

สารต้านจุลินทรีย์และสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ของราจากดินป่าชายเลน Antimicrobial Substances and Phylogenetic Relationships of Fungi from Mangrove Soil

พญทิฏฐิกร ศุภพล*

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110

สิตา ปรีดานนท์

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค)

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอลำลูกเกด จังหวัดปทุมธานี 12120

Preuttiporn 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),

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของสารเมตาบอไลต์จากราดินในการต้านจุลินทรีย์และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราที่มีศักยภาพโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล แยกราจากดินป่าชายเลนได้ทั้งหมด 106 ไอโซเลท นำมาเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่เขย่าเป็นเวลา 3 สัปดาห์ นำเลี้ยงราสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (broth ethyl acetate, BE) และเส้นใยราสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (cell ethyl acetate, CE) และเฮกเซน (cell hexane, CH) สารสกัด 318 สาร นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี colorimetric broth microdilution พบสารสกัด 8 สาร จากรา 6 ไอโซเลท มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยสารที่มีศักยภาพสูงสุด คือ BE จาก TSU-MF1 (*Talaromyces flavus*) และ CE จาก TSU-MF2 (*Penicillium* sp.) และ TSU-MF5 (*Xylaria feejeensis*) มีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA ได้ดีที่สุดให้ค่า MIC/MBC เท่ากับ 64/128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจัดจำแนกราก 6 ไอโซเลท โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS หรือ 28S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ พบรา 5 ไอโซเลท มีความใกล้ชิดกับไฟลัมแอสโคไมโคตา (*Talaromyces flavus*, *Penicillium* sp., *Hongkongmyces pedis*, *Dothidiomycetes* sp. และ

Xylaria feejeensis) และโพลีเมอร์เบสิดิโอไมโคตา 1 ไอโซเลท (*Subulicystidium* sp.) จากผลการศึกษายืนยันว่าราดินมีความหลากหลายของชนิดพันธุ์ และมีศักยภาพในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์

คำสำคัญ : ราดิน; ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์; สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ; ดินป่าชายเลน

Abstract

This research aims to study the potential of antimicrobial metabolites of soil fungi and phylogenetic relationships of the potential fungal isolates based on molecular techniques. A total of 106 fungal isolates were obtained from mangrove soil. They were cultured in potato dextrose broth at room temperature without shaking for 3 weeks. Culture broth were extracted with ethyl acetate (broth ethyl acetate, BE). Fungal mycelia were extracted with ethyl acetate (cell ethyl acetate, CE) and hexane (cell hexane, CH). Antimicrobial activities of 318 extracts were tested by the colorimetric broth microdilution method. Eight extracts from 6 isolates showed the highest potential against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The best active extracts consisting of BE from TSU-MF1 (*Talaromyces flavus*) and CE from TSU-MF2 (*Penicillium* sp.) and TSU-MF5 (*Xylaria feejeensis*) were most active against MRSA (MIC/MBC, 64/128 µg/ml). Six active isolates were identified based on nucleotide sequences of ITS region and 28S ribosomal DNA. They belong to two Phyla including Ascomycota 5 isolates (*Talaromyces flavus*, *Penicillium* sp., *Hongkongmyces pedis*, *Dothidiomycetes* sp. and *Xylaria feejeensis*) and Basidiomycota 1 isolate (*Subulicystidium* sp.). Especially, these results confirmed that fungi from mangrove soil provide high species diversity and have the potential to produce antimicrobial agents.

Keywords: soil fungi; antimicrobial activity; phylogenetic relationship; mangrove soil

1. บทนำ

ปัญหาการการดื้อยาของจุลินทรีย์ก่อโรครยังคงเป็นปัญหาสำคัญในปัจจุบัน โดยประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์มีกลไกในการป้องกันการทำลายจากยาปฏิชีวนะเหล่านั้น ดังนั้นหน่วยงานต่าง ๆ จึงให้ความสนใจและพยายามหาแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ โดยเฉพาะจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อเพิ่มโอกาสในการพบสารออกฤทธิ์ที่มีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งสารเมตาบอไลต์หลายชนิดที่มี

ศักยภาพที่เคยรายงานมาก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่ได้จากตัวอย่างดิน [1] ดังนั้นนักวิจัยจึงพยายามมองหาแหล่งของตัวอย่างจากบริเวณที่มีการศึกษาน้อยอยู่หรือยังไม่มีการศึกษามาก่อน ได้แก่ ตัวอย่างดินจากทะเลหรือดินป่าชายเลนโดยป่าชายเลนมีความอุดมสมบูรณ์ และมีความหลากหลายของทรัพยากรทางธรรมชาติ ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นแหล่งที่น่าสนใจเราเป็นจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายและรายงานว่ามีราประมาณ 1.5 ล้านสายพันธุ์ แต่ที่ทราบชื่อมีเพียง 80,000 สายพันธุ์ [2] นอกจากนี้พบว่าราที่มีศักยภาพใน

การผลิตสารเมทาบอลิท์หลายชนิดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยสารออกฤทธิ์ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่ได้จากราที่แยกจากดิน [3] ราในดินทำหน้าที่สำคัญในระบบนิเวศ โดยช่วยย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ โดยเฉพาะองค์ประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนและย่อยสลายยาก ได้เป็น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กรดอินทรีย์ แร่ธาตุต่าง ๆ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลเวอร์ เป็นต้น รวมทั้งช่วยปลดปล่อยสารอาหารและธาตุอาหารกลับคืนสู่ดิน ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์ [4] จากรายงานต่าง ๆ พบว่าราจากดินหลายสายพันธุ์ ผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี เช่น เทอริอิก แอซิดและบิวทิโรแลคโตน จาก *Aspergillus terreus* มีฤทธิ์ยับยั้ง *Erwinia carotovora* [5] สารไตรโคโคนินจาก *Trichoderma koningii* ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและราก่อโรคพืชหลายชนิด [6] และสารซิตรีนินและเพนนิซิลิกแอซิดจาก *Penicillium* spp. ออกฤทธิ์ยับยั้งกว้างทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*) แบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli* และ *Salmonella Typhi*) และยีสต์ (*Candida albicans*) [7] จากรายงานการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าราที่แยกได้จากดินเป็นแหล่งผลิตสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่น่าสนใจ ประกอบกับภาคใต้มีพื้นที่ป่าชายเลนกว่า 2,400 ตารางกิโลเมตร กระจายอยู่ในหลายจังหวัด และมีพันธุ์ไม้หลากหลาย โดยในการศึกษานี้เลือกพื้นที่ป่าชายเลน จังหวัดตรัง เป็นแหล่งในการศึกษา เนื่องจากพื้นที่ดังกล่าวมีความอุดมสมบูรณ์ มีความหลากหลายทางชีวภาพและนอกจากนี้ยังไม่มีมีการบุกรุกหรือเข้าไปศึกษามาก่อน [8]

2. วัตถุประสงค์

เพื่อสำรวจราจากดินป่าชายเลนที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค กลุ่มแบคทีเรีย

และยีสต์ และจัดจำแนกชนิดโดยการศึกษาสายสัมพันธ์เชิงวัฒนาการของราที่มีศักยภาพในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์

3. วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกรา

เก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มจากบริเวณป่าชายเลน จังหวัดตรัง จำนวน 5 จุด จุดละ 500 กรัม ที่ระดับความลึก 0-10 เซนติเมตร ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เพื่อนำมาศึกษาที่ห้องปฏิบัติการ ชั่งดิน 10 กรัม เจือจางในน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ระดับความเจือจางสิบเท่า (1:10) จากนั้นบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าและวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ดูด่วนใส 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างลงใน 9 มิลลิลิตร ของน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} - 10^{-6} จากนั้นดูด 0.1 มิลลิลิตร ของตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นลงบนอาหาร rose-bengal chloramphenicol agar (RBC) และเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้าอาหารนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตผลทุกวัน หากพบโคโลนีของราให้เขียนเส้นใยของราที่พบทุกโคโลนีด้วยเทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยเขี่ยปลายเส้นใยของรา (hyphal tip isolation) ลงในจานอาหาร potato dextrose agar (PDA) จนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำราทั้งหมดที่แยกได้มาจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น สังเกตโคโลนี ขนาด รูปร่าง ลักษณะเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้กล้องเตอริโอซุม และสังเกตลักษณะเส้นใย ผงกัน การย้อมติดสี และโครงสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามคู่มือจัดจำแนก [9] นำราที่แยกได้ทั้งหมดไปเลี้ยงใน PDA แบบเอียง และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการ

ศึกษาต่อไป

3.2 การเพาะเลี้ยงราในอาหารเหลวและการสกัดสารด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

นําราทึ่แยกได้ทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลากล ต่อเชื้อ 1 โอไซเลท วางไว้ในอุณหภูมิห้อง โดยไม่เขย่า เป็นเวลา 3 สัปดาห์ กรองแยกน้ำเลี้ยงเชื้อและตัวเซลล์ น้ำเลี้ยงเขื่อนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท 3 ครั้ง โดยใช้ปริมาตรของตัวทำละลายต่อตัวอย่างในอัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นเติมแอนไฮไดรส์โซเดียมซัลเฟต (anhydrous sodium sulfate, Na_2SO_4) และทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงราที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (broth ethyl acetate, BE) ส่วนตัวเซลล์ตัดให้เป็นชิ้นขนาดเล็กด้วยมีดผ่าตัด และแช่ด้วยเมทานอลเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำสารที่อยู่ในส่วนของเมทานอลมาสกัดต่อเนื่องด้วยเอทิลอะซิเตท 3 ครั้ง และเฮกเซน 3 ครั้ง โดยใช้ปริมาตรของตัวทำละลายต่อตัวอย่างในอัตราส่วน 1:1 และทำให้แห้งเช่นเดียวกับน้ำเลี้ยงเชื้อ จะได้สารสกัดหยาบส่วนเส้นใยราที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (cell ethyl acetate, CE) และเฮกเซน (cell hexane, CH) นำสารสกัดหยาบ BE, CE และ CH ละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้ได้สารสกัดความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเก็บไว้เป็นสารละลายเข้มข้นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากราด้วยวิธี colorimetric broth micro-dilution

3.3.1 เชื้อทดสอบ ได้รับความอนุเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ จากห้องปฏิบัติการรา

วิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้แก่ แบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ [แบคทีเรียแกรมบวก : *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1 (MIC 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และแบคทีเรียแกรมลบ : *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) และยีสต์ 2 สายพันธุ์ (*Candida albicans* ATCC90028 และ *Cryptococcus neoformans* ATCC90112)

3.3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ [10-11]

การเตรียมแบคทีเรีย : นำแบคทีเรียมาขีดแบบตัดกัน (cross streak) บน nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเชื้อเชื้อ 3-5 โคโลนี ใส่ลงในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 3-5 ชั่วโมง ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland (1.5×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) ด้วยน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำมาเจือจางกับอาหาร mueller-hinton broth (MHB) ในอัตราส่วน 1:200 ได้เชื้อประมาณ 10^6 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบ

3.3.3 การเตรียมยีสต์ : เพาะเลี้ยงยีสต์บนอาหาร Sabouraud's dextrose agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง สำหรับ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans* เมื่อครบกำหนดนำโคโลนีเดียวของยีสต์ 3-5 โคโลนี ใส่ลงในอาหาร Sabouraud's dextrose broth (SDB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปเขย่าใน incubator shaker ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็น 3-5 ชั่วโมง สำหรับ *C. albicans* และที่

อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 3-5 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans* นำยีสต์มาปรับความขุ่นให้ได้ 2.0 McFarland (6.0×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) ด้วยน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำมาเจือจางกับอาหาร SDB ในอัตราส่วน 1:20 ได้เชื้อประมาณ 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตรเพื่อนำไปทดสอบ

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบต้องการคัดเลือกสารสกัดที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี colorimetric broth micro-dilution โดยเตรียมสารสกัดหยาบ ให้ได้ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่สารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในจานหลุมแบบ 96 หลุม จำนวน 3 หลุม และใส่เชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่ม โดยแบคทีเรียและ *C. albicans* บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 15 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดหดยีสรีชาซูริน (resazurin) ที่เจือจาง (1:10) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ (ความเข้มข้นสุดท้ายของยีสรี 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อีก 3 ชั่วโมง และสำหรับ *C. neoformans* บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดหดยีสรีชาซูรินที่เจือจาง (1:10) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิห้องอีก 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยสังเกตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีน้ำเงินเนื่องจากมีรีชาซูรินผสมอยู่ หากสารสกัดยับยั้งเชื้อทดสอบได้ อาหารยังคงมีสีน้ำเงินเช่นเดิม

แต่หากสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เชลล์มีการเจริญจะรีดิวซ์รีชาซูรินทำให้อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือใสสุดควบคุมสำหรับการทดสอบโดยใช้ยาปฏิชีวนะ แวนโคมัยซินและเจนตามัยซินเป็นชุดควบคุมเชิงบวกสำหรับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบตามลำดับ และแอมโฟเทอริซิน บีเป็นชุดควบคุมเชิงบวกสำหรับยีสต์ และใช้โดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นชุดควบคุมเชิงลบโดยสารสกัดแต่ละสารทำการทดสอบ 1 ครั้ง จำนวน 3 ซ้ำ

3.3.5 การตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (minimum inhibitory concentrations, MICs) และการตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ (minimum bactericidal concentration, MBCs) หรือ (minimum fungicidal concentration, MFCs)

นำสารสกัดที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบและหาค่า (MICs) และ (MBCs หรือ MFCs) ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ โดยเตรียมสารสกัดหยาบ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้บันทึกเป็นค่า MIC จากนั้นนำเชื้อจากหลุมทดสอบที่ให้ผลการยับยั้งทุกหลุมจากงานทดสอบมาซิดบนอาหาร NA สำหรับแบคทีเรีย และ SDA สำหรับยีสต์ โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้จะถูกบันทึกเป็นค่า MBC สำหรับแบคทีเรียหรือ MFC สำหรับยีสต์ ชุดควบคุมสำหรับการทดสอบโดยใช้ยาปฏิชีวนะ แวนโคมัยซินและเจนตามัยซินเป็นชุดควบคุมเชิงบวกสำหรับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

ตามลำดับ และแอมโฟเทอรีซิน บีเป็นชุดควบคุมเชิงบวกสำหรับยีสต์ และใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ โดยสารสกัดและชุดควบคุมทั้งหมดทำการทดสอบ 1 ครั้ง จำนวน 3 ซ้ำ

3.4 จัดจำแนกชนิดราที่มีศักยภาพในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

เลี้ยงราในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรองแยกเส้นใยและล้างเส้นใยด้วยน้ำอุ่นปราศจากเชื้อ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำเส้นใยไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งหรือเก็บในโถงบดยาปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ชำคิน เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอของราโดยวิธี CTAB [12]

นำเส้นใยที่ผ่านการระเหยแห้ง (50-100 มิลลิกรัม) มาบดในโถงบดยาด้วยทรายซิลิกา (silica sand) จากนั้นตากเส้นใยที่บดแล้วไว้ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมโลซิสบัฟเฟอร์ (ประกอบด้วย 100 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ 1.4 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์ เอทิลีนไดเอมีน-เตตระอะซิติกแอซิด และ 2 เปอร์เซ็นต์ ซิทิลไตรเมทิล-แอมโมเนียมโบรไมด์) ปริมาตร 600 มิลลิลิตร นำหลอดไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเขย่าหลอดไปมาทุก 10 นาที จากนั้นเติมสารผสมของคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาประมาณ 20 ครั้ง และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสด้านบนปริมาตร 480 ไมโครลิตร ลงในหลอดใหม่และเติมไอโซโพรพานอล 300 ไมโครลิตร นำหลอดไปบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) วางไว้ให้แห้ง และละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยเจลอเล็กโทร-โฟริซิสแบบอะกาโรสในบัฟเฟอร์ทีอีเอ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่กำลังไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที ย้อมเจลดด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับแถบ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.4.2 การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอบริเวณ ITS หรือ 28S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสและการอ่านลำดับนิวคลีโอไทป์

การจัดจำแนกชนิดราในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย 2 บริเวณ ด้วยกัน ได้แก่ ITS (internal transcribed spacer) และ 28S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยบริเวณที่เป็นที่นิยมมากที่สุด คือ ITS เนื่องจากสามารถจัดจำแนกได้ในระดับจิ้นัส สปีชีส์ และสายพันธุ์ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกศึกษาบริเวณ ITS โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนนี้ โดยใช้ไพรเมอร์สากล และไพรเมอร์จำเพาะต่อฟังไจประกอบด้วย ITS1F/ITS4, ITS5/ITS4, ITS3/ITS4 และ ITS1/ITS4 และสำหรับราที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้โดยบริเวณ ITS จะนำมาศึกษาในส่วนของบริเวณ 28S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ LROR/LR7 ส่วนผสมและปริมาตรของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (50 ไมโครลิตร) ประกอบด้วยน้ำนาโนบริสุทธิ์ 38 ไมโครลิตร; 50 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 ไมโครลิตร; บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่า 2.5 ไมโครลิตร; 10 มิลลิโมลาร์ ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟตทั้งสี่ชนิด 1.0 ไมโครลิตร; 10 ไมโครโมล ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด 1.0 ไมโครลิตร; 10 ไมโครโมล ไพรเมอร์รีเวิร์ด 1.0

ไมโครลิตร 2 หน่วยต่อไมโครลิตร; แท็ค ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ 0.5 ไมโครลิตร และ 100-500 นาโนกรัม ของ ดีเอ็นเอแม่แบบ 1.0 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่องของ Bio-Rad MyCycler (Bio-Rad, Hercules, CA) จากนั้น ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ โดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสในบัฟเฟอร์ที่อือ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ ทำผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จรูป (QIAquick PCR purification Kits) จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ไปอ่าน ลำดับเบส (DNA sequencing) ด้วยไพร์เมอร์เดียวกับ ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

3.5 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) และการจัดจำแนกเชื้อราโดยวิธี maximum parsimony และวิธี Bayesian inference

ลำดับเบสดีเอ็นเอแต่ละเส้นจะตรวจสอบ คุณภาพด้วยโปรแกรม BioEdit 7.0.7 [13] จากนั้นนำ ลำดับเบสดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTN เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank คัดเลือกลำดับเบสที่ให้ค่าความเหมือนกับ ลำดับเบสดีเอ็นเอของราตัวอย่าง และจัดเรียงลำดับ เบสของราตัวอย่างกับราที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน ด้วยโปรแกรม ClustalW [14] จากนั้นนำข้อมูลลำดับ เบสที่จัดเรียงลำดับเบสแล้วมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิง วิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ด้วยโปรแกรม PAUP* 4.0b10 [15] ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) โดยกำหนดค่าบูทสแตรป (bootstrap) เท่ากับ 1000 และกำหนดค่า Kishino-Hasegawa (KH) tests [16] และพิจารณา phylogenetic tree ที่ได้ร่วมกับวิธี วิเคราะห์ Bayesian inference (BI) ด้วยโปรแกรม MrBayes 3.0b4 [17] เพื่อเป็นค่าความเชื่อมั่นที่ใช้ใน

การอ่านผลและการจัดจำแนกรา จากนั้นนำข้อมูล ลำดับเบสทั้งหมดของราตัวอย่างฝากไว้ในฐานข้อมูล ของ GenBank เพื่อเพิ่มฐานข้อมูลและเป็นประโยชน์ ในการศึกษาอื่น ๆ ในอนาคต

การวิเคราะห์ phylogenetic tree ที่สร้าง ด้วยวิธี MP กำหนดให้ค่าพารามิเตอร์ทางสถิติต่าง ๆ ประกอบด้วย tree length, consistency index (CI), retention index (RI), relative consistency index (RC), homoplasy index (HI) และค่าความเชื่อมั่น บูทสแตรป ตามลำดับ และเลือก MPTs (most parsimonious trees) ที่แสดงโทโพโลยี (topology) ที่ดี ที่สุด ด้วยวิธีทางสถิติ K-H tests โดยพิจารณาที่ค่า บูทสแตรป ซึ่งมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์

ส่วนวิธี Bayesian inference (BI) วิเคราะห์ ด้วยวิธี markov chain Monte Carlo (MCMC) โดยใช้โมเดล (GTR+I+G) ซึ่งได้จากการทดสอบด้วย โปรแกรม MrModeltest 2.2 [18] หลังจากนั้นจึง ทดสอบด้วย hierarchical likelihood ratios (hLRTs) (วิเคราะห์ 3,000,000 ชั่วโมง และสุ่มตัวอย่างข้อมูล ทุก ๆ 100 ชั่วโมง ที่ 3,000 phylogenetic tree) โดย พิจารณาค่าบูทสแตรปที่มากกว่า หรือเท่ากับ 0.95 นอกจากนี้ยังพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เพื่อ เพิ่มความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การแยกและจัดจำแนกราโดยลักษณะทางสัณฐาน

การแยกราจากดินในพื้นที่ป่าชายเลน จังหวัดตรัง โดยวิธีเกลี่ยเชืบนอาหาร RBC สามารถ แยกได้ทั้งหมด 106 ไอโซเลท เมื่อนำราทั้งหมดมา ศึกษาลักษณะทางสัณฐานเบื้องต้น พบรา 10 ไอโซเลท สามารถจัดจำแนกได้ในระดับจีนัส คือ *Penicillium* (5 ไอโซเลท) *Fusarium* (3 ไอโซเลท) และ *Trichoderma*

(2 ไอโซเลท) ส่วนราอีก 96 ไอโซเลท ไม่พบการสร้างโครงสร้างสปอร์บนอาหาร PDA หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 21 วัน จึงไม่สามารถจัดจำแนกได้

4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากราในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค

4.2.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัด (200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)

สารสกัดทั้งหมด 318 สาร ประกอบด้วย BE (106 สาร) CE (106 สาร) และ CH (106 สาร) จากรา 106 ไอโซเลท ที่แยกจากดินป่าชายเลน เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* ATCC25923, MRSA SK1, *E. coli* ATCC 25922 *P. aeruginosa* ATCC90112 *C. albicans* ATCC90028 และ *C. neoformans* ATCC90112 ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบว่าสารสกัดจำนวน 123 สาร จากทั้งหมด 318 สาร คิดเป็น 38.6 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* ATCC25923 และ MRSA SK1) และสารสกัดทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ เมื่อเปรียบเทียบศักยภาพของสารสกัดทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ BE, CE และ CH พบว่าสารสกัดจากเห็กเซน (CH) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แต่สารสกัดจากเอทิลอะซิเตท (CE) 35 สาร คิดเป็น 11 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงรา (BE) 88 สาร คิดเป็น 27.7 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าเราสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์

4.2.2 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งและฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบ

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบว่าสารสกัดจำนวน 123 สาร มีศักยภาพในการ

ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ MRSA) จึงนำสารสกัดดังกล่าวมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งและฆ่า *S. aureus* และ MRSA ในช่วงความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เพื่อระบุค่า MIC และ MBC ตามลำดับ พบสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 8 สาร จากรา 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ MRSA ได้ โดยค่า MIC อยู่ในช่วง 64-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยสารสกัด 3 สาร ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด คือ BE จาก *Talaromyces flavus* (TSU-MF1) CE จาก *Penicillium* sp. (TSU-MF2) และ *Xylaria feejeensis* (TSU-MF5) โดยมีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA ให้ค่า MIC/MBC เท่ากับ 64/128 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ส่วนสารสกัดทั้งหมด 8 สาร แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ให้ค่า MIC/MBC เท่ากับ 128/>128 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (ตารางที่ 1)

ผลการแยกราจากดินป่าชายเลน พบว่าจำนวนราที่แยกได้มีปริมาณน้อยกว่าการศึกษาของ Borwornwiriyan และคณะ 2013 ซึ่งแยกราดินบริเวณเขื่อนรัชชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานี แยกได้ทั้งหมด 10^4 - 10^6 ซีเอฟยูต่อกรัม [19] มากกว่าจำนวนไอโซเลทในการศึกษานี้ อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัยด้วยกัน ได้แก่ ปริมาณที่เก็บตัวอย่าง ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ สารอาหาร และแร่ธาตุต่าง ๆ ของดิน [20] ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อปริมาณเชื้อที่ได้ มีรายงานของ Yongchalermpchai และคณะ 2011 รายงานค่าความเป็นกรดต่างของดินบริเวณเขื่อนรัชชประภา เท่ากับ 4.90-6.43 โดยราเจริญได้ดีในสภาวะความเป็นกรด [21] ดังนั้นจึงอาจจะเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมให้สามารถแยกราได้ในปริมาณมาก ซึ่งดินที่เก็บจากบริเวณป่าชายเลน ในการศึกษานี้เป็นดินสีเข้มน่อนข้างเหนียว มีค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 8-8.2 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rao และ Brahmaji (2014) รายงานสมบัติและลักษณะของดินป่าชายเลน พบว่า

เป็นดินป่าชายเลนมีสีดำเข้ม มีค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 8.35-8.79 นอกจากนี้ดินป่าชายเลน ยังมีปริมาณความเค็ม 20-32 ส่วนในหนึ่งพันส่วน และผลของฤดูกาลและตำแหน่งของดินที่เก็บตัวอย่างก็ส่งผลต่อปริมาณของแร่ธาตุในดิน และจำนวนประชากรจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้น [22] นอกจากนี้ Das และคณะ (2011) รายงานปริมาณของสารอินทรีย์และปริมาณจุลินทรีย์ที่พบบนผิวน้ำดิน และที่ระดับความลึกต่าง ๆ พบว่าสารอาหารและปริมาณจุลินทรีย์บนผิวน้ำดินมีปริมาณมากกว่าดินชั้นล่าง โดยผิวน้ำดินมีจำนวนจุลินทรีย์สูงถึง 12.44×10^4 ซีเอฟยูต่อกรัม นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงเวลาในการบ่มเชื้อในช่วง 20-80 ชั่วโมง เชื้อจะเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและสูงที่สุด ระยะเวลาการบ่มเชื้อในช่วงดังกล่าวจึงเหมาะสมสำหรับการแยกรากในดิน [23] จากรายงานวิจัยต่าง ๆ จะเห็นได้ว่ามีหลายปัจจัยส่งผลต่อปริมาณราที่แยกได้โดยรากจากดินที่แยกได้จากการศึกษาจากหน้าส่วนใหญ่เป็นราในจีนัส *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium* และ *Trichoderma* ซึ่งเป็นราที่สร้างโครงสร้างสปอร์ และราเหล่านี้มีศักยภาพในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ที่หลากหลาย [24-25] นอกจากนี้ยังมีรายงานพบสารใหม่ออรานทิซิน เอ และ บี (auranticins A และ B) ในกลุ่มเดฟไซโดน (depsidones) ที่ผลิตจากรา *Preussia aurantiaca* ซึ่งแยกได้จากดินป่าชายเลน [26] ดังนั้นในการศึกษานี้จึงนำรากจากดินป่าชายเลนที่แยกได้มาศึกษาศักยภาพในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารที่ผลิตจากรามีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี โดยยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสองสายพันธุ์ ได้แก่ MRSA และ *S. aureus* จากสารสกัดทั้งหมด 318 สาร พบสารสกัด 123 สาร ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกคิดเป็น 38.6 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจากสารสกัดที่มีศักยภาพ (123 สาร) นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ช่วง

ความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เพื่อระบุค่า MIC และ MBC ตามลำดับ พบสารสกัด 8 สาร (BE 6 สาร และ CE 2 สาร) จากราก 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อได้ดี โดยสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้ง MRSA ให้ค่า MIC/MBC เท่ากับ 64/128 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และกลุ่มของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ได้ดี คือ สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและจากเส้นใยที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (BE และ CE) ขณะที่สารสกัดจากเส้นใยที่สกัดด้วยเฮกเซน (CH) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 6 สายพันธุ์ จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสารที่มีศักยภาพเป็นสารมีชีวที่ราผลิตได้ทั้งภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ โดยผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wongthong และคณะ 2014 ที่ประเมินประสิทธิภาพของราที่แยกจากดิน บริเวณอุทยานแห่งชาติเขานัน จังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่าสารสกัด BE และ CE จากรามีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค โดยสารสกัด 81 สาร (50.63 เปอร์เซ็นต์) จากราก 52 สายพันธุ์ มีศักยภาพยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด [27] แต่จากการศึกษาของ Borwornwiriyan และคณะ 2013 พบว่าสารสกัด CH จากรากที่แยกจากดิน ให้ค่าการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ต่ำกว่าสารสกัดจากส่วน CE และ BE ตามลำดับ [19] อย่างไรก็ตาม ราที่แยกได้ในการศึกษาและการศึกษาก่อนหน้าเป็นราต่างสายพันธุ์และจากแหล่งตัวอย่างต่างกัน ซึ่งอาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลต่อศักยภาพของสารออกฤทธิ์และพบว่าสายพันธุ์เดียวกันเมื่อเลี้ยงในอาหารต่างชนิดและใช้สภาวะในการเลี้ยงต่างกันก็ส่งผลต่อปริมาณและสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ [28-29] นอกจากนี้ตัวทำลายที่ใช้ในการสกัดสารก็ส่งผลต่อศักยภาพของสารในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดย Lihan และคณะ 2014 พบว่าสารสกัดเมทานอลจากรา *Penicillium verruculosum* ที่แยกจากดินมีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* (MIC 25 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิเมตร) [30] ขณะที่สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากรา ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปัจจัยไอโซเลท TSU-MF2 (*Penicillium* sp.) ในการศึกษาครั้งนี้ ข้างต้น

ตารางที่ 1 สารสกัดหายาที่มีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร

ไอโซเลท	สารสกัด	MIC/MBC (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)	
		MRSA	SA
TSU-MF1 (<i>Talaromyces flavus</i>)	BE	64/128	128/>128
TSU-MF2 (<i>Penicillium</i> sp.)	BE	128/128	128/>128
	CE	64/128	128/>128
TSU-MF3 (<i>Hongkongmyces pedis</i>)	BE	128/128	128/>128
TSU-MF4 (<i>Dothidiomycetes</i> sp.)	BE	128/128	128/>128
TSU-MF5 (<i>Xylaria feejeensis</i>)	BE	128/>128	128/>128
	CE	64/128	128/>128
TSU-MF6 (<i>Subulicystidium</i> sp.)	BE	128/>128	128/>128
ยาปฏิชีวนะ			
แวนโคมัยซิน		2/4	2/4

MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้; MBC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้; SA คือ *Staphylococcus aureus* ATCC25923; MRSA คือ *S. aureus* สายพันธุ์ SK1 จากผู้ป่วยที่ดื้อยา methicillin; BE คือ สารสกัดจากน้ำเลี้ยงราที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท; CE คือ สารสกัดจากตัวเซลล์ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

ตารางที่ 2 การจำแนกรามีศักยภาพในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลบริเวณ ITS และ 28S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

แทกซา	คลาส	ผลจัดจำแนกทางชีวโมเลกุล	รหัสนิวคลีโอไทด์		
			เปอร์เซ็นต์ความเหมือน	ITS	28S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ
TSU-MF1	Eurotiomycetes	<i>Talaromyces flavus</i>	100	KX940916	-
TSU-MF2	Eurotiomycetes	<i>Penicillium</i> sp.	99.5	KX940917	-
TSU-MF3	Dothideomycetes	<i>Hongkongmyces pedis</i>	96.3	KX940918	-
TSU-MF4	Dothideomycetes	<i>Dothidiomycetes</i> sp.	100	-	KX940921
TSU-MF5	Sordariomycetes	<i>Xylaria feejeensis</i>	100	KX940919	-
TSU-MF6	Agariomycetes	<i>Subulicystidium</i> sp.	99.5	KX940920	-

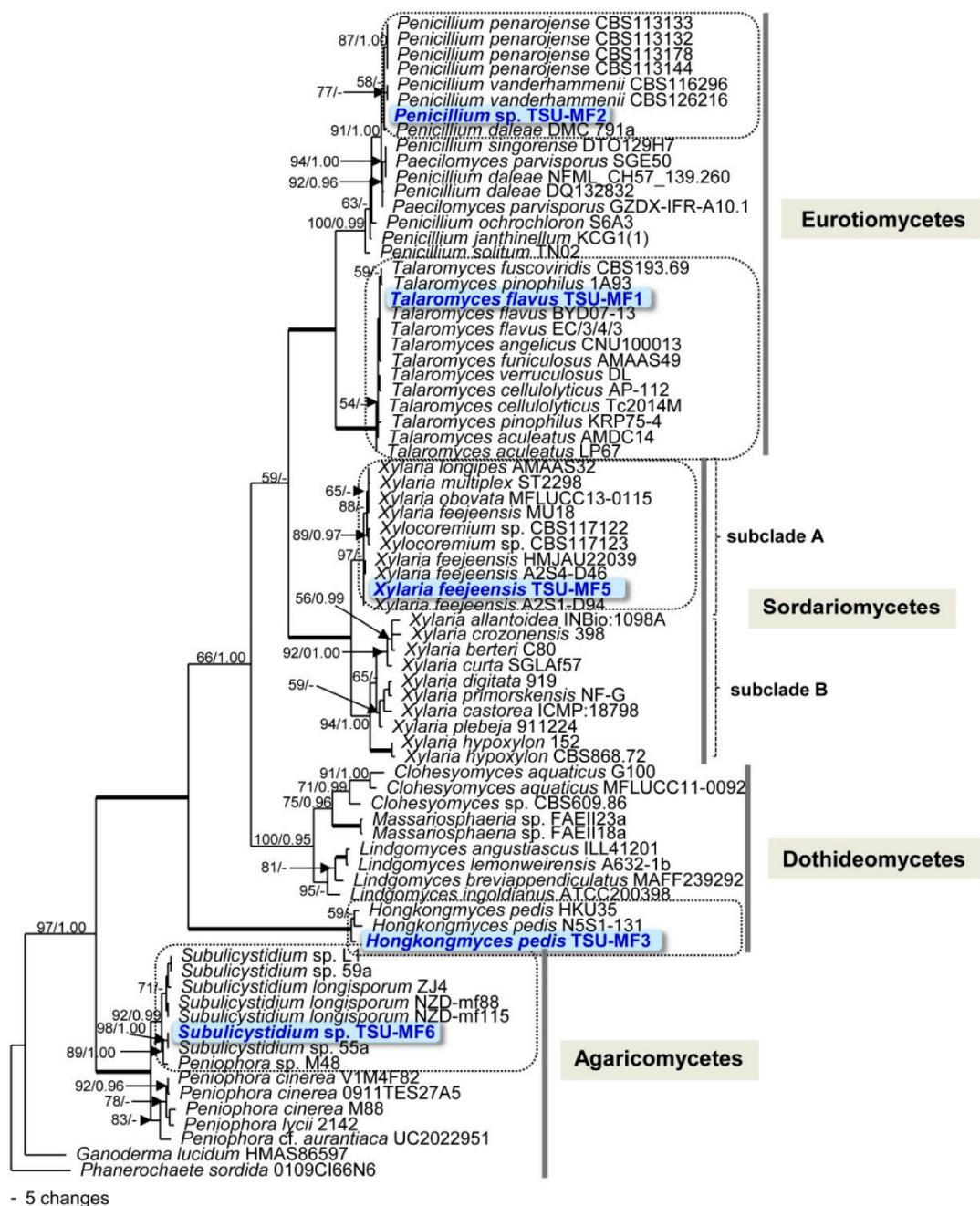
4.3 ผลการจัดจำแนกและวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของราจากดินโดยวิธีทางชีวโมเลกุล

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด 318 สาร ในการยับยั้งจุลินทรีย์ พบสารสกัดที่มีประสิทธิภาพ สูงสุดจำนวน 8 สาร จากรา 6 สายพันธุ์ ที่สามารถ ยับยั้งจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงนำราทั้ง 6 สายพันธุ์ มาจัด จำแนกชนิดโดยการศึกษายีนสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ผลการศึกษาพบว่ารา 5 สายพันธุ์ จัดจำแนกอยู่ใน ไฟล์มแอสโคไมโคตา (TSU-MF1-5) และ 1 สายพันธุ์ อยู่ในไฟล์มเบสิดิโอไมโคตา (TSU-MF6) โดยไอโซเลท TSU-MF4 ไม่สามารถจัดจำแนกได้ด้วยบริเวณ ITS จึง จัดจำแนกชนิดด้วยบริเวณ 28S ไรบโซมอลดีเอ็นเอ (ตารางที่ 2)

ข้อมูลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิง วิวัฒนาการบริเวณ ITS ของราที่แยกได้ในการศึกษานี้ สามารถจำแนกข้อมูลออกเป็น 4 เคลด (clades) ดังนี้ Eurotiomycetes, Sordariomycetes, Dothideo- mycetes และ Agaricomycetes เมื่อวิเคราะห์ความ สัมพันธ์ด้วยวิธี maximum parsimony ได้ MPT 7 trees ซึ่งมีค่า tree length CI, RI, RC และ HI เท่ากับ 1,328, 0.620, 0.931, 0.577 และ 0.380 (รูปที่ 1) ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของรา TSU-MF1 และ TSU-MF2 พบว่ามีตำแหน่งอยู่ในคลาส Eurotio- mycetes อันดับ Eurotiales มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด กับสมาชิกในวงศ์ Trichocomaceae (เคลดEurotio- mycetes) โดยรา TSU-MF1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Talaromyces* ที่ความเชื่อมั่นบูทสแทรปของ MP 100 เปอร์เซนต์และค่าความน่าจะเป็นของ BI เท่ากับ 1.00 ดังนั้นจึงจัดจำแนกรา TSU-MF1 เป็น *T. flavus* ส่วน รา TSU-MF2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับหลายสปีชีส์ ของยีส *Penicillium* และมีความเชื่อมั่นบูทสแทรป ของ MP 58 เปอร์เซนต์และค่าความน่าจะเป็นของ BI ต่ำกว่า 0.95 ดังนั้นจึงจัดจำแนกรา TSU-MF2 ได้แค่

ระดับยีส คือ *Penicillium* sp. รา TSU-MF3 พบว่ามี ตำแหน่งอยู่ในคลาส Dothideomycetes อันดับ Pleosporales โดย TSU-MF3 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด กับ *Hongkongmyces pedis* ที่ความเชื่อมั่นบูทส- แทรปของ MP 100 เปอร์เซนต์และค่าความน่าจะเป็น ของ BI เท่ากับ 1.00 ดังนั้นจึงจำแนกรา TSU-MF3 เป็น *H. pedis* ส่วนไอโซเลท TSU-MF5 พบว่ามี ตำแหน่งอยู่ในคลาส Sordariomycetes อันดับ Xylariales มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสมาชิกในวงศ์ Xylariaceae (เคลด Sordariomycetes) ซึ่งเคลดนี้ ประกอบด้วย 2 ซับเคลด คือ ซับเครด A และ B โดยรา TSU-MF5 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับซับเคลด A ที่ ความเชื่อมั่นบูทสแทรปของ MP 97 เปอร์เซนต์และค่า ความน่าจะเป็นของ BI ต่ำกว่า 0.95 TSU-MF5 มีความ สัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *X. feejeensis* มากที่สุดดังนั้นจึงจัด จำแนกรา TSU-MF5 เป็น *X. feejeensis* รา TSU- MF6 พบว่ามีตำแหน่งอยู่ในคลาส Agaricomycetes อันดับ Trechisporales มีความสัมพันธ์กับสมาชิกใน วงศ์ Hydnodontaceae (เคลด Agaricomycetes) โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Subulicystidium* sp. 55a มากที่สุด ที่ความเชื่อมั่นบูทสแทรปของ MP 98 เปอร์เซนต์ และค่าความน่าจะเป็นของ BI เท่ากับ 1.00 ดังนั้นจึงจัดจำแนกชนิดของรา TSU-MF6 ได้เป็น *Subulicystidium* sp. และสำหรับไอโซเลท TSU-MF4 จากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบริเวณ 28S ไรบโซมอลดีเอ็นเอพบว่า TSU-MF4 มี ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับราหลายยีสในคลาส Dothideomycetes จึงจำแนกชนิดของรา TSU-MF4 เป็นราในคลาส Dothideomycetes (ไม่แสดงผลการ วิเคราะห์)

ผลการจัดจำแนกและการศึกษาสาย สัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราที่ได้จากดิน โดยศึกษายีน ในบริเวณ ITS และ 28S ไรบโซมอลดีเอ็นเอ พบว่ารา



รูปที่ 1 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ในส่วนของบริเวณ ITS ของราจากดินป่าชายเลน โดยสามารถจัดจำแนกได้ 4 คลาส ดังนี้ คลาส Eurotiomycetes (TSU-MF1 และ TSU-MF2), Sordariomycetes (TSU-MF5), Dothideomycetes (TSU-MF3) และ Agaricomycetes (TSU-MF6) ค่าความเชื่อมั่นบูทสแตรพจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) ซึ่งมากกว่า หรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (ซ้าย) และค่าความน่าจะเป็นของ BI ที่มากกว่า หรือเท่ากับ 0.95 (ขวา) และเส้นทึบ คือ ค่า MP บูทสแตรพเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์/ค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 1.00

ส่วนใหญ่กระจายอยู่ในไฟลัมแอสโคไมโคตา 5 โอโซเลท ในอันดับ Eurotiales, Pleosporales และ Xylariales และพบเพียง 1 โอโซเลท จัดอยู่ในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา ในคลาส Agariomycetes โดยราที่พบในการศึกษานี้ส่วนใหญ่เคยมีรายงานในการศึกษารากที่แยกได้จากดินและจากแหล่งอื่น ๆ ราชที่พบในดินส่วนใหญ่เป็นสปีชีส์ที่พบได้บ่อย [19,25,31] ยกเว้นราโอโซเลท TSU-MF3 (*Hongkongmyces pedis*) ราสายพันธุ์นี้อยู่ในแฟมิลี Lindgomycetaceae คลาส Dothideomycetes พบรากกลุ่มนี้จากเศษไม้ กิ่งไม้ผุในแหล่งน้ำจืด และในประเทศออสเตรเลีย อียิปต์ ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา [32] และราโอโซเลท TSU-MF6 (*Subulicystidium* sp.) เป็นราในคลาส Agariomycetes เคยรายงานว่าพบบริเวณซากกิ่งไม้ ใบไม้ที่เน่าเปื่อย ทำหน้าที่ในการย่อยซากพืชต่าง ๆ และบางสปีชีส์เป็นเอนโดไมคอร์ไรซาที่มีความสัมพันธ์กับรากพืชในลักษณะพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน แต่ไม่พบว่าเป็นสปีชีส์หลักที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และราจากดินที่แยกได้ส่วนใหญ่ เป็นราในไฟลัมแอสโคไมโคตาและ Zygomycota เนื่องจากรากกลุ่มนี้ผลิตสปอร์แบบไม่อาศัยเพศได้จำนวนมาก เมื่อเทียบกับราในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thorn และคณะ (1996) พบรากกลุ่ม saprophytic basidiomycetes ได้น้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ [33] ซึ่งในการศึกษาพบ *Agaricus arvensis*, *Lepista nuda* และ *Marasmius oreades* เป็นราในคลาส Agariomycetes รา 2 สายพันธุ์ในการศึกษานี้ *Hongkongmyces pedis* และ *Subulicystidium* sp. ที่แยกจากดินป่าชายเลน จังหวัดตรัง ยังไม่พบรายงานในการศึกษาดินป่าชายเลนหรือดินจากแหล่งอื่นมาก่อน จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการศึกษารากจากบริเวณที่ไม่เคยมีการศึกษาสามารถช่วยเพิ่มโอกาสการเจอเชื้อและราเหล่านี้ยังมีที่มีศักยภาพในการผลิตสารยับยั้ง

จุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี

5. สรุป

ผลการศึกษารากที่แยกได้จากดินป่าชายเลนโดยวิธีเกลี่ยเชื้อบนอาหารสามารถแยกรากได้ทั้งหมด 106 โอโซเลท นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบรา 10 โอโซเลท สามารถจัดจำแนกได้ในระดับจีนัส ได้แก่ *Penicillium* (5 โอโซเลท) *Fusarium* (3 โอโซเลท) และ *Trichoderma* (2 โอโซเลท) โดยราส่วนใหญ่ไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำราทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเหลวและสกัดสารจากน้ำเลี้ยงราและเส้นใยของรากับตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเส้นใยสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (CE) และเฮกเซน (CH) และน้ำเลี้ยงราสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (BE) ได้สารสกัดทั้งหมด 318 สารจากราก 106 โอโซเลท และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี colorimetric broth microdilution มีสิริชาชุนเป็นอินดิเคเตอร์ในการอ่านผล พบว่าสารสกัด 123 สาร คิดเป็น 38.6 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และ MRSA แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด 123 สารที่ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรีย ได้จาก BE 88สาร (27.7 เปอร์เซ็นต์) และ CE 35 สาร (11 เปอร์เซ็นต์) แต่สารสกัดในกลุ่ม CH ไม่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่ทดสอบ ดังนั้นสรุปได้ว่าส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงราที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสองสายพันธุ์ได้ดี จากนั้นนำสารที่ให้ค่าการยับยั้งที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปหาค่า MIC และ MBC ในช่วงความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัด 8 สาร จากราก 6 โอโซเลท มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยสามารถยับยั้ง *S. aureus* และ MRSA ได้ในช่วงความเข้มข้น 64-128

ไม่โครกรัมต่อ จากนั้นนำราทั้ง 6 ไอโซเลท มาจัดจำแนกชนิดโดยการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum parsimony ร่วมกับวิธี Bayesian inference เพื่อความน่าเชื่อถือของการศึกษาพบว่าราทั้ง 6 ไอโซเลท มีความสัมพันธ์กับคลาส Eurotiomycetes, Sordariomycetes, Dothideomycetes และ Agaricomycetes โดย 5 ไอโซเลท มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไฟลัมแอสโคไมโคตา ได้แก่ *Talaromyces flavus* (TSU-MF1), *Penicillium* sp. (TSU-MF2), *Hongkongmyces pedis* (TSU-MF3), *Dothidiomycetes* sp. (TSU-MF4) และ *Xylaria feejeensis* (TSU-MF5) และ 1 ไอโซเลท ในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา ได้แก่ *Subulicystidium* sp. (TSU-MF6) จากผลการศึกษารั้วนี้ชี้ให้เห็นว่าราที่แยกได้จากดินป่าชายเลนมีศักยภาพในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ โดยเฉพาะ *S. aureus* และ MRSA อย่างไรก็ตาม จำนวนสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบมีเพียง 2 สายพันธุ์ ในแต่ละกลุ่ม (แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์) หากเพิ่มจำนวนของสายพันธุ์ของจุลินทรีย์สามารถเพิ่มโอกาสการรายงานศักยภาพของสารสกัดที่ได้จากราดินป่าชายเลน นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังพบว่าไม่เคยมีรายงานจากดินป่าชายเลนมาก่อนเป็นการยืนยันว่าการเลือกพื้นที่ศึกษาที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนเป็นประโยชน์ในการค้นพบเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตสารที่น่าสนใจและอาจนำไปใช้ประโยชน์ต่าง ๆ ในอนาคต

6. ข้อเสนอแนะ

6.1 การศึกษานี้เก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 5 จุด จำนวน 1 ครั้ง ในเดือนมีนาคม อาจเพิ่มจำนวนหรือความถี่ของการเก็บตัวอย่างในเดือนและช่วงฤดูกาลต่าง ๆ เนื่องจากเป็นการเพิ่มโอกาสการเจอเชื้อ ซึ่งราเหล่านี้ อาจผลิตสารที่น่าสนใจ และมีประโยชน์ในการ

นำไปใช้ในอนาคต

6.2 เนื่องจากสารสกัดที่นำมาทดสอบเป็นสารสกัดหยาบดังนั้นสารที่มีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ควรนำไปแยกให้บริสุทธิ์และนำมาทดสอบกับจุลินทรีย์อีกครั้ง เพื่อให้ทราบว่าสารที่ออกฤทธิ์เป็นสารใดและเป็นไปได้ว่าอาจพบสารโครงสร้างใหม่จากการศึกษานี้

6.3 การศึกษานี้ศึกษาจุลินทรีย์ 3 กลุ่ม (แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์) กลุ่มละ 2 สายพันธุ์ อาจเพิ่มจำนวนสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่ม เพื่อใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดและเพื่อเพิ่มการรายงานผลการทดสอบ

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. วชิรินทร์ รุกขไชยศิริกุล และ รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำหรับการสนับสนุนตลอดระยะเวลาการวิจัย

8. รายการอ้างอิง

- [1] Singh, A., Luthra, U. and Saxena, R.K., 2017, Brief of review on bioactive metabolites of fungus isolated from soil, IJIR. 3: 1460-1466.
- [2] Hawksworth, D.L., 2001, The magnitude of fungal diversity: The 1.5 million species estimate revisited, Mycol. Res. 105: 1422-1432.
- [3] Livermore, D.M., 2011, Discover research: The scientific challenge of finding new antibiotics, J. Antimicrob. Chemother. 66: 1941-1944.
- [4] Monton, J.B., 2005, Fungi, pp. 141-161,

- Yarnell, D., Ed., Principles and application of soil microbiology, 2nd Ed., Pearson Education, Inc., New Jersey.
- [5] Cazar, M.E., Schmeda-Hirschmann, G. and Astudillo, L., 2005, Antimicrobial butyrolactone I derivatives from the Ecuadorian soil fungus *Aspergillus terreus* Thorn. Var *terreus*, World J. Microbiol. Biotechnol. 21: 1067-1075.
- [6] Xia-Yan, S., Qing-Tao, S., Shu-Tao, X., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S. and Yu-Zhong, Z., 2006, Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens, FEMS Microbiol. Rev. 260: 119-125.
- [7] Gharaei-Fathabad, E., Tajick-Ghanbary, M. A. and Shahronkri, N., 2009, Antimicrobial properties of *Penicillium* species isolated from agriculture soils of Northern Iran, Res. J. Toxins 1: 1-7.
- [8] Jachowshi, N.R.A., Quak, M.S.Y., Friess, D.A., Duangnamon, D., Webb, E.L. and Ziegler, A.D., 2013, Mangrove biomass estimation in Southwest Thailand using machine learning, Appl. Geogr. 45: 311-321.
- [9] Barnett, H.L. and Hunter, B.B., 1998, Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Prentice Hall, Inc., New York.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2002a, Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved standard M7-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2002b, Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- [12] O'Donnell, K., Cigelnik, E., Weber, N.S. and 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.
- [13] Hall, T., 2005, BioEdit: Biological Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP, Available: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page1.html>.
- [14] 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.
- [15] Swofford, D.L., 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- [16] 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.
- [17] Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F., 2001, MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees, *Bioinformatics* 17: 754-755.
- [18] Nylander, J.A.A., 2004, MrModeltest v. 2.0, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
- [19] Borwornwiriyan, K., 2013, Screening of soil fungi from plant genetic conservation project area, Rajjaprabha dam, Suratthani province which produced antimicrobial substances. M.Sc. Thesis, Prince of Songkla University, Songkhla.
- [20] Standing, D. and Killham, K., 2007, The Soil Environment, pp. 1-22, Elsas, J.D.V., Jansson, J.K. and Trevors, J.T. (Eds.), Modern Soil Microbiology, 2nd Ed., CRC press, Boca Raton.
- [21] Yongchalermchai, C., Nilnond, C. and Pechkep, S., 2011, A study of diversity of soils and morphology with their chemical and physical properties, The complete research report, Prince of Songkla University, Songkhla.
- [22] Rao, V.V.P. and Brahmaji, R. P., 2014, Physico-Chemical analysis of mangrove soil in the Machilipatnam coastal region, Krishna district, Andhra Pradesh, *IJERT.* 3: 10-12.
- [23] Das, S., De, M., Ray, R., Ganguly, D., Jana, T.K. and De, T.K., 2011, Salt tolerant culturable microbes accessible in the soil of the Sundarban mangrove forest, India *Open Ecol. J.* 2: 35-40.
- [24] Mazumder, P.M., Mazumder, R., Mazumder, A. and Sasmal, D.S., 2002, Antimicrobial activity of the mycotoxin citrinin obtained from the fungus *Penicillium citrinum*, *Anc. Sci. Life* 3: 191-197.
- [25] Thatoi, H., Behere, B.C., Dangar, T.K. and Mishra, R.R., 2010, Microbial biodiversity in mangrove soils of Bhitarkanika, Odisha, India *Int. J. Environ. Biol.* 2: 50-58.
- [26] Sahoo, K. and Dhal, N.K., 2009, Potential microbial diversity in mangrove ecosystems: A review, *Indian J. Mar. Sci.* 38: 249-256.
- [27] Wongthong, S., Bangrak, P., Phongpaichit, S., Somrithpol, S. and Songkumarn, P., 2014, Antimicrobial activity of soil fungi from Khao Nan National Park, Nakhon Si Thammarat province, Thailand, *JPAM.* 8: 2999-3010.
- [28] Elias, B.C., Said, S., de Albuquerque, S. and Pupo, M.T., 2006, The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck, *Microbiol. Res.* 161: 273-280.
- [29] Talukdar, S., Talukdar, M., Buragohian, M., Yadav, A., Yadav, R.N.S. and Bora, T.C., 2016, Enhanced candidal compound production by a new soil isolate

- Penicillium verruculosum* MKH7 under submerged fermentation, BMC. Microbiol. 16: 1-12.
- [30] Lihan, S., Lin, C.D., Ahmad, I., Sinang, F.M., Hua, N.K. and Sallehin, A.A., 2014, Antimicrobial producing microbes isolated from soil sample collected from Nanga Merit Forest in Sarawak, Malaysian Borneo, Euro. J. Exp. Bio. 4: 494-501.
- [31] Khalil, A.M.A., El-sheikh, H.H. and Sultan, M.H., 2013, Distribution of fungi in mangrove soil of coastal areas at Nabq and Ras Mohammed Protectorates, J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2: 264-274.
- [32] Tsang, C.C.C., Chan, J.F.W., Trendell-Sm, N.J., Ngan, A.H.Y., Ling, I.W.H., Yuen, K.Y., Lau, S.K.P. and Wood, P.C.Y., 2014, Subcutaneous phaeohyphomycosis in a patient with IgG4-related sclerosing disease caused by a novel ascomycete, *Hongkongmyces pedis* gen. et sp. nov.: First report of human infection associated with the family *Lindgomycetaceae*, Med. Mycol. 52: 736-747.
- [33] Thorn, R.G., Reddy, C.A., Harris, D. and Pual, E.A., 1996, Isolation of saprophytic Basidiomycetes from soil, Appl. Environ. Microbiol. 62: 4288-4292.