บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *H. scutata* และการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

มีรายงานการค้นพบราแมลง *H. scutata* เป็นครั้งแรกที่ประเทศสิงคโปร์ โดย Petch (1921) หลังจากนั้นก็ไม่มีรายงานเกี่ยวกับราชนิดนี้อีกเลย จนกระทั่ง Sivichai และ Hywel-Jones (1999) สำรวจพบราแมลง *H. scutata* ในประเทศไทยครั้งแรก บนใบพืชสกุล *Syzygium* spp. ที่บริเวณศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร อำเภอสุไหงโกลก จังหวัดนราธิวาส และ Srichan (2003) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อรา *H. scutata* บริเวณแปลงปลูกต้นหว้าหิน (*S. tumida*) และหว้าน้ำ (*S. oblatum*) ในเขตป่าพรุสิรินธร สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *H. scutata* ได้จำนวน 46 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 31 isolates คิดเป็นร้อยละ 67.39 ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการแยกเชื้อราชนิดนี้ โดย Srichan (2003) ที่สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 45 isolates จากตัวอย่าง stroma ของเชื้อรา *H. scutata* ที่เจริญเต็มที่ (mature stroma) จำนวน 97 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 46.39 การที่สามารถแยกเชื้อได้สูงกว่านั้น อาจเนื่องมาจากในการศึกษาครั้งนี้คัดเลือกเฉพาะ ตัวอย่าง stroma ของเชื้อรา *H. scutata* ที่สดและเจริญเต็มที่ และทำการแยกเชื้อภายในวันที่เก็บตัวอย่าง ในห้องปฏิบัติการ จึงลดการปนเปื้อนจากเชื้อราชนิดอื่นได้ *H. scutata* เจริญได้ช้ามากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หากมีการปนเปื้อนเชื้อราชนิดอื่นที่เจริญเร็วกว่า จะไม่สามารถแยกเชื้อได้

จำนวนราแมลง *H. scutata* ที่พบตามธรรมชาตินั้นมีความแตกต่างกัน ปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนราแมลงตามธรรมชาติ คือ จำนวนแมลง และสภาวะแวดล้อม เช่น ในแต่ละฤดูกาล มีความแตกต่างของอุณหภูมิอากาศ ปริมาณน้ำฝน ความเข้มแสง และความชื้น

(Wolfe, 1981 อ้างโดย Moore-Landecker, 1996) ปัจจัยเหล่านี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และการแพร่กระจายของเชื้อรา *H. scutata* เช่นเดียวกัน การเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อครั้งนี้ ได้เก็บในเดือนกรกฎาคม 2545 ซึ่งเป็นช่วงฤดูร้อน ฝนไม่ตก ความชื้นสัมพัทธ์น้อย จึงพบตัวอย่างเชื้อรา *H. scutata* น้อย ประมาณ 2-3 ตัวอย่างต่อต้น ได้ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างอีกครั้งในเดือนกุมภาพันธ์ หลังฤดูฝน พบตัวอย่างเชื้อราเป็นจำนวนมาก ในบางต้นพบมากกว่า 100 ตัวอย่างต่อกิ่ง นอกจากนี้ Srichan (2003) ได้ทำการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อรา *H. scutata* บนต้นหว้าหินและหว้าน้ำ พบว่าโอกาสการพบเชื้อนี้บนต้นหว้าหินมีมากกว่าบนต้นหว้าน้ำ และระดับของกิ่ง (สูง, กลาง และต่ำ) มีโอกาสการพบเชื้อได้เท่ากัน แต่ในทางปฏิบัตินั้นการเก็บตัวอย่างบนกิ่งระดับสูง ทำได้ยากกว่า แม้ว่า stroma จะมีสีสดใส แต่ก็มีขนาดเล็ก และจะอยู่ที่ด้านบนของใบพืช ทำให้สังเกตเห็นได้ยากกว่ากิ่งที่อยู่ระดับต่ำหรือระดับกลาง ที่สามารถมองเห็นด้านบนของใบพืชได้

2. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *H. scutata*

Stroma ของเชื้อรา *H. scutata* พบอยู่ด้านบนของใบหว้าหิน และหว้าน้ำ มีสีส้มเหลืองส้ม รูปร่างกลม ขอบบางตรงกลางนูน ลักษณะคล้ายโล่ หรือเม็ดกระดุม จึงสามารถมองเห็นได้ชัดเจนบนใบพืช stroma ที่เจริญเต็มที่มีขนาดประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร บริเวณขอบบางเป็นที่อยู่ของ perithecia ภายในบรรจุ ascospores จำนวนมาก สามารถมองเห็นบริเวณปากเปิดของ perithecia ด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน มีลักษณะเป็นจุดเล็กๆ มีจำนวนมาก ซึ่งจะพบเฉพาะ stroma ที่เจริญเต็มที่แล้วเท่านั้น ทำให้สามารถคัดเลือก mature stroma สำหรับการแยกเชื้อได้ง่าย ส่วน stroma ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (young stroma) จะไม่เห็นบริเวณปากเปิดของ perithecia จากการนำ stroma มาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด ผิวบนของ stroma พบจุดเล็กๆ เป็นบริเวณปากเปิดของ perithecia และจาก stroma ที่ทำการตัด section ตามขวางพบ perithecia มีรูปร่างคล้ายขวดก้นกลม (flask-shaped) ภายในมี ascospores รูปร่างรี (Srichan, 2003) ลักษณะแตกต่างกับที่ Petch (1921) ได้บรรยายไว้ (ตารางที่ 10)

เชื้อรา *H. scutata* ที่แยกได้บนอาหาร PDA มีลักษณะโคโลนีในแต่ละ isolates คล้ายๆ กัน คือมีรูปร่างโคโลนีค่อนข้างกลม นูนไม่สม่ำเสมอ ช่วงแรกของการเจริญอาจสังเกตเห็นเส้นใยเล็กๆ จำนวนมาก หลังจากนั้นเส้นใยเหล่านี้จะอัดแน่นเป็นโคโลนีแข็ง ในบาง isolates พบเส้นใยบางส่วนเจริญแทรกในเนื้อวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อแผ่กระจายรอบๆ โคโลนี ลักษณะเช่นนี้มีการเจริญเติบโตเร็วกว่าปกติ โดยปกติเชื้อรา *H. scutata* จะเจริญเติบโตช้ามากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 4-6 มิลลิเมตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเชื้อรา *H. scutata* บาง isolates สร้างสารสีส้มแดง ปล่อยออกมารอบๆโคโลนี สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนเป็นวงแคบๆ

หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้โคโลนี กลม แข็ง แต่ขณะเตรียมตัวอย่าง พบว่ามีของเหลวใสอยู่ในโคโลนี ตรงกลางโคโลนีจะมีลักษณะนิ่ม เมื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด พบลักษณะของขนาดเส้นใยแตกต่างกันทั้ง 3 ตำแหน่ง เนื่องมาจากอายุของเส้นใยในแต่ละตำแหน่งแตกต่างกัน เส้นใยที่มีอายุมากจะมีขนาดใหญ่และเริ่มมีการสลายตัวของผนังเซลล์เส้นใย แต่เส้นใยที่เกิดใหม่จะมีขนาดเล็กและมีลักษณะยืดยาวออกไปผนังเซลล์เรียบ การสร้างโคนิเดียสามารถพบได้ทั้ง 3 ตำแหน่ง แต่มีลักษณะและปริมาณที่แตกต่างกัน โดยตรงกลางโคโลนีจะพบโคนิเดียเป็นจำนวนมากอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และโคนิเดียส่วนใหญ่จะหลุดออกจาก conidiophores แล้ว แต่บริเวณขอบโคโลนีจะพบโคนิเดียปริมาณที่น้อยกว่าและโคนิเดียที่พบจะอยู่ติดกับก้าน conidiophores ที่เป็นเช่นนี้เพราะเส้นใยในแต่ละระยะมีอายุไม่เท่ากัน และเชื้อรา *H. scutata* เป็นเชื้อที่มีการเจริญเติบโตช้ามาก โคโลนีที่นำมาศึกษานี้มีอายุถึง 8 สัปดาห์ ทั้ง 3 ตำแหน่งของโคโลนีที่นำมาศึกษาจึงมีความต่างของอายุเส้นใยมากพอสมควร ทำให้เกิดความแตกต่างของเส้นใย และโคนิเดียที่พบอย่างชัดเจน

ลักษณะโคนิเดียที่พบ มีรูปร่างรี ปลายด้านหนึ่งกลมมน ขนาด 1-1.5×5-6 ไมโครเมตร เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อราในสกุล *Hypocrella* ด้วยกัน พบว่าลักษณะโคนิเดียมีความแตกต่างจากเชื้อราในสกุลนี้ เช่น เชื้อรา *H. discoidea* จะมีโคนิเดียรูปร่าง

รีหัวท้ายแหลม คล้ายกระสวย (fusiform) ขนาด 7-12 ไมโครเมตร (Hywel-Jones and Evans, 1993, Srichan, 2003) และจากการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยา โดย Srichan (2003) พบว่าเชื้อรา *H. scutata* SSC57 จัดอยู่คนละกลุ่มกับ *H. discoidea* ซึ่งเป็น type strain และเสนอแนะว่าเชื้อรา *H. scutata* ไม่น่าจะจัดอยู่ใน genus *Hypocrella* อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษา phylogeny ของเชื้อรา *H. scutata* อย่างละเอียดเพื่อยืนยันผลต่อไป

ตารางที่ 10 ลักษณะของเชื้อรา *H. scutata*

Table **10** The characteristics of *H. scutata*

Characteristics	Details
shape and texture of stroma	flattened convex, up to 2 mm. thick in centre, margin acute or obtuse, surface even, glabrous, resinous, fractures vitreous, hypothallus (when present), membranous, translucent; lower surface flat.
colour of stroma	bright ochraceous orange when fresh pale brown, red-brown ostioles to dark brown with aging, lower surface translucent yellow-brown with central yellowish opaque spot with radiating anastomosing yellow lines.
perithecia	rather deeply sunk, flask-shaped or laterally compressed, up to 0.8 mm. deep.
asci	cylindric, 400-500×8-10 µm.
part-spores	cylindric with rounded ends, 3-6×1.5 µm.
distribution	Malaysia, Singapore, Philippines, Thailand.
synonyms	*Hypocrea scutata*
conidia	fusiform

ที่มา: Petch (1921)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเชื้อรา *H. scutata* จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษามีความสำคัญทางการแพทย์ โดยก่อให้เกิดโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อย และเชื้อราชนิดเส้นใยบางชนิดที่เป็นปัญหาในการปนเปื้อน จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบเป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มดังนี้ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* ATCC25923 สายพันธุ์มาตรฐานที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ และ Methicillin-resitant *S. aureus* (MRSA) SK1 เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาในกลุ่มเพนนิซิลิน แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 สายพันธุ์มาตรฐานที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ เชื้อยีสต์ ได้แก่ *C. albicans* NCPF3153 สายพันธุ์มาตรฐาน และ *C. neoformans* PSU ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล ส่วนเชื้อราชนิดเส้นใยที่เป็นเชื้อก่อโรค 2 ชนิด ได้แก่ *M. gypseum* เป็นเชื้อโรคกลากที่พบได้ทั่วๆ ไป ทำให้เกิดโรคกลากที่ศีรษะ หนวดเครา ลำตัว แขนขา ในร่มผ้าและที่เท้า เชื้อราชนิดนี้ชอบเคอราติน (keratinophilic fungi) และ *P. marneffei* ซึ่งก่อโรคติดเชื้อในร่างกายกับหลายอวัยวะ เช่น ต่อมน้ำเหลือง ไขกระดูก ตับ ปอด กระดูก เป็นต้น มักพบในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานบกพร่อง ผู้ป่วยโรคเอดส์ และเชื้อราอีก 7 ชนิด ได้แก่ *A. flavus, A. niger, Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Cladosporium* sp. *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. สามารถพบได้ทั่วไปและก่อปัญหาการปนเปื้อนในแหล่งต่างๆ

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเชื้อรา *H. scutata* เบื้องต้นนั้นได้ใช้วิธี agar diffusion โดยเจาะวุ้นรอบๆโคโลนีของเชื้อรา *H. scutata* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 4 สัปดาห์มาทดสอบ เนื่องจากเชื้อรา *H. scutata* จะสร้างสารและปล่อยออกมารอบๆโคโลนี จากการสังเกตพบการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่นในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. scutata* และเกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ปนเปื้อนบริเวณรอบโคโลนีของเชื้อรา *H. scutata* จึงแน่ใจว่าเชื้อรา *H. scutata* สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยั้บยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ จึงได้ทำการทดสอบโดยการเจาะวุ้นรอบๆโคโลนีเชื้อรา *H. scutata* มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกมาทดสอบในเบื้องต้น เพื่อคัดเลือกเชื้อรา *H. scutata* ที่สามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์ไปศึกษาขั้นต่อ

ไป การทดสอบโดยวิธี agar diffusion นั้น มีข้อดี คือ เป็นวิธีการที่สะดวก สามารถเห็นผลการทดสอบได้ชัดเจน วิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน เป็นวิธีที่เหมาะกับการทดสอบในเบื้องต้นกับสารที่สามารถละลายน้ำและแพร่ซึมในวุ้นได้ ซึ่งสารที่ *H. scutata* สร้างสามารถแพร่ซึมในวุ้นได้

เชื้อรา *H. scutata* ทั้ง 34 isolates ที่นำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์นั้น พบว่า 25 isolates คิดเป็นร้อยละ 73.53 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราชนิดเส้นใยบางชนิดได้แก่ *M. gypseum, Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. โดยมีจำนวน 18 isolates คิดเป็นร้อยละ 52.94 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. gypseum* ได้ และ 1 isolate คิดเป็นร้อยละ 2.94 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ และมีเชื้อรา *H. scutata* 6 isolates คิดเป็นร้อยละ 17.65 ที่ยับยั้งได้ทั้ง *M. gypseum*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. แต่ไม่พบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่นำมาทดสอบ ได้คัดเลือกเชื้อรา *H. scutata* จำนวน 4 isolates คือ SSC18, P30, P36 และ P37 ซึ่ง SSC18 และ P36 ให้ผลในการยับยั้งเชื้อรา *M. gypseum*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ดี สำหรับ P30 และ P37 ให้ผลในการยับยั้งเชื้อราได้ดีรองลงมา ซึ่งสังเกตจากระยะห่างของ inhibition zone ระหว่างวุ้นที่เจาะมาทดสอบกับปลายเส้นใยราที่ทดสอบ

4. การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา *H. scutata*

หลังจากได้คัดเลือกเชื้อรา *H. scutata* จำนวน 4 isolates ได้แก่ SSC18, P30, P36 และ P37 แล้ว จึงทำการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* ทั้ง 4 isolates นี้ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด คือ PDA, PDA+YE, PuDA, PuDA+YE, GYM และ SPDA

อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นอาหารที่นิยมใช้ในการแยกและเลี้ยงเชื้อรา เชื้อราหลายชนิดให้ผลการเจริญดีบนอาหาร PDA จากรายงานการแยกและเลี้ยงเชื้อราแมลงชนิดต่างๆ โดย Hywel-Jones (2002) และเชื้อราในวงศ์ Clavicipitaceae ตัวอย่างเช่น *A. tubulata, A. samoensis, H. discoidea*, *H. gaertneriana, H. schizostachyi* และ

H. africana ก็นิยมเลี้ยงบนอาหาร PDA (Hywel-Jones and Evans, 1993, Hywel-Jones and Samuels, 1998, Boonphong *et al.,* 2001) ในตัวแมลง มีองค์ประกอบของโปรตีนสูง (Samuels and Paterson, 1995, Moore-Landecker, 1996, Hywel-Jones, 2002) จึงได้เติม yeast extract ซึ่งเป็นแหล่งของโปรตีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาการเจริญในครั้งนี้ และจากรายงานการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *H. raciborskii* และ *A. placenta* โดย Ibrahim และคณะ (1993) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิดคือ ฟักทอง มะละกอ มันเทศ และหัวไชเท้า พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำจากฟักทอง ให้ผลการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ดีที่สุดและรองลงมาเป็น มะละกอ กับมันเทศ จึงได้เลือกฟักทองและมันเทศมาศึกษาการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* ในครั้งนี้ด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีวัดการเจริญเติบโต โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *H. scutata* ที่เจริญบนอาหารแข็งทุกๆสัปดาห์เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์เพราะเชื้อรา *H. scutata* จะเจริญช้ามากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *H. scutata* ทั้ง 4 isolates สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิดที่นำมาทดสอบ และบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลการเจริญดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี อยู่ในช่วง 16.77–9.07 มิลลิเมตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Srichan (2003) ที่ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* SSC32, SSC33 และ SSC47 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ PDA, malt extract agar (MA), glucose yeast extract agar (GYA) และ corn meal agar (CMA) โดยพบว่าบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลการเจริญดีที่สุดเช่นกัน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลการเจริญรองลงมาคือ SPDA, GYM และ PuDA จากข้อมูลของกองโภชนาการ (2535) แสดงคุณค่าอาหารของมันฝรั่ง ซึ่งประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 14.9, โปรตีนร้อยละ 2.5, ไขมันร้อยละ 0.2, แคลเซียมร้อยละ 0.016, เหล็กร้อยละ 0.0017 และ ไนอาซินร้อยละ 0.001 สำหรับมันเทศประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 22.5, โปรตีนร้อยละ 0.6, ไขมันร้อยละ 0.098, แคลเซียมร้อยละ 0.00076 และไนอาซินร้อยละ 0.0005 ส่วนของฟักทอง มีคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 24.6, โปรตีนร้อยละ 2.9 และไขมันร้อยละ 1.5 ไม่มี

รายงานของแร่ธาตุและวิตามินต่างๆในฟักทองจากส่วนเนื้อที่ปอกเปลือกออก จากข้อมูลทั้งหมดที่มีอยู่ขณะนี้ ยากที่จะสรุปความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารอาหารต่อการเจริญของเชื้อราแมลงได้ การเจริญและปริมาณความต้องการสารอาหารของราแมลงยังคงไม่มีข้อมูลที่ ชัดเจน (Deacon, 1997) นอกจากสารอาหารหลัก (คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน และไขมัน) แล้ว แร่ธาตุและวิตามินต่างๆ เป็นสิ่งจำเป็น มีความสำคัญกับ basic cellular metabolism จากรายงานของ Ibrahim และคณะ (1993) พบว่า *H. raciborskii* และ *A. placenta* เจริญและสร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำจากฟักทองได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำจากมันเทศ อย่างไรก็ตามปริมาณสารอาหารในฟักทองและมันเทศที่ Ibrahim และคณะ (1993) อ้างถึง มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 4.6 และ 28.2 และโปรตีนร้อยละ 1.4 และ 1.2 ตามลำดับ และกล่าวว่า ปริมาณโปรตีนที่สูงอาจมีผลต่อการสร้างสปอร์ ซึ่งปริมาณโปรตีนในมันฝรั่งและในฟักทองของไทย มีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ *H. scutata* เจริญในมันฝรั่งได้ดีกว่าในฟักทอง นอกจากนี้ ในมันเทศมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าในฟักทอง แต่ *H. scutata* ยังสามารถเจริญได้ดีกว่า ทั้งนี้อาจเป็นผลจากปริมาณแร่ธาตุและวิตามินในมันฝรั่งและมันเทศ ซึ่งสูงกว่าในฟักทอง อย่างไรก็ตามในอาหาร PDA และ PuDA ที่เติม yeast extract ซึ่งมีปริมาณวิตามินสูง กลับพบว่าไม่ได้ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อราให้มากขึ้น Hywel-Jones และ Evans (1993) กล่าวว่า ถึงแม้เชื้อราในกลุ่ม *Hypocrella* จะจัดอยู่ในกลุ่มพิเศษของพวกราแมลง ที่เป็น obligate pathogens แต่ก็สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทั่วไป โดยไม่ต้องเติมสารอาหารพิเศษ การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาถึงผลของ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของเชื้อรา เนื่องจากรากลุ่มนี้สามารถปรับตัวให้ทนต่อ pH ได้กว้าง และช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์และการเจริญของราแมลงอยู่ระหว่าง 5.0-6.0 (Ibrahim *et al.*, 1993) ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้มี pH 5.6

ในธรรมชาติที่สำรวจเก็บตัวอย่างเชื้อรา *H. scutata* พบว่าเชื้อจะอยู่ด้านบนของใบหว้าหินและหว้าน้ำ ซึ่งสัมผัสกับแสงแดดช่วงกลางวันโดยตรง มีอุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส เพราะฉะนั้น เชื้อน่าจะสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง จึงนำมาศึกษาการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส จากผลการ

ทดลอง พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้เลยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส Artjariyasripong (1999) พบว่าเชื้อรา *H. discoidea* และ *Aschersonia samoensis* จะเจริญช้ามากที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราทั้งสองนี้คือที่ 25 องศาเซลเซียส คล้ายกับ Srichan (2003) ซึ่งพบว่าเชื้อรา *H. scutata* and *H. schizostachyi* มีการเจริญช้ามากที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* อยู่ในช่วง 20-25 องศาเซลเซียส Hywel-Jones (2002) กล่าวว่า ราแมลงไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 28 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของราแมลงส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 20-25 องศาเซลเซียส (Boonphong *et al.,* 2001, Isaka *et al.,* 2001, Hywel-Jones, 2002) ดังนั้นเชื้อนี้ในธรรมชาติอาจหยุดการเจริญชั่วคราว ในเวลากลางวัน ที่อุณหภูมิสูง การเจริญส่วนใหญ่น่าจะเกิดในเวลากลางคืน ที่อุณหภูมิลดต่ำลง

5. การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาในการเลี้ยงต่อการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อรา *H. scutata*

มีรายงานการวิจัยเลี้ยงเชื้อราแมลงเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ได้แก่ Czapek-dox broth (Difco) (Krasnoff *et al.,* 1996), minimum salt medium (Isaka *et al.,* 2001) จึงได้นำอาหารทั้งสองนี้มาศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อรา *H. scutata* ในครั้งนี้ ร่วมกับอาหาร PDB ซึ่งให้ผลการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* ดีที่สุดจากการทดลองที่ผ่านมา สำหรับเปลือกกุ้งที่ผสมใน PDB เนื่องจากในธรรมชาติ เชื้อรา *H. scutata* เจริญบนแมลงตัวแมลงมีองค์ประกอบของไคติน ซึ่งอาจจะส่งเสริมการสร้างสารสำคัญบางชนิด จึงใช้เปลือกกุ้งเป็นแหล่งของไคตินที่ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในการศึกษาครั้งนี้ ด้วย

ในการศึกษาเบื้องต้นโดยการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร และเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเชื้อราเจริญเติบโตได้น้อยมาก จึงเปลี่ยนมาเป็นการเลี้ยงแบบไม่เขย่า และลดปริมาตรของอาหารลงเหลือ 50 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เนื่องจากชิ้นส่วนของเชื้อ

จากโคโลนี จะติดกันแน่นเป็นก้อน และตกลงที่ก้น flask ถ้าใส่อาหารมากเกินไปอากาศจะแพร่ผ่านอาหารไปถึงเชื้อได้น้อยลง

จากผลการทดลอง เชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหาร PDB รองลงมาเป็น CDB และ MSM สำหรับอาหาร PDB+เปลือกกุ้ง ให้การเจริญต่ำสุด chitin 1 % ที่เติมลงไปใน PDB เป็นตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อรา มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับสมบัติของไคโตแซนที่เป็นอนุพันธ์ของไคตินในเปลือกกุ้ง พบว่าไคโตแซนมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Roller and Covill, 1999) ในการศึกษาครั้งนี้ พบการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อรา *H. scutata* หลังจากที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ คล้ายกับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราแมลงชนิดอื่นๆ ที่ต้องเลี้ยงเป็นเวลา 21-29 วัน (Krasnoff *et al.,* 1996, Boonphong *et al.,* 2001, Isaka *et al.,* 2001) และเมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบมีการสร้างสารต้านจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ในสัปดาห์ที่ 12 สามารถพบการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM จากเชื้อ *H. scutata* 2 isolates คือ SSC18 และ P36 แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CDB ไม่พบการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ทั้งที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อรา *H. scutata* มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ดังนั้น ในการทดลองถัดไปเป็นการเลี้ยงเชื้อรา *H. scutata* เพื่อนำมาสกัดสารต้านจุลินทรีย์ จะทำการเลี้ยงเชื้อรา *H. scutata* ในอาหาร PDB เป็นเวลา 8 สัปดาห์ คัดเลือกเชื้อรา *H. scutata* จำนวน 2 isolates คือ SSC18 และ P36 ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้ดี

6. การเลี้ยงเชื้อรา *H. scutata* เพื่อนำมาสกัดสารและการสกัดสาร

จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่าปริมาณเชื้อรา *H. scutata* ที่เจริญในอาหารเหลวน้อยมาก เพราะเชื้อรา *H. scutata* มีการเจริญช้าและเชื้อเจริญเกาะที่ก้น flask เป็นส่วนใหญ่ ปริมาณอาหารที่ใช้ (50 มิลลิลิตร) มากเกินความต้องการของเชื้อ และยังมีผลต่อการเจือจางของสารต้านจุลินทรีย์ที่เชื้อรา *H. scutata* ผลิตออกมา ในการทดลองนี้จึงได้ปรับเปลี่ยนไปใช้ขวดแบน ใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 20 มิลลิลิตร วางขวดในลักษณะนอน ความสูงของอาหารเพียง 5-7 มิลลิเมตร เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศ เพราะเชื้อรา *H. scutata* ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต ข้อดีของการใช้ขวดแบนใน

การเลี้ยงเชื้อในครั้งนี้ คือ ขวดแบนมีปากขวดแคบช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ เนื่องจากต้องใช้เวลานานถึง 8 สัปดาห์ในการเลี้ยงเชื้อรา *H. scutata* และสามารถวางซ้อนกันได้ ไม่เปลืองเนื้อที่ พบว่าวิธีการนี้เชื้อเจริญได้ดี สังเกตได้จากลักษณะของเส้นใยที่เจริญเป็นกลุ่มเล็กๆ ทั่วผิวขวด

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *H. scutata* SSC18 และ P36 ในอาหาร PDB ครบ 8 สัปดาห์ ได้นำมากรองแยกส่วนมวลชีวภาพออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท และบิวธานอล ซึ่งแยกสารออกมาได้ตามลำดับขั้ว สำหรับการสกัดส่วนมวลชีวภาพใช้ตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท และเมธานอล แต่ก่อนสกัดต้องทำให้เซลล์แตก ด้วยวิธีการแช่เซลล์ในไนโตรเจนเหลวแล้วนำมาบด ทำให้สามารถสกัดสารออกมาได้ง่ายขึ้น จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาหาร้อยละของสารสกัด พบว่าร้อยละของสารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตททั้งส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อและส่วนมวลชีวภาพ อยู่ในช่วง 0.01–4.0 สำหรับร้อยละของสารสกัดด้วยบิวธานอลจากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 0.04 และ 0.08 ซึ่งถือว่าน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละของสารสกัดด้วยเมธานอลจากส่วนของมวลชีวภาพของ SSC18 และ P36 เป็น 2.03 และ 2.29

จากการนำสารสกัดที่ได้มาตรวจสอบบนโครมาโทกราฟีแผ่นบาง พบว่าสารสกัดทั้งหมดไม่แสดงโครมาโทแกรมที่มีการแยกของสาร เมื่อตรวจสอบด้วยตาเปล่าหรือภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรได้ อย่างไรก็ตามสารที่สกัดด้วย เอธิลอะซิเตทและบิวธานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้ง *M. gypseum* แต่ไม่ยับยั้ง *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการสกัด เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี disc diffusion พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *M. gypseum*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. เมื่อนำมาทำให้แห้งโดยเครื่อง Freeze dryer ได้ร้อยละของสารจาก SSC18 และ P36 เท่ากับ 0.05 และ 0.05 ตามลำดับ และเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านราอีกครั้ง พบว่าสามารถยับยั้ง *M. gypseum*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ดี แสดงว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านรา เป็นสารที่มีขั้วสูง และอยู่ในชั้นน้ำ ดังนั้นจึงได้นำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการสกัดมาทำให้แห้งได้ร้อยละของสารจาก SSC18 และ P36 เท่ากับ 0.38

และ 0.35 ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ พบว่าสามารถยับยั้ง *M. gypseum*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุด

7. การทดสอบฤทธิ์ของสารที่สกัดได้จากเชื้อรา *H. scutata* SSC18 และ P36

จากผลการทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (เอธิลอะซิเตท, บิวทานอล และเมธานอล) ทั้งจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อและมวลชีวภาพของเชื้อรา *H. scutata* SSC18 และ P36 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. gypseum* เล็กน้อย และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp.ได้ แต่สารที่ได้จากการระเหยแห้งของส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อรา *H. scutata* ทั้ง 2 isolates ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. gypseum*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ชัดเจนกว่า จึงนำสารทั้ง 12 สารมาทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* และสารส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อระเหยแห้งต่อเชื้อ *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. โดยวิธี broth microdilution ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบหาค่า MIC ของ NCCLS ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 8 สาร ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* ค่อนข้างสูงอยู่ในช่วง 625-2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารที่ได้จากการระเหยแห้งส่วนน้ำเลี้ยงที่ผ่านการสกัดของ SSC18 ให้ค่า MIC ต่อเชื้อราทั้ง 4 ชนิด เท่ากับ คือ 64, 64, 32 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับ P36 ให้ค่า MIC ต่อเชื้อราทั้ง 4 ชนิด เท่ากัน คือ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารที่ได้จากการระเหยแห้งส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านการสกัดนั้นให้ค่า MIC ดังนี้ SSC18 ให้ค่า MIC ต่อเชื้อราทั้ง 4 ชนิด เท่ากับ 64, 32, 16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนของ P36 ให้ค่า MIC ต่อเชื้อราทั้ง 4 ชนิด เท่ากับ 128, 64, 128 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าสารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แต่สูงกว่าค่า MIC ของยามาตรฐาน miconazole ซึ่งให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* และ *Cladosporium* sp. เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามสารที่นำมาทดสอบในครั้งนี้เป็นเพียงสารสกัด

หยาบ (crude extracts) เท่านั้น ซึ่งจะมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ผสมอยู่ด้วย ในน้ำหนักแห้งของสารที่ชั่งมาทดสอบ จึงมีความน่าสนใจในการนำสารไปแยกให้บริสุทธิ์และศึกษาต่อไป ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อรา *H. scutata* ผลิตนั้น มีสมบัติในการละลายน้ำได้ดี

ในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษเบื้องต้นต่อเซลล์ไรสีน้ำตาล เป็นการทดสอบเบื้องต้น ที่แสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตของสาร หรือสารทดสอบอาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างใดอย่างหนึ่งที่น่าสนใจในการที่จะนำมาศึกษาต่อไป (Solis *et al.,* 1993) จากผลการทดสอบพบว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 8 สาร มีค่า LC_{50} ต่อไรสีน้ำตาล อยู่ระหว่าง 101.16-768.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างอื่นที่น่าสนใจนอกเหนือจากฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ในการศึกษาครั้งนี้ ส่วนสารที่ได้จากการระเหยแห้งของส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อรา SSC18 ให้ค่า LC_{50} มากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าถ้านำสารนี้มาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำมาก และจาก P36 ให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 60.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับปานกลาง

มีรายงานการวิจัยศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราแมลงหลายชนิด เช่น เชื้อในสกุล *Cordyceps*, *Aschersonia*, *Hypocrella*, *Verticillium*, *Beauveria*, *Metarhizium* และ *Entomophthora* และพบสารที่น่าสนใจ เช่น สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (Boonphong *et al.,* 2001) สารฆ่าแมลง (Krasnoff *et al.,* 1996) เอนไซม์ในกลุ่ม protease, chitinase และ glucanase (Deshpande, 1999) สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย (Isaka *et al.,* 2001) เป็นต้น ซึ่งราแมลงก็เป็นอีกแหล่งหนึ่งของการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ที่ได้รับความสนใจและมีรายงานการศึกษาอย่างต่อเนื่อง

สรุปผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง stroma ของเชื้อรา *H. scutata* จากป่าพรุสิรินธรในการศึกษาครั้งนี้ สามารถรวบรวมตัวอย่างได้ 46 ตัวอย่างและแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 31 isolates คิดเป็นร้อยละ 67.39

2. เชื้อรา *H. scutata* จะเจริญเติบโตช้ามากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีในแต่ละ isolates มีลักษณะคล้ายๆ กัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 4-6 มิลลิเมตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3. เชื้อรา *H. scutata* เจริญบนอาหาร PDA ได้ดีที่สุด และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อรา *H. scutata* คือที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อนี้ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

4. เชื้อรา *H. scutata* สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อราชนิดเส้นใย *M. gypseum*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. แต่ไม่พบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียและยีสต์ที่นำมาทดสอบ

5. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อรา *H. scutata* ผลิตนั้น มีสมบัติในการละลายน้ำได้ดี

6. สารที่ได้จากการระเหยแห้งส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อรา *H. scutata* SSC18 และ P36 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. gypseum*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. โดยให้ค่า MIC ต่อเชื้อราทั้ง 4 ชนิด เท่ากับ 64, 32, 16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 128, 64, 128 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีความเป็นพิษต่อไรสีน้ำตาลต่ำมาก

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น และได้ทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบเท่านั้น แต่ก็สามารถทราบว่าเชื้อรา *H. scutata* สร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านราที่น่าสนใจ และมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี มีความเป็นขั้วสูง อาจนำไปศึกษาหาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆได้ และยังได้ศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อเจริญและสร้างสารได้ดีที่สุด แต่ยังไม่ถึงขั้นการผลิตสารในปริมาณมากๆ ดังนั้นการศึกษาให้ลึกลงไปจนสามารถผลิตสารให้ได้ในปริมาณที่มากพอเพื่อนำไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ และศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป