



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของราที่แยกได้จากนาเกลือ

**Study of antimicrobial activities of fungi isolated from solar salterns**

อภิรดี ปิรันธนภักย์และ สุดารัตน์ สวนจิตร์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี 20131

**Apiradee Pilantanapak and Sudarat Suanjit**

**Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131**

สิงหาคม 2559

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของราที่แยกได้จากนาเกลือ” ดำเนินการสำเร็จ  
สมบูรณ์ได้ ด้วยทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ปีงบประมาณ  
ประมาณ 2557 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณคุณศโรชา ประสงค์ผลชัย และคุณนันทิพัฒน์ สุริยะวงศ์ ผู้ช่วยวิจัย และรศ.ดร.วารี  
เนื่องจางค์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่ทำการ  
ทดลองด้านเคมี ตลอดจนให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย

อภิรดี ปิรันชนภักย์  
สุภารัตน์ สวนจิตร

สิงหาคม 2559

## บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของราที่แยกได้จากดินและน้ำในนาเกลือ จำนวน 150 สายพันธุ์ โดยใช้สารสกัดเอธิลอะซิเตทหยาบจากอาหาร potato dextrose broth ความเค็ม 30 ppt (PDB/sw) ที่ใช้เลี้ยงราทดสอบ นำไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 6 ชนิดและยีสต์ *Candida albicans* สายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 2 สายพันธุ์ ด้วยวิธี disk diffusion พบว่าสารสกัดหยาบ 60 สารจากอาหารเหลวเลี้ยงรา 150 สายพันธุ์ (ร้อยละ 40) ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด และสารสกัดหยาบ 36 สาร (ร้อยละ 24) ยับยั้งยีสต์ทดสอบอย่างน้อย 1 สายพันธุ์ สารสกัดเกือบทั้งหมดยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* TISTR 008 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ดี ค่า MIC ต่อแบคทีเรียแกรมบวกของสารสกัดจาก PDB/sw ของราที่ดีที่สุด ที่คัดเลือกมาจำนวน 11 สายพันธุ์ อยู่ในช่วง 8-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า MIC ต่อยีสต์อยู่ในช่วง 512-1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ราที่สารสกัดให้ผลยับยั้งดีต่อแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสองชนิด ( $MIC \leq 128$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีจำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ SS 066, SS 069, SS 070, SS 076, SS 078, SS 079, SSpb4215 และ SSpb4225 เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของสารสกัดจาก PDB/sw และ PDB/dw (ความเค็ม 0 ppt) ของราที่คัดเลือกไว้จำนวน 5 สายพันธุ์ จาก 8 สายพันธุ์ พบว่าแตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์รา สารองค์ประกอบในสารสกัดสามารถแยกออกจากกันโดยวิธี TLC ในตัวทำละลาย toluene: methanol: acetone (6:1:3 ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าราสายพันธุ์เดียวกันแต่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็มต่างกัน แสดงจำนวนสารองค์ประกอบต่างกัน แต่ส่วนใหญ่สารที่แยกได้มีค่า  $R_f$  ไม่แตกต่างกัน พบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารองค์ประกอบที่แยกได้บนแผ่น TLC โดยวิธี autobiography อย่างชัดเจน แต่ในเบื้องต้นยังไม่สามารถตัดสินแน่ชัดว่าการยับยั้งเป็นผลมาจากสารองค์ประกอบใด มีแนวโน้มว่าสารองค์ประกอบ ที่มีค่า  $R_f$  0.62 และ 0.64 (PDB/sw และ PDB/dw) ของสารสกัดรา SS 069 ค่า  $R_f$  0.70 และ 0.71 (PDB/sw) ของสารสกัดรา SSpb1122 ค่า  $R_f$  0.66 และ 0.69 (PDB/sw) ของสารสกัดรา SSpb4225 ค่า  $R_f$  0.68 (PDB/sw) ของสารสกัดรา SSpb4332 ยังคงยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 ได้ดีที่สุด และดีกว่า *S. aureus* ATCC 25923 การจัดจำแนกราทางอนุพัทธ์ศาสตร์ร่วมกับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราที่ดีที่สุดที่คัดเลือกมา จำนวน 11 สายพันธุ์ข้างต้น สามารถระบุสปีชีส์ได้เพียง 1 สายพันธุ์ ราวส่วนใหญ่เป็น *Aspergillus* ที่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ รา SS 033 และ SS 066 เป็นราที่ระบุแทกซอนได้เพียง *Dothidiomyces* และ *Hypocreales* ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าราที่มีคุณสมบัติยับยั้งแกรมบวกจากนาเกลือส่วนใหญ่มีแนวโน้มเป็นราชนิดใหม่

**คำสำคัญ:** รานาเกลือ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ TLC bioautography ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

## Abstract

Antimicrobial activity of fungi isolated from soil and water in solar salterns were evaluated. Crude extract from culture filtrates of 150 fungi in potato dextrose broth at salinity 30 ppt (PDB/sw) were extracted with ethyl acetate and were tested against six standard bacteria and two standard *Candida albicans*, by disk diffusion technique. Sixty and thirty six out of 150 crude extracts (40% and 24%) could inhibited at least one tested bacteria and at least one *Candida* strain, respectively. Almost all of the extracts exhibited stronger anti-bacterial activity against Gram positive bacteria; *Bacillus cereus* TISTR 008 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The PDB/sw extracts from eleven fungi showed low MIC; 8-256  $\mu\text{g/ml}$ , against Gram positive bacteria while the MIC against yeast were 512-1024  $\mu\text{g/ml}$ . Eight fungi which processed the best activity ( $\text{MIC} \leq 128 \mu\text{g/ml}$ ) against both Gram positive bacteria were SS 066, SS 069, SS 070, SS 076, SS 078, SS 079, SSpb4215 and SSpb4225. Comparison of MIC between PDB/sw and PDA/dw (0 ppt salinity) extracts of five selected fungi varied depend on the fungal strains. The composition of all extracts could be separated in toluene: methanol: acetone (6:1:3 v/v) by TLC method. Extracts from the same fungus cultured in different salinity sources showed different numbers of composition, but most similar in  $R_f$  value. The positive antibacterial activity against tested bacteria can be seen obviously by bioautography, however the exact positive component could not be determined in this preliminary study. In seemed that, the compounds with  $R_f$  0.62/0.64 (PDB/sw and PDB/dw) extracts of SS 069,  $R_f$  0.70/ 0.71 (PDB/sw) of SSpb1122,  $R_f$  0.66/ 0.69 (PDB/sw) of SSpb4225,  $R_f$  0.68 (PDB/sw) of SSpb4332 still revealed high activity against *B. cereus* TISTR 008 and better than *S. aureus* ATCC 25923. Molecular identification of 11 selected best fungi, together with the study of evolutionary relation could indicate only one fungus into species level. Most of the fungi were unknown *Aspergillus* spp. SS 033 and SS 066 could be located in only the Dothidiomycetes and Hypocreales taxa, respectively. The results indicated that most of the fungi with anti-Gram positive bacteria from solar salterns were new to Sciences.

**Keywords:** solar saltern fungi, antimicrobial, TLC, bioautography, evolutionary relationship

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ ภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ.....	ง
สารบัญ.....	จ-ฉ
สารบัญตาราง.....	ช-ณ
สารบัญภาพ.....	ญ-ฎ
บทนำ.....	1
บททวนเอกสารและวรรณกรรม.....	4
วัตถุประสงค์และวิธีการทดลอง.....	8
แหล่งตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง.....	8
สายพันธุ์จุลินทรีย์.....	11
อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	11
การเลี้ยงราและสารสกัดจากรา.....	13
การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์.....	13
การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี Agar well diffusion.....	14
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากราเกลือในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี Disk diffusion .....	15
การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration, MIC) ของแบคทีเรียด้วยวิธี Broth micro dilution.....	15
การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration, MIC) ของยีสต์ด้วยวิธี broth micro dilution .....	16
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากราด้วยวิธี Thin layer chromatography.....	17
การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากราอาหารเลี้ยงรามาเกลือ โดยวิธี Bioautography.....	17
การจัดจำแนกราทางสัณฐานวิทยา.....	18
การจัดจำแนกราทางอนุพันธุศาสตร์.....	18
การเก็บรักษาเชื้อ.....	19

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ผลการทดลอง.....	22
การคัดกรองรานาเกลือในการยับยั้งจุลินทรีย์.....	22
ผลของสารสกัดอาหารเลี้ยงเชื้อจากรานาเกลือในการยับยั้งจุลินทรีย์.....	24
ผลของความเค็มอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ของสารที่สกัดได้.....	32
การศึกษาค่า MIC/MBC ของจุลินทรีย์ .....	37
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากราดูด้วยวิธี Thin layer chromatography.....	40
การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือโดยวิธี Bioautography .....	42
การจัดจำแนกราดูที่ใช้ในการศึกษาเบื้องต้น.....	49
สรุปและอภิปรายผล.....	76
เอกสารอ้างอิง.....	83
ภาคผนวก.....	91

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รานาเกลือที่นำมาทดสอบจำนวน 150 สายพันธุ์.....	12
2	องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนยีน Beta tubulin และ ITS.....	20
3	ขั้นตอนของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ ITS.....	20
4	ขั้นตอนของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ยีน Beta tubulin .....	21
5	ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของอาหารเลี้ยงเชื้อจากรานาเกลือ.....	23
6	ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ.....	27
7	การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากรานาเกลือที่เลี้ยงในอาหารที่ผสมและไม่ผสม น้ำทะเล.....	33
8	MIC/MBC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือจังหวัดจันทบุรีและฉะเชิงเทราต่อแบคทีเรีย.....	38
9	MIC/MBC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือจังหวัดเพชรบุรีต่อแบคทีเรีย.....	39
10	MIC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือจังหวัดจันทบุรี ฉะเชิงเทรา และเพชรบุรี ต่อยีสต์.....	40
11	องค์ประกอบของสารสกัด.....	41
12	การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลือ โดยวิธี Bioautography.....	45
13	จำนวนสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลือสายพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์.....	48
14	ผลการจัดจำแนกราทางสัณฐานวิทยาและลักษณะของโคโลนีราที่ศึกษา 127 สายพันธุ์.....	49
15	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 033 เปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn.....	51
16	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 034 เปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn.....	53
17	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 066 เปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn.....	54

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
18	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 070 เปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn.....	56
19	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 076 เปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn.....	57
20	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 078 เปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn.....	58
21	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 112 เปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn.....	59
22	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Beta-tubulin gene ของรา SSpb1122 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn.....	60
23	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Beta tubulin gene ของรา SSpb4207 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn.....	61
24	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Beta tubulin gene ของรา SSpb4208 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn.....	63
25	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา SSpb4215 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn....	64
26	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา SSpb4217 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn...	65
27	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา SSpb4225 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn...	67
28	ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ของรานานาเกลือ และราทะเลที่แยกได้จากเพชรบุรี จันทบุรี และฉะเชิงเทราเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn.....	68



## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
29	ราที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ.....	71
30	Sequence Identity Matrix ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS จากราที่คัดแยกได้จากนาเกลื้อ จำนวน 11 ไอโซเลท.....	72
31	ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน tub2 ของรานาเกลื้อ ไอโซเลท SSpb1122 และ SSpb4208 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn.....	73
32	แทกซอนของราที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ.....	75
33	การระบุแทกซอนของราที่คัดเลือก 13 สายพันธุ์.....	75
34	การยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ควบคุมด้วยแผ่นดิสก์ยามาตรฐาน.....	92
35	การทดสอบระบบหาความเข้มข้นต่ำสุดควบคุมด้วยยามาตรฐาน.....	92
36	ขั้นตอนการเจือจางสารสกัด.....	93

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะนาเกลือนอกฤดูกาลทำนาเกลือ.....	8
2	ลักษณะนาเกลือในฤดูกาลทำนาเกลือ.....	9
3	ลักษณะหลากหลายของดินและน้ำในนาเกลือในแปลงและฤดูกาลต่างๆ กัน.....	10
4	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>B. cereus</i> TISTR 121 ของอาหารเลี้ยงรานาเกลือ ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion.....	22
5-7	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ATCC 25933 และ <i>B. cereus</i> TISTR 121 ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ ทดสอบ โดยวิธี disk diffusion .....	25-26
8	ความสามารถของสารสกัดจากรานาเกลือในการยับยั้งยีสต์ก่อโรค <i>C. albicans</i> ATCC 10231 และ <i>C. albicans</i> ATCC 90028.....	30
9	ความสามารถของสารสกัดจากรานาเกลือ SS 076 ในการยับยั้งยีสต์ก่อโรค <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	31
10	ความสามารถของสารสกัดจากรานาเกลือ SSpb1122 ในการยับยั้งยีสต์ก่อโรค <i>C. albicans</i> ATCC 10231 และ <i>C. albicans</i> ATCC 90028.....	31
11	ความสามารถของสารสกัดจากรานาเกลือในการยับยั้งยีสต์ก่อโรค <i>C. albicans</i> ATCC 10231 เมื่อตรวจผลหลังบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	32
12-13	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ATCC 25923 และ <i>B. cereus</i> TISTR 121 ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือเตรียมจากน้ำปกติ และน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt .....	36
14	ฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ <i>C. albicans</i> ATCC 10231 และ <i>C. albicans</i> ATCC 90028 ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือเตรียมจากน้ำปกติ และน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ทดสอบ โดยวิธี disk diffusion.....	37
15	จำนวนองค์ประกอบทางเคมีและค่า $R_f$ ของสารองค์ประกอบในสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ เมื่อแยกโดยวิธี TLC.....	42
16	ความสามารถของสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC ของสารสกัดจากรานาเกลือ SS 069 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB /dw และ PDB/sw ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008 และ <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	43

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ความสามารถของสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC ของสารสกัดจากรานาเกลื้อ SSpb 1122 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB/dw และ PDB/sw ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008 และ <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	43
18	ความสามารถของสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC ของสารสกัดจากรานาเกลื้อ SSpb 4217 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB/dw และ PDB/sw ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008 และ <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	44
19	ความสามารถของสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC ของสารสกัดจากรานาเกลื้อ SSpb 4225 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB/dw และ PDB/sw ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008 และ <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	44
20	ความสามารถของสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC ของสารสกัดจากรานาเกลื้อ SSpb 4332 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB/dw และ PDB/sw ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008 และ <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	44
21	ความสามารถของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลื้อ ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008 และ <i>S. aureus</i> ATCC 25923 บนอาหาร MHA ของสารสกัด SS 069 ที่เตรียมจาก PDB/dw และ PDB/sw.....	47
22	ความสามารถของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลื้อ ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008 และ <i>S. aureus</i> ATCC 25923 บนอาหาร MHA ของสารสกัด SSpb1122 ที่เตรียมจาก PDB/dw และ PDB/sw.....	47
23	ความสามารถของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลื้อ ในการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 008 และ <i>S. aureus</i> ATCC 25923 บนอาหาร MHA ของสารสกัด SSpb4225 ที่เตรียมจาก PDB/dw และ PDB/sw.....	48
24	ลักษณะของรา SS 033 บนอาหาร PDA/sw.....	51
25	ลักษณะของรา SS 034 บนอาหาร PDA/sw ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope.....	52
26	ลักษณะของรา SS 066 บนอาหาร PDA/sw.....	53
27	ลักษณะของรา SS 069 บนอาหาร PDA/sw.....	55

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
28	ลักษณะโคโลนีของรา SS 070 บนอาหาร PDA/sw..... 56
29	ลักษณะโคโลนีของรา SS 076 บนอาหาร PDA/sw..... 57
30	ลักษณะโคโลนีของรา SS 078 บนอาหาร PDA/sw..... 58
31	ลักษณะของรา SS 112 บนอาหาร PDA/sw..... 59
32	ลักษณะของรา SSpb1122 บนอาหาร PDA/sw..... 60
33	ลักษณะของรา SSpb4207 บนอาหาร PDA/sw..... 61
34	ลักษณะของรา SSpb4208 บนอาหาร PDA/sw..... 62
35	ลักษณะของรา SSpb4215 บนอาหาร PDA/sw..... 63
36	ลักษณะของรา SSpb4217 บนอาหาร PDA/sw..... 65
37	ลักษณะของรา SSpb4225 บนอาหารPDA/sw..... 66
38	แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราจำนวน 11 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จาก นาเกลือ..... 70
39	แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของรานาเกลือ 2 ไอโซเลท คือ SSpb1122 และ SSpb4208..... 74

## บทที่ 1

### บทนำ

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์มีทั้ง แบคทีเรีย ยีสต์ รา โปรโตซัว และริคเกตเซีย แบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อยมีหลายวงศ์ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการก่อโรคทางเดินอาหารในคนที่พบบ่อย ได้แก่ *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* และ *Yersinia* นอกจากนี้ *Escherichia coli* บางสายพันธุ์ ยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดเชื้อในกระแสเลือดหรืออาหารเป็นพิษได้ ขณะที่แบคทีเรียวงศ์ Streptococcaceae สกุล *Staphylococcus* ส่วนใหญ่เป็นเชื้อประจำถิ่นและเป็นเชื้อฉวยโอกาส ในสภาวะที่โฮสต์อ่อนแอ *Staphylococcus* 12 ชนิด สามารถก่อโรคได้ในคน (Joklik *et al.*, 1988) *Staphylococcus* ที่มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุดคือ *S. aureus* เพราะทำให้เกิดการติดเชื้อได้กับทุกบริเวณของร่างกาย เช่น การติดเชื้อที่ผิวหนัง การติดเชื้อในกระแสเลือด (Bacteremia) และอาจก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น ลิ้นหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบ (สุบันทิต นิมรัตน์, 2551) นอกจากนี้แบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่ยังคือต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งเกิดจากการที่แบคทีเรียคือยาถ่ายทอคพลาสมิด ซึ่งมีจินคือยาไปสู่เชื้ออื่นๆ ทำให้อัตราการคือยาในแบคทีเรียต่างๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (อภิรดี ปิรันธนาภักย์, 2554) และนอกจากแบคทีเรียยังมียีสต์และราก่อโรคในมนุษย์ แม้ว่าจะมีไม่มากนัก ยีสต์และราก่อโรคในมนุษย์ที่พบบ่อยที่สุด คือสกุล *Candida*, *Cryptococcus* และ *Aspergillus* (Repentigny, 2010) ปัจจุบันยีสต์ *C. albicans* เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในมนุษย์ โดยเฉพาะผู้ที่มีการกดภูมิคุ้มกันต่ำ (Odds *et al.*, 2006) โดยทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร ช่องปาก ช่องคลอด และผิวหนัง (Mavor *et al.*, 2005)

ปัจจุบันปัญหาจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่คือยา กลายเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข เนื่องจากเชื้อคือยาสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่บกพร่องทางภูมิคุ้มกันและยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล ขณะที่ไม่มียาปฏิชีวนะใดที่สามารถควบคุมเชื้อคือยาได้ทั้งหมด (Walsh and Amyes, 2004) จึงเกิดความจำเป็นในการศึกษาสารต้านจุลินทรีย์และสารก่อฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่ๆ เพื่อนำมาผลิตยาชนิดใหม่เพิ่มขึ้น เริ่มจากการมองหาแหล่งอาศัยใหม่ๆ ที่ยังไม่มีมีการสำรวจหรือยังมีการสำรวจไม่มาก มีแนวโน้มสูงที่จะพบจุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ ที่มีศักยภาพในการผลิตสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ

ราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการปรับตัวได้ดีจึงพบการแพร่กระจายในระบบนิเวศที่หลากหลาย แม้จะเป็นระบบนิเวศที่ไม่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ทั่วไป เช่น ราที่เจริญในระบบนิเวศที่มีค่า water activity ( $a_w$ ) ต่ำ หรือรากลุ่มที่สามารถเจริญในระบบนิเวศที่มีความเค็มหรือความเข้มข้นของแร่ธาตุสูง ราที่เจริญได้ดีในบริเวณที่มีความเข้มข้นเกลือสูงหรือราที่ต้องเจริญในที่ที่มีเกลือ จัดว่าเป็นราชอบเกลือ (Halophilic fungi, Halophile) ขณะที่ราที่เจริญได้หรือทนอยู่ได้ในที่ที่มีความเข้มข้นเกลือสูง จัดว่าเป็นราทนเกลือ (Halotolerant fungi) (Tuomela *et al.*, 2000) ราในแหล่งที่มีความเข้มข้นเกลือสูงมีความสามารถในการปรับตัวให้อยู่รอดได้ทั้งในบริเวณที่ความเข้มข้นรังสีอัลตราไวโอเล็ตสูง รวมถึงอยู่รอดได้ในบริเวณที่มี pH อุณหภูมิ และความดันแตกต่างกัน (Chatchawan, *et al.*, 2011) ปัจจุบันการศึกษารานในกลุ่ม halophilic ในบริเวณที่มีค่าความเค็มสูงมากๆ (Hypersaline environment) เช่น นาเกลือ ทะเลสาบ และ Dead Sea มีเพิ่มมากขึ้น แต่ยังมีรายงานว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับรากลุ่มอื่นๆ เนื่องจากพบครั้งแรกไม่ถึง 20 ปีที่ผ่านมา โดยมีรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับความหลากหลายของราที่อาศัยในนาเกลือกลุ่ม halotolerant และ halophilic จากหลายประเทศในปี ค.ศ. 2000 (Gunde-Cimerman *et al.*, 2005)

มีรายงานว่าราสายหลายกลุ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งราที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมพิเศษหรือสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ต้องมีกลไกพิเศษในการปรับตัวเพื่อให้อาศัยอยู่ได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารบางชนิดแล้วส่งออกนอกเซลล์ (Extracellular products) (Frisvad and Samson, 2004) ซึ่งอาจเป็นสารประกอบปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ เช่น เอนไซม์ หรือกรด (Margesin and Schinner, 2001; Behal, 2003, Frisvad and Samson, 2004, Lu *et al.*, 2008) สารประกอบทุติยภูมิที่ราสร้างขึ้นหลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายและมีประสิทธิภาพสูง (Hyde, 2001; Kurtboke and Swings, 2004) เช่น มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ต้านไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Phongpichit *et al.*, 2006, 2007) ดังนั้นราสายที่เป็น halotolerant ที่พบในสภาพแวดล้อมทางทะเล (Bernan *et al.*, 1997; Ireland *et al.*, 1988, 1993; Kobayashi and Ishibashi, 1993) ซึ่งเป็นสภาวะที่มีปัจจัยทางกายภาพแตกต่างจากสภาพแวดล้อมทั่วไป จึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจสำหรับการค้นหาราที่ผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่ มีราสายพันธุ์ใหม่จำนวนมากถูกพบในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงทั่วโลก แต่ในประเทศไทยซึ่งมีพื้นที่ติดกับทะเล และมีแหล่งผลิตเกลือทะเลที่สำคัญหลายจังหวัด เช่น สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สมุทรปราการ ชลบุรี และเพชรบุรี (Chatchawan *et al.*, 2011) ยังมีผู้ศึกษาชนิดและคุณสมบัติการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์จากรานาเกลือน้อยมาก

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองรายชื่อกานนาเกลือในประเทศไทย ที่สามารถสร้างสาร  
ยับยั้งจุลินทรีย์ประเภทต่างๆ รวมถึงศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของราและสารออกฤทธิ์ที่ราผลิตขึ้น เพื่อเป็น  
ฐานข้อมูลและองค์ความรู้ใหม่ เพื่อการศึกษาและพัฒนาในขั้นต่อไป

## บทที่ 2

### บททวนเอกสารและวรรณกรรม

#### 1. นาเกลือและระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง

นาเกลือ (Solar salterns, Marine salterns) เป็นระบบนิเวศทางทะเลประเภทหนึ่งที่มีมนุษย์สร้าง (Man-made ecosystem) ระบบนิเวศนาเกลือมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างจากระบบนิเวศอื่นๆ โดยมีปัจจัยสิ่งแวดล้อมหลายประการที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์รวมทั้งราที่อาศัยอยู่ในบริเวณนี้ ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลในนาเกลือ ได้แก่ ความเค็ม pH อุณหภูมิ ความเข้มแสง และปริมาณสารอาหาร (Nayak *et al.*, 2012) ความเค็มมีผลต่อราในด้านแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) (Gretchen, 2006) ความเค็มในนาเกลืออยู่ในช่วง 3-35% (Buchalo *et al.*, 1998) ซึ่งสูงมากเมื่อเทียบกับความเค็มของน้ำทะเลปกติ จัดเป็น extreme environment หรือ hypersaline environment และจัดเป็นระบบนิเวศความเค็มสูงแบบ thalassohaline ซึ่งเป็นระบบนิเวศที่มีอออนของธาตุต่างๆ สูง นาเกลือมีโซเดียมและคลอไรด์เป็นส่วนประกอบของแร่ธาตุหลักในดินและน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารประกอบของสารประกอบ calcite, gypsum, halite, sylvite และ carnallite (Brock, 1979) ส่วนปัจจัยทางชีวภาพที่มีอิทธิพลโดยตรงคือพืชและอินทรีย์สารที่เป็นทั้งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารของรา ในต่างประเทศมีรายงานนาเกลือและระบบนิเวศที่มีความเค็มสูงในประเทศเปอร์โตริโก ประเทศฝรั่งเศส ประเทศสโลวีเนีย ประเทศสเปน ประเทศปอร์ตุเกส และประเทศอินเดีย เป็นต้น (Cantrell *et al.*, 2006; Nayak *et al.*, 2012) นอกจากนาเกลือแล้วยังมีระบบนิเวศที่มีความเค็มสูงอื่นๆ ที่มีรากลุ่ม halophile และ halotolerant อาศัยอยู่ เช่น saline soil, hyper saline lagoon, salt lake และ Dead Sea เป็นต้น (Buchlo *et al.*, 1998; DasSarma and Arora, 2001, Cantrell *et al.*, 2011)

ประเทศไทยมีพื้นที่ทำนาเกลือทั้งหมดประมาณ 81,485 ไร่ โดยจังหวัดเพชรบุรีมีพื้นที่มากที่สุด ร้อยละ 47.0 รองลงมาได้แก่ จังหวัดสมุทรสาคร ร้อยละ 43.1 จังหวัดสมุทรสงคราม ร้อยละ 7.7 นาเกลือภาคตะวันออกอยู่ในจังหวัดชลบุรี ร้อยละ 1.0 จังหวัดจันทบุรี ร้อยละ 0.6 และจังหวัดฉะเชิงเทรา ร้อยละ 0.2 (ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล, 2553) สถานที่ที่เหมาะสมแก่การทำนาเกลือคือพื้นที่ราบริมทะเลที่น้ำทะเลสามารถขึ้นได้ตลอดปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดริมทะเล บริเวณที่มีการผลิตเกลือมากประมาณ



ร้อยละ 90 ของผลผลิตทั้งประเทศอยู่ในพื้นที่ 3 จังหวัดคือ เพชรบุรี สมุทรสาคร และสมุทรสงคราม ส่วนพื้นที่ที่มีการผลิตเกลือเพียงเล็กน้อย ผลิตเกลือเพียงประมาณร้อยละ 10 ของผลผลิตเกลือทั้งประเทศ คือ จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงและภาคใต้ได้แก่ ชลบุรี จันทบุรี ระยอง และปัตตานี

## 2. ลักษณะนาเกลือและการทำนาเกลือในประเทศไทย

การผลิตเกลือของประเทศไทย แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ เกลือทะเลหรือเกลือสมุทรและเกลือสินเธาว์หรือเกลือหิน เกลือทะเลหรือเกลือสมุทร (Sea salt) คือเกลือที่ผลิตขึ้น โดยนำน้ำทะเลขึ้นมาตากแดดให้น้ำระเหยไปจนเหลือแต่ผลึกเกลือ ส่วนเกลือสินเธาว์ (Rock salt) คือเกลือที่ได้จากการนำน้ำผิวดินที่มีเกลืออยู่หรือเกลือบนผิวดินมาละลายน้ำแล้วต้ม หรือได้จากเกลือหินที่อยู่ใต้ดิน โดยใช้วิธีฉีดน้ำลงไปละลายเกลือในบ่อเกลือ หรือใช้วิธีสูบน้ำเกลือใต้ดินขึ้นมาตากแดด หรือนำไปต้มเพื่อให้ได้ผลึกเกลือ (ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล, 2553) แต่ในการศึกษานี้จะกล่าวถึงเฉพาะการผลิตเกลือสมุทร และเรียกสั้นๆ ว่าการทำนาเกลือ การทำนาเกลือในภาคกลางจะเริ่มทำประมาณเดือนพฤศจิกายนหรือฤดูแล้งถึงเดือนพฤษภาคมของปีถัดไป ใช้ระยะเวลาประมาณ 6-7 เดือน ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ เนื่องจากการทำนาเกลือไม่สามารถทำได้ในช่วงฤดูฝน และจะเริ่มเก็บผลผลิตเกลือได้ประมาณกลางเดือนมกราคมเป็นต้นไป สำหรับการทำนาเกลือในภาคใต้ที่จังหวัดปัตตานี จะมีระยะเวลานานกว่าภาคกลาง โดยสามารถทำนาเกลือได้ปีละ 2 ครั้ง ครั้งแรกเริ่มประมาณเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมิถุนายน ช่วงเวลาประมาณ 5 เดือน และครั้งที่สองเริ่มประมาณเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน เป็นช่วงเวลาประมาณ 2 เดือน รวมมีช่วงเวลาดำเนินการทำนาเกลือประมาณ 8 เดือน ส่วนในช่วงเดือนตุลาคม ถึงเดือนมกราคม จะมีฝนตกชุกจึงไม่สามารถทำนาเกลือได้ (ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล, 2553)

### 2.1 ส่วนประกอบของนาเกลือ (แหล่งเรียนรู้ออนไลน์ สสวท. และปราชญ์ชาวบ้าน (แนะนำส่วนตัว))

นาเกลือประกอบด้วยส่วนต่างๆ แบ่งออกเป็นแปลงคล้ายคันนา แต่ละแปลงมีความเค็มแตกต่างกัน และมีชื่อเรียกแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ตัวอย่างการเรียกเช่น วังน้ำหรือนาขังเป็นแปลงสำหรับเก็บน้ำทะเลที่นำเข้ามาสำหรับเก็บไว้ใช้ตลอดฤดูกาลทำนาเกลือ นาตากหรือนาแผ่หรือนาเปรียบเทียบเป็นแปลงสำหรับให้น้ำตากแดด เพื่อให้น้ำระเหยออกไปเป็นการเพิ่มความเค็ม นารองเชื้อคือนาสำหรับตากน้ำที่มีความเข้มข้นพอสมควร โดยจะตากน้ำให้ได้ความเค็มประมาณ 150 ส่วนในพันส่วน (ppt) นาเชื้อเป็นนา

สำหรับเพาะเชื้อเกลื้อ ซึ่งต้องตากน้ำให้ น้ำมีความเค็มสูงถึง 240 ppt ส่วนนาปลงเป็นนาขึ้นตอนสุดท้าย สำหรับตากน้ำเค็ม เพื่อให้เกลื้อตกผลึกเป็นเม็ดเกลื้อ

## 2.2 วิธีทำนาเกลื้อ (ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล, 2553)

การทำนาเกลื้อจะเริ่มเมื่อฝนท้ายฤดูผ่านไปหรือช่วงประมาณเดือนตุลาคม ขึ้นตอนแรกคือ การเตรียมพื้นที่สำหรับการทำนาเกลื้อ เริ่มจากกั้นน้ำฝนที่ขังอยู่ในนา เพื่อไว้ใช้สำหรับขุดร่องนาและเสริมคันดินใหม่เพื่อให้คันดินสูงขึ้นสำหรับใส่น้ำเกลื้อในปิดไป จากนั้นขุดรางส่งน้ำจากนาเกลื้อถึงชายทะเล และติดตั้งอุปกรณ์วิดน้ำ เพื่อเอาน้ำทะเลมาใช้ทำนาเกลื้อ ขึ้นตอนต่อมาคือ วิดน้ำจากรางส่งน้ำให้เต็มวังน้ำ และเริ่มคันน้ำเข้าสู่นาดากหรือนาประเทียบ หลังจากนั้นคันจึงน้ำเข้าสู่นาเชือรองเป็นสวนที่ 3 ตากน้ำไว้ประมาณ 5-7 วัน แสงแดดจะทำให้ น้ำระเหยจนปริมาณน้ำลดลงและความเค็มเพิ่มมากขึ้น สังเกตจากคราบน้ำที่จับอยู่ริมบ่อ ขึ้นตอนต่อมาคือคันน้ำจากนาเชือรองเข้าสู่ นาเชือ ซึ่งเป็นการเตรียมน้ำสำหรับใช้ในนาปลง จากนั้นทำการปรับพื้นที่นาปลงเพื่อรองรับน้ำจากนาเชือ โดยใช้วัสดุกลิ้งบดทับผิวดินให้เรียบแน่นไม่ให้มีรอยแตก ประมาณ 4-5 ครั้ง ครั้งละ 3-5 วัน และการบดกลิ้งผิวดินจะใช้ระยะเวลาห่างกันประมาณ 5-7 วัน ตามสภาพผิวดิน จากนั้นคันน้ำจากนาเชือเข้าสู่ นาปลง น้ำเกลื้อจะค่อยๆ ตกผลึกเป็นเม็ดเกลื้อและเกาะตัวกันหนา มีค่าความเค็มประมาณ 820-870 ppt ขึ้นตอนสุดท้ายเป็นการเก็บผลึกเกลื้อ เริ่มจากเกลื้อที่ตกผลึกหนาประมาณ 2 เซนติเมตรขึ้นไป จะใช้รั้วชวยเกลื้อให้ผลึกเกลื้อแตกออกจากกัน ทำการชวยเกลื้อจนทั่วนา จากนั้นใช้ทับทิมที่มีลักษณะคล้ายจอบเกลี่ยผลึกเกลื้อให้เป็นแถวยาวไปตามคันนา แล้วใช้ทับทิมขุ่ม (ตะล่อมเกลื้อ) รวมผลึกเกลื้อให้เป็นกอง นำเข้าเก็บในฉางหรือยุ้งเกลื้อ

## 3. การทบทวนวรรณกรรม

ในระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง ความหลากหลายของราอาจจะน้อยกว่าบริเวณอื่นๆ เนื่องจากราในบริเวณนี้ต้องมีการปรับตัวทางสรีรวิทยาเพื่อให้ทน โซเดียมคลอไรด์สูง (Gunde-Cemeran *et al.*, 2009; Ravindran *et al.*, 2012; Ronsberg *et al.*, 2013) ราชอบเกลื้อที่พบส่วนใหญ่เป็นราในกลุ่ม anamorph ซึ่งเป็นราในช่วงสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ของราไฟลัม Ascomycota (Gunde-Cemeran *et al.*, 2014) สกุลราที่พบมากในนาเกลื้อ คือ *Aspergillus* และ *Penicillium* ราชอบเกลื้อที่แท้จริงพบเฉพาะในสกุล *Aspergillus* (Gonsalves *et al.*, 2012)

ราชอบเกลือชนิดแรกที่มีรายงานเป็นราจาก Dead Sea ก็คือรา *Gymnascella marismoutui* (Buchalo *et al.*, 1998) และรา *Cladosporium* like เป็นราชอบเกลือชนิดแรกที่แยกได้จากนาเกลือ จากประเทศ สโลวีเนีย (Gunde-Cemeran *et al.*, 2000) ราทนเกลือชนิดเด่นที่พบได้ในบริเวณนี้ ได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium* และ *Scopulariopsis* (Gunde-Cemeran *et al.*, 2009) จากการศึกษา ของ Grishkan *et al.* (2003) ซึ่งศึกษาการกระจายของราทนเกลือบริเวณ Dead Sea ได้เก็บตัวอย่างน้ำและ ดินตะกอนในปี 1999-2000 พบราทั้งสิ้น 38 species จาก 19 genera โดยพบราในกลุ่ม Oomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina และ mitosporic fungi สำหรับรากลุ่มเด่นที่พบมากได้แก่ *Penicillium weslingii* (Frequency of occurrence 73%), *Cladosporium cladosporioides* (Frequency of occurrence 64%), *Beauveria alba* (Frequency of occurrence 55%) และ *Eurotium herbariorum* (Frequency of occurrence 55%) จากการศึกษาของ Cantrell *et al.* (2006) ที่ศึกษาความหลากหลายของราในบริเวณชายฝั่งตะวันตกเฉียงใต้ เมือง Cabo Rojo โดยเก็บตัวอย่างน้ำ ดินตะกอนและ microbial mat ในนาเกลือ ที่มีความเค็มสูงประมาณ 600 psu (ppt) ในช่วงเดือนมิถุนายน 2003 และ 2004 ราที่คัดแยกได้จากน้ำมี 27 ชนิด (86 สายพันธุ์) ดินตะกอนมี 8 ชนิด (44 สายพันธุ์) และ microbial mat 16 ชนิด (53 สายพันธุ์) ชนิดของราที่พบมากได้แก่ *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., และ *Cladosporium* spp. โดยในน้ำพบ *C. sphaerospermum* มากที่สุด (24 สายพันธุ์) ในดินตะกอนพบรากลุ่ม sterile mycelium-Moniliaceae มากที่สุด (16 สายพันธุ์) และ microbial mat พบ *A. niger* มากที่สุด (20 สายพันธุ์) Nayak *et al.*, (2012) สำรวจราทนเกลือและราชอบเกลือ ในนาเกลือจาก Goa ประเทศอินเดีย พบว่าราที่พบได้แก่รา *Aspergillus* spp. รองลงมาคือพบ *Penicillium* spp. และพบ *Eurotium* ประปราย Ali *et al.*, (2014) พบว่าราชอบเกลือที่แยกได้จากนาเกลือจังหวัดเพชรบุรี ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ทำการศึกษา สร้างสารต้านแบคทีเรียได้ดี ขณะที่ Sepcic *et al.* (2011) รายงานการยับยั้ง *Bacillus subtilis*

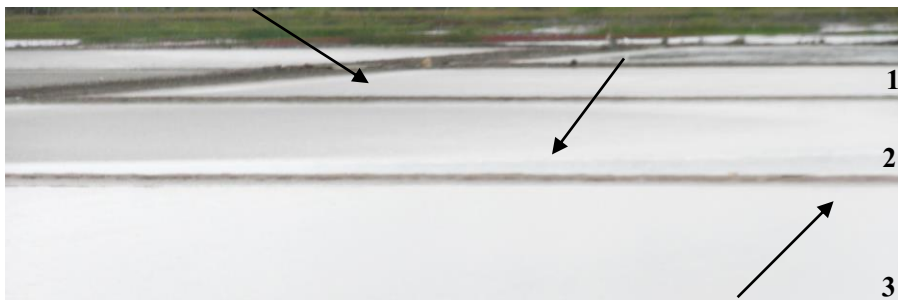
### บทที่ 3

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

### 1. แหล่งตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำจากนาเกลือ ในตำบลท่าข้าม อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ( $13^{\circ}30'8''\text{N } 100^{\circ}59'24''\text{E}$ ) และอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ( $12^{\circ}37'18''\text{N } 102^{\circ}00'70''\text{E}$ ) ในฤดูน้ำมาก และฤดูน้ำน้อย รวมทั้งหมด 4 ครั้ง คือเดือนตุลาคม พ.ศ. 2554 เดือนมกราคม พ.ศ. 2555 เดือนเมษายน พ.ศ. 2555 และเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2555 โดยที่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2554 และเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2555 เป็นตัวแทนของฤดูน้ำมากซึ่งไม่ใช่ฤดูทำนาเกลือ น้ำในนาเกลือทุกแปลงมีลักษณะทางกายภาพที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 1) ส่วนเดือนมกราคม พ.ศ. 2555 และเดือนเมษายน พ.ศ. 2555 เป็นตัวแทนฤดูน้ำน้อยซึ่งเป็นช่วงเวลาทำนาเกลือ เลือกเก็บตัวอย่างจากแปลงนาเกลือมีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ได้แก่ สีของน้ำ ความขุ่น และตะกอนแขวนลอยในนาเกลือ (ภาพที่ 2) ส่วนการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบุรี เก็บที่อำเภอบ้านแหลม ( $13^{\circ}14'1''\text{N } 99^{\circ}58'02''\text{E}$ ) ทั้งหมด 4 ครั้งในช่วงต้นและท้ายฤดูทำนาเกลือ คือเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2556 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2556 และเดือนมีนาคม พ.ศ. 2557

การเก็บตัวอย่างดิน ใช้ท่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร เก็บดินตั้งแต่ระดับผิวน้ำดิน จนถึงความลึก 15 เซนติเมตร ส่วนตัวอย่างน้ำเก็บโดยใช้ขวดเก็บตัวอย่างปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บน้ำที่ระดับความลึกจากผิวน้ำ 5 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างดินและน้ำใส่ถุงพลาสติกแช่ในน้ำแข็ง นำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาความหลากหลายของราและวัดค่าความเค็ม โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจางก่อนวัดด้วย salinometer



ภาพที่ 1 ลักษณะนาเกลือนอกฤดูการทำนาเกลือ; 1, 2 และ 3 เป็นแปลงที่เก็บตัวอย่าง ลูกศรแสดงบริเวณใกล้ขอบของแปลงซึ่งเป็นบริเวณเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 2 ลักษณะนาเกลือในฤดูกาลทำนาเกลือ; 1, 2 และ 3 เป็นแปลงที่เก็บตัวอย่าง ลูกศรแสดงบริเวณ  
ใกล้ขอบของแปลงทั้ง 3 ขอบซึ่งเป็นบริเวณเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 3 ลักษณะหลากหลายของดินและน้ำในนาเกลือในแปลงและฤดูกาลต่างๆ กัน

## 2. สายพันธุ์จุลินทรีย์

### 2.1 สายพันธุ์รา

ราที่แยกจากนาเกลือจังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดจันทบุรี และจังหวัดเพชรบุรี จำนวน 150 สายพันธุ์ ราทั้งหมดเก็บเป็น stock culture ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (ตารางที่ 1)

### 2.2 สายพันธุ์แบคทีเรียและยีสต์

ใช้เป็นเชื้อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากรานาเกลือ ซึ่งยกเว้น *Bacillus* ที่จัดซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย แบคทีเรียที่เหลือทั้งหมดและยีสต์ จัดซื้อจากกรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ จังหวัดจันทบุรี จุลินทรีย์ทั้งหมดได้รับการเก็บรักษาไว้เป็น stock culture ในภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Salmonella* Typhimurium ATCC 13311

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Bacillus cereus* TISTR 008 และ *Bacillus subtilis* TISTR 121

*Candida albicans* ATCC 90028 และ *Candida albicans* ATCC 10231

## 3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato dextrose agar/broth (Difco, USA) ผสมน้ำตาลความเข้มข้น 30 ppt (PDA/sw, PDB/sw)

Potato dextrose broth/agar (PDB/dw, PDA/dw) (Difco, USA)

Sabouraud dextrose agar (SDA) (Difco, USA)

Muller Hinton agar (MHA) (Difco, USA)

Muller Hinton agar (MHA) + 2% glucose

MHA + 2% glucose + 0.5 µg/ml methylene blue (MHA-GMB)

Nutrient agar (NA)

Tryptic soy agar (TSA)

Tryptic soy broth (TSB)

Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Lonza, USA)

**ตารางที่ 1** รานาเกลือที่นำมาทดสอบจำนวน 150 สายพันธุ์

SS 001	SS 026	SS 053	SS 078	SSpb1110	SSpb4108
SS 002	SS 027	SS 054	SS 079	SSpb1117	SSpb4207
SS 003	SS 028	SS 055	SS 080	SSpb1122	SSpb4208
SS 004	SS 029	SS 056	SS 082	SSpb1130	SSpb4215
SS 005	SS 030	SS 057	SS 083	SSpb1209	SSpb4217
SS 006	SS 031	SS 058	SS 084	SSpb1210	SSpb4225
SS 007	SS 032	SS 059	SS 085	SSpb1211	SSpb4226
SS 008	SS 033	SS 060	SS 086	SSpb1212	SSpb4234
SS 009	SS 034	SS 061	SS 087	SSpb1301	SSpb4301
SS 010	SS 035	SS 062	SS 088	SSpb1302	SSpb4304
SS 011	SS 037	SS 063	SS 089	SSpb1303	SSpb4307
SS 012	SS 038	SS 064	SS 090	SSpb1306	SSpb4308
SS 013	SS 039	SS 065	SS 091	SSpb1307	SSpb4309
SS 014	SS 040	SS 066	SS 092	SSpb1308	SSpb4312
SS 015	SS 041	SS 067	SS 093	SSpb1309	SSpb4313
SS 016	SS 042	SS 068	SS 094	SSpb1310	SSpb4316
SS 017	SS 043	SS 069	SS 097	SSpb1311	SSpb4319
SS 018	SS 044	SS 070	SS 099	SSpb1312	SSpb4320
SS 019	SS 045	SS 071	SS 101	SSpb1314	SSpb4321
SS 020	SS 047	SS 072	SS 102	SSpb1315	SSpb4323
SS 021	SS 048	SS 073	SS 103	SSpb2213	SSpb4325
SS 022	SS 049	SS 074	SS 104	SSpb3124	SSpb4327
SS 023	SS 050	SS 075	SS 105	SSpb3208	SSpb4328
SS 024	SS 051	SS 076	SS 109	SSpb3301	SSpb4329
SS 025	SS 052	SS 077	SS 112	SSpb4107	SSpb4332

หมายเหตุ SS xxx: รานาจากจังหวัดจันทบุรีและฉะเชิงเทรา เก็บตัวอย่างปี 2554, SSpbxxxx: รานาจากจังหวัดเพชรบุรี เก็บตัวอย่างปี 2555



#### 4. การเลี้ยงราและสารสกัดจากรา

##### 4.1 การเลี้ยงรา

เลี้ยงราจากนาเกลื้อที่จะทำการตรวจหาสารยับยั้งจุลินทรีย์บนอาหาร PDA/sw บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร เจาะชั้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยรา 2 ชั้น ใส่ลงในอาหาร PDB/sw ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 10 วัน เมื่อครบกำหนด นำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 เพื่อแยกส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนเส้นใยออกจากกัน เก็บรักษาส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

##### 4.2 การเตรียมสารสกัดจากราเกลื้อ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงรา 40 มิลลิลิตร มาสกัดด้วย ethyl acetate 40 มิลลิลิตร 2 ครั้งแรงๆ นาน 20 นาที นำส่วนสกัด ethyl acetate ที่ได้มารวมกัน นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้ง ละลายสารสกัดที่ได้ด้วยสารละลาย 50% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

#### 5. การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

##### 5.1 การเตรียม 0.5 McFarland standards (CLSI, 2006)

ผสม 0.048 mol/L ของ  $\text{BaCl}_2$  (1.175% w/v  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ 0.18 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1% v/v) ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกวนอย่างต่อเนื่อง ตรวจสอบความขุ่นของสารแขวนลอยที่เตรียม โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 nm โดยต้องมีค่า OD อยู่ในช่วง 0.08-0.13 เก็บสารแขวนลอยที่เตรียมได้ปริมาณ 4-6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาดเดียวกับหลอดทดลองที่ใช้กับเชื้อแบคทีเรียที่จะนำมาปรับความขุ่น เก็บหลอดสารแขวนลอยในที่มืด เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 5.2 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ (CLSI, 2012)

เพาะแบคทีเรียทดสอบบนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีเดี่ยว 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร TSB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อทดสอบให้ได้ความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน  $10^{-1}$  McFarland No. 0.5 (ในกรณีทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ) และปรับให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 (ในกรณีทดสอบกับสารสกัด) ซึ่ง *E.coli* ATCC 25922 จะมีเซลล์ประมาณ  $1 \times 10^7$ - $2 \times 10^7$  CFU/ml และ  $1 \times 10^8$ - $2 \times 10^8$  CFU/ml ตามลำดับ

## 5.3 การเตรียมยีสต์ทดสอบ (ดัดแปลงจาก CLSI, 2004)

เชื้อยีสต์ลงบนอาหาร SDA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์จำนวน 1-2 โคโลนีใส่ลงในอาหาร SDB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำเชื้อมาปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 (กรณีทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ) และปรับให้เท่ากับ  $10^{-1}$  McFarland No. 0.5 (กรณีทดสอบกับสารสกัด) ซึ่งจะมีเซลล์ประมาณ  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  CFU/ml และประมาณ  $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$  CFU/ml ตามลำดับ

## 6. การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี Agar well diffusion

ป้ายแบคทีเรียทดสอบ / ยีสต์ทดสอบ ที่มีความขุ่นเทียบเท่า  $10^{-1}$  McFarland No.0.5 ลงบนผิวหน้าอาหาร NA สำหรับยีสต์ใช้อาหาร SDA โดยป้ายให้ทั่ว 3 ระนาบ แต่ละระนาบทำมุม 60 องศา ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตรเจาะรูออก ปิเปิดอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่เจาะไว้ (สำหรับชุดควบคุมผลลบใช้อาหารเหลวที่ปลอดเชื้อ) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งรอบหลุม (ทำ 2 ซ้ำ)

## 7. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากรานาเกลือในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี **Disk diffusion** (CLSI, 2006)

ป้ายแบคทีเรียทดสอบลงบนอาหาร MHA ให้ทั่วทั้งผิวหน้าอาหารทั้ง 3 ระนาบ หยดสารสกัดลงบนแผ่นดิสก์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำแผ่นดิสก์ไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แผ่นดิสก์จุ่มสารละลาย 50% DMSO 20 ไมโครลิตร ที่ผึ่งจนแห้งเป็นชุดควบคุมผลลบ และใช้ดิสก์ยา gentamycin (10 ไมโครกรัม) เป็นชุดควบคุมผลบวก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น ทำการทดลอง 2 ซ้ำ รายงานค่าเฉลี่ย สารสกัดที่ให้ผลยับยั้งดีจะนำมาทดสอบ 2 ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

กรณีใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีข้างต้น โดยเปลี่ยนมาใช้อาหาร Muller Hinton agar ที่เติม 2% glucose และสารละลาย methylene blue 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (MHA-GMB) (ดัดแปลงจาก CLSI, 2004) และใช้ fluconazole (25 ไมโครกรัม) เป็นชุดควบคุมผลบวก

หมายเหตุ รากจากเพชรบุรีที่สารสกัดให้ผลยับยั้งดีจะถูกคัดเลือกไว้ เพื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB/dw และ PDB/sw ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง และสกัดสารเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ตามขั้นตอนในข้อ 4, 5 และ 7 แต่จะทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

## 8. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (**Minimum inhibitory concentration, MIC**) ของแบคทีเรียด้วยวิธี **Broth micro dilution** (CLSI, 2006)

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากรานาเกลือ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ทำที่ความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 1,024-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยนำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นที่ผสมอยู่ในอาหารเหลว 1 มิลลิตร มาใส่ลงหลุมของ microtiter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland เจือจางด้วย NSS ในอัตราส่วน 1:10 นำไปหยดลงในแต่ละหลุมของ 96 well microliter plate หลุมละ 5 ไมโครลิตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ชุดควบคุมผลบวกใช้ยามาตรฐาน gentamycin และ ampicillin ชุดควบคุมผลลบใช้สารละลาย 50% DMSO และกำหนดให้หลุมที่ 11 เป็น growth control ส่วนหลุมที่ 12 กำหนดให้เป็น

sterility control บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยดูการเจริญของเชื้อทดสอบในหลุมต่างๆ บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

ในกรณีที่ต้องการทราบค่า minimum bactericidal concentration (MBC) นำอาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมที่อาหารใสมาเทียบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจดูการเจริญของเชือบนจานอาหาร โดยบันทึกค่าความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชือบนจานอาหาร

## 9. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibitory concentration, MIC) ของยีสต์ด้วยวิธี Broth micro dilution (คัดแปลงจาก CLSI, 2008)

ทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 1,024-4 ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิตร โดยนำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นที่ผสมอยู่ในอาหารเหลว RPMI 1640 1 มิลลิตร มาเติมลงหลุมของ 96 well microliter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำยีสต์ที่มีความขุ่นเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No 0.5 เจือจางด้วย NSS ในอัตราส่วน 1:50 และเจือจางอีกครั้งด้วยด้วย NSS ในอัตราส่วน 1:20 จะได้เชื้อประมาณ  $1.0 \times 10^3 - 5 \times 10^3$  เซลล์ต่อมิลลิตร แล้วนำไปหยดลงในแต่ละหลุมของ microliter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งในหลุมจะมีเชื้อประมาณ  $0.5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^3$  เซลล์ต่อมิลลิตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ชุดควบคุมผลบวกใช้ยามาตรฐาน fluconazol และชุดควบคุมผลลบใช้ สารละลาย 50% DMSO การทดสอบในหลุมที่ 11 กำหนดให้เป็น growth control ส่วนหลุมที่ 12 กำหนดให้เป็น sterility control บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยดูความขุ่นของเชื้อทดสอบ บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญยีสต์ได้

ในกรณีที่ต้องการทราบค่า (Minimum fungicidal concentration, MFC) นำอาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมที่อาหารใสมาเทียบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจดูการเจริญของเชือบนจานอาหาร โดยบันทึกค่าความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชือบนจานอาหาร

**10. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากราดิววิธี Thin layer chromatography (ดัดแปลงจาก Jois, Sarkar, & Gurusiddaiah, 1986)**

นำสารสกัดมาแยกองค์ประกอบทางเคมี เริ่มจากเตรียมตัวดูดซับ โดยใช้แผ่น TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub> ตัดให้มีขนาด 1x10 เซนติเมตร กำหนดระดับตัวทำละลายให้อยู่สูงกว่าขอบด้านล่างของแผ่น TLC 0.5 เซนติเมตร กำหนดระยะจุดสารแต้มสารลงบนแผ่น TLC ให้ห่างจากขอบด้านล่าง 1 เซนติเมตร และห่างจากขอบด้านข้าง 0.5 เซนติเมตร กำหนดตำแหน่ง solvent front ให้อยู่ต่ำกว่าขอบด้านบนของแผ่น TLC 1 เซนติเมตร จากนั้นใช้ capillary tube ขนาดเล็กดูดสารสกัดปริมาตร 2-5 ไมโครลิตรไปจุดลงบนแผ่น TLC และวางพักไว้ให้สารแห้ง เตรียมตัวทำละลาย toluene, methanol และ acetone แล้วผสมตัวทำละลายข้างต้นด้วยอัตราส่วน 6:1:3 (v/v) ในภาชนะที่ปิดสนิทประมาณ 10 นาที เพื่อให้ตัวทำละลายอิ่มตัว จากนั้นนำแผ่น TLC ไปแช่ในตัวทำละลายในภาชนะที่ปิดสนิทที่เตรียมไว้ เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่แพร่ถึงตำแหน่ง solvent front นำแผ่น TLC ออกมาพักให้แห้ง บันทึกลักษณะแถบสารภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร ในที่มืด สังเกตการเรืองแสงและสีของแถบสารและวัดระยะที่สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่บนแผ่น TLC คำนวณหาค่า retention factor (R<sub>f</sub>) ของสารสกัด จากสูตร R<sub>f</sub> = ระยะทางที่ตัวอย่งเคลื่อนที่/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

**11. การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรณานาเกลือ โดยวิธี Bioautography (ดัดแปลงจาก Hamburger & Cordell, 1987)**

การยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ โดยวิธี bioautography ทำโดยวางแผ่น TLC บนผิวหน้าอาหาร MHA ที่ป้ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No.0.5 ไว้แล้ว ในกรณีของยีสต์วางบน MHA-GMB ที่ป้ายยีสต์ทดสอบที่เทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No.0.5 กดแผ่น TLC เบบ่า ๆ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง บ่มแบคทีเรียเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับยีสต์บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง กำหนดให้ชุดควบคุมผลลบคือแผ่น TLC ที่ผ่านการวางในวิญภาคเคลื่อนที่ บันทึกความสามารถในการยับยั้ง โดยประมาณการขนาดบริเวณยับยั้งรอบสารด้วยสายตา ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การยับยั้งรา แบคทีเรีย และยีสต์ของสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC อีกวิธีหนึ่งเพื่อให้สามารถระบุสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ชัดเจนขึ้น ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีข้างต้น

โดยตัดแยกแผ่น TLC ตรงบริเวณที่มีสารองค์ประกอบ วางบนผิวหน้าอาหาร MHA ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ป้ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No.0.5 ไว้แล้ว ในกรณีของยีสต์ทำเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนมาวางบน MHA-GMB และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

## 12. การจัดจำแนกรทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะการเจริญของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ ศึกษาโครงสร้างสืบพันธุ์ของราโดยเทคนิคการเพาะเชื้อบนบนสไลด์ (Slide culture) ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound บนที่ก้อตราการเจริญและลักษณะโคโคโคนี พร้อมทั้งถ่ายภาพ ทำการจำแนกชนิดของราเทียบกับคู่มือ Illustrated genera of imperfect fungi (Barnett & Hunter, 2006) และคู่มือของ Frisvad and Samson *et al.* (2004) เป็นหลัก

## 13. การจัดจำแนกรทางอนุพันธุศาสตร์

### 13.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ราจากจังหวัดจันทบุรีและฉะเชิงเทรา ใช้วิธีของ Atkins and Clark (2004) โดยนำเส้นใยรา มาทำให้แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว บดเส้นใยให้เป็นผง ทำให้เส้นใยแตกด้วย lysis buffer (100 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA และ 2% SDS) สกัดโปรตีนด้วย phenol และ chloroform-isoamyl alcohol ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer และเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ราจากจังหวัดเพชรบุรี นำเส้นใยรามาสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป E.Z.N.A. Forensic DNA Isolation Kit (Omega Bio-Tek) และดำเนินการสกัดตามคำแนะนำในชุดสกัด

### 13.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยผสมองค์ประกอบต่างๆ ตามลำดับ ลงในหลอดสำหรับทำพีซีอาร์ ดังแสดงในตารางที่ 2 ไพร์เมอร์ที่ใช้คือ ITS5/ITS4 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG/TCCTCCGCTTATTGATATGC) สำหรับเพิ่มปริมาณ ITS และ ไพร์เมอร์ Bt2a /Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTTTC/ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) สำหรับเพิ่มปริมาณยีน beta tubulin นำหลอดปฏิกิริยาที่เตรียมได้ไปดำเนินการปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเครื่อง thermal cycler ซึ่งดำเนินการปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นจำนวน 35 รอบ โดยสภาวะของการดำเนินการปฏิกิริยามีขั้นตอน

การดำเนินปฏิบัติการพีซีอาร์ ดังแสดง ในตารางที่ 3-4 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

### 13.3 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำบริสุทธิ์แล้ว ส่งไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen ประเทศเกาหลี)

### 13.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเราแต่ละไอโซเลทที่ได้จากการอ่านโดยใช้ไพร์เมอร์แต่ละเส้น มาสร้าง contig โดยใช้โปรแกรม BioEdit และนำไปวิเคราะห์ความคล้ายคลึงโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลสาธารณะในฐานข้อมูล GenBank บน NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ใช้โปรแกรม Basic alignment search tool (BLASTn)

### 13.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเครื่องหมายที่อ่านได้ของเราทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งดีหรือเชื้อใหม่ รวมทั้งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของราชชนิดต่างๆ จาก GenBank มาจัดเรียง และนำไปวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสร้างแผนภูมิไฟโลแกรม (Phylogram) โดยใช้โปรแกรม Mega 6 โมเดลที่คำนวณที่รี คือ p-distance ทดสอบความถูกต้องของทรี โดยวิธี bootstrapping (1,000 ซ้ำ)

## 14. การเก็บรักษาเชื้อ

นำเชื้อที่แยกได้มาถ่ายลงในหลอดอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกว่าเชื้อจะเจริญใส่น้ำมันพาราฟินปราศจากเชื้อจนท่วมอาหารที่มีอยู่ในหลอด พันจุลหลอดด้วยพาราฟิล์ม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ราชที่คาดว่าเป็นราชชนิดใหม่หรือมีคุณสมบัติที่น่าสนใจ ส่งไปเก็บรักษาไว้ที่ศูนย์รวบรวมสายพันธุ์รา Biotec Culture Collection (BCC) จังหวัดปทุมธานี

**ตารางที่ 2** องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนยีน Beta tubulin และ ITS

สารองค์ประกอบ	Beta tubulin	ITS
10X reaction buffer	1X	1X
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	2.5 mM
10 mM dNTP (mix)	0.2 mM	0.2 mM
10 μM primer	Bt2a/Bt2b	ITS5/ITS4
- forward	0.2 μM	0.2 μM
- reverse	0.2 μM	0.2 μM
Taq DNA polymerase	1U	1U
template	50-100 ng	50-100 ng
ปริมาตรรวม	50 μl	50 μl

**ตารางที่ 3** ขั้นตอนของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ ITS

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ต่อรอบ	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	1 นาที	} 35
Annealing	53	1 นาที	
Extension	72	2 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1



ตารางที่ 4 ขั้นตอนของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ยีน Beta tubulin

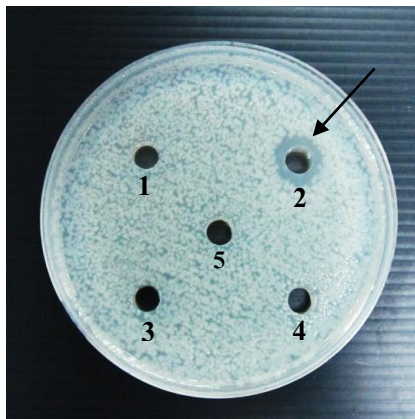
ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ต่อรอบ	จำนวนรอบ
Initial denaturation	96	2 นาที	1
Denaturation	96	1 นาที	} 35
Annealing	53	1 นาที	
Extension	72	1.5 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. การคัดกรองรานาเกลือในการยับยั้งจุลินทรีย์

จากการนำราที่แยกได้จากนาเกลือจังหวัดฉะเชิงเทราและจันทบุรีจำนวน 100 สายพันธุ์ (SS 001-SS 100) ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (PDB/sw) 30 มิลลิตร แล้วนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture filtrate) จากรอายุ 7 วัน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 6 ชนิด (7 สายพันธุ์) คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Bacillus cereus* TISTR 008, *B. subtilis* TISTR 121, *Candida albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี agar well diffusion พบว่ารา 19 สายพันธุ์ (ร้อยละ 19.0) สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่นำมาทดสอบ ได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด และส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รา SS 063 และ SS 085 สร้างสารยับยั้ง *E. coli* ได้ แต่ไม่สมบูรณ์ พบโคโลนีเชื้อส่วนหนึ่งในบริเวณยับยั้ง รา SS 060 ยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ไม่สมบูรณ์เช่นกัน รา 2 สายพันธุ์ (ร้อยละ 2.0) สามารถสร้างสารยับยั้งยีสต์ทดสอบได้ 1 สายพันธุ์ ราที่ให้ผลยับยั้งแสดงในตารางที่ 5 ตัวอย่างผลบวกแสดงในภาพที่ 4 (รายละเอียดอยู่ในรายงานการทดลองปีงบประมาณ 2556)



ภาพที่ 4 กุทรียับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* TISTR 121 ของอาหารเลี้ยงรานาเกลือ ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion; 1: SS 090, 2: SS 091, 3: SS 093, 4: SS 094, 5: อาหารปลอดเชื้อใช้เป็นชุดควบคุมผลลบ

ตารางที่ 5 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของอาหารเลี้ยงเชื้อจากรานาเกลือ

ลำดับ	อาหารเลี้ยงเชื้อของรา	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)							
		EC	PA	ST	SA	BC	BS	CA1	CA2
1	SS 026	-	-	-	12*	-	-	-	-
2	SS 027	-	-	-	10*	-	-	-	-
3	SS 032	-	-	-	13*	-	-	9**	-
4	SS 033	-	-	-	11	10	-	-	-
5	SS 038	-	-	-	10*	-	9	-	-
6	SS 045	-	-	-	11	11	-	-	-
7	SS 047	-	-	-	11	10	9	-	-
8	SS 048	-	-	-	12	11	-	-	-
9	SS 057	-	-	-	13*	-	-	-	-
10	SS 060	-	9*	-	-	-	-	-	-
11	SS 063	24*	-	-	-	-	-	-	-
12	SS 069	-	-	-	16	14	18	-	-
13	SS 074	-	-	-	12*	-	-	-	-
14	SS 076	-	-	-	10*	-	-	-	-
15	SS 078	-	-	-	10*	-	-	9*	-
16	SS 085	12*	-	-	11	10	-	-	-
17	SS 089	-	-	-	10*	-	-	-	-
18	SS 091	-	-	-	11	11	16	-	-
19	SS 099	-	-	-	11	10	15	-	-

หมายเหตุ: *E. coli* ATCC 25922, PA = *P. aeruginosa* ATCC 27853, SA = *S. aureus* ATCC 25923, ST = *S. Typhimurium* ATCC 13311, BC = *B. cereus* TISTR 008, BS = *B. subtilis* TISTR 121, CA1 และ CA2 = *C. albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028, + คือ ยับยั้งได้ - คือ ไม่ยับยั้ง  
\* คือ ยับยั้งไม่สมบูรณ์

## 2. ผลของสารสกัดอาหารเลี้ยงเชื้อจากรานาเกลือในการยับยั้งจุลินทรีย์

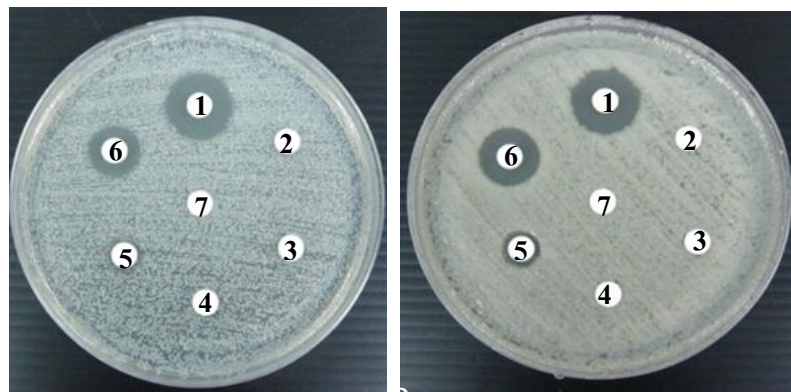
### 2.1 การยับยั้งแบคทีเรีย

เมื่อนำสารสกัด 20 ไมโครลิตร ที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อรา 40 มิลลิลิตรของรา 34 สายพันธุ์ (17 สายพันธุ์ ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นบวก และ 17 สายพันธุ์ ให้ผลการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นลบ) จากจังหวัดฉะเชิงเทราและจันทบุรี มาละลายด้วยตัวทำละลาย 50% DMSO 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disk diffusion พบว่าผลจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัดไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกัน สารสกัดที่ทำให้บริเวณยับยั้งขนาดใหญ่อาจให้ผลทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นลบ นอกจากนี้ผลของสารสกัดในการยับยั้ง *Bacillus cereus* TISTR 008 และ *Bacillus subtilis* TISTR 121 ไม่แตกต่างกัน สารสกัดจากอาหารเลี้ยงรา รหัส SS 031 SS 066 SS 069 SS 070 SS 076 (SS 078) SS 079 SS 091 SS 097 และ SS 099 จากทั้งหมด 34 สาร (29.4%) แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิดได้ดี สามารถพบเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้มากกว่า 13 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบกับจุลินทรีย์ต่างๆ กัน ขึ้นกับชนิด/สายพันธุ์ที่ทดสอบ (รายละเอียดอยู่ในรายงานการทดลองปีงบประมาณ 2556)

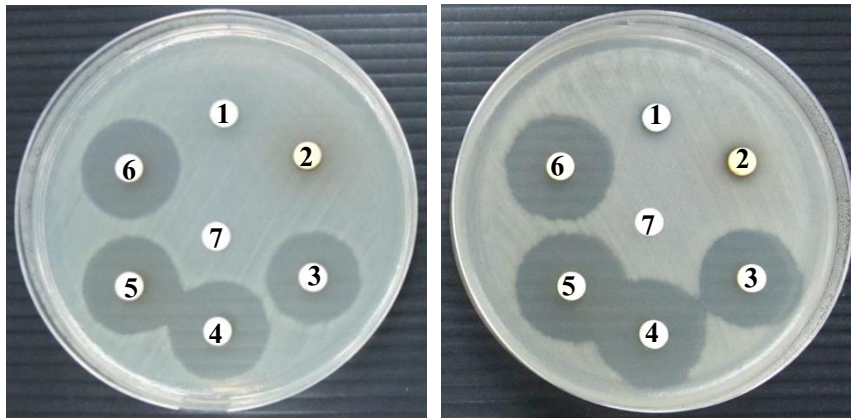
จากผลการทดลองในปีแรกซึ่งยังไม่พบราที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี เป็นที่พอใจ การที่ผลของการยับยั้งโดยอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถใช้เป็นวิธีคัดกรองราที่สร้างสารยับยั้ง ประกอบกับผลที่ไม่แตกต่างกันของสารสกัดในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 และ *B. subtilis* TISTR 121 ในปีนี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อจากจังหวัดเพชรบุรีมาทำการทดสอบเพิ่มเติม อีก 50 สายพันธุ์ ซึ่งเมื่อรวมกับเชื้อจังหวัดฉะเชิงเทราและจันทบุรี จะเป็นจำนวน 150 สายพันธุ์ (รายละเอียดอยู่ในตารางที่ 1) นำราทั้ง 150 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและนำมาสกัดสารออกฤทธิ์ นำสารสกัดทั้งหมดมาทดสอบทั้งหมดกับจุลินทรีย์ทดสอบเดิมจำนวน 6 สายพันธุ์ (ตัด *B. subtilis* TISTR 121 เนื่องจากให้ผลไม่ต่างจาก *B. cereus* TISTR 008 และไม่ใช้เชื้อก่อโรค) ผลพบว่าสารสกัดที่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ อย่างน้อย 1 ชนิดมี 60 สาร จากรา 150 สายพันธุ์ (ร้อยละ 40.0) ส่วนใหญ่ยังคงเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และส่วนใหญ่เห็นบริเวณยับยั้งที่ชัดเจน ยกเว้นในกรณี *S. aureus* ATCC 25923 และยีสต์ที่ให้บริเวณยับยั้งกว้าง แต่ในบางครั้งมีแบคทีเรียส่วนหนึ่งเจริญในบริเวณยับยั้งได้ (ตารางที่ 6) สารสกัดจากอาหารเลี้ยงรา เพียง 13 สายพันธุ์ (ร้อยละ 8.7) เท่านั้นที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* ATCC 27853

และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ได้เล็กน้อย ให้บริเวณยับยั้ง เส้นผ่าศูนย์กลาง 7-10 มิลลิเมตร ไม่พบว่าสารสกัดจากราสายพันธุ์ใดสามารถยับยั้ง แบคทีเรียแกรมลบ *E.coli* ATCC 25922 ได้

สารสกัดจากอาหารเลี้ยงรารหัส SS 066 SS 069 SS 078 SS 079 SS 091 SSpb3124 SSpb3208 SSpb4107 SSpb4207 SSpb4208 SSpb4215 SSpb4217 SSpb4225 SSpb4226 SSpb4301 SSpb4304 SSpb4307 SSpb4308 SSpb4309 SSpb4312 SSpb4313 SSpb4316 SSpb4319 SSpb4320 SSpb4321 SSpb4323 SSpb4325 SSpb4327 SSpb4328 SSpb4329 และ SSpb4332 (แสดงชื่อเชื้อด้วยตัวหนา) แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดี โดยกรณีแบคทีเรียแกรมบวกสามารถพบเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 15 มิลลิเมตร รา SSpb4207 SSpb4208 SSpb4215 SSpb4217 SSpb4225 SSpb4321 SSpb4328 SSpb4329 และ SSpb4332 ยับยั้งได้ดีทั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. cereus* TISTR 008 พบเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้มากกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิเมตร กับแบคทีเรียทดสอบ ทั้งสองชนิด (เน้นด้วยสีเทา) ตัวอย่างบริเวณยับยั้งแสดงในภาพที่ 5-7 เมื่อพิจารณาผลทดสอบกับจุลินทรีย์ ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ พบว่าสารสกัดที่มาจากราที่กล่าวมา ที่ให้ผลยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ มี 12 สายพันธุ์ ได้แก่ S 069 SS 089 SSpb3124 SSpb4217 SSpb4225 SSpb4226 SSpb4307 SSpb4308 SSpb4309 SSpb4319 SSpb4321 และ SSpb4328

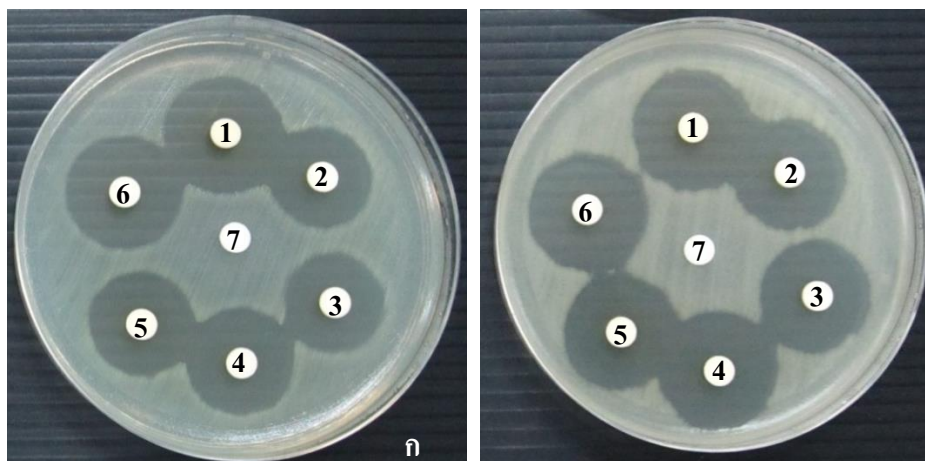


ภาพที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 (ก) และ *B. cereus* TISTR 121 (ข) ของสารสกัด จากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ ทดสอบโดยวิธี disk diffusion; 1: สารสกัดจาก SS 069, 2: สารสกัดจาก SS 067, 3: สารสกัดจาก SS 064, 4: สารสกัดจาก SS 047, 5: สารสกัดจาก SS 038, 6: สารสกัดจาก SS 099, 7: disk สารละลาย 50% DMSO ใช้เป็นชุดควบคุมผลลบ



ก

ภาพที่ 6 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 (ก) และ *B. cereus* TISTR 121 (ข) ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรณานาเกลือ ทดสอบโดยวิธี disk diffusion; 1: สารสกัดจาก SSpb1301, 2: สารสกัดจาก SSpb4108, 3: สารสกัดจาก SSpb4307, 4: สารสกัดจาก SSpb4308, 5: สารสกัดจาก SSpb4309, 6: สารสกัดจาก SSpb4319, 7: disk สารละลาย 50% DMSO ใช้เป็นชุดควบคุมผลลบ



ก

ภาพที่ 7 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 (ก) และ *B. cereus* TISTR 121 (ข) ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรณานาเกลือ ทดสอบโดยวิธี disk diffusion; 1: สารสกัดจาก SSpb4321, 2: สารสกัดจาก SSpb4323, 3: สารสกัดจาก SSpb4325, 4: สารสกัดจาก SSpb4327, 5: สารสกัดจาก SSpb4328, 6: สารสกัดจาก SSpb4329, 7: disk สารละลาย 50% DMSO ใช้เป็นชุดควบคุมผลลบ

ตารางที่ 6 ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ

ลำดับที่	สารสกัดของ ราสายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)						
		EC	PA	ST	SA	BC	CA1	CA2
1	SS 006	-	-	-	12	9	-	-
2	SS 014	-	-	-	11	13	-	-
3	SS 026	-	-	-	8*	8	-	-
4	SS 027	-	-	-	9*	8	-	-
5	SS 031	-	-	-	17*	-	13	20*
6	SS 033	-	-	-	-	10	-	-
7	SS 034	-	-	-	-	8	-	-
8	SS 035	-	-	-	8*	-	-	-
9	SS 045	-	-	-	8*	7	-	-
10	SS 047	-	-	-	8*	8	-	8*
11	SS 048	-	-	-	-	8	-	8*
12	SS 057	-	-	-	9*	-	-	-
13	<b>SS 066</b>	-	-	-	<b>17</b>	<b>14</b>	-	-
14	<b>SS 069</b>	-	<b>9</b>	-	<b>19</b>	<b>16.5</b>	-	-
15	SS 070	-	-	-	12	13.5	-	27*
16	SS 072	-	-	-	-	9.5	-	-
17	SS 074	-	-	-	-	8	-	-
18	SS 076	-	-	-	12.5	12.5	17*	14*
19	<b>SS 078**</b>	-	-	-	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>11*</b>	<b>14.5*</b>
20	<b>SS 079</b>	-	-	-	<b>15</b>	<b>16</b>	-	<b>18*</b>

หมายเหตุ: *E. coli* ATCC 25922, PA = *P. aeruginosa* ATCC 27853, SA = *S. aureus* ATCC 25923, ST= *S. Typhimurium* ATCC 13311, BC = *B. cereus* TISTR 008, CA1 และ CA2 = *C. albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028, + คือ ยับยั้งได้ - คือ ไม่ยับยั้ง \* คือ ยับยั้งไม่สมบูรณ์

ตารางที่ 6 ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดของ ราสายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)						
		EC	PA	ST	SA	BC	CA1	CA2
21	SS 089	-	-	7	8*	8	-	-
<b>22</b>	<b>SS 091</b>	-	-	-	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>15*</b>	<b>22.5*</b>
23	SS 097	-	-	-	13	12	-	18.5
24	SS 099	-	-	-	12	14	-	8*
25	SSpb1110	-	-	-	8	7	-	-
26	SSpb1117	-	-	-	11	8	13	10
27	SSpb1122	-	-	-	13	12	17	12
28	SSpb1130	-	-	-	12	12	16	11.5
29	SSpb1301	-	-	-	-	7	-	-
30	SSpb1302	-	-	-	-	7	-	-
31	SSpb1303	-	-	-	-	7	-	-
32	SSpb1306	-	-	-	10	9	-	-
33	SSpb1311	-	-	-	-	9	-	-
34	SSpb1312	-	-	-	-	7	-	-
<b>35</b>	<b>SSpb3124</b>	-	-	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>19.5</b>	<b>13</b>	<b>13</b>
<b>36</b>	<b>SSpb3208</b>	-	-	-	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>37</b>	<b>SSpb4107</b>	-	-	-	<b>18</b>	<b>21</b>	-	-
<b>38</b>	<b>SSpb4207</b>	-	-	-	<b>22</b>	<b>21.5</b>	<b>10.5</b>	<b>9.5</b>
<b>39</b>	<b>SSpb4208</b>	-	-	-	<b>22</b>	<b>21.5</b>	<b>10</b>	<b>8</b>
<b>40</b>	<b>SSpb4215</b>	-	-	-	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>9</b>	-

หมายเหตุ: *E. coli* ATCC 25922, PA = *P. aeruginosa* ATCC 27853, SA = *S. aureus* ATCC 25923, ST= *S. Typhimurium* ATCC 13311, BC = *B. cereus* TISTR 008, CA1 และ CA2 = *C. albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028, + คือ ยับยั้งได้ - คือ ไม่ยับยั้ง \* คือ ยับยั้งไม่สมบูรณ์



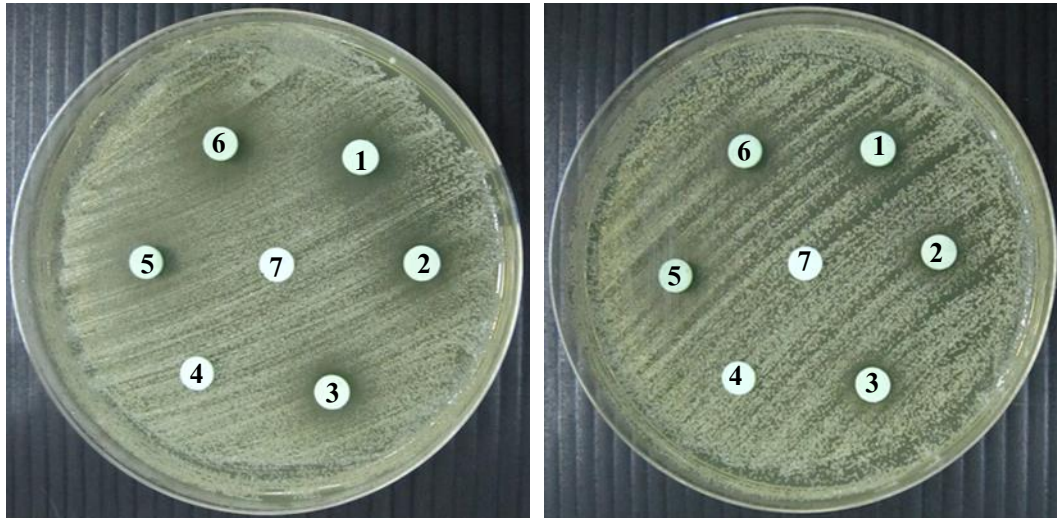
ตารางที่ 6 ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดของ ราสายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)						
		EC	PA	ST	SA	BC	CA1	CA2
41	SSpb4217	-	8	-	22	22.5	9	7
42	SSpb4225	-	9	-	21.5	21	10.5	9
43	SSpb4226	-	8	-	19	20.5	9	9
44	SSpb4301	-	-	-	15	18.5	15*	15*
45	SSpb4304	-	-	-	13	17	11	10
46	SSpb4307	-	-	8	17.5	18.5	8	8*
47	SSpb4308	-	-	8	18.5	19.5	9*	9*
48	SSpb4309	-	-	8	18.5	20	9.5	9*
49	SSpb4312	-	-	-	12	15	-	-
50	SSpb4313	-	-	-	18	21	9*	9*
51	SSpb4316	-	-	-	18	21.5	-	-
52	SSpb4319	-	8	-	19.5	21	8.5*	8.5*
53	SSpb4320	-	-	-	22.5	17.5	8*	-
54	SSpb4321	-	10	-	20	23	8*	9.5*
55	SSpb4323	-	-	7.5	18	19.5	8	-
56	SSpb4325	-	-	-	17.5	18.5	8	-
57	SSpb4327	-	-	-	18.5	20.0	7	-
58	SSpb4328	-	-	10	20	20.5	8	-
59	SSpb4329	-	-	-	21.5	20.5	11.5	9.5
60	SSpb4332	-	-	-	22.5	21.5	11.5	10.0

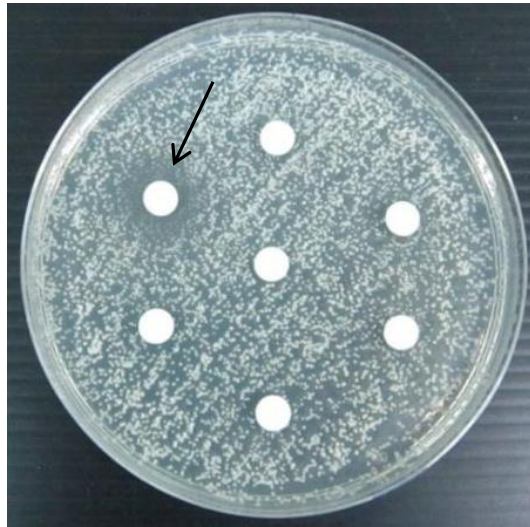
หมายเหตุ: E. coli ATCC 25922, PA = P. aeruginosa ATCC 27853, SA = S. aureus ATCC 25923, ST= S. Typhimurium ATCC 13311, BC = B. cereus TISTR 008, CA1 และ CA2 = C. albicans ATCC 10231 และ C. albicans ATCC 90028, + คือ ยับยั้งได้ - คือ ไม่ยับยั้ง \* คือ ยับยั้งไม่สมบูรณ์

## 2.2 การยับยั้งยีสต์ก่อโรค

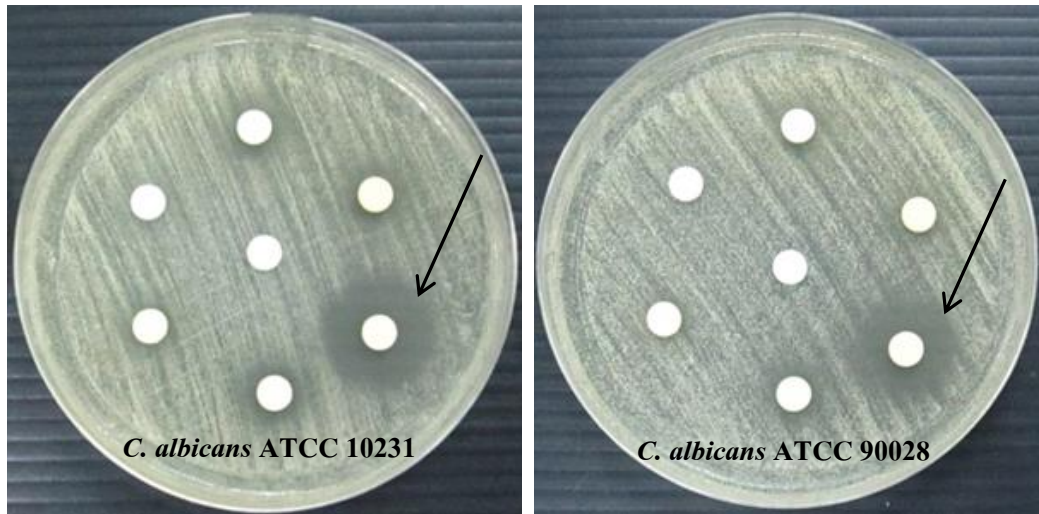
พบการยับยั้งยีสต์ในสารสกัดจากรานาเกลือจำนวน 36 สายพันธุ์จากทั้งหมด 150 สายพันธุ์ (ร้อยละ 24.0) ให้เส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสระหว่าง 7-17 มิลลิเมตร บางครั้งพบว่ามีเชื้อบางส่วนเจริญเป็นโคโลนีในบริเวณยับยั้ง (ตารางที่ 6 ภาพที่ 8-9) การยับยั้งยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีอัตราไม่แตกต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์ราที่ทดสอบ สารสกัดจากรา SSpb1122 และ SSpb1130 สามารถยับยั้งยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ดีที่สุด เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งมากกว่า 15 มิลลิเมตร (ตารางที่ 6 ภาพที่ 10) ขณะที่ SS 097 สามารถยับยั้งยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 ได้ดีที่สุด ในบางกรณีการยับยั้งยีสต์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อราจะเห็นผลชัดเจนขึ้นเมื่อบ่มไว้ประมาณ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 11)



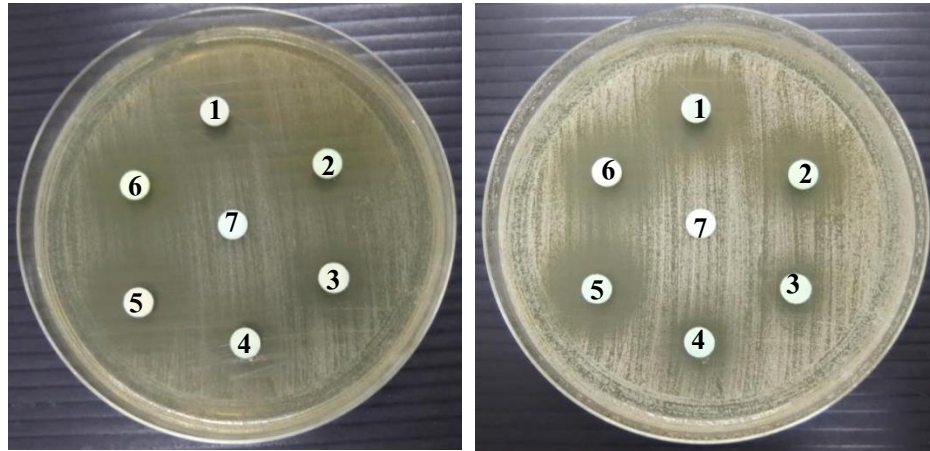
**ภาพที่ 8** ความสามารถของสารสกัดจากรานาเกลือในการยับยั้งยีสต์ก่อโรค *C. albicans* ATCC 10231 (ภาพซ้าย) และ *C. albicans* ATCC 90028 (ภาพขวา) 1: สารสกัดจาก SSpb4207, 2: สารสกัดจาก SSpb4208, 3: สารสกัดจาก SSpb4225, 4: สารสกัดจาก SSpb4235, 5: สารสกัดจาก SSpb4329, 6: สารสกัดจาก SSpb4332, 7: disk สารละลาย 50% DMSO ใช้เป็นชุดควบคุมผลลบ



ภาพที่ 9 ความสามารถของสารสกัดจากรานาเกลื้อ SS 076 (ลูกศรชี้) ในการยับยั้งยีสต์ก่อโรค *C. albicans* ATCC 10231: ให้โซนไม่ใส มียีสต์บางส่วนเจริญได้



ภาพที่ 10 ความสามารถของสารสกัดจากรานาเกลื้อ SSpb1122 (ลูกศรชี้) ในการยับยั้งยีสต์ก่อโรค *C. albicans* ATCC 10231 (ภาพซ้าย) และ *C. albicans* ATCC 90028 (ภาพขวา)



**ภาพที่ 11** ความสามารถของสารสกัดจากรานาเกลือในการยับยั้งยีสต์ก่อโรค *C. albicans* ATCC 10231 เปรียบเทียบความชัดเจนเมื่อตรวจผลหลังบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพซ้าย) และ 48 ชั่วโมง (ภาพขวา) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส: 1,2 สารสกัดจาก SSpb1117 (PDB/dw) และ SSpb1117 (PDB/sw); 3,4 สารสกัดจาก SSpb3124 (PDB/dw) และ SSpb3124 (PDB/sw); 5,6 สารสกัดจาก SSpb1122 (PDB/dw) และ SSpb1122 (PDB/sw)

### 3. ผลของความเค็มอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ของสารที่สกัดได้

การสุ่มเลือกராจังหวัดเพชรบุรี ซึ่งส่วนใหญ่สร้างสารที่มีลักษณะการออกฤทธิ์ดีและครอบคลุม จุลินทรีย์หลายชนิด จำนวน 35 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ใน อาหารที่เตรียมด้วยน้ำทะเล ให้มีความเค็ม 30 ppt (PDA/sw) และเตรียมด้วยน้ำจืด (PDA/dw) นำสารสกัด ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองลักษณะ มาเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7 จะเห็นว่าสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราทั้ง 2 ลักษณะ สามารถ ให้ผลยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์เหมือนหรือแตกต่างกันได้ทั้ง 2 กรณี ขึ้นกับสายพันธุ์รานานำมาศึกษา (ตารางที่ 7 ภาพที่ 12-14) สารสกัดส่วนใหญ่จากรานาน้ำที่เตรียมด้วยน้ำทะเลหรือเตรียมด้วยน้ำจืด ยับยั้ง แบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ได้ใกล้เคียงกัน (สารสกัดที่ให้ผลยับยั้งแตกต่างกันชัดเจนแสดงด้วยตัวหนา ในตารางที่ 7) สารสกัดจากรา SSpb1117 SSpb1122 SSpb1130 ที่เลี้ยงในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำจืด ยับยั้ง ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดี การยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 ที่พบได้กับสารสกัดจากรานาน้ำที่เลี้ยงใน อาหารที่เตรียมด้วยน้ำทะเลเท่านั้น ได้แก่สารสกัด SSpb3124 SSpb4207 SSpb4208 SSpb4309 SSpb4321 และ SSpb4332 สารสกัดจากรา SSpb4309 ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลเท่านั้นที่ออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ได้ ขณะที่สารสกัดจากรา SSpb4107 ที่เตรียมด้วยน้ำจืดเท่านั้นที่ออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ได้

ตารางที่ 7 การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากรานาเกลือที่เลี้ยงในอาหารไม่ผสมน้ำทะเล (PDB/dw) และผสมน้ำทะเล (PDB/sw)

ลำดับ	รายนามเกลือ	ความเค็ม (ppt)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (มิลลิเมตร) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)						
			EC	PA	ST	SA	BC	CA1	CA2
1	SSpb1110	PDB/dw	-	-	-	18.00±0.00	-	-	-
		PDB/sw	-	-	-	8.00±0.00	7.00±0.00	-	-
2	SSpb1117*	PDB/dw	8.00±0.00	-	8.00±0.00	18.00±0.00	17.00±0.00	17.00±0.00	14.00±0.00
		PDB/sw	-	-	-	11.00±0.00	8.00±0.00	13.00±0.00	10.00±0.00
3	SSpb1122*	PDB/dw	-	-	-	20.00±0.00	21.33±0.58	19.00±0.00	13.00±0.00
		PDB/sw	-	-	-	13.00±0.00	12.00±0.00	17.00±0.00	12.00±0.00
4	SSpb1130*	PDB/dw	-	-	-	17.00±0.00	16.00±0.00	19.00±0.00	14.00±1.00
		PDB/sw	-	-	-	12.00±0.00	12.00±0.00	16.00±0.00	11.67±1.53
5	SSpb1209	PDB/dw	-	-	-	-	-	-	-
		PDB/sw	-	-	-	-	-	-	-
6	SSpb1210	PDB/dw	-	-	-	-	7.00±0.00	-	-
		PDB//sw	-	-	-	-	-	-	-
7	SSpb1211	PDB/dw	-	-	-	-	-	-	-
		PDB/sw	-	-	-	-	-	-	-
8	SSpb1212	PDB/dw	-	-	-	-	-	-	-
		PDB/sw	-	-	-	-	-	-	-
9	SSpb1301	PDB/dw	8.00±0.00	8.00±0.00	8.00±0.00	-	7.00±0.00	-	-
		PDB/sw	-	-	-/-7.00	-	7.00±0.00	-	-
10	SSpb1307	PDB/dw	-	-	-	-	-	-	-
		PDB/sw	-	-	-	-	-	-	-
11	SSpb1312	PDB/dw	-	-	-	7.00+0.00	7.00+0.00	-	-
		PDB/sw	-	-	-	-	7.00+0.00	-	-
12	SSpb1314	PDB/dw	-	-	-	-	-	-	-
		PDB/sw	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: *E. coli* ATCC 25922, PA = *P. aeruginosa* ATCC 27853, SA = *S. aureus* ATCC 25923, ST= *S. Typhimurium* ATCC 13311, BC = *B. cereus* TISTR 008, CA1 และ CA2 = *C. albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028, + คือ ยับยั้งได้ - คือ ไม่ยับยั้ง \* คือ ยับยั้งไม่สมบูรณ์

ตารางที่ 7 การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากรานาเกลือที่เลี้ยงในอาหารไม่ผสมน้ำทะเล (PDB/dw) และผสมน้ำทะเล (PDB/sw) (ต่อ)

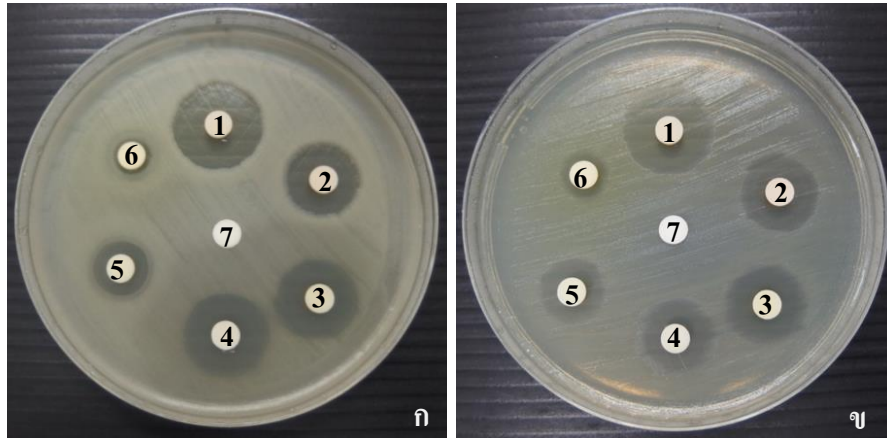
ลำดับ	รายนามเกลือ	ความเค็ม (ppt)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (มิลลิเมตร) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)						
			EC	PA	ST	SA	BC	CA1	CA2
13	SSpb2213	PDB/dw	-	-	-	-	-	-	-
		PDB/sw	-	-	-	-	-	-	-
14	SSpb3124	PDB/dw	-	-	-	20.00+0.00	18.33+0.58	12.33+0.00	-
		PDB/sw	-	-	8.00+0.00	15.00+0.00	19.33+0.58	<b>13.00+0.00</b>	<b>13.00+0.00</b>
15	SSpb3208	PDB/dw	-	-	-	15.00+0.00	18.00+0.00	<b>12.33+0.00</b>	<b>10.33+0.58</b>
		PDB/sw	-	-	-	15.00+0.00	18.00+0.00	<b>10.33+0.58</b>	<b>10.00+0.00</b>
16	SSpb3301	PDB/dw	-	-	-	-	-	-	-
		PDB/sw	-	-	-	-	-	-	-
17	SSpb4107	PDB/dw	-	-	-	<b>22.00+0.00</b>	<b>23.00+0.00</b>	<b>9.00+0.00</b>	<b>8.00<sup>+</sup>+0.00</b>
		PDB/sw	-	-	-	18.00+0.00	21.00+0.00	-	-
18	SSpb4108	PDB/dw	-	-	-	7.67+0.58	7.00+0.00	-	-
		PDB/sw	-	-	-	-	-	-	-
19	SSpb4207	PDB/dw	-	-	-	23.00+0.00	21.00+0.00	8.00 <sup>+</sup> +0.00	-
		PDB/sw	-	-/-9	-	22.00+0.00	21.33+0.58	10.67+0.58	9.33+0.58
20	SSpb4208	PDB/dw	-	-	-	23.00+0.00	21.00+0.00	9.00 <sup>+</sup> +0.00	-
		PDB/sw	-	-/-9	-	22.00+0.00	21.33+0.58	10.00+0.00	8.00+0.00
21	SSpb4215	PDB/dw	-	-	-	20.67+0.58	23.00+0.00	9.00+0.00	-
		PDB/sw	-	-	-	20.33+0.58	24.00+0.00	9.00+0.00	-
22	SSpb4217	PDB/dw	-	-	-	19.00+0.00	20.33+0.58	9.00 <sup>+</sup> +0.00	-
		PDB/sw	-	8.00+0.00	-	22.00+0.00	22.33+0.58	9.00+0.00	-
23	SSpb4225	PDB/dw	-	-	-	15.33+0.58	17.00+0.00	7.00 <sup>+</sup> +0.00	7.00 <sup>+</sup> +0.00
		PDB/sw	-	<b>9.00+0.00</b>	-	<b>21.33+0.58</b>	<b>21.00+0.00</b>	<b>10.33+0.58</b>	<b>9.00+1.00</b>
24	SSpb4307	PDB/dw	-	-	-	<b>21.33+0.58</b>	<b>20.00+0.00</b>	7.00 <sup>+</sup> +0.00	-
		PDB/sw	-	-	8.00+0.00	17.33+0.58	18.33+0.58	8.00+0.00	8.00 <sup>+</sup> +0.00

หมายเหตุ: E. coli ATCC 25922, PA = P. aeruginosa ATCC 27853, SA = S. aureus ATCC 25923, ST= S. Typhimurium ATCC 13311, BC = B. cereus TISTR 008, CA1 และ CA2 = C. albicans ATCC 10231 และ C. albicans ATCC 90028, + คือ ยับยั้งได้ - คือ ไม่ยับยั้ง \* คือ ยับยั้งไม่สมบูรณ์

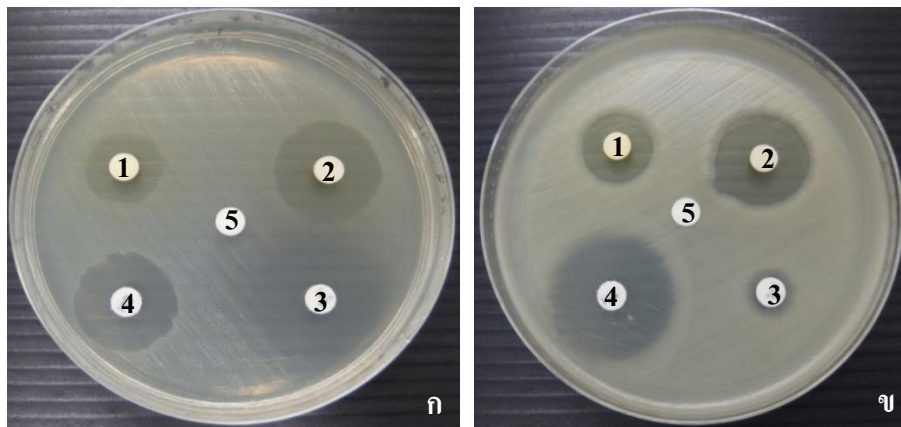
ตารางที่ 7 การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากรานาเกลือที่เลี้ยงในอาหารไม่ผสมน้ำทะเล (PDB/dw) และผสมน้ำทะเล (PDB/sw) (ต่อ)

ลำดับ	รายนามเกลือ	ความเค็ม (ppt)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (มิลลิเมตร) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)						
			EC	PA	ST	SA	BC	CA1	CA2
25	SSpb4308	PDB /dw	-	-	-	21.00+0.00	22.00+0.00	8.00 <sup>+</sup> +0.00	8.00 <sup>+</sup> +0.00
		PDB/sw	-	-	8.00+0.00	18.33+0.57	19.67+0.58	9.00 <sup>+</sup> +0.00	9.00 <sup>+</sup> +0.00
26	SSpb4309	PDB/dw	-	-	-	16.67+0.58	15.00+0.00	-	-
		PDB/sw	-	-	<b>8.00+0.00</b>	<b>18.67+0.58</b>	<b>20.00+0.00</b>	<b>9.67+0.58</b>	<b>9.00<sup>+</sup>+0.00</b>
27	SSpb4313	PDB/dw	-	-	-	22.00+0.00	19.00+0.00	7.00 <sup>+</sup> +0.00	-
		PDB/sw	-	-	-	18.00+0.00	21.00+0.00	9.00 <sup>+</sup> +0.00	9.00 <sup>+</sup> +0.00
28	SSpb4319	PDB/dw	-	8.00+0.00	-	19.00+0.00	20.00+0.00	8.00 <sup>+</sup> +0.00	-
		PDB/sw	-	8.00+0.00	-	19.67+0.58	21.00+0.00	8.67 <sup>+</sup> +1.15	8.33 <sup>+</sup> +0.58
29	SSpb4320	PDB/dw	-	-	-	19.67+0.58	20.00+1.73	7.00 <sup>+</sup> +0.00	-
		PDB/sw	-	-	-	22.67+0.58	17.33+1.15	8.00 <sup>+</sup> +0.00	-
30	SSpb4321	PDB/dw	-	-	-	10.00+0.00	16.00+0.00	9.00 <sup>+</sup> +0.00	-
		PDB/sw	-	<b>10.00+0.00</b>	-	<b>20.00+0.00</b>	<b>23.00+0.00</b>	<b>8.00<sup>+</sup>+0.00</b>	<b>9.67+1.15</b>
31	SSpb4323	PDB	-	-	-	18.00+0.00	16.00+0.00	-	-
		PDB/Sw	-	-	7.67+0.58	18.00+0.00	19.33+0.58	8.00 <sup>+</sup> +0.00	-
32	SSpb4325	PDB	-	-	-	16.00+0.00	18.00+0.00	-	-
		PDB/Sw	-	-	-	17.67+0.58	18.33+0.58	8.00 <sup>+</sup> +0.00	-
33	SSpb4327	PDB	-	-	-	20.33+0.58	19.00+1.00	7.00 <sup>+</sup> +0.00	-
		PDB/Sw	-	-	-	18.33+0.58	20.00+1.00	7.00 <sup>+</sup> +0.00	-
34	SSpb4328	PDB	-	-	-	18.00+0.00	16.67+0.58	-	-
		PDB/Sw	-	-	<b>10.00+0.00</b>	<b>20.00+0.00</b>	<b>20.67+0.58</b>	<b>8.00+0.00</b>	-
35	SSpb4332	PDB	-	8.00+0.00	7.00+0.00	19.33+0.57	20.00+0.00	9.00 <sup>+</sup> +0.00	-
		PDB/Sw	-	-	-	<b>22.33+1.15</b>	<b>21.33+0.58</b>	<b>11.33+0.58</b>	<b>10.00<sup>+</sup>+0.00</b>

หมายเหตุ: E. coli ATCC 25922, PA = P. aeruginosa ATCC 27853, SA = S. aureus ATCC 25923, ST= S. Typhimurium ATCC 13311, BC = B. cereus TISTR 008, CA1 และ CA2 = C. albicans ATCC 10231 และ C. albicans ATCC 90028, + คือ ยับยั้งได้ - คือ ไม่ยับยั้ง \* คือ ยับยั้งไม่สมบูรณ์

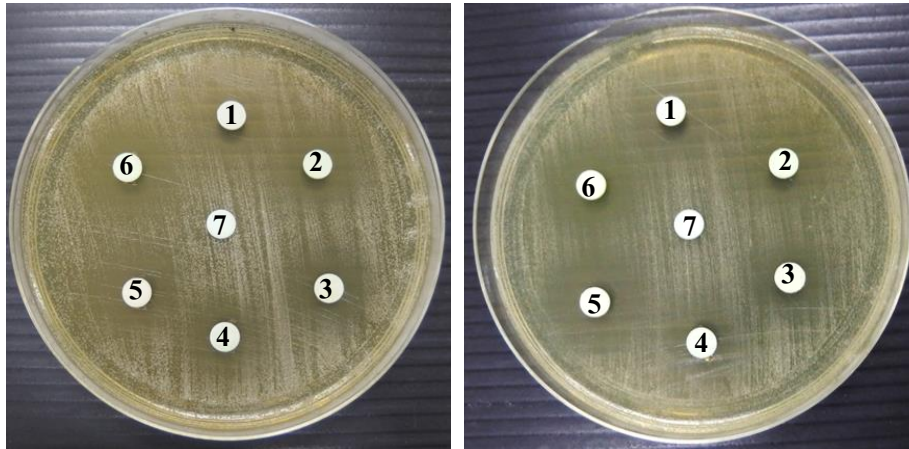


ภาพที่ 12 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 (ก) และ *B. cereus* TISTR 121 (ข) ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรณานาเกลือเตรียมจากน้ำปกติ (PDB/dw) และน้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 ppt (PDB/sw); 1: สารสกัดจาก SSpb4107 (PDB/dw), 2: สารสกัดจาก SSpb4107 (PDB/sw), 3: สารสกัดจาก SSpb3208 (PDB/dw), 4: สารสกัดจาก SSpb3208 (PDB/sw), 5: สารสกัดจาก SSpb1130 (PDB/dw), 6: สารสกัดจาก SSpb1130 (PDB/sw), 7: disk ชุบสารละลาย 50% DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ



ภาพที่ 13 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 (ก) และ *B. cereus* TISTR 121 (ข) ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรณานาเกลือเตรียมจากน้ำปกติ (PDB/dw) และน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt (PDB/sw) ทดสอบโดยวิธี disk diffusion; 1: สารสกัดจาก SSpb4225 (PDB/dw), 2: สารสกัดจาก SSpb4225 (PDB/sw), 3 และ 4: disk ยามาตรฐาน ampicillin 25 ไมโครกรัม และ gentamycin 25 ไมโครกรัม เป็นชุดควบคุมผลบวก, 5: disk สารละลาย 50% DMSO ใช้เป็นชุดควบคุมผลลบ





ภาพที่ 14 ภาพซ้ายยังยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 (ก) และ *C. albicans* ATCC 90028 (ข) ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรณากลือเตรียมจากน้ำปกติ (PDB/dw) และน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt (PDB/sw) ทดสอบโดยวิธี disk diffusion; 1: สารสกัดจาก SSpb1117 (PDB/dw), 2: สารสกัดจาก SSpb1117 (PDB/sw), 3: สารสกัดจาก SSpb3124 (PDB/dw), 4: สารสกัดจาก SSpb3124 (PDB/sw), 5: สารสกัดจาก SSpb1122 (PDB/dw), 6: สารสกัดจาก SSpb1122 (PDB/sw), 7: disk สารละลาย 50% DMSO ใช้เป็นชุดควบคุมผลลบ

#### 4. การศึกษาค่า MIC/MBC ของจุลินทรีย์

##### 4.1 การหาค่า MIC/MBC ของแบคทีเรีย

จากรายงานฉบับสมบูรณ์ปีงบประมาณ 2556 เมื่อนำสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อรารหัส SS 066 SS 069 SS 070 SS 076 SS 078 และ SS 099 มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) และการทำลายแบคทีเรีย (MBC) ด้วยวิธี broth micro dilution พบว่าสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรณ SS 070 SS 078 และ SS 069 / SS 076 มีค่า MIC ต่อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ต่ำสุดเรียงตามลำดับ ค่า MIC ของ SS 070 มีค่าต่ำสุดคือ มี MIC ต่อ *Bacillus cereus* TISTR 008 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 8) ค่า MIC ของ SS 099 ต่อ *B. cereus* TISTR 121 และ *S. aureus* ATCC 25923 มีค่าเท่ากันคือ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดจากอาหารเลี้ยงรณ SS 066 มีค่า MIC ต่อเชื้อทดสอบสูงกว่าสารสกัดที่กล่าวมา 1-4 ระดับ SS 070 และ SS 078 สามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ขณะที่ SS 069 และ SS 076 ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ค่า MIC ของ SS 076 ต่อ *B. cereus* TISTR 121, *S. aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311

เท่ากับ 64, 32, 128 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า MIC ของ SS 069 ต่อ *B. cereus* TISTR 121, *S. aureus* ATCC 25923 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 เท่ากับ 32, 64 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 MIC/MBC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรณานาเกลือจังหวัดจันทบุรีและฉะเชิงเทราต่อแบคทีเรีย

สารสกัด รณานาเกลือ (ที่มา)	MIC/MBC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรณานาเกลือต่อแบคทีเรียทดสอบ ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	BC		SA		EC		PA		ST	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
SS 066 (PDB/sw)	128	256	128	256	-	-	-	-	-	-
SS 069 (PDB/sw)	32	32	64	256	-	-	128*	512*	-	-
SS 070 (PDB/sw)	8	16	16	32	-	-	-	-	-	-
SS 076 (PDB/sw)	64	128	32	128	128*	512*	-	-	128*	512*
SS 078 (PDB/sw)	16	32	32	64	-	-	-	-	-	-
SS 099 (PDB/sw)	64	64	64	128	-	-	-	-	-	-

เชื้อทดสอบ; EC = *E. coli* ATCC 25922, PA = *P. aeruginosa* ATCC 27853, SA = *S. aureus* ATCC 25923, ST = *S. Typhimurium* ATCC 13311, BC = *B. cereus* TISTR 008, CA1 = *C. albicans* ATCC 10231, CA2 = *C. albicans* ATCC 90028, - คือไม่ยับยั้ง; MIC >1024  $\mu\text{g/ml}$ , \* Unstable activity

ในปีงบประมาณนี้ได้นำเชื้อจากจังหวัดเพชรบุรีมาทำการหา MIC ต่อแบคทีเรียทดสอบ โดยเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดที่ได้จากอาหารเตรียมด้วยน้ำกลั่น (PDB/dw) และที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (PDB/sw) ผลแสดงในตาราง 9 จากตาราง SSpb3124 (PDB/sw), SSpb4215 (PDB/sw) และ SSpb4225 (PDB/sw) มีค่า MIC ต่ำสุด ต่อ *B.cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากัน คือ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สารสกัด SSpb4215 (PDB/sw) และ SSpb4225 (PDB/sw) มีค่า MBC ต่อ *B.cereus* TISTR 008 เท่ากับค่า MIC สารสกัด SSpb3124 (PDB/sw) มีค่า MBC ต่อแบคทีเรียแกรมบวกสูงกว่าค่า MIC 1 ระดับ

ตารางที่ 9 MIC/MBC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือจังหวัดเพชรบุรีต่อแบคทีเรีย

สารสกัด รานาเกลือ (ที่มา)	MIC/MBC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือต่อแบคทีเรียทดสอบ ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	BC		SA		EC		PA		ST	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
SSpb1122 (PDB/dw)	512	512	512	1024	1024	-	1024	1024	1024	1024
SSpb1122 (PDB/sw)	256	256	256	512	-	-	-	-	-	-
SSpb3124 (PDB/dw)	128	512	512	1024	-	-	-	-	-	-
<b>SSpb3124 (PDB/sw)</b>	<b>64</b>	<b>128</b>	<b>128</b>	<b>256</b>	-	-	-	-	-	-
SSpb4207 (PDB/dw)	128	128	256	1024	-	-	-	-	-	-
SSpb4207 (PDB/sw)	128	128	256	1024	-	-	-	-	-	-
SSpb4215 (PDB/dw)	256	256	256	1024	-	-	-	-	-	-
<b>SSpb4215 (PDB/sw)</b>	<b>64</b>	<b>64</b>	<b>128</b>	<b>512</b>	1024	-	-	-	-	-
SSpb4217 (PDB/dw)	128	128	256	1024	-	-	-	-	-	-
SSpb4217 (PDB/sw)	128	128	256	1024	-	-	-	-	-	-
SSpb4225 (PDB/dw)	256	512	512	1024	-	-	-	-	-	-
<b>SSpb4225 (PDB/sw)</b>	<b>64</b>	<b>64</b>	<b>128</b>	<b>512</b>	-	-	-	-	-	-
SSpb4332 (PDB/dw)	512	512	512	1024	-	-	-	-	-	-
SSpb4332 (PDB/sw)	128	256	256	1024	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ เชื้อทดสอบ; EC = *E. coli* ATCC 25922, PA = *P. aeruginosa* ATCC 27853, SA = *S. aureus* ATCC 25923, ST = *S. Typhimurium* ATCC 13311, BC = *B. cereus* TISTR 008, CA1 = *C. albicans* ATCC 10231, CA2 = *C. albicans* ATCC 90028, - คือไม่ยับยั้ง; MIC >1024  $\mu\text{g/ml}$ , \* Unstable activity

#### 4.2 การทดสอบหาค่า MIC/MFC ของยีสต์ก่อโรค

เมื่อหาค่า MIC ต่อยีสต์ *Candida* ทั้งสองสายพันธุ์ ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาที่เตรียมด้วยน้ำทะเล พบว่า MIC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานา SS 070 SS 078 SSpb4215 และ SSpb4225 ต่อยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ เท่ากับ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน ขณะที่สารสกัดรา SS 069 และ SSpb4207 มีค่า MIC ต่อยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 เท่ากับ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 10) และพบว่าค่า MFC ของสารสกัดส่วนใหญ่มีค่าเท่ากับ MIC หรือสูงกว่าค่า MIC อยู่ 1 ระดับ

ตารางที่ 10 MIC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือจังหวัดจันทบุรี ฉะเชิงเทรา และเพชรบุรี ต่อยีสต์

สารสกัด รานาเกลือ (ที่มา)	MIC/MLC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือต่อยีสต์ทดสอบ ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. albicans</i> ATCC 90028	
	MIC	MFC	MIC	MFC
SS 066 (PDB/sw)	1024	>1024	>1024	>1024
SS 069 (PDB/sw)	512	1024	1024	1024
<b>SS 070 (PDB/sw)</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>
SS 076 (PDB/sw)	1024	1024	1024	1024
<b>SS 078 (PDB/sw)</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>1024</b>
SSpb1122 (PDB/sw)	1024	1024	>1024	>1024
SSpb3124 (PDB/sw)	>1024	>1024	>1024	>1024
SSpb4207 (PDB/sw)	512	1024	1024	>1024
<b>SSpb4215 (PDB/sw)</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>
SSpb4217 (PDB/sw)	1024	1024	1024	1024
<b>SSpb4225 (PDB/sw)</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>1024</b>
SSpb4332 (PDB/sw)	>1024	>1024	>1024	>1024

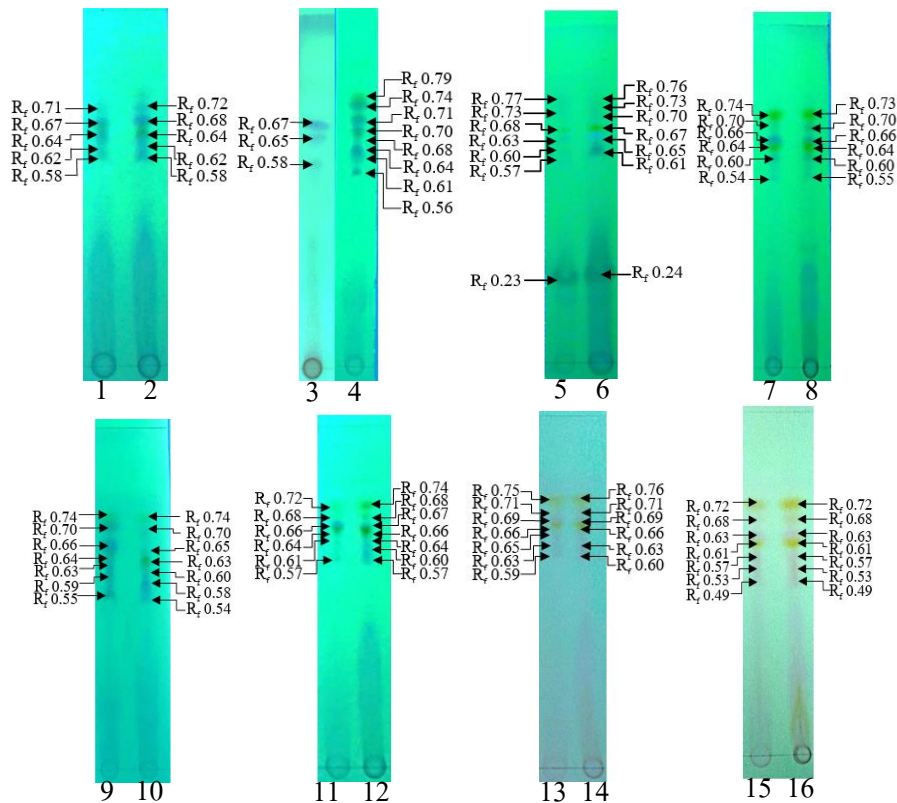
##### 5. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากราด้วยวิธี Thin layer chromatography

สารสกัดที่คัดเลือกมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากราด้วยวิธี thin layer chromatography เป็นสารสกัดจากอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (PDB/dw) และเตรียมจากน้ำทะเล (PDB/sw) ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีหรือออกฤทธิ์กว้าง จำนวน 16 สาร ในแต่ละสารสกัดพบจำนวนสารองค์ประกอบแตกต่างกันระหว่าง 3-8 สาร เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารองค์ประกอบในสารสกัดจากอาหาร PDB/dw และ PDB/sw ส่วนใหญ่สารที่แยกได้มีค่า  $R_f$  ใกล้เคียงกัน แต่จำนวนสารที่แยกได้ไม่เท่ากัน กรณีค่า  $R_f$  ของสารที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกันมาก ( $\pm 0.01$ ) มีความเป็นไปได้ว่าอาจเป็นสารเดียวกัน แต่ในบางครั้งก็เป็นไปได้ว่าอาจเป็นสารคนละชนิด เนื่องจากสีและความเข้มของสารต่างกัน (ตารางที่ 11 และ ภาพที่ 15)

ตารางที่ 11 องค์ประกอบของสารสกัด

สารสกัด/ รามาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	จำนวน สารองค์ประกอบ	ค่า $R_f$ *
SS 069	PDB/dw	5	0.58, 0.62, 0.64, 0.67, 0.71
	PDB/sw	5	0.58, 0.62, 0.64, 0.68, 0.72
SSpb1122	PDB/dw	3	0.58, 0.60, 0.67
	PDB/sw	8	0.56, 0.61, 0.64, 0.68, 0.70, 0.71, 0.74, 0.79
SSpb3124	PDB/dw	7	0.23, 0.57, 0.60, 0.63, 0.68, 0.73, 0.77
	PDB/sw	7	0.24, 0.61, 0.65, 0.67, 0.70, 0.73, 0.76
SSpb4207	PDB/dw	6	0.54, 0.60, 0.64, 0.66, 0.70, 0.74
	PDB/sw	6	0.55, 0.60, 0.64, 0.66, 0.70, 0.73
SSpb4215	PDB/dw	7	0.55, 0.59, 0.63, 0.64, 0.66, 0.70, 0.74
	PDB/sw	7	0.54, 0.58, 0.60, 0.63, 0.65, 0.70, 0.74
SSpb4217	PDB/dw	6	0.57, 0.61, 0.64, 0.66, 0.68, 0.72
	PDB/sw	6	0.57, 0.60, 0.64, 0.66, 0.68, 0.74
SSpb4225	PDB/dw	7	0.60, 0.63, 0.65, 0.66, 0.69, 0.71, 0.75
	PDB/sw	6	0.60, 0.63, 0.66, 0.69, 0.71, 0.76
SSpb4332	PDB/dw	7	0.49, 0.53, 0.57, 0.61, 0.63, 0.68, 0.72
	PDB/sw	7	0.49, 0.53, 0.57, 0.61, 0.63, 0.68, 0.72

\*แยกด้วยระบบตัวทำละลาย toluene: methanol: acetone, 6:1:3 v/v



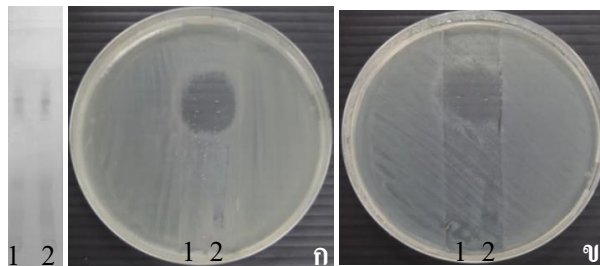
ภาพที่ 15 จำนวนองค์ประกอบทางเคมีและค่า  $R_f$  ของสารองค์ประกอบในสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือเมื่อแยกโดยวิธี TLC; 1: SS 069 (PDB/dw), 2: SS 069 (PDB/sw), 3: SSpb1122 (PDB/dw), 4: SSpb1122 (PDB/sw), 5: SSpb3124 (PDB/dw), 6: SSpb3124 (PDB/sw), 7: SSpb4207 (PDB/dw), 8: SSpb4207 (PDB/sw), 9: SSpb4215 (PDB/dw), 10: SSpb4215 (PDB/sw), 11: SSpb4217 (PDB/dw), 12: SSpb4217 (PDB/sw), 13: SSpb4225 (PDB/dw), 14: SSpb4225 (PDB/sw), 15: SSpb4332 (PDB/dw), 16: SSpb4332 (PDB/sw)

#### 6. การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือโดยวิธี Bioautography

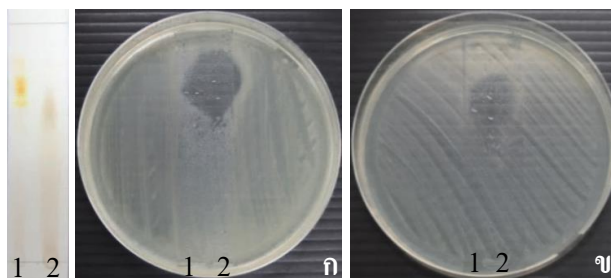
นำสารสกัดจากอาหาร PDB ที่ไม่มีความเค็ม (PDB/dw) และมีความเค็ม 30 ppt (PDB/sw) จากรานาเกลือ SS 069 SSpb1122 SSpb4217 SSpb4225 และ SSpb4332 รวมจำนวน 10 สาร ที่ผ่านการแยกองค์ประกอบด้วยวิธี TLC จนได้สารองค์ประกอบที่มีค่า  $R_f$  ต่างๆ กัน มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 25923 ยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028 โดยวางแผ่น TLC ที่ผ่านการแยกสารองค์ประกอบลงบนอาหารโดยตรง พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ทดสอบเห็นบริเวณยับยั้งเป็นโซนใส

รอบบริเวณที่มีสารองค์ประกอบ (ภาพที่ 16-20) และเมื่อตัดแผ่น TLC บริเวณสารองค์ประกอบของสารสกัดมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย พบสารองค์ประกอบมีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 25923 เห็นบริเวณยับยั้งเป็น โชนใส ขณะที่ไม่พบสารองค์ประกอบมีประสิทธิภาพยับยั้งยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ (ตารางที่ 12)

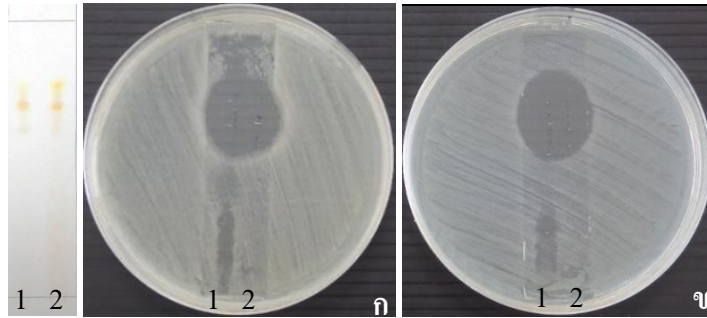
จากตารางที่ 12 สารองค์ประกอบจากสารสกัดจากอาหาร PDB/dw และ PDB/sw สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้แตกต่างกัน (1+ ถึง 3+) สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.66 กับ 0.69 จากสารสกัดอาหาร PDB/sw เลียงรา SSpb4225 ให้ผลยับยั้งดี (3+) กับทั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 25923 สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.62 กับ 0.64 จากสารสกัดอาหารทั้ง PDB/dw และ PDB/sw เลียงรา SS 069 ให้ผลยับยั้งดี (3+) กับ *B. cereus* TISTR 008 สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.70 กับ 0.71 จากสารสกัดอาหาร PDB/sw เลียงรา SSpb1122 และ สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.61 กับ 0.63 จากสารสกัดอาหาร PDB/sw เลียงรา SSpb4332 ให้ผลยับยั้งดี (3+) กับ *B. cereus* TISTR 008 เพียงเชื้อเดียว (ภาพที่ 21-23)



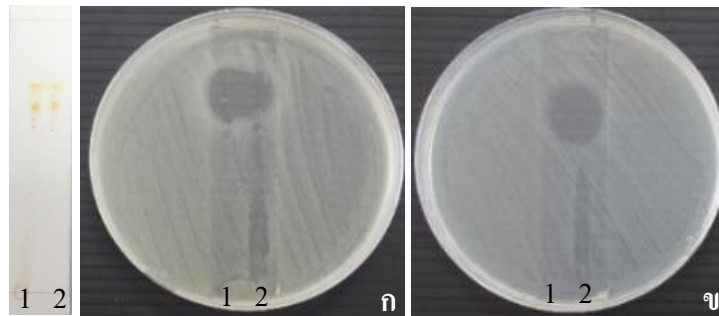
ภาพที่ 16 ความสามารถของสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC ของสารสกัดจากรานาเกลื้อส SS 069 เลี้ยงด้วยอาหาร PDB/dw (1) และ PDB/sw (2) ในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 (ก) และ *S. aureus* ATCC 25923 (ข)



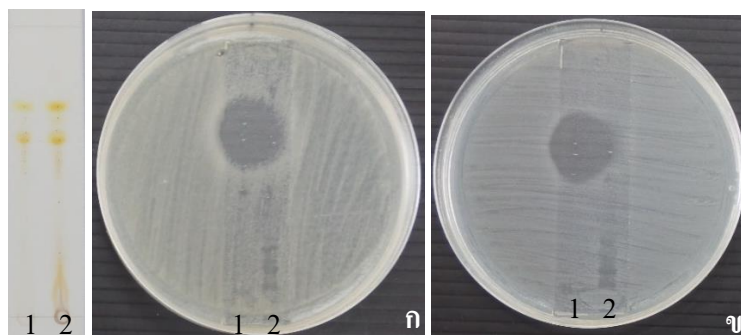
ภาพที่ 17 ความสามารถของสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC ของสารสกัดจากรานาเกลื้อส SSpb1122 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB/dw (1) และ PDB/sw (2) ในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 (ก) และ *S. aureus* ATCC 25923 (ข)



ภาพที่ 18 ความสามารถของสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC ของสารสกัดจากรานาเกลื้อ SSpb4217 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB/dw (1) และ PDB/sw (2) ในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 (ก) และ *S. aureus* ATCC 25923 (ข)



ภาพที่ 19 ความสามารถของสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC ของสารสกัดจากรานาเกลื้อ SSpb4225 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB/dw (1) และ PDB/sw (2) ในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 (ก) และ *S. aureus* ATCC 25923 (ข)



ภาพที่ 20 ความสามารถของสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC ของสารสกัดจากรานาเกลื้อ SSpb4332 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB/dw (1) และ PDB/sw (2) ในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 (ก) และ *S. aureus* ATCC 25923 (ข)



ตารางที่ 12 การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานาเกลือ โดยวิธี Bioautography

สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของ สารสกัด	R <sub>r</sub> *	ระดับความสามารถในการยับยั้ง			
			<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
			TISTR 008	ATCC 25923	ATCC 10231	ATCC 90028
SS 069	PDB/dw	0.62 ถึง 0.64	3+	1+	-	-
		0.67	2+	1+	-	-
		0.71	1+	-	-	-
	PDB/sw	0.58	1+	-	-	-
		0.62 ถึง 0.64	3+	1+	-	-
		0.68	1+	1+	-	-
SSpb1122	PDB/dw	0.58	1+	-	-	-
		0.60	1+	-	-	-
		0.67	2+	1+	-	-
	PDB/sw	0.61	1+	-	-	-
		0.64	1+	-	-	-
		0.68	2+	+1	-	-
		0.70 ถึง 0.71	3+	+1	-	-
		0.74	1+	-	-	-
0.79	1+	-	-	-		
SSpb4217	PDB/dw	0.64 ถึง 0.66	1+	1+	-	-
		0.68	1+	1+	-	-
		0.72	1+	1+	-	-
	PDB/sw	0.64 ถึง 0.66	1+	1+	-	-
		0.68	1+	1+	-	-
		0.74	-	1+	-	-

\* แยกด้วยระบบตัวทำละลาย toluene: methanol: acetone, 6:1:3 v/v

\*\* ระดับการยับยั้ง 3+ หมายถึง ยับยั้งดี 2+ หมายถึง ยับยั้งปานกลาง 1+ หมายถึง ยับยั้งเล็กน้อย

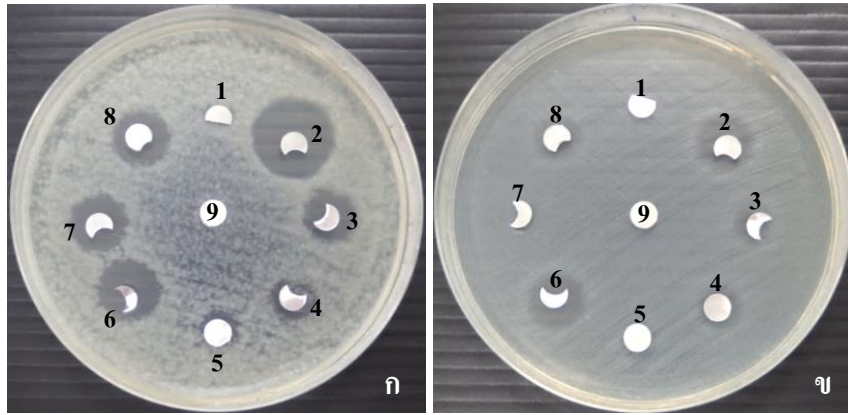
- หมายถึง ไม่ยับยั้ง

ตารางที่ 12 การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยสารองค์ประกอบของสารสกัดจากรานากะลิ้อ โดยวิธี Bioautography (ต่อ)

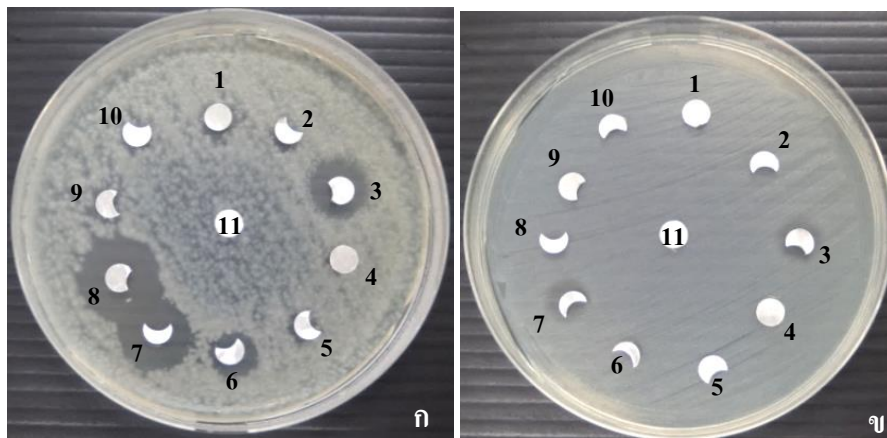
สารสกัด/ รานากะลิ้อ	แหล่งที่มา ของ สารสกัด	$R_f$ *	ระดับความสามารถในการยับยั้ง			
			<i>B. cereus</i> TISTR 008	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. albicans</i> ATCC 90028
SSpb4225	PDB/dw	0.66 ถึง 0.69	2+	2+	-	-
		0.71	1+	1+	-	-
		0.75	1+	1+	-	-
	<b>0.66 ถึง 0.69</b>		<b>3+</b>	<b>3+</b>	-	-
	PDB/sw	0.71	1+	1+	-	-
		0.76	1+	1+	-	-
SSpb4332	PDB/dw	0.57	1+	-	-	-
		0.61 ถึง 0.63	2+	2+	-	-
		0.68	1+	1+	-	-
		0.72	1+	1+	-	-
	PDB/sw	0.57	1+	-	-	-
		0.61 ถึง 0.63	1+	2+	-	-
<b>0.68</b>		<b>3+</b>	<b>2+</b>	-	-	

\* แยกด้วยระบบตัวทำละลาย toluene: methanol: acetone, 6:1:3 v/v

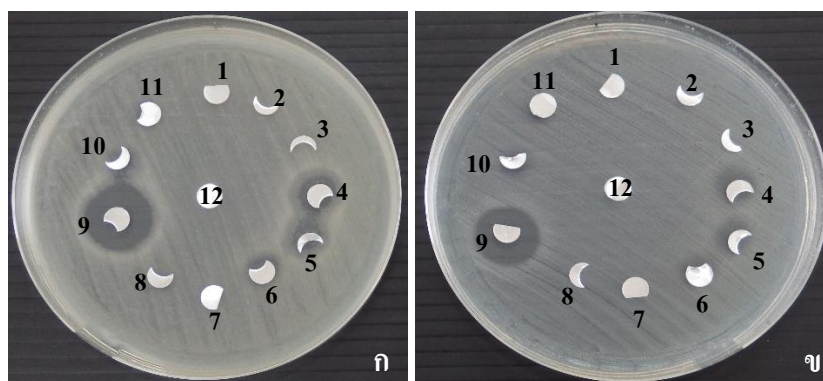
\*\* ระดับการยับยั้ง 3+ หมายถึง ยับยั้งดี 2+ หมายถึง ยับยั้งปานกลาง 1+ หมายถึง ยับยั้งเล็กน้อย  
- หมายถึง ไม่ยับยั้ง



ภาพที่ 21 ความสามารถของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือ ในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 (ก) และ *S. aureus* ATCC 25923 (ข) บนอาหาร MHA ของสารสกัด SS 069 ที่เตรียมจาก PDB/dw (1-4) และ PDB/sw (5-8); 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, 5: 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: ดิสก์ควบคุมผลลบ สารละลาย 50% DMSO



ภาพที่ 22 ความสามารถของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือ ในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 (ก) และ *S. aureus* ATCC 25923 (ข) บนอาหาร MHA ของสารสกัด SSpb1122 ที่เตรียมจาก PDB/dw (1-3) และ PDB/sw (4-10); 1: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.58, 2: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.60, 3: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.67, 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: ดิสก์ควบคุมผลลบ สารละลาย 50% DMSO



ภาพที่ 23 ความสามารถของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงรานาเกลือ ในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 008 (ก) และ *S. aureus* ATCC 25923 (ข) บนอาหาร MHA ของสารสกัด SSpb4225 ที่เตรียมจาก PDB/dw (1-3) และ PDB/sw (4-10); 1: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.60, 2: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.63, 3: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.65, 4: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.66 กับ 0.69, 5: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.71, 6: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.75, 7: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.60, 8: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.63, 9: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.66 กับ 0.69, 10: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.71, 11: สารองค์ประกอบ  $R_f$  0.76, 12: ดิสก์ควบคุมผลลบ สารละลาย 50% DMSO

ตารางที่ 13 จำนวนสารองค์ประกอบในสารสกัดจากรานาเกลือสายพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์

สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่ง สารสกัด	จำนวนสาร องค์ประกอบ ที่แยกได้	จำนวนสารองค์ประกอบที่ยับยั้งจุลินทรีย์			
			<i>B. cereus</i> TISTR 008	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. albicans</i> ATCC 90028
SS 069	PDB/dw	5	4	3	0	0
	PDB/sw	5	4	3	0	0
SSpb1122	PDB/dw	3	3	1	0	0
	PDB/sw	8	7	3	0	0
SSpb4217	PDB/dw	6	4	4	0	0
	PDB/sw	6	3	4	0	0
SSpb4225	PDB/dw	7	4	4	0	0
	PDB/sw	6	4	4	0	0
SSpb4332	PDB/dw	7	5	4	0	0
	PDB/sw	7	4	3	0	0

ข้อมูลในตารางที่ 13 เปรียบเทียบจำนวนสารองค์ประกอบที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ พบว่า สารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราทั้ง 5 ชนิด ส่วนใหญ่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ใน ขณะที่ไม่พบการยับยั้งยีสต์ จำนวนสารองค์ประกอบในสารสกัดสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้แตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และความเค็มของอาหารเลี้ยงราที่นำมาสกัด สารองค์ประกอบจากราสายพันธุ์ เดียวกันที่สกัดมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำทะเลให้ผลดีกว่าน้ำกลั่น

## 7. การจัดจำแนกราที่ใช้ในการศึกษาเบื้องต้น

ตารางที่ 14 สรุปการจัดจำแนกรากที่ศึกษาทางสัณฐานวิทยาทั้งราจากการศึกษาที่ผ่านมาใน ปีงบประมาณ 2556 จำนวน 72 สายพันธุ์ และที่ทำการศึกษาเพิ่มเติมในปีงบประมาณ 2557 จำนวน 55 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 127 สายพันธุ์ พบว่าราที่จัดจำแนกได้น้อยระดับจีโนม มีทั้งหมด 12 จินัส ทั้งหมดเป็นราในกลุ่มอะนามอร์ฟ ซึ่งพบเฉพาะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ รา 20 สายพันธุ์ ไม่สามารถ จำแนกทางสัณฐานวิทยาเนื่องจากไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ ส่วนอีก 4 สายพันธุ์ไม่สามารถระบุจีโนม ได้ในขณะนี้ (Unidentified 1-3) คาดว่าอาจเป็นราชนิดใหม่

ราที่ให้ผลการยับยั้งที่ระดับหนึ่ง หรือมีคุณสมบัติที่น่าสนใจ ได้มีการศึกษารายละเอียดลักษณะ ทางสัณฐานวิทยา รวมถึงการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนไว้ดังนี้

ตารางที่ 14 การจัดจำแนกรากทางสัณฐานวิทยาและลักษณะ โคลินิของราที่ศึกษา 127 สายพันธุ์

กลุ่ม/สกุล	จำนวน	สายพันธุ์รา
<i>Acremonium</i> sp.	2	SS 043, SS 066
<i>Alternaria alternata</i>	3	SS 001, SS 052, SS 104
<i>Aspergillus candidus</i>	2	SS 002, SS 003
<i>Aspergillus flavus</i>	3	SS 035, SS 068, SS 071
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10	SS 024, SS 030, SS 048, SS 073, SS 076, SS 079, SS 082, SS 090, SS 097
<i>Aspergillus niger</i>	1	SS 105
<i>Aspergillus</i> spp.	11	SS 039, SS 060, SS 061, SS 069, SSpb1307, SSpb1310, SSpb1311, SSpb3124, SSpb3208, SSpb3301, SSpb4107

ตารางที่ 14 การจัดจำแนกรากทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนีของราที่ศึกษา 127 สายพันธุ์ (ต่อ)

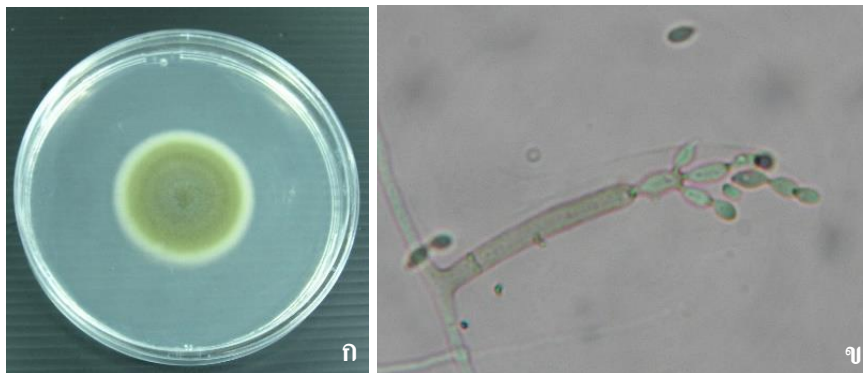
กลุ่ม/สกุล	จำนวน	สายพันธุ์รา
<i>Aspergillus</i> sp.1	5	SSpb1117, SSpb1122, SSpb1130, SSpb4307, SSpb4320
<i>Aspergillus</i> sp.2	10	SSpb1301, SSpb1315, SSpb4207, SSpb4208, SSpb4313, SSpb4319, SSpb4321, SSpb4325, SSpb4327, SSpb4328
<i>Aspergillus</i> sp.3	2	SSpb1306, SSpb1308
<i>Aspergillus</i> sp.4	3	SSpb4215, SSpb4309, SSpb4329
<i>Aspergillus</i> sp.5	5	SSpb4217, SSpb4225, SSpb4226, SSpb4323, SSpb4332
<i>Bipolaris</i> sp.	5	SS 031, SS 047, SS 088, SS 089, SSpb1212
<i>Botrytis</i> sp.	1	SSpb4234
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	8	SS 010, SS 027, SS 032, SS 033, SS 038, SS 041, SS 049, SS 051
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	SS 037, SS 045
<i>Colletotrichum</i> sp.	2	SS 062, SS 065
<i>Curvuralia lunata</i>	3	SS 006, SS 007, SS 059, SS112
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	SS 014, SS 018
<i>Fusarium</i> sp.	4	SS 017, SS 022, SS 026, SS 034
<i>Nigrospora sphaerica</i>	1	SS 055
<i>Penicillium</i> spp.	9	SS 042, SS 044, SS 056, SS 109, SSpb4108, SSpb4301, SSpb4304, SSpb4312, SSpb4316
<i>Pithomyces</i> sp.	4	SS 005, SS 011, SS 012, SS 013
Unidentified 1	2	SSpb1302, SSpb1303
Unidentified 2	1	SSpb1314
Unidentified 3	1	SSpb2213

**ตารางที่ 14** การจัดจำแนกรากทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนีของราที่ศึกษา 127 สายพันธุ์ (ต่อ)

กลุ่ม/สกุล	จำนวน	สายพันธุ์รา
Unidentified mycelia sterilia	20	SS 004, SS 008, SS 009, SS 015, SS 019, SS 023, SS 028, SS 029, SS 040, SS 050, SS 053, SS 054, SS 057, SS 058, SS 063, SS 064, SS 067, SS 070, SS 072, SS 078, SS 099, SSpb1110 SSpb1209, SSpb1211 SSpb1309

**การจัดจำแนกราก SS 033**

การจัดจำแนกราก SS 033 โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนีเมื่อเลี้ยงรบนอาหาร potato dextrose agar ความเค็ม 30 ppt (PDA/sw) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส พบโคโลนี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 เซนติเมตร ผิวหน้าโคโลนีสีเขียวอมเทา เส้นใยละเอียดแน่น ด้านหลังสีดำ conidiophore ยาว แตกกิ่ง ผิวเรียบ conidia สีเขียว รูปทรงกลมรี ไม่มีผนังกั้น ขนาด 3.0-4.0  $\mu\text{m}$  มีรอย scar บริเวณปลายเซลล์ conidia ต่อกันเป็นสาย (ภาพที่ 24) ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 15



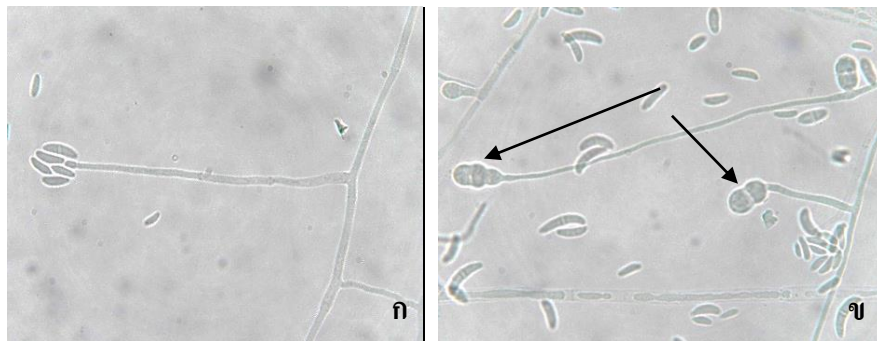
**ภาพที่ 24** ลักษณะของรา SS 033 บนอาหาร PDA/sw; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีอายุ 7 วัน ข: ลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 033 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
GQ153092.1	Dothideomycetes sp. 11109	100	99
GQ153083.1	Dothideomycetes sp. 11089	100	99
GQ153060.1	Dothideomycetes sp. 11048	100	99
KP701937.1	<i>Cladosporium tenuissimum</i> DTO 130-F6	100	99
KX349488.1	<i>Cladosporium tenuissimum</i> Fck-3-45	100	99

#### การจัดจำแนกรา SS 034

การจัดจำแนกราส SS 034 โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนีเมื่อเลี้ยงราบนอาหาร potato dextrose agar ความเค็ม 30 ppt (PDA/sw) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส พบโคโลนี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.0 เซนติเมตร โคโลนีสีขาว-สีส้ม ผิวหน้าฟู เส้นใยมีผนังกั้น conidia รูปยาวคล้ายกล้วยหอม หรือรูปยาวคล้ายเสี้ยวพระจันทร์ มีหลายเซลล์ พบคลามีโดสปอร์อยู่ทั่วไป (ภาพที่ 25) การวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 16



ภาพที่ 25 ลักษณะของรา SS 034 บนอาหาร PDA/sw ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์ light microscope; ก: ลักษณะโคโคนิเดียและโคโคนิดีโอฟอร์, ข: ลักษณะคลามีโดสปอร์ (ลูกศรชี้)

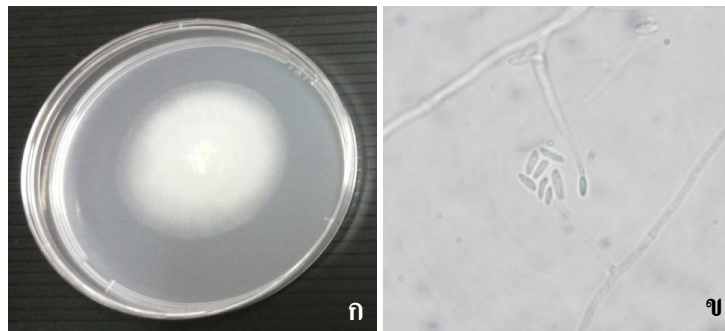


ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 034 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
HQ671187.1	<i>Fusarium chlamydosporum</i> strain YS-110	100	100
FJ426391.1	<i>Fusarium chlamydosporum</i> strain DB-L39	100	100
KJ584541.1	<i>Fusarium chlamydosporum</i> strain Sz5_2H	99	100
JX867234.1	<i>Fusarium chlamydosporum</i> strain JI-T3	99	100
JN986774.1	<i>Fusarium chlamydosporum</i> strain DHMJ22	99	100

#### การจัดจำแนกรรา SS 066

การจัดจำแนกรราหีส SS 066 โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะ โคลโคนีเมื่อเลี้ยงรบนอาหาร potato dextrose agar ความเค็ม 30 ppt (PDA/sw) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส พบโคลโคนีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร โคลโคนีขาวบางค่อนข้างเรียบติดผิวอาหาร เมื่อแก่ผิวโคลโคนีเป็นผงสีครีมถึงน้ำตาลอมเหลือง ขอบด้านหลังโคลโคนีสีน้ำตาลอมเหลือง เส้นใยเป็นแบบมีผนังกันใส ไม่มีสี สร้าง conidia รูปรียาวขนาดประมาณ 1 x 2-3 ไมโครเมตร เกิดเป็นกลุ่มเกาะกันบนปลายโคนดิโอฟอร์ที่เรียงตรง ไม่แตกแขนง (ภาพที่ 26) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 17



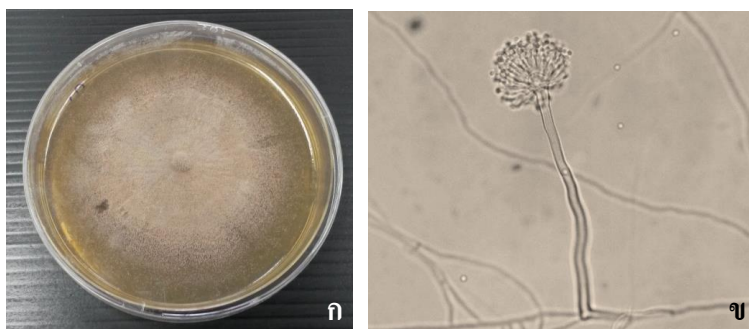
ภาพที่ 26 ลักษณะของรา SS 066 บนอาหาร PDA/sw; ก: ลักษณะโคลโคนีอายุ 7 วัน บนอาหาร, ข: ลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์ของรา SS 066 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope

ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 066 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
JN851014.1	Hypocreales sp. SCSGAF0072	100	99
JF819173.1	Hypocreales sp. TA26-59	97	99
KC506358.1	Fungal sp. AM2013 strain 212*_Jp	96	98
KC506355.1	Fungal sp. AM2013 strain 207_Jmp	98	98
HQ596914.1	Hypocreales sp. SE511	96	98
HQ596921.1	Hypocreales sp. S68	95	98

#### การจัดจำแนกรรา SS 069

การจัดจำแนกรราหีส SS 069 โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนี เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDA/sw เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส พบโคโลนีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนี เป็นผงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีไม่เรียบ ด้านหลังโคโลนีสีน้ำตาลอมเหลือง หักเป็นร่อง ลักษณะเส้นใย เป็นแบบมีผนังกันใสไม่มีสี สร้าง conidia รูปกลม ขนาด 2.5 ไมโครเมตร sterigma บนหัว vesicle เป็นแบบ biseriate คลุมรอบ vesicle พบ foot cell ที่ฐานโคนิดิโอฟอร์เรียบตรง ไม่มีสี เมื่อทำการจัดจำแนกเบื้องต้นพบว่าเป็น *Aspergillus* sp. (ภาพที่ 27) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ด้วยโปรแกรม BLASTn (ไม่ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS) เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าข้อมูลแสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (99%) กับ *Aspergillus niger* (รายงานไว้ในรายงานปีงบประมาณ 2556) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณา ลักษณะโคโลนีและสัณฐานของราสายพันธุ์นี้พบว่ามีลักษณะโดยทั่วไปแตกต่างไปจาก *A. niger* ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงระบุแทกซอนของรา SS 069 เป็น *Aspergillus* sp. SS 069 โดยที่ราสายพันธุ์นี้อาจเป็นสปีชีส์ใหม่



ภาพที่ 27 ลักษณะของรา SS 069 บนอาหาร PDA/sw; ก: ลักษณะโคโลนีอายุ 14 วัน บนอาหาร ข: ลักษณะ foot cell และ โครงสร้างสืบพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope

#### การจัดจำแนกรา SS 070 และ SS 099

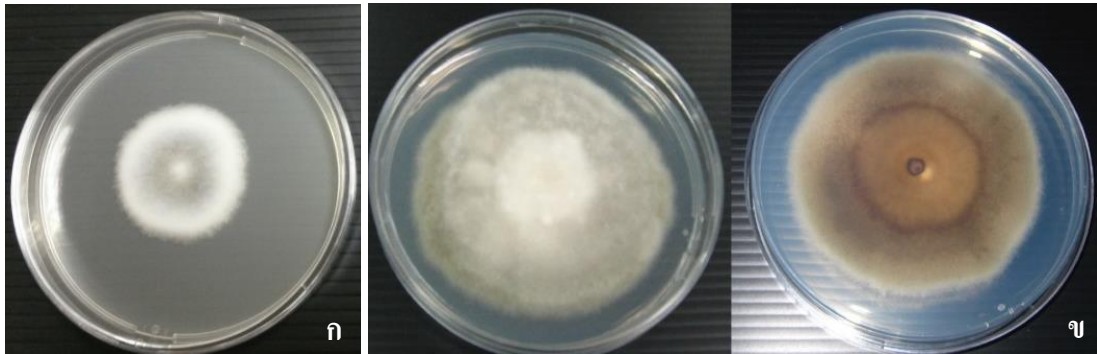
ลักษณะโคโลนีของราทั้ง 2 สายพันธุ์คล้ายคลึงกันมาก

ลักษณะโคโลนีรารหัส SS 070 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/sw เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส พบโคโลนีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีขาวเป็นปุย ขอบฟูเล็กน้อย ด้านหลังโคโลนีสีเทาดำ ขอบโคโลนีขาวโคโลนี เมื่อแก่โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเทา ด้านหลังโคโลนีสีน้ำตาลอมเหลือง ไม่สร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ

ลักษณะโคโลนีรารหัส SS 099 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/sw เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 4.8 เซนติเมตร มีลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับรา SS 070 สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นราชนิดเดียวกัน (ภาพที่ 28) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล แสดงในตารางที่ 18

#### การจัดจำแนกรา SS 076

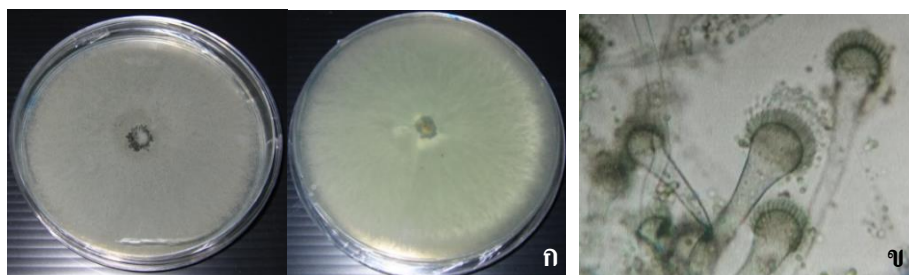
ลักษณะโคโลนีรารหัส SS076 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/sw เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส พบโคโลนีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนี เป็นผงเขียวอมดำ ด้านหลังโคโลนีสีน้ำตาลอ่อน สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ สปอร์รูปกลม ไม่มีสี เกิดบน sterigma ด้านบนหัว vesicle ขนาดใหญ่ประมาณ 2/3 ของหัว sterigma เป็นแบบ uniseriate (ภาพที่ 29) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 19



ภาพที่ 28 ลักษณะโคโลนีของรา SS 070 บนอาหาร PDA/sw; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีอายุ 6 วัน, ข: ลักษณะด้านหน้าและด้านหลังโคโลนีอายุ 14 วัน

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 070 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover	MAX identity
		(%)	(%)
HM195267.1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> isolate Delhi	100	98
KC005707.1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> isolate NLF07	99	98
GQ870276.1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> isolate SH01	99	98
HM195266.1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> strain 6028	100	98
KC315946.1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> strain BM	97	98
AB179836.1	<i>Bipolaris sacchari</i>	97	97
KP211436.1	<i>Bipolaris maydis</i> isolate T28	97	97
KJ830829.1	<i>Bipolaris sacchari</i> strain NRRL 5241	96	97



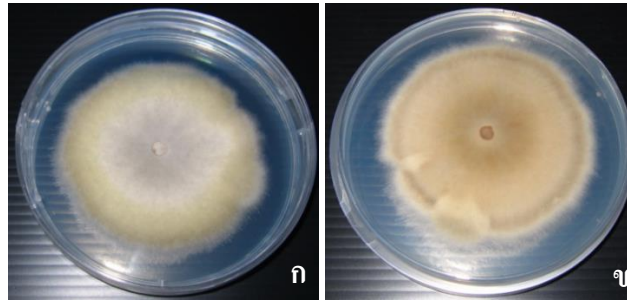
ภาพที่ 29 ลักษณะโคโลนีของรา SS 076 บนอาหาร PDA/sw; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีอายุ 14 วัน, ข: ลักษณะด้านหลังและด้านหน้าโคโลนีอายุ 14 วันลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์ของรา SS 076 ภายใต้อุปกรณ์กล้องจุลทรรศน์ light microscope

ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 076 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
JQ388268.1	<i>Aspergillus</i> sp. DoF23	97	100
EU823312.1	Fungal endophyte sp. IJL02	97	99
KX349472.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> isolate F3-3-27	97	99
JQ082499.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> isolate TBG3-3	96	100
JF815071.1	<i>Aspergillus</i> sp. TMS-2011	96	99
JF815069.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> isolate LF5	96	99
GU244530.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> isolate 15-F	96	99

#### การจัดจำแนกรา SS 078

ลักษณะโคโลนีราหีส SS 078 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/sw เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส พบโคโลนีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนี เทาอมเขียว ก่อนข้างฟู ด้านหลังโคโลนีน้ำตาลอมเหลือง สร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (ภาพที่ 30) การวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 20



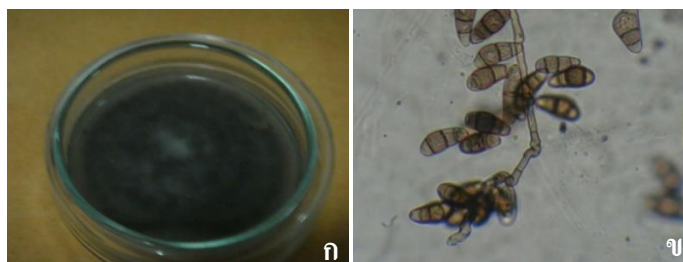
ภาพที่ 30 ลักษณะโคโลนีของรา SS 078 บนอาหาร PDA/sw; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีอายุ 7 วัน;  
ข: ลักษณะด้านหลังโคโลนีอายุ 7 วัน

ตารางที่ 20 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 078 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover	MAX identity
		(%)	(%)
KC315946.1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> strain BM	100	97
HM195267.1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> isolate Delhi	100	97
HM195266.1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> strain 6028	100	97
KC005707.1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> isolate NLF07	100	97
GQ870276.1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> isolate SH01	100	97
AB179836.1	<i>Bipolaris sacchari</i>	100	97
KF922875.1	<i>Bipolaris maydis</i> isolate F49	99	97

### การจัดจำแนกรา SS 112

ลักษณะโคโลนีราหีส SS 112 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/sw เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส โคโลนีเจริญเร็ว พบโคโลนีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.0 เซนติเมตร ผิวหน้าโคโลนีสีเทาดำ พู ผิวหน้าคล้ายสำลี ด้านหลังสีดำ conidiophore เกิดเดี่ยวๆ สีน้ำตาล ขนาด 80-90  $\mu\text{m}$  ปลายและด้านข้างเป็นที่เกิดของ conidia ที่มีขนาด 4-6 X 16-18  $\mu\text{m}$  ผิวเรียบ เซลล์เป็นทรงรี มี 4 เซลล์ เซลล์กลางมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่นๆ เล็กน้อย (ภาพที่ 31) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 21



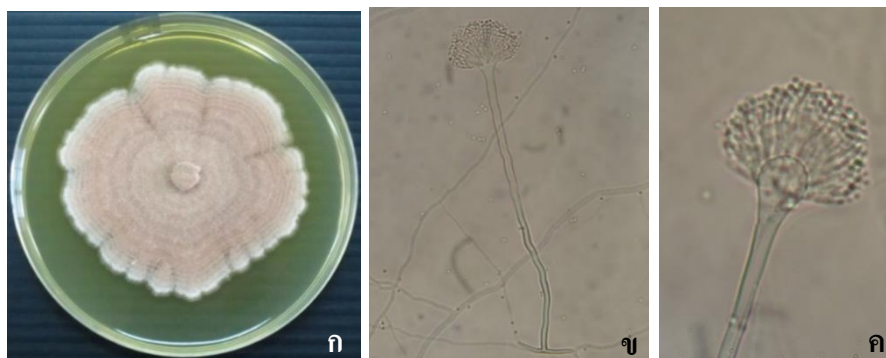
ภาพที่ 31 ลักษณะของรา SS 112 บนอาหาร PDA/sw; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีอายุ 7 วัน; ข : ลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์ของรกายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope

ตารางที่ 21 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของรา SS 112 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover	MAX identity
		(%)	(%)
HQ832834.1	<i>Curvularia</i> sp. LH3	100	99
AB290141.2	<i>Curvularia</i> sp. KMU4944	96	100
JQ955586.1	<i>Curvularia</i> sp. CASMB-SEF 31	98	99
JF742784.1	<i>Curvularia</i> sp. Z10	99	97

### การจัดจำแนกรา SSpb1122

จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนี เมื่อเลี้ยงรา 14 วัน บนอาหาร PDA/sw ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส โคโลนีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 ไมโครเมตร ลักษณะโคโลนีเป็นผงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีสีขาว ไม่เรียบ เป็นรอยหยัก สร้าง conidia รูปกลม (Globose) ไม่มีสี ผิวเรียบ ขนาดประมาณ 2  $\mu\text{m}$  ต่อกันเป็นสาย 5-8 สปอร์บน sterigma ที่เกิดบนหัว vesicle ที่เป็นแบบ biseriata หัว vesicle ขนาดประมาณ 10-12.5  $\mu\text{m}$  sterigma คลุมประมาณ 2/3 ของ vesicle โคนิดิโอฟอร์ ตรง ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 32) การวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน beta tubulin ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 22



ภาพที่ 32 ลักษณะของรา SSpb1122 บนอาหาร PDA/sw; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีอายุ 14 วัน, ข: ลักษณะ foot cell, ค: ลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope

ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Beta-tubulin gene ของรา SSpb1122 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn

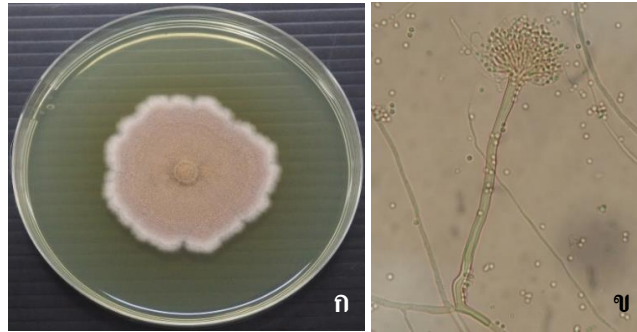
Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
GQ376127.1	<i>Aspergillus terreus</i> isolate UOA/HCPF 3355	100	99
HQ285595.1	<i>Aspergillus terreus</i> strain KCCM60335	100	99
GQ376130.1	<i>Aspergillus terreus</i> isolate UOA/HCPF 5704	100	99
GQ376128.1	<i>Aspergillus terreus</i> isolate UOA/HCPF 3706	100	99
JQ897354.1	<i>Aspergillus terreus</i>	100	99
GQ376132.1	<i>Aspergillus terreus</i> isolate A1S4_D36	100	99
GQ376131.1	<i>Aspergillus terreus</i> isolate UOA/HCPF 9995	100	99

#### การจัดจำแนกรา SSpb4207

การจัดจำแนกรารหัส SSpb4207 โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนี เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDA/sw 30 ppt เมื่อเลี้ยง 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส โคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4.8 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีเป็นผงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีสีขาว ไม่เรียบ เป็นรอยหยัก ลักษณะใต้กล้อง สร้าง conidia รูปกลม (Globose) ผิวเรียบ ไม่มีสี ขนาด 2.5 ไมโครเมตร ต่อกันเป็นสาย 2-5 สปอร์บน sterigma บนหัว vesicle ที่เป็นแบบ biseriata ขนาด ประมาณ 10 ไมโครเมตร sterigma กลุมรอบ



vesicle โคนิดิโอฟอร์ตรง ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 33) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta tubulin ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 23



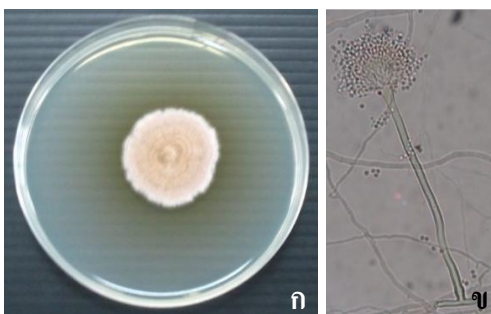
ภาพที่ 33 ลักษณะของรา SSpb4207 บนอาหาร PDA/sw; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนี อายุ 14 วัน, ข: ลักษณะfoot cell และ โครงสร้างสืบพันธุ์ได้กล้องจุลทรรศน์ light microscope

ตารางที่ 23 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Beta tubulin gene ของรา SSpb4207 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover	MAX identity
		(%)	(%)
HQ832962.1	<i>Aspergillus</i> sp. BMP3043	100	98
KC007332.1	<i>Aspergillus</i> sp. O_3_BESC_246e	100	97
GU566209.1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	100	97
KF624764.1	<i>Aspergillus flavipes</i> voucher RIFA	99	97
KC143754.1	Uncultured <i>Aspergillus</i> clone CEobese399	99	97
GU566238.1	<i>Aspergillus flavipes</i> strain E14	100	96
KM215631.1	<i>Aspergillus iizukae</i> isolate G82	100	96
AB859956.1	<i>Aspergillus lizukae</i>	100	96
KJ704842.1	<i>Aspergillus flavipes</i>	98	96
KC478518.1	<i>Aspergillus</i> sp. RSPG_185	95	97

### การจัดจำแนกรหัส SSpb4208

การจัดจำแนกรหัส SSpb4208 โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนี เมื่อเลี้ยงรบบนอาหาร PDA/sw เมื่อเลี้ยง 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส โคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4.8 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีเป็นผงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีสีขาว ไม่เรียบ สร้างสารที่มีสีเหลืองในอาหารแข็งจนเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองรอบโคโลนี ลักษณะได้ก่อกอง สร้าง conidia รูปกลม (Globose) ผิวเรียบ ไม่มีสี ขนาด 2.5 ไมโครเมตร ต่อกันเป็นสาย 2-5 สปอร์ บน sterigma บนหัว vesicle ที่เป็นแบบ biseriate ขนาด ประมาณ 10 ไมโครเมตร sterigma คลุม รอบ vesicle โคนิดิโอฟอร์ตรง ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 34) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta tubulin ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 24



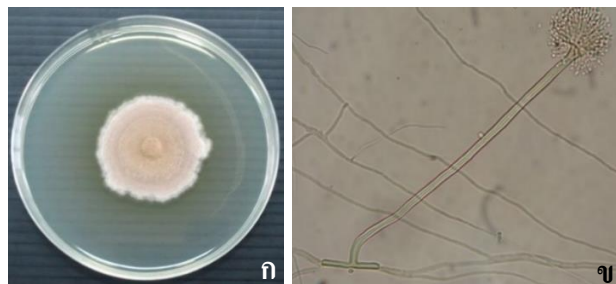
ภาพที่ 34 ลักษณะของรา SSpb4208 บนอาหาร PDA/sw; ก, ลักษณะด้านหน้าโคโลนี อายุ 7 วัน, ข: ลักษณะ foot cell และ โครงสร้างสืบพันธุ์ได้ก่อกองจุลทรรศน์ light microscope

### การจัดจำแนกรหัส SSpb4215

การจัดจำแนกรหัส SSpb4215 โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนี เมื่อเลี้ยงรบบนอาหาร PDA/sw เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส โคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5.5 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีเป็นผงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีสีขาว ไม่เรียบ เป็นรอยหยัก ลักษณะได้ก่อกอง สร้าง conidia รูปกลม (Globose) ไม่มีสี ผิวเรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 ไมโครเมตร ที่ต่อกันเป็นสาย 2-5 สปอร์บน sterigma ที่เกิดบนหัว vesicle vesicle เป็นแบบ biseriate ขนาดประมาณ 7.5-12.5 ไมโครเมตร sterigma คลุมรอบ vesicle โคนิดิโอฟอร์ตรง ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 35) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 24 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Beta tubulin gene ของรา SSpb4208 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
KJ775087.1	<i>Aspergillus templicola</i> strain DTO_267H4	95	81
KJ775092.1	<i>Aspergillus templicola</i> strain DTO_270C6	95	80
EU014079.1	<i>Aspergillus aureofulgens</i> isolate NRRL 6326	75	84
KJ775072.1	<i>Aspergillus capensis</i> strain DTO_179E6	95	80
LN909024.1	<i>Aspergillus templicola</i>	93	81
EU014086.1	<i>Aspergillus iizukae</i> isolate NRRL 3750	93	80
HG916695.1	<i>Aspergillus</i> sp. VH-2014c	93	80
LN909025.1	<i>Aspergillus templicola</i>	93	80
HG916696.1	<i>Aspergillus</i> sp. VH-2014c	93	80
LM644271.1	<i>Aspergillus</i> sp. 3 VH-2014	93	80
EU014084.1	<i>Aspergillus flavipes</i> isolate NRRL 5504	93	80
FJ491717.1	<i>Aspergillus flavipes</i> strain CBS 115.56	93	80
HG916688.1	<i>Aspergillus iizukae</i>	93	80
KJ775078.1	<i>Aspergillus micronesiensis</i>	95	79
LM644268.1	<i>Aspergillus iizukae</i>	93	79



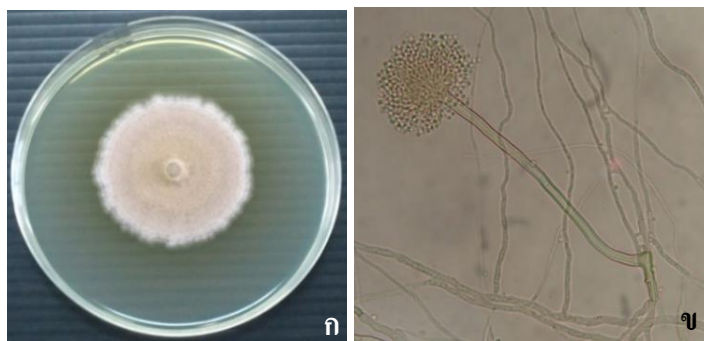
ภาพที่ 35 ลักษณะของรา SSpb4215 บนอาหาร PDA/sw; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีอายุ 14 วัน, ข: ลักษณะ foot cell และโครงสร้างสืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope

ตารางที่ 25 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา SSpb4215 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
HQ832962.1	<i>Aspergillus</i> sp. BMP3043	100	98
KC478518.1	<i>Aspergillus</i> sp. RSPG_185	99	97
KF624764.1	<i>Aspergillus flavipes</i> voucher RIFA 7A	100	97
KC007332.1	<i>Aspergillus</i> sp. O_3_BESC_246e 1	100	97
GU566209.1	<i>Aspergillus flavipes</i> strain BH	100	97
KJ704842.1	<i>Aspergillus flavipes</i>	99	97
KC143754.1	Uncultured <i>Aspergillus</i> clone CEobese399	100	96
GU187875.1	Uncultured fungus clone RFLP54	100	96
KM215631.1	<i>Aspergillus flavipes</i> strain E14	99	96
AY214443.1	<i>Aspergillus flavipes</i> isolate YNCA0241	95	97
KM215631.1	<i>Aspergillus lizukae</i> isolate G82	100	96
AY214443.1	<i>Aspergillus flavipes</i> strain UWFP 1022	98	97
KF417580.1	<i>Aspergillus flavus</i> strain JA4	96	97
JN246076.1	<i>Aspergillus</i> aff. <i>Flavipes</i> A13	98	96
JF817254.1	<i>A. flavus</i> strain Can S- 34A	98	96

#### การจัดจำแนกรรา SSpb4217

การจัดจำแนกรราหัตถ์ SSpb4217 โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนี เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDA/sw เป็นเวลา 14 วันที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส โคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5.2 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีเป็นผงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีสีขาว ไม่เรียบ เป็นรอยหยัก ลักษณะได้ก่อกองสร้าง conidia รูปกลม (Globose) ไม่มีสี ผิวเรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 ไมโครเมตร ต่อกันเป็นสาย 2-5 สปอร์บน sterigma ที่เกิดบนหัว vesicle vesicle แบบ biseriate ขนาดประมาณ 10-12.5 ไมโครเมตร sterigma คลุม รอบ vesicle โคนิดิโอฟอร์ ตรง ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 36) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 26



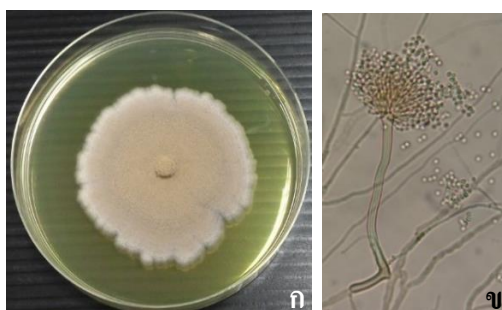
ภาพที่ 36 ลักษณะของรา SSpb4217 บนอาหาร PDA/sw; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีอายุ 14 วัน, ข: ลักษณะ foot cell และ โครงสร้างสืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope

ตารางที่ 26 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา SSpb4217 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
HQ832962.1	<i>Aspergillus</i> sp. BMP3043	100	98
KP890482.1	Fungal sp. 54835	98	98
KC007332.1	<i>Aspergillus</i> sp. O_3_BESC_246e	100	97
GU566209.1	<i>Aspergillus flavipes</i> strain BH	100	97
KF624764.1	<i>Aspergillus flavipes</i> voucher RIFA 7A	99	97
KC478518.1	<i>Aspergillus</i> sp. RSPG_185	97	97
GU566238.1	<i>Aspergillus flavipes</i> strain E14	99	97
KC143754.1	Uncultured <i>Aspergillus</i> clone CEobese399	99	97
KP068687.1	<i>Aspergillus flavipes</i> isolate YNCA0241	95	97
KM215631.1	<i>Aspergillus iizukae</i> isolate G82	100	96

## การจัดจำแนกราส SSpb4225

การจัดจำแนกราส SSpb4225 โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนี เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDA/sw เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส โคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6.0 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีเป็นผงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีสีขาว ไม่เรียบ เป็นรอยหยัก ลักษณะได้ก่อกองสร้าง conidia รูปกลม (Globose) ไม่มีสี ผิวเรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 ไมโครเมตร ต่อกันเป็นสาย 2-5 สปอร์บน sterigma ที่เกิดบนหัว vesicle vesicle แบบ biseriate ขนาดประมาณ 7.5-10 ไมโครเมตร sterigma คลุม รอบ vesicle โคนิดิโอฟอร์ ตรง ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 37) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 27



ภาพที่ 37 ลักษณะของรา SSpb4225 บนอาหาร PDA/sw; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีอายุ 14 วัน, ข: ลักษณะ foot cell และโครงสร้างสืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope

## 8. การวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ ITS ของราที่คัดเลือก

### 8.1 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS

จากการใช้โปรแกรม BLASTn วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ซึ่งครอบคลุมดีเอ็นเอในส่วน ITS1, 5.8S และ ITS2 (ความยาว 502-526 bp) ของราซึ่งคัดแยกได้จากนาเกลือจังหวัดเพชรบุรีจำนวน 4 ไอโซเลท และราที่คัดแยกจากจันทบุรี และฉะเชิงเทรา จำนวน 7 ไอโซเลท โดยที่ 99-100% ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของราแต่ละไอโซเลท ถูกนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบและแสดงความเหมือนกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณเดียวกัน ซึ่งปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ในระดับ 98-100% ดังแสดงในตารางที่ 28

ตารางที่ 27 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา SSpb4225 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
HQ832962.1	<i>Aspergillus</i> sp. BMP3043	99	98
KP890482.1	Fungal sp. 54835	96	98
KC007332.1	<i>Aspergillus</i> sp. O_3_BESC_246e	100	97
GU566209.1	<i>Aspergillus flavipes</i> strain BH	99	97
GU566238.1	<i>Aspergillus flavipes</i> strain E14	99	96
KM215631.1	<i>Aspergillus iizukae</i> isolate G82 e	99	96
KF624764.1	<i>Aspergillus flavipes</i> voucher RIFA 7A 1	97	97
KJ704842.1	<i>Aspergillus flavipes</i>	99	96
KC143754.1	Uncultured <i>Aspergillus</i> clone CEobese399	97	97
AB859956.1	<i>Aspergillus iizukae</i>	99	96
KC478518.1	<i>Aspergillus</i> sp. RSPG_185	93	97
JN246076.1	<i>Aspergillus</i> aff. <i>flavipes</i> A13	95	97
JF817254.1	<i>Aspergillus flavipes</i> strain CanS-34A	95	97
HQ288052.1	<i>Aspergillus</i> sp. NRRL 58570	91	98
KT809365.1	<i>Aspergillus flavipes</i> strain PJ03-11	94	97

## 8.2 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของราทั้ง 11 ไอโซเลท มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับราสายพันธุ์ต่างๆ ที่แสดงความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ในระดับแทกซอนตั้งแต่ แฟมิลี (ไม่ได้แสดงผล) จนถึงระดับจันัสและสปีชีส์ พบว่าให้รูปแบบของต้นไม้สายวิวัฒนาการที่เป็นรูปแบบเดียวกัน ภาพที่ 38 เป็นแผนภูมิต้นไม้แสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับจันัสและสปีชีส์ของรา 11 ไอโซเลท ที่วิเคราะห์ร่วมกับราสายพันธุ์ต่างๆ (ตารางที่ 29) พบว่าราทั้ง 11 ไอโซเลท ถูกแบ่งออกเป็น 2 คลัสเตอร์ โดยที่คลัสเตอร์แรก ประกอบด้วยไอโซเลท SSpb4207, SSpb4215, SSpb4217, SSpb4225, SS 033, SS 034, SS 066 และ SS 076 ส่วนคลัสเตอร์ที่สอง

ตารางที่ 28 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ของรานาเกลื้อและราทะเลที่แยกได้จากเพชรบุรี จันทบุรี และฉะเชิงเทราเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

Fungi	Taxon	Accession No.	ความยาว (bp)	Query cover (%)	MAX identity (%)
SS 033	<i>Dothideomycetes</i> sp. MSEF4	KT310926.1	520	99	99
SS 034	<i>Fusarium chlamyosporum</i> YS-110	HQ671187.1	502	100	100
SS 066	<i>Hypocreales</i> sp. SCSGAF0072	JN851014.1	540	100	99
SS 070	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> Delhi	HM195267.1	550	100	98
SS 076	<i>Aspergillus</i> sp. DoF23	JQ388268.1	556	100	100
SS 099	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> Delhi	HM195267.1	547	100	98
SS 112	<i>Curvularia</i> sp. LH3	HQ832834.1	546	100	99
SSpb4207	<i>Aspergillus</i> sp. BMP3043	HQ832962.1	615	100	98
SSpb4215	<i>Aspergillus</i> sp. BMP3043	HQ832962.1	585	100	98
SSpb4217	<i>Aspergillus</i> sp. BMP3043	HQ832962.1	602	100	98
SSpb4225	<i>Aspergillus</i> sp. BMP3043	HQ832962.1	626	99	98

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าความเหมือนสูงสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยพิจารณาจากลำดับที่มีคะแนนของการวิเคราะห์สูงสุด (เข้าถึงข้อมูล ณ วันที่ 8 มีนาคม 2559)

ประกอบด้วยราไอโซเลท SS 070, SS 099 และ SS 112 โดยแต่ละคลัสเตอร์แสดงความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 0.497-0.982 และ 0.848-0.992 ตามลำดับ (ตารางที่ 30)

แผนภูมิที่ปรากฏในภาพที่ 38 แสดงให้เห็นว่าราไอโซเลท SS 033 และ SS 034 มีความใกล้ชิดกับราในจีนัส *Dothideomycetes* และ *Fusarium chlamyosporum* ตามลำดับ ราไอโซเลท SS 066 แสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับ *Hypocreales* ในขณะที่ SSpb4207, SSpb4215, SSpb4217, SSpb4225 และ SS 076 แสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับราในจีนัส *Aspergillus* โดยที่ SSpb4207, SSpb4215, SSpb4217 และ SSpb4225 ซึ่งแสดงสายสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันเองเป็นอย่างมาก แสดงสายวิวัฒนาการในลักษณะพี่น้องกับ *Aspergillus flavipes* ในขณะที่ SS 076 สายสัมพันธ์ที่ใกล้ชิด



มากกับ *Aspergillus fumigatus* ในอีกทางหนึ่งราไอโซเลท SS 070 และ SS 099 ซึ่งมีบรรพบุรุษล่าสุดร่วมกัน แสดงสายวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับราในจีนัส *Cochliobolus* โดยราทั้งสองไอโซเลทดังกล่าวนี้ แยกแยะออกจาก *Cochliobolus heterostrophus* ในลักษณะของเคลดพี่น้อง (Sister clade) สำหรับสายวิวัฒนาการของราไอโซเลท SS 112 พบว่าแสดงความใกล้ชิดเป็นอย่างมากกับราในจีนัส *Curvularia*

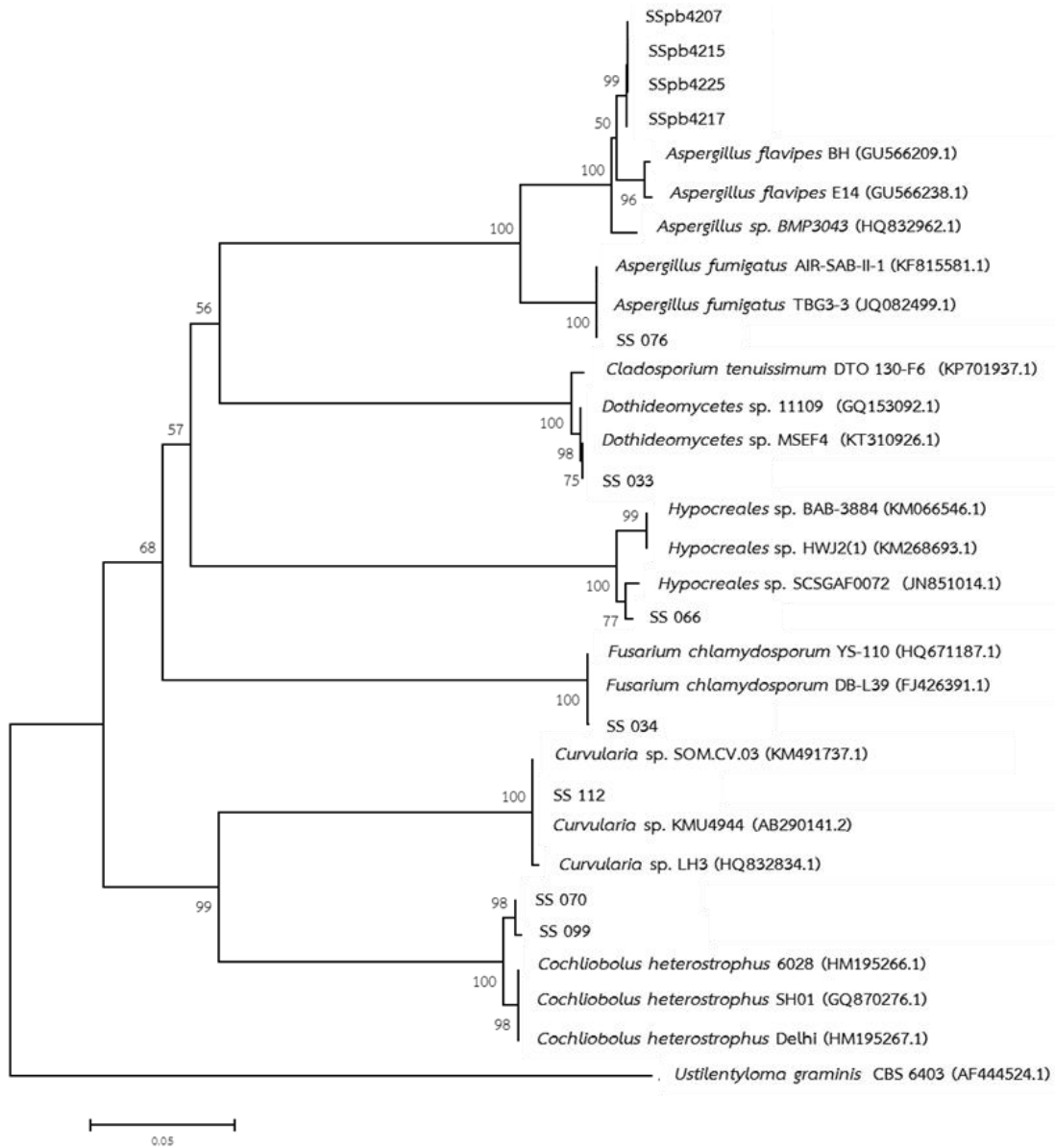
## 9. การจัดจำแนกรายการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนำรหัส *Beta-tubulin (tub2)*

### 9.1 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการวิเคราะห์ความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tub2* ของราซึ่งคัดแยกได้จากนาเกลือจังหวัดเพชรบุรีจำนวน 2 ไอโซเลท คือ SSpb1122 และ SSpb4208 เปรียบเทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของราไอโซเลท SSpb1122 แสดงความเหมือนสูงสุด 99% กับ *Aspergillus terreus* UOA/HCPF 3355 ในขณะที่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของรา SSpb4208 แสดงความเหมือนสูงสุดเพียง 79% กับ *Aspergillus templicola* DTO\_267H ดังแสดงในตารางที่ 31

### 9.2 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tub2* ของราทั้ง 2 ไอโซเลท มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับราสายพันธุ์ต่างๆ ที่แสดงความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวในระดับแท็กซอนตั้งแต่แฟมิลี (ไม่ได้แสดงผล) จนถึงระดับจีนัสและสปีชีส์ พบว่าให้รูปแบบของต้นไม้สายวิวัฒนาการที่เป็นรูปแบบเดียวกัน ภาพที่ 39 เป็นแผนภูมิต้นไม้แสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับจีนัสและสปีชีส์ของรา SSpb1122 และ SSpb4208 ที่วิเคราะห์ร่วมกับราสายพันธุ์ต่างๆ (ตารางที่ 32) พบว่าราทั้ง 2 ไอโซเลท ถูกจัดวางบนแผนภูมิต้นไม้ในคลัสเตอร์ที่ต่างกัน (ภาพที่ 39) โดย SSpb1122 ถูกจัดอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับ *Aspergillus alabamensis* *Aspergillus hortai* และ *Aspergillus terreus* โดยมีสายสัมพันธ์ที่มีบรรพบุรุษร่วมล่าสุดกับ *A. terreus* อย่างไรก็ตาม SSpb1122 ได้มีสายวิวัฒนาการแยกออกจาก *A. terreus* โดยแสดงความสัมพันธ์ในลักษณะแท็กซอนพี่น้อง (Sister taxon) ในขณะที่ SSpb4208 นั้น ถึงแม้ว่ามีตำแหน่งบนแผนภูมิอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับ *Aspergillus iizukae* และ *Aspergillus templicola* SSpb4208 แสดงสายวิวัฒนาการที่แยกออกจาก *Aspergillus* ทั้งสองสปีชีส์นี้อย่างชัดเจน



ภาพที่ 38 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราจำนวน 11 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากนาเกลือ; แผนภูมินี้สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแต่ละ แทกซอน โดยมีหน่วยเป็นอัตราการแทนที่คู่เบสในแต่ละตำแหน่งบนยีนเครื่องหมาย อัตราการแปรผันทางพันธุกรรมบนยีนเครื่องหมายคำนวณโดยใช้โมเดล gamma distribution และทดสอบความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้วิธี bootstrap test (1000 ซ้ำ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS จำนวน 448 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 31 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Ustilentyloma graminis* CBS 6403 (AF444524.1) เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

ตารางที่ 29 ภาที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

ไอโซเลท/แตกซอน	Accession no.	แหล่งที่มา
SS 033	-	งานวิจัยนี้
SS 034	-	งานวิจัยนี้
SS 066	-	งานวิจัยนี้
SS 070	-	งานวิจัยนี้
SS 076	-	งานวิจัยนี้
SS 099	-	งานวิจัยนี้
SS 112	-	งานวิจัยนี้
SSpb4207	-	งานวิจัยนี้
SSpb4215	-	งานวิจัยนี้
SSpb4217	-	งานวิจัยนี้
SSpb4225	-	งานวิจัยนี้
<i>Aspergillus</i> sp. BMP3043	HQ832962.1	GenBank
<i>Aspergillus flavipes</i> BH	GU566209.1	GenBank
<i>Aspergillus flavipes</i> E14	GU566238.1	GenBank
<i>Aspergillus fumigatus</i> AIR-SAB-II-1	KF815581.1	GenBank
<i>Aspergillus fumigatus</i> TBG3-3	JQ082499.1	GenBank
<i>Cladosporium tenuissimum</i> DTO 130-F6	KP701937.1	GenBank
<i>Cochliobolus heterostrophus</i> 6028	HM195266.1	GenBank
<i>Cochliobolus heterostrophus</i> Delhi	HM195267.1	GenBank
<i>Cochliobolus heterostrophus</i> SH01	GQ870276.1	GenBank
<i>Curvularia</i> sp. KMU4944	AB290141.2	GenBank
<i>Curvularia</i> sp. LH3	HQ832834.1	GenBank
<i>Curvularia</i> sp. SOM.CV.03	KM491737.1	GenBank
<i>Dothideomycetes</i> sp. 11109	GQ153092.1	GenBank
<i>Dothideomycetes</i> sp. MSEF4	KT310926.1	GenBank

ตารางที่ 29 ภาที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (ต่อ)

ไอโซเลท/แทกซอน	Accession no.	แหล่งที่มา
<i>Fusarium chlamydosporum</i> DB-L39	FJ426391.1	GenBank
<i>Fusarium chlamydosporum</i> YS-110	HQ671187.1	GenBank
<i>Hypocreales</i> sp. BAB-3884	KM066546.1	GenBank
<i>Hypocreales</i> sp. HWJ2(1)	KM268693.1	GenBank
<i>Hypocreales</i> sp. SCSGAF0072	JN851014.1	GenBank
<i>Ustilentyloma graminis</i> CBS 6403	AF444524.1	GenBank

ตารางที่ 30 Sequence Identity Matrix ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS จากราที่คัดแยกได้จากนาเกลือ จำนวน 11 ไอโซเลท

	SS 033	SS 034	SS 066	SS 070	SS 076	SS 099	SS 112	SSpb 4207	SSpb 4215	SSpb 4217	SSpb 4225
SS 033	ID										
SS 034	0.612	ID									
SS 066	0.597	0.596	ID								
SS 070	0.594	0.645	0.570	ID							
SS 076	0.669	0.600	0.579	0.595	ID						
SS 099	0.592	0.646	0.572	0.992	0.594	ID					
SS 112	0.582	0.627	0.551	0.851	0.594	0.848	ID				
SSpb4207	0.584	0.514	0.523	0.525	0.790	0.521	0.535	ID			
SSpb4215	0.569	0.497	0.507	0.508	0.779	0.505	0.519	0.951	ID		
SSpb4217	0.597	0.525	0.534	0.535	0.807	0.532	0.546	0.978	0.971	ID	
SSpb4225	0.597	0.526	0.536	0.537	0.799	0.534	0.538	0.982	0.934	0.961	ID

หมายเหตุ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม MEGA6

ตารางที่ 31 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tub2* ของรานาเกลื้อ ไอโซเลท SSpb1122 และ SSpb4208 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

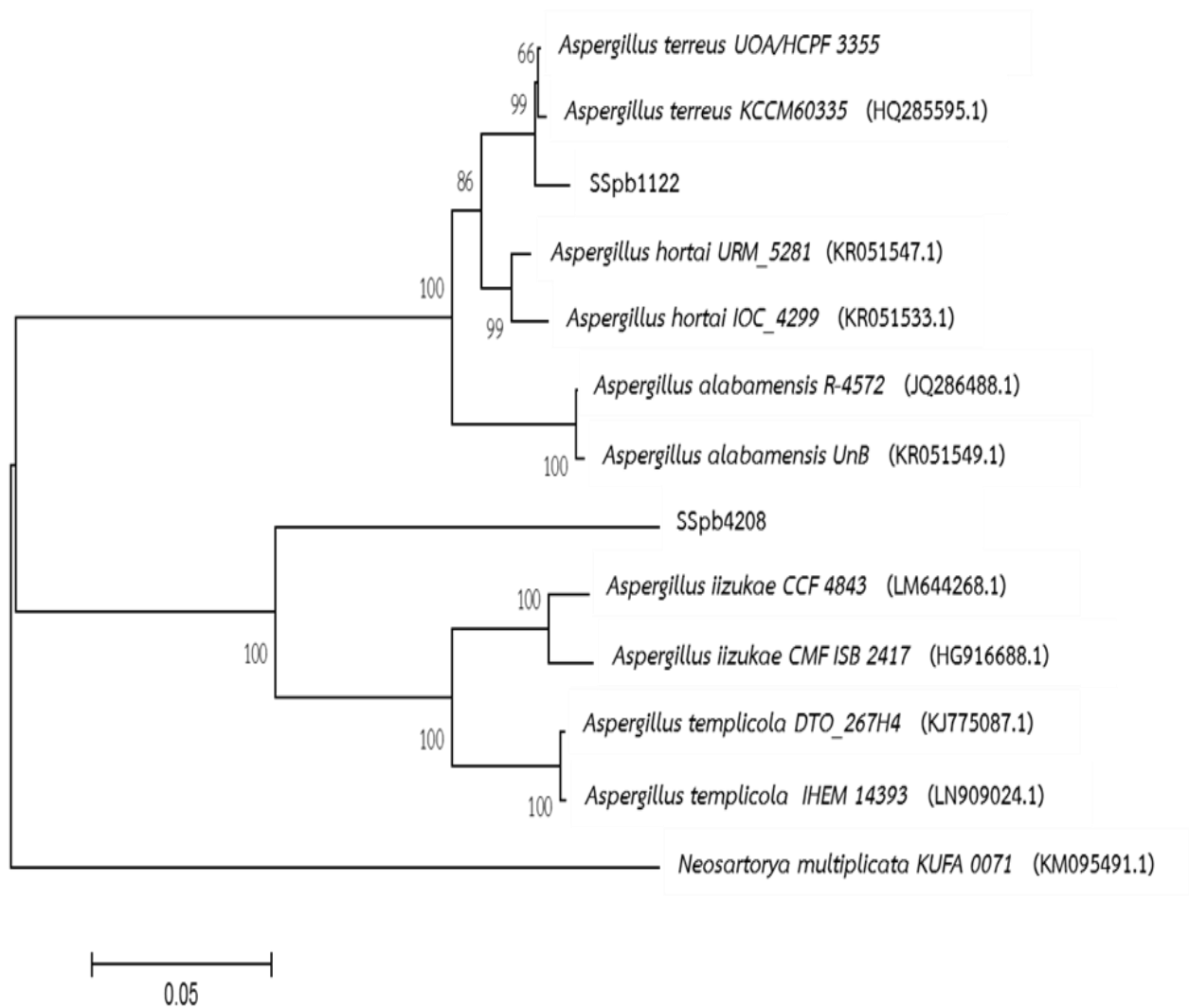
Fungi	Taxon	Accession No.	ความยาว (bp)	Query cover (%)	MAX identity (%)
SSpb1122	<i>Aspergillus terreus</i> UOA/HCPF 3355	GQ376127.1	536	100	99
SSpb4208	<i>Aspergillus templicola</i> DTO_267H4	KJ775087.1	435	96	79

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าความเหมือนสูงสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยพิจารณาจากลำดับที่มีคะแนนของการวิเคราะห์สูงสุด (เข้าถึงข้อมูล ณ วันที่ 8 มีนาคม 2559)

#### 10. การระบุแทกซอนของราจากนาเกลื้อ

จากการวิเคราะห์ความเหมือนและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของรา 11 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากนาเกลื้อ โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS สามารถระบุแทกซอนของราดังกล่าวได้อย่างน้อยในระดับจีนัส ทั้งหมด 4 จีนัส คือ *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia* และ *Cochliobolus* และหากใช้เกณฑ์การระบุแทกซอนระดับสปีชีส์อยู่ที่ค่าความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 99% พบว่ามีราเพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถระบุแทกซอนในระดับสปีชีส์ได้คือ SS 034 โดยระบุเป็น *Fusarium chlamydosporum* (ตารางที่ 33)

ในการระบุแทกซอนของรา SSpb1122 และ SSpb4208 ที่ศึกษาใช้ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ความเหมือนและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tub2* และใช้เกณฑ์การระบุแทกซอนระดับสปีชีส์อยู่ที่ค่าความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 99% ซึ่งในกรณีนี้สามารถระบุแทกซอน ของ SSpb1122 ได้เป็น *Aspergillus terreus* ในขณะที่ไอโซเลท SSpb4208 นั้น ถึงแม้ว่าสายวิวัฒนาการจะมีความใกล้ชิดกับราในจีนัส *Aspergillus* หลายสปีชีส์ แต่เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีนเครื่องหมายมีเพียง 79 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีนี้จึงไม่สามารถระบุแทกซอนของราไอโซเลทนี้ในระดับจีนัสและสปีชีส์ได้ โดยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบในยีน *tub2* ของ SSpb4208 (มากกว่า 20%) เมื่อพิจารณาแล้ว ทำให้สามารถพิจารณา ราไอโซเลทนี้เป็นแทกซอนที่อยู่ใต้น้อยคลาสนิใหม่ได้



ภาพที่ 39 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของรานาเกลือ 2 ไอโซเลท คือ SSpb1122 และ SSpb4208; แผนภูมินี้สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tub2* และใช้ *p*-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแต่ละแตกซอน โดยมีหน่วยเป็นอัตราการแทนที่คู่เบสในแต่ละตำแหน่งบนยีนเครื่องหมาย อัตราการแปรผันทางพันธุกรรมบนยีนเครื่องหมายคำนวณโดยใช้โมเดล gamma distribution และทดสอบความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้วิธี bootstrap test (1000 ซ้ำ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS จำนวน 383 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 13 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Neosartorya multiplicata* KUFA 0071 (KM095491.1) เป็นแตกซอนนอกกลุ่ม

ตารางที่ 32 แยกชอนของราที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

ไอโซเลท/แยกชอน	Accession no.	แหล่งที่มา
SSpb1122	-	งานวิจัยนี้
SSpb4208	-	งานวิจัยนี้
<i>Aspergillus alabamensis</i> R-4572	JQ286488.1	GenBank
<i>Aspergillus alabamensis</i> UnB	KR051549.1	GenBank
<i>Aspergillus hortai</i> IOC_4299	KR051533.1	GenBank
<i>Aspergillus hortai</i> URM_5281	KR051547.1	GenBank
<i>Aspergillus iizukae</i> CCF 4843	LM644268.1	GenBank
<i>Aspergillus iizukae</i> CMF ISB 2417	HG916688.1	GenBank
<i>Aspergillus templicola</i> DTO_267H4	KJ775087.1	GenBank
<i>Aspergillus templicola</i> IHEM 14393	LN909024.1	GenBank
<i>Aspergillus terreus</i> KCCM60335	HQ285595.1	GenBank
<i>Aspergillus terreus</i> UOA/HCPF 3355	GQ376127.1	GenBank
<i>Neosartorya multiplicata</i> KUFA 0071	KM095491.1	GenBank

ตารางที่ 33 การระบุแยกชอนของราที่คัดเลือก 13 สายพันธุ์

Fungi	Taxon	Fungi	Taxon
SS 033	<i>Dothideomycetes</i> sp.	SSpb1122	<i>Aspergillus</i> sp.
SS 034	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	SSpb4207	<i>Aspergillus</i> sp.
SS 066	<i>Hypocreales</i> sp.	SSpb4208	<i>Aspergillus</i> sp.
SS 070	<i>Cochliobolus</i> sp.	SSpb4215	<i>Aspergillus</i> sp.
SS 076	<i>Aspergillus</i> sp.	SSpb4217	<i>Aspergillus</i> sp.
SS 099	<i>Cochliobolus</i> sp.	SSpb4225	<i>Aspergillus</i> sp.
SS 112	<i>Curvularia</i> sp.		

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษารานาเกลือทั้งจากจังหวัดฉะเชิงเทรา จันทบุรี และเพชรบุรี รวม 150 สายพันธุ์ พบว่า นาเกลือเป็นแหล่งที่สำคัญของราที่สามารถนำมายับยั้งแบคทีเรียได้ดีและอาจนำมายับยั้งยีสต์ได้ สารสกัดจากร้อยละ 40.0 (60/150 สายพันธุ์) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้มากกว่า 1 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นแกรมบวก ราเหล่านี้สามารถผลิตสารต้านจุลชีพนี้ได้เร็วและสารส่วนใหญ่ถูกปล่อยออกมาในอาหารเหลว ทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้งานต่อ ประสิทธิภาพของ culture filtrate ที่พบนับว่ามีประสิทธิภาพดีใกล้เคียงหรืออาจดีกว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสกุลมังกุดที่มีผู้รายงานไว้ โดยเมื่อนำผลของ culture filtrate ของรานาเกลือปริมาตร 100 ไมโครลิตรในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบมาเปรียบเทียบกับรายงานของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสกุลมังกุด ที่นำอาหารเลี้ยงเชื้อ 80 ไมโครลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในอาหารเหลว 300 มิลลิลิตร มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น โดยวิธีเดียวกัน พบอาหารเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสกุลมังกุดเพียงร้อยละ 18.6 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 90028 ชนิดใดชนิดหนึ่ง (Phongpaichit *et al.*, 2006)

ประสิทธิภาพที่ดีของสารรานาเกลือในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ยังเห็นได้จากการใช้สารสกัดเพียงความเข้มข้นต่ำ (100 µg/disk) สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้ใกล้เคียงกับ disk ยา gentamycin มาตรฐาน (10 µg/disk) การที่สารสกัดมีประสิทธิภาพต่ำกว่ายา gentamycin เนื่องจากสารที่สกัดได้เป็นเพียงสารสกัดหยาบ ยังมีสารอื่นๆ เจือปนอยู่มาก ประกอบกับสภาวะที่เลี้ยงและสภาวะที่ใช้ทดสอบเป็นสภาวะที่ใช้กันทั่วไปในเบื้องต้น ยังไม่ได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเจาะจงต่อราแต่ละสายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพ ซึ่งหากได้ทำการปรับปรุงสภาวะจนเหมาะสมแล้ว ก็อาจทำให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นได้ (Mathan *et al.*, 2013; Nomila Merlin *et al.*, 2013)

ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าบางครั้งราชนิดเดียวกัน เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบและเมื่อนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ ผลที่ได้แตกต่างกัน การที่ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัดในการยับยั้งแตกต่างกันมิได้หลายสาเหตุ เช่นอาจเนื่องจากความแตกต่างของปริมาณ และความบริสุทธิ์



ของสารต้านจุลชีพ หรือความมีชีวิตที่แตกต่างกันของสารต้านจุลชีพ กรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อให้ผลบวกส่วน สารสกัด ethyl acetate ให้ผลลบ อาจเนื่องจาก ethyl acetate เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง จึงสามารถ ดึงสารเฉพาะสารที่มีขั้วปานกลางออกจากอาหาร แต่ไม่สามารถดึงสารที่มีขั้วสูงหรือสารที่มีขั้วต่ำที่ออก ฤทธิ์ในอาหารออกมาได้ (Ramos *et al.*, 2006) ในกรณีนี้จึงควรทดลองเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้ในการ สกัดสาร ส่วนในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อให้ผลลบ ส่วนสารสกัด ethyl acetate ให้ผลบวก อาจเนื่องจาก สารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในอาหารเหลวมีน้อยเกินไป อาจมีสารเจือปนในอาหารที่ยับยั้งการออกฤทธิ์ หรือ เนื่องจากสารต้านจุลชีพนั้นเป็นสารที่เป็นโมเลกุลมีขั้ว เช่น peptides (Good and Nielsen, 1988)

ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัดยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* TISTR 008 และ *B. subtilis* TISTR 121 ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 สอดคล้องกับรายงานของรามาจากหลากหลายแหล่ง มีรายงานว่าสารสกัดจากราที่แยกได้จากปะการังทะเล สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* 20019 และ *S. aureus* ATCC 6538P ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922 (Wang *et al.*, 2011) การที่ รามาจากเกลือส่วนใหญ่ สามารถผลิตสารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ได้ดีเฉพาะกับแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้ สันนิษฐานได้ว่ากลไกที่ใช้น่าจะเป็นการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ มีรายงานว่าสารสกัดสามารถยับยั้ง แบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ มาจากความแตกต่างของโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แกรมบวกและแกรมลบ (Forbes, *et al.*, 2002; Nanninga, 1998; Kock, 1998) แบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ ที่ซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ รวมถึงมี periplasmic space กั้นกลาง ระหว่างชั้นทั้งสอง และยังมีเปปติโดไกลแคนชั้นบางๆ 1-2 ชั้นแทรกอยู่ (Kock, 1998) ด้วยเหตุนี้แบคทีเรีย แกรมลบจึงมีคุณสมบัติด้านการผ่านของสาร ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Reith and Mayer, 2011) และ การที่ยีสต์ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดไม่ดีแตกต่างจากแบคทีเรีย อาจเนื่องมาจากผนังเซลล์มีองค์ประกอบแตกต่าง กันออกไป คือมีกลูแคนและแมนแนน อย่างไรก็ตามยังไม่ได้ทำการศึกษากลไกอย่างแน่ชัดในการศึกษานี้

ในบางครั้งพบว่าในบริเวณยับยั้งเชื้อรอบ disk มีแบคทีเรียหรือยีสต์บางส่วนเจริญอยู่ ทำให้บริเวณ ยับยั้งไม่ใสเท่าที่ควร อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดไม่เพียงพอที่จะยับยั้งเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ หรือ อาจเนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดปรับตัวให้ทนต่อสารต้านจุลชีพที่รามาเกลือผลิตขึ้นได้ ดังที่มีรายงาน เสมอๆ ในกรณีเชื้อคือยา (Ahmad, *et al.*, 1950, Cavallito *et al.*, 1945) และในกรณี *Candida albicans*

ATCC 10231 มีรายงานว่า การทนต่อสารต้านจุลชีพ อาจเนื่องจากถูกกระตุ้นโดยปัจจัยในสิ่งแวดล้อมหรือจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของจุลินทรีย์เอง (Sadeghi *et al.*, 2008)

จากการศึกษาเพิ่มเติมมาจากเพชรบุรี พบว่าราจากเพชรบุรีสร้างสารยับยั้งได้ดีกว่าและมากกว่าจากจังหวัดฉะเชิงเทราและจันทบุรี เหตุผลยังไม่เป็นที่ทราบ แต่อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสภาพภูมิอากาศ การพัดผ่านของมรสุม ทั้งนี้เพราะเพชรบุรีเป็นจังหวัดทางภาคกลางตอนล่าง ซึ่งมีสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศต่างจากฝั่งทะเลภาคตะวันออก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องของปริมาณน้ำฝนและความชื้นสัมพัทธ์ (กรมอุตุฯ, 2558)

ค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 52923 ของสารสกัดที่ทดสอบอยู่ในช่วง 64-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ พบว่าสารสกัดราที่พบว่ายับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ สารสกัด SS 069 SSpb3124 SSpb4217 SSpb4225 SSpb4226 SSpb4319 และ SSpb4328 ค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 52923 ของสารสกัดจากราจังหวัดเพชรบุรี สารสกัด SSpb3124 SSpb4215 และ SSpb4225 มีค่าต่ำที่สุด คือ 64 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีรายงานว่าค่า MIC ของ Aspergicin จากรา *Aspergillus* sp. FSY-01 และสารบริสุทธิ์ *Aspergillus* sp. FSW-02 ที่แยกได้จากป่าชายเลน ในการยับยั้ง *S. aureus* คือ 62.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่ำกว่าสารสกัดหยาบในการศึกษานี้ประมาณ 1-8 เท่า (Zhu *et al.*, 2011)

MIC ของสารสกัดจากรานาเกลือในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ในช่วง 1,024->1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของการศึกษานี้ นับว่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ *Arthrinium arundinis* ในการยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่เท่ากับ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากัน 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 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่ำกว่าสารสกัดในการศึกษาครั้งนี้จากรานาเกลือประมาณ 4-32 เท่า (Yao *et al.*, 2014) และค่า MIC ในการยับยั้ง *E. coli* ของสารบริสุทธิ์ Aspergicin จากรา *Aspergillus* sp. FSY-01 และ *Aspergillus* sp. FSW-02 ที่แยกได้จากป่าชายเลน คือ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าสารสกัดหยาบในการศึกษาครั้งนี้ประมาณ 33 เท่า (Zhu *et al.*, 2011)

ความเค็มในอาหารเลี้ยงราเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้าง และประสิทธิภาพในการสร้าง สารต้านจุลชีพของรานากเกลือ มีรายงานว่าราทะเลที่แท้จริงสร้างสารออกฤทธิ์ได้ดีในน้ำจืดมากกว่าน้ำทะเล เนื่องจากไม่ต้องสูญเสียพลังงานในการสร้างสารเพื่อการดำรงชีพ แต่จากการศึกษานี้พบว่าความเค็ม สามารถกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานหรือการสร้างสารแตกต่างกันขึ้นกับชนิดรา แต่บางชนิดก็สามารถ ให้ผลดีไม่แตกต่างกัน เช่น SSpb3208 SSpb4215 และ SSpb4217 ในแง่การนำไปใช้ราที่สร้างสารได้ดี ในน้ำจืดจะมีประโยชน์กว่า เนื่องจากเลี้ยงได้ง่ายกว่าและประหยัดกว่า

แม้ว่าค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 52923 ในช่วง 64-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ก่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับสารบริสุทธิ์ และสารจากราในบางแหล่ง แต่หากได้รับการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม เช่นปรับความเค็มอาหารที่ใช้เลี้ยง (Mathan *et al.*, 2013; Nomila Merlin *et al.*, 2013) รวมถึงปรับสารอาหารและสภาวะอื่นๆ หรือทำบริสุทธิ์ให้สารบริสุทธิ์ มากขึ้น สารเหล่านี้ก็น่าจะมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 52923 เห็นได้จากการทดสอบเปรียบเทียบผลของความเค็มเบื้องต้นในการศึกษานี้

การจัดจำแนกราเบื้องต้นทำโดยวิธีมาตรฐานวิทยา เพื่อให้สามารถระบุแทกซอนรา 150 สายพันธุ์ ได้อย่างรวดเร็ว และส่วนใหญ่ระบุได้ถูกต้องในระดับจีนัส แต่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ จึงได้คัดเลือกรา ที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งดี มีค่า MIC ต่ำ หรือราที่อาจเป็นชนิดใหม่ มาจัดจำแนกทางพันธุศาสตร์ โดยใน ปังบประมาณที่ผ่านมา ได้คัดเลือกรานากเกลือจากภาคตะวันออก (รหัส SS) ไปวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกัน ของลำดับเบส 18S rRNA gene แต่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์แน่ชัด เนื่องจากพบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนเครื่องหมายนี้ มีความคล้ายคลึงกันสูงมากในราแต่ละชนิด สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากยีนดังกล่าว มีลักษณะที่อนุรักษ์สูงมาก ทำให้มีอัตราการเกิดวิวัฒนาการได้ค่อนข้างช้า สามารถกล่าวได้ว่ายีนนี้อาจ ไม่สามารถให้รายละเอียดของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของราในระดับสปีชีส์ หรือระดับจีนัสได้ (รายละเอียดแสดงไว้ในรายงานปังบประมาณ 2556) ดังนั้นการจัดจำแนกราในระดับ สปีชีส์โดยวิธีนี้ มีความจำเป็นต้องอาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน หรือโมเลกุลดีเอ็นเอ เครื่องหมายอื่นๆ ที่มีอัตราการเกิดวิวัฒนาการที่เร็วกว่ายีน 18S rRNA เช่น ITS (Internal transcribed spacer) หรือยีนที่เข้ารหัส beta tubulin เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ราหลายสายพันธุ์ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่า น่าจะเป็นราสปีชีส์ใหม่ จากการศึกษาที่คัดเลือกไว้ศึกษาทางพันธุศาสตร์ จำนวน 13 สายพันธุ์ มีเพียง *Fusarium chlamydosporum* สายพันธุ์เดียวที่ระบุสปีชีส์ได้ นอกนั้นคาดว่าอาจเป็นสปีชีส์ใหม่ รา 2 สายพันธุ์

(SS 033 และ SS 066) ระบุได้เพียงระดับคลาสและออเดอร์ รา 7 สายพันธุ์ ถูกระบุอยู่ในสกุล *Aspergillus* ในจำนวนนี้ 1 สายพันธุ์ (SSpb4208) อาจไม่ใช่ *Aspergillus* ถึงแม้ว่าจะมีลักษณะทางสัณฐานบ่งชี้ว่า น่าจะเป็น *Aspergillus* คือพบ foot cell และลักษณะ vesicle และ sterigma เนื่องจาก มีความคล้ายคลึงกับ *Aspergillus* หลากหลายสปีชีส์ แต่มีความคล้ายคลึงเพียงร้อยละ 79-81 ซึ่งในกรณีที่ความคล้ายคลึงต่ำกว่าร้อยละ 80 อาจจัดรานี้ให้อยู่ในคลาสใหม่ได้ อย่างไรก็ตามควรต้องทำการทดสอบยืนยันอีกครั้งหนึ่ง จากข้อจำกัดทางด้านงบประมาณและบุคลากร แม้ในการศึกษานี้ทำได้เพียงการคัดเลือกบางส่วนหนึ่ง มาทำการจัดจำแนกทางอนุพันธุศาสตร์ แต่การที่พบว่าราส่วนใหญ่ที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มี แนวโน้มเป็นราชนิดใหม่หรือแตกชนิดใหม่ ทำให้คาดว่าราส่วนใหญ่ในอนาคตน่าจะเป็นราใหม่ที่ยังรอ การค้นพบและศึกษาสารชนิดใหม่ๆ ที่น่าจะผลิตได้

การสร้างสารออกฤทธิ์กว้างของ *Aspergillus* SS 069, *Aspergillus* SS 076 และ *Aspergillus* spp. จากจังหวัดเพชรบุรีหลายสายพันธุ์ ในการศึกษาที่สอดคล้องกับ Abdullah and Zafrul (2010) ที่รายงานว่า *Aspergillus* spp. เป็นแหล่งของสารต้านจุลชีพ สารสกัดเอธิลอะซิเตท จาก *Aspergillus* แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกคือ *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Sarcina lutea* และ *Staphylococcus aureus* และยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด รวมทั้ง *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella* ที่นำมาทดสอบ อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษา *Aspergillus* ที่สามารถสร้างสารต้านจุลชีพ ส่วนใหญ่แยกได้จากดิน (Dix and Webster, 1995; Klich, 2002; Thompson *et al.*, 1994) ดังนั้นหากเป็น *Aspergillus* สปีชีส์ใหม่ที่พบในระบบนิเวศน์ที่แตกต่างไป ก็มีแนวโน้มที่จะให้สารต้านจุลชีพชนิดใหม่ ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพ

เป็นที่น่าสังเกตว่า SS 070 SS 078 และ SS 099 ซึ่งต่างก็เป็นราที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกต่างๆ ได้ดี เป็นราในแท็กซอนเดียวกันในรูปอะนามอร์ฟ/เทลิโอเมอร์ฟ คือ *Bipolaris/Cochliobolus* แต่ทั้งหมดไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ใดๆ ซึ่งอาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมในอนาคตนี้อาจรุนแรงเกินไป อย่างไรก็ตามการที่รานี้สามารถปรับตัวให้เจริญได้ในอนาคต และมีค่า MIC ต่อแบคทีเรียแกรมบวกต่ำ ชี้ให้เห็นว่าราในสกุลนี้น่าจะมีแนวโน้มที่จะให้สารต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพเช่นกัน และน่าจะเป็นสารคนละประเภทกับสารที่สร้างจาก *Aspergillus* ซึ่งออกฤทธิ์กว้างกว่า จากการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า *Bipolaris/Cochliobolus* สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้หลากหลาย เช่น phytotoxin, silver nanoparticles, antioxidant, anti MRSA

(Nakajima, 1998; Saha *et al.*, 2010; Arunpanichlert *et al.*, 2012) แต่เนื่องจากมีรายงานว่า *Bipolaris/ Cochliobolus* บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคในมนุษย์ ก่อนการนำมาใช้งานจึงต้องทำการศึกษาถึงความปลอดภัยก่อน (da Cunha *et al.*, 2012)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากรานาเกลื้อ จำนวน 8 สายพันธุ์ ด้วยวิธี thin layer chromatography พบองค์ประกอบของสารส่วนใหญ่มี 6-7 ชนิด ส่วนใหญ่ที่มีค่า  $R_f$  ต่างกันเมื่อเทียบสารสกัด PDB กับ PDB/SW และเทียบระหว่างราต่างสายพันธุ์กัน จำนวนสารองค์ประกอบที่พบว่ารานาเกลื้อสร้างในการศึกษานี้ มีมากกว่าจำนวนสารองค์ประกอบของสารสกัดจากอาหาร PDB เลี้ยงรา *A. terreus* MP1 และ *A. ochraceus* MP2 ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล ประเทศอินเดีย ที่พบสารองค์ประกอบยับยั้งจุลินทรีย์ 4 และ 3 ชนิด (Meenupriya *et al.*, 2011) ขณะที่ราทะเล *Curvularia* sp. และ *Aspergillus* sp. ที่แยกได้จากน้ำทะเล ประเทศอินเดีย พบสารองค์ประกอบเพียง 2 และ 5 ชนิด ตามลำดับ (Swathi *et al.*, 2013)

การศึกษาประสิทธิภาพของสารองค์ประกอบโดยวิธี autobiography ในการศึกษานี้เป็นขั้นคัดกรองเท่านั้น เนื่องจากมีข้อจำกัดในการแยกสารบนแผ่น TLC การใช้ระบบตัวทำละลายที่อาจยังไม่เหมาะสมกับชนิดของสาร หรือการที่โมเลกุลสารองค์ประกอบมีขั้วใกล้เคียงกันมาก ทำให้พบว่าสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC ไม่แยกออกจากกันชัดเจน ดังนั้นในการทำ autobiography จึงเห็นเป็นบริเวณยับยั้งรอบแผ่น TLC บริเวณที่มีสารองค์ประกอบทั้งหมด ไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นการยับยั้งโดยแถบสารองค์ประกอบใด ผู้วิจัยจึงได้พยายามระบุว่าผลยับยั้งที่แท้จริงมาจากสารองค์ประกอบใด โดยตัดแยกแผ่น TLC ที่มีสารองค์ประกอบต่างๆ กันเป็นส่วนๆ เพื่อใช้แทน disk นำมาทดสอบ การยับยั้งจุลินทรีย์บนอาหารแข็งอีกครั้งหนึ่ง แต่เนื่องจากสารดังกล่าวอยู่ใกล้กันมาก ทำให้การตัดสารองค์ประกอบแต่ละสารมีขนาดและรูปร่างไม่มาตรฐาน ประกอบกับสารองค์ประกอบชนิดเดียวกันในแผ่น TLC มีความเข้มข้นของสารไม่เท่ากัน คือมีทั้งด้านที่มีความเข้มข้นของสารสูงตรงบริเวณส่วนโค้ง และด้านที่มีความเข้มข้นต่ำตรงบริเวณส่วนเว้า ทำให้บริเวณยับยั้งไม่เป็นวงกลมไม่สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ การบันทึกประสิทธิภาพของสารในการศึกษานี้ทำได้เพียงการประเมินเป็นระดับความแรง (1+ - 3+) ด้วยสายตาเท่านั้น เห็นชัดในการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก พบสารองค์ประกอบเดี่ยวชนิดเดียวกัน มีรัศมีของบริเวณยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันไม่เท่ากัน โดยบริเวณส่วนโค้งให้ขนาดโซนกว้างกว่าบริเวณส่วนเว้า

จากการคัดเลือกสารองค์ประกอบของสกัดจากอาหารเลี้ยงรา SS 069 SSpb1122 SSpb4217 SSpb4225 และ SSpb4332 ที่มีค่า  $R_f$  ต่างๆ กัน (ยกเว้นกรณีที่สารต่างชนิดอยู่ชิดกันมากบนแผ่น TLC ไม่สามารถตัดแยกออกจากกัน ก็จะนำมาศึกษาไปพร้อมกัน) มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และ

พบว่าสารองค์ประกอบส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 ขณะที่บางสารเท่านั้นที่ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ได้ แสดงให้เห็นว่าสารเหล่านี้น่าจะมีกลไกในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างกัน แม้จะเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเหมือนกัน ไม่พบสารองค์ประกอบที่สามารถยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารที่มีค่า  $R_f$  เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ( $\pm 0.01$ ) จากราชนิตเดียวกัน ส่วนใหญ่ให้ผลการยับยั้งเหมือนกันหรือใกล้เคียงกันขึ้นกับสายพันธุ์จุลินทรีย์ทดสอบ และสารที่มีค่า  $R_f$  เท่ากันหรือใกล้เคียงกันจากราชนิตต่างกัน บางครั้งให้ผลยับยั้งต่างกัน ซึ่งปกติสารที่มีค่า  $R_f$  และประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์เท่ากันหรือใกล้เคียงกันมีแนวโน้มว่าจะเป็นสารเดียวกัน มีขี้ว หรือน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน ในกรณีหลังนี้จึงอาจเป็นไปได้ว่าเป็นเพราะสารมีโครงสร้างแตกต่างกัน นอกจากนี้ การที่พบว่าสารองค์ประกอบจากราสาสายพันธุ์เดียวกัน เลี้ยงพร้อมกันในอาหารที่มีความเค็ม 30 ppt และไม่มีเค็ม แตกต่างกันทั้งปริมาณและชนิด ( $R_f$  ต่างกัน) ยืนยันถึงกลไกของราในนาเกลือที่แตกต่างกันในน้ำจืดและน้ำเค็ม

#### งานที่จะทำต่อไป

1. ปรับปรุงสภาวะของราชนิตใหม่ที่สร้างสารต้านจุลชีพได้ดี เพื่อให้สามารถผลิตสารปริมาณมากเชิงพาณิชย์ รวมถึงศึกษาความปลอดภัยในการนำไปใช้งาน
2. การทำบริสุทธิ์สารต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพดี เพื่อการศึกษาโครงสร้างสาร ประสิทธิภาพ และกลไกในการต้านจุลินทรีย์ของสารที่รานาเกลือผลิต

## เอกสารอ้างอิง

- การทำนาเกลือ. (ม.ป.ป.). ใน *คลังปัญญาไทย*. วันที่ค้นข้อมูล 1 พฤศจิกายน 2554, เข้าถึงได้จาก <http://www.panyathai.or.th/wiki/index.php/การทำนาเกลือ>
- การทำนาเกลือ. (2553). ใน *ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล*, วันที่ค้นข้อมูล 1 มีนาคม 2555, เข้าถึงได้จาก <http://www.mkh.in.th/index.php/2010-03-22-18-05-14/2010-03-26-05-53-43>
- กรมอุตุนิยมวิทยา. (2558). วันที่ค้นข้อมูล 7 มิถุนายน 2558, เข้าถึงได้จาก <http://www.tmd.go.th/>
- สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2551). *ตำราวิชาการจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม วงศ์ไมโครคอคเคซีอีและสเตรปโตคอคเคซีอี*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อภิรดี ปลั้นชนภาคย์. (2554). การถ่ายทอดยีนโดยกระบวนการคอนจูเกชันในแบคทีเรียแกรมลบ. ใน *วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด (บรรณาธิการ). หนังสือชุดเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคด้านจุลชีววิทยาชีวเคมี และพันธุวิศวกรรม*. (หน้า 156-162). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.
- <http://www.mkh.in.th/index.php/2010-03-22-18-05-14/2010-03-26-05-53-43>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (National Center for Biotechnology Information).
- Abdullah, H. and Zafrul, A.T.M. (2010). In vitro antibacterial, cytotoxic and free radical scavenging activities of an *Aspergillus* species. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*. 13, 47-50.
- Ahmad, K., Scheneider, H.A. and Strong, F.M. (1950). Studies on the biological action of antimycin. *Architecture Biochemistry*. 28, 281-294.
- Ali, I., Siwarungson, N., Punnapayak, H., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Bankeeree, W. and 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.

- Arunpanichlert, J., Rukachaisirikul, V., Tadpetch, K., Phongpaichit, S., Hutadilok-Towatana, N., Supaphon, O. and Sakayaroj, J. (2012). A dimeric chromanone and a phthalide: Metabolites from the seagrass-derived fungus *Bipolaris* sp. PSU-ES64. *Phytochemistry Letters*. 5, 604–608.
- Atkins, S.D. and Clark, I.M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics*. 45, 3-15.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (2006). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4<sup>th</sup> ed.), St. Paul Minnesota, The APS Press.
- Behal, V. (2003). Alternative sources of biologically active substances. *Folia Microbiologica*. 48, 563-571.
- Bernan, V.S., Greenstein, M. and Maise, W.M. (1997). Marine microorganisms as a source of new natural products. *Advance in Applied Microbiology*. 43, 57-90.
- Brock, T.D. (1979). Ecology of saline lake. In M. Shilo (Eds.), *Strategies of microbial life in extreme environment*. (pp. 29-49). Berlin, Dahlem Konferenzen.
- Buchalo, A.S., Nevo, E., Wasser, S.P., Oren, A. and Molitoris, H.P. (1998). Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea first records. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*. 265, 1461-1465.
- Cantrell, S.A., Casillas-Martinez, L. and Molina, M. (2006). Characterization of fungi from Hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological Research*. 110, 962–970.
- Cantrell, S.A., Dianese, J.C., Fell, J., Gunde-Cimerman, N. and Zalar, P. (2011). Unusual fungal niches. *Mycologia*. 103, 1161-1174.
- Cavallito, C.J., Bailey, J.H., Haskell, T.H., McComick, J.R. and Warner, W.F. (1945). The inactivation of antibacterial agents and their mechanism of action. *Journal of Bacteriology*. 50, 61-69.
- Chatchawan, T., Peerapornpisal, Y. and Komarek, J. (2011). Diversity of cyanobacteria in man-made solar saltern, Petchaburi Province, Thailand. *Fottea*. 11, 203–214.



- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2004). Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: Approved Guideline, M44-A- First Edition. CLSI document M44-A. CLSI. Wayne, Pennsylvania.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Reference method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Seventh Edition. document M7-A7. CLSI. Wayne, Pennsylvania.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). 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.
- da Cunha, K.C., Sutton, D. A., Fothergill, A.W., Cano, J., Gené, J., Madrid, H., De Hoog, S., Crous, P.W. and Guarro, J. (2012). Diversity of *Bipolaris* species in clinical samples in the United States and their antifungal susceptibility profiles. *Journal of Clinical Microbiology*. 5, 4061-4066.
- Dassarma S. and Arora, P. (2001). Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1, 1.
- Dix, N.J. and Webster, J. (1995). *Fungal Ecology*. London, Chapman & Hall.
- Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology*. 49, 1-173.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2002). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Missouri, Elsevier Science.
- Gonsalves, V., Nayak, S. and Nazareth, S. (2012). Halophilic fungi in a polyhaline estuarine habitat. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 3, 30-36

- Good, L. and Nielsen, P.E. (1998). Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95, 2073-2076.
- Greetchen, M.D. (2006). Fungal diversity present at a hypersaline environment in Cabo Rojo, Puerto Rico determine by characterization of isolates and analysis of environmental rRNA genes clone libraries. Thesis Master of Science in Biology. University of Puerto Rico Mayaguez Campus. Puerto Rico.
- Grishkan, I., Nevo, E. and Wasser, S.P. (2003). Soil Micromycete diversity in the hypersaline Dead Sea coastal area, Israel. *Mycological Progress*. 2, 19-28.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., De Hoog, S. and Plemenitas, A. (2000). Hypersaline waters in salterns natural ecological niches for halophilic black yeasts. *Federation of European Microbiology Societies Microbiology Ecology*. 32, 235-240.
- Gunde-Cimerman, N., Frisvad, J.C., Zalar, P. and Plemenitas, A. (2005). Halotolerant and halophilic fungi. In: S.K. Deshmukh and M.K. Rai (Eds.), *The biodiversity of fungi: Their role in human life*. (pp. 69-127). New Delhi, Oxford and IBH Publishing Cp Pvt. Ltd.
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., and Plemenita, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*. 113, 1231-1241.
- Gunde-Cimerman, N. and Zalar. P. (2014). Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine. *Journal of Biotechnology*. 52, 170-179.
- Hamburger, M.O and Cordell, G A. (1987). A direct bioautographic tlc assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*. 50, 19-22.
- Hyde, K.D. (2001). Increasing the likelihood of novel compound discovery from filamentous fungi. In S. B. Pointing & K. D. Hyde (Eds.), *Fungal Diversity Research Series 6*, (pp.77-91). Hong Kong, Fungal Diversity Press.

- Ireland, C.M., Roll, D.M., Molinski, T.F., McKee, T.C., Zabriskie, T.M. and Swersey, J.C. (1988). Uniqueness of the marine chemical environment, categories of marine natural products from invertebrates. *Biomedical Important of Marine Organism*. 13, 1-43.
- Ireland, C.M., Copp, B.R., Foster, M.P., McDonald, L.A., Radisky, D.C. and Swersey, J.C. (1993). Biomedical importance of marine natural products, *In* D.H. Attaway and O.R. Zaborsky (Eds.), *Marine Biotechnology*. (pp. 1-43). New York, Plenum Press.
- Jois, H. R., Sarkar, A. and Gurusiddaiah, S. (1986). Antifungal macrodiolide from *Streptomyces* sp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 30, 458-464.
- Joklik, W.K., Willett, H.P., Amos, B. and Wilfert, C.M. (1988). *Zinsser Microbiology*. Sydney, Prentice-Hall International.
- Klich, M.A. (2002). Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*. 94, 21-27.
- Kobayashi, J. and Ishibashi, M. (1993). Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Cheminform*. 93, 1753-1769.
- Kock, N. (1998). Can communication medium limitation foster better group outcome: an action research study. *Information & Management*. 34, 295-305.
- Kurtboke, I. and Swings, J. (2004). Microbial genetic resources and biodiscovery. Australia, Queensland Complete Printing Services.
- Lu, Z.Y., Wang, W.L., Tao, H.W., Zhu, T.J., Fang, Y.C., Gu, Q.Q. and Zhu, M. (2008). Citrinin dimers from the halotolerant fungus *Penicillium citrinum* B-57. *Journal of Natural Products*. 71, 543-546.
- Margesin, R. and Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 5, 73-83.
- Mathan, S., Subramanian, V. and Nagamony, S. (2013). Optimization and antimicrobial metabolic production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297. *European Journal of Experimental Biology*. 3,138-144.

- Mavor, A.L., Thewes, S. and Hube, B. (2005). Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current Drug Targets*. 6, 863–874.
- Meenupriya, J., Majumdar, Atlanta, Jenifer, Antojasmine and Thanaraj, M. (2011). Biochemical analysis and structure elucidation of  $\alpha$ -Campholene aldehyde from marine sponge-derived *Aspergillus terreus* MP. *Der Pharma Chemica*. 3, 466-473.
- Nomilar Merlin, J., Nimal Christudas, I.V.S., Praveen Kumar, P. and Agastian, P. (2013). Optimization of growth and bioactive metabolite production: *Fusarium solani*. *Asian Journal of Phamaceutical and Clinical Research*. 6, suppl 3, 98-103.
- Nakajima, H. (1998). Structures and biosyntheses of phytotoxins in *Cochliobolus spicifer* and *Bipolaris sorokiniana*: C<sub>3</sub> unit addition reaction in phytotoxin biosyntheses. In K. Kohmoto and O.C. Yodar (Eds.), *Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Disease, Proceedings of the 3rd Tottori International Symposium on Host-Specific Toxins, Daisen, Tottori, Japan, August 24-29, 1997*.
- Nanninga, N. (1988). Growth and form in microorganisms: morphogenesis of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*. 34, 381-389.
- Nayak, S.S., Gonsalve, V. and Nazareth, S.W. (2012). Isolation and salt tolerance of halophillic fungi from mangroves and solar saltern in Gao-India. *India Journal of Geo-Marine Science*. 42, 164-172.
- Odds, F.C., Gow, N.A.R. and Brown A.J.P. (2006). Toward a molecular understanding of *Candida albicans* virulence. In J., Heitman, S. G., Filler, J. E. Jr., Edwards and A. P., Mitchell, (Eds.), *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis*. (pp. 305–319). Washington DC, APS Press.
- Phongpaichit, S., Nikom, J., Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., Hutadilok-Towatana, N., Rukachaisirikul, V., and Kirtikara, K. (2007). Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. *Federation of European Microbiological Societies Immunology Medical Microbiology*. 51, 517-525.

- Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj J. (2006). Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology*. 48, 367-372.
- Ravindran, C., Naveenan, T., Varatharajan, G. R., Rajasabapathy, R., Vijayakanth, S., Kumar, A. and Meena R.M. (2012). A role for antioxidants in acclimation of marine derived pathogenic fungus (NIOCC1) to salt stress. *Microbial Pathogenesis*. 53, 168-179.
- Reith, J. and Mayer, C. (2011). Peptidoglycan turnover and recycling in gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 92, 1-11.
- Repentigny, L.D. (2010). Serodiagnosis of *Candidiasis*, *Aspergillosis*, and *Cryptococcosis*. *Oxford Journals*. 14, 11-22.
- Romos, M.V., Bandeira, G.P., Freitas, C.D.T., Nogueira, N.A.P., Alencar N.M.N., Sousa, A.S. and Carvalho, A.F.U. (2006). Latex constituents from *Calotropis procera* (R.Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101, 503-510.
- Ronsberg, D., Debbab, A., Mandi, A., Wray, V., Dai, H., Kurtan, T., Proksch, P. and Aly, A.H. (2013). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*. *Tetrahedron Letters*. 54, 3256-3259.
- Sadeghi, A.M.M., Dorkoosh, F.A., Avadi, M.R., Saadat, P., Rafiee-Tehrani, M. and Junginger, H.E. (2008). Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. *International Journal of Pharmaceutics*. 355, 299-306.
- Saha, S., Sarkar, J., Chattopadhyay, D., Patra, S., Chakraborty, A. and Acharya, K. (2010). Production of silver nanoparticles by a phytopathogenic fungus *Bipolaris nodulosa* and its antimicrobial activity. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 5, 887-895.

- Sepcic, K., Zalar, P. and Gunde-Cimerman, N. (2011). Low Water Activity Induces the production of bioactive metabolites in halophilic and halotolerant fungi. Department of Biology, *Biotechnical Faculty*, University of Ljubljana.
- Swathi, J., Sowjanya, K.M., Narendra, K., Rathnakar Reddy, K.V.N. and Krishna Sadya, A. (2013). Isolation, identification and production of bioactive metabolites from marine fungi collected from coastal area of Andhra Pradesh, India. *Journal of Pharmacy Research*. 6, 663-666.
- Thompson, L., Castrillon, M. A., Delgado, M. and Garcia, M. (1994). Isolation of several species of the genus *Aspergillus* from soil of intrahospital ornamental plants. *Revista Medica de Chile*. 122, 1367-1371.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itavaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresour and Technology*. 72, 169-183.
- Walsh, F.M. and Amyes, S.G.B. (2004). Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Microbiology*. 7, 439-444.
- Wang, Y.N., Shao, C.L., Zheng, C.J., Chen, Y.Y. and Wang, C.Y. (2011). Diversity and antibacterial activities of fungi derived from the Gorgonian *Echinogorgia rebekka* from the South China Sea. *Marine Drugs*. 9, 1379-1390.
- White T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). *PCR Protocols: A guide to methods and applications: applications: and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. New York, Academic Press.
- Yao, Q., Wang, J., Zhang, X., Nong, X., Xu, X. and Qi, S (2014). Cytotoxic polyketides from the deep-sea-derived fungus *Engyodontium album* DFFSCS021. *Marine Drugs*. 12, 5905-5915.
- Zhu, F., Chen, G., Chen, X., Huang, M. and 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 ก

### สารละลาย

#### สารเคมี

##### 0.5 McFarland Standard (Barry, 1985)

1% Barium chloride                      0.05    ml

1% Sulfuric acid                         9.95    ml

\*\* ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน เก็บในที่มืด

จำนวนเซลล์แบคทีเรียและยีสต์ คือ  $1 \times 10^8$  และ  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

##### 50% Dimethylsulfoxide (DMSO)

Dimethylsulfoxide (DMSO)            50       ml

Distilled water                            50       ml

##### น้ำยาทดสอบและสีย้อม Lactophenol

Lactic acid                                 20.0    ml

Phenol หลอมเหลว                        20.0    ml

Glycerol                                    40       ml

น้ำกลั่น                                      20       ml

วิธีเตรียม เติม phenol ลงในส่วนผสมของ Lactic acid, Glycerol และน้ำกลั่น นำไปอุ่นให้ละลาย กวนให้เข้ากัน

ภาคผนวก ข

การควบคุมคุณภาพระบบทดสอบการยับยั้งเชื้อ

ตารางที่ 34 การยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ควบคุมด้วยแผ่นดิสก์ยามาตรฐาน

จุลินทรีย์	เส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (มิลลิเมตร)			อ้างอิง
	Ampicillin (10 µg/disk)	Gentamycin (10 µg/disk)	Fluconazole (25 µg/disk)	
<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, 2008

ตารางที่ 35 การทดสอบระบบหาความเข้มข้นต่ำสุดควบคุมด้วยยามาตรฐาน

จุลินทรีย์	Minimum Inhibitory Concentration (MIC)			อ้างอิง
	Ampicillin (10 µg/mL)	Gentamycin (10 µg/mL)	Fluconazole (25 µg/mL)	
<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>S. aureus</i> ATCC 25923	0.5-2	0.12-1	-	CLSI, 2007
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	-	-	0.25-1.0	CLSI, 2002



**ภาคผนวก ก**  
**ขั้นตอนการเจือจางสารสกัด**

ตารางที่ 36 ขั้นตอนการเจือจางสารสกัด (ดัดแปลงจาก CLSI, 2012)

ขั้นตอน ที่	ความ เข้มข้น (ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร)	แหล่ง	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	+ ตัวทำ ละลาย (มิลลิลิตร) (DMSO)	= ความ เข้มข้นสาร (ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร)	= ความเข้มข้น สุดท้าย ที่ 1:100 (ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร)	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