สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแอนติไบโอติกจากราที่เป็นเอ็นโดไฟท์และแอคติโนมัยซีทบริเวณรากพืชป่าชายเลน

Optimization of Antimicrobial Compound Production from Endophytic Fungi and Actinomycetes Surrounding Mangrove Plant Roots

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์
อภิรดี ปิลันธนภาคย์

2 S มี.ค. 2555
301406
เริ่มบริการ
29 พ.ค. 2555

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554

อภินันทนาการ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแอนติไบโอติกจากราที่เป็นเอ็นโดไฟท์ และแอคติโนมัยซีทบริเวณรากพืชป่าชายเลน" นี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2554 เป็นระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2553 – 30 กันยายน 2554 จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณนางสาวเนาวรัตน์ ละออเอี่ยม นางสาวนิภาพร พานทอง ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ นางสาวสุพรรษา พันธุ์ธรรม นางสาวพิราวรรณ แสงสง่า นักศึกษาปริญญาตรี นางสาวจิราภรณ์ ธนากุลปกรณ์ และนางสาวดวงนภา เครืออยู่ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้ช่วยวิจัยในโครงการ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุเคราะห์สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือและครุภัณฑ์ต่างๆ บางส่วน ขอขอบคุณโครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือและครุภัณฑ์ต่างๆ ตลอดจนสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณสุติรัตน์ ปุ่นประเสริฐ นักวิทยาศาสตร์โครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกแอคติโนมัยซีท ที่สามารถสร้างสารรงควัตถุสีแดงจำนวน 7 ไอโซเลต นำมาเลี้ยงด้วยอาหารต่าง ๆกันคือ อาหาร ISP2 อาหาร Soybean meal อาหาร Oatmeal อาหาร ISP2+น้ำมันงา และ อาหาร ISP2+ น้ำมันปลา และตรวจสอบการสร้างสารรงควัตถุและฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในขณะเดียวกัน พบว่าอาหาร ISP2 ที่ไม่เติมอาหารธรรมชาติอื่น ๆ ให้ผลการสร้างสารรงควัตถุและให้ฤทธิ์ยับยั้งที่ดีกว่า และเลือกแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารรงควัตถุที่สร้างรงควัตถุสีแดง หรือ แดงคล้ำ มาเลี้ยงในอาหาร ISP2 เพื่อสกัดสารรงควัตถุให้ได้ปริมาณมาก พบว่าแอคติโนมัยซีท 54-4 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 สามารถสร้างรงควัตถุสีแดง ได้ปริมาณ 0.15 0 กรัม / อาหาร 1 ลิตร จากการสกัดด้วย Ethyl acetate เมื่อนำสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีท 54-4 มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่ามีสารสีแดง สีส้ม และสีชมพู จำนวนมาก ไม่ต่ำกว่า 40 ชนิด แต่ไม่พบว่าแอคติโนมัยซีท 54-4 สร้างสารโพรดิจิโอซิน แต่อาจสร้างสารที่คล้ายโพรดิจิโอซินหลายชนิด สารสกัดหยาบของ แอคติโนมัยซีท A16-1 ให้สารรงควัคถุสีแดงจำนวนมากเช่นกัน และมี spectrum peak ที่ใกล้เคียงกัน คือ A16-1 ให้ spectrum peak สูงสุด ที่ 480 nm ในขณะที่สารจาก แอคติโนมัยซีท 54-4 ให้ spectrum peak สูงสุด ที่ 520 nm และ 560 ผลจากการตรวจสอบสารที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของแอคติโนมัยซีท 54-4 ด้วย HPLC พบว่าสารใน fraction ที่ 8-15 พบว่ามี peak ที่ชัดเจนอยู่ 2 peak ที่ค่า Rt ที่ 23 และ Rt ที่ 27 นาที และที่ Rt 23 นาทีจะพบ 2 peaks ระหว่าง 220-270 nm และพบ 3 peaks อยู่ระหว่าง 450-550 nm ซึ่ง peaks เหล่านี้คล้ายคลึงกับ peak ที่พบในสารสกัดหยาบ ส่วน แอคติโนมัยซีทA1-3 และ A3-3 ให้สารสีแดงม่วงน้ำตาล และสีม่วงน้ำเงิน ตามลำดับ และสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีท 54-5 ไม่ให้ฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) สารสกัดหยาบจากเชื้อทุกตัวให้ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ แต่เฉพาะแอคติโนมัยซีท 54-4 และ A16-1 ให้ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วย โดย แอคติโนมัยซีท 54-4 ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก มีค่า IC_{50}=8.50 µg/ml ส่วนสารจาก A16-1 ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม มีค่าIC_{50}=1.72, 1.56, 3.10 และ 2.61 µg/ml ใน fraction ที่ 5, 6,7-8 และ 9-12 ตามลำดับ ซึ่งนับว่าออกฤทธิ์แรงมากกว่า doxorubicine ซึ่งเป็นยารักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน นอกจากนี้ สารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีท ทั้ง 54-4และ A16-1 สามารถยับยั้งเซล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยเช่นกัน จากการหาลำดับเบสของ 16S rDNA ยีน พบว่าแอคติโนมัยซีททั้ง 2 ชนิดเป็นแอคติโนมัยซีทในจีนัส *Streptomyces* ซึ่งมีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่

Abstract

Seven isolates of actinomycetes pigment producing strains were selected and cultured on various types of media: ISP2, soybean meal, oatmeal, ISP2+sesami oil and ISP2+ fish oil, in which pigment and antimicrobial production were investigated at the same time. The result revealed that on ISP2 without any other natural substrate supplement gave better pigment and antimicrobial production. Strains giving red or dark red pigment production were selected to culture in ISP2 for extraction the red pigment. It was found that ethyl acetate extraction of Actinomycete 54-4 in ISP2 medium could yield 0.150 g crude pigment per litre medium. Partial purification of the crude pigment by column chromatography revealed more than 40 components of the substances in red, orange, and pink, but real prodigiosin substance was not found from Actinomycete 54-4, but analogue substances of prodigiosin may be mixed. Crude extract of Actinomycete A16-1 gave various components of red pigments as same as strain 54-4 with the highest spectrum peaks at 480 nm, while Actinomycete 54-4 gave the highest peaks at 520 and 560 nm. The result of HPLC analyses of 54-4 partial purification of the red pigments gave 2 unique peaks at Rt 23 and Rt 27. At Rt 23 found 2 peaks between 220-270 and 3 peaks between 450-550 nm in which resemble to those found in the crude extract. Actinomycetes A1-3 and A3-3 gave dark purplish-brown red and puplish-blue in color when purification, respectively. The crude extract of Actinomycete 54-5 did not give apoptosis of KB cell lines. All of the crude pigments in every strain gave antimicrobial activity, but only the pigments of Actinomycete 54-4 and A16-1 gave inducing apoptosis of HeLa cell lines and breast cancer cell lines with IC_{50} =8.50 μg/ml for crude extract of Actinomycetes 54-4 and IC_{50}=1.72, 1.56, 3.10 และ 2.61 μg/ml , for fraction 5, 6, 7-8, and 9-12 of A16-1, respectively, which stronger than the IC_{50} of doxorubicine . The crude extract of Actinomycete 54-4 and A16-1 could induce apoptosis of leukemia cell lines as well. The analysis of 16S rDNA base sequences, revealed that both of the actinomycetes are members of genus *Streptomyces* which has a tendency to be new species.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	9
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	16
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	40
เอกสารอ้างอิง	43

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงสารเมตาโบไลท์ใหม่ ๆที่สร้างจาก marine actinomycetes ระหว่างปี 2003-2005 (Lam, 2006)	6
2	ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่เป็นยารักษาโรคและสร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยซีท (Borgos, 2006)	7
3.	เชื้อราเอนโดไฟท์ที่ใช้ในการศึกษา แยกได้จากพืชป่าชายเลนต่าง ๆชนิด และการจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์	9
4	แอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกมาศึกษา แยกได้จาก ตะกอนชนิดต่าง ๆ	10
5	สภาวะการเลี้ยงราในอาหารเหลวที่ศึกษา	11
6	ผล antibiosis ระหว่างราเอ็นโดไฟท์กับราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน	17
7	ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหารต่างกัน ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน	19
8	ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียมสารสกัดจากราที่หมักใน 0.5xPDB ต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช	20
9	ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียมสารสกัดจากราที่หมักใน SDB ต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช	21
10.	ความเค็มที่เหมาะสมของอาหารเหลวในการเตรียมสารสกัดยับยั้งราโรคพืช จากน้ำหมักราที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ในอาหาร 0.5xPDB	22
11	ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหาร 0.5xPDB ที่ความเค็มต่างกัน เป็นเวลา 3 วัน ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน	23
12	ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหารต่างกัน ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน	24
13	ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ Br834 ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* ในอาหารรำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง	26
14	จำนวนชนิดและรูปแบบสารองค์ประกอบในสารสกัดหยาบของราเอ็นโดไฟท์ สายพันธุ์ Th121	27
15	จำนวนชนิดและสารประกอบในสารสกัดเตรียมจากรา Th121 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น	27
16	การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารต่าง ๆ ของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากป่าชายเลน	29
17	การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ ของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากป่าชายเลน	30

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
18	แสดงจำนวนองค์ประกอบของสาร ที่เห็นได้ บนแผ่นโครมาโทแกรม สารเมตาโบไลท์ที่สร้างได้ของแอคติโนมัยซีททที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY, SCA, AB2, TSA และ ISP2	31
19	แสดงปริมาณการสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อาหารเหลวธรรมชาติ (กรัม/100 ml)	32
20	แสดงผลของการศึกษา Bioautography assay ของแอคติโนมัยซีท A1-3, A3-3, A16-1, 54-4, 54-5 ต่อเชื้อ MRSA 22	33
21	แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส A1-3 ด้วย Column Chromatography	35
22	แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส A3-3 ด้วย Column Chromatography	36
23	แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส A16-1 ด้วย Column Chromatography	37
24	แสดงผลการทดสอบไบโอออโตกราฟีของเชื้อ A1-3 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ MRSA P86	38
25	แสดงผล การทดสอบไบโอออโตกราฟีของเชื้อ A3-3 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ MRSA H78	38
26	แสดงผลการทดสอบไบโอออโตกราฟีของเชื้อ A16-1 ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ MRSA P45	39

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 ระดับ antibiosis ในวันที่ 4 ของการเจริญ Th121 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร), ก: ระดับความแรง 3+ บนอาหาร 0.5xPDA; ข: ระดับความแรง 3+ บนอาหาร SDA; ค: ไม่พบ antibiosis บนอาหาร LNA 17

2 ระดับ antibiosis ของ SC15A3 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *F. oxysporum* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร) บนอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 4 วัน, ก: ระดับความแรง 2+ บนอาหาร 0.5xPDA; ข: ระดับความแรง 2+ บนอาหาร SDA;ค: ไม่ยับยั้งการเจริญบนอาหาร LNA 18

3. ระดับ antibiosis เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์ Br830 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *F. oxysporum* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร) บนอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 4 วัน, ก: ระดับความแรง 4+ บนอาหาร 0.5xPDA; ข: ระดับความแรง 3+ บนอาหาร SDA; ค: ระดับความแรง 1+ บนอาหาร LNA 18

4 การยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดที่เตรียมจากน้ำหมักราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ ในวันที่ 4 ของการเจริญ, ก: สารสกัดจาก Th111 บนแผ่น disc เมื่อวางร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*; ข: สารสกัดจาก Br830 บนแผ่น disc เมื่อวางร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides*; 1= PDB, 2 = 0.5xPDB, 3 = YMB, 4 = LNB, 5 = SDB, CT- = แผ่น disc ชุบสารละลาย 0.5%DMSO ใช้เป็นตัวควบคุมผลลบ 24

5 การเจริญราเอ็นโดไฟท์ *A. brassicicola* ที่เลี้ยงในอาหารเตรียมจากธัญพืชชนิดต่างๆ ในวันที่ 4 ของการเจริญ, ก: รำข้าวผสมกับน้ำกลั่น อัตราส่วน 60 กรัม: 40 มิลลิลิตร; ข: ปลายข้าวหุงสุก 100 กรัม; ค: ข้าวฟ่างหุงสุก 100 กรัม 25

6 การเจริญ *A. brassicicola* เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ Br834 ที่เลี้ยงในอาหารเตรียมจากธัญพืชรำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง ความเข้มข้นสารสกัด 4,000 µg/ml (40 µg /diac), ก: สารสกัดจากรำข้าวผสมกับข้าวฟ่างอัตราส่วน 1:1; ข: สารสกัดจาก Br834 ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวผสมกับข้าวฟ่างอัตราส่วน 1:1; ค: สารสกัดจาก Br834 ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวผสมกับข้าวฟ่างอัตราส่วน 1:2; ง: สารละลาย 10%DMSO 26

7 สารประกอบที่ได้จากการวิเคราะห์ TLC ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ Th121 ในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ ที่ เตรียมจากน้ำกลั่น; ก: 0.5 PDB, ข: PDB, ค :YMB, ง: LNB, จ: SDB 28

8 แสดง จำนวนสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารออกฤทธิ์ บนแผ่นโครมาโทแกรม เมื่อนำสารสกัดหยาบ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารต่างกัน จะพบว่าจำนวนองค์ประกอบของสารจะแตกต่างออกไป 32

9 โครมาโทแกรมแสดงสารที่เป็นองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ใน แต่ละfraction ของแอคติโนมัยซีท 54- 4 34

10 โครมาโทแกรมแสดง สารที่เป็นองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ใน แต่ละ fraction ของ แอคติโนมัยซีท A1-3 34

11 โครมาโทแกรมแสดง สารที่เป็นองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ใน แต่ละ fractionของ แอคติโนมัยซีท A3-3 35

1. บทนำ

ป่าชายเลนเป็นแหล่งของทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญ ซึ่งนอกจากจะทำหน้าที่ผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารแล้ว ยังมีจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ทั้งรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท โดยเฉพาะอย่างยิ่งราที่เป็นเอ็นโดไฟท์และแอคติโนมัยซีท เพราะเป็นจุลินทรีย์ที่หลายรายงานพบว่าเป็นแหล่งของการสร้างสารแอนติไบโอติกหลายชนิดและชนิดที่แยกได้จากบริเวณรากพืชชายเลนยังไม่มีการศึกษามากนักในประเทศไทย การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแอนติไบโอติกจากจุลินทรีย์เหล่านี้ ก็เป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญของการมีโอกาสค้นพบสารชนิดใหม่ ๆ เนื่องจากถ้าอาหารหรือสภาวะในการเลี้ยงไม่เหมาะสมสารที่สร้างขึ้นอาจมีปริมาณน้อยเกินไปจนไม่สามารถตรวจพบ ทำให้พลาดที่จะได้พบสารชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพที่ดีในการออกฤทธิ์ยับยั้ง นอกจากนี้พื้นที่ของป่าชายเลนเป็นบริเวณที่มีการเชื่อมต่อกับทะเล ดังนั้นสิ่งแวดล้อมของทั้งราเอ็นโดไฟท์ และแอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ ณ บริเวณนี้จึง ต้องเป็นชนิดที่มีการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมที่ยากลำบากหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นความแห้งแล้งและอุณหภูมิสูงเวลาที่น้ำลง และเวลาที่มีความชื้นสูงและอุณหภูมิที่ต่ำลงในช่วงเวลาน้ำขึ้น ซึ่งมีผลต่อการสร้างสารเมตาโบไลท์ต่าง ๆ ไม่มากก็น้อย และทั้งราเอ็นโดไฟท์ ของพืชป่าชายเลนก็มีความหลากหลายของชนิด โดยเฉพาะที่ได้จากต้นโกงกางใบใหญ่ (*Rhiizophora mucronata*) Ananda and Sridhar (2002) และแอคติโนมัยซีท บริเวณป่าชายเลนก็มีรายงานว่ามักจะเป็นแหล่งที่อยู่ของแอคติโนมัยซีทใหม่ ๆ และมีชนิดที่สามารถสร้างสารไบโอแอคทีฟที่หลากหลายชนิดจำนวนมาก (รัตนาภรณ์, 2541; Hong et al, 2007; Srivibool and Sukchotiratana, 2006) ซึ่งหากได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารเหล่านี้ก็จะทำให้มีโอกาสที่จะได้สารใหม่ ๆ มากขึ้นตามไปด้วย

ราเอ็นโดไฟท์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช และสามารถเจริญได้ดีโดยไม่ทำให้เกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติแก่พืชชนิดนั้น ๆ (Petrini, 1991) สามารถพบราเอ็นโดไฟท์ได้ในพืชตระกูลต่างๆ เป็นจำนวนมาก และพบว่ารากลุ่มนี้มีความสำคัญต่อพืชที่อาศัยอยู่ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยจะช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านทานศัตรูพืชต่างๆ เพิ่มความแข็งแรงและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ได้ดีกว่าพืชที่ไม่มีเอ็นโดไฟท์อาศัยอยู่ ทั้งยังมีอิทธิพลต่อความหลากหลายทางชีวภาพหรือพืชกลุ่มนั้น ๆ ด้วย ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเกษตรกรรมและพืชเศรษฐกิจ (Saikkonen, 2007) จึงมีการศึกษาวิจัยราเอ็นโดไฟท์กันอย่างกว้างขวาง มีรายงานว่าราเอ็นโดไฟท์สามารถผลิตเอนไซม์ที่จำเป็น สำหรับอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช นอกจากนี้ยังพบว่าราเอ็นโดไฟท์จากพืชต่าง ๆ สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพต้านจุลินทรีย์หลายชนิด รวมทั้งต้านราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (Park et al., 2005; Xu et al., 2009; Chaeprasert et al., 2010)

ส่วนแอคติโนมัยซีทก็เป็นแหล่งของการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายชนิด จากการสำรวจรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ และสารแอนติไบโอติก ของ Lazzarini et al (2000) พบว่า ในจำนวนสารแอนติไบโอติกที่มีอยู่ในปัจจุบันประมาณกว่า 8000 ชนิดนั้น พบว่ามากกว่า 60% ถูกสร้างมาจากแอคติโนมัยซีท โดยที่เป็นสารที่ Streptomycetes สร้างขึ้น 45.6% และอีกประมาณ 16% สร้างได้จากแอคติโนมัยซีทที่หายาก และสารแอนติไบโอติกที่สร้าง

นั้นส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีทใน Family *Streptomyceteaceae* รองลงมาได้แก่ *Micromonosporaceae, Pseudonocardiaceae, Nocardiaceae* และ *Streptosporangiaceae* ตามลำดับ และจาก หลาย ๆ รายงานได้แสดงให้เห็นว่า แอคติโนมัยซีทมีการแพร่กระจายโดยทั่วไปในตะกอนของทะเลชายฝั่ง รวมไปถึงสิ่งแวดล้อมทางทะเลอื่น ๆ และตะกอนก้นทะเลลึก ๆ ด้วย (Ghanem et al., 2000; Pathom-aree,et al. 2006; Bull, et al. 2005; Maldonado, et al., 2005; Bredholdt, et al. 2007, Bredholdt, et al. 2008). นับว่าแอคติโนมัยซีทก็เป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความน่าสนใจ ในการค้นหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในป่าชายเลนเขตร้อนของประเทศไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศเป็นประเทศเขตร้อน ที่มักประสบปัญหาราก่อโรคในพืชเศรษฐกิจ และราจัดเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำความเสียหายให้แก่พืชผลมากที่สุด มีรายงานว่ามีรามากกว่า 8,000 ชนิดที่เป็นสาเหตุโรคพืช และมีพืชชั้นสูงรวมถึงพืชผลทางการเกษตรเกิดโรคเนื่องจากราไม่น้อยกว่า 100,000 โรค รากลุ่มอะนามอร์ฟเป็นรากลุ่มหนึ่งที่มีรายงานการเป็นสาเหตุโรคพืชในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ทั้งในประเทศและต่างประเทศทั่วโลก เช่น *Colletotrichum* spp. เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนส *Fusarium* spp. สาเหตุโรคเน่าและโรคเหี่ยว *Alternaria* spp. ก่อโรคใบจุดดำในพืชตระกูลกะหล่ำ (Menzies et al., 1990; Zulfiqar et al., 1996; Adaskaveg and Hartin, 1997; Intana et al., 2005; Muto et al., 2006; Srinon et al., 2006) โรคพืชเหล่านี้ทำความเสียหายทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิตเป็นอย่างมาก ส่งผลให้ผลผลิตที่ได้มีจำนวนน้อยไม่คุ้มกับการลงทุน และต้องมีการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันเชื้อราก่อโรคเหล่านี้ ซึ่งสารเคมีที่ใช้อาจส่งผลเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ต่อมนุษย์และสัตว์ (นิตยา โนคำ, 2552)

การควบคุมโรคพืชทางชีววิธี เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ควบคุมโรคพืชได้ และปลอดภัยกว่าการใช้สารเคมี ซึ่งอาจทำได้โดยใช้ราที่ไม่ก่อโรคในการควบคุมราปรปักษ์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชโดยตรง หรืออาจใช้สารก่อฤทธิ์ที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อทำลายราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (Hostettmann and Marston, 1994; Intana et al., 2005; Xie et al., 2008) การใช้สารสกัดจากราในการยับยั้งราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (antifungal activity) มีรายงานไว้น้อยมากเมื่อเทียบกับวิธีแรกแต่ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมามีผู้ให้ความสนใจกันมากขึ้น เนื่องจากพบว่าราเอ็นโดไฟท์ สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด (Park et al., 2005)

จากการสังเกตและการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่าความสามารถของราเอ็นโดไฟท์ ในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพแตกต่างกัน แม้ในราสายพันธ์เดียวกันที่เลี้ยงไม่พร้อมกันหรือเลี้ยงในสภาวะที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อชนิดและความเค็มอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลัก เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ที่มีต่อความสามารถของราเอ็นโดไฟท์จากพืชชายเลนในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยใช้ราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิดคือ *Alternaria brassicicola, Colletotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium oxysporum* เป็นตัวแทนราที่นำมาทดสอบในการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแอนติไบโอติกของราเอ็นโดไฟท์และของแอคติโนมัยซีท ที่แยกได้จากบริเวณรากพืชป่าชายเลน เพื่อจะได้สามารถเลี้ยงเชื้อรา หรือเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารแอนติไบโอติกได้ ให้มีการสร้างในปริมาณมากเพื่อจะได้มีสารในปริมาณที่เพียงพอต่อการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ

2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ราเอ็นโดไฟท์

ราเอ็นโดไฟท์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชเกือบทุกชนิด โดยอาศัยแบบพึ่งพาและไม่ก่อให้เกิดโรคแก่พืชที่อาศัย พืชที่เป็นโฮสต์จะทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารให้กับเชื้อรา ขณะเดียวกันราที่เป็นเอ็นโดไฟท์ จะให้ประโยชน์แก่พืชที่อาศัยอยู่ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยจะช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านทานศัตรูพืชต่างๆ เพิ่มความแข็งแรงและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมราเอ็นโดไฟต์ (Guo et al., 2008; Tan et al., 2001) และราทะเล (Bugai and Ireland, 2002) จากไม้ในป่าชายเลน เป็นตัวอย่างของราชั้นสูงกลุ่มใหม่ที่มีการศึกษาในประเทศไทยเมื่อประมาณ 15 ปีที่ผ่านมานี้ เป็นที่ทราบกันว่ากลุ่มเชื้อราเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีประโยชน์หลายชนิด จากรายงานวิจัยหลายรายงานพบว่าราเอ็นโดไฟท์เป็นแหล่งสำคัญแหล่งหนึ่งที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอันดับสอง ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด

ในปัจจุบันการใช้ยารักษาโรคกำลังประสบปัญหาการดื้อยา ทำให้นักวิทยาศาสตร์ต้องค้นหาตัวยาใหม่ ๆ ในการรักษาโรค ซึ่งในปัจจุบันอาจมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีในตัวยาเดิมให้มีฤทธิ์ที่ดีขึ้น หรือการหาตัวยาใหม่ ๆ จากแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ เช่น จากแบคทีเรีย จากรา รวมทั้งจากราเอ็นโดไฟท์ มีรายงานการศึกษาพบว่าการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งและเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดดื้อยาจากราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยและพืชป่าชายเลน โดยเฉพาะราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลนของไทยมีความน่าสนใจมาก เนื่องจากราเหล่านี้มักผลิตสารที่มีโครงสร้างที่น่าสนใจและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี เนื่องจากบริเวณป่าชายเลนมีความผันแปรมากทั้งทางทางกายภาพและชีวภาพสูง ต่อไปนี้เป็นรายงานจากการศึกษาราเอ็นโดไฟท์จากทั้งในประเทศไทยและในต่างประเทศ

ราเอ็นโดไฟท์ส่วนใหญ่เป็นพวกอะนามอร์ฟ (Lumyong et al., 2004) ราทะเลจากพืชและไลเคนส์ส่วนใหญ่เป็นรากลุ่มแอสโคมัยซีส ซึ่งเป็นรากลุ่มใหญ่ของโลก แต่เป็นรากลุ่มที่มีผู้ศึกษาและรายงานไว้น้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในป่าชายเลนประเทศไทย ส่วนใหญ่ยังอยู่ในระยะของการสำรวจและรวบรวมสายพันธุ์ เนื่องจากการแยกรากลุ่มแอสโคมัยซีสจากแหล่งตัวอย่างในธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงเป็นขั้นตอนที่ต้องอาศัยทักษะและประสบการณ์ แต่หากได้มาแล้วมีโอกาสสูงที่ราในกลุ่มนี้จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ใหม่ ๆ (Isaka et al., 2002; Guan et al., 2005) เนื่องจากป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศ ที่มีแหล่งอาหารและสภาวะที่เหมาะสมให้เป็นที่อยู่ของราหลายกลุ่ม ระบบนิเวศมีลักษณะเฉพาะที่ทำให้ราที่อาศัยอยู่ต้องมีการปรับตัวและแข่งขันเพื่อการเจริญ ทำให้ต้องมีกลไกป้องกันตัวเองรวมทั้งมีการผลิตสารต่าง ๆ ที่มีลักษณะเฉพาะ และเป็นประโยชน์ต่อตัวราเองออกมา (Guan et al., 2005) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้

Kumaresan et al. (2001) ศึกษาราเอ็นโดไฟท์ ของพืช 7 ชนิด ในป่าชายเลนเขตน้ำกร่อยของประเทศอินเดีย และพบว่า สามารถแยกราไมโตสปอร์ (อะนามอร์ฟ) แอสโคมัยซีส และราที่พบแต่เพียงเส้นใยจากส่วนใบของพืช ราเอ็นโดไฟท์หลายชนิดสามารถพบได้บนโฮสท์มากกว่า 1 ชนิด และในโฮสท์ต่างชนิดชนิดพบราเอ็นโดไฟท์เด่น ๆ ต่างชนิด

กัน Schmeda-Hirschmann et al. (2004) รายงานการสร้าง secondary metabolite ชนิดใหม่ 2 ชนิด จากราเอ็นโดไฟท์ 2 ชนิด คือ *Penicillium janczewskii* และราที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้อีก 1 ชนิด ที่หมักใน potato dextrose broth

Guo et al. (2008) ได้รายงานว่าราเอ็นโดไฟท์พบได้บนพืชทุกชนิด และพบว่าราเหล่านี้เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ชีวภาพใหม่ ๆ มากมาย ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม โดยย้ำถึงการศึกษาบทบาทสารก่อฤทธิ์ชีวภาพจากเอ็นโดไฟท์ รวมถึงลักษณะงานวิจัยในอนาคตและปัญหาที่พบในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากเอ็นโดไฟท์ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่องานวิจัยในปัจจุบัน

Schmeda-Hirschmann et al. (2005) ได้รายงานการสร้าง secondary metabolite ชนิดใหม่ 2 ชนิด ที่ได้จากราเอ็นโดไฟท์ 2 ชนิด คือ *Penicillium janczewskii* และราที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้อีก 1 ชนิด โดยหมักใน potato dextrose broth

Joseph and Priya (2010) ได้ทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการสร้างสารต้านราจากเอ็นโดไฟท์ และศักยภาพในการนำมาใช้ในทางการแพทย์และการเกษตร เช่น *Muscodor albus* สร้างสารระเหยหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งราและแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังเน้นให้เห็นถึงความสำคัญของงานวิจัยเกี่ยวกับเอ็นโดไฟท์ในด้านการเกษตร โดยสารสกัดจากเอ็นโดไฟท์หลากหลายชนิดสามารถยับยั้งราที่เป็นสาเหตุโรคพืชได้

Strobel et al. (2004) ได้รายงานเช่นกันว่าจุลินทรีย์ที่เป็นเอ็นโดไฟท์นั้นสามารถพบได้ในพืชทุกชนิด ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้อาจอาศัยอยู่ตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพืชที่เป็นโฮสท์ และมีลักษณะความสัมพันธ์ในหลาย ๆ ลักษณะตั้งแต่การพึ่งพาอาศัยกัน Symbiosis) จนกระทั่งถึงความสัมพันธ์ที่ให้โทษ เช่น ก่อให้เกิดโรค (pathogenic) จุลินทรีย์ที่เป็นเอ็นโดไฟท์ จะให้ความช่วยเหลือแก่พืชที่เป็นโฮสท์ด้วยการสร้างสารที่เป็นประโยชน์ ช่วยปกป้องพืชให้มีชีวิตอยู่รอดได้ด้วยดี และเมื่อมีการสกัดสารเหล่านี้ออกมาศึกษา ก็พบว่า สารที่ราเอ็นโดไฟท์สร้างขึ้นเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคในปัจจุบันได้ รวมทั้งเป็นประโยชน์ทางด้านการเกษตร และอุตสาหกรรม และสารเหล่านี้มีหลายชนิด ตั้งแต่สารแอนติไบโอติก สารยับยั้งเชื้อรา สารกดภูมิคุ้มกัน สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง เหล่านี้เป็นเพียงตัวอย่างของสิ่งที่พบได้จากการแยกเชื้อพวกเอ็นโดไฟท์ สกัดสารที่เชื้อสร้างได้มาศึกษา ทำสารให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของสาร

จากการศึกษาของ ชัยวัฒน์ บุญมากาศ และคณะ (2550) ได้ทำการศึกษาศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอ็นโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในพืชวงศ์ stemonaceae (หนอนตายหยาก) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค คือ *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas solanacearum* subvar.1, *Pseudomonas solanacearum* subvar.2 และ *Xanthomonas citrii* พบว่า ราเอ็นโดไฟท์บางไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 4 สายพันธุ์

จากการศึกษาของพูนลาภ ป้อมเป็ง และคณะ (2550) ซึ่งได้ตรวจกรองการออกฤทธิ์เบื้องต้นของราเอ็นโดไฟท์เบื้องต้นด้วยวิธี dual-culture agar diffusion ที่ออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* พบราเอ็นโดไฟต์ที่แยกจากตัวอย่างพืชสมุนไพร (กรวยป่า เพกา และกอมขม) ที่มีสัณฐานวิทยาทางโคโลนี ลักษณะของสปอร์ แตกต่างกัน จำนวน 40 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเชื้อที่แตกต่างกัน 6 ชนิด มีจำนวนถึง 15 ไอโซเลต (37.5 %) ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบบางชนิด ยกเว้น *P. aeruginosa* ราเอ็นโดไฟต์ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ต้าน *S. aureus* พบว่าชนิดของ

อาหารเพาะเชื้อมีผลต่อราเอ็นโดไฟต์ทั้งในด้านการสร้างสารออกฤทธิ์และความแรงของสารออกฤทธิ์ ราเอ็นโดไฟต์ส่วนใหญ่ที่ออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เป็นราที่เพาะเลี้ยงบน malt extract agar การเพาะเลี้ยงราเอ็นโดไฟต์ในสภาวะที่แตกต่างกันคือเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งจะให้ฤทธิ์ต้าน จุลินทรีย์ที่แตกต่างกับเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวอีกส่วนหนึ่งด้วย

2.2 แอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทเป็นแหล่งของการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายชนิด จากการสำรวจรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ และสารแอนติไบโอติก ของ Lazzarini และคณะ (2000) พบว่า ในจำนวนสารแอนติไบโอติกที่มีอยู่ในปัจจุบันประมาณกว่า 8000 ชนิดนั้น พบว่ามากกว่า 60% ถูกสร้างมาจากแอคติโนมัยซีท โดยที่เป็นสารที่ Streptomycetes สร้างขึ้น 45.6 % และอีกประมาณ 16% สร้างได้จากแอคติโนมัยซีทที่หายาก และสารแอนติไบโอติกที่สร้างนั้นส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีทใน Family *Streptomyceteaceae* รองลงมาได้แก่ *Micromonosporaceae, Pseudonocardiaceae, Nocardiaceae* และ *Streptosporangiaceae* ตามลำดับ และจาก หลาย ๆรายงานได้แสดงให้เห็นว่า แอคติโนมัยซีทมีการแพร่กระจายโดยทั่วไปในตะกอนของทะเลชายฝั่ง รวมไปถึงสิ่งแวดล้อมทางทะเลอื่น ๆ และตะกอนก้นทะเลลึก ๆ ด้วย (Ghanem et al., 2000; Pathom-aree,et al. 2006; Bull, et al. 2005; Maldonado, et al., 2005; Bredholdt, et al. 2007, Bredholdt, et al. 2008).

การค้นพบสารแอนติไบโอติกจากแอคติโนมัยซีทที่ได้จากระบบนิเวศทางทะเลนั้น เริ่มตั้งแต่มีรายงานของ Okami (1976) ซึ่งได้พบสาร istamycin จาก *Streptomyces tenjimariensis* ที่แยกได้จากโคลนในทะเลตื้น ๆ ของอ่าวซากามิ ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งสาร istamycin นี้ประกอบด้วยน้ำตาลอะมิโนหนึ่งโมเลกุล และ aminocyclitol อีกหนึ่งโมเลกุลและสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมากมาย รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ดื้อยาต่อกลุ่ม aminoglycoside อื่น ๆ ด้วย

ในปี 1989 Miyado และคณะ (Miyado et al. 1989) ได้เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญในอาหารที่ดีของการค้นพบสารแอนติไบโอติกชนิดใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน *Streptosporangium* spp. ค้นพบมากกว่า 30 ชนิดในช่วงเวลา 30 ปี ที่ผ่านมานี้นับจากรายงานการค้นพบครั้งแรกใน ปี 1966 ซึ่งหลายชนิดของแอนติไบโอติกที่สร้างขึ้นนี้ส่วนมากแล้วอยู่ในรูปของสารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนและหลากหลายมาก

จากการศึกษาวิจัยของ Hong และคณะ (2009) ซึ่งได้แยกได้จากดินป่าชายเลนรวม 8 แห่งของประเทศจีน โดยแยกแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมดประมาณ 2000 กว่าไอโซเลต และในจำนวนนี้พบว่ามีแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารเมตาโบไลท์อันดับ 2 ที่สำคัญจำนวนมาก โดยมีทั้งสารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกของลำไส้ (human colon tumor) ยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* และยับยั้ง *Staphylococcus aureus* จำนวน ประมาณ 20%, 50% และ 10% ตามลำดับ ขณะที่มีแอคติโนมัยซีทอีก 3 % ที่สสามารถยับยั้งโปรตีนไทโรซีนฟอสเฟต 1 บี (Protein tyrosine phosphate 1B, PTP1B) ซึ่งเป็นโปรทีนที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับอาการของโรคเบาหวาน นอกจากนี้ยังมีอีก 9 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเอ็นไซม์ aurora kinaseA ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่มีความสัมพันธ์กับอาการของโรคประสาทเสื่อม (neurodegenerative) ไอโซเลตทั้งหมดนี้ได้ถูกนำมาศึกษารูปร่างลักษณะเพื่อจำแนกชนิดในระดับจีนัส พบว่ามีทั้งหมด

13 จีนัส ที่พบมากที่สุดคือ *Micromonospora* และ *Streptomyces* ส่วนแอคติโนมัยซีทที่ให้ผลที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity) มีทั้งหมด 7 จีนัส และโดยภาพรวมแล้วดินจากป่าชายเลนพบแอคติโนมัยซีทที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมากและในช่วงระยะเลา 6-8 ปีที่ผ่านมานี้ พบว่ามีการค้นพบสารแอนติไบโอติกทั้งที่เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ และสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง และเมตาโบไลท์อื่น ๆที่เป็นสารใหม่ ๆ จำนวนมาก จาก Actinomycetes ทะเล (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงสารเมตาโบไลท์ใหม่ ๆที่สร้างจาก marine actinomycetes ระหว่างปี 2003-2005 (Lam, 2006)

Compounds	Source	Activity
Abyssomicins	*Verrucosispora* sp.	Antibacterial
Aureoverticillactam	*Streptomyces aureoverticillatus*	Anticancer
Bonactin	*Streptomyces* sp.	Antibacterial,;antifungal
Caprolactones	*Streptomyces* sp.	Anticancer
Chandrananimycins	*Actinomadura* sp.	Anticancer; antialgal; antifungal; antibacterial
Chinikomycins	*Streptomyces* sp.	Anticancer
Chloro-dihydroquinones	*Novel Actinomycete*	Antibacterial, Anticancer
Diazepinomicin	*Micromonospora* sp.	Antibacterial; anticancer; anti-inflamatory
3,6-disubstituted indoles	*Streptomyces* sp.	Anticancer
Frigocyclinones	*Streptomyces griseus*	Antibacterial
Glaciapyrroles	*Streptomyces* sp.	Antibacterial
Gutinimycin	*Streptomyces* sp.	Antibacterial
Helquinoline	*Janibacter limosus*	Antibacterial
Himalomycins	*Streptomyces* sp.	Antibacterial
IB-00208	*Actinomadura* sp.	Anticancer
Komodoquinone A	*Streptomyces* sp.	Neuritogenic activity
Lajollamycin	*Streptomyces nodusus*	Antibacterial
Marinomycins	*Marinispora*	Antibacterial; anticancer
Michercharmycins	*Thermoactinomyces* sp.	Anticancer
MKN-349A	*Nocardiopsis* sp.	Unknown biological activity
Salinosporamide A (NPI-0052)	*Salinispora tropica*	Anticancer
Sporolides	*Salinispora tropica*	Unknown biological activity
Trioxacarcins	*Streptomyces* sp.	Antibacterial; anticancer; antimalarial

จากตารางข้างบนนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ของแอคติโนมัยซีท ที่ยังคงสามารถพบได้เรื่อย ๆ และในแอคติโนมัยซีทชนิดหนึ่ง ๆ อาจให้สารออกฤทธิ์ที่สำคัญหลายประเภท ทั้งที่เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ เซลล์มะเร็ง หรือมีสารยับยั้งสาหร่าย หรือมาลาเรียร่วมด้วย เป็นต้น นอกจากนี้ตัวอย่างของยาปฏิชีวนะที่สร้างได้จากแอคติโนมัยซีทในปัจจุบันก็มีเป็นจำนวนมากที่มีการใช้งาน และมีการผลิตในทางอุตสาหกรรม ตัวอย่างของยาปฏิชีวนะที่สร้างโดยแอคติโนมัยซีทแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่เป็นยารักษาโรคและสร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยซีท (Borgos, 2006)

Antibiotic class	Example drug	Producing actinomycete
Glycopeptides	Vancomycin	*Amycolatopsis orientalis*
Aminoglycosides	Streptomycin	*Streptomyces griseus*
Macrolides	Erythromycin	*Saccharopolyspora erythraea*
Tetracyclins	Chlortetracycline	*Streptomyces aureofaciens*
Chloramphenicol	Chloramphenicol	*Streptomyces venezuelae*
Lipopeptides	Daptomycin	*Streptomyces roseosporus*
Rifamycins	Rifampicin	*Amycolatopsis mediterranei*
Polyenes	Nystatin	*Streptomyces noursei*

Xiao et al. (2008) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากป่าชายเลนในเมือง Zhangzhou และ เมือง Fujian ของประเทศจีน โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Candida albicans* และ *Rhizoctonia solani* รวมทั้งเซลล์เนื้องอก 3 ชนิด คือ BEL 7402, A549 และ HL 60 cell ines พบว่า 42.3 % ของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มีสารแอนติไบโอติกยับยั้งจุลินทรีย์ 37.4 % ของแอคติโนมัยซีท พบว่ามีสารยับยั้งเซลล์เนื้องอก (anti-tumor activities) และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ของแอคติโนมัยซีทเหล่านี้ พบว่าเป็น *Streptomyces* 89% *Microomonospora* 6.1 % *Saccharomonospora* 0.6 % *Actinomadura* 3.7 % และ *Nocardiopsis* 0.6 % และพบว่าเป็น *Streptomyces* ชนิดใหม่ถึง 3 isolates

จากรายงานของ Bister et al. (2004) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่คัดเลือกเชื้อได้จาก *Actinomyces* จำนวน 200 ไอโซเลต จากทั้งบนบกและในทะเล และได้สกัดสารออกฤทธิ์จากแอคติโนมัยซีทที่พบเหล่านี้ ได้พบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่รบกวนการสร้างกรด *para*-aminobenzoic (*p*ABA) ซึ่งเป็นสาร intermediate ที่สำคัญที่นำไปสู่การสร้างสาร tetrahydrofolate และการค้นพบครั้งนี้ได้นำไปสู่การค้นพบสาร ออกฤทธิ์ชนิดใหม่ abyssomicin G, H และ abyssomicin- C

ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภท polyketyde ที่สร้างได้จาก *Verrucosispora* AB-18-032 ซึ่งเป็นแอคติโนมัยซีทจากทะเล แยกเชื้อได้จากตะกอนก้นทะเลของประเทศญี่ปุ่น ที่ความลึก *289* เมตร สาร abyssomicin C มีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA ได้ดีมาก และมีค่า MIC ที่ 4 µg/ ml และ สามารถยับยั้ง VRSA ได้ที่ 13 µg /ml (Keller et al., 2007)

2.3 **ปัจจัยสำคัญในการสร้างสารแอนติไบโอติกในแอคติโนมัยซีท**

จากการศึกษาของ Gunnarsson et al., (2003) ได้ศึกษาการสร้างสาร A 40926 จากแอคติโนมัยซีทจีนัส *Nonomuraea* sp. ATCC 39727 จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่แตกต่างกันนั้น พบว่าในการสร้างสารเมตาโบไลท์ของเชื้อตัวนี้ไม่ได้ถูกกระตุ้นให้สร้างได้มากขึ้นเมื่อเชื้อมีการเจริญเต็มที่ แต่จะเริ่มมีการสร้างสารเมื่อการเจริญเริ่มลดลง หรือเกิดขึ้นเมื่อสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเริ่มขาดแคลนลง ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว สารอาหารนั้นมีความสำคัญทั้งสำหรับอัตราการสร้างสารเมตาโบไลท์อันดับสอง และสำหรับการกระตุ้นให้เกิดขบวนการสร้างสาร ยกตัวอย่างในกรณีของการสร้างสาร actinorhodin โดย *S. coelicolor* ซึ่งถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างเมื่อ โพแตสเซียมฟอสเฟต และไนโตรเจน เริ่มขาดแคลน หรือเมื่ออัตราการเจริญเริ่มลดลง นอกจากนั้นอัตราการสร้าง Actinorhodin ยังเป็นปฏิภาคกลับกับความเข้มข้นของสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน และการสร้าง chloramphenicol ใน *S. venezualae* จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อการใช้ C- และ N- ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นไปอย่างไม่ค่อยดี อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของกลูโคสที่มีอยู่มากในช่วงเริ่มต้นของการเลี้ยงนั้นมีผลตรงกันข้ามกับการสร้างสาร chloramphenicol แต่ว่าไม่ส่งผลให้การเริ่มขบวนการสร้าง แอนติไบโอติกใน *S. venezualae* ช้าไปในการเลี้ยงแบบ batch culture ส่วนใน *Amycolatopsis orientalis* ที่สามารถสร้าง vancomycin นั้น พบว่าเมื่อในอาหารมีปริมาณฟอสเฟตน้อย ๆ ก็จะช่วยเพิ่มการสร้างสารแอนติไบโอติกทั้งในถังหมักแบบbatch และ continuous และคล้าย ๆ กับกรณีการสร้างสาร teichoplanin ใน *Actinoplanes teichomyceticus* เมื่อความเข้มข้นของฟอสเฟต และแอมโมเนียมในอาหารลดลง จะทำให้การสร้างสาร teichoplanin ลดลงไปในการเลี้ยงแบบ batch fermentation

จากรายงานของ Parungao et al. (2007) ซึ่งได้ศึกษาแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากตะกอนดินทั้งจากบริเวณน้ำกร่อย น้ำทะเล และบริเวณดินแห้งจากเกาะ Samal ประเทศฟิลิปปินส์ โดยแยกแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 54 ไอโซเลต เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและรา เช่น *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Candida utilis* และ *Aspergilus niger* พบว่ามีแอคติโนมัยซีท 14 ไอโซเลต จากทั้งหมด 54 ไอโซเลตสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด มี 13 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด และพบว่ามี 4 ไอโซเลตที่ที่สามารถยับยั้งเชื้อราอย่างน้อย 1 ชนิด พบว่าตัวอย่างที่แยกได้จากดินแห้งนั้นให้สารออกฤทธิ์สูงกว่าบริเวณอื่น โดยมีถึง 52 % ที่ให้สารยับยั้งแบคทีเรียและ 13 % ที่ให้สารยับยั้งเชื้อรา แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากตะกอนทะเลไม่ให้สารออกฤทธิ์และมี 1 ไอโซเลตที่แยกจากบริเวณน้ำกร่อยที่ให้สารออกฤทธิ์

3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1. เชื้อทดสอบ

ราโรคพืช: *Alternalia brassicicola* DOAC 0436, *Colletotrichum gloeosporioides* DOAC 0782 และ *Fusarium oxysporum* DOAC 0436 จัดซื้อจากกรมวิชาการเกษตร

แบคทีเรียและยีสต์: *Bacillus subtilis* TISTR, *Escherichia coli*, *Candida albicans* TISTR 5239, จัดซื้อจาก TISTR และ *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, *MRSA* แยกได้จากคนไข้

3.2. ราเอ็นโดไฟท์

เป็นราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากใบโพธิ์ทะเล ลำพูและโปรงแดง จากโรงเรียนบางปะกงบวรวิทยายน (พิพิธภัณฑ์นิเวศป่าชายเลน) อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา และศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่ใช้ในการศึกษาแยกได้จากพืชป่าชายเลนชนิดต่าง ๆ และการจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอ็นโดไฟท์	host	การจัดจำแนก
Th021	โพธิ์ทะเล	Mycelia sterilia
Th121	โพธิ์ทะเล	Hyphomycete
Sc10A3	ลำพู	Ascomycete
Sc15A3	ลำพู	Mycelia sterilia
Br830	โปรงแดง	*Colletotrichum* sp.
Br834	โปรงแดง	Mycelia sterilia

3.3 แอคติโนมัยซีท

เป็นแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากป่าชายเลน จากจังหวัดจันทบุรี และจังหวัดชลบุรี ทั้งจากบริเวณที่ใกล้รากพืชชายเลน ดินเต็มไปด้วยสาหร่ายสีเขียวปกคลุม และจากบริเวณดินที่ค่อนข้างแห้ง

ตารางที่ 4 แอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกมาศึกษา แยกได้จาก ตะกอนชนิดต่าง ๆ

แอคติโนมัยซีท	แหล่งที่แยกเชื้อ	การจำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์
CH 54-4	ป่าชายเลนจันทบุรี	*Streptomyces*
A1-3	ป่าชายเลนชลบุรี	*Streptomyces*
A3-3	ป่าชายเลนชลบุรี	*Streptomyces*
A11-8	ป่าชายเลนชลบุรี	*Streptomyces*
A16-1	ป่าชายเลนชลบุรี	*Streptomyces*
SM16-2	ป่าชายเลนชลบุรี	*Streptomyces*
A19-5	ป่าชายเลนชลบุรี	*Streptomyces*

3.4 **วิธีการทดลองสำหรับราเอ็นโดไฟท์**

การทดสอบยืนยันปฏิสัมพันธ์ระหว่างเอ็นโดไฟท์และราสาเหตุ โรคพืช

3.4.1 ใช้ cork borer (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) เจาะชิ้นวุ้นจากบริเวณขอบโคโลนีเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่ทราบว่าสามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ที่เพาะเลี้ยงไว้ มาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, SDA และ LNA

3.4.2 ใช้ cork borer ขนาดเดียวกัน เจาะชิ้นวุ้นเชื้อราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporoides* หรือ *F. oxysporum* มาวางลงในจานเพาะเลี้ยงเดียวกันกับเอ็นโดไฟท์ โดยให้ราทั้ง 2 ชนิดห่างกัน 2.5 เซนติเมตร

3.4.3 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-7 วัน

3.4.4 บันทึกระยะห่างของเส้นใยราทั้งสองชนิด และแปลผลเป็นระดับยับยั้งแบบ antibiosis (antibiosis level or inhibition level, I.L.)

การแปลผลใช้หลักเกณฑ์ ดังนี้

Inhibition level; Very Strong (4+) I.L. >1 cm, Strong (3+) I.L. >0.6 -1cm, Moderate (2+) I.L. >0.2- 0.6 cm, Weak (1+) I.L. $\leq$ 0.2 cm

การเพาะเลี้ยงเชื้อเอ็นโดไฟท์ในอาหารเหลวและการสกัดสาร

3.4.5 ใช้ cork borer (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) เจาะบริเวณขอบของโคโลนีราเอ็นโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช 5 ชิ้น ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 0.5x PDB และ SDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.4.6 บ่มโดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน 7 วัน หรือ 14 วัน

3.4.7. นำราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงไว้มากรองด้วยกระดาษกรอง No.3 เพื่อแยกส่วนของเส้นใยราและอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากกัน นำส่วนอาหารเลี้ยงราที่ได้มาสกัดสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ ด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate เขย่าแรง ๆ 2 รอบ นานรอบละ 15-20 นาที

3.4.8 นำส่วน ethyl acetate ทั้ง 2 รอบมารวมกัน นำไปเพิ่มความเข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแห้ง (evaporator) ละลายสารสกัดที่ได้ด้วย 0.5% DMSO ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงราเพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ

แบ่งการศึกษาเป็น 2 ขั้นตอน

3.4.9. การศึกษาสภาวะเบื้องต้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงราในอาหารเหลว

ทำการศึกษาชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ความเค็มในอาหารที่เหมาะสม และระยะเวลาการเลี้ยง ของราเอ็นโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (จากผลปฏิสัมพันธ์) ได้แตกต่างกัน 6 สายพันธุ์ นำสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (น้ำหมัก) ไปทดสอบการยับยั้ง บันทึกผลเป็นระดับการยับยั้ง (I.L.)

ตารางที่ 5 สภาวะการเลี้ยงราในอาหารเหลวที่ศึกษา

เอ็นโดไฟท์	ชนิดอาหาร	ความเค็ม	ระยะเวลาการหมัก	ราทดสอบ
Th21	0.5xPDB, SDB, LNB	0, 10, 15, 20 และ 30 ppt	3 วัน 7 วัน และ 14 วัน	*C.gloeosporioides*
Th121				*A.brassicicola*
Sc10A3				*A.brassicicola*, *F.oxysporum*
Sc15A3				*A.brassicicola*, *F.oxysporum*
Br830				*C.gloeosporioides*, *F.oxysporum*
Br834				*C.gloeosporioides*, *F.oxysporum*

นำสภาวะที่ดีที่สุดจากข้อ 3.3.1 ทีละปัจจัย มาศึกษาผลต่อการสร้างสารก่อฤทธิ์ของราเอ็นโดไฟท์ 2 สายพันธ์ที่คัดเลือกไว้ และทดสอบการยับยั้งการเจริญต่อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ บันทึกผลเป็นระยะการยับยั้ง (Inhibition distance)

3.4.10 การศึกษาสภาวะเหมาะสมด้วยการหมักแบบ solid state

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ solid state
2. นำธัญญพืชที่ใช้เลี้ยงสัตว์หลายชนิด ผสมกันในอัตราส่วนแตกต่างกัน บรรจุลงในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วนำมาทดลองเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ดังนี้

- รำข้าวผสมกับน้ำกลั่น อัตราส่วน 60 กรัม: 40 มิลลิลิตร (รำข้าว: น้ำกลั่น)
- ปลายข้าวสุก 100 กรัม (1:1) (เป็นการหุงปลายข้าว 1 ถ้วยตวง ในน้ำกลั่น 1 ถ้วยตวง)
- ปลายข้าวสุก 100 กรัม (2:1) (เป็นการหุงปลายข้าว 2 ถ้วยตวง ในน้ำกลั่น 1 ถ้วยตวง)

- ข้าวฟ่าง 100 กรัม (1:1) (เป็นการหุงข้าวฟ่าง 1 ถ้วยตวง ในน้ำกลั่น 1 ถ้วยตวง)
- รำข้าวผสมกับปลายข้าว (1:1) นำรำข้าว 50 กรัมมาผสมกับปลายข้าวที่หุงสุกแล้ว 50 กรัม
- รำข้าวผสมกับปลายข้าว (2:1) นำรำข้าว 65 กรัมมาผสมกับปลายข้าวที่หุงสุกแล้ว 35 กรัม
- รำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง (1:1) นำรำข้าว 50 กรัมมาผสมกับปลายข้าวฟ่างที่หุงสุกแล้ว 50 กรัม
- รำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง (2:1) นำรำข้าว 65 กรัมมาผสมกับปลายข้าวฟ่างที่หุงสุกแล้ว 35 กรัม

3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. การหมัก

1. คัดเลือกราเอ็นโดไฟท์ที่ให้ผลยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดีนอาหารแข็งแต่ไม่ดีในอาหารเหลว เลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ solid state ที่ได้เตรียมไว้ดังข้อ 3.4.1 ในการทดลองนี้ได้เลือกรา Br834

2. นำรา Br834 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3. ใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตรเจาะโคโลนีของรา BUEN 834 นำชิ้นวุ้น ใส่ลงในฟลาสก์อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ solid state ฟลาสก์ละ 5 ชิ้น (ชนิดละ 4 ฟลาสก์)

4. นำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

5. นำฟลาสก์อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ solid state ชนิดละ 2 ฟลาสก์มาสกัดด้วย absolute ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง ก่อนนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 เก็บสารละลายที่กรองได้ใส่หลอดปราศจากเชื้อเพื่อนำไปประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง

6. นำฟลาสก์อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ solid state ชนิดละ 2 ฟลาสก์มาผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 50 มิลลิลิตร สกัดด้วย ethyl acetate ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ หลาย ๆ ครั้ง แล้วทิ้งไว้ 3 ชั่วโมงก่อนนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3

7. เติม ethyl acetate ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ข้อ 3.4.2.6 อีกครั้ง แล้วเขย่าเพื่อสกัดสารประมาณ 10 นาที แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 และแยกสารออกด้วยกรวยแยกเพื่อแยกเอาส่วนของ ethyl acetate เก็บใส่หลอดปราศจากเชื้อรวมกับในข้อ 3.2.2.6 แล้วนำไปประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง

3.4.11. **ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ด้วยวิธี** Disc diffusion

1. ใช้ cork borer (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) เจาะวุ้นที่มีราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporoides* หรือ *F. oxysporum* มาวางบนอาหารทดสอบ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน

2. ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดราจากเอ็นโดไฟท์ 20 ไมโครลิตร หยดลงบน disc มาตรฐานที่เตรียมไว้ วางตากลมให้แห้งสนิทจากนั้นนำมาวางบนจานอาหาร PDA โดยวางให้มีระยะห่างจากขอบโคโลนีราเอ็นโดไฟท์ ประมาณ 1.0 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 4 วัน ใช้สารละลาย 0.5% DMSO เป็นสารควบคุมผลลบ (ทำ 2 ซ้ำ)

3. บันทึกลักษณะการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช เทียบกับสารละลาย 0.5% DMSO (ทำ 3 ซ้ำ) โดยการวัดระยะห่างเส้นใยรากับแผ่น disc แปลผลเป็นระดับการยับยั้ง (inhibition Distance, I.L.) หรือบันทึกระยะยับยั้ง (inhibition Distance, I.D.)จากการวัดระยะห่างเส้นใยรากับแผ่น disc โดยตรง

การแปลผลใช้หลักเกณฑ์ ดังนี้

Inhibition level: Very strong 3+, I.L. ≥0.6 cm; Strong 2+, I.L. ≥0.3 -< 0.6 cm; weak 1+, I.L. ≥ 0.1 - < 0.3 cm; not inhibit -, IL < 0.1 cm; I.L. = Level of Inhibition distance between colony and disc

3.4.12 **ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากราในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ด้วยวิธี** Disc diffusion

1. นำสารสกัดจากเอ็นโดไฟท์ที่ให้ผลยับยั้งราก่อโรคพืชมาเจือจางด้วยสารละลาย 10% DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 5,000, 4,000, 3,000, 2,000 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการทดสอบการยับยั้งราก่อโรค ด้วยวิธี Disc diffusion แต่ใช้สารสกัดจากรำข้าวผสมกับข้าวฟ่างที่ไม่เติมสารสกัด อัตราส่วน 1:1และสารละลาย 10% DMSO เป็นสารละลายควบคุม (ทำ 2 ซ้ำ)

2. บันทึกลักษณะการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช เทียบกับสารละลายควบคุม โดยการวัดระยะห่างเส้นใยรากับแผ่น disc แปลผลเป็นระยะห่างขอบโคโลนีจากแผ่น disc (inhibition Distance, I.D.) หาค่าเฉลี่ย บันทึกระยะยับยั้งที่คำนวณได้เป็นเซนติเมตร

3.4.13 **ศึกษารูปแบบสารองค์ประกอบในสารสกัดด้วยวิธี** Thin layer chromatography (TLC)

1. หยดสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 20 x20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น silica gel 60F_{254} ขนาด 20x20 เซนติเมตร ให้จุดอยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่น 1.5 เซนติเมตร วางผึ่งให้สารแห้ง

2. นำแผ่น TLC วางในภาชนะปิดสนิท ภายในบรรจุสารละลาย chloroform และ methanol ในอัตราส่วน 9:1 ให้ระดับสารละลายอยู่ต่ำกว่าสาร

3. เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนถึงตำแหน่ง 0.5 เซนติเมตร จากขอบบนนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะวางผึ่งให้แห้ง

4. ตรวจสอบสารประกอบที่แยกออกจากกันใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.5 ขั้นตอนและวิธีการสำหรับแอคติโนมัยซีท

3.5.1 การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ให้สารแอนติไบโอติก

เนื่องจากแอคติโนมัยซีทมีความแตกต่างของการสร้างสารแอนติไบโอติก ตามความแตกต่างของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อมากที่สุด จึงขอเน้นในเรื่องนี้เป็นพิเศษ นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากบริเวณรากพืชป่าชายเลน (ที่มีเศษซากของรากพืช)ที่สามารถสร้างสารแอนติไบโอติกได้ มาทดสอบการสร้างสารแอนติไบโอติกด้วยวิธี Streak plate technique ด้วยการเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ Antibiotic Production Medium2 , ISP2 (International Streptomyces Project 2), Glucose Yeast Extract, Starch Casein Agar และ TSA.(Trypticase Soy Agar) โดย Streak เชื้อให้เจริญบนจานอาหาร บ่มจานอาหารที่ 30 °C เป็นเวลา 2-5 วัน ขึ้นกับชนิดเชื้อ ก่อนที่จะ Streak เชื้อทดสอบ(จากอาหารเหลว) อายุ 18-24 ชั่วโมง *(Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus*, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA, *Bacillus subtilis Escherichia coli*, และ *Candida albicans)* บ่มเชื้อต่อไปอีก 24---48 ชั่วโมง แล้วสังเกตผล บันทึกผลด้วยการวัดระยะของการยับยั้ง

3.5.2 การสกัดสารแอนติไบโอติกจากแอคติโนมัยซีท

นำเชื้อ แอคติโนมัยซีท มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสมที่มากกว่า 1 ชนิด เพื่อให้ได้ปริมาณสารมากขึ้น โดยบ่มในตู้บ่ม 30 °C เขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-7 วัน สกัดสารออกจากเซลล์และ medium ด้วย ethyl acetate/ หรือ solvent ที่เหมาะสมอื่น ๆ เก็บสารที่แห้งแล้วใน vial

3.5.3 การศึกษาองค์ประกอบของ สารสกัดรออกฤทธิ์ด้วยการทำ Bioautography Assay

นำสารสกัดหยาบที่ได้ มาละลายใน DMSO (Dimethyl Sulphoxide) แล้วนำมาแยกสารขั้นต้นด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้แผ่น Silia Gel Aluminium sheet (Silica Gel 60 F254) ตัดให้ได้ขนาดที่สามารถวางลงใน Petridish ได้ แยกสารด้วย solvent system ที่เหมาะสม โดยเริ่มจาก Chloroform: methanol 9:1 (หรือ 8:2/ 7:3 หรือ solvent system อื่น ๆ เป็นต้น) จนกว่าสารสกัดจะแยกได้ดี ผลการแยกสารทำได้โดยนำแผ่น chromatogram มาส่องดูด้วยแสง UV แล้วทำเครื่องหมาย Spot ของสารไว้ นำแผ่น chromatogram นี้มาวางบนจานอาหารที่ swab เชื้อทดสอบไว้แล้ว นำจานอาหารไว้ที่ 4 °C 2-4 ชั่วโมง แล้วค่อยนำมา บ่มที่ 32 °C 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์ยับยั้งเชื้อของสารแต่ละ component เปรียบเทียบกับการยับยั้งของ Chromatogram ที่ได้จากสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดอื่น ๆ ในเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดเดียวกัน

3.5.4 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อ Actinomycetes และ ราเอ็นโดไฟท์ที่สร้างสารได้ดี และน่าสนใจ จะนำมา

ศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรวจสอบลักษณะเชื้อ เส้นสายสปอร์/ ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์/ และหรือ

ด้วยกล้องอิเลคตรอน และจำแนกชนิดด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลด้วยการหาลำดับเบส ของ 16S rRNA gene และ 28S rRNA gene ในแอคติโนมัยซีท และรา ตามลำดับ สกัด DNA ตามวิธีของการสกัดของชุดสกัด

สำหรับแอคติโนมัยซีทเมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เทคนิคโพลีเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Polymerase chain reaction) แล้ว จึงทำ DNA ให้บริสุทธิ์ด้วย ชุดทำความบริสุทธิ์ DNA (DNA purification Kit) ตรวจสอบปริมาณของ DNA บนอะกาโรส เจล อิเลคโตรโฟริซิส และหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้โดยใช้เครื่อง ABI automated DNA sequencer แล้วเชื่อมต่อลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้ให้สมบูรณ์ และทำ sequence alignment ของยีน 16S rRNA แล้วจึงเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสที่มีใน GenBank เพื่อวิเคราะห์ว่าแอคติโนมัยซีท เป็นชนิดใด หรือจีนัสใด

4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัยของราเอ็นโดไฟท์

4.1. ศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมสำหรับทดสอบราและเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์จากราเอ็นโดไฟท์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

การศึกษา antibiosis ของราเอ็นโดไฟท์ Th21 และ Th121 จากใบโพธิ์ทะเลในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *Alternalia brassicicola* และ *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร 0.5xPDA, SDA และ LNA พบว่า เอ็นโดไฟท์ Th21 สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดีบนอาหารทั้ง 3 ชนิด แต่ไม่ยับยั้ง *A. brassicicola* ในขณะที่ Th121 ยับยั้ง *A. brassicicola* ได้บนอาหารทั้ง 3 ชนิด แต่ไม่ยับยั้ง *C. gloeosporioides* พบว่าระดับ antibiosis ของ Th121 บนอาหาร 0.5x PDA และ SDA เท่ากันและดีกว่า บนอาหาร LNA (ภาพที่ 1-3 และตารางที่ 6)

การศึกษา antibiosis ของราเอ็นโดไฟท์ Sc10A3 และ Sc15A3 จากใบลำพูในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* และ *Fusarium oxysporum* บนอาหาร 0.5xPDA, SDA และ LNA พบว่าทั้ง Sc10A3 และ Sc15A3 สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* และ *F. oxysporum* บนอาหาร 0.5x PDA และ SDA ได้ดีใกล้เคียงกัน แต่ไม่ยับยั้งบนอาหาร LNA

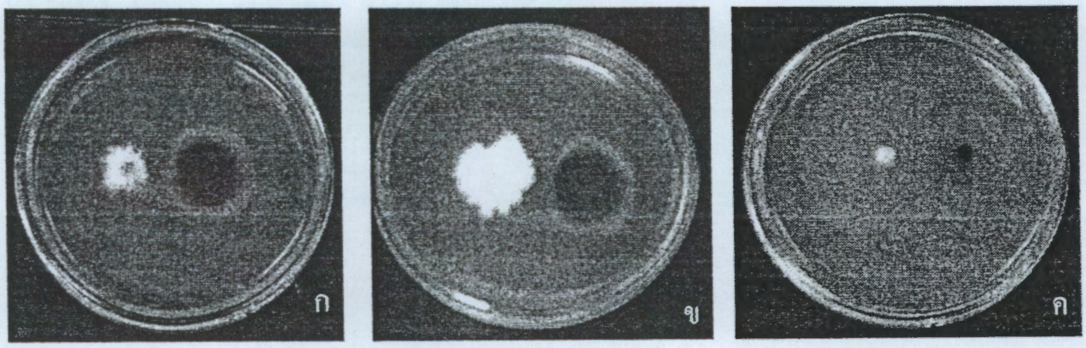
การศึกษา antibiosis ของราเอ็นโดไฟท์ Br830 และ Br834 จากใบโปรงแดง ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* บนอาหาร 0.5xPDA, SDA และ LNA พบว่า Br830 สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C .gloeosporioides* และ *F. oxysporum* บนอาหาร 0.5xPDA และ SDA ได้ใกล้เคียงกัน และดีกว่า บนอาหาร LNA ส่วน Br834 ยับยั้งราทั้งสองชนิดได้ดีบนอาหาร SDA

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ราเอ็นโดไฟท์แสดงการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดีบนอาหารแข็งที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (SDA) ถึงค่อนข้างสมบูรณ์ (0.5xPDA) ขณะที่บน LNA ซึ่งมีสารอาหารต่ำเอ็นโดไฟท์ส่วนใหญ่ที่ศึกษาไม่ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของราเอ็นโดไฟท์และราสาเหตุโรคพืชด้วย อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้คัดเลือกเฉพาะอาหารแข็งที่มีสารอาหารสมบูรณ์พอควร (SDA และ 0.5x PDA) ไปทำการศึกษาในขั้นต่อไป

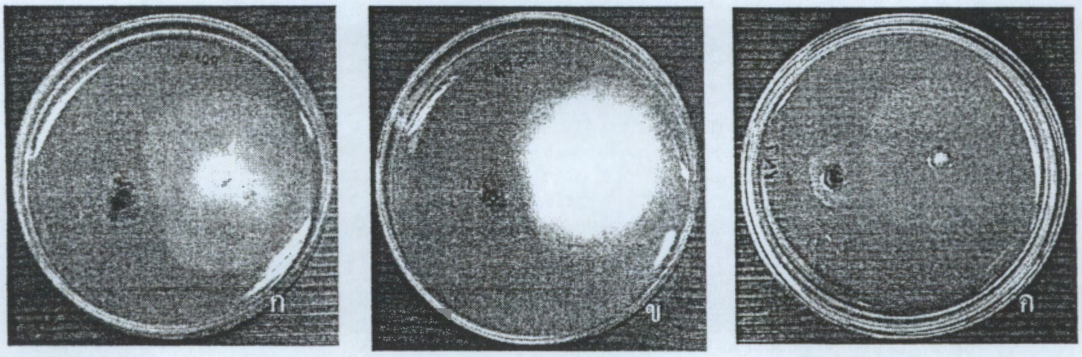
ตารางที่ 6 ผล antibiosis ระหว่างราเอ็นโดไฟท์กับราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน

เอ็นโดไฟท์	ระดับความสามารถในการเกิด antibiosis บนอาหารเลี้ยงเชื้อ								
	A. brassicicola			*C. gloeosporioides*			*F. oxysporum*		
	0.5x PDA	SDA	LNA	0.5x PDA	SDA	LNA	0.5x PDA	SDA	LNA
Th21	-	-	-	3+	2+	3+	ND	ND	ND
Th121	3+	3+	-	-	-	-	ND	ND	ND
Sc10A3	2+	2+	-	ND	ND	ND	2+	2+	-
Sc15A3	3+	3+	-	ND	ND	ND	2+	2+	-
Br 830	ND	ND	ND	4+	4+	1+	4+	3+	1+
Br 834	ND	ND	ND	4+	3+	4+	1+	3+	1+

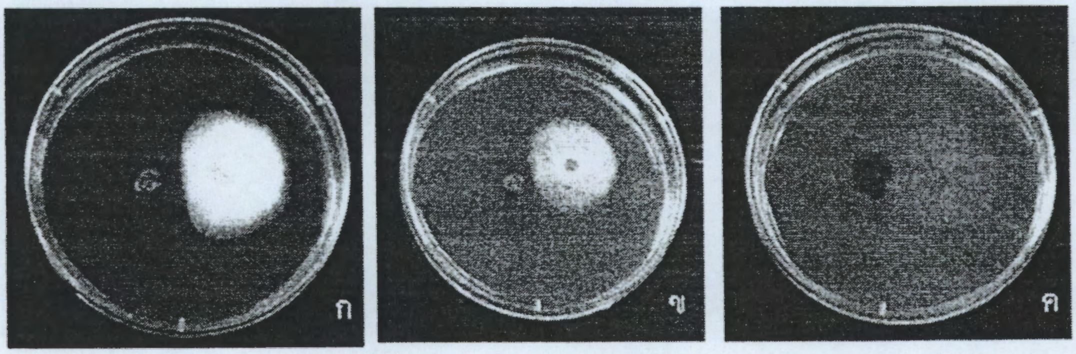
หมายเหตุ ND= ไม่ได้ทดสอบ



ภาพที่ 1 ระดับ antibiosis ในวันที่ 4 ของการเจริญ Th121 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร), ก: ระดับความแรง 3+ บนอาหาร 0.5xPDA; ข: ระดับความแรง 3+ บนอาหาร SDA; ค: ไม่พบ antibiosis บนอาหาร LNA



ภาพที่ 2 ระดับ antibiosis ของ SC15A3 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *F. oxysporum* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร) บนอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 4 วัน, ก: ระดับความแรง 2+ บนอาหาร 0.5xPDA; ข: ระดับความแรง 2+ บนอาหาร SDA; ค: ไม่ยับยั้งการเจริญบนอาหาร LNA



ภาพที่ 3 ระดับ antibiosis เมื่อเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ Br830 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *F. oxysporum* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร) บนอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 4 วัน, ก: ระดับความแรง 4+ บนอาหาร 0.5xPDA; ข: ระดับความแรง 3+ บนอาหาร SDA; ค: ระดับความแรง 1+ บนอาหารLNA

4.2. การศึกษาชนิดอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงราเอ็นโดไฟท์เพื่อสกัดสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ

ผลจากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า เมื่อศึกษาสารสกัดที่เตรียมจากน้ำหมักรา Th21 ที่เลี้ยงใน 0.5xPDB และ SDB พบว่าสารสกัดทั้งที่เตรียมจากน้ำหมัก 0.5xPDB และ SDB 20 ไมโครลิตร สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดี คือให้ผลการยับยั้งระดับ 3+ เหมือนกัน สารสกัดที่เตรียมจากน้ำหมัก 0.5xPDA ของรา Th121 20 ไมโครลิตร สามารถยับยั้ง *A. brassicicola* ได้ในระดับ 1+ ขณะที่สารสกัดที่เตรียมจากน้ำหมัก SDB ไม่ยับยั้ง แต่เมื่อเพิ่มปริมาสารสกัดที่ทดสอบเป็น 40 ไมโครลิตร สามารถยับยั้ง *A. brassicicola* ได้ในระดับ 1+

เมื่อศึกษาสารสกัดที่เตรียมจากน้ำหมักรา Sc10A3 และ Sc15A3 ที่เลี้ยงใน 0.5xPDB และ SDB พบว่าสารสกัดที่เตรียมจาก 0.5xPDB และ SDB 20 ไมโครลิตร สามารถยับยั้ง *F. oxysporum* ที่ระดับ 2+ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *A. brassicicola*

สารสกัดจากรา Br830 ที่เลี้ยงใน 0.5xPDA ไม่ยับยั้ง *C. gloeosporioides* แต่ยับยั้ง *F. oxysporum* ได้ดี (2+) ขณะที่เมื่อเลี้ยงใน SDA ไม่ยับยั้งทั้ง *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* สารสกัดจากรา Br834 ที่สกัดจาก culture filtrate ทั้ง 0.5xPDB และ SDB ไม่สามารถยับยั้งราโรคพืชทั้ง 2 ชนิด

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหารต่างกัน ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน

เอ็นโดไฟท์	ระดับการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ					
	A. brassicicola		*C. gloeosporioides*		*F. oxysporum*	
	0.5x PDB	SDB	0.5x PDB	SDB	0.5x PDB	SDB
Th21	ND	ND	3+	3+	ND	ND
Th121	1+	1+	ND	ND	ND	ND
Sc10A3	-	-	ND	ND	2+	2+
Sc15A3	-	-	ND	ND	2+	2+
Br 830	ND	ND	-	-	2+	-
Br 834	ND	ND	-	-	-	-

หมายเหตุ ND: ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากให้ผล antibiosis เป็นลบ

4.3. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงราเพื่อเตรียมสารสกัดยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 8 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ของสารสกัดจากน้ำหมักราเอ็นโดไฟท์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร 0.5xPDB เป็นเวลา 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน พบว่า เมื่อเลี้ยงเอ็นโดไฟท์ใน 0.5xPDB สารสกัดจาก 0.5xPDB ของ Th21 อายุ 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน ให้ผลยับยั้ง *C. gloeosporioides* ในระดับ 3+ ไม่แตกต่างกัน สารสกัดจาก Th121 ที่เลี้ยงในอาหาร 0.5xPDB 3 วันและ 7 วัน ให้ผลการยับยั้ง *A. brassicicola* 2+ และ 1+ ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเลี้ยงนาน 14 วัน สารที่สกัดมา จากน้ำหมักไม่สามารถยับยั้ง *A. brassicicola*

สารสกัดจากน้ำหมักเอ็นโดไฟท์ Sc10A3 และ Sc15A3 ที่เลี้ยงในอาหาร 0.5xPDB 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน ให้ผลยับยั้ง *F. oxysporum* และ *A. brassicicola* ไม่แตกต่างกัน สารสกัดจากรา Br830 ที่เลี้ยงในอาหาร 0.5xPDB 3 วัน 7 วัน และ

14 วัน สามารถยับยั้ง *F. oxysporum* ได้ไม่แตกต่างกัน แต่สารสกัดจากน้ำหมัก Br830 ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดีกว่าสารสกัดจาก Br830 ที่เลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกัน เป็นเวลา 3 วัน และ 7 วัน 1 ระดับ

ตารางที่ 9 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบสารสกัดจากน้ำหมักราเอ็นโดไฟท์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร SDB เป็นเวลา 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน ต่อความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช พบว่าผลของสารสกัดที่สกัดได้จาก Th21, Sc10A3 และ Sc15A3 สอดคล้องกับผลของสารสกัดที่สกัดจากราชนิดเดียวกันที่เลี้ยงใน 0.5xPDB สารสกัดจาก Br830 ที่เลี้ยงในอาหาร SDB ต่างจากที่เลี้ยงในอาหาร 0.5xPDB เล็กน้อย ส่วนสารสกัดจากเอ็นโดไฟท์ Br834 ที่เลี้ยงในอาหาร SDB เป็นเวลา 3 วัน 7 วัน และ 14 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides*

เนื่องจากการเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ใน 0.5xPDB และ SDB ทั้ง 3 วัน 7 วันและ 14 วันมีแนวโน้มไม่แตกต่างกัน เพื่อการประหยัดค่าใช้จ่ายด้านอาหารและเวลาในการหมักราเพื่อทำการสกัดสารจึงได้เลือกอาหาร 0.5xPDB และการหมักเป็นเวลา 3 วัน ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 8 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียมสารสกัดจากราที่หมักใน 0.5xPDB ต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

เอ็นโดไฟท์	ระดับการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชเมื่อเลี้ยงเป็นเวลาต่างกัน								
	A. brassicicola			*C. gloeosporioides*			*F. oxysporum*		
	3 วัน	7 วัน	14 วัน	3 วัน	7 วัน	14 วัน	3 วัน	7 วัน	14 วัน
Th21	ND	ND	ND	3+	3+	3+	ND	ND	ND
Th121	2+	1+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sc10A3	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-
Sc15A3	-	-	-	ND	ND	ND	2+	2+	2+
Br830	ND	ND	ND	-	-	1+	2+	2+	2+
Br834	ND	ND	ND	-	-	-	1+	-	-

หมายเหตุ ND: ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากให้ผล antibiosis เป็นลบ

ตารางที่ 9 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียมสารสกัดจากราที่หมักใน SDB ต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

เอ็นโดไฟท์	ระดับการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชเมื่อเลี้ยงเป็นเวลาต่างกัน								
	A. brassicicola			*C. gloeosporioides*			*A. brassicicola*		
	3 วัน	7 วัน	14 วัน	3 วัน	7 วัน	14 วัน	3 วัน	7 วัน	14 วัน
Th21	ND	ND	ND	3+	3+	3+	ND	ND	ND
Th121	1+	1+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sc10A3	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-
Sc15A3	-	-	-	ND	ND	ND	2+	2+	2+
Br830	ND	ND	ND	-	1+	1+	2+	2+	2+
Br834	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ND: ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากให้ผล antibiosis เป็นลบ

4.4. การศึกษาผลของความเค็มที่เหมาะสมที่ใช้เลี้ยงราเอ็นโดไฟท์เพื่อสกัดสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ

การทดสอบสารสกัดสารจากน้ำหมักราเอ็นโดไฟท์ ที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 วันในอาหาร 0.5xPDB ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น และที่เตรียมด้วยน้ำทะเลที่ปรับให้มีค่าความเค็ม 10, 15, 20 และ 30 ppt (ส่วนในพันส่วน) ดังแสดงตารางที่ 7 พบค่าความเค็มที่เหมาะสมของอาหารในการเตรียมสารสกัดจากราที่หมักอยู่ระหว่าง 0-15 ppt โดยน้ำกลั่นเหมาะสมต่อการใช้เตรียมอาหารเพื่อเลี้ยงราในการเตรียมสารสกัดยับยั้งราสาเหตุโรคพืชมากที่สุด รองลงมาคือ 10 และ 15 ppt ขณะที่ที่ค่าความเค็มอื่น สารสกัดให้ผลทดสอบลบ

4.5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักราที่คัดเลือก

เลือกรา TH121 และ Br830 ซึ่งให้ผลยับยั้ง (antibiosis) ดี (3+ - 4+) แต่ผลการทดสอบสารสกัดอ่อนกว่ามาทดสอบค่าความเค็มและชนิดอาหารที่เหมาะสมในลักษณะคล้ายคลึงกับที่กล่าวมาข้างต้นอีกครั้งหนึ่ง (ทำ 3 ซ้ำ) แต่เพิ่มชนิดอาหารเป็น 5 ชนิด นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบกับราก่อโรคพืชทั้ง 3 ชนิด วัดระยะการยับยั้งและคำนวณหาค่าเฉลี่ย

ผลในตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำกลั่นเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ Th121 เพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ยับยั้งรายับยั้งราสาเหตุโรคพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. brassicicola* และ *F. oxysporum* ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเค็ม 10 ppt เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ Br830 เพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ยับยั้งรา สาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides*

ตารางที่ 11 แสดงการทดสอบอาหารที่เหมาะสมจะนำมาเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ 5 ชนิด โดยเพิ่มอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์อีก 2 ชนิด (PDB และ YMB) เพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ซึ่งจะเห็นว่า 0.5xPDB และ PDB

เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ Th111 เพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ (ภาพที่ 4ก) ขณะที่ SDB เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ Br830 เพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ (ภาพที่ 4ข) ฤทธิ์ยับยั้งของสารที่สกัดได้จากราที่เลี้ยงใน YMB อยู่ในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่น แต่มีแนวโน้มเป็นอาหารที่ดีสำหรับการเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์แบบไม่จำเพาะเจาะจง เพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพที่มีฤทธิ์กว้าง (ภาพที่ 4ก และภาพที่ 4ข)

ตารางที่ 10 ความเค็มที่เหมาะสมของอาหารเหลวในการเตรียมสารสกัดยับยั้งราโรคพืช จากน้ำหมักราที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ในอาหาร 0.5xPDB

เอ็นโดไฟท์	ราสาเหตุโรคพืช	ระดับการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชเมื่อเลี้ยงที่ค่าความเค็มต่างกัน				
		0 ppt	10 ppt	15 ppt	20 ppt	30 ppt
Th21	*C. gloeosporioides*	3+	2+	-	-	-
Th111	*A. brassicicola*	1+	1+	-	-	-
Sc10A3	*A. brassicicola*	-	-	-	-	-
	F.oxysporum	1+	-	-	-	-
Sc15A3	*A. brassicicola*	-	-	-	-	-
	F.oxysporum	2+	-	-	-	-
Br830	*C. gloeosporioides*	-	1+	-	-	-
	F.oxysporum	1+	-	-	-	-
Br834	*C. gloeosporioides*	-	-	-	-	-
	F.oxysporum	1+	1+	1+	-	-

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ตารางที่ 11 ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหาร 0.5xPDB ที่ความเค็มต่างกัน เป็นเวลา 3 วัน ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน

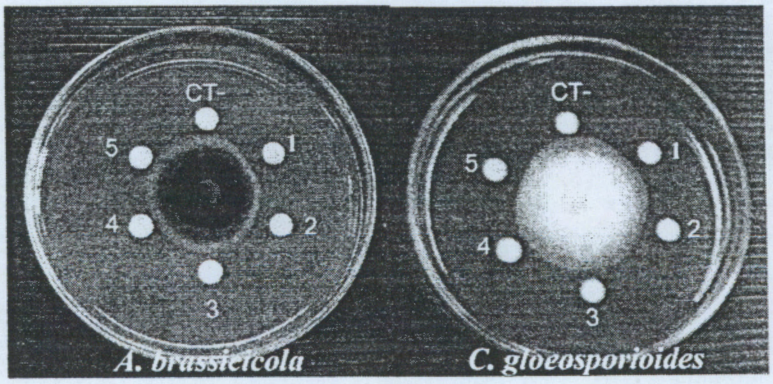
ราเอ็นโดไฟท์	ราสาเหตุโรคพืช	ค่าเฉลี่ยระยะยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช เมื่อเลี้ยงที่ค่าความเค็มต่างๆ (ซ.ม.)				
		0 ppt	10 ppt	15 ppt	20 ppt	30 ppt
Th121	*A. brassicicola*	0.27 ± 0.05	0.13 ±0.05	0.13 ±0.05	0	0
	C. gloeosporioides	0.1	0.1± 0.02	0	0	0
	F. oxysporum	0.27 ±0.05	0.13 ±0.05	0.13 ±0.05	-	-
Br830	*A. brassicicola*	0	0.23 ±0.12	0.17 ±0.05	0.1	0.1
	C. gloeosporioides	0	0.13 ±0.05	0	0	0
	F. oxysporum	0.07 ±0.02	0	0	0	0

579.1751
ร 374 ก
ฉ.3

301406

ตารางที่ 12 ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหารต่างกัน ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน

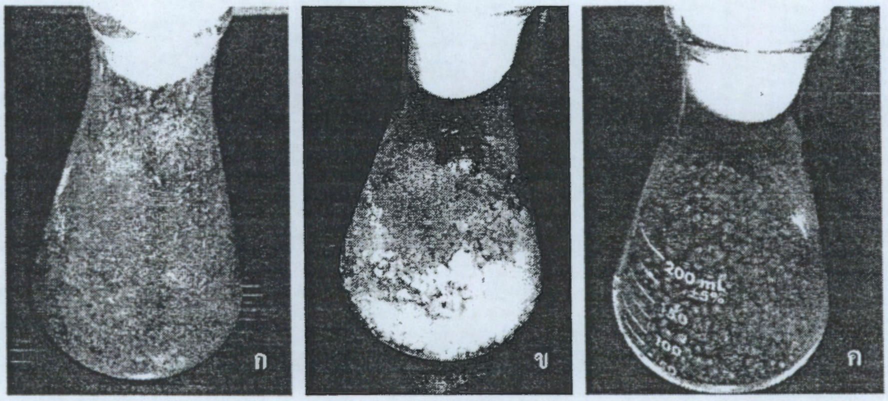
เอ็นโดไฟท์	ราสาเหตุโรคพืช	ค่าเฉลี่ยระยะยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชเมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ (ซ.ม.)				
		LNB	0.5x PDB	PDB	SDB	YMB
Th121	*A. brassicicola*	0.16 ±0.06	0.46 ± 0.08	0.37 ±0.09	0.05 ± 0.05	0.25 ± 0.08
	C. gloeosporioides	0.06 ±0.04	0.16 ±0.06	0.27 ±0.07	0.10 ±0.4	0.14 ± 0.08
	F. oxysporum	0.05 ±0.05	0.08 ±0.03	0.11 ±0.05	0.08 ±0.07	0.12 ±0.04
Br830	*A. brassicicola*	0.06 0.04	0.06 0.04	0.1 0.04	0.26 0.04	0.15 0.05
	C. gloeosporioides	0.07 ±0.07	0.1 ±0.04	0.1	0.27 ±0.04	0.2 ±0.06
	F. oxysporum	0.04 ±0.04	0.08 ±0.05	0.07 ±0.04	0.22 ±0.1	0.16 ±0.08



ภาพที่ 4 การยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดที่เตรียมจากน้ำหมักราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ ในวันที่ 4 ของการเจริญ, ก: สารสกัดจาก Th111 บนแผ่น disc เมื่อวางร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola;* ข: สารสกัดจาก Br830 บนแผ่น disc เมื่อวางร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides*; 1= PDB, 2 = 0.5xPDB, 3 = YMB, 4 = LNB, 5 = SDB, CT- = แผ่น disc ชุบสารละลาย 0.5%DMSO ใช้เป็นตัวควบคุมผลลบ

4.6 การศึกษาสภาวะอาหารแข็งที่เหมาะสมของการเตรียมสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ Br834

เมื่อทำการหมักราเอ็นโดไฟท์ Br834 ซึ่งเป็นราที่ให้ผล antibiosis ดีมาก แต่ไม่สร้างสารก่อฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช หรือสร้างน้อยมากเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว บนอาหารแข็งที่เตรียมจากธัญพืชชนิดต่างๆ ในสัดส่วนต่างๆ กัน (Solid state fermentation) พบว่า Br834 เจริญได้ดีในอาหารเกือบทุกชนิด ยกเว้นอาหารที่มีข้าวฟ่างเป็นส่วนผสม (ภาพที่ 5) แต่เมื่อนำสารสกัด ethanol และ ethyl acetate จากอาหารที่เลี้ยงรา Br834 ไปทดสอบ พบว่าเฉพาะสารสกัด ethanol จากราที่เลี้ยงในอาหารที่มีข้าวฟ่างเป็นส่วนผสม ความเข้มข้น 1,000 µg/ml (10 µg /disc) ความเข้มข้นขึ้นไป เท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *A. brassicicola* ที่นำมาทดสอบ ผลการยับยั้งจะเห็นชัดเมื่อสารละลายเข้มข้นตั้งแต่ 3,000-4,000 µg/ml (40 µg /diac) และพบว่าอาหารที่มีอัตราส่วนรำต่อข้างฟ่าง 1:1 จะให้ผลดีที่สุดในการเลี้ยง Br834 เพื่อให้สร้างสารยับยั้ง (ตารางที่ 12 และภาพที่ 6)

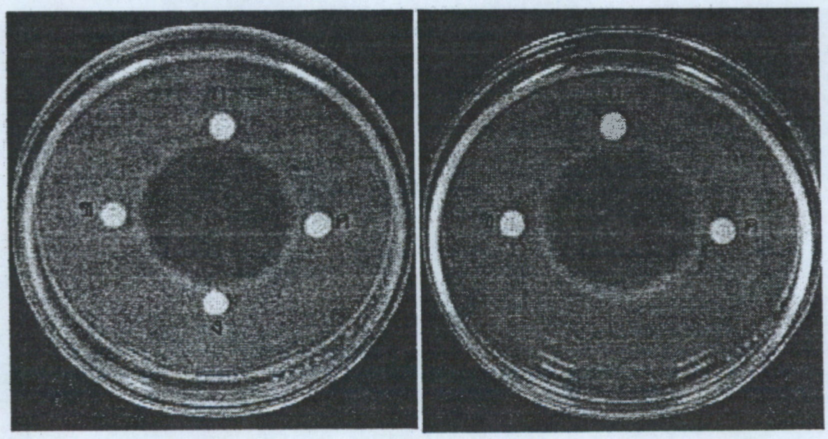


ภาพที่ 5 การเจริญราเอ็นโดไฟท์ *A. brassicicola* ที่เลี้ยงในอาหารเตรียมจากธัญพืชชนิดต่างๆ ในวันที่ 4 ของการเจริญ, ก: รำข้าวผสมกับน้ำกลั่น อัตราส่วน 60 กรัม: 40 มิลลิลิตร; ข: ปลายข้าวหุงสุก 100 กรัม; ค: ข้าวฟ่างหุงสุก 100 กรัม

ตารางที่ 13 ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ Br834 ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* ในอาหารรำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง

ความเข้มข้นสารสกัด (µg/ml)	ค่าเฉลี่ยระยะยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช (ซ.ม.)*	
	รำข้าว :ข้าวฟ่าง 1:1	รำข้าว :ข้าวฟ่าง 1:2
1000	0.5	0
2000	1	1
3000	1.8	1.2
4000	1.8	1.2
5000	1.6	1.5

* ค่าที่รายงานเป็นค่าที่เทียบกับสารละลายควบคุม เมื่อให้ระยะทางในชุดควบคุมเป็นศูนย์



ภาพที่ 6 การเจริญ *A. brassicicola* เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ Br834 ที่เลี้ยงในอาหารเตรียมจากธัญพืช รำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง ความเข้มข้นสารสกัด 4,000 µg/ml (40 µg /diac), ก: สารสกัดจากรำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง อัตราส่วน 1:1; ข: สารสกัดจาก Br834 ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวผสมกับข้าวฟ่างอัตราส่วน 1:1; ค: สารสกัดจาก Br834 ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวผสมกับข้าวฟ่างอัตราส่วน 1:2; ง: สารละลาย 10%DMSO

4.7 **การศึกษาสารองค์ประกอบโดยวิธี** thin layer chromatography

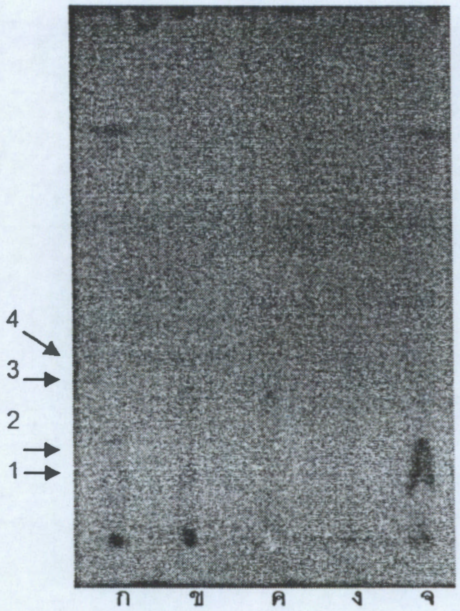
การวิเคราะห์ชนิดสารองค์ประกอบในสารสกัดหยาบที่ได้จากการหมักราเอ็นโดไฟท์ Th121 ซึ่งเป็นราที่ตอบสนองกับการปรับสภาวะดีที่สุดในอาหารเหลว PDB ที่มีค่าความเค็มต่าง ๆ กัน พบว่ารูปแบบของสารที่วิเคราะห์ได้หลังจากเลี้ยงในอาหาร PDB ยังไม่แตกต่างกันชัดเจน สารสกัดหยาบทั้งหมดประกอบด้วยสารประกอบ >2 ชนิด ที่มีค่า Rf ต่างกันเล็กน้อย (ตารางที่ 14) แต่หลังจากนำราเอ็นโดไฟท์ไปหมักต่อในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น พบว่าสารสกัดจากราที่เลี้ยงในอาหารต่างกัน ให้รูปแบบสารองค์ประกอบต่างกัน (ตารางที่ 15) ในสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ Th121 ที่เลี้ยงใน PDB และ YMB ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสม พบสารประมาณ 3 องค์ประกอบ ที่เป็นองค์ประกอบเด่น (ภาพที่ 7)

ตารางที่ 14 จำนวนชนิดและรูปแบบสารองค์ประกอบในสารสกัดหยาบของราเอ็นโดไฟท์ สายพันธุ์ Th121

ความเค็ม (ppt)	สารประกอบที่พบ
0	2, 3
10	1, 2
15	1,2
20	1,2
30	2, 3

ตารางที่ 15 จำนวนชนิดและสารประกอบในสารสกัดเตรียมจากรา Th121 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น

อาหาร	สารประกอบที่พบ
LNB	4
0.5 PDB	2, 3
PDB	1,2
SDB	1,2
YMB	3



ภาพที่ 7 สารประกอบที่ได้จากการวิเคราะห์ TLC ของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ Th121 ในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมจากน้ำกลั่น; ก: 0.5 PDB, ข: PDB, ค :YMB, ง: LNB, จ: SDB

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย แอคติโนมัยซีท

4.8 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง

ได้นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกแล้ว จำนวน 7 สายพันธุ์ คือ A1-3, A3-3, A11-8, A11-9, A 16-1, A 16-2, และ A 19-5 มาทดสอบความสามารถสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus, E.coli, Candida albicans,*) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่อาหาร International Streptomyces Project 2 (ISP2), และ อาหาร ISP2 ที่เติมสารอาหารธรรมชาติ เช่น ISP2+soybean meal, ISP2+ oatmeal, ISP2+ น้ำมันงา ISP2+ น้ำมันปลา รวมทั้งเปรียบเทียบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบนอาหาร Glucose Yeast Extract (GY), อาหาร Antibiotic Production medium 2(AB2), International Streptomyces Project 2 (ISP2), Trypticase Soy medium (TSA), Starch Casein Agar (SCA) (ตารางที่ 17) ผลการทดสอบพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีททุกสายพันธุ์ ส่วนมากสร้างสารออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดในอาหาร ISP2 รวมทั้งสามารถยับยั้ง MRSA P 39 (Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus P39)/หรือ* MRSA P37 *และ*(MRSA SP 22 และทุกสายพันธุ์ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี และเป็นที่แน่ชัดว่าอาหาร ISP2 เป็นอาหารที่เชื้อแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่สร้างสารออกฤทธิ์ได้มาก (ตารางที่ 16,17)

ตารางที่ 16 การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมด้วยอาหารธรรมชาติต่าง ๆ กัน ของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากป่าชายเลน

Isolate ID	Medium	Antibiosis to (cm)				
		M. luteus	*E. coli*	*C. albicans*	*MRSA SP37*	*MRSA P39*
54-4	ISP2+oatmeal	-	0.5	-	0.7	0.5
	ISP2+soybean meal					
	ISP2 + sesami					
	ISP2+ fishoil					
	ISP2					
A1-3	ISP2+oatmeal	-	0.6	-	4.3	5
	ISP2+soybean meal	-	0.5	-	4.5	5.5
	ISP2 + sesami	-	-	-	-	-
	ISP2+ fishoil	-	-	-	-	-
	ISP2	-	1.2	0.2	1	1.2
					MRSA SP22	MRSA P39
A3-3	ISP2+oatmeal	-	1.3	0.2	1.2	1.5
	ISP2+soybean meal		1.5	-	1.2	1.5
	ISP2 + sesami		1.8	d	1.5	1.8
	ISP2+ fishoil		1	0.6	>4.0	>4.0
	ISP2		1.8	0.3	2.1	1.9
A16-1	ISP2+oatmeal	-	0.7	-	0.6	0.6
	ISP2+soybean meal		1.2	-	1	1
	ISP2 + sesami		0.9	-	0.8	0.8
	ISP2+ fishoil		1	-	0.5	1

	ISP2		3.5	-	1	2.5
A16-2	ISP2+oatmeal		0.7	-	0.6	0.6
	ISP2+soybean meal		1	-	0.9	0.9
	ISP2 + sesami		0.8	-	0.5	0.7
	ISP2+ fishoil			-	-	-
	ISP2		2.3	1.2	1.8	>3.0
A11-8	ISP2+oatmeal		scarce growth	scarce growth	scarce growth	scarce growth
	ISP2+soybean meal		3.8	NG	3.5	3.5
	ISP2 + sesami		scarce growth	scarce growth	scarce growth	scarce growth
	ISP2+ fishoil		scarce growth	scarce growth	scarce growth	scarce growth
	ISP2		5.2	1.5	2.8	5
A11-9	ISP2+oatmeal		0.6	-	0.6	0.6
	ISP2+soybean meal			-	-	0
	ISP2 + sesami		0.6	-	1	0.8
	ISP2+ fishoil		0.2		0.2	0.2
	ISP2		1.7	0.2	1.2	2

ตารางที่ 17 การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ ของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากป่าชายเลน

	ระยะการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบ (cm)					
Isolate ID	Medium	*M. luteus*	*E. coli*	*C. albicans*	*MRSA SP37*	*MRSA P39*
CH 54-4	GY	-	-	-	-	-
	SCA	-	1,1	-	1.5	1.6
	AB2	0.3	-	-	-	-
	TSA	-	-	1.5	-	-
	ISP2	-	-	0.2	-	-
A1-3	GY	-	-	-	-	-
	SCA	-	1.0	0.1	1.0	1.0
	AB2	-	>3.5	-	-	-
	TSA	-	0.3	0.1	0.3	0.4
	ISP2	-	1.2	0.2	1.0	1.2
A3-3	GY	-	-	-	-	-
	SCA	-	1.8	0.2	1.6	1.8
	AB2	-	>3.5	-	-	-
	TSA	-	-	0.5	-	-
	ISP2	-	1.8	0.3	2.1	1.9
A11-8	GY	-	0.9	-	-	-
	SCA	-	3.0	-	2.8	2.8
	AB2	-	1.6	-	2.2	1.8
	TSA	-	3.1	-	3.0	3.3
	ISP2	-	5.2	1.5	2.8	5.0
A11-9	GY	-	-	-	-	-
	SCA	-	1.2	-	1.1	1.2
	AB2	-	-	-	-	-
	TSA	-	-	-	-	-
	ISP2	-	1.7	0.5	1.2	2.0

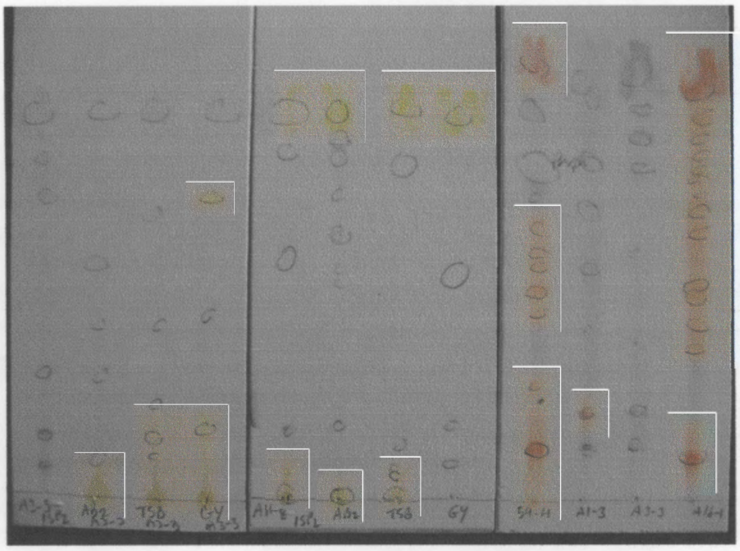
A16-1	GY	-	-	-	-	-
	SCA	-	0.6	-	0.7	
	AB2	-	1.2	0.1	1.1	1.2
	TSA					
	ISP2	-	3.5	-	1.0	2.5
A16-2	GY	-	-	-	-	-
	SCA	-	0.7	-	0.6	0.8
	AB2	-	0.9	-	0.8	0.8
	TSA	-	0.5	-	1.1	1.2
	ISP2	-	2.3	1.2	1.8	>3.5

4.9 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำเร็จรูป

เลือกแอคติโนมัยซีทที่ให้สารออกฤทธิ์ และบางสายพันธุ์ก็สร้างรงค์วัตถุ ด้วย คือ A11-8, A16-1 และ A3-3 มาทดลองเลี้ยงต่อในอาหารเหลว ทั้ง 5 ชนิด คือ อาหาร ISP2, AB2, GY, SCA และอาหาร TSA ในflask ขนาด 250 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าซ้ายขวา ด้วยความเร็ว 110 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 10- 14 วัน สกัดด้วย ethyl acetate/ methanol / Chlor oform/methanol (จนกว่าสารจะออกหมด หรือขึ้นกับสารของเชื้อแต่ละชนิดว่าสามารถละลายในตัวทำละลายใดได้ดีกว่า) แล้วระเหยเอา solvent ออก ด้วยเครื่อง evaporator แล้วเก็บสารที่ได้ใน vial ที่ทราบน้ำหนัก ตารางที่ 18 แสดงจำนวนองค์ประกอบของสาร ที่เห็นได้ บนแผ่นโครมาโทแกรม สารเมตาโบไลท์ที่สร้างได้ของแอคติโนมัยซีทที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY, SCA, AB2, TSA และ ISP2

Medium	GY	SCA	AB2	TSB	ISP2
Isolate ID					
A3-3	6	No growth	7	8	6
A11-8	4	No growth	6	5	6
A16-1	7	No growth	5	8	7

สารสกัดหยาบ ของแอคติโนมัยซีทชนิดต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารต่างกัน พบว่าเชื้อชนิดเดียวกันอาจสร้างสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันไป (ทั้งปริมาณและชนิด) ขึ้นกับอาหารที่ใช้เลี้ยง เช่น แอคติโนมัยซีท A3-3 สามารถสร้างสารไบโอแอคทีฟได้ถึง 8, 7 และ 6 กลุ่ม ที่ให้ค่า Rf ต่างกันออกไปในบางกลุ่มสาร ในอาหารเหลว TSB, AB2 และ ISP 2 ตามลำดับ (ในอาหาร SCA เชื้อไม่เจริญ)แอคติโนมัยซีท A11-8 สร้าง สารไบโอแอคทีฟได้ 6, 5 และ 4 กลุ่ม ในอาหาร ISP2 , TSB และ GY ตามลำดับ (ในอาหาร SCA เชื้อไม่เจริญ)ส่วน แอคติโนมัยซีท A16-1สร้างสารไบโอแอคทีฟได้ 8, 7, และ 7 กลุ่ม ในอาหาร TSB, GY และ ISP2 ตามลำดับ



ภาพที่ 7 แสดง จำนวนสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารออกฤทธิ์ บนแผ่นโครมาโทแกรม เมื่อนำสารสกัดหยาบ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารต่างกัน จะพบว่าจำนวนองค์ประกอบของสารจะแตกต่างออกไป

ตารางที่ 19 แสดงปริมาณการสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อาหารเหลวธรรมชาติ (กรัม/100 ml)

Isolate ID	ISP2+Glucose	Oat meal	Kidney bean	Soybean meal	Wheat bran
CH 54-4	0.1107	0.0470	0.0566	0.0340	0.0195
A1-3	0.320	0.1218	0.0566	0.0363	0.0421
A19-5	0.2248	0.2137	0.0477	0.0480	0.2015

เมื่อเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยอาหารเหลว จากธรรมชาติเทียบกับเมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2+ glucose จะพบว่า อาหาร ISP2 ยังเป็นอาหารที่แอคติโนมัยซีทชนิดต่าง ๆสร้างสารออกฤทธิ์ได้มากกว่าอาหารจากธรรมชาติอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ ทั้งหมด เช่นอาหารข้าวโอ๊ต ถั่วแดง ถั่วเหลือง และรำข้าว

4.10 ผลการศึกษาการทำ Bioautograpgy Assay

เมื่อนำสารสกัดหยาบของสายพันธุ์ A1-3, A3-3, A16-1, 54-4, 54-5 A11-8, A19-5 ที่ได้ มา ละลายด้วย DMSO (Dimethyl sulphoxide) มาแยกสารเบื้องต้นวิธีทางโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography) ด้วยนำสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทแต่ละ strain มา spot ลงบนแผ่น Silica gel 60 F_{254} (Merck) แล้วแยกด้วย Chloroform: Methanol 9:1 ใน Chromatography tank ทำให้ทราบว่าแอคติโนมัยซีทแต่ละสายพันธุ์นั้น สามารถสร้างสาร

นำสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทแต่ละ strain มา spot ลงบนแผ่น Silica gel 60 F_{254} (Merck) แล้วแยกด้วย Chloroform: Methanol 9:1 ใน Chromatography tank ทำให้ทราบว่าแอคติโนมัยซีทแต่ละสายพันธุ์นั้น สามารถสร้างสารได้หลายชนิด และ จากการศึกษา Bioautoassay ทำให้ทราบว่า แต่ละสายพันธุ์สร้างสารออกฤทธิ์ได้มากกว่า 1 สาร (ตารางที่ 20) โดยมี MRSA22 เป็นเชื้อทดสอบ

ตารางที่ 20 แสดงผลของการศึกษา Bioautography assay ของแอคติโนมัยซีท A1-3, A3-3, A16-1, 54-4, 54-5 ต่อเชื้อ MRSA 22

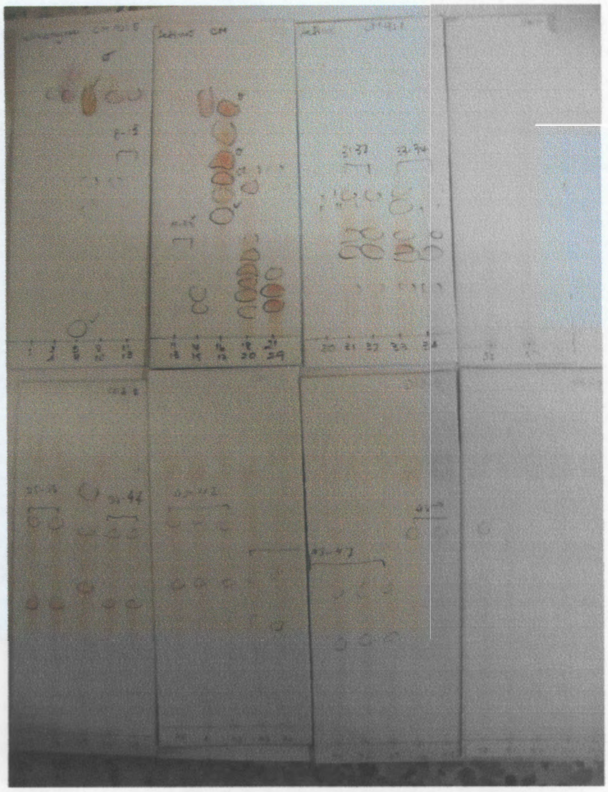
	ค่า R_f ของกลุ่มสารที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโทแกรม				
กลุ่มสาร	A1-3	A3-3	A16-1	54-4	54-5
1	0.5609(+)	0.0300(-)	0.0170(+)	0.2317(+)	0.1066(-)
2	0.8414(+)	0.0850(-)	0.0820(+)	0.2804(+)	0.1800(+)
3		0.1280(-)	0.1350(+)	0.3353(+)	0.2266(+)
4		0.1700(-)	0.1760(+)	0.3963(+)	0.2600(+)
5		0.3650(-)	0.2240(-)	0.5670(-)	0.2933(+)
6		0.4570(+)	0.6350(-)	0.6280(-)	0.3133(+)
7		0.6400(+)	0.8940(-)	0.6890(-)	0.3466(+)
8		0.8170(+)		0.7560(+)	0.3733(-)
9				0.8902(-)	0.4000(-)
10					0.4600(-)
11					0.5600(-)
12					0.6733(-)
13					0.8200(-)
14					0.8800(-)

หมายเหตุ (+) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ MRSA 22

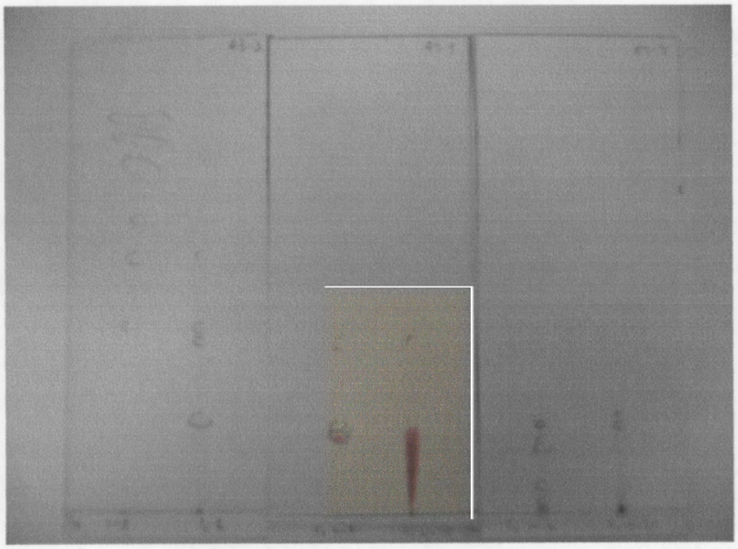
(-) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ MRSA 22

4.11 ทำสารให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วย Column Chromatography **และ** TLC

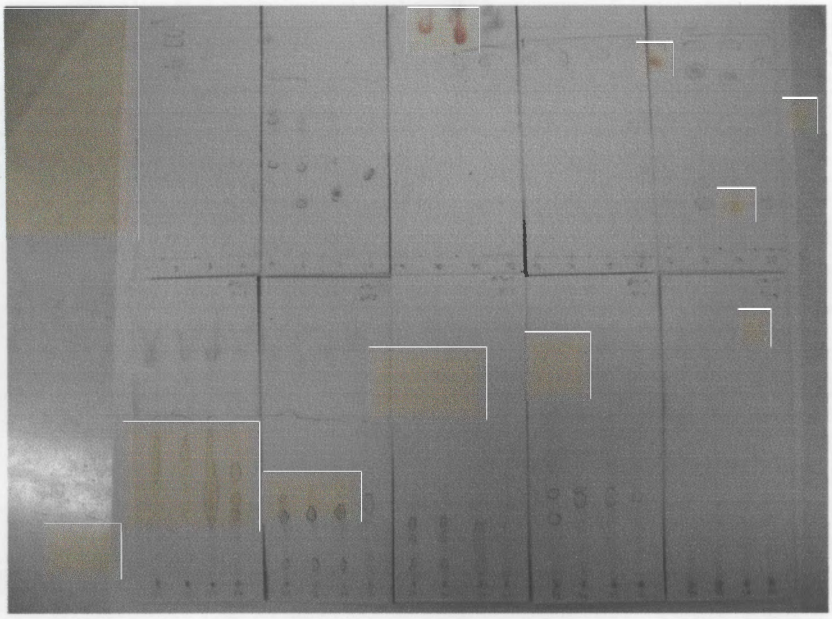
เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์สีแดงได้ดี มาเลี้ยงในปริมาณมากขึ้น ในอาหารเหลว ISP2 ซึ่งประกอบด้วย เชื้อแอคติโนมัยซีท 54-4, A1-3, A3-3 และ A 16-1 โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท บนจานเพาะเชื้อ เพื่อให้ได้สปอร์เชื้อปริมาณมาก ที่ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 3-4 วันก่อนถ่ายเชื้อลงใน flask ขนาด 1000 ml 4-6 flasks เมื่อสกัดสารด้วย ethyl acetate และหรือ chloroform: methanol 2:1 สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีท 54-4 ได้สารทั้งหมด 0.150 g/l เมื่อทำ fractionation ด้วย Colum Cromatography (เก็บ fraction ครั้งละ 10 ml) แล้ว จึงนำสาร มา spot ลงบนแผ่น Silica gel 60 และ แยกสารออกจากกันด้วย Chloroform : methanol 9:1, 8:2, และ 7:3 (ขึ้นกับสารที่ได้จาก fraction ต่าง ๆ)



ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมแสดง สารที่เป็นองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ใน แต่ละ fraction ของแอคติโนมัยซีท 54-4



ภาพที่ 9 โครมาโทแกรมแสดง สารที่เป็นองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ใน แต่ละ fraction ของแอคติโนมัยซีท A1-3



ภาพที่ 10 โครมาโทแกรมแสดง สารที่เป็นองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ใน แต่ละ fraction ของแอคติโนมัยซีท A3-3

และได้นำสารจากเชื้อแอคติโนมัยซีท A1-3, A3-3 มาทำ Fractionation ด้วย Column Chromatograpgy ต่อไป โดยเริ่มจากสารสกัดหยาบ A1-3 ปริมาณ 0.1791 กรัม ผลการแยกสารสกัดหยาบแสดงดังตารางที่ 21 และ A3-3 ในตารางที่ 22

ตารางที่ 21 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส A1-3 ด้วย Column Chromatography

fraction	ระบบตัวทำละลาย	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ผลการรวม fraction
1	Chloroform	0.0162	1
2	Chloroform	0.0051	2
3	Chloroform: Methanol 3:7	0.0532	3
4	Chloroform: Methanol 3:7	0.0128	4
5	Chloroform: Methanol 2:8	0.0029	5-8
6	Chloroform: Methanol 2:8	0.0030	
7	Methanol	0.0021	
8	Methanol	0.0019	

9	Methanol : Acetone : น้ำ 4 : 4: 2	0.0014	9-10
10	Methanol : Acetone : น้ำ 4 : 4: 2	0.0009	

ตารางที่ 22 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส A3-3 ด้วย Column Chromatography

fraction	ตัวทำละลาย	น้ำหนักแห้ง(กรัม)	ผลการรวม fraction
1	Chloroform	0.1228	1-4
2	Chloroform	0.0470	
3	Chloroform	0.0274	
4	Chloroform	0.0235	
5	mix	0.0120	5-6
6	Chloroform : Methanol 90:10	0.0159	
7	Chloroform : Methanol 90:10	0.0193	7-8
8	Chloroform : Methanol 90:10	0.0223	
9	Chloroform : Methanol 90:10	0.0247	9-10
10	Mix	0.0271	
11	Chloroform : Methanol 80:20	0.0218	11-16
12	Chloroform : Methanol 80:20	0.0287	
13	Chloroform : Methanol 80:20	0.0276	
14	Chloroform : Methanol 70:30	0.0245	
15	Chloroform : Methanol 70:30	0.0084	
16	Chloroform : Methanol 70:30	0.0019	
17	Mix	0.0148	17-20
18	Chloroform : Methanol 50:50	0.0179	
19	Mix	0.0036	
20	Methanol	0.0093	

ตารางที่ 23 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส A16-1 ด้วย Column Chromatography

fraction	ตัวทำละลาย	น้ำหนักแห้ง(กรัม)	ผลการรวม fraction
1	Chloroform	0.1285	1
2	Chloroform	0.0030	2
3	Chloroform	0.0012	3
4	Chloroform	0.0022	4
5	mix	0.0014	5
6	Chloroform : Methanol 95:5	0.0149	6
7	Chloroform : Methanol 95:5	0.0062	7-9
8	Chloroform : Methanol 95:5	0.0035	
9	Chloroform : Methanol 95:5	0.0047	
10	Chloroform : Methanol 90:10	0.0216	10-12
11	Chloroform : Methanol 90:10	0.0089	
12	Chloroform : Methanol 90:10	0.0028	
13	Chloroform : Methanol 90:10	0.0008	13-16
14	Mix	0.0045	
15	Chloroform : Methanol 70:30	0.0064	
16	Chloroform : Methanol 70:30	0.0006	
17	Mix	0.0124	17-19
18	Chloroform : Methanol 50:50	0.0081	
19	Mix	0.0032	
20	Methanol	0.0093	20-21
21	Methanol	0.0113	

เมื่อนำสารที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วด้วย Column Chromatography มาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ อีกครั้ง พบว่าสารที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากทุกสายพันธุ์ มีจำนวนองค์ประกอบที่เป็นสารออกฤทธิ์มากขึ้นมาก ไม่ว่าจะเป็น A1-3, A3-3 หรือ A16-1 ดังตารางที่ 24, 25 และ 26

ตารางที่ 24 แสดงผลการทดสอบไบโอออโตกราฟีของเชื้อ A1-3 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ MRSA P86

fraction	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ค่า R_f ของแต่ละกลุ่มสาร			
		1	2	3	4
1	0.0162	0.5469 +	0.7679 +		
2	0.0051	0.8066 +			
3	0.0532	0.2544 +	0.6804 -		
4	0.0128	0.1538 +	0.7514 -		
5-8	0.0099	0.1803 +	0.5519 +	0.7158 +	0.8579 -
9-10	0.0023	0.0437 -			

หมายเหตุ + มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ (MRSA P86)

- ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบP86)

ตารางที่ 25 แสดงผลการทดสอบไบโอออโตกราฟีของเชื้อ A3-3 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ MRSA H78

fraction	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ค่า R_f ของแต่ละกลุ่มสาร						
		1	2	3	4	5	6	7
1-4	0.0090	0.3380 -	0.7660 +	0.8550 -	0.9330 -			
5-6	0.0041	0.0770 +	0.1940 +	0.2500 -	0.3330 -	0.3830 -	0.8270 -	
7-8	0.0039	0.0550 +	0.1270 +	0.1880 +	0.2380 +	0.3830 +	0.4440 +	0.7000 -
9-10	0.0059	0.1330 +						

11-16	0.0350	0.0550 +	0.1000 +	0.2380 +				
17-20	0.0035	0.0330 +	0.1000 +	0.2330 +				

หมายเหตุ + มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ (MRSA H78)

- ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (MRSA H78)

ตารางที่ 26 แสดงผลการทดสอบไบโอออโตกราฟีของเชื้อ A16-1 ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ MRSA P45

fraction	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ค่า R_f ของแต่ละกลุ่มสาร					
		1	2	3	4	5	6
1	0.1285	0.1345 (-)	0.9122 (-)				
2	0.0030	0.0643 (-)	0.2397 (-)	0.9064 (-)			
3	0.0012	0.0529 (-)	0.1941 (-)	0.2235 (-)	0.9117 (-)		
4	0.0022	0.0647 (-)	0.2000 (-)	0.2235 (-)	0.8823 (-)		
5	0.0014	0.5853 (-)	0.7012 (-)	0.7865 (+)	0.9207 (+)		
6	0.0149	0.5487 (+)	0.6219 (+)	0.7256 (+)	0.7865 (+)	0.8597 (+)	0.9451 (+)
7-9	0.0144	0.36477 (-)	0.4402 (+)	0.5094 (+)	0.5974 (+)	0.7106 (+)	0.786 (+)
10-12	0.0333	0.2955 (+)	0.3522 (+)	0.3836 (-)	0.4402 (-)	0.5660 (-)	0.6729 (-)
13-16	0.0123	0.0389 (-)	0.0947 (-)	0.1688 (-)	0.2727 (-)	0.3831 (-)	
17-19	0.0237	0.0389 (-)	0.0714 (-)	0.1168 (-)	0.1623 (-)		
20-21	0.01476	0.0413 (-)	0.1448 (-)	0.2896 (-)	0.6551 (-)	0.7793 (-)	

หมายเหตุ (+) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ (MRSA P45)

(-) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (MRSA P45)

จะเห็นได้ชัดเจนว่า แอคติโนมัยซีท ทุก ๆสายพันธุ์ มีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์อยู่เป็นจำนวนมาก เฉพาะแอคติโนมัยซีท A16-1 สายพันธุ์เดียวก็ให้สารออกฤทธิ์ จากทุก ๆ fraction รวมกันมากถึง 15 องค์ประกอบ (ตารางที่ 26) จากการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งและคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา พบว่า A16-1 และ A16-2 เป็นชนิดเดียวกัน และ A11-8 ให้ผลไม่ชัดเจนต่อฟทธิ์ยับยั้ง จึงไม่ได้นำมาทำ fractionation

5 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่นำมาศึกษา ให้ผลในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดีในอาหารที่เตรียมจากน้ำกลั่นที่ไม่ได้ผสมน้ำทะเล เมื่อความเค็มในอาหาร $\geq$20 ppt ราเอนโดไฟท์สร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพไม่ได้หรือสร้างได้น้อยมาก คุณสมบัตินี้สอดคล้องกับรายงานอื่นๆ ที่ผ่านมาในราทะเล มีรายงานว่าราทะเลส่วนใหญ่สร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพได้ดีในน้ำกลั่น เนื่องจากไม่ต้องสูญเสียพลังงานในการสร้างสารเพื่อปกป้องตนเองจากความเค็ม (Bugni and Ireland, 2004) เป็นไปได้ว่าสมมุติฐานนี้สามารถนำมาใช้กับราเอนโดไฟท์ในพืชชายเลนได้ เนื่องจากมีราเอนโดไฟท์จากพืชชายเลนถูกจัดเป็นราทะเลประเภทหนึ่ง (Miller, 2000; Proksch *et al.*, 2010)

ความสมบูรณ์ของสารอาหารมีความสำคัญอย่างมาก ต่อการสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช จากการศึกษาพบว่าอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ เช่น PDB, SDB และ YMB จะช่วยให้ราเอนโดไฟท์สร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดี ส่วนอาหาร LNA ซึ่งมีสารอาหารน้อยมาก คือมีแหล่งคาร์บอน (dextrose) 2 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน (yeast extract และ malt extract) 0.3 กรัมต่อลิตร (Motti *et al.*, 2007) ให้ผลต่างออกไปอย่างชัดเจน นอกจากความสมบูรณ์ของสารอาหารแล้ว ชนิดของสารอาหารอาจมีส่วนสำคัญเช่นเดียวกัน ซึ่งถ้าพิจารณาองค์ประกอบของอาหาร PDB และ SDB ในด้านแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะพบว่าน่าจะมีองค์ประกอบต่างกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิตเมตาบอไลท์ของรา (Li *at al.*, 2007) Abbanat *et al.* (1998) รายงานว่า อาหาร SDA มีแหล่งคาร์บอน (glucose และ maltose) 20 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน (peptone) 10 กรัมต่อลิตร ขณะที่ PDB มีแหล่งคาร์บอน (dextrose) 20 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนเป็น potato infusion (Oh *et al.*, 1999) ดังนั้นเป็นไปได้ว่า ผลของสารสกัดที่ต่างกันของ Th121 และ BR830 ที่เลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกัน ทั้งกรณีของ PDB และ SDB (จากตารางที่ 8) น่าจะมาจากความแตกต่างของสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกเหนือจากคุณสมบัติจำเพาะของราเอนโดไฟท์เองหรือปัจจัยอื่นๆ ที่ยังไม่ได้ศึกษาในที่นี้ ทั้ง Th121 และ BR830 สามารถสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดีพอควร ใน YMB เป็นไปได้ว่าอาจมีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมพอควรต่อทั้ง Th121 และ BR830

จากการศึกษาพบว่าเวลา 3-14 วัน ในการเลี้ยงราไม่มีผลต่างกันอย่างมีนัยสำคัญต่อการสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ อาจเนื่องจากบนอาหารที่สมบูรณ์ ราสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วทำให้เข้าสู่ระยะ stationary ได้อย่างรวดเร็ว ระยะเวลาเลี้ยงราเอนโดไฟท์ 3-14 วัน ให้ผลในการยับยั้งราโรคพืชที่ไม่แตกต่างกัน คล้ายคลึงกับรายงานของ Vichitsoonthonkul *et al.* (2008) ที่ศึกษาสารสกัดราเอนโดไฟท์จากหนอนตายหยากต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด พบว่าสารสกัดที่เลี้ยงราที่ระยะเวลา 7 วัน 14 วัน และ 28 วัน ในอาหาร PDB ให้ผลยับยั้งไม่แตกต่างกัน ในทำนองเดียวกันการที่รายังไม่สร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช เมื่อเลี้ยงใน LNB นาน 14 วัน อาจเป็นเพราะรามีอัตราการเจริญต่ำ จึงยังไม่เข้าสู่ระยะ stationary หรือมีแหล่งไนโตรเจนไม่เพียงพอสำหรับการผลิตเมตาบอไลท์

ผลการศึกษาปัจจัยพื้นฐานข้างต้นและสมมุติฐานที่กล่าวมา ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นจริงสำหรับราเอนโดไฟท์จากพืชชายเลนส่วนใหญ่ เนื่องจากจำนวนสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาเพียง 6 สายพันธุ์ แต่ผู้วิจัยคิดว่าผลเบื้องต้นที่ได้น่าจะมีประโยชน์ในการใช้เป็นแนวทางสำหรับศึกษาการสร้างสารของราเอนโดไฟท์ จากพืชชายเลนในครั้งต่อๆไป หรือเพื่อการเลือกศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์จำเพาะที่สนใจ เนื่องจากปัจจุบันรายงานการศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์ในป่าชายเลนยังมีไม่มากนัก (Lin *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2009; Chaeprasert *et al.*, 2010)

การศึกษานี้ผู้วิจัยมุ่งเน้นศึกษาสภาวะอาหารและความเค็มของรา 3 ชนิดคือ Th121 Br830 และ Br834 ซึ่งเป็นราที่ผลการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี coculture บนอาหารแข็งและผลการยับยั้งของสารสกัดจากราที่เลี้ยงในอาหารเหลวไม่สอดคล้องกัน พบว่าเมื่อเปลี่ยนมาเลี้ยงราในสภาวะที่เหมาะสม Th121 และ Br830 สามารถผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชในอาหารเหลวได้ดีขึ้น คือเมื่อเลี้ยง Th121 เป็นเวลา 3 วัน ในอาหาร 0.5xPDB และ PDB ที่เตรียมจากน้ำกลั่น Th121 มีการสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* ได้ดีที่สุด และเมื่อเลี้ยง Th121 เป็นเวลา 3 วัน ในอาหาร PDB ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. gloelosporiodes* ได้ดีที่สุด ขณะที่เมื่อเลี้ยง Br830 เป็นเวลา 3 วัน ในอาหาร SDB ที่เตรียมจากน้ำทะเลและปรับให้มีค่าความเค็ม 10 ppt Br830 สร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* และ *C. gloelosporiodes* ได้ดีสุด (ระดับ 2+ เพิ่มจากเดิมที่ไม่ยับยั้งหรือยับยั้งได้ในระดับ 1+) ส่วนการยับยั้ง *F. oxysporum* ยังอยู่ที่ระดับเดิม (ระดับ 2+)

ในการศึกษานี้พบว่ายังไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในอาหารเหลว ที่ส่งผลให้ Br834 สร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดี จึงได้ทดลองเลี้ยงในอาหารแข็งที่ผสมธัญพืชชนิดต่างๆ พบว่าเฉพาะอาหารที่มีข้าวฟ่างเป็นส่วนผสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้อัตราส่วน รำข้าว : ข้าวฟ่าง 1:1 ให้ผลดีที่สุด แต่ยังให้ผลยับยั้งได้เฉพาะ *A. brassicicola* ในระดับ ปานกลางคือ 1+ ทั้งนี้เนื่องจากยังมีปัจจัยอื่นๆของการหมักในอาหารแข็งที่มีผลต่อการสร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพหรือการสกัดอีกมากที่ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม อาจรวมถึงต้องศึกษาสภาวะในการสกัดสารและตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด จากการสกัดด้วย ethanol และ ethyl acetate พบว่าน่าจะมีสารอื่นๆ เจือปนอยู่มาก เห็นได้จากได้สารสกัดมีสีหรือสารคล้ายไขมันเจือปน (ไม่ได้แสดงไว้) สารดังกล่าวอาจมีฤทธิ์ยับยั้งการก่อฤทธิ์ของสารที่สร้างจากเอนโดไฟท์

สารสกัดที่ยับยั้งได้ น่าจะเป็นสารในกลุ่มไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย ตัวอย่างสารในกลุ่มไม่มีขั้วที่ผ่านการสกัดหยาบด้วย ethyl acetate ที่ได้จากราเอนโดไฟท์ เช่น deoxybostrycin, aloesol และ deoxytetrahydrobostrycin เป็นต้น (Kjer, 2009) ส่วนราเอนโดไฟท์ที่ยับยั้งในขั้นตอนแรกโดยวิธี dual culture เมื่อนำมาสกัดสารแล้ว ไม่สามารถยับยั้งราโรคพืช *A. brassicicola* อาจเนื่องจากการสกัดสารที่ไม่ได้ปริมาณสารที่มากพอ การวิเคราะห์รูปแบบสารองค์ประกอบหลังจากปรับค่าความเค็มของอาหาร PDB ที่ใช้เลี้ยงราเอนโดไฟท์ ยังไม่พบว่าราเอ็นโดไฟท์สร้างสารที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัด และสารประกอบที่ 2 และ 3 อาจเป็นสารชนิดเดียวกันเนื่องจากอัตราการเคลื่อนที่ในแผ่น TLC ใกล้เคียงกันมาก แต่ การทำ TLC ของสารสกัดจากเอนโดไฟท์ เมื่อใช้อาหารชนิดต่างๆ กันที่ปรับค่าความเค็มให้เหมาะสม แสดงให้เห็นรูปแบบของสารองค์ประกอบที่เปลี่ยนไปขึ้นกับชนิดอาหารที่ใช้เลี้ยง ในสารสกัดจากอาหารที่เหมาะสมที่ใช้เลี้ยงราเอนโดไฟท์ Th121 พบสารประกอบที่แตกต่างหรือปริมาณที่ต่างจากที่พบในสารสกัดที่เตรียมจากอาหารที่ไม่เหมาะสม สารประกอบเหล่านี้น่าจะเป็นสารที่มีบทบาทในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไป

สำหรับแอคติโนมัยซีทในทุก ๆสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ พบว่าการเลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกันมีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพชัดเจนและมีผลต่อการเจริญด้วย บางอาหารที่นำมาเลี้ยงอาจทำให้เชื้อไม่สามารถสร้างสารบางตัวและขึ้นกับเชื้อแต่ละชนิดที่จะชอบอาหารไม่เหมือนกันด้วย เช่น ในอาหาร Glucose Yeast Extract broth เชื้อ A11-8 สร้างสารได้น้อยชนิด กว่าในอาหาร ISP2 และ AB2 8 ขณะเดียวกันในเชื้อ A 3-3 จะสร้างสารได้มากชนิดเมื่อเลี้ยงในอาหาร TSB แต่ในอาหารอื่น ๆ สร้างสารได้น้อยชนิด และเมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 เชื้อแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่

เจริญเติบโตได้ดี และสร้างสารออกฤทธิ์ได้มาก รองลงมาคือ อาหารข้าวโอ๊ตซึ่งเป็นอาหารธรรมชาติที่อุดมไปด้วยแร่ธาตุและวิตามิน บี ขณะเดียวกัน ในอาหาร SCA เชื้อแอคติโนมัยซีททุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด แต่เมื่อเลี้ยงใน Starch Casein Broth กลับไม่มีสายพันธุ์ใดเจริญได้ เมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อปริมาณมาก ไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Column Chromatography พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีททุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษานี้ สร้างสารเมตาโบไลท์จำนวนมากขึ้นมาก ซึ่งมีทั้งสารออกฤทธิ์และไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ และพบว่าในสารเมตาโบไลท์เหล่านี้มีสารออกฤทธิ์จำนวนมากและเชื่อว่ามีความหลากหลายของโครงสร้างด้วยเช่นกันซึ่งคงจะได้ทำการศึกษาต่อไป ผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่า ทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาเป็นแอคติโนมัยซีทในจีนัส *Streptomyces* ทั้งหมด

เอกสารอ้างอิง

นิตยา โนคำ. 2552. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสของกล้วยโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ . วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต, สาขาวิชาโรคพืช, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Abbanat, D., Leighton, M., Maiese, W., Jones, E. B. G., Pearce, C. and Greenstein, M. 1998. Cell wall active antifungal compounds product by the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* L-15G256I. Taxonomy and fermentation. Journal of Antibiotics. 51, 296-302.

Adaskaveg, J.E. and Hartin, R.J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in Califonia. Phytopathology. 87, 979-987.

Ananda, K. and Sridhar K. R. 2002. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west Coast of India. *Canadian J. Microbiology.* 48: 871-878

Bister, B. , Bischoff, D., Strobele, M., Riedlinger, J.,. Reicke, A., Wolter, F., Bull, A. T., Zahner, H., Fiedler, H. P. and Sussmuth, R.D., 2004. Abyssomicin C- a polycyclic antibiotic from a marine *Verrucosispora* strain as an inhibitor of the p- aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. *Angew. Chem. Int. Edit.* 43: 2574-2576

Bredholdt, H., Galatenko, O. A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L. P. And Zotchev, S. B.2007. Rare actinomycetes bacteria from the shallowwater sediments from of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity. Environmental Microbiology. 9:2756-2764

Bredholdt, H., Fjaervik, E., Johnsen, G., and Zotchev, S. B.2008. Actinomyetes from sediment in the Trondheim fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Mar. Drugs.* 6: 12-24

Bugni, T. and Ireland C.M. 2004. Marine-derived fungi :a chemically and biologically diverse group of microorganisms. Natural Product Reports 21, 143-163.

Bull, A.T., Stach, J.E., Ward, A.C. & Goodfellow, M. (2005) Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87(1), 65-79.

Bugni, T. and Ireland C.M. 2004. Marine-derived fungi : a chemically and biologically diverse group of microorganisms. Natural Product Reports. 21, 143-163.

Chaeprasert, S., Piapukiew, J., Whalley, A. and Sihanonth, P. 2010. Endophytic fungi from mangrove plant species of Thailand: Their antimicrobial and anticancer poteincial. Botanica Marina. 53, 555-564.

Davis, N. D., Cole, R. T., Dorner, J. W. Weete, J. D., Backman, P. A., Clark, E. M., King, C. C., Schmidt, S. P. and Diener, U. L. 1986. Steroid metabolites of *Acremonium coenophialum*, an endophyte of tall fescue. Agricultural Food Chemistry. 34, 105-108.

Ganesh, M., Vasudevan, M. and Sivakumar, T. 2009. Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. Bangladesh Journal of Pharmacology. 4, 13-16.

Ghanem, N. B., Sabry, S. A. El-Sherif, Z. M. and El-Ela, G. A. Abu. 2000. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J. Gen. Appli. Microbiol.*46:105-111

Guan, S.H., Sattler, I., Lin, W.H., Guo, D.A. and Grabley, S. 2005. *p*-Aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte: *Streptomyces griseus* subsp. Journal of Natural products 68, 1198-1200.

Guo, B., Wang, Y., Sun, X. and Tang, K. 2008. Bioactive natural products from endophyte: A review. Applied Biochemistry and Microbiology. 44,136-142.

Hostettmann, K. and Marston, A. 1994. Search for new antifungal compounds from higher plants. Pure and Applied Chemistry. 66, 2231-2234.

Hong, K., Gao, A-H., Xie, Q-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H-P., Yu, H-P., Yao, S-H., Goodfello, M., and Ruan, J-S. 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove Soils and plants in China. *Mar. Drugs.* 7:24-44

Intana, W., Suwanno, T. and Chamswarng, C. 2005. Use of antifungal metabolite from *Trichoderma virens* for controlling Chinese kale leaf spots caused by *Alternaria brassicicola.* Walailuk Journal of Science and Technology. 2, 1-9.

Isaka, M., Suyarnsestakorn, C, Tanticharoen, M., Kongsaeree, P. and Thebtaranonth, Y. 2002. .Aigialomycins A-E, new resorcylic macrolides from the marine mangrove fungus *Aigialus parvus.* Journal of Organic Chemistry. 67, 1561-1566.

Joseph, B., Priya, R.M. 2011. Bioactive compounds from endophytes and their potential in Pharmaceutical effect: A Review. American Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 1,291-309.

Keller, S., Nicholson, G., Drahl, C., Sorensen, E., Fiedler, H. P. and Sussmuth, R.D. 2007. Abyssomicins G and H and atrop-abyssomicin C from the marine *Verrucosospora* strain AB-18-032. J. Antibiot. 60: 391-394.

Kjer, J. 2009. New natural products from endophytic fungi from mangrove plants structure elucidation and biological screening. *Bioresource Technology*, 2, 3-35. Retrieved December15, 2010, from http://docserv.uni-duesseldorf. de/servlets/ DerivateServlet/Derivate-17938/Dissertation_JuliaKjer.pdf.

Kumaresan, V. and Suryanarayanan, T.S. 2001. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. Mycological Research. 105, 1388-1391.

Lam, K. S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Openion in Microbiology*. 9: 245-251

Lazzarini, A., L. Cavaletti., G. Toppo, and F. Marinelli. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *J. Antonie van Leeuwenhoek* 78: 399-405

Li, L., Qiao, B. and Yuan, Y. 2007. Nitrogen sources affect Streptolydigin production and related secondary metabolites distribution of *Streptomyces lydicus* AS 4.2501. Chinese Journal of Engineering. 15, 403-410.

Lin, W., Li, L., Fu, H., Sattler, I., Huang, X. and Grabley, S. 2005. New cyclopentenone derivatives from an endophytic *Streptomyces* sp. isolated from the mangrove plant *Aegiceras comiculatum*. Journal of Antibiotics. 58, 594–598.

Lumyong, S., Lumyong, P. and Hyde, K.D. 2004. Endophytes *In* Thai Fungal Diversity. (eds E.B.G. Jones, M. Tantichareon and K.D. Hyde). BIOTEC Thailand, 197-205.

Maldonado, L. A., Stach, J. E: M., Pathom-aree, W., Ward, A. C., ., Bull, A. T. and Goodfellow, M. 2005.Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87: 11-18

Menzies, J.G., Koch, C. and Seywerd, F. 1990. Addition to the host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Plant disease. 74, 569-572.

Miller, J.D. 2000. Screening for secondary metabolites *In:* Marine Mycology - A practical approach (eds. K.D. Hyde and S.B. Pointing), Fungal Diversity Research Series I, Fungal Diversity Press, Hong Kong, 158-171.

Miyadoh, S., H. Anzai, S. Amano and T. Shomura. 1989. *Actinomadura malachitica* and *Microtetraspora viridis* are synonyms and should be transfered as *Actinomadura viridis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:152-158

Motti, C. A., Bourne, D. G., Burnell, J. N., Dcyle, J. R., Haines, D. S., Liptrot, C. H., Liewellyn, L. E., Ludke, S., Muirhead, A. and Tapiolas, D. M. 2007. Screening marine fungi for inhibitors of the C4 plant enzymes pyruvate phosphate dikinase: Unguinol as a potential novel herbicide candidate. Applied and Environmental Microbiology. 73, 1921-1927.

Muto, M., Mulabagal, V., Huang, H. C., Takahashi, H., Tsay, H. S. and Huang, J. W. 2006. Toxicity of black nightshade (*Solanum nigrum*) extracts on *Alternaria brassicicola*, causal agent of black leaf spot of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*). Phytopathology. 154, 45-50.

Okami, Y., T. Okazaki, T. Kitahara and H. crassa Umezewa. 1976 . Study on marine micro-organisms : A new antibiotic, Aplasmomycin, Produced by a streptomycetes isolated from shallow sea mud. *Japanese Journal of antibiotic*. 29:1019-1023

Oh, Ki-Bong., Hamada, Kazu., Saito, Mikako., Lee, Hun-Jun. and Matsuoka, Hideaki. 1999. Isolated and properties of an extracellular β-glucosidase from a filamentous fungus, *Cladosporium resinae*, isolated from kerosene. Biochemistry. 63, 281-287.

Park, J.H., Choi, G.J., Lee, H.B., Kim, K.M., Jung, H.S., Lee, S.W., Jang, K.S. and Cho, K.Y., 2005. Griseofulvin from *Xylaria* sp. Strain F0010, and endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. Joumal of Microbiology and Biotechnology. 15, 112-117.

Pathom-aree, W., Nogi, Y., Sutcliffe, I.C., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. and Goodfellow, M. (2006). *Williamsia marianensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Mariana Trench. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 1123–1126.

Pretini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. *In* : Microbial Ecology of leaves. (eds J. Andrews and S. Hirano), Springer-Verlag, New York, 179-197.

Proksch, P., Putz, A., Ortlepp, S., Kjer, J. and Bayer, M. 2010. Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes. Phytochemistry Reviews. 9, 475-489.

Saikkonen, K. 2007. Forest structure and fungal endophytes. Fungal Biology Reviews. 21, 67-74.

Schmeda-Hirschmann, G., Hormazabal, E., Astudillo, L., Rodriguez, J. and Theoduloz, C. 2005. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21, 27- 32.

Srinon, W., Chuncheen, K., Jirattiwarutkul, K., Soytong, K. and Kanokmedhakul, S. 2006. Efficacies of antagonistic fungi against Fusarium wilt disease of cucumber and tomato and the assay of its enzyme activity. Journal of Agriculture Technology. 2, 191-201.

Srivibool, R. and Sukchotiratana, M. 2006. Bioperspective of actinomycetes isolated from coastal Soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin Journal of Scince and Technology*. 32:353-358.Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. 2004 Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod.*;67:257-68.

Vichitsoonthonkul, T., Boonmakad, C. and Supatrakul, A. 2007. Bioactive compound produced by endophytic fungi of *Stemona* spp. for bacterial plant pathogen control. Agricultural Science. 38, 339-343.

Xiao, J., Xu, J., Xie, S., Zhang, X., Yu, Z., and Xu, J. 2008. Isolation of mangrove Actinomycetes and their antagonistic activities. *Chin J Appl Environ Biol.* 14: 244-248

Xie, L.W., Jiang, S.M., Zhu, H.H., Sun, W., Ouyag, Y.C., Dai, S.K. and Xiang, L. 2008. Potential inhibitors against *Sclerotinia sclerotium* produced by the fungus *Myrothecium* sp. associated with the marine sponge *Axinella* sp. European Journal of Plant Pathology. 122, 571-578.

Xing, Yong-Mei., Chen, Juan., Cui, Jin-Long., Chen, Xiao-Mei. and Guo, Shun-Xing. 2009. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiforum* from Vietman. Current Microbiology. 10, 284-289.

Xu, J., Kjer, J., Sendker, J., Wray, V., Guan, H., Edrada, R., Muller, Werner E. G., Bayer, M., Lin, W., Wu, J. and Proksch, P. 2009. Cytosporones, coumarins, and an alkaloid from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. Bioorganic & Medicinal Chemistr. 17, 7362–7367.

Zulfiqar, M., Brlansky, R.H. andTimmer, I.W. 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. Mycologia. 88, 121-128.