ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราชอบเกลือ *Aspergillus* sp. SSPB4332

Antimicrobial and Antioxidant Activity of Culture Filtrate-Extracts from Halophilic Fungus *Aspergillus* sp. SSPB4332

สโรชา ประสงค์ผลชัย[1] วารี เนื่องจำนงค์[2] สุดารัตน์ สวนจิตร[3] และอภิรดี ปิลันธนภาคย์[3*]

Sarocha Prasongphonchai[1], Waree Naengchomnong[2], Sudarat Suanjit[3] and Apiradee Pilantanapak[3*]

[1]*สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[2] *ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[3] *ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[1]*Program in Biological Sciences, Faculty of Science, Burapha University*

[2]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University*

[3]*Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University*

Received : 5 August 2016

Accepted : 8 November 2016

Published online : 17 November 2016

บทคัดย่อ

Aspergillus sp. SSPB4332 เป็นราชอบเกลือสามารถเจริญได้บนอาหาร potato dextrose agar ที่มีความเค็มสูงสุด 250 ppt ในการศึกษาได้เพาะเลี้ยงราสายพันธุ์นี้ในอาหาร potato dextrose broth (PDB/DW) และ potato dextrose broth ที่มีความเค็ม 30 ppt (PDB/SW) จากนั้นนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเส้นใยออกแล้วไปสกัดด้วย ethyl acetate และนำสารสกัดหยาบไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี disk diffusion จุลินทรีย์ทดสอบประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* TISTR 008 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 รวมถึงยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 สารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงราทั้ง PDB/DW และ PDB/SW แสดงศักยภาพการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดอาหารเลี้ยงรา PDB/SW สำหรับ *B. cereus* และ *S. aureus* คือ 128 และ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ค่า MIC สารสกัดหยาบจากอาหาร PDB/DW สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 008 และ *S. aureus* ATCC 25923 คือ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) ในระบบตัวทำละลาย toluene:methanol:acetone อัตราส่วน 6:1:3 (v/v) พบองค์ประกอบในสารสกัดหยาบทั้ง PDB/DW และ PDB/SW ตรงกัน จำนวน 7 สาร มีค่า R_f เท่ากับ 0.49, 0.53, 0.57, 0.61, 0.63, 0.68 และ 0.72 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า *Aspergillus* sp. SSPB4332 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี ประมาณการเทียบเท่า ascorbic acid 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : ราชอบเกลือ สารสกัด ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านยีสต์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

***Corresponding author. E-mail:** apiradee@buu.ac.th

Abstract

Aspergillus sp. SSPB4332 is halophilic fungus growing on potato dextrose agar salinity up to 250 ppt. The fungal strain was cultured in potato dextrose broth (PDB/DW) as well as 30 ppt salinity-potato dextrose broth (PDB/SW), and the culture filtrates were subjected to ethyl acetate extraction. Disk diffusion assay was adopted to evaluate the inhibitory effect of crude extracts against Gram positive bacteria; *Bacillus cereus* TISTR 008 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Gram negative bacteria; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, and yeast: *Candida albicans* ATCC 90028. The crude extracts of culture filtrates from PDB/DW and PDB/SW exhibited more potent inhibitory effect against Gram positive bacteria than Gram negative bacteria and yeast. The MIC of crude extracts from PDB/SW against *B. cereus* and *S. aureus* were 128 and 256 µg/ml, respectively, whereas the MIC of PDB/DW crude extracts against all of these strains were 512 µg/ml. The seven components with the R_f values of 0.49, 0.53, 0.57, 0.61, 0.63, 0.68 and 0.72 respectively were separated from both crude extracts by thin layer chromatography in toluene: methanol: acetone solvent system at the ratio of 6: 1 : 3 (v/v). Besides antimicrobial substance(s), the production of potent antioxidant(s) compared to 1.25 mg/ml ascorbic acid was also pronounced by *Aspergillus* sp. SSPB4332.

Keywords: halophilic fungi, crude extract, antibacterial, anti-yeast, antioxidant

บทนำ

ราชอบเกลือ (halophilic fungi) พบได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือ Nazareth *et al.* (2012) แบ่งรากลุ่มนี้ได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ facultative halophiles คือราที่ไม่ต้องการเกลือในการเจริญแต่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ และ obligate halophiles คือ ราที่ต้องการเกลือความเข้มข้น 2%-15% ในการเจริญ Kushner (1993) นิยามไว้ว่าราที่เจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่ความเข้มข้นเกลือ NaCl 15%-32% เป็นรากลุ่ม extreme halophiles เชื่อกันว่าการที่ราอยู่รอดภายใต้สภาวะ extreme saline น่าจะมีกลไกพิเศษเพื่อปรับตัวภายใต้สภาวะเครียดและสร้างสารที่มีประโยชน์ในการอยู่รอด (Sepcic *et al.,* 2011; Gunde-Cimerman and Zalar, 2014) โดยเฉพาะการสร้างสารทุติยภูมิ เช่น สารต้านจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ (Margesin and Schinner, 2001; Frisvad, 2005) และสารต้านอนุมูลอิสระ (Canturk *et al.,* 2013) เป็นต้น

การดื้อยาของจุลินทรีย์ก่อโรคเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข เนื่องจากมีแนวโน้มพบเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ และไม่มียาปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมเชื้อดื้อยาได้ทั้งหมด (Frieden, 2013) ส่งผลให้ในปี พ.ศ. 2010 ประเทศไทยมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากเชื้อดื้อยามากกว่าปีละ 19,000 ราย เมื่อเทียบกับ 23,000 รายต่อปีในประเทศที่มีจำนวนประชากรมากกว่ามากอย่างสหรัฐอเมริกา (Reuters, 2016) นอกจากนี้ปัญหาความเสื่อมที่เกิดจากร่างกายผลิตอนุมูลอิสระในสภาวะเครียดจากมลพิษในสิ่งแวดล้อม หรือรับจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ทำให้ความต้องการทั้งสารอาหาร และ/หรือยาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเพื่อชะลอหรือลดความเสื่อม (Percival, 1996; Devasagayam *et al*., 2004) ดังนั้นความต้องการสารต้านจุลินทรีย์และสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่ๆจึงเพิ่มขึ้น และสารสกัดจากราก็เป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง

ความต้องการราจากแหล่งใหม่ ๆ มีรายงานการพบราหลายชนิดที่มีคุณค่าและความสำคัญ ในการผลิตยารักษาทั้งโรคทั่วไปและโรคที่รักษายาก เช่น มาลาเรีย วัณโรค มะเร็ง (Mayer and Hamann, 2004) หรือโรคที่เกิดจากความเสื่อม (Percival, 1996; Devasagayam *et al*., 2004) เนื่องจากราจากแหล่งใหม่ ๆ มักจะสร้างสารชนิดใหม่ๆที่จุลินทรีย์ก่อโรคยังไม่รู้จัก จึงให้ผลดีในการรักษาเชื้อดื้อยา ปัจจุบันความสนใจนำจุลินทรีย์ชอบเกลือ หรือทนเกลือสูงมาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพจึงมีเพิ่มขึ้นในหลากหลายลักษณะโดยเฉพาะอย่างยิ่งความสนใจนำมาผลิตสารต้านจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระ (Demain, 2007; Canturk *et al.,* 2013; Ali *et al.,* 2014) แต่ก็นับว่ายังมีน้อยมากเมื่อเทียบกับราจากแหล่งอื่นๆ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความสามารถในการสร้างสารที่มีประโยชน์จากนาเกลือในการยับยั้งจุลินทรีย์และอนุมูลอิสระ และศึกษาศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

วิธีดำเนินการวิจัย

สายพันธุ์ราที่ศึกษา

Aspergillus sp. SSPB4332 แยกได้จากดินนาเกลือ อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี (13°14'1"N 99°58'02"E) ที่ระดับความลึก 5-10 เซนติเมตร

สายพันธุ์จุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบเป็นสายพันธุ์มาตรฐานประกอบด้วย แบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์ และยีสต์ 1 สายพันธุ์ แบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 รวมถึงยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 จัดซื้อจากกรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ส่วนแบคทีเรีย *Bacillus cereus* TISTR 121 จัดซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

การทดสอบการชอบเกลือ

ทดสอบการชอบเกลือในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม ด้วยวิธีดัดแปลงจาก Moubasher *et al*. (1990) โดยเลี้ยงราบนอาหาร potato dextrose agar ที่เตรียมจากน้ำกลั่น (PDA/DW) และ PDA/SW ที่ปรับความเค็มจนมีความเค็ม 15, 30, 50, 100, 150, 200 และ 250 ppt บ่มในสภาวะ static ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน บันทึกความสามารถในการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเค็มต่างๆ จากการที่ราสามารถงอกเส้นใยลงในอาหารที่มีความเค็มนั้น บันทึกช่วงความเค็มที่พบว่าราสามารถเจริญได้

การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรานาเกลือ

ตัดขอบโคโลนีราที่เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar ความเค็ม 30 ppt (PDA/SW) จำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB/DW และ PDB/SW ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะ static ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา10 วัน (3 ซ้ำ) จากนั้นนำอาหารมากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1) ส่วนของอาหารเหลวจะนำมารวมกัน และสกัดด้วย ethyl acetate 2 ครั้ง ส่วนสกัดที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งจะนำมารวมกัน ระเหยแห้งส่วนสกัดด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator จนตัวทำละลายระเหยจนหมด ละลายสารสกัดหยาบด้วยสารละลาย 50% dimethyl sulfoxide (50% DMSO) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี disk diffusion

การเตรียมแบคทีเรียสำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง ใช้วิธี disk diffusion ตามวิธีของ NCCLS (2012) บนอาหาร Muller Hinton agar (MHA) ส่วนการทดสอบ การยับยั้งยีสต์ใช้วิธี disk diffusion ตามวิธีของ NCCLS (2004) บนอาหาร MHA ที่เติม glucose 2% และ methylene blue dye 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (MHA-GMB) ชุดควบคุมคุณภาพสำหรับแบคทีเรียใช้ดิสก์ยามาตรฐาน ampicillin 10 ไมโครกรัม และ gentamycin 10 ไมโครกรัม สำหรับยีสต์ใช้ดิสก์ยามาตรฐาน fluconazole 25 ไมโครกรัม ชุดควบคุมผลลบใช้สารละลาย 50% DMSO

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (minimum inhibitory concentration: MIC)

การหาค่า MIC ของสารสกัด ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และยีสต์ทำโดยวิธี broth micro dilution ตามวิธีของ NCCLS (2006) และ NCCLS (2008) ตามลำดับ ทดสอบสารสกัดที่ความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 1,024-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชุดควบคุมคุณภาพสำหรับแบคทีเรียใช้ยามาตรฐาน ampicillin และ gentamycin สำหรับยีสต์ใช้ยามาตรฐาน fluconazole กรณีชุดควบคุมผลลบใช้สารละลาย 1% DMSO หลุมอาหารเหลวที่ใสหรือไม่พบการเจริญของเชื้อทุกหลุมจะใช้ปิเปตดูดอาหารเหลว 10 ไมโครลิตร มาถ่ายลงบนอาหารแข็งชนิดเดิม ที่ไม่ผสมสารยับยั้งจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimal lethal concentration: MLC)

การหาองค์ประกอบโดยวิธี thin layer chromatography (TLC)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากราด้วยวิธี TLC ที่ดัดแปลงจาก Jois *et al*. (1986) ใช้ capillary tube ขนาดเล็กจุดสารลงบนแผ่น TLC Silica gel 60 F_{254} (1x10 เซนติเมตร) แยกองค์ประกอบออกจากกันในตัวทำละลาย toluene:methanol:acetone อัตราส่วน 6:1:3 (v/v) บันทึกการเรืองแสงและสีของแถบสารภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร และวัดระยะที่สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่บนแผ่น TLC คำนวณหาค่า retention factor (R_f) ของสารสกัดจากสูตร

R_f = ระยะทางที่ตัวอย่างเคลื่อนที่/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากทั้ง PDA/DW และ PDA/SW โดยวิธี dot blot DPPH rapid staining ที่ดัดแปลงจาก Arora and Chandra (2010) ใช้ capillary tube ขนาดเล็กดูดสารสกัดหยาบที่เจือจางลง 50 เท่า ไปจุดลงบนแผ่น TLC ขนาด 1x1 เซนติเมตร วางพักไว้ให้แห้ง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นสเปรย์สารละลาย 0.4 mM DPPH ลงบนแผ่น TLC ซับสีส่วนเกินออกด้วยกระดาษซับ และวางทิ้งไว้ให้แห้ง อ่านผลทันที ถ้าสารสกัดสามารถต้านอนุมูลอิสระ จุดของสารสกัดบนแผ่น TLC จะมีสีขาวถึงสีเหลือง ในการทดสอบใช้สาร ascorbic acid for injection (March Pharmaceutical, Thailand) (ความเข้มข้น 0.00025 - 250 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นชุดควบคุมผลบวก และสารละลาย 1% DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การทดสอบความสามารถในการชอบเกลือ

รา *Aspergillus* sp. SSPB4332 สามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ที่มีความเค็ม 15, 30, 50, 100, 150, 200 และ 250 ppt จัดเป็นราชอบเกลือสูง (extreme halophile) ตามเกณฑ์ ของ Kushner (1993) ซึ่งที่ผ่านมามีรายงาน *Aspergillus*

ชอบเกลือและทนเกลือหลายสายพันธุ์ จากนาเกลือในหลายประเทศ (Cantrell *et al*., 2006, Moubasher *et al*., 1990; Nayak *et al*., 2012)

การยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์โดยวิธี disk diffusion

สารสกัดหยาบของ *Aspergillus* sp. SSPB4332 เพาะเลี้ยงในอาหาร PDB/SW และ PDB/DW ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี โดยสามารถยับยั้ง *B. cereus* ด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 21.33 และ 20.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ และยับยั้ง *S. aureus* ด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 22.33 และ 19.33 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากอาหาร PDB/DW ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ S. Typhimurium ATCC 13311 ได้ในระดับปานกลาง โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเพียง 8.00 และ 7.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจาก PDB/SW สามารถยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 ได้เล็กน้อย แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 7.67 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1) การพบว่ารา *Aspergillus* จากนาเกลือสร้างสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ คล้ายคลึงกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีรายงานการสร้าง secondary metabolites มากกว่า 120 ชนิดโดย *Aspergillus* sp.ในระบบนิเวศทางทะเล (marine derived *Aspergillus* sp.) (Lee *et al*., 2013) การทดสอบ supernatant ของ *Aspergillus* หลายสายพันธุ์จาก saltpans ใน Botswana ให้ผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus megaterium* และ *S. aureus* ได้ดีที่สุด (Lebogang *et al.,* 2009) นอกจากนี้ Ali *et al.* (2014) รายงานว่าการทดสอบ supernatant ของ *Aspergillus* 5 สายพันธุ์ จากนาเกลือจังหวัดเพชรบุรี แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* และ *E. coli* บนจานอาหารให้ผลทำนองเดียวกัน คือสามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบได้ การที่ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบแตกต่างกันแสดงว่าราน้ำอาจสร้างสารยับยั้งที่มีกลไกยับยั้งต่างกัน สารที่สร้างขึ้นน่าจะมีเป้าหมายตรงผนังเซลที่แตกต่างกันระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ส่วนการยับยั้งยีสต์มีความเป็นไปได้ที่สารนี้ไม่ได้ออกออกฤทธิ์ที่ผนังเซลของยีสต์ หรือราอาจมีการสร้างสารยับยั้งยีสต์ด้วยกลไกที่ต่างจากการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย สารที่สร้างขึ้นจึงมีคุณสมบัติต่างกัน นอกจากนี้เป็นไปได้ว่า ethyl acetate อาจยังไม่ใช่ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์จากราน้ำเกลือ จากความรู้และการทดลองที่ผ่านมาของผู้วิจัย ความสามารถของราในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเค็มต่างกันเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว แม้ว่าจะมีรายงานว่าราทะเลส่วนใหญ่สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้ดีในน้ำกลั่น เนื่องจากไม่ต้องสิ้นเปลืองพลังงานในการควบคุมแรงดันออสโมซิสในเซล (Bugni and Ireland, 2004)

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) และทำลาย (MLC) จุลินทรีย์

สารสกัดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ได้เล็กน้อย MIC และ MLC ต่อแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S.* Typhimurium ATCC 13311 มีค่าเท่ากันคือ MIC > 1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MLC > 1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด PDB/SW เลี้ยงรา *Aspergillus* sp. SSPB4332 มีประสิทธิภาพดีกว่า PDB/DW ในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียแกรมบวก ค่า MIC ต่อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* และ *S. aureus* ของสารสกัดจาก PDB/SW คือ 128 และ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจาก PDB/DW มีค่า MIC ต่อแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 2 ชนิดเท่ากับ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า MIC ต่อยีสต์มีค่าต่ำสุด 1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) สารสกัดจากรา *Aspergillus* sp. SSPB4332 มีฤทธิ์ยับยั้งค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับสารสกัด ethyl acetate จากราเอนโดไฟท์ในสาหร่ายทะเล 3 ชนิด ของประเทศไทย ซึ่งรายงานค่า MIC ของรา 5 สายพันธุ์ ต่อ *S. aureus* ATCC 25923 และรา 3 สายพันธุ์ ต่อ *C. albicans* ATCC 90028 ระหว่าง 8 ถึง >200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Supaphon *et al.,* 2013) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้

เป็นครั้งแรกที่มีการรายงานค่า MIC ของสารสกัดจากรานาเกลือประเทศไทย ที่ผ่านมา Ali *et al*. (2014) รายงานไว้เพียงประสิทธิภาพของ crude filtrate ในการยับยั้งแบคทีเรียเบื้องต้นเท่านั้น เป็นไปได้ว่าสารก่อฤทธิ์ทุติยภูมิจากรานาเกลืออาจเป็นคนละประเภทกับราเอนโดไฟท์และ ethyl acetate อาจไม่ใช่ตัวทำละลายที่เหมาะสม

ตารางที่ 1 การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากรานาเกลือ *Aspergillus* sp. SSPB4332 โดยวิธี disk diffusion

แหล่งของสารสกัด	**ขนาดของโซนยับยั้ง** (Inhibition zone) (mm)					
	จุลินทรีย์ทดสอบ					
Aspergillus (SSPB4332)	*B. cereus* TISTR 121	*S. aureus* ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*S.* Typhimurium ATCC 13311	*C. albicans* ATCC 90028
PDB/DW	20.00±0.00	19.33±0.57	-	8.00±0.00	7.00±0.00	-
PDB/SW	21.33±0.58	22.33±1.15	-	-	-	7.67±0.58
10 µg Ampicillin	9-10	27-30	17-19	20-22	20-24	
10 µg Gentamycin	21-25	20.21	20-21	19-20	18-19	
25 µg Fluconazole						30-31

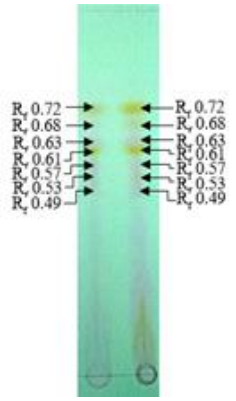
หมายเหตุ – คือไม่พบโซนยับยั้ง

ตารางที่ 2 MIC และ MLC ต่อแบคทีเรียและยีสต์ของสารสกัดจากรานาเกลือ *Aspergillus* sp. (SSP4332)

แหล่งของสารสกัด	**จุลินทรีย์ทดสอบ**									
	แบคทีเรียแกรมบวก				**แบคทีเรียแกรมลบ**				**ยีสต์**	
	B. cereus TISTR 121		*S. aureus* ATCC 25923		*P. aeruginosa* ATCC 27853		*S.* Typhimurium ATCC 13311		*C. albicans* ATCC 90028	
	MIC (µg/ml)	MLC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MLC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MLC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MLC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MLC (µg/ml)
PDB/DW	512	512	512	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
PDB/SW	128	256	256	1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	1,024	>1,024

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากราด้วยวิธี Thin layer chromatography

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด *Aspergillus* SSPB4332 จาก PDB/DW และ PDB/SW ด้วยวิธี TLC ในระบบตัวทำละลาย toluene:methanol:acetone อัตราส่วน 6:1:3 (v/v) พบสารองค์ประกอบ 7 สาร เท่ากัน มีค่า R_f เท่ากัน คือ เท่ากับ 0.49, 0.53, 0.57, 0.61, 0.63, 0.68 0.72 ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) ของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงรา *Aspergillus* sp. SSPB4332, 1: อาหารที่ไม่มีความเค็ม (PDB/DW), 2: อาหารที่ไม่มีความเค็ม (PDB/SW)

การทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบทั้งสองชุดที่เจือจางลง 50 เท่า มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระดับปานกลาง (2+) เทียบเท่า ascorbic acid ความเข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นสารควบคุม นั่นคือสารสกัดที่ความเข้มข้นตั้งต้นมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้เทียบเท่ากับ ascorbic acid 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีรายงานว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จาก *Eugenia jambolana* ประเทศอินเดีย อยู่ที่ร้อยละ 50-80 ขณะที่ฤทธิ์ของ ascorbic acid อยู่ที่ร้อยละ 90 (Yadav *et al.,* 2014)

ภาพที่ 2 ลักษณะสีที่เกิดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระบนแผ่น TLC siliga gel 60F_{254} โดย Dot blot DPPH rapid staining A, B: สารสกัด SSPB 4332 จาก PDB/DW และ PDBSW ตามลำดับ (ความเข้มระดับ 2+); C, D และ E เป็นชุดควบคุมผลบวก ascorbic acid ที่ความเข้มข้น: 0.00025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มระดับ 1+), 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มระดับ 2+ และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มระดับ 3+) ตามลำดับ; F เป็นตัวควบคุมผลลบ

สรุปผลการวิจัย

Aspergillus sp. สายพันธุ์ SSPB4332 ที่แยกได้จากนาเกลือ สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 121, *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดี กว่าแบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 และยังสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำราสายพันธุ์นี้มาศึกษาและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ในระยะต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน ปี 2557) เรื่อง " การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของราที่แยกได้จากนาเกลือ"

เอกสารอ้างอิง

Ali, I., Siwarungson, N., Punnapayak, H., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Bankeeree, W., & Rakshit, S.K. (2014). Screening of potential biotechnological applications from obligate halophilic fungi, isolated from a man-made solar saltern located in Phetchaburi province, Thailand. *Pakistan Journal of Botany*, *46*, 983-988.

Arora, D.S., & Chandra, P. (2010). Assay of antioxidant potential of two *Aspergillu*s isolates by different methods under various physio-chemical conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*, 765-777.

Bugni, T.S., & Ireland, C.M. (2004). Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganism. *Natural Product Reports, 21,* 143-163.

Canturk, Z., Dikmen, M., Ozturk, N., Kocabiyik, E., & Ilhan S. (2013). Antioxidant properties of halotolerant *Penicillium chrysogenum var. chrysogenum* secondary metabolites. *E-Health and Bioengineering*, *4*, 1-4.

Cantrell, S.A., Casillas-Martínez, L., & Molina, M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological Research*, *110*, 962–970.

Demain, A.L. (2007). The business of Biotechnology. *Industrial Biotechnology*, *3*, 269-283.

Devasaqayam, T.P., Tilak, J.C., Boloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., & Lele, R.D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, *52*, 794-804.

Frisvad, J.C. (2005). Halotolerant and halophilic fungi and their extrolite production. In N. Gunde-Cimerman, A. Oren, & A. Plemenitas (Eds.*), Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria and eukarya*. (pp. 425-439). Netherlands: Springer.

Frieden, T. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention*, 49-89.

Gunde-Cimerman, N., & Zalar, P. (2014). Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine. *Journal of Biotechnology*, *52,* 170-179.

Jois, H.R., Sarkar, A., & Gurusiddaiah, S. (1986). Antifungal macrodiolide from *Streptomyces* sp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *30*, 458-464.

Kushner, D.J. (1993). Growth and nutrition of halophilic bacteria. In R.H. Vreeland, & L.I. Hochstein. (Eds.), *The biology of halophilic bacteria,* (pp 87-103). Florida: CRC Press.

Lebogang, L., Taylor, J.E., & Mubyana- John, T. (2009). A preliminary study of the fungi associated with saltpans in Botswana and their anti-microbial properties. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability © 2009 Global Science Books.*

Lee, Y.M., Kim, M.J., Li, H., Zhang, P., Bao, B., Lee, K.J., & Jung, J.H. (2013). Marine-derived *Aspergillus* species as a source of bioactive secondary metabolites. *Marine Biotechnology, 15*, 499-519.

Mahboubi, M., Mahboubi, A., & Kazempour, N. (2015). The antimicrobial activity of *Prunella vulgaris* extracts. *Herba Polonica, 1,* 31-38.

Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, *5*, 73-83.

Mayer, A.M.S., & Hamann, M.T. (2004). Marine Pharmacology in 2000: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Biotechnology*, *6*, 37-52.

Moubasher, A.H., Abdel-Hafez, S.I.I., Bagy, M.M.K., & Abdel-Satar, M.A. (1990). Halophilic and halotolerant fungi in cultivated desert and salt marsh soils from Egypt. *Acta Mycologica* , *26*, 65-81.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2004). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guideline. Document M44-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard (7thed.). M7-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard (3rded.). M27–A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2012). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard (11thed.). M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.

Nayak, S.S., Gonsalves, V., & Nazareth, S.W. (2012). Isolation and salt tolerance of halophilic fungi from mangroves and solar salterns in Goa-India. *Indian Journal of Marine Science*, *42*, 164-172.

Nazareth, S., Gonsalves, V. and Nayak, S. (2012). A first record of obligate halophilic *Aspergilli* from the Dead Sea. *Indian Journal of Microbiology*, *52*, 22-27.

Percival, M. (1996). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*, NUT031 1/96 Rev. 10/98.

Reuters (2016). Drug-resistant bacterial infections rising in Thailand, study says. Retrieved October 19, 2016 from http://www.reuters.com/article/thailand-health-idUSL3N1BJ20G

Supaphon, P., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V., & Sakayaroj, J. (2013). Antimicrobial potential of endophytic fungi derived from three seagrass species: *Cymodocea serrulata, Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii. PLoS ONE 8(8): e72520. doi:10.1371/journal.pone.0072520*.

Sepcic, K., Zalar, P., & Gunde-Cimerman, N. (2011). Low water activity induces the production of bioactive metabolites in halophilic and halotolerant fungi. *Marine Drugs*, *9*, 43-58.

Yadav, M., Yadav, A., & Yadav, J.P. (2014). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *7*, 256-261.