

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ
ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์และพืชเจ้าบ้าน (บัวหลวง)
Antimicrobial and Antioxidant Activities of Extracts from
Fungal Endophytes and their Host Plant
(*Nelumbo nucifera*)

พฤทธิกร ศุภพล*

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง
ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110

สิตา ปรีดานนท์

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค)
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

วรรณฤดี หิรัญรัตน์ และอัสภาวุธ หิรัญรัตน์

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง
ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110

Preuttiorn Supaphon*

Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung Campus,
Ban Phrao, Pa Payom, Phatthalung 93110

Sita Preedanon

National Center for Genetic and Engineering and Biotechnology (BIOTEC),
Klong Nueng, Klong Luang, Pathum Thani 12120

Wanrudee Hiranrat and Asadawut Hiranrat

Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung Campus,
Ban Phrao, Pa Payom, Phatthalung 93110

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์และพืชเจ้าบ้าน (บัวหลวง) แยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 31 ไอโซเลท จากชิ้นตัวอย่าง 480 ชิ้น นำราเอนโดไฟท์ทั้งหมดไปเลี้ยงในอาหารเหลว PDB จากนั้นสกัดสารจากราเอนโดไฟท์และพืช (กลีบดอกและใบ) ด้วยเอทิลอะซิเตท และเมทานอล นำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์จำนวน 93 สาร และสารสกัดจากบัวหลวงจำนวน 4 สาร มา

ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี colorimetric broth microdilution และ DPPH free radical scavenging ตามลำดับ พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์มีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดจากบัวหลวง โดยสารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (CE) ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท FL020 (*Curvularia geniculata*) สามารถยับยั้ง MRSA และ *S. aureus* ได้ดีที่สุดให้ค่า MIC เท่ากับ 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเส้นใยที่สกัดด้วยเมทานอล (CM) จากราเอนโดไฟท์ ไอโซเลท FL014 (*Curvularia* sp.) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาที่ยืนยันว่าราเอนโดไฟท์จากบัวหลวงเป็นแหล่งของสารเมทาโบไลต์ทุติยภูมิที่มีศักยภาพ

คำสำคัญ : ราเอนโดไฟท์; บัวหลวง; ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

This research aims to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from endophytic fungi and their host plant (*Nelumbo nucifera*). A total of 31 fungal isolates were obtained from 480 segments. All fungal isolates were cultured into potato dextrose broth. Fungal endophytes and plant (petal and leaf) were extracted with ethyl acetate and methanol. Ninety-three extracts from fungal endophyte and four extracts from *N. nucifera* were determined for their antimicrobial and antioxidant activities by using a colorimetric broth microdilution and DPPH free radical scavenging assay, respectively. The results showed that fungal endophyte extracts are more effective than plant extracts. Cell ethyl acetate extract (CE) obtained from the fungal isolate FL020 (*Curvularia geniculata*) was the most active extract against MRSA and *S. aureus* at MIC 4 and 8 $\mu\text{g/ml}$, respectively. On the other hand, cell methanol extract (CM) from fungal isolate FL014 (*Curvularia* sp.) had the strongest antioxidant activity with IC_{50} 0.02 mg/ml. This study confirmed that endophytic fungi investigated from *N. nucifera* could be a potential source of active secondary metabolites.

Keywords: endophytic fungi; *Nelumbo nucifera*; antimicrobial activity; antioxidant activity

1. บทนำ

ประเทศไทยอุดมไปด้วยทรัพยากรทางธรรมชาติ คนไทยเรียนรู้และมีประสบการณ์ในการนำทรัพยากรเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดยเฉพาะการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรค สมุนไพรมีกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ ปัจจุบันมีการศึกษาพืชสมุนไพรกันอย่างกว้างขวางทั้ง

ในและต่างประเทศ เนื่องจากสารพฤกษเคมีในสมุนไพรมีฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรค สมุนไพรไทยมากกว่า 700 สปีชีส์ ที่นำมาใช้ในการรักษา แต่การพัฒนาสมุนไพรเหล่านี้ไปเป็นยารักษาโรคยังประสบปัญหาหลายประการด้วยกัน ตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง (สถานที่และฤดูกาลในการเก็บ) ตลอดจนถึงการเตรียมพืชเพื่อใช้ในการรักษา และการ

นำไปใช้กับผู้ป่วย โดยพบว่าปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อความคงตัว คุณภาพและองค์ประกอบของสารเคมีในพืช [1] จากปัญหาดังกล่าวนักวิจัยและหน่วยงานต่าง ๆ จึงพยายามหาแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ เพื่อเพิ่มโอกาสในการเจอสารที่มีศักยภาพมากขึ้นและแก้ไขปัญหาคาปนพิษในสมุนไพรมาใช้โดยตรง โดยแหล่งของสารออกฤทธิ์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วและนอกจากนี้พบว่าจุลินทรีย์มีศักยภาพในการผลิตสารพิษทุติยภูมิหลายชนิดเหมือนพืชการศึกษาก่อนหน้านี้พบสารเมตาบอไลต์ไม่ต่ำกว่า 200,000 สารจากธรรมชาติ โดย 20,000 สาร ได้จากจุลินทรีย์โดยเฉพาะราประมาณ 15,000 สาร [2] ราเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่พบได้จากตัวอย่างบนบกและแหล่งน้ำ ซึ่งมีความหลากหลายและมีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศวิทยา นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในด้านอุตสาหกรรม การแพทย์ และการเกษตร ประมาณการว่ามีราทั้งหมดประมาณ 1.5-5.1 ล้าน สปีชีส์ แต่มีการศึกษาแล้วเพียง 100,000 สปีชีส์ รากลุ่มหนึ่งที่เจริญร่วมกับพืช คือ ราเอนโดไฟท์ เป็นราที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชในช่วงเวลาหนึ่งและไม่ทำให้พืชเกิดโรคหรือแสดงอาการของโรค นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์ยังช่วยให้พืชทนต่อความแห้งแล้ง ทนต่อแมลงและศัตรูพืชต่าง ๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช [3] โดยมีการสำรวจความหลากหลายของราเอนโดไฟท์จากพืชและสารเมตาบอไลต์จากราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและจุลินทรีย์ก่อโรคมมากขึ้น [4-5] อย่างไรก็ตาม การค้นพบสารที่มีศักยภาพดังกล่าวจากราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาจากพืชบก [6-8] แต่สัดส่วนการศึกษาราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชน้ำยังมีไม่มากนัก โดยในการศึกษานี้สนใจศึกษาศักยภาพของราเอนโดไฟท์และบัวหลวงเนื่องจากบัวหลวงมีกระจายอยู่จำนวนมาก

และบัวเป็นพืชน้ำที่มีประโยชน์หลายด้านทั้งใช้เป็นอาหารและยารักษาโรค มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากบัวหลวงในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญของบัวหลวง [9-10] แต่ยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจากบัวหลวงและของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากบัวหลวงมาก่อน ซึ่งผลการศึกษาช่วยเพิ่มแหล่งทางเลือกของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและชี้ให้เห็นศักยภาพของสารเมตาบอไลต์ที่ได้จากพืชและราเอนโดไฟท์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบและดอกของบัวหลวงเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบและดอกของบัวหลวง (พืชเจ้าบ้าน)

3. วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1. การเก็บตัวอย่าง

โดยเก็บตัวอย่างบัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) แบบสุ่มในพื้นที่จังหวัดพัทลุง จำนวน 60 ต้น ในเดือนพฤษภาคม นำตัวอย่างมาล้างทำความสะอาด และวางให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน คือ กลีบดอกและใบ โดยตัวอย่างจำนวน 30 ต้น นำมาเตรียมสำหรับสกัดสารด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และอีก 30 ต้น นำมาแยกราเอนโดไฟท์

3.2. การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารจากบัวหลวง

นำส่วนกลีบดอกและใบของบัวหลวง ตัดให้เป็นชิ้นขนาดเล็กและนำอบในตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น นำตัวอย่างแต่ละส่วนมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (เอทิลอะซิเตตและเมทานอล) อัตราส่วน

ของตัวอย่างต่อตัวทำลาย คือ 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แช่ตัวอย่างด้วยตัวทำลายวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองแยกส่วนของตัวทำลายและตัวอย่างออกจากกัน นำส่วนของตัวทำลายมาด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดยาทั้งหมด 4 สาร จากกลีบดอกที่สกัดด้วยเมทานอล (petal methanol, PM) กลีบดอกที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (petal ethyl acetate, PE) ใบที่สกัดด้วยเมทานอล (leaf methanol, LM) และใบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (leaf ethyl acetate, LE) เตรียมส่วนสกัดยาด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บส่วนสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3. การแยกและสกัดสารจากราเอนโดไฟท์

นำกลีบดอกและใบของบัวหลวงมาทำความสะอาดพื้นผิวด้วยชุดของสารละลายเอทานอลและโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (เอทานอล ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ 3 นาที โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที เอทานอล ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ 3 นาที และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 30 วินาที) ตัดตัวอย่างให้มีขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร โดยใช้จำนวนชิ้นตัวอย่าง 16 ชิ้น (8 ชิ้น จากดอก และ 8 ชิ้น จากใบ) ต่อบัวหลวง 1 ต้น จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างไปวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ (penicillin และ streptomycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตและแยกราเอนโดไฟท์ทุกวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (hyphal tip isolation) ลงในอาหาร PDA ที่ไม่ผสมยาปฏิชีวนะจนได้เชื้อบริสุทธิ์ วิเคราะห์อัตราการแยกราเอนโดไฟท์

จากส่วนใบและกลีบดอกของบัวหลวง โดยหาค่าเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อจากสูตรเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อ = $(\text{จำนวนเชื้อที่แยกได้} \div \text{จำนวนชิ้นตัวอย่างทั้งหมด}) \times 100$

นำราเอนโดไฟท์ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ ต่อรา 1 ไอโซเลท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นกรองแยกเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกัน โดยเส้นใยสกัดด้วยเมทานอล ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำลายอินทรีย์ 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำสารส่วนนี้มาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำลายอินทรีย์ 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต-แอนไฮดรัส (Na_2SO_4) และทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดยา 2 ส่วน คือ เซลล์ที่สกัดด้วยเมทานอล (cell methanol, CM) และเซลล์ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (cell ethyl acetate, CE) ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อถูกสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท จำนวน 3 ครั้ง เติมโซเดียมซัลเฟต-แอนไฮดรัสและทำให้แห้งวิธีเดียวกันกับการสกัด CM และ CE จะได้สารสกัดน้ำเลี้ยงราที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (broth ethyl acetate, BE) เตรียมส่วนสกัดยาด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ส่วนสกัดความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บส่วนสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัด

ได้รับความอนุเคราะห์จุลินทรีย์ทดสอบจำนวน 8 สายพันธุ์ จากห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก [*Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ clinical isolate of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1] แบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) และ ยีสต์ (*Candida albicans* ATCC90028, *C. albicans* NCPF3153, *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 และ *C. neoformans* ATCC900113)

3.4.1 การเตรียมจุลินทรีย์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัด

แบคทีเรีย : เชื้อแบคทีเรีย 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร nutrient broth (NB) และเขย่าที่ตุ้มบ่มเชื้อความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ปราศจากเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland standard (เชื้อประมาณ 1.5×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) และเจือจางเชื้อด้วยอาหาร Mueller-Hinton broth (MHB) ในอัตราส่วน 1:200 (เชื้อประมาณ 1.5×10^6 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร)

ยีสต์ : เชื้อยีสต์ 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร Sabouraud's dextrose broth (SDB) และเขย่าที่ตุ้มบ่มเชื้อความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง สำหรับ *C. albicans* และที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans* จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ปราศจากเชื้อให้ได้ 2 McFarland standard (เชื้อประมาณ 6.0×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1:20 ด้วยอาหาร SDB (เชื้อประมาณ 6.0×10^6 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร)

3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับจุลินทรีย์ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution ในจานทดสอบแบบ 96 หลุม (96 well plate) ดัดแปลงตามวิธีของ Supaphon และคณะ (2013) [11] นำสารสกัดยับยั้งที่เตรียมไว้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหาร MHB และ SDB สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ หยดสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในจานทดสอบ จำนวน 3 หลุม และหยดเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับยีสต์ *C. neoformans* หยดสีรีซาซูลิน (resazurin) ที่เจือจาง (1:10) ลงในหลุมทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของสีเท่ากับ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นำจานทดสอบไปบ่มต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และยีสต์ (*C. albicans*) ส่วน *C. neoformans* นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยสังเกตสีของรีซาซูลิน หากสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อได้จะยังคงเห็นสีของรีซาซูลินเป็นสีน้ำเงิน หากสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้สีของรีซาซูลินจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูของรีโซรูฟีน (resorufin) หรือไฮโดรรีโซรูฟีน (hydroresorufin) ไม่มีสีจากนั้นนำสารสกัดที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบและหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (MICs) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ (MBCs หรือ MFCs) ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสาร

สกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมสารสกัดหยาบในจานทดสอบให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 128-0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และระบุค่า MIC โดยสังเกตผลของสีรีซาชูริน เช่นเดียวกับการทดสอบก่อนหน้า จากนั้นแยกเชื้อจากหลุมทดสอบที่ให้ผลการยับยั้งทุกหลุมในจานทดสอบ (สีน้ำเงิน) ลงบนอาหาร NA สำหรับแบคทีเรีย และ SDA สำหรับยีสต์โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้จะถูกบันทึกเป็นค่า MBC หรือ MFC สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ สำหรับชุดควบคุมเชิงบวกใช้ยาแวนโคไมซิน (vancomycin) สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก และเจนตามัยซิน (gentamicin) สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ และแอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) สำหรับยีสต์ และใช้ DMSO เป็นชุดควบคุมเชิงลบ

3.5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ 2,2-ไดพีนิล-1-พิกิลไฮดราซิลไฮเดรต (DPPH) เบื้องต้นที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในจานทดสอบแบบ 96 หลุม ดัดแปลงตามวิธีของ Premianu และ Jaynthy (2014) [12] โดยเติมสารสกัดหยาบปริมาตร 25 ไมโครลิตร สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ดังนี้ เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ = $[(A_0 - A_1) \div A_0] \times 100$ เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่มีสารสกัด และ A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่มีสารสกัด จากนั้นนำสารสกัดที่ให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่า 50 % มาหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่

สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (inhibitory concentration, IC_{50}) ในช่วงความเข้มข้น (10-0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

3.6 การจัดจำแนกราเอนโดไฟต์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

3.6.1 การสกัดดีเอ็นเอ

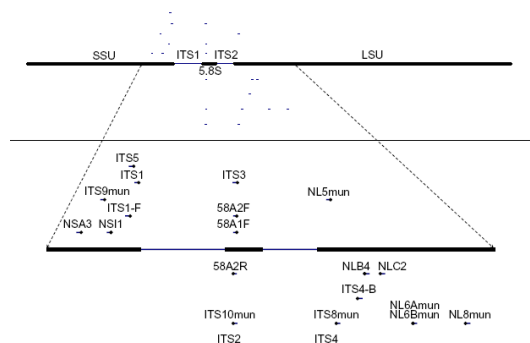
เลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระในอาหาร PDB ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรองแยกเส้นใยและล้างเส้นใยด้วยน้ำอุ่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำเส้นใยเก็บในโถงบดยาปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ดัดแปลงตามวิธีของ O' Donnell และคณะ (1997) [13] นำเส้นใยที่มีน้ำหนัก 50-100 มิลลิกรัม มาบดในโถงบดยาด้วยทรายซิลิกา (silica sand) จากนั้นนำเส้นใยที่บดแล้วใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติม 500 มิลลิลิตร ของซีแทบ ไลซิสบัฟเฟอร์ (CTAB lysis buffer) [ประกอบด้วย 100 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl), 1.4 โมลาร์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaCl), 25 มิลลิโมลาร์ของเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (EDTA) และซีทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์] นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าหลอดไปมาทุก 10 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาทีที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนลงในหลอดใหม่ และเติมฟีนอล:คลอโร-ฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol: chloroform: isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 25:24:1 เขย่าหลอดไปมาเบา ๆ และเติม 7.5 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตท (ammonium acetate) และเอทานอล ปริมาตร 650 ไมโครลิตรนำหลอดไปบ่มที่

-20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ตูด่วนใส่ถัง และล้างตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ วางไว้ให้แห้งและละลายใน 50 ไมโคร ลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยเจลอิลีกโทรโฟริซิสแบบอะกาโรส ในบัฟเฟอร์ที่อีเอ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่กำลังไฟ 100 โวลต์เป็นเวลา 30-40 นาที ย้อมเจลดด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.6.2 การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่และการอ่านลำดับเบส

บริเวณที่ใช้ศึกษาและจัดจำแนกกรา คือ ITS (internal transcribed spacer) ดัง รูปที่ 1 เนื่องจากสามารถจัดจำแนกได้ในระดับจีโนมและสปีชีส์ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ ประกอบด้วย ITS1F/ITS4 (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA / TCCTCCGCTTATTGATATGC) ITS5/ITS4 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG / TCCTCCGCTTATTGATATGC) ITS3/ITS4 (GCATCGATGAAGAACGCAGC / TCCTCCGCTTATTGATATGC) ITS1/ITS4 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG / TCCTCCGCTTATTGATATGC) โดยส่วนผสมและปริมาตรของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำนาโนเพียว (nanopure water) 38 ไมโครลิตร, 50 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 2.5 ไมโครลิตร, บัฟเฟอร์พีซีอาร์ความเข้มข้น 10 เท่า (10x PCR buffer) 2.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ ดีเอ็นทีพี (dNTPs) 1.0 ไมโครลิตร, 10 ไมโครโมล ฟอว์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) 1.0 ไมโครลิตร, 10 ไมโครโมล รีเวิร์ดไพรเมอร์ (reverse primer) 1.0

ไมโครลิตร, 2 หน่วยต่อไมโครลิตร แท็คติเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (*Taq* DNA polymerase) 0.5 ไมโครลิตร และ ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) น้ำหนัก 100-500 นาโนกรัม 1.0 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่องของ Bio-Rad MyCycler (Bio-Rad, Hercules, CA) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) โดยเจลอิลีกโทรโฟริซิสแบบอะกาโรส ในบัฟเฟอร์ที่อีเอความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่กำลังไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที ย้อมเจลดด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดปฏิบัติการสำเร็จรูป (QIAquick PCR purification Kits) ก่อนส่งอ่านลำดับเบสโดยบริษัท Macrogen, a Korean biotechnology ประเทศเกาหลี



รูปที่ 1 แผนที่ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอและไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS [14]

3.5.3 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยวิธีmaximum parsimony, maximum-likelihood และ Bayesian inference

ลำดับเบสของดีเอ็นเอแต่ละเส้นจะถูกตรวจสอบคุณภาพโดยโปรแกรม BioEdit 7.0.7 [15] จากนั้นนำลำดับเบสแต่ละเส้นไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTN เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสใน

ฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) คัดเลือกลำดับเบสที่ให้ค่าความเหมือนกับลำดับเบสของราตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW [16] สร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) โปรแกรม PAUP* 4.0b10 [17] โดยกำหนดค่าบูทสแตรปเท่ากับ 1000 และกำหนดค่า Kishino-Hasegawa (KH) tests [18] และหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพื่อเป็นค่าความเชื่อมั่นที่ใช้ในการอ่านผลและการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ การวิเคราะห์ phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี MP กำหนดให้ค่านวนค่าทางสถิติต่าง ๆ ประกอบด้วย tree length consistency index (CI) retention index (RI) relative consistency index (RC) และ homoplasy index (HI) และค่าความเชื่อมั่นบูทสแตรป ตามลำดับ และเลือก MPTs (most parsimonious trees) ที่แสดงโทโพโลยี (topology) ที่ดีที่สุดด้วยวิธีทางสถิติ K-H tests โดยพิจารณาที่ค่าบูทสแตรป ซึ่งมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์จากนั้นวิเคราะห์ phylogenetic tree ร่วมกับวิธี ML และ BI โดยวิธี ML วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม RAxML 8.2.4 [19] วิธี Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) ใช้โมเดล (GTR) และพิจารณาค่าบูทสแตรป ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.95 สำหรับวิธี BI วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MrModeltest 2.2 [20] วิธี Markov chain Monte Carlo (MCMC) โมเดล (GTR+I+G) พิจารณาค่าบูทสแตรปที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.95 นอกจากนี้ยังพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกกราเอนโดไฟท์จากบัวหลวง

การคัดแยกกราเอนโดไฟท์จากกลีบดอกและใบของบัวหลวง ได้ราทั้งหมด 31 ไอโซเลท จากจำนวน

ขึ้นตัวอย่างทั้งหมด 480 ขึ้น (15 ไอโซเลท จากกลีบดอก 240 ขึ้น และ 16 ไอโซเลท จากใบ 240 ขึ้น) พบว่าเปอร์เซ็นต์การแยกกราเอนโดไฟท์ได้จากกลีบดอกและใบไม่มีความแตกต่างกัน มีค่าอัตราการแยกกราเอนโดไฟท์ได้ในช่วง 6.25-6.67 เปอร์เซ็นต์

4.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ

4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

นำสารสกัดทั้งหมดจำนวน 97 สาร จากราเอนโดไฟท์ 93 สาร (CM, CE และ BE อย่างละ 31 สาร) และจากบัวหลวง 4 สาร (PM, PELM และ LE อย่างละ 1 สาร) มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากบัวหลวงไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว ขณะที่สารสกัดจำนวน 12 สาร จากราเอนโดไฟท์ 4 ไอโซเลท ที่แยกได้จากใบของบัวหลวงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่มีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งและฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบพบว่าสารสกัด CE จากราเอนโดไฟท์ ไอโซเลท FL020 สามารถยับยั้ง MRSA และ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมา คือ สารสกัด CE จากราเอนโดไฟท์ 2 ไอโซเลท คือ FL033 และ FL048 มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* และ *C. neoformans* ATCC90112 ให้ค่า MIC เท่ากับ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดที่เหลือ (8 สาร) ให้ค่าการยับยั้งจุลินทรีย์ในช่วง 32-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1)

4.2.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

นำสารสกัดจากราเอนโดไฟท์และบัวหลวงมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสาร

สกัดทั้ง 4 สาร ได้แก่ PM, PELM และ LE (กลีบดอก และใบที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทิลอะซิเตท) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้ค่า IC_{50} ในช่วง 0.59-0.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดจากราเอนโดไฟท์จำนวน 7 สาร (จากราเอนโดไฟท์ 6 ไอโซเลท) สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ค่า IC_{50} ในช่วง 0.02-0.65

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด CM จากราเอนโดไฟท์ ไอโซเลท FL014, FL 020 และ FL033 มีศักยภาพสูงสุดในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.02, 0.04 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 สารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งและฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

รหัส	สารสกัด	MIC/MBC หรือ MFC (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)							
		แบคทีเรีย				ยีสต์			
		แกรมบวก		แกรมลบ					
		SA	MRSA	EC	PA	CA28	CA53	CN12	CN13
FL014	CM	-	-	-	-	-	-	-	-
	CE	32/>128	128/>128	-	-	-	-	-	-
	BE	-	-	-	-	-	-	-	-
FL020	CM	64/>128	128/>128	-	-	128/>128	128/>128	-	-
	CE	8/128	4/128	-	-	128/>128	128/>128	-	-
	BE	32/>128	32/>128	-	-	-	-	-	-
FL033	CM	-	-	-	-	-	-	-	-
	CE	16/>128	32/>128	-	-	-	-	128/>128	128/>128
	BE	-	-	-	-	-	-	-	-
FL048	CM	-	-	-	-	-	-	-	-
	CE	128/>128	-	-	-	-	-	16/128	-
	BE	-	-	-	-	-	-	-	-
ยาปฏิชีวนะ									
แวนโคมัยซิน		0.5/1	0.5/1						
เจนตามัยซิน				0.5/1	0.5/1				
แอมโฟเทอริซิน บี						0.5/1	0.5/1	0.5/1	0.5/2

MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร; MBC หรือ MFC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียและยีสต์ในช่วงความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร; SA คือ *Staphylococcus aureus* ATCC25923; MRSA คือ clinical isolate methicillin-resistant *S. aureus* SK1; EC คือ *Escherichia coli* ATCC25922; PA คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; CA1 คือ *Candida albicans* ATCC90028; CA2 คือ *C. albicans* NCPF; CA3 คือ *C. albicans* 3153; CN12 คือ *Cryptococcus neoformans* ATCC90112; CN13 คือ *C. neoformans* ATCC90113; CM คือ สารสกัดจากเซลล์ที่สกัดด้วยเมทานอล; CE คือ สารสกัดจากเซลล์ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท; BE คือ สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์และบัวหลวง

ราเอนโดไฟท์	IC ₅₀ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	เมทานอล	เอทิลอะซิเตท	
	เส้นใย	เส้นใย	น้ำเลี้ยงเชื้อ
FL014	0.02(CM)	-	-
FS016	0.5 (CM)	-	-
FL020	0.04(CM)	-	-
FP023	0.5(CM)	-	-
FL027	0.65(CM)	-	-
FL033	0.25(CM)	-	-
บัวหลวง	เมทานอล	เอทิลอะซิเตท	
ใบ	0.59 (LM)	0.63 (LE)	
ดอก	0.65 (PM)	0.61 (PE)	
กรดแอสคอร์บิก	0.005		

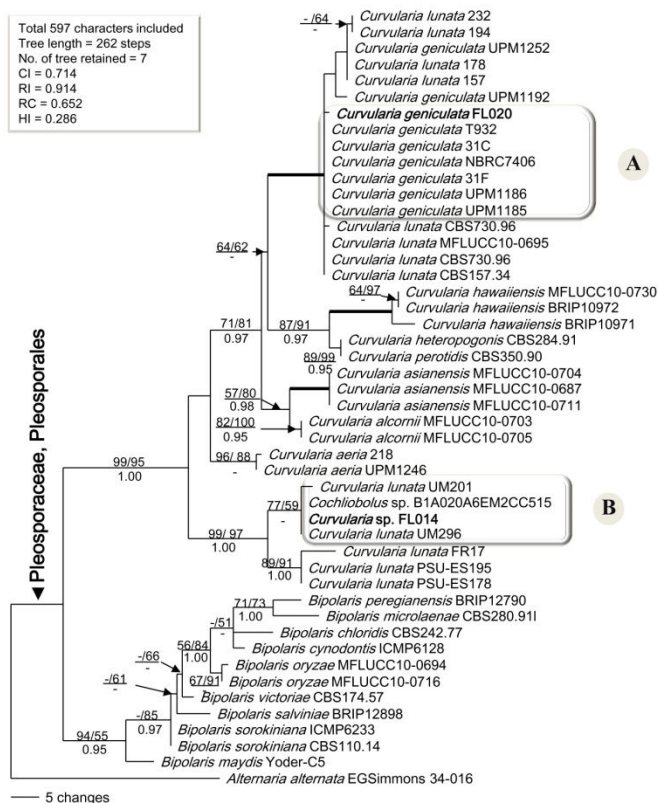
4.3 การการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ 4 ไอโซเลท ได้แก่ FL014, FL020, FL033 และ FL048 มีศักยภาพดีที่สุดในการทดสอบฤทธิ์ข้างต้น ดังนั้นจึงจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลและสร้าง phylogenetic tree โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ ร่วมกัน ได้แก่ maximum parsimony (MP), maximum-likelihood (ML) และ Bayesian inference (BI) ผลการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟท์ทั้ง 4 ไอโซเลท จัดจำแนกอยู่ใน 3 คลาสของไฟลัมแอสโคไมโคตา ได้แก่ Sordariomycetes (1 ไอโซเลท) Eurotiomycetes (1 ไอโซเลท) และ Dothideomycetes (2 ไอโซเลท) โดยราเอนโดไฟท์ 2 ไอโซเลท (FL014 และ FL020) มีความสัมพันธ์กับสมาชิกในคลาส Dothideomycetes อันดับ Pleosporales และแฟมมิลี Pleosporaceae โดยราไอโซเลท FL014 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับราในจีนัส *Curvularia* ในซับเคลด B โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.5-100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเชื่อมั่นบูทสตราปของ MP และ ML เท่ากับ ร้อยละ 77 และ 59 ตามลำดับ และค่าความน่าจะเป็นของ BI น้อยกว่า 0.95 ดังนั้นจึงจัดจำแนกราไอโซเลท FL014 เป็น *Curvularia* sp. และราไอโซเลท FL020 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับราในซับเคลด A โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.8 เปอร์เซ็นต์ กับ *Curvularia geniculata* ดังนั้นจึงจัดจำแนกราไอโซเลท FL020 ได้เป็น *Curvularia geniculata* (รูปที่ 2) ส่วนไอโซเลท FL033 อยู่ในคลาส Sordariomycetes อันดับ Hypocreales มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสมาชิกในแฟมมิลี Nectriaceae ซึ่งรา FL033 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับราในจีนัส *Fusarium* ที่ความเชื่อมั่นบูทสตราปของ MP และ ML เท่ากับ ร้อยละ 58 และ 79 ตามลำดับ และค่าความน่าจะเป็นของ BI น้อยกว่า 0.95 ดังนั้นจึงจัดจำแนกรา FL033 เป็น *Fusarium verticillioides* (เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์) (รูปที่ 3) และ ไอโซเลท FL048 มีความสัมพันธ์กับสมาชิกในคลาส Eurotiomycetes อันดับ Eurotiales แฟมมิลี Trichocomaceae โดยไอโซเลท FL048 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับจีนัส *Penicillium* ที่ความเชื่อมั่นบูทสตราปของ MP และ ML เท่ากับ ร้อยละ 62 และ 65 ตามลำดับ และค่าความน่าจะเป็นของ BI น้อยกว่า 0.95 ดังนั้นจึงจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ FL048 เป็น *Penicillium sclerotiorum* (เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์) (รูปที่ 4)

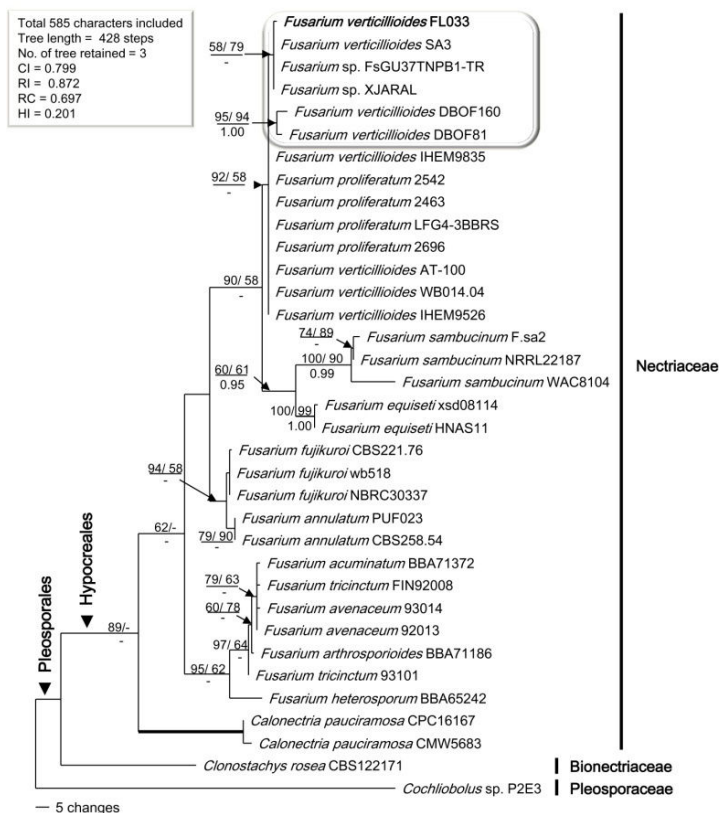
เนื่องจากปัญหาการรักษามะเร็งในปัจจุบันทั้งปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรค ปัญหาผลข้างเคียงของการรักษา [21-22] ดังนั้นนักวิจัยจึงสนใจศึกษาศักยภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

โดยเฉพาะจุลินทรีย์และพืชสมุนไพรเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ และใช้เป็นแหล่งทางเลือกของการศึกษาในอนาคต พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชและสารสกัดจากพืชมีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและต้านอนุมูลอิสระได้ดี การศึกษานี้จึงสนใจศึกษาบัวหลวงและราเอนโดไฟท์จากบัวหลวงเนื่องจากบัวหลวงเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพและสรรพคุณในการรักษาโรค [10] และยังไม่พบการเปรียบเทียบศักยภาพของสารสกัดจากบัวหลวงและราเอนโดไฟท์จากบัวหลวงมาก่อน โดยราเอนโดไฟท์และพืชเจ้าบ้านมีความสัมพันธ์ค่อนข้างซับซ้อน อยู่ร่วมกันในรูปแบบต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ [21] จากผลการแยก

เอนโดไฟท์จากกลีบดอกและใบของบัวหลวงสามารถแยกได้ทั้งหมด 31 ไอโซเลท จากกลีบดอกจำนวน 15 ไอโซเลท และใบ 16 ไอโซเลท โดยอัตราการแยกเอนโดไฟท์จากกลีบดอกและใบของบัวหลวงมีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 6.25-6.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจำนวนเชื้อและการกระจายของราเอนโดไฟท์ในส่วนต่าง ๆ ของพืช อาจมาจากหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น สถานที่เก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ อายุของพืช ฤดูกาล และสารอาหารที่มีอยู่ในแต่ละส่วนของพืช [23] นอกจากนี้สารละลายที่ใช้ทำความสะอาดผิวใบก็มีผลต่ออัตราการแยกเชื้อ เนื่องจากพืชแต่ละส่วนมีลักษณะทางสรีรวิทยาแตกต่างกัน [11]



รูปที่ 2 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) บริเวณ ITS ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท FL020 และ FL014 ที่แยกได้จากบัวหลวง โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony (MP), maximum-likelihood (ML) และ Bayesian inference (BI)

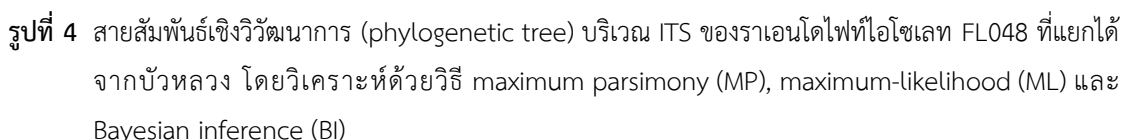


รูปที่ 3 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) บริเวณ ITS ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท FL033 ที่แยกได้จากบัวหลวง โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony (MP), maximum-likelihood (ML) และ Bayesian inference (BI)

ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ 93 สาร และสารสกัดจากบัวหลวง 4 สาร ในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี colorimetric broth microdilution และ DPPH free radical scavenging พบว่าสารสกัดจากบัวหลวงไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารสกัดทั้ง 4 สาร ของบัวหลวงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ค่า IC_{50} ในช่วง 0.59-0.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดจากใบของบัวหลวงที่สกัดด้วยเมทานอล (LM) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดให้ค่า IC_{50} 0.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Arjun และคณะ (2012) [24] รายงานศักยภาพ

ของสารสกัดจากใบของบัวหลวงที่สกัดด้วย เฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล ในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี ให้ค่า IC_{50} ในช่วง 0.23-0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* MTCC98 และ *Bacillus subtilis* MTCC441) แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* MTCC1687 และ *Proteus mirabilis* MTCC 3310) และยีสต์ (*C. albicans* MTCC3310) ที่ค่าความเข้มข้นในช่วง 50-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Ming-Zhi และคณะ (2015) [25] ศึกษาศักยภาพของสารสกัดเอทานอลจากดอกของบัวหลวงพบว่าสารสกัดมีศักยภาพใน

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยผลการศึกษา สอดคล้องกับปริมาณฟิโนลิกรวมที่พบในส่วนใบ ดอก เหน้้า และเมล็ด พบว่าในเมล็ดมีปริมาณฟิโนลิกรวมสูง ที่สุด เท่ากับ 270.90 มิลลิกรัม กรดกาแลกตอ 100 กรัม ของสารสกัด ตามด้วยสารสกัดจากใบ (252.34 มิลลิกรัม กรดกาแลกตอ 100 กรัมของสารสกัด) เหน้้า (241.01 มิลลิกรัม กรดกาแลกตอ 100 กรัมของสาร สกัด) และดอก (220.57 มิลลิกรัม กรดกาแลกตอ 100 กรัมของสารสกัด)



การศึกษานี้ยังศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากบัวหลวง ในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัด CE จากราเอนโดไฟท์ FL020 สามารถยับยั้ง MRSA และ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ให้ค่า MIC (ทดสอบในช่วงความเข้มข้นของสารสกัด 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เท่ากับ 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมา คือ สารสกัด CE จากราเอนโดไฟท์ FL033 และ FL048 มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* และ *C. neoformans* ATCC90112 เท่ากัน ให้ค่า MIC เท่ากับ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนอกจากนี้สารสกัดจากราเอนโดไฟท์ยังสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ค่า IC_{50} ในช่วง 0.02-0.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด CM จากราเอนโดไฟท์ FL014 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ FL020 (IC_{50} เท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ FL033 (IC_{50} เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ราที่มีศักยภาพในการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ สามารถจัดจำแนกโดยการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum parsimony (MP) ร่วมกับ maximum-likelihood (ML) และ Bayesian inference (BI) พบว่าราเอนโดไฟท์ไโโซเลท FL014, FL020, FL033 และ FL048 จัดจำแนกได้เป็น *Curvularia* sp., *Curvularia geniculata*, *Fusarium verticillioides* และ *Penicillium sclerotiorum* ตามลำดับ ราเอนโดไฟท์ที่พบในการศึกษานี้เคยรายงานในพืชสมุนไพรหลายชนิด และมีศักยภาพในการผลิตสารที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระได้ดี Yadav และคณะ (2014) Kharwar และคณะ (2011) [27] ศึกษาราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพร (*Adenocalymma alliaceum*) พบราในจีนัส *Curvularia*, *Fusarium* และ *Penicillium*

ผลิตสารที่มีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ (*Shigella flexnii*, *Salmonella enteritidis*, *S. paratyphi*, *Morganella morganii* และ *P. aeruginosa*) ที่ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion ให้ค่าวงใสในช่วง 6-10 มิลลิเมตร และ Bhardwaj และคณะ (2015) [28] แยกราเอนโดไฟท์จาก *Pinus roxburghii* พบว่ารา *Penicillium frequentans* ผลิตสารยับยั้ง *E. coli*, *S. Typhimurium*, *B. subtilis* และ *C. albicans* ให้ค่า MIC เท่ากับ 1.25, 2.5, 0.625 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Yadav และคณะ (2014) [29] ศึกษาสารพิษทุติยภูมิของราเอนโดไฟท์ที่แยกจาก *Eugenia jambolana* Lam. โดยตรวจพบฟีนอล ซาโปนิน และเทอร์พีน ใน *Fusarium* sp. อัลคาลอยด์ ฟีนอล เทอร์พีน และฟลาโวนอยด์ ใน *Penicillium spinulosum* พบซาโปนินและสเตอรอลใน *Curvularia lunata* โดยสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 จีนัสมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ในช่วง 39-40 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานองค์ประกอบของสารจากราเอนโดไฟท์และพืช โดยพบว่าราเอนโดไฟท์สามารถผลิตสารพิษทุติยภูมิได้หลายชนิดเช่นเดียวกับพืชเจ้าบ้าน ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอล แทนนิน และเทอร์พีน เป็นต้น [30-31] โดยสารเมตาบอไลต์เหล่านี้มีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระได้ดี [25,26] แต่ยังไม่พบรายงานศักยภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ในบัวหลวงและสารสกัดจากบัวหลวงในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระมาก่อน โดยผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากบัวหลวงและราเอนโดไฟท์ในการศึกษานี้ต่างจากการศึกษาก่อนหน้า อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัยทั้งแหล่งของตัวอย่าง ชนิดของพืช ส่วนของพืช ฤดูกาล ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดและวิธีการสกัด

เป็นต้น โดยปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อปริมาณสารเมทา-
บอไลต์และศักยภาพของสารจากราเอนโดไฟท์และพืช
[30-31] มีรายงานการศึกษาผลของตัวทำละลาย
อินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดและวิธีการสกัดสารของพืช 5
ชนิด ได้แก่ ไหม้ ขมิ้น ขิง อบเชย และกานพลู พบว่า
ตัวทำละลายอินทรีย์และวิธีการสกัดมีผลต่อ
องค์ประกอบของสารพฤกษเคมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์
และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [33-34] นอกจากนี้สายพันธุ์
ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานี้ต่างจากการศึกษาก่อน
หน้าอาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลต่อฤทธิ์ยับยั้ง
จุลินทรีย์ของสารสกัด โดยสารสกัดจากราเอนโดไฟท์
สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ
MRSA) และยีสต์ (*C. neoformans*) ได้ดี แต่ไม่มีฤทธิ์
ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบ
ของสารที่ได้จากราเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลท และ
องค์ประกอบของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก
ของแบคทีเรียแกรมลบที่มีชั้นของไขมันซึ่งอาจช่วย
ป้องกันสารเข้าสู่เซลล์ [35-37]

5. สรุป

การศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากราเอนโด-
ไฟท์และบัวหลวง (พืชเจ้าบ้าน) ในการยับยั้งจุลินทรีย์
และต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดจากบัว
หลวงไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 200
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดจากราเอนโด-
ไฟท์ที่แยกได้จากใบของบัวหลวงสามารถยับยั้ง
จุลินทรีย์ทดสอบได้ที่ระดับความเข้มข้น 200
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด CE จากราเอนโด-
ไฟท์ ไอโซเลท FL020 สามารถยับยั้ง MRSA และ
S. aureus ได้ดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 4 และ 8
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมา คือ สาร
สกัด CE จากราเอนโดไฟท์ 2 ไอโซเลท คือ FL033
และ FL048 มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* และ

C. neoformans ATCC90112 ให้ค่า MIC เท่ากับ 16
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดทั้งหมดจากรา
เอนโดไฟท์และบัวหลวงนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล
อิสระ DPPH พบว่าสารสกัดจากบัวหลวงมีฤทธิ์ต้าน
อนุมูลอิสระให้ค่า IC_{50} ในช่วง 0.59-0.65 มิลลิกรัมต่อ
มิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดจากราเอนโดไฟท์มีฤทธิ์ต้าน
อนุมูลอิสระ DPPH ให้ค่า IC_{50} ในช่วง 0.02-0.65
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด CM จากราเอนโด-
ไฟท์ ไอโซเลท FL014, FL020 และ FL033 มีศักยภาพ
สูงสุดในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ ให้ค่า IC_{50}
เท่ากับ 0.02, 0.04 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ตามลำดับ จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการ
ยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดจาก
ราเอนโดไฟท์ 4 ไอโซเลท ได้แก่ FL014, FL020,
FL033 และ FL048 มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้ง
จุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระโดยจัดจำแนกโดยการ
วิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้เป็น
Curvularia sp., *Curvularia geniculata*, *Fusarium*
verticillioides และ *Penicillium sclerotiorum* ตาม
ลำดับ จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจาก
ราเอนโดไฟท์และบัวหลวงมีศักยภาพในการผลิตสาร
ต้านจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ
โดยเฉพาะสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ซึ่งอาจใช้เป็น
แหล่งทางเลือกเพื่อทดแทนและลดปัญหาการใช้
สมุนไพรรักษาในอนาคต

6. ข้อเสนอแนะ

6.1 การศึกษานี้เก็บตัวอย่างบัวหลวง 1 ครั้ง ใน
เดือนพฤษภาคม ควรเพิ่มจำนวนหรือความถี่ของการ
เก็บตัวอย่างเพื่อเพิ่มโอกาสการเจอเชื้อที่มีศักยภาพใน
การผลิตสารที่น่าสนใจและมีประโยชน์ในการนำไปใช้
ในอนาคต

6.2 การศึกษานี้ใช้สารสกัดที่นำมาทดสอบเป็น

สารสกัดหยาบ ดังนั้นควรนำสารที่มีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระไปแยกให้บริสุทธิ์และศึกษาพิษวิทยาเคมีของสารสกัด เพื่อระบุองค์ประกอบของสารที่มีศักยภาพ

6.3 ควรเพิ่มจำนวนสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ทดสอบในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ ซึ่งอาจช่วยเพิ่มรายงานศักยภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์และบัวหลวง

7. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการวิจัยทุนรายได้มหาวิทยาลัยทักษิณ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ประเภททุนยุทธศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) ที่อำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

8. รายการอ้างอิง

- [1] Kummalue, T., 2012, Difficulties of druge development from Thai herbal medicine, Pharm. Anal. Acta. S15. (doi: 10.4172/2153-2435.S15-002)
- [2] Newman, D.J., Cragg, G.M. and Snader, K.M., 2003, Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002, J. Nat. Prod. 66: 1022-1037.
- [3] Gao, X., Zhou, H., Xu, D., Yu, C., Chen, Y. and Qu, L., 2005, High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent

approach, FEMS Microbiol. Lett. 249: 255-266.

- [4] Alva, P., McKenzie, E.H.C., Pointing, S.B., Pena-Muralla, R. and Hyde, K.D., 2002, Do sea grasses harbor endophytes: Fungi in marine environments, edited by K.D. Hyde, Fungal Diversity Res. Ser. 7: 167-178.
- [5] Aly, A.H., Debbab, A., Kier, J. and Proksch, P., 2010, Fungal endophytes from higher plants: A prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products, Fungal Divers. 41: 1-16.
- [6] Huang, Y., Wang, J., Li, G., Zheng, Z. and Su, W., 2001, Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalaxus fortunei* and *Torreya grandis*, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 31: 163-167.
- [7] Phongcharoen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S. and Sakayaroj, J., 2007, A new dihydrobenzofuran derivative from the endophytic fungus *Botryosphaeria mamane* PSU-M76, Chem. Pharm. Bull. 55: 1404-1405.
- [8] Rukachisirikul, V., Sommart, U., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J. and Kirtikara, K., 2008, Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. Phytochemistry 69: 783-787.
- [9] Kanabkaew, T. and Puetpaiboon, U., 2004, Aquatic plants for domestic wastewater treatment: Lotus (*Nelumbo nucifera*) and

- Hydrilla (*Hydrilla verticillata*) systems, Songklanakarin J. Sci. Technol. 26: 749-756.
- [10] Bhardwaj, A. and Modi, K.P., 2015, A review on therapeutic potential of *Nelumbo nucifera* (Gaertn): The sacred lotus, IJPSR. 7: 42-54.
- [11] Supaphon, P., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J., 2013, Antimicrobial potential of endophytic fungi derived from three seagrasses (*Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii*) from Thailand, PLoS ONE 8 (8): e72520. (doi: 10.1371/journal.pone.0072520).
- [12] Premianu, N. and Jaynthy, C., 2014, Antioxidant activity of endophytic fungi isolated from *Lansea coromendalica*, Int. J. Res. Pharm. Sci. 5: 304-308.
- [13] O'Donnell, K. Cigelnik, E. Weber, N.S., Trappe, J.M., 1997, Phylogenetic relationships among Ascomycetous truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis, Mycologia 89: 48-65.
- [14] Matin, K.J. and Rygiewicz, P.T., 2005, Fungal-specific PCR primers developed for analysis ITS region of environmental DNA extracts, BMC Microbiol. 5: 1-11.
- [15] Hall, T., 2005, BioEdit: Biological Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP, Available Source: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page1.html>.
- [16] Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994, Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucl. Acids Res. 22: 4673-4680.
- [17] Swofford, D.L., 2002, PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- [18] Kishino, H. and Hasegawa, M., 1989, Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea, J. Mol. Evol. 29: 170-179.
- [19] Stamatakis, A., 2014, RAXML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post analysis of large phylogenies, Bioinformatics 30: 1312-1313.
- [20] Nylander, J.A.A., 2004, MrModeltest v. 2.0, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
- [21] Owen, N.L. and Hundley, N., 2004, Endophytes-the chemical synthesizers inside plants, Sci. Prog. 87: 79-99.
- [22] Won, K.J., Lin, H.Y., Jung, S., Cho, S.M., Shin, H.C., Bae, Y.M., Lee, S.H., Kim, H.J., Joen, B.H. and Kim, B., 2012, Antifungal miconazole induces cardiotoxicity via inhibition of APE/REF-1-related pathway in rat neonatal cardiomyocytes, J. Toxicol. Sci. 126: 289-305.

- [23] Wilson, W.L., 1998, Isolation of endophytes from seagrasses from Bermuda, M.Sc. Thesis, University of New Brunswick, Canada.
- [24] Arjun, P., Priya, S.M., Sivan, P.S.S., Krishnamoorthy, M. and Balasubramanian, K., 2012, Antioxidant and antimicrobial activity of *Nelum bonucifera* Gaertn. leaf extracts, J. Acad. Indus. Res. 1: 15-18.
- [25] Ming-Zhu, Z., Wu, W., Li-Li, J., Ping-Fang, Y. and Ming-Quan, G., 2015, Analysis of flavonoids in Lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves and their antioxidant activity using macroporous resin chromatography coupled with LC-MS/MS and antioxidant biochemical assays, Molecules 20: 10553-10565.
- [26] Shukla, K. and Chaturvedi, N., 2016, *In vitro* antioxidant properties of different parts of *Nelumbo nucifera* Gaertn. IJAPBC. 5: 196-201.
- [27] Kharwar, R.N., Verma, S.K., Mishra, A., Gond, S.K., Sharma, V.K., Afreen, T. and Kumar, A., 2011, Assessment of diversity, distribution and antibacterial activity of endophytic fungi isolated from a medicinal plant, *Adeocalymma alliaceum* Miers, Symbiosis 55: 39-46.
- [28] Bhardwaj, A., Sharma, D., Jadon, N. and Agarwal, P.K., 2015, Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spike of *Pinus roxburghii*, AC Microb. 6: 1-9.
- [29] Yadav, M., Yadav, A. and Yadav, J.P., 2014, *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam, Asian Pac. J. Trop. Med. 7: 256-261.
- [30] Nayak, B.K., 2014, Endophytic fungal enumeration from various leaf samples of a medicinal plant: *Ziziphus mauritiana*, Int. J. Pharm. Tech. Res. 7: 344-348.
- [31] Chen, J.M., Ling, C. and Lu-Ping, Q., 2016, A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review, Front Microbio. 7: (doi: 10.3389/fmicb.2016.00906)
- [32] Nagda, V., Gajbhiye, A. and Kumar, D., 2017, Isolation and characterization of endophytic fungi from *Calotropis procera* for their antioxidant activity, Asian J. Pharm. Clin. Res. 10: 254-258.
- [33] Sunder, J., Dingh, D.R., Jeeyakumar, S., Kundu, A. and De, A.K., 2011, Antibacterial activity in solvent extract of different parts of *Morinda citrifolia* plant, J. Pharm. Sci Res. 3: 1404-1407.
- [34] Abdelfadel, M.M., Khalaf, H.H., Sharoba, A.M. and Assous, M.T.M., 2016, Effect of extraction methods on antioxidant and antimicrobial activities of some spices and herbs extracts, J. Food Technol. Nutr. Sci. 1: 1-14.
- [35] Beveridge, T.J., 1999, Structure of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles, J. Bacteriol. 181: 4725-

- 4733.
- [36] Modarresi-Chahardehi, A., Ibrahim, D., Fariza-Sulaiman, S. and Mousavi, L., 2012, Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*, Rev. Biol. Trop. 60: 1567-1576.
- [37] Valle, D.L., Cabrera, E.C., Puzon, J.J.M. and Rivera, W.L., 2016, Antimicrobial activities of methanol, ethanol and supercritical CO₂ extracts of Philippine *Piper betle* L. on clinical isolates of Gram-positive and Gram-negative bacteria with transferable multiple drug resistance, PLoS ONE 11: e0146349.