บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ราทะเลในระบบนิเวศป่าชายเลน

ป่าชายเลนเป็นทรัพยากรที่พบได้ในแถบประเทศเขตร้อน และกึ่งเขตร้อน (Macintosh & Ashton, 2000; Kathiresan & Bingham, 2001) พบได้ทั่วไปตามพื้นที่ชายฝั่งทะเล บริเวณปากแม่น้ำ ชายฝั่งทะเล อ่าว ทะเลสาบ และเกาะ ซึ่งเป็นบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึง (Banerjee, 2011) มักจะพบป่าชายเลนที่มีความอุดมสมบูรณ์ในกลุ่มประเทศภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย พม่า รวมถึงประเทศไทย (Giri et al., 2011; Donato et al., 2011)

ป่าชายเลนเป็นพื้นที่วิกฤตทางความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity hotspots) ของราทะเล (Shearer et al., 2007) ซึ่งราทะเลจากป่าชายเลนเป็นกลุ่มราขนาดใหญ่อันดับที่สอง ในกลุ่มของราทะเล (Sridhar, 2004) ในประเทศไทยมีการศึกษาราทะเลครั้งแรกในปี ค.ศ. 1984 (Kohlmeyer, 1984) ปัจจุบันมีรายงานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพ และนิเวศวิทยาของราทะเลในประเทศไทยมากขึ้น จากการสำรวจบริเวณหาดทราย ชายฝั่งทะเล ป่าชายเลน และป่าจาก (Pilantanapak, Jons, & Eaton, 2005; Jones et al., 2006; Sakayaroj, Supaphon, Jones, & Phongpaichit, 2011)

1.1 ราทะเล

Kohlmeyer and Kohlmeyer (1979) แบ่งราทะเลเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ Obligate marine fungi เป็นราที่สามารถเจริญ และสร้างสปอร์ได้เฉพาะในน้ำทะเล และเขตน้ำกร่อย ราทะเลกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นราชั้นสูงในกลุ่ม Ascomycota, Basidiomycota รวมถึงรูป Anamorphic fungi (Sakayaroj et al., 2004) Facultative marine fungi เป็นราน้ำจืด หรือราในสิ่งแวดล้อมบนบกที่สามารถเจริญหรือ สร้างสปอร์ได้ในสภาวะแวดล้อมทางทะเล (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979) ส่วนใหญ่อยู่ในรูป Anamorphic fungi ปัจจุบันนิยมเรียกราทั้งสองกลุ่มนี้รวมกันว่า Marine-derived fungi (Bugni & Ireland, 2004)

สามารถพบราทะเลได้ทั่วไปทั้งในน้ำทะเล หาดทราย หาดโคลน หรือป่าชายเลน มักยึดเกาะกับซับสเตรตต่าง ๆ ส่วนใหญ่ เช่น ใบไม้ เนื้อไม้ หญ้าทะเล ปะการัง ดิน ทราย หรือในสัตว์ที่มีกระดองแข็งหรือเปลือกแข็งหุ้ม (Kohlemeyer & Kohlemeyer, 1979; Hyde & Alias, 2000; Tsui & Hyde, 2004; Vrijmoed, 2000) เศษไม้ (Renner, Jensen, & Fenical, 1998; Schlingmann, Milne, Williams, & Carter, 1998) ราก ผล เมล็ดของพืชที่ขึ้นบริเวณป่าชายเลน (Sakayaroj et al., 2004) ไลเคน (Hawksworth, 2000; Kohlmeyer, Hawksworth, & Volkmann- Kohlmeyer, 2004)

สัตว์ทะเล เช่น ปลา หอย และปู (Liu et al., 2006; Jones & Pang, 2012) และสาหร่ายทะเล (Barata, 2006; Suryanarayanan et al., 2010)

Schmit and Shearer (2003) รายงานจำนวนราจากป่าชายเลนทั้งหมด 625 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้นับรวมสายพันธุ์ที่พบจากตัวอย่างดิน โคลน และพืชป่าชายเลน และเมื่อไม่นานมานี้ Jones, Sakayaroj, Suetrong, Somrithipol, and Pang (2009) รายงานจำนวนราทะเลชั้นสูงที่พบในป่าชายเลนจำนวน 530 สายพันธุ์ ส่วนข้อมูลราทะเลในประเทศไทย พบราทะเล 154 สายพันธุ์ เป็นราในกลุ่ม Ascomycota 116 สายพันธุ์ Basidiomycota 3 สายพันธุ์ Anamorphic fungi 28 สายพันธุ์ และ Straminopiles 7 สายพันธุ์ (Jones et al., 2006)

1.2 ราเอนโดไฟท์ และราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน

ราเอนโดไฟท์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่สมบูรณ์ แต่ไม่ทำให้พืชเกิดโรค เมื่ออาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชจะเจริญโดยการแทรกเส้นใยไปในเซลล์ หรือระหว่างเซลล์พืชใช้สารอาหารจากพืชที่อยู่อาศัย (Strobel & Long, 1998) สามารถพบราเอนโดไฟท์ได้ในพืชทุกชนิดรวมถึง มอส และไลเคน (Li, Zhou, Guo, & Guo, 2007; U'Ren, Lutzoni, Miadlikowska, & Arnold, 2010) อาจพบการอาศัยในช่วงหนึ่งของวงชีวิต หรือตลอดวงชีวิตในลักษณะพึ่งพาอาศัยกัน (Tanaka et al., 2002; Arun & Sridhar, 2006) ซึ่งพืชจะปกป้องราจากภาวะไม่เหมาะสมต่าง ๆ ส่วนราเอนโดไฟท์จะสร้างสารออกฤทธิ์บางชนิดที่เป็นประโยชน์แก่พืช (Carroll, 1988) ราเอนโดไฟท์ที่พบส่วนใหญ่เป็นราในกลุ่ม Ascomycota, Basidiomycota และ Anamorphic fungi (Carroll, 1988; Stone, Bacon, & White, 2000; Rungjindamai, Pinruan, Choeyklin, Hattori, & Jones, 2008) และส่วนน้อยเป็น Oomycota (Park et al., 2003)

ราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนเป็นราทะเลกลุ่มหนึ่งที่มีผู้ศึกษากันมาก รายงานที่กล่าวถึงส่วนใหญ่จะอยู่แถบประเทศเขตร้อน และกึ่งเขตร้อน เนื่องจากมีทรัพยากรป่าชายเลนเป็นจำนวนมาก มีการศึกษาราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนชนิดต่าง ๆ (Kumaresan & Suryanarayanan, 2001; Ananda & Sridhar, 2002; Yang et al., 2006b; Alias, Zainuddin, & Jones, 2010) ได้แก่ โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata* Poir) (Xu et al., 2009b; Bhimba et al., 2011) โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata* Blume) (Rukachaisirikul et al., 2011) รังกะแท้ (*Kandelia candel* (L.) Druce) (Huang et al., 2007; Chen et al., 2003a; Wen et al., 2009) เล็บมือนาง (*Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco) (Huang et al., 2011a; Zhang et al., 2011) แสมขาว (*Avicennia alba* Blume) แสมดำ (*A. officinalis* L.) พังกาหัวสุมดอกแดง (*Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Savigny) ถั่วดำ (*B. parviflora* Wight & Arn. ex Griff.) ฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea* Voigt) ลำพู (*Sonneratia caseolaris* (L.) Engl.) สึง้ำ

(*Scyphiphora hydrophyllacea* Gaertn. f.) ตะบูนขาว (*Xylocarpus granatum* Koen.) ตะบูนดำ (*X. Moluccensis* Roem.) (Rukachaisirikul et al., 2011)

2. โรคพืช และราสาเหตุโรคพืช

โรคพืช หมายถึง การที่พืชมีความผิดปกติทางด้านสรีรวิทยา ส่งผลให้พืชนั้นมีโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไป โดยจะแสดงอาการบริเวณรอยโรค (Dickinson, 2003) ทำให้พืชเกิดความเสียหาย ส่งผลให้มูลค่าทางเศรษฐกิจของผลผลิตลดลง สาเหตุของโรคพืชเกิดจากปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ สภาพของดิน สภาพของอากาศ มลพิษในอากาศ สารเคมีที่ใช้ การขาดหรือได้รับธาตุอาหารมากเกินไป ปัจจัยทางชีวภาพเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้พืชเกิดโรค มีรายงานสิ่งมีชีวิต 11 กลุ่ม เป็นสาเหตุของโรค ได้แก่ พืชดอกที่เป็นปรสิต (Parasitic angiosperm) สาหร่าย (Algae) หนอนตัวกลม (Nematodes) ไฟโตพลาสมา (Phytoplasma) โอโอไมซีส (Oomycetes) โปรโตซัว (Trypanosomatid) พลาสโมดิโอฟอร์โรไมซีส (Plasmodiophoromycetes) แบคทีเรีย (Bacteria) รา (Fungi) ไวรัส (Virus) และไวรอยด์ (Viroid) (Strange, 2003) การบุกรุกของจุลินทรีย์โรคพืชจะมีการสร้างเอนไซม์ หรือสารพิษที่ทำให้องค์ประกอบของผนังเซลล์พืชสลายตัว (Omokolo, Nankeu, Niemenak, & Boudjeko, 2003) หรือเมื่อเป็นโรคแล้วสามารถระบาดไปสู่ต้นอื่นได้ (Infection disease) โรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตมักสร้างความเสียหายกับพืชได้มาก และรุนแรง อีกทั้งยังต้องเสียค่าใช้จ่ายในการควบคุมโรคสูงกว่าโรคพืชที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต การใช้วิธีการต่าง ๆ ในการป้องกัน หรือลดการเกิดโรคทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น และเกิดการตกค้างของสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และสภาพแวดล้อมอีกด้วย (Muto, Takahashi, Ishihara, Yuasa, & Huang, 2005)

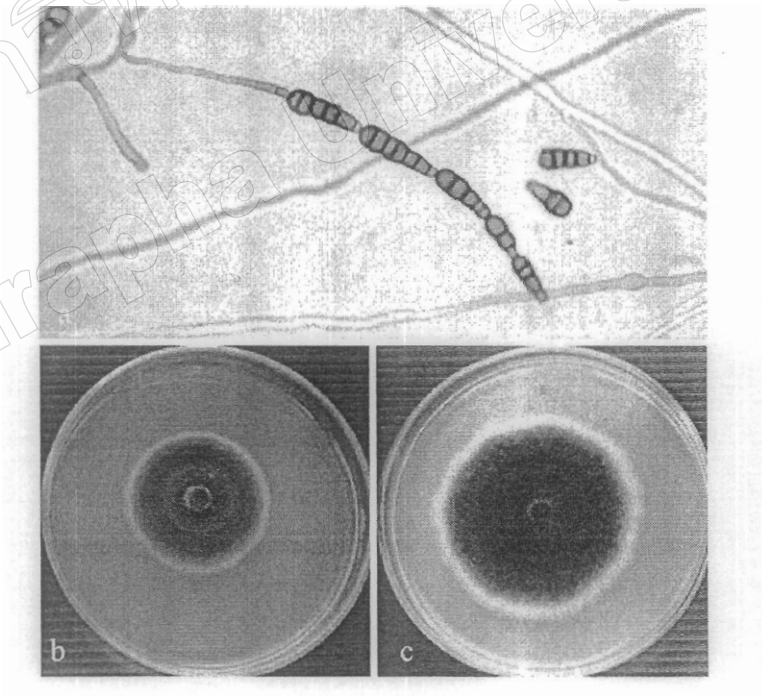
ราเป็นสาเหตุหลักของอาการผิดปกติในพืชที่พบบ่อย (Rossman & Palm, 2008) ได้แก่ อาการแผลจุด (Spots) อาการไหม้ (Blight) อาการเน่า (Rot) อาการเหี่ยว (Wilt) อาการราน้ำค้าง (Downy mildew) อาการแป้ง (Powdery mildew) อาการแอนแทรคโนส (Anthracnose) อาการราสนิม (Rust) อาการราเขม่าดำ (Smut) อาการเน่าคอดิน (Damping-off) อาการยอดแห้งตาย (Die-back) สามารถจัดจำแนกราสาเหตุโรคพืชได้เป็น 8 ไฟลัม ได้แก่ Myxomycota, Plasmodiophoromycota, Oomycota, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota รวมถึงรากลุ่ม Anamorphic fungi (Strange, 2003)

ในประเทศไทยมีราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดที่เป็นปัญหาสำคัญทางเศรษฐกิจรวมถึง *A. brassicicola, C. gloeosporioides, F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งเป็นราทดสอบในการศึกษานี้ ราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบสร้างความเสียหายให้พืชได้แตกต่างกันดังนี้

2.1 *Alternaria brassicicola*

เป็นสาเหตุของโรคใบจุดสีดำ (Black spot) ของผักตระกูลกะหล่ำ และผักกาดต่าง ๆ ทำให้ใบพืชเกิดจุดสีดำ (Chen, Price, & Park-Ng, 2003b; Muto et al., 2005) ทำลายพืชเป้าหมายโดยการสร้างสารพิษ เช่น Brassicicenes, Fusicoccane-like หรือ Diterpenoid (MacKinnon, Keifer, & William, 1999) กลไกการเข้าทำลายมี 2 กลไก กลไกแรกสารพิษที่ผลิตจะทำลายเนื้อเยื่อพืชบางส่วน (Necrosis) กลไกที่สองสารพิษจะส่งผลให้เซลล์ตาย (Apoptosis) (Lawrence et al., 2008) นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคโคนเน่าระดับดิน โดยจะติดไปกับเมล็ดพันธุ์เมื่อเพาะเมล็ดทำให้ราเข้าทำลายต้นอ่อนของพืชตระกูลกะหล่ำ (Shresta, Mathur, & Munk, 2000; Köhl & Wolf, 2005)

ลักษณะทางสัณฐานของ *A. brassicicola* DOAC 0436 (ภาพที่ 2-1) Conidia มีสีน้ำตาลดำ มีรูปร่างคล้ายกระสวย ท้ายป้าน Conidia เกิดต่อกันเป็นลูกโซ่ Conidiophore ยาว 23-84 ไมโครเมตร Conidia มีผนังกั้นตามยาวตั้งแต่ 0-4 เซลล์ และผนังกั้น ตามขวาง 2-9 เซลล์ Conidia มีขนาดประมาณ 4-9 x 20-60 ไมโครเมตร

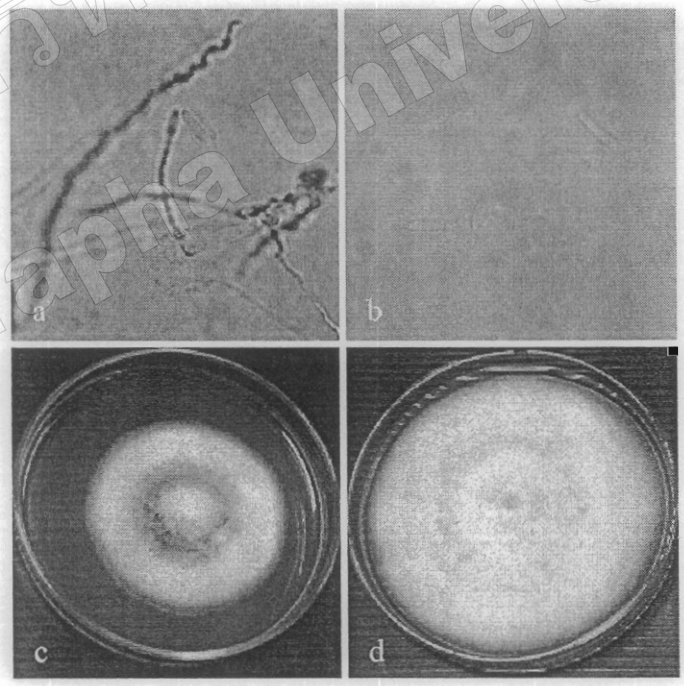


ภาพที่ 2-1 ลักษณะทางสัณฐานของ *A. brassicicola* DOAC 0436 ก่อโรคใบจุดสีดำในคะน้า; a: Conidia สายยาวบน Conidiophore, b: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น อายุ 7 วัน, c: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt อายุ 7 วัน

2.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ซึ่งเป็นปัญหากับทุกส่วนของต้นพืช ได้แก่ ต้นกล้า ยอดอ่อน ช่อดอก ใบ ดอก ผลอ่อน ผลแก่ รวมถึงเป็นปัญหากับผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว (Post-harvest) มากกว่าผลผลิตระหว่างการเก็บเกี่ยว (Johnson, Cooke, & Mead, 1993) ตัวอย่างพืชที่ประสบปัญหา เช่น มะม่วง (Sangeetha & Rawal, 2008; Gupta et al., 2010) มะละกอ (Banos, Lopez, Monola, & Wilson, 2003) พริก (Gopinath et al., 2006; Than et al., 2008) บางครั้งความเสียหายสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของผลิตผลที่ส่งออก (Kader, 2002) รอยโรคที่พบเป็นแผลกลมรีขนาด 1-2 เซนติเมตร เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบตัวเป็นแอ่ง และพบ Acervurus ซ้อนกันบริเวณแผล (Abd-Alla, El-Mohamedy, & Badeaa, 2006)

ลักษณะทางสัณฐานของ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 (ภาพที่ 2-2) พบ Conidia รูปร่างทรงกระบอก หัวท้ายมน (Cylindrical) ไม่มีสี ส่วนใหญ่ไม่มีผนังกั้นตามขวาง อาจพบผนังกั้นตามขวาง 1 เซลล์ Conidia มีขนาด 9-24 x 3-4.5 ไมโครเมตร



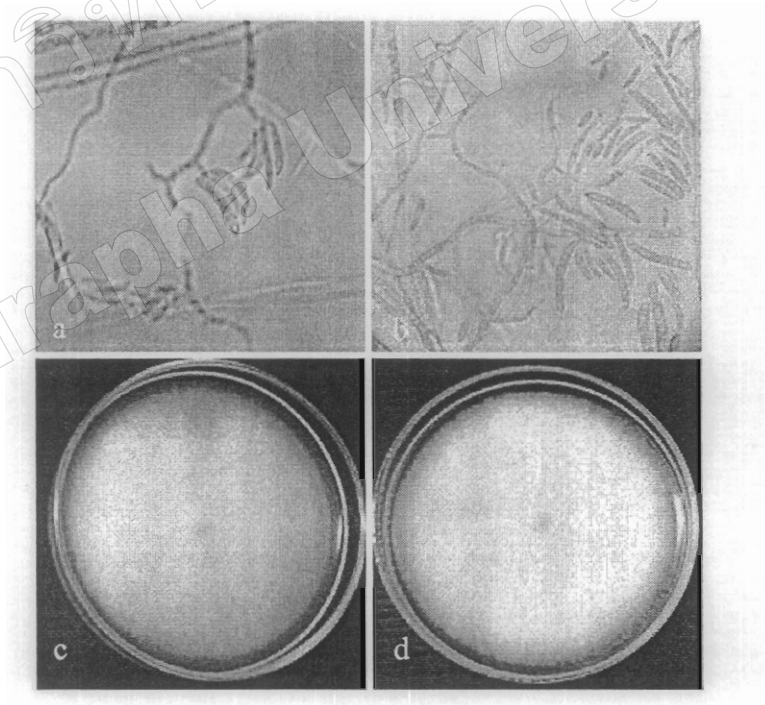
ภาพที่ 2-2 ลักษณะทางสัณฐานของ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ก่อโรคแอนแทรคโนสในถั่วเหลือง; a: Conidia บน Conidiophore, b: Single conidia, b: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น อายุ 7 วัน, c: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt อายุ 7 วัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.3 *Fusarium oxysporum*

เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) ซึ่งเป็นปัญหากับพืชหลายชนิด ได้แก่ แตงกวา (Park, Paulitz, & Baker, 1987) กล้วย (Dita et al., 2010) พริก (Jabeen, Ahmed, Ghani, & Sofi, 2009; Suryanto et al., 2010) มะเขือเทศ (Steinkellner, Mammerler, & Vierheilig, 2005; Olivian et al., 2006; Chantal et al., 2006; Takken & Rep, 2010) การติดเชื้อเกิดขึ้นบริเวณระบบท่อลำเลียงน้ำ โดยจะเริ่มที่ใบด้านล่างก่อนแล้วจึงลามไปสู่ใบส่วนที่อยู่ด้านบน ทำให้พืชเกิดอาการใบหยิก กลายเป็นสีน้ำตาล และแห้งเหี่ยวในที่สุด (Steinkellner et al., 2005)

ลักษณะทางสัณฐานของ *F. oxysporum* DOAC 1808 (ภาพที่ 2-3) ในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสามารถสร้างสปอร์ได้ 3 แบบ คือ Macroconidia มีรูปร่างโค้งเล็กน้อยคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยวถึงเกือบตรง มีผนังกั้นตามขวาง 3-5 เซลล์ Microconidia เป็นรูปไข่ มีผนังกั้นตามขวาง 1-2 เซลล์ Conidia ทั้งสองแบบไม่มีสี เกิดบน Conidiophore และ Chlamydospore เป็นสปอร์ในระยะพักจะสะสมอาหารในเส้นใยจนผนังหนาขึ้น



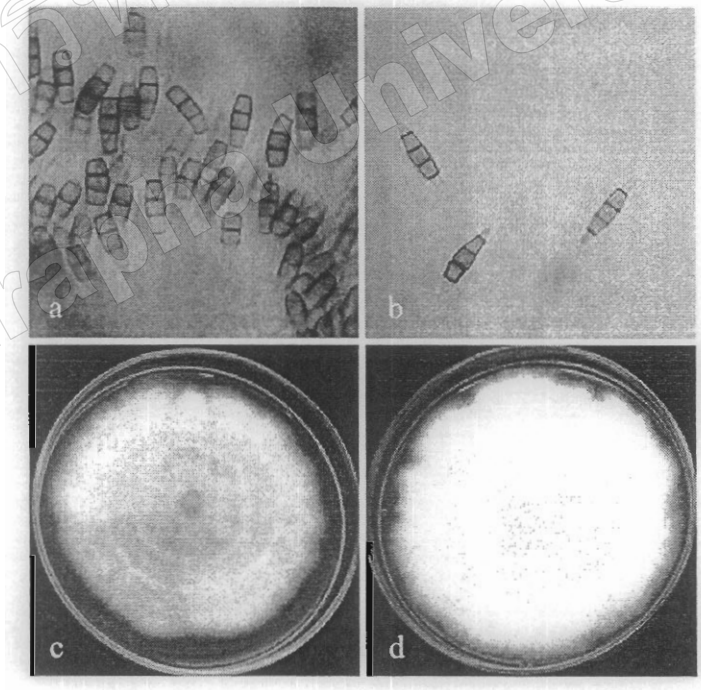
ภาพที่ 2-3 ลักษณะทางสัณฐานของ *F. oxysporum* DOAC 1808 ก่อโรคตายพรายในกล้วย; a: Conidia บน Conidiophore, b: Single conidia, c: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น อายุ 7 วัน, d: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล ความเค็ม 15 ppt อายุ 7 วัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.4 *Pestalotiopsis* sp.

เป็นสาเหตุของโรคใบจุด (Leaf spot) เริ่มจากเป็นจุดสีเทาขนาดใหญ่ และทำให้เกิดอาการใบแห้งในมังคุด (*Garcinia mangostana*) (Khewkhom, Shangchote, & Sangsiri, 2010) ทำให้เกิดโรคก้านใบ/ใบย่อยไหม้ (Petiole/Rachis blight) ในปาล์ม (Uchaida, 2004) ทำให้เกิดอาการเนื้อเยื่อกิ่งตาย (Twigs dieback) ในบลูเบอร์รี่ (Espinoza, Briceño, Keith, & Latorre, 2008) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดโรคผลเน่าในระหว่างเก็บเกี่ยว และหลังการเก็บเกี่ยวในฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) (Keith, Velasquez, & Zee, 2006)

ลักษณะทางสัณฐานของ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 (ภาพที่ 2-4) เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เชื้อเจริญให้โคโลนีสีขาว ลักษณะเป็นวง มีการสร้าง Pycnedia ลักษณะคล้ายหยดน้ำสีดำมัน เป็นจำนวนมากในโคโลนี ลักษณะของ Conidia มีรูปร่างคล้ายกระสวย มี 5 เซลล์ ลักษณะของส่วนหัวและท้ายมีลักษณะใส กลางเซลล์มีเข้ม ที่ปลายเซลล์มีระยางค์ 2-3 เส้น Conidia มีขนาด 21-28 x 8-10 ไมโครเมตร



ภาพที่ 2-4 ลักษณะทางสัณฐานของ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 ก่อโรคใบไหม้ในมังคุด; a: Conidia ใน Pycnedium, b: Single conidia, c: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น อายุ 7 วัน, d: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt อายุ 7 วัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

กว่า 100 ปีที่ผ่านมาการกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่ใช้สารเคมีเป็นหลัก ส่งผลให้ศัตรูพืชดื้อต่อสารเคมี สารเคมีตกค้างในผลิตผลทางการเกษตร และการใช้สารเคมีผิดประเภท หรือการใช้มากเกินจำเป็นยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย จากผลกระทบดังกล่าวบวกกับการเริ่มใช้กฎหมายควบคุมการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่รัดกุมมากขึ้น ทำให้การพัฒนากระบวนการควบคุมโดยชีววิธีเป็นไปอย่างต่อเนื่อง (Haject, 2004) มีผู้ให้ความหมายของการควบคุมโดยชีววิธี ได้แก่ การใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งควบคุมจำนวนประชากรของสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูพืชให้มีจำนวนลดลง หรือทำลายศัตรูพืชนั้น (Elinberg, Enkegaard, Vestergaard, & Jensen, 2000) ส่วนความหมายที่กำหนดโดยสถาบันวิทยาศาสตร์สหรัฐอเมริกา (US National academy sciences) ในปี ค.ศ. 1998 หมายถึง การใช้สิ่งมีชีวิตจากธรรมชาติ หรือสิ่งมีชีวิตที่ถูกดัดแปลงยีน ดัดแปลงผลิตภัณฑ์ของยีน เพื่อลดผลกระทบของสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูพืช และเกื้อกูลสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น พืชไร่ พืชสวน สัตว์ หรือจุลินทรีย์ (Haject, 2004) นักควบคุมโรคพืชบางท่านได้ขยายความเพิ่มเติมถึงการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีว่าต้องสามารถปรับเปลี่ยนให้เข้ากับเทคโนโลยีใหม่ ๆ ได้ (Charudattan, Chandramohan, & Wyss, 2002) นอกจากนี้ยังหมายถึง การลดปริมาณ หรือลดกิจกรรมของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยอาศัยสิ่งมีชีวิต และจุลินทรีย์ รวมถึงการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติในการควบคุมโรคพืช (Pal & Gardener, 2006)

ปัจจุบันมีการนำราปฏิปักษ์ (Antagonistic fungi) มาใช้ในการควบคุมราสาเหตุโรคพืชเป็นจำนวนมาก เช่น การใช้ *Nigrospora* sp. (WS01), *Penicillium* sp. (WS01), *Trichoderma harzianum* (WS01), *T. hamatum* (WS01), *T. hamatum* (WS01), *T. viride* (WS01) และ *Gliocladium virens* (WS01) ในการควบคุมราโรคพืช *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* และ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Srinon, Chuncheen, Jirattiwarutkul, Soytong, & Kanokmedhakul, 2006) การใช้ *T. longibrachiatum, T. harzianum, T. viride, T. koningii* และ *G. roseum* ในการควบคุมราสาเหตุโรคพืช *F. solani, F. sambucinum, F. moniliforme, S. sclerotiorum* และ *R. solani* (Celar, 2003) นอกจากราในกลุ่มดังกล่าวยังพบการนำราทะเล กลุ่มต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้ในการควบคุมราสาเหตุโรคพืชเช่นกัน ได้แก่ ราทะเล *Diaporthe* sp. ในการควบคุม *Aspergillus niger* (Lin et al., 2005) ราเอนโดไฟท์ *Phomopsis* sp. ZSU-H76 ในการควบคุม *F. oxysporum* (Huang et al., 2008) ราทะเล *Varicosporina ramulosa* ในการควบคุม *F. solani* (Mabrouk et al., 2008)

กลไกการควบคุมจุลินทรีย์โรคพืชโดยชีววิธีมี 4 ประเภท คือ

1. กลไกการแข่งขัน (Competition)

เกิดจากการที่จุลินทรีย์ต้องแก่งแย่งสารอาหาร เช่น ธาตุอาหาร อากาศ แร่ธาตุ หรือแม้แต่ที่อยู่อาศัย เพื่อการเจริญ และกิจกรรมของเซลล์ (Klepzig et al., 2001) ตัวอย่างเช่น การแก่งแย่งสารอาหาร ทำให้เกิดกิจกรรม Antagonistic หรือในสภาวะการขาดสารอาหารสามารถทำให้ราผลิตสารออกฤทธิ์ได้ (Celar, 2003) ราที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืชจะใช้สารอาหารที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนในดิน เช่น น้ำตาลที่มีโครงสร้างอย่างง่าย กรดอะมิโน และยังสามารถใช้สารอาหารได้หลากหลายเพื่อการอยู่รอด และแพร่กระจายในดิน (Blackeman, 1978)

2. กลไกการหลั่งสารยับยั้งการเจริญ (Antibiosis)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญตั้งแต่ 1 ชนิด จากกระบวนการเมแทบอลิซึมแล้วขับออกไปเพื่อความเป็นพิษ และฆ่าจุลินทรีย์อื่น หากสารนั้นมีประสิทธิภาพก็จะยับยั้งราโรคพืชได้ในระยะไกล (Pal & Gardener, 2006) ในห้องปฏิบัติการที่ศึกษากลไกนี้นิยมใช้วิธีการเลี้ยงราปฏิปักษ์ร่วมกับราสาเหตุโรคพืช (Dual culture technique) ตรวจผลโดยวัดระยะยับยั้งจากระยะห่างของขอบโคโลนีราทั้ง 2 ชนิด (Mishra et al., 2011)

3. กลไกปรสิต (Parasitism)

คือการที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเจริญอยู่ในราสาเหตุโรคพืชแล้วเข้าทำลายเพื่อใช้อาหาร หรือสารประกอบต่าง ๆ จากราสาเหตุโรคพืช แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ Necrotrophic mycoparasite เป็นกลุ่มที่ต้องฆ่า หรือทำลายราสาเหตุโรคพืชให้ตายก่อนโดยการสร้าง Chitinase, Cellulase และ β-1, 3-glucanase ออกมาย่อยสลาย Chitin, β-1, 3-glucan และ Cellulose ที่เป็นส่วนประกอบของ ผนังเซลล์ของราสาเหตุโรคพืช ทำให้เส้นใยเกิดการ Lysis แล้วจึงดูดซึมสารอาหาร กลุ่มที่สอง Biotrophic mycoparasite รากลุ่มนี้อาจสร้าง Haustoria แทงเข้าไปในเส้นใยของราสาเหตุโรคพืชเพื่อดูดซึมสารอาหารโดยไม่ทำให้ราสาเหตุโรคพืชตาย (Jeffries, 1995; Jacobs, Holtzman, & Seifert, 2005; Kemen et al., 2005)

4. กลไกการชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induction of host resistance)

สารชีวเคมีที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในดิน และจุลินทรีย์ที่อาศัยร่วมกับพืช สามารถชักนำให้พืชปกป้องตนเอง และนำไปสู่ความต้านทานต่อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชด้วย การชักนำให้เกิดความต้านทานสามารถเกิดขึ้นได้เฉพาะที่ เช่น ใบ ราก ลำต้น หรือทั้งระบบตั้งแต่รากสู่ใบ ขึ้นอยู่กับชนิด แหล่งกำเนิด และจำนวนของชีวเคมี หรือสารกระตุ้นนั้น (Pal & Gardener, 2006) สารที่เป็นสารกระตุ้น ได้แก่ Salicylic acid และ Jasmonic acid (He et al., 2004) หรือสารที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคบริเวณรากพืช (Yoshida, Sano, Wada, Takabayashi, & Okada, 2009)

4. ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากราทะเล

การปรับตัวให้อยู่รอดในระบบนิเวศทางทะเล ไม่ว่าจะเป็นการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะทางกายภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เช่น การขึ้นลงของน้ำ ความเค็ม ความดันออสโมซิส อุณหภูมิ หรือการปรับตัวต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในระบบนิเวศ (Bhakuni & Rawat, 2005; Sakayaroj et al., 2004) ทำให้ราทะเลผลิตสารป้องกันตนเอง (Defense compounds) หรือผลิตเพื่อใช้เป็นสารสื่อสัญญาณ (Signaling molecules) (Rohlfs & Churchill, 2011; Rodrigues et al., 2011) สารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ที่ราผลิตขึ้นดังกล่าวเป็นสารที่ไม่จำเป็นต่อการเจริญโดยตรง มีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก เรียกสารที่ได้ว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (Marine natural products) ถือได้ว่าราทะเลเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ (Sakayaroj et al., 2004; Bugni & Ireland, 2004) ปัจจุบันนักวิจัยให้ความสนใจศึกษาผลิตภัณฑ์ทางทะเลเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะการนำมาประยุกต์ใช้ด้านเภสัชกรรม ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณสมบัติทางเคมี เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ รวมถึงการพัฒนายา (Molinsky et al., 2009)

ปัจจุบันมีการศึกษาผลิตภัณฑ์จากราป่าชายเลนอย่างกว้างขวาง ได้แก่ สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial agent) เช่น สารกลุ่ม Pyrrolidinone กลุ่ม Mycoepoxydiene กลุ่ม L-isoleucine (Daferner, Ankea. & Sterner, 2002; Lin et al., 2005; Gallado et al., 2006) สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งโปรโตซัว (Antiprotozoal agent) ของ Halorosellinic acid จากราทะเล *Halorosellinia oceanica* (Chinworrungsee et al., 2001) สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง (Anticancer agent) ของสารกลุ่ม Peptides กลุ่ม Arugosin กลุ่ม Chromone และสารกลุ่ม Anthracenedione (Huang et al., 2007; Lin et al., 2008a; Xu et al., 2009a; Zhang et al., 2010) สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัส (Antiviral agent) ของสารกลุ่ม Isoindolones จากราเอนโดไฟท์ *Emericella* sp. (Zhang et al., 2011) และสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา (Antifungal agent) ของสารกลุ่ม Lactone กลุ่ม Benzofuran กลุ่ม Dibutylphthalate และสารกลุ่ม Ergosterol (Lin et al., 2005; Mabrouk et al., 2008) นอกจากที่กล่าวมายังมีสารยับยั้งราที่ผู้วิจัยได้รวบรวมไว้ดังแสดงในตารางที่ 2-1 และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ แสดงในตาราง 2-2

ตารางที่ 2-1 สารยับยั้งราก่อโรค (Antifungal) จากราในระบบนิเวศทางทะเล

ราทะเล	สารยับยั้งรา	ราก่อโรคที่ทดสอบ	อ้างอิง
Pestalotiopsis sp.	Pestalotiopyrone	*C. albicans*, *C. neoformance*, *Microsporum gypseum*	Rukachaisirikul et al. (2011)
Phomopsis sp.	Cytosporone	*C. albicans*, *F. oxysporum*	Huang et al. (2008)
Daldinia eschscholzii	Lactone	*Cladosporium cucumerinum*	Tarman et al. (2012)
Acremonium furcatum	L-isoleucine	*Colletotrichum truncatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cynerea*, *Aspergillus fumigatus*, *F. virguliforme*, *Macrophomina phaseolina*	Gallado et al. (2006)
Penicillium chrysogenum	Penicisteroids	*Alternaria brassicae*, *Aspergillus niger*	Gao et al. (2011)
Fasciatispora nypae	Chromone	*C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*	Zainuddin et al. (2010)
Aspergillus niger	Pyrone	*Alternaria brassicae*, *F. oxysporum*, *Coniella diplodiella*, *Physalospora piricola*	Liu et al. (2011)
Diaporthe sp.	Lactone Benzofuran	*Aspergillus niger* *Alternaria alternata*	Lin et al. (2005)
Varicosporina ramulosa	Dibutylphthalate	*F. solani* *C. albicans*	Mabrouk et al. (2008)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ จากราในระบบนิเวศทางทะเล

ราทะเล	สารออกฤทธิ์	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
Zopfiella latipes	Pyrrolidinone	Antibacterial	Daferner et al. (2002)
Diaporthe sp.	Mycoepoxydiene	Antibacterial	Lin et al. (2005)
Halorosellinia oceanica	Halorosellinic acid	Antiprotozoal	Chinwongsee et al. (2001)
Diaporthe sp.	Mycoepoxydiene	Antibacterial	Lin et al. (2005)
Penicillium sp.	Arugosin	Anticancer	Lin et al. (2008b)
Acremonium furcatum	Isoleucine	Antibacterial	Gallado et al. (2006)
Pestalotiopsis sp	Chromone	Anticancer	Xu et al. (2009a)
Cladosporium sp.	Phthalate	Antifouling	Qi et al. (2009)
	Lynamicin	Antimicrobial	
Aspergillus sp.	Asperxanthone	Antiviral	Wu et al. (2009)
	Asperbiphenyl		
Cosmospora sp.	Aquastatin	Antidiabethic	Seo et al. (2009)
Aspergillus sydowi	Oxotryprostatin	Cytotoxic	Zhang et al. (2008b)
	Hydroxyterezine		
Halorosellinia sp.	Anthracenedione	Anticancer	Zhang et al. (2010)
Emericella sp.	Isoindolones	Antiviral	Zhang et al. (2011)
Phoma herbrarum	Phthalate	Antibacterial	Bhimba et al. (2012)
Halorosellinia sp.	Anthraquinone	Anticancer	Yu et al. (2012)
Microsporum sp.	Neocchinulin	Anticancer	Wijesekara et al. (2013)
Chrysosporium articulatum	Chysoarticulins	Anticancer	Jeon et al. (2013)
Penicillium sp.	Citrinin	Cytotoxic	Subramani et al. (2013)
		Antibacterial	
Curvularia sp.	Apralactone	Cytotoxic	Greve et al. (2008)
	Dehydrocurvularin		

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. สภาวะในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ราทะเลเหมือนจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ต้องการสารอาหาร และปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมเพื่อการเจริญ (Carlile, Watkinson, & Gooday, 2001) เพื่อสร้างพลังงาน เป็นสารโครงสร้างของเซลล์ หรือสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์ รวมถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ (Adrio & Demain, 2003; Both, Csukai, Stumpf, & Spanu, 2005) สภาวะที่ราต้องการในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มักจะแตกต่างกันไปตามชนิด และสายพันธุ์ของรา ซึ่งอาจเหมือน หรือแตกต่างกับสารอาหารที่ราต้องการในการเจริญ (Frisvad, Andersen, & Thrane, 2008; Pillay, Polya, & Spangenberg, 2011) ทุกครั้งที่ศึกษาราสายพันธุ์ใหม่ หากต้องการได้ผลผลิตที่ดีจำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.1 สารอาหารในการการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารอาหารหลักสำหรับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรา ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน หรือธาตุอาหาร ในกรณีของราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนและราทะเลทั่วไป มีการศึกษาความแตกต่างของสูตรอาหารเหลวที่เป็น Synthetic media แตกต่างกัน ประกอบด้วย Glucose, Dextrose, Maltose, Yeast extracts, Peptone, Beef extracts และ Malt extract (Lin et al., 2002; Chen et al., 2003a; Zhu & Lin, 2006; Huang et al., 2007; Abdel-Wahab et al., 2007; Huang et al., 2008) เป็นหลัก มีการปรับเปลี่ยนสัดส่วนของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แตกต่างกันไปในแต่ละการศึกษา การใช้อาหารประเภท Semi-synthetic media ได้แก่ Potato dextrose broth (PDB) (Lin et al., 2005; Isaka et al., 2009; Rukachaisirikul et al., 2011; Huang et al., 2011a; Buatong, Phongpaichit, Rukachaisirikul, & Sakayaroj, 2011) และ Sabouraud dextrose broth (SDB) (Bhimba et al., 2011) รวมทั้งการใช้อาหารประเภท Natural media ที่ไม่ทราบองค์ประกอบอาหาร ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 2-3 และตารางที่ 2-4

5.2 สภาวะทางกายภาพ

นอกจากสารอาหารแล้ว ปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด–ด่าง ยังมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Yu & Keller, 2005) สภาวะที่มีรายงานได้แก่ ความเค็มหรือเกลือที่ใช้ ส่วนใหญ่จะใช้ NaCl หรือเกลือทะเล (Chen et al., 2003a; Zhu & Lin, 2006; Wen et al., 2009) อาหารเหลวที่เตรียมด้วยน้ำทะเล หรือน้ำทะเลเทียม และอาหารเหลวที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (Lin et al., 2008a; Lin et al., 2008b; Xu et al., 2009a) ระยะเวลาในการเลี้ยงรามีทั้งที่มีรายงาน เป็นระยะเวลาสั้น ๆ ระหว่าง 5 วัน ถึง 16 วัน (Lin et al., 2008b; Bhimba et al., 2011) และระยะเวลาที่มากกว่า 16 วัน ถึง 40 วัน (Huang et al., 2007;

Chen et al., 2003a) อุณหภูมิที่มีรายงานอยู่ระหว่าง 24 ถึง 30 องศาเซลเซียส (Chen et al., 2003a; Huang et al., 2007; Rukachaisirikul et al., 2011) ส่วนค่าความเป็นกรด–ด่างที่มีรายงานเท่ากับ 7 หรือเท่ากับค่าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียม (Huang et al., 2007; Isaka et al., 2009) สภาวะทางกายภาพที่ใช้เลี้ยงราเอนโดไฟท์ และราทะเลเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แสดงดังตารางที่ 2-5 และตารางที่ 2-6

6. วิธีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรา

6.1 การสกัดสารออกฤทธิ์จากรา

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรานิยมใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว หรือมีขั้วอ่อนเพื่อละลายสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขั้ว หรือมีขั้วอ่อนจากอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงรา ตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่ เอธิลอะซิเตต เอทานอล เฮกเซน เมทานอล และไดคลอโรมีเทน (Motti et al., 2007; Trisuwan et al., 2009; Tarman et al., 2011) ผสมตัวทำละลายกับอาหารที่ผ่านการเลี้ยงรา ในกรวยแยก จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 10-15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้สารแยกชั้น ในกรณีที่สารไม่แยกชั้นอาจต้องทำการระเหยบางส่วน แล้วจึงสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นอีกครั้ง หลังจากตั้งทิ้งไว้ให้แยกส่วนของตัวทำละลายที่มีส่วนของสารออกฤทธิ์ละลายอยู่ จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วย Rotary evaporator ให้แห้ง ละลายสารสกัดที่ได้ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อเก็บไว้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

6.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคของสารสกัดใช้หลักการดังนี้

6.2.1 วิธี Diffusion เป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบความไวของจุลินทรีย์ก่อโรคต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขั้ว ได้ดีกว่าสารที่ไม่มีขั้ว (Burns et al., 2000) ในการทดสอบจะใช้แผ่นดิสก์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ชุบด้วยสารทดสอบ และวางบนผิวหน้าอาหารแข็งที่มีจุลินทรีย์ทดสอบ สารออกฤทธิ์จะแพร่สู่อาหาร และยับยั้งการงอก หรือการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ ตรวจผลการทดสอบโดยการวัดขนาดโซนยับยั้ง (Davies, Kelly, Jacobs, & Appelbaum, 2000) ในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชนิยมใช้หลักการ Diffusion เช่นเดียวกัน แต่มีรายละเอียดบางขั้นตอนที่แตกต่างกันคือ ในขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช จะเลี้ยงราสาเหตุโรคพืชบนอาหารเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นจึงนำแผ่นดิสก์ที่ชุบสารวางให้ห่างจากขอบโคโลนีราประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มเป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจผลการทดสอบโดยการวัดระยะยับยั้ง (Inhibition distance) จากขอบโคโลนีราสาเหตุโรคพืช ถึงขอบของแผ่นดิสก์ (ดัดแปลงจาก Xia & Ng. 2005; Ye & Ng, 2005)

ตารางที่ 2-3 ชนิดของอาหารเหลวในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	พืชที่ราอาศัย	อาหารเลี้ยงเชื้อ	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ		อ้างอิง
1	สายพันธุ์ 1962	รังกะแท้	Glucose yeast	Yeast extract 1 g/L	Glucose 10 g/L	Huang et al. (2007)
		(*K. candel*)	extract	Peptone 2 g/L		
2	*Pestalotiopsis* sp.	โกงกางใบเล็ก	Potato dextrose	Potato starch 4 g/L	Dextrose 20 g/L	Rukachaisirikul et al. (2011)
	PSU-MA92	(*R. apiculata*)				
3	*Penicillium* sp. JP-1	เล็บมือนาง	-	Yeast extracts 3 g/L	Mannitol 20 g/L	Lin et al. (2008b)
		(*A. corniculatum*)		Corn steep liquor 1 g/L	Glucose 10 g/L	
				$Mg_2SO_4.7H_2O$ 0.3 g/L	Maltose 20 g/L	
				Monosodium glutamate 10 g/L	KH_2PO_4 0.5 g/L	
4	*Alternaria* sp. ZJ9-6B	เล็บมือนาง	Potato dextrose	Potato starch 4 g/L	Dextrose 20 g/L	Huang et al. (2011a)
		(*A. corniculatum*)				
5	สายพันธุ์ 1893	รังกะแท้	Glucose yeast	Yeast extract 0.5 g/L	Glucose 5 g/L	Chen et al. (2003a)
		(*K. candel*)	extract	Peptone 1 g/L		
				Beef extract 0.5 g/L		
6	*Sporothrix* sp. (#4335)	รังกะแท้	Glucose yeast	Yeast extract 2 g/L	Glucose 10 g/L	Wen et al. (2009)
		(*K. candel*)	extract	Peptone 1 g/L		

หมายเหตุ - ไม่ได้รายงานไว้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-4 ชนิดของอาหารเหลวในการเลี้ยงราทะเลเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ลำดับที่	ราทะเล	แหล่งของรา	อาหารเลี้ยงเชื้อ	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ		อ้างอิง
1	*Massarina* sp. CNT-016	โคลนทะเล	Yeast malt extract	Malt extract 10 g/L Yeast extracts 4 g/L	Glucose 10 g/L	Abdel-Wahab et al. (2007)
2	*Verruculina enalia*	เศษไม้	-	Yeast extracts 0.5 g/L Peptone 1 g/L Beef extract 0.5 g/L	Glucose 5 g/L	Lin et al. (2002)
3	*Aigialus parvus* BCC5311	เศษไม้	Potato dextrose	Potato starch 4 g/L	Dextrose 20 g/L	Isaka et al. (2009)
4	*Diaporthe* sp. 14LY2	เศษไม้	Potato dextrose	Potato starch 4 g/L	Dextrose 20 g/L	Lin et al. (2005)
5	*Cladosporium* sp.	โคลนทะเล	-	Yeast extract 5 g/L Peptone 10 g/L	Dextrose 10 g/L	Gallo, Seldes, & Cabrera (2004)
6	*Hypoxylon oceanicum*	เศษไม้	Potato dextrose	Potato starch 4 g/L	Dextrose 20 g/L	Chinworrungsee et al. (2001)
7	*Penicillium* sp. F23-2	-	-	Potato 40 g/L	Maltose 20 g/L Mannitol 20 g/L	Sun et al. (2009)

หมายเหตุ - ไม่ได้รายงานไว้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-5 ปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ลำดับที่	ราเอนโดไฟท์	ปัจจัยทางกายภาพ					อ้างอิง
		ความเค็ม	ระยะเวลา (วัน)	อัตราการให้อากาศ (รอบ/นาที)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าความเป็นกรด – ด่าง	
1	สายพันธุ์ 1962	NaCl 2 g/L	25	ให้อากาศ	28	7	Huang et al. (2007)
2	*Pestalotiopsis* sp. PSU-MA92 *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA119	น้ำกลั่น	28	-	อุณหภูมิห้อง	-	Rukachaisirikul et al. (2011)
3	*Penicillium* sp. JP-1	น้ำทะเล	30	-	24	7	Lin et al. (2008b)
4	สายพันธุ์ 1893	NaCl 3 g/L	40	ให้อากาศ	30	-	Chen et al. (2003a)
5	*Alternaria* sp. ZJ9-6B	เกลือทะเล 3 g/L	30	ให้อากาศ	28	-	Huang et al. (2011a)
6	*Phomopsis* sp. ZSU-H76	NaCl 3 g/L	25	200	30	-	Huang et al. (2008)
7	*Emericella* sp. (HK-ZJ)	น้ำทะเล	30	ตั้งทิ้งไว้	24	6.5	Zhang et al. (2011)

หมายเหตุ - ไม่ได้รายงานไว้

340268

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ.เฉลิมพระเกียรติ อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

Burapha University

ตารางที่ 2-6 ปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ ในการเลี้ยงราทะเลเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ลำดับที่	ราทะเล	ปัจจัยทางกายภาพ					อ้างอิง
		ความเค็ม	ระยะเวลา (วัน)	อัตราการให้อากาศ (รอบ/นาที)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าความเป็นกรด – ด่าง	
1	*Massarina* sp. CNT-016	น้ำทะเล	16	280	27	-	Abdel-Wahab et al. (2007)
2	*Verruculina enalia*	น้ำทะเล	45	ให้อากาศ (ไม่ระบุ)	30	-	Lin et al. (2002)
3	*Aigialus parvus* BCC 5311	-	80	ตั้งทิ้งไว้	25	-	Isaka et al. (2009)
4	*Diaporthe* sp. 14LY2	น้ำทะเล	7	120	25	-	Lin et al. (2005)
5	*Cladosporium* sp.	น้ำทะเลเทียม	14	-	25	-	Gallo et al. (2004)
6	*Halocyphina villosa*	-	20	150	22	5.5	Kupka et al. (1981)
7	*Penicillium sp.* F23-2	-	7	160	28	-	Sun et al. (2009)

หมายเหตุ - ไม่ได้รายงานไว้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6.2.2 วิธี Dilution เป็นวิธีประมาณค่าความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ บนอาหารแข็ง หรือในอาหารเหลว ส่วนใหญ่นิยมใช้ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ (Minimal inhibitory concentration; MIC) วิธีนี้ใช้ได้กับสารทดสอบที่เป็นสารสกัด สารบริสุทธิ์ สารมีขั้ว หรือสารไม่มีขั้ว (Otvos & Cudic, 2007) ทดสอบฤทธิ์ของสารด้วยการผสมสารในอาหารที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลว จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารที่เตรียมไว้ข้างต้นบ่ม และตรวจหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค โดยดูจากการเจริญของเชื้อระดับความเข้มข้นใดที่ไม่พบการเจริญถือว่าเป็น MIC ในกรณีที่ทดสอบในอาหารเหลวนิยมทำเป็น Micro dilution โดยจะผสมสารและอาหารในหลุม การตรวจผลจะอาศัยการตรวจวัดความขุ่นหลุมที่ใสเป็นหลุมที่เชื้อไม่เจริญ เมื่อเทียบกับหลุมควบคุมถือว่าระดับความเข้มข้นของหลุมนั้นเป็นค่า MIC (Choma & Grzelak, 2011)

6.3 การศึกษาสารองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สามารถศึกษาสารองค์ประกอบโดยใช้หลักการโครมาโตกราฟี (Chromatography) ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกสารโดยใช้ความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารบนเฟสคงที่ (Stationary phase) โดยการพาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งแต่ละประเภทนี้จะมีเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่แตกต่างกันไป การจะเลือกใช้วิธีใดในการวิเคราะห์สารนั้นขึ้นอยู่กับงบประมาณในการศึกษา และวัตถุประสงค์ของการศึกษาว่าต้องการความบริสุทธิ์ของสารเพียงใด แบ่งโครมาโตกราฟีตามรูปแบบของเทคนิคได้ 2 ประเภท ได้แก่

6.3.1 โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (Column chromatography)

เป็นการทำบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการความบริสุทธิ์สูงจำเป็นต้องใช้วิธีการ หรือเครื่องมือที่มีความเที่ยงตรง แม่นยำ การทำบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์จากราทะเลที่มีรายงานได้แก่ Gas chromatography (GC), High performance liquid chromatography (HPLC) (Chen et al., 2003a; Gallo et al., 2004) หลักการของโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์โดยสังเขปมีดังนี้

6.3.1.1 Gas chromatography (GC) เป็นเทคนิคการแยกสารพวกที่มีขั้วต่ำอยู่ในสภาวะที่เป็นแก๊สหรือไอ โดยใช้แก๊สตัวพาเป็นเฟสเคลื่อนที่ ตัวพาที่นิยมใช้เป็นฮีเลียม ไนโตรเจน และไฮโดรเจน เครื่อง GC ประกอบด้วย ส่วนฉีดสาร (Injector) เตาอบ (Oven) คอลัมน์ (Column) ตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector) ระบบบันทึก และเก็บข้อมูล (Recorder & Integrator) ผลที่ได้จะแสดงในรูปของโครมาโทแกรม (Chromatogram) แบ่งเทคนิค GC ออกเป็น 2 แบบตามลักษณะเฟสคงที่ คือ Gas-solid chromatography (GSC) ใช้หลักการดูดซับโดยเฟสคงที่ (ของแข็ง) โดยจะดูดซับสารตัวอย่างในสถานะแก๊ส หรือไอที่ต้องการแยกได้ในคอลัมน์ ใช้แยก

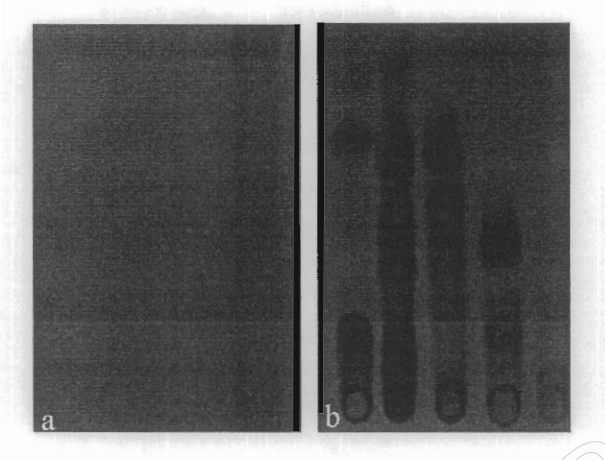
สารที่มีโมเลกุลเล็ก ๆ ที่สามารถเปลี่ยนเป็นแก๊ส หรือไอ และ Gas-liquid chromatography (GLC) ใช้หลักการ Partition สารผสมที่ต้องการแยกในสภาพที่เป็นแก๊ส หรือไอเมื่อผ่านเข้าสู่คอลัมน์จะแยกออกจากกันโดยใช้ความแตกต่างในการกระจายตัวอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลว ตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector) จะตรวจวัดองค์ประกอบที่มีในสารตัวอย่าง แล้วส่งสัญญาณอิเล็กโทรนิคไปยังตัวประมวลผล เพื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ของสารองค์ประกอบต่อเวลาออกมาเป็นโครมาโทแกรม เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้พีค (Peaks) หรือความสูงพีคของสารมาตรฐาน (McNair & Miller, 1998)

6.3.1.2 High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ และปริมาณวิเคราะห์ที่นิยมใช้แยกสารผสมโดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (High pressure pump) สูบของเหลวหรือตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (Injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสคงที่ (Stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แล้วจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัดสัญญาณที่ตรวจวัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้า ตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ โดยสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ แสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรมประกอบด้วยพีคของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารผสมในคอลัมน์ (Meyer, 2004)

6.3.2 โครมาโตกราฟีแบบแผ่น (Planar chromatography) โครมาโทกราฟีที่นิยม เช่น Paper chromatography (PC) และ Thin layer chromatography (TLC) ซึ่งจะมีเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่แตกต่างกันไป (Wixom & Gehrke, 2010)

6.3.2.1 Thin layer chromatography (TLC)

การวิเคราะห์สารเบื้องต้นด้วย TLC เป็นวิธีที่สะดวก และค่าใช้จ่ายไม่สูง การวิเคราะห์ไม่ซับซ้อน มีเฟสคงที่เป็น ซิลิกาเจล อะลูมินา หรือโพลีเอไมด์ ส่วนใหญ่นิยมใช้ซิลิกาเจลในรูปของแผ่น TLC สำเร็จรูป ตัวอย่างเช่น TLC silica gel 60 F_{254} บนแผ่นอะลูมิเนียม ซิลิกาเจลจะผสมสารเรืองแสง ที่เรืองแสง (สีเขียว) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Merck, Germany) เฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารองค์ประกอบที่ได้จากราใช้ได้ทั้งแบบสารเดียว หรือสารผสมแต่ไม่ควรผสมเกิน 3 สาร เช่นคลอโรฟอร์ม กับ เมทานอล ในอัตราส่วน 9: 1 (Nithya & Muthumary, 2011) เบนซีน กับ คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1: 1 คลอโรฟอร์ม กับ เอทานอล ในอัตราส่วน 1: 1 คลอโรฟอร์ม กับ เบนซีน ในอัตราส่วน 5: 1 (Khudyakova, Pivkin, Kuznetsova, & Svetashev, 2000) เอธิลอะซิเตต (Silva, Almeida, Arruda, & Gusmão, 2011) หรือใช้ไดคลอโรมีเทน กับ เมทานอล ในอัตราส่วน 95: 5 (Mabrouk et al., 2008) หลังจากการแยกสารจะเห็นแถบสารองค์ประกอบชัดเจนดังแสดงในภาพที่ 2-5



ภาพที่ 2-5 การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC; a: แผ่น TLC ที่เรืองแสงสีเขียวเมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร; b: การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC (ที่มา: D'Almeida, Albertoa, Quisped, Schmeda-Hirschmannd, & Isla, 2012)

6.4 การตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบที่แยกได้บนแผ่น TLC (Bioautography) เป็นเทคนิคผสมผสานระหว่าง TLC กับการตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธีการที่เหมาะสม (Shahverdi, Abdolpour, Monsef-Esfahani, & Farsam, 2006; Marton, 2011) เช่น Agar diffusion bioautography อาศัยหลักการเดียวกับ Disc diffusion โดยนำแผ่น TLC ที่มีแถบขององค์ประกอบที่ตำแหน่งต่าง ๆ ตัดเป็นแถบตามแนวยาวของการแยกสารวางบนอาหารแข็งเพาะเชื้อจุลินทรีย์ โดยวงตำแหน่ง Fraction ที่ก้นจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสม แล้วจึงตรวจผลการยับยั้ง แต่ผลที่ปรากฏมักน้อยกว่าความเป็นจริงถ้าสารมีการดูดซับสูงบนแผ่น TLC หรืออาจทำการศึกษาโดยใช้วิธีพ่นสารละลายแขวนลอยสปอร์ราสาเหตุโรคพืชลงบนแผ่น TLC ที่มีแถบขององค์ประกอบตำแหน่งต่าง ๆ (Engelmeier & Hadacek, 2006)

6.5 การพิสูจน์โครงสร้างสารของสารประกอบอินทรีย์โดยใช้หลักการ Spectroscopy เป็นการศึกษาพลังงานที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการดูดกลืน (Absorption) การคาย (Emission) หรือการกระเจิง (Scattering) ของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic radiation) ของอะตอมหรือโมเลกุลในสารตัวอย่าง ตรวจวัดรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าด้วยเครื่องตรวจวัด แปลงรังสีตกกระทบ (Incident radiation) ให้เป็นกระแสไฟฟ้า (Electric current) เปลี่ยนมาเป็นสัญญาณข้อมูลในรูปของกราฟความสัมพันธ์ของการดูดกลืนแสงในแต่ละความยาวคลื่น เทคนิคที่นิยมใช้ศึกษา ได้แก่ Mass spectroscopy (MS), Ultraviolet spectroscopy และ Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) (Francis & Annick, 2000; Hollas, 2004; Duarte, Rocha-Santos, Freitas, & Duarte, 2012) และอาจใช้ร่วมกับเทคนิคอื่น เช่น X-ray diffraction (Chen et al., 2003a)

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

Chen et al. (2003a) ศึกษาราแอนโดไฟท์สายพันธุ์ 1893 ที่แยกจากรังกะแท้ (*K. candel*) ในป่าชายเลนของประเทศจีน ในอาหารเหลวประกอบด้วย Glucose 5 กรัม/ลิตร Peptone (1 กรัม/ลิตร) Yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร Beef extract 0.5 กรัม/ลิตร และ NaCl 3 กรัม/ลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน สกัดด้วยเอธิลอะซิเตต พบสารชนิดใหม่ในกลุ่ม Lactones 2 ชนิด

Lin et al. (2005) ศึกษาราทะเล *Diaporthe* sp. HLY2 บนเศษใบไม้ในป่าชายเลนของประเทศจีน โดยเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่ผสมน้ำทะเล 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) เขย่าที่ 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สกัดด้วยเอธิลอะซิเตตพบสาร 3 ชนิด เป็นสารใหม่ 1 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger* ได้

Abdel-Wahab et al. (2007) ศึกษาราทะเล *Massarina* sp. CNT-016 ที่แยกจากโคลนบริเวณเกาะ Palau โดยเลี้ยงในอาหารเหลว ที่ประกอบด้วย Yeast extract 4 กรัม/ลิตร Malt extract 10 กรัม/ลิตร และ Glucose 10 กรัม/ลิตร ในน้ำทะเล เขย่าด้วยความเร็วที่ 280 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 วัน สกัดด้วยเอธิลอะซิเตตพบสาร 4 ชนิด เป็นสารใหม่ 2 ชนิด

Motti et al. (2007) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต Uguinol ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ Piruvate phosphate dikinase ของพืช C4 จากราทะเล 449 ไอโซเลท โดยใช้สภาวะทางกายภาพที่แตกต่างกัน 5 สภาวะ ได้แก่ อาหารที่มีสารอาหารสูง (High-nutrient) อาหารที่มีสารอาหารต่ำ (Low-nutrient) อาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูง (High-pH) อาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ (Low-pH) และอาหารที่ไม่มีเกลือ (No-salt) โดยเตรียมจากน้ำทะเลเทียม และน้ำกลั่น ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน พบว่าอาหารชนิดเด่นที่ส่งผลต่อการผลิต Uguinol คือ อาหารที่มีสารอาหารสูง และอาหารที่ไม่มีเกลือ

Mabrouk et al. (2008) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารที่ออกฤทธิ์จากราทะเล *Varicosporina ramulosa* คัดเลือกอาหารเหลว Biomalt ที่ประกอบด้วย Biomalt 20 กรัม/ลิตร ในการหาสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมโดยใช้ปัจจัยทางกายภาพ 4 ปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง เขย่าด้วยความเร็วรอบต่าง ๆ พบว่าสภาวะเหมาะสมที่ส่งผลให้อัตราการผลิตสารชนิดที่ 3 สูงที่สุด ได้แก่ ระยะเวลา 8 วัน อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 และเขย่าด้วยความเร็ว 65 รอบ/นาที และสภาวะที่เหมาะสมที่ส่งผลให้อัตราการผลิตสารชนิดที่ 10 สูงสุด ได้แก่ ระยะเวลา 10 วัน ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 150 รอบ/นาที เมื่อวิเคราะห์สารเบื้องต้นด้วยวิธี TLC พบสาร 13 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์แตกต่างกัน และสารชนิดเด่น ๆ คือ สารชนิดที่ 13 สามารถยับยั้ง

Escherichia coli และ *Bacillus subtilis* บนอาหาร Nutrient agar ยับยั้ง *Candida albicans* และ *Fusarium solani* บนอาหาร Dox agar และสารชนิดที่ 10 สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* บนอาหาร Nutrient agar และ *Candida albicans* บนอาหาร Dox agar ตามลำดับ

Isaka et al. (2009) ศึกษาราทะล *Aigialus parvus* BCC 5311 บนไม้ในป่าชายเลนของประเทศไทย โดยเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 80 วัน สกัดด้วยเอธิลอะซิเตตพบสาร 12 ชนิด เป็นสารใหม่ 6 ชนิด และมีสารบางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งมาลาเรีย

Xiong et al. (2009) ศึกษาแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านแบคทีเรียจากราทะเล *Cladosporium* sp. F14 โดยใช้อาหารเหลวที่มีสัดส่วนที่แตกต่างกันของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ Glucose, Xylose และ Glycerol และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ Yeast extract, Tryptone, Ammonium sulphate, Sodium nitrate และ Urea เตรียมด้วยน้ำทะเลปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าสูตรอาหารที่แตกต่างกันมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ต่างชนิดกัน ได้แก่ อาหารที่มีส่วนประกอบของ Glucose และ Tryptone 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการยับยั้ง *Vibrio fluvialis* ได้ดี แตกต่างจากอาหารที่มีส่วนประกอบของ Glucose และ Yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการยับยั้ง *Micrococcus luteus* ได้ดี และพบว่าเมื่อไม่มีน้ำตาลการผลิตสารออกฤทธิ์จะน้อยลง

Rukachaisirikul et al. (2011) ศึกษาราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* spp. PSU-MA92 และ PSU-MA119 ที่แยกจากกิ่งของต้นโกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) และต้นโกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) ในป่าชายเลนของประเทศไทย ตามลำดับ เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สกัดด้วยเอธิลอะซิเตต พบสาร 6 ชนิด แต่สารเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่เป็นสารยับยั้งรา และแบคทีเรีย คือ Pestalotiopyrones B

Xu et al. (2011) ศึกษาราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* sp. ที่แยกจากโกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) ในป่าชายเลนของประเทศจีน เลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้ข้าวเป็นซับเสตรต สกัดด้วยเอธิลอะซิเตต พบสาร 19 ชนิด เป็นสารชนิดใหม่ถึง 16 ชนิด

Bhimba et al. (2012) ศึกษาราเอนโดไฟท์แยกจากใบพืชป่าชายเลน *Phoma herbarum* VB7 เลี้ยงในอาหารเหลว Sabouraud dextrose สกัดด้วยเอธิลอะซิเตต พบสาร Phthalate ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

Yu et al. (2012) ศึกษาราเอนโดไฟท์แยกจากใบพืชป่าชายเลน *Halorosesellina* sp. (No. 1403) เลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย Yeast extract 1 กรัม/ลิตร Peptone 2 กรัม/ลิตร และ Glucose 10 กรัม/ลิตร ในน้ำทะเลเทียม พบสารในกลุ่ม Anthraquinone มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Jeon et al. (2013) ศึกษาราทะเล *Chrysosporium articulatum* แยกจากฟองน้ำทะเลประเทศเกาหลี เลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย Yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร Peptone 0.5 กรัม/ลิตร และ Glucose 1 กรัม/ลิตร ในน้ำทะเลเทียม บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่150 รอบ/นาที เป็นเวลา 21 วัน สกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตต เมื่อทำบริสุทธิ์สารพบสาร 3 ชนิด คือ Chrysoarticulin A-C เป็นสารในกลุ่ม Benzolactones มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง K562 และ A549

Wijesekara et al. (2013) ศึกษาราทะเล *Microsporum* sp. แยกจากสาหร่ายทะเล ในเขตทะเลของประเทศเกาหลี เลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย Yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร Peptone 0.5 กรัม/ลิตร และ Glucose 1 กรัม/ลิตร ในน้ำทะเลที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 3: 2 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วัน สกัดสารด้วย เอธิลอะซิเตตพบสาร Neoechinulin A มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University