

ศักราชของราที่แยกได้จากนาเกลือต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส
และคุณสมบัติทางเทคโนโลยีชีวภาพบางประการ

สโรชา ประสงค์ผลชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ


คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา


มีนาคม 2559

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ สโรชา ประสงค์ผลชัย ฉบับนี้แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

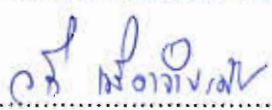

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิรดี ปิรันชนภาคย์)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. วารี เนื่องจันทัก)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

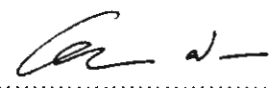

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ไกรรัมย์)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิรดี ปิรันชนภาคย์)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วารี เนื่องจันทัก)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุเทพ ภาสุระ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา


.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 24 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2559

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพฉบับนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ได้ด้วยดี ทั้งนี้ได้รับแนวคิด คำแนะนำ ความช่วยเหลือ คำปรึกษาทั้งทางด้านวิชาการและการปฏิบัติตลอดจนช่วยเหลือและสนับสนุนทางด้านต่าง ๆ จาก ผศ.ดร.อภิรดี ปลัดธนภาคย์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ รศ.ดร.วาริ เนื่องจังก์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการสอบที่ให้คำแนะนำสิ่งที่ดีที่สุด และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ตลอดจนขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา และแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดีตลอดทั้งการวิจัย

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.อภิรดี ปลัดธนภาคย์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่สนับสนุนทุนวิจัย และส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณ คุณพนา นิลน้อยศรี สำหรับความความรู้ในการทำนาเกลือและความช่วยเหลือเกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างจากนาเกลือ ในการทดลองตลอดทั้งวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และภาควิชาจุลชีววิทยาที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี รวมทั้ง คุณวรรณฎ จงโยธา และคุณสุดิรัตน์ ปุ่นประเสริฐ ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องการเบิกอุปกรณ์ การใช้สารเคมี และการใช้เครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบพระคุณครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำวิจัยครั้งนี้ ความดีของโครงการทางจุลชีววิทยาฉบับนี้ขอบแต่ผู้มีพระคุณและทุกท่านที่กล่าวมา

ศโรชา ประสงค์ผลชัย

55910134: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

คำสำคัญ: รา/ นาเกลือ/ ราชอบเค็ม/ แอนแทรกโนส/ สารต้านจุลินทรีย์/ สารลดแรงตึงผิว/ สารต้านอนุมูลอิสระ

สโรชา ประสงค์ผลชัย: ศักยภาพของราที่แยกได้จากนาเกลือต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสและคุณสมบัติทางเทคโนโลยีชีวภาพบางประการ (POTENTIAL OF FUNGI FROM SOLAR SALTERN AGAINST FUNGI CAUSING ANTHRACNOSE DISEASES AND SOME BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: อภิรดี ปิลาธนภักย์, Ph.D., วาริ เนื่องจางันค์, Ph.D., 163 หน้า ปี พ.ศ. 2559.

การศึกษาศักยภาพทางเทคโนโลยีชีวภาพของรานานาเกลือจำนวน 120 สายพันธุ์ โดยการทดสอบคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ได้แก่ การชอบเกลือ การยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนส การยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ คุณสมบัติการสร้างสารลดแรงตึงผิวและสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่ารานาเกลือทั้งหมดเป็นราชอบเค็มและรา 73 สายพันธุ์ (ร้อยละ 60.8) ชอบเค็มสูง สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีความเค็มสูงถึง 250 ppt จากการทดสอบประสิทธิภาพของราในการยับยั้งราทดสอบ *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี Dual culture พบรา 60 สายพันธุ์สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิดได้อย่างใดอย่างหนึ่งบนอาหาร PDA หรือ PDA/SW_{30 ppt} เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าสารสกัด Ethyl acetate 40 สารจากอาหารเหลือเลี้ยงรา 28 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษา ยับยั้ง *C. gloeosporioides* หรือ *C. capsici* ด้วยประสิทธิภาพร้อยละ 50 ขึ้นไป รวมทั้งแสดงกิจกรรมการลดแรงตึงผิวของน้ำมันมะกอก เมื่อทดสอบโดยวิธี Parafilm M และสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ สารสกัดส่วนใหญ่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัด PDB/SW_{30 ppt} จากอาหารเหลือเลี้ยงราส่วนใหญ่แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่า สารสกัดจาก PDB ค่า MIC ของสารสกัด 18 สารจากราที่มีคุณสมบัติที่ดีที่คัดเลือกไว้ 9 สารพันธุ์ต่อ *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* อยู่ระหว่าง 512- \geq 2048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่า MIC ที่มีต่อแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ในช่วง 64-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากอาหารเลี้ยงรา PDB และ PDB/SW_{30 ppt} ของรา *Aspergillus* sp. SSPB3208 ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดีที่สุด มีค่า MIC ต่อ *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* เท่ากันคือ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดทั้งหมดแสดงองค์ประกอบที่แยกได้ชัดเจนโดยวิธี TLC ในตัวทำละลาย Toluene: Methanol: Acetone (6:1:3 ปริมาตรต่อปริมาตร) การทดสอบการยับยั้งของสารองค์ประกอบที่แยกได้จากสารสกัดเลี้ยงรา *Aspergillus* sp. SSPB3208 พบว่า 6 สาร จากทั้งหมด 7 สาร ยับยั้ง *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* ได้ แต่บางครั้งผลการยับยั้งแตกต่างกันขึ้นกับความเค็มของอาหารที่นำมาสกัด

55910134: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCES; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCES)

KEYWORDS: FUNGI/ SOLAR SALTERN/ HALOPHILE FUNGI/ ANTHRACNOSE/
ANTIMICROBIAL/ BIOSURFACTANT/ ANTIOXIDANT

SAROCHA PRASONGPHONCHAI: POTENTIAL OF FUNGI FROM SOLAR SALTERN
AGAINST FUNGI CAUSING ANTHRACNOSE DISEASES AND SOME BIOTECHNOLOGICAL
PROPERTIES. ADVISORY COMMITTEE: APIRADEE PILANTANAPAK, Ph.D., WAREE
NAENGCHOMNONG, Ph.D., 163 P. 2016.

Biotechnological potential of 120 fungi from solar saltern was evaluated by several characters; halophile, anti-anthracnose fungi, antibacterial and yeast, biosurfactant and antioxidant producing. All solar saltern fungi were halophile. Seventy three fungi (60.8%) were extreme halophile which could grow on media up to 250 ppt. Testing of inhibition efficiency against test *C. capsici* and *C. gloeosporioides* by dual culture technique revealed 60 fungal isolates could inhibit either *C. capsici* or *C. gloeosporioides* on PDA or PDA/SW_{30 ppt}. By disc diffusion test, 40 ethyl acetate-extracts from 28 fungal culture filtrates inhibited either *C. capsici* or *C. gloeosporioides* at the percentage of efficiency ≥ 50 . These extracts acted as biosurfactant with olive oil by Parafilm M method and also as antioxidant. The extracts inhibited Gram-positive bacteria better than Gram-negative bacteria and yeast. Mostly, the MIC of extracts from PDA/SW_{30 ppt} were better than from PDB. The MIC of 18 extracts from 9 selected fungi with good activity, against *C. capsici* and *C. gloeosporioides* ranged from 512-2048 $\mu\text{g/ml}$ while the MIC against Gram-positive bacteria were 64-512 $\mu\text{g/ml}$. Extract from PDA and PDB/SW_{30 ppt} of *Aspergillus* sp. SSPB3208 showed best inhibitory activity against both *C. capsici* and *C. gloeosporioides* at the MIC 512 $\mu\text{g/ml}$. The composition of all extracts could be separated in Toluene: Methanol: Acetone (6: 1: 3 v/v) by TLC method. Six out of seven composition of extracts from *Aspergillus* sp. SSPB3208 could inhibited *C. capsici* and *C. gloeosporioides*. Different results can be observed in some compositions depended on salinity of medium source.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	5
สมมติฐานของการวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	5
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
นาเกลือ.....	8
รานาเกลือ ราชอบเค็ม และราทนเค็ม.....	9
โรคพิษและราสาเหตุโรคพิษ.....	15
การควบคุมราโรคพิษโดยชีววิธี.....	16
จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ.....	19
สารต้านจุลชีพและผลิตภัณฑ์ชีวภาพ.....	23
หลักการทดสอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษา.....	25
รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	31
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	33
วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี.....	33
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	36
การเตรียมเชื้อทดสอบ.....	36
การทดสอบคุณสมบัติการชอบเค็ม.....	36

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การคัดกรองและศึกษาประสิทธิภาพของรานาเกลือในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Dual culture.....	36
การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรานาเกลือ.....	38
การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี Disc diffusion.....	38
การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือต่อการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ โดยวิธี Disc diffusion.....	39
การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration; MIC) ของสารสกัด จากอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Broth Microdilution.....	40
การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้ง การเจริญของยีสต์โดยวิธีมาตรฐาน Broth microdilution.....	41
ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายแบคทีเรียและยีสต์ (Minimal lethal concentration, MLC).....	41
การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้ง การเจริญของรา โดยใช้วิธี Agar dilution.....	42
การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากราดำด้วยวิธี Thin layer chromatography	42
การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือโดยวิธี Bioautography.....	43
การศึกษาความสามารถในการลดแรงตึงผิว.....	44
การศึกษาโดยวิธี Parafilm M	44
การศึกษาโดยวิธี Drop collapsing	44
การศึกษาความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Oil displacement test).....	44
การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดย Dot blot DPPH rapid staining.	45
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	46

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	47
คุณสมบัติการชอบเค็ม.....	47
การคัดกรองและศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนส.....	52
การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช....	52
การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ โดยวิธี Disc diffusion.....	74
การเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งจุลินทรีย์.....	82
การศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) และทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการทำลายจุลินทรีย์ (MLC).....	83
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากราดด้วยวิธี Thin layer chromatography	97
การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ โดยวิธี Bioautography	100
การศึกษาความสามารถในการลดแรงดึงผิว	103
การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบโดยวิธี Dot blot DPPH rapid staining.....	115
การเปรียบเทียบคุณสมบัติของรานาเกลือ และศักยภาพด้านต่าง ๆ ของสารสกัด.....	115
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	119
5 อภิปรายและสรุปผล.....	121
สรุปผลการทดลอง.....	121
อภิปราย.....	123
ข้อเสนอแนะ.....	132
บรรณานุกรม.....	133
ภาคผนวก.....	149
ภาคผนวก ก รานาเกลือที่ใช้ในการศึกษา.....	150
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย.....	155

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก ก การควบคุมการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ด้วยแผ่นดิสก์ยามาตรฐาน.....	158
ภาคผนวก ง ขั้นตอนการเจือจางสารสกัด	159
ภาคผนวก จ การเตรียมยามาตรฐานสำหรับด้านจุลินทรีย์	160
ภาคผนวก ฉ การควบคุมการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์โดยการหาความเข้มข้นต่ำสุดด้วย ยามาตรฐาน.....	161
ภาคผนวก ช สกัดส่วนกรดไขมันของน้ำมัน.....	162
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	163

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 การแบ่งกลุ่มจุลินทรีย์ตามความต้องการเกลือในการเจริญ.....	11
2-2 อาการและสาเหตุโรคพืชที่เกิดจุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ.....	16
2-3 ประเภทและกลไกการควบคุมโรคพืชโดยชีววิถี.....	17
4-1 คุณสมบัติการชอบเค็มของรานาเกลือ.....	48
4-2 ระดับคุณสมบัติการชอบเค็มของรานาเกลือ.....	50
4-3 ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนสถูกยับยั้งการเจริญ (ID) โดยรานาเกลือ เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน.....	53
4-4 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นร้อยละ (%IE) ราสาเหตุโรคพืชด้วยรานาเกลือ เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน.....	60
4-5 จำนวนรานาเกลือที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่ระดับ %IE ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงร่วมกัน (Dual culture) เป็นเวลา 3 และ 5 วัน.....	66
4-6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นร้อยละ (%IE) ของสารสกัดจากรานาเกลือในการ ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช.....	66
4-7 จำนวนสารสกัดจากรานาเกลือที่เลี้ยงในอาหาร PDB และPDB/SW _{30 ppt} ในการยับยั้ง ราสาเหตุโรคพืชที่ระดับ %IE ต่าง ๆ กัน.....	71
4-8 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นร้อยละ (%IE) ของสารสกัดจากรานาเกลือใน การยับยั้งราสาเหตุโรคพืชในเกณฑ์ที่ดีมาก.....	72
4-9 ฤทธิ์ยับยั้งทดสอบแบคทีเรียของสารสกัดจากรานาเกลือ.....	74
4-10 การเปรียบเทียบจำนวนสารสกัดและรานาเกลือในการยับยั้งแบคทีเรีย.....	76
4-11 จำนวนสารสกัดจากอาหาร PDB ที่ไม่มีและมีความเค็มที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย.....	77
4-12 ฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ของสารสกัดจากรานาเกลือ.....	78
4-13 จำนวนและร้อยละของรานาเกลือและสารสกัดที่ประสิทธิภาพของในการยับยั้งยีสต์ เมื่อวัดผลที่เวลาแตกต่างกัน.....	82
4-14 จำนวนและร้อยละสารสกัดจากอาหารเหลวที่ไม่มีและมีความเค็มในการยับยั้งยีสต์ เมื่อวัดผลที่เวลาแตกต่างกัน.....	82

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4-15 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งจุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ	84
4-16 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ราสาเหตุโรคพืช เมื่อเลี้ยง รบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 และ 5 วัน.....	87
4-17 MLC ของสารสกัดที่ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช บนอาหารPDA.....	92
4-18 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) และทำลาย (MLC) แบคทีเรีย.....	95
4-19 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) และทำลาย (MLC) ยีสต์...	98
4-20 จำนวนองค์ประกอบและค่า R_p ของสารสกัด.....	100
4-21 ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วยสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลือโดยวิธี Bioautography.....	104
4-22 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลือ โดยวิธี Bioautography.....	107
4-23 เปรียบเทียบฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัด SSPB3208 ในการยับยั้ง จุลินทรีย์.....	111
4-24 จำนวนสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลือสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์.....	111
4-25 ความสามารถของสารสกัดที่สกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือในการลดแรงดึงผิวเมื่อ ทดสอบด้วยวิธีต่าง ๆ กัน.....	112
4-26 ความสามารถของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระ โดย Dot blot DPPH rapid staining.....	116
4-27 การเปรียบเทียบสัณฐานภาพด้านต่าง ๆ ของสารสกัดรานาเกลือ.....	118
4-28 การจัดจำแนกรานาเกลือ.....	119

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1-1 ขั้นตอนการศึกษา.....	7
2-1 รูปแบบปฏิสัมพันธ์ของโคโลนิรา.....	19
2-2 สารลดแรงตึงผิว โมเลกุลเดี่ยว (monomer)	24
2-3 สารลดแรงตึงผิว I-anionic (SDS), II-cationic (CTAB), III- nonionic (C ₁₂ E ₄) และ VI-zwitterionic (C ₈ -lecithin).....	25
2-4 ลักษณะ Micelle ของสารลดแรงตึงผิว.....	29
2-5 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH radical.....	30
3-1 การศึกษา Inhibition distance (ID) ที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis โดยวิธี Dual Culture	37
3-2 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis โดยวิธี Dual Culture.....	37
3-3 การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดโดยวิธี Disc Diffusion.....	39
3-4 ลักษณะหยดสารสกัด โดยวิธี Drop collapsing test บนผิวหน้าน้ำมันปาล์มในงานอาหารแบบ 96 หลุม.....	44
3-5 การกระจายตัวของน้ำมันมะกอก โดยวิธี Oil displacement test.....	45
3-6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารละลาย Ascorbic acid ที่ความเข้มข้นระดับ A: 1+ เทียบเท่าสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.00025, B: 2+ เทียบเท่าสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ C: 3+ เทียบเท่าสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	46
4-1 รูปแบบของการเจริญของรานาเกลือทั้งหมดที่ศึกษา.....	51
4-2 ลักษณะการเจริญของรานาเกลือรูปแบบต่าง ๆ บนอาหาร PDA ที่มีความเค็ม 0-250 ppt ในงานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม.....	51
4-3 ปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis ของราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนส.....	59
4-4 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากอาหารเหลว PDB/SW _{30ppt} เติ่งรานาเกลือ SSPB4207 ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช <i>C. capsici</i> DOAC 1511 โดยวิธี Disc diffusion.....	72
4-5 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากอาหารเหลว PDB/SW _{30 ppt} เติ่งรานาเกลือ SSPB4207 ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช <i>C. gloeosporioides</i> DOAC 1782 โดยวิธี Disc diffusion.....	73

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-6 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากอาหารเหลว PDB เลี้ยงรานาเกลือ SSPB3124 ในการยับยั้ง ราสาเหตุโรคพืช <i>C. capsici</i> DOAC 1511 โดยวิธี Disc diffusion.....	73
4-7 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากอาหารเหลว PDB/SW _{30 ppt} เลี้ยงรานาเกลือ SSPB3124 ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช <i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782 โดยวิธี Disc diffusion.....	73
4-8 ฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือที่ไม่มีและมีความเค็มใน การยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008 บนอาหาร MHA โดยวิธี Disc diffusion.....	77
4-9 ฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้ง <i>C. albicans</i> ATCC 10231 โดยวิธี Disc diffusion บนอาหาร MHA-GMB เมื่อบ่ม 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง.....	81
4-10 ฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือ ในการยับยั้ง <i>C. albicans</i> ATCC 90028 โดยวิธี Disc diffusion บนอาหาร MHA-GMB เมื่อบ่ม 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง.....	81
4-11 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราสาเหตุโรคพืช <i>C. capsici</i> DOAC 1511 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี Agar dilution.....	88
4-12 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราสาเหตุโรคพืช <i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี Agar dilution.....	88
4-13 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราสาเหตุโรคพืช <i>C. capsici</i> DOAC 1511 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี Agar dilution เมื่อบ่ม 3 วัน.....	89
4-14 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราสาเหตุโรคพืช <i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี Agar dilution เมื่อบ่ม 3 วัน.....	89
4-15 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราสาเหตุโรคพืช <i>C. capsici</i> DOAC 1511 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี Agar dilution เมื่อบ่ม 5 วัน.....	91

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-16 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราสาเหตุโรคพืช <i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี Agar dilution เมื่อบ่ม 5 วัน.....	91
4-17 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงด้านการเจริญของราสาเหตุโรคพืช <i>C. capsici</i> DOAC 1511 บนอาหาร PDA ภายหลังจากยับยั้งโดยสารสกัด SSPB3208 (PDB) ในขั้นตอนการหาค่า MIC	93
4-18 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงด้านการเจริญของราสาเหตุโรคพืช <i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782 บนอาหาร PDA ภายหลังจากยับยั้งโดยสารสกัด SSPB3124 (PDB) ในขั้นตอนการหาค่า MIC.....	93
4-19 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของแบคทีเรีย <i>B. cereus</i> TISTR 008 โดยวิธี Broth microdilution ที่ความเข้มข้น 1,024 -2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร...	97
4-20 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของยีสต์ <i>C. albicans</i> ATCC 90028 โดยวิธี Broth microdilution ที่ความเข้มข้น 1,024-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	97
4-21 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานากลิ้อ โดยวิธี TLC; 1: SSCS0069 (PDB), 2: SSCS0069 (PDB/SW _{30 ppt}), 3: SSPB1122 (PDB), 4: SSPB1122 (PDB/SW _{30 ppt}), 5: SSPB3124 (PDB), 6: SSPB3124 (PDB/SW _{30 ppt}), 7: SSPB3208 (PDB), 8: SSPB3208 (PDB/SW _{30 ppt}), 9: SSPB4207 (PDB), 10: SSPB4207 (PDB/SW _{30 ppt}), 11: SSPB4215 (PDB), 12: SSPB4215 (PDB/SW _{30 ppt}).....	101
4-22 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานากลิ้อ โดยวิธี TLC; 1: SSPB4217 (PDB), 2: SSPB4217 (PDB/SW _{30 ppt}), 3: SSPB4225 (PDB), 4: SSPB4225 (PDB/SW _{30 ppt}), 5: SSPB4332 (PDB), 6: SSPB4332 (PDB/SW _{30 ppt}).....	102
4-23 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช <i>C. capsici</i> DOAC 1511 โดยวิธี Autobiosis บนอาหาร PDA ของสารสกัด SSPB3208	105
4-24 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช <i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782 โดยวิธี Autobiosis บนอาหาร PDA ของสารสกัด SSPB3208.....	105

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-25 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลื้อ SSCS00069 ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008, <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	106
4-26 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลื้อ SSPB1122 ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008, <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	106
4-27 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลื้อ SSPB3208 ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008, <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	106
4-28 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลื้อ ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 โดยวิธี Autobiosis บนอาหาร MHA ของสารสกัด SSCS0069.....	109
4-29 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลื้อ ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 โดยวิธี Autobiosis บนอาหาร MHA ของ สารสกัด SSPB1122.....	109
4-30 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลื้อ ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 โดยวิธี Autobiosis บนอาหาร MHA ของ สารสกัด SSPB3208 (PDB)	110
4-31 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลื้อ ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 โดยวิธี Autobiosis บนอาหาร MHA ของ สารสกัด SSPB3208 (PDB/SW _{30 ppt}).....	110
4-32 ลักษณะหยดสารบนแผ่น Parafilm M.....	114
4-33 การกระจายตัวของน้ำมันมะกอกเมื่อทดสอบการลดแรงตึงผิวของสารสกัด SSPB4107 โดยวิธี Oil displacement test.....	114
4-34 ลักษณะสีที่เกิดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระบนแผ่น TLC silica gel 60 F ₂₅₄ ด้วย Dot blot DPPH rapid staining ของสารสกัด.....	115
4-35 ลักษณะโคโลนีของรา <i>Aspergillus</i> sp.1 (SSPB4225) บนอาหาร PDA/SW _{30 ppt} เป็นเวลา 14 วัน และโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X.....	120

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-36	
ลักษณะโคโคไคโนของรา <i>Aspergillus</i> sp.2 (SSPB3124) บนอาหาร PDA/SW _{30 ppt} เป็นเวลา	
14 วัน B-C: โครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X.....	120

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

นาเกลือ (Solar salterns) เป็นสถานที่สำหรับผลิตเกลือ มักอยู่ในบริเวณพื้นที่ติดทะเล นาเกลือถูกสร้างขึ้นโดยใช้ดินเหนียวกันโดยรอบ เป็นระบบที่มีลักษณะเป็นบ่อลักษณะตื้นหลายบ่อ โดยทุกบ่อเชื่อมกันบริเวณมุมบ่อเพื่อเป็นช่องทางนำน้ำทะเลเข้ามาในบ่อ (Mani, Salgaonkar, Das, & Braganca, 2012) และเกลือถูกผลิตโดยอาศัยการระเหยของน้ำทะเลด้วยวิธีทางธรรมชาติ (Oren, 2002) น้ำในนาเกลือจะมีการเพิ่มระดับความเค็มอย่างต่อเนื่อง จากระดับปานกลางจนถึงระดับที่มีความเค็มสูง (Hypersaline) (Oren, 2002; Zajc, Zalar, Plemenitas, & Gunde-Cimerman, 2012) ในช่วงที่มีการทำนาเกลือความเค็มของน้ำทะเลในนาเกลือจะเพิ่มขึ้นมากกว่า 10 เท่าของความเค็มน้ำทะเลปกติ ซึ่งมีค่าประมาณ 35 ส่วนในพันส่วน (Part per thousand, ppt) เมื่อน้ำระเหยส่งผลให้น้ำในนาเกลือมีค่าความเค็มมากถึง 90-250 ppt เมื่อเกลืออิ่มตัวจึงเกิดเป็นผลึกเกลือ (NaCl crystal หรือ halite crystal) (Chatchawan, Peerapornpisal, & Komarek, 2011; Oren, 2002) นาเกลือจัดเป็นสภาวะวิกฤตยากแก่การดำรงชีวิต เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือ ความเป็นกรดต่าง (pH) อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารอาหาร ปริมาณออกซิเจน ปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (Water activity, a_w) รังสีจากแสงอาทิตย์ และไอออนต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสม (Griffith, 1994; Mani et al., 2012; Oren, 2002)

การศึกษารานาเกลือครั้งแรกเริ่มต้นโดย Gunde-Cimerman, Zalar, de Hoog และ Plemenitas (2000) ศึกษาและแยกได้จากน้ำนาเกลือ หลังจากนั้นทั่วโลกจึงเริ่มศึกษารานาเกลือ (Zajc et al., 2012) ทำให้มีรายงานการค้นพบรานาเกลือจำนวนเพิ่มขึ้น ปัจจุบันมีรายงานการแยกจากรานาเกลือจากหลากหลายทวีป คือ ยุโรป เอเชีย แอฟริกา และอเมริกาเหนือ (Butinar, Santos, Spencer-Martins, & Oren, 2005a; Butinar, Sonjak, Zalar, Plemenitas, & Gunde-Cimerman, 2005b; Butinar, Zalar, Frisvad, & Gunde-Cimerman, 2005c; Cantrell, Martines, & Molina, 2006; Zalar, Hoog, Schroers, Frank, & Gunde-Cimerman, 2005) ราที่พบจำนวนมากที่สุดคือ ราทนเค็ม (Halotolerant fungi) และราทนเค็มสุดขีด (Extremely halotolerant fungi) รองลงมาคือ ราชอบเค็ม (Halophile, Halophilic fungi) ซึ่งมีรายงานการพบราในกลุ่ม Halotolerant มากถึงร้อยละ 75 (Cantrell et al., 2006) ไม่นับรวมยีสต์หลายชนิดจากรานาเกลือ เช่น *Hortaea werneckii*, *Phaeothea triangularis*, *Trimmatostroma salinum* และ *Aurerobasidium pullulans* (Gunde-Cimerman et al., 2000) ความหลากหลายของราที่พบในนาเกลือขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ความเค็ม

ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายน้ำ ปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ ความเป็นกรดต่าง และการกระจายทางภูมิศาสตร์ (Gunde-Cimerman, Frisvad, Zalar, & Plemenitas, 2005)

มีรายงานว่าราที่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ราชอบเค็มที่พบแตกต่างกับแบคทีเรียที่ชอบเค็ม เนื่องจากราสามารถเจริญและปรับตัวให้เข้ากับช่วงความเค็มระดับต่าง ๆ ได้ดีกว่าแบคทีเรีย (Griffith, 1994; Cantrell et. al., 2006, Gunde-Cimerman & Zalar 2014) สิ่งสำคัญสำหรับการปรับตัวในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มคือความสามารถในการรักษาสมดุลแรงดันออสโมติกภายในเซลล์และภายนอกเซลล์โดยวิธีสะสมและ/หรือการสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติรักษาสมดุลแรงดันออสโมติก (Compatible organic solute) (Han & Prade, 2002; Gunde-Cimerman & Zalar 2014; Oren, 1999) ราสามารถปรับตัวทางสัณฐานวิทยาในสภาวะวิกฤตซึ่งเกี่ยวข้องกับรูปแบบลักษณะของการเจริญ ลักษณะเซลล์ ขนาดเซลล์ การสร้างสปอร์ และการเปลี่ยนแปลงลักษณะ Colony (Han & Prade, 2002) เชื่อกันว่าสิ่งเหล่านี้มีความสำคัญต่อการเจริญ การอยู่รอดภายใต้สภาวะที่มีความเค็มสุดขีด (Extremely saline condition) ดังนั้นราชอบเค็มน่าจะมีกลไกพิเศษเพื่อปรับตัวและอาจสร้างสารที่มีประโยชน์ (Gunde-Cimerman & Zalar, 2014)

ราชอบเค็มหลายชนิดสามารถผลิตสารแล้วและหลังออกนอกเซลล์ (Extracellular) (Frisvad, 2005) ซึ่งอาจเป็นสารประกอบในกลุ่มทุติยภูมิ เอนไซม์ หรือกรดอินทรีย์ (Frisvad, 2005; Margesin & Schinner, 2001) มีรายงานว่าราสายที่แยกได้จากนาเกลือสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ เช่น สารต้านจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ สารลดแรงตึงผิว (Surfactant) และสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) (Ali et al., 2014; Oren, 2002; Margesin & Schinner, 2001; Sepcic, Zalar, & Gunde-Cimerman, 2011) ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติในการปรับตัวให้อยู่รอดรวมถึงการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการปรับตัว จึงมีความน่าสนใจอย่างมาก ปัจจุบันมีการนำเชื้อจุลินทรีย์และราจากแหล่งต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพหลากหลาย เช่น นำมาผลิตสารต้านจุลินทรีย์ เอนไซม์ (Berdy, 2005; Davies & Davies, 2010) ผลิตสารที่ใช้เป็นตัวควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ (Pal & Gardener, 2006; Kaewchai, Soyong, & Hyde, 2009) สารลดแรงตึงผิว (Pacwa-Pociniczak, Plaza, Piotrowska-Seget, & Cameotra, 2011) และสารต้านอนุมูลอิสระ (Demain, 2007) เป็นต้น

ทางการเกษตร โรคพืชเป็นปัญหาหลักของเกษตรกร โรคพืชส่วนใหญ่เกิดจากราซึ่งทำความเสียหายต่อพืชและยังส่งผลให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ (Horbach, Navarro-Quesadac, Knoggec, & Deisinga, 2011) ราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (Plant phytopathogenic fungi) มีมากกว่า 8,000 ชนิด (Adams, 1997) *Colletotrichum* เป็นหนึ่งในราสาเหตุโรคพืชที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก (Gautam, 2014; Than,

Prihastuti, Phoulivong, Taylor, & Hyde, 2008b) โดยทำให้ผลผลิตพืชทางการตลาดลดลงร้อยละ 10-80 ในประเทศกำลังพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย (Poonpolgul & Kumphai, 2007) เนื่องจากโรคแอนแทรกคโนสเป็นปัญหาที่เกิดในพืช ผัก ผลไม้ ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างรุนแรง ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (Hadden & Black, 1989; Bosland & Votava, 2003) ปัจจุบันเกษตรกรมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Pesticides) เพื่อกำจัดราก่อโรคพืช ทำให้เกิดปัญหาสารเคมีตกค้างเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค สัตว์ แมลง รวมถึงสิ่งแวดล้อม (Arcury, Quandt, & Russell, 2002; Cabrito, Teixeira, & Sa-Correia, 2009) นอกจากนี้อาจทำให้ราสาเหตุโรคพืชมีความต้านทานต่อสารเคมีเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการใช้สารในปริมาณที่สูงขึ้นและมีค่าใช้จ่ายที่สูง ดังนั้นสารกำจัดศัตรูพืชที่มาจากธรรมชาติมีประสิทธิภาพและปลอดภัยจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ว่าเป็นทางเลือกหนึ่งที่ดีสำหรับใช้ผลิตสารชีวภาพที่มีความสามารถกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากมีรายงานสารฆ่าราหลายชนิด ซึ่งปัจจุบันนำมาขายเป็นการค้า เช่น Ketomium ผลิตจาก *Chaetomium globosum* และ *C. cupreum*, Promote ผลิตจาก *Trichoderma harzianum* และ *T. viride*, SoilGard ผลิตจาก *Gliocladium virens* และ Trichodex ผลิตจาก *T. harzianum* (Kaewchai et al., 2009) อย่างไรก็ตามสารฆ่าราจากราทนเค็มยังไม่มีผู้ศึกษาและรายงานไว้

ปัญหาจากจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ดื้อยา (Antibiotic-resistant pathogen) มีการพบมานานมากกว่า 20 ปี แต่เริ่มมีการตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวเมื่อประมาณ 5-10 ปีที่ผ่านมา (Davies & Davies, 2010) ปัจจุบันมีแนวโน้มกลายเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข เนื่องจากจุลินทรีย์ดื้อยามีอัตราเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ และไม่มียาปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมจุลินทรีย์ดื้อยาได้ทั้งหมด (Walsh & Amyes, 2004; Frieden, 2013) จุลินทรีย์ดื้อยาอาจส่งผลให้ผู้ป่วยมีโอกาสติดจุลินทรีย์ฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน และยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล จุลินทรีย์ดื้อยาปฏิชีวนะที่สำคัญได้แก่ จุลินทรีย์กลุ่ม Enterococcus (*E. faecium* และ *E. faecalis*) ที่ดื้อยา Vancomycin *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยา Methicillin *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi ที่ดื้อยา Carbapenem (Frieden, 2013; Amyes & Thomson, 1995; Brusselsaers, Vogelaers, & Blot, 2011) ปัญหาเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยาส่งผลให้ประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะมีมูลค่ามากกว่าปีละ 10,000 ล้านบาทในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2543-2554) ในการรักษาผู้ป่วย (พงษ์พิสุทธิ์ จงอุดมสุข, 2555) ปัจจุบันพบคนไทยติดจุลินทรีย์ดื้อยาปฏิชีวนะมากกว่า 100,000 คนต่อปี และเสียชีวิตมากกว่าปีละ 30,000 ราย ซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นมูลค่ามหาศาล (พงษ์พิสุทธิ์ จงอุดมสุข, 2555) ดังนั้นความต้องการสารต้านจุลชีพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อผลิตเป็นยาชนิดใหม่จึงเพิ่มขึ้น และราก็เป็นอีกทางเลือก

ที่น่าสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากมีรายงานการพบราหลายชนิดที่มีคุณค่าและความสำคัญ ในการผลิต ยารักษาโรคทั่วไปและโรคที่รักษายาก เช่น มาลาเรีย วัณโรค มะเร็ง (Mayer & Hamann, 2004)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว สร้างโดยสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และราบางชนิด (Amaral, Coelho, Marrucho, & Coutinho, 2010; Satpute, Banat, Dhakephalkar, Banpurkar, & Chopade, 2010; Pacwa-Pociniczak et al., 2011) นอกจากสารลดแรงตึงผิวจะมีประโยชน์ในการขจัดคราบไขมันคิบบที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ยังสามารถนำมาพัฒนาเป็นสารต้านจุลชีพ สารต้านเซลล์มะเร็ง รวมถึงไวรัส (Rodrigues, Banat, Teixeira, & Oliveira, 2006) สารลดแรงตึงผิวยังนำมาประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น ใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ หรือน้ำยาซักล้าง (Fakruddin, 2012) สำหรับราสายมีรายงานเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว เช่น Glycolipoprotein ผลิตจาก *Aspergillus ustus* (Kiran et al., 2009) Glycolipid ผลิตจาก *Ustilago maydis* (Alejandro, Humberto, & Maria, 2011) และสารสกัดจากรา *Fusarium* sp. BS-8 (JQ860113) (Qazi, Subhan, Fatima, Ali, & Safia Ahmed, 2013)

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ (Free radical) ซึ่งคืออะตอม โมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในกระบวนการ Metabolism การสันดาป และชีวเคมี จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการรักษาหรือป้องกันสภาวะเสื่อมสภาพและรักษาสุขภาพ ถ้าร่างกายมีอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหลอดเลือดตีบ และแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด โรคอัลไซเมอร์ โรคไขข้ออักเสบ โรคชรา แต่ปกติร่างกายจะมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างเองและรับจากภายนอกในการป้องกันร่างกายเพื่อไม่ให้เกิดความเสียหายจากอนุมูลอิสระ แต่เนื่องจากในปัจจุบันร่างกายมีการรับอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นจากสิ่งต่าง ๆ เช่น มลพิษควันบุหรี่ สารเสพติด เจ็บ ป่วย ความเครียด หรือแม้กระทั่งการออกกำลังกาย สารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกมีความจำเป็นอย่างยิ่งในแง่ของสุขภาพ ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระเช่น Ascorbic acid (Vitamin C), Tocotrienols (Vitamin E), Glutathione (Percival, 1996; Devasagayam et al., 2004) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดรวมถึงรา ตัวอย่างราที่สร้างสารต้านอนุมูลอิสระเช่น ราในกลุ่ม *Aspergillus* และ *Penicillium* (Chandra & Arora, 2009) *Gymnascella dankaliensis*, *Nigrospora oryzae*, *Engyodontium album* (Abdel-Monem, Abdel-Azeem, Ashry, Ghareeb, & Nabil-Adam, 2013)

ปัจจุบันนักกณิณวิทยาสนใจศึกษารากจากแหล่งที่คาดว่าจะมีสายพันธุ์ราที่มีความสามารถในการผลิตที่ดี สามารถสร้างสารและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ข้างต้นอย่างกว้างขวาง แต่มีราจากแหล่งต่าง ๆ ในธรรมชาติอีกมากที่ยังไม่มีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ ดังนั้นจึงมีการสำรวจรา

จากธรรมชาติในแหล่งใหม่ ๆ เพื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์รา และเก็บรวบรวมราเหล่านั้นเพื่อการใช้ประโยชน์ นาเกลือซึ่งเป็นพื้นที่ติดทะเลและมีสภาพที่ปัจจัยทางชีวภาพ กายภาพ และเคมีแตกต่างจากสภาพทั่วไป จึงเป็นแหล่งที่กำลังเป็นที่สนใจสำหรับการค้นหาที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติการชอบเค็มของราที่แยกได้จากนาเกลือ
2. เพื่อศึกษาศักยภาพของราที่แยกได้จากนาเกลือในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

Colletotrichum spp.

3. เพื่อศึกษาว่าราที่สร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ หรือไม่
4. เพื่อศึกษาว่าราที่สร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชสามารถสร้างสารที่มีศักยภาพทางเทคโนโลยีชีวภาพอื่น ๆ หรือไม่

สมมติฐานของการศึกษา

1. ราที่แยกได้จากนาเกลือน่าจะมีคุณสมบัติเป็นราชอบเค็ม และสารที่ราผลิตน่าจะมีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *Colletotrichum* spp.
2. ราที่มีรวมถึงสารที่มีความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ อาจมีความสามารถในการยับยั้งที่จุลินทรีย์อื่น ๆ และอาจสร้างสารที่มีประโยชน์อื่น ๆ เช่น สารลดแรงตึงผิว สารต้านอนุมูลอิสระ ร่วมด้วย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สามารถคัดเลือกราจากนาเกลือที่สามารถสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *Colletotrichum* spp. และมีความสามารถในการทนเค็มไว้เพื่อศึกษาและพัฒนา
2. สามารถคัดเลือกราที่นอกจากจะมีคุณสมบัติข้างต้นแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ หรือสร้างสารที่มีศักยภาพทางเทคโนโลยีชีวภาพอื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาศักยภาพของรานาเกลือสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพของราที่แยกได้จากดินและน้ำนาเกลือ จังหวัดเพชรบุรี ฉะเชิงเทรา และจันทบุรี จำนวน 120 สายพันธุ์ การศึกษาแบ่งเป็น 4 ตอน (ดังขึ้นตอนที่ 1-3 แสดงภาพที่ 1-1)

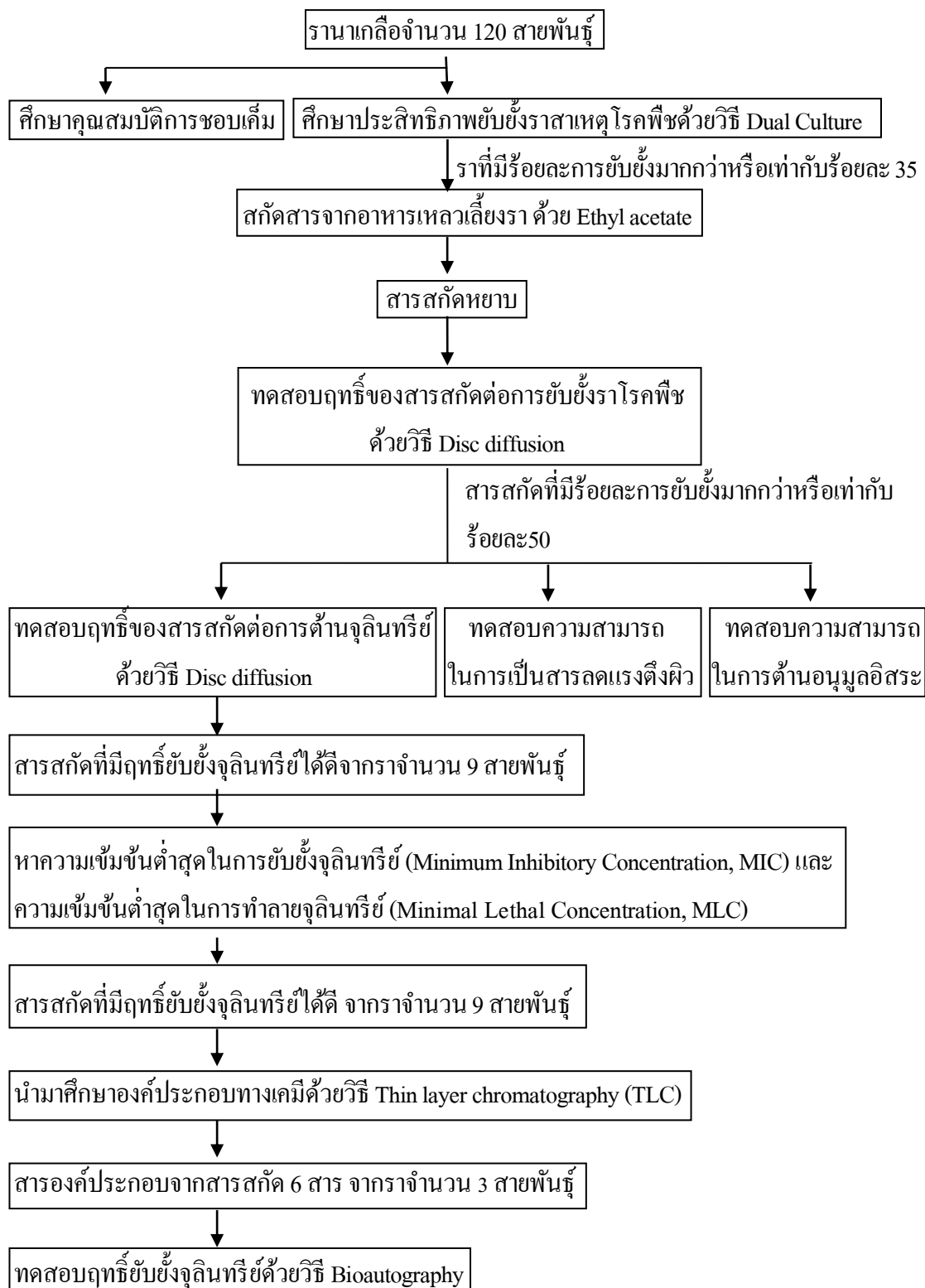
1. ศึกษาคุณสมบัติการชอบเค็มของรา
2. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช เป็นการนำราที่แยกได้จากดินนาเกลือและน้ำนาเกลือจังหวัดเพชรบุรี ฉะเชิงเทรา และจันทบุรี มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช จำนวน 2 ชนิด คือ *Colletotrichum capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 โดยวิธี Dual Culture และเลือกราที่พบการยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ ร้อยละ 35 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 10 วัน ก่อนที่จะนำส่วนของอาหารเหลวมาสกัดสารด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราโรคพืชข้างต้น โดยวิธี Disc diffusion

3. สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 จะนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์อื่น ๆ และทดสอบความสามารถทางเทคโนโลยีชีวภาพอื่น ๆ

- 3.1 ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยีสต์ของสารสกัด โดยวิธี Disc diffusion จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบได้แก่ *Bacillus cereus* TISTR 121, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Candida albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028 คัดเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้จากราจำนวน 9 สายพันธุ์มาหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimum inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (Minimal lethal concentration, MLC) และนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) สารองค์ประกอบแต่ละสารจากสารสกัด 6 สารจากราจำนวน 3 สายพันธุ์ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ก็นำมาทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Bioautography

- 3.2 ทดสอบคุณสมบัติทางเทคโนโลยีชีวภาพอื่น ๆ ได้แก่ คุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

4. นำราที่คัดเลือกได้ทั้งหมดมาจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา



ภาพที่ 1-1 ขั้นตอนการศึกษา

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. นาเกลือ

1.1 การผลิตเกลือในประเทศไทย

การผลิตเกลือของประเทศไทยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ เกลือทะเลหรือเกลือสมุทร (Sea salt) และเกลือหินหรือเกลือสินเธาว์ (Rock salt) (ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล, 2553) เกลือทะเลหรือเกลือสมุทร คือ เกลือที่ผลิตขึ้นในนาเกลือ โดยนำน้ำทะเลขึ้นมาตากแดดให้น้ำระเหยไปเหลือแต่ผลึกเกลือ (Solar evaporation system) (Kostick, 1993) ส่วนเกลือสินเธาว์ คือ เกลือที่ทำจากดินที่น้ำชะดินละลายแล้วแห้งปรากฏเป็นคราบเกลือติดอยู่บนผิวดิน (ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล, 2553) ต่อมาในปี พ.ศ. 2512 การผลิตเกลือสินเธาว์ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือเปลี่ยนแปลงไปเป็นการใช้เกลือหินซึ่งอยู่ชั้นใต้ดิน (Krairapanond, Krairapanond, Sinthuwanich, & Junpet, 1992) โดยใช้วิธีฉีดน้ำลงไปละลายเกลือในบ่อเกลือหรือใช้วิธีสูบน้ำเกลือใต้ดินขึ้นมาตากแดดหรือต้มเพื่อให้ได้ตะกอนเกลือ (ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล, 2553)

1.2 นาเกลือในประเทศไทย

ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ผลิตเกลือสมุทรทั้งหมดประมาณ 81,485 ไร่ โดยประมาณร้อยละ 90 ของผลผลิตทั้งประเทศ อยู่ที่ 3 จังหวัดภาคกลาง คือ จังหวัดเพชรบุรี (ร้อยละ 47.0) สมุทรสาคร (ร้อยละ 43.1) สมุทรสงคราม (ร้อยละ 7.7) ส่วนพื้นที่ที่มีการผลิตเกลือเพียงเล็กน้อยประมาณร้อยละ 10 ของผลผลิตเกลือทั้งประเทศ คือ จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ จังหวัดชลบุรี (ร้อยละ 10.0) จันทบุรี (ร้อยละ 0.6) ฉะเชิงเทรา (ร้อยละ 0.4) ตามลำดับ (ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล, 2553) พื้นที่เหล่านี้เป็นสถานที่ที่เหมาะสมแก่การทำนาเกลือ คือ พื้นที่ราบริมทะเลขนาดใหญ่ใกล้ชายฝั่งทะเล (Sintusaard, Chantachon, & Koseyayotin, 2009a)

1.3 การทำนาเกลือ

1. ส่วนประกอบของนาเกลือ

นาเกลือประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่มีทางเชื่อมต่อกันและมีชื่อที่ใช้เรียกแตกต่างกันตามกระบวนการ คือ วังน้ำ นาแม่ (นาตากหรือนาประเทียบ) นารองเชื้อ นาเชื้อ (นาดอก) และนาวาง (นาปลง) ตามลำดับ ซึ่งแต่ละพื้นที่มีการเรียกแตกต่างกันออกไป วังน้ำเป็นพื้นที่สำหรับเก็บน้ำทะเลไว้ใช้ตลอดฤดูกาลทำนาเกลือ นาแม่เป็นพื้นที่สำหรับตากน้ำทะเลเพื่อให้น้ำระเหยออก เป็นการเพิ่มระดับความเค็มของน้ำทะเล นารองเชื้อเป็นนาสำหรับตากน้ำทะเลที่มีความเค็มพอสมควร โดยตาก

น้ำทะเลให้ได้ความเค็มประมาณ 150 ppt นาเชื้อเป็นนาสำหรับเพาะเชื้อเกลือ ซึ่งต้องตากน้ำทะเลให้น้ำทะเลมีความเค็มสูงถึง 240 ppt นาวางเป็นนาชั้นสุดท้ายสำหรับตากน้ำทะเลที่มีความเค็มสูงจัดเพื่อให้เกลือเริ่มตกผลึกเป็นเม็ดเกลือ (เกษตรพอเพียงคลับ, 2556)

2. วิธีทำนาเกลือ

การทำนาเกลือในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือประมาณเดือนพฤศจิกายนหรือฤดูแล้งถึงเดือนเมษายนของปีถัดไป ใช้ระยะเวลาประมาณ 6-7 เดือน เนื่องจากมีแสงแดดและลมที่เหมาะสม แต่ทั้งนี้ระยะเวลาในการทำนาเกลือยังขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ โดยเริ่มเก็บผลผลิตเกลือได้ประมาณกลางเดือนมกราคมเป็นต้นไป (ปราชญ์ชาวบ้าน; Sintusaard et al., 2009a, b)

ขั้นตอนแรกของการทำนาเกลือ คือ การเตรียมพื้นที่ เริ่มจากกั้นน้ำฝนให้ขังอยู่ในนาเพื่อไว้ใช้สำหรับขุดร่องนาและเสริมคันดินใหม่ เพื่อให้คันดินสูงขึ้นสำหรับใส่น้ำทะเลในปีถัดไป จากนั้นขุดรางส่งน้ำจากนาเกลือถึงชายทะเล เพื่อเอาน้ำทะเลมาใช้ทำนาเกลือ และติดตั้งอุปกรณ์ทำนาเกลือ ขั้นตอนต่อมา คือ วิดน้ำทะเลผ่านทางรางส่งน้ำให้เต็มวังน้ำ และเริ่มคันน้ำทะเลเข้าสู่นาแม่ หลังจากนั้นคันน้ำทะเลเข้าสู่ร่องเชื้อ จากนั้นตากน้ำทะเลไว้ประมาณ 5-7 วัน แสงแดดจะทำให้ น้ำทะเลระเหยจนปริมาณน้ำลดลงและความเค็มเพิ่มมากขึ้น สังเกตจากคราบน้ำที่จับอยู่ริมบ่อ ขั้นตอนต่อมา คือ คันน้ำจากนาร่องเชื้อเข้าสู่นาเชื้อ ซึ่งเป็นการเตรียมน้ำสำหรับใช้ในนาวาง จากนั้นทำการปรับพื้นที่นาปลงเพื่อรองรับน้ำจากนาเชื้อ โดยใช้วัสดุกลิ้งบดทับผิวดินให้เรียบแน่นไม่ให้มีรอยแตกประมาณ 4-5 ครั้ง ครั้งละ 3-5 วัน และการบดกลิ้งผิวดินควรใช้ระยะเวลาห่างกันประมาณ 5-7 วัน ตามสภาพผิวดิน จากนั้นคันน้ำจากนาเชื้อเข้าสู่नावาง น้ำเกลือจะค่อย ๆ ตกผลึกเป็นเม็ดเกลือและเกาะตัวกันหนา ซึ่งผลึกเกลือมีค่าความเค็มประมาณ 820-870 ppt ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการเก็บผลึกเกลือ คือ การเอาเกลือเข้าเก็บในฉางหรือยุ้งเกลือ เริ่มจากเกลือที่ตกผลึกหนาประมาณ 2 เซนติเมตรขึ้นไป ใช้รั้วชวยเกลือให้ผลึกเกลือแตกออกจากกัน ทำการชวยเกลือจนทั่วนา จากนั้นใช้ทับทาซึ่งมีลักษณะคล้ายจอบเกลี่ยผลึกเกลือให้เป็นแถวยาวไปตามคันนา ต่อมาใช้ทับทาชุ่มรวมผลึกเกลือให้เป็นกอง (เกษตรพอเพียงคลับ, 2556)

2. รานาเกลือ ชอบเค็ม และราทนเค็ม

2.1 การแบ่งรานาเกลือ ราชอบเค็ม และราทนเค็ม

สิ่งแวดล้อมที่มีเกลืออาจพบจุลินทรีย์ที่ชอบเค็มหรือชอบเกลือหลายกลุ่ม (DasSarma & Arora, 2001; Oren; 2002) จุลินทรีย์ทั่วไปแบ่งความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีเกลือ (NaCl) เป็น 2 กลุ่ม คือ จุลินทรีย์กลุ่มไม่ชอบเค็ม (Non-halophile microorganism) คือ จุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเจริญในสถานะที่มีเกลือหรือมีเกลือมากกว่าร้อยละ 1 และจุลินทรีย์กลุ่มชอบเค็ม (Halophile microorganism)

คือ จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือเท่านั้น Kushner (1978; 1993) แบ่งจุลินทรีย์กลุ่มที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือตามความสามารถในการเจริญตามช่วงความเค็มที่แตกต่างกันได้ 5 ประเภท คือ

1. Non-halophile เจริญได้บนอาหารที่มี NaCl น้อยกว่า 0.2 M
2. Slight halophile เจริญได้บนอาหารที่มี NaCl ระหว่าง 0.2-0.5 M
3. Moderate halophile เจริญได้บนอาหารที่มี NaCl ระหว่าง 0.5-2.5 M
4. Borderline extreme halophile เจริญได้บนอาหารที่มี NaCl ระหว่าง 1.5-4.0 M
5. Extreme halophile เจริญได้บนอาหารที่มี NaCl อยู่ในช่วง 2.5-5.2 M

แต่คำจำกัดความที่ใช้กับราแตกต่างจากจุลินทรีย์ทั่วไป เนื่องจากราที่พบในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือมีพฤติกรรมแตกต่างจากกลุ่มจุลินทรีย์อื่น ๆ โดยรากลุ่มชอบเค็มสามารถเจริญและปรับตัวได้ทั้งในสภาวะที่ไม่มีเกลือและมีเกลืออีกทั้งสามารถเจริญบนอาหารที่ไม่มีเกลือจนถึงอาหารที่มีเกลืออิ่มตัวสูง (Cantrell, Dianese, Fell, Gunde-Cimerman, & Zalar, 2011; Gunde-Cimerman, Ramos, & Plemenitas, 2009; Plemenitas, Vaupotic, Lenassi, Kogej, & Gunde Cimerman, 2008) ดังนั้นคำจำกัดความเกี่ยวกับคุณสมบัติของราในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือ จึงมีผู้ให้ความหมายไว้หลายลักษณะและใช้เกณฑ์แตกต่างกันไป เช่น แบ่งตามพฤติกรรมของราออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. ราชอบเกลือหรือราชอบเค็ม (Halophile, Halophilic fungi) เป็นราที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ 3 M และสามารถแยกได้จากสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็มมากกว่า 1.7 M (Gunde-Cimerman, Frisvad, Zalar, & Plemenitas, 2005) รากลุ่มชอบเค็มยังแบ่งตามความต้องการเกลือในการเจริญ ออกเป็น 2 กลุ่ม (Buchalo, Nevo, Wasser, Oren, & Molitoris, 1998; Nayak, Gonsalves, & Nazareth, 2012; Gonsalves, Nayak, & Nazareth, 2012; Nazareth, Gonsalves, & Nayak, 2012) คือ

- 1.1 Obligate halophile fungi คือ ราที่ต้องการเกลือในการเจริญ ราไม่สามารถเจริญบนอาหารที่ไม่มีเกลือ

- 1.2 Facultative halophile fungi คือ ราที่ไม่ต้องการเกลือในการเจริญ ราสามารถเจริญบนอาหารได้ทั้งอาหารที่ไม่มีเกลือและมีเกลือ เนื่องจากราไม่ต้องใช้เกลือในการเจริญ

2. ราทนเกลือหรือราทนเค็ม (Halotolerant fungi) คือ ราที่ทนต่อเกลือหรือทนเค็ม ซึ่งแบ่งตามความสามารถในการทนเกลือออกเป็น 3 ประเภท (Cantrell et al., 2006) คือ

- 2.1 Highly halotolerant คือ ราที่สามารถเจริญบนอาหารที่มี NaCl ร้อยละ 25 และมีขนาดของโคโลนีมากกว่า 3 เซนติเมตรเมื่อเลี้ยง 10 วันบนอาหารทดสอบ

2.2 Moderately halotolerant คือ ราที่สามารถเจริญบนอาหารที่มี NaCl ร้อยละ 25 และมีขนาดของโคโลนี 2-3 เซนติเมตรเมื่อเลี้ยง 10 วันบนอาหารทดสอบ

2. Weakly halotolerant คือ ราที่สามารถเจริญบนอาหารที่มี NaCl ร้อยละ 25 และมีขนาดโคโลนีน้อยกว่า 2 เซนติเมตรเมื่อเลี้ยง 10 วันบนอาหารทดสอบ เกณฑ์การแบ่งจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มสรุปดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 การแบ่งกลุ่มจุลินทรีย์ตามความต้องการเกลือในการเจริญ

ประเภทจุลินทรีย์	เกณฑ์การเจริญที่ใช้	อ้างอิง
จุลินทรีย์ทั่วไป	Halophiles -Non halophilic (<0.2 M salt) -Slight halophile (0.2-0.5 M salt) -Moderate halophile (0.5-2.5 M salt) -Borderline extreme halophile (1.5-4.0 M salt) -Extreme halophile (2.5-5.2 M salt)	Kushner (1978, 1985)
	Halotolerant -เป็น Non halophile (<0.2 M salt) และสามารถทนต่อเกลือสูง (Extremely halotolerant >2.5 M salt)	
	Halophiles -Non halophilic (0% NaCl) -Slight halophiles (3% (w/v) NaCl) -Moderate halophiles (3%-15% (w/v) NaCl) -Extreme halophiles (25% (w/v) NaCl) -Borderline extreme halophiles (>12% (w/v) NaCl)	Margesin & Schinner (2001)
	Halotolerant -จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญบนอาหารที่ไม่มีเกลือและมีเกลือ -Extremely halotolerant จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญบนอาหารที่ไม่มีเกลือและมีเกลือมากกว่าร้อยละ 15 (w/v) NaCl (2.5 M)	

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

ประเภท จุลินทรีย์	เกณฑ์การเจริญที่ใช่	อ้างอิง
จุลินทรีย์ ทั่วไป	Halophiles -Non-halophiles (< 0.2 M NaCl) -Slight halophiles (0.2-0.85 M (1-5%) NaCl) -Moderate halophiles (0.85-3.4 M (5-20%) NaCl) -Extreme halophiles (3.4-5.1 M (20-30%) NaCl) Halotolerant -จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญบนอาหารที่ไม่มีเกลือหรือที่มี ความเข้มข้นของเกลือสูง	DasSarma & DasSarma (2012)
	Halophiles -Non halophile (<2% Salt) -Slight halophiles (2.0-5.0% Salt) -Moderate halophiles (5.0-15% Salt) -Extreme halophile (15.0-30.0% Salt)	Anwar & Chauhan (2012)
แบคทีเรีย	Halophiles -Non halophilic (< 0.2 M salt) -Slight halophile (0.2-0.5 M salt) -Moderate halophile (0.5-2.5 M salt) -Borderline extreme halophile (1.5-4.0 M salt) -Extreme halophile (2.5-5.2 M) Halotolerant -Non halophile (<0.2 M salt) และสามารถทนต่อเกลือสูง -Extremely halotolerant (>2.5 M salt)	Kushner (1978, 1985)
ยีสต์	Halophiles -ราที่สามารถเจริญที่ 1.5-3 M NaCl และแยกได้เป็นประจำ จากสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็มสูงกว่า 1.7 M Halotolerant -ราที่สามารถเจริญที่ 0-3 M NaCl	Gunde- Cimerman et al. (2005; 2009)

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

ประเภท จุลินทรีย์	เกณฑ์การเจริญที่ใช้	อ้างอิง
ยีสต์	Halophilic -ไม่เจริญบนอาหารที่ไม่มีเกลือ	Plemenitas et al. (2014)
รา	Halophiles -Non-halophiles (<0.2 M หรือประมาณ 1% NaCl) -Mild halophiles (0.2-0.5 M หรือประมาณ 1-3% NaCl) -Moderate halophiles (0.5-2.5 M หรือประมาณ 3-15% NaCl) -Borderline extreme halophiles (1.5-4.0 M หรือประมาณ 9%-23% NaCl) -Extreme halophiles, (2.5-5.2 M หรือ ประมาณ 15-32% NaCl)	Kushner (1993)
	Halophiles -ไม่เจริญบนอาหารที่ไม่มีเกลือ	Cantrell et al. (2006)
	Halotolerant -ราที่สามารถเจริญที่ไม่มีเกลือถึงมีความเข้มข้นของเกลือสูง -Highly halotolerant (เจริญมากกว่า 3 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยง 10 วัน ในอาหาร 25% NaCl) -Moderately halotolerant (เจริญระหว่าง 2-3 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยง 10 วัน ในอาหาร 25%NaCl) -Weakly halotolerant (เจริญน้อยกว่า 2 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยง 10 วัน ในอาหาร 25%NaCl)	
	Obligate halophile -ราที่ไม่เจริญบนอาหารที่ไม่มีเกลือ	Buchalo et al. (1998)
	Obligate halophiles -ราที่ไม่เจริญบนอาหารที่ไม่มีเกลือ	Gonsalves et al. (2012)
	Facultative halophiles -ราที่เจริญเพิ่มขึ้นเมื่อมีเกลือมากขึ้น	

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

ประเภท จุลินทรีย์	เกณฑ์การเจริญที่ใช้	อ้างอิง
รา	Obligate halophiles -ราที่ต้องการเกลือในการเจริญ ไม่เจริญบนอาหารที่ไม่มีเกลือ (>2% NaCl)	Nayak et al. (2012)
	Facultative halophiles -ราที่ไม่ต้องการเกลือในการเจริญ สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีเกลือ	Nayak et al. (2012)
	Obligate halophiles -ราที่ต้องการเกลือในการการเจริญ (2-15%)	Nazareth et al. (2012)
	Facultative halophiles -ราที่ไม่ต้องการเกลือในการเจริญ และสามารถเจริญได้บนอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ	

2.2 ความหลากหลายของรานาเกลือและราทนเค็ม

เนื่องจากนาเกลือจัดเป็นสภาพแวดล้อมสุดขีด (Extreme environment) ยกเว้นการดำรงชีวิต ดังนั้นราหลายชนิดจึงต้องปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมดังกล่าว โดยราที่พบในนาเกลือมักพบว่าเป็นกลุ่ม Anamorphic fungi ซึ่งเป็นช่วงชีวิตการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของรากลุ่ม Ascomycota มักพบราในจินัส *Aspergillus* และ *Penicillium* เช่น *A. niger*, *A. sydowii*, *A. candidus* และ *P. chrysogenum* (Gunde-Cimerman & Zalar, 2014) ราที่พบในนาเกลือส่วนใหญ่เป็นราที่สามารถงอกและเจริญเป็นเส้นใยในสถานะที่มีเกลือในกลุ่ม Facultative halophile เช่น *A. candidus*, *A. flavus*, *P. chrysogenum* และส่วนน้อยเป็นราในกลุ่ม Obligate halophile เช่น *A. penicilioides* และ *A. unguis* (Nayak et al., 2012; Nazareth et al., 2012) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการแยก 17 ชนิด 43 สายพันธุ์จากดินนาเกลือ อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี โดยพบราในจินัส *Aspergillus* 4 ชนิด 5 สายพันธุ์ที่เป็นราชอบเกลือ คือ *A. flavus*, *A. gracilis*, *A. penicillioides* (2 สายพันธุ์) และ *A. restrictus* (Ali, Kanhayuwa, Rachdawong, & Rakshit, 2012)

3. โรคพืช (Plant Disease) และสาเหตุโรคพืช (Plant pathogenic fungi)

3.1 โรคพืช

โรคพืช หมายถึง ภาวะที่พืชผิดปกติ (Ravichandra, 2013) อาจเกิดจากสิ่งมีชีวิต เช่น รา แบคทีเรีย ไวรัส ไวรอยด์ และสิ่งไม่มีชีวิต เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ความเข้มของแสง มลภาวะ ธาตุอาหาร (Kennelly, Mara, Rivard, Miller, & Smith, 2012) โดยส่งผลให้การทำงานของระบบต่าง ๆ ในพืชเกิดความผิดปกติ ทำให้พืชเปลี่ยนแปลงไป (ชลิตา เล็กสมบูรณ์, 2557) ปัจจัยที่ทำให้พืชเป็นโรค มี 3 ประการ คือ พืช สภาพแวดล้อม และเชื้อสาเหตุโรคพืช (Ravichandra, 2013)

3.2 ลักษณะอาการโรคพืชที่เกิดจากจุลินทรีย์

ลักษณะอาการของโรค เป็นการที่พืชตอบสนองต่อเชื้อโรค อาการของโรคสามารถพบได้ บนส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ราก ลำต้น กิ่งก้าน ใบ ดอก ผล เมล็ด ซึ่งมีลักษณะอาการของโรคหลาย ประเภท แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ อาการภายใน (Internal symptoms) และอาการภายนอก (External symptoms) ลักษณะอาการโรคพืชอาจพบได้หลายลักษณะ เนื่องจากมีหลายสาเหตุ เช่น การเจริญเติบโตผิดปกติ โดยอาจพบว่าพืชมีการเจริญเติบโตลดลงหรือช้าลง หรือมีขนาดและรูปร่างผิดปกติ หรือกลุ่มที่พบว่าเนื้อเยื่อถูกทำลาย เช่น เนื้อเยื่อตาย เป็นจุดแผล เหี่ยว น้ํา รวมถึงลักษณะอื่น ๆ เช่น เหลืองและด่าง สีผิดปกติ นอกจากนี้บางครั้งพืชที่เป็นโรคนั้นยังแสดงออกให้เห็นส่วนของเชื้อรา เช่น Sclerotium, Stroma หรือ Mycelium ปรากฏบริเวณแผล โดยปรากฏให้เห็นอยู่รวมกันเป็นกลุ่มบริเวณ ส่วนต่าง ๆ ของพืช (ชลิตา เล็กสมบูรณ์, 2557; Ravichandra, 2013) (ตารางที่ 2-2)

3.3 สาเหตุโรคพืช

ราจัดเป็นสาเหตุสำคัญของโรคพืช ซึ่งสร้างความเสียหายต่อพืชและยังส่งผลให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นมูลค่ามหาศาล (Horbach et al., 2011) สาเหตุโรคพืช 10 อันดับต้น ๆ ที่มีรายงานทั่วโลกได้แก่ *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Puccinia* spp., *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Colletotrichum* spp., *Ustilago maydis*, *Melampsora lini* ตามลำดับ (Dean et al., 2012)

สาเหตุโรคพืชที่ทำการศึกษา *Colletotrichum capsici* และ *C. gloeosporioides* เป็นสาเหตุโรคพืชที่พบบ่อยใน 10 อันดับแรก (Dean et al., 2012) *Colletotrichum* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนส อาการจุด อาการไหม้ในพืช ผัก ผลไม้ อีกทั้งยังก่อโรคทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว *Colletotrichum* เป็นราที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual) ในกลุ่ม Anamorphic เป็น Coelomycetes ที่สร้างโคนิเดียใน Acervuli การก่อโรคของ *Colletotrichum* ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์พืช (Dean et al., 2012) ประเทศไทยมีรายงานการพบพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยหลายชนิดที่เป็น

ตารางที่ 2-2 อาการและสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากจุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ

อาการของโรค	สาเหตุโรค		
	แบคทีเรีย	รา	ไวรัส
อาการเหลือง (Chlorosis, Yellow)	+		
อาการด่าง (Mosaic, Mottle)			+
อาการจุด (Spot)	+	+	+
อาการขีดและแถบ (Streak, Stripe)	+	+	
อาการไหม้ (Blight)	+	+	
อาการใบเป็นกระจุก (Rosette)			+
อาการเหี่ยว (Wilt)	+	+	
อาการแคระแกร็น (Stunt, Dwarf)		+	+
อาการบวมโต (Gall, Tumour, Knot)	+	+	
อาการรูปร่างผิดปกติ (Malformation)			+
อาการเน่า (Rot)	+	+	
อาการเน่าระดับดิน (Damping off)		+	
อาการรากและโคนเน่า (Root and Stem rot)		+	
แอนแทรกโนส (Anthracnose)		+	

โรคแอนแทรกโนสที่เกิดจากรา *C. gloeosporioides* เช่น มะละกอ (Tongpin, Pongpisutta, & Rattanakreetakul, 2012) พริกชี้ฟ้า (อรุณ ชาญชัยเชาว์วัฒน์ และ จุริมาศ วงศ์ศรีรัตน์, 2552) มะม่วง (อังสุมา ชยสมบัติ, 2533) และ *C. capsici* ที่พบในผลพริก (Montri, Taylor, & Mongkolporn, 2009; Than, Jeewon, Hyde, Pongsupasamit, Mongkolpornde, & Taylor, 2008a, Than et al., 2008b)

4. การควบคุมราโรคพืชโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นการควบคุมโรคพืชโดยใช้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต มี 3 ประเภท คือ การเป็นปฏิปักษ์ทางตรง (Direct antagonism) การเป็นปฏิปักษ์ผสมแบบทางตรงและทางอ้อม (Mixed-path antagonism) และการเป็นปฏิปักษ์ทางอ้อม (Indirect antagonism) (Pal & Gardener, 2006) ทั้งหมดมีการใช้กลไกต่าง ๆ แตกต่างกันไป 7 รูปแบบ ดังตารางที่ 2-3 ขณะที่ Porter (1924) และ Dickinson and Boardman (1971) รายงานการศึกษาไว้ 4 รูปแบบ คือ Mutually intermingling growth,

Intermingling, Mutual slight inhibition และ Mutual inhibition at a distance โดยรวมกลไกที่ 2-5 เป็น Antibiosis

ตารางที่ 2-3 ประเภทและกลไกการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Pal & Gardener, 2006)

Type	Mechanism
Direct antagonism	Hyperparasitism/predation
Mixed-path antagonism	Antibiotics
	Lytic enzymes
	Unregulated waste products
	Physical/chemical interference
Indirect antagonism	Competition
	Induction of host resistance

4.1 การเป็นปรสิตและการล่าเหยื่อ (*Hyperparasites and predation*)

การเป็นปรสิต คือ การที่ราปฏิบัติเข้าไปฆ่าหรือทำลายราสาเหตุโรคพืช โดยการสร้างเส้นใยรัดหรือแทรกเส้นใยเข้าไปในราสาเหตุโรคพืช และใช้อาหารจากภายในเส้นใยของราสาเหตุโรคพืช ส่งผลให้กิจกรรมด้านการเจริญของเส้นใยของราสาเหตุโรคพืชลดลง เช่น *Trichoderma* เป็นราปรสิตที่มีความสามารถในการแทรกเส้นใยเข้าไปในเส้นใยของรา *Pythium* ราสาเหตุโรคนำกล้าเน่า โคนเน่า ยอดเน่า ของพืชผัก (Kaewchai, 2012)

4.2 การสร้างสารปฏิชีวนะ (*Antibiotics*)

การสร้างสารปฏิชีวนะเป็นกลไกการควบคุมโรคพืชโดยสร้างสารออกมายับยั้ง คือ การที่ราปฏิบัติใช้ความสามารถในการผลิตหรือหลั่งสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญ หรือทำลายราสาเหตุโรคพืช เช่น สารพิษ หรือสารปฏิชีวนะ (Pal & Gardener, 2006) ตัวอย่างราที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราสาเหตุโรคพืช เช่น *Trichoderma virens* สร้างสาร Gliotoxin ยับยั้งโรคโคนเน่า (Damping-off diseases) ที่เกิดจากรา *Rhizoctonia solani* (Wilhite, Lunsden, & Strancy, 2001)

4.3 การสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย (Lytic enzymes)

การสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเป็นกลไกการควบคุมโรคพืชโดยเชื้อปฏิปักษ์ผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลาย ตัวอย่างเช่น *Trichoderma* spp. สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายหลายชนิดประกอบด้วย Chitinase, B-1, 3-Glucanase และ Protease เอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายผนังเซลล์และยับยั้งการงอกของสปอร์ราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด (Viterbo, Ramot, Chernin, & Chet, 2002)

4.4 การสร้างของเสีย (Unregulated waste products)

การสร้างของเสียเป็นกลไกการควบคุมโรคพืชโดยเชื้อปฏิปักษ์ผลิตของเสียประเภทสารระเหย เช่น Ammonia, Carbon dioxide, Hydrogen cyanide ที่มีคุณสมบัติยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (Pal & Gardener, 2006) เช่น Hydrogen cyanide มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดโรคจุดดำ (Black rot) ในใบยาสูบซึ่งมีสาเหตุจากรา *Thielaviopsis basicol* (Voisard, Keel, Haas, & Defago, 1989) และสารระเหย เช่น Ammonia สามารถยับยั้ง *Pythium ultimum* ที่ทำให้เกิดโรคโคนผ้าย่น (Howell, Beier, & Stipanovic, 1988)

4.5 การรบกวนทางกายภาพและทางเคมี (Physical/Chemical interference)

การรบกวนทางกายภาพและทางเคมี เป็นการที่เชื้อปฏิปักษ์สร้างสารที่ทำให้ลักษณะทางกายภาพหรือทางเคมีให้ไม่เหมาะสมกับราสาเหตุโรคพืช ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas fluorescens* ผลิตสารปฏิชีวนะ 2,4-Diacetylphloroglucinol (Weller, Raaijmakers, McSpadden Gardener, & Thomashow, 2002) ที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่พบในดิน เช่น *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *lini*, *Pythium debaryanum* (Keel et al., 1992)

4.6 การแข่งขัน (Competition)

การแข่งขันเป็นการที่เชื้อราปฏิปักษ์และราสาเหตุโรคพืชมีความต้องการอาหารและที่อยู่ที่มีจำกัดเหมือนกัน จึงทำให้เกิดการแข่งขันเพื่อแย่งอาหารและครอบครองพื้นที่ (Viterbo et al., 2002) คือ การที่ราปฏิปักษ์ครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชไม่สามารถเจริญหรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ (Sumeet & Mukerji, 2000)

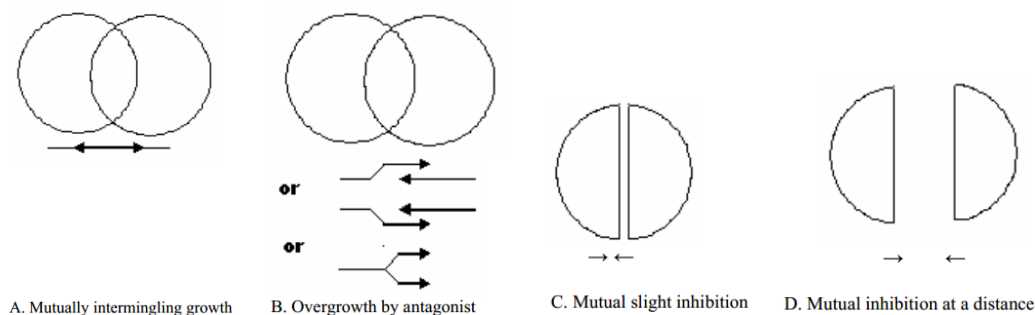
4.7 การชักนำให้เกิดความต้านโรค (Induction of host resistance)

การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อราสาเหตุโรคพืช เป็นกลไกการต่อต้านการเกิดโรคของพืชเอง และเกิดอย่างซับซ้อน (Harman, Howell, Vitarbo, Chet, & Lorito, 2004) การเกิดการต้านทานของพืชอาจเกิดเฉพาะที่หรือเกิดทั่วทั้งต้น ขึ้นอยู่กับชนิด แหล่ง และปริมาณของสิ่งกระตุ้น (Pal & Gardener, 2006) พืชมีการต้านทานต่อสิ่งเร้าที่หลากหลาย ทั้งทางกายภาพ ทางเคมี และชีวภาพ เช่น แรงโน้มถ่วง แสง อุณหภูมิ ความเครียด น้ำ สารอาหาร และจุลินทรีย์ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยที่ทำให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีให้มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคมมากขึ้น ตัวอย่างเช่น *Trichoderma* sp.

เป็นตัวอย่างราที่ทราบกันกว้างขวางว่าสามารถเหนี่ยวนำให้พืชมีความต้านทานต่อโรค (Haas & Defago 2005; Harman et al., 2004)

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของรา 2 ชนิดในห้องปฏิบัติการ ทำได้โดยการเลี้ยงราด้วยกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Dual culture) แล้วสังเกตรูปแบบการเจริญของราแต่ละชนิด Porter (1924) และ Dickinson and Boardman (1971) รายงานการศึกษาไว้ 4 รูปแบบ (ภาพที่ 2-1) คือ

1. Mutually intermingling growth คือ ราทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญร่วมกันโดยไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ไม่แสดงลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม
2. Intermingling ราเจริญครอบคลุมราอีกสายพันธุ์ทั้งด้านบนและด้านล่างของโคโลนี ราและเจริญได้ดีกว่าจนทำให้ราอีกชนิดหยุดการเจริญ
3. Mutual slight inhibition ระยะยับยั้งระหว่างกันเล็กน้อย มีระยะระหว่างรา 2 ชนิดเกือบติดต่อกันและมองเห็นไม่ชัดเจน มีระยะยับยั้งแคบ ระหว่างกัน 0.1-2 มิลลิเมตร
4. Mutual inhibition at a distance ระยะยับยั้งระหว่างกันมากกว่า 2 มิลลิเมตร



ภาพที่ 2-1 รูปแบบปฏิสัมพันธ์ของโคโลนีรา (Porter, 1924; Dickinson & Boardman, 1971)

5. จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

5.1 ราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส *Colletotrichum capsici* และ *C. gloeosporioides*

Colletotrichum capsici เป็นราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสในผลพริก (Chilli fruit) โดยสร้างแผลบนพริกเป็นรูปรีตึงกลมขนาด 750-1500 ไมโครเมตร ราสร้าง Acervuli รูปทรงไข่และทรงกลม สีน้ำตาลถึงดำ ขนาดประมาณ 85-200 ไมโครเมตร หนาแน่นบนรอยแผลหรือบนผิวหนังด้านนอกของผลพริก ด้วยสปอร์สีเทา มี Setae ขนาด 90-140 x 4-7 ไมโครเมตร มี 1-5 ผนังชั้น สีน้ำตาล มีลักษณะผนังเรียบ แข็ง ปลายเรียว โคนดิโอฟอร์แบบเดี่ยว ไม่มีสีถึงน้ำตาลใส ทรงกระบอก ขนาดประมาณ

16-26 x 3-4 ไมโครเมตร โคนิเดียเป็นเซลล์เดี่ยว ผนังเรียบ ไม่มีสี ลักษณะโค้งปลายเรียวทั้งสองข้าง หรือรูปกระสวยมีขนาดประมาณ 16-25 x 3-4 ไมโครเมตร (Shenoy et al., 2007)

โคโลนีบน Potato dextrose agar (PDA) เริ่มแรกมีสีขาว ต่อมากลายเป็นสีเทาถึงเขียวเมื่อมีอายุมากขึ้น มีขนาดประมาณ 85 มิลลิเมตร เมื่อเลี้ยง 10 วัน เส้นใยฟูสีขาวถึงเทา Acervuli สีนํ้าตาลเข้มถึงดำ โคนิดิโอฟอร์แบบเดี่ยว ไม่มีสี ทรงกระบอก อยู่บน Phialide มีผนังกั้น แดกแขนงเป็นบางครั้ง ปลายยอดเรียว ขนาดประมาณ 20 x 3 ไมโครเมตร โคนิเดียมีสีขาว เป็นเซลล์เดี่ยว ผนังเรียบ ไม่มีสี โค้ง ผนังเซลล์ไม่มีสี ปลายทั้งสองข้างเรียว ขนาดประมาณ 16-22 x 4 ไมโครเมตร Appressorium สีนํ้าตาลเข้ม ทรงกลมหรือรูปไข่ ผนังเรียบ มีขนาดประมาณ 8-30 x 5-10 ไมโครเมตร เส้นใยไม่มีสี แดกแขนง มีผนังกั้น บางครั้งพัฒนาเป็นโครงสร้าง Chlamydospore ที่ซับซ้อน (Shenoy et al., 2007)

Colletotrichum gloeosporioides เป็นราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในผักผลไม้หลายชนิด โคลนีบนอาหาร PDA มีขนาดประมาณ 25-35 มิลลิเมตร เมื่อเลี้ยง 10 วัน เส้นใยสีขาว ฟูคล้ายลำติ มี Acervuli รูปร่างคล้ายจานหรือเบาะ ที่มี Setae บริเวณ โคนิเดียมีขนาด 17-18.5 x 4-5 ไมโครเมตร ทรงกระบอก ปลายทั้งสองข้างเรียว (Weir, Johnston, & Damm, 2012)

5.2 รายละเอียดเกี่ยวกับยีสต์ทดสอบ

Candida albicans มีลักษณะโคโลนี กลม ทึบแสง สีขาวครีม สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นยีสต์ที่มีรูปร่างหลายรูปแบบตั้งแต่ยีสต์เซลล์เดี่ยว (Unicellular yeast) ถึงเส้นใยแท้จริง (True hyphae) ขึ้นกับระยะเวลาของการเจริญ อาหาร และสภาวะแวดล้อม รูปแบบยีสต์มีลักษณะเซลล์รูปกลมถึงรูปรี ขนาดประมาณ 3.5-6 x 6-10 ไมโครเมตร สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual Reproduction) โดยการแตกหน่อ (Budding) และอาจสร้าง Pseudomycelium โดยการแตกหน่อติด ๆ กันยาวออกเป็นเส้น รูปแบบเส้นใยเกิดจากการงอกของ Germ tube จากเซลล์ยีสต์ เมื่อ Germ tube งอกยาวออกไปเรื่อย ๆ จะเกิดผนังกั้นเซลล์ ซึ่งมีความยาวไม่จำกัด ไข้วสายรากันไปมา เกิดเป็นกลุ่มสายรา ซึ่งสายรามีความกว้างประมาณ 2-10 ไมโครเมตร (Sudbery, Gow, & Berman, 2004)

C. albicans ทำให้เกิดโรค Candidiasis ในมนุษย์ ซึ่งเกิดตามผิวหนัง เล็บ เชื้อนช่องปาก ช่องคลอด ทางเดินอาหาร เชื้อนหัวใจ และสมอง โรคนี้พบได้ในทุกวัย พบมากในเด็กอ่อน คนอ้วน ผู้สูงอายุ หญิงตั้งครรภ์ เมาหวาน คนที่กินยาปฏิชีวนะนาน ๆ และคนที่เป็นโรคเอดส์

5.3 แบคทีเรียทดสอบ

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเซลล์รูปท่อน ขนาด 0.3-1.0 x 1.6 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ สร้างกรดและก๊าซจากการหมักน้ำตาล Lactose ให้ผล IMViC +++ คือ การทดสอบ Indole สามารถสร้าง Indole จาก Tryptophan การทดสอบ Methyl red สามารถสร้างกรด

จากการหมักย่อย Glucose การทดสอบ Voges Proskauer ไม่สร้างสาร Acetyl methyl carbinol ในอาหาร Glucose-peptone และการทดสอบ Citrate ไม่สามารถใช้ Citrate เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังไม่ผลิตก๊าซ Hydrogen sulfide ไม่ผลิต Urease และ Phenylalanine deaminase ผลิตเอนไซม์ Lysine decarboxylase

E. coli สามารถก่อโรคได้ 3 กลุ่มหลัก คือ อุจจาระร่วง การติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ และก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารกแรกคลอด กลุ่มอุจจาระร่วง เช่น ก่อโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ กลุ่มการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ เช่น กระเพาะปัสสาวะอักเสบ ไตอักเสบ กรวยไตอักเสบ และปัสสาวะลำบาก นอกจากนี้ยังก่อโรคในได้ในระบบอื่น ๆ ทุกระบบในร่างกาย รวมถึงก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล ได้แก่ โลหิตเป็นพิษ ไข้ตั้งอักเสบ เยื่อหุ้มช่องท้องอักเสบ การติดเชื้อที่ถุงน้ำดี ปอดบวม และลื่นหัวใจอักเสบ

E. coli ATCC 25922 Serotype O6 Biotype1 มีคุณสมบัติ คือ ไม่ผลิต Verotoxin คือ ไม่ทำให้เกิดความเสียหายแก่เยื่อของลำไส้ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic)

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา 1 เส้น ขนาดเซลล์ประมาณขนาด 0.5-1 x 1.5-5.0 ไมโครเมตร สามารถสร้างเมือกภายนอกเซลล์ (Surface slime) คล้ายแคปซูล เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน เจริญช้าในสภาพแวดล้อมที่มีอาหารน้อยและไม่มีก๊าซออกซิเจน (Anaerobic) สามารถใช้ Nitrate เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายแทนออกซิเจน เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอนไซม์ Oxidase และรงควัตถุเรืองแสงชนิด Pyoverdine ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้และเรืองแสงสีเขียวเหลือง เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

P. aeruginosa เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส สามารถทำให้เกิดโรคได้ในหลายระบบของร่างกาย เช่น หัวใจและกระแสเลือด ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในกระแสเลือด ติดเชื้อในส่วนกระดูกและข้อต่อ เกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อมาจากเนื้อเยื่ออื่นหรือการติดเชื้อในระบบประสาทส่วนกลาง เช่น โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อในส่วนตาและหู หากติดเชื้อในหูผู้สูงอายุก่อให้เกิดอาการที่มีความรุนแรง ซึ่งนำไปสู่ปัญหาด้านการได้ยิน ใบหน้าเป็นอัมพาต หรือเสียชีวิต ส่วนการติดเชื้อที่ตามักเกิดจากการได้รับบาดเจ็บ ซึ่งทำให้เกิดรอยแผลเป็นที่กระจกตาและทำให้ตาบอดในที่สุด ระบบทางเดินปัสสาวะมักเกิดจากการใช้เครื่องมือทางการแพทย์หรือการผ่าตัด การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจมักพบที่ปอดทำให้เกิดโรคปอดเรื้อรัง

P. aeruginosa ATCC 27853 คือตัวยาปฏิชีวนะ Penicillin, Ampicillin, Safalotin, Cefoxitin, Tetracycline, Sulfonamides, Chloramphenicol และคือตัวยากลุ่ม Aminoglycoside ได้แก่ Streptomycin และ Kanamycin

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม อยู่เป็นเชลล์เดี่ยว เป็นคู่ เชลล์อาจเรียงต่อกันเป็นโซ่สั้น ๆ หรือเป็นกลุ่มแบบพวงองุ่น ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ไม่สร้างสปอร์ สร้างแคปซูลได้แต่พบได้น้อยมาก สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase สร้างกรดจากน้ำตาล Glucose เป็นแบคทีเรียที่มีความทนทานที่สุดในจำพวกแบคทีเรียไม่สร้างสปอร์ เนื่องจากทนความแห้งแล้งได้ดีและยังทนต่อความเข้มข้นของเกลือที่สูงได้ สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงร้อยละ 7.5-10.0

S. aureus เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในร่างกายมนุษย์ สามารถทำให้เกิดโรคได้หลายบริเวณ เช่นบริเวณผิวหนังและบาดแผล ทำให้เกิดฝี หนอง อาหารเป็นพิษ ปอดบวม ติดเชื้อในกระแสโลหิต ไช้กระดูกและไขข้ออักเสบ กลุ่มอาการช็อกจากสารพิษ การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด และสามารถสร้างสารพิษ Enterotoxin ซึ่งแบ่งออกเป็น 8 ชนิด ได้แก่ ชนิด A, B, C1, C2, C3, D, E และ H สารพิษนี้มีคุณสมบัติพิเศษ คือ ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และยังสามารถในกระเพาะอาหาร สารเหล่านี้ ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเดิน และอาจช็อกได้

Salmonella Typhimurium เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง มีขนาดเชลล์ 0.7-1.5 x 2-5 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา ที่ยาวและมีอยู่รอบเชลล์ เจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรดต่าง 4.5-9.0 ทนต่ออุณหภูมิต่ำ สร้างก๊าซจากการหมักย่อน้ำตาล Glucose, Arabinose, Dulcitol, Rhamnose และ Acetate ไม่หมักย่อน้ำตาล Lactose สร้างก๊าซ Hydrogen sulfide (H₂S) เล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron agar (TSI) ให้ผลลบต่อการทดสอบ Citrate, Urease, Ornithine และ Decarboxylase

S. Typhimurium ก่อให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ (Typhoid fever) และ Salmonellosis ในมนุษย์ โดยเชื้อสามารถเกาะติดกับเยื่อเมือกของเซลล์ลำไส้ได้ดี เนื่องจากมี O-antigen และ VI-antigen ยังทำให้สามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้ มีคุณสมบัติทนต่อกรด เชื้อสามารถสร้าง Enterotoxin และ Exotoxin เชื้อสามารถอาศัยในเม็ดเลือดขาว ทำให้เชื้อสามารถแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนได้ โรค Salmonellosis ที่เกิดในมนุษย์มี 3 กลุ่มอาการ คือ โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ Enteric fever และ โลหิตเป็นพิษ

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์รูปไข่ขนาดเล็กอยู่บริเวณกลางเชลล์ เชลล์มีความยาวมากกว่า 0.9 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นสายยาว เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนและสร้างสารพิษ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อเจริญได้ คือ

55 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อเจริญได้ คือ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเหมาะสมที่เชื้อเจริญ อยู่ช่วงในระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 6-7 และ ปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์ สามารถนำไปใช้ได้คือ 0.92

B. cereus เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ (Food poisoning) เกิดจากการบริโภคสารพิษ 2 ชนิดที่เชื้อสร้าง คือ Emetic toxin ทำให้อาเจียน (Emetic syndrome) และ Enterotoxin ทำให้เกิด อาการอุจจาระร่วง (Diarrhea) เชื้อสามารถสร้าง Hemolysin ทำหน้าที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เอนไซม์ Lacithinase, Protease และ Dnase ทำหน้าที่ทำลาย Lecithin โปรตีน และ DNA ของเซลล์ เอนไซม์ Penicillinase สามารถทำลายวงแหวน Lactams ของยาในกลุ่ม Penicillin ทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่ม Penicillin และ Cephalosporin ได้

6. สารต้านจุลชีพและผลิตภัณฑ์ชีวภาพ (Microbial agent and natural products)

6.1 สารต้านจุลชีพ

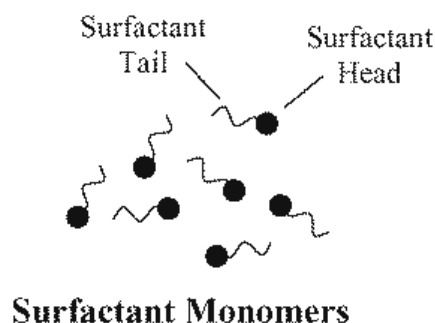
สารต้านจุลชีพ เป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ จัดเป็นสาร ออกฤทธิ์ชีวภาพซึ่งอาจได้จากจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา นอกจากนี้สารต้านแบคทีเรีย สารออกฤทธิ์ชีวภาพยังสามารถใช้เป็นสารต้านรา ต้านไวรัส สารต้านมาลาเรีย และสารต้านมะเร็ง (Huang, Wang, Li, Zheng, & Su, 2001) การออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ชีวภาพพบได้ 2 ลักษณะคือ ออกฤทธิ์กว้าง (Broad spectrum) และออกฤทธิ์แคบ (Narrow-spectrum) การออกฤทธิ์กว้าง หมายถึง สารต้านจุลินทรีย์สามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์หลายกลุ่ม ขณะที่การออกฤทธิ์แคบ หมายถึง สารต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่งหรือจุลินทรีย์บางสายพันธุ์เท่านั้น (Palmer, Pett, & Akl, 1995)

6.2 ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ

ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ คือ ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ สารเคมี สารที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิต (Sarker, Latif, & Gray, 2006) เป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) หรือสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (Molecular weight <2000 Atomic mass unit, amu) (Cannell, 1998) มีรายงานการผลิตผลิตภัณฑ์ ชีวภาพโดยจุลินทรีย์หลากหลายประเภท ได้แก่

สารลดแรงตึงผิว (Surfactant) คือ เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติทำให้แรงตึงผิวของ ของเหลวลดลง ช่วยให้การกระจายตัวของของเหลวเพิ่มขึ้น และช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างของเหลว สองชนิดหรือระหว่างของเหลวกับของแข็งสารลดแรงตึงผิวเป็น Amphiphilic molecules ซึ่งโมเลกุล ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขั้ว (Hydrophilic) หรือส่วนหัวที่ชอบน้ำ และไม่มีขั้ว (Hydrophobic)

หรือส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำ (Rangel-Yagui, Pessoa Jr, & Tavares, 2005; Pacwa-Pociniczak et al., 2011)
 ดังภาพที่ 2-2

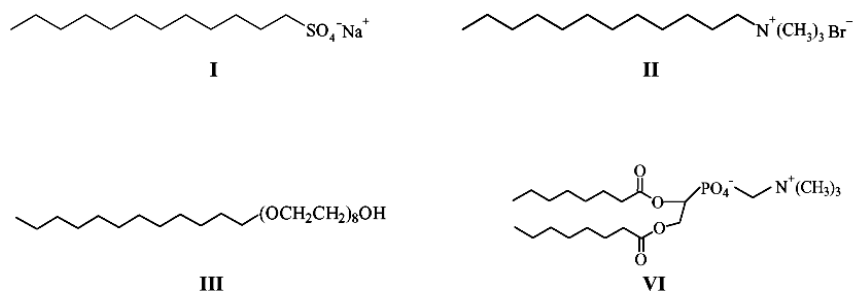


ภาพที่ 2-2 สารลดแรงตึงผิวโมเลกุลเดี่ยว (Monomer) (Rangel-Yagui et al., 2005)

สารลดแรงตึงสามารถแบ่งตามลักษณะประจุไฟฟ้า (Electrical charge) ออกเป็น 4 ประเภท
 ดังนี้

1. Anionic surfactant เป็นสารที่เมื่อละลายน้ำแล้วแตกตัวและส่วนหัวมีประจุลบ คุณสมบัติ คือ มีฟองมาก และละลายน้ำได้ดี
2. Cationic surfactant สารกลุ่มนี้เมื่อละลายน้ำแล้วส่วนหัวมีประจุบวก คุณสมบัติ ไม่มีฟองและสามารถเกาะพื้นผิวได้ดี
3. Nonionic surfactant สารกลุ่มนี้เมื่อละลายน้ำแล้วไม่แตกตัวจึงไม่มีประจุ คุณสมบัติ ของสารกลุ่มนี้แตกต่างกันไป ตั้งแต่ละลายน้ำได้จนไม่ละลายน้ำ ซึ่งมีการใช้งานที่แตกต่างกันออกไป คุณสมบัติฟองน้อย และมักใช้คู่กับ Anionic surfactant อื่น ๆ
4. Amphoteric surfactant (Zwitterionics) สารกลุ่มนี้มีทั้งประจุบวกและลบอยู่ในโมเลกุล เดียวกัน เมื่อละลายน้ำแสดงประจุใดขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ถ้าสภาพแวดล้อมเป็นกรดแสดงประจุ บวก สภาพแวดล้อมเป็นด่างแสดงประจุลบ คุณสมบัติหลักของสารกลุ่มนี้ คือ ทนน้ำกระด้างป้องกัน ไฟฟ้าสถิต ให้ความนุ่มได้

ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิว เช่น Sodium dodecyl sulfate (SDS), Dodecyltrimethyl-ammonium bromide (DTAB), *n*-Dodecyl tetra (Ethylene oxide) ($C_{12}E_4$) และ Dioctanoyl phosphatidylcholine (C_8 -lecithin) ซึ่งเป็น Anionic cationic nonionic และ Zwitterionic ตามลำดับ (Rangel-Yagui et al., 2005) (ภาพที่ 2-3)



ภาพที่ 2-3 สารลดแรงตึงผิว I-anionic (SDS), II-cationic (CTAB), III- nonionic (C₁₂E₈) และ VI-zwitterionic (C₈-lecithin) (Rangel-Yagui et al., 2005)

สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน คือ สารที่ทำหน้าที่ต่อต้าน ชะลอ ยับยั้ง การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสารที่สามารถจับอนุมูลอิสระ (Free radical) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (Brewer, 2011; Lu, Lin, Yao, & Chen, 2010) อนุมูลอิสระ คือ สารหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (Unpaired electron) ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (Outer orbital) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุล มีสถานะไม่เสถียรจึงจำเป็นต้องหาอิเล็กตรอนจากสารอื่นมาทดแทน และทำให้สารที่ถูกดึงอิเล็กตรอนไปอยู่ในสถานะไม่เสถียร จึงจำเป็นต้องหาอิเล็กตรอนจากสารอื่นมาทดแทนเพื่อให้มีความเสถียรเช่นกัน การเกิดอนุมูลอิสระจึงเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ไปเรื่อย ๆ สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งตามกลไกได้เป็น 3 ชนิด คือ ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (Preventive antioxidant) ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระ (Scavenging antioxidant) และทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง (Chain breaking antioxidant) ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ Ascorbic acid (Vitamin C), Tocotrienols (Vitamin E), Beta-carotene, Ubiquinone, Uric acid, Bilirubin, Albumin, Sulfhydryl groups ในกรด Amino Cysteine ซึ่งมีอยู่ในโปรตีน, (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006)

7. หลักการทดสอบต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา

7.1 หลักการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี *Disc diffusion*

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี *Disc diffusion* (Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1996) เป็นวิธีที่ได้รับการรับรองวิธีมาตรฐานโดย Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีหลักการคือ สารต้านจุลชีพปริมาณแน่นอนจะแพร่ออกจากกระดาษรูปกลม (Paper disc) ทุกทิศทางเพื่อไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

โดยความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพสูงสุดเมื่ออยู่ใกล้แผ่นกระดาษ เมื่อระยะเวลาการแพร่ของสารเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของสารลดลง และสารต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้ากว่าสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยสารออกฤทธิ์ ณ จุดใด ๆ จะไม่สามารถเจริญบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ทำให้เกิดเป็นโซนไฮส (Inhibition zone) ซึ่งการแพร่ของสารมีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารในการยับยั้งเชื่อว่ามีน้อยเพียงใด

การทดสอบใช้อาหารมาตรฐาน Mueller Hinton agar เนื่องจากมีความเป็นกรดต่างเป็นกลางอยู่ระหว่าง 7.2-7.4 และมีการควบคุมไอออนประจุบวกได้แก่ Calcium ไม่เกิน 25 มิลลิกรัมต่อลิตร Magnesium ไม่เกิน 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมี Thymidine น้อยมากหรือไม่มี เนื่องจากความเป็นกรดต่างและสารดังกล่าวมีผลต่อสารต้านจุลชีพบางชนิด อาหารแข็งสำหรับทดสอบมีความหนาอยู่ที่ 4 มิลลิเมตร เชื้อที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียและยีสต์ใช้ต้องมีอายุ 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้อยู่ในระยะ Log phase และใช้เชื้อที่มีปริมาณเหมาะสมมาเจือจางในน้ำเกลือ (Normal saline solution, NSS) ปลอดเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0.85 เพื่อรักษาสมดุลออสโมติกของเซลล์ (CLSI, 2012) และยีสต์ใช้อาหาร Muller Hinton agar ที่ผสม Glucose ร้อยละ 2 และสีย้อม Methylene blue 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (MHA-GMB) สำหรับ *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* และ *C. krusei* (CLSI, 2004) เชื้อทดสอบต้องมีการควบคุมความขุ่นให้มีมาตรฐานเดียวกันโดยสำหรับแบคทีเรียใช้ 0.5 McFarland standard เป็นสารเทียบความขุ่นจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 1.0×10^8 - 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรสำหรับแบคทีเรีย (CLSI, 2012) และให้ได้เชื้อประมาณ 1.0×10^6 - 1.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรสำหรับยีสต์ (CLSI, 2004) ซึ่งเทียบเท่า Absorbance ที่ 0.08-0.13 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร (CLSI, 2006) แบคทีเรียและยีสต์ที่เจือจางแล้วนำมาใส่ภายใน 15 นาที เพื่อไม่ให้เกินเวลาที่จุลินทรีย์ใช้แบ่งเซลล์ (Generation time) ใช้ไม้พันสำลี (Cotton swab) จุ่มเชื้อที่ผ่านการปรับความขุ่น ป้ายเชื้อทดสอบทำมุม 60 องศา จำนวน 3 ระบาย จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (CLSI, 2002; 2012)

7.2 หลักการทดสอบหาค่า MIC/MLC ของจุลินทรีย์

การทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี Broth microdilution เป็นวิธีมาตรฐานของ CLSI ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีหลักการคือ ผสมสารต้านจุลชีพความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเมื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยค่า MIC คือ ความเข้มข้นในระดับต่ำสุด (ในหลอดทดลอง) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งโดยสารออกฤทธิ์ ณ ความเข้มข้นนั้น ๆ จะไม่สามารถเจริญได้ ทำให้อาหารไม่มีความขุ่น การทดสอบใช้อาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) สำหรับแบคทีเรีย เนื่องจากมีการควบคุมชนิดและปริมาณสารอาหาร ความเป็นกรดต่างให้เหมาะสมกับการทดสอบแบคทีเรียตามที่กล่าวมาข้างต้น ส่วนอาหาร Roswell Park Memorial Institute 1640

ใช้สำหรับยีสต์และรา เนื่องจากมีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 ± 0.1 ไม่มี Bicarbonate มี Glutamine และ Phenol red เป็นตัวควบคุมความเป็นกรดต่าง เนื่องจากความเป็นกรดต่างและสารดังกล่าวมีผลต่อสารต้านยีสต์และราบางชนิด เชื้อที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียและยีสต์ใช้โคโลนีที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในระยะ Log phage แบคทีเรียและยีสต์ที่มีปริมาณเหมาะสมมาเจือจางในน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ เพื่อรักษาความสมดุลของเซลล์ ให้ได้แบคทีเรียประมาณ 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อหลุม (CLSI, 2006) และยีสต์ให้ได้เชื้อประมาณ $5.0 \times 10^2 - 2.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อหลุม (CLSI, 2002) แบคทีเรียและยีสต์ที่เจือจางแล้วนำมาใช้ภายใน 15 นาที เพื่อไม่ให้เกินเวลาที่จุลินทรีย์ใช้แบ่งเซลล์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับราใช้สปอร์ประมาณ $4 \times 10^3 - 5 \times 10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก CLSI 2008a) มีการทดสอบควบคุมผลเชิงลบ คือ ไม่ใส่สารต้านจุลชีพ เพื่อควบคุมว่าเชื้อทดสอบมีการเจริญปกติ (Quality control) และควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากเชื้อ (Sterility control)

MLC คือ ความเข้มข้นของในระดับต่ำสุด (ในหลอดทดลอง) ที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ ทดสอบโดยการนำอาหารเหลวหลอดที่ผ่านการทดสอบหาค่า MIC และไม่มี ความขุ่นทุกหลอด ไปหยดลงบนอาหารที่ไม่ผสมสารต้านจุลชีพ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MHA สำหรับแบคทีเรีย MHA-GMB สำหรับยีสต์ และ PDA สำหรับรา อ่านความเข้มข้นระดับต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนจานอาหาร

7.3 หลักการศึกษาองค์ประกอบของสารด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

โครมาโทกราฟี (Chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพ และแยกสารผสมให้เป็นสารบริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารผสมในวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ผ่านวัฏภาคนิ่ง (Stationary Phase) สารแต่ละชนิดมีความสามารถในการแยกแตกต่างกัน ประสิทธิภาพการแยกสารผสมขึ้นอยู่กับชนิดตัวดูดซับที่อยู่ในวัฏภาคนิ่ง และขึ้นกับตัวทำละลาย (Solvent) ในวัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งตัวดูดซับแต่ละชนิดมีความสามารถในการดูดซับสารบนพื้นผิวได้แตกต่างกัน เช่น ตัวดูดซับมีขี้ผึ้งสามารถดูดซับสารมีขี้ผึ้งได้ดีกว่าสารไม่มีขี้ผึ้ง ส่วนตัวทำละลายมีหน้าที่ชะสารผสมออกจากวัฏภาคนิ่ง ซึ่งความเร็วในการชะสารแตกต่างกันขึ้นกับขี้ผึ้งของตัวทำละลาย โดยการที่สารผสมเคลื่อนที่ได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดระหว่างสารในสารผสมกับตัวดูดซับในวัฏภาคนิ่ง ดังนั้นการเลือกตัวดูดซับและตัวทำละลายที่เหมาะสมกับประเภทของสารที่ต้องการแยก จึงทำให้ความสามารถในการแยกสารบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพสูงสุด (Mcguffin, 2004)

การทดสอบด้วยวิธี TLC เป็น Solid-liquid adsorption chromatography ที่ใช้แผ่น TLC เป็นตัวดูดซับ ซึ่งในการศึกษานี้ใช้แผ่น TLC สำเร็จรูป (TLC silica gel 60 F₂₅₄) เป็นตัวดูดซับ โดย Silica gel, Alumina, Cellulose หรือสารอื่น ๆ ที่เคลือบบนผิวของ Aluminum เป็นวัฏภาคนิ่งสามารถใช้แยกสาร

ได้เกือบทุกชนิดโดยเฉพาะสารที่เป็นกรด กลาง หรือเบสอ่อน และมีสารเรืองแสงผสมอยู่เพื่อใช้ตรวจสอบตำแหน่งของสารโดยมองภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และใช้ตัวชะเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ในการทดสอบ TLC ตัวทำละลายถูกดูดซึมและเคลื่อนที่ในแนวตั้ง และพาสารเคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับ เนื่องจากสารต่างชนิดกันถูกดูดซับได้ไม่เท่ากัน จึงถูกตัวทำละลายพาขึ้นมาสูงได้ไม่เท่ากัน ทำให้เกิดการแยกของสาร TLC เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพและใช้พิสูจน์ชนิดสารโดยการเปรียบเทียบ R_f (Retention factor) ซึ่งเป็นค่าคงที่ของสารแต่ละชนิดกับสารมาตรฐานในตัวทำละลายหนึ่ง ๆ เพื่อใช้ในการบ่งบอกชนิดของสาร ข้อดีของการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC เป็นวิธีที่สะดวก ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้สารปริมาณน้อยมากในการแยกสาร ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับวิเคราะห์สาร ข้อเสียคือใช้แยกสารปริมาณมาก ๆ ไม่ได้ (Kowalska, Kaczmariski, & Prus, 2003; Touchstone, 1992)

เทคนิคการวิเคราะห์สารด้วย TLC มีวิธีการคือจุด (Spotting) สารผสมที่ต้องการตรวจสอบ สารองค์ประกอบด้วยหลอด Capillary บริเวณปลายด้านหนึ่งของแผ่น TLC ให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมา 1 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำแผ่น TLC วางลงในภาชนะที่ใส่ตัวทำละลาย หรือวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อยู่ต่ำกว่าระดับจุดที่แต้มในระบบปิด สังเกตรอยเปียกของตัวทำละลายที่ซึมขึ้นด้านบนของแผ่น TLC รอยเปียกของตัวทำละลายที่เรียกว่า Solvent front ตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับ เมื่อมาถึงปลายด้านบนของแผ่น TLC (ห่างจากปลายด้านล่างลงมา 1 เซนติเมตร) จึงเอาแผ่น TLC ออก เมื่อตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับก็จะพาสารที่ตรวจหาองค์ประกอบขึ้นไปด้วยตามความสามารถในการละลายของตัวทำละลายนั้น ๆ จึงเกิด การแยกของสารเกิดขึ้น การตรวจหาองค์ประกอบของสารทำได้โดยนำแผ่น TLC มาตรวจการเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะเห็นสารองค์ประกอบของสารเรืองแสงสีเขียว จากนั้นใช้ดินสอขีดรอยสาร และรอย Solvent front เพื่อใช้ในการคำนวณค่า R_f ที่เป็นอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดที่ทำการแต้ม ไปถึงตำแหน่งสุดท้ายเทียบกับระยะทางทั้งหมดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Striegel & Hill, 1996)

7.4 หลักการการทดสอบการลดแรงดึงผิว

7.4.1 วิธี Parafilm M

การทดสอบคุณสมบัติของสารในการลดแรงดึงผิวของของเหลวมีหลักการคือ สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงดึงผิวเมื่อละลายอยู่ในของเหลวหรือน้ำ สามารถทำให้แรงดึงผิวที่สูงมากของโมเลกุลของน้ำ (แรงดึงผิวของน้ำ) ลดลง เมื่อหยดสารที่มีคุณสมบัติลดแรงดึงผิวลงบนแผ่น Parafilm M ส่วนหัวของโมเลกุลสารลดแรงดึงผิวที่ชอบน้ำจะจับกับโมเลกุลของน้ำ ส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำจึงพยายามหนีโมเลกุลน้ำโดยไปเกาะกับพื้นผิวที่ว่าง เช่น อากาศ ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงดึงผิวถูกผลักออกไป

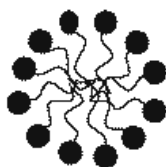
เรียงตัวกันอยู่ที่ผิวหน้าของน้ำ แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลน้ำบริเวณผิวหน้าจึงลดลง น้ำที่มีสารลดแรงดึงผิวจึงกระจายตัวดีขึ้นและแผ่กว้างออกไปบนแผ่น Parafilm M ในขณะที่น้ำที่ไม่มีสารลดแรงดึงผิวยังคงรักษาแรงดึงดูดโมเลกุลที่สูงมากไว้จึงคงสภาพรูปทรงเดิม (Mishra et al., 2009)

7.4.2 วิธี Drop collapsing

การทดสอบคุณสมบัติของสารในการลดแรงดึงผิวของของเหลวบนผิวน้ำมันมีหลักการคือ เมื่อเติมสารที่มีคุณสมบัติลดแรงดึงผิวลงบนผิวน้ำมัน ส่วนของโมเลกุลส่วนหางที่ชอบไขมันจะเข้าจับกับน้ำมัน และส่วนหัวของโมเลกุลที่ชอบน้ำจะพยายามหนีน้ำมันไปเกาะกับพื้นผิวที่เป็นน้ำ จึงทำให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลน้ำบริเวณพื้นผิวที่มีน้ำมันลดลง จึงเห็นหยดสารแผ่กว้างออกไปบนผิวน้ำมัน ในขณะที่น้ำที่ไม่มีสารลดแรงดึงผิวยังคงรักษาแรงดึงดูดโมเลกุลที่สูงมากไว้จึงคงสภาพรูปทรงเดิม (Mishra et al., 2009)

7.4.3 วิธี Oil displacement

การทดสอบคุณสมบัติของสารในการลดแรงดึงผิวบนผิวน้ำมันที่ลอยบนน้ำ มีหลักการคือ สารที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงดึงผิวเมื่อเติมลงบนผิวน้ำมันที่ลอยบนน้ำ โมเลกุลส่วนหางที่ชอบไขมันจะหันเข้าจับกับน้ำมันโมเลกุลสั้น ๆ และหันส่วนหัวที่ชอบน้ำออก เกิดการรวมตัวเป็น Micelle (ภาพที่ 2-4) Micelle มีส่วนนอกเป็นส่วนที่ไม่ชอบไขมันเมื่ออยู่บนผิวน้ำมันจึงผลักน้ำมันบริเวณรอบ ๆ น้ำมันจึงเกิดการกระจายเป็นบริเวณกว้าง จากนั้นส่วนหัวที่ชอบน้ำของไมเซลล์เข้าจับกับโมเลกุลน้ำ ทำให้แรงดึงผิวของผิวสัมผัสของน้ำกับน้ำมันลดลง น้ำมันจึงละลายในน้ำ (Mishra et al., 2009)



Micelle

ภาพที่ 2-4 ลักษณะ Micelle ของสารลดแรงดึงผิว (Rangel-Yagui et al., 2005)

7.5 หลักการทดสอบ *Bioautography* (จากสารบนแผ่น TLC)

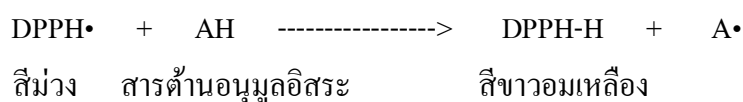
การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี *Bioautography* เป็นการทดสอบความสามารถองค์ประกอบของสารที่อยู่บนแผ่น TLC เพื่อทดสอบฤทธิ์ขององค์ประกอบสารในการยับยั้งจุลินทรีย์

ซึ่งมีวิธีการและหลักการเช่นเดียวกับ การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion แต่เปลี่ยนจากการวางแผ่นดิสก์เป็นวางแผ่น TLC (Choma & Grzelak, 2010; Hamburger & Cordell, 1987; Pawle & Singh, 2014) แต่ในการศึกษานี้ได้เพิ่มวิธีที่ดัดแปลงโดยใช้การตัดดิสก์บริเวณที่มีสารออกมาจากแผ่น TLC มาวางด้วย

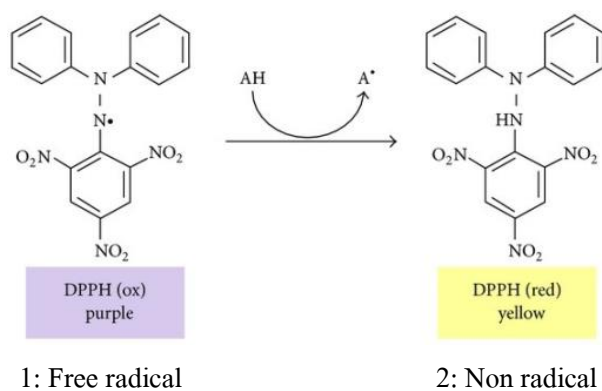
7.6 หลักการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1, 1-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

radical

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH radical (DPPH•) เป็นวิธีการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ หลักการคืออนุมูลอิสระ (DPPH•) ที่เสถียร (Stable radical) ในตัวทำละลาย Methanol ซึ่งมีสีม่วงเข้ม เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (AH) สีม่วงเข้มจะจางหายไป เกิดปรากฏการณ์ฟอกจางสีบนพื้นสีม่วงกลายเป็นสีขาวอมเหลือง ตามสมการดังนี้ (Blois, 1958)



DPPH• สีม่วง (ภาพที่ 2-5 โครงสร้างที่ 1) จะรับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเปลี่ยนเป็น โมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ ทำให้สีม่วงของ DPPH• จางลงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 2-5 โครงสร้างที่ 2) ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงจะลดลงมาก



ภาพที่ 2-4 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH radical; 1: Free radical และ 2: Non radical (Teixeira, Gaspar, Garrido, Garrido, & Borges, 2013)

การทดสอบวิธี DPPH มีข้อดี คือ ทำได้ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ข้อเสีย คือ อนุมูล DPPH• มีความคงตัวไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย

8. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kiran et al. (2009) ศึกษาการผลิตสารลดแรงดึงผิวจากรา *A. ustus* (MSF3) ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Fasciospongia cavernosa* พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร Sabouraud dextrose broth ราสามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวได้มากที่สุด เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ราผลิตสารลดแรงดึงผิวให้ได้มากที่สุดพบว่าสภาวะความเป็นกรดค่าที่ 7.0 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เกลือร้อยละ 3 แหล่งคาร์บอนเป็น Glucose และมี Yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับให้ราผลิตสารลดแรงดึงผิว

Arora and Chandra (2010) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของรา *Aspergillus* spp. ที่แยกได้จากดิน พบว่า *Aspergillus* PR78 และ *Aspergillus* PR66 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดค่าที่ 7.0 บนอาหารที่มี Sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนมี Sodium nitrate, Yeast extract, Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน และพบว่าการสกัดอาหารเหลวเลี้ยงรา (Broth culture filtrate) ด้วย Ethyl acetate สามารถแยกสารได้ดีที่สุด พบว่าสารสกัด Ethyl acetate จากรา *Aspergillus* sp. PR78 มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระดีเทียบเท่ากับกรด Ascorbic ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

Alejandro et al. (2011) ศึกษารา *Ustilago maydis* FBD12 พบว่ารามีความสามารถในการผลิต Glycolipids ที่มีประสิทธิภาพในการลดแรงดึงผิว ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Typhimurium

Sepcic et al. (2011) ศึกษาคุณสมบัติการทำให้เม็ดเลือดแตกตัว (Hemolysis) และการยับยั้งแบคทีเรียของสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรากนาเกลือที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ต่ำ พบราหลายชนิดเช่น *Alternaria tenuissima* EXF-2329, *Cladosporium spinulosum* EXF-334, *Fusarium graminearum* EXF-2254 มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแตกตัว และยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

Ali et al. (2012) ได้ทำการแยกและวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic) รวมถึงศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากกลุ่ม Obligate halophilic ที่แยกได้จากนาเกลือจังหวัดเพชรบุรี ประเทศไทย พบว่าจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus flavus* Strain 6830 (HQ693703), *A. gracilis* NRRL 4962 (EF652045), *A. penicillioides* ATCC 16910 (AY373862), *A. penicillioides* SCSGAF0031

(JN85099) และ *A. restrictus* ATCC 16912 (AY373864) สามารถปรับตัวและเจริญที่ความเค็ม 10-15% NaCl (w/v) จัดเป็น Slight alkalinity ที่ความเป็นกรดค่า 7.0-7.5 และอุณหภูมิระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส

Nayak et al. (2012) คัดแยกและศึกษาความสามารถในการทนเกลือของรากลุ่มชอบเค็มที่แยกได้จากป่าชายเลนและนาเกลือ Goa ประเทศอินเดีย พบว่าราส่วนใหญ่ที่พบคือ *Aspergillus* และ *Penicillium* พบรา 1 สปีชีส์ คือ *A. penicilloides* เป็นรากลุ่ม Obligate halophile ที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีเกลือตั้งแต่ร้อยละ 2 และเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 10

Ali et al. (2014) ศึกษาศักยภาพทางชีวภาพ คือ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ ของรากลุ่ม Obligate halophilile แยกได้จากนาเกลือจังหวัดเพชรบุรี ประเทศไทย พบว่ารากลุ่มชอบเค็มจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus flavus* Strain 6830 (HQ693703), *A. gracilis* NRRL 4962 (EF652045), *A. penicillioides* ATCC 16910 (AY373862), *A. penicillioides* SCSGAF0031 (JN85099) และ *A. restrictus* ATCC 16912 (AY373864) สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า *A. flavus* และ *A. penicillioides* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบกิจกรรมการผลิตเอนไซม์พบว่า *A. flavus* สามารถผลิตเอนไซม์ Cellulase *A. gracilis* สามารถผลิตเอนไซม์ Amylase, Lipase, Xylanase *A. penicillioides* ATCC 16910 สามารถผลิต Amylase และ Xylanase *A. restrictus* สามารถผลิต Cellulase, Lipase และ Protease ในขณะที่ *A. penicillioides* SCSGAF0031 ไม่ผลิตเอนไซม์ Amylase, Cellulase, Lipase, Xylanase, Protease และ Lipase

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. สายพันธุ์ราที่ศึกษา

ราที่แยกจากดินและน้ำนาเกลือ อำเภอบางปะกง จังหวัดเชิงเทรา (13°30'8"N 100°59'24"E) อำเภอบางปะหัน จังหวัดฉะเชิงเทรา (12°37'18"N 102°00'70"E) อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี (13°14'1"N 99°58'02"E) จำนวน 120 สายพันธุ์ (รายละเอียดในภาคผนวก ก) ราคั่งกล่าวเก็บเป็น Stock culture ที่ห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2. สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบประกอบด้วยราสาเหตุโรคพืชแอนแทรคโนสจำนวน 2 ชนิด คือ *Colletotrichum capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ราทดสอบจัดซื้อจากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ยีสต์ก่อโรคจำนวน 2 สายพันธุ์ *Candida albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028 รวมถึงแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 จัดซื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ส่วน *Bacillus cereus* TISTR 121 จัดซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยจุลินทรีย์ทดสอบทั้งหมดเก็บรักษาไว้ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1 Potato dextrose agar (PDA) (Difco™, USA) และ Potato dextrose agar ที่ปรับความเค็มด้วยน้ำทะเลจนมีความเค็ม 15, 30, 50, 100, 150, 200 และ 250 ppt (PDA/SW_{xxppt})
- 3.2 Potato dextrose broth (PDB) (Difco™, USA) / Potato dextrose broth ที่ปรับความเค็มด้วยน้ำทะเลจนมีความเค็ม 30 ppt (PDB/SW_{30ppt})
- 3.3 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 (Lonza, USA)
- 3.4 Sabouraud dextrose agar (SDA) (Difco™, USA)
- 3.5 Muller Hinton agar (MHA) (Difco™, USA)
- 3.6 Muller Hinton broth (MHB) (Difco™, USA)
- 3.7 Muller Hinton agar (Difco™, USA) ที่เติม Glucose ร้อยละ 2 และ Methylene blue dye 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (MHA-GMB)

4. วัสดุและอุปกรณ์

- 4.1 Auto pipette P200, P1000 (Gilson[®], USA)
- 4.2 Pipette Controller (CappAid[™])
- 4.3 Salinometer (Atago 2441-w05, Japan)
- 4.4 Vortex mixer (Scientific Industries, USA)
- 4.5 Analytical balance (Mettler Toledo AB-S, Switzerland)
- 4.6 Electronic balance (Mettler Toledo PB602, Switzerland)
- 4.7 Diaphragm vacuum pump (LabTech GM-0.33II, USA)
- 4.8 Light microscope (Olympus CH30RF 200, Japan)
- 4.9 Stereo microscope (Zeiss STEMI SV6, Germany), Cold light source (Zeiss KL200, Germany)
- 4.10 Rotary evaporator (Buchi[®] Model R-250/V Basic, Switzerland), Vacuum pump system (Buchi[®] Model V-503, Switzerland), Water circulating cooling bath (Model BC-10, Switzerland)
- 4.11 Incubator 37[°]C (Scientific G560E, USA)
- 4.12 Autoclave (Wiseclave WACS60) (Daihan Scientific, Korea)
- 4.13 Refrigerator (Misubishi, Model MR-F38D-SS, Thailand)
- 4.14 Laminar air flow (Biological safety cabinets class II type A/B₃) (Nuair, NU-440-400E, USA)
- 4.15 Cork borer with diameter 0.6 mm (Gammaco, Thailand)
- 4.16 Capillary tube (Hirschmann[®], Germany)
- 4.17 Pipette tips (QSP, USA)
- 4.18 Cotton swab (United Medical, Thailand)
- 4.19 Paper disc (AA-discs) with diameter 0.6 mm (Whatman[®], UK)
- 4.20 Filter paper Whatman No. 1 (Whatman[®], England)
- 4.21 TLC silica gel 60F₂₅₄ (Merck, Germany)
- 4.22 Parafilm M (Brand, Germany)
- 4.23 Petri disc (Gosselin, USA)
- 4.24 24 well และ 96 microtiter plate (Thermo Scientific, China)

- 4.25 Sterile syringe filter with a 0.45 μm pore size (Sartorius[®], Germany)
- 4.26 Micro centrifuge tube (Thermo, India)
- 4.27 Microtube, natural & cap with o-ring (Quality Scientific Plastics, USA)
- 4.28 Cylinder (Pyrex[®], USA)
- 4.29 Erlenmeyer flask volume 250 ml (Pyrex[®], USA)
- 4.30 Separatory funnel volume 500 ml (Witeg NS29, 2/23, Germany)

5. สารเคมี

- 5.1 0.85% NaCl, Normal saline solution (NSS)
- 5.2 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) (Sigma-Aldrich, Singapore)
- 5.4 Acetone (AnalaR NORMAPUR, EC)
- 5.5 Ascorbic acid injection (March Pharmaceutical, Thailand)
- 5.6 Dichloromethane (J.T. Baker, USA)
- 5.7 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Fisher Scientific, India)
- 5.8 Ethanol (EtOH, AR grade) (Mallinckrodt Chemical, Malaysia)
- 5.9 Ethyl acetate (EtOAc, AR grade) (Fisher Scientific, UK)
- 5.10 Hexane (Fisher Scientific, UK)
- 5.11 Methylene blue dye (Merck, Germany)
- 5.12 Methanol (MeOH, AR grade) (Mallinckrodt Chemical, Malaysia)
- 5.13 Olive oil (Yabarra, Spain)
- 5.14 Soybean oil (Cook, Thailand)
- 5.15 Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck, Germany)
- 5.16 Tween 80 (Merck, Germany)

6. ยาต้านจุลชีพ

- 6.1 Ampicillin 10 μg /disc (Oxoid, England)
- 6.2 Fluconazole 25 μg /disc (Himedia[®], India)
- 6.3 Fluconazole powder (Tokyo Chemical Industry, Japan)
- 6.4 Gentamicin 10 μg /disc (Oxoid, England)
- 6.5 Gentamicin powder (Calbiochem[®], China)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อทดสอบ

การเตรียมรานาเกลือและราสาเหตุโรคพืช ทำโดยนำเส้นใยรานาเกลือจากหัวเชื้อวางลงบนอาหาร Potato dextrose agar ที่ปรับความเค็มด้วยน้ำทะเลจนมีความเค็ม 30 ppt (PDA/SW_{30 ppt}) ในกรณีราสาเหตุโรคพืชวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน หรือจนกว่าราเจริญดี ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร จุ่ม 95% Ethanol นำไปผ่านเปลวไฟ รอให้เย็น จากนั้นนำไปตัดขอบโคโลนีรานาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน

2. การทดสอบคุณสมบัติการชอบเค็ม (ดัดแปลงจาก Moubasher, Abdel-Hafez, Bagy, & Abdel-Satar, 1990)

ทดสอบคุณสมบัติการชอบเค็มของราในงานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม โดยเลี้ยงรานาอาหาร PDA ปกติ และ PDA ที่ปรับความเค็มด้วยน้ำทะเลจนมีความเค็ม 15, 30, 50, 100, 150, 200 และ 250 ppt บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นสังเกตการเจริญของราและบันทึกผลการเจริญของรานาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเค็มต่าง ๆ แปลผลการคุณสมบัติการชอบเค็มของราซึ่งดัดแปลงจาก Kushner (1993) โดยใช้เกณฑ์ดังนี้

เจริญเฉพาะบนอาหารที่ไม่มีเค็ม: ไม่ชอบเค็ม (Non halophile)

เจริญได้สูงสุดบนอาหารที่มีความเค็ม 15 - 30 ppt: ชอบเค็มต่ำ (Mild halophile)

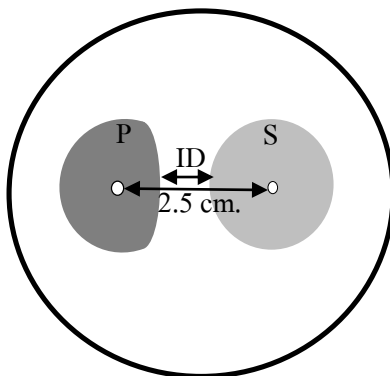
เจริญได้สูงสุดบนอาหารที่มีความเค็ม 50 - 150 ppt: ชอบเค็มปานกลาง (Moderate halophile)

เจริญได้สูงสุดบนอาหารที่มีความเค็ม 200 - 250 ppt: ชอบเค็มสูง (Extreme halophile)

3. การคัดกรองและศึกษาประสิทธิภาพของรานาเกลือในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี

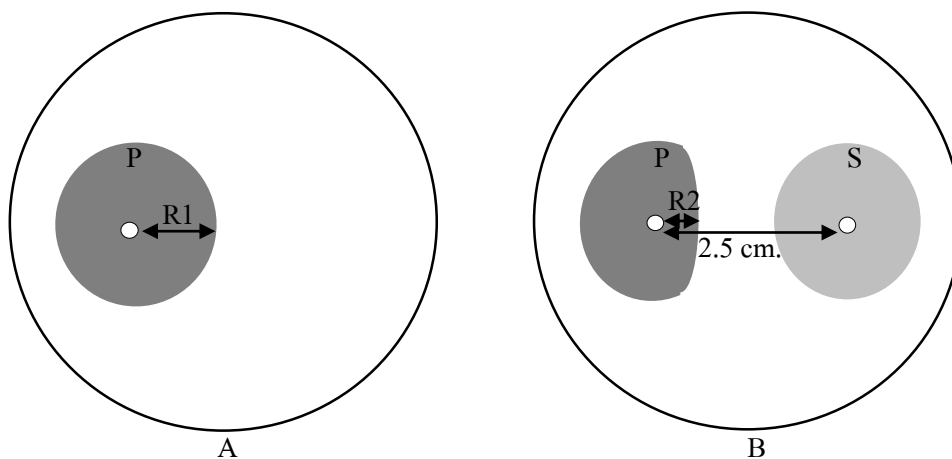
Dual culture (ดัดแปลงจาก Whipps, 1987)

การคัดกรองรานาเกลือที่สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช เริ่มจากใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนีรานาเกลือและราสาเหตุโรคพืช จากนั้นนำชิ้นส่วนของราทั้งสองชนิดมาเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA และ PDA/SW_{30 ppt} ให้ขอบชิ้นวุ้นห่างกัน 2.5 เซนติเมตร ในกรณีราที่เจริญช้า ให้วางชิ้นวุ้นรานานั้นบนอาหารก่อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 2 ซ้ำ สังเกตผลปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis บันทึกระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (Inhibition distance; ID) เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 และ 5 วัน ดังภาพที่ 3-1



ภาพที่ 3-1 การศึกษาค่า Inhibition distance (ID) ที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis โดยวิธี Dual culture, S คือ รานาเกลือ P คือ ราสาเหตุโรคพืช

นำรานาเกลือที่มีค่า Inhibition distance >2 มิลลิเมตร มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี Dual culture ดังกล่าวข้างต้นอีกครั้ง แต่เพิ่มชุดควบคุมที่วางเฉพาะชิ้นวุ้นราสาเหตุโรคพืช และเปลี่ยนวิธีการบันทึกผลเป็นการวัดขนาดโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชที่ถูกยับยั้งการเจริญเทียบกับขนาดโคโลนีราชุดควบคุม ดังภาพที่ 3-2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 3-2 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis โดยวิธี Dual Culture, S คือ รานาเกลือ P คือ ราสาเหตุโรคพืช; A: ชุดควบคุม โดยที่ R1 คือ รัศมีโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชเมื่อเลี้ยงร่วมกับรานาเกลือ B: ชุดทดสอบ โดยที่ R2 คือ รัศมีโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชด้านที่ถูกยับยั้ง

คำนวณประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นรื้อยละ (Percentage inhibition efficiency; %IE) จากสูตร $\%IE = [(R1-R2)/R1] \times 100$ โดย R1 คือ รัศมีโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชในชุดควบคุม R2 คือ รัศมีโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชในชุดทดสอบ แปลผลร้อยละการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชด้วยรณานเกลื้อ โดยใช้เกณฑ์ดังนี้

%IE \geq 70 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีมาก (Very high antagonistic activity)

%IE 50 - <70 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดี (High antagonistic activity)

%IE 35 - <50 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (Moderate antagonistic activity)

%IE <35 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งน้อย (Low antagonistic activity)

4. การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรณานเกลื้อ

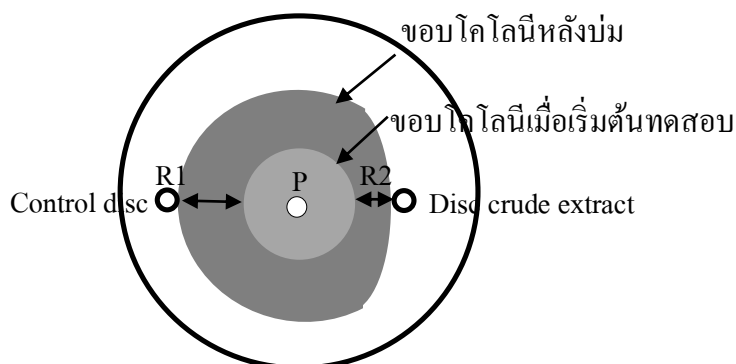
ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนีราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA/SW_{30 ppt} จำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB/SW_{30 ppt} ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร (3 flask) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เพื่อให้เชื้ออยู่ในระยะ Stationary phase จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1) เพื่อแยกส่วนของเส้นใยและส่วนของอาหารเหลว นำส่วนของอาหารเหลวทั้ง 3 flask มารวมกันและสกัดด้วย Ethyl acetate โดยผสมอาหารเหลวกับ Ethyl acetate ในอัตราส่วนอาหารเหลว 1 ส่วนต่อ Ethyl acetate 1 ส่วน ใน Separatory funnel เขย่าแรง ๆ เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เก็บสารสกัด Ethyl acetate ไว้ จากนั้นนำส่วนของอาหารเหลวที่สกัดแล้วไปสกัดซ้ำอีกครั้ง แล้วนำสารสกัด Ethyl acetate ที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกัน นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส ความดัน 240 มิลลิบาร์ หมุนด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ละลายสารสกัดหยาบด้วยสารละลาย 50% Dimethyl sulfoxide (50% DMSO) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับทดสอบต่อไป

5. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากรณานเกลื้อต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

โดยวิธี *Disc diffusion*

ใช้ Cork borer ตัดขอบโคโลนีราสาเหตุโรคพืชและนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้น ใช้ปากกิบปราศจากเชื้อ กีบดิสก์ซูปสารสกัดและวางดิสก์ลงบนผิวหน้าอาหาร กดเบา ๆ ให้ดิสก์ติดกับวุ้น วางดิสก์ห่างจากขอบ โคโลนีรา 1 เซนติเมตร (ภาพที่ 3-3) โดยชุดควบคุมเชิงลบใช้ดิสก์ซูปสารละลาย 50% DMSO ที่แห้งแล้ว บ่มราที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สังเกตผลทุกวัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณ

ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช (Percentage inhibition efficiency; %IE) โดยใช้เกณฑ์เดียวกับการหาค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชด้วยรานาเกลือ



ภาพที่ 3-3 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (P) ของสารสกัด โดยวิธี Disc diffusion โดย R1 = รัศมีโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชในชุดควบคุม R2 = รัศมีโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชในชุดทดสอบ

6. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือต่อการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์

โดยวิธี Disc diffusion

6.1 การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบ

6.1.1 การปรับความขุ่นแบคทีเรียทดสอบ (CLSI, 2012)

เลี้ยงแบคทีเรียทดสอบบนอาหาร Muller Hinton agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เจ็ยเชื้อโคโลนีเดี่ยว 3-5 โคโลนีลงใน Normal saline solution (NSS) ที่ปราศจากเชื้อ ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No.0.5 ด้วย NSS ซึ่ง *Escherichia coli* ATCC 25922 จะมีเซลล์ประมาณ 1×10^8 - 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

6.1.2 การปรับความขุ่นยีสต์ทดสอบ (CLSI, 2004)

เลี้ยงยีสต์ทดสอบบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจ็ยเชื้อโคโลนีเดี่ยว 3-5 โคโลนีลงใน NSS ที่ปราศจากเชื้อที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับความขุ่นของเชื้อทดสอบให้ได้ความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No 0.5 โดยใช้ NSS ซึ่ง *Candida* จะมีเซลล์ประมาณ 1×10^6 - 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

6.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (CLSI, 2004; 2012)

นำจุลินทรีย์ทดสอบที่ปรับความขุ่นเทียบกับ McFarland No.0.5 แล้วเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม โดยใช้ไม้ Sterile cotton swab จุ่มลงใน Suspension เชื้อทดสอบ หมุน Swab หลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้เชื้อซึมเข้าให้ทั่ว และ Swab กับผิวด้านในของหลอดแล้วกดให้ Swab พอหมดนำมาป้ายเป็น 3 ระบายลงผิวน้ำอาหาร MHA สำหรับแบคทีเรีย และ Muller Hinton agar ที่เติม Glucose ร้อยละ 2 และ Methylene blue dye 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (MHA-GMB) ปล่อยให้ผิวน้ำอาหารเพาะเชื้อแห้ง แต่ไม่เกิน 15 นาที ใช้คีมคีบปลายแหลมที่ทำให้ปราศจากเชื้อคีบดิสก์ที่มีสารสกัดและสารต้านจุลชีพวางลงบนผิวน้ำอาหารตามตำแหน่ง กดเบา ๆ ให้ดิสก์ติดกับวุ้น โดยตัวควบคุมผลเชิงบวกสำหรับแบคทีเรียใช้ดิสก์ยามาตรฐาน Ampicillin ขนาดยา 10 ไมโครกรัม และ Gentamycin ขนาดยา 10 ไมโครกรัม สำหรับยีสต์ใช้ดิสก์ยามาตรฐาน Fluconazole ขนาดยา 25 ไมโครกรัม ตัวควบคุมผลเชิงลบใช้ดิสก์ซุบสารละลาย 50% DMSO ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งจากนั้นนำไปบ่มทันทีหรือภายใน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดยวางคว่ำให้ด้านที่เป็นวุ้นอยู่ข้างบน สำหรับยีสต์บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ อ่านผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสเป็นมิลลิเมตร โดยใช้เกณฑ์ดังนี้

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง >20 มม. มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีมาก (Very high activity)

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง >15 - 20 มม. มีฤทธิ์ในการยับยั้งดี (High activity)

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง >10 - 15 มม. มีฤทธิ์ในการยับยั้งปานกลาง (Moderate activity)

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง >6 - 10 มม. มีฤทธิ์ในการยับยั้งน้อย (Low activity)

หมายเหตุ การทดสอบระบบควบคุมด้วยดิสก์ยามาตรฐาน สำหรับแบคทีเรียใช้ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 บนอาหาร MHA ยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 บนอาหาร MHA-GMB (ภาคผนวก ค) ดิสก์สารสกัดและดิสก์ควบคุมผลเชิงลบต้องทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำมาทำการทดสอบ

7. การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Broth microdilution (CLSI, 2006)

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ลดลงตามลำดับครึ่งละ 1 เท่า ตั้งแต่ 1,024-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รายละเอียดการเตรียมสารสกัด ภาคผนวก ง) นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับอาหารเหลว นำอาหารเหลวที่ผสมสารสกัดแล้วหยอดลงหลุมของ 96 well microtiter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland เจือจางด้วย NSS ที่ปราศจากเชื้อ ในอัตราส่วน 1:10 นำไปหยอดลงในแต่ละหลุมของ Microliter

plate หลุมละ 5 ไมโครลิตร จะได้เชื้อประมาณ 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ตัวควบคุมผลเชิงบวกใช้สารละลายยามาตรฐาน Ampicillin และ Gentamycin และตัวควบคุมผลเชิงลบใช้สารละลาย 1% DMSO และกำหนดให้หลุมที่ 11 กำหนดให้เป็น Quality control ส่วนหลุมที่ 12 กำหนดให้เป็น Sterility control บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญของเชื้อทดสอบในหลุมต่าง ๆ ที่บันทึกผลเป็นค่า MIC

หมายเหตุ การทดสอบระบบควบคุมด้วยสารละลายยามาตรฐาน Ampicillin และ Gentamycin สำหรับแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ในอาหาร MHB (ภาคผนวก ฉ)

8. การศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ โดยวิธีมาตรฐาน *Broth microdilution* (CLSI, 2008)

ศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของสารที่ลดลงตามลำดับครึ่งละ 1 เท่า ตั้งแต่ $1,024-4$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รายละเอียดการเตรียมสารสกัด ภาคผนวก ง) นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับอาหารเหลว RPMI 1640 แล้วนำอาหารที่ผสมสารสกัดแล้วหยอดลงหลุมของ 96 well microliter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำยีสต์ที่มีความขุ่นเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No 0.5 เจือจางด้วย NSS ในอัตราส่วน 1:50 และเจือจางอีกครั้งด้วย NSS ในอัตราส่วน 1:20 จะได้เชื้อประมาณ $1 \times 10^3-5 \times 10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปหยอดลงในแต่ละหลุมของ Microliter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งในหลุมจะมีเชื้อประมาณ $0.5 \times 10^3-2.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ตัวควบคุมผลเชิงบวกใช้สารละลายยามาตรฐาน Fluconazole และ ตัวควบคุมผลเชิงลบใช้สารละลาย 1% DMSO การทดสอบ ในหลุมที่ 11 กำหนดให้เป็น Quality control ส่วนหลุมที่ 12 กำหนดให้เป็น Sterility control บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญของเชื้อทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ บันทึกผลเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC)

หมายเหตุ การทดสอบระบบควบคุมด้วยสารละลายยามาตรฐาน Fluconazole สำหรับยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 ในอาหาร RPMI 1640 (ภาคผนวก ฉ)

9. การศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายแบคทีเรียและยีสต์ (*Minimal Lethal Concentration, MLC*) (Pearson, Steigbigel, Davis, & Chapman, 1980)

การศึกษาหาค่าความเข้มข้นของเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายแบคทีเรียและยีสต์ โดยใช้ไปเปิดดูอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อในหลุมทดสอบ MIC ที่ไม่พบเชื้อเจริญ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยอดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA สำหรับแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

MHA-GMB สำหรับยีสต์ บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดอ่านผลโดยตรวจดูการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อเป็นค่า MLC

10. การศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้งการเจริญของราโดยวิธี *Agar dilution* (ดัดแปลงจาก Kim et al., 2012)

ศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้งการเจริญของรา โดยตัดชิ้นวุ้นราจากขอบโคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร วางชิ้นวุ้นราบนอาหารในงานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม ที่มี PDA ปริมาตรหลุมละ 500 ไมโครลิตร และมีความเข้มข้นของสารสกัดลดลงตามลำดับครึ่งละ 1 เท่า ตั้งแต่ 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรผสมอยู่ (รายละเอียดการเตรียมสารสกัด ภาคผนวก ง) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 5 วัน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยชุดควบคุมเชิงลบ คือ PDA ที่เติมสารละลาย 1% DMSO ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของรบบนอาหารทดสอบ บันทึกผลเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC)

11. การศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายรา

การศึกษาค่าความเข้มข้นของเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายรา โดยนำชิ้นวุ้นราในหลุม MIC ที่ผ่านการบ่ม 5 วัน ที่ไม่พบราเจริญ มาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดอ่านผลโดยตรวจดูการเจริญของรบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของราเป็นค่า MLC

12. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากราโดยวิธี *Thin layer chromatography* (ดัดแปลงจาก Doss, 1970)

นำสารสกัดจากข้อ 4 มาแยกองค์ประกอบทางเคมี เริ่มจากเตรียมตัวดูดซับ โดยใช้แผ่น TLC Silica Gel 60 F₂₅₄ ตัดให้มีขนาด 1x10 เซนติเมตร กำหนดระดับตัวทำละลายให้อยู่สูงกว่าขอบด้านล่างของแผ่น TLC 0.5 เซนติเมตร กำหนดระยะจุดสารลงบนแผ่น TLC ที่แต้มสารสกัด ห่างจากขอบด้านล่าง 1 เซนติเมตร และห่างจากขอบด้านข้าง 0.5 เซนติเมตร กำหนดตำแหน่ง Solvent front อยู่ต่ำกว่าขอบด้านบนของแผ่น TLC 1 เซนติเมตร จากนั้นใช้ Capillary tube ขนาดเล็กดูดสารสกัด ปริมาตร 2-5 ไมโครลิตรไปจุดลงบนแผ่น TLC และวางพักไว้ให้สารแห้ง เตรียมตัวทำละลาย Toluene: Methanol: Acetone ในอัตราส่วน 6:1:3 ในภาชนะที่ปิดสนิทประมาณ 10 นาที เพื่อให้ตัวทำละลายอิ่มตัว จากนั้นนำแผ่น TLC ไปแช่ในตัวทำละลายดังกล่าวในภาชนะที่ปิดสนิท เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่แพร่ถึงตำแหน่ง Solvent front นำแผ่น TLC ออกมาพักให้แห้ง ภายใต้อัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สังเกตการเรืองแสงและสีของสารองค์ประกอบพร้อมทั้งวัดระยะที่สาร

แต่ละชนิดเคลื่อนที่บนแผ่น TLC คำนวณค่า R_f ของสารสกัด จากสูตร $R_f =$ ระยะทางที่ตัวอย่างเคลื่อนที่/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

13. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรามาเกลือโดยวิธี

Bioautography (ดัดแปลงจาก Hamburger & Cordell, 1987)

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี Bioautography ทำโดยเลี้ยงราสาเหตุโรคพืชบนจานอาหาร PDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน ตัดแผ่น TLC ตรงบริเวณที่มีสารองค์ประกอบ นำไปตากแสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วางสารองค์ประกอบ TLC ลงบนผิวหน้าอาหาร PDA เว้นระยะห่างจากขอบราสาเหตุโรคพืช 1 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน กำหนดให้ผลเชิงลบคือแผ่น TLC ที่ผ่านการวางในวิภูภาคเคลื่อนที่ โดยไม่หยดสารสกัด ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ สังเกตและบันทึกผลการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชโดยใช้เกณฑ์ดังนี้

3+ หมายถึง ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งห่างจากขอบแผ่นสารองค์ประกอบประมาณ ≥ 5 มม. มีฤทธิ์ในการยับยั้งดี (High activity)

2+ หมายถึง ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งห่างจากขอบแผ่นสารองค์ประกอบประมาณ 3-4 มม. มีฤทธิ์ในการยับยั้งปานกลาง (Moderate activity)

1+ หมายถึง ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งห่างจากขอบแผ่นสารองค์ประกอบประมาณ 1-2 มม. มีฤทธิ์ในการยับยั้งต่ำ (Low activity)

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ โดยวิธี Bioautography ใช้วิธีเดียวกับ Disc diffusion แต่เปลี่ยนจากวงดิสก์เป็นวางแผ่น TLC และเนื่องจากปริมาณสารสกัดใน TLC มีน้อยเพื่อให้ผลบวกชัดเจนจึงเปลี่ยนอาหารที่ใช้ทดสอบให้มีปริมาตรจานละ 10 มิลลิลิตร วางแผ่น TLC บนผิวหน้าอาหาร MHA สำหรับแบคทีเรีย และ MHA-GMB สำหรับยีสต์ หลังจากป้ายเชื้อทดสอบที่เทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No.0.5 แล้วกดสารองค์ประกอบ TLC เบบ่า ๆ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง จึงนำแผ่น TLC ออก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สำหรับยีสต์บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง กำหนดให้ผลเชิงลบคือ แผ่น TLC ที่ผ่านการวางในวิภูภาคเคลื่อนที่ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ สังเกตการยับยั้งโซนการยับยั้ง บันทึกผลการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ โดยใช้เกณฑ์ดังนี้

3+ หมายถึง มีโซนใสห่างจากขอบแผ่นสารองค์ประกอบประมาณ ≥ 6 มม. มีฤทธิ์ในการยับยั้งดี (High activity)

2+ หมายถึง มีโซนใสห่างจากขอบแผ่นสารองค์ประกอบประมาณ 3-5 มม. มีฤทธิ์ในการยับยั้งปานกลาง (Moderate activity)

1+ หมายถึง มีไขมันใต้วงจากขอบแผ่นสารองค์ประกอบประมาณ 1-2 มม. มีฤทธิ์ในการยับยั้งต่ำ (Low activity)

14. การศึกษาสามารถในการลดแรงตึงผิว

14.1 การศึกษาโดยวิธี Parafilm M (Sari et al., 2014)

ใช้ปิเปตดูดสารสกัดจากข้อ 4 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หยดบน Parafilm M อ่านผลทันที สังเกตลักษณะของหยดเทียบกับหยดสารละลาย 50% DMSO สารสกัดที่สามารถลดแรงตึงผิวได้จะมีลักษณะหยดแบนกว่าสารละลาย 50% DMSO ที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลเชิงลบ กำหนดให้สารละลาย Tween 80 และสารละลาย SDS เป็นตัวควบคุมผลเชิงบวก ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (ภาพที่ 3-4)

14.2 การศึกษาโดยวิธี Drop collapsing (ดัดแปลงจาก Kiran et al., 2009)

ใช้ปิเปตดูดน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม และน้ำมันหมูที่ผ่านการใช้แล้ว 1 ครั้ง ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96 well microliter plate นำไปบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารสกัดจากข้อ 4 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าน้ำมันที่แบนราบ อ่านผลภายหลังการทดสอบ 1 นาที ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ สารสกัดที่สามารถลดแรงตึงผิวได้จะมีลักษณะหยดแบนกว่าสารละลาย 50% DMSO ที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลเชิงลบ กำหนดให้สารละลาย Tween 80 และสารละลาย SDS เป็นตัวควบคุมผลเชิงบวก (ภาพที่ 3-4)

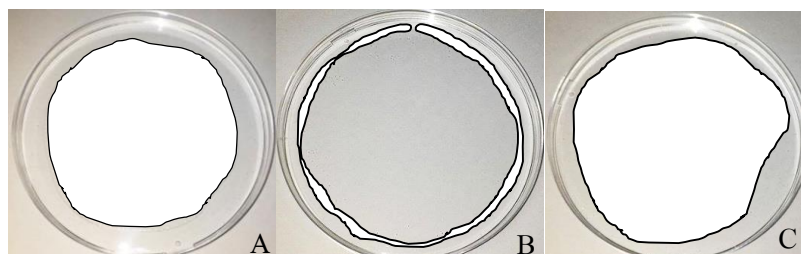


ภาพที่ 3-4 ลักษณะหยดสารสกัดโดยวิธี Drop collapsing test บนผิวหน้าน้ำมันปาล์มในงานอาหารแบบ 96 หลุม; A: หลุมที่ยังไม่ได้ทดสอบ B: ผลเชิงบวกสารละลาย SDS C: ผลเชิงลบสารละลาย 50%DMSO

14.3 การศึกษาความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Oil displacement test) (ดัดแปลงจาก Kiran et al., 2009)

เทน้ำกลั่นที่สะอาดและปราศจากเชื้อ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร หยดน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม และน้ำมันหมูที่ผ่านการใช้แล้ว 1 ครั้ง ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำ จากนั้นหยดสารสกัดจากข้อ 4 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำมัน อ่านผลโดยสารสกัดที่สามารถลดแรงตึงผิวจะทำให้ไขมันเกิดการกระจายตัว

ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ กำหนดให้ตัวควบคุมผลเชิงบวก คือ สารละลาย Tween 80 และ สารละลาย SDS และตัวควบคุมผลเชิงลบ คือ สารละลาย 50% DMSO (ภาพที่ 3-5)

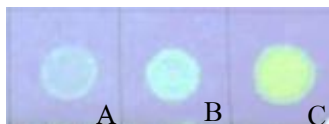


ภาพที่ 3-5 การกระจายตัวของน้ำมันมะกอกโดยวิธี Oil displacement test; A: งานน้ำมันที่ลอยบนผิวหน้า น้ำ B: ผลเชิงบวก สารละลาย SDS C: ผลเชิงลบ สารละลาย 50%DMSO
หมายเหตุ สีขาวคือบริเวณของน้ำมันมะกอก

15. การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี *Dot blot DPPH rapid staining*

(ดัดแปลงจาก Arora & Chandra, 2010)

ใช้ Capillary tube ขนาดเล็กดูดสารสกัดจากข้อ 4 ที่เจือจางลง 50 เท่า ด้วยจุดลงบนแผ่น TLC วางพักไว้ให้แห้ง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นสเปรย์สารละลาย 0.4 mM DPPH ลงบนแผ่น TLC ชับสีส่วนเกินออกด้วยกระดาษซับ และวางทิ้งไว้ให้แห้ง อ่านผลทันทีถ้าสารสกัดสามารถต้านอนุมูลอิสระ สารองค์ประกอบบนแผ่น TLC จะมีสีเหลืองที่ระดับต่าง ๆ และอ่อนลงจนเห็นสีขาว ประเมินระดับการต้านอนุมูลอิสระจากสีที่เห็นด้วยสายตา เทียบกับสีเมื่อใช้สารละลาย Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้เกณฑ์ดังนี้ สีเทียบเท่าสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระดับ 3+ สีเทียบเท่าสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระดับ 2+ สีเทียบเท่าสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.00025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระดับ 1+ (ภาพที่ 3-6) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ กำหนดให้ ตัวควบคุมผลเชิงบวก คือสารละลาย Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 3 ระดับข้างต้น และสารละลาย 1% DMSO ที่เป็นตัวควบคุมผลเชิงลบการตัดสีผลบวกจะใช้วิธี Grading จากสีเทียบกับสารละลายควบคุมผลเชิงบวก สารละลาย Ascorbic acid



ภาพที่ 3-6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารละลาย Ascorbic acid ที่ความเข้มข้นระดับ A: 1+ เทียบเท่าสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.00025, B: 2+ เทียบเท่าสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ C: 3+ เทียบเท่าสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

16. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เลี้ยงรบนอาหาร PDA/SW_{30 ppt} ศึกษาลักษณะโคโลนีลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใย และโครงสร้างสืบพันธุ์ของรกายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope และกล้องจุลทรรศน์ Light microscope และจัดจำแนกในระดับจีนัสหรือสปีชีส์ โดยใช้ The key: Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett & Hunter, 2006)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. คุณสมบัติการชอบเค็ม

จากการทดสอบคุณสมบัติการชอบเค็มของรานาเกลือจำนวน 120 สายพันธุ์ พบว่ารานาเกลือทั้งหมดเป็นราที่มีคุณสมบัติการชอบเค็ม สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีความเค็มถึงอาหารที่มีช่วงความเค็มสูงสุดตั้งแต่ 30-250 ppt ซึ่งราแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติการชอบเค็มแตกต่างกัน (ตารางที่ 4-1) เมื่อแบ่งราตามเกณฑ์คุณสมบัติการชอบเค็มพบว่า ราจำนวน 73 สายพันธุ์ (60.8%) มีคุณสมบัติการชอบเค็มสุดขีด (Extreme halophile) คือเจริญได้บนอาหารที่มีความเค็มสูงสุดตั้งแต่ 200 ppt ขึ้นไป ราจำนวน 44 สายพันธุ์ (36.7%) มีคุณสมบัติการชอบเค็มปานกลาง (Moderate halophile) คือเจริญได้บนอาหารที่มีความเค็มสูงสุดช่วง 50 ppt ถึง 150 ppt และรา 3 สายพันธุ์ (2.5%) เป็นราที่มีคุณสมบัติการชอบเค็มต่ำ (Mild halophile) สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีความเค็มสูงสุดช่วง 15 ppt ถึง 30 ppt และไม่พบราสายพันธุ์ที่เจริญได้เฉพาะในอาหารที่ไม่มีเกลือ ดังตารางที่ 4-2

เมื่อพิจารณาจลศาสตร์การเจริญของราทั้งหมดพบลักษณะการเจริญแตกต่างกัน 4 รูปแบบ คือ

1. ราเจริญได้ดีบนอาหารที่ไม่มีความเค็มถึงความเค็มต่ำและเจริญได้ช้าลงบนอาหารที่มีระดับความเค็มสูงขึ้น
2. ราเจริญได้ดีไม่แตกต่างกันทั้งบนอาหารที่ไม่มีความเค็มและมีความเค็มทุกระดับ
3. ราเจริญได้ดีบนอาหารที่มีความเค็มระดับปานกลาง
4. ราไม่เจริญบนอาหารที่ไม่มีความเค็ม แต่เจริญได้ดีบนอาหารที่มีระดับความเค็มสูง

ราชอบเค็มส่วนใหญ่ที่พบเป็นราที่มีลักษณะการเจริญในรูปแบบที่ 1 โดยราเจริญบนอาหารที่ไม่มีความเค็มและมีความเค็มได้ดีในช่วงความเค็ม 0-30 ppt เมื่อความเค็มของอาหารเพิ่มขึ้น ราเจริญได้ช้าลงและเมื่อถึงความเค็มที่ราไม่สามารถทนได้ก็จะหยุดเจริญ รูปแบบการเจริญที่พบรองลงมาคือรูปแบบที่ 2 คือ ราเจริญได้ดีบนอาหารที่ไม่มีความเค็มและที่มีความเค็มไม่แตกต่างกันในทุกระดับความเค็ม ลักษณะการเจริญรูปแบบที่ 3 พบไม่มากนัก ราคุ่มนี้เมื่อเลี้ยงรบนอาหารที่ไม่มีความเค็ม ราเจริญได้เพียงเล็กน้อย ในขณะที่เมื่อเลี้ยงรบนอาหารที่มีความเค็มระดับปานกลางราเจริญได้ดีและราเจริญได้ดีที่สุดในความเค็มของอาหารในช่วง 30-50 ppt เมื่อความเค็มของอาหารเพิ่มมากขึ้นอัตราการเจริญของราจะลดลงเรื่อย ๆ จนหยุดเจริญ เช่นเดียวกับราคุ่มที่ 1 การเจริญรูปแบบที่ 4 เป็นราที่ต้องการความเค็มในการเจริญ เมื่อเลี้ยงรบนอาหารที่ไม่มีความเค็มราไม่เจริญ แต่เมื่ออาหารที่มีความเค็มเพิ่มขึ้นราเจริญได้ดีขึ้นและราเจริญได้ดีที่สุดที่ความเค็มประมาณ 150 ppt ซึ่งพบเพียง

1 สายพันธุ์เท่านั้น คือ SSPB2203 รากลุ่มที่ 4 จัดเป็น Obligate halophile ขณะที่กลุ่มที่ 1-3 จัดเป็น Facultative halophile ตามคำนิยามของ Nayak et al. (2012) ตัวอย่างลักษณะการเจริญของราแต่ละกลุ่มแสดงดังภาพที่ 4-1 และ 4-2

ตารางที่ 4-1 คุณสมบัติการชอบเค็มของรานาเกลือ

ลำดับ	รานาเกลือ	ระดับความเค็ม สูงสุดที่ราเจริญ (ppt)	ลำดับ	รานาเกลือ	ระดับความเค็ม สูงสุดที่ราเจริญ (ppt)
1	SSCS0003	0-100	22	SSCR0505	0-200
2	SSCS0006	0-100	23	SSCR0506	0-250
3	SSCS0031	0-100	24	SSCR0507	0-200
4	SSCR0034	0-200	25	SSPB1105	0-100
5	SSCR0044	0-200	26	SSPB1109	0-200
6	SSCR0045	0-200	27	SSPB1110	0-100
7	SSCR0066	0-250	28	SSPB1111	0-100
8	SSCS0069	0-250	29	SSPB1116	0-30
9	SSCS0070	0-150	30	SSPB1117	0-250
10	SSCS0074	0-150	31	SSPB1118	0-250
11	SSCR0078	0-150	32	SSPB1119	0-100
12	SSCR0082	0-200	33	SSPB1120	0-100
13	SSCR0088	0-150	34	SSPB1122	0-250
14	SSCR0102	0-150	35	SSPB1123	0-250
15	SSCS0106	0-250	36	SSPB1126	0-250
16	SSCS0109	0-150	37	SSPB1128	0-250
17	SSCS0115	0-250	38	SSPB1130	0-250
18	SSCR0501	0-200	39	SSPB1204	0-30
19	SSCR0502	0-150	40	SSPB1206	0-150
20	SSCR0503	0-200	41	SSPB1209	0-100
21	SSCR0504	0-250	42	SSPB1210	0-150

หมายเหตุ ทดสอบบนอาหาร PDA ที่มีความเค็ม 0, 15, 30, 50, 100, 150, 200 และ 250 ppt

ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

ลำดับ	รายนามเกลือ	ระดับความเค็ม สูงสุดที่ราเจริญ (ppt)	ลำดับ	รายนามเกลือ	ระดับความเค็ม สูงสุดที่ราเจริญ (ppt)
43	SSPB1211	0-50	68	SSPB2209	0-50
44	SSPB1212	0-150	69	SSPB2210	0-100
45	SSPB1213	0-150	70	SSPB2212	0-50
46	SSPB1214	0-250	71	SSPB2213	0-200
47	SSPB1215	0-200	72	SSPB2302	0-250
48	SSPB1218	0-150	73	SSPB2304	0-50
49	SSPB1219	0-200	74	SSPB2305	0-30
50	SSPB1302	0-200	75	SSPB2308	0-100
51	SSPB1303	0-200	76	SSPB2310	0-100
52	SSPB1306	0-150	77	SSPB3101	0-250
53	SSPB1307	0-100	78	SSPB3104	0-150
54	SSPB1308	0-100	79	SSPB3108	0-250
55	SSPB1309	0-200	80	SSPB3111	0-200
56	SSPB1310	0-200	81	SSPB3114	0-250
57	SSPB1311	0-250	82	SSPB3117	0-250
58	SSPB1312	0-200	83	SSPB3120	0-200
59	SSPB1314	0-150	84	SSPB3124	0-150
60	SSPB1315	0-50	85	SSPB3203	0-250
61	SSPB2101	0-100	86	SSPB3204	0-200
62	SSPB2102	0-150	87	SSPB3207	0-200
63	SSPB2103	0-100	88	SSPB3208	0-250
64	SSPB2104	0-150	89	SSPB3209	0-250
65	SSPB2108	0-50	90	SSPB3301	0-250
66	SSPB2202	0-250	91	SSPB3304	0-250
67	SSPB2203	15-250	92	SSPB3305	0-250

หมายเหตุ ทดสอบบนอาหาร PDA ที่มีความเค็ม 0, 15, 30, 50, 100, 150, 200 และ 250 ppt

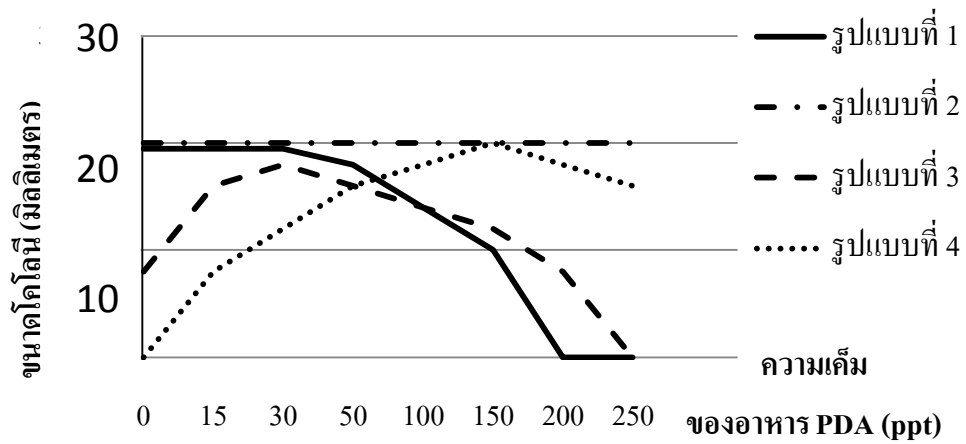
ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

ลำดับ	รายนามเกลือ	ระดับความเค็ม สูงสุดที่ราเจริญ (ppt)	ลำดับ	รายนามเกลือ	ระดับความเค็ม สูงสุดที่ราเจริญ (ppt)
93	SSPB3312	0-250	107	SSPB4307	0-250
94	SSPB3314	0-200	108	SSPB4308	0-250
95	SSPB4107	0-250	109	SSPB4309	0-250
96	SSPB4108	0-200	110	SSPB4313	0-250
97	SSPB4206	0-250	111	SSPB4319	0-250
98	SSPB4207	0-250	112	SSPB4320	0-250
99	SSPB4208	0-250	113	SSPB4321	0-250
100	SSPB4215	0-150	114	SSPB4323	0-250
101	SSPB4217	0-200	115	SSPB4324	0-250
102	SSPB4225	0-250	116	SSPB4325	0-250
103	SSPB4234	0-150	117	SSPB4327	0-250
104	SSPB4235	0-150	118	SSPB4328	0-250
105	SSPB4301	0-200	119	SSPB4329	0-250
106	SSPB4304	0-200	120	SSPB4332	0-250

หมายเหตุ ทดสอบบนอาหาร PDA ที่มีความเค็ม 0, 15, 30, 50, 100, 150, 200 และ 250 ppt

ตารางที่ 4-2 ระดับคุณสมบัติการชอบเค็มของรายนามเกลือ

ระดับความเค็ม สูงสุดที่ราเจริญ (ppt)	จำนวน สายพันธุ์	ร้อยละ	คุณสมบัติ การชอบเค็ม	จำนวน สายพันธุ์	ร้อยละ
30	3	2.5%	Mild halophile	3	2.5%
50	6	5.0%			
100	17	14.2%	Moderate halophile	44	36.7%
150	21	17.5%			
200	26	21.7%			
250	47	39.2%	Extreme halophile	73	60.8%



ภาพที่ 4-1 รูปแบบการเจริญของรานาเกลือทั้งหมดที่ศึกษา; — คือ การเจริญของรารูปแบบที่ 1 - · - คือ การเจริญของรารูปแบบที่ 2 - - คือ การเจริญของรารูปแบบที่ 3 และ ····· คือ การเจริญของรารูปแบบที่ 4



ภาพที่ 4-2 ลักษณะการเจริญของรานาเกลือรูปแบบต่าง ๆ บนอาหาร PDA ที่มีความเค็ม 0-250 ppt ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม เมื่อบ่มเป็นเวลา 10 วัน; A: การเจริญของรารูปแบบที่ 1 SSCR0078 B: การเจริญของรารูปแบบที่ 2 SSCR0066 C: การเจริญของรารูปแบบที่ 3 SSPB2102 และ D: การเจริญของรารูปแบบที่ 4 SSPB2203

2. การคัดกรองและศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนส

เบื้องต้นทำการศึกษาศึกษาการสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช 2 ชนิด คือ *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 โดยวิธี Dual culture บนอาหาร PDA และ PDA/SW_{30 ppt} เป็นเวลา 3 และ 5 วัน รานาเกลือจำนวน 60 สายพันธุ์ (50.0%) จากจำนวนทั้งหมด 120 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชโดยเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis มีระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (Inhibition distance, ID) มากกว่า 2 มิลลิเมตร ระยะเวลาที่เลี้ยงร่วมกัน 3 วัน มีค่า ID มากกว่าเมื่อเลี้ยงร่วมกัน 5 วัน และรานาเกลือสามารถสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดีทั้งบนอาหาร PDA และ PDA/SW_{30 ppt} แต่ความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 4-3)

เมื่อนำรานาเกลือจำนวน 60 สายพันธุ์ ที่มีค่า ID มากกว่า 2 มิลลิเมตร ไปศึกษาการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชซ้ำโดยวิธี Dual culture อีกครั้ง แต่เปลี่ยนจากการหาค่า ID เป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งในหน่วยร้อยละ (Percentage inhibition efficiency; %IE) พบว่ารานาเกลือมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแตกต่างกันขึ้นกับชนิดราทดสอบ ระยะเวลาที่เลี้ยงร่วมกัน และความเค็มของอาหารที่ใช้ทดสอบ รานาเกลือจำนวน 50 สายพันธุ์ (83.3%) จากรานาเกลือ 60 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วย %IE มากกว่าหรือเท่ากับ 35 (ตารางที่ 4-4) พบว่ารานาเกลือ SSCS0069, SSPB4107, SSPB4215, SSPB4225 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วย %IE มากกว่า 57 เมื่อเลี้ยงร่วมกัน 5 วัน บนอาหาร PDA และ PDA/SW_{30 ppt} รานาเกลือที่แสดงประสิทธิภาพดีที่สุด คือ SSPB4225 มีค่า %IE เท่ากับ 75.0 และ 76.0 ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA/SW_{30 ppt} เป็นเวลา 5 วัน (ภาพที่ 4-3) %IE ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแสดงให้เห็นว่ารานาเกลือส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ได้ดีกว่า *C. capsici* DOAC 1511 และเมื่อเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 3 วัน รานาเกลือส่วนใหญ่ที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชในระดับต่ำถึงปานกลาง แต่เมื่อเลี้ยงร่วมกัน 5 วัน รานาเกลือส่วนใหญ่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งดีขึ้นกว่าระดับเดิม (ตารางที่ 4-5)

3. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

เมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากอาหารเหลว PDB และ PDB/SW_{30 sw} รวม 100 สารสกัด จากรานาเกลือที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งมากกว่าร้อยละ 35 จำนวน 50 สายพันธุ์ พบว่าประสิทธิภาพและจำนวนสารสกัดที่ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแตกต่างกันขึ้นกับชนิดราสาเหตุโรคพืชที่ทำการทดสอบและความเค็มของอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงรานาเกลือ ดังตารางที่ 4-6 และ 4-7

ตารางที่ 4-3 ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (ID) โดยรานาเกลือเมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน

ลำดับ	รานาเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		<i>C. capsici</i> DOAC 1511				<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782			
		PDA		PDA/SW _{30 ppt}		PDA		PDA/SW _{30 ppt}	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
1	SSCS0006	3.50±0.71	-	2.50±0.71	-	1.50±0.71	-	1.00±0.00	-
2	SSCS0031	-	-	-	-	8.00±0.00	1.00±0.00	11.00±0.00	2.00±0.00
3	SSCR0044	-	-	-	-	-	-	15.00±0.00	2.00±0.00
4	SSCR0066	-	-	-	-	10.50±0.71	1.50±0.71	-	-
5	SSCS0069	17.00±0.00	14.50±0.71	16.50±0.71	13.00±0.00	17.00±0.00	13.00±0.00	13.50±0.71	9.50±0.71
6	SSCS0070	10.00±0.00	5.00±0.00	8.00±0.00	3.00±0.00	12.00±0.00	6.00±0.00	7.00±0.00	2.00±0.71
7	SSCR0088	-	-	-	-	1.00±0.00	-	3.50±0.71	1.50±0.71
8	SSCS0106	6.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	-	10.00±0.00	2.50±0.71	2.00±0.00	-
9	SSCS0115	10.00±0.00	3.50±0.00	-	-	10.00±0.00	1.00±0.00	-	-
10	SSCR0501	8.00±0.00	-	6.00±0.00	-	12.00±0.00	2.00±0.00	5.00±0.00	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

ลำดับ รานาเกลือ		ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		<i>C. capsici</i> DOAC 1511				<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782			
		PDA		PDA/SW _{30 ppt}		PDA		PDA/SW _{30 ppt}	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
11	SSCR0502	-	-	-	-	10.00±0.00	2.50±0.71	3.00±0.00	-
12	SSCR0503	-	-	-	-	-	-	13.50±0.71	5.00±0.00
13	SSCR0505	-	-	-	-	15.00±0.00	2.00±0.00	3.00±0.00	-
14	SSCR0506	-	-	-	-	-	-	17.00±0.00	4.00±0.00
15	SSCR0507	-	-	-	3.00±0.00	-	-	-	4.00±0.00
16	SSPB1105	-	-	-	5.00±0.00	-	-	-	-
17	SSPB1110	16.00±0.00	14.00±0.00	12.00±0.00	7.00±0.00	13.00±0.00	10.00±0.00	12.00±0.00	8.00±0.00
18	SSPB1116	-	9.50±0.71	-	6.00±0.00	-	8.00±0.00	-	8.50±0.71
19	SSPB1117	12.00±4.41	8.00±0.00	5.00±0.00	1.00±0.00	13.00±0.00	6.00±0.00	5.50±0.71	-
20	SSPB1122	10.50±0.71	4.50±0.71	4.50±0.71	1.50±0.71	9.50±2.12	4.00±1.41	8.50±0.71	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

ลำดับ	รณานาเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		<i>C. capsici</i> DOAC 1511				<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782			
		PDA		PDA/SW _{30 ppt}		PDA		PDA/SW _{30 ppt}	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
21	SSPB1130	10.00±0.00	7.50±0.71	8.50±0.71	5.50±2.12	11.00±0.00	5.50±0.71	1.00±0.00	-
22	SSPB1204	-	-	-	-	-	8.00±0.00	-	1.00±0.00
23	SSPB1209	8.50±0.71	3.50±0.71	9.50±0.71	2.50±0.71	7.50±0.71	2.00±0.00	10.00±0.00	3.00±0.00
24	SSPB1210	5.00±0.71	-	6.00±0.71	-	7.50±0.71	-	6.50±0.71	-
25	SSPB1211	6.00±0.00	3.00±0.00	2.50±0.71	1.00±0.00	8.50±0.71	2.00±0.00	5.00±0.00	1.00±0.00
26	SSPB1212	-	-	6.00±0.00	4.50±2.15	-	-	8.50±0.71	2.00±0.00
27	SSPB1218	17.00±0.00	16.00±0.00	17.00±0.00	16.00±1.41	19.00±0.00	15.00±0.00	14.00±0.00	12.00±0.00
28	SSPB1302	-	-	-	-	11.00±0.00	2.00±0.00	-	-
29	SSPB1312	-	-	-	-	7.50±3.54	1.00±1.41	8.00±0.00	-
30	SSPB2104	-	6.50±0.71	-	3.00±0.00	-	11.00±0.00	-	6.00±0.00

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

ลำดับ	รายนามเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		<i>C. capsici</i> DOAC 1511				<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782			
		PDA		PDA/SW _{30 ppt}		PDA		PDA/SW _{30 ppt}	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
31	SSPB2202	-	-	8.00±1.41	1.50±0.71	11.00±1.41	1.50±0.71	-	-
32	SSPB2210	8.00±0.00	3.00±1.41	6.00±0.00	2.00±0.00	12.00±0.00	2.5±0.71	10.00±0.00	2.00±0.00
33	SSPB2213	-	-	-	4.00±0.00	-	-	-	3.00±0.00
34	SSPB3114	-	2.00±0.00	-	-	-	14.00±0.00	-	-
35	SSPB3117	-	-	-	-	11.00±0.00	4.50±0.71	6.00±0.00	-
36	SSPB3120	-	-	-	-	12.00±0.00	4.00±0.00	4.50±0.71	-
37	SSPB3124	11.50±0.71	7.00±0.00	9.00±1.41	5.00±1.41	12.50±0.71	8.00±0.00	6.50±0.71	2.00±0.00
38	SSPB3208	13.00±1.41	8.00±0.00	14.00±0.00	7.50±0.71	11.00±1.41	7.50±0.71	9.00±0.00	4.00±0.00
39	SSPB3301	8.00±0.00	6.00±0.00	6.50±0.71	-	5.50±0.71	1.00±0.00	14.00±0.00	10.00±0.00
40	SSPB4107	16.50±0.71	12.00±0.00	17.50±0.71	12.50±0.71	17.50±0.71	11.50±0.71	14.00±0.00	8.50±0.71

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

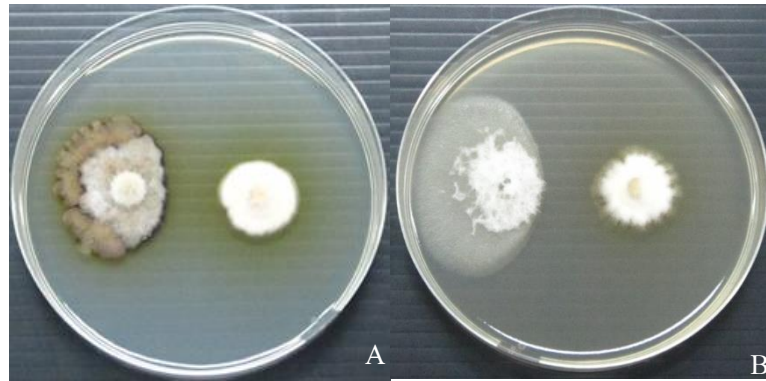
		ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
ลำดับ	รاناเกลือ	<i>C. capsici</i> DOAC 1511				<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782			
		PDA		PDA/SW _{30 ppt}		PDA		PDA/SW _{30 ppt}	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
41	SSPB4108	1.50±0.71	-	6.50±0.71	2.50±0.71	8.00±1.41	4.50±0.71	1.00±0.00	-
42	SSPB4207	19.00±0.00	16.00±0.00	16.00±0.00	11.00±0.00	16.00±0.00	12.00±0.00	16.00±0.00	10.00±0.00
43	SSPB4208	13.50±0.71	9.50±0.71	14.00±0.00	9.50±0.71	16.00±0.00	11.00±0.00	9.00±0.71	4.50±0.71
44	SSPB4215	16.50±0.71	12.50±0.71	15.00±0.00	10.00±0.00	17.00±1.41	12.00±1.41	15.00±1.41	10.00±0.00
46	SSPB4225	16.50±0.71	14.00±1.41	16.00±0.00	12.50±0.71	15.50±0.71	10.50±0.71	16.00±0.00	12.00±0.00
47	SSPB4307	13.00±0.00	10.50±0.71	12.50±0.71	10.00±0.00	15.00±0.00	10.50±0.71	15.00±0.00	10.00±0.00
48	SSPB4308	14.50±0.71	11.00±1.41	10.00±0.00	5.00±0.00	15.50±0.71	9.00±1.41	15.50±0.71	9.50±0.71
49	SSPB4309	13.00±0.00	9.50±0.71	8.00±0.00	4.00±0.00	13.50±0.71	9.00±0.00	11.00±0.00	5.50±0.71
50	SSPB4313	18.50±0.71	12.00±1.41	10.50±0.71	6.50±0.71	18.50±0.71	13.00±1.41	13.00±1.41	8.00±1.41

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

ลำดับ	รاناเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		<i>C. capsici</i> DOAC 1511				<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782			
		PDA		PDA/SW _{30 ppt}		PDA		PDA/SW _{30 ppt}	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
51	SSPB4319	13.00±0.00	7.50±0.71	10.00±0.00	5.50±0.71	15.00±0.00	8.00±0.00	9.50±0.71	3.50±0.71
52	SSPB4320	16.50±0.71	8.00±0.00	13.50±0.71	13.50±0.71	13.50±0.71	9.50±0.71	15.00±0.00	10.00±0.00
53	SSPB4321	10.50±0.71	5.00±0.00	8.00±0.00	4.00±0.00	9.00±0.00	8.00±0.00	7.00±0.00	4.50±0.00
54	SSPB4323	15.00±0.00	11.00±0.00	12.00±0.00	7.00±0.00	16.00±0.00	10.00±0.00	16.50±0.71	11.00±1.41
55	SSPB4324	15.00±0.00	10.50±0.71	16.00±0.00	13.00±0.00	15.00±0.00	11.50±0.00	11.00±0.00	6.00±0.00
56	SSPB4325	16.50±0.71	13.00±0.00	13.50±0.71	9.00±1.41	16.00±0.00	11.00±0.00	13.00±0.00	18.00±0.00
57	SSPB4327	15.50±0.71	11.00±1.41	13.50±0.71	9.50±0.71	11.50±0.71	6.00±0.00	13.00±0.00	7.00±0.00
58	SSPB4328	12.00±0.00	7.00±0.00	10.00±0.00	6.00±0.00	13.50±0.71	8.00±0.00	7.50±0.71	3.00±0.00
59	SSPB4329	11.50±0.71	8.50±0.71	10.00±0.00	5.50±0.71	13.00±0.00	10.00±0.00	8.50±0.71	4.50±0.71
60	SSPB4332	13.50±0.71	10.00±0.00	11.00±1.41	7.50±0.71	15.50±0.71	8.50±0.71	4.50±0.71	4.50±0.71

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis



ภาพที่ 4-3 ปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis ของราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนส A: *C. capsici* DOAC 1511 และ B: *C. gloeosporioides* DOAC 0782 (ซ้าย) กับรานาเกลือ SSPB4225 (ขวา) เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDA_{30 ppt} เป็นเวลา 5 วัน

สารสกัด 82 สาร (82.0%) จากรานาเกลือ 47 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ขณะที่สารสกัดเพียง 76 สาร (76.0%) จากรานาเกลือ 42 สายพันธุ์มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 ตารางที่ 4-8 สรุปรายละเอียดของสารสกัด 11 สารจากรานาเกลือ 10 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้งสองชนิดในระดับดีมาก (%IE ≥ 70) เมื่อเลี้ยงราด้วยอาหารเหลว PDB หรือ PDB/SW_{30 ppt} รานาเกลือที่ผลิตสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 หรือ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ในระดับดีมาก เฉพาะในอาหารเหลว PDB คือ SSCS0106, SSCS0115, SSPB3208, SSPB4107 และ SSPB4329 เฉพาะในอาหารเหลว PDB/SW_{30 ppt} คือ SSPB4215 และ SSPB4217 รานาเกลือที่สร้างสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้งสองชนิดในระดับดีมาก เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB/SW_{30 ppt} คือ SSPB4207 และ SSPB4324 สารสกัด SSPB4207 จากอาหาร PDB/SW_{30 ppt} มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 มากกว่า *C. gloeosporioides* DOAC 0782 มีค่า %IE เท่ากับ 76 และ 70 ตามลำดับ (ภาพที่ 4-4 และ 4-5) ในทางกลับกันสารสกัด SSPB4324 จากอาหาร PDB/SW_{30 ppt} ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides* DOAC 0782 มากกว่า *C. capsici* DOAC 1511 มีค่า %IE เท่ากับ 77 และ 70 ตามลำดับ พบรานาเกลือเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น คือ SSPB3124 ที่สามารถสร้างสารที่มีประสิทธิภาพดีมากในอาหารเหลวทั้งสองชนิด แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน สารสกัด SSPB3124 จาก PDB/SW_{30 ppt} ยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 ได้ดีกว่า *C. gloeosporioides* DOAC 0782 และสารสกัด SSPB3124 จาก PDB ยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ได้ดีกว่า *C. capsici* DOAC 1511 มีค่า %IE สูงที่สุดเท่ากันคือ 80 (ภาพที่ 4-6, 4-7)

ตารางที่ 4-4 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นรื้อยละ (%IE) ของราสาเหตุโรคพืชด้วยรานากเกลือ เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน

ลำดับ	รานากเกลือ	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นรื้อยละ (%IE)							
		<i>C. capsici</i> DOAC 1511				<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782			
		PDA		PDA/SW _{30 ppt}		PDA		PDA/SW _{30 ppt}	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
1	SSCS0006	20.00±0.00	-	22.22±3.85	-	27.27±0.00	-	16.16±3.54	-
2	SSCS0031	-	-	-	-	30.00±0.00	44.44±0.00	23.08±0.00	60.00±0.00
3	SSCR0044	-	-	8.00±0.00	39.29±0.00	-	-	20.00±0.00	47.12±1.98
4	SSCR0066	-	-	-	-	15.15±5.25	29.15±2.79	-	-
5	SSCS0069	40.00±0.00	60.00±0.00	60.00±0.00	76.00±0.00	45.45±0.00	60.00±0.00	55.01±3.54	68.89±1.92
6	SSCS0070	23.33±5.77	22.22±3.85	31.11±3.85	42.67±6.11	27.27±0.00	40.00±0.00	20.25±0.00	43.33±0.00
7	SSCR0088	-	-	-	-	27.27±0.00	-	28.57±0.00	50.67±2.30
8	SSCS0106	13.33±5.77	13.33±7.64	31.11±3.85	-	27.30±9.14	40.00±0.00	-	-
9	SSCS0115	10.00±0.00	15.56±10.18	-	-	33.33±5.25	40.00±0.00	-	-
10	SSCR0501	4.17±7.22	-	27.78±4.81	-	30.23±0.00	51.21±0.00	30.00±0.00	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

		ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นรื้อยละ (%IE)							
ลำดับ	รานาเกลือ	<i>C. capsici</i> DOAC 1511				<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782			
		PDA		PDA/SW _{30 ppt}		PDA		PDA/SW _{30 ppt}	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
11	SSCR0502	-	-	-	-	22.48±13.42	62.06±4.69	16.67±5.77	-
12	SSCR0503	-	-	-	-	-	-	13.33±5.77	45.98±5.26
13	SSCR0505	-	-	-	-	30.23±0.00	24.12±9.39	26.67±11.55	
14	SSCR0506	-	-	-	-	-	-	30.00±0.00	39.29±0.00
15	SSCR0507	-	-	-	34.52±2.06	-	-	-	47.13±1.99
16	SSPB1105	-	-	-	39.27±0.00	-	-	-	-
17	SSPB1110	23.33±5.77	37.50±0.00	10.25±4.44	39.27±4.05	23.08±0.00	29.41±0.00	4.45±3.85	28.57±0.00
18	SSPB1116	-	20.83±3.61	-	23.08±4.05	-	23.53±0.00	-	20.64±2.75
19	SSPB1117	40.00±0.00	41.02±4.44	37.78±3.85	58.67±2.31	30.00±0.00	44.44±0.00	28.21±4.44	-
20	SSPB1122	33.33±5.77	25.64±4.44	33.33±0.00	52.00±0.00	50.00±0.00	61.11±5.56	42.42±3.50	64.59±1.81

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นรื้อยละ (%IE)							
		<i>C. capsici</i> DOAC 1511				<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782			
		PDA		PDA/SW _{30 ppt}		PDA		PDA/SW _{30 ppt}	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
21	SSPB1130	16.67±5.77	35.55±3.85	48.89±7.70	65.33±4.62	30.00±0.00	44.44±0.00	23.08±0.00	60.00±0.00
22	SSPB1204	-	-	-	-	-	15.58±0.00	-	-
23	SSPB1209	30.00±0.00	42.31±0.00	27.44±3.93	50.62±0.00	2.77±4.81	29.39±2.84	27.45±6.79	50.58±1.98
24	SSPB1210	20.00±0.00	46.29±3.21	22.22±3.85	49.33±2.31	13.33±5.77	50.00±0.00	28.21±4.44	65.56±1.93
25	SSPB1211	10.00±0.00	20.51±4.45	42.22±3.85	58.67±2.31	16.66±5.78	36.70±2.92	27.78±0.00	53.13±0.00
26	SSPB1212	50.00±10.00	44.45±3.70	38.78±6.80	57.48±2.38	13.89±4.81	44.17±2.84	29.41±0.71	58.62±0.00
27	SSPB1218	40.00±0.00	56.25±0.00	48.72±11.75	70.31±8.43	58.97±4.45	56.86±3.39	60.00±0.00	66.67±0.00
28	SSPB1302	-	-	-	-	18.00±0.00	-	4.45±3.85	-
29	SSPB1312	-	-	-	-	0.37±0.64	11.11±3.85	33.33±4.12	41.33±2.30
30	SSPB2104	-	4.17±9.55	-	23.08±4.05	-	19.61±6.80	-	15.88±2.75

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

ลำดับ	รานากลื้อ	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นรื้อยละ (%IE)							
		<i>C. capsici</i> DOAC 1511				<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782			
		PDA		PDA/SW _{30 ppt}		PDA		PDA/SW _{30 ppt}	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
31	SSPB2202	6.67±5.77	27.08±7.22	-	43.32±0.00	10.25±4.44	15.68±6.80	8.89±10.18	-
32	SSPB2210	12.50±0.00	42.22±3.85	19.45±4.81	55.95±5.45	30.23±0.00	40.38±4.69	10.00±0.00	49.42±1.99
33	SSPB2213	-	-	-	20.00±0.00	-	-	-	33.33±0.00
34	SSPB3114	-	33.33±0.00	-	-	-	50.00±0.00	-	20.40±8.69
35	SSPB3117	-	-	-	-	1.11±0.00	8.89±3.85	21.43±0.00	-
36	SSPB3120	-	-	-	-	16.66±5.78	24.07±3.21	27.78±0.00	-
37	SSPB3124	26.67±5.77	41.02±4.44	33.33±0.00	58.67±2.31	50.00±0.00	55.55±0.00	51.28±4.45	66.67±2.31
38	SSPB3208	33.33±5.77	30.77±7.69	26.67±0.00	52.00±0.71	43.33±5.77	59.26±6.42	56.41±4.33	65.33±2.31
39	SSPB3301	-	-	34.96±8.31	35.00±0.00	1.11±0.00	26.67±0.00	16.67±4.12	41.33±2.30
40	SSPB4107	40.00±0.00	58.82±0.00	68.28±7.14	73.00±2.31	48.48±5.25	61.13±2.59	64.45±3.85	68.96±0.00

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

		ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นรื้อยละ (%IE)							
ลำดับ	รاناเกลือ	<i>C. capsici</i> DOAC 1511				<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782			
		PDA		PDA/SW _{30 ppt}		PDA		PDA/SW _{30 ppt}	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
41	SSPB4108	-	5.99±3.70	45.58±00.00	53.36±6.29	0.00±0.83	27.75±2.84	49.02±3.39	58.62±0.00
42	SSPB4207	56.99±0.00	67.32±0.00	67.48±0.00	75.00±0.00	33.00±0.00	46.67±0.00	71.43±7.14	73.00±2.31
43	SSPB4208	16.67±5.77	47.06±0.00	42.86±0.00	64.00±0.00	36.36±0.00	58.15±2.59	40.00±6.67	56.32±5.27
44	SSPB4215	50.00±0.00	61.54±0.00	63.72±3.93	71.19±0.00	55.55±4.81	58.95±2.85	58.82±0.00	65.52±0.00
45	SSPB4217	33.33±1.11	55.71±4.04	49.88±4.34	62.50±0.00	43.33±0.58	46.15±0.00	52.38±4.12	69.05±2.06
46	SSPB4225	46.65±6.21	65.14±3.78	59.35±0.00	75.00±0.00	40.74±6.41	57.78±3.85	71.42±0.00	76.00±0.00
47	SSPB4307	41.67±8.34	54.80±5.65	51.05±6.99	55.10±2.99	57.58±5.25	66.18±0.00	59.53±8.25	69.33±4.62
48	SSPB4308	26.67±5.77	30.77±0.00	40.00±6.67	60.00±0.00	50.00±0.00	55.55±0.00	61.53±0.00	70.67±2.31
49	SSPB4309	41.67±0.00	54.80±0.00	41.73±4.04	51.64±2.99	51.52±5.25	59.74±2.79	38.10±14.87	58.67±6.11
50	SSPB4313	33.33±5.77	33.33±4.44	44.45±3.85	62.67±2.31	30.00±10.00	38.89±5.56	51.28±4.45	66.67±2.31

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

		ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นรื้อยละ (%IE)							
ลำดับ	รานาเกลือ	<i>C. capsici</i> DOAC 1511				<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782			
		PDA		PDA/SW _{30 ppt}		PDA		PDA/SW _{30 ppt}	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
51	SSPB4319	23.33±5.57	55.56±0.00	46.67±0.00	68.00±0.00	43.33±5.77	51.85±3.21	48.72±4.45	72.22±1.92
52	SSPB4320	33.33±5.77	38.46±0.00	51.00±3.75	65.33±2.31	43.33±5.75	46.29±3.21	58.97±4.43	68.00±0.00
53	SSPB4321	30.00±0.00	55.56±0.00	40.00±0.00	60.00±0.00	36.67±5.77	57.41±3.20	35.90±4.44	61.11±1.92
54	SSPB4323	33.33±5.77	41.02±4.44	44.45±3.85	62.67±2.31	50.00±0.00	55.55±0.00	48.15±3.21	64.59±1.81
55	SSPB4324	33.33±5.77	54.17±3.61	51.54±0.00	79.76±0.00	56.41±4.45	62.75±3.40	51.11±3.85	61.90±0.00
56	SSPB4325	36.67±5.77	48.72±0.00	47.85±3.92	60.22±2.37	50.00±8.33	68.63±3.13	64.71±5.88	77.01±1.99
57	SSPB4327	30.00±0.00	58.86±3.70	52.38±6.80	67.08±4.11	27.78±4.81	47.45±2.85	58.82±0.00	67.82±1.99
58	SSPB4328	26.67±5.77	55.56±0.00	46.67±0.00	64.00±0.00	36.67±5.77	55.56±5.56	41.02±4.44	72.22±1.92
59	SSPB4329	30.00±0.00	55.56±0.00	53.00±0.00	68.00±0.71	40.00±0.00	55.56±0.00	38.46±0.00	67.67±0.00
60	SSPB4332	30.00±0.00	55.56±0.00	40.00±0.00	64.00±0.00	50.00±0.00	61.11±0.00	38.46±0.00	66.67±0.00

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis

ตารางที่ 4-5 จำนวนรานาเกลื้อที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่ระดับ %IE ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงร่วมกัน (Dual culture) เป็นเวลา 3 และ 5 วัน

ราสาเหตุโรคพืช	อาหาร	ระยะ เวลาที่ เลี้ยงรา ร่วมกัน	จำนวนรานาเกลื้อที่แสดงประสิทธิภาพ ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่ระดับต่าง ๆ				
			%IE	%IE	%IE	%IE	รวม
			<35	35-<50	50-<70	≥70	
<i>C. capsici</i>	PDA	3 วัน	28	7	4	0	39
		5 วัน	12	12	16	0	40
DOAC 1511	PDA/SW ₃₀ ppt	3 วัน	13	17	10	0	40
		5 วัน	3	7	25	7	42
<i>C. gloeosporioides</i>	PDA	3 วัน	29	11	11	0	51
		5 วัน	13	13	25	0	51
DOAC 0782	PDA/SW ₃₀ ppt	3 วัน	25	10	14	2	51
		5 วัน	4	9	28	5	46

หมายเหตุ รานาเกลื้อที่ใช้ทดสอบมีทั้งหมด 60 สายพันธุ์

ตารางที่ 4-6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นรื้อยละ (%IE) ของสารสกัดจากรานาเกลื้อในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลื้อ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ ของสารสกัดเป็นรื้อยละ	
			<i>C. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
			DOAC 1511	DOAC 0782
1	SSCS0031	PDB	6.67±11.55	23.33±5.77
		PDB/SW ₃₀ ppt	13.33±11.55	36.67±5.77
2	SSCR0044	PDB	16.67±5.77	16.67±5.77
		PDB/SW ₃₀ ppt	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 4-6 (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ ของสารสกัดเป็นร้อยละ	
			<i>C. capsici</i> DOAC 1511	<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782
3	SSCS0069	PDB	66.67±5.77	50.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	53.33±5.77	66.67±5.77
4	SSCS0070	PDB	23.33±5.77	10.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	30.00±0.00	26.67±5.77
5	SSCR0088	PDB	33.33±5.77	-
		PDB/SW _{30 ppt}	13.33+11.55	10.00±0.00
6	SSCS0106	PDB	40.00±10.00	70.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	-	-
7	SSCS0115	PDB	50.00±0.00	80.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	40.00±0.00	56.67±5.77
8	SSCR0501	PDB	-	-
		PDB/SW _{30 ppt}	-	-
9	SSCR0502	PDB	13.33±5.77	23.33±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	10.00±10.00	2.00±0.00
10	SSCR0503	PDB	-	16.67±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	13.33±5.77	-
11	SSCR0506	PDB	-	-
		PDB/SW _{30 ppt}	-	20.00±0.00
12	SSCR0507	PDB	-	-
		PDB/SW _{30 ppt}	-	-
13	SSPB1105	PDB	36.67±5.77	33.33±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	33.33±5.77	40.00±0.00

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 4-6 (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ ของสารสกัดเป็นร้อยละ	
			<i>C. capsici</i> DOAC 1511	<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782
14	SSPB1110	PDB	26.67±5.77	40.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	30.00±17.32	36.67±5.77
15	SSPB1117	PDB	56.67±5.77	40.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	23.33±5.77	30.00±0.00
16	SSPB1122	PDB	60.00±0.00	33.33±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	23.33±11.55	40.00±0.00
17	SSPB1130	PDB	-	3.33±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	-	10.00±0.00
18	SSPB1209	PDB	30.00±0.00	30.00±10.00
		PDB/SW _{30 ppt}	-	10.00±0.00
19	SSPB1210	PDB	6.67±5.77	30.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	20.00±0.00	-
20	SSPB1211	PDB	-	-
		PDB/SW _{30 ppt}	-	33.33±5.77
21	SSPB1212	PDB	-	10.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	-	10.00±0.00
22	SSPB1218	PDB	3.33±5.77	-
		PDB/SW _{30 ppt}	50.00±10.00	20.00±0.00
23	SSPB1312	PDB	13.33±5.77	6.67±15.55
		PDB/SW _{30 ppt}	-	16.66±5.58
24	SSPB2202	PDB	-	-
		PDB/SW _{30 ppt}	-	20.00±0.00

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 4-6 (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ ของสารสกัดเป็นร้อยละ	
			<i>C. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
			DOAC 1511	DOAC 0782
25	SSPB2210	PDB	-	13.33±5.58
		PDB/SW _{30 ppt}	-	-
26	SSPB3114	PDB	10.00±0.00	50.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	6.67±5.77	-
27	SSPB3124	PDB	46.67±5.77	80.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	80.00±0.00	63.33±5.77
28	SSPB3208	PDB	60.00±10.00	73.33±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	56.67±5.77	63.33±5.77
29	SSPB3301	PDB	-	-
		PDB/SW _{30 ppt}	30.00±0.00	10.00±0.00
30	SSPB4107	PDB	70.00±0.00	60.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	63.33±5.77	46.67±5.77
31	SSPB4108	PDB	10.00±17.31	-
		PDB/SW _{30 ppt}	13.33±23.09	-
32	SSPB4207	PDB	50.00±0.00	50.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	76.67±5.77	70.00±0.00
33	SSPB4208	PDB	46.67±5.77	50.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	63.33±5.77	63.33±5.77
34	SSPB4215	PDB	63.33±5.77	53.33±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	70.00±0.00	50.00±0.00
35	SSPB4217	PDB	53.33±5.77	50.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	63.33±5.77	60.00±0.00

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 4-6 (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ ของสารสกัดเป็นร้อยละ	
			<i>C. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
			DOAC 1511	DOAC 0782
36	SSPB4225	PDB	26.67±5.77	30.00±10.00
		PDB/SW _{30 ppt}	60.00±0.00	70.00±0.00
37	SSPB4307	PDB	36.67±5.77	50.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	23.33±11.55	50.00±0.00
38	SSPB4308	PDB	66.67±5.77	56.67±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	40.00±0.00	40.00±0.00
39	SSPB4309	PDB	13.33±5.77	20.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	46.67±11.55	56.67±5.77
40	SSPB4313	PDB	-	40.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	60.00±0.00	53.33±5.77
41	SSPB4319	PDB	53.33±5.77	53.33±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	30.00±0.00	40.00±0.00
42	SSPB4320	PDB	30.00±10.00	36.67±0.57
		PDB/SW _{30 ppt}	46.67±5.77	50.00±0.00
43	SSPB4321	PDB	20.00±0.00	43.33±0.57
		PDB/SW _{30 ppt}	40.00±0.00	50.00±0.00
44	SSPB4323	PDB	-	13.33±0.57
		PDB/SW _{30 ppt}	50.00±0.00	50.00±0.00
45	SSPB4324	PDB	16.67±5.77	30.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	70.00±0.00	76.67±5.77
46	SSPB4325	PDB	40.00±0.00	40.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	26.70±5.77	50.00±10.00

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 4-6 (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ ของสารสกัดเป็นร้อยละ	
			<i>C. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
			DOAC 1511	DOAC 0782
47	SSPB4327	PDB	36.67±5.77	56.67±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	60.00±0.00	56.67±5.77
48	SSPB4328	PDB	3.33±5.77	23.33±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	36.67±5.77	40.00±0.00
49	SSPB4329	PDB	70.00±0.00	53.33±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	36.67±5.77	40.00±0.00
50	SSPB4332	PDB	66.67±5.77	56.66±5.77
		PDB/SW _{30 ppt}	50.00±0.00	50.00±0.00

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 4-7 จำนวนสารสกัดจากรานาเกลือที่เลี้ยงในอาหาร PDB และ PDB/SW_{30 ppt} ในการยับยั้ง
ราสาเหตุโรคพืชที่ระดับ %IE ต่าง ๆ กัน

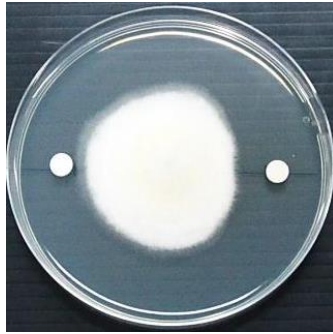
ระดับ	เกณฑ์ (%IE)	จำนวนสารสกัดจากรานาเกลือที่แสดง ประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช			
		<i>C. capsici</i>		<i>C. gloeosporioides</i>	
		DOAC 1511		DOAC 0782	
		PDB	PDB/SW _{30 ppt}	PDB	PDB/SW _{30 ppt}
Low antagonistic activity	<35	18	16	18	13
Moderate antagonistic activity	35 - <50	6	7	6	9
High antagonistic activity	50 - <70	12	11	13	16
Very high antagonistic activity	≥70	2	4	4	3

ตารางที่ 4-8 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นรื้อยละ (%IE) ของสารสกัดจากรานาเกลือ ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชในระดับดีมาก

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ ของสารสกัดเป็นรื้อยละ	
			<i>C. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
			DOAC 1511	DOAC 0782
1	SSCS0106	PDB	40.00±10.00	70.00±0.00
2	SSCS0115	PDB	50.00±0.00	80.00±0.00
3	SSPB3124	PDB	46.67±5.77	80.00±0.00
		PDB/SW _{30 ppt}	80.00±0.00	63.33±5.77
4	SSPB3208	PDB	60.00±10.00	73.33±5.77
5	SSPB4107	PDB	70.00±0.00	60.00±0.00
6	SSPB4207	PDB/SW _{30 ppt}	76.67±5.77	70.00±0.00
7	SSPB4215	PDB/SW _{30 ppt}	70.00±0.00	50.00±0.00
9	SSPB4225	PDB/SW _{30 ppt}	60.00±0.00	70.00±0.00
9	SSPB4324	PDB/SW _{30 ppt}	70.00±0.00	76.67±5.77
10	SSPB4329	PDB	70.00±0.00	53.33±5.77



ภาพที่ 4-4 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากอาหารเหลว PDB/SW_{30 ppt} เกลือรานาเกลือ SSPB4207 ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 โดยวิธี Disc diffusion; ดิสก์ซ้าย; ตัวควบคุมผลเชิงลบ (สารละลาย 50%DMSO) ดิสก์ขาว; ดิสก์สารสกัด



ภาพที่ 4-5 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากอาหารเหลว PDB/SW_{30 ppt} เลี้ยงรานาเกลือ SSPB4207 ในการยับยั้งราสาเหตุโรครพืช *C. gloeosporioides* DOAC 0782 โดยวิธี Disc diffusion; ดิสก์ซ้่าย; ตัวควบคุมผลเชิงลบ (สารละลาย 50%DMSO) ดิสก์ขาว; สารสกัด



ภาพที่ 4-6 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากอาหารเหลว PDB เลี้ยงรานาเกลือ SSPB3124 ในการยับยั้งราสาเหตุโรครพืช *C. capsici* DOAC 1511 โดยวิธี Disc diffusion; ดิสก์ซ้่าย; ตัวควบคุมผลเชิงลบ (สารละลาย 50%DMSO) ดิสก์ขาว; สารสกัด



ภาพที่ 4-7 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากอาหารเหลว PDB/SW_{30 ppt} เลี้ยงรานาเกลือ SSPB3124 ในการยับยั้งราสาเหตุโรครพืช *C. gloeosporioides* DOAC 0782 (%IE=80.00) โดยวิธี Disc diffusion; B: ดิสก์ซ้่าย; ตัวควบคุมผลเชิงลบ (สารละลาย 50%DMSO) ดิสก์ขาว; สารสกัด

4. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรณานาเกลือในการยับยั้งแบคทีเรียและ ยีสต์โดยวิธี *Disc diffusion*

เมื่อนำสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วยค่า %IE มากกว่าหรือเท่ากับ 50 จำนวน 40 สาร จากรณานาเกลือ 28 สายพันธุ์ ที่ มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยวิธี *Disc diffusion* พบว่าสารสกัด 39 สาร (97.5%) จากรณานาเกลือ 27 สายพันธุ์ (96.4%) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่ง ดังตารางที่ 4-9 แต่ทั้งนี้แต่ละสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแตกต่างกันไป โดยที่สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 25923 ด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสดีที่สุด คือ 24.0 และ 23.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัด 39 สาร (97.5%) และ 38 สาร (95.0%) มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 25923 ตามลำดับ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของสารสกัดมีค่อนข้างต่ำกว่าแบคทีเรียแกรมบวกค่อนข้างมาก (ดังตารางที่ 4-10)

ตารางที่ 4-9 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดจากรณานาเกลือ

ลำดับ	สารสกัด/ รณานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
			BC	SA	EC	PA	ST
1	SSCS0069	PDB	21.00±0.00	20.00±0.00	-	-	-
2	SSCS0069	PDB/SW _{30 ppt}	18.00±1.00	22.33±0.58	-	-	-
3	SSCS0106	PDB	19.00±1.00	14.00±0.00	-	-	-
4	SSCS0115	PDB	19.00±0.00	15.00±0.00	-	-	-
5	SSCS0115	PDB/SW _{30 ppt}	16.33±0.58	12.00±0.00	-	-	-
6	SSPB1117	PDB	17.00±0.00	18.00±0.00	-	-	8.00±0.00
7	SSPB1122	PDB	21.33±0.58	20.00±0.00	-	-	-
8	SSPB1218	PDB/SW _{30 ppt}	-	-	-	-	-
9	SSPB3114	PDB	12.00±0.00	-	-	-	-
10	SSPB3124	PDB	18.33±0.58	20.00±0.00	-	-	-
11	SSPB3124	PDB/SW _{30 ppt}	19.33±0.58	15.00±0.00	-	-	8.00±0.00

หมายเหตุ เชื้อทดสอบ; BC = *B. cereus* TISTR 008, SA = *S. aureus* ATCC 25923, EC = *E. coli* ATCC 25922, PA = *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ ST = *S. Typhimurium* ATCC 13311
- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

ตารางที่ 4-9 (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
			BC	SA	EC	PA	ST
12	SSPB3208	PDB	18.00±0.00	15.00±0.00	-	-	-
13	SSPB3208	PDB/SW _{30 ppt}	18.00±0.00	15.00±0.00	-	-	-
14	SSPB4107	PDB	23.00±0.00	22.00±0.00	-	-	-
15	SSPB4107	PDB/SW _{30 ppt}	21.00±0.00	18.00±0.00	-	-	-
16	SSPB4207	PDB	21.00±0.00	23.00±0.00	-	-	-
17	SSPB4207	PDB/SW _{30 ppt}	21.33±0.58	22.00±0.00	-	-/9*	-
18	SSPB4208	PDB	21.00±0.00	23.00±0.00	-	-	-
19	SSPB4208	PDB/SW _{30 ppt}	21.33±0.58	22.00±0.00	-	-/9*	-
20	SSPB4215	PDB	23.00±0.00	20.67±0.58	-	-	-
21	SSPB4215	PDB/SW _{30 ppt}	24.00±0.00	20.33±0.58	-	-	-
22	SSPB4217	PDB	20.33±0.58	19.00±0.00	-	-	-
23	SSPB4217	PDB/SW _{30 ppt}	22.33±0.58	22.00±0.00	-	-	-
24	SSPB4225	PDB/SW _{30 ppt}	21.00±0.00	21.33±0.58	-	9.00±0.00	-
25	SSPB4307	PDB	20.00±0.00	21.33±0.58	-	-	-
26	SSPB4307	PDB/SW _{30 ppt}	18.33±0.58	17.33±0.58	-	-	8.00±0.00
27	SSPB4308	PDB	22.00±0.00	21.00±0.00	-	-	-
28	SSPB4309	PDB/SW _{30 ppt}	20.00±0.00	18.67±0.58	-	-	8.00±0.00
29	SSPB4313	PDB/SW _{30 ppt}	21.00±0.00	18.00±0.00	-	-	-
30	SSPB4319	PDB	20.00±0.00	19.00±0.00	-	8.00±0.00	-
31	SSPB4320	PDB/SW _{30 ppt}	17.33±0.15	22.33±0.58	-	-	-
32	SSPB4321	PDB/SW _{30 ppt}	23.00±0.00	20.00±0.00	-	-	-

หมายเหตุ เชื้อทดสอบ; BC = *B. cereus* TISTR 008, SA = *S. aureus* ATCC 25923, EC = *E. coli* ATCC 25922, PA = *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ ST = *S. Typhimurium* ATCC 13311

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

* หมายถึง ผลการทดสอบบางครั้งไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

ตารางที่ 4-9 (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มาของ สารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง โชนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
			BC	SA	EC	PA	ST
33	SSPB4323	PDB/SW _{30 ppt}	19.33±0.58	18.00±0.00	-	-	7.67±0.58
34	SSPB4324	PDB/SW _{30 ppt}	21.00±0.00	22.33±0.58	-	-	-
35	SSPB4325	PDB/SW _{30 ppt}	18.33±0.58	17.67±0.58	-	-	-
36	SSPB4327	PDB	19.00±1.00	20.33±0.58	-	-	-
37	SSPB4327	PDB/SW _{30 ppt}	20.00±1.00	18.33±0.58	-	-	-
38	SSPB4329	PDB	21.00±0.00	22.33±0.58	-	-	-
39	SSPB4332	PDB	20.00±0.00	19.33±0.57	-	8.00±0.00	7.00±0.00
40	SSPB4332	PDB/SW _{30 ppt}	21.33±0.58	22.33±1.15	-	-	-
Ampicillin 10 ug/disc			9-10	27-30	17-19	22-22	20-24
Gentamicin 10 ug/disc			21-25	20-21	20-21	19-20	18-19

หมายเหตุ เชื้อทดสอบ; BC = *B. cereus* TISTR 008, SA = *S. aureus* ATCC 25923, EC = *E. coli* ATCC 25922, PA = *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ ST = *S. Typhimurium* ATCC 13311
 - หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

ตารางที่ 4-10 การเปรียบเทียบจำนวนสารสกัดและรานาเกลือในการยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียทดสอบ	จำนวนสารสกัดและรานาเกลือที่ยับยั้งแบคทีเรีย			
	สารสกัด		รานาเกลือ	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
<i>B. cereus</i> TISTR 008	39	97.5	27	96.4
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	38	95.0	26	92.9
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0.0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3-5	7.5-12.5	3-5	10.7-17.9
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	6	15.0	6	21.4

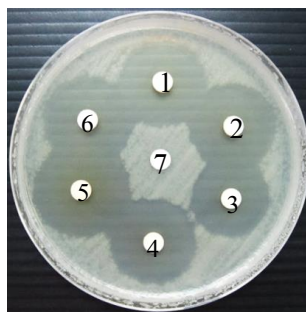
หมายเหตุ สารสกัดที่นำมาศึกษาทั้งหมด 40 สาร จากรานาเกลือทั้งหมด 28 สายพันธุ์

นอกจากชนิดแบคทีเรียทดสอบแล้วความเค็มของอาหารเหลวก็มีผลต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของรานาเกลื้อ ดังตารางที่ 4-11 ในภาพรวมจำนวนสารสกัดจากอาหารเหลว PDB และ PDB/SW_{30 ppt} ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกแตกต่างกันเล็กน้อย และโดยส่วนใหญ่ฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเหลว PDB และ PDB/SW_{30 ppt} จากรานาเกลื้อในการยับยั้งแบคทีเรียมีค่าไม่แตกต่างกัน พบสารสกัด PDB และ PDB/SW_{30 ppt} จากรานาเกลื้อ 3 สายพันธุ์ คือ SSPB4207, SSPB4215 และ SSPB4332 มีฤทธิ์ดีมาก สามารถยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 ด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส >20 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4-8)

ตารางที่ 4-11 จำนวนสารสกัดจากอาหาร PDB ที่ไม่มีและมีความเค็มที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียทดสอบ	จำนวนสารสกัดจากอาหารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย			
	PDB		PDB/SW _{30 ppt}	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
<i>B. cereus</i> TISTR 008	19	100.0	20	95.2
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	18	94.7	20	95.2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0.0	0	0.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2	10.5	1-3	4.8-14.3
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	2	10.5	4	19.0

หมายเหตุ สารสกัดที่นำมาศึกษาทั้งหมด 40 สาร (จากอาหาร PDA 19 สาร และ PDB/SW_{30 ppt} 21 สาร)



ภาพที่ 4-8 ฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลื้อที่ไม่มีและมีความเค็มในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 บนอาหาร MHA โดยวิธี Disc diffusion; 1: สารสกัด SSPB4207 (PDB), 2: สารสกัด SSPB4207 (PDB/SW_{30 ppt}), 3: สารสกัด SSPB4215 (PDB), 4: สารสกัด SSPB4215 (PDB/SW_{30 ppt}), 5: สารสกัด SSPB4332 (PDB), 6: สารสกัด SSPB4332 (PDB/SW_{30 ppt}), 7: ดิสก์ควบคุมผลเชิงลบ (สารละลาย 50%DMSO)

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งยีสต์ พบว่าสารสกัดจากรานาเกลือแต่ละสายพันธุ์มีฤทธิ์ในการยับยั้งยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์แตกต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์ทดสอบ ดังตารางที่ 4-12 ส่วนใหญ่สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ดีกว่ายีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 โดยที่เวลาในการวัดผล มีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งยีสต์ เมื่อวัดผลที่ 24 ชั่วโมง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งยีสต์ดีกว่า และมีผลทำให้จำนวนของสารสกัดที่ให้ผลบวกมากกว่าเปรียบเทียบกับกรวัดผลที่ 48 ชั่วโมง สารสกัดจากอาหารเหลว PDB เลี้ยงรานาเกลือ SSPB1122 และ SSPB1130 มีฤทธิ์ในการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ดีที่สุด ด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสเท่ากับคือ 19.00 มิลลิเมตร เมื่อวัดผลที่ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4-12 และ ภาพที่ 4-9, 4-10) สารสกัดจากอาหารเหลว PDB เลี้ยงรานาเกลือ SSCS0106 ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 ได้ดีที่สุดด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส 15.3 มิลลิเมตร สารสกัดจากรานาเกลือ SSPB3208 จากอาหารเหลว PDB และ PDB/SW_{30 ppt} เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อตรวจผลที่ 24 ชั่วโมงให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสยับยั้ง *C. albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028 ด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง 12.3, 10.3 และ 10.3, 10.0 มิลลิเมตรตามลำดับ ในบางการทดสอบกับยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 พบเชื้อเจริญบางส่วนโดยเฉพาะบริเวณขอบโซนการยับยั้ง จำนวนสารสกัดที่ให้ผลบวกกับยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028 ที่เวลาต่างกันสรุปไว้ในตารางที่ 4-13 สารสกัด 38 สาร (95.0%) จาก 40 สารสกัดเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 ในขณะที่สารสกัด 22 สาร (55.0%) มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 เมื่อวัดผลที่ 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4-12 ฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ของสารสกัดจากรานาเกลือ

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
			<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. albicans</i> ATCC 90028	
			24 ชม.	48 ชม.	24 ชม.	48 ชม.
1	SSCS0069	PDB	8.67±0.58	-	7.00*±0.00	-
2	SSCS0069	PDB/SW _{30 ppt}	10.00±0.00	-	8.33±0.58	8.00*±0.00
3	SSCS0106	PDB	15.33±0.58	13.33±0.58	15.33±0.58	13.33±0.58
4	SSCS0115	PDB	14.00±0.00	9.67±0.58	12.33±0.58	8.67±1.15

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

* หมายถึง โซนไม่ใส มีเชื้อขึ้นบางส่วน

ตารางที่ 4-12 (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
			<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. albicans</i> ATCC 90028	
			24 ชม.	48 ชม.	24 ชม.	48 ชม.
5	SSCS0115	PDB/SW _{30 ppt}	9.00±0.00	8.00*±0.00	-	-
6	SSPB1117	PDB	17.00±0.00	14.00±0.00	14.00±0.00	7.00±0.00
7	SSPB1122	PDB	19.00±0.00	15.00±0.00	13.00±0.00	9.00±0.00
8	SSPB1218	PDB/SW _{30 ppt}	-	-	-	-
9	SSPB3114	PDB	10.00±0.00	9.00*±0.00	9.00±0.00	8.00*±0.00
10	SSPB3124	PDB	12.33±0.58	9.33±0.58	-	-
11	SSPB3124	PDB/SW _{30 ppt}	13.00±0.00	10.00±0.00	13.00±0.00	10.00±0.00
12	SSPB3208	PDB	12.33±0.58	9.00±1.00	10.33±0.58	9.00*±0.00
13	SSPB3208	PDB/SW _{30 ppt}	10.33±0.58	8.33±0.58	10.00±0.00	9.00*±0.00
14	SSPB4107	PDB	9.00±0.00	8.00*±0.00	8.00*±0.00	-
15	SSPB4107	PDB/SW _{30 ppt}	-	-	-	-
16	SSPB4207	PDB	8.00*±0.00	-	-	-
17	SSPB4207	PDB/SW _{30 ppt}	10.67±0.58	9.00±0.00	9.33±0.58	8.00±0.00
18	SSPB4208	PDB	9.00*±0.00	-	-	-
19	SSPB4208	PDB/SW _{30 ppt}	10.00±0.00	8.00±0.00	8.00±0.00	7.00±0.00
20	SSPB4215	PDB	9.00±0.00	8.00*±0.00	-	-
21	SSPB4215	PDB/SW _{30 ppt}	9.00±0.00	8.00*±0.00	-	-
22	SSPB4217	PDB	9.00*±0.00	-	-	-
23	SSPB4217	PDB/SW _{30 ppt}	9.00±0.00	-	7.00*±0.00	-
24	SSPB4225	PDB/SW _{30 ppt}	10.33±0.58	7.33±0.58	9.00±1.00	7.00±0.00
25	SSPB4307	PDB	7.00*±0.00	-	-	-
26	SSPB4307	PDB/SW _{30 ppt}	8.00*±0.00	-	7.00*±0.00	-
27	SSPB4308	PDB	7.00±0.00	8.00*±0.00	8.00*±0.00	-
			8.00*±0.00			

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

* หมายถึง โซนไม่ใส มีเชื้อขึ้นบางส่วน

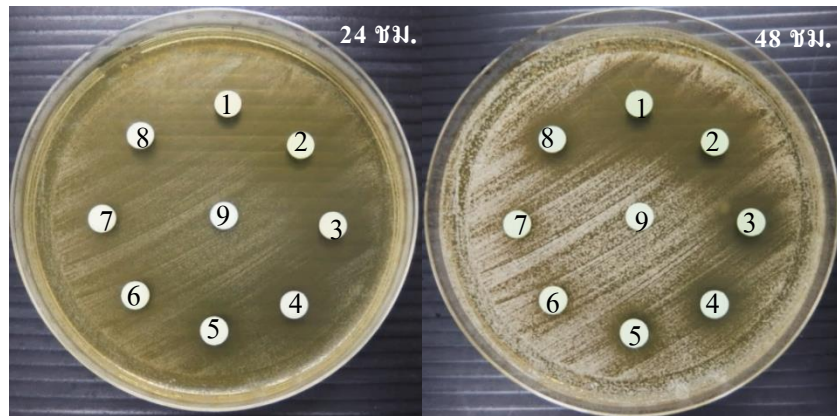
ตารางที่ 4-12 (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
			<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. albicans</i> ATCC 90028	
			24 ชม.	48 ชม.	24 ชม.	48 ชม.
28	SSPB4309	PDB/SW _{30 ppt}	9.67±0.58	8.00*±0.00	9.00*±0.00	-
29	SSPB4313	PDB/SW _{30 ppt}	9.00*±0.00	7.00*±0.00	9.00*±0.00	-
30	SSPB4319	PDB	8.00*±0.00	-	-	-
31	SSPB4320	PDB/SW _{30 ppt}	8.00*±0.00	-	-	-
32	SSPB4321	PDB/SW _{30 ppt}	11.00±0.00	9.00*±0.00	11.00±0.00	8.00*±0.00
			12.00*±0.00			
33	SSPB4323	PDB/SW _{30 ppt}	8.00*±0.00	-	-	-
34	SSPB4324	PDB/SW _{30 ppt}	15.00±0.00	12.33±0.58	13.00±0.00	10.00±0.00
35	SSPB4325	PDB/SW _{30 ppt}	8.00*±0.00	-	-	-
36	SSPB4327	PDB	7.00*±0.00	-	-	-
37	SSPB4327	PDB/SW _{30 ppt}	7.00*±0.00	-	-	-
38	SSPB4329	PDB	7.00*±0.00	-	-	-
39	SSPB4332	PDB	9.00*±0.00	7.00*±0.00	-	-
40	SSPB4332	PDB/SW _{30 ppt}	11.33±0.58	10.33±0.58	10.00±0.00	7.67±0.58
						9.00*±0.00
Fluconazol (25 µg/ Disc)			≥33-35	NT	≥30-31	NT

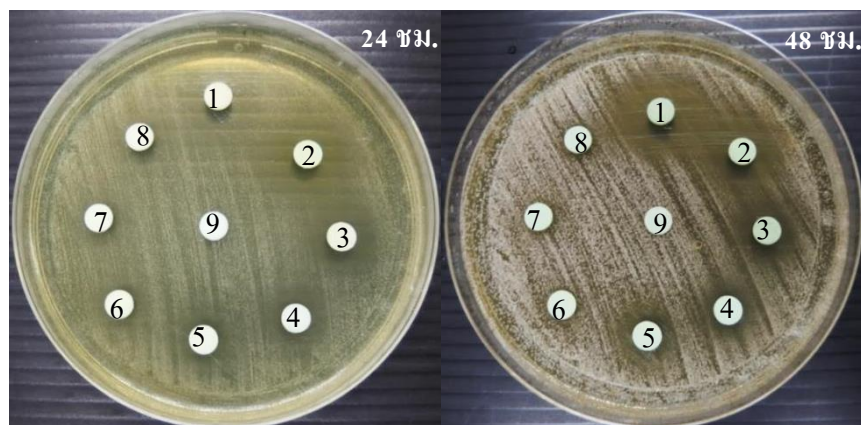
หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

* หมายถึง โซนไมใส มีเชื้อขึ้นบางส่วน

นอกจากเวลาแล้วความเค็มของอาหารเหลวเลี้ยงราก็มีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ของสารสกัดจากอาหารเหลว PDB และ PDB/SW_{30 ppt} มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ดีกว่า *C. albicans* ATCC 90028 สารสกัดจากอาหารเหลว PDB ที่มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 มีจำนวนมากกว่า PDB/SW_{30 ppt} ในการกลับกันสารสกัดจากอาหารเหลว PDB/SW_{30 ppt} มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 ได้มากกว่าสารสกัดจากอาหารเหลว PDB ดังตารางที่ 4-14



ภาพที่ 4-9ฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้ง *C. albicans* ATCC 10231 โดยวิธี Disc diffusion บนอาหาร MHA-GMB เมื่อบ่ม 24 ชั่วโมง (ซ้าย) และ 48 ชั่วโมง (ขวา); 1: สารสกัด SSPB1130 (PDB), 2: สารสกัด SSPB1130 (PDB/SW_{30 ppt}), 3: สารสกัด SSPB3208 (PDB), 4: สารสกัด SSPB3208 (PDB/SW_{30 ppt}), 5: สารสกัด SSPB4107 (PDB), 6: สารสกัด SSPB4107 (PDB/SW_{30 ppt}), 7: สารสกัด SSPB4225 (PDB), 8: สารสกัด SSPB4225 (PDB/SW_{30 ppt}), 9: ดิสก์ควบคุมผลเชิงลบ สารละลาย 50%DMSO



ภาพที่ 4-10ฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือ ในการยับยั้ง *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี Disc diffusion บนอาหาร MHA-GMB เมื่อบ่ม 24 ชั่วโมง (ซ้าย) และ 48 ชั่วโมง (ขวา); 1: สารสกัด SSPB1130 (PDB), 2: สารสกัด SSPB1130 (PDB/SW_{30 ppt}), 3: สารสกัด SSPB3208 (PDB), 4: สารสกัด SSPB3208 (PDB/SW_{30 ppt}), 5: สารสกัด SSPB4107 (PDB), 6: สารสกัด SSPB4107 (PDB/ SW_{30 ppt}), 7: สารสกัด SSPB4225 (PDB), 8: สารสกัด SSPB4225 (PDB/SW_{30 ppt}), 9: ดิสก์ควบคุมผลเชิงลบ สารละลาย 50%DMSO

ตารางที่ 4-13 จำนวนและร้อยละของสารสกัดและรานาเกลือที่มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ เมื่อวัดผลที่เวลาแตกต่างกัน

ยีสต์ทดสอบ	ระยะเวลาที่บ่ม	จำนวนในการยับยั้งยีสต์			
		สารสกัด		รานาเกลือ	
		จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	24 ชม.	38	95.0	27	96.4
	48 ชม.	24	57.5	18	64.3
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	24 ชม.	21	55.0	20	71.4
	48 ชม.	15	37.5	14	50.0

หมายเหตุ สารสกัดที่นำมาศึกษาทั้งหมด 40 สาร จากรานาเกลือทั้งหมด 28 สายพันธุ์

ตารางที่ 4-14 จำนวนและร้อยละสารสกัดจากอาหารเหลวที่ไม่มีและมีความเค็มในการยับยั้งยีสต์เมื่อวัดผลที่เวลาแตกต่างกัน

ยีสต์ทดสอบ	ระยะเวลาที่บ่ม	จำนวนในการยับยั้งยีสต์			
		PDB		PDB/SW _{30 ppt}	
		จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	24 ชม.	19	100	19	90.5
	48 ชม.	11	57.9	12	57.1
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	24 ชม.	9	47.4	13	61.9
	48 ชม.	6	31.6	9	42.8

หมายเหตุ สารสกัดที่นำมาศึกษาทั้งหมด 40 สาร (จากอาหาร PDA 19 สาร และ PDB/SW_{30 ppt} 21 สาร)

5. การเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งจุลินทรีย์

เมื่อคัดเลือกเฉพาะสารสกัดที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชระดับดีและดีมากตั้งแต่ร้อยละ 50 ขึ้นไป (%IE \geq 50) มาศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ โดยวิธี Disc diffusion เห็นความสอดคล้องระหว่างประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชกับฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ ระดับหนึ่งชัดเจนแตกต่างกันขึ้นกับชนิดจุลินทรีย์ทดสอบ (ตารางที่ 4-15) สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชในระดับดีและดีมาก มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบอย่างน้อย 3 ชนิดในระดับปานกลางขึ้นไป (Inhibition zone >10 มิลลิเมตร) สารสกัดที่น่าสนใจ

เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดี ตัวอย่างเช่น สารสกัด SSPB4207 (PDB/SW_{30 ppt}) และ SSPB4324 (PDB/SW_{30 ppt}) เป็นสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้งสองชนิดและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกในระดับดีมาก (Inhibition zone >20 มิลลิเมตร) และยังมีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ได้ในระดับปานกลาง (Inhibition zone >10-15 มิลลิเมตร) สารสกัด SSPB3124 (PDB), SSPB3124 (PDB/ SW_{30 ppt}), SSPB3208 (PDB), SSPB4107 (PDB), SSPB4215 (PDB/SW_{30 ppt}) และ SSPB4225 (PDB/SW_{30 ppt}) ยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 หรือ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ได้ในระดับดีถึงดีมากและยังยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ สารสกัด SSPB1122 (PDB) และ SSPB1130 (PDB) มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ในระดับดี ราที่สามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรีย แกรมบวกในอาหารที่ไม่มีและมีความเค็มคือ SSCS0069, SSPB4217 และ SSPB4332

6. การศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) และทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการทำลายจุลินทรีย์ (MLC)

6.1 MIC และ MLC ของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

นำสารสกัดจากอาหารเหลวที่ไม่มีและมีความเค็มจากรานาเกลือที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชในระดับดีมาก (%IE >70) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหรือยีสต์ตั้งแต่ระดับดีขึ้นไป มาหาค่า MIC และ MLC รวมทั้งหมด 18 สาร ดังตารางที่ 4-16 ค่า MIC และ MLC ของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชมีฤทธิ์แตกต่างกันขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด ชนิดราทดสอบและชนิดรานาเกลือ เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้นจาก 256 ถึง 2,048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชให้มีขนาดโคโลนีที่เล็กลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม จนถึงไม่พบการเจริญของรา สารสกัดจากอาหารเหลว PDB และ PDB/SW_{30 ppt} จากรา SSPB3208 และสารสกัดจากอาหารเหลว PDB/SW_{30 ppt} จากรา SSPB3124 สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 มีค่า MIC เท่ากันคือ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจำนวน 7 สาร มีค่า MIC ในการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 ได้ดีกว่า *C. gloeosporioides* DOAC 0782 สารสกัดจำนวน 2 สาร มีค่า MIC ในการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 ได้ดีกว่าหรือเท่ากับ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 และสารสกัด 9 สาร มีค่า MIC ในยับยั้งราทั้งสองชนิดเท่ากับ *C. capsici* DOAC 1511 เท่ากับ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ดังตารางที่ 4-16

ค่า MIC ของสารสกัดยังขึ้นกับความเค็มของอาหารเลี้ยงรานาเกลือที่นำมาสกัด ส่วนใหญ่สารสกัดจากอาหารที่มีความเค็มมีความสามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดีกว่าสารสกัดจากอาหารที่ไม่มีความเค็ม สารสกัดจากรานาเกลือ SSPB4207 และ SSPB4215 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร PDB/SW_{30 ppt}

ตารางที่ 4-15 การเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งจุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ

สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญ		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
		<i>C. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
		DOAC 1511	DOAC 0782	TISTR 121	ATCC 25923	ATCC 27853	ATCC 13311	ATCC 10231	ATCC 90028
SSCS0069	PDB	3+	3+	4+	3+	-	-	1+	1+
	PDB/SW _{30 ppt}	3+	3+	3+	4+	-	-	1+	1+
SSCS0106	PDB	2+	4+	3+	2+	-	-	3+	3+
SSCS0115	PDB	3+	4+	3+	2+	-	-	2+	2+
SSPB1122	PDB	3+	2+	4+	3+	-	-	3+	2+
SSPB1130	PDB	3+	1+	3+	3+	-	-	3+	2+
SSPB3124	PDB	2+	4+	3+	3+	-	-	1+	1+
	PDB/SW _{30 ppt}	4+	3+	3+	3+	-	+	2+	2+

หมายเหตุ 4+ หรือ มีฤทธิ์ระดับดีมาก หมายถึง %IE \geq 70, Inhibition zone >20 mm
 3+ หรือ มีฤทธิ์ระดับดี หมายถึง %IE 50 - <70, Inhibition zone >15-20 mm
 2+ หรือ มีฤทธิ์ระดับปานกลาง หมายถึง %IE 35-<50, Inhibition zone >10-15 mm
 1+ หรือ มีฤทธิ์ระดับต่ำ หมายถึง <35, Inhibition zone >6-10 mm

ตารางที่ 4-15 (ต่อ)

สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญ		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง โชนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
		<i>C. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
		DOAC 1511	DOAC 0782	TISTR 121	ATCC 25923	ATCC 27853	ATCC 13311	ATCC 10231	ATCC 90028
SSPB3208	PDB	3+	4+	3+	2+	-	-	2+	1+
SSPB4107	PDB	4+	3+	4+	4+	-	-	1+	1+
SSPB4207	PDB	3+	3+	4+	4+	-	-	1+	-
	PDB/SW _{30 ppt}	4+	4+	4+	4+	1+	-	2+	1+
SSPB4208	PDB	2+	3+	4+	4+	1+	-	1+	-
SSPB4215	PDB	3+	3+	4+	4+	-	-	1+	-
	PDB/SW _{30 ppt}	4+	3+	4+	4+	-	-	1+	-
SSPB4217	PDB	3+	3+	4+	3+	-	-	1+	-
	PDB/SW _{30 ppt}	3+	3+	4+	4+	1+	-	2+	1+

หมายเหตุ 4+ หรือ มีฤทธิ์ระดับดีมาก หมายถึง %IE ≥ 70 , Inhibition zone >20 mm
 3+ หรือ มีฤทธิ์ระดับดี หมายถึง %IE 50 - <70, Inhibition zone >15-20 mm
 2+ หรือ มีฤทธิ์ระดับปานกลาง หมายถึง %IE 35-<50, Inhibition zone >10-15 mm
 1+ หรือ มีฤทธิ์ระดับต่ำ หมายถึง <35, Inhibition zone >6-10 mm

ตารางที่ 4-15 (ต่อ)

สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญ		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
		<i>C. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
		DOAC 1511	DOAC 0782	TISTR 121	ATCC 25923	ATCC 27853	ATCC 13311	ATCC 10231	ATCC 90028
SSPB4225	PDB/SW _{30 ppt}	3+	4+	4+	4+	1+	-	2+	1+
SSPB4324	PDB/SW _{30 ppt}	4+	4+	4+	4+	-	-	2+	2+
SSPB4329	PDB	4+	3+	4+	4+	-	-	+	-
SSPB4332	PDB	3+	3+	3+	3+	1+	1+	1+	-
	PDB/SW _{30 ppt}	3+	3+	4+	4+	-	-	2+	1+
Ampicillin (10 ug/disc)		NT	NT	1+,2+	4+	4+	4+	NT	NT
Gentamicin (10 ug/disc)		NT	NT	4+	3+,4+	3+	3+	NT	NT
Fluconazole (25 ug/disc)		NT	NT	NT	NT	NT	NT	4+	4+

หมายเหตุ 4+ หรือ มีฤทธิ์ระดับดีมาก หมายถึง %IE \geq 70, Inhibition zone >20 mm
 3+ หรือ มีฤทธิ์ระดับดี หมายถึง %IE 50 - <70, Inhibition zone >15-20 mm
 2+ หรือ มีฤทธิ์ระดับปานกลาง หมายถึง %IE 35-<50, Inhibition zone >10-15 mm
 1+ หรือ มีฤทธิ์ระดับต่ำ หมายถึง <35, Inhibition zone >6-10 mm
 NT หมายถึง Not test หรือ ไม่ได้ทดสอบ

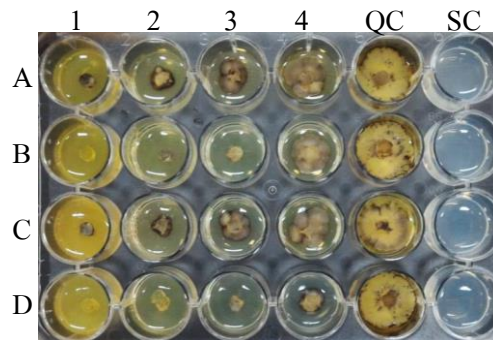
ตารางที่ 4-16 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ราสาเหตุโรคพืช เมื่อเลี้ยง
 ราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 และ 5 วัน

รاناเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)			
		<i>C. capsici</i> DOAC 1511		<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
SSCS0069	PDB	512	1,024	1,024	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	2,048	>2,048	>2,048	>2,048
SSPB1122	PDB	1,024	2,048	2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	512	1,024	2,048	>2,048
SSPB3124	PDB	1,024	2,048	1,024	2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	512	1,024	512	1,024
SSPB3208	PDB	512	1,024	512	512
	PDB/SW _{30 ppt}	512	1,024	512	512
SSPB4207	PDB	2,048	>2,048	2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	512-1,024*	2,048	1,024	>2,048
SSPB4215	PDB	2,048	>2,048	2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	512	1,024	1,024	1,024
SSPB4217	PDB	2,048	>2,048	>2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	1,024	>2,048	>2,048	>2,048
SSPB4225	PDB	>2,048	>2,048	>2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	2,048	2,048	2,048->2,048*	>2,048
SSPB4332	PDB	2,048->2,048*	>2,048	2,048->2,048*	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	2,048->2,048*	>2,048	2,048->2,048*	>2,048

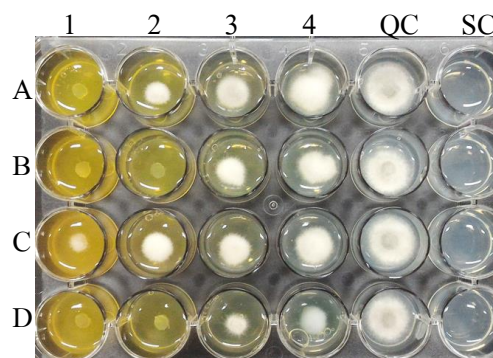
หมายเหตุ * หมายถึง ค่า MIC ของผลการทดสอบ 2 ซ้ำ

สามารถยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วยค่า MIC เท่ากันคือ 512 และ 1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเลี้ยงด้วย PDB สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ต่ำกว่าในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้งสองชนิดคือมีค่า MIC เท่ากันเท่ากับ 2,048 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

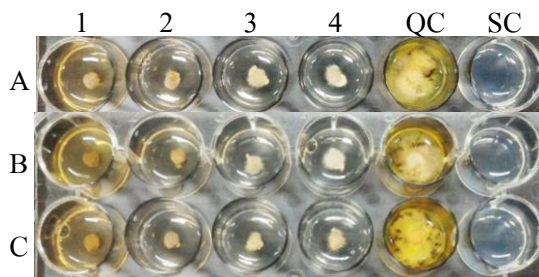
(ภาพที่ 4-11 และ 4-12) อย่างไรก็ตามสารสกัดจากอาหารเหลว PDB และ PDB/SW_{30 ppt} จากรา SSPB3208 และสารสกัดจากอาหารเหลว PDB/SW_{30 ppt} จากรา SSPB3124 มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดสามารถยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วยค่า MIC เท่ากันคือ 512 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-13 และ 4-14)



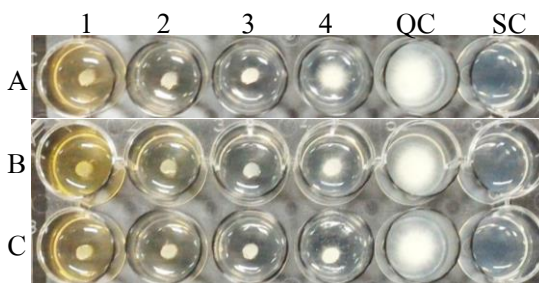
ภาพที่ 4-11 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลุมที่ 1-4 ตามลำดับ) โดยวิธี Agar dilution; A1-4: สารสกัด SSPB4207 (PDB), B1-4: SSPB4207 (PDB/SW_{30 ppt}), C1-4: SSPB4215 (PDB), D1-4: SSPB4215 (PDB/SW_{30 ppt}), QC: Quality control, SC: Sterility control



ภาพที่ 4-12 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี Agar dilution; A1-4: SSPB4207 (PDB), B1-4: SSPB4207 (PDB/SW_{30 ppt}), C1-4: SSPB4215 (PDB), D1-4: SSPB4215 (PDB/SW_{30 ppt}), QC: Quality control, SC: Sterility control



ภาพที่ 4-13 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราสาเหตุโรครากพืช *C. capsici* DOAC 1511 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลุมที่ 1-4 ตามลำดับ) โดยวิธี Agar dilution; เมื่อบ่ม 3 วัน A1-4: สารสกัด SSPB3124 (PDB/SW_{30 ppt}), B1-4: SSPB3208 (PDB), C1-4: SSPB3208 (PDB/SW_{30 ppt}), QC: Quality control, SC: Sterility control



ภาพที่ 4-14 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราสาเหตุโรครากพืช *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลุมที่ 1-4 ตามลำดับ) โดยวิธี Agar dilution; A1-4: สารสกัด SSPB3124 (PDB/SW_{30 ppt}), B1-4: SSPB3208 (PDB), C1-4: SSPB3208 (PDB/SW_{30 ppt}), QC: Quality control, SC: Sterility control

จากการทดสอบหาค่า MIC ของราสาเหตุโรครากพืช เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ชุดควบคุมผลเชิงลบ (สารละลาย 1%DMSO) พบราเจริญเต็มหลุมทดสอบ ในขณะที่การเจริญของราโรครากพืช มี 3 รูปแบบ คือ

1. ราเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้แต่ไม่เต็มหลุมทดสอบ
2. ราไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่เจริญบนชิ้นวุ้นเดิม
3. ไม่พบการเจริญของรา

ดังนั้นจึงบ่มต่ออีก 2 วัน เพื่อดูประสิทธิภาพการยับยั้งและลักษณะการเจริญของรา เมื่อบ่มรานาน 5 วัน พบลักษณะการเจริญของรา 2 ลักษณะ ลักษณะที่ 1 คือ ราไม่สามารถเจริญต่อได้ และลักษณะที่ 2 คือ ราสามารถเจริญต่อได้ ส่งผลให้เมื่อบ่มเชื่อนาน 5 วัน มีค่า MIC ที่สูงขึ้น ตัวอย่าง ลักษณะที่ 1 เช่น สารสกัดจากอาหารเหลว PDB และ PDB/SW_{30 ppt} จากรา SSPB3208 สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 เมื่อบ่ม 3 และ 5 วัน มีค่า MIC เท่ากัน คือ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และลักษณะที่ 2 เช่น สารสกัดจากอาหารเหลว PDB และ PDB/SW_{30 ppt} จากรา SSPB3208 และสารสกัดจากอาหารเหลว PDB/SW_{30 ppt} จากรา SSPB3124 เมื่อบ่ม 3 วัน สามารถยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 มีค่า MIC เท่ากันคือ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อบ่ม 5 วันพบว่า *C. capsici* DOAC 1511 สามารถเจริญต่อได้ ทำให้มีค่า MIC สูงขึ้น คือ 1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 4-15 และ 4-16

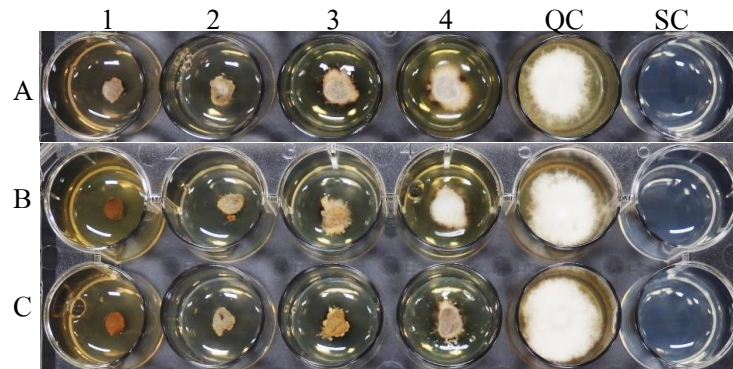
เมื่อนำชิ้นวุ้นราสาเหตุโรคพืชที่ผ่านการหาค่า MIC มาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA ที่ไม่มีสารสกัด เพื่อทดสอบความสามารถในการเจริญของราสาเหตุโรคพืช และอ่านค่า MLC พบราสาเหตุโรคพืชมีการเจริญแตกต่างกัน 3 รูปแบบ คือ

1. ราไม่สามารถเจริญต่อได้
2. ราสามารถเจริญได้ด้วยขนาดโคโลนีที่เล็กลง
3. ราสามารถเจริญได้ปกติ (เมื่อเทียบกับ Quality control)

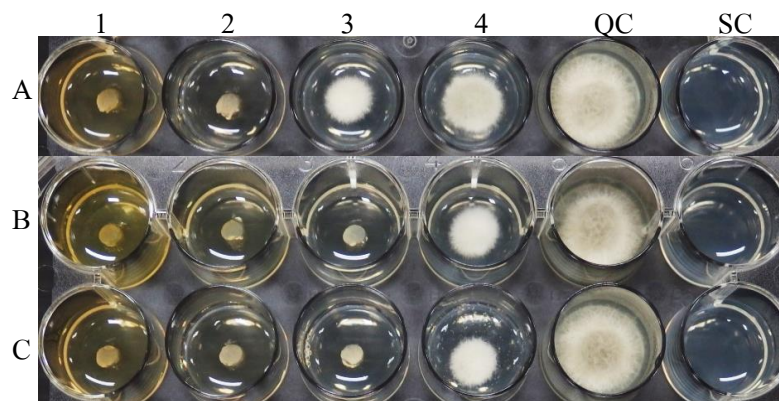
ทั้งนี้ราในรูปแบบที่ 1 ซึ่งไม่พบการเจริญจะถือว่าราถูกทำลาย และความเข้มข้นต่ำสุดของ สารสกัดนั้นถือเป็นค่า MLC ดังตารางที่ 4-17 ตัวอย่างรูปแบบที่ 1 และ 2 คือ สารสกัดจากอาหารเหลว PDB เลี้ยงรา SSPB3208 สามารถยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2,048 และ 1,024-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รูปแบบที่ 3 คือ สารสกัดจากอาหารเหลว PDB เลี้ยงรา SSPB3124 ที่ความเข้มข้น 1,024-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 (ภาพที่ 4-17 และ 4-18)

6.2 MIC และ MLC ของสารสกัดในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรีย

นำสารสกัดทั้ง 18 สาร ผ่านการหาค่า MIC ต่อราสาเหตุโรคพืช มาหาค่า MIC และ MLC ต่อแบคทีเรียพบว่าสารสกัดทั้งหมดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ มีค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 25923 ในช่วง 64-512 และ 128-1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4-18) โดยที่รานาเกลือส่วนใหญ่สร้างสารที่มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียได้ดีในอาหารที่มีความเค็มที่เหมาะสมแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของรานาเกลือ สารสกัดจากอาหาร PDB จากรานาเกลือ SSPB0069 และ SSPB4217 มีค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรียต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากอาหาร PDB/SW_{30 ppt} ในขณะที่



ภาพที่ 4-15 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลุมที่ 1-4 ตามลำดับ) โดยวิธี Agar dilution; เมื่อป่ม 5 วัน A1-4: สารสกัด SSPB3124 (PDB/SW_{30 ppt}), B1-4: SSPB3208 (PDB), C1-4: SSPB3208 (PDB/SW_{30 ppt}), QC: Quality control, SC: Sterility control



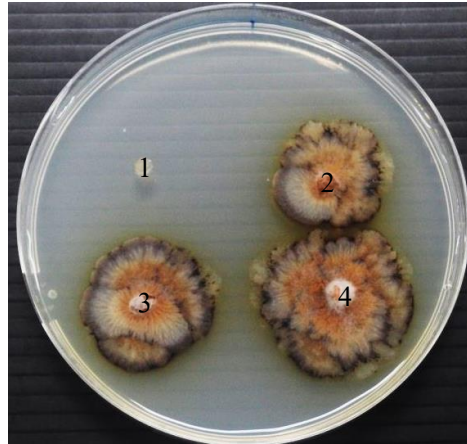
ภาพที่ 4-16 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลุมที่ 1-4 ตามลำดับ) โดยวิธี Agar dilution; เมื่อป่ม 5 วัน A1-4: สารสกัด SSPB3124 (PDB/SW_{30 ppt}), B1-4: SSPB3208 (PDB), C1-4: SSPB3208 (PDB/SW_{30 ppt}), QC: Quality control, SC: Sterility control

ตารางที่ 4-17 MLC ของสารสกัดที่ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช บนอาหาร PDA

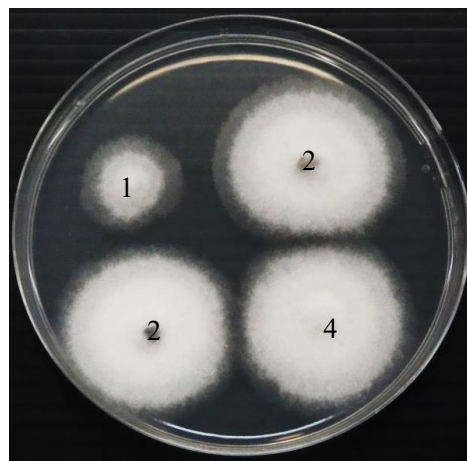
สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	MLC (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)	
		<i>C. capsici</i> DOAC 1511	<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782
SSCS0069	PDB	>2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	>2,048	>2,048
SSPB1122	PDB	>2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	>2,048	>2,048
SSPB3124	PDB	>2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	>2,048	1,024-2,048*
SSPB3208	PDB	2,048->2,048*	512-1,024*
	PDB/SW _{30 ppt}	>2,048	1,024-2,048*
SSPB4207	PDB	>2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	>2,048	>2,048
SSPB4215	PDB	>2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	>2,048	1,024
SSPB4217	PDB	>2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	>2,048	>2,048
SSPB4225	PDB	>2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	>2,048	2,048
SSPB4332	PDB	>2,048	>2,048
	PDB/SW _{30 ppt}	>2,048	>2,048

หมายเหตุ * หมายถึง ค่า MLC ของผลการทดสอบ 2 ซ้ำ

สารสกัดจากอาหาร PDB/SW_{30 ppt} จากรานาเกลือ SSPB4215 และ SSPB4332 มีค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรียต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากอาหาร PDB แต่ทั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดจากรานาเกลือ SSPB4207 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวทั้งสองความเค็มมีค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรียไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 4-17 รูปแบบการเจริญของราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 บนอาหาร PDA หลังผ่านการยับยั้งโดยสารสกัด SSPB3208 (PDB) ในขั้นตอนการหาค่า MIC หลังบ่ม 5 วัน; 1: รูปแบบที่ 1 ราไม่สามารถเจริญได้ หลังสัมผัสกับสารสกัดที่มีความเข้มข้น 2,048, ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 2-4: รูปแบบที่ 2 ราสามารถเจริญได้ด้วยขนาดโคโลนีที่เล็กลง หลังสัมผัสกับสารสกัดที่มีความเข้มข้น 1,024, 512 และ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4-18 รูปแบบการเจริญของราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides* DOAC 0782 บนอาหาร PDA หลังผ่านการยับยั้งโดยสารสกัด SSPB3124 (PDB) ในขั้นตอนการหาค่า MIC หลังบ่ม 5 วัน; 1: รูปแบบที่ 2 ราสามารถเจริญได้ด้วยขนาดโคโลนีที่เล็กลง หลังสัมผัสกับสารสกัดที่มีความเข้มข้น 2,048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ, 2-4: รูปแบบที่ 3 ราสามารถเจริญได้ปกติ หลังสัมผัสกับสารสกัดที่มีความเข้มข้น 1,024, 512 และ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารสกัดจากอาหาร PDB เลียงรา SSCS0069, SSPB3208, SSPB4217 และสารสกัดจากอาหาร PDB/SW_{30 ppt} เลียงรา SSPB4215, SSPB4225 ยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 ด้วยค่า MIC ต่ำที่สุดเท่ากัน 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-19) และมีค่า MLC อยู่ในช่วง 64-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดทั้งหมดนี้ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีรองลงมา มีค่า MIC ต่ำที่สุดเท่ากัน คือ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MLC อยู่ในช่วง 512-1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดมีฤทธิ์ค่อนข้างต่ำในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่มีค่า MIC $\geq 1,024$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด SSPB1122 (PDB) ที่มีค่า MIC และ MLC ดีที่สุดในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 3 ชนิด คือ มีค่า MIC และ MLC ในการยับยั้งและทำลาย *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 เท่ากันคือ 1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4-18)

6.3 MIC และ MLC ของสารสกัดในการยับยั้งและทำลายยีสต์

เมื่อนำสารสกัดทั้งหมด 18 สาร ที่ทดสอบหาค่า MIC ที่มีต่อราสาเหตุโรคพืช มาหาค่า MIC และ MLC ต่อยีสต์ พบว่าสารสกัดมีค่า MIC และ MLC กับ *C. albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028 เมื่อตรวจผลที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน คือ 512->1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4-19) โดยที่รูปแบบของสารสกัดในการยับยั้งยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์พบ 2 ลักษณะ คือ ลักษณะที่ 1 สารสกัดมีประสิทธิภาพการยับยั้ง *C. albicans* ATCC 10231 ได้ดีกว่า *C. albicans* ATCC 90028 ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากอาหารเหลว PDB และ PDB/SW_{30 ppt} เลียงรานาเกลือ SSPB0069 และสารสกัดจากอาหารเหลว PDB/SW_{30 ppt} เลียงรานาเกลือ SSPB4207 ค่า MIC ของสารสกัดเมื่อตรวจผลที่ 24 ชั่วโมง ในการยับยั้ง *C. albicans* ATCC 10231 ต่ำกว่า *C. albicans* ATCC 90028 มีค่า MIC คือ 512 และ 1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ลักษณะที่ 2 สารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน สารสกัดจากอาหารเหลว PDB เลียงรานาเกลือ SSPB4217 และสารสกัดจากอาหารเหลว PDB/SW_{30 ppt} เลียงรานาเกลือ SSPB4215 และ SSPB4225 เมื่อตรวจผลที่ 24 ชั่วโมง มีค่า MIC ในการยับยั้งยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์เท่ากัน คือ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรณีการทำลายยีสต์ของสารสกัดพบรูปแบบการทำลาย 2 ลักษณะนี้เช่นกัน นอกจากชนิดของยีสต์ทดสอบแล้วประสิทธิภาพของสารสกัดยังขึ้นกับความเค็มอาหารเหลวและเวลาในการตรวจผล โดยที่สารสกัดจากรานาเกลือ SSPB4215 และ SSPB4225 ที่เลี้ยงด้วย PDB/SW_{30 ppt} มีค่า MIC ในการยับยั้งยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ต่ำกว่าที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB สารสกัดยับยั้งหรือทำลายยีสต์ทดสอบได้ดีที่ 24 ชั่วโมง และมีประสิทธิภาพลดลงเมื่อตรวจผลที่ 48 ชั่วโมง สารสกัด PDB/SW_{30 ppt} จากรา SSPB4215 มีค่า MIC ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 ได้ดีที่สุดในที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ค่า MIC ไม่แตกต่างกันคือเท่ากับ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-20) และมีค่า MLC ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 512 และ 1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

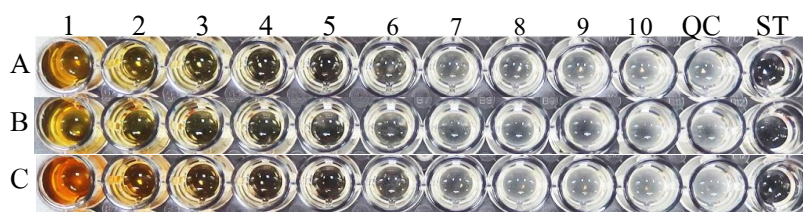
ตารางที่ 4-18 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) และทำลาย (MLC) แบคทีเรีย

สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. Typhimurium</i>	
		TISTR 008		ATCC 25923		ATCC 25922		ATCC 27853		ATCC 13311	
		MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
		(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
SSCS0069	PDB	64	128	128	512	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	128	128	256	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
SSPB1122	PDB	512	512	512	1,024	1,024	>1,024	1,024	1,024	1,024	1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	256	256	256	512	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
SSPB3124	PDB	128	512	512	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	64	128	128	256	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
SSPB3208	PDB	64	64	64*-128	128	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	64	256	128*-256	128	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
SSPB4207	PDB	128	128	256	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	128	128	256	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024

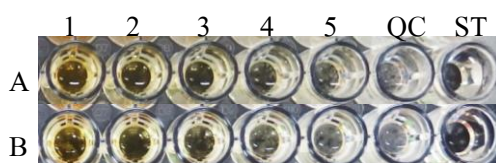
หมายเหตุ * หมายถึง ค่า MIC หรือ MLC ของผลการทดสอบ 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 4-18 (ต่อ)

สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มาของ สารสกัด	<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. Typhimurium</i>	
		TISTR 008		ATCC 25923		ATCC 25922		ATCC 27853		ATCC 13311	
		MIC (µg/mL)	MLC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MLC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MLC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MLC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MLC (µg/mL)
SSPB4215	PDB	256	256	256	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	64	64	128	512	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	1,024	>1,024
SSPB4217	PDB	64	128	128	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	128	128	256	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
SSPB4225	PDB	256	512	512	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	64	64	128	512	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
SSPB4332	PDB	512	512	512	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	128	256	256	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
	Gentamicin	0.25	0.5	0.25,1	0.5,1	1	2	0.5	2	0.25	0.5
	Ampicillin	8,4	4	0.5-2	0.5	2	4	>8	>8	0.25	0.25



ภาพที่ 4-19 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของแบคทีเรีย *B. cereus* TISTR 008 โดยวิธี Broth microdilution ที่ความเข้มข้น 1,024-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลุมที่ 1-10); A1-10: SSCS0069 (PDB), B1-10: SSPB4215 (PDB/SW_{30 ppt}), C1-10: SSPB4225 (PDB/SW_{30 ppt}), QC: Quality control, ST: Sterility control



ภาพที่ 4-20 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี Broth microdilution ที่ความเข้มข้น 1,024-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลุมที่ 1-5) ตามลำดับ ; A1-5: SSPB4215 (PDB/SW_{30 ppt}) ที่เวลา 24 ชั่วโมง, B1-5: ที่เวลา 48 ชั่วโมง, QC: Quality control, ST: Sterility control

7. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากราโดยวิธี Thin layer chromatography

สารสกัดที่นำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Thin layer chromatography เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 18 สารสกัด พบจำนวนสารองค์ประกอบ 3-8 สารที่มีความเข้มข้นและสีของสารองค์ประกอบในสารสกัดจากอาหาร PDA และ PDB/SW_{30 ppt} แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4-20 (ภาพที่ 4-21 และ 4-22) เมื่อเปรียบเทียบค่า R_f ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหาร PDA และ PDB/SW_{30 ppt} เลียงราชนิดเดียวกัน พบว่าส่วนใหญ่ค่า R_f ของสารมีทั้งเหมือนกันและแตกต่างกัน ในทศนิยมตำแหน่งสุดท้ายด้วยค่า R_f ใกล้เคียงกัน ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจเป็นสารเดียวกัน ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากอาหาร PDB เลียงรา SSPB1122 พบสารองค์ประกอบ 3 สาร มีค่า R_f เท่ากับ 0.58, 0.60 และ 0.67 ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจาก PDB/SW_{30 ppt} พบจำนวนสารองค์ประกอบมากที่สุดคือ 8 สาร มีค่า R_f เท่ากับ 0.56, 0.61, 0.64, 0.68, 0.70, 0.71, 0.74 และ 0.79 ตามลำดับ โดยสารองค์ประกอบ R_f 0.60 และ 0.67 จากสารสกัด PDB อาจเป็นสารเดียวกับ R_f 0.61 และ 0.68 จากสารสกัด PDB/SW_{30 ppt}

ตารางที่ 4-19 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) และทำลาย (MLC) ยีสต์

สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	<i>C. albicans</i> ATCC 10231				<i>C. albicans</i> ATCC 90028			
		บ่ม 24 ชม.		บ่ม 48 ชม.		บ่ม 24 ชม.		บ่ม 48 ชม.	
		MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
		($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
SSCS0069	PDB	512	1,024	512	1,024	1,024	1,024	1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	512	>1,024	512	>1,024	1,024	>1,024	1,024	>1,024
SSPB1122	PDB	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	1,024	>1,024	>1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	1,024	1,024	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
SSPB3124	PDB	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
SSPB3208	PDB	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
SSPB4207	PDB	1,024	1,024	1,024	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
	PDB/SW _{30 ppt}	512	1,024	512	1,024	1,024	>1,024	>1,024	>1,024

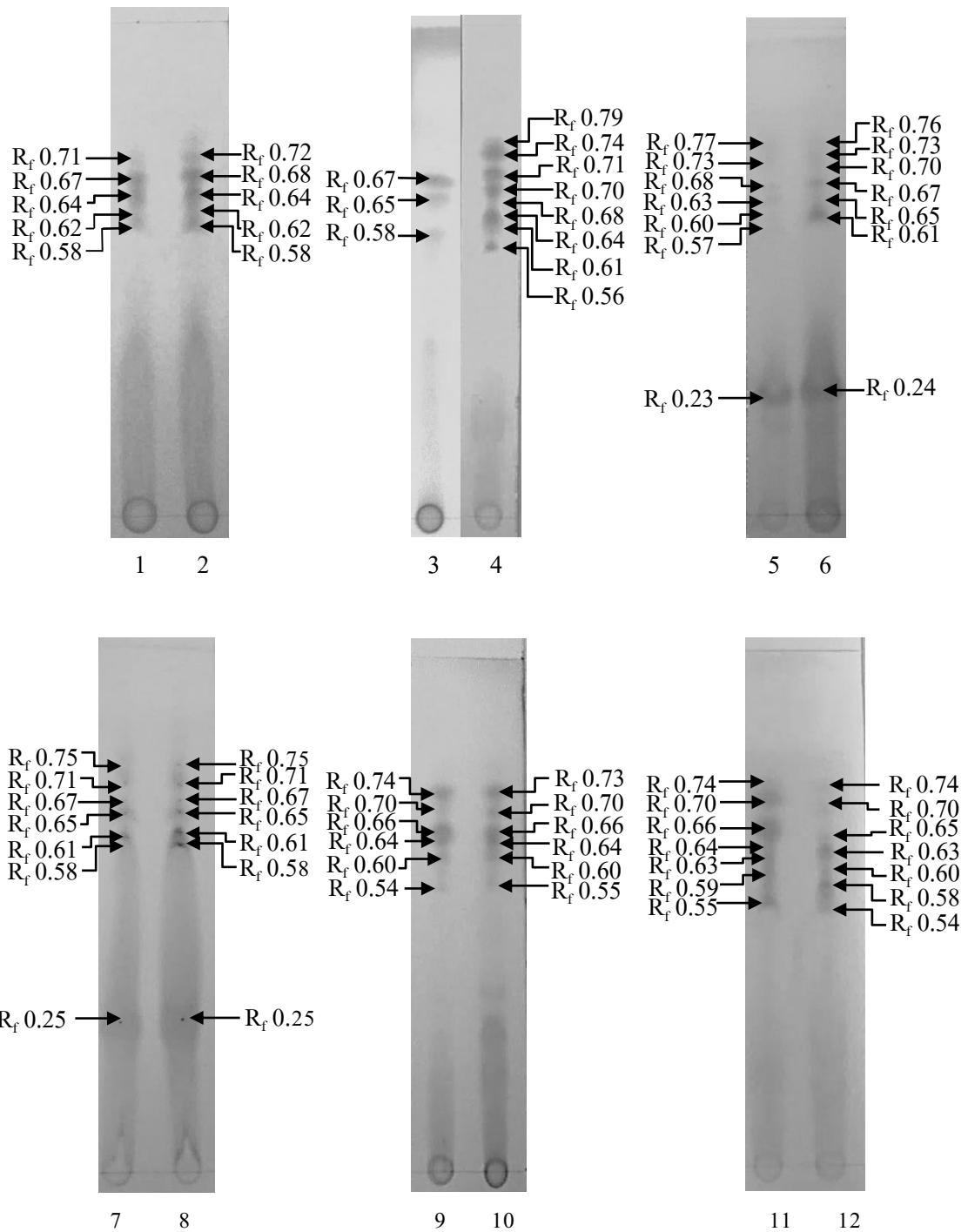
ตารางที่ 4-20 จำนวนองค์ประกอบและค่า R_f ของสารสกัด

สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	จำนวน สารองค์ประกอบ	R_f *
SSCS0069	PDB	5	0.58, 0.62, 0.64, 0.67, 0.71
	PDB/SW _{30 ppt}	5	0.58, 0.62, 0.64, 0.68, 0.72
SSPB1122	PDB	3	0.58, 0.60, 0.67
	PDB/SW _{30 ppt}	8	0.56, 0.61, 0.64, 0.68, 0.70, 0.71, 0.74, 0.79
SSPB3124	PDB	7	0.23, 0.57, 0.60, 0.63, 0.68, 0.73, 0.77
	PDB/SW _{30 ppt}	7	0.24, 0.61, 0.65, 0.67, 0.70, 0.73, 0.76
SSPB3208	PDB	7	0.25, 0.58, 0.61, 0.65, 0.67, 0.71, 0.75
	PDB/SW _{30 ppt}	7	0.25, 0.58, 0.61, 0.65, 0.67, 0.71, 0.75
SSPB4207	PDB	6	0.54, 0.60, 0.64, 0.66, 0.70, 0.74
	PDB/SW _{30 ppt}	6	0.55, 0.60, 0.64, 0.66, 0.70, 0.73
SSPB4215	PDB	7	0.55, 0.59, 0.63, 0.64, 0.66, 0.70, 0.74
	PDB/SW _{30 ppt}	7	0.54, 0.58, 0.60, 0.63, 0.65, 0.70, 0.74
SSPB4217	PDB	6	0.57, 0.61, 0.64, 0.66, 0.68, 0.72
	PDB/SW _{30 ppt}	7	0.57, 0.60, 0.64, 0.66, 0.67, 0.68, 0.74
SSPB4225	PDB	7	0.59, 0.63, 0.65, 0.66, 0.69, 0.71, 0.75
	PDB/SW _{30 ppt}	6	0.60, 0.63, 0.66, 0.69, 0.71, 0.76
SSPB4332	PDB	7	0.49, 0.53, 0.57, 0.61, 0.63, 0.68, 0.72
	PDB/SW _{30 ppt}	7	0.49, 0.53, 0.57, 0.61, 0.63, 0.68, 0.72

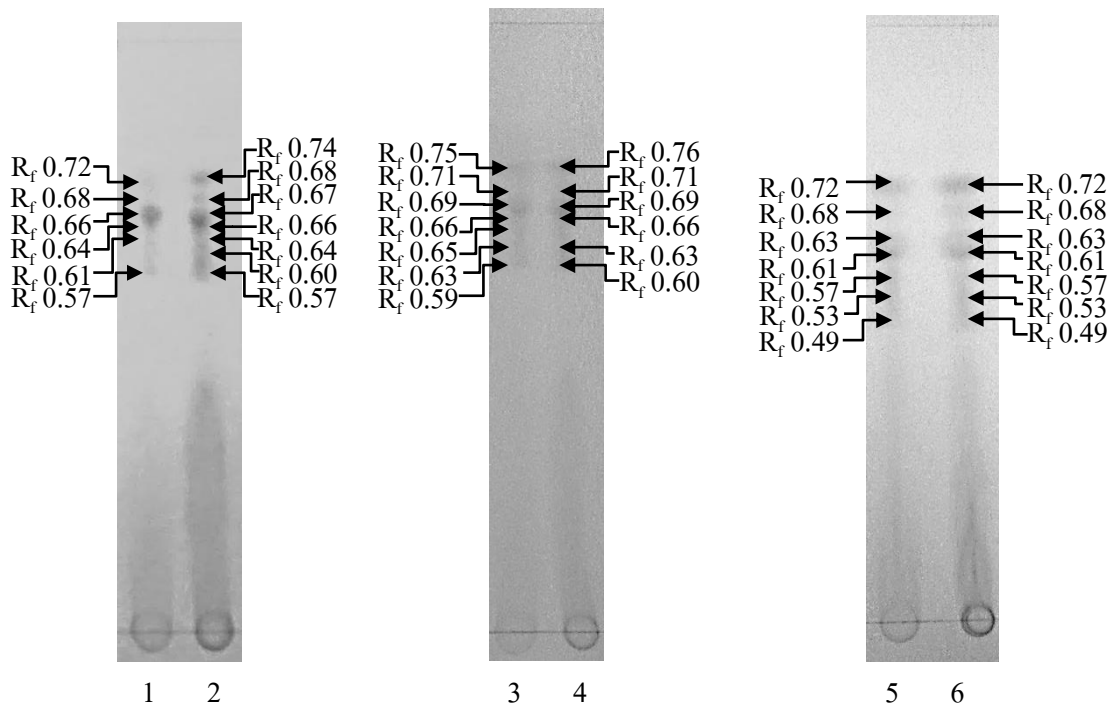
หมายเหตุ * ตัวทำละลาย Toluene: Methanol: Acetone, 6:1:3 v/v

8. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารองค์ประกอบจากสารสกัดโดยวิธี *Bioautography*

เมื่อนำสารสกัดจากอาหาร PDB ที่ไม่มีและมีความเค็ม 30 ppt จำนวน 6 สาร จากรานาเกลือ จำนวน 3 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ได้ดีได้แก่ ราที่สร้างสารได้ดีในอาหารที่ไม่มี ความเค็ม คือ SSCS0069 ราที่สร้างสารได้ดีในอาหารที่มีความเค็ม 30 ppt คือ SSPB1122 และราที่สร้าง สารได้ดีในอาหารที่ไม่มีและมีความเค็ม 30 ppt คือ SSPB3208 ที่ผ่านการแยกองค์ประกอบด้วย



ภาพที่ 4-21 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ โดยวิธี TLC; 1: SSCS0069 (PDB), 2: SSCS0069 (PDB/SW_{30 ppt}), 3: SSPB1122 (PDB), 4: SSPB1122 (PDB/SW_{30 ppt}), 5: SSPB3124 (PDB), 6: SSPB3124 (PDB/SW_{30 ppt}), 7: SSPB3208 (PDB), 8: SSPB3208 (PDB/SW_{30 ppt}), 9: SSPB4207 (PDB), 10: SSPB4207 (PDB/SW_{30 ppt}), 11: SSPB4215 (PDB), 12: SSPB4215 (PDB/SW_{30 ppt})



ภาพที่ 4-22 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือโดยวิธี TLC; 1: SSPB4217 (PDB), 2: SSPB4217 (PDB/SW_{30 ppt}), 3: SSPB4225 (PDB), 4: SSPB4225 (PDB/SW_{30 ppt}), 5: SSPB4332 (PDB), 6: SSPB4332 (PDB/SW_{30 ppt})

วิธี TLC จนได้สารองค์ประกอบที่มีค่า R_f ต่าง ๆ กันมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Bioautography พบสารองค์ประกอบในแผ่นคัสท์ที่วางมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ดังตารางที่ 4-21 เมื่อสังเกตผลด้วยตาเปล่าพบสารองค์ประกอบยับยั้งจุลินทรีย์ได้ 3 ระดับ คือ 1+ มีฤทธิ์ในการยับยั้งต่ำ 2+ มีฤทธิ์ในการยับยั้งปานกลาง และ 3+ ยับยั้งดี มีฤทธิ์ในการยับยั้งดี สารองค์ประกอบจากสารสกัด PDB/SW_{30 ppt} เลี้ยงรา SSPB1122 จำนวน 5 สาร จาก 8 สาร R_f 0.61, 0.64, 0.68, 0.70 กับ 0.71 มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้งสองชนิด โดยที่สารองค์ประกอบยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 ได้ดี ในขณะที่ยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 เพียงระดับต่ำ-ปานกลาง สารองค์ประกอบทุกสารจากสารสกัด PDB ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้งสองชนิดในระดับต่ำ-ปานกลาง เท่านั้น สารองค์ประกอบ R_f 0.58 จากอาหาร PDB เลี้ยงรา SSPB3208 ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้งสองชนิดได้ดี และ R_f เดียวกันสารองค์ประกอบจากสารสกัด PDB/SW_{30 ppt} ยับยั้งได้ดี เฉพาะกับ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 เท่านั้นสารองค์ประกอบที่ R_f 0.65 จากอาหาร PDB และ PDB/ SW_{30 ppt} ยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ได้ในระดับดี ถึงปานกลาง และยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 ในระดับต่ำเท่านั้น สารองค์ประกอบจากสารสกัด จากรา SSCS0069 ไม่สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ (ภาพที่ 4-23 และ 4-24)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยวางแผ่น TLC ที่ผ่านการแยกสารองค์ประกอบ พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ เกิดโซนใสในบริเวณที่มีสารองค์ประกอบ (ภาพที่ 4-25, 4-26 และ 4-27) และเมื่อตัดแผ่น TLC บริเวณสารองค์ประกอบของสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พบสารองค์ประกอบมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 25923 เกิดเป็นโซนใส ดังตารางที่ 4-22 สารองค์ประกอบส่วนหนึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งในระดับดี (3+) กับแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 ตรงกับราสาเหตุโรคพืช เช่น สารองค์ประกอบ R_f 0.70 กับ 0.71 จากสารสกัดอาหาร PDB/SW_{30 ppt} เลียงรา SSPB1122 และสารองค์ประกอบที่ R_f 0.58 จากสารสกัดอาหาร PDB และ PDB/SW_{30 ppt} เลียงรา SSPB3208 ในขณะที่ทุกสารองค์ประกอบจากสารสกัดจากอาหาร PDB และ PDB/SW_{30 ppt} เลียงรา SSCS0069 ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช แต่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* TISTR 008 ได้ โดยสารองค์ประกอบ R_f 0.62 กับ 0.64 จากสารสกัดอาหาร PDB และ PDB/SW_{30 ppt} มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* TISTR 008 ได้ในระดับดี สำหรับการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 สารองค์ประกอบส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งในระดับต่ำเท่านั้น (ภาพที่ 4-28, 4-29, 4-30 และ 4-31)

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารองค์ประกอบที่ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีคือสารองค์ประกอบ R_f 0.58, 0.61 และ 0.65 จากสารสกัดอาหาร PDB และ PDB/SW_{30 ppt} เลียงรานาเกลือ SSPB3208 พบว่าสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหาร PDB มีฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่สารองค์ประกอบของสกัดส่วนใหญ่จากอาหาร PDB/SW_{30 ppt} ไม่ยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ดังตารางที่ 4-23 และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนสารองค์ประกอบที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (ตารางที่ 4-24) พบว่าจำนวนสารองค์ประกอบของสารสกัดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้มีฤทธิ์ยับยั้งแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และความเค็มของอาหารเลี้ยงร่าที่นำมาสกัดสาร สำหรับการยับยั้ง ยีสต์พบว่าสารองค์ประกอบของสารสกัดทั้งหมดไม่สามารถยับยั้งยีสต์ทดสอบ

9. การศึกษาความสามารถในการลดแรงตึงผิว

การศึกษาความสามารถของสารสกัดในการเป็นสารลดแรงตึงผิวเบื้องต้นโดยวิธี Parafilm M, Drop collapsing และ Oil displacement พบว่าสารสกัด 40 สาร (100%) แสดงความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิวเมื่อทดสอบด้วย Parafilm M ขณะที่เมื่อทดสอบโดยวิธี Oil displacement กับน้ำมันปาล์ม น้ำมันมะกอก และน้ำมันหมู ที่ผ่านการใช้แล้ว พบผลบวกเพียง 22 สาร (55.0%) กับน้ำมันมะกอก ไม่พบสารสกัดที่มีความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิวกับน้ำมันอื่น ๆ และการทดสอบโดยวิธี Drop collapsing (ตารางที่ 4-25)

ตารางที่ 4-21 ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วยสารองค์ประกอบของสกัดจากรานาเกลือโดยวิธี
Bioautography

สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	R _f *	ระดับความสามารถในการยับยั้ง	
			<i>C. capsici</i> DOAC 1511	<i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782
SSPB1122		0.58	2+	1+
	PDB	0.60	2+	2+
		0.67	2+	1+
		0.56	2+	-
	PDB/SW _{30 ppt}	0.61	3+	1+
		0.64	3+	1+
		0.68	3+	1+
		0.70 กับ 0.71	3+	2+
		0.74	3+	-
		0.79	2+	1+
SSPB3208		0.25	2+	1+
	PDB	0.58	3+	3+
		0.61	2+	2+
		0.65	1+	3+
		0.67	-	2+
		0.71	2+	1+
		0.75	2+	-
		0.25	2+	-
	PDB/SW _{30 ppt}	0.58	3+	-
		0.61	2+	-
		0.65	1+	2+
		0.71	1+	-
		0.75	1+	-

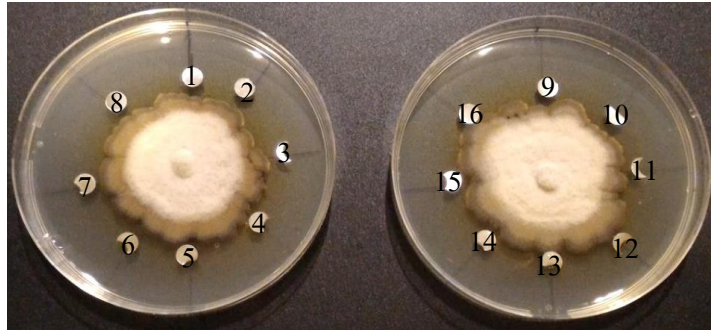
หมายเหตุ * ตัวทำละลาย Toluene:Methanol:Acetone, 6:1:3 v/v

3+ หมายถึง มีฤทธิ์ในการยับยั้งดี (High activity)

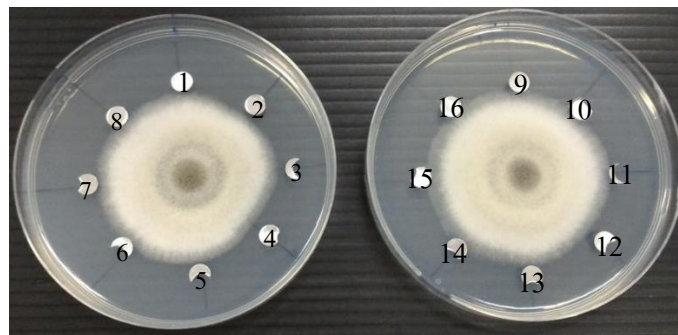
2+ หมายถึง มีฤทธิ์ในการยับยั้งปานกลาง (Moderate activity)

1+ หมายถึง มีฤทธิ์ในการยับยั้งยับยั้งน้อย (Low activity)

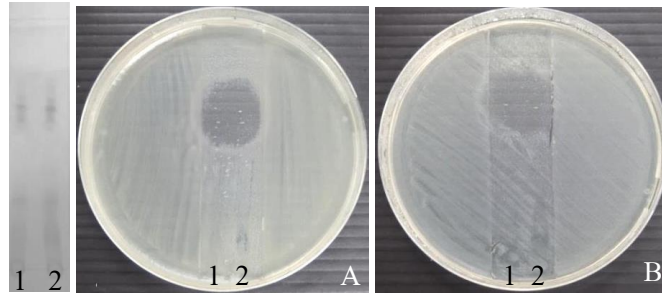
- หมายถึง ไม่มีในฤทธิ์การยับยั้ง (Non activity)



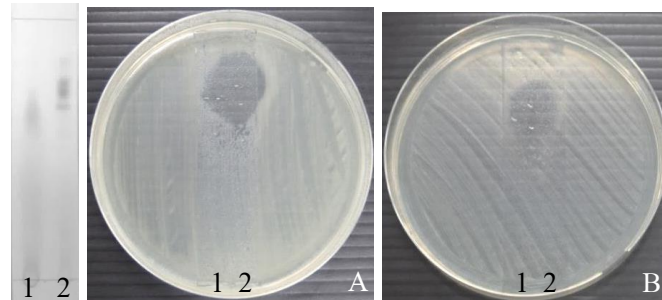
ภาพที่ 4-23 ภาพของสารองค์ประกอบในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 โดยวิธี Autobiogenesis บนอาหาร PDA ของสารสกัด SSPB3208 (PDB); 1: สารองค์ประกอบ R_f 0.25, 2: สารองค์ประกอบ R_f 0.58, 3: สารองค์ประกอบ R_f 0.61, 4: สารองค์ประกอบ R_f 0.65, 5: สารองค์ประกอบ R_f 0.67, 6: สารองค์ประกอบที่ R_f 0.71, 7: สารองค์ประกอบ R_f 0.75 สารสกัด SSPB3208 (PDB/SW_{30 ppt}); 9: สารองค์ประกอบ R_f 0.25, 10: สารองค์ประกอบ R_f 0.58, 11: สารองค์ประกอบ R_f 0.61, 12: สารองค์ประกอบ R_f 0.65, 13: สารองค์ประกอบ R_f 0.67, 14: สารองค์ประกอบ R_f 0.71, 15: สารองค์ประกอบ R_f 0.75 ดิสก์ควบคุมผลเชิงลบ; 8 และ 16: สารละลาย 50%DMSO



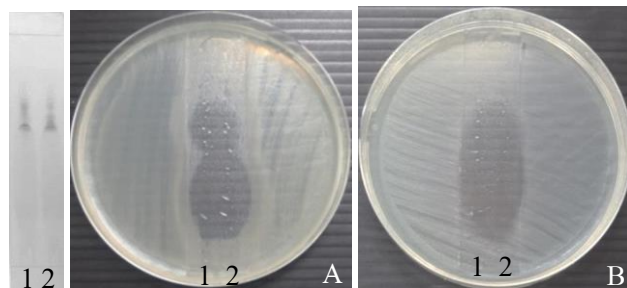
ภาพที่ 4-24 ภาพของสารองค์ประกอบในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides* DOAC 0782 โดยวิธี Autobiogenesis บนอาหาร PDA ของสารสกัด SSPB3208 (PDB); 1: สารองค์ประกอบ R_f 0.25, 2: สารองค์ประกอบ R_f 0.58, 3: สารองค์ประกอบ R_f 0.61, 4: สารองค์ประกอบ R_f 0.65, 5: สารองค์ประกอบ R_f 0.67, 6: สารองค์ประกอบ R_f 0.71, 7: สารองค์ประกอบ R_f 0.75 สารสกัด SSPB3208 (PDB/SW_{30 ppt}); 9: สารองค์ประกอบ R_f 0.25, 10: สารองค์ประกอบ R_f 0.58, 11: สารองค์ประกอบ R_f 0.61, 12: สารองค์ประกอบ R_f 0.65, 13: สารองค์ประกอบ R_f 0.67, 14: สารองค์ประกอบ R_f 0.71, 15: สารองค์ประกอบ R_f 0.75 ดิสก์ควบคุมผลเชิงลบ; 8 และ 16: สารละลาย 50%DMSO



ภาพที่ 4-25 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลือ SSCS0069 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร;
 1: PDB, 2: PDB/SW_{30 ppt} ในการยับยั้ง; A: *B. cereus* TISTR 008, B: *S. aureus* ATCC
 25923



ภาพที่ 4-26 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลือ SSPB1122 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร;
 1: PDB, 2: PDB/SW_{30 ppt} ในการยับยั้ง; A: *B. cereus* TISTR 008, B: *S. aureus* ATCC
 25923



ภาพที่ 4-27 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลือ SSPB3208 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร;
 1: PDB, 2: PDB/SW_{30 ppt} ในการยับยั้ง; A: *B. cereus* TISTR 008, B: *S. aureus* ATCC
 25923

ตารางที่ 4-22 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่วัดด้วยสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลื่อ โดยวิธี Bioautography

สารสกัด/ รานาเกลื่อ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	R _f *	ระดับฤทธิ์ในการยับยั้ง	
			<i>B. cereus</i> TISTR 008	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
SSCS0069	PDB	0.62 ถึง 0.64	3+	1+
		0.67	2+	1+
		0.71	1+	-
	PDB/SW _{30 ppt}	0.58	1+	-
		0.62 ถึง 0.64	3+	1+
		0.68	1+	1+
SSPB1122	PDB	0.58	1+	-
		0.60	1+	-
		0.67	2+	1+
	PDB/SW _{30 ppt}	0.61	1+	-
		0.64	1+	-
		0.68	2+	+1
		0.70 ถึง 0.71	3+	+1
		0.74	1+	-
		0.79	1+	-

หมายเหตุ * ตัวทำละลาย Toluene:Methanol:Acetone, 6:1:3 v/v

3+ หมายถึง มีฤทธิ์ในการยับยั้งดี (High activity)

2+ หมายถึง มีฤทธิ์ในการยับยั้งปานกลาง (Moderate activity)

1+ หมายถึง มีฤทธิ์ในการยับยั้งต่ำ (Low activity)

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง (Non activity)

จากการทดสอบการเป็นสารลดแรงตึงผิวบนแผ่น Parafilm M สารสกัดที่ให้ผลบวกทั้งหมด มีความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิวเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุมผลเชิงลบ (สารละลาย 50%DMSO) โดยสารสกัดมีลักษณะหยดแบนกว่าหยดของ สารละลาย 50%DMSO เล็กน้อย ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากอาหาร PDB/SW_{30 ppt} จากรา SSPB3124 (ภาพที่ 4-32)

ตารางที่ 4-22 (ต่อ)

สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	R _f *	ระดับฤทธิ์ในการยับยั้ง	
			<i>B. cereus</i> TISTR 008	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
SSPB3208	PDB	0.25	1+	-
		0.58	3+	1+
		0.61	1+	1+
		0.65	3+	2+
		0.67	1+	-
		0.71	1+	-
	PDB/SW _{30 ppt}	0.25	1+	-
		0.58	3+	1+
		0.61	1+	1+
		0.65	1+	1+
		0.67	1+	-
		0.71	1+	-

หมายเหตุ * ตัวทำละลาย Toluene:Methanol:Acetone, 6:1:3 v/v

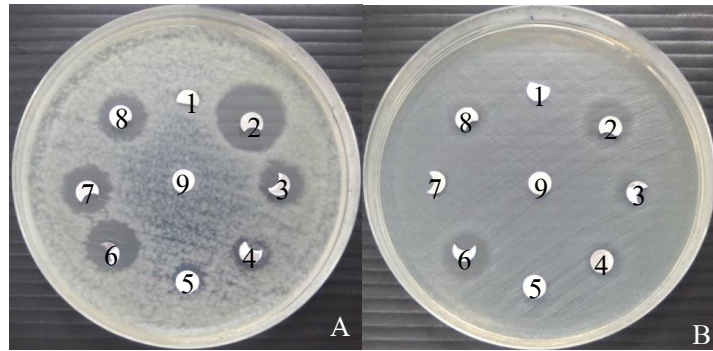
3+ หมายถึง มีฤทธิ์ในการยับยั้งดี (High activity)

2+ หมายถึง มีฤทธิ์ในการยับยั้งปานกลาง (Moderate activity)

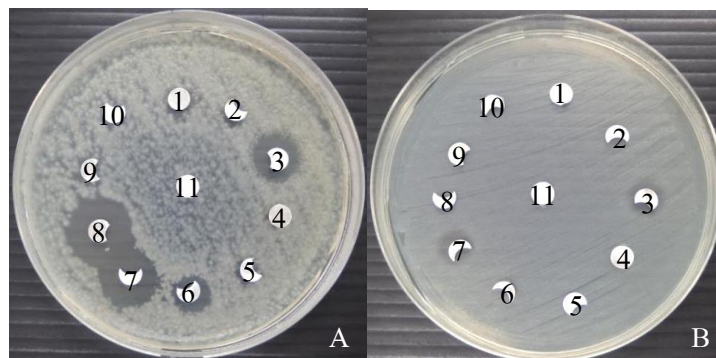
1+ หมายถึง มีฤทธิ์ในการยับยั้งต่ำ (Low activity)

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง (Non activity)

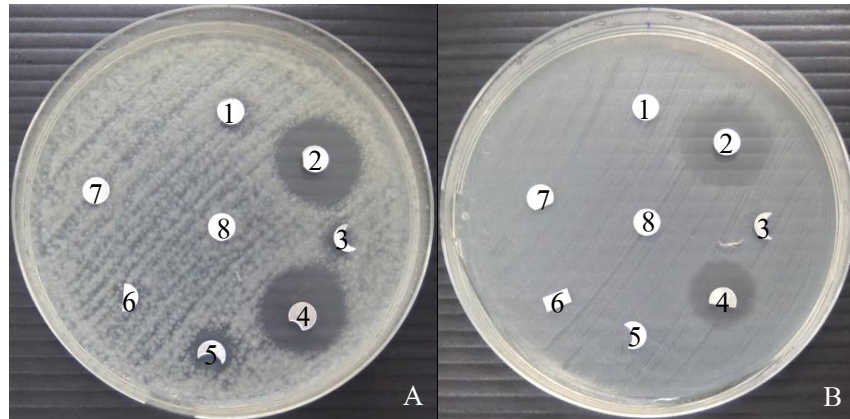
จากการทดสอบความสามารถในการลดแรงตึงผิว โดยวิธี Oil displacement test สารสกัดที่ลดแรงตึงผิวกับน้ำมันมะกอกได้ทำให้น้ำมันเกิดการกระจายตัว แต่น้ำมันเกิดการกระจายตัวได้ไม่ดีเมื่อเทียบกับชุดควบคุมผลเชิงบวก สารละลาย SDS และสารละลาย Tween80 และสารสกัดที่ไม่มีสารลดแรงตึงผิวจะไม่ทำให้น้ำมันเกิดการกระจายตัวแต่จะเกิดเป็นหยดสารบนผิวหน้าน้ำมันเหมือนกับชุดควบคุมผลเชิงลบ (สารละลาย 50%DMSO) (ภาพที่ 4-33)



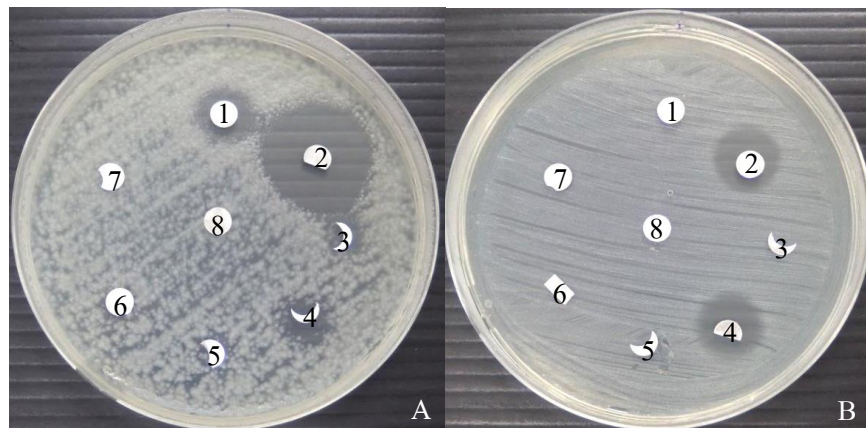
ภาพที่ 4-28 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้ง;
 A: *B. cereus* TISTR 008, B: *S. aureus* ATCC 25923 โดยวิธี Autobiosis บนอาหาร MHA
 ของสารสกัด SSCS0069 (PDB); 1: สารองค์ประกอบ R_f 0.58, 2: สารองค์ประกอบ R_f
 0.62 และ 0.64, 3: สารองค์ประกอบ R_f 0.67, 4: สารองค์ประกอบ R_f 0.71 และสารสกัด
 SSCS0069 (PDB/SW_{30 ppt}); 6: สารองค์ประกอบ R_f 0.58, 6: สารองค์ประกอบ R_f 0.62
 และ 0.64, 7: สารองค์ประกอบ R_f 0.68, 8: สารองค์ประกอบ R_f 0.72, 9: ดิสก์ควบคุมผล
 เจริญเติบโต สารละลาย 50%DMSO



ภาพที่ 4-29 ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้ง;
 A: *B. cereus* TISTR 008, B: *S. aureus* ATCC 25923 โดยวิธี Autobiosis บนอาหาร MHA
 ของสารสกัด SSPB1122 (PDB); 1: สารองค์ประกอบ R_f 0.58, 2: สารองค์ประกอบ R_f 0.60,
 3: สารองค์ประกอบ R_f 0.67 และสารสกัด SSPB1122 (PDB/SW_{30 ppt}); 4: สารองค์ประกอบ
 R_f 0.56, 5: สารองค์ประกอบ R_f 0.61, 6: สารองค์ประกอบ R_f 0.64, 7: สารองค์ประกอบ
 R_f 0.68, 8: สารองค์ประกอบ R_f 0.70 และ 0.71, 9: สารองค์ประกอบ R_f 0.74, 10: สารองค์ประกอบ
 R_f 0.79, 11: ดิสก์ควบคุมผลเจริญเติบโต สารละลาย 50%DMSO



ภาพที่ 4-30ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้ง;
 A: *B. cereus* TISTR 008, B: *S. aureus* ATCC 25923 โดยวิธี Autobiobiosis บนอาหาร MHA
 ของสารสกัด SSPB3208 (PDB); 1: สารองค์ประกอบ R_f 0.25, 2: สารองค์ประกอบ R_f 0.58,
 3: สารองค์ประกอบ R_f 0.61, 4: สารองค์ประกอบ R_f 0.65, 5: สารองค์ประกอบ R_f 0.67,
 6: สารองค์ประกอบที่ R_f 0.71, 7: สารองค์ประกอบ R_f 0.75, 8: ดิสก์ควบคุมผลเชิงลบ
 สารละลาย 50%DMSO



ภาพที่ 4-31ฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้ง;
 A: *B. cereus* TISTR 008, B: *S. aureus* ATCC 25923 โดยวิธี Autobiobiosis บนอาหาร MHA
 ของสารสกัด SSPB3208 (PDB/SW_{30ppm}); 1: สารองค์ประกอบ R_f 0.25, 2: สารองค์ประกอบ
 R_f 0.58, 3: สารองค์ประกอบ R_f 0.61, 4: สารองค์ประกอบ R_f 0.65, 5: สารองค์ประกอบ R_f
 0.67, 6: สารองค์ประกอบ R_f 0.71, 7: สารองค์ประกอบ R_f 0.75, 8: ดิสก์ควบคุมผลเชิงลบ
 สารละลาย 50%DMSO

ตารางที่ 4-23 เปรียบเทียบฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัด SSPB3208 ในการยับยั้งจุลินทรีย์

R _f *	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์			
		<i>C. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
		DOAC 1511	DOAC 0782	TISTR 008	ATCC 25923
0.58	PDB	3+	3+	3+	1+
	PDB/SW _{30 ppt}	3+	-	3+	1+
0.61	PDB	2+	2+	1+	1+
	PDB/SW _{30 ppt}	2+	-	1+	1+
0.65	PDB	1+	3+	3+	2+
	PDB/SW _{30 ppt}	1+	2+	1+	1+

หมายเหตุ * หมายถึง Toluene: Methanol: Acetone, 6:1:3 v/v

3+ หมายถึง มีฤทธิ์ในการยับยั้งดี (High activity)

2+ หมายถึง มีฤทธิ์ในการยับยั้งปานกลาง (Moderate activity)

1+ หมายถึง มีฤทธิ์ในการยับยั้งต่ำ (Low activity)

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง (Non activity)

ตารางที่ 4-24 จำนวนสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลือสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	จำนวนสาร องค์ประกอบ ที่แยกได้	จำนวนสารองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์			
			<i>C. capsici</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
			DOAC 1511	DOAC 0782	TISTR 008	ATCC 25923
SSCS0069	PDB	5	-	-	4	3
	PDB/SW _{30 ppt}	5	-	-	4	3
SSPB1122	PDB	3	3	3	3	1
	PDB/SW _{30 ppt}	8	8	6	7	3
SSPB3208	PDB	7	6	6	6	3
	PDB/SW _{30 ppt}	7	6	1	6	3

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง (Non activity)

จากการทดสอบความสามารถในการลดแรงตึงผิว โดยวิธี Drop collapsing test สารสกัดทั้งหมดไม่มีความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิวบนผิวของน้ำมัน โดยสารสกัดบนผิวน้ำมันที่มีลักษณะหยดเท่ากับตัวควบคุมผลเชิงลบ (สารละลาย 50%DMSO) ในขณะที่ตัวควบคุมผลเชิงบวกมีลักษณะหยดแบนราบไปกับผิวน้ำมัน

ตารางที่ 4-25 ความสามารถของสารสกัดที่สกัดจากอาหารเหลือเลี้ยงรานาเกลือในการลดแรงตึงผิวเมื่อทดสอบโดยวิธีต่าง ๆ กัน

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ความสามารถในการลดแรงตึงผิว				
			วิธี Parafilm M	วิธี Oil displacement			วิธี Drop collapsing
				น้ำมัน ปาล์ม	น้ำมัน มะกอก	น้ำมัน หมู	
1	SSCS0069	PDB	+	-	-	-	-
2	SSCS0069	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	-	-	-
3	SSCS0106	PDB	+	-	+	-	-
4	SSCS0115	PDB	+	-	+	-	-
5	SSCS0115	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	+	-	-
6	SSPB1117	PDB	+	-	-	-	-
7	SSPB1122	PDB	+	-	+	-	-
8	SSPB1218	PDB	+	-	-	-	-
9	SSPB3114	PDB	+	-	-	-	-
10	SSPB3124	PDB	+	-	+	-	-
11	SSPB3124	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	+	-	-
12	SSPB3208	PDB	+	-	+	-	-
13	SSPB3208	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	+	-	-
14	SSPB4107	PDB	+	-	+	-	-
15	SSPB4107	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	+	-	-
16	SSPB4207	PDB	+	-	+	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิว

+ หมายถึง มีความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิว

ตารางที่ 4-25 (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ความสามารถในการลดแรงตึงผิว				
			วิธี Parafilm M	วิธี Oil displacement			วิธี Drop collapsing
				น้ำมัน ปาล์ม	น้ำมัน มะกอก	น้ำมัน หมู	
17	SSPB4207	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	+	-	-
18	SSPB4208	PDB	+	-	-	-	-
19	SSPB4208	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	-	-	-
20	SSPB4215	PDB	+	-	+	-	-
21	SSPB4215	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	-	-	-
22	SSPB4217	PDB	+	-	-	-	-
23	SSPB4217	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	-	-	-
24	SSPB4225	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	-	-	-
25	SSPB4307	PDB	+	-	-	-	-
26	SSPB4307	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	+	-	-
27	SSPB4308	PDB	+	-	+	-	-
28	SSPB4309	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	+	-	-
29	SSPB4313	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	-	-	-
30	SSPB4319	PDB	+	-	+	-	-
31	SSPB4320	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	+	-	-
32	SSPB4321	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	-	-	-
33	SSPB4323	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	+	-	-
34	SSPB4324	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	+	-	-
35	SSPB4325	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	+	-	-
36	SSPB4327	PDB	+	-	-	-	-
37	SSPB4327	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	-	-	-
38	SSPB4329	PDB	+	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิว

+ หมายถึง มีความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิว

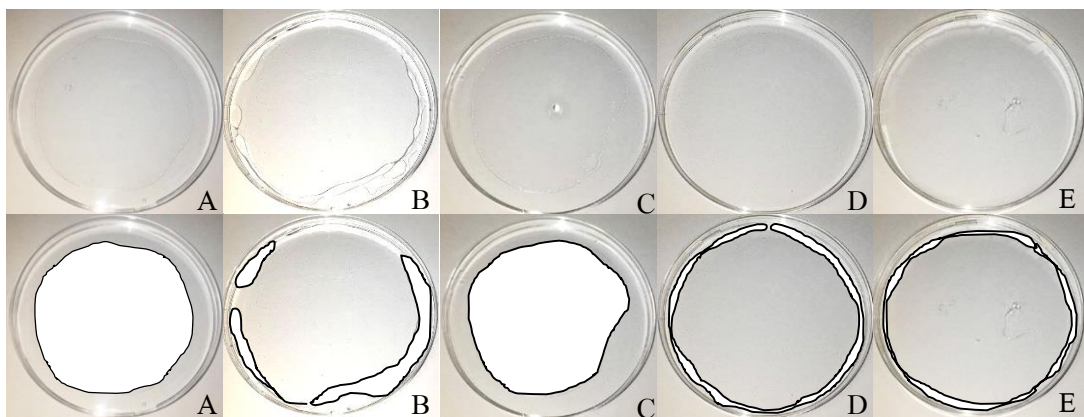
ตารางที่ 4-25 (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ความสามารถในการลดแรงตึงผิว				
			วิธี Parafilm M	วิธี Oil displacement			วิธี Drop collapsing
				น้ำมัน ปาล์ม	น้ำมัน มะกอก	น้ำมัน หมู	
39	SSPB4332	PDB	+	-	+	-	-
40	SSPB4332	PDB/SW _{30 ppt}	+	-	-	-	-
	สารละลาย SDS		+	+	+	+	+
	สารละลาย Tween80		+	+	+	+	+

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิว
+ หมายถึง มีความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิว



ภาพที่ 4-32 ลักษณะหยดสารบนแผ่น Parafilm M; A: สารสกัด SSP3124 (PDB/SW_{30 ppt}), B: ผลเชิงลบ สารละลาย 50%DMSO, C: ผลเชิงบวกสารละลาย SDS และ D: ผลเชิงบวกสารละลาย Tween80

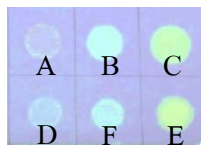


ภาพที่ 4-33 ลักษณะการกระจายตัวของน้ำมันมะกอกเมื่อทดสอบการลดแรงตึงผิวของสารสกัด SSPB4107 โดยวิธี Oil displacement test; A: จานน้ำมันที่ลอยบนผิวน้ำ B: สารสกัด SSPB4107 (PDB/SW_{30 ppt}) C: ผลเชิงลบ สารละลาย 50%DMSO D: ผลเชิงบวก สารละลาย SDS และ E: ผลเชิงบวก สารละลาย Tween80

หมายเหตุ แถวบนคือ ภาพถ่ายจริง และแถวล่างคือ ลายเส้นแสดงขอบของน้ำมันมะกอก

10. การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบ โดยวิธี *Dot blot DPPH rapid staining*

เนื่องจากพบว่าตัวสารละลาย 50% DMSO มีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในการทดสอบ เมื่อนำสารสกัด 40 สาร มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี *Dot blot DPPH rapid staining* จึงทำการเจือจางลง 50 เท่า เพื่อไม่ให้มีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดแต่ละสารมีความสามารถแตกต่างกันดังตารางที่ 4-26 ตามระดับความแรงเมื่อตรวจสอบด้วยตาเปล่า สารให้ผลบวกเห็นเป็นสีเหลือง (3+) เหลืองจาง (2+) จนถึงสีขาวจาง ๆ (1+) สารสกัดส่วนใหญ่ (80.0%) มีคุณสมบัติในการเป็นต้านอนุมูลอิสระ ในเกณฑ์ปานกลาง (2+) คือ เทียบเท่าสารละลาย Ascorbic acid 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด 7 สาร (17.5%) ต้านอนุมูลอิสระได้ในเกณฑ์สูง (3+) เทียบเท่าสารละลาย Ascorbic acid 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด 1 สาร (2.50%) ต้านอนุมูลอิสระในเกณฑ์ต่ำ เทียบเท่าสารละลาย Ascorbic acid 0.00025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างสารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (+) ในระดับต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 4-34



ภาพที่ 4-34 ลักษณะสีที่เกิดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระบนแผ่น TLC silica gel 60F₂₅₄ ด้วย *Dot blot DPPH rapid staining* ของสารสกัด A: SSPB1218 (PDB) (1+) B: SSPB4107 (PDB) (2+) C: SSPB1122 (PDB/SW_{30 ppt}) (3+) D, E และ F เป็นชุดควบคุมผลเชิงบวก สารละลาย Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น: 0.00025, 0.025 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

11. การเปรียบเทียบคุณสมบัติของรานานเกลื้อและศักยภาพด้านต่าง ๆ ของสารสกัด

เมื่อนำรานานเกลื้อที่ให้ผลการศึกษาด้านต่าง ๆ ดี จำนวน 9 สายพันธุ์มาเปรียบเทียบความสามารถในการทนความเค็มและศักยภาพด้านต่าง ๆ ของสารสกัดจากรานานเกลื้อ ได้แก่ การยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแบคทีเรีย และยีสต์ การเป็นสารลดแรงตึงผิว และการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังตารางที่ 4-27 พบว่ารานานเกลื้อทั้ง 9 สายพันธุ์ เป็นราที่มีความสามารถในการทนความเค็ม และยังสามารถสร้างสารที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้งสองชนิดได้ในอาหารเหลว PDB และหรือ PDB/SW_{30 ppt} ยับยั้งแบคทีเรียอย่างน้อย 2 ชนิด และยีสต์อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ และสารเหล่านี้ยังมีศักยภาพในการเป็นสารลดแรงตึงผิวและสารต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 4-26 ความสามารถของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระ โดย Dot blot DPPH rapid staining

ลำดับ	สารสกัด/รานาเกลือ	แหล่งที่มาของสารสกัด	ระดับการต้านอนุมูลอิสระ
1	SSCS0069	PDB	2+
2	SSCS0069	PDB/SW _{30 ppt}	2+
3	SSCS0106	PDB	2+
4	SSCS0115	PDB	3+
5	SSCS0115	PDB/SW _{30 ppt}	2+
6	SSPB1117	PDB	3+
7	SSPB1122	PDB	3+
8	SSPB1218	PDB/SW _{30 ppt}	1+
9	SSPB3114	PDB	2+
10	SSPB3124	PDB	3+
11	SSPB3124	PDB/SW _{30 ppt}	2+
12	SSPB3208	PDB	2+
13	SSPB3208	PDB/SW _{30 ppt}	2+
14	SSPB4107	PDB	2+
15	SSPB4107	PDB/SW _{30 ppt}	2+
16	SSPB4207	PDB	2+
17	SSPB4207	PDB/SW _{30 ppt}	2+
18	SSPB4208	PDB	2+
19	SSPB4208	PDB/SW _{30 ppt}	2+
20	SSPB4215	PDB	2+
21	SSPB4215	PDB/SW _{30 ppt}	2+
22	SSPB4217	PDB	2+
23	SSPB4217	PDB/SW _{30 ppt}	2+
24	SSPB4225	PDB/SW _{30 ppt}	2+

หมายเหตุ 1+ หมายถึง มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเกณฑ์ต่ำ

2+ หมายถึง มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเกณฑ์ปานกลาง

3+ หมายถึง มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเกณฑ์สูง

ตารางที่ 4-26 (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/รานาเกลือ	แหล่งที่มาของสารสกัด	ระดับการต้านอนุมูลอิสระ
25	SSPB4307	PDB	3+
26	SSPB4307	PDB/SW _{30 ppt}	2+
27	SSPB4308	PDB	2+
28	SSPB4309	PDB/SW _{30 ppt}	2+
29	SSPB4313	PDB/SW _{30 ppt}	2+
30	SSPB4319	PDB	2+
31	SSPB4320	PDB/SW _{30 ppt}	2+
32	SSPB4321	PDB/SW _{30 ppt}	2+
33	SSPB4323	PDB/SW _{30 ppt}	2+
34	SSPB4324	PDB/SW _{30 ppt}	2+
35	SSPB4325	PDB/SW _{30 ppt}	3+
36	SSPB4327	PDB	3+
37	SSPB4327	PDB/SW	2+
38	SSPB4329	PDB	2+
39	SSPB4332	PDB	2+
40	SSPB4332	PDB/SW _{30 ppt}	2+
สารละลาย Ascorbic acid 25 $\mu\text{g/mL}$			3+
สารละลาย Ascorbic acid 0.025 $\mu\text{g/mL}$			2+
สารละลาย Ascorbic acid 0.00025 $\mu\text{g/mL}$			1+
สารละลาย 1%DMSO			-

หมายเหตุ 1+ หมายถึง มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเกณฑ์ต่ำ

2+ หมายถึง มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเกณฑ์ปานกลาง

3+ หมายถึง มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเกณฑ์สูง

ตารางที่ 4-27 การเปรียบเทียบศักยภาพด้านต่าง ๆ ของสารสกัดรานากะลิ

สารสกัด/ รานากะลิ	ระดับ ความเข้มข้น สูงสุด ที่ราเจริญ	คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี Disc diffusion								คุณสมบัติการเป็น สารลดแรงตึงผิว		คุณสมบัติการเป็น
		ราสาเหตุโรคพืช		แบคทีเรีย				ยีสต์		วิธี Parafilm M	วิธี Oil displacement	สารต้านอนุมูลอิสระ วิธี Dot blot DPPH
		CC	CG	BC	SA	PA	ST	CA1	CA9			
SSCS0069	0-250 ppt	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
SSPB1122	0-100 ppt	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
SSPB3124	0-150 ppt	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SSPB3208	0-250 ppt	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
SSPB4207	0-250 ppt	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
SSPB4215	0-150 ppt	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
SSPB4217	0-200 ppt	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
SSPB4225	0-250 ppt	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
SSPB4332	0-250 ppt	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง มีคุณสมบัติ

- หมายถึง ไม่มีคุณสมบัติ

เชื้อทดสอบ; CC = *C. capsici* DOAC 1511, CG = *C. gloeosporioides* DOAC 0782, BC = *B. cereus* TISTR 008, SA = *S. aureus* ATCC 25923, EC = *E. coli* ATCC 25922, PA = *P. aeruginosa* ATCC 27853 ST = *S. Typhimurium* ATCC 1331, CA1 = *C. albicans* ATCC 10231 และ CA9 = *C. albicans* ATCC 90028

12 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากรานาเกลื้อ 9 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างสารที่มีความสามารถที่น่าสนใจ ซึ่งเป็นราที่แยกได้จากดินนาเกลื้อจังหวัดจันทบุรี และเพชรบุรี สามารถจำแนกได้ ดังตารางที่ 4-28

ตารางที่ 4-28 การจัดจำแนกรานาเกลื้อ

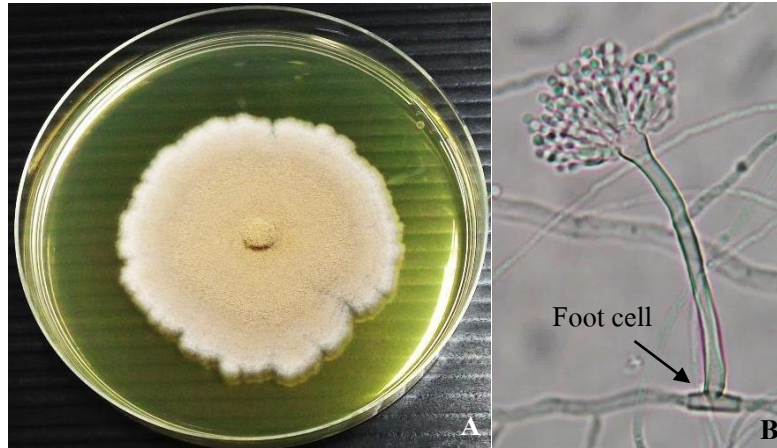
รานาเกลื้อ	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่าง	การจำแนก
SSCS0069	ดินนาเกลื้อ จังหวัดจันทบุรี	เม.ย. 2553	<i>Aspergillus</i> sp.2
SSPB1122	ดินนาแม่ของนาเกลื้อ จังหวัดเพชรบุรี	ธ.ค. 2555	<i>Aspergillus</i> sp.1
SSPB3124	ดินนาแม่ของนาเกลื้อ จังหวัดเพชรบุรี	ธ.ค. 2556	<i>Aspergillus</i> sp.2
SSPB3208	ดินนาวางของนาเกลื้อ จังหวัดเพชรบุรี	ธ.ค. 2556	<i>Aspergillus</i> sp.2
SSPB4207	ดินนาวางของนาเกลื้อ จังหวัดเพชรบุรี	มี.ค. 2557	<i>Aspergillus</i> sp.1
SSPB4215	ดินนาวางของนาเกลื้อ จังหวัดเพชรบุรี	มี.ค. 2557	<i>Aspergillus</i> sp.1
SSPB4217	ดินนาวางของนาเกลื้อ จังหวัดเพชรบุรี	มี.ค. 2557	<i>Aspergillus</i> sp.1
SSPB4225	ดินนาวางของ นาเกลื้อ จังหวัดเพชรบุรี	มี.ค. 2557	<i>Aspergillus</i> sp.1
SSPB4332	ดินนาดอกของ นาเกลื้อ จังหวัดเพชรบุรี	มี.ค. 2557	<i>Aspergillus</i> sp.1

Aspergillus sp. 1

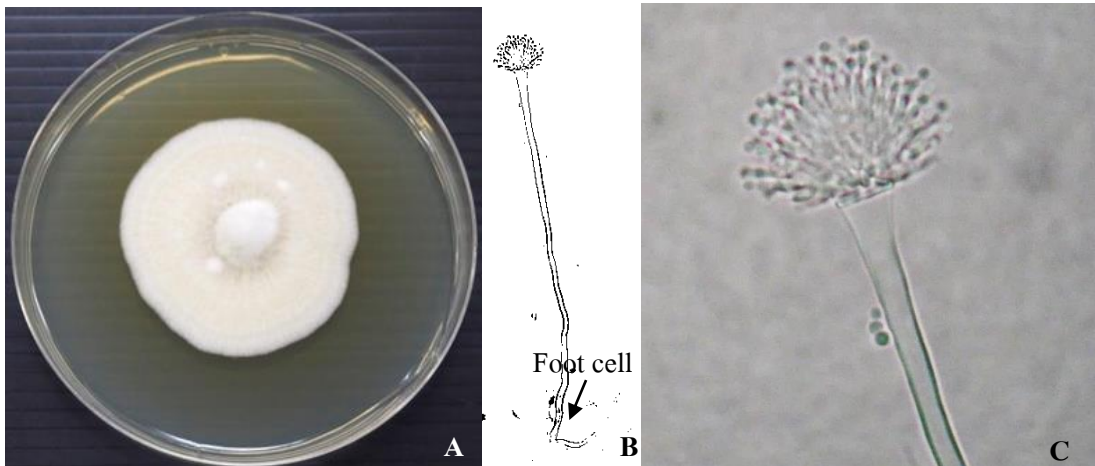
Aspergillus sp.1 มีลักษณะโคโลนีเป็นผงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีไม่เรียบ สีขาว เป็นรอยหยัก เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/SW_{30 ppt} เป็นเวลา 14 วัน มีขนาดโคโลนีประมาณ 6.0 เซนติเมตร สร้างสารที่มีสีเหลืองในอาหารแข็งจนเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองรอบโคโลนี โครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X พบ โคนิเดียรูปกลม ไม่มีสี ขนาด 2.5 ไมโครเมตรที่ต่อกันเป็นสาย 2-4 สปอร์บน Phialide แบบ Biseriate ขนาด 0.12x0.88-1.0 ไมโครเมตร บนหัว Vesicle ขนาด 10 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 4-35

Aspergillus sp. 2

Aspergillus sp. 2 โคลนีราเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/SW_{30 ppt} เป็นเวลา 14 วัน มีขนาดโคโลนี 4.7 เซนติเมตร สีขาว เส้นใยฟูเล็กน้อย สร้างสปอร์สีขาวบริเวณกลางกลางโคโลนี สร้างสารที่มีสีเหลืองในอาหารแข็งจนเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองรอบโคโลนี โครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X พบ โคนิเดียรูปกลม ไม่มีสี ขนาด 2.5 ไมโครเมตร ที่ต่อกันเป็นสาย 2-4 สปอร์บน Phialide แบบ Uniseriate ขนาด 0.12x0.88-1.0 ไมโครเมตร บนหัว Vesicle ขนาด 10 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 4-36



ภาพที่ 4-35 A: ลักษณะโคโลนีของรา *Aspergillus* sp.1 (SSPB4225) บนอาหาร PDA/SW_{30ppt} เป็นเวลา 14 วัน B: โครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X



ภาพที่ 4-36 A: ลักษณะโคโลนีของรา *Aspergillus* sp.2 (SSPB3124) บนอาหาร PDA/SW_{30ppt} เป็นเวลา 14 วัน B-C: โครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

การประเมินศักยภาพทางเทคโนโลยีชีวภาพของรานาเกลือจำนวน 120 สายพันธุ์ เริ่มจากการคัดกรองราที่มีคุณสมบัติยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนส *Colletotrichum* จากนั้นนำราที่คัดกรองได้มาศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคอื่น ๆ รวมถึงคุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิว และสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่ารานาเกลือเป็นราชอบเค็มสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเค็มสูงสุดตั้งแต่ 30 ppt ขึ้นไป รานาเกลือส่วนใหญ่ (ร้อยละ 60.8) เป็นราชอบเค็มสุดขีด (Extreme halotolerant) และมีรูปแบบการเจริญแตกต่างกัน ส่วนมากเจริญได้ดีบนอาหารที่ไม่มีเกลือ และเจริญช้าลงในอัตราที่แตกต่างบนอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือสูงขึ้น

รานาเกลือร้อยละ 50.0 จากจำนวน 120 สายพันธุ์ มีความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *Colletotrichum* ได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วยปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis ($ID \geq 2$ มิลลิเมตร) บนอาหาร PDA และ/หรือ PDA/SW_{30 ppt} ในจำนวนนี้ราร้อยละ 83.3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วยค่า $\%IE \geq 35$ รานาเกลือรหัส SSPB4225 ให้ผลยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วยค่า $\%IE$ สูงสุดเท่ากับ 75.0 และ 76.0 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงร่วมกัน 5 วัน บนอาหาร PDA/SW_{30 ppt} รองลงมาคือ รานาเกลือ SSPB4207 ให้ผลการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วยค่า $\%IE$ สูงสุดเท่ากับ 75.0 และ 73.0 ตามลำดับ รานาเกลือ SSPB4215 ให้ผลการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วยค่า $\%IE$ สูงสุดเท่ากับ 71.1 และ 65.5 ตามลำดับ

เมื่อนำราที่มีค่า $\%IE \geq 35$ ไปเลี้ยงในอาหาร PDB และ PDB/SW_{30 ppt} ตามความเหมาะสมของสายพันธุ์รานั้น ๆ แล้วนำอาหารมาสกัดสารออกฤทธิ์ จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนสโดยวิธี Disc diffusion รานาเกลือยังคงผลิตสารที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ได้ดีกว่า *C. capsici* DOAC 1511 สารสกัด 40 สาร จากรานาเกลือ 28 สายพันธุ์ ให้ค่า $\%IE \geq 50$ พบว่าสารสกัดจากอาหาร PDB และ PDB/SW_{30 ppt} เลี้ยงรานาเกลือ SSPB 3124 สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 และ *C. capsici* DOAC 1511 ด้วยค่า $\%IE$ สูงที่สุด 80 เท่ากัน

เมื่อนำสารสกัดจากรานาเกลือที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วยค่า $\%IE \geq 50$ จำนวน 40 สาร มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ โดยวิธี Disc diffusion พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์

ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่ายีสต์ และแบคทีเรียแกรมลบ ด้วยขนาด Inhibition zone กว้างที่สุด 24.0, 19.0 และ 9.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยยีสต์มีขนาด Inhibition zone เมื่อตรวจผลที่ 24 ชั่วโมง กว้างกว่า 48 ชั่วโมง สารสกัด SSPB4207 (PDB/SW_{30 ppt}) เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีมากในการยับยั้ง ราสาเหตุโรคพืช (%IE \geq 70) และแบคทีเรียแกรมลบ (Inhibition zone $>$ 20 มิลลิเมตร) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 รวมถึงยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์

เมื่อคัดเลือกรานาเกลือจำนวน 9 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ดี และออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิดจากการศึกษาที่ผ่านมา มาเลี้ยงใน PDB และ PDB/SW_{30 ppt} ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำอาหารมาสกัดด้วย Ethyl acetate และนำมาทดสอบหาค่า MIC ในการยับยั้ง ราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนส พบว่าสารสกัด PDB/SW_{30 ppt} จากรานาเกลือส่วนใหญ่มีค่า MIC ดีกว่า สารสกัดจาก PDB ไม่ว่าจะเลี้ยง 3 วัน หรือ 5 วัน โดยค่า MIC แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของรานาเกลือ ค่า MIC ในการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 อยู่ระหว่าง 512- \geq 2048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด PDB และ PDB/SW_{30 ppt} จากรานาเกลือ SSPB3208 มีค่า MIC ต่ำสุดในการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วยค่า MIC 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน เมื่อเลี้ยง 3 วัน และมีค่า MIC 512 และ 1,024 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเลี้ยง 5 วัน

การทดสอบหาค่า MIC และ MLC ในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ พบว่าสารสกัดมีค่า MIC และ MLC ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกในช่วง 64-512 และ 64-1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยับยั้งแกรมลบเท่ากันในช่วง 1,024- $>$ 1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ขณะที่ มีค่า MIC และ MLC ในการยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028 เท่ากันคือ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อแยกองค์ประกอบของสารสกัด ด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) พบว่า ตัวทำละลาย Toluene: Methanol: Acetone ในอัตราส่วน 6:1:3 ปริมาตรต่อปริมาตร เป็นตัวทำละลาย ที่แยกองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหาร PDB และ PDB/SW_{30 ppt} ทั้งหมดได้ชัดเจน

การทดสอบ Bioautography ของสารองค์ประกอบแต่ละสารที่แยกได้จากสารสกัด พบสาร องค์ประกอบส่วนใหญ่จากสารทดสอบทั้งหมด 38 สาร มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 และแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และสารองค์ประกอบส่วนหนึ่งสามารถ ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides* DOAC 0782 และแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ด้วยฤทธิ์ยับยั้งที่แตกต่างกัน สารองค์ประกอบทั้งหมดไม่สามารถยับยั้งยีสต์ได้

เมื่อทดสอบความสามารถอื่น ๆ คือ ความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิว และสารต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดจำนวน 40 สาร จากสารสกัดจากรานาเกลือที่คัดกรองได้ (สารสกัดที่มีค่า %IE \geq 50

ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง) พบสารสกัดทั้งหมดมีคุณสมบัติลดแรงดึงผิวเมื่อทดสอบด้วยวิธี Parafilm M แต่ความสามารถค่อนข้างต่ำ ในขณะที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดี

การจัดจำแนกรานาเกลือโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาพบว่า รานาเกลือที่สร้างสารดีคือสายพันธุ์ SSCS0069, SSPB1122, SSPB3124, SSPB3208, SSPB4207, SSPB4215, SSPB4217, SSPB4225 และ SSPB4332 ทั้งหมดเป็นราในจีนัส *Aspergillus*

ดังนั้นรานาเกลือซึ่งเป็นราชอบเค็มสามารถจัดเป็นราที่มีศักยภาพในการสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนสได้ดี ราเหล่านี้ยังมีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและสร้างสารต้านอนุมูลอิสระดี จึงน่าจะนำมาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพได้ในอนาคต

อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดสอบพบว่ารานาเกลือทั้งหมดเป็นราชอบเค็ม มีความสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเค็มตั้งแต่ 0 ppt ถึง 30 ppt ขึ้นไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการสำรวจความสามารถการทนเค็มของราที่แยกได้จากนาเกลือทั่วโลก (Kogej, Gostincar, Volkmann, Gorbushina, & Gunde-Cimerman, 2006; Kralj-Kuncic, Kogej, Drobne, & Gunde-Cimerman, 2010; Zajc et al., 2012) การทดสอบยังพบว่ารานาเกลือเป็นราชอบเค็มปานกลางตั้งแต่ 50-150 ppt ถึงชอบเค็มสูงแตกต่างกันหลายระดับตั้งแต่ 200-250 ppt สอดคล้องกับรายงานความสามารถในการชอบเค็มของรานาเกลือที่แยกได้จากนาเกลือในหลายประเทศ เช่น Cabo Rojo รัฐเปอร์โตริโก ประเทศสหรัฐอเมริกา (Cantrell et al., 2006) Dowmat al Jandal ประเทศซาอุดีอาระเบีย และ Goa ประเทศอินเดีย (Mohammed, Tantry, & Rahiman, 2014; Nayak et al., 2012) มีรายงานว่าการที่ราอาศัยอยู่ในนาเกลือที่มีสถานะเค็มจัดเป็นสภาวะวิกฤตยากแก่การดำรงชีวิต ทำให้รานาเกลือมีกลไกการปรับตัวให้เข้ากับความเค็มต่าง ๆ นอกจากการปรับตัวด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยา ยังมีการรักษาสมดุลแรงดันออสโมติกในเซลล์และภายนอกเซลล์โดยการเก็บสะสมและหรือการสังเคราะห์ Compatible organic solute เพื่อความอยู่รอด (Han & Prade, 2002; Gunde-Cimerman & Zalar 2014; Oren, 1999) และเพื่อรักษาความเข้มข้น Na^+ ภายในเซลล์ให้ต่ำกว่าระดับที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Plemenitas et al., 2014)

มีรายงานว่าเมื่อเลี้ยงราด้วยกันจะเกิดปฏิสัมพันธ์ 3 ลักษณะ คือ ปฏิปักษ์ทางตรง (Direct antagonism) ปฏิปักษ์ทางอ้อม (Indirect antagonism) และปฏิปักษ์แบบผสม (Mixed-path antagonism) การเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ Antibiosis ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของรานาเกลือเป็นแบบผสม คืออาจเกิดจากรานาเกลือสร้างผลิตภัณฑ์ และหลั่งสารปฏิชีวนะ (Antibiotics) หรือ สารพิษ (Toxin) ออกมายับยั้งหรือทำลายราสาเหตุโรคพืช รานาเกลืออาจสร้างของเสียหรือสารที่รบกวนทางกายภาพและทางเคมีที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือไม่เหมาะกับราสาเหตุโรคพืช (Pal & Gardener, 2006) ดังนั้น

ในการศึกษานี้จึงเลือกลักษณะ Antibiosis เพื่อใช้เป็นการคัดกรองเบื้องต้น ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ร่วมกับวิธี Dual culture และการคำนวณหาค่า ID แบบ Mutual inhibition at a distance ที่มีหลักการเกิดระยะยับยั้งระหว่างกันมากกว่า 2 มิลลิเมตร ซึ่ง Porter (1924) และ Dickinson and Boardman (1971) เคยรายงานไว้ มาใช้คัดกรองรานาเกลื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชในขั้นต่อไป

การศึกษาศักยภาพของรานาเกลื้อในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนส โดยวิธี Dual culture จะทำการเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 3 และ 5 วัน บนอาหาร PDA และ PDA/SW_{30 ppt} พบว่ารานาเกลื้อสามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วย %IE ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงร่วมกัน 5 วัน บนอาหาร PDA/SW_{30 ppt} มีรายงานว่าระยะการเจริญของรามีผลต่อการสร้างสารและสะสมสารในปริมาณที่แตกต่างกัน ในช่วงเวลา 1-3 วัน รานาเกลื้อส่วนใหญ่อยู่ในช่วง Lag phase ซึ่งเป็นช่วงที่ราปรับตัวเข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ ในช่วงนี้รามีการสร้างเอนไซม์และสารอื่น ๆ ที่เป็นสารปฐมภูมิ (Primary metabolite) ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ (Griffin, 1994) จึงไม่พร้อมที่จะสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ซึ่งเป็นสารประกอบทุติยภูมิ (Secondary metabolite) แต่เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วันรานาเกลื้อน่าจะเจริญอยู่ในช่วงปลาย Log phase ถึง Stationary phase และสร้างสารประกอบทุติยภูมิปริมาณมากขึ้น สะสมมากขึ้น มีรายงานว่าสารทุติยภูมิของราเส้นสายหลายชนิดเป็นสารที่สำคัญต่อราที่ผลิตสารนั้น ๆ เช่น เป็นสารปฏิชีวนะสำหรับใช้ในขบวนการป้องกันตัวเองให้อยู่รอดในระบบนิเวศ หรือสิ่งแวดล้อมที่เป็นอันตรายต่อชีวิต (Fox & Howlett, 2008) ด้วยเหตุผลเดียวกันนี้จึงได้เลือกเลี้ยงรานาเกลื้อเป็นเวลา 10 วัน เพื่อให้มั่นใจว่าราเจริญอยู่ในช่วง Stationary phase สร้างสารทุติยภูมิเพื่อนำสารสกัดไปใช้

การที่รานาเกลื้อส่วนใหญ่ร้อยละ 42 และร้อยละ 46 สร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ตามลำดับ บนอาหาร PDA/SW_{30 ppt} ได้ดีกว่า PDA รวมถึงที่พบว่ารานาเกลื้อชนิดเดียวกันสร้างสารที่มีฤทธิ์แตกต่างกันในอาหารเหลวที่มีความเค็มต่างกัน ให้ผลเช่นเดียวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากราหลายชนิดที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมทางทะเล ประเทศอินโดนีเซีย (Tarman et al., 2011)

ในการทดสอบสารสกัดมีการนำอาหารเหลวที่ไม่มีความเค็ม (PDB) และมีความเค็ม (PDB/SW_{30 ppt}) จากการเลี้ยงราเท่ากันทุกฟลasks นำไปสกัดสารจนแห้ง ละลายในตัวทำละลายเดียวกัน ปริมาตรเท่ากัน และนำสารสกัดที่ละลายแล้วปริมาตรเท่ากันมาทดสอบ โดยไม่ทราบน้ำหนักที่แท้จริงของสารออกฤทธิ์ แต่การที่รานาเกลื้อแต่ละสายพันธุ์มีความต้องการสภาวะทางกายภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ที่ไม่เหมือนกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ถูกสร้างขึ้นอาจไม่เท่ากัน แม้จะมีการควบคุมตามข้างต้นแล้วก็ตาม

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชโดยเทคนิค Disc diffusion ของสารสกัดจากอาหารเหลว PBD และ PDB/SW_{30 ppt} จำนวน 100 สาร จากรานาเกลือ 50 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกไว้ พบว่าบางครั้งประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของรานาเกลือในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Dual culture เนื่องจากการที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งโดยวิธี Dual culture เกิดจากสารปฐมภูมิเป็นหลัก ส่วนวิธี Disc diffusion เกิดจากสารทุติยภูมิเป็นหลัก ดังนั้นการที่พบว่าบางครั้งสารสกัดไม่สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชหรือมีผลการยับยั้งลดลงเมื่อเทียบกับการทดสอบโดยวิธี Dual culture อาจเนื่องจากรางสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวอยู่ในช่วง Log phase จึงสร้างเพียงสารปฐมภูมิสำหรับการเจริญเท่านั้น ยังไม่สร้างสารออกฤทธิ์ที่เป็นสารทุติยภูมิ (Walker & White, 2005) นอกจากนี้ Ethyl acetate ที่เลือกนำมาสกัดสาร อาจไม่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์บางชนิด คือ สารที่มีขั้วกลาง (Medium polarity compound) เช่น Peptide และขั้วต่ำ (Low polarity compound) เช่น Terpene, Hydrocarbon ที่อยู่ในอาหารเหลวออกมาได้ (Justino, Duarte, Freitas, Duart, & Rocha-Santos, 2014) มีรายงานราหลายชนิดที่แยกจากสิ่งแวดล้อมสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติหลากหลาย เช่น Polyketide, Terpene, Terpenoid, Quinone, Indole และ Alkaloid (Hasan, Ansari, Ahmad, & Mishra, 2015; Keller, Turner & Bennett, 2005; Swathi, Narendra, Sowjanya, & Krishna Satya, 2013; Vaske & Crews, 2014) แต่การทดลองนี้ไม่ได้ทำการศึกษากลุ่มของสารที่รานาเกลือผลิต รวมถึงชนิดตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ได้ดีที่สุด แต่จากรายงานอื่น ๆ พบว่าสารสกัด Ethyl acetate จากอาหารเหลวเลี้ยงราทะเล *Aspergillus terreus* MP1 และ *A. ochraceus* MP2 ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล ประเทศอินเดีย เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด สามารถดึงสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอื่น ๆ (Meenupriya, Majumdar, Jenifer, Britto, & Thangaraj, 2011; Meenupriya & Thangaraj, 2011)

สารสกัดที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดีเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี แต่ให้ผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ไม่คีนิก รานาเกลือที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียก่อโรค อาจมีกลไกการออกฤทธิ์แบบใดแบบหนึ่ง ดังที่มีรายงานในสารสกัดจากจุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ยับยั้งหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งการสร้างโปรตีน ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก หรือยับยั้งขบวนการสร้างเมตาบอลิซึม (Czaplewski et al., 2009; Davies & Davies, 2010) แต่ยังไม่สามารถศึกษาในที่นี้ อย่างไรก็ตามกลไกที่สำคัญและมีโอกาสเป็นไปได้ว่าจะเป็นการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เนื่องจากการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีที่ซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีสายของ Peptidoglycan ชั้นบาง ๆ ชั้นกลางระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอก (Outer

membrane) ที่ประกอบไปด้วยชั้นไขมันกับเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (Inner membrane) ดังนั้นเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบจึงมีคุณสมบัติด้านการผ่านของสาร และมีส่วนช่วยให้เซลล์ทนต่อการถูกทำลายโดยสารปฏิชีวนะ (Beveridge, 1999; Delcour, 2009) การที่ยีสต์ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดไม่ดี แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวก อาจเนื่องมาจากผนังเซลล์มีองค์ประกอบแตกต่างกันออกไป คือมี Glucan และ Mannan เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ *C. albicans* ยังสามารถสร้างไบโอฟิล์มซึ่งประกอบไปด้วยสารโพลีเมอร์ต่าง ๆ มาห่อหุ้มเซลล์ไว้ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน ส่งผลให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม สารเคมี และยาต้านจุลชีพ (Chandra et al., 2001) หรืออาจเป็นเพราะสารที่ราผลิตมีกลไกในการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ต่างกัน (Ghannoum & Rice, 1999) และการที่บางครั้งเห็นเป็นโซนไม่ใสเนื่องจากมีเชื้อเจริญบางส่วน อาจเนื่องมาจากยีสต์ถูกยับยั้งได้ถึงความเข้มข้นสารระดับหนึ่ง และความเข้มข้นของสารสกัดอาจไม่เพียงพอที่จะยับยั้งเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (May, King, & Warren, 1997)

สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดสอดคล้องกับรายงานสารสกัดจากราที่แยกได้จากนาเกลือและ Subglacial ice (Sepcic et al., 2011) เช่นเดียวกันมีรายงานว่า Crude filtrate จากรานาเกลือ จังหวัดเพชรบุรี (Ali et al., 2014) และสารบริสุทธิ์จากราที่แยกจากสิ่งแวดล้อมทะเล (Xu et al., 2015; Zainuddin et al., 2010) สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ได้ การที่สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella Typhimurium* มีรายงานในรานานาเกลือ *Aspergillus flavus* (Ali et al., 2014)

จากการทดสอบพบสารสกัดจากรานาเกลือยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC 25923 และยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสในช่วง 10-23 และ 8-9 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากแหล่งอื่น ๆ ในระบบนิเวศพบว่าสารสกัดจากรานาเกลือให้ผลยับยั้ง *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ดีกว่าสารสกัดจากราทะเล *Epicoccum nigrum* (KT28), *Xylaria psidii* (KT30) และ *Mycelium sterillum* (KT29, KT32, KT33) จากประเทศอินโดนีเซีย ที่ให้ค่าโซนใสระหว่าง 7-14 และ 6.6-12.6 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Tarman et al., 2011) และดีกว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ *Aspergillus niger* (FEL01, FEL02, FEL05, FEL06) รวมถึงราอีกหลายชนิดที่แยกได้จากพีชป่าชายเลน ประเทศบราซิล ที่ให้ค่าโซนใสในการยับยั้ง *S. aureus* ระหว่าง 10-21 มิลลิเมตร และไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ (Silva, Almeida, Arruda, & Gusmao, 2011) สารสกัดในการศึกษานี้ยับยั้ง *B. cereus* ด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสในช่วง 12-24 มิลลิเมตร ดีกว่าสารสกัด Ethyl acetate จากราเอนโดไฟท์ *Hypocrea lixii* และ *Meyerozyma guilliermondii* ที่แยกจากป่าชายเลน ประเทศอินเดีย ที่ให้ค่าโซนใสเท่ากัน คือ 14 มิลลิเมตร (Vasant, Thangaraj, Ajithkumar, Ramanadevi, & Vallentin-Bhimba, 2013) และดีกว่าสารสกัด Ethanolic, Methanolic

และน้ำ จากรา *Ganoderma* หลายชนิดที่แยกได้จากราก ลำต้น และท่อนไม้ที่ตายแล้ว จากประเทศไนจีเรีย ที่ให้ค่าโซนในระหว่าง 7-15 มิลลิเมตร (Jonathan & Awotona, 2010) สารสกัดให้โซนยับยั้ง *S. Typhimurium* และ *C. albicans* ต่ำกว่าราเอนโดไฟท์หลายชนิดที่แยกได้จากพืชในสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็ม Salt marsh ในปากแม่น้ำ Vellar ประเทศอินเดีย (Kalyanasundaram, Nagamuthu, & Muthukumaraswamy, 2015) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ทดสอบที่ใช้เป็นคนละสายพันธุ์กับรายงานที่กล่าวมา นอกจากนี้การได้มาของสารสกัดในแต่ละรายงานยังแตกต่างกัน ส่งผลให้ความเข้มข้นและชนิดของสารในดิสก์ต่างกันทำให้ยากต่อการเปรียบเทียบ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Ampicillin และ Gentamicin ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ พบว่าสารสกัดเกือบทั้งหมดยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* ด้วยโซนกว้างกว่ายา Ampicillin และเทียบเท่ากับยา Gentamicin การยับยั้ง *S. aureus* ทั้งหมดให้โซนต่ำกว่ายา Ampicillin แต่เทียบเท่ากับยา Gentamicin ในขณะที่การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ รวมทั้งยีสต์มีขนาดโซนในช่วง 7-15 มิลลิเมตร ซึ่งต่ำกว่าดิสก์ยามาตรฐาน Ampicillin และ Gentamicin สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ และ Fluconazole สำหรับยีสต์

MIC ในการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ของสารสกัดอาหารเหลว PDB เลี้ยงรานาเกลือที่คัดเลือกมาจำนวน 9 สายพันธุ์ ทั้งที่ไม่มีความเค็มและที่มีความเค็มมีค่าในช่วง 512->2048 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรเหมือนกัน แต่ไม่สามารถเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่น ๆ ที่มีผู้รายงานไว้ เนื่องจากวิธีการทดสอบหาค่า MIC ในการยับยั้งเส้นใยราสาเหตุโรคพืชเป็นวิธีที่แตกต่างจากผู้วิจัยอื่น ๆ รายงานไว้ ซึ่งโดยทั่วไปเป็นการหาค่า MIC ในการยับยั้งการงอกของสปอร์รา

ค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 52923 อยู่ในช่วง 64-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ก่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ ค่า MIC ของ Aspergicin จากรา *Aspergillus* sp. FSY-01 และ *Aspergillus* sp. FSW-02 ที่แยกได้จากป่าชายเลนในการยับยั้ง *S. aureus* คือ 62.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร มีค่าต่ำกว่าสารสกัดในการศึกษานี้ประมาณ 1-8 เท่า (Zhu, Chen, Chen, Huang, & Wan, 2011) และค่า MIC ของสารสกัดจากรานาเกลือในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ในช่วง 1,024->1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรของการศึกษานี้ ก่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ *Arthrinium arundinis* ในการยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่มีค่าเท่ากันคือ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ต่ำกว่าสารสกัดในการศึกษานี้ประมาณ 11 เท่า (Ramos & Said, 2011) และค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ C8, C10, C15, C16 และ C19 จากรา *Engyodontium album* DFFSCS021 ที่แยกได้จากทะเลลึก ในการยับยั้ง *E. coli* ในช่วง 32-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรต่ำกว่าสารสกัดในการศึกษานี้ประมาณ 4-32 เท่า (Yao et al., 2014) และ

ค่า MIC ในการยับยั้ง *E. coli* ของสารบริสุทธิ์ *Aspergicin* จากรา *Aspergillus* sp. FSY-01 และ *Aspergillus* sp. FSW-02 ที่แยกได้จากป่าชายเลน คือ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ซึ่งต่ำกว่าสารสกัดในการศึกษาครั้งนี้ประมาณ 33 เท่า (Zhu et al., 2011)

ค่า MIC ในการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028 อยู่ในช่วง 512->2048 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ก่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ในรายงานอื่น ๆ สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ *A. arundinis* (Ramos & Said, 2011) มีค่า MIC ดีที่สุด คือ 240 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และสารบริสุทธิ์ Trichodermapentone A จากรา *T. koningii* (Song et al., 2010) Didymellamides A จากราทะเล *Stagonosporopsis cucurbitacearum* มีค่า MIC คือ 3.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (Haga et al., 2013)

การที่ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากรานาเกลือมีประสิทธิภาพน้อยกว่าสารบริสุทธิ์อื่น ๆ ในการยับยั้งจุลินทรีย์ อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบประกอบด้วยสารหลายสารรวมกัน และสารอาจเกิดปฏิกิริยาด้านฤทธิ์ระหว่างกัน ส่งผลให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ถูกสารอื่นด้านให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลง ดังเช่นมีรายงานว่าเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดร่วมกันจะทำให้เกิดการต้านฤทธิ์กันของยา (Gunnison, Kunishige, Coleman, & Jawetz, 1955)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากรานาเกลือ 9 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 18 สาร ด้วยวิธี Thin layer chromatography ในระบบตัวทำละลาย Toluene: Methanol: Acetone ในอัตราส่วน 6:1:3 ปริมาตรต่อปริมาตรเหมือนกันทุกสารสกัด พบว่ารานาเกลือสามารถสร้างสารที่มีค่า R_f แตกต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์รานาเกลือและความเค็มของอาหารเหลวที่เลี้ยงรา เมื่อนำสารสกัดจากอาหารเหลว PDB ที่ไม่มีความเค็มและมีความเค็มมาแยกองค์ประกอบของสาร พบสารองค์ประกอบส่วนใหญ่มี 6-7 ชนิด การแยกสารองค์ประกอบแต่ละชนิดขึ้นกับสมบัติของสาร และสารแต่ละชนิดมีสมบัติในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน ซึ่งปริมาณการดูดกลืนแสงขึ้นกับความเข้มข้นของสารนั้น โดยสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และสารประกอบเชิงซ้อน เป็นสารที่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นอัลตราไวโอเล็ต

สารองค์ประกอบส่วนใหญ่ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 และแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 ด้วยผลการยับยั้งที่แตกต่างกันไป สารองค์ประกอบที่ค่า R_f เท่ากันหรือใกล้เคียงกันจากราชนิดเดียวกัน ให้ผลการยับยั้งเหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน น่าจะเป็นสารเดียวกัน และกรณีที่สารองค์ประกอบจากราต่างชนิดกันมีค่า R_f เท่ากันหรือใกล้เคียงกันและมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน ก็อาจเป็นสารเดียวกันหรือต่างกันได้ ส่วนในกรณีที่สารองค์ประกอบที่มี R_f เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน แต่สารมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างกัน อาจเป็นไปได้ว่าเป็นสารที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน และราต่างชนิดกันอาจสร้างสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันที่มี

โครงสร้างและฤทธิ์ของสารที่ต่างกัน สารที่มีค่า R_f เท่ากันเมื่อสร้างจากราต่างสายพันธุ์กัน อาจเป็นสารต่างชนิดที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ว่าราชนิดเดียวกันอาจสร้างสารได้ไม่แตกต่างกันในอาหารที่ไม่มีและมีความเค็ม สารสกัดจาก PDB และ PDB/SW_{30ppt} จากราชนิดเดียวกันที่มีจำนวนและค่า R_f ของสารองค์ประกอบเท่ากันหรือต่างกันเล็กน้อย อาจสันนิษฐานได้ว่าสารดังกล่าวเป็นสารชนิดเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหาร PDB เลี้ยงรา *Aspergillus terreus* MP1 และ *A. ochraceus* MP2 ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล ประเทศอินเดีย พบสารองค์ประกอบ 4 และ 3 ชนิด ตามลำดับที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (Meenupriya & Thangaraj, 2011; Meenupriya et al., 2011) ขณะที่ราทะเล *Curvularia* sp. และ *Aspergillus* sp. ที่แยกได้จากน้ำทะเล ประเทศอินเดีย พบสารองค์ประกอบ 2 และ 5 ชนิด ตามลำดับ (Swathi, Sowjanya, Narendra, Reddy, & Satya, 2013)

การศึกษาฤทธิ์ของสารองค์ประกอบโดยวิธี Autobiography เป็นขั้นคัดกรองเท่านั้น เนื่องจากข้อจำกัดในการแยกสารบนแผ่น TLC คือ ตัวทำละลายใช้ในการศึกษาอาจไม่เหมาะสมกับชนิดของสารหรือสารองค์ประกอบมีขั้วใกล้เคียงกันมาก สารองค์ประกอบที่พบจึงแยกได้ไม่ชัดเจน ทำให้การตัดบริเวณสารองค์ประกอบแต่ละสารมีขนาดและรูปร่างไม่มาตรฐาน และในแผ่นสารองค์ประกอบชนิดเดียวกันมีความเข้มข้นของสารไม่เท่ากัน คือมีทั้งด้านที่มีความเข้มข้นของสารสูง (ส่วนโค้ง) และด้านที่มีความเข้มข้นต่ำ (ส่วนเว้า) การทดสอบการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชขององค์ประกอบสารได้วางส่วนโค้งของดิสก์สารซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงเข้าหาขอบโกลโลนีราทดสอบ ทำให้การวัดความสามารถของสารในการศึกษาครั้งนี้ไม่สมบูรณ์ เห็นชัดในการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก พบสารองค์ประกอบเดียวชนิดเดียวมีรัศมีของโซนบริเวณส่วนโค้งขนาดกว้างกว่ารัศมีบริเวณส่วนเว้า

การเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบโดยวิธี Disc diffusion กับวิธี Autobiography ทำได้เพียงเบื้องต้นเท่านั้น เนื่องจากข้อจำกัดของลักษณะแถบสารบนแผ่น TLC และการประเมินผลด้วยสายตาที่กล่าวมาข้างต้น นอกจากนี้จากการทดสอบใช้ความหนาของอาหารแตกต่างกัน และใช้ปริมาณของสารทดสอบแตกต่างกัน การทดสอบฤทธิ์ของสารบน TLC ซึ่งมีปริมาณสารอยู่น้อยและใช้อาหารเพียง 10 มิลลิลิตรต่อจานเพื่อให้สามารถตรวจสอบผลได้ และอาจเป็นไปได้ว่าการที่พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าสารองค์ประกอบ เนื่องจากการทดสอบใช้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงกว่าสารองค์ประกอบ หรือมีความเป็นไปได้ว่าสารหลายชนิดที่ผสมกันในสกัดหยาบมีกลไกการออกฤทธิ์ร่วมกันซึ่งอาจเกิดปฏิกิริยาเสริมฤทธิ์ระหว่างกัน หรือสารหลายชนิดที่ผสมในสารสกัดหยาบอาจเกิดปฏิกิริยาด้านฤทธิ์ระหว่างกัน ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ลดลง ส่วนการที่สารองค์ประกอบมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ต่ำกว่าสารสกัดหยาบที่มีปริมาณมากกว่า เนื่องจากสารองค์ประกอบเป็นสารบริสุทธิ์จึงสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งสมบูรณ์

ด้วยวิธีการทดสอบที่แตกต่างกัน พบว่าสารสกัดจากรานาเกลือทั้งหมด 40 สาร มีคุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวได้ดีเมื่อทดสอบบนแผ่น Parafilm M สารสกัด 22 สาร (ร้อยละ 55) มีคุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวเมื่อทดสอบโดยวิธี Oil displacement กับน้ำมันมะกอก เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์พบว่าให้ผลบวกเช่นเดียวกับ Cell free Supernatant ของยีสต์ *P. antarctica* Y7954, *P. aphidis* YB-205 และ *P. habeiensis* Y10BS025 (Sari, Kusharyoto, & Artika, 2014) และเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่น ๆ พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลือเลี้ยงรานาเกลือที่สามารถลดแรงตึงผิวเมื่อทดสอบโดยวิธี Oil displacement มีจำนวนมากกว่า Supernatant จากอาหารเหลือเลี้ยงแบคทีเรีย 25 สายพันธุ์ จาก 128 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากโรงรถ ภาคเหนือ ประเทศไทย ที่ทดสอบกับน้ำมันแร่ (Mineral oil) (Techaoei, Leelapornpisid, Santiarwarn, & Lumyong, 2007) และจำนวนต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ Supernatant จากอาหารเหลือเลี้ยงยีสต์ 16 ชนิด (ร้อยละ 100) ที่แยกได้จากพื้นที่ชายฝั่งทะเล ของเกาะสีชัง ประเทศไทย เมื่อทดสอบกับน้ำมันดิบ (Crude oil) (Luepongattana, Jindamarakot, Thaniyavarn, & Thaniyavarn, 2014) สำหรับความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากรามีรายงาน Culture supernatant จากรา *A. ustus* MSF3 ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลมีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวเมื่อทดสอบ โดยวิธี Drop collapsing และ Oil displacement กับน้ำมันดิบ (Kiran et al., 2009) อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบศักยภาพทำได้ยาก เนื่องจากความแตกต่างของสารทดสอบ ประเภทน้ำมัน วัตถุประสงค์ของการศึกษา รวมทั้งวิธีการที่ใช้ศึกษา การศึกษานี้ใช้สารสกัดหยาบและใช้น้ำมันมะกอก และปาล์ม และน้ำมันหมู ที่ผ่านการใช้แล้ว น้ำมันมีสัดส่วนของกรดไขมันที่แตกต่างกัน (Syed, 2015) (แสดงส่วนประกอบของน้ำมัน ดังภาคผนวก ข) เพื่อจุดประสงค์การนำมาใช้งานด้านการซักล้างหรือใช้บำบัดคราบน้ำมันจากอาหารที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ต่างจากรายงานอื่น ๆ ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ Supernatant จากอาหารเหลือเลี้ยงจุลินทรีย์และทดสอบกับน้ำมันดิบ (Kiran et al., 2009; Luepongattana et al., 2014) จึงให้ผลแตกต่างกัน และการใช้สารสกัดอาจให้ผลต่ำกว่า Cell free supernatant เนื่องจาก Cell free supernatant ประกอบไปด้วยสารหลายกลุ่มมากกว่าสารสกัด Ethyl acetate ที่มีเพียงสารบางกลุ่มเท่านั้นและสารเหล่านั้นอาจไม่ใช่สารที่มีสมบัติลดแรงตึงผิว (Justino et al., 2014)

การที่สารสกัดจากรานาเกลือให้ผลการทดสอบแตกต่างกัน เมื่อทดสอบ 3 วิธี เนื่องจากแต่ละวิธีทดสอบคุณสมบัติของสารด้วยหลักการที่แตกต่างกันคือ วิธี Parafilm M ทดสอบการสูญเสียเสถียรภาพจากแรงหรือความตึง (Interfacial tension) ของสารสกัดบนแผ่น Parafilm M เช่นเดียวกันวิธี Drop collapsing เพื่อดูการสูญเสียเสถียรภาพจากแรงหรือความตึงของสารสกัดบนผิวหน้าของน้ำมัน วิธี Oil displacement test ทดสอบการเป็นสารลดแรงตึงผิวสารสกัดบนน้ำมันที่ลอยบนผิวหน้าน้ำ เพื่อดูความสามารถในการสร้าง Micelle ทำให้น้ำมันละลายในน้ำ และทำให้น้ำมันเกิดการกระจายตัว

(Mishra et al., 2009) โดยทั่วไปมักใช้หลายวิธีร่วมกันด้วยน้ำมันที่แตกต่างกัน ในการคัดกรองสารลดแรงตึงผิวเบื้องต้น

ก่อนการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้ทำการเจือจางสารสกัด 50 เท่า และพบว่าสารสกัดที่เจือจางลง 50 เท่า ยังคงมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอย่างน้อยดีเทียบเท่า Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.00025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อประเมินระดับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Grading เทียบกับสีเหลืองและอ่อนลงที่ระดับต่าง ๆ ของ Ascorbic acid ด้วยตาเปล่า จึงคาดว่าสารสกัดที่ไม่ได้เจือจางน่าจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่านี้มาก อย่างไรก็ตามการประเมินด้วยสายตาเป็นไปได้เพียงการประเมินเบื้องต้นเท่านั้น ส่วนการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในการศึกษาครั้งนี้ ใช้การวิเคราะห์วิธี Dot blot DPPH rapid staining โดยที่สารสกัดที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง เกิดการจางลงจนเป็นสีเหลือง การทดสอบวิธีนี้เป็นารทดสอบด้วยวิธีทางเคมีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว แต่ทั้งนี้วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ได้เบื้องต้นเท่านั้น เนื่องจาก DPPH เป็นสารที่ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ส่งผลให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง (Bondet, Brand-Williams, & Berset, 1997; Molyneux, 2004) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่เจือจาง 50 เท่ากับสารสกัดจากราชนิดอื่น ๆ พบว่าสารสกัดที่เจือจาง 50 เท่าจากรานาเกลือ 40 สาร มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งหมดเช่นเดียวกับสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ 21 สาร ที่แยกได้จาก *Eugenia jambolana* (ต้นหว่า) ประเทศอินเดีย (Yadav, Yadav, & Yadav, 2014) นอกจากนี้พบว่ารายงานการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราแหล่งอื่น ๆ เช่น สารสกัดจากรา *Aspergillus* sp. JPY1 และ *Phoma* sp. ที่แยกได้จาก *Salvadora oleoides* ประเทศอินเดีย (Dhankhar, Kumar, Dhankhar, & Yadorennav, 2012) สารสกัดจากราทะเล *Gymnascella dankaliensis*, *Nigrospora oryzae* และ *Engyodontium album* ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล (*Hippospongia communis*) ประเทศอียิปต์ (Abdel-Monem et al., 2013) และ Fungal filtrates จากรา 2 ชนิด *A. flavus* และ *A. penicillioides* ที่แยกได้จากนาเกลือประเทศไทย (Ali et al., 2014)

การจำแนกชนิดของรานาเกลือที่มีความสามารถด้านต่าง ๆ ที่ดี พบว่ารานาเกลือทั้งหมดเป็น *Aspergillus* 2 สปีชีส์ ซึ่งจีโนม *Aspergillus* เป็นราที่พบได้มากในสิ่งแวดล้อม (Cantrell et al., 2006; 2011) มีรายงานการพบ *Aspergillus* หลายชนิดที่แยกได้จากแหล่งที่มีความเค็มสูงที่มีคุณสมบัติขบเค็ม เช่น *A. penicillioides*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. penicillioides*, *A. sydowii*, *A. versicolor* (Gonsalves et al., 2012) และมีรายงานการศึกษา *Aspergillus* ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะโดยส่วนใหญ่

แยก *Aspergillus* sp. ได้จากดิน (Dix & Webster, 1995; Klich, 2002; Thompson, Castrillon, Delgado, & Garcia, 1994) *Aspergillus* หลายชนิดสามารถผลิตยาปฏิชีวนะและผลิตสารพิษ Mycotoxin ซึ่งเป็น Toxic secondary metabolites ที่สร้างขึ้นในอากาศ และสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม

Aspergillus sp. SSCS0069, SSPB3124 และ SSPB3208 ที่ศึกษาครั้งนี้มีคุณสมบัติผลิตสารที่มีประสิทธิภาพสูงและมีขอบเขตการยับยั้งจุลินทรีย์กว้าง เนื่องจากสามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิด คือ *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 และยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ทั้ง 2 ชนิดคือ *Bacillus cereus* TISTR 121 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ดีสอดคล้องกับรายงานของ Hasan and Zafrul Azam (2010) ที่รายงานว่า *Aspergillus* เป็นแหล่งของสารต้านจุลินทรีย์ โดยสารสกัด Ethyl acetate จาก *Aspergillus* sp. แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Sarcina lutea* และ *S. aureus*

การศึกษาทั้งหมดแสดงแนวโน้มว่ารานาเกลือเป็นราที่มีศักยภาพ ในการนำไปใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยมีความน่าสนใจในแง่ของการชอบเค็ม และในแง่ของการผลิตสารที่มีความสามารถสำหรับนำไปใช้ในด้านต่าง ๆ ทั้งการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนส การผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ และสารลดแรงตึงผิว สามารถนำไปพัฒนาประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม ทางสิ่งแวดล้อม การบำบัดของเสีย หรือนำสารไปศึกษาเพื่อสำหรับสังเคราะห์ทางเคมีเป็นต้น

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimize) ในการเลี้ยงรานาเกลือเพื่อให้รานาเกลือสร้างสารในปริมาณสูงและมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น สำหรับนำไปศึกษาและพัฒนาทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

บรรณานุกรม

- เกษตรพอเพียงคลับ. (2556). *การทำนาเกลือ*. เข้าถึงได้จาก <http://www.kasetporpeangclub.com/forums/นวัตกรรมฟุ้งตนเอง/3897-การทำนาเกลือ.html>.
- ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล. (2553). *การทำนาเกลือ*. เข้าถึงได้จาก <http://www.mkh.in.th/index.php/2010-03-22-18-05-14/2010-03-26-05-53-43>.
- ชลิดา เล็กสมบูรณ์. (2557). *โรคพืชและการวินิจฉัย*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พงษ์พิสุทธิ์ จงอุดมสุข. (2555). เชื้อคือยาปฏิชีวนะวิกฤตและทางออกของสังคมไทย. *HSRI Forum*, 1-16.
- อังสุมา ชยสมบัติ. (2533). *โรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. วิทยานิพนธ์, วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรุณ ชาญชัยชาววิวัฒน์ และจรีมาศ วงศ์ศิริรัตน์. (2552). การควบคุมโรคแอนแทรกโนสในพริกชี้ฟ้า (*Colletotrichum gloeosporioides*) โดยยีสต์แยกได้จากผักและผลไม้. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์*, ปีที่ 9, 120-131.
- Abdel-Monem, N., Abdel-Azeem, A. M., Ashry, E. S. H. E., Ghareeb, D. A., & Nabil-Adam, A. (2013). Assessment of secondary metabolites from marine-derived fungi as antioxidant. *Open Journal of Medicinal Chemistry*, 3, 60-73.
- Adams, D. J. (1997). Drug and pesticide resistance in fungi. In J. D. Hayes, & C. R. Wolf (Eds.), *Molecular genetics of drug resistance* (pp. 31-80). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Alejandro, C. S., Humberto, H. S., & Maria, J. F. (2011). Production of glycolipids with antimicrobial activity by *Ustilago maydis* FBD12 in submerged culture. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 2512-2523.
- Ali, I., Kanhayuwa, L., Rachdawong, S., & Rakshit, S. K. (2012). Identification, phylogenetic analysis and characterization of obligate halophilic fungi isolated from a man-made solar saltern in Phetchaburi province, Thailand. *Annals of Microbiology*, 1-9.
- Ali, I., Siwarungson, N., Punnapayak, H., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Bankeeree, W., & Rakshit, S. K. (2014). Screening of potential biotechnological applications from obligate halophilic fungi, isolated from a man-made solar saltern located in Phetchaburi province, Thailand. *Pakistan Journal of Botany*, 46, 983-988.

- Amaral, P. F. F., Coelho, M. A. Z., Marrucho, I. M., & Coutinho, J. A. P. (2010). Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. In R. Sen (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 236-249). New York: Springer Verlag.
- Amyes, S. G. B., & Thomson, C. J. (1995). Antibiotic resistance in the ICU: the eve of destruction. *British Journal of Intensive Care*, 5, 263-271.
- Anwar, T., & Chauhan, R. S. (2012). Computational analysis of halotolerance genes from halophilic prokaryotes to infer their signature sequences. *International Journal of Advanced Biotechnology and Bioinformatics*, 1, 69-78.
- Arcury, T. A., Quandt, S. A., & Russell, G. B. (2002). Pesticide safety among farmworkers: perceived risk and perceived control as factors reflecting. *Environmental Justice*, 233-240.
- Arora, D. S., & Chandra, P. (2010). Assay of antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 765-777.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (2006). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4th ed.). St. Paul Minnesota : The American phytopathological society press.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1996). Antimicrobial sensitivity testing by agar diffusion method. *African Journal of Clinical*, 44, 493.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics-Nature*, 58, 1-26.
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles, *Journal of Bacteriology*, 181, 4725-4733.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• Free Radical Method. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30, 609–615.
- Bosland, P. W., & Votava, E. J. (2003). *Peppers: vegetable and spice capsicums*. New York: CAB International.
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10, 211-247.

- Brusselaers, N., Vogelaers, D., & Blot, S. (2011). The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. *Annals of Intensive Care, 1*, 1-7.
- Buchalo, A. S., Nevo, E., Wasser, S. P., Oren, A., & Molitoris, H. P. (1998). Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea first records. *The Royal Society, 265*, 1461-1465.
- Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005a). Yeast diversity in hypersaline habitats. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 244*, 229-234.
- Butinar, L., Sonjak, S., Zalar, P., Plemenitas, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005b). Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Botanica Marina, 48*, 73-79.
- Butinar, L., Zalar, P., Frisvad, J. C., & Gunde-Cimerman, N. (2005c). The genus *Eurotium*—members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology, 51*, 155-166.
- Cabrito, T. R., Teixeira, M. C., & Sá-Correia, I. (2009). Global adaptive response and resistance to agricultural fungicides: lessons from yeast and phytopathogenic fungi. In P. De Costa, & P. Bezerra (Eds.), *Fungicides: chemistry, environmental impact and health effects* (pp. 228-253). New York: Nova Science Publishers.
- Cannell, R. J. P. (1998) How to approach the isolation of a natural product, in Natural Products Isolation. In R. J. P. Cannell (Ed.), *Methods in Biotechnology* (pp. 1-51). New Jersey: Humana Press.
- Cantrell, S. A., Dianese, J. C., Fell, J., Gunde-Cimerman, N., & Zalar, P. (2011). Unusual fungal niches. *Mycologia, 103*, 1161-1174.
- Cantrell, S. A., Martinez, L. C., & Molina, M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological research, 110*, 962–970.
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., & Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology, 183*, 5385-5394.
- Chandra, P., & Arora, D. S. (2009). Antioxidant activity of fungi isolated from soil of different areas of Punjab, India. *Journal of applied and natural science, 1*, 123-128.

- Chatchawan, T., Peerapornpisal, Y., & Komarek, J. (2011). Diversity of cyanobacteria in man-made solar saltern, Petchaburi Province, Thailand. *Fottea*, *11*, 203–214.
- Choma, I. M., & Grzelak, E. M. (2010). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, *19*, 2684-2691.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2004). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guideline. Document M44-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; approved Standard_ Seventh Edition. M7-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. M100-S17. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008a). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard 2nd ed. M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008b). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd ed. M27–A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, Eleventh Edition. M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Czaplewski, L. G., Collins, I., Boyd, E. A., Brown, D., East, S. P., Gardiner, M., Fletcher, R., Haydon, D. J., Henstock, V., Ingram, P., Jones, C., Noula, C., Kennison, L., Rockley, C., Rose, V., Thomaidis-Brears, H. B., Ure, R., Whittaker, M., & Stokes, N. R. (2009). Antibacterial alkoxybenzamide inhibitors of the essential bacterial cell division protein. *Medicinal Chemistry Letters*, *9*, 524–527.
- DasSarma, S., & Arora, P. (2001). Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9.
- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2012). Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-11.

- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, 417-433.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414-430.
- Delcour, A. H., (2009). Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794, 808–816.
- Demain, A. L. (2007). The business of biotechnology. *Industrial biotechnology*, 3, 269-283.
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Boloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794-804
- Dhankhar, S., Kumar, S., Dhankhar, S., & Yadav, J. P. (2012). Antioxidant activity of fungal endophytes isolated from *Salvadora oleoides* Decne. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 380-385.
- Dickinson, C. H., & Boardman, F. (1971). Physiological studies of some fungi isolated from peat. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 293-305.
- Dix, N. J., & Webster, J. (1995). *Fungal Ecology*. London: Chapman & Hall.
- Doss, M. (1970). Analytical and preparative thin-layer chromatography of porphyrin methyl esters. *Z Klin Chem Klin Biochem journal*, 8, 197-207
- Fakruddin, M. D. (2012). Biosurfactant: production and application. *Petroleum & environmental biotechnology*, 3, 1-5.
- Fox, E. M., & Howlett, B. J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 481–487.
- Frieden, T. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States. *Centers for disease control and prevention*, 49-89.
- Frisvad, J. C. (2005). Halotolerant and halophilic fungi and their extracellular production. In N. Gunde-Cimerman, A. Oren, & A. Plemenitas, (Eds.), *Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria and eukarya* (pp. 425–439). Netherlands: Springer.
- Gautam, A. K. (2014). The genera *Colletotrichum*: an incitant of numerous new plant diseases in India Gautam. *Journal on new Biological Reports*, 3, 9-21.

- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*, 501-517.
- Gonsalves, V., Nayak, S., & Nazareth, S. (2012). Halophilic fungi in a polyhaline estuarine habitat. *Journal of Yeast and Fungal Research*, *3*, 30-36.
- Griffith, R. W. (1994). The life of the first vertebrates. *Bioscience*, *44*, 408-409.
- Gunde-Cimerman, N., Frisvad, J. C., Zalar, P., & Plemenitas, A. (2005). Halotolerant and halophilic fungi. In S. K. Deshmukh, & M. K. Rai (Eds.), *Biodiversity of Fungi-their role in human life*. (pp. 69-128). New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co.
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., & Plemenitas, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, *113*, 1231-1241.
- Gunde-Cimerman, N., & Zalar, P. (2014). Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine. *Journal of Biotechnology*, *52*, 170-179.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, G. S., & Plemenitas, A. (2000). Hypersaline waters in salterns: natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, *32*, 235-240.
- Gunnison, J. B., Kunishige, E., Coleman, V. R., & Jawetz, E. (1995). The mode of action of antibiotic synergism and antagonism: the effect in vitro on bacteria not actively multiplying. *Journal of general microbiology*, *13*, 509-518.
- Haas, D., & Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, *3*, 307-319.
- Hadden, J. F., & Black, L. L. (1989). Anthracnose of pepper caused by *Colletotrichum* spp. In *Proceeding of the international symposium on integrated management practices: tomato and pepper production in the tropics* (pp.189-199), Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Centre.
- Haga, A., Tamoto, H., Ishino, M., Kimura, E., Sugita, T., Kinoshita, K., Takahashi, K., Shiro, M., & Koyama, K. (2013). Pyridone alkaloids from a marine-derived fungus, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, and their activities against azole-resistant *Candida albicans*. *Journal of Natural Products*, *76*, 750-754.

- Hamburger, M. O., & Cordell, G. A. (1987). A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*, 50, 19-22.
- Han, K. H., & Prade, R. A. (2002). Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 43, 1065-1078.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Vitarbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2, 43-56.
- Hasan, A. Al., & Azam, A. T. M. Z. (2010). In vitro antibacterial, cytotoxic and free radical scavenging activities of an *Aspergillus* species. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 13, 47-50.
- Hasan, S., Ansari, M. I., Ahmad, A., & Mishra, M. (2015). Major bioactive metabolites from marine fungi: A Review. *Bioinformation*, 11, 176-181.
- Horbach, R., Navarro-Quesadac, A. R., Knoggec, W., & Deising, H. B. (2011). *Journal of Plant Physiology*, 168, 51-62.
- Howell, C. R., Beier, R. C., & Stipanovic, R. D. (1988). Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* pre-emergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology*, 78, 1075-1078.
- Huang, Y., Wang J., Li, G., Zheng, Z., & Su, W. (2001). Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortune* and *Torreya grandis*. *African Journal of Biotechnology*, 7, 3004-3010.
- Jonathan, S. G., & Awotona, F. E. (2010). Studies on antimicrobial potentials of three *Ganoderma* species. *African Journal of Biomedical Research*, 13, 133-139.
- Justino, C. I. L., Duarte, K., Freitas, A. C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2014). Classical Methodologies for preparation of extracts functions. In D. Barcelo (Ed.), *Analysis of Marine Samples in Search of Bioactive Compounds* (pp 35-57). Netherlands: Elsevier.
- Kaewchai, S. (2012). Application of *Trichoderma* spp. for plant disease control. *Princess of Naradhiwad University Journal*, 108-123.
- Kaewchai, S., Soyong, K., & Hyde, K. D. (2009). Mycofungicides and fungal biofertilizers. *Fungal Diversity*, 38, 25-50.

- Kalyanasundaram, I., Nagamuthu, J., & Muthukumaraswamy, S. (2015). Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated and identified from salt mask plant in Velar Estuary. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 7, 13-20.
- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D., & De'fago, G. (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, 4-13.
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 937-947.
- Kennelly, M., Mara, J., Rivard, C., Miller, G. L., & Smith, D. (2012). Introduction to abiotic disorders in plants. *The Plant Health Instructor*. United State: APS publishers.
- Kim, J. H., Chang, P. K., Chan, K. L. Faria, N. C. G., Mahoney, N., Kim, Y. K., Martins M. L., & Campbell, B. C. (2012). Enhancement of commercial antifungal agents by kojic acid. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 13867-13880.
- Kiran, G. S., Hema, T. A., Gandhimathia, R., Selvina, J., Thomasa, T. A., Ravji T. R., & Natarajaseenivasana, K. (2009). Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73, 250-256.
- Klich, M. A. (2002). Identification of Common *Aspergillus* Species. Centraal bureau voor schimmel cultures, P.O.Box 85167, www.cbs.knaw.nl/publications/index.html
- Kogej, T., Gostincar, C., Volkman, M., Gorbushina, A. A., & Gunde-Cimerman, N. (2006). Mycosporines in extremophilic fungi-novel complementary osmolytes. *Environmental Chemistry*, 3, 105-110.
- Kohlmeyer, J., & Volkman-Kohlmeyer, B. (1991). Illustrated key to filamentous higher marine fungi. *Botanica Marina*, 34, 1-61.
- Kostick, D. S. (1993). *The material flow of salt*. Washington DC: U.S department of the interior.
- Kowalska, T., Kaczmariski, K., & Prus, W. (2003). Theory and mechanism of thin-layer chromatography. In J. Sherma, & B. Fried (Eds.), *Handbook of Thin-Layer Chromatography* (pp. 62-105). New York: Marcel Dekker.

- Krairapanond, N., Krairapanond, A., Sinthuwanich, D., & Junpet, T. (1992). Environment impact of rock salt mining and water resources of northeast Thailand. In *Proceedings of the International Symposium on Strategies for Utilizing Salt Affected Lands, February 17-25* (pp. 309-322). Bangkok, Thailand: Department of Land Development.
- Kralj-Kuncic, M., Kogej, T., Drobne, D., & Gunde-Cimerman, N. (2010). Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 329-337.
- Kushner, D. J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In D. J. Kushner (Ed.), *Microbial life in extreme environments* (pp 317-368). London: Academic Press.
- Kushner, D. J. (1985). The Halobacteriaceae. In I. C. Gunsalus, C. R. Woese, & R. S. Wolfe (Eds.), *The Bacteria, a Treatise on Structure and Function* (pp. 171-206). San Diego: Academic Press.
- Kushner, D. J. (1993). Growth and nutrition of halophilic bacteria. In R. H. Vreeland, & L. Hochstein, (Eds.), *The biology of halophilic bacteria* (pp 87-103). Florida: CRC Press.
- Luepongpatana, S., Jindamarakot, S., Thaniyavarn, S., & Thaniyavarn, J. (2014). Screening of biosurfactant production yeast and yeast-like fungi isolated from the coastal areas of Koh Si Chang. In *The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference* (pp. 468-477). Chiang Rai.
- Lu, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, 840-860.
- Mani, K., Salgaonkar, B. B., Das, D., & Bragança, J. M. (2012). Community solar salt production in Goa, India. *Aquatic Biosystems*, 8, 1-8.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5, 73-83.
- Mayer, A. M. S., & Hamann, M. T. (2004). Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Biotechnology*, 6, 37-52.

- May, J. L., King, A., & Warren, C. A. (1997). Fluconazole disc diffusion testing for the routine laboratory. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40, 511–516.
- McFarland, J. (1907). The nephelometer an instrument for estimating the number of bacteria in suspension used for calculating the index and for vaccine. *Journal American Medical Association*, 49, 1176-1178.
- McGuffin, V. L. (2004). Theory of chromatography. In E. Heftmann (Ed.), *Chromatography* (pp.1-94). Netherlands: Elsevier B. V.
- Meenupriya, J., Majumdar, A., Jenifer, A., Britto, U., & Thangaraj, M. (2011). Biochemical analysis and structure elucidation of α - Campholene aldehyde from marine sponge-derived *Aspergillus terreus* MP1, *Der Pharma Chemica*, 3, 466-473.
- Meenupriya, J., & Thangaraj, M. (2011). Analytical characterization and structure elucidation of metabolites from *Aspergillus ochraceus* MP2 fungi. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1, 376-380.
- Mishra, M., Muthuprasanna, P., Prabha, K. S., Rani, P. S., Satish Babu, I. A., Chandiran, I. S., & Shalini, S. (2009). Basics and potential applications of surfactants-A Review. *International Journal of Pharm Tech Research*, 1, 1354–1365.
- Mohammed, A. H., Tantry, B. A., & Rahiman, A. (2014). Phenotypic characterization of moderate halophilic fungi from athalassohaline lake in Saudi Arabia. *European Scientific Journal*, 10, 1857-7431.
- Montri, P., Taylor, P. W. J., & Mongkolporn, O. (2009). Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the causal agent of chili anthracnose, in Thailand. *Plant Disease Journal*, 93, 17-20.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211-219.
- Moubasher, A. H., Abdel-Hafez, S. I. I., Bagy, M. M. K., & Abdel-Satar, M. A. (1990). Halophilic and halotolerant fungi in cultivated desert and salt marsh soils from Egypt. *Acta Mycologica*, 26, 65-81.
- Nayak, S. S., Gonsalves, V., & Nazareth, S. W. (2012). Isolation and salt tolerance of halophilic fungi from mangroves and solar salterns in Goa-India. *Indian Journal of Marine Science*, 42, 164-172.

- Nazareth, S., Gonsalves, V., & Nayak, S. (2012). A first record of obligate halophilic *Aspergilli* from the Dead Sea. *Indian Journal of Microbiology*, *52*, 22-27.
- Oren, A. (1999). Microbiological studies in the Dead Sea: future challenges toward the understanding of life at the limit of salt concentrations. *Hydrobiologia*, *405*, 1-9.
- Oren, A. (2002). Hypersaline environment and their biota. In A. Oren (Ed.), *Halophilic microorganism and their environment, Life in extreme habitats and astrobiology* (pp. 575). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Pacwa-Pociniczak, M., Plaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*, 633-654.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1-25.
- Palmer, D. L., Pett, S. B., & Akl, B. F. (1995). Bacterial wound colonization after broad-spectrum versus narrow-spectrum antibiotics. *The Annals of Thoracic Surgery*, *59*, 626-31.
- Pawle, G., & Singh, S. K. (2014). Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical analysis of an endophytic species of *Nigrospora* isolated from living fossil *Ginkgo biloba*. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, *4*, 1-9.
- Pearson, R. D., Steigbigel, R. T., Davis, H. T., & Chapman, S. W. (1980). Method for reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *18*, 699-708.
- Percival, M., (1996). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*; Advanced Nutrition Publications inc, 1-4.
- Plemenitas, A., Lenassi, L., Konte, T., Kejzar, A., Zajc, J., Gostincar C., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: a molecular perspective. *Frontiers in microbiology*, *5*, 1-12.
- Plemenitas, A., Vaupotic, T., Lenassi, M., Kogej, T., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity, a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology*, *61*, 67-75.

- Poonpolgul, S., & Kumphai, S. (2007). Chilli pepper anthracnose in Thailand. country report. In: D. G. Oh, & K. T. Kim, (Eds.), *Abstracts of the first international symposium on chilli anthracnose* (p 23). Korea: National Horticultural Research Institute.
- Porter, C. L. (1924). Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi. *American Journal of Botany*, *11*, 168-188.
- Qazi, M. A., Subhan, M., Fatima, N., Ali, M. I., & Ahmed, S. (2013). Role of biosurfactant produced By *Fusarium sp.* BS-8 in enhanced oil recovery (EOR) through sand pack column. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, *3*, 599-604.
- Ramos, H. P., & Said, S. (2011). Modulation of biological activities produced by an endophytic fungus under different culture conditions. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *2*, 443-449.
- Rangel-Yagui, C. O., Pessoa-Jr, A., & Tavares, L. C. (2005). Micellar solubilization of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *8*, 147-163.
- Ravichandra, N. G. (2013). Fundamentals of plant pathology. Delhi: PHI Learning Limited.
- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *57*, 609-618.
- Sari, M., Kusharyoto, W., & Artika, I. M. (2014). Screening for biosurfactant-producing yeast: confirmation of biosurfactant production. *Biotechnology*, *13*, 106-111.
- Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (2006). Natural products isolation. (2nd ed). New Jersey: Humana Press.
- Sepcic, K., Zalar, P., & Gunde-Cimerman, N. (2011). Low water activity induces the production of bioactive metabolites in halophilic and halotolerant fungi. *Marine Drugs*, *9*, 43-58.
- Satpute, S. K., Banat, M. I., Dhakephalkar, P. K., Banpurkar, A. G., & Chopade, B. A. (2010). Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, *28*, 436-450.
- Shenoy, B. D., Jeewon, R., Lam, W. H., Bhat, D. J., Than, P. P., Taylor, P. W. J., & Hyde, K. D. (2007). Morpho-molecular characterisation and epitypification of *Colletotrichum capsici* (*Glomerellaceae, Sordariomycetes*), the causative agent of anthracnose in chilli. *Fungal Diversity*, 197-211.

- Silva, M. R. O., Almeida, A. C., Arruda, F. V. F., & Gusmao, N. (2011). Endophytic fungi from brazilian mangrove plant *Laguncularia racemose* (L.) Gaertn. (Combretaceae): their antimicrobial potential. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 1260-1266.
- Sintusaard, P., Chantachon, S., & Koseyayotin, M. (2009a). Solar salt culture: production pattern, conservation, revitalization and salt making occupational development in the saline basin of Samutprakarn. *Pakistan Journal of Social Sciences*, 6, 239-241.
- Sintusaard, P. (2009b). Salt culture: Method of production conservation preservation and development of salt farms in the coastal regions in central Thailand. *Social Sciences*, 4, 583-586.
- Song, F., Dai, H., Tong, Y., Ren, B., Chen, C., Sun, N., & Zhang, L. (2010). Trichoderma ketones AD and 7-O-methylkoninginin D from the marine fungus *Trichoderma koningii*. *Journal of Natural Products*, 73, 806-810.
- Striegel, M. F., & Hill, J. (1996). Thin-layer chromatography for binding media analysis. Los Angeles: The Getty Conservation Institute.
- Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *TRENDS in Microbiology*. 12, 317-324.
- Sumeet, R., & Mukerji, K. G. (2000). Exploitation of protoplast fusion technology in improving biocontrol potential. In R. R. Upadhyay, K. G. Mukerji, & B. P. Chamola, (Eds.), *Biocontrol potential and its exploitation insustainable agriculture* (pp. 39-48). New York: Kluwer Academy Plenum.
- Swathi, J., Narendra, K., Sowjanya, K. M., & Krishna Satya, A. (2013). Marine fungal metabolites as a rich source of bioactive compounds. *African Journal of Biochemistry Research*, 7, 184-196.
- Syed, A. (2015). Specialty/GM vegetable oils: properties and applications in food (rapeseed, sunflower, soybean). *Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition: Properties, Processing and Application*. In G. Talbot (Ed.). UK. Woodhead Publishing.
- Swathi, J., Sowjanya, K. M., Narendra, K., Reddy, K. V. N. R., & Satya, A. K. (2013). Isolation, identification & production of bioactive metabolites from marine fungi collected from coastal area of Andhra Pradesh, India. *Journal of Pharmacy Research*, 6, 663-666.

- Tarman, K., Lindequist, U., Wende, K., Porzel A., Arnold, N., & Wessjohann, L. A. (2011). Isolation of a new natural product and cytotoxic and antimicrobial activities of extracts from fungi of Indonesian marine habitats. *Marine Drugs*, 9, 294-306.
- Techaoei, S., Leelapornpisid, P., Santiarwarn, D., & Lumyong, S. (2007). Preliminary screening of biosurfactant producing microorganisms isolated from hot spring and garages in northern Thailand. *KMITL Science and Technology Journal*, 7, 38-43.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *Hindawi Publishing Corporation Biomed Desearch International*, 1-11.
- Than, P. P., Jeewon R., Hyde, K. D., Pongsupasamit, S., Mongkolpornde, O., & Taylor P. W. J. (2008a). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology*, 57, 562–572.
- Than, P. P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P. W. J., & Hyde, K. D. (2008b). Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9, 764-778.
- Thompson, L., Castrillon, M. A., Delgado, M., & García, M. (1994). Isolation of several species of the genus *Aspergillus* from soil of intrahospital ornamental plants. *Revista medica de Chile*, 122, 1367-71.
- Tongpin, W., Pongpisutta, R., & Rattanakreetakul, C. (2012). Potential of antagonistic yeast to control *Colletotrichum gloeosporioides* causing papaya fruit anthracnose. *Agricultural Science Journal*, 43, 576-579.
- Touchstone, J. C. (1992). *Practice of thin layer chromatography*. New York: John Wiley & Sons Publishing.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.
- Vasant, R. A., Thangaraj, M., Ajithkumar, T. T., Ramanadevi, V., & Valentin Bhimba, B. (2013). Antagonistic assay of secondary metabolites of mangrove associated fungi against fish and human pathogens. *Bulletin of Pharmaceutical and Medical Sciences*, 1, 20-26.

- Vaske, Y. M., & Crews, P. (2014). An update on the biomedical prospects of marine-derived small molecules with fascinating structure and stereochemical diversity. In B. Hernandez-Ledesma, & M. Herrero, (Eds.). *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources* (pp.1-26). United States: Wiley-Blackwell.
- Viterbo A., Ramot O., Chernin L., & Chet, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, *81*, 549-556.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D., & Defago, G. (1989). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The European Molecular Biology Organization Journal*, *8*, 351-358.
- Walker, G. M., & White, N. W. (2005). Introduction to fungal physiology. In K. Kavanagh (Ed.), *Fungi Biology and Applications* (pp.1-36). United Kingdom: John Wiley & Sons.
- Walsh, F. M., & Amyes, S. G. B. (2004). Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Microbiology*, *7*, 439-444.
- Walsh, T. J., & Dixon, D. M. (1989). Nosocomial aspergillosis: environmental microbiology, hospital epidemiology, diagnosis and treatment.
- Weir, B. S., Johnston, P. R., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, *73*, 115–180.
- Weller, D. M., Raaijmakers, J., McSpadden Gardener, B., & Thomashow, L. M. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *40*, 309-348.
- Whipps, J. M. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, *107*, 127-142.
- Wilhite, S. E., Lunsden, R. D., & Strancy, D. C. (2001). Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 5055-5062.
- Xu, L., Meng, W., Cao, C., Wang, J., Shan, W., & Wang, Q. (2015). Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. *Marine Drugs*, *13*, 3479-3513.
- Yadav, M., Yadav, A., & Yadav, J. P. (2014). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *7*, 256-261.

- Yao, Q., Wang, J., Zhang, Z., Nong, X., Xu, X., & Qi, S., (2014). Cytotoxic polyketides from the deep sea derived-fungus *Engyodontium album* DFFSCS021. *Marine drugs*, 12, 5902-5915.
- Zainuddin, N., Alias, S. A., Lee, C. W., Ebel, R., Othman, N. A., Mukhtar, M. R., & Awang, K. (2010). Antimicrobial activities of marine fungi from Malaysia. *Botanica Marina*, 53, 507–513.
- Zajc, J., Zalar, P., Plemenitaš, A., & Gunde-Cimerman, N. (2012). The Mycobiota of the Salterns. In Raghukumar, C. (Ed.), *Biology of Marine Fungi* (pp. 133-158). Berlin: Springer.
- Zalar, P., Hoog, G. S., Schroers, H. Frank, J. M., & Gunde-Cimerman, N. (2005). Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 87, 311-328.
- Zhu, F., Chen, G., Chen, X., Huang, M., & Wan, X. (2011). Aspergicin, a new antibacterial alkaloid produced by mixed fermentation of two marine-derived mangrove epiphytic fungi. *Chemistry of Natural Compounds*, 47, 767–769.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
รายนามเกลือที่ใช้ในการศึกษา

ตาราง ก รายนามเกลือที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับ	รายนามเกลือ	จังหวัดที่เก็บ	เดือน/ปีที่เก็บ	แหล่งที่เก็บ			ความเค็ม (ppt)
				นาแฝ	นาดอก	นาวาง	
1	SSCS0003	จันทบุรี	1/54		/		300
2	SSCS0006	จันทบุรี	1/54	/			285
3	SSCS0031	จันทบุรี	4/54	/			165
4	SSCR0034	ฉะเชิงเทรา	4/54		/		168
5	SSCR0044	ฉะเชิงเทรา	4/54	/			150
6	SSCR0045	ฉะเชิงเทรา	4/54	/			150
7	SSCR0066	ฉะเชิงเทรา	7/54	/			150
8	SSCS0069	จันทบุรี	4/53			/	350
9	SSCS0070	จันทบุรี	4/53			/	350
10	SSCS0074	ฉะเชิงเทรา	1/53	/			180
11	SSCR0078	ฉะเชิงเทรา	1/53			/	270
12	SSCR0082	ฉะเชิงเทรา	1/53			/	270
13	SSCR0088	ฉะเชิงเทรา	1/53		/		250
14	SSCR0102	ฉะเชิงเทรา	1/53			/	270
15	SSCS0106	จันทบุรี	4/53		/		280
16	SSCS0109	จันทบุรี	4/53			/	350
17	SSCS0115	จันทบุรี	4/53			/	350
18	SSCR0501(AQ)	ฉะเชิงเทรา	7/55	-----ไม่มีข้อมูล-----			
19	SSCR0502 (BC)	ฉะเชิงเทรา	7/55	-----ไม่มีข้อมูล-----			
20	SSCR0503 (BD)	ฉะเชิงเทรา	7/55	-----ไม่มีข้อมูล-----			

ตาราง ก (ต่อ)

ลำดับ	รายนามเกลือ	จังหวัดที่เก็บ	เดือน/ปีที่เก็บ	แหล่งที่เก็บ			ความเค็ม (ppt)
				นาแพ	นาดอก	นาวาง	
21	SSCR0504 (WB)	ฉะเชิงเทรา	7/55	-----ไม่มีข้อมูล-----			
22	SSCR0505 (WC)	ฉะเชิงเทรา	7/55	-----ไม่มีข้อมูล-----			
23	SSCR0506 (WE)	ฉะเชิงเทรา	7/55	-----ไม่มีข้อมูล-----			
24	SSCR0507 (WF)	ฉะเชิงเทรา	7/55	-----ไม่มีข้อมูล-----			
25	SSPB1105	เพชรบุรี	12/55	/			95
26	SSPB1109	เพชรบุรี	12/55	/			95
27	SSPB1110	เพชรบุรี	12/55	/			95
28	SSPB1111	เพชรบุรี	12/55	/			95
29	SSPB1116	เพชรบุรี	12/55	/			95
30	SSPB1117	เพชรบุรี	12/55	/			95
31	SSPB1118	เพชรบุรี	12/55	/			95
32	SSPB1119	เพชรบุรี	12/55	/			95
33	SSPB1120	เพชรบุรี	12/55	/			95
34	SSPB1122	เพชรบุรี	12/55	/			95
35	SSPB1123	เพชรบุรี	12/55	/			95
36	SSPB1126	เพชรบุรี	12/55	/			95
37	SSPB1128	เพชรบุรี	12/55	/			95
38	SSPB1130	เพชรบุรี	12/55	/			95
39	SSPB1204	เพชรบุรี	12/55			/	190
40	SSPB1206	เพชรบุรี	12/55			/	190
41	SSPB1209	เพชรบุรี	12/55			/	190
42	SSPB1210	เพชรบุรี	12/55			/	190
43	SSPB1211	เพชรบุรี	12/55			/	190
44	SSPB1212	เพชรบุรี	12/55			/	190
45	SSPB1213	เพชรบุรี	12/55			/	190

ตาราง ก (ต่อ)

ลำดับ	รายนามเกลือ	จังหวัดที่เก็บ	เดือน/ปีที่เก็บ	แหล่งที่เก็บ			ความเค็ม (ppt)
				นาแพ	นาดอก	นาวาง	
46	SSPB1214	เพชรบุรี	12/55			/	190
47	SSPB1215	เพชรบุรี	12/55			/	190
48	SSPB1218	เพชรบุรี	12/55			/	190
49	SSPB1219	เพชรบุรี	12/55			/	190
50	SSPB1302	เพชรบุรี	12/55		/		95
51	SSPB1303	เพชรบุรี	12/55		/		95
52	SSPB1306	เพชรบุรี	12/55		/		95
53	SSPB1307	เพชรบุรี	12/55		/		95
54	SSPB1308	เพชรบุรี	12/55		/		95
55	SSPB1309	เพชรบุรี	12/55		/		95
56	SSPB1310	เพชรบุรี	12/55		/		95
57	SSPB1311	เพชรบุรี	12/55		/		95
58	SSPB1312	เพชรบุรี	12/55		/		95
59	SSPB1314	เพชรบุรี	12/55		/		95
60	SSPB1315	เพชรบุรี	12/55		/		95
61	SSPB2101	เพชรบุรี	3/56	/			115
62	SSPB2102	เพชรบุรี	3/56	/			115
63	SSPB2103	เพชรบุรี	3/56	/			115
64	SSPB2104	เพชรบุรี	3/56	/			115
65	SSPB2108	เพชรบุรี	3/56	/			115
66	SSPB2202	เพชรบุรี	3/56			/	385
67	SSPB2203	เพชรบุรี	3/56			/	385
68	SSPB2209	เพชรบุรี	3/56			/	385
69	SSPB2210	เพชรบุรี	3/56			/	385
70	SSPB2212	เพชรบุรี	3/56			/	385

ตาราง ก (ต่อ)

ลำดับ	รاناเกลือ	จังหวัดที่เก็บ	เดือน/ปีที่เก็บ	แหล่งที่เก็บ			ความเค็ม (ppt)
				นาแพ	นาดอก	นาวาง	
71	SSPB2213	เพชรบุรี	3/56			/	385
72	SSPB2302	เพชรบุรี	3/56		/		220
73	SSPB2304	เพชรบุรี	3/56		/		220
74	SSPB2305	เพชรบุรี	3/56		/		220
75	SSPB2308	เพชรบุรี	3/56		/		220
76	SSPB2310	เพชรบุรี	3/56		/		220
77	SSPB3101	เพชรบุรี	12/56	/			100
78	SSPB3104	เพชรบุรี	12/56	/			100
79	SSPB3108	เพชรบุรี	12/56	/			100
80	SSPB3111	เพชรบุรี	12/56	/			100
81	SSPB3114	เพชรบุรี	12/56	/			100
82	SSPB3117	เพชรบุรี	12/56	/			100
83	SSPB3120	เพชรบุรี	12/56	/			100
84	SSPB3124	เพชรบุรี	12/56	/			100
85	SSPB3203	เพชรบุรี	12/56			/	270
86	SSPB3204	เพชรบุรี	12/56			/	270
87	SSPB3207	เพชรบุรี	12/56			/	270
88	SSPB3208	เพชรบุรี	12/56			/	270
89	SSPB3209	เพชรบุรี	12/56			/	270
90	SSPB3301	เพชรบุรี	12/56		/		100
91	SSPB3304	เพชรบุรี	12/56		/		100
92	SSPB3305	เพชรบุรี	12/56		/		100
93	SSPB3312	เพชรบุรี	12/56		/		100
94	SSPB3314	เพชรบุรี	12/56		/		100
95	SSPB4107	เพชรบุรี	3/57	/			270

ตาราง ก (ต่อ)

ลำดับ	รายนามเกลือ	จังหวัดที่เก็บ	เดือน/ปีที่เก็บ	แหล่งที่เก็บ			ความเค็ม (ppt)
				นาแพ	นาดอก	นาวาง	
96	SSPB4108	เพชรบุรี	3/57	/			270
97	SSPB4206	เพชรบุรี	3/57			/	450
98	SSPB4207	เพชรบุรี	3/57			/	450
99	SSPB4208	เพชรบุรี	3/57			/	450
100	SSPB4215	เพชรบุรี	3/57			/	450
101	SSPB4217	เพชรบุรี	3/57			/	450
102	SSPB4225	เพชรบุรี	3/57			/	450
103	SSPB4234	เพชรบุรี	3/57			/	450
104	SSPB4235	เพชรบุรี	3/57			/	450
105	SSPB4301	เพชรบุรี	3/57		/		300
106	SSPB4304	เพชรบุรี	3/57		/		300
107	SSPB4307	เพชรบุรี	3/57		/		300
108	SSPB4308	เพชรบุรี	3/57		/		300
109	SSPB4309	เพชรบุรี	3/57		/		300
110	SSPB4313	เพชรบุรี	3/57		/		300
111	SSPB4319	เพชรบุรี	3/57		/		300
112	SSPB4320	เพชรบุรี	3/57		/		300
113	SSPB4321	เพชรบุรี	3/57		/		300
114	SSPB4323	เพชรบุรี	3/57		/		300
115	SSPB4324	เพชรบุรี	3/57		/		300
116	SSPB4325	เพชรบุรี	3/57		/		300
117	SSPB4327	เพชรบุรี	3/57		/		300
118	SSPB4328	เพชรบุรี	3/57		/		300
119	SSPB4329	เพชรบุรี	3/57		/		300
120	SSPB4332	เพชรบุรี	3/57		/		300

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato Dextrose agar (PDA)

PDA (Difco™, USA)	39	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 39 กรัม ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Potato Dextrose agar ที่ปรับความเค็มด้วยน้ำทะเล (PDA/SW_{xx ppm})

PDA (Difco™, USA)	39	กรัม
น้ำทะเล	1	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 39 กรัม ละลายให้เข้ากันในน้ำทะเลปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Potato Dextrose broth (PDB)

PDB (Difco™, USA)	28	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 28 กรัม ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Potato Dextrose broth ที่ปรับความเค็มด้วยน้ำทะเล (PDB/SW_{30 ppm})

PDB (Difco™, USA)	28	กรัม
น้ำทะเล	1	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 28 กรัม ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Mueller Hinton agar (MHA)

Mueller Hinton agar (Difco™, USA)	38	กรัม
-----------------------------------	----	------

น้ำกลั่น	1	ลิตร
----------	---	------

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 38 กรัม ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Mueller Hinton agar + 2% Glucose และ 0.5 µg/mL Methylene Blue Dye (MHA-GMB)

Mueller Hinton agar (Difco™, USA)	38	กรัม
-----------------------------------	----	------

Glucose	20	กรัม
---------	----	------

Methylene blue dye	100	ไมโครลิตร
--------------------	-----	-----------

น้ำกลั่น	1	ลิตร
----------	---	------

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 38 กรัม Glucose 20 กรัม และ Methylene blue dye 100 ไมโครลิตร ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมี**0.5 McFarland Standard (CLSI, 2006)**

1% Barium chloride	0.05	มิลลิลิตร
--------------------	------	-----------

1% Sulfuric acid	9.95	มิลลิลิตร
------------------	------	-----------

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน นำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ได้ความขุ่นเทียบเท่า Absorbance ที่ 0.08-0.13 เก็บในที่มืด

สารละลาย 50% Dimethylsulfoxide (DMSO)

Dimethylsulfoxide (DMSO)	50	มิลลิลิตร
--------------------------	----	-----------

น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	50	มิลลิลิตร
----------------------	----	-----------

ผสม Dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน และเก็บในขวดสีชา

0.4 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

เตรียมสารละลาย 0.4 mM DPPH ใน Methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (M.W. = 394.33)

จาก $g / M.W. = CV / 1000$

$$g = \frac{(0.4 \times 10^{-3}) \times 10 \times 394.33}{1000}$$

$$g = 0.00158 \text{ กรัม}$$

ดังนั้นชั่งสาร DPPH 0.00158 กรัม ละลายใน Methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Methylene blue dye

Methylene blue dye	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

ละลาย Methylene blue dye 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน

Normal saline solution (NSS)

NaCl	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย NaCl 0.85 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน นิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

น้ำยาทดสอบและสีย้อม**Lactophenol**

Lactic acid	20	มิลลิลิตร
Phenol	20	มิลลิลิตร
Glycerol	40	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

เติม phenol ที่หลอมเหลว ลงในส่วนผสมของ Lactic acid, Glycerol และน้ำกลั่น นำไปอุ่นให้ละลาย และผสมให้เข้ากัน นิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

การควบคุมการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ด้วยแผ่นดิสก์ยามาตรฐาน

ตาราง ค-1 มาตรฐานการควบคุมการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ด้วยแผ่นดิสก์ยามาตรฐาน

จุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (มิลลิเมตร)			อ้างอิง
	Ampicillin (10 µg/disc)	Gentamycin (10 µg/disc)	Fluconazole (25 µg/disc)	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	16-22	19-26	-	CLSI, 2007
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	16-21	-	CLSI, 2007
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	27-35	19-27	-	CLSI, 2007
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	-	-	28 – 39	CLSI, 2008b

ภาคผนวก ง
ขั้นตอนการเจือจางสารสกัด

ตาราง ง-1 ขั้นตอนการเจือจางสารสกัด

ขั้นตอน ที่	ความ เข้มข้น* (ไมโคร กรัมต่อ มิลลิลิตร)	แหล่ง	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	+ ตัวทำ ละลาย (มิลลิลิตร) (DMSO)	= ความเข้มข้น* (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	= ความเข้มข้น สุดท้าย** ที่ 1:100 (ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร)	Log2
1	12800	Stock			12,800	128	7
2	12800	Stock	0.5	0.5	6,400	64	6
3	12800	Stock	0.5	1.5	3,200	32	5
4	12800	Stock	0.5	3.5	1,600	16	4
5	1600	ขั้นตอนที่ 4	0.5	0.5	800	8.0	3
6	1600	ขั้นตอนที่ 4	0.5	1.5	400	4.0	2
7	1600	ขั้นตอนที่ 4	0.5	3.5	200	2.0	1
8	200	ขั้นตอนที่ 7	0.5	0.5	100	1.0	0
9	200	ขั้นตอนที่ 7	0.5	1.5	50	0.5	-1
10	200	ขั้นตอนที่ 7	0.5	3.5	25	0.25	-2
11	25	ขั้นตอนที่ 10	0.5	0.5	12.5	0.125	-3
12	25	ขั้นตอนที่ 10	0.5	1.5	6.25	0.0625	-4
13	25	ขั้นตอนที่ 10	0.5	3.5	3.1	0.03	-5
14	3.1	ขั้นตอนที่ 13	0.5	0.5	1.6	0.016	-6
15	3.1	ขั้นตอนที่ 13	0.5	1.5	0.8	0.008	-7
16	3.1	ขั้นตอนที่ 13	0.5	3.5	0.4	0.004	-8
17	0.4	ขั้นตอนที่ 16	0.5	0.5	0.2	0.002	-9

* ละลายอยู่ใน DMSO

**ละลายด้วยอาหารทดสอบ

ภาคผนวก จ

การเตรียมยามาตรฐานสำหรับต้านจุลินทรีย์ (CLSI, 2002; 2006; 2012)

เตรียมยาต้านแบคทีเรียโดยใช้ยามาตรฐาน Ampicillin และ Gentamycin และยาต้านยีสต์ และรา โดยใช้ยามาตรฐาน fluconazole ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคูณค่า Assay Potency จากเอกสารกำกับยา และคำนวณตามสูตรที่ 1 ในกรณีที่ยาเป็นผง หรือ สูตรที่ 2 ในกรณีที่ยาเป็นน้ำ

$$\text{สูตรที่ 1} \quad \text{Weight (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentration (mL)}}{\text{Assay Potency } (\mu\text{g/mg})}$$

$$\text{สูตรที่ 2} \quad \text{Vol. (mL)} = \frac{\text{Weight (mg)} \times \text{Assay Potency } (\mu\text{g/mg})}{\text{Concentration } (\mu\text{g/mL})}$$

ซึ่งยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง หรือ คูดยามาตรฐานด้วยปิเปตใส่ในหลอดปราศจากเชื้อ เติมน้ำปราศจากเชื้อในปริมาณที่กำหนด สำหรับยามาตรฐาน Ampicillin ให้ละลายด้วย 0.1 โมลต่อลิตร Phosphate buffer ที่มี pH 8.0 ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex จากนั้นเจือจายามาตรฐานเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 2 เท่าของยาที่จะทำการทดสอบ ซึ่งการทดสอบสำหรับแบคทีเรียและยีสต์จะใช้ความเข้มข้นยาเริ่มต้น 64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นนำยามาตรฐานมาเจือจางลง 10 เท่า ด้วยน้ำปราศจากเชื้อ สำหรับ Ampicillin เจือจางด้วย 0.1 โมลต่อลิตร Phosphate buffer ที่มี pH 6.0 จะได้ยามาตรฐานที่ความเข้มข้น 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บยามาตรฐานที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ฉ
การควบคุมการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์
โดยการหาความเข้มข้นต่ำสุดด้วยมาตรฐาน

ตารางที่ ฉ-1 การควบคุมการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์โดยการหาความเข้มข้นต่ำสุดด้วยมาตรฐาน

จุลินทรีย์	Minimum Inhibitory Concentration (MIC)			อ้างอิง
	Ampicillin	Gentamycin	Fluconazole	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2-8	0.25-1	-	CLSI, 2007
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	0.5-2	-	CLSI, 2007
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	-	-	0.25-1.0	CLSI, 2002

ภาคผนวก ข
สัดส่วนกรดไขมันของน้ำมัน

ตารางที่ ข-1 สัดส่วนกรดไขมันของน้ำมัน (Syed, 2015)

น้ำมัน (Oil)	ไขมันอิ่มตัว (Saturated fat)					ไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fat)		
						ไขมันไม่อิ่มตัว เชิงเดี่ยว (Monounsaturated)	ไขมันไม่อิ่มตัว เชิงซ้อน (Polyunsaturated)	
	Capric acid (C10:0)	Lauric acid (C12:0)	Myristic acid (C14:0)	Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (N-9) (18:1)	Linoleic acid (N-6) (18:2)	α -Linoleic acid (N-3) (18:3)
น้ำมันปาล์ม (Palm oil)	0	0	1	45	4	40	10	0
น้ำมันมะกอก (Olive oil)	0	0	0	13	3	71	10	1
น้ำมันหมู (Lard oil)	0	0	2	26	14	44	10	0