วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร ฉบับพิเศษ
การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 5

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสกุลไมร์ทาซีอี้ที่พบในพื้นที่ป่าพรุควนเคร็ง

Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated from Myrtaceae at Kuankreng Peatlands

จำเนียร กิ้วเส้ง[1*] สุมาลี เลี่ยมทอง[2] และ ศุภวรรณ พรหมเพรา[3]

[1]นักศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา [2]อาจารย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา [3]ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาสถิติประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช 802080

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสกุลไมร์ทาซีอี้ ที่พบในพื้นที่ป่าพรุควนเคร็ง จำนวน 4 ชนิด คือ เสม็ด เสม็ดขาว หว้า และโทะ ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้จากพืชทุกชนิดและแยกได้ทั้งหมด 124 ไอโซเลต เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค โดยวิธี agar well diffusion พบว่ามีราเอนโดไฟท์ 46 ไอโซเลต (37.1%) ที่สามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างน้อย 1 ชนิด เมื่อทำการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์จากการทดสอบเบื้องต้นด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และนำไปทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี microdilution broth พบว่า สารสกัดจากราเอนโดไฟท์ 156 สาร จากจำนวนทั้งหมด 174 สาร (89.6%) ให้ค่า MIC ≤ 200 μg/mL โดยให้ค่า MIC ต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC25923, MRSA SK1, *P. aeruginosa* ATCC27853, *C. albican* ATCC90028,*C. neoformmans* ATCC90112 และ *M. gypseum* เท่ากับ 128, 200, 200, 64, 200, 16 และ 200 μg/mL ตามลำดับ

Abstract

The purpose of this research was to study antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from Myrtaceae (*Melaleuca cajeputi*, *Malaleuca leucadendra*, *Syzygium cumini* L. and *Rhodomyrtus tomentasa* (Ait.) Hassk.) at Kuankreng Peatlands. A total of 124 isolates of endophytic fungi were obtained from all plant types. Three week old fermentation broths of endophytic fungi were tested for antimicrobial activity against pathogenic microorganisms using the agar well diffusion method. Forty- six isolates (37.1%) inhibited at least 1 type of pathogen. Fermentation broth and cells of active endophytes were further extracted with organic solvents and tested for MIC using the microdilution broth method. The results show that 156 of the total of 174 crude extracts (89.6%) produced MIC ≤ 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 128, 200, 200, 64, 200, 16 and 200 μg/mL, respectively.

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ราเอนโดไฟท์ ไมร์ทาซีอี้ พรุควนเคร็ง
Keywords : Antimicrobial Activity, Endophytic Fungi, Myrtaceae, Kuankreng Peatlands

*ผู้นิพนธ์ประสานงานไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ giusang_@hotmail.com โทร. 08 1086 5370

1. บทนำ

ปัจจุบันโรคติดเชื้อยังคงเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลกและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ที่ก่อปัญหาในการรักษาอย่างมาก ดังนั้นการหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ มาใช้แทนยาเดิมที่ใช้ในการรักษาแล้วไม่ได้ผล จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ควรกระทำอย่างเร่งด่วน แหล่งของสารต้านจุลินทรีย์แหล่งหนึ่งที่มีความสำคัญ คือราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi) โดยราเอนโดไฟท์ เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรคใดๆ กับพืชอาศัยหรือก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติแก่พืชชนิดนั้นๆ (วรรณฤดี, 2552) จากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ พบว่ามีราเอนโดไฟท์บางชนิดที่สร้างสารที่น่าสนใจและสามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นยาชนิดใหม่ๆ ได้

ป่าพรุควนเคร็งเป็นป่าพรุขนาดใหญ่แห่งหนึ่งของภาคใต้ รองจาก พรุโต๊ะแดง มีพื้นที่รวมทั้งหมดประมาณ 223,320 ไร่ ครอบคลุมพื้นที่เขตรอยต่อของ 3 จังหวัด คือ จังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา (ปิติวงษ์ และคณะ, 2547) โดยมี ต.เคร็ง จ.นครศรีธรรมราช เป็นจุดศูนย์กลางของป่าพรุ บริเวณดังกล่าวเคยเป็นป่าดิบชื้นที่อุดมสมบูรณ์มาก่อน (สมบูรณ์ และคณะ, 2545) แต่ในปัจจุบันพบว่า ดินและน้ำมีสภาพเป็นกรดสืบเนื่องมาจากไฟไหม้ป่าและเกิดการท่วมขังของน้ำ ป่าพรุควนเคร็งจึงกลายเป็นป่าพรุที่เสื่อมโทรม และเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นการศึกษาราเอนโดไฟท์จากพืชที่เจริญในสภาวะดินและน้ำเป็นกรดสูง เช่น ในพื้นที่ป่าพรุควนเคร็ง จึงน่าจะมีโอกาสพบราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ได้เป็นอย่างดี ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยมุ่งศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชหลักสกุลไมร์ทาซีอี้ ที่พบมากในพื้นที่ป่าพรุควนเคร็ง 4 ชนิด คือ เสม็ด เสม็ดขาว หว้า และโทะ ตลอดจนการจำแนกประเภทของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาซึ่งสามารถนำข้อมูลและเชื้อราเอนโดไฟท์ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การเกษตร และ การอุตสาหกรรมต่อไปได้

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่างพืช

ทำการเก็บตัวอย่างพืชสกุลไมร์ทาซีอี้ 4 ชนิด คือ เสม็ด เสม็ดขาว หว้า และโทะ ที่ขึ้นในพื้นที่ป่าพรุควนเคร็ง ตำบลเคร็ง อำเภอชะอวด จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยเก็บตัวอย่างใบพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีลักษณะอาการของโรคนำตัวอย่างพืชมาล้างด้วย detergent (Clorox) ผึ่งให้แห้งภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) เมื่อตัวอย่างพืชแห้งแล้ว ใช้ใบมีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ นำไปผ่านไฟแล้วตัดตัวอย่างพืชออกเป็นชิ้นเล็กๆ

2.2 การแยกราเอนโดไฟท์

นำตัวอย่างพืชที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ มากำจัดเชื้อบริเวณผิวโดยแช่ใน 95% ethanol นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน 5% sodium hypochlorite นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่ใน 95% ethanol อีกครั้ง นาน 30 วินาที นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นาน 3-5 วินาที แล้วจึงนำตัวอย่างพืชไปวางบนอาหาร PDA ที่เติมยา tetracycline และ ampicillin ความเข้มข้น 50 mg/L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตผลทุกวัน เมื่อพบว่ามีการเจริญของ เชื้อรางอกออกมาจากชิ้นส่วนตัวอย่างพืช ทำการตัดส่วน hyphal tip ของเชื้อราแล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่เติม ยาปฏิชีวนะ โดยทำการเก็บตัวอย่างเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน นับจากวันแรกที่พบการงอกของเชื้อราจากชิ้นส่วนตัวอย่าง เมื่อแยกเชื้อรา ได้บริสุทธิ์แล้ว ทำการเก็บเชื้อราบนอาหารวุ้นเอียง PDA เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว

นำราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้อ 2 ซึ่งมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันมาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3-4 วัน หรือจนกว่าจะพบว่ามีการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา ใช้ใบมีดผ่าตัดจุ่ม 95% ethanol นำไปผ่านเปลวไฟ แล้วรอให้เย็น หลังจากนั้นนำไปตัดชิ้นส่วนบริเวณขอบของโคโลนีให้มีขนาดชิ้นละ 1×1

ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 300 mL ที่บรรจุในฟลาส์กขนาด 500 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนด ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น จากนั้นนำเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เฮกซีน (hexene) และ เอทธิลอะซีเตท (ethyl acetate) เพื่อหาสารต้านจุลินทรีย์ที่เชื้อราเอนโดไฟท์ชนิดนั้นๆ สร้างขึ้น

2.4 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 6 ชนิด คือ Staphylococus aureus ATCC29523, methicillin–resistant Staphylococus aureus SK1 (MRSA), Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, Escherichiacoli ATCC25922, Candida albicans ATCC90028 และ Crytococcus neoformans ATCC90012 และเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกจากผู้ป่วย 1 ชนิด คือ Microsporum gypseum โดยทำการเตรียมการและดำเนินการทดสอบดังนี้

2.4.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานโดยการ streak เชื้อแบคทีเรีย S. aureus ATCC29523, MRSA SK1, E. coli ATCC25922 และ P. auruginosa ATCC27853 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเชื้อยีสต์ C. albicans ATCC90028 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA และบ่มที่อุณหภูมิ 35 ºC เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ C. neoformans ATCC90012 จะ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เช่นเดียวกับ C. albicans แต่จะบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนดเขี่ยเชื้อ 3-5 single colonies ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) สำหรับแบคทีเรีย และ อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 สำหรับเชื้อยีสต์ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 ºC เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 และ 2.0 Mcfarland standard สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับด้วย normal saline solution (NSS)

สำหรับเชื้อรา M. gypseum จะเตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 ºC เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ หรือจนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์ ทำการเก็บสปอร์โดยการใช้ลูกแก้วที่ปราศจากเชื้อกลิ้งบนผิวโคโลนีเชื้อราเพื่อให้สปอร์หลุดออกจากเส้นใย เติม NSS แล้วปรับความขุ่นของ spore suspension ให้ได้ความเข้มข้น $4x10^3$ – $5x10^4$ spore/mL โดยใช้ hemacytometer

2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL (ดัดแปลงจาก CLSI M7-A4, 2000)

นำสารสกัดหยาบจากเชื้อราเอนโดไฟท์มาละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/mL เก็บไว้เป็น stock solution ที่อุณหภูมิ -20 ºC เมื่อจะใช้ทำการทดสอบ นำสารละลายที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว มาละลายต่อด้วย DMSO ในอัตราส่วน 1:10 และละลายต่ออีกครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth (MHB) ในอัตราส่วน 1:25 ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 400 µg/mL ดูดสารสกัดหยาบ 50 µl ใส่ในแต่ละหลุมของ sterile 96-well microtiter plate ความเข้มข้นละ 2 หลุม จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน (0.5 MF) มาเจือจางด้วย NSS ในอัตราส่วน 1:200 ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียมาตรฐานประมาณ $5x10^5$ CFU/mL ดูดสารละลายแบคทีเรียมาตรฐาน 50 µL ใส่ในแต่ละหลุม ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ 200 µg/mL บ่ม plate ที่อุณหภูมิ 35 ºC เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม 10 µL ของ 0.18% resazurin indicator ลงไปในแต่ละหลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 ºC เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ อ่านผลการทดสอบเมื่อครบเวลาที่กำหนด

ใช้ยา vancomycin และ gentamicin ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 4 µg/mL เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกและใช้ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดสำหรับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ตามลำดับ

2.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL (ดัดแปลงจาก CLSI MA27-A2, 2002a)

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อยีสต์ เช่นเดียวกับแบคทีเรีย เพียงแต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 และบ่ม microtiter plate ที่อุณหภูมิ 35 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ C. albicans และ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สำหรับเชื้อ C. neoformans เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงเติม 10 µL ของ 0.18% resazurin indicator ลงไปในแต่ละหลุม และทำการอ่านผลการทดสอบหลังจากที่บ่ม plate ไว้ที่อุณหภูมิ 35 ºC เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ใช้ยา amphotericin B ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 4 µg/mL เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกในการยับยั้งยีสต์และใช้ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัด

2.4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL (ดัดแปลจาก CLSI MA27-A2, 2002a)

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อรา เช่นเดียวกับแบคทีเรีย เพียงแต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 และบ่ม microtiter plate ที่อุณหภูมิ 25 ºC เป็นเวลา 6 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงเติม 10 µL ของ 0.18% resazurin indicator ลงไปในแต่ละหลุม และทำการอ่านผลการทดสอบหลังจากที่บ่ม plate ไว้ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25 ºC

ใช้ยา miconazole ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 4 µg/mL เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกในการยับยั้งราและใช้ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัด

ในการอ่านผลการทดสอบ อาศัยการเปลี่ยนสีของ resazurin ตามวิธีของ Drummond and Waigh (2000) ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อได้ (ผลบวก) resazurin จะมีสีน้ำเงินหรือสีม่วงเหมือนเดิม แต่ถ้าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (ผลลบ) เชื้อจะสามารถเติบโตและเปลี่ยนสี resazurin ให้เป็นสีชมพู

นำสารสกัดซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ไปทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) หรือ minimal fungicidal concentration (MFC)

2.4.5 การหาค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์

การหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบใช้วิธี broth microdilution ที่ดัดแปลงจาก CLSI M7 - A4 (CLSI, 2000) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ดัดแปลงจาก CLSI MA27 – A2 (CLSI, 2002a) สำหรับเชื้อยีสต์ และดัดแปลงจาก CLSI MA34 – A (CLSI, 2002b) สำหรับเชื้อรา โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบด้วยวิธี serial dilution โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 128 µg/mL และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 64, 32, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 µg/mL ตามลำดับ

หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 35 ºC เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ซึ่งจะแสดงผลเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วง คือค่า MIC

สำหรับสารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 128 µg/mL จะรายงานว่ามีค่า MIC เท่ากับ 200 µg/mL

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียหรือรา (MBC หรือ MFC) ของสารสกัดหยาบจะทำโดยนำสารละลายจากหลุม microtitier plate ที่มีค่าความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับค่า MIC ไป streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA สำหรับเชื้อยีสต์และรา นำไปบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหาร คือค่า MBC และความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อยีสต์หรือราเจริญบนอาหาร คือค่า MFC

2.5 การจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา

เลือกศึกษาราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ โดยการนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30ºC) เมื่อราเจริญและมีลักษณะโคโลนีที่เด่นชัด นำมาบันทึกภาพ บันทึกลักษณะ วัดขนาดการเจริญ และทำ slide culture เพื่อดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างสืบพันธุ์ทั้งชนิดมีเพศและไม่มีเพศภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำไปจำแนกเปรียบเทียบกับขนาดและลักษณะใน

Compendium of Soil Fungi Volume I (Domsch et al., 1993) และ Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett and Hunter, 1998)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 การแยกราเอนโดไฟท์จากพืชสกุลไมร์ทาซีอี้

ในการแยกราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างพืชสกุลไมร์ทาซีอี้ 4 ชนิด คือ เสม็ด เสม็ดขาว หว้า และโทะ ที่ขึ้นในป่าพรุควนเคร็ง ในตำบลเคร็ง จังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่า สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ 124 ไอโซเลต เป็นเชื้อที่แยกได้จากเสม็ดขาวมากที่สุดจำนวน 50 ไอโซเลต (40.3%) รองลงมาคือ หว้า และโทะ จำนวน 48 (38.7%), และ 16 (12.9%) ไอโซเลต ตามลำดับ และแยกจากเสม็ด ได้น้อย โดยแยกได้ 10 (8.1%) ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

เมื่อพิจารณาถึงชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกราเอนโดไฟท์ พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ เป็นเชื้อราที่ได้มาจากส่วนของแผ่นใบมากที่สุด จำนวน 46 ไอโซเลต (37.1%) รองลงมาคือ จากส่วนของกิ่ง ก้านใบ เส้นกลางใบ และเส้นใบ ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ จำนวน 34 (27.4%), 24 (19.4%), 12 (9.7%) และ 8 (6.5%) ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้

ชนิดพืช	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้					
	กิ่ง	ก้านใบ	เส้นใบ	แผ่นใบ	เส้นกลางใบ	รวม
เสม็ด	4	2	1	3	-	10
เสม็ดขาว	15	8	1	19	7	50
หว้า	11	10	4	18	5	48
โทะ	4	4	2	6	-	16
รวม	34	24	8	46	12	124

อัตราการแยกราเอนโดไฟท์ที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อและชนิดของพืชที่ต่างกัน อาจเนื่องมาจากมีเชื้อราเอนโดไฟท์บางชนิด ที่มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ (Sieber et al., 1991; Brown et al., 1998; Fisher et al., 1994; Fisher et al., 1995; Barengo et al., 2000; Photita et al., 2000d and de Siqueira et al, 2011) หรือจำเพาะกับชนิดของพืชอาศัย (Guo et al., 1998 and Gennaro et al., 2003; Arnold and Lutzoni, 2007) หากเนื้อเยื่อใดหรือพืชชนิดใดมีอาหารและมีสรูปที่เหมาะสมกับชนิดของราเอนโดไฟท์มากกว่า หรือมีกลไกการป้องกันการเข้าอยู่อาศัยของราเอนโดไฟท์น้อยกว่า โอกาสที่จะตรวจพบราเอนโดไฟท์ก็จะมีมากกว่า อายุของใบพืชมีผลต่ออัตราการแยกเชื้อเช่นเดียวกัน โดยอัตราการแยกราเอนโดไฟท์จะสูงในใบพืชที่มีอายุมากกว่า (Fisher et al., 1995; Taylor et al., 1999; brown et al., 1998 and Photita, 2000) ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีระยะเวลาในการสะสมเชื้อจากสิ่งแวดล้อมได้มากกว่า (Fröhlich et al., 2000 และ Photita, 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสภาวะแวดล้อมที่พืชเจริญ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน และแหล่งของจุลินทรีย์รอบต้นพืช จะมีผลต่ออัตราการเข้าอยู่อาศัยในต้นพืชได้เช่นเดียวกัน (Carroll, 1995 and Photita, 2000)

3.2 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion

จากการนำราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จำนวนทั้งสิ้น 124 ไอโซเลต ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า มีเชื้อราจำนวน 46 ไอโซเลต (37.1%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งแยกเป็นเชื้อราจากเสม็ด เสม็ดขาว หว้า และโทะจำนวน 7, 17, 18 และ 4 ไอโซเลต ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 70.0, 34.0, 37.5 และ 25.0 ของเชื้อราที่แยกได้จากพืชแต่ละชนิด ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งด้วยน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ พบว่าน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์จากเสม็ด เสม็ดขาว หว้า และโทะ สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 1-3 ชนิด และน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ ก่อโรคเพียงชนิดเดียว โดยมีน้ำเลี้ยงจากราเอนโดไฟท์จำนวน 36 ไอโซเลต (78.3%) ที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 1 ชนิด ในขณะที่มี น้ำเลี้ยงจากราเอนโดไฟท์เพียง 8 (17.4%) และ 2 (4.3%) ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 2 และ 3 ชนิดตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งด้วยน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์

ชนิดพืช	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค			
		1 ชนิด	2 ชนิด	3 ชนิด	รวม
เสม็ด	10	6	1	-	7
เสม็ดขาว	50	12	4	1	17
หว้า	48	15	2	1	18
โทะ	16	3	1	-	4
รวม	124	36	8	2	46

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์จากพืชในตระกูลไมร์ทาซีอี้ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ ก่อโรค มีค่าสูงกว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชในกลุ่ม *Garcinia* sp. ที่มีเปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้งเท่ากับ 18.6 % (Phongpaichit *et al*., 2006) แต่มีค่าต่ำกว่าราเอนโดไฟท์จากต้นจิก มีเปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้งเท่ากับ 46.4 % (สุมาลีและแน่งน้อย, 2555) และเนื่องจากน้ำเลี้ยงเชื้อราส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้เพียงชนิดเดียว แสดงว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ ที่แยกได้จากพืชตระกูลไมร์ทาซีอี้ในป่าพรุควนเคร็งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแคบ (narrow spectrum)

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ พบว่า น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก S. aureus ATCC25923 ได้ดี โดยมีเชื้อราเอนโดไฟท์ 46 ไอโซเลต จากเชื้อราที่นำมาทำการทดสอบทั้งสิ้น 124 ไอโซเลต (37.1%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดนี้ อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้ง MRSA SK1 แบคทีเรียแกรมลบ (P. aeruginosa ATCC27853 และ E. coli ATCC25922) ยีสต์ (C. albicans ATCC90028 และ C. neoforman ATCC90012) และรา M. gypseum ได้น้อย โดยมีน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์จากราเพียง 1-6 ไอโซเลต (0.8-4.8%) ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคดังกล่าวได้ (ตารางที่ 3) โดยทั่วไปแล้วสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติจะออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากส่วนประกอบชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบจะจำกัดการแพร่เข้าสู่เซลล์ของสารออกฤทธิ์ ทำให้สารออกฤทธิ์เข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียแกรมลบได้น้อยลง (Denyer et al., 2004 and Bansal et al., 2010) สารธรรมชาติส่วนใหญ่จึงไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ หรือหากยับยั้งได้ก็มักพบว่าต้องใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูง (Anzai et al., 2003; Marinho et al., 2005 and Phongpaichit et al., 2006)

ตารางที่ 3 ชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งด้วยน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์

ชนิดพืช	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่นำมาทดสอบ	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
เสม็ด	10	5	1	0	1	0	0	1
เสม็ดขาว	50	14	2	1	2	2	0	2
หว้า	48	13	2	3	0	0	1	3
โทะ	16	4	0	0	1	0	0	0
รวม	124	36	5	4	4	2	1	6

SA = Staphylococus aureus ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant Staphylococcus aureus SK1,
PA = Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, EC = Escherichia coli ATCC25922,
CA = Candida albicans ATCC90028, CN = Cryptococcus neoformans ATCC90012,
MG = Microsporum gypseum จากผู้ป่วย

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเอนโดไฟท์ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่าสารสกัดหยาบร้อยละ 89.6 ของสารสกัดทั้งหมดที่ทดสอบ ยังคงมีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบเช่นเดียวกับน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ได้เช่นเดียวกับน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรานั้น พบว่ามีสารสกัดหยาบร้อยละ 66.6 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา M. gypseum (ตารางที่ 4) โดยสารสกัดหยาบจากเส้นใยราด้วย hexane (CH) มีฤทธิ์ในการยับยั้งใกล้เคียงกับสารสกัดจากเส้นใยราด้วย ethyl acetate (CE) และสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate (BE) แสดงว่าสารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้วต่ำหรือขั้วปานกลางที่เชื้อราสร้างแล้วเก็บไว้ในเซลล์หรือเป็นสารที่มีขั้วปานกลางที่เชื้อราสร้างแล้วปล่อยออกนอกเซลล์

ตารางที่ 4 จำนวนสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL

สารสกัด	จำนวนสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์/จำนวนสารสกัดที่นำมาทดสอบ (%สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค)							
	SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG	รวม*
BE	36/36 (100.0)	5/5 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	2/2 (100)	1/1 (100)	4/6 (66.6)	52/58 (89.6%)
CH	36/36 (100.0)	5/5 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	2/2 (100)	1/1 (100)	4/6 (66.6)	52/58 (89.6%)
CE	36/36 (100.0)	5/5 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	2/2 (100)	1/1 (100)	4/6 (66.6)	52/58 (89.6%)
รวม	108/108 (100.0)	15/15 (100.0)	12/12 (100.0)	12/12 (100.0)	6/6 (100.0)	3/3 (100.0)	12/18 (66.6)	156/174 (89.6%)

3.4 การทดสอบหาค่า MIC และ MBC หรือ MFC

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้งเชื้อได้ (MIC) หรือความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ฆ่าเชื้อได้ (MBC หรือ MFC) ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดที่ใช้ในการทดสอบให้ค่า MIC ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบทั้งหมดอยู่ในช่วงที่สูงกว่าค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (ตารางที่ 5) หากนำสารสกัดหยาบมาทำให้บริสุทธิ์อาจจะทำให้ได้สารที่มี

ฤทธิ์ดีขึ้น เช่น จากการศึกษาของ Maria et al. (2005) ที่พบว่า สารสกัดหยาบจากเชื้อ Aspergillus sp. 3 และ MS1 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ Cryptococcus albidus ได้ แต่เมื่อนำสารสกัดหยาบไปทำให้บริสุทธิ์ กลับพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะในสารสกัดหยาบมีสารออกฤทธิ์น้อยหรือมีสารหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ต้านกัน เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์จึงได้สารที่มีความเข้มข้นมากขึ้นและออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น

ตารางที่ 5 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

Test Microorganism	Antibiotics	MIC range (µg/mL)	
		Antibiotics	Crude extracts
S. aureus	Vancomycin	1	128-200
MRSA SK1		1	200
P. aeruginosa	Gentamicin	4	200
E. coli		0.5	64-200
C. albicans	Amphotericin B	2	200
C. neoformans		2	16-200
M. gypseum	Miconazole nitrate	1	200

สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดดังนี้ สารสกัด 2RT L1.1 CE และ 2MC P1.2 CE สำหรับ S. aureus (128 µg/mL) สารสกัดหยาบ BE, CH และ CE ของเชื้อราเอนโดไฟท์ 5 ไอโซเลต คือ 2MC B1.4, 2ML L1.1, 2SC P1.3, 3ML B1.6 และ 4SC L1.11 สำหรับ MRSA SK1 (MIC = 200 µg/mL) สารสกัด 2SC P1.3, 3ML B1.3, 4SC B1.3 และ 4SC B1.5 สำหรับ P. aeruginosa (MIC = 200 µg/mL) สารสกัด 2RT L1.1 CE สำหรับ E. coli (MIC = 64 µg/mL) สารสกัดหยาบ BE, CH และ CE จากเชื้อรา 2ML P1.1 และ 3ML P1.3 สำหรับ C. albicans (MIC = 200 µg/mL) สารสกัด 4SC L1.10 BE สำหรับ C. neoformans (MIC = 16 µg/mL) และสารสกัดหยาบ BE, CH และ CE 2MC L1.2, 2SC B1.1, 2SC V1.2 และ 3SC V1.3 สำหรับ M. gypseum (MIC = 200 µg/mL) โดยสารสกัดทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 µg/mL หรือต่ำกว่า (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุด

จุลินทรีย์ทดสอบ	สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด	
	สารสกัดหยาบ	MIC (µg/mL)
S. aureus	2RT L1.1 CE 2MC P1.2 CE	128
MRSA	2MC B1.4 BE, CH, CE 2ML L1.1 BE, CH, CE 2SC P1.3 BE, CH,CE 3ML B1.6 BE, CH, CE 4SC L1.11 BE, CH, CE	200
P. aeruginosa	2SC P1.3BE, CH, CE, 3ML B1.3BE, CH, CE, 4SC B1.3BE, CH, CE , 4SC B1.5BE, CH, CE	200
E. coli	2RT L1.1CE	64
C. albicans	2ML P1.1 BE, CH, CE 3ML P1.3 BE, CH, CE	200
C. neoformans	4SC L1.10 BE	16
M. gypseum	2MC L1.2 BE, CH, CE 2SC B1.1 BE, CH, CE 2SC V1.2 BE, CH, CE 3SC V1.3 BE, CH, CE	200

สารสกัดหยาบทั้งหมดที่ทำการทดสอบในครั้งนี้ ไม่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL แสดงว่าสารส่วนใหญ่มีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว อย่างไรก็ตามหากเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ใช้ในทดสอบให้มากขึ้น อาจพบว่ามีสารบางชนิดที่สารถฆ่าเชื้อได้

3.5 การจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา 19 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ ก่อโรคแต่ละชนิดที่ดีที่สุด (ตารางที่ 6) พบว่าเป็นเชื้อรา Aspergillus niger มากที่สุด จำนวน 6 ไอโซเลต รองลงมาคือ Aspergillus sp. และ Penicillium sp. จำนวนชนิดละ 4 ไอโซเลต และ Trichoderma sp. จำนวน 2 ไอโซเลต และเป็นเชื้อรากลุ่มที่ไม่สร้างโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ (sterile hypha) จำนวน 3 ไอโซเลต จากชนิดของราที่จำแนกได้พบว่า ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชในตระกูลไมร์ทาซีอี้ในป่าพรุควนเคร็ง เป็นกลุ่มของราเอนโดไฟท์ที่พบได้บ่อยเป็นกลุ่มที่สร้างสารออกฤทธิ์ได้ดี สอดคล้องกับการรายงานของ Berdy (2005) ที่รายงานว่า ในจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 6,450 ชนิด มากกว่าร้อยละ 30 มาจากเชื้อราในกลุ่ม Penicillium และ Aspergillus

4. สรุป

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสกุลไมร์ทาซีอี้ ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้จากพืชทุกชนิดและแยกได้ทั้งหมด 124 ไอโซเลต เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค โดยวิธี agar well diffusion พบว่ามีรา เอนโดไฟท์ 46 ไอโซเลต (37.1%) ที่สามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างน้อย 1 ชนิด เมื่อทำการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์จากการทดสอบเบื้องต้นด้วยตัวทำละลายทางเคมี และนำไปทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี microdilution broth พบว่า สารสกัดจากราเอนโดไฟท์ 156 สาร จากจำนวนทั้งหมด 174 สาร (89.6%) ให้ค่า MIC ≤ 200 µg/mL โดยให้ค่า MIC ต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ S. aureus ATCC25923, MRSA SK1, P. aeruginosa

ATCC27853, C. albican ATCC90028, C. neoformmans ATCC90112 และ M. gypseum เท่ากับ 128, 200, 200, 64, 200, 16 และ 200 µg/mL ตามลำดับ และจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงว่าราเอนโดไฟท์จากพืชในป่าพรุควนเคร็ง เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวรูปที่สำคัญ ควรที่จะแยกสาร วิเคราะห์สูตรโครงสร้าง ตลอดจนทำการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพชนิด อื่น ๆ เช่นฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์โสภนา วงศ์ทอง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบลักษณะสัณฐานทางวิทยาของราเอนโดไฟท์

6. เอกสารอ้างอิง

ปิติวงษ์ ตันติโชดก, ศิวฤทธิ์ พงศกรรังศิลป์, พิมพ์ลภัส พงศกรรังศิลป์, นุสนธิ์ สงเอียด, รัชฎา คชแสงสัตน์, ขจรยุทธ อัจจิกุล, เพ็ญนภา สวนทอง, ธนิต สมพงษ์ และสุพันธ์ พู่ผกา. 2547. **รายงานการศึกษาลำดับความสำคัญของปัญหาและความต้องการของประชาชนเพื่อการวิจัยและพัฒนาพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนัง**. นครศรีธรรมราช : มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

วรรณฤดี หิรัญรัตน์. 2552. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์. **วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ, 12** (2), 90.

สมบูรณ์ เจริญจิระตระกูล, อาแว มะแส, คันธรส พวงแก้ว และปริญญา บัณฑิโต. 2545. **การวางแผนเพื่อการพัฒนาจัดการทรัพยากรในพรุควนเคร็ง : การวิเคราะห์ความต้องการฝึกอบรมเพื่อการจัดการทรัพยากรที่ยั่งยืน.** สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุมาลี เลี่ยมทอง และแน่งน้อย แสงเสน่ห์. 2555. **รายงานโครงการการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นจิก** (Baringtonia acutangula L. Gaertn)

Anzai, Y., Saito, N., Tanaka., M., Kinoshita, K., Koyama, Y. and Kato, F. 2003. Organization of the biosynthetic gene cluser for the polyketide macrolide mycinamicin in Micromonospora griseorubida. FEMS Microbiology Letter. 218:135-141.

Arnold, A.E. and Lutzoni, F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspot? Ecology. 88:541-549.

Bansal, S., Malwal, M. and Sarin, R. 2010. Anti-bacterial efficacy of some plants used in folkaric medicines in arid zone. Journal of Pharmacy Research. 3:2640-2642.

Barengo, N. Sieber, T.N. Holdenreider, O. 2000. Diversity of endophytic mycobiota in leaves an twigs of pubescent birch (Betula pubescens). Sydowia. 52:305-320.

Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th Edition. American Phytopathological Society, Minnesota USA. 218 pp.

Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites: a personal view. The journal of Antibiotics. 58:1-26.

Brown, K.B., Hyde, K.D., Guest, D.I. 1998. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminate* species complex in Hong Kong and Australia. Fungal Diversity. 1:27-51.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2000. References method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard-second edition. CLSI documents M27-A2. CLSI, Wayne.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2002a. References method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard-fourth edition. CLSI documents M27-A2. CLSI, Wayne.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2002b. References method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard-second edition. CLSI documents M38-A. CLSI, Wayne.

de Siqueira, V.M., Conti, R., de Araüjo, J. and Souza-Motta, C.M. 2011. Endophytic fungi from The medicinal plants *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. Symbiosis. 53:89-95.

Denyer, S.P., Hodges, N.A. and Gorman, S.P. 2004. Hogo and Russell's Pharmaceutical Microbiology. Blackwell Science: USA.

Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.W. 1993. Compendium of Soil Fungi Volume I. IHWVerlag Press.

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

Fisher, P.J., Petrini, O., Petrini, L.E. and Sutton, B.C. 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. New Phytologist. 127 : 133-137.

Fisher, P.J., Petrini, L.E., Sutton, B.C. and Petrini, O. 1995. A study of fungal endophytes in leaves, stems and root of *Gynoxis oleifolia* Muchler (Compositae) from Ecuador. Nova Hedwigia. 60 : 589-594.

Fröhlich, J., Hyde, K.D. and Petrini, O. 2000. Endophytic fungi associated with palms. Mycological Research. 104: 1202-1212.

Gennaro, M., Gonthier, P., Nicolotti, G., 2003. Fungal endophytic communities in healthy and declining *Quercus robur* L. and *Q. cerris* L. trees in northern Italy. Journal of Phytopathology. 151:529-534.

Guo, L.D., Hyde, K.D. and Liew, E.C.Y. 1998. A method to promote sporulation in palm endophytic fungi. Fungal Diversity. 1: 109-113.

Marinho, A.M.R., Rodrigues-Filho, E., Moitinho, M.L.R. and Santos, L.S. 2005. Biological active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of Melia azedarach. Journal of Brazilian Chemical Society. 16:280-283.

Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V., and Sakayaroj J. 2006. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 48: 367-372.

Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. and Hyde, K.D. 2000. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminate*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. Paper presents at the Asian Mycological Congress 2000 (AMC 2000) incorporating the 2nd Asia-Pasific Mycological Congress on Biodiversity and Biotechnology, and held at the University of Hong Kong on 9 – 13 July 2000.

Sieber, T.N. Sieber-Canavesi, F. Dorworth, C.E. 1991, Endophytic fungi of red alder (alnus-rubra) leaves and twigs in British-Columbia. Canadian Journal of Botany. 69:407-411.

Taylor, J.E., Hyde, K.D. and Jone, E. 1999. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortune*, within and outside its natural geographic range. New Phytologist. 142:335-346.