อภินันทนาการ สัญญาเลขที่ R2557B003

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย เรื่อง ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะม่วงป่า

(Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Mangifera caloneura*)

ผู้วิจัย สังกัดคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

นางอุรัตน์ พิมลศรี

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 28 ก.พ. 2565
เลขทะเบียน 1049054
เลขเรียกหนังสือ ว QK 604 .2 .E53 อ85นร 2563

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะม่วงป่า
(Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Mangifera caloneura*)

ผู้รับผิดชอบ นางอุรัตน์ พิมลศรี สัดส่วนที่ทำการวิจัย 100 %

สถานที่ติดต่อ

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก
โทรศัพท์ : 055-964624 โทรสาร : 055-964470

งบประมาณที่ได้รับอนุมัติ

150,000 บาท (หนึ่งแสนห้าหมื่นบาทถ้วน)

ระยะเวลาดำเนินงาน

1 ตุลาคม 2556 – 30 กันยายน 2559)

สถานที่ดำเนินงานวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ โครงการกองทุนวิจัยเงินรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2557 เป็นอย่างสูง ที่ได้มอบโอกาสในการเพิ่มประสบการณ์ในการทำงานวิจัย และให้การสนับสนุนงบประมาณดังกล่าวนี้ และ ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านของภาควิชาฯ ที่ได้อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆสำหรับทำงานวิจัยนี้

นางอุรัตน์ พิมลศรี

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ราเอนโดไฟต์จำนวน 275 ไอโซเลต แยกได้จากใบและกิ่งของมะม่วงป่าในพื้นที่ตำบลบางระกำ อำเภอบางระกำ และตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก และจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ในลำดับจีนัส ได้แก่ *Colletotrichum* sp.(12.73%), *Fusarium* sp. (10.55%), *Phomopsis* sp.(3.28%), *Phoma* sp. (1.09%), *Alternaira* sp. (4.73%), *Curvularia* sp.(4.37%), *Helminthospora* sp.(2.91%), *Xylaria* sp.(8.37%), *Penicilium* sp. (3.64%), Mycelis sterilia (9.09%), *Bipolaris* sp.(2.55%), *Pestalotiopsis* sp.(3.64%), *Trichoderma* sp.(5.46%), *Aspergillus* sp. (6.19%), *Paecilomyces* sp.(4.00%), *Sclerotium* sp. (2.19%) และ Unidentified (15.28%) จากนั้นนำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Malt extract broth(MEB) นำส่วนน้ำเลี้ยงมาทดสอบฤทธิ์ต้าน *Bacillus cereus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Shigella flexneri, Vibrio cholerae, Candida albicans* และ *Colletotrichum* sp. ด้วยวิธี paper disc agar diffusion พบว่าน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบได้มากกว่าหรือเท่ากับ 4 ชนิด และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone มากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร จำนวน 22 ไอโซเลต และ *Fusarium* sp. 1MCB-L10 แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด จึงได้นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 วัน แล้วกรองแยกส่วนของน้ำเลี้ยงมาสกัดด้วย methanol และ ethyl acetate นำสารสกัดหยาบทั้งสองส่วนมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Paper disc agar diffusion และตรวจหาค่า minimum inhibitory concentration(MIC), minimum bactericidal concentration(MBC) และ minimum fungicidal concentration (MFC) ต่อเชื้อทดสอบ *E.coli* และ *C. albicans* พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol แสดงผลการออกฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethyl acetate นอกจากนี้ยังตรวจพบสารพฤกษเคมีบางชนิดทั้งในใบมะม่วงป่าและสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะม่วงป่าเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์อาจนำไปใช้ในทางการแพทย์หรือทางการเกษตรต่อไปได้

คำสำคัญ : ราเอนโดไฟต์ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา มะม่วงป่า

Abstract

Two hundred and seventy-five isolates of endophytic fungi isolated from leaf and antinode of *Mangifera caloneura* in the area of Tumbol Bangrakhum, Bangrakum district and Tumbol Tapo, Maung district, Phitsanulok province were isolated and also identified by morphological characteristics. Those fungal endophytes were identified belong to *Colletotrichum* sp. (12.73%), *Fusarium* sp. (10.55%), *Phomopsis* sp. (3.28%), *Phoma* sp. (1.09%), *Alternaria* sp. (4.73%), *Curvularia* sp. (4.37%), *Helminthospora* sp. (2.91%), *Xylaria* sp. (8.37%), *Penicillium* sp. (3.64%), Mycelia Sterilia (9.09%), *Bipolaris* sp. (2.55%), *Pestalotiopsis* sp. (3.64%), *Trichoderma* sp. (5.46 %), *Aspergillus* sp. (6.19%), *Paecilomyces* sp. (4.00%), *Sclerotium* sp. (2.19%) and Unidentified (15.28%). All endophytic fungal isolates were screened for potential production of bioactive metabolites. They were tested for antimicrobial activity against pathogenic microorganisms such as *Bacillus cereus, Escherichia coli, Staphylococus aureus, Shigella flexneri, Vibrio cholerae, Candida albicans* and *Colletotrichum* sp. The malt extract broth (MEB) was used as fermentation medium. The supernatants of 10 days fermentation were checked the antimicrobial activity against the test organisms as mention by using paper disc agar diffusion method. The amount of 22 antimicrobial compound producing isolates which showed inhibitory effect on the growth ≥ 4 of the test organisms and the diameter of the inhibition zone greater than or equal to 10 millimeter (mm). The isolate *Fusarium* sp. 1MCB-L10 showed the highest antimicrobial activity spectrum and then selected for culturing into 200 milliliter (ml) of MEB as fermentation media for 15 days. The filtrate was extracted with methanol and ethyl acetate. Both crude extracts were tested for antimicrobial activity against against *E. coli* and *C. albicans* by using paper disc agar diffusion method and also determined minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC). It was found that the methanolic extract showed a better inhibition to the test organisms than the ethyl acetate extract. In addition, some phytochemicals were detected in both wildmango leaves and crude extract of isolated endophytic fungus. These results indicated that endophytic fungi from wild mango is a potential source of bioactive compounds that may useful in medicine or agriculture.

Keywords : Endophytic fungi, Antibacterial activity, Antifungal activity, *Mangifera caloneura*

คำย่อ

°ซ	=	องศาเซลเซียส
ซม.	=	เซนติเมตร
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
ชม.	=	ชั่วโมง
ATCC	=	American type culture collection
DMST	=	Culture Collection for Medical Microorganism Department of Medical Sciences Thailand
EtOAc	=	ethyacetate
g	=	กรัม
MIC	=	Minimum inhibitory concentration
MBC	=	Minimum bactericidal concentration
µg	=	ไมโครกรัม
mg/ml	=	milligram/milliter
µg/ml	=	microgram/mililiter
ml	=	มิลลิลิตร
µl	=	ไมโครลิตร
mm	=	มิลลิเมตร
ϕ	=	Diameter
MHA	=	Mueller Hilton Agar
PDA	=	Potato Dextrose Agar
MEA	=	Malt Extract Agar
MHB	=	Mueller Hilton Broth
PDB	=	Potato Dextrose Broth
MEB	=	Malt Extract Broth

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
คำย่อ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย	19
บทที่ 5 อภิปรายผล และสรุปผลการวิจัย	26
ข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	30
ประโยชน์ที่ได้รับ	35
ภาคผนวก	
ก. Triple Surface Sterilization	36
ข. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	36
ค. ผลงานวิจัยที่นำไปเผยแพร่	38

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.	รายชื่อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ จำแนกชนิดโดยใช้ Phylogeny analysis (Maheshwari R. et al.,2017)	9
ตารางที่ 2.	แสดงจำนวนไอโซเลตของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกิ่งและใบของมะม่วงป่าในเขตตำบลบางระกำ อำเภอบางระกำ และตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก	19
ตารางที่ 3.	แสดงรายชื่อจีนัสของราเอนไฟต์ที่จำแนกชนิดได้ จำนวนไอโซเลต และเปอร์เซ็นต์ของแต่ละจีนัสจากจำนวนทั้งหมดที่แยกได้	20
ตารางที่ 4.	น้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลตที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบได้ $\geq$ 4 ชนิด และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ inhibition zone $\geq$ 10 มิลลิเมตร	22
ตารางที่ 5.	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบสกัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Fusarium* sp. 1MCB-L10	23
ตารางที่ 6.	แสดงค่า MIC ,MBC และ MFC ของ MEOH Crude extract และ EtOAc crude extract จาก การเพาะเลี้ยง *Fusarium* sp. 1MCB-L10 ต่อ *E. coli* และ *C. albicans*	24
ตารางที่ 7.	แสดงผลทดสอบทางคุณภาพสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงป่าและราเอนโดไฟต์	25

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1. มะม่วงป่าที่เจริญในพื้นที่ตำบลบางระกำ อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก 5

รูปที่ 2. แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ 7

รูปที่ 3. แสดงเส้นใย(ลูกศรชี้)ของราเอนโดไฟต์ *Neotyphodium coenophialum* ที่เจริญแทรกอยู่ระหว่าง epidermal cells ของ tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) ย้อมด้วย analine blue (40×). 8

รูปที่ 4. การจำแนกเชื้อราเอนโดไฟต์และการดำรงอยู่ในเซลล์พืช 8

รูปที่ 5. แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อราบางจีนัสที่แยกได้จากมะม่วงป่า 21
(ก : *Fusarium* sp., ข : *Penicllium* sp., ค : *Paecilomyces* sp., ง : *Aspergillus* sp., จ : *Curvularia* sp., และ ฉ : *Alternaria* sp.)

รูปที่ 6. แสดงลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของ *Fusarium* sp. 1MCB-L10 ที่แยกได้จากใบมะม่วงป่า 24

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อแบคทีเรีย และโรคติดเชื้อรา ยีสต์แคนดิดา(*Candida* spp.) มีผลคุกคามมากขึ้นต่อสุขภาพของคนไทยได้ทุกเพศทุกวัยในสภาพปัจจุบัน และเชื้อสาเหตุของโรคต่างๆก็เกิดการดื้อยาเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นการวิจัยเกี่ยวกับการค้นหาสารต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ ที่มีสมบัติในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุก่อโรค และมีพิษน้อยที่สุดต่อมนุษย์ จึงเป็นความสำคัญและท้าทายของนักวิจัยที่ได้มีโอกาสในการได้ทำวิจัย ในปัจจุบันยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่นำมาใช้ในการรักษาโรค ได้แก่ penicillin, griseofulvin ผลิตได้จากเชื้อรา *Penicillium* spp. และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่นๆ เช่น lovastatin ซึ่งใช้เป็นยาลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด ยากดภูมิคุ้มกัน cyclosporine A ผลิตได้จากเชื้อรา *Trichoderma polysporum* เป็นต้น และได้ยังมีการศึกษาค้นคว้าหา secondary metabolites ชนิดใหม่ๆที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อราอย่างต่อเนื่อง เช่น การค้นพบ zaragozic acid, viridiofungins, fusidienol เป็นต้น นอกจากนี้ยังเชื่อกันว่าเชื้อราที่เจริญในแหล่งพิเศษมักสร้าง secondary metabolites ชนิดใหม่ๆได้ ดังนั้นการศึกษาเพื่อทำการแยกเชื้อราจากแหล่งอาศัยแหล่งใหม่ๆ จึงเป็นไปได้สูงที่จะแยกได้เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ และ/หรือ เชื้อราที่สร้างสาร secondary metabolites ชนิดใหม่ที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Deacon J.W.,1997, KingstonD.G., 1996, Haung et. al., 1995 และ Charles et.al., 2000)

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น มีชนิดของพันธุ์พืชมากมายหลายชนิดที่มีศักยภาพและน่าสนใจในการนำมาศึกษาทำการแยกหาชนิดของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ และ/หรือ เชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างสาร secondary metabolites ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi) เป็นเชื้อรากลุ่มหนึ่งที่เจริญอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ในส่วนต่างๆของพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรค จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา ได้ทำการแยกราเอนโดไฟต์ได้ในพืชหลายชนิด ได้แก่ หญ้า ต้นไม้ยืนต้น พืชล้มลุก พืชไม้พุ่ม ชนิดต่างๆ และยังพบว่า ราเอนโดไฟต์ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีลักษณะเหมือน หรือคล้ายกันกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ในพืชที่มีราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้เหล่านี้ ยังมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ ทางการเกษตร และการควบคุมจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆได้ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ราเอนโดไฟต์สามารถผลิตได้ ตัวอย่างเช่น สารในกลุ่ม alkaloids, flavonoids, phenols, phenolic acid และ peptide ข้อมูลต่าง ๆเหล่านี้ ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในพืชในเขตหนาว และอบอุ่น ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อน มีความชื้นสูง จะเห็นได้ว่า ต้นไม้บ้านเรามีความหลากหลายทางชีวภาพมาก และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสรรพคุณในการนำมาใช้ในด้านต่างๆและนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมาย เช่น ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อใน

คนชนิดต่างๆ ควบคุมเชื้อสาเหตุก่อโรคในพืชได้ เป็นต้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการแยกราเอนโดไฟต์จากมะม่วงป่า ซึ่งเป็นพืชที่มีอายุยาวนานนับเป็นสิบๆปี ทนต่อสิ่งแวดล้อม มีความต้านทานต่อศัตรูพวกแมลง วัชพืช และเชื้อราก่อโรคได้ และนำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงเพื่อคัดเลือกหาสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านเชื้อรา- ยีสต์ ซึ่งเชื้อยีสต์ *Candida* เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อราบริเวณเยื่อบุในช่องปาก อวัยวะเพศ ผิวหนัง เล็บมือ เล็บเท้า ในคนปกติ และผู้ป่วยที่มีความบกพร่องทางระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคเอดส์ ผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวาน มะเร็ง และอื่นๆ เป็นต้น (กัญยา และคณะ 2547)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกและจำแนกชนิดราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะม่วงป่า
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และ หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้ง/ฆ่าเชื้อทดสอบ
4. เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากราเอนไฟต์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เชื้อราที่เจริญในแหล่งอาศัยพิเศษมักสร้าง secondary metabolites ชนิดใหม่ๆได้ ดังนั้น การศึกษาการแยกเชื้อราจากแหล่งอาศัยแหล่งใหม่ๆ จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะแยกได้เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ และ/หรือ เชื้อราสามารถสร้างสาร secondary metabolites ชนิดใหม่ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีลักษณะเหมือน หรือคล้ายกันกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตในพืชที่ราเอนโดไฟต์ใช้เป็นแหล่งอาศัย พืชชนิดต่างๆจึงเป็นแหล่งสำคัญอย่างหนึ่งที่น่าสนใจ โดยเฉพาะกลุ่มราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi) ซึ่งเป็นเชื้อรากลุ่มหนึ่งที่เจริญอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ ในส่วนต่างๆของพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรค และเอื้อต่อการดำรงชีวิตของพืชได้เป็นอย่างดี จึงได้นำมะม่วงป่ามาทำการแยกหาเชื้อราเอนโดไฟต์ ที่คาดหวังว่ามีโอกาสได้เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ๆ และ/หรือ ได้เชื้อราที่สร้างสาร secondary metabolites ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้

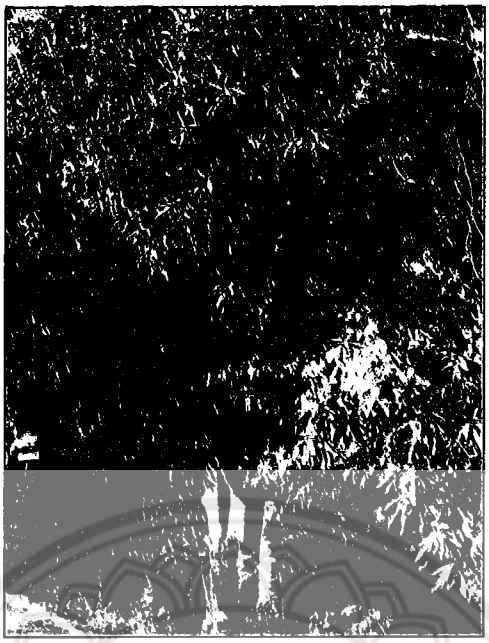
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

โรคติดเชื้อ เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อหรือพิษของเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง ที่อาจเกิดจากการถ่ายทอดจากคนสู่คน จากสัตว์หรือแมลงสู่คนหรือจากการติดเชื้อโรคโดยตรงและผ่านพาหะ เชื้อเหล่านี้ได้แก่ เชื้อไวรัส เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา เป็นต้น สามารถพบได้ในคนทุกเพศทุกวัย เชื้อสาเหตุของโรคบางชนิดเกิดการดื้อยา ทำให้ก่อปัญหาในการรักษาอย่างมากมาย จึงจำเป็นที่จะต้องแสวงหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ มาใช้ทดแทนยาชนิดเดิมที่ใช้ในการรักษาแล้วไม่ได้ผล (นงนุช, 2540) การระบาดของโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยๆ ได้แก่ โรคบิดไม่มีตัว (Shigellosis) พบได้ทั่วโลกประมาณ 2 ใน 3 ของผู้ป่วยทั้งหมด เชื้อแบคทีเรียสาเหตุ คือ *Shigella* spp. การระบาดของโรคเกิดขึ้นได้บ่อยในแหล่งที่เป็นชุมชนแออัด และประชาชนมีสุขอนามัยส่วนบุคคลไม่ดี โรคบิดชนิดนี้ พบว่า เป็นโรคประจำถิ่นในเขตภูมิอากาศร้อนและเขตอบอุ่น (www.thaigcd.ddc.moph.go.th) โรคอหิวาตกโรค เป็นโรคติดต่อจากการรับประทานอาหารและน้ำที่ปนเปื้อน *Vibrio cholerae* โรคชนิดนี้เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยที่มีผลกระทบต่อภาพลักษณ์ของการท่องเที่ยว และการส่งออกอาหาร อหิวาตกโรคเป็นโรคติดต่อที่ต้องมีการควบคุมป้องกัน เพราะมีแนวโน้มแพร่ระบาดข้ามประเทศได้ ซึ่งต้องแจ้งต่อองค์การอนามัยโลกภายใน 24 ชั่วโมง ตามกฎอนามัยระหว่างประเทศ พ.ศ. 2548 ทำให้เกิดกระเพาะหรือลำไส้อักเสบ เข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทานอาหาร แล้วเชื้อจะเข้าไปเกาะอยู่บริเวณลำไส้เล็กและสร้างสารพิษ (Cholera toxin) กระตุ้นให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง ถ้าไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงทีอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ (http://nih.dmsc.moph.go.th/fsheet/showimgpic.php?id=43) โรคอาหารเป็นพิษ (Food poisoning) สาเหตุเกิดจาก *Bacillus cereus* หรือ *Staphylococcus aureus* ได้ โดยร่างกายได้รับ

สารพิษ (Intoxication) ที่แบคทีเรียเหล่านี้สร้างขึ้นในอาหารก่อนที่จะบริโภคเข้าไป สารพิษชนิดนี้ทนต่ออุณหภูมิสูง และทนความเป็นกรดในกระเพาะได้ดี มักทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการคลื่นไส้และอาเจียน (http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1116)

Candidiasis เป็นโรคติดเชื้อยีสต์ ส่วนใหญ่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพกับบริเวณเยื่อเมือก (Mucocutaneous membrane) ในส่วนต่างๆของร่างกาย ได้แก่ ในช่องปาก เกิดลักษณะเป็นปื้นฝ้าขาวๆ มีสาเหตุมาจากยีสต์ *Candida* spp. สำหรับตัวที่ทำให้เกิดการติดเชื้อได้บ่อยมากที่สุด คือ *C. albicans* และมีแนวโน้มจะเพิ่มอัตราการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำ *Candida* สามารถเจริญแข่งขันชนะเชื้อประจำถิ่นได้ ปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของยีสต์ชนิดนี้ในร่างกาย ได้แก่ การใช้ยากลุ่ม corticosteroids สภาวะการเป็นโรคเบาหวาน การใช้ยาที่มีผลต่อการไหลของน้ำลาย การรักษามะเร็งด้วยรังสีบำบัดหรือเคมีบำบัด ภาวะขาดสารอาหาร ได้แก่ ขาดธาตุเหล็ก สังกะสี วิตามินบี 12 และ โฟเลต การรับประทานยาคุมกำเนิดเพื่อให้มีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนสูง สตรีตั้งครรภ์ สุขอนามัยช่องปากไม่ดี การสูบบุหรี่ ภาวะเครียด และการใช้ยา antihistamine เป็นต้น นอกจากนี้โรคติดเชื้อที่มักระบาดในประเทศไทยยังมีอีกมากเช่น อหิวาตกโรค[5] นอกจากนี้ ยังมีโรคที่ทำให้เกิดโรคในพืช ผักเศรษฐกิจชนิดต่างๆ ซึ่งทำความเสียหายทางเศรษฐกิจ ทำให้รายได้ของเกษตรกรลดลง ได้แก่ โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) มีเชื้อราสาเหตุของโรค ได้แก่ *Colletotrichum* spp. โดยเฉพาะมักทำให้เกิดโรคชนิดนี้กับมะม่วงทุกๆสายพันธุ์ โดยเชื้อสาเหตุจะเข้าทำลายที่ช่อดอก ทำให้ช่อดอกแห้ง ดอกร่วง และช่อที่ติดผลอ่อนรวมทั้งผลแก่จะมีแผลเน่าดำ ในสภาพอากาศที่มีความชื้นสูง จะสร้างสปอร์สีชมพูเกิดขึ้นตามบริเวณแผลที่เป็นโรค (http://guru.google.co.th/guru/thread?tid=334b4b5b2d9800e8)

มะม่วงป่า มีชื่อพื้นบ้านเรียกว่า มะม่วงพรวน มะม่วงเทพรส มะม่วงกะล่อน (*Mangifera caloneura*) จัดอยู่ในวงศ์ Anacardiaceae (รูปที่ 1.) เป็นต้นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูงประมาณ 15-30 เมตร พบได้ในป่าผลัดใบ ป่าดงดิบชื้น ป่าดงดิบแล้งทั่วไป และป่าเบญจพรรณหรือตามที่ชุ่มชื้นทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงใต้ ที่สูงจากระดับน้ำทะเล 50 - 300 เมตร



รูปที่ 1. มะม่วงป่าที่เจริญในพื้นที่ตำบลบางระกำ อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก

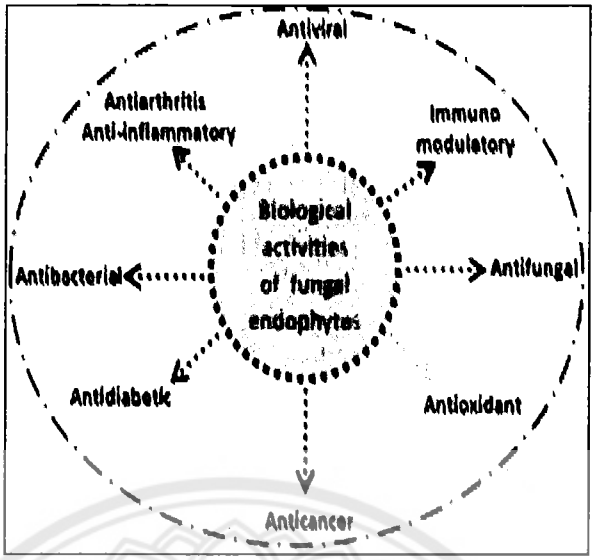
มะม่วงป่า มักมีต้นขนาดใหญ่เจริญอยู่ตามธรรมชาติได้เอง มีอายุยืนนานทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ส่วนของใบ และผล ไม่ถูกรบกวนจากแมลงศัตรู หรือเชื้อก่อโรคบางชนิดเลย เมื่อเปรียบเทียบกับมะม่วงเศรษฐกิจชนิดพันธุ์ต่างๆ ที่เรานำผลมารับประทานแล้ว ซึ่งต้องมีขั้นตอนการดูแลรักษาในระยะการเจริญต่างๆมากมายในระหว่างการเพาะปลูก เช่น ใส่ปุ๋ย รดน้ำ บำรุงรักษาต้นมะม่วง การกำจัดวัชพืช ใช้สารกำจัดเชื้อราที่ทำให้ผลเน่าเสีย และการกำจัดปราบศัตรูพืช เช่น เพลี้ยจั๊กจั่น แมลงวันทอง หรือ เป็นต้น (http://clgc.rdi.ku.ac.th/index.php/rs/fruit/132-manaifera) นอกจากนี้มะม่วงป่า ยังมีสารพฤกษเคมี (Phytochemicals)หลายชนิด ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินซี กรดฟีโนลิก (Phenolic acid) กรดเอลลาจิก (Ellagic acid) และสารแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ที่ช่วยช่วยในการลดความเสี่ยงจากโรคหัวใจและมะเร็ง ช่วยสร้างเสริมภูมิคุ้มกันและการทำงานของระบบประสาท ชะลอการเกิดกระที่ผิวหนัง นอกจากนี้ยังมีสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต เส้นใย โปรตีน แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก วิตามินเอ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ไนอาซิน วิตามินซี และเบต้าแคโรทีน ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ของมะม่วงป่าคือ เนื้อในเมล็ดและเปลือกต้นของมะม่วงป่า มีสารพวกแทนนิน มีสรรพคุณในการแก้ท้องร่วง แก้บิด แก้อาเจียน ผลอ่อน มีวิตามินซี ป้องกันโรคเลือดออกตามไรฟัน ผลสุก มีสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันโรคมะเร็ง และช่วยต้านความชรา (http://www.dailynews.co.th/agriculture/171652)

ส่วนข้อมูลทางพฤกษเคมี(Phytochemistry)ของมะม่วง (*Mangifera* spp.) โดยทั่วไปพบว่า มีสารพฤกษเคมีบางชนิดที่สกัดแยกได้จากส่วนกิ่งของมะม่วงอยู่บ้าง ได้แก่ benzenoids, triterpenes, coumarins, steroids, flavonoids, xanthones, flavonols, sesquiterpenes และ monoterpenes เป็นต้น นอกจากนี้ จากรายงานการแยกสารสกัดจากกิ่งมะม่วงจิ้งหรีด (*M. odorata*) ซึ่งเป็นมะม่วงพันธุ์

ที่พบได้บนเกาะบอเนียว ประเทศอินโดนีเซีย การสกัดด้วย dichloromethane, acetone และ methanol สามารถแยกสารบริสุทธิ์ ได้ 10 ชนิด ได้แก่ 3β–Taraxerol, Friedelin, β-sitosterol, Isomangiferolic acid, Mangiferolic acid, Mangiferonic acid, 3β-Hydroxy-5α-cycloart-24-en-26-al, Cycloartenone, Taxifolin และ Eriodictyol (http://www.mwit.ac.th/~teppode/sc40228_Example_Presentation_seminar.pdf) ชนพื้นเมืองในบางประเทศได้นำส่วนต่างๆของมะม่วงมาใช้เป็นยาสมุนไพร ได้แก่ ส่วนใบสดนำมาเคี้ยวใช้รักษาโรคของเหงือกและฟัน นำมาคั้นเอาส่วนน้ำใช้รักษาอาการอักเสบ และส่วนใบนำมาต้มกินใช้เป็นยาลดความดันโลหิต รักษาโรคหลอดลมอักเสบ รักษาเบาหวาน ปวดฟัน แก้บิด แก้หอบหืด ใช้ใบมาต้ม เอาส่วนน้ำนำไปล้างแผลเพื่อฆ่าเชื้อและทำให้แผลหายเร็ว เปลือกต้นมะม่วงนำมาต้มใช้รักษาอาการท้องร่วง แก้บิด แก้ปวดฟัน รักษาโรคตับ รักษาเบาหวาน รักษาริดสีดวงทวาร แก้แผลในปาก อมบ้วนปากแก้ปัญหาทางเหงือกและฟัน ป้องกันฟันผุ การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น จากการที่คนพื้นเมืองเหล่านี้ได้นำส่วนต่างของมะม่วงมาใช้ประโยชน์อย่างหลากหลายมาช้านานดังกล่าว จึงสะท้อนให้เห็นว่า มะม่วงเป็นผลไม้เก่าแก่พันธุ์หนึ่งของโลกได้เป็นอย่างดี และน่าสนใจมากคือ จากการศึกษาวิจัยของคนพื้นเมืองเหล่านั้นพบว่าทั้งใบและเปลือกของมะม่วงมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ทั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแผลและในช่องปาก เป็นต้น แต่การศึกษาวิจัยก็ยังมีไม่กว้างขวางครอบคลุมนัก ยังรอนักวิจัยค้นหาความลับของผลไม้โบราณต้นนี้ต่อไป (http://www.oknation.net/blog/sukanda/2010/01/31/entry-1)

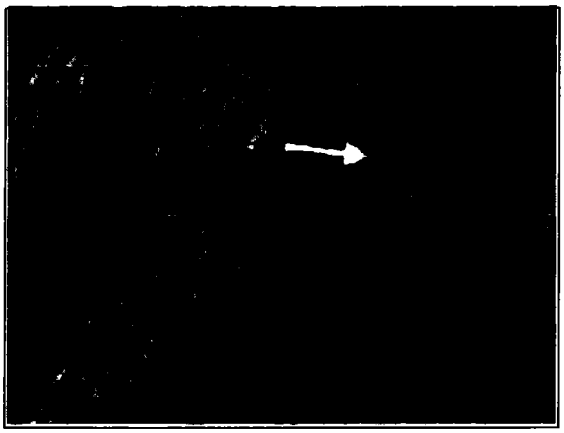
เชื้อราเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่มีความหลากหลายชนิดต่างๆมากมาย คาดว่าจำนวนสายพันธุ์เชื้อราทั้งหมดที่มีในโลกมีประมาณ 1.0-1.6 ล้านสายพันธุ์ จำนวนสายพันธุ์เชื้อราที่ถูกค้นพบแล้วจนถึงปัจจุบันจึงมีเพียงประมาณ 5-8% เท่านั้น (Cairlile and Watkinson ,1994, Rossman 1994) การที่เป็นเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากแหล่งที่อยู่อาศัย และบริเวณที่ได้มีการศึกษาแยกเชื้อราเท่าที่ผ่านมามีเพียงไม่กี่แหล่ง และในบางบริเวณพื้นที่เท่านั้น เช่น Saprobic fungi ที่เจริญอยู่ในดิน ในขยะ ในพืชที่เน่าเปื่อย และซากสัตว์ และเชื้อราก่อโรค เป็นต้น

การศึกษาค้นคว้าหา Secondary metabolites ชนิดใหม่ๆที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อรามีการศึกษามาอย่างต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน ได้ค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มต่างสรุปได้ดังรูปที่ 2. ได้แก่ Antiviral, Anti-arthritis, Anti-inflammatory, Antibacterial, Antidiabetic, Immunomodulatory, Antioxidants และ Antifungal ได้ และยังมีการค้นพบ Zaragozic acids และ Viridiofungins ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง Squalene synthase ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาพัฒนาใช้เป็นยาลด Cholesterol ในเลือด ส่วน Zaragozic acids D, D2, Chaetomellic acids และ Fusidienol มีฤทธิ์ยับยั้งต่อ Farnesyl-protein transferase ซึ่งมีแนวโน้มเป็นไปได้ที่จะนำมาพัฒนาใช้เป็นยาต้านมะเร็ง (http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1116) การค้นพบสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา Fusaricide และ Oxysporidinone จาก *Fusarium* sp. (Rossman 1994) เป็นต้น

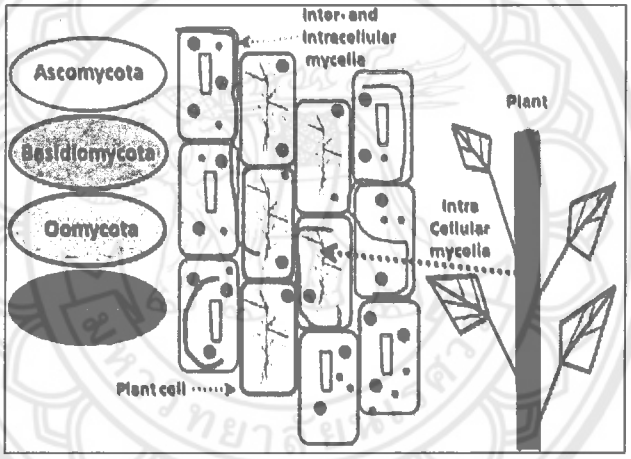


รูปที่ 2. แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ (Maheshwari R. et al., 2017)

ราเอนโดไฟต์เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของพืช (รูปที่ 3.) และสามารถเจริญได้ดี โดยไม่ทำให้ให้เกิดโรค หรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติแก่พืชอาศัยชนิดนั้นๆ เชื้อราชนิดนี้อาศัยอยู่ในพืชแบบพึ่งพาและไม่ก่อให้เกิดโรคต่อพืชที่อาศัย โดยพืชอาศัยทำหน้าที่เป็นแหล่งกำบังและให้อาหารกับเชื้อรา โดยราเอนไฟต์อาศัยอยู่กับพืชอาศัยแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Symbiosis) โดยที่จะได้ประโยชน์กันทั้ง 2 ฝ่าย หรือ mutualism ซึ่งเชื้อราจะได้รับสารอาหารต่าง ๆ จากพืช และพืชก็จะได้รับสาร Bioactive compounds จากเชื้อราช่วยป้องกันพืชจากการถูกทำลายจากสัตว์ แมลง nematode หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ พบราเอนโดไฟต์ได้ในพืชตระกูลต่างๆได้มากมาย (Stone J. et.al. 2004) ส่วนใหญ่ราเอนโดไฟต์จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota, Mitosporic fungi, Basidiomycota, Zygomycota และ Oomycota (Sinclair et. al. 1996, Zheng and Jiang 1995) ดังแสดงการจำแนกชนิดราเอนโดไฟต์และการดำรงอยู่ในเซลล์พืช (รูปที่ 4.) นอกจากนี้ Maheshwari R. et al.,2017 ได้รวบรวมรายชื่อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเซลล์โฮสต์ชนิดต่างไว้ดังแสดงในตารางที่ 1.



รูปที่ 3. แสดงเส้นใย(ลูกศรชี้)ของราเอนโดไฟต์ *Neotyphodium coenophialum* ที่เจริญแทรกอยู่ระหว่าง epidermal cells ของ tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) ย้อมด้วย analine blue (40×). (Karen A.O. et.al., 2012)



รูปที่ 4. การจำแนกเชื้อราเอนโดไฟต์และการดำรงอยู่ในเซลล์พืช (Maheshwari R. et al.,2017)

ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืช ซึ่งราเอนโดไฟต์มีความสำคัญต่อพืชที่อาศัยทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยช่วยเพิ่มความแข็งแรงและความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Petrini, O. 1991) ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชอาศัยที่มีสมบัติเป็นประโยชน์ต่อการผลิตยาปฏิชีวนะ ซึ่งราเอนโดไฟต์เหล่านี้ก็สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เช่นเดียวกับพืชอาศัย ได้แก่ สารในกลุ่ม Alkalods, Flavonoids, Phenols, Phenolic acid และ Peptide ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในพืชบางชนิดเหล่านี้ก็มีศักยภาพต่อการนำไปใช้ในทางการแพทย์ ทางการเกษตร ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุก่อโรคในพืชชนิดต่างๆได้ (Zhao et.al. 2011) และยังพบว่า ราเอนโดไฟต์ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีลักษณะเหมือน หรือคล้ายกันกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตในพืชที่มีราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ (Pavitha et.al. 2012)

ตารางที่ 1. รายชื่อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ จำแนกชนิดโดยใช้Phylogeny analysis (Maheshwari R. et al.,2017)

Endophytic fungi	Host plants
Muscodor albus	*Cinnamomum zeylanicum*
Alternaria, Cladosporium, Chaetomium, Curvularia, Drechslera ,Scopulariopsis,Acremonium, Aspergillus, Colletotrichum, Fusarium, Paecilomyces, Penicillium.	*Glycine max*
Alternaria sp., Colletotrichum sp., Phomopsis sp., Xylaria sp.	*Artemisia capillaris, A. indica, and A. lactiflora*
Cladosporium sp., Acremonium sp., Trichoderma sp., Monilia sp., Fusarium sp., Spicaria sp., Humicola sp., Rhizoctonia sp., Cephalosporium sp., Botrytis sp., Penicillium sp., Chalaropsis sp. and Geotrichum sp.	*Cephalotaxus mannii*
Fusarium solani	*Taxus baccata*
Stemphylium sedicola SBU-16	*Taxus baccata*
Fusarium sp., Nectria rigidiuscula	*Annona squamosa*
Fusarium oxysporum, Emericella nidulans	*Ipomea batatas*
Paraconiothyrium sp.	*Capsicum annuum, Cucumis sativus, Glycine max*
Phomopsis sp.,, Diaporthe sp., Dothideomycete sp., Cordyceps sp.	*Trichilia elegans*
Alternaria sp., Cladosporium sp., Curvularia sp., Fusarium sp., Phaeoacremonium sp., Trichoderma sp.	*Aquilaria malaccensis*
Trichoderma sp.,	*Coffea arabica*
Trichothecium sp.	*Phyllanthus amarus*
,Glomerella spp.,Diaporthae/Phomopsis sp., Alternaria spp., Cochliobolus sp., Cladosporium sp., Emericella sp.	*Aegle marmelos, Coccinia indica , Moringa oleifera*
Acremonium sp., Colletotrichum sp., Cochliobolus sp., Fusarium, Hypocrea sp., Nemania sp.	*Lycium chinense*

Endophytic fungi	Host plants
Colletotrichum sp., Curvularia sp., Fusarium sp., Phomopsis sp., Verticillium sp., Fusarium sp., Phomopsis sp.	*Tabernaemontana heyneana*
Alternaria sp., Phomopsis magnoliae	*Artemisia argyi.*
Acremonium *sp.*,Penicillium *sp.*	*Gossypium hirsutum*
Trichoderma brevicompactum	*Allium sativum*
Sporidiobolus sp., Rhodotorula sp., Pilidium concavum, Corynespora cassiicola, Neodeightonia subglobosa, Aspergillus awamori, Aspergillus sp.	*Fragaria x ananassa*
Epichloë festucae	*Festuca rubra*
Pestalotiopsis fici	*Camellia sinensis*
Aspergillus niger , Bipolaris maydis, Meyerozyma guilliermondii, Fusarium verticillioides	*Ocimum sanctum*
Aspergillus sp., Penicillium sp., Unidentified Eurotiomycete belong to Eurotiomycetes sp., Acremonium sp., Colletotrichum sp., Fusarium sp., Nodulisporium sp., Pestalotiopsis	*Marchantiapolymorpha*
Fusarium proliferatum,Fusariumsp.,F. solani, Curvularia lunata,Trichoderma atroviride, Calonectria gracilis, Rhizoctonia solani, Bionectria ochroleuca	*Musa acuminata*
Penicillium chrysogenum, P. chrysogenum,Fusarium oxysporum, F. nygamai	*Tamarix nilotica, Cressa cretica*
Diaporthe sp.,, Colletotrichum sp.,, Nigrospora sp., Botryosphaeria sp., Aspergillus sp., Penicillium sp., Neofusicoccum sp., Cercospora sp., Rhizoctonia sp., Alternaria sp., Curvularia sp.	*Artemisia lavandulifolia, A. tangutica, A. brachyloba, A. subulata, A. argy A. scoparia*
Penicillium polonicum	*Huperzia serrata*
Diaporthe ampelina	*Commiphora wightii*
Emericella qaudrilineata(RS-5)	*Pteris pellucida*
Chaetomium globosum	*Nymphaea nouchali*

Endophytic fungi	Host plants
Aspergillus sp., Chaetomium sp., Curvularia sp., Dreschelara sp., Fusarium sp., Penicillum sp., Colletotrichum sp., Nigrospora sp., Pestalotiopsis sp. and Phyllosticta sp.	*Hugonia mystax*
Aspergillus nidulans, Aspergillus oryzae.	*Ginkgo biloba*
Phomopsis theicola	*Litsea hypophaea*
Fusarium sp.	*Honeysuckle*
Aspergillus flavus	*Solanum nigrum*
Pestalotiopsis clavispora	*Dendrobium officinale*
Trichoderma-Hypocrea, Penicillium Phialemonium.	*Balanophora japonica*
Trichoderma sp., Aspergillus sp., Rhizopus sp., Cladosporium sp., Alternata sp., Penicillium sp., Chepalosporium sp.	*Toona sinensis*
Cladosporium cladosporioides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Penicillium citrinum, Monascus ruber, Fusarium semitectum, Fusarium sp., Fusarium sp.	*Corn cob*
Fusarium solani	*Phaius tankervilleae, Dendrobium lancifolium, Calanthe triplicata*
Talaromyces amestolkiae	*Kandelia obovata*

จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าราเอนโดไฟต์เป็นแหล่งสำคัญแหล่งหนึ่งที่สร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ใช้เป็นยารักษาโรค และทางด้านการเกษตรได้ และเนื่องจากในปัจจุบันการใช้ยารักษาโรคติดเชื้อกำลังประสบปัญหาเชื้อก่อโรคบางชนิดมีการดื้อยา ได้มีรายงานการศึกษาพบว่า การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งและเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรและพืชป่าของไทยบางชนิดมีความน่าสนใจมาก เนื่องจากเชื้อราเหล่านี้มักผลิตสารที่มีโครงสร้างที่น่าสนใจและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ซึ่งอาจเป็นเพราะพื้นที่ป่ามีความผันแปรมากทางกายภาพและชีวภาพสูง ซึ่งสารเหล่านี้อาจนำไปพัฒนาเป็นยาที่ใช้ได้จริงในอนาคตได้

ปัจจุบันได้รับการศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟต์อย่างจริงจังมากขึ้น (Petrini O. 1991) ซึ่งสามารถแยกได้จากพืชหลายชนิด เช่น ไม้ยืนต้น ทั้งไม้ไม่ผลัดใบและไม้ผลัดใบ ไม้พุ่ม ต้นหญ้า พืชสมุนไพร ซึ่งการรายงานข้อมูลส่วนใหญ่ได้จากพืชในเขตหนาวและเขตอบอุ่น (Carroll G.C. 1990 และ 1991) ได้แก่ การแยกราเอนโดไฟต์ได้หลายชนิดจาก *Picea mariana* และสร้างสาร secondary metabolites ที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลงได้ (Johnson et.al. 1994)

ราเอนโดไฟต์เป็นเชื้อรากลุ่มหนึ่งที่ความน่าสนใจอย่างยิ่งในปัจจุบัน โดยได้ค้นพบว่ายาต้านมะเร็งชนิดใหม่ placlitaxel (taxol) ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากต้น Pacific yew และแยกจากเชื้อ *Taxomyces andreanae* ที่สร้าง secondary metabolites (Sterle, A., and Strobel G., 1995) นอกจากนี้ยังพบว่า *Pestalotiopsis microspora* ซึ่งเป็นราเอนโดไฟต์ที่เจริญในต้น *Taxus wallachinana* ก็สร้าง taxol ได้เช่นกัน (Strobel et.al., 1997) การแยก *Acremonium* sp. ได้จากต้น European yew (*Taxus baccata*) สร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ leucinostatins (Strobel and Hess,1997) Wang และคณะ (2000) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์ต้านเนื้องอกและฤทธิ์ต้านเชื้อราของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากพืชสมุนไพรของจีน 3 ชนิดคือ *Taxus mairei, Cephalataxus fortunei* และ *Torreya grandis* พบว่าราเอนโดไฟต์เกือบทั้งหมดจัดอยู่ใน genus *Paecilomyces* sp. ซึ่งสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเนื้องอก และสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราได้มากที่สุด (Huang et.al. 2001, Wang et.al. 2000)

นอกจากนี้ในประเทศไทยได้มีรายงานการแยกราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp.จากต้นสัก สามารถผลิต zanthone dimer ชนิดใหม่ ได้แก่ phomoxanthones A, B ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต้านมาลาเรียและวัณโรค (Isaka et.al. 2001) พูนลาภ และคณะ (2550) รายงานว่าการตรวจกรองเบื้องต้นด้วยวิธี dual-culture agar diffusion ถึงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* และ *C. albicans* ของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากตัวอย่างพืช ได้แก่ กรวยป่า เพกา และ กอมขม พบว่าราเอนโดไฟต์ที่มีสัณฐานวิทยาทางโคโลนีแตกต่างกัน มีจำนวน 40 ไอโซเลต มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบบางชนิด ยกเว้น *P. aeruginosa* 15 ไอโซเลต (37.5 %) ราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้าน S. aureus พบว่าการเพาะเลี้ยงบน malt extract agar ให้ผลในการสร้างสารออกฤทธิ์และความแรงของสารออกฤทธิ์ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ในสภาวะที่เป็นอาหารเหลวมีผลต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีเช่นกัน นัยนา และสุริยา (2550) ได้ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วย 95% เอทานอล จากพืช 4 ชนิด ได้แก่ หมากนวล หมากเขียว คูน และตะแบก โดยนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ คือ *Escherichia coli* และ *S. aureus* พบว่าสารสกัดจากหมากนวลสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ และมี Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ที่ระดับความเข้มข้น เท่ากับ 250 ppm

กมลวรรณ และคณะ ได้รายงานการแยกราเอนโดไฟต์จำนวน 372 ไอโซเลต จากพืชป่าชายเลนทั้งหมด 40 ชนิด คัดเลือกราเอนโดไฟต์ จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Talaromyces trachyspermus* (KUFA 35), *Eurotium chevarii* (KUFA 39), *Neosartorya* spp. (KUFA 41 และ 47) และ *Nigrospora* sp. (KUFA 51) มาสกัดสารทุติยภูมิและทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 10,000 1,000 100 10 และ 1 ppm ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 10 ชนิด ด้วยวิธี Dilution Plate ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจาก *T. trachyspermus* (KUFA 35) มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาได้แก่ *E. chevarii* (KUFA 39), *Neosartorya* sp. (KUFA 41), *Neosartorya* sp. (KUFA 47) และ *Nigrospora* sp. (KUFA 51) ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm สารสกัดจาก *T. trachyspermus* (KUFA 35) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Rhizoctonia solani* ได้ 50% ขณะที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สารสกัดจาก *T. trachyspermus* (KUFA 35) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora palmivora* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้มากกว่า 95% รวมถึงสารสกัดจาก *E. chevarii* (KUFA 39) และ *Neosartorya* sp. (KUFA 41) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora palmivora, Lasiodiplodia theobromae, C. gloeosporioides* และ *Sclerotium rolfsii* ได้มากกว่า 50% ในขณะที่สารสกัดจารา *Neosartorya* sp. (KUFA 41) และ *Nigrospora* sp. (KUFA 51) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm เท่านั้น (https://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/2558/KC5201047.pdf)

อามีนา และคณะ (2560) ได้ทำการคัดแยกราเอนโดไฟต์จากสาหร่ายทะเลจำนวน 8 สายพันธุ์ ใน 4 จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย พบว่ามีจำนวนราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 82 ไอโซเลต และสามารถจัดจำแนกราเอนไฟต์ด้วยวิธีสัณฐานวิทยาและอณูชีวโมเลกุลออกได้เป็น 3 สกุล 4 สปีสีช์ และไม่สามารถจำแนกราได้จำนวน 25 ไอโซเลต ได้แก่ *Penicillium spp. Aspergillus fumigates, A. niger, A. flavus, A. rhizopodus* และ *Rhizopus spp.* เมื่อนำราเอนโดไฟต์ข้างต้นมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดด้วยวิธี Agar plug diffusion พบว่า *A. rhizopodus* มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดดีที่สุด จึงได้เลือก A. rhizopodus มาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี sequential solvent separation โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ เอทธิลอะซิเตท และเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากเอทธิลอะซิเตทมีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดและแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Aeromonas hydrophila, Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella Stratford* (ESBL), *Salmonella typhimurium* (ESBL) และ *Salmonella* weltevreden (ESBL) และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ดีที่สุด 3 สายพันธุ์ คือ *E. coli* ATCC 25922 (Clear zone = 38.65±0.03 มิลลิเมตร), *S. aureus* ATCC 25923 (Clear zone = 37.25±0.00 มิลลิเมตร) และ *S. weltevreden* (ESBL) (Clear zone = 36.29±3.31 มิลลิเมตร) ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร ผลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (P<.01) ซึ่งการที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้ดีเป็นผลมาจากส่วนประกอบสำคัญของกลุ่มสารsecondary metabolites ที่ได้จากราเอนโดไฟต์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างพืช

ทำการเก็บพืชตัวอย่าง มะม่วงป่า จาก ตำบลบางระกำ อำเภอบางระกำ และตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ตำบลละ 5 ต้น โดยเก็บพืชตัวอย่างในส่วนของใบ(Leaf) และกิ่ง(Petiole) ของพืชตัวอย่างที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีลักษณะอาการของโรค หรือแมลงกัดกิน แล้วนำตัวอย่างพืชกลับมาห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ทันที

2. การแยกเชื้อราเอนโดไฟต์

นำตัวอย่างพืชส่วนต่างๆแต่ละชนิดมาล้างด้วยน้ำประปา เพื่อเอาฝุ่นละอองต่างๆออก ผึ่งให้แห้งหมาดๆ แล้วใช้กรรไกรปราศจากเชื้อ ตัดชิ้นส่วนพืชขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร นำตัวอย่างพืชที่ตัดเป็นชิ้น ๆแล้ว มากำจัดเชื้อบริเวณผิวโดยการทำ triple surface sterilization แล้วจึงนำตัวอย่างพืชไปวางบนอาหาร malt extract agar (MA) ที่เติม chloramphenicol ความเข้มข้น 30 mg/L นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตผลทุกวัน เมื่อพบว่ามีการเจริญของเส้นใยเชื้อรางอกออกมาจากชิ้นส่วนตัวอย่างพืช ทำการตัดส่วน hyphal tip ของเส้นใยเชื้อราแล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ แล้วทำการเก็บเชื้อราที่แยกได้บนอาหารวุ้นเอียง PDA เก็บไว้เป็น stock culture เพื่อนำไปใช้ในทดลองต่อไป

3. จำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้

บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์บนอาหารเพาะเชื้อ 4 ชนิด คือ Potato dextrose agar และ Malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7-10 วัน แล้วบันทึกภาพลักษณะโคโลนีด้านบน และด้านล่างของโคโลนี ส่วนลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใย สปอร์ เพาะเลี้ยงโดยวิธี slide culture technique ส่องดูลักษณะ และบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะต่างๆตามคู่มือการจัดจำแนกชนิด (Barnett and Hunter, 1987, 1998, 1980, Brain. 1980, Katsuhiko Ando. 2015. Domch K.H. and W. Gams .1980 และ Kifferand Morelet 2000)

4. การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์เบื้องต้นที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์

เชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในข้อ 2 ซึ่งมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4-5 วัน หรือจนกว่าจะพบว่ามีการเจริญของ colony ของเชื้อรา ใช้ cork borer ที่ปราศจากเชื้อ ตัดส่วนปลายเส้นใยของราเอนโดไฟต์บริเวณขอบ colony มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร จำนวน 1 ชิ้น แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว Malt extract

broth (MB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ทำไอโซเลตละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน บน reciprocal shaker ความเร็ว 100 stroke/ นาที เมื่อครบกำหนด ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อรา นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี Paper disc agar diffusion method โดยนำ cell suspension ของแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Staphyloococus. aureus, Escherichia. coli ATCC* 25922, *Shigella flexneri* DMST 16113และ *Vibrio cholerae* ปรับความขุ่นเทียบกับสารละลาย Mc Farland No. 0.5 มาเกลี่ย (swab) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar (MHA) ด้วยไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ ส่วนเชื้อราทดสอบ ได้แก่ *Candida albicans* DMST 8684และ *Colletotrichum* sp. ทำ cell หรือ spore suspension ปรับความเข้มข้นของเซลล์ หรือ สปอร์ เท่ากับ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ แล้วปิเปตน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลต ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำไปวางในจานเพาะเชื้อที่ได้เกลี่ยเชื้อทดสอบไว้แล้ว ชุด Positive control ของแบคทีเรียใช้แผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐาน gentamycin 10 µg/แผ่น ส่วนเชื้อราใช้ amphotericin B 10 µg/แผ่น นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone โดยใช้ vernier caliper วัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร เชื้อทดสอบแบคทีเรีย

5. การเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลวเพื่อทำการสกัดสารสกัดหยาบ

5.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์

จากผลการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้ในข้อ 4 นำเชื้อราเอนโดไฟต์จาก stock culture มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4-5 วัน หรือจนกว่าจะพบว่ามีการเจริญของ colony ของเชื้อรา ใช้ cork borer ที่ปราศจากเชื้อ ตัดส่วนปลายเส้นใยของราเอนโดไฟต์บริเวณขอบ colony มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร จำนวน 5 ชิ้น แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MB ปริมาตร 200 มล. ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 500 มล. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน บน reciprocal shaker ความเร็ว 100 stroke/ นาที เมื่อครบกำหนด ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงของเชื้อรา เพื่อนำไปทำการสกัดสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่อไป

5.2 การสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ทำการแยกน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 5.1 โดยการกรองด้วยผ้าขาวบางแยกเอากากเส้นใยออก แล้วกรองอีกครั้งหนึ่งด้วย กระดาษกรอง Whatman No.1 ได้น้ำเลี้ยง (fermentation broth) ของเชื้อราเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลตนั้นๆ แบ่งเป็น สองส่วน ส่วนแรกทำการสกัดด้วย methanol โดยใช้อัตราส่วนน้ำเลี้ยงต่อ MeOH เท่ากับ 2:1 แล้วนำ fermentation broth อีกส่วนหนึ่งไปสกัดด้วย Ethyl Acetate (EtOAc) โดยใช้อัตราส่วนน้ำเลี้ยงต่อ EtOAc เท่ากับ 2:1 เช่นกัน ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิดทั้งหมด ชนิดละ 2 ครั้ง แล้วนำสารละลายในส่วนของตัวทำละลายที่ได้

จากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกันแล้วเติมสารกำจัดน้ำ (dehydrating agent) คือ sodium sulfate anhydrous ลงไป ทำการกรอง แล้วนำ filtrate ที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator จนได้สารสกัดหยาบ ได้เป็น methanolic extract และ EtOAc crude extract ตามลำดับ สารสกัดหยาบที่ได้จากทั้งสองส่วนที่ได้นี้ เก็บเตรียมไว้ไปใช้ในการทดสอบเบื้องต้นหาสารพฤษเคมีทางคุณภาพ การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และหาค่า MIC MFC และ MBC ในการทดลองต่อไป

5.3 การทดสอบฤทธิ์สารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่ผลิตได้จากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะม่วงป่า (AOAC. 1990, Harbourne J.B. 1973 และ Sahm D. and Washington F. 1990)

5.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยวิธี paper disc agar diffusion ของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากราเอนโดไฟต์ นำสารสกัดหยาบจากเชื้อราเอนโดไฟต์มาละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 100 mg/ml หยดลงบน paper disc (∅ 6 mm) ปริมาตร ประมาณ 20 ไมโครลิตร แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในการทดสอบ ได้แก่ Muller Hinton agar (MHA) และ Potato dextrose agar (PDA) ทำการเตรียมเชื้อทดสอบแบคทีเรีย และยีสต์ เตรียม cell suspension เช่นเดียวกันกับการทดลองในข้อ 4 และใช้สารปฏิชีวนะเป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกต่อเชื้อทดสอบ คือ gentamycin 10 µg/แผ่น และ amphotericin B 10 µg/ แผ่น สำหรับเชื้อทดสอบแบคทีเรีย และเชื้อรา ตามลำดับ บันทึกผลของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นรอบๆ paper disc ด้วย vernier caliper มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

5.3.2 การหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Minimal bactericidal Concentration (MBC) และ Minimal fungicidal Concentration (MFC) ของสารสกัดหยาบจากราเอนไฟต์ที่แยกได้จากมะม่วงป่า การตรวจหาค่า MIC เป็นการทดสอบหาระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบแบคทีเรีย และเชื้อรา นำสารสกัดหยาบจากเชื้อราเอนโดไฟต์มาละลายด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/ml เก็บไว้เป็น stock solution ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วทำการเจือจางสารสกัด ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB และ PDB สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อราตามลำดับ โดย ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB และ PDB ลงใน steriled 96-well microtiter plates หลุมละ 50 µl แล้วปิเปตสารกัดหยาบใส่ ลงใน steriled 96-well microtiter plates ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอยู่ หลุมละ 50 µl แล้วทำการเจือจางแบบ 2-fold dilution เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบอยู่ในช่วง 100-0.2 mg/ml แล้วปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้ายทิ้ง 50 µl โดยทำการทดสอบความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ จากนั้นปิเปตเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เตรียมไว้ใส่ ลงใน steriled 96-well microtiter plates ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและสารกัดหยาบ หลุมละ 50 µl เขย่าเบาๆ สำหรับเชื้อทดสอบแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อราบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-78 ชั่วโมง จากนั้นหยด resazurin indicator (0.18%) 10 µl เชื้อทดสอบแบคทีเรีย ทำการบ่มต่อ 3-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อรา หยด resazurin indicator (0.18%) 10 µl แล้ว บ่มต่ออุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่ indicator ไม่เปลี่ยนสี จากสีฟ้าเป็นสีชมพู ดัดแปลงตามวิธีของ Palomino et al., 2002 และใช้สารปฏิชีวนะ gentamycin และamphotericin B เป็น positive control

การหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของสารสกัดหยาบ โดยนำผลที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ในการทดสอบ MIC มา streak บนอาหารแข็ง NA และ PDA สำหรับเชื้อทดสอบแบคทีเรีย และเชื้อรา ตามลำดับ บันทึกผลความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเลย เป็นค่า MBC และ MFC ตามลำดับ

6.. การทดสอบทางคุณภาพของสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากตัวอย่างพืช และราเอนโดไฟต์ (Mada et.al.,2012, Ravisshankar et.al.,2012, Harborne J.B. 1983, Harbourne J.B. 1973 และ Bruneton J. 1995)

การเตรียมสารสกัดตัวอย่างพืช นำตัวอย่างใบของมะม่วงป่า มาล้างน้ำสะอาด ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C จนตัวอย่างแห้งสนิท แล้วนำไปบดด้วยเครื่องบด จนได้เป็นผงละเอียด นำตัวอย่างพืชที่บดละเอียดแล้วประมาณ 100 กรัม มาสกัดด้วย ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ Methanol และ Ethyl acetate ใช้ตัวทำละลายในการสกัดชนิดละ 500 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 คืน แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางแยกเอากากออก แล้วนำส่วนน้ำมากรองอีกทีด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ระเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบของแต่ละตัวทำละลาย เก็บไว้ทดสอบในการทดลองที่ ต่อไป

นำสารสกัดหยาบของใบของมะม่วงป่า และสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟต์มาวิเคราะห์ทางคุณภาพของสารพฤกษเคมี ได้แก่ Alkaloids (Hager test) Flavonoids (Modified ammonia test) Steroids (Salkowski's test) Terpenoids (Modified Salkowdki test) Reducing sugar (Fehling test) Cardiac glycosides (Killer-Killant's test) Saponins (Frothing) และ Tannins ($FeCl_3$ test)

สถานที่ทำการศึกษาทดลอง

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

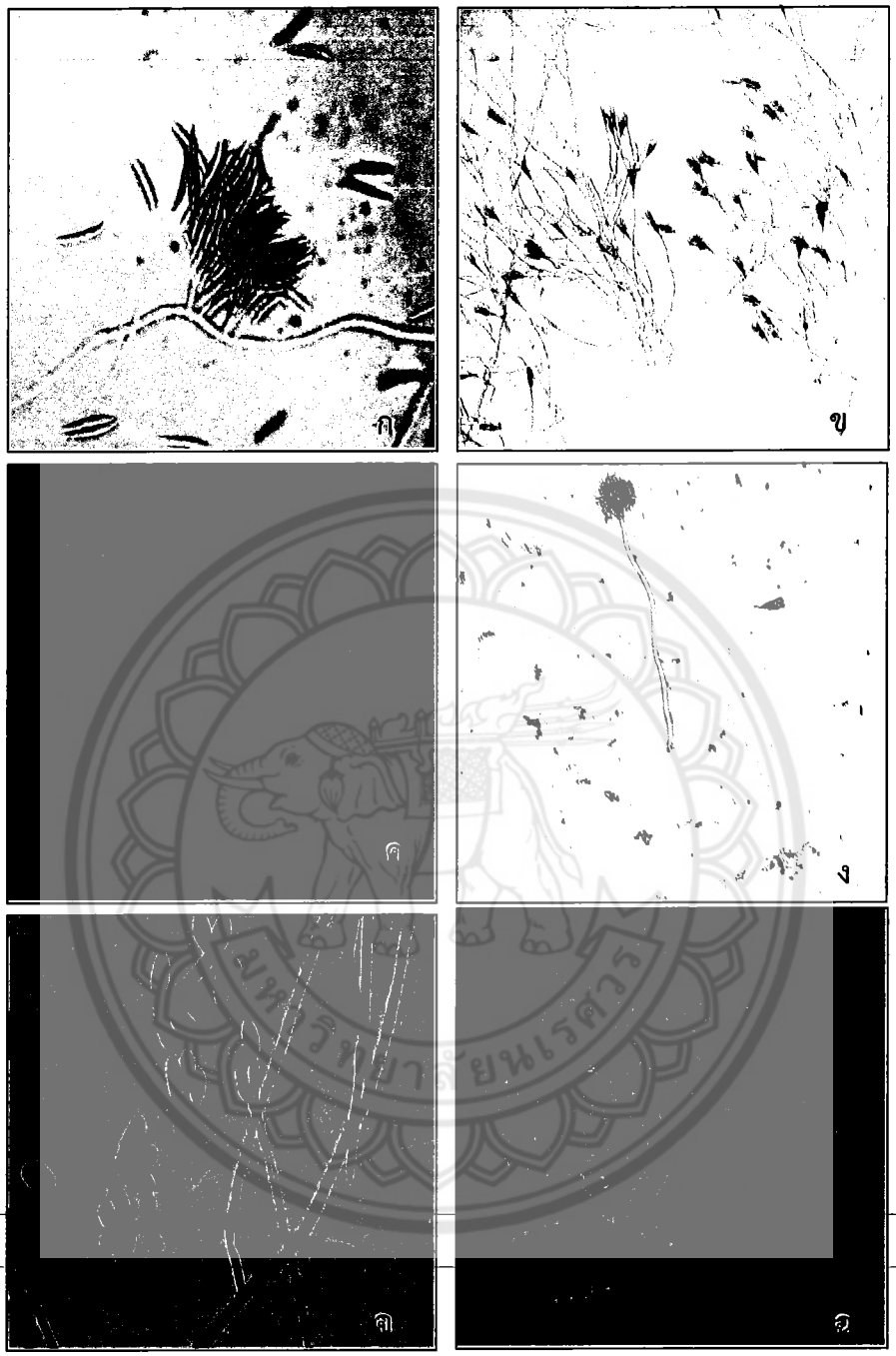
บทที่ 4

ผลการวิจัย

การเก็บรวบรวมใบ กิ่ง จากต้นมะม่วงป่า ในเขตพื้นที่ตำบลบางระกำจำนวน 5 ต้น และตำบลท่าโพธิ์ จำนวน 5 ต้น สามารถแยกราเอนโดไฟต์บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 275 ไอโซเลต ดังตารางที่ 2.

ตารางที่ 2. แสดงจำนวนไอโซเลตของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกิ่งและใบของมะม่วงป่าในเขตตำบลบางระกำ อำเภอบางระกำ และตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	มะม่วงป่า	จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้(ไอโซเลต)		
		กิ่ง (Petiole=P)	ใบ(Leaf=L)	รวมทั้งหมด
ตำบลบางระกำ อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก	1MCB	19	30	49
	2MCB	11	21	32
	3MCB	9	17	26
	4MCB	10	21	31
	5MCB	4	16	20
ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก	6MCT	5	11	16
	7MCT	8	13	21
	8MCT	14	22	36
	9MCT	9	15	24
	10MCT	6	14	20



รูปที่ 5. แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อราบางจีนัสที่แยกได้จากมะม่วงป่า (ก : *Fusarium* sp., ข : *Penicllium* sp., ค : *Paecilomyces* sp., ง : *Aspergillus* sp., จ : *Curvularia* sp., และ ฉ : *Alternaria* sp.)

การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ที่บรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 stroke/นาที เป็นเวลานาน 10 วัน เมื่อนำน้ำเลี้ยงมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อทดสอบ ได้แก่ *B. cereus, E.coli, S. aureus, Shi. flexneri, V. cholerae, C. albicans* และ *Colletotrichum* sp ด้วยวิธี paper disc agar diffusion พบว่า น้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบได้มากกว่าหรือ เท่ากับ 4 ชนิด และแสดงผลให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone มากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร มีจำนวนเพียง 22 ไอโซเลต ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.

ตารางที่ 4. น้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลตที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบได้ $\geq$ 4 ชนิด และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ inhibition zone $\geq$ 10 มิลลิเมตร

ราเอนโดไฟต์ (ไอโซเลต)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ inhibition zone (มิลลิเมตร)						
	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ			เชื้อรา	
	B. cereus	*S. aureus*	*E. coli*	*Shi. flexneri*	*V. cholerae*	*C. albicans*	*Colletotrichum* sp
1MCB-L02	NI	10.0	10.0	NI	NI	10.0	12.0
1MCB-L07	10.0	12.0	10.0	NI	NI	10.0	10.0
1MCB-L10	10.0	14.5	12.5	12.0	10.0	13.5	10.0
1MCB-P12	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
2MCB-L12	11.0	12.0	10.0	NI	NI	10.0	NI
2MCB-P05	10.0	12.0	10.0	NI	10.0	12.0	10.0
3MCB-L01	11.5	10.5	12.0	10.0	10.0	11.0	10.0
3MCB-L13	NI	10.0	10.5	NI	10.0	NI	10.0
4MCB-L17	10.0	12.5	11.5	10.0	10.5	11.0	12.0
5MCB-L04	10.0	10.0	NI	10.0	NI	10.0	10.0
5MCB-P04	NI	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	11.0
6MCB-L01	10.0	10.0	10.0	10.0	10.5	10.0	10.0
6MCT-L07	NI	10.0	10.5	NI	10.0	10.0	10.0
7MCT-L10	NI	10.5	10.0	NI	NI	10.5	10.0
7MCT-P05	10.5	11.0	10.0	10.0	10.0	12.0	10.0
8MCT-L01	12.0	12.5	10.5	10.0	10.0	12.5	11.0
8MCT-L15	12.0	12.0	12.0	10.0	10.0	12.0	12.0
8MCT-L19	12.5	14.0	10.0	10.0	10.0	13.0	10.0
9MCT-L09	NI	10.0	10.0	NI	NI	10.5	10.0
9MCT-P08	10.5	10.5	10.0	NI	NI	10.0	10.0

10MCT-P03	NI	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
10MCT-P06	NI	10.5	10.5	10.0	10.0	11.0	10.0
Gentamycin 10 µg	22.0	20.0	18.0	16.0	18.0	ND	ND
Amphotericin B 10 µg	ND	ND	ND	ND	ND	16.5	14.0

หมายเหตุ : NI = No inhibition zone observed ; ND = Not detected

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่แสดงการออกฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบพบว่าไอโซเลต 1MCB-L10 จำแนกชนิดเป็น *Fusarium* sp. มีลักษณะโคโลนีและโคนิเดีย ดังรูปที่ 6. เลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB แล้วนำ filtrate มาสกัดด้วย methanol และ ethylacetate ได้สารสกัดหยาบ 2 ส่วน คือ methanolic crude extract และ ethylacetate crude extract เมื่อนำสารสกัดหยาบทั้งสองส่วนมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อทดสอบ 7 ชนิด ดังข้างต้น ด้วยวิธี paper disc agar diffusion ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 5. ส่วนการทดสอบหาค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบทั้งสองส่วน โดยการทำ two fold serial dilution ใน microtiter plate พบว่า ค่า MIC, MBC, MFC ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol มีค่าระดับความเข้มข้นต่ำกว่าของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethyl acetate ดังตารางที่ 6.

ตารางที่ 5. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Fusarium* sp. 1MCB-L10

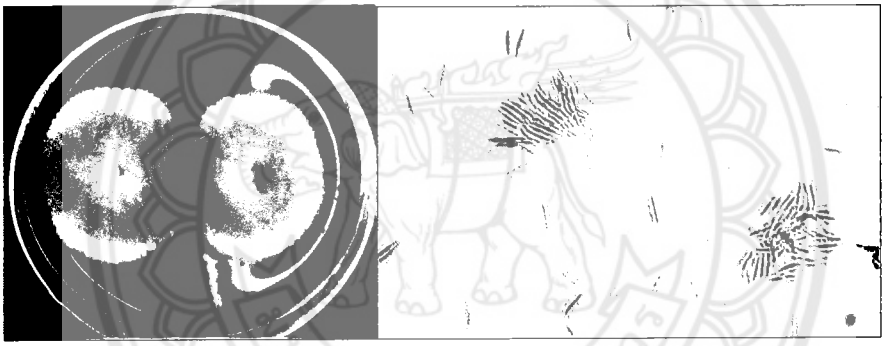
Fusarium sp. 1MCB-L10 Crude Extract	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ inhibition zone (มิลลิเมตร) (เส้นผ่าศูนย์กลางของ paper disc 6.0)						
	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ			เชื้อรา	
	B. cereus	*S. aureus*	*E. coli*	*Shi. flexneri*	*V. cholerae*	*C. albicans*	*Colletotrichum* sp
MEOH Crude Extract	7.5	10.0	15.0	NI	NI	11.5	10.0
EtOAc Crude Extract	NI	7.0	10.0	7.0	NI	8.0	10.0
Gentamycin 10 µg	22.0	20.0	18.0	16.0	18.0	ND	ND
Amphotericin B 10 µg	ND	ND	ND	ND	ND	16.5	14.0

หมายเหตุ : NI = No inhibition zone observed ; ND = Not detected

ตารางที่ 6. แสดงค่า MIC ,MBC และ MFC ของ MEOH Crude Extract และ EtOAc Crude Extract จากการเพาะเลี้ยง *Fusarium* sp. 1MCB-L10 ต่อ *E. coli* และ *C. albicans*

Fusarium sp. 1MCB-L10 Crude Extract		MIC(mg/ml)	MBC(mg/ml)	MFC(mg/ml)
E. coli	MEOH Crude Extract	12.5	6.3	ND
	EtOAc Crude Extract	25.0	12.5	ND
C. albicans	MEOH Crude Extract	25.0	ND	12.5
	EtOAc Crude Extract	50.0	ND	25.0

หมายเหตุ : ND = Not detected



รูปที่ 6. แสดงลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของ *Fusarium* sp. 1MCB-L10 ที่แยกได้จากใบมะม่วงป่า

ว QK
b0U
.2.E53
อ๔๓ร
1049054

สำนักหอสมุด
28 ก.พ. 2565

ผลการนำสารสกัดหยาบของใบมะม่วงป่า และสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟต์ที่สกัดด้วย Methanol และ Ethylacetate มาวิเคราะห์ทางคุณภาพของสารพฤกษเคมี ให้ผลดังแสดงใน ตารางที่ 7.

ตารางที่ 7. แสดงผลทดสอบทางคุณภาพสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงป่า และราเอนโดไฟต์

สารพฤกษเคมี	ใบมะม่วงป่า		*Fusarium* sp. 1MCB-L10	
	MeOH	EtOAc	MeOH	EtOAc
Alkaloids	+	+	+	-
Flavonoids	+	+	+	+
Steroids	-	-	NT	NT
Terpenoids	+	NT	NT	NT
Reducing sugar	+	NT	-	NT
Cardiac glycosides	-	NT	-	NT
Saponins	+	+	+	-
Tannins	+	+	-	-

หมายเหตุ : + = Detected, - Not detected = และ NT = Not tested

บทที่ 5

อภิปรายผล และสรุปผลการวิจัย

เชื้อราหลายชนิดมีความสามารถผลิตสาร secondary metabolites ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางการแพทย์และทางการเกษตร ดังนั้นสำหรับประเทศไทยที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก จึงน่าที่จะมีเชื้อราที่ยังรอการค้นพบ และนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่าง ๆ ได้อีกอย่างมากมาย จากการนำใบและกิ่งของมะม่วงป่าจำนวน 10 ต้น มาแยกราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมดจำนวน 275 ไอโซเลต ซึ่งแต่ละต้นของแต่ละพื้นที่ของการเก็บตัวอย่างสามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้จำนวนแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมะม่วงป่ามีอายุหรือลักษณะสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ทำให้มีประชากรของเชื้อราเจริญอยู่มีจำนวนแตกต่างกันได้ (Hata et *al.*1998) โดยแยกราเอนโดไฟต์จากส่วนใบได้จำนวนมากกว่าส่วนกิ่ง (ตารางที่ 2.) สอดคล้องกับรายงานของ Radu and Kqueen (2002) สามารถแยกราเอนโดไฟต์จากส่วนใบพืชได้มากที่สุด เท่ากับ 90.90 % เมื่อเทียบกับส่วนกิ่ง และลำต้นของพืชสมุนไพรในประเทศมาเลเซีย เมื่อนำราเอนโดไฟต์ทั้งหมดที่แยกได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MEA และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากการทำ slide culture technique เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทั้งสองส่วนดังกล่าวแล้ว สามารถจัดจำแนกชนิดในระดับจีนัสได้จำนวน 16 genus ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน genus *Colletotrichum* , *Fusarium*, Mycelia Sterila จำนวน 35(12.73%), 29(10.55%), 25(9.09%)โอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 3. และ รูปที่ 5.) และไอโซเลตที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 42 (15.28%)ไอโซเลต เนื่องจากสภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไม่สร้างโคนิเดีย ซึ่งราเอนโดไฟต์เหล่านี้สามารถแยกจากพืชตระกูลปาล์มได้เช่นกัน (Song *et al.* 2016, Frohlich *et al.* 2000)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงจากการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB ต่อแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบ โดยวิธี paper disc agar diffusion พบว่าน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์ออกฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบซึ่งแสดงผลจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต และราเอนโดไฟต์จำนวน 22 ไอโซเลตเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบมากกว่าหรือเท่ากับ($\geq$) 4 ชนิด ของเชื้อที่นำมาทดสอบ และแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone $\geq$ 10 มิลลิเมตร จะเห็นว่า bioactive metabolite ในน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์ทุกไอโซเลต สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยเฉพาะราเอนโดไฟต์ไอโซเลต 1MCB-L10 ซึ่งแยกมาจากส่วนใบของมะม่วงป่าในพื้นที่ตำบลบางระกำ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ทั้ง 7 ชนิด ถือได้ว่า เป็นไอโซเลตที่มีขอบเขตในการออกฤทธิ์กว้าง(broad spectrum) และแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone กว้างที่สุด เท่ากับ 14.5 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.) ซึ่งได้จัดจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็น *Fusarium* sp. (รูปที่ 6.) สอดคล้องกับรายงานของ สุภักตร์ และ ธีระ (2550) ที่ทำการคัดแยกราเอนโดไฟต์จากมะเกลือ (*Diospyros mollis* Grif) แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ของสารทุติยภูมิ ต่อ *S. aureus* ด้วยวิธี Paper

disc diffusion assay พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงไอโซเลต BB2, EB2 และ CB2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดี เช่นกัน

ผลการนำ methanolic crude extract และ ethylacetate crude extract จากการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. 1MCB-L10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อทดสอบ 7 ชนิด ด้วยวิธี paper disc agar diffusion จะเห็นได้ว่า methanolic crude extract แสดงการออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *E. coli* มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ inhibition zone มากที่สุดเท่ากับ 15.0 มิลลิเมตร นอกจากนี้แสดงการออกฤทธิ์ต่อจำนวนเชื้อสอบชนิดอื่นๆ และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ inhibition zone ได้มากกว่า ethylacetate crude extract (ตารางที่ 5.)

การทดสอบหาค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบทั้งสองส่วน โดยการทำ two fold serial dilution ใน microtiter plate พบว่า ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol ต่อเชื้อทดสอบ *E. coli* มีค่าระดับความเข้มข้นที่ 12.5 mg/ml และ 6.3 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีกว่าของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethyl acetate และค่า MIC และ MFC ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol ต่อเชื้อทดสอบ *C. albicans* มีค่าระดับความเข้มข้นที่ 25.0 และ 12.5 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ได้ดีกว่าของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethyl acetate เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 6.)

ผลการนำสารสกัดหยาบของใบมะม่วงป่า และสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. 1MCB-L10 ที่สกัดด้วย Methanol และ Ethylacetate มาวิเคราะห์ทางคุณภาพของสารพฤกษเคมี พบว่า สารสกัดหยาบของใบมะม่วงป่า และ *Fusarium* sp. 1MCB-L10 ที่สกัดด้วย MeOH ตรวจพบว่ามีจำนวนชนิดสารพฤกษเคมี ได้มากกว่า EtOAc (ตารางที่ 7.) และสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย MeOH ของใบมะม่วงป่า ตรวจว่ามีชนิดของสารพฤกษเคมีกลุ่มต่างๆ ได้แก่ Alkaloids, Flavonoids, Terpenoids, Reducing sugar, Saponins และ Tannins ตรวจไม่พบสารกลุ่ม Cardiac glycoside และ Steroids สอดคล้องกับรายงานของ Donatus E. O. and Vitus E. ในปี 2008 ตรวจพบสารพฤกษเคมีของใบมะม่วงพันธุ์ *Mangifera indica* Linn. ในกลุ่ม Alkaloids, Phenols, Flavonoids, Saponins และ Tannins เช่นเดียวกัน ส่วนสารสกัดหยาบของ *Fusarium* sp. 1MCB-L10 ที่สกัดด้วย MeOH ตรวจพบว่า มีชนิดของสารพฤกษเคมีกลุ่ม Alkaloids, Flavonoids และ Saponins เท่านั้น

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยนี้ สามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้ทั้งจากส่วนใบ และกิ่งของมะม่วงป่า ราเอนโดไฟต์บางไอโซเลตสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และเชื้อราที่นำมาทดสอบได้ สารสกัดหยาบจากราเอนไฟต์ที่แยกได้สร้างสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ แสดงว่าราเอนโดไฟต์เหล่านี้มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาต่อยอดนำไปศึกษาวิจัยเพื่อใช้ในทางการแพทย์ หรือทางเกษตรเพื่อควบคุมโรคพืชบางชนิดต่อไปได้ การศึกษาอื่น ๆ ยังคงจำเป็นสำหรับการระบุสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทำการทดสอบกับเชื้อทดสอบให้เพิ่มจำนวนชนิดมากขึ้น เป็นต้น และสามารถนำผลการวิจัยที่ได้นี้ไปต่อยอดพัฒนางานวิจัยต่อไป

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาทางด้านเคมีเพื่อทำการแยก วิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้

2. ปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือสายพันธุ์ของราเอนโดไฟต์เพื่อให้มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น

3. ในปัจจุบันมะม่วงป่า มีอยู่จำนวนน้อย ค่อนข้างหาได้ยาก แต่มีสรรพคุณทางยาและมีราเอนโดไฟต์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารต้านแบคทีเรียและสารต้านเชื้อราและยีสต์ได้ จึงน่าจะหาแนวทางในการอนุรักษ์มะม่วงป่าพันธุ์นี้ไว เพื่อคนรุ่นหลังๆในอนาคตต่อไป

มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th Ed. Washington, DC, USA.

Baker C. and Thormsberg C. 1983. Inoculums Standardization in Antimicrobial Susceptibility Tests. Evaluation of overnight age culture. J. Chin. Microbial.17: p.140-57.

Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth edition. The American Phytopathological Society.

Bernett H.L., Barry B. Hunter.1987. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th edition Mac millan Publishing Company .USA. 218.

Brain C. Sutton. 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfect with pycnidium, acervulus and stroma. Common Wealth Mycological Institute. 696.

Bruneton J. 1995. Pharmacognosy, Phytochemiistry and Medicinal Plants. Intercept Ltd Londers, New York. 2nd Edition. p. 386.

Carlile, M.J., and S. C. Watkinson. 1994. The Fungi. Academic Press, London.p.9

Carroll, G. C. 1990. Fungal endophytes in vascular plants: mycological research opportunities in Japan. Trans. Mycol. Soc. Japan 31: 103-116.

Carroll, G. C. 1991. Fungal associates of woody plants as insect antagonists in leaves and stems. pp. 253-271. In P. Barbosa, V.A. Ksischik and C. G. Jones (eds.), Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interactions, John Wiley & Sons. Inc., New York

Charles W. Bacon and James F. White .2000. Microbial endophytes . Marcel Dekker Inc. New York.

Deacon, J. W.1997. Modern Mycology,3rd ed. Blackwell Science, Oxford. pp.9 -10.

Domch K.H. and W. Gams .1980. *Compendium of soil fungi*. Volume 1. Academic Press pp. 859.

Frohlich, J., Hyde, K. D. and Petrini, O. 2000. Endophytic fungi associated with palms. Mycological Research 104:1202-1212

Harborne JB. 1983. Phytochemical Method: A guide to Modern Techniques of Plants Analysis. 2nd Edn. Chapman and Hall New York.

Harbourne JB. 1973.Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis, London, Chapman and Hall. p.221-32.

Hata K, Futai K and Tsuda M .1998. Seasonal and needle age-dependentchanges of the endophytic mycobiota in *Pinus thunbergii* and *Pinus densifloraneedles.* Can J Bot 76:245–250.

http://clgc.rdi.ku.ac.th/index.php/rs/fruit/132-manaifera

http://guru.google.co.th/guru/thread?tid=334b4b5b2d9800e8

http://nih.dmsc.moph.go.th/fsheet/showimgpic.php?id=43

http://www.dailynews.co.th/agriculture/171652

http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1116

http://www.mwit.ac.th/~teppode/sc40228_Example_Presentation_seminar.pdf

http://www.oknation.net/blog/sukanda/2010/01/31/entry-1

http://www.thaigcd.ddc.moph.go.th

https://en.wikipedia.org/wiki/Fusidic_acid. Fusidic acid. Retrieved 2020.05.24

https://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/2558/KC5201047.pdf

Huang, L., R. B. Lingham, G. H. Harris, et al. 1995.New fungal metabolites as potential antihypercholesterolemics and anticancer agents. Can. J. Bot. 73 (Suppl. 1): S898-S906

Isaka, M., A. Jaturapat, K. Rukseree, K. Danwisetkanjana, M. Tanticharoen, and Y. Thebtaranonth. 2001. phomoxanthones A and B, novel xanthone dimmers from the endophytic fungus Phomopsis species J. Nat. Prod. ASAP July 13.

Johnson, J. A., and N. J. Whitney. 1994. Cytotoxicity and insecticidal activity of endophytic fungi from black spruce (*Picea mariana*) needles. Can. J. Microbial. 40:24-27.

Karen A.O. et. al. 2012. Exploring the potential of symbiotic fungal endophytes in cereal disease suppression. Biological Control .63(2) 69-78.

Katsuhiko Ando. 2015. Identification of mitosporic fungi.Biological resource center ,national Institute of technology and evaluation (NITE) Japan. pp.86.

Kiffer, E. and Morelet, M. 2000. The Deuteromycetes, Mitosporic Fungi: Classification and Generic Keys. Science Publishers, USA.

Kingston, D. G. I. 1996. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead atructures. pp. 101-116. In C. G. Wermuth (ed.),The Practice of Medicinal Chemistry. Academic Press, London.

Mada et al., 2012. Phytochemical & Antimicrobial Efficacy of *Mangifera indica* Stem Bark World J. Life Sci. and Medical Research ;2(2): 81

Maheshwari R. et al., 2017) Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. Brazilian Archives of Biology and Technology 60. e17160542 Jan/Dec. 1-26

Naik, B. S., J. Shashikala, and Y. Krishnamurthy. 2009.Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*. Microbiol. Res. 164: 290-296.

Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J. & Portaels, F. 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 46.2720 -2722.

Pavithra N., L. Sathish , K. Ananda. 2012. Antimicrobial and enzyme activity of endophytic fungi isolated from Tulsi. Journal of pharmaceutical and biomedical science.16(12) 1-6.

Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. p. 179-197. In J. H. Andrews, and S. S. Hirano (eds), Microbial Ecology of Leaves. Springer-Verlag, New York.

Petrini, O.1991. Fungal endophytes of tree leaves.p. 179-197. In J. H. Andrews, and S. S. Hirano (eds),. Microbial Ecology of Leaves. Springer-Verlag, New York.

Radu, S., and C.Y. Kqueen. 2002. Preliminary screening of Endophytic fungi from Medicianl Plants in Malasia for antimicrobial and antitumour activity. Malasian Journal of Medicical Sciencees. 9: 23 – 33.

Raju, N., S. Niranjana, G. Janardhana, H. Prakash, H. Naik, B. S., J. Shashikala, and Y. Krishnamurthy. 2009. Study on the diversity of endophytic communities seed oil on skin pathogenic microorganisms. Res. J. Med. Plant, 1(2): 60-64.

Ravishankar et al. 2012. Preliminary phytochemical screening and in vitro antibacterial activity on *Asparagus racemosus* root extract . IJPCBS. 2(1), 117-1231.

Rossman, A. Y. 1994. A strategy for an all taxa inventory of fungal biodiversity. In C.-I. Peng, and C. H. Chou (eds.). Biodiversity and terrestrial ecosystems. Inst. Botany, Acad. Sinica Monograph Series No.14.

Sahm D, and Washington F. 1990. Antimicrobial Susceptibility Test Dilution Method, In: Manuals of Clinical Microbiology, Lennette E.H 5th edition, America Society of Microbiology. Washington DC. p.1105-16.

Sinclair, J.B. and Cerkauskas, R.F. (1996). Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In: Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants (eds. S.C. Redlin and L.M. Carris). APPS Press, St Paul Minnesota: 3-30.

Sofowora A. 1982. Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. John Wiley and Sons Ltd. Chichester. pp 142-145.

Song, J. J., Pongnak, W. and Soytong, K. 2016. Isolation and Identification of Endophytic Fungi from 10 Species Palm Trees International Journal of Agricultural Technology 12(2): 349-363.

Sterle, A., and G. Strobel .1995. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J. Nat. Prod.* 58:1315-1324.

Stone J, White J, Polishook J. 2004. Endophytic Fungi Measuring and Monitoring Biodiversity of Fungi. Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, Boston MA, 2004; pp. 241-270.

Strobel, G. A., and W. M. Hess. 1997 Glucosylation of the peptide leucinostatin A produced by an endophytic fungus of European yew may protect the host from leucinostatin toxicity. *Chem. Biol.* 4:529-536.

Strobel, G., X. Yang, J. Sears, R. Kramer, R. S. Sidhu, and W. M. Hess. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. Microbiology 142:435-440.

Wang J.F., G.L. Li, H.Y. Lu, Z.H. Zheng, Y.J. Huang and W.J. Su .2000. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 193 pp. 249–253.

Yaojian Huang, Jianfeng Wang, Guiling Li, Zhonghui Zheng and Wenjin Su, Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical *plants Taxus mairei, Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 31(2001),pp.163-167.

Zhao J. Shan T. Mou Y. and Zao L. (2011) Plant+derived bioactive compounds produced by endophytic fungi . *Mini Rev Med. Chem.* 11(12). 159-168.

Zheng RY, Jiang H. 1995. Rhizomucor endophyticus sp. nov., an endophytic zygomycetes from higher plants. Mycotaxon 56: 455-466

กัญยา ปรีชาศุทธิ์, ขจรศักดิ์ ตระกูลพัว และ บงกชวรรณ สุตะพาหะ. 2547. เชื้อราที่สำคัญทางการแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลีนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นงนุช วณิตย์ธนาคม. 2540. วิทยาเชื้อราทางการแพทย์. พี.บี.ฟอเรน บุคส์ เซ็นเตอร์ พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพ.

นัยนา ต่างใจ และสุริยา ฤธาทิพย์. 2550. ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดของสารสกัดจากหมากนวล. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. กรุงเทพฯ. ปีที่ 40 ฉบับที่ 3.

พูนลาภ ป้อมเป็ง และคณะ (2550) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์จากกรวยป่า เพกา และ กอมขม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

ภาคผนวก

ก. **Triple Surface Sterilization** (อุรัตน์ และ อารี, 2550)

ทำความสะอาดส่วนพื้นผิวภายนอกของตัวอย่างชิ้นส่วนพืชให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี แช่ใน แอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที แช่ในสารละลาย sodium hypochlorite 1% นาน 3 นาที แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95% นาน 30 วินาที จากนั้นปล่อยให้ในอากาศ (air dry) โดยนำตัวอย่างชิ้นส่วนของพืชมาวางบนกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อใน Laminar flow

ข. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

ส่วนประกอบ มีดังนี้

Potato infusion	200	g
Dextrose	20	g
Agar	20	g
Distilled water	1000	ml

ขั้นตอนการเตรียม นำมันฝรั่งมาล้างให้สะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร 200 กรัม ต้มในน้ำ ประมาณ 10-15 นาที กรองเอาส่วนวนน้ำสกัดมาเติม Dextrose และ agar อย่างละ 20 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มล. แล้วนำไปต้มอีกครั้งจนวุ้นละลาย แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient agar (NA)

ส่วนประกอบ มีดังนี้

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Agar	15	g
Distilled water	1000	ml

เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

3. Nutrient Broth (NB)

ส่วนประกอบ มีดังนี้

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Distilled water	1000	ml

เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

4. Mueller Hinton Agar (MHA)

ส่วนประกอบ มีดังนี้

Beef infusion	30	g
Casein acid hydrolysate	17.5	g
Starch	1.5	g
Agar	17.5	g
Distilled water	1000	ml

เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

5. Malt extract agar (MEA)

ส่วนประกอบ มีดังนี้

Malt extract	3	g
Yeast extract	3	g
Peptone	5	g
Glucose	10	g
Agar	20	g
Distilled water	1000	ml

เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

ค. ผลงานวิจัยที่นำไปเผยแพร่

อุรัตน์ พิมลศรี. 2563. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะม่วงป่า(*Mangifera caloneura)* วารสารนิติเวชศาสตร์ ปีที่ 12 ฉบับที่ 1 มกราคม - มิถุนายน 2563 หน้าที่ 29-47.

วารสารนิติเวชศาสตร์

Forensic Medicine Journal

ปีที่ 12 ฉบับที่ 1 มกราคม - มิถุนายน 2563 Vol.12 No.1

ISSN 1905 - 3800

Free thinking, but reasonable, cared for social benefits

อิสระทางความคิด แต่มีเหตุผล และเพื่อประโยชน์ต่อสังคม

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะม่วงป่า (*Mangifera caloneura*)

อุรัตน์ พิมลศรี*

บทคัดย่อ

ราเอนโดไฟต์จำนวน 275 ไอโซเลต แยกได้จากใบและกิ่งของมะม่วงป่าในพื้นที่ตำบลบางระกำ อำเภอบางระกำ และตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก และจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ในลำดับจีนัส ได้แก่ *Colletotrichum sp.*(12.73%), *Fusarium* sp. (10.55%), *Phomopsis* sp.(3.28%), *Phoma* sp. (1.09%), *Alternaira* sp. (4.73%), *Cuvularia* sp.(4.37%), *Helminthospora* sp.(2.91%), *Xylaria* sp.(8.37%), *Penicilium* sp. (3.64%), *Mycelis sterilia* (9.09%), *Bipolaris* sp.(2.55%), *Pestalotiopsis* sp.(3.64%), *Trichoderma* sp.(5.46%), *Aspergillus* sp. (6.19%), *Paecilomyces* sp.(4.00%), *Sclerotium* sp. (2.19%) และ Unidentified (15.28%) จากนั้นนำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Malt extract broth(MEB) นำส่วนน้ำเลี้ยงมาทดสอบฤทธิ์ต้าน *Bacillus cereus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Shigella flexneri, Vibrio cholerae, Candida albicans* และ *Colletotrichum* sp. ด้วยวิธี paper disc agar diffusion พบว่าน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบได้มากกว่าหรือเท่ากับ 4 ชนิด และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone มากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร จำนวน 22 ไอโซเลต และ *Fusarium* sp. 1MCB-L10 แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด จึงได้นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 วัน แล้วกรองแยกส่วนของน้ำเลี้ยงมาสกัดด้วย methanol และ ethyl acetate นำสารสกัดหยาบทั้งสองส่วนมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Paper disc agar diffusion และตรวจหาค่า minimum inhibitory concentration(MIC), minimum bactericidal concentration(MBC) และ minimum fungicidal concentration (MFC) ต่อเชื้อทดสอบ *E.coli* และ *C.albicans* พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol แสดงผลการออกฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethyl acetate จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะม่วงป่าเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์อาจนำไปใช้ในทางการแพทย์หรือทางการเกษตรต่อไปได้

คำสำคัญ : ราเอนโดไฟต์ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ มะม่วงป่า

---

*ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

*ผู้เขียนที่รับผิดชอบบทความ E-mail: uratpi@nu.ac.th

Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated From *Mangifera caloneura*

Urat Pimolsri*

Abstract

Two hundred and seventy-five isolates of endophytic fungi isolated from leaf and antinode of *Mangifera caloneura* in the area of Tumbol Bangrakhum, Bangrakum district and Tumbol Tapo, Maung district, Phitsanulok province were isolated and also identified by morphological characteristics. Those fungal endophyes were identified belong to *Colletotrichum* sp. (12.73%), *Fusarium* sp. (10.55%), *Phomopsis* sp. (3.28%), *Phoma* sp. (1.09%), *Alternaria* sp. (4.73%), *Cuvularia* sp. (4.37%), *Helminthospora* sp. (2.91%), *Xylaria* sp. (8.37%), *Penicilium* sp. (3.64%), *Mycelis sterilia* (9.09%), *Bipolaris* sp. (2.55%), *Pestalotiopsis* sp. (3.64%), *Trichoderma* sp. (5.46 %), *Aspergillus* sp. (6.19%), *Paecilomyces* sp. (4.00%), *Sclerotium* sp. (2.19%) and Unidentified (15.28%). All endophytic fungal isolates were screened for potential production of bioactive metabolites. They were tested for antimicrobial activity against pathogenic microorganisms such as *Bacillus cereus, Escherichia coli, Staphylococus aureus, Shigella flexneri, Vibrio cholerae, Candida albicans* and *Colletotrichum* sp. The malt extract broth (MEB) was used as fermentation medium. The supernatants of 10 days fermentation were checked the antimicrobial activity against the test organisms as mention by using paper disc agar diffusion method. The amount of 22 antimicrobial compound producing isolates which showed inhibitory effect on the growth more than or equal to 4 of the test organisms and the diameter of the inhibition zone greater than or equal to 10 millimetre (mm). The isolate *Fusarium* sp. 1MCB-L10 showed the highest antimicrobial activity spectrum and then selected for culturing into 200 milliliter (ml) of MEB as fermentation media for 15 days. The filtrate was extracted with methanol and ethyl acetate. Both crude extracts were tested for antimicrobial activity against test organisms as above by using paper disc agar diffusion method and also determined minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC) against *E.coli* and *C.albicans*. It was found that the methanolic extract showed a better inhibition to the test organisms than the ethyl acetate extract. These results indicated that endophytic fungi from wild mango is a potential source of bioactive compounds that may useful in medicine or agriculture.

Keywords: endophytic fungi, antimicrobial activity, *Mangifera caloneura*

---

*Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Muang, Phitsanulok 65000

* Corresponding author. E-mail: uratpi@nu.ac.th

บทนำ

ราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi) เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชและสามารถเจริญแฝงอยู่โดยไม่ทำให้เกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติต่อพืช ซึ่งเป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (mutualism) โดยเชื้อราจะได้รับสารอาหารชนิดต่าง ๆ จากพืช และพืชก็จะได้รับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อราผลิตขึ้น ช่วยในการป้องกันพืชจากการถูกรบกวนหรือทำลายจากสัตว์ แมลง เนมาโทด (nematode) หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (Petrini,1991) ปัจจุบันได้มีรายงานการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆได้จากพืชหลายชนิด ได้แก่ *Picea* mariana (Strobel *et al*,1996) Pacific yew (Sterle and Strobel,1995) *Taxus wallachinana* (Strobel *et al*,1996) European yew(Strobel and Hess,1997) และจากรายงานของ Wang และคณะ (2000) ได้ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรจีน 3 ชนิด ได้แก่*Taxus mairei, Cephalataxus fortunei* และ *Torreya grandis* เป็นต้น

มะม่วงป่า มีชื่อพื้นบ้านว่า มะม่วงพรวน มะม่วงเทพรส มะม่วงกะล่อน (*Mangifera caloneura*) จัดอยู่ในวงศ์ Anacardiaceae เป็นต้นไม้ยืนต้น เจริญเองตามธรรมชาติ มีชีวิตอยู่รอดได้ยาวนาน ทนทานต่อสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติได้ดี พบได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยส่วนใบ และผล ไม่ถูกรบกวนจากแมลง หรือเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับมะม่วงเศรษฐกิจพันธุ์ต่าง ๆ ชนพื้นเมืองในบางประเทศนำมาใช้เป็นยาสมุนไพร ได้แก่ ใบสด นำมาเคี้ยวรักษาโรคทางเหงือกและฟัน น้ำคั้นใบสด รักษาอาการโรคหลอดลมอักเสบ รักษาเบาหวาน ปวดฟัน แก้บิด แก้หอบหืด ล้างแผลเพื่อฆ่าเชื้อและทำให้แผลหายเร็ว สะท้อนให้เห็นว่าใบมะม่วงมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ยังไม่มีรายงานวิจัยมากนัก การค้นคว้าหาเชื้อราที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆได้มีรายงานมาอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน ได้แก่ *Fusidium coccineum* ผลิต zaragozic acids และ viridiofungins ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง squalene synthase ซึ่งจะนำมาพัฒนาใช้เป็นยาลด cholesterol ในเลือด zaragozic acids D1, D2, chaetomellic acids และ fusidienol มีฤทธิ์ยับยั้งต่อ farnesyl-protein transferase มีแนวโน้มที่จะนำมาพัฒนาใช้เป็นยาต้านมะเร็ง (https://en.wikipedia.org/wiki/Fusidic_acid) และ การค้นพบ fusaricide และ oxysporidinone ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราผลิตได้จาก *Fusarium* sp. (Roseman, 1994) เป็นต้น รายงานวิจัยในประเทศไทย พูนลาภ และคณะ (2550)ทำการแยกราเอนโดไฟต์จากกรวยป่า เพกา และกอมขม สามารถแยกราเอนโดไฟต์ที่มีลักษณะโคโลนีทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันได้จำนวน 40 ไอโซเลต แล้วนำมาคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นต่อเชื้อทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* โดยวิธี dual-

culture agar diffusion พบว่าราเอนโดไฟต์มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งหมด ยกเว้น *P. aeruginosa* จำนวน 15 ไอโซเลต(37.5 %) ราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้าน *S. aureus* และการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Malt extract agar สามารถสร้างสารออกฤทธิ์และความแรงของสารออกฤทธิ์ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีผลต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

จะเห็นได้ว่า ราเอนโดไฟต์สามารถแยกได้จากพืชชนิดต่างๆ และผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ หรือทางการเกษตรช่วยควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุก่อโรคชนิดต่างๆ(Zhao *et al*, 2011) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นรายงานของพืชในเขตหนาวและเขตอบอุ่น (Carroll, 1990 และ Carroll, 1991) ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อน มีชนิดของพืชเจริญอยู่ตามธรรมชาติมากมาย แต่ยังไม่มีรายงานใดเลยที่ได้ทำการแยกราเอนโดไฟต์จากม่วงป่า และศึกษาสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำมะม่วงป่า มาทำการแยกราเอนโดไฟต์ จัดจำแนกชนิด และเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งสามารถนำผลการวิจัยที่ได้นี้ไปต่อยอดพัฒนางานวิจัยต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างพืช และการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์

เก็บตัวอย่างใบ และกิ่ง ของมะม่วงป่าที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีลักษณะอาการของโรค หรือแมลงกัดกิน ในพื้นที่ตำบลบางระกำ อำเภอบางระกำ และตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 10 ต้น นำตัวอย่าง มาล้างด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้งพอหมาดๆ ใช้กรรไกรปราศจากเชื้อ ตัดตัวอย่างให้มีขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร ทำการแยกเชื้อด้วยเทคนิค tissue transplanting โดยทำการกำจัดเชื้อบริเวณพื้นผิวดัดแปลงจาก Naik *et al.*(2009) ด้วยการทำ triple surface sterilization ด้วยการแช่ชิ้นตัวอย่างใน 70% Ethanol นาน 1 นาที 2.5% NaOCl นาน 3 นาที และ 70% Ethanol นาน 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วจึงนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar (MA) ที่เติม chloramphenicol ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส : ซ°) เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจดูเส้นใยของราเอนโดไฟต์เจริญออกมาจากชิ้นตัวอย่างพืช ย้ายเส้นใยให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ทำการแยกเชื้อ 10 ชิ้น ใบ/ต้น แล้วทำการตัดส่วนปลายเส้นใย (hyphal tip)ไปเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา

5 วัน เมื่อได้เชื้อราบริสุทธิ์แล้ว ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อราไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นเอียง PDA เป็น Stock culture เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ซ° นำไปไว้ใช้ในทดลองต่อไป

2. การจำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้

ทำการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์จาก Stock culture บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MEA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 10 วัน แล้วบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี ได้แก่ ผิวหน้า และสีของโคโลนี สีของเส้นใย และสปอร์ การสร้างรงควัตถุ และศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากการเตรียมสไลด์ โดยวิธี Slide culture technique จากนั้นนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มาเปรียบเทียบลักษณะตามคู่มือการจัดจำแนกชนิด (Barnettand Hunter, 1987, 1998, 1980, Brain. 1980, Katsuhiko Ando.2015. Domch K.H. and W. Gams .1980 และ Kifferand Morelet 2000) ในระดับจีนัส (Genus)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้

นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมด มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ปราศจากเชื้อตัดบริเวณส่วนปลายเส้นใยขอบโคโลนี เป็น agar block ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร ถ่ายเชื้อจำนวน 1 ชิ้น ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Malt extract broth (MEB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ทำไอโซเลตละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน บน reciprocal shaker ความเร็ว 100 stroke/นาที ทำการเก็บน้ำเลี้ยง (supernatant) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี paper disc agar diffusion โดยนำ cell suspension ของแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Bacillus cereus, Staphyloococus. aureus, Escherichia. coli, Shigella flexneri* และ *Vibrio cholerae* ปรับความขุ่นเทียบกับสารละลาย Mc Farland No. 0.5 มาเกลี่ย (swab) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar (MHA) ด้วยไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ ส่วนเชื้อราทดสอบ ได้แก่ *Candida albicans* และ *Colletotrichum* sp. ทำ cell หรือ spore suspension ปรับความเข้มข้นของเซลล์ หรือ สปอร์ เท่ากับ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ ชุด Positive control ของแบคทีเรียใช้แผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐาน gentamycin 10 µg/แผ่น ส่วนเชื้อราใช้ amphotericin B 10 µg/แผ่น นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone โดยใช้ vernier caliper วัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบของ *Fusarium* sp. 1MCB-L10 โดยวิธี Paper disc diffusion

4.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ ทำการเพาะเลี้ยง *Fusarium* sp. 1MCB-L10 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ให้ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดบริเวณส่วนปลายเส้นใยบริเวณขอบๆโคโลนีออกเป็นชิ้นๆ(agar block) แล้วถ่ายชิ้นวุ้นนี้จำนวน 5 ชิ้น ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มบน reciprocal shaker ความเร็ว 100 stroke/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน ทำการเก็บน้ำเลี้ยง (fermentation broth) โดยการกรองด้วยผ้าขาวบาง แยกเอากากเส้นใยออก แล้วกรองอีกครั้งด้วย กระดาษกรอง Whatman No.1 แบ่งน้ำเลี้ยงเป็น 2 ส่วน ไปสกัดด้วย mathanol(MeOH) และ ethyl acetate (EtOAc) อัตราส่วนของน้ำเลี้ยงต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 2:1 ทำการสกัดตัวทำละลายทั้งหมด 2 ครั้ง แล้วระเหยตัวทำละลายออกให้แห้งด้วย rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ methanolic crude extract และ ethyl acetate crude extract

4.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบโดยวิธี Paper disc agar diffusion โดยนำแบคทีเรียทดสอบมาเตรียม cell suspension ปรับความขุ่นเทียบกับสารละลาย Mc Farland เท่ากับ No. 0.5 นำมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ส่วน *C.albicans* ทำ cell suspension และ *Colletotrichum* sp. ทำ spore suspension ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^{6} เซลล์หรือสปอร์/มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นนำสารสกัดหยาบทั้งสองส่วนมาละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปรับความเข้มข้น 100 mg/ml หยดลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (∅) เท่ากับ 6 มิลลิเมตร ปริมาตร 20 μl แล้วนำมาวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เกลี่ยเชื้อทดสอบไว้แล้ว ชุดควบคุมที่ให้ผลบวกใช้ยาปฏิชีวนะ gentamycin 10 µg/แผ่น และ amphotericin B 10 µg/แผ่น สำหรับเชื้อทดสอบแบคทีเรีย และเชื้อรา ตามลำดับ นำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส(clear zone) ด้วย vernier caliper มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

5. การหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัดหยาบ *Fusarium* sp. 1MCB-L10

การตรวจหาค่า MIC เป็นการทดสอบหาระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ โดยนำสารสกัดหยาบทั้งสองส่วนจากการเพาะเลี้ยง *Fusarium* sp. 1MCB-L10 มาละลายด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 mg/ml เก็บไว้เป็น stock solution แล้วทำการเจือจางสารสกัดหยาบวิธี two fold serial dilution ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB สำหรับต่อเชื้อทดสอบ *E. coli* และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB สำหรับต่อเชื้อทดสอบ *C. albicans* โดยการปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB และ PDB ปราศจากเชื้อลงใน 96-well microtiter plates หลุมละ 50 µl แล้วปิเปตสารสกัดหยาบใส่ลงใน 96-well microtiter plates ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอยู่ หลุมละ 50 µl แล้วทำการเจือจางแบบ 2-fold dilution เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบอยู่ในช่วง 100-0.2 mg/ml แล้วดูดอาหารและสารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้ายทิ้ง 50 µl โดยทดสอบความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ จากนั้นดูดเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เตรียมไว้ใส่ sterile 96-well microtiter plates ที่มีอาหารเหลวและสารกัดหยาบ หลุมละ 50 µl เขย่าเบาๆ สำหรับเชื้อทดสอบแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง จากนั้นหยด resazurin indicater (0.18%) 10 µl ลงไปในทุกหลุม ทำการบ่มต่อ 3-5 ชั่วโมง เชื้อทดสอบเชื้อรา บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วหยด resazurin indicator (0.18%) 10 µl บ่มต่อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่ indicator ไม่เปลี่ยนสี จากสีฟ้าเป็นสีชมพู ดัดแปลงตามวิธีของ Palomino *et al.*2002 และใช้สารปฏิชีวนะ gentamycin และ amphotericin B เป็น positive control

การหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อทดสอบ *E. coli* และ C. *albicans* โดยนำผลที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ในการทดสอบหาค่า MIC มา streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient Agar (NA) และ PDA สำหรับแบคทีเรีย และเชื้อราทดสอบตามลำดับ บันทึกผลความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เป็นค่า MBC และ MFC ตามลำดับ

ผลการศึกษา

การเก็บรวบรวมใบ กิ่ง จากต้นมะม่วงป่า ในเขตพื้นที่ตำบลบางระกำจำนวน 5 ต้น และตำบลท่าโพธิ์จำนวน 5 ต้น สามารถแยกราเอนโดไฟต์บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 275 ไอโซเลต ดังตารางที่ 1.

ตารางที่ 1. แสดงจำนวนไอโซเลตของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกิ่งและใบของมะม่วงป่าในเขตตำบลบางระกำ อำเภอบางระกำ และตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	มะม่วงป่า	จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ (ไอโซเลต)		
		กิ่ง (Petiole=P)	ใบ (Leaf=L)	รวมทั้งหมด
ตำบลบางระกำ อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก	1MCB	19	30	49
	2MCB	11	21	32
	3MCB	9	17	26
	4MCB	10	21	31
	5MCB	4	16	20
ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก	6MCT	5	11	16
	7MCT	8	13	21
	8MCT	14	22	36
	9MCT	9	15	24
	10MCT	6	14	20

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่ได้เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ **PDA** และ **MEA** ประกอบกับลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากการทำ **slide culture technique** ของราเอนโดไฟต์สามารถจัดจำแนกชนิดได้จำนวน **16 genus** ดังตารางที่ 2.

ตารางที่ 2. แสดงรายชื่อจีนัสของราเอนไฟต์ที่จำแนกชนิดได้ จำนวนไอโซเลต และเปอร์เซนต์ของแต่ละจีนัส

จัดจำแนกชนิดเป็นจีนัส (Genus)	จำนวนไอโซเลต(Isolate)	จำนวนเปอร์เซนต์ (%)
Colletotrichum sp.	35	12.73
Fusarium sp.	29	10.55
Phomopsis sp.	9	3.28
Phoma sp.	3	1.09
Alternaira sp.	13	4.73
Cuvularia sp.	12	4.37
Helminthospora sp.	8	2.91
Xylaria sp.	23	8.37
Penicilium sp.	10	3.64
Mycelis sterilia	25	9.09
Bipolaris sp,	7	2.55
Pestalotiopsis sp.	10	3.64
Trichoderma sp.	15	5.46
Aspergillus sp.	17	6.19
Paecilomyces sp.	11	4.00
Sclerotium sp.	6	2.19
Unidentified	42	15.28

การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ที่บรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 stroke/นาที เป็นเวลานาน 10 วัน เมื่อนำน้ำเลี้ยงมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อทดสอบ ได้แก่ *B. cereus, E.coli, S. aureus, Shi. flexneri, V. cholerae, C. albicans* และ *Colletotrichum* sp ด้วยวิธี paper disc agar diffusion พบว่า น้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบได้มากกว่าหรือ เท่ากับ 4 ชนิด และแสดงผลให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone มากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร มีจำนวนเพียง 22 ไอโซเลต ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.

ตารางที่ 3. น้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลตที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบได้ $\geq$ 4 ชนิด และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ inhibition zone $\geq$ 10 มิลลิเมตร

ราเอนโดไฟต์ (ไอโซเลต)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ inhibition zone (มิลลิเมตร)						
	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ			เชื้อรา	
	B. cereus	*S. aureus*	*E. coli*	*Shi. flexneri*	*V. cholerae*	*C. albicans*	*Colletotrichum* sp
1MCB-L02	NI	10.0	10.0	NI	NI	10.0	12.0
1MCB-L07	10.0	12.0	10.0	NI	NI	10.0	10.0
1MCB-L10	10.0	14.5	12.5	12.0	10.0	13.5	10.0
1MCB-P12	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0

2MCB-L12	11.0	12.0	10.0	NI	NI	10.0	NI
2MCB-P05	10.0	12.0	10.0	NI	10.0	12.0	10.0
3MCB-L01	11.5	10.5	12.0	10.0	10.0	11.0	10.0
3MCB-L13	NI	10.0	10.5	NI	10.0	NI	10.0
4MCB-L17	10.0	12.5	11.5	10.0	10.5	11.0	12.0
5MCB-L04	10.0	10.0	NI	10.0	NI	10.0	10.0
5MCB-P04	NI	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	11.0
6MCB-L01	10.0	10.0	10.0	10.0	10.5	10.0	10.0
6MCT-L07	NI	10.0	10.5	NI	10.0	10.0	10.0
7MCT-L10	NI	10.5	10.0	NI	NI	10.5	10.0
7MCT-P05	10.5	11.0	10.0	10.0	10.0	12.0	10.0
8MCT-L01	12.0	12.5	10.5	10.0	10.0	12.5	11.0
8MCT-L15	12.0	12.0	12.0	10.0	10.0	12.0	12.0
8MCT-L19	12.5	14.0	10.0	10.0	10.0	13.0	10.0

9MCT-L09	NI	10.0	10.0	NI	NI	10.5	10.0
9MCT-P08	10.5	10.5	10.0	NI	NI	10.0	10.0
10MCT-P03	NI	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
10MCT-P06	NI	10.5	10.5	10.0	10.0	11.0	10.0
Gentamycin 10 µg	22.0	20.0	18.0	16.0	18.0	ND	ND
Amphotericin B 10 µg	ND	ND	ND	ND	ND	16.5	14.0

หมายเหตุ : NI = No inhibition zone observed ; ND = Not detected

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่แสดงการออกฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบพบว่าไอโซเลต 1MCB-L10 จำแนกชนิดเป็น *Fusarium* sp. มีลักษณะโคโลนีและโคนิเดีย ดังรูปที่ 1. เลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB แล้วนำ filtrate มาสกัดด้วย methanol และ ethylacetate ได้สารสกัดหยาบ 2 ส่วน คือ methanolic crude extract และ ethylacetate crude extract เมื่อนำสารสกัดหยาบทั้งสองส่วนมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อทดสอบ 7 ชนิด ดังข้างต้น ด้วยวิธี paper disc agar diffusion ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4. ส่วนการทดสอบหาค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบทั้งสองส่วน โดยการทำ two fold serial dilution ใน microtiter plate พบว่า ค่า MIC, MBC, MFC ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol มีค่าระดับความเข้มข้นต่ำกว่าของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethyl acetate ดังตารางที่ 5.

ตารางที่ 4. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Fusarium* sp. 1MCB-L10

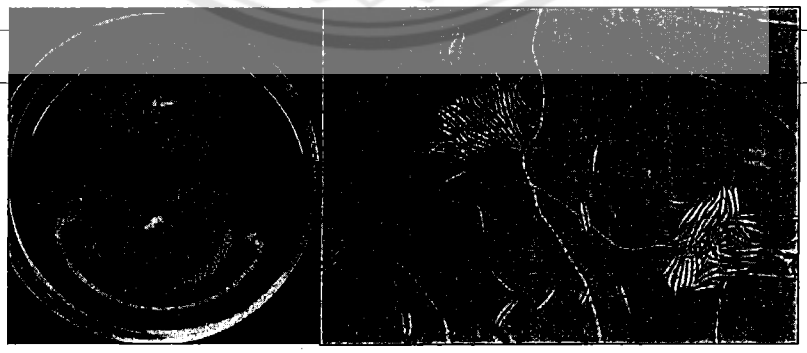
Fusarium **sp. 1MCB-L10 Crude Extract**	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ inhibition zone (มิลลิเมตร) (เส้นผ่าศูนย์กลางของ paper disc 6.0)						
	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ			เชื้อรา	
	B. cereus	***S. aureus***	***E. coli***	***Shi. flexneri***	***V. cholerae***	***C. albicans***	***Colletotrichum*** **sp**
MEOH Crude Extract	7.5	10.0	15.0	NI	NI	11.5	10.0
EtOAc Crude Extract	NI	7.0	10.0	7.0	NI	8.0	10.0
Gentamycin 10 µg	22.0	20.0	18.0	16.0	18.0	ND	ND
mphotericin B 10 µg	ND	ND	ND	ND	ND	16.5	14.0

หมายเหตุ : NI = No inhibition zone observed ; ND = Not detected

ตารางที่ 5. แสดงค่า MIC ,MBC และ MFC ของ MEOH Crude Extract และ EtOAc Crude Extract จากการเพาะเลี้ยง *Fusarium* sp. 1MCB-L10 ต่อ *E. coli* และ *C. albicans*

***Fusarium* sp. 1MCB-L10 Crude Extract**		**MIC(mg/ml)**	**MBC(mg/ml)**	**MFC(mg/ml)**
E. coli	MEOH Crude Extract	12.5	6.3	ND
	EtOAc Crude Extract	25.0	12.5	ND
C. albicans	MEOH Crude Extract	25.0	ND	12.5
	EtOAc Crude Extract	50.0	ND	25.0

หมายเหตุ : ND = Not detected



รูปที่ 1. แสดงลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของ *Fusarium* sp. 1MCB-L10 ที่แยกได้จากใบมะม่วงป่า

อภิปรายผลการศึกษา

เชื้อราหลายชนิดมีความสามารถผลิตสาร secondary metabolites ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางการแพทย์และทางการเกษตร ดังนั้นสำหรับประเทศไทยที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก จึงน่าที่จะมีเชื้อราที่ยังรอการค้นพบ และนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่าง ๆ ได้อีกอย่างมากมาย

จากการนำใบและกิ่งของมะม่วงป่าจำนวน 10 ต้น มาแยกราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมดจำนวน 275 ไอโซเลต ซึ่งแต่ละต้นของแต่ละพื้นที่ของการเก็บตัวอย่างสามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้จำนวนแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมะม่วงป่ามีอายุหรือลักษณะสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ทำให้มีประชากรของเชื้อราเจริญอยู่มีจำนวนแตกต่างกันได้ (Hata *et al.*1998) โดยแยกราเอนโดไฟต์จากส่วนใบได้จำนวนมากกว่าส่วนกิ่ง(ตารางที่ 1.) สอดคล้องกับรายงานของ Radu and Kqueen (2002) สามารถแยกราเอนโดไฟต์จากส่วนใบพืชได้มากที่สุด 90.9 % เมื่อเทียบกับส่วนกิ่ง และลำต้นของพืชสมุนไพรในประเทศมาเลเซีย เมื่อนำราเอนโดไฟต์ทั้งหมดมาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่ได้เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MEA ประกอบกับลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากการทำ slide culture technique เมื่อเปรียบเทียบลักษณะดังกล่าวแล้ว สามารถจัดจำแนกในระดับจีนัสได้จำนวน 16 genus สวนใหญ่จัดอยู่ใน genus *Colletotrichum , Fusarium, Mycelia Sterila* จำนวน 35(12.73%), 29(10.55%), 25(9.09%)ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 2.) และไอโซเลตที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 42 (15.28%)ไอโซเลต เนื่องจากสภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไม่สร้างโคนิเดีย ซึ่งราเอนโดไฟต์เหล่านี้สามารถแยกจากพืชตระกูลปาล์มได้เช่นกัน(Song *et al.* 2016, Frohlich *et al.* 2000)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงจากการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB ต่อแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบ โดยวิธี paper disc agar diffusion พบว่าน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์ออกฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบซึ่งแสดงผลจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต และราเอนโดไฟต์จำนวน 22 ไอโซเลตเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรามากกว่าหรือเท่ากับ($\geq$) 4 ชนิด ของเชื้อที่นำมาทดสอบ และแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone $\geq$ 10 มิลลิเมตร จะเห็นว่า bioactive metabolite ในน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์ทุกไอโซเลต สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S.aureus* ได้ โดยเฉพาะราเอนโดไฟต์ไอโซเลต 1MCB-L10 ซึ่งแยกมาจากส่วนใบของมะม่วงป่าในพื้นที่ตำบลบางระกำ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ทั้ง 7 ชนิด ถือได้ว่า เป็นไอโซเลตที่มีขอบเขตในการออกฤทธิ์กว้าง(broad

spectrum) และแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone กว้างที่สุด เท่ากับ 14.5 มิลลิเมตร (ตารางที่ 3.) ซึ่งได้จัดจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็น *Fusarium* sp. (รูปที่ 1.) สอดคล้องกับรายงานของ สุภักตร์ และธีระ (2550) ที่ทำ การคัดแยกราเอนโดไฟต์จากมะเกลือ (*Diospyros mollis Grif*) แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ของสารทุติยภูมิ ต่อ *S. aureus*, ด้วยวิธี Paper disc diffusion assay พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยง BB2, EB2 และ CB2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดี เช่นกัน

ผลการนำ methanolic crude extract และ ethylacetate crude extract จากการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. 1MCB-L10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อทดสอบ 7 ชนิด ด้วยวิธี paper disc agar diffusion จะเห็นว่า methanolic crude extract แสดงการออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *E. coli* มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ inhibition zone มากที่สุดเท่ากับ 15.0 มิลลิเมตร นอกจากนี้แสดงการออกฤทธิ์ต่อจำนวนเชื้อสอบชนิดอื่นๆ และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ inhibition zone ได้มากกว่า ethylacetate crude extract (ตารางที่ 4.)

การทดสอบหาค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบทั้งสองส่วน โดยการทำ two fold serial dilution ใน microtiter plate พบว่า ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol ต่อเชื้อทดสอบ *E. coli* มีค่าระดับความเข้มข้นที่ 12.5 mg/ml และ 6.3 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีกว่าของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethyl acetate และค่า MIC และ MFC ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol ต่อเชื้อทดสอบ *C. albicans* มีค่าระดับความเข้มข้นที่ 25.0 และ 12.5 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ได้ดีกว่าของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethyl acetate เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 5.)

สรุปผลการศึกษา

จากผลการวิจัยนี้ สารสกัดหยาบจากราเอนไฟต์ที่แยกได้จากมะม่วงป่า สร้างสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ แสดงว่าราเอนโดไฟต์เหล่านี้ มีศักยภาพและความสำคัญต่อการศึกษาในอนาคตของพืชชนิดนี้ เพื่อประโยชน์ต่อในการนำไปใช้ในยาและเวชภัณฑ์ การศึกษาอื่น ๆ ยังคงจำเป็นสำหรับการระบุสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นต้น และสามารถนำผลการวิจัยที่ได้นี้ไปต่อยอดพัฒนางานวิจัยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยภายใต้งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.แสงชัย นทีวรานารถ ที่ช่วยตรวจทานแก้ไขต้นฉบับงานวิจัยนี้ และ ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับทำงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth edition. The American Phytopathological Society.

Bernett H.L., Barry B. Hunter.1987. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th edition Mac millan Publishing Company .USA. 218.

Brain C. Sutton. 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfect with pycnidium, acervulus and stroma. Common Wealth Mycological Institute. 696.

Carroll, G. C. 1990. Fungal endophytes in vascular plants: mycological research opportunities in Japan. Trans. Mycol. Soc. Japan 31: 103-116.

Carroll, G. C .1991. Fungal associates of woody plants as insect antagonists in leaves and stems.pp. 253-271. In P. Barbosa, V.A. Ksischik and C. G. Jones (eds.), Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interactions, John Wiley & Sons. Inc., New York

Domch K.H. and W. Gams .1980. *Compendium of soil fungi.* Volume 1. Academic Press pp.859.

Frohlich, J., Hyde, K. D. and Petrini, O. 2000. Endophytic fungi associated with palms. Mycological Research 104:1202-1212

Hata K, Futai K and Tsuda M .1998. Seasonal and needle age-dependentchanges of the endophytic mycobiota in Pinus thunbergii and Pinus densifloraneedles. Can J Bot 76:245–250.

Huang, L., R. B. Lingham, G. H. Harris.1995. New fungal metabolites as potential antihypercholesterolemics and anticancer agents. *Can. J. Bot.* 73 (Suppl. 1): S898-S906.

Katsuhiko Ando.2015. Identification of mitosporic fungi.Biological resource center ,national Institute of technology and evaluation (NITE) Japan. pp.86.

Kiffer, E. and Morelet, M. 2000. The Deuteromycetes, Mitosporic Fungi: Classification and Generic Keys. Science Publishers, USA.

Naik, B. S., J. Shashikala, and Y. Krishnamurthy. 2009.Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*. Microbiol. Res. 164: 290-296.

Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J. & Portaels, F. 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 46.2720 -2722.

Petrini, O.1991. Fungal endophytes of tree leaves.p. 179-197. In J. H. Andrews, and S. S. Hirano (eds),. Microbial Ecology of Leaves. Springer-Verlag, New York.

Radu, S., and C.Y. Kqueen. 2002. Preliminary screening of Endophytic fungi from Medicianl Plants in Malasia for antimicrobial and antitunour activity. Malasian Journal of Medicical Sciencees. 9: 23 – 33.

Raju, N., S. Niranjana, G. Janardhana, H. Prakash, H. Naik, B. S., J. Shashikala, and Y. Krishnamurthy. 2009. Study on the diversity of endophytic communities seed oil on skin pathogenic microorganisms. Res. J. Med. Plant, 1(2): 60-64.

Rossman, A. Y. 1994. A strategy for an all taxa inventory of fungal biodiversity. In C.-I. Peng, and C. H.Chou (eds.). Biodiversity and terrestrial ecosystems. Inst. Botany, Acad. Sinica Monograph Series No.14.

Song, J. J., Pongnak, W. and Soytong, K. 2016. Isolation and Identification of Endophytic Fungi from 10 Species Palm Trees International Journal of Agricultural Technology 12(2): 349-363.

Sterle, A., and G. Strobel .1995. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, Taxus brevifolia. *J. Nat. Prod.* 58:1315-1324.

Strobel, G. A., and W. M. Hess. 1997 Glucosylation of the peptide leucinostatin A produced by an endophytic fungus of European yew may protect the host from leucinostatin toxicity. *Chem. Biol.* 4:529-536.

Strobel, G., X. Yang, J. Sears, R. Kramer, R. S. Sidhu, and W. M. Hess. 1996 Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142:435-440.

Wang J.F., G.L. Li, H.Y. Lu, Z.H. Zheng, Y.J. Huang and W.J. Su .2000. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 193 pp. 249–253.

Yaojian Huang, Jianfeng Wang, Guiling Li, Zhonghui Zheng and Wenjin Su.2001. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei and Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 31 pp.163-167.

Zhao J. Shan T. Mou Y. and Zao L. (2011) Plant+derived bioactive compounds produced by endophytic fungi . *Mini Rev Med. Chem.* 11(12). 159-168.

https://en.wikipedia.org/wiki/Fusidic_acid. Fusidic acid. Retrieved 2020.05.24

พูนลาภ ป้อมเป็ง และคณะ (2550) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์จากกรวยป่า เพกา และ กอมขม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

สุภักตร์ ปลิงกระโทก และ ธีระ ธรรมวงศา. 2550. ราเอนโดไฟต์จากมะเกลือและลักษณะทางสัณฐานวิทยา.งานวิจัย. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา. สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ.

สัญญาเลขที่ .....R2557C006.....

ชื่อโครงการ.....ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะม่วงป่า .....

รายงานสรุปการเงิน (ในรอบ ...30.... เดือน)

ชื่อผู้รับทุน (หัวหน้าโครงการ) .....นางอุรัตน์ พิมลศรี.....

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ ....1 ตุลาคม 2556..... ถึงวันที่ .....31 มีนาคม 2559.....

รายจ่าย

หมวด (ตามสัญญา)	งวดที่ 1	งวดที่ 2	งวดที่ 3	รวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน(งวดที่ 1-3)	งบประมาณทั้งหมดที่ตั้งไว้	คงเหลือ (หรือเกิน)
ก. ส่วนที่โครงการบริหาร						
1. ค่าตอบแทน	3,000.00	1,000.00	-	4,000.00	15,000.00	11,000.00
2. ค่าใช้สอย	5,000.00	1,500.00	-	6,500.00	18,000.00	11,500.00
3. ค่าวัสดุ	49,013.00	60,487.00	-	109,500.00	115,000.00	5,500.00
4. ค่าสาธารณูปโภค	-	-	-	-	2,000.00	2,000.00
รวม	57,013.00	62,987.00	-	120,000.00	150,000.00	30,000.00

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

	จำนวนเงินที่ได้รับ		วันที่ได้รับ
งวดที่ 1	60,000.00	บาท	29-Nov-56
งวดที่ 2	60,000.00	บาท	12-Jun-57
งวดที่ 3	-	บาท	.....
อื่นๆ	-	บาท	.....
รวม	120,000.00	บาท	

ค่าใช้จ่าย

งวดที่ 1	57,013.00	บาท
งวดที่ 2	62,987.00	บาท
งวดที่ 3	-	บาท
อื่นๆ	-	บาท
รวม	120,000.00	บาท

จำนวนเงินคงเหลือ - บาท

.....

(.....นางอุรัตน์ พิมลศรี.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

.....

(...นางอุรัตน์ พิมลศรี.....)

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ