

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยแบคทีเรียกรดแลคติก

มณฑล เลิศคณาวณิชกุล¹, พงศ์พันธ์ พงศ์พนิตานนท์¹ และ สุชาติ อัครสุด¹

บทคัดย่อ

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดักซ์นิกลุ่มแบคทีเรีย (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ MRSA No.1-10, 4-1, 5-4, 1-7) และกลุ่มเชื้อรา (*Candida albicans*) ของแบคทีเรียกรดแลคติก (*Lactobacillus planterum*, *Lactobacillus* C3, C7, L14 และ *Enterococcus* N15) โดยใช้วิธีซีดเชื้อและวิธีแพร่ผ่านของสารเข้าเนื้อวุ้น ปรากฏว่าเชื้อดักซ์นิทั้งหมดยกเว้นเชื้อราถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาศึกษาในการทดสอบทั้งสองวิธี อย่างไรก็ตามพบว่า *C. albicans* ถูกยับยั้งการเจริญได้โดย *Lactobacillus* L14 เมื่อทดสอบด้วยวิธีซีดเชื้อ แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธีแพร่ผ่านของสารเข้าเนื้อวุ้นปรากฏว่าฤทธิ์ดังกล่าวได้หายไป ซึ่งพบว่าเหมือนกันในน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทุกตัวที่นำมาทดสอบโดยพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสภาพเป็นกรดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดักซ์นิดีกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ถูกปรับสภาพให้เป็นกลาง แต่พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus* C7 ยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ MRSA No.1-7 ได้ซึ่งอาจเนื่องมาจากฤทธิ์ของชีวสารอื่นนอกเหนือจากกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดดังกล่าวผลิตออกมา

คำรหัส: MRSA, Lactic Acid Bacteria

บทนำ

ปัจจุบันการดื้อยาปฏิชีวนะของกลุ่มแบคทีเรียกำลังเข้าสู่ภาวะวิกฤต เนื่องจากมีแบคทีเรียหลายชนิดดื้อยาปฏิชีวนะหลายตัว (multidrug resistance, MDR) และบางชนิดมีการดื้อยาปฏิชีวนะทุกตัว (panresistance) จึงเริ่มมีการพบโรคติดเชื้อที่รักษาไม่ได้ (untreatable infectious disease) ที่ไม่ใช่เอดส์เพิ่มขึ้นตลอดเวลา¹ ผู้ป่วยต้องอยู่ในโรงพยาบาลนานขึ้น เสียค่าใช้จ่ายมากขึ้น จนถึงเกิดโรคที่รักษาไม่ได้ซึ่งเกิดจากการดื้อยาปฏิชีวนะทำให้อัตราป่วยตายสูงขึ้นจากโรคติดเชื้อแบคทีเรียจึงกลับมาสูงขึ้นอีกครั้งหนึ่ง² แบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขในปัจจุบันนี้ คือ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยพบในโรงพยาบาลมากกว่าในชุมชน และ

มักดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β -lactams ทั้งกลุ่ม³ และพบว่ามีอัตราการแพร่ระบาดของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปี 2530 ถึงปี 2539 จาก 1 รายเป็น 105 ราย ในประเทศอังกฤษและเวลส์⁴ สำหรับในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของเชื้อ MRSA ได้ ตั้งแต่ร้อยละ 2-19 โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะมีปริมาณเพิ่มสูงมากขึ้นในโรงพยาบาลที่เชื้อ MRSA เป็นเชื้อประจำถิ่น เช่น คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, โรงพยาบาลหาดใหญ่ และมีรายงานการระบาดของเชื่อดังกล่าวในหอผู้ป่วยไฟไหม้-น้ำร้อนลวก โรงพยาบาลศิริราช จนต้องปิดหอผู้ป่วยชั่วคราว เมื่อ พ.ศ. 2534⁵⁻⁶ ยาปฏิชีวนะ vancomycin ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจาก MRSA ในโรงพยาบาลมากที่สุด แต่หากมีการใช้ยานี้ดื้อกันอย่างต่อเนื่องแพร่หลายต่อไป เชื้อก็สามารถที่จะดื้อยาปฏิชีวนะ

¹สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80160

Study on adverse effectiveness of Lactic Acid Bacteria against Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

Monthon Lertcanawanichakul¹, Pongphan Pongpanitanon¹. and Suchada Akarasut¹.

ABSTRACT

This study was examined for adverse-effectiveness of various strains of Lactic Acid Bacteria (LAB) [*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus* C3, *Lactobacillus* C7, *Lactobacillus* L14 and *Enterococcus* N15] against indicating microorganisms [*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) No.1-10, No.4-1, No.5-4, No.1-7 and *Candida albicans* by means of cross streak plate method and agar well diffusion method, simultaneously. From both methods, the results indicated that the most of, not all, indicating strains were inhibited by LAB, except *C. albicans*. Only *Lactobacillus* No.14 could inhibit growth of *C. albicans* by streak plate method. The antimicrobial activity of filtrated broth by agar well diffusion method was indicated that the acidic-filtrated broth was stronger adverse effectiveness against indicating strains than neutral-filtrated broth. However, the neutral-filtrated broth of *Lactobacillus* C7 showed a inhibitory effect against MRSA 1-7. It might be resulted of others bioactive molecules than acidic production of those lactic acid bacteria.

key words: MRSA, Lactic Acid Bacteria

ชนิดนี้ได้ ดังมีรายงานบ้างแล้วในกลุ่มเชื้อดังกล่าวซึ่งมีการตั้งชื่อเป็นกลุ่ม Vancomycin-Intermediate/Resistant *S. aureus* (VISA/VRSA)^{3, 7-8} อย่างไรก็ตามได้มีรายงานเกี่ยวกับความพยายามใช้ชีวสารที่สกัดจากสมุนไพร⁹⁻¹¹ และ/หรือการคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกมาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างมากมายเพื่อค้นหาชีวสาร ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซีติล อะเซ-ทาลดีไฮด์ รูเทอริน และแบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ^{12-16, 17} ซึ่งอาจสามารถนำมาทดแทนสารเคมีสังเคราะห์เพื่อผลิตเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและ/หรือ จุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ จึงได้มีความพยายามศึกษาฤทธิ์ชีวสารของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรีย

กรดแลคติกในการควบคุมการเจริญของเชื้อกลุ่ม MRSAดังกล่าว ซึ่งในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus* C3, C7, L14 และ *Enterococcus* N15 ต่อการยับยั้งเชื้อ MRSA สายพันธุ์ต่างๆ รวมทั้งรา (*S. aureus* ATCC 25923, MRSA No.1-10, No.4-1, No.5-4, No.1-7 และ *Candida albicans*)¹² เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อทดสอบ

1.1 การเตรียมเชื้อ Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) และ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

School of Allied Health Sciences and Public Health Walailak University Nakhon Si Thammarat 80160

นำเชื้อ MSSA ATCC25923 และ MRSA หมายเลข 1-10, 5-4, 1-7, 4-1 จากตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (°ซ) (มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช) มาซัดลงบนจานเพาะเชื้อ Mannitol Salt Agar (MSA) หรือ MSA ที่มียาปฏิชีวนะ oxacillin (MSAox) ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มก.ก/มล) สำหรับเชื้อ MSSA และ MRSA ตามลำดับ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง(ชม.) จากนั้นนำลักษณะโคโลนีที่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA หรือ MSAox เป็นสีเหลืองมาศึกษาลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยวิธีย้อมสีแกรม แล้วนำโคโลนีมาทดสอบยืนยันกลุ่มเชื้อด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมีโดยใช้ Plasma เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ coagulase ใช้ phenol red (PR)-Glucose และ PR-Mannitol เพื่อทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแมนนิทอล ตามลำดับ โดยเชื้อกลุ่ม *S. aureus* มีรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รูปร่างกลมติดสีแกรมบวก อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้ง และสามารถผลิตเอนไซม์ coagulase รวมทั้งสามารถใช้น้ำตาลทั้งสองชนิดได้³

1.2 การทดสอบความไวของเชื้อ MSSA และ MRSA ต่อยา oxacillin

เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อ (MSSA หรือ MRSA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller-Hinton (M-H) ให้มีความขุ่นเทียบเท่า MacFarland No. 0.5 มีปริมาณเชื้อโดยประมาณ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นใช้ลูป (loop) จุ่มสารแขวนลอยเชื้อมาซัดลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง M-H เป็นแนวยาวจากซ้ายไปขวาทำจนครบทุกเชื้อ แล้ววางแผ่นยามาตรฐาน oxacillin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม (Oxoid) ลงบนรอยขีดของเชื้อข้างต้น นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม สังเกตดูว่า MRSA จะไม่ปรากฏ inhibition zone เกิดขึ้น ส่วน MSSA จะให้ inhibition zone ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร³ จากนั้นนำเชื้อทั้งหมดมาเก็บเป็น Stock ใน 15% Glycerol แล้วนำ

ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -30 °C เพื่อรอการทดสอบ

1.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (TISTR 050), *Lactobacillus* C3, C7, L14 และ *Enterococcus* N15 จากตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 °ซ (มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช) มาซัดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mann Rogosa Sharpe (MRS) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม จากนั้นนำโคโลนีมาทดสอบเบื้องต้นด้วยการทดสอบการผลิตเอนไซม์ catalase ด้วย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide: H_2O_2) ซึ่งเชื้อที่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่สร้างเอนไซม์ดังกล่าว แล้วทำการเก็บเป็น Stock ใน 15% Glycerol นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -30 °ซ เพื่อรอการทดสอบ

2. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเชื้อ MSSA หรือ MRSA

2.1 การเตรียมเชื้อดัชนี (indicating strains)

เตรียมสารแขวนลอยเชื้อที่ใช้เป็นดัชนี (MSSA, MRSA และ *Candida albicans*) ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5 โดยชุดโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ต้องการมาทำเป็นสารแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soy broth (TSB) เพื่อนำไปซิดในแนวตั้งฉากหรือนำไปป้ายให้ทั่วพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบ ด้วยเทคนิคขีดเชื้อ (streak plate) หรือ Agar diffusion ตามลำดับ

2.2 เทคนิคขีดเชื้อ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (มล) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม จากนั้นใช้หัวหยดเชื้อแต่ละสารแขวนลอยเชื้อจากในหลอดมาซิดลงบนผิวจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TGE [กลูโคส (1%), Yeast Extract (1%), Tryptone (1%), $MnSO_4$ (0.01 มก), $MgSO_4$ (0.01 มก), Tween80 (2-3 หยด)] ตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลางให้มีความหนาของเส้นประมาณ 0.4 เซนติเมตร (ชม) แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา

48 ซม. จากนั้นนำจานเพาะเชื้อดังกล่าวมาฉีดด้วยเชื้อดัชนีที่เตรียมไว้ในหัวข้อ 2.1 ด้วยหัวถ่ายเชื้อให้อยู่ในแนวตั้งฉากกับแนวของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยระวังอย่าให้แนวเชื้อใหม่สัมผัสกับแนวเชื้อเดิมและให้ทำซ้ำแบบเดิมจนกระทั่งครบทุกเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยทำการทดสอบแบบ 2 ซ้ำ แล้วนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม

2.3 Agar Diffusion Test

2.3.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ (Filtrated broth)

ของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีปริมาตร 10 มล โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของทุกเชื้อทดสอบในแต่ละหลอดเทียบเท่ากับ McFarland No.0.5 นำไปบ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชม จากนั้นนำสารแขวนลอยเชื้อดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที (Hettich) ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 20 นาที ดูดเอาส่วนใสมาทำการกรองด้วยกระดาษ

กรองที่มีขนาดรูผ่านเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร (มค.ม) (Millipore) จากนั้นทำการแบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่หนึ่งยังคงสภาพเดิมไว้ แต่ส่วนที่ 2 ให้ทำการปรับ pH ให้มีค่าประมาณ 7 โดยใช้ 2N NaOH ทำซ้ำข้างต้นจนกระทั่งครบเชื้อทดสอบทุกตัว และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อเป็นตัวควบคุมการทดลองเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี Agar Diffusion

2.3.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อดัชนีด้วยวิธี

Agar Diffusion

หยดน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุม ลงในหลุมของจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ได้ป้ายเชื้อที่ใช้เป็นดัชนีไว้ก่อนหน้าแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งน้ำเลี้ยงเชื้อซึมเข้าเนื้อวุ้นจนหมด จากนั้นจึงนำเข้าไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชม แล้วนำมาบันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดัชนีโดยแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ ด้วยวิธี cross streak

เชื้อดัชนี1	<i>L.plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i> No.			<i>Enterococcs</i> N15	Negative Control
		L14	C3	C7		
<i>S. aureus</i>	+ ^w	+	+	+	+	-
MRSA No.1-10	+	+	+	+	+	-
MRSA No.1-7	+	+	+	+	+	-
MRSA No.4-1	+ ^w	+	+	+	+	-
MRSA No.5-4	+ ^w	+	+	+	+	-
<i>C. albicans</i>	-	+	-	-	-	-

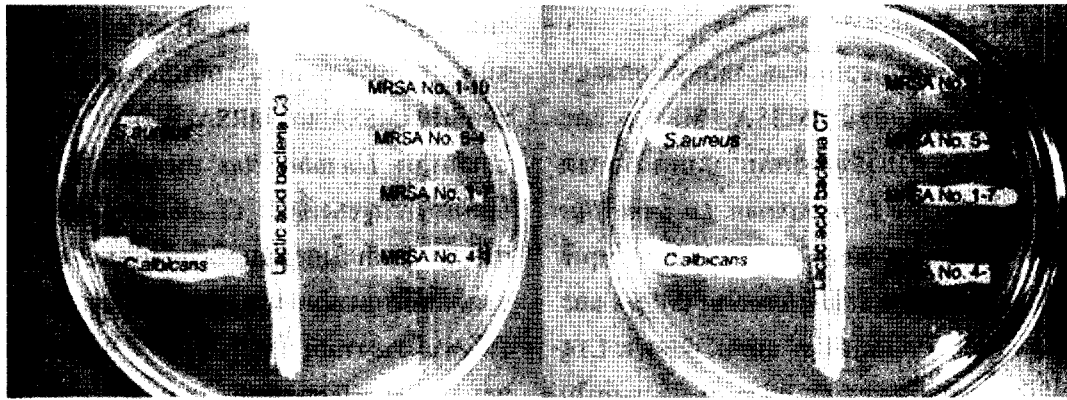
¹*S. aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (MSSA); MRSA, Methicillin- resistant *S.aureus*; *C. albicans*, *Candida albicans*

Negative Control = MRS agar ที่ไม่ได้ฉีดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแนวกึ่งกลาง

+ = เชื้อไม่สามารถเจริญได้ในระยะที่อยู่ใกล้กับแนวซิดกลาง (มีฤทธิ์ยับยั้ง)

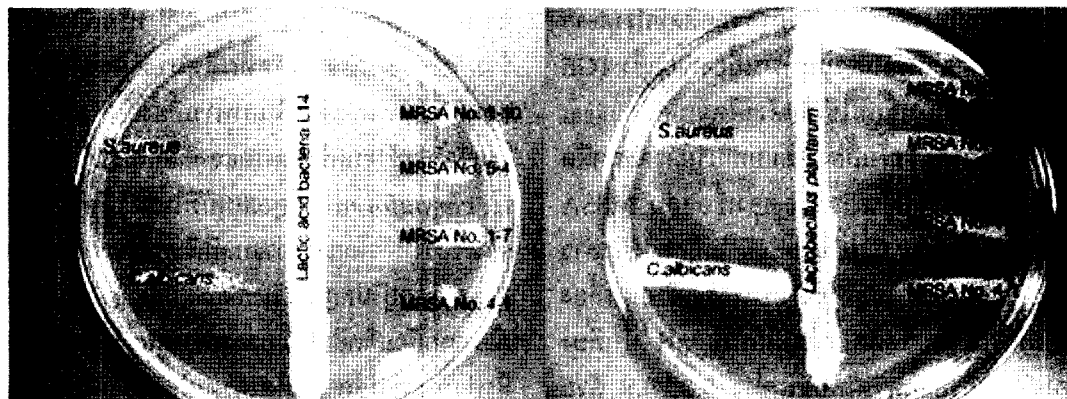
+^w = เชื้อสามารถเจริญได้บ้างในระยะที่อยู่ใกล้กับแนวซิดกลาง (มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลาง)

- = เชื้อสามารถเจริญได้ในระยะที่อยู่ใกล้กับแนวซิดกลาง (ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง)



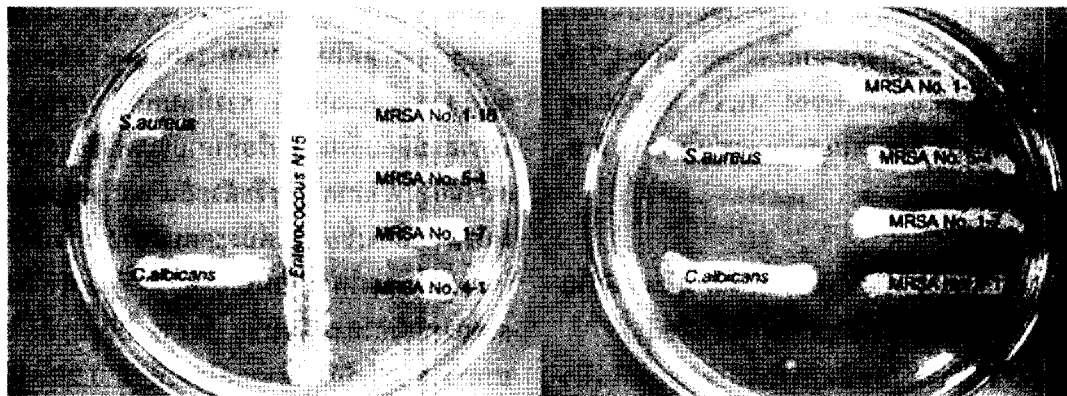
Lactobacillus C3

Lactobacillus C7



Lactobacillus L14

L. plantarum



Enterococcus N15

Control

รูปที่ 1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดัดขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ ด้วยวิธี cross streak. ในงานเฉพาะเชื้อเดียวกัน : เชื้อที่ขีดในแนวกกลางคือแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการทดสอบ, เชื้อที่ขีดในแนวตั้งฉากด้านซ้ายจากบนมาล่าง คือ *S. aureus* และ *C. albicans* ตามลำดับ, เชื้อที่ขีดในแนวตั้งฉากด้านขวาจากบนมาล่าง คือ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) No. 1-10, 5-4, 1-7, 4-1 ตามลำดับ

ผลการศึกษา

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งเชื้อดื้อยา (MSSA, MRSA และ *C. albicans*) ด้วยวิธีซิดเชอพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกตัวกล่าวคือ *L. plantarum*, *Lactobacillus* C3, C7, L14 และ *Enterococcus* N15 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* (MSSA และ MRSA) ที่ใช้เป็นดัชนีได้ทั้งหมด แต่พบว่ามีเฉพาะ L14 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปราศจากเชื้อมาหยอดลงในหลุมในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TGE เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ใช้เป็นดัชนีโดยเทคนิค agar diffusion ปรากฏว่าน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทุกตัวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม MSSA และ MRSA ยกเว้น *L. plantarum* ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว ส่วน *C. albicans* ไม่ถูกยับยั้งการเจริญด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก และเมื่อปรับ pH น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกให้อยู่ในช่วง 6.9 ± 0.2 ด้วย 2N NaOH แล้วนำไปหยอดลงในหลุมเช่นเดียวกับข้างต้น ปรากฏว่าฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อที่ใช้เป็นดัชนีหายไป ยกเว้นน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก C7 ที่ยังคงเห็นฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ MRSA No.5-4 อยู่บ้างเพียงเล็กน้อย ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 2

วิจารณ์

การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นดัชนี

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ให้ลักษณะโคโลนี สีขาวขุ่นกลมมน ขอบเรียบ ส่วนลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนหรือกลม ไม่สร้างสปอร์ซึ่งอยู่ในสกุล *Lactobacillus*, *Lactococcus* หรือ *Enterococcus*¹⁹ และมีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคมานชนิด แต่ฤทธิ์ดังกล่าวมักจะมีความจำเพาะเพียงแบคทีเรีย

แกรมบวก^{12-16, 20} โดยพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทุกชนิด ที่นำมาศึกษาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MSSA และ MRSA) ที่ใช้เป็นดัชนีได้ทั้งหมด และมีเพียง *Lactobacillus* หมายเลข 14 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* ได้ดังแสดงในรูปที่ 2 การยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกได้มีรายงานมากมาย แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อยีสต์รายังพบมีรายงานอยู่น้อย²¹ ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะพบในกลุ่มของ heterofermentative lactic acid bacteria โดยเป็นคุณสมบัติส่วนใหญ่ของกรดแลคติกหรืออะซิติก รวมถึง metabolites ต่างๆ^{12-16, 17, 20-23} หรือเป็นการทำงานร่วมกันของกรดแลคติกที่ผลิตมาจากแบคทีเรียกรดแลคติกกับกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS²⁰ และโดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม *L. plantarum*, *L. coryniformis* มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา²²⁻²³ โดยคาดว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 น่าจะอยู่ในสกุล *Lactobacillus* species เช่นกัน เนื่องจากย้อมติดสีแกรมบวกรูปร่างท่อนไม่มีสปอร์¹⁹ และมีรูปแบบการใช้คาร์โบไฮเดรตเช่นเดียวกับเชื้อในสกุลดังกล่าวคือหมักย่อยน้ำตาล glucose, fructose, maltose, lactose, sucrose, trehalose, xylose, ribose, mannitol, amygdalin แต่ไม่หมักย่อย raffinose และสามารถย่อยสลาย esculin²⁴ การที่แบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติยับยั้งและ/หรือทำลายแบคทีเรียแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อ^{12-16, 20-23} และความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจ ปรับปรุงได้โดยใช้อาหาร MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคสเพียง 0.2% (MRS 0.2%) เพื่อลดการเกิดกรดของอาหาร นอกจากนี้อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญคือสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้ซึ่งอาจอยู่ในกลุ่มของ homofermentative lactic acid bacteria ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว (ร้อยละ 85-95)^{20, 25-28} จึงทำให้ความเข้มข้นของชีวสารอื่นๆ มีน้อย และ/หรือไม่ถูกผลิตออกมาและอาจจะไปมีผลต่อเทคนิคในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง

ตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดักชนิโดยแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ

เชื้อดักชนิ	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดักชนิ											
	Control		<i>Lactobacillus</i> C3		<i>Lactobacillus</i> C7		<i>Lactobacillus</i> L14		<i>Enterococcus</i> N15		<i>L. plantarum</i>	
	ก่อนปรับ	หลังปรับ	ก่อนปรับ	หลังปรับ	ก่อนปรับ	หลังปรับ	ก่อนปรับ	หลังปรับ	ก่อนปรับ	หลังปรับ	ก่อนปรับ	หลังปรับ
	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH
<i>S.aureus</i>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
MRSA No.1-10	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
MRSA No.1-7	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
MRSA No.4-1	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
MRSA No.5-4	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-

+ = เกิด Clear Zone รอบๆ หลุมที่ทำการหยดน้ำเลี้ยงเชื้อ (Filtrated Broth) ที่นำมาทดสอบ

- = ไม่เกิด Clear Zone รอบๆ หลุมที่ทำการหยดน้ำเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบ

การเจริญของเชื้อดักชนิโดยพบว่าเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus* L14 มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี agar well diffusion ปรากฏว่าไม่พบฤทธิ์ดังกล่าว ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดของการแพร่ของชีวสารเข้าไปในเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้ออันเนื่องมาจากขนาดและ/หรือชนิดโมเลกุลของชีวสารนั้นๆ ซึ่งถ้าชีวสารเป็นสารกลุ่มน้ำมันก็ จะทำให้การแพร่ผ่านเข้าไปในเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อเป็นไปได้ยาก²⁹ แต่มีบางรายงานพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion¹⁸ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างกันของจำนวนวันที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมชีวสาร ซึ่ง พบว่า หากเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไว้เกิน 36 ชม จะทำให้ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราหายไปและเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราปรากฏว่ามีการสูญเสียฤทธิ์ไปซึ่งไม่ทราบเหตุผลแน่ชัดแต่อาจเนื่องมาจากกระบวนการตกตะกอนเสียสภาพที่ไม่สามารถเปลี่ยนกลับมารูปแบบเดิม (irreversible precipitation-denaturation process) ซึ่งเนื่องมาจากการ freeze-thaw²²⁻²³

เนื่องจากมีรายงานว่ากรดอินทรีย์ที่ได้มาจากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นสารชนิดหนึ่งที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆ รวมทั้งรา^{12-16, 20-23, 25-28} ดังนั้นเพื่อยืนยันข้อความดังกล่าวจึงได้ปรับ pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อให้อยู่ประมาณ 6.9 ± 0.2 ซึ่งเป็นผลให้ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ดักชนิหายไป แสดงให้เห็นว่ากรดอินทรีย์มีบทบาทดังกล่าว อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข C7 ยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ MRSA 1-7 ได้ (ตารางที่ 2) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความสามารถผลิตสารอื่นออกมา นอกเหนือจากกรดอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ MRSA ได้ ซึ่งอาจจะเป็นฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินหรือชีวสารอื่นๆ ที่ผลิตมาจากแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งต้องมีการทดสอบในขั้นต่อไป²⁰

สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาศึกษา (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus* No. L14, C3, C7 และ *Enterococcus* N15) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ดีกว่าเชื้อรา *Candida albicans* ที่นำมาทดสอบทั้งวิธีจิตเชื้อและ Agar well

diffusion และพบว่า มีเฉพาะ *Lactobacillus* L14 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* เมื่อทดสอบด้วยวิธีซีดเชื้อแต่จะสูญเสียฤทธิ์ดังกล่าวไปเมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion ซึ่งอาจเนื่องมาจากปริมาณชีวสารที่เชื้อผลิตออกมามีน้อยเกินไปหรือระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกยังไม่เหมาะสม¹⁸ หรือมีการเสื่อมสลายของชีวสาร²²⁻²³ นอกจากนี้ พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกปราศจากเชื้อที่ไม่ได้ปรับ pH ให้เป็นกลางสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นดัชนีดีกว่า *C. albicans* แต่เมื่อทำการปรับ pH ให้เป็นกลางพบว่า จะสูญเสียฤทธิ์ดังกล่าวไป ยกเว้นน้ำเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* No. C7 ยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA No. 1-7 ได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากฤทธิ์ของชีวสารอื่นนอกเหนือจากกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดดังกล่าวผลิตออกมา^{12-16, 20}

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช และขอขอบคุณสำนักวิทยาศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และวัสดุอุปกรณ์บางอย่างในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. นลินี อัสวโกศล และคณะ. ประสิทธิภาพด้านโรคติดเชื้อในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โฮลิสติก; 2540.
2. กนกรัตน์ ศิริพานิชกร. โรคติดเชื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โฮลิสติก; 2541.
3. กองโรงพยาบาลภูมิภาค. คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรีย. กองโรงพยาบาลภูมิภาค 2540: 145-6.
4. อภิชัย คงศิริวรกุล. มหันตภัยในอากาศ. วารสาร UPDATE 2540; 12(134): 90-4.
5. ไวยวรรณ ณะมัย. การระบาดของเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) อุบัติการณ์ในหอผู้ป่วยอายุรกรรมชาย โรงพยาบาลเลิดสิน. วารสารกรมการแพทย์ 2543; 25(1): 30-9.
6. Cookson B. Staff carriage of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1989; 27:1471-6.
7. Edmond B, Wenzel P, Pascualle W. "Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* : perspectives on measures needed for control." [Online]. Available: <http://www.md.ucl.ac.be/didac/hosp/vanco/htm> 1996.
8. "Fact Sheet: VISA/VRSA." [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/vanco/Vanco.htm> 2003.
9. อภิราม สงศรี และ มณฑล เลิศคนาวนิชกุล. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ของสารสกัดสมุนไพร. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2545; 44(4):250-60.
10. รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, พร้อมจิต ศรีลัมพ์, ธิราภา แสนเสนา, นกมล กิตติวรารุณี และ มาลิน จุลศิริ. ฤทธิ์ต้านเชื้อและต้านการก่อกลายพันธุ์ของพืชตระกูลส้ม. วารสารเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล 2537; 21(1):7-15.
11. de Almeida Alves TM, Silva AF, Brandao M, Grandi TSM, de Fatima A Smania E, Junior AS and Zani CL. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2000; 95(3):367-373.
12. ชุตินันท์ ประสิทธิ์วิริยวิชา, จัทรวดี โล่เสถียรกิจ, และ ศิริมา สุวรรณบุญ. สารแบคทีเรียโอซิน ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหาร. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 2545; 4(2): 10-20.
13. ปาริชาติ พุ่มขจร, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ, และ ยุภารัตน์ เครือวงษา. ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 2543; 28(1):22-30.
14. ปาริชาติ พุ่มขจร และ พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. แลคติกแอซิดแบคทีเรีย : สารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2543 12(3):101-7.

15. ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2542; 11(2):65-71.
16. วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล.ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. สงขลานครินทร์ วทท 2543; 22(2):177-89.
17. สุมณฑา วัฒนสินธุ์. จุลชีพเพื่อสุขภาพ. วารสารจารย์พา; 2542: 65; 41-4.
18. มณฑล เลิศคณาวณิชกุล. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก ที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการแสดงออกของยีนโคติเนส ในแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้. นครศรีธรรมราช: สำนักวิทยาศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, 2547. 72 หน้า. (ว 160636)
19. ดวงพร คันธโชติ. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร :สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ 2537.
20. พงษ์เทพ วิไลพันธ์. แบคเทอริโอซิน. วารสารจารย์พา 2546: 72:16-25.
21. Cabo ML, Braber AF and Koenraad P. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. J food Prot. 2002; 65:1309-16.
22. Magnusson J and Schnurer J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryneformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Appl Environ Microbiol 2001; 67(1); 1-5.
23. Magnusson J, Strom K, Roos, S, Sjogren J and Schnurer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Lett 2003; 219:129-35.
24. bioMerieux. คู่มือการใช้งาน API50CH และ API50CHL 2004.
25. Batish VK, Roy U, Lal R and Grover S. Antifungal attributes of lactic acid bacteria - A review. Cri Rev Biotechnol 1997: 17(3); 209-25
26. Corsetti AM, Gobbetti M, Rossi J and Damiani P. Antimould activity of sourdog lactic acid bacteria: identification of a mixture of organics acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. Appl Microbiol Biotechnol 1998: 50; 253-6.
27. Niku-paavola M-L, Laitila A, Mattila-Sandholm T and Haikara A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. J Appl Microbiol 1999: 86; 29-35.
28. Cabo ML, Braber AF and Koenraad P. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. J food Prot. 2002: 65; 1309-16.
29. มาลิน จุลศิริ. ยาด้านจุลชีพ (ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์). กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์อักษรบัณฑิต. 2532.