รหัสโครงการ BRN 006 G - 52

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นจิก (*Barringtonia acutangula* L. Gaertn)

(Screening of endophytic fungi producing bioactive substances from *Barringtonia acutangula* L. Gaertn.)

ผู้วิจัย

นางสาวสุมาลี เลี่ยมทอง และ นางสาวแน่งน้อย แสงเสน่ห์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

สนับสนุนโดยโครงการเครือข่ายการวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทรัพยากรชีวภาพของประเทศไทย (โครงการ BRN)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นจิก ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากโครงการเครือข่ายการวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทรัพยากรชีวภาพของประเทศไทย (โครงการ BRN) เป็นจำนวนเงิน 140,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย ตั้งแต่ วันที่ 1 สิงหาคม 2552 ถึง วันที่ 30 กรกฎาคม 2553 รวม 12 เดือน คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณนางสาวจำเนียร กิ้วเส้ง นางสาวจีรภา ปราบไกรยี และนางสาวจิรภา ลำดับพังศ์ ที่มีส่วนร่วมในการทำงานวิจัย จนงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ศ.ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล และ ดร.เยาวภา สุขพรมา ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการสกัดสาร ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบ NMR ของสารสกัด พร้อมทั้งให้การสนับสนุนแผ่น TLC

ขอขอบคุณอาจารย์โสภนา วงศ์ทอง คณะวิทยาศาสตร์และทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบลักษณะสัณฐานทางวิทยาของราเอนโด-ไฟท์

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อ รศ.ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์รับเป็นอาจารย์พี่เลี้ยงงานวิจัย และให้ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ จนทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กุมภาพันธ์ 2555

บทคัดย่อ

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากใบ ก้านใบ และกิ่งของต้นจิก (*Barringtonia acutangula* L. Gaertn) จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ชุมพร และสุราษฎร์ธานี พบว่า เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อของราเอนโดไฟท์จำนวน 392 ไอโซเลตที่แยกได้ ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในคน 7 ชนิด คือ *Staphylococus aureus* ATCC25923, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC25922, *Candida albicans* ATCC90028, *Cryptococcus neoformans* ATCC90012 และ *Microsporum gypseum* มีเชื้อราจำนวน 182 ไอโซเลต (46.4%) ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด โดยยับยั้ง *P. aeruginosa* ATCC27853 ได้มากที่สุด จำนวน 119 ไอโซเลต (30.4%) รองลงมาคือ *S. aureus* ATCC25923 และ MRSA จำนวน 46 และ 38 ไอโซเลต (11.7 และ 9.7 %) และยับยั้งจุลินทรีย์ที่เหลือได้น้อย (0.5-3.8%) เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อราและเส้นใยราที่มีฤทธิ์ในการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อไปสกัดสารด้วยตัวทำละลาย แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์กับจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งจากการทดสอบกับน้ำเลี้ยงเชื้อรา พบว่ามีสารสกัดหยาบจำนวน 174 สารจากสารสกัดหยาบทั้งหมด 443 สาร (39.3%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml โดยมีสารสกัดหยาบที่ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิด ดังนี้คือ สารสกัด C57CH สำหรับ *C. neoformans* (MIC = 0.5 µg/ml) สารสกัด S4CH, S12CH, S16CH และ S28CH สำหรับ C.. *albicans* (MIC = 0.5 µg/ml) สารสกัด C9CH สำหรับ *S. aureus* (MIC = 16 µg/ml) สารสกัด N76CE และ C3CH สำหรับ MRSA (MIC = 32 µg/ml) สารสกัด N45BE สำหรับ *P. aeruginosa* (MIC = 4 µg/ml) สารสกัด C60BE, C60CE และ S35BE สำหรับ *E. coli* (MIC = 200 µg/ml) สารสกัด S52BE และ C52CH สำหรับ *M. gypseum* (MIC = 200 µg/ml) มีสารสกัดเพียง 1.13% ที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ที่ทดสอบ เมื่อนำสารสกัดที่ให้ค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 128 µg/ml และมีปริมาณสารเหลือมากกว่า 2.5 mg จำนวน 20 สาร ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ และ $OH^{\cdot}$ และบันทึกข้อมูล ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR พบว่าสารสกัดทุกสารมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล $OH^{\cdot}$ (IC_{50} = 0.02-2.80 mg/ml) และสารสกัด 14 สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล $DPPH^{\cdot}$ (IC_{50}= 0.03-0.24 mg/ml) สารสกัดหยาบ 2 สาร เป็นสารบริสุทธิ์ คือ S12BE เป็นสาร abscisic acid และ S28BE เป็นอนุพันธ์ของสารประเภท isochromanone เชื้อราเอนโดไฟท์ 38 ไอโซเลต ที่ให้สารสกัดหยาบที่มีค่า MIC ต่อจุลินทรีย์ก่อโรค ≤ 128 µg/ml ส่วนใหญ่เป็นราที่จัดอยู่ในกลุ่ม mycelia sterilia (76.3%) ส่วนราที่เหลือจัดอยู่ในกลุ่ม *Pennicillium* sp.

และ *Colletotrichum* sp กลุ่มละ 2 ไอโซเลต *Xylaria* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Sporothrix* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ชนิดละ 1 ไอโซเลต

จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงว่าราเอนโดไฟท์จากต้นจิก เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญภาพ	vii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	3
วิธีการทดลอง	4
ผลการทดลอง	17
วิจารณ์ผลการทดลอง	79
สรุปผลการทดลอง	86
เอกสารอ้างอิง	88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างต้นจิก ที่นำมาแยกราเอนโดไฟท์	4
2	จำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นจิก	17
3	ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	20
4	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามส่วนของพืชที่นำมาแยกเชื้อ	22
5	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรค	23
6	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบโดยวิธี agar disc diffusion	25
7	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากต้นจิก จังหวัดนครศรีธรรมราช ทดสอบโดยวิธี agar diffusion	27
8	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากต้นจิก จังหวัดชุมพร ทดสอบโดยวิธี agar diffusion	32
9	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ที่แยกได้จากต้นจิก จังหวัดสุราษฎร์ธานี ทดสอบโดยวิธี agar diffusion	35
10	น้ำหนักสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์	38
11	ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ที่ระดับความเข้มข้น 200 μg/ml	43
12	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 4 μg/ml โดยวิธี broth microdilution	46
13	ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานและช่วงค่า MIC ของสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบโดยวิธี broth microdilution	47
14	ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ทดสอบโดยวิธี broth microdilution	50
15	ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ จากจังหวัดชุมพร ทดสอบโดยวิธี broth microdilution	54

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ทดสอบโดยวิธี broth microdilution	57
17	สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุด	59
18	ค่า MIC และ MBC หรือ MFC ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบ	60
19	โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟท์จากต้นจิกที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับหรือต่ำกว่า 128 μg/ml	61
20	ข้อมูลสารสกัดหยาบจากต้นจิกที่ส่งบันทึกข้อมูล ^{1}H- NMR	65
21	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์	68
22	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ที่ให้สารสกัดหยาบที่ให้ค่า MIC ต่อจุลินทรีย์ก่อโรค ≤ 128 μg/ml	70

สารบัญภาพ

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างใบและกิ่งของต้นจิก	5
2	ตำแหน่งการตัดชิ้นส่วนตัวอย่างจากใบพืชเพื่อใช้ในการแยกราเอนโดไฟท์	5
3	ตัวอย่างราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืช	6
4	ตัวอย่างราเอนโดไฟท์ที่แยกได้	7
5	การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว	8
6	แผนภาพการสกัดสารทางเคมีของราเอนโดไฟท์ ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	10
7	เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นจิก จำแนกตามจังหวัด	18
8	เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นจิก จำแนกตามส่วนของพืช	18
9	การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี agar well diffusion	19
10	เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ จำแนกตามจังหวัด	20
11	เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ จำแนกตามจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	21
12	เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ จำแนกตามส่วนของพืชที่นำมาแยกเชื้อ	22
13	เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรค	24
14	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 μg/ml จำแนกตามชนิดของสารสกัดหยาบ	44
15	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 μg/ml จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	45
16	สูตรโครงสร้างของ abscisic acid จากสารสกัด S12BE	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
17	สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ของสารประเภท isochromanone จากสารสกัด S34BE	66
18	ตัวอย่างโคโลนีของราเอนโดไฟท์ที่ไม่มีการสร้าง conidia (mycelia sterilia)	72
19	ลักษณะโคโลนีและstomata ของราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp.	75
20	ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* sp.	76
21	ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp.	76
22	ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์ *Acremonium* sp.	77
23	ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์ *Sporothrix* sp.	77
24	ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* sp.	77
25	ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์ *Penicillium* sp.	78