สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากสาหร่ายทะเล ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด

Bioactive compounds of endophytic fungi isolated from seaweeds inhibiting some pathogen bacteria

อามีนา สาแม[1,4] อัษฎาวุธ หิรัญรัตน์[2] สมพงศ์ โอทอง[3,4] พฤทธิ์ภร ศุภพล[3] และนุกูล อินทระสังขา[3,4*]

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

[2]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

[3]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

[4]หน่วยวิจัยการจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

[*]Corresponding Author, E-mail: nugul@tsu.ac.th

บทคัดย่อ

การคัดแยกราเอนโดไฟท์จากสาหร่ายทะเลจำนวน 8 สายพันธุ์ ใน 4 จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย พบว่ามีจำนวนราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 82 ไอโซเลต และสามารถจัดจำแนกราด้วยวิธีสัณฐานวิทยาและอณูชีวโมเลกุลออกได้เป็น 3 สกุล 4 สปีสีช์ และไม่สามารถจำแนกราได้จำนวน 25 ไอโซเลต ได้แก่ *Penicillium* spp. *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus rhizopodus* และ *Rhizopus* spp. เมื่อนำราเอนโดไฟท์ข้างต้นมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดด้วยวิธี Agar plug diffusion พบว่า *A. rhizopodus* มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดดีที่สุด จึงเลือก *A. rhizopodus* มาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี sequential solvent separation โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทธิลอะซิเตทและเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากเอทธิลอะซิเตทมีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดและแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Stratford (ESBL), *Salmonella* Typhimurium (ESBL) และ *Salmonella* Weltevreden (ESBL) และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ดีที่สุด 3 สายพันธุ์ คือ *E. coli* ATCC 25922 (Clear zone = 38.65±0.03 มิลลิเมตร), *S. aureus* ATCC 25923 (Clear zone = 37.25±0.00 มิลลิเมตร)

และ *S.* Weltevreden (ESBL) (Clear zone = 36.29±3.31 มิลลิเมตร) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (P<.01) ซึ่งการที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้ดีเป็นผลมาจากส่วนประกอบสำคัญของกลุ่มสาร secondary metabolites ที่ได้จากราเอนโดไฟท์ ซึ่งจะมีการศึกษาต่อไปถึงองค์ประกอบของสารข้างต้นและประโยชน์ของสาร เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสารข้างต้นต่อไป

ABSTRACT

This research was conducted by isolating the endophytic fungi from 8 seaweeds collecting from coastal areas of 4 southern provinces, Thailand. There were 82 fungal isolates obtained. By using morphological and molecular approaches for identification, we found that the endophytic fungi belonged to 3 genera, 4 species and other 25 unidentified, namely, *Penicillium* spp. *Aspergillus fumigates, Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus rhizopodus,* and *Rhizopus* spp. The primary screening with Agar plug diffusion technique, we found only 1 species, namely *A. rhizopodus* has showed the highest inhibition activities against some pathogens bacteria. Therefore, only *A. rhizopodus* isolate was then selected for further study solvent extraction with sequential solvent extract with ethyl acetate and methanol. The crude extracts were tested for the inhibitory effect against selected pathogenic bacteria. Only ethyl acetate extract has showed the inhibition activity against 9 pathogens bacteria and antibiotic resistant bacteria which were *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923*, Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* ATCC 25922*, Klebsiella pneumonia*e ATCC 700603*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Stratford (ESBL), *Salmonella* Typhimurium (ESBL) and *Salmonella* Weltevreden (ESBL). This chemical has shown the highest inhibition activities against *E. coli* ATCC 25922 (Clear zone = 38.65±0.03 mm)*, S. aureus* ATCC 25923 (Clear zone = 37.25±0.00 mm)*,* and *S.* Weltevreden (ESBL) (Clear zone = 36.29±3.31 mm). These results were statistically significant difference at the confidence level of 99% (P< .01). These bioactive compounds produced by endophytic fungi could inhibit certain pathogens may be due to some components of these secondary metabolites which need to be studied in more details for their roles and structures.

คำสำคัญ: สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แบคทีเรียก่อโรค ราเอนโดไฟท์ สาหร่ายทะเล

Keywords: Bioactive compounds, Pathogenic bacteria, Endophytic fungi, Seaweeds

บทนำ

ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค มีแนวโน้มสูงขึ้น จนกลายเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขทั่วโลก เนื่องจากมีการใช้ยาปฏิชีวนะเกินขนาดในการรักษาโรค ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคจำนวนมากดื้อยาเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว จุลินทรีย์ก่อโรคในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Streptococcus* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli, Klebsiella pneumonia*e (ภิรุญ, 2009) *Salmonella* Typhimurium และ *Salmonella* Enterica ที่สามารถสร้างเอนไซม์ Extended Spectrum ß-Lactamase (ESBL) (ธีรยุทธ และคณะ, 2558) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ย่อยสลายยากลุ่มเบต้า-แลคแทมได้หลายชนิด ทำให้มีการดื้อยาเบต้า-แลคแทมเกือบทุกกลุ่ม นอกจากนี้ เชื้อดังกล่าวข้างต้นยังส่งผลทำให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่เป็นโรคทางด้านภูมิคุ้มกัน หากไม่มีการควบคุมหรือไม่มียารักษา จะทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ดังนั้น ทำให้ความต้องการสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ จากแหล่งที่ยังไม่มีการรายงานเพิ่มมากขึ้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช และเป็นสารที่มีความจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Hiranrat, 2009) และสารดังกล่าวต้องไม่มีผลเสียต่อร่างกายหรือให้มีผลข้างเคียงน้อยที่สุด เนื่องจากสารเหล่านั้นจะถูกนำไปแปรรูปให้เป็นส่วนประกอบของยาที่ใช้รักษาโรค

สาหร่ายทะเลเป็นแหล่งผลิตสาร secondary metabolites (Villarreal-Gomez et al., 2010) ที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากมีศักยภาพในการผลิตสาร secondary metabolites ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายและมีประสิทธิภาพสูง (Del Val et al., 2001) แต่ปริมาณของสาหร่ายทะเลมีไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องเสาะหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในปริมาณที่มากขึ้น ปัจจุบันมีรายงานวิจัยจำนวนมาก พบว่าจุลินทรีย์เป็นแหล่งทรัพยากรที่น่าสนใจในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในปัจจุบัน โดยเฉพาะกลุ่มเชื้อรา จากรายงานมีการค้นพบเชื้อราบางกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ในลักษณะแบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยไม่ก่อให้เกิดโรคต่อพืชอาศัยและอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืช เรียกว่า ราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi) (Sandhu et al., 2014) ซึ่งราดังกล่าวจะทำหน้าที่ผลิตสาร secondary metabolites บางกลุ่มที่สามารถป้องกันอันตรายแก่พืชที่ราอาศัยอยู่และยังช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Mathan et al., 2013) และเชื้อราก่อโรคได้ (Kaewkrajay et al., 2014)

ดังนั้น ราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากสาหร่ายทะเลเป็นทางเลือกใหม่ที่มีความสำคัญสำหรับแหล่งของการผลิตสาร secondary metabolites ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะบางชนิดที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและจำแนกราเอนโดไฟท์ จากสาหร่ายทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะบางชนิด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสารดังกล่าวเป็นสารประกอบของตัวยาใหม่ใช้รักษาโรคหรือใช้ประโยชน์อื่น ๆ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเลจำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enteromorpha intestinalis*, *Enteromorpha clarthrata*, *Enteromorpha prolitera*, *Chaeto-*

morpha antennina, *Chaetomorpha crassa*, *Cualerpa racemosa*, *Gracilaria fisheri* และ *Sargassum* sp. จาก 4 จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ ปัตตานี สงขลา สตูล และกระบี่ จำนวน 1-2 กิโลกรัมต่อชนิด นำตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บได้มาล้างด้วยน้ำทะเลให้สะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกและอิพิไฟท์ที่เกาะติดมากับสาหร่าย จากนั้นนำสาหร่ายแต่ละชนิดใส่ในถุงพลาสติกที่มีน้ำทะเลปิดมิดชิดแล้วนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการ

2. การคัดแยกราเอนโดไฟท์

นำตัวอย่างสาหร่ายทะเลมาทำการแยกราเอนโดไฟท์ โดยใช้เทคนิคการฆ่าเชื้อที่ผิวใบ (surface sterilization) จากนั้นนำชิ้นส่วนทัลลัสของสาหร่ายทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนของทัลลัสมาวางบนอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA เติม 0.85% NaCl และยาปฏิชีวนะ Streptomycin ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ เมื่อมีการเจริญของเชื้อรา นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (PDA เติม 0.85% NaCl ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะในจานใหม่) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (งานวิจัยนี้ดัดแปลงจาก Thirunavukkarasu et al., 2011 ; Suryanarayanan et al., 2010) จากนั้นเก็บเชื้อราบริสุทธิ์ ที่แยกได้ ไว้ศึกษาต่อไป

3. การจำแนกราเอนโดไฟท์

การจำแนกราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้อ 2 โดยการศึกษาคุณลักษณะการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 2-4 สัปดาห์ แล้วบันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อรา สีโคโลนีและเส้นใย และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโดยการเตรียมสไลด์สด โดยใช้ lactophenol cotton blue และยังศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา โดยการเพาะเลี้ยงบนแผ่นสไลด์ (slide culture) แล้วส่องดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอนกำลังขยาย 40X จากนั้นนำมาจัดจำแนกเชื้อราตามคู่มือการจำแนกเชื้อรา (เสาวนิตย์, 2550) นอกจากนี้ยังจำแนกราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุล โดยอาศัยการสกัด rDNA ของเส้นใยราเอนโดไฟท์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปของ Forensic DNA Isolation Kit (Omega Bio-Tek) จากนั้นนำมาตรวจสอบลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณ rDNA ส่วน ITS คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และส่วนของ Beta-Tubulin คู่ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b โดยเทคนิค PCR และนำ DNA บริสุทธิ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ Macrogen (ประเทศเกาหลีใต้)และเปรียบเทียบความเหมือนในฐานข้อมูลสากล GenBank (NCBI)

4. การคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด ดัดแปลงจาก Buapet (2006)

นำราเอนโดไฟท์ที่บริสุทธิ์แล้วมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการคัดเลือกแต่ละชนิด ได้แก่ PDA, malt extract agar (MEA), sabouraud's dextrose agar (SDA) และ corn meal agar (CMA) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ ห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นใช้ sterile cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นของราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแต่ละชนิด นำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดจำนวน 6 สายพันธุ์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียทดสอบเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonella* Typhimurium (ESBL)

ด้วยวิธี Agar plug diffusion โดยนำแบคทีเรียทดสอบมา swab ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) จนทั่ว ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำชิ้นวุ้นของราเอนโดไฟท์มาวางทับลงบนอาหารแข็ง NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อรา โดยทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแบคทีเรียก่อโรคและเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ดีที่สุดไว้ศึกษาต่อไป

5. การสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดจากราเอนโดไฟท์

นำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่คัดเลือกจากข้อ 4 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง SDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นใช้ sterile cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นของรา จำนวน 10-15 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลว SDB ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นนำมากรองแยกส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อราออกจากกัน นำส่วนของน้ำเลี้ยงมาสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตท (ethyl acetate) สารสกัดที่ได้นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบส่วนที่ 1 คือ สารสกัดหยาบส่วนน้ำเลี้ยงสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตท (BE) และส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตท (BW) (ส่วนที่ 2) นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดและแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* ATCC 25923, *A. hydrophila*, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S.* Stratford (ESBL), *S.* Typhimurium (ESBL) และ *S.* Weltevreden (ESBL)

ส่วนเส้นใยนำไปแช่ในเอทธิลอะซิเตท เป็นเวลา 2 วัน กรองเอาเส้นใยออก (จำนวน 2 ครั้ง) นำสารสกัดที่ได้ทั้งสองครั้งรวมกัน นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบส่วนที่ 3 คือ สารสกัดหยาบส่วนเส้นใยที่สกัดด้วย เอทธิลอะซิเตท (CE) นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบส่วนที่ 1 จากนั้นนำเส้นใยที่เหลือมาแช่ในเมทานอล (methanol) ทำเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบส่วน ที่ 3 จะได้สารสกัดส่วนที่ 4 คือ สารสกัดหยาบส่วนเส้นใยที่สกัดด้วยเมทานอล (CM) นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบส่วนที่ 1 (Phooyadao, 2010)

6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์

นำชุดทดสอบและชุดควบคุม ได้แก่ สารสกัดที่ได้จากการสกัดลำดับส่วนจำนวน 4 ส่วน ได้แก่ BE, BW, CE และ CM (ชุดทดสอบ), tetracycline (positive control) และ 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (negative control) มาอย่างละ 1 มิลลิกรัม มาละลายให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเจือจางต่อด้วยตัวทำละลาย 10% DMSO ให้ได้ระดับความเข้มข้น 0.8, 0.6, 0.4 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำชุดทดสอบและชุดควบคุมไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะบางชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* ATCC 25923, *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *S.*

Typhimurium (ESBL), *S.* Weltevreden (ESBL) และ *S.* Stratford (ESBL) โดยมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียทดสอบเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยนำแบคทีเรียทดสอบมา swab ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) จนทั่ว ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นใช้ sterile cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นออกให้มีลักษณะเป็นหลุม ๆ จากนั้นใส่สารสกัดที่เตรียมไว้ในหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกต clear zone บริเวณที่เกิดขึ้นรอบหลุมและทำการวัดค่า clear zone ที่เกิดขึ้นของแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะบางชนิด (ดัดแปลงจากวิธี Khan, 2010)

ผลการวิจัย

1. ผลการคัดแยกราเอนโดไฟท์

จากการเก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเลใน 4 จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ ปัตตานี สงขลา สตูล และกระบี่ สามารถพบกลุ่มสาหร่ายทะเล 3 กลุ่ม คือ กลุ่มสาหร่ายสีเขียว (green algae; Chlorophyta) จำนวน 3 สกุล 6 สปีชีส์ กลุ่มสาหร่ายสีแดง (red algae ; Rhodophyta) จำนวน 1 สกุล 1 สปีชีส์ และกลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae; Phaeophyta) จำนวน 1 สกุล รวมทั้งสิ้น 8 สายพันธุ์ คือ *C. racemosa*, *C. antennina*, *C. crassa*, *E. clarthrata*, *E. intestinalis*, *E. prolitera*, *G. fisheri* และ *Sargassum* sp. (รูปที่ 1) เมื่อนำสาหร่ายดังกล่าวข้างต้นมาคัดแยกราเอนโดไฟท์ พบว่ามีจำนวนรา เอนโดไฟท์จำนวนทั้งสิ้น 82 ไอโซเลต ได้แก่ สาหร่าย *C. racemosa* 14 ไอโซเลต, *C. antennina* 9 ไอโซเลต, *C. crassa* 7 ไอโซเลต, *E. clarthrata* 4 ไอโซเลต, *E. intestinalis* 16 ไอโซเลต, *E. prolitera* 6 ไอโซเลต, *G. fisheri* 11 ไอโซเลต และ *Sargassum* sp. 15 ไอโซเลต พบว่า จำนวนราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากสาหร่ายสกุล *Enteromorpha* spp. พบมากที่สุด จำนวน 26 ไอโซเลตรองลงมา คือ สาหร่าย *Chaetomorpha* spp., *Sargassum* spp., *Caulerpa* spp. และ *Gracilaria* spp. 16, 15, 14 และ 11 ไอโซเลต ตามลำดับ

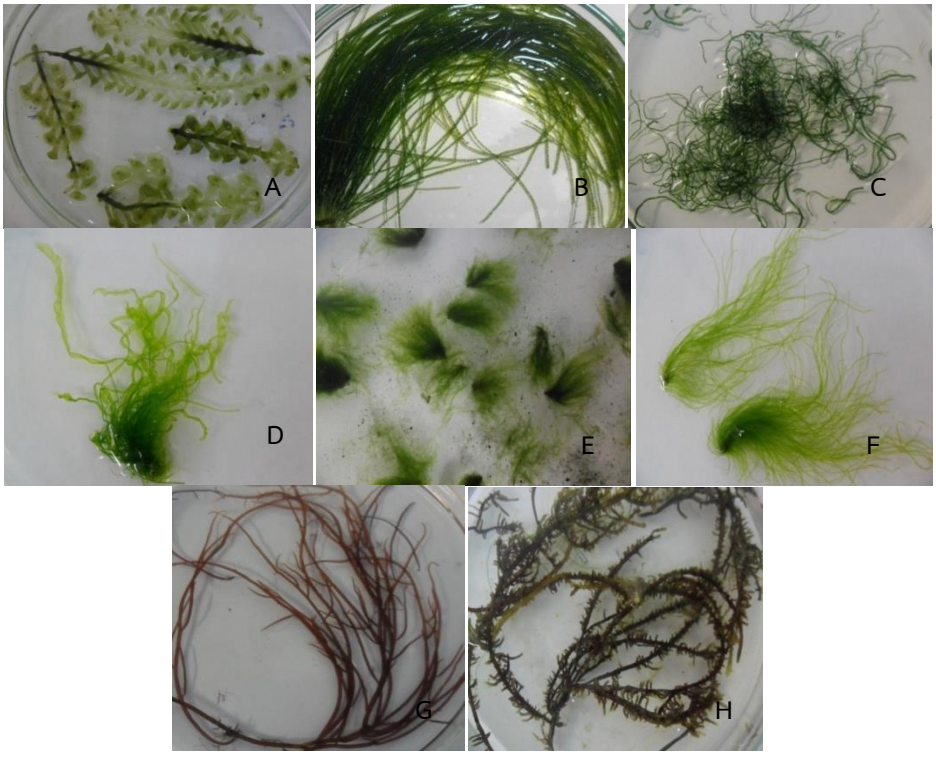
2. ผลการจำแนกราเอนโดไฟท์

เมื่อนำเชื้อราบริสุทธิ์ทุกไอโซเลตมาจัดจำแนกสามารถแบ่งออกเป็น 3 สกุล และ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Penicillum* spp. จำนวน 27 ไอโซเลต, *Rhizopus* sp. จำนวน 1 ไอโซเลต และ *Aspergillus* spp. ซึ่งสกุล *Aspergillus* สามารถจำแนกระดับสปีชีส์ออกเป็น 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Aspergillus fumigates* จำนวน 16 ไอโซเลต *Aspergillus niger* จำนวน 9 ไอโซเลต, *Aspergillus flavus* จำนวน 3 ไอโซเลตและ *Aspergillus rhizopodus* จำนวน 1 ไอโซเลต และไม่สามารถจำแนกราเอนโดไฟท์ได้จำนวน 25 ไอโซเลต (รูปที่ 2)

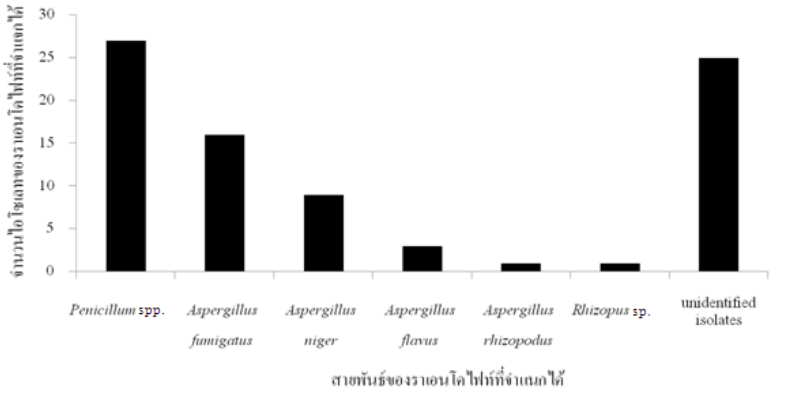
3. ผลการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

จากการนำราเอนโดไฟท์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการคัดเลือกแต่ละชนิด ได้แก่ PDA, SDA, MEA และ CMA นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เจาะชิ้นวุ้นของราที่เลี้ยงบนอาหารแต่ละชนิดให้มีขนาดเท่ากัน นำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดบนอาหารแข็ง NA พบว่ามีราเอนโดไฟท์ จำนวน 10 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียงไอโซเลตเดียว คือ *A. rhizopodus* (CAS08) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ 6 สายพันธุ์ คือ *B. cereus*, *Bacillus* sp., *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC

27853, *E. coli* ATCC 25922 และ *S.* Typhimurium (ESBL) นอกจากนี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสล้อมรอบแบคทีเรียทดสอบ > 10 มิลลิเมตร จำนวนถึง 5 สายพันธุ์ คือ *B. cereus*, *Bacillus* sp., *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 และ *S.* Typhimurium (ESBL) ยกเว้นสายพันธุ์ *S. aureus* ATCC 25923 มีขนาดวงใสเท่ากับ 5-10 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1) นอกจากนี้พบว่าอาหารที่เลือกใช้เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราที่สามารถยับยั้งการการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคแต่ละชนิดที่ต่างกัน พบว่าอาหาร PDA เป็นอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์มากที่สุดและรองลงมาคือ อาหาร SDA, MEA และ CMA (ตารางที่ 1, รูปที่ 3) จึงคัดเลือกราเอนโดไฟท์ *A. rhizopodus* (CAS08) เพียงไอโซเลตเดียวมาศึกษาต่อไป



รูปที่ 1 สาหร่ายทะเลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างใน 4 จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย ประกอบด้วย (A) *C. racemosa*, (B) *C. antennina,* (C) *C. crassa,*(D) *E. clarthrata*, (E) *E. intestinalis*, (F) *E. prolitera,* (G) *G. fisheri* และ (H) *Sargassum* sp.



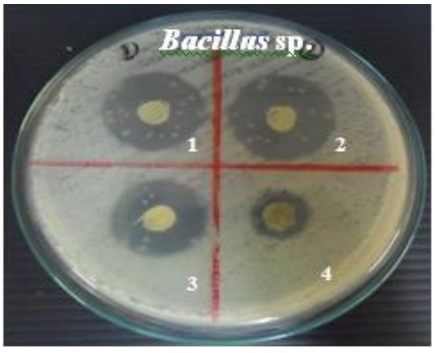
รูปที่ 2 สายพันธุ์ของราเอนโดไฟท์ที่จัดจำแนกได้

ตารางที่ 1 ผลของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดของราเอนโดไฟท์ *A. rhizopodus* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

ราเอนโดไฟท์	อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)					
		B. cereus	*Bacillus* sp.	*S. aureus* ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*S.* typhimurium (ESBL)
CAS05	PDA	+++	+++	+	-	-	-
	MEA	+	+	-	-	-	-
CAS07	PDA	++	++	+	-	-	-
CAS08	PDA	+++	+++	++	+++	++	++
	SDA	+++	+++	++	+++	+++	+++
	MEA	+++	+++	++	++	+++	-
	CMA	++	++	-	++	+++	-
CCK04	PDA	++	++	++	-	-	-
CCK06	PDA	+	+	+	-	-	-
CCK07	PDA	++	++	+	-	-	-
	SDA	++	++	-	-	-	-
GFP02	PDA	+	-	+	+		-
GFP04	PDA	+	+	+	-	-	-
GFP05	PDA	++	+	+	-	-	-
SG15	PDA	+++	++	+	-	-	-
	SDA	+++	+++		-	-	-
	MEA	++	++	-	-	-	-
	CMA	++	++	-	-	-	-

* อาหารที่ใช้เลี้ยงราเอนโดไฟท์ประกอบด้วย: Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) และ Corn Meal Agar (CMA) และอาหารที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียก่อโรค คือ nutrient agar (NA)

** Inhibition zone diameter index: +++ >10mm, ++ 5-10mm, + <5mm, - no zone (Mathan et al., 2013)



รูปที่ 3 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Bacillus* sp. ของราเอนโดไฟท์ *A. rhizopodus* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วย (1) PDA, (2) SDA, (3) MEA และ (4) CMA

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์

เมื่อนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดลำดับส่วนทั้ง 4 ส่วน ได้แก่ BE, BW, CE และ CM มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดรวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะจำนวนทั้งสิ้น 9 สายพันธุ์ เบื้องต้นด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัด BE และ CE สามารถยับยั้งแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 9 สายพันธุ์ รองลงมาคือ CM สามารถยับยั้งแบคทีเรียบางสายพันธุ์ และ BW ที่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ นอกจากนี้สารสกัดหยาบ BE และ CE สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะ (tetracycline ; positive control) โดยเฉพาะ CE สามารถยับยั้งแบคทีเรียดีที่สุด 3 สายพันธุ์ คือ *E. coli* ATCC 25922 (Clear zone = 38.65±0.03 มิลลิเมตร), *S. aureus* ATCC 25923 (Clear zone = 37.25±0.00 มิลลิเมตร), และ *S.* Weltevreden (ESBL) (Clear zone = 36.29±3.31 มิลลิเมตร) ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (P<.01) (ตารางที่ 2)

วิจารณ์ผลและสรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเลใน 4 จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดปัตตานี สงขลา สตูลและกระบี่ พบจำนวนสาหร่ายทะเล 8 สายพันธุ์ เมื่อนำมาคัดแยกราเอนโดไฟท์ พบจำนวนราเอนโดไฟท์จำนวนทั้งสิ้น 82 ไอโซเลต และพบราเอนโดไฟท์มากที่สุดในสาหร่ายสกุล *Enteromorpha* spp. จำนวน 26 ไอโซเลต รองลงมาคือสาหร่าย *Chaetomorpha* spp. จำนวน 16 ไอโซเลต ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Tanuttawongcharoen (2555) พบว่า สาหร่ายสกุล *Enteromorpha* spp. เป็นสาหร่ายทะเลที่มีการค้นพบมากและมีปริมาณมากที่สุดในประเทศไทย นอกจากนี้สาหร่ายดังกล่าวข้างต้นยังมีความพิเศษในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ทนต่อความเค็มในช่วงกว้าง ทนต่อสภาพน้ำน้อย และสามารถเจริญเติบโตบริเวณน้ำกร่อยได้ (Tanuttawongcharoen, 2555) ส่งผลทำให้ราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมากและหลากหลายชนิดในสาหร่ายชนิดนี้ เมื่อนำราเอนโดไฟท์มาจัดจำแนกด้วยวิธีสัณฐานวิทยาและอณูชีวโมเลกุล พบว่าราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ที่ได้จากการจำแนกเป็นกลุ่มราที่อยู่ในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) เช่น *Penicillum* spp. และ *Aspergillus* spp. บางกลุ่มจัด

ราชนิดนี้ให้อยู่ในไฟลัม Deuteromycota หรือ imperfect fungi ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีสภาวะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สาเหตุที่ยังไม่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ อาจเนื่องมาจากการสูญเสียความสามารถในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศไปในช่วงใดช่วงหนึ่งของการเจริญหรืออาจเป็นเพราะยังไม่พบสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thirunavukkarasu et al., (2011) ที่มีการพบราเอนโดไฟท์ในกลุ่ม imperfect fungi ได้แก่ *Alternaria* sp. *Aspergillus* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus Fusarium* sp. *Penicillium* sp.1 และเป็นราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกมาจากสาหร่ายทะเล อาทิเช่น *Caulerpa racemosa*, *Sargassum* sp. *Ulva lactuca* และ *Gracilaria edulis* นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์ข้างต้นมีความสามารถผลิตสาร secondary metabolites บางชนิดที่มีประโยชน์ เช่น สารปฏิชีวนะและสารกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโต ส่วนงานวิจัยนี้จะเน้นประโยชน์ฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ด้วยการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 2 วิธี คือ วิธีแรก Agar plug diffusion โดยนำแบคทีเรียทดสอบมา swab ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) จากนั้นนำชิ้นวุ้นของราเอนโดไฟท์มาวางทับลงบนอาหารแข็ง NA บ่มไว้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราหรืออีกวิธีที่หนึ่ง Agar well diffusion วิธีการนี้จะเตรียมสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ขึ้นมาก่อน จากนั้นนำสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์มาทดสอบกับแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งมีวิธีการทดสอบคล้ายคลึงกับ Agar plug diffusion

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *S.* Weltevreden, *E.coli* และ *S.aureus* จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ *A. rhizopodus* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Concentration of crude extract (mg/ml)	Clear zone diameter (mm)								
	S. weltevreden (ESBL)			*E.coli* ATCC 25922			*S.aureus* ATCC 25923		
	control	Broth EtOAc	Mycelium EtOAc	Control	Broth EtOAc	Mycelium EtOAc	Control	Broth EtOAc	Mycelium EtOAc
0.2	4.05±0.01	11.63±2.37	10.77±2.50	17.65±0.01	13.02±0.02	21.58±2.51	7.01±0.01	12.34±1.58	25.02±6.34
0.4	5.84±0.02	13.76±0.22**	25.38±6.40**	19.34±0.02*	18.64±0.93	24.98±0.32*	7.52±0.02*	15.23±1.66*	29.35±2.90
0.6	9.92±0.04**	23.13±1.24**	29.55±2.76	20.64±0.01	24.30±1.13	34.93±0.39	9.51±0.01	21.25±0.14	33.58±5.41
0.8	10.95±0.07**	22.88±5.13**	34.25±4.74**	20.16±0.01	31.70±4.81*	37.10±0.07*	12.23±0.01	24.42±0.60	37.85±0.64
1.0	11.59±0.02**	24.99±0.01**	36.29±3.31**	24.64±0.02**	31.14±0.01**	38.65±0.03**	13.84±0.01**	24.65±0.00**	37.25±0.00

เครื่องหมาย (*) และ (**) แสดงว่ามีความความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<.05) และ 99% (P<.01) , แสดง Control = ยา tetracycline, Broth EtOAc =สารสกัดหยาบส่วนน้ำเลี้ยงสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตท, Mycelium EtOAc = สารสกัดหยาบส่วนเส้นใยสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตท

จากผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 วิธี ข้างต้น ทำให้ได้ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ *A. rhizopodus* เป็นราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะจำนวนทั้งสิ้น 9 สายพันธุ์ และสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าชุดควบคุมถึง 3 สายพันธุ์ ; *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 และ *S.* Weltevreden (ESBL) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Buapet (2006) ที่ได้นำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเหง้าขมิ้นชันมาทดสอบยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ปรากฏว่าสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งแบคทีเรียดีที่สุด คือ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Khan (2010) ได้นำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์คัดแยกจากพืชสมุนไพรมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งผลของสารสกัดหยาบแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค คือ *B. subtilis, S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *S.* Typhimurium และยังทำให้เกิดขนาด Clear zone ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะบางชนิด อาทิเช่น polymyxin B, streptomycin และ tetracycline (Khan, 2010) ราเอนโดไฟท์มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ และสามารถสร้างสารที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นกลไกการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือยับยั้งการสร้างโปรตีนและการทำงานของเอนไซม์ของแบคทีเรีย ด้วยขบวนการสร้างสารปฏิชีวนะหรือสารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้

ดังนั้นจึงมีการนำราเอนโดไฟท์สกัดเอาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาเป็นสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เนื่องจากสารเหล่านั้นเป็นสารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช และเป็นสารที่มีความจำเพาะเจาะจง ต้องไม่เป็นผลเสียต่อร่างกายหรือมีผลข้างเคียงน้อยที่สุด (Hiranrat, 2009) และแนวโน้มพัฒนามาแปรรูปให้เป็นส่วนประกอบของยาที่ใช้รักษาโรคต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ปีการศึกษา 2559 คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ส่งเสริมและสนับสนุนแหล่งเงินทุนการวิจัยในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ธีรยุทธ เกษมสันต์ ศุภารัตน์ สุทธิมุสิก และมณฑล เลิศวร-ปรีชา. (2558). การตรวจคัดกรองเชื้อ *Salmonella enterica* จากตัวอย่างอุจจาระสุกร ในจังหวัดพัทลุงที่สร้างเอนไซม์ Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL). ใน: การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53, กรุงเทพฯ. 1-1595.

ภิรุญ มุตสิกพันธ์. (2552). สถานการณ์เชื้อแบคทีเรียดื้อยาในประเทศไทย. แหล่งข้อมูล : http:// kb.hsri.or.th/สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.)/researchreports ค้นเมื่อวันที่ 18 มกราคม 2560.

เสาวนิตย์ ชอบบุญ. (2550). การจำแจกราเส้นสายที่พบในอาหารและอากาศ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. หน้า 1-132

Buapet, P. (2006). Bioctive secondary metabolites from endophytic fungi (*Fusarium equiseti*) from *Curcuma longa* Rhizomes. M.Sc. biotechnology, faculty of science, Chula-longkorn University. Bangkok: 1-173 (in Thai).

del Val, A.G., Platas., G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., Vicente, F., Portillo, E., del Rio, M.J., Reina, G.G., and Pelaez, F. (2001). Screening of antimicrobial activities in red, green and brow macro-

algae from Gran Canaria (Canary lslands Spain). International Microbiology 4, 35-40.

Hiranrat, W. (2009). Bioactive compound from endophytic fungi. Journal of Thaksin 12(2): 90-100 (in Thai).

Kaewkrajay, C., Dethoup, T. and Sathitpanawong, L. (2014). Efficacy of endophytic fungi isolated (*Sesbania Javanica*) against plant pathogenic fungi. Journal of Khon Kaen Aer. 42(3): 271-282 (in Thai).

Khan, R. (2010). Bioactive metabolites of endophytic fungi from madicinal plant. lap lambert academic publishing. 92-94.

Mathan, S., Subramanian, V., Nagamony, S. And Ganapathy, K. (2013) Isolation of endophytic fungi marine algae and its bioactivity. Resiearch in Pharmaceutical Sciences 4(1): 45-49.

Phooyadao, M. (2010). Isolation and elucidation of compound(s) from endophytic fungi LI. M. Ed. chemistry, Graduate School, Srinakharinwirot University. Bangkok: 1-82 (in Thai).

Sandhu, S.S., Kumar, S., and Aharwal, R.P. (2014). Isolation and identification of endophytic fungi from *Ricinus communis* linn. and their antibacterial activity. International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry 4(3): 661-618.

Suryanarayanan, T.S., Venkatachalam, A., Thirunavukkarasu, N., Ravishankar, J.P., Doble, M., and Geetha, V. (2010). Internal mycobiota of marine macroalgae from the Tamilnadu coast: distribution, diversity and biotechnological potential. Botanica Marina 53: 457-468.

Tanuttawongcharoen, R. (2012). Flavoring agent and antioxidant agent from hydrolyzed *Ulva intestinalis* protein M.sc., biochemical technology, Faculty of Bioresources and Technology. Bangkok: 1-157 (in Thai).

Thirunavukkarasu, N., Suryanarayanan, T.S., Murali, T.S., Ravishankar, J.P., and Gummadi, S.N. (2011). L- asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds. Mycosphere 2(2): 147-155.

Villarreal-Gomez, L.J., Soria Mercado, I.E., Guerra-Rivas, G., and Ayala-Sanchez, N.E. (2010). Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. Revista de Biologia Marina Oceanografia 45(2): 267-275.

❑❑❑❑❑