การคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากต้นมันปู

ปาณิสรา ว่องพรรณงาม

เสนอต่อมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

SCREENING OF ENDOPHYTIC FUNGI PRODUCING ANTIMICROBIAL SUBSTANCES FROM GLOCHIDION WALLICHIANUM MÜLL.ARG.

PANISARA WONGPUN-NGAM

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science in Science Education
Nakhon Si Thammarat Rajabhat University
Academic Year 2012

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากต้นมันปู

ผู้วิจัย นางปาณิสรา ว่องพรรณงาม

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ศึกษา

คณะอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

..... ประธาน

(ดร.สุมาลี เลี่ยมทอง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร สุทิน)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภวรรณ พรหมเพรา)

..... กรรมการ

(ดร.สุมาลี เลี่ยมทอง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร สุทิน)

..... กรรมการ

(ดร.สายใจ วัฒนเสน)

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ไว้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปัญญา เลิศไกร) (อาจารย์สมพงค์ เหมือนเพชร)

ผู้อำนวยการสำนักงานคณะกรรมการบัณฑิตศึกษา ผู้อำนวยการสำนักส่งเสริมวิชาการและงานทะเบียน

วันที่ 23 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2555

บทคัดย่อ

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากต้นมันปู
ผู้วิจัย	นางปาณิสรา ว่องพรรณงาม
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ศึกษา
ประธานอาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สุมาลี เลี่ยมทอง
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร สุทิน

ราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในพืชหลายชนิดเป็นแหล่งสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกราเอนโดไฟท์จากใบมันปูที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างใบและกิ่งมันปู ได้ทั้งหมด 208 ไอโซเลต เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไทอายุ 3 สัปดาห์ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค 7 ชนิด (Staphylococus aureus ATCC25923, Methicillin resistant S. aureus SK1, Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, Escherichia coli ATCC25922, Candida albicans ATCC90028, Cryptococcus neoformmans ATCC90112) และ Microsporum gypseum โดยวิธี agar well diffusion พบราเอนโดไฟท์ 36 ไอโซเลต (17.3%) ที่สามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคอย่างน้อย 1 ชนิด เมื่อทำการแยกสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์จากการทดสอบเบื้องต้นด้วยตัวทำละลายทางเคมี และนำไปทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี microdilution broth พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ 20 ไอโซเลต จำนวน 31 สารสกัด จากจำนวนทั้งหมด 84 สาร (36.9%) ให้ค่า MIC $\leq$ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้ค่า MIC ต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ S. aureus ATCC25923, MRSA SK1, P. aeruginosa ATCC27853, C. albican ATCC90028, C. neoformmans ATCC90112 และ M. gypseum เท่ากับ 32, 200, 200, 4, 32 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์จากต้นมันปูเป็นอีกแหล่งที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี ที่อาจนำไปใช้ควบคุมปัญหาโรคติดเชื้อในคนได้

ABSTRACT

The Title	Screening of Endophytic Fungi Producing Antimicrobial Substances from Glochidion wallichianum Müll.Arg.
The Author	Mrs.Panisara Wongpun-ngam
Program	Science Education
Thesis Chairman	Dr.Sumalee Liamthong
Thesis Advisors	Assistant Professor Dr.Supaporn Sutin

Endophytic fungi that reside within several kinds of plants have been recognized as potential sources of bioactive substances. The aim of this study was to screen for endophytic fungi producing antimicrobial substances from Glochidion wallichianum. A total of 208 isolates endophytic fungi were obtained from leaves and branches of G. wallichaianum. Three week old fermentation broth of endophytic fungi were tested for antimicrobial activity against 7 human pathogens (Staphylococcus aureus ATCC25923, Methicillin resistant S. aureus SK1, Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, Escherichia coli ATCC25922, Candida albicans ATCC90028, Cryptococus neoformans ATCC90112) and Microsporum gypseum using agar well diffusion method. Thirty-six isolates (17.3%) inhibited at least 1 type of pathogen. Fermentation broth and cells of active endophyte were further extracted with chemical agents and tested for MIC using the microdilution broth method. The results show that 31 of the total of 84 crude extracts (36.9%) from 20 isolates produced an MIC $\leq$ 200 µg/ml. The lowest MIC for S. aureus ATCC25923, MRSA SK1, P. aeruginosa ATCC27853, C. albicans ATCC90028, C. neoformans ATCC90012 and M. gypseum were 32, 200, 200, 4, 32 and 8 µg/ml respectively. This study indicates that endophytic fungi from G. wallichianum are a potential sources of antimicrobial substances that might assist in the control of infectious diseases in humans.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาของ ดร.สุมาลี เลี่ยมทอง ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร สุทิน กรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภวรรณ พรหมเพรา ดร.หัสชัย และ ดร.เอมอร สิทธิรักษ์ ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านที่ให้คำปรึกษาและแนะนำข้อคิดเห็นที่มีคุณค่า รวมทั้งให้การสนับสนุนตลอดระยะเวลาในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาเป็นอย่างดีและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ นางสาวรัตนาภรณ์ เขียวบรรจง ผู้อำนวยการโรงเรียนเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ นครศรีธรรมราช คณะครูและนักเรียนทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการศึกษาระดับปริญญาโท และการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ นางสาวจำเนียร กิ้วเส้ง และบุคลากรศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ทุกท่านที่กรุณาให้ความร่วมมือ ช่วยเหลือและสนับสนุน ตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัย

ขอบคุณเพื่อนนักศึกษาปริญญาโทสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษาทุกท่าน และครอบครัวว่องพรรณงาม ที่ร่วมทุกข์ร่วมสุข คอยช่วยเหลือ สนับสนุน และเป็นกำลังใจให้ซึ่งกันและกัน

ประโยชน์และคุณค่าอันพึงมีของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาแด่บิดา มารดา บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ปาณิสรา ว่องพรรณงาม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญภาพ ..... ช

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

กรอบแนวคิดในการวิจัย 2

สมมติฐานของการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

นิยามศัพท์เฉพาะ 3

ประโยชน์ของการวิจัย 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

ราเอนโดไฟท์ 4

ความหมายของราเอนโดไฟท์ 4

ลักษณะเฉพาะของราเอนโดไฟท์ 6

การกระจายของราเอนโดไฟท์ 6

บทบาททางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่มีต่อพืชอาศัย 7

ต้นมันปู 19

3 วิธีดำเนินการวิจัย 23

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง 23

เครื่องมือดำเนินการวิจัย 23

บทที่ **หน้า**

วิธีดำเนินการวิจัย 26
สถิติที่ใช้ในการวิจัย 45

4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 46
ผลการแยกราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู 46
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้นของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ 50
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ 60
ผลการจำแนกราเอนโดไฟท์ โดยใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา 79

5 สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ 90
สรุปผลการทดลอง 90
อภิปรายผลการทดลอง 92
ข้อเสนอแนะ 99

บรรณานุกรม 100

ประวัติผู้วิจัย 111

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 จำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของต้นมันปู ที่เก็บจากอำเภอต่างๆ 48

2 ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ อายุ 3 สัปดาห์ ที่แยกได้จากต้นมันปู ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion 51

3 ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะ 54

4 จำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้น จากส่วนต่างๆ ของพืช จำแนกตามอำเภอที่ทำการเก็บตัวอย่าง 55

5 จำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้น จำแนกตามชนิดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ 59

6 ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ของต้นมันปู 61

7 ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงรา เปรียบเทียบกับ สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ของต้นมันปู 71

8 จำนวนไอโซเลต จำนวนสารสกัด และค่า MIC ของราเอนโดไฟท์ ที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากต้นมันปู 77

9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ 86

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 ลักษณะการเจริญของราเอนโดไฟท์ (Neotyphodium coenophialum) ในเนื้อเยื่อใบของหญ้า Tall fescue (Festuca arundinacea) 5
2 การกระจายของราเอนโดไฟท์ในช่วงสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 7
3 ช่วงชีวิตของราเอนโดไฟท์ Beauveria bassiana (SPCL 03047) 15
4 ช่วงชีวิตของราเอนโดไฟท์ Clonostachys rosea (SPCL 03062) 15
5 ต้นมันปูจากอำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช 20
6 กิ่งและใบของต้นมันปู 21
7 กิ่งและใบของต้นมันปูที่มีลักษณะสมบูรณ์ 26
8 ส่วนต่างๆ ของต้นมันปูที่ทำการแยกตัวอย่าง 27
9 การวางชิ้นส่วนใบของต้นมันปูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่เติมยาปฏิชีวนะ penicillin G และ streptomycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร 27
10 ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้บริสุทธิ์ 28
11 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว PDB 29
12 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ 29
13 ตัวอย่างน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่เตรียมทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น 30
14 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 31
15 การเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคลงในอาหารเหลว 32
16 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมได้ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 ชั่วโมง 32
17 การปรับความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ 33
18 การลงเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 33
19 การเจาะวุ้นอาหาร จำนวน 17 หลุม ด้วยปลายจับของพาสเจอร์ปิเปต 34
20 การหยดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ลงในอาหารวุ้นที่เจาะ 34
21 ชุดควบคุมทดสอบฤทธิ์ต้าน E. coli ATCC25922 ด้วยแผ่นยาปฏิชีวนะ Gentamicin 10 ไมโครกรัม/แผ่น 35

ภาพที่ **หน้า**

22 การเจาะอาหารรอบขอบโคโลนีของรา Microsporum gypseum 35
23 ตัวอย่างน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ อายุ 3 สัปดาห์ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในเบื้องต้น..... 37
24 การกรองแยกเส้นใยราออกจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ 37
25 ขั้นตอนการสกัดน้ำเลี้ยงและเส้นใยราเอนโดไฟท์
ด้วยตัวทำละลายทางเคมีชนิดต่างๆ 38
26 การกรองน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl cetate..... 39
27 การนำสารละลายที่ได้จากน้ำเลี้ยงราไปทำให้แห้ง
ด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน 39
28 การแช่เส้นใยราเอนโดไฟท์ในตัวทำละลาย methanol..... 40
29 การสกัดเส้นใยราเอนโดไฟท์ด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate..... 40
30 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA (slide culture) 45
31 ตัวอย่างราเอนโดไฟท์ที่แยกได้บริสุทธิ์จากต้นมันปู
ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน 46
32 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นมันปู จำแนกตามพื้นที่เก็บตัวอย่าง..... 49
33 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นมันปู
จำแนกตามส่วนของพืชที่นำมาแยกเชื้อ..... 49
34 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น
จำแนกตามพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง..... 56
35 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น
จำแนกตามส่วนต่างๆ ของต้นมันปูที่นำมาแยกราเอนโดไฟท์..... 56
36 Inhibition zone ที่ได้จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้น
ของราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู ด้วยวิธี agar well diffusion..... 57
37 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น
จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ..... 60
38 จำนวนสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์
จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ..... 78
39 ร้อยละของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ จำแนกตามชนิดของสารสกัด..... 78
40 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต PL – B1.2 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA
ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์..... 79

ภาพที่ **หน้า**

41 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต PL – B3.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 80
42 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต PL – B3.2 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 80
43 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต PL – B3.5 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 81
44 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต PL – P3.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 81
45 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต CT – P3.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 82
46 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต LT – B2.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 82
47 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต NB – B3.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 83
48 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต NB – M3.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 83
49 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต GP – P1.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 84
50 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต PL – P2.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 84
51 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต CT – M1.3 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 85

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาการระบาดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในปัจจุบัน ได้มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และกลายเป็นปัญหาให้กับวงการแพทย์ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยเป็นอย่างมาก ซึ่งปัญหาเชื้อดื้อยาเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาอื่นๆ ตามมา เช่น ทำให้โอกาสการรักษาที่จะได้ ผลดีมีน้อยลงไป ทำให้เกิดภาวะโรคแทรกซ้อนได้ง่าย เกิดความล่าช้าและยุ่งยากในการรักษา และทำให้อัตราการเสียชีวิตเพิ่มสูงขึ้น รวมถึงปัญหาทางเศรษฐกิจ เช่น ค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลที่สูงขึ้นเพราะต้องใช้ยาราคาแพง ผู้ป่วยต้องพักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานานและยังก่อให้เกิดความยากลำบากแก่แพทย์ในการเลือกยาที่ส่งผลดีต่อการรักษา ซึ่งบางครั้งจำเป็นต้องใช้ยาที่มีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น โดยปัญหาเชื้อดื้อยาพบได้บ่อยในยาปฏิชีวนะหรือยาฆ่าเชื้อ (antibiotics) ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะโรคติดเชื้อทางเดินหายใจต่างๆ แต่มักมีผู้ใช้ยานี้ในทางที่ไม่เหมาะสม เช่น นำไปรักษาโรคหวัดที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งไม่สามารถรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะ จากปัญหาดังกล่าวทำให้ความต้องการสารต้านจุลินทรีย์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ เพิ่มสูงขึ้น เพื่อลดภาวะเชื้อดื้อยาอันเป็นปัญหาสำคัญในระบบสาธารณสุขของประเทศไทยในปัจจุบัน

ประเทศไทยจัดเป็นดินแดนที่มีความหลากหลายในทรัพยากรธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจากกลุ่มเชื้อราที่เป็นแหล่งทรัพยากรที่น่าสนใจในด้านการค้นหาสารต้านจุลินทรีย์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ประมาณการว่าจำนวนรามี 1.5 ล้านชนิด (species) แต่จำนวนราที่ศึกษามีเพียง 50,000 ชนิด ดังนั้นจึงมีราอย่างน้อย 1 ล้านชนิดที่ยังไม่มีการค้นพบ (Hawksworth & Rossman, 1997) ซึ่งน่าจะเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ อีกเป็นจำนวนมาก

ราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi) เป็นราที่เจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตในลักษณะพึ่งพาอาศัยกัน (mutualistic symbiosis) โดยพืชจะเป็นแหล่งที่อยู่และให้อาหารแก่เชื้อรา ในขณะที่เชื้อราจะผลิตสารออกมาเพื่อป้องกันตัวเองจากศัตรูพืช สัตว์ แมลง และจุลินทรีย์ ซึ่งพืชจะได้ประโยชน์ร่วมด้วย (Huang et at., 2001) มีรายงานการศึกษาพบว่า 27 – 51% ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากราเอนโดไฟท์เป็นสารใหม่ (Schulz et al., 2002; Strobel et al., 2003) โดยสารที่สกัดจากราดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย

ยับยั้งการอักเสบ เป็นสารต้านมะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ ลดปริมาณน้ำตาลในเลือดและฤทธิ์อื่นๆ (Strobel et al., 1993; Sterile et al., 1993; Strobel et al., 1996; Strobel et al., 1999; Li et al., 2001; Strobel, 2003; Strobel & Daisy, 2003)

มันปู (Glochidion wallichianum Müll.Arg.) จัดอยู่ในแฟมิลี่ Euphorbiaceae เป็นพืชธรรมชาติ เกิดตามที่ราบเชิงเขาในท้องถิ่นภาคใต้ของไทย โดยชาวบ้านนิยมนำยอดมันปูมารับประทานเป็นผักสด เนื่องจากมีรายงานว่าพืชหลายชนิดในแฟมิลี่ Euphorbiaceae สามารถสร้างสาร Labaditin ซึ่งเป็นสารกลุ่มเพปไทด์ชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Barbosa et al., 2011) และสารหลายชนิดที่สร้างจากพืช Mallotus sp. แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านไวรัส และฤทธิ์ที่เป็นพิษต่อเซลล์ (Riviere et al., 2010)

ดังนั้นการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากต้นมันปู จึงน่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ที่มีประโยชน์ในทางการเกษตร อุตสาหกรรมการผลิตยาทางเภสัชกรรม และทางการแพทย์เป็นอย่างยิ่ง (Bacon & White, 2000; Strobel & Daisy, 2003)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู
3. เพื่อจำแนกชนิดราเอนโดไฟท์จากต้นมันปูที่มีศักยภาพที่ดีในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

กรอบแนวคิดในการวิจัย

ราเอนโดไฟท์ เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด การศึกษาครั้งนี้เพื่อคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในคน โดยแยกราเอนโดไฟท์จากต้นมันปูในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช กระบี่ และพัทลุง นำราเอนโดไฟท์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันไปศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงเชื้อ และสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยรา โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ยีสต์และรา จากนั้นจึงนำราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีไปจำแนกชนิดของราโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าจะสามารถตรวจพบราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากต้นมันปู ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ การเกษตร อุตสาหกรรม และพัฒนาให้เกิดคุณค่าทางเศรษฐกิจต่อไปในอนาคตได้

สมมติฐานของการวิจัย

ราเอนโดไฟท์จากต้นมันปูสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้

ขอบเขตของการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร คือ ต้นมันปู โดยการสุ่มตัวอย่างต้นมันปูจากอำเภอเมือง อำเภอเฉลิมพระเกียรติ อำเภอนาบอน จังหวัดนครศรีธรรมราช จากอำเภอลำทับ อำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่ และอำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง อำเภอละ 1 ต้นๆ ละ 3 กิ่งและ 3 ใบ

ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา

1. ตัวแปรต้นคือ ราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู
2. ตัวแปรตามคือ สารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ระยะเวลาในการทดลอง คือ เดือนพฤศจิกายน 2552 – เดือนตุลาคม 2553

สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในช่องว่างภายในเซลล์ของลำต้น ก้านใบ รากและใบของพืชแบบ symbiosis โดยไม่ทำให้เกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติแก่พืชนั้นๆ แต่จะผลิตสารออกมาเพื่อป้องกันตัวเองจากศัตรูพืช สัตว์ แมลง หรือจุลินทรีย์ ซึ่งพืชได้รับประโยชน์ด้วย

2. สารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (antimicrobial substances) คือ สารที่ได้จากธรรมชาติ อาจได้จากสัตว์ พืช หรือจุลินทรีย์ รวมถึงผลผลิตที่ได้จากเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง และมีผลในการทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยใช้สารในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น

ประโยชน์ของการวิจัย

1. ทราบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และราของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู
2. ทราบชนิดของราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีประสิทธิภาพสูง
3. อนุรักษ์สายพันธุ์ราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ สำหรับการศึกษาวิจัยและการตรวจกรองหาสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่อาจมีประโยชน์ทางด้านการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

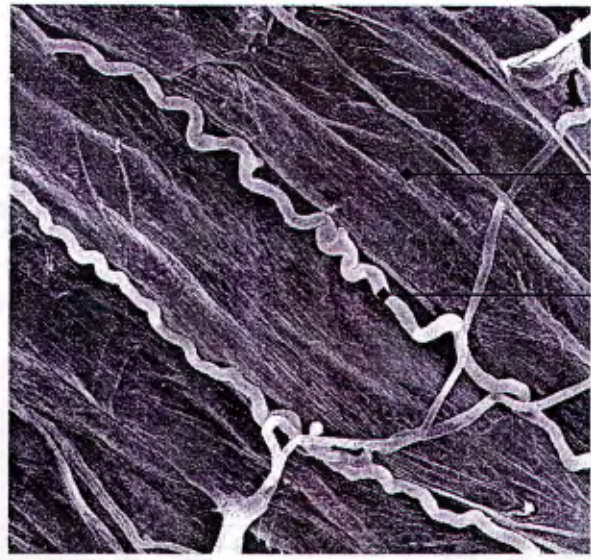
ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากต้นมันปู ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง โดยนำเสนอตามลำดับดังนี้

1. ราเอนโดไฟท์
   1.1 ความหมายของราเอนโดไฟท์
   1.2 ลักษณะเฉพาะของราเอนโดไฟท์
   1.3 การกระจายของราเอนโดไฟท์
   1.4 บทบาททางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่มีต่อพืชอาศัย
      1.4.1 ราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
      1.4.2 ราเอนโดไฟท์ทำหน้าที่เป็นจุลินทรีย์คุ้มครองพืช
      1.4.3 ราเอนโดไฟท์กับการควบคุมราและแบคทีเรียก่อโรคพืช
2. ต้นมันปู

ราเอนโดไฟท์

ความหมายของราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi)

ในปี ค.ศ. 1866 Heinrich Anton De Bary ได้ใช้คำว่า “endophyte” เป็นครั้งแรก (Susan, 1992; Ghimire & Hyde, 2008) โดยคำว่า “endo” มาจากภาษากรีก “endon” ที่แปลว่าภายใน รวมกับคำว่า “phyte” มาจาก “phyton” ที่แปลว่า พืช (Chanway, 2002) ดังนั้นเอนโดไฟท์จึงหมายถึงจุลินทรีย์ใดๆ ที่ในช่วงหนึ่งหรือตลอดชีวิตอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืช บริเวณลำต้น กิ่ง ใบและส่วนต่างๆ ของพืช (ภาพที่ 1) โดยที่ไม่ก่อให้เกิดโรคต่อพืชอาศัย (Petrini, 1991; Wilson, 1995)



ภาพที่ 1 ลักษณะการเจริญของราเอนโดไฟท์ (Neotyphodium coenophialum) ในเนื้อเยื่อใบของหญ้า tall fescue (Festuca arundinacea)

ที่มา: www.pubs.caes.uga.edu/caespubs/pubcd/B1351/B1351.htm

ราเอนโดไฟท์พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น หญ้า สาหร่าย ไม้ยืนต้น ทั้งไม้ผลัดใบและไม้ไม่ผลัดใบ ไม้พุ่ม รวมทั้งไม้สมุนไพร (Strobel et al., 2002; Davis et al., 2003; Jordaan et al., 2006) ซึ่งราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยแบบพึ่งพาอาศัยกัน (mutualistic symbiosis) (Huang et at., 2001) โดยพืชให้ที่อยู่อาศัยและเป็นแหล่งอาหารแก่ราเอนโดไฟท์ ในขณะเดียวกันราเอนโดไฟท์จะสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ให้แก่พืชหลายประการ เช่น

1. สร้างสารพิษในพืชเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของแมลงและไส้เดือนฝอย (Elmi et al., 2000; Bush et al., 1997; Schardl & Phillips, 1997; Breen, 1994; Clement et al., 1994; West et al., 1988)

2. สร้างสารปฏิชีวนะที่มีผลต้านแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคในคนและพืช (Wicklow et al., 2005; Dingle & McGee, 2003; Walters, 2000; Franco & Coutinho, 1991; White & Cole, 1986)

3. ช่วยให้พืชมีความทนทานต่อความเครียด ทั้งทางชีวภาพและกายภาพ (Bacon & White, 2000)

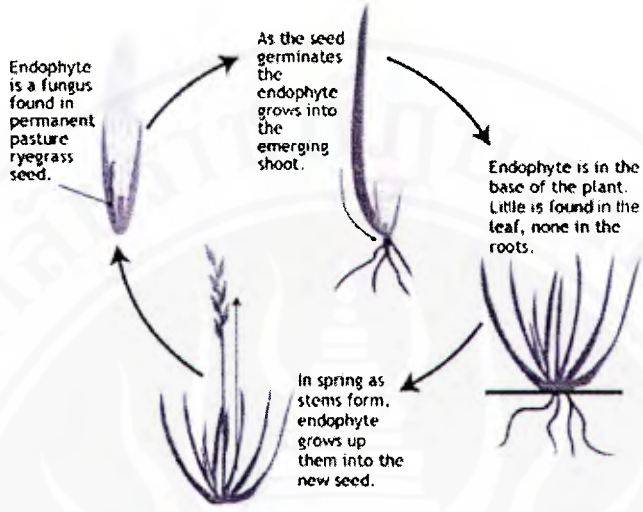
ในปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับกันว่า ราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญทางด้านการแพทย์ การเกษตร และทางอุตสาหกรรม (Azevedo et al., 2000; Lu et al., 2000; Huang et al., 2001; Tan & Zou, 2001; Strobel, 2003; Strobel & Daisy, 2003; Strobel et al., 2004; Ma et al., 2004)

ลักษณะเฉพาะของราเอนโดไฟท์

ราเอนโดไฟท์มีความแตกต่างจากจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช (pathogen) ซึ่งมีรูปแบบการเข้าทำลายพืชแตกต่างกัน โดยจุลินทรีย์ก่อโรคพืชบางชนิดสร้างสารพิษออกมาเพื่อทำลายเนื้อเยื่อของพืชอาศัย เรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า necrotroph ในขณะที่บางชนิดเจริญอยู่บนพื้นผิวของพืชจะจัดอยู่ในกลุ่ม epiphytes และจุลินทรีย์ที่เจริญบนซากพืชที่ตายแล้วจัดเป็นกลุ่ม saprophytes ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ล้วนก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชทั้งสิ้น ในอดีตได้จัดจุลินทรีย์ที่มีรูปแบบการดำรงชีพที่คล้ายกับราเอนโดไฟท์คือ mycorhiza ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ทั้งภายในพืชและบริเวณรอบๆ รากของพืชไว้ในกลุ่มของราเอนโดไฟท์ แต่ในปัจจุบันได้จัดจุลินทรีย์กลุ่มนี้แยกออกมาจากกลุ่มของราเอนโดไฟท์ เนื่องจากมีโครงสร้างบางส่วนของเส้นใย (hyphae) เจริญปกคลุมอยู่รอบๆ รากของพืช (ไม่ได้อยู่ในเซลล์ของพืชทั้งหมด) และจุลินทรีย์อีกกลุ่มที่รู้จักกันดี คือ Rhizobium ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการตรึงก๊าซไนโตรเจนอิสระในอากาศให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย (NH_3) หรือกรดอะมิโน (เช่น alanine) แต่การอาศัยของ Rhizobium ในรากพืช ส่งผลทำให้รากพืชเกิดการเปลี่ยนแปลงคือทำให้เกิดปมราก (nodule) ขึ้นมา จากความผิดปกติที่เกิดขึ้นจึงแยกศึกษาจุลินทรีย์ชนิดนี้ออกจากราเอนโดไฟท์ (นคร หน่อแก้ว, 2547)

การกระจายของราเอนโดไฟท์

การกระจายของราเอนโดไฟท์เกิดขึ้นได้ใน 2 ลักษณะ ขึ้นอยู่กับระยะการสืบพันธุ์ของราเอนโดไฟท์กล่าวคือ การกระจายของราเอนโดไฟท์จากพืชชนิดหนึ่งไปสู่พืชชนิดเดียวกันในพื้นที่ต่างกัน โดยอาศัยปัจจัยทางธรรมชาติ เช่น ลม สัตว์พาหะต่างๆ แมลง นก เป็นต้น จะเกิดขึ้นในช่วงที่ราเอนโดไฟท์มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า horizontal transmission และการกระจายอีกลักษณะหนึ่งเป็นการกระจายของราเอนโดไฟท์ในพืชจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง โดยการพัฒนาผ่านเมล็ดและเจริญพร้อมกับการงอกของเมล็ดต่อไป โดยราเอนโดไฟท์ที่มีการกระจายแบบนี้จะอยู่ในช่วงสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) เรียกกระบวนการนี้ว่า vertical transmission (ภาพที่ 2) (Schardl & Phillips, 1997; Bayman et al.,1998; Clay, 2004)



ภาพที่ 2 การกระจายของราเอนโดไฟท์ในช่วงสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

ที่มา: www.agriseeds.co.nz/.../endophyte-summary.html

บทบาททางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่มีต่อพืชอาศัย

1. ราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชต่างๆ สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antibiotics) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) (Strobel et al., 2002; strobel & Daisy, 2003; Lu et al.,2000) เช่น ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้น yew (Taxus brevifolia) สามารถสร้างสาร taxol ซึ่งเป็นสารกลุ่ม diterpenoid ที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง (anticancer) (Schiff & Horowita, 1980; Suffness, 1995; Ji et al., 2006) ราเอนโดไฟท์ Pestalotiopsis microspora สร้างสาร torreyanic acid ที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและทำให้เซลล์ตาย (Lee et al., 1996) ราเอนโดไฟท์ Rhinocladiella sp. สร้างสารกลุ่ม cytochalasins ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งและต้านจุลินทรีย์ (Wagenaar et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จากราเอนโดไฟท์หลายคณะด้วยกัน เช่น

จี และคนอื่นๆ (Ge et al., 2009) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ Aspergillus fumigatus พบสาร 9-deacetoxyfumigaclavine C ในกลุ่ม alkaloids ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (K562) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.1 μM ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสาร doxorubicin hydrochloride ที่ใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว

ราดู และควีน (Radu & Kqueen., 2002) รายงานว่าเมื่อนำสาร isopropanone จากราเอนโดไฟท์ 121 ไอโซเลต ที่แยกได้จากสมุนไพร 72 ชนิดในประเทศมาเลเซียมาทดสอบหา

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ สารสกัดจากราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งการเจริญของ Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae และ Alternaria sp. ได้ แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของ Salmonella typhimurium นอกจากนั้นยังพบว่าสาร isopropanone จากราเอนโดไฟท์จำนวน 16 ไอโซเลตมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (antitumor)

ลี และคนอื่นๆ (Li et al., 2005) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศจีน จำนวน 12 ชนิด สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 130 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเนื้องอกและการเจริญของเชื้อรา พบราเอนโดไฟท์จำนวน 9.2% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเนื้องอกและ 30% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

โมฮานตา และคนอื่นๆ (Mohanta et al., 2008) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพร 3 ชนิดในประเทศอินเดีย ได้แก่ Andrographis paniculata, Acorus calamus และ Drynaria quercifolia สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลต (14 genera) ในจำนวนนี้เป็นราเอนโดไฟท์กลุ่มที่เป็นเส้นสาย (filamentous form) จำนวน 31 ไอโซเลต (51.66%) และกลุ่มคล้ายยีสต์ (yeast form) จำนวน 29 ไอโซเลต (48.33%) ในจำนวนราเอนโดไฟท์กลุ่มที่เป็นเส้นสาย พบราเอนโดไฟท์จำนวน 13 ไอโซเลต (41.9%) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด และ 19.3% ยับยั้งทั้งแบคทีเรียและรา ในขณะที่ 6.4% ของรากลุ่มดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทุกชนิด

สำหรับประเทศไทยมีการศึกษาถึงความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชหลายชนิดด้วยกัน เช่น

เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และคนอื่นๆ (Phongpaichit et al., 2007) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล Garcinia sp. 5 ชนิด ในภาคใต้ของไทย ได้แก่ ส้มแขก มะพูด มังคุด ชะมวง และ G. scortechinii สามารถแยกราเอนไฟท์ได้ทั้งหมด 1,979 ไอโซเลต เมื่อสุ่มเลือกเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันได้ 377 ไอโซเลตไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบราเอนโดไฟท์มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค 60% ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 28% ฤทธิ์ต้านรา 0.9 – 17.9% ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 6.4 – 10.1% ฤทธิ์ต้านไวรัส HSV–1 13.3% ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (NCI-H187) 26.7% และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Vero cell) 13.3% โดยราเอนโดไฟท์ไม่สามารถยับยั้ง KB cell ได้

สุเทพ ไวยครุฑธา และคนอื่นๆ (Wiyakrutta et al., 2004) ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร จำนวน 81 ชนิด จากป่าในสี่ภาคของประเทศไทย โดยการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน 360 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ malt Czapek broth และ yeast extract sucrose broth แล้วนำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบ

ฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ 92 ไอโซเลตมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค Mycobacterium tuberculosis H37Ra ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย Plasmodium falciparum K1 จำนวน 6 ไอโซเลต ฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคเริม (HSV-type1) จำนวน 40 ไอโซเลต ฤทธิ์ยับยั้ง KB cell line จำนวน 60 ไอโซเลต และฤทธิ์ยับยั้ง BC cell line จำนวน 48 ไอโซเลต

รัชนี สวัสดิ์ชูพงศ์ (2544) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชสมุนไพรไทย 6 ชนิด คือ กระดังงาไทย พญายา เทียนกิ่ง แก้ว ชะพลูและผักหวานบ้าน โดยการแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 58 ไอโซเลตจากกิ่งและใบที่ได้ทำให้พื้นผิวปราศจากเชื้อ เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี dual culture agar diffusion พบว่าราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ (74.14%) มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สายพันธุ์มาตรฐานคือ Staphylococcus aureus ATCC29213, Escherichia coli ATCC25922, Canida albicans ATCC10231 และ S. cerevisiae ATCC9763

สุธีรา วัชรดิษฐ์ (2545) ทำการศึกษาเพื่อหาสารทุติยภูมิจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ ARE-1 ที่แยกได้จากใบน้อยโหน่ง พบว่าเมื่อทำการแยกสารบริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อและเซลล์ของราเอนโดไฟท์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 5 ชนิดคือ succinic acid monoethyl ester, phenylacetic acid, 2-(4'hydroxy) ethyl acetate, 4-hydroxyphenethyl alcohol และ ergosterol และพบว่าสาร ergosterol แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคอย่างอ่อน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

พรเทพ ชมชื่น (2547) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ Phomopsis sp. จากผักหวานเมา (Urobotrya siamensis) และราเอนโดไฟท์ไอโซเลต LRUB 20 ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ในวงศ์ Magnaporthaceae จากกิ่งกะตังใบ (Leea rubra) โดยนำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์มาทำการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสาร asterric acid, 2 - hydroxymethyl - 3 - methyl-cyclopent - 2 - enone และ 3 - nitropropionic acid แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ M. tuberculosis H37Rv โดยมีค่า MIC เท่ากับ 200, 200 และ 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

นอกจากนี้ได้มีผู้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากสมุนไพรเปล้าใหญ่ (Croton oblongifolius) ในหลายจังหวัดด้วยกัน เช่น

บำรุงศักดิ์ ปุริโส (2546) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากสมุนไพรเปล้าใหญ่ (Croton oblongifolius) จากอำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 62 ไอโซเลต เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี agar well diffusion method พบว่าราเอนโดไฟท์ไอโซเลต PcBr20 คือ Fusarium sp. (anamorph) หรือ Gibberella sacchari (telemorph) สามารถสร้างสารซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้ง

จุลินทรีย์ทดสอบได้กว้าง และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวไปแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทรกราฟีและตกผลึก แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าสาร fusaric acid และ dehydrofusaric acid ที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้ง B. subtilis ATCC6633, S. aureus ATCC25923, E. coli ATCC25922, P. aeruginosa ATCC27853, S. cerevisiae TISTR 5169, C. albicans ATCC10231 และ Trichophyton mentagrophytes โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.98, 62.50, 15.62, 1000, 62.50, 1000 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จตุพล เหลียงสกุล (2546) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากเปล้าใหญ่ จังหวัดฉะเชิงเทรา สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 84 ไอโซเลต แต่มีราเอนโดไฟท์เพียง 7 ไอโซเลตที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ เมื่อทำการแยกสารสกัดด้วยเอธิลแอซิเตดจากน้ำหมักและเส้นใยของราเอนโดไฟท์ แล้วนำสารที่แยกได้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งคน 5 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620) เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) พบสารที่แยกได้จากราเอนโดไฟท์มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.4, 13.6, 11.6, 10.9 และ 12.1 nM ตามลำดับ

วันทนีย์ ทมมีด (2547) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเปล้าใหญ่ในจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 72 ไอโซเลต พบว่าราเอนโดไฟท์ดังกล่าวเป็นรา Bipolaris sp., Fusarium sp., Phomopsis sp. และราในกลุ่ม Xylariaceae เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ทุกไอโซเลต โดยวิธี dual culture agar diffusion technique พบว่า 15% ของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรีย และ 8% ยับยั้งเฉพาะยีสต์ ในขณะที่ 9.7% สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียและยีสต์ อย่างไรก็ตาม 67% ของราเอนโดไฟท์ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

ณัฐจิรา อ้นนวล (2547) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากเปล้าใหญ่ที่ปลูกภายในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของราเอนโดไฟท์ 47 ไอโซเลต ที่แยกได้โดยวิธี agar well diffusion method พบว่าราเอนโดไฟท์ไอโซเลต CuLm17 ซึ่งเป็นรา Penicillium sp. สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี จึงนำสารดังกล่าวมาทำการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีและตกผลึก ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ folipastain และ unguinol หลังจากนำสารบริสุทธิ์มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารบริสุทธิ์มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด คือ B. subtilis ATCC6633, S. aureus ATCC25923, E. coli ATCC25922 และ P. aeruginosa ATCC27853 รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ HepG2, SW620, CHAGO, KATO-3 และ BT474 แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

มณฑิรา โพธิ์ถาวร (2547) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากใบเปล้าน้อย (Croton sublyratus) แยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 75 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น โดยวิธี dual culture agar diffusion technique พบว่าราเอนโดไฟท์ Bipolaris spicifera ไอโซเลต CsPr03 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด เมื่อนำเชื้อราดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว malt extracts broth แล้วแยกสารบริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีโครมาโทกราฟีและตกผลึก จะได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด คือสาร curvulin บริสุทธิ์ สาร emodin และสาร curvulin สังเคราะห์ เมื่อนำสารบริสุทธิ์มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่าสาร curvulin มีฤทธิ์ยับยั้ง B. subtilis ATCC6633, S. cerevisiae TISTR5169 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.62 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สาร emodin มีฤทธิ์ยับยั้ง C. albicans ATCC10231 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร curvulin สังเคราะห์มีฤทธิ์ยับยั้ง S. aureus ATCC25923 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วรรษยา วิเศษศักดากร (2547) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบอินทนิลน้ำ (Lagerstroemia speciosa Linn.) พบราเอนโดไฟท์กลุ่ม mycelia sterilia ไอโซเลต K - BK5 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้ง B. subtilis เมื่อทำการศึกษาเพื่อหาสารทุติยภูมิจากราเอนโดไฟท์ดังกล่าว โดยทำการแยกสารบริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อและเซลล์ของรา ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีและตกผลึก พบสาร deoxyaustrocortirubin ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย B. subtilis โดยมีค่า MIC เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

ศรัณยา คุ้มวงษา (2547) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากใบและกิ่งยอ (Morinda citrifolia L.) ที่สุ่มเก็บจาก 4 จังหวัดในประเทศไทย สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 178 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ พบว่าราเอนโดไฟท์ Nodulisporium sp. ไอโซเลต LSS06 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด นั่นคือสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้ง B. subtilis, S. aureus, E. coli และ C. albicans เมื่อทำการแยกสารสกัดด้วยเอธิลแอซิเตดจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา ได้ของผสม B1 ที่เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้ง B. subtilis ATCC6633 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบ

อนุรีย์ ขันบุญ (2547) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบพลู (Piper betle Linn.) โดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดปทุมธานี ระยอง นครศรีธรรมราช และกรุงเทพ สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 32 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่าราเอนโดไฟท์ Fusarium proliferatum ไอโซเลต PBL004 มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี คือ

ออกฤทธิ์ยับยั้ง B. subtilis ATCC6633, E. coli ATCC25922 และ C. albicans ATCC10231 เมื่อทำการศึกษาเพื่อแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีโครมาโทกราฟีและตกผลึกได้ของผสม CB1 ที่เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าของผสมดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้ง B. subtilis ATCC6633 และ C. albicans ATCC10231 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.81 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีฤทธิ์ยับยั้ง herpes simplex virus type I ATCC VR-260 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด HepG2, SW620, KATO-3 และ BT474 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.8, 5.5, 7.4 และ 6.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

นิรมล จันทร์คง (2547) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากกระชายดำ (Kaempferia parviflora) ที่สุ่มเก็บจาก 3 จังหวัดในประเทศไทย สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 36 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี dual culture agar diffusion technique พบราเอนโดไฟท์ Alternaria tenuissima ไอโซเลต KPCH007 มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบดีที่สุด คือยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เมื่อทำการแยกสารสกัดด้วยเอธิลแอซิเตดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและจากเส้นใยราเอนโดไฟท์ ได้สารบริสุทธิ์ที่เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งคน 5 ชนิด พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย B. subtilis, S. aureus, P. aeruginosa และ E. coli ได้แล้ว นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด SW620, BT474, KATO-3, HepG2 และ CHAGO ได้

สุวรรณา จันทสุบรรณ (2547) ได้ศึกษาสารออกฤทธ์ทางชีวภาพที่สร้างจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบประยงค์ (Aglaia odorate Lour.) จากจังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม ปัตตานี และกรุงเทพมหานคร สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ของราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี dual culture agar diffusion พบราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ (67%) มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สายพันธุ์มาตรฐาน โดยราเอนโดไฟท์ mycelia sterilia ไอโซเลต Aopn12 มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้กว้าง เมื่อทำการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนสกัดเอธิลแอซิเตตจากเส้นใยของราเอนโดไฟท์ไอโซเลตดังกล่าว จะได้สารบริสุทธิ์ที่เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งคน 5 ชนิด พบสารที่ได้แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย B. subtilis อย่างอ่อน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด SW620, BT474, KATO-3, HepG2 และ CHAGO ได้สูง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.5, 5.4, 6, 5.4 และ 3.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ทัศวรรณ สมสีมี (2548) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากกระท้อน (Sandoricum koetjape) จากจังหวัดจันทบุรี สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต ประกอบด้วย mycelia sterilia 12 ไอโซเลต, Colletotrichum sp. 1 ไอโซเลต, Fusarium

sp. 2 ไอโซเลต และราในกลุ่ม Xylariaceae 5 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี dual culture agar diffusion technique พบราเอนโดไฟท์ที่แยกได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 8 ไอโซเลต จากนั้นคัดเลือกราเอนโดไฟท์ไอโซเลต CHB18 (กลุ่ม Xylariaceae) ซึ่งสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ C. albicans ATCC10231 จึงเลือกราดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว malt extract เป็นเวลา 42 วัน แล้วนำส่วนสกัดเอธิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยรามาสกัดแยกสารที่ราผลิตได้ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีและตกผลึก ได้สารบริสุทธิ์ที่เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ B. subtilis ATCC6633, P. aeruginosa ATCC27853 และ C. albicans ATCC10231 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากันทุกเชื้อ รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง SW620, KATO-3 และ HepG2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.9, 8.8 และ 8.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เริงฤทธิ์ สัปปะพันธ์ (2550) ได้แยกราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพร 3 ชนิดคือ ฟ้าทะลายโจร หนอนตายยาก และสาบเสือได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต เมื่อนำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ B. subtilis, S. aureus และ E. faecalis ด้วยวิธี broth microdilution assay เพื่อหาค่า MIC และ MBC พบว่าสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟต์บางชนิดที่แยกได้จากสาบเสือและหนอนตายยากมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ B. subtilis ได้ที่ความเข้มข้น 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ S. aureus และ E. faecalis ในขณะที่สารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากฟ้าทะลายโจรไม่ยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิด

จะเห็นได้ว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด เช่น สาร isopropanone, สาร taxol ในกลุ่ม diterpenoid, สาร torreyanic acid ในกลุ่ม cytochalasins หรือสารกลุ่ม alkaloids ซึ่งสารเหล่านี้ล้วนมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (antitumor) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial) ฤทธิ์ต้านรา (antifungal) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) รวมถึงแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic cell) แสดงว่าราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการผลิตยา เพื่อประโยชน์ทางด้านการแพทย์ต่อไปในอนาคต

2. ราเอนโดไฟท์ทำหน้าที่เป็นจุลินทรีย์คุ้มครองพืช

ราเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่นอกจากจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้แล้ว (Azevedo et al., 2000; Faeth, 2002) สารทุติยภูมิที่ราเอนโดไฟท์สร้างขึ้นยังสามารถช่วยทำให้พืชมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของแมลง สัตว์ ไส้เดือนฝอย และโรคต่างๆ ได้ดีขึ้น โดยการสร้างสารพิษป้องกันการเข้าทำลายของศัตรูพืช เช่น สาร alkaloid มีรายงานว่าหญ้าที่มีราเอนโดไฟท์จะมีสารกลุ่ม alkaloid อยู่ จึงทำให้มีความต้านทานต่อแมลงกลุ่ม

ที่กินใบและสัตว์เคี้ยวเอื้อง (herbivore) (University of Rhode Island, 2005) ตัวอย่างของการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของราเอนโดไฟท์ที่ทำหน้าที่เป็นจุลินทรีย์คุ้มครองพืชมีดังนี้

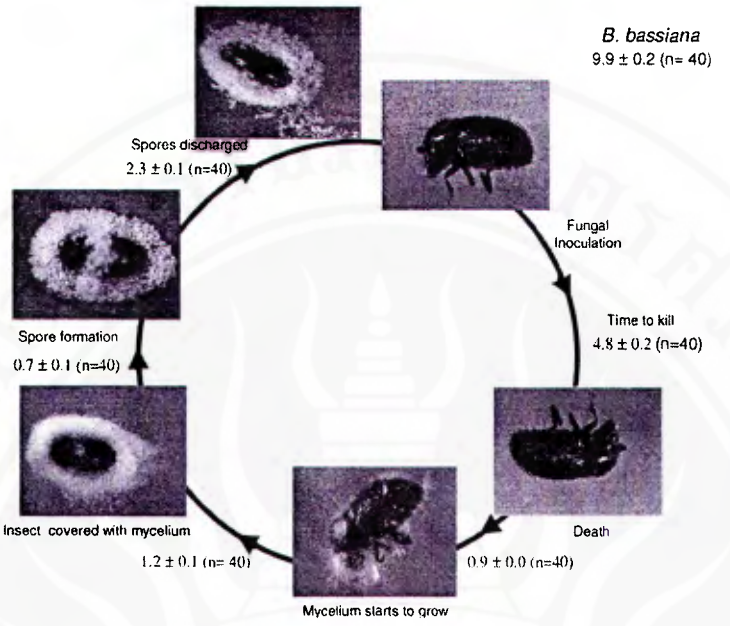
ฟินด์เลย์ และคนอื่นๆ (Findlay et al., 1997) ได้ศึกษาสารที่เป็นพิษต่อแมลงจากราเอนโดไฟท์ในหญ้าเมืองหนาว Gaultheria procumbens L. พบสาร 5 - hydroxyl - 2 - benzofuran ที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ของตัวอ่อนหนอนชนิด Christoneura fumiferana Clem.

แนร์ และคนอื่นๆ (Niere et al., 2004) รายงานว่าราเอนโดไฟท์สามารถป้องกันการเกิดโรคในต้นกล้วย โดยมีผลลดการเข้าทำลายของตัวอ่อนด้วงชนิด Cosmopolites sordidus และไส้เดือนฝอยชนิด Radopholus similes ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่สำคัญของต้นกล้วย

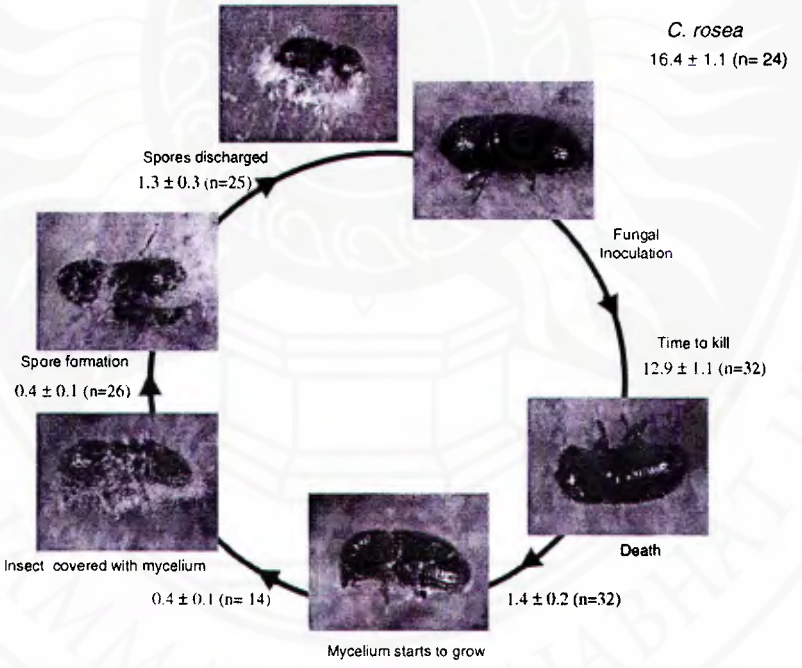
ชวอร์ และคนอื่นๆ (Schwarz et al., 2004) พบว่าราเอนโดไฟท์ Phomopsis phaseoli และ Melaconium betulinum ที่แยกจากกิ่งและใบของพืช Betula pendula และ B. pubescens ในประเทศเยอรมนี สามารถสร้างสาร 3 - Hydroxypropionic acid ที่ทำลายไส้เดือนฝอย Meloidogyne incognita ซึ่งก่อโรคในพืชได้ โดยมีค่า LD_{50} เท่ากับ 12.5 – 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เลซี่ และนีเวน (Lacey & Neven, 2006) รายงานว่าสามารถนำสารระเหยอินทรีย์ (volatile organic compounds : VOCs) ที่ได้จากราเอนโดไฟท์ Muscodor albus ไปใช้เป็นยาฆ่าแมลงในการกำจัดตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของผีเสื้อ potato tuber moth (Phthorimaea operculella) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูธรรมชาติของมันฝรั่งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เวก้า และคนอื่นๆ (Vega et al., 2008) ได้ศึกษาราเอนโดไฟท์ในต้นกาแฟจากประเทศสหรัฐอเมริกา โคลัมเบีย เม็กซิโก และเปอร์โตริโก พบราเอนโดไฟท์จำนวน 5 สกุล ได้แก่ Acremonium, Beauveria, Cladosporium, Clonostachys และ Paecilomyces โดยราเอนโดไฟท์ B. bassiana และ Clonostachys rosea (ที่ความเข้มข้น 1 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) มีช่วงชีวิตในการเข้าทำลายมอดเจาะเมล็ดกาแฟ จำนวน 9.9 ± 0.2 วัน (ภาพที่ 3) และ 16.4 ± 1.1 วัน (ภาพที่ 4) ตามลำดับ



ภาพที่ 3 ช่วงชีวิตของราเอนโดไฟท์ Beauveria bassiana (SPCL 03047)



ภาพที่ 4 ช่วงชีวิตของราเอนโดไฟท์ Clonostachys rosea (SPCL 03062)

ในประเทศไทยมีรายงานถึงความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชหลายคณะด้วยกัน เช่น

วิวัฒน์ เสือสะอาด และคนอื่นๆ (2551) ได้ประเมินประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์ B. bassiana ในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืช 3 ชนิดคือ หนอนและตัวเต็มวัยของแมลงดำหนามมะพร้าว (Brontispa longissima) ตัวเต็มวัยของมอดเจาะเมล็ดกาแฟ (Hypothenemus hampi) และปลวก (Coptotermes gestroi) โดยการพ่นสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของราเอนโดไฟท์ลงบนตัวแมลง พบว่าราเอนโดไฟท์ B. bassiana ทำให้หนอนและตัวเต็มวัยของแมลงดำหนามมะพร้าวตาย 82.5% และ 75% ตามลำดับ ส่วนตัวเต็มวัยของมอดเจาะเมล็ดกาแฟตาย 77.5% และปลวกตาย 87.7% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าราเอนโดไฟท์ B. bassiana สามารถเข้าทำลายเพลี้ยจักจั่นช่อมะม่วง (Idioscopus clypealis และ I. niveosparsus) หนอนกินขั้วผล (Orgyia postica) หนอนกินช่อดอก (Eublemma abrupta) (กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผลไม้ สมุนไพร และเครื่องเทศ, 2542) หนอนไหม และหนอนกระทู้ผัก (กฤษณา, 2534)

จากรายงานข้างต้นพบว่าราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี ทำให้พืชมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของแมลง สัตว์ ไส้เดือนฝอย และโรคต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งนับว่าราเอนโดไฟท์เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมภาคเกษตร

3. ราเอนโดไฟท์กับการควบคุมราและแบคทีเรียก่อโรคพืช

ราเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ซึ่งนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคพืช (Liu et al., 2001) โดยราเอนโดไฟท์หลายชนิดสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์รบกวนหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในพืชได้ โดยการแพร่ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ พื้นดิน หรือทางอากาศ เมื่อเชื้อราหรือแบคทีเรียก่อโรคในพืชได้รับสารดังกล่าว สารเหล่านั้นจะทำงานโดยไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุก่อโรค ทำให้สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ในที่สุด (จีรพันธ์ วรพงษ์, 2548) มีผู้วิจัยหลายคณะได้รายงานเกี่ยวกับความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการควบคุมราและแบคทีเรียก่อโรคพืช เช่น

จีรพันธ์ วรพงษ์ และคนอื่นๆ (Worapong et al., 2001) รายงานว่าราเอนโดไฟท์ M. albus จากอบเชย (Cinnamomum zeylanicum) สามารถสร้างสาร VOCs ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุก่อโรคในพืชและมนุษย์ได้

เมอร์เออร์ และแมนเคอร์ (Mercier & Manker, 2005) ได้นำราเอนโดไฟท์ M. albus ไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเมล็ดข้าวไรน์ พบว่าสามารถลดการเกิดโรคจากเชื้อรา Rhizoctonia solani ที่เป็น

สาเหตุของโรคแคระแกร็น (damping – off) ในบร็อคโคลี และเชื้อรา Phytophthora capsici ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากปม (root rot) ในพริกหวานได้

รูบินี และคนอื่นๆ (Rubini et al., 2005) รายงานว่าราเอนโดไฟท์ Gliocladium catenulatum สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Crinipellis perniciosa ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพุ่มไม้กวาด (witches's broom disease) ที่ก่อความเสียหายต่อการงอกของเมล็ดโกโก้ (Theobroma cacao) ได้ถึง 70%

ไมเจีย และคนอื่นๆ (Mejia et al., 2008) พบว่าเมื่อถ่ายราเอนโดไฟท์ Colletotrichum gloeosporioides, Clonostachys rosea และ Botryosphaeria ribis ลงไปในต้นโกโก้จะสามารถลดการสูญเสียจากการเข้าทำลายของเชื้อรา Moniliophthora roreri ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค frosty pod rot และเชื้อรา P. palmivora ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคจุดดำ (black - pod disease) ในต้นโกโก้ได้

ฮานาดะ และคนอื่นๆ (Hanada et al., 2009) พบว่าราเอนโดไฟท์ Trichoderma martiale ไอโซเลต ALF247 มีฤทธิ์เข้าทำลายเชื้อรา P. palmivora ที่เป็นสาเหตุของโรคจุดดำในต้นโกโก้ได้

ในประเทศไทยมีการรายงานถึงความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการควบคุมราและแบคทีเรียก่อโรคพืชหลายคณะด้วยกัน เช่น

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (2548) ได้รายงานการศึกษาสารชีวภาพที่แยกได้จากราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรกว่า 50 ชนิด เช่น ต้นอบเชย ชมพูพันธ์ทิพย์ จันทน์เทศ ฝางเป็นต้น พบว่า มีราเอนโดไฟท์หลายไอโซเลตที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุก่อโรคพืชได้ ราเอนโดไฟท์ดังกล่าว ได้แก่ ราเอนโดไฟท์ M. albus ไอโซเลต MFC2 สร้างสาร VOCs ที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคในเมล็ดข้าว, ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต TRL2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ P. palmivora ที่ก่อโรครากเน่าโคนเน่าในทุเรียน, ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต VFIB1 และ CSC28 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ C. gloeosporioides ที่ก่อโรคแอนแทรกโนส (anthracnose) ในผลไม้, ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต VFIB1, TRL2 และVTL7 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ P. capsici ที่ก่อโรครากเน่าโคนเน่าในพริก

จิตรา เกาะแก้ว (2550) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ 210 ไอโซเลต จากพืชสมุนไพร จำนวน 16 ชนิดคือ กระวาน กระชายขาว ราชพฤกษ์ โคลงเคลง ค้อนตีหมา เตยหนาม นาวน้ำ ทับทิม โกศจุฬาลำพา ตะขาบปีน กล้วย ผักหวานใหญ่ ฝางส้ม ชะเอมเถา เถา ส้มกุ้งและตดหมูตดหมา จากจังหวัดนครราชสีมา นครปฐม และกาญจนบุรี เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช 10 ชนิดบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) พบราเอนโดไฟท์ที่เจริญช้าและไม่สร้างสปอร์ จำนวน 5 ไอโซเลต และรา Pestalotiopsis sp. จำนวน 1 ไอโซ

เลต สามารถยับยั้งการเจริญของรา Alternaria alternate, Bipolaris maydis, Lasiodiodia theobromae, Phytophthora palmivora และ Sclerotium rolfsii ซึ่งเป็นราก่อโรคพืชในห้องปฏิบัติการได้

ชัยวัฒน์ บุญมากาศ (2550) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์จากพืชในวงศ์ Stemonaceae โดยเก็บตัวอย่างต้นหนอนตายยากชนิด Stemona burkilliic จากจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ระยอง และนครราชสีมา และเก็บตัวอย่างต้นหนอนตายยากชนิด S. Kerrii จากจังหวัดเชียงใหม่ รวมจำนวนทั้งหมด 58 ตัวอย่าง สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 170 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช ด้วยวิธี plate diffusion method พบว่าราเอนโดไฟท์จำนวน 15 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Erwinia carotovora, Pseudomonas solanacearum และ Xanthomonas citrii ได้

นลิน รัตน์นราทร (2552) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืชจากราเอนโดไฟท์ของหนอนตายยาก (S. burkillii, S. colinsae และ S. kerrii) จากจังหวัดลำพูน เชียงใหม่ นครราชสีมา ระยอง เลย และชลบุรี โดยสามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 124 ไอโซเลต เมื่อนำราดังกล่าวมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี agar well diffusion bioassay พบว่าราเอนโดไฟท์ จำนวน 13 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา A. brassicola, Penicillium sp., F. solani และ F. oxysporum ได้ โดยมีราเอนโดไฟท์ 4 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชที่ใช้ทดสอบได้ทุกชนิด ในขณะที่อีก 9 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของราที่ใช้ทดสอบได้บางชนิด

วิราชินี ทาจีนะ (2551) ได้ศึกษาความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากเต่าร้างหนู (Wallichia siamensis) สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้จำนวน 191 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับราสาเหตุโรคพืช พบราเอนโดไฟท์ จำนวน 3 ไอโซเลตที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Sclerotium sp. จากพริก, Phythopthora sp. จากมะเขือเทศ และ Curvularia senegalensis จากเมล็ด Borassus flabellifer L. โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 81.2 – 87.9%, 77.5 – 84.6% และ 78.8 – 83.7% ตามลำดับ

ศศิธร วงศ์เรือง และฤทัยรัตน์ คำแสน (2551) ได้ศึกษาผลของราเอนโดไฟท์จากมะเขือเทศ ส้ม และยางพาราในการยับยั้งการเจริญของ P. infestans ที่เป็นสาเหตุโรค late blight โดยแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากส่วนของราก ลำต้น และใบของพืชทั้ง 3 ชนิด สามารถแยกราเอนโดไฟท์ ได้ทั้งหมด 298 ไอโซเลต เมื่อนำราเอนโดไฟท์มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา P. infestans ด้วยวิธี dual culture พบราเอนโดไฟท์ Fusarium sp. สายพันธุ์ RR251 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา P. infestans ได้สูงสุด 62.22% รองลงมาคือราเอนโดไฟท์

Penicillium sp. ไอโซเลต RL3036 ให้ผลการยับยั้ง 56.67% และ Aspergillus sp. สายพันธุ์ OS3029 ให้ผลการยับยั้ง 55.56%

วันพร เข็มมุกต์ และพิภพ ลำยอง (2551) ได้ศึกษาการควบคุมโรคใบจุดดำลำไย โดยใช้ราเอนโดไฟท์จากต้นลำไย พบว่าสามารถแยกราเอนโดไฟท์จากต้นลำไยได้ทั้งหมด 660 ไอโซเลต ในจำนวนนี้จัดกลุ่มได้ 65 taxa เมื่อนำราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกไว้ 50 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา Colletotrichum sp. ซึ่งเป็นสาเหตุโรคใบจุดดำลำไยด้วยวิธี dual culture โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 50 กรรมวิธี 4 ซ้ำ พบว่าราเอนโดไฟท์ Eurotium sp., Colletotrichum sp. No 2, mycelia sterilia, Beltrania sp. และ Trichoderma spp. ให้ผลการยับยั้ง 57.35 - 67.89%

จากรายงานพบว่าราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งสำคัญในการสร้างสารที่มีฤทธิ์รบกวนหรือยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุก่อโรคในพืชชนิดต่างๆ ได้ดี โดยเฉพาะในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ยางพารา ลำไย โกโก้ เป็นต้น

ต้นมันปู

(รักษ์ พฤกษชาติ, 2552)

อนุกรมวิธานของต้นมันปู (IPNI, 2007)

Kingdom Plantae

Division Magnoliophyta

Class Magnoliopsida

Order Euphorbiales

Family Euphobiaceae

Genus Glochidion

ชื่อวิทยาศาสตร์ Glochidion wallichianum Müll.Arg.

ชื่อพื้นเมือง มันปู มันปูใหญ่ (นครศรีธรรมราช) ชุมเล็ด พุงหมู (ชุมพร) ยอดเทะ ยอดกะทิ (ตรัง) นกนอนทะเล (นราธิวาส)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มันปูเป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่ มีความสูงต้นประมาณ 15 เมตร (ภาพที่ 5) ใบเป็นใบเดี่ยว ก้านใบสั้น ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ออกแบบสลับ ใบมีรูปร่างเป็นรูปไข่ ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม โคนใบมน ใบกว้าง 3 – 5.5 เซนติเมตร ใบยาว 7 – 14 เซนติเมตร หน้าใบสีเขียวออกมัน

เล็กน้อย หลังใบสีเขียวอ่อนกว่าหน้าใบ ใบอ่อนและก้านอ่อนมีสีเขียวหรือสีเขียวอมแดง (ภาพที่ 6) ดอกเป็นดอกช่อ มีขนาดเล็ก

แหล่งที่พบ

ตามป่าดิบ ที่ราบเชิงเขา ที่ราบริมทุ่งนา พบทางภาคใต้ของประเทศไทย

การปลูก

มันปูเป็นพืชธรรมชาติที่พบได้ในป่าดิบ ที่ราบแถบเชิงเขา ชาวบ้านนำมาปลูกบริเวณสวนใกล้บ้าน การขยายพันธุ์ทำได้โดยการเพาะเมล็ด การตอนกิ่งและการแยกหน่ออ่อนจากต้นแม่

ประโยชน์ทางยา

รากและลำต้น มีสรรพคุณแก้ร้อนใน เป็นยาบำรุง

ประโยชน์ทางอาหาร

ยอดมันปูนิยมรับประทานเป็นผักสดแกล้มกับน้ำพริกแกงรสจัด และรับประทานร่วมกับขนมจีนน้ำยา

ภาพที่ 5 ต้นมันปูจากอำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช

ภาพที่ 6 กิ่งและใบของต้นมันปู

ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในแฟมิลี่ Euphorbiaciae

จากการศึกษาและรวบรวมเอกสาร พบว่าพืชในแฟมิลี่ Euphorbiaciae มีการสร้างสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดังนี้

บาร์บาซา และคนอื่นๆ (Barbasa et al., 2011) ได้รายงานการค้นพบสาร Labaditin ซึ่งเป็นวงเพปไทด์ชนิดหนึ่งที่แสดงฤทธิ์ยับยังแบคทีเรียแกรมบวกได้

ริฟเวียร์ และคนอื่นๆ (Riviere et al., 2010) รายงานว่าพืช Mallotus sp.ในประเทศเวียดนาม สร้างสาร diterpenoids, triterpenoids, steroids, flavonoids, coumarinolignoids, phloroglucinol และ benzopyrans ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านไวรัส และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์

เดอแวพพา และคนอื่นๆ (Devappa et al., 2011) ศึกษาสาร diterpenes จำนวน 68 ชนิด ที่แยกได้จากพืช Jatropha sp. พบว่าสารเหล่านี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (P338) และ KB carcinoma cell ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์

คูเต้ และคนอื่นๆ (Kuete et al., 2010) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบและสารประกอบที่แยกได้จากเปลือกลำต้นของพืช Drypetes tessmanniana พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา Microsporum audouinii ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคกลากในคน และยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Streptomyces faecalis โดยมีค่า MIC เท่ากับ 78.12 และ 156.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

นอกจากนี้ มีการค้นพบว่าพืชในสกุล Glochidion สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้

แท็ง และคนอื่นๆ (Thang et al., 2011) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่แยกได้จากใบของพืช Glochidion obliquum พบสาร rotundic acid มีฤทธิ์ลดการอักเสบและแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์

ศศิภาวรรณ มาชะนา และคนอื่นๆ (Machana et al., 2011) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งตับจากพืช 6 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากพืช Glochidion daltanii แสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ในคน โดยมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 100 – 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จะเห็นได้ว่าพืชในแฟมิลี่ Euphorbiaceae อีกหลายชนิดที่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะพืชในสกุล Glochidion ดังนั้นการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากต้นมันปู จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตยาทางเภสัชกรรม และทางการแพทย์ต่อไปได้ในอนาคต

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ เป็นการศึกษาการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากต้นมันปู ในบทนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง
2. เครื่องมือดำเนินการวิจัย
3. วิธีดำเนินการวิจัย
   - 3.1 การเก็บพืชตัวอย่าง
   - 3.2 การแยกราเอนโดไฟท์
   - 3.3 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว
   - 3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น สำหรับน้ำเลี้ยงรา
   - 3.5 การสกัดน้ำเลี้ยงราและเส้นใยรา ด้วยตัวทำละลายทางเคมี
   - 3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ สำหรับสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์
   - 3.7 การหาค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์
   - 3.8 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์
4. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร คือ ต้นมันปู โดยการสุ่มตัวอย่างต้นมันปูจากอำเภอเมือง อำเภอเฉลิมพระเกียรติ อำเภอนาบอน จังหวัดนครศรีธรรมราช จากอำเภอลำทับ อำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่ และอำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง อำเภอละ 1 ต้นๆ ละ 3 กิ่งและ 3 ใบ

เครื่องมือดำเนินการวิจัย

1. จุลินทรีย์สำหรับการทดสอบ

แบคทีเรีย (แกรมบวก)

- Staphylococcus aureus ATCC29523
- methicillin – resistant S. aureus (MRSA) SK1

แบคทีเรีย (แกรมลบ)

- Escherichia coli ATCC25922
- Pseudomonas aeruginosa ATCC27853

ยีสต์

- Candida albicans ATCC90028
- Cryptococcus neoformans ATCC90012

รา

- Microsporum gypseum

2. ยาต้านจุลินทรีย์

- ยาต้านแบคทีเรียแกรมบวก Vancomycin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/แผ่น
- ยาต้านแบคทีเรียแกรมลบ Gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/แผ่น
- ยาต้านยีสต์ Amphotericin B ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/แผ่น
- ยาต้านรา Miconazole nitrate ความเข้มข้น 30ไมโครกรัม/แผ่น
- ยาปฏิชีวนะ Penicillin G และ Streptomycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Nutrient agar (NA)
- Nutrient broth (NB)
- Potato dextrose agar (PDA)
- Potato dextrose broth (PDB)
- Sabouraud dextrose agar (SDA)
- Sabouraud dextrose broth (SDB)
- Mueller Hinton broth (MHB)
- RPMI – 1640

4. สารเคมีทั่วไป

- Ethanol ความเข้มข้น 95%
- Sodium hyphlorite ความเข้มข้น 5%
- NaCl (normal saline solution : NSS) ความเข้มข้น 0.85%
- Resazurin indicator ความเข้มข้น 0.18%
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Methanol (MeOH, coมิลลิเมตรercial grade)

- Hexane (analytical reagent grade : AR grade)
- Ethyl acetate (EtOAc, analytical reagent grade : AR grade)
- Sodium sulphate anhydrous
- McFarland Standard
- สีย้อม Lactophenol cotton – blue

5. เครื่องมือวิทยาศาสตร์

- กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- กล้องถ่ายภาพดิจิตอล
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
- ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven)
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator)
- ตู้แช่แข็ง (freezer)
- ตู้เย็น (refrigerator)
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

6. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

- จานเพาะเชื้อ (petri dishes)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flasks)
- กระบอกตวง (cylinders)
- บีกเกอร์ (beakers)
- หลอดทดลอง (test tubes)
- พาสเจอร์ปิเปต (pasture's pipettes)
- ปิเปตดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ ชนิดปรับปริมาตร (multi - channel automatic pipette)
- 96 – well microtiter plate
- ไมโครปิเปตทิป (micropipette tip)
- เครื่องนับสปอร์ (haemacytometer)
- เครื่องมือวัดขนาด (vernier caliper)
- ปากคีบ (forceps)

- ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
- สไลด์ (glass slides)
- กระจกปิดสไลด์ (cover slips)
- กระดาษฟอยด์ (foil)
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- ถุงมือยาง
- กรรไกร

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บพืชตัวอย่าง

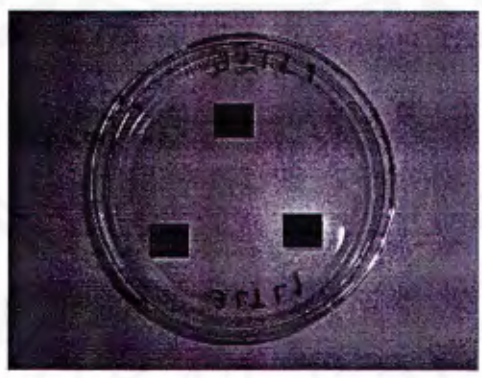
ทำการเก็บตัวอย่างต้นมันปูในอำเภอเมือง (MN) อำเภอนาบอน (NB) อำเภอเฉลิมพระเกียรติ (GP) จังหวัดนครศรีธรรมราช จากอำเภอลำทับ (LT) อำเภอคลองท่อม (CT) จังหวัดกระบี่ และจากอำเภอเมือง (PL) จังหวัดพัทลุง โดยเก็บตัวอย่างใบพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์ สีเขียวเข้ม ไม่มีลักษณะอาการของโรค (ภาพที่ 7) เก็บตัวอย่างต้นละ 3 กิ่งและ 3 ใบ โดยในแต่ละอำเภอจะเก็บตัวอย่างอำเภอละ 1 ต้น นำตัวอย่างพืชกลับมาแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ทันที โดยนำตัวอย่างพืชมาล้างด้วย detergent ผึ่งให้แห้งภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) เมื่อตัวอย่างพืชแห้งแล้ว ใช้ใบมีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95% นำไปผ่านเปลวไฟ แล้วตัดส่วนของเส้นใบ (vein : V), เส้นกลางใบ (midrib : M), ผิวใบ (lamina : L), ก้านใบ (petriole : P) และกิ่ง (branch : B) ออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1 x 1 ตารางเซนติเมตร เป็นจำนวน 2, 3, 3, 4 และ 10 ชิ้นตามลำดับ (ภาพที่ 8) พร้อมทั้งกำหนดรหัสดังนี้ อำเภอที่เก็บ – ส่วนของพืช, ลำดับไอโซเลตเชื้อรา เช่น PL – B1.2 หมายถึง ตัวอย่างต้นมันปูชิ้นนี้เก็บจากอำเภอเมืองพัทลุง ได้จากส่วนของกิ่ง และเป็นเชื้อราไอโซเลตลำดับที่ 1.2

ภาพที่ 7 กิ่งและใบของต้นมันปูที่มีลักษณะสมบูรณ์

ภาพที่ 8 ส่วนต่างๆ ของต้นมันปูที่ทำการแยกตัวอย่าง

การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

นำตัวอย่างพืชที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ มากำจัดเชื้อบริเวณผิว โดยแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 5% นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95% อีกครั้ง นาน 30 วินาที นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นาน 3 – 5 วินาที แล้วจึงนำตัวอย่างพืชไปวางบนอาหาร PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะ penicillin G และ streptomycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 9) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 วัน สังเกตผลทุกวัน เมื่อพบว่ามีการเจริญของรางอกออกมาจากชิ้นส่วนตัวอย่างพืช ทำการตัดส่วน hyphal tip ของรา นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ โดยทำการเก็บตัวอย่างราเป็นเวลา 7 วัน นับจากวันแรกที่พบการงอกของเชื้อราจากชิ้นส่วนตัวอย่าง เมื่อแยกเชื้อราได้บริสุทธิ์แล้ว (ภาพที่ 10) ทำการเก็บราในอาหารวุ้นเอียงที่อุณหภูมิห้อง

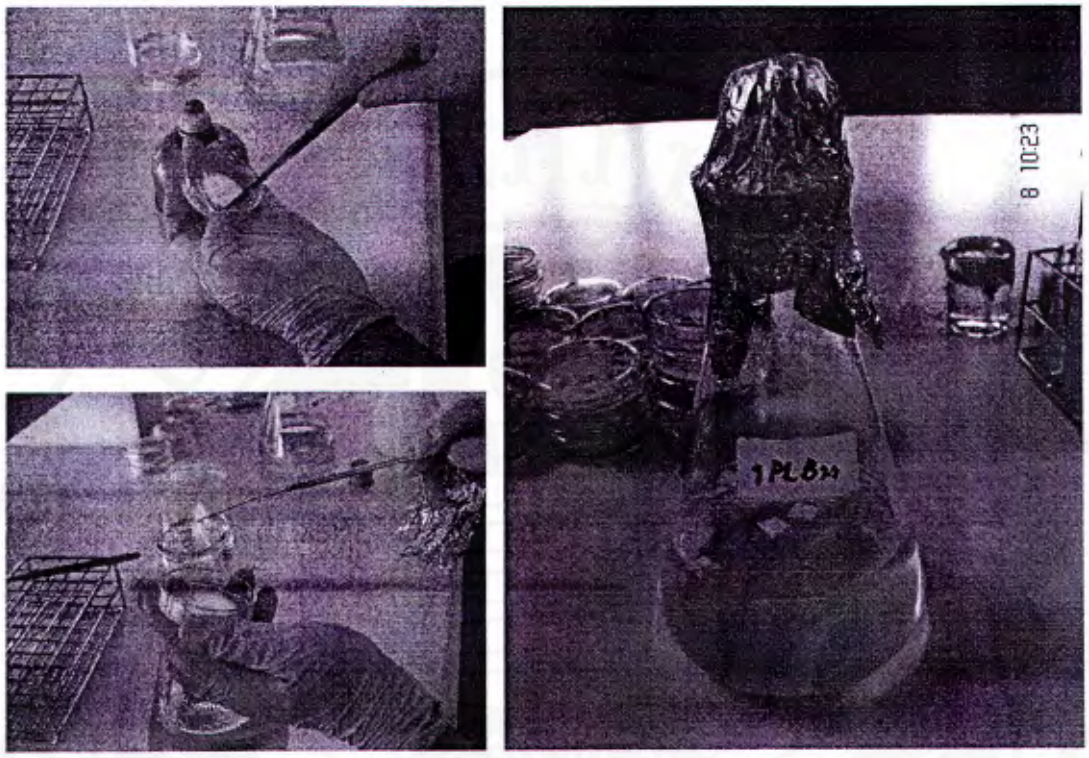


ภาพที่ 9 การวางชิ้นส่วนใบของต้นมันปูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่เติมยาปฏิชีวนะ penicillin G และ streptomycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 10 ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้บริสุทธิ์

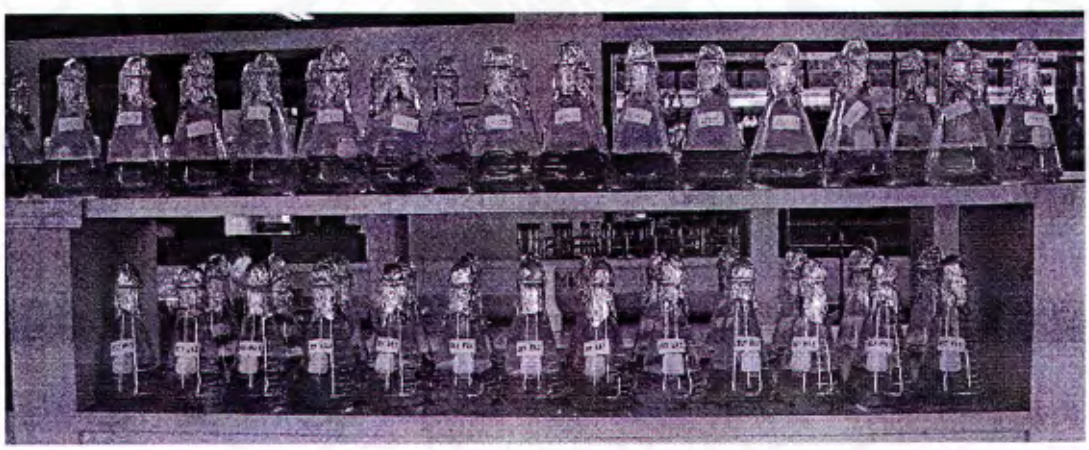
การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

คัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ ซึ่งมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 - 4 วัน หรือจนกว่าจะพบว่ามีการเจริญของโคโลนีของรา ใช้ใบมีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95% นำไปผ่านเปลวไฟ รอให้เย็น หลังจากนั้นนำไปตัดชิ้นส่วนบริเวณขอบโคโลนี ให้มีขนาดชิ้นละ 1 x 1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร (ภาพที่ 11) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 12) แล้วเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงรา (ภาพที่ 13) เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

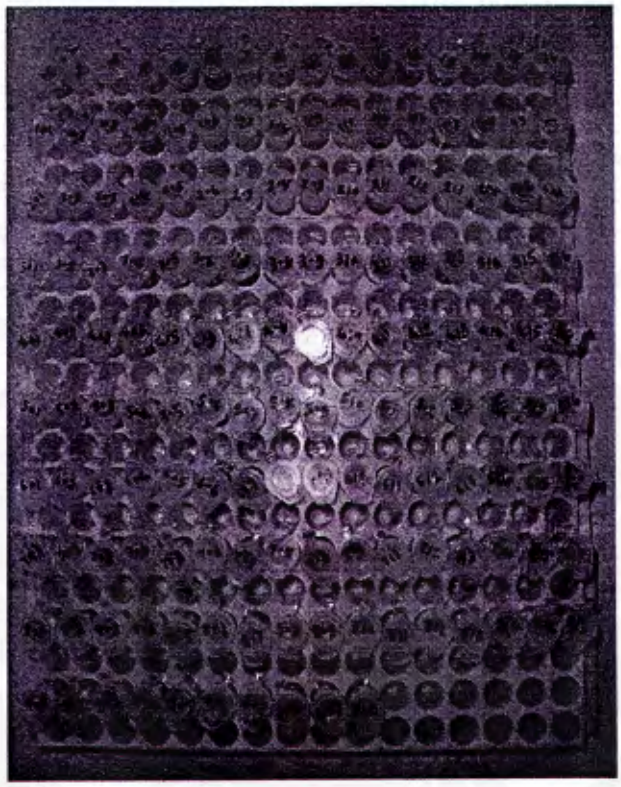


ก. ข.

ภาพที่ 11 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว PDB
ก. การตัดชิ้นส่วนโคโลนี
ข. การถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว PDB



ภาพที่ 12 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์



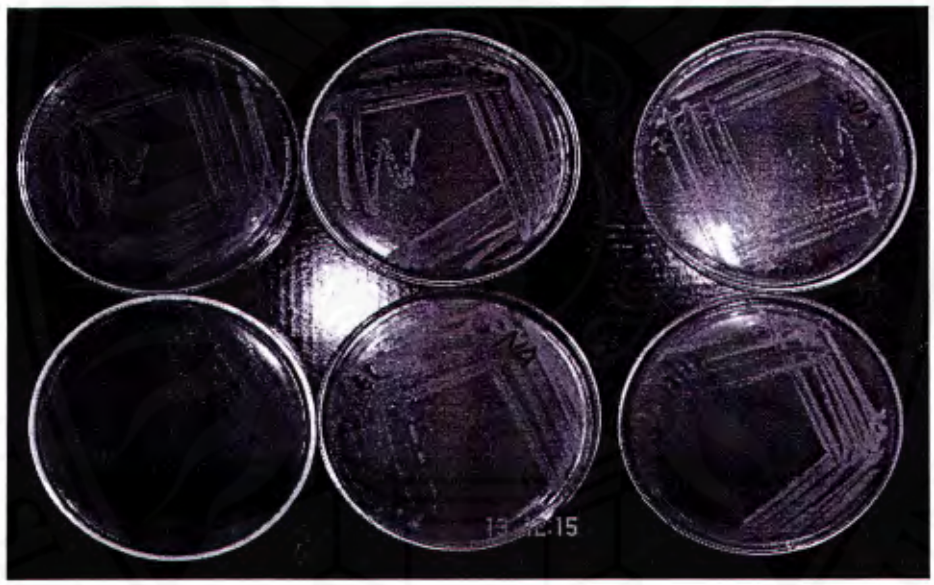
ภาพที่ 13 ตัวอย่างน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่เตรียมทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น สำหรับน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ โดยวิธี agar well diffusion (Lorain, 1996)

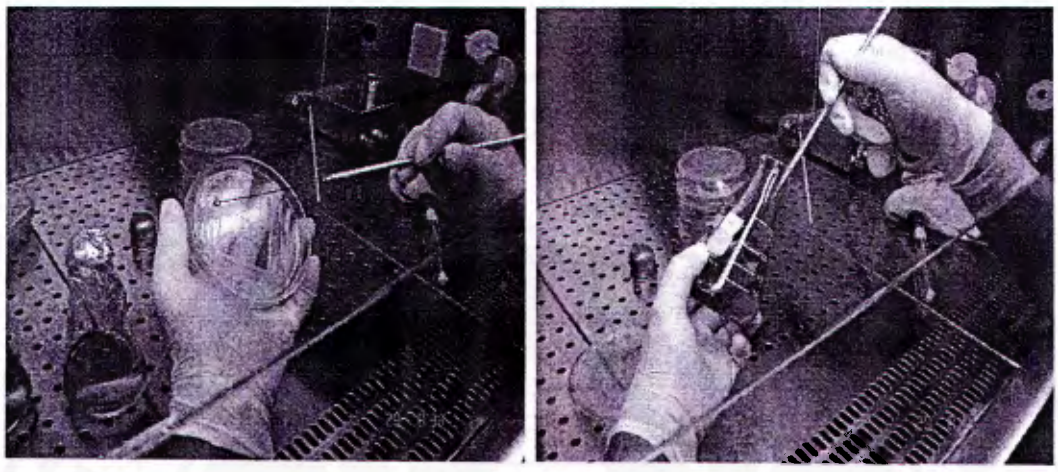
1. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยีสต์

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ (inoculums) ด้วยการ streak แบคทีเรีย Staphylcus aureus ATCC29523, methicillin – resistant S. aureus (MRSA) SK1, Escherichia coli ATCC25922 และ Pseudomonas aeruginosa ATCC27853 บนอาหาร nutrient agar (NA) และยีสต์ Candida albicans ATCC90028 และ C. neoformans ATCC90012 บนอาหาร sabouraud dextrose agar (SDA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง ยกเว้น C. neoformans ATCC90012 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 14) เขี่ยเชื้อจำนวน 3 – 5 single colonies ลงในอาหาร nutrient broth (NB) สำหรับแบคทีเรีย และ sabouraud dextrose broth (SDB) สำหรับยีสต์ (ภาพที่ 15) นำ inoculums ที่เตรียมได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 3 – 5 ชั่วโมง (ภาพที่ 16) แล้วนำมาปรับให้ได้ความขุ่นของแบคทีเรียและยีสต์เท่ากับ 0.5 และ 2.0 McFarland standard (MF) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ ด้วย normal saline solution : NSS (ภาพที่ 17)

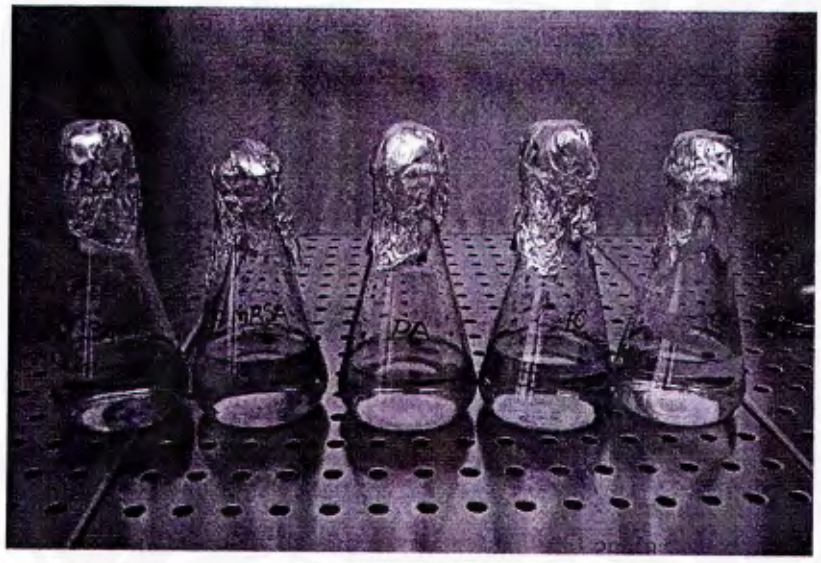
ทำการลงเชื้อโดยใช้ sterile cotton swab จุ่มเชื้อแล้วบิดให้หมาด ทำการ swab ให้ทั่วจานอาหารที่มีความหนา 4 มิลลิเมตร โดยแบคทีเรียใช้อาหาร Mueller – Hinton agar (MHA) และยีสต์ใช้อาหาร SDA (ภาพที่ 18) ทำการเจาะวุ้นอาหารด้วยปลายที่จับของพาสเจอร์ปิเปต (pasteur's pipette) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร โดยทำทั้งหมด 17 หลุมต่อจาน (ภาพที่ 19) หลังจากนั้นหยดน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงใน PDB ที่อายุ 3 สัปดาห์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้แล้ว (ภาพที่ 20) โดยชุดควบคุมทดสอบด้วยแผ่นยาปฏิชีวนะ สำหรับแบคทีเรีย S. aureus ใช้ยา vancomycin 30 ไมโครกรัม/แผ่น E. coli ATCC25922 และ P. aeruginosa ATCC27853 ใช้ยา gentamicin 10 ไมโครกรัม/แผ่น ส่วนยีสต์ใช้ amphotericin B 10 ไมโครกรัม/แผ่น (ภาพที่ 21) นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง สำหรับ C. neoformans ATCC90012 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการอ่านผล โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone โดยใช้ vernier caliper หน่วยการวัดเป็นมิลลิเมตร



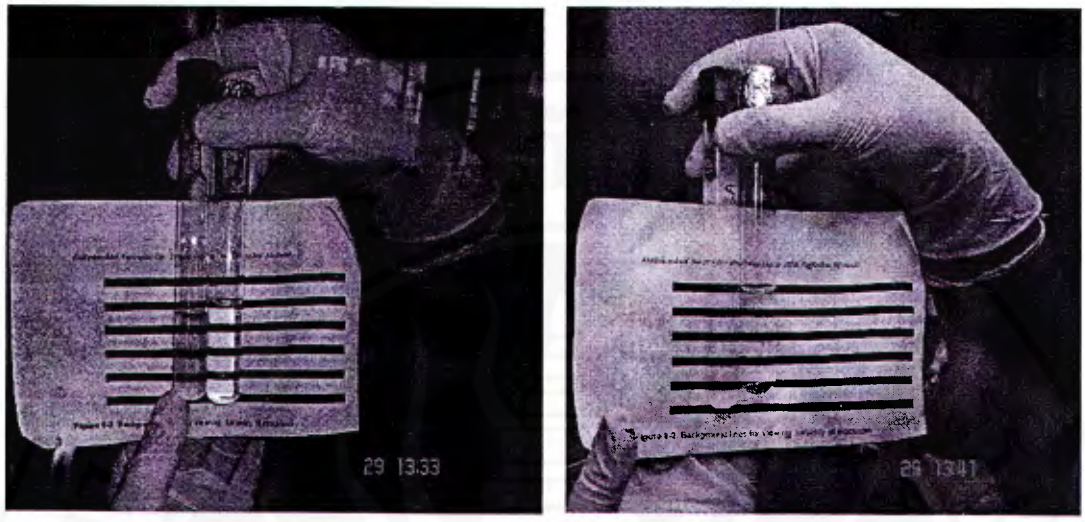
ภาพที่ 14 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 15 การเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคลงในอาหารเหลว

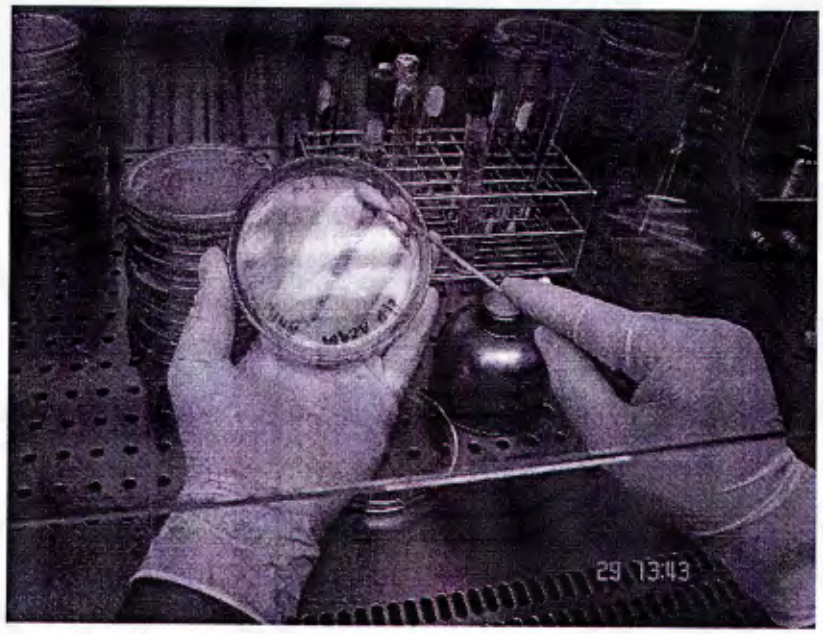


ภาพที่ 16 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมได้ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 ชั่วโมง

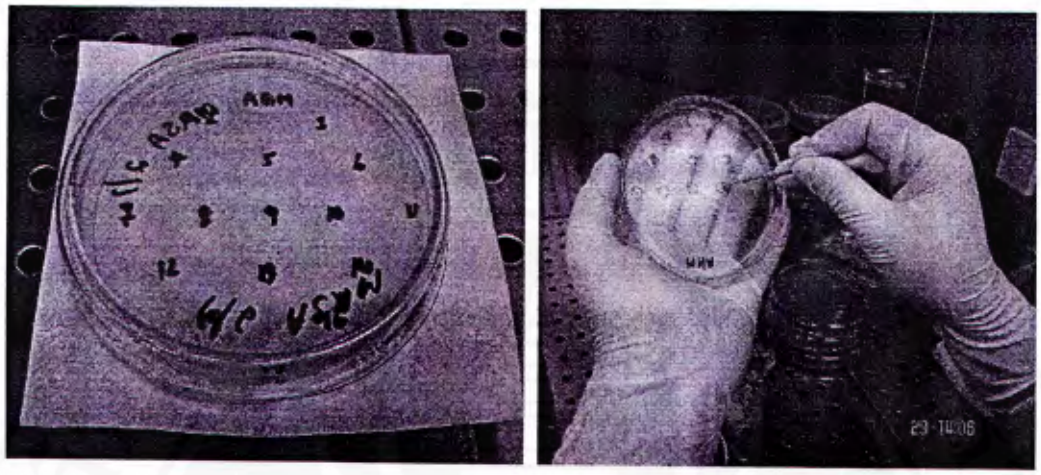


ก. ข.

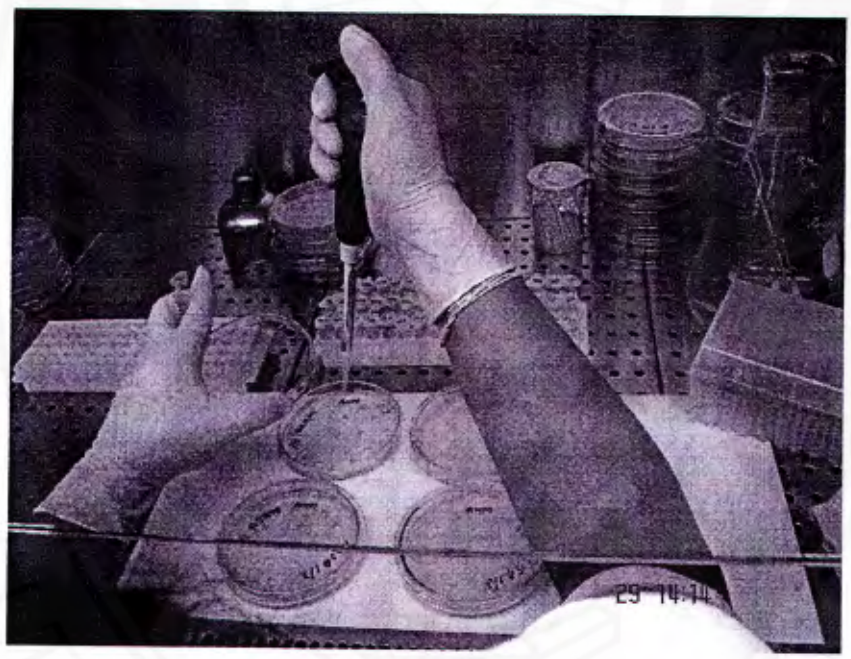
ภาพที่ 17 การปรับความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ
ก. ก่อนปรับความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์
ข. หลังปรับความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์



ภาพที่ 18 การลงเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 19 การเจาะวุ้นอาหาร จำนวน 17 หลุม ด้วยปลายจับของพาสเจอร์ปิเปต



ภาพที่ 20 การหยดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ลงในอาหารวุ้นที่เจาะ

ภาพที่ 21 ชุดควบคุมทดสอบฤทธิ์ต้าน E. coli ATCC25922
ด้วยแผ่นยาปฏิชีวนะ gentamicin 10 ไมโครกรัม/แผ่น

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านรา (ดัดแปลงจากวิธีของ Huang et al., 2000)

เตรียม inoculum ของรา โดยเลี้ยง Microsporum gypseum บนอาหาร SDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 4 ให้ได้โคโลนีที่มีลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร หลังจากนั้นใช้ปลายที่จับของพาสเจอร์ปิเปตเจาะอาหารที่อยู่รอบขอบโคโลนีของราที่กำลังเจริญเติบโต โดยเจาะห่างจากขอบของโคโลนีประมาณ 0.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 22) แล้วหยดน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงใน PDB ที่อายุ 3 สัปดาห์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะ โดยชุดควบคุมทดสอบด้วยยา miconazole nitrate (30 ไมโครกรัม/แผ่น) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 – 4 วัน สังเกตผลการยับยั้งทุกวัน หากมีการยับยั้งจะพบ inhibition zone หรือพบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญเลยหลุมไปได้

ภาพที่ 22 การเจาะอาหารรอบขอบโคโลนีของรา Microsporum gypseum

การสกัดน้ำเลี้ยงราและเส้นใยรา ด้วยตัวทำละลายทางเคมี

นำน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น (ภาพที่ 23) ไปกรองแยกเส้นใยราออกจากน้ำเลี้ยงรา โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (ภาพที่ 24) จากนั้นนำเส้นใยราและน้ำเลี้ยงราไปสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี เพื่อหาสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ราเอนโดไฟท์ชนิดนั้นๆ สร้างขึ้น โดยมีขั้นตอนการสกัด (ภาพที่ 25) ดังนี้

1. การสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์

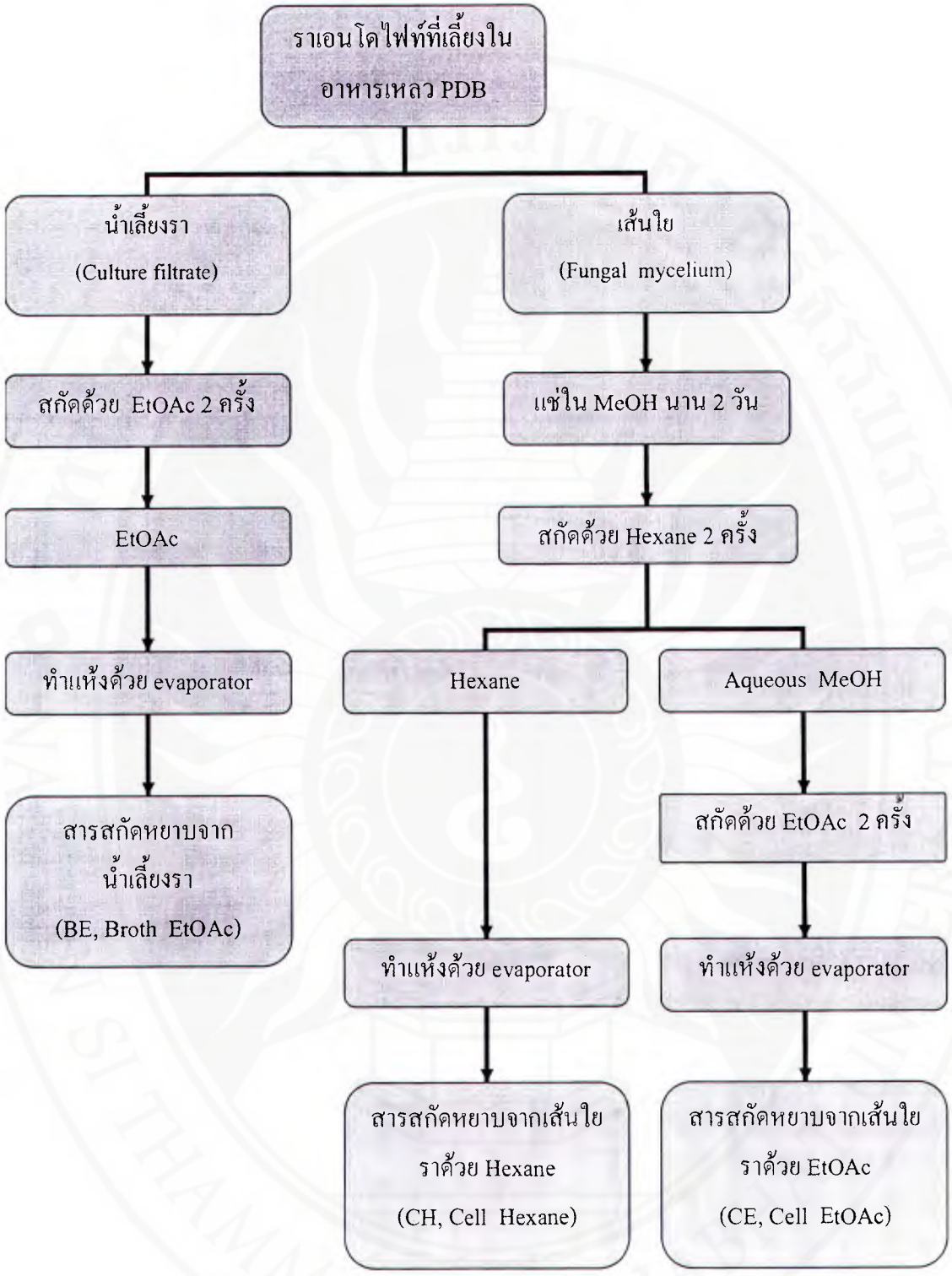
ทำการสกัดโดยใช้ ethyl acetate (EtOAc, AR grade) โดยใช้อัตราส่วนน้ำเลี้ยงราต่อ EtOAc เท่ากับ 2 : 1 ทำการสกัดทั้งหมด 2 ครั้ง แล้วนำ EtOAc ที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกัน แล้วใส่สารกำจัดน้ำ (dehydrating agent) คือ sodium sulphate anhydrous ลงไป หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (ภาพที่ 26) แล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) (ภาพที่ 27) ที่อุณหภูมิประมาณ 40 – 45 องศาเซลเซียสได้สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ (BE, Broth EtOAc) แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

2. การสกัดเส้นใยของราเอนโดไฟท์

ทำการสกัดคล้ายกับการสกัดน้ำเลี้ยงรา โดยนำเส้นใยราแช่ใน methanol (MeOH, commercial grade) เป็นเวลา 2 วัน (ภาพที่ 28) นำสารละลาย MeOH ไปทำให้เข้มข้น โดยการระเหยตัวทำละลายบางส่วนออกไป จากนั้นเติมน้ำลงไป แล้วนำไปสกัดด้วย hexane (AR grade) ในอัตราส่วน 2 : 1 โดยทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำ hexane ที่ได้จากการสกัดไปทำแห้ง หลังจากนั้นนำสารละลาย aqueous MeOH ที่ผ่านการสกัดด้วย hexane แล้ว ไปสกัดต่อด้วย EtOAc ในอัตราส่วน 2 : 1 เช่นเดียวกัน โดยสกัดด้วย EtOAc 2 ครั้ง (ภาพที่ 29) ซึ่งจากการสกัดดังกล่าวจะได้สารสกัด 2 ส่วน คือ CH (Cell hexane) และ CE (Cell EtOAc) ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

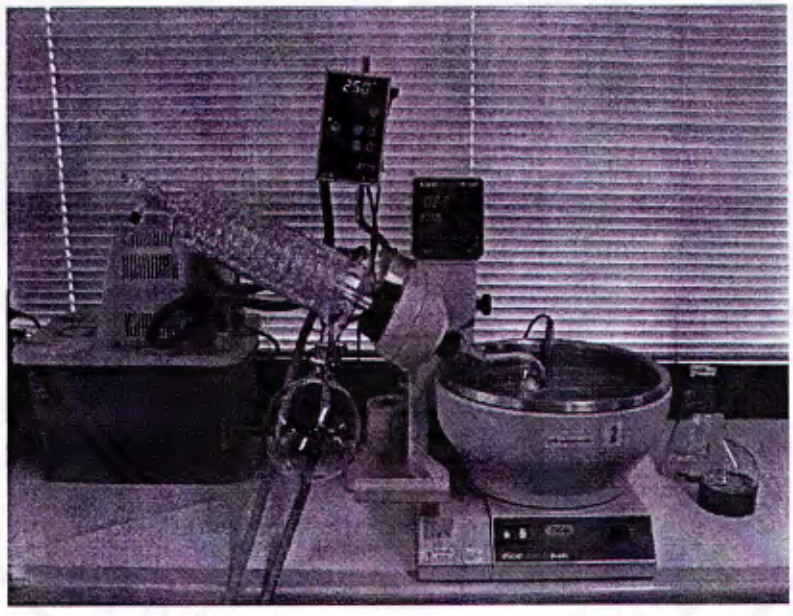
ภาพที่ 23 ตัวอย่างน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ อายุ 3 สัปดาห์ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในเบื้องต้น

ภาพที่ 24 การกรองแยกเส้นใยราออกจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์

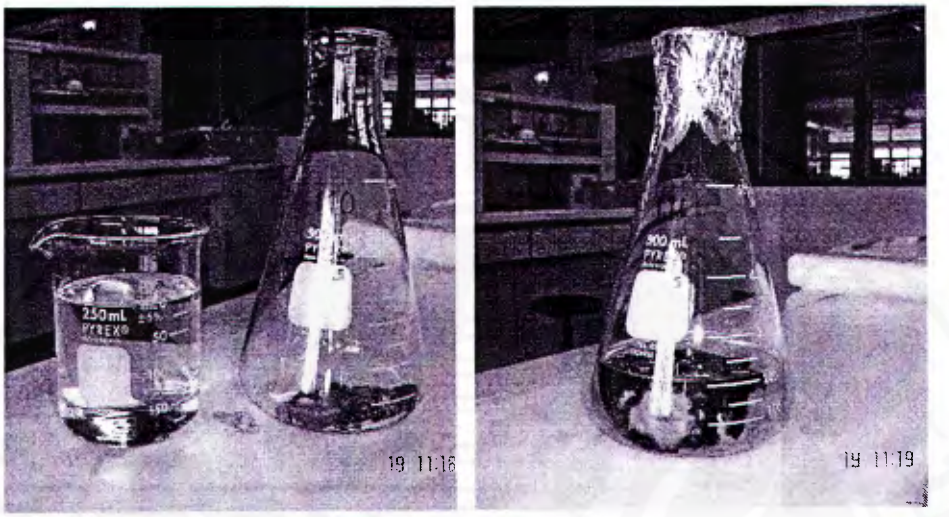


ภาพที่ 25 ขั้นตอนการสกัดน้ำเลี้ยงและเส้นใยราเอนโดไฟท์ ด้วยตัวทำละลายทางเคมีชนิดต่างๆ

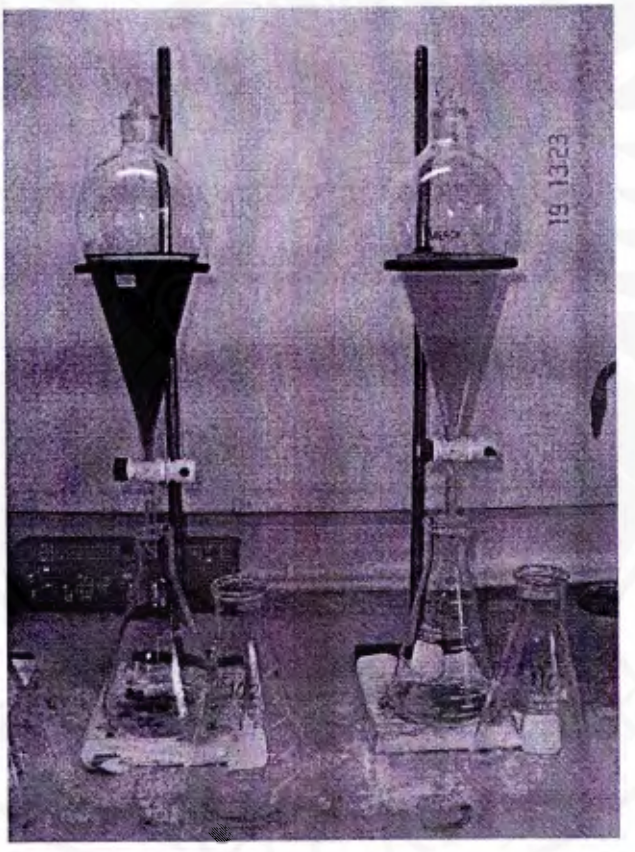
ภาพที่ 26 การกรองน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate



ภาพที่ 27 การนำสารละลายที่ได้จากน้ำเลี้ยงราไปทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน



ภาพที่ 28 การแช่เส้นใยราเอนโดไฟท์ในตัวทำละลาย methanol



ภาพที่ 29 การสกัดเส้นใยราเอนโดไฟท์ด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ สำหรับสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ โดยวิธี agar disc diffusion (Lorian, 1996)

1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานด้วยการ streak เชื้อแบคทีเรีย S. aureus ATCC25923, MRSA SK1, E. coli ATCC25922 และ P. aeruginosa ATCC27853 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อยีสต์ C. albicans ATCC90028 จะ streak เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง และ C. nioformans ATCC90012 จะ streak เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เช่นกัน แต่บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการ streak เชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 – 5 single colonies ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และเชื้อยีสต์ C. albicans ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI – 1640 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 3 – 5 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับด้วย NSS ความเข้มข้น 0.85 % ให้ได้ความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์เท่ากับ 0.5 และ 2.0 MF ตามลำดับ ซึ่งจะมีปริมาณแบคทีเรียและยีสต์ประมาณ 5 x 10^5 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (CFU, colony – forming unit) ส่วนเชื้อรา M. gypseum ให้เขี่ยเชื้อบน SDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 2 – 3 สัปดาห์ หรือจนกว่าจะมีการสร้างสปอร์ ทำการเก็บสปอร์โดยวิธีกลิ้งบนลูกกลิ้งที่ปราศจากเชื้อที่มี NSS อยู่ จากนั้นเตรียม spore suspension ให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์ 4 x 10^3 - 5 x 10^4 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร โดยใช้ hemacytometer

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

นำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์มาละลายด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส แล้วเจือจางด้วย DMSO ในอัตราส่วน 1 : 10 และอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ในอัตราส่วน 1 : 25 จะได้ความเข้มข้นของสารสกัด 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารสกัดหยาบ (400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 – well microtiter plate ทำการเจือจางแบคทีเรีย (0.5 MF) ด้วย NSS ในอัตราส่วน 1 : 200 (~ 5 x 10^5 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) แล้วนำแบคทีเรียมา 50 ไมโครลิตร ไปเติมลงในแต่ละหลุม จะได้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้เติม resazurin indicator ความเข้มข้น 0.18% จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 2 – 3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ (Drummond & Waigh, 2002)

ยาต้านแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบคือ vancomycin (แกรมบวก) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ gentamicin (แกรมลบ) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI – 1640 แทน นำ microtiter plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ C. albicans และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ C. neoformans แล้วเติม resazurin indicator ความเข้มข้น 0.18% จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Drummond & Waigh, 2002)

ยาต้านยีสต์มาตรฐานที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบคือ amphotericin B ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านรา

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านรา M. gypseum เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI – 1640 และบ่ม microtiter plate ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน แล้วเติม resazurin indicator ความเข้มข้น 0.18% จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

ยาต้านรามาตรฐานที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบคือ miconazole ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5. การอ่านผลการทดสอบ

ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อได้ อาหารเลี้ยงเชื้อจะยังคงมีสีน้ำเงินหรือสีม่วง (ผลบวก) แต่ถ้าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (ผลลบ) เชื้อจะเจริญเติบโตและเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีชมพูหรือไม่มีสี

การหาค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ โดยวิธี broth microdilution (Lorain, 1996)

1. การหาค่า MIC ต่อแบคทีเรีย

นำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์มาละลายด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส แล้วเจือจางด้วย DMSO ในอัตราส่วน 1 : 10 และอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ในอัตราส่วน 1 : 25 จะได้ความเข้มข้นของสารสกัด 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารสกัดหยาบ (400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 – well microtiter plate ทำการเจือจางแบคทีเรีย (0.5 MF) ด้วย NSS ในอัตราส่วน

1 : 200 (~ 5 x 10^5 CFU/ml) แล้วนำแบคทีเรียมา 50 ไมโครลิตร ไปเติมลงในแต่ละหลุม จะได้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารสกัดหยาบด้วยวิธีเจือจางความเข้มข้น (serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 128, 64, 32, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้เติม resazurin indicator ความเข้มข้น 0.18% จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 2 – 3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ (Drummond & Waigh, 2002)

ยาต้านแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบคือ vancomycin (แกรมบวก) ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ gentamicin (แกรมลบ) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การหาค่า MIC ต่อยีสต์

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI – 1640 แทน นำ microtiter plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ C. albicans และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ C. neoformans แล้วเติม resazurin indicator ความเข้มข้น 0.18% จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Drummond & Waigh, 2002)

ยาต้านยีสต์มาตรฐานที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบคือ amphotericinB ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การหาค่า MIC ต่อรา

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านรา M. gypseum เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI – 1640 และบ่ม microtiter plate ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน แล้วเติม resazurin indicator ความเข้มข้น 0.18% จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

ยาต้านเชื้อรามาตรฐานที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบคือ miconazole ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลังจากบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ จะอ่านเป็นค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ซึ่งจะแสดงผลเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วง

การหาค่า minimal bactericidal concentration (MBC) และ minimal fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ ทำโดยนำสารละลายจากหลุม microtitier plate ที่มีค่าความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับค่า MIC มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA

สำหรับแบคทีเรียและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA สำหรับยีสต์และรา บ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ คือค่า MBC และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่ายีสต์ได้ คือค่า MFC

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological study) ของราเอนโดไฟท์

1. Macroscopic morphological characters

เลือกศึกษาเฉพาะราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่น่าสนใจ โดยการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA เพื่อศึกษาลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใยโคโลนี และอัตราการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟท์ ด้วยวิธีการสังเกตด้วยตาเปล่า ทำการถ่ายภาพและบันทึกผลการสังเกต

2. Microscopic morphological characters

ทำการศึกษาโครงสร้างการสืบพันธุ์ (reproductiv structure) ของราเอนโดไฟท์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมด้วยสี lactophenol cotton-blue เพื่อศึกษาลักษณะการมี/ไม่มีผนังกั้น สีของเส้นใย การสร้างสปอร์ พร้อมทั้งถ่ายภาพและบันทึกผล

ขั้นตอนการทำ slide culture

1) นำแท่งแก้วงอและกระจกปิดสไลด์วางลงในจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในตู้อบความร้อนแห้ง ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 3 ชั่วโมง

2) เตรียมอาหาร PDA ในปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำอาหาร PDA เทใส่จานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

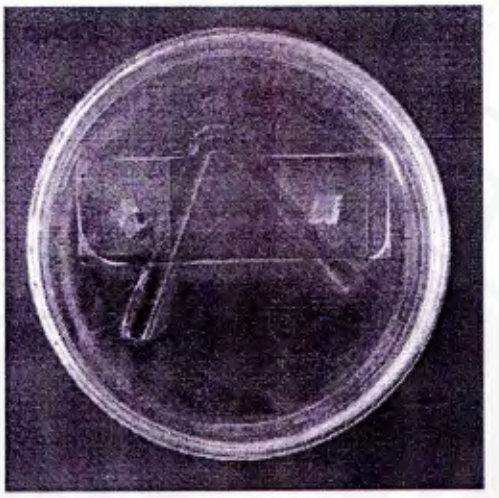
3) ตัดชิ้นส่วนของอาหาร PDA ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 1 X 1 ตารางเซนติเมตร แล้วนำมาวางบนกระจกสไลด์ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ

4) นำเข็มเขี่ยเชื้อเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งให้เย็นสักครู่ นำมาเขี่ยเส้นใยราที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำมาวางที่ด้านข้างของชิ้นส่วนอาหาร PDA ให้ครบทั้ง 4 ด้าน

5) ใช้ปากคีบคีบกระจกปิดสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95% เผาไฟ รอจนไฟดับและเย็น นำมาวางปิดทับบนอาหาร PDA ที่วางเส้นใยของเชื้อราเรียบร้อยแล้ว

6) นำน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทใส่ในจานเพาะเชื้อเพียงเล็กน้อย เพื่อเพิ่มความชื้นให้กับเส้นใยรา หลังจากนั้นวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2 – 3 วัน (ภาพที่ 30) สังเกตผล

7) นำเส้นใยรามาย้อมด้วยสี lactophenol cotton-blue จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพ



ภาพที่ 30 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA (slide culture)

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ค่าร้อยละ (percentage) โดยใช้สูตร (พรรณี ลีกิจวัฒนะ, 2552)

$$PCT = \frac{Ni \times 100}{Nt}$$

เมื่อ PCT แทน ค่าร้อยละ

Ni แทน ค่าความถี่ที่ต้องการเปลี่ยนให้เป็นร้อยละ

Nt แทน จำนวนความถี่ทั้งหมด

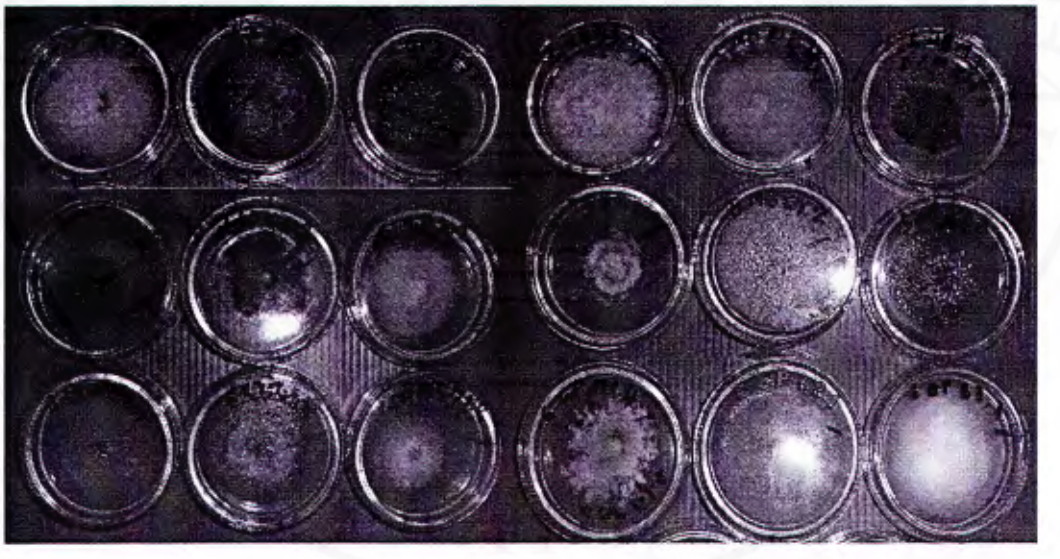
บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การเสนอผลการวิจัย เรื่องการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากต้นมันปู ผู้วิจัยได้นำเสนอผลการวิเคราะห์ข้อมูลตามลำดับดังนี้

1. ผลการแยกราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู
2. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้นของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์
3. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์
4. ผลการจำแนกราเอนโดไฟท์ โดยใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการแยกราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู

จากการแยกราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างต้นมันปูที่เก็บจากอำเภอเมือง อำเภอนาบอน อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอลำทับ อำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่ และอำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง โดยเก็บตัวอย่างต้นมันปูอำเภอละ 1 ต้น ต้นละ 3 กิ่งและ 3 ใบ สามารถแยกราเอนโดไฟท์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันได้จากตัวอย่างต้นมันปู รวมทั้งหมด 208 ไอโซเลต ดังตัวอย่างแสดงในภาพที่ 31



ภาพที่ 31 ตัวอย่างราเอนโดไฟท์ที่แยกได้บริสุทธิ์จากต้นมันปูที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน

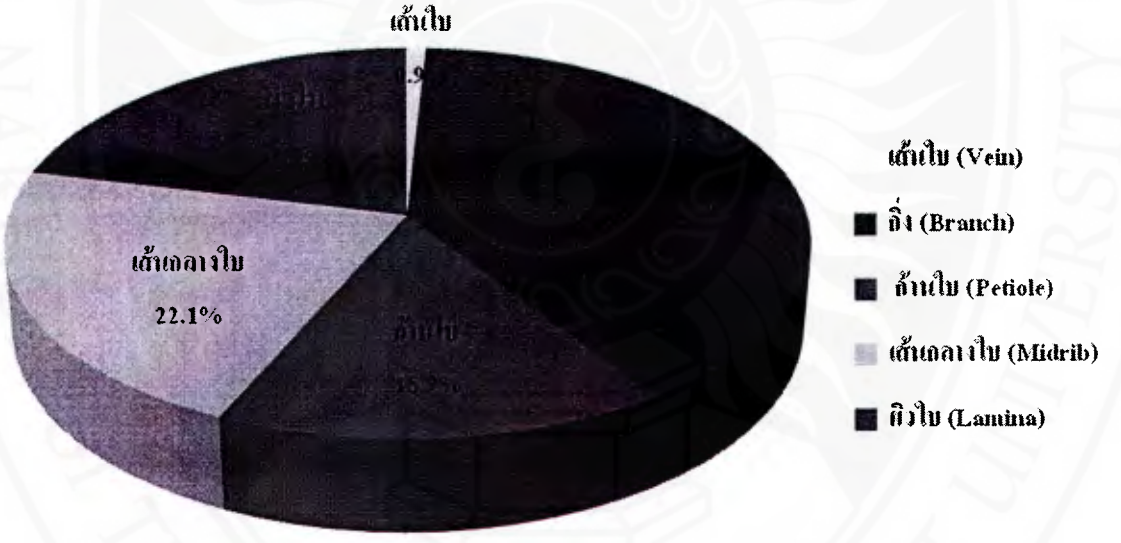
เมื่อพิจารณาถึงพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างต้นมันปู พบว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากอำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง มีจำนวนมากที่สุด คือ 49 ไอโซเลต คิดเป็น 23.6% ของจำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมด อำเภออื่นๆ ที่แยกได้รองลงมาคือ อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 45 ไอโซเลต (21.6%) อำเภอลำทับ จังหวัดกระบี่ จำนวน 32 ไอโซเลต (15.3%) อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 28 ไอโซเลต (13.5%) จากอำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่ และอำเภอนาบอน จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 27 ไอโซเลต (13.0%) ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 32

เมื่อพิจารณาจากส่วนต่างๆ ของต้นมันปูที่นำมาแยกราเอนโดไฟท์ ซึ่งประกอบไปด้วย กิ่ง (branch : B) ก้านใบ (petriole : P) เส้นกลางใบ (midrib : M) เส้นใบ (vein : V) และผิวใบ (lamina : L) สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้จากส่วนของกิ่งมากที่สุด จำนวน 83 ไอโซเลต คิดเป็น 39.9% ของจำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมด ส่วนอื่นๆ ของใบที่แยกราเอนโดไฟท์ได้รองลงมาคือ เส้นกลางใบ จำนวน 46 ไอโซเลต (22.1%) ผิวใบ จำนวน 44 ไอโซเลต (21.2%) ก้านใบ จำนวน 33 ไอโซเลต (15.9%) และจากเส้นใบได้น้อยที่สุด จำนวน 2 ไอโซเลต (0.9%) ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 33

ตารางที่ 1 จำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของต้นมันปูที่เก็บจากอำเภอต่างๆ

พื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างต้นมันปู	จำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืช					รวม (ร้อยละ)
	กิ่ง (B)	ก้านใบ (P)	เส้นกลางใบ (M)	เส้นใบ (V)	ผิวใบ (L)	
อำเภอเมือง (MN) จังหวัดนครศรีธรรมราช	11	7	7	0	3	**28 (13.5)**
อำเภอนาบอน (NB) จังหวัดนครศรีธรรมราช	10	6	8	0	3	**27 (13.0)**
อำเภอเฉลิมพระเกียรติ (GP) จังหวัดนครศรีธรรมราช	15	6	14	1	9	**45 (21.6)**
อำเภอลำทับ (LT) จังหวัดกระบี่	10	8	3	0	11	**32 (15.3)**
อำเภอคลองท่อม (CT) จังหวัดกระบี่	7	4	10	0	6	**27 (13.0)**
อำเภอเมือง (PL) จังหวัดพัทลุง	30	2	4	1	12	**49 (23.6)**
รวม (ร้อยละ)	**83 (39.9)**	**33 (15.9)**	**46 (22.1)**	**2 (0.9)**	**44 (21.2)**	**208 (100)**

ภาพที่ 32 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นมันปู จำแนกตามพื้นที่เก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 33 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นมันปู จำแนกตามส่วนของพืชที่นำมาแยกเชื้อ

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์

จากการนำราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ จำนวน 208 ไอโซเลต ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำน้ำเลี้ยงราไปทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion พบราเอนโดไฟท์ จำนวน 36 ไอโซเลต คิดเป็น 17.3% ของจำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมดที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และราชนิดใดชนิดหนึ่งที่นำมาทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 2 เปรียบเทียบกับฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะ ดังแสดงในตารางที่ 3

จากจำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จำนวน 36 ไอโซเลต พบราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากอำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง มากที่สุด จำนวน 11 ไอโซเลต คิดเป็น 30.5% ของจำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งหมด รองลงมาคือ อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 8 ไอโซเลต (22.2%) อำเภอนาบอน จังหวัดนครศรีธรรมราช และอำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่ จังหวัดละ 6 ไอโซเลต (16.7%) อำเภอลำทับ จังหวัดกระบี่ จำนวน 3 ไอโซเลต (8.3%) และอำเภอที่พบราเอนโดไฟท์มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ จำนวนน้อยที่สุดคือ อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยพบเพียง 2 ไอโซเลต (5.6%) ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 34

เมื่อพิจารณาจากส่วนต่างๆ ของต้นมันปูที่นำมาแยกราเอนโดไฟท์ พบราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น มาจากส่วนของกิ่งมากที่สุด จำนวน 17 ไอโซเลต คิดเป็น 47.2 % ของจำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งหมด รองลงมา คือเส้นกลางใบ จำนวน 11 ไอโซเลต (30.6 %) ก้านใบ จำนวน 5 ไอโซเลต (13.9 %) และจากผิวใบ จำนวน 3 ไอโซเลต (8.3%) ทั้งนี้ราเอนโดไฟท์ที่แยกจากส่วนของเส้นใบไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในเบื้องต้น ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 35

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ อายุ 3 สัปดาห์ ที่แยกได้จากต้นมันปู ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	รหัสราเอนโดไฟท์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone diameter (mm)						
			SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
1	PL- B1.2	A102							+
2	PL- B2.5	A115	10.35	17.20					
3	PL- L2.2	A201	8.15	9.00					
4	PL- B3.1	A202	9.90	10.70					+
5	PL- B3.2	A203							+
6	PL- B3.4	A205	9.50						
7	PL- B3.5	A206							+
8	PL- P3.1	A207							+
9	CT- B1.1	A208	10.70						
10	CT- P3.1	A211							+
11	LT- B2.1	A212	8.10						
12	LT- L1.2	A301	8.05						

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923 **MRSA** = methicillin-resistant S. aureus SK1 **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853

EC = Escherichia coli ATCC25922 **CA** = Candida albicans ATCC90028 **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112

MG = Microsporum gypseum **ราเอนโดไฟท์** (อำเภอที่เก็บ – ส่วนของพืช,ลำดับไอโซเลตของเชื้อรา) (+) = มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	รหัสราเอนโดไฟท์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone diameter (mm)						
			SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
13	NB - B3.1	A306							+
14	NB - B3.2	A307							+
15	NB - B3.3	A308	1.20	9.20					
16	NB - M3.1	A309							+
17	NB - M3.2	A310	7.00	6.30					
18	GP - B1.1	A312	13.00						
19	GP - M1.3	A316	8.15	7.40					
20	GP - P1.1	A402					11.50		+
21	GP - P2.1	A403	10.10	8.50					+
22	GP - L2.1	A406	8.10	7.40					
23	CT - M1.2	A3	10.60	11.20					
24	MN - M1.1	A11			10.45				

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923 **MRSA** = methicillin-resistant S. aureus SK1 **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853

EC = Escherichia coli ATCC25922 **CA** = Candida albicans ATCC90028 **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112

MG = Microsporum gypseum **ราเอนโดไฟท์** (อำเภอที่เก็บ – ส่วนของพืช,ลำดับไอโซเลตของเชื้อรา) (+) = มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	รหัสราเอนโดไฟท์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone diameter (mm)						
			SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
25	NB - M1.1	A13	11.00	9.95					
26	GP - M1.4	A15	8.25	8.75					
27	PL - B1.2	B102						11.90	
28	PL - B2.3	B110	15.70	15.20	10.10	8.55			
29	PL - P2.1	B113	10.55	12.80					+
30	CT - M1.2	B213		10.80					
31	CT - M1.3	B214	13.35				14.95	12.75	+
32	CT - M2.3	B304	8.70	10.50					
33	LT - B2.1	B316	7.70	8.40					
34	MN - B1.5	B504	14.30						
35	GP - B1.4	B711	8.80						
36	GP - M3.1	B811	8.50						

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923 **MRSA** = methicillin-resistant S. aureus SK1 **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853

EC = Escherichia coli ATCC25922 **CA** = Candida albicans ATCC90028 **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112

MG = Microsporum gypseum ราเอนโดไฟท์ (อำเภอที่เก็บ – ส่วนของพืช,ลำดับไอโซเลตของเชื้อรา) (+) = มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone diameter (mm)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
Vancomycin	30 µg/แผ่น	15.00	16.85					
Gentamicin	10 µg/แผ่น			22.40	21.30			
AmphotericinB	10 µg/แผ่น					10.95	10.25	
Miconazole	30 µg/แผ่น							+

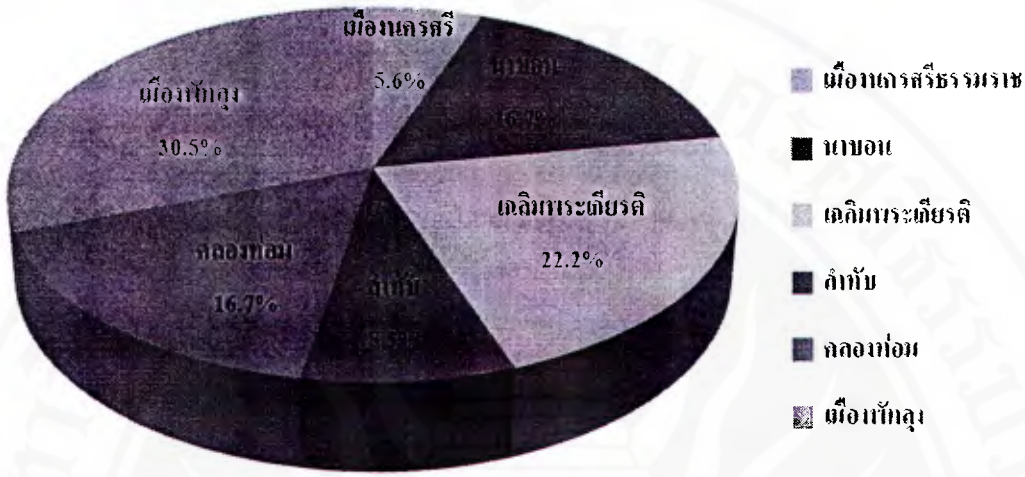
SA = Staphylococcus aureus ATCC25923 **MRSA** = methicillin-resistant S. aureus SK1 **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853

EC = Escherichia coli ATCC25922 **CA** = Candida albicans ATCC90028 **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112

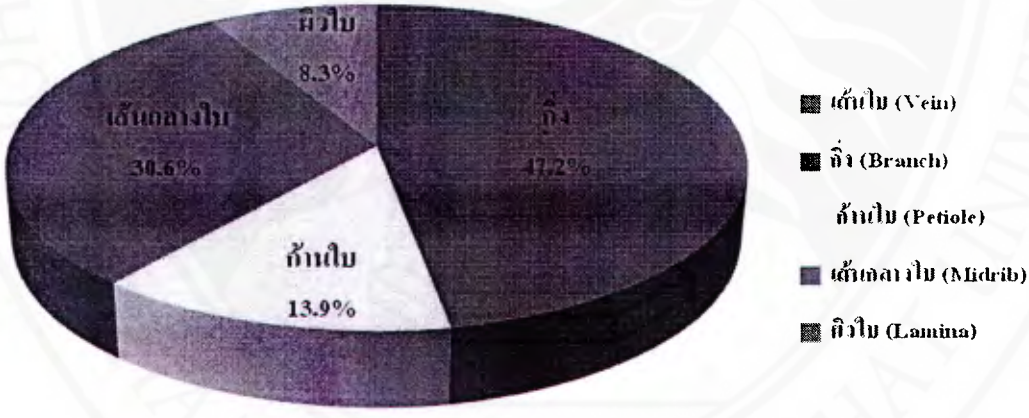
MG = Microsporum gypseum (+) = มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา

ตารางที่ 4 จำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้นจากส่วนต่างๆ ของพืช จำแนกตามอำเภอที่ทำการเก็บตัวอย่าง

พื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างต้นมันปู	จำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งหมดจากส่วนต่างๆ ของพืช					รวม (ร้อยละ)
	กิ่ง (B)	ก้านใบ (P)	เส้นกลางใบ (M)	เส้นใบ (V)	ผิวใบ (L)	
อำเภอเมือง (MN) จังหวัดนครศรีธรรมราช	1	0	1	0	0	**2 (5.6)**
อำเภอนาบอน (NB) จังหวัดนครศรีธรรมราช	3	0	3	0	0	**6 (16.7)**
อำเภอเฉลิมพระเกียรติ (GP) จังหวัดนครศรีธรรมราช	2	2	3	0	1	**8 (22.2)**
อำเภอลำทับ (LT) จังหวัดกระบี่	2	0	0	0	1	**3 (8.3)**
อำเภอคลองท่อม (CT) จังหวัดกระบี่	1	1	4	0	0	**6 (16.7)**
อำเภอเมือง (PL) จังหวัดพัทลุง	8	2	0	0	1	**11 (30.5)**
รวม (ร้อยละ)	**17 (47.2)**	**5 (13.9)**	**11 (30.6)**	**0 (0.0)**	**3 (8.3)**	**36 (100)**



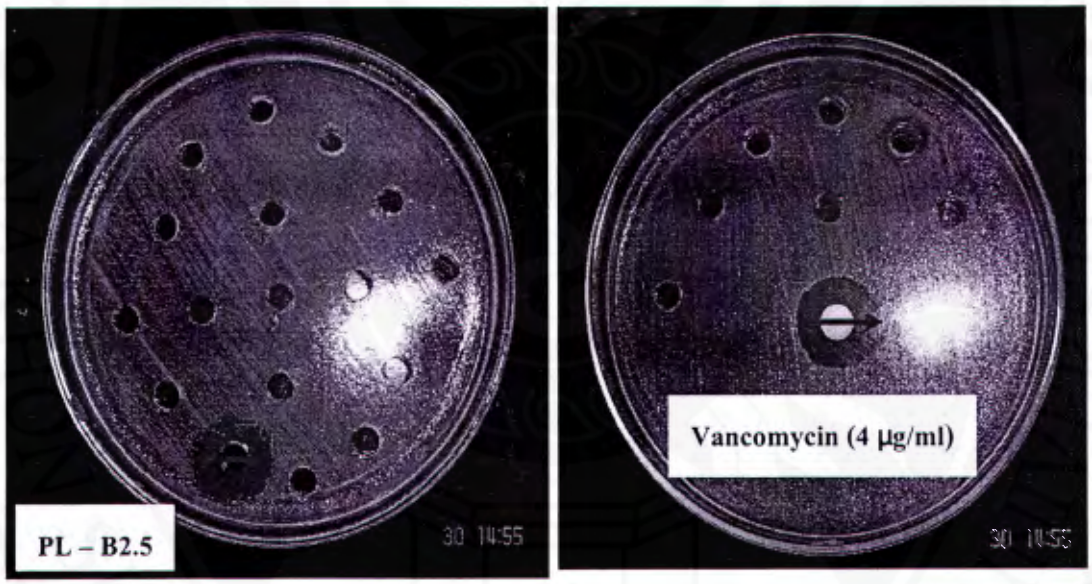
ภาพที่ 34 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น จำแนกตามพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 35 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น จำแนกตามส่วนต่างๆ ของต้นมันปูที่นำมาแยกราเอนโดไฟท์

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งโดยน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ พบราเอนโดไฟท์ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวก S.aureus ATCC29523 จำนวน 24 ไอโซเลต คิดเป็น 66.7% ของจำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งหมด โดยราเอนโดไฟท์ PL – B2.3 ให้ค่า inhibition zone กว้างที่สุด เท่ากับ 15.70 มิลลิเมตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ inhibition zone (15.00 มิลลิเมตร) ของยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน vancomycin ที่ใช้เปรียบเทียบ ส่วนราเอนโดไฟท์ที่เหลือ จำนวน 23 ไอโซเลต มีค่า inhibition zone อยู่ระหว่าง 7.00 – 14.30 มิลลิเมตร

ราเอนโดไฟท์ จำนวน 16 ไอโซเลต มีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA คิดเป็น 44.4% ของจำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งหมด โดยราเอนโดไฟท์ PL – B2.5 ให้ค่า inhibition zone กว้างที่สุด เท่ากับ 17.20 มิลลิเมตร (ภาพที่ 36) ซึ่งใกล้เคียงกับ inhibition zone (16.85 มิลลิเมตร) ของยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน vancomycin ที่ใช้เปรียบเทียบ ส่วนราเอนโดไฟท์ที่เหลือ จำนวน 15 ไอโซเลต มีค่า inhibition zone อยู่ระหว่าง 6.30 – 15.20 มิลลิเมตร



ก. ข.

ภาพที่ 36 Inhibition zone ที่ได้จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้นของราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู ด้วยวิธี agar well diffusion

ก. น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ทดสอบกับจุลินทรีย์ Methicilin – resistant S. aureus (MRSA) SK1

ข. ยาต้านแบคทีเรีย vancomycin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบ

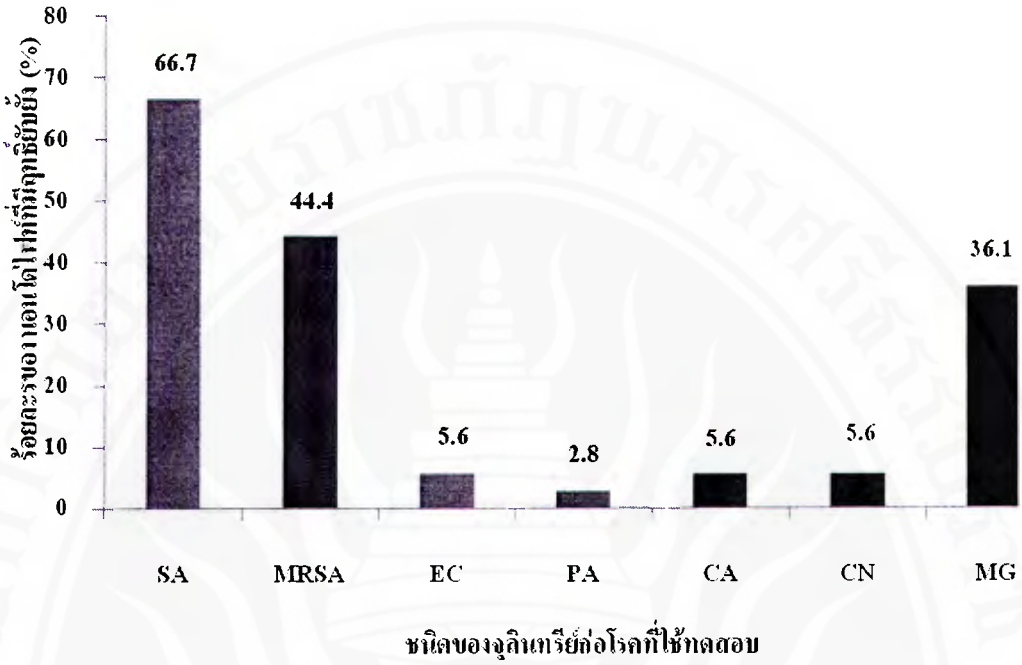
สำหรับเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ พบว่ามีราเอนโดไฟท์ เพียง 2 ไอโซเลต คือ MN – M1.1 และ PL – B2.3 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มนี้ คิดเป็น 5.6% ของจำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งหมด โดยราเอนโดไฟท์ MN – M1.1 และ PL – B2.3 ให้ค่า inhibition zone ต่อเชื้อ E. coli ATCC25923 เท่ากับ 10.45 และ 10.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ และมีเพียงราเอนโดไฟท์ PL – B2.3 ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง P. aeruginosa ATCC27853 โดยมีค่า inhibition zone เท่ากับ 8.55 มิลลิเมตร ซึ่งทั้ง 2 ไอโซเลตมีค่า inhibition zone น้อยกว่า inhibition zone ของยา gentamicin ที่ใช้เปรียบเทียบคือ 22.40 และ 21.30 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อ E. coli ATCC25923 และ P. aeruginosa ATCC27853 ตามลำดับ

ราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ C. albican ATCC90028 มีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ CT – M1.3 และ GP – P1.1 คิดเป็น 5.6% ของจำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งหมด โดยมีค่า inhibition zone เท่ากับ 14.95 และ 11.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนราเอนโดไฟท์ CT – M1.3 และ PL – B1.2 มีฤทธิ์ยับยั้ง C. neoformans ATCC90012 โดยมีค่า inhibition zone เท่ากับ 12.75 และ 11.90 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลตมีขนาด inhibition zone ใกล้เคียงกับ inhibition zone ของยา amphotericin B มาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบ คือ 10.95 และ 10.25 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อ C. albican ATCC90028 และ C. neoformans ATCC90012 ตามลำดับ

พบราเอนโดไฟท์ จำนวน 13 ไอโซเลต คิดเป็น 36.1% ของจำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งหมด ที่สามารถยับยั้งรา M. gypseum ได้ ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 37

ตารางที่ 5 จำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้น จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ

ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ	ราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์				
	จำนวนไอโซเลต	ร้อยละ	รา เอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด	Inhibition zone (มิลลิเมตร)	ยาต้านจุลินทรีย์ Inhibition zone (มิลลิเมตร)
แบคทีเรียแกรมบวก					Vancomycin
S. aureus ATCC29523	24	66.7	PL – B2.3	15.70	15.00
MRSA SK1	16	44.4	PL – B2.5	17.20	16.85
แบคทีเรียแกรมลบ					Gentamicin
E. coli ATCC25923	2	5.6	MN – M1.1	10.45	21.30
P. aeruginosa ATCC27853	1	2.8	PL – B2.3	8.55	22.40
ยีสต์					Amphotericin B
C. albican ATCC90028	2	5.6	CT – M1.3	14.95	10.25
C. neoformans ATCC90012	2	5.6	CT – M1.3	12.75	10.95
รา					Miconazole
M. gypseum	13	36.1	-	-	



ภาพที่ 37 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์

จากการนำน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์และเส้นใยรา จำนวน 36 ไอโซเลต ที่ทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นแล้วพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ไปสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมีได้เป็นสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงราด้วย ethyl acetate (BE) สารสกัดหยาบจากเส้นใยราด้วย hexane (CH) และสารสกัดหยาบจากเส้นใยราด้วย ethyl acetate (CE) ได้สารสกัดรวม 108 สารสกัด นำสารสกัดไปเจือจางเพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ โดยทำการทดสอบเฉพาะกับจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งจากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของน้ำเลี้ยงเชื้อ สารสกัดใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะนำมาเจือจางด้วยวิธีเจือจางความเข้มข้นให้มีความเข้มข้น 128, 64, 32, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อหาค่า MIC ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ สารใดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าหรือเท่ากับ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะรายงานว่ามีค่า MIC เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ของต้นมันปู

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	สารสกัด	Minimal Inhibitory Concentration (MIC)						
			SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
1	PL – B1.2	A102-BE							##
		A102-CH							32
		A102-CE							128
2	PL – B2.5	A115-BE	200	200					
		A115-CH							
		A115-CE		200					
3	PL – L2.2	A201-BE							
		A201-CH							
		A201-CE		200					
4	PL – B3.1	A202-BE	200	200					16
		A202-CH							##
		A202-CE							##

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	รา เอนโดไฟท์	สารสกัด	Minimal Inhibitory Concentration (MIC)						
			SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
5	PL – B3.2	A203-BE							128
		A203-CH							##
		A203-CE							##
6	PL – B3.4	A205-BE							
		A205-CH							
		A205-CE							
7	PL – B3.5	A206-BE							##
		A206-CH							128
		A206-CE							16
8	PL – P3.1	A207-BE							32
		A207-CH							##
		A207-CE							16

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	สารสกัด	Minimal Inhibitory Concentration (MIC)						
			SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
9	CT – B1.1	A208-BE	32						
		A208-CH							
		A208-CE	32						
10	CT – P3.1	A211-BE							64
		A211-CH							##
		A211-CE							128
11	LT – B2.1	A212-BE							
		A212-CH							
		A212-CE	32						
12	LT – L1.2	A301-BE							
		A301-CH							
		A301-CE							

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	สารสกัด	Minimal Inhibitory Concentration (MIC)						
			SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
13	NB – B3.1	A306-BE							128
		A306-CH							128
		A306-CE							##
14	NB – B3.2	A307-BE							##
		A307-CH							##
		A307-CE							##
15	NB – B3.3	A308-BE		200					
		A308-CH							
		A308-CE							
16	NB – M3.1	A309-BE							##
		A309-CH							64
		A309-CE							8

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	สารสกัด	Minimal Inhibitory Concentration (MIC)						
			SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
17	NB – M3.2	A310-BE							
		A310-CH							
		A310-CE							
18	GP – B1.1	A312-BE							
		A312-CH							
		A312-CE	32						
19	GP – M1.3	A316-BE							
		A316-CH							
		A316-CE		200					
20	GP – P1.1	A402-BE					8		128
		A402-CH					4		##
		A402-CE					16		128

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 μg/ml

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	รานอนโดไฟท์	สารสกัด	Minimal Inhibitory Concentration (MIC)						
			SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
21	GP – P2.1	A403-BE							16
		A403-CH							64
		A403-CE		200					64
22	GP – L2.1	A406-BE	128	200					
		A406-CH		200					
		A406-CE							
23	CT – M1.2	A3-BE							
		A3-CH							
		A3-CE		200					
24	MN – M1.1	A11-BE							
		A11-CH							
		A11-CE							

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	ราแอนโดไฟท์	สารสกัด	Minimal Inhibitory Concentration (MIC)						
			SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
25	NB – M1.1	A13-BE							
		A13-CH		200					
		A13-CE		200					
26	GP – M1.4	A15-BE							
		A15-CH							
		A15-CE							
27	PL – B1.2	B102-BE						200	
		B102-CH						32	
		B102-CE						200	
28	PL – B2.3	B110-BE		200					
		B110-CH				200			
		B110-CE							

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	สารสกัด	Minimal Inhibitory Concentration (MIC)						
			SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
29	PL – P2.1	B113-BE		200					8
		B113-CH							##
		B113-CE							64
30	CT – M1.2	B213-BE							
		B213-CH							
		B213-CE		200					
31	CT – M1.3	B214-BE					128	200	16
		B214-CH					4	200	16
		B214-CE					16	200	##
32	CT – M2.3	B304-BE							
		B304-CH	200	200					
		B304-CE							

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	สารสกัด	Minimal Inhibitory Concentration (MIC)						
			SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
33	LT – B2.1	B316-BE							
		B316-CH							
		B316-CE		200					
34	MN – B1.5	B504-BE							
		B504-CH							
		B504-CE							
35	GP – B1.4	B711-BE							
		B711-CH							
		B711-CE							
36	GP – M3.1	B811-BE							
		B811-CH							
		B811-CE							

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ของต้นมันปู พบสารสกัดจำนวน 17 สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA SK1 ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 36.4% ของจำนวนสารสกัดที่นำมาทดสอบฤทธิ์ทั้งหมด รองลงมาคือ S. aureus ATCC25923 จำนวน 7 สารสกัด (9.7%) โดยสารสกัด A208 – BE และ CE, A212 – CE และ A312 – CE มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าค่า MIC ของยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน vancomycin ที่ใช้เปรียบเทียบคือ 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ S. aureus ATCC25923 และ MRSA SK1 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7

ส่วนฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ พบสารสกัด จำนวน 1 สาร (33.3%) คือ B110 – CH มีฤทธิ์ยับยั้ง P. aeruginosa ATCC27853 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าค่า MIC ของยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน gentamicin ที่ใช้เปรียบเทียบคือ 0.5 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ E. coli ATCC25923 และ P. aeruginosa ATCC27 ตามลำดับ

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ พบสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ GP – P1.1 และ CT – M1.3 จำนวน 6 สารสกัด คิดเป็น 100% ของจำนวนสารสกัดที่นำมาทดสอบฤทธิ์ทั้งหมด มีฤทธิ์ยับยั้ง C. albican ATCC90028 ให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 4 – 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด A402 - CH และ B214 – CH มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าค่า MIC ของยาต้านยีสต์มาตรฐาน amphotericin B ที่ใช้เปรียบเทียบ สำหรับเชื้อ C. albican ATCC90028 คือ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด จำนวน 6 สาร (100%) จากราเอนโดไฟท์ PL – B1.2 และ CT – M1.3 มีฤทธิ์ยับยั้ง C. neoformans ATCC90012 ที่ค่า MIC อยู่ในช่วง 32 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด B102 – CH มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าค่า MIC (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของยาต้านยีสต์มาตรฐาน amphotericin B

พบสารสกัดจำนวน 23 สารสกัด (59.0%) มีฤทธิ์ยับยั้งรา M. gypseum โดยให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 8 – 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด A309 – CE และ B113 – BE มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าค่า MIC (1ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของยาต้านรามาตรฐาน miconazole

เมื่อพิจารณาชนิดของตัวทำละลายทางเคมี พบสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ จำนวน 60 สารสกัด โดยเป็นสารสกัดหยาบจากเส้นใยราด้วย ethyl acctate (CE) มากที่สุด จำนวน 23 สารสกัด คิดเป็น 38.3% ของจำนวนสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งหมด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงราด้วย ethyl acetate (BE) จำนวน 22 สารสกัด (36.7%) และสารสกัดหยาบจากเส้นใยราด้วย hexane (CH) จำนวน 15 สารสกัด (25.0%) ดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 38 - 39

ตารางที่ 7 ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงรา เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ของต้นมันปู

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	สารสกัด	SA		MRSA		EC		PA		CA		CN		MG	
			IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC
1	PL – B1.2	A102-CH														32
		A102-CE													+	128
2	PL – B2.5	A115-BE	10.35	200	17.20	200										
		A115-CE				200										
3	PL – L2.2	A201-CE	8.15		9.00	200										
4	PL – B3.1	A202-BE	9.90	200	10.70	200									+	16
5	PL – B3.2	A203-BE													+	128
6	PL – B3.4	A205 *	9.50													
7	PL – B3.5	A206-CH														128
		A206-CE													+	16

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923, **MRSA** = methicillin-resistant S. aureus SK1, **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, **EC** = Escherichia coli ATCC25922, **CA** = Candida albicans ATCC90028, **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112, **MG** = Microsporum gypseum, **IZ** = Inhibition zone (mm), **MIC** = Minimal inhibitory concentration (µg/ml), **BE** = broth extracted with ethyl acetate, **CH** = cell extracted with hexane, **CE** = cell extracted with ethyl acetate, **(+)** = มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์, ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml, (*) = มีสารสกัด BE, CH และ CE

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	สารสกัด	SA		MRSA		EC		PA		CA		CN		MG	
			IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC
8	PL – P3.1	A207-BE														32
		A207-CE													+	16
9	CT – B1.1	A208-BE	10.70	32												
		A208-CE		32												
10	CT – P3.1	A211-BE														64
		A211-CE													+	128
11	LT – B2.1	A212-CE	8.10	32												
12	LT – L1.2	A301 *	8.05													
13	NB – B3.1	A306-BE														128
		A306-CH													+	128

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923, **MRSA** = methicillin-resistant S. aureus SK1, **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, **EC** = Escherichia coli ATCC25922, **CA** = Candida albicans ATCC90028, **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112, **MG** = Microsporum gypseum, **IZ** = Inhibition zone (mm), **MIC** = Minimal inhibitory concentration (µg/ml), **BE** = broth extracted with ethyl acetate, **CH** = cell extracted with hexane, **CE** = cell extracted with ethyl acetate, **(+)** = มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์, ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml, (*) = มีสารสกัด BE, CH และ CE

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ลำดับที่	แอนโดไฟท์	สารสกัด	SA		MRSA		EC		PA		CA		CN		MG	
			IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC
14	NB – B3.2	A307 *													+	##
15	NB – B3.3	A308-BE	1.20		9.20	200										
16	NB – M3.1	A309-CH														64
		A309-CE													+	8
17	NB – M3.2	A310 *	7.00		6.30											
18	GP – B1.1	A312-CE	13.00	32												
19	GP – M1.3	A316-CE	8.15		7.40	200										
20	GP – P1.1	A402-BE										8				128
		A402-CH									11.50	4			+	##
		A402-CE										16				128

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923, **MRSA** = methicillin-resistant S. aureus SK1, **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, **EC** = Escherichia coli ATCC25922, **CA** = Candida albicans ATCC90028, **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112, **MG** = Microsporum gypseum, **IZ** = Inhibition zone (mm), **MIC** = Minimal inhibitory concentration (µg/ml), **BE** = broth extracted with ethyl acetate, **CH** = cell extracted with hexane, **CE** = cell extracted with ethyl acetate, (+) = มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์, ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml, (*) = มีสารสกัด BE, CH และ CE

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	สารสกัด	SA		MRSA		EC		PA		CA		CN		MG	
			IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC
21	GP – P2.1	A403-BE														16
		A403-CH													+	64
		A403-CE	10.10		8.50	200										64
22	GP – L2.1	A406-BE		128		200										
			8.10		7.40											
		A406-CH				200										
23	CT – M1.2	A3-CE	10.60		11.20	200										
24	MN – M1.1	A11 *					10.45									
25	NB – M1.1	A13-CH				200										
			11.00		9.95											
		A13-CE				200										
26	GP – M1.4	A15 *	8.25		8.75											

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923, **MRSA** = methicillin-resistant S. aureus SK1, **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, **EC** = Escherichia coli ATCC25922, **CA** = Candida albicans ATCC90028, **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112, **MG** = Microsporum gypseum, **IZ** = Inhibition zone (mm), **MIC** = Minimal inhibitory concentration (µg/ml), **BE** = broth extracted with ethyl acetate, **CH** = cell extracted with hexane, **CE** = cell extracted with ethyl acetate, (+) = มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์, ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml, (*) = มีสารสกัด BE, CH และ CE

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	สารสกัด	SA		MRSA		EC		PA		CA		CN		MG	
			IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC
27	PL – B1.2	B102-BE												200		
		B102-CH											11.90	32		
		B102-CE												200		
28	PL – B2.3	B110-BE	15.70		15.20	200	10.10		8.55							
		B110-CH								200						
29	PL – P2.1	B113-BE	10.55		12.80	200									+	8
		B113-CE														64
30	CT – M1.2	B213-CE			10.80	200										
31	CT – M1.3	B214-BE										128		200		16
		B214-CH	13.35								14.95	4	12.75	200	+	16
		B214-CE										16		200		

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923, **MRSA** = methicillin-resistant S. aureus SK1, **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, **EC** = Escherichia coli ATCC25922, **CA** = Candida albicans ATCC90028, **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112, **MG** = Microsporum gypseum, **IZ** = Inhibition zone (mm), **MIC** = Minimal inhibitory concentration (µg/ml), **BE** = broth extracted with ethyl acetate, **CH** = cell extracted with hexane, **CE** = cell extracted with ethyl acetate, **(+)** = มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์, ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml, **(*)** = มีสารสกัด BE, CH และ CE

ตารางที่ 7 (ต่อ)

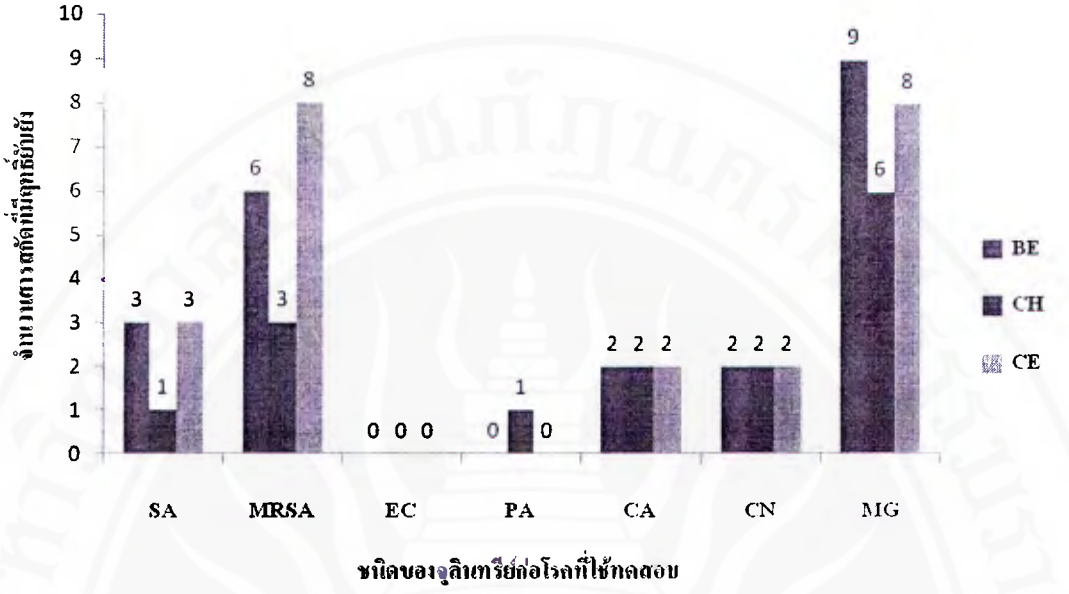
ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	สารสกัด	SA		MRSA		EC		PA		CA		CN		MG	
			IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC
32	CT – M2.3	B304-CH	8.70	200	10.50	200										
33	LT – B2.1	B316-CE	7.70		8.40	200										
34	MN – B1.5	B504 *	14.30													
35	GP – B1.4	B711 *	8.80													
36	GP – M3.1	B811 *	8.50													
ยาปฏิชีวนะที่ใช้เปรียบเทียบ																
Vancomycin [30 µg/ml]			15.00	1	16.85	2										
Gentamicin [10 µg/ml]							21.30	0.5	22.40	2						
AmphotericinB [10 µg/ml]											10.25	0.5	10.95	1		
Miconazole [30 µg/ml]															+	1

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923, **MRSA** = methicillin-resistant S. aureus SK1, **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, **EC** = Escherichia coli ATCC25922, **CA** = Candida albicans ATCC90028, **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112, **MG** = Microsporum gypseum, **IZ** = Inhibition zone (mm), **MIC** = Minimal inhibitory concentration (µg/ml), **BE** = broth extracted with ethyl acetate, **CH** = cell extracted with hexane, **CE** = cell extracted with ethyl acetate, (+) = มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์, ## = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml, (*) = มีสารสกัด BE, CH และ CE

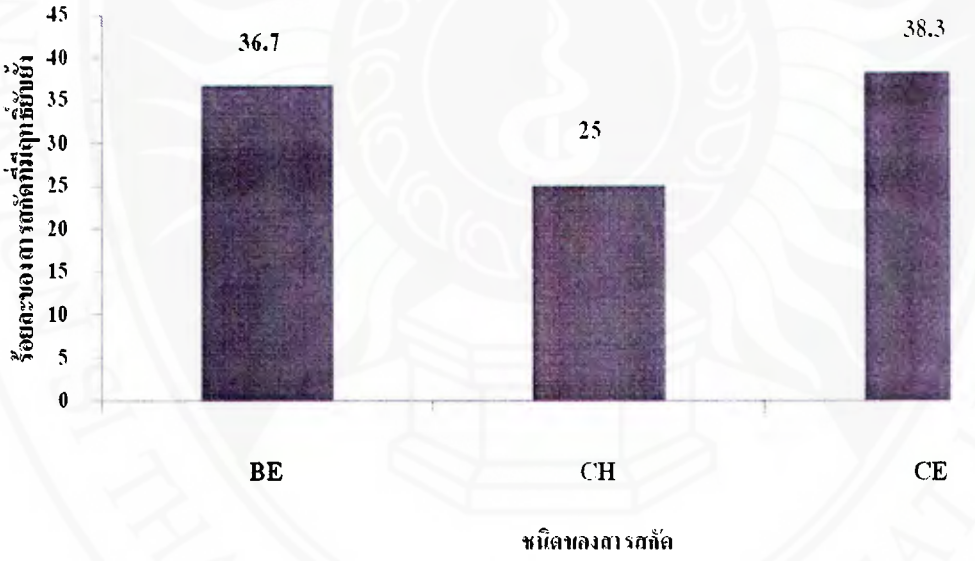
ตารางที่ 8 จำนวนไอโซเลต จำนวนสารสกัด และค่า MIC ของราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากต้นมันปู

รายการ	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย				ฤทธิ์ต้านยีสต์		ฤทธิ์ต้านรา	รวม
	SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG	
จำนวนไอโซเลตที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์	24 / 208	16 / 208	2 / 208	1 / 208	2 / 208	2 / 208	13 / 208	**36/208**
/ จำนวนไอโซเลตทั้งหมด (%)	(11.54)	(7.69)	(0.96)	(0.48)	(0.96)	(0.96)	(6.25)	**(17.3)**
จำนวนสารสกัดที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์	7 / 72	17 / 48	0 / 6	1 / 3	6 / 6	6 / 6	23 / 39	**48/108**
/ จำนวนสารสกัดที่ทดสอบฤทธิ์ทั้งหมด (%)	(9.7)	(35.4)	(0.00)	(33.3)	(100)	(100)	(59.0)	**(44.45)**
จำนวนสารสกัดจาก BE (%)	3	6	0	0	2	2	9	**22 (36.7)**
จำนวนสารสกัดจาก CH (%)	1	3	0	1	2	2	6	**15 (25.0)**
จำนวนสารสกัดจาก CE (%)	3	8	0	0	2	2	8	**23 (38.3)**
ค่า MIC ของสารสกัด (µg/ml)	32 - 200	200		200	4 - 128	32 - 200	8 - 128	
ค่า MIC ของ vancomycin (µg/ml)	1	2						
ค่า MIC ของ gentamicin (µg/ml)			0.5	2				
ค่า MIC ของ amphotericin B (µg/ml)					0.5	1		
ค่า MIC ของ miconazole (µg/ml)							1	

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate



ภาพที่ 38 จำนวนสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ



ภาพที่ 39 ร้อยละของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ จำแนกตามชนิดของสารสกัด

ผลการจำแนกราเอนโดไฟท์ โดยใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ จำนวน 36 ไอโซเลต พบราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ดี โดยให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 8 - 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 16 ไอโซเลต เมื่อนำราเอนโดไฟท์ดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 – 14 วัน พบราเอนโดไฟท์ จำนวน 4 ไอโซเลต ไม่มีการเจริญเติบโต จึงนำราเอนโดไฟท์ที่เหลือจำนวน 12 ไอโซเลต ไปจำแนกชนิดโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ซึ่งประกอบด้วยอัตราการเจริญเติบโต ลักษณะโคโลนี สีของเส้นใย การมีผนังกั้น และโครงสร้างการสืบพันธุ์ แสดงผลดังภาพที่ 40 – 51 จากผลการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู่ พบราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล Aspergillus sp. จำนวน 9 ไอโซเลต รองลงมาคือ สกุล Penicillium sp. จำนวน 2 ไอโซเลต และ Fusarium sp. จำนวน 1 ไอโซเลต ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9

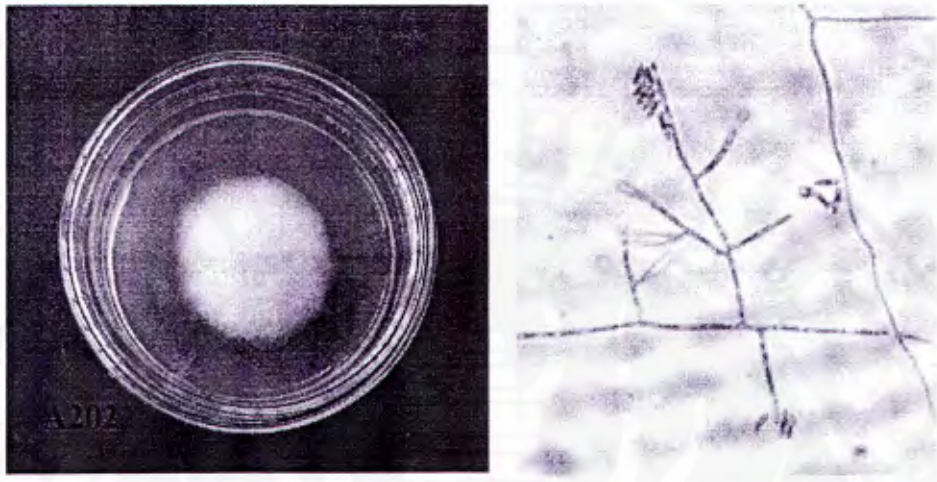
ก.

ข.

ภาพที่ 40 ราเอนโดไฟท์ PL – B1.2 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ก. ลักษณะโคโลนี

ข. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

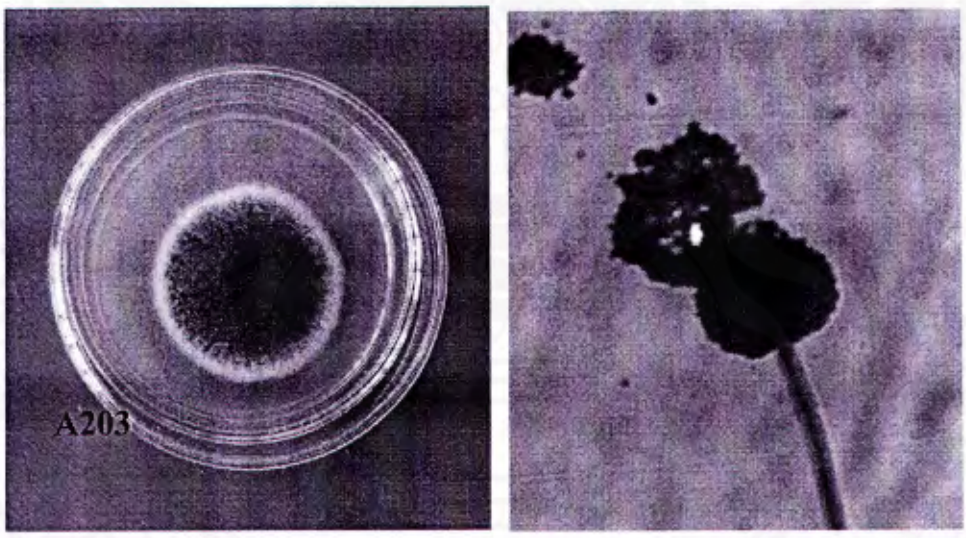


ก. ข.

ภาพที่ 41 ราเอนโดไฟท์ PL – B3.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ก. ลักษณะโคโลนี

ข. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า



ก. ข.

ภาพที่ 42 ราเอนโดไฟท์ PL – B3.2 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ก. ลักษณะโคโลนี

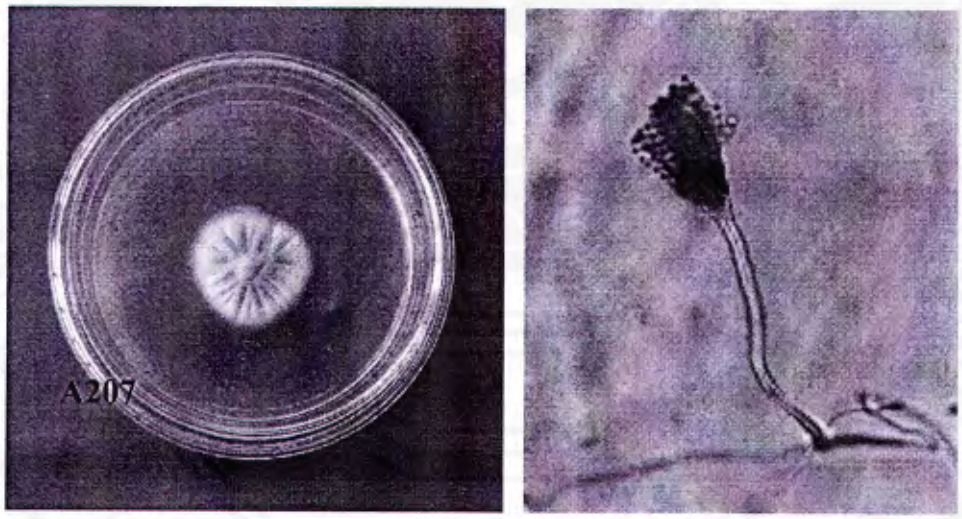
ข. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

ก. ข.

ภาพที่ 43 ราเอนโดไฟท์ PL – B3.5 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ก. ลักษณะโคโลนี

ข. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

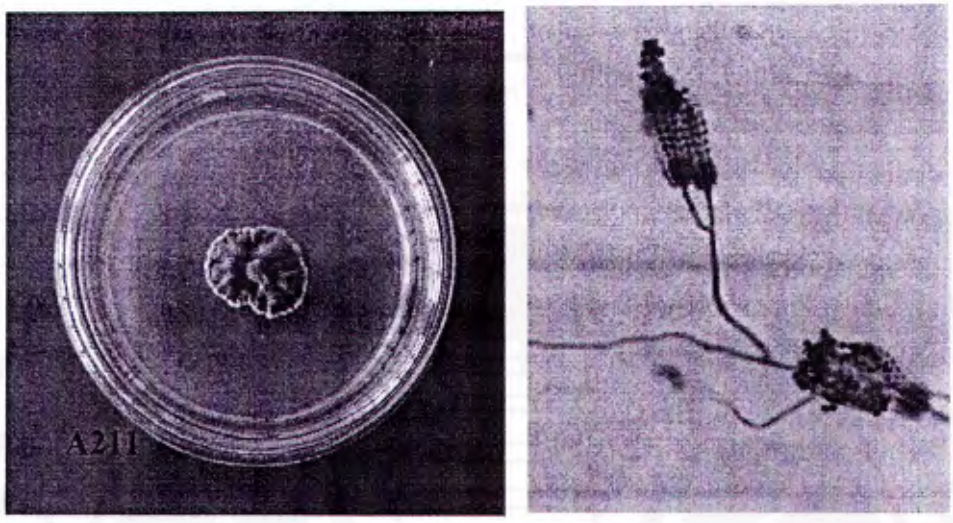


ก. ข.

ภาพที่ 44 ราเอนโดไฟท์ PL – P3.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ก. ลักษณะโคโลนี

ข. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

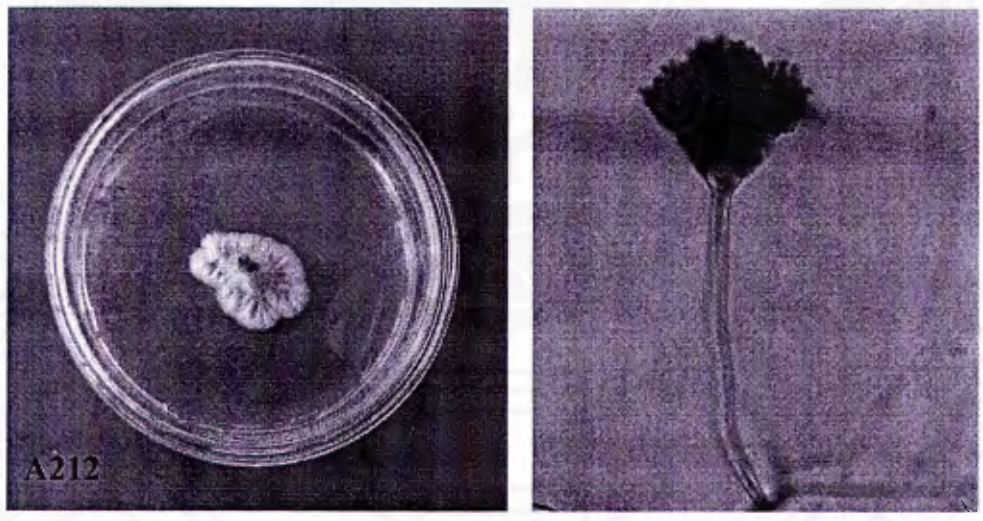


ก. ข.

ภาพที่ 45 ราเอนโดไฟท์ CT – P3.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ก. ลักษณะโคโลนี

ข. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

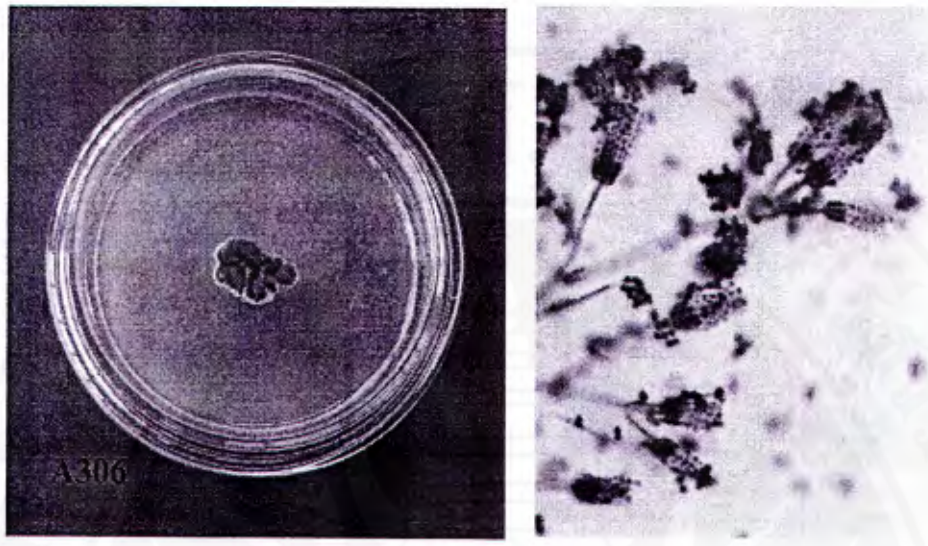


ก. ข.

ภาพที่ 46 ราเอนโดไฟท์ LT – B2.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ก. ลักษณะโคโลนี

ข. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

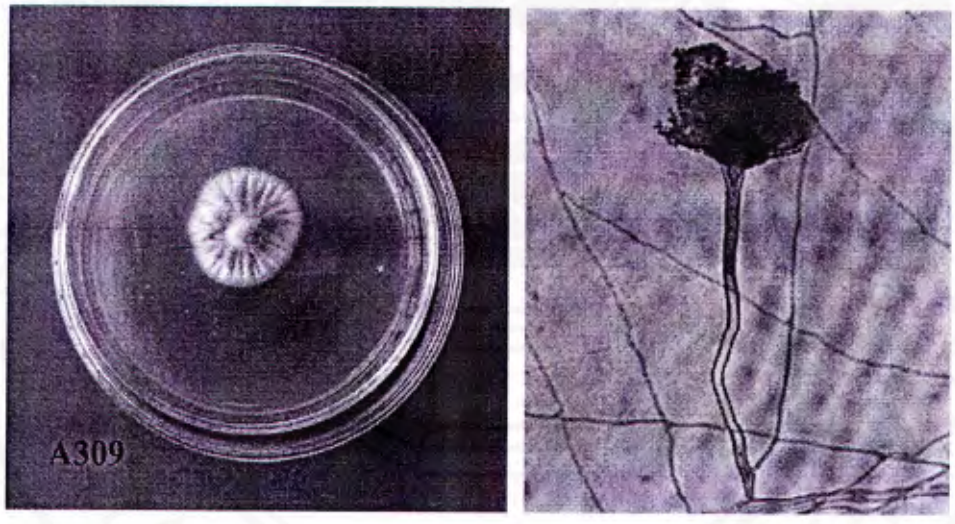


ก. ข.

ภาพที่ 47 ราเอนโดไฟท์ NB – B3.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ก. ลักษณะโคโลนี

ข. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

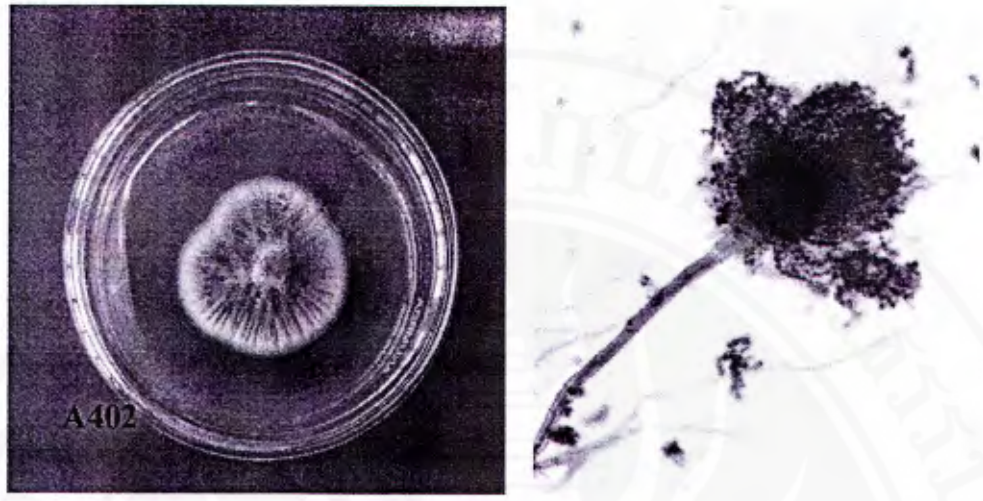


ก. ข.

ภาพที่ 48 ราเอนโดไฟท์ NB – M3.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ก. ลักษณะโคโลนี

ข. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า



ก. ข.

ภาพที่ 49 ราเอนโดไฟท์ GP – P1.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ก. ลักษณะโคโลนี

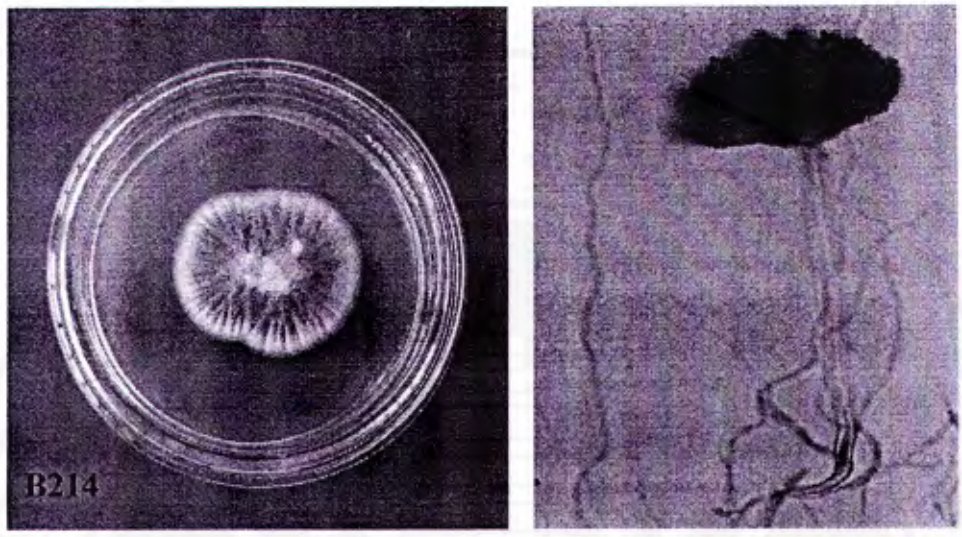
ข. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

ก. ข.

ภาพที่ 50 ราเอนโดไฟท์ PL – P2.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ข. ลักษณะโคโลนี

ค. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า



ก. ข.

ภาพที่ 51 ราเอนโดไฟท์ CT – M1.3 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ข. ลักษณะโคโลนี

ค. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

รหัสรา	รา เอนโดไฟท์	ชิ้นส่วนของพืช	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์					การจัดจำแนก	ชนิดของสารสกัด	ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์	
			อัตราการเจริญเติบโต (7 วัน)	ลักษณะโคโลนี (7 วัน)	สปอร์	ลักษณะเส้นใย				ชนิดเชื้อทดสอบ	ค่า MIC (µg/ml)
						สีเส้นใย	ผนังกั้น				
A102	PL – B1.2	กิ่ง	เร็ว	สีเขียวเข้ม แบนราบ	สีเขียวเข้ม	สีขาว	มี	*Aspergillus* sp.	CH	MG	32
									CE		128
A202	PL – B3.1	กิ่ง	เร็ว	สีขาวฟู ตรงกลางมีสีส้ม	สีส้ม	สีขาว	มี	*Fusarium* sp.	BE	MG	16
A203	PL – B3.2	กิ่ง	เร็ว	สีดำกำมะหยี่	สีดำ	สีขาว	มี	*Aspergillus* sp.	BE	MG	128
A206	PL – B3.5	กิ่ง	เร็ว	สีเขียวอ่อน ขรุขระ	สีเขียวอ่อน	สีขาว	มี	*Aspergillus* sp.	CH	MG	128
									CE		16
A207	PL – P3.1	ก้านใบ	ช้า	สีส้ม รอบๆ มีแฉกเป็นร่อง	สีส้ม	สีขาว	มี	*Aspergillus* sp.	BE	MG	32
									CE		16

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; **ND** = (No – determine) ไม่ได้ศึกษา เนื่องจากไม่มีการเจริญเติบโต; เร็ว = เจริญเต็ม plate ในเวลา 5 – 7 วัน ; ช้า = มากกว่า 7 วัน

ตารางที่ 9 (ต่อ)

รหัสรา	รา เอนโดไฟท์	ชิ้นส่วนของพืช	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์					การจัดจำแนก	ชนิดของสารสกัด	ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์	
			อัตราการเจริญเติบโต (7 วัน)	ลักษณะโคโลนี (7 วัน)	สปอร์	ลักษณะเส้นใย				ชนิดเชื้อทดสอบ	ค่า MIC (µg/ml)
						สีเส้นใย	ผนังกั้น				
A208	CT – B1.1	กิ่ง	ND	ND	ND	ND	ND	ND	BE, CE	SA	32
A211	CT – P3.1	ก้านใบ	ช้า	สีเขียวเข้ม กำมะหยี่ อัดแน่น	สีเขียวเข้ม	สีขาว	มี	Penicillium sp.	BE	MG	64
									CE		128
A212	LT – B2.1	กิ่ง	ช้า	สีส้ม รอบๆ มีแฉกเป็นร่อง	สีส้ม	สีขาว	มี	Aspergillus sp.	CE	SA	32
A306	NB – B3.1	กิ่ง	ช้า	สีเขียวเข้ม กำมะหยี่ อัดแน่น	สีเขียวเข้ม	สีขาว	มี	Penicillium sp.	BE, CH	MG	128

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; **ND** = (No – determine) ไม่ได้ศึกษา เนื่องจากไม่มีการเจริญเติบโต; เร็ว = เจริญเต็ม plate ในเวลา 5 – 7 วัน ; ช้า = มากกว่า 7 วัน

ตารางที่ 9 (ต่อ)

รหัสรา	รา เอนโดไฟท์	ชิ้นส่วนของพืช	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์					การจัดจำแนก	ชนิดของสารสกัด	ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์	
			อัตราการเจริญเติบโต (7 วัน)	ลักษณะโคโลนี (7 วัน)	สปอร์	ลักษณะเส้นใย				ชนิดเชื้อทดสอบ	ค่า MIC (µg/ml)
						สีเส้นใย	ผนังกั้น				
A309	NB – M3.1	เส้นกลางใบ	ช้า	สีส้ม รอบๆ มีแฉกเป็นร่อง	สีส้ม	สีขาว	มี	*Aspergillus* sp.	CH	MG	64
									CE		8
A312	GP – B1.1	กิ่ง	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CE	SA	32
A402	GP – P1.1	ก้านใบ	ช้า	สีส้ม รอบๆ มีแฉกเป็นร่อง	สีส้ม	สีขาว	มี	*Aspergillus* sp.	BE	CA	8
									CH		4
									CE		16
									BE, CE	MG	128
A403	GP – P2.1	ก้านใบ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	BE	MG	16
									CH, CE		64

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= **C**andida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; **ND** = (No – determine) ไม่ได้ศึกษา เนื่องจากไม่มีการเจริญเติบโต; เร็ว = เจริญเต็ม plate ในเวลา 5 – 7 วัน ; ช้า = มากกว่า 7 วัน

ตารางที่ 9 (ต่อ)

รหัสรา	รา เอนโดไฟท์	ชิ้นส่วนของพืช	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์					การจัดจำแนก	ชนิดของสารสกัด	ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์	
			อัตราการเจริญเติบโต (7 วัน)	ลักษณะโคโลนี (7 วัน)	สปอร์	ลักษณะเส้นใย				ชนิดเชื้อทดสอบ	ค่า MIC (µg/ml)
						สีเส้นใย	ผนังกั้น				
B102	PL – B1.2	กิ่ง	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CH	CN	32
B113	PL – P2.1	ก้านใบ	เร็ว	สีเขียวเข้ม	สีเขียว	สีขาว	มี	*Aspergillus* sp.	BE	MG	8
				แบนราบ	เข้ม				CE		64
B214	CT – M1.3	เส้นกลางใบ	ช้า	สีส้ม รอบ ๆ มีแฉกเป็นร่อง	สีส้ม	สีขาว	มี	*Aspergillus* sp.	BE	CA	128
									CH		4
									CE		16
									BE, CH	MG	16

SA = Staphylococcus aureus ATCC25923; **MRSA**= methicillin-resistant S. aureus SK1; **PA** = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853; **EC** = Escherichia coli ATCC25922; **CA**= Candida albicans ATCC90028; **CN** = Cryptococcus neofermans ATCC90112; **MG** = Microsporum gypseum; **BE** = broth extracted with ethyl acetate; **CH** = cell extracted with hexane; **CE** = cell extracted with ethyl acetate; **ND** = (No – determine) ไม่ได้ศึกษา เนื่องจากไม่มีการเจริญเติบโต; เร็ว = เจริญเต็ม plate ในเวลา 5 – 7 วัน ; ช้า = มากกว่า 7 วัน

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

จากการประมาณการว่า จำนวนราในโลกนี้มี 1.5 ล้านชนิด (species) แต่จำนวนราที่ศึกษามีเพียง 50,000 ชนิด ดังนั้นจึงมีราอีกอย่างน้อย 1 ล้านชนิดที่ยังไม่มีการค้นพบ (Hawksrorth and Rossman, 1997) โดยเฉพาะกลุ่มราเอนโดไฟท์ที่เจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชแบบพึ่งพาอาศัยกัน สามารถผลิตสารเพื่อป้องกันตัวเองจากศัตรูพืช สัตว์ แมลง และจุลินทรีย์ มีรายงานการศึกษาพบว่า 27–51 % ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากราเอนโดไฟท์เป็นสารใหม่ (Schulz et al., 2002; Strobel et al., 2003) โดยสารที่สกัดจากราเอนโดไฟท์มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย ยับยั้งการอักเสบ เป็นสารต้านมะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ ลดปริมาณน้ำตาลในเลือดและฤทธิ์อื่นๆ (Strobel et al., 1993; Sterile et al., 1993; Strobel et al., 1996; Strobel et al., 1999; Li et al., 2001; Strobel, 2003; Strobel and Daisy, 2003) ซึ่ง Tan and Zou (2001) เชื่อว่าราเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารเคมีชนิดเดียวกันกับพืชอาศัยได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการแลกเปลี่ยนของสารพันธุกรรม(horizontal genetic transfer) ระหว่างราเอนโดไฟท์กับพืชอาศัยที่ดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัย (mutualistic symbiosis) (Huang et al., 2001)

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการแยกราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู (Glochidion wallichianum) ซึ่งจัดเป็นผักพื้นบ้านที่พบในท้องถิ่นทางภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ของราเอนโดไฟท์ในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในคน ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีไปใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะ เพื่อลดภาวะเชื้อดื้อยาอันเป็นปัญหาสำคัญในระบบสาธารณสุขของประเทศไทยในปัจจุบัน

สรุปผลการทดลอง

1. ตัวอย่างต้นมันปูที่เก็บจากจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และกระบี่ สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 208 ไอโซเลต ซึ่งได้จากส่วนของกิ่งมากที่สุด จำนวน 83 ไอโซเลต (39.9%) และจากอำเภอเมือง จังหวัดพัทลุงมากที่สุด จำนวน 49 ไอโซเลต (23.6%)

2. จากราเอนโดไฟท์ 208 ไอโซเลต มีราเอนโดไฟท์ จำนวน 36 ไอโซเลต (17.3%) ที่น้ำเลี้ยงราสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และราชนิดใดชนิดหนึ่งที่นำมาทดสอบ ซึ่งได้จากส่วนของกิ่งมากที่สุด จำนวน 17 ไอโซเลต (47.2%) และจากอำเภอเมือง จังหวัดพัทลุงมากที่สุด จำนวน 11 ไอโซเลต (30.5%) จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบดังนี้

2.1 น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ PL – B2.3 มีฤทธิ์ยับยั้ง S. aureus ATCC25923 ดีที่สุด ให้ค่า inhibition zone เท่ากับ 15.70 มิลลิเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับ inhibition zone (15.00 มิลลิเมตร) ของยาปฏิชีวนะทดสอบ vancomycin

2.2 น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ PL – B2.5 มีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA SK1 ดีที่สุด ให้ค่า inhibition zone เท่ากับ 17.20 มิลลิเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับ inhibition zone (16.85 มิลลิเมตร) ของยาปฏิชีวนะทดสอบ vancomycin

2.3 น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ MN – M1.1 มีฤทธิ์ยับยั้ง E. coli ATCC25923 ดีที่สุด ให้ค่า inhibition zone เท่ากับ 10.45 มิลลิเมตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่า inhibition zone (21.30 มิลลิเมตร) ของยาปฏิชีวนะทดสอบ gentamicin

2.4 น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ PL – B2.3 มีฤทธิ์ยับยั้ง P. aeruginosa ATCC27853 ดีที่สุด ให้ค่า inhibition zone เท่ากับ 8.55 มิลลิเมตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่า inhibition zone (22.40 มิลลิเมตร) ของยาปฏิชีวนะทดสอบ gentamicin

2.5 น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ CT – M1.3 มีฤทธิ์ยับยั้ง C. albican ATCC90028 และ C. neoformans ATCC90012 ดีที่สุด ให้ค่า inhibition zone เท่ากับ 14.95 และ 12.75 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า inhibition zone (10.25 และ 10.95 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อ C. albican ATCC90028 และ C. neoformans ATCC90012 ตามลำดับ) ของยาปฏิชีวนะทดสอบ amphotericin B

2.6 น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ จำนวน 13 ไอโซเลต คิดเป็น 36.1 % ของจำนวนราเอนไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งหมด มีฤทธิ์ยับยั้ง M. gypseum

3. สารสกัดจากราเอนโดไฟท์ 108 สารสกัด พบสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ จำนวน 60 สารสกัด (55.56%) โดยเป็นสารสกัดหยาบจากเส้นใยราด้วย ethyl acetate (CE) มากที่สุด จำนวน 23 สารสกัด (38.3%) ซึ่งสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดในแต่ละการทดสอบดังนี้

3.1 สารสกัด A208 – BE, A208 – CE, A212 – CE และ A312 – CE มีฤทธิ์ยับยั้ง S. aureus ATCC25923 ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่า MIC (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของยาปฏิชีวนะ vancomycin

3.2 สารสกัดส่วนใหญ่ จำนวน 17 สารสกัด (36.4%) มีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA SK1 ที่ค่า MIC เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่า MIC (2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของยาปฏิชีวนะ vancomycin

3.3 สารสกัด B110 – CH มีฤทธิ์ยับยั้ง P. aeruginosa ATCC27853 ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่า MIC (2ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของยาปฏิชีวนะ gentamicin และไม่พบสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง E. coli ATCC25923

3.4 สารสกัด A402 – CH และ A214 – CH มีฤทธิ์ยับยั้ง C. albican ATCC90028 ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่า MIC (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของยาปฏิชีวนะ amphotericin B

3.5 สารสกัด B102 - CH มีฤทธิ์ยับยั้ง C. neoformans ATCC90012 ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่า MIC (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของยาปฏิชีวนะ amphotericin B

3.6 สารสกัด A309 – CE และ B113 – BE มีฤทธิ์ยับยั้ง M. gypseum ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่า MIC (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของยาปฏิชีวนะ miconazole

4. จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ จำนวน 16 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ดี โดยให้ค่า MIC ต่อเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งต่ำกว่า 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบราเอนโดไฟท์ 4 ไอโซเลตไม่มีการเจริญเติบโตส่วนที่เหลืออีก 12 ไอโซเลต จัดอยู่ในสกุล Aspergillus sp. จำนวน 9 ไอโซเลต รองลงมาคือสกุล Penicillium sp. จำนวน 2 ไอโซเลต และ Fusarium sp. จำนวน 1 ไอโซเลต ตามลำดับ

อภิปรายผลการทดลอง

การแยกและคัดเลือกราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู

ในการสุ่มเก็บตัวอย่างต้นมันปูจากอำเภอเมือง อำเภอนาบอน อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอลำทับ อำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่ และอำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง ครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณที่มีความเหมาะสม คือ 1) พืชมีการเจริญอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีลักษณะเฉพาะในแต่ละพื้นที่ 2) พืชมีการเจริญเติบโตอยู่ในบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพร่วมกับพืชชนิดอื่นๆ และ 3) เป็นพืชท้องถิ่นในภาคใต้ที่มีการบริโภคเป็นอาหารในชีวิตประจำวัน โดยเก็บตัวอย่างพืชจากชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกัน จากส่วนของเส้นใบ เส้นกลางใบ ผิวใบ ก้านใบและกิ่ง ส่วนละ 2, 3, 3, 4 และ 10 ชิ้นตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อเพิ่มโอกาสในการพบจำนวนชนิดของราเอนโดไฟท์ภายในต้นเดียวกัน ซึ่งจะทำให้การคัดเลือกชนิดของราเอนโดไฟท์มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น ตามที่สโตรเบล (Strobel, 2003) ได้กล่าวไว้ว่าพืชในเขตร้อนเป็นพืชอาศัยของราเอนโดไฟท์ที่มีความหลากหลาย มากกว่าพืชที่เจริญอยู่ในบริเวณที่มีอากาศแห้งและเย็น ซึ่งมีความหลากหลายของชนิดพืชน้อยกว่า ทำให้มีโอกาสตรวจพบราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชเขตร้อนได้จำนวนมากกว่า

จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาแยกราเอนโดไฟท์ทันที โดยการนำมาล้างด้วย detergent แล้วนำมาตัดส่วนของเส้นใบ เส้นกลางใบ ผิวใบ ก้านใบ และกิ่งเป็นชิ้นเล็กๆ เป็นจำนวน 2, 3, 3, 4 และ 10 ชิ้นตามลำดับ รวมจำนวนตัวอย่างพืชทั้งหมด 396 ชิ้น นำมาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่บนพื้นผิวใบ (epiphytes) จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาวางบนอาหาร PDA ที่มีการเติมยา penicillin G และ streptomycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียไม่ให้เจริญบนอาหาร เมื่อมีการเจริญของราเอนโดไฟท์ออกมาจากชิ้นส่วนตัวอย่างพืช ได้ตัดส่วน hyphal tip ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ โดยเก็บตัวอย่างราเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ได้ราที่บริสุทธิ์ แล้วคัดเลือกราเอนโดไฟท์แต่ละชนิดที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน ได้ทั้งหมด 208 ไอโซเลต เมื่อนำมาคำนวณหาอัตราการแยกราเอนโดไฟท์ (isolation rate) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงจำนวนของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ต่อหนึ่งหน่วยของตัวอย่างพืช โดยคำนวณจากสูตร (Jordaan et al., 2006)

$$\text{อัตราการแยกราเอนโดไฟท์} = \frac{\text{จำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ (208 ไอโซเลต)}}{\text{จำนวนชิ้นของตัวอย่างพืชทั้งหมด (396 ชิ้น)}}$$

พบว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นมันปูมีอัตราการแยกราเอนโดไฟท์ เท่ากับ 0.56 ไอโซเลต/ชิ้นส่วนตัวอย่างพืช ซึ่งมีค่าสูงกว่าอัตราการแยกราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จาก Lippia sidoides, Colophospermum mopane, Azadirachta indica และ Crataeva magna ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.50, 0.49, 0.35 และ 0.086 ไอโซเลต/ชิ้นส่วนตัวอย่างพืช (Siqueira et al., 2011; Jordaan et al.,2006; Mahesh et al., 2005; Nalini et al., 2005) แต่อัตราการแยกราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู มีค่าต่ำกว่าอัตราการแยกราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จาก Pinus monticola ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.3 ไอโซเลต/ชิ้นส่วนตัวอย่างพืช (Ganley & Newcombe, 2006) เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการแยกราเอนโดไฟท์ที่ได้จากพืชเพียงหนึ่งชนิด ทั้งนี้จำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง ส่วนของพืช ขนาดของตัวอย่างพืช ความถี่ในการแยกเชื้อ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และกลุ่มเชื้อราที่ศึกษา ซึ่งมีผลต่ออัตราการแยกราเอนโดไฟท์ จากอัตราการแยกราเอนโดไฟท์ดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าต้นมันปูจัดเป็นแหล่งสำคัญแหล่งหนึ่งที่มีความหลากหลายชนิดของราเอนโดไฟท์

การศึกษาในครั้งนี้ ทำการแยกราเอนโดไฟท์ได้จากส่วนของกิ่งมากที่สุด รองลงมาคือ เส้นกลางใบ ก้านใบ ผิวใบและเส้นใบตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย (2549) ที่แยกราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล Garcinia sp. ได้จากส่วนของกิ่งมากที่สุด รองลงมาคือ ผิวใบ เส้นกลางใบ ก้านใบ และเส้นใบ ตามลำดับ และจากรายงานของจีนแก้วเปี่ยม (Jeenkaewpican, 2010) พบว่าการแยกราเอนโดไฟท์จากต้นโทะ ได้จากส่วนของเส้นกลางใบ รองลงมาคือ แผ่นใบ

กิ่ง เส้นใบ และก้านใบ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของแคนนอนและซิมมอน (Cannon & Simmons, 2002) ที่รายงานว่า ในพืชที่มีแผ่นใบกว้างมักพบราเอนโดไฟท์ในบริเวณใกล้กับส่วนฐานของเส้นกลางใบมากกว่าแผ่นใบ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะบริเวณส่วนดังกล่าวมีปริมาณน้ำสะสมมากกว่าส่วนของแผ่นใบ จึงทำให้สปอร์ของราเอนโดไฟท์งอกได้ดีกว่า (Saikkonen, 2007) และยังเป็นบริเวณที่ราเอนโดไฟท์สามารถแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชได้และยังเป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อลำเลียงที่สำคัญ กล่าวคือมีทั้งท่อลำเลียงน้ำ (xylem) และท่อลำเลียงอาหาร (phloem) ที่เป็นแหล่งอาหารให้แก่ราเอนโดไฟท์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของบิชอพ (Bishop, 2002) ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างข้าวสาลีกับราเอนโดไฟท์ Fusarium proliferatum พบว่าราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่บริเวณเนื้อเยื่อพืชของข้าวสาลี ได้แก่ เอพิเดอร์มิส (epidermis), กลุ่มมัดท่อลำเลียง (vascular bundle sheath) และท่อลำเลียงน้ำ เช่นเดียวกับการพบแบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวนมาก บริเวณท่อลำเลียงอาหารจากรากและกิ่งของ Ulmas sp. (Mengoni et al., 2003)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

จากการนำราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ จำนวน 208 ไอโซเลต ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB โดยทำการเลี้ยงเป็นเวลา 2 – 3 สัปดาห์ เนื่องจากสโตรเบลและคนอื่นๆ (Strobel et al., 1996) ได้ศึกษาแล้วพบว่า ราเอนโดไฟท์ Pestalotiopsis microspora สามารถสร้างสาร taxol ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เมื่อราอยู่ในช่วงอายุ 2 – 3 สัปดาห์ ดังนั้นราเอนโดไฟท์ในระยะนี้จึงมีความสามารถในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ออกมาภายนอกเซลล์ได้ในปริมาณมา จึงนิยมนำน้ำเลี้ยงราในระยะนี้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น ด้วยวิธี agar well diffusion ซึ่งเป็นวิธีที่เพิ่มโอกาสในการคัดกรองหาสารต้านจุลินทรีย์จากราเอนโดไฟท์ได้มากขึ้น ซึ่งวิธีนี้เหมาะกับสารออกฤทธิ์กลุ่มที่มีความเป็นขั้วสูง สามารถละลายน้ำได้ดี และมีขนาดโมเลกุลเล็ก ทำให้สารออกฤทธิ์สามารถละลายและแพร่ซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี จึงเกิดผลการยับยั้งที่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อด้อยคือ กรณีที่สารออกฤทธิ์บางชนิดที่มีความเป็นขั้วต่ำ หรืออาจมีขนาดโมเลกุลใหญ่ไม่สามารถละลายและแพร่ซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จะเกิด inhibition zone แคบหรือไม่เกิด inhibition zone เลย ซึ่งมีผลต่อจำนวนราเอนโดไฟท์ที่ตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธีนี้ หลังจากตรวจคัดกรองแล้ว หากพบว่าราเอนโดไฟท์ไอโซเลตใดสามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์ได้ จะนำน้ำเลี้ยงราและเส้นใยราเอนโดไฟท์นั้นไปสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี เพื่อให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีความเข้มข้นมากขึ้น แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยนำสารสกัดมาเจือจางด้วยวิธีเจือจางความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้น 200, 128, 64, 32, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตามลำดับ เพื่อหาค่า MIC ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ โดยนำผลไปเปรียบเทียบกับยาต้านเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงรา พบราเอนโดไฟท์มีฤทธิ์ยับยั้ง S.aureus ATCC25923 มากที่สุด จำนวน 24 ไอโซเลต คิดเป็น 11.54% ของจำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมด รองลงมาคือฤทธิ์ยับยั้ง MRSA จำนวน 16 ไอโซเลต (7.69%) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของพงษ์ไพจิตร และคนอื่นๆ (Phongpaichit et al., 2006) ที่ได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้นของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล Garcinia sp. จำนวน 5 ชนิด พบว่าน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์มีฤทธิ์ยับยั้ง S.aureus ATCC25923 และ MRSA จำนวน 48.6% และ 42.9% ตามลำดับ ในจำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง S. aureus ATCC25923 พบว่าราเอนโดไฟท์PL – B2.3 มีฤทธิ์ยับยั้ง S. aureus ATCC25923 ดีที่สุด ให้ค่า inhibition zone กว้าง 15.70 มิลลิเมตร ในขณะที่ราเอนโดไฟท์ PL – B2.5 มีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA ดีที่สุด ให้ค่า inhibition zone กว้าง 17.20 มิลลิเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่า inhibition zone ของยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน vancomycin ที่ใช้เปรียบเทียบ ที่มีค่า inhibition zone เท่ากับ 15.00 มิลลิเมตร และเมื่อนำน้ำเลี้ยงราไปเพิ่มความเข้มข้นโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี พบสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง S. aureus ATCC25923 และ MRSA จำนวน 7 และ 17 สารสกัดตามลำดับ คิดเป็น 9.7% และ 35.4% ของจำนวนสารสกัดที่นำมาทดสอบฤทธิ์ทั้งหมด โดยสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ PL - B2.3 และ PL – B2.5 ให้ค่า MIC มากกว่า 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งมากกว่าค่า MIC ของยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน vancomycin ที่มีค่า MIC เท่ากับ 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ S.aureus ATCC25923 และ MRSA ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์จากต้นมันปูสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ที่มีความเป็นขั้วสูง สามารถละลายน้ำได้ดี และมีขนาดโมเลกุลเล็ก สารจึงละลายน้ำและแพร่ซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี จึงเกิด inhibition zone ในการยับยั้ง S.aureus ATCC25923 และ MRSA ได้กว้าง เช่นเดียวกับราเอนโดไฟท์ Periconia sp. จากต้น Taxus cuspidata ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมทั้ง S. aureus ATCC6538 (Kim et al., 2004)

สำหรับแบคทีเรียชนิดแกรมลบ เมื่อนำน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์จากต้นมันปูไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง E. coli ATCC25923 และ P. aeruginosa ATCC27853 พบว่าให้ค่า inhibition zone แคบ คือ 8.55 – 10.45 มิลลิเมตร ซึ่งน้อยกว่าค่า inhibition zone ของยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน gentamicin ที่ใช้เปรียบเทียบ คือ 21.30 และ 22.40 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อ E. coli ATCC25923 และ P. aeruginosa ATCC27853 ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดที่ได้จากราเอนโดไฟท์ PL – B2.3 และ MN – M1.1 ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง พบว่าสารสกัดไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง E. coli ATCC25923 ในขณะที่พบสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ PL – B2.3 ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน มีฤทธิ์ยับยั้ง P. aeruginosa ATCC27853

โดยมีค่า MIC เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าค่า MIC ของยา gentamicin ที่มีค่า MIC เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์จากราเอนโดไฟท์ของต้นมันปู ส่วนใหญ่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมลบ E. coli ATCC25923 และ P. aeruginosa ATCC27853 หรือหากมีฤทธิ์ในการยับยั้งก็จะมีฤทธิ์ยับยั้งได้น้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของบาร์โบซา และคนอื่นๆ (Barbosa et al., 2011) ที่พบสารออกฤทธิ์จากพืชในแฟมิลี่ Euphorbiaceae มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่นเดียวกับการค้นพบสารสกัดจากพืชสมุนไพร Euphorbia macroclada L. ที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง E. coli ATCC25923 (Darwish & Aburjai, 2010) สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีองค์ประกอบทางเคมี (chemical composition) ของผนังเซลล์ที่ซับซ้อน กล่าวคือผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยชั้นเพปทิโดไกลแคนที่บาง เพียงร้อยละ 5 – 10 และมีเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ที่มีไขมันมากถึง 11 – 22 % ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ ทำให้เมมเบรนชั้นนอกทำหน้าที่เป็นเครื่องกั้นสารเคมีและเอนไซม์จากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2552) ทำให้แบคทีเรียแกรมลบมีความต้านทานต่อสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก จึงหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ยาก หากสารมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ มักจำเป็นต้องใช้สารที่มีความเข้มข้นสูง เช่น การใช้สารออกฤทธิ์กลุ่ม citrinin, emodin และ janthinone ในปริมาณที่มีความเข้มข้นสูงถึง 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้ง P. aeruginosa ซึ่งได้ผลปานกลาง และมีฤทธิ์ยับยั้ง E. coli ได้ผลในระดับต่ำ (Marinho et al., 2005) ในทำนองเดียวกับการใช้สารออกฤทธิ์ diterpene ในการยับยั้ง E. coli ATCC25922 ได้ผลปานกลาง (Kim et al., 2004)

เมื่อนำน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง C. albican ATCC90028 และ C. neoformans ATCC90012 พบราเอนโดไฟท์ จำนวน 2 ไอโซเลต คิดเป็น 0.96% ของจำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมด โดยให้ค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 11.50 – 14.95 มิลลิเมตร และ 11.90 – 12.75 มิลลิเมตรตามลำดับ ที่สามารถยับยั้งเชื้อ 2 ชนิดนี้ได้ โดยมีค่าใกล้เคียงกับค่า inhibition zone ของยาต้านยีสต์มาตรฐาน amphotericin B ที่ใช้เปรียบเทียบคือ 10.95 และ 10.25 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อ C. albican ATCC90028 และ C. neoformans ATCC90012 ตามลำดับ ซึ่งบราดีและคลาดี (Brady & Clardy, 2000) รายงานว่าสาร pentaketide ที่สร้างจากราเอนโดไฟท์ Fusarium sp. มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้ง C. albican โดยให้ค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 20 – 24 มิลลิเมตร และเมื่อนำสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ พบว่าสารสกัดทุกสารที่นำมาทดสอบฤทธิ์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง C. albican และ C. neoformans ด้วยค่า MIC 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยเฉพาะสารสกัดจากเส้น

ใยราด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (CH) มีฤทธิ์ยับยั้ง C. albican และ C. neoformans ด้วยค่า MIC ต่ำสุดเท่ากับ 4 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า MIC ของยาต้านยีสต์มาตรฐาน amphotericin B ที่ใช้เปรียบเทียบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสโตรเบลและคนอื่นๆ (Strobel et al., 1999) พบราเอนโดไฟท์ Cryptosporiopsis quercina สร้างสาร cryptocandin ออกฤทธิ์ยับยั้ง C. albican โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่ายาต้านรามาตรฐาน amphotericin B ที่ใช้เปรียบเทียบเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์จากต้นมันปูสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้ง C. albican และ C. neoformans ได้ใกล้เคียงกับยาต้านมาตรฐาน amphotericin B ที่ใช้เปรียบเทียบ โดยสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงรามีสภาพความเป็นขั้วสูง ในขณะที่สารสกัดจากเส้นใยราด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีสภาพความเป็นขั้วต่ำ

ราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู มีฤทธิ์ยับยั้งรา M. gypseum ได้จำนวน 13 ไอโซเลต (21.7%) เริ่มต้นตั้งแต่การให้ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นเป็นบวกสำหรับน้ำเลี้ยงรา และให้ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยค่า MIC อยู่ในช่วง 8 – 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเฉพาะราเอนโดไฟท์ NB – M3.1 และ PL – P2.1 ให้ค่า MIC เท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าค่า MIC ของยาต้านมาตรฐาน miconazole ที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ผลการศึกษาที่ได้มีความแตกต่างจากรายงานของ ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย (2549) ที่เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อจากพืชสกุล Garcinia ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งรา M. gypseum แต่เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปสกัดทางเคมีให้มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น พบว่าสารสกัดบางสารสามารถยับยั้ง M. gypseum ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 2 – 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากรายงานของโรแจซ และคนอื่นๆ (Rojas et al., 2004) พบว่าสารสกัดส่วนน้ำจากพืช Gentianella nitida ไม่มีผลยับยั้งรา M. gypseum แต่สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ ethanol ความเข้มข้น 95%, ethylacetate และ methanol มีผลยับยั้งรา M. gypseum ได้เป็นอย่างดี

การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในครั้งนี้ ได้เลือกราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ให้ค่า MIC อยู่ระหว่าง 4 – 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 16 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อให้ราเอนโดไฟท์มีการสร้างสปอร์และนำลักษณะของสปอร์ที่ได้มาจัดจำแนกราเอนโดไฟท์จากผลการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู เป็นเชื้อราที่จัดอยู่ใน Division Eumycota พบราเอนโดไฟท์กระจายอยู่ 3 สกุล ดังนี้

ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต PL – B3.1 จัดอยู่ในสกุล Fusarium sp. ซึ่งสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้ง M. gypseum โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีนักวิจัยหลายคนที่รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ของราเอนโดไฟท์ในสกุล Fusarium sp. เช่น หยางและคณะ (Yang et al., 2012) พบว่า

สาร Fusaroside ที่สร้างจากราเอนโดไฟท์ Fusarium sp. LN – 11 จากใบของ Melia azedarach นอกจากนี้ ราเอนโดไฟท์ Fusarium oxysporum ที่แยกได้จากลำต้นใต้ดินของพืช Acorus calamus แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบได้ในระดับสูง และยับยั้งเชื้อยีสต์ได้ในระดับกลาง (Barik et al., 2010) และราเอนโดไฟท์ Fusarium oxysporum ที่แยกได้จากพืช Juniperus recurva สามารถสร้างสาร podophyllotoxin ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยาต้านเซลล์มะเร็งได้ (Kour et al., 2008) รวมถึงการค้นพบราเอนโดไฟท์ F. redolens ที่แยกได้จากลำต้นใต้ดินของพืช Dioscorea zingiberensis ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง Bacillus subtilis, Staphylococcus haemolyticus, Escherichia coli และ Xanthomonas vesicatoria (Xu et al., 2008)

ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต CT – P3.1 และ NB – B3.1 จัดอยู่ในสกุล Penicillium sp. ซึ่งสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้ง M. gypseum โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 64 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้มีรายงานเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์สกุล Penicellium sp. เช่น การแยกราเอนโดไฟท์ Penicillium coffeae ได้จากต้นกาแฟ Coffea arabica L. (Peterson et al., 2005) และมีการค้นพบสาร Penicillenols จากราเอนโดไฟท์ Penicillium sp. GQ – 7 ที่แยกได้จากพืช Aegiceras corniculatum โดยสารแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HL – 60 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.76 และ 3.20 ไมโครโมล (Lin et al., 2008)

ราเอนโดไฟท์จากต้นมันปูโดยส่วนใหญ่ จำนวน 9 ไอโซเลต จัดอยู่ในสกุล Aspergillus sp. ซึ่งสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้ง S. aureus ATCC29523, C. albican ATCC90028 และ M. gypseum โดยมีรายงานเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์สกุล Aspergillus sp. เช่น ราเอนโดไฟท์ A. parasiticus ที่แยกได้จากเปลือกของต้น Sequoia sempervirens สามารถสร้างสาร sequoiatones และ sequoiamonascins ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์และมีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ (Stierle et al., 2003) ราเอนโดไฟท์ A. fumigates CY018 ที่แยกได้จากใบพืช Cynodon dactylon สามารถสร้างสาร asperfumoid และ asperfumin ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง C. albicans ได้ (Liu et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบราเอนโดไฟท์สกุล Aspergillus sp. ที่แยกได้จากพืช Writhtia tinctoria และ Aravae lanata มีฤทธิ์ยับยั้ง Pseudomonas fluorescens และ P. aeruginosa (Sunkar & Naciyar, 2011)

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ราเอนโดไฟท์จากต้นมันปู ส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล Aspergillus sp. สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น ethyl acetate โดยสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีที่สุด รองลงมาคือฤทธิ์ยับยั้งรา ดังนั้นต้นมันปูจึงจัดเป็นแหล่งสำคัญแหล่งหนึ่งในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะกลุ่มยาต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราให้กับอุตสาหกรรมการผลิตยาได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการแยกและคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชท้องถิ่นชนิดอื่นๆ

1. ควรมีการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากราเอนโดไฟท์ที่น่าสนใจ

2. ควรมีการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากราเอนโดไฟท์ที่น่าสนใจให้มีปริมาณมากขึ้น เพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์

3. ควรศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสารพันธุกรรมระหว่างราเอนโดไฟท์กับพืชอาศัย

4. ควรมีการจำแนกชนิดของราเอนโดไฟท์ โดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมประกอบร่วมกับการจำแนกราโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อความถูกต้องและแม่นยำ

บรรณานุกรม

กฤษณา พงษ์พานิช. (2534). การเพาะเลี้ยงและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับแมลงของเชื้อรา Beauveria bassiana (Bals.). **วารสารวิจัยและส่งเสริมการเกษตร**. 8 (2): 26 – 31.

กลุ่มวิจัยแมลงศัตรูไม้ผล สมุนไพรและเครื่องเทศ. (2542). **แมลงศัตรูไม้ผล**. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

จตุพล เหลียงสกุล. (2546). **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเปล้าใหญ่ในจังหวัดฉะเชิงเทรา**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิตรา เกาะแก้ว. (2550). ราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรและการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ. ใน **รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาพืช** (หน้า 571 – 578). กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. (2552). ความหลากหลายของราเอนโดไฟท์ในพืชป่าจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวงและเกาะแสมสาร. ใน **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 (วทท.35) วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552**. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.

ชัยวัฒน์ บุญมากาศ, อัมพร ศุภตระกูล และทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล. (2550). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ของพืชในวงศ์ Stemonaceae ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 38 (6): 339 – 343.

ณัฐจิรา อ้นนวล. (2547). **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากเปล้าใหญ่ที่ปลูกภายในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทัศวรรณ สมสีมี. (2548). **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากกระท้อน (Sandoricum koetjape) จังหวัดจันทบุรี**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธนวัช สุจริตวรกุล. (2551). ความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบพืชในป่าเต็งรัง อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ประเทศไทย. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 2** (หน้า 576). กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยศิลปากร.

นคร หน่อแก้ว. (2547). เอนโดไฟท์จุลินทรีย์ที่น่าสนใจ. **วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์**. 1 (1): 51 – 55.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2552). **จุลชีววิทยาทั่วไป**. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นลิน รัตน์นราทร, เกษรา เพิ่มสุข และทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล. (2552). สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืชจากราเอนโดไฟท์ของหนอนตายยาก. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 40 (1): 114 – 117.

นิรมล จันทร์คง. (2547). **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากกระชายดำ (Kaempferia parviflora)**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บำรุงศักดิ์ ปุริโส. (2546). **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชสมุนไพรเปล้าใหญ่**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรรณี ลีกิจวัฒนะ. (2552). **วิธีวิจัยทางการศึกษา**. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาครุศาสตร์อุตสาหกรรม คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรเทพ ชมชื่น. (2547). **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ Phomopsis sp. จากผักหวานเมา (Urobotrya siamensis) และสายพันธุ์ LRUB20 จากกะตังใบ (Leea rubra)**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มณฑิกา โพธิ์ถาวร. (2547). **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์จากใบเปล้าน้อย (Croton sublyratus)**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัชนี สวัสดิ์ชูพงศ์. (2544). **ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชสมุนไพรไทย**. วิทยานิพนธ์คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เริงฤทธิ์ สัปปะพันธ์. (2550). ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทย. ใน **การประชุม The 12th Biological Sciences Graduate Congress วันที่ 17 – 19 ธันวาคม 2550**. มาเลเซีย: มหาวิทยาลัยมาลายา.

วรรษยา วิเศษศักดากร. (2547). **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบอินทนิลน้ำ (Lagerstroemia speciosa Linn.)**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันทนีย์ ทมมืด. (2547). **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ (Fusarium verticillioides) ที่แยกจากเปล้าใหญ่ จังหวัดกาญจนบุรี**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันพร เข็มมุกต์ และพิภพ ลำยอง. (2551). การควบคุมโรคใบจุดดำลำไย โดยใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ในลำไย. ใน **รายงานการประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยพืชเขตร้อนและกึ่งร้อน ครั้งที่ 2 วันที่ 21 – 22 สิงหาคม 2551** (หน้า 73). กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วิราชินี ทาจีนะ. (2551). **ความหลากหลายทางชีวภาพและความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากเต่าร้างหนู (Wallichia siamensis)**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิวัฒน์ เสือสะอาด, พิมพรรณ สมมาตย์, ปวีณา บูชาเทียน, อาภรณ์ ปั้นทองคำ และรัตติรส เชียงสิน. (2551). **งานวิจัยเรื่องการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราขาว Beuveria bassiana ในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชเศรษฐกิจ**. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ศรัณยา คุ้มวงษา. (2547). **ราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบและกิ่งยอ (Morinda citrifolia L.)**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศศิธร วงศ์เรือง และฤทัยรัตน์ คำแสน. (2551). ผลของเชื้อราเอนโดไฟท์จากมะเขือเทศ ส้ม และยางพารา ในการยับยั้งการเจริญของ Phytophthora infestans. **วารสารเกษตรนเรศวร**. 11 (2): 89 – 98.

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. (2548). **นักวิจัยไทยเร่งใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช**. [Online]. Available: http://www.ryt9.com/s/prg/18614. 28 ตุลาคม 2552.

สุธีรา วัชรดิษฐ์. (2545). **สารทุติยภูมิจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์เออาร์อี 1 ที่แยกได้จากใบน้อยโหน่ง**. วิทยานิพนธ์คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุวรรณา จันทสุบรรณ. (2547). **ราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบประยงค์ (Aglaia odorate Lour.)**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อนุรีย์ ขันบุญ. (2547). **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพลู (Piper betle Linn.)**. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Arnold, A.E., Maymard, L.C., Kyllo, D., Rojas, E., Maynard, Z., Robin, N. and Herre, E.A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 100: 15649 – 15654.

Azevedo, J.L., Maccheroni Jr., W., Pereira, J.O. and Araujo, W.L. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electric Journal of Biotechnology**. 3: 40 – 65.

Bacon, C.W. and White, J.F. (2000). Microbial Endophyte. New York: Marcel Dekker Inc.

Barbosa, S.C., Cilli, E.M., Dias, L.G. Stabeli, R.G. and Ciancaglini, P. (2011). LAbaditin, a cyclic peptide with rich biotechnological potential: preliminary toxicological studies and structural changes in water and lipid membrane environment. **Amino Acids**. 40 (1): 135 – 144.

Barik B.P., Tayung, K., Jagadev, P.N. and Dutta, S.K. (2010). Phylogenetic placement of an endophytic fungus Fusarium oxysporum isolated from Acorus calamus rhizomes with antimicrobial activity. **EJBS** 2 (1) Jan-March.

Bayman, P., Angulo – Sandoval, P., Baez – Ortiz, Z. And Lodge, D.J. (1998). Distribution and dispersal of Xylaria endophytes in two tree species in Puerto Rico. **Mycological Research**. 102: 944 – 948.

Breen, J.P. (1994). Acremonium endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. **Annual Review of Entomology**. 39: 401 – 423.

Bush, L.P., Wilkinson, H.H. and Schardl, C.L. (1997). Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. **Plant Physiology**. 114: 1 – 7.

Cannon, P.F. and Simmons, C.M. (2002). Diversity and host performance endophyte, Trichoderma hamatum, delays the onset of drought stress in Theobroma cacao. **Biological Control**. 46: 24 – 35.

Chanway, C.P. (2002). Bacterial endophytes. **Encyclopedia of Pest Management**.

Clay, K. (2004). Fungi and the food of gods. **Nature**. 427: 401 – 402.

Clement, S.L., Kaiser, W.J. and Eichenseer, H. (1994). Acremonium endophytes in germplasms of major grasses and their utilization for insect resistance. In: Bacon, C.W., White, J. (Eds.), **Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses**. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 185 – 199.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). (2000). Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7 – A4. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). (2002b). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts. Approved standard M27 – A2. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). (2002c). Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility tests for filamentous fungi. Approved standard M38 – A. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, Wayne, PA.

Darwish, R.M. and Aburjai, T.A. (2010). Effect of ethnomedicinal plants used in folklore medicine in Jordan as antibiotic resistant inhibitors on Escherichia coli. BMC **Complementary and Alternative Medicine**. 10 (1): 9.

Davis, E.C., Franklin, J.B., Shaw, A.J. and Vilgalys, R. (2003). Endophytic Xylaria (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. **American Journal of Botany**. 90: 1661 – 1667.

Davappa, R.K., Makkar, H.P.S. and Becker, K. (2011). Jatropha Diterpenes: a Review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 88 (3): 301 – 322.

Dingle, J. And McGee, P.A. (2003). Some endophytic fungi reduce the density of pustules of Puccinia recondite f. sp. tritici in wheat. **Mycological Research**. 107: 310 – 316.

Drummond, A. J. and Waigh, R. D. (2000). The development of microbiological methods for phytochemical screening. **Recent Research Developments in Phytochemistry**. 4: 143 – 152.

Elmi, A.A., West, C.P., Robbins, R.T. and Kirkpatrick, T.L. (2000). Endophyte effects on reproduction of a root-knot nematode (Meloidogyne marylandi) and osmotic adjustment in tall fescue. **Grass and Forage Science**. 55: 166 – 172.

Faeth, S.H. (2002). Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **Oikos**. 98: 25 – 36.

Findlay, J.A., Buthelezi, S., Li, G. and Seveck, M. (1997). Insect toxins from an endophytic fungus from wintergreen. **Journal of Natural Products**. 60 (11): 1213 – 1215.

Franco, C.M. and Coutinho, L.E. (1991). Detective of novel secondary metabolites. **Crit Rev Biotechnol**. 11 (3): 193 – 276.

Ge, H.M., Yu, A.G., Zhang, J., Wu, J.H. and Tan, R.X. (2009). Bioactive alkaloids from endophytic Aspergillus fumigatus. **Journal of Natural Products**. 72 (4): 753 – 755.

Ghimire, S.R. and Hyde, K.D. (2008). **Plant surfade micrology**. Heidelberg: Springer-Verlag.

Hanada, R.E., Pomella, A.W.V., Soberanis, W., Loguercio, L.L. and Pereira, J.O. (2009). Biocontrol potential of Trichoderma martiale against the black-pod disease (Phytophthora palmivora) of cacao. **Biological Control**. 50 (2): 143 – 149.

Hawksworth, D.L., and Rossman, A.Y. (1997). Where are all the underscribed fungi? **Phytopathology**. 87 (9): 888 – 891.

Huang, Y., Wang, J., Li, G., Zheng, Z. And Su, W. (2001). Antitumer and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants Taxus mairei, Cephalataxus fortunei and Torreya grandis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 31: 163 – 167.

IPNI. (2007). Glochidion wallichianum Müll.Arg. in The International Plant Names Index. (Online). Available: http://data.gbif.org/species/15482904 [Dec 6, 2009]

Jeenkaewpieam, (2010). Endophytic fungi from Rhodomyrtus tomentosa (Ait.) Hassk which produce antimicrobial substance. Master of Science, Prince of Songkla University, Songkla, Thailand.

Ji, Y., Bi, J.N., Yan, B. and Zhu, X.D. (2006). Taxol – producing fungi: a new approach to industrial production of taxol. **Chinese Journal of Biotechnology**. 22 (1): 1 – 6.

Jordaan, A., Taylor, J.E. and Rossenkhan, R. (2006). Occurrence and possible role of endophytic fungi associated with seed pods of Colophostermum mopane (Fabaceae) in Botswana. **South African Journal of Botany**. (Article in press).

Kour, A., Shawl, A.S., Rehman, S., Sultan, P., Qazi, P.H., Suden, P., Khajuria, R.K. and Verma, V. (2008). Isolation and identification of an endophytic strain of Fusarium oxysporum producing podophyllotoxin from Juniperus recurva. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 24: 1115–1121.

Kuete, V., Dongfack, M.D.J., Mbaveng, A.T., Lallemand, M.C. and Van-Dufat, H.T. (2010). Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from the stem bark of Drypetes tessmanniana. **Chinese Journal of Integrative Medicine**. 16 (4): 337 – 343.

Lacey, L.A. and Neven, L.G. (2006). The potential of the fungus, Muscodor albus, as a microbial control agent of potato tuber moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in stored potatoes. **Journal of Invertebrate Pathology**. 91: 195 – 198.

Lee, J., Strobel, G.A., Lobkovsky, E. And Clardy, J.C. (1996). Torreyanic acid: a selectivity cytotoxic quinine dimmer from the endophytic fungus Pestalotiopsis microspora. **Journal of Organic Chemistry**. 61 (10): 3232 – 3233.

Li, J.Y., Harper, J.K., Grant, D.M., Tombe, B.O., Bashyal, B., Hess, W.M. and Strobel, G.A. (2001). Ambuic acid, a highly functionalized cycohexanone with antifungal activity from Pestalotaposis spp. and Monochaetia sp. **Phytochemistry**. 56: 463 – 468.

Li, H., Qing, C., Zhang, Y. and Zhao, A. (2005). Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 21: 1515 – 1519.

Lin, Z.J., Lu, Z.Y., Zhu, T.J., Fang, Y.C., Gu, Q.Q. and Zhu, W.M.. (2008). Penicillenols from Penicillium sp. GQ-7, an endophytic fungus associated with Aegiceras corniculatum.**Chemical & Pharmaceutical Bulletin.** 56: 217 – 220.

Liu, J.Y., Song, Y.C., Zhang, Z., Wang, L., Guo, Z.J., Zou, W.X. and Tan, R.X.. (2004). Aspergillus fumigatus CY018, an endophytic fungus in Cynodon dactylon as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnolog**. 114 (3): 279 – 287.

Lu, H., Aou, W.X., Meng, J.C., Hu, J. And Tan, R.X. (2000). New Bioactive metabolites produced by Collectotrichum sp., an endophytic fungus in Artermisia annua. **Plant Science**. 151: 67 – 73.

Ma, Y.M., Li, Y., Liu, J.Y., Song, Y.C. and Tan, R.X. (2004). Anti- Helicobacter pyroli metabolites from Rhizoctonia sp. Cy064, an endophytic fungus in Cynodon dactylon. **Fitoterapia.** 75: 451 – 456.

Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S. Nonpunya, A. and Sripanidkulchai, B. (2011). Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. **Chinese Medicine**. 6 (1): 39.

Mercier, J. And Manker, D.C. (2005). Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in greenhouse soilless mix by the volatile-producing fungus Muscodor albus. **Crop Protection**. 24 (4): 355 – 362.

Mejia, L.C., Rojas, E.I., Maynard, Z., Bael, S.V., Arnold, A.E., Hebbar, P., Samuels, G.J., Robbins, N. and Herre E.A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of Theobroma cacao pathogens. **Biological Control**. 46: 4 – 14.

Mohanta, J., Tayung, K. and Mohapatra, U.B. (2008). Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethno-medicinal plants of Similipal Biosphere Reserve,India. **The Internet Journal of Microbiology**. 5 (2).

Niere, B., Gold, C.S. and Coyne, D. (2004). Can fungal endophytes control soilborne pests in banana? **Bulletin OILB/SROP**. 27: 203 – 209.

Petrini, O. (1991). **Fungal endophytes of tree leaves, in Microbial Ecology of Leaves** (Eds: J. A. Andrews, S.S. Hirano). Springer-Verlag. New York, 179.

Peterson, S.W., Vega, F.E., Posada, F. and Nagai, C.. (2005). Penicillium coffeae, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to P. fellutanum, P. thiersii and P. brocae based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. **Mycologia**, 97 (3): 659–666.

Phongpaichit, S., Nikom, J., Runggindamai, N., Sakayaroj, J., Towatana, N.H., Rukachaisirikul, V. and Kirtikara, K. (2007). Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from Garcinia plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 51 (3): 517 – 525.

Radu and Kqueen, Y. (2002). Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in Malasia for antimicrobial and antitumor activity. **Malaysian Journal of Medical Sciences**. 9 (2): 23 – 33.

Riviere, C., Nguyen Thi Hong, V., Tran Hong, Q., Chataigne, G. and Nguyen Hoai, N. (2010). Mallotus species from Vietnamese mountainous areas: phytochemistry and pharmacological activities. **Phytochemistry Reviews**. 9 (2): 217 – 253.

Rubini, M.R., Silva-Ribeiro, R.T., Pomella, A.W.V., Maki, C.S., Araujo, W.L., dos Santos, D.R. and Azevedo, J.L. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (Theobroma cacao L.) and biological control of Crinipellis perniciosa, causal agent of Witches's broom disease. **International Journal of Biological Sciences**. 1 (1): 24 – 33.

Saikkonen, K. (2007). Forest structure and fungal endophytes. **Fungal Biology Review**. 2: 67 – 74.

Schardl, C.L. and Philips, T.D. (1997). Protective grass endophytes: Where are they from and where are they going? **Plant Diseasse**. 81: 430 – 438.

Schiff, P.B. and Horowitz, S.B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American.** 77: 1561 – 1565.

Schwarz, M., Kopcke, B., Weber, R.W.S., Sterner, O. and Anke, H. (2004). 3 – Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi. **Phytochemistry**. 65 (15): 2239 – 2245.

Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Rommert, A.K. and Hrohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**. 106: 996 – 1004.

Sterile, A., Strobel, G.A. and Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by Taxomyces andreanae. **Science.** 260: 214 – 216.

Stierle, D.B., Stierle, A.A. and Bugni, T.. (2003). Sequoiamonascins A-D: novel anticancer metabolites isolated from a redwood endophyte. **Journal Organic Chemitry**. 68 (12): 4966 – 4969.

Strobel, G.A., Stierle, A., Stierle, D. and Hess, W.M. (1993). Taxomyces andreanae a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew. **Mycotaxon**. 47: 71 – 78.

Strobel, G., Yang, X., Sears, J. Kramer, R. Sidhu, R.S. and Hess, W.M. (1996). Taxol from Pestalotiopsis microspora, an endophytic fungus of Taxus wallichiana. **Microbiology**. 142: 435 – 440.

Strobel, G.A., Miller, R.V., Miller, C.M., Condron, M.M., Teplow, D.B. and Hess, W.M. (1999). Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus Cryptosporiopsis cf. Quercina. **Microbiology**. 145: 1919 – 1926.

Strobel, G.A. (2002). Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Review in Biotechnology**. 22: 315 – 333.

Strobel, G.A., Ford, E., Worapong, J., Parper, J.K., Arif, A.M., Grant, D.M., Fung, P.C.W. and Chan, K. (2002). Ispoesacin, and isobenzofuranone from Pestalotiopsis microspora, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**. 60: 179 – 183.

Strobel, G.A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**. 5: 535 – 544.

Strobel, G. And Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 67 (4): 491 – 502.

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**. 67: 257 – 268.

Suffness, M. (1995). Taxol, Science and Applications. Boca Raton, Fla: CRC Press.

Susan, I. (1992). **Fungal-plant interactions** (1st ed.). London: Chapman & Hall.

Tan, R.X. and Zou, W.X. (2001). Endophytes: a rich of functional metabolites. **Natural Product Reports**. 18: 448 – 459.

Thang, T.D., Kuo, P.C. Yu, C.S. Shen, Y.C. and Hoa, L.H.M. (2011). Chemical constituents of the leaves of Glochidion obliquum and their bioactivity. **Archives of Pharmacal Research**. 34 (3): 383 – 389.

University of Rhode Island. (2005). Endophyte-enhanced grasses. University of Rhode Island GreenShare Factsheets. (Online). Available: http://www uri.edu/ce/factsheets/prints/endophyte.html [Accessed Mar 2, 2006]

Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F. and Rehner, S.A. (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**. 46: 72 – 82.

Wagenaar, M., Corwin, J., Strobel, G.A. and Clady, J. (2000). Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus Rhinocladiella. **Journal of Natural Products**. 63 (12): 1692 – 1695.

West, C.P., Izekor, E., Oosterhuis, D.M. and Robbins, R.T. (1988). The effect of Acremonium coenophialum on the growth and nematode infestation of tall fescue. **Plant Soil**. 112: 3 – 6.

White, J.F. and Cole, G.T. (1986). Endophyte-host associations in forage grasses. V. Occurrence of fungal endophytes in certain species of Bromus and Poa. **Mycologia**. 78: 852 – 856.

Wicklow, D.T., Roth, S., Deyrup, S.T., Gloer, J.B. (2005).A protective endophyte of maize: Acremonium zeae antibiotics inhibitory to Aspergillus flavus and Fusarium verticillioides. **Mycological Research**. 109: 610 – 618.

Wilson, D., (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**. 73: 274 – 276.

Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrungsi, N. and Meevootisom, V. (2004). Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 20: 265 - 272.

Worapong, J., Strobel, G., Ford, E.J., Li, J.Y., Baird, G. and Hess, W.H. (2001). Muscodor albus anam. Gen. et sp. Nov., an endophyte from Cinnamomum zeylanicum. **Mycotaxon**. 79: 67 – 79.

Xu, L., Zhou, L., Zhao, J., Li, J., Li, X. and Wang, J. (2008). Fungal endophytes from Dioscorea zingiberensis rhizomes and their antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**. 46: 68– 72.

Yang, S.X., Wang, H.P., Gao, J.M., Zhang, Q., Laatsch, H. and Kuang, Y.. (2012). Fusaroside, a unique glycolipid from Fusarium sp., an endophytic fungus isolated from Melia azedarach. **Organic & Biomolecular Chemistry.** (online) Available: http//www.bioportfolio.com/resources/pmarticle/261241/ [Accessed Oct 6, 2011]

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – ชื่อสกุล นางปาณิสรา ว่องพรรณงาม

วัน เดือน ปีเกิด 25 กันยายน 2518

สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดยะลา

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 12 ซอยแม่อ่างทอง 3 ถนนพัฒนาการคูขวาง
ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80000

ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน ครูชำนาญการ กลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์
โรงเรียนเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ นครศรีธรรมราช
อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80190

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2537	ม.6 โรงเรียนคณะราษฎรบำรุง อำเภอเมือง จังหวัดยะลา
พ.ศ. 2541	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
พ.ศ. 2542	ประกาศนียบัตรบัณฑิตทางการสอน มหาวิทยาลัยทักษิณ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา