

## บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

### 4.1 การแยก และจัดจำแนกเชื้อราเอนโดไฟต์จากบัวสาย

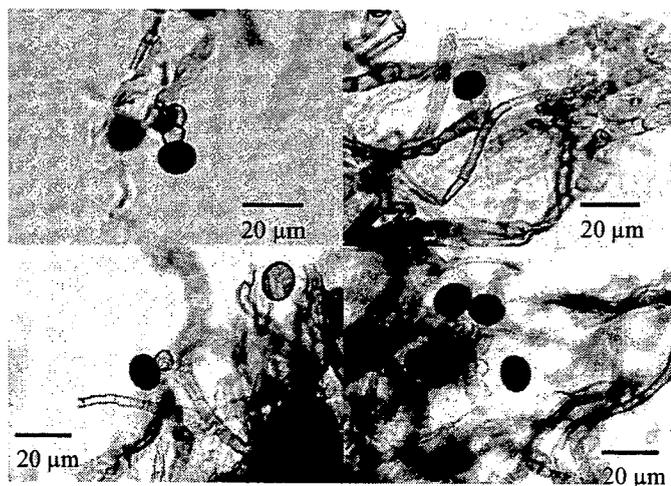
แยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากส่วนต่างๆของบัวสาย ได้แก่ กลีบดอก เกสร ก้านดอก ใบ และ ก้านใบ ได้ทั้งหมด 88 ไอโซเลท จากชิ้นตัวอย่างทั้งหมด 272 ชิ้น คิดเป็น isolation rate เท่ากับ 32.3 เปอร์เซ็นต์ โดย 33 ไอโซเลทจากกลีบดอก 16 ไอโซเลท จากก้านดอก 23 ไอโซเลทจากใบ 1 ไอโซเลทจากเกสร และ 15 ไอโซเลทจากก้านใบ (ตารางที่ 4)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

เชื้อราเอนโดไฟต์ 7 ไอโซเลท จากเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 88 ไอโซเลท ที่สามารถจัดจำแนกได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา คิดเป็น 7.9% เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจัดจำแนกได้ทั้งหมด 3 จีนัส ได้แก่ *Nigrospora* spp. 5 ไอโซเลท *Curvularia* spp. 1 ไอโซเลท และ *Pestalotiopsis* spp. 1 ไอโซเลท และที่เหลืออีก 33 ไอโซเลท ไม่พบโครงสร้างในการสืบพันธุ์ จึงจัดเป็นกลุ่ม unidentified endophytic fungi (รูปที่ 2-4) โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้ง 88 ไอโซเลท นำมาจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันได้ทั้งหมด 40 กลุ่ม โดยเลือกตัวแทนจากแต่ละกลุ่ม มาได้ 40 ไอโซเลท จาก 40 กลุ่ม มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการศึกษาต่อไป

#### **Genus *Nigrospora***

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

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



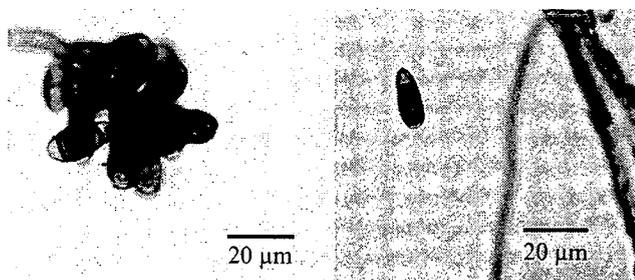
รูปที่ 2 ลักษณะ โคนิเดียม และเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Nigrospora* spp. ที่กำลังขยาย 400 เท่า

### Genus *Curvularia*

**Taxonomic classification:** Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Class Euascomycetes, Order:

Pleosporales and Family: Pleosporaceae

**Fungal isolates:** TSU-WPF014



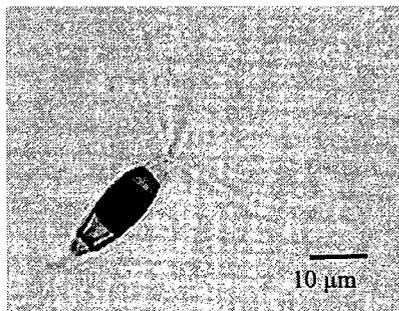
รูปที่ 3 ลักษณะ โคนิเดียมของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Curvularia* spp. ที่กำลังขยาย 400 เท่า

### Genus *Pestalotiopsis*

**Taxonomic classification:** Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Class: Sordariomycetes,

Order: Xylariales and Family: Amphisphaeriaceae

**Fungal isolates:** TSU-WWLS022



รูปที่ 4 ลักษณะ โคนิเดียมของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* spp. ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

ตารางที่ 4 การกระจายของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆของบัวสาย

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

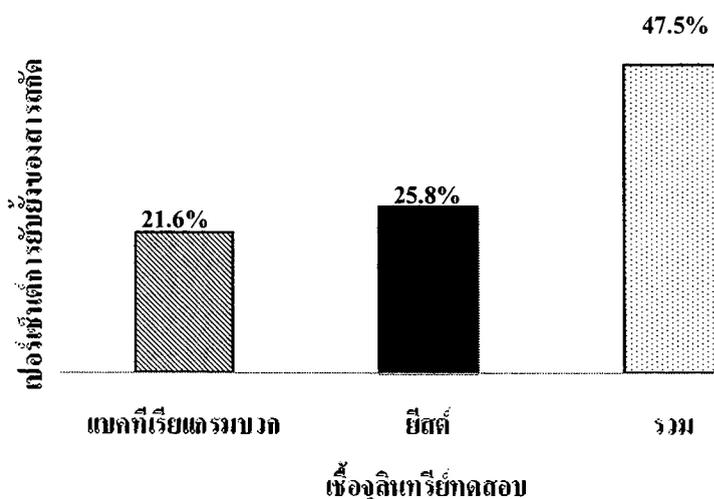
หมายเหตุ: isolation rate (IR) คือ จำนวนของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ / จำนวนชิ้นตัวอย่างทั้งหมด

#### 4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์

##### 4.2.1 การทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดยับยั้งความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

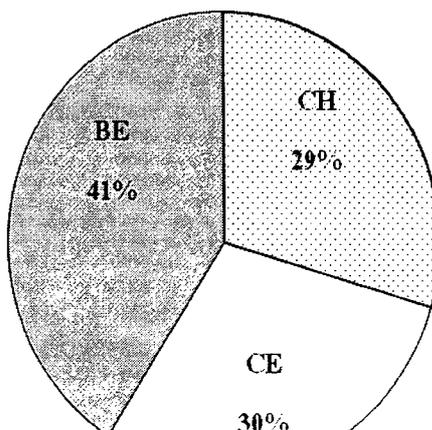
สารสกัดหยาบ 3 กลุ่มเป็นสารที่ได้จากเชื้อราเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลท ได้แก่ Cell Hexane (CH), Cell Ethyl acetate (CE) และ Broth Ethyl acetate (BE) รวมสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา

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



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

เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ



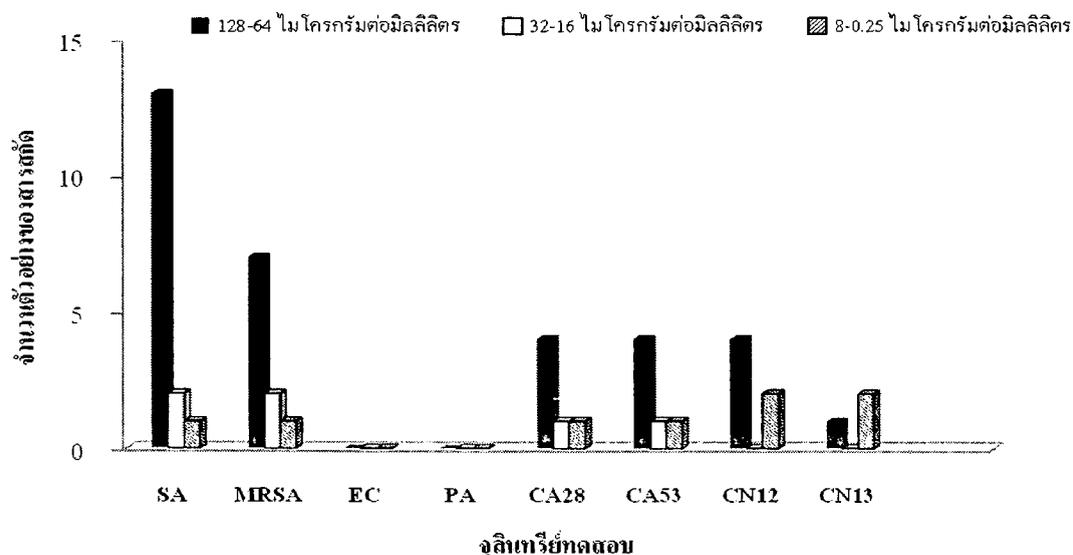
รูปที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดทั้ง 3 ส่วน คือ BE CH และ CE ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ

BE; Broth Ethyl acetate, CH; Cell Hexane และ CE; Cell Ethyl acetate

#### 4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในช่วงความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

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

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



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

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

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหายาที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหายาที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบ ในช่วงความเข้มข้น 0.25-128

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

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

SA, *Staphylococcus aureus* ATCC25923; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; EC, *Escherichia coli* ATCC25922; PA, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; CA1, *Candida albicans* ATCC90028; CA2, *C. albicans* NCPF 3153; CN12, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 (flucytosine-sensitive) และ CN13, *C. neoformans* ATCC90113 (flucytosine-resistant)