รหัสโครงการ 2557A13602020

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราที่แยกจากดินในถ้ำในภาคใต้ของประเทศไทย
Antimicrobial Activities of Fungi Isolated from Cave Soils in Southern Region of Thailand

สุมาลี เลี่ยมทอง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557
มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราที่แยกจากดินในถ้ำในภาคใต้ของประเทศไทย” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ดร.โสภนา วงศ์ทอง อาจารย์ประจำหลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ที่ช่วยอนุเคราะห์ตรวจสอบความถูกต้องของการจำแนกชนิดของเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ขอขอบคุณนางสาวจำเนียร กิ้วเส้ง ผู้ช่วยวิจัย นายศักดิ์นรินทร์ จำปานนท์ นายอนุสรณ์ ศรีนุ่น นางสาวสุนันทา จันทร์แย้ม นางสาวไอลดา หงษ์ทอง นางสาววรรณกานต์ รังษี นางสาวนิศากร แก้วประภา นักศึกษาปริญญาตรี หลักสูตรจุลชีววิทยา นางสาวชมพูนุช อาจทากิจ นางสาวอุษณีย์ มีจังหาร นางสาวสุมาลี น้ำแก้ว นางสาวจุไรวรรณ มาช่วย นักศึกษาปริญญาตรี หลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ที่มีส่วนร่วมในการทำงานวิจัย จนงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จสมบูรณ์

สุมาลี เลี่ยมทอง
กันยายน 2558

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราที่แยกจากดินในถ้ำในภาคใต้ของประเทศไทย
ผู้วิจัย สุมาลี เลี่ยมทอง
ปีงบประมาณ 2557

บทคัดย่อ

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของเชื้อราจำนวน 315 ไอโซเลต ที่แยกได้จากดินถ้ำใน 7 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย พบว่า เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้ออายุ 3 สัปดาห์ ของราดินถ้ำที่แยกได้ ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในคน 7 ชนิด คือ *Staphylococus aureus* ATCC25923, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Candida albicans* ATCC90028, *Cryptococcus neoformans* ATCC90012 และ *Microsporum gypseum* โดยวิธี agar well diffusion method พบว่ามีเชื้อราจำนวน 108 ไอโซเลต (34.3%) ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อราและเส้นใยราที่มีฤทธิ์ในการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อ ไปสกัดสารด้วยตัวทำละลาย แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี colorimetric broth microdilution พบว่ามีสารสกัดหยาบจำนวน 129 สารจากสารสกัดหยาบทั้งหมด 324 สาร (39.8%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml โดยให้ค่า MIC ต่ำสุดสำหรับเชื้อ *S. aureus*, MRSA, *E. coli, P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. neoformans* and *M. gypseum* เท่ากับ 16, 16, 128, 128, 8, 8, และ 32 µg/mL ตามลำดับ มีสารสกัดเพียง 1 สารที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ และมีสารสกัดหยาบจำนวน 3 สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 5-6 ชนิด เมื่อนำสารดังกล่าวไปบันทึกข้อมูล ข้อมูล ^{1}H-NMR พบว่าสามารถแบ่งสารได้เป็น 6 กลุ่ม ซึ่งมีบางกลุ่มที่ให้ข้อมูล ^{1}H-NMR ที่น่าสนใจ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราดินถ้ำ 315 ไอโซเลต พบว่าเป็นเชื้อราใน division Eumycota ใน sub-division Zygomycotina และ Deuteromycotina ซึ่งใน sub-division Zygomycotina พบ 1 genus คือ *Cunninghamella* sp. (n=2) ส่วนใน sub-division Deuteromycotina จัดเป็นเชื้อราในกลุ่ม Hyphomycetes (n=271) ได้แก่ *Aspergillus* sp. (n= 111), *Penicillium* sp. (n= 91), *Trichoderma* sp. (n=37), *Fusarium* sp. (n= 14), *Curvlaria* sp. (n=13), *Gliocladium* sp. (n=2) และ *Acremonium* sp. (n=2) และ *Paecilomyces* sp. (n=2) ส่วนเชื้อราที่เหลือจำนวน 42 ไอโซเลต เป็นเชื้อราในกลุ่ม mycelia sterilia เชื้อราถ้ำที่สร้างสารออกฤทธิ์ดี 14 ไอโซเลต เป็นเชื้อราในจีนัส *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* และ *Trichoderma*

จากการศึกษาในครั้งนี้นอกจากแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของราดินถ้ำแล้ว ยังพบว่าเชื้อราดินถ้ำเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญที่อาจนำไปใช้ในการควบคุมโรคติดเชื้อในมนุษย์ได้

Research Title: Antimicrobial Activities of Fungi Isolated from Cave Soils in Southern Region of Thailand

Resercher : Sumalee Liamthong

ABSTRACT

The aim of this study was to study antimicrobial activities of cave fungi isolated from cave soils in 7 provinces in the southern region of Thailand. Three week old fermentation broths of 315 isolates of cave fungi were tested for antimicrobial activity against 7 human pathogens including *Staphylococcus aureus* ATCC25923, Methicillin resistant *S. aureus* SK1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC25922, *Candida albicans* ATCC90028, *Cryptococus neoformans* ATCC90112 and *Microsporum gypseum* using the agar well-diffusion method. Fermentation broths and cells of active cave fungi were further extracted with chemical agents and tested for minimum inhibitory concentrations (MIC) using the colorimetric broth microdilution method. The results show that 129 of the total of 324 crude extracts (39.8%) produced MIC ≤ 200 µg/ml. The lowest MIC for *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *C. neoformans* and *M. gypseum* were 16, 16, 128, 128, 8, 8, and 32 µg/mL, respectively. Only one crude extract killed pathogen and 3 crude extracts inhibited 5-6 pathogens. Twenty crude extracts were chemically analysis using the ^{1}H-NMR method. The results showed 6 groups of ^{1}H-NMR profiles and some profiles poses interesting characteristic. Morphological studies of all 315 isolates of cave fungi revealed that these isolates belong to the division Eumycota in sub-division Zygomycotina and Deuteromycotina. Sub-division Zygomycotina found 1 genus, *Cunninghamella* sp. (n=2). Subdivision Deuteromycotina includes 271 isolates of Hyphomycetes including *Aspergillus* sp. (n= 111), *Penicillium* sp. (n= 91), *Trichoderma* sp. (n=37), *Fusarium* sp. (n= 14), *Curvlaria* sp. (n=13), *Gliocladium* sp. (n=2) and *Acremonium* sp. (n=2) และ *Paecilomyces* sp. (n=2). Moreover, it also includes 42 isolates of sterile hyphae. The 14 top cave fungi were identified by morphological characteristics and molecular technique. The result showed that these 14 isolates belonged to 4 genus; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*

This study indicates that cave fungi not only diverse but also are potential sources of antimicrobial substances that might assist in the control of infectious diseases in humans.

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
3.1	ตัวอย่างเชื้อราที่ได้จากตัวอย่างดินถ้ำ	9
3.2	ตัวอย่างเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินถ้ำ	9
3.3	การเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว	10
3.4	การสกัดสารทางเคมีของราถ้ำ ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	12
4.1	เปอร์เซ็นต์ชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากดินถ้ำ	18
4.2	ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงราถ้ำในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค โดยวิธี agar well diffusion	19
4.3	เปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จำแนกตามจังหวัดที่มาของเชื้อรา	20
4.4	เปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จำแนกตามจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	21
4.5	เปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	22
4.6	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	27
4.7	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามชนิดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์	28
4.8	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	29
4.9	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์จำแนกตามชนิดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	30

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญตารางภาคผนวก	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
คำสำคัญของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 4 ผลการวิจัย	16
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	39
บรรณานุกรรม	45
ภาคผนวก	50
ภาคผนวก ก การจัดจำแนกเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	51
ภาคผนวก ข ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ่ำ	136
ภาคผนวก ค น้ำหนักและลักษณะของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราดินถ่ำ	151
ภาคผนวก ง ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ่ำที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	160
ภาคผนวก จ ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ่ำ	176

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวอย่างรายชื่อถ้ำในจังหวัดที่จะทำการเก็บตัวอย่างดินเพื่อแยกเชื้อรา	5
4.1	ถ้ำที่เก็บตัวอย่างดินเพื่อแยกเชื้อรา	16
4.2	ชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากดินถ้ำ	17
4.3	ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	19
4.4	จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรค	21
4.5	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของยาปฏิชีวนะและน้ำเลี้ยงเชื้อ	23
4.6	น้ำหนักสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราดินถ้ำ	24
4.7	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	26
4.8	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	29
4.9	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 4 µg/ml	30
4.10	ค่า MIC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	32
4.11	ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานและช่วงค่า MIC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	33
14.12	สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุด	34
14.13	ชนิดของราดินถ้ำที่ให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุด	36
14.14	โครมาโทแกรมของสารสกัดจากราดินถ้ำที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี	37
4.15	ข้อมูลสารสกัดหยาบจากราดินถ้ำที่ส่งบันทึกข้อมูล ^{1}H-NMR	38

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางที่		หน้า
ก.1	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาเกรียบ ในจังหวัดชุมพร	52
ก.2	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาพลู ในจังหวัดชุมพร	56
ก.3	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาน้อย ในจังหวัดชุมพร	60
ก.4	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาโคก ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี	64
ก.5	การจำแนกเชื้อราทีแยกจากดินถ้ำแกลบ ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี	68
ก.6	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำขรมวนาราม ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี	72
ก.7	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาขุนพนม ในจังหวัดนครศรีธรรมราช	76
ก.8	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาปูน ในจังหวัดนครศรีธรรมราช	80
ก.9	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำแก้วสุรกานต์ ในจังหวัดนครศรีธรรมราช	84
ก.10	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำสุมโน จังหวัดพัทลุง	88
ก.11	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำคูหาสวรรค์ จังหวัดพัทลุง	92
ก.12	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาอ้อ จังหวัดพัทลุง	96
ก.13	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาพระ จังหวัดสงขลา	100
ก.14	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำศรีเกษร จังหวัดสงขลา	104
ก.15	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขานุ้ย จังหวัดสงขลา	108
ก.16	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำผึ้ง ในจังหวัดตรัง	112
ก.17	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเลเขากอบ ในจังหวัดตรัง	116
ก.18	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำสำนักสงฆ์เขาหลักจันทร์ ในจังหวัดตรัง	120
ก.19	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำช้างสี ในจังหวัดกระบี่	124
ก.20	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำบางเหียน ในจังหวัดกระบี่	128
ก.21	การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำวารีริน ในจังหวัดกระบี่	132
ข.1	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดชุมพร	137
ข.2	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดสุราษฎร์ธานี	139
ข.3	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดนครศรีธรรมราช	141
ข.4	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดพัทลุง	143
ข.5	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดสงขลา	145
ข.6	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดตรัง	147
ข.7	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดกระบี่	149
ค.1	น้ำหนักสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราดินถ้ำ	152
ค.2	ลักษณะของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อราดินถ้ำ	156

สารบัญตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ง.1	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดชุมพร ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	161
ง.2	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	163
ง.3	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	165
ง.4	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดพัทลุง ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	168
ง.5	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดสงขลา ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	170
ง.6	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดตรัง ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	172
ง.7	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดกระบี่ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	176
จ.1	ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดชุมพร	177
จ.2	ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี	179
จ.3	ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราช	181
จ.4	ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดพัทลุง	184
จ.5	ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดสงขลา	186
จ.6	ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดตรัง	188
จ.7	ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดกระบี่	190

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
3.1	ตัวอย่างเชื้อราที่ได้จากตัวอย่างดินถ้ำ	9
3.2	ตัวอย่างเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินถ้ำ	9
3.3	การเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว	10
3.4	การสกัดสารทางเคมีของราถ้ำ ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	12
4.1	เปอร์เซ็นต์ชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากดินถ้ำ	18
4.2	ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงราถ้ำในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค โดยวิธี agar well diffusion	19
4.3	เปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จำแนกตามจังหวัดที่มาของเชื้อรา	20
4.4	เปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จำแนกตามจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	21
4.5	เปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	22
4.6	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	27
4.7	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามชนิดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์	28
4.8	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	29
4.9	ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์จำแนกตามชนิดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	30

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคติดเชื้อเป็นปัญหาสำคัญของประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก สาเหตุหลักของปัญหาโรคติดเชื้อคือการเพิ่มขึ้นของเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหรือการเกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาสชนิดใหม่ๆ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในการรักษาเป็นอย่างมาก จึงมีความจำเป็นที่จะต้องแสวงหายาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ มาใช้ทดแทนยาเดิมที่ใช้รักษาไม่ได้ผล (Zhang *et al*., 2009; O'Donnell *et al*., 2010) โดยแหล่งของยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่มักจะมาจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในสิงแวดล้อมที่ยังไม่มีการสำรวจหรือสำรวจน้อย (Ningthoujam *et al*., 2009)

ถ้ำเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่มีการสำรวจเพื่อศึกษาหาจุลินทรีย์ที่สร้างสารออกฤทธิ์น้อย (Yucell and Yamac, 2010) และจากสภาพแวดล้อมทั่วไปของถ้ำที่มีอาหารน้อย ไม่มีแสงหรือมีแสงน้อย มีปริมาณออกซิเจนต่ำ มีอุณหภูมิที่สูงเนื่องจากไม่มีช่องไหลเวียนอากาศ และมีความชื้นสูง (Schabereiter-Gurtner *et al*., 2002, Goltenboth, 2006) ทำให้จุลินทรีย์ต้องมีการแข่งขันกัน สร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น เพื่อช่วยให้อยู่รอดได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญนี้ เช่น จากการศึกษาของ Kim *et al*. (1998) ที่พบว่า อัตราการผลิตสารต้านราของ actinomycetss ทีแยกได้จากถ้ำมีอัตราสูงกว่า actinomycetes ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ที่ทำการเกษตร ดังนั้นการศึกษาจุลินทรีย์ในถ้ำจึงน่าจะทำให้เกิดการค้นพบจุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ ทีมีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ได้สูง (Nakaew, 2009; Yucell and Yamac, 2010)

ราเป็นจุลินทรีย์ที่มีมากที่สุดในถ้ำ เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญในที่ที่มีอาหารน้อย และมีอัตราการสร้างสปอร์ที่ใช้ในการขยายพันธุ์สูง (Jurado *et al*., 2010) และเนื่องจากถ้ำแต่ละแห่งจะมีสภาวะแวดล้อมในถ้ำที่แตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้มีชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในถ้ำแตกต่างกันด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาราที่แยกจากดินในถ้ำ ในพื้นที่ 7 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย คือ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา ตรัง และกระบี่ จังหวัดละ 3 ถ้ำ โดยจะทำการแยกราจากดินในถ้ำให้ได้ไม่น้อยกว่า 300 ไอโซเลต เพื่อใช้ศึกษาหาราที่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค พร้อมทั้งจำแนกประเภทของราและหาสูตรโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี การศึกษาครั้งนี้จะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจากราทีแยกจากดินในถ้ำในเขตภาคใต้ของประเทศไทยเป็นครั้งแรก และผู้วิจัยคาดหวังว่าเชื้อราและข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านการแพทย์และการอุตสาหกรรมต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกเชื้อและคัดเลือกราจากดินในถ้ำที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบจากเส้นใยรา
3. เพื่อจำแนกชนิดราที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ที่ดี
4. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดี

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

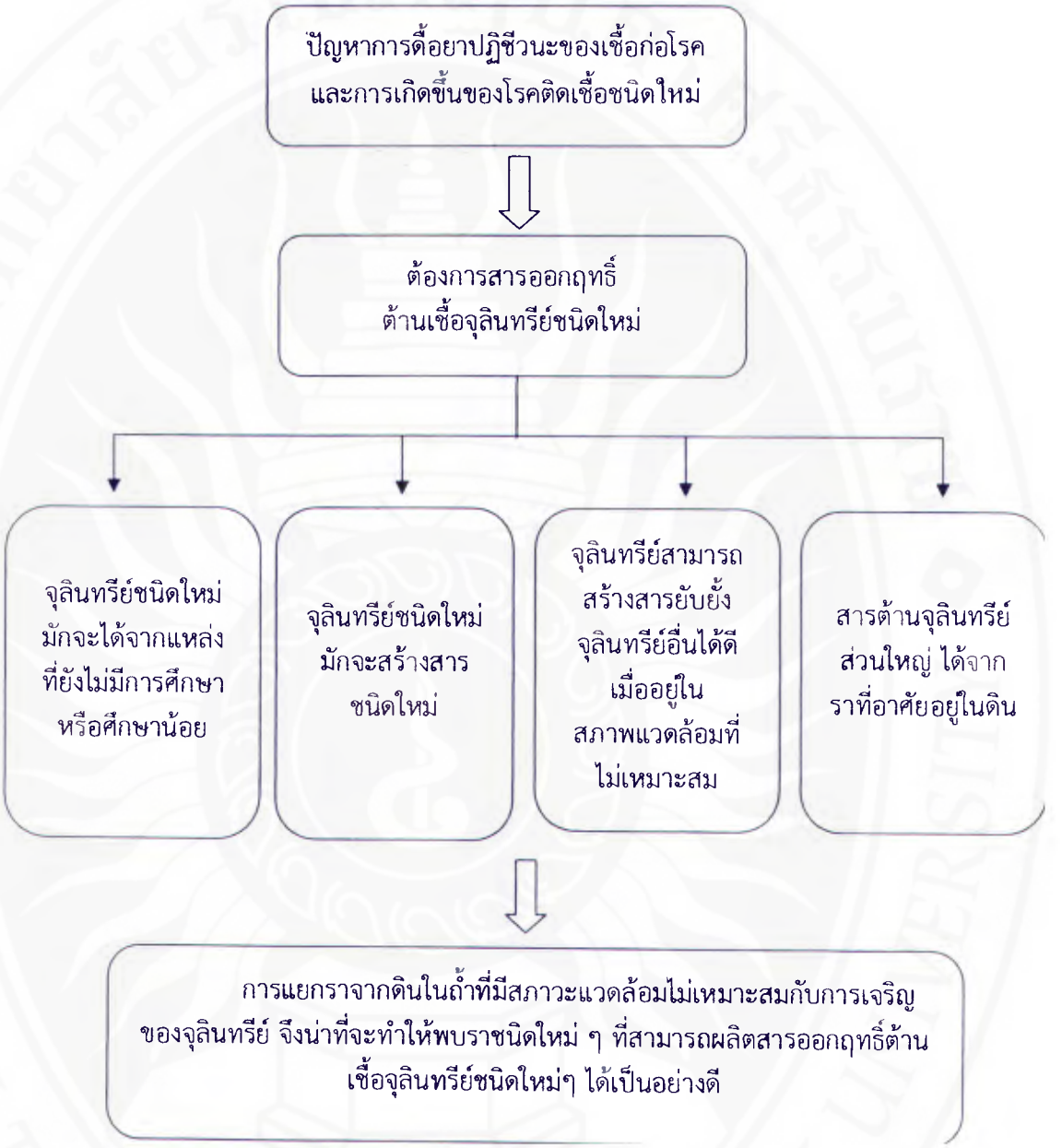
1. แยกเชื้อราจากดินในถ้ำ ในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา ตรัง และกระบี่ จังหวัดละ 3 ถ้ำ

2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบจากเส้นใยรา โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด แกรมลบ 2 ชนิด ยีสต์ 2 ชนิด และรา 1 ชนิด

3. จำแนกชนิดราที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ที่ดีด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

4. ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดีด้วยเทคนิค TLC และ ^{1}HNMR

1.4 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



1.5 คำสำคัญของการวิจัย

ราดิน (soil fungi) ถ้ำ (cave) สารยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial substances)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านยีสต์ และฤทธิ์ต้านรา ของน้ำเลี้ยงเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำ

2. ทราบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านยีสต์ และฤทธิ์ต้านรา ของสารสกัดจากราที่แยกจากดินถ้ำ

3. ทราบชนิดของราที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดี

4. ทราบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดี

5. อนุรักษ์สายพันธุ์ราที่คัดแยกได้สำหรับการศึกษาวิจัย และการตรวจกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นที่อาจมีประโยชน์ทางด้านการแพทย์ เกษตรกรรม และอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

2.1 ถ้ำในภาคใต้ของประเทศไทย

ถ้ำคือโพรงที่ลึกเข้าไปในภูเขาหรือเป็นช่องที่เป็นโพรงลึกเข้าไปในพื้นดินหรือภูเขา มีขนาดใหญ่พอที่มนุษย์สามารถเข้าไปได้ ถ้ำที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติโดยทั่วไปจะเกิดในหินปูนที่มีน้ำใต้ดินไหลผ่านกันเซาะ ซึ่งมักพบตามภูเขาหินปูนหรือภูเขาชายฝั่งทะเล ในภาคใต้ของประเทศไทยมีถ้ำอยู่เป็นจำนวนมาก ตัวอย่างถ้ำในพื้นที่จังหวัดที่จะทำการเก็บตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างรายชื่อถ้ำในจังหวัดที่จะทำการเก็บตัวอย่างดินเพื่อแยกเชื้อรา

จังหวัด	ตัวอย่างถ้ำ
ชุมพร	ถ้ำเขาเกรียบ ถ้ำเขาพลู ถ้ำรับร่อ ถ้ำเขาเงิน ถ้ำเขาข่า ถ้ำทิพย์ปรีดา ถ้ำขวัญเมือง
สุราษฎร์ธานี	ถ้าสิงขร ถ้ำปะการัง ถ้ำขมิ้น ถ้ำคูหา ถ้ำน้ำทะลุ ถ้ำค้างคาว ถ้ำสมรภูมิ ถ้ำผึ้ง ถ้ำแก้ว พร้าว ถ้ำลูกเผ็ด ถ้ำเบื้องแบบ
นครศรีธรรมราช	ถ้ำหงส์ ถ้ำวังนายผุด ถ้ำทองพรรณรา ถ้ำเขาวังทอง ถ้ำขุนคลัง ถ้ำเขาขุนพนม ถ้ำพระเจ้าศรีธรรมโศกราช ถ้ำแก้วสุรกานต์ ถ้ำเขาพับผ้า ถ้ำกรุงนาง ถ้ำเขาหลอน
พัทลุง	ถ้ำสุมโน ถ้ำมาลัยเทพนิมิต ถ้ำคูหาสวรรค์ ถ้ำมัจฉาปลาวน ถ้ำพระนอน ถ้ำเขาช้างหาย ถ้ำพุทธโคดม
สงขลา	ถ้ำเขารูปช้าง ถ้ำผึ้ง ถ้ำรูนกสัก ถ้ำตลอด ถ้ำศรีเกสร ถ้ำเขานุ้ย ถ้ำนางพญาเลือดขาว ถ้ำครก ถ้ำน้ำใส ถ้ำกระดูก
ตรัง	ถ้ำเขาช้างหาย ถ้ำเลเขากอบ ถ้ำเจ้าไหม ถ้ำเจ้าคุณ ถ้ำพระพุทธ ถ้ำพระยาพิชัย ถ้ำมรกต
กระบี่	ถ้ำเสด็จ ถ้ำเขาผึ้ง ถ้ำลอดเหนือ ถ้ำลอดใต้ ถ้ำผีหัวโต ถ้ำสองพี่น้อง ถ้ำหัวกะโหลกใน ถ้ำโต๊ะหลวง ถ้ำเสือน้อย ถ้ำเสือนอก ถ้ำเพชร ถ้ำพระ

2.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากจุลินทรีย์ที่แยกจากดินในถ้ำ

จุลินทรีย์ในดินเป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีการนำมาผลิตเป็นยาปฏิชีวนะมากที่สุด โดยพบว่ามากกว่าร้อยละ 70 ของยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันผลิตมาจากจุลินทรีย์ในดิน (Ningthoujam *et al.*, 2009) ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม actinomycetes จะเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ในดินที่ถูกศึกษามากที่สุด (Korn-Wendish and Kutzner, 1992; Yoshiko, 2003; Kumar *et al.*, 2010) ถึงแม้ว่าการศึกษา actinomycetes ที่แยกจากดินในถ้ำจะมีการศึกษาน้อยกว่า actinomycetes ที่แยกจากดินในแหล่ง

อื่นๆ มาก แต่การศึกษา actinomycetes ที่แยกได้จากดินในถ้ำนอกจากจะพบ actinomyces สายพันธุ์เป็นจำนวนมากแล้ว (Groth *et al.*, 1999; Jurado *et al.*, 2005a,b; Lee , 2006a,b,c, Nakaew, 2009) actinomyceres ที่แยกได้หลายสายพันธุ์ยังมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญ ตัวอย่างของการศึกษาสารออกฤทธิ์ที่สร้างจาก actinomycetes ที่แยกได้จากดินในถ้ำ ได้แก่

Kim *et al.*, (1998) พบว่า อัตราการผลิตสารต้านราของ actinomyces ที่แยกได้จากถ้ำมีอัตราสูงกว่า actinomyces ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ที่ทำการเกษตร

Groth *et al.*, (2002) พบว่า actinomyces ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ *Knoellia sineensis* และ *Knoellia subterranean* ที่แยกจากสิ่งแวดล้อมภายในถ้ำผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

Herold *et al.*, (2005) พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ polykedite glycoside ชนิดใหม่ คือสาร cervimycins A-D ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ vancomycin ได้ โดยสารชนิดใหม่ดังกล่าวสร้างมาจากเชื้อ *Streptomycetes tendae* ที่แยกได้จากถ้ำ Grotta dei cervi ในประเทศอิตาลี

Yucel and Yamac (2010) สามารถแยก actinomycetes จากผนังถ้ำ sleleothem surface และดินใน 19 ถ้ำ ของประเทศตุรกี ได้ทั้งหมด 290 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกับแบคทีเรียจำนวน 4 ชนิด ยีสต์จำนวน 2 ชนิด และราจำนวน 4 ชนิดแล้ว พบว่ามี actinomycetes จำนวน 180 ไอโซเลต (62%) ที่สามารถยับยั้งเชื้อที่ต้องการทดสอบได้ โดยหนึ่งใน actinomycetes ที่แยกได้ *คือ Streptomyces* sp 1492 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดและมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบควบคุม

สำหรับการศึกษาในประเทศไทย พบว่า มีคณะผู้วิจัยที่ศึกษาจุลินทรีย์ในถ้ำที่ผลิตสารออกฤทธิ์เพียง 3 กลุ่มซึ่งเป็นการศึกษา actinomycetes ทั้งสามกลุ่ม กล่าวคือ Laopaksa *et al,.* (1987) ศึกษาความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะของ actinomycetes ที่แยกได้จากดินในถ้ำในเขตภาคกลางของประเทศไทย Jaiinphun *et al.*, (2003) ศึกษาฤทธิ์ต้านราของ actinomycetes ที่แยกได้จากดินในถ้ำในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน และ Nakaew *et al.*, (2009) ที่ศึกษาความหลากหลายและการสร้างสารออกฤทธิ์ของ actinomycetes กลุ่มหายาก ที่แยกได้จากดินในถ้ำผาตูบในจังหวัดน่านและถ้ำผานางคอยในจังหวัดแพร่

สำหรับการศึกษาเชื้อราในถ้ำ โดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นการศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา โดยไม่มีการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อราในกลุ่มนี้ (Mason-Williams and Holland, 1967; Cunningham *et al.*, 1995; Koilraj, *et al.*, 1999; Novakova, 2009; Bastian *et al.*, 2010)

การศึกษาในครั้งนี้จึงน่าที่จะเป็นครั้งแรกที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราที่แยกจากดินในถ้ำในภาคใต้ของประเทศไทย

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยเรื่องการคัดเลือกเชื้อราที่แยกได้จากพืช ดิน และน้ำ จากป่าพรุควนเคร็งที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรมมีวัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. จุลินทรีย์มาตรฐานที่ใช้ทดสอบ

แบคทีเรีย

แบคทีเรียแกรมบวกได้แก่

- *Staphylococcus aureus* ATCC29523 (SA)
- Methicillin resistant *S aureus* SK1 (MRSA)

แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่

- *Escherichia coli* ATCC25922 (EC)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (PA)

เชื้อราและยีสต์

เชื้อรา ได้แก่

- *Microsporum gypseum* (MG)

ยีสต์ ได้แก่

- *Candida albicans* ATCC90028 (CA)
- *Cryptococcus neoformans* ATCC90012 (CN)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

- Saburaund dextrose agar (SDA)
- Saburaund dextrose broth (SDB)
- Mueller Hinton agar (MHA)
- Mueller Hinton broth (MHB)
- Potato dextrose agar (PDA)
- Potato dextrose broth (PDB)
- Nutrient agar (NA)
- Nutrient broth (NB)

สารเคมี

- Methanol
- Ethyl acetate
- Hexane
- ยาต้านแบคทีเรีย: vancomycin, gentamycin
- ยาต้านเชื้อรา : amphotericin B, miconazole
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Resazurin indicator (0.18%)

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆ ทางจุลชีววิทยาและทางเคมี

- บีกเกอร์ (beaker)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- กรวยแยก (separating funnel)
- กรวยกรอง (funnel filtration)
- จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- หลอดทดลอง (tube)
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven)
- แผ่นกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

3.2 วิธีการทดลอง

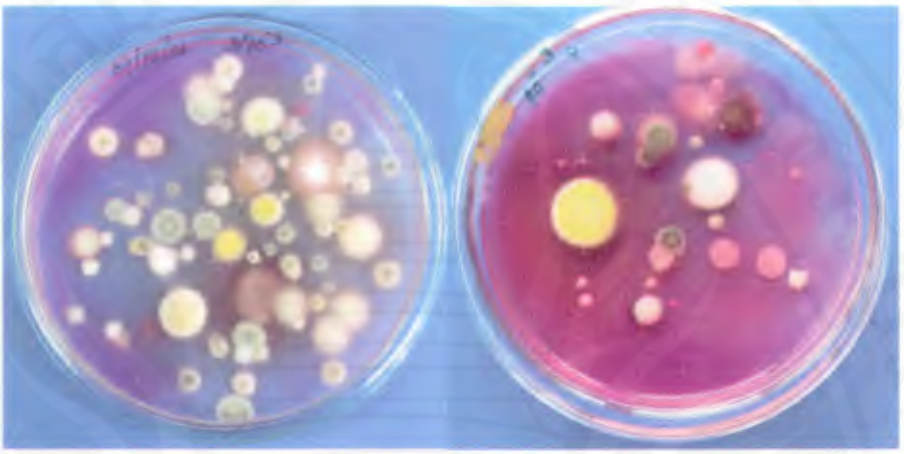
1. **การเก็บตัวอย่างดิน**

ทำการเก็บตัวอย่างดิน จากถ้ำใน 7 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย คือ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา ตรัง และกระบี่ จังหวัดละ 3 ถ้ำ โดยเก็บตัวอย่างดินภายในถ้ำที่ระดับความลึก 5-10 cm จากระดับผิวดิน ทำการเก็บดินถ้ำ ถ้ำละ 5 จุด นำดินใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ นำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อทำการแยกเชื้อต่อไป

2. การแยกเชื้อราจากดิน

นำตัวอย่างดินในแต่ละถ้ำมารวมกัน ผสมให้เข้ากัน ชั่งดิน 1 กรัม ผสมกับ sterile saline 9 ml เจือจางต่อด้วยวิธี 10 fold dilution จนกระทั่งได้ระดับการเจือจางอยู่ในช่วง 10^{1} - 10^{5} นำ 0.1 ml ของสารแขวนลอยตัวอย่างดินแต่ละระดับการเจือจางไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่เติมยาปฏิชีวนะ nystatin (250 mg/L), streptomycin (125 mg/L) และ penicillin G (50 mg/L) นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตผลทุกวัน เมื่อพบว่ามีการเจริญของเชื้อรา (ภาพที่ 3.1) ทำการตัดส่วน hyphal tip ของเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน ภายใต้กล้อง stereo zoom นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน นับจากวันแรกที่พบการงอกของเชื้อราจาก

ชิ้นส่วนตัวอย่าง เมื่อแยกเชื้อราได้บริสุทธิ์แล้ว (ภาพที่ 3.2) ทำการเก็บเชื้อราอาหารวุ้นเอียง PDA ราดทับด้วยพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อ แช่ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4°C



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างเชื้อราที่ได้จากตัวอย่างดินถ้ำ

ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินถ้ำ

3. **การจำแนกชนิดของเชื้อราดินถ้ำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา**

นำตัวอย่างราดินถ้ำ จำนวนถ้ำละ 15 ไอโซเลต ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราเจริญและมีลักษณะโคโลนีที่เด่นชัด นำมาบันทึกภาพ บันทึกลักษณะโคโลนี ลักษณะเส้นใยและสปอร์ทำ slide culture เพื่อดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างสืบพันธุ์ทั้งชนิดมีเพศและไม่มีเพศภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยเทียบเคียงกับลักษณะของเชื้อราใน Compendium of Soil Fungi Volume I (Domsch *et. al.*, 1993), Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett and Hunter, 1998) และ Identification of Pathogenic Fungi (Campbell *et. al.*, 2013)

4. การเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำเชื้อราที่แยกได้ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 3-4 วัน หรือจนกว่าจะพบว่ามีการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา ใช้ใบมีดผ่าตัดจุ่ม 95% ethanol นำไปผ่านเปลวไฟ แล้วรอให้เย็น หลังจากนั้นนำไปตัดชิ้นส่วนบริเวณขอบโคโลนี ให้มีขนาดชิ้นละ 1x1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 300 ml ที่บรรจุในฟลาส์กขนาด 500 ml โดยเลี้ยงชนิดละ 2 ฟลาสก์ นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 3.3) ตัวอย่างเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินถ้ำเมื่อครบกำหนด ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อรา เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

ภาพที่ 3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว

5. การสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราและเส้นใยราด้วยตัวทำละลายทางเคมี

นำน้ำเลี้ยงเชื้อราที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้จากการทดสอบเบื้องต้นไปสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี เพื่อหาสารต้านจุลินทรีย์ที่เชื้อราชนิดนั้น ๆ สร้างขึ้น โดยการกรองแยกเส้นใยของเชื้อราออก โดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

5.1 การสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อรา

ทำการสกัดโดยใช้ ethyl acetate (EtOAc, AR grade) โดยใช้อัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อรา ต่อ EtOAc เท่ากับ 2:1 ทำการสกัดทั้งหมด 2 ครั้ง แล้วนำ EtOAc ที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกันแล้วใส่สารกำจัดน้ำ (dehydrating agent) คือ sodium sulphate anhydrous ลงไป หลังจากนั้นกรองแล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ

ประมาณ 40-45 °C ได้สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BE, Broth EtOAc) (ภาพที่ 3 4)

5.2 การสกัดเส้นใยของเชื้อรา

ทำการสกัดคล้ายกับการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อรา โดยนำเส้นใยของเชื้อราแช่ใน methanol (MeOH, commercial grade) เป็นเวลา 2 วัน นำสารละลาย MeOH ไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยตัวทำละลายบางส่วนออกไป จากนั้นเติมน้ำลงไป แล้วนำไปสกัดด้วย hexane (AR grade) ในอัตราส่วน 2:1 โดยทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำ hexane ที่ได้จากการสกัดไปทำแห้ง หลังจากนั้นนำสารละลาย aqueous MeOH ที่ผ่านการสกัดด้วย hexane แล้ว นำไปสกัดต่อด้วย EtOAc ในอัตราส่วน 2:1 เช่นกัน โดยสกัดด้วย EtOAc 2 ครั้ง ซึ่งจากการสกัดดังกล่าวจะได้สารสกัด 2 ส่วน คือ CH (Cell hexane) และ CE (Cell EtoAC) ตามลำดับ (ภาพที่ 3.4)

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

6.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้อรา ด้วยวิธี agar well diffusion (Lorian, 1996)

6.1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

เตรียม inoculum ด้วยการ streak เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC29523, Methicillin-Resistant *S aureus* (MRSA) SK1, *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) และเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC90028 และ *Cryptococcus neoformans* ATCC90012 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ 3-5 single colonies ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) สำหรับแบคทีเรีย และ sabourod dextrose broth (SDB) สำหรับยีสต์ นำไปบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ใน shaker incubator เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที หลังจากนั้นนำมาปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 และ 2.0 Mcfarland standard สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับด้วย normal saline solution (NSS) 0.85% ทำการลงเชื้อโดยใช้ sterile cotton swab จุ่มเชื้อ แล้วบิดให้หมาด ทำการ swab ให้ทั่วจานอาหารที่มีความหนา 4 mm โดยแบคทีเรียใช้อาหาร mueller hinton agar (MHA) และยีสต์ใช้ sabourod dextrose agar (SDA) ทำการเจาะวุ้นอาหารด้วยปลายที่จับของ pasteur's pipette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm โดยทำทั้งหมด 17 หลุมต่อจาน หลังจากนั้นหยดน้ำเลี้ยงเชื้อของราที่เพาะเลี้ยงใน PDB ที่อายุ 3 สัปดาห์ ปริมาตร 80 µl ลงไปในหลุมที่เจาะไว้แล้ว โดยชุดควบคุมทดสอบด้วยแผ่นยาปฏิชีวนะ สำหรับแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC29523 ใช้ยา vancomycin 30 µg/แผ่น *E. coli* ATCC25922 และ *P. auruginosa* ATCC 27853 ใช้ยา gentamicin 10 µg/แผ่น ส่วนยีสต์ใช้ amphotericin B 10 µg/แผ่น นำไปบ่มที่ 35 °C 18-24 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans* ATCC90012 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการอ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone โดยใช้ vernier caliper หน่วยการวัดเป็นมิลลิเมตร

ภาพที่ 3.4 การสกัดสารทางเคมีของราถ้ำ ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

6.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา (ดัดแปลงจากวิธีการของ Huang *et al*., 2000)

เตรียม inoculum ของเชื้อรา โดยเลี้ยง *M. gypseum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA นำไป incubate ที่ 25°C 3-4วัน ให้ได้โคโลนีที่มีลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 cm หลังจากนั้นใช้ pasteur's pipette เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่รอบ ๆ โคโลนี ของเชื้อราที่กำลังเจริญเติบโต โดยเจาะห่างจากขอบของ colony ประมาณ 0.5 cm แล้วหยอดน้ำเลี้ยงเชื้อราที่เพาะเลี้ยงใน PDB ที่อายุ 3 สัปดาห์ ปริมาตร 80 µl ลงไปในหลุมที่เจาะไว้แล้ว โดยชุดควบคุมทดสอบด้วยแผ่นยาปฏิชีวนะ miconazole nitrate 30 µg/แผ่น นำไป incubate ที่ 25 °C 3-4 วัน สังเกตผลการยับยั้งเชื้อทุกวัน หากมีการยับยั้งจะพบ inhibition zone หรือพบว่าเชื้อจะไม่สามารถเจริญเลยหลุมไปได้

6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา โดยวิธี colorimetric broth microdilution

6.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานโดยการ streak เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC29523, MRSA SK1, *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC90028 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA และบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *C. neoformans* ATCC90012 จะ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เช่นเดียวกับ *C. albicans* แต่จะบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนดเขี่ยเชื้อ 3-5 single colonies ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) สำหรับแบคทีเรีย และอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 สำหรับเชื้อยีสต์ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 และ 2.0 Mcfarland standard (MF) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับด้วย normal saline solution (NSS)

สำหรับเชื้อรา *M. gypseum* จะเตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ หรือจนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์ ทำการเก็บสปอร์โดยการใช้ลูกแก้วที่ปราศจากเชื้อกลิ้งบนผิวโคโลนีเชื้อราเพื่อให้สปอร์หลุดออกจากเส้นใย เติม NSS 0.85% แล้วปรับความขุ่นของ spore suspension ให้ได้ความเข้มข้น $4x10^3$ – $5x10^4$ spore/ml โดยใช้ haemacytometer

6.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml (ดัดแปลงจาก CLSI M7-A4, 2000)

นำสารสกัดหยาบจากเชื้อรามาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/mL เก็บไว้เป็น stock solution ที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อจะใช้ทำการทดสอบ นำสารละลายที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว มาละลายต่อด้วย DMSO ในอัตราส่วน 1:10 และละลายต่ออีกครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth (MHB) ในอัตราส่วน 1:25 ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 400 µg/ml ดูดสารสกัดหยาบ 50 µl ใส่ในแต่ละหลุม sterile 96-well microtiter plate ความเข้มข้นละ 2 หลุม จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน (0.5 MF) มาเจือจางด้วย NSS ในอัตราส่วน 1:200 ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียมาตรฐานประมาณ $5x10^5$ CFU/ml ดูดสารละลายแบคทีเรียมาตรฐาน 50 µl ใส่ในแต่ละหลุม ซึ่งจะทำให้ได้

ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ 200 µg/ml บ่ม plate ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม 10 µl ของ resazurin indicator 0.18% ลงไปในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ อ่านผลการทดสอบเมื่อครบเวลาที่กำหนด

ใช้ยา vancomycin และ gentamicin ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 4 µg/ml เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกและใช้ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดสำหรับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ตามลำดับ

6.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml (ดัดแปลงจาก CLSI MA27-A2, 2002a)

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อยีสต์เช่นเดียวกับแบคทีเรีย เพียงแต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 และบ่ม microtiter plate ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. albicans* และ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สำหรับเชื้อ *C. neoformans* เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงเติม 10 µl ของ resazurin indicator 0.18% ลงไปในแต่ละหลุม และทำการอ่านผลการทดสอบหลังจากที่บ่ม plate ไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ใช้ยา amphotericin B ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 4 µg/ml เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกในการยับยั้งยีสต์และใช้ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัด

6.2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml (ดัดแปลงจาก CLSI MA38-A, 2002b)

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อราเช่นเดียวกับแบคทีเรีย เพียงแต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 และบ่ม microtiter plate ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 6 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงเติม 10 µl ของ resazurin indicator 0.18% ลงไปในแต่ละหลุม และทำการอ่านผลการทดสอบหลังจากที่บ่ม plate ไว้ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25°C

ใช้ยา miconazole ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 4 µg/ml เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกในการยับยั้งราและใช้ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัด

ในการอ่านผลการทดสอบ อาศัยการเปลี่ยนสีของ resazurin ตามวิธีของ Drummond and Waigh (2000) ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อได้ resazurin จะมีสีน้ำเงินหรือสีม่วงเหมือนเดิม (ผลบวก) แต่ถ้าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (ผลลบ) เชื้อจะสามารถเติบโตและเปลี่ยนสี resazurinให้เป็นสีชมพู

นำสารสกัดซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ไปทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) หรือ minimal fungicidal concentration (MFC)

6.2.5 การหาค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบจากรา

การหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบใช้วิธี colorimetric broth microdilution ที่ดัดแปลงจาก CLSI M7 – A4 (CLSI, 2000) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ดัดแปลงจาก CLSI MA27 – A2 (CLSI, 2002a) สำหรับเชื้อยีสต์ และดัดแปลงจาก CLSI MA38 – A (CLSI, 2002b) สำหรับเชื้อรา โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบด้วยวิธี serial 2-fold dilution โดย

เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 128 µg/mL และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 64, 32, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 µg/mL ตามลำดับ

หลังจากบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ซึ่งจะแสดงผลเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วง คือค่า MIC สาหรับสารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 128 µg/mL จะรายงานว่ามีค่า MIC เท่ากับ 200 µg/mL

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียหรือยีสต์ รา (MBC หรือ MFC) ของสารสกัดหยาบจากราจะทำโดยนำสารละลายจากหลุม microtiter plate ที่มีค่าความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับค่า MIC ไป streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA สำหรับเชื้อแบคทีเรียและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA สำหรับเชื้อยีสต์และรา นำไปบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหาร คือค่า MBC และความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อยีสต์หรือราเจริญบนอาหาร คือค่า MFC

7. การจำแนกชนิดของเชื้อราที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดที่ดีที่สุด

นำเชื้อราดินถ้ำที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดที่ดีทีสุด มาสกัดดีเอ็นเอ และ ทำ PCR บริเวณยีน ITS1 ถึง ITS2 (Lian *et al.*, 2008) ด้วยคู่ primer ITS5 และ ITS4 จำแนกชนิดเชื้อราดินถ้ำโดยหาลำดับเบสของ DNA ด้วยวิธี direct sequenced ที่ Macrogen ประเทศเกาหลี แล้วนำข้อมูลมา BLAST search ผ่าน NCBI GenBank database (Altschul *et al.*, 1990)

8 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น

นำสารสกัดจากเชื้อราที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี มาศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC และส่งทดสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค ^{1}HNMR ที่ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การแยกเชื้อราจากดินถ้ำ

ในการเก็บตัวอย่างจากดินถ้ำเพื่อทำการศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินจากถ้ำใน 7 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย คือ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง จังหวัดละ 3 ถ้ำ ซึ่งมีรายถ้ำที่ทำการเก็บตัวอย่างและรหัสถ้ำแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ถ้ำที่เก็บตัวอย่างดินเพื่อแยกเชื้อรา

จังหวัด	ชื่อถ้ำ	รหัสถ้ำ
ชุมพร	ถ้ำเขาเกรียบ	CCP 1
	ถ้ำเขาพลู	CCP 2
	ถ้ำเขานาง	CCP 3
สุราษฎร์ธานี	ถ้ำเขาโคก	CSR 1
	ถ้ำแกลบ	CSR 2
	ถ้ำขรมวนาราม	CSR 8
นครศรีธรรมราช	ถ้ำเขาขุนพนม	CNA 1
	ถ้ำเขาปูน	CAN 2
	ถ้ำแก้วสุรกานต์	CAN 3
พัทลุง	ถ้ำสุมโน	CPA 1
	ถ้ำคหาสวรรค์	CPA 2
	ถ้ำเขาอ้อ	CPA 3
สงขลา	ถ้ำศรีเกษร	CSK 1
	ถ้ำเขาพระ	CSK 2
	ถ้ำเขานุ้ย	CSK 3
ตรัง	ถ้ำผึ้ง	CTR 1
	ถ้ำเลเขากอบ	CTR 2
	ถ้ำสำนักสงฆ์เขาหลักจันทร์	CTR 3
กระบี่	ถ้ำช้างสี	CKB 1
	ถ้ำบางเหียน	CKB 2
	ถ้ำวารีริน	CKB 3

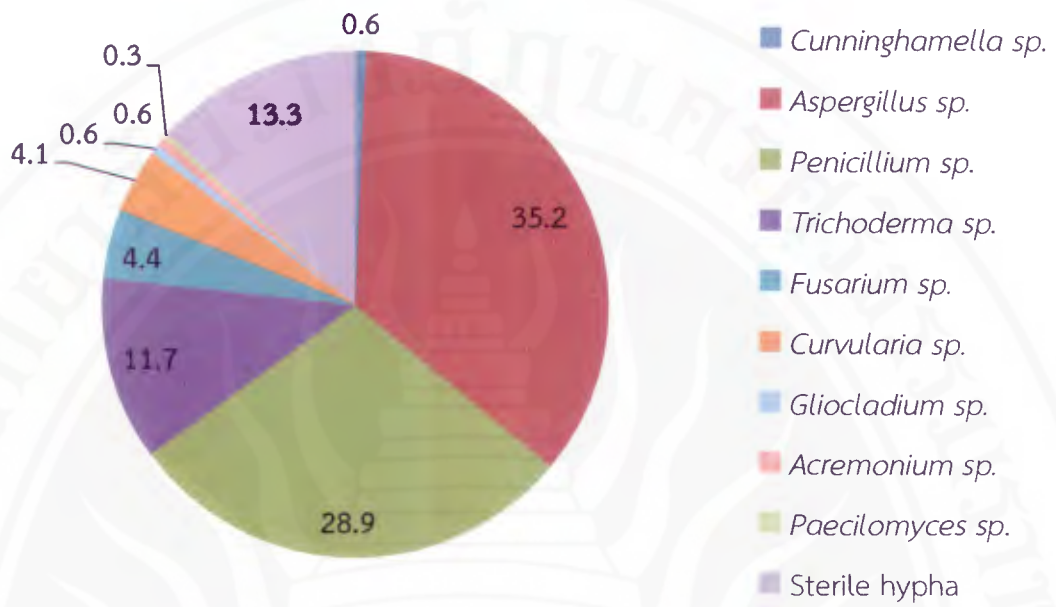
4.2 การจำแนกชนิดของเชื้อราดินถ้ำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการนำตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากดินในแต่ละถ้ำ ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน จำนวนถ้ำละ 15 ไอโซเลต รวมทั้งสิ้น 315 ไอโซเลต ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน พบว่าเชื้อรามีลักษณะโคโลนี และลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงดังตารางในภาคผนวกที่ ก.1 - ก.15

เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราทั้ง 315 ไอโซเลต ที่แยกได้ไปเทียบเคียงกับเชื้อราในคู่มือจำแนก 3 ฉบับคือ Compendium of Soil Fungi Volume I (Domsch *et. al.*, 1993), Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett and Hunter, 1998) และ Identification of Pathogenic Fungi (Campbell *et al.*, 2013) พบว่าเชื้อราที่นำมาศึกษาเป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกั้น ไม่พบโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จัดอยู่ใน division Eumycota ใน sub-division Zygomycotina และ Deuteromycotina ซึ่งใน sub-division Zygomycotina พบ 1 genus คือ *Cunninghamella* sp จำนวน 2 ไอโซเลต (0 63%) ส่วนใน sub-division Deuteromycotina จัดเป็นเชื้อราในกลุ่ม Hyphomycetes จำนวน 271 ไอโซเลต (86.0%) ได้แก่ *Aspergillus* sp จำนวน 111 ไอโซเลต (35.2%), *Penicillium* sp. จำนวน 91 ไอโซเลต (28.9%), *Trichoderma* sp จำนวน 37 ไอโซเลต (11.7%), *Fusarium* sp. จำนวน 14 ไอโซเลต (4.4%), *Curvlaria* sp จำนวน 13 ไอโซเลต (4 1%), *Gliocladium* sp. และ *Acremonium* sp ชนิดละ 2 ไอโซเลต (0.6 และ 0.6 %) และ *Paecilomyces* sp จำนวน 1 ไอโซเลต (0 3%) ส่วนเชื้อราที่เหลือจำนวน 42 ไอโซเลต เป็นเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ จึงจัดอยู่ในกลุ่ม sterile hypha (13.3%) (ตารางที่ 4.2 และ ภาพที่ 4.1)

ตารางที่ 4.2 ชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากดินถ้ำ

Division (จำนวนไอโซเลต)	Sub-Division (จำนวนไอโซเลต)	Genus (จำนวนไอโซเลต)
Eumycota (315)	Zygomycotina (2)	*Cunninghamella* sp (2)
	Deuteromycotina (271)	*Aspergillus* sp. (111)
		Penicillium sp. (91)
		Trichoderma sp. (37)
		Fusarium sp (14)
		Curvularia sp. (13)
		Gliocladium sp.(2)
		Acremonium sp.(2)
		Paecilomyces sp.(1)
	Sterile hypha (42)	



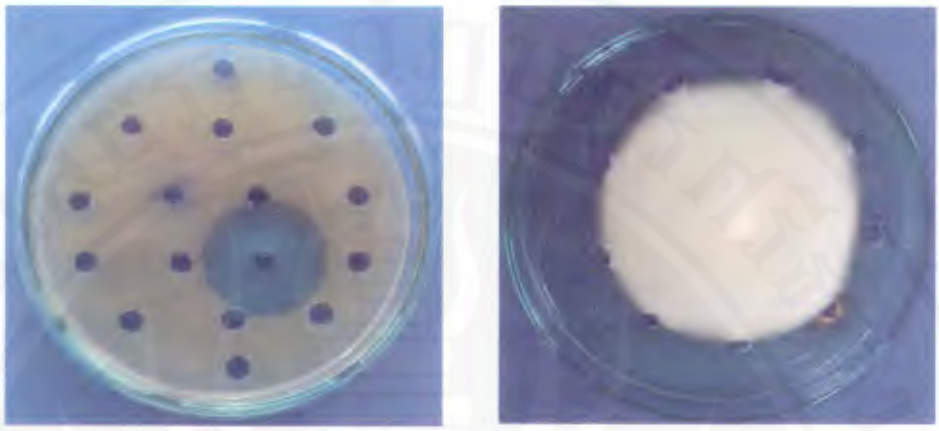
ภาพที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์ชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากดินถ้ำ

4.3 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion

จากการนำราที่แยกได้จากดินถ้ำจำนวน 315 ไอโซเลต ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 7 ชนิด ด้วยวิธี agar well diffusion (ภาพที่ 4.2) พบว่า มีเชื้อราจำนวน 108 ไอโซเลต (34.3%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (ตารางที่ 4.3)

เชื้อราที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดนครศรีธรรมราช มีจำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่ผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากที่สุด โดยมีเชื้อรา 53.3% ของเชื้อราที่แยกได้ ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เชื้อราที่แยกจากจังหวัดที่เหลือ มีเชื้อราจำนวน 22.2-37.8% ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (ตารางที่ 4.3 และ ภาพที่ 4.3)

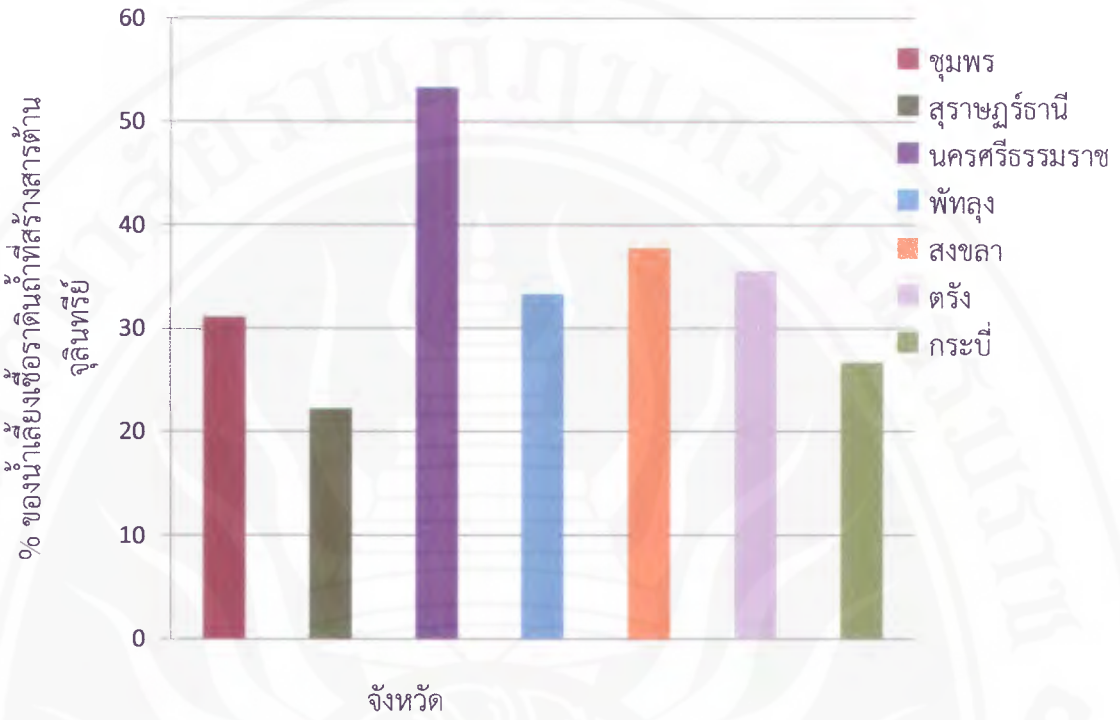
เมื่อพิจารณาถึงจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งด้วยน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ พบว่า น้ำเลี้ยงราดินถ้ำสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 1-4 ชนิด และน้ำเลี้ยงราถ้ำส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้น้อยชนิด โดยมีน้ำเลี้ยงจากราถ้ำจำนวน 73 ไอโซเลต (23.2%) ที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 1 ชนิด จำนวน 25 ไอโซเลต (7.9%) ที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 2 ชนิด และมีน้ำเลี้ยงจากดินถ้ำเพียง 6 (1.9%) และ 4 (1.3%) ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 3 และ 4 ชนิดตามลำดับ (ตารางที่ 4.3 และ ภาพที่ 4.4)



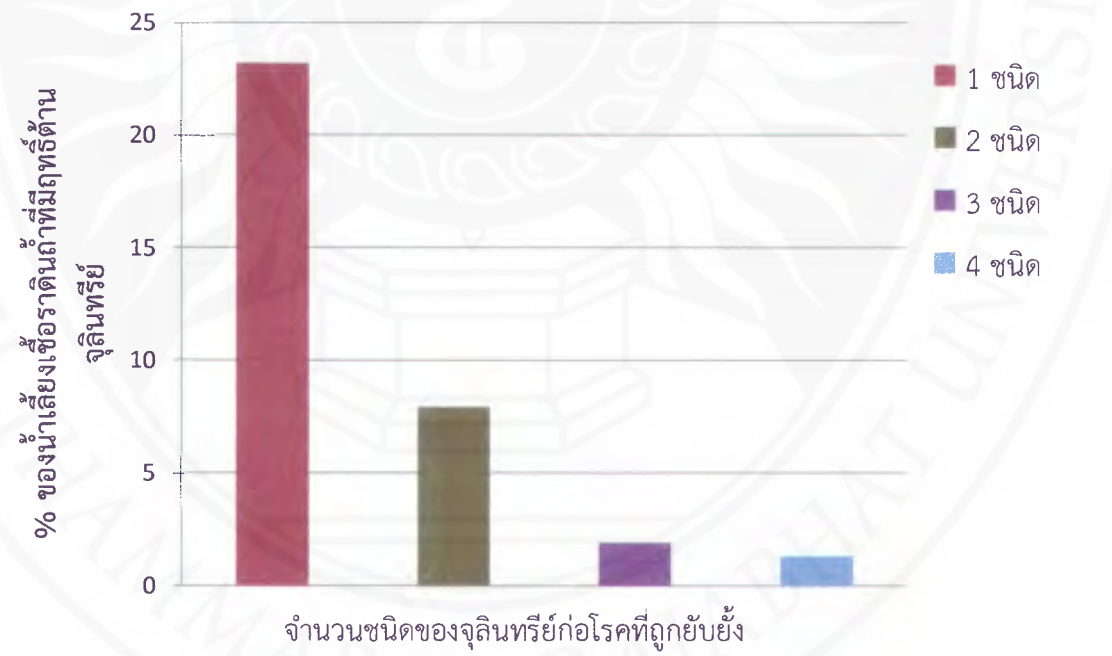
ภาพที่ 4.2 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงราถ้ำในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค โดยวิธี agar well diffusion

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

จังหวัด	จำนวนไอโซเลตที่นำมาทดสอบฤทธิ์	จำนวนไอโซเลตที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค				
		1 ชนิด	2 ชนิด	3 ชนิด	4 ชนิด	รวม
ชุมพร	45	11	3	0	0	14
สุราษฎร์ธานี	45	7	3	0	0	10
นครศรีธรรมราช	45	16	7	1	0	24
พัทลุง	45	10	2	0	3	15
สงขลา	45	13	3	1	0	17
ตรัง	45	9	5	2	0	16
กระบี่	45	7	2	2	1	12
รวม	315	73	25	6	4	108



ภาพที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จำแนกตามจังหวัดที่มาของเชื้อรา



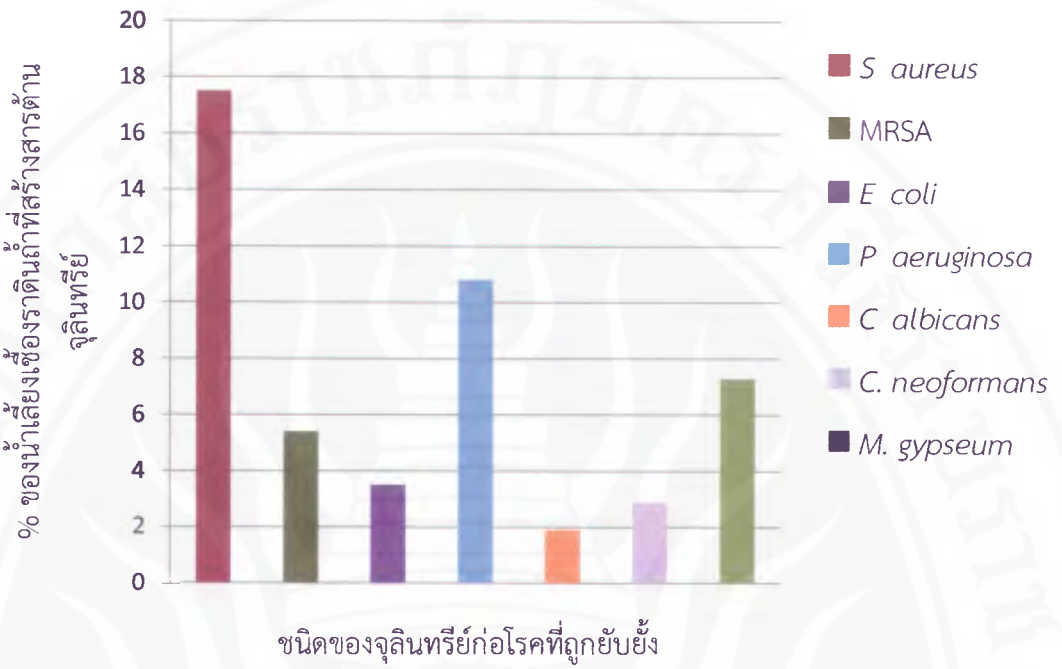
ภาพที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จำแนกตามจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งโดยน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำ พบว่า จากเชื้อราที่นำมาทดสอบ 315 ไอโซเลต น้ำเลี้ยงราดินถ้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC25923 ได้มากที่สุด โดยมีน้ำเลี้ยงจากเชื้อราดินถ้ำ 55 ไอโซเลต (17.5%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดนี้ น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* ATCC27853 ได้ดีรองลงมา โดยมีน้ำเลี้ยงจากเชื้อราดินถ้ำ 34 ไอโซเลต (10.8%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. aeruginosa* ATCC27853 อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำเลี้ยงจากเชื้อราดินถ้ำสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่เหลือได้น้อย โดยมีจำนวนน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำน้อยกว่าร้อยละ 8 ของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำที่นำมาทดสอบ ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *M gymseum*, แบคทีเรียแกรมบวก MRSA SK1 แบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC25922และเชื้อยีสต์ก่อโรคทั้ง 2 ชนิดได้ (ตารางที่ 4.4 และ ภาพที่ 4.5)

ตารางที่ 4.4 จำนวนไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรค

จังหวัด	จำนวนไอโซเลตของราถ้ำที่ทดสอบ	จำนวนไอโซเลตของราถ้ำที่มีฤทธิ์ยับยั้ง							
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG	รวม*
ชุมพร	45	7	0	1	8	0	0	2	14
สุราษฎร์ธานี	45	6	2	1	2	0	1	1	10
นครศรีธรรมราช	45	7	2	0	17	2	2	3	24
พัทลุง	45	9	6	2	3	1	1	4	15
สงขลา	45	10	3	3	0	1	0	5	17
ตรัง	45	8	2	1	1	1	3	6	16
กระบี่	45	8	2	3	3	1	2	2	12
รวม	315	55	17	11	34	6	9	23	108

*=มีเชื้อราดินถ้ำบางไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากกว่า 1 ชนิด



ภาพที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง

สำหรับการทดสอบควบคุมในการศึกษาครั้งนี้ใช้ยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน vancomycin ความเข้มข้น 30 µg/disc สำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC25923 และ MRSA ซึ่งให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 20.8 และ 16.9 mm และใช้ยา gentamicin ความเข้มข้น 10 µg/disc สำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 ซึ่งให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 21.3 และ 23.1 mm และใช้ยา amphotericin B ความเข้มข้น 10 µg/disc สำหรับเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC90028 และ *C. neoformans* ATCC90012 ซึ่งให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 14.5 และ 15.0 mm สำหรับเชื้อรา *M. gypseum* เมื่อทดสอบกับยา miconazole ความเข้มข้น 30 µg/disc พบว่าถูกยับยั้งด้วยยาชนิดนี้ (ตารางที่ 4.5) ซึ่งผลจากการทดสอบควบคุมทั้งหมด แสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบทั้งหมดไวต่อยามาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำแสดงผลดังตารางในภาคผนวกที่ ข.1 - ข.7 ซึ่งพบว่าราดินถ้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC25923, MRSA และ *E. coli* ATCC25922 อยู่ในช่วง 8.0-17.0, 9.0-15.4 และ 7.4-16.3 mm ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ที่ได้จากการทดสอบโดยยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน

สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC27853 พบว่า ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone อยู่ในช่วง 6.3-27.7 mm โดยมีน้ำเลี้ยงของเชื้อรา CNA 2-5 ที่ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone กว้างกว่ายาปฏิชีวนะมาตรฐาน gentamicin ที่ใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบ ส่วนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำต่อเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC90028 พบว่าอยู่ในช่วง 10.0-27.9 mm ซึ่งพบว่ามีน้ำเลี้ยงราดินถ้ำจำนวน 2 ไอโซเลต คือ CKB 3-1 และ CSK3-2 ที่ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 21.0 และ 27.9 mm ซึ่งกว้างกว่ายาปฏิชีวนะมาตรฐาน ส่วนผลการทดสอบกับเชื้อ *C. neoformans* ATCC90012 นั้น พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อราให้ค่า inhibition zone ต่อเชื้อนี้อยู่ในช่วง 7.5-31.0 mm ซึ่งมีเชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลต คือ CSR 2-5, CNA 2-12, CAN 3-13 และ CKB 3-1 ที่ให้ค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 15.6-31.0 mm ซึ่งกว้างกว่าที่ได้จากยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบ สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำต่อเชื้อ *M. gypseum* พบว่ามีน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ 23 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *M. gypseum* ได้ (ตารางภาคผนวกที่ ข.1 - ข.7 และตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของยาปฏิชีวนะและน้ำเลี้ยงเชื้อ

สารทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)						
	SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
Vancomycin	20.8	16.9					
Gentamicin			23.1	21.3			
Amphotericin B					14.5	15.0	
Miconazole							+
น้ำเลี้ยงเชื้อ	8.0-17.0	9.0-15.4	7.4-16.3	6.2-27.7	10.0-27.9	7.5-31.0	+

SA = *S. aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1
PA = *P. aeruginosa* ATCC27853, EC = *E. coli* ATCC25922
CA = *C. albicans* ATCC90028, CN = *C. neoformans* ATCC90012
MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ
+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

4.4 สารสกัดจากเชื้อราดินถ่ำ

เมื่อนำเชื้อราดินถ่ำ จำนวน 108 ไอโซเลต ที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ไปทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate และสกัดเส้นใยด้วย hexane และ ethyl acetate จะได้สารสกัดหยาบชนิดละ 108 สาร รวมเป็นสารสกัดหยาบที่สกัดได้ทั้งสิ้น 324 สาร โดยมีน้ำหนักของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate (BE) สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย hexane (CH) และสารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย ethyl acetate (CE) อยู่ในช่วง 1 1-128.9, 2.4-67 9 และ 1.1-73.8 mg ตามลำดับ (ตารางที .1) น้ำหนักเฉลี่ยของสารสกัดหยาบ CE มีค่าเท่ากับ 21 7 mg ซึ่งใกล้เคียงสารสกัดหยาบ BE ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 20.5 มิลลิกรัม ส่วนสารสกัดหยาบ CH มีน้ำหนักเฉลี่ยต่ำสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12.6 มิลลิกรัม (ตารางที่ 4.6 และตารางภาคผนวกที่ ค.1) 4.1) ลักษณะของสารที่สกัดได้แสดงดังตารางภาคผนวกที่ ค.2

ตารางที่ 4.6 น้ำหนักสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราดินถ่ำ

ชนิดของสารสกัดหยาบ	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (mg)	
	ช่วงน้ำหนัก	น้ำหนักเฉลี่ย
BE	1.1-128.9	20.5
CH	2.4-67.9	12.6.
CE	1.1-73.8	21.7

BE = สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราด้วย ethyl acetate

CH = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย hexane

CE = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย ethyl acetate

4.5 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

จากการนำสารสกัดหยาบจากราดินถ้ำจากเชื้อราจำนวน 108 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution แสดงผลการทดสอบดังข้อมูลในตารางภาคผนวกที่ ง.1 – ง.7 ซึ่งพบว่า มีสารสกัดหยาบจากเชื้อราจำนวน 80 ไอโซเลต (74.1%) จำนวน 129 สาร (39.8%) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 1-6 ชนิด และสารสกัดส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเพียงชนิดเดียว โดยมีสารสกัดหยาบจำนวน 81 สาร (25.0%) ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 1 ชนิด ในขณะที่มีสารสกัดหยาบจำนวน 30, 15, 2 และ 1 สาร (9.3, 4.6, 0.9 และ 0.3%) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 2, 3, 5 และ 6 ชนิด ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.6)

สารสกัดหยาบมีรูปแบบในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 2 ชนิด จำนวน 13 รูปแบบ โดยมีรูปแบบที่ยับยั้ง *S. aureus* ATCC25923 ร่วมกับ MRSA SK1 เป็นรูปแบบที่พบบ่อยที่สุด และมีรูปแบบในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด จำนวน 10 รูปแบบ โดยมีรูปแบบที่ยับยั้ง *S. aureus* ATCC25923 ร่วมกับ MRSA SK1 และ *E. coli* ATCC25922 และรูปแบบที่ยับยั้ง *S. aureus* ATCC25923 ร่วมกับ *P. aeruginosa* ATCC27853 และ *C. neoformans* ATCC90012 เป็นรูปแบบที่พบบ่อยที่สุด มีรูปแบบที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 5 และ 6 ชนิด ประเภทละ 1 รูปแบบ โดยที่รูปแบบที่ยับยั้งจุลินทรีย์ 5 ชนิด จะเป็นการยับยั้ง *S. aureus* ATCC25923, MRSA SK1, *E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC27853 ร่วมกับ *C albicans* ATCC90028 สำหรับรูปแบบที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 6 ชนิด จะเป็นรูปแบบที่ยับยั้งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบทุกชนิดยกเว้น *M gypseum* (ตารางที่ 4.7)

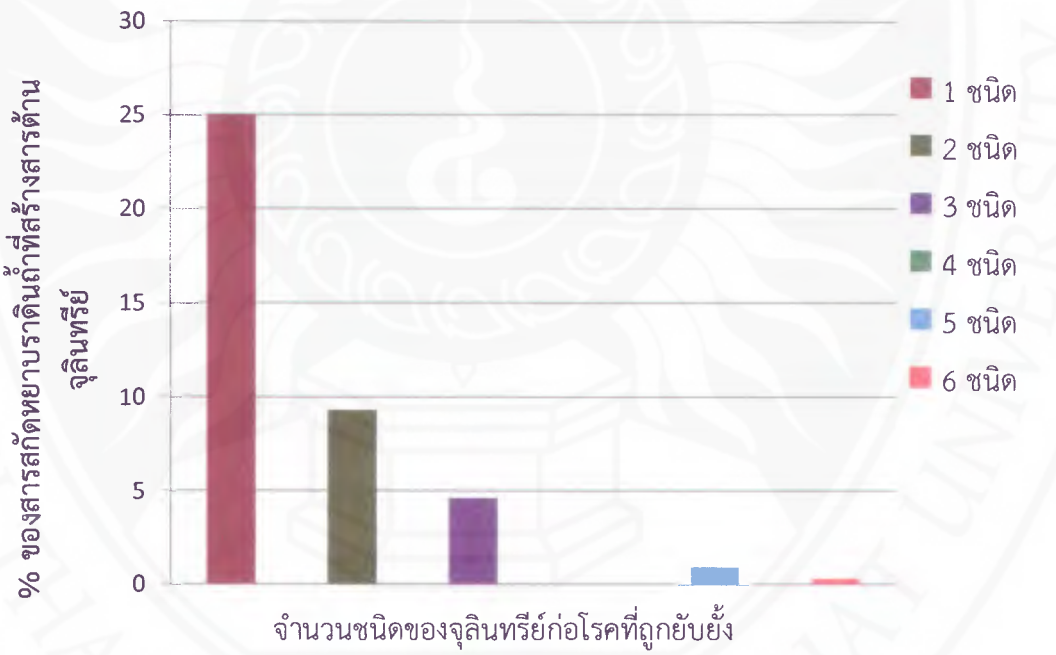
เมื่อพิจารณาถึงชนิดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่าสารสกัดหยาบ BE มีจำนวนของสารสกัดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากที่สุด โดยมีสารสกัดหยาบจำนวน 59 สาร (54.7%) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ สารสกัดหยาบ CE จำนวนของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากรองลงมา โดยมีสารสกัดหยาบ CE จำนวน 47 สาร (43.5%) ที่สามารถยับยั้งได้ ส่วนสารสกัดหยาบ CH มีจำนวนของสารสกัดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้น้อยที่สุด โดยมีสารสกัดหยาบ CH เพียง 23 สาร (21.3%) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (ตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง

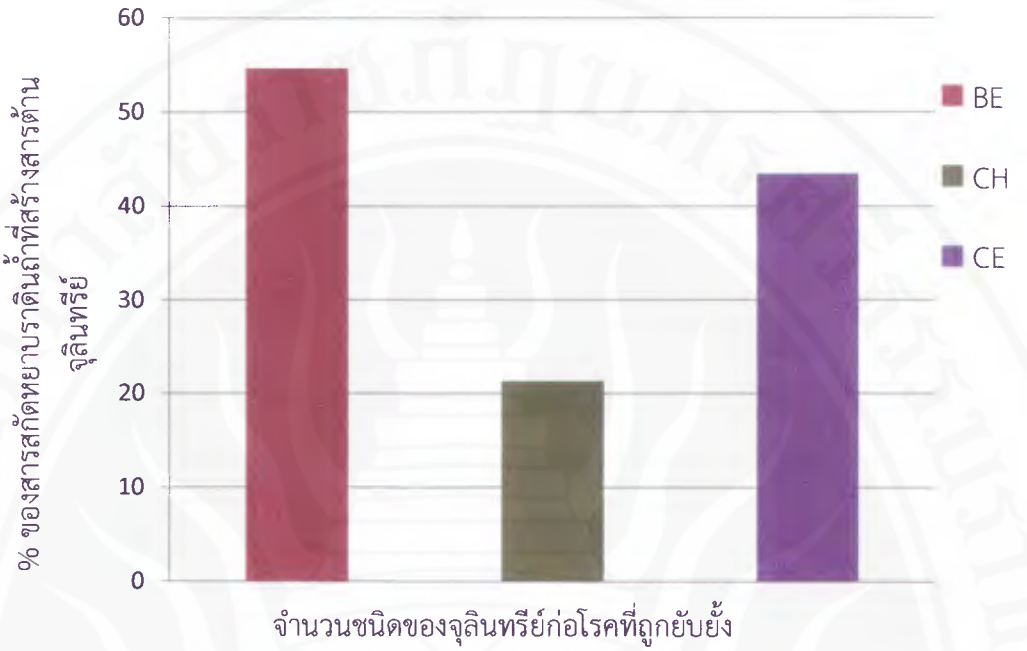
จำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	ชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้ง			
		BE	CH	CE	รวม
1	1. SA	10	4	12	26
	2. MRSA	2	1	2	5
	3. EC	1	0	1	2
	4. PA	1	0	1	2
	5. CA	6	5	7	17
	6. CN	5	8	8	21
	7. MG	5	0	2	7
	รวม	30	18	33	81
2	1. SA+MRSA	1	1	3	5
	2. SA+CA	2	0	1	3
	3. SA+CN	2	2	0	4
	4. SA+MG	1	0	2	3
	5. MRSA+EC	2	0	0	2
	6. MRSA+PA	0	1	0	1
	7. MRSA+CN	1	0	0	1
	8. EC+PA	0	0	1	1
	9. EC+CA	1	0	0	1
	10. PA+CA	0	1	1	2
	11. PA+CN	1	0	0	1
	12. CA+CN	2	0	1	3
	13. CA+MG	2	0	1	3
	รวม	15	5	10	30
3	1. SA+MRSA+EC	3	0	0	3
	2. SA+MRSA+PA	0	0	2	2
	3. SA+MRSA+MG	0	0	1	1
	4. SA+EC+CN	1	0	0	1
	5. SA+PA+CN	2	0	1	3
	6. SA+CA+CN	1	0	0	1
	7. SA+CN+MG	1	0	0	1

ตารางที่ 4.7 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง (ต่อ)

จำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	ชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้ง			
		BE	CH	CE	รวม
3 (ต่อ)	8. MRSA+PA+CN	1	0	0	1
	9. EC+CA+MG	1	0	0	1
	10. CA+CN+MG	1	0	0	1
	รวม	11	0	4	15
5	1. SA+MRSA+EC+PA+CA	2	0	0	2
	รวม	2	0	0	2
6	1. SA+MRSA+EC+PA+CA+CN	1	0	0	1
	รวม	1	0	0	1



ภาพที่ 4.6 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง



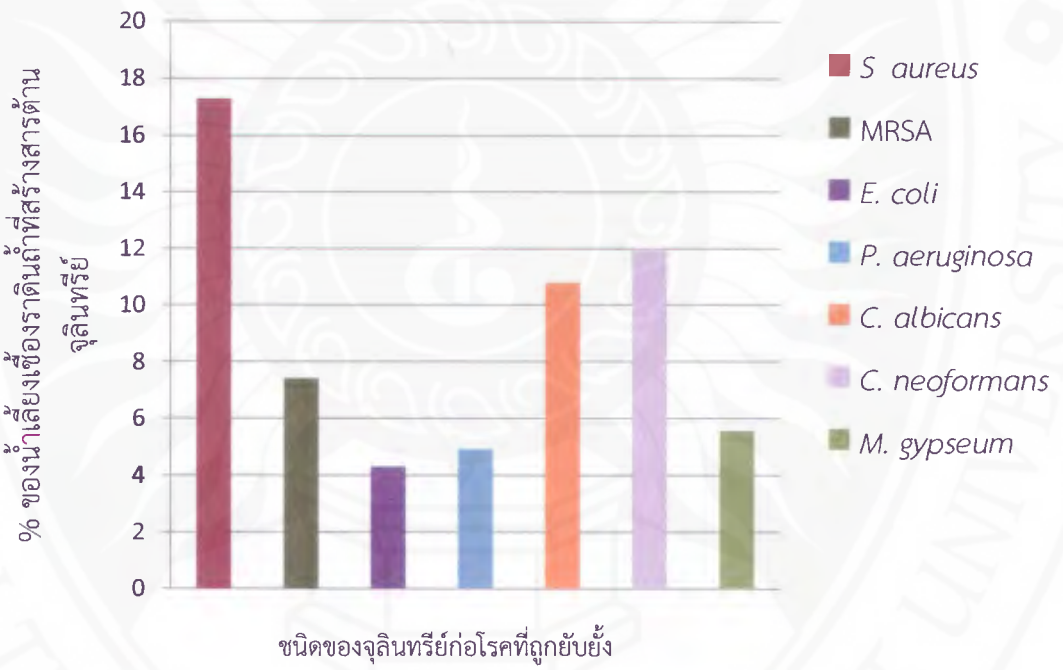
ภาพที่ 4.7 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามชนิดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง พบว่าสารสกัดหยาบสามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC25923 ได้มากที่สุด โดยมีสารสกัดหยาบจำนวน 56 สาร (17.3%) ที่สามารถยับยั้งได้ สารสกัดหยาบสามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. neoformans* ATCC90012 และ *C. albicans* ATCC90028 ได้ตีรองลงมา โดยมีสารสกัดหยาบจำนวน 39 และ 35 สาร (12.0 และ 10.8%) ที่สามารถยับยั้งยีสต์นี้ได้ ตามลำดับ มีสารสกัดหยาบจำนวน 24 สาร (7.4%) ที่สามารถยับยั้ง MRSA SK1 ได้ สารสกัดหยาบสามารถยับยั้งเชื้อรา *M gypseum* และแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* ATCC27853 และ *E. coli* ATCC25922 ได้น้อย โดยมีสารสกัดหยาบเพียง 18, 16 และ 14 สาร (5.6, 4.9 และ 4.3%) ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.8)

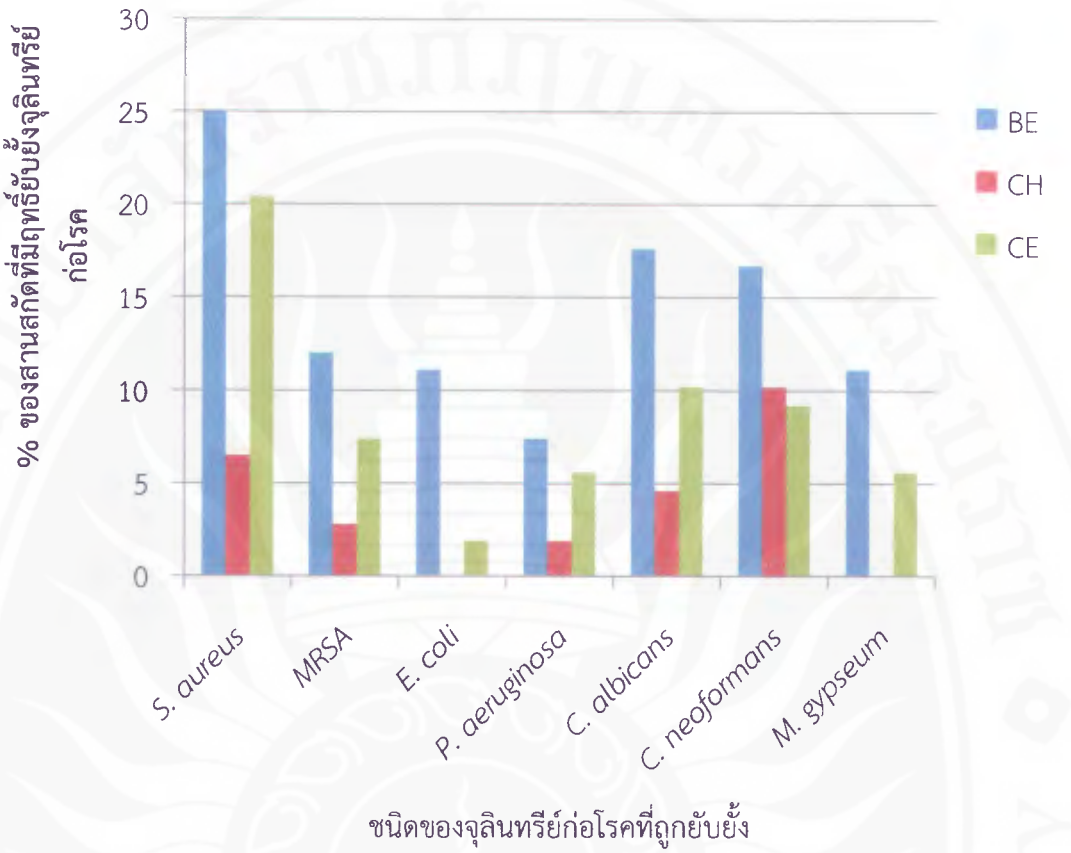
เมื่อพิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งร่วมกับชนิดของสารสกัดที่ยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า แม้ว่า *S. aureus* ATCC25923, MRSA SK1, *P. aeruginosa* ATCC27853 และ *C. albicans* ATCC90028 ถูกยับยั้งได้ด้วยสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด แต่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบชนิด BE ได้มากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบ CE และถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบ CH ได้น้อยที่สุด ส่วนเชื้อ *C. neoformans* ATCC90012 แม้ว่าจะถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด และถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบชนิด BE ได้มากที่สุดเช่นเดียวกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 4 ชนิดข้างต้น แต่พบว่าถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบ CE ได้ใกล้เคียงกับสารสกัดหยาบ CH ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอีก 2 ชนิดที่เหลือ คือ *E. coli* ATCC25922 และ *M. gypseum* พบว่า ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดเพียง 2 ชนิด และถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบ BE ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบ CE (ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.9)

ตารางที่ 4.8 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง

ชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค			
	BE	CH	CE	รวม
S. aureus	27	7	22	56
MRSA	13	3	8	24
E. coli	12	0	2	14
P. aeruginosa	8	2	6	16
C. albicans	19	5	11	35
C. neoformans	18	11	10	39
M. gypseum	12	0	6	18



ภาพที่ 4.8 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง



ภาพที่ 4.9 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์จำแนกตามชนิดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง

สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 4 µg/ml พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดถูกยับยั้งโดยยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 4 µg/ml

ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน	ฤทธิ์การยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 4 µg/ml						
	SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
Vancomycin	+	+					
Gentamicin			+	+			
Amphotericin B					+	+	
Miconazole							+

หมายเหตุ : + = มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

4.6 ค่า MIC, MBC หรือ MFC

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 128 µg/mL แล้วนำไปเจือจางต่อแบบ 2 fold dilution ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดในช่วง 128 - 0.25 µg/mL เพื่อนำไปทดสอบหาค่า MIC ซึ่งหากสารสกัดใดไม่สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ที่ระดับความเข้มข้นในช่วงดังกล่าว จะรายงานผลว่าสารสกัดหยาบนั้นมีค่า MIC เท่ากับ 200 µg/mL ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากรากดินถ้ำ ให้ค่า MIC ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ จ.1 – จ.7 ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบให้ค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา อยู่ในช่วง 16-200, 128-200, 8-200 และ 32-200 µg/mL ตามลำดับ และมีจำนวนของสารสกัดหยาบที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิด เท่ากับ 200 µg/mL สูงสุด (ตารางที 4.10 และตารางที่ 4.11)

สารสกัดหยาบที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเท่ากับหรือต่ำกว่า 32 µg/mL จะเป็นสารสกัดหยาบ BE และ CE ส่วนสารสกัดหยาบ CH ให้ค่า MIC ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทำการทดสอบในครั้งนี้ต่ำสุดเท่ากับ 64 µg/mL (ตารางที่ 4 10)

ผลการทดสอบหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ พบว่า ยาปฏิชีวนะ vancomycin ให้ค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S aureus* ATCC25923 และ MRSA SK1 ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ 1 และ 2 µg/ml ตามลำดับ ส่วนยาปฏิชีวนะมาตรฐาน gentamicin ที่ใช้ในการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบนั้น ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC27853 สูงกว่าเชื้อ *E coli* ATCC25922 โดยให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC27853 เท่ากับ 4 µg/ml และให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *E coli* ATCC25922 เท่ากับ 0.5 µg/ml ส่วนการทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อยีสต์และรานั้น พบว่า ยาปฏิชีวนะ amphotericin B ให้ค่า MIC ต่อเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC90028 และ *C. neoformans* ATCC90012 เท่ากับ 0.5 และ 1 µg/ml ตามลำดับ ส่วนยา miconazole ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* เท่ากับ 1 µg/ml ซึ่งค่า MIC ของยาปฏิชีวะมาตรฐานต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบทั้งหมด มีค่าต่ำกว่าค่า MIC ของสารสกัดหยาบ (ตารางที่ 4.10 และตารางที่ 4 11)

ตารางที่ 4.10 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้ง	ชนิดของสารสกัดหยาบ	จำนวนสารสกัดที่ให้ค่า MIC เท่ากับ						
		200 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	รวม
SA	BE	20	4	1	1	1	0	27
	CH	7	0	0	0	0	0	7
	CE	10	5	4	1	2	0	22
	รวม	37	9	5	2	3	0	56
MRSA	BE	13	0	0	0	0	0	13
	CH	3	0	0	0	0	0	3
	CE	5	0	0	1	2	0	8
	รวม	21	0	0	1	2	0	24
EC	BE	6	6	0	0	0	0	12
	CH	0	0	0	0	0	0	0
	CE	2	0	0	0	0	0	2
	รวม	8	6	0	0	0	0	14
PA	BE	5	3	0	0	0	0	8
	CH	2	0	0	0	0	0	2
	CE	5	1	0	0	0	0	6
	รวม	12	4	0	0	0	0	16
CA	BE	14	1	2	0	1	1	19
	CH	4	0	1	0	0	0	5
	CE	6	2	1	1	1	0	11
	รวม	24	3	4	1	2	1	35
CN	BE	11	5	1	0	0	1	18
	CH	7	3	1	0	0	0	11
	CE	7	2	1	0	0	0	10
	รวม	25	10	3	0	0	1	39
MG	BE	9	0	1	2	0	0	12
	CH	0	0	0	0	0	0	0
	CE	5	0	1	0	0	0	6
	รวม	14	0	2	2	0	0	18
รวม		141	32	14	6	7	2	202

ตารางที่ 4.11 ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานและช่วงค่า MIC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

จุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบ	ยาปฏิชีวนะ	ค่า MIC (µg/mL)	
		ยาปฏิชีวนะ	สารสกัดหยาบ
S. aureus ATCC25923	Vancomycin	1	16-200
MRSA SK1		2	16-200
E. coli ATCC25922	Gentamicin	0.5	128-200
P. aeruginosa ATCC27853		4	128-200
C. albicans ATCC90028	Amphotericin B	2	8-200
C. neoformans ATCC90012		2	8-200
M. gypseum	Miconazole nitrate	1	32-200

เมื่อพิจารณาถึงสารสกัดหยาบที่ให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นสารที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อที่ทดสอบต่ำสุด พบว่ามีสารสกัดจำนวน 3 และ 2 สาร ที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC25923 และ MRSA SK1 ต่ำสุด เท่ากับ 16 µg/mL มีสารสกัดจำนวน 6 และ 4 สาร ที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียลบ *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 ต่ำสุด เท่ากับ 128 µg/mL ในขณะที่มีสารสกัดเพียงชนิดละ 1 สาร ที่มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC90028 และ *C. neoformans* ATCC90012 ซึ่งให้ค่า MIC เท่ากับ 128 µg/mL และมีสารสกัด 2 สาร ที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อรา *M. gypseum* ต่ำสุด ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 32 µg/mL (ตารางที่ 14.12)

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของสารสกัดที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบแต่ละชนิดดีที่สุด พบว่า สารสกัดที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่ำสุด เป็นสารสกัดชนิด BE และ CE โดยสารสกัดหยาบที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC25922 ยีสต์ทั้ง 2 ชนิด เชื้อรา *M. gypseum* ต่ำสุดทั้งหมด และสารสกัดที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* ATCC27853 ต่ำสุดส่วนใหญ่ เป็นสารสกัดชนิด BE ในขณะที่สารสกัดที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก MRSA SK1 ต่ำสุดทั้งหมด และสารสกัดที่ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ MRSA SK1 ส่วนใหญ่เป็นสารสกัดชนิด BE (ตารางที่ 14.12)

สารสกัดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 5 และ 6 ชนิด ทั้งหมดเป็นสารสกัดกลุ่ม BE โดย สาร CCP 1-4 BE และ CNA 1-2 BE ยับยั้งได้ 5 ชนิด และสาร CTR 2-5 BE ยับยั้งได้ 6 ชนิด (ตารางภาคผนวกที่ จ.1, จ.3 และ จ.6)

ผลการทดสอบหาค่า MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบ พบว่า มีสารสกัดเพียงสารเดียวที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคได้ คือสารสกัดหยาบ CTR 2-5 CE ซึ่งให้ค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 64 µg/mL (ตารางภาคผนวกที่ จ.1-จ 7)

ตารางที่ 14.12 สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุด

จุลินทรีย์ทดสอบ	สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด	
	สารสกัดหยาบ	MIC (µg/mL)
S. aureus ATCC25923	CNA 1-2 CE CNA 2-10 CE CTR 2-6 BE	16
MRSA SK1	CNA 1-2 CE CTR 2-5 CE	16
E. coli ATCC25922	CSR 2-7 BE CNA 1-2 BE CPA 3-6 BE CPA 3-15 BE CSK 2-13 BE CTR 2-5 BE	128
P. aeruginosa ATCC27853	CSR 3-11BE CPA 3-9 BE CPA 3-11 BE CPA 3-11 CE	128
C. albicans ATCC90028	CSK 3-2 BE	8
C. neoformans ATCC90012	CKB 3-1 BE	8
M. gypseum	CPA 2-10 BE CTR 3-6 BE	32

4.7 การจำแนกชนิดของเชื้อราดินถ้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี

จากการนำเชื้อราดินถ้ำที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี โดยพิจารณาคัดเลือกไอโซเลตที่ให้ค่า MIC ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อก่อโรคแต่ละชนิดต่ำสุด ไอโซเลตที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์และไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 5 และ 6 ชนิด รวมจำนวน 16 ไอโซเลต ไปสกัด DNA แล้วนำ DNA ที่สกัดได้ไปทำ PCR บริเวณยีน ITS1 ถึง ITS2 ด้วยคู่ primer ITS5 และ ITS4 พบว่ามีเชื้อรา จำนวน 2 ไอโซเลต คือ CSK 3-2 และ CKB 3-1 ที่เป็นเชื้อราในกลุ่มที่ไม่สร้างสปอร์ (sterile hypha) ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ สำหรับเชื้อราที่เพิ่มปริมาณ DNA ได้ ได้ส่ง PCR product ที่ได้ไปอ่านลำดับเบสของ DNA ด้วยวิธี direct sequenced ที่ Macrogen ประเทศเกาหลี แล้วนำข้อมูลที่ได้มา BLAST search ผ่าน NCBI GeneBank database ซึ่งพบว่าเชื้อราที่นำมาจำแนกให้ค่า % identities กับข้อมูลใน NCBI GeneBank database อยู่ในช่วง 97-100% สามารถจำแนกเชื้อราได้ถึงระดับสปีชีส์ ผลการจำแนกโดยอาศัยข้อมูลทางชีวโมเลกุลให้ผลสอดคล้องกับผลจากการจำแนกโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา (ตารางที่ 4.13)

เชื้อราดินถ้ำที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีทีสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ จำนวน 15 ไอโซเลตที่นำมาจำแนกทางชีวโมเลกุล พบเป็น เชื้อรา *Aspergillus* 7 ไอโซเลต (*A. versicolor, A. niger, A. glaucus, A. terreus, A. flavipes* และ *A. calidoustus* ชนิดละ 1 ไอโซเลต) เป็นเชื้อ *Penicililum* 5 ไอโซเลต (*P. citrium, P. chrysogenum, P. sclerotiorum, P. strovenetum*และ *P. aculeatum* ชนิดละ 1 ไอโซเลต) เป็นเชื้อ *Fusarium oxysporium* และ *Trichoderma pleurotum* ชนิดละ 1 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 14.13 ชนิดของราดินถ้ำที่ให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุด

รหัสเชื้อราดินถ้ำ	ผลการจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล		ผลการจำแนกด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา	ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบที่เชื้อราสร้าง
	ชนิดของรา	% identities	ชนิดของรา	
CCP1-4	*Penicililum citrium*	97	*Penicililum* sp.	ยับยั้งได้ 5 ชนิด
CSR 2-7	*Aspergillus versicolor*	98	*Aspergillus* sp.	MIC ต่อเชื้อ EC ต่ำสุด
CSR 3-11	*Fusarium oxysporium*	99	*Fusarium* sp.	MIC ต่อเชื้อ PA ต่ำสุด
CNA 1-2	*Aspergillus niger*	100	*Aspergillus* sp.	MIC ต่อเชื้อ SA และ MRSA และ EC ต่ำสุด ยับยั้งได้ 5 ชนิด
CNA 2-10	*Aspergillus flavus*	100	*Aspergillus* sp.	MIC ต่อเชื้อ SA ต่ำสุด
CPA 2-10	*Aspergillus glaucus*	97	*Aspergillus* sp.	MIC ต่อเชื้อ MG ต่ำสุด
CPA 3-6	*Penicililum chrysogenum*	99	*Penicililum* sp.	MIC ต่อเชื้อ EC ต่ำสุด
CPA 3-9	*Aspergillus terreus*	98	*Aspergillus* sp.	MIC ต่อเชื้อ PA ต่ำสุด
CPA 3-11	*Aspergillus flavipes*	99	*Aspergillus* sp.	MIC ต่อเชื้อ PA ต่ำสุด
CPA 3-15	*Aspergillus calidoustus*	100	*Aspergillus* sp.	MIC ต่อเชื้อ EC ต่ำสุด
CSK 2-13	*Penicililum sclerotiorum*	100	*Penicililum* sp.	MIC ต่อเชื้อ EC ต่ำสุด
CSK 3-2	-		Sterile hypha	MIC ต่อเชื้อ CA ต่ำสุด
CTR 2-5	*Penicililum strovenetum*		*Penicililum* sp.	MIC ต่อเชื้อ MRSA และ EC ต่ำสุด ฆ่า SA ที่ 64 µg/mL ยับยั้งได้ 6 ชนิด
CTR 2-6	*Penicillium aculeatum*		*Penicillium* sp.	MIC ต่อเชื้อ SA ต่ำสุด
CTR 3-6	*Trichoderma pleurotum*		*Trichoderma* sp.	MIC ต่อเชื้อ MG ต่ำสุด
CKB 3-1	-		Sterile hypha	MIC ต่อเชื้อ CN ต่ำสุด

4.7 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วย TLC และ ^{1}H-NMR

จากการนำสารสกัดหยาบที่ให้ค่า MIC ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อก่อโรคแต่ละชนิดต่ำสุด สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ และสารสกัดหยาบที่สามมารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 5 และ 6 ชนิด รวมจำนวน 20 สาร ไปตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC และ ^{1}H-NMR พบว่า สารสกัดหยาบให้โครมาโทแกรมที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือมองเห็นได้ใน UV ที่ความยาวคลื่น 256 และ 366 nm ซึ่งโครมาโทแกรมที่ได้จะแสดงให้เห็นเป็น 1 หรือ 2 จุด (ตารางที่ 14.14) และพบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อการมองเห็นจุดปรากฏใน TLC ชัดเจนกว่าสารสกัดจากเส้นใยรา

ตารางที่ 14.14 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากราดินถ้ำที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี

รหัสรา	สารสกัด	น้ำหนักสาร (mg)	ลักษณะสาร	โครมาโตแกรม		
				ตาเปล่า	UV	
					256 nm	366 nm
CCP 1-14	BE	51.6	น้ำตาล เหนียว		*	
CSR 2-7	BE	7.5	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว			* ยาว
CSR 3-11	BE	8.2	เหลืองเข้ม เหนียว	*		*
CNA 1-2	BE	28.4	น้ำตาลเข้ม เหนียว		*	**
	CE	29.6	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว			*
CNA 2-10	CE	11.9	น้ำตาล เหนียว			*
CPA 2-10	BE	60.1	ครีม เหนียว		*	*
CPA 3-6	BE	39.2	ครีม เหนียว		*	**
CPA 3-9	BE	2.3	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	*		*
CPA 3-11	BE	9.7	เหลืองเข้ม เหนียว		*	*
	CE	15.2	เหลืองเข้ม เหนียว			
CPA 3-15	BE	9.3	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว		**	
CSK 2-13	BE	20.8	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว			**
CSK 3-2	BE	23.4	เหลืองอ่อน เหนียว		* ยาว	
	CE	3.6	ใส ไม่มีสี		*	
CTR 2-5	BE	28.6	น้ำตาลเข้ม เหนียว		**	
	CE	26.1	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว			*
CTR 2-6	BE	4.9	เหลืองอ่อน เหนียว		*	**
CTR 3-6	BE	26.3	เหลืองอ่อน ผง		*	
CKB 3-1	BE	20.1	เหลืองเข้ม เหนียว		*	

หมายเหตุ * = โครมาโทแกรมแสดง 1 จุด ** = โครมาโทแกรมแสดง 2 จุด

ผลจากการนำสารสกัดหยาบไปบันทึกข้อมูล และ ^{1}H-NMR พบว่าสามารถจำแนกกลุ่มของข้อมูลได้เป็น 6 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 14.15 ซึ่งมีสารสกัดหยาบหลายสารที่ให้ข้อมูล ^{1}H-NMR ที่น่าสนใจ

ตารางที่ 4.15 ข้อมูลสารสกัดหยาบจากราดินถ้ำที่ส่งบันทึกข้อมูล ^{1}H-NMR

กลุ่มที่	ข้อมูล ^{1}H-NMR	สารสกัดหยาบ
1	แสดงสัญญาณของโอลิฟินิกและอะโรมาติกโปรตอนที่น่าสนใจ	CTR 2-5 CE, CNA 1-2 BE, CPA 3-11 CE CTR 3-6 BE,
2	แสดงสัญญาณของโอลิฟินิกและอะโรมาติกโปรตอน	CPA 2-10 BE, CPA 3-6 BE, CPA 3-11 BE
3	แสดงสัญญาณของโอลิฟินิกโปรตอนและที่สนามสูง	CTR 2-5 BE, CPA 3-9 BE, CTR 2-6 BE
4	แสดงสัญญาณของอะโรมาติกโปรตอน	CNA 1-2 CE
5	แสดงสัญญาณโปรตอนของอนุพันธ์เบนซีน	CPA 3-15 BE, CSK 3-2 CE
6	แสดงสัญญาณของ long chain Hydrocarbon	CCP 1-14 BE, CSR 2-7 BE, CSR 3-11 BE CNA 2-10 CE, CSK 2-13 BE, CSK 3-2 BE CSK 3-1 BE

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราที่แยกจากดินในถ้ำในภาคใต้ของประเทศไทย ที่ได้ทำการแยกเชื้อราดินถ้ำ ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ศึกษาฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี และนำเชื้อราที่สร้างสารออกฤทธิ์ดีไปจำแนกด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. เชื้อราที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ เป็นเชื้อราที่แยกได้จากดินในถ้ำ ใน 7 จังหวัด ในภาคใต้ของประเทศไทย คือ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา ตรัง และกระบี่ จังหวัดละ 3 ถ้ำ ถ้ำละ 15 ไอโซเลต รวมเป็นเชื้อราดินถ้ำที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 315 ไอโซเลต

2. จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราดินถ้ำ 315 ไอโซเลต พบว่าเป็นเชื้อราใน division Eumycota ใน sub-division Zygomycotina และ Deuteromycotina ซึ่งใน sub-division Zygomycotina พบ 1 genus คือ *Cunninghamella* sp. (n=2) ส่วนใน sub-division Deuteromycotina จัดเป็นเชื้อราในกลุ่ม Hyphomycetes (n=271) ซึ่งพบ 8 จีนัส ได้แก่ *Aspergillus* sp (n= 111), *Penicillium* sp (n= 91), *Trichoderma* sp (n=37), *Fusarium* sp (n= 14), *Curvlaria* sp. (n=13), *Gliocladium* sp. (n=2) และ *Acremonium* sp. (n=2) และ *Paecilomyces* sp. (n=2) ส่วนเชื้อราที่เหลือจำนวน 42 ไอโซเลต เป็นเชื้อราในกลุ่ม mycelia sterilia

3. น้ำเลี้ยงเชื้อราของเชื้อราดินถ้ำ จำนวน 108 ไอโซเลต (34.3%) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบได้ 1-4 ชนิด

4. สารสกัดหยาบจากราดินถ้ำ จำนวน 129 สาร จากสารสกัดหยาบทั้งหมด 324 สาร (39.8%) มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml

5. ค่า MIC ต่ำสุดของสารสกัดสำหรับเชื้อ *S. aureus*, MRSA, *E. coli, P. aeruginosa, C. albicans, C. neoformans* and *M. gypseum* มีค่าเท่ากับ 16, 16, 128, 128, 8, 8, และ 32 µg/mL ตามลำดับ

6. มีสารสกัดเพียง 1 สารที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ และมีสารสกัดหยาบจำนวน 3 สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 5-6 ชนิด

7. สามารถแบ่งกลุ่มข้อมูล ^{1}H-NMR ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี ที่นำมาทดสอบจำนวน 20 สาร ได้เป็น 6 กลุ่ม ซึ่งมีบางกลุ่มที่ให้ข้อมูล ^{1}H-NMR ที่น่าสนใจ

8. การจำแนกเชื้อราที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลให้ผลสอดคล้องกับการจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

9. เชื้อราถ้ำที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี เป็นเชื้อราในจีนัส *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* และ *Trichoderma*

5.2 อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราที่แยกจากดินในถ้ำในภาคใต้ของประเทศไทยในครั้งนี้ ได้ทำการแยกเชื้อราจากดินในถ้ำ ใน 7 จังหวัด ในภาคใต้ของประเทศไทย คือ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา ตรัง และกระบี่ จังหวัดละ 3 ถ้ำ ซึ่งพบว่าสามารถแยกราได้จากทุกถ้ำ และได้ทำการคัดเลือกเชื้อราจากแต่ละถ้ำ ถ้ำละ 15 ไอโซเลต รวมจำนวน 315 ไอโซเลต เพื่อใช้ในการศึกษา

เมื่อนำเชื้อราถ้ำที่แยกได้ทั้ง 35 ไอโซเลตไปจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน-วิทยา พบว่าเป็นเชื้อราใน division Eumycota ใน sub-division Zygomycotina และ Deuteromycotina ซึ่งใน sub-division Zygomycotina พบ 1 genus คือ *Cunninghamella* sp. (n=2) ส่วนใน sub-division Deuteromycotina จัดเป็นเชื้อราในกลุ่ม Hyphomycetes (n=271) ซึ่งพบ 8 จีนัส ได้แก่ *Aspergillus* sp. (n= 111), *Penicillium* sp. (n= 91), *Trichoderma* sp. (n=37), *Fusarium* sp. (n= 14), *Curvlaria* sp. (n=13), *Gliocladium* sp. (n=2) และ *Acremonium* sp. (n=2) และ *Paecilomyces* sp. (n=2) ส่วนเชื้อราที่เหลือจำนวน 42 ไอโซเลต เป็นเชื้อราในกลุ่ม sterile hypha

เนื่องจากเชื้อราที่สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศในกลุ่ม Hyphomycetes ส่วนใหญ่ หากพบการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศจะสร้างภายในถุง ascus ซึ่งจะถูกจัดให้อยู่กลุ่ม Ascomycota ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Vanderwolf *et al.*, (2013a) ที่ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อรา ยีสต์ และราเมือกจากถ้ำจากทั่วโลก จากรายงานจำนวน 225 ฉบับ ที่ได้ตีพิมพ์ในวารสารจำนวน 149 รายชื่อ หนังสือ 10 เล่ม แล้วพบว่าเชื้อราส่วนใหญ่ที่พบในถ้ำ ส่วนใหญ่ 69.1% เป็นเชื้อราในกลุ่ม Ascomycota รองลงมาคือ Basidiomycota, Zygomycota, Mycetozoa, Oomycota จำนวน 20, 6.6, 2.6 และ 1 % ตามลำดับ ส่วนเชื้อราอีก 0.8% ที่เหลือจะเป็นเชื้อราในกลุ่ม Amoebozoa, Chytridiomycota, Microsporidiomycota, และ Percolozoa และจีนัสของราถ้ำที่ถูกรายงานบ่อยนอกเหนือจากเชื้อรา *Histoplasma* และ *Geomyces* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ศึกษากันมาก ได้แก่ *Aspergillus* (38 จาก 60 แหล่ง), *Penicillium* (36), *Mucor* (29), *Fusarium* (27), *Trichoderma* (25), *Cladosporium* (23), *Alternaria* (21), *Paecilomyces* (21), *Acremonium* (19), *Chrysosporium* (19), *Laboulbenia* (18), *Rhizopus* (18), *Mortierella* (17), *Chaetomium* (16), *Rhachomyces* (16), *Trichophyton* (15), *Humicola* (14), *Isaria* (14), *Absidia* (13), *Beauveria* (13), *Phoma* (13), *Verticillium* (13), *Aureobasidium* (12), *Gliocladium* (12), *Coprinus* (11), *Cunninghamella* (11), *Epicoccum* (11), *Geotrichum* (11), *Microsporum* (11), *Botrytis* (10), *Candida* (10), *Mycena* (10), *Scopulariopsis* (10), และ *Stachybotrys* (10)

จากการตรวจเอกสารเกี่ยวกับการศึกษาความหลากหลายของราถ้ำในประเทศไทย พบเพียงการศึกษาของ Bouree *et al.*, 1990 ที่ได้ทำการแยกเชื้อราดินจาก 14 ถ้ำ ในประเทศไทย และ

3 ถ้ำ ในสุลาเวสี แล้วพบว่าเชื้อราที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราฉวยโอกาส (opportunist fungi) ซึ่งได้แก่ *Cunninghamella*, *Scedosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Penicillium* ซึ่งมี 4 ชนิด จาก 5 ชนิดที่เหมือนกับที่พบในการศึกษาครั้งนี้

ราดินถ้ำส่วนใหญ่ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อราที่มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งสามารถใช้ลักษณะโคโลนี เส้นใย รูปร่างและการเรียงตัวของสปอร์ในการจำแนกชนิดของเชื้อราได้ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อราในแหล่งอื่น เช่น ในกลุ่มของราเอนโดไฟท์ที่พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่ไม่มีการสร้างสปอร์ (mycelia sterilia) (Kumaresan and Suryanarayanan, 2001; Ananda and Sridhar, 2002; and Maria *et al.*, 2005; Phongpaichit *et al.*, 2006; Hormazabal and Piontelli, 2009) อย่างไรก็ตามมีเชื้อราถ้ำจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นจำนวนถึง 42 ไอโซเลต ที่ไม่สร้างสปอร์ หากต้องการจำแนกชนิดของเชื้อราในกลุ่มนี้ จำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงที่ช่วยกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์ ซึ่งมีรายงานว่าการเปลี่ยนสูตรอาหาร อุณหภูมิ ความเข้มแสง ระยะเวลาการให้แสง การเติมชิ้นส่วนพืช หรือสารบางชนิด จะสามารถกระตุ้นให้เชื้อบางชนิดสร้างโครงสร้างที่ใช้ในการจัดจำแนกได้ แต่ก็พบไม่บ่อยนัก อีกทั้งการใช้วิธีการทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกเชื้อ เป็นวิธีการที่ต้องใช้เวลา และแรงงานมาก จึงพบได้บ่อยว่าในปัจจุบันนักวิจัยจะเปลี่ยนมาใช้ใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลในการจำแนกเชื้อ และพบว่าเป็นวิธีที่มีความไว มีความจำเพาะ และมีประสิทธิภาพในการจำแนกดี (Guo *et al.*, 1998; Gao, *et al.*, 2005; Phongpaichit *et al.*, 2006; Sette *et al.*, 2006 และ Xing and Guo, 2011) อย่างไรก็ตามวิธีการทางชีวโมเลกุลเป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายสูง ในการศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยจึงจะทำการจำแนกชนิดเชื้อราโดยวิธีทางชีวโมเลกุลเฉพาะกับกลุ่มของเชื้อราที่สร้างสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพดี

เนื่องจากราถ้ำที่แยกได้ในครั้งนี้เป็นรากลุ่มที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (cuturable fungi) เท่านั้น เชื้อราถ้ำชนิดอื่นที่ไม่สามารถโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (uncuturable fungi) หรือเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ช้า จะไม่ถูกคัดเลือก ดังนั้นชนิดและจำนวนราถ้ำที่แยกได้จึงมีค่าน้อยกว่าจำนวนที่มีอยู่เป็นจริง (Vanderwolf et al., 2013b และ Bass and Richards, 2011) ซึ่งหมายถึงโอกาสที่จะตรวจพบราถ้ำที่สร้างสารออกฤทธิ์ดีก็จะน้อยลงด้วย มีรายงานว่าการใช้เทคนิคในการตรวจหาราที่ไม่ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น enzyme-linked immunsorbent assay (ELISA) (Johnson *et al.*, 1982), การตรวจหา (1-3)-β-D-glucan ในผนังเซลล์ของรา (Johnston *et al.*, 2006), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Duong *et al.*, 2006 and Tao *et al.*, 2008) Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP) (Nikolcheva and Bärlocher, 2004, 2005) หรือการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย DNA (Guo *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001 and Seena *et al.*, 2008) จะทำให้ตรวจพบชนิดของรามากขึ้น

จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อของราถ้ำจำนวน 315 ไอโซเลต ที่แยกได้ ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในคน 7 ชนิด คือ *S. aureus* ATCC25923, MRSA SK1, *P. aeruginosa* ATCC27853, *E. coli* ATCC25922, *C. albicans* ATCC90028, *C. neoformans* ATCC90012 และ *M. gypseum* พบว่ามีน้ำเลี้ยงของเชื้อราจำนวน 108 ไอโซเลต (34.3%) ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่นำมาทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Liamthong (2013) ที่พบว่า 32.4% ของน้ำเลี้ยงเชื้อราทะเลที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเล สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

อย่างน้อย 1 ชนิด อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราถ้ำที่มีฤทธิ์ในการศึกษาในครั้งนี้ มีค่าสูงกว่าการศึกษาของ Phongpaichit *et al.* (2006) ที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชกลุ่ม *Garcinia* sp. และการศึกษาของสุมาลีและแน่งน้อย (2555) ที่ศึกษาฤทธิ์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชในพื้นที่ป่าพรุควนเคร็ง แล้วพบว่ามีเพียง 18.6% ของเชื้อราเอนโฟไฟท์จากพืชกลุ่ม *Garcinia* sp. และ 29.9% ของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชในพื้นที่ป่าพรุควนเคร็ง ที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่มเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ได้อย่างน้อย 1 ชนิด

น้ำเลี้ยงเชื้อราดินถ้ำสามารถยับยั้งเชื้อได้ 1-4 ชนิด โดยยับยั้งเชื้อ 1 ชนิดได้มากที่สุด (23.2%) รองลงมาคือ 2, 3 และ 4 ชนิด โดยมีเปเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 7.9, 1.9 และ 1.3% ตามลำดับ แสดงว่าเชื้อราดินถ้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแคบ (narrow spectrum)

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่ามีน้ำเลี้ยงราดินถ้ำถึง 34 ไอโซเลต (10.8%) ที่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ ซึ่งเชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่พบบ่อยว่าทำให้เกิดการติดเชื้อกับผู้ป่วยภายหลังการผ่าตัดหรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบที่มีความต้านทานต่อสารออกฤทธิ์มาก สารธรรมชาติส่วนใหญ่ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้หรือหากยับยั้งได้ก็มักพบว่าต้องใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูง (Anzai *et al.*, 2003; Marinho *et al.*, 2005 และ Phongpaichit *et al.*, 2006) การพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อราจากราดินถ้ำหลายไอโซเลตสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดได้ จึงเป็นการค้นพบที่น่าสนใจและควรศึกษาถึงชนิดของสารออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ต่อไป

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงเชื้อในครั้งนี้ ใช้วิธี agar well diffusion test ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบที่ทำได้ง่ายและเหมาะที่จะใช้คัดกรองสารทดสอบที่มีปริมาณมาก เป็นวิธีที่เหมาะจะใช้ทดสอบสารที่มีความเป็นขั้วสูง ละลายน้ำได้ดี และมีขนาดโมเลกุลเล็ก สามารถทำให้ละลายและแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี ทำให้เกิดการยับยั้งที่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามมีสารออกฤทธิ์บางชนิดที่มีความเป็นขั้วต่ำหรือมีขนาดโมเลกุลใหญ่ ทำให้ได้ขนาด inhibitin zone แคบหรือไม่เกิด inhibition zone ซึ่งทำให้การคัดเลือกราดินถ้ำผิดพลาดไป ส่งผลให้ได้จำนวนราดินถ้ำที่สร้างสารออกฤทธิ์น้อยกว่าที่เป็นจริง

มีสารสกัดหยาบจำนวน 129 สาร จากสารสกัดหยาบทั้งหมด 324 สาร (39.8%) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 1-6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL โดยสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราและเส้นใยราด้วย ethyl acetate (BE และ CE) มีจำนวนของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อดรคมากกว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยราด้วย hexane (CH) แสดงว่าสารออกฤทธิ์ที่สร้างโดยราถ้ำส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มที่มีขั้วปานกลางที่เชื้อราสร้างและเก็บไว้ในเซลล์ ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ Buatong *et al.*, (2011) และ Jeenkeawpieam (2010) ที่พบว่าสารออกฤทธิ์ที่เชื้อราสร้างส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้วต่ำที่เชื้อราสร้างแล้วเก็บไว้ในเซลล์

จากจำนวนเชื้อราถ้ำ 108 ไอโซเลต ที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ เมื่อนำมาสกัดเป็นสารสกัดหยาบ แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งที่จุลินทรีย์อีกครั้ง พบว่ามีสารสกัดหยาบจากเชื้อราดินถ้ำเพียง 80 ไอโซเลต (74.1%) ที่ยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค แสดงให้เห็นว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบเป็นสารต่างชนิดกัน โดยสารออกฤทธิ์ในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นสารที่มีขั้วสูง ในขณะที่สารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบเป็น

สารที่มีขั้วต่ำกว่า หรืออาจเป็นได้ว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อมีสารหลายชนิดที่ออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งจุลินทรีย์ เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วยตัวทำละลายจะเป็นการแยกเฉพาะสารบางตัวออกมาทดสอบฤทธิ์ จึงทำให้ฤทธิ์ที่ได้ด้อยลงไป อย่างไรก็ตามการสกัดสารอาจทำให้สารบางสารมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถออกฤทธิ์กว้างขึ้นหรือออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น ดังจะเห็นได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ที่น้ำเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้สูงสุด 4 ชนิด ในขณะที่สารสกัดหยาบสามารถยับยั้งเชื้อได้ถึง 6 ชนิด หรือการนำสารสกัดหยาบไปทำให้บริสุทธิ์ก็อาจทำให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น เช่น จากการศึกษาของ Maria *et al.* (2005) ที่พบว่า สารสกัดหยาบจากเชื้อ *Aspergillus* sp. 3 และ MS1 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Cryptococcus albidus* ได้ แต่เมื่อนำสารสกัดหยาบไปทำให้บริสุทธิ์ กลับพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะในสารสกัดหยาบมีสารออกฤทธิ์น้อยหรือมีสารหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ต้านกัน เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์จึงได้สารที่มีความเข้มข้นมากขึ้นและออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น

จากการทดสอบหาค่า MIC พบว่า สารสกัดหยาบให้ค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา อยู่ในช่วง 16-200, 128-200, 8-200 และ 32-200 µg/mL ตามลำดับ ซึ่งมีสารสกัดหยาบหลายสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดี โดยให้ค่า MIC ต่อเชื้อยีสต์สูงกว่ายาปฏิชีวนะเพียง 4 เท่า หรือสามารถยับยั้ง MRSA ได้ดี มีค่า MIC สูงกว่ายาปฏิชีวนะเพียง 8 เท่า หรือมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ถึง 5 และ 6 ชนิด ซึ่งสารเหล่านี้บางสารให้ข้อมูล ^{1}H-NMR ที่น่าสนใจ จึงควรทำการแยกเพื่อหาสารออกฤทธิ์หรือศึกษาถึงกลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเหล่านี้ต่อไป

เนื่องจากมีสารสารสกัดหยาบเพียง 5 สารที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบ แสดงว่าสารส่วนใหญ่มีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามหากความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบเพิ่มมากขึ้น สารสกัดหยาบบางชนิดอาจมีฤทธิในการฆ่าเชื้อได้

จากการนำเชื้อราที่ถ้ำที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี ที่ให้ค่า MIC ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อก่อโรคแต่ละชนิดต่ำสุด ที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ หรือที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 5 และ 6 ชนิด รวมจำนวน 16 ไอโซเลต ไปจำแนกชนิดโดยอาศัยวิธีการทางชีวโมเลกุล พบว่า มีเชื้อรา 2 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ จึงไม่สามารถนำไปจำแนกโดยวิธีการทางชีวโมเลกุลได้ ซึ่งปัญหาเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณ DNA เป็นปัญหาหนึ่งที่พบได้บ่อยในการจำแนกด้วยวิธีนี้ ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ไม่เหมาะสม อีกปัญหาที่พบได้บ่อยคือข้อมูลที่มีอยู่ใน GeneBank มีไม่เพียงพอที่ใช้ในการเทียบเคียงกับเชื้อราชนิดใหม่ ๆ ทำให้มีราถ้ำเป็นจำนวนมากที่ไม่สามารถจำแนกชนิดโดยอาศัยวิธีนี้ได้ (Hawsworth, 2001 และ Bas and Richards, 2011)

จากเชื้อราดินถ้ำที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ จำนวน 14 ไอโซเลตที่นำมาจำแนกโดยวิธีทางชีวโมเลกุล พบเป็น เชื้อรา *Aspergillus* 7 ไอโซเลต (*A. versicolor*, *A. niger*, *A. glaucus*, *A. terreus*, *A. flavipes* และ *A. calidoustus* ชนิดละ 1 ไอโซเลต) เป็นเชื้อ *Penicililum* 5 ไอโซเลต (*P. citrium*, *P. chrysogenum*, *P. sclerotiorum*, *P. strovenetum* และ *P. aculeatum* ชนิดละ 1 ไอโซเลต) ที่เหลือเป็นเชื้อ *Fusarium oxysporium* และ *Trichoderma pleurotum* ชนิดละ 1 ไอโซเลต ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

อ้างอิงจากรายงานของ Vanderwolf *et al.*, (2013a) ที่รายงานสปีชีส์ของเชื้อราที่พบได้บ่อยในถ้ำจากแหล่งข้อมูล 60 แหล่ง ว่านอกเหนือจาก *Histoplasma* spp. and *Geomyces destructans* แล้ว เชื้อราที่พบได้บ่อยในถ้ำจะเป็นเชื้อรา *Aspergillus versicolor* (23), *Aspergillus niger* (20), *Penicillium chrysogenum* (19), *Cladosporium cladosporioides* (18), *Aspergillus fumigatus* (16), *Aspergillus ustus* (13), *Aspergillus flavus* (12), *Fusarium solani* (12), *Geomyces pannorum* (12), *Trichoderma viride* (12), *Beauveria bassiana* (11), *Cephalotrichum stemonitis* (11), *Cladosporium herbarum* (11), *Alternaria alternata* (10), *Aureobasidium pullulans* (10), *Paecilomyces lilacinus* (10), *Penicillium brevicompactum* (10), *Penicillium simplicissimum* (10), and *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* (10) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสปีชีส์ราดินถ้ำที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า มีบางสปีชีส์ที่เป็นสปีชีส์ของเชื้อราที่พบได้บ่อยในถ้ำ

จากชนิดของราถ้ำที่ออกฤทธิดีที่จำแนกได้ พบว่า มีความสอดคล้องกับ Bérdy (2005) ที่รายงานว่า ในจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 6,450 ชนิด มากกว่าร้อยละ 30 มาจากเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* และ *Aspergillus* และ Phongpaichit *et al* (2006) ที่รายงานว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จาก *Garcenia* sp. ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีเป็นเชื้อราที่จัดอยู่ในจีนัส *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Eutypella*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pennicillium*, *Phomopsis* และ *Xylaria*

ปัญหาหนึ่งที่พบในการศึกษาครั้งนี้และเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในการศึกษาเกี่ยวกับรา คือ สารที่ราสร้างขึ้นมีปริมาณน้อย (Yu *et al.*, 2010) ไม่สามารถนำไปศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมี หรือนำไปทดสอบสารออกฤทธิ์ของสารนั้นได้ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณและชนิดของสารที่รา ได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ปริมาณอากาศ และระยะเวลาที่ใช้เลี้ยง (Bode *et al.*, 2002; Strobel *et al.*, 2004 และ Maria *et al.*, 2005) การศึกษาเพื่อหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เพื่อให้ราดินถ้ำสร้างสารออกฤทธิ์ให้ได้ปริมาณมาก จึงเป็นอีกหัวข้อหนึ่งที่น่าสนใจศึกษา

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าราดินถ้ำนอกจากจะมีความหลากหลายแล้ว ยังเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจอีกแหล่งหนึ่ง ควรที่จะแยกสาร วิเคราะห์สูตรโครงสร้าง ตลอดจนทำการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่น ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ต่อไป

บรรณานุกรม

สุมาลี เลี่ยมทอง และแน่งน้อย แสงเสน่ห์. 2555. รายงานการวิจัยการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชในพื้นที่ป่าพรุควนเคร็ง. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

Altschul, S F , Gish, W., Miller, W., Myers, E W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology. 215:403-410.

Ananda, K. and Sridhar, K.R. 2002. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on west coast of India Canadian Journal of Microbiology. 48: 871-878.

Anzai, Y., Saito, N., Tanaka., M., Kinoshita, K., Koyama, Y. and Kato, F. 2003. Organization of the biosynthetic gene cluser for the polyketide macrolide mycinamicin in Micromonospora griseorubida. FEMS Microbiology Letter. 218:135-141.

Bass, D. and Richards, T.A. 2011. Three reasons to re-evaluate fungal diversity "on earth and in the ocean". Fungal Biology Review. 25:159-164.

Bastain, F., Jurado, V., Novakova, A., Alabouvette, C. and Saiz-Kimenez, C. 2010. The microbiology of Lascaux cave. Microbiology. 156:644-652.

Bouree P.; Leclerc P , Devalette J.J , De Bievre C., 1990: Survey of mycological flora in caves in thailand. Bulletin De La Societe Francaise De Mycologie Medicale. 63-66

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2000. Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2002A. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2002B. Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.

Cunningham, K.I., Northup, D.E., Pollastro, R M., Wright, W.G. and Larock, E J 1995. Bacteria, fungi and biokarst in Lechuguilla cave. Carlsbad caverns national park, New Mexico. Envion. Geol 25:2-8.

Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.W. 1993. Compendium of Soil Fungi Volume I. IHWVerlag Press.

Duong, L.M., Jeewon, R., Lumyong, S. and Hyse, K.D. 2006. DGGE coupled with ribosomal DNA phylogenies reveal uncharacterized fungal phylotypes on living leaves of *Magnolia liliifera*. Fungal Diversity. 23: 121-138.

Goltenboth, F., 2006. Ecology of insular southeast asia : The Indonesian archipelago. pp. 229-238.

Groth, I., Schumann, P., Schuetze, B., Augsten, K., Kramer, I. and Stackebrandt, E. 1999. *Beutenbergia cavernae* gen. nov., sp. nov., an L-lysine-containing actinomycete isolated from a cave. Int. J. Syst. Bacteriol. 49 : 1733-1740.

Groth, I., Schumann, P., Schuetze, K., Augten, K. and Stackebrandt, E. 2002. *Knoellia sineensis* gen. nov. sp. nov. and *Knoellia subterranean* sp. nov. two novel actinobacteria isolated from a cave. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:1102-1108.

Guo, L.D., Hyde, K.D. and Liew, E.C Y 1998. A method to promote sporulation in palm endophytic fungi. Fungal Diversity. 1: 109-113.

Guo, B., Wang, Y., Sun, X., and Tang, K. 2008. Bioactive natural product from endophytes: A review. Applied Biochemistry and Microbiology. 44: 136-142.

Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research. 105(12):1422-1432.

Herrold, K , Gollmick F.A., Groth, I Roth, M. Menzel, K.D., Mollmann, U., Grafe, U. and Hertweck. C. 2005. Cervimycin A-D: A polyketide glycoside complex from a cave bacterium can defeat vancomycin resistance. Chem. Eur. J. 11: 5523-5530.

Hormazabal, E. and Piontelli, E. 2009. Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25:27-32.

Jaiinphun, J., Cheeptham., Sonthichai, W., and Lumyong, S. 2003 Antifungal activity of actinomycetes isolated from cave soils in Mae Hongson Province, Thailand. Thai Journal Biotechnology. 4(1):16-23.

Johnson, M.C., Pirone, T.P. Siegel, M.R. and Varney, D.R. 1982. Detection of *Epichloe typhina* in tall fescue by mean of enzyme-linked immunosorbent assay. Photopathology. 72:647-650.

Johnston, P.R. Sutherland, P.W. and Joshee, S. 2006. Visualising endophytic fungi within leaves by detection of (1-3)-β-D-glucans in fungal cell wall. Mycologist. 20:159-162.

Jurado, V , Porca, E., Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Sanchez-Moral, S., and Saiz-Jimenez, C. 2010. Fungal outbreak in a show cave. Science of the total environment. 408:3632-3638.

Kim, B.S., Lee, J.Y., and Hwang, B.K. 1998. Diversity of actinomycetes antagonistic to plant pathogenic fungi in cave and sea-mud soils of Korea. J. Microbiol. 36(2):86-92.

Koilraj, A J., Marimuthu., G., Natarajan,. K., Saravanan, S., Maran, P. and Hsu, M.J. 1999. Fungal diversity inside cave of southern India. Curr. Sci. 77:1081-1084.

Korn-Wendisch, F. and Kutzner, H.J 1992. In: The Prokaryotes A handbook of the biology bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, application. 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberge, New York. pp 921-995.

.Kumar, J.S , Kumar, S.T., Santhanam, P. and Masilamaniselvam, M. 2010. Effect of mutation on antimicrobial activity of actinomycetes from Western Ghat's of India , Middle-East Journal of Science Research 6(1):37-44.

Kumaresan, V and Suryanarayanan, T.S. 2002. Endophyte assemblage in young, mature and senescent leaves of Rhizophora apiculata: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. Fungal Diversity. 9:81-91

Laorpaksa, S , Yingyong, A., Thoongsuwan, S. and Pongsopida, A. 1987. Study of antibiotic producing actinomycetes from cave soil in central region of Thailand. J. Natl. Res. Council Thailand. 19:61-79.

Lee, S D. 2006a, *Nocardia jejuensis* sp. nov., a novel actinomycete is isolated from a natural cave in Jeju island, Republic of Korea. Int. J. Syst Evol. Microbiol. 56 : 559-562.

Lee, S.D. 2006b. *Actinocorallia jejuensis* sp. nov. and *Amycolatosis halotolerans* sp nov. novel actinomycetes isolated from a natural cave. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56 : 549-553.

Lee, S D. 2006a. *Actinocorallia cavernae* sp. nov., isolated from a natural cave in Jeju, Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56 : 1085-1088.

Lian, B., Zang, J., Hou, W., Yuan, S. and Smith, D.L. 2008. PCR-bsed sensitive detection of the edible fungus *Boletus edulis* rDNA ITS sequences Electronic Journal of Biotechnology. 11:3.

Liamthong, S. 2013. Antimicrobial activity of fungi isolated from marine organisms 113th Ann. Mtg. Amer. Soc. Microbiol. Denver, CO. USA.

Manson-Williams A. and Holland, L 1967. Investigation into the "wall fungus" found in caves. Trans Cave Group Great Britain. 9 : 137-139.

Marinho, A.M.R., Rodrigues-Filho, E., Moitinho, M.L.R. and Santos, L.S. 2005. Biological active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of Melia azedarach. Journal of Brazilian Chemical Society. 16:280-283.

Nakaew, N., Pathom-aree, W. and Lumyong, S. 2009. Generic diversity of rare actonomycetes from Thai cave soils and their possible use as new bioactive compounds. Actinomycetologica. 23: 21-26.

Ningthoujam, D.S., Sanasam, S. and Nimaichand, S. 2009. Screening of Actinomycetes isolates from niche habitats in Manipur for antibiotic activity. Am. J. Biochem. Biotechnol. 5(4):221-225.

Novakova, A. 2009. Microscopic fungi isolated from the Domica cave system (Slovak karst national park, Slovakia) Int. J. Speleol. 38:71-82.

O'Donnell, F., Smyth, T.J.P., Ramachandran ,V.N. and Smyth, W.F. 2010. A study of the antimicrobial activity of selected synthetic and naturally occurring quinolone. International Journal of antimicrobial agents. 35:30-38.

Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V., and Sakayaroj J. 2006. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 48: 367-372.

Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Pinar, G., Lubitz, W. and Rolleke, S. 2002. Altamira Cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacteria communities. FEMS Microbiol. Lett. 211:7-11.

Seena,S.,Wynberg, N., Bärlocher, F. 2008. Fungal diversity during leaf decomposition in a stream assessed through clone libraries. Fungal Diversity. 30:1-14.

Sette, L.D., Passarini M.R.Z., Delarmelina, C., Salani, F., and Duartermelina M.C.T. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. World J Microbiol Biotechnol. 22: 1185-1195.

Tao, G., Liu, Z.Y., Hyde, K.D., Lui, X.Z. and Yu, Z.N. 2008. Whole rDNA analysis reveals novel an endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). Fungal Diversity. 33:101-122.

Vanderwolf, K.J., Molloch, D., McAlpine, D.F. and Forbes, G.J. 2013a. A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. International Journal of Speleology..42(1):77-96.

Vanderwolf, K.J., Molloch, D., McAlpine, D.F. and Forbes, G.J. 2013b. Ectomycota associated with hibernating bats in Eastern Canadian caves prior to the emergence of white-nose syndrome. Northeastern Naturalist. 20(1):115-130.

Xing, X. and Guo, S. 2011. Fungal endophyte communities in four Rhizophoraceae mangrove species on the south coast of China. Ecol Res. 26:403-409.

Yang, C.H., Crowley, D.E., Borneman, J., Keen, N.T. 2001. Microbial phyllosphere population are more complex than previously realized. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America. 98:3889-3894.

Yoshiko, O.H. 2003. Activation of potential function in *Streptomyces* for regulation of secondary metabolism. Actinomycetol., 17:67-70.

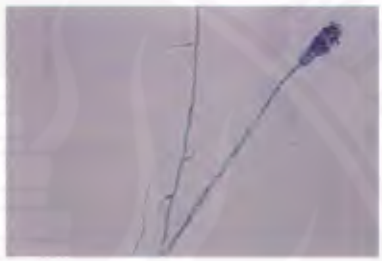
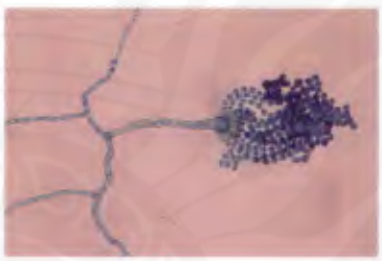
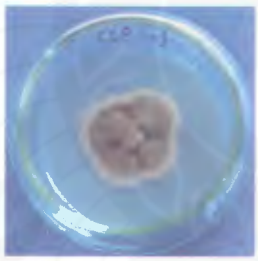
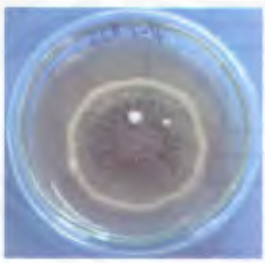
Yucel, S. and Yamac, M. 2010. Selection of Streptomyces isolates from Turkish kartic caves against antibiotic resistant microorganisms. Pak. J. harm. Sci. 23(1):1-6.

Zhang, Y., Mu J., Feng Y., Kang Y., Gu P.J., Wang Y., Ma L.F., and Zhu Y.H. 2009. Broad spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organism: isolation, bioassay, and taxonomy. Mar. Drugs. 7:97-112.

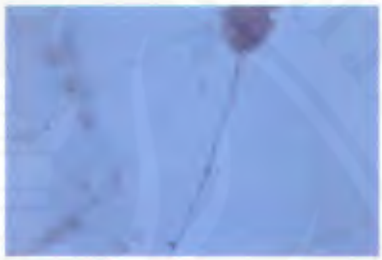
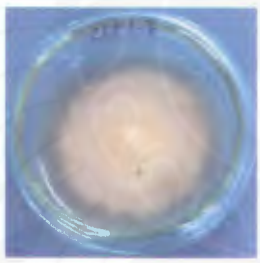
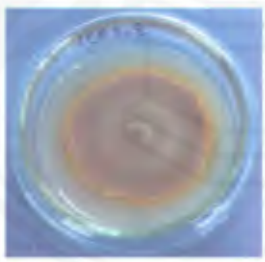
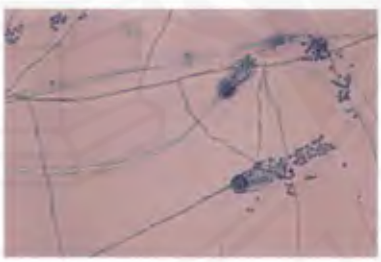
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การจัดจำแนกเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

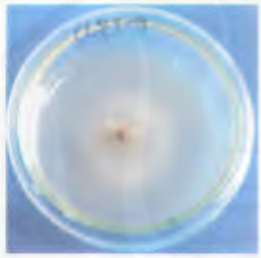
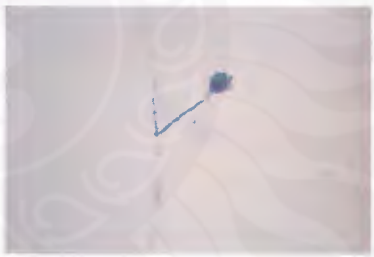
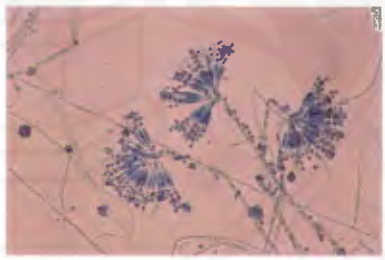
ตารางที่ ก.1 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาเกรียบ ในจังหวัดชุมพร

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CCP 1-1			*Penicillium* sp.
CCP 1-2			*Aspergillus* sp.
CCP 1-3			*Penicillium* sp.
CCP 1-4			*Penicillium* sp.

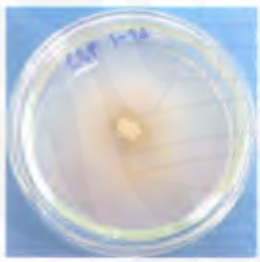
ตารางที่ ก.1 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาเกรียบ ในจังหวัดชุมพร (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CCP 1-5			*Penicillium* sp.
CCP 1-6			*Aspergillus* sp.
CCP 1-7			Sterile hypha
CCP 1-8			*Penicillium* sp.

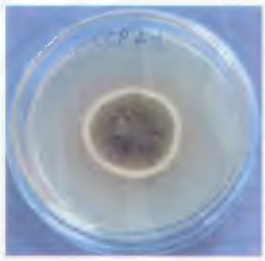
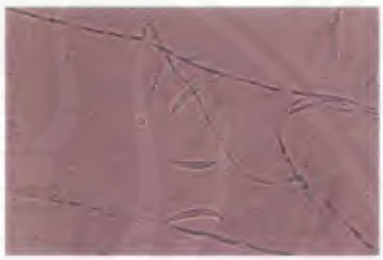
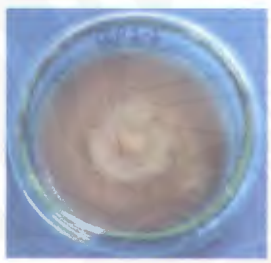
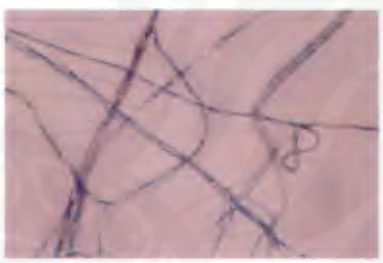
ตารางที่ ก.1 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาเกรียบ ในจังหวัดชุมพร (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CCP 1-9			*Aspergillus* sp.
CCP 1-10			*Penicillium* sp.
CCP 1-11			*Aspergillus* sp.
CCP 1-12			*Penicillium* sp.

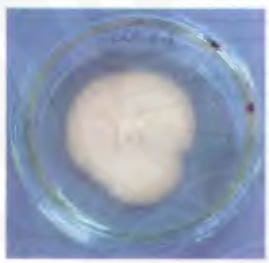
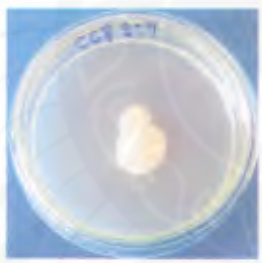
ตารางที่ ก.1 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาเกรียบ ในจังหวัดชุมพร (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CCP 1-13			Sterile hypha
CCP 1-14			*Penicillium* sp.
CCP 1-15			Sterile hypha

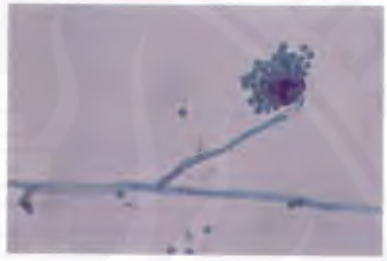
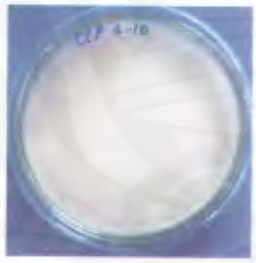
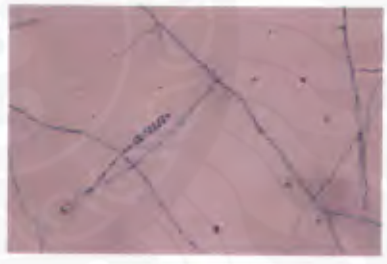
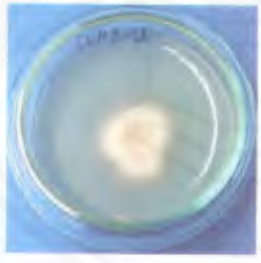
ตารางที่ ก.2 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาพลู ในจังหวัดชุมพร

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CCP 2-1			*Fusarium* sp.
CCP 2-2			Sterile hypha
CCP 2-3			*Penicillium* sp.
CCP 2-4			*Aspergillus* sp.

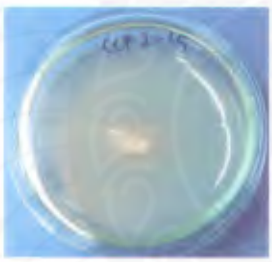
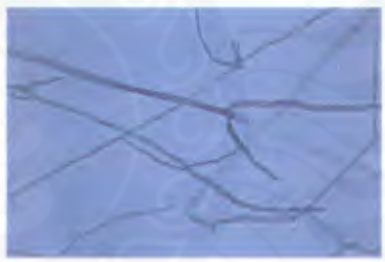
ตารางที่ ก.2 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาพลู ในจังหวัดชุมพร (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CCP 2-5			*Aspergillus sp.*
CCP 2-6			*Penicillium* sp.
CCP 2-7			*Aspergillus* sp.
CCP 2-8			*Penicillium* sp.

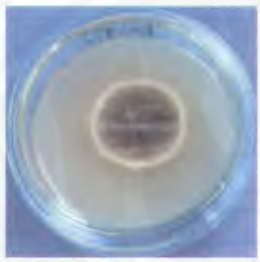
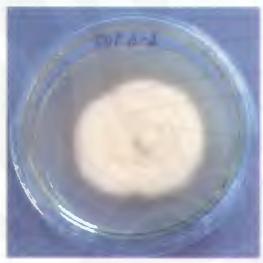
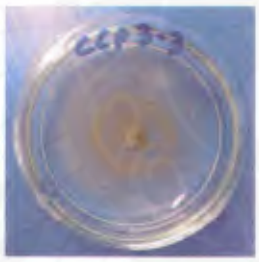
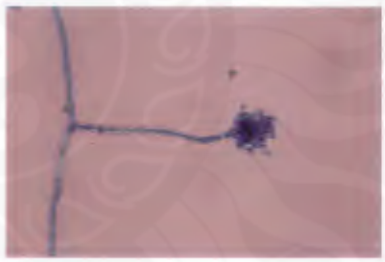
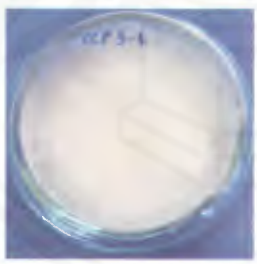
ตารางที่ ก.2 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาพลู ในจังหวัดชุมพร (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CCP 2-9			*Aspergillus* sp.
CCP 2-10			Sterile hypha
CCP 2-11			*Penicillium* sp.
CCP 2-12			*Aspergillus* sp.

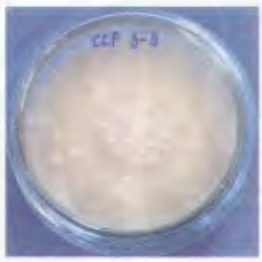
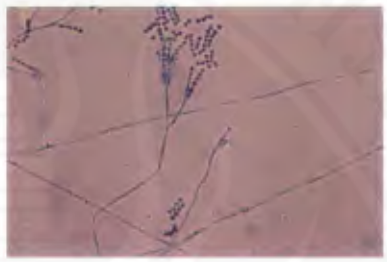
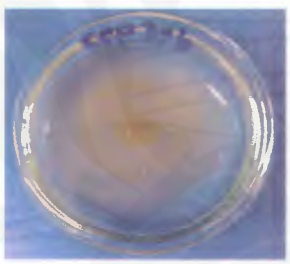
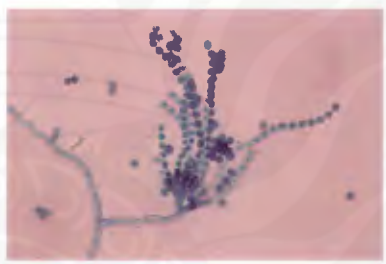
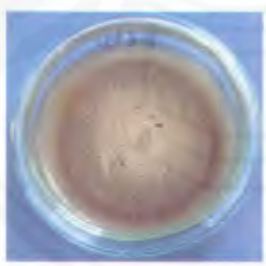
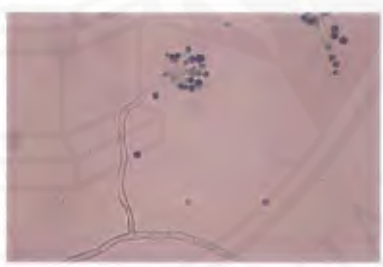
ตารางที่ ก.2 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาพลู ในจังหวัดชุมพร (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CCP 2-13			*Acremonium* sp.
CCP 2-14			*Aspergillus* sp.
CCP 2-15			Sterile hypha

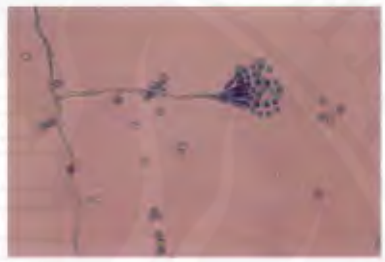
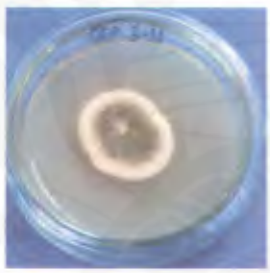
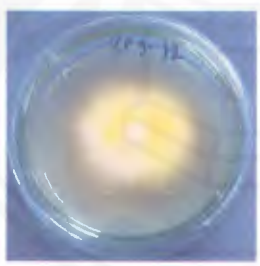
ตารางที่ ก.3 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาน้อย ในจังหวัดชุมพร

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CCP 3-1			*Penicillium* sp.
CCP 3-2			Sterile hypha
CCP 3-3			*Aspergillus* sp.
CCP 3-4			*Aspergillus* sp.

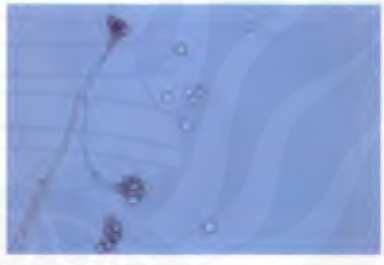
ตารางที่ ก.3 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาน้อย ในจังหวัดชุมพร (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CCP 3-5			*Penicillium* sp.
CCP 3-6			*Aspergillus* sp.
CCP 3-7			Sterile hypha
CCP 3-8			*Aspergillus* sp.

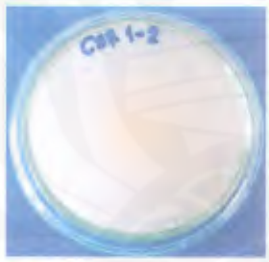
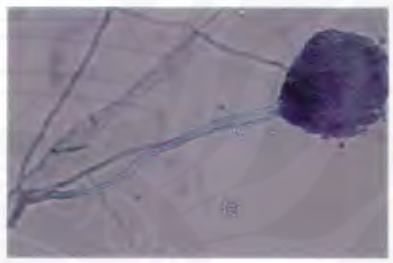
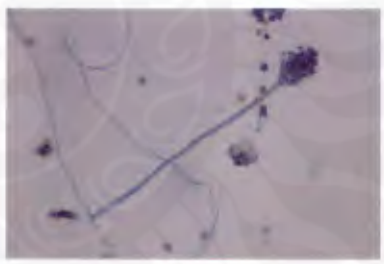
ตารางที่ ก.3 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาน้อย ในจังหวัดชุมพร (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CCP 3-9			*Aspergillus* sp.
CCP 3-10			*Aspergillus* sp.
CCP 3-11			*Penicillium* sp.
CCP 3-12			*Penicillium* sp.

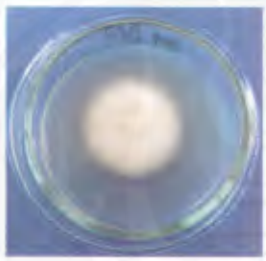
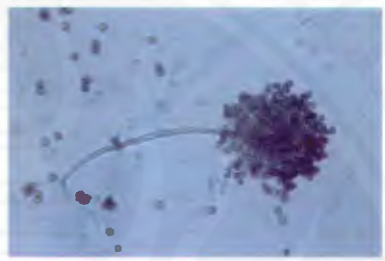
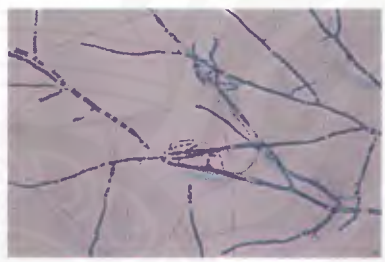
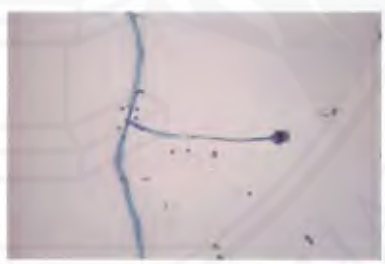
ตารางที่ ก.3 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาน้อย ในจังหวัดชุมพร (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CCP 3-13			*Aspergillus* sp.
CCP 3-14			*Cunninghamella* sp.
CCP 3-15			*Curvularia* sp.

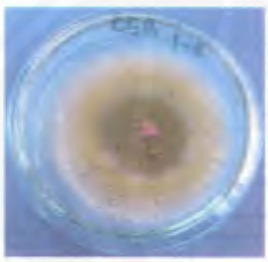
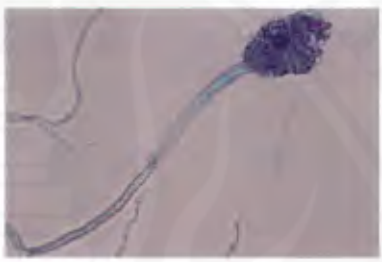
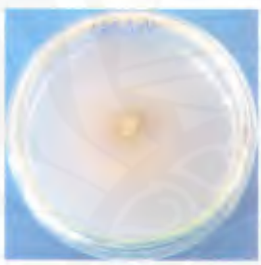
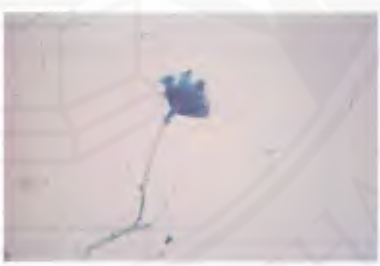
ตารางที่ ก.4 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาโคก ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSR 1-1			*Penicillium* sp.
CSR 1-2			*Aspergillus* sp.
CSR 1-3			*Aspergillus* sp.
CSR 1-4			Sterile hypha

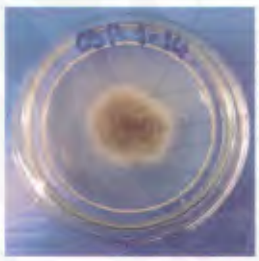
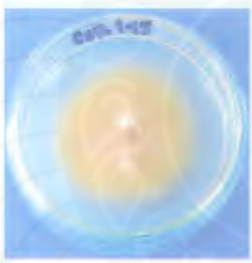
ตารางที่ ก.4 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาโคก ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSR 1-5			*Aspergillus* sp.
CSR 1-6			Sterile hypha
CSR 1-7			*Trichoderma* sp.
CSR 1-8			*Aspergillus* sp.

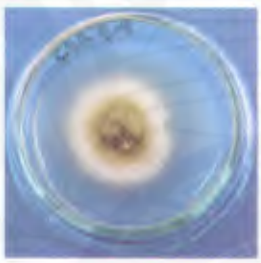
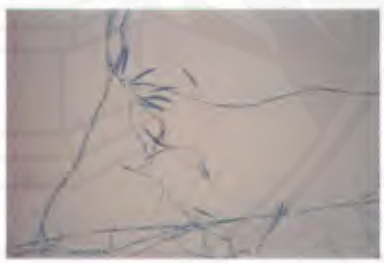
ตารางที่ ก.4 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาโคก ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSR 1-9			*Aspergillus* sp.
CSR 1-10			*Aspergillus* sp.
CSR 1-11			*Trichoderma* sp.
CSR 1-12			*Aspergillus* sp.

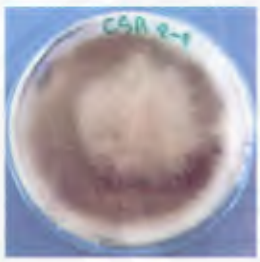
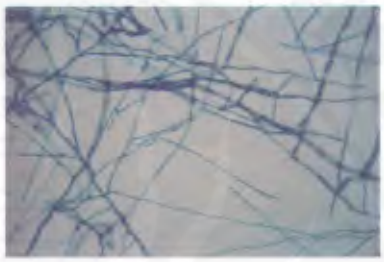
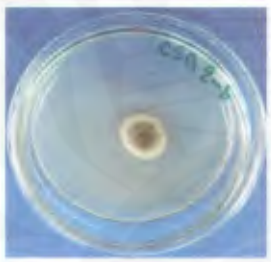
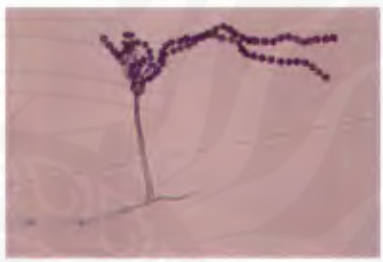
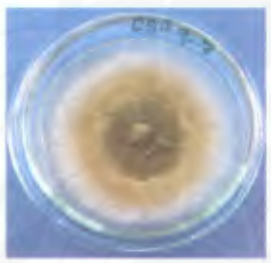
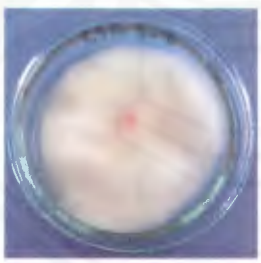
ตารางที่ ก.4 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาโคก ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSR 1-13			*Aspergillus* sp.
CSR 1-14			*Penicillium* sp.
CSR 1-15			*Penicillium* sp.

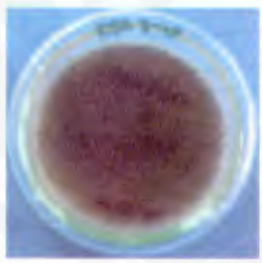
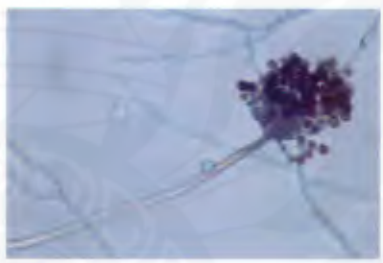
ตารางที่ ก.5 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ่านแกลบ ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSR 2-1			*Trichoderma* sp.
CSR 2-2			*Aspergillus* sp.
CSR 2-3			Sterile hypha
CSR 2-4			*Fusarium* sp.

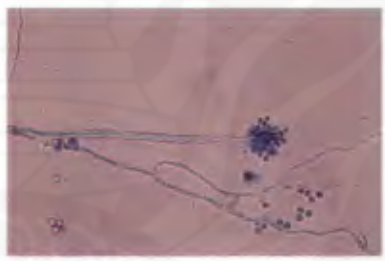
ตารางที่ ก.5 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำแกลบ ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSR 2-5			Sterile hypha
CSR 2-6			*Aspergillus* sp.
CSR 2-7			*Aspergillus* sp.
CSR 2-8			*Fusarium* sp.

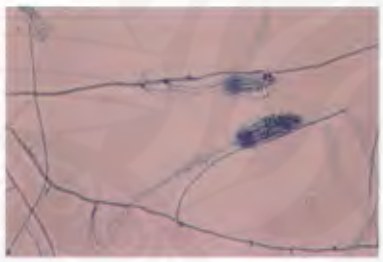
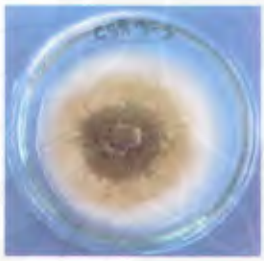
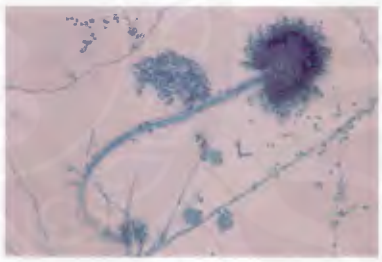
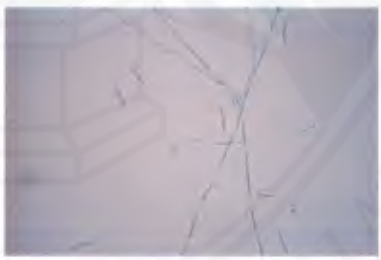
ตารางที่ ก.5 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำแกลบ ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSR 2-9			Sterile hypha
CSR 2-10			*Aspergillus* sp.
CSR 2-11			*Fusarium* sp.
CSR 2-12			*Aspergillus* sp.

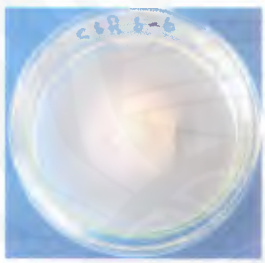
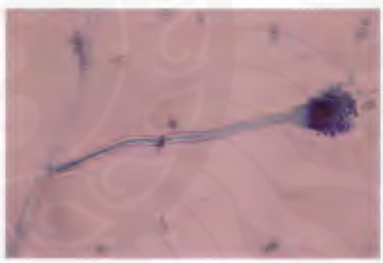
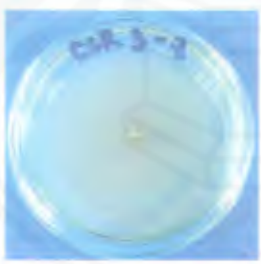
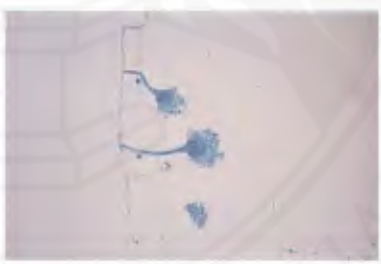
ตารางที่ ก.5 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำแกลบ ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSR 2-13			*Aspergillus* sp.
CSR 2-14			*Aspergillus* sp.
CSR 2-15			*Curvularia* sp.

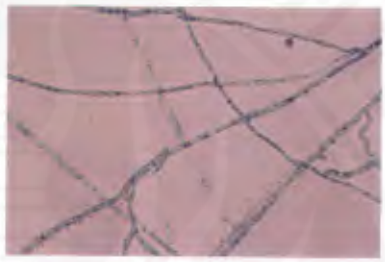
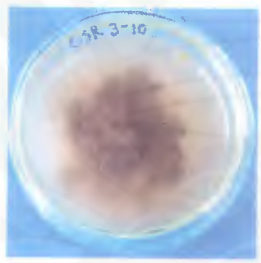
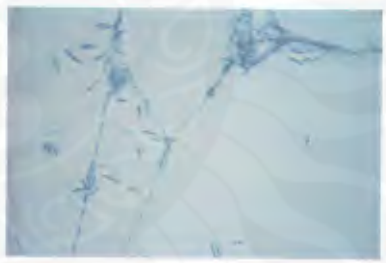
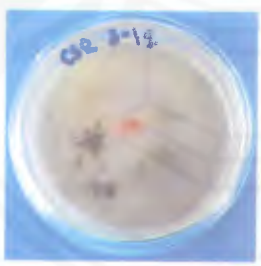
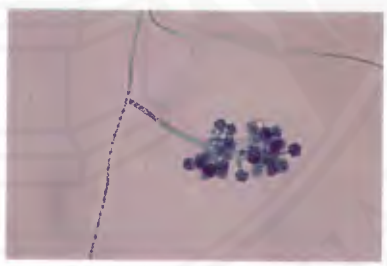
ตารางที่ ก.6 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำขรมวนาราม ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSR 3-1			*Penicillium* sp.
CSR 3-2			*Penicillium* sp.
CSR 3-3			*Aspergillus* sp.
CSR 3-4			*Fusarium* sp.

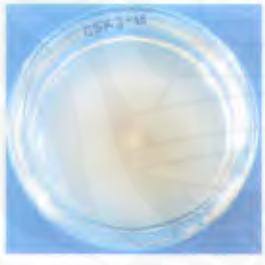
ตารางที่ ก.6 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำขรมวนาราม ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSR 3-5			*Aspergillus* sp.
CSR 3-6			*Penicillium* sp.
CSR 3-7			*Aspergillus* sp.
CSR 3-8			*Aspergillus* sp.

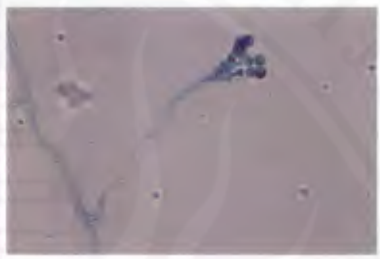
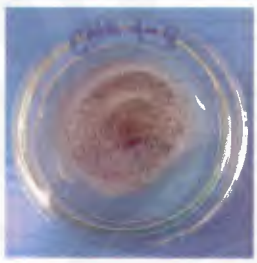
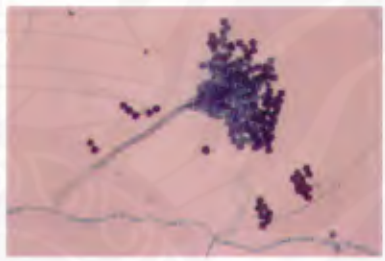
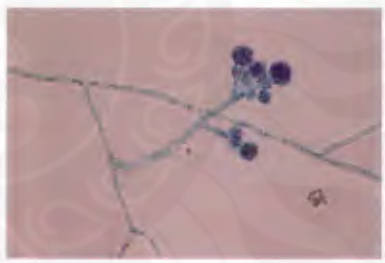
ตารางที่ ก.6 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำขรมวนาราม ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSR 3-9			Sterile hypha
CSR 3-10			Sterile hypha
CSR 3-11			*Fusarium* sp.
CSR 3-12			*Trichoderma* sp.

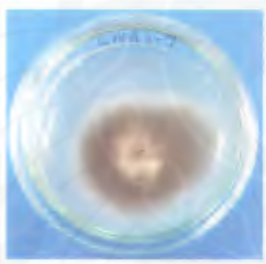
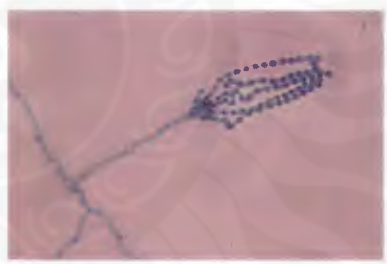
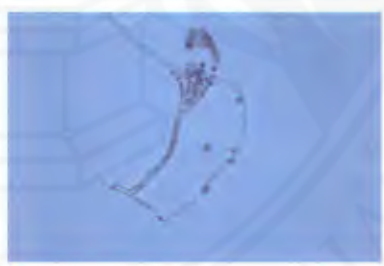
ตารางที่ ก.6 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำขรมวนาราม ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSR 3-13			*Aspergillus* sp.
CSR 3-14			*Trichoderma* sp.
CSR 3-15			*Aspergillus* sp.

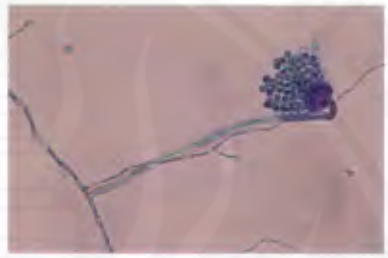
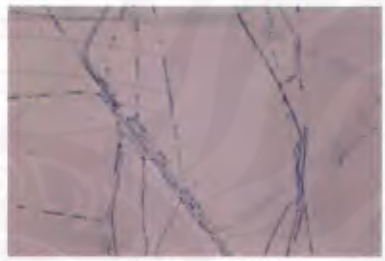
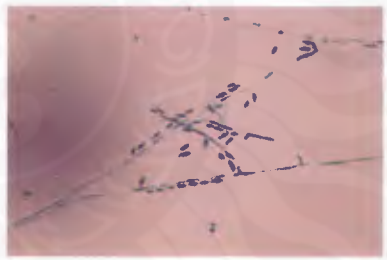
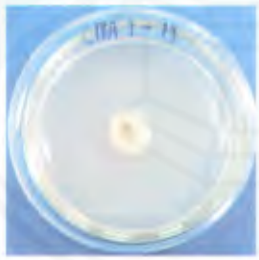
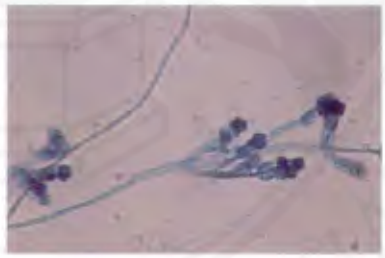
ตารางที่ ก.7 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาขุนพนม ในจังหวัดนครศรีธรรมราช

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CNA 1-1			*Aspergillus* sp.
CNA 1-2			*Aspergillus* sp.
CNA 1-3			*Gliocladium* sp.
CNA 1-4			*Penicillium* sp.

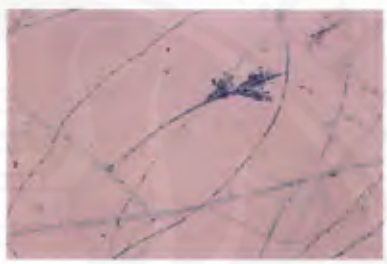
ตารางที่ ก.7 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาขุนพนม ในจังหวัดนครศรีธรรมราช (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CNA 1-5			*Penicillium* sp.
CNA 1-6			*Fusarium* sp.
CNA 1-7			*Aspergillus* sp.
CNA 1-8			*Aspergillus* sp.

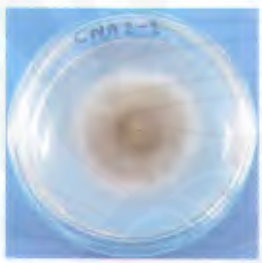
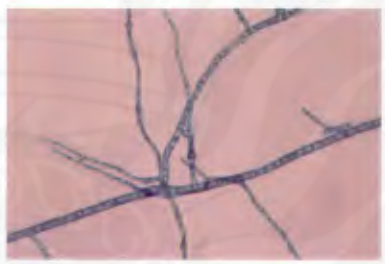
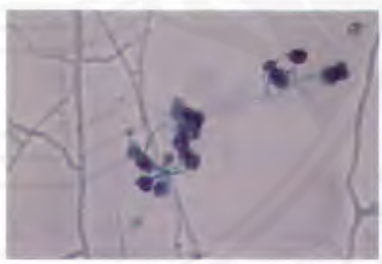
ตารางที่ ก.7 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาขุนพนม ในจังหวัดนครศรีธรรมราช (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CNA 1-9			*Aspergillus* sp.
CNA 1-10			Sterile hypha
CNA 1-11			*Acremonium* sp.
CNA 1-12			*Trichoderma* sp.

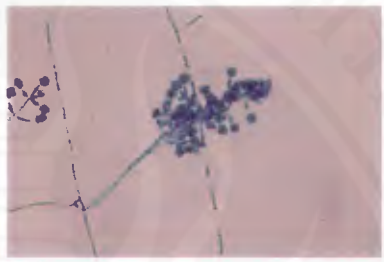
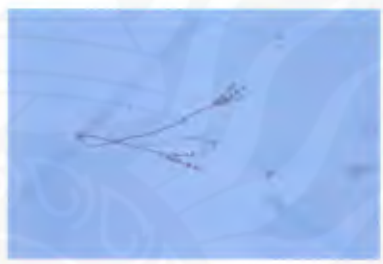
ตารางที่ ก.7 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาขุนพนม ในจังหวัดนครศรีธรรมราช (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CNA 1-13			*Penicillium* sp.
CNA 1-14			*Penicillium* sp.
CNA 1-15			*Aspergillus* sp.

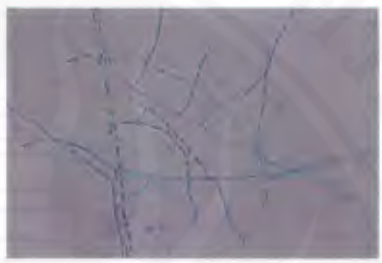
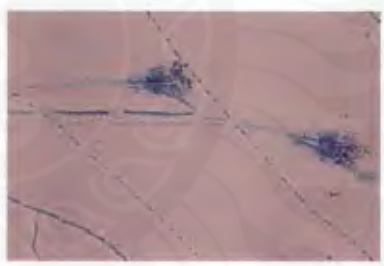
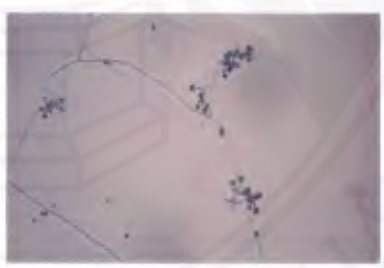
ตารางที่ ก.8 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาปูน ในจังหวัดนครศรีธรรมราช

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CNA 2-1			*Gliocladium* sp.
CNA 2-2			Sterile hypha
CNA 2-3			*Aspergillus* sp.
CNA 2-4			*Trichoderma* sp.

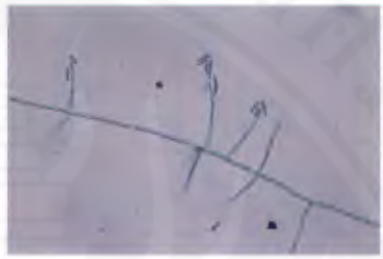
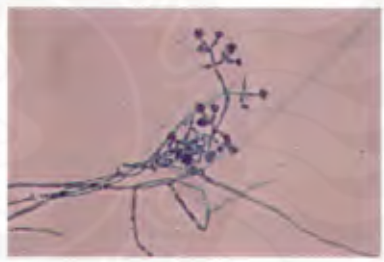
ตารางที่ ก.8 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาปูน ในจังหวัดนครศรีธรรมราช (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CNA 2-5			*Trichoderma* sp.
CNA 2-6			*Penicillium* sp.
CNA 2-7			*Penicillium* sp.
CNA 2-8			*Penicillium* sp.

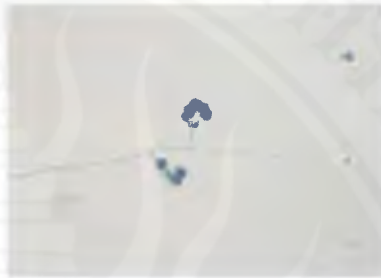
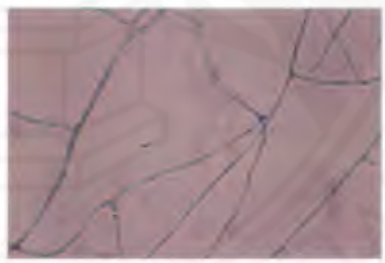
ตารางที่ ก.8 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาปูน ในจังหวัดนครศรีธรรมราช (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CNA 2-9			Sterile hypha
CNA 2-10			*Aspergillus* sp.
CNA 2-11			*Penicillium* sp.
CNA 2-12			*Trichoderma* sp.

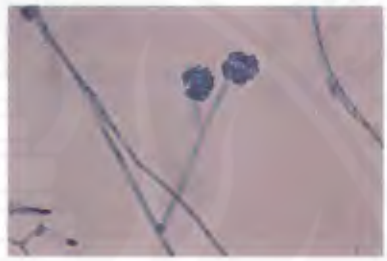
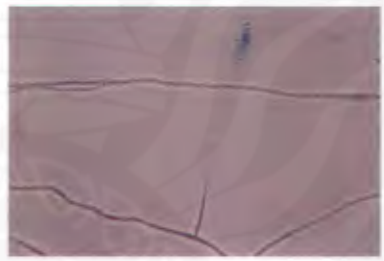
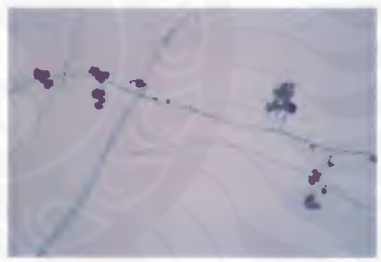
ตารางที่ ก.8 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาปูน ในจังหวัดนครศรีธรรมราช (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CNA 2-13			*Acremonium* sp.
CNA 2-14			*Penicillium* sp.
CNA 2-15			*Trichoderma* sp.

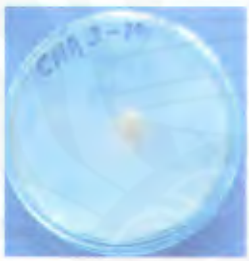
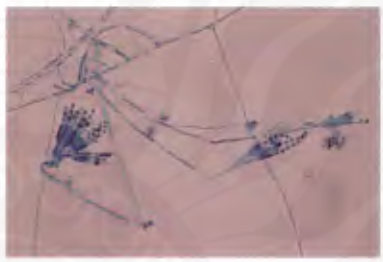
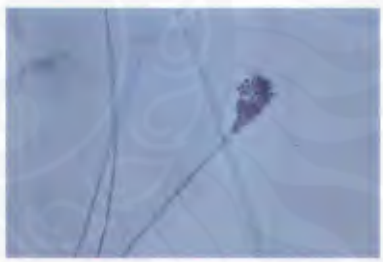
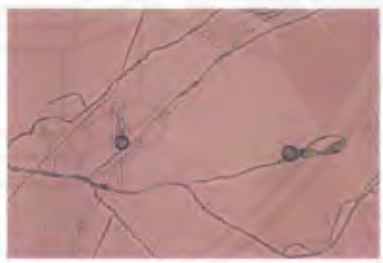
ตารางที่ ก.9 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำแก้วสุรกานต์ ในจังหวัดนครศรีธรรมราช

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CNA 3-1			*Aspergillus* sp.
CNA 3-2			*Penicillium* sp.
CNA 3-3			*Aspergillus* sp.
CNA 3-4			Sterile hypha

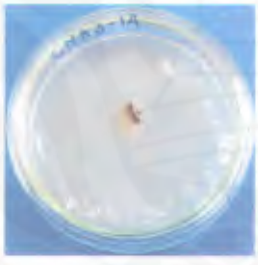
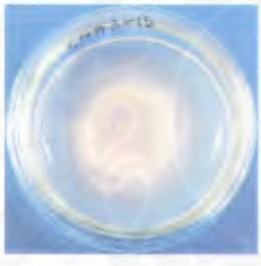
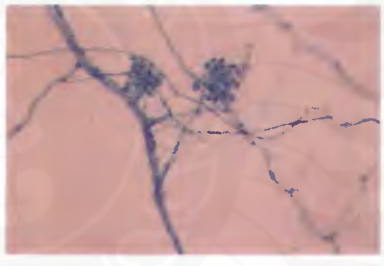
ตารางที่ ก.9 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำแก้วสุรกานต์ ในจังหวัดนครศรีธรรมราช (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CNA 3-5			*Aspergillus* sp.
CNA 3-6			*Penicillium* sp.
CNA 3-7			*Trichoderma* sp.
CNA 3-8			*Trichoderma* sp.

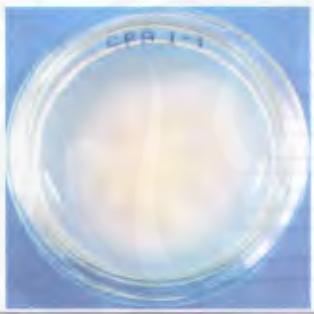
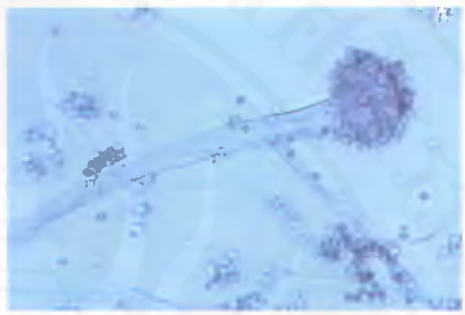
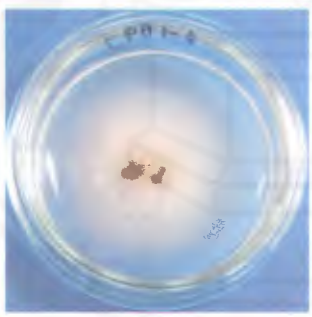
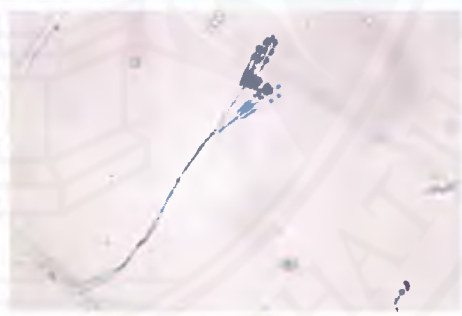
ตารางที่ ก.9 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำแก้วสุรกานต์ ในจังหวัดนครศรีธรรมราช (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CNA 3-9			*Aspergillus sp.*
CNA 3-10			*Penicillium* sp.
CNA 3-11			*Penicillium* sp.
CNA 3-12			Sterile hypha

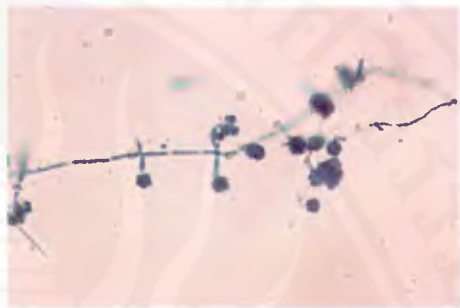
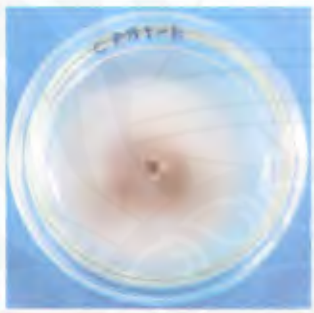
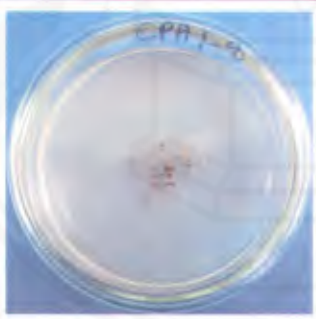
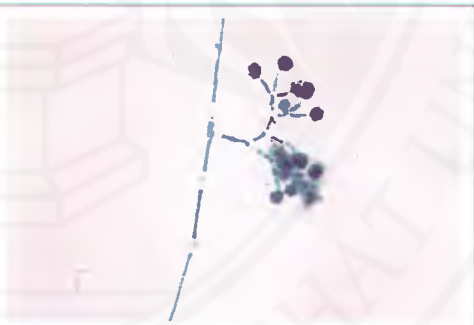
ตารางที่ ก.9 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำแก้วสุรกานต์ ในจังหวัดนครศรีธรรมราช (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CNA 3-13			Sterile hypha
CNA 3-14			*Trichoderma* sp.
CNA 3-15			*Fusarium* sp.

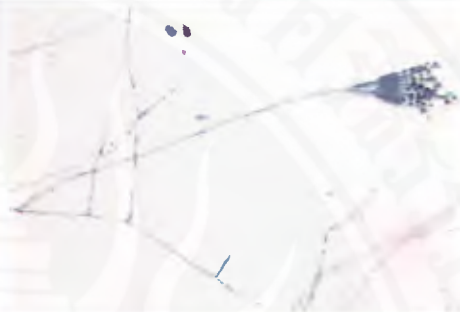
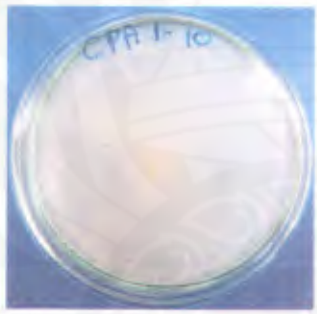
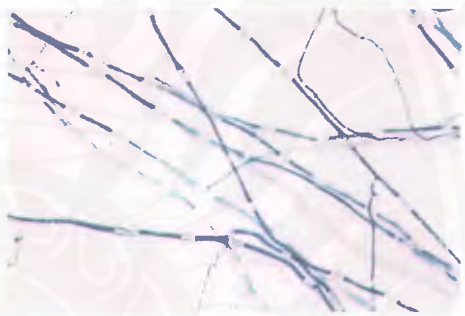
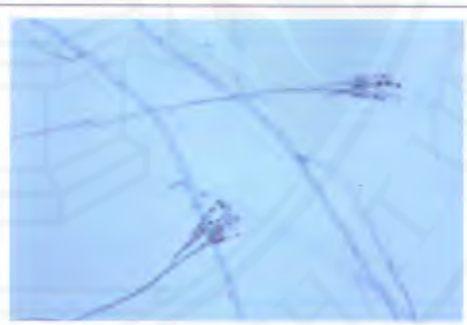
ตารางที่ ก.10 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำสุมโน จังหวัดพัทลุง

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CPA 1-1			*Aspergillus* sp.
CPA 1-2			*Penicillium* sp.
CPA 1-3			*Fusarium* sp.
CPA 1-4			*Penicillium* sp.

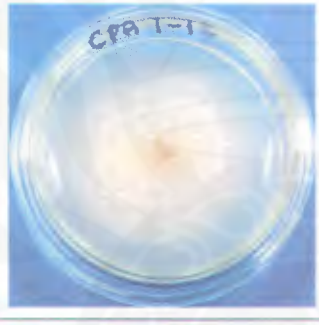
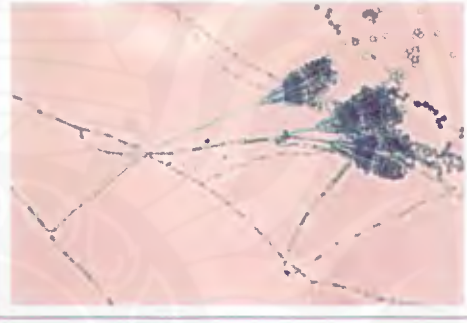
ตารางที่ ก.10 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำสุมโน จังหวัดพัทลุง (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CPA 1-5			*Trichoderma* sp.
CPA 1-6			*Aspergillus* sp.
CPA 1-7			*Penicillium* sp.
CPA 1-8			*Trichoderma* sp.

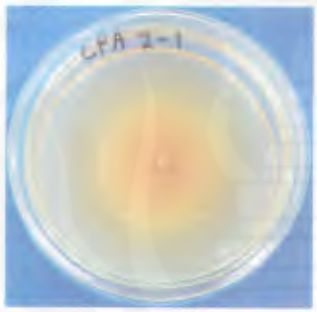
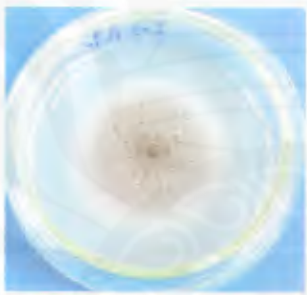
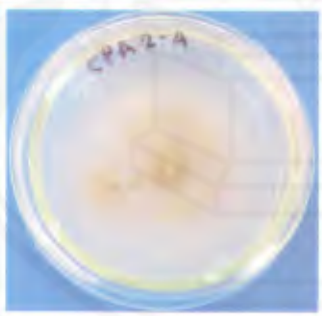
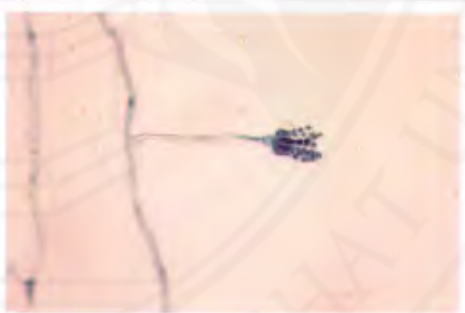
ตารางที่ ก.10 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำสุมโน จังหวัดพัทลุง (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CPA 1-9			*Penicillium* sp.
CPA 1-10			Sterile hypha
CPA 1-11			*Trichoderma* sp.
CPA 1-12			*Penicillium* sp.

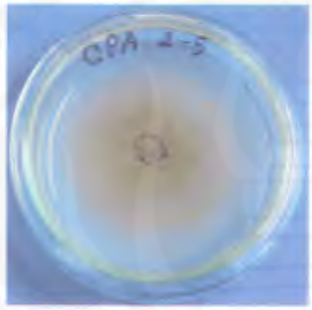
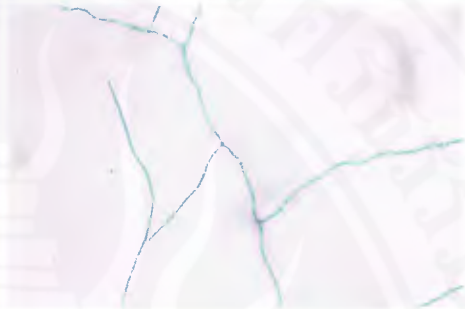
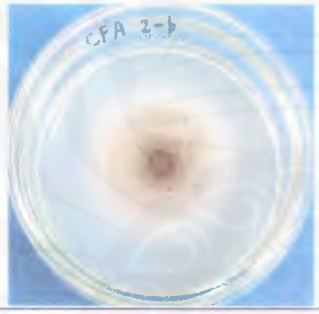
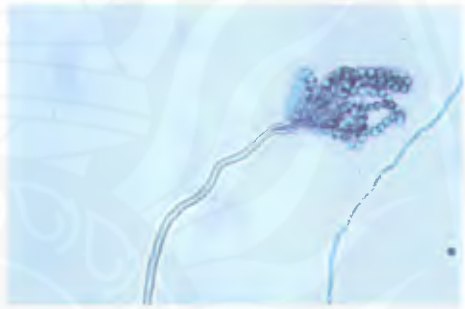
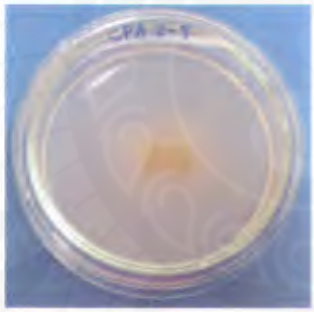
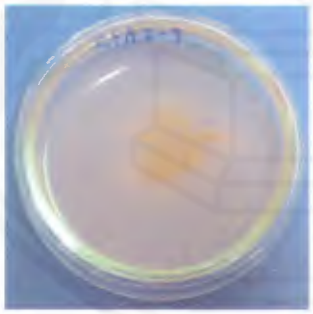
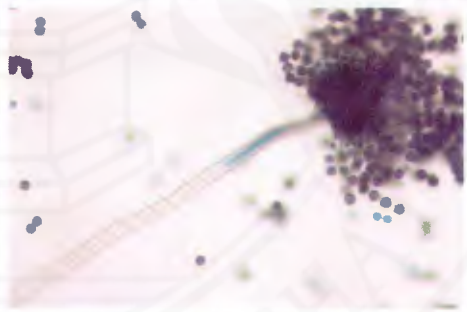
ตารางที่ ก.10 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำสุมโน จังหวัดพัทลุง (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CPA 1-13			*Aspergillus* sp.
CPA 1-14			*Penicillium* sp.
CPA 1-15			*Aspergillus* sp.

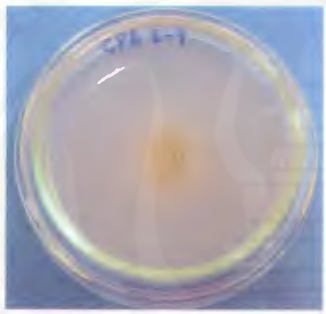
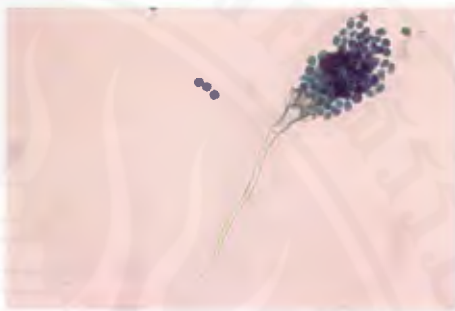
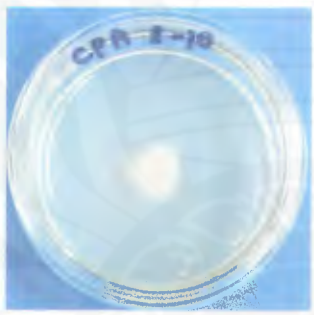
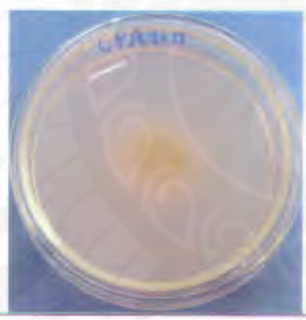
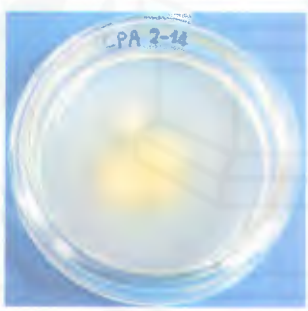
ตารางที่ ก.11 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำคูหาสวรรค์ จังหวัดพัทลุง

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CPA 2-1			*Penicillium* sp.
CPA 2-2			*Penicillium* sp.
CPA 2-3			*Trichoderma* sp.
CPA 2-4			*Penicillium* sp.

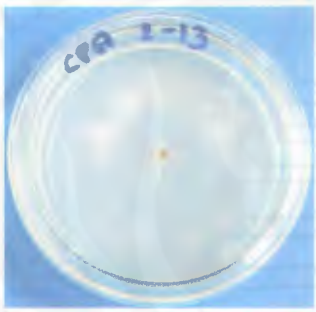
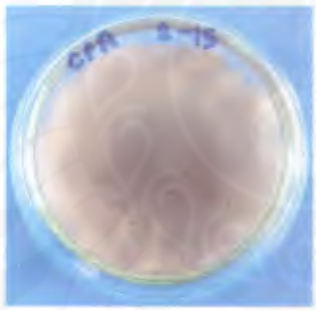
ตารางที่ ก.11 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำคูหาสวรรค์ จังหวัดพัทลุง (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CPA 2-5			Sterile hypha
CPA 2-6			*Aspergillus* sp.
CPA 2-7			*Aspergillus* sp.
CPA 2-8			*Aspergillus* sp.

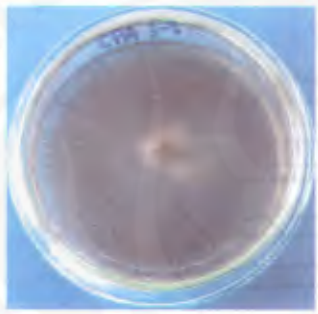
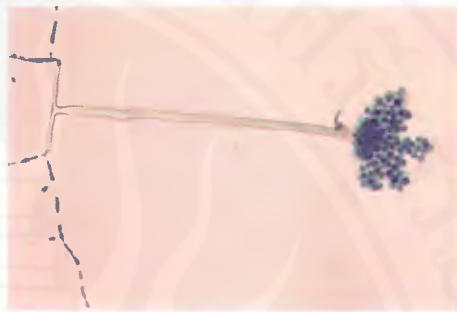
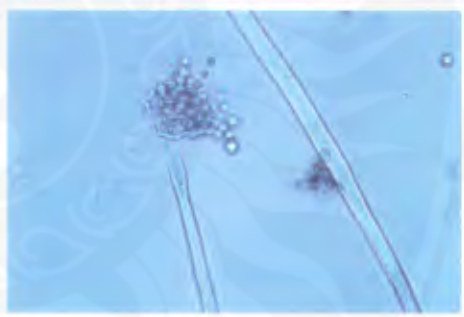
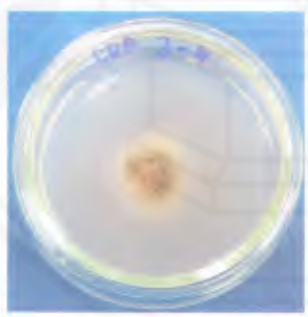
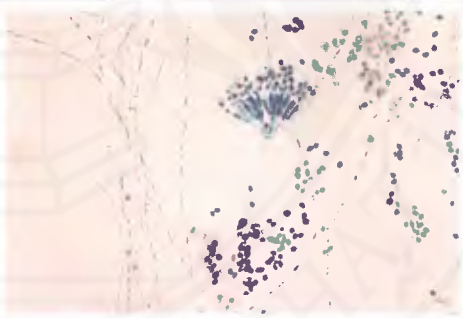
ตารางที่ ก.11 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำคูหาสวรรค์ จังหวัดพัทลุง (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CPA 2-9			*Aspergillus* sp.
CPA 2-10			*Aspergillus* sp.
CPA 2-11			*Penicillium* sp.
CPA 2-12			*Aspergillus* sp.

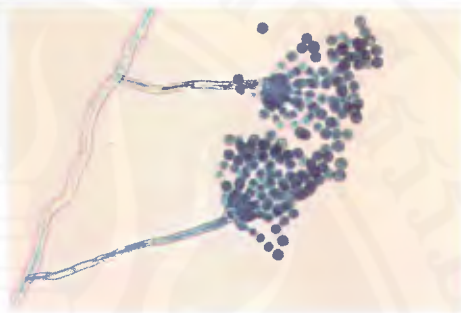
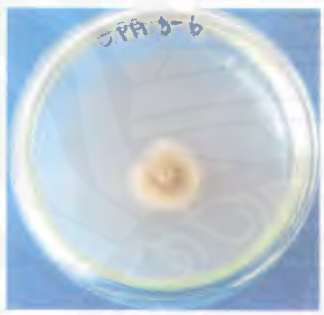
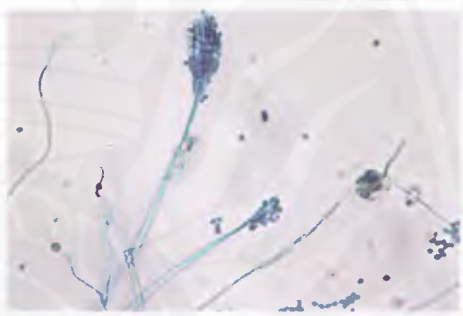
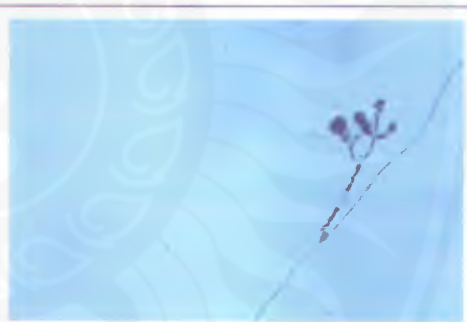
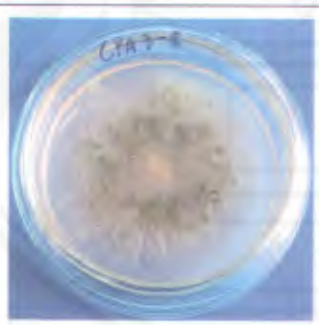
ตารางที่ ก.11 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำคูหาสวรรค์ จังหวัดพัทลุง (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CPA 2-13			*Trichoderma* sp.
CPA 2-14			*Aspergillus* sp.
CPA 2-15			Sterile hypha

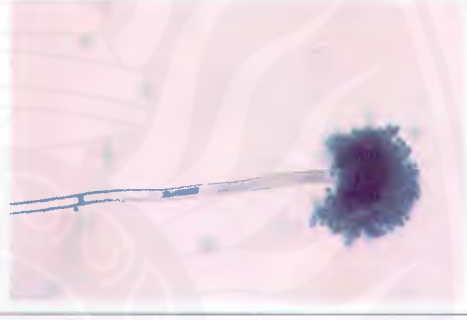
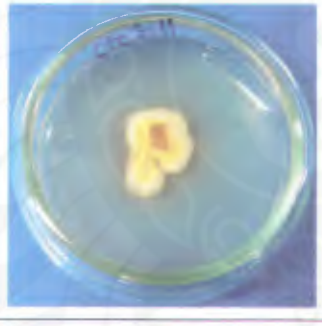
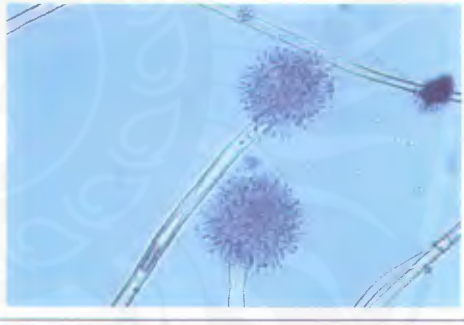
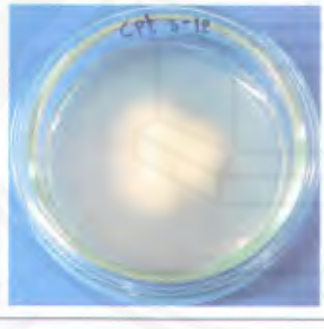
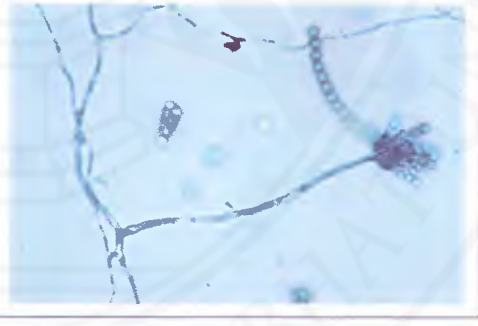
ตารางที่ ก.12 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาอ้อ จังหวัดพัทลุง

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CPA 3-1			*Aspergillus* sp.
CPA 3-2			*Trichoderma* sp.
CPA 3-3			*Aspergillus* sp.
CPA 3-4			*Penicillium* sp.

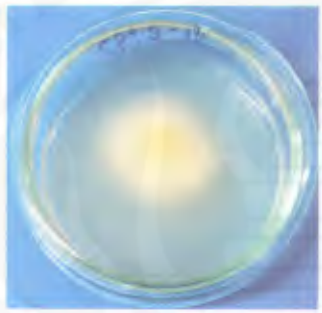
ตารางที่ ก.12 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาอ้อ จังหวัดพัทลุง (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CPA 3-5			*Aspergillus* sp.
CPA 3-6			*Penicillium* sp.
CPA 3-7			*Trichoderma* sp.
CPA 3-8			*Aspergillus* sp.

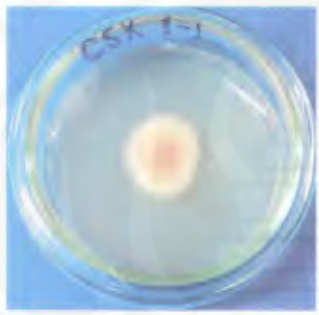
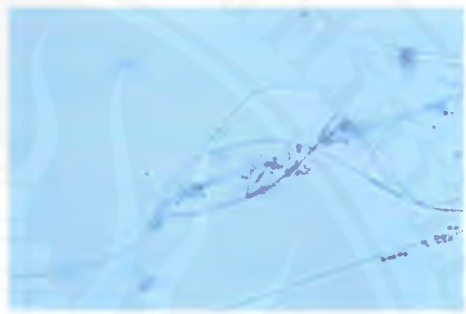
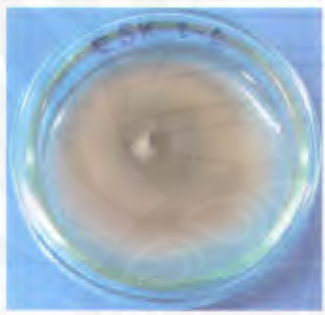
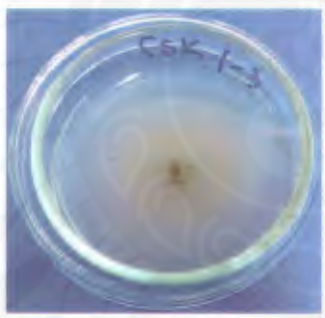
ตารางที่ ก.12 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาอ้อ จังหวัดพัทลุง (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CPA 3-9			*Aspergillus* sp.
CPA 3-10			*Aspergillus* sp.
CPA 3-11			*Aspergillus* sp.
CPA 3-12			*Penicillium* sp.

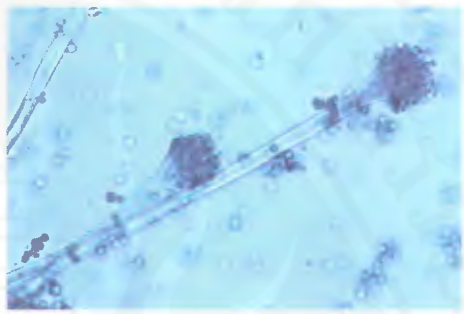
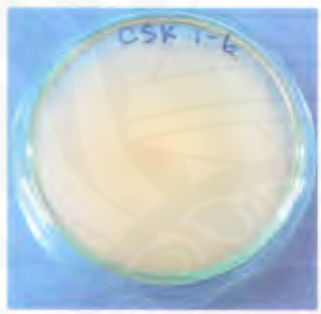
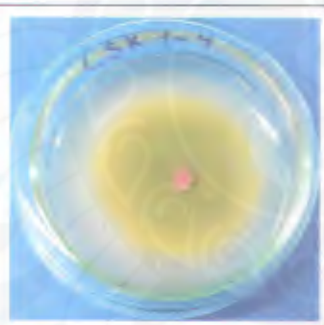
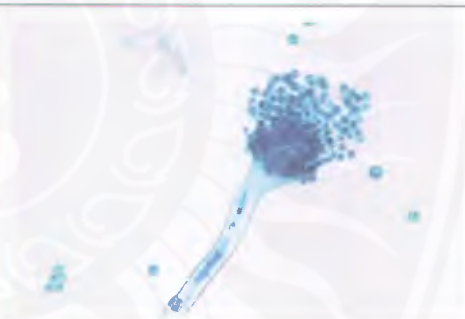
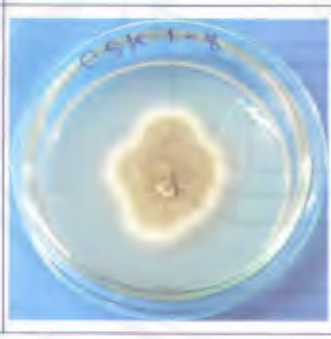
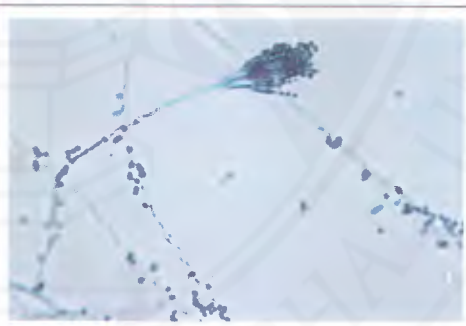
ตารางที่ ก.12 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาอ้อ จังหวัดพัทลุง (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CPA 3-13			*Penicillium* sp.
CPA 3-14			*Trichoderma* sp.
CPA 3-15			*Aspergillus* sp.

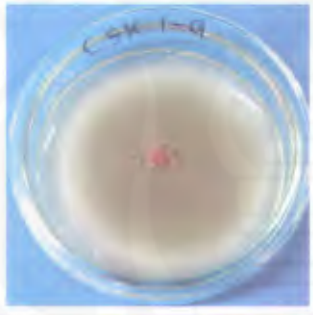
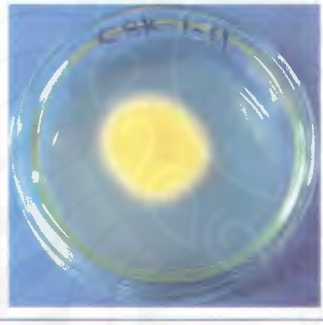
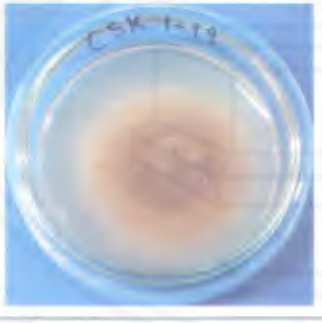
ตารางที่ ก.13 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาพระ จังหวัดสงขลา

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSK 1-1			*Penicillium* sp.
CSK 1-2			*Curvularia* sp.
CSK 1-3			*Aspergillus* sp.
CSK 1-4			*Penicillium* sp.

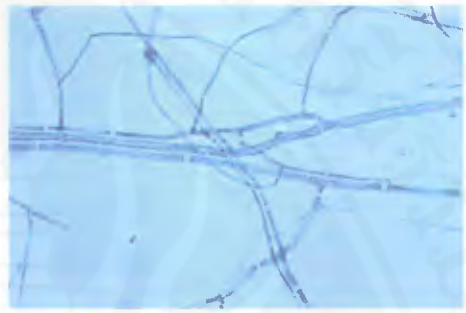
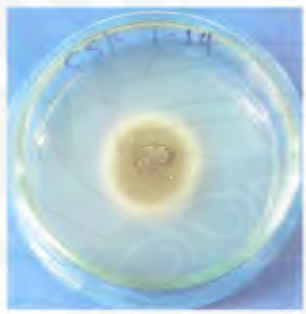
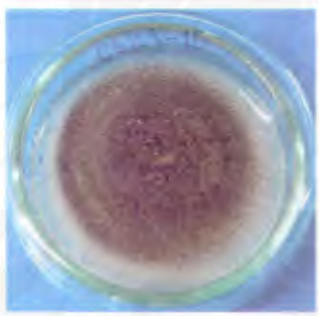
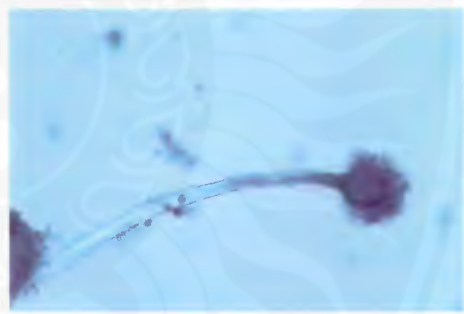
ตารางที่ ก.13 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขาพระ จังหวัดสงขลา (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSK 1-5			*Aspergillus* sp.
CSK 1-6			*Aspergillus* sp.
CSK 1-7			*Aspergillus* sp.
CSK 1-8			*Penicillium* sp.

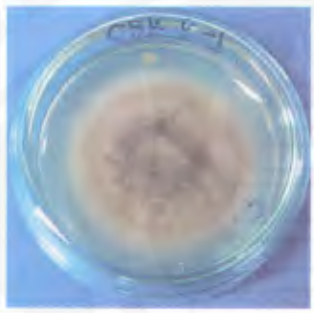
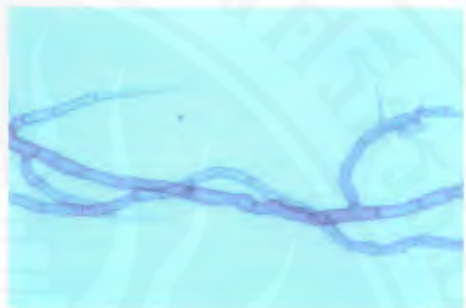
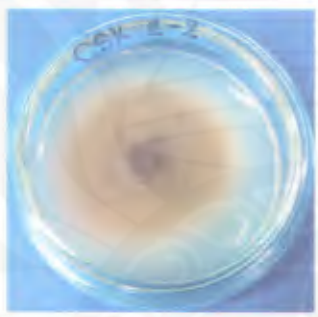
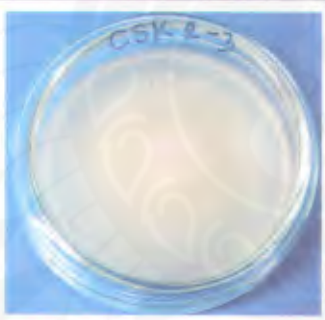
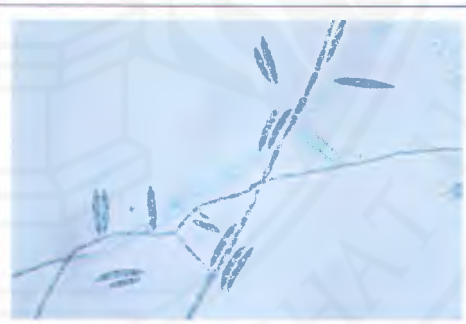
ตารางที่ ก.13 การจำแนกเชื้อราที่แยกได้จากดินถ้ำเขาพระ จังหวัดสงขลา (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSK 1-9			*Aspergillus* sp.
CSK 1-10			*Aspergillus* sp.
CSK 1-11			*Penicillium* sp.
CSK 1-12			*Curvularia* sp.

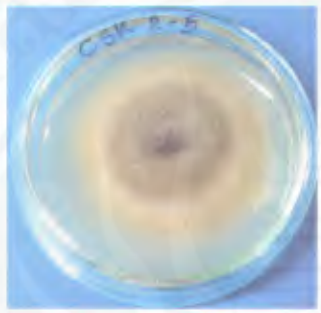
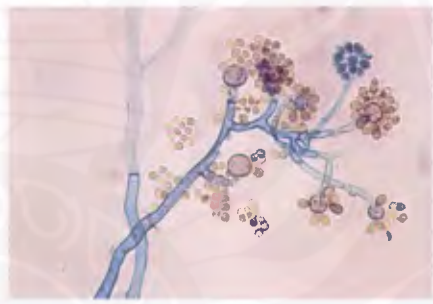
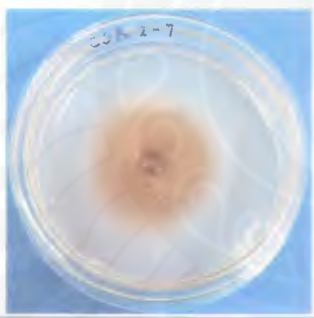
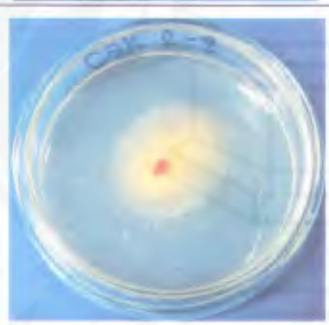
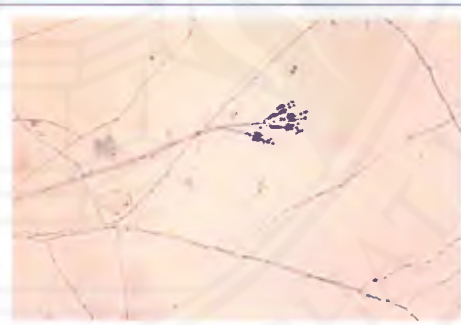
ตารางที่ ก.13 การจำแนกเชื้อราที่แยกได้จากถ้ำเขาพระ จังหวัดสงขลา (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSK 1-13			Sterile hypha
CSK 1-14			*Penicillium* sp.
CSK 1-15			*Aspergillus* sp.

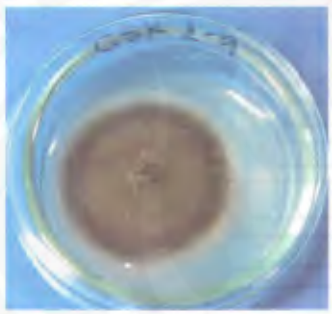
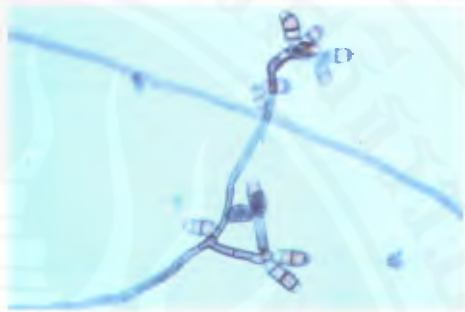
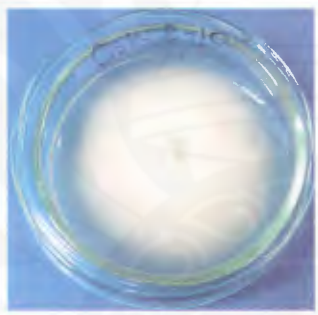
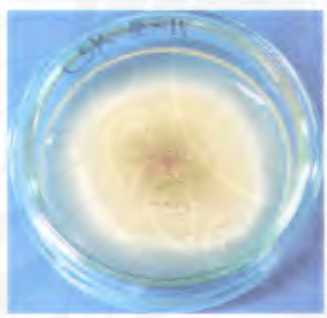
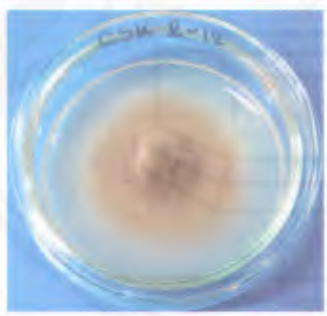
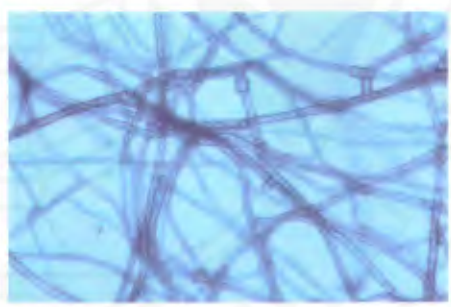
ตารางที่ ก.14 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำศรีเกษร จังหวัดสงขลา

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSK 2-1			Sterile hypha
CSK 2-2			*Curvularia* sp.
CSK 2-3			Sterile hypha
CSK 2-4			*Fusarium* sp.

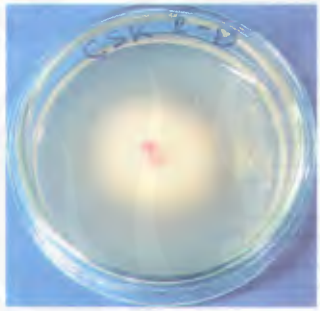
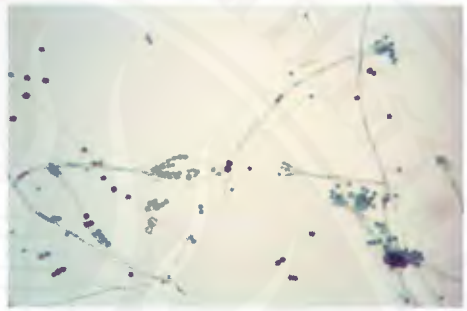
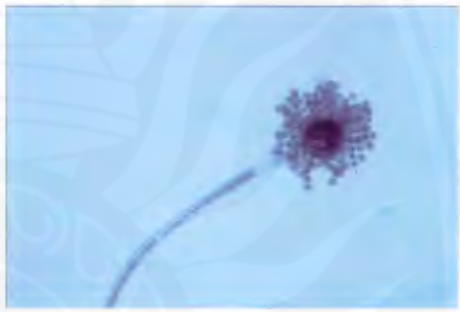
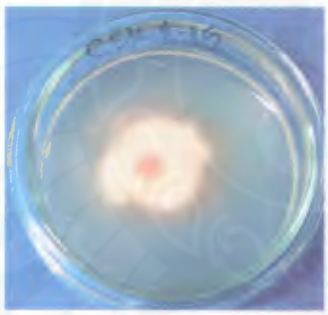
ตารางที่ ก.14 การจำแนกเชื้อราที่แยกได้จากดินถ้ำศรีเกษร จังหวัดสงขลา (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSK 2-5			*Curvularia* sp.
CSK 2-6			*Cunninghamella* sp.
CSK 2-7			*Curvularia* sp.
CSK 2-8			*Penicillium* sp.

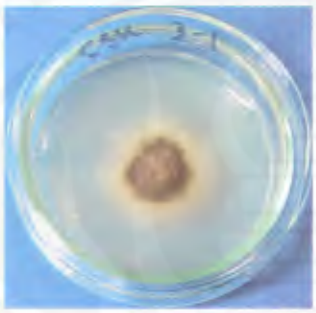
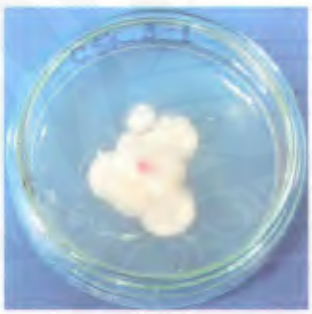
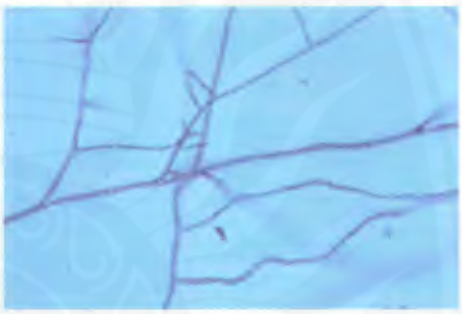
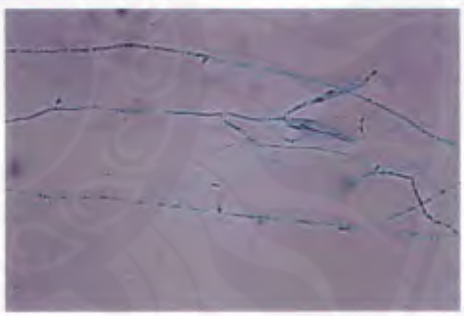
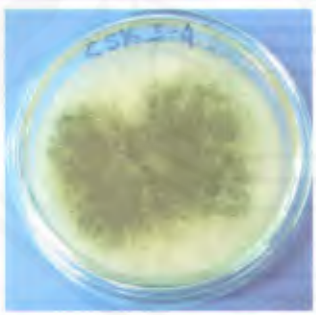
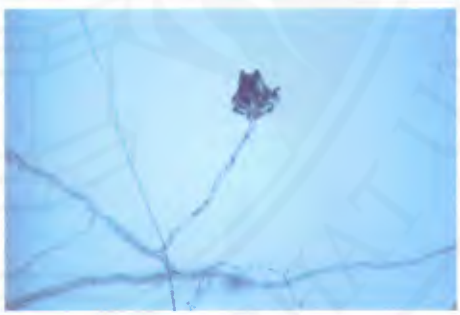
ตารางที่ ก.14 การจำแนกเชื้อราที่แยกได้จากดินถ้ำศรีเกษร จังหวัดสงขลา (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSK 2-9			*Curvularia* sp.
CSK 2-10			*Aspergillus* sp.
CSK 2-11			*Penicillium* sp.
CSK 2-12			Sterile hypha

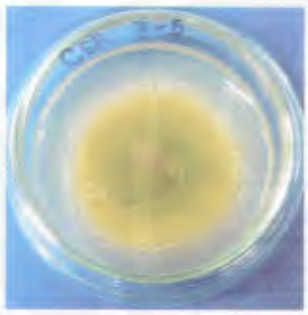
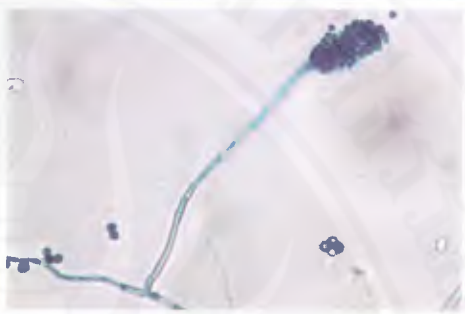
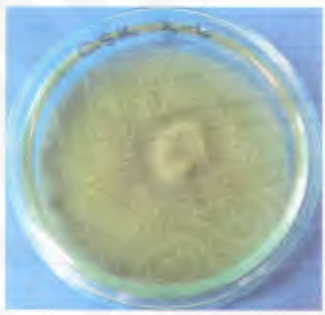
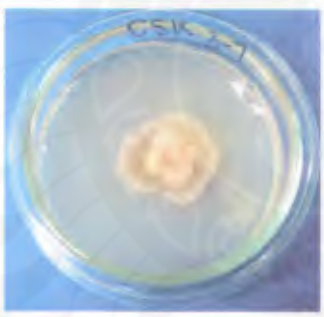
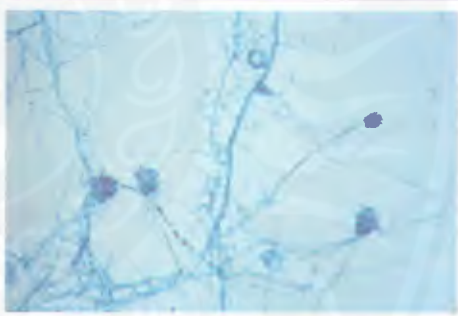
ตารางที่ ก.14 การจำแนกเชื้อราที่แยกได้จากดินถ้ำศรีเกษร จังหวัดสงขลา (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSK 2-13			*Penicillium* sp.
CSK 2-14			*Aspergillus* sp.
CSK 2-15			*Fusarium* sp.

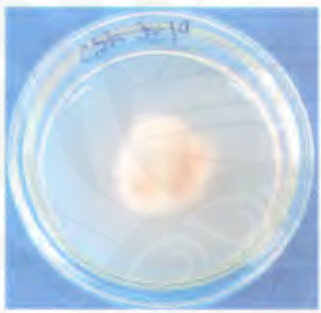
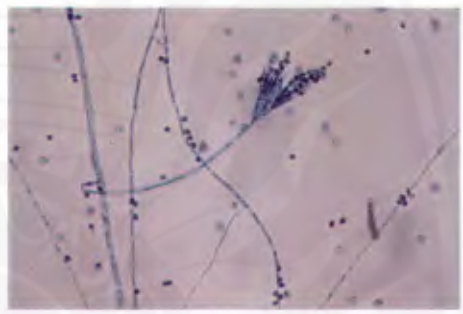
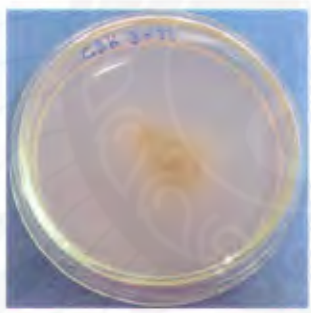
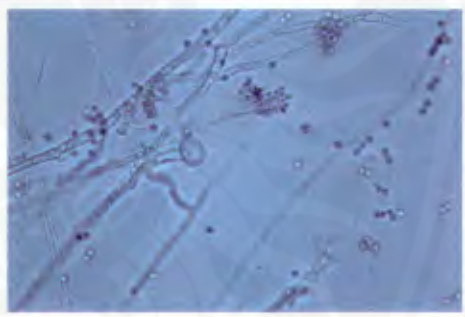
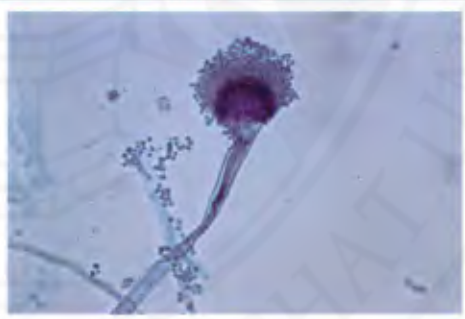
ตารางที่ ก.15 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขานุ้ย จังหวัดสงขลา

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSK 3-1			Sterile hypha
CSK 3-2			Sterile hypha
CSK 3-3			*Paeciomyces* sp.
CSK 3-4			*Aspergillus* sp.

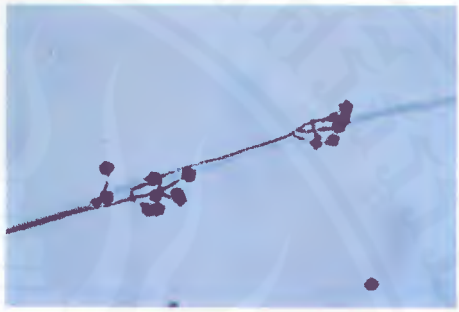
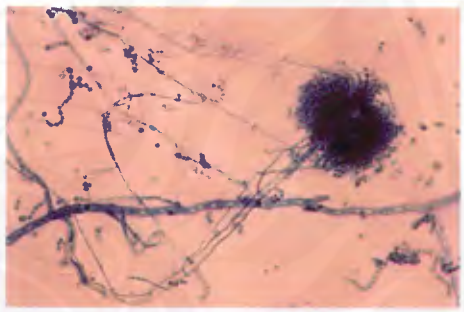
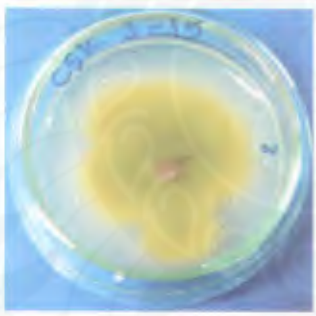
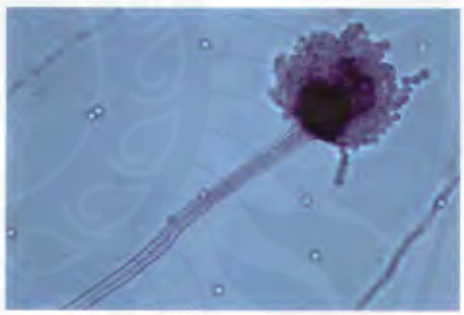
ตารางที่ ก.15 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขานุ้ย จังหวัดสงขลา (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSK 3-5			*Aspergillus* sp.
CSK 3-6			*Trichoderma* sp.
CSK 3-7			*Aspergillus* sp.
CSK 3-8			*Aspergillus* sp.

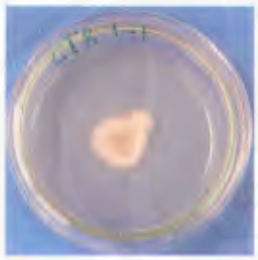
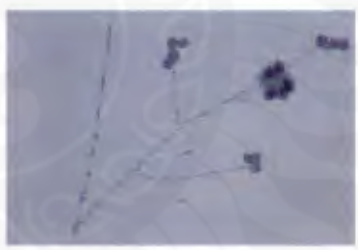
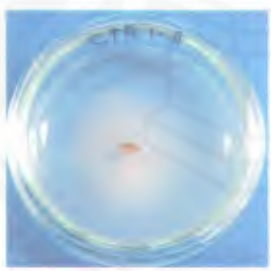
ตารางที่ ก.15 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขานุ้ย จังหวัดสงขลา (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSK 3-9			*Curvularia* sp.
CSK 3-10			*Penicillium* sp.
CSK 3-11			*Penicillium* sp.
CSK 3-12			*Aspergillus* sp.

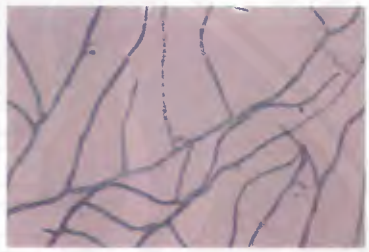
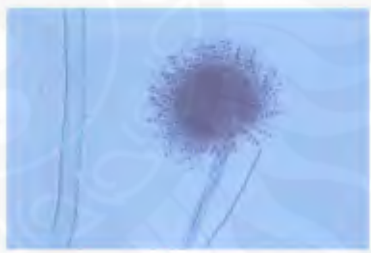
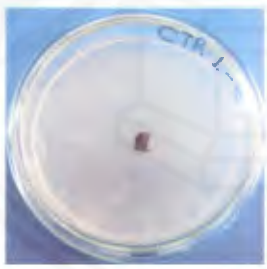
ตารางที่ ก.15 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเขานุ้ย จังหวัดสงขลา (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CSK 3-13			*Trichoderma* sp.
CSK 3-14			*Aspergillus* sp.
CSK 3-15			*Aspergillus* sp.

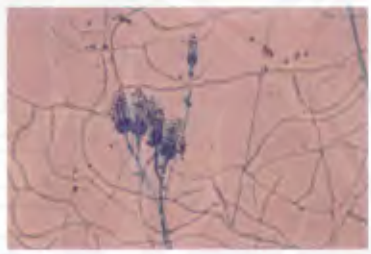
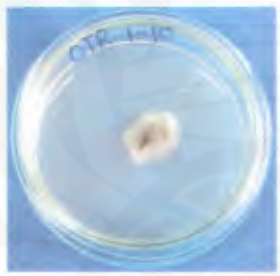
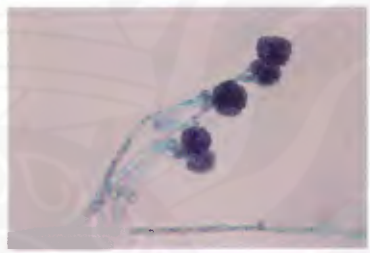
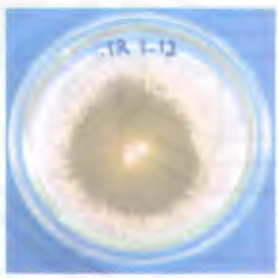
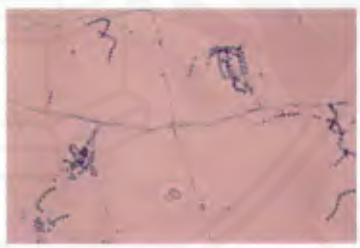
ตารางที่ ก.16 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำผึ้ง ในจังหวัดตรัง

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CTR 1-1			*Penicillium* sp.
CTR 1-2			*Aspergillus* sp.
CTR 1-3			*Trichoderma* sp.
CTR 1-4			Sterile hypha

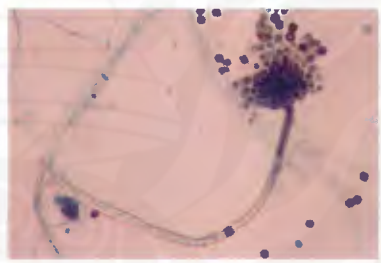
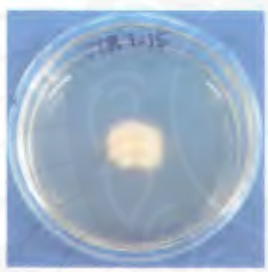
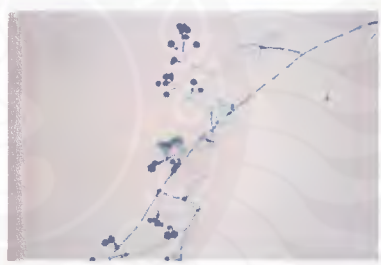
ตารางที่ ก.16 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำผึ้ง ในจังหวัดตรัง (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CTR 1-5			Sterile hypha
CTR 1-6			*Aspergillus* sp.
CTR 1-7			*Aspergillus* sp.
CTR 1-8			Sterile hypha

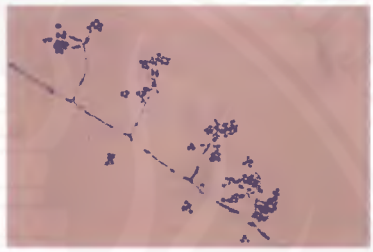
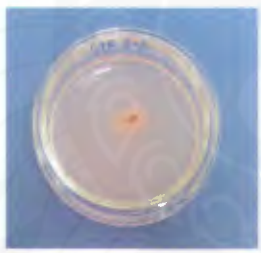
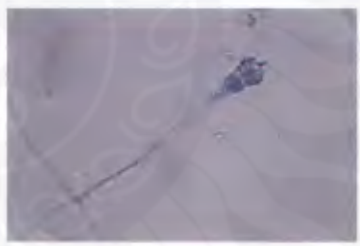
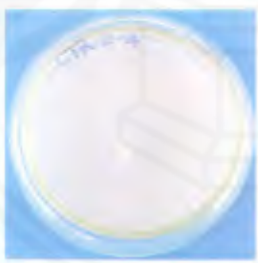
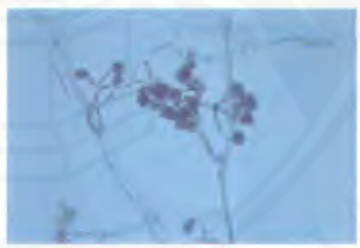
ตารางที่ ก.16 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำผึ้ง ในจังหวัดตรัง (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CTR 1-9			*Aspergillus* sp.
CTR 1-10			*Trichoderma* sp.
CTR 1-11			*Aspergillus* sp.
CTR 1-12			*Penicillium* sp.

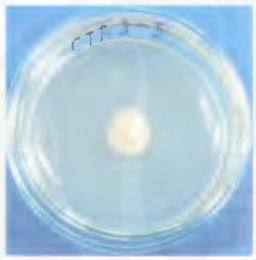
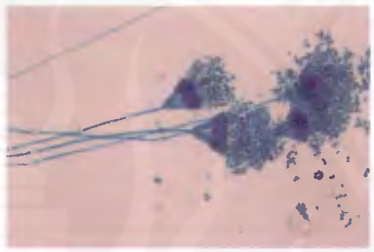
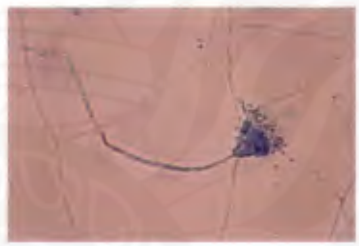
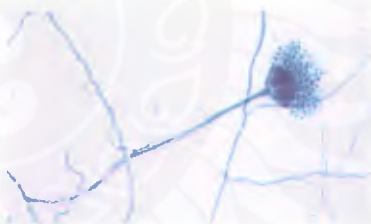
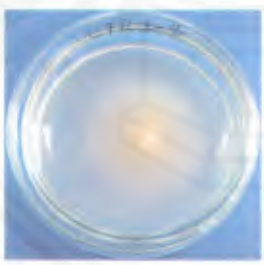
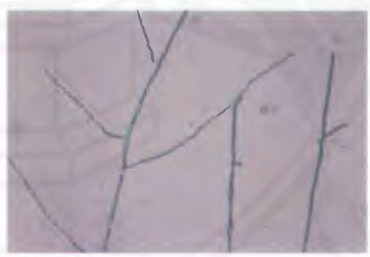
ตารางที่ ก.16 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำผึ้ง ในจังหวัดตรัง (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CTR 1-13			*Curvularia* sp.
CTR 1-14			*Aspergillus* sp.
CTR 1-15			*Trichoderma* sp.

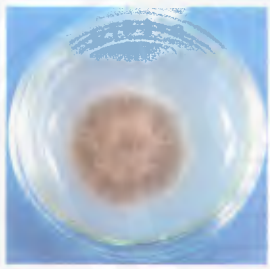
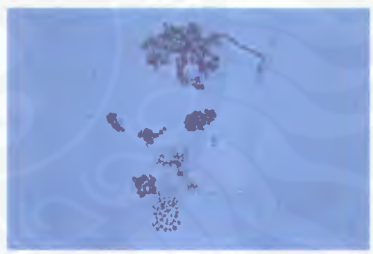
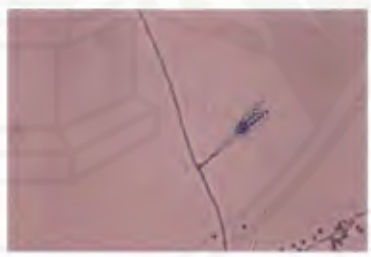
ตารางที่ ก.17 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเลเขากอบ ในจังหวัดตรัง

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CTR 2-1			*Trichoderma* sp.
CTR 2-2			*Penicillium* sp.
CTR 2-3			*Penicillium* sp.
CTR 2-4			*Trichoderma* sp.

ตารางที่ ก.17 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเลเขากอบ ในจังหวัดตรัง (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CTR 2-5			*Penicililum* sp.
CTR 2-6			*Penicillium* sp.
CTR 2-7			*Aspergillus* sp.
CTR 2-8			Sterile hypha

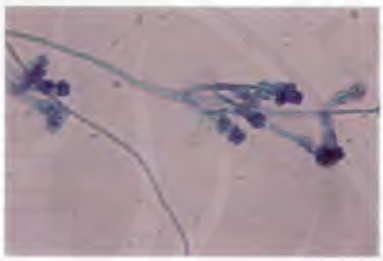
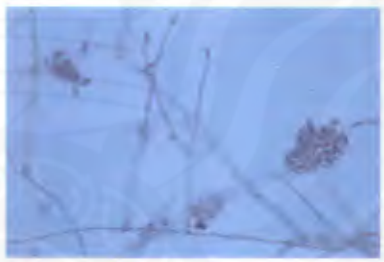
ตารางที่ ก.17 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเลเขากอบ ในจังหวัดตรัง (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CTR 2-9			*Curvularia* sp.
CTR 2-10			*Penicillium* sp
CTR 2-11			*Aspergillus* sp.
CTR 2-12			*Penicillium* sp.

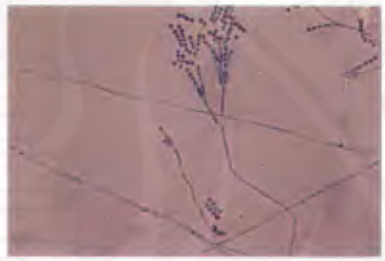
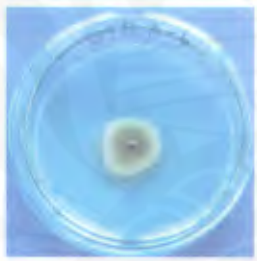
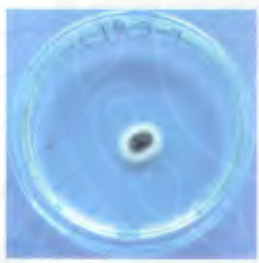
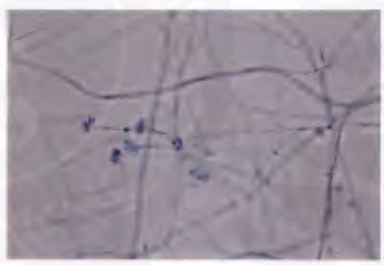
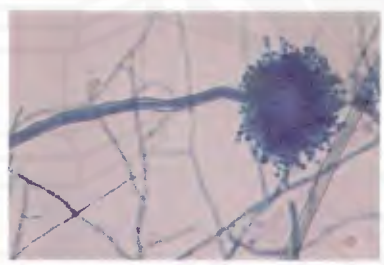
ตารางที่ ก.17 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำเลเขากอบ ในจังหวัดตรัง (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CTR 2-13			*Penicillium* sp.
CTR 2-14			*Trichoderma* sp.
CTR 2-15			*Trichoderma* sp.

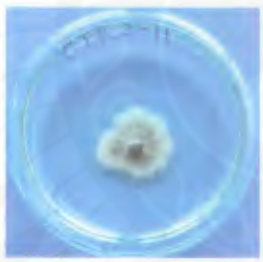
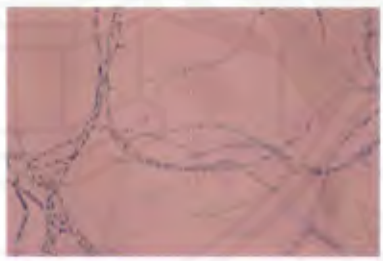
ตารางที่ ก.18 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำสำนักสงฆ์เขาหลักจันทร์ ในจังหวัดตรัง

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CTR 3-1			*Trichoderma* sp.
CTR 3-2			*Penicillium* sp.
CTR 3-3			*Aspergillus* sp.
CTR 3-4			*Curvularia* sp.

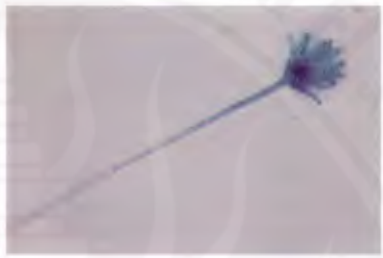
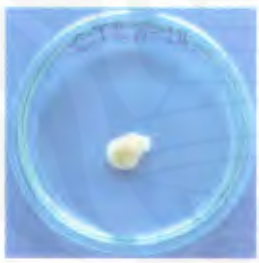
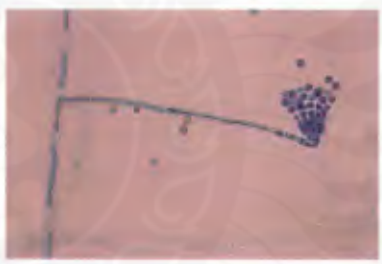
ตารางที่ ก.18 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำสำนักสงฆ์เขาหลักจันทร์ ในจังหวัดตรัง (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CTR 3-5			*Penicillium* sp.
CTR 3-6			*Trichoderma* sp.
CTR 3-7			*Penicillium* sp.
CTR 3-8			*Aspergillus* sp.

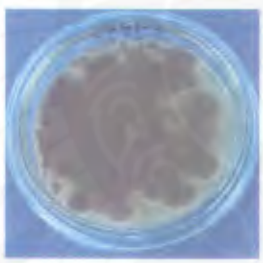
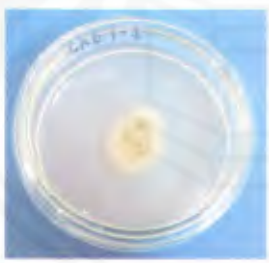
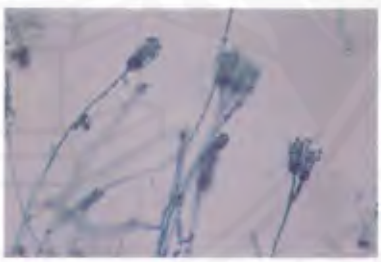
ตารางที่ ก.18 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำสำนักสงฆ์เขาหลักจันทร์ ในจังหวัดตรัง (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CTR 3-9			*Penicillium* sp.
CTR 3-10			*Penicillium* sp.
CTR 3-11			*Penicillium* sp.
CTR 3-12			Sterile hypha

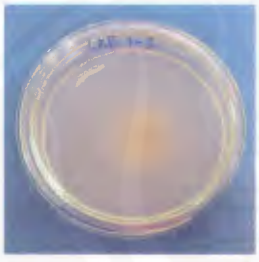
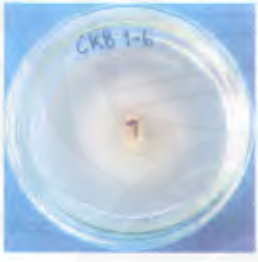
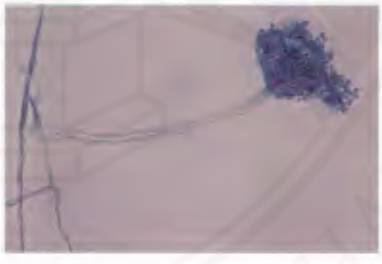
ตารางที่ ก.18 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำสำนักสงฆ์เขาหลักจันทร์ ในจังหวัดตรัง (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CTR 3-13			*Penicillium* sp.
CTR 3-14			Sterile hypha
CTR 3-15			*Penicillium* sp.

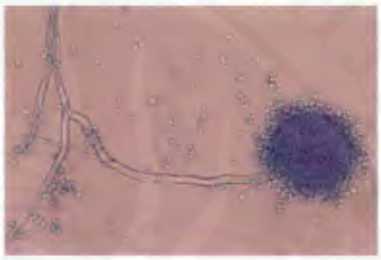
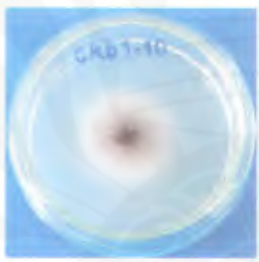
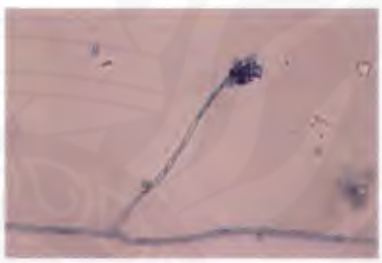
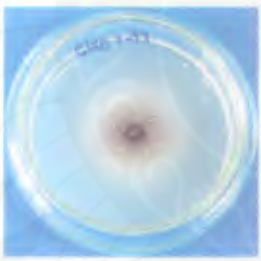
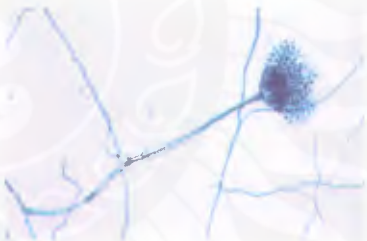
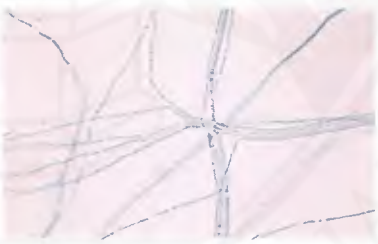
ตารางที่ ก.19 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำช้างสี ในจังหวัดกระบี่

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CKB 1-1			*Trichoderma* sp.
CKB 1-2			*Trichoderma* sp.
CKB 1-3			*Penicillium* sp.
CKB 1-4			*Penicillium* sp.

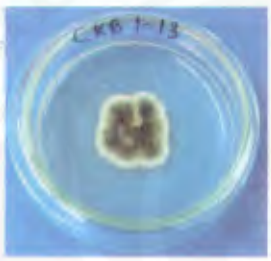
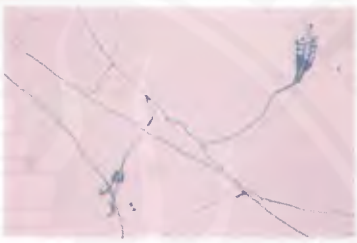
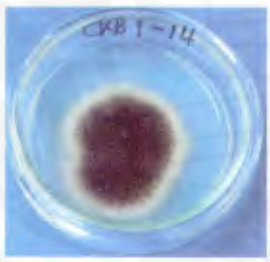
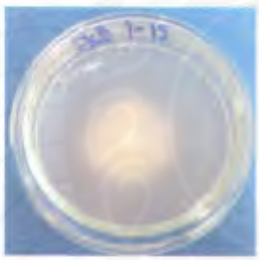
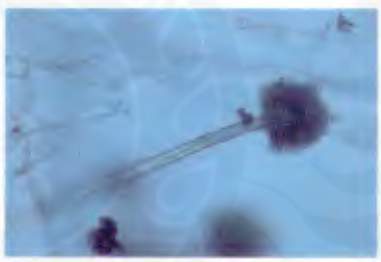
ตารางที่ ก.19 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำช้างสี ในจังหวัดกระบี่(ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CKB 1-5			*Penicillium* sp.
CKB 1-6			*Penicillium* sp.
CKB 1-7			*Penicillium* sp.
CKB 1-8			*Aspergillus sp.*

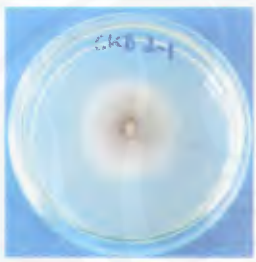
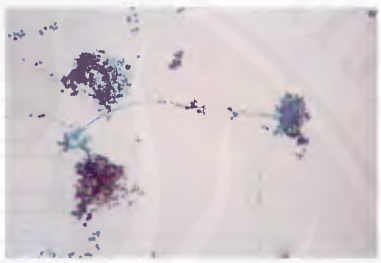
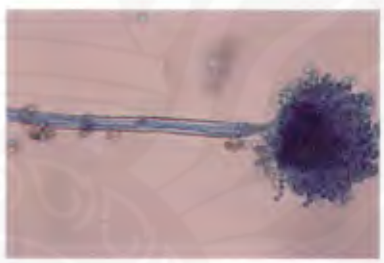
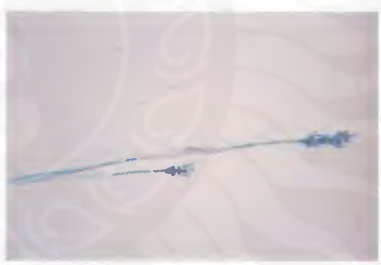
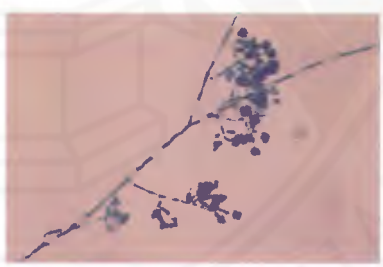
ตารางที่ ก.19 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำช้างสี ในจังหวัดกระบี่ (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CKB 1-9			*Aspergillus* sp.
CKB 1-10			*Aspergillus* sp.
CKB 1-11			*Aspergillus* sp.
CKB 1-12			Sterile hypha

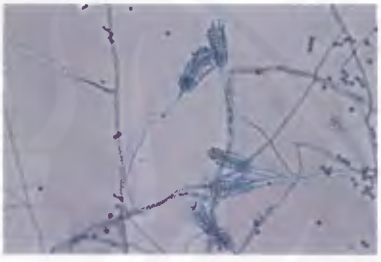
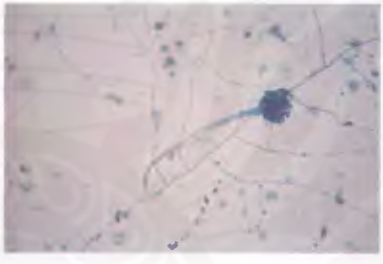
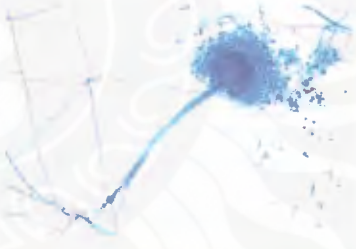
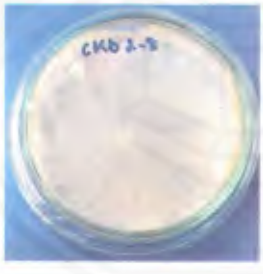
ตารางที่ ก.19 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำช้างสี ในจังหวัดกระบี่ (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CKB 1-13			*Penicillium* sp.
CKB 1-14			*Aspergillus* sp.
CKB 1-15			*Aspergillus* sp.

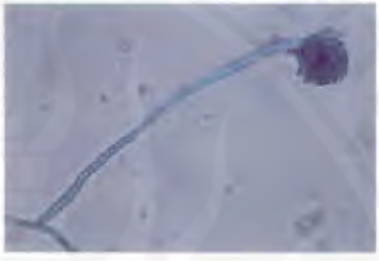
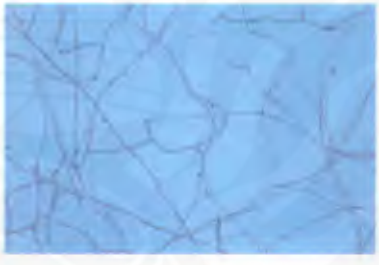
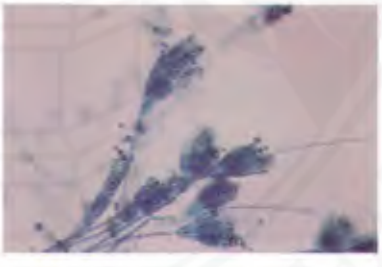
ตารางที่ ก.20 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำบางเหียน ในจังหวัดกระบี่

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CKB 2-1			*Aspergillus sp.*
CKB 2-2			*Aspergillus* sp.
CKB 2-3			*Penicillium* sp.
CKB 2-4			*Trichoderma* sp.

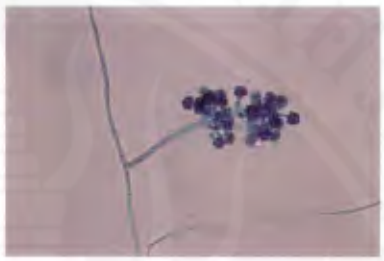
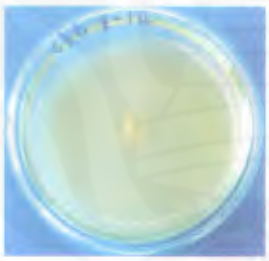
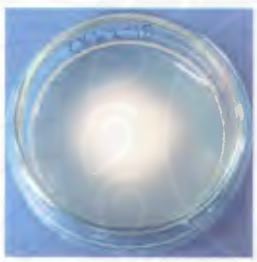
ตารางที่ ก.20 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำบางเหียน ในจังหวัดกระบี่ (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CKB 2-5			*Penicillium* sp.
CKB 2-6			*Aspergillus* sp.
CKB 2-7			*Aspergillus* sp.
CKB 2-8			*Aspergillus* sp.

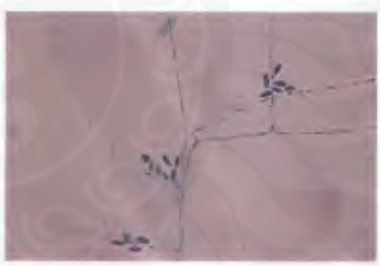
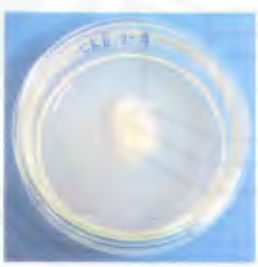
ตารางที่ ก.20 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำบางเหียน ในจังหวัดกระบี่ (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CKB 2-9			*Aspergillus* sp.
CKB 2-10			Sterile hypha
CKB 2-11			*Aspergillus* sp.
CKB 2-12			*Penicillium* sp.

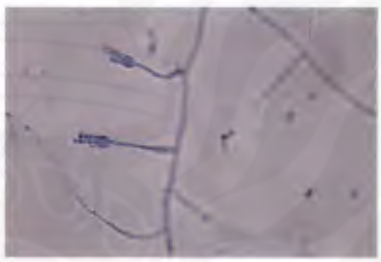
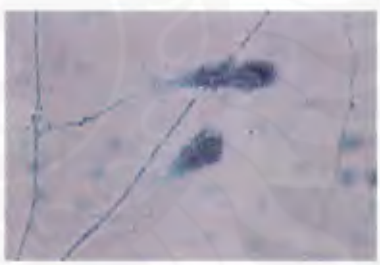
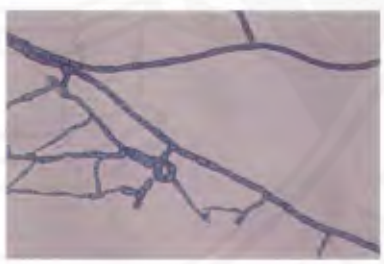
ตารางที่ ก.20 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำบางเหียน ในจังหวัดกระบี่ (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CKB 2-13			*Trichoderma* sp.
CKB 2-14			*Trichoderma* sp.
CKB 2-15			Sterile hypha

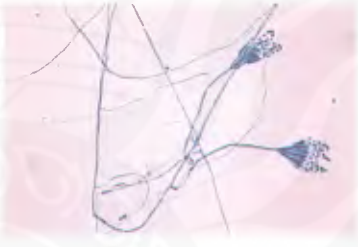
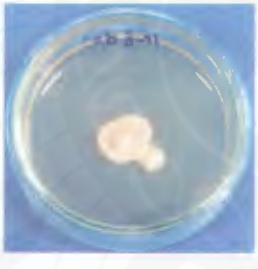
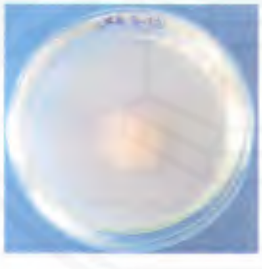
ตารางที่ ก.21 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำวารีริน ในจังหวัดกระบี่

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CKB 3-1			Sterile hypha
CKB 3-2			*Fusarium* sp.
CKB 3-3			*Fusarium* sp.
CKB 3-4			*Aspergillus* sp.

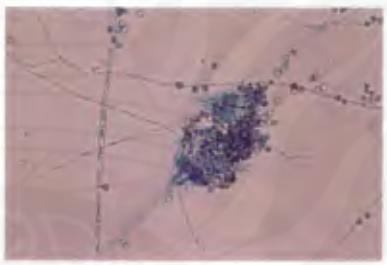
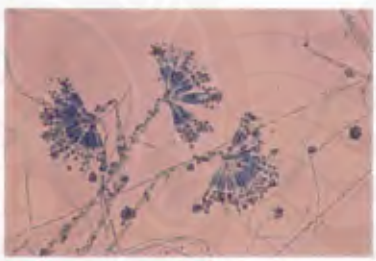
ตารางที่ ก.21 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำวารีริน ในจังหวัดกระบี่ (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CKB 3-5			*Curvularia* sp
CKB 3-6			*Penicillium* sp.
CKB 3-7			*Penicillium* sp.
CKB 3-8			Sterile hypha

ตารางที่ ก.21 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำวารีริน ในจังหวัดกระบี่ (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CKB 3-9			Sterile hypha
CKB 3-10			*Penicillium* sp.
CKB 3-11			*Penicillium* sp.
CKB 3-12			*Fusarium* sp.

ตารางที่ ก.21 การจำแนกเชื้อราที่แยกจากดินถ้ำวารีริน ในจังหวัดกระบี่ (ต่อ)

รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	กลุ่มของรา
CKB 3-13			*Aspergillus* sp.
CKB 3-14			*Penicillium* sp.
CKB 3-15			*Penicillium* sp.

ภาคผนวก ข

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ

ตารางที่ ข.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดชุมพร

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
1	CCP 1-1							
2	CCP 1-2							
3	CCP 1-3				10.4			
4	CCP 1-4	11						
5	CCP 1-5	13.1						
6	CCP 1-6							
7	CCP 1-7				13			
8	CCP 1-8							
9	CCP 1-9							
10	CCP 1-10	13			16			
11	CCP 1-11							
12	CCP 1-12							
13	CCP 1-13							
14	CCP 1-14				12.3			
15	CCP 1-15	17						
16	CCP 2-1							
17	CCP 2-2							
18	CCP 2-3							
19	CCP 2-4							
20	CCP 2-5	11			6.2			
21	CCP 2-6							
22	CCP 2-7							+
23	CCP 2-8							
24	CCP 2-9							
25	CCP 2-10							
26	CCP 2-11				10			+
27	CCP 2-12							
28	CCP 2-13							
29	CCP 2-14							
30	CCP 2-15				10.7			

ตารางที่ ข.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดชุมพร (ต่อ)

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
31	CCP 3-1							
32	CCP 3-2							
33	CCP 3-3							
34	CCP 3-4							
35	CCP 3-5				11.1			
36	CCP 3-6	12.4						
37	CCP 3-7							
38	CCP 3-8							
39	CCP 3-9							
40	CCP 3-10							
41	CCP 3-11							
42	CCP 3-12							
43	CCP 3-13	10		10				
44	CCP 3-14							
45	CCP 3-15							

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CCP 1 = ถ้ำเขาเกรียบ CCP 2 = ถ้ำเขาพลู

CCP 3 = ถ้ำเขานาง

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

\+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

ตารางที่ ข 2 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
1	CSR 1-1							
2	CSR 1-2							
3	CSR 1-3							
4	CSR 1-4							
5	CSR 1-5							
6	CSR 1-6							
7	CSR 1-7							
8	CSR 1-8							
9	CSR 1-9							
10	CSR 1-10							
11	CSR 1-11							
12	CSR 1-12							
13	CSR 1-13							
14	CSR 1-14	10.5						
15	CSR 1-15							
16	CSR 2-1							
17	CSR 2-2							
18	CSR 2-3							
19	CSR 2-4	11.3						
20	CSR 2-5						15.6	
21	CSR 2-6							
22	CSR 2-7							+
23	CSR 2-8							
24	CSR 2-9							
25	CSR 2-10							
26	CSR 2-11	8.7						
27	CSR 2-12							
28	CSR 2-13		15.4		16.7			
29	CSR 2-14	11.4			9.4			
30	CSR 2-15							

ตารางที่ ข.2 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ต่อ)

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
31	CSR 3-1							
32	CSR 3-2							
33	CSR 3-3			9.4				
34	CSR 3-4	15.3						
35	CSR 3-5							
36	CSR 3-6							
37	CSR 3-7							
38	CSR 3-8							
39	CSR 3-9							
40	CSR 3-10							
41	CSR 3-11	11.5	11.4					
42	CSR 3-12							
43	CSR 3-13							
44	CSR 3-14							
45	CSR 3-15							

SA = *S. aureus* ATCC25923
MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1
PA = *P. aeruginosa* ATCC27853
EC = *E. coli* ATCC25922
CA = *C. albicans* ATCC90028
CN = *C. neoformans* ATCC90012
MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย
CSR 1 = ถ้ำเขาโคก
CSR 2 = ถ้ำแกลบ
CSR 3 = ถ้ำขรมวนาราม
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ
+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

ตารางที่ ข.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดนครศรีธรรมราช

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
1	CNA 1-1				13.1			
2	CNA 1-2	10.5						+
3	CNA 1-3				11.3			
4	CNA 1-4	9.7			10.8			
5	CNA 1-5				10.5			
6	CNA 1-6				9.7			
7	CNA 1-7							
8	CNA 1-8				11.4			
9	CNA 1-9				13.8	11.7		
10	CNA 1-10							
11	CNA 1-11							
12	CNA 1-12							
13	CNA 1-13	11.1						
14	CNA 1-14							
15	CNA 1-15	12.5						
16	CNA 2-1							
17	CNA 2-2				10.4			
18	CNA 2-3							
19	CNA 2-4		12.3					
20	CNA 2-5				27.7			
21	CNA 2-6							
22	CNA 2-7							
23	CNA 2-8				10.8			
24	CNA 2-9							
25	CNA 2-10				10.8			
26	CNA 2-11							
27	CNA 2-12	12.1			10.3		16.2	
28	CNA 2-13							
29	CNA 2-14				10.3			
30	CNA 2-15				9.8	10.0		

ตารางที่ **ข.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค**ของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดนครศรีธรรมราช (ต่อ)

ลำดับที่	**ราดินถ้ำ**	**ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)**						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
31	CNA 3-1							
32	CNA 3-2							
33	CNA 3-3	11.0						
34	CNA 3-4							
35	CNA 3-5							
36	CNA 3-6							
37	CNA 3-7	8.0	13.3					
38	CNA 3-8				11.0			
39	CNA 3-9							
40	CNA 3-10				20.8			+
41	CNA 3-11							
42	CNA 3-12							+
43	CNA 3-13				11.0		18.4	
44	CNA 3-14							
45	CNA 3-15							

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CNA 1 = **ถ้ำเขาขุนพนม** CNA 2 = **ถ้ำเขาปูน**

CNA 3 = **ถ้ำแก้วสุรกานต์**

หมายเหตุ : **ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ**

\+ = **มีฤทธิ์ในการยับยั้ง**

ตารางที่ ข.4 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดพัทลุง

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
1	CPA 1-1							+
2	CPA 1-2							
3	CPA 1-3							
4	CPA 1-4							
5	CPA 1-5	15.5	11.8		13.6			+
6	CPA 1-6							
7	CPA 1-7							
8	CPA 1-8							
9	CPA 1-9	10.4	9.6			10.6	13.8	
10	CPA 1-10							
11	CPA 1-11							+
12	CPA 1-12							
13	CPA 1-13							
14	CPA 1-14							
15	CPA 1-15							
16	CPA 2-1							
17	CPA 2-2							
18	CPA 2-3							
19	CPA 2-4							
20	CPA 2-5							
21	CPA 2-6							
22	CPA 2-7							
23	CPA 2-8				12			+
24	CPA 2-9							
25	CPA 2-10	11.8	9.4	11	16.3			
26	CPA 2-11							
27	CPA 2-12							
28	CPA 2-13	9.7						
29	CPA 2-14							
30	CPA 2-15							

ตารางที่ ข.4 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดพัทลุง (ต่อ)

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
31	CPA 3-1							
32	CPA 3-2							
33	CPA 3-3		10.7					
34	CPA 3-4							
35	CPA 3-5	10.4						
36	CPA 3-6		12.9					
37	CPA 3-7							
38	CPA 3-8							
39	CPA 3-9	9.3						
40	CPA 3-10							
41	CPA 3-11	9.6						
42	CPA 3-12	12.1						
43	CPA 3-13							
44	CPA 3-14	10						
45	CPA 3-15		10.9	13.8				+

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CPA 1= ถ้ำสุมโน CPA 2 = ถ้ำคูหาสวรรค์

CPA 3 = ถ้ำเขาอ้อ

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

ตารางที่ ข.5 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดสงขลา

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
1	CSK 1-1	12.7						
2	CSK 1-2	10.8	11.4					
3	CSK 1-3							
4	CSK 1-4							
5	CSK 1-5	9.4						
6	CSK 1-6							
7	CSK 1-7	9.7	11.6					+
8	CSK 1-8	11.8						
9	CSK 1-9							
10	CSK 1-10							
11	CSK 1-11							
12	CSK 1-12							+
13	CSK 1-13							
14	CSK 1-14	10.8						
15	CSK 1-15							
16	CSK 2-1							
17	CSK 2-2							
18	CSK 2-3							
19	CSK 2-4							
20	CSK 2-5	12.5						
21	CSK 2-6							
22	CSK 2-7			12.4				
23	CSK 2-8			10				
24	CSK 2-9							
25	CSK 2-10							
26	CSK 2-11							
27	CSK 2-12							
28	CSK 2-13			10.6				
29	CSK 2-14							
30	CSK 2-15							+

ตารางที่ ข.5 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดสงขลา (ต่อ)

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
31	CSK 3-1							
32	CSK 3-2					27.9		+
33	CSK 3-3							
34	CSK 3-4							
35	CSK 3-5							
36	CSK 3-6	11.7						
37	CSK 3-7							
38	CSK 3-8	10.3						
39	CSK 3-9							
40	CSK 3-10							
41	CSK 3-11							
42	CSK 3-12							
43	CSK 3-13	12.3						+
44	CSK 3-14							
45	CSK 3-15		10.8					

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CSK 1 = ถ้ำศรีเกษร CSK 2 = ถ้ำเขาพระ

CSK 3 = ถ้ำเขานุ้ย

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

\+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

ตารางที่ ข.6 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดตรัง

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
1	CTR 1-1	9.3						
2	CTR 1-2							
3	CTR 1-3	9.0						
4	CTR 1-4							
5	CTR 1-5							
6	CTR 1-6							
7	CTR 1-7							
8	CTR 1-8							
9	CTR 1-9							
10	CTR 1-10							
11	CTR 1-11							
12	CTR 1-12				11.7		11.1	
13	CTR 1-13							
14	CTR 1-14							
15	CTR 1-15	11.6	15.0	10.2				
16	CTR 2-1				12.8			+
17	CTR 2-2							
18	CTR 2-3							
19	CTR 2-4							
20	CTR 2-5					10.7		+
21	CTR 2-6	16.6	14.5				9.2	
22	CTR 2-7							
23	CTR 2-8							
24	CTR 2-9							
25	CTR 2-10							+
26	CTR 2-11	12.1						
27	CTR 2-12							
28	CTR 2-13							
29	CTR 2-14							
30	CTR 2-15							+

ตารางที่ ข.6 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดตรัง (ต่อ)

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
31	CTR 3-1							
32	CTR 3-2							+
33	CTR 3-3	8.8						
34	CTR 3-4							
35	CTR 3-5	9.9						
36	CTR 3-6	10.5						
37	CTR 3-7							
38	CTR 3-8							
39	CTR 3-9							
40	CTR 3-10					11.0	7.5	
41	CTR 3-11	14.1						+
42	CTR 3-12							
43	CTR 3-13							
44	CTR 3-14							
45	CTR 3-15							

SA = *S. aureus* ATCC25923
MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1
PA = *P. aeruginosa* ATCC27853
EC = *E. coli* ATCC25922
CA = *C. albicans* ATCC90028
CN = *C. neoformans* ATCC90012
MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย
CTR 1 = ถ้ำผึ้ง
CTR 2 = ถ้ำเลเขากอบ
CTR 3 = ถ้ำสำนักสงฆ์เขาหลักจันทร์
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ
+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

ตารางที่ ข.7 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดกระบี่

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
1	CKB 1-1							
2	CKB 1-2	14						
3	CKB 1-3	9.3						
4	CKB 1-4							
5	CKB 1-5							
6	CKB 1-6							
7	CKB 1-7	12.6						
8	CKB 1-8	11.7						
9	CKB 1-9	8.8	9	7.4				
10	CKB 1-10							
11	CKB 1-11							
12	CKB 1-12							
13	CKB 1-13							
14	CKB 1-14	14.2						+
15	CKB 1-15							
16	CKB 2-1							
17	CKB 2-2							
18	CKB 2-3							
19	CKB 2-4	10	13.3	12	11.8			
20	CKB 2-5							
21	CKB 2-6							
22	CKB 2-7							
23	CKB 2-8	10.7		11	9.6			
24	CKB 2-9							+
25	CKB 2-10							
26	CKB 2-11							
27	CKB 2-12							
28	CKB 2-13				10.9			
29	CKB 2-14							
30	CKB 2-15							

ตารางที่ ข.7 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงราดินถ้ำ ที่แยกได้จากถ้ำในจังหวัดกระบี่ (ต่อ)

ลำดับที่	ราดินถ้ำ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ย (มิลลิเมตร)						
		SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
31	CKB 3-1					21	31	
32	CKB 3-2							
33	CKB 3-3							
34	CKB 3-4							
35	CKB 3-5							
36	CKB 3-6							
37	CKB 3-7							
38	CKB 3-8							
39	CKB 3-9							
40	CKB 3-10							
41	CKB 3-11						9.9	
42	CKB 3-12							
43	CKB 3-13							
44	CKB 3-14							
45	CKB 3-15							

SA = *S. aureus* ATCC25923
MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1
PA = *P. aeruginosa* ATCC27853
EC = *E. coli* ATCC25922
CA = *C. albicans* ATCC90028
CN = *C. neoformans* ATCC90012
MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย
CKB 1 = ถ้ำผึ้ง
CKB 2 = ถ้ำเลเขากอบ
CKB 3 = ถ้ำสำนักสงฆ์เขาหลักจันทร์
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ
+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

ภาคผนวก ค

น้ำหนักและลักษณะของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราดินถ้ำ

ตารางที่ ค.1 น้ำหนักสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราดินถ่ำ

ลำดับที่	รหัสสารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
		BE	CH	CE
1	CCP 1-3	3.1	5.6	26.8
2	CCP 1-4	11.7	8.2	16.5
3	CCP 1-5	12.5	17.6	20.9
4	CCP 1-7	10.2	19.5	19.9
5	CCP 1-10	4.6	15.9	37.8
6	CCP 1-14	4.8	15.4	54.2
7	CCP 1-15	5.5	13.6	15.4
8	CCP 2-5	10.6	16.3	44
9	CCP 2-7	10.5	67.9	15.9
10	CCP 2-11	1.1	7.4	3.3
11	CCP 2-15	20.4	13	73.8
12	CCP 3-5	3.3	10.2	23.1
13	CCP 3-6	9	9.5	11.1
14	CCP 3-13	7.3	5.5	17.1
15	CSR 1-14	58.4	15.8	16.2
16	CSR 2-4	5.6	3.4	9
17	CSR 2-5	21.8	6.2	10.7
18	CSR 2-7	14.2	19.3	8.4
19	CSR 2-11	2.7	14.1	4.9
20	CSR 2-13	54.2	20.3	8.4
21	CSR 2-14	83.4	15.2	15.2
22	CSR 3-3	5.6	8.4	3.2
23	CSR 3-4	4.8	16.2	3.4
24	CSR 3-11	15.6	9.5	3.5
25	CAN 1-1	6.6	3.5	17.3
26	CNA 1-2	51.6	28.3	50.7
27	CNA 1-3	9.5	27.9	15.3
28	CNA 1-4	12.5	6.6	20.6
29	CNA 1-5	1.6	20.9	3.5
30	CNA 1-6	1.6	13.9	1.9

ตารางที่ ค.1 น้ำหนักสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราดินถ่า (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสสารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
		BE	CH	CE
31	CNA 1-8	2.8	8.4	14.3
32	CNA 1-9	18.7	17	11.8
33	CNA 1-13	9.6	22.2	19.7
34	CNA 1-15	15.3	4.7	19.1
35	CNA 2-2	4.7	12.8	23.7
36	CNA 2-4	5.7	6.3	11.7
37	CNA 2-5	7.3	23.3	27.4
38	CNA 2-8	5.7	8.5	40.7
39	CNA 2-10	5.4	15.3	20.6
40	CNA 2-12	2.7	6.2	38.6
41	CNA 2-14	2.7	5.8	44.8
42	CNA 2-15	53.6	3.1	22.1
43	CNA 3-3	22.9	16.4	16.3
44	CNA 3-7	128.9	28.2	5.7
45	CNA 3-8	4.2	8.8	13.2
46	CNA 3-10	3.5	46.4	45.3
47	CNA 3-12	3.3	18.4	20.2
48	CNA 3-13	12.2	18.9	14.7
49	CKB 1-2	10.2	12.2	25.4
50	CKB 1-3	2.1	4.1	13.4
51	CKB 1-7	10.5	23.6	16.1
52	CKB 1-8	25.4	12.5	19.2
53	CKB 1-9	7.8	6.2	37.8
54	CKB 1-14	7.8	16.8	20.6
55	CKB 2-4	11.8	6.9	24.3
56	CKB 2-8	6.6	7.4	13.9
57	CKB 2-9	24.9	4.7	19.9
58	CKB 2-13	10.5	7.7	37.8
59	CKB 3-1	39.6	9.1	5.4
60	CKB 3-11	4.4	12.7	12.4

ตารางที่ ค.1 น้ำหนักสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราดินถ่า (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสสารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
		BE	CH	CE
61	CTR 1-1	77.4	13.6	64.2
62	CTR 1-3	74.6	9	61.7
63	CTR 1-12	45.9	17.2	19
64	CTR 1-15	11.2	7.7	47.3
65	CTR 2-1	7.8	14.9	39.6
66	CTR 2-5	47.2	28.7	52.1
67	CTR 2-6	9.4	12.3	11.6
68	CTR 2-10	15.7	4.6	9.4
69	CTR 2-11	26.9	13.5	21.7
70	CTR 2-15	12.1	7.1	26.1
71	CTR 3-2	38.4	6.2	66.7
72	CTR 3-3	13.4	9.8	28.6
73	CTR 3-5	24.4	11.5	53.7
74	CTR 3-6	46.4	14.1	13.7
75	CTR 3-10	27.5	27	11.3
76	CTR 3-11	12	7.9	35.5
77	CPA 1-1	5.9	14.6	28.1
78	CPA 1-5	3.2	12.8	17.5
79	CPA 1-9	17.8	12.4	17.8
80	CPA 1-11	4.9	21.5	8.3
81	CPA 2-8	58.3	14.4	50.6
82	CPA 2-10	63.4	5.5	26.3
83	CPA 2-13	4.4	14.9	26.5
84	CPA 3-3	12.2	9.6	9.7
85	CPA 3-5	46.7	6.4	27.6
86	CPA 3-6	71.4	14	2.5
87	CPA 3-9	4	2.4	13.5
88	CPA 3-11	18.9	12	28.1
89	CPA 3-12	33.2	8.8	3.3
90	CPA 3-14	1.4	4.2	5.4

ตารางที่ ค.1 น้ำหนักสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราดินถ้ำ (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสสารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
		BE	CH	CE
91	CPA 3-15	14.8	7.1	27.9
92	CSK 1-1	1.9	30.5	58.9
93	CSK 1-2	34.5	7.4	4.5
94	CSK 1-5	22.6	4.4	38.7
95	CSK 1-7	42.3	4	11.2
96	CSK 1-8	5.7	3.9	1.7
97	CSK 1-12	12	6.1	20.2
98	CSK 1-14	7.3	3.4	9.7
99	CSK 2-5	49.4	10	1.1
100	CSK 2-7	19.4	5.4	12.1
101	CSK 2-8	37.6	12.3	17.4
102	CSK 2-13	41.3	7.1	15.5
103	CSK 2-15	1.9	18.1	15.6
104	CSK 3-2	46.3	5.3	4.1
105	CSK 3-6	38.9	5.3	11.1
106	CSK 3-8	41.9	6.5	4.8
107	CSK 3-13	17.6	2.6	23.3
108	CSK 3-15	10.2	5.8	5.1

หมายเหตุ CCP = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดชุมพร CSR = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี
CNA = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดนครศรีธรรมราช CKB = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดกระบี่
CTR = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดตรัง CPA = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดพัทลุง
CSK = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดสงขลา
BE = สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราด้วย ethyl acetate
CH = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย hexane
CE = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย ethyl acetate

ตารางที่ ค.2 ลักษณะของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อราดินถ่า

ลำดับที่	รหัสสารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
		BE	CH	CE
1	CCP 1-3	น้ำตาลอมเหลืองเหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
2	CCP 1-4	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลือง เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
3	CCP 1-5	น้ำตาลแดงอมเหลืองเหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลือง เหนียว
4	CCP 1-7	น้ำตาลแดง	ส้ม เหนียว	น้ำตาลเข้ม เหนียว
5	CCP 1-10	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
6	CCP 1-14	น้ำตาล เหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
7	CCP 1-15	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลือง เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
8	CCP 2-5	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลแดง เหนียว
9	CCP 2-7	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
10	CCP 2-11	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
11	CCP 2-15	น้ำตาลแดง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลเข้ม เหนียว
12	CCP 3-5	เหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
13	CCP 3-6	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลือง เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
14	CCP 3-13	ครีม ผง	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
15	CSR 1-14	น้ำตาลแดงอมเหลืองเหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
16	CSR 2-4	เหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
17	CSR 2-5	น้ำตาล ผง	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	น้ำตาลแดง เหนียว
18	CSR 2-7	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
19	CSR 2-11	น้ำตาล เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
20	CSR 2-13	น้ำตาล ผง	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
21	CSR 2-14	น้ำตาล ผง	เหลือง เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
22	CSR 3-3	เหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
23	CSR 3-4	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
24	CSR 3-11	เหลืองเข้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
25	CNA 1-1	ครีม ผง	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน เหนียว
26	CNA 1-2	น้ำตาลเข้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลเข้มอมเหลืองเหนียว
27	CNA 1-3	น้ำตาลเข้ม เหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว	น้ำตาล ผง
28	CNA 1-4	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
29	CNA 1-5	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลืองเข้ม	ใส ไม่มีสี
30	CNA 1-6	น้ำตาลอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	ใส ไม่มีสี

ตารางที่ ค.2 ลักษณะของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อราดินถ้ำ (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสสารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
		BE	CH	CE
31	CNA 1-8	น้ำตาลแดง เหนียว	น้ำตาลแดง เหนียว	น้ำตาลแดง เหนียว
32	CNA 1-9	น้ำตาลเข้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
33	CNA 1-13	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
34	CNA 1-15	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน	ดำเข้ม เหนียว
35	CNA 2-2	น้ำตาลแดง เหนียว	น้ำตาล เหนียว	น้ำตาลเข้ม เหนียว
36	CNA 2-4	ดำ เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลแดง เหนียว
37	CNA 2-5	น้ำตาล	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
38	CNA 2-8	น้ำตาล	น้ำตาล เหนียว	น้ำตาล เหนียว
39	CNA 2-10	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	น้ำตาล เหนียว
40	CNA 2-12	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
41	CNA 2-14	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลือง เหนียว
42	CNA 2-15	เหลืองอ่อนเหนียว	ใส ไม่มีสี	เหลืองอ่อน เหนียว
43	CNA 3-3	น้ำตาลแดงอมเหลืองเหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
44	CNA 3-7	น้ำตาล ผง	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
45	CNA 3-8	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
46	CNA 3-10	น้ำตาลเข้ม เหนียว	เหลือง เหนียว	น้ำตาลแดงเข้ม เหนียว
47	CNA 3-12	น้ำตาลแดงเข้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลแดง เหนียว
48	CNA 3-13	ดำ เหนียว	เหลือง เหนียว	น้ำตาลเข้ม เหนียว
49	CKB 1-2	น้ำตาลแดงเหนียว	เหลือง เหนียว	น้ำตาล ผง
50	CKB 1-3	น้ำตาลอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลเข้ม เหนียว
51	CKB 1-7	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
52	CKB 1-8	น้ำตาลเข้ม เหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว	น้ำตาลเข้ม เหนียว
53	CKB 1-9	เหลืองเข้ม เหนียว	เหลือง เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
54	CKB 1-14	น้ำตาลแดง เหนียว	เหลือง เหนียว	น้ำตาล
55	CKB 2-4	น้ำตาลอ่อน	ขาวขุ่น	น้ำตาลอ่อน
56	CKB 2-8	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน	ขาวขุ่น
57	CKB 2-9	น้ำตาลอ่อน ผง	น้ำตาล เหนียว	น้ำตาลแดง เหนียว
58	CKB 2-13	เขียวอมเหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน ผง	เขียวเข้ม เหนียว
59	CKB 3-1	เหลืองเข้ม เหนียว	เหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
60	CKB 3-11	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว

ตารางที่ ค.2 ลักษณะของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อราดินถั่ว (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสสารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
		BE	CH	CE
61	CTR 1-1	น้ำตาลเข้มเหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลเข้ม
62	CTR 1-3	น้ำตาลเข้มอมเหลือง	เหลือง เหนียว	น้ำตาลเข้ม เหนียว
63	CTR 1-12	น้ำตาลแดงอมเหลืองเหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลแดง เหนียว
64	CTR 1-15	น้ำตาลแดง เหนียว	น้ำตาลแดงเข้ม เหนียว	ดำ เหนียว
65	CTR 2-1	น้ำตาลแดง	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน เหนียว
66	CTR 2-5	น้ำตาลเข้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
67	CTR 2-6	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
68	CTR 2-10	เขียวอมเหลือง เหนียว	เหลือง เหนียว	เขียวอมเหลือง เหนียว
69	CTR 2-11	น้ำตาลแดงอมเหลืองเหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เขียวอมเหลือง เหนียว
70	CTR 2-15	น้ำตาลเข้มอมเหลืองเหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
71	CTR 3-2	น้ำตาล เหนียว	ส้ม เหนียว	น้ำตาลแดง เหนียว
72	CTR 3-3	เหลืองเข้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว
73	CTR 3-5	เหลืองเข้ม เหนียว	เหลือง เหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว
74	CTR 3-6	เหลืองอ่อน ผง	เหลือง เหนียว	เหลือง เหนียว
75	CTR 3-10	น้ำตาลเข้มอมเหลืองเหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
76	CTR 3-11	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
77	CPA 1-1	น้ำตาลอมเหลืองเหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
78	CPA 1-5	เหลือง เหนียว	เหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
79	CPA 1-9	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
80	CPA 1-11	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
81	CPA 2-8	น้ำตาลเข้ม เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	น้ำตาลเข้ม เหนียว
82	CPA 2-10	ครีม เหนียว	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น
83	CPA 2-13	น้ำตาลเข้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว
84	CPA 3-3	น้ำตาล ผง	ใส ไม่มีสี	เหลืองอ่อน เหนียว
85	CPA 3-5	น้ำตาล ผง	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาล เหนียว
86	CPA 3-6	ครีม เหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว	ครีม เหนียว
87	CPA 3-9	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เขียวอ่อน เหนียว	น้ำตาลเข้ม เหนียว
88	CPA 3-11	เหลืองเข้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว
89	CPA 3-12	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
90	CPA 3-14	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว

ตารางที่ ค.2 ลักษณะของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อราดินถ่า (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสสารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
		BE	CH	CE
91	CPA 3-15	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาล
92	CSK 1-1	เหลืองอ่อนเหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
93	CSK 1-2	น้ำตาลเข้ม เหนียว	ส้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
94	CSK 1-5	น้ำตาล ผง	น้ำตาล ผง	น้ำตาลเข้ม ผง
95	CSK 1-7	น้ำตาล ผง	ใส ไม่มีสี	น้ำตาลเข้ม
96	CSK 1-8	เหลืองเข้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
97	CSK 1-12	ดำเข้ม เหนียว	ส้ม เหนียว	น้ำตาล
98	CSK 1-14	เหลืองเข้ม เหนียว	เหลือง เหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว
99	CSK 2-5	น้ำตาลเข้ม เหนียว	ชมพู เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
100	CSK 2-7	น้ำตาลเข้ม เหนียว	ชมพู เหนียว	น้ำตาล
101	CSK 2-8	น้ำตาลเข้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลเข้ม
102	CSK 2-13	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน
103	CSK 2-15	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองเข้ม เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว
104	CSK 3-2	เหลืองอ่อน เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	ใส ไม่มีสี
105	CSK 3-6	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลแดงอมเหลืองเหนียว
106	CSK 3-8	น้ำตาลอ่อน ผง	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาล
107	CSK 3-13	น้ำตาลอมเหลือง เหนียว	เหลืองอ่อน เหนียว	น้ำตาลแดงอมเหลืองเหนียว
108	CSK 3-15	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาล เหนียว

หมายเหตุ CCP = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดชุมพร CSR = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี
CNA = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดนครศรีธรรมราช CKB = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดกระบี่
CTR = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดตรัง CPA = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดพัทลุง
CSK = เชื้อราถ้ำจากจังหวัดสงขลา
BE = สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราด้วย ethyl acetate
CH = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย hexane
CE = สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย ethyl acetate

ภาคผนวก ง

ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบรากดินถ่อน

ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ตารางที่ ง.1 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดชุมพร ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CCP 1-3 BE							+
2	CH							
3	CE							
4	CCP 1-4 BE			+				
5	CH							
6	CE		+					
7	CCP 1-5 BE	+						
8	CH	+						
9	CE							
10	CCP 1-7 BE					+	+	
11	CH						+	
12	CE					+		+
13	CCP 1-10 BE					+		+
14	CH							
15	CE						+	
16	CCP 1-14 BE	+	+	+	+	+		
17	CH							
18	CE							
19	CCP 1-15 BE	+						
20	CH						+	
21	CE						+	
22	CCP 2-5 BE	+				+	+	
23	CH							
24	CE							+
25	CCP 2-7 BE					+	+	+
26	CH							
27	CE							
28	CCP 2-11 BE							
29	CH							
30	CE							

ตารางที่ ง.1 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดชุมพร ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
31	CCP 2-15 BE							
32	CH							
33	CE	+						
34	CCP 3-5 BE							
35	CH							
36	CE							
37	CCP 3-6 BE	+					+	+
38	CH							
39	CE							
40	CCP 3-13 BE							
41	CH							
42	CE							

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CCP 1 = ถ้ำเขาเกรียบ CCP 2 = ถ้ำเขาพลู

CCP 3 = ถ้ำเขานาง

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL

ตารางที่ ง.2 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CSR 1-14 BE							
2	CH							
3	CE							
4	CSR 2-4 BE	+						
5	CH							
6	CE	+						
7	CSR 2-5 BE							
8	CH							
9	CE							
10	CSR 2-7 BE	+	+	+				
11	CH							
12	CE			+				
13	CSR 2-11 BE	+						
14	CH							
15	CE	+						
16	CSR 2-13 BE							
17	CH							
18	CE							
19	CSR 2-14 BE							
20	CH							
21	CE							
22	CSR 3-3 BE							
23	CH							
24	CE						+	
25	CSR 3-4 BE	+					+	
26	CH							
27	CE	+						

ตารางที่ ง.2 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
28	CSR 3-11 BE	+			+		+	
29	CH							
30	CE							

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CSR 1 = ถ้ำเขาโคก CSR 2 = ถ้ำแกลบ

CSR 3 = ถ้ำขรมวนาราม

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL

ตารางที่ ง.3 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CNA 1-1 BE					+		
2	CH							
3	CE							
4	CNA 1-2 BE	+	+	+	+	+		
5	CH		+					
6	CE	+	+		+			
7	CAN 1-3 BE	+						
8	CH							
9	CE							
10	CNA 1-4 BE						+	
11	CH							
12	CE							
13	CNA 1-5 BE							
14	CH							
15	CE							
16	CNA 1-6 BE							
17	CH							
18	CE							
19	CNA 1-8 BE							
20	CH						+	
21	CE							
22	CNA 1-9 BE							
23	CH	+						
24	CE							
25	CNA 1-13 BE	+				+		
26	CH							
27	CE							
28	CNA 1-15 BE			+		+		
29	CH							
30	CE							

ตารางที่ ง.3 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
31	CNA 2-2 BE							
32	CH							
33	CE							
34	CNA 2-4 BE							
35	CH						+	
36	CE							
37	CNA 2-5 BE							
38	CH							
39	CE							
40	CNA 2-8 BE							
41	CH					+		
42	CE	+						
43	CNA 2-10 BE							
44	CH							
45	CE	+	+					
46	CNA 2-12 BE					+		
47	CH							
48	CE							
49	CNA 2-14 BE						+	
50	CH							
51	CE	+						
52	CNA 2-15 BE							
53	CH							
54	CE							
55	CNA 3-3 BE							
56	CH	+						
57	CE					+		
58	CNA 3-7 BE					+		
59	CH							
60	CE						+	

ตารางที่ ง.3 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
61	CNA 3-8 BE						+	
62	CH							
63	CE							
64	CNA 3-10 BE							
65	CH						+	
66	CE		+					
67	CNA 3-12 BE	+						
68	CH							
69	CE							
70	CNA 3-13 BE							
71	CH							
72	CE							

SA = *S. aureus* ATCC25923
MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1
PA = *P. aeruginosa* ATCC27853
EC = *E. coli* ATCC25922
CA = *C. albicans* ATCC90028
CN = *C. neoformans* ATCC90012
MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย
CNA 1 = ถ้ำเขาขุนพนม
CNA 2 = ถ้ำเขาปูน
CNA 3 = ถ้ำแก้วสุรกานต์
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ
+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL

ตารางที่ ง.4 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดพัทลุง ที่ระดับ ความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CPA 1-1 BE							
2	CH							
3	CE					+		
4	CPA 1-5 BE					+		
5	CH					+		
6	CE					+		
7	CPA 1-9 BE	+						
8	CH						+	
9	CE	+						
10	CPA 1-11 BE							
11	CH							
12	CE							
13	CPA 2-8 BE	+				+		
14	CH				+	+		
15	CE				+			
16	CPA 2-10 BE							+
17	CH							
18	CE							
19	CPA 2-13 BE							
20	CH							
21	CE							
22	CPA 3-3 BE							
23	CH							
24	CE							
25	CPA 3-5 BE							+
26	CH							
27	CE							
28	CPA 3-6 BE	+	+	+				
29	CH							
30	CE							

ตารางที่ ง.4 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดพัทลุง ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
31	CPA 3-9 BE				+		+	
32	CH							
33	CE	+			+		+	
34	CPA 3-11 BE	+			+		+	
35	CH							
36	CE	+	+		+			
37	CPA 3-12 BE							
38	CH							
39	CE	+						
40	CPA 3-14 BE							
41	CH							
42	CE							
43	CPA 3-15 BE		+	+				
44	CH							
45	CE							

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CPA 1= ถ้ำสุมโน CPA 2 = ถ้ำคูหาสวรรค์

CPA 3 = ถ้ำเขาอ้อ

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

\+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL

ตารางที่ ง.5 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดสงขลา ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CSK 1-1 BE							
2	CH							
3	CE							
4	CSK 1-2 BE							+
5	CH							
6	CE							
7	CSK 1-5 BE							
8	CH							
9	CE							
10	CSK 1-7 BE							
11	CH							
12	CE							
13	CSK 1-8 BE					+		
14	CH					+		
15	CE					+		
16	CSK 1-12 BE							
17	CH							
18	CE	+						
19	CSK 1-14 BE	+						
20	CH							
21	CE							
22	CSK 2-5 BE						+	
23	CH						+	
24	CE						+	
25	CSK 2-7 BE		+				+	
26	CH							
27	CE							+
28	CSK 2-8 BE		+	+				
29	CH							
30	CE							

ตารางที่ ง.5 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดสงขลา ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
31	CSK 2-13 BE	+	+	+				
32	CH							
33	CE							
34	CSK 2-15 BE							
35	CH							
36	CE							
37	CSK 3-2 BE					+		
38	CH							
39	CE					+		
40	CSK 3-6 BE				+			
41	CH							
42	CE						+	
43	CSK 3-8 BE							
44	CH	+						
45	CE							
46	CSK 3-13 BE							
47	CH							
48	CE							
49	CSK 3-15 BE							
50	CH							
51	CE	+						

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CSK 1 = ถ้ำศรีเกษร CSK 2 = ถ้ำเขาพระ

CSK 3 = ถ้ำเขานุ้ย

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL

ตารางที่ ง.6 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดตรัง ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CTR 1-1 BE			+		+		+
2	CH						+	
3	CE					+	+	
4	CTR 1-3 BE	+		+			+	
5	CH							
6	CE					+		
7	CTR 1-12 BE							
8	CH							
9	CE							
10	CTR 1-15 BE							
11	CH							
12	CE	+	+					+
13	CTR 2-1 BE	+						+
14	CH							
15	CE			+	+			
16	CTR 2-5 BE	+	+	+	+	+	+	
17	CH							
18	CE	+	+					
19	CTR 2-6 BE	+	+					
20	CH	+					+	
21	CE	+	+					
22	CTR 2-10 BE		+		+		+	
23	CH							
24	CE						+	
25	CTR 2-11 BE							+
26	CH							
27	CE							
28	CTR 2-15 BE							
29	CH							
30	CE							

ตารางที่ ง.6 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดตรัง ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
31	CTR 3-2 BE							
32	CH	+	+					
33	CE							
34	CTR 3-3 BE	+						
35	CH							
36	CE	+						
37	CTR 3-5 BE							
38	CH					+		
39	CE	+						+
40	CTR 3-6 BE					+		+
41	CH							
42	CE							
43	CTR 3-10 BE							
44	CH	+					+	
45	CE						+	
46	CTR 3-11 BE							
47	CH							
48	CE							

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CTR 1 = ถ้ำผึ้ง CTR 2 = ถ้ำเลเขากอบ

CTR 3 = ถ้ำสำนักสงฆ์เขาหลักจันทร์

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

\+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL

ตารางที่ ง.7 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำทีแยกได้จากจังหวัดกระบี ทีระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CKB 1-2 BE	+					+	
2	CH						+	
3	CE							
4	CKB 1-3 BE	+						
5	CH							
6	CE							
7	CKB 1-7 BE		+					
8	CH		+		+			
9	CE	+						
10	CKB 1-8 BE							
11	CH							
12	CE	+				+		
13	CKB 1-9 BE							
14	CH							
15	CE					+		
16	CKB 1-14 BE							
17	CH							
18	CE							
19	CKB 2-4 BE		+					
20	CH							
21	CE							
22	CKB 2-8 BE							
23	CH							
24	CE							
25	CKB 2-9 BE							
26	CH							
27	CE	+						+
28	CKB 2-13 BE							+
29	CH							
30	CE				+	+		

ตารางที่ ง.7 ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดกระบี่ ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
31	CKB 3-1 BE					+	+	
32	CH							
33	CE							
34	CKB 3-11 BE							
35	CH							
36	CE							

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CKB 1 = ถ้ำผึ้ง CKB 2 = ถ้ำเลเขากอบ

CKB 3 = ถ้ำสำนักสงฆ์เขาหลักจันทร์

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

\+ = มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL

ภาคผนวก จ

ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำ

ตารางที่ **จ.1** ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดชุมพร

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CCP 1-3 BE							200
2	CH							
3	CE							
4	CCP 1-4 BE			200				
5	CH							
6	CE		200					
7	CCP 1-5 BE	200						
8	CH	200						
9	CE							
10	CCP 1-7 BE					200	200	
11	CH						200	
12	CE					200		200
13	CCP 1-10 BE					200		200
14	CH							
15	CE						200	
16	CCP 1-14 BE	200	200	200	200	200		
17	CH							
18	CE							
19	CCP 1-15 BE	128						
20	CH						200	
21	CE						200	
22	CCP 2-5 BE	200				64	128	
23	CH							
24	CE							200
25	CCP 2-7 BE					200	200	64
26	CH							
27	CE							
28	CCP 2-11 BE							
29	CH							
30	CE							

ตารางที่ จ 1 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดชุมพร (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
31	CCP 2-15 BE							
32	CH							
33	CE	32						
34	CCP 3-5 BE							
35	CH							
36	CE							
37	CCP 3-6 BE	200					200	200
38	CH							
39	CE							
40	CCP 3-13 BE							
41	CH							
42	CE							

SA = *S. aureus* ATCC25923
MRSA = methicillin-resistant *S aureus* SK1
PA = *P. aeruginosa* ATCC27853
EC = *E. coli* ATCC25922
CA = *C. albicans* ATCC90028
CN = *C. neoformans* ATCC90012
MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย
CCP 1 = ถ้ำเขาเกรียบ
CCP 2 = ถ้ำเขาพลู
CCP 3 = ถ้ำเขานาง

ตารางที่ จ.2 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CSR 1-14 BE							
2	CH							
3	CE							
4	CSR 2-4 BE	128						
5	CH							
6	CE	128						
7	CSR 2-5 BE							
8	CH							
9	CE							
10	CSR 2-7 BE	200	200	128				
11	CH							
12	CE			200				
13	CSR 2-11 BE	200						
14	CH							
15	CE	200						
16	CSR 2-13 BE							
17	CH							
18	CE							
19	CSR 2-14 BE							
20	CH							
21	CE							
22	CSR 3-3 BE							
23	CH							
24	CE						128	
25	CSR 3-4 BE	32					200	
26	CH							
27	CE	64						

ตารางที่ จ.2 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
28	CSR 3-11 BE	200			128		200	
29	CH							
30	CE							

SA = *S. aureus* ATCC25923
MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1
PA = *P. aeruginosa* ATCC27853
EC = *E. coli* ATCC25922
CA = *C. albicans* ATCC90028
CN = *C. neoformans* ATCC90012
MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย
CSR 1 = ถ้ำเขาโคก
CSR 2 = ถ้ำแกลบ
CSR 3 = ถ้ำขรมวนาราม
หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ จ.3 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราช

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CNA 1-1 BE					64		
2	CH							
3	CE							
4	CNA 1-2 BE	200	200	128	200	200		
5	CH		200					
6	CE	16	16		200			
7	CAN 1-3 BE	200						
8	CH							
9	CE							
10	CNA 1-4 BE						64	
11	CH							
12	CE							
13	CNA 1-5 BE							
14	CH							
15	CE							
16	CNA 1-6 BE							
17	CH							
18	CE							
19	CNA 1-8 BE							
20	CH						200	
21	CE							
22	CNA 1-9 BE							
23	CH	200						
24	CE							
25	CNA 1-13 BE	128				200		
26	CH							
27	CE							
28	CNA 1-15 BE			200		200		
29	CH							
30	CE							

ตารางที่ จ.3 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราช (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
31	CNA 2-2 BE							
32	CH							
33	CE							
34	CNA 2-4 BE							
35	CH						200	
36	CE							
37	CNA 2-5 BE							
38	CH							
39	CE							
40	CNA 2-8 BE							
41	CH					200		
42	CE	64						
43	CNA 2-10 BE							
44	CH							
45	CE	16	32					
46	CNA 2-12 BE					200		
47	CH							
48	CE							
49	CNA 2-14 BE						128	
50	CH							
51	CE	200						
52	CNA 2-15 BE							
53	CH							
54	CE							
55	CNA 3-3 BE							
56	CH	200						
57	CE					128		
58	CNA 3-7 BE					200		
59	CH							
60	CE						200	

ตารางที่ จ.3 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราช (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
61	CNA 3-8 BE						200	
62	CH							
63	CE							
64	CNA 3-10 BE							
65	CH						128	
66	CE		200					
67	CNA 3-12 BE	200						
68	CH							
69	CE							
70	CNA 3-13 BE							
71	CH							
72	CE							

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CNA 1 = ถ้ำเขาขุนพนม CNA 2 = ถ้ำเขาปูน

CNA 3 = ถ้ำแก้วสุรกานต์

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ จ.4 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดพัทลุง

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CPA 1-1 BE							
2	CH							
3	CE					200		
4	CPA 1-5 BE					200		
5	CH					200		
6	CE					32		
7	CPA 1-9 BE	200						
8	CH						200	
9	CE	200						
10	CPA 1-11 BE							
11	CH							
12	CE							
13	CPA 2-8 BE	200				200		
14	CH				200	64		
15	CE				200			
16	CPA 2-10 BE							32
17	CH							
18	CE							
19	CPA 2-13 BE							
20	CH							
21	CE							
22	CPA 3-3 BE							
23	CH							
24	CE							
25	CPA 3-5 BE							200
26	CH							
27	CE							
28	CPA 3-6 BE	200	200	128				
29	CH							
30	CE							

ตารางที่ จ.4 ค่า MIC/MBC **หรือ** MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดพัทลุง (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC **หรือ** MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
31	CPA 3-9 BE				128		200	
32	CH							
33	CE	200			200		128	
34	CPA 3-11 BE	200			128		128	
35	CH							
36	CE	200	200		128			
37	CPA 3-12 BE							
38	CH							
39	CE	128						
40	CPA 3-14 BE							
41	CH							
42	CE							
43	CPA 3-15 BE		200	128				
44	CH							
45	CE							

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CPA 1= ถ้ำสุมโน CPA 2 = ถ้ำคูหาสวรรค์

CPA 3 = ถ้ำเขาอ้อ

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ จ.5 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดสงขลา

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CSK 1-1 BE							
2	CH							
3	CE							
4	CSK 1-2 BE							200
5	CH							
6	CE							
7	CSK 1-5 BE							
8	CH							
9	CE							
10	CSK 1-7 BE							
11	CH							
12	CE							
13	CSK 1-8 BE					200		
14	CH					200		
15	CE					200		
16	CSK 1-12 BE							
17	CH							
18	CE	200						
19	CSK 1-14 BE	200						
20	CH							
21	CE							
22	CSK 2-5 BE						200	
23	CH						200	
24	CE						200	
25	CSK 2-7 BE		200				200	
26	CH							
27	CE							64
28	CSK 2-8 BE		200	200				
29	CH							
30	CE							

ตารางที่ จ.5 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดสงขลา (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
31	CSK 2-13 BE	200	200	128				
32	CH							
33	CE							
34	CSK 2-15 BE							
35	CH							
36	CE							
37	CSK 3-2 BE					8		
38	CH							
39	CE					16		
40	CSK 3-6 BE				200			
41	CH							
42	CE						200	
43	CSK 3-8 BE							
44	CH	200						
45	CE							
46	CSK 3-13 BE							
47	CH							
48	CE							
49	CSK 3-15 BE							
50	CH							
51	CE	200						

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CSK 1 = ถ้ำศรีเกษร CSK 2 = ถ้ำเขาพระ

CSK 3 = ถ้ำเขานุ้ย

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ จ.6 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดตรัง

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CTR 1-1 BE			200		128		200
2	CH						128	
3	CE					200	64	
4	CTR 1-3 BE	200		200			128	
5	CH							
6	CE					200		
7	CTR 1-12 BE							
8	CH							
9	CE							
10	CTR 1-15 BE							
11	CH							
12	CE	128	200					200
13	CTR 2-1 BE	200						200
14	CH							
15	CE			200	200			
16	CTR 2-5 BE	200	200	128	200	200	128	
17	CH							
18	CE	64/64	16					
19	CTR 2-6 BE	16	200					
20	CH	200					64	
21	CE	64	200					
22	CTR 2-10 BE		200		200		200	
23	CH							
24	CE						200	
25	CTR 2-11 BE							200
26	CH							
27	CE							
28	CTR 2-15 BE							
29	CH							
30	CE							

ตารางที่ จ.6 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดตรัง (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
31	CTR 3-2 BE							
32	CH	200	200					
33	CE							
34	CTR 3-3 BE	200						
35	CH							
36	CE	200						
37	CTR 3-5 BE							
38	CH					200		
39	CE	200						200
40	CTR 3-6 BE					200		32
41	CH							
42	CE							
43	CTR 3-10 BE							
44	CH	200					128	
45	CE						200	
46	CTR 3-11 BE							
47	CH							
48	CE							

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CTR 1 = ถ้ำผึ้ง CTR 2 = ถ้ำเลเขากอบ

CTR 3 = ถ้ำสำนักสงฆ์เขาหลักจันทร์

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ

ตารางที่ จ.7 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดกระบี่

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
1	CKB 1-2 BE	128					200	
2	CH						200	
3	CE							
4	CKB 1-3 BE	64						
5	CH							
6	CE							
7	CKB 1-7 BE		200					
8	CH		200		200			
9	CE	128						
10	CKB 1-8 BE							
11	CH							
12	CE	200				200		
13	CKB 1-9 BE							
14	CH							
15	CE					128		
16	CKB 1-14 BE							
17	CH							
18	CE							
19	CKB 2-4 BE		200					
20	CH							
21	CE							
22	CKB 2-8 BE							
23	CH							
24	CE							
25	CKB 2-9 BE							
26	CH							
27	CE	128						200
28	CKB 2-13 BE							200
29	CH							
30	CE				200	64		

ตารางที่ จ.7 ค่า MIC/MBC หรือ MFC ของสารสกัดหยาบราดินถ้ำที่แยกได้จากจังหวัดกระบี่ (ต่อ)

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ค่า MIC/MBC หรือ MFC (µg/mL)						
		SA	MRSA	PA	EC	CA	CN	MG
31	CKB 3-1 BE					16	8	
32	CH							
33	CE							
34	CKB 3-11 BE							
35	CH							
36	CE							

SA = *S. aureus* ATCC25923 MRSA = methicillin-resistant *S. aureus* SK1

PA = *P. aeruginosa* ATCC27853 EC = *E. coli* ATCC25922

CA = *C. albicans* ATCC90028 CN = *C. neoformans* ATCC90012

MG = *M. gypseum* จากผู้ป่วย

CKB 1 = ถ้ำผึ้ง CKB 2 = ถ้ำเลเขากอบ

CKB 3 = ถ้ำสำนักสงฆ์เขาหลักจันทร์

หมายเหตุ : ทำการทดลองอย่างละสองซ้ำ