ฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นกาฝาก

BIOACTIVITY OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM PARASITIC PLANTS

เมจรีย์ ปอประสิทธิ์
ศิรัฐจิกาล พันธุ์จารุรัตน์
สัติยานันท์ ใจห้าว

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นกาฝาก

BIOACTIVITY OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM PARASITIC PLANTS

เมจรีย์ ปอประสิทธิ์

ศิรัฐจิกาล พันธุ์จารุรัตน์

สัติยานันท์ ใจห้าว

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....148977
วัน,เดือน,ปี.....18 ส.ค. 2560

.b.12878376
.i.

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

BIOACTIVITY OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM PARASITIC PLANTS

MAEJAREE POPRASIT

SIRATCHIKARN PANJARURAT

SATTIYANAN JAIHAW

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY) DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นกาฝาก Bioactivity of endophytic fungi isolated from parasitic plants.
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเมจรีย์ ปอประสิทธิ์ รหัสนักศึกษา 55051152 นางสาวศิรัฐจิกาล พันธุ์จารุรัตน์ รหัสนักศึกษา 55051176 นางสาวสัติยานันท์ ใจห้าว รหัสนักศึกษา 55051190
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.จิตติ ท่าไว ประธานกรรมการ	
ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการ	
ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นกาฝาก Bioactivity of endophytic fungi isolated from parasitic plants.
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเมจรีย์ ปอประสิทธิ์ รหัสนักศึกษา 55051152 นางสาวศิรัฐจิกาล พันธุ์จารุรัตน์ รหัสนักศึกษา 55051176 นางสาวสัติยานันท์ ใจห้าว รหัสนักศึกษา 55051190
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นกาฝาก จำนวน 8 ต้น เก็บจากบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยทำการแยกราเอนโดไฟท์จากต้นกาฝากได้ทั้งหมด 192 ไอโซเลต แล้วสุ่มเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันจำนวน 139 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหาร PDB จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อราที่มีอายุ 2 และ 4 สัปดาห์ ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar well diffusion และจำแนกชนิดของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ผลการศึกษาพบว่า มีราเอนโดไฟท์จำนวน 5 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้แก่ ไอโซเลต 3CB9 3DB4 และ 3EB2 สามารถยับยั้งเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1 ได้ ไอโซเลต 2CB4 สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococus aureus ATCC 25923* ได้ ส่วนไอโซเลต 3GL3 สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli ATCC 25922* ได้ และสามารถจำแนกราเอนโดไฟท์ได้ 3 ไอโซเลตได้ดังนี้ ไอโซเลต 2CB4 คือรา *Chaetomium* sp. ไอโซเลต 3CB9 คือรา *Curvularia* sp. และไอโซเลต 3DB4 คือรา *Alternaria* sp. ส่วนไอโซเลต 3EB2 และ3GL3 พบว่าสร้างเส้นใยเพียงอย่างเดียว แต่ไม่สร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์อื่นๆ ดังนั้นข้อมูลยังไม่เพียงพอ จึงไม่สามารถจำแนกชนิดได้ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากาฝากเป็นแหล่งของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ

คำสำคัญ : กาฝาก เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ราเอนโดไฟท์ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ทางชีวภาพ

Title	Bioactivity of endophytic fungi isolated from parasitic plants.	
Students	Mrs. Meajaree Pororasit	Student ID 55051152
	Mrs. Siratchikarn Panjarurat	Student ID 55051176
	Mrs. Sattiyanan Jaihaw	Student ID 55051190
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2015	
Advisor	Dr. Nattawut Rungjindamai	

Abstract

The objective of this dissertation was to study the bioactivity of endophytic fungi isolated from parasitic plants. Eight parasitic plants were collected at King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL). A total of 192 endophytic fungi were isolated from these plant samples. One hundred and thirty nine isolates were randomly selected based on their morphotypes. The selected isolates of endophytic fungi were cultured in potato dextrose broth. The culture filtrates were tested for antimicrobial activities against four bacteria including Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1, *Staphylococus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC-25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-278 by the agar well diffusion method. The results showed that 5 isolates were able to inhibit test pathogens. Three Isolates (3CB9 3DB4 and 3EB2) inhibited the growth of *Staphylococus aureus ATCC-25923 and MRSA SK1* while isolate 2CB4 inhibited the growth of *Staphylococus aureus ATCC-25923* and isolate 3GL3 inhibited *Escherichia coli ATCC 25922*. These endophytic fungi were identified based on their morphological characteristics isolate 2CB4 3CB9 and 3DB4 were identified as *Chaetomium* sp., *Curvularia sp.* and *Alternaria sp.* However isolates 3EB2 and 3GL3 are sterile mycelia and do not produce any reproductive structure. This study demonstrates that parasitic plants are a significant source of endophytic fungi producing antimicrobial activity.

Keywords: Antimicrobial activities, Bioactivity, Endophytic fungi, Parasitic plants, Pathogen.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุกๆท่าน ขอขอบพระคุณ ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย ที่คอยให้คำปรึกษาดูแลอย่างใกล้ชิดและให้ความช่วยเหลือแนะนำที่ดีในการปรับปรุงข้อบกพร่องในการทำโครงงานพิเศษ และขอขอบพระคุณกรรมการสอบโครงงานพิเศษคือ รศ.ดร.จิตติ ท่าไว และดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ที่ให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยาและเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ สาขาวิชาชีววิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในเรื่องเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่อาคารสถานที่ที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือ

ขอขอบพระคุณ แม่บ้านและภารโรงที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้เก็บต้นกาฝาก ตลอดจนให้คำแนะนำและช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณบิดา-มารดา ที่ให้ได้รับการศึกษา ตลอดจนคอยเลี้ยงดูและอบรมสั่งสอน และเป็นกำลังใจเป็นแรงผลักดันในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงเพื่อนๆและบุคคลอื่นๆที่ไม่ได้กล่าวมา ผู้จัดทำโครงงานขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

นางสาวเมจรีย์ ปอประสิทธิ์
นางสาวศิรัฐจิกาล พันธุ์จารุรัตน์
นางสาวสัติยานันท์ ใจห้าว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก

Abstract ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ซ

คำย่อสัญลักษณ์ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2

2.1 กาฝาก 3

2.1.1 ลักษณะต้น 3

2.1.2 ชนิดของกาฝาก 4

2.1.3 การแพร่พันธุ์ 5

2.1.4 ประโยชน์ของกาฝาก 5

2.2 ราเอนโดไฟท์ 6

2.2.1 การแพร่กระจายของราเอนโดไฟท์ 7

2.2.2 ความจำเพาะต่อโฮสท์ของราเอนโดไฟท์ (Host specificity) 7

2.2.3 บทบาททางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ต่อพืช 8

2.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 9

2.4 แบคทีเรียก่อโรค 10

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.1 *Staphylococcus aureus* 10
2.4.2 *Escherichia coli* 10
2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa* 11
2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ 12
2.5.1 Dilution Method 12
2.5.2 Diffusion Method 12
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 15
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี 15
3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 15
3.1.2 สารเคมี 16
3.1.3 พืชกาฝาก 17
3.1.4 เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 17
3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ 17
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย 17
3.2.1 การเก็บตัวอย่างและแยกราเอนโดไฟท์จากกาฝาก 17
3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของราเอนโดรไฟท์ในการยับยั้ง
การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion 17
3.2.3 การจำแนกราเอนโดรไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง
การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 20
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 21
4.1 การแยกราเอนโดไฟท์จากต้นกาฝาก 21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของราเอนโดรไฟท์ในการยับยั้ง
การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion 21

4.3 การจำแนกราเอนโดรไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง
การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา 26

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 34

5.1 สรุปผลการวิจัย 34

5.2 ข้อเสนอแนะ 34

เอกสารอ้างอิง 35

ภาคผนวก 38

ภาคผนวก ก 39

ภาคผนวก ข 41

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 ข้อมูลต้นกาฝากที่เก็บได้จากบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง....18

4.1 จำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นกาฝาก....21

4.2 ราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 4 23

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 รากกาฝาก....3

2.2 ใบกาฝาก....4

2.3 ดอกกาฝาก....4

2.4 การแพร่พันธุ์ของกาฝากโดยนกกาฝาก....5

2.5 การป้องกันโรคพืชของเชื้อราเอนโดไฟท์ในต้นโกโก้....6

2.6 วงจรชีวิตของราเอนโดไฟต์ในพืช....7

2.7 เชื้อรา *Xylaria* sp....9

2.8 ลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus aureus*....10

2.9 ลักษณะของเชื้อ *Escherichia coli*....11

2.10 ลักษณะของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*....12

4.1 ราเอนโดไฟท์ที่สุ่มเลือกมาทดสอบ....22

4.2 บริเวณยับยั้งของไอโซเลต 2CB4 ต่อเชื้อ *Staphylococus aureus* ATCC 25923....24

4.3 บริเวณยับยั้งของไอโซเลต 3CB9 ต่อเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1....24

4.4 บริเวณยับยั้งของไอโซเลต 3DB4 ต่อเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1....24

4.5 บริเวณยับยั้งของไอโซเลต 3EB2 ต่อ เชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1....25

4.6 แสดงบริเวณยับยั้งของไอโซเลต 3GL3 ต่อเชื้อ *Escherichia coli* ATCC-25922....25

4.7 ลักษณะของราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 2CB4....28

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.8 ลักษณะของราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3CB9 27
4.9 ลักษณะของราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3DB4 30
4.10 ลักษณะของราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3EB2 31
4.11 ลักษณะของราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3GL3 32

คำย่อสัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
MIC	Minimum Inhibitory Concentration (ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการการเจริญเชื้อของจุลินทรีย์)
ITS	Internal Transcribed Spacer (เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นสากลในการระบุชื่อเชื้อรา)
rpm.	Revolutions per minute (รอบต่อนาที)
CFU	Colony forming unit (หน่วยวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์)
µg	microgram (ไมโครกรัม)
ml	milliliter (มิลลิลิตร)
SA	*Staphylococus aureus ATCC 25923*
MRSA	Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1
PA	*Pseudomonas aeruginosa ATCC-278*
EC	*Escherichia coli ATCC-25922*
GEN	Gentamycin
VA	Vancomycin

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะนั้นมีเริ่มมีมากขึ้น จนกลายเป็นปัญหาสำคัญในปัจจุบัน เนื่องจากไม่มียาปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมเชื้อก่อโรคที่ดื้อยาได้ จากปัญหาดังกล่าวทำให้มีความต้องการสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้มีแหล่งสำคัญมาจากจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารปฏิชีวนะ ส่วนใหญ่เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้จะมาจากพืช เนื่องจากพืชบางชนิดสามารถสร้างสารทุติยภูมิได้ เพื่อทำหน้าที่ปกป้องพืชจากศัตรูทางธรรมชาติและสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด (Cowan,1999)

พืชกาฝาก (Parasitic plants) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจัดอยู่ในวงศ์ Loranthaceae มักอาศัยเกาะขึ้นกับพืชอื่นและแย่งอาหารจากพืชที่เกาะอยู่ กาฝากจัดเป็นพืชอิงอาศัย (epiphyte) โดยการใช้รากแทงเข้าไปในท่อลำเลียงน้ำและแร่ธาตุของต้นไม้เพื่อแย่งอาหารมาเป็นของมัน พืชกาฝากมีอยู่มากมายหลายชนิด เช่น กาฝากประเภทเบียนรากจะเกาะอยู่บริเวณรากเบียนรากพืชชนิดอื่น และกาฝากประเภทเบียนลำต้นจะเกาะอยู่กับลำต้น กิ่ง ก้านและใบ การแพร่พันธุ์ของพืชกาฝากส่วนใหญ่จะอาศัยนกกาฝากเป็นตัวช่วยในการแพร่พันธุ์เมล็ดและผสมเกสร (อัสมา และคณะ,2554) มีรายงานการศึกษาการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในพืชกาฝากพบว่า มีการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ 9 ชนิดได้จากส่วน endopyte ของต้น Viscum album ซึ่งเป็นกาฝากชนิดหนึ่ง พบว่า รา *Fusarium oxysporum* สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *Trichothecium sp.* ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Proteus mirabilis* (Sadananda et al.,2013)

เชื้อราเอนโดรไฟท์ (Endophytic fungi) เป็นราที่มีช่วงชีวิตหนึ่งหรือตลอดทั้งชีวิตอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช ไม่ก่อให้เกิดโรคในพืช พบได้ทุกส่วนของพืชทั้งใบ ลำต้น ก้านใบและราก โดยเนื้อเยื่อของพืชที่มีราเอนโดรไฟท์สามารถทำงานได้ตามปกติ ราเอนโดรไฟท์อาจอาศัยอยู่ในสภาวะเกื้อกูล (mutuality) หรืออิงอาศัย (symbiotic) ซึ่งในปัจจุบันพบว่าราเอนโดรไฟท์เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในด้านการแพทย์ การเกษตรและทางอุตสาหกรรม (มนสวรรค์ และคณะ,2553) และจากรายงานการศึกษาประสิทธิภาพของราเอนโดรไฟท์จากโสนในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชพบว่า ราเอนโดรไฟท์ *T. trachyspypermus* สายพันธุ์ 1-41-4 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช โดยสามารถยับยั้งได้ถึง 64.8% และ 76.7% ตามลำดับ และราเอนโดรไฟท์ *Phomopsis sp.* สายพันธุ์ 3-212-2 สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชได้มากกว่า 70% ส่วนราเอนโดรไฟท์ที่เหลือสามารถควบคุมราสาเหตุโรคพืชได้ปานกลาง (ชุติมา และคณะ,2557)

ในงานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาการคัดเลือกเชื้อราเอนโดรไฟท์ที่แยกจากพืชกาฝาก แล้วสุ่มเลือกเชื้อราเอนโดรไฟท์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค จากนั้นคัดเลือกเชื้อราเอนโดรไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และจัดจำแนกราเอนโดรไฟท์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดแยกเชื้อราเอนโดรไฟท์จากต้นกาฝากให้ได้ประมาณ 150 ไอโซเลต

2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดรไฟท์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

3. เพื่อจัดจำแนกราเอนโดรไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

แยกและคัดเลือกเชื้อราเอนโดรไฟท์จากต้นกาฝากจำนวน 8 ต้น จากบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง นำเชื้อราเอนโดรไฟท์ที่แยกได้บริสุทธิ์ไปทดสอบประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion แล้วจัดจำแนกราเอนโดรไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

2. สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ของราเอนโดรไฟท์ที่มีการฤทธิ์ทางชีวภาพได้

3. เกิดการเรียรู้เทคนิคในการแยกราเอนโดไฟท์ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดรไฟท์และเทคนิคในการเตรียมสไลด์เชื้อรา

4. สามารถนำผลการศึกษาที่ได้ไปต่อยอดและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารต้านจุลินทรีย์ (antibiotic)

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กาฝาก

2.1.1 ลักษณะกาฝาก

กาฝาก (parasites) เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ในวงศ์ Loranthaceae อันดับ Santalales จีนัส Loranthaceae ชื่อไทยว่า **"กาฝาก"** กาฝากเป็นพืชที่มีเนื้อไม้แข็ง มีใบเขียวชอุ่มและผลัดใบตามฤดูกาล ซึ่งมีลักษณะสำคัญดังนี้

1. ราก รากกาฝากจัดเป็นรากเบียน (haustorium) ซึ่งจะแทงทะลุเปลือกไม้เข้าไปถึงชั้นเยื่อสร้างความเจริญเติบโต (Cambium) ของพืชที่เกาะอาศัยอยู่ รากจะใช้เกาะยึดกับลำต้นหรือกิ่งของไม้ชนิดอื่น (รูปที่ 2.1)

รูปที่ 2.1 รากกาฝาก (กลุ่มอารักขาพืช สำนักงานเกษตรจังหวัดนนทบุรี,2556)

2. ลำต้น ต้นกาฝากมีลักษณะเป็นเถาเลื้อย ลำต้นมีขนาดเล็กและแตกกิ่งขนาดเล็กออกจำนวนมาก

3. ใบ กาฝากเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ มีใบเป็นใบเดี่ยวที่ติดเรียงแบบตรงกันข้าม (opposite) ขอบใบเรียบ เนื้อใบเหนียวหนา บางชนิดมีใบกว้าง แต่บางชนิดมีใบแคบ โคนใบเรียว ปลายใบมนหรือบางชนิดปลายใบแหลม แผ่นใบเรียบ และค่อนข้างเป็นมัน (รูปที่ 2.2)

รูปที่ 2.2 ใบกาฝาก (บุษณีย์ เอี่ยมสีดา,2550)

4. ดอก ดอกกาฝากมีขนาดเล็กเป็นช่อบริเวณปลายยอด ดอกมีกลีบดอกสีเหลืองหรือส้มแดง (รูปที่ 2.3) ดอกกาฝากเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ภายในดอกมีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียทำให้ผสมตัวเองในดอกและผสมข้ามดอกได้

รูปที่ 2.3 ดอกกาฝาก (บุษณีย์ เอี่ยมสีดา,2550)

5. เมล็ดกาฝาก เมล็ดกาฝากมีลักษณะรูปไข่ เมล็ดมีสีส้มอมน้ำตาล เมล็ดมีขนาดเล็ก และเบา ไม่มีเปลือกหุ้มเมล็ดแต่จะมีเมือกเหนียวหุ้มเมล็ด

2.1.2 ชนิดของกาฝาก

กาฝากแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามลักษณะการเจริญเติบโตคือ

1. ชนิดที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ (holoparasites) จัดเป็นปรสิตต้นไม้แท้ ที่ไม่มีการสังเคราะห์ด้วยแสงและสร้างอาหารเองไม่ได้

2. ชนิดมีคลอโรฟิลล์ (hemiparasites) มีการสังเคราะห์ด้วยแสงสำหรับการเติบโตของลำต้นและใบ แต่จะเกาะเชื่อมกับต้นไม้อื่นเพื่อดูดน้ำและสารอาหารบางชนิดจากไม้อื่นเท่านั้น

2.1.3 การแพร่พันธุ์

เมล็ดกาฝากไม่สามารถแพร่พันธุ์ได้เอง นอกจากจะอาศัยนกเท่านั้น โดยนกจะกินผลกาฝากเข้าไปเป็นอาหารแล้วถ่ายเมล็ดกาฝากออกมาพร้อมกับมูลของมัน เนื่องจากเมล็ดกาฝากมียางเหนียวหุ้มอยู่จึงติดอยู่ที่ปากของนก ทำให้นกต้องเอาปากไปเช็ดกับกิ่งไม้ที่มันเกาะจนเมล็ดกาฝากติดอยู่กับกิ่งไม้ แล้วงอกเป็นต้นกาฝากเกาะกินต้นไม้นั้น ส่วนดอกกาฝากจะแพร่พันธุ์โดยนกจะสอดจะงอยปากเข้าไปดูดกินน้ำหวานในกรวยดอกกาฝาก ละอองเกสรตัวผู้จะติดตามปากและขนบริเวณหน้าผากของนก เมื่อนกเหล่านี้สอดจะงอยปากเข้าไปดูดกินน้ำหวานในดอกกาฝากดอกอื่น ละอองเกสรตัวผู้จึงร่วงหล่นและผสมกับเกสรตัวเมียในดอกกาฝากดอกนั้น (รูปที่ 2.4) ในทางชีววิทยาถือว่าเป็นการพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันระหว่างนกกับต้นกาฝากแบบชั่วคราว

รูปที่ 2.4 การแพร่พันธุ์ของกาฝากโดยนกกาฝาก (กลุ่มอารักขาพืชสำนักงานเกษตรจังหวัดนนทบุรี, 2556)

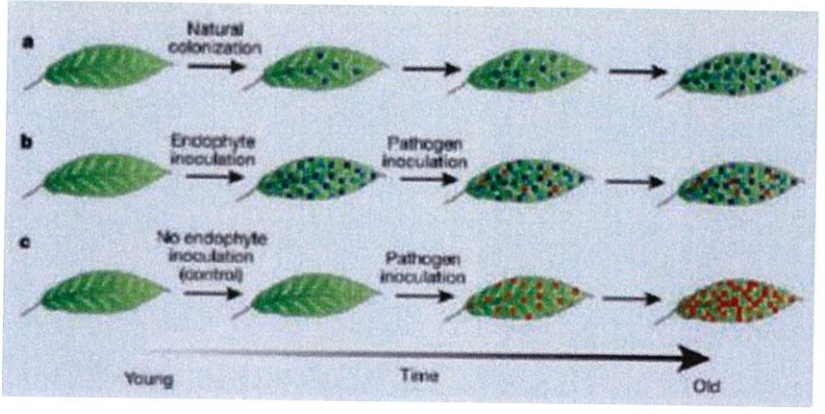
2.1.4 ประโยชน์ของกาฝาก

ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถือเป็นพื้นที่ที่มีกาฝากเจริญเติบโตและแพร่กระจายมากพื้นที่หนึ่งได้นำใบและลำต้นกาฝากมาใช้ประโยชน์เป็นสมุนไพรในหลายด้าน เช่น นำใบและลำต้นมาต้มน้ำดื่มหรือคั้นจากใบ มีสรรพคุณในการต้านการลุกลาม ช่วยป้องกันโรคมะเร็งและรักษาโรคตีซ่าน นอกจากนี้ยังใช้รักษาบรรเทาอาการไอ โรคเบาหวาน ลดความดันโลหิตสูงและใช้รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ส่วนสารสกัดหรือน้ำต้มทั้งใบและลำต้นออกฤทธิ์กระตุ้นการสร้าง T-lymphocyte ทำให้ภูมิต้านทานของร่างกายสูงขึ้น และยังออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยบำรุงเซลล์การเสื่อมของเซลล์ และเมื่อนำลำต้นมาฝนหรือนำใบมาขยี้จะใช้ทารักษาแผลติดเชื้อ รักษาโรคผิวหนังได้

2.2 ราเอนโดไฟท์

เอนโดไฟท์ (endophyte) มาจากคำว่า endo หมายความว่าข้างใน และคำว่า phyte หมายถึงพืชดังนั้น เอนโดไฟท์ จึงหมายถึงสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในต้นพืช ส่วนราเอนโดไฟท์หมายถึงราที่มีช่วงชีวิตหนึ่งหรือตลอดทั้งชีวิตอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรคในพืช ราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชทั้งพืชบกและพืชน้ำ ซึ่งอาจจะอาศัยอยู่ในส่วนราก ลำต้น กิ่งหรือใบ และสามารถใช้ชีวิตร่วมกับพืชได้หลายรูปแบบเช่น การอยู่ร่วมกันแบบ antagonistic pathogen ราเอนโดไฟท์เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพและเป็นแหล่ง metabolite บางชนิด สามารถผลิตสารในกลุ่มของสารปฏิชีวนะ ที่มีคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น ต้านเชื้อรา (antifungal) และต้านแบคทีเรีย (antibacterial) ที่ก่อโรคในคนสัตว์หรือพืช (อัจฉรียา, 2557)

ราเอนโดไฟท์ถูกค้นพบครั้งแรกในประเทศนิวซีแลนด์และสหรัฐอเมริกาปลายปี 1940 โดยพบว่ามีการสร้างสารพิษจากราเอนโดไฟท์ที่เจริญอยู่ในหญ้าที่ใช้เลี้ยงสัตว์ ซึ่งหลังจากที่สัตว์กินหญ้าเข้าไปแล้วแสดงอาการผิดปกติจึงได้มีการศึกษาเรื่อยมาจนปัจจุบันทำให้ทราบว่าราเอนโดไฟท์มีบทบาทสำคัญในการช่วยป้องกันพืช โดยสามารถผลิตสารพิษขึ้นมาในเนื้อเยื่อพืช (Clay,1986) ดังรูปที่ 2.5 เป็นการทดลองที่แสดงให้เห็นถึงการช่วยป้องกันโรคพืชของเชื้อราเอนโดไฟท์ในต้นโกโก้

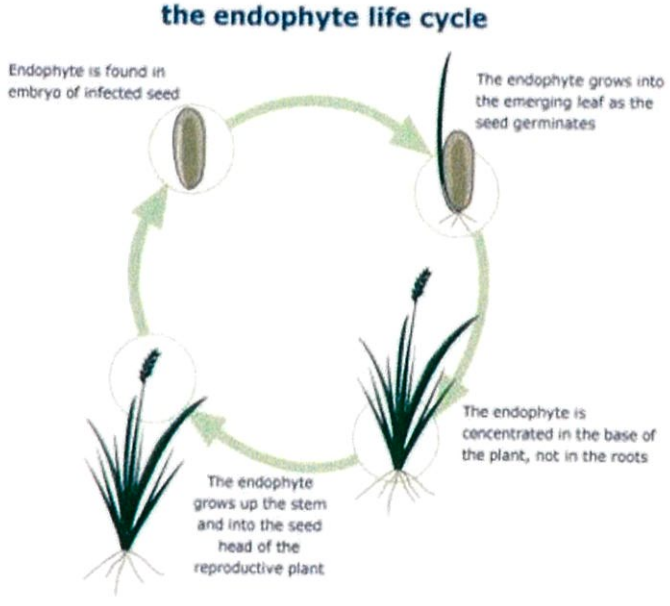


รูปที่ 2.5 การป้องกันโรคพืชของเชื้อราเอนโดไฟท์ในต้นโกโก้ (มนสวรรค์, 2553)

a การอยู่ร่วมกันของราเอนโดไฟท์ในใบไม้ตามปกติ
b ใบไม้ที่ได้รับการฉีดราเอนโดไฟท์ เมื่อฉีดเชื้อโรคพืชเข้าไปพบว่าราเอนโดไฟท์ช่วยสร้างสารควบคุมเชื้อโรคทำให้เนื้อเยื่อได้รับความเสียหายเพียงเล็กน้อย
c ใบไม้ที่ไม่ได้รับการฉีดราเอนโดไฟท์เข้าไปควบคุม เมื่อฉีดเชื้อโรคพืชเข้าไปพบว่าเชื้อโรคพืชสามารถเจริญเติบโตได้อย่างอิสระจึงทำให้ใบพืชเสียหายและตายในที่สุด

2.2.1 การแพร่กระจายของราเอนโดไฟท์

ราเอนโดไฟท์บางชนิดมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการส่งเส้นใยผ่านเข้าไปแอบแฝงในเมล็ดแล้วผลิตเส้นใยรุ่นต่อไป แล้วเจริญไปพร้อมกับเนื้อเยื่อของโฮสท์ภายในเนื้อเยื่อโฮสท์ เส้นใยของราจะเจริญอยู่ระหว่างเซลล์และเส้นใยจะแพร่กระจายไปทั่วทั้งใบและลำต้น โดยแพร่กระจายในแนวขนานกับแกนยาวของพืช ไม่มีเส้นใยเหมือนราทั่วไป ทำให้มีการแพร่กระจายไปยังโฮสท์อื่นโดยอาศัยโครงสร้างระยะเจริญเข้าไปเจริญอยู่ภายในรังไข่และเมล็ดของพืช (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 วงจรชีวิตของราเอนโดไฟต์ในพืช (มนศวรรค์,2553)

การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศของราเอนโดไฟท์เกิดขึ้นภายในสโตรมาบนใบและช่อดอกของพืชโดยการสร้างสปอร์ ซึ่งราเอนโดไฟต์ไม่สามารถสร้างสปอร์หรือสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศบนผิวโฮสท์ได้ ดังนั้นสปอร์ที่สร้างใหม่ก็จะมีการแพร่กระจายโดยลม แมลงไปยังโฮสท์ใหม่ เมื่อมีการแพร่กระจายไปติดยังดอกของโฮสท์ก็จะมีการแฝงเข้าไปในออวุล ซึ่งเจริญไปเป็นเมล็ดต่อไปพร้อมกับการเจริญของเอนโดไฟท์ ราเอนโดไฟท์ทำให้พืชแข็งแรงโดยมีผลกับกระบวนการทางนิเวศวิทยาและสรีระวิทยา (มนศวรรค์, 2553)

2.2.2 ความจำเพาะต่อโฮสท์ของราเอนโดไฟท์ (Host specificity)

ราเอนโดไฟท์จะมีการจำเพาะต่อโฮสท์ โดยมีกลไกการจดจำ เช่น การงอกของสปอร์ราเอนโดไฟท์ Xylaria จะตอบสนองกับสารสกัด monolignol glucoside ของพืชที่อาศัย ระดับความจำเพาะต่อโฮสท์ซึ่งในราเอนโดไฟท์ยังไม่เป็นที่ทราบชัดนักในขณะนี้ บางชนิดพบได้ทั่วไปและอาจแยกเป็นเชื้อ

บริสุทธิ์ได้จากพืช หลายชนิดที่เจริญเติบโตอยู่ในที่ซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ชนิดของราเอนโดไฟท์ที่พบในพืช ทั่วๆไปได้แก่ *Cladosporium* sp., *Nodulisporuim* sp. และ *Pleospora* sp. ราเอนโดไฟต์บางชนิดค่อนข้างจะมีความจำเพาะต่อต้นพืชและมักจะแยกได้จากพืช family เดียวกันหรือจาก family ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น บางชนิดก็มักพบในเนื้อเยื่อชนิดเดียวกัน เช่น ราเอนโดไฟท์ที่อยู่ในพวกสน (conifer needle) (Carroll & Petrini, 1983)

2.2.3 บทบาททางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ต่อพืช

ราเอนโดไฟท์ไม่มีโครงสร้างพิเศษสำหรับหาอาหาร เส้นใยของราเอนโดไฟท์มีขนาดความกว้างประมาณ 10 – 15 มิลลิไมครอน เมื่อเข้าไปอยู่ในเส้นใยพืชแล้วอาจจะม้วน เส้นใยจะแทงทะลุเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์หรืออาจเข้าไปอยู่ในเซลล์ของโฮสท์ และได้รับอาหารจากโฮสท์เปลี่ยนรูปร่างไปหรืออาจมีลักษณะบวม นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์บางชนิดอาจเกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทานทางเคมีของพืชและราเอนโดไฟท์ทำหน้าที่ต่อต้านการเจริญลุกลามของเชื้อโรคชนิดอื่นในพืช (antagonist) ทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรค (จิตรา, 2552)

ราเอนโดไฟท์มีบทบาทในการป้องกันพืชที่มันอาศัยอยู่ โดยการปกป้องพืชจากเชื้อราก่อโรคด้วยการยับยั้งหรือทำลายเชื้อราก่อโรค เช่น ราเอนโดไฟท์ Gliocladium catenulatum สามารถยับยั้งเชื้อรา Crinipellis perniciosa ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค witches broom ที่ก่อความเสียหายอย่างมากต่อการปลูกต้นโกโก้ (Rubini et al., 2005)

ราเอนโดไฟท์มีบทบาทในการต้านเชื้อโรคพืช โดยมีส่วนช่วยในการต้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในพืช จากงานวิจัยพบว่า การมีราเอนโดไฟท์ใน pyrennial ryegrass สามารถป้องกันโรคที่เกิดจาก *Puccinia coronate* ได้ดีกว่าพืชที่ไม่มีการ infect ของราเอนโดไฟท์ ซึ่งสันนิษฐานว่าราเอนโดไฟท์บางสปีชีส์สามารถเป็นปฏิปักษ์ต่อราชนิดอื่น เช่น ราเอนโดไฟท์ *Acremonium coenophialum* มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ pathogen ในหญ้า (White and Cole, 1985)

ราเอนโดไฟท์มีบทบาทในการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดที่จำเป็นในการเข้าไปอยู่และอยู่รอดภายในเซลล์ของพืช โดยราเอนโดไฟท์จะได้สารอาหารจากพืชที่อาศัยและสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆที่มีประโยชน์ต่อพืช เช่น สารต้านเชื้อก่อโรค สารต้านแมลงต่างๆ ที่จะมารุกรานพืช เป็นต้น

ราเอนโดไฟท์มีบทบาทในการเป็นผู้ย่อยสลาย โดยเมื่อพืชที่มันอาศัยอยู่เสื่อมสภาพหรือใกล้ตาย ราเอนโดไฟท์จะสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น cellulose, xylanase, ligninase เมื่อเกิดการย่อยสลายจะทำให้เกิดการหมุนเวียนของวัฏจักรอาหารและแร่ธาตุ ซึ่งมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตอื่นต่อไป มีรายงานว่า ราเอนโดไฟท์สามารถสร้าง wood dedrading enzyme เพื่อย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบของพืช ราเอนโดไฟท์กลุ่ม xylariaceous และ rhytismataceous สามารถย่อยสลายลิกนินได้ ถือว่าเป็นผู้ย่อยสลายที่ดี (วรรณฤดี, 2552)

2.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) คือ สารจากสิ่งมีชีวิตที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็งเต้านม มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค และสารนั้นจะต้องไม่มีผลกระทบต่อร่างกายหรือมีน้อยมาก เพราะเมื่อสารนั้นถูกนำมาแปรรูปให้เป็นส่วนประกอบของยานั้นไม่ต้องการให้ยามีผลกับส่วนที่ดีของร่างกาย ยกเว้นเชื้อโรคที่เราต้องการกำจัดเท่านั้น หากสารใดมีผลข้างเคียง เราจะจัดสารนั้นให้อยู่ในพวกสารพิษ

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางธรรมชาติ เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในสิ่งมีชีวิตเหล่านี้นักวิทยาศาสตร์คาดว่าอาจมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์กับมนุษย์ จึงได้มีการศึกษาวิจัยพบว่าจุลินทรีย์เป็นแหล่งทรัพยากรที่น่าสนใจในด้านการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปัจจุบัน โดยเฉพาะกลุ่มเชื้อรา โดยกลุ่มเชื้อราที่พบจากแมลงมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น

- เชื้อรา *Cordyceps unilateralis* มีสารกลุ่ม erythrostominones ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

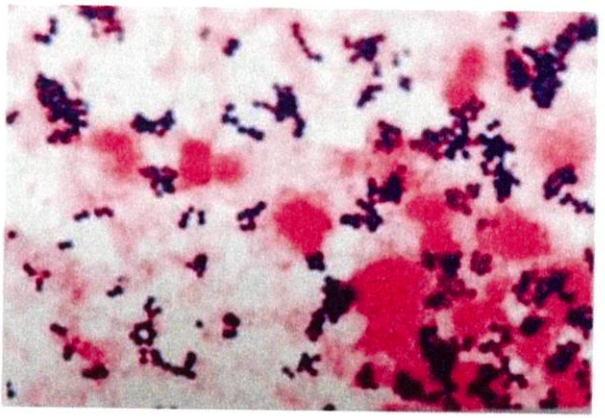
- เชื้อราที่พบจากไม้ที่ผุผัง เช่น เชื้อราในกลุ่ม Xylaria (รูปที่ 2.7) พบสารหลายชนิด เช่น ใน Xylaria sp. พบสาร depudecin phaseolinone phomenone อนุพันธ์ของ cytochalasin Q และ (E)-methyl 3-(4-methoxy-phenoxy) propenoate ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียในระดับที่ดี นอกจากนั้นยังพบสาร multiplolides A และ B จาก Xylaria multiplex มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา ประมาณ 7 และ 2 mg/ml ตามลำดับ

รูปที่ 2.7 เชื้อรา *Xylaria* sp. (ปัทมา พิทยขจรวุฒิ, 2546)

2.4 แบคทีเรียก่อโรค

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

S.aureus เป็นแบคทีเรียรูปร่างทรงกลมติดสีแกรมบวก มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาร 1 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นกลุ่มๆ ทำให้ดูเกมือนพวงองุ่น แต่จะพบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่และเป็นสายสั้นๆ (โดยมากไม่เกิน 4 เซลล์) อยู่ปะปนด้วยเสมอ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนไหว ส่วนใหญ่ไม่มีแคปซูล ให้ผลบวกในการทดสอบ catalase และในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะสลายน้ำตาลให้กรด การติดต่อของเชื้อนี้มาสู่คน ติดต่อโดยการรับประทานหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนเข้าไป ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้องและท้องเดิน ส่วนมากไม่มีไข้ อาการรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับจำนวนสารพิษในอาหารที่รับประทานเข้าไป เชื้อ *S.aureus* ที่ผลิตสารพิษส่วนใหญ่มักเป็นพวกที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ coagulase ได้ (รูปที่ 2.8)



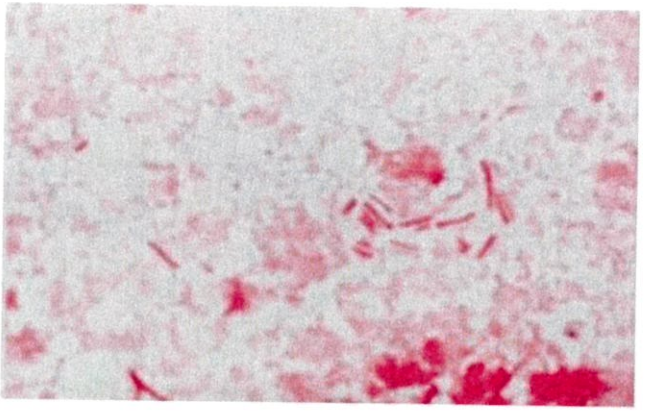
รูปที่ 2.8 ลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (วารีรัตน์ หนูหีต,2557)

แหล่งที่พบเชื้อ *S.aureus* พบได้ตามส่วนต่างๆ ของร่างกายมนุษย์ เช่น จมูก มือ แผลเรื้อรัง ผิวหนัง เสื้อผ้า อากาศและฝุ่นละออง

2.4.2 *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae สกุล Escherichia เป็นแบคทีเรียอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม มีแหล่งอาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น ในสิ่งแวดล้อมพบได้ใน น้ำ พืช อากาศและดิน มีรูปร่างเป็นแท่ง ติดสีแกรมลบ (รูปที่ 2.9) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน เคลื่อนที่โดยใช้ Paritrichous flagelh ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10 –

40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 – 37 องศาเซลเซียส ก่อให้เกิดโรคเมื่อได้รับเชื้อภายใน 18 – 24 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการอุจจาระร่วงบ่อยครั้ง อุจจาระเป็นมูกเลือด ปวดท้อง มีอาการชีด เนื่องจากสารพิษของเชื้อไปทำลายเม็ดเลือดแดง จึงเกิดภาวะไตวายได้ แต่ผู้ติดเชื้อบางรายอาจไม่แสดงอาการของโรคแต่สามารถถ่ายทอดเชื้อให้ผู้อื่นได้ (อรอนงค์ รัชตราเชนชัย, 2556)

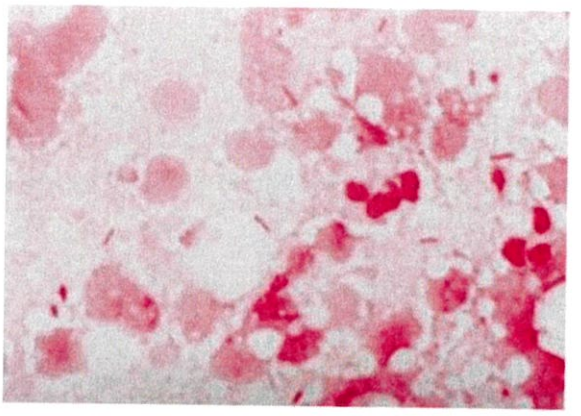


รูปที่ 2.9 ลักษณะของเชื้อ *Escherichia coli* (วารีรัตน์ หนูหีต,2557)

แหล่งที่พบเชื้อ *E.coli* มักปนเปื้อนในวัตถุดิบที่นำมาผลิต พนักงาน แมลงสัตว์กัดแทะ อุปกรณ์ต่างๆ น้ำและน้ำแข็งที่ใช้ในกระบวนการผลิต

2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง อยู่ในวงศ์ *Pseudomonadaceae* สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagellum 1 เส้น ที่ติดอยู่บริเวณขั้วเซลล์ (รูปที่ 2.10) ปกติจะพบกระจายในดิน น้ำ พืช ขยะ และเป็น normal flora ในลำไส้คน *Psedomonas* สามารถทำให้เกิดโรคในคนได้ รวมทั้งสัตว์ โรคที่มีการติดเชื้อ *P.aeruginosa* มีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูง โดยเฉพาะการติดเชื้อในกระแสเลือดและการติดเชื้อที่ปอด



รูปที่ 2.10 ลักษณะของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (วารีรัตน์ หนูหีต,2557)

P.aeruginosa ค่อนข้างทนต่อสารเคมีมากกว่าเซลล์แบคทีเรียปกติทั่วๆไป บางครั้งพบเป็น Normalmicrobiota ในลำไส้หรือบนผิวหนัง ในโรงพยาบาลอาจพบเชื้อได้ตามอ่างล้างหน้า เครื่องช่วยหายใจ เครื่องทำความชื้น

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์คือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญหรือความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์คือ การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์ ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สามารถแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 วิธี คือ Dilution Method และ Diffusion Method มีรายละเอียดดังนี้

2.5.1 Dilution Method

เป็นวิธีหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเรียกความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์นี้ว่า Minimal Inhibition Concentration หรือ MIC ซึ่งการวิเคราะห์หา MIC สามารถทำได้โดยการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ให้มีความเข้มข้นต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีคือ การเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ในของเหลว (Broth Dilution Method) และการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง (Agar Dilution Method)

2.5.2 Diffusion Method

เป็นวิธีการทดสอบความไวของสารต้านจุลินทรีย์ในการยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ จะอาศัยหลักที่ว่าสารจะซึมจากที่มีความเข้มข้นสูงไปยังที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นจึงนำสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งอยู่ใน

รูปแผ่นยาที่เป็นกระดาษกรองหรือเม็ดยาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดโดยแผ่นกระดาษกรอง (Disc Diffusion Method หรือ Filler Paper Disc) และการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นสามารถสังเกตได้ จากการที่จุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณโดยรอบที่มีสารต้านจุลินทรีย์อยู่

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์โดย Diffusion Method

Diffusion Method เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบความไวในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ วิธีการนี้มักทำการทดสอบกับสารต้านจุลินทรีย์เพียงความเข้มข้นเดียวเท่านั้น โดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อใส่สารต้านจุลินทรีย์ปริมาณหนึ่งไว้ในภาชนะบรรจุซึ่งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เพาะเชื้อจุลินทรีย์ไว้ ภายหลังจากการบ่มเพาะเชื้อให้สังเกตดูรอบๆ บริเวณภาชนะที่ตัวสารต้านจุลินทรีย์ซึมไปนั้นจะมีบริเวณใส (Clear Zone) ที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโต โดยบริเวณใสนี้จะเรียกว่า Inhibition Zone แล้ววัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น เพราะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นนั้นจะมีขนาดแคบและกว้างแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเส้น ผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นนั้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบอีกด้วย

Diffusion Method เริ่มด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แล้วใช้แท่งแก้วหรือแท่งเหล็กเจาะบนผิววุ้นให้มีช่องเกิดขึ้น จากนั้นเติมสารละลายของสารต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ใส่ลงไปในช่องวุ้นเหล่านั้น สารต้านจุลินทรีย์จะแพร่กระจายไปในเนื้อวุ้นโดยสารต้านจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ชนิดนั้น จุลินทรีย์จะไม่เจริญบริเวณรอบๆ บริเวณที่มีสารต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวอยู่ ซึ่งหากมีบริเวณใดที่ถูกยับยั้งมากนั้น แสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์หรือยาชนิดนั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดนั้นมาก

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จำเนียร และคณะ (2556) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสกุลไมร์ทาซีอี้จำนวน 4 ชนิด แยกได้ทั้งหมด 124 ไอโซเลต เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์อายุ 3 สัปดาห์ ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค โดยวิธี agar well diffusion พบว่ามีราเอนโดไฟท์ 46 ไอโซเลต (37.1%) ที่สามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างน้อย 1 ชนิด เมื่อทำการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์จากการทดสอบเบื้องต้นด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และนำไปทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี microdilution broth พบว่า สารสกัดจากราเอนโดไฟท์ 156 สารจากจำนวนทั้งหมด 174 สาร (89.6%) ให้ค่า MIC ≤ 200 µg/ml.

Sadananda TS และคณะ (2013) ศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แตกต่างกัน 9 ชนิด ซึ่งแยกได้จากส่วนต่างๆของต้น Viscum album โดยแยกเลคตินและเชื้อราเอนโดรไฟท์ แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย

วิธี affinity chromatography พบว่าเลคตินที่แยกจากเชื้อราเอนโดรไฟท์มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่โดดเด่น โดยเลคตินจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Proteus mirabilis, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus* เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อ *Trichothecium* sp. ยับยั้งการเจริญเติบโตของ Proteus mirabilis แลคตินที่สกัดได้จาก Viscum album ในเชื้อแบคทีเรียก่อโรคยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ปานกลาง และเลคตินที่สกัดได้จากเชื้อราเอนโดรไฟท์มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

Jiang Shu และคณะ (2013) ได้ศึกษาถึงความหลากหลายทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเชื้อราเอนโดรไฟท์จากตังกุย โดยการแยกเชื้อ เพาะเลี้ยง จัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ และการทดสอบกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พบว่าราเอนโดไฟท์จำนวน 206 สายพันธุ์ที่แยกจากตังกุย เมื่อนำมาทดสอบกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์มีจำนวน 20% สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ และมีจำนวน 8 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งสูงเมื่อทดสอบด้วยเชื้อราก่อโรค เชื้อราเอนโดไฟท์ *Coccosporella* sp. *Karst.* และ *Carundinis* มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *A. solani* เชื้อรา *Fusella* sp. และ *Myxormia* sp. มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *R. solani* และ *Hypodermium* sp.

Feng Pan และคณะ (2016) ได้ศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพลูคาวจำนวน 28 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการจำแนกและตรวจสอบราเอนโดไฟท์ (จำนวน 28 สายพันธุ์) ใช้วิธีวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสายวิวัฒนาการของลำดับ ITS พบว่าเชื้อ *Chaetomium globosum* มีฤทธิ์การต้านเชื้อรา โดยเฉพาะต่อต้านเชื้อ *Exserohilum turcicum* นอกจากนี้พบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ให้ผลดีที่สุดคือ เมื่อใช้อาหาร PDB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและหมักเป็นเวลา 4-8 วัน และการสกัดเอทิลอะซิเตทที่ความร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

Libo Xiang และคณะ (2016) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราในพืชสมุนไพรจากสวนพฤกษศาสตร์ของ เมืองฮูฮั่น ประเทศจีนด้วยวิธีชีวภาพ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อตรวจหาเชื้อราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรจีน และเพื่อพิสูจน์ว่าสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และอาจมีประสิทธิภาพใช้ในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ พบว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จำนวน 208 สายพันธุ์ที่เก็บได้จากลำต้น (83) ใบ (121) และดอก (4) จากพืชสมุนไพร 26 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ Alternaria, Phomopsis, Colletotrichum, Phoma และ Acremonium เมื่อทดสอบเชื้อราเอนโดรไฟท์เหล่านี้กับเชื้อราก่อโรคในข้าวสาลี ซึ่งมีราเอนโดไฟท์ 15 สายพันธุ์ที่ยับยั้งเชื้อ BGT มีประสิทธิภาพยับยั้งตั้งแต่ 65.4% ถึง 100% เชื้อ LPS-1 ซึ่งแยกได้จากลำต้นของไชนิสฮอลลี่มีประสิทธิภาพสูงมีผลยับยั้งได้ถึง 100% เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของลำดับ ITS rDNA พบว่า LPS-1 คือเชื้อ *Pseudotheobromae*

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)
- เครื่องเขย่าสาร (Shaker)
- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
- ไมโครปิเปต (Micropipette)
- ทิป (Tip)
- สไลด์ (Slide)
- กระจกปิดสไลด์ (Cover slide)
- ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) และเข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
- ปิเปตต์ (Pipette)
- จานเพาะเชื้อ (Plate)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- จุกยาง (Rubber cork)
- แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

- ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)
- ขวดดูแรน (Duran) ขนาด 500 มิลลิลิตร
- ขวดกลม (Round bottle) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- ขวดแบน (Flat bottle) ขนาด 120 มิลลิลิตร
- ช้อนตักสาร (Spatula)
- กระดาษชั่งสาร (Weighing Paper)
- คีมคีบ (Forceps)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
- พาราฟิล์ม (Parafilm)
- มีดผ่าตัด (Scalpel)
- กรรไกร (Scissor)
- บิกเกอร์ (Beaker) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- ไม้พันสำลี (Cotton bud)

3.1.2 สารเคมี

- Alcohol 95%
- NaCl 0.85%
- Antibiotic: Gentamycin, Vancomycin , Streptomycin และ Ganamycin
- Sodium hypoclorite 5%
- Glycerol 30%
- 0.5 Mcfarland standard
- Lactophenal cotton blue

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.1.3 พืชกาฝาก

พืชกาฝากจำนวน 8 ต้น จากบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.4 เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

- Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1
- *Staphylococus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC-25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-278

3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Potato dextrose agar (PDA)
- Potato dextrose broth (PDB)
- Nutrient agar (NA)
- Nutrient broth (NB)
- Mueller Hinton agar (MHA)

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่างและแยกราเอนโดไฟท์จากกาฝาก

1. เก็บตัวอย่างใบและกิ่งของกาฝากจำนวน 8 ต้น บริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเก็บใบและกิ่งกาฝากใส่ถุงพลาสติก บันทึกข้อมูล สถานที่ที่เก็บ และวันที่เก็บตามตารางที่ 3.1

148977

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลต้นกาฝากที่เก็บได้จากบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ต้นที่	รหัส	บริเวณที่เก็บ	วันที่เก็บ
1	A	หน้าตึกพระเทพ	4 กุมภาพันธ์ 2559
2	B	หน้าตึกอธิการบดี (ต้นเล็ก)	4 กุมภาพันธ์ 2559
3	C	หน้าตึกอธิการบดี (ต้นใหญ่)	4 กุมภาพันธ์ 2559
4	D	โรงอาหารพระเทพ	19 กุมภาพันธ์ 2559
5	E	ทางเดินหน้าตึกอธิการบดี	19 กุมภาพันธ์ 2559
6	F	คณะวิทยาศาสตร์	19 กุมภาพันธ์ 2559
7	G	โรงอาหารคณะวิศวกรรมศาสตร์	23 เมษายน 2559
8	H	ตึกสิบสองชั้นคณะวิศวกรรมศาสตร์	23 เมษายน 2559

2. การแยกราเอนโดไฟท์จากใบและกิ่งกาฝาก นำใบและกิ่งมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นตัดให้เป็นชิ้นขนาดเล็กด้วยมีดผ่าตัดปราศจากเชื้อ ส่วนใบตัดเป็นชิ้นขนาด 1X1 เซนติเมตร และส่วนกิ่งตัดตามยาวให้มีขนาด 1X1 เซนติเมตร จำนวน 8 – 10 ชิ้น

3. การฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว นำใบและกิ่งที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที 5% Sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที และแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นนำมาแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 3-5 วินาที (วรรณฤดี และคณะ, 2552)

4. นำชิ้นใบและกิ่งวางบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) โดยวางจานละ 4 ชิ้น ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

5. เมื่อเชื้อราเริ่มเจริญเก็บตัวอย่างเชื้อราเป็นเวลา 5 วัน นับจากวันแรกที่มีการเจริญของเชื้อรา โดยใช้เข็มตัดชิ้นวุ้นที่มีราเจริญอยู่ นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) เพื่อแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์

6 คัดเลือกเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทร์ก่อโรค

7 เมื่อคัดเลือกเชื้อราบริสุทธิ์ได้แล้ว เก็บตัวอย่างเชื้อราที่คัดเลือกได้ในกลีเซอรอล 30% แล้วนำไปแช่แข็งที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของราเอนโดรไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion

1. การเพาะเลี้ยงราเอนโดรไฟท์ที่แยกได้

1.1) นำราเอนโดไฟท์บริสุทธิ์ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในขวดแบนที่มีอาหาร Potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยใช้มีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95% นำไปผ่านไฟจนร้อนแดง แล้วรอให้เย็น หลังจากนั้นตัดชิ้นวุ้นบริเวณที่มีเชื้อราให้มีขนาดชิ้นละประมาณ 1x 1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 4 - 5 ชิ้น

1.2) ถ่ายชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราลงในขวดแบนที่มีอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) โดยไม่ต้องปิดฝาขวดให้สนิทเพื่อให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 - 4 สัปดาห์ จะได้ผลิตภัณฑ์ออกมา 2 ส่วน คือส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อรา (culture filtrate) และเส้นใยของเชื้อรา (fungal mycelium) นำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อราที่บ่มเป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ไปทดสอบ

2. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่จะใช้ในการทดสอบ

2.1) เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบมี 4 ชนิด คือ Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1, *Staphylococus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC-25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-278 เตรียมโดยเทคนิค streak plate ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

2.2) จากนั้นใช้ loop ถ่ายเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวจากเพลตจำนวน 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร Nutrient broth (NB) แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 3 – 6 ชั่วโมง จนขุ่น

2.3) นำมาปรับความขุ่นด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้ได้ 0.5 Mcfarland standards ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ $1x10^8$ cfu/ml (สุรางค์รัตน์, 2558)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของราเอนโดรไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion (Sadananda TS et al., 2014)

3.1) ใช้เทคนิค Swab เชื้อก่อโรคแต่ละชนิดลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Mueller hinton agar (MHA) โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มลงในสารละลาย 0.5 Mcfarland standards แล้วทาให้ทั่วจานเพาะเชื้อ จากนั้นใช้หลอดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อเจาะอาหาร Mueller hinton agar (MHA) ในเพลตให้เป็นหลุม โดยเจาะให้เป็นวงกลมจำนวน 8 หลุม เพื่อหยดน้ำเลี้ยงเชื้อราและเจาะตรงกลาง 1 หลุม เพื่อใช้หยดอาหาร Nutrient broth (NB)

3.2) ใช้ไมโครปิเปตต์หยดน้ำเลี้ยงเชื้อราลงไปปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อหลุม และหยดอาหาร Nutrient broth (NB) ปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงไปที่หลุมตรงกลาง ส่วนหลุมควบคุมจะใช้ยา

ปฏิชีวนะVancomycin 30 µg/แผ่น สำหรับเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1 และ *Staphylococus aureus* ATCC 25923 และใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamycin 10 µg/แผ่น สำหรับเชื้อ *Escherichia coli* ATCC-25922 *และ Pseudomonas aeruginosa* ATCC-278นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้น วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส แล้วบันทึกผล

3.2.3 การจำแนกราเอนโดรไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (จำเนียร และคณะ, 2556)

1 การศึกษาลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อรา บันทึกผลโดยดูลักษณะโคโลนีของเชื้อรา การเจริญของเส้นใย และการสร้างสปอร์ของเชื้อราแต่ละชนิด บันทึกผลและถ่ายภาพโคโลนีของเชื้อรา

2 สังเกตลักษณะของราเอนโดไฟท์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้เทคนิค Slide culture

2.1) การเตรียมจานเพาะเชื้อ โดยนำกระดาษทิชชูวางไว้ในจานเพาะเชื้อ ใช้แท่งแก้วงอรูปตัว v วางบนกระดาษทิชชู แล้วนำสไลด์ที่สะอาดวางบนแท่งแก้วงอรูปตัว v จากนั้นนำไปอบเพื่อฆ่าเชื้อ

2.2) การเตรียมวุ้น วุ้นที่เตรียมคือ Potato dextrose agar (PDA) เทบนจานเพาะเชื้อให้มีความหนากว่าปกติ แล้วตัดวุ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณด้านละ 1 เซนติเมตรหลายๆชิ้น

2.3) การนำเชื้อราลงเพาะเลี้ยง นำวุ้นที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสวางลงตรงกลางสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อนำเชื้อรามาแตะที่ส่วนหนาทั้ง 4 ด้านของวุ้น แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเทลงในจานเพาะเชื้อปริมาณเล็กน้อย เพื่อให้เกิดความชื้นแก่เชื้อราในการเจริญเติบโต

2.4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส สังเกตจนเชื้อรามีการเจริญเกือบถึงขอบของกระจกปิดสไลด์ (ประมาณ 2 สัปดาห์) ตรวจผลโดยหยด lactophenal cotton blue ลงบนสไลด์ที่สะอาด แล้วนำกระจกปิดสไลด์ที่ปิดบนวุ้นแตะบน lactophenal cotton blue นำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.5) ศึกษารายละเอียดโครงสร้างต่างๆของเชื้อรา แล้วจำแนกชนิด

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

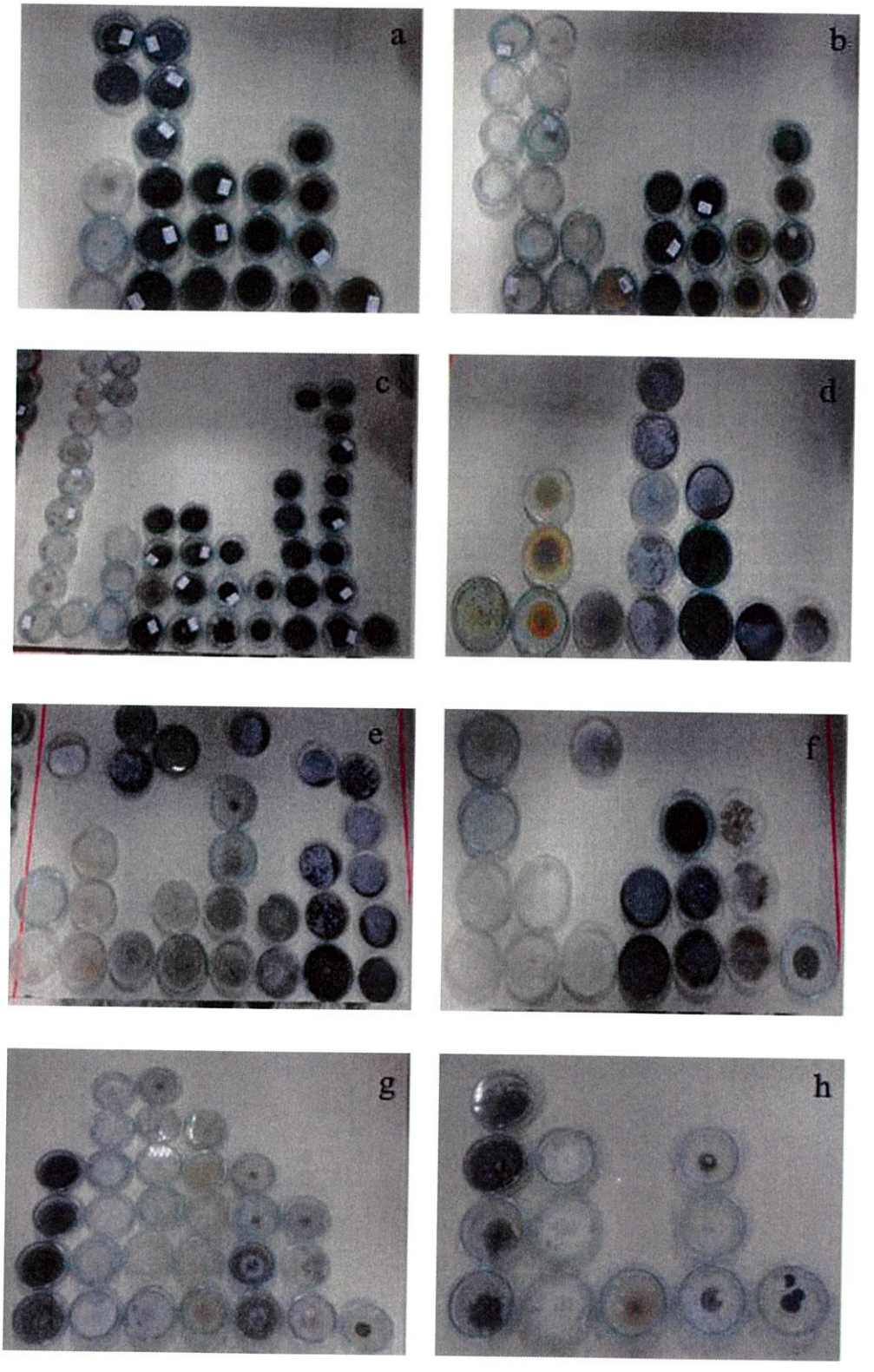
4.1 การแยกราเอนโดไฟท์จากต้นกาฝาก

ในการแยกราเอนโดไฟท์จากต้นกาฝากจำนวน 8 ต้น จากบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้แก่ บริเวณตึกพระเทพจำนวน 2 ต้น บริเวณตึกอธิการบดีจำนวน 3 ต้น บริเวณคณะวิทยาศาสตร์จำนวน 1 ต้น และบริเวณคณะวิศวะกรรมศาสตร์จำนวน 2 ต้น สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 192 ไอโซเลต เมื่อพิจารณาถึงชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกราเอนโดไฟท์ พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้เป็นเชื้อราที่ได้มาจากส่วนของใบมากที่สุดจำนวน 125 ไอโซเลต (65.10%) รองลงมาคือจากส่วนของกิ่งซึ่งมีเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จำนวน 67 ไอโซเลต (34.90%) (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 จำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นกาฝาก

ต้นกาฝาก	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นกาฝาก		
	ใบ (B)	กิ่ง (L)	รวม
ต้นที่ 1 (A)	12	10	22
ต้นที่ 2 (B)	16	9	25
ต้นที่ 3 (C)	40	4	44
ต้นที่ 4 (D)	11	4	15
ต้นที่ 5 (E)	23	5	28
ต้นที่ 6 (F)	5	12	17
ต้นที่ 7 (G)	15	14	29
ต้นที่ 8 (H)	3	9	12
รวม	125	67	192

จากนั้นทำการคัดเลือกเฉพาะไอโซเลตที่มีลักษณะของโคโลนีแตกต่างกันมาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยคัดเลือกมาทั้งหมด 139 ไอโซเลต คิดเป็น 72.40% ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด เป็นเชื้อที่แยกได้จากต้นกาฝาก A 12 ไอโซเลต ต้นกาฝาก B 14 ไอโซเลต ต้นกาฝาก C 28 ไอเลต ต้นกาฝาก D 11 ไอโซเลต ต้นกาฝาก E 24 ไอโซเลต ต้นกาฝาก F 15 ไอโซเลต ต้นกาฝาก G 24 ไอโซเลต และต้นกาฝาก H 11 ไอโซเลต (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 เชื้อราเอนโดไฟท์ที่สุ่มเลือกมาทดสอบ a คือต้น A, b คือต้น B, c คือต้น C, d คือต้น D, e คือต้น E, f คือต้น F, g คือต้น G และ h คือต้น H ตามลำดับ

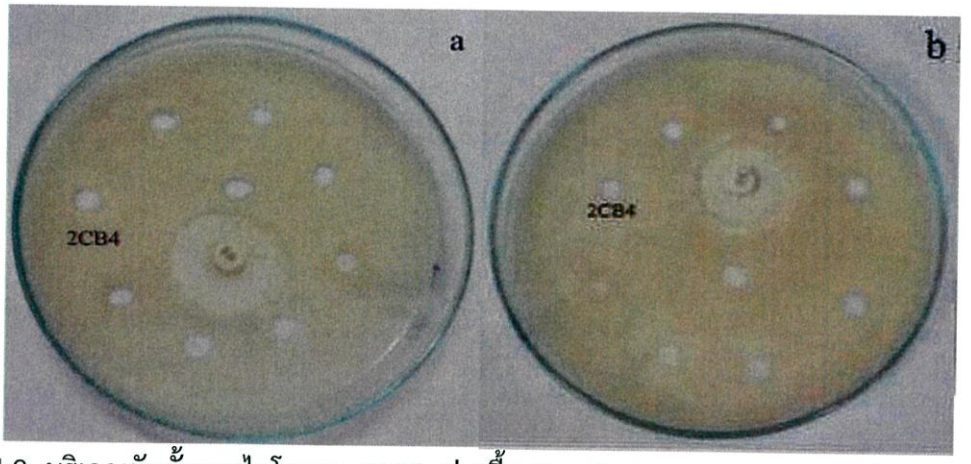
4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดรไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion

จากการนำราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นกาฝาก ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB แล้วนำน้ำเพาะเลี้ยงชื้อราที่มีอายุ 2 และ 4 สัปดาห์ไปทดสอบหาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion พบว่าจำนวนราเอนโดไฟท์ที่เลือกมาทดสอบทั้งหมด 139 ไอโซเลต มีเชื้อที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่นำมาทดสอบจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต 2CB4 3CB9 3DB4 3EB2 และ 3GL3 (ตารางที่ 4.2)

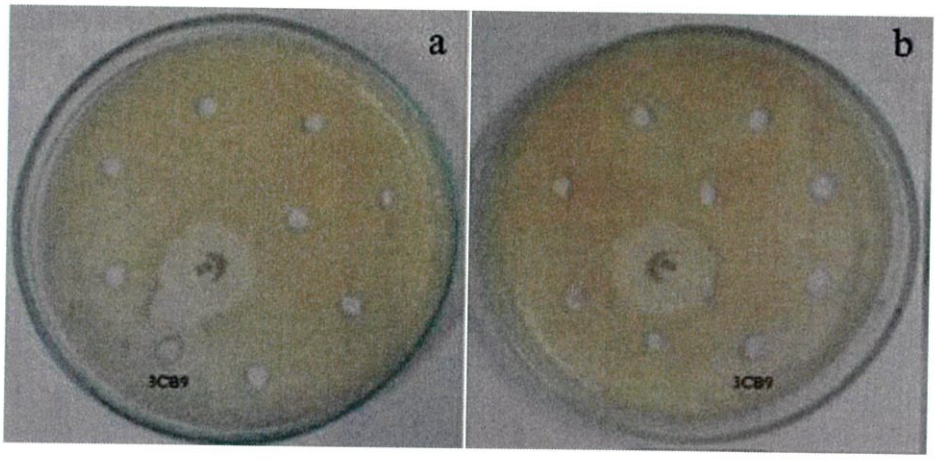
ตารางที่ 4.2 เชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อก่อโรค (มิลลิเมตร) ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 4

รหัสเชื้อ	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อก่อโรค (มม.) ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 4							
	SA		MRSA		PA		EC	
	2	4	2	4	2	4	2	4
2CB4	9.45	16.25	-	-	-	-	-	-
3CB9	-	-	12.0	18.5	-	-	-	-
3DB4	-	-	-	27.0	-	-	-	-
3EB2	-	-	18.0	23.4	-	-	-	-
3GL3	-	-	-	-	-	-	10.25	22.35
GEN	-	-	-	-	24.0	21	25.5	24
VA	21.5	23	22	23.5	-	-	-	-
อาหาร NB	-	-	-	-	-	-	-	-

SA = *Staphylococus aureus* ATCC 25923, MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-278, EC = *Escherichia coli* ATCC-25922, GEN = Gentamycin, VA = Vancomycin

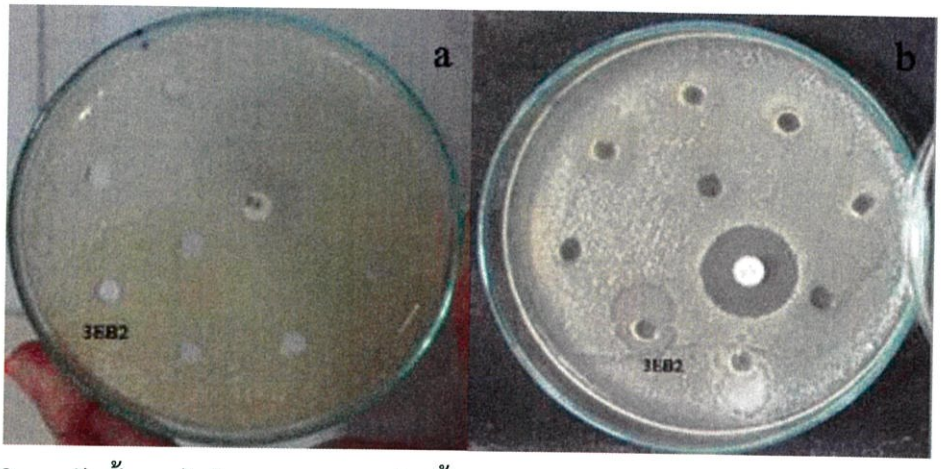


รูปที่ 4.2 บริเวณยับยั้งของไอโซเลต 2CB4 ต่อเชื้อ *Staphylococus aureus* ATCC 25923 โดย a และ b แสดงผลการทดสอบในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ตามลำดับ

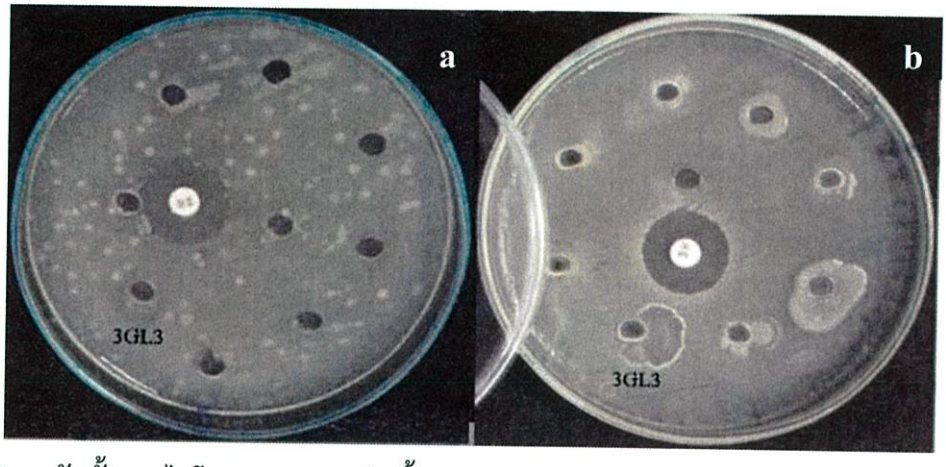


รูปที่ 4.3 บริเวณยับยั้งของไอโซเลต 3CB9 ต่อเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1 โดย a และ b แสดงผลการทดสอบในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ตามลำดับ

รูปที่ 4.4 บริเวณยับยั้งของไอโซเลต 3DB4 ต่อเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1 ซึ่งเป็นผลการทดสอบในช่วงสัปดาห์ที่ 4



รูปที่ 4.5 บริเวณยับยั้งของไอโซเลต 3EB2 ต่อเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1 โดย a และ b แสดงผลการทดสอบในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 บริเวณยับยั้งของไอโซเลต 3GL3 ต่อเชื้อ *Escherichia coli* ATCC-25922 โดย a และ b แสดงผลการทดสอบในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ตามลำดับ

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion ผลที่ได้อาจจะยังไม่มีความแม่นยำมากพอ เนื่องจากวิธีนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้น จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งที่แท้จริงได้ (อัมพรรัตน์, 2555) หากต้องการเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งจะต้องใช้วิธีการอื่นในการทดสอบด้วย เช่น วิธี microbroth dilution ซึ่งจากงานวิจัยของอัมพรรัตน์ (2555) พบว่า เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี microbroth dilution ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์บางส่วนหายไปเมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ดังนั้นงานวิจัยที่ศึกษาจึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ใดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด

4.3 การจำแนกเชื้อราเอนโดรไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการจำแนกชนิดของราเอนโดไฟท์ทั้ง 5 ไอโซเลต โดยการนำเชื้อราเอนโดไฟท์มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน นำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้เทคนิค Slide culture แล้วศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ดังนี้

ไอโซเลต 2CB4 เมื่อเลี้ยงเชื้อไว้บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเชื้อรามีอายุ 7 วันโคโลนีมีสีเทาจนเกือบดำ มีเส้นใยฟูสีขาวอยู่ตรงกลางโคโลนี เมื่ออายุ 14 วัน โคโลนีมีสีดำเข้ม เส้นใยฟูสีขาวกระจายไปทั่วโคโลนี เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เท่า พบว่าเส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นยาว มีผนังกั้น ใสไม่มีสี และมีการแตกแขนงเป็นรูปตัว Y ส่วนสปอร์มีรูปร้างกลมคล้ายผลมะนาว มีหนามยาวยื่นออกมา จากลักษณะดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 2CB4 เป็นเชื้อราจีนัส *Chaetomium* sp. (รูปที่ 4.7) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Feng และคณะ (2016) ซึ่งได้ศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์ 28 ไอโซเลตที่แยกได้จากต้นคาวทอง (*Houttuynia cordata*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรของจีน เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับ ITS พบว่าเป็นเชื้อ *Chaetomium globosum* จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Chaetomium globosum* มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สูงโดยเฉพาะกับเชื้อ *Exserohilum turcicum.*

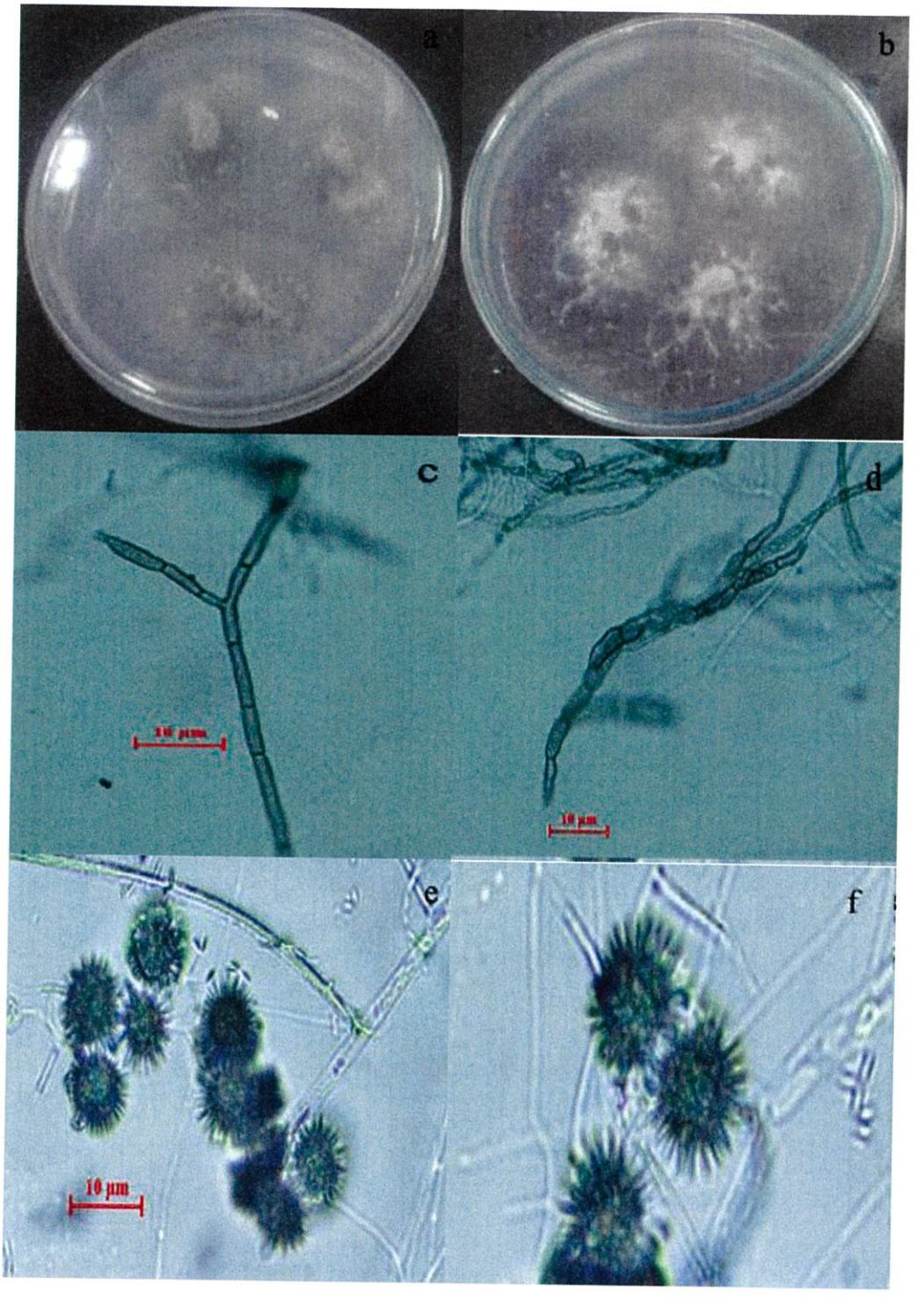
ไอโซเลต 3CB9 เมื่อเลี้ยงเชื้อไว้บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเชื้อรามีอายุ 7 วันโคโลนีมีสีน้ำตาลปนเทา มีลักษณะฟูคล้ายสำลีและกลมนูนขึ้นมาเหนือผิวหน้าอาหาร เมื่ออายุ 14 วันโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ ความกลมนูนเหนือผิวหน้าอาหารหายไป มีเส้นใยฟูคล้ายสำลีขึ้นมาแทน และเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เท่า พบว่าเส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นเล็กยาว แตกแขนงและมีผนังกั้น ใสไม่มีสี ส่วนสปอร์มีรูปร่างรี (ellipsoid) หรือคล้ายถังเบียร์ (barrel shaped) บริเวณเซลล์กลางมีผนังกั้น (septate) สีดำเข้ม ส่วนปลายเซลล์มีสีอ่อน จากลักษณะดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3CB9 เป็นเชื้อราจีนัส *Curvularia* sp. (รูปที่ 4.8) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Helder และคณะ (2005) ได้ศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อรา *Curvularia* sp. ที่แยกจากใบของต้นอบเชย ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศบาซิล โดยได้ทำการสกัดสาร benzopyran จากเชื้อรา *Curvularia* sp. แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราพบว่า สารสกัด benzopyran จากเชื้อรา *Curvularia* sp. สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Cladosporium sphaerospermum* และ *C. cladosporioides* ได้

ไอโซเลต 3DB4 เมื่อเลี้ยงเชื้อไว้บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเชื้อรามีอายุ 7 วันโคโลนีมีสีเทาจนเกือบดำ มีลักษณะฟูคล้ายสำลีและกลมนูนขึ้นมาเหนือผิวหน้า

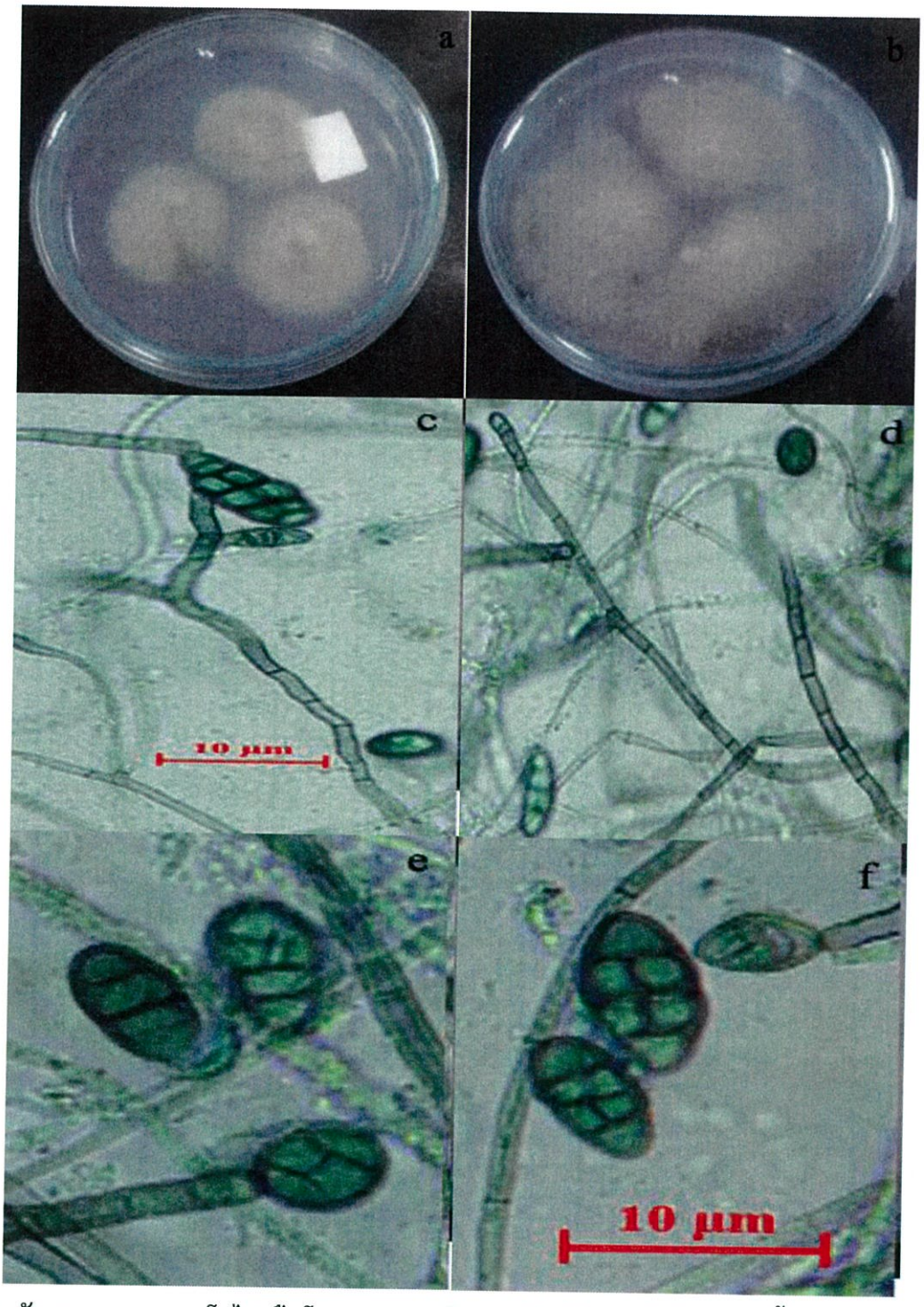
อาหาร เมื่ออายุ 14 วันโคโลนีมีสีเข้มขึ้นจากเดิม ลักษณะกลมนูนเหนือผิวหน้าอาหารยังคงอยู่ และมีเส้นใยฟูสีขาวกระจายไปทั่วโคโลนี เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เท่า พบว่าเส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นยาว มีผนังกั้น ใสไม่มีสี และมีการแตกแขนงเป็นรูปตัว Y ส่วนสปอร์มีรูปร่างกระบอง (obclavate) มีลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีผนังกั้น (septate) สีดำเข้มระหว่างเซลล์แต่ละเซลล์ จากลักษณะดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3DB4 เป็นเชื้อราจีนัส *Alternaria* sp. (รูปที่ 4.9) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jingfeng และคณะ (2016) ซึ่งได้ศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Alternaria* sp. Samif01 ที่แยกจากรากของต้นตานเชียม (*Salvia miltiorrhiza*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรของประเทศจีน โดยการสกัดสาร alternariol 9-methyl ether จากเชื้อรา *Alternaria* sp. Samif01 ผลการศึกษาพบว่าสาร alternariol 9-methyl ether มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis, Agrobacterium tumefaciens, Pseudomonas lachrymans, Ralstonia solanacearum, Xanthomonas vesicatoria, Staphylococcus haemolyticus* ซึ่งผลที่ได้แสดงถึงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงของสาร alternariol 9-methyl ether ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Alternaria* sp. Samif01.

ไอโซเลต 3EB2 เมื่อเลี้ยงเชื้อไว้บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเชื้อรามีอายุ 7 วันโคโลนีมีสีขาวกระจายไปทั่ว เมื่ออายุ 14 วันโคโลนีมีลักษณะสีขาวฟูเหมือนสำลี เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เท่า พบว่าเส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นยาว มีผนังกั้น ใสไม่มีสี และไม่มีการแตกแขนง ไม่พบสปอร์ (รูปที่ 4.10) จึงไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อได้ เนื่องจากข้อมูลยังไม่เพียงพอ

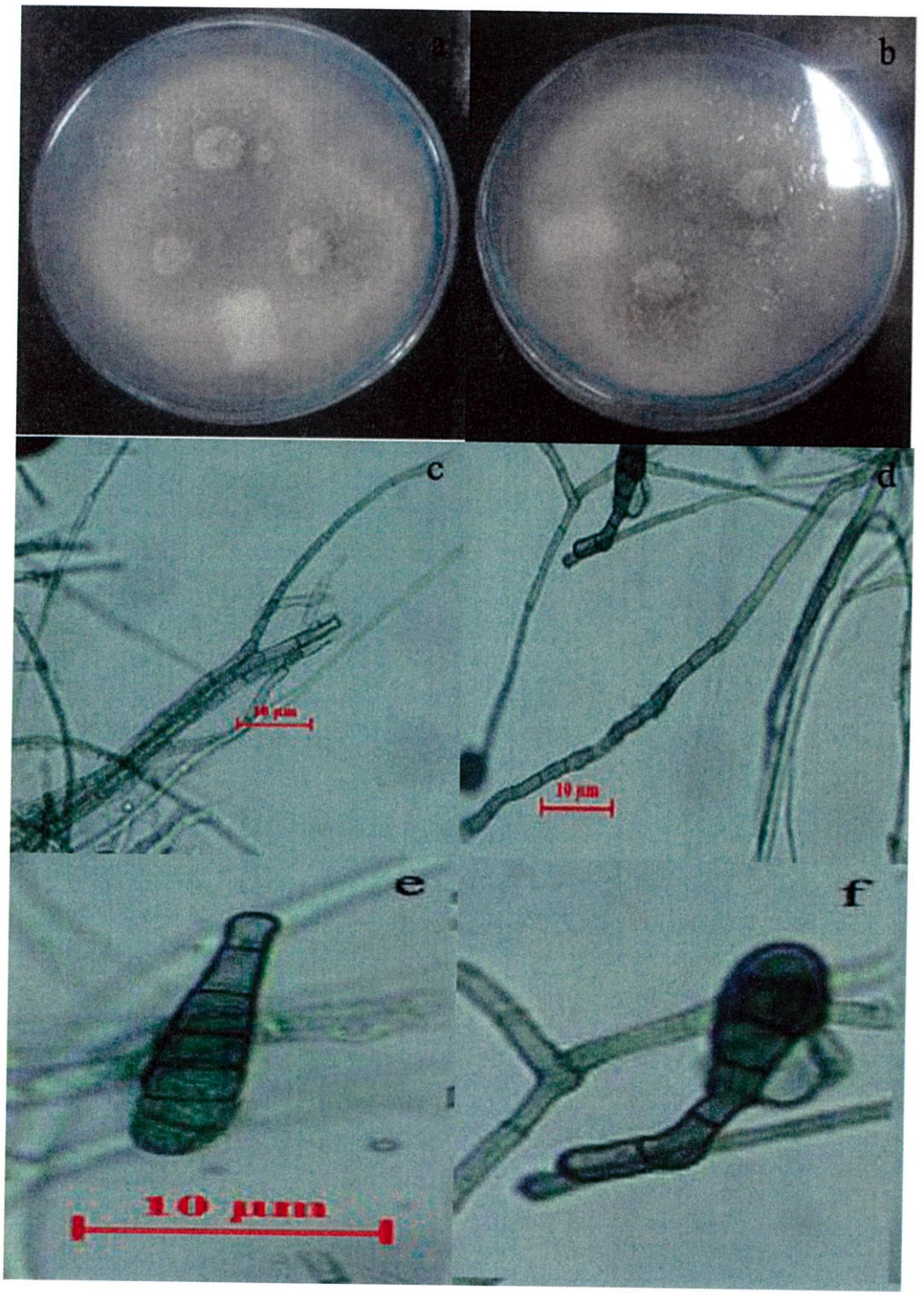
ไอโซเลต 3GL3 เมื่อเลี้ยงเชื้อไว้บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเชื้อรามีอายุ 7 วันโคโลนีมีสีเขียวกระจายไปทั่ว และบริเวณขอบโคโลนีมีเส้นใยสีขาวเกิดขึ้น เมื่ออายุ 14 วันโคโลนีมีสีเขียวเข้มข้น และเส้นใยสีขาวตรงขอบโคโลนีมีลักษณะฟูขึ้นมา เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เท่า พบว่าเส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นยาว มีผนังกั้น ใสไม่มีสี และมีการแตกแขนงเป็นรูปตัว Y ไม่พบสปอร์ (รูปที่ 4.11) จึงไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อได้ เนื่องจากข้อมูลยังไม่เพียงพอ



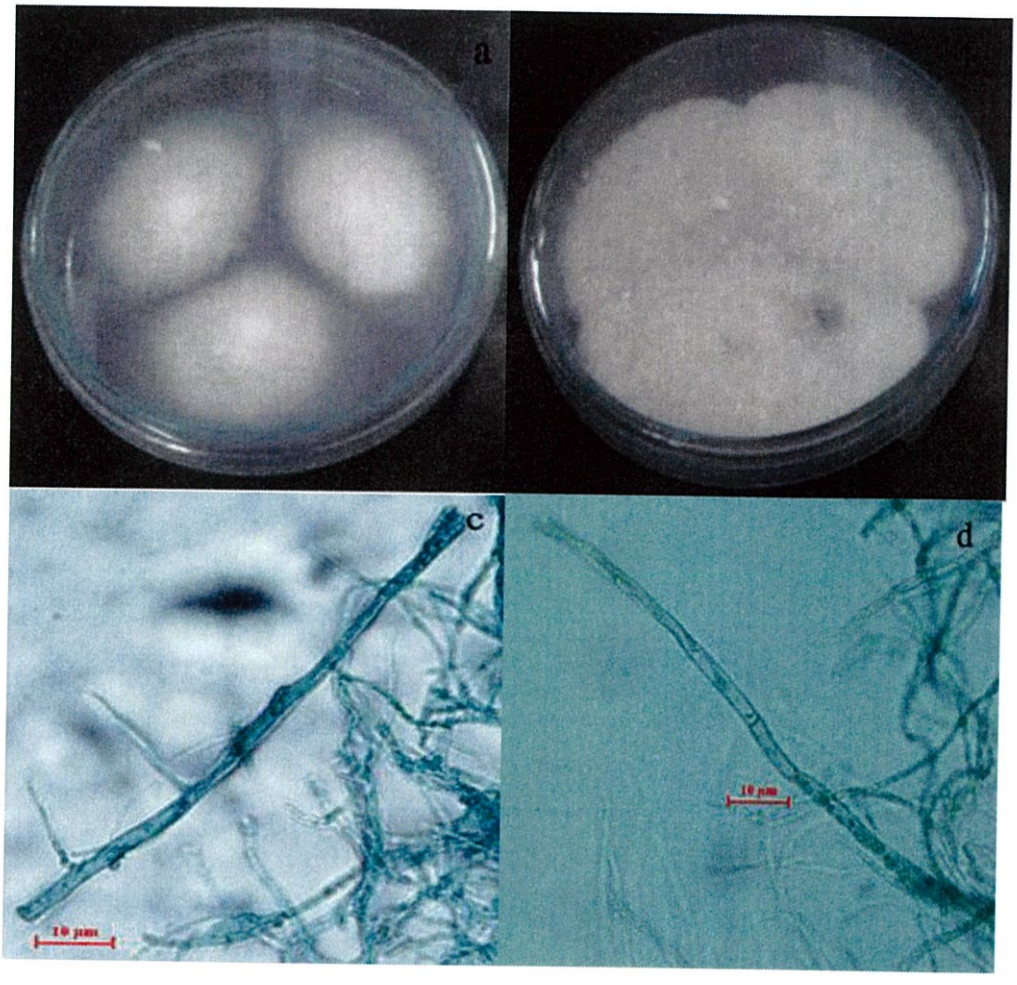
รูปที่ 4.7 ลักษณะของราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 2CB4 โดย a คือ ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ; b คือลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ; c,d คือ ลักษณะเส้นใยของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X ; e,f คือ ลักษณะสปอร์ของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X



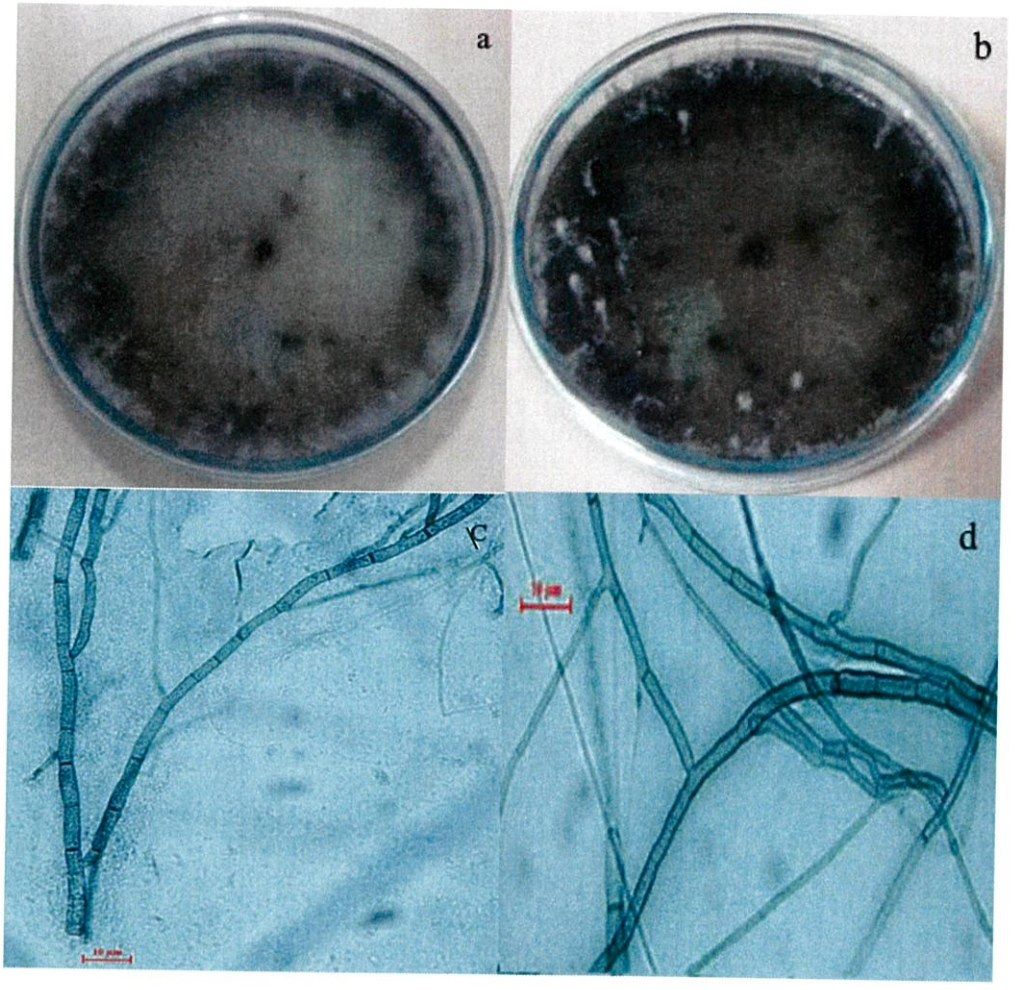
รูปที่ 4.8 ลักษณะของราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3CB9 โดย a คือ ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ; b คือลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ; c,d คือ ลักษณะเส้นใยของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X ; e,f คือ ลักษณะสปอร์ของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X



รูปที่ 4.9 ลักษณะของราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3DB4 โดย a คือ ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ; b คือลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ; c,d คือ ลักษณะเส้นใยของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X ; e,f คือ ลักษณะสปอร์ของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X



รูปที่ 4.10 ลักษณะของราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3EB2 โดย a คือ ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ; b คือลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ; c,d คือ ลักษณะเส้นใยของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X



รูปที่ 4.11 ลักษณะของราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3GL3 โดย a คือ ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ; b คือลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ; c,d คือ ลักษณะเส้นใยของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

จากการจัดจำแนกเชื้อราตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถจำแนกได้ค่อนข้างละเอียดและมีความถูกต้อง แต่พบว่าสามารถจำแนกได้แค่ในระดับจีนัสเท่านั้น ไม่สามารถจำแนกในระดับสปีชี่ส์ได้ อีกทั้งยังพบว่าต้องใช้เวลาในการจำแนกนาน เพราะต้องเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน และยังพบว่าเชื้อราบางชนิดไม่สามรถจำแนกชนิดได้ เนื่องจากไม่มีการสร้างโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์ จากปัญหาดังกล่าวมีแนวทางแก้ไขคือ ในการจำแนกชนิดของเชื้อราต้องใช้วิธีการจัดจำแนกโดยใช้ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรม ใช้ข้อมูลลำดับ DNA ในส่วน ITS ประกอบกันเพื่อช่วยในการจำแนกได้ดียิ่งขึ้น (Feng et al., 2016) ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือสามารถจำแนกเชื้อราได้ถึงระดับสปีชีส์ทำให้จำแนกได้หลายชนิด สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและสามารถใช้กับเชื้อราได้ทุกประเภททั้งแบบที่ไม่มีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ เชื้อราที่โตช้าหรือ

เลี้ยงยาก (Gao et al., 2005) และเนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ใช้อาหาร PDA ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา เพียงชนิดเดียว ควรใช้อาหารชนิดอื่น เช่น cornmeal agar (CMA) และ oat meal agar (OA) ร่วมกับอาหาร PDA ในการเพาะเลี้ยงด้วย (จิตรา และคณะ., 2552)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากต้นกาฝากจำนวน 8 ต้น พบว่าสามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ 192 ไอโซเลต และทำการคัดเลือกเฉพาะไอโซเลตที่มีลักษณะของโคโลนีแตกต่างกันได้ 139 ไอโซเลต เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อราสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี โดยพบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 5 ไอโซเลต สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ คือ ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3CB9 ที่แยกได้จากกาฝากต้น C ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3DB4 ที่แยกได้จากกาฝากต้น D และราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3EB2 ที่แยกได้จากกาฝากต้น E สามารถยับยั้งเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* SK1 ได้ ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 2CB4 ที่แยกได้จากกาฝากต้น C สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococus aureus* ATCC 25923 ได้ ส่วนราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3GL3 แยกได้จากกาฝากต้น G สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC-25922 ได้ โดยพบว่าราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3DB4 สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดและเกิดบริเวณยับยั้งที่กว้าง ชัดเจน

จากการจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 5 ไอโซเลต โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X แล้วเปรียบเทียบกับหนังสืออ้างอิง พบว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 2CB4 เป็นเชื้อราจีนัส *Chaetomium* sp. เชื้อราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3CB9 เป็นเชื้อราจีนัส *Curvularia* sp. เชื้อราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3DB4 เป็นเชื้อราจีนัส *Alternaria* sp. ส่วนเชื้อราเอนโดไฟท์ไอโซเลต 3EB2 และ 3GL3 พบว่าสร้างเส้นใยเพียงอย่างเดียว แต่ไม่สร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์อื่นๆ ดังนั้นข้อมูลยังไม่เพียงพอ จึงไม่สามารถจำแนกชนิดได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การแยกราเอนโดไฟท์จากพืชชนิดอื่นๆ
2. การศึกษาลักษณะของกาฝาก เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างราเอนโดไฟท์กับกาฝาก
3. การศึกษาองค์ประกอบของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ เพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
4. การสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ แล้วนำสารที่ได้มาพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะต่อไป
5. การศึกษาราเอนโดไฟท์ในระดับพันธุกรรมเพื่อสามารถจำแนกชนิดเชื้อราในระดับสปีชีส์ได้

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มอารักขาพืช สำนักงานเกษตรจังหวัดนนทบุรี. 2556. "กาฝาก (parasites)." *เตือนภัยการระบาดศัตรูพืช สำนักงานเกษตรจังหวัดนนทบุรี.* 2(10) : 1-3.

จิตรา เกาะแก้ว, เลขา มาโนช, จีรพันธ์วรพงษ์, นิพนธ์ วิสารทานนท์, ณรงค์ สิงห์บุระอุดม, อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ และวรวรรณ ปุณณะตระกูล. 2552. "ราเอนโดไฟต์ในพืชสมุนไพรและการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ." หน้า 571-578. **ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 45 สาขาพืช.** กรุงเทพฯ.

จำเนียร กิ้วเส้ง, สุมาลี เลี่ยมทอง และศุภวรรณ พรหมเพรา. 2556. "ฤทธิ์ต้าจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสกุลไมร์ทาซีอี้ที่พบในพื้นที่ป่าพรุควนเกร็ง." *วารสารวิชาการและการวิจัย ฉบับพิเศษ การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล.* 5 : 320-330.

ชุติมา แก้วกระจาย, ธิดา เดชฮวบ และเลิศชาย สถิตพนาวงศ์. 2557. "ประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์จากโสน (*Sesbania javanica*) ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช." *แก่นเกษตร.* 42(3) : 271-282.

บุษณีย์ เอี่ยมสีดา. 2550. **สัณฐานวิทยาและความสามารถของกาฝากต้นหว้าในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิด.** [Online]. Available : http://puechkaset.com.

ปัทมา พิทยขจรวุฒิ. 2546. "สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณค่าจากทรัพยากรชีวภาพของไทย." *@ll BIOTECH.* 1(5).

มนสวรรค์ ภูยาดาว. 2553. "การสกัดและการหาโครงสร้างของสารจากเชื้อราเอนโดไฟท์ L1." สารนิพนธ์ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

วรรณฤดี หิรัญรัตน์. 2552. "สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดรไฟท์." *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ.* 12(2) : 90-100.

วารีรัตน์ หนูหีต. 2557. "การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนบนผิวสัมผัสโดยใช้สารสกัดจากพืชตระกูลขิง." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). 2555. **บัญชีรายการทรัพย์สินชีวภาพรา.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน).

อัจฉรียา ชมเชย. 2557. "การพัฒนาหัวเชื้อราเอนโดไฟท์เพื่อส่งเสริมการเจริญและการควบคุมโรคในข้าวสายพันธุ์เศรษฐกิจของไทย." **ใน รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2555,** มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

อัมพรรัตน์ ประไพรวงศ์. 2555. "การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Clay, K. 1986. "Induced Vivipary in *Cyperrus virens* and The Transmission of The Fungus *Balensia cyperi.*" *Can. J. Bot.* 64 : 2984 – 2988.

Cowan, M.M. 1999. "Plant Products as Antimicrobial Agents." *Clinical Microbiology Reviews*. 12 : 564-582.

Feng Pan, Zheng-Qiong Liu, Que Chen, Ying-Wen Xu, Kai Hou, Wei Wu. 2016. "Endophytic Fungus Strain 28 Isolated from *Houttuynia cardata* Possesses Wide-Spectrum Antifungal Activity." *Brazilian Journal of Microbiology*. 47 : 480-488.

Gao, X.X., Zhou, H., Xu, D.Y., Yu, C.H., Chen, Y.Q. and Qu, L.H. 2005. "High Diversity of Endophytic Fungi from The Pharmaceutical Plant, *Heterosmilax japonica Kunth* Revealed by Cultivation-Independent Approach." *FEMS Microbiology Letters.* 249 : 255-266.

Helder Lopes Teles, Geraldo Humberto Silva, Ian Castro-Gamboa, Vanderlan da Silva Bolzani, Jose Odair Pereira, Claudio Miguel Costa-Neto, Renato Haddad, Marcos Nogueira Eberlin, Maria Claudia Marx Young and Angela Regina Araujo. 2005. "Benzopyrans from *Curvularia* sp., an Endophytic Fungus Associated with *Ocotea corymbosa* (Lauraceae)." *Phytochemistry*. 66 : 2362-2367.

Jingfeng Lou, Ruiting Yu, Xiaohan Wang, Ziling Mao, Linyun Fu, Yang Liu and Ligang Zhou. 2016. "Aiternariol 9-Methyl Ether from The Endophytic Fungus *Alternaria* sp. Samif01 and Its Bioactivities". *Brazilian Journal of Microbiology.* 47 : 96-101.

Rubini, M.R., Silva-Ribeiro, R.T., Pomella, A.W.V., Maki, C.S., Araújo, W.L., dos Santos, D.R. and Azededo, J.L. 2005. "Diverisity of Endophytic Fungal Community of Cacao (*Theobroma cacao L.*) and Biological Control of *Crinipellis perniciosa,* Causal Agent of Witches' Broom Disease." *International Journal of Biological Sciences*. 1 : 24-33.

Sadananda, TS1. Govindappa, M1. and Ramachandra, YL2. 2013. "Antibacterial Activity of *Viscum Album* Endophytic Fungal Lectin." *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research.* 4(12) : 1033-1042.

White, J. F. and Cole, G. T. 1985. "Endophyte-Host Associations in Forage Grasses III In vitro Inhibition of Fungi by *Acremonium coenophialum*." *Mycologia.* 77 : 487-489.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient broth (NB) อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

Nutrient agar (NA) อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

Potato dextrose agar (PDA) อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

Potato dextrose broth (PDB) อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

Muller Hinton agar (MHA) อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

อาหาร MHA	21	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียม 0.85% NaCl

NaCl	0.85	g
น้ำกลั่น	100	ml

การเตรียม 5% Sodium hypochlorite

Sodium hypochlorite	5	ml
น้ำกลั่น	95	ml

การเตรียม 30% Glycerol

เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 99.9% ปริมาตร 30 ml ลงในน้ำกลั่น 50 ml แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml

ภาคผนวก ข

ต้นกาฝากที่เก็บจากบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ต้นที่ 1 (A) บริเวณหน้าตึกพระเทพ

ต้นที่ 2 (B) บริเวณหน้าตึกอธิการบดี (ต้นเล็ก)

ต้นที่ 3 (C) บริเวณหน้าตึกอธิการบดี (ต้นใหญ่)

ต้นที่ 4 (D) บริเวณโรงอาหารพระเทพ

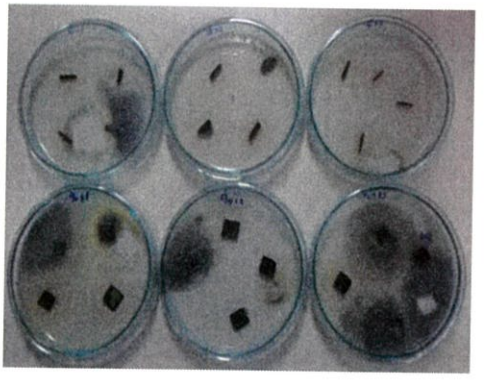
ต้นที่ 5 (E) บริเวณทางเดินหน้าตึกอธิการบดี

ต้นที่ 6 (F) บริเวณคณะวิทยาศาสตร์

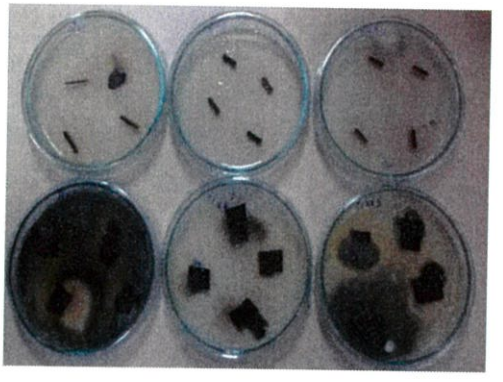
ต้นที่ 7 (G) บริเวณโรงอาหารวิศวกรรมศาสตร์

ต้นที่ 8 (H) บริเวณตึกสิบสองชั้นวิศวกรรมศาสตร์

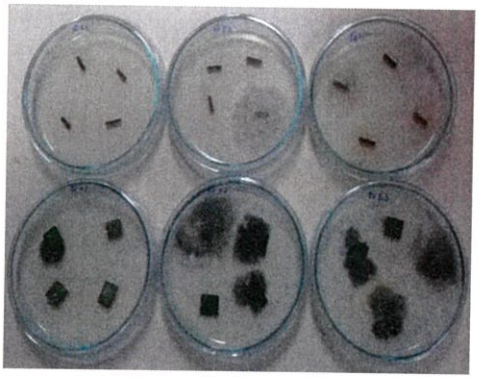
ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกาฝากแต่ละต้น



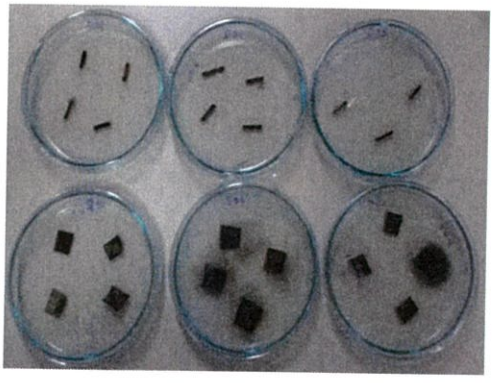
ต้นที่ 1 (A)



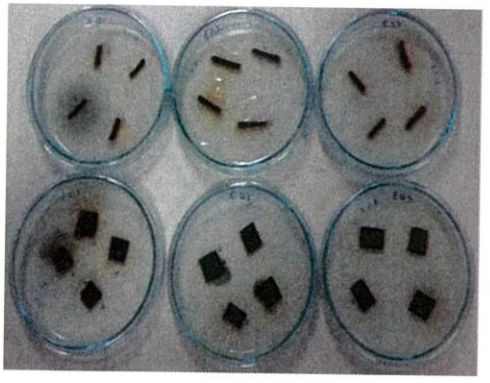
ต้นที่ 2 (B)



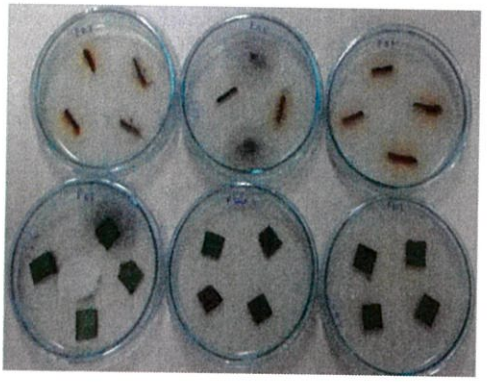
ต้นที่ 3 (C)



ต้นที่ 4 (D)



ต้นที่ 5 (E)



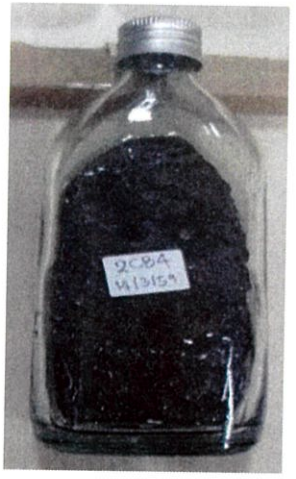
ต้นที่ 6 (F)

ต้นที่ 7 (G)

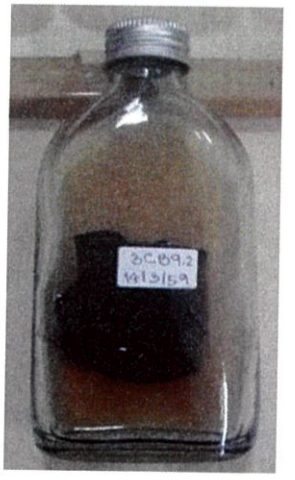
ต้นที่ 8 (H)

การเพะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่แยกในขวดแบนที่มีอาหาร Potato dextrose broth (PDB)

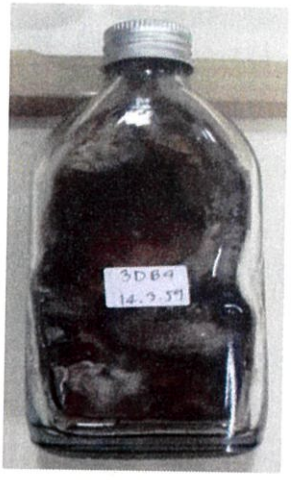
ลักษณะของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว PDB



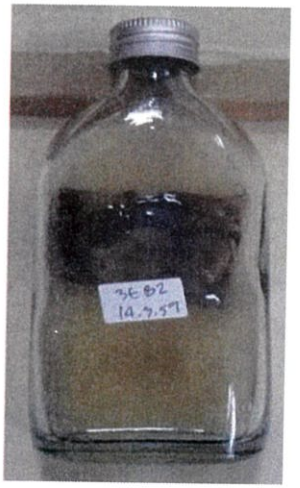
2CB4



3CB9



3DB4



3EB2

3GL3