บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยก Bacillus ที่สามารถยับยั้ง *B. pseudomallei*

คุณสมบัติการใช้น้ำตาล arabinose เป็นคุณสมบัติเฉพาะและคงที่ของเชื้อ *B. pseudomallei* ไม่พบว่าเชื้อมีการเปลี่ยนแปลง biotype เมื่อเก็บเชื้อไว้นานเป็นปี หรือระหว่างการ subculture นอกจากนี้ยังสามารถบอกถึง virulence ของเชื้อโดย *B. pseudomallei* ara^- มี virulence สูงในการก่อโรคในขณะที่ *B. pseudomallei* ara^+ มี virulence ต่ำ (Smith *et al*., 1997) ในการศึกษานี้ได้ตรวจสอบคุณสมบัติในการใช้น้ำตาล arabinose และได้เลือก PSU68 (ara^-) และ PSU69 (ara^+) เป็นตัวแทนในการศึกษาต่อไป

ในการแยกเชื้อ Bacillus จากตัวอย่างดินทั้ง 3 ภาคของประเทศไทยคือภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ พบเชื้อ Bacillus ที่ยับยั้ง *B. pseudomallei* ในตัวอย่างดินจากภาคเหนือและภาคใต้เป็นจำนวนใกล้เคียงกัน คือภาคเหนือพบ 4 ไอโซเลทจากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 16 ไอโซเลท ภาคใต้พบ 39 ไอโซเลทจากเชื้อที่แยกได้ 191 ไอโซเลทคิดเป็น 25.0 และ 20.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2) ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจมากเนื่องจากการศึกษาของ Vuddhakul และคณะ (1999) พบว่าสามารถแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ในดินจากภาคเหนือและภาคใต้เป็นจำนวนใกล้เคียงกัน คือ 4.4 และ 5.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับในขณะที่การแยกเชื้อ *B. pseudomallei* จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือเท่ากับ 20.4 เปอร์เซ็นต์ และเป็นภาคที่มีผู้ติดเชื้อ *B. pseudomallei* สูงสุดในประเทศไทย (Vuddhakul *et al*., 1999) ดังนั้นน่าจะมีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Bacillus กับปริมาณ *B. pseudomallei* ในดินภาคเหนือและภาคใต้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้มีการแยก Bacillus จากตัวอย่างดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาเปรียบเทียบ ทำให้ข้อมูลนี้ยังไม่กระจ่างชัด สำหรับในภาคกลางไม่พบ Bacillus ที่สามารถยับยั้ง *B. pseudomallei* เนื่องจากจำนวนตัวอย่างดินที่เก็บมาน้อยเกินไป คือ 2 ตัวอย่าง และแยกเชื้อได้เพียง 11 ไอโซเลท

4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้ง

จากการศึกษาปัจจัยต่างๆในการเลี้ยงเชื้อ Bacillus เพื่อสร้างสารยับยั้ง *B. pseudomallei* พบว่า Bacillus สายพันธุ์ PSU82Ba ที่คัดเลือกได้มีการเจริญใน TSB และสร้างสารยับยั้งได้ในปริมาณมากกว่าใน LB เนื่องจากใน TSB มี yeast extract ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการผลิตสารยับยั้งสามารถถูกควบคุมโดย carbon และ nitrogen metabolite เช่นในการสร้าง erythromycin จะลดลงเมื่อเติมไนโตรเจน เช่น ammonium chloride glycine หรือ soybean meal ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Smith *et al*., 1962) และการเติม glucose ในปริมาณน้อย สามารถยับยั้งการสร้าง rhizocticin A (Kugler *et al*., 1990) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการสร้างสารยับยั้งจะสร้างได้ดีที่ pH 8 และ pH 9 แสดงว่าเชื้อสามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งได้ปริมาณมากในสภาวะที่เป็นด่าง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อเจริญและสร้างสารยับยั้งได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่เชื้อเจริญได้น้อยและไม่พบการสร้างสารยับยั้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งคล้ายกับสายพันธุ์ *B. cereus* ซึ่ง Naclerio และคณะ (1993) พบว่าสร้าง cerein ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่พบการสร้างที่ 25 องศาเซลเซียส และมีการสร้างน้อยลงที่ 37 องศาเซลเซียส จากการทดลองเลี้ยง PSU82Ba ในอาหารเหลว TSB เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-36 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ แต่ในชั่วโมงที่ 48-96 พบว่ามีความสามารถในการยับยั้ง *B. pseudomallei* (รูปที่ 3.12) แสดงว่า PSU82Ba สร้างสารยับยั้ง ในช่วง stationary phase และจะมีการสร้างมากที่สุดในชั่วโมงที่ 96 มีรายงานว่าสารปฏิชีวนะเปปไทด์ ที่ Bacillus สร้างขึ้นจากไรโบโซมจะถูกควบคุมการสร้างโดยจีนส์ที่อยู่รวมกลุ่มกันใน polycistronic transcription units และอยู่ภายใต้การควบคุมของ regulatory systems ซึ่งจะถูกกระตุ้นให้ทำงานเมื่อ Bacillus เข้าสู่ระยะ stationary phase (Nakano and Zuber, 1990)

4.3 คุณสมบัติของสารยับยั้ง

ในการศึกษาครั้งนี้จากการหาน้ำหนักโมเลกุลสารยับยั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba โดยวิธี Centriprep พบสารยับยั้งส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาล

ตัน และส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ดาลตัน มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. pseudomallei* แสดงว่าสารยับยั้งอาจประกอบด้วยสารมากกว่า 1 ชนิด หรือมีเพียง 1 ชนิดซึ่งสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ดาลตัน แต่มีความสามารถจับกับโปรตีนโมเลกุลใหญ่จึงทำให้สารส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตันมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. pseudomallei* ได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งนี้เป็นสารที่ทนความร้อน (heat stable) เนื่องจากยังคงมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. pseudomallei* หลังจากผ่านความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 10 20 30 นาที และ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที สารยับยั้งที่สร้างจาก PSU82Ba ไม่สามารถยับยั้ง *B. subtilis*, *E. feacalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* , *P. aeruginosa* และ *Salmonella* spp. แต่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp. และ *Shigella* spp. แสดงว่าสารยับยั้งนี้ไม่ได้ออกฤทธิ์ที่ peptidoglycan หรือ lipopolysaccharide ซึ่งเป็นองค์ประกอบจำเพาะของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ตามลำดับ แต่สารยับยั้งนี้อาจจะออกฤทธิ์กับโครงสร้างที่จำเพาะของเชื้อแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งได้ ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาต่อไปในอนาคตว่าโครงสร้างที่จำเพาะนี้คืออะไรและเป็นส่วนประกอบส่วนไหนของแบคทีเรีย นอกจากนี้การที่พบว่าสารยับยั้งไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. pseudomallei* ara^{+} ช่วยยืนยันว่าเชื้อทั้ง 2 ตัวน่าจะเป็นคนละสปีชีส์ (species) และมีโครงสร้างบางส่วนแตกต่างกัน โดยปัจจุบันมีหลายรายงานที่แนะนำให้จัด *B. pseudomallei* ara^{+} เป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *B. thailandensis* (Brett *et al*., 1998)

4.4 MIC และ MBC ของสารยับยั้ง

จากการศึกษาพบว่าสารยับยั้งมีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้งสายพันธุ์ ara^{-} และ ara^{+} ต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารยับยั้งนั้น โดยพบว่าค่า MIC และ MBC ของ *B. pseudomallei* ara^{-} (1:16 และ 1:8) สูงกว่า *B. pseudomallei* ara^{+} (1:4 และ 1:2) แสดงว่าสารยับยั้งออกฤทธิ์ต่อสายพันธุ์ ara^{-} มากกว่า ara^{+} ซึ่งยืนยันได้จากผลการทำจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าสารยับยั้งทำลายโครงสร้างของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ ara^{-} รุนแรงกว่า *B. pseudomallei* สายพันธุ์ ara^{+} (รูปที่ 3.14 C และ F กำลังขยาย 40,000 เท่า) อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ขัดแย้งกับการทดสอบสาร

ยับยั้งกับ *B. pseudomallei* ara^{+} โดยใช้ agar well diffusion (รูปที่ 3.13) ซึ่งพบว่าสารยับยั้งไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ที่น้ำเลี้ยงเชื้อ Bacillus สายพันธุ์ PSU82Ba ผลิตสารยับยั้งแตกต่างกัน 2 ชนิด ชนิดหนึ่งละลายน้ำได้ดีและออกฤทธิ์กับ *B. pseudomallei* ara^{-} ซึ่งให้ผลบวกกับการทดลองทั้งวิธี agar well diffusion และ tube dilution อีกชนิดหนึ่งออกฤทธิ์กับ *B. pseudomallei* ara^{+} ละลายน้ำได้ไม่ดี โดยให้ผลลบกับการทดสอบโดยวิธี agar well diffusion แต่เมื่อทดสอบโดยวิธี broth dilution จะให้ผลบวกและด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อทั้งสองชนิดแตกต่างกัน การทดลองต่อไปในอนาคตจะช่วยทำให้เรื่องนี้ชัดเจนขึ้น

4.5 การแยกสารยับยั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba

จากการตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40% พบว่าสารยับยั้งจากเชื้อ PSU82Ba เป็นสารที่มีความเป็นขั้วน้อยสภาพการละลายต่ำ ดังนั้นเมื่อเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อ ทำให้สภาพของไอออนของน้ำเลี้ยงเชื้อสูงขึ้นและไอออนดังกล่าวจับกับโมเลกุลของน้ำทำให้สารยับยั้งรวมตัวกันตกตะกอน อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีนบางชนิดในน้ำเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba ก็มีสภาพการละลายต่ำเช่นเดียวกับสารยับยั้ง เพราะเมื่อตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวมากขึ้น (50%) พบว่าค่าแอคทิวิตีจำเพาะของสารยับยั้งลดลงเพราะมีโปรตีนชนิดอื่นตกตะกอนลงมาด้วยเช่นกัน (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง)

การตกตะกอนสารยับยั้งด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40 % ทำให้สารยับยั้งมีความเข้มข้นสูงขึ้น ปริมาณเนื้อสารยับยั้งที่ได้กลับคืนมาหลังตกตะกอน (recovery activity) เท่ากับ 35 % จากน้ำเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น อย่างไรก็ตามแม้จะเพิ่มความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมมากกว่า 40% ในการตกตะกอนจะได้เนื้อสารกลับคืนมาไม่เกิน 38 % (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) และพบการปนเปื้อนของโปรตีนจากการตกตะกอนเพิ่มมากขึ้นทำให้ยากต่อการแยกสารยับยั้งให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป ดังนั้นจึงเลือกใช้การตกตะกอนเกลือที่ความอิ่มตัว 40 % ซึ่งทำให้สารยับยั้งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นและลดการปนเปื้อนจากโปรตีนตัวอื่น

สารยับยั้งที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วผ่านคอลัมน์ Sephadex G-10 ชะด้วยบัฟเฟอร์ 25 mM Tris-HCl, pH8.8 ตรวจไม่พบสารยับยั้งหลังผ่านคอลัมน์แล้ว ในขณะที่ตรวจพบปริมาณโปรตีนทั้งก่อนและหลังผ่านคอลัมน์ในปริมาณใกล้เคียงกันรวมทั้งไม่พบความแตกต่างของแบบแผนโปรตีนเมื่อทำอิเล็กโทรฟอรีซิส (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) แสดงว่าสารยับยั้งสามารถจับกับ Sephadex G-10 ได้ เนื่องจาก Sephadex G-10 มีปริมาณ cross-link สูง ดังนั้นจึงนำสารยับยั้งที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 10 % glycerol พบว่าสารยับยั้งถูกชะออกมา 2 peak คือ peak S_1 และ peak S_2 แต่ตรวจพบโปรตีนเฉพาะใน peak S_1 เท่านั้น (รูปที่ 3.17) แสดงว่า glycerol สามารถยับยั้งการจับตัวของสารยับยั้งกับโปรตีนและ Sephadex G-50 ได้

เมื่อนำสารละลาย pool peak S1 ไปทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพแล้วตัดวุ้นนำไปทดสอบการยับยั้งของสารยับยั้ง พบว่าโปรตีนจาก pool peak S1 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ แต่พบปฏิกิริยาการยับยั้งในชิ้นวุ้นที่ 17-20 ซึ่งเป็นตำแหน่งวุ้นที่มีขนาดเล็กกว่าโปรตีนมาตรฐานขนาด 7,160 ดาลตัน ส่วนใน peak S_2 สารยับยั้งที่ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่าใน peak S_1 เนื่องจากตรวจไม่พบโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด และการย้อมสีคูมาซีบลูเมื่อทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (รูปที่ 3.18 ช่องวุ้นที่ 3) และเมื่อตัดวุ้นนำไปทดสอบการยับยั้ง *B. pseudomallei* พบว่าปฏิกิริยาการยับยั้งในชิ้นวุ้นที่ 17-20 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับที่พบใน pool peaks S_1 (รูปที่ 3.19) ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสารยับยั้งนี้เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและน่าจะมีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1,500 ดาลตัน เพราะถูกชะออกมาที่ปริมาตรชะทั้งหมดของคอลัมน์ (Vt) (ความสามารถในการแยกขนาดโมเลกุลของ Sephadex G-50 อยู่ในช่วง 1,500-30,000 ดาลตัน) ดังนั้นสารยับยั้งจากเชื้อ PSU82Ba อาจจะเป็นสารกลุ่มเปปไทด์ (peptide) ที่ไม่ใช่โปรตีนขนาดใหญ่แต่มีสมบัติในการจับกับโปรตีนหรือสารอื่นในน้ำเลี้ยงเชื้อ รวมทั้ง Sephadex ที่มีเปอร์เซ็นต์การ cross-link สูง เช่น Sephadex G-10 ได้ และด้วยเหตุผลนี้เองทำให้ เมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งโดยวิธี Centriprep จึงพบการยับยั้ง *B. pseudomallei* ในน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน และน้อยกว่า 10,000 ดาลตัน (ตารางที่ 3.4)

จากการศึกษาพบว่าสารยับยั้งมีสภาพการละลายต่ำจึงสามารถจับกับโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นหลังการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-50 (pool peak S_1 และ peak S_2) จึงได้นำตัวอย่างไปแยกต่อด้วยวิธี อิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ ซึ่งเป็นการแยกสารทางไฟฟ้าที่ไม่ขึ้นกับรูปร่างและประจุของสารแต่ขึ้นกับขนาดเพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองบ่งชี้ว่าสารยับยั้งจากเชื้อ PSU82Ba ที่จับอยู่กับโปรตีนสามารถแยกด้วยวิธีทางไฟฟ้าได้ แต่การแยกสารยับยั้งด้วยไฟฟ้าอาจทำให้สารยับยั้งจับกับสารที่ผสมอยู่ในบัฟเฟอร์ตัวอย่าง เช่น glycerol หรือ โบรโมฟีนอลบลู ดังนั้นสารยับยั้งจะเคลื่อนตัวไปในสนามไฟฟ้าพร้อมกับสารดังกล่าวและปรากฏอยู่ตำแหน่งเดียวกับชิ้นวุ้นที่ 19-20 (รูปที่ 3.18 ชุด A) ซึ่งเป็นระยะสิ้นสุดในการเคลื่อนที่ของสารในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถระบุได้ว่าสารยับยั้งจากเชื้อ PSU82Ba เป็นสารยับยั้งชนิดใดและมีโครงสร้างอย่างไร เนื่องจากยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารยับยั้งในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานนำไปสู่การศึกษาวิจัยเพื่อระบุโครงสร้าง และชนิดของสารนี้ในอนาคต ซึ่งอาจเป็นสารตัวใหม่และสามารถนำมาปรับปรุงเป็นยาชนิดใหม่รักษาผู้ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ดื้อต่อยาที่ใช้ในปัจจุบัน นอกจากนี้การรู้โครงสร้างของสารนี้ทำให้รู้เป้าหมาย (target) ของสารนี้บนโครงสร้างของ *B. pseudomallei* ด้วย อันจะนำไปสู่การออกแบบยาชนิดใหม่ๆ ที่สามารถออกฤทธิ์ต่อเป้าหมายเดียวกันนี้ได้เช่นกัน

4.6 การบ่งชี้ PSU82Ba ทางชีวเคมี

ในการศึกษานี้ได้ทำการบ่งชี้ Bacillus PSU82Ba โดยการทดสอบทางชีวเคมีและพบว่าไม่ใช่ *B. anthracis* และ *B. cereus* โดย *B. anthracis* ให้ผล non-hemolysis บน BA แต่ PSU82Ba ให้ผล β-hemolysis ส่วน *B. cereus* ให้ผลบวกอาหารเลี้ยงเชื้อ citrate และ tyrosine แต่ PSU82Ba ให้ผลลบในอาหารชนิดเดียวกัน ซึ่ง Bacillus ทั้ง 2 ชนิดนี้จัดว่าเป็น Bacillus ที่พบบ่อยว่าก่อให้เกิดโรคอันตรายในมนุษย์ ดังนั้นอาจนำ PSU82Ba ไปใช้ควบคุมปริมาณ *B. pseudomallei* ในดิน ซึ่งจะเป็นการแก้ปัญหาของโรคเมลิออยโดสิสโดยตรง