

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การแยก actinomycetes จากตัวอย่างดิน

ทำการแยก actinomycetes จากดิน 4 บริเวณ ทั้งหมด 16 ตัวอย่างที่สภาวะต่าง ๆ กัน 4 สภาวะคือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 9 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 7 และ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 9 ได้เชื้อตัวอย่างทั้งหมดรวม 178 ไอโซเลตดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวน actinomycetes ที่แยกได้ทั้ง 4 บริเวณ ภายใต้สภาวะต่างๆ

รหัส ตัวอย่างดิน	จำนวน actinomycetes ที่แยกได้ภายใต้สภาวะ				รวมจำนวนที่ แยกได้
	30°C, pH 7	30°C, pH 9	45°C, pH 7	45°C, pH 9	
G1	1	8	6	1	16
G2	6	4	1	2	13
O1	9	2	6	3	20
O2	4	4	6	2	16
D1	7	3	5	4	19
D2	6	3	5	7	21
D4	2	2	5	1	10
D5	2	5	1	2	10
D6	0	3	1	2	6
D7	1	1	4	2	8
D8	0	2	1	3	6
DA	7	ND	ND	ND	7
DB	7	ND	ND	ND	7
DC	10	ND	ND	ND	10
DD	5	ND	ND	ND	5
DE	4	ND	ND	ND	4
					178

- หมายเหตุ 1. G: ทุ่งหญ้า (Glass land or Vegetation), O: สวนมะม่วง (Orchard), D: ป่าเบญจพรรณ (Dry Dipterocarp)
2. รหัส G1-G2 O1-O2 และ D1-D8 คือตัวอย่างดินจากการเก็บดินในครั้งที่หนึ่ง และรหัส DA-DE คือตัวอย่างดินจากการเก็บดินในครั้งที่สอง
3. ND = ไม่ได้คัดแยก

หลังจากคัดแยก actinomycetes ได้ทั้งหมด 178 ไอโซเลตที่มีความสามารถเจริญได้ในสภาวะต่างๆ กัน เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วทั้งหมดถูกเก็บรักษาในอาหารแข็งเยื้องชนิด MS ที่ห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บในรูปของสปอร์แขวนลอยใน 30% กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บเป็น culture collection (ภาคผนวก ง)

4.2 การศึกษาสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี ของ actinomycetes ที่แยกได้ เพื่อจัดกลุ่มเบื้องต้นด้วยลักษณะฟีโนไทป์

actinomycetes ทั้งหมด 178 ไอโซเลตถูกนำมาศึกษาสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี ตามลักษณะของสายสปอร์ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ความสามารถในการสังเคราะห์รงควัตถุเมลานิน และความสามารถในการย่อย 0.4% ไชแลน 0.1% กวานีน 0.4% อะดีนีน และ 0.4% ไฮโปแซนทีน ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การจัดกลุ่ม actinomycetes จากสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี

ไอโซเลต	กลุ่ม	สัณฐานวิทยาของสายสปอร์	การใช้แหล่งคาร์บอน				ความสามารถในการย่อย				การเจริญบนอาหารแข็งไทโรซีน	การสร้างรงควัตถุเมลานินบนอาหารแข็งไทโรซีน
			แอลอะราบีโนส	ราฟฟิโนส	แรมโนส	ซูโคลอส	ไชแลน	กวานีน	อะดีนีน	ไฮโปแซนทีน		
D145708	1	RAAL	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
G130905	2	RAAL	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D445703	3	RAAL	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
G130906	4	RAAL	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
G130907		RAAL	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D445701		RAAL	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
G130908	5	RAAL	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-

ตารางที่ 4.2 การจัดกลุ่ม actinomycetes จากสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี (ต่อ)

ไอโซเลต	กลุ่ม	สัณฐานวิทยาของสายสปอร์	การใช้แหล่งคาร์บอน				ความสามารถในการย่อย				การเจริญบนอาหารแข็ง ไทรโรซีน	การสร้างรงควัตถุเมลาโนบิน อาหารแข็งไทรโรซีน
			แอล อะราบิโนส	ราฟฟิโนส	แรมโนส	ซูโครส	ไซแลน	กวานีน	อะดีนีน	ไฮโปแซนทีน		
D430701	6	RAAL	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
D130703	7	RAAL	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
D145901		RAAL	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
D230704	8	RAAL	-	-	-	-	+	-	NG	NG	+	-
G130902	9	RAAL	-	-	-	-	+	-	NG	NG	+	+
O245702		RAAL	-	-	-	-	+	-	NG	NG	+	+
G230903	10	RAAL	-	-	-	-	+	+	NG	-	+	-
D845902	11	RAAL	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
G230902	12	RAAL	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
O130903		RAAL	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
G145705	13	RAAL	-	-	-	-	+	+	NG	+	+	+
O145708	14	RFF	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
O245905	15	RFF	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
D530905	16	RFF	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D130706	17	RFF	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
D530901		RFF	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
D645721	18	RFF	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
D645901	19	RFF	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
D230904	20	RFF	-	-	-	-	+	+	NG	NG	+	-
D230903	21	RFF	-	-	-	-	+	+	+	NG	+	-
D145902	22	RFF	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
D245701		RFF	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
D530902		RFF	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
D245902	23	RFF	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+

ตารางที่ 4.2 การจัดกลุ่ม actinomycetes จากสถาบันวิทยา สรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี (ต่อ)

ไอโซเลต	กลุ่ม	สถาบันวิทยาของสายสปอร์	การใช้แหล่งคาร์บอน				ความสามารถในการย่อย				การเจริญบนอาหารแข็ง ไทโรซีน	การสร้างรงควัตถุเมลาโนบิน อาหารแข็งไทโรซีน
			แอลอะราบีโนส	ราฟฟิโนส	แรมโนส	ซูโคส	ไซแลน	กาวีน	อะดีนีน	ไฮโปแซนทีน		
G130910	24	SC	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
DD30706	25	SC	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
D230705	26	SC	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
O130709	27	SC	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
D130906		SC	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
D130908		SC	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
O145903	28	SC	-	-	-	-	+	-	NG	-	+	-
D145703	29	SC	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
O145702	30	SC	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
DE30703	31	SC	-	-	-	-	NG	NG	NG	-	-	-
O230701	32	SC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
D430903		SC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
D245906	33	SC	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
D245904	34	SC	-	-	-	-	+	-	NG	+	+	-
G230908	35	SC	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
O245707		SC	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
D245909		SC	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
D530908	36	SC	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
D230703	37	SC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
D245907		SC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
D845703		SC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
O145904	38	SC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
O245701	39	RFS	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
O230904	40	RFS	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

ตารางที่ 4.2 การจัดกลุ่ม actinomycetes จากสถาบันวิทยา สิริวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี (ต่อ)

ไอโซเลต	กลุ่ม	สถาบันวิทยาของสายสปอร์	การใช้แหล่งคาร์บอน				ความสามารถในการย่อย				การเจริญบนอาหารแข็งไทโรซีน	การสร้างรงควัตถุเมลานินบนอาหารแข็งไทโรซีน
			แอล อะราบีโนส	ราฟฟิโนส	แรมโนส	ซูโคส	ไซแลน	กวานีน	อะดีนีน	ไฮโปแซนทีน		
D745710	41	RFS	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
O245906	42	RFS	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
DD30704	43	RAT	-	-	-	-	-	NG	NG	NG	-	-
O230704	44	RAT	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
D430902	45	RAT	-	-	-	-	+	-	NG	+	+	+
D730901	46	RAT	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
G245902	47	RAAS	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
D130905	48	RAAS	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
D230901	49	RAAS	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
D145706		RAAS	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
D145904	50	RAAS	-	-	-	-	-	+	+	NG	+	-
O230902	51	RAAS	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
D145903		RAAS	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
D245905	52	RAAS	-	-	-	-	+	-	NG	+	+	-
G245901	53	RAAS	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
D245707		RAAS	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
G245703	54	RAAS	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
O245907		RAAS	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
D245908	55	RAAS	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
DB30707	56	RAAS	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
D430702	57	RAAS	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
D445902	58	RAAL	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
D745903	59	RAAL	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

ตารางที่ 4.2 การจัดกลุ่ม actinomycetes จากสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี (ต่อ)

ไอโซเลต	กลุ่ม	สัณฐานวิทยาของสายสปอร์	การใช้แหล่งคาร์บอน				ความสามารถในการย่อย				การเจริญบนอาหารแข็งไทโรซีน	การสร้างรงควัตถุเมลานินบนอาหารแข็งไทโรซีน
			แอล อะราบิโนส	ราฟฟิโนส	แรมโนส	ซูโครส	ไซแลน	กวานีน	อะดีนีน	ไฮโปแซนทีน		
D130701	60	RFF	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
D845903	61	RFF	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
D130711	62	RFF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O145706	63	SC	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
DA30701	64	SC	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
D245706	65	SC	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
DC30709		SC	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
D145709	66	SC	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
D845904	67	SC	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
O130701	68	SC	+	+	+	+	NG	NG	NG	NG	-	-
D245702	69	SC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D745902	70	SC	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
O145707	71	SC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
O130901		SC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
DA30703		SC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
DD30701	72	RFS	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
D830903	73	RAT	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
D745707	74	RAT	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
D545902	75	RAT	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
DC30711	76	RAT	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
D745705	77	RAAS	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
D445704	78	RAAS	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
D745706	79	RAAS	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
G230712	80	RAAL	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-

ตารางที่ 4.2 การจัดกลุ่ม actinomycetes จากสถาบันวิทยา สรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี (ต่อ)

ไอโซเลต	กลุ่ม	สถาบันวิทยาของสายสปอร์	การใช้แหล่งคาร์บอน				ความสามารถในการย่อย				การเจริญบนอาหารแข็งไทโรซีน	การสร้างรงควัตถุเมลาโนนินบนอาหารแข็งไทโรซีน
			แอล อะราบิโนส	ราฟฟิโนส	แรมโนส	ซูโครส	ไซแลน	กวานีน	อะดีนีน	ไฮโปแซนทีน		
D530906	81	RFF	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
DE30701	82	SC	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
DD30702	83	SC	+	+	+	-	NG	+	+	+	-	-
DB30704	84	SC	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
DB30705	85	SC	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
D630902	86	RAAL	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
DB30703	87	RAAL	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
G145703	88	RAAS	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
D245705	89	RAAS	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
G130703	90	RAAL	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
D445705	91	RAAL	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
DB30701	92	RAAL	-	-	+	-	+	-	NG	+	+	+
DE30705	93	RFF	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
DA30707	94	RFF	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
D630904	95	RFF	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
DA30702	96	SC	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
DE30704	97	SC	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
DC30707	98	RFS	-	-	+	-	NG	+	NG	+	-	-
DC30710	99	RAT	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
G130909	100	RAAS	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
D830902	101	RAAL	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
D445702	102	SC	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
DC30703	103	SC	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
DC30704		SC	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-

ตารางที่ 4.2 การจัดกลุ่ม actinomycetes จากสถาบันวิทยา สรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี (ต่อ)

ไอโซเลต	กลุ่ม	สถาบันวิทยาของสายสปอร์	การใช้แหล่งคาร์บอน				ความสามารถในการย่อย				การเจริญบนอาหารแข็งไทโรซีน	การสังเคราะห์วิตามินบีบนอาหารแข็งไทโรซีน
			แอล อะราบิโนส	ราฟฟิโนส	แรมโนส	ซูโคส	ไซแลน	กวานีน	อะดีนีน	ไฮโปแซนทีน		
O230901	104	RFF	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
G130903	105	RFF	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
O145902	106	RFF	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
D130705	107	RFF	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
DB30702	108	RAAS	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
O245704	109	RAAS	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
DC30705	110	SC	-	+	-	+	NG	-	NG	-	-	-
D645902	111	RAT	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
DC30701	112	RAAS	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
DA30704	113	SC	-	+	+	-	+	NG	NG	-	+	-
DE30702	114	RAAS	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
G230901	115	RFF	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
G145702	116	RAAL	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
G145709	117	RAAL	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
G230705	118	RAAL	+	-	-	-	+	+	NG	+	+	-
DA30705	119	RFF	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
D145707	120	RFF	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
O130703	121	RFF	+	-	-	-	+	+	NG	-	+	+
D545901	122	RFF	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
D630903	123	RFF	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
O230706	124	SC	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
G230703	125	RFS	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
O145705	126	RAT	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
DD30703	127	RAAS	+	-	-	-	NG	-	-	+	-	-

ตารางที่ 4.2 การจัดกลุ่ม actinomycetes จากสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี (ต่อ)

ไอโซเลต	กลุ่ม	สัณฐานวิทยาของสายสปอร์	การใช้แหล่งคาร์บอน				ความสามารถในการย่อย				การเจริญบนอาหารแข็งไทโรซีน	การสร้างรงควัตถุเมลานินบนอาหารแข็งไทโรซีน
			แอล อะราบีโนส	ราฟฟิโนส	แรมโนส	ซูโคลส	ไซแลน	กวานีน	อะดีนีน	ไฮโปแซนทีน		
O130708	128	RAAS	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
O230903	129	RAAS	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
G145704	130	RAAL	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
D230706	131	SC	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
O130706	132	RAAS	+	-	+	-	+	+	+	NG	+	-
D230701	133	RAAS	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
G230704	134	RAAL	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
D130708	135	RFF	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
D230702	136	RFF	+	-	+	+	+	-	NG	+	+	+
O145701	137	SC	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
O130702		SC	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
O130704		SC	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
DA30706	138	RAAS	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
O245706	139	RAAL	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-
O245703	140	RAAS	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
DC30708	141	RAAS	+	+	-	-	NG	NG	NG	NG	-	-
DC30702	142	RAAS	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
G230706	143	RFS	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
G230709	144	RFF	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
G145708	145	RFF	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
DB30706	146	RAAS	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D130707	147	RFF	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
D530703	148	RAAL	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
O130705	149	RFF	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+

ตารางที่ 4.2 การจัดกลุ่ม actinomycetes จากฐานฐานวิทยา สรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี (ต่อ)

ไอโซเลต	กลุ่ม	สัณฐานวิทยาของสายสปอร์	การใช้แหล่งคาร์บอน				ความสามารถในการย่อย				การเจริญบนอาหารแข็งไทโรซีน	การสร้างรงควัตถุเมลานินบนอาหารแข็งไทโรซีน
			แอล อะราบีโนส	ราฟฟิโนส	แรมโนส	ซูโดลส	ไซแลน	กวานีน	อะดีนีน	ไฮโปแซนทีน		
D530701	150	SC	+	-	-	+	-	-	+	NG	+	-
O130710	151	RASS	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
DD30705	152	RAAS	+	-	-	+	+	NG	NG	+	+	+
รวม 178	152											

หมายเหตุ

RAAL = สายสปอร์ปลายโค้งแบบตะขอบขนาดใหญ่ (Retinaculum Apertum Atypical Large)

RASS = สายสปอร์ปลายโค้งแบบตะขอบขนาดเล็ก (Retinaculum Apertum Atypical Small)

RAT = สายสปอร์ปลายโค้งแบบวงกลม (Retinaculum Apertum Atypical Typical)

RFF = สายสปอร์มีลักษณะโค้งงอเล็กน้อย (Rectus Flexibilis Flexuous)

RFS = สายสปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง (Rectus Flexibilis Straight)

SC = สายสปอร์เป็นเกลียว (Spiral&Coil; SC)

NG = ไม่เจริญ

+

-

จากการศึกษาสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี พบว่า actinomycetes ทั้ง 178 ไอโซเลตมีลักษณะใกล้เคียงกับ *Streptomyces* และสามารถจัดกลุ่มได้ 17 กลุ่มที่มีลักษณะฟีโนไทป์ที่เหมือนกัน และมี 135 ไอโซเลตที่มีลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันออกไป จึงสามารถจัดกลุ่ม *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ทั้งหมด 178 ไอโซเลตโดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ได้เป็น 152 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มที่มีลักษณะฟีโนไทป์ที่เหมือนกันคาดว่าน่าจะเป็น *Streptomyces* สายพันธุ์เดียวกันหรือใกล้เคียงกันมากแต่ทั้งนี้ก็ยังไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัดจากข้อมูลข้างต้นทางฟีโนไทป์ เนื่องจากการข้อมูลฟีโนไทป์ที่ได้มีจำนวนมากและหลากหลายอีกทั้งยังมีข้อจำกัดด้านข้อมูลฟีโนไทป์ที่ศึกษา ดังนั้นการจัดกลุ่มด้วยลักษณะฟีโน

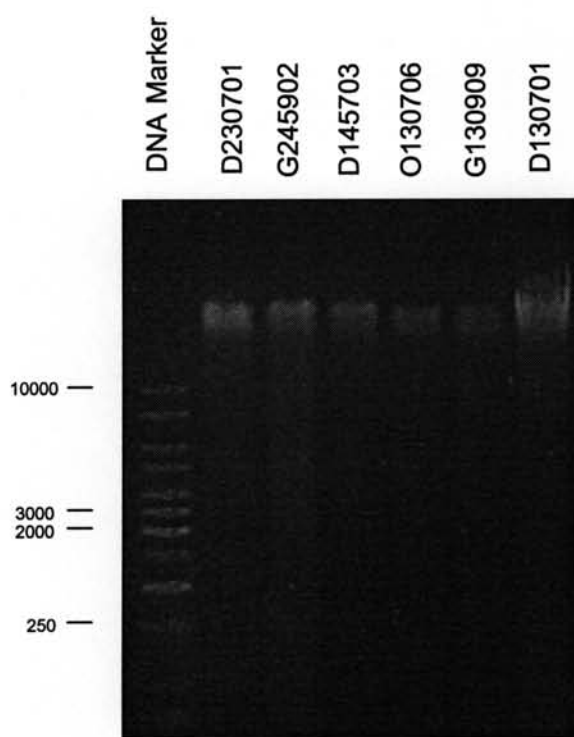
ไทป์จึงถือว่าการจัดจำแนกเบื้องต้นเท่านั้น ข้อมูลดังกล่าวเพียงข้อมูลเดียวไม่สามารถนำมาใช้ในการระบุความสัมพันธ์ของ *Streptomyces* spp. ในระดับสปีชีส์ได้ หลังจากนั้นจึงสุ่มคัดเลือกตัวแทนของกลุ่มที่จัดได้จากข้อมูลพีโนไทป์ทั้งหมด 100 ไอโซเลตเพื่อนำไปศึกษาถึงลักษณะจีโนไทป์ต่อไป

4.3 การศึกษาลักษณะจีโนไทป์ของ *Streptomyces* spp. เพื่อจัดกลุ่มด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

4.3.1 การจัดกลุ่มโดยใช้เทคนิคลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP

4.3.3.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาความเข้มข้นของจีโนมิคดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อ PCR

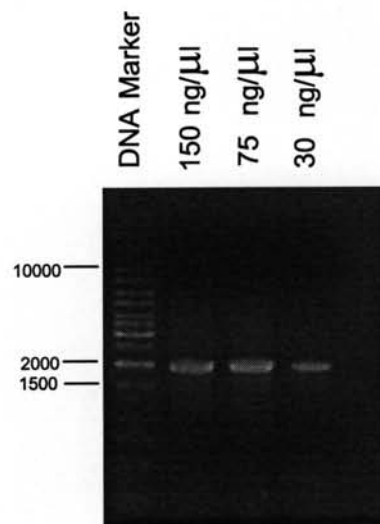
นำตัวแทนจากแต่ละกลุ่มที่สุ่มเลือกมาจากการจัดกลุ่มด้วยลักษณะพีโนไทป์จำนวน 100 ไอโซเลตมาสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ และตรวจสอบความเข้มข้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงเป็นตัวอย่างในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างการวิเคราะห์จีโนมิคดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิสของตัวแทนกลุ่ม *Streptomyces* spp.

จากการวิเคราะห์จีโนมคติเอ็นเอบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ามีความสมบูรณ์ ไม่มีรอยขาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอมีขนาดและมีความเข้มที่ใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตร และคำนวณหาอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} มีค่าอยู่ในระหว่าง 1.8 - 2.0 แสดงว่าจีโนมคติเอ็นเอมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปใช้ต่อไป

หลังจากนั้นนำจีโนมคติเอ็นเอมาเจือจางให้มีความเข้มข้นระหว่าง 30-150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S-ITS ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ pA และ BL235 แล้วจึงวิเคราะห์หาผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 4.2

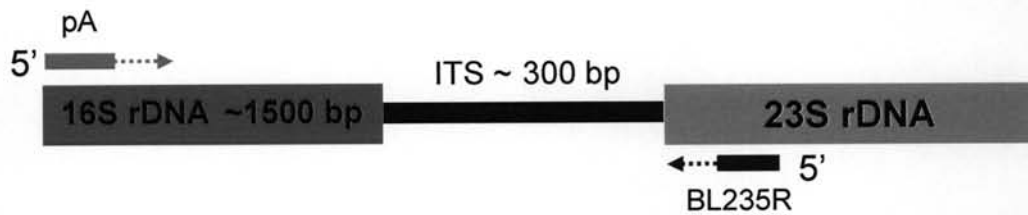


รูปที่ 4.2 ตัวอย่างผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ของไอโซเลต D230701 โดยใช้จีโนมคติเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลังจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าจีโนมคติเอ็นเอทุกความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 1800 bp เช่นเดียวกัน และไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจากปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะ แต่ความเข้มของแถบที่ได้จากความเข้มข้นของจีโนมคติเอ็นเอที่แตกต่างกันนั้นหมายถึงมีปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต่างกัน ซึ่งพบว่าจีโนมคติเอ็นเอที่มีความเข้มข้นระหว่าง 75-150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่มากพอในการนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับการวิเคราะห์ในต่อไป นอกจากนี้

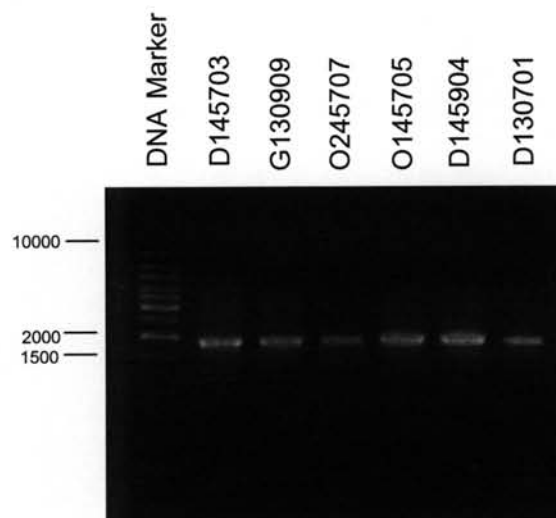
4.3.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S-ITS โดยวิธี PCR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S-ITS โดยเริ่มจากบริเวณ 16S rDNA ซึ่งมีความยาวประมาณ 1500 bp ไปจนถึงบริเวณ ITS ซึ่งมีความยาวประมาณ 300 bp ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ pA เป็น forward primer ที่จำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 8-27 ของ 16S rDNA และ BL235R เป็น reverse primer ที่จำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 3-20 ของ 23S rDNA ซึ่งตำแหน่งของบริเวณที่จะทำการเพิ่มปริมาณแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ไดอะแกรมบริเวณ 16S rDNA-ITS-23S rDNA และบริเวณที่ไพรเมอร์ต่างๆ จำเพาะที่ใช้ทำการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 1800 bp ตามที่ต้องการดังแสดงในรูปที่ 4.4



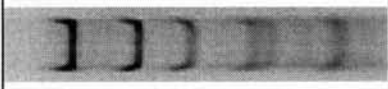


รูปที่ 4.4 ตัวอย่างการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ 16S-ITS มีขนาดประมาณ 1800 bp ของ *Streptomyces* spp. ที่เป็นตัวแทนกลุ่ม

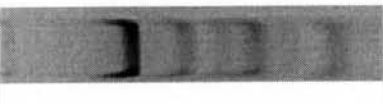




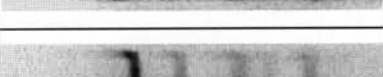


4.3.3.3 การจัดกลุ่มด้วยลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ที่ได้จากการตัด 16S-ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* และ *BstUI*

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนของบริเวณ 16S-ITS มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *HaeIII* หรือ *BstUI* โดยทำการตัดแยกกัน ซึ่งตัดแปลงจากรายงานของ Lanoot และคณะ (2005) ที่ทำการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิดร่วมกัน ทำให้ได้ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอรูปแบบเดียว แต่พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความซับซ้อนมาก เนื่องจากให้จำนวนแถบดีเอ็นเอจำนวนมากถึง 10-15 แถบ ดังนั้น ในการทดลองนี้ เพื่อให้ได้ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่ซับซ้อนมาก จึงทำการตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดแต่เป็นปฏิกิริยาตัดแยกกัน โดยในครั้งแรกได้ตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย *HaeIII* จากการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย *HaeIII* ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 4-6 แถบ หลังจากวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Quantity One ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จึงจัดกลุ่มตามรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกันไว้ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มจากทั้งหมด 100 ไอโซเลตเป็น 11 กลุ่มใหญ่ ตั้งชื่อเป็นกลุ่ม 11 ผลการจัดกลุ่มแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการจัดกลุ่มใหญ่ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII*



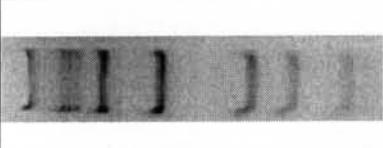

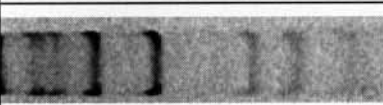
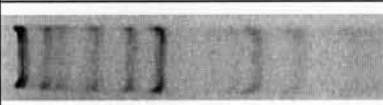
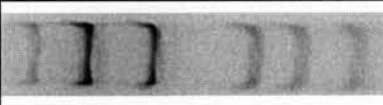




การจัดกลุ่มใหญ่ด้วยเอนไซม์ <i>HaeIII</i>	ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HaeIII</i>	สมาชิกกลุ่ม	จำนวน
กลุ่มที่ 1		D130706, D230705, D845903, G230704, D230903, D245701, D245902, O230903, G130905, D245707, D130707, G145703, D130905, D130711, D245702, D545902, G245902, D745903, D230701, D245905, D130705, O145903, G145705, D445701, D830903, O130709, O145707, G145708, D145902, D445703, G230902, D830902, O245905, O145701, D430902, O145902, D145703, D230702, O130708, O130703, DA30707, O130706, D845904, D445902, G130903, D145707, O130901	47
กลุ่มที่ 2		O245706, G130909, D845902, D645902, G245901, O145705, D245706, G130907, O245707, D430903, O130704, O230701, D230704, DB30702, D145903, D630903, D245908, D130703, O145708, D630904, O245704, D230901, D145904, G130902, DC30711, O145705, D745707	27
กลุ่มที่ 3		O245701, D130908, D745902, D545901	4

ตารางที่ 4.3 ผลการจัดกลุ่มใหญ่ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* (ต่อ)

การจัดกลุ่มใหญ่ด้วยเอนไซม์ <i>HaeIII</i>	ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HaeIII</i>	สมาชิกกลุ่ม	จำนวน
กลุ่มที่ 4		G230903, O245703, D445702, G230705, D845703, G145709, D530905, D130701	8
กลุ่มที่ 5		G230706, G230712, D530908, D530902, O230704	5
กลุ่มที่ 6		O230706, O245906, D730901	3
กลุ่มที่ 7		O130903, D530703	2
กลุ่มที่ 8		D145706	1
กลุ่มที่ 9		D230904	1
กลุ่มที่ 10		O145702	1
กลุ่มที่ 11		DC30709	1

จากนั้นนำตัวอย่างจากเชื้อที่ได้ในแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 1 ตัวอย่างไปตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*PI แล้วนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Quantity One พบว่าตัวอย่างที่จัดไว้ในกลุ่มเดียวกันจากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *HaeIII* มีรูปแบบดีเอ็นเอค่อนข้างหลากหลายเมื่อตัดด้วย *Bst*PI ดังนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้มาจัดจำแนกเป็นกลุ่มย่อย ผลการจัดกลุ่มได้แสดงในตารางที่ 4.4




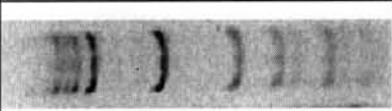

ตารางที่ 4.4 ผลการจัดกลุ่มย่อยด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*UI

การจัดกลุ่มย่อยด้วยเอนไซม์ <i>Bst</i> UI	ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bst</i> UI	สมาชิกกลุ่ม	จำนวน
กลุ่มที่ 1/1		D130706, D230705, D845903, G230704, D230903	5
กลุ่มที่ 1/2		D245701, D245902, O230903, G130905	4
กลุ่มที่ 1/3		D245707, D130707, G145703, D130905, D130711, D245702, D545902	7
กลุ่มที่ 1/4		G245902, D745903, D230701, D245905, D130705	5
กลุ่มที่ 1/5		O145903, G145705, D830903, O130709, D445701	5
กลุ่มที่ 1/6		O145707, G145708, D145902, D445703, G230902, D830902	6
กลุ่มที่ 1/7		O245905, O145701, D430902	3
กลุ่มที่ 1/8		O145902, D145703	2
กลุ่มที่ 1/9		D230702, O130708, O130703	3
กลุ่มที่ 1/10		DA30707, O130706	2
กลุ่มที่ 1/11-15	แสดงในภาคผนวก	D845904, D445902, G130903, D145707, O130901	5
กลุ่มที่ 2/1		O245706, G130909, D845902, D645902, G245901, O145705, D245706, D745707	8

ตารางที่ 4.4 ผลการจัดกลุ่มย่อยด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BstUI (ต่อ)

การจัดกลุ่มย่อยด้วยเอนไซม์ BstUI	ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ BstUI	สมาชิกกลุ่ม	จำนวน
กลุ่มที่ 2/2		G130907, O245707, D430903, O130704, O230701, D230704, DB30702	7
กลุ่มที่ 2/3		D145903, D630903, D245908	3
กลุ่มที่ 2/4		D130703, O145708, D630904	3
กลุ่มที่ 2/5-10	แสดงในภาคผนวก	O245704, D230901, D145904, G130902, DC30711, O145705	6
กลุ่มที่ 3/1		O245701, D130908	2
กลุ่มที่ 3/3-4	แสดงในภาคผนวก	D745902, D545901	2
กลุ่มที่ 4/1		G230903, O245703, D445702, G230705	4
กลุ่มที่ 4/2		D845703, G145709, D530905	3
กลุ่มที่ 4/3	แสดงในภาคผนวก	D130701	1
กลุ่มที่ 5/1		G230706, G230712	2
กลุ่มที่ 5/2		D530908, D530902	2
กลุ่มที่ 5/3	แสดงในภาคผนวก	O230704	1

ตารางที่ 4.4 ผลการจัดกลุ่มย่อยโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*UI (ต่อ)

การจัดกลุ่มย่อยด้วยเอนไซม์ <i>Bst</i> UI	ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hae</i> III	สมาชิกกลุ่ม	จำนวน
กลุ่มที่ 6/1		O230706	1
กลุ่มที่ 6/2		O245906	1
กลุ่มที่ 6/3		D730901	1
กลุ่มที่ 7/1		O130903	1
กลุ่มที่ 7/2		D530703	1

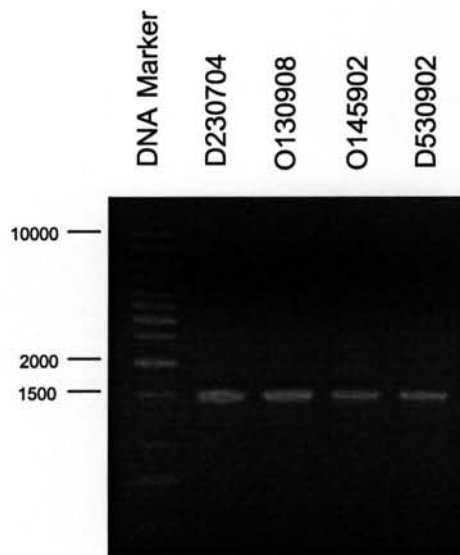
จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบริเวณ 16S-ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hae*III ประกอบกับ *Bst*UI สามารถจัดกลุ่ม *Streptomyces* spp. 100 ไอโซเลตได้เป็นกลุ่มใหญ่ 11 กลุ่มจาก *Hae*III และกลุ่มย่อย 39 กลุ่มจาก *Bst*UI เมื่อเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มด้วยลักษณะฟีโนไทป์ (ตารางที่ 4.2) พบว่ามีความสอดคล้องกันบางส่วนจากการจัดกลุ่มด้วยลักษณะฟีโนไทป์กับลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16S-ITS RFLP แต่ก็มีข้อมูลจำนวนมากที่ไม่สอดคล้องกัน เนื่องจากความหลากหลายของลักษณะฟีโนไทป์ที่พบ และการศึกษาลักษณะจีโนไทป์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบริเวณ 16S-ITS ให้ข้อมูลที่น้อยกว่า จึงสามารถจัดกลุ่มได้อย่างง่ายและชัดเจนมากขึ้น และเพื่อเป็นการยืนยันความแม่นยำของการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค 16S-ITS RFLP จึงนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับจัดกลุ่มด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA ในขั้นต่อไป

4.3.2 การจัดกลุ่มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA

คัดเลือกตัวแทน *Streptomyces* จากแต่ละกลุ่มที่จัดด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP ทั้งหมด 29 ไอโซเลต มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA

4.3.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยวิธี PCR

ตัวแทนในแต่ละกลุ่มย่อยที่คัดเลือกมาทั้งหมด 29 ไอโซเลตดังต่อไปนี้คือ DC30709 D245707 G145708 O230704 D230903 O130706 O130903 O145902 O145702 D145706 O145708 D230704 O145903 O245704 O145701 D230701 D530902 D245701 D230904 O230706 O130708 O245701 O245706 D245908 D730901 O245906 D130908 D845703 G230704 และ G230705 (ตารางที่ 4.4) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 1500 bp ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ pA และ pH แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 1500 bp ตามที่ต้องการ ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 4.5

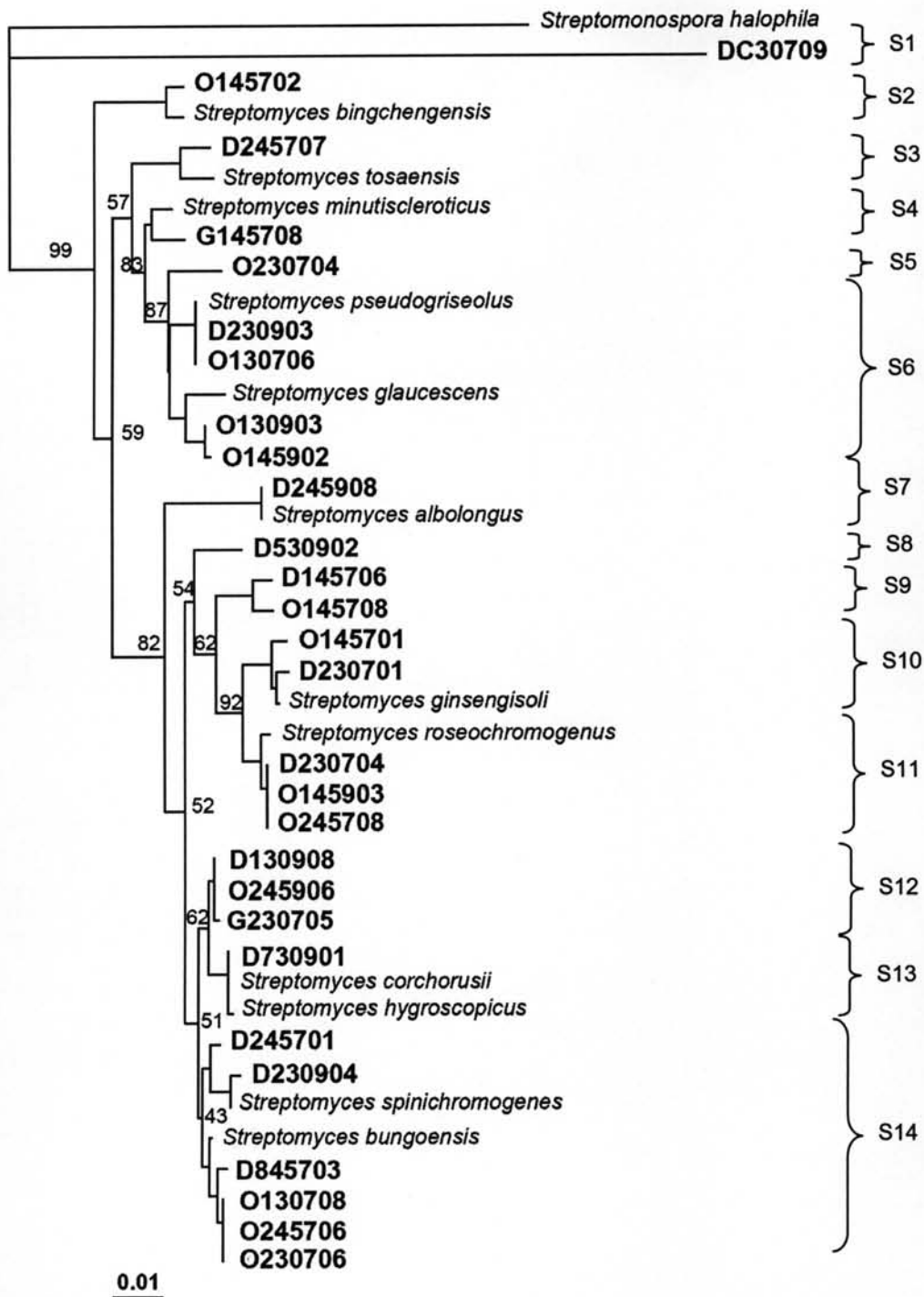


รูปที่ 4.5 ตัวอย่างการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR 16S rDNA

หลังจากนั้นจึงแยกผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากอะกาโรสเจลและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

4.3.2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไอโซเลตตัวแทนกลุ่มที่ถูกจัดจำแนกด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP และสร้าง Phylogenetic Tree

หลังจากได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อระบุชนิดของไอโซเลต พบว่าจากทั้งหมด 29 ไอโซเลตเป็น *Streptomyces* spp. 28 ไอโซเลต *Amycolatosis* spp. 1 ไอโซเลต (ภาคผนวก ง) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ทั้งหมด 29 ไอโซเลตประกอบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Streptomyces* spp. 12 สายพันธุ์จากฐานข้อมูล GenBank ดังต่อไปนี้ *Streptomyces bingchengensi* (AB245393) *Streptomyces tosaensis* (AB184489) *Streptomyces minutiscleroticus* (EF178696) *Streptomyces pseudogriseolus* (DQ442541) *Streptomyces glaucescens* (AB184843) *Streptomyces albolongus* (AB184425) *Streptomyces ginsengisoli* (AB245393) *Streptomyces roseochromogenus* (AB184512) *Streptomyces corchorusii* (AB184267) *Streptomyces hygrosopicus* (EF063474) *Streptomyces spinichromogenes* (AB184534) *Streptomyces bungoensis* (AY999905) (ภาคผนวก ง) ถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อสร้าง Phylogenetic Tree เพื่อหาความสัมพันธ์กันในระดับสปีชีส์ และเป็นการยืนยันความหลากหลายของ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 Phylogenetic Tree ของตัวแทน *Streptomyces* spp. ทั้ง 29 ไอโซเลต ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Streptomonospora halophila* นำมาจากรฐานข้อมูล GenBank เพื่อใช้เป็นรากของ Phylogenetic Tree 0.01 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเบส 1 ตำแหน่งในจำนวน 100 นิวคลีโอไทด์ ตัวเลขในจุดแตกกิ่งแสดงโอกาสในการปรากฏ 1000 ครั้งใน bootstrap tree

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Streptomyces* spp. ทั้ง 29 ไอโซเลตมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกันมากซึ่งหมายถึงมีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกันมาก หลังจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Phylogenetic Tree พบว่าสามารถจัดกลุ่มจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA โดยใช้ค่าของ bootstrap tree ที่มีค่ามากกว่า 50% ขึ้นไปในแต่ละกิ่ง ได้เป็น 14 กลุ่ม และพบว่าไอโซเลต DC30709 ถูกแยกออกมาจาก phyletic line จึงเป็นไอโซเลตที่คาดว่าน่าจะเป็นสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งจะต้องทำการศึกษาทั้งทางด้านจีโนมไทป์และฟีโนไทป์ให้ละเอียดต่อไป หลังจากนั้นนำข้อมูลการจัดกลุ่มจาก Phylogenetic Tree มาเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มด้วยข้อมูล 16S-ITS RFLP เพื่อศึกษาความสอดคล้องของการจัดกลุ่มทั้งสองวิธี ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบการจัดกลุ่มด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA กับ การจัดกลุ่มด้วยข้อมูล 16S-ITS RFLP

ไอโซเลต	การจัดกลุ่มด้วย 16S rDNA	การจัดกลุ่มด้วย16S-ITS RFLPด้วย เอนไซม์ <i>HaeIII</i>
DC30709	S1	11
O145702	S2	10
D245707	S3	1
G145708	S4	1
O230704	S5	5
O145902	S6	1
O130706		7
D230903		1
O130903		1
D245908	S7	2
D530902	S8	5
D145706	S9	8
O145708		2
O145701	S10	1
D230701		1
D230704	S11	2
O145903		1
O245704		2

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบการจัดกลุ่มด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA กับ การจัดกลุ่มด้วยข้อมูล 16S-ITS RFLP (ต่อ)

ไอโซเลต	การจัดกลุ่มด้วย 16S rDNA	การจัดกลุ่มด้วย16S-ITS RFLPด้วย เอนไซม์ <i>HaeIII</i>
D130908	S12	3
O245906		6
G230705		4
D730901	S13	6
D245701	S14	1
O130708		1
O245706		2
D845703		4
O230706		6
D230904		9

จากการเปรียบเทียบการจัดกลุ่มด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA กับ การจัดกลุ่มด้วยข้อมูลลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP พบการกระจายตัวของการจัดกลุ่มด้วย16S-ITS RFLP อยู่ในการจัดกลุ่มด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA อยู่ในหลายกลุ่ม แต่พบว่ามีความสอดคล้องกันในหลายกลุ่มเช่นในกลุ่ม S10 มีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP และในกลุ่ม S1 และ S2 ที่ถูกแยกออกมาเพียงหนึ่งไอโซเลต เช่นเดียวกับการจัดกลุ่มด้วย 16S-ITS RFLP นอกจากนี้การจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP ให้ข้อมูลที่ละเอียดกว่าการจัดกลุ่มด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ดังแสดงในกลุ่ม S6 S11 S12 และ S14 ที่ตรงกับการจัดกลุ่มด้วย 16S-ITS RFLP มากกว่า 1 กลุ่ม ดังนั้นการจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP จึงเป็นวิธีที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ *Streptomyces* spp. ในระดับสปีชีส์หรือในระดับสายพันธุ์ได้ และนำมาจัดกลุ่ม *Streptomyces* spp. เบื้องต้นได้

4.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านจุลชีพโดยใช้วิธี **stainless cup**

นำ *Streptomyces* ทั้งหมด 178 ไอโซเลตที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านจุลชีพโดยใช้วิธี **stainless cup** และวัดความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (ภาคผนวก ง) พบว่า *Streptomyces* spp. ทั้งหมด 19 ไอโซเลตที่แยกได้มีความสามารถสร้างสารต้านจุลชีพกับสายพันธุ์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ได้และความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อสายพันธุ์ทดสอบแตกต่างกัน วัดได้จากความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น พบว่ามี *Streptomyces* spp. 4 ไอโซเลต คือ O230704 O245706 D245909 และ D630903 สามารถสร้างสารต้านการเจริญของ *Candida albicans* และ *Aspergillus niger* และมี 2 ไอโซเลต คือ O145702 และ DC30711 สามารถสร้างสารต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดจากการสร้างสารต้านจุลชีพของ *Streptomyces* ทั้ง 19 ไอโซเลต

รหัส จุลชีพทดสอบ	<i>C. albican</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. niger</i>
	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (เซนติเมตร)			
G145708	0	0	1.6	0
G245901	0	0	0	2.0
O145702	3.0	0	1.5	0
O145904	0	0	2.0	0
O230701	0	0	1.2	0
O230704	1.5	0	0	1.2
O230901	0	0	1.5	0
O245704	1.8	0	0	0
O245706	1.5	0	0	1.2
D230704	2.5	0	0	0
D230904	0	0	1.6	0
D245904	0	0	0	1.2
D245909	3.0	0	0	1.7
D445705	2.5	0	0	0
D530901	1.7	0	0	0
D630903	1.5	0	0	2.5
D645901	0	0	1.0	0
DB30704	0	0	1.4	0
DC30711	1.5	0	1.8	0
รวม	10	0	9	6

หมายเหตุ กำหนดให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส 2.5-3.0 เซนติเมตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญดีที่สุด น้อยกว่า 2.5-1.5 เซนติเมตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญดีปานกลางและน้อยกว่า 1.5-1.0 เซนติเมตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญต่ำ