บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผลการวิจัย

จากการคัดแยกราเอนโดไฟท์จากใบพืชชายเลนพบว่าขนาดใบพืชไม่เป็นปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนราเอนโดไฟท์ที่พบ จากการศึกษานี้ใบพืชชายเลนแต่ละชนิดที่มีขนาดใบแตกต่างกันมีอัตราการแยกราเอนโดไฟท์ที่ต่างกัน ตั้งแต่ 0.8 ไอโซเลทต่อใบถึง 3.36 ไอโซเลทต่อใบ ซึ่งในพืชหนึ่งชนิดมีรายงานการพบราเอนโดไฟท์ได้มากกว่าหนึ่งชนิดและในใบพืชบางชนิดสามารถแยกราเอนโดไฟท์ที่มีลักษณะเหมือนกันได้ (Arnold, Maymard, Gilbert, Coley, & Kursar, 2000) โดย Silva, Alimeida, Arruda, & Gusmão (2011) คัดแยกราเอนโดไฟท์จากใบพืชชายเลน *Laguncularia racemosa* ได้ทั้งหมด 70 สายพันธุ์ ขณะที่ Maria et al. (2005) พบราเอนโดไฟท์ *Aspergillus* sp. ได้ทั้งในพืชชายเลน *Acanthus ilicifolius* และ *Acrostichum aureum* เป็นต้น

ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากใบพืชชายเลน แต่ละสายพันธุ์มีสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ ได้แก่ การสร้างสปอร์และฟรุตบอดีที่แตกต่างกันและมีอัตราการสร้างช้าหรือเร็วต่างกัน ส่วนใหญ่ไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ที่ช่วยในการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา ในเบื้องต้นจึงจัดราดังกล่าวไว้ในกลุ่ม mycelia sterilia (Selim et al., 2012) ตามลักษณะโคโลนี และอัตราการเจริญ อย่างไรก็ตามหลังจากได้ทำการกระตุ้นรากลุ่ม mycelia sterilia ให้สร้างสปอร์โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2 สัปดาห์แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ พบว่ารา mycelia sterilia จำนวนหนึ่งมีการสร้างฟรุตบอดีบนโคโลนีและในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถจัดจำแนกราเป็นรา *Phomopsis* sp., *Phylosticta* sp. และ *Guignardia* sp. ได้เพิ่มขึ้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากเมื่ออุณหภูมิไม่เหมาะสมและปริมาณสารอาหารลดลงส่งผลให้ราอยู่ในสภาวะกดดัน จึงมีการสร้างสปอร์เพื่อความอยู่รอด ดังรายงานของ Morton (1961) กล่าวว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงและแหล่งสารอาหารเช่น ไนโตรเจนและคาร์บอน ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการกระตุ้นให้ราสร้างสปอร์ จากการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟท์ที่มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม coelomycete ราที่พบได้บ่อยได้แก่ *Collectotrichum* sp., *Phomopsis* sp. และ *Phyllosticta* sp. ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hodkinson & Parnell (2007) ที่พบราดังกล่าวได้ในกลุ่มพืชที่มีท่อลำเลียง (vascular plants)

มีรายงานกล่าวว่าเมื่อมีการเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกันจะเกิดกลไก antibiosis ร่วมกับภาวะแข่งขัน หรือภาวะปรสิตของจุลินทรีย์ (Abdel-Sater, 2001) การเกิดกลไก antibiosis จะมีการสร้างสารทุติยภูมิออกมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งสารทุติยภูมิแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ สารทุติยภูมิโมเลกุลเล็ก ได้แก่ สารปฏิชีวนะ และสารทุติยภูมิโมเลกุลใหญ่ ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ เปปไทด์ เอนไซม์ และอื่น ๆ (Zhang et al., 2009) สารทุติยภูมิมีผลกระทบต่อราสาเหตุโรคพืชโดยจะเข้าไปรบกวนโมเลกุลเป้าหมายในส่วนต่าง ๆ ของราสาเหตุโรคพืช เนื้อเยื่อและเซลล์ โดยเป้าหมายหลักประกอบด้วย เมมเบรน โปรตีน และกรดนิวคลีอิก (Sadananda et al., 2011, Ribera & Zuñiga, 2012) ดังนั้นการศึกษาความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วยวิธี dual culture จึงใช้การคัดกรองราเอนโดไฟท์ 2 ขั้นตอน เพื่อคัดเลือกกลุ่มราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป ในการศึกษาขั้นตอนแรกทำการคัดเลือกราเอนโดไฟท์เบื้องต้นโดยวางชิ้นวุ้นเส้นใยราเอนโดไฟท์ห่างจากราสาเหตุโรคพืช 2.5 เซนติเมตร พบว่าราเอนโดไฟท์ 80 ไอโซเลทจาก 150 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชได้มีระยะยับยั้ง (Inhibition distance: ID) มากกว่า 2 มิลลิเมตร เป็นการยับยั้งแบบ mutual inhibition ซึ่งเป็นปฏิสัมพันธ์ที่แรงกว่า slight mutual inhibition (Hashmi & Ghaffar, 2006) และน่าจะสอดคล้องกับปฏิสัมพันธ์โดยการหลั่งสารระยะไกลแบบ antibiosis (Dix & Webster, 1995) จากนั้นจึงเพิ่มระยะห่างระหว่างราเอนโดไฟท์และราสาเหตุโรคพืชเป็น 5 เซนติเมตร ตามวิธีของ Adebola & Amadi (2010), Dennis & Webster (1971), Ruano-Rosa, Moral-Navarrete, & Lopez-Herrera (2010) และ Zegeye, Santhanam, Gorfu, Tessera, & Kassa (2011) เพื่อคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพ

สารสกัดจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์แบบไม่เขย่าให้อากาศและแบบเขย่าให้อากาศบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงในสภาวะแบบเขย่าให้อากาศมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช แบคทีเรีย และยีสต์ดีกว่าสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงแบบไม่เขย่าให้อากาศ เนื่องจากการเลี้ยงแบบเขย่าให้อากาศทำให้เซลล์ของราเอนโดไฟท์ได้รับออกซิเจนที่เพียงพอและทั่วถึงกว่าแบบไม่เขย่าให้อากาศ ซึ่งออกซิเจนมีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตสารทุติยภูมิ (Shittu, Alofe, Onawunmi, Ogundaini, & Tiwalade, 2005; Shih, Tsai, & Hsieh, 2007) ในงานวิจัยได้เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหาร PDB ที่ระยะเวลา 7 วัน เนื่องจากเป็นช่วงที่รามีการเจริญอยู่ในระยะ stationary phase มีรายงานว่าในระยะนี้ราจะมีการผลิตสารทุติยภูมิออกมา (Robinson, Singh, & Nigan, 2001) ในการผลิตสารทุติยภูมิจะเริ่มต้นการผลิตเมื่อแหล่งสารอาหารที่

สำคัญเช่น คาร์บอน ไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัส ลดน้อยลง นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณและคุณภาพของสารทุติยภูมิประกอบด้วย อุณหภูมิ ค่าพีเอช องค์ประกอบของอาหาร ช่วงเวลาการบ่มเชื้อ และปริมาณออกซิเจน (Barrios-González & Mcjia, 1996) และในการเพาะเลี้ยงราแอนโดไฟท์ในงานวิจัยนี้ไม่ได้เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำทะเล เนื่องจากในขั้นการทดสอบร่วมกับราสาเหตุโรคพืช แบคทีเรียและยีสต์จะมีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ เพราะจุลินทรีย์เหล่านี้บางสายพันธุ์ไม่สามารถทนเกลือได้ที่ความเข้มข้นสูง จะเจริญได้ไม่ดีหรือไม่เจริญบนอาหารที่เติมน้ำทะเล จุลินทรีย์ที่ได้รับเกลือในความเข้มข้นสูงจะทำให้เซลล์เกิดภาวะ osmotic shock (Mudryk & Donderski, 1991)

เมื่อนำสารสกัดอาหารเลี้ยงราแอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในเกณฑ์ดี 10 ตัวอย่างมาศึกษาองค์ประกอบสารทางเคมีเบื้องต้นโดยวิธี thin-layer chromatography (TLC) เพื่อจะได้ทราบว่าสารสกัดแต่ละชนิดประกอบด้วยสารกี่ชนิด และทราบตำแหน่งสารได้โดยวัดค่า R_f ในการแยกองค์ประกอบสารสกัดมีการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน ตัวทำละลายที่จะนำมาใช้ในการเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่จะต้องมีคุณสมบัติในการแยกองค์ประกอบสารได้อย่างเหมาะสม ซึ่งขึ้นกับความมีขั้วของสาร (polarity) ที่ต้องการแยกและความมีขั้วของวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ความมีขั้วของสารในวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นตัวพาให้องค์ประกอบสารเคลื่อนที่ โดยตัวทำละลายที่มีความมีขั้วต่ำจะทำให้องค์ประกอบสารไม่เคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่น้อย และสารที่มีขั้วสูงจะพาองค์ประกอบสารเคลื่อนที่ได้ไกล หากต้องการลดการเคลื่อนที่ของสารหรือค่า R_f ลงต้องผสมสารที่มีความมีขั้วต่ำลงไป จะทำให้เห็นองค์ประกอบสารที่แยกกันชัดเจนขึ้น (Choma & Grzelak, 2010) ดังนั้นเมื่อผสมตัวทำละลายที่แตกต่างกันเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ก็จะสามารถแยกองค์ประกอบของสารสกัดได้แถบสารที่มีค่า R_f และสีของแถบสารต่างกัน จากรายงานการศึกษาราแอนโดไฟท์พบว่าสารก่อฤทธิ์ชีวภาพที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่มสาร alkaloids, aliphatic compound, flavonoids, isocoumarin, lactones, lignans, peptides, phenylpropanoids, phenols, quinones, steroids และ terpenoids (Yu et al., 2010; Zhou, Zhao, Shan, Cai, & Peng, 2010) ดังนั้นในงานวิจัยใช้ตัวทำละลายที่มีความมีขั้วต่ำถึงมีขั้วระดับกลาง 5 สาร ดังนี้ เฮกเซน โทลูอีน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และอะซีโตนในการแยกองค์ประกอบสาร สารสกัดเอทิลอะซิเตต เฮกเซนและเอทานอลจากอาหารเลี้ยงรา เนื่องจากคาดว่าสารสกัดจะจัดอยู่ในกลุ่มสารก่อฤทธิ์ชีวภาพดังกล่าว

เมื่อแยกองค์ประกอบสารทางเคมีได้แล้วได้นำแผ่น TLC แถบสารมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี autobioassay เพื่อศึกษาว่าแถบสารใดมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่าแถบสารสกัดทั้ง 10 ตัวอย่างไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช แบคทีเรียบางสายพันธุ์ และยีสต์ แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. cereus* TISTR 121 การที่แถบสารสกัดจากอาหาร

เลี้ยงราไม่ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช แบคทีเรียบางสายพันธุ์ และยีสต์ที่เคยมีการยับยั้งในในการทดสอบสารสกัดโดยวิธี disc diffusion อาจเป็นเพราะปริมาตรสารที่ใช้จุดบนแผ่น TLC ปริมาตร 2-5 ไมโครลิตรนั้นน้อยเกินไปเมื่อนำไปวางบนอาหาร PDA ทำให้ความเข้มข้นสารที่แพร่ลงในอาหารเจือจางลง ส่งผลให้แถบสารไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าวได้ อีกทั้งความสามารถในการแพร่ของสารแต่ละชนิดลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อย่อมมีผลต่อการแสดงฤทธิ์ของสาร หากสารชนิดใดมีการดูดซับสูงบนแผ่น TLC จะไม่สามารถแพร่ผ่านเข้าสู่อาหารและไปออกฤทธิ์ต่อเชื้อได้ (Choma & Grzelak, 2010; Bhawani, Sulaiman, Hashim, & Mohamad, 2010) ผลของฤทธิ์ที่ปรากฏจึงน้อยกว่าความเป็นจริง

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารก่อฤทธิ์ชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากใบพืชชายเลน สรุปได้ว่า

1. คัดแยกราเอนโดไฟท์ 150 ไอโซเลทจากใบพืชชายเลน 13 ชนิดจากจังหวัดจันทบุรี ชลบุรี และฉะเชิงเทรา จำนวน 75 ใบ มีอัตราการแยกราเอนโดไฟท์เฉลี่ย 2 ไอโซเลทต่อใบ

2. ราเอนโดไฟท์ 23 ไอโซเลทมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Alternaria brassicicola* DOAC 0436, *Colletotrichum capsici* DOAC 1511, *C. gloeosporioides* DOAC 0782, *F. oxysporum* DOAC 1808 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 ได้ในเกณฑ์ปานกลางที่ค่าร้อยละ 31.11±1.92 ถึง 45.0+5.0 เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture

3. ราเอนโดไฟท์ BUEN 914 mycelia sterilia 33 สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides DOAC* 0782 และ *F. oxysporum* DOAC 1808 ได้ดีที่สุด และราเอนโดไฟท์ BUEN 878 mycelia sterilia 16 สามารถยับยั้ง *A. brassicicola DOAC 0436*, *C. capsici* DOAC 1511 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 ได้ดีที่สุด

4. สารสกัดเอทิลอะซิเตต เฮกเซน และเอทานอลจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงในสภาวะแบบเขย่าให้อากาศควบคุมอุณหภูมิมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าที่เลี้ยงแบบไม่เขย่าให้อากาศ โดยเฉพาะฤทธิ์ของสารสกัดเอทิลอะซิเตต และเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ได้ในเกณฑ์ปานกลางถึงดี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 10.0±0.0 มิลลิเมตรถึง 26.33±0.58 มิลลิเมตร และ 11.0±1.0 มิลลิเมตรถึง 28.0±0.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ

5. สารสกัดเอทานอลจากอาหารเลี้ยงรา BUEN 938 mycelia sterilia 35 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028 ดีที่สุด สารสกัดเอทานอลจากอาหารเลี้ยงรา BUEN 950 mycelia sterilia 42 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S.* Typhimurium ATCC 13311 และ *E. coli* ATCC 25922 ดีที่สุด และสารสกัดเอทานอลจากอาหารเลี้ยงรา BUEN 976 *F. oxysporum* มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* TISTR 121 ได้ดีที่สุดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 22.33 ± 0.58 มิลลิเมตร

6. แถบสารสกัดเอทิลอะซิเตตและเอทานอลจากอาหารเลี้ยงรา BUEN 976 *F. oxysporum* ที่ค่า R_f 0.0-0.56 และแถบสารสกัดเอทานอลจากอาหารเลี้ยงรา BUEN 914 Mycelia sterilia 33 ที่ค่า R_f 0.0-0.08 มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. cereus* TISTR 121 แถบสารสกัดเอทิลอะซิเตตและเอทานอลจากอาหารเลี้ยงรา BUEN 950 Mycelia sterilia 42 ที่ค่า R_f 0.84 มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* TISTR 121

ข้อแนะนำ

ควรมีการ optimize จำนวนวันและสภาวะในการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเป็นข้อมูลในคัดเลือกจำนวนวันและสภาวะในการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่เหมาะสมที่สามารถสร้างสารชีวภาพได้มีประสิทธิภาพที่สุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University