

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

ในสภาวะการณ์ที่โลกมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วแต่การที่ประชากรโลกมีสุขภาพที่ดีก็ยังคงเป็นสิ่งสำคัญที่สุด การดื้อยาของเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลก็เพิ่มขึ้นทุกขณะ ดังนั้นการเสาะหาสารประกอบทางชีวภาพ (bioactive compound) จากพืชชนิดต่างๆที่พบในท้องถิ่นนั้นๆ และจุลินทรีย์ยังคงเป็นไปอย่างต่อเนื่อง ปัญหาสำคัญที่มีผลกระทบต่อสุขภาพและสาธารณสุขในโรงพยาบาล อันเป็นสาเหตุของการสูญเสียชีวิตและค่าใช้จ่ายในการรักษา คือ ผู้ป่วยที่มีบาดแผลติดเชื้อเรื้อรัง เนื่องจากการรักษาแผลติดเชื้อเป็นเวลานานจะส่งผลทำให้เชื้อดื้อยา ทำให้ยากต่อการรักษาและยังส่งผลให้แผลของผู้ป่วยเกิดการติดเชื้อเรื้อรังในกลุ่มเชื้อที่ดื้อยา นอกจากนี้แผลติดเชื้อยังมีสาเหตุมาจากการเกิดภาวะต่างๆได้ เช่น โรคเบาหวาน แผลกดทับ แผลติดเชื้อ แผลไฟไหม้ เป็นต้น ซึ่งแผลติดเชื้อ (wound infection) ที่ผิวหนังนั้นเกิดจากการที่แผลเรื้อรังมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะการปนเปื้อนเชื้อที่อาศัยอยู่ประจำถิ่นบริเวณผิวหนัง ได้แก่ *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Propionibacterium acnes* เป็นต้น เชื้อที่พบรายงานในผู้ป่วยติดเชื้อ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* กลุ่มที่ย่อยเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ (β -hemolysis) ได้แก่ *Streptococcus pyrogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas (Xanthomonas)* และยังพบว่า *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบในแผลผู้ป่วยเบาหวานและพบหลังจากการเกิดแผลของผู้ป่วยผ่านไป 4 สัปดาห์ จะพบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Proteus spp.*, *E. coli*, และ *Klebsiella spp.* หากแผลไม่หายจะพบจุลินทรีย์เชื้อในกลุ่ม *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, และ *Stenotrophomonas spp.* (Charmberlain, 2007) แผลเรื้อรังนั้นเกิดจาก การทำเคมีบำบัด การที่ยืนถูกทำลาย และการรักษาผู้ป่วยด้วยสเตียรอยด์ ซึ่งแผลเรื้อรังนี้จะพบในผู้ป่วยโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน ไตล้มเหลว ความดันโลหิต เป็นต้น (Charmberlian, 2007) การรักษาแผลเรื้อรัง ดังนั้นการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านแบคทีเรียชนิดใหม่จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีแผลเรื้อรังและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาครีมรักษาแผลติดเชื้อเรื้อรังต่อไป

จุลินทรีย์เอนโดไฟท์จะพบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิดโดยทำหน้าที่ในการสร้างสารบางชนิดขึ้นมาช่วยในการป้องกันตัวเองและการมีชีวิตรอด ซึ่งจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จะอาศัยอยู่ในช่องว่างใน

เนื้อเยื่อพืช เช่น ท่อน้ำ ท่ออาหาร เป็นต้น และมีการตอบสนองต่อการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ เมื่อเรื้อรังมีรายงานเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) จากจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพร (medical plant or herb) ที่มีคุณสมบัติมากมาย ได้แก่ มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดลิ่มเลือดหรือการแข็งตัวของเลือด (antithrombotic) มีฤทธิ์ฆ่าแมลง และอื่นๆ เป็นต้น จุลินทรีย์เอนโดไฟท์จะมีความหลากหลายของจุลินทรีย์และคุณลักษณะของสารที่พบในจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ ซึ่งจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จะพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยสิตและรา เป็นต้น (Zhang *et al.*, 2014) เมื่อเรื้อรังนี้ก็ได้มีการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพร Aharwal *et al.* (2014) แยกราเอนโดไฟท์ *Fusarium solani*, *Cladosporium herbarum*, *Drechslera modulosa*, *Curvularia pallescens* และ *Alternaria alterna* จากต้นดอกกรัก (*Calotropis procera* (Aiton.) R.Br.) พืชสมุนไพรจากประเทศอินเดีย มีฤทธิ์ยับยั้ง *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้ นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์ *Fusarium solani* ที่แยกได้จากมะเขือเทศมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Staphylococcus aureus* NCTC6571 ได้ดี ให้ค่า MIC เท่ากับ 12.5 และ 6.25 $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับ ซึ่งราชนิดนี้จะสร้างสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ tannins และ สารประกอบ phenol รวมทั้งมีรายงานพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ และสารที่สร้างจากจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จะมีข้อดี คือ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์หรือมีความเป็นพิษน้อย ในทางตรงกันข้ามหากจุลินทรีย์เอนโดไฟท์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ก็จะส่งผลให้เนื้อเยื่อของพืชเจ้าบ้านตายเช่นกัน ดังนั้นต้นพืชเองจึงต้องมีระบบในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ลดความเป็นพิษกับเซลล์ได้ (Aharwal *et al.*, 2014) ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีข้อดีกว่าสารที่ได้จากพืช คือ สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ตลอดเวลา สามารถพัฒนาปรับปรุงอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมเพื่อให้การผลิตสารเพิ่มขึ้น และสายพันธุ์จุลินทรีย์ยังมีโอกาสปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีความสามารถผลิตสารได้มากขึ้น

สาบเสือ (*Chromolaena odorata*) เป็นพืชที่พบโดยทั่วไปในประเทศไทย สำหรับสาบเสือนี้อาจมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยามากมาย ได้แก่ ฤทธิ์ในการฆ่าแมลง เช่น สารสกัดจากใบสาบเสือนี้อาจมีผลต่อการตายของหนอนใยผัก (มณีญา เพียรเจริญ, 1996) และการห้ามเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจากดอกสาบเสือนี้อาจมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ชนิดต่าง (Suksamrarn *et al.*, 2004; Dash & Murthy, 2011) ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., และ *Pseudomonas aeruginosa* (Kigigha *et al.*, 2013; Eze *et al.*, 2013; Stanley *et al.*, 2014) ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคท้องเสีย (diarrheal) 4 ชนิด

ได้แก่ *Klebseilla oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* และ *Vibrio cholera* (Anitndehou et al., 2013), ฤทธิ์ยับยั้งไบโอฟิล์ม ได้แก่ ฤทธิ์ฆ่า biofilm ของ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (Yahya et al., 2014) เป็นต้น เนื่องจากมีรายงานว่า ถ้าแยกจุลินทรีย์เอนโดไฟต์จากพืชที่มีฤทธิ์ทางเภสัช จะทำให้ได้จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชเช่นกัน เช่น ราเอนโดไฟต์ *Fusarium proliferatum* ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร *Celastrus angulatus* ของประเทศจีน มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ (Selim, 2010) ซึ่งยังไม่มีรายงานวิจัยการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากวัชพืชต้นสาบเสือ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เหมือนกับที่พืชสร้างขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีคุณลักษณะเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ นอกจากนี้อายุพืชหรือระยะพืชที่นำมาแยกจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ก็จะมีผลต่อชนิดและคุณลักษณะของ จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ โดยอายุของพืชที่เหมาะสมในการนำมาแยกจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ คือ ต้องเป็นพืชที่ไม่แก่หรืออ่อนจนเกินไป แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยของ Loaces et al. (2011) พบว่า จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการเจริญและสามารถสร้างฮอร์โมน IAA มีการสร้าง siderophore และสามารถตรึงไนโตรเจนได้นั้นจะพบจุลินทรีย์นี้ในระยะการเจริญของพืชแตกต่างกัน คือ พบในเมล็ดพืชข้าวมากที่สุด รองลงมา คือ ในรากพืชระยะแตกกอ (tillering) และในรากพืชระยะน้ำท่วมขัง (flooding)

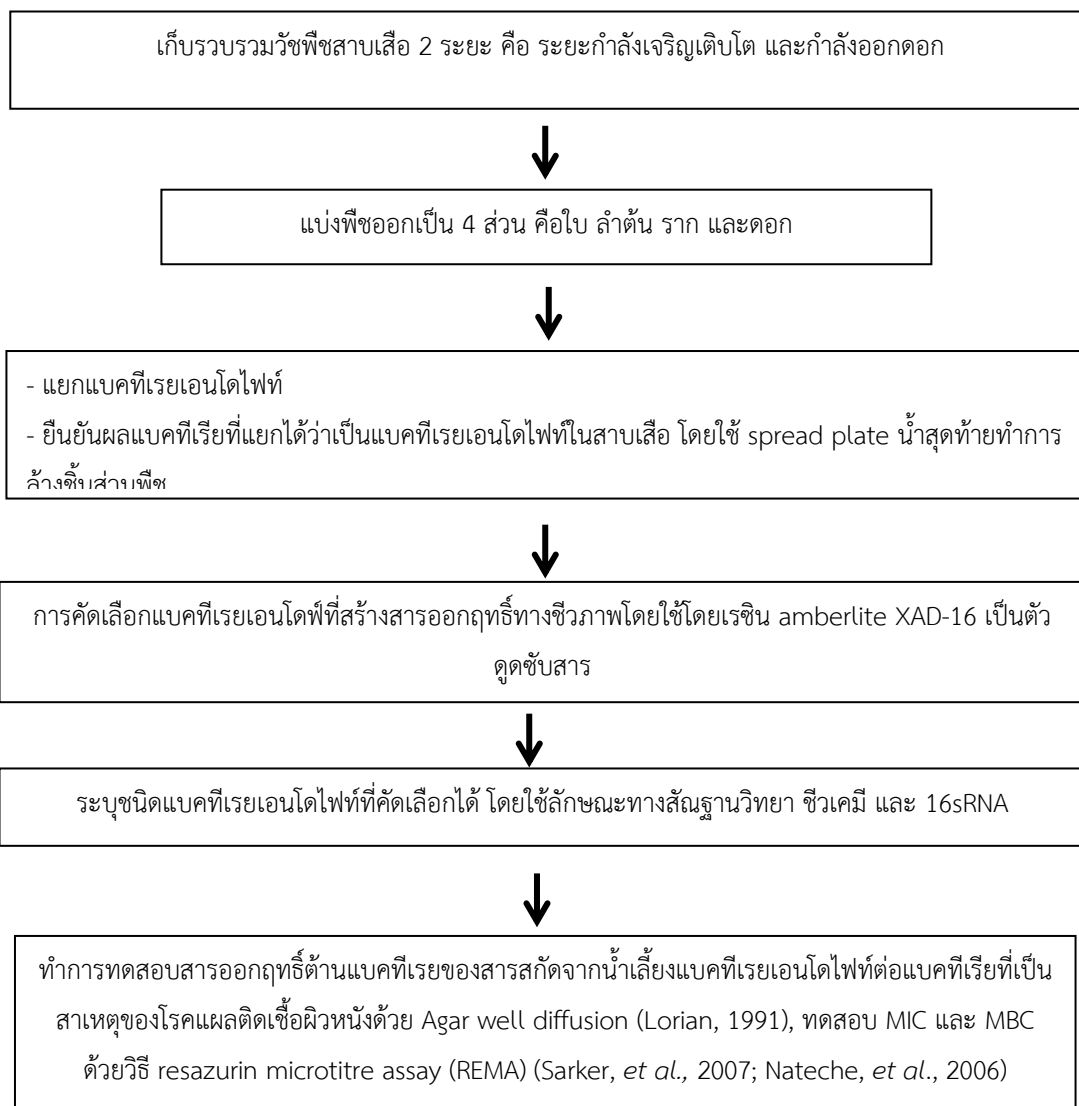
ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ ได้แก่ แบคทีเรีย รา และ แอคติโนมัยสิท จากวัชพืชสมุนไพรสาบเสือที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแผลติดเชื้อ โดยทำการเก็บตัวอย่างพืช 2 ระยะ คือ ระยะที่สาบเสือกำลังเจริญ และระยะที่สาบเสี้ออกดอก ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคแผลติดเชื้อผิวหนัง โดยทำการทดสอบสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคแผลติดเชื้อผิวหนังและเป็นปัญหาที่บ่อยในโรงพยาบาล ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Propionibacterium acnes* และ *Enterococcus faecalis* แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* เพื่อจะได้สารออกฤทธิ์ทางเภสัชชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อนำไปเป็นครีมาใช้ในการรักษาโรคแผลติดเชื้อต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ จากวัชพืชสมุนไพรสาบเสือที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแผลติดเชื้อผิวหนัง
2. ระบุชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้

3. ทดสอบสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ต่อแบคทีเรียก่อโรคผลัดใบเชื้อผิวหนัง

ขอบเขตการวิจัย



คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

สาบเสือ (*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson) คือ เป็นวัชพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกากลาง มีเขตแพร่กระจายตั้งแต่ทางตอนใต้ของฟลอริดา จนถึงพื้นที่ตอนเหนือของอาร์เจนตินา ระบาดไปทั่วเขตร้อนของโลกทุกทวีป ทวีป ยกเว้นการระบาดเข้าไปในทวีปออสเตรเลีย

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยที่เชื้ออาจจะยังไม่ตายทั้งหมด โดยเฉพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานนาน 18-24 ชั่วโมง (Peterson & Shanholtzer, 1992) ซึ่งเป็นการทดสอบในอาหารเหลวที่ผสมยาหรือสารต้านเชื้อแบคทีเรียที่ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นของยาต่างกันตามลำดับ (serial dilution) โดยให้ถือว่าความเข้มข้นของยาในหลอดทดลองที่มีระดับของสารต่ำที่สุดและไม่พบการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวเป็นค่า MIC แต่เมื่อนำสารจากหลอดทดลองที่ไม่พบการเจริญของเชื้อมาทำการเพาะเชื้อในอาหารแข็งที่ไม่มียาด้านเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นอาจพบการเจริญของเชื้อได้

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) และ minimum lethal concentration หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารฆ่าแบคทีเรียที่สามารถฆ่าเชื้อได้ 99.9% ($3 \log_{10}$ reduction) ของเชื้อทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ (เทียบเทียบจากเชื้อเริ่มต้น) โดยเฉพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานนาน 18-24 ชั่วโมง สำหรับคำว่า minimum lethal concentration จะใช้เมื่อทดสอบอ้างอิงโดยตรงกับจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ใช่แบคทีเรีย ได้แก่ รา และ ไวรัส เป็นต้น (Peterson & Shanholtzer, 1992)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยที่ได้สามารถนำไปใช้เพื่อต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากสารสกัดแบคทีเรียเอนโดไฟต์

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสาบเสือ

2.1.1 ชื่อ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson

ชื่อภาษาไทย: สาบเสือ

ชื่ออื่นๆ: มีดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ชื่ออื่นของสาบเสือ

จังหวัด	ชื่ออื่นของสาบเสือ
กาญจนบุรี	เสื่อหมอบ
ขอนแก่น	หญ้าเลาฮ้าง
ตราด	เบญจมาศ
ชลบุรี	หมาหลง (อำเภอศรีราชา)
เชียงใหม่	นองเส็งเปรง, เซโปกวย (กะเหรี่ยง)
เพชรบูรณ์	ฝรั่งรุกที่ฝรั่งเหาะ, มนทน
แม่ฮ่องสอน	ไต้ปู้กุก (กะเหรี่ยง)
สิงห์บุรี	สาบเสือ
สุโขทัย	หญ้าดอกขาว
สุพรรณบุรี	เสื่อหมอบ, ฝรั่งเหาะ, ฝรั่งรุกที่
สุราษฎร์ธานี	ชาผักคราด, ยี่สุนเถื่อน
สระบุรี	หญ้าดงรัง, หญ้าสิริไอสวรรค์
เลย	สะพัง
ระนอง	รำ, เคย, หญ้าเมืองวาย, หญ้าดอกขาว
ราชบุรี	เสื่อหมอบ, บ้านร้าง, ผักคราด
หนองคาย	หญ้าลิ้มเมือง
อุดรธานี	มั่งกระต่าย
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	หญ้าเมืองฮ้าง, หญ้าเหม็น
อื่นๆ	หญ้าฝรั่งเสส หญ้าเครื่องบิน ปวยกีเซา เชียงเจกั้ง

ที่มา: ธารธรรมแก้ว เชื้อเมือง, (2537); พิสุทธิพร ฉ่ำใจ. (2550)

2.1.2 การจัดลำดับอนุกรมวิธานของสาบเสือ (Chakraborty et al., 2011; Suwaibah et al., 2012)

Kingdom	<i>Plantae</i> – Plants
Subkingdom	<i>Tracheobionta</i> - Vascular plants
Superdivision	<i>Spermatophyta</i> – Seed plants
Division	<i>Magnoliophyta</i> - Flowering plants
Class	<i>Magnoliopsida</i> - Dicotyledons
Subclass	<i>Asteridae</i>
Order	<i>Asterales</i>
Family	Asteraceae – Aster family
Genus	<i>Chromolaena</i> DC. (thoroughwort)
Species	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) King & Robinson - Jack in the bush

Synonyms: *Eupatorium affine* Hook & Arn.,
Eupatorium brachiatum Wikstrom,
Eupatorium clematitidis DC.,
Eupatorium conyzoides M. Vahl,
Eupatorium divergens Less.,
Eupatorium floribundum Kunth,
Eupatorium graciliflorum DC.,
Eupatorium odoratum L.,
Eupatorium sabeanum Buckley,
Eupatorium stigmatosum Meyen & Walp.,
Osmia conyzoides (Vahl) Sch.-Bip.,
Osmia divergens (Less.) Schultz-Bip.,
Osmia floribunda (Kunth) Schultz-Bip.,
Osmia graciliflora (DC.)Sch. Bip.,
Osmia odorata (L.) Schultz-Bip.

2.1.3 ถิ่นกำเนิด

สาบเสือ (siam weed) เป็นวัชพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกากลาง มีเขตแพร่กระจายตั้งแต่ทางตอนใต้ของฟลอริดา จนถึงพื้นที่ตอนเหนือของอาร์เจนตินา ขึ้นทั่วไปเขตร้อนของโลกทุกทวีป ยกเว้น ในทวีปออสเตรเลีย ซึ่งเพิ่งจะพบเพียงเล็กน้อยในช่วงเวลาภายใน 10 ปีที่ผ่านมา ดังนั้นจึงเป็นวัชพืชที่ขึ้นโดยทั่วไป ที่เรียกสาบเสือเนื่องจากก้านและใบเมื่อขยี้จะมีกลิ่นแรงคล้ายสาบเสือ (ธารธรรมแก้ว เชื้อแก้ว, 2537; สุรศักดิ์ ราตรี, 2554)

2.1.4 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

สาบเสือจัดเป็นไม้ล้มลุกเป็นไม้พุ่มเพราะมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมายจนดูเป็นทรงพุ่ม ลำต้นและกิ่งก้านปกคลุมด้วยขนอ่อนนุ่ม ก้านและใบเมื่อขยี้จะมีกลิ่นแรงคล้ายสาบเสือ (ธารธรรมแก้ว เชื้อเมือง, 2537; สุรศักดิ์ ราตรี, 2554; Queensland government, 2011; Land protection, 2006)

ใบ (leaves) ใบเดี่ยวออกจากลำต้น ที่ข้อ แบบตรงกันข้าม รูปรีค่อนข้างเป็นสามเหลี่ยมขอบใบหยักเป็นซี่ฟันหยาบๆ ปลายใบแหลม ฐานใบกว้าง เรียวสอบเข้าหากัน ขนาด 6.1-8.8 X 10.1-13.4 เซนติเมตร ใบนุ่ม สีเขียวอ่อน เส้นใบเห็นชัดเจน 3 เส้น มีขนปกคลุมทั้งสองด้านของผิวใบ ยอดอ่อนจะมีสีม่วง ผิวใบทั้งสองด้าน ก้านใบ 1.4-2.3 (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของใบต้นสาบเสือ

ที่มา: Queensland government (2011)

ดอก (flower) เป็นช่อเป็นกระจุกคล้ายร่ม สีขาวหรือฟ้าอมม่วงออกที่ปลายกิ่ง ลักษณะเป็นก้อนขนาด 4-8 เซนติเมตร มีดอกย่อยจำนวน 10-35 ดอก มีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน

เซนติเมตร รอบนอกเป็นดอกเพศเมีย มีก้านชูเกสรยาว ด้านในเป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบดอกเป็นหลอด ปลายแยกเป็น 5 แฉก เกสรเพศผู้สั้น 5 อัน อยู่ภายในหลอดดอก ดอกวงนอกบานก่อน กลีบดอก หลอมรวมกันเป็นหลอด ผลขนาดเล็ก รูปร่างเป็น ห้าเหลี่ยม สีน้ำตาลหรือดำ มีหนามแข็งบนเส้นของผล ส่วนปลายผลมีขนสีขาว ช่วยพยุงให้ผลและเมล็ดปลิวตามลมได้ไกลๆ จึงแพร่พันธุ์อย่างรวดเร็ว ออกดอกในเดือนกรกฎาคม และออกดอกอีกครั้งเดือนกันยายนถึงตุลาคม (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะของดอกต้นสาบเสือ

ที่มา: Queensland government, (2011)

ผล แห้งแตก รูปร่างเป็น 5 เหลี่ยม สีน้ำตาล มีหนามแข็งบนเส้นของผล

เมล็ด (seeds) มีขนาดเล็กรูปกระสวยแบน ส่วนปลายมีขนยาวสีขาว เมล็ดของต้นสาบเสือจะถูกสร้างขึ้นภายใน 8-10 สัปดาห์หลังจากออกดอกแล้ว เมล็ดจะมีทั้งหมดประมาณ 80,000 เมล็ดต่อต้นต่อฤดูกาล แต่ละเมล็ดจะมีขนสีขาวติดอยู่ทำให้ถูกกระจายไปยังแหล่งอื่นได้ง่ายโดยลมและน้ำ เมล็ดจะงอกหลังจากฝนตกและเมล็ดสามารถอยู่รอดได้หลายปี (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของดอกสาบเสือที่แก่แล้ว

ที่มา: Land protection (2006)

ลำต้น (stem) ลำต้น สูง 1-2 เมตร เรียบไม่ขรุขระ มีสีเขียว ปกคลุมด้วยขนอ่อนนุ่ม เมื่อแก่จะออกสีน้ำตาล (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 ลักษณะของลำต้นสาบเสือที่แก่แล้ว

ที่มา: Land protection (2006)

ราก (root) ระบบรากจะมีทั้งรากแก้วและรากฝอยอยู่ใต้ดิน ส่วนที่เชื่อมต่อกับลำต้นจะมีลักษณะเป็น basal ball (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 ลักษณะของรากสาบเสื่อที่แก่แล้ว

ที่มา: Land protection (2006)

2.1.5 การแพร่กระจาย

ขึ้นทั่วไปทั้งในสภาพดินชื้นหรือแห้ง แพร่กระจายในแหล่งปลูกพืชยืนต้นและที่รกร้าง ว่างเปล่าและตามที่มีแสงแดดมากมายขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด

2.1.6 สรรพคุณ (ธารธรรมแก้ว เชื้อเมือง, 2537; สุรศักดิ์ ราตรี, 2554; พิสุทธิพร ฉ่ำใจ, 2550)

ใบ ใช้ตำให้ละเอียดพอกบาดแผลสด ช่วยห้ามเลือดได้เป็นอย่างดี (ชาวเขานิยมใช้) แก้กตาฟาง ตาแฉะ รักษาโรคสีดวงทวาร

ลำต้น แก้วปวดท้อง ท้องเฟ้อ แก้นมคัด แก้วปวด ตูดหนอง

ดอก แก้วร้อนในกระหายน้ำ แก้วอ่อนเพลีย บำรุงหัวใจ แก้วไข้

อื่นๆ ใบมีกลิ่นฉุน มีสารยับยั้งการงอกและชะลอการเจริญเติบโตของพืชอื่น

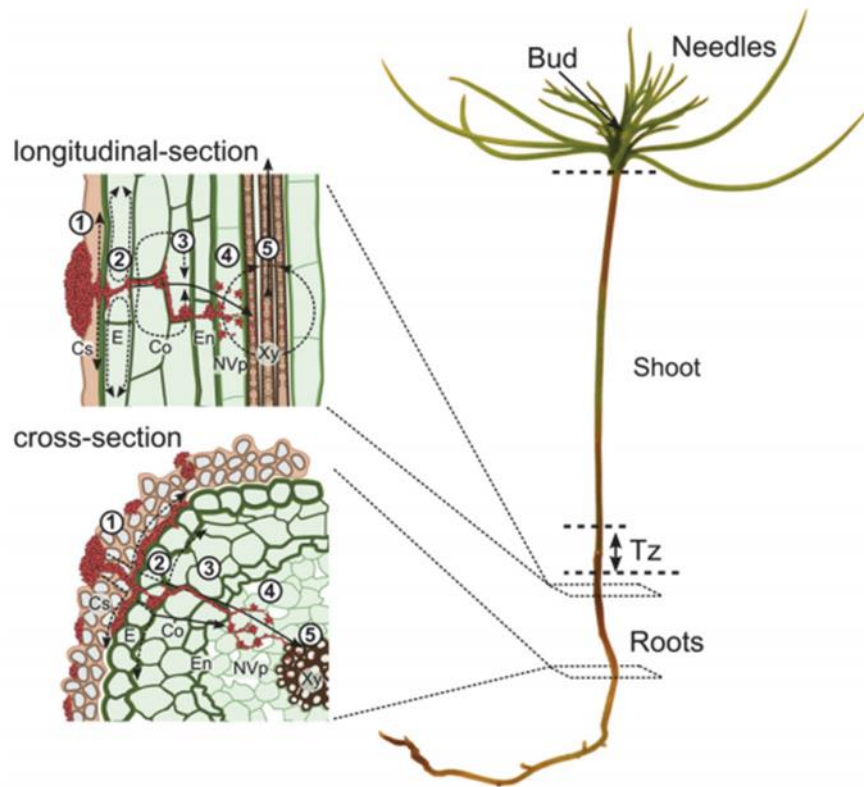
2.2 เอนโดไฟต์

เอนโดไฟต์ คือ รา แบคทีเรีย หรือ แอคติโนมัยซีส ที่ช่วงชีวิตในระยะใดระยะหนึ่งหรือทั้งชีวิตอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช ไม่ว่าจะเป็นส่วนของราก ใบ หรือลำต้น และไม่ทำอันตรายไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชที่เป็นผู้ให้อาศัย การดำรงชีวิตของเอนโดไฟต์เป็นแบบอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) โดยอาจช่วยพืชที่เป็นผู้ให้อาศัยทั้ง ทางตรงและทางอ้อม ผลิตสาร secondary metabolite ที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อปกป้องพืชผู้ให้อาศัยปลอดภัยจากการทำลายของเชื้อก่อโรค ช่วยส่งเสริมการเจริญ และช่วยให้พืชมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Li et al., 2000; Strobel et al., 2002) และอาจเป็นแหล่งที่มาของยาตัวใหม่ และยังสามารถจัดการกับโรคพืชได้เป็นอย่างดี (Azevedo et al., 2000)

การค้นพบเอนโดไฟต์เกิดขึ้นครั้งแรกในประเทศนิวซีแลนด์และสหรัฐอเมริกาในปลายปี 1940 โดยค้นพบสารพิษที่สร้างจากเอนโดไฟต์ที่เจริญอยู่ในหญ้าที่ใช้เลี้ยงสัตว์ ซึ่งหลังจากที่สัตว์กินหญ้าเข้าไปแล้วจะแสดงอาการผิดปกติและเริ่มมีการศึกษาเรื่อยมาจนสืบเนื่องถึงปัจจุบันจึง พบว่า เอนโดไฟต์มีบทบาทสำคัญในการช่วยปกป้องพืช จากการถูกทำลายด้วยแมลงกัดกินที่มาจากสัตว์กินพืชชนิดต่างๆ นอกจากนี้จากการศึกษายัง พบว่า การที่พืชมีเชื้อเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ยังช่วยให้พืชมีความทนทานต่อการฉีกขาดเนื่องจากแรงกระทำต่างๆในธรรมชาติ ช่วยสร้างฮอร์โมนพืช (phytohormone) บางอย่างช่วยให้พืชมีความสามารถในการแข่งขัน ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดพืชและสามารถสร้างสารประกอบที่น่าสนใจอื่นๆอีกมาก เช่น เอนไซม์ (Azevedo et al., 2000)

2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเอนโดไฟต์กับพืชในทางนิเวศวิทยา

เอนโดไฟต์จะอาศัยอยู่ภายในต้นพืช โดยไม่ก่อให้เกิดโรคแก่ต้นพืชที่ราอาศัยอยู่ (Strobel et al., 2002) โดยอาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular spaces) ของส่วนลำต้น (stem) เปลือกไม้ (bark) ท่อลำเลียงน้ำ (xylem) ใบ (leaves) เส้นใบ (petioles) ราก (root) และเมล็ด (seed) ของพืชชั้นสูง (ภาพที่ 1) ราเอนโดไฟต์จะมีความเกี่ยวข้องกับพืชในลักษณะที่เป็นภาวะพึ่งพากัน (mutualistic) ภาวะที่ต้องอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiotic) และ ภาวะที่อยู่รวมกันโดยฝ่ายหนึ่งได้ประโยชน์แต่อีกฝ่ายไม่ได้ประโยชน์แต่ไม่ได้รับอันตราย(commensal) แต่บางครั้งอาจจะทำให้เกิดพยาธิสภาพกับต้นพืชได้ถ้าต้นพืชมีภาวะอ่อนแอหรือมีความเครียดเกิดขึ้น โดยจะพบราเอนโดไฟต์ได้ในพืชจำพวกหญ้า ไม้ผลัดใบ ไม้ยืนต้น และไม้พุ่ม เป็นต้น(Strobel et al., 2002)



ภาพที่ 2.6 รูปแบบแบคทีเรียที่แทรกเข้าไปในแผ่นหอมของ *Methylobacterium extorquens* 13060 ที่บริเวณรากพืชเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อ (1) แบคทีเรียรวมกลุ่มกันเป็นแผ่นรูปทรงกระบอกอยู่ในบริเวณผิวของรากพืช (2) แบคทีเรียแทรกตัวเข้ามาอยู่ในชั้นผิวของผนังเซลล์ (3) แบคทีเรียจะสร้างลักษณะคล้ายเส้นด้าย (thread-like structures) ในชั้นเนื้อเยื่อลำเลียง (4) ลักษณะของเอนโดไฟต์ที่อยู่ในเซลล์พืชและมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์เนื้อเยื่อพาราไคม่า (parenchymal cells) ในท่อลำเลียงน้ำ (xylem vessels) (5) เกิดการรวมกลุ่มกันของแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการคายน้ำหลังจากมีการลำเลียงน้ำ, Cs, cylindrical sheath; Co, cortex; E, epidermis; En, endodermis; NVp, non-vascular parenchyma; Tz, transition zone; Xy, xylem vessels

ที่มา: Koskimäki (2016)

2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์

การศึกษาศาสตร์ภูมิจากเอนโดไฟต์ โดยมากมักศึกษาจากพืชสมุนไพรหรือพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากคาดว่าเอนโดไฟต์ที่อาศัยร่วมกับพืชดังกล่าวอาจจะสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่นเดียวกับพืชที่อาศัยดังตารางที่ 1

2.4.1 สารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial agent)

การออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์จัดเป็นฤทธิ์เบื้องต้นที่มีการทดสอบ โดยมักทดสอบกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคแล้ววัดความสามารถในการออกฤทธิ์จากขนาดวงใสที่เกิดขึ้น หรืออาจรายงานเป็นค่า MIC (minimum inhibitory concentration) หรือค่า IC (inhibition concentration)

ตารางที่ 2.2 เอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์

พืชเจ้าบ้าน	เอนโดไฟต์	ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ	อ้างอิง
<i>Daphnopsis americana</i>	Not identified	<i>Staphylococcus aureus</i> และ <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> ,	Brady et al. (2001)
โกฐจุฬาลัมพา (<i>Artemisia annua</i> L.)	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Phytophthora capsici</i> , <i>Rhizoctonia cerealis</i> , <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> , <i>Helminthosporium sativum</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Microbotryum</i> sp.	Lu et al. (2000)
ปรังไซ (<i>Acrostichum aureum</i> L)	<i>Penicillium</i> sp. <i>Cryptosporiopsis</i> sp, <i>Pezicula</i> sp.	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> Yeasts	Cui et al. (2008)
ต้นบีช ไม้บีช (<i>Fagus sylvatica</i>)	<i>Cryptosporiopsis</i> Quercina	<i>Candida albicans</i>	Noble et al. (1991)
<i>Urospermum picroides</i>	<i>Ampelomyces</i> sp.	<i>Verticillium albo-atrum</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Aly et al. (2008)
ใบของข้าวหอมกระดังงา (<i>Oryza sativa</i> L.)	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Phacelia grisea</i>	สายทอง แก้วฉาย (2557)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

พืชเจ้าบ้าน	เอนโดไฟต์	ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ	อ้างอิง
โสน (<i>Sesbania javanica</i>)	<i>Chaetomium globosum</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Curvularia</i> spp., <i>Nigrosporium sphaerica</i> , <i>Pestalotiopsis</i> spp., <i>Phomopsis</i> spp., <i>Talaromyces trachyspermus</i> , <i>Zygosporium masonii</i> และ <i>unidentified</i> spp.	<i>Bipolaris maydis</i> <i>Alternaria alternate</i> <i>Colletotrichum</i> spp. <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Phytophthora palmivora</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotium rolfsii</i>	ชุตินา แก้วกระจาย (2557)
ไม้ยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมและ พันธุ์ RRIM 600 (<i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg.)	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Phytophthora palmivora</i> <i>Phytophthora botryosa</i>	กาญจนา มณี ศรี (2557)
พลูดาว (<i>Houttuynia cordata</i> Thunb)	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Fusarium graminearum</i> Sehwa, <i>Alternaria solani</i> (Ell. et Mart.) Sorauer, <i>Phytophthora capsici</i> Leonian, <i>Botrytis cinerea</i> person, <i>Fusarium moniliforme</i> Sheld, <i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler, <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. Niveum, <i>Alternaria solani</i> Sorauer, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary, <i>Exserohilum turcicum</i> , <i>Thielaviopsis basicola</i> , <i>Aphanomyces raphani</i> Kendrick, <i>Puccinia zoysiae</i> Diet, <i>Bipolaris maydis</i>	Pan. et al. (2016)
โสม (<i>Panax ginseng</i> Meyer)	<i>Colletotrichumpisi</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Phoma terrestris</i>	<i>Alternaria panax</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum panacicola</i> , <i>Cylindrocarpon destructans</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , และ <i>Phytophthora cactorum</i>	Park. et al. (2015)

2.4.2 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง (cytotoxic activity)

นอกจากฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคแล้วจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ยังเป็นแหล่งผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งได้

ตารางที่ 2.3 เอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง

แหล่งของ เอนโดไฟต์	เอนโดไฟต์ ที่แยกได้	สารบริสุทธิ์ที่ แยกได้จากเอน โดไฟต์	ฤทธิ์ของเอนโดไฟต์	อ้างอิง
<i>Torreya grandis</i> , <i>Cephalataxus fortune</i> , <i>Taxus mairei</i>	-	-	ร้อยละ 6.4 แสดงฤทธิ์ cytotoxic ต่อ KB cells ร้อยละ 13.4 แสดงฤทธิ์ cytotoxic ต่อเซลล์ HL-60	Huang et al. (2001)
ต้นเปล้าใหญ่ (Corton oblongifolius Roxb.)	-	<i>Folipastatin unguinol</i>	Folipastatin แสดงฤทธิ์ ยับยั้ง เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2) มะเร็งลำไส้ ใหญ่ (SW 620) มะเร็ง ปอด (GHAGO) กระเพาะอาหาร (KATO-3) และมะเร็ง เต้านม (BT474)	นุชจิรา อ่อน นวล (2004)
<i>Tabernaemontana heyneana</i> Wall. (Apocynaceae)	<i>Fusarium graminearum</i>	เอนไซม์ L-asparaginase	-	Manasa & Nalini (2014).
ส่วนเหง้าของขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i>)	<i>Eurotium</i> sp.	เอนไซม์ L-asparaginase	-	Jalgaonwala et al. (2014)
พืชกุหลาบพุกาม (<i>Cymbopogon citratus</i>), หอมแขก (<i>Murraya koenigii</i>) ตะไคร้หอม (<i>Oldenlandia diffusa</i>) และผักขมหิน (<i>Pereskia bleo</i>)	<i>Colletotrichum</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phoma</i> , <i>Penicillium</i>	เอนไซม์ L-asparaginase	-	Chow et al. (2015)

2.4.3 สารต้านเนื้องอก (Antitumor Agents)

เอนโดไฟต์ *Aspergillus parasiticus* ที่เจริญอยู่ในพืชจำพวกไม้เนื้อแดง (Redwood) สามารถสร้างสาร Sequoiatones A และ B ที่จัดเป็นเอสเทอร์ชนิดหนึ่ง ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพแล้วพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดเซลล์เนื้องอกได้ (Noble et al., 1991)

2.4.4 สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (Antiviral Agents)

เอนโดไฟต์ *Cytospora* sp. ซึ่งสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสที่เป็น Cytomegalovirus protease inhibitors, cytonic acid A และ B (Gou et al., 2000)

2.4.5 สารกดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive Agents)

ปัจจุบันยาที่ให้แกผู้ป่วยที่มีการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับข้อต่อ เช่น โรคปวดข้อปวดกล้ามเนื้อ โรคไขข้ออักเสบ หรือผู้ป่วยที่ร่างกายอยู่ในภาวะที่ต้องการอินซูลิน จะเป็นยาที่มีส่วนประกอบของสาร Subglutinol A และ B ซึ่งเป็นสารที่ได้จากเอนโดไฟต์ *Fusarium subglutinans* จากต้น *Taxus wilfordii* โดยสารตัวนี้จะมีฤทธิ์ในการทำให้เกิด Immunosuppression คือเป็นสารกดภูมิคุ้มกันที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Lee et al., 1995)

2.4.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Agents)

พบเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* ที่แยกได้จากต้น *Terminalia morobensis* ซึ่งเป็นพืชในเขตป่าฝนทางตอนเหนือของประเทศปาปัวนิวกินี (Strobel et al., 2002) สามารถสร้างสารในกลุ่ม Isobenzofuranone คือ Isopestacin โดยสารนี้นอกจากจะมีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพจำพวกราและแบคทีเรียแล้ว ยังพบว่า มีฤทธิ์ต้านการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน โดยจะไปจับกับอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย

2.4.7 สารที่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (Neurotoxicity Agents)

สารที่แยกได้จากเอนโดไฟต์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นสารในกลุ่มของอัลคาลอยด์ เช่น Ergot alkaloid โดยสารชนิดนี้จะมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อประสาทของแมลงและสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม (Bush et al., 1997) ซึ่งแยกได้จากเอนโดไฟต์ *Neotyphodium coenophialum* และ *Claviceps purpurea* ที่อาศัยอยู่ในต้น *Festuca arundinacea* และ *Zizania aquatica* (Powell & Petroski, 1992)

2.4.8 สารไล่แมลง (Insect repellent)

Nodulisporic acid ที่สร้างจาก *Nodulisporium* sp. ที่แยกได้จาก

Bontia daphnoides ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งตัวอ่อนของแมลงบางชนิด (Ondeyka et al., 1997) หรือสารแนฟฟาลีนที่เป็นองค์ประกอบหลักจากรา *Muscodor vitigenus* ที่แยกได้จากพืชเถาวัลย์ *Paullina paullinioides* มีฤทธิ์ไล่แมลง (Daisy et al., 2002)

2.4.9 สารป้องกันโรคเบาหวาน (Antidiabetic Agent)

สารเมทาบอลิต์ที่สร้างจากแบคทีเรีย *Pseudomasaris* sp. ที่ได้จากพืชในเขตป่าฝนของประเทศคองโก จะออกฤทธิ์เหมือน insulin ไม่ทำให้เกิดการแพ้ และไม่ถูกย่อยในระบบทางเดินอาหาร จึงสามารถให้ยาโดยการกินได้ (Strobel & Daisy, 2003)

2.4.10 สารต้านเชื้อมาลาเรีย (Antimalarial Agent)

มีการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum* sp. ที่พบในผักกาดข้างสามารถสร้างสารตัวใหม่ได้ 3 ชนิด ที่เป็นอนุพันธ์ของ dihydroisocoumarin คือ 7-butyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pent-11-enylisochroman-1-one, 7-butyl-15-enyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pent-11-enylisochroman-1-one และ 7-butyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pentylisochroman-1-one ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย วัณโรค และเชื้อราได้ (Palangpol et al., 2003)

2.4.11 สารควบคุมทางชีวภาพ (Biological control)

จากการศึกษาราเอนโดไฟต์ *Phomopsis phaseoli* ที่แยกได้จากต้น *Quercus suber* ที่สามารถผลิตสาร 3-hydroxypropionic acid ที่มีฤทธิ์ฆ่าปรสิตในพืช *Meloidogyne incognita* โดยมีค่า LD₅₀ ในช่วง 12.5-15 µg/ml (Schwarz et al., 2004)

จากรายงานการพบสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่กล่าวมาแล้ว หากเราสามารถสกัดสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกับพืชที่เอนโดไฟต์ชนิดนั้นๆ อาศัยอยู่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชสมุนไพรไทย เช่น ขมิ้นชันที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ ก็จะมีประโยชน์อย่างมากต่อการพัฒนาด้านการแพทย์และด้านอื่นๆที่จะนำสารที่ได้พัฒนาไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต

2.5 โรคติดเชื้อทางผิวหนัง (skin infection disease) (ภัทรชัย กิรติสิน, 2551)

การติดเชื้อบริเวณผิวหนังจะสัมพันธ์กับการเกิดบาดแผลติดเชื้อ (wound infection) ได้แก่ แผลที่เกิดจากอุบัติเหตุ แผลถูกสัตว์กัด แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก แผลผ่าตัด และแผลที่ถูกสิ่งของ ทะลุผ่านชั้นผิวหนัง เป็นต้น การติดเชื้อบางชนิดทำให้เกิดฝีหนอง (abscess) ในบริเวณที่ติดเชื้อและอาจลุกลามไปติดเชื้อในระบบได้

2.5.1 แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุ

เชื้อที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อที่บาดแผลบริเวณผิวหนัง คือ

1) Group A *Streptococcus* (GAS) ที่เรียกว่า “strep.” เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบในผิวหนังและลำคอ ผู้ป่วยจะมีอาการไข้ รวมทั้ง เกิด impetigo (pyoderma) ที่เป็นการติดเชื้อที่ผิวหนังผ่านทางบาดแผลที่ถลอก พบบ่อยในเด็ก โดยมีรอยโรคเป็นตุ่มนูนแดงมีน้ำใส (blister) ต่อมาเป็นตุ่มหนอง (pustule) และแตกออกเป็นสะเก็ด เกิดการเน่าเปื่อยของเนื้ออย่างรวดเร็วที่เรียกว่า necrotizing fasciitis เชื้อสามารถแพร่กระจายไปส่วนอื่น ๆ จากการเกาและติดต่อไปยังคนอื่นได้ง่าย เชื้อสามารถบุกรุกเข้าสู่ระบบต่างๆได้

2) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Staphylococcus aureus ที่เรียกว่า “staph.” เป็นแบคทีเรียที่พบการติดเชื้อที่บริเวณที่ผิวหนังและชั้นใต้ผิวหนัง แต่การติดเชื้อในคนปกติได้ประมาณ 25-30% ปัจจุบันเชื้อชนิดนี้เป็นปัญหาสำคัญในการดื้อยาในโรงพยาบาล เนื่องจากมีการดื้อยาของกลุ่ม penicillinase-resistant penicillins เช่น methicillin ซึ่งเป็นยาหลักในการรักษา จึงเรียกชื่อเชื้อสายพันธุ์นี้ว่า methicillin-resistant *S. aureus* เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่พบการติดเชื้อของบาดแผลที่ผิวหนัง คือ *Enterococcus*, *Nocardia* และ *Mycobacterium* เป็นต้น รวมทั้งเชื้อในกลุ่มที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobe) ได้แก่ *Peptostreptococci* spp., *Clostridium perfringens* และ *Actinomyces* spp. นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นสาเหตุสำคัญในการติดเชื้อในโรงพยาบาล คือ *E. coli*, และ *Proteus* sp. โดยเฉพาะเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่พบเป็นสาเหตุสำคัญในการติดเชื้อของแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infections) ที่ทำให้เกิดอัตราการป่วย (morbidity) และอัตราการตาย (mortality) นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคทางเดินหายใจ เช่น ปอดอักเสบ (pneumonia), โรค rhinoscleroma, โรคเยื่อจมูกอักเสบฝ่อ (ozoena or atrophic rhinitis), โรคไซนัสอักเสบ (sinusitis) และ โรคหูชั้นกลางอักเสบ (otitis) ซึ่งปัจจุบันมีการดื้อยาทำให้ต้องหายาปฏิชีวนะที่มีช่วงการรักษากว้างขึ้น (broad-spectrum antibiotics) ในโรงพยาบาลจะพบสายพันธุ์ที่มีการดื้อยาซึ่ง

สายพันธุ์ที่ดื้อยานี้จะมีการสร้างเอนไซม์ extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) สายพันธุ์ที่มีการแพร่ระบาด (epidemic strains) ทำให้มีอัตราการป่วยและการตายของผู้ป่วยเพิ่มขึ้นในโรงพยาบาล คือ สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยากลุ่ม cephalosporin (Kumar et al., 2013)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จุลินทรีย์เอนโดไฟท์ประกอบด้วยจุลินทรีย์ 3 กลุ่ม ได้แก่ (ตารางที่ 2.4)

2.6.1 รา (Fungi)

Sutjaritvorakul et al. (2011) ได้ทำการแยกราเอนโดไฟท์จากป่าเต็งรัง อำเภอนาสอง จังหวัดน่าน 4 ชนิด ต้นยางพลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.) ต้นสาละ (*Shorea robusta* Roxb.) ต้นรัง (*Shorea siamensis* Miq.) และ ต้นชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble.) พบราเอนโดไฟท์ *Phyllosticta* spp. (15 ไอโซเลท) *Nodulisporium* spp. (13 ไอโซเลท) และ *Xylaria* sp. 1 (10 ไอโซเลท) ซึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ คือ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aerogenosa* และ *Escherichia coli* โดยวิธี paper disk แต่มีเพียง *Nodulisporium* sp. (DT6) และ *Xylaria* sp. (DO9) เท่านั้นที่ยับยั้ง *Candida albicans* ได้

Liang et al. (2012) ทำการศึกษาราเอนโดไฟท์จากรากและใบของหนวดปลาชุก แคระ (*Ophiopogon japonicas*, Liliaceae) พบว่า สารสกัดจากเส้นใยและอาหารเหลวยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ เท่ากับ 53.33 % และ 33.33% ตามลำดับ และสามารถยับยั้ง *Cryptococcus neoformans* จากสารสกัดจากเส้นใยและอาหารเหลว เท่ากับเท่ากับ 70 % และ 36.67 % ตามลำดับ

Mangunwardoyo et al. (2012) ได้แยกราเอนโดไฟท์จากกล้วยไม้หวายตะมอย *Dendrobium crumenatum* จากส่วนของราก หน่อ (bulbous) ต้น และใบ พบว่า รา *Guinardia endophyllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitalensis*) จะพบในปริมาณมากที่สุด และ พบว่า ราเอนโดไฟท์ *Fusarium nivale* มีฤทธิ์ยับยั้ง *Candida albicans* และ *C. tropicalis* ในขณะที่ราเอนโดไฟท์ทุกชนิดที่แยกได้จะไม่สามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

Shekhawat et al. (2013) ได้ทำการคัดเลือกราเอนโดไฟต์ต้นเลี่ยน *Melia azedarach* L. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า สามารถคัดเลือกราเอนโดไฟต์ได้ 2 ชนิด คือ *Aspergillus flavus* แยกได้จากใบ และ *Trichoderma koningii* Oudem แยกได้จากราก ที่มีฤทธิ์

ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* โดยให้ค่าบริเวณใสเท่ากับ 20.2 ± 0.6 และ 18.05 ± 0.8 mm ตามลำดับโดยใช้วิธี agar diffusion

Aharwal et al. (2014) สามารถแยกราเอนโดไฟต์จากต้นดอกกรัก (*Calotropis procera* (LINN.) R.BR.) ที่เป็นพืชสมุนไพรจากประเทศอินเดีย คือ *Fusarium solani*, *Cladosporium herbarum*, *Drechslera modulosa*, *Curvularia pallescens* และ *Alternaria alterna* ที่สามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้

Gupta et al. (2014) ทำการแยกราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรต่างกัน 9 ชนิดและต่างแหล่งกัน พบว่ามี 3 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Streptococcus pyrogenes*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* และ *Klebsiella pneumoniae*

Hateet et al. (2014) ศึกษาการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากราเอนโดไฟต์ *Fusarium solani* ที่แยกได้จากมะเขือเทศ พบว่า สารสกัดจากรามีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Staphylococcus aureus* NCTC6571 โดยให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 28 และ 45 mm และให้ค่า MIC เท่ากับ 12.5 และ 6.25 $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ *Fusarium solani* จะประกอบด้วยสารกลุ่ม tannins และสารประกอบ phenol แต่ไม่พบ amino acid และ flavonoids

Chow et al. (2014) ได้ทำการแยกราเอนโดไฟต์ที่สร้างเอนไซม์ L-asparaginase ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากพืชสมุนไพร 4 ชนิด คือ ตรีศโคร (*Cymbopogon citratus*), ต้นหอมแขก (*Murraya koenigii*), ฟ้าทะลายโจร (*Oldenlandia diffusa*) และต้นกุหลาบพุกาม (*Pereskia bleo*) โดยคัดเลือกจากการสร้างบริเวณสีชมพูในอาหาร เนื่องจากมีการ hydrolyze สาร asparagine ไปเป็นกรด aspartic และ ammonia จึงเปลี่ยนสี phenol red ที่เป็น indicator จาก สีเหลือง (สถานะเป็น acid) เป็นสีชมพู (สถานะเป็น alkaline) และหาปริมาณเอนไซม์ asparaginase โดย Nesslerization ซึ่งจากพืชสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด พบเอนโดไฟต์ 89 ไอโซเลท คือ ได้จากตรีศโคร 14 ไอโซเลท, จากต้นหอมแขก 10 ไอโซเลท, จากฟ้าทะลายโจร 25 ไอโซเลท และจากต้นกุหลาบพุกาม 40 ไอโซเลท พบว่ามีเพียง 25 ไอโซเลท เท่านั้นที่สร้างเอนไซม์ asparaginase ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไอโซเลทที่แยกได้จากต้นกุหลาบพุกาม ให้ค่าการสร้างเอนไซม์ asparaginase ระหว่าง 0.0069 – 0.025 $\mu\text{M/mL/min}$ ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบ ได้แก่ จีนิส *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phema* และ *Penicillium*

2.6.2 แอคติโนมัยซีท (actinomycetes)

Hema et al. (2012) ได้ทำการแยกเอนโดไฟต์แอคติโนมัยซีทจากสะเดา (*Azadiracta indica*), กระจเพรา (*Ocinum sanctum*) และ ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด คือ อาหาร starch casein agar, starch casein nitrate agar, อาหารแข็งแยกแอคติโนมัยซีท และ soyabean agar พบว่า อาหาร starch casein agar จะพบแอคติโนมัยซีทมากที่สุดและพบเอนโดไฟต์แอคติโนมัยซีท *Streptomyces* sp. ที่สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyrogenes*, *Klebsiella pneumonia* และ *Pseudomonas aeruginosa*

Machavariani et al. (2014) ทำการแยกแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรที่เก็บสะสมได้จากกรุงมอสโก พบว่า สมุนไพรซีบัคธอร์น(seabuckthorn) *Hippophae rhamnoides* และ ตำแย *Urtica dioica* มีการกระจายตัวของแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์เท่ากับ 11.7 % สมุนไพรวิโอล่า(viola) *Viola odorata* มีการกระจายตัวของแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์เท่ากับ 11.8 % และ ผักกาดน้ำ *Platago major* มีการกระจายตัวของแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์เท่ากับ 10 % นอกจากนี้ยังพบว่า การกระจายตัวของแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์มากที่สุด คือ *Streptomyces* sp. (79 ไอโซเลท) รองลงมา คือ *Micromonospora* sp. (33 ไอโซเลท) และ *Nocardiopsis* sp. (8 ไอโซเลท) ซึ่งแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะพบจำนวนแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์มากที่สุดที่มีสารยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้มากที่สุด

2.6.3 แบคทีเรีย

Kumar et al. (2014) ได้แยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากรากของต้นชุมเห็ด *Cassia tora* L. พบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* CT1, *Agrobacterium tumefaciens* CT2, *Bacillus* sp. CT3, *Pseudomonas putida* IC4 และ *Pseudomonas* sp. CT5 ซึ่งแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมดสามารถยับยั้ง *E. coli* และ *Klebsiella pneumonia* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ยกเว้น แบคทีเรียเอนโดไฟต์ *Agrobacterium tumefaciens* CT2

ตารางที่ 2.4 สารออกฤทธิ์ชีวภาพและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในจุลินทรีย์เอนโดไฟต์

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์	พืชเจ้าบ้าน	สารออกฤทธิ์ชีวภาพ	อ้างอิง
แบคทีเรีย			
<i>Bacillus pumilus</i>	มันสำปะหลัง (cassava)	Pumilacidin (มีฤทธิ์ยับยั้งรา)	de Melo et al., (2009)
<i>Bacillus subtilis</i> CT1, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> CT2, <i>Bacillus</i> sp. CT3, <i>Pseudomonas putida</i> IC4 และ <i>Pseudomonas</i> sp. CT5	ต้นชุมเห็ด (<i>Cassia tora</i> L.)	มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>E. coli</i>	Kumar et al. (2014)
<i>Bacillus subtilis</i> CT1, <i>Bacillus</i> sp. CT3, <i>Pseudomonas putida</i> IC4 และ <i>Pseudomonas</i> sp. CT5	ต้นชุมเห็ด (<i>Cassia tora</i> L.)	มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>Klebsiella pneumonia</i>	Kumar et al. (2014)
รา			
<i>Muscodor albus</i>	อบเชย (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์	Worapong et al. (2001); Strobel et al. (2001)
<i>Pestalotiopsis jester</i>	-	Jesterone and hydroxyl-jesterone (มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์)	Li & Strobel (2001)
<i>Pestalotiopsis</i> spp. และ <i>Monochaetia</i> sp.	พืชในป่าฝน (rainforests)	Ambumic acid (มีฤทธิ์ยับยั้งรา)	Li et al. (2001)
<i>Pestalotiopsis microspore</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	Pestacin และ isopestacin (มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ ฤทธิ์ยับยั้งรา)	Strobel et al. (2002)
<i>Penicillium janthinellum</i>	ต้นเฮียน (<i>Melia azedorach</i>)	Citrinin (ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย)	Marinho et al. (2005)
<i>Phomopsis cassia</i>	ซีเห็กอเมริกา (<i>Cassia spectabilis</i>)	Ethyl 2,4-dihydroxy-5,6-dimethylbenzoate and phomopsilactone (ฤทธิ์ยับยั้งรา)	Silva et al. (2005)

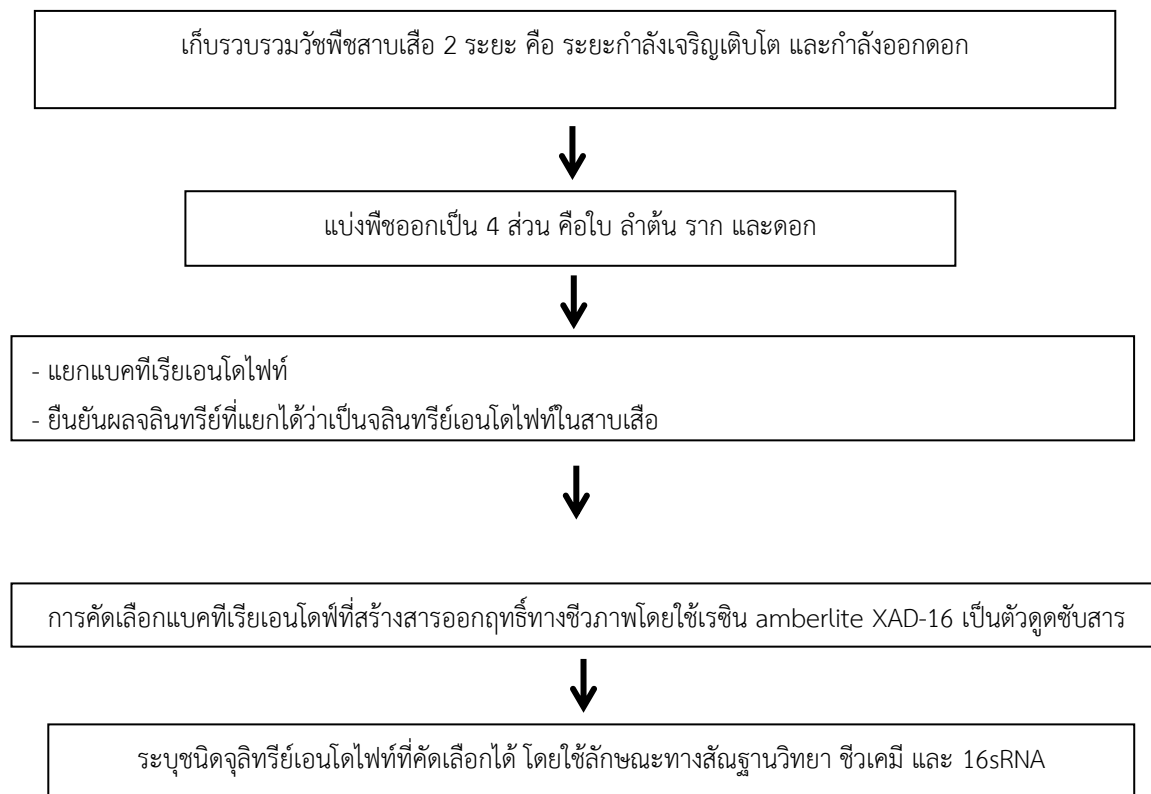
ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

จุลินทรีย์เอนโดไฟท์	พืชเจ้าบ้าน	สารออกฤทธิ์ชีวภาพ	อ้างอิง
<i>Candida globosum</i>	แป๊ะก๊วย (<i>Ginkgo biloba</i>)	Chaetomugilin A and D (ฤทธิ์ยับยั้งรา)	Liu et al., (2008)
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Hypericum perforatum</i>	hypericin, emodin (ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์)	Kusari et al., (2008)
<i>Pestalotiopsis adusta</i>	-	Pestalachlorides A-C, antifungal metabolites	Li et al. (2008)
<i>Phomopsis</i> sp. ZSU-H76	ต้นไม้จากป่าชายเลน (mangrove)	Cytosporone B and C (ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย)	Huang et al. (2008)
<i>Xylaria</i> sp. YX-28	แป๊ะก๊วย (<i>Ginkgo biloba</i>)	7-amino-4-methycoumarin (ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย)	Liu et al. (2008)
<i>Verticillium</i> sp.	ต้นหม่อน (<i>Rehmannia glutinosa</i>)	2,6-dihydroxy-2-methyl-7-(prop-1E-1 benzofuran-3(2H)-one and ergosterol peroxide (ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์)	You et al. (2009)
<i>Penicillium brasilliam</i>	<i>Melia azedarach</i>	Phenylpropanoid amides (ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย)	Fill et al. (2010)
<i>Guinardia endophyllicola</i> และ <i>Fusarium nivale</i>	กล้วยไม้หวายตะมอย (<i>Dendrobium crumenatum</i>)	ฤทธิ์ยับยั้ง <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i>	Mangunward oyo et al. (2012)
<i>Fusarium nivale</i>	กล้วยไม้หวายตะมอย (<i>Dendrobium crumenatum</i>)	ฤทธิ์ยับยั้ง <i>Candida albicans</i> และ <i>C. tropicalis</i>	Mangunward oyo et al. (2012)
<i>Aspergillus flavus</i> แยกได้จากใบ และ <i>Trichoderma koningii</i> Oudem แยกได้จากราก	ต้นเลี่ยน (<i>Melia azedarach</i> L.)	ฤทธิ์ยับยั้ง <i>Staphylococcus aureus</i>	Shekhawat et al. (2013)
<i>Fusarium solani</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Drechslera modulosa</i> , <i>Curvularia pallescens</i> และ <i>Alternaria alterna</i>	ต้นดอกกรัก (<i>Calotropis procera</i> (LINN.) R.BR.)	ฤทธิ์ยับยั้ง <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginonosa</i> และ <i>Klebseilla pneumoniae</i>	Aharwal et al. (2014)

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

จุลินทรีย์เอนโดไฟท์	พืชเจ้าบ้าน	สารออกฤทธิ์ชีวภาพ	อ้างอิง
แอสโตมัยซีตัส <i>Streptomyces sp.</i>	จากสะเดา (<i>Azadiracta indica</i>), กระเพรา (<i>Ocinum sanctum</i>) และ ลูกใต้ใบ (<i>Phyllanthus amarus</i>)	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyrogenes</i> , <i>Klebseilla pneumonia</i> และ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hema et al. (2012)
<i>Streptomyces sp.</i> , <i>Micromonospora sp.</i> , และ <i>Nocardiosis sp.</i>	สมุนไพรรชี่บักธอร์น (sea buckthorn) <i>Hippophae rhamnoides</i> , ตำแย (<i>Urtica dioica</i>), สมุนไพรวีโอล่า (viola), ผักกาดน้ำ (<i>Platago major</i>)	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i>	Machavariani et al. (2014)

2.7 กรอบแนวคิดในการวิจัย





ทำการทดสอบสารออกฤทธิ์จากสารสกัดน้ำเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคแผล
ติดเชื้อผิวหนังด้วย Agar well diffusion (Lorian, 1991), ทดสอบ MIC และ MBC ด้วยวิธี Macro broth
dilution technique

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างสาบเสือ

เก็บตัวอย่างต้นสาบเสือบริเวณวนอุทยานน้ำตกกะเปาะ ตำบลหงส์ อำเภอน้ำขุ่น จังหวัดชุมพร ลักษณะตัวอย่างที่เก็บ เป็นต้นสาบเสือที่เจริญเติบโตมากที่สุด โดยสูงตั้งแต่ 100 เซนติเมตร ขึ้นไป ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะได้นำมาแยกแอมพลูที่เรียในห้องปฏิบัติการดังภาพ 3.1 เซนติเมตร โดยนำตัวอย่างสาบเสือไปตรวจสอบชนิดของพันธุ์พืชเปรียบเทียบกับตัวอย่างของสำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืชว่าตรงกับสาบเสือหมายเลข BKF No.154702 (SN 163789)

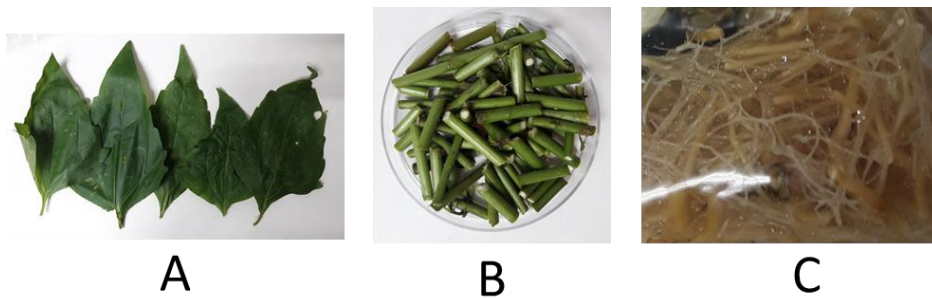


ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างต้นสาบเสือ

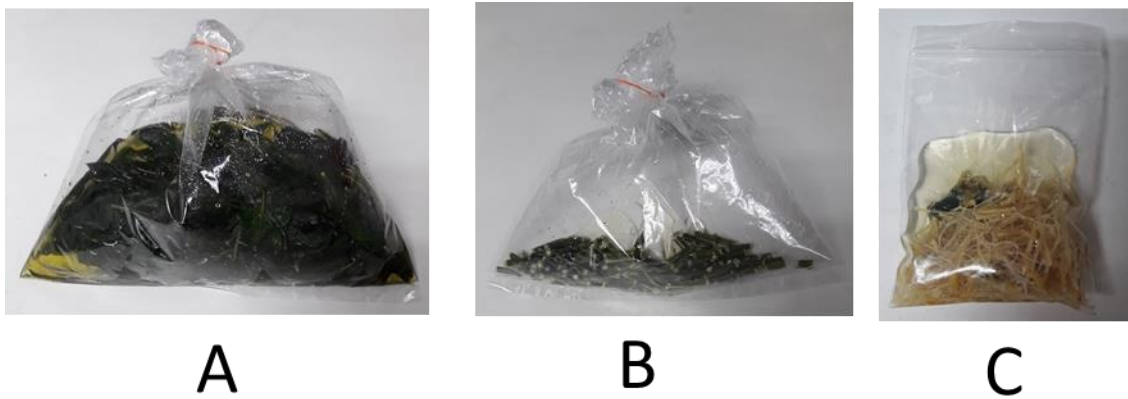
3.2 การแยกแอมพลูที่เรียเอ็นโดไฟท์

นำตัวอย่างต้นสาบเสือที่เก็บมาทำการล้างน้ำให้สะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นแยกส่วนของพืชออกเป็น 4 ส่วน คือ ส่วน ราก ลำต้น และใบ แต่ละส่วนตัดเป็นชิ้นเล็กยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตรดังภาพที่ 3.2 แล้วนำไปแยกจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์โดยใช้วิธีฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวของพืช โดยแช่ใน 70% ethanol นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง จากนั้นนำมาแช่ใน

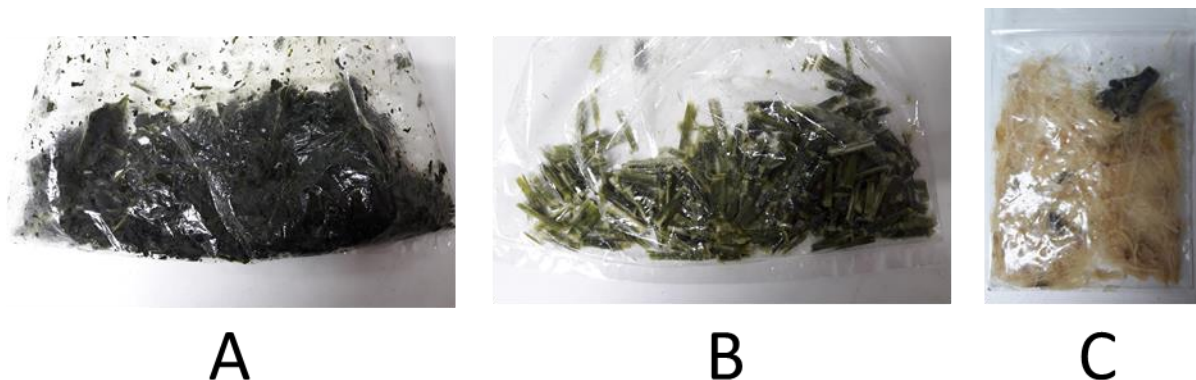
0.2 % $HgCl_2$ นาน 45 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 6 ครั้ง ดังภาพที่ 3.3 ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ นำแต่ละส่วนของพืช ประมาณ 10 กรัม ไปบดในโถรงที่ปลอดเชื้อ จากนั้นเติม 90 ml ของ 0.85% NaCl ดังภาพที่ 3.4 นำมาทำ serial dilution และ spread plate ลงบนอาหารต่างชนิดกันดังตารางที่ 3.1 แล้วบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม นาน 2 วัน



ภาพที่ 3.2 การเก็บแยกและตากแดดส่วนใบ (A) ลำต้น (B) และราก (C) สาบเสือ



ภาพที่ 3.3 การล้างส่วนใบ (A) ลำต้น (B) และราก (C) สาบเสือ



ภาพที่ 3.4 ส่วนของสาบเสือที่บดแล้ว ใบ (A) ลำต้น (B) และราก (C) สาบเสือ

ตารางที่ 3.1 อาหารแยกแบคทีเรีย

ชนิดจุลินทรีย์	อาหาร
Bacteria	Trypticase soy agar (TSA)

3.3 ยืนยันการเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์

ทำการยืนยันผลจุลินทรีย์ที่แยกได้ว่าเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในต้นสาบเสือ ไม่ใช่จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมา โดยทำการ spread plate น้ำล้างพืชน้ำสุดท้าย เหมือนข้อ 3.2

3.4 การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อผิวหนัง

3.4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้น

ทำการวิเคราะห์หาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยใช้เทคนิค point-inoculated ทำการเตรียมแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเจือจางให้ได้จำนวนแบคทีเรีย $10^5 - 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเทียบความขุ่นให้ได้เทียบกับความขุ่นของ McFarland Standard No.5 ทำการ swab ลงบนอาหารแข็ง TSA จากนั้นนำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มา point-inoculated อาหารแข็งที่ swab เชื้อก่อโรคไว้แล้ว นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ

บริเวณใสของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ยับยั้งก่อโรคและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ (Baker et al., 2015)

3.4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ขั้นที่ 2

3.4.2.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟท์

1) นำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ที่บริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสม ปริมาตร 50 mL นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150-200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-5 วัน เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ ใช้หัวเชื้อ 10 % ถ่ายลงในอาหารเหลวที่เหมาะสมของแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยเติมเรซิน amberlite XAD-200 ปริมาณ 2 g สำหรับดูดซับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากนั้นนำไปบ่มที่ความเร็วรอบ 150-200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน

2) นำอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อมากรองเอาเรซินออก ทำการล้างเรซินด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 100 mL ซับด้วยกระดาษทิชชูที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นทำการชะสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่อยู่ในเรซิน โดยแช่ใน methanol ปริมาตร 100 mL นาน 6 h แล้วกรองเรซินออกแล้วนำไประเหย methanol ออกโดยใช้ rotary evaporation นำไประเหิดให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry และเก็บที่ -20°C จนกว่าจะนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

3.4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์

1) การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

1.1) เชื้อโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มา 1 ลูบใส่ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบ ปริมาตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร

1.2) นำหลอดไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3) นำมาเจือจางให้ได้จำนวนแบคทีเรีย $10^5 - 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเทียบความขุ่นกับความขุ่นของ McFarland Standard No.5 ในการเจือจางนี้ทำโดยการใช้ปิเปตที่ปราศจากเชื้อแล้วหยดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ที่หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ จนได้ความขุ่นที่ต้องการ

2) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียทดสอบ

ในการทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งโดยวิธี Agar well diffusion โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด และต้องไม่ประกอบด้วยสารที่ขัดขวางประสิทธิภาพของสารที่ต้องการทดสอบ ดังนั้นจึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน (ดังตารางที่ 3.2) อาหารเลี้ยงเชื้อควรมีความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร ตลอดทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ (25 มิลลิลิตร)

ตารางที่ 3.2 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสำคัญ

ชนิดจุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ
1. Gram-positive bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Trypticase soy media
<i>Stap. epidemis</i>	Trypticase soy media
<i>Bacillus cereus</i>	Trypticase soy media
<i>Enterococcus faecalis</i>	Trypticase soy media
<i>Propionibacterium acnes</i>	Trypticase soy media
2. Gram-negative bacteria	
<i>E. coli</i>	Trypticase soy media
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Trypticase soy media
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Trypticase soy media

3.4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion

ทำการ swab เชื้อแบคทีเรียก่อโรคปรับความเข้มข้นของเชื้อแล้วลงบนอาหารแข็ง ให้ทั่วแบบ three-ways จากนั้นทำการเจาะหลุมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ด้วย Cork borer No.3 จากนั้นเติมสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม บ่มเลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางฤทธิ์ยับยั้ง (Inhibition zone) การทดลองแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง ผลการยับยั้งแบคทีเรียวัดได้จากขนาดของโซนใสโดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration หรือ MIC)

3.4.2.3 การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารสกัด ด้วยวิธี Macro broth dilution technique

1) การเตรียมสารละลาย resazurin (preparation of resazurin solution)

เตรียมสารละลาย resazurin ให้ได้ความเข้มข้น 0.01% (w/v) ในน้ำกลั่น จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บได้นาน 1 สัปดาห์ (Sarker et al., 2007) หรือละลาย resazurin 270 mg tablet ใน 40 mL จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm (Nateche et al., 2006)

2) การเตรียมแบคทีเรีย

เตรียมความขุ่นของเชื้อ (turbidity) โดยเปรียบเทียบกับ Macfarland standards No. 0.5 ซึ่งจะได้ค่าปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 5×10^6 cfu/mL

3) การทดสอบใน 96 wells plate

แถวที่ 1 เติมสารละลายตัวอย่างทดสอบที่ละลายด้วย 10% (v/v) DMSO ปริมาตร 100 μ L แถวสารทดสอบ เติม 80 μ L ของอาหารเหลว TSB หรือ normal saline solution (ถ้าเป็นสารละลายบริสุทธิ์จะเตรียม stock เท่ากับ 1mg/mL และถ้าเป็นสารสกัดจะเตรียม stock เท่ากับ 10mg/mL) จากนั้นทำการเจือจางสารทดสอบโดยเติมสารทดสอบ 80 μ L ในหลุมที่ 1 และดูดแบบต่อเนื่องไปเรื่อยๆและหลุมสุดท้ายจะดูดทิ้ง แต่ช่องในแถวจะเติม 10 μ L ของสารละลาย resazurin เติม 10 μ L ของสารละลายเชื้อที่เข้มข้น 5×10^6 cfu/mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5×10^5 cfu/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 – 18 หรือ 24 ชั่วโมง ขึ้นกับ จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

4) การอ่านผล

1) การอ่านผล การหา Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

เมื่อบ่มเชื้อจนครบเวลาที่ต้องการแล้ว ให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่มีสีอมม่วง อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC ของ บันทึกรหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร ค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้อย่างสมบูรณ์

2) การหา Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

จากการทดสอบหาค่า MIC ในการทดลองข้างต้น สามารถนำมาหาค่า MBC โดยให้นำหลุมที่มีสีอมม่วงและสีชมพูและน้ำเงินจากหลุมสีอมม่วงอย่างละ 2 หลุม จุลินทรีย์ทดสอบที่ไม่ตายจะกลับเจริญได้ใหม่เมื่อปราศจากสารต้านจุลชีพ อ่านค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่น้อยที่สุดที่ฆ่าเชื้อจะได้ 99.9 เปอร์เซ็นต์ (คือ มีจุลินทรีย์ขึ้นได้น้อยกว่า 10 โคลนต่อ 0.1 มิลลิลิตร) การหา MBC ทำได้โดยสารละลาย 10 μ L ที่เลือกไว้ drop ลงในอาหารแข็ง นำเข้า ที่ 35 - 37 องศาเซลเซียสนาน 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมานับจำนวนโคโลนี

3.5 การระบุชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ (ภาพที่ 3.5)

3.5.1 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียโดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ลงบนอาหารแข็ง บ่มเขื่อนาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาลักษณะ

ทางสัณฐานวิทยาของเชื้อบริสุทธิ์โดยการตรวจลักษณะการเจริญ ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปย้อมสีแบบกรมและย้อมสปอร์เพื่อจัดกลุ่มของแบคทีเรีย

3.5.2 การทดสอบทางชีวเคมี

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา ได้แก่ การทดสอบ TSI การเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ความสามารถในการใช้ซิเตรท การสร้างยูเรีย ตรวจและบันทึกผลเป็นผลบวกหรือลบ

3.5.3 การระบุชนิดโดย 16sRNA

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกในอาหาร Luria-Bertani medium (LB medium) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำใส่ทิ้ง จากนั้นทำการสกัดแยกดีเอ็นเอโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Pospiech and Neumann (1995) โดยแขวนลอยตะกอนเซลล์ใน SET buffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA และ 20 mM Tris-HCl) 0.5 มิลลิลิตร เติม lysozyme (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร นำไป vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม proteinase K ปริมาตร 14 ไมโครลิตร และ SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของ proteinase K เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ SDS เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์) ผสมให้เข้ากันโดยวิธีการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยวิธีการกลับหลอดไปมา ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อมาเติม chloroform ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยวิธีการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol และผสมโดยวิธีการกลับหลอดไปมา เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย EtOH ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้แห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer (10 mM Tris และ 1 mM EDTA·2Na พีเอช 8) ปริมาตร 100-200 ไมโครลิตร (เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส) เพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 16S rRNA จากดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ไพรเมอร์ 27F, 1541R, 518F และ 1429R นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Eztaxon (Chun et al., 2007) หลังจากนั้นนำข้อมูลที่คล้ายกันของลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกรมบวกสร้างสปอร์สายพันธุ์เปรียบเทียบ (Type strain) ที่มีความ

ใกล้เคียงกันทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW ซึ่งอยู่ในชุดโปรแกรม BioEdit จากนั้นใช้โปรแกรม MEGA 4

3.6 การทดสอบคุณสมบัติสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์ (hydrolytic enzymes) ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากทั้งหมด 9 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์ ได้แก่ เอนไซม์ Cellulase, Amylase, Protease และ Lipase ด้วยวิธี Agar Plate Assay โดยนำทั้ง 9 ไอโซเลต ทำการ point inoculate ลงบนอาหารแข็งสำหรับทดสอบเอนไซม์แต่ละชนิดและบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 1-3 วัน

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase จะใช้อาหารแข็ง CarboxyMethyl Cellulose (CMC) และทำการทดสอบผลด้วยการหยดสารละลาย Congo red (1% w/v) ให้ท่วมนาน 15 นาที และล้างสีออกด้วย 1.0 M NaCl นาน 15 นาที (Ammar *et al.*, 1998)

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Amylase จะใช้อาหารแข็ง TSB ที่เติม 1% ของ Starch และทำการทดสอบผลด้วยการหยดสารละลาย Iodine reagent ให้ท่วมและสังเกตบริเวณใสรอบๆโคโลนีแบคทีเรีย ถ้าไม่พบบริเวณใสรอบๆโคโลนีแบคทีเรียให้ใช้ Loop ค่อยๆขีดเชื่อบนผิวหน้าอาหารออกจะสังเกตเห็นบริเวณใสได้โคโลนีแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ amylase ได้ (Gupta *et al.*, 2003)

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Protease จะใช้อาหารแข็ง Skim milk (Himedia) ตรวจสอบผลด้วยการสังเกตบริเวณใสรอบๆโคโลนีแบคทีเรีย (Kole *et al.*, 1988)

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Amylase จะใช้อาหารแข็ง ที่ประกอบด้วย peptone (1.5%) NaCl (0.5%) CaCl₂ (1%) และ Tween 80 (1%) (Shukla & Gupta, 2007)

3.7 การประเมินผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) แบบ Complete Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากสาบเสือ

จากการเก็บตัวอย่างวัชพืชสาบเสือจากวนอุทยานน้ำตกกะเปาะ ตำบลหงส์ อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดชุมพร ทำการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ได้ดังตารางที่ 4.1 จากผลการทดลองพบว่าจำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมดพบในส่วนใบมากที่สุด คือ 2.6×10^4 CFU/g รองลงมาคือส่วนรากและลำต้นสาบเสือ ในขณะที่ชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมด 32 ไอโซเลตจะพบในส่วนรากมากที่สุด คือ 15 ไอโซเลต รองลงมาคือส่วนใบและลำต้น

ตารางที่ 4.1 จำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมดและไอโซเลตของแบคทีเรียที่แยกได้จากสาบเสือ

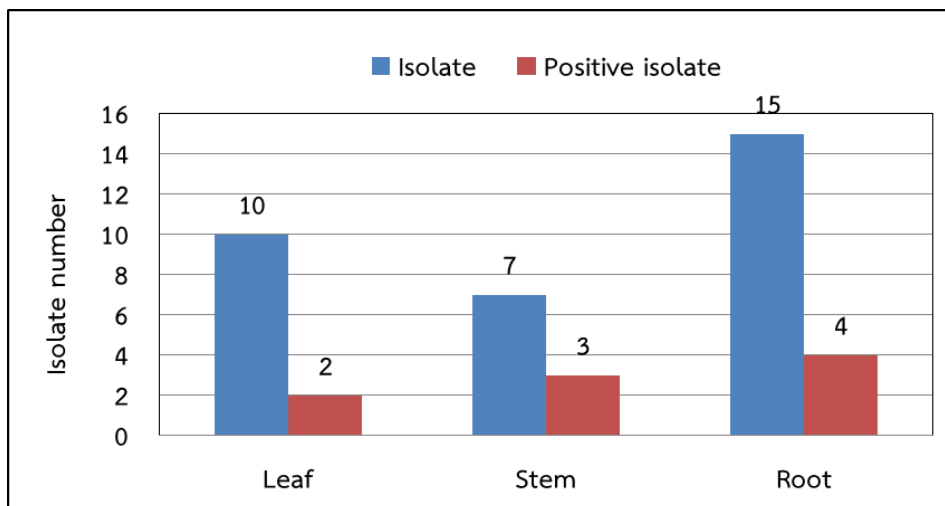
Part of plant	Endophytic bacteria	
	CFU/g	Isolate
Leaf	2.6×10^4	10
Stem	5.3×10^3	7
Root	1.5×10^3	15
		32

4.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อผิวหนัง

4.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้น

จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมด 32 ไอโซเลต ที่แยกได้จากส่วนใบ ลำต้น และราก เท่ากับ 10 7 และ 15 ตามลำดับ นำมาทำการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค point inoculum ที่แยกได้จากจังหวัดชุมพร พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมด 9 ไอโซเลต ได้แก่จากราก ใบ ลำต้น เท่ากับ 4, 3 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ เพอร์เซ็นต์ของจำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ให้ผลบวกต่อการยับยั้งแบคทีเรีย

ก่อโรคจะพบในส่วนลำต้นมากที่สุดเท่ากับ 42.86 % รองลงมาคือรากและใบเท่ากับ 26.67 และ 20.0 % ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 เปรียบเทียบระหว่างจำนวนไอโซเลตแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ให้ผลบวกต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคจากสาบเสือ

จากตารางที่ 4.2 แสดงผลของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิค point inoculum ที่แยกได้จากส่วนใบสาบเสือจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ LBCH3 และ LBCH12 พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต LBCH3 มีความสามารถผลิตสารยับยั้ง *B. cereus* TISTR 687 ได้มากที่สุดและรองลงมาคือไอโซเลต LBCH13 ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อเท่ากับ 2.5 และ 2.0 ตามลำดับ นอกจากนี้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต LBCH 13 ยังสามารถยับยั้งได้ 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus epidemis* TISTR 1466 *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 *Bacillus cereus* TISTR 687 และ *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 ในขณะที่แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต LBCH 3 สามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อได้ 2 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus epidemis* TISTR 1466 และ *Bacillus cereus* TISTR 687 ดังตารางที่ 4.2, 4.3 ภาพที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อก่อโรคและอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อก่อโรคต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเอนโดไฟต์จากใบสาบเสือ

Isolates	Leaf			
	Microbial pathogens	Inhibition zone diameter (mm)	Colony diameter (mm)	Ratio of Inhibition diameter with colony diameter
LBCH3	<i>S. aureus</i> TISTR 1466	7	5	1.4
	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	16	10	1.6
	<i>B. cereus</i> TISTR 687	10	4	2.5
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	16	12	1.3
LBCH13	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	14	14	1.0
	<i>B. cereus</i> TISTR 687	12	6	2.0

จากตารางที่ 4.3 แสดงผลของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิค point inoculum ที่แยกได้จากส่วนใบสาบเสือจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ SBCH1-5 SBCH3 และ SBCH6 พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต SBCH3 มีความสามารถผลิตสารยับยั้ง *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 ได้มากที่สุดให้ค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อเท่ากับ 1.8 แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต SBCH6 สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus epidermis* TISTR 1466 *Bacillus cereus* TISTR 687 และ *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 ในขณะที่สามารถแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต SBCH1-5 ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus epidermis* TISTR 1466 ได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ดังตารางที่ 4.3 ภาพที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อก่อโรคและอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อก่อโรคต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเอนโดไฟต์จากลำต้นสาบเสือ

Isolates	Microbial pathogens	Stem		
		Inhibition zone diameter (mm)	Colony diameter (mm)	Ratio of Inhibition diameter with colony diameter
SBCH1-5	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	3	1	3.0
SBCH3	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	11	7	1.8
SBCH6	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	15	15	1.0
	<i>B. cereus</i> TISTR 687	16	12	1.3
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	17	13	1.3

จากตารางที่ 4.4 แสดงผลของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิค point inoculum ที่แยกได้จากส่วนใบสาบเสือจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ RBCH1 RBCH5 RBCH11 และ RYCH5 พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RBCH5 มีความสามารถผลิตสารยับยั้ง *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 ได้มากที่สุดให้ค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อเท่ากับ 4.7 และยังสามารถยับยั้งเชื้อชนิดอื่นได้อีก 8 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 *Staphylococcus epidermis* TISTR 1466 *Bacillus cereus* TISTR 687 *Enterococcus faecalis* TISTR 379 *Propionibacterium acnes* DMST 14916 *Escherichia coli* TISTR 780 และ *Klebsiella pneumoniae* TISTR 1843 ไอโซเลต RYCH5 สามารถยับยั้งเชื้อชนิดอื่นได้อีก 6 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 *Staphylococcus epidermis* TISTR 1466 *Bacillus cereus* TISTR 687 379 *Propionibacterium acnes* DMST 1491 *Klebsiella pneumoniae* TISTR 1843 และ *Salmonella typhimurium* ATCC แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RBCH11 สามารถยับยั้งเชื้อ ได้ 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus epidermis* TISTR 1466 *Propionibacterium acnes* DMST 14916 และ *Salmonella typhimurium* ATCC 13311

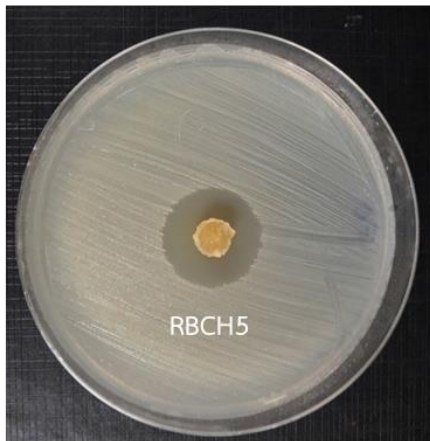
ในขณะที่สามารถแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RBCH1 ยับยั้งเชื้อได้ชนิดเดียวคือ *Propionibacterium acnes* DMST 1 ดังตารางที่ 4.4 ภาพที่ 4.2

ตารางที่ 4.4 เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อก่อโรคและอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อก่อโรคต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากรากสาบเสือ

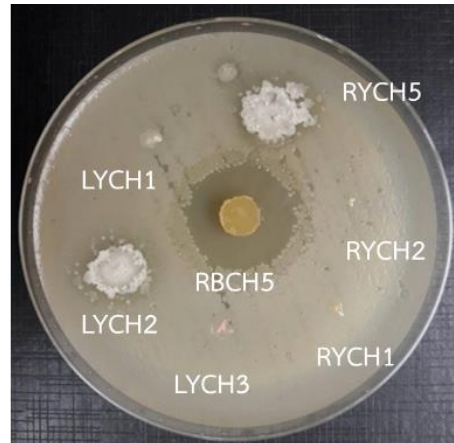
Isolates	Root			
	Microbial pathogens	Inhibition zone diameter (mm)	Colony diameter (mm)	Ratio of Inhibition diameter with colony diameter
RBCH1	<i>Propionibacterium acnes</i> DMST 14916	5	4	1.3
RBCH5	<i>S. aureus</i> TISTR 1466	26	7	3.7
	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	23	7	3.3
	<i>B. cereus</i> TISTR 687	22	7	3.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 379	22	7	3.1
	<i>Propionibacterium acnes</i> DMST 14916	23	7	3.3
	<i>E. coli</i> TISTR 780	22	7	3.1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> TISTR 1843	23	7	3.3
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	33	7	4.7
RBCH11	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	20	20	1.0
	<i>Propionibacterium acnes</i> DMST 14916	20	19	1.1
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	18	15	1.2

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

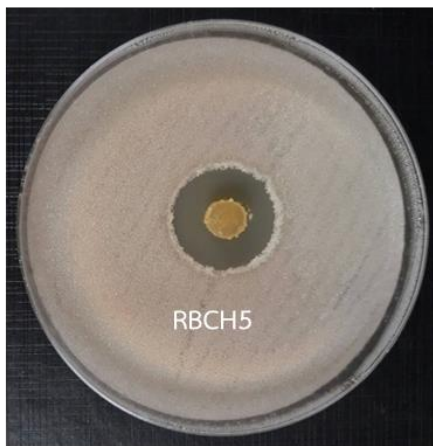
Isolates	Root			
	Microbial pathogens	Inhibition zone diameter (mm)	Colony diameter (mm)	Ratio of Inhibition diameter with colony diameter
RYCH5	<i>S. aureus</i> TISTR 1466	13	12	1.1
	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	15	10	1.5
	<i>B. cereus</i> TISTR 687	13	10	1.3
	<i>Propionibacterium acnes</i> DMST 14916	16	14	1.1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> TISTR 1843	30	30	1.0
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	15	10	1.5



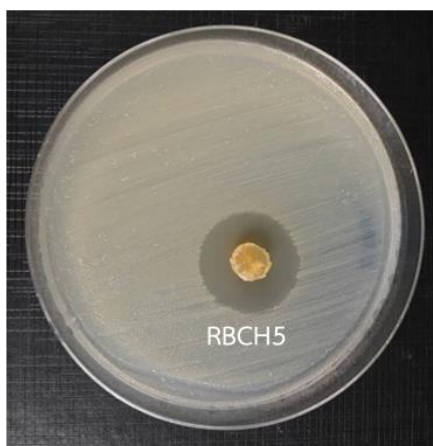
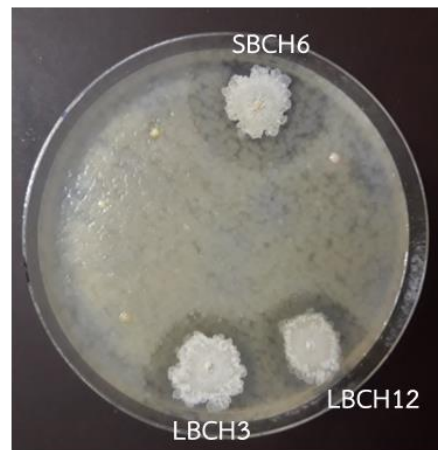
S. aureus TISTR 1466



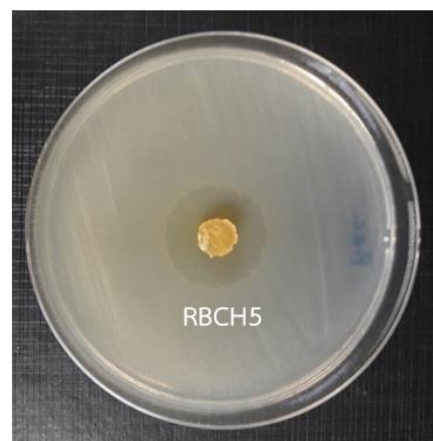
B. cereus TISTR 687



S. epidermis TISTR 1466

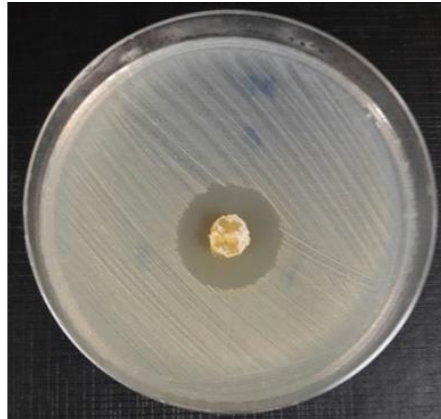


Enterococcus faecalis TISTR 379



Propionibacterium acnes DMST 14916

ภาพที่ 4.2 บริเวณยับยั้งเชื้อก่อโรคต่างๆจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากสาบเสียบนอาหาร
แข็ง TSB เวลนานาน 1 วัน



Klebsiella pneumoniae TISTR 1843



Salmonella typhimurium ATCC 13311

ภาพที่ 4.2 (ต่อ)

4.2.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ชั้นที่ 2

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์มาทำการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคตามผลที่คัดเลือกได้เบื้องต้นโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 100 mg/mL จากตารางที่ 4.5 แสดงผลของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่า ไอโซเลตที่ให้ค่าโซนใสยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในช่วง 30-35 mm คือ สารสกัดหยาบจากไอโซเลต LBCH3 และ RYCH5 ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 (34.7 ± 7.2 mm) และ *Bacillus cereus* TISTR 687 (31.0 ± 1.0 mm) ตามลำดับ ไอโซเลตที่ให้ค่าโซนใสยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในช่วง 20-25 mm คือ สารสกัดหยาบจากไอโซเลต LBCH12 ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus epidermis* TISTR 1466 (25.0 ± 2.0 mm) และ *Bacillus cereus* TISTR 687 (22.0 ± 7.0 mm) และ ไอโซเลต RYCH5 ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus epidermis* TISTR 1466 (24.7 ± 0.67 mm) แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตที่แยกได้จากใบสาบเสือจะให้ค่าโซนใสยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี อย่างไรก็ตามแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตที่แยกได้จากรากสาบเสือจะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลากหลายชนิด ได้แก่ ไอโซเลต RYCH5 และ RBCH5 แต่แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตที่แยกได้จากลำต้นสาบเสือจะให้ค่าโซนใสยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ต่ำและไม่มีความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ก่อโรคที่ยับยั้งได้

4.2.3 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี Broth dilution technique และหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ (minimal bactericidal concentration, MBC)

จากการหาค่าบริเวณยับยั้งเชื้อที่เป็นการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบว่ามีสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หรือไม่ ดังนั้นในขั้นต่อไปจึงเป็นขั้นตอนในการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ โดยการศึกษาค่า MIC ของสารสกัดหยาบนั้นจะศึกษาเฉพาะสารสกัดที่ให้ผลบวกในขั้นต้นมาแล้วโดยใช้ค่าความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 100 mg/ml

จากตารางที่ 4.6 แสดงผลของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ให้ค่า MIC ดีที่สุดคือแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกจากรากสาบเสือ แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RBCH5 ให้ค่า MIC ดีที่สุดต่อ *Propionibacterium acnes* DMST 14916 ให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.39 และ 0.78 mg/mL ตามลำดับ รองลงมา คือ ยับยั้ง *Staphylococcus epidermis* TISTR 1466 ให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.78 และ 1.56 mg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RYCH5 จะให้ค่า MIC และ BMC เท่ากันคือ 1.56 และ 3.12 mg/mL ต่อ *Staphylococcus*

epidermis TISTR 1466 *Propionibacterium acnes* DMST 14916 และ *Salmonella typhimurium* ATCC 13311

ตารางที่ 4.5 บริเวณยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดหยาบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่เข้มข้น 100 mg/ml

Isolates	Gram-positive bacteria				Gram-negative bacteria		
	<i>Stap. aureus</i> TISTR 1466	<i>S. epidemis</i> TISTR 1466	<i>B. cereus</i> TISTR 687	<i>Pro. acnes</i> DMST 14916	<i>E. coli</i> TISTR 780	<i>Klebsiella pneumoniae</i> TISTR 1843	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC13311
Leaf							
LBCH3	34.7±7.2	11±2.0	20.0±2.0	ND	ND	ND	15.7±1.15
LBCH13	ND	25.0±2.0	22.0±7.0	ND	ND	ND	ND
Stem							
SBCH 1-5	ND	13.7±1.2	ND	ND	ND	ND	ND
SBCH3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15.0±1.0
SBCH6	ND	11.5±0.7	19.0±1.4	ND	ND	ND	12.0±1.2
Root							
RBCH1	NDN	ND	ND	14±0.6	ND	ND	ND
RBCH5	12.33±0.	11.67±0.6	13.3±0.7	14±1.7	11.3±0.6	13.3±1.5	14.3±2.3
RBCH11	ND	14.0±1.7		14±1.7	ND	ND	13.3±7.6
RYCH5	15.7±0.6	24.7±0.6.7	31.0±1.0	13.3±0.6	ND	15.0±2.0	15.3±0.6
Erythomycin (10µg/mL)	20	26	26	32	21	20	18

หมายเหตุ: ND, not detected; ^a, value of inhibition zone diameter included 7 mm of well; ^b, Polymyxin B (300U)

ตารางที่ 4.6 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

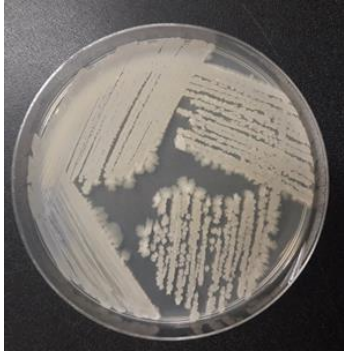


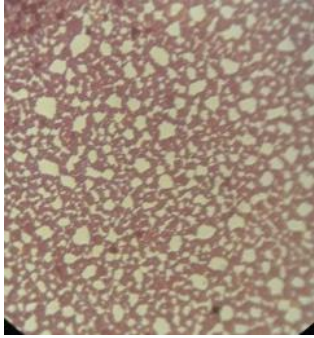
Isolates	Tested microorganisms	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
Leaf			
LBCH3	<i>S. aureus</i> TISTR 1466	50	100
	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	12.5	25
	<i>B. cereus</i> TISTR 687	50	100
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	50	100
LBCH13	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	12.5	25
	<i>B. cereus</i> TISTR 687	50	100
Stem			
SBCH1-5	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	50	100
SBCH3	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	0.39	0.78
SBCH6	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	12.5	25
	<i>B. cereus</i> TISTR 687	50	100
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	12.5	25
Root			
RBCH1	<i>Propionibacterium acnes</i> DMST 14916	12.5	25
RBCH5	<i>S. aureus</i> TISTR 1466	12.5	25
	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	0.78	1.56
	<i>B. cereus</i> TISTR 687	12.5	25
	<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 379	25	50
	<i>Propionibacterium acnes</i> DMST 14916	0.39	0.78
	<i>E. coli</i> TISTR 780	12.5	25
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> TISTR 1843	12.5	25
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	12.5	25
RBCH11	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	50	100
	<i>Propionibacterium acnes</i> DMST 14916	25	50
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	25	50
RYCH5	<i>S. aureus</i> TISTR 1466	50	100
	<i>S. epidermis</i> TISTR 1466	1.56	3.12
	<i>B. cereus</i> TISTR 687	25	50
	<i>Propionibacterium acnes</i> DMST 14916	1.56	3.12
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> TISTR 1843	50	100
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	1.56	3.12

4.3 การระบุชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์

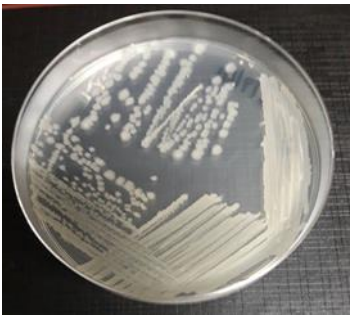


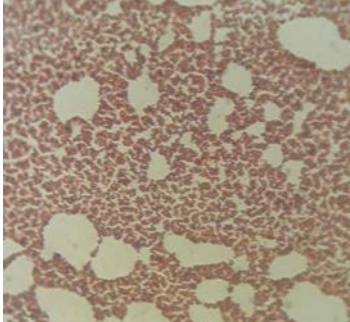

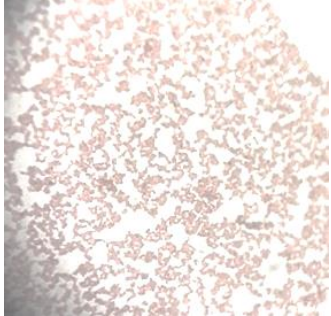
4.3.1 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ประกอบด้วยลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง TSA การติดสีแกรมของแบคทีเรีย และการจัดเรียงตัวของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า พบว่า ไอโซเลตที่มีโคโลนีสีขาวขุ่นขอบเรียบ กลางนูน แสงผ่านได้ และลักษณะเซลล์เป็นแกรมบวก ติดสีม่วง รูปร่างท่อน มีสปอร์กลางเซลล์ ได้แก่ แบคทีเรียเอนโดไฟต์ LBCH3 SBCH6 RBCH11 และ RYCH5 ไอโซเลตที่มีโคโลนีสีขาวขุ่น มันวาว ขอบเรียบ กลางนูน แสงผ่านไม่ได้ และลักษณะเซลล์มีรูปร่างกลม แกรมบวก ติดสีม่วง อยู่เป็นกลุ่ม ได้แก่ LBCH13 และ RBCH1 ไอโซเลตที่มีโคโลนีมีสีขาวออกเหลือง มันวาว ขอบเรียบ กลางนูน แสงผ่านไม่ได้ และลักษณะเซลล์ รูปร่างกลม ติดสีม่วง แกรมบวก ได้แก่ SBCH1-5 SBCH3 และ ไอโซเลตที่มีโคโลนีมีสีขาวถึงเหลือง ขอบเรียบ เนื้อไม่เนียนเจริญดีอาหารขุ่นออกเหลือง ผิวด้าน นูนกลาโคโลนี แสงผ่านไม่ได้ และลักษณะเซลล์แตกกิ่งก้านสาขาติดสีม่วง แกรมบวก ได้แก่ RBCH5 ดังตารางที่ 4.7, 4.8 และ 4.9


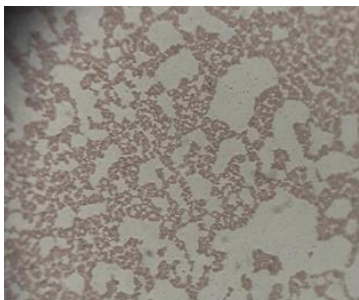

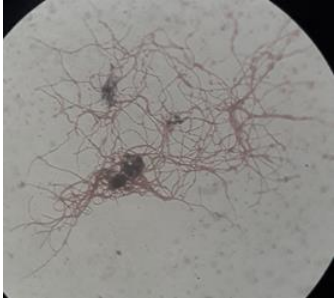
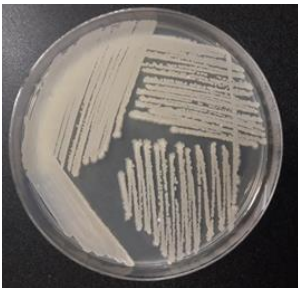

ตารางที่ 4.7 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรีย
เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบสาบเสือ

ไอโซเลต	ลักษณะเชื้อเจริญบนอาหารแข็ง TSA	ลักษณะภายใต้กล้อง
LBCH3	 <p data-bbox="464 981 986 1077">แบคทีเรียเจริญเร็ว โคโลนีสีขาวขุ่นขอบไม่เรียบ กลางนูน แสงผ่านไม่ได้ มีลักษณะแผ่</p>	 <p data-bbox="1018 925 1385 1126">กำลังขยาย 100x แกรมบวก ติดสีม่วง รูปร่างท่อน อยู่เดี่ยวหรือต่อกันเป็นคู่ มีสปอร์ กลางเซลล์</p>
LBCH13	 <p data-bbox="464 1603 943 1700">โคโลนีสีขาวขุ่น มันวาว ขอบเรียบ กลางนูน แสงผ่านไม่ได้</p>	 <p data-bbox="1018 1603 1369 1760">กำลังขยาย 100x แกรมบวก ติดสีม่วง รูปร่างกลม อยู่เป็นกลุ่ม</p>

ตารางที่ 4.8 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรีย
เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นสาบเสือ

ไอโซเลท	ลักษณะเชื้อเจริญบนอาหารแข็ง	ลักษณะภายใต้กล้อง
SBCH6	 <p data-bbox="464 862 981 907">โคโลนีสีขาวขุ่นขอบเรียบ กลางนูน แสงผ่านได้</p>	 <p data-bbox="1018 862 1396 1019">กำลังขยาย 100x รูปร่างแท่ง ติดสีม่วง แกรมบวก มี สปอร์กลางเซลล์</p>
SBCH1-5	 <p data-bbox="464 1377 981 1467">โคโลนีมีสีขาวออกเหลือง มันวาว ขอบเรียบ กลางนูน แสงผ่านไม่ได้</p>	 <p data-bbox="1018 1377 1374 1467">กำลังขยาย 100x รูปร่างกลม ติดสีม่วง แกรมบวก</p>
SBCH3	 <p data-bbox="464 1825 981 1915">โคโลนีสีขาวขุ่นออกเหลือง โคโลนีเล็ก ผิวมัน วาว ขอบเรียบ นูน แสงผ่านไม่ได้</p>	 <p data-bbox="1018 1825 1374 1915">กำลังขยาย 100x รูปร่างกลม ติดสีม่วง แกรมบวก</p>

ตารางที่ 4.9 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากรากสาบเสือ

ไอโซเลท	ลักษณะเชื้อเจริญบนอาหารแข็ง	ลักษณะภายใต้กล้อง
RBCH1	 <p data-bbox="464 864 938 965">โคโลนีสีขาวขุ่นออกเหลือง ผิวมันวาว ขอบเรียบ นูนกลาง แสงผ่านได้</p>	 <p data-bbox="1018 864 1358 965">กำลังขยาย 100x รูปร่างกลม ติดสีแดง แกรมลบ</p>
RBCH5	 <p data-bbox="464 1319 979 1469">โคโลนีมีสีขาวถึงเหลือง ขอบเรียบ เนื้อไม่เนียน เจริญติดอาหารขุ่นออกเหลือง ผิวด้าน นูนกลาง โคโลนี แสงผ่านไม่ได้</p>	 <p data-bbox="1018 1319 1401 1469">กำลังขยาย 100x มีลักษณะเป็นเส้นแตกกิ่งก้านสาขา ติดสีม่วง แกรมบวก</p>
RBCH11	 <p data-bbox="464 1827 895 1872">โคโลนีขาวขุ่น ผิวเรียบ นูน แสงผ่านได้</p>	 <p data-bbox="1018 1778 1394 1917">กำลังขยาย 100x รูปร่างแท่ง ติดสีม่วง แกรมบวก มีสปอร์กลางเซลล์</p>

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะเชื้อเจริญบนอาหารแข็ง	ลักษณะภายใต้กล้อง
RYCH5	 <p data-bbox="464 864 970 958">โคโลนีขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ นูนกลาง แสงผ่านได้</p>	 <p data-bbox="1018 864 1394 1016">กำลังขยาย 100x รูปร่างแท่ง ติดสีม่วง แกรมบวก มีสปอร์กลางเซลล์</p>

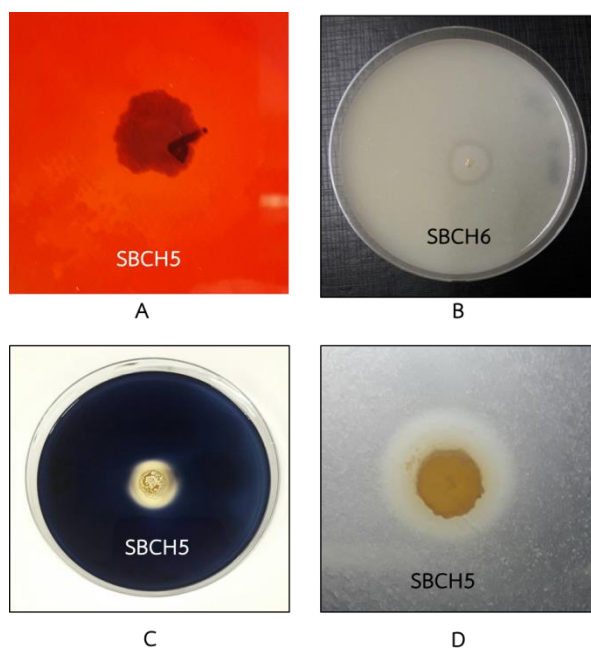
4.3.3 ผลทดสอบคุณสมบัติสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์ (hydrolytic enzymes)

ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้

จากการทดสอบคุณสมบัติสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้แก่ คุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ cellulase, protease, lipase และ amylase ดังแสดงในตารางที่ และภาพที่ ผลพบว่า ไอโซเลต RBCH5 สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้ง 4 ชนิด รองลงมาคือ ไอโซเลต RBCH11 และ RYCH5 ดังตาราง 4.10 และภาพที่ 4.3

ตารางที่ 4.10 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์

Isolates	Hydrolytic enzyme			
	Cellulase	Protease	Amylase	Lipase
LBCH3	-	+	+	+
LBCH13	-	-	-	-
SBCH6	-	+	+	-
SBCH1-5	-	-	-	-
SBCH3	-	-	-	-
RBCH1	-	-	-	+
RBCH5	+	-	+	+
RBCH11	-	+	+	+
RYCH5	-	+	+	+



ภาพที่ 4.3 สร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง CMC (A) อาหารแข็ง Skim milk (B) อาหารแข็ง Starch (C) และอาหารแข็ง Tween (D)

4.3.4 การระบุชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RCHB5 โดยการทดสอบทางชีวเคมี และ 16sRNA

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และให้ค่า MIC ต่อ *S. epidermis* TISTR 1466 และ *Propionibacterium acnes* DMST 14916 ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลต RCHB5 มาทดสอบทางชีวเคมีพบว่า ติดสีม่วงของแกรมบวก สร้างสปอร์ได้ ไม่เคลื่อนที่ สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายแป้ง เซลลูโลส และ tween80 ได้ แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนและเจลาตินได้ ให้ผลบวกในการใช้ urea และ citrate ให้ผลลบกับการทดสอบ indole lysine และ phenylalanine ดังตารางที่ 4.11

วิเคราะห์ระบุชนิดที่แน่นอนโดยทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนบริเวณ 16s rRNA จากการวิเคราะห์ลำดับเบส 16s rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวภาพ และวิวัฒนาการแผนภูมิ ต้นไม้ เพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบว่า ไอโซเลต RCHB5 มีความใกล้เคียงกับแอกติโนมัยซีท *Streptomyces parvulus* NBRC 13193^T 99.86 % ดังตารางที่ 4.12 และภาพที่ 4.4

ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต

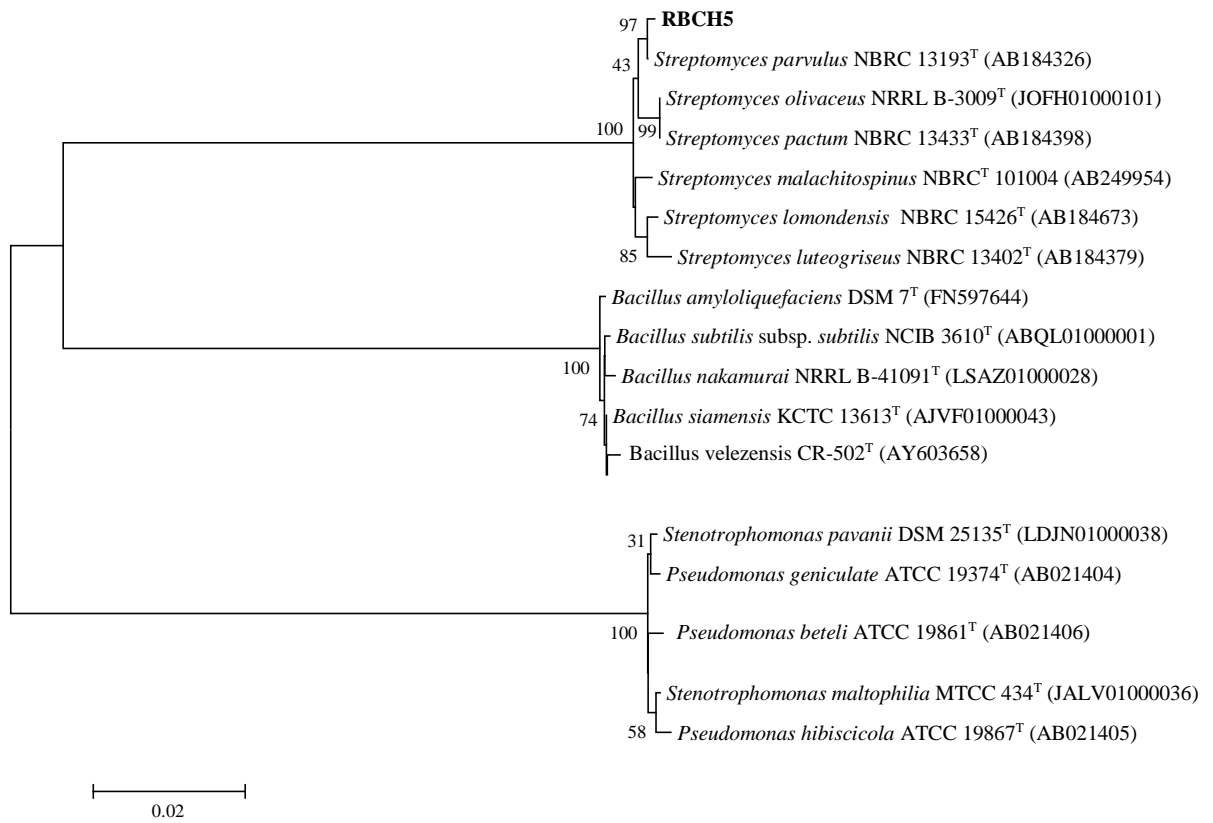
RCHB5

Morphological and physiological characteristics	RCHB5	<i>Streptomyces parvulus</i> RSPSN2 ^a
Gram staining	+	+
Spore staining	+	+
Hydrolysis		
Starch hydrolysis	+	+
Casein hydrolysis/ skimmilk hydrolysis	-	-
Cellulose hydrolysis	+	+
Tween80 hydrolysis	+	+
Gelatin liquefaction	-	-
TSI	A/K	ND
Motile	-	-
Indole	-	-
Lysine	-	-
Urease	+	+
Phenylalanine	-	-
Citrate	+	+

หมายเหตุ: ND, Not detected; ^a, Shetty et al. (2014)

ตารางที่ 4.12 ลำดับเบส 16s rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวภาพเพื่อจัดจำแนกชนิด

Isolate	Part of plant	Closed homology	Pairwise similarity
RCHB5	Root	<i>Streptomyces parvulus</i> NBRC 13193 ^T	99.86 %



ภาพที่ 4.4 วิวัฒนาการแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต

RBCH5

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมด 32 ไอโซเลต ที่แยกได้จากส่วนใบ ลำต้น และราก เท่ากับ 10 7 และ 15 ตามลำดับ ถูกนำมาคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้น โดยใช้เทคนิค point inoculum พบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมด 9 ไอโซเลต จากราก ใบ ลำต้น เท่ากับ 4 3 และ 2 ไอโซเลต เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ให้ผลบวกต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจะพบในส่วนลำต้นมากที่สุดเท่ากับ 42.86 % รองลงมาคือ รากและใบเท่ากับ 26.67 และ 20.0 % ตามลำดับ จากคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค point inoculum และการใช้สารสกัดหยาบพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RBCH5 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 9 ชนิด ให้อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางค่าโซนใสยับยั้งกับเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีได้ดี ได้แก่ *Salmonella typhimurium* ATCC 13311(4.7) *Staphylococcus aureus* TISTR 1466(3.7) *Staphylococcus epidermis* TISTR 1466(3.3) *Propionibacterium acnes* DMST 14916(3.3) *Klebsiella pneumoniae* TISTR 1843 (3.3) *Bacillus cereus* TISTR 687(3.1) *Enterococcus faecalis* TISTR 379(3.1) และ *Escherichia coli* TISTR 780 (3.1) สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี คือ ไอโซเลตที่ LBCH3 และ RYCH5 ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 (34.7 ± 7.2 mm) และ *Bacillus cereus* TISTR 687 (31.0 ± 1.0 mm) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RBCH5 ที่แยกได้จากรากสาบเสื่อจะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลากหลายชนิด ให้ค่า MIC ดีที่สุดต่อ *Propionibacterium acnes* DMST 14916 ให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.39 และ 0.78 mg/mL ตามลำดับ รองลงมา คือ ยับยั้ง *Staphylococcus epidermis* TISTR 1466 ให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.78 และ 1.56 mg/mL ตามลำดับ ดังนั้นจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และลำดับเบส 16s rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RCHB5 พบว่ามีลักษณะเหมือนกับ *Streptomyces parvulus* RSPSN2

5.2 อภิปรายผล

5.2.1 จากการเก็บตัวอย่างพืชทั้งสองจังหวัดเพื่อนำมาแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมด 32 ไอโซเลต ที่แยกได้จากส่วนใบ ลำต้น และราก ถูกนำมาคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค point inoculum พบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมด 9 ไอโซเลต จากราก ใบ ลำต้น เท่ากับ 4 3 และ 2 ไอโซเลต เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ให้ผลบวกต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจะพบในส่วนลำต้นมากที่สุดเท่ากับ 42.86 % รองลงมาคือรากและใบ เท่ากับ 26.67 และ 20.0 % ตามลำดับ เนื่องจากในการแยกลักษณะและสมบัติของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จะมีปัจจัยที่มีอิทธิพลกับจำนวนในการพบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ เช่น บริเวณพื้นที่ของพืช อายุ ฤดูกาลและสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปจะพบแบคทีเรียเอนโดไฟต์มากในส่วน ลำต้น ใบ และ รากเพราะว่า ส่วนเหล่านี้เป็นแหล่งสารอาหารที่สมบูรณ์ของพืช (Strobel et al., 2003) ก่อนหน้านี้ได้มีรายงานว่า พบจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่แยกจาก *Tabernaemontana heyneana* Wall. (Apocynaceae) พบใน ใบ 268 ไอโซเลต และลำต้น 133 ไอโซเลต (Jeewon et al., 2002) ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อม ระบบนิเวศ ของโฮสต์พืช มีความสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเมแทบอลิต์และส่งผลต่อการสร้างฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (Tan et al., 2001)

5.2.2 คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

จากคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค point inoculum และการใช้สารสกัดหยาบพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RBCH5 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 9 ชนิด ให้อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางค่าโซนใสยับยั้งกับเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ให้ค่า MIC ดีที่สุดต่อ *Propionibacterium acnes* DMST 14916 ให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.39 และ 0.78 mg/mL ตามลำดับ รองลงมา คือ ยับยั้ง *Staphylococcus epidermis* TISTR 1466 ให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.78 และ 1.56 mg/mL ตามลำดับ ดังนั้น จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และลำดับเบส 16s rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RCHB5 พบว่ามีลักษณะเหมือนกับ *Streptomyces parvulus* RSPSN2 แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RCHB5 ที่แยกได้จากรากสาบเสือ คือ แอคติโนมัยซีท *Streptomyces parvulus* ที่แยกได้ด้วยอาหาร สอดคล้องกับรายงานของ Hema et al. (2012) ที่แยกเอนโดไฟต์แอคติโนมัยซีท *Streptomyces* sp. จากสะเดา (*Azadiracta indica*), กระจเพรา (*Ocinum sanctum*) และ ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) ที่ยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumonia* และ *Pseudomonas aeruginosa* นอกจากนี้ในสาบเสือนี้อาจพบเอนโดไฟต์แอคติโนมัยซีท *Streptomyces* เพียงชนิดเดียวทั้งนั้นเนื่องจาก *Streptomyces* sp. เป็นเอนโดไฟต์

แอกติโนมัยซีทที่พบกระจายตัวมากที่สุด (79 ไอโซเลท) รองลงมา คือ *Micromonospora* sp. (33 ไอโซเลท) และ *Nocardiopsis* sp. (8 ไอโซเลท) ซึ่งแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้มากที่สุด จากพืชสมุนไพรที่เก็บสะสมได้ที่ของกรมอสมโค ได้แก่ สมุนไพรซีบัคธอร์น (seabuckthorn) *Hippophae rhamnoides* และ ตำแย *Urtica dioica* สมุนไพรวิลล่า (viola) *Viola odorata* และ ผักกาดน้ำ *Platago major* (Machavariani et al., 2014)

5.2.3 การระบุชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศมีแหล่งอาศัยอยู่ในดิน เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นแหล่งหลักที่ใช้ในการผลิตยาในระดับอุตสาหกรรมและใช้ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ (Baltz 2007) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ สร้างสปอร์ เส้นใยที่ชูในอากาศ มีสีเทา เส้นใยที่เจริญในอาหารหรือสัสเตอร์มีสีเหลือง ติดสีแกรมบวกและไม่เคลื่อนที่ วิชาเคมี ได้แก่ ให้การทดสอบ urease และ citrate เป็นบวก และให้การทดสอบ indole lysine phenylalanine เป็นลบ และให้ผลการย่อยสัสเตอร์ได้ เช่น สามารถย่อย แป้ง เซลลูโลส tween 80 ได้ แต่ไม่สามารถย่อยเคซีนและเจลาตินได้ ในขณะที่ *Streptomyces parvulus* VITJS11 ที่แยกได้จากน้ำทะเลจะไม่สามารถย่อยเคซีนได้ (Naine et al., 2015) ดังนั้นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลต RCHB5 มีความใกล้เคียงกับจีส *Streptomyces* (Shirilling et al., 1966) และมีคุณสมบัติเหมือนกับ *Streptomyces parvulus* RSPSN2 (Shetty et al., 2014) .

5.3 ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

จากผลการศึกษาวินิจฉัยครั้งนี้ พบว่า พืชที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้ก็จะทำให้มีจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีเช่นกัน ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคจะพบในส่วนลำต้นของพืช และจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสร้างสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลากหลายชนิดได้แก่ Actinomycetes

5.4 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

5.3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์

5.3.3 ศึกษาการทำให้สารผลิตสารต้านจุลินทรีย์บริสุทธิ์เพื่อนำไปเป็นยารักษาโรคผิวหนัง

ต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

- กาญจนา มณีศรีไ (2557). การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma sp.* จากเนื้อไม้ยางพารา สำหรับควบคุมเชื้อ *Phytophthora palmivora* และ *Phytophthora botryose*. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต. สาขาวิชาโรคพืช. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 86 หน้า.
- ชุติมา แก้วกระจาย, ธิดา เดชฮวบ และ เลิศชาย สถิตย์พนาวงศ. (2557). ประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์จากโสน (*Sesbania javanica*) ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช. *แก่นเกษตร*. 42. 271-282.
- พิสุทธิพร ฉ่ำใจ. (2550). *สมุนไพรคุณและประโยชน์เพื่อนำมาใช้*. ต้นธรรมสำนักพิมพ์, กรุงเทพฯ. 304 หน้า.
- นุชจิรา อ่อนนวล. (2004). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* (วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, คณะวิทยาศาสตร์
- มัญญา เพียรเจริญ. (1996). ผลของสารสกัดจากใบสาบเสือ *Chromolaena odorata* (L.) ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ขจัดพิษของหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, คณะวิทยาศาสตร์, สาขาวิชาสัตววิทยา.
- ภัทรชัย กิรติสิน. (2551). *ตำราวิทยาแบคทีเรียทางการแพทย์*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ, หจก.วี.เจ.พริ้นติ้ง. 703 หน้า.
- สุรศักดิ์ ราตรี. (2554). *พรรณไม้หนองระเวียง*. เอ็กซ์เดคคอร์, 231 หน้า.
- สายทอง แก้วฉาย (2557). การศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์จากใบข้าวหอมกระดังงาและคุณสมบัติการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์. *วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์*. 6(3). 112-120.
- ธารธรรมแก้ว เชื้อเมือง. (2537). *สมุนไพรสำคัญที่ควรรู้*. สำนักพิมพ์กำแก้ว, 271 หน้า.

บรรณานุกรมภาษาภาษาต่างประเทศ

- Aharwal, R. R., Kumar, S. & Sandhu, S. S. (2014). Isolation and antimicrobial property of endophytic fungi isolated from Indian medicinal plant *Calotropis procera* (Linn.) R.BR. *World ournal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(5), 678-691.
- Aly, A. H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Müller, W. E. G., Kozytska, S., Hentschel, U., Proksch, P., Ebel, R. (2008). Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry*. 69(8), 1716-1725.
- Antindehou, M., Lagnika, L., Guérolde, B., Strub, J. M., Zhao, M., Dorselaser, A. V., Marchioni, E., Prévost, G., Haikel, Y., Taddéi, C., Sanni, A., Metz-Boutigue, M.-H. (2013). Isolation and identification of two antibacterial agents from *Chromolaena odorata* L. activity against four diarrheal strains. *Advances in Microbiology*. 3, 115-121.
- Azevedo, J. L., Maccheroni, W., Jr., Pereira, J. O., & de Araujo, W. L. (2000). Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3(1), 40-65.
- Baltz, R.H. (2007). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8, 557-563.
- Brady, S.F., Bondi, S.M. & Clardy, J. (2001). The Guanacastepene: A highly diverse family of secondary metabolites produced by an endophytic fungus. *Journal of the American Society*. 123(4), 3005-3008.
- Bush, L.P., Wilkinson, H.H., & Schardl, C.L. (1997). Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology* 114, 1-7
- Chakraborty, A. K., Rambhade, S. & Patil, U. (2011). *Chromolaena odorata* (L.): an overview. *Journal of Pharmacy Research*. 4(3), 573-576.
- Chakraborty, A. K., Rambhade, S. & Patil, U. (2011). *Chromolaena odorata* (L.): an overview. *Journal of Pharmacy Research*. 4(3), 573-576.
- Chow, Y., Adeline, S, Y., & Ting., (2014). Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. *Journal of Advanced Research*. 6. 869-876.

- Chun, J., Lee, J., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K. & Lim, Y. (2007). Eztaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2259-2261.
- Daisy, B. H., Strobel, G. A., Castillo, U., Ezra, D., Sears, J., Weaver, D. K., & Runyon, J. B. (2002). Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology.* 148, 3737–3741.
- Dash, G. H. & P. N. Murthy. (2011). Antimicrobial activity of few selected medical plants. *International Research Journal of Pharmacy.* 2(1), 146-152.
- Eze, E. A., N. E. Oruche, V.C. Onuora & C.N. Eze. (2013). Antibacterial screening of crude ethanolic leaf extracts of four medicinal plants. *Journal of Asian Scientific Research.* 3(5): 431-439.
- Fill, T. P., Silva, B. F., & Rodrigues-Fo, E. (2010). Biosynthesis of phenylpropanoid amides by an endophytic *Penicillium brasilianum* found in root bark of *Melia azedarach*. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 20(3), 622-629.
- Guo B., Dai, J. R., Ng, S., Huang, Y., Leong, C., & Ong, W., (2000). Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* sp. *J. Nat. Prod.* 63, 602–604.
- Huang, Z., Cai, X., Shao, C., She, Z., Xia, X., Chen, Y., Yang, J., Zhou, S., Lin, Y. (2008). Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. *Phytochemistry.* 69(7), 1604-1608.
- Hateet, R. R., Muhsin, T. M., & Humadi, K. J. (2014). Antibacterial activities secondary metabolites from endophytic fungus *Fusarium solani*. *Journal of Basrah Researches.* 40(1), 94-101.
- Hema, S. N., Devi, D. K., Sinduja, G. & Sandhya, R. (2012). Isolation of endophytic actinomycetes from medicinal plants and its mutational effect in biocontrol activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 3(11), 4338-4344.
- Huang, Y., Wang, J., Li, G., Zheng, Z. & Su, W. (2001). Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus*

- mairei, *Cephalataxus fortune* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 31(2), 163-167.
- Jalgaonwala, E., and Mahajan, T, R., (2014). Production of anticancer enzyme asparaginase from endophytic *Eurotium sp.* isolated from rhizomes of *Curcuma longa*. *European Journal of Experimental Biology*. 4(3), 36-43 .
- Jeewon, R., (2014). L-Asparaginase Activity of Fungal Endophytes from *Tabernaemontana heyneana* Wall. (Apocynaceae), Endemic to the Western Ghats (India). Hindawi Publishing Corporation. 1-7.
- Kigigha, L. & Zige, D. V. (2013). Activity of *Chromolaena odorata* on enteric and superficial etiologic bacterial agents. *American Journal of Research Communication*. 1(11), 266-276.
- Kole, M. M, Draper, I., & Gerson, D. F., (1988), Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 41, 197-206.
- Koskimäki, J. (2016). The interaction between the intracellular endophytic bacterium, *Methylobacterium extorquens* DSM13060, and acots pine (*Pinus sylvestris* L.). *A science Rerum Naturalium*. Faculty of science University of Oulu Graduate School. 103 p.
- Kumar, A., Verma, A.K., Sharma, A.K. & Rahal, A. (2013). Presence of extended spectrum Beta-lactamases producing alpha hemolytic *Escherichia coli* in yellow-wattled Lapwing (*Vanellus malabaricus*). *Asian J. Animal Sci.*, 7, 64-69.
- Kumar, V., Kumar, A. & Pandey, K. D. & Roy, B. K. (2014). Isolation and characterization of bacterial endophytes from the roots of *Cassia tora* L. *Annals of Microbiology*. 65, 1391–1399.
- Kusari, S., Lamshöft, M., Zühlke, S., Spiteller, M. (2008). An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *Journal of Natural Products*. 71(2), 159-162.
- Land protect. (2006). Siam weed *Chromolaena odorata* Declared class1. Natural Resources and Water. Website: http://www.nqccs.com.au/library/weeds/siam_weed.pdf, 1 Aug, 2014.

- Lee, J. C., Lobkovsky, E., Pliam, N. B., Stroble, G. A. & Clardy, J. (1995). Subglutinol A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *J. Org. Chem.* 60: 7076-7077.
- Liang, H., Xing, Y., Chen, J., Zhang, D., Guo, S., & Wang, C. (2012). Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 12(238), 1-6.
- Li, E., Jiang, L., Guo, L., Zhang, H., & Che, Y. (2008). Pestalachlorides A–C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 16(17), 7894-7899.
- Li, J. Y. & Strobel, G. A. (2001). Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry.* 57(2), 261-265.
- Li, J. Y., G. A. Strobel, J. K. Harper, E. Lobkovsky & J. Clardy. (2000). Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Microbiology and Molecular Biology reviews.* 491–502.
- Loaces, I., Ferrando, L., & Scavino, A. F. (2010). Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microb. Ecol.* 61, 606–618.
- Liu, T. J., Yeh, Y. C., Ting, C. T., Lee, W. L., Wang, L. C., Lee, H. W., Wang, K. Y., Lai, H. C., Lai, H. C. (2008). *Ginkgo biloba* extract 761 reduces doxorubicin-induced apoptotic damage in rat hearts and neonatal cardiomyocytes. 80(2), 227-235.
- Lu, H., Zou, W.X., Meng, J.C., Hu, J., Tan, R.X. (2000). New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum sp.*, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science.* 151. 67-73.
- Manasa, C. & Nalini, M. S. (2014). L-Asparaginase Activity of Fungal Endophytes from *Tabernaemontana heyneana* Wall. (Apocynaceae), Endemic to the Western Ghats (India). *International Scholarly Research Notices.* Article ID 925131, 7 pages.

- Mangunwardoyo, W., Suciati, W. & Gandjar, I. (2012). Frequency of endophytic fungi isolated from *Dendrobium crumenatum* Sw. (Pigeon orchid) and antimicrobial activity. *Biodiversitas*. 13(1), 34-39.
- Machavariani, N. G., Ivankova, T. D., Sineva, O. N., & Terekhova, L. P. (2014). Isolation of endophytic actinomycetes from medicinal plants of the Moscow region, Russia. *World Applied Sciences Journal*. 30(11), 1599–1604.
- Marinho, A. M. R., Rodrigues-Filho, E., da Luz, M., Moitinho, R. & Santo, L. S. (2005). Biologically Active Polyketides Produced by *Penicillium janthinellum* Isolated as an Endophytic Fungus from Fruits of *Melia azedarach*. 16(2), 280-283.
- de Melo, F. M. P., Fiore, M. F., de Moraes, L. A. B., Silva-Stenico, M. E., Scramin, S., Teixeira, M. A., de Melo, I. S. (2009). Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. *Scientia Agricola*. 66(5), 583-592.
- Nateche, F., Martin, A., Baraka, S., Palomino, J. C., Khaled, S., & Portaels, F. (2006). Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. *Journal of Medical Microbiology*. 55, 857-860. DOI 10.1099/jmm.0.46513-0.
- Nine, S. J., Devi, C. S., Mohanasrinivasan, V. & Vaishnavi, B. (2015). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 crude extract. 58(2), 198-207.
- Noble, H. M., Langley, D., Sidebottom, P. J., Lane, S. J. & Fisher, P.J. (1991). An echinocandin produced by an endophytic fungus *Periconia* sp. with antibacterial activity. *Journal of Phytochemistry*. 69, 1185-1196.
- Ondeyka, J. G., Helm, G. L., Hensens, O. D., Goetz, M. A., Zink, D. L., Tsiouras, A., Shoop, W. L., Slayton, L., Dombrowski, A. W., Polishook, J. D., Ostlind, D. A., Tsou, N. N., Ball, R. G., Singh, S. B. (1997). Nodulisporic acid A, a novel and potent insecticide from a *Nodulisporium* sp. Isolation, structure determination, and chemical transformations. *J Am Chem Soc*. 119, 8809–8816.

- Pan, F., Liu, Z. Q., Chen, Q., Xu, Y. W., Hou, K., & Wu, W. (2016). Endophytic fungus strain 28 isolated from *Houttuynia cordata* possesses wide-spectrum antifungal activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47, 480–488.
- Park, Y. H., Chung, J. Y., Ahn, D. J., Kwon, T. R., Lee, S. K., Bae, I., Yun, H. K., & Bae, H. (2015). Screening and characterization of endophytic fungi of *Panax ginseng* Meyer for biocontrol activity against ginseng pathogens. *Biological Control*. 91, 71–81.
- Peterson, L.R. & Shanholtzer, C. J. (1992). Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews*. 5(4), 420-432.
- Powell, R.G., & Petroski, R.J., (1992). The loline group of pyrrolizidine alkaloids. In: Pelletier, S.W. (Ed.), *The Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Vol. 8. Springer, Berlin, pp. 320–338.
- Queensland government. (2011). Siam weed *Chromolaena odorata*. Fact sheet DECLARED CLASS 1 PEST PLANT.
Website: http://www.daff.qld.gov.au/documents/Biosecurity_EnvironmentalPests/IPA-Siam-Weed-PP49.pdf.
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 42, 321–324.
- Schwartz D. A., Freedman, J. H. & Linney, E. A. (2004). Environmental genomics: a key to understanding biology, pathophysiology and disease. *Human Molecular Genetics*. 13(2), 217–224.
- Shekhawat, K. K., Rao, D. V. & Batra, A. (2013). In vitro Antimicrobial Activities of Endophytic Fungi Isolates from Medicinal Tree - *Melia azedarach* L.. *Journal of Microbiology Research*. 3(1), 19-24.
- Silva, G. H., Telesa, H. L., Trevisana, H. C., Bolzani, V. S., Youngb, M. C. M., Pfenningc, L. H., Eberlind, M. N., Haddad, R., Costa-Netoe, C. M., & Araújo, A. R. (2005). New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. 16(6B), 1463-1466.

- Stanley, M. C., Ifeanyi, O. E., Nwakaego, C. C. & Esther, I. O. (2014). Antimicrobial effects of *Chromolaena odorata* on some human pathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(3), 1006-1012.
- Strobel G., & Daisy B., (2003), Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67, 491–502.
- Strobel, G. A., Dirkse, E., Sears, J. & Markworth, C.. (2001). Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*. 147, 2943–2950.
- Strobel, G., Ford, E., Worapong, J., Harper, J. K., Arif, A. M., Grant, D. M., Fung, P. C. W., & Chan, K. (2002). Ispoestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotipis microspora*, possessing anti-fungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*, 60, 179-183.
- Suksamran, A., A. Chotipong, T. Suavansri, S. Boongird, P. Timsuksai, S. Vimuttipong, & A. Chuaynugul. (2004). Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. *Arch Pharm Res*. 27(5), 507-511.
- Suwaibah, M., R. Zatilfariyah, M. A. Aslizah and S. N. Baharum. (2012). Chemical Composition of Local *Eupatorium odoratum* Essential Oil using GC-MS. UMT 11th International Annual Symposium on Sustainability Science and Management. 1383-1388.
- Sutjaritvorakul, T., Whalley, A. J. S., Sihanonth, P., & Roengsumran, S. (2011). Antimicrobial activity from endophytic fungi isolated from plant leaves in Dipterocarpaceae forest at Viengsa district Nan province, Thailand. *International Journal of Agricultural Technology*. 2(1), 115-121.
- Worapong, J, Strobel G.A., Ford, E.J., & Li, J.Y. (2001). *Muscodor albus* anam. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. *Mycotaxon*. 79, 67–79.
- Yahya, M. F. Z. R., Ibrahim, M. S. A., Zawawi, W. H. A. W. M. & Hamid, U. M. A. (2014). Biofilm killing effects of *Chromolaena odorata* extracts against *Pseudomonas aeruginosa*. *Research Journal of Phytochemistry*. 8(3): 64-73.
- You, F., Han, T., Wu, J-Z., Huang, B-K., & Qin, L-P. (2009). Antifungal secondary metabolites from endophytic *Verticillium* sp. *Biochemical Systematics and Ecology*. 37(3), 162-165.

Zhang, H.W., Ying, C., & Bai, X.L. (2014). Advancement in endophytic microbes from medicinal plants. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 5, 1589-600.

ประวัติผู้วิจัย

- 1) ชื่อ นาง.ศรีสุดา หาญภาคภูมิ
(Mrs. Srisuda Hanphakphoom)
- 2) ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
- 3) สถานที่ทำงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
295 ถนนราชสีมา แขวงดุสิต เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร 10300
- 4) ประวัติการศึกษา วท.บ.(สัตวศาสตร์)สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล (บางพระ)
วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ปร.ด. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 5) สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ: จุลชีววิทยาทางอาหาร เอนไซม์เทคโนโลยี จุลินทรีย์และปรสิตวิทยา
ทางการแพทย์ จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม เทคนิคทางพันธุศาสตร์
- 6) ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและนอกประเทศผลงานวิจัย
 - 6.1) ผู้ร่วมวิจัย: เรื่อง การผลิตไวน์ปีทูท
: เรื่องการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางผิวหนัง(ทุนสกอ.)
 - 6.2) หัวหน้าโครงการ: เรื่อง การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมืองและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินในเค็มหมักก้นดจากผลิตภัณฑ์สินค้าโอท็อป
 - 6.3) หัวหน้าโครงการ: เรื่อง การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ(ทุนวช. 2556)
 - 6.4) ผู้ร่วมวิจัย: เรื่องฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ต้ายแบคทีเรีย และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากพืชทสวรรณ (Clerodendrum) (ทุน วช. 2557)
 - 6.5) ผู้ร่วมวิจัย: เรื่อง การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายPLLA โดยเชื้อ *Laceyella sacchari* LP175 ด้วยการหมักแบบแห้ง (ทุน วช. 2558)

การเสนอผลงาน

- 1) Hanphankphoom, S., Maneewong N., Sukkhum S., Tokuyama and Kitpreechavanich, V. 2010. Purification and characteristics of PLA-degrading enzyme produced from *Laceyella sacchari* LP175. 19-21 Nov. 2010. p. 56. The 2nd Joint Seminar in Asian Core Program Khon Kaen, Thailand.

2) Hanphankphoom, S., Maneewong N., Suriyachagkun C., Tokuyama and Kitpreechavanich, V. 2012. Screening poly(L-lactide)-degrading thermophilic bacteria, enzyme production and characterization. 4-6 Oct 2012. International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology. Poster on 3rd October 2012 at Kosa Hotel, Khon Kean, Thailand.

3) Hanphankphoom, S., Maneewong N., Suriyachagkun C. Kitpreechavanich, V. 2012. Screening of poly(L-lactide)-degrading thermophilic bacteria, enzyme production and characterization. Aug 24, 2012. P24. RGJ Seminar Series LXXXVIII Microbial Resources: Their Biodiversity and Utilization. Kasetsart University, Thailand.

4.) Hanphankphoom, S., Maneewong N., Sukkhum S., Tokuyama and Kitpreechavanich, V.2013. Poly(L-lactide)-degrading thermophilic bacteria: screening and optimum conditions for PLA-degrading enzyme production. March 28-29, 2013. I-KUSTARS The International Kasetsart University Science and Technology Annual Research Symposium with the Theme Science Frontier Toward ASEAN. Oral presentation.

ประสบการณ์ทำวิจัย:

1) ปี 2550: ทำวิจัยที่ Hiroshima Kokusai Gakuin University เป็นเวลา 2 เดือน ภายใต้ทุน JSPS-NRCT “Thermotolerant photosynthetic bacteria for the photosynthetic bacteria for lipopolysaccharide (LPS) production” Research collaboration under JSPS-NRCT Scientific Cooperation, August 01 to September 14, 2006 at Hiroshima Kokusai Gakuin University

2) ปี 2553: ทำวิจัยที่ Shizuoka University เป็นเวลา 3 เดือน ภายใต้ทุน JENESYS “Purification and characteristics of PLA-degrading enzyme” Research collaboration under JENESYS program under Dr. Shinji TOKUYAMA Shizuoka University, Japan, 12 May -9 Aug, 2010

ตีพิมพ์:

1. Hanphakphoom S., N. Maneewong, S. Sukhumaporn, S. Tokuyama and V. Kitpreechavanich. 2014. Characterization of poly (L-lactide)-degrading enzyme produced by thermophilic filamentous bacteria *Laceyella sacchari* LP175. J. Gen. Appl. Microbiol. 60 (1):13-22.

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวปิยาภรณ์ วรานุสันติกุล
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Piyaporn Waranusantigul
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-8099-00258-689
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อดีสะดวก คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต โทรศัพท์: 089-4505409 โทรสาร: 024239419 E-mail: wpiyaporn@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา
 - พ.ศ. 2539 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาธารณสุขศาสตร์) คณะสาธารณสุขศาสตร์ ม.มหิดล
 - พ.ศ. 2544 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยาสภาวะแวดล้อม) คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล
 - พ.ศ. 2552 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล (ทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 7)
6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)
Phytoremediation
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
 - 7.1 ผลงานตีพิมพ์วารสารต่างประเทศ
 - Waranusantigul P, Pokethitoyook P, Kruatrachue M, Upatham E.S. 2003. Kinetics of basic dye (methylene blue) biosorption by giant duckweed (*Spirodela polyrrhiza*). *Environmental Pollution* 125 (3), pp. 385-392.
 - Waranusantigul P, Kruatrachue M, Pokethitoyook P, Auesukaree C. 2008. Evaluation of Pb phytoremediation potential in *Buddleja asiatica* and *B. paniculata*. *Water, Air, and Soil Pollution* 193 (1-4), pp. 79-90. (ทุน The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, the Thailand Research Fund and in part by The Center on Environmental Health, Toxicity and Management of Toxic Chemicals under Science &

Technology Postgraduate Education and Research Development Office (PERDO) of the Ministry of Education)

- Waranusantigul P, Lee H, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Auesukaree C. 2011. **Isolation and characterization of lead-tolerant *Ochrobactrum intermedium* and its role in enhancing lead accumulation by *Eucalyptus camaldulensis***. *Chemosphere In Press, Corrected Proof*, Available online 20 July 2011

7.2 นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

- **Characterization of lead-tolerant rhizobacteria from *Buddleja asiatica* collected from the Bo Ngam lead mine in Thailand** งานประชุม Society for Industrial Microbiology Annual Meeting-2009 (รางวัล Outstanding Student Poster Presentation สาขา Environmental Microbiology)