของ CuCl₂ ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *P. aeruginosa* SWUC02

เตรียม *P. aeruginosa* SWUC02 ดังวิธีในการทดลอง 1.1 แล้วปิเปิด *P. aeruginosa* SWUC02 ให้มีความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายเป็น 1×10^5 CFU.mL⁻¹ ในอาหาร LB ที่เติม CuCl₂ ความเข้มข้นแตกต่างกัน 0.005%, 0.01%, 0.015% และ 0.02% (w/v) ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน หลังจากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อดังวิธีในข้อการทดลอง 1.1 และทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้ง *S. aureus* ดังวิธีในการทดลอง 1.3

5.3 ปริมาณการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จาก *P. aeruginosa* SWUC02

เตรียม *P. aeruginosa* SWUC02 ดังวิธีในการทดลอง 1.1 แล้วปิเปิด *P. aeruginosa* SWUC02 ให้มีความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายเป็น 1×10^5 CFU.mL⁻¹ ในอาหาร LB ที่เติม CuCl₂ ความเข้มข้น 0.01% (w/v) ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 บ่มที่ความเร็วรอบความเขย่าคือ 0, 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน หลังจากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อดังวิธีในข้อการทดลอง 1.1 และทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้ง *S. aureus* ดังวิธีในการทดลอง 1.3

5.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *P.*

aeruginosa SWUC02

เตรียม *P. aeruginosa* SWUC02 ดังวิธีในการทดลอง 1.1 แล้วปิเปิด *P. aeruginosa* SWUC02 ให้มีความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายเป็น 1×10^5 CFU.mL⁻¹ ในอาหาร LB ที่เติม CuCl₂ ความเข้มข้น 0.01% (w/v) ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 บ่มค่าความเร็วรอบความเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิแตกต่างกันได้แก่ 26, 28, 30, 32 และ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน หลังจากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อดังวิธีในข้อการทดลอง 1.1 และทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้ง *S. aureus* ดังวิธีในการทดลอง 1.3

5.5 ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก

P. aeruginosa SWUC02

เตรียม *P. aeruginosa* SWUC02 ดังวิธีในการทดลอง 1.1 แล้วปิเปิด *P. aeruginosa* SWUC02 ให้มีความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายเป็น 1×10^5 CFU.mL⁻¹ ลงในอาหาร LB ที่เติม CuCl₂ ความเข้มข้น 0.01% (w/v) และปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5, 6, 7, 8 และ 9 บ่มที่ค่าความเร็วรอบความเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน หลังจากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อดังวิธีในข้อการทดลอง 1.1 และทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้ง *S. aureus* ดังวิธีในการทดลอง 1.3

5.6 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *P.*

aeruginosa SWUC02

เตรียม *P. aeruginosa* SWUC02 ดังวิธีในการทดลอง 1.1 แล้วปิเปิด *P. aeruginosa* SWUC02 ให้มีความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายเป็น 1×10^5 CFU.mL⁻¹ ในอาหาร LB ที่เติม CuCl₂ ความเข้มข้น 0.01% (w/v) ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 บ่มค่าความเร็วรอบความเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3, 6, 9, 12 และ 15 วัน หลังจากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อดังวิธีในข้อการทดลอง 1.1 และทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้ง *S. aureus* ดังวิธีในการทดลอง 1.3

5.7 อาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *P.*

aeruginosa SWUC02

เตรียม *P. aeruginosa* SWUC02 ดังวิธีในการทดลอง 1.1 แล้วปิเปิด *P. aeruginosa* SWUC02 ให้มีความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายเป็น 1×10^5 CFU/ml ลงในอาหาร 4 ชนิด คือ Tryptone Soya Broth (TSB), Nutrient Broth (NB), King's B Medium (King's B) และ Miller's Luria-Bertani Broth (LB) ที่มี CuCl₂ ความเข้มข้น 0.01% (w/v) (รายละเอียด

ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาคผนวก ก) ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน หลังจากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อดังวิธีในข้อ 1.1 และทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้ง *S. aureus* ดังวิธีในข้อ 1.3

6. การแยกและการสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02

ดัดแปลงวิธีจาก (Viviane F. Cardozo และคนอื่น ๆ, 2013) นำน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.1 มาสกัดด้วยตัวทำละลายได้แก่ hexane, dichloromethane และ ethyl acetate ด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดยใช้อัตราส่วนสารละลาย 200 มิลลิลิตรต่อน้ำเลี้ยงเซลล์ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาระเหยแห้งโดยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำมาระเหยแห้งส่วนที่เหลือที่อุณหภูมิห้อง บนที่กผลน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลาย

การทดสอบฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ของสารสกัด ทำโดยละลายสารสกัดด้วย 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทดสอบความสามารถของสารสกัดเช่นเดียวกับการทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้ง *S. aureus* ดังวิธีในข้อ 1.3 โดยใช้ 10% DMSO เป็นชุดควบคุม

7. การศึกษาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อและทำลาย *S. aureus*

7.1 ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (MIC)

ปิเปตอาหาร Mueller-Hinton Broth ความเข้มข้น 2 เท่า (2xMHB) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมของ 96-well plate จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 มาเจือจางสารลงทีละ 2 เท่า ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 2xMHB จากความเข้มข้น 100% v/v จนถึง 0.19% v/v สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้อ และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึงความเข้มข้น 1.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยปิเปตแต่ละความเจือจางลงในหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วปิเปต *S. aureus* ATCC 25923 ที่อยู่ในอาหาร MHB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 1×10^5 CFU/ml) ลงไปในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บันทึกผลค่าการดูตกดินแสง โดยใช้การตรวจด้วยเครื่อง

microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร การทดลองควบคุมคืออาหาร MHB ที่ไม่ผสมสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 (รายละเอียดดัง ภาคผนวก ข)

ในการหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจะหาจากการเปรียบเทียบค่าความกระเจิงแสงที่วัดได้จากชุดทดลองกับชุดควบคุม (อาหาร Mueller–Hinton Broth ที่ไม่มีเชื้อ) ด้วยเครื่อง microtiter plate reader (Santos และคนอื่น ๆ, 2010; Watts และคนอื่น ๆ, 2008)

7.2 ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการทำลายเชื้อ *S. aureus* (MBC)

ปิเปตเชื้อจาก 96–well plate จากการทดลอง 7.1 หลุมที่ไม่พบความขุ่นที่เกิดจากการเจริญของเชื้อของทุกหลุม นำมาหลุมละ 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร Mueller–Hinton agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยบันทึกผลความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่มีการเจริญของโคโลนี

8. การศึกษาการยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. aureus* โดยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

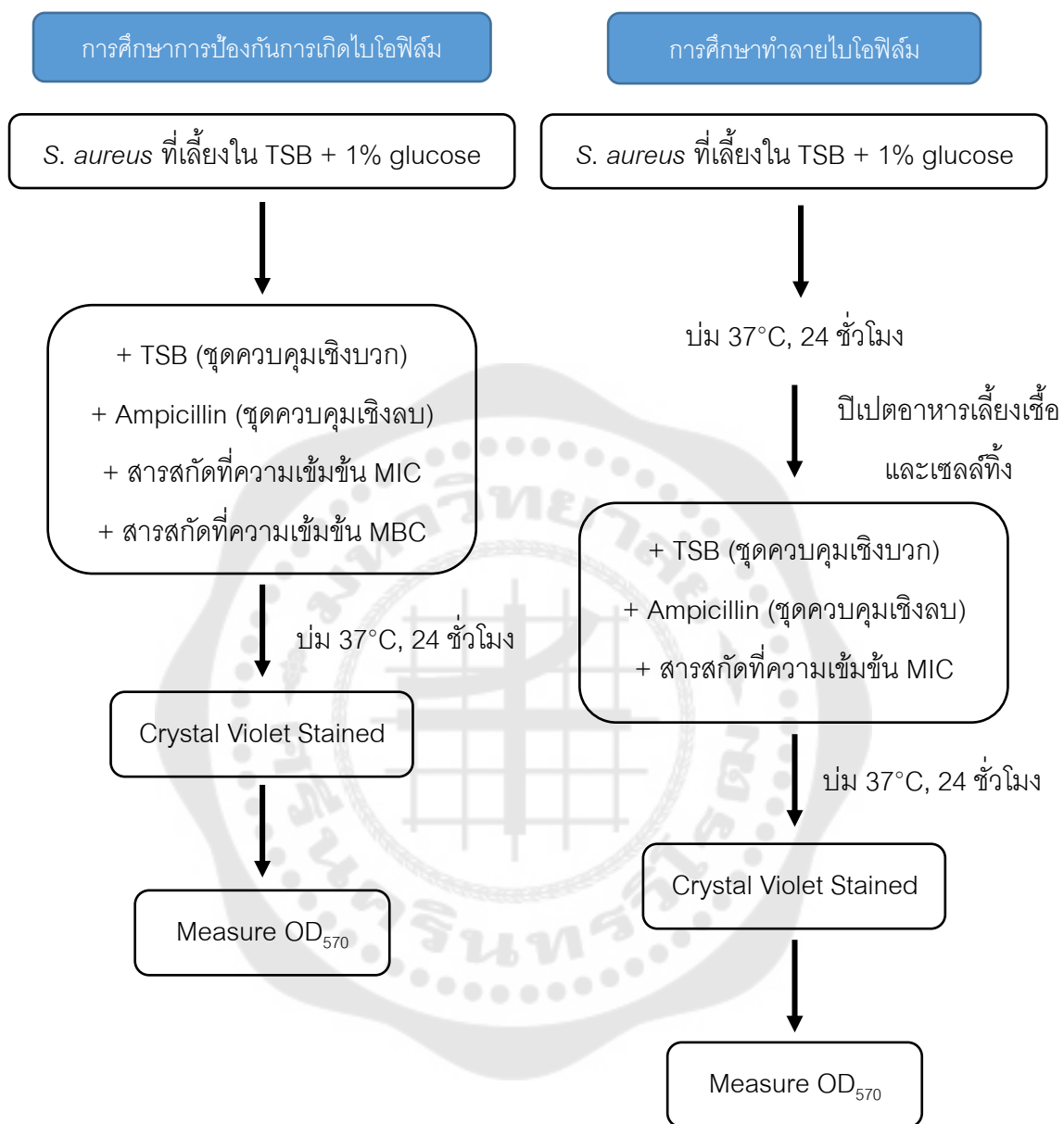
8.1. การศึกษาการป้องกันการเกิดไบโอฟิล์มด้วยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *P. aeruginosa* SWUC02

ปิเปตอาหาร TSB ที่เติม 1% glucose ความเข้มข้น 2 เท่า (2xTSB) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมของ 96–well plate นำสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 และ vancomycin มาเจือจางสารลงทีละ 2 เท่า จากความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึงความเข้มข้น 1.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตแต่ละความเจือจางแล้วปิเปตลงในเพลทปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ เตรียมเชื้อ *S. aureus* ตามวิธีดังในข้อ 1.2 ในอาหาร TSB ที่เติม 1% glucose แล้วปิเปต *S. aureus* 100 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 1×10^5 CFU/ml) ลงไปในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การทดลองควบคุมคือ *S. aureus* ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ที่เติม 1% glucose ที่ไม่มีสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวัดปริมาณไบโอฟิล์มด้วยการย้อมด้วยสี crystal violet โดยปิเปตของเหลวและเซลล์แขวนลอยในจานเพาะเชื้อทิ้ง จากนั้นเติม 0.01% crystal violet ปริมาตร 190 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเท 0.01% crystal violet แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีแล้วล้างสี crystal violet ที่ติดกับไบโอฟิล์มด้วย 33% (v/v) glacial acetic acid ปริมาตร 160 ไมโครลิตร บันทึกผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (Cruz และคนอื่น ๆ, 2018; Stepanović และคนอื่น ๆ, 2000)

8.2. การศึกษาการทำลายไบโอฟิล์มด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *P. aeruginosa* SWUC02

เตรียม *S. aureus* ตามวิธีดังในข้อ 1.2 ในอาหาร TSB ที่เติม 1% glucose มาปิเปตลงในจานเพาะเชื้อ 96-well plate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์ม ต่อมาปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์ทิ้ง จากนั้นนำสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 และ vancomycin มาเจือจางสารลงทีละ 2 เท่า จากความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึงความเข้มข้น 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตแต่ละความเจือจางลงในเพลทปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อศึกษาความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์ม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาณไบโอฟิล์มด้วยการย้อมด้วยสี crystal violet ดังวิธีในการทดลอง 8.1 การทดลองควบคุมคือ *S. aureus* ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ที่เติม 1% glucose ที่ไม่มีสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (ภาพประกอบ 6)





ภาพประกอบ 6 วิธีการศึกษาการป้องกันการเกิดและทำลายไบโอฟิล์ม

9. การทดสอบประสิทธิภาพของของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* สายพันธุ์ที่พบในครัวเรือนและสายพันธุ์ที่ดื้อยา

9.1 การทดสอบการดื้อยาของ *S. aureus* ที่คัดแยกได้จากผิวหนังในครัวเรือน

นำ *S. aureus* ที่คัดแยกได้จากครัวเรือน (สิริรักษ์ และคนอื่น ๆ, ข้อมูลยังไม่ถูกเผยแพร่) มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ penicillin ด้วยวิธีทดสอบด้วยวิธี disk diffusion โดยนำ *S. aureus* มาปรับความหนาแน่นเซลล์เป็น 1×10^8 CFU.mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0.100 ± 0.005) ด้วยอาหาร Mueller-Hinton Broth แล้วนำมาเกลี่ยลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar จากนั้นนำแผ่นยาปฏิชีวนะ penicillin ความเข้มข้น 10 units มาวางลงบนเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกขนาดโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นแล้วนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลการดื้อยาของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2021) จากนั้นทดสอบลักษณะการดื้อต่อยา methicillin ด้วยวิธี phenotypic method for detection of MRSA (CLSI, 2021) (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ค) โดยทดสอบจากความไวต่อยาปฏิชีวนะ cefoxitin ด้วยวิธี broth dilution โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลอง 7.1 แต่เริ่มทดสอบจากความเข้มข้นของ cefoxitin ที่ 32-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำค่าความเข้มข้น MIC ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลการดื้อยาของ CLSI จากมาตรฐาน CLSI, (2021) และ อ้างอิงจาก CDC, (2019a) *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา cefoxitin กล่าวได้ว่าเป็น MRSA

9.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* สายพันธุ์ที่พบในครัวเรือนและสายพันธุ์ที่ดื้อยา

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง MRSA โดยนำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 มาทำการทดสอบการหาค่า MIC เช่นเดียวกับการทดลองที่ 7.1 กับ MRSA ที่แยกได้จากครัวเรือน

10. การทดสอบประสิทธิภาพการประยุกต์ใช้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ
P. aeruginosa SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้อากาศ และเชื้อในกลุ่ม
Staphylococci ที่พื้นผิวบนอ่างล้างมือครัวเรือน

นำกระดาษปราศจากเชื้อขนาด 5×5 เซนติเมตร จุ่มสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 (ที่ความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$, $2 \times \text{MIC}$ และ $4 \times \text{MIC}$), sodium hypochlorite 0.5% (ชุดควบคุมเชิงบวก) และ น้ำประปาปราศจากเชื้อ (ชุดควบคุมเชิงลบ) แล้วนำไปวางบนพื้นผิวอ่างล้างมือ 4 บริเวณ ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ ถูพื้นผิวอ่างล้างมือบริเวณที่เคยวางแผ่นทดสอบดังกล่าว นำไม้พันสำลีที่ถูพื้นผิวแล้วใส่หลอดทดลองเดิมที่มี phosphate buffered saline (PBS) 5 มิลลิลิตร นำหลอดดังกล่าวไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำสารแขวนลอยของตัวอย่างไปเจือจางลงทีละ 10 เท่า และนำแต่ละระดับความเจือจางมาถูลงบนอาหาร Plate Count Agar (PCA) และ Baird Parker agar (BP) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเพื่อคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณ *S. aureus* (CFU/cm²) ตามลำดับ

11. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกการทดลองถูกทำซ้ำอย่างเป็นอิสระอย่างน้อย 3 ซ้ำ ข้อมูลเชิงปริมาณที่ได้จากการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์รูปแบบการแจกแจงของข้อมูลด้วยวิธี Q-Q plot และ histogram

หากข้อมูลมีการแจกแจงปกติ ข้อมูลจะถูกนำไปทดสอบความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี one-way analysis of variance และจะถูกทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Fisher's least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

หากข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติปกติ ข้อมูลจะถูกนำไปทดสอบความแตกต่างค่ามัธยฐานของข้อมูลด้วยวิธี Kruskal-Wallis one-way analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลองด้วยวิธี Mann-Whitney U ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ต่อเชื้อก่อโรคในมนุษย์

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ต่อเชื้อก่อโรคในมนุษย์พบว่า *P. aeruginosa* SWUC02 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *B. cereus*, *K. pneumoniae* และ *S. aureus*, ได้ดีที่สุดในลำดับ (11.67 ± 0.31, 10.77 ± 2.16 และ 8.13 ± 1.03 มิลลิเมตร) รองลงมาคือ *Salmonella* sp., *E. coli*, *Shigella* sp. และ *A. baumannii* (6.01 ± 0.49, 4.74 ± 0.58, 3.67 ± 0.86 และ 2.48 ± 0.32 มิลลิเมตร) ตามลำดับ และไม่สามารถยับยั้ง *Enterobacter* sp. ได้ ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* และ *B. cereus* ได้ โดยพบโซนยับยั้งแบบสมบูรณ (clear zone) ขนาด 11.70 ± 1.50 และ 3.33 ± 0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตาราง 4)

ตาราง 4 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ต่อเชื้อก่อโรค

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค	ขนาดของโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	<i>P. aeruginosa</i> SWUC02	น้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> SWUC02
<i>A. baumannii</i>	2.48 ± 0.32 ^{c*}	–
<i>E. coli</i>	4.74 ± 0.58 ^{bc*}	–
<i>Enterobacter</i> sp.	–	–
<i>K. pneumoniae</i>	10.77 ± 2.16 ^{ab*}	–
<i>Salmonella</i> sp.	6.01 ± 0.49 ^{b*}	–
<i>Shigella</i> sp.	3.67 ± 0.86 ^{c*}	–
<i>S. aureus</i>	8.13 ± 1.03 ^{ab*}	11.70 ± 1.50 ^{a**}
<i>B. cereus</i>	11.67 ± 0.31 ^{a*}	3.33 ± 0.58 ^{b**}

ตัวเลขแสดงขนาดของโซนยับยั้ง halo zone* และ clear zone** เฉลี่ย ในหน่วย มิลลิเมตร ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษท้ายตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบภายในคอลัมน์ การวิเคราะห์ทางสถิติใช้วิธี Kruskal–Wallis Test

และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Mann–Whitney U Test โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ P–Value < 0.05

2. การศึกษาองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *P. aeruginosa* SWUC02

จากผลการทดสอบข้างต้นพบว่า *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลากหลาย รวมถึงน้ำเลี้ยงเชื้อของ *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถนำไปใช้ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกก่อโรคได้ การศึกษาในลำดับถัดไปจึงต้องการศึกษาองค์ประกอบของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *P. aeruginosa* SWUC02 ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ อาทิ Lipase, Protease, β -1,3-glucanase, Chitinase และการสร้าง Ammonia โดยผลการทดลองในระดับ *in vitro* พบว่า *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถผลิตเอนไซม์ Protease และ β -1,3-glucanase ได้ แต่ไม่พบการผลิต Ammonia, Lipase และ Chitinase (ตาราง 5)

ตาราง 5 การศึกษาองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ *P. aeruginosa* SWUC02

สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์	ผลการทดสอบ
Ammonia	–
Lipase	–
Protease	+
β -1,3-glucanase	+
Chitinase	–

+ หมายถึง *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถผลิตสารที่ต้องการทดสอบได้

– หมายถึง *P. aeruginosa* SWUC02 ไม่สามารถผลิตสารที่ต้องการทดสอบได้

3. ลักษณะของสารในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus*

จากการศึกษาลักษณะของสารออกฤทธิ์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *P. aeruginosa* SWUC02 ที่ใช้ในการยับยั้ง *S. aureus* พบว่าสารดังกล่าวสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ในช่วง 40–100 องศาเซลเซียส และความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* ลดลงเมื่ออบที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที (ตาราง 6)

นอกจากนี้ น้ำเลี้ยงเชื้อของ *P. aeruginosa* SWUC02 ยังมีความสามารถในการทนต่อ เอนไซม์ Pepsin และ Proteinase K ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถทำลายโปรตีนได้อีกด้วย (ตาราง 6)

ตาราง 6 แสดงลักษณะของสารในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus*

สภาวะที่ใช้ในการศึกษาลักษณะของสาร	ขนาดของโซนยับยั้งสมบูรณ์ (มิลลิเมตร)
เอนไซม์ ^{ns}	
Untreated	18.46 ± 0.50
Treated with Proteinase K	17.48 ± 0.45
Treated with Pepsin	17.89 ± 0.80
อุณหภูมิ (°C)	
32 (30 นาที)	19.57 ± 0.71 ^a
40 (30 นาที)	19.63 ± 0.86 ^a
60 (30 นาที)	19.72 ± 0.71 ^a
80 (30 นาที)	19.50 ± 0.55 ^a
100 (30 นาที)	19.07 ± 0.85 ^a
121 (15 นาที)	16.96 ± 0.40 ^b

ตัวเลขแสดงขนาดของโซนยับยั้ง (clear zone) เฉลี่ย ในหน่วยมิลลิเมตร ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษท้ายตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบภายในคอลัมน์ การวิเคราะห์ทางสถิติใช้วิธี Kruskal–Wallis Test และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Mann–Whitney U Test โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ P-Value < 0.05 เครื่องหมาย “ns” แสดงถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

4. การศึกษาขึ้นที่เกี่ยวกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน *P. aeruginosa* SWUC02 โดยใช้เทคนิค whole-genome sequencing

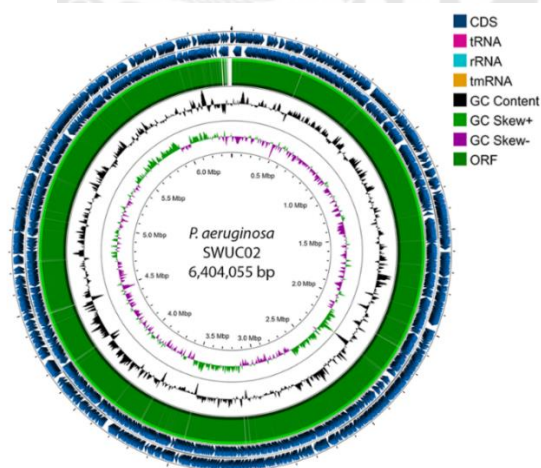
สายพันธุ์ SWUC02 ได้ถูกจัดจำแนกเป็น *P. aeruginosa* โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (Sudyoung และคนอื่น ๆ, 2020) ในการทดลองนี้ *P. aeruginosa* SWUC02 ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ลักษณะสารพันธุกรรมทั้งหมดในจีโนม และผลการทดลองสามารถ

ยืนยันได้ว่าเป็น *P. aeruginosa* โดยลักษณะจีโนมเป็น Close circular DNA ที่ไม่มีพลาสมิด ภายในเซลล์ และมีขนาดจีโนม 6,404,055 คู่เบส (base pair; bp) มีปริมาณ GC content อยู่ที่ 66.45% และมีปริมาณ Protein Coding Sequence (CDS) 6,214 ลำดับ (ภาพประกอบ 7, ตาราง 7)

ตาราง 7 ภาพรวมจีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02 โดย RAST version 2.0

เรื่อง	ลักษณะ
Size (bp)	6,404,055
GC content (%)	66.45
Protein Coding Sequence (CDS)	6,214
Hypothetical protein (sequences)	2,380
Number of Subsystems	394
tRNA	66
rRNA	3
Plasmid	-

- หมายถึง ไม่พบลักษณะ



ภาพประกอบ 7 แผนที่และขนาดจีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02 โดย CGView Server

(เรียงจากวงด้านนอกสุด คือ Forward CDSs; Reverse CDSs; Open Reading Frame (ORF); GC content; และ GC skew)

ตาราง 8 แสดงยีนดื้อยาที่พบบนจีโนมของ *P. aeruginosa* จากฐานข้อมูล CARD และที่พบใน *P. aeruginosa* SWUC02

กลุ่มยีนดื้อยา	ยีน*	ชื่อเต็มยีน	ยีนที่พบใน <i>P. aeruginosa</i> SWUC02
beta-lactams	<i>bla</i> _{PAO}	PAO-1 beta-lactamase	+
resistance	<i>bla</i> _{GES-1}	GES-1 beta-lactamase	-
	<i>bla</i> _{OXA-50}	OXA-50 beta-lactamase	+
aminoglycoside resistance	<i>aph(3')-XV</i>	Aminoglycoside phosphotransferase XV	-
	<i>aph(3')-IIb</i>	Aminoglycoside phosphotransferase IIb	+
	<i>aac(6')Ib-cr</i>	Aminoglycoside acetyltransferase	-
	<i>aacA4</i>	Aminoglycoside acetyltransferase A4	-
	<i>aadA6</i>	Aminoglycoside adenyltransferase A6	-
chloramphenicol acetyltransferase	<i>catB7</i>	Chloramphenicol acetyltransferase B7	+
fosfomycin	<i>fosA</i>	Fosfomycin resistance protein	+
tetracycline	<i>tet(G)</i>	Tetracycline efflux protein	+

*; ยีนที่พบบนจีโนม *P. aeruginosa* ในฐานข้อมูล CARD ที่มา (McArthur และคนอื่น ๆ, 2013)

+; พบยีนบนจีโนม *P. aeruginosa* SWUC02, -; ไม่พบยีนบนจีโนม *P. aeruginosa* SWUC02

การวิเคราะห์จีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02 เพื่อศึกษา ยีนดื้อยาที่มีในจีโนม โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ResFinder ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมข้อมูลยีนดื้อยาปฏิชีวนะที่พบในจีโนมแบคทีเรีย (Florensa และคนอื่น ๆ, 2022) และใช้โปรแกรมของ ResFinder สำหรับวิเคราะห์ผลการวิเคราะห์พบว่าในจีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycoside, beta-lactams, chloramphenicol และ Fosfomycin ได้แก่ aminoglycoside phosphotranferase gene (*aph(3')-IIb*), beta-lactams resistance gene

(*bla*_{PAO} and *bla*_{OXA-50}), chloramphenicol acetyltransferase (*catB7*) และ glutathione transferase “fosfomycin resistance protein” (*fosA*) โดยทุกยีนมี %coverage เป็น 100% และมี %identity อยู่ในช่วง 98–100% ทั้งนี้ %coverage แสดงความครอบคลุมระหว่างยีนที่วิเคราะห์และยีนที่อยู่บนฐานข้อมูล ResFinder และ %identity แสดงถึงความคล้ายคลึงระหว่างยีนที่วิเคราะห์และยีนที่อ้างอิง (ตาราง 9)

ตาราง 9 แสดงยีนต้านยาปฏิชีวนะของ *P. aeruginosa* SWUC02 โดยใช้ฐานข้อมูล ResFinder โดย “*” แสดงเลขประจำรหัสข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในฐานข้อมูล Genbank

ชื่อยีน	Accession no.*	%Coverage	%Identity
<i>P. aeruginosa</i> SWUC02			
<i>aph(3')-IIb_1</i>	X90856	100	98.51
<i>bla</i> _{OXA-50} -3	AY306132	100	100
<i>bla</i> _{PAO} -4	AY083592	100	99.5
<i>catB7_1</i>	AF036933	100	98.28
<i>fosA_4</i>	ACWU01000146	100	100

การวิเคราะห์จีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02 เพื่อศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้ Prokka ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการระบุยีน (annotation) (Seemann, 2014) และใช้ RAST เซิร์ฟเวอร์ ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการระบุกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกัน (Aziz และคนอื่น ๆ, 2008) เพื่อทำการวิเคราะห์หากกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และจีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02 ยังถูกนำไปเปรียบเทียบกับ antiSMASH database และใช้โปรแกรมของ antiSMASH ในการระบุชนิดและวิเคราะห์กลุ่มยีนที่มีหน้าที่ในการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Blin และคนอื่น ๆ, 2021) นอกจากนี้ BAGEL เซิร์ฟเวอร์ เป็นอีกหนึ่งโปรแกรมที่ใช้ในการระบุชนิดของกลุ่มยีนที่มีหน้าที่ในการผลิตแบคทีริโอซิน (van Heel และคนอื่น ๆ, 2018)

ผลการทดลองพบว่าจีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02 มีกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมด 16 กลุ่มยีน (ผลการวิเคราะห์รวมจาก RAST, antiSMASH, BAGEL และ Prokka) แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ คือ แบคทีริโอซิน (Bacteriocin), สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary Metabolite) และ ไฮเดรอฟอร์ (Siderophores) (ตาราง 10)

ตาราง 10 แสดงผลการวิเคราะห์หากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยฐานข้อมูล (a) RAST, (b) BAGEL4, (c) AntiSMASH และ (d) Prokka

ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	ชื่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
Bacteriocin	Bottromycin ^b
	Colicin E2 ^a
	Pyocin-S2 ^{b,d}
	Colicin V ^d
Secondary Metabolite	L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid ^c
	Lankacidin C ^c
	Paerucumarin ^a
	Phenazine ^d
	Pyoverdine ^c
	Pyochelin ^{a,b}
	Endophenazine A/Endophenazine B ^c
	Oxalomycin B ^c
	Pyocyanine ^c
	Thanamycin ^c
Siderophore	Aerobactin ^a
	Enterobactin ^d

5. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จาก *P. aeruginosa* SWUC02

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *P. aeruginosa* SWUC02 เพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ที่เข้มข้น *S. aureus* ได้ดีที่สุด ได้ออกแบบการทดลองในรูปแบบ one-factor at a time โดยมี 7 ปัจจัยได้แก่ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น, ความเข้มข้นของ CuCl₂, อัตราการเขย่า, อุณหภูมิเพาะเลี้ยง, ความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อ, ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพคือเลี้ยงด้วยอาหาร LB หรือ TSB ที่มี 0.01% CuCl₂ โดยมีสภาวะความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ pH 7 ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 1 × 10⁵ CFU.mL⁻¹ ปริมาณการให้อากาศโดยการเขย่าที่

ความเร็วรอบ 100 rpm เลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 วัน (ตาราง 11)

ตาราง 11 แสดงผลการศึกษากการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	ปัจจัยของสภาวะ	ขนาดของโซนยับยั้งสมบูรณ์ (มิลลิเมตร)
ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (CFU.mL ⁻¹)	1×10 ³	12.85 ± 0.68 ^b
	1×10 ⁴	13.66 ± 0.44 ^a
	1×10 ^{5*}	14.30 ± 0.66 ^a
ความเข้มข้นของ CuCl ₂ (w/v)	0.000%	4.65 ± 0.89 ^c
	0.005%	13.80 ± 0.35 ^b
	0.010%*	14.86 ± 0.34 ^a
	0.015%	15.42 ± 0.23 ^a
	0.020%	14.83 ± 0.54 ^a
อัตราการเขย่า (rpm)	50	3.13 ± 0.65 ^c
	100*	15.26 ± 0.48 ^a
	150	14.85 ± 0.58 ^{ab}
	200	14.50 ± 0.43 ^b
อุณหภูมิเพาะเลี้ยง (องศาเซลเซียส)	26	3.51 ± 0.52 ^c
	28	14.16 ± 0.62 ^b
	30	14.63 ± 0.50 ^{ab}
	32*	15.46 ± 0.58 ^a
	34	14.76 ± 0.66 ^{ab}

ตาราง 11 (ต่อ)

สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	ปัจจัยของสภาวะ	ขนาดของโซนยับยั้งสมบูรณ (มิลลิเมตร)
ความเป็นกรด-ด่าง ของ อาหารเลี้ยงเชื้อ	5	13.49 ± 0.30 ^a
	6	12.63 ± 0.88 ^{ab}
	7*	13.18 ± 0.65 ^{ab}
	8	12.72 ± 0.61 ^{ab}
	9	9.60 ± 0.40 ^b
ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	3	9.54 ± 0.38 ^c
	6	14.90 ± 0.88 ^b
	9	15.39 ± 0.64 ^b
	12*	17.07 ± 0.47 ^a
	15	17.16 ± 0.36 ^a
อาหารที่ใช้ในการเลี้ยง	TSB	18.34 ± 0.85 ^a
	NB	15.50 ± 0.85 ^b
	King' s B	16.72 ± 0.88 ^b
	LB*	18.07 ± 0.98 ^a

*สภาวะที่เลือกนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป ตัวเลขแสดงขนาดของโซนยับยั้ง (clear zone) เฉลี่ย ในหน่วยมิลลิเมตร ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษท้ายตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบภายในคอลัมน์ การวิเคราะห์ทางสถิติใช้วิธี Kruskal-Wallis Test และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Mann-Whitney U Test โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ P-Value < 0.05

6. การแยกและการสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02

การศึกษากการแยกและการสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ได้แบ่งตัวทำละลายออกเป็น 3 ชนิดตามสมบัติการมีขั้วจากต่ำไปสูงได้แก่ hexane, dichloromethane และ ethyl acetate ตามลำดับ การศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถละลายใน dichloromethane ได้ดีที่สุด โดยแสดงโซนยับยั้งต่อ *S. aureus* ATCC 25923 ขนาด 13.33 ± 4.29 มิลลิเมตร โดยพบโซนยับยั้งสมบูรณ์ที่เกิดขึ้นสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น (ตารางที่ 12) จากผลจะสังเกตได้ว่าน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถทำละลายเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane เนื่องจากในธรรมชาติในการทำงานของสารเมแทบอลิท์อาจจะมีปัจจัยที่ส่งเสริมฤทธิ์ให้ดียิ่งขึ้นเช่น coenzyme หรือ cofactor เป็นต้น ซึ่งการสกัดอาจมีผลทำให้สารส่งเสริมฤทธิ์เหล่านั้นถูกสกัดออกไปหรือเสียสภาพความสามารถในการส่งเสริมฤทธิ์ (Khatibi และคนอื่น ๆ, 2022) อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีความเป็นไปได้ว่าสารนี้อาจจะมีประโยชน์ที่สามารถนำไปใช้ต่อรวมถึงความสะดวกในการนำไปใช้งานและการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ จึงได้นำสารนี้ไปศึกษาต่อถึงความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำละลายเชื้อหรือไบโอฟิล์มได้

ตาราง 12 แสดงผลของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923

ชุดการทดลอง	ขนาดของโซนยับยั้งสมบูรณ์ (มิลลิเมตร)
cell-free culture (ชุดควบคุม)*	18.46 ± 0.50^a
hexane extract**	0.51 ± 1.10^c
dichloromethane extract**	13.33 ± 4.29^b
ethyl acetate extract**	4.98 ± 8.57^c

ตัวเลขแสดงขนาดของโซนยับยั้งสมบูรณ์ (clear zone) เฉลี่ย ในหน่วยมิลลิเมตร \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษท้ายตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบภายในคอลัมน์ จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Kruskal–Wallis Test และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Mann–Whitney U Test โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ P-Value < 0.05 “*” ความเข้มข้น 100 % v/v, “***” ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

7. การศึกษาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อและทำลาย *S. aureus* ATCC 25923

การศึกษาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อและทำลาย *S. aureus* ATCC 25923 พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อและทำลาย *S. aureus* ATCC 25923 ของน้ำเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ 0.098% และ 0.391% ตามลำดับ และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อและทำลาย *S. aureus* ATCC 25923 ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อจากตัวทำละลาย dichloromethane อยู่ที่ระดับเดียวกันคือ 3.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$) (ตาราง 13)

ตาราง 13 แสดงระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้งเชื้อ (MIC) และทำลาย (MBC) *S. aureus* ATCC 25923

ชุดการทดลอง	MIC	MBC
cell-free culture*	0.098% v/v	0.391% v/v
dichloromethane extract**	3.91 $\mu\text{g/mL}$	3.91 $\mu\text{g/mL}$

** ทดสอบที่ความเข้มข้น 50–0.098% v/v,

*** ทดสอบที่ความเข้มข้น 500–0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8. การศึกษาการยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ATCC 25923 โดยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02

การศึกษาการยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ATCC 25923 โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อจากตัวทำละลาย dichloromethane อยู่ที่ระดับ 15.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ยาปฏิชีวนะ vancomycin มีความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งไบโอฟิล์ม *S. aureus* ATCC 25923 อยู่ที่ 0.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่พบความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำลายไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ โดยความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ทำการทดสอบทั้งสารสกัด dichloromethane และยาปฏิชีวนะ vancomycin คือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 14)

ตาราง 14 แสดงระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง (MBIC) และทำลายไบโอฟิล์ม (MBEC) ของ *S. aureus* ATCC25923 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$)

ชุดการทดลอง	MBIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBEC ($\mu\text{g/mL}$)
dichloromethane extract*	15.625	> 500
vancomycin*	0.625	> 500

“*” ทดสอบที่ความเข้มข้น 500–0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

9. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* สายพันธุ์ที่พบในครัวเรือนและสายพันธุ์ที่ดื้อยา

9.1 การทดสอบการดื้อยาของ *S. aureus* ที่คัดแยกได้จากผิวหนังในครัวเรือน

นำเชื้อ *S. aureus* จำนวน 7 สายพันธุ์ (ISL26, 32, 33, 34, 35, 57 และ 59) ที่แยกมาจากครัวเรือนในพื้นที่กรุงเทพมหานคร (ศิริรักษ์ และคนอื่น ๆ, ข้อมูลยังไม่ถูกเผยแพร่) มาทดสอบลักษณะการดื้อต่อยา penicillin และ cefoxitin ตามวิธีของ CLSI, (2021) ด้วยวิธี disk diffusion พบว่า ทุกสายพันธุ์ดื้อต่อ penicillin โดยพบขนาดโซนยับยั้ง ที่เกิดจาก penicillin 10 units น้อยกว่า 28 mm และเมื่อนำทุกสายพันธุ์ไปทดสอบการดื้อต่อยา cefoxitin ด้วยวิธี broth dilution พบว่า ทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา โดยพบว่าค่า MIC ของ cefoxitin มากกว่า 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในทุกสายพันธุ์ ซึ่งกล่าวได้ว่าทุกสายพันธุ์เป็น MRSA (อ้างอิงจากมาตรฐาน CLSI, Zone Diameter breakpoint: penicillin 10 units \leq 28 mm.; MIC breakpoint: cefoxitin \geq 8 $\mu\text{g/mL}$) (ตารางที่ 15)

ตาราง 15 *S. aureus* ที่มีความสามารถในดื้อต่อยาปฏิชีวนะ cefoxitin

สายพันธุ์ <i>S. aureus</i>	โซนยับยั้ง penicillin 10 units (มิลลิเมตร)	ความไวต่อยา ปฏิชีวนะ penicillin	MIC cefoxitin µg/ml	ความไวต่อยา ปฏิชีวนะ cefoxitin
ISL26	0	R	8	R
ISL32	0	R	32	R
ISL33	0	R	32	R
ISL34	0	R	32	R
ISL35	0	R	32	R
ISL57	0	R	32	R
ISL59	0	R	8	R

ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความไวของ *S. aureus* ต่อยาปฏิชีวนะ โดย “S” หมายถึงไวต่อยาปฏิชีวนะ และ “R” หมายถึง ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

9.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* สายพันธุ์ที่พบในคร้วเรือนและสายพันธุ์ที่ดื้อยา

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 จะสุ่มนำเชื้อ MRSA จากการทดลองที่กล่าวมา 7 สายพันธุ์ ได้แก่ ISL26, 32, 33, 34, 35, 57 และ 59 ส่วนการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ MRSA ในคร้วเรือน โดยมีระดับความเข้มข้นอยู่ที่ 0.1–0.78 % v/v ในขณะที่สารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ก็มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ MRSA ในคร้วเรือนเช่นเดียวกัน โดยมีระดับความเข้มข้นอยู่ที่ 3.91–15.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 16)

ตาราง 16 แสดงระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง (MIC) MRSA ที่พบในครัวเรือน

สายพันธุ์	MIC ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ของน้ำเลี้ยงเชื้อ (% v/v)
<i>S. aureus</i>		
ISL26	7.81	0.39
ISL32	15.63	0.78
ISL33	3.91	0.10
ISL34	3.91	0.10
ISL35	7.81	0.20
ISL57	15.63	0.39
ISL59	7.81	0.39

10. การทดสอบประสิทธิภาพการประยุกต์ใช้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* ที่พื้นผิวบนอ่างล้างมือครัวเรือน

จากการศึกษาประสิทธิภาพการประยุกต์ใช้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* ที่พื้นผิวบนอ่างล้างมือครัวเรือน โดยในการศึกษานี้จะสนใจไปที่ความสามารถของสารสกัด (dichloromethane extract) จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้อากาศและเชื้อในกลุ่ม Staphylococci พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 เท่า (3.91, 7.82, 15.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ใช้อากาศได้อย่างมีนัยสำคัญที่ P-Value < 0.05 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่การยับยั้งเชื้อในกลุ่ม Staphylococci นั้นในทุกความเข้มข้นของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อในกลุ่ม Staphylococci ในธรรมชาตินั้นอาจมีการสร้างไบโอฟิล์มทำให้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ไม่สามารถเข้าสู่ตัวเชื้อได้จึงเป็นผลให้ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ (ตารางที่ 17)

ตาราง 17 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการประยุกต์ใช้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* ที่พื้นผิวบนอ่างล้างมือครัวเรือน

ชุดการทดลอง	Aerobic Plate Count (CFU/cm ² ± S.D.)	Staphylococci Plate Count (CFU/cm ² ± S.D.)
sterile water	54.53 ± 16.19 ^a	11.10 ± 9.72 ^a
3.91 µg/mL dichloromethane extract	29.73 ± 15.77 ^b	14.93 ± 9.63 ^a
7.82 µg/mL dichloromethane extract	17.13 ± 12.55 ^b	18.33 ± 9.13 ^a
15.64 µg/mL dichloromethane extract	19.5 ± 14.28 ^b	9.13 ± 6.96 ^a
0.5% NaOCl	0 ^c	0 ^b

ตัวเลขแสดงจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นเฉลี่ย ในหน่วย CFU/cm² ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษท้ายตัวเลขที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบภายในคอลัมน์ จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Kruskal–Wallis Test และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Mann–Whitney U Test โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ P–Value < 0.05

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. ความสามารถของเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Pseudomonas เป็นจีแนสของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ ยกตัวอย่างเช่น pyoluteorin, pyrrolnitrin, phenazine-1-carboxylic acid และ bacteriocins เป็นต้น ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา (Preston, 2004; Santoyo และคนอื่น ๆ, 2012) ในงานวิจัยนี้ *P. aeruginosa* SWUC02 มีความสามารถในการทำลายเชื้อก่อโรคทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางส่วนได้ ในขณะที่น้ำเลี้ยงเชื้อสามารถทำลาย *S. aureus* และ *B. cereus* ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Raji El Feghali และ Nawas, (2018) และ Navarro และคนอื่น ๆ, (2020) รายงานว่า *P. aeruginosa* LV มีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *S. aureus*, *S. saprophyticus* และ *Enterococcus faecalis* จากการศึกษาของ Qi และคนอื่น ๆ, (2020) ได้ศึกษาความสามารถของ *P. monteilii* ต่อการยับยั้ง *Aeromonas hydrophila* พบว่า *P. monteilii* สายพันธุ์ JK-1 มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ และสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังได้มีการวิเคราะห์ชนิดของสารปฏิชีวนะด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ซึ่งพบว่าเป็นสาร 1-hydroxyphenazine และเมื่อนำสารปฏิชีวนะที่ผ่านการสกัดแล้วไปทำการทดสอบกับ *A. hydrophila* ทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* พบว่าสารสกัดปฏิชีวนะนี้สามารถยับยั้งการเจริญได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีหลายงานวิจัยค้นพบว่า *P. aeruginosa* LV สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ประเภท pyocyanin ที่สามารถทำลายไบโอฟิล์มของ *S. saprophyticus*, *A. baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* และ *E. coli*

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์ protease ใน *P. aeruginosa* พบว่ามีการผลิต proteinase, gelatinase, caseinase, elastase A-B, protease IV และ alkaline protease (Oldak และ Trafny, 2005; Twining และคนอื่น ๆ, 1993) ในส่วนของเอนไซม์ glucanase จะมีหน้าที่ในการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งมีส่วนประกอบหลักสำคัญเป็น glucan โดยเอนไซม์จะไปทำการตัดพันธะ β -1,3- glucan ส่งผลให้เกิดความไม่สมบูรณ์ของผนังเซลล์แล้วทำให้เชื้อราตายในเวลาต่อมา (Goel และคนอื่น ๆ, 2010; Raveendran และคนอื่น ๆ, 2018) อย่างไรก็ตาม glucanase มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เช่นกัน ดังรายงานของ Calazans และคน

อื่น ๆ, (2021) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับ glucanase ที่ผลิตจากยีสต์ *Wickerhamomyces anomalous* ต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ที่แยกได้จากเนื้อสัตว์ ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการทำลายผนังเซลล์ของ *S. aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อย่างไรก็ตาม มีหลายรายงานกล่าวถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *P. aeruginosa* ตัวอย่างเช่น รายงานของ (El-Sheshtawy และ Doheim, 2014) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตสาร biosurfactant ที่ได้จาก *P. aeruginosa* ATCC-10145 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม rhamnolipid เป็นส่วนประกอบ ในงานวิจัยดังกล่าวนี้ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี cup assay พบว่าสาร biosurfactant ที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* ATCC-10145 มีความสามารถในการยับยั้ง *Micrococcus luteus*, *Bacillus pumilus* และ จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี agar diffusion พบว่าสารนี้ยังมีฤทธิ์ในการทำลาย *Penicillium chrysogenum* และ *Candida albicans* นอกจากนี้ Buonocore และคนอื่น ๆ, (2023) ได้ศึกษาถึงการให้ biosurfactant จาก *P. gessardii* สายพันธุ์ M15 ที่เป็น rhamnolipid ในกลุ่ม glycopeptide จากนั้นทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* พบว่า biosurfactant ดังกล่าวสามารถทำลายเซลล์ ยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์ม และทำลายไบโอฟิล์มของ *S. aureus* สายพันธุ์ 6538 และ MRSA ได้

นอกจากนี้ (Kamei และ Isnansetyo, 2003) ได้มีการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *P. aeruginosa* ด้วย 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) ที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. พบว่า DAPG สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *P. aeruginosa* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีระดับ MIC อยู่ที่ 1 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และไม่สามารถทำลาย *P. aeruginosa* ได้ นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังได้มีการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการทนต่อความร้อน ยังพบอีกว่า DAPG มีคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิอยู่ที่ 35–70 องศาเซลเซียส และความสามารถในการทำลายเชื้อจะหมดลงเมื่ออยู่ในอุณหภูมิมากกว่า 100 องศาเซลเซียส (Zhao และคนอื่น ๆ, 2022)

จากการศึกษาโดย Fontoura และคนอื่น ๆ, (2009) ได้ทดสอบการสกัดเปปไทด์ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ 4B โดยสารสกัดเปปไทด์นี้สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งแกรมลบและแกรมบวกได้หลายชนิด เช่น *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *S. heamolyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* และ *Salmonella* sp. เป็นต้น และยังสามารถยับยั้งยีสต์ *Candida utilis* และ

Kluyveromyces marxianus ได้อีกด้วย จากการศึกษานี้ในปี 2021 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับ *P. mediterranea* ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ medipeptins ซึ่งเป็นสารประเภท cyclic lipopeptides ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ได้โดยจากการศึกษานี้พบว่าสามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อก่อโรคพืช เช่น *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. translucens* pv. *graminis* และ *P. syringae* pv. *tomato* เป็นต้น และสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในมนุษย์ได้แก่ *B. cereus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* และ *S. aureus* เป็นต้น (Zhou และคนอื่น ๆ, 2021)

นอกจากสารประเภทเปปไทด์แล้ว ก็ยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ อีกตัวอย่างเช่น Szamosvari และคนอื่น ๆ, (2019) ได้ศึกษา *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) ซึ่งเป็นสารส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (quorum sensing signal) ที่พบในเชื้อ *Pseudomonas* spp. โดยในการศึกษานี้พบว่า PQS นี้สามารถทำลายเชื้อก่อโรค *Moraxella catarrhalis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยกลไกในการยับยั้งการเจริญจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ โดยอาจจะไปกระตุ้นการเกิด oxidative stress หรืออาจจะทำหน้าที่ในการจับการโลหะเช่นเดียวกับซิงค์เดอริฟออร์ (Lin และคนอื่น ๆ, 2018)

จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ *P. aeruginosa* SWUC02 ผลิตขึ้น พบว่า *P. aeruginosa* SWUC02 มีความสามารถในการผลิต protease และ glucanase โดย protease เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการสลายพันธะของโมเลกุลของโปรตีนขนาดใหญ่ให้กลายเป็นเปปไทด์สายสั้น โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ protease จะมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทางอ้อม ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียบางชนิดมีโปรตีนที่อยู่ด้านนอกเซลล์ซึ่งอาจมีไว้สำหรับนำสารเข้าสู่เซลล์ การยึดเกาะพื้นผิวหรือการสร้างไบโอฟิล์ม เอนไซม์ protease นี้จะเข้าไปทำงานโดยการไปตัดพันธะในโปรตีนเหล่านั้น ส่งผลให้เกิดการรบกวนกระบวนการต่าง ๆ ภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียและทำให้แบคทีเรียเหล่านั้นตายในที่สุด (Schmidtchen และคนอื่น ๆ, 2002)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จาก *P. aeruginosa* SWUC02 มีความสามารถในการทนต่อความร้อนสูงถึง 100 องศาเซลเซียส และสามารถป้องกันการถูกทำลายจากเอนไซม์ Proteinase K และ Pepsin ได้ นอกจากนี้จากการศึกษาคคุณสมบัติความมีชีวิตสารยังพบอีกว่าสารสกัดนี้มีชีวปานกลางซึ่งสามารถถูกสกัดได้ดีที่สุดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane และ ethyl acetate ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในการศึกษาชนิดของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 อาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

2. ลักษณะจีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าจีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02 มีขนาดจีโนม 6.404 ล้านคู่เบส และมีกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่หลากหลายชนิดทั้งหมดจำนวน 17 กลุ่มยีน โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ สารเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ, แบคทีริโอซิน และ ซิเคอร์โรฟอรั ในการศึกษาของ Alam และคนอื่น ๆ, (2021) ซึ่งได้มีการศึกษา genome mining การศึกษาจีโนมของแบคทีเรียเพื่อศึกษากลุ่มของยีนในการผลิตสารที่มีประโยชน์ซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติใน *Pseudomonas* โดยผู้วิจัยได้นำข้อมูลจีโนมของ *Pseudomonas* จากฐานข้อมูล NCBI มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม antiSMASH, PRISM 4 และ BAGEL4 เพื่อศึกษากลุ่มยีนที่มีความสามารถในการผลิตสารเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ จากการศึกษพบว่าจีโนมของ *Pseudomonas* spp. โดยทั่วไปจะมีกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการการผลิตสารเมแทบอลิซึมทุติยภูมิอยู่ระหว่าง 6-16 กลุ่มยีนต่อจีโนม ได้แก่กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต aryl polyene, acyl amino acids, beta-lactam, beta-lactone, butyrolactone, tRNA-dependent cyclodipeptide synthases, non-ribosomal peptides, N-acetylglutamine amide, phenazine, ranthipeptide, redox-cofactor, RiPP-like, siderophore, terpene, thiopeptide และ hybrid biosynthesis gene clusters (BGCs) ซึ่ง hybrid BGCs หมายถึงกลุ่มยีนที่สามารถสังเคราะห์สารเมแทบอลิซึมได้มากกว่า 1 ชนิด และมีขนาดของจีโนมระหว่าง 4.689-7.189 ล้านคู่เบส นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BAGEL4 ยังพบอีกว่าแบคทีริโอซินส่วนใหญ่ที่พบจะประกอบไปด้วย colicin E6, carocin D, colicin E9, putidacin L, colicin, pyocin S, bottromycin, class II lanthipeptide และ colicin-10 เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาก่อนหน้าเมื่อเทียบกับผลการศึกษา whole genome sequencing พบว่าสารหลายชนิดที่พบบนจีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ยกตัวอย่างเช่น Phenazine เป็นสารอินทรีย์ที่ถูกสังเคราะห์ได้จาก *P. aeruginosa* ซึ่ง phenazine นี้มีหลายชนิดขึ้นกับโครงสร้างที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้น (Biessy และ Filion, 2018) ยกตัวอย่างเช่น pyocyanin ซึ่งเป็น phenazine เป็นสารรงควัตถุสีน้ำเงินแกมเขียวที่ถูกสังเคราะห์จาก *P. aeruginosa* มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย, เชื้อรา และ โปรโตซัว โดยมีกลไกที่สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ reactive oxygen species: ROS ผ่านปฏิกิริยารีดอกซ์ ส่งผลให้เซลล์เกิดความเครียดและถูกทำลายเช่นเดียวกับ phenazine ส่วนใหญ่ (Baron และคนอื่น ๆ, 1989; Jayaseelan และคนอื่น ๆ, 2014; Raji El Feghali และ Nawas, 2018) นอกจากนี้การศึกษายังพบ endophenazine A และ B ซึ่งเป็นสารรงควัตถุที่มี

ความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา โดยมีกลไกหลักในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดจากการกระตุ้นการสร้าง ROS เช่นเดียวกัน (Gebhardt และคนอื่น ๆ, 2002)

Pyoverdine, Pyochelin, Enterobactin และ Aerobactin เป็นสารในกลุ่มซิติเดอริโอฟอร์ ซึ่งมีความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะและรับไอออนโลหะเข้าสู่เซลล์ สารในกลุ่มซิติเดอริโอฟอร์เหล่านี้ส่วนมากไม่ได้มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยตรง แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไอออนโลหะมีอยู่อย่างจำกัด ซิติเดอริโอฟอร์ที่สังเคราะห์นี้จะส่งผลให้แบคทีเรียมีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ไม่มีการสังเคราะห์ซิติเดอริโอฟอร์ (Ghssein และ Ezzeddine, 2022; Miethke และ Marahiel, 2007) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าสารซิติเดอริโอฟอร์ในกลุ่มนี้บางชนิดมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดย Britigan และคนอื่น ๆ, (1992) พบว่าเมื่อ pyochelin ที่จับกับไอออนกับโลหะ (ferripyochelin) สามารถกระตุ้นการเกิด hydroxyl free radical จากการสลาย superoxide และ hydrogen peroxide ผ่านปฏิกิริยา Haber–Weiss ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไอออนของโลหะเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ในสภาวะที่มีอากาศ

จากการศึกษาในปี 2022 ได้มีการศึกษาจีโนมของ *P. aeruginosa* FG106 ด้วยโปรแกรม RAST server และ antiSMASH จากผลการวิเคราะห์พบว่า *P. aeruginosa* FG106 มีขนาดจีโนมอยู่ที่ 6,283,027 คู่เบส มีปริมาณ GC content อยู่ที่ 66.55% และมี protein coding sequences อยู่ที่ 5941 ยีน นอกจากนี้ยังพบสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิประกอบไปด้วย pyochelin, pyoverdine, L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butanoic acid, pyocyanine, thanamycin และ bicylomycin จากผลที่ได้จาก *P. aeruginosa* FG106 พบว่ามีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Alam และคนอื่น ๆ, (2021) และผลที่ได้จาก *P. aeruginosa* SWUC02 ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษา ยังพบอีกว่า *P. aeruginosa* FG106 ยังมีการสร้างเอนไซม์ lipase และ protease อีกด้วย (F. Ghadamgahi และคนอื่น ๆ, 2022)

จากการศึกษายีนดื้อยาที่พบใน *P. aeruginosa* SWUC02 ในงานวิจัยนี้ พบว่ามียีน aminoglycoside phosphotranferase gene (*aph(3')-IIb*), beta-lactams resistance gene (*bla_{PAO}* and *bla_{OXA-50}*), chloramphenicol acetyltransferase (*catB7*) และ glutathione transferase “fosfomycin resistance protein” (*fosA*) อยู่ในจีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02 ซึ่งเป็นยีนที่พบได้ทั่วไปใน *Pseudomonas* spp. จากการศึกษาโดย Ahmed, (2022) ได้นำข้อมูลจีโนมของ *P. aeruginosa* ไปทำการวิเคราะห์โดยนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (McArthur และคนอื่น ๆ, 2013)

พบว่ายีนดีออกซาส่วนใหญ่ที่พบใน *P. aeruginosa* ประกอบไปด้วย bla_{PAO} , bla_{GES-1} , $aph(3')-XV$, bla_{OXA-50} , $aacA4$, $catB7$, $aph(3')-IIb$, $aadA6$, $fosA$, $tet(G)$ และ $aac(6')Ib-cr$ และจากการศึกษาลักษณะจีโนมของ *P. aeruginosa* SWUC02 พบว่าเป็น circular genome และไม่พบ plasmid อยู่ใน *P. aeruginosa* SWUC02 ดังนั้นจึงไม่มีโอกาสที่ยีนดีออกซาจาก *P. aeruginosa* SWUC02 จะกระจายไปยังสิ่งแวดล้อม โดยการถ่ายทอดแบบ Horizontal Gene Transfer (Martinez และ Baquero, 2002)

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *P. aeruginosa* SWUC02

จากการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *P. aeruginosa* SWUC02 พบว่าความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากที่เลี้ยง *P. aeruginosa* ในสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธี one-factor at a time (OFAT) ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสม โดยเป็นการศึกษาทีละปัจจัยเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในปัจจุบันที่ศึกษาแล้ว การศึกษาปัจจัยต่อไปจะยึดค่าปัจจัยที่เหมาะสมก่อนหน้าไว้แล้วหาสภาวะที่เหมาะสมในปัจจุบันต่อไป เป็นเช่นนี้ไปจนครบทุกปัจจัย นอกจากนี้วิธี OFAT ยังสามารถศึกษาได้ง่าย เหมาะกับการศึกษาที่มีตัวแปรมาก ๆ มีความผิดพลาดของข้อมูลน้อย และสามารถหาข้อผิดพลาดในปัจจุบันในการทดลองได้ง่าย จากนั้นจึงนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางโดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวทำละลาย dichloromethane ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับการศึกษาที่มีการเพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* ในสภาวะที่ใกล้เคียงกันพบว่ามีความสอดคล้องกัน โดย de Oliveira และคนอื่น ๆ, (2016) ได้นำ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ LV มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มี 0.01% $CuCl_2$ เป็นเวลา 10 วัน พบว่าสารที่ผลิตได้จาก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ LV นี้สามารถทำลายเซลล์ของ *Xanthomonas citri* pv. *citri* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการศึกษานี้ยังได้ทำการสกัดสารพบว่าสารที่ยับยั้งอยู่ในกลุ่ม phenazine และอาจมีสารประกอบ organometallic ที่น่าจะมีความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งเซลล์และไบโอฟิล์มของแบคทีเรียได้อีกด้วย ต่อมาจากการศึกษาโดย Navarro และคนอื่น ๆ, (2020) ได้มีการเลี้ยง *P. aeruginosa* สายพันธุ์ LV ในสภาวะและการสกัดเช่นเดียวกับการศึกษาของ de Oliveira และคนอื่น ๆ, (2016) พบว่าสารสกัดที่ได้จาก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ LV มีความสามารถในการยับยั้ง *K. pneumoniae* สายพันธุ์ Kpn-19 และ *Enterococcus faecium* ATCC 6569 ได้อย่างมี

ประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน และยังได้มีการไปศึกษาต่อเพื่อระบุชนิดของสารพบว่าสารประกอบ organometallic คือ fluopsin C

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต pyocyanin ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด (Rani และคนอื่น ๆ, 2018) จาก *P. aeruginosa* โดย (Elbargisy, 2021) ได้นำ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ P21 และ PA14 ซึ่งแยกได้จากทางเดินปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีอาการการติดเชื้อในช่องทางเดินปัสสาวะ ไปทำการทดสอบผลของปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ pyocyanin ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการเขย่า อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ pyocyanin คือนำ *P. aeruginosa* ไปเลี้ยงในอาหาร King' A medium อัตราการเขย่า 200 RPM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH ระหว่าง 7-8 และระยะเวลา 4 วัน

การศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดที่แยกได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* สกัดได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate พบว่ามีความสามารถในการยับยั้ง MRSA โดยมีระดับ MIC และ MBC อยู่ที่ 0.64 µg/mL และ 1.28 µg/mL ตามลำดับ จากนั้นทางผู้วิจัยได้นำสารสกัดนี้ไปทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค HPLC, LC-MS และ NMR พบว่าเป็นสารประกอบชนิดใหม่ 5-(1*H*-indol-3-yl)-4-pentyl-1,3-oxazole-2-carboxylic acid. จากงานวิจัยยังได้มีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* มีความปลอดภัยต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงอย่างมากแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นของสารสูงถึง 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามจากการศึกษาสารสกัดที่ได้จาก *P. aeruginosa* SWUC02 ในตัวทำละลาย ethyl acetate ก็มีความสามารถในการยับยั้งเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่าอาจมีสารที่ในกลุ่มเดียวกัน (Santhaseelan และคนอื่น ๆ, 2022)

จากการศึกษาสารสกัดจาก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ LV พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย dichloromethane คือ phenazine-1-carboxylic acid ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายในการทำลายเชื้อ *Botrytis cinerea* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Simionato และคนอื่น ๆ, 2017) จากการศึกษาครั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ก็อาจสามารถสกัดออกมาได้เช่นเดียวกัน และยังสอดคล้องกับผลที่ได้จาก whole genome sequencing อีกด้วย

จากการศึกษาการใช้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* LV ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่าง ๆ กัน เพื่อใช้ในการยับยั้ง MRSA พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* LV ด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และ ethyl acetate ผสม dichloromethane มีความสามารถในการ

ทำลาย MRSA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีระดับ MIC อยู่ที่ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อทดสอบกับ MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยพบว่าไม่สามารถยับยั้งได้ (V. F. Cardozo และคนอื่น ๆ, 2013; Kerbauy และคนอื่น ๆ, 2016) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่พบว่าระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 (dichloromethane extract) ในการยับยั้ง (MIC) และการทำลาย (MBC) เซลล์ของ *S. aureus* ATCC 25923 พบว่ามีระดับ MIC และ MBC อยู่ที่ 3.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถทำลาย MRSA ที่พบในครว้เรือนได้โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 3.91 ถึง 15.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง MRSA เช่นกัน โดยมีความเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ที่ได้จาก *P. aeruginosa* SWUC02 เป็นสารที่อาจแตกต่างจากสารที่ผลิตได้จาก *P. aeruginosa* LV เนื่องจากประสิทธิภาพในการทำลายที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถระบุชนิดของสารที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

4. การประยุกต์ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* สายพันธุ์ที่พบในครว้เรือนและสายพันธุ์ที่ดื้อยา และยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์ม *S. aureus*

ปัญหาการดื้อยาของ *S. aureus* และแนวทางการกำจัดเชื้อดื้อยาเป็นสิ่งที่กำลังถูกให้ความสำคัญในปัจจุบัน เนื่องจาก *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสที่สามารถส่งผลกระทบต่อสุขภาพร่างกายต่อมนุษย์ตั้งแต่โรคทั่วไปจนถึงโรคที่ทำให้เสียชีวิต จากการประเมินผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ในการยับยั้ง *S. aureus* สายพันธุ์ที่พบในครว้เรือนที่ดื้อยา จำนวนทั้งหมด 7 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อทั้งหมดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีช่วงความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งได้ของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 อยู่ที่ 3.91–15.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.1–0.78 % v/v ตามลำดับ

จากผลการประยุกต์ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 สามารถลดปริมาณเชื้อที่พื้นผิวอ่างล้างมือครว้เรือนได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่สามารถลดปริมาณเชื้อในกลุ่ม Staphylococci ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในธรรมชาติเชื้ออาจอยู่ในสภาวะที่มีการสร้างไบโอฟิล์ม ทำให้สารสกัดไม่สามารถเข้าไปทำลายตัวเซลล์ของเชื้อในกลุ่ม Staphylococci ได้โดยอ้างอิงจากผลการทดสอบการยับยั้งไบโอฟิล์มซึ่งสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ไม่สามารถยับยั้งได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้การศึกษการประยุกต์ใช้สารสกัดยังพบปัญหาที่เกิดขึ้นในการวิจัย เนื่องจากวิธีการทดลองที่ไม่

สามารถควบคุมปริมาณเชื้อเริ่มต้น จึงส่งผลให้ผลที่ได้จากการทดลองที่ได้ในแต่ละครั้งไม่เป็นไปตามสมมุติฐาน ดังนั้น การศึกษาการประยุกต์ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 อาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ยังไม่เป็นที่แพร่หลาย การศึกษาส่วนใหญ่มักจะเน้นไปใช้ตัวเล็กของสารสกัดมากกว่า ยกตัวอย่างเช่น จากการศึกษาโดย Saadati และคนอื่น ๆ, (2022) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของ rhamnolipid ที่สกัดได้จาก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ MA01 ต่อการยับยั้งการเจริญและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไบโอฟิล์มของ MRSA พบว่า rhamnolipid ที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* MA01 มีความสามารถในการยับยั้งทั้งเซลล์และไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ได้ โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 0.18% และ 1.5% ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อนำไปทดสอบการทำลายกับไบโอฟิล์มของ MRSA พบว่าไบโอฟิล์มของ MRSA ถูกทำลายได้ด้วย rhamnolipid ที่ความเข้มข้น 12% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสามารถในการยับยั้งและการทำลายไบโอฟิล์มของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 แสดงให้เห็นว่าความสามารถของสารปฏิชีวนะในการทำลายจุลินทรีย์จะลดลงเมื่อจุลินทรีย์นั้นอยู่ในสภาวะที่มีการสังเคราะห์ไบโอฟิล์ม โดยการสกัด rhamnolipid นั้นสามารถทำได้โดยการใส่ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่ำจนถึงปานกลางยกตัวอย่างเช่น chloroform หรือ acetone เป็นต้น ยกตัวอย่างจากงานวิจัยในปี 2021 ได้มีการศึกษาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ rhamnolipid ที่ได้จาก *P. aeruginosa* โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายผสม methanol/chloroform/acetone จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า rhamnolipid ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณของ *S. aureus* ถึงประมาณ 92 % (Msarah และคนอื่น ๆ, 2021) จากความมีขั้วของตัวทำละลายจากการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่าการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 อาจจะสามารถสกัดออกมาได้เช่นเดียวกัน ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาในอนาคตเช่นเดียวกัน

การศึกษาการประยุกต์ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ I-2 มาใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้ง *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* และ *V. fluvialis* ผ่านการทดสอบ well diffusion, disc diffusion และ cross-streak พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ I-2 มีความสามารถในการยับยั้ง *Vibrio* ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ทางผู้วิจัยยังได้มีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดที่ได้จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ I-2 โดยเป็นสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย chloroform ซึ่งมีคุณสมบัติความมีขั้วใกล้เคียงกับตัวทำ

ละลายจากการศึกษา^{นี้} นอกจากนี้สารสกัดยังไม่พบความเป็นพิษต่อตัวอ่อนกุ้งอีกด้วย (Chythanya และคนอื่น ๆ, 2002)

จากข้อมูลงานวิจัยด้านความปลอดภัยดังกล่าวข้างต้น สนับสนุนความเป็นไปได้ของการนำสารสกัดจาก *P. aeruginosa* SWUC02 ในการนำไปประยุกต์ใช้ไม่เพียงแต่การยับยั้งเชื้อก่อโรคในมนุษย์แต่อาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปศุสัตว์หรือการกำจัดเชื้อผลิตภัณฑ์ก่อนการอุปโภคหรือบริโภคได้อีกด้วย

จากงานวิจัยในครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่า *P. aeruginosa* SWUC02 และน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ยังมีคุณสมบัติในการทนต่อเอนไซม์ pepsin และ proteinase K อีกทั้งยังสามารถทนต่อความร้อนได้มากถึง 100 องศาเซลเซียส และนอกจากนี้การศึกษาด้วยเทคนิค whole-genome sequencing ยังแสดงให้เห็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิที่มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์อยู่หลากหลายชนิดซึ่งในอนาคตอาจยังจำเป็นต้องศึกษาถึงการผลิตสารเหล่านั้นต่อไป อย่างไรก็ตามจากการศึกษา^{นี้}แม้ว่าจะยังไม่ทราบถึงองค์ประกอบของสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 แต่สารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยง *P. aeruginosa* SWUC02 นี้ก็ยังคงแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการยับยั้งการเจริญทั้ง *S. aureus* และ MRSA อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ตลอดจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการลดปริมาณของเชื้อในธรรมชาติได้อีกด้วย ซึ่งข้อมูลที่ได้จาก *P. aeruginosa* SWUC02, น้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 และ สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* SWUC02 ที่ได้จากการศึกษา^{นี้}อาจเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในอนาคต

บรรณานุกรม

- Ahmed, O. B. (2022). Detection of Antibiotic Resistance Genes in *Pseudomonas aeruginosa* by Whole Genome Sequencing. *Infect Drug Resist*, 15, 6703-6709.
- Alam, K., Islam, M. M., Li, C., Sultana, S., Zhong, L., Shen, Q., . . . Li, A. (2021). Genome Mining of *Pseudomonas* Species: Diversity and Evolution of Metabolic and Biosynthetic Potential. *Molecules*, 26(24).
- Alav, I., Sutton, J. M., และ Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(8), 2003-2020.
- Ali, S. S., Moawad, M. S., Hussein, M. A., Azab, M., Abdelkarim, E. A., Badr, A., . . . Khalil, M. (2021). Efficacy of metal oxide nanoparticles as novel antimicrobial agents against multi-drug and multi-virulent *Staphylococcus aureus* isolates from retail raw chicken meat and giblets. *International Journal of Food Microbiology*, 344, 109116.
- Allonsius, C. N., Vandenheuvel, D., Oerlemans, E. F. M., Petrova, M. I., Donders, G. G. G., Cos, P., . . . Lebeer, S. (2019). Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Scientific Reports*, 9(1), 2900.
- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., และ Rodicio, M. R. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, 2(7).
- Avalos, M., Garbeva, P., Raaijmakers, J. M., และ van Wezel, G. P. (2020). Production of ammonia as a low-cost and long-distance antibiotic strategy by *Streptomyces* species. *The ISME Journal*, 14(2), 569-583.
- Azam, M. W., และ Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350-359.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., . . . Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9(1), 75.
- Balaban, N., และ Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1), 1-10.

- Bandara, H., Yau, J. Y. Y., Watt, R. M., Jin, L. J., and Samaranayake, L. P. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* inhibits *in-vitro* *Candida* biofilm development. *BMC Microbiology*, 10(1), 125.
- Baron, S. S., Terranova, G., and Rowe, J. J. (1989). Molecular mechanism of the antimicrobial action of pyocyanin. *Current Microbiology*, 18(4), 223-230.
- Becker, K., and Eiff, C. V. (2011). Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci *Manual of Clinical Microbiology* (308-330).
- Bedoya, J. C., Dealis, M. L., Silva, C. S., Niekawa, E. T. G., Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., . . . Andrade, G. (2019). Enhanced production of target bioactive metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 653-664.
- Behzadi, P., Baráth, Z., and Gajdács, M. (2021). It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, 10(1).
- Besinis, A., De Peralta, T., and Handy, R. D. (2014). The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. *Nanotoxicology*, 8(1), 1-16.
- Bhattacharya, M., Wozniak, D. J., Stoodley, P., and Hall-Stoodley, L. (2015). Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13(12), 1499-1516.
- Biessy, A., and Fillion, M. (2018). Phenazines in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: biosynthesis, regulation, function and genomics. *Environ Microbiol*, 20(11), 3905-3917.
- Blair, J. M. A., Richmond, G. E., and Piddock, L. J. V. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 9(10), 1165-1177.
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, Marnix H., and Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and

- comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W29-W35.
- Britigan, B. E., Roeder, T. L., Rasmussen, G. T., Shasby, D. M., McCormick, M. L., และ Cox, C. D. (1992). Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells. Implications for *Pseudomonas*-associated tissue injury. *J Clin Invest*, 90(6), 2187-2196.
- Buonocore, C., Giugliano, R., Della Sala, G., Palma Esposito, F., Tedesco, P., Folliero, V., . . . de Pascale, D. (2023). Evaluation of Antimicrobial Properties and Potential Applications of *Pseudomonas gessardii* M15 Rhamnolipids towards Multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutics*, 15(2).
- Calazans, G. F., Silva, J. C. d., Delabeneta, M. F., Paris, A. P., Yassuda Filho, P., Auler, M. E., . . . Gandra, R. F. (2021). Antimicrobial activity of Wickerhamomyces anomalus mycocins against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from meats. *Food Science and Technology*, 41.
- Cardozo, V. F., Oliveira, A. G., Nishio, E. K., Perugini, M. R., Andrade, C. G., Silveira, W. D., . . . Nakazato, G. (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 12, 12.
- Cardozo, V. F., Oliveira, A. G., Nishio, E. K., Perugini, M. R. E., Andrade, C. G. T. J., Silveira, W. D., . . . Nakazato, G. (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12(1), 12.
- CDC. (2019a). Laboratory Testing. <https://www.cdc.gov/mrsa/lab/index.html>
- CDC. (2019b). Staph infections can kill. <https://www.cdc.gov/vitalsigns/staph/index.html>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., และ Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569.
- Chythanya, R., Karunasagar, I., และ Karunasagar, I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*, 208(1), 1-10.

- CLSI. (2021). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 31st ed. (41). USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cruz, C. D., Shah, S., and Tammela, P. (2018). Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. *BMC Microbiology*, 18(1), 173.
- da Silva Vasconcellos, F. C., de Oliveira, A. G., Lopes-Santos, L., Cely, M. V. T., Simionato, A. S., Pistori, J. F., . . . Andrade, G. (2014). Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. pruni. *Agricultural Sciences*, 2014.
- de Oliveira, A. G., Spago, F. R., Simionato, A. S., Navarro, M. O., da Silva, C. S., Barazetti, A. R., . . . Andrade, G. (2016). Bioactive Organocopper Compound from *Pseudomonas aeruginosa* Inhibits the Growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front Microbiol*, 7, 113.
- Dimkić, I., Janakiev, T., Petrović, M., Degrassi, G., and Fira, D. (2022). Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117, 101754.
- Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., and Adibkia, K. (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 44, 278-284.
- El-Sheshtawy, H. S., and Doheim, M. M. (2014). Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. *Egyptian Journal of Petroleum*, 23(1), 1-6.
- Elbargisy, R. M. (2021). Optimization of nutritional and environmental conditions for pyocyanin production by urine isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi J Biol Sci*, 28(1), 993-1000.
- Evenson, M. L., Ward Hinds, M., Bernstein, R. S., and Bergdoll, M. S. (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of*

Food Microbiology, 7(4), 311-316.

- Fellermann, H., Shirt-Ediss, B., Kozyra, J., Linsley, M., Lendrem, D., Isaacs, J., และ Howard, T. (2019). Design of experiments and the virtual PCR simulator: An online game for pharmaceutical scientists and biotechnologists. *Pharmaceutical statistics*, 18(4), 402-406.
- Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P., Aytan-Aktug, D., และ Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder - an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microb Genom*, 8(1).
- Fontoura, R., Spada, J. C., Silveira, S. T., Tsai, S. M., และ Brandelli, A. (2009). Purification and characterization of an antimicrobial peptide produced by *Pseudomonas* sp. strain 4B. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 205-213.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., และ Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 49-62.
- Frank, D. N., Feazel, L. M., Bessesen, M. T., Price, C. S., Janoff, E. N., และ Pace, N. R. (2010). The Human Nasal Microbiota and *Staphylococcus aureus* Carriage. *PLOS ONE*, 5(5), e10598.
- Gao, M., Glenn, A. E., Blacutt, A. A., และ Gold, S. E. (2017). Fungal Lactamases: Their Occurrence and Function. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Gebhardt, K., Schimana, J., Krastel, P., Dettner, K., Rheinheimer, J., Zeeck, A., และ Fiedler, H. P. (2002). Endophenazines A-D, new phenazine antibiotics from the arthropod associated endosymbiont *Streptomyces anulatus*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)*, 55(9), 794-800.
- Ghadamgahi, F., Tarighi, S., Taheri, P., Saripella, G. V., Anzalone, A., Kalyandurg, P. B., . . . Vetukuri, R. R. (2022). Plant Growth-Promoting Activity of *Pseudomonas aeruginosa* FG106 and Its Ability to Act as a Biocontrol Agent against Potato, Tomato and Taro Pathogens. *Biology*, 11(1).
- Ghadamgahi, F., Tarighi, S., Taheri, P., Saripella, G. V., Anzalone, A., Kalyandurg, P. B., . . .

- . Vetukuri, R. R. (2022). Plant Growth-Promoting Activity of *Pseudomonas aeruginosa* FG106 and Its Ability to Act as a Biocontrol Agent against Potato, Tomato and Taro Pathogens. *Biology (Basel)*, 11(1).
- Ghssein, G., and Ezzeddine, Z. (2022). A Review of *Pseudomonas aeruginosa* Metallophores: Pyoverdine, Pyochelin and Pseudopaline. *Biology (Basel)*, 11(12).
- Gilman, J., Walls, L., Bandiera, L., and Menolascina, F. (2021). Statistical Design of Experiments for Synthetic Biology. *ACS Synthetic Biology*, 10(1), 1-18.
- Gionco, B., Tavares, E. R., de Oliveira, A. G., Yamada-Ogatta, S. F., do Carmo, A. O., Pereira, U. d. P., . . . Andrade, G. (2017). New Insights about Antibiotic Production by *Pseudomonas aeruginosa*: A Gene Expression Analysis. *Frontiers in Chemistry*, 5.
- Goel, D., Singh, A. K., Yadav, V., Babbar, S. B., and Bansal, K. C. (2010). Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Protoplasma*, 245(1-4), 133-141.
- Grant, J. R., and Stothard, P. (2008). The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), W181-W184.
- Gristina, A. G., Naylor, P., and Myrvik, Q. (1988). Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Medical progress through technology*, 14(3-4), 205-224.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., and Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075.
- Gutierrez, A., Havelaar Arie, H., Schneider Keith, R., and Tamber, S. (2022). Antimicrobial Efficacy of Un-Ionized Ammonia (NH₃) against *Salmonella* Typhimurium in Buffered Solutions with Variable pH, NH₃ Concentrations, and Urease-Producing Bacteria. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e01850-01821.
- Hennekinne, J.-A., De Buyser, M.-L., and Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 815-836.
- Howlin, R. P., Brayford, M. J., Webb, J. S., Cooper, J. J., Aiken, S. S., and Stoodley, P. (2015). Antibiotic-Loaded Synthetic Calcium Sulfate Beads for Prevention of

- Bacterial Colonization and Biofilm Formation in Periprosthetic Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 111-120.
- Idrees, M., Sawant, S., Karodia, N., and Rahman, A. (2021). *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *International journal of environmental research and public health*, 18(14), 7602.
- Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., and Dharmaraj, S. (2014). Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol*, 30(4), 1159-1168.
- Kamei, Y., and Isnansetyo, A. (2003). Lysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(1), 71-74.
- Kang, S., Kong, F., Shi, X., Han, H., Li, M., Guan, B., . . . Yue, X. (2020). Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Pseudomonas fluorescens* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its application on whole milk. *Food Control*, 108, 106876.
- Kerbauy, G., Cp Vivian, A., C Simões, G., S Simionato, A., Pelisson, M., C Vespero, E., . . . Cp Mello, J. (2016). Effect of a metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(4), 389-397.
- Khatibi, S. A., Hamidi, S., and Siahi-Shadbad, M. R. (2022). Application of Liquid-Liquid Extraction for the Determination of Antibiotics in the Foodstuff: Recent Trends and Developments. *Crit Rev Anal Chem*, 52(2), 327-342.
- Kobayashi, S. D., Malachowa, N., and DeLeo, F. R. (2015). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Abscesses. *The American Journal of Pathology*, 185(6), 1518-1527.
- Köhl, J., Kolnaar, R., and Ravensberg, W. J. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Kokaew, K., Malee, R., and Rattanasatchatham, D. (2020). *The Study of Bacterial*

- Contamination and Antibiotics Resistance in Bacteria isolated from Ready-to-Eat Foods in Phra Nakhon Si Ayutthaya district* In รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ครั้งที่ 4 (pp. 511-520).
- Kumar, A., และ Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1486-1513.
- Lambert, P. A. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95 Suppl 41(Suppl 41), 22-26.
- Lamont, I. L., และ Martin, L. W. (2003). Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 149(4), 833-842.
- Le, H. H., Dalsgaard, A., Andersen, P. S., Nguyen, H. M., Ta, Y. T., และ Nguyen, T. T. (2021). Large-Scale *Staphylococcus aureus* Foodborne Disease Poisoning Outbreak among Primary School Children. *Microbiology Research*, 12(1).
- Lin, J., Cheng, J., Wang, Y., และ Shen, X. (2018). The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 230.
- Madsen, A. M., Phan, H. U. T., Laursen, M., White, J. K., และ Uhrbrand, K. (2020). Evaluation of Methods for Sampling of *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcus* Species from Indoor Surfaces. *Annals of Work Exposures and Health*, 64(9), 1020-1034.
- Martinez, J. L., และ Baquero, F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*, 15(4), 647-679.
- Matias, R. R., Sepúlveda, A. M. G., Batista, B. N., de Lucena, J. M. V. M., และ Albuquerque, P. M. (2021). Degradation of *Staphylococcus aureus* Biofilm Using Hydrolytic Enzymes Produced by Amazonian Endophytic Fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(7), 2145-2161.
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., . . . Wright, G. D. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(7), 3348-3357.

- Miethke, M., and Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(3), 413-451.
- MSarah, M., Firdose, A., Hazrin-Chong, N. H., and Wan Mohd Noor, W. S. A. (2021). Extraction and antimicrobial activity of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* UKMP14T. *Malaysian Journal of Microbiology*, 17, 103-112.
- Mulligan, M. E., Murray-Leisure, K. A., Ribner, B. S., Standiford, H. C., John, J. F., Korvick, J. A., . . . Yu, V. L. (1993). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *The American Journal of Medicine*, 94(3), 313-328.
- Naseem, T., and Durrani, T. (2021). The role of some important metal oxide nanoparticles for wastewater and antibacterial applications: A review. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3, 59-75.
- Navarro, M. O. P., Dilarri, G., Simionato, A. S., Grzegorzczuk, K., Dealis, M. L., Cano, B. G., . . . Andrade, G. (2020). Determining the Targets of Fluopsin C Action on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Front Microbiol*, 11, 1076.
- Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*, 70(3), 461-477.
- Nurfarahin, A. H., Mohamed, M. S., and Phang, L. Y. (2019). Development of Palm Fatty Acid Distillate-Containing Medium for Biosurfactant Production by *Pseudomonas* sp. LM19. *Molecules*, 24(14).
- Oldak, E., and Trafny, E. A. (2005). Secretion of proteases by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(8), 3281-3288.
- Oyeleye, A., and Normi, Y. M. (2018). Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. *Bioscience reports*, 38(4), BSR2018032300.
- Park, J.-H., Lee, J.-H., Cho, M. H., Herzberg, M., and Lee, J. (2012). Acceleration of protease effect on *Staphylococcus aureus* biofilm dispersal. *FEMS Microbiology*

Letters, 335(1), 31-38.

- Peacock, S. J., and Paterson, G. K. (2015). Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 577-601.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., and Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1132-1147.
- Prabhawathi, V., Boobalan, T., Sivakumar, P. M., and Doble, M. (2014). Antibiofilm Properties of Interfacially Active Lipase Immobilized Porous Polycaprolactam Prepared by LB Technique. *PLOS ONE*, 9(5), e96152.
- Preston, G. M. (2004). Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1446), 907-918.
- Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., and Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1), e102.
- Pulido, D., Prats-Ejarque, G., Villalba, C., Albacar, M., González-López Juan, J., Torrent, M., . . . Boix, E. (2016). A Novel RNase 3/ECP Peptide for *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Eradication That Combines Antimicrobial, Lipopolysaccharide Binding, and Cell-Agglutinating Activities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 6313-6325.
- Pumart, P., Phodha, T., Thamlikitkul, V., Riewpaiboon, A., Prakongsai, P., and Limwattananon, S. (2012). Health and economic impacts of antimicrobial resistance in Thailand. *J Health Systems Res*, 6, 352-360.
- Qessaoui, R., Zanzan, M., Ajerrar, A., Lahmyed, H., Boumair, A., Tahzima, R., . . . Bouharroud, R. (2022). *Pseudomonas* Isolates as Potential Biofungicides of Green Mold (*Penicillium digitatum*) on Orange Fruit. *International Journal of Fruit Science*, 22(1), 142-150.
- Qi, X., Xue, M., Cui, H., Yang, K., Song, K., Zha, J., . . . Ling, F. (2020). Antimicrobial activity of *Pseudomonas montellii* JK-1 isolated from fish gut and its major metabolite, 1-hydroxyphenazine, against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 526,

735366.

- Raaijmakers, J. M., และ Mazzola, M. (2011). Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 50(1), 403-424.
- Raji El Feghali, P. A., และ Nawas, T. (2018). Pyocyanin: a powerful inhibitor of bacterial growth and biofilm formation. *Madridge J Case Rep Stud*, 2(2), 101-107.
- Rani, A., Chauhan, S., และ Azmi, W. (2018). Production and antimicrobial, antioxidant and anticancer applications of pyocyanin from isolated *Pseudomonas aeruginosa*. *SciFed J Fermentation and Microbial Technol*, 1, 1-13.
- Rattanachuy, P., Kantachote, D., Tantirungkij, M., Nitoda, T., และ Kanzaki, H. (2010). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by extracellular compounds from a proteolytic bacterium *Pseudomonas* sp. W3. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1), 8-9.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalya, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., . . . Pandey, A. (2018). Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food technology and biotechnology*, 56(1), 16-30.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482-501.
- Riccardi, C., D'Angelo, C., Calvanese, M., Ricciardelli, A., Sellitto, A., Giurato, G., . . . Fondi, M. (2021). Whole-genome sequencing of *Pseudomonas* sp. TAE6080, a strain capable of inhibiting *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Marine Genomics*, 60, 100887.
- Robicsek, A., Jacoby, G. A., และ Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(10), 629-640.
- Saadati, F., Shahryari, S., Sani, N. M., Farajzadeh, D., Zahiri, H. S., Vali, H., และ Noghabi, K. A. (2022). Effect of MA01 rhamnolipid on cell viability and expression of quorum-sensing (QS) genes involved in biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*, 12(1), 14833.

- Santhaseelan, H., Dinakaran, V. T., Sakthivel, B., Somasundaram, M., Thanamegam, K., Devendiran, V., . . . Rathinam, A. J. (2022). Bioactive Efficacy of Novel Carboxylic Acid from Halophilic *Pseudomonas aeruginosa* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Metabolites*, 12(11).
- Santos, T. M. A., Gilbert, R. O., Caixeta, L. S., Machado, V. S., Teixeira, L. M., and Bicalho, R. C. (2010). Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from uteri of postpartum dairy cows to antibiotic and environmental bacteriophages. Part II: *In vitro* antimicrobial activity evaluation of a bacteriophage cocktail and several antibiotics. *Journal of Dairy Science*, 93(1), 105-114.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. d. C., and Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., . . . Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging infectious diseases*, 17(1), 7-15.
- Scallan, E., Jones, T. F., Cronquist, A., Thomas, S., Frenzen, P., Hofer, D., . . . Angulo, F. J. (2006). Factors Associated with Seeking Medical Care and Submitting a Stool Sample in Estimating the Burden of Foodborne Illness. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(4), 432-438.
- Schmidtchen, A., Frick, I. M., Andersson, E., Tapper, H., and Bjorck, L. (2002). Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol*, 46(1), 157-168.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
- Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., de Jesus, M. L. A., Barazetti, A. R., da Silva, C. S., Simões, G. C., . . . de Oliveira, A. G. (2017). The Effect of Phenazine-1-Carboxylic Acid on Mycelial Growth of *Botrytis cinerea* Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Srinivasan, R., Santhakumari, S., Poonguzhali, P., Geetha, M., Dyavaiah, M., and Xiangmin,

- L. (2021). Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., and Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179.
- Stevens, K. N. J., Crespo-Biel, O., van den Bosch, E. E. M., Dias, A. A., Knetsch, M. L. W., Aldenhoff, Y. B. J., . . . Koole, L. H. (2009). The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood. *Biomaterials*, 30(22), 3682-3690.
- Sudyoung, N., Tokuyama, S., Krajangsang, S., Pringsulaka, O., and Sarawaneeyaruk, S. (2020). Bacterial antagonists and their cell-free cultures efficiently suppress canker disease in citrus lime. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(2), 173-181.
- Szamosvari, D., Schuhmacher, T., Hauck, C. R., and Bottcher, T. (2019). A thiochromenone antibiotic derived from the *Pseudomonas* quinolone signal selectively targets the Gram-negative pathogen *Moraxella catarrhalis*. *Chem Sci*, 10(27), 6624-6628.
- Tan, Y., Ma, S., Leonhard, M., Moser, D., and Schneider-Stickler, B. (2018). β -1,3-glucanase disrupts biofilm formation and increases antifungal susceptibility of *Candida albicans* DAY185. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 942-946.
- Tishyadhigama, P., Dejsirilert, S., Thongmali, O., Sawanpanyalert, P., Aswapokee, N., and Piboonbanakit, D. (2011). Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Thailand from 2000 to 2005. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 92(8), 8.
- Tortorella, E., Tedesco, P., Palma Esposito, F., January, G. G., Fani, R., Jaspars, M., and De Pascale, D. (2018). Antibiotics from Deep-Sea Microorganisms: Current Discoveries and Perspectives. *Marine Drugs*, 16(10).
- Twining, S. S., Kirschner, S. E., Mahnke, L. A., and Frank, D. W. (1993). Effect of

- Pseudomonas aeruginosa elastase, alkaline protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34(9), 2699-2712.
- Urish, K. L., DeMuth, P. W., Craft, D. W., Haider, H., and Davis, C. M. (2014). Pulse Lavage is Inadequate at Removal of Biofilm from the Surface of Total Knee Arthroplasty Materials. *The Journal of Arthroplasty*, 29(6), 1128-1132.
- Usman, M. S., El Zowalaty, M. E., Shameli, K., Zainuddin, N., Salama, M., and Ibrahim, N. A. (2013). Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 8, 4467-4479.
- van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., and Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W278-W281.
- Watrous, J., Roach, P., Alexandrov, T., Heath, B. S., Yang, J. Y., Kersten, R. D., . . . Dorrestein, P. C. (2012). Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(26), E1743-1752.
- Watts, J. L., Shryock, T. R., Apley, M., Bade, D. J., Brown, S. D., Gray, J. T., . . . Zurenko, G. E. (2008). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals —Third Edition* (28). 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Witek-Krowiak, A., Chojnacka, K., Podstawczyk, D., Dawiec, A., and Pokomeda, K. (2014). Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. *Bioresource Technology*, 160, 150-160.
- Zhao, H., Liu, L., Yang, L., Gu, Q., Li, Y., Zhang, J., . . . Wu, Q. (2022). Pseudomonas protegens FJKB0103 Isolated from Rhizosphere Exhibits Anti-Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Activity. *Microorganisms*, 10(2).

Zhou, L., de Jong, A., Yi, Y., และ Kuipers, O. P. (2021). Identification, Isolation, and Characterization of Medipeptins, Antimicrobial Peptides From *Pseudomonas mediterranea* EDOX. *Frontiers in Microbiology*, 12.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร

1. Tryptic Soya Broth

Tryptone 17 g/L

Soya peptone 3 g/L

Sodium chloride 5 g/L

Dipotassium hydrogen phosphate 2.5 g/L

Dextrose (Glucose) 2.5 g/L

นำอาหารมาละลายด้วยน้ำกรองและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. 4% Peptone Broth

Peptone 40 g/L

นำอาหารมาละลายด้วยน้ำกรองและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient Broth

Peptone 5 g/L

Sodium chloride 5 g/L

HM peptone B 1.5 g/L

Yeast extract 1.5 g/L

นำอาหารมาละลายด้วยน้ำกรองและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. King's B medium

Pancreatic digest of casein 10 g/L

Proteose peptone No. 3 10 g/L

Dipotassium phosphate 1.5 g/L

Magnesium sulfate 1.5 g/L

นำอาหารมาละลายด้วยน้ำกรองและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Miller's Luria–Bertani Broth

Tryptone 10 g/L

Yeast extract 5 g/L

Sodium chloride 10 g/L

นำอาหารมาละลายด้วยน้ำกรองและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Skim milk agar

Tryptone 5 g/L

Yeast extract 2.5 g/L

Dextrose 1 g/L

Skim milk powder 25 g/L

นำอาหารมาละลายด้วยน้ำกรองและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Mineral salt medium laminarin

K_2HPO_4 1.73 g/L

KH_2PO_4 0.68 g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/L

NaCl 4 g/L

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g/L

NH_4NO_3 1 g/L

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02 g/L

laminarin 0.15 g/L

นำอาหารมาละลายด้วยน้ำกรองและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. Colloidal chitin agar

K_2HPO_4 0.7 g/L

KH_2PO_4 0.3 g/L

$MgSO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5 g/L

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L

$ZnSO_4$ 0.001 g/L

$MnCl_2$ 0.001 g/L

moist colloidal chitin 2.0%

นำอาหารมาละลายด้วยน้ำกรองและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข

วิธีการคำนวณและการทดลองการหาค่า MIC

ในการคำนวณปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อจะใช้วิธีการเจือจางสารสกัดลงครั้งละ 2 เท่า โดยเจือจางจากระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 500 จนถึง 0.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้

เจือจางครั้งที่ 0

dichloromethane extract ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 100 μL

จะได้ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

เจือจางครั้งที่ 1

2xMHB 100 μL +

dichloromethane extract ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 100 μL

ทำอย่างนี้จนกระทั่งถึงครั้งที่ 9

เมื่อเจือจางเสร็จเรียบร้อยแล้วจะทำการประปรมาณทุกหลุมให้เท่ากับ 100 μL แล้วเติมเชื้อ *S. aureus* ที่ผสมอยู่ในอาหาร ความเข้มข้น 1×10^5 CFU/mL ลงไปในแต่ละหลุม หลุมละ 100 μL ดังนั้น ทุกหลุมในตอนแรกจะถูกเจือจางลงไปอีกหลุมละ 2 เท่า ซึ่งความเข้มข้นใหม่จะแสดงดังต่อไปนี้

ครั้งที่เจือจาง	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	ก่อนเติมเชื้อ	หลังเติมเชื้อ
เจือจางครั้งที่ 0	1,000	500
เจือจางครั้งที่ 1	500	250
เจือจางครั้งที่ 2	250	125
เจือจางครั้งที่ 3	125	62.5
เจือจางครั้งที่ 4	62.5	31.25
เจือจางครั้งที่ 5	31.25	15.625
เจือจางครั้งที่ 6	15.625	7.8125
เจือจางครั้งที่ 7	7.8125	3.90625
เจือจางครั้งที่ 8	3.90625	1.953125
เจือจางครั้งที่ 9	1.953125	0.9765625



ภาคผนวก ค

วิธีการยืนยันสายพันธุ์ MRSA ตามมาตรฐาน CLSI

Table 2C.
Staphylococcus spp.
M02 and M07Table 2C. Zone Diameter and MIC Breakpoints for *Staphylococcus* spp.

Testing Conditions Medium: Disk diffusion: MHA Broth dilution: CAMHB; CAMHB + 2% NaCl for oxacillin; CAMHB supplemented to 50 µg/mL calcium for daptomycin. Agar dilution: MHA; MHA + 2% NaCl for oxacillin. NOTE: Agar dilution has not been validated for daptomycin. Inoculum: Colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland Standard Incubation: 35°C ± 2°C; ambient air Disk diffusion: 16-18 hours; 24 hours (for ceftioxin when testing <i>Staphylococcus</i> spp., except <i>S. aureus</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. pseudintermedius</i> , and <i>S. schleiferi</i>) Dilution methods: 16-20 hours; 24 hours for oxacillin and vancomycin Testing at temperatures above 35°C may not detect methicillin (oxacillin)-resistant staphylococci (MRS).	Routine QC Recommendations (see Tables 4A-1 and 5A-1 for acceptable QC ranges) Disk diffusion: <i>S. aureus</i> ATCC [®] 25923 Dilution methods: <i>S. aureus</i> ATCC [®] 29213 Refer to Tables 4A-2 and 5A-2 to select strains for routine QC of β-lactam combination agents. When a commercial test system is used for susceptibility testing, refer to the manufacturer's instructions for QC test recommendations and QC ranges.
--	--

General Comments

- For disk diffusion, test a maximum of 12 disks on a 150-mm plate and no more than 6 disks on a 100-mm plate; disks should be placed no less than 24 mm apart, center to center (see M02, Subchapter 3.6). Each zone diameter should be clearly measurable; overlapping zones prevent accurate measurement. Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk (see the *M02 Disk Diffusion Reading Guide*²). Hold the Petri plate a few inches above a black background illuminated with reflected light, except for linezolid, which should be read with transmitted light (plate held up to light source). The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth. With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, disregard slight growth (20% or less of the lawn of growth) and measure the more obvious margin to determine the zone diameter. For linezolid, any discernible growth within the zone of inhibition is indicative of resistance to the respective agent.
- S. aureus* complex consists of the coagulase-positive species *S. aureus*, *Staphylococcus argenteus*, and *Staphylococcus schweitzeri*. If *S. argenteus* is identified by MALDI-TOF MS or sequencing, it is recommended that it be reported as "*S. aureus* complex (*S. argenteus*)," and *S. aureus* phenotypic testing method recommendations, breakpoints, and interpretive categories should be used. Human infections with *S. schweitzeri* have yet to be reported.³
- For staphylococci when testing chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, linezolid, tedizolid, and tetracycline by broth microdilution MIC, trailing growth can make end-point determination difficult. In such cases, read the MIC at the lowest concentration where the trailing begins. Tiny buttons of growth should be ignored (see M07, Figures 3 and 4). With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, read the end point at the concentration in which there is ≥ 80% reduction in growth compared with the control (see M07, Figure 5).
- Routine testing of urine infection of *Staphylococcus saprophyticus* is not advised, because infections respond to concentrations achieved in urine of antimicrobial agents commonly used to treat acute, uncomplicated UTIs (eg, nitrofurantoin, trimethoprim-sulfamethoxazole, or a fluoroquinolone).
- Historically, resistance to the penicillinase-stable penicillins (see Glossary I) has been referred to as "methicillin resistance" or "oxacillin resistance." MRSAs are strains of *S. aureus* that express *mecA*, *mecC*, or another mechanism of methicillin (oxacillin) resistance, such as changes in affinity of penicillin-binding proteins for oxacillin (modified *S. aureus* strains).
- Most methicillin (oxacillin) resistance is mediated by *mecA*, encoding PBP2a (also called PBP2'). Testing for *mecA* and PBP2a are the most definitive tests for detection of methicillin (oxacillin) resistance for *Staphylococcus* spp. Isolates that test positive for *mecA* or PBP2a or resistant by any of the recommended phenotypic methods should be reported as methicillin (oxacillin) resistant (see Appendix H and table below).

Detection of methicillin (oxacillin) resistance in staphylococci is achieved by using specific methods as listed in Table 2C and further described in Tables 3G-1 and 3G-2.

Organism	Phenotypic Methods for Detection of Methicillin (Oxacillin)-Resistant <i>Staphylococcus</i> spp.				
	Cefoxitin MIC	Cefoxitin disk diffusion	Oxacillin MIC	Oxacillin disk diffusion	Oxacillin salt agar
<i>S. aureus</i>	Yes (16-20 h)	Yes (16-18 h)	Yes (24 h)	No	Yes (24 h)
<i>S. lugdunensis</i>	Yes (16-20 h)	Yes (16-18 h)	Yes (24 h)	No	No
<i>S. epidermidis</i>	No	Yes (24 h)	Yes (24 h)	Yes (16-18 h)	No
<i>S. pseudintermedius</i>	No	No	Yes (24 h)	Yes (16-18 h)	No
<i>S. schleiferi</i>	No	No	Yes (24 h)	Yes (16-18 h)	No
<i>Staphylococcus</i> spp. (not listed above or not identified to the species level)	No	Yes ^a (24 h)	Yes ^a (24 h)	No	No

Abbreviations: h, hour(s); MIC, minimal inhibitory concentration; MRS, methicillin (oxacillin)-resistant staphylococci; PBP2a, penicillin-binding protein 2a.
^a For isolates that fall into the category of *Staphylococcus* spp. (not listed above or not identified to the species level) from serious infections for which the oxacillin MICs are 1-2 µg/mL, testing for *mecA* or PBP2a should be considered, because these are the most definitive tests for detection of methicillin (oxacillin) resistance (see comment [18]). Recent data suggest that the cefoxitin disk diffusion test may not perform reliably for all species (eg, *S. haemolyticus*) that fall into the category of "*Staphylococcus* spp. (not listed above or not identified to the species level)."¹⁵ Mechanisms of methicillin (oxacillin) resistance other than *mecA* are rare and include a novel *mecA* homologue, *mecC*.⁹ MICs for strains with *mecC* are typically cefoxitin resistant and oxacillin susceptible; *mecC* resistance cannot be detected by tests directed at *mecA* or PBP2a.

- MRS, as defined by cefoxitin or oxacillin testing, as appropriate to the species, are considered resistant to other β-lactam agents, ie, penicillins, β-lactam combination agents, cephalosporins (with the exception of ceftaroline), and carbapenems. This is because most cases of documented MRS infections have responded poorly to β-lactam therapy or because convincing clinical data that document clinical efficacy for those agents have not been presented.
- For tests for β-lactamase production, methicillin (oxacillin) resistance and *mecA*-mediated methicillin (oxacillin) resistance using cefoxitin, reduced susceptibility to vancomycin, ICR, and high-level mupirocin resistance (*S. aureus* only), refer to Tables 3F, 3G-1, 3G-2, 3H, and 3J, respectively.

NOTE: Information in boldface type is new or modified since the previous edition.

ประวัติผู้เขียน

