

บทที่ 3

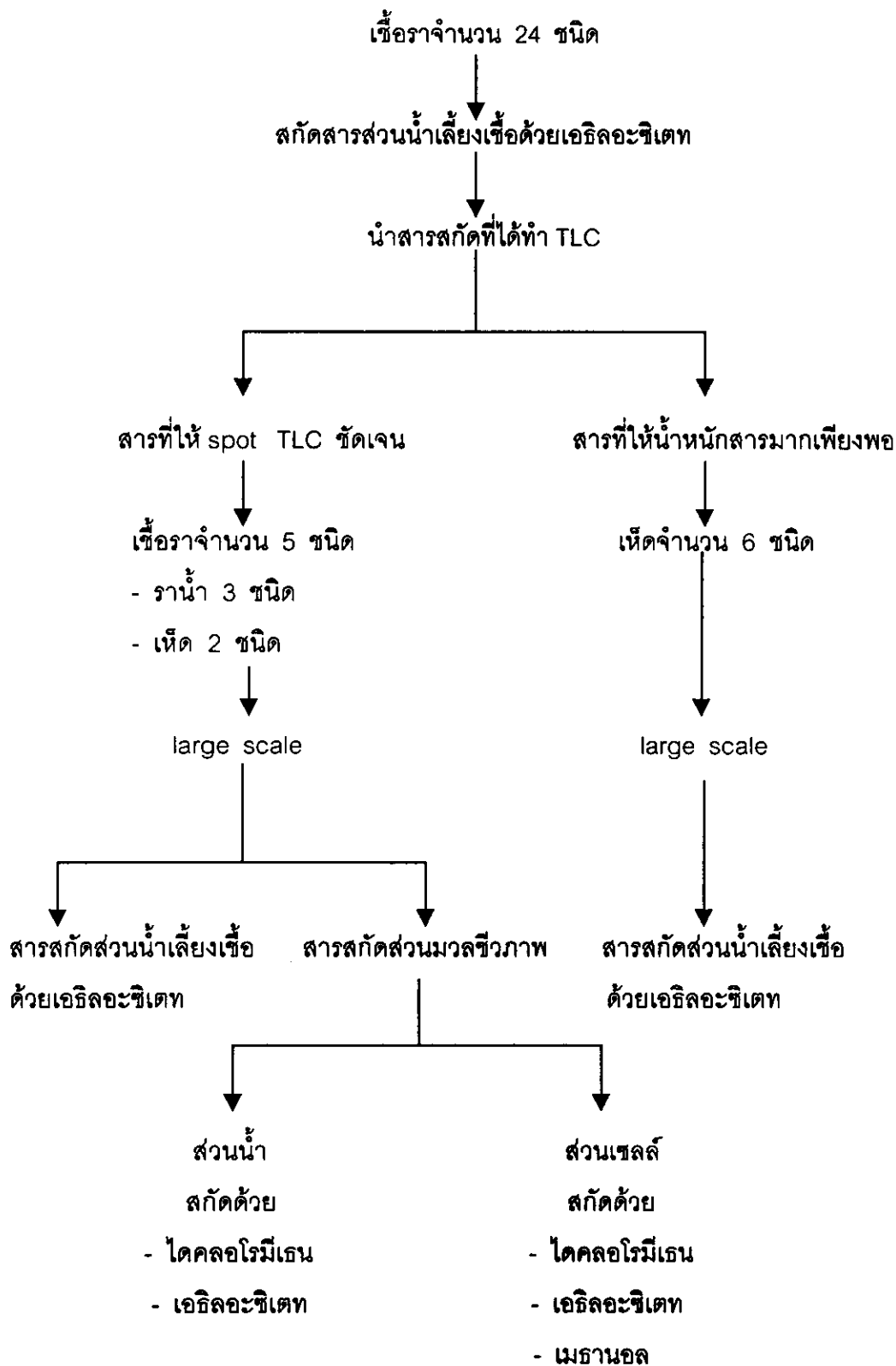
ผลการทดลอง

1. สารสกัดที่ได้จากเชื้อรา

ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อราชนิดเส้นใยจำนวน 24 ชนิด เมื่อผ่านขั้นตอนการสกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตท ได้สารสกัดปริมาณค่อนข้างน้อย จึงเลือกสารสกัดที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์โดยพิจารณาจากลักษณะโครมาโทแกรมบนโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC) และน้ำหนักของสารสกัด (ภาพประกอบ 15) ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 11 ชนิด โดยแบ่งเป็นสารที่มีลักษณะโครมาโทแกรมที่มีการแยกกันชัดเจน มีจำนวน 5 ชนิด ประกอบด้วย ราน้ำ 3 ชนิด ได้แก่ *B. rhombica*, ราน้ำ T002/4 และ *Volutella* sp. VO6 และ เห็ด 2 ชนิด ซึ่งได้แก่ เห็ดขนขาว (*Lentinus* sp. BL 23) และเห็ดโคน (*T. cylindricus*) (ค่า Rf ของสารแสดงในตาราง 3) จากนั้นนำเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนมากขึ้น (large scale) เพื่อนำไปสกัดสารจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อและจากมวลชีวภาพ โดยเชื้อ 1 ชนิดเมื่อนำไปสกัดสารจากส่วนมวลชีวภาพ จะให้สารสกัดจำนวน 5 ส่วน แล้วจึงเลือกสารสกัดที่มีน้ำหนักร้อยละสูงไปทดสอบฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ สำหรับสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ให้น้ำหนักร้อยละค่อนข้างสูงเมื่อสกัดด้วยเอธิลอะซิเตท มีจำนวน 6 ชนิด โดยเป็นสารสกัดจากเห็ดทั้งหมด ประกอบด้วย เห็ดรังนก (*C. striatus*), *P. sanguineus*, เห็ดแครง (*S. commune*), *X. allantoidea*, *Xylaria* sp. 2 และ *Xylaria* sp. BL 25 ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดทั้ง 6 ชนิด ให้ได้ปริมาณเพิ่มขึ้น แล้วนำไปสกัดสารจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตท น้ำหนักร้อยละของสารสกัดที่ได้จากราน้ำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยเอธิลอะซิเตท อยู่ในช่วง 0.001-0.016 สำหรับน้ำหนักร้อยละของสารสกัดที่ได้จากเห็ดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยเอธิลอะซิเตท อยู่ในช่วง 0.007 -0.046 (ตาราง 4) นอกจากนี้ยังได้น้ำหนักร้อยละของสารสกัดจากส่วนมวลชีวภาพจากเชื้อรา 2 ชนิด ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ได้แก่ สารสกัดจากราน้ำ T002/4 ส่วนน้ำที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และสารสกัดจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*) ส่วนน้ำที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและส่วนมวลที่สกัดด้วยเมธานอล น้ำหนักร้อยละของสารสกัดดังกล่าวอยู่ในช่วง 0.393-14.520 (ตาราง 5)

เห็ดและราน้ำเมื่อผ่านขบวนการสกัดและขั้นตอนการคัดเลือกแล้ว จะให้สารสกัดรวมทั้งสิ้น 28 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยสารที่สกัดจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อจำนวน 11 สาร และสารที่สกัดจากส่วนมวลชีวภาพจำนวน 17 สาร นำสารสกัดทั้งหมดนี้ไปทดสอบฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี disc diffusion

ภาพประกอบ 15 วิธีการคัดเลือกสารสกัดเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์



ตาราง 3 ค่า Rf ของสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (ในระบบ 60% EtOAc/Petrol และ 100% EtOAc)

ชื่อเชื้อรา	ค่า Rf บน TLC เมื่อดูใน UV		ค่า Rf บน TLC จากการย้อมด้วย Anisaldehyde
	ราน้ำ		
	60% EtOAc/Petrol	100% EtOAc	60% EtOAc/Petrol
<i>B. rhombica</i>	0.69, 0.83, 0.90	-	0.56, 0.70, 0.86
ราน้ำ T002/4	-	0.20, 0.56	-
<i>Volutella</i> sp. V06	0.58	-	-
เห็ด			
	60% EtOAc/Petrol	100% EtOAc	60% EtOAc/Petrol
เห็ดขอนขาว (<i>Leninus</i> sp.BL 23)	0.48, 0.91	-	-
เห็ดโคน (<i>T. cylindricus</i>)	0.6	-	0.9

ตาราง 4 น้ำหนักร้อยละของสารที่สกัดได้จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตท

เชื้อรา	ร้อยละของสารที่สกัดได้
ราน้ำ	
<i>Beltrania rhombica</i>	0.007
ราน้ำ T002/4	0.016
<i>Volutella</i> sp. (VO6)	0.001
เห็ด	
เห็ดรังนก (<i>C. striatus</i>)	0.025
เห็ดขอนขาว (<i>Lentinus</i> sp.BL 23)	0.008
<i>P. sanguineus</i>	0.007
เห็ดแครง (<i>S. commune</i>)	0.025
เห็ดโคน (<i>T. cylindricus</i>)	0.010
<i>X. allantoidea</i>	0.018
<i>Xylaria</i> sp. 2	0.013
<i>Xylaria</i> sp.BL 25	0.046

ตาราง 5 น้ำหนักร้อยละของสารที่สกัดได้จากส่วนมวลชีวภาพที่ด้านจุลินทรีย์ได้

เชื้อรา	ร้อยละของสารที่สกัดได้
ราน้ำ T002/4	B.1 0.455
เห็ดโคน (<i>T. cylindricus</i>)	B.1 0.393 B.5 14.520

หมายเหตุ : B.1 : สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ

B.5 : สารสกัดด้วยเมธานอลจากมวลชีวภาพส่วนมวล

2. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยวิธี disc diffusion

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐานผลดังแสดงในตาราง 6 (ภาพประกอบ 16) พบว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 จะไวต่อยาทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ oxacillin, vancomycin, erythromycin, amikacin และ ampicillin แต่เชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* SK1(MRSA) จะไวต่อยา vancomycin เพียงชนิดเดียว และต่อยา oxacillin, erythromycin, amikacin และ ampicillin สำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบพบว่า *E. coli* ATCC 25922 ไวต่อยา amikacin, ampicillin, tetracycline และ gentamicin แต่มีความไวปานกลางต่อยา cephalothin สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* ตี้อยาทุกชนิดที่ทดสอบได้แก่ amikacin, tetracycline, gentamicin, chloramphenicol และ netilmicin

การทดสอบยาต้านเชื้อรา amphotericin B กับเชื้อยีสต์ พบว่า ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. albicans* SH, *C. albicans* PSU และ *C. neoformans* PSU ไวต่อยา amphotericin B

ตาราง 6 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยวิธี disc diffusion

ยามาตรฐาน (ความแรง)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)									
	SA	MRSA	EC	PA	CaSH	CaPSU	CnPSU			
Oxacillin (10 µg)	19(S)	N(R)								
Vancomycin (30 µg)	16(S)	16.5(S)								
Erythromycin (15 µg)	24(S)	N(R)								
Amikacin (30 µg)	23.5(S)	N(R)	20.75(S)	N(R)						
Ampicillin (10 µg)	28.25(S)	N(R)	14(S)							
Tetracycline (30 µg)			20.4(S)	9.5(R)						
Gentamicin (10 µg)			19.6(S)	N(R)						
Cephalothin (30 µg)			15.85(I)							
Chloramphenicol (30 µg)				N(R)						
Netilmicin (30 µg)				N(R)						
Amphotericin B (10 µg)					19(S)	18.6(S)	19(S)			

SA: *S. aureus* ATCC25923

CaSH: *C. albicans* SH

N : no zone

MRSA: Methicillin resistant *S. aureus* SK1

CaPSU: *C. albicans* PSU

S: susceptible

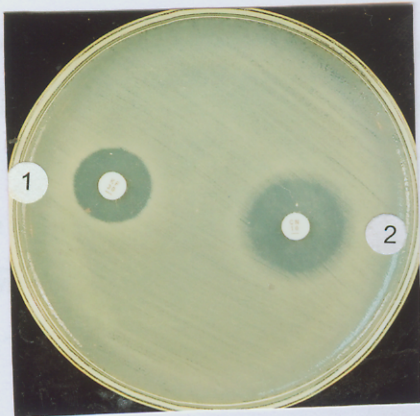
EC: *E. coli* ATCC 25922

CnPSU: *C. neoformans* PSU

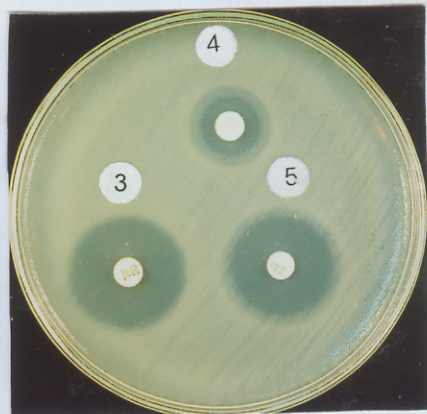
R: resistant

PA: *P. aeruginosa*

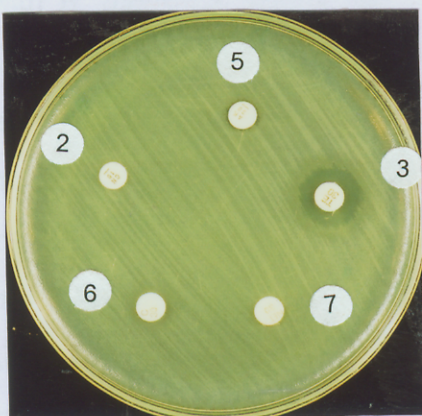
I: intermediate susceptible



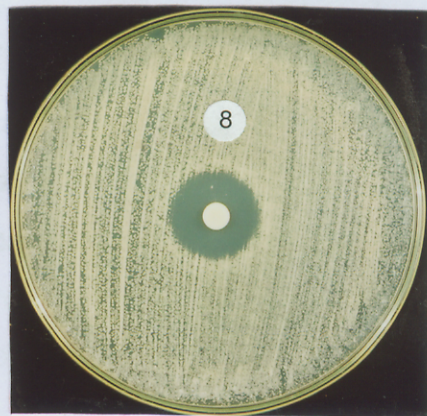
EC



EC



PA



CaPSU

ภาพประกอบ 16 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยวิธี disc diffusion

EC: *E. coli* ATCC 25922

PA: *P. aeruginosa*

CaPSU: *C. albicans* PSU

1: Cephalothin 30 μ g

2: Gentamicin 10 μ g

3: Tetracycline 30 μ g

4: Ampicillin 10 μ g

5: Amikacin 30 μ g

6: Chloramphenicol 30 μ g

7: Netilmicin 30 μ g

8: Amphotericin B 10 μ g

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดจากเชื้อรา โดยวิธี disc diffusion

สารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตทที่นำมาทดสอบมีทั้งหมด 11 สารสกัด โดยเป็นสารสกัดจากราน้ำ 3 ชนิด และสารสกัดจากเห็ด 8 ชนิด สำหรับสารสกัดส่วนมวลชีวภาพที่นำมาทดสอบมี 5 ชนิด ประกอบด้วยราน้ำ 3 ชนิด จำนวน 10 สารสกัด และเห็ด 2 ชนิด จำนวน 7 สารสกัด รวมทั้งสิ้น 17 สารสกัด เชื้อราทั้ง 5 ชนิดนี้ (ราน้ำ *B. rhombica*, ราน้ำ T002/4, ราน้ำ *Volutella* sp. V06, เห็ดชอนขาว และเห็ดโคน) ให้ spot บน TLC ชัดเจน จากการนำแผ่น disc ที่มีสารสกัดที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อแผ่น มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พบว่ามีสารสกัดเพียงบางชนิดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ และสามารถทำให้เกิดวงใสได้เพียงเล็กน้อย

สารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตท (ตาราง 7, ภาพประกอบ 17) ที่สกัดจากราน้ำ 3 ชนิด ได้แก่ *B. rhombica*, T002/4 และ *Volutella* sp. ไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างชัดเจน โดยสารสกัดจาก *B. rhombica* ทำให้เกิดรอยจางของเชื้อรอบแผ่น disc ต่อเชื้อ *S. aureus*, MRSA และ *C. neoformans* สำหรับสารสกัดจาก *Volutella* sp. สามารถทำให้เกิดรอยจางรอบแผ่น disc ต่อเชื้อ *S. aureus*, *C. albicans* SH, *C. albicans* PSU และ *C. neoformans* แต่สารสกัดจากราน้ำ T002/4 ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ สำหรับสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตทที่ได้จากเห็ด พบว่าสามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อ *S. aureus* เท่านั้น โดยทำให้เกิดวงใสมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6.25-7.75 มิลลิเมตร สารสกัดดังกล่าวสกัดได้จากเห็ดชอนขาว (*Lentinus* sp. BL23), *P. sanguineus* และ *Xylaria* sp. 2 นอกจากนี้สารสกัดจาก *P. sanguineus* ยังทำให้เกิดรอยจางรอบแผ่น disc ต่อเชื้อ *C. neoformans*

สารสกัดส่วนมวลชีวภาพด้วยไดคลอโรมีเทน เอธิลอะซิเตทและเมธานอล ที่สกัดจากราน้ำ (ตาราง 8) 3 ชนิด มีจำนวน 10 สารสกัด พบว่ามีสารสกัดเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ สารสกัดดังกล่าว คือ สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ ของราน้ำ T002/4 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นเชื้อ *P. aeruginosa* และสามารถยับยั้งเชื้อ *C. neoformans* ได้ดีที่สุด โดยทำให้เกิดวงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 23.40 มิลลิเมตร สารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทำให้เกิดวงใสได้กว้างกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สำหรับสารสกัดอีก 9 ชนิด ไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้

สารสกัดส่วนมวลชีวภาพด้วยไดคลอโรมีเทน เอธิลอะซิเตทและเมธานอล ที่สกัดจากเห็ด (ตาราง 8) 2 ชนิด มีจำนวน 7 สารสกัด พบว่าสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำของเห็ดโคน (*T. cylindricus*) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทุกชนิด ยกเว้นเชื้อ *P. aeruginosa* สารสกัดชนิดนี้สามารถยับยั้งเชื้อ *C. neoformans* ได้กว้างที่สุด โดย

ทำให้เกิดวงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22.00 มิลลิเมตร และรองลงมา คือ เชื้อ *S. aureus* ทำให้เกิดวงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15.62 มิลลิเมตร นอกจากนี้สารสกัดด้วยเมธานอลจากมวลชีวภาพส่วนมวลของเห็ดชนิดเดียวกันนี้ ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *C. neoformans* ได้ สำหรับสารสกัดจากเห็ดขอนขาว (*Lentinus* sp. BL23) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด และจากการทดสอบด้วยสารสกัดชนิดต่างๆ พบว่าไม่มีสารสกัดชนิดใดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ สำหรับแผ่น disc ชุดควบคุม ซึ่งบรรจุตัวทำละลาย DMSO ไม่ทำให้เกิดวงใสต่อเชื้อทุกชนิด

ตาราง 7 การทดสอบฤทธิ์ป้องกันในการต้านแบคทีเรีย และยีสต์ของสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตท โดยวิธี disc diffusion

สารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงโต (mm± S.D)									
	SA	MRSA	EC	PA	CaSH	CaPSU	CnPSU			
control (DMSO)	-	-	-	-	-	-	-			
น้ำ										
<i>B. rhombica</i>	*	*	-	-	*	*	*			
T002/4	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Volutella</i> sp. V06	*	-	-	-	-	-	6.6±0.14			
เห็ด										
เห็ดครงนก (<i>C. striatus</i>)	*	-	-	-	-	-	-			
เห็ดของขา (<i>Lentinus</i> sp.BL 23)	7.75±0.35	-	-	-	-	-	6.58±0.10			
<i>P. sanguineus</i>	6.75±0.0	-	-	-	-	-	*			
เห็ดคตง (<i>S. commune</i>)	-	-	-	-	-	-	-			
เห็ดโคน (<i>T. cylindricus</i>)	-	-	-	-	-	-	-			
<i>X. allantoides</i>	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Xylaria</i> sp. 2	6.25±0.0	-	-	-	-	-	-			
<i>Xylaria</i> sp. BL 25	-	-	-	-	-	-	-			

SA: *S. aureus* ATCC 25923

CaSH: *C. albicans* SH

-: ไม่เกิดวงโต

MRSA: Methicillin resistant *S. aureus* SK1

CaPSU: *C. albicans* PSU

*: เกิดรอยจากขอบแผ่น disc

EC: *E. coli* ATCC 25922

CnPSU: *C. neoformans* PSU

PA: *P. aeruginosa*

ตาราง 8 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย และยีสต์ของสารสกัดส่วนมวลชีวภาพของเชื้อราด้วยโคคลอโรไมรีน เอธิลอะซิเตทและเมธานอล

สารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm ± S.D)									
	SA	MRSA	EC	PA	CaSH	CaPSU	CnPSU			
control (DMSO)	-	-	-	-	-	-	-			
รากำ										
<i>Beltrania rhombica</i>										
B.3	-	-	-	-	-	-	-			
B.4	-	-	-	-	-	-	-			
B.5	-	-	-	-	-	-	-			
รากำ T002/4										
B.1	17.23±0.39	11.28±1.0	7.13±0.18	-	12.03 ±0.32	10.25±0.18	23.4 ±0.14			
B.3	-	-	-	-	-	-	-			
B.4	-	-	-	-	-	-	-			
B.5	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Volutella</i> sp. V06										
B.3	-	-	-	-	-	-	-			
B.4	-	-	-	-	-	-	-			
B.5	-	-	-	-	-	-	-			

B.1: สารสกัดด้วยโคคลอโรไมรีนจาก

มวลชีวภาพส่วนน้ำ

B.2: สารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจาก

มวลชีวภาพส่วนน้ำ

B.3: สารสกัดด้วยโคคลอโรไมรีนจาก

มวลชีวภาพส่วนมวล

B.4: สารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจาก

มวลชีวภาพส่วนมวล

B.5: สารสกัดด้วยเมธานอลจาก

มวลชีวภาพส่วนมวล

SA: *S. aureus* ATCC 25923

PA: *P. aeruginosa*

CnPSU: *C. neoformans* PSU

MRSA: Methicillin resistant *S. aureus* SK1

CaSH: *C. albicans* SH

- : ไม่เกิดวงใส

EC: *E. coli* ATCC 25922

CaPSU: *C. albicans* PSU

ตาราง 8 (ต่อ)

สารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงไต (mm±S.D)									
	SA	MRSA	EC	PA	CaSH	CaPSU	CnPSU			
control (DMSO)	-	-	-	-	-	-	-			
เห็ด										
เห็ดขอนขาว (<i>Lentinus</i> sp.BL 23)										
B.3	-	-	-	-	-	-	-			
B.4	-	-	-	-	-	-	-			
B.5	-	-	-	-	-	-	-			
เห็ดโคน (<i>T. cylindricus</i>)										
B.1	15.62±0.39	10.33±0.14	7.1±0.21	-	11.28±0.88	10.83±0.25	22±0.0			
B.2	-	-	-	-	-	-	-			
B.3	-	-	-	-	-	-	-			
B.5	8.1±0.45	-	-	-	-	-	10.8±0.14			

SA: *S. aureus* ATCC 25923

CaSH: *C. albicans* SH

B.1: สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ

MRSA: Methicillin resistant *S. aureus* SK1

CaPSU: *C. albicans* PSU

B.2: สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ

EC: *E. coli* ATCC 25922

CnPSU: *C. neoformans* PSU

B.3: สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนมวล

PA: *P. aeruginosa*

- : ไม่เกิดวงไต

B.4: สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทจากมวลชีวภาพส่วนมวล

B.5: สารสกัดด้วยเมทานอลจากมวลชีวภาพส่วนมวล

ภาพประกอบ 17 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเชื้อรา โดยวิธี disc diffusion

SA: *S. aureus* ATCC 25923

CaSH: *C. albicans* SH

MRSA: Methicillin resistant *S. aureus* SK1

Cn: *C. neoformans*

EC: *E. coli* ATCC 25922

1: ชุดควบคุม (DMSO)

2: สารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอริลอะซิเตทจาก *Xylaria* sp. 2

3: สารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอริลอะซิเตทจาก *P. sanguineus*

4: สารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอริลอะซิเตทจาก *Xylaria* sp. BL25

5: สารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอริลอะซิเตทจาก *X. allantoidea*

6: สารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอริลอะซิเตทจากเห็ดขอนขาว (*Lentinus* sp. BL23)

7: สารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอริลอะซิเตทจาก *B. rhombica*

8: สารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอริลอะซิเตทจาก *Volutella* sp. V06

9: สารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอริลอะซิเตทจากราน้ำ T002/4

10: สารสกัดด้วยไตรโคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*)

11: สารสกัดด้วยเอริลอะซิเตทจากมวลชีวภาพส่วนน้ำจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*)

12: สารสกัดด้วยไตรโคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนมวลจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*)

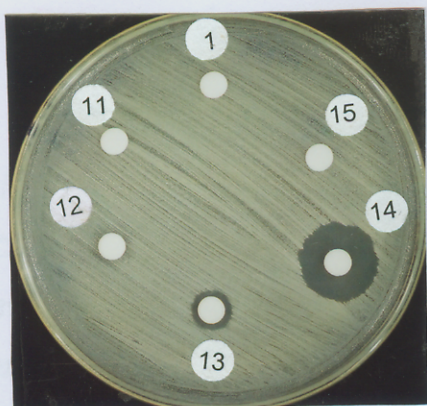
13: สารสกัดด้วยเมธานอลจากมวลชีวภาพส่วนมวลจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*)

14: สารสกัดด้วยไตรโคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำจากราน้ำ T002/4

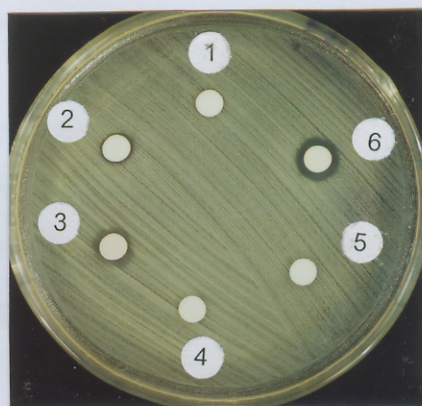
15: สารสกัดด้วยไตรโคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนมวลจากราน้ำ T002/4

16: สารสกัดด้วยเมธานอลจากมวลชีวภาพส่วนมวลจากราน้ำ T002/4

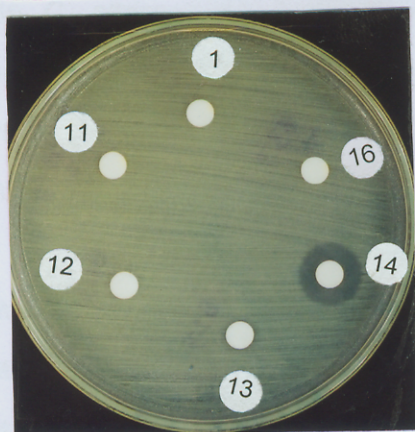
สารสกัดความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อ disc



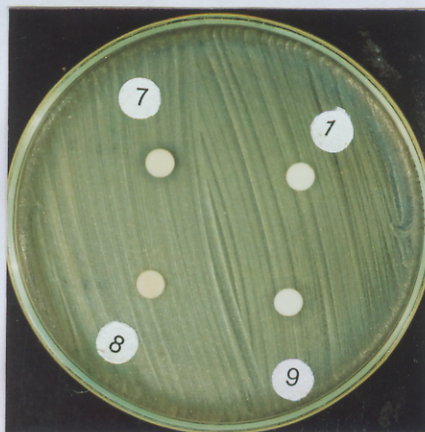
SA



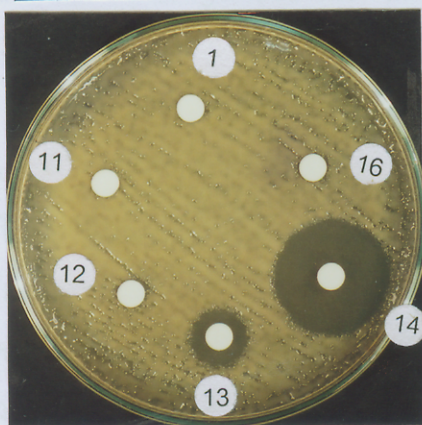
SA



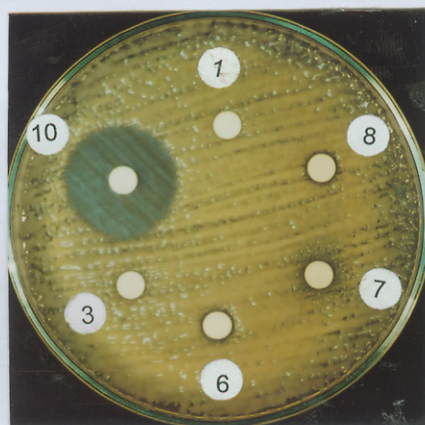
MRSA



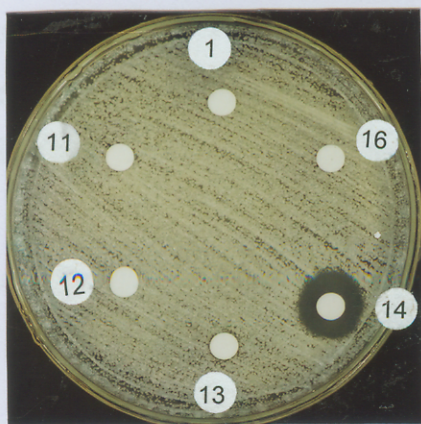
MRSA



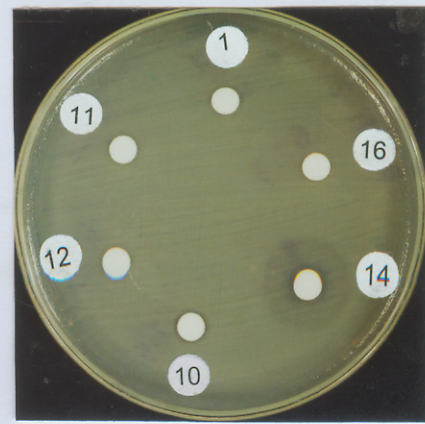
Cn



Cn



CaSH



EC

4. การทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดต่อแบคทีเรียและยีสต์ โดยวิธี agar microdilution

สารสกัดที่ทำให้เกิดวงใส หรือทำให้เกิดรอยจางรอบแผ่น disc จะถูกนำมาหาค่า MIC โดยวิธี agar microdilution สารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตทที่นำมาทดสอบเพื่อหาค่า MIC ประกอบด้วยสารสกัดจากราน้ำและสารสกัดจากเห็ด (ตาราง 9, ภาพประกอบ 18) พบว่าสารสกัดจาก *B. rhombica* มีฤทธิ์กว้างสุด สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดย MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* มีค่าต่ำสุด คือ 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า MIC ต่อเชื้อ *C. albicans* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีค่าเท่ากับ 15.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *C. neoformans* มีค่า MIC ค่อนข้างสูง คือ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากราน้ำ *Volutella* sp. สามารถยับยั้งเชื้อ *C. neoformans* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยับยั้ง *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตทจากเห็ดที่นำมาหาค่า MIC มี 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจาก เห็ดขอนขาว (*Lentinus* sp. BL23), *P. sanguineus* และ *Xylaria* sp. 2 พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* มากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจาก *P. sanguineus* มีค่า MIC ต่อเชื้อ *C. neoformans* เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับสารสกัดส่วนมวลชีวภาพที่นำมาทดสอบ (ตาราง 10) พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81 และ 3.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารดังกล่าวสกัดด้วยไดคลอโรโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ จากราน้ำ T002/4 และเห็ดโคน (*T. cylindricus*) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *C. neoformans* โดยให้ค่า MIC เท่ากัน คือ 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *C. albicans* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ถูกยับยั้งจากสารทั้ง 2 ชนิด เช่นเดียวกัน แต่มีค่า MIC ค่อนข้างสูง คือ 125 และ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ MRSA ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ

สำหรับค่า MIC ของยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน penicillin G, vancomycin, gentamicin, tetracycline และ amphotericin B มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.03-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง 9 ค่า MIC ของสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อราด้วยเอริลอะซีเตท โดยวิธี agar microdilution

สารสกัด	MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
	SA	MRSA	EC	PA	CaSH	CaPSU	CnPSU			
รากำ										
<i>B. rhombica</i>	0.98	250			15.63	15.63	125			
<i>Volutella</i> sp. V06	250						31.25			
เห็ด										
เห็ดขอนขาว (<i>Lentinus</i> sp. BL23)	>500						>500			
<i>P. sanguineus</i>	>500						500			
<i>Xylaria</i> sp. 2	>500									

SA: *S. aureus* ATCC 25923

MRSA: Methicillin resistant *S. aureus* SK1

EC: *E. coli* ATCC 25922

PA: *P. aeruginosa*

CaSH: *C. albicans* SH

CaPSU: *C. albicans* PSU

CnPSU: *C. neoformans*

ตาราง 10 ค่า MIC ของสารสกัดส่วนมรดชีวภาพจากเชื้อรา และยาค้านจุลินทรีย์ โดยวิธี agar microdilution

สารสกัด	MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
	SA	MRSA	EC	PA	CaSH	CaPSU	CnPSU			
รากน้ำ										
รากน้ำ T002/4 B.1	7.81	>500	500		125	125	7.81			
เห็ด										
เห็ดโคน (<i>T. cylindricus</i>) B.1	3.9	>500	500		62.5	62.5	7.81			
เห็ดโคน (<i>T. cylindricus</i>) B.5	>500						>500			
ยาค้านจุลินทรีย์										
Penicillin G	0.03									
Vancomycin		1								
Gentamicin			1							
Tetracycline				16						
Amphotericin B					0.13	0.13	0.25			

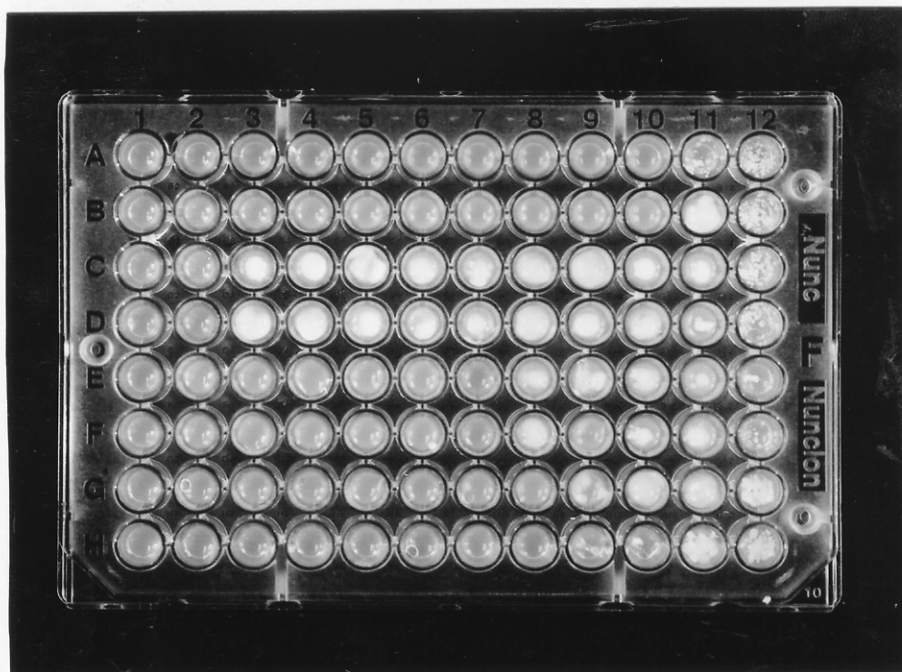
SA: *S. aureus* ATCC 25923 CaSH: *C. albicans* SH B.1: สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมรดชีวภาพส่วนน้ำ

MRSA: Methicillin resistant *S. aureus* SK1 CaPSU: *C. albicans* PSU B.2: สารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจากมรดชีวภาพส่วนน้ำ

EC: *E. coli* ATCC 25922 CnPSU: *C. neoformans* B.3: สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมรดชีวภาพส่วนมรด

PA: *P. aeruginosa* B.4: สารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจากมรดชีวภาพส่วนมรด

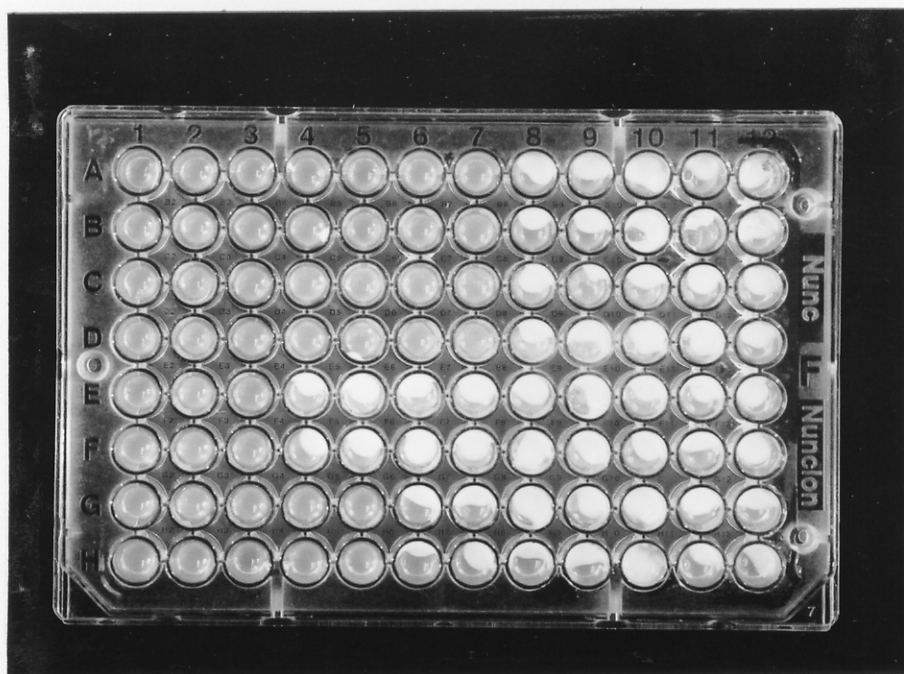
B.5: สารสกัดด้วยเมทานอลจากมรดชีวภาพส่วนมรด



a

ภาพประกอบ 18 การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดต่อแบคทีเรียและยีสต์ โดยวิธี agar microdilution

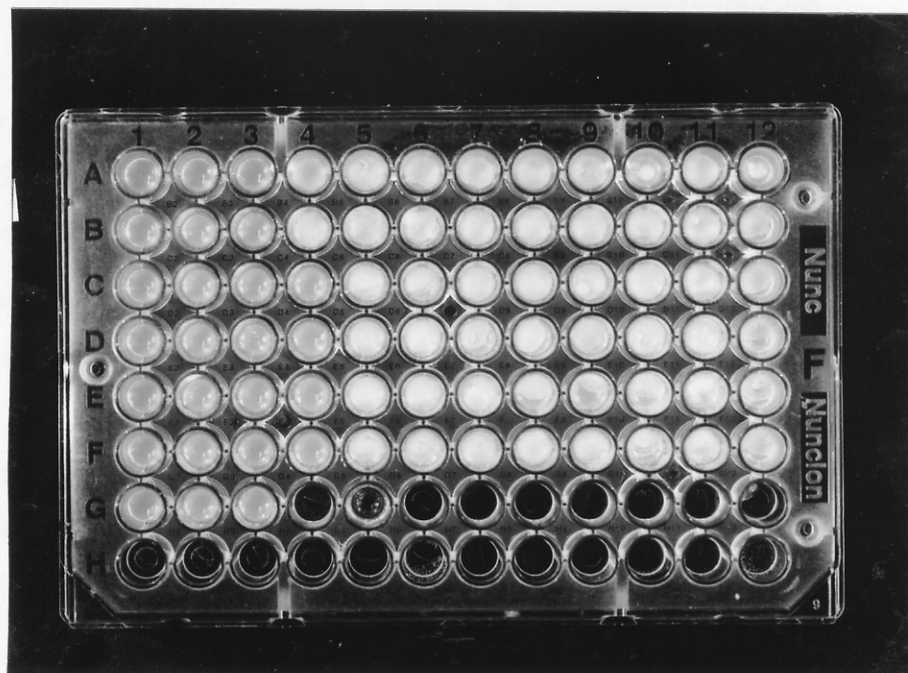
- a: แถว A, B: *S. aureus* ทดสอบกับสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตทจาก *B. rhombica* (ค่า MIC หลุมที่ 10 : 0.98 $\mu\text{g/ml}$)
- แถว C, D: *S. aureus* ทดสอบกับสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตทจาก *Volutella* sp. V06 (ค่า MIC หลุมที่ 2 : 250 $\mu\text{g/ml}$)
- แถว E, F: *S. aureus* ทดสอบกับสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำจากราน้ำ T002/4 (ค่า MIC หลุมที่ 7 : 7.81 $\mu\text{g/ml}$)
- แถว G, H: *S. aureus* ทดสอบกับสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*) (ค่า MIC หลุมที่ 8 : 3.9 $\mu\text{g/ml}$)
- หลุมที่ 12: growth control



b

ภาพประกอบ 18 (ต่อ) การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดต่อแบคทีเรียและยีสต์ โดยวิธี agar microdilution

- b: แถว A, B: *C. neoformans* ทดสอบกับสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพ ส่วนน้ำจากราน้ำ T002/4 (ค่า MIC หลุมที่ 7 : 7.81 $\mu\text{g/ml}$)
- แถว C, D: *C. neoformans* ทดสอบกับสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพ ส่วนน้ำจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*) (ค่า MIC หลุมที่ 7 : 7.81 $\mu\text{g/ml}$)
- แถว E, F: *C. neoformans* ทดสอบกับสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตท จาก *B. rhombica* (ค่า MIC หลุมที่ 3 : 125 $\mu\text{g/ml}$)
- แถว G, H: *C. neoformans* ทดสอบกับสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตท จาก *Volutella* sp. V06 (ค่า MIC หลุมที่ 5 : 31.25 $\mu\text{g/ml}$)
- หลุมที่ 12: growth control



c

ภาพประกอบ 18 (ต่อ) การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดต่อแบคทีเรียและยีสต์ โดยวิธี
agar microdilution

c: แถว A, B: *C. albicans* SH ทดสอบกับสารสกัดด้วยไตรโคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพ
ส่วนน้ำจากราน้ำ T002/4 (ค่า MIC หลุมที่ 3 : 125 $\mu\text{g/ml}$)

แถว C, D: *C. albicans* PSU ทดสอบกับสารสกัดด้วยไตรโคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพ
ส่วนน้ำจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*) (ค่า MIC หลุมที่ 4 : 62.5 $\mu\text{g/ml}$)

แถว E, F: *C. albicans* SH ทดสอบกับสารสกัดด้วยไตรโคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพ
ส่วนน้ำจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*) (ค่า MIC หลุมที่ 4 : 62.5 $\mu\text{g/ml}$)

แถว G: control (sterile agar)

หลุมที่ 12: growth control

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดเส้นใยของสารสกัด โดยวิธี disc diffusion

สารสกัดที่นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *M. gypseum*, *T. rubrum* และ *P. marneffeii* มีทั้งหมด 28 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อรากลุ่มทั้ง 3 สายพันธุ์ได้น้อยมาก มีสารสกัดเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ คือ สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนสกัดจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ จากราน้ำ T002/4 และเห็ดโคน (*T. cylindricus*) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ สำหรับสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตททั้งที่สกัดจากราน้ำและสกัดจากเห็ดไม่สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ (ตาราง 11, ภาพประกอบ 19)

6. การทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดต่อเชื้อราชนิดเส้นใย โดยวิธี broth microdilution และการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี สไลด์หลุม

จากการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี disc diffusion ทำให้ได้สารสกัด 2 ชนิด สำหรับนำมาทดสอบเพื่อหาค่า MIC ต่อ *M. gypseum* และ *T. rubrum* และ หาค่า EC_{50} ต่อ *P. marneffeii* ซึ่งได้แก่สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนสกัดจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ จากราน้ำ T002/4 และเห็ดโคน (*T. cylindricus*) ในการทดสอบครั้งนี้ได้ใช้วิธี broth microdilution เพื่อหาค่า MIC ต่อเชื้อกลุ่ม dermatophyte ทั้ง 2 สายพันธุ์ และใช้วิธีการทดสอบในสไลด์หลุมเพื่อหา EC_{50} ต่อเชื้อ *P. marneffeii*

สารสกัดทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อกลุ่ม dermatophytes ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดจากราน้ำ T002/4 สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 ชนิดโดยมีค่า MIC เท่ากัน คือ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*) มีค่า MIC ที่สูงกว่าสารสกัดจากราน้ำ โดยให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *M. gypseum* เท่ากับ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *T. rubrum* (ตาราง 12) เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ที่ได้จากสารสกัดทั้ง 2 ชนิดกับยาด้านเชื้อรามาตรฐาน miconazole ซึ่งมีค่า MIC ต่อ *M. gypseum* และ *T. rubrum* เท่ากับ 4 และ 2 ไมโครกรัมตามลำดับ ก็ยังถือว่าเป็นค่า MIC ที่ค่อนข้างสูง

สำหรับเชื้อ *P. marneffeii* ได้ทดสอบโดยวิธี สไลด์หลุม (ตาราง 13, ภาพประกอบ 20) เนื่องจากเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี broth microdilution ไม่สามารถอ่านผลได้เพราะโคนิเดียไม่เจริญออกเป็นสายรา จึงทดสอบด้วยวิธี สไลด์หลุม ซึ่งพบว่าสารสกัดจากราน้ำ T002/4 ที่ระดับความเข้มข้น 15.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของสายราได้ร้อยละ 19.50 ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่นำมาคำนวณหาค่า EC_{50} เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดครั้งละ 2 เท่า ก็ให้ค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายราสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น

เมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสาหร่ายเท่ากับ 68.57 เมื่อนำค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสาหร่ายที่ได้มาเขียนกราฟเส้นตรง และคำนวณค่า EC_{50} จากสมการ linear regression ได้ค่า EC_{50} เท่ากับ 284.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 14)

การยับยั้งการเจริญของสาหร่ายโดยสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำของเห็ดโคน (*T. cylindricus*) ให้ผลทำนองเดียวกับสารสกัดจากราน้ำ T002/4 แต่สามารถยับยั้งการเจริญของสาหร่ายได้ดีกว่า โดยมีค่า EC_{50} ต่ำกว่า คือ 210.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับค่า MIC ที่ได้จากยาด้านเชื้อราได้เลือกจากความเข้มข้นแรกที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากไม่สามารถนำค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสาหร่ายมาคำนวณหาค่า EC_{50} เพราะการเจริญของเชื้อ *P. marneffeii* ในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างกันมาก โดยที่ระดับความเข้มข้น 32-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อไม่สามารถเจริญได้เลย แต่ที่ระดับความเข้มข้นของยาดั้งแต่ 0.5-0.063 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อเจริญได้ดีและให้ค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสาหร่ายน้อยกว่าร้อยละ 20 ซึ่งไม่สามารถนำคำนวณค่า EC_{50} ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC ซึ่งมีค่า เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง 11 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของสารสกัดส่วนมวลชีวภาพของเชื้อรา
ด้วยไดคลอโรมีเทน เอธิลอะซิเตทและเมทานอล

สารสกัด	เชื้อรา		
	<i>M. gypseum</i>	<i>P. marneffeii</i>	<i>T. rubrum</i>
control (DMSO)	-	-	-
ราน้ำ			
<i>B. rhombica</i> B.3	-	-	-
B.4	-	-	-
B.5	-	-	-
ราน้ำ T002/4 B.1	+	+	+
B.3	-	-	-
B.4	-	-	-
B.5	-	-	-
<i>Volutella</i> sp.V06 B.3	-	-	-
B.4	-	-	-
B.5	-	-	-
เห็ด			
เห็ดขอนขาว(<i>Lentinus</i> sp.BL23) B.3	-	-	-
B.4	-	-	-
B.5	-	-	-
เห็ดโคน(<i>T. cylindricus</i>) B.1	+	+	+
B.2	-	-	-
B.3	-	-	-
B.5	-	-	-

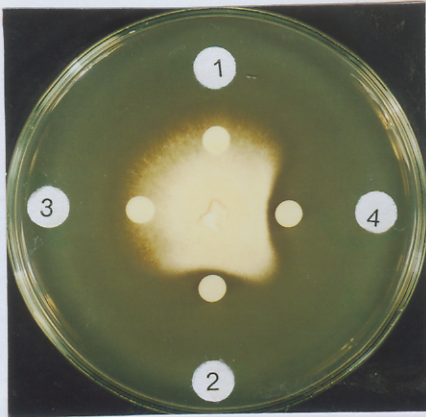
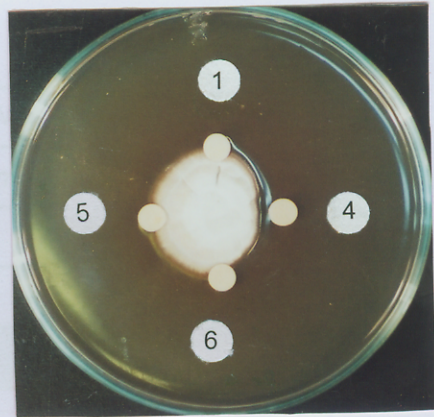
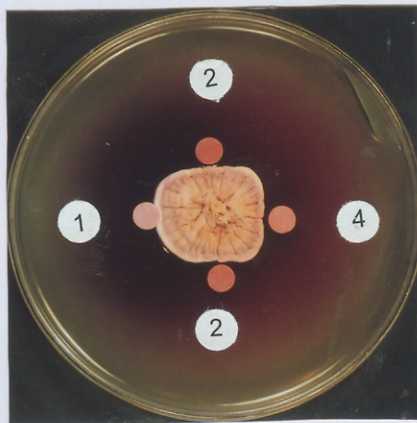
B.1: สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ - : no inhibition

B.2: สารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ + : inhibition

B.3: สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนมวล

B.4: สารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจากมวลชีวภาพส่วนมวล

B.5: สารสกัดด้วยเมทานอลจากมวลชีวภาพส่วนมวล

*M. gypseum**T. rubrum**P. marneffei*

ภาพประกอบ 19 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดเส้นใยของสารสกัด โดยวิธี disc diffusion

1: control (DMSO)

2: สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*)

3: สารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจากมวลชีวภาพส่วนน้ำจากเห็ดโคน (*T. cylindricus*)

4: สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำจากราน้ำ T002/4

5: สารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจากมวลชีวภาพส่วนมวลจากราน้ำ T002/4

6: สารสกัดด้วยเมธานอลจากมวลชีวภาพส่วนมวลจากราน้ำ T002/4

สารสกัดความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อ disc

ตาราง 12 การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อราชนิดเส้นใย
โดยวิธี broth microdilution

สารสกัด	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>M. gypseum</i>	<i>T. rubrum</i>
ราน้ำ T002/4 B.1	64	64
เห็ดโคน (<i>T. cylindricus</i>) B.1	256	64
ยาด้านเชื้อรา		
Miconazole	4	2

B.1: สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ

ตาราง 13 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสายรา *P. marneffe* ในสไลด์หัดุม

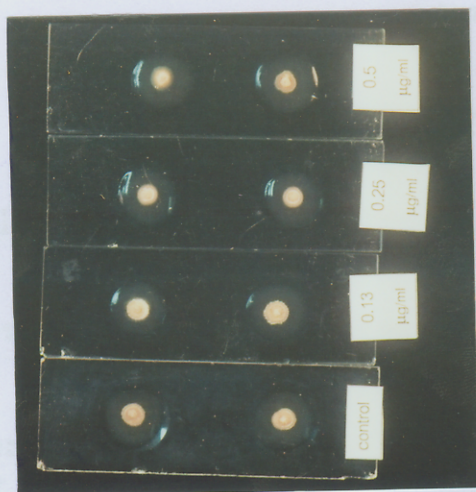
สารสกัด		ร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา <i>P. marneffe</i> i										
µg/ml		15.63	31.25	62.5	125	250	500					
รำน้ำ T002/4 B.1		19.5	28.05	28.94	34.74	50.75	68.57					
เห็ดโคน (<i>T. cylindricus</i>) B.1		13.19	30.6	34.1	40.4	57.04	78.97					
Miconazole (µg/ml)	0.063	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32		
	N	N	N	20	100	100	100	100	100	100	100	100

N : no inhibition

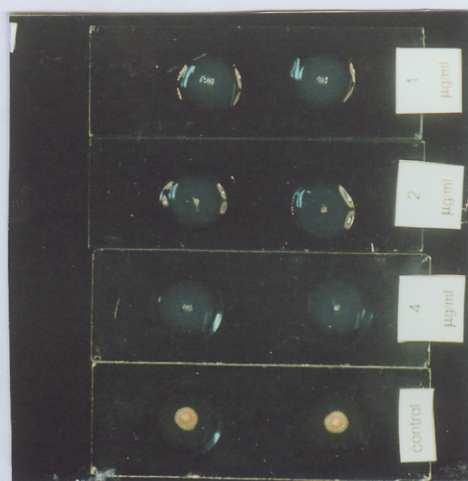
ตาราง 14 ค่า EC₅₀ ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของสายรา *P. marneffe*

สารสกัด	EC ₅₀ (µg/ml)		สมการ	r ²
	<i>P. marneffe</i>			
รำน้ำ T002/4 B.1	284.6		y = 0.096x + 22.679	0.9701
เห็ดโคน (<i>T. cylindricus</i>) B.1	210.74		y = 0.1044x + 22.999	0.993

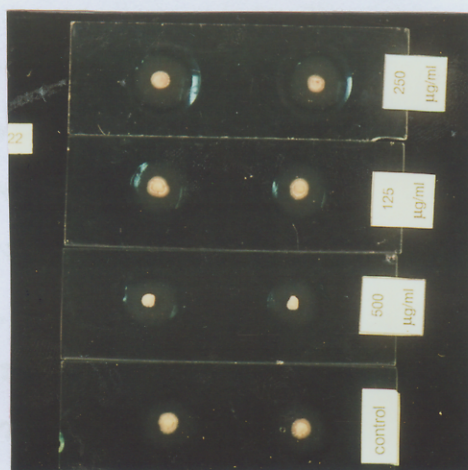
B.1: สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำ



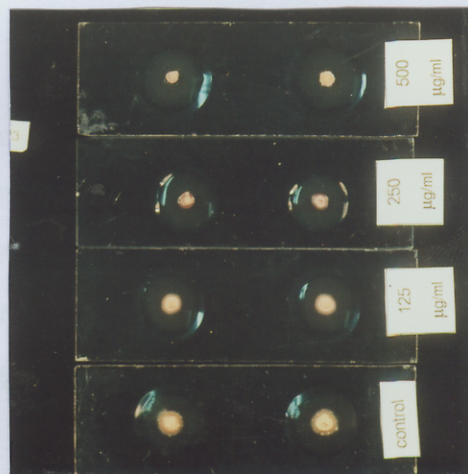
a.1



a.2



b



c

ภาพประกอบ 20 ขนาดโคโลนีของ *P. marneffeii* ในสไลด์หลุมเมื่อทดสอบกับยาต้านราสารสกัดจากราน้ำ T002/4 และเห็ดโคน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

a.1: ทดสอบกับยาต้านรา miconazole ที่ระดับความเข้มข้น 0.13-0.5 µg/ml

a.2: ทดสอบกับยาต้านรา miconazole ที่ระดับความเข้มข้น 1-4 µg/ml

b: ทดสอบกับสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำจากราน้ำ T002/4

c: ทดสอบกับสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากมวลชีวภาพส่วนน้ำจากเห็ดโคน

(*T. cylindricus*)