นิพนธ์ต้นฉบับ
(Original article)

ความสามารถของไนซินต่อการยับยั้งจุลชีพก่อโรคทางผิวหนังที่พบบ่อย

วัชรมาศ ม่วงแก้ว ธิตินันท์ กิติสิน สันต์ สุวรรณมณี ยุวดี มหาคุณกิจเจริญ นัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ
ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

การเปลี่ยนแปลงของภูมิอากาศร่วมกับการใช้ยาที่ไม่มีการควบคุมอย่างเหมาะสม โดยเฉพาะกลุ่มยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้เชื้อก่อโรคที่ผิวหนังดื้อยา และอัตราการติดเชื้อดื้อยาในคนไข้เพิ่มมากขึ้น ด้วยเหตุดังกล่าวจึงมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพก่อโรคจากสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอื่นๆ เพิ่มขึ้น เพื่อนำมาใช้แทนยาและเวชภัณฑ์ต่างๆ การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของไนซินซึ่งสร้างจากแบคทีเรียกลุ่ม *Lactococcus lactis* ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลชีพก่อโรคผิวหนังที่พบบ่อยในภูมิภาคเขตร้อนในสภาพแวดล้อมทดลอง คือ เชื้อรา *Trichophyton rubrum* ยีสต์ *Candida albicans* และแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากการศึกษาพบว่าไนซินสามารถลดการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ที่ Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration เท่ากับ 120 และ 1,920 µg/ml ตามลำดับ โดยความเข้มข้นของไนซินที่ 120 µg/ml ไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ สำหรับการศึกษาในเชื้อราและยีสต์ พบว่าไนซินสามารถลดการเจริญได้น้อยและต้องใช้ปริมาณไนซินสูงที่ค่า MIC เท่ากับ 960 µg/ml จากผลการทดลองนี้เห็นได้ว่าไนซินมีผลต่อการลดการเจริญทั้งของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ อีกทั้งยังไม่ทำลายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ความเข้มข้นดังกล่าว ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าไนซินเป็นสารธรรมชาติที่เหมาะสมจะใช้เป็นทางเลือกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพก่อโรคทางผิวหนังที่พบบ่อยในบริเวณพื้นที่เขตร้อน

คำสำคัญ: ไนซิน โรคติดเชื้อทางผิวหนัง ต้านจุลชีพก่อโรคทางผิวหนัง จุลชีพก่อโรคทางผิวหนังที่พบบ่อย

ผู้นิพนธ์หลัก:
ผศ.ดร.นพ.นัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ
ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
420/6 ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
อีเมล์: natthanej.lup@mahidol.ac.th

Antimicrobial activity of nisin on common dermatological pathogens

Watcharamat Muangkaew, Thitinan Kitisin, San Suwanmanee, Yuvadee Mahakunkijcharoen, Natthanej Luplertlop
Departmaent of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

Abstract

Environmental changes and lack of proper medical treatments can induce drug resistant microbes including those from dermatological infections. Therefore, alternative and effective treatments against dermatological pathogens from natural resources and herbs become essential. This study aimed to determine a promising nisin treatment as an alternative way for preventing dermatological infections. Nisin from *Lactococcus lactis* was used for *in vitro* treating common dermatological pathogens usually found in tropical regions including *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus.* The results showed that nisin reduced the growth of *S. aureus* as indicated by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (120 and 1,920 µg/ml, respectively). Moreover, 960 µg/ml of nisin was found to reduce the growth of *T. rubrum* and *C. albicans* as indicated by MIC. In addition, this concentration of nisin 120 µg/ml did not exhibit any effect on fibroblast cells *in vitro*. Therefore, this study demonstrated that nisin can be probably used as an alternative therapeutic agent for treating dermal infection caused by common dermatological pathogens.

Keywords: nisin, dermatological diseases, anti-microbial activity, common dermatological pathogens

Corresponding author:
Natthanej Luplertlop
Departmaent of Microbiology and Immunology,
Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University
420/6 Ratchawithi Road, Ratchathewi, Bangkok 10400
E-mail: natthanej.lup@mahidol.ac.th

บทนำ

จุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนังส่วนใหญ่จะเป็นการติดเชื้อจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus* เช่น *Staphylococcus aureus*[1] และเชื้อราในกลุ่ม *Dermatophytes* เช่น *Trichophytons, Microsporums, Epidermophytons* และ Nondermatophyte เช่น *Candida species*[2] ปัจจุบันการติดเชื้อดังกล่าวมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากเชื้อมีความดื้อยาเพิ่มขึ้นจากการใช้ยาที่ผิดวิธีรวมถึงมีจำนวนผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเพิ่มขึ้น[3] ดังนั้นการใช้ยาเพื่อลดการเพิ่มจำนวนจุลชีพจึงแพร่หลายมากขึ้น ทั้งนี้การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ เดิมจะใช้สารเคมีเข้าไปทำลายโปรตีนและกรดนิวคลีอิกของจุลชีพ ต่อมาพบว่าการใช้ยาในระยะเวลาที่ยาวนาน รวมถึงการใช้ยาที่ผิดวิธีอาจก่อให้เกิดการดื้อยา ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาสารสกัดจากสมุนไพร ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตสารต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา[4] เพิ่มมากขึ้น ตัวอย่างสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ เช่น ฝาง[5] ลูกยอ[6] และใบฟักข้าว[4] เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการค้นพบว่าจุลชีพที่มีอยู่ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ในร่างกายแต่ไม่ก่อให้เกิดโรค ที่เรียกว่า โปรไบโอติก สามารถผลิตกรดแลคติก ซึ่งใช้ป้องกันและรักษาโรคได้ โดยมีพรีไบโอติกซึ่งเป็นกลุ่มคาร์โบไฮเดรตชนิดเฉพาะเรียกว่า โอลิโกแซคคาไรด์ ที่ไม่มีการย่อยสลายและไม่ถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก แต่จะถูกหมักให้ย่อยสลายโดยแบคทีเรียโปรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ ก่อให้เกิดสารต่างๆ มาช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลชีพเหล่านี้ โปรไบโอติกบางชนิด เช่น *Lactococcus lactis* ผลิตแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ช่วยยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหาร[7]

แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีน ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจากเปปไทด์ต้านจุลชีพ ถูกผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้ แบคเทอริโอซินแบ่งตามความสามารถในการยับยั้งได้เป็น 2 ชนิดคือ แบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งในช่วงแคบ สามารถยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดได้ เช่น Lactocin 27[8] และแบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งในช่วงกว้าง จะยับยั้งแบคทีเรียข้ามกลุ่มได้ เช่น ไนซิน[9]

แบคเทอริโอซินผลิตได้ทั้งจากแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ที่สามารถผลิตกรดแลกติก (Lactic acid bacteria, LAB) ในช่วงปีที่ผ่านมาแบคเทอริโอซินจำนวนมากถูกจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติของกรดอะมิโนและการทนต่อความร้อน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มหลัก[10] ประกอบด้วย กลุ่มแลนติไบโอติก เช่น ไนซิน กลุ่มเปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและทนต่อความร้อน เช่น เพดิโอซิน pediocin AcH/PA1 และกลุ่มโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่แต่ไม่ทนต่อความร้อน เช่น เฮลเวทิซิน เจ แบคเทอริโอซินในสองกลุ่มแรก ได้มีการพัฒนาเพื่อใช้ยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร แต่มีเพียงไนซินเพียงชนิดเดียวที่สามารถใช้ในผลผลิตทางอุตสาหกรรม โดยได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหารประเภทสารกันเสีย[10]

ไนซิน เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactococcus latis* เป็นหนึ่งในจีนัสของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก ซึ่งถูกค้นพบในปี 1928 โดย Rogers[11] โดยโครงสร้างของไนซินประกอบด้วยสายเปปไทด์ มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำและมีประจุเป็นบวก สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยรบกวนการสร้างผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียเป้าหมายและทำให้เกิดรูบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane protein)[8] แม้ว่ามีกลุ่มวิจัยหลายกลุ่ม ได้ทำการศึกษาถึงความแตกต่างของโครงสร้าง การสังเคราะห์ และการนำไนซินมาทดสอบฤทธิ์ทางยา และสารอาหารในอุตสาหกรรมอาหาร แต่การศึกษาฤทธิ์ของไนซินในการต่อต้านจุลชีพชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา ยังมีการศึกษาไม่มากนัก

จากข้อมูลเบื้องต้นทีมวิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาถึงศักยภาพในการนำไนซินมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ โดยมุ่งเน้นผลในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพก่อโรคที่พบบ่อยในภูมิภาคเขตร้อน คือ เชื้อรา และแบคทีเรีย ก่อให้เกิดโรคที่ผิวหนัง ได้แก่ *Trichophyton spp., Candida albicans* และ *Staphylococcus aureus* ผลจากการทดลองนี้จะเป็นข้อมูลที่สำคัญในทางวิทยาศาสตร์สำหรับนำไปใช้ในการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทาผิวหนังที่มีคุณสมบัติลดเชื้อราและแบคทีเรีย ก่อโรคบริเวณผิวหนังที่พบบ่อยในภูมิภาคนี้ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของไนซินในการยับยั้งจุลชีพก่อโรคในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อนำไปใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ทาผิวหนังต่อไป

วิธีการศึกษา

1. เตรียมไนซินจาก *Lactobacillus lactis*

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. lactis* subsp. *Lactis* PD 6.9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 ที่มี 0.4% Glucose และนำไปสกัดตามขั้นตอนของ Margarate Alice Fontes Saraiva และคณะ[12]

2. การศึกษาฤทธิ์ของไนซินต่อการมีชีวิต และรูปร่างลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์บน cover glass ใน well ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM+10% FBS ประมาณ 18-24 ชั่วโมง ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ $1x10^7$ cell/ml หลังจากนั้นนำไนซินที่เจือจางแบบ Two-fold dilution ตั้งแต่ความเข้มข้น 1,920 ถึง 5 µg/ml ใส่ลงไปในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เลี้ยงบน cover glass แล้วนำไปบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย PBS ประมาณ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Hemocytometer และดูลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted microscope) รุ่น AE 31 Type 101

3. การทดสอบฤทธิ์ของไนซินต่อแบคทีเรีย โดยการหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

ทำการเจือจางไนซินให้มีความเข้มข้น ดังนี้ 960, 480, 240, 120, 60, 30, 15, 10 และ 5 µg/ml ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ในหลอดทดลอง หลังจากนั้นนำเชื้อ *S. aureus* ที่แยกออกเป็น Isolate colony จำนวน 10 โคโลนี ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และปรับความขุ่นโดยเทียบเท่ากับ No. 0.5 McFarland standard แล้วเติมลงไปในหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นของไนซินต่างๆ กัน โดยมีชุดควบคุมลบคือ หลอดทดลองที่ใส่เชื้อแต่ไม่ได้ใส่ไนซิน กับหลอดทดลองที่ใส่แต่อาหารเลี้ยงเชื้อ ชุดควบคุมบวกคือ หลอดทดลองที่ใส่ยา Penicillin และ Ampicillin จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูความขุ่นในแต่ละหลอดทดลองด้วยตาเปล่าเทียบกับชุดควบคุม ความเข้มข้นของไนซินในหลอดที่ไม่มีความขุ่นจะเป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

จากการหาค่า MIC สามารถนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้หมด (MBC) โดยนำหลอดทดลองจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดไป spread บน plate อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ้าความเข้มข้นของไนซินสามารถฆ่าเชื้อได้จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หากเชื้อไม่ตายจะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. การทดสอบความสามารถของไนซินต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion method

ปรับความขุ่นของเชื้อ *S. aureus* จำนวน 10 โคโลนี โดยเทียบกับ No. 0.5 McFarland standard นำไป streak ให้ทั่วผิวหน้า plate อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar หลังจากนั้นนำกระดาษกรอง ขนาด 6 mm. ที่ปราศจากเชื้อ มาชุบด้วยไนซินความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีชีวิตเหลืออยู่ครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) นำไปวางบน plate บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อปล่อยให้ไนซินแพร่กระจายก่อนที่จะนำไปบ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ใช้ยา Ampicillin 120 µg/disc และ Penicillin 20 µg/disc เป็นชุดควบคุม อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone

5. การทดสอบฤทธิ์ของไนซินต่อเชื้อราและยีสต์โดยการหาค่า MIC

- การเตรียม conidial suspension จากการเลี้ยงเชื้อ *T. rubrum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำ glass bead ที่ปราศจากเชื้อใส่ลงไปและกลิ้งไปมาบนโคโลนีของเชื้อรา จนกระทั่งเส้นใยราแบนราบ เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อและใช้ Pasteur pipette ที่ปราศจากเชื้อ ดูดขึ้นลงจนกระทั่งโคโลนีของเชื้อรากระจายตัว นำ conidial suspension ที่ได้มาปรับความเข้มข้นให้ได้เป็น $4x10^3$ conidia/ml

- การเตรียม *C. albicans* นำยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เป็นเวลา 2 วัน อุณหภูมิ 25°C มาปรับความขุ่นโดยเทียบกับ No.2 McFarland standard

จากนั้นทำการเจือจางไนซินให้มีความเข้มข้นดังนี้ คือ 1,920, 960, 480, 240, 120, 60, 30, 15, 10 และ 5 µg/ml ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose broth ในหลอดทดลอง นำเชื้อราและยีสต์ที่ปรับความขุ่นแล้ว เติมลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอด โดยมีชุดควบคุมลบคือ หลอดทดลองที่ใส่เชื้อแต่ไม่ได้ใส่ไนซิน กับหลอดทดลองที่ใส่แต่อาหารเลี้ยงเชื้อ ชุดควบคุมบวกคือ หลอดทดลองที่ใส่ยา Azole หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C กรณีเป็นยีสต์บ่ม 2 วัน ส่วนเชื้อรา บ่ม 7 วัน การอ่านผลดูความขุ่นด้วยตาเปล่าเทียบกับชุดควบคุม ความเข้มข้นของไนซินในหลอดที่ไม่มีความขุ่นจะเป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

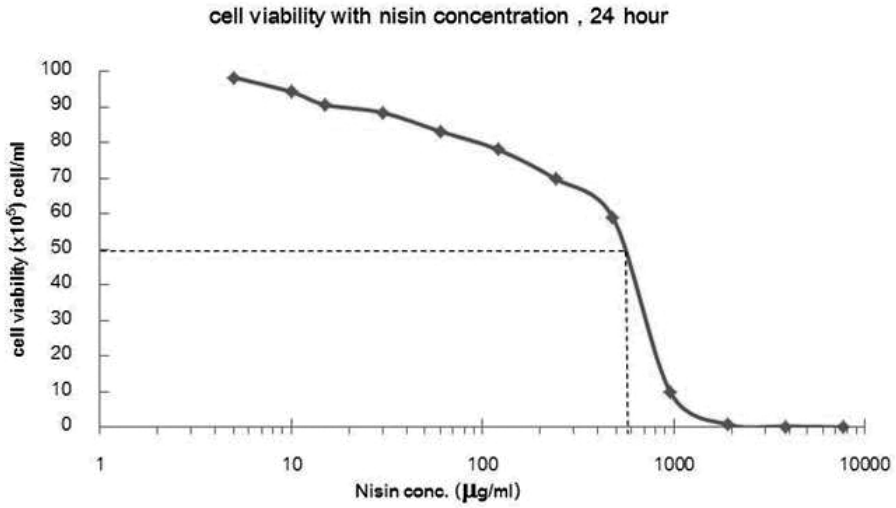
6. การทดสอบความสามารถของไนซินต่อการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ โดยวิธี disc diffusion method

ทำการปรับความขุ่นของเชื้อรา *T. rubrum* และยีสต์ *C. albicans* แล้วนำไป streak ให้ทั่วผิวหน้า plate อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA หลังจากนั้นนำกระดาษกรอง ขนาด 6 mm. ที่ปราศจากเชื้อ มาชุบด้วยไนซิน ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีชีวิตเหลืออยู่ครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) นำไปวางบน plate เชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อปล่อยให้ไนซินแพร่กระจายก่อนจะนำบ่มต่อที่อุณหภูมิ 25°C กรณีเป็นยีสต์ บ่มเป็นเวลา 2 วัน ส่วนเชื้อราบ่มเป็นเวลา 7 วัน ใช้ยา Azole เป็นชุดควบคุม อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone

■ ผลการศึกษา

ผลการทดสอบคุณสมบัติของไนซินต่อการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

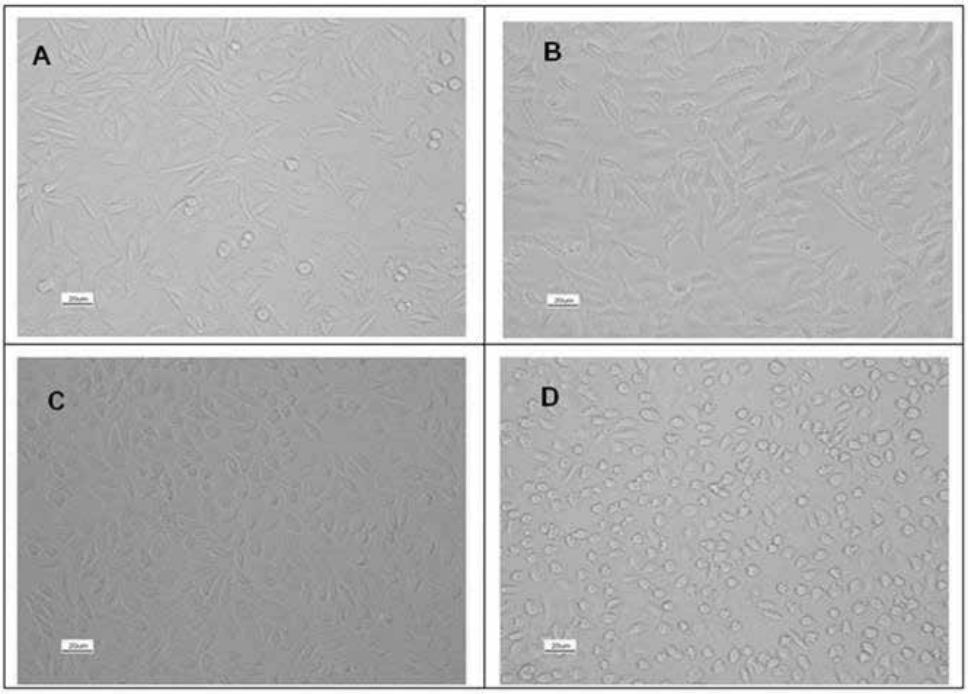
จากการศึกษาคุณสมบัติความเข้มข้นของไนซินต่อการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของไนซินสูงมีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ลดลง เมื่อหาความเข้มข้นของไนซินที่ทำให้เซลล์มีชีวิตเหลืออยู่ครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) จะได้เท่ากับ 550 µg/ml ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนซินกับปริมาณการมีชีวิตของเซลล์

ผลการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและลักษณะการเกาะตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ จากการกระตุ้นด้วยไนซินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของไนซินที่ 120 µg/ml ยังไม่มีผลต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ใส่ไนซิน เซลล์ยังคงมีรูปร่างเป็นรูปกระสวยเช่นเดิม และเซลล์เริ่มหดตัวมากที่ความเข้มข้นของไนซินที่ 960 µg/ml และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างชัดเจนคือ เซลล์เปลี่ยนรูปร่างจากกระสวยเป็นกลม การยึดติดของผิวเซลล์ลดลงมากที่ความเข้มข้น 3,840 µg/ml ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงผลของไนซินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ในหลอดทดลองเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นที่แตกต่างกันที่ 24 ชั่วโมง (A) ไม่ได้ใส่สารสกัดไนซิน (B) ความเข้มข้นของไนซิน 120 µg/ml (C) ความเข้มข้นของไนซิน 960 µg/ml (D) ความเข้มข้นของไนซิน 3,840 µg/ml

ผลการศึกษาฤทธิ์ของไนซินต่อแบคทีเรีย โดยการหาค่า MIC และ MBC

จากการทดสอบฤทธิ์ของไนซินต่อแบคทีเรีย พบว่าไนซินสามารถลดการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ที่ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 120 และ 1,920 µg/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งความเข้นข้นของไนซินที่สามารถลดการเจริญของเชื้อเมื่อเทียบกับ Penicillin และ Ampicillin มีความเข้มข้นสูงกว่ามาก

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ของไนซินต่อการลดการเจริญของเชื้อ *S. aureus*

Substances	*S. aureus* (10 Isolates colony)	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
Penicillin	10	60
Ampicillin	60	240
Nisin	120	1,920

เมื่อศึกษาการลดการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 10 โคโลนี โดยวิธี disc diffusion ที่ความเข้มข้นของไนซินที่ LD_{50} เท่ากับ 550 µg/ml พบว่าทั้ง 10 โคโลนี ให้ผลเหมือนกันคือ สามารถลดการเจริญของเชื้อ จากการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ได้ตั้งแต่ 8.5 ± 0.2 ถึง 9.1 ± 0.5 mm. ซึ่งใกล้เคียงกับผลของ Penicillin ความเข้มข้น 20 µg/disc และ Ampicillin ความเข้มข้น 120 µg/disc วัด inhibition zone ได้เท่ากับ 8.7 ± 0.2 และ 9.1 ± 0.4 mm. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Inhibition zone ของไนซินต่อเชื้อ *S. aureus*

Isolate colony no.	Inhibition zone (mm.)	Isolate colony no.	Inhibition zone (mm.)
1	8.6 ± 0.3	7	8.8 ± 0.3
2	9.1 ± 0.5	8	8.6 ± 0.2
3	8.9 ± 0.3	9	8.9 ± 0.4
4	8.6 ± 0.2	10	8.6 ± 0.3
5	9.0 ± 0.3	Penicillin 20 µg/disc	8.7 ± 0.2
6	8.5 ± 0.2	Ampicillin 120 µg/disc	9.1 ± 0.4

ผลการศึกษาฤทธิ์ของไนซินต่อเชื้อราและยีสต์ โดยการหาค่า MIC

จากการทดสอบฤทธิ์ของไนซินต่อเชื้อราและยีสต์ พบว่าไนซินสามารถลดการเจริญของเชื้อ *T. rubrum* และ *C. albicans* ได้ ที่ MIC เท่ากับ 960 และ 240 µg/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 กล่าวคือ ต้องใช้ความเข้มข้นสูงจึงสามารถลดการเจริญของเชื้อได้เมื่อเทียบกับยา Azole ที่มีค่า MIC เท่ากับ 60 และ 30 µg/ml ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ของไนซินต่อการลดการเจริญของเชื้อราและยีสต์

Pathogen	MIC (µg/ml)		Inhibition zone (mm.)	
	Nisin	Azole drug.	Nisin 550 µg/ml	Azole 30 µg/disc
T. rubrum	960	60	8.2 ± 0.4	19 ± 0.2
C. albicans	240	30	15 ± 0.3	22 ± 0.4

เมื่อศึกษาการลดการเจริญของ *T. rubrum* และ *C. albicans* โดยวิธี disc diffusion ที่ความเข้มข้นของไนซินที่ LD_{50} เท่ากับ 550 µg/ml พบว่า วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ได้เท่ากับ 8.2 ± 0.4 และ 15 ± 0.3 mm. ตามลำดับ ซึ่ง inhibition zone ไม่ใกล้เคียงกับการใช้ยา Azole ความเข้มข้น 30 µg/disc ดังแสดงในตารางที่ 3

จากการทดสอบฤทธิ์ของไนซิน ในการศึกษานี้ พบว่า ไนซินที่ความเข้มข้น 120 µg/ml สามารถลดการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้เทียบเท่ากับประสิทธิภาพของยา Penicillin และ Ampicillin ที่ความเข้มข้น 10 และ 60 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นระดับนี้ของไนซินไม่มีผลต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ แต่ในการทดสอบการลดการเจริญของเชื้อ *T. rubrum* และ *C. albicans* ต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้น คือ 960 และ 240 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งเป็นระดับที่มีผลต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และมีฤทธิ์ต่ำกว่ายา Azole ที่ความเข้มข้น 60 และ 30 µg/ml ตามลำดับ

■ อภิปรายผล

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของไนซินต่อการลดการเจริญของจุลชีพที่ก่อโรคทางผิวหนังและผลต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยจะศึกษาเชื้อ *S. aureus* , *T. rubrum* และ *C. albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคทางผิวหนัง พบว่าจากการทดลองไนซินสามารถลดการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ และปริมาณความเข้มข้นของไนซินที่ใช้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ส่วนเชื้อ *T. rubrum* และ *C. albicans* ไนซินลดการเจริญของเชื้อได้น้อย ต้องใช้ความเข้มข้นของไนซินสูง ซึ่งเป็นความเข้มข้นของไนซินในระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสมใจ ศิริโภค และคณะ[13] ได้ศึกษาแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. lactis* subsp. *Lactis* FFL 17-2 พบว่า สามารถลดการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดี และเมื่อเปรียบเทียบ antibacterial activity กับไนซิน ผลที่ได้สามารถลดการเจริญของ *S. aureus* ได้ประมาณ 75%

ของ commercial nisin ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml และงานวิจัยของคมแข พิลาสมบัติ และคณะ[14] ได้มีการนำไนซินร่วมกับกรดแลกติกไปใช้ในการลดการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ที่ปนเปื้อนจากเนื้อสัตว์ พบว่าสามารถทำลายเชื้อ *Salmonella typhimurium* ได้ที่ 24 ชั่วโมง มากไปกว่านั้นจากผลการศึกษายังพบว่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของ azole มากกว่า nisin เนื่องจากเป้าหมายของยากลุ่ม azole จะจำเพาะต่อการยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและยีสต์มากกว่าไนซิน โดยกลุ่ม azole จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ lanosterol 14α-demethylase เพื่อยับยั้งการเปลี่ยนแปลง lanosterol ไปเป็น ergosterol ซึ่ง ergosterol มีผลต่อการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราและยีสต์ ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและยีสต์ได้ แต่ในส่วนของไนซินจะจำเพาะต่อ peptidoglycan precursor lipid II ซึ่งสามารถยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและยีสต์ได้น้อย[15-17] จากงานวิจัยข้างต้นนี้ทำให้ทราบว่าไนซินสามารถลดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้

ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไนซินไปพัฒนาเป็นยาควบคุมการเจริญของ *S. aureus* ที่ก่อโรคผิวหนัง

สรุปผล

ไนซินน่าจะมีบทบาทในการลดการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ที่ก่อโรคทางผิวหนังและความเข้มข้นที่ใช้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ จากการทดลองไนซินน่าจะนำไปพัฒนาทำเป็นยาทา เวชภัณฑ์ หรือเวชสำอางค์ เพื่อลดการเจริญของเชื้อ *S. aureus*

เอกสารอ้างอิง

1. Weller R, Price RJ, Ormerod AD, et al. Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi, candida and bacterial skin pathogens. J Appl Microbiol 2001;90:648-52.
2. Barry LH. Dermatophyte infections. Am Fam Physician 2003;67(1):101-9.
3. Katarina C, Bryan AS, George JM. Skin microflora and bacterial infections of the skin. Investigative Dermatology Symposium Proceedings 2001;6:170-4.
4. บงกชวรรณ สุตะพาหะ และบรรยง คันธวะ. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดใบฟักข้าว. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2554;44(1):31-7.
5. พรเทพ เต็มรังษี. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อที่แยกจากแผลติดเชื้อ (ปริญญานิพนธ์). ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2554.
6. ทัศนีย์ ปัญจานนท์, กันทิมา ชูแสง และ ธีรกุล อาภรณ์สุวรรณ. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากผลยอ. วารสารสมุนไพร 2548;12(1):19-9.
7. เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล. Probiotic & prebiotic คู่หูกู้วิกฤตโรคในระบบทางเดินอาหารเทคโนโลยีชีวภาพ 2552;203:66-72.
8. Sullivan L, Ross RP, Hill C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie 2002;84(5-6):593-604.
9. Tagg JR, Dajani AS. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol Rev 1976;40:722-56.
10. Jeevaratnam K, Jamuna M, Bawa AS. Biological preservation of foods-bacteriocins of lactic acid bacteria. Biotechnology 2005;4:446-54.
11. Yoneyama F, Fukao M, Zendo T, et al. Biosynthetic characterization and biochemical features of the third natural nisin variant, nisin Q, produced by *Lactococcus lactis* 61-14. J Appl Microbiol 2008;105:1982-90.

12. Margarate AFS, Ingolf FN, Maria CB, et al. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp. Lactis* PD6.9. J Microbiol Antimicrob 2014;6(5):79-87. http://www.academicjournals.org/journal/JMA/article-abstract/0D5D7BF46176
13. สมใจ ศิริโภค, ประวัติ อังประภาพรชัย, ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และคณะ. การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 2550;23(2):92-114.
14. คมแข พิลาสมบัติ และ ผสุดี ตังวัชรินทร์. Effect of bacteriocin and lactic acid on inhibition of *Salmonella typhimurium*. Proceedings of the 4th Meat science and technology; 19 กรกฎาคม 2557; กรุงเทพ:2557. หน้า 95-100.
15. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. Clin Microbiol Rev 1999;2(1):40-79.
16. Wiedemann I, Breukink E, Kuipers OP, et al. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. J Biol Chem 2001;276(3):1772-9.
17. Gut IM, Blanke SR, Ballard JD, et al. Mechanism of inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by the lantibiotic nisin. ACS Chem Biol 2011;6(7):744-52.