



รายงานวิจัยปีที่ 1

ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากรานาเกลือ

(Antimicrobial Activity of Extracts from Fungi in Solar Salterns)

อภิรดี ปิรันชนภาคย์ และสุดารัตน์ สวนจิตร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี 20131

Apiradee Pilantanapak and Sudarat Suanjit

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

มีนาคม 2557

รายงานวิจัยปีที่ 1

ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากรานาเกลือ

(Antimicrobial Activity of Extracts from Fungi in Solar Salterns)

อภิรดี ปิณฑนภักย์ และสุदारัตน์ สวนจิตร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี 20131

Apiradee Pilantanapak and Sudarat Suanjit

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

มีนาคม 2557

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากรานาเกลื้อ” ปีที่ 1 สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานประมาณแผ่นดิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้จัดสรรเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2556 สนับสนุนงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณฝ่ายวิจัยมหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้สนับสนุนให้งานวิจัยนี้เกิดขึ้นได้ ขอขอบคุณคุณศโรชา ประสงค์ผลชัย คุณมนกานต์ เพ็ญโคตรแก้ว และคุณศรัณยา รักเสรี นักศึกษาช่วยงานวิจัย คุณสุรียพร เอี่ยมศรี ผู้ช่วยวิจัย คุณเนติรัตน์ ปูนประเสริฐ เจ้าหน้าที่โครงการบัณฑิตศึกษา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานวิจัย คณะผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยนี้คงมีประโยชน์ต่อผู้สนใจตามสมควร

อภิรดี ปิรันธนภักย์  
สุภารัตน์ สวนจิตร

มีนาคม 2557

## บทคัดย่อ

การคัดกรองรานาเกลือที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จำนวน 100 สายพันธุ์ พบว่าอาหารเหลวที่เลี้ยงรา 19 สายพันธุ์ (ร้อยละ 19) แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Bacillus cereus* TISTR 008, *B. subtilis* TISTR 121, *Candida albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028 อย่างน้อยชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยวิธี agar well diffusion เมื่อสูมนำสารสกัดเอธิลอะซิเตทของอาหารที่เลี้ยงราและให้ผลยับยั้งจุลินทรีย์ 17 สาร และที่ไม่ให้ผลยับยั้งจุลินทรีย์ 17 สาร มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าความสามารถในการยับยั้งแตกต่างกัน ไม่สอดคล้องกับผลทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ผลยับยั้งขึ้นกับชนิดรานาเกลือและจุลินทรีย์ทดสอบ จากสารสกัดที่ทดสอบ 34 สาร สารสกัดที่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด มี 24 สาร (ร้อยละ 70.6) สารสกัดจากอาหารเลี้ยงรา SS 031 SS 066 SS 069 SS 070 SS 076 SS 078 SS 079 SS 091 SS 097 และ SS 099 แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิดได้ดีและส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สารสกัดจากอาหารเลี้ยงราสายพันธุ์ SS 069 และ SS 076 แสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 32-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การจัดจำแนกเบื้องต้นพบว่า รา SS 069 คือ *Aspergillus* sp. ส่วน SS 076 คือ *A. fumigatus* สารสกัดจากอาหารเลี้ยงราสายพันธุ์ SS 070 มีค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ต่ำสุด คือค่า MIC ต่อ *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การจัดจำแนกเบื้องต้นพบว่า รา SS 070 คือ *Bipolaris* sp./*Cochliobolus* sp.

**คำสำคัญ:** รา นาเกลือ สารสกัด ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

## ABSTRACT

Screening of 100 fungi from solar salterns for antimicrobial activity revealed that broth cultures of nineteen fungi (19%) inhibited at least one tested microorganism; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Bacillus cereus* TISTR 008, *B. subtilis* TISTR 121, *Candida albicans* ATCC 10231 and *C. albicans* ATCC 90028, by agar well diffusion method. When acetate-extracts from fermentation broths of 17 and 17 fungi which were random selected from fungi with positive and negative results by agar well test, respectively, were tested by agar disc methods. The variation of results was obtained depended on pair of fungal strains and tested bacteria. Twenty four (70.6%) out of 34 broth extracts could inhibit at least one tested microorganism. Broth extracts from SS 031, SS 066, SS 069, SS 070, SS 076, SS 078, SS 079, SS 091, SS 097 and SS 099 inhibited several tested microorganisms, mostly Gram positive bacteria. Broth extracts from SS 069 and SS 076 inhibited both Gram positive and Gram negative bacteria. The minimal inhibitory concentration (MIC) were between 32-128 microgram per milliliter. SS069 and SS 076 were preliminary identified as *Aspergillus* sp. and *A. fumigatus*, respectively. Broth extract from SS 070 showed minimal MIC against *B. cereus* TISTR 008 and *S. aureus* ATCC 25923 equal to 8 and 16 microgram per milliliter, respectively. The preliminary identification indicated SS 070 was *Bipolaris* sp. / *Cochliobolus* sp.

**Keywords:** Fungi, Solar salterns, Extracts, Antimicrobial activity

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง .....	จ
สารบัญภาพ .....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	
นาเกลือและระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง .....	3
ลักษณะนาเกลือและการทำนาเกลือในประเทศไทย.....	4
การทบทวนวรรณกรรม .....	5
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการทดลอง.....	7
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	18
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล .....	41
บรรณานุกรม .....	45

## สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 18S rRNA .....	16
ตารางที่ 2	คู่ไพรเมอร์ยูนิเวอร์ซัล NS1 และ NS8.....	17
ตารางที่ 3	ขั้นตอนของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ .....	17
ตารางที่ 4	ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของอาหารเลี้ยงเชื้อจากรานาเกลื้อ.....	19
ตารางที่ 5	ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลื้อ .....	22
ตารางที่ 6	ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลื้อ SS 069.....	26
ตารางที่ 7	MIC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลื้อต่อแบคทีเรียทดสอบ.....	28
ตารางที่ 8	ผลการจัดจำแนกรากที่ใช้ในการศึกษา 71 สายพันธุ์.....	29
ตารางที่ 9	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 066 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn .....	31
ตารางที่ 10	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 069 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn .....	33
ตารางที่ 11	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 070 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn.....	35
ตารางที่ 12	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 099 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn .....	36
ตารางที่ 13	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 076 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn .....	38
ตารางที่ 14	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 078 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn .....	40

## สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะนาเกลือนอกฤดูกาลทำนาเกลือ .....	7
ภาพที่ 2	ลักษณะนาเกลือในฤดูกาลทำนาเกลือ .....	8
ภาพที่ 3	ลักษณะหลากหลายของดินและน้ำในนาเกลือในแปลงและฤดูกาลต่างๆกัน .....	9
ภาพที่ 4	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>B.cereus</i> TISTR 121 ของอาหารเลี้ยงเชื้อรานาเกลือ ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion .....	18
ภาพที่ 5	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 และ <i>B. cereus</i> TISTR 121 ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ ทดสอบโดยวิธี disc diffusion .....	25
ภาพที่ 6	ฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ <i>C. albicans</i> ATCC 10231 ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือทดสอบโดยวิธี disc diffusion .....	25
ภาพที่ 7	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 และ <i>Bacillus cereus</i> TISTR 121 ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ SS 069 .....	27
ภาพที่ 8	ลักษณะของรา <i>Acremonium</i> sp. SS 066 บนอาหาร PDA/sw 30 ppt.....	30
ภาพที่ 9	ลักษณะของรา <i>Aspergillus</i> sp. SS 069 บนอาหาร PDA/sw 30 ppt.....	32
ภาพที่ 10	ลักษณะโคโคโคนีของรา <i>Cochliobolus</i> sp./ <i>Bipolaris</i> sp. SS 099 บนอาหาร PDA/sw 30 ppt	34
ภาพที่ 11	ลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์ของรา SS 076 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope กำลังขยาย 40x .....	37
ภาพที่ 12	ลักษณะโคโคโคนีของรา <i>Cochliobolus</i> sp./ <i>Bipolaris</i> sp. SS 078 บนอาหาร PDA/sw 30 ppt.....	39





# บทที่ 1

## บทนำ

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์มีทั้ง แบคทีเรีย ยีสต์ รา โปรโตซัว และริคเกตเซีย เป็นต้น แบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อยมีหลายวงศ์ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการก่อโรคทางเดินอาหารในคน ตัวอย่างที่พบได้แก่ *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* และ *Yersinia* *Escherichia coli* บางสายพันธุ์ ยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดเชื้อในกระแสเลือด แบคทีเรียวงศ์ Streptococcaceae ในสกุล *Staphylococcus* ส่วนใหญ่เป็นเชื้อประจำถิ่นและเป็นเชื้อฉวยโอกาส ในสภาวะที่โฮสต์อ่อนแอ *Staphylococcus* 12 ชนิด สามารถก่อโรคได้ในคน (Joklik *et al.*, 1988) แบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ที่มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุดคือ *S. aureus* เพราะทำให้เกิดการติดเชื้อมากกับทุกบริเวณของร่างกาย เช่น การติดเชื้อที่ผิวหนัง ก่อให้เกิดหนอง การติดเชื้อในกระแสเลือด (Bacteremia) และอาจก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น ลิ้นหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบ (สุบัติต นิมรัตน์, 2551) นอกจากนี้แบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่ ยังมีปัญหาคือต่อยาปฏิชีวนะ ที่เกิดจากการที่แบคทีเรียคือต่อยาถ่ายทอดพลาสมิดซึ่งมีจีนที่ทำให้ดื้อยาไปสู่เชื้ออื่นๆ ทำให้อัตราการดื้อยาในแบคทีเรียต่างๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (อภิรดี ปิลันธนาภักย์, 2554) และนอกจากแบคทีเรียยังมียีสต์และราก่อโรคในมนุษย์ แม้ว่าจะมีเพียงไม่กี่ชนิดก็ตาม ยีสต์และรากล่อโรคในมนุษย์ที่พบบ่อยที่สุด คือสกุล *Candida*, *Cryptococcus* และ *Aspergillus* (Repentigny, 2010) ปัจจุบันยีสต์ *C. albicans* เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในมนุษย์ โดยเฉพาะผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ (Odds *et al.*, 2006) โดยทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร ช่องปาก ช่องคลอด และผิวหนัง (Mavor *et al.*, 2005)

ปัจจุบันปัญหาจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อดื้อยา กลายเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข เนื่องจากไม่มียาปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมเชื้อดื้อยาได้ทั้งหมด (Walsh and Amyes, 2004) เชื้อดื้อยาสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาส ในผู้ป่วยที่บกพร่องทางภูมิคุ้มกัน และยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล จึงมีความต้องการสารต้านจุลินทรีย์และสารออกฤทธิ์ชีวภาพมาผลิตยาชนิดใหม่เพิ่มขึ้น ทำให้มีการศึกษาแหล่งที่มากันอย่างกว้างขวาง ในทางจุลชีววิทยาการศึกษาจะเริ่มจากการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างสารยับยั้งจากธรรมชาติ ตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้จุลินทรีย์สาเหตุของ

โรคที่ต้องการควบคุมมาทดสอบ เมื่อได้สายพันธุ์ที่ให้ผลยับยั้งจึงหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการผลิตสารต่อไป (นุกุล อินทรสังขา, 2551)

ราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการปรับตัวได้ดี จึงพบการแพร่กระจายในระบบนิเวศที่หลากหลาย แม้จะเป็นระบบนิเวศที่ไม่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ทั่วไป เช่น ราที่เจริญในระบบนิเวศที่มีค่า water activity ( $a_w$ ) ต่ำ หรือรากลุ่มที่สามารถเจริญในระบบนิเวศที่มีความเค็มหรือความเข้มข้นของแร่ธาตุสูง ราที่เจริญได้ดีในที่ที่มีความเค็มสูง จัดว่าเป็นราชอบเค็ม (Halophilic fungi, Halophile) ขณะที่ราที่เจริญได้หรือทนอยู่ได้ในที่ที่มีความเค็มสูง จัดว่าเป็นราทนเค็ม (Halotolerant fungi) (Tuomela *et al.*, 2000) มีรายงานว่าราสายหลายกลุ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งราที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมพิเศษหรือสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งต้องมีกลไกพิเศษในการปรับตัวเพื่อให้อาศัยอยู่ได้ สามารถผลิตสารแล้วส่งออกนอกเซลล์ (Extrolites) (Frisvad and Samson, 2004) ซึ่งอาจเป็นสารประกอบทุติยภูมิ เอนไซม์ หรือกรด (Margesin and Schinner, 2001; Behal, 2003) สารประกอบทุติยภูมิที่ราสร้างขึ้นหลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายและมีประสิทธิภาพสูง (Hyde, 2001; Kurtboke and Swings, 2004) เช่นมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ต้านไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Phongpichit *et al.*, 2006, 2007) ดังนั้นราสายที่เป็น Halotolerant ที่พบในสภาพแวดล้อมทางทะเล (Bernan *et al.*, 1997; Ireland *et al.*, 1988, 1993; Kobayashi and Ishibashi, 1993) ซึ่งเป็นสภาวะที่มีปัจจัยทางกายภาพแตกต่างจากสภาพแวดล้อมทั่วไป จึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจสำหรับการค้นหาราที่ผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่ โดยมีรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับความหลากหลายของราที่อาศัยในนาเกลือกลุ่ม Halotolerant และ Halophilic ในหลายประเทศตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 (Gunde-Cimerman *et al.*, 2005) ตั้งแต่นั้นมา มีราสายพันธุ์ใหม่จำนวนมากถูกพบในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงทั่วโลก แต่ในประเทศไทยซึ่งมีพื้นที่ติดกับทะเลและมีแหล่งผลิตเกลือทะเลที่สำคัญหลายจังหวัด เช่น สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สมุทรปราการ ชลบุรี และเพชรบุรี (Chatchawan *et al.*, 2011) ยังไม่มีผู้ใดศึกษาชนิดและคุณสมบัติการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองราสายที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จากนาเกลือในในประเทศไทย รวมถึงศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของราที่ผลิตสาร และคุณสมบัติเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ที่ราผลิตขึ้น

## บทที่ 2

### บททวนเอกสารและวรรณกรรม

#### 1. นาเกลือและระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง

นาเกลือ (solar salterns, Marine salterns) เป็นระบบนิเวศทางทะเลประเภทหนึ่งที่มีมนุษย์สร้าง (Man-made ecosystem) ระบบนิเวศนาเกลือ มีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างจากระบบนิเวศอื่นๆ โดยมีปัจจัยสิ่งแวดล้อมหลายประการที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์รวมทั้งราที่อาศัยอยู่ในบริเวณนี้ ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลในนาเกลือ ได้แก่ ความเค็ม pH อุณหภูมิ ความเข้มแสง และปริมาณสารอาหาร (Nayak *et al.*, 2012) ความเค็มมีผลต่อราในด้านแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) (Greetchen, 2006) ความเค็มในนาเกลืออยู่ในช่วง 3-35% (Buchalo *et al.*, 1998) ซึ่งสูงมากเมื่อเทียบกับความเค็มของน้ำทะเลปกติ จึงจัดเป็น extreme environment เป็นระบบนิเวศที่มีความเค็มสูงแบบ hypersaline environment และจัดเป็นระบบนิเวศความเค็มสูง แบบ thalassohaline ซึ่งเป็นระบบนิเวศที่มีมีอิออนของธาตุต่างๆสูง นาเกลือมีส่วนประกอบของแร่ธาตุหลักในดินและน้ำ คือ โซเดียมและคลอไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการตกตะกอนของสารประกอบ calcite, gypsum, halite, sylvite และ carnallite (Brock, 1979) ส่วนปัจจัยทางชีวภาพที่มีอิทธิพลโดยตรงคือพืชและอินทรีย์สาร ที่เป็นทั้งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารของรา ในต่างประเทศมีรายงานนาเกลือและระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง ในประเทศเปอร์โตริโก ประเทศฝรั่งเศส ประเทศสโลวีเนีย ประเทศสเปน ประเทศปอร์ตุเกส และประเทศอินเดีย เป็นต้น (Cantrell *et al.*, 2006; Nayak *et al.*, 2012) นอกจากนาเกลือแล้ว ยังมีระบบนิเวศที่มีความเค็มสูงอื่น ๆ (hypersaline environment) ที่มีรากลุ่ม halophile และ halotolerant อาศัยอยู่ เช่น saline soil, hyper saline lagoon, salt lake และ Dead Sea เป็นต้น (Buchlo *et al.*, 1998; DasSarma and Arora, 2001, Cantrell *et al.*, 2011)

ประเทศไทยมีพื้นที่ทำนาเกลือทั้งหมดประมาณ 81,485 ไร่ โดยจังหวัดเพชรบุรีมีพื้นที่มากที่สุด ร้อยละ 47.0 รองลงมาได้แก่จังหวัดสมุทรสาคร ร้อยละ 43.1 จังหวัดสมุทรสงคราม ร้อยละ 7.7 นาเกลือในภาคตะวันออก มีที่จังหวัดชลบุรีร้อยละ 1.0 จังหวัดจันทบุรี ร้อยละ 0.6 และจังหวัดฉะเชิงเทรา ร้อยละ 0.2 (<http://www.mkh.in.th/index.php/2010-03-22-18-05-14/2010-03-26-05-53-43>), ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล,

2010) สถานที่ที่เหมาะสมแก่การทำนาเกลือคือพื้นที่ราบริมทะเลที่น้ำทะเลสามารถขึ้นได้ตลอดปี เพราะดินเป็นดินเหนียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดริมทะเล พื้นที่ที่มีการผลิตเกลือมาก ประมาณร้อยละ 90 ของผลผลิตทั้งประเทศอยู่ที่ 3 จังหวัดคือ เพชรบุรี สมุทรสาคร และสมุทรสงคราม ส่วนพื้นที่ที่มีการผลิตเกลือเพียงเล็กน้อย ประมาณร้อยละ 10 ของผลผลิตเกลือทั้งประเทศ คือ จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ได้แก่ ชลบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทราและปัตตานี

## 2. ลักษณะนาเกลือและการทำนาเกลือในประเทศไทย

การผลิตเกลือของประเทศไทย แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ เกลือทะเลหรือเกลือสมุทรและเกลือสินเธาว์หรือเกลือหิน เกลือทะเลหรือเกลือสมุทร (Sea salt) คือเกลือที่ผลิตขึ้น โดยนำน้ำทะเลขึ้นมาตากแดดให้น้ำระเหยไปจนเหลือแต่ผลึกเกลือ ส่วนเกลือสินเธาว์ (Rock salt) คือเกลือที่ได้จากการนำน้ำผิวดินที่มีเกลืออยู่หรือเกลือบนผิวดินมาละลายน้ำแล้วต้ม หรือได้จากเกลือหินที่อยู่ใต้ดิน โดยใช้วิธีฉีดน้ำลงไปละลายเกลือในบ่อเกลือ หรือใช้วิธีสูบน้ำเกลือใต้ดินขึ้นมาตากแดด หรือนำไปต้มเพื่อให้ได้ผลึกเกลือ (ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล, 2010) แต่ในการศึกษานี้จะกล่าวถึงเฉพาะการผลิตเกลือสมุทร และเรียกสั้นๆว่า การทำนาเกลือ การทำนาเกลือในภาคกลางจะเริ่มทำประมาณเดือนพฤศจิกายนหรือฤดูแล้งถึงเดือนพฤษภาคมของปีถัดไป ใช้ระยะเวลาประมาณ 6-7 เดือนขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ เนื่องจากการทำนาเกลือไม่สามารถทำได้ในช่วงฤดูฝน และจะเริ่มเก็บผลผลิตเกลือได้ประมาณกลางเดือนมกราคมเป็นต้นไป สำหรับการทำนาเกลือในภาคใต้ที่จังหวัดปัตตานี จะมีระยะเวลานานกว่าภาคกลาง โดยสามารถทำนาเกลือได้ปีละ 2 ครั้ง ครั้งแรกเริ่มประมาณเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมิถุนายน ช่วงเวลาประมาณ 5 เดือน และครั้งที่สองเริ่มประมาณเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน เป็นช่วงเวลาประมาณ 2 เดือน รวมมีช่วงเวลากการทำนาเกลือประมาณ 8 เดือน ส่วนในช่วงเดือนตุลาคม ถึงเดือนมกราคม จะมีฝนตกชุกจึงไม่สามารถทำนาเกลือได้ (คลังปัญญาไทย, ม.ป.ป.)

### 2.1 ส่วนประกอบของนาเกลือ (คลังปัญญาไทย, ม.ป.ป. และปราชญ์ชาวบ้าน)

นาเกลือประกอบด้วยส่วนต่างๆ แบ่งออกเป็นแปลงคล้ายคันนา แต่ละแปลงมีความเค็มแตกต่างกัน และมีชื่อเรียกแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ตัวอย่างการเรียกเช่น วังน้ำเป็นแปลงสำหรับเก็บน้ำทะเลที่นำเข้ามาสำหรับเก็บไว้ใช้ตลอดฤดูกาลทำนาเกลือ นาดากหรือนาประเทียบเป็นแปลงสำหรับให้น้ำตากแดด เพื่อให้ น้ำระเหยออกไปเป็นการเพิ่มความเค็ม นาเช็รองคือนาสำหรับตากน้ำที่มีความเข้มข้น

พอสมควร โดยจะตากน้ำให้ได้ความเค็มประมาณ 150 ส่วนในพันส่วน (ppt) นาเชื้อเป็นนาสำหรับเพาะเชื้อเกลือ ซึ่งต้องตากน้ำให้น้ำมีความเค็มสูงถึง 240 ppt นาปลงเป็นนาขั้นตอนสุดท้ายสำหรับตากน้ำเค็ม เพื่อให้เกลือตกผลึกเป็นเม็ดเกลือ

## 2.2. วิธีทำนาเกลือ (คลังปัญญาไทย, ม.ป.ป. และปราชญ์ชาวบ้าน)

การทำนาเกลือจะเริ่มเมื่อฝนท้ายฤดูจะผ่านไปหรือช่วงประมาณเดือนตุลาคม ขั้นตอนแรก คือการเตรียมพื้นที่สำหรับการทำนาเกลือ เริ่มจากกั้นน้ำฝนที่ขังอยู่ในนา เพื่อไว้ใช้สำหรับขุดร่องนาและเสริมคันดินใหม่ เพื่อให้คันดินสูงขึ้นสำหรับใส่น้ำเกลือในปีถัดไป จากนั้นขุดรางส่งน้ำจากนาเกลือถึงชายทะเลและติดตั้งอุปกรณ์วิดน้ำ เพื่อเอาน้ำทะเลมาใช้ทำนาเกลือ ขั้นตอนที่มาคือ วิดน้ำจากรางส่งน้ำ ให้เต็มวังน้ำ และเริ่มดันน้ำเข้าสู่นาดากหรือนาประเทียบ หลังจากนั้นดันจิงน้ำเข้าสู่นาเชือรอนเป็นส่วนที่ 3 ตากน้ำไว้ประมาณ 5-7 วัน แสงแดดจะทำให้ น้ำระเหยจนปริมาณน้ำลดลงและความเค็มเพิ่มมากขึ้น สังเกตจากคราบน้ำที่จับอยู่ริมบ่อ ขั้นตอนที่มาคือดันน้ำจากนาเชือรอนเข้าสู่นาเชื้อซึ่งเป็นการเตรียมน้ำสำหรับใช้ในนาปลง จากนั้นทำการปรับพื้นที่นาปลงเพื่อรองรับน้ำจากนาเชื้อ โดยใช้วัสดุกลิ้งบดทับผิวดินให้เรียบแน่นไม่ให้มีรอยแตก ประมาณ 4-5 ครั้ง ครั้งละ 3-5 วัน และการบดกลิ้งผิวดิน จะใช้ระยะเวลาห่างกันประมาณ 5-7 วัน ตามสภาพผิวดิน จากนั้นดันน้ำจากนาเชื้อเข้าสู่นาปลง น้ำเกลือจะค่อยๆ ตกผลึกเป็นเม็ดเกลือและเกาะตัวกันหนา มีค่าความเค็มประมาณ 820-870 ppt ขั้นตอนที่มาคือการเก็บผลึกเกลือ เริ่มจากเกลือที่ตกผลึกหนาประมาณ 2 เซนติเมตรขึ้นไป จะใช้รั้วชวยเกลือให้ผลึกเกลือแตกออกจากกัน ทำการชวยเกลือจนทั่วนา จากนั้นใช้ทับทา ซึ่งมีลักษณะคล้ายจอบเกลี่ยผลึกเกลือให้เป็นแถวยาวไปตามคันนา แล้วใช้ทับทาชุ่ม (ตะล่อมเกลือ) รวมผลึกเกลือให้เป็นกอง นำเข้าเก็บในฉางหรือยุ้งเกลือ

## 2. การทบทวนวรรณกรรม

ในระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง ความหลากหลายของราอาจจะน้อยกว่าบริเวณอื่นๆ เนื่องจากราในบริเวณนี้ต้องมีการปรับตัวทางสรีรวิทยาเพื่อให้ทน โสเดียมคลอไรด์สูง (Gunde-Cemeran *et al.*, 2009; Ravindran *et al.*, 2012; Ronsberg *et al.*, 2013 ) ราชอบเค็มชนิดแรกที่มีรายงานเป็นราจาก Dead Sea คือรา *Gymnascella marismoutui* ( Buchalo *et al.*, 1998) และรา *Cladosporium like* เป็นราชอบเค็มชนิดแรกที่ยกได้จากนาเกลือ

จากประเทศสโลวีเนีย (Gunde-Cemeran *et al.*, 2000) ราทนเค็มชนิดเด่นที่พบได้ในบริเวณนี้ ได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium* และ *Scopulariopsis* (Gunde-Cemeran *et al.*, 2009)

จากการศึกษาของ Grishkan *et al.* (2003) ซึ่งศึกษาการกระจายของราทนเค็มบริเวณ Dead Sea ได้เก็บตัวอย่างน้ำและดินตะกอนในปี 1999-2000 พบราทั้งสิ้น 38 species จาก 19 genera โดยพบราในกลุ่ม Oomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina และ Mitosporic fungi สำหรับรากลุ่มเด่นที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Penicillium weslingii* (Frequency of occurrence 73 %), *Cladosporium cladosporioides* (64%), *Beauveria alba* (55%) และ *Eurotium herbariorum* (55%) จากการศึกษาของ Cantrell *et al.* (2006) ที่ศึกษาความหลากหลายของราในบริเวณชายฝั่งตะวันตกเฉียงใต้ เมือง Cabo Rojo โดยเก็บตัวอย่างน้ำ ดินตะกอนและ microbial mat ในนาเกลือ ที่มีความเค็มสูงประมาณ 600 psu (ppt) ในช่วงเดือนมิถุนายน 2003 และ 2004 ราที่คัดแยกได้จากน้ำมี 27 ชนิด (86 สายพันธุ์) ดินตะกอนมี 8 ชนิด (44 สายพันธุ์) และ microbial mat 16 ชนิด (53 สายพันธุ์) ชนิดของราที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., และ *Cladosporium* spp. โดยในน้ำพบ *C. Shaerospermum* มากที่สุด (24 สายพันธุ์) ในดินตะกอนพบรากลุ่ม Sterile mycelium-Moniliaceae มากที่สุด (16 สายพันธุ์) และ microbial mat พบ *A. niger* มากที่สุด (20 สายพันธุ์) Nayak *et al.*, (2012) สำรวจราทนเค็มและราชอบเค็มในนาเกลือจาก Goa ประเทศอินเดีย พบว่าราที่พบได้แก่รา *Aspergillus* spp. รองลงมาคือพบ *Penicillium* spp. และพบ *Eurotium* ประปราย

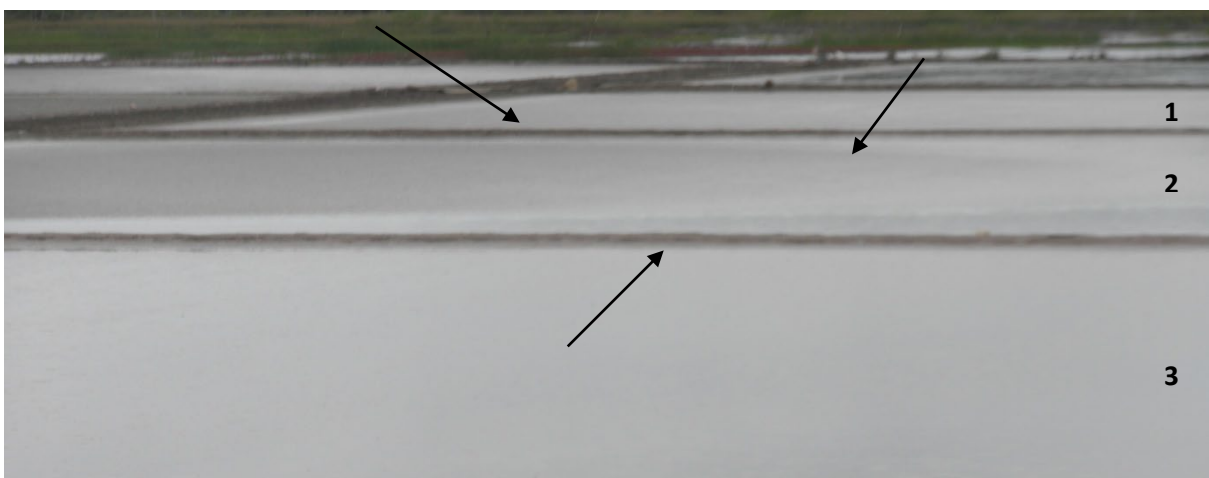
ราในแหล่งที่มีเกลือสูง มีความสามารถในการปรับตัวให้อยู่รอดได้ ในที่มีเกลือสูงความเข้มข้นแสงอัลตราไวโอเลตสูง รวมถึงอยู่รอดได้ในที่มี pH อุณหภูมิและความดันที่แตกต่างกัน (Chatchawan, *et al.*, 2011) ปัจจุบันการศึกษารากลุ่ม halophilic ในบริเวณที่มีค่าความเค็มสูงมากๆ (hypersaline environment) เช่น นาเกลือ ทะเลสาบ และ Dead Sea เพิ่มมากขึ้นแต่ยังนับว่าน้อยมาก เมื่อเทียบกับรากลุ่มอื่นๆ เนื่องจากพบครั้งแรกไม่ถึง 20 ปีที่ผ่านมา ขณะที่มียางานว่าราในนาเกลือมีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิเอนไซม์ และกรดชนิดต่างๆ (Frisvad and Samson, 2004, Lu *et al.*, 2008, Margesin and Schinner, 2001) ประกอบกับจุลินทรีย์ทนเค็มและจุลินทรีย์ชอบเค็มกำลังเป็นที่สนใจมากขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาความสามารถของราในนาเกลือในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่มีความสำคัญชนิดต่างๆ

### บทที่ 3

#### วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

##### 1. แหล่งตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำจากนาเกลือ ในอำเภอท่าข้าม จังหวัดฉะเชิงเทรา และอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจังหวัดจันทบุรี ในเดือนตุลาคม 2554 มกราคม 2555 เมษายน 2555 และเดือนกรกฎาคม 2555 แต่ละแหล่งตัวอย่างเก็บทั้งดินและน้ำในแปลงเดียวกัน ในฤดูน้ำมากซึ่งไม่ใช่ฤดูทำนาเกลือ (กรกฎาคม และ ตุลาคม) ซึ่งความเค็มของน้ำในแต่ละแปลงไม่แตกต่างกันมากนัก ทำการเก็บจาก 3 แปลงที่อยู่ติดกัน (ภาพที่ 1) ส่วนในฤดูน้ำน้อย (มกราคมและเดือนเมษายน) เก็บตัวอย่างจากแปลงที่มีลักษณะต่างกัน และมีระดับความเค็มแตกต่างกัน (ภาพที่ 2) ในแต่ละแปลงเก็บตัวอย่างบริเวณใกล้กับขอบแปลง 3 ขอบ ตัวอย่างดินเก็บที่ระดับความลึก 0-10 เซนติเมตร โดยใช้ท่อเก็บดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ตัวอย่างน้ำเก็บโดยการหย่อนขวดเก็บน้ำลงไปที่ระดับความลึกจากผิวน้ำ 5 เซนติเมตร นำตัวอย่างดินและน้ำใส่ถุงพลาสติกที่สะอาดแช่ในน้ำแข็ง นำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อทำการศึกษา ดินและน้ำที่พบจะมีลักษณะแตกต่างกันไป ขึ้นกับชั้นดิน แปลงนาและฤดูกาลที่เก็บ ตัวอย่างแสดงในภาพที่ 3

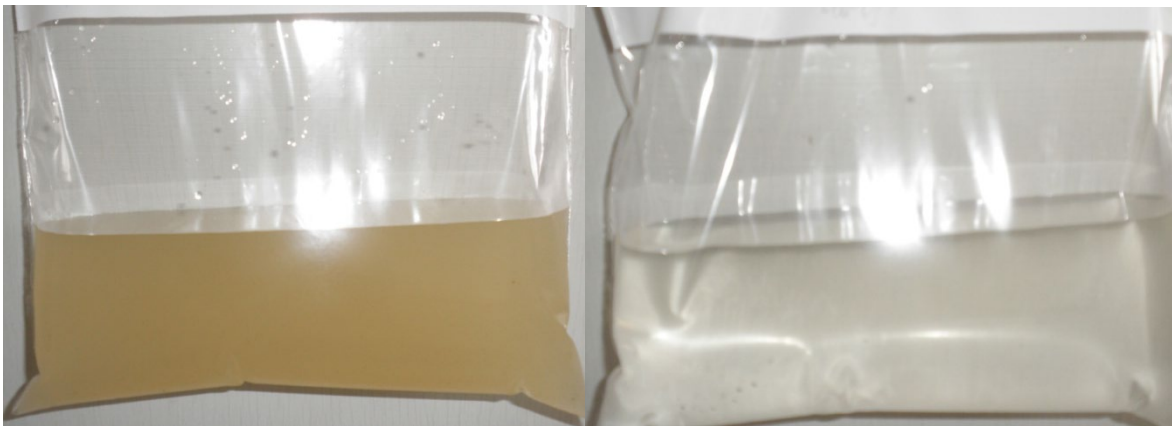
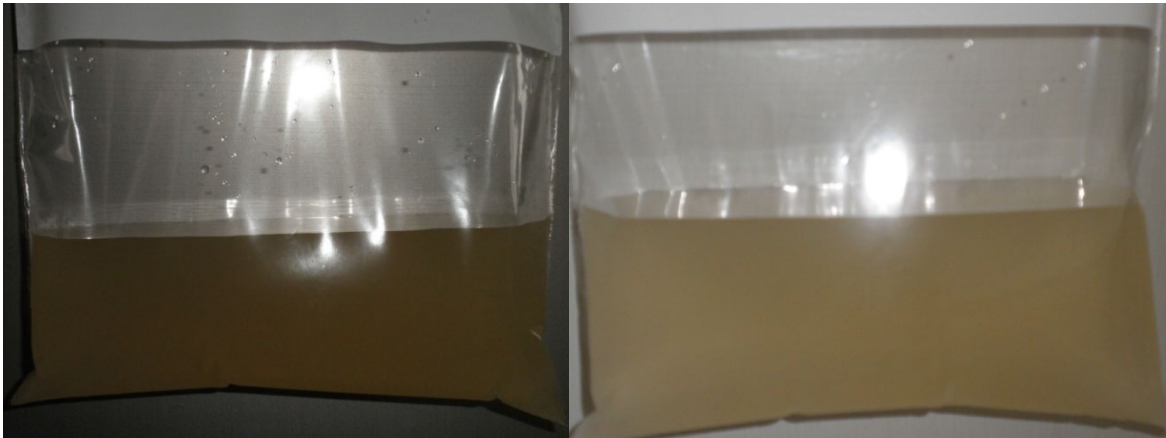


ภาพที่ 1 ลักษณะนาเกลือนอกฤดูกาลทำนาเกลือ; 1, 2 และ 3 เป็นแปลงที่เก็บตัวอย่าง ลูกศรแสดงบริเวณใกล้ขอบของแปลงซึ่งเป็นบริเวณเก็บตัวอย่าง ลักษณะที่เห็นภายนอกและความเค็มแตกต่างกันไม่มาก





ภาพที่ 2 ลักษณะนาเกลือในฤดูกาลทำนาเกลือ; 1, 2 และ 3 เป็นแปลงที่เก็บตัวอย่าง ลูกศรแสดงบริเวณใกล้ขอบของแปลงทั้ง 3 ขอบซึ่งเป็นบริเวณเก็บตัวอย่าง ลักษณะที่เห็นภายนอกและความเต็มแตกต่างกันชัดเจน



ภาพที่ 3 ลักษณะหลากหลายของดินและน้ำในนาเกลือในแปลงและฤดูกาลต่างๆกัน

## 2. สายพันธุ์จุลินทรีย์

### 2.1. สายพันธุ์รา

ราที่แยกจากนาเกลือจังหวัดฉะเชิงเทราและจังหวัดจันทบุรี จำนวน 100 สายพันธุ์ ราทั้งหมดเก็บเป็น stock culture ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

### 2.2. สายพันธุ์แบคทีเรียและยีสต์

ใช้เป็นเชื้อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากนาเกลือ ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียและยีสต์ที่ได้แยกจากผู้ป่วยจัดซื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จังหวัดนนทบุรี

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Salmonella* Typhimurium ATCC 13311

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Bacillus cereus* TISTR 121

*Candida albicans* ATCC 10231

*Candida albicans* ATCC 90028

## 3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

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

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

Potato dextrose broth/agar (Difco, USA)

Sabouraud dextrose agar (SDA) (Difco, USA)

Muller Hinton agar (MHA) (Difco, USA)

Muller Hinton agar + 2% glucose

Nutrient agar (NA)

Tryptic soy agar (TSA)

Tryptic soy broth (TSB)

RPMI 1640 Medium

#### 4. การเลี้ยงราและสารสกัดจากรา

##### 4.1. การเลี้ยงรา

เลี้ยงราจากนาเกลื้อที่จะทำการตรวจหาสารยับยั้งจุลินทรีย์บนอาหาร PDA/sw บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร เจาะขึ้นรู้นบริเวณปลายเส้นใยรา 2 ชิ้นใส่ลงในอาหาร PDB/sw ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปกรวยขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 เพื่อแยกส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนเส้นใยออกจากกัน เก็บรักษาส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

##### 4.2. การเตรียมสารสกัดจากราเกลื้อ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงรา 40 มิลลิลิตร มาสกัดด้วย ethyl acetate 40 มิลลิลิตร 2 ครั้งแรงๆ นานครั้งละ 10-20 นาที นำส่วนสกัด ethyl acetate ที่ได้มารวมกัน นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความดัน 240 มิลลิบาร์ หมุนด้วยความเร็วรอบ 100 ครั้งต่อนาที จนกระทั่งแห้ง ละลายสารสกัดที่ได้ด้วย 50% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

#### 5. การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

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

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

## 5.2. การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ (CLSI, 2006)

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

## 5.3 การเตรียมยีสต์ทดสอบ (ดัดแปลงจาก CLSI, 2002)

เชื้อยีสต์ลงบนอาหาร SDA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์จำนวน 1-2 โคโลนีลงในอาหาร SDB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำเชื้อมาปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 โดย suspend ใน 5 ml 0.85% NaCl (กรณีทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ)/ $10^{-1}$  McFarland No. 0.5 (กรณีทดสอบกับสารสกัด) ซึ่งจะมีเซลล์ประมาณ  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  CFU/ml และประมาณ  $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$  CFU/ml ตามลำดับ

## 6. การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี Agar well diffusion

ป้ายแบคทีเรียทดสอบ / ยีสต์ทดสอบ ที่มีความขุ่นเทียบเท่า  $10^{-1}$  McFarland No.0.5 ลงบนผิวหน้า NA ให้ทั่วสำหรับยีสต์ใช้อาหาร SDA ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร เจาะรูบนอกปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่เจาะไว้ (สำหรับตัวควบคุมผลลบ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปลอดเชื้อ) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกการยับยั้งของเชื้อจากวงใสรอบ well (ทำ 2 ซ้ำ)

## 7. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากรานาเกลือในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี disc diffusion (CLSI, 2006)

ใช้ไม้พันสำลีที่นำเชื้อจุ่มเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ จากนั้นบิดสำลีให้หมาดๆกับผิวภายในของหลอดทดลอง ป้ายเชื้อลงบนอาหาร MHA ให้ทั่วทั้งผิวหน้าอาหาร ป้าย 3 ระบายทำมุม 60 องศา หยอดสารสกัดลงบนแผ่นดิสก์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำแผ่นดิสก์ไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย

ใช้แผ่นดิสก์จุ่มสารละลาย 50% DMSO 20 ไมโครลิตรเป็นตัวควบคุมผลลบ และใช้ดิสก์ยา gentamycin (10 ไมโครกรัมต่อดิสก์)/ fluconazole (25 ไมโครกรัมต่อดิสก์) เป็นตัวควบคุมผลบวก สำหรับทดสอบแบคทีเรีย และยีสต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้น บนทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ สารสกัดที่ให้ผลยับยั้งดี จะนำมาทดสอบ 2 ซ้ำ อีกครั้งหนึ่ง

กรณียีสต์ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีข้างต้น โดยเปลี่ยนมาใช้อาหาร MHA+2% glucose (ดัดแปลงจาก NCCLS, 2004)

#### 8. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (minimum inhibitory concentration, MIC) ของแบคทีเรียด้วยวิธี broth micro dilution (CLSI, 2006)

นำอาหาร MHB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หยดใส่ในหลุม micro dilution plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำสารสกัดจากรานาเกลื่อ 100 ไมโครลิตรความเข้มข้น 1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหยดลงในหลุมที่ 1 ของ micro dilution plate จากนั้นทำการเจือจางครั้งละ 2 เท่า ในหลุมถัดๆไป เพื่อให้มีความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ 512-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ มาเจือจางลงให้ได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ  $10^7$  cfu/ml จากนั้นนำมาหยดลงในหลุม micro dilution plate หลุมละ 5 ไมโครลิตรทุกหลุม ( $5 \times 10^4$  cfu/well) บ่ม plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านค่า MIC ใช้ยา gentamicin เป็นสารควบคุมผลบวก

ในกรณีที่ต้องการทราบค่า MBC นำอาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมที่ไม่พบการเจริญของเชื้อมา เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจดูการเจริญของเชื้อบนจานอาหาร โดยบันทึกค่าความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนจานอาหาร

#### 9. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (minimum inhibitory concentration, MIC) ของยีสต์ด้วยวิธี broth micro dilution (ดัดแปลงจาก CLSI, 2002)

นำอาหาร RPMI 1640 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหยดใส่ในหลุม micro dilution plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำสารสกัดจากรานาเกลื่อ 100 ไมโครลิตรความเข้มข้น 2,048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหยดลงในหลุมที่ 1

ของ micro dilution plate จากนั้นทำการเจือจางครั้งละ 2 เท่า ในหลุมถัดๆไป เพื่อให้มีความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่  $1,024 \times 10^{-1}$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลุมสุดท้ายจุดทิ้ง 100 ไมโครลิตร) นำเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ มาเจือจางด้วยอาหาร RPMI 1640 1000 เท่า (1:50 ตามด้วย 1:20) ซึ่งจะได้ความเข้มข้นเท่ากับ  $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$  cfu/ml จากนั้นเจือจางต่ออีก 1 เท่าด้วยอาหารเดียวกัน นำมา 100 ไมโครลิตร หยดลงหลุม micro dilution plate ( $0.5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^3$  cfu/ml) บ่ม plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงอ่านค่า MIC ชุดควบคุมการทดลองใช้ยา fluconazole ความเข้มข้นตั้งแต่ 256-0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับทดสอบ *C. albicans* ATCC 10231 และยา fluconazole ความเข้มข้นตั้งแต่ 8-0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับทดสอบ *C. albicans* ATCC 90028

หมายเหตุ ในการหาค่า MIC ในหลุมสุดท้ายและรองสุดท้ายจะใช้เป็น diluent control และ negative control โดย diluent control เติม อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตรกับ DMSO 100 ไมโครลิตร แล้วจุดทิ้ง 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อทดสอบ 100 ไมโครลิตร ส่วน negative control ทำเช่นเดียวกันแต่ไม่เติมเชื้อ

ในกรณีที่ต้องการทราบค่า MBC นำอาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมที่ไม่พบการเจริญของเชื้อมา เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจดูการเจริญของเชื้อบนจานอาหาร โดยบันทึกค่าความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนจานอาหาร

## 10. การจัดจำแนกราทางสัตวฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะการเจริญของรกายได้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ ศึกษาโครงสร้างสืบพันธุ์ของราโดยเทคนิคการเพาะเชื้อบนบนสไลด์ (slide culture) ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound บันทึกลักษณะการเจริญพร้อมทั้งถ่ายภาพ สำหรับการจำแนกชนิดของราเทียบกับ Key Illustrated genera of imperfect fungi (Barnett & Hunter, 2006)

## 11. การจัดจำแนกราทางอนุพันธุศาสตร์

### 11.1. การสกัดดีเอ็นเอ ใช้วิธีของ Atkins and Clark (2004)

นำเส้นใยมาทำให้แข็งด้วยในโตรเจนเหลว บดเส้นใยให้เป็นผง ทำให้เส้นใยแตกด้วย lysis buffer (100 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA และ 2% SDS) สกัดโปรตีนด้วย Phenol และ Chloroform-Isoamyl alcohol ภายหลังตกตะกอน DNA ด้วย ethanol ละลายใน TE buffer และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ-20 °C

### 11.2. การทำปฏิกิริยาอุกิโอพอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดปริมาณ 2  $\mu$ l มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยผสมองค์ประกอบต่าง ๆ ตามลำดับ ลงในหลอดสำหรับทำพีซีอาร์ ดังแสดงในตารางที่ 1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ เป็นคู่ไพร์เมอร์ยูนิเวอร์ซัลสำหรับเพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA NS1 และ NS8 (White *et al.*, 1990) แสดงดังตารางที่ 2 นำหลอดปฏิกิริยาที่เตรียมได้ไปดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเครื่อง thermal cycler ซึ่งดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นจำนวน 35 รอบ โดยสภาวะของการดำเนินปฏิกิริยามีขั้นตอนการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังแสดงในตารางที่ 3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

### 11.3. การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทำโดยการเซนตริฟิวจ์ ตามวิธีของชุด Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

### 11.4. การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำบริสุทธิ์แล้ว ส่งไปยังบริษัทไบโอดีไซน์ จำกัด เพื่ออ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพร์เมอร์ชุดเดียวกับที่ทำพีซีอาร์ (NS1 และ NS8)

### 11.5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 18S rRNA ของราทะเลที่ศึกษา โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลสาธารณะในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ใช้โปรแกรม Basic alignment search tool (BLASTn) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอ



โอไทค์ของราแต่ละไอโซเลทที่ได้จากการอ่านโดยใช้ไพร์เมอร์แต่ละเส้นมาสร้าง contig โดยใช้โปรแกรม BioEdit

## 12. การเก็บรักษาเชื้อ

นำเชื้อที่แยกได้มา subculture ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกว่าเชื้อจะเจริญ ใส่น้ำมันพาราฟินปราศจากเชื้อจนท่วมอาหารที่มีอยู่ในหลอด พันจุลหลอดด้วยพาราฟิล์ม เก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ราที่คาดว่าเป็นราชนิดใหม่หรือมีคุณสมบัติที่น่าสนใจ จะส่งไปเก็บรักษาไว้ที่ศูนย์รวบรวมสายพันธุ์รา Biotec Culture Collection (BCC)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 18S rRNA

องค์ประกอบ	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	35	-
10X reaction buffer	5.0	1X
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP (mix)	1.0	0.2 mM
10 μM Primer		
- NS 1 (Forward)	2.5	0.5 μM
- NS 8 (Reward)	2.5	0.5 μM
100 ng μl <sup>-1</sup> DNA template	2.0	100 ng
5 U μl <sup>-1</sup> <i>Pfu</i> DNA polymerase	0.5	2.5 U
ปริมาตรรวม	50	-

ตารางที่ 2 คู่ไพรเมอร์ยูนิเวอร์ซัล NS1 และ NS8

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)*
NS1	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	56	1,800
NS8	TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA	65	

\* ขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้ตัดข้อมูลส่วนอินทรอนแล้ว

ตารางที่ 3 ขั้นตอนของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์

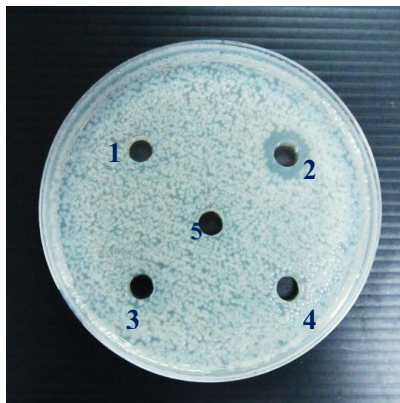
ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ต่อรอบ	จำนวนรอบ
Initial denaturation	96	2 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	} 35
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	2 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1. การคัดกรองรานาเกลือในการยับยั้งจุลินทรีย์

จากการนำราที่แยกได้จากนาเกลือ 100 สายพันธุ์ ( SS 001-SS 100) ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) 30 มิลลิลิตร แล้วนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) จากรายอายุ 7 วัน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 6 ชนิด (7 สายพันธุ์) คือ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. Typhimurium* ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *B. cereus* TISTR 121, *Candida albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี agar well diffusion พบว่ารา 19 สายพันธุ์ (ร้อยละ 19.0) สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่นำมาทดสอบ ได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด รา 19 สายพันธุ์ (ร้อยละ 19.0) สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ได้อย่างน้อยหนึ่งชนิดและส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รา SS 063 และ SS 085 สร้างสารยับยั้ง *E. coli* ได้ แต่ไม่สมบูรณ์ พบโคโลนิเชื้อส่วนหนึ่งในวงใส รา SS 060 ยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ไม่สมบูรณ์เช่นกัน รา 2 สายพันธุ์ (ร้อยละ 2.0) สามารถสร้างสารยับยั้งยีสต์ทดสอบได้ 1 สายพันธุ์ ราที่ให้ผลยับยั้งแสดงในตารางที่ 4 ตัวอย่างผลบวกแสดงในภาพที่ 4



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

ตารางที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของอาหารเลี้ยงเชื้อจากรานาเกลือ

ลำดับ	อาหารเลี้ยงเชื้อของรา	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)						
		EC	PA	ST	SA	BC	CA1	CA2
1	SS 026	-	-	-	12*	-	-	-
2	SS 027	-	-	-	10*	-	-	-
3	SS 032	-	-	-	10*	-	9*	-
4	SS 033	-	-	-	11	10	-	-
5	SS 038	-	-	-	10*	-	-	-
6	SS 045	-	-	-	11	11	-	-
7	SS 047	-	-	-	11	10	-	-
8	SS 048	-	-	-	12	11	-	-
9	SS 057	-	-	-	13*	-	-	-
10	SS 060	-	9*	-	-	-	-	-
11	SS 063	24*	-	-	-	-	-	-

*Escherichia coli* ATCC 25922, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ST= *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, BC = *Bacillus cereus* TISTR 121, CA1 และ CA2 = *Candida albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028, + คือ ยับยั้งได้ - คือไม่ยับยั้ง

ตารางที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของอาหารเลี้ยงเชื้อจากรานาเกลื้อ (ต่อ)

ลำดับ	อาหารเลี้ยงเชื้อของรา	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)						
		EC	PA	ST	SA	BC	CA1	CA2
12	SS 069	-	-	-	16	14	-	-
13	SS 074	-	-	-	12*	-	-	-
14	SS 076	-	-	-	10*	-	-	-
15	SS 078	-	-	-	10*	-	9*	-
16	SS 085	12*	-	-	11	10	-	-
17	SS 089	-	-	-	10*	-	-	-
18	SS 091	-	-	-	11	11	-	-
19	SS 099	-	-	-	11	10	-	-

*Escherichia coli* ATCC 25922, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ST= *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, BC = *Bacillus cereus* TISTR 121, CA1 และ CA2 = *Candida albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028, + คือ ยับยั้งได้ - คือไม่ยับยั้ง

#### 4.2. ผลของสารสกัดอาหารเลี้ยงเชื้อจากรานาเกลือในการยับยั้งแบคทีเรีย

เมื่อนำสารสกัด 20 ไมโครลิตร ที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 80 มิลลิลิตร ของรา 17 สายพันธุ์ ที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ และ 17 สายพันธุ์ที่ผลการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นลบ มาละลายด้วยตัวทำละลาย 50% DMSO 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดที่ให้ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิดมี 24 สาร จากจำนวนสารที่ทดสอบ 34 สาร (ร้อยละ 70.6) สารสกัดอาหารเลี้ยงเชื้อจากรา 24 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิดและส่วนใหญ่ยังคงเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (ตารางที่ 5) และพบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เห็นได้จากวงใสที่ชัดเจน ยกเว้นในกรณี *S. aureus* ATCC 25923 ที่พบว่าไม่มีแบคทีเรียส่วนหนึ่งเจริญในวงใสได้ สารสกัดจากรา 10 สายพันธุ์ (ร้อยละ 29.4) สามารถสร้างสารยับยั้งยีสต์ทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งสายพันธุ์

สารสกัดจากรา 4 สายพันธุ์ คือ SS 031 SS 076 SS 078 และ SS 091 สามารถสร้างสารยับยั้งยีสต์ทดสอบได้ทั้งสองสายพันธุ์ รวมทั้งยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก บางครั้งพบการยับยั้งยีสต์ทดสอบเกิดไม่สมบูรณ์ พบยีสต์ส่วนหนึ่งเจริญในวงใสได้ (เช่นเดียวกับการยับยั้งยีสต์ทดสอบของสารสกัดส่วนใหญ่) สารสกัดจากรา SS 069 เท่านั้นที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้เล็กน้อย (เส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 9 มิลลิเมตร) และสารสกัดจากรา SS 078 เท่านั้น ที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Salmonella* Typhimurium ได้ แต่ผลที่ได้ไม่แน่นอน การศึกษา 2 ชั้น 2 รอบ ให้ผลต่างกัน (เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 0 และ 14 มิลลิเมตรในแต่ละรอบ) สารสกัดจากรา 34 สายพันธุ์ (SS 031 SS 066 SS 069 SS 070 SS 076 (SS 078) SS 079 SS 091 SS 097 และ SS 099) จากทั้งหมด 34 สาร (29.4%) แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิดได้ดี สามารถพบเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสได้มากกว่า 13 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบกับจุลินทรีย์ต่างๆกัน ขึ้นกับชนิด/ สายพันธุ์ที่ทดสอบ ตัวอย่างวงใสแสดงในภาพที่ 5-6

เมื่อพิจารณาสารสกัดที่ให้ผลยับยั้งดี (เส้นผ่าศูนย์กลางวงใสได้มากกว่า 15 มิลลิเมตร) พบว่า ผลจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัดไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกัน สารสกัดที่ให้ผลวงใสขนาดใหญ่อาจให้ผลทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นลบ

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ

ลำดับที่	สารสกัดของ รสาายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางวงโตแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)						
		EC	PA	ST	SA	BC	CA1	CA2
1	SS 006	-	-	-	12	9	-	-
2	SS 014	-	-	-	11	13	-	-
3	SS 022	-	-	-	-	-	-	-
4	SS 026	-	-	-	8*	8	-	-
5	SS 027	-	-	-	9*	8	-	-
6	SS 031	-	-	-	17*	-	13	20*
7	SS 033	-	-	-	-	10	-	-
8	SS 034	-	-	-	-	8	-	-
9	SS 035	-	-	-	8*	-	-	-
10	SS 038	-	-	-	-	-	-	-
11	SS 039	-	-	-	-	-	-	-

EC = *Escherichia coli* ATCC 25922, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,  
 SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, ST = *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311,  
 BC = *Bacillus cereus* TISTR 121, CA1 และ CA2 = *Candida albicans* ATCC 10231 และ  
*C. albicans* ATCC 90028, - คือไม่ยับยั้ง\* คือยับยั้งบางส่วน

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดของ ราสายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)						
		EC	PA	ST	SA	BC	CA1	CA2
12	SS 045	-	-	-	8*	7	-	-
13	SS 047	-	-	-	8*	8	-	8*
14	SS 048	-	-	-	-	8	-	8*
15	SS 057	-	-	-	9*	-	-	-
16	SS 060	-	-	-	-	-	-	-
17	SS 063	-	-	-	-	-	-	-
18	SS 064	-	-	-	-	-	-	-
19	<b>SS 066</b>	-	-	-	<b>17</b>	<b>14</b>	-	-
20	SS 067	-	-	-	-	-	-	-
21	<b>SS 069</b>	-	<b>9</b>	-	<b>19</b>	<b>16.5</b>	-	-
22	<b>SS 070</b>	-	-	-	<b>12</b>	<b>13.5</b>	-	<b>27*</b>

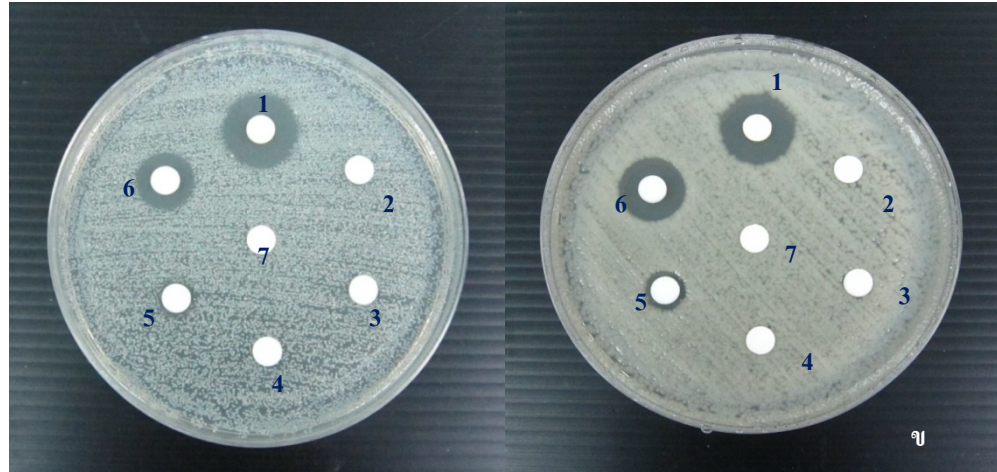
EC = *Escherichia coli* ATCC 25922, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,  
 SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ST = *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311,  
 BC = *Bacillus cereus* TISTR 121, CA1 และ CA2 = *Candida albicans* ATCC 10231 และ  
*C. albicans* ATCC 90028, - คือ ไม่ยับยั้ง\* คือยับยั้งบางส่วน



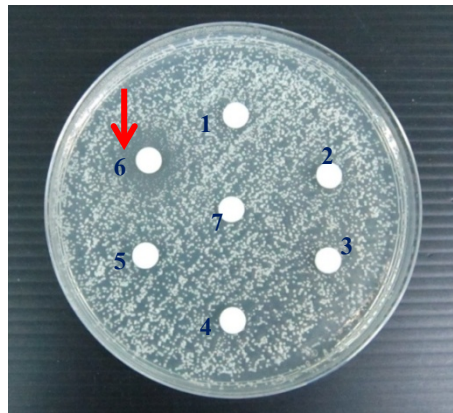
ตารางที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดของ ราสายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)						
		EC	PA	ST	SA	BC	CA1	CA2
23	SS 072	-	-	-	-	9.5	-	-
24	SS 074	-	-	-	-	8	-	-
25	<b>SS 076</b>	-	-	-	<b>12.5</b>	<b>12.5</b>	17*	14*
26	SS 077	-	-	-	-	-	-	-
27	<b>SS 078**</b>	-	-	<b>0,14</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>11*</b>	<b>14.5*</b>
28	<b>SS 079</b>	-	-	-	<b>15</b>	<b>16</b>	-	<b>18*</b>
29	SS 084	-	-	-	-	-	-	-
30	SS 087	-	-	-	-	-	-	-
31	SS 089	-	-	7	8*	8	-	-
32	<b>SS 091</b>	-	-	-	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>15*</b>	<b>22.5*</b>
33	SS 097	-	-	-	13	12	-	18.5
34	<b>SS 099</b>	-	-	-	<b>12</b>	<b>14</b>	-	<b>8*</b>

*Escherichia coli* ATCC 25922, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ST= *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, BC = *Bacillus cereus* TISTR 121, CA1 และ CA2 = *Candida albicans* ATCC 10231 และ *C. albicans* ATCC 90028, + คือ ยับยั้งได้ - คือไม่ยับยั้ง



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



ภาพที่ 6 ฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ ทดสอบโดยวิธี disc diffusion; 1: สารสกัดจาก SS 063, 2: สารสกัดจาก SS 066, 3: สารสกัดจาก SS 072, 4: สารสกัดจาก SS 074, 5: สารสกัดจาก SS 075, 6: สารสกัดจาก SS 076, 7: disc สารละลาย 50% DMSO ใช้เป็นตัวควบคุมผลลบ

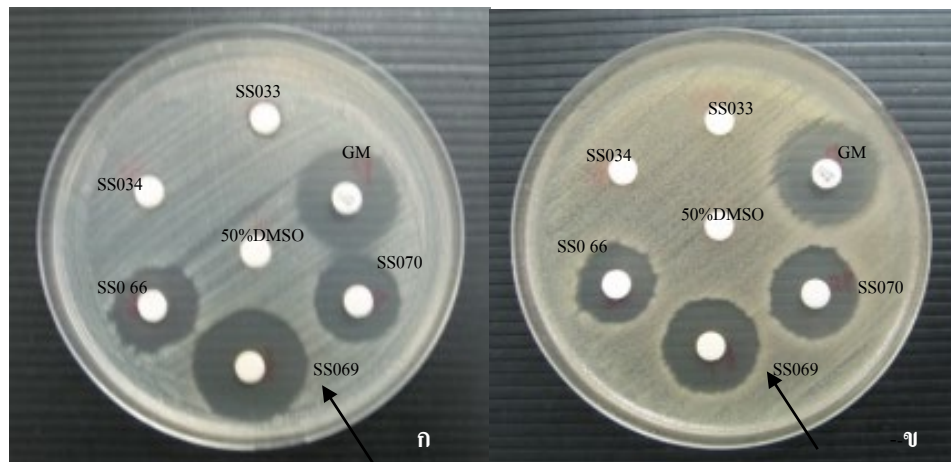
#### 4.3. การทดสอบยืนยันการประสิทธิผลของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราในการยับยั้งแบคทีเรีย

เมื่อนำสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราที่ดีจำนวนหนึ่งคือ SS 066 SS 069 SS 070 SS 076 SS 078 และ SS 099 มาทำการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion (100 µg/disk) เทียบกับสารสกัดของ SS 033 และ SS 034 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งน้อย และเทียบกับ disk ยา gentamycin (10 µg/disk) พบว่าสารสกัดที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 13 มิลลิเมตรจากรางที่ 2 (SS 066 SS 069 SS 070 SS 076 SS 078 และ SS 079) แสดงให้เห็นวงใสที่ชัดเจน สารสกัดจากอาหารเลี้ยงรา SS 069 มีฤทธิ์ดีที่สุด คือสามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ATCC 27853 ให้เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 9 มิลลิเมตร สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุดคือ 26 มิลลิเมตร รองลงมาคือยับยั้ง *B. cereus* TISTR 1211 9.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ SS 069

สารสกัดรานาเกลือ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยวงใส (มิลลิเมตร)				
	EC	PA	ST	SA	BC
SS 066				17	15
SS 069	-	9	-	26,24	20,20
SS 070	-	-	-	19, 18	18,19
SS076	14	-	12	25,25	19,19
SS 078	-	-	-	18,18	20,20
SS 099	-	-	-	19,19	16,17
Gentamycin (Gm)	10	23	25	24	22

เชื้อทดสอบ; EC = *Escherichia coli* ATCC 25922, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ST = *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, BC = *Bacillus cereus* TISTR 121, - = ไม่ยับยั้ง



ภาพที่ 7 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ก) และ *Bacillus cereus* TISTR 121 (ข) ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรามาเกลือ SS 069 (100 µg/disk) (ลูกศรชี้) ทดสอบโดยวิธี disc diffusion เทียบกับ disc ยา gentamycin (GM,10 µg/disk) ใช้สารละลาย 50% DMSO เป็นตัวควบคุมผลลบ

#### 4.4. การทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของจุลินทรีย์ก่อโรค

เมื่อนำสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อรารหัส SS 066 SS 069 SS 070 SS 076 SS 078 และ SS 099 มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) และทำลาย (MBC) แบคทีเรีย ด้วยวิธี broth micro dilution พบว่าสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรา SS 070 SS 078 และ SS 069 / SS 076 มีค่า MIC ต่อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ต่ำสุดเรียงตามลำดับ SS 070 และ SS 078 สามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ขณะที่ SS 069 และ SS 076 ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ค่า MIC ของ SS 076 ต่อ *B. cereus* TISTR 121, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 เท่ากับ 64, 32, 128 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า MIC ของ SS 069 ต่อ *B. cereus* TISTR 121, *S. aureus* ATCC 25923 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 เท่ากับ 32, 64 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า MIC ของ SS 099 ต่อ *B. cereus* TISTR 121 และ *S. aureus* ATCC 25923 มีค่าเท่ากันคือ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดจากอาหารเลี้ยงรา SS 066 มีค่า MIC ต่อเชื้อทดสอบสูงกว่าสารสกัดที่กล่าวมา 1-4 ระดับ ค่า MIC ของ SS 070 มีค่าต่ำสุดคือ มีค่า MIC ต่อ

*B.cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 7)

เมื่อหาระดับ MIC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรา SS 069 ต่อยีสต์ *Candida* ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่ามีค่า MIC ต่อยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10231 และ *C. Albicans* ATCC 90028 เท่ากับ 1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน

ตารางที่ 7 MIC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือต่อแบคทีเรียทดสอบ

สารสกัด	MIC ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือต่อแบคทีเรียทดสอบ (µg/ml)									
	EC		PA		ST		SA		BC	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
SS 066							128	256	128	256
SS 069			128	512			64	256	32	32
SS 070							16	32	8	16
SS 076	128	512			128	512	32	128	64	128
SS 078							32	64	16	32
SS 099							64	128	64	64

เชื้อทดสอบ; EC = *Escherichia coli* ATCC 25922, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ST = *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311, BC = *Bacillus cereus* TISTR 121

#### 4.5. การจัดจำแนกรากที่ใช้ในการศึกษา

ทำการจัดจำแนกราก SS 069 SS 070 SS 076 และรากอื่นๆทางสัณฐานวิทยา รวม 71 สายพันธุ์ พบว่ารากที่จัดจำแนกได้ทั้งหมด 52 สายพันธุ์ เป็นรากกลุ่มอะนามอร์ฟ ซึ่งพบเฉพาะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ราก 19 สายพันธุ์ ไม่สามารถจำแนกทางสัณฐานวิทยาเนื่องจากไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ ผลการจัดจำแนก แสดงในตารางที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากที่ให้ผลยับยั้ง มีดังนี้

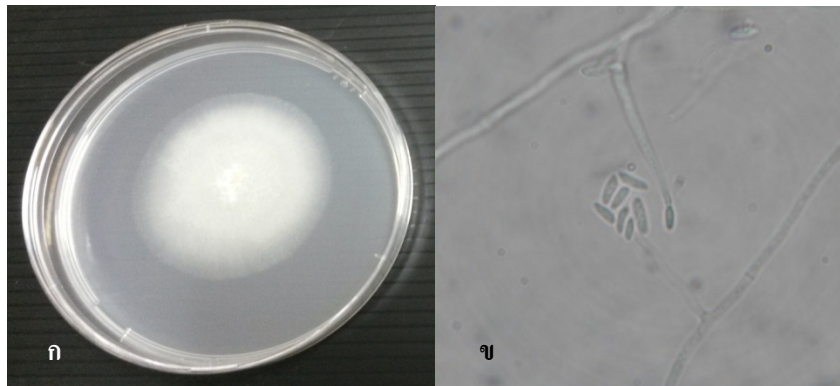
ตารางที่ 8 ผลการจัดจำแนกรวมที่ใช้ในการศึกษา 71 สายพันธุ์

กลุ่ม/สกุล	จำนวน	สายพันธุ์
<i>Acremonium</i> sp.	1	SS 001, SS 043, SS 066
<i>Alternaria</i> <i>alternata</i>	3	SS 052, SS 104
<i>Aspergillus</i> <i>candidus</i>	2	SS 002, SS 003
<i>Aspergillus</i> <i>flavus</i>	3	SS 035, SS 068, SS 071
<i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i>	5	SS 024, SS 030, SS 048, SS 073, SS 076, SS 110
<i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	1	SS 105
<i>Aspergillus</i> spp.	5	SS 039, SS 060, SS 061, SS 069
<i>Bipolaris</i> sp.	2	SS 031, SS 047
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	7	SS 010, SS 027, SS 032, SS 033, SS 041, SS 049, SS 051
<i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i>	3	SS 037, SS 038, SS 045
<i>Colletotrichum</i> sp.	2	SS 062, SS 065
<i>Curvularia</i> <i>lunata</i>	3	SS 006, SS 007, SS 059
<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	2	SS 014, SS 018
<i>Fusarium</i> sp.	4	SS 017, SS 022, SS 026, SS 034
<i>Nigrospora</i> <i>sphaerica</i>	1	SS 055
<i>Penicillium</i> spp.	4	SS 042, SS 044, SS 056, SS 109
<i>Pithomyces</i> spp.	4	SS 005, SS 011, SS 012, SS 013
Unidentified mycelia sterilia	19	SS 004, SS 008, SS 009, SS 015, SS 019, SS 023, SS 028, SS 029, SS 040, SS 050, SS 053, SS 054, SS 057, SS 058, SS 063, SS 064, SS 067, SS 070, SS 072, SS 078, SS 099

## การระบุชนิดของราที่สร้างสารยับยั้งได้ดี

### การจัดจำแนกรา SS066

การจัดจำแนกรรหหัส SS 066 โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนีเมื่อเลี้ยงรบนอาหาร potato dextrose agar ความเค็ม 30 ppt (PDA/sw 30 ppt ) อายุ 7 วัน พบว่า SS 066 มีลักษณะโคโลนีขาวบางค่อนข้างเรียบติดผิวอาหาร เมื่อแก่ผิวโคโลนีเป็นผงสีครีมถึงน้ำตาลอมเหลือง ขอบด้านหลังโคโลนีสีน้ำตาลอมเหลือง โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร ลักษณะเส้นใยเป็นแบบมีผนังกันใสไม่มีสี สร้าง conidia รูปรียาวขนาดประมาณ 1 x 2-3 ไมโครเมตร เกิดเป็นกลุ่มเกาะกันบนปลายโคนดิโอฟอร์ที่เรียบตรง ไม่แตกแขนง (ภาพที่ 8) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 066 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (98%) กับราในجنัส *Acremonium* อย่างน้อย 2 สปีชีส์ คือ *A. radiatum* และ *A. breve* (ตารางที่ 9) อีกทั้งข้อมูลลักษณะสัณฐานดังที่กล่าวข้างต้นไม่ได้บ่งชี้อย่างชัดเจนว่า SS 066 มีลักษณะตรงกับราทั้งสองสปีชีส์นี้ ในเบื้องต้นจึงระบุแทกซอนของรา SS 066 ได้เพียงระดับجنัส คือ *Acremonium* sp. SS 066 โดยที่ราสายพันธุ์นี้อาจเป็นสปีชีส์ใหม่



ภาพที่ 8 ลักษณะของรา *Acremonium* sp. SS 066 บนอาหาร PDA/sw 30 ppt; ก: ลักษณะโคโลนีอายุ 7 วัน บนอาหาร ข: ลักษณะเส้นใยและโครงสร้างสืบพันธุ์ของรา SS 066 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope กำลังขยาย 40x

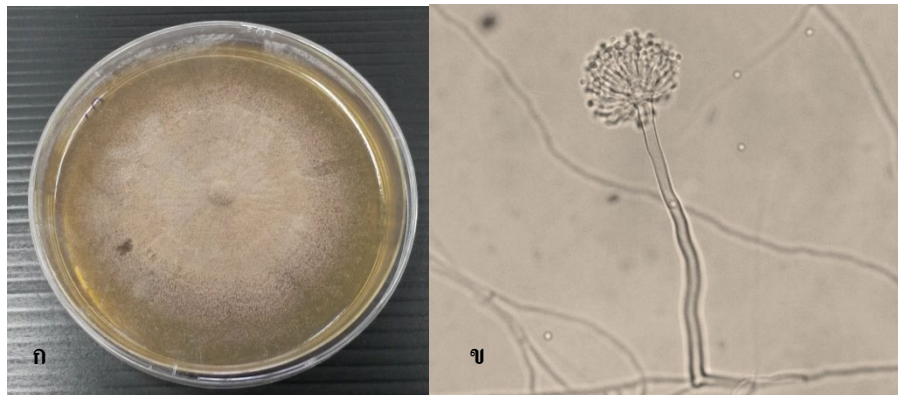
ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 066 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

SS 066_18srrna	Query cover	Mix ident.
<i>Acremonium radiatum</i> strain CBS 142.62 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
<i>Acremonium breve</i> strain CBS 150.62 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
<i>Acremonium</i> sp. ZH11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	98%
<i>Acremonium gamsii</i> strain CBS 726.71 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
<i>Acremonium</i> sp. 1 FW2SW3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
<i>Acremonium roseolum</i> strain CBS 289.62 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	94%
<i>Hypocreales</i> sp. GMG_C1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	99%	94%
<i>Volutella ciliata</i> 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), internal transcribed spacer 1 (ITS1) and internal transcribed spacer 2 (ITS2), strain BBA 70047	99%	94%



### การจัดจำแนกราส SS 069

การจัดจำแนกราส SS 069 โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนี เมื่อเลี้ยงรบนอาหาร PDA/sw 30 ppt อายุ 7 วัน พบว่า SS 069 มีลักษณะโคโลนี เป็นผงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีไม่เรียบ ด้านหลังโคโลนีสีน้ำตาลอมเหลือง หยักเป็นร่อง โคโลนีมีขนาด 6 เซนติเมตร ลักษณะเส้นใยเป็น แบบมีผนังกันใสไม่มีโครงสร้าง conidia รูปกลม ขนาด 2.5 ไมโครเมตร บน sterigma แบบ phialide บนหัว vesicle พบ foot cell ที่ฐานโคนดิโอฟอร์ เมื่อทำการจัดจำแนกเบื้องต้นพบว่าเป็น *Aspergillus* sp. (ภาพที่ 9) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 069 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (99%) กับ *Aspergillus niger* (ตารางที่ 10) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาลักษณะโคโลนีและสัณฐานของราสายพันธุ์นี้พบว่า มีลักษณะโดยทั่วไปแตกต่างไปจาก *A. niger* ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงระบุแท็กซอนของรา SS 069 เป็น *Aspergillus* sp. SS 069 โดยที่ราสายพันธุ์นี้อาจเป็นสปีชีส์ใหม่



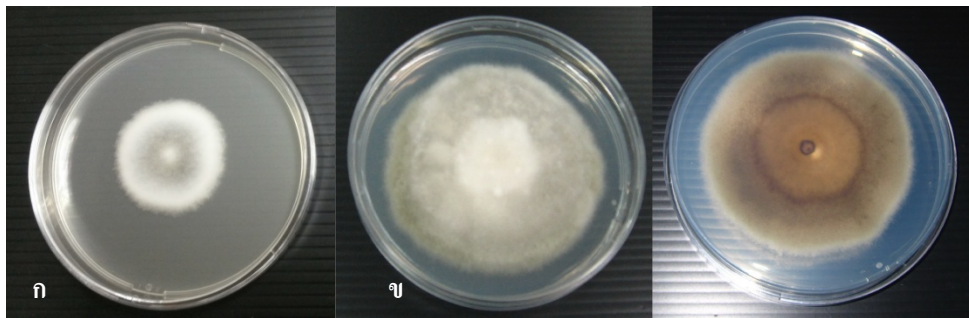
ภาพที่ 9 ลักษณะของรา *Aspergillus* sp. SS 069 บนอาหาร PDA/sw 30 ppt; ก: ลักษณะโคโลนีอายุ 14 วันบนอาหาร ข: ลักษณะเส้นใยและโครงสร้างสืบพันธุ์ของรา SS 069 ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ light microscope กำลังขยาย 40x

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 069 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

SS 069_18srRNA	Query cover	Mix ident.
ZL-2008 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
<i>Aspergillus flavipes</i> strain CBS 260.73 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<i>Aspergillus</i> sp. LQ21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<i>Aspergillus awamori</i> strain HB-03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<i>Fennellia flavipes</i> gene for 18S rRNA, partial sequence	100%	98%
<i>Aspergillus terreus</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	100%	98%
<i>Aspergillus niger</i> strain IMT 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<i>Aspergillus</i> sp. Ar-4jing-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	100%	98%
<b><i>Aspergillus niger</i> contig An03c0110, genomic contig</b>	<b>100%</b>	<b>99%</b>
<i>Aspergillus niger</i> contig An03c0100, genomic contig	100%	98%

## การจัดจำแนกรา SS 070 และ SS 099

ลักษณะโคโลนีของราทั้ง 2 สายพันธุ์คล้ายคลึงกันมาก เมื่อนำมาศึกษาทางพันธุศาสตร์พบว่า เป็น *Cochliobolus/Bipolaris* เหมือนกัน ลักษณะโคโลนีราห้ำ SS 070 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/sw 30 ppt อายุ 7 วัน พบว่ามีลักษณะโคโลนีขาวเป็นปุย ขอบฟูเล็กน้อย ด้านหลังโคโลนีสีเทาดำ ขอบโคโลนีขาวโคโลนีมีขนาด 5 เซนติเมตร เมื่อแก่โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเทา ด้านหลังโคโลนีสีน้ำตาลอมเหลือง ไม่สร้างสปอร์ ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ลักษณะโคโลนีราห้ำ SS 099 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/sw 30 ppt อายุ 7 วัน พบว่ามีลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับรา SS 070 คืออายุ 7 วัน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 4.8 เซนติเมตร สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นราชนิดเดียวกัน และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 070 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (99%) กับราหลายสปีชีส์ในจีนัส *Cochliobolus* (anamorph) และ *Bipolaris* (teleomorph) รวมถึง *Setosphaeria monoceras* ที่มีลักษณะสัณฐานคล้ายคลึงกับราในจีนัสทั้งสองนี้ ดังแสดงในภาพที่ 10 และตารางที่ 11 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงยังไม่สามารถระบุแทกซอนของ SS 070 ได้อย่างชัดเจน ในเบื้องต้นจึงได้ระบุเป็น *Cochliobolus* sp. / *Bipolaris* sp. โดยคาดว่าน่าจะเป็นราสปีชีส์ใหม่ และเนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 099 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (98%) กับราในจีนัส *Cochliobolus/Bipolaris* และ *Setosphaeria monoceras* (ภาพที่ 10 และตารางที่ 12) ในเบื้องต้นจึงระบุแทกซอนของรา SS 099 เป็น *Cochliobolus* sp. / *Bipolaris* sp. เช่นเดียวกับ SS 070



ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของรา *Cochliobolus* sp. / *Bipolaris* sp. SS 099 บนอาหาร PDA/sw 30 ppt;

ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีอายุ 6 วัน ข: ลักษณะด้านหน้าและด้านหลังโคโลนีอายุ 14 วัน

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 070 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

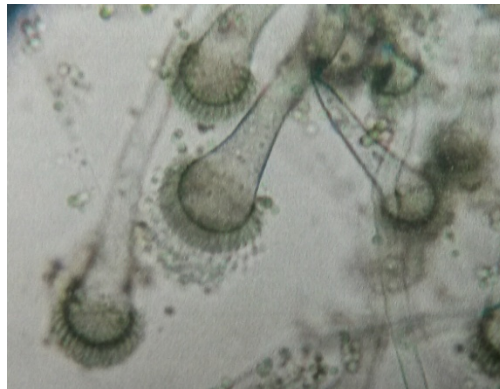
SS 070_18srRNA	Query cover	Mix ident.
<i>Cochliobolus sativus</i> strain NBRC 100205 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence >gb JN941631.1	100%	99%
<i>Cochliobolus sativus</i> 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
<i>Bipolaris</i> sp. JF2 18S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, partial sequence	100%	99%
<i>Bipolaris eleusines</i> 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	99%	99%
<i>Cochliobolus geniculatus</i> strain NBRC 7406 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	100%	99%
<i>Cochliobolus hawaiiensis</i> strain NBRC 32570 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	100%	99%
<i>Cochliobolus hawaiiensis</i> strain NBRC 100201 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	100%	99%
<i>Cochliobolus lunatus</i> strain NBRC 100173 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	100%	99%
<i>Cochliobolus lunatus</i> strain NBRC 100164 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence >gb JN941610.1	100%	99%
<b><i>Setosphaeria monoceras</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</b>	100%	99%

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 099 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

SS 099_18srRNA	Query cover	Mix ident.
<i>Cochliobolus sativus</i> 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
<i>Bipolaris eleusines</i> 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	99%	98%
<i>Bipolaris</i> sp. JF2 18S ribosomal RNA gene and ITS 1, partial sequence	99%	98%
<i>Cochliobolus geniculatus</i> strain NBRC 7406 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	99%	98%
<i>Cochliobolus hawaiiensis</i> strain NBRC 32570 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	99%	98%
<i>Cochliobolus hawaiiensis</i> strain NBRC 100201 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	99%	98%
<i>Cochliobolus lunatus</i> strain NBRC 100173 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	99%	98%
<i>Cochliobolus lunatus</i> strain NBRC 100164 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	99%	98%
<b><i>Setosphaeria monoceras</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</b>	99%	98%
<i>Cochliobolus lunatus</i> 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	99%	98%

## การจัดจำแนกรา SS 076

ลักษณะโคโลนีรารหัส SS 076 เมื่อเลี้ยงรบนอาหาร PDA/sw 30 ppt อายุ 7 วัน พบว่ามีลักษณะโคโลนีเป็นผงเขียวอมดำ ด้านหลังโคโลนีสีน้ำตาลอ่อน โคโลนีมีขนาด 6 เซนติเมตร สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ สปอร์รูปกลม ไม่มีสี เกิดบน sterigma ด้านบนหัว vesicle ขนาดใหญ่ประมาณ 2/3 ของหัว เรียงตัวชั้นเดียว (ภาพที่11) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 076 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (99 %) กับ *Aspergillus fumigatus* (ตารางที่ 13) เมื่อพิจารณาลักษณะสัณฐานร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จึงระบุแทกซอนของรา SS 076 เป็น *Aspergillus fumigatus* SS 076



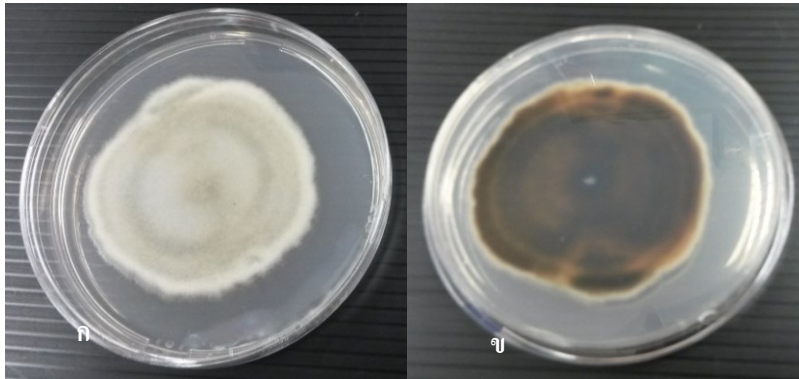
ภาพที่ 11 ลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์ของรา SS 076 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope กำลังขยาย 40x

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 076 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

SS 076_18srRNA	Query cover	Mix ident.
<i>Aspergillus fumigatus</i> gene for 18S rRNA, partial sequence	100%	99%
<i>Aspergillus fumigatus</i> small subunit ribosomal RNA	100%	99%
<i>Aspergillus fumigatus</i> small subunit ribosomal RNA	100%	99%
<i>Aspergillus fumigatus</i> strain UPSC 1771 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	99%
<i>Aspergillus fumigatus</i> strain UPSC 2006 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	99%
<i>Neosartorya fischeri</i> 18S small subunit rRNA gene	100%	98%
<i>Aspergillus fumigatus</i> strain FS160 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<i>Aspergillus</i> sp. FE8 gene for 18S rRNA	100%	98%
<i>Aspergillus fumigatus</i> strain SK1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
<i>Aspergillus clavatus</i> gene for 18S rRNA, partial sequence	100%	98%

## การจัดจำแนกรา SS 078

ลักษณะโคโลนีรารหัส SS 078 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/sw 30 ppt อายุ 7 วัน พบว่ามีลักษณะโคโลนีเทาอมเขียว ค่อนข้างฟู ด้านหลังโคโลนีน้ำตาลอมเหลือง โคโลนีมีขนาด 5.5 เซนติเมตร ไม่สร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (ภาพที่12) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 078 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (97%) กับ *Cochliobolus heterostrophus* (anamorph) และ *Bipolaris acchari* (teleomorph) ดังแสดงในตารางที่ 14 เมื่อพิจารณาลักษณะสัณฐานร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA มีความเป็นไปได้สูง ที่ราสายพันธุ์นี้จะเป็นสปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่เคยมีผู้ใดรายงานหรือจัดเก็บข้อมูลไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยในเบื้องต้นระบุแทกซอนของรา SS 078 เป็น *Cochliobolus* sp./*Bipolaris* sp. (ตารางที่ 14)



ภาพที่ 12 ลักษณะโคโลนีของรา *Cochliobolus* sp./*Bipolaris* sp. SS 078 บนอาหาร PDA/sw 30 ppt; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีอายุ 7 วัน ข: ลักษณะด้านหลังโคโลนีอายุ 7 วัน



ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของรา SS 078

เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

SS 078_ITS	Query cover	MIX ident
<i>Cochliobolus heterostrophus</i> strain BM internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S r RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28Sr RNA gene, partial sequence	100%	97%
<i>Cochliobolusheterostrophus</i> isolate NLF61 18S r RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S rRNA gene, partial sequence	100%	97%
<i>Cochliobolusheterostrophus</i> isolate NLF28 18S r RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S r RNA gene, partial sequence	100%	97%
<i>Cochliobolus heterostrophus</i> isolate NLF07 18S r RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r RNA gene,, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S r RNA gene, partial sequence	100%	97%
<i>Cochliobolusheterostrophus</i> isolate Delhi 18S r RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S r RNA gene, partial sequence	100%	97%
<i>Cochliobolusheterostrophus</i> strain 6028 18S r RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S r RNA gene, partial sequence	100%	97%
<i>Cochliobolusheterostrophus</i> isolate SH01 18S r RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S r RNA gene, partial sequence	100%	97%
<i>Bipolarissacchari</i> gene for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	100%	97%
<i>Cochliobolusheterostrophus</i> strain 1 18S r RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%
<i>Cochliobolusheterostrophus</i> strain BM32 18S r RNA gene,, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S r RNA gene, partial sequence	98%	97%

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า นากเกลือเป็นแหล่งที่สำคัญของรา ที่สามารถนำมาด้านแบคทีเรียแกรมบวก ราร้อยละ 17 สามารถสร้างสารด้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ ราเหล่านี้สามารถผลิตสารนี้ได้เร็วคือพบการยับยั้งจุลินทรีย์ เมื่อใช้เวลาเลี้ยงเพียง 7 วันในอาหารเหลว 30 มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพดีใกล้เคียงหรืออาจดีกว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสกุลมังกุด โดยเมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อรานากเกลือ 100 ไมโครลิตรมาทดสอบการยับยั้ง เปรียบเทียบกับรายงานของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสกุลมังกุด ที่นำอาหารเลี้ยงเชื้อ 80 ไมโครลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในอาหารเหลว 300 มิลลิลิตร มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธีเดียวกัน พบมีอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 18.6 สามารถสร้างสารด้านจุลินทรีย์ก่อโรค *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 90028 ชนิดใดชนิดหนึ่ง (Phongpaichit *et al.*, 2006)

ประสิทธิภาพที่ดีของสารสกัด ยังเห็นได้จากการใช้สารสกัดเพียงความเข้มข้นต่ำ (100 µg/disk) สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้ใกล้เคียงกับ disc ยา gentamycin มาตรฐาน (10 µg/disk) ซึ่งความแตกต่าง 10 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้น่าจะยอมรับได้ เนื่องจากการทดสอบเปรียบเทียบเบื้องต้นประกอบด้วยสารที่สกัดได้เป็นเพียงสารสกัดหยาบ ยังมีสารอื่น ๆ เจือปนอยู่มาก สภาวะที่เลี้ยงและสภาวะที่ใช้ทดสอบเป็นสภาวะที่ใช้กันทั่วไปในเบื้องต้น ยังไม่ได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเจาะจงต่อราสายพันธุ์ที่ผลิตสารยับยั้ง

ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า บางครั้งราชนิดเดียวกัน เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบและเมื่อนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ ผลที่ได้แตกต่างกัน การที่ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัดในการยับยั้งแตกต่างกันมิได้หลายสาเหตุ ก็อาจเนื่องจากความแตกต่างของปริมาณ และความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์ หรือความมีขี้ที่แตกต่างกันของสารออกฤทธิ์ กรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อให้ผลบวกส่วนสารสกัด ethyl acetate ให้ผลลบ อาจเนื่องจาก ethyl acetate เป็นทำละลายที่มีขี้ปานกลาง จึงสามารถดึงสารเฉพาะที่มีขี้ปานกลางออกจากอาหาร แต่ไม่สามารถดึงสารที่มีขี้สูงหรือสารที่มีขี้ต่ำที่ออกฤทธิ์ในอาหารออกมาได้ (Ramos *et al.*, 2006) ในกรณีนี้จึงควรทดลองเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาร ส่วนในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อ

ให้ผลลบ ส่วนสารสกัด ethyl acetate ให้ผลบวก อาจเนื่องจากสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในอาหารเหล่านี้น้อยเกินไป หรืออาจมีสารเจือปนในอาหารที่ยับยั้งการออกฤทธิ์ ดังนั้นหากต้องการคัดกรองราที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ ก่อนนำไปสกัดสาร อาจต้องเปลี่ยนวิธีใหม่คัดกรองใหม่หรือเปลี่ยนชนิดอาหารที่เลี้ยง

ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัด ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC 2592, *B. cereus* TISTR008 และ *B. subtilis* TISTR 121 ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 สอดคล้องกับรายงานของรามาจากหลากหลายแหล่ง มีรายงานว่าสารสกัดจากราที่แยกได้จากปะการังทะเล สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* 20019 และ *S. aureus* ATCC 6538P ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922 (Wang *et al.*, 2011) การที่รามาจากทะเลมีส่วนใหญ่ สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้สันนิษฐานได้ว่า กลไกที่ใช้น่าจะเป็นการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ มีรายงานว่าการที่สารสกัดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ มาจากความแตกต่างของโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Forbes, *et al.*, 2002) แบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Nanninga, 1998) โดยมีเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ รวมถึงมี Periplasmic space กั้นกลางระหว่างชั้นทั้งสอง และยังมีเปปติโดไกลแคนชั้นบางๆ 1-2 ชั้นแทรกอยู่ (Kock, 1998) เยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบจึงมีคุณสมบัติด้านการผ่านของสารได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีเพียงผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นของสารเปปติโดไกลแคนหรือมีวรินที่หนาซ้อนกันหลายชั้น (Reith and Mayer, 2011) และการที่ยีสต์ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดไม่ดีแตกต่างจากแบคทีเรีย อาจเนื่องมาจากผนังเซลล์มีองค์ประกอบแตกต่างกันออกไป คือมีกลูแคนและแมนแนน อย่างไรก็ตามยังไม่ได้ทำการศึกษากลไกอย่างแน่ชัดในการศึกษานี้

การยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดและยีสต์เห็นเป็น turbid zone อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารสกัดไม่เพียงพอที่จะยับยั้งเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ หรืออาจเนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดปรับตัวให้ทนต่อยาได้ (Ahmad, *et al.*, 1950, Cavallito *et al.*, 1945) และในกรณีที่จุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Candida albicans* ATCC 10231 สามารถเจริญรอบ disc สารสกัด ทำให้เห็นเป็น turbid zone อาจเนื่องจากถูกกระตุ้นโดยปัจจัยในสิ่งแวดล้อมหรือจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ (Sadeghi *et al.*, 2008)

การพบว่าราบางชนิด (SS 069 และ SS 076) ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และพบว่า SS 070 SS 078 และ SS 099 เป็นราที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกต่างๆ ได้ดี

รวมถึงค่า MIC ของสารสกัดจากนาเกลือหลายสายพันธุ์ มีค่าค่อนข้างต่ำ คืออยู่ระหว่าง 32-128 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นแนวโน้มว่าหากได้รับการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม และในสภาพที่เป็นสารบริสุทธิ์ น่าจะมีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดี

การศึกษาเบื้องต้นพบว่า ราที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งดี มีค่า MIC ต่ำ หลายสายพันธุ์ ที่คัดเลือก มาจัดจำแนกทางพันธุศาสตร์ โดยวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันของลำดับเบส 18S rRNA gene ไม่สามารถระบุสปีชีส์แน่ชัด เนื่องจากพบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเครื่องหมายนี้ มีความคล้ายคลึงกันสูงมาก ในราแต่ละชนิด สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากยีนดังกล่าวมีลักษณะที่อนุรักษ์สูงมาก ทำให้มีอัตราของการเกิดวิวัฒนาการได้ค่อนข้างช้า ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่า ยีนนี้อาจไม่สามารถให้รายละเอียดของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของราในระดับสปีชีส์หรือระดับจิ้นส์ได้ ซึ่งในการจัดจำแนกรายในระดับสปีชีส์โดยวิธีนี้ มีความจำเป็นต้องอาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน หรือโมเลกุลดีเอ็นเอ เครื่องหมายอื่น ๆ ที่มีอัตราของการเกิดวิวัฒนาการที่เร็วกว่ายีน 18S rRNA เช่น ITS (internal transcribed spacer) หรือ ยีนที่นำรหัส elongation factor เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง SS 078 ซึ่งมีแนวโน้มสูงว่าน่าจะเป็น ราสปีชีส์ใหม่

การสร้างสารออกฤทธิ์กว้างของ *Aspergillus* SS 069 และ SS 076 ในการศึกษาที่สอดคล้องกับ Abdullah and Zafrul (2010) ที่รายงานว่า *Aspergillus* sp. เป็นแหล่งของสารต้านจุลินทรีย์ โดยสารสกัดเอธิลอะซิเตท จาก *Aspergillus* แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกคือ *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Sarcina lutea* และ *S. aureus* และยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด รวมทั้ง *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *Salmonella* ที่นำมาทดสอบ อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษา *Aspergillus* ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ ส่วนใหญ่แยกได้จากดิน (Dix and Webster, 1995; Klich, 2002; Thompson *et al.*, 1994) ดังนั้นหาก SS 069 และ SS 076 เป็น *Aspergillus* สปีชีส์ใหม่ที่พบในระบบนิเวศน์ที่แตกต่างไป ก็มีแนวโน้มที่จะให้สารต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ

เป็นที่น่าสังเกตว่า SS 070 SS 078 และ SS 099 ซึ่งต่างก็เป็นราที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกต่างๆได้ดี เป็นราในแท็กซอนเดียวกันคือ *Bipolaris/Cochliobolus* แต่ทั้งหมดไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ใดๆ ซึ่งอาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมในนาเกลืออาจรุนแรงเกินไป อย่างไรก็ตาม การที่รานี้สามารถปรับตัวให้เจริญได้ในนาเกลือ และมีค่า MIC ต่อแบคทีเรียแกรมบวกต่ำ ซึ่งให้เห็นว่ารานี้ในสกุลนี้น่าจะมี

แนวโน้มที่จะให้สารต้านจุลชีพชนิดใหม่ ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพ และน่าจะเป็นสารคนละประเภทกับสารที่สร้างจาก *Aspergillus* SS 069 และ *A. fumigatus* SS 076 ซึ่งออกฤทธิ์กว้างกว่าจากการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า *Bipolaris/Cochliobolus* สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้หลากหลาย เช่น phytotoxin, silvernano particles, antioxidant, anti MRSA (Nakajima , 1998; Saha *et al.*, 2010; Arunpanichlert *et al.*, 2012)

## บรรณานุกรม

- การทำนาเกลือ. (ม.ป.ป.). ใน *คลังปัญญาไทย*. วันที่ค้นข้อมูล 1 พฤศจิกายน 2554, เข้าถึงได้จาก  
<http://www.panyathai.or.th/wiki/index.php/การทำนาเกลือ>
- การทำนาเกลือ. (2553). ใน *ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล*, วันที่ค้นข้อมูล 1 มีนาคม 2555, เข้าถึงได้จาก  
<http://www.mkh.in.th/index.php/2010-03-22-18-05-14/2010-03-26-05-53-43>
- นุกูล อินทระสังขา. (2551). *วิทยาเชื้อรา*. สงขลา: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- สุบัตินิต นิมรัตน์. (2551). *ตำราวิชาการจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม วงศ์ไมโครคอคเคซีอีและสเตรปโตคอคเคซีอี*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อภิรดี ปิณฑนภากย์. (2554). การถ่ายทอดยีนโดยกระบวนการคอนจูเกชันในแบคทีเรียแกรมลบ. ใน *วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด (บรรณาธิการ). หนังสือชุดเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคด้านจุลชีววิทยาชีวเคมี และพันธุวิศวกรรม*. (หน้า 156-162). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.
- <http://www.mkh.in.th/index.php/2010-03-22-18-05-14/2010-03-26-05-53-43>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (National Center for Biotechnology Information).
- Abdullah, H., and Zafrul, A.T.M. (2010). In vitro antibacterial, cytotoxic and free radical scavenging activities of an *Aspergillus* species. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*. 13, 47-50.
- Ahmad, K., Scheneider, H. A., and Strong, F. M. (1950). Studies on the biological action of antimycin. *Architecture Biochemistry*. 28, 281-294.
- Arunpanichlert, J., Rukachaisirikul, V., Tadpetch, K., Phongpaichit, S., Hutadilok-Towatana, N., Supaphon, O., and Sakayaroj, J. (2012). A dimeric chromanone and a phthalide: Metabolites from the seagrass-derived fungus *Bipolaris* sp. PSU-ES64. *Phytochemistry Letters*. 5, 604–608.
- Atkins, S.D., and Clark, I.M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics*. 45. 3–15.
- Barnett, H. L., and Hunter, B. B. (2006). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4<sup>th</sup> ed.), St. Paul Minnesota, The APS Press.

- Behal, V. (2003). Alternative sources of biologically active substances. *Folia Microbiologica*. 48, 563-571.
- Bernan, V.S., Greenstein, M., and Maise, W.M. (1997). Marine microorganisms as a source of new natural products. *Advance in Applied Microbiology*. 43, 57-90.
- Brock, T.D. (1979). Ecology of saline lake. In M. Shilo (Eds.), *Strategies of microbial life in extreme environment*. (pp. 29-49). Berlin, Dahlem Knferenzen.
- Buchalo, A. S., Nevo, E., Wasser, S. P., Oren, A., and Molitoris, H. P. (1998). Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea first records. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*. 265, 1461-1465.
- Cantrell, S. A., Casillas-Martinez, L., and Molina, M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological Research*. 110, 962–970.
- Cantrell, S.A., Dianese, J.C., Fell, J., Gunde-Cimerman, N., and Zalar, P. (2011). Unusal fungal niches. *Mycologia*. 103, 1161-1174.
- Cavallito, C. J., Bailey, J. H., Haskell, T. H., McComick, J. R., and Warner, W. F. (1945). The inactivation of antibacterial agents and their mechanism of action. *Journal of Bacteriology*. 50, 61-69.
- Chatchawan, T., Peerapornpisal, Y., and Komarek, J. (2011). Diversity of cyanobacteria in man-made solar saltern, Petchaburi Province, Thailand. *Fottea*. 11, 203–214.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002). Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard-Second Edition. *CLSI document M27-A2*. Pennsylvania, CLSI.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2004). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: Approved Guideline, M44-A- First Edition. *CLSI document M44-A*. Pennsylvania, CLSI.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-Seven Edition. *CLSI document M7-A7*. Pennsylvania, CLSI.
- Dassarma S., and Arora, P. (2001). Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1, 1.
- Dix, N. J., and Webster, J. (1995). *Fungal Ecology*. London, Chapman & Hall.
- Frisvad, J. C., and Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology*. 49, 1-173.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., and Weissfeld, A. S. (2002). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Missouri, Elsevier Science.
- Greetchen, M.D. (2006). Fungal diversity present at a hypersaline environment in Cabo Rojo, Puerto Rico determine by characterization of isolates and analysis of environmental rRNA genes clones libraries. Thesis Master of Science in Biology. University of Puerto Rico Mayaguez Campus. Puerto Rico.
- Grishkan, I., Nevo, E., and Wasser, S.P. (2003). Soil Micromycete diversity in the hypersaline Dead Sea coastal area, Israel. *Mycological Progress*. 2, 19-28.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., De Hoog, S., and Plemenitas, A. (2000). Hypersaline waters in salterns natural ecological niches for halophilic black yeasts. *Federation of European Materials Societies Microbiology Ecology*. 32, 235–240.
- Gunde-Cimerman, N., Frisvad, J. C., Zalar, P., and Plemenitas, A. (2005). Halotolerant and halophilic fungi. In: S.K. Deshmukh and M.K. Rai (Eds.), *The biodiversity of fungi: Their role in human life*. (pp. 69-127). New Delhi, Oxford and IBH Publishing Cp Pvt. Ltd.
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., and Plemenita, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*. 113, 1231-1241.
- Hyde, K. D. (2001). Increasing the likelihood of novel compound discovery from filamentous fungi.



- In S. B. Pointing & K. D. Hyde (Eds.), *Fungal Diversity Research Series 6*, (pp.77-91). Hong Kong, Fungal Diversity Press.
- Ireland, C. M., Roll, D. M., Molinski, T. F., McKee, T. C., Zabriskie, T. M., and Swersey, J. C. (1988). Uniqueness of the marine chemical environment, categories of marine natural products from invertebrates. *Biomedical Important of Marine Organism*. 13, 1-43.
- Ireland, C. M., Copp, B. R., Foster, M. P., McDonald, L. A., Radisky, D. C., and Swersey, J. C. (1993). Biomedical importance of marine natural products, In D. H. Attaway and O. R. Zaborsky (Eds.), *Marine Biotechnology*. (pp. 1-43). New York, Plenum Press.
- Joklik, W.K., Willett, H.P., Amos, B., and Wilfert, C.M. (1988). *Zinsser Microbiology*. Sydney, Prentice-Hall International.
- Klich, M. A. (2002). Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*. 94, 21-27.
- Kobayashi, J., and Ishibashi, M. (1993). Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Cheminform*. 93, 1753-1769.
- Kock, N. (1998). Can communication medium limitation foster better group outcome: an action research study. *Information & Management*. 34, 295-305.
- Kurtboke, I., and Swings, J. (2004). Microbial genetic resources and biodiscovery. Australia, Queensland Complete Printing Services.
- Lu, Z.Y., Wang, W.L., Tao, H.W., Zhu, T.J., Fang, Y.C., Gu, Q.Q., and Zhu, M. (2008). Citrinin dimers from the halotolerant fungus *Penicillium citrinum* B-57. *Journal of Natural Products*. 71, 543-546.
- Margesin, R., and Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 5, 73-83.
- Mavor, A. L., Thewes, S., and Hube, B. (2005). Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current Drug Targets*. 6, 863-874.
- Nakajima, H. (1998). Structures and biosyntheses of phytotoxins in *Cochliobolus spicifer* and *Bipolaris*

*sorokiniana*: C<sub>3</sub> unit addition reaction in phytotoxin biosyntheses. *Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Disease, Series: Developments in Plant Pathology*. 13, 71-79.

Nanninga, N. (1988). Growth and form in microorganisms: morphogenesis of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*. 34, 381-389.

Nayak, S.S., Gonsalve, V., and Nazareth, S.W. (2012). Isolation and salt tolerance of halophilic fungi from mangroves and solar saltern in Gao-India. *India Journal of Geo-Marine Science*. 42, 164-172.

Odds, F. C., Gow, N.A.R., and Brown A.J.P. (2006). Toward a molecular understanding of *Candida albicans* virulence. In J., Heitman, S. G., Filler, J. E. Jr., Edwards and A. P., Mitchell, (Eds.), *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis*. (pp. 305–319). Washington DC, APS Press.

Phongpaichit, S., Nikom, J., Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., Hutadilok-Towatana, N., Rukachaisirikul, V., and Kirtikara, K. (2007). Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. *Federation of European Microbiological Societies Immunology Medical Microbiology*. 51, 517-525.

Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V., and Sakayaroj J. (2006). Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology*. 48, 367-372.

Ravindran, C., Naveenan, T., Varatharajan, G. R., Rajasabapathy, R., Vijayakanth, S., Kumar, A.H., and Meena R. M. (2012). A role for antioxidants in acclimation of marine derived pathogenic fungus (NIOCC 1) to salt stress. *Microbial Pathogenesis*. 53, 168-179.

Reith, J., and Mayer, C. (2011). Peptidoglycan turnover and recycling in gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 92, 1-11.

Repentigny, L. D. (2010). Serodiagnosis of *Candidiasis*, *Aspergillosis*, and *Cryptococcosis*. *Oxford Journals*. 14, 11-22.

Romos, M. V., Bandeira, G. P., Freitas, C. D. T., Nogueira, N. A. P., Alencar N. M. N., Sousa, A. S., and Carvalho, A. F. U. (2006). Latex constituents from *Calotropis procera* (R.Br.) display toxicity upon

- egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101, 503-510.
- Ronsberg, D., Debbab, A., Mandi, A., Wray, V., Dai, H., Kurtan, T., Proksch, P., and Aly, A. H. (2013). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*. *Tetrahedron Letters*. 54, 3256-3259.
- Sadeghi, A. M. M., Dorkoosh, F. A., Avadi, M. R., Saadat, P., Rafiee-Tehrani, M., and Junginger, H. E. (2008). Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. *International Journal of Pharmaceutics*. 355, 299-306.
- Saha, S., Sarkar, J., Chattopadhyay, D., Patra, S., Chakraborty, A., and Acharya, K. (2010). Production of silver nanoparticles by a phytopathogenic fungus *Bipolaris nodulosa* and its antimicrobial activity. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 5, 887-895.
- Thompson, L., Castrillon, M. A., Delgado, M., and Garcia, M. (1994). Isolation of several species of the genus *Aspergillus* from soil of intrahospital ornamental plants. *Revista Medica de Chile*. 122, 1367-1371.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itavaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresour and Technology*. 72, 169-183.
- Walsh, F. M., and Amyes, S. G. B. (2004). Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Microbiology*. 7, 439-444.
- Wang, Y. N., Shao, C. L., Zheng, C. J., Chen, Y. Y., and Wang, C. Y. (2011). Diversity and antibacterial activities of fungi derived from the Gorgonian *Echinogorgia rebekka* from the South China Sea. *Marine Drugs*. 9, 1379-1390.

White T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. (1990). *PCR Protocols: A guide to methods and applications: applications: and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. New York, Academic Press.