ผลของสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium insidiosum*

Effect of Extracted Compound from Bacterial Strains Isolated from Environmental Against *Pythium insidiosum*

ศุภกร พลธรรม (Supakorn Pontham)* รุ่งลัดดา ยาปิ่น (Rungladda Yapin)**
รัตนาภรณ์ ใสหมี (Rattanaporn Saimee)** ดร.กัญญลักษณ์ ชัยคำภา (Dr.kunyaluk Chaicumpar)***
ดร.ไมตรี ปะการะสังข์ (Dr.Maitree Pakarasang)**** ดร.ราตรี ทวิชากรตระกูล (Dr.Ratree Travichakorntrakool)****
ดร.ยอดหทัย ทองศรี (Dr.Yordhathai Thongsri)***** ดร.จุฬารัตน์ ปริยชาติกุล (Dr.Chularut Prariyachatigul)******

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อเป็นการคัดกรองหาเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมซึ่งผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* ศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสภาวะที่เหมาะสม และทำการสกัดสารโดยใช้สารอินทรีย์ 2 ชนิด คือ ethyl acetate และ dichloromethane จากนั้นจึงทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *P. insidiosum* ด้วยเทคนิค Disc Diffusion Method จากการทดลอง พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถต้านการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* มี 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* 2 สายพันธุ์ (ST2521 และ ST62302), *Enterobacter cloacae* 2 สายพันธุ์ (ST3604 และ ST2503), *Aeromonas sobria* ST2206, *Klebsiella pneumoniae* ST2501 และ *Pseudomonas stutzeri* ST1302 แต่มีเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* ได้ทั้งหมด 17 สายพันธุ์ (100%) ในขณะที่ *A. baumannii* ST2521 และ *A. baumannii* ST62302 ยับยั้งได้เพียง 70.58 % (12/17) และ 82.35 % (14/17) ตามลำดับ

ABSTRACT

The purposes of this study were screening for environmental bacterial strains that produce anti-*Pythium insidiosum* metabolites. The bacterias were cultured in optimal condition and extracted with dichloromethane and ethyl acetate. Disc diffusion methods were used to see the inhibitory effects against *P. insidiosum*. From the experiment we found that 7 strains of bacterial have an anti- *Pythium insidiosum* ability including *Acinetobacter baumannii* 2 strains (ST2512 and ST62302), *Enterobacter cloacae* 2 strains (ST3604 and ST2503), *Aeromonas sobria* ST2206, *Klebsiella pneumoniae* ST2501 and *Pseudomonas stutzeri* ST1302. The only 5 strains of bacteria could inhibit 17 strains of *P. insidiosum* (100%). While the inhibition was only 70.58 % (12/17) and 82.35 % (14/17) in *A. baumannii* ST2521 and *A. baumannii* ST62302, respectively.

คำสำคัญ: เชื้อ *Pythium insidiosum* โรค Pythiosis สารสกัด

Keywords: *Pythium insidiosum*, Pythiosis, Extracted compound

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
*** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
***** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
****** อาจารย์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*
******* รองศาสตราจารย์ กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

เชื้อ *Pythium insidiosum* จัดอยู่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต และอยู่ในวงศ์ Oomycetes มีลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยคล้ายเชื้อรา แต่ไม่ใช่เชื้อราที่แท้จริง มีวงจรชีวิตอยู่ในแหล่งน้ำ (Mendoza et al., 1993) เช่น นาข้าว บึง สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ด้วยการสร้างซูโอสปอร์ (zoospore) ที่สามารถว่ายน้ำได้ (Chaiprasert et al., 1990) ก่อให้เกิดโรคที่มีความรุนแรงและเป็นโรคที่มีอัตราการตายค่อนข้างสูง หากสัตว์หรือคนที่มีรอยแผลเปิดตามอวัยวะต่างๆ เช่น เท้าหรือขาอาจได้รับซูโอสปอร์เข้าสู่ร่างกายทางบาดแผล (Thianprasit et al., 1996) โรคนี้สามารถเกิดได้ทั้งในสัตว์และคน เช่น สุนัข แมว ม้า (Davis et al., 2006, Bosco et al., 2005, Miller et al., 1983) Krajaejun et al. 2006 ลักษณะรอยโรคที่พบในคนส่วนใหญ่ มี 4 ลักษณะ คือ 1) รอยโรคบริเวณผิวหนัง (subcutaneous) 5% 2) รอยโรคที่เส้นเลือด (vascular) 59% 3) รอยโรคที่บริเวณดวงตา (ocular/orbital/corneal ulcers) 33% และ 4) มีการติดเชื้อบริเวณอวัยวะภายใน (internal organs) 3% ซึ่งเรียกว่า "โรค Pythiosis" (Krajaejun et al., 2008) Bach et al. 2010 ปัจจุบันยังไม่มียาชนิดใดที่สามารถใช้เป็นยามาตรฐานในการใช้รักษาผู้ป่วยโรคนี้ได้ ผู้ป่วยส่วนใหญ่จำเป็นจะต้องรับการผ่าตัดอวัยวะส่วนดังกล่าวที่ติดเชื้อทิ้ง มีรายงานการรักษาผู้ป่วยแบบกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunotherapy) ซึ่งผลการรักษาได้ผลในบางรายเท่านั้น (Mendoza et al., 2005, Pereira et al., 2008) เชื้อ *Pythium insidiosum* ไม่มี ergosterol ที่ผนังเซลล์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งถือเป็นเป้าหมายที่สำคัญของยาหลายๆ กลุ่ม ในการออกฤทธิ์ยับยั้งและทำลายเชื้อรา ดังนั้นการศึกษาวิจัยค้นคว้าหายาชนิดใหม่ๆ จึงมีบทบาทสำคัญที่จะช่วยพัฒนาการรักษาผู้ป่วยต่อไป จากการศึกษาของ รุ่งลัดดา, รัตนาภรณ์ (2550) ได้ศึกษาตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำ 23 แหล่งในเขตพื้นที่ภาคอีสาน ซึ่งได้แก่ จังหวัดขอนแก่น 19 แหล่ง และจังหวัดอุดรธานี 4 แหล่งพบว่ามีแบคทีเรีย 104 ชนิด แยกได้จากแหล่งน้ำที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.insidiosum* SIMI 666 [C-K] ต่อมายอดหทัย และคณะ (2014) ได้นำเอาแบคทีเรียจำนวน 104 ชนิด มาทดสอบฤทธิ์การกำจัดเชื้อ *P. insidiosum* พบว่าเชื้อ 16 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ดังกล่าว และได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *Psuedomonas stutzeri* ST1302 มาทดสอบด้วยเทคนิค Disc diffusion พบว่ามีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* SIMI 666 [C-K] ได้เป็นอย่างดี แต่ด้วยความรู้ที่ขาดหายไป คือ เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ อีก 15 สายพันธุ์จะมีผลในการหลั่งสารสำคัญได้หรือไม่ งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่เหลือว่ามีสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* สายพันธุ์อื่นๆ หรือไม่ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นการคัดกรองหาเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมซึ่งผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum*

วิธีการศึกษา

การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

1. นำแบคทีเรียทั้งหมด 16 สายพันธุ์ที่เก็บรักษาไว้ในอาหาร skim milk ที่ได้จากการศึกษาวิจัยของ รุ่งลัดดา, รัตนาภรณ์ (2550) ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ มา subculture บน Brain Heart Infusion broth และ Mac Conkey Agar เพื่อตรวจสอบการเจริญและประสิทธิภาพของเชื้อก่อนนำไปทำการทดสอบ แล้วทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เจริญมาทำการศึกษา ซึ่งมีทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* ST2512, *Acinetobacter baumannii* ST62302, *Enterobacter cloacae* ST3604, *Enterobacter cloacae* ST2503, *Klebsiella pneumoniae* ST2501, *Aeromonas sobria* ST2206 และ *Pseudomonas stutzeri* ST1302 จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีไปเลี้ยงต่อในอาหาร BHI ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น ในสภาวะเขย่า ที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2. ทำการย้ายเชื้อแบคทีเรียที่ครบ 24 ชม. ไปเลี้ยงในอาหาร BHI ปริมาตร 700 มิลลิลิตรโดยปรับความเข้มข้นของเชื้อเทียบกับ Mac Farland Standard No.1 โดยใช้ปริมาตรเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 7 มิลลิลิตร : 700 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า ที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 3 วัน (Thongsri et al., 2014)

การเตรียมเชื้อ *Pythium insidiosum*

นำเชื้อ *P. insidiosum* ทั้งหมด (แยกได้จากผู้ป่วย 17 สายพันธุ์) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ โรงพยาบาลศิริราช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล มาเพาะเชื้อใน SDA plate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 2 วัน แล้วจึงนำไปใช้ในการวิจัยต่อไป

การสกัดสารจากเชื้อแบคทีเรีย

1. หลังจากที่ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร BHI ครบ 3 วันแล้ว นำไปแยกเอาส่วนใส (supernatant) และตะกอนเซลล์ (cell debris) โดยใช้เครื่องปั่นแยกความเร็วสูง ที่ความเร็ว 8,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที เพื่อนำไปทำการศึกษาหาสารปฏิชีวนะต่อไป

2. นำเฉพาะส่วนใสไปกรองเอาตะกอนเซลล์ที่อาจจะเหลือจากขั้นตอนการปั่นตกตะกอนออกไปให้หมด โดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นระเหยให้มีความเข้มข้นขึ้นเป็น 10 เท่า โดยใช้เครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Rotary evaporator) จากนั้นนำทั้งส่วนใสและตะกอนเซลล์ ไปไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการสกัดหาสารที่มีฤทธิ์ (Thongsri et al., 2014)

การสกัดด้วยสาร Organic Solvent

นำทั้งส่วนใสและตะกอนเซลล์ มาทำการสกัดด้วยสาร organic solvent คือ Dichloromethane และ Ethyl acetate ในการสกัดสารจากเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วย organic solvent จะต้องสังเกตุว่าสมควรใช้สารชนิดใดจึงจะเหมาะสม หลังจากนั้นจึงนำไปประเหยแห้ง โดยใช้เครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Rotary evaporator) อีกครั้ง ชั่งน้ำหนักสารที่ได้ เพื่อที่จะนำสารที่ได้นี้ไปทดสอบประสิทธิภาพ (Thongsri et al., 2014)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดที่ได้

นำสารสกัดที่ได้มาละลายใน 10% DMSO เป็นตัวทำละลาย (Dória et al., 2015) แล้วปรับให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำการดูดไปใส่ในดิสก์ยาเปล่า (blank disc) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ดังนั้นในแต่ละดิสก์จะมีความเข้มข้นเท่ากันคือ 10 มิลลิกรัม แล้วนำไปทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* ทั้งหมด 17 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค Disc diffusion และทำการวัดการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (10% DMSO) ด้วยเครื่องมือวัด (vernier caliper) เพื่อหาฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์หาว่าสารชนิดใดให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุด

วิธีการในการวิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ เพื่อเปรียบเทียบและประเมินผลว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ใดที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* ทั้ง 17 isolates มากที่สุด และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นการยับยั้งการเจริญ (Antimicrobial percent activity) จากสูตรด้านล่าง (Mahlke et al., 2009)

$$A\% = \frac{100 \times \text{จำนวนสายพันธุ์ที่ไวต่อสารสารสกัด}}{\text{จำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่ทดสอบ}}$$

สถานที่และระยะเวลาในทำการทดลอง

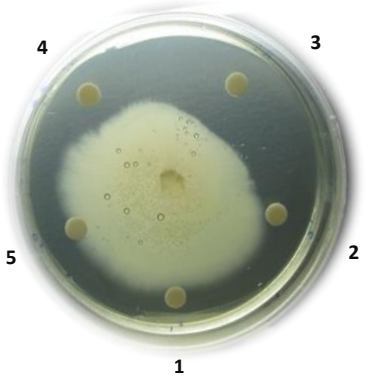
ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในช่วง มิถุนายน 57 - ตุลาคม 58

ผลการศึกษา

จากผลการทดลองพบว่า สารที่ทำการสกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 7 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ *P. insidiosum* แต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 1) พบว่า 10% DMSO สามารถนำมาใช้เป็นตัวทำละลายได้กับสารสกัดทุกชนิดและไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* จึงนำมาใช้เป็น Negative control (ภาพที่ 1)

ผลการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า สารสกัดที่ได้จากเชื้อ *Enterobacter cloacae* 2 สายพันธุ์ (ST3604 และ ST2503), *Aeromonas sobria* ST2206, *Klebsiella pneumoniae* ST2501 และ *Pseudomonas stutzeri* ST1302 ให้ผลการยับยั้งได้เป็นอย่างดี (100%) ในขณะที่สารสกัดจากเชื้อ *A. baumannii* ST2521 และ *A. baumannii* ST62302 ให้ผล การยับยั้ง 70.58 % และ 82.35 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การใช้ organic solvent กับเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในการสกัดสาร พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* ทั้ง 2 สายพันธุ์ (ST2521 และ ST62302) และ *P. stutzeri* ST1302 ใช้ Dichloromethane ส่วนเชื้อ *A. sobria* ST2206, *E. cloacae* ST3604, *E. cloacae* ST2503 และ *K. pneumoniae* ST2501 ใช้ Ethyl acetate ในการสกัดจึงจะสามารถสกัดสารได้ดี เมื่อนำไปทดสอบกับเชื้อ *P. insidiosum*



ภาพที่ 1 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย (1=*A. baumannii* ST2512, 2=*A. baumannii* ST62302, 3=*E.cloacae* ST3604, 4=*P. stutzeri* ST1302 และ 5=10% DMSO)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้พบว่า สารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* ทั้ง 7 สายพันธุ์ ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งที่แตกต่างกัน โดยนำเชื้อ *P. insidiosum* ทั้ง 17 สายพันธุ์ มาใช้ในการทดสอบ พบว่า สารสกัดจากแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ *E. cloacae* ST3604, *E. cloacae* ST2503, *K. pneumoniae* ST2501, *A.sobria* ST2206 และ *P.stutzeri* ST1302 ให้ผลการยับเชื้อ *P. insidiosum* ทั้ง 17 สายพันธุ์ (100%) ในขณะที่เชื้อ *A. baumannii* ST2521 ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* 12 สายพันธุ์ (70.58%) และสารสกัดจากเชื้อ *A. baumannii* ST62302 ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* 14 สายพันธุ์ (82.35%) จากงานวิจัยของยอดหทัยและคณะ (2014) พบว่า สารสกัดจากเชื้อ *P. stuzeri* ST1302 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* สายพันธุ์ SIMI 666 [C-K] ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผู้วิจัยได้นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ด้วย อนึ่งองค์ความรู้ในการวิจัยครั้งนี้ เพื่อหาชนิดของสารชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง ในการทำลายเชื้อ *P. insidiosum* และเป็นแนวทางในการผลิตยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ สำหรับใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคพิทิโอซีสในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านทุนสนับสนุนการวิจัย ในการทำวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนกลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตารางที่ 1 แสดงค่าเปอร์เซ็นการยับยั้งการเจริญ (Antimicrobial percent activity) ของสารสกัดจากแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ต่อการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum*

ชนิดของสารสกัด	ผลการยับยั้งต่อเชื้อ *P. insidiosum* 17 สายพันธุ์																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	(A%)
สารสกัด 1	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	70.58
สารสกัด 2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	82.35
สารสกัด 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
สารสกัด 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
สารสกัด 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
สารสกัด 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
สารสกัด 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
10%DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
จำนวนสารที่ออกฤทธิ์	7	7	5	6	7	7	7	5	7	6	7	7	7	7	5	7	7	

หมายเหตุ : 1 = CBS.673.85, 2 = M 29, 3 = MCC 9, 4 = MCC 10, 5 = MCC 2, 6 = MCC 3, 7 = MCC 5, 8 = MCC 6, 9 = MCC 8, 10 = SIMI 18093, 11 = SIMI 283-40, 12 = SIMI 2921-45, 13 = SIMI 2989-42, 14 = SIMI 322-37, 15 = SIMI 7874, 16 = SIMI 8727, 17 = SIMI 9743
สารสกัด 1 = *A.baumannii* ST2512, สารสกัด 2 = *A.baumannii* ST62302, สารสกัด 3 = *E.cloacae* ST3604, สารสกัด 4 = *E.cloacae* ST2503, สารสกัด 5 = *K.pneumoniae* ST2501, สารสกัด 6 = *A.sobria* ST2206, สารสกัด 7 = *P.stutzeri* ST1302 และ 10% DMSO = ชุดควบคุมเชิงลบ

เอกสารอ้างอิง

รุ่งลัดดา ยาปิ่น, รัตนาภรณ์ ใสหมี. การแยกจุลชีพจากแหล่งน้ำที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium insidisoum* : [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์]. ขอนแก่น: คณะเทคนิคการแพทย์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น ; 2550.

Bach BC, Leal DB, Ruchel JB, Souza Vdo C, Maboni G, Dal Pozzo M, et al. Immunotherapy for pythiosis: Effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model. Biomed Pharmacother 2010; 64: 718-22.

Bosco Sde M, Bagagli E, Araujo JP Jr, Candeias JM, de Franco MF, Alencar Marques ME, et al. Human pythiosis, Brazil. Emerg Infect Dis 2005; 11: 715-8.

Chaiprasert A, Samerpitak K, Wanachiwanawin W,Thasnakorn P. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. Mycoses 1990; 33: 317-23.

Dória R GS, Carvalho M B, Freitas S H, Laskoski L M, Colodel E M, Mendonça F S, et al. Evaluation of intravenous regional perfusion with amphotericin B and dimethylsulfoxide to treat horses f or pythiosis of a limb. BMC Vet Res 2015; 11: 152.

Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Pracharktam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. Clin Infect Dis 2006; 43: 569-76.

Krajaejun T SB, Chaiprasert A, Srimuang S. Do You Know Human Pythiosis?. J Infect Dis Antimicrob Agents 2008; 45-51.

Mahlke J D, Boligon A A, Machado M M, Spader T B, Alves S H, et al. In vItro antimicrobial and antioxidant activities of a crude extract and fractions from *Buddleja thyrsoides* lam. Leaves. Quim. Nova 2009; 32: 277-281.

Mendoza L ,Newton JC. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum.* Med Mycol 2005; 43: 477-86.

Mendoza L, Hernandez F,Ajello L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum.* J Clin Microbiol 1993; 31: 2967-73.

Miller RI. Investigation tnto the biology of three phycomycotic agents pathogenic for horse in Australia. Mycopathologia 1983; 81: 23-28.

Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, de Azevedo MI, Silveira F, da Costa FF, et al. Comparison between immunotherapy and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. J Med Myco 2008; 18: 129-33.

Thianprasit M, Chaiprasert A,Imwidthaya P. Human pythiosis. Curr Top Med Mycol 1996; 7: 43-54.

Thongsri Y, Aromdee C, Yenjai C, Kanokmedhakul S, Chaiprasert A, Hamal P, et al. Detection of diketopiperazine and pyrrolnitrin, compounds with anti-*Pythium insidiosum* activity, in a Pseudomonas stutzeri environmental strain. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2014; 158(3):378-83.