5 สรุปผลการวิจัย

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

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

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

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

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

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

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

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

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