สัญญาเลขที่ 03-1/2557

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

Distribution and antimicrobial potential of endophytic fungi associated with *Nymphaea* spp. (waterlily) in Thale noi, Phattalung province, Thailand

การกระจายและศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ในบัวสาย ทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง ประเทศไทย


หัวหน้าโครงการ

อ.ดร.พฤทธิภร ศุภพล



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

มหาวิทยาลัยทักษิณ

# คำรับรองคุณภาพ

**รายงานวิจัยเรื่อง** การกระจายและศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อราแอนโดไฟท์ในบัวสายทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง ประเทศไทย

**ผู้วิจัย** พฤทธิภร ศุภพล

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ ขอรับรองว่ารายงานวิจัยฉบับนี้ได้ผ่านการประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว มีความเห็นว่าผลงานวิจัยฉบับนี้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์

- ☐ ดีมาก
- ☑ ดี
- ☐ ปานกลาง
- ☐ พอใช้
- ☐ ควรปรับปรุง

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรพันธุ์ เขมคุณาศัย)

ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

วันที่ 26 เดือนพฤษภาคม พ.ศ.2558

# บทคัดย่อ

**ชื่อโครงการวิจัย** **การกระจายและศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อราเอนโดไฟในบัวสาย ทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง ประเทศไทย**

**Distribution and antimicrobial potential of endophytic fungi associated with *Nymphaea* spp. (waterlily) in Thale noi, Phattalung province, Thailand**

**ชื่อผู้วิจัย** ดร. พฤทฐิภร ศุภพล
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ
โทรศัพท์ 074-692255

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททุนพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2557 จำนวนเงิน 90,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1ปี ตั้งแต่ 1 มิถุนายน 2557 ถึง 31 พฤษภาคม 2558

---

## บทคัดย่อ

เชื้อราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ การศึกษาราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่จะศึกษาจากพืชบนบก โดยการศึกษาราเอนโดไฟท์จากพืชน้ำยังมีน้อยอยู่ ในการศึกษานี้จึงสนใจศึกษาการกระจายและฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์จากบัวสาย พืชน้ำในจังหวัดพัทลุง ประเทศไทย โดยแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 88 ไอโซเลท จากส่วนใบ ก้านใบ ดอก ก้านดอก และเกสร จากบัวสาย สามารถจัดจำแนกได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา คิดเป็น 7.9% เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจัดจำแนกได้ทั้งหมด 3 จีนัส ได้แก่ *Nigrospora* spp. 5 ไอโซเลท *Curvularia* spp. 1 ไอโซเลท และ *Pestalotiopsis* spp. 1 ไอโซเลท และที่เหลืออีก 33 ไอโซเลท ไม่พบโครงสร้างในการสืบพันธุ์ จึงจัดเป็นกลุ่ม unidentified endophytic fungi สารสกัดที่ได้จากเชื้อราเอนโดไฟท์ ประกอบด้วย cell ethyl acetate extract (CE), cell hexane extract (CH) และ broth ethyl acetate extract (BE) และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในคนโดยวิธี colorimetric broth microdilution สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ดีที่สุดคือ สารสกัด CH จากไอโซเลท TSU-WPLS036 (Unidentified endophytic fungi)ให้ค่า MIC/MFC ต่อ *Candida albicans* ATCC90028 เท่ากับ 2/8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่า MIC/MFC กับเชื้อทดสอบในกลุ่มยีสต์ *C. albicans* NCPF 3153, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 (flucytosine-sensitive) และ *C. neoformans* ATCC90113 (flucytosine-resistant) เท่ากับ 4/128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่า MIC/MBC ต่อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

ATCC25923 และ MRSA, methicillin-resistant *S. aureus* เท่ากับ 4/>128 และ 8/>128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดี

**คำสำคัญ :** ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ราเอนโดไฟท์ และ ดอกบัวสาย

## Abstract

Endophytic fungi are important source of bioactive metabolites. Most studied endophytic fungi have been isolated from terrestrial plants. Endophytic fungi from aquatic plants have been rarely studied. In this study, we focused on distribution and antimicrobial activity of endophytic fungi from *Nymphaea* spp., a aquatic plant from Phattalung Province, Thailand. Eighty-eight fungal endophytes were obtained from leaf, leaf stalk, flower, flower stalk and pollen of waterlily samples. Seven isolates (7.9%) could be identified into three genus including *Nigrospora* spp. 5 isolates *Curvularia* spp. 1 isolates และ *Pestalotiopsis* spp. 1 isolate. The remaining isolates could not identified by their morphology. Therefore, they were identified as unidentified endophytic fungi. Three crude extracts including cell ethyl acetate extract (CE), cell hexane extract (CH) and broth ethyl acetate extract (BE) were obtained from each isolate and evaluated for their antimicrobial activity against human pathogens by a colorimetric broth microdilution test. One fungal endophyte, unidentified fungal endophyte TSU-WPLS036CH showed strong antifungal activity against *Candida albicans* ATCC90028 (MIC/MFC, 2/8 µg/ml) and *C. albicans* NCPF 3153, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 (flucytosine-sensitive) และ *C. neoformans* ATCC90113 (flucytosine-resistant) (MIC/MFC, 4/128 µg/ml). Whereas, this extract showed the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (MIC/MBC, 4/>128 µg/ml) and MRSA, methicillin-resistant *S. aureus* (MIC/MBC, 8/>128 µg/ml). These results indicated that the extracts of endophytic fungi are a good source of antimicrobial activity.

**Keywords:** Antimicrobial activity, Endophytic fungi and *Nymphaea* spp.

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากหลายหน่วยงานด้วยกัน โดยได้รับเงินสนับสนุนการทำวิจัยตลอดโครงการจากสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยทักษิณ ในปีงบประมาณ 2557 นอกจากนี้งานวิจัยจะสำเร็จไปไม่ได้ หากไม่ได้รับความร่วมมือ และคำแนะนำจากคณาจารย์ภายนอกมหาวิทยาลัย ได้แก่ รศ.ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ ศ.ดร. วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตลอดการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ดร. พฤทฐิภร ศุภพล

ผู้ทำวิจัย

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| **บทคัดย่อ** | 1 |
| **Abstract** | 2 |
| **กิตติกรรมประกาศ** | 3 |
| **สารบัญ** | 4 |
| สารบัญตาราง | 6 |
| สารบัญภาพ | 7 |
| **บทที่ 1บทนำ** | 8 |
| 1.1 ที่มา และความสำคัญ | 8 |
| 1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย | 9 |
| 1.3 ขอบเขตของโครงงานวิจัย | 9 |
| 1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน | 10 |
| **บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** | 11 |
| 2.1 บัว | 11 |
| 2.2 เชื้อราเอนโดไฟท์ | 15 |
| **บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย** | 17 |
| 3.1 ตัวอย่าง และการคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ | 17 |
| 3.2 การจัดจำแนกเชื้อราเอนโดไฟท์ | 17 |
| 3.3 การสกัดสารจากเชื้อราเอนโดไฟท์ | 18 |
| 3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อก่อโรค | 18 |
| 3.5 การทดสอบของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution tests | 20 |
| 3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล | 22 |

# สารบัญ (ต่อ)


| | หน้า |
|---|---|
| **บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล** | 23 |
| 4.1 การแยก และการจัดแนกเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสาย | 23 |
| 4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์ | 25 |
| **บทที่ 5 อภิปรายผลสรุป และข้อเสนอแนะ** | 30 |
| 5.1 การแยก และการจัดแนกเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสาย | 30 |
| 5.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อราแอนโดไฟท์ | 33 |
| **บรรณานุกรม** | 36 |

# สารบัญตาราง


| ตาราง | หน้า |
|---|---|
| 1 ส่วนประกอบ และสรรพคุณของบัว | 12 |
| 2 บัวสายในประเทศไทย | 13 |
| 3 การวิเคราะห์การกระจายของเชื้อราเอนโดไฟท์ | 22 |
| 4 การกระจายของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆของบัวสาย | 25 |
| 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ในช่วงความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร | 29 |
| 6 ค่า isolation rate ของเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสาย และพืชอื่นๆ | 32 |


มหาวิทยาลัยทักษิณ THAKSIN UNIVERSITY

# สารบัญภาพ


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | วงจรชีวิตของเชื้อราเอนโดไฟท์แบบอาศัย และไม่อาศัยเพศ | 15 |
| 2 | ลักษณะโคนิเดียและเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Nigrospora* spp. ที่กำลังขยาย 400 เท่า | 24 |
| 3 | ลักษณะโคนิเดียของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Curvularia* spp. ที่กำลังขยาย 400 เท่า | 24 |
| 4 | ลักษณะโคนิเดียของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* spp. ที่กำลังขยาย 400 เท่า | 25 |
| 5 | แสดงฤทธิ์ของสารสกัดต่อกลุ่มของจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก และยีสต์ | 26 |
| 6 | แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดทั้ง 3 ส่วน ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ | 27 |
| 7 | จำนวนของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ | 28 |


มหาวิทยาลัยทักษิณ THAKSIN UNIVERSITY

# บทที่ 1 บทนำ

## 1.1 ที่มาและความสำคัญ

เชื้อราเอนโดไฟท์ คือ เชื้อราที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืช โดยไม่ทำให้พืชเกิดโรค พบเชื้อราเอนโดไฟท์อยู่ในพืชเกือบทุกชนิด นอกจากนี้ เชื้อราเอนโดไฟท์ยังอาศัยอยู่กับพืชแบบพึ่งพาอาศัยกัน เชื้อราเอนโดไฟท์จะได้รับสารอาหารจากพืช ส่วนพืชเจ้าบ้านเองก็ได้รับประโยชน์จากเชื้อราเอนโดไฟท์เนื่องจากเชื้อราเอนโดไฟท์จะสร้างสารออกมาช่วยป้องกันแมลงศัตรูพืช ป้องกันโรคพืช และเพิ่มความทนทานของพืชในสภาวะที่แห้งแล้ง เป็นต้น เชื้อราเอนโดไฟท์ถูกศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยมีการค้นพบสาร taxol ในต้น yew tree ที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (Stierle et al., 1993) จากการค้นพบนี้ จึงทำให้มีการศึกษาเชื้อราเอนไฟท์ที่อยู่ในพืชชนิดนี้และพืชอื่นๆตามมา นอกจากนี้เชื้อราเอนโดไฟท์ยังสร้างสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆได้ดี รวมทั้งเอนไซม์ และสารต้านอนุมูลอิสระ

ทะเลน้อยเป็นทะเลสาบที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากมาย ทั้งระบบนิเวศ พืชพรรณ สัตว์น้ำ โดยเฉพาะพืชน้ำหลากหลายชนิด เช่น ผักตบชวา จอก แหน สาหร่ายต่างๆ กระจูด กก ย่านลิเภา และบัว เป็นต้น บัวสาย เป็นพืชน้ำชนิดหนึ่งในตระกูล *Nymphaea* ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากในทะเลน้อย หรืออาจจะเรียกว่า ทะเลบัวสาย บัวเป็นพืชน้ำที่มีประโยชน์ในหลากหลายด้านด้วยกัน ทั้งใช้เป็นอาหาร และยารักษาโรค มีรายงานการศึกษาต่างๆในบัว เช่น ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากบัวในการยับยั้งเชื้อก่อโรคต่างๆ รวมถึงศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญของบัว แต่ยังไม่พบการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์ในบัว ดังนั้นในการศึกษานี้จึงสนใจศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสายจากแหล่งอุทยานแห่งชาติทะเลน้อย ซึ่งเป็นทรัพยากรในจังหวัดพัทลุง

งานวิจัยนี้จะศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากบัวสายชนิดต่างๆ ในอุทยานแห่งชาติทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง โดยจะทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากส่วนต่างๆของบัวสาย ได้แก่ ดอก ใบ ลำต้น และราก เพื่อดูความสัมพันธ์และกลุ่มของเชื้อราจากส่วนต่างๆของบัว จากนั้นศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้กับเชื้อก่อโรค เชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมดจะถูกจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการศึกษาการกระจายของกลุ่มเชื้อราเอนโดไฟท์จะเป็นฐานข้อมูลให้กับการศึกษาอื่นๆต่อไป รวมทั้งเป็นการรายงานครั้งแรกที่มีการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสาย ในทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง นอกจากนี้ผลของการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นอาจจะนำไปสู่การค้นพบเชื้อ และสารใหม่ๆ สุดท้ายจากผลการศึกษาทั้งหมดยังสามารถใช้เป็นข้อมูลให้คนในชุมชนเห็นประโยชน์และคุณค่าของทรัยพยากรท้องถิ่นที่มีอยู่ เพื่อจะได้ช่วยกันอนุรักษ์ทรัพยากรเหล่านี้

**1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ เพื่อ ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราเอนโดไฟท์ในบัวสาย ในทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง โดยมีวัตถุประสงค์ย่อย 4 ข้อ ดังต่อไปนี้

1.คัดแยกและศึกษาการกระจายของกลุ่มเชื้อราเอนโดไฟท์ในบัวสาย

2.เปรียบเทียบกลุ่มของเชื้อราเอนโดไฟท์ในส่วนต่างๆของบัวสาย

3.ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

4.จัดจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

**1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย**

คัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ และศึกษาการกระจายของกลุ่มเชื้อราเอนโดไฟท์ โดยดูการกระจายของกลุ่มเชื้อราในบัวสาย สายพันธุ์ต่างๆ และส่วนต่างๆของต้น ได้แก่ ดอก ใบ ราก และลำ

ต้น นำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้มาสกัดสารด้วยตัวสกัดต่างๆ และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกับเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐาน เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ ในอนาคต

**1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน**

เนื่องจากเชื้อราเอนโดไฟท์มีศักยภาพในด้านต่างๆมากมาย ทั้งให้ประโยชน์ต่อพืชเจ้าบ้านที่เชื้อราเอนโดไฟท์ไปอาศัยอยู่ โดยช่วยป้องกันแมลง ทำให้พืชเจ้าบ้านทนต่อความร้อนและความแห้งแล้งได้ดี เป็นต้น รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ ที่นำไปใช้ในอุตสาหกกรม และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถต้านเชื้อก่อโรคต่างๆได้ ทำให้มีการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากแหล่งต่างๆ โดยเฉพาะในพืชบกอย่างกว้างขวาง แต่ปัจจุบันมีการหาแหล่งตัวอย่างใหม่ๆเพิ่มมากขึ้น เพื่อช่วยเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อราเอนโดไฟท์และสารใหม่ที่เชื้อราผลิตขึ้น เช่น สาหร่าย และหญ้าทะเล เป็นต้น หญ้าทะเลเป็นพืชดอกที่อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่ง และมีรายงานพบเชื้อราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเลชนิดต่างๆที่มีสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้ที่ความเข้มข้นของสารต่ำ นอกจากนี้ยังพบสารโครงสร้างใหม่ ที่เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากหญ้าทะเลผลิตขึ้น ดังนั้นการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสายสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งเป็นพืชน้ำจึงน่าสนใจ โดยเฉพาะการศึกษาจากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ในท้องถิ่นอย่าง อุทยานแห่งชาติทะเลน้อย ซึ่งยังไม่พบรายงานการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชน้ำจากแหล่งตัวอย่างนี้มาก่อน

# บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 บัว

บัวเป็นพืชน้ำชนิดหนึ่ง มีลำต้นเป็นเหง้า หรือไหล ทุกส่วนของพืชมีน้ำยางใสเมื่อถูกอากาศจะเป็นสีดำและเป็นใย ถูกจัดอยู่ใน family Nymphaeaceae และเจริญขึ้นมาจากใต้น้ำ บัวมีทั้งหมด 5 สกุล 80 ชนิด บางชนิดอยู่เหนือน้ำ หรือใต้น้ำ ผิวใบด้านล่างเห็นเส้นใยนูนชัด ขอบใบอาจจะเรียบหรือหยัก ก้านดอกยาว สมบูรณ์เพศทั้งเกสรเพศเมียและเพศผู้ บัวแบ่งออกได้เป็น บัวหลวง หรือชื่อสากล คือ Lotus และบัวสาย ชื่อสากลคือ Waterlily (วีณา 2546 และ จิตราภรณ์ 2548)

บัวหลวงถูกแบ่งออกเป็น 2 ประเภทย่อยคือ บัวหลวง ซีกโลกตะวันออก มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย ให้ดอกสีขาว และสีชมพู-แดง นักพฤษศาสตร์ให้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo nucifera* และบัวหลวงซีกโลกตะวันตก มีถิ่นกำเนิดในอเมริกาเหนือ ให้ดอกสีเหลือง นักพฤษศาสตร์ให้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo lutea*

บัวสายถูกจัดออกเป็น 2 ประเภทย่อยได้แก่ บัวฝรั่ง มีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่นและหนาวทั้งในยุโรปและอเมริกา บัวกลุ่มนี้จะทนทานต่อความหนาวเย็น ภาษาสากลเรียกบัวกลุ่มนี้ว่า Hardy waterlily ส่วนอีกกลุ่มเรียก บัวสาย มีชื่อสากลว่า Tropical waterlily เป็นบัวในเขตร้อน ซึ่งยังถูกแบ่งย่อยออกเป็น บัวผัน (ดอกใหญ่) และบัวเผื่อน (ดอกเล็ก) ชนิดของบัวสายในประเทศไทย และสรรพคุณ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

**ตารางที่ 1** ส่วนประกอบและสรรพคุณของบัว (วีณา 2546 และ จิตราภรณ์ 2548)

| บัว | ส่วนประกอบ | สรรพคุณ |
|---|---|---|
| บัวสาย *Nymphaea* spp. | โปรตีน ฟอสฟอรัส เหล็ก เส้นใย วิตามินเอ วิตามินบี1 ไนอะซิน วิตามินอี สารเบต้าซิโตสเตอรอล สารกลุ่มเคอร์เซตาเจตีน (quercetagetin) และไมริเซติน (myricetin) | **ดอกบัว** - มีรสฝาดหอมและเย็น บำรุงกำลัง บำรุงหัวใจ บำรุงครรภ์ บำรุงร่างกาย แก้ไข้<br>**เมล็ดบัว** – บำรุงกำลังและร่างกาย<br>**สายบัว (ก้านดอก)** - มีรสจืด ช่วยบรรเทาความร้อนในร่างกายและตับพิษ<br>**หัว** - มีรสหอมเผ็ดเล็กน้อย บำรุงร่างกาย บำรุงครรภ์ บำรุงหัวใจ บำรุงธาตุ |

**ตารางที่ 2.** บัวสายในประเทศไทย (ปริมลาภ และ คมกฤช 2548)

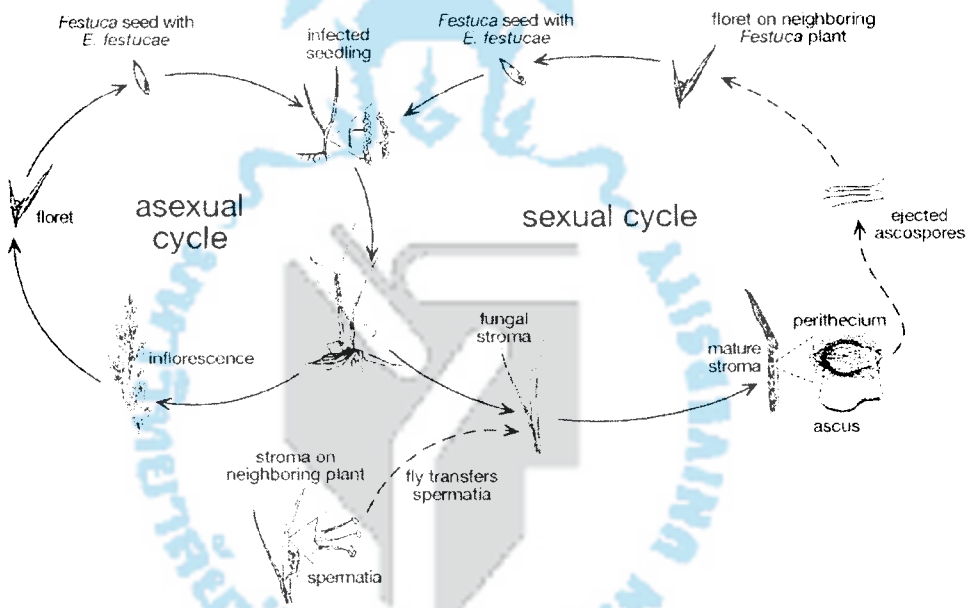
| **ชื่อวิทยาศาสตร์** | **ชื่อสามัญ** | **ถิ่นกำเนิด** | **ลักษณะ** |
|---|---|---|---|
| *Nymphaea* spp. | Larpchaiporn (ลาภชัยพร) | ประเทศไทย | **ใบอ่อน**: กลม หน้าใบสีน้ำตาลแดงเข้ม หลังใบสีน้ำตาลแดง<br>**ใบแก่**: กลม หน้าใบสีน้ำตาลแดง เหลือบเขียว หลังใบสีน้ำตาลแดง ขอบใบจักรแหลม ปลายใบมน<br>**ก้านใบ**: สีน้ำตาลแดง ไม่มีขน<br>**ดอก**: สีแดงสด มีสีขาวช่วงโคนใบ |
| *Nymphaea* spp. | Red Flare (เรดแฟลร์) | สหรัฐอเมริกา | **ใบอ่อน**: รูปไข่ หน้าและหลังใบสีแดงเข้มมาก<br>**ใบแก่**: รูปไข่ หน้าและหลังใบสีแดงเข้มมาก<br>ปลายมน<br>**ก้านใบ**: สีแดงเข้ม ไม่มีขน<br>**ดอก**: สีแดงเข้ม |
| *Nymphaea* spp. | Maeploi (แม่พลอย) | ประเทศไทย | **ใบอ่อน**: รูปไข่ หน้าใบสีเขียวเข้ม หลังใบสีเขียวขี้ม้า<br>**ใบแก่**:รูปไข่ หน้าใบสีน้ำตาลแดง หลังใบสีเขียวขี้ม้า ขอบใบจักรแหลม ปลายใบมน<br>**ก้านใบ**: สีแดงเข้ม ไม่มีขน<br>**ดอก**: สีแดงเข้ม |
| *Nymphaea* spp. | Sir Galahad (เซอร์ กัลลาหาด) | สหรัฐอเมริกา | **ใบอ่อน**: รูปไข่ หน้าใบสีเขียว หลังใบสีน้ำตาลออกเขียว ปลายมน<br>**ใบแก่**: รูปไข่ หน้าใบสีเขียว หลังใบสีน้ำตาลออกเขียว<br>**ก้านใบ**: สีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่มีขน<br>**ดอก**: สีขาว |

บัวนอกจากจะมีฤทธิ์ทางยา ใช้เป็นอาหาร และสมุนไพรท้องถิ่นแล้ว ยังมีการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากบัวต่างๆอีก ได้แก่ สารสกัดเอทานอล และน้ำ ของพืชน้ำในประเทศอียิปต์ *Echinochloa stagnina*, *Pistia stratiotes* และ *Nymphaea lotus* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยสารสกัดจากเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *Cadida albicans* ATCC10231ได้ดีที่สุด ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC) เท่ากับ 78.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (minimal bactericidal concentration, MBC) 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Daboor and Haroon, 2012) Arjun et al (2012) รายงานฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบของบัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) ที่สกัดด้วย hexane, acetone และ methanol พบว่า สารสกัดหยาบจาก methanol มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* มากที่สุด ส่วนสารสกัดจาก hexane และ acetone มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระของบัว *N. nucifera* ในรายงานอื่นๆอีกด้วย (Sittiwet, 2009, Venkatesh and Dorai, 2011) อีกทั้งมีการนำบัว *N. nucifera* ไปใช้ในระบบน้ำเสีย พบว่าบัวหลวงมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำเสียได้ดี (Kanabkaew and Puetpaiboon, 2004) นอกจากบัวหลวงแล้ว บัวสายก็ยังมีการศึกษาและรายงานฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน ส่วนใบของบัวสาย *Nymphaea lotus* ที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* และ *Escherichia coli* (clear zone 8-25 มิลลิเมตร) ยับยั้งเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* (clear zone 8-15 มิลลิเมตร) (Akinjogunla et al., 2009) นอกจากฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สารสกัดจากดอกของบัวสาย *Nymphaea pubescens* ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย (Selvakumari et al, 2012) มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากบัวสายในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอีกหลาย

รายงาน โดยพบว่าสารสกัด มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ได้ดี (Akinjogunla et al., 2010: Sikder et al., 2012: Dash et al., 2013)

**2.2 เชื้อราเอนโดไฟท์**

เชื้อราเอนโดไฟท์คือ เชื้อราที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชในช่วงเวลาหนึ่งโดยไม่ทำให้พืชเจ้าบ้านเกิดโรค (Bacon and White, 2000) เชื้อราเอนโดไฟท์สามารถสืบพันธุ์หรือแพร่กระจายได้ 2 แบบ ทั้งแบบอาศัยเพศ เรียกว่า horizontal transmission และแบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า vertical tranmission (Tan and Zou, 2001)




**รูปที่ 1** วงจรชีวิตของเชื้อราเอนโดไฟท์แบบอาศัยและไม่อาศัยเพศ (Bush et al., 1997)

เชื้อราเอนโดไฟท์มีศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิต่างๆมากมายภายในพืชเจ้าบ้าน ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคกับพืชเจ้าบ้าน และช่วยป้องกันแมลง เป็นต้น (Gao et al., 2005) นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์ยังผลิตสารอัลคาลอยด์ 4 กลุ่มด้วยกัน ได้แก่ aminopyrrolizidines (loline)

pyrrolopyrazines (paramine) ergotoxin และ indolediterpenoid มีรายงานพบว่าสารอัลคาลอยด์เหล่านี้ ช่วยป้องกันแมลงศัตรูพืช เชื้อราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ถูกศึกษาในพืชบนบก และสารสกัดจากเชื้อราเหล่านี้สร้างสารต้านจุลินทรีย์ทั้งต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา ที่ก่อโรคในคน (Phongpaichit et al., 2006; Liu et al., 2008, Xu et al., 2008; Gong and Guo, 2009) เช่น สารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์ *Botryosphaeria* sp. ที่แยกได้จากมังคุด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Microsporum gypseum* ให้ค่า MIC 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมามีการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากแหล่งต่างๆ มากขึ้นเพื่อเพิ่มโอกาสในการเจอเชื้อใหม่ๆ หรือสารโครงสร้างใหม่ๆรวมทั้งพืชน้ำ เช่น สาหร่าย และหญ้าทะเล (Zuccaro et al., 2008: Zhang et al., 2009: Sakayaroj et al., 2010: Supaphon et al., 2013) สาร hexapeptide แยกได้จากเชื้อราเอนโดไฟท์ *Scytallidium* sp. จากหญ้าทะเล *Halodule wrightii* สามารถต้านเชื้อ Herpes simplex virus (Rowley et al., 2003) เมื่อเร็วๆนี้มีรายงานการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเล 4 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ *Cymodocea serrulata, Enhalus accoroides Halophila ovalis* และ *Thalassia hemprichii* พบเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในคน โดยเฉพาะในกลุ่ม เชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC90028, *C. albicans* NCPF3153, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112, *C. neoformans* ATCC900113 และเชื้อรา *M. gypseum* และ *Penicillium marneffei* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (Supaphon et al., 2013, 2014)

อุทยานแห่งชาติทะเลน้อยมีความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศต่างๆ รวมทั้งเป็นแหล่งทรัพยากรที่มีอยู่ในท้องถิ่น ในการศึกษานี้จึงสนใจที่จะศึกษาการกระจายของเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัว เชื้อราเอนโดไฟท์มีประโยชน์ในด้านต่างๆมากมาย ประกอบกับมีรายงานการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์ และฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชน้ำมีศักยภาพในการยับยังเชื้อก่อโรค และยังไม่มีรายงานการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวในทะเลน้อยมาก่อน

# บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 ตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

บัวสายพันธุ์ต่างๆ ในสกุล *Nymphaea* spp. จะถูกเก็บบริเวณ พื้นที่อุทยานแห่งชาติทะเลน้อย อำเภอควนขนุน จังหวัด พัทลุง ซึ่งมีพื้นที่ครอบคลุม 3 จังหวัด ได้แก่ พัทลุง สงขลา และนครศรีธรรมราช สุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง โดยทำการเก็บตัวอย่างบัว ชนิดละ 5 ต้น นำตัวอย่างบัวมาตัดเพื่อแยกออกเป็นส่วน ดอก ใบ ราก และลำต้น จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละส่วนมาล้างด้วยน้ำสะอาดและทำความสะอาดพื้นผิวเพื่อทำลายเชื้ออิพิไฟท์ ด้วยสารละลายเอทานอล และ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ เชื้อราเอนโดไฟท์จะถูกแยกจากส่วน ดอก ใบ ราก และลำต้น ด้วย aseptic technique โดยตัดชิ้นตัวอย่างในแต่ละส่วน ขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 72 ชิ้นต่อ 1 ต้น จากนั้นนำไปวางในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 ºC สังเกตและแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ทุกวันเป็นเวลา 2 อาทิตย์ ลงในอาหาร PDA ที่ไม่ผสมยาปฏิชีวนะ และถ่ายเชื้อราเอนโดไฟท์โดยเทคนิค hyphal tip isolationจนได้เชื้อบริสุทธิ์

## 3.2 การจัดจำแนกเชื้อราเอนโดไฟท์

เชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ ถูกนำมาจัดกลุ่มและจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) ที่อุณหภูมิ25 ºC เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจัดจำแนกเชื้อราด้วย macroscopic morphology โดยดูลักษณะของโคโลนี สี และลักษณะของเส้นใย เป็นต้น และจัดจำแนก โดยใช้ microscopic morphology ด้วย โดยดู ขนาด สี และรูปร่างของโครงสร้างสืบพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วน

เชื้อที่ไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์และไม่สามารถจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จะถูกจัดเก็บใน 20%กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -80 ºC ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อนำไปจัดจำแนกโดยวิธีทางชีวโมเลกุล และใช้ในการศึกษาอื่นต่อไป

**3.3 การสกัดสารจากเชื้อราเอนโดไฟท์**

เชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมดจะถูกจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเลือกตัวแทนกลุ่มมาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ต่อเชื้อ 1 ไอโซเลท วางไว้ที่อุณหภูมิ 25 ºC เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ กรองแยกตัวเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกัน โดยตัวเซลล์สกัดด้วย methanol (MeOH) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน และนำสารส่วนนี้มาสกัดต่อด้วย ethyl acetate และ hexane และทำให้แห้งด้วย anhydrous sodium sulphate ($Na_2SO_4$) และ rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 45 ºC จะได้สารสกัดหยาบในส่วน cell ethyl acetate (CE) และ cell hexane (CH) ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อถูกสกัดด้วย ethyl acetate ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ด้วยกรวยแยก นำสารที่ได้จากส่วนนี้มารวมกัน และทำให้แห้งด้วย anhydrous sodium sulphate ($Na_2SO_4$) และ rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 45 ºC ก็จะได้สารสกัดหยาบในส่วนของ broth ethyl acetate (BE) (Phongpaichit et al., 2006) สารสกัดหยาบที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและมีสัญญาณ NMR ที่น่าสนใจจะถูกนำไปศึกษาโครงสร้างสารในงานวิจัยอื่นต่อไป

**3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อก่อโรค**

**เชื้อทดสอบ**

**เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก**

*Staphylococcus aureus* ATCC25923

Clinical isolate of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1

**เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ**

*Escherichia coli* ATCC25922

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

**ยีสต์**

*Candida albicans* ATCC90028

*C. albicans* NCPF3153

*Cryptococcus neoformans* ATCC90112

*C. neoformans* ATCC900113

**การเตรียมสารสกัดหยาบ**

นำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางต่อด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อทดสอบต่อไป โดยทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

**การเตรียมยาปฏิชีวนะมาตรฐาน**

ละลายยา vancomycin และ gentamicin ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนยา amphotericin B เตรียมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยา miconazole 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยาปฏิชีวนะมาตรฐานทั้งหมดถูกเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20

องศาเซลเซียส ยา vancomycin และ gentamicin ใช้เป็นยามาตรฐานกับแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ตามลำดับ และยา amphotericin B ใช้เป็นยามาตรฐานกับยีสต์

**การเตรียมเชื้อทดสอบ**

**แบคทีเรีย :** เขี่ยแบคทีเรีย 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร nutrient broth (NB) และเขย่าที่ตู้บ่มเชื้อความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อด้วย น้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 0.5 McFarland standard (เชื้อประมาณ $1.5\times10^{8}$ CFU/ml) และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1:200 ด้วยอาหาร Mueller-Hinton Broth (MHB)

**ยีสต์:** เขี่ยยีสต์ 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร Sabouraud's dextrose broth (SDB) และเขย่าที่ตู้บ่มเชื้อ ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง สำหรับ *Candida albicans* และที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง สำหรับ *Cryptococcus neoformans* จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อด้วย น้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 2 McFarland standard และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1:20 ด้วยอาหาร SDB

**3.5 การทดสอบของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution tests** (CLSI, 2002a, 2002b; Sarker, et al., 2007)

**ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี colorimetric broth microdilution นำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาเจือจางด้วยอาหาร MHB และ SDB เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ ให้ได้ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หยดสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร

B. 192931
581.634
ว A35 ก
2558
ฉ.1



ลงใน 96 well plate จำนวน 3 หลุม และหยดเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับ *S. aureus,* MRSA, *E. coli, P. aeruginosa* และ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans* หยดสี resazurin ที่เจือจาง (1:10) ลงในหลุมทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และยีสต์ (*C. albicans*) ส่วน *C. neoformans* นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 1 วัน อ่านผลการทดสอบโดยสังเกตุสีของ resazurin หากสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อได้จะยังคงเห็นสีของ resazurin เป็นสีน้ำเงิน หากสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้สีของ resazurin จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือไม่มีสี

**การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (The minimum inhibitory concentrations; MICs) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ (The minimum bactericidal concentration; MBCs)**

สารสกัดที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะนำมาทดสอบและหาค่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (MICs) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ (MBCs) ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution tests เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ โดยเตรียมสารสกัดหยาบใน microtiter plates ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.025-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ จะบันทึกเป็นค่า MIC จากนั้น streak เชื้อจากหลุมทดสอบที่ให้ผลการยับยั้งทุกหลุมจาก microtiter plate ลงบนอาหาร nutrient agar (NA) สำหรับแบคทีเรีย และ Sabouraud's dextrose agar (SDA) สำหรับยีสต์ โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้จะถูกบันทึกเป็นค่า MBC

**3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล**

วิเคราะห์การกระจายของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากบัวสายพันธุ์ต่างๆ และจากส่วนต่างๆของบัวสายโดยหาค่า Isolation rate (IR) (Gong and Guo, 2009; JianQiu et al., 2008) ตามตารางที่ 3

**ตารางที่ 3.** การวิเคราะห์การกระจายเชื้อราเอนโดไฟท์

| **การวิเคราะห์** | **ความหมาย** | **การคำนวณ** |
|---|---|---|
| Isolation rate | อัตราการแยกเชื้อที่ได้จากตัวอย่างพืช | IR = จำนวนเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด / จำนวนชิ้นตัวอย่างทั้งหมด |

# บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

## 4.1 การแยก และจัดจำแนกเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสาย

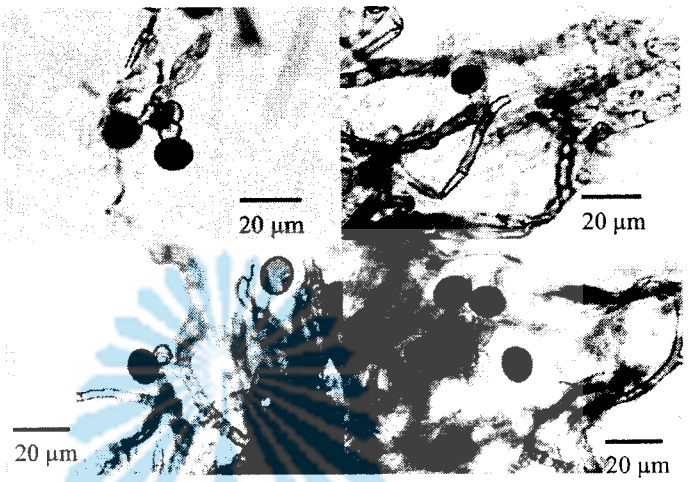
แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากส่วนต่างๆของบัวสาย ได้แก่ กลีบดอก เกสร ก้านดอก ใบ และก้านใบ ได้ทั้งหมด 88 ไอโซเลท จากชิ้นตัวอย่างทั้งหมด 272 ชิ้น คิดเป็น isolation rate เท่ากับ 32.3 เปอร์เซ็นต์ โดย 33 ไอโซเลทจากกลีบดอก 16 ไอโซเลท จากก้านดอก 23 ไอโซเลทจากใบ 1 ไอโซเลทจากเกสร และ 15 ไอโซเลทจากก้านใบ (ตารางที่ 4) ในการศึกษานี้ เก็บตัวอย่างบัวจำนวน 2 ครั้ง โดยผลการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์พบเชื้อราเอนโดไฟท์ (isolation rate) จากก้านดอก (0.5) ก้านใบ (0.5) กลีบดอก (0.4) ใบ (0.3) และเกสร (0.1) ตามลำดับ

เชื้อราเอนโดไฟท์ 7 ไอโซเลท จากเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 88 ไอโซเลท ที่สามารถจัดจำแนกได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา คิดเป็น 7.9% เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจัดจำแนกได้ทั้งหมด 3 จีนัส ได้แก่ *Nigrospora* spp. 5 ไอโซเลท *Curvularia* spp. 1 ไอโซเลท และ *Pestalotiopsis* spp. 1 ไอโซเลท และที่เหลืออีก 33 ไอโซเลท ไม่พบโครงสร้างในการสืบพันธุ์ จึงจัดเป็นกลุ่ม unidentified endophytic fungi (รูปที่ 2-4) โดยเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้ง 88 ไอโซเลท นำมาจัดกลุ่มตามลักษณะทางสันฐานวิทยาที่แตกต่างกันได้ทั้งหมด 40 กลุ่ม โดยเลือกตัวแทนจากแต่ละกลุ่ม มาได้ 40 ไอโซเลท จาก 40 กลุ่ม มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการศึกษาต่อไป

**Genus *Nigrospora***

**Taxonomic classification:** Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Order: Trichosphaeriales

**Fungal isolate:** TSU-WPF023, TSU-WPFS025, TSU-WPFS043, TSU-WWF016 และ TSU-WWF018

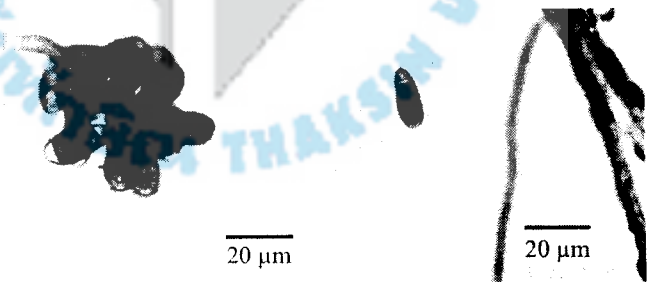



**รูปที่ 2** ลักษณะโคนิเดีย และเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Nigrospora* spp. ที่กำลังขยาย 400 เท่า

**Genus *Curvularia***

**Taxonomic classification:** Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Class Euascomycetes, Order: Pleosporales and Family: Pleosporaceae

**Fungal isolates:** TSU-WPF014

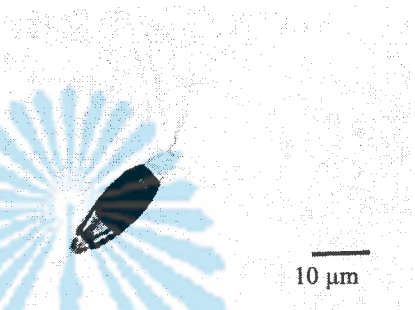



**รูปที่ 3** ลักษณะโคนิเดียของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Curvularia* spp. ที่กำลังขยาย 400 เท่า

**Genus *Pestalotiopsis***

**Taxonomic classification:** Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Class: Sordariomycetes, Order: Xylariales and Family: Amphisphaeriaceae

**Fungal isolates:** TSU-WWLS022




**รูปที่ 4** ลักษณะโคนิเดียของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* spp. ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

**ตารางที่ 4 การกระจายของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆของบัวสาย**

| จำนวนไอโซเลทของเชื้อราเอนโดไฟท์/ จำนวนชิ้นตัวอย่าง | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ดอก | ก้านดอก | ใบ | ก้านใบ | เกสร | Total |
| 33/80 | 16/32 | 23/80 | 15/32 | 1/80 | 88/272 |
| IR | | | | | |
| (0.4) | (0.5) | (0.3) | (0.5) | (0.1) | (0.3) |

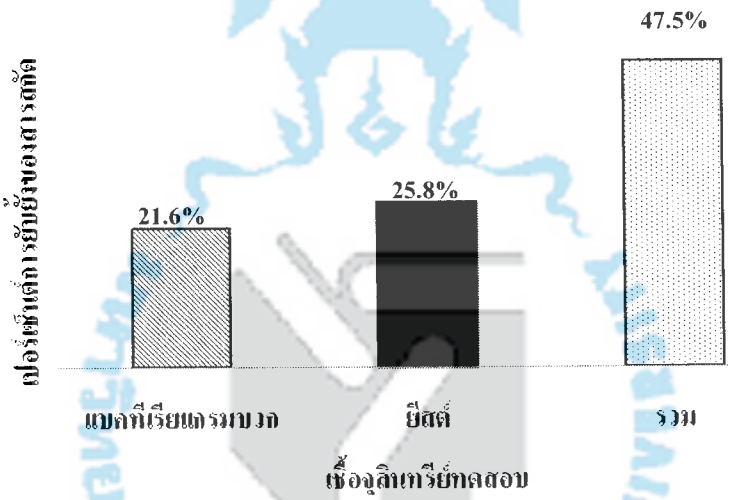
หมายเหตุ: isolation rate (IR) คือ จำนวนของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ / จำนวนชิ้นตัวอย่างทั้งหมด

**4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์**

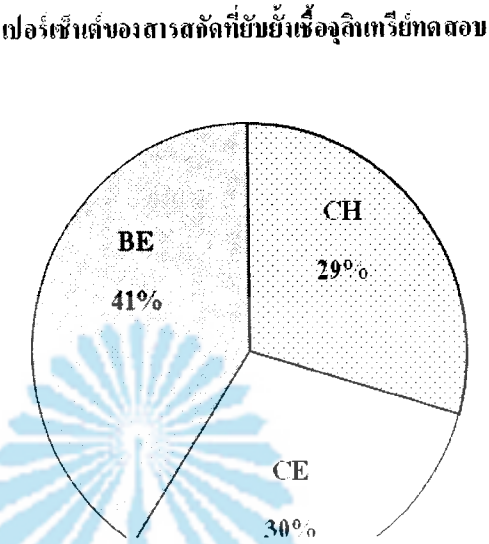
4.2.1 การทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดหยาบ 3 กลุ่มเป็นสารที่ได้จากเชื้อราเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลท ได้แก่ Cell Hexane (CH), Cell Ethyl acetate (CE) และ Broth Ethyl acetate (BE) รวมสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา

เอนโดไฟท์ 40 ไอโซเลท ทั้งหมด 120 ตัวอย่าง โดยสารสารสกัดทั้ง 120 ตัวอย่าง พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 47.5 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 5) จากผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าสารสกัดจากเชื้อรา แอนโดไฟท์ ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (21.6 เปอร์เซ็นต์) และยีสต์ (25.8 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ กลุ่มของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุดคือ สารสกัดหยาบจากส่วนของน้ำเลี้ยงราที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (BE, 41 เปอร์เซ็นต์) ตามด้วยสารสกัดหยาบจากส่วนของเซลล์ราที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (CE, 30 เปอร์เซ็นต์) และเฮกเซน (CH, 29 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (รูปที่ 6)




**รูปที่ 5** แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดต่อกลุ่มของจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก SA, *Staphylococcus aureus* ATCC25923; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; และยีสต์ CA1, *Candida albicans* ATCC90028; CA2, *C. albicans* NCPF 3153; CN12, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 (flucytosine-sensitive); CN13 และ *C. neoformans* ATCC90113 (flucytosine-resistant)

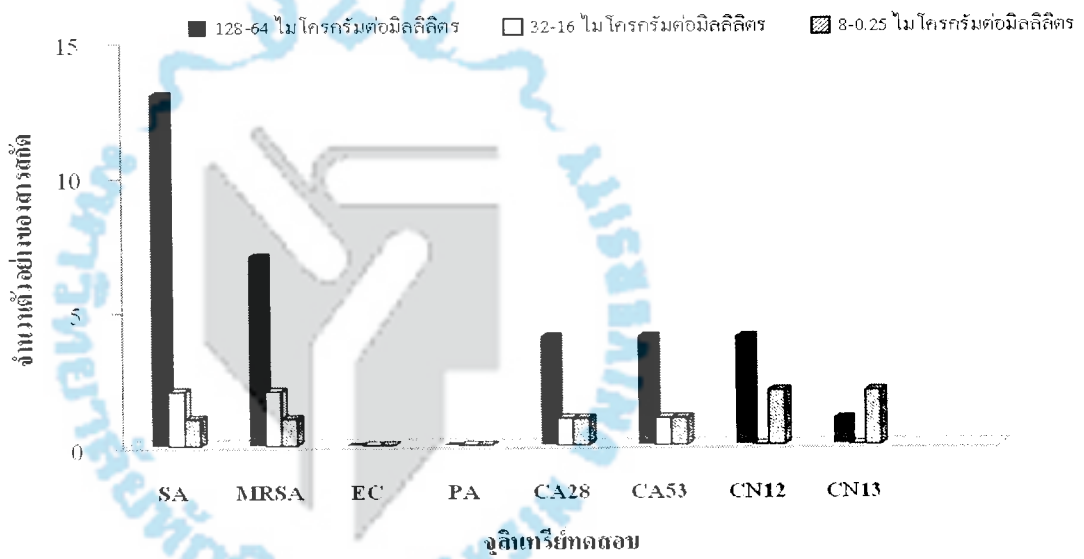



**รูปที่ 6** แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดทั้ง 3 ส่วน คือ BE CH และ CE ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ BE; Broth Ethyl acetate, CH; Cell Hexane และ CE; Cell Ethyl acetate

**4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบที่ช่วงความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

นำสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ (Minimum inhibitory concentrations, MICs) และ หาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ (Minimum bactericidal concentrations, MBCs or Minimum fungicidal concentrations, MFCs) โดยจัดกลุ่มความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 3 ระดับ คือ ฤทธิ์ยับยั้งต่ำ (ความเข้มข้น 128-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปานกลาง (ความเข้มข้น 32-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสูงสุด (ความเข้มข้น 8-0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (รูปที่ 7) สารสกัดส่วนใหญ่ (33 ตัวอย่าง) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่ำในช่วงความเข้มข้น 128-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกถึง 16 ตัวอย่าง และยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบ 10 ตัวอย่าง

ผลการหาค่า MIC และ MBC พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ดีที่สุดคือ สารสกัด CH จากไอโซเลท TSU-WPLS036 (Unidentified endophytic fungi)ให้ค่า MIC/MFC เมื่อทดสอบด้วย *Candida albicans* ATCC90028 เท่ากับ 2/8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่า MIC/MFC กับการทดสอบในกลุ่มยีสต์ *C. albicans* NCPF 3153, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 (flucytosine-sensitive) และ *C. neoformans* ATCC90113 (flucytosine-resistant) เท่ากับ 4/128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่า MIC/MBC ต่อ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ MRSA, methicillin-resistant *S. aureus* เท่ากับ 4/>128 และ 8/>128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5)




**รูปที่ 7** จำนวนตัวอย่างของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบในช่วงความเข้มข้น 128-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น 32-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 8-0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร SA, *Staphylococcus aureus* ATCC25923; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; EC, *Escherichia coli* ATCC25922; PA, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853;

CA1, *Candida albicans* ATCC90028; CA2, *C. albicans* NCPF 3153; CN12, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 (flucytosine-sensitive) และ CN13, *C. neoformans* ATCC90113 (flucytosine-resistant)

**ตารางที่ 5** ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบ ในช่วงความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| **Crude extract (Fungal identification)** | **MIC /MBC or MFC values (µg/mL)** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **SA** | **MRSA** | **EC** | **PA** | **CA28** | **CA53** | **CN12** | **CN13** |
| TSU-WWL026CE | 128/>128 | | | | | | | |
| TSU-WPLS034CE | 64/>128 | 16/>128 | | | | | | |
| TSU-WPLS034CH | 64/>128 | 64/64 | | | | | 128/>128 | 128/>128 |
| TSU-WWF020CE | 64/>128 | 128/>128 | | | 128/>128 | 128/>128 | | |
| TSU-WWF020CH | 64/>128 | 128/>128 | | | 128/>128 | 128/>128 | | |
| TSU-WPF014BE (*Curvularia* sp.) | | | | | 64/>128 | 64/>128 | | |
| TSU-WPF014CE (*Curvularia* sp.) | | | | | | | 128/>128 | 128/>128 |
| TSU-WPF014CH (*Curvularia* sp.) | | | | | | | 128/>128 | 128/>128 |
| TSU-WWF006CH | 128/>128 | | | | | | | |
| TSU-WWF001CE | 128/>128 | | | | | | | |
| TSU-WWF001CH | 128/>128 | | | | | | | |
| TSU-WWFS025CE | 128/>128 | | | | | | | |
| TSU-WWFS025CH | 128/>128 | | | | | | | |
| TSU-WPF048CH | | | | | 128/>128 | 128/>128 | | |
| TSU-WPFS043CH | 64/>128 | 64/>128 | | | | | 128/>128 | |
| TSU-WWF023CH | 128/>128 | 128/>128 | | | | | | |
| TSU-WWF023CE | 32/>128 | 64/>128 | | | | | | |
| TSU-WPLS036BE | 64/>128 | 128/>128 | | | | | | |
| TSU-WPLS036CE | 16/>128 | 16/>128 | | | 16/>128 | 16/64 | 8/128 | 8/128 |
| TSU-WPLS036CH | 4/>128 | 8/>128 | | | 2/8 | 4/128 | 4/128 | 64/>128 |
| **Antibiotics** | | | | | | | | |
| Vancomycin | **0.5/1** | **1/2** | | | | | | |
| Gentamicin | | | **0.25/0.5** | **0.25/0.5** | | | | |
| Amphotericin B | | | | | **0.125/0.5** | **0.125/0.5** | **0.125/1** | **0.25/2** |

SA, *Staphylococcus aureus* ATCC25923; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; EC, *Escherichia coli* ATCC25922; PA, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; CA1, *Candida albicans* ATCC90028; CA2, *C. albicans* NCPF 3153; CN12, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 (flucytosine-sensitive) และCN13,*C. neoformans* ATCC90113 (flucytosine-resistant)

# บทที่ 5 อภิปรายผลสรุป และข้อเสนอแนะ

## 5.1 การแยก และการจัดจำแนกเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสาย

จากการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสาย ที่เก็บบริเวณทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์กระจายอยู่ในส่วนต่างๆของบัวสาย ทั้ง กลีบดอก ก้านดอก ใบ ก้านใบ และเกสร พบและแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้มากที่สุดจากส่วนก้านดอก (0.5) ก้านใบ (0.47) และกลีบดอก (0.4) ตามลำดับ การกระจายของเชื้อราเอนโดไฟท์ในส่วนต่างๆของพืช อาจมาจากหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องด้วยกัน เช่น สถานที่เก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ อายุของพืช ฤดูกาล และสารอาหารที่มีอยู่ในแต่ละส่วนของพืช (Wilson, 1998) ความสัมพันธ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์กับเนื้อเยื่อพืชเจ้าบ้านค่อนข้างมีความซับซ้อน (Owen, et al., 2004) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อราเอนโดไฟท์และพืชต่างอยู่ร่วมกัน ในรูปแบบความสัมพันธ์ที่ต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ซึ่งกันและกัน โดยพืชได้รับการปกป้องต่อแมลง และเชื้อก่อโรคพืช นอกจากนี้ยังพบว่าพืชที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์อยู่สามารถทนต่อความร้อน และความแห้งแล้งได้อีกด้วย อัตราการแยกเชื้อ (isolation rate) ของเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสายพบว่ามีค่า isolation rate เท่ากับ 0.3 ใกล้เคียงกับ isolation rate จากพืชบก แต่หากเปรียบเทียบ isolation rate กับกลุ่มพืชน้ำ เช่น หญ้าทะเล พบว่า isolation rate ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากหญ้าทะเลมีค่าเท่ากับ 0.03 ซึ่งต่ำกว่า isolation rate จากบัวสาย อาจเป็นไปได้ว่าเนื่องจากหลายปัจจัยด้วยกัน ทั้งลักษณะทางภายภาพ และชีวภาพของสถานที่เก็บตัวอย่าง และสารอาหารของพืชที่ต่างกัน (ตารางที่ 6) เชื้อราเอนโดไฟท์ที่จัดจำแนกได้ในการศึกษานี้ สามารถจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัญฐานวิทยาได้ 3 จีนัสด้วยกัน คือ *Nigrospora, Curvularia* และ *Pestalotiopsis* ซึ่งจัดเป็น common genus ที่พบเป็นเชื้อราเอนโดไฟท์ในพืช (Buatong, 2009 และ Supaphon et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ โดยพบว่า

เชื้อราส่วนใหญ่ ไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ โดยเชื้อรากลุ่มนี้ควรจัดจำแนกโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุลต่อไป

นอกจากนี้สารสะลายที่ใช้ทำความสะอาดผิวใบก็มีผลต่ออัตราการแยกเชื้อได้เช่นกัน เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีลักษณะทางสรีระวิทยาแตกต่างกัน ในการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นของชุดสารละลาย และเวลา ดังนี้ 10% ethanol เวลา 3 นาที, 3% sodium hypochlorite เวลา 1 นาที, 10% ethanol เวลา 3 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ อ้างอิงตามงานวิจัยของ Supaphon et al, (2013) ซึ่งศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเล ที่เป็นพืชน้ำ เนื่องจากพบว่าพืชน้ำเหล่านี้ มีลักษณะทางสรีระของใบ และลำต้น ที่อวบน้ำ และบางกว่าพืชบก Phongpaichit, et al (2006) การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชบก ใช้ชุดความเข้มข้นที่สูง และเวลาในการฆ่าเชื้อผิวใบนานกว่าชุดของสารละลายในพืชน้ำ ดังนี้ 95% ethanol (EtOH) เวลา 30 วินาที, 5% sodium hypochlorite เวลา 5 นาที, 95% ethanol เวลา 30 วินาที และล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบและอัตราการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากชุดสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ และเวลาในการฆ่าเชื้อที่ต่างกัน พบว่าหากเลือกใช้สารละลายในการฆ่าเชื้อผิวใบไม่เหมาะกับลักษณะของพืช จะมีผลต่อจำนวนของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ ดังนั้นการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชควรเลือกใช้ชุดของสารละลายที่เหมาะสม

**ตารางที่ 6** ค่า isolation rate ของเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสาย และพืชอื่นๆ

| **พืช** | **Isolation rate (isolates/segment)** | **อ้างอิง** |
|---|---|---|
| *Colophospermum mopane* | 0.49 | Cowan, 1999 |
| *Azadirachta indica* | 0.35 | Mahesh et al., 2005 |
| *Crataeva magna* | 0.086 | Nalini et al., 2005 |
| *Terminalia arjuna* | 0.11 | Tejesvi et al., 2005 |
| *Pinus monticola* | 1.3 | Ganley and Newcombe, 2006 |
| *Garcinia* sp. | 3.0 | Rungjindamai, 2005 |
| *Camptotheca acuminata* | 0.36 | Lin et al., 2007 |
| *Eucommia ulmoides* | 0.87 | |
| *Forsythia suspense* | 0.93 | |
| *F. giraldiana* | 0.7 | |
| *F. ovata* | 0.82 | Sun et al., 2008 |
| *Berberis poiretii* | 0.92 | |
| *Rhus potanini* | 0.83 | |
| *Forsythia suspense* | 0.93 | |
| *F. giraldiana* | 0.7 | |
| *Pinus tabulaeformis* | 0.66 | Guo et al., 2008 |
| *Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco | 0.10 | |
| *Avicennia alba* Bl. | 0.14 | |
| *Bruguiera cylindrical* Bl. | 0.10 | Chaowalit, 2009 |
| *Lumnitzera littorea* Voigt | 1.0 | |
| *Rhizophora apiculata* Bl. | 0.2 | |
| *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. | 0.25 | |
| *Xylocarpus granatum* Koen. | 0.36 | |
| *Enhalus acoroides* | 0.014 | |
| *Thalassia hemprichii* | 0.024 | Supaphon et al., 2013 |
| *Halophila ovalis* | 0.082 | |
| *Cymodocea serrulata* | 0.014 | |

**ตารางที่ 6** ค่า isolation rate ของเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสาย และพืชอื่นๆ (ต่อ)

| **พืช** | **Isolation rate (isolates/segment)** | **อ้างอิง** |
|---|---|---|
| *Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco | 0.2 | |
| *Avicennia alba* BI. | 0.43 | |
| *Avicennia officinalis* L. | 0.17 | |
| *Bruguiera cylindrica* BI | 1.05 | |
| *Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Savigny | 0.1 | |
| *Bruguiera parviflora* Wight & Arn.ex Griff | 0.48 | |
| *Ceriops decandra* Ding Hou | 0.2 | |
| *Ceriops tagal* (Perr.) C.B. Rob. | 0.13 | |
| *Heritiera littoralis* Ait | 0.55 | Buatong, 2009 |
| *Lumnitzera littorea* Voigt | 0.85 | |
| *Rhizophora apiculata* BI. | 0.83 | |
| *Rhizophora mucronata* Poir. | 0.47 | |
| *Scyphiphora hydrophyllacea* | 0.37 | |
| *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. | 0.43 | |
| *Sonneratia griffithii* Kurz | 0.2 | |
| *Sonneratia ovate* Back | 0.48 | |
| *Xylocarpus moluccensis* Roem. | 0.54 | |
| *Scyphiphora hydrophyllacea* | 0.37 | |
| *Hevea brasiliensis* | 0.78 | Gazis and Chaverri, 2010 |
| *Nymphaea* spp. | 0.3 | การศึกษานี้ |

**5.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์**

เนื่องจากปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรคมีเพิ่มมากขึ้น และยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษายังมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เช่น เป็นอันตรายต่อไต เป็นผื่น และกระเพาะอาหารเป็นแผล เป็นต้น (Won, et al., 2012 และ Owen and Hundley, 2004) ดังนั้นนักวิจัยจึงสนใจศึกษาเกี่ยวกับ

ความสามารถของสิ่งมีชีวิต เช่นจุลินทรีย์ หรือ พืช และสมุนไพรชนิดต่างๆ เพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค เพื่อลดปัญหาการดื้อยา และผลข้างเคียงจากยา

มีรายงานการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากกลุ่มพืชน้ำ และพบว่าสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชน้ำมีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และพบว่าการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชน้ำยังไม่แพร่หลายมากนัก เมื่อเทียบกับพืชบก (Wilson, 1998; Alva, et al., 2002 and Sakayaroj, et al., 2010 และ Supaphon, et al., 2013) การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชน้ำ คือ บัวสาย เนื่องจากเป็นทรัพยากรในท้องถิ่น และยังไม่มีรายงานการศึกษาศักยภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์จากบัวสาย ในทะเลน้อย จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี โดยสารสกัดจากส่วนของเส้นใยที่สกัดด้วยเฮกเซน (CH) ของไอโซเลท TSU-WPLS036 (Unidentified endophytic fungi) มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่ดีที่สุด โดยให้ค่า MIC/MFC เมื่อทดสอบด้วย *Candida albicans* ATCC90028 เท่ากับ 2/8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Supaphon, et al. (2013) โดยพบว่าสารสกัด CH จากเชื้อราเอนโดไฟท์ PSU-ES73 (*Fusarium* sp.) แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *C. neoformans* ได้ดีที่สุด ให้ค่า MIC/MFC เท่ากับ 2/4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจากผลการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Scanning Electron Microscope, SEM) พบว่าสารสกัดไปทำลายผนังเซลล์ของยีสต์ Arunpanichlert et al. (2011) ทำการแยกสารสกัดหยาบส่วน CH จากเชื้อ PSU-ES73 ให้เป็นสารบริสุทธิ์ และพบว่าสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง *C. neoformans* (MIC 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) คือสารบริสุทธิ์ zearalenone แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดในการศึกษานี้ยังเป็นสารสกัดหยาบ จึงอาจต้องนำไปแยกและศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ต่อไป

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากบัวสาย ทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง มีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี และยังเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทุติยภูมิที่น่าสนใจ

**ข้อเสนอแนะ**

1. ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากบัวสาย โดยเพิ่มการศึกษาการจัดจำแนกโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล
2. ศึกษาศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับสารบริสุทธิ์
3. ศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่ได้

# บรรณานุกรม

Akinjogunla, O. J., Adegoke, A. A., Udokang, I. P. and Adebayo-Taya, B. C. 2009. Antimicrobial potential of *Nymphaea lotus* (Nymphaeaceae) against wound pathogens. **J. Med. Plants**. Res. (3),138-141.

Akinjogunla, O. J., Yah, C. S., Eghafona, N. O. and Ogbemudia, F. O. 2010. Antibacterial activity of leave extracts of *Nymphaea lotus* (Nymphaeaceae) on *Methicillin* resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) isolated from clinical samples. **Ann. Biol. Res.** (1), 174-184.

Alva, P., McKenzie, E.H.C., Pointing, S.B., Pena-Muralla, R. and Hyde, K.D. 2002. Do sea grasses harbour endophytes, In: Fungi in marine environments, edited by K.D. Hyde, **Fungal Diversity Research Series**. (7), 167-178.

Arjun, P., Priya, S. M., Sivan, P.S.S., Krishnamoorthy, M. and Balasubramanian, K. 2012. Antioxidant and antimicrobial activity of *Nelumbo nucifera* Gaertn. leaf extracts. **J. Acad. Indus. Res.** (1), 15-18.

Arunpanichlert, J., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S., Supaphon, O. and Sakayaroj, J. 2011. A β-resorcylic macrolide from the seagrass-derived fungus *Fusarium* sp. PSU-ES73. **Archives of Pharmacal Research**. (34), 1633-1637

Bacon, C.W. and White, J.F. 2000. Microbial Endophytes. United States of America. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 63-65.

Buatong, J., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J., 2011. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** (27), 3005-3008.

Bush, L. P., Wilkinson, H.H. and Schardl, C. L. 1997. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. **Plant Physiol.** (114), 1-7.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002a. Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002b. Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. (12), 564-582.

Daboor, S. M. and Haroon, A. M. 2012 In vitro: Antimicrobial potential and phytochemical screening of some eyptian aquatic plants. **J. Egyp Aqua Res**. (38), 223-239.

Dash, B. K., Sen, M. K., Alam, K., Hossain, K., Islam, R., Banu, N. A., Rahman, S. and Jamal, A. H. M. 2013. Antibacterial activity of *Nymphaea nouchali* (Burm. f) flower. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. (12), 1-4.

Ganley, R.J. and Newcombe, G. 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of Pinus monticola. **Mycological Research**. (110), 318-327.

Gao, X., Zhou, H., Xu, D., Yu, C., Chen, Y. and Qu, L. 2005. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiol. Lett**. (249), 255-266.

Gazis, R. and Chaverri, P. 2010. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. (3), 240-254.

Guo, L.D., Huang, G.R. and Wang, Y. 2008. Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. **Journal of Integrative Plant Biology.** (50), 997- 1003.

Gong, L. J. and Guo, S. X. 2009. The endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. **Afr J Biotechnol**. (8), 731-736.

JianQiu, S., LiangDong, G., Wei, Z., WenXiang, P. and Defu, C. 2008. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. **Sci. China C: Life Sci**. (51), 751-759.

Kanabkaew, T. and Puetpaiboon, U. 2004. Aquatic plants for domestic wastewater treatment:Lotus (*Nelumbo nucifera*) and Hydrilla (*Hydrilla verticillata*) systems. **Songklanakarin J. Sci. Technol**. (26), 749-756.

Kumar, C.S., Sarada, D.V L., Gideon, T.P. and Rengasamy, R. 2008. Antibacterial activity of three South Indian seagrasses, *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Zostera capensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. (24), 1989-1992.

Lin, X., Lu, C., Huang, Y., Zheng, Z., Su, W. and Shen, Y. 2007. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant,Camptotheca acuminata: isolation, identification and bioactivity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. (23), 1037-1040.

Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., Zhou, J. 2008. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. **Appl Microbiol Biotechnol**. (78), 241-247.

Mahesh, B., Tejesvi, M.V., Nalini, M.S. and Prakash, H.S. 2005. Endophytic mycoflora of inner bark of Azadirachta indicaA. Juss. **Current Science**. (88), 218-219.

Nalini, M.S., Mahesh, B., Tejesvi, M.V., Prakash, H.S., Subbaiah, V., Kini, K.R. and Shetty, H. 2005. Fungal endophytes from the three-leaved carper, Crataeva magna(Lour.) DC. (Capparidaceae). **Mycopathologia.** (159), 245-249.

Owen,N. L. and Hundley, N. 2004. Endophytes-the chemical synthesizers inside plants. Science Progress. 87: 79-99.

Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J. 2006. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** (48), 367-372.

Rowly, D.C., Kelly, S., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. and Fencial, W. 2003. Halovirs A-E, new anti-viral agents from a marine-derived fungus of the genus *Scytalidium*. **Bioorg. Med. Chem.** (11), 4263-4274.

Rungjindamai, N. 2005. Endophytic fungi from *Garcinia* spp. Which produce antimicrobial substances. M.Sc. Thesis, Prince of Songkla University, Thailand.

Sakayaroj, J., Preedanon, S., Supaphon, O., Jones, E.B.G. and Phongpaichit, S., 2010. Phylogenetic diversity of endophyte assemblages associated with the tropical seagrass *Enhalus acoroides* in Thailand. **Fungal Diversity.** (42), 27–45.

Selvakumari, E., Shantha, S., Prabhu, P. T. and Sreenathkumar, C. 2012. Antiproliferative activity of ethanolic flower extract from *Nymphaea pubescens* willd against human cervical and breast carcinoma in vitro. **Int J pharm**. (3), 124-125.

Sarker, S.D., Nahar, L., and Kumarasamy, Y. 2007. Microtiterplate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**. (42), 321-324.

Sikder, M. A. A., Jisha, H. R., Kuddud, M. R., Rumi, F., Kaisar, M. A. and Rashid, M. A. 2012. Evaluation of Bioactivities of *Nymphaea nouchali* (Burm. f) -the National Flower of Bangladesh. **Pharm J.** (15), 1-5.

Sittiwet, C. 2009.Antimicrobial activity of Essential Oil from *Nelumbo nucifera* Gaertn. Pollen. **Int. J. Pharm**. (5), 98-100.

Stierle, A., Strobel, G. and Stierle, D., 1993.Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science.** (260), 214-216.

Sun, J.Q., Guo, L.D., Zang, W., Ping, W.X. and Chi, D.F. 2008. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. **Science China Series C- Life Science.** (51), 751-759.

Supaphon, P., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J. 2014. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from the seagrass *Enhalus acoroides*. **Indian J. Geo-Marine Sci**. (in press).

Supaphon, P., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J. 2013. Antimicrobial potential of endophytic fungi derived from three seagrasses (*Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii*) from Thailand. PLoS ONE. 8(8): e72520. doi: 10.1371/journal.pone.0072520

Tan, R. X. and Zou, W. X. 2001. Endophytes a rich source of functional metabolites. **Nat. Prod. Rep.** (18), 448-49.

Tejesvi, M., Nahesh, B., Nalini, M., Prakash, H., Kini, K., Subbiah, V. and Shetty, H. 2005. Endophytic fungal asemblanges from inner barkand twig of Terminalia arjunaW. and A. (Combretaceae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. (21), 1535-1540.

Venkatesh, B. and Dorai, A. 2011. Antibacterial and Antioxidant potential of White and Pink *Nelumbo Nucifera* Gaertn Flowers. International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. Singapore.5:213-217.

Wilson, W.L. 1998. Isolation of endophytes from seagrasses from Bermuda. M.Sc. Thesis, University of New Brunswick, Canada.

Won, K.J., Lin, H.Y., Jung, S., Cho, S.M., Shin, H.C., Bae, Y.M., Lee, S.H., Kim, H.J., Joen, B.H., and Kim, B. Antifungal miconazole induces cardiotoxicity via inhibition of APE/REF-1-related pathway in rat neonatal cardiomyocytes. **Toxicological Sciences.** (126), 289-305.

Xu, L., Zhou, L., Zhao, J., Li, J., Li, X. and Wang, J. 2008. Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. **Lett. Appl. Microbiol**. (46), 68-72.

Zhang, Y., Mu, J., Feng, Y., Kang, Y., Zhang, J., Gu, P.J., Wang, Y., Ma, L.F. and Zhu, Y.H. 2009. Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms: isolation, bioassay and taxonomy. **Mar. Drugs**. (7), 97-112.

Zuccaro, A., Schoch, C.L., Spatafora, J.w., Kohlmeyer, J., Draeger, S. and Mitchell, J.I. 2008. Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. **Appl. Environ. Microbiol**. (74), 931-941.

ปริมลาภ ชูเกียรติมั่น และ คมกฤช ชูเกียรติมั่น (2548). **บัวประดับในประเทศไทย**. เนชั่นบุ๊ค กรุงเทพมหานคร หน้า1-192.

จิตราภรณ์ ธวัชพันธุ์ (2548). **หลักอนุกรมวิธานพืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร หน้า 1-266.

วีณา เชิดบุญชาติ (2546). **พลังดอกไม้**. สำนักพิมพ์บ้านและสวน กรุงเทพมหานคร หน้า 1-288