



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การระบุสายพันธุ์และลักษณะของ actinomycetes ที่คัดแยกจากชันโรง (*Tetragonula laeviceps*) และผึ้งโพรง (*Apis cerana*)

ชื่อนิสิต นายน้ำเพชร เจียรนัยปยุกต์ เลขประจำตัว 5832328323

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการ

การระบุสายพันธุ์และลักษณะของ actinomycetes ที่คัดแยกจากชันโรง  
(*Tetragonula laeviceps*) และผึ้งโพรง (*Apis cerana*)

โดย

นายน้ำเพชร เจียรนัยปยุกต์ รหัสนินิต 5832328323

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพิงคะ

ปีการศึกษา

2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

*Wongkorn*

หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลฉวีชัย)

คณะกรรมการสอบโครงการ

*Wongkorn*

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ  
(อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพิงคะ)

*Orathai*

กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรทัย ภิญญาคง)

*Ekawat*

กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การระบุสายพันธุ์และลักษณะของ actinomycetes ที่คัดแยกจากชันโรง (*Tetragonula laeviceps*)  
และผึ้งโพรง (*Apis cerana*)

โดย

นายน้ำเพชร เจียรนัยปยุกต์

เลขประจำตัวนิต 5832328323

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ

อาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2561

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ชื่อโครงการ การระบุสายพันธุ์และลักษณะของ actinomycetes ที่คัดแยกจากชันโรง (*Tetragonula laeviceps*) และผึ้งโพรง (*Apis cerana*)

นิสิตในโครงการ นายน้ำเพชร เจียรนัยปยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพิงคะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทคัดย่อ

นับตั้งแต่มีการค้นพบยาปฏิชีวนะชนิดแรก คือ เพนิซิลินเมื่อปี พ.ศ.2471 ยาปฏิชีวนะได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์อย่างแพร่หลาย ทำให้มีจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะถือกำเนิดขึ้น ยาที่มีอยู่จึงไม่สามารถใช้รักษาโรคได้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อปัญหาทางสาธารณสุขเป็นอย่างมาก การหาสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งเชื้อดื้อยาเหล่านี้จึงมีความสำคัญ โดยหนึ่งในผู้ผลิตสารปฏิชีวนะที่ใหญ่ที่สุดคือแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีทีส (actinomycetes) โดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* ดังนั้น การแยกเชื้อ *Streptomyces* จากแหล่งที่ยังไม่มีการค้นหา เช่น แมลง ซึ่งมีการอาศัยอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ในลักษณะพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) อาจนำไปสู่การค้นพบสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่ได้ ในงานวิจัยนี้ได้นำ actinomycetes จำนวน 41 ไอโซเลทซึ่งคัดแยกจากแมลง 2 ชนิดได้แก่ ชันโรง (*Tetragonula laeviceps*) และผึ้งโพรง (*Apis cerana*) มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ISP-2 เพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา และนำ actinomycetes จำนวน 39 ไอโซเลทมาเลี้ยงบนอาหาร MR5 เพื่อทดสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบ โดยผลการทดสอบพบว่า actinomycetes กว่า 80 % ที่เพาะเลี้ยงได้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ซึ่งได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* จากนั้นจึงนำยีน 16S rRNA จำนวน 18 ไอโซเลทมาเพิ่มจำนวน วิเคราะห์ลำดับเบส และทำการระบุสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน พบว่า actinomycetes ที่นำมาวิเคราะห์เป็นสกุล *Streptomyces* ทั้งหมด ซึ่งได้แก่ *Streptomyces drozdowiczii*, *Streptomyces fumigatiscleroticus*, *Streptomyces seoulensis*, *Streptomyces bikiniensis*, *Streptomyces anandii* และ *Streptomyces andamanensis* และพบว่ามัลักษณะทางสัณฐานวิทยารวมถึงฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบที่ใกล้เคียงกันกับที่เคยมีรายงานไว้แล้ว ต่อมาได้ทำการวิเคราะห์ความใกล้ชิดของแต่ละไอโซเลทด้วยการสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ยีน 16S rRNA ของ actinomycetes สายพันธุ์ที่เคยมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับแมลงในการวิเคราะห์ และพบว่าไอโซเลทที่แยกได้จากชันโรงและผึ้งโพรงถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันที่ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ผลของการศึกษาในครั้งนี้อาจนำไปสู่การค้นพบ actinomycetes สายพันธุ์ใหม่ และอาจนำไปสู่การพัฒนาชนิดใหม่เพื่อนำไปใช้ในอนาคตได้

**Project title** Identification and characterization of actinomycetes isolated from stingless bee (*Tetragonula laeviceps*) and honey bee (*Apis cerana*)

**Investigator** Nampetch Charanaipayuk

**Advisor** Dr. Chompoonik Kanchanabanca

**Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University**

---

Since the first antibiotic, penicillin, was discovered in 1928, antibiotics are commonly used worldwide. Consequently, antibiotic resistance microorganisms have emerged and antibiotic drugs become ineffective leading to serious public health problems. Therefore, searching for new drugs is necessary. One of the greatest antibiotic producers are actinomycetes, especially *Streptomyces* genus, so actinomycetes isolated from novel source, i.e. symbionts of insects, could potentially lead to the discovery of novel bioactive compound. In this study, 41 isolates of actinomycetes obtained from eastern honey bees (*Apis cerana*) and stingless bees (*Tetragonula laeviceps*) were investigated as source to isolate actinomycetes. We examined colony morphology on ISP-2 agar, and 39 isolates tested for antimicrobial compound production on MR5 agar. We found that more than 80 % of these isolates exhibited antimicrobial activity against tested species *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*, 16S rRNA gene of 18 isolates were amplified and sequenced for the molecular identification of the isolates. The result showed all sequenced isolates are *Streptomyces*. The closely related strains were identified as *Streptomyces drozdowiczii*, *Streptomyces fumigatiscleroticus*, *Streptomyces seoulensis*, *Streptomyces bikiniensis*, *Streptomyces anandii* and *Streptomyces andamanensis* and found that morphology and antimicrobial activity are similar with those closely related strains. Additionally, phylogenetic trees were constructed using 16s rRNA gene of previously reported insect symbiont *Streptomyces* strains. The result showed there is no different cluster between stingless bee isolated and honey bee isolated. However, this study suggest the potential of novel drugs discovery from *Streptomyces* related to *A. cerana* and *T. laeviceps* in the future.

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยโครงการเสริมประสบการณ์นี้จะสำเร็จลุล่วงด้วยดีไม่ได้ หากไม่ได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากอาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพิงคะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาได้มอบความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ พร้อมกับอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจที่ตลอดในการทำวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนได้ปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ทำให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์และสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดระยะเวลาการศึกษาและการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครลาภสกุล เพื่อน ๆ และพี่ ๆ ห้องวิจัย 2014 ที่อนุเคราะห์เครื่องมือต่าง ๆ รวมทั้งให้คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์จิราภรณ์ ธนียวัน ที่อนุเคราะห์เชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ในการงานวิจัย

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ที่คอยถามสารทุกข์สุขดิบของข้าพเจ้า และคอยติดตามความคืบหน้าของงานวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนเพิ่มศักยภาพส่วนงานในด้านการวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องวิจัย 2018 สำหรับความช่วยเหลือ ความเมตตา คำแนะนำ ในการทำวิจัยทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ปรัชญา รัชชธนาพิทักษ์ ที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือต่าง ๆ ในงานวิจัย และให้กำลังใจเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณพี่อภิญญา สุวรรณวงศ์ที่เป็นกำลังใจ คอยช่วยเหลือและอยู่เคียงข้างข้าพเจ้าในการเรียนและการใช้ชีวิตมาโดยตลอด

ขอขอบคุณรุ่นพี่ เพื่อน รุ่นน้องทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยาและคณะอื่น ๆ ที่คอยให้กำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณพี่ ๆ บริษัท อุตสาหกรรมทิววงษ์ จำกัด ที่ได้มอบประสบการณ์ต่าง ๆ ในช่วงฝึกงานทำให้การวิจัยเป็นไปได้อย่างราบรื่น

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และเครือญาติทุกคนที่คอยอบรม สั่งสอน และให้การสนับสนุนจนสำเร็จการศึกษาได้

นายน้ำเพชร เจียรนัยปยุกต์

(Nampetch Charanaipayuk)

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินการทดลอง	11
2.1 เครื่องมือ วัสดุและเคมีภัณฑ์	11
2.2 วิธีดำเนินการทดลอง	15
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	20
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	42
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	48
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	49
ภาคผนวก ข สูตรและวิธีการเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลาย	51
ภาคผนวก ค ข้อมูลอ้างอิงการทดลอง	53



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1.1 ลำดับการค้นพบยาปฏิชีวนะที่ผลิตจากสารเมตาบอไลต์ของ <i>Streptomyces</i>	5
ตารางที่ 2.1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	14
ตารางที่ 2.2 ปริมาตรและความเข้มข้นของสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณยีน	18
ตารางที่ 2.3 สภาวะของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในแต่ละขั้นตอนเพื่อเพิ่มจำนวนยีน	18
ตารางที่ 3.1 การจัดกลุ่ม actinomycetes ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เจริญบนอาหารแข็ง ISP-2	21
ตารางที่ 3.2 การจัดกลุ่ม actinomycetes ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เจริญบนอาหารแข็ง ISP-2 และ MR5	23
ตารางที่ 3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี agar plug	26
ตารางที่ 3.4 การจัดกลุ่ม actinomycetes ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร ISP-2, MR5 และฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบ	27
ตารางที่ 3.5 การระบุสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงของ actinomycetes ที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยโปรแกรม Blastn	34
ตารางที่ 3.6 การจัดกลุ่ม actinomycetes ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร ISP-2, MR5 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบ และการระบุสายพันธุ์	37
ตารางที่ 3.7 ตารางแสดงตัวอย่างของแมลงที่สามารถคัดแยก actinobacteria ที่ใช้อ้างอิงการทำ phylogenetic tree	41
ตารางที่ 5.1 ตารางแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการทดลองการต้านจุลินทรีย์ทดสอบ	53
ตารางที่ 5.2 ตารางแสดง actinomycetes ที่นำมาสร้าง phylogenetic tree	55

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1.1 รูปแสดงสัณฐานวิทยาของ actinomycetes บนอาหารแข็ง และภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	2
รูปที่ 1.2 รูปแสดงลักษณะโครงสร้างผนังเซลล์ของ actinomycetes	2
รูปที่ 1.3 รูปแสดงลักษณะสปอร์ของ actinomycetes	3
รูปที่ 1.4 โครงสร้างของ geosmin	3
รูปที่ 1.5 ลักษณะวงจรชีวิตของ <i>Streptomyces</i>	4
รูปที่ 1.6 ตัวอย่างโครงสร้างของยาปฏิชีวนะซึ่งสกัดจากสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิของ <i>Streptomyces</i>	5
รูปที่ 1.7 รูปแสดงความสัมพันธ์ของ <i>Streptomyces</i> , แมลง และจุลินทรีย์ก่อโรค	7
รูปที่ 1.8 โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจาก <i>Streptomyces</i> sp. MspM5 ซึ่งคัดแยกได้จากปลวก	7
รูปที่ 1.9 โครงสร้างของ mycangimycin ที่ผลิตจาก <i>Streptomyces</i> sp. ซึ่งคัดแยกได้จากด้วงสนภูเขา	8
รูปที่ 1.10 โครงสร้างของ sceliphrolactam ที่ผลิตจาก <i>Streptomyces</i> spp. ซึ่งคัดแยกได้จากตัวต่อ	8
รูปที่ 1.11 รูปเส้นใยของ actinomycetes ที่คัดแยกได้จากชันโรง <i>T. collina</i> ในประเทศไทย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	9
รูปที่ 2.1 รูปแสดงตำแหน่งการวางชิ้นวุ้น actinomycetes เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี agar plug	16
รูปที่ 3.1 รูปแสดงตัวอย่างสีของอาหาร ISP-2 ด้านล่าง	20
รูปที่ 3.2 รูปแสดงตัวอย่างสีของสปอร์บนอาหาร ISP-2	20
รูปที่ 3.3 รูปแสดงตัวอย่างสีของเม็ดสีที่สร้างบนโคโลนี	20
รูปที่ 3.4 รูปแสดงตัวอย่างสีของการผลิตเม็ดสีที่ละลายน้ำได้	21
รูปที่ 3.5 รูปแสดงตัวอย่างสีของอาหาร MR5 ด้านล่าง	22
รูปที่ 3.6 รูปแสดงตัวอย่างสีของสปอร์บนอาหาร MR5	22
รูปที่ 3.7 รูปแสดงตัวอย่างสีของการผลิตเม็ดสีที่ละลายน้ำได้	22
รูปที่ 3.8 รูปแสดงตัวอย่างการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี agar plug	25
รูปที่ 3.9 ผลการตรวจสอบการสกัด genomic DNA ด้วยการทำให้เลคโตรโพรีซิส	29
รูปที่ 3.10 ผลการตรวจสอบการสกัด genomic DNA หลังจากนำไปบ่มด้วย RNase A ด้วยการทำให้เลคโตรโพรีซิส	29
รูปที่ 3.11 ผลการตรวจสอบการสกัด genomic DNA หลังจากลดปริมาณของเชื้อด้วยการทำให้เลคโตรโพรีซิส	30
รูปที่ 3.12 ผลการตรวจสอบการสกัด genomic DNA ด้วยการทำให้เลคโตรโพรีซิส	31

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
รูปที่ 3.13 ผลการตรวจสอบการสกัด genomic DNA หลังจากนำไปบ่มด้วย RNase A ด้วยการทำให้เลคโตรโพรีซิส	31
รูปที่ 3.14 ผลการตรวจสอบการสกัด genomic DNA หลังจากนำไปบ่มด้วย RNase A ด้วยการทำให้เลคโตรโพรีซิส	32
รูปที่ 3.15 ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA ด้วยการทำให้เลคโตรโพรีซิส	33
รูปที่ 3.16 รูปแสดง Neighbor-Joining phylogenetic tree ที่ได้จากการเทียบยีน 16S rRNA	40

## บทที่ 1

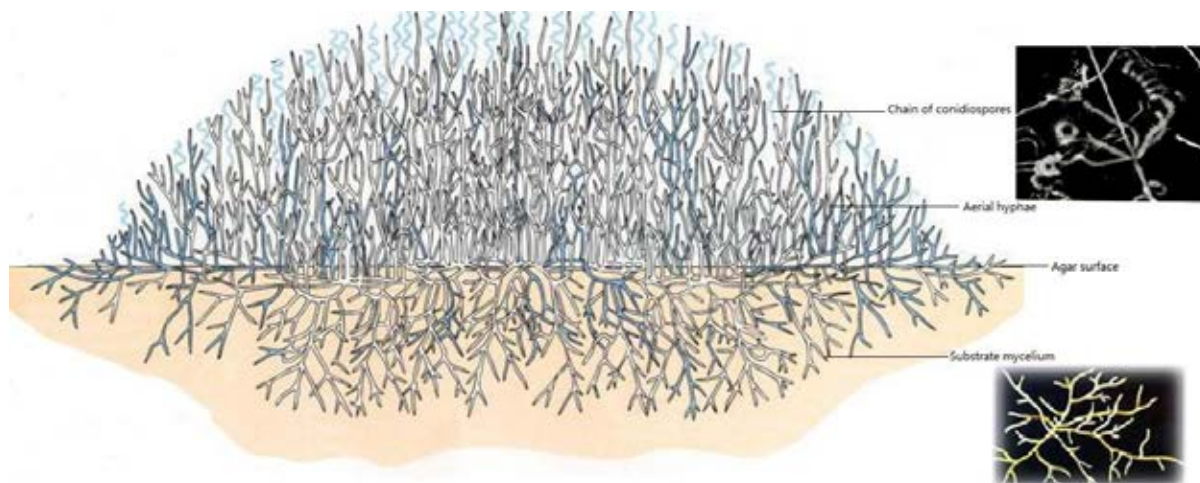
### บทนำ

#### 1.1 ยาปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์

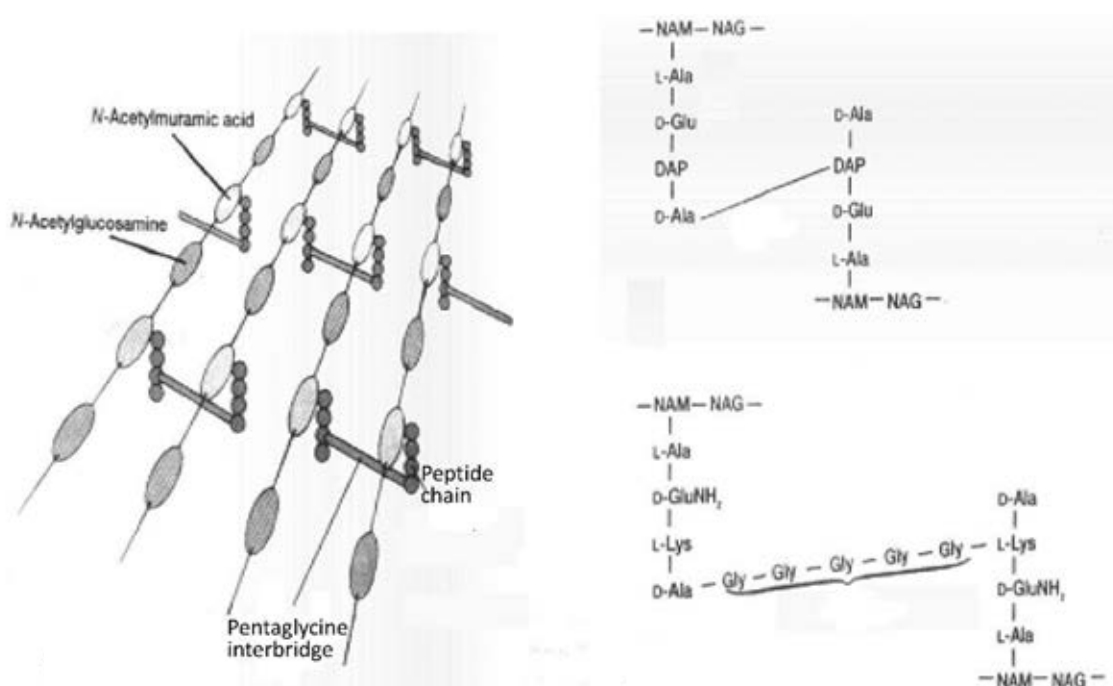
ยาปฏิชีวนะหมายถึงยาที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยยาปฏิชีวนะอาจผลิตได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ สำหรับยาปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพมักจะเป็นสารจำพวกเมตาบอไลต์ (metabolite) ซึ่งสามารถพบได้ทั้งเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) โดยส่วนมาก เมตาบอไลต์ปฐมภูมิมักจะผลิตขึ้นโดยสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ สามารถเป็นได้ทั้งพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) และกรดไขมัน (fatty acid) (Berdy, 2005) ในขณะที่การผลิตเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ มักจะไม่สัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ การผลิตมักจะขึ้นกับสารอาหารที่จุลินทรีย์ได้รับ (Drew and Demain, 1977) สามารถออกฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย รา ไวรัส รวมถึงเซลล์มะเร็งได้ (Berdy, 2005) โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดี คือ แบคทีเรียกลุ่ม actinomycetes ซึ่งในปัจจุบันพบว่า 45% ของยาปฏิชีวนะผลิตมาจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้ (Ouchari et al., 2018)

#### 1.2 Actinomycetes

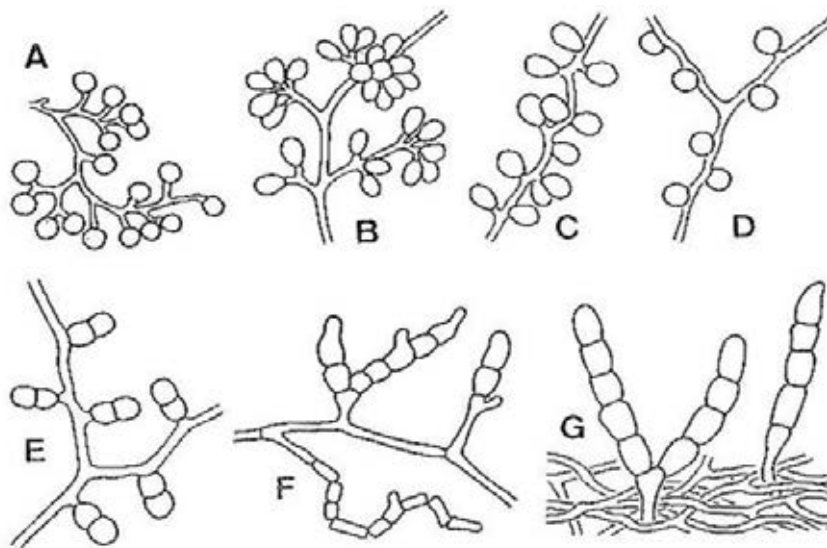
Actinomycetes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) ที่มีลักษณะพิเศษคือ สามารถเจริญโดยการสร้างเส้นใยและสปอร์ (spore) ได้ โดยมีการสร้างเส้นใย 2 ชนิด คือ เส้นใยใต้ผิวอาหารเรียกว่า substrate mycelium และเส้นใยเหนือผิวอาหารเรียกว่า aerial mycelium (รูปที่ 1.1) ในจีโนมมีปริมาณนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่มีเบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) สูง (Lo et al., 2002) ผนังเซลล์มีองค์ประกอบของไกลแคน (glycan) โดยมีหน่วยย่อยเป็น N-acetyl glucosamine (NAG) และ N-acetyl muramic acid (NAM) ซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะ  $\beta$ -(1,4)-glycosidic และพบ diaminopimelic (DAP) (รูปที่ 1.2) (Chaudhary et al., 2013) สามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ตามดินหรือแหล่งน้ำตามธรรมชาติ สปอร์ของ actinomycetes สามารถพบลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้หลายรูปแบบ (รูปที่ 1.3) actinomycetes มีด้วยกันหลายสกุล ได้แก่ *Streptosporangium*, *Micromonospora*, *Microbiospora*, *Nocardia*, *Dectylosporangium*, *Microtetraspora*, *Actinomadura*, *Actinoplanes* และที่พบได้มากที่สุดคือ *Streptomyces* (Hayakawa, Ishizawa, and Nonomura, 1988)



รูปที่ 1.1 รูปแสดงสัณฐานวิทยาของ actinomycetes บนอาหารแข็ง และภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Li et al., 2016)



รูปที่ 1.2 รูปแสดงลักษณะโครงสร้างผนังเซลล์ของ actinomycetes (Prescott et al., 1999)

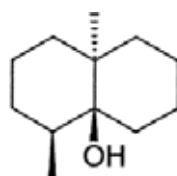


รูปที่ 1.3 รูปแสดงลักษณะสปอร์ของ actinomycetes (A) *Micromonospora*, (B) *Thermomonospora*, (C) *Saccharomonospora*, (D) *Thermoactinomyces*, (E) *Microbispora*, (F) *Nocardia brevicatena* และ (G) *Catellatospora* (Li et al., 2016)

### 1.3 Streptomyces

#### 1.3.1 ลักษณะทั่วไปของ Streptomyces

*Streptomyces* เป็นแบคทีเรียสกุลที่ใหญ่ที่สุดของ actinomycetes โดยในปัจจุบันมีการค้นพบมากกว่า 500 สายพันธุ์ (Ikeda et al., 2003) โดยทั่วไปแล้วจะพบ *Streptomyces* ดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลาย (saprophyte) (Flärdh and Buttner, 2009) โดยการหลั่งเอนไซม์ (enzyme) ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ โดย *Streptomyces* สามารถย่อยสลายสารประกอบจำพวก ไนเตรต (nitrate) เคซีน (casein) เจลาติน (gelatin) แป้ง รวมถึงเซลลูโลส (cellulose) เพื่อนำไปใช้ในการเจริญ (Book et al., 2016) โคลนินของ *Streptomyces* บนอาหารแข็งจะมีลักษณะเป็นผง (powdery) คล้ายผ้ากำมะหยี่ (velvety) นอกจากนี้ยังอาจพบการสร้างเม็ดสี (pigment) และสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Flärdh and Buttner, 2009) โดยสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิของแบคทีเรียสกุลนี้ นอกจากจะมีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นแล้ว ยังมีการผลิตสารที่ชื่อว่า geosmin ซึ่งทำให้ดินมีกลิ่นเฉพาะตัว ทำให้ทราบได้ว่า *Streptomyces* มีการกระจายตัวอยู่ในดินตามธรรมชาติ (Flärdh and Buttner, 2009) โครงสร้างของ geosmin แสดงดังรูปที่ 1.4

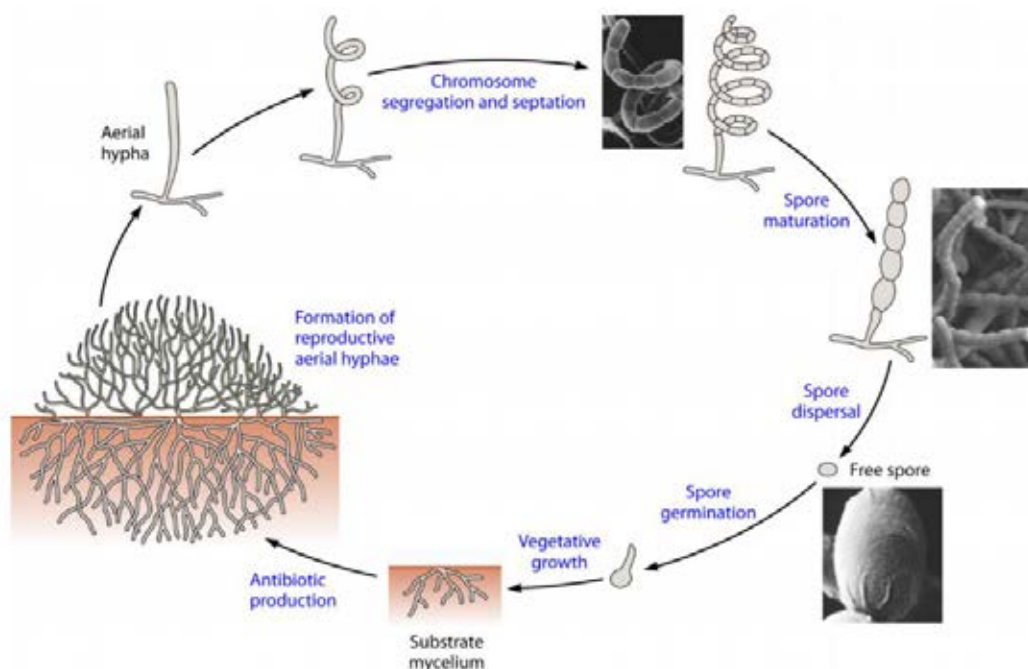


(-)-Geosmin

รูปที่ 1.4 โครงสร้างของ geosmin ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิของ *Streptomyces* ที่ทำให้ดินมีกลิ่นเฉพาะตัว (Flärdh and Buttner, 2009)

### 1.3.2 วงจรชีวิตของ *Streptomyces*

เมื่อสปอร์ของ *Streptomyces* อยู่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สปอร์จะเริ่มงอก (germination) เป็น germ tube (รูปที่ 1.5) ซึ่งจะเจริญต่อไปเป็น substrate mycelium โดยจัดว่าเป็นเส้นใยชนิดแรกที่เจริญ มีหน้าที่ในการดูดซึมน้ำและอาหารไปใช้ในการเจริญ เมื่ออาหารเริ่มหมด substrate mycelium จะตายลงในขณะที่ aerial mycelium จะเริ่มเจริญขึ้นไปบนอากาศเพื่อสร้างสปอร์ซึ่งใช้ในการสืบพันธุ์ (Mendez et al., 1985) นอกจากนี้ยังมีการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิขึ้นในระยะนี้เพื่อยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ โดย *Streptomyces* จะผลิตขึ้นเพื่อยับยั้งสิ่งมีชีวิตอื่นที่จะมาใช้สารอาหารที่เกิดจากการสลายตัวของ substrate mycelium มาใช้ในการเจริญ (Barka et al., 2016) แม้ว่าสปอร์ของ *Streptomyces* จะสามารถทนอยู่ในที่แล้งได้เป็นเวลานานแต่สปอร์ของแบคทีเรียชนิดนี้จะมีความต้านทานต่อสภาวะที่ไม่เอื้ออำนวยต่ำกว่าสปอร์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* (Flärdh and Buttner, 2009)

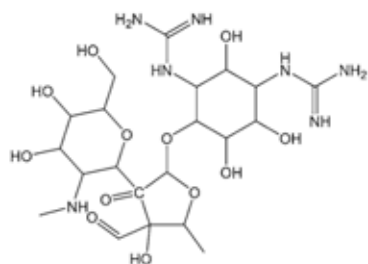


รูปที่ 1.5 ลักษณะวงจรชีวิตของ *Streptomyces* (Barka et al., 2016)

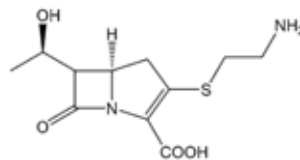
### 1.3.3 ยาปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *Streptomyces*

เมตาบอไลต์ทุติยภูมิของ *Streptomyces* ส่วนมากมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย รา หรือไวรัส (Bérdy, 2005) ทำให้มีการนำสารเมตาบอไลต์ที่สร้างจากแบคทีเรียสกุลนี้ไปผลิตเป็นยาปฏิชีวนะกันอย่างแพร่หลาย ในปัจจุบันพบว่ายาปฏิชีวนะกว่า 80% ของ actinomycetes ผลิตมาจากสกุล *Streptomyces* ซึ่งนับว่าเป็นสกุลที่ผลิตยาปฏิชีวนะมากที่สุด (Procópio et al., 2012) ยาปฏิชีวนะชนิดแรกที่ได้จากแบคทีเรียสกุลนี้คือ streptomycin ซึ่งผลิตได้ในปี ค.ศ. 1944 โดยสารชนิดนี้ผลิตได้จาก *Streptomyces griseus* (Procópio et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีการผลิตยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ ซึ่งได้จากเมตาบอไลต์ของแบคทีเรียสกุลนี้เช่น chloramphenicol ผลิตจาก

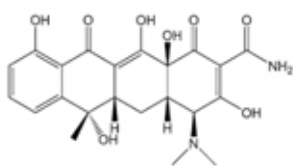
*Streptomyces venezuelae*, thienamycin ผลิตจาก *Streptomyces cattleya* และ tetracyclin ผลิตจาก *Streptomyces aureofaciens* (Procópio et al., 2012) (รูปที่ 1.6) และยังมีการผลิตยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1.1



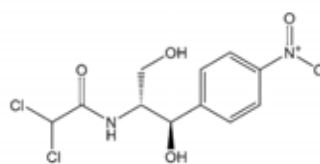
Streptomycin



Chloramphenicol



Thienamycin



Tetracyclin

รูปที่ 1.6 ตัวอย่างโครงสร้างของยาปฏิชีวนะซึ่งสกัดจากสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิของ *Streptomyces* (Katz and Baltz, 2016)

ตารางที่ 1.1 ลำดับการค้นพบยาปฏิชีวนะที่ผลิตจากสารเมตาบอไลต์ของ *Streptomyces* (ดัดแปลงจาก Procópio et al., 2012)

ยาปฏิชีวนะ	สายพันธุ์ที่ผลิต	ปีที่ค้นพบ
Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	1944
Cephalosporins	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	1945
Chloramphenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	1949
Neomycin	<i>Streptomyces fradiae</i>	1949
Tetracyclin	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	1950
Nystatin	<i>Streptomyces noursei</i>	1950
Viomycin	<i>Streptomyces vinaceuse</i>	1951
	<i>Streptomyces capreolus</i>	
Lincomycin	<i>Streptomyces lincolensis</i>	1952

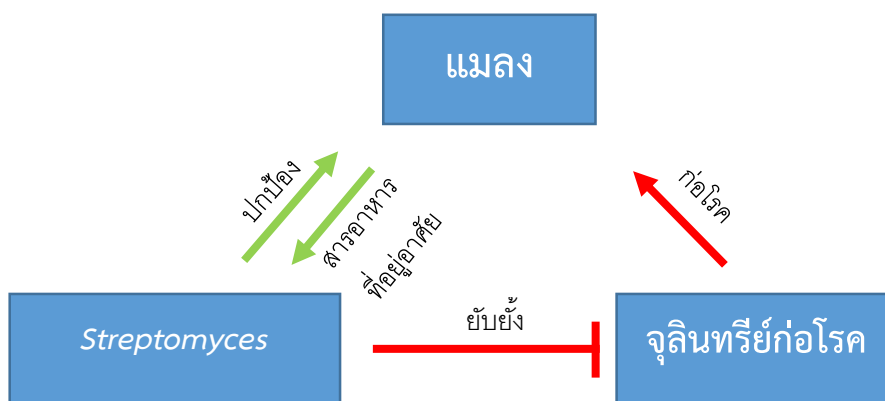


ยาปฏิชีวนะ	สายพันธุ์ที่ผลิต	ปีที่ค้นพบ
Cycloserine	<i>Streptomyces garyphalus</i>	1955
ancomycin	<i>Streptomyces orientalis</i>	1956
Noviobiocin	<i>Streptomyces niveus</i>	1956
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1957
Fosfomycin	<i>Streptomyces fradiae</i>	1969
Ribostamycin	<i>Streptomyces ribosidificus</i>	1970
Daptomycin	<i>Streptomyces roseosporus</i>	2003
Platensimycin	<i>Streptomyces platensis</i>	2006

อย่างไรก็ตาม แม้ว่ายาปฏิชีวนะสามารถใช้ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogens) ได้หลายชนิด แต่การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างผิดวิธีทำให้ในปัจจุบันนี้ประสบปัญหาการดื้อยาอย่างมากโดยเฉพาะในแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (Bizuye, Moges, and Andualem, 2013) และในเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอีกหลายชนิด ทำให้ยาปฏิชีวนะที่มีอยู่ไม่สามารถใช้รักษาโรคได้ มีการคาดการณ์ว่าในปี ค.ศ.2050 จะมีผู้เสียชีวิตจากปัญหาเชื้อดื้อยาและยังส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจโลกโดยคิดเป็นมูลค่าสูงถึง 100 ล้านดอลล่าร์สหรัฐ (Jim O Neill, 2016) อีกทั้งการค้นพบสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิของ *Streptomyces* ที่คัดแยกจากดินหรือแหล่งน้ำกลับได้สารที่เคยมีรายงานไว้ก่อนแล้ว ทำให้ต้องมีการคัดแยกเชื้อ *Streptomyces* จากแหล่งอื่น ๆ ซึ่งมีแนวโน้มที่จะพบสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่มีมีการค้นพบ ได้แก่ ทะเลทราย แนวปะการัง ปุ๋ยมูลไส้เดือน (Masand et al., 2018; Mahmoud and Kalendar, 2016; Kumar et al., 2012) และแมลง

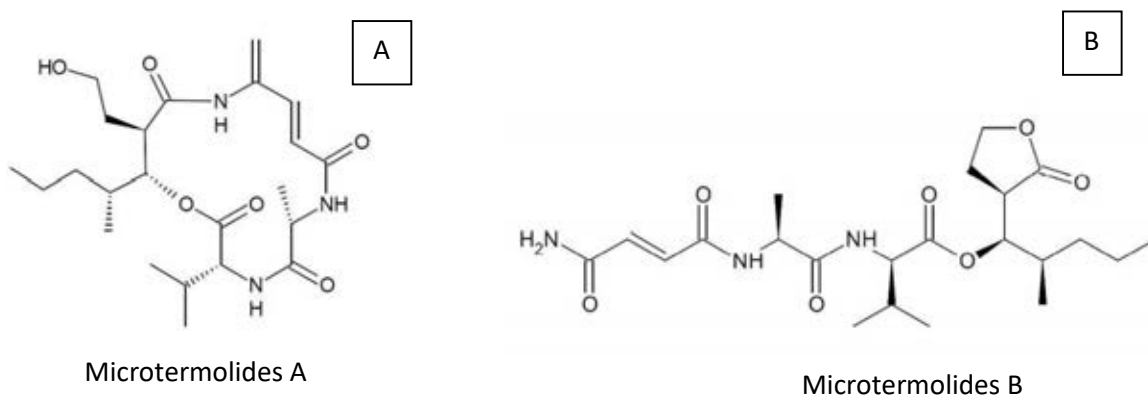
#### 1.4 *Streptomyces* ที่มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพากับแมลง

บนโลกนี้มีแมลงอยู่เป็นจำนวนมากซึ่งแมลงส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับจุลินทรีย์หลายชนิดรวมถึงแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* ซึ่งดำรงชีวิตอยู่แบบพึ่งพากัน (mutualistic) โดยแมลงจะให้สารอาหารและที่อยู่อาศัยกับ *Streptomyces* ในขณะที่เดียวกัน *Streptomyces* จะผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิเพื่อปกป้องแมลงจากจุลินทรีย์ก่อโรค (รูปที่ 1.7) (Kaltenpoth, 2009; Arango et al., 2016; Van Arnam, Currie and Clardy, 2018) นอกจากนี้ยังคาดว่าการศึกษาความสัมพันธ์แบบพึ่งพากันทำให้แมลงมีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมและแหล่งอาหารใหม่ ๆ ได้ (Cavalier-Smith, 1992)



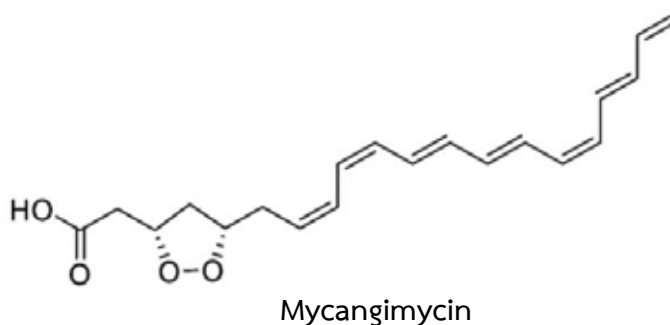
รูปที่ 1.7 รูปแสดงความสัมพันธ์ของ *Streptomyces*, แมลง และจุลินทรีย์ก่อโรค

จากงานวิจัยของ Carr และคณะ (2012) ได้ทำการคัดแยก *Streptomyces* จากปลวกโดยคัดแยกได้ 30 ไอโซเลท และพบว่า *Streptomyces* sp. MspM5 เป็นสายพันธุ์ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนซึ่งสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ 2 ชนิดที่ยังไม่เคยมีการรายงานการค้นพบมาก่อนซึ่งได้แก่ microtermolides A และ microtermolides B (รูปที่ 1.8) โดยสารทั้ง 2 ชนิดออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Carr et al., 2012)



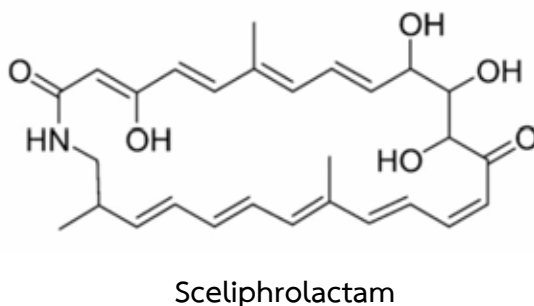
รูปที่ 1.8 โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. MspM5 ซึ่งคัดแยกได้จากปลวก A: microtermolides A, B: microtermolides B (Carr et al., 2012)

จากงานวิจัยของ Oh และคณะ (2009) ได้มีการคัดแยก *Streptomyces* sp. จากด้วงสนภูเข่า *Dendroctonus frontalis* และค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนซึ่งมีชื่อว่า mycangimycin (รูปที่ 1.9) โดยสารชนิดนี้มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของรา และยังสามารถต้านการเจริญของโปรโตซัว *Plasmodium* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียได้ (Oh et al., 2009)



รูปที่ 1.9 โครงสร้างของ mycangimycin ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. ซึ่งคัดแยกได้จากตัวส่ง  
ภูษา (Oh et al., 2009)

จากงานวิจัยของ Poulsen และคณะได้มีการคัดแยก *Streptomyces* spp. ได้ 15 ไอโซเลทที่จากตัวต่อ *Sceliphron caementarium* และมีการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ชื่อว่า sceliphrolactam (รูปที่ 1.10) ซึ่งผลิตจาก *Streptomyces* spp. ที่คัดแยกได้ สารชนิดนี้ออกฤทธิ์ในการต้านการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา amphotericin B ได้ (Poulsen et al., 2011)



รูปที่ 1.10 โครงสร้างของ sceliphrolactam ที่ผลิตจาก *Streptomyces* spp. ซึ่งคัดแยกได้จากตัวต่อ  
(Poulsen et al., 2011)

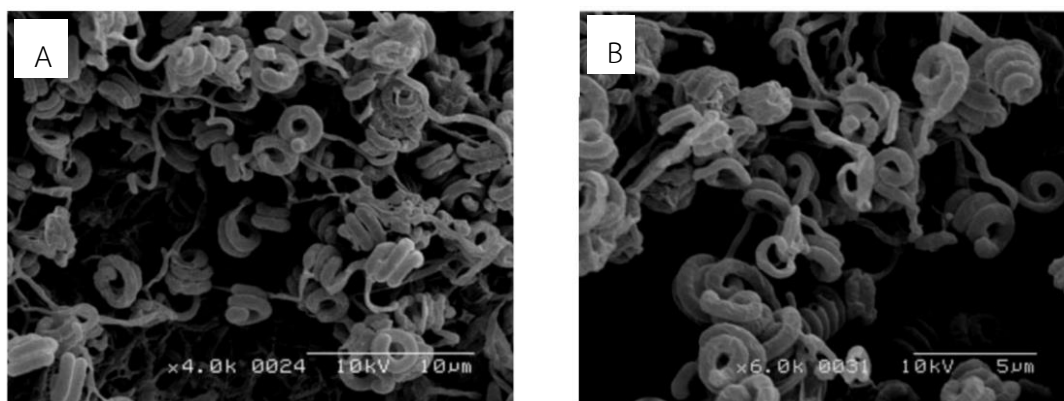
จากการศึกษาก่อนหน้าจะเห็นได้ว่าการคัดแยก *Streptomyces* สายพันธุ์ใหม่ได้จากแมลง และมีการ  
ค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ จึงทำให้มีความเป็นไปได้ที่  
จะค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่อาจนำไปใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่ดื้อ  
ต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้

### 1.5 *Streptomyces* ที่มีความสัมพันธ์กับแมลงจำพวกผึ้ง

ผึ้งมีความสำคัญต่อระบบนิเวศเป็นอย่างมากโดยเฉพาะบทบาทในการผสมเกสรของดอกไม้ (Cambroner-Heinrichs et al., 2019) และยังมีการพบจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ รวมถึงแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* ด้วยเช่นกัน จึงมีงานวิจัยที่คัดแยกและศึกษา *Streptomyces* ที่อาศัยร่วมกับแมลงจำพวกผึ้งกันมากขึ้น

จากการศึกษาของ Inglis และคณะ (1993) ได้มีการคัดแยก *Streptomyces* จากส่วนต่าง ๆ ของรัง เช่น เกสร อาหาร รวมถึงทางเดินอาหารของผึ้งตัดใบ *Megachile rotundata* โดยงานวิจัยนี้ได้สรุปว่า *Streptomyces* sp. เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ของแมลงชนิดนี้ (Inglis et al., 1993)

นอกจากนี้ จากการศึกษานี้ของ Promnuan และคณะ (2013) ได้มีการค้นพบ *Streptomyces* สายพันธุ์ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนโดยคัดแยกได้จากชันโรง *Tetragonilla collina* ที่อาศัยอยู่ในประเทศไทย ได้แก่ *Streptomyces Chiangmaiensis* sp. nov. และ *Streptomyces lannensis* sp. nov. (รูปที่ 1.11) (Promnuan et al., 2013)



รูปที่ 1.11 รูปเส้นใยของ actinomycetes ที่คัดแยกได้จากชันโรง *T. collina* ในประเทศไทยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด A: *S. Chiangmaiensis* sp. nov., B: *S. lannensis* sp. nov.

(Promnuan et al., 2013)

จากการศึกษาของ Cambroner-Heinrichs และคณะ (2019) ได้มีการคัดแยก *Streptomyces* จากส่วนต่าง ๆ ของรัง และลำตัวของชันโรง *Tetragonisca angustula* ที่อาศัยอยู่ในประเทศคอสตาริกา โดยงานวิจัยนี้ได้สรุปว่าชันโรงมีบทบาทเป็นพาหะในการถ่ายโอน *Streptomyces* ในสิ่งแวดล้อม (Cambroner-Heinrichs et al., 2019)

จากการศึกษา *Streptomyces* ที่มีความสัมพันธ์ร่วมกันกับแมลงกลุ่มผึ้งได้มีการค้นพบ *Streptomyces* สายพันธุ์ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะระบุสายพันธุ์ของ actinomycetes ที่คัดแยกได้จากชันโรง (*Tetragonula laeviceps*) และผึ้งโพรง (*Apis cerana*) โดยนางสาวอรพรรณ ตั้งวิชัย (Orapun Tangwichai, 2016) เป็นผู้คัดแยก ซึ่งอาจมีการค้นพบสายพันธุ์ใหม่และในอนาคตอาจนำสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงได้ไปทำการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่เพื่อนำไปใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีการดื้อยาได้

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อระบุสายพันธุ์ของ actinomycetes ที่คัดแยกได้จากชันโรงและผึ้งโพรง และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อเพิ่มความเข้าใจในแบคทีเรียกลุ่ม actinomycetes ที่มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพากับแมลงถึงบทบาทหน้าที่ ที่มีในสิ่งแวดล้อม และความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยผลของการศึกษาในครั้งนี้อาจเป็นแนวทางในการผลิตยาปฏิชีวนะชนิดใหม่เพื่อใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจุลินทรีย์ก่อโรค ทำให้สามารถลดจำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากโรคติดเชื้อซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย รวมถึงประเทศอื่นทั่วโลกในอนาคต

## บทที่ 2

### เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

#### 2.1 เครื่องมือ วัสดุ และเคมีภัณฑ์

##### 2.1.1 เครื่องมือ

- 1) กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH 30 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
- 2) เครื่องกวนสารให้ความร้อน (hotplate stirrer) รุ่น RCT basic ของบริษัท IKA ประเทศเยอรมนี
- 3) เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex ประเทศสหรัฐอเมริกา และบริษัท DURAN ประเทศเยอรมนี
- 4) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น Innova TM 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 5) เครื่องชั่งหยาบ รุ่น BP610 ของบริษัท Sartorius ประเทศเยอรมนี
- 6) เครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation) ของบริษัท UVITEC ประเทศอังกฤษ
- 7) เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น HVE-50 ของบริษัท Hirayama ประเทศญี่ปุ่น
- 8) เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (centrifuge) รุ่น MIKRO 185 ของบริษัท Hettich Zentrifugen ประเทศเยอรมนี
- 9) เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนขนาดเล็ก (spin down) รุ่น MYSPIN G ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 10) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermocycler) รุ่น T100 Thermal Cycler ของบริษัท Bio-rad ประเทศออสเตรเลีย
- 11) เครื่องมือทำเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส รุ่น PowerPacTM Basic ของบริษัท Bio-rad ประเทศออสเตรเลีย
- 12) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Biophotometer D30 ของบริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมนี
- 13) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (digital pH meter) รุ่น FE20 FiveEasy™ ของบริษัท Mettler Toledo ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 14) เครื่องอุ่นหลอดทดลอง (heating block) รุ่น MD-MINI ของบริษัท Major Science ประเทศสหรัฐอเมริกา

- 15) ตู้ชีวนิรภัย (biosafety cabinet level 2) รุ่น Microtech V6-T ของบริษัท แล็บ ไมโคร ประเทศไทย
- 16) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Panasonic ประเทศไทย
- 17) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electric Co. ประเทศญี่ปุ่น
- 18) ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) รุ่น INE 500 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 19) ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น UN75 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 20) ตู้เย็น รุ่น MR-BF 30H ของบริษัท Mitsubishi ประเทศไทย
- 21) ไมโครปิเปตต์ 10 100 และ 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมนี
- 22) ไมโครเวฟ รุ่น ER-C23SC(W) ของบริษัทโตชิบา ประเทศไทย
- 23) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WNB14 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี

#### 2.1.2 วัสดุ

- 1) กระดาษ Whatman (paper disc) ของบริษัท General Electric ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2) จานเพาะเชื้อพลาสติก (plastic petri dish) ของบริษัท Greiner bio-one ประเทศไทย
- 3) ไมโครปิเปตต์ทีป (micro pipette tip) ขนาด 10 100 และ 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท ไชเนอจี ประเทศไทย
- 4) ถุงมือชนิดไม่มีแป้ง ของบริษัทศรีตรังโกล์ฟประเทศไทย
- 5) พาราฟิล์ม (parafilm) ของบริษัท Bemis ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 6) พาสเจอร์ปิเปตต์ขนาด (pasteur pipette) 150 มิลลิเมตร ของบริษัท Volac ประเทศสหราชอาณาจักร
- 7) สไลด์นับเซลล์ (cell counting chamber) ของบริษัท BOECO ประเทศเยอรมนี
- 8) หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร ของบริษัท Nest ประเทศจีน
- 9) หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ของบริษัท Neptune Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 10) หลอดพลาสติกแช่แข็ง (cryogenic vial) ของบริษัท Nest ประเทศจีน
- 11) หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ของบริษัท Nest ประเทศจีน
- 12) หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร ของบริษัท Nest ประเทศจีน

13) ห่วงโซ่เชื้อและเข็มเชื้อ ของบริษัท SPL life science ประเทศเกาหลีใต้

### 2.1.3 เคมีภัณฑ์

- 1) 85% Glycerol ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 2) Casamino acid ของบริษัท Becton, Diskinson ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3) D-glucose monohydrate,  $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$  ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 4) EDTA sodium salt ของบริษัท VWR ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 5) Chloramphenicol ของบริษัท Biobasic ประเทศแคนาดา
- 6) Casein hydrolysate ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
- 7) Cyclohexamide ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 8) Sodium chloride (NaCl) ของบริษัท Emsure ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 9) Sodium hydroxide (NaOH) ของบริษัท Emsure ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 10) Dextrose ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
- 11) Tris base ของบริษัท Biorad ประเทศออสเตรเลีย
- 12) Tris-acetate ( $C_4H_{11}NO_3$ ) ของบริษัท VWR ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 13) Agar bacteriological grades ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
- 14) Beef extract ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
- 15) Malt extract ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
- 16) Yeast extract ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
- 17) Starch ของบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd ประเทศออสเตรเลีย
- 18) Potassium sulfate ( $K_2SO_4$ ) ของบริษัท Emsure ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 19) Magnesium chloride hexahydrate ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 20) Agarose molecular biology grades ของบริษัท Vivantis Technologies ประเทศมาเลเซีย
- 21) Absolute ethanol ของบริษัท Emsure ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 22) SDS ของบริษัท Biorad ประเทศออสเตรเลีย



23) Tryptic soy broth (TSB) ของบริษัท Becton, Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา

24) TES ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

#### 2.1.4 เอนไซม์และรีเอเจนท์ทางอณูชีววิทยา

1) 6X loading dye ของบริษัท Biotechrabbit ประเทศเยอรมนี

2) DNA มาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kb DNA Ladder) ของบริษัท Biotechrabbit ประเทศเยอรมนี

3) DNA strain G ของบริษัท SERVA ประเทศเยอรมนี

4) KOD One™ PCR master Mix ของบริษัท TOYOBO ประเทศญี่ปุ่น

5) Lysozyme ของบริษัท SERVA ประเทศเยอรมนี

6) Protinase K ของบริษัท Thermo Sciencetific ประเทศสหรัฐอเมริกา

7) RNase A ของบริษัท Thermo Sciencetific ประเทศสหรัฐอเมริกา

#### 2.1.5 น้ำ

1) น้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 1 (purified water type I) ใช้สำหรับเตรียมบัฟเฟอร์และงานทางอณูชีววิทยา

2) น้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 2 (purified water type II) ใช้สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 2.1.6 โอลิโกนิวคลีโอไทด์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์หรือไพรเมอร์ (primer) (ตารางที่ 2.1) ที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ผลิตจากบริษัท Integrated DNA Technologies (IDT)

ตารางที่ 2.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' ถึง 3')	อุณหภูมิหลอมเหลว Tm <sup>a</sup> (องศาเซลเซียส)	การใช้งาน
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	53.2	PCR <sup>b</sup> , sequencing <sup>c</sup>
518F	CCAGCAGCCGCGTAATACG	57.9	sequencing
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	54.6	PCR

<sup>a</sup>; melting temperature, <sup>b</sup>; การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA, <sup>c</sup>; การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

### 2.1.7 จุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อทดสอบของ actinomycetes นำมาจากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* โดย *B. subtilis* ได้รับความอนุเคราะห์จากรศ.ดร.จิราภรณ์ ธนียวรรณ

## 2.2 วิธีดำเนินการทดลอง

### 2.2.1 การเลี้ยงเชื้อ actinomycetes

นำสารละลายสปอร์ของ actinomycetes ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสโดยน.ส. อรพันธ์ ตั้งวิชัย (Orapun Tangwichai, 2016) มาทำการชีตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง International Streptomyces Project 2 (ISP-2, ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจนเชื้อจะสร้างสปอร์นำโคโลนีเดี่ยวไปชีตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ISP-2 อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะของโคโลนีและบันทึกผล

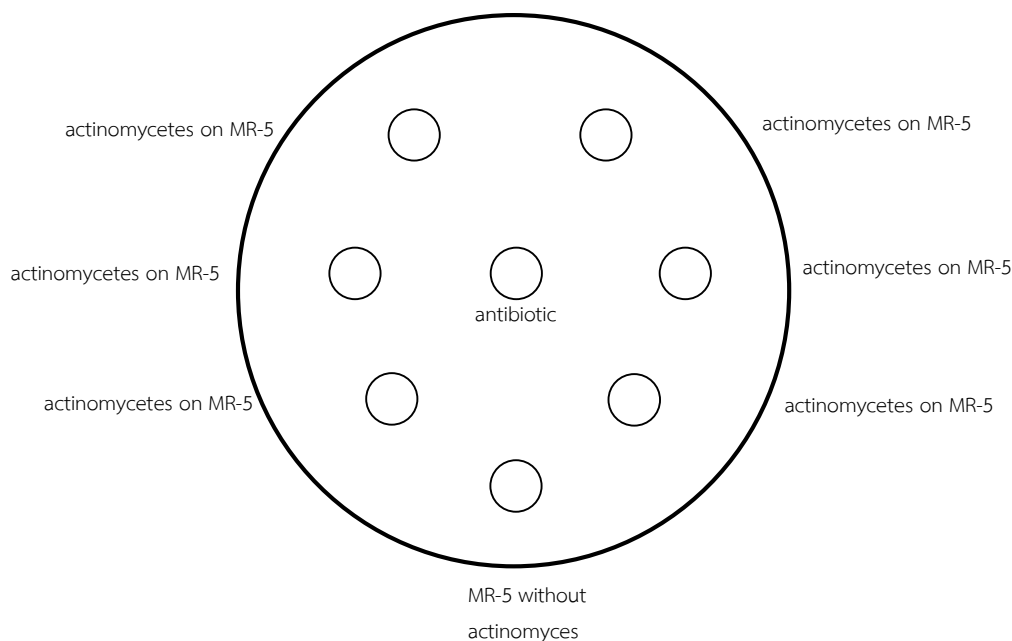
การเรียกชื่อ actinomycetes ที่คัดแยกจากชั้นโรงและฝั่งโพรงมีหลักเกณฑ์คือตัวอักษรตัวแรกบอกถึงส่วนที่พบเชื้อ actinomycetes โดย I หมายถึงภายในลำตัวของแมลง และ E หมายถึงภายนอกลำตัวของแมลง ถัดมาคือกลุ่มของตัวอักษรซึ่งหมายถึงชนิดของแมลงที่ทำการคัดแยก actinomycetes โดย SB หมายถึงชั้นโรง และ EHB หมายถึงฝั่งโพรง และตัวเลขบ่งบอกถึงลำดับที่คัดแยกได้

### 2.2.2 การเก็บรักษาสปอร์

นำน้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 3 มิลลิตรมาหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ISP-2 ที่มี actinomycetes ที่สร้างสปอร์ ใช้ห้วงเชื้อพลาสติกขูดบนโคโลนีเบา ๆ ให้สปอร์หลุดออกจากเส้นใย ดูดสารละลายนี้ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร นำสารละลายสปอร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรไปหยดบนสไลด์นับจำนวนเซลล์เพื่อนับจำนวนสปอร์ จากนั้นทำการดูดสารละลายสปอร์ปริมาตร 900 ไมโครลิตรใส่หลอดแช่แข็งขนาด 2 มิลลิลิตรและเติมสารละลาย 85% glycerol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของ glycerol ประมาณ 20%) นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 2.2.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบ

ใช้การทดสอบวิธี agar plug โดยนำสารละลายสปอร์มาทำการปรับให้ได้ความเข้มข้นสปอร์เท่ากับ  $1 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปกระจาย (overlay) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง modified R5 (MR5, ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันโดยบันทึกลักษณะของโคโลนีทุกวัน นำเชื้อทดสอบไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Muller Hilton (MH broth, ภาคผนวก ก) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืนด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นทำการปรับให้ได้ความขุ่น  $OD_{600}$  เท่ากับ 0.1 นำเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตรผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Muller Hilton (MH agar, ภาคผนวก ก) ขณะเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตรและทำการ pour plate รอให้อาหารแข็ง นำส่วนบนของพาสเจอร์ปีเปตต์ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วมาเจาะให้ได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MR5 ที่มี actinomycetes เจริญมาเจาะด้วยพาสเจอร์ปีเปตต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH agar ด้วยเข็มเย็บเชื้อที่ผ่านการเผาจนร้อนแดงแล้ว และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MR5 ที่ไม่มี actinomycetes เจริญเป็นชุดควบคุม นำยาปฏิชีวนะที่อยู่ในกระดาษ paper disc มาวางบริเวณกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม โดยแบคทีเรียจะใช้ chloramphenicol 30 ไมโครกรัม และยีสต์ใช้ cyclohexamide 50 ไมโครกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยวัดจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อทดสอบ



รูปที่ 2.1 รูปแสดงตำแหน่งการวางชิ้นวุ้น actinomycetes เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี agar plug เชื้อทดสอบได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans*

## 2.2.4 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA, gDNA)

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA, gDNA) ด้วยวิธี salting out (Kieser et al., 2000) (โดยชุดสปอร์ของ actinomycetes ที่เจริญบนอาหารแข็งด้วยห้วงเขี้ยวเชื่อมมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว tryptic soy broth (TSB, ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาซาม์คืนด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ดูดอาหารเหลวปริมาตร 1.25 มิลลิลิตรใส่หลอดไมโครเซนติพีพิจขนาด 2 มิลลิลิตรจำนวน 2 หลอดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม SET buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร ตามด้วย lysozyme ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าด้วยการเคาะที่ก้นหลอดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงด้วยเครื่องอุ่นหลอดทดลอง ทำการเติมสารละลาย 10% SDS ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% และ protease K ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกมาที่ก้นหลอดด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนขนาดเล็ก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงด้วยเครื่องอุ่นหลอดทดลอง ทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลาย 5M NaCl ปริมาตรหลอดละ 200 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับไปกลับมา เติม chloroform ปริมาตรหลอดละ 500 ไมโครลิตรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสลงในหลอดใหม่แล้วเติม isopropanol ที่แช่เย็นไว้ปริมาตร 1 เท่า ทำการผสมแบบกลับไปกลับมาอย่างช้าๆ นำหลอดแรกไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วดูดสารละลายจากหลอดที่ 2 ใส่ลงในหลอดแรก นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งและดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ที่แช่เย็นไว้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้งซาม์คืน เติมสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม RNase A ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 2.2.5 การตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

ตรวจสอบขนาดและปริมาณของ DNA ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย 0.8% (w/v) agarose gel โดยเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส ทำโดยการชั่ง agarose gel น้ำหนัก 0.16 กรัม ผสมกับบัฟเฟอร์ 1x Tris Acetate EDTA (1x TAE, ภาคผนวก) 20 มิลลิลิตร ทำให้ละลายโดยให้ความร้อนด้วยการนำไปเข้าไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้เย็นลง จากนั้นนำ SERVA DNA stain G ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตรไปผสมในสารละลายเจล นำสารละลายนี้ไปเทบนแผ่นพิมพ์ รอให้เจลแข็งตัวแล้วนำไปวางบนเครื่องทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เท 1x TAE buffer จนท่วมเจล ต่อมานำ DNA ตัวอย่าง ผสมกับ 6x loading dye ที่อัตราส่วน 5 ต่อ 1 บนแผ่นพาราฟิล์ม แล้วทำการหยอดลงในหลุมของเจล ใช้ DNA มาตรฐานขนาด 1 กิโลเบสสำหรับอ้างอิงขนาดและความเข้มข้นของ DNA ตัวอย่าง เปิดเครื่องโดยตั้งค่าความต่างศักย์ที่ 80 โวลต์ 30 นาที นำเจลไปตรวจสอบการเรืองแสงของ DNA ภายใต้ UV ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

## 2.2.6 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA

การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA จะใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ polymerase chain reaction (PCR) ด้วยการใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ซึ่งจำเพาะกับลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA โดยการเตรียมส่วนผสมสารละลายสำหรับเพิ่มจำนวนยีนจะเตรียมที่ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร (ตารางที่ 2.2) และนำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสถานะอุณหภูมิในขั้นตอนต่างๆของปฏิกิริยาได้แก่ ขั้นตอนแยกสายคู่ DNA ต้นแบบ (denaturation) ขั้นตอนไพรเมอร์จับกับ DNA ต้นแบบ (annealing) ขั้นตอนสังเคราะห์ DNA สายใหม่ (extension) และขั้นสิ้นสุดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ (final extension) ตามที่กำหนดโดยสถานะที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนจะแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 2.2 ปริมาตรและความเข้มข้นของสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณยีน

สารละลาย	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาณสาร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
DI water type I		20	
27F primer	10 ไมโครโมลาร์	1.5	0.3 ไมโครโมลาร์
1492 R primer	10 ไมโครโมลาร์	1.5	0.3 ไมโครโมลาร์
DNA template	5 ถึง 50 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร	2.0	0.2 ถึง 10 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร
KOD One PCR master mix		25	
<b>รวม</b>		<b>50</b>	

ตารางที่ 2.3 สถานะของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในแต่ละขั้นตอนเพื่อเพิ่มจำนวนยีน

ขั้นตอนของปฏิกิริยา	สถานะการทำ PCR		จำนวนรอบ
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
Denaturation	98	10 วินาที	45 <sup>1</sup>
Annealing	55	5 วินาที	
Extension	68	8 วินาที	
Final extension	72	4 นาที	1

<sup>1</sup>; รอบของวงจร denaturation, annealing และ extension

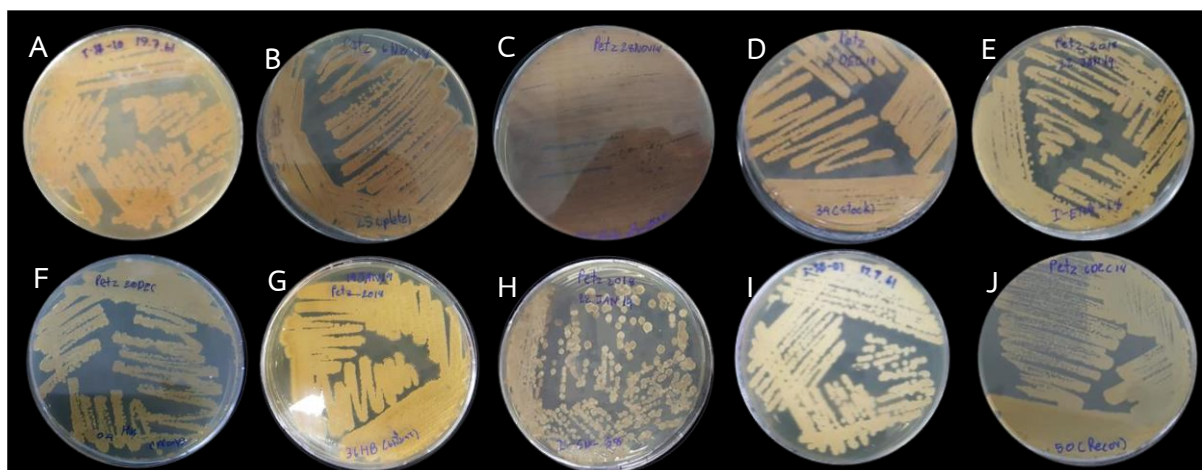
### 2.2.7 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ระบุสายพันธุ์และสร้าง phylogenetic tree

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจะทำโดยการส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตรพร้อมกับระบุค่าความเข้มข้นของตัวอย่างให้กับ บริษัท Bionics (Bionics) ประเทศเกาหลีใต้โดยไพรเมอร์ที่เลือกใช้คือ 27F และ 518F จากนั้นนำผลที่ได้รับมาตรวจสอบการจัดเรียงของลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ actinomycetes ที่เลือกมาศึกษาโดยใช้ Blastn ตรวจสอบลำดับกรดอะมิโน ระบุสายพันธุ์ และสร้าง phylogenetic tree ด้วย MEGA 7

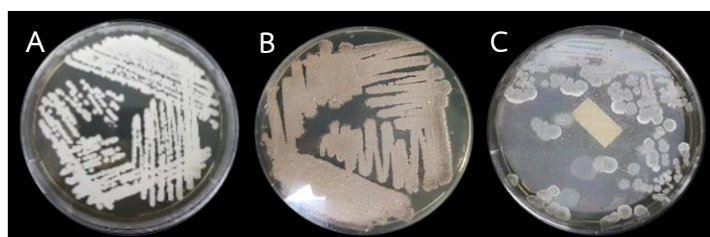
### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

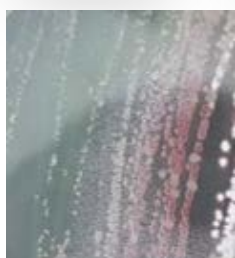
นำเชื้อ actinomycetes ที่ นางสาวอรพันธ์ ตั้งวิชัย ได้คัดแยกจากชันโรง *T. laeviceps* และผึ้งโพรง *A. cerana* และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสทั้งหมด 68 ไอโซเลทมาเลี้ยงใหม่ พบว่ามีเพียง 41 ไอโซเลทที่สามารถเลี้ยงใหม่ได้ เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนรา 11 ไอโซเลท ปนเปื้อนแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท และไม่เจริญ 8 ไอโซเลท โดยไอโซเลทที่เจริญคัดแยกจากชันโรง 24 ไอโซเลท และที่คัดแยกจากผึ้งโพรง 17 ไอโซเลท พบว่าโคลนินของแต่ละไอโซเลทมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ISP-2 ซึ่งมีรายงานว่าใช้ในการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ actinomycetes (Siddique et al., 2014) (รูปที่ 3.1, 3.2, 3.3, 3.4) และสามารถจำแนกได้ 17 กลุ่มตามสีของอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง (reverse) สีของสปอร์ เม็ดสีที่สร้างขึ้นบนโคลนิน (colony pigment) และสีของเม็ดสีที่ละลายน้ำได้ (soluble pigment) (ตารางที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 รูปแสดงตัวอย่างสีของอาหาร ISP-2 ด้านล่าง A: น้ำตาล (I-SB-10), B: น้ำตาลเข้ม (I-SB-21), C: น้ำตาลเข้มออกดำ (I-SB-46), D: น้ำตาลอ่อน (I-EHB-34), E: น้ำตาลอ่อนออกเหลือง (I-EHB-18), F: ทอง (I-EHB-04), G: สีเหลือง (I-EHB-36), H: เหลืองฟาง (I-SB-38), I: เหลืองออกขาว (I-SB-01), J: เหลืองอ่อน (I-SB-50)



รูปที่ 3.2 รูปแสดงตัวอย่างสีของสปอร์บนอาหาร ISP-2 A: ขาว (I-SB-01), B: เทาออกน้ำตาล (I-EHB-36), C: เทา (I-SB-38)



รูปที่ 3.3 รูปแสดงตัวอย่างสีของเม็ดสีที่สร้างบนโคลนิน เม็ดสีสีแดง (I-SB-45)



รูปที่ 3.4 รูปแสดงตัวอย่างสีของการผลิตเม็ดสีที่ละลายน้ำได้ อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (I-SB-02)

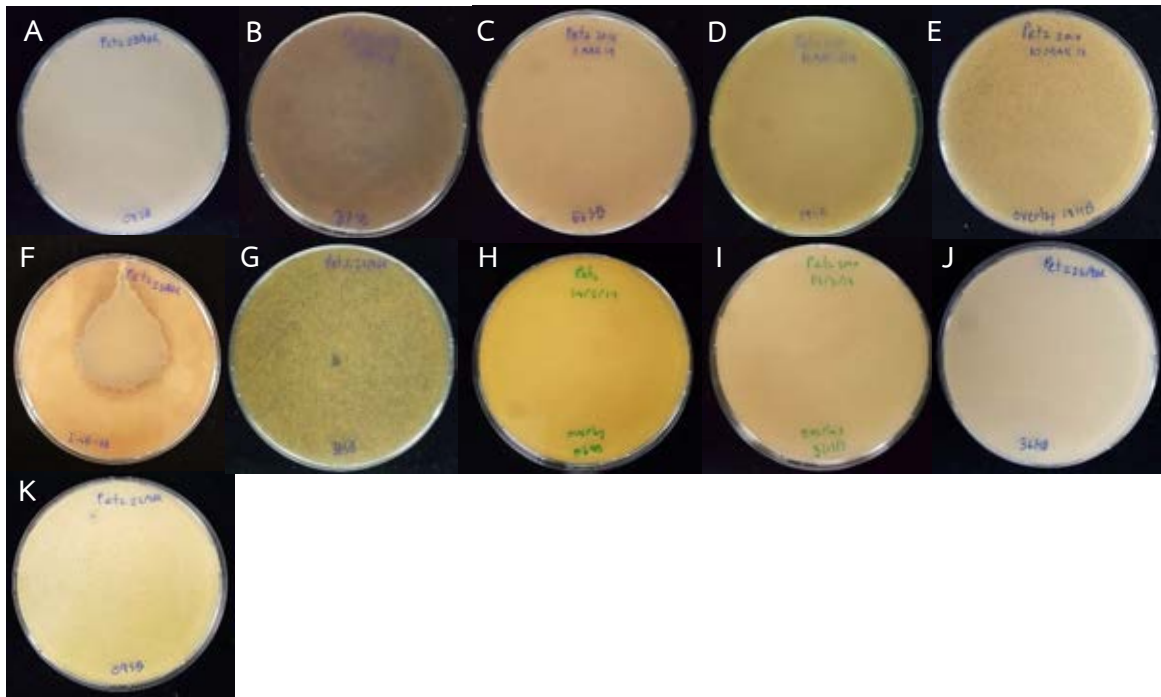
ตารางที่ 3.1 การจัดกลุ่ม actinomycetes ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เจริญบนอาหารแข็ง ISP-2

กลุ่มที่	Aerial <sup>a</sup>	Reverse <sup>b</sup>	Spore	Colony pigments <sup>c</sup>	Soluble pigments <sup>d</sup>	Isolate
1	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	-	I-SB-36, I-EHB-22
2	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	เหลือง	I-SB-02, I-SB-10
3	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-SB-56, I-EHB-07, I-EHB-26, I-EHB-27, I-EHB-28, I-EHB-29
4	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	แดง	-	I-SB-45
5	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทา	-	-	I-SB-06, I-SB-34
6	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทา	-	เหลือง	I-SB-08
7	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-SB-19, I-SB-21, I-SB-25
8	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	-	I-SB-46, I-EHB-31
9	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	I-SB-07, I-SB-09, I-SB-61, I-EHB-34
10	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-SB-74, I-SB-75, I-EHB-19, I-EHB-20, I-EHB-33, I-EHB-35
11	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-EHB-05, I-EHB-06, I-EHB-18
12	ขาว	ทอง	เทา	-	-	I-EHB-04
13	ขาว	เหลือง	เทาออกน้ำตาล	-	เหลือง	I-EHB-36
14	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	I-SB-35, I-SB-37, I-SB-38
15	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-SB-71, I-SB-73
16	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาว	-	-	I-SB-01
17	ขาว	เหลืองอ่อน	เทา	-	-	I-SB-50

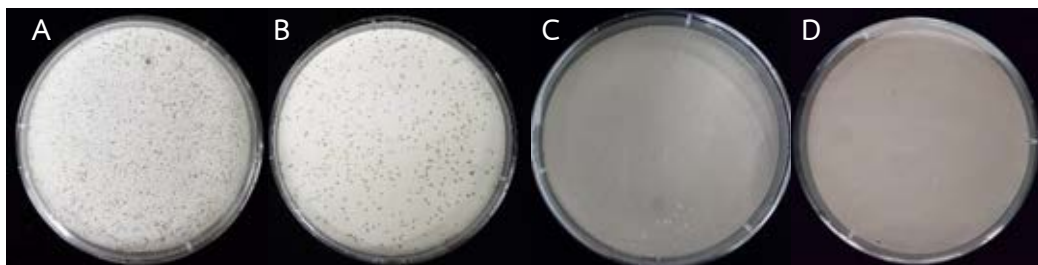
<sup>a</sup>: สีของ aerial mycelium, <sup>b</sup>: สีของอาหารด้านล่าง, <sup>c</sup>: เม็ดสีบนโคโลนี <sup>d</sup>: เม็ดสีที่ละลายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำ actinomycetes ทั้ง 41 ไอโซเลทมาเจริญบนอาหาร MR5 เพื่อดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสามารถในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ (Lee et al., 2010) ทดสอบโดยบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน สามารถเพาะเลี้ยงได้เพียง 39 ไอโซเลท แบ่งเป็นไอโซเลทที่คัดแยกจากชั้นโรง 23 ไอโซเลท และผึ่งโพรง 16 ไอโซเลท โดยไอโซเลท I-SB-45 เกิดการปนเปื้อนแบคทีเรีย และไอโซเลท I-EHB-04 ไม่เจริญบนอาหาร MR5 นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถจำแนกสีของ substrate mycelium สีของสปอร์ และเม็ดสีที่ละลายในอาหาร (3.5, 3.6 และ 3.7) โดยสามารถจำแนก actinomycetes ได้ 34 กลุ่ม (ตารางที่ 3.2)

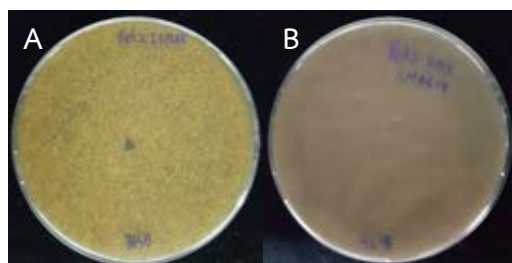




รูปที่ 3.5 รูปแสดงตัวอย่างสีของอาหาร MR5 ด้านล่าง A: ข้าวอกครีม (I-SB-08), B: น้ำตาลเข้มออกดำ (I-SB-37), C: น้ำตาลครีมเข้ม (I-SB-56), D: น้ำตาลอ่อน (I-SB-19), E: น้ำตาลอ่อนออกเหลือง (I-EHB-18), F: น้ำตาลอมส้ม (I-SB-38), G: ดำ (I-SB-36), H: ส้ม (I-SB-06), I: ส้มอ่อน (I-EHB-31), J: เหลืองฟาง (I-EHB-36), K: เหลืองออกขาว (I-SB-09)



รูปที่ 3.6 รูปแสดงตัวอย่างสีของสปอร์บนอาหาร MR5 A; ข้าว (I-SB-09), B; ข้าวอกครีม (I-SB-01), C; เทา (I-SB-08), D: เทาออกน้ำตาล (I-SB-56)



รูปที่ 3.7 รูปแสดงตัวอย่างสีของการผลิตเม็ดสีที่ละลายน้ำได้ A; ทอง (I-SB-36), B; ดำ (I-SB-46)

ตารางที่ 3.2 การจัดกลุ่ม actinomycetes ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เจริญบนอาหารแข็ง ISP-2 และ MR5

กลุ่มที่	ISP-2					MR5					Isolates
	Aerial <sup>a</sup>	Reverse <sup>b</sup>	Spore	Colony pigments <sup>c</sup>	Soluble pigments <sup>d</sup>	Aerial	Reverse	Spore	Colony pigments	Soluble pigments	
1	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลครีม	-	-	I-EHB-22
2	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	-	ขาว	ดำ	ขาว	-	ทอง	I-SB-36
3	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	เหลือง	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-SB-10
4	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	เหลือง	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-SB-02
5	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	แดง	-	-	-	-	-	-	I-SB-45
6	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลครีมเข้ม	น้ำตาลครีม	-	-	I-SB-56
7	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	I-EHB-29
8	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	ส้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-EHB-07, I-EHB-26, I-EHB-27
9	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	I-EHB-28
10	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	ดำ	I-SB-34
11	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทา	-	-	ขาว	ส้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-SB-06
11	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทา	-	เหลือง	ขาว	ขาวออกครีม	เทา	-	-	I-SB-08
13	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลครีม	-	-	I-SB-19
14	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-SB-21, I-SB-25
15	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	ดำ	I-SB-46
16	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	-	ขาว	ส้มอ่อน	เทา	-	-	I-EHB-31
17	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-SB-61
18	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทา	-	-	I-EHB-34
19	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาว	-	-	I-SB-09
20	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	เทา	-	-	I-SB-07
21	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	ขาวออกครีม	เทา	-	-	I-EHB-20

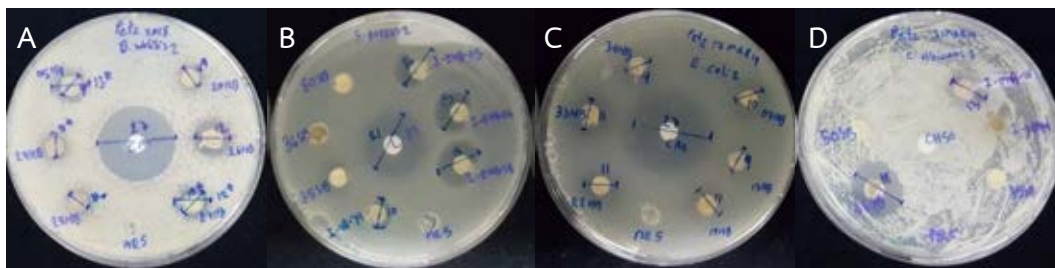
<sup>a</sup>: สีของ aerial mycelium, <sup>b</sup>: สีของอาหารด้านล่าง, <sup>c</sup>: เม็ดสีบนโคโลนี <sup>d</sup>: เม็ดสีที่ละลายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

กลุ่มที่	ISP-2					MR5					Isolates
	Aerial <sup>a</sup>	Reverse <sup>b</sup>	Spore	Colony pigments <sup>c</sup>	Soluble pigments <sup>d</sup>	Aerial	Reverse	Spore	Colony pigments	Soluble pigments	
22	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-SB-74, I-SB-75
23	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-EHB-19, I-EHB-33, I-EHB-35
24	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทา	-	-	I-EHB-06, I-EHB-18
25	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	เทา	-	-	I-EHB-05
26	ขาว	ทอง	เทา	-	-	-	-	-	-	-	I-EHB-04
27	ขาว	เหลือง	เทาออกน้ำตาล	-	เหลือง	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-EHB-36
28	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	ดำ	I-SB-37
29	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลอมส้ม	เทา	-	-	I-SB-38
30	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาว	-	-	I-SB-35
31	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	I-SB-73
32	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทา	-	-	I-SB-71
33	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาว	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาวครีม	-	-	I-SB-01
34	ขาว	เหลืองอ่อน	เทา	-	-	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	I-SB-50

<sup>a</sup>: สีของ aerial mycelium, <sup>b</sup>: สีของอาหารด้านล่าง, <sup>c</sup>: เม็ดสีบนโคโลนี <sup>d</sup>: เม็ดสีที่ละลายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ actinomycetes ที่เจริญบนอาหารที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ ISP-2 และ MR-5 พบว่า actinomycetes ส่วนใหญ่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันตามชนิดของอาหาร ทั้งนี้เกิดจากการที่อาหาร 2 ชนิดนี้มีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ทำให้มีผลต่อการเจริญของ actinomycetes นอกจากนี้ยังอาจมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผล เช่น ระยะเวลาที่บ่ม ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ฯลฯ และเมื่อเปรียบเทียบการจัดกลุ่มพบว่าเชื้อ 9 ไอโซเลทยังคงถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ I-EHB-07, I-EHB-26 และ I-EHB-27 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ I-SB-21 และ I-SB-25 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ I-SB-74 และ I-SB-75 และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ I-EHB-19, I-EHB-33 และ I-EHB-35 และกลุ่มที่ 5 ได้แก่ I-EHB-06 และ I-EHB-18 ซึ่งเชื้อทั้ง 12 ไอโซเลทนี้อาจมีความใกล้เคียงกัน หรืออาจเป็นสายพันธุ์เดียวกันได้

นำชิ้นอาหาร MR5 ที่มี actinomycetes เจริญเป็นเวลา 7 วันไปทำการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบ (รูปที่ 3.8) ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis* และ *S. aureus*) แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) และยีสต์ (*C. albicans*) ด้วยวิธี agar plug โดยวัดจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งได้ผลดังตารางที่ 5.1 (ภาคผนวก ค) โดยนำ actinomycetes มาทดสอบทั้งหมด 39 ไอโซเลท



รูปที่ 3.8 รูปแสดงตัวอย่างการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี agar plug A: *B. subtilis*, B: *S. aureus*, C: *E. coli*, D: *C. albicans*

ผลการทดสอบ (ตารางที่ 3.3) พบว่ามี actinomycetes ที่สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ 5 ไอโซเลท มี actinomycetes ที่สามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ 9 ไอโซเลท มี 4 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก มี 14 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งได้เฉพาะ *B. subtilis* มี 2 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งได้เฉพาะ *C. albicans* มี 5 ไอโซเลทที่ไม่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบสายพันธุ์ใดเลย และไม่มีไอโซเลทใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ได้ เมื่อทำการเปรียบเทียบผลที่ได้จากนางสาวอรพันธ์ ตั้งวิชัย (Orapun, 2016) พบว่าผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบมีความแตกต่างกัน ซึ่งมีสาเหตุจากอาหารที่ใช้เลี้ยง actinomycetes เป็นอาหารคนละชนิดกัน และวิธีการที่ใช้ทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบก็มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลให้ actinomycetes ผลิตสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่างชนิดกันได้

ตารางที่ 3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี agar plug

Number of suppressed tested microorganism	tested microorganism <sup>a</sup>					Isolates (MR5)	Isolates (Orapun, 2016) (NA)
	BS	SA	EC	PA	CA		
0						I-SB-19, I-SB-38, I-SB-46, I-SB-50, I-SB-56	I-SB-02, I-SB-07, I-SB-08, I-SB-10, I-SB-46, I-SB-56, I-SB-73, I-EHB-28, I-EHB-29, I-EHB-35, I-EHB-36
1	+					I-SB-02, I-SB-07, I-SB-08, I-SB-10, I-SB-21, I-SB-35, I-SB-61, I-SB-73, I-SB-74, I-SB-75, I-EHB-20, I-EHB-28, I-EHB-29, I-EHB-36	I-SB-06, I-SB-09, I-SB-19, I-EHB-22, I-EHB-26
1		+				-	I-SB-21, I-SB-50, I-SB-61, I-SB-74, I-SB-75
1					+	I-SB-01, I-SB-36	-
2		+			+	I-SB-25, I-SB-34, I-SB-37, I-EHB-31	I-EHB-20, I-EHB-33, I-EHB-34
3	+	+	+			I-SB-06, I-SB-71, I-EHB-07, I-EHB-19, I-EHB-22, I-EHB-26, I-EHB-27, I-EHB-33, I-EHB-35	-
4	+	+	+		+	I-SB-09, I-EHB-05, I-EHB-06, I-EHB-18, I-EHB-34, I-EHB-27	I-SB-31, I-SB-71, I-EHB-05, I-EHB-06, I-EHB-07, I-EHB-18, I-EHB-19,

<sup>a</sup>: เครื่องหมาย “+” หมายถึงสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้,

BS: *B. subtilis*

SA: *S. aureus*

EC: *E. coli*

PA: *P. aeruginosa*

CA: *C. albicans*

เมื่อได้ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบจึงนำมาทำการจัดกลุ่ม actinomycetes ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร ISP-2, MR5 และฤทธิ์การยับยั้ง (ตารางที่ 3.4) โดยพบว่าสามารถทำการจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 34 กลุ่ม โดยกลุ่มที่จำแนกตามลักษณะที่ใกล้เคียงกันเหลือเพียง 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ I-SB-07, I-EHB-26 และ I-EHB-27 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ I-SB-74 และ I-SB-75 และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ I-EHB-19, I-EHB-33 และ I-EHB-35 และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ I-EHB-06 และ I-EHB-18 นอกจากนี้ยังพบว่า actinomycetes บางไอโซเลทที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันกลับมีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบต่างกัน ในขณะที่เดียวกัน บางสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างกันกลับมีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบเหมือนกัน ด้วยเหตุนี้ทำให้ต้องมีการระบุสายพันธุ์โดยวิธีทางอนุวิธานและตรวจสอบความใกล้เคียงกันของแต่ละ isolate ด้วยวิธีการทำ phylogenetic tree โดยใช้ยีน 16S rRNA ในการวิเคราะห์

ตารางที่ 3.4 การจัดกลุ่ม actinomycetes ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เจริญบนอาหารแข็ง ISP-2, MR5 และฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบ

กลุ่มที่	ISP-2					MR5					Inhibition <sup>e</sup>	Isolates
	Aerial <sup>a</sup>	Reverse <sup>b</sup>	Spore	Colony pigments <sup>c</sup>	Soluble pigments <sup>d</sup>	Aerial	Reverse	Spore	Colony pigments	Soluble pigments		
1	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลครีม	-	-	BS, SA, EC	I-EHB-22
2	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	-	ขาว	ดำ	ขาว	-	ทอง	CA	I-SB-36
3	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	เหลือง	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	I-SB-10
4	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	เหลือง	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	I-SB-02
5	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	แดง	-	-	-	-	-	-	No data	I-SB-45
6	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลครีมเข้ม	น้ำตาลครีม	-	-	-	I-SB-56
7	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	BS	I-EHB-29
8	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	ส้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS, SA, EC	I-EHB-07, I-EHB-26, I-EHB-27
9	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	BS	I-EHB-28
10	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	ดำ	BS, SA	I-SB-34
11	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทา	-	-	ขาว	ส้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS, SA, EC	I-SB-06
12	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทา	-	เหลือง	ขาว	ขาวออกครีม	เทา	-	-	BS	I-SB-08
13	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลครีม	-	-	-	I-SB-19
14	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	I-SB-21
15	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS, SA	I-SB-25
16	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	ดำ	-	I-SB-46
17	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	-	ขาว	ส้มอ่อน	เทา	-	-	BS, SA	I-EHB-31
18	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	I-SB-61
19	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทา	-	-	BS, SA, EC, CA	I-EHB-34
20	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาว	-	-	BS, SA, EC, CA	I-SB-09
21	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	เทา	-	-	BS	I-SB-07
22	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	ขาวออกครีม	เทา	-	-	BS	I-EHB-20

<sup>a</sup>: สีของ aerial mycelium, <sup>b</sup>: สีของอาหารด้านล่าง, <sup>c</sup>: เม็ดสีบนโคโลนี <sup>d</sup>: เม็ดสีที่ละลายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ, <sup>e</sup>: ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

BS: *B. subtilis*

SA: *S. aureus*

EC: *E. coli*

PA: *P. aeruginosa*

CA: *C. albicans*

No data: ไม่ได้ทำการทดสอบ

กลุ่มที่	ISP-2					MR5					Inhibition <sup>e</sup>	Isolates
	Aerial <sup>a</sup>	Reverse <sup>b</sup>	Spore	Colony pigments <sup>c</sup>	Soluble pigments <sup>d</sup>	Aerial	Reverse	Spore	Colony pigments	Soluble pigments		
23	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	I-SB-74, I-SB-75
24	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS, SA, EC	I-EHB-19, I-EHB-33, I-EHB-35
25	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทา	-	-	BS, SA, EC, CA	I-EHB-06, I-EHB-18
26	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	เทา	-	-	BS, SA, EC ,CA	I-EHB-05
27	ขาว	ทอง	เทา	-	-	-	-	-	-	-	No data	I-EHB-04
28	ขาว	เหลือง	เทาออกน้ำตาล	-	เหลือง	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	I-EHB-36
29	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	ดำ	BS, SA	I-SB-37
30	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลอมส้ม	เทา	-	-	-	I-SB-38
31	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาว	-	-	BS	I-SB-35
32	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	I-SB-73
33	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทา	-	-	BS, SA, EC	I-SB-71
34	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาว	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาวครีม	-	-	CA	I-SB-01
35	ขาว	เหลืองอ่อน	เทา	-	-	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	-	I-SB-50

<sup>a</sup>: สีของ aerial mycelium, <sup>b</sup>: สีของอาหารด้านล่าง, <sup>c</sup>: เม็ดสีบนโคโลนี <sup>d</sup>: เม็ดสีที่ละลายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ <sup>e</sup>: ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

BS: *B. subtilis*

SA: *S. aureus*

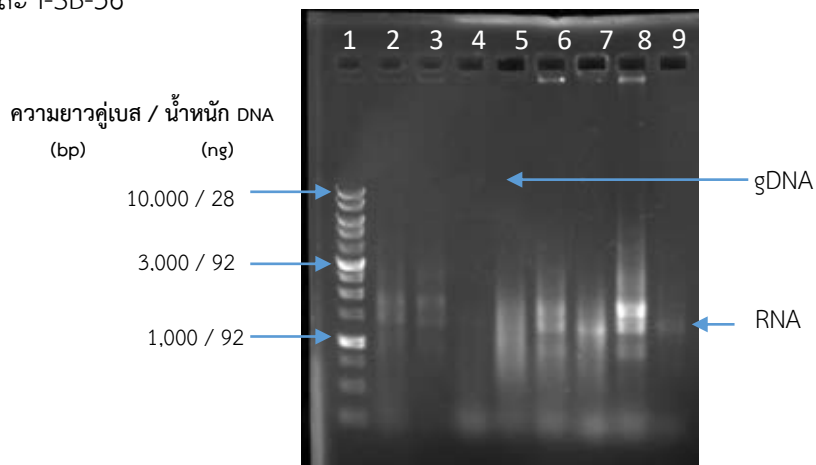
EC: *E. coli*

PA: *P. aeruginosa*

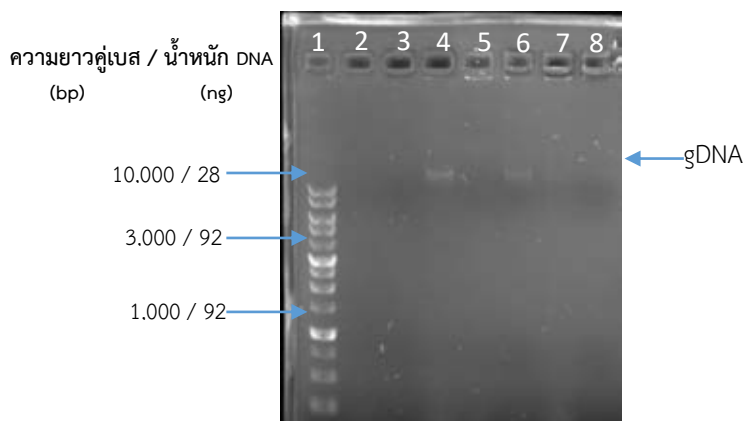
CA: *C. albicans*

No data: ไม่ได้ทำการทดสอบ

วิเคราะห์ยีน 16S rRNA ทำได้โดยนำ 39 ไอโซเลทที่ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบมาทำการวิเคราะห์สายพันธุ์โดยสามารถสกัด gDNA ได้ 31 ไอโซเลท โดยมี 8 ไอโซเลทที่ไม่สามารถสกัด gDNA ได้ นำ gDNA ที่สกัดได้มาตรวจวิเคราะห์ขนาดและปริมาณด้วยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (รูปที่ 3.9) โดยผลจากการสกัด gDNA พบว่ามีปริมาณ RNA ที่มากเกินไป และ gDNA ที่สกัดได้ละลายไม่ดีจึงทำให้การสังเกต gDNA เป็นไปได้ยาก ผู้วิจัยจึงนำ gDNA ที่สกัดได้ไปทำการเติม RNase A ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบด้วยวิธีทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสอีกครั้ง (รูปที่ 3.10) พบว่าสามารถเห็นแถบของ gDNA ได้ชัดเจนมากขึ้น จากรูปที่ 3.9 และ 3.10 ผู้วิจัยสามารถสกัด gDNA ของ actinomycetes ได้ 5 ไอโซเลท ได้แก่ I-SB-21, I-SB-35, I-SB-38, I-SB-50 และ I-SB-56



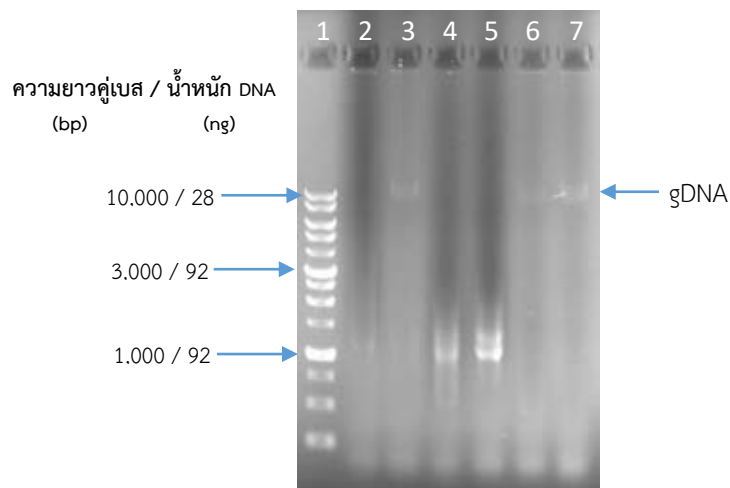
**รูปที่ 3.9** ผลการตรวจสอบการสกัด genomic DNA ด้วยการทำให้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2 และ 3 คือตัวอย่างของผู้ทำปฏิบัติการร่วม; เลนที่ 4 คือ I-SB-21; เลนที่ 5 คือ I-SB-35; เลนที่ 6 คือ I-SB-36; เลนที่ 7 คือ I-SB-38; เลนที่ 8 คือ I-SB-50 และเลนที่ 9 คือ I-SB-56



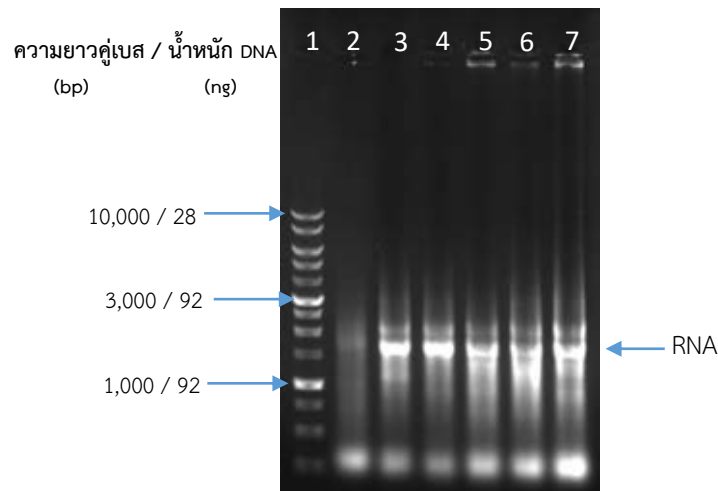
**รูปที่ 3.10** ผลการตรวจสอบการสกัด genomic DNA หลังจากนำไปบ่มด้วย RNase A ด้วยการทำให้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2 และ 3 คือตัวอย่างของผู้ทำปฏิบัติการร่วม; เลนที่ 4 คือ I-SB-35; เลนที่ 5 คือ I-SB-36; เลนที่ 6 คือ I-SB-38; เลนที่ 7 คือ I-SB-50; และเลนที่ 8 คือ I-SB-56



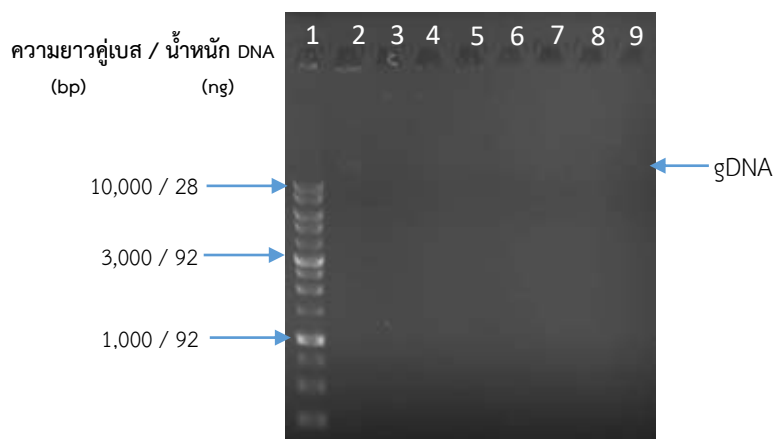
เนื่องจากการสกัด gDNA พบว่ามีปริมาณ RNA ปนเปื้อนจำนวนมาก และผลของ gDNA ไม่ดีนัก ซึ่งอาจเกิดได้จากปริมาณเซลล์ไม่เหมาะสมกับสารเคมีที่ใช้สกัด ผู้วิจัยจึงลดปริมาณเชื้อที่เลี้ยงอาหาร TSB ที่นำมาสกัด gDNA จาก 5 มิลลิลิตร เป็น 2.5 มิลลิลิตร โดย actinomycetes ที่ทำการสกัดในครั้งนี้ได้แก่ I-EHB-05, I-EHB-20, I-EHB-26, I-EHB-27, I-EHB-28 และ I-EHB-29 (รูปที่ 3.11) โดยพบว่าสามารถสกัด gDNA ได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่ I-EHB-20, I-EHB-28 และ I-EHB-29 ในขณะที่ I-EHB-05 ไม่สามารถสกัด gDNA ได้ และ I-EHB-26 และ I-EHB-27 ยังคงมีปริมาณ RNA ปนเปื้อนจำนวนมากอยู่ ผู้วิจัยจึงนำไปเติม RNase A ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (รูปที่ 3.12) พร้อมกันนี้ ผู้วิจัยได้สกัด gDNA ของไอโซเลท I-SB-01, I-SB-06, I-SB-07, I-SB-34, I-SB-37, I-SB-46, I-EHB-26 และ I-EHB-27 (รูปที่ 3.12) พบว่า gDNA ที่สกัดได้มีปริมาณ RNA ปนเปื้อนในปริมาณมากจึงนำไปบ่มด้วย RNase และตรวจสอบผล (รูปที่ 3.13) โดยพบว่าสามารถเห็นแถบ gDNA ได้ชัดเจนมากขึ้น แต่ gDNA ที่ได้มีปริมาณต่ำจึงทำให้สังเกตได้ยาก จากการสกัด gDNA ในครั้งนี้ ผู้วิจัยสามารถสกัด gDNA ของ actinomycetes ได้ 9 ไอโซเลท ได้แก่ I-SB-01, I-SB-34, I-SB-37, I-SB-46, I-EHB-20, I-EHB-26, I-EHB-27, I-EHB-28 และ I-EHB-29



รูปที่ 3.11 ผลการตรวจสอบการสกัด genomic DNA หลังจากลดปริมาตรของเชื้อด้วยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2 คือ I-EHB-05; เลนที่ 3 คือ I-EHB-20 เลนที่ 4 คือ I-EHB-26; เลนที่ 5 คือ I-EHB-27; เลนที่ 6 คือ I-SB-28; และเลนที่ 7 คือ I-EHB-29

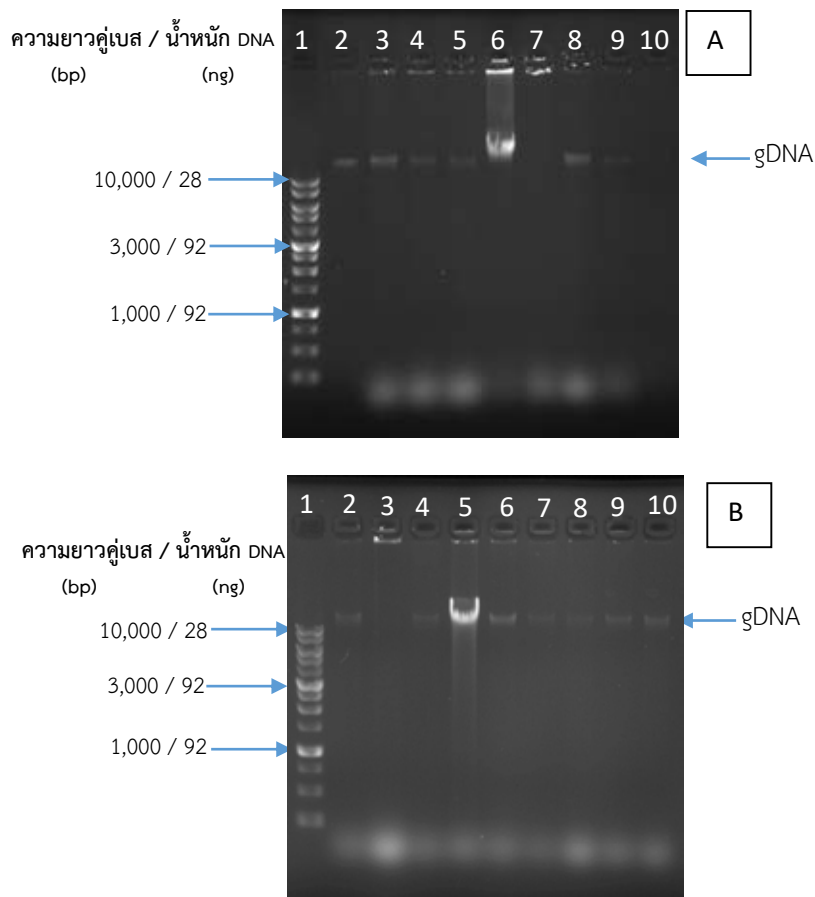


รูปที่ 3.12 ผลการตรวจสอบการสกัด genomic DNA ด้วยการทำให้เกลือเลคโตรโพรสิส ใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8% กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2 คือ I-SB-01; เลนที่ 3 คือ I-SB-06 เลนที่ 4 คือ I-SB-07; เลนที่ 5 คือ I-SB-34; เลนที่ 6 คือ I-SB-37 และเลนที่ 7 คือ I-SB-46



รูปที่ 3.13 ผลการตรวจสอบการสกัด genomic DNA หลังจากนำไปปมด้วย RNase A ด้วยการทำให้เกลือเลคโตรโพรสิส ใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2 คือ I-SB-01; เลนที่ 3 คือ I-SB-06 เลนที่ 4 คือ I-SB-07; เลนที่ 5 คือ I-SB-34; เลนที่ 6 คือ I-SB-37; เลนที่ 7 คือ I-SB-46 เลนที่ 8 คือ I-EHB-26 และเลนที่ 9 คือ I-EHB-27

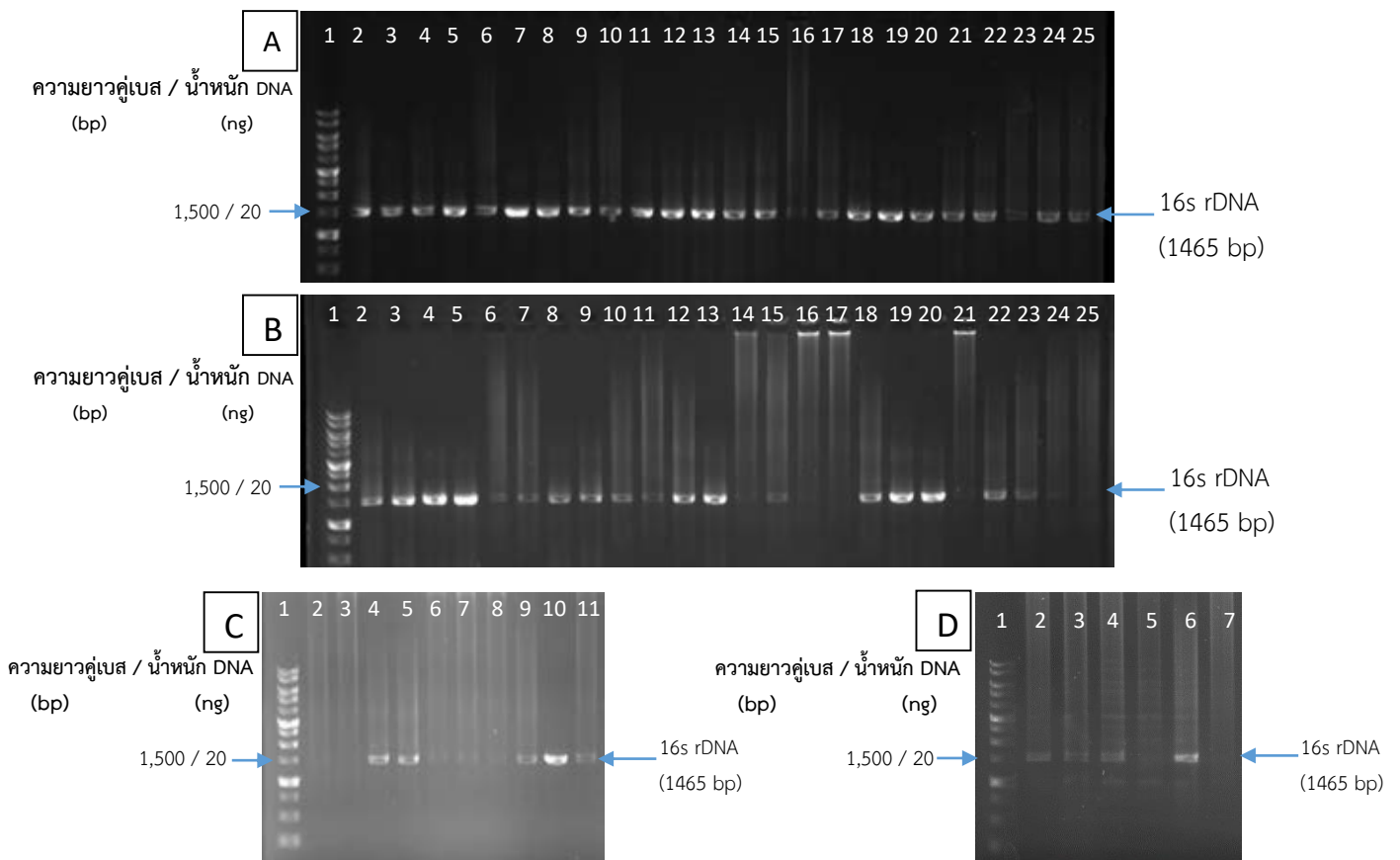
เนื่องจาก gDNA ที่สกัดได้มีปริมาณ gDNA น้อย ผู้วิจัยจึงนำ actinomycetes ไอโซเลทที่เหลือมาทำการสกัดโดยนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืนหลังจากดูดอาหาร TSB ออกหมดแล้ว และลดปริมาตรของ TE buffer จาก 500 ไมโครลิตร เหลือ 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเติม RNase A ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตรวจสอบด้วยวิธี เจลอิเล็กโตรโพรสิส (รูปที่ 3.14) พบว่าสามารถสังเกตเห็นแถบของ gDNA ได้ชัดเจน เนื่องจาก gDNA มีความเข้มข้นมากขึ้น



รูปที่ 3.14 ผลการตรวจสอบการสกัด genomic DNA หลังจากนำไปบ่มด้วย RNase A ด้วยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% A: กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2 คือ I-SB-09; เลนที่ 3 คือ I-SB-19; เลนที่ 4 คือ I-SB-25; เลนที่ 5 คือ I-SB-61; เลนที่ 6 คือ I-SB-71; เลนที่ 7 คือ I-SB-73 เลนที่ 8 คือ I-SB-74 เลนที่ 9 คือ I-EHB-05 และ เลนที่ 10 คือ I-EHB-06 B: กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2 คือ I-SB-06; เลนที่ 3 คือ I-SB-36; เลนที่ 4 คือ I-EHB-18; เลนที่ 5 คือ I-EHB-19; เลนที่ 6 คือ I-EHB-22; เลนที่ 7 คือ I-EHB-33 เลนที่ 8 คือ I-EHB-34 เลนที่ 9 คือ I-EHB-35 และ เลนที่ 10 คือ I-EHB-36

จากการทดลองการสกัด gDNA ด้วยวิธี salting out สามารถสกัด gDNA ของ actinomycetes ได้ทั้งสิ้น 31 ไอโซเลทจาก 39 ไอโซเลท โดยเป็น actinomycetes ที่คัดแยกจากชันโรง 17 ไอโซเลท ได้แก่ I-SB-01, I-SB-06, I-SB-09, I-SB-19, I-SB-21, I-SB-25, I-SB-34, I-SB-35, I-SB-36, I-SB-37, I-SB-38, I-SB-46, I-SB-50, I-SB-56, I-SB-61, I-SB-71, I-SB-74 และฟัซง 14 ไอโซเลท ได้แก่ I-EHB-05, I-EHB-06, I-EHB-18, I-EHB-19, I-EHB-20, I-EHB-22, I-EHB-26, I-EHB-27, I-EHB-28, I-EHB-29, I-EHB-33, I-EHB-34, I-EHB-35, I-EHB-36 โดยมี 8 ไอโซเลทที่ไม่สามารถสกัด gDNA อาจมีสาเหตุมาจากความผิดพลาดระหว่างการสกัดและเวลาที่จำกัด ทั้งนี้สภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัด gDNA คือนำเซลล์ที่ดูด TSB ออกจนหมดมาทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืนแล้วจึงทำการสกัด หลังจากการสกัดเสร็จทำการเติม RNase A ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในการละลาย gDNA

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบส ระบุสายพันธุ์และความใกล้เคียงโดยมีขั้นตอนการทำคือ นำ gDNA ของ actinomycetes ที่สกัดได้ทั้ง 31 ไอโซเลทมาทำการเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA ด้วยการทำ PCR โดยใช้ primer 27F และ 1492R โดยเพิ่มจำนวนไอโซเลทละ 2 ปฏิกริยา ปฏิกริยาละ 50 ไมโครลิตร และตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (รูปที่ 3.15) พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนได้ 28 ไอโซเลทจาก 31 ไอโซเลท โดยมี 3 ไอโซเลทที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวน 16S rRNA ได้เนื่องจาก gDNA มีปริมาณต่ำเกินไป ได้แก่ I-SB-36, I-EHB-04, I-EHB-34



รูปที่ 3.15 ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA ด้วยการทำให้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% A: กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2, 3 คือ I-SB-01; เลนที่ 4, 5 คือ I-SB-35; เลนที่ 6, 7 คือ I-SB-38; เลนที่ 8,9 คือ I-SB-50; เลนที่ 10, 11 คือ I-SB-56; เลนที่ 12, 13 คือ I-SB-37 เลนที่ 14, 15 คือ I-SB-46 เลนที่ 16, 17 คือ I-SB-34; เลนที่ 18, 19 คือ I-SB-21; เลนที่ 20, 21 คือ I-EHB-20 เลนที่ 22, 23 คือ I-EHB-26 และเลนที่ 24,25 คือ I-EHB-27; B: กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2, 3 คือ I-EHB-28; เลนที่ 4, 5 คือ I-EHB-29; เลนที่ 6, 7 คือ I-SB-09; เลนที่ 8,9 คือ I-SB-19; เลนที่ 10, 11 คือ I-SB-25; เลนที่ 12, 13 คือ I-SB-61 เลนที่ 14, 15 คือ I-EHB-36 เลนที่ 16, 17 คือ I-EHB-34; เลนที่ 18, 19 คือ I-SB-71; เลนที่ 20, 21 คือ I-SB-74 เลนที่ 22, 23 คือ I-EHB-05 และเลนที่ 24, 25 คือ I-EHB-06 C: กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2, 3 คือ I-SB-56; เลนที่ 4, 5 คือ I-SB-06; เลนที่ 6, 7 คือ I-SB-36; เลนที่ 8,9 คือ I-EHB-18; และเลนที่ 10, 11 คือ I-EHB-19 D: กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2, 3 คือ I-EHB-22; เลนที่ 4, 5 คือ I-EHB-33 และเลนที่ 6, 7 คือ I-EHB-35

นำผลิตภัณฑ์ 16s rRNA ที่ได้จากการ PCR ของทั้ง 28 ไอโซเลทไปวิเคราะห์ลำดับเบสโดยบริษัท Bionics ใช้ไพรเมอร์ 27F และ 518F โดยสามารถวิเคราะห์ได้ 18 ไอโซเลท นำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้มาทำการระบุสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม Blastn (ตารางที่ 3.5) โดยเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI

ตารางที่ 3.5 การระบุสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงของ actinomycetes ที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยโปรแกรม Blastn

Isolate	Size <sup>a</sup> (bp)	closest relative	accession number	Size <sup>b</sup> (bp)	identity
I-SB-21	973	<i>Streptomyces fumigatiscleroticus</i> VIT-SP4	KM875468.1	1,291	100.00
I-SB-35	947	<i>Streptomyces seoulensis</i> KCTC 9819	CP032229.1	1,479	100.00
I-SB-37	934	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> Tm3	MF801337.1	1,344	100.00
I-SB-38	1,174	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> Tm3	MF801337.1	1,344	99.74
I-SB-46	824	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> USC048	KX358671.1	1,387	99.64
I-SB-61	920	<i>Streptomyces fumigatiscleroticus</i> VIT-SP4	KM875468.1	1,291	99.46
I-SB-71	1,108	<i>Streptomyces bikiniensis</i> 13661V	EU741193.1	1,492	99.64
I-SB-74	1,346	<i>Streptomyces fumigatiscleroticus</i> XY191	MH432668.1	1,507	99.55
I-EHB-05	1,118	<i>Streptomyces anandii</i> Qn-1	KF951414.1	1,332	100.00
I-EHB-18	1,141	<i>Streptomyces anandii</i> Qn-1	KF951414.1	1,332	99.91
I-EHB-19	1,361	<i>Streptomyces andamanensis</i> KC-112	NR_149230.1	1,500	99.85
I-EHB-20	1,250	<i>Streptomyces fumigatiscleroticus</i> XY191	MH432668.1	1,507	99.92
I-EHB-22	1,104	<i>Streptomyces andamanensis</i> KC-112	NR_149230.1	1,500	100.00
I-EHB-26	1,289	<i>Streptomyces andamanensis</i> KC-112	NR_149230.1	1,500	100.00
I-EHB-27	1,348	<i>Streptomyces andamanensis</i> KC-112	NR_149230.1	1,500	100.00
I-EHB-28	1,317	<i>Streptomyces fumigatiscleroticus</i> XY191	MH432668.1	1,507	99.92
I-EHB-29	1,329	<i>Streptomyces fumigatiscleroticus</i> XY191	MH432668.1	1,507	99.92
I-EHB-35	1,164	<i>Streptomyces andamanensis</i> KC-112	NR_149230.1	1,507	97.85

<sup>a</sup>: ความยาวลำดับเบสของแต่ละไอโซเลท, <sup>b</sup>: ความยาวลำดับเบสของสายพันธุ์อ้างอิง

จากการวิเคราะห์สายพันธุ์ของ actinomycetes ที่เพาะเลี้ยงได้พบว่า actinomycetes ที่เพาะเลี้ยงได้ส่วนใหญ่มีความใกล้ชิดกับ actinomycetes ที่อยู่แบบอิสระในสิ่งแวดล้อมและเป็นสกุล *Streptomyces* ทั้งหมด ส่วนมากเป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าสามารถคัดแยกได้จากดิน มีเพียงไอโซเลท I-SB-37 และ I-SB-38 เท่านั้นที่มีความใกล้ชิดกับ *S. drozdowiczii* Tm3 ซึ่งเคยมีรายงานว่าสามารถคัดแยกได้จากลำไส้ของแมลงหางดีด *Tomocerus minor* (Agamennone et al., 2018) โดยจากการรายงานพบว่า actinomyces สายพันธุ์นี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร M490 คือโคโลนีมีสีส้มออกน้ำตาล สร้างสปอร์สีขาว เมื่อเทียบกับทั้ง 2 ไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงได้พบว่าลักษณะโคโลนีมีความแตกต่างกันเนื่องจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงต่างกัน หรือเป็นสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันแต่มีลักษณะต่างกัน นอกจากนี้ *S. drozdowiczii* Tm3 สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ซึ่งเมื่อเทียบกับผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบแล้วพบว่า ไอโซเลท I-SB-37 สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้แต่ไม่สามารถยับยั้ง *C. albicans* ได้ ในขณะที่ I-SB-38 ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้เลย ผลการทดลองที่แตกต่างกันมีสาเหตุจากอาหารที่ใช้ทดสอบแตกต่างกัน หากต้องการเทียบว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกันหรือไม่อาจต้องทำการทดลองเพิ่มเติมโดยการใช้อาหารชนิดเดียวกันในการทดสอบ และเพิ่มไพรเมอร์ 1492R ในการวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อให้ได้ความยาวที่มากขึ้น

จากการเปรียบเทียบ *S. andamanensis* KC112 ซึ่งคัดแยกได้จากดิน (Sripreechasak et al., 2016) พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร มีโคโลนีสีเหลืองเข้ม สร้างสปอร์สีเทา และไม่สร้างเม็ดสี เมื่อเทียบกับไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงได้พบว่ามี ความใกล้เคียงกันกับที่เคยมีรายงานจึงคาดว่า ไอโซเลท I-EHB-19, I-EHB-22, I-EHB-26, I-EHB-27 และ I-EHB-35 มีความใกล้ชิดกับ *S. andamanensis* KC112 อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยได้รายงานว่า *S. andamanensis* KC112 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. subtilis* ได้เล็กน้อย เมื่อเทียบกับการทดลองฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบพบว่าไอโซเลท I-EHB-19, I-EHB-22, I-EHB-26, I-EHB-27 และ I-EHB-35 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้ง *B. subtilis*, *S. aureus* และ *E. coli* ซึ่งคาดว่าผลการออกฤทธิ์มีความแตกต่างกันมีสาเหตุมาจากอาหารที่ใช้ทดสอบแตกต่างกัน

จากการเทียบ *S. anandii* Qn-1 ซึ่งคัดแยกได้จากดิน พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานการผลิตสารปฏิชีวนะ ได้แก่ pantaene G8 มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา (Batra and Bajaj, 1966) และ glivocarcin M มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (Nakano et al., 1981) เมื่อเทียบกับไอโซเลท I-EHB-05 และ I-EHB-18 พบว่ามีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้ง *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *C. albicans* จึงคาดว่า 2 ไอโซเลทนี้อาจมีความใกล้เคียงกับ *S. anandii* Qn-1 และอาจมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิไปผลิตเป็นยาปฏิชีวนะได้ในอนาคต

จากการเทียบ *S. fumigatiscleroticus* XY191 ซึ่งคัดแยกได้จากใบชา (Shan et al., 2018) พบว่า สารสกัดจากอาหาร MYG สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ *B. subtilis* และ *S. aureus* เมื่อเทียบกับการทดลองในครั้ง นี้พบว่าไอโซเลท I-SB-74, I-EHB-20, I-EHB-28 และ I-EHB-29 สามารถยับยั้งได้เพียง *B. subtilis* เท่านั้น ซึ่งผลการทดลองที่แตกต่างกันนี้คาดว่า เป็นผลมาจากอาหารที่ใช้ทดสอบมีความต่างกัน

ในส่วนของ actinomyces สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีความใกล้เคียงกัน ได้แก่ *S. andamanensis* KC112 ซึ่งแยกได้จากดิน (Sripreechasak et al., 2016), *S. drozdowiczii* USC048 ซึ่งแยกได้จากดิน (Semedo et al., 2004), *Streptomyces bikiniensis* 13661V แยกได้จากแนวปะการัง (Solano et al., 2009), *S. fumigatiscleroticus* VIT-SP4 ซึ่งคัดแยกได้จากดิน และ *S. seoulensis* ซึ่งแยกจากดิน (Chun et al., 1997) โดยสายพันธุ์เหล่านี้ไม่พบการมีรายงานของข้อมูลที่ระบุถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ รวมถึงสารเมตาบอไลต์จึงทำให้ไม่สามารถเทียบกับไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงได้

อย่างไรก็ตามจะพบว่า actinomycetes บางไอโซเลทมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบที่ต่างกัน แต่เมื่อทำการระบุสายพันธุ์กลับพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่ได้ลำดับของ 16S rRNA ไม่เต็มสาย (900 bp ถึง 1300 bp) ซึ่งอาจพบลำดับเบสที่แตกต่างในช่วงที่หายไปทำให้การระบุสายพันธุ์ผิดพลาด ในอนาคตควรเพิ่มความยาวที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ 1492R เพิ่มเติม

นำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบบนอาหาร ISP-2, MR5 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบ และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA มาทำการจัดกลุ่ม actinomycetes (ตารางที่ 3.6) พบว่าสามารถระบุสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงของแต่ละไอโซเลทรวมทั้งสิ้น 22 ไอโซเลทจากทั้งหมด 41 ไอโซเลท โดยไอโซเลท I-EHB-07, I-EHB-19, I-EHB-22, I-EHB-26, I-EHB-27, I-EHB-33 และ I-EHB-35 มีความใกล้เคียงกับ *S. andamanensis* KC112 ไอโซเลท I-EHB-05, I-EHB-06 และ I-EHB-18 มีความใกล้เคียงกับ

*S. anandii* Qn-1 ไอโซเลท I-SB-74, I-SB-75, I-EHB-20, I-EHB-28 และ I-EHB-29 มีความใกล้เคียงกับ *S. fumigatiscleroticus* XY191 ไอโซเลท I-SB-21, I-SB-61 มีความใกล้เคียงกับ *S. fumigatiscleroticus* VIT-SP4 ไอโซเลท I-SB-37, I-SB-38 และ I-SB-46 มีความใกล้เคียงกับ *S. drozdowiczii* Tm3 ไอโซเลท I-SB-35 มีความใกล้เคียงกับ *S. seoulensis* KCTC9819 และไอโซเลท I-SB-71 มีความใกล้เคียงกับ *S. bikiniensis* 13661V ผลจากการจัดกลุ่มและระบุสายพันธุ์พบว่าสามารถระบุสายพันธุ์ได้ 16 กลุ่มจาก 35 กลุ่ม ทั้งนี้ยังมี actinomycetes ที่ยังไม่ได้ทำการระบุสายพันธุ์อีก 17 กลุ่มซึ่งได้แก่ไอโซเลท I-SB-01, I-SB-02, I-SB-06, I-SB-07, I-SB-08, I-SB-09, I-SB-10, I-SB-19, I-SB-25, I-SB-34, I-SB-36, I-SB-45, I-SB-50, I-SB-56, I-SB-73, I-EHB-04, I-EHB-31, I-EHB-34 และ I-EHB-36 ซึ่งในอนาคตควรทำการทดลองเพื่อระบุสายพันธุ์ของ actinomycetes เหล่านี้

ตารางที่ 3.6 การจัดกลุ่ม actinomycetes ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เจริญบนอาหารแข็ง ISP-2, MR5 ฤทธิการต้านจุลินทรีย์ทดสอบ และการระบุสายพันธุ์

กลุ่มที่	ISP-2				MR5				Inhibition <sup>e</sup>	Closet relative	Isolates <sup>f</sup>		
	Aerial <sup>a</sup>	Reverse <sup>b</sup>	Spore	Colony Soluble pigments <sup>c</sup>	Aerial	Reverse	Spore	Colony Soluble pigments					
1	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลครีม	-	-	BS, SA, EC	<i>S. andamanensis</i> KC112	I-EHB-22
2	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	-	ขาว	ดำ	ขาว	-	ทอง	CA	-	I-SB-36
3	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	เหลือง	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	-	I-SB-10
4	ขาว	น้ำตาล	เทา	-	เหลือง	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	-	I-SB-02
5	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	แดง	-	-	-	-	-	-	No data	-	I-SB-45
6	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลครีมเข้ม	น้ำตาลครีม	-	-	-	-	I-SB-56
7	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	BS	<i>S. fumigatiscleroticus</i> XY191	I-EHB-29
8	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	ส้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS, SA, EC	<i>S. andamanensis</i> KC112	I-EHB-07, I-EHB-26, I-EHB-27
9	ขาว	น้ำตาล	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	BS	<i>S. fumigatiscleroticus</i> XY191	I-EHB-28
10	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	ดำ	BS, SA	-	I-SB-34
11	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทา	-	-	ขาว	ส้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS, SA, EC	-	I-SB-06
12	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทา	-	เหลือง	ขาว	ขาวออกครีม	เทา	-	-	BS	-	I-SB-08
13	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลครีม	-	-	-	-	I-SB-19
14	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	<i>S. fumigatiscleroticus</i> VIT-SP4	I-SB-21
15	ขาว	น้ำตาลเข้ม	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS, SA	-	I-SB-25
16	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	ดำ	-	<i>S. drozdowiczii</i> Tm3	I-SB-46
17	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	-	ขาว	ส้มอ่อน	เทา	-	-	BS, SA	-	I-EHB-31
18	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	<i>S. fumigatiscleroticus</i> VIT-SP4	I-SB-61
19	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทา	-	-	BS, SA, EC, CA	-	I-EHB-34
20	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาว	-	-	BS, SA, EC, CA	-	I-SB-09
21	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทา	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	เทา	-	-	BS	-	I-SB-07
22	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	ขาวออกครีม	เทา	-	-	BS	<i>S. fumigatiscleroticus</i> XY191	I-EHB-20

<sup>a</sup>: สีของ aerial mycelium, <sup>b</sup>: สีของอาหารด้านล่าง, <sup>c</sup>: เม็ดสีบนโคโลนี, <sup>d</sup>: เม็ดสีที่ละลายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ, <sup>e</sup>: ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ, <sup>f</sup>: ไอโซเลทที่ขีดเส้นใต้หมายถึงไอโซเลทที่ทำการระบุสายพันธุ์

BS: *B. subtilis*

SA: *S. aureus*

EC: *E. coli*

PA: *P. aeruginosa*

CA: *C. albicans*

No data: ไม่ได้ทำการทดสอบ



กลุ่มที่	ISP-2					MR5					Inhibition <sup>e</sup>	Closet relative	Isolates <sup>f</sup>
	Aerial <sup>a</sup>	Reverse <sup>b</sup>	Spore	Colony pigments <sup>c</sup>	Soluble pigments <sup>d</sup>	Aerial	Reverse	Spore	Colony pigments	Soluble pigments			
23	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	<i>S. fumigatiscleroticus</i> XY191	I-SB-74, I-SB-75
24	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS, SA, EC	<i>S. andamanensis</i> KC112	I-EHB-19, I-EHB-33, I-EHB-35
25	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทา	-	-	BS, SA, EC, CA	<i>S. anandii</i> Qn-1	I-EHB-06, I-EHB-18
26	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	เทา	-	-	BS, SA, EC, CA	<i>S. anandii</i> Qn-1	I-EHB-05
27	ขาว	ทอง	เทา	-	-	-	-	-	-	-	No data	-	I-EHB-04
28	ขาว	เหลือง	เทาออกน้ำตาล	-	เหลือง	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	-	I-EHB-36
29	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลเข้มออกดำ	เทา	-	ดำ	BS, SA	<i>S. drozdowiczii</i> Tm3	I-SB-37
30	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	ขาว	น้ำตาลอมส้ม	เทา	-	-	-	<i>S. drozdowiczii</i> Tm3	I-SB-38
31	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาว	-	-	BS	<i>S. seoulensis</i> KCTC 9819	I-SB-35
32	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อน	เทาออกน้ำตาล	-	-	BS	-	I-SB-73
33	ขาว	เหลืองฟาง	เทาออกน้ำตาล	-	-	ขาว	น้ำตาลอ่อนออกเหลือง	เทา	-	-	BS, SA, EC	<i>S. bikinensis</i> 13661V	I-SB-71
34	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาว	-	-	ขาว	เหลืองออกขาว	ขาวครีม	-	-	CA	-	I-SB-01
35	ขาว	เหลืองอ่อน	เทา	-	-	ขาว	เหลืองฟาง	เทา	-	-	-	-	I-SB-50

<sup>a</sup>: สีของ aerial mycelium, <sup>b</sup>: สีของอาหารด้านล่าง, <sup>c</sup>: เม็ดสีบนโคโลนี, <sup>d</sup>: เม็ดสีที่ละลายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ, <sup>e</sup>: ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ, <sup>f</sup>: ไอโซเลทที่ขีดเส้นใต้หมายถึงไอโซเลทที่ทำการระบุสายพันธุ์

BS: *B. subtilis*

SA: *S. aureus*

EC: *E. coli*

PA: *P. aeruginosa*

CA: *C. albicans*

No data: ไม่ได้ทำการทดสอบ

ทำการสร้าง phylogenetic tree (รูปที่ 3.16) จากยีน 16S rRNA โดยเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI โดยใช้ *Streptomyces* สายพันธุ์ที่เคยมีรายงานความสัมพันธ์ร่วมกับแมลงเป็นสายพันธุ์อ้างอิง (ตารางที่ 5.2, ภาคผนวก ค) โดยใช้ *Mycobacterium tuberculosis* เป็น สายพันธุ์นอกกลุ่ม (out group) (Cambroner-Heinrichs et al., 2019) วิธีการทำคือนำลำดับเบสที่ได้มาทำการ alignment ด้วยโปรแกรม Muscle จากนั้นทำการสร้าง neighbor-joining phylogenetic tree (Saitou and Nei, 1987) ด้วยโปรแกรม MEGA 7 พบว่าสามารถแบ่งความใกล้ชิดได้เป็น 4 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ไอโซเลท I-SB-37, I-SB-38, I-SB-46 และ I-SB-71 มีความใกล้ชิดกับ *Streptomyces griseus*, *Streptomyces bikiniensis*, *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces drozdowiczii* และ *Streptomyces* sp. ที่พบรายงานความสัมพันธ์กับแมลงชนิดอื่น ๆ

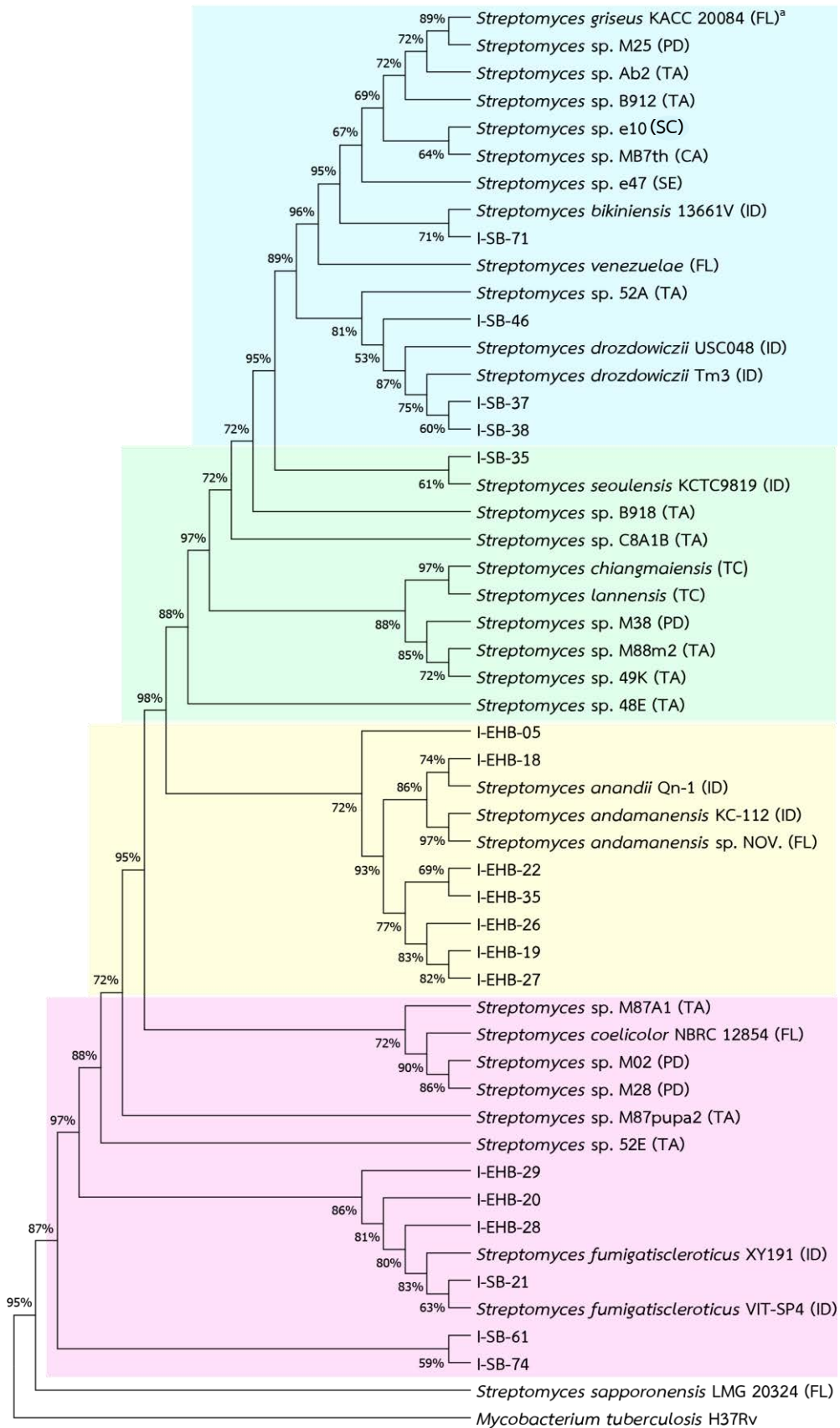
กลุ่มที่ 2 ได้แก่ไอโซเลท I-SB-35 ซึ่งมีความใกล้ชิดกับ *Streptomyces seoulensis* และ *Streptomyces* sp. ที่พบรายงานความสัมพันธ์ร่วมกับแมลงชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะชันโรง

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ไอโซเลท I-EHB-05, I-EHB-18, I-EHB-19, I-EHB-22, I-EHB-26 และ I-EHB-27 มีความใกล้ชิดกับ *Streptomyces andamanensis* และ *Streptomyces anandii* โดยกลุ่มนี้ไม่พบความใกล้ชิดกับ *Streptomyces* ที่พบในแมลงชนิดอื่นจึงคาดว่าน่าจะมีเฉพาะต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน ซึ่งในที่นี้คือผึ้งโพรง *Apis cerana*

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ไอโซเลท I-SB-21, I-SB-61, I-SB-74, I-EHB-20, I-EHB-28 และ I-EHB-29 มีความใกล้ชิดกับ *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces fumigatiscleroticus* และ *Streptomyces* sp. ที่พบรายงานความสัมพันธ์ร่วมกับแมลงชนิดอื่น ๆ

จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าสามารถแบ่ง actinomycetes ที่เพาะเลี้ยงได้ออกเป็น 4 กลุ่ม โดยไอโซเลทที่แยกได้จากชันโรง *T. angustula* และผึ้งโพรง *A. cerana* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันที่ไม่มีความแตกต่างกัน

ทั้งนี้ *Streptomyces* ที่แยกมาจากชันโรง *T. angustula* และผึ้งโพรง *A. cerana* ยังมีความน่าสนใจที่จะนำไปค้นหาสารออกฤทธิ์ที่ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ รวมถึงไวรัส และเซลล์มะเร็ง เพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาสำหรับใช้ในด้านสาธารณสุขได้



รูปที่ 3.16 รูปแสดง Neighbor-Joining phylogenetic tree ที่ได้จากการเทียบยีน 16S rRNA

Phylogenetic tree แสดงถึงความใกล้ชิดกันของ actinomycetes แต่ละสายพันธุ์

๑:สายพันธุ์ของแมลงที่สามารถตัดแยก actinobacteria ได้ (ตารางที่ 3.7)

ตารางที่ 3.7 ตารางแสดงตัวอย่างของแมลงที่สามารถคัดแยก actinobacteria ที่ใช้อ้างอิงการทำ phylogenetic tree

Abbreviation	Host-species	Common name
ID	Identity from Blastn	-
FL	Free living	-
TA	<i>Tetragonisca angustula</i>	ชันโรง
TC	<i>Tetragonilla collina</i>	ชันโรง
SC	<i>Sceliphron caementarium</i>	แตน Dauber mud
CA	<i>Chalybion californicum</i>	ตัวต่อ Blue mud
PD	<i>Polistes dominulus</i>	แตนยุโรป

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษา actinomycetes ที่แยกจากชั้นโรง *T. angustula* และ ผึ้งโพรง *A. cerana* โดย น.ส.อรพันธุ์ ตั้งวิชัย พบว่าสามารถนำมาเพาะเลี้ยงใหม่บนอาหาร ISP-2 ได้ทั้งหมด 41 ไอโซเลทจาก 68 ไอโซเลท โดย 27 ไอโซเลทที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงใหม่ได้เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นหรือไม่เจริญ เมื่อนำ 41 ไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงได้บนอาหาร ISP-2 พบว่าสามารถจัดจำแนกได้ 17 กลุ่มตามลักษณะทาง สัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน จากนั้นจึงนำ 41 ไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงได้มาเลี้ยงบนอาหาร MR-5 โดยสามารถ เพาะเลี้ยงได้ 39 ไอโซเลทโดยมี 1 ไอโซเลทปนเปื้อนแบคทีเรีย และอีก 1 ไอโซเลทไม่เจริญ จากการสังเกต ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร ISP-2 และ MR5 สามารถจำแนก actinomycetes ได้ 34 กลุ่ม โดย actinomycetes ส่วนใหญ่มีลักษณะแตกต่างจากที่สังเกตได้บนอาหาร ISP-2 จากนั้นนำชิ้นวัฒนธรรม MR5 ที่มี actinomycetes เจริญมาทำการทดสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ ซึ่งได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ผลการทดสอบพบว่า actinomycetes ส่วนใหญ่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดย *B. subtilis* เป็นเชื้อทดสอบที่ถูกยับยั้งมากที่สุด และ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อทดสอบเพียงสายพันธุ์เดียวที่ไม่ถูกยับยั้งจากสารที่ actinomycetes ผลิตขึ้น เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ actinomycetes ที่เจริญบนอาหาร ISP-2 และ MR5 มาทำการจัดกลุ่มร่วมกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบ สามารถจำแนกได้ 35 กลุ่ม จากนั้นนำ actinomycetes ทั้ง 39 ไอโซเลทที่เจริญบนอาหาร MR-5 มาทำการสกัด gDNA ซึ่งสามารถสกัดได้เพียง 31 ไอโซเลทจาก 39 ไอโซเลท โดย 8 ไอโซเลทที่ไม่สามารถสกัดได้มีสาเหตุมาจากความผิดพลาดในการสกัด นำ gDNA มาทำการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R พบว่ามีเพียง 28 ไอโซเลทที่สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้ ในขณะที่ 3 ไอโซเลทที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้นั้น คาดว่าอาจเกิด จากการใช้ปริมาณ DNA template ในสัดส่วนที่ไม่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา รวมถึงอาจเกิดการปนเปื้อน โปรตีนทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR หรือยีน 16S rRNA มีปริมาณต่ำ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ 27F และ 518F พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ 18 ไอโซเลท โดย 10 ไอโซเลทที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้นั้นเกิดจากปริมาณยีน 16S rRNA ที่เพิ่มจำนวนมีปริมาณ ต่ำเกินไป จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18 ไอโซเลทที่สามารถวิเคราะห์ได้มาทำการระบุสายพันธุ์ที่ ใกล้เคียงโดยใช้โปรแกรม Blastn เทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าสามารถระบุได้ว่าเป็นสกุล *Streptomyces* ทั้งหมด ซึ่งได้แก่ *S. drozdowiczii*, *S. fumigatiscleroticus*, *S. seoulensis*, *S. bikiniensis*, *S. anandii* และ *S. andamanensis* เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบพบว่า actinomycetes ที่วิเคราะห์ลำดับเบสได้ส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน โดยมี 2 ไอโซเลทซึ่งได้แก่ I-EHB-05 และ I-EHB-18 ที่มีความใกล้เคียงกับ *S. anandii* Qn-1 ซึ่งจากงานวิจัยก่อน หนักระบุว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีการผลิตยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ดี จึงคาดว่า 2 ไอโซเลทนี้อาจมีความสามารถในการสารปฏิชีวนะที่คล้ายกับสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นจึงทำการจัด กลุ่มเพื่อระบุสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน พบว่าสามารถระบุสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันกับ actinomycetes ที่คัดแยก ได้จากแมลง 2 ชนิดนี้ทั้งสิ้น 22 ไอโซเลทจากทั้งหมด 41 ไอโซเลท นำ 18 ไอโซเลทที่ทำการระบุสายพันธุ์ได้มา ทำการสร้าง neighbor-joining phylogenetic tree โดยเทียบกับ actinomycetes ที่เคยมีรายงานว่ามี

ความสัมพันธ์แบบพึ่งพากับแมลงชนิดอื่น ๆ ผลที่ได้พบว่า actinomycetes ที่คัดแยกได้จากชันโรงและผึ้งโพรง ส่วนใหญ่มีความใกล้เคียงกันจึงคาดว่า *Streptomyces* เหล่านี้ไม่มีความจำเพาะกับแมลงเจ้าบ้าน ในอนาคตควรมีการทำการทดลองเพิ่มเติมโดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 17 ไอโซเลทที่เหลือเพื่อระบุสายพันธุ์ของ actinomycetes ที่คัดแยกได้จากชันโรง และผึ้งโพรง ผลของการศึกษาในครั้งนี้อาจเป็นการเพิ่มความเข้าใจในบทบาทของ actinomycetes ที่มีความสัมพันธ์ร่วมกันกับแมลงทั้ง 2 ชนิดนี้ และอาจค้นพบ actinomycetes สายพันธุ์ใหม่ซึ่งอาจมีความสามารถการผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคที่ดื้อยากันอยู่ในปัจจุบันได้

## เอกสารอ้างอิง

- Agamennone, V., Roelofs, D., van Straalen, N. M., and Janssens, T. K. S. (2018). Antimicrobial activity in culturable gut microbial communities of springtails. *J Appl Microbiol*, 125(3), 740–752.
- Arango, R. A., Carlson, C. M., Currie, C. R., McDonald, B. R., Book, A. J., Green, F., and Raffa, K. F. (2016). Antimicrobial activity of actinobacteria isolated from the guts of subterranean termites. *Environ Entomol*, 45(6), 1415–1423.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., and Van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiol Mol Bio Rev*, 80(4), 1-43.
- Batra, S. K., and Bajaj, B. S. (1966). Pentaene g8--a new antifungal antibiotic from *Streptomyces anandii*. *Indian J Exp Biol*, 4(1), 50–51.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot*, 58(1), 1–26.
- Bizuye, A., Moges, F., and Andualem, B. (2013). Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in gondar town, north west ethiopia. *Asian Pacific J Trop Dis*, 3(5), 375–381.
- Book, A. J., Lewin, G. R., McDonald, B. R., Takasuka, T. E., Wendt-Pienkowski, E., Doering, D. T., and Currie, C. R. (2016). Evolution of high cellulolytic activity in symbiotic *Streptomyces* through selection of expanded gene content and coordinated gene expression. *PLoS Biol*, 14(6), doi: 10.1371/journal.pbio.1002475.
- Cambroner-Heinrichs, J. C., Matarrita-Carranza, B., Murillo-Cruz, C., Araya-Valverde, E., Chavarría, M., and Pinto-Tomás, A. A. (2019). Phylogenetic analyses of antibiotic-producing *Streptomyces* sp. isolates obtained from the stingless-bee *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini). *Microbiology*, 165(3), 292–301.
- Carr, G., Poulsen, M., Klassen, J. L., Hou, Y., Wyche, T. P., Bugni, T. S., and Clardy, J. (2012). Microtermolides a and b from termite-associated *Streptomyces* sp. and structural revision of vinylamycin. *Org Lett*, 14(11), 2822–2825.
- Cavalier-Smith, T. (1992). Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis. *Trends Ecol Evol*, 7(12), 422–423.
- Chaudhary, H. S., Soni, B., Shrivastava, A. R., and Shrivastava, S. (2013). Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *J Appl Pharm Sci*, 3(8), 83–94.
- Chun, J., Youn, H.-D., Yim, Y. I., Lee, H., Kim, M. Y., Chil Hah, Y., and Kang, S. O. (1997). *Streptomyces seoulensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 47(2), 492-498.

- Drew, S. W., and Demain, A. L. (1977). Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu Rev Microbiol*, 31(1), 343–356.
- Flärdh, K., & Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol*, 7(1), 36–49.
- Hayakawa, M., Ishizawa, K., and Nonomura, H. (1988). Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. *J. Ferment. Technol*, 66(4), 367–373.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., and Mura, S. O. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol*, 21(5), 526–531.
- Inglis, G. D., Sigler, L., and Goette, M. (1993). Aerobic microorganisms associated with alfalfa leafcutter bees (*Megachile rotundata*). *Microb Ecol*, 26(2), 125–143.
- Jim O'Neill. (2016). An audience with jim o'neil. *Nat Rev Drug Discov*, 15(8), 526–526.
- Kaltenpoth, M. (2009). Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects?. *Trends Microbiol*, 17(12), 529–535.
- Katz, L., and Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 43(2–3), 155–176.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., and Hopwood, D. A. Practical *Streptomyces* genetics. John Innes Centre. England, 2000.
- Kumar, V., Bharti, A., Negi, Y. K., Gusain, O., Pandey, P., and Bisht, G. S. (2012). Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. *Braz J Microbiol*, 43(1), 205–214.
- Lee, H. N., Huang, J., Im, J. H., Kim, S. H., Noh, J. H., Cohen, S. N., and Kim, E. S. (2010). Putative tetR family transcriptional regulator sco1712 encodes an antibiotic downregulator in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 76(9), 3039–3043.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C. (2016). Morphological identification of actinobacteria. *InTech*. 59-86. doi: 10.5772/61461
- Lo, C. W., Lai, N. S., Cheah, H.-Y., Wong, N. K. I., and Ho, C. C. (2002). Actinomycetes isolated from soil samples from the crocker range sabah. *ARBEC, July-Sept*(September), 1–7.
- Mahmoud, H. M., and Kalendar, A. A. (2016). Coral-associated actinobacteria: diversity, abundance, and biotechnological potentials. *Front Microbiol*, 7, 204.



- Madden, A. A., Grasseti, A., Soriano, J. N., and Starks, P. T. (2013) Actinomycetes with antimicrobial activity isolated from paper wasp (hymenoptera: vespidae: polistinae) nest. *Environ Entomol*, 42(4), 703-710
- Masand, M., Sivakala, K. K., Menghani, E., Thinesh, T., Anandham, R., Sharma, G., and Jose, P. A. (2018). Biosynthetic potential of bioactive *Streptomyces* isolated from arid region of the thar desert, rajasthan (india). *Front Microbiol*, 9, 687. doi: 10.3389/fmicb.2018.00687
- Matarrita-Carranza, B., Moreira-Soto, R. D., Murillo-Cruz, C., Mora, M., Currie, C. R., and Pinto-Tomas, A. A. (2017). Evidence for widespread associations between neotropical hymenopteran insects and actinobacteria. *Front Microbiol*, 8, 2016. doi: 10.3389/FMICB.2017.02016
- Méndez, C., Braña, A. F., Manzanal, M. B., and Hardisson, C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can J Microbiol*, 31(5), 446–450.
- Nakano, H., Matsuda, Y., Ito, K., Ohkubo, S., Morimoto, M., and Tomita, F. (1981). Gilvocarcins, new antitumor antibiotics. 1. taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot*, 34(3), 266–270.
- Oh, D. C., Scott, J. J., Currie, C. R., and Clardy, J. (2009). Mycangimycin, a polyene peroxide from a mutualist *Streptomyces* sp. *Org Lett*, 11(3), 633–636.
- Orapun Tangwichai. Screening of bioactive compounds produced by *Streptomyces* spp. isolated from eastern honey bee (*Apis cerana*) and stingless bee (*Tetragonula laeviceps*). Master's Thesis, Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 2016.
- Ouchari, L., Boukeskase, A., Bouizgarne, B., and Ouhdouch, Y. (2018). Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from unexplored hot merzouga desert and their taxonomic diversity. *Biol Open*. doi: 10.1242/bio.035410
- Poulsen, M., Oh, D.-C., Clardy, J., and Currie, C. R. (2011). Chemical analyses of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. *PLoS One*, 6(2), doi: 10.1371/journal.pone.0016763
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. The history and scope of microbiology. In: Microbiology (4<sup>th</sup> edith). Xi'am World Publishing Corporation Press. China. pp. 1-10, 1999.
- Procópio, R., Reis Da Silva, I., Kassawara Martins, M., Lúcio De Azevedo, J., and De Araújo, M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J infect dis*, 16(5), 466-471

- Promnuan, Y., Kudo, T., Ohkuma, M., and Chantawannakul, P. (2013). *Streptomyces Chiangmaiensis* sp. nov. and *Streptomyces lannensis* sp. nov., isolated from the south-east asian stingless bee (*Tetragonilla collina*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(5), 1896–1901.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4(4), 406–425.
- Semedo, L. T., Gomes, R. C., Linhares, A. A., Duarte, G. F., Nascimento, R. P., Rosado, A. S., and Coelho, R. R. (2004). *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(4), 1323–1328.
- Shan, W., Zhou, Y., Liu, H., and Yu, X. (2018). Endophytic actinomycetes from tea plants (*Camellia sinensis*): isolation, abundance, antimicrobial, and plant-growth-promoting activities. *Biomed Res Int*, 2018, 1–12.
- Siddique, S., Syed, Q., Adnan, A., and Ashraf Qureshi, F. (2014). Isolation, characterization and selection of avermectin-producing *Streptomyces avermitilis* strains from soil samples. *Jundishapur J Microbiol*, 7(6), 10366. doi: 10.5812/jjm.10366
- Solano, G., Rojas-Jiménez, K., Jaspars, M., and Tamayo-Castillo, G. (2009). Study of the diversity of culturable actinomycetes in the north Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96(1), 71–78.
- Sripreechajak, P., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Shibata, C., and Tamura, T. (2016). *Streptomyces andamanensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66(5), 2030–2034.
- Van Arnem, E. B., Currie, C. R., and Clardy, J. (2018). Defense contracts: molecular protection in insect-microbe symbioses. *Chem Soc Rev*, 47(5), 1638–1651.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตรวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. International Streptomycetes Project 2 (ISP-2) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Yeast extract	4.0	กรัม
Malt extract	10.0	กรัม
Dextrose	4.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม

ละลายในน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. Muller Hinton (MH) agar ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Beef extract	2.0	กรัม
Casein hydrolysate	17.5	กรัม
Strach	1.5	กรัม
Agar	17.0	กรัม

ละลายในน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 3. Muller Hinton (MH) broth ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Beef extract	2.0	กรัม
Casein hydrolysate	17.5	กรัม
Strach	1.5	กรัม

ละลายในน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 4. Modified R5 agar (MR5) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Casaminoacid	0.1	กรัม
Potassium sulfate	0.25	กรัม
Magnesium chloride hexahydrate	10.12	กรัม
TES	5.73	กรัม
Trace element solution	2.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม

ละลายในน้ำและปรับให้ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 จากนั้นเติมน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 5. Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tryptic soy broth แบบผง	30.0	กรัม
-------------------------	------	------

ละลายในน้ำและปรับให้ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.3 จากนั้นเติมน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

## สูตรบัฟเฟอร์และสารเคมี

## 1. 10% SDS ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

SDS	100	กรัม
-----	-----	------

ละลายในน้ำ DI type I 1000 มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสจนละลาย

## 2. 5M NaCl ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

NaCl	292.2	กรัม
------	-------	------

ละลายในน้ำ DI type I 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 3. 1M Tris HCl pH 7.5 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tris	121.1	กรัม
------	-------	------

ละลายในน้ำ DI type I 800 มิลลิลิตรและปรับให้ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.5 ด้วย hydrochloric acid 1N จากนั้นเติมน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 4. 0.5 M Tris HCl pH 8.0 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tris	60.6	กรัม
------	------	------

ละลายในน้ำ DI type I 800 มิลลิลิตรและปรับให้ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8.0 ด้วย hydrochloric acid 1N จากนั้นเติมน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 5. 0.5 M sodium EDTA pH 8.0 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

EDTA salt	186.0	กรัม
-----------	-------	------

ละลายในน้ำ DI type I 800 มิลลิลิตรและปรับให้ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8.0 ด้วย sodium hydroxide 1N จากนั้นเติมน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 6. SET buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

5M NaCl	15	มิลลิลิตร
0.5M EDTA pH 8.0	50	มิลลิลิตร
1M Tris-HCl pH 7.5	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายมาผสมกัน จากนั้นเติมน้ำ DI type I ปริมาตร 915 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 7. TE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

0.5M Tris-HCl pH 8.0	20	มิลลิลิตร
0.5M Sodium EDTA pH 8.0	2	มิลลิลิตร

นำสารละลายผสมกัน นำสารละลายมาผสมกัน จากนั้นเติมน้ำ DI type I ปริมาตร 978 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 8. 50X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tris-acetate	242.28	กรัม
Acetic acid	57.88	กรัม
0.5M Ethylenediaminetetraacetic acid	100	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำและปรับให้ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

#### 9. 1X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

50X TAE buffer	20	มิลลิลิตร
น้ำ DI type II	980	มิลลิลิตร

## ภาคผนวก ค

## ข้อมูลอ้างอิงการทดลอง

ตารางที่ 5.1 ตารางแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการทดลองการต้านจุลินทรีย์ทดสอบ

ไอโซเลข	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
I-SB-01	-	-	-	-	8.0±0.8
I-SB-02	9.0±0.8	-	-	-	-
I-SB-06	11.3±0.4	10.6±0.4	9.0±0.8	-	-
I-SB-07	7.6±0.4	-	-	-	-
I-SB-08	8.6±0.4	-	-	-	-
I-SB-09	11.6±0.4	15.0±0.8	9.6±0.4	-	12.0±0.8
I-SB-10	8.3±0.4	-	-	-	-
I-SB-19	-	-	-	-	-
I-SB-21	8.3±0.4	-	-	-	-
I-SB-25	9.0±0	8.0±0	-	-	-
I-SB-34	11.0±0.8	9.0±1.4	-	-	-
I-SB-35	11.6±0.4	-	-	-	-
I-SB-36	-	-	-	-	18.3±0.4
I-SB-37	9.3±0.4	8.0±0	-	-	-
I-SB-38	-	-	-	-	-
I-SB-46	-	-	-	-	-
I-SB-50	-	-	-	-	-
I-SB-56	-	-	-	-	-
I-SB-61	8.6±0.4	-	-	-	-
I-SB-71	11.0±0	10.3±0.4	14.3±0.4	-	-



ไอโซเลข	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
I-SB-73	8.6±0.4	-	-	-	-
I-SB-74	8.3±0.4	-	-	-	-
I-SB-75	8.6±0.4	-	-	-	-
I-EHB-05	12.0±0.8	15.6±0.4	11.3±0.9	-	10.0±1.6
I-EHB-06	13.0±0	15.0±0.8	11.0±0.8	-	11.6±2.0
I-EHB-07	10.6±0.4	13.3±0.4	10.6±0.4	-	-
I-EHB-18	12.6±0.4	16.0±0	9.6±0.4	-	14.3±0.9
I-EHB-19	11.6±0.4	14.3±0.4	10.3±0.4	-	-
I-EHB-20	8.0±0	-	-	-	-
I-EHB-22	8.0±0.8	14.0±0	10.3±0.9	-	-
I-EHB-26	12.6±0.4	14.3±0.9	15.6±0.4	-	-
I-EHB-27	12.3±0.4	13.3±0.4	13.0±0	-	-
I-EHB-28	8.6±0.9	-	-	-	-
I-EHB-29	8.0±0.8	-	-	-	-
I-EHB-31	9.6±0.4	10.6±0.4	-	-	-
I-EHB-33	12.0±0.0	15.3±0.4	11.6±0.4	-	-
I-EHB-34	8.6±0.4	14.6±0.4	8.6±0.4	-	14.3±1.2
I-EHB-35	11.3±0.4	12.6±0.4	11.6±1.2	-	-
I-EHB-36	7.6±0.4	-	-	-	-

ตารางที่ 5.2 ตารางแสดง actinomycetes ที่นำมาสร้าง phylogenetic tree

Reference strain	accession number	size (bp)	host-associated	isolation site	citation
<i>Streptomyces</i> sp. M87pupa2	KY067284.1	1,110	<i>Tetragonisca angustula</i>	ตัวอ่อน	a
<i>Streptomyces</i> sp. Ab2	KY067236.1	1,111	<i>Tetragonisca angustula</i>	ลำตัว	a
<i>Streptomyces</i> sp. B912	KY067244.1	1,111	<i>Tetragonisca angustula</i>	ผิวของรัง	a
<i>Streptomyces</i> sp. M87A1	KY067275.1	1,110	<i>Tetragonisca angustula</i>	ลำตัว	a
<i>Streptomyces</i> sp. M88m2	KY067289.1	1,110	<i>Tetragonisca angustula</i>	น้ำผึ้ง	a
<i>Streptomyces</i> sp. B918	KY067296.1	1,110	<i>Tetragonisca angustula</i>	ลำตัว	a
<i>Streptomyces</i> sp. C8A1B	KY067298.1	1,110	<i>Tetragonisca angustula</i>	ลำตัว	a
<i>Streptomyces chaingmaiensis</i>	AB562507.1	1,510	<i>Tetragonilla collina</i>	รัง	b
<i>Streptomyces lannaensis</i>	AB562508.1	1,512	<i>Tetragonilla collina</i>	รัง	b
<i>Streptomyces</i> sp. 48E	KY214202.1	1,357	<i>Tetragonisca angustula</i>	ลำตัว	c
<i>Streptomyces</i> sp. 49K	KY214206.1	1,347	<i>Tetragonisca angustula</i>	เกสร	c
<i>Streptomyces</i> sp. 52A	KY214223.1	1,253	<i>Tetragonisca angustula</i>	ลำตัว	c
<i>Streptomyces</i> sp. 52E	KY214226.1	1,362	<i>Tetragonisca angustula</i>	ลำตัว	c
<i>Streptomyces</i> sp. e10	GQ351298.1	999	<i>Sceliphron erythrocephalus</i>	ลำตัว	d
<i>Streptomyces</i> sp. e47	GQ351300.1	1,037	<i>Sceliphron erythrocephalus</i>	ลำตัว	d
<i>Streptomyces</i> sp. MB7th	GQ351311.1	1,072	<i>Chalybion californicum</i>	ลำตัว	d
<i>Streptomyces</i> sp. M02	HQ336265.1	1,392	<i>Polistes dominulus</i>	รัง	e
<i>Streptomyces</i> sp. M25	HQ336280.1	1,388	<i>Polistes dominulus</i>	รัง	e
<i>Streptomyces</i> sp. M28	HQ336282.1	1,388	<i>Polistes dominulus</i>	รัง	e
<i>Streptomyces</i> sp. M38	HQ336288.1	1,329	<i>Polistes dominulus</i>	รัง	e
<i>Streptomyces venezuelae</i>	AB045890.1	1,483	Free living	ดิน	-
<i>Streptomyces sapporoensis</i>	AJ781378.1	1,476	Free living	ดิน	-
<i>Streptomyces coelicolor</i> NRBC 12854	NR_112305.1	1,476	Free living	ดิน	-
<i>Streptomyces griseus</i>	NR_042791.1	1,490	Free living	ดิน	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV	NR_102810.2	1,532	Human pathogen	-	-

<sup>a</sup>: (Matarrita-Carranza et al., 2017), <sup>b</sup>: (Promnuan et al., 2013), <sup>c</sup>: (Cambronero-Heinrichs et al., 2019),

<sup>d</sup>: (Poulsen et al., 2011), <sup>e</sup>: (Madden et al., 2013)

