



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การระบุชนิดของแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากปุ๋ยมูลไส้เดือน  
Identification of actinomycetes isolated from worm cast

ชื่อนิสิต นายชนภัทร เทศนา เลขประจำตัว 583230ถ23

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.



โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์  
เรื่อง  
การระบุชนิดของแอกติโนมัลลิตที่คัดแยกจากปุ๋ยมูลไส้เดือน

โดย  
นายชนภัทร เทศนา  
เลขประจำตัวนิต 5832306523

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ  
อาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ประจำปีการศึกษา 2561  
ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	การระบุชนิดของแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกจากปุ๋ยมูลไส้เดือน
นิสิตในโครงการ	นายชนภัทร เทศนา
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ
ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	

---

### บทคัดย่อ

การดื้อยาต้านจุลินทรีย์เป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์มีกลไกในการดื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถเกิดได้จากหลากหลายสาเหตุ อย่างไรก็ตามในช่วงระยะเวลา 30 ปีหลังจากที่ผ่านมานั้น พบว่าไม่มีการค้นพบยาปฏิชีวนะในกลุ่มใหม่เพิ่มเติม ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกแอกติโนมัยซีท (actinomycetes) ซึ่งเป็นผู้ผลิตที่สำคัญในการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิจากแหล่งใหม่ เช่น มูลสัตว์ เพื่อเพิ่มความเป็นไปได้ในการค้นพบยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ การวิจัยในครั้งนี้สนใจที่จะศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ actinomycetes ที่คัดแยกจากปุ๋ยมูลไส้เดือน ที่เลี้ยงด้วยมูลโคนม จากจังหวัดราชบุรี ประเทศไทย และตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จาก actinomycetes ทั้งหมด 86 ไอโซเลท สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 27 กลุ่ม ตามสีของ substrate mycelium, สีของ aerial mycelium, สารมีสีที่ถูกผลิตขึ้น และสีของสปอร์ จากเชื้อทั้งหมดได้นำ 45 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* ด้วยเทคนิค agar plug จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้นำเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA สามารถระบุชนิดได้เพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้น คือ WC115 สามารถระบุสายพันธุ์ได้ คือ *Streptomyces tendae* ATCC 19812 โดยมี %identity เท่ากับ 100.00% และมีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces tritolerans* AS1 ที่มีรายงานว่าคัดแยกได้จากทางเดินอาหารของไส้เดือน (*Eisenia foetida*) ดังนั้นผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ อาจเป็นการเพิ่มความรู้และความเข้าใจความสัมพันธ์ของ actinomycetes กับปุ๋ยมูลไส้เดือน อีกทั้งอาจนำไปสู่การค้นพบ actinomycetes ชนิดใหม่ หรือการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ซึ่งจะนำไปสู่การค้นพบยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ ที่สามารถนำไปใช้ด้านการแพทย์ และเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

**Project title** Identification of actinomycetes isolated from worm cast

**Investigator** Chanaphat Thetsana

**Advisor** Dr. Chompoonik Kanchanabanca

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

---

### Abstract

Antimicrobial resistance is one of the world's major public health problems. It occurs when microorganisms have mechanisms for the resistance of drugs which can cause by a variety of reasons. However, during the past 30 years, there is no new antibiotic group discovered. Therefore, several academic research isolated actinomycetes, the important producers of many secondary metabolites, from new sources such as animal cast to get more possibilities for the discovery of new drugs. This experiment studied the morphology of actinomycetes isolated from worm cast fed with milk-cows' dung from Ratchaburi province, Thailand and their ability to inhibit the growth of microorganisms. Eighty-six isolates were sorted into 27 groups according to their color of substrate, aerial mycelium, pigment and spore. Among them, 45 isolates were screened for antimicrobial activity against 5 tested microorganisms, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*, using agar plug technique. Based on their potent antimicrobial activity, 12 isolates were further explored their 16S rRNA gene analysis. Only one isolates, WC115 was identified as *Streptomyces tendae* ATCC 19812 (100.00%) and closely related to *Streptomyces tritolerans* AS1 that isolated from earthworm gut (*Eisenia foetida*). This study may increase knowledge and understanding of the relationship between actinomycetes and worm cast that will lead to the discovery of new useful antimicrobial drugs in the future.

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยโครงการเสริมประสบการณ์นี้จะสำเร็จลุล่วงด้วยดีไม่ได้ หากไม่ได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพิงคะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาได้มอบความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ พร้อมกับอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดในการทำวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนได้ปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์และสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดระยะเวลาการศึกษาและการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องวิจัย 2018 และนางสาวปรัชญา รักรัษนาพิทักษ์ สำหรับความช่วยเหลือ ความเมตตา คำแนะนำ และกำลังใจให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณนางสาวณัฐพร ประทีปวิทวณิช ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณทั้งรุ่นพี่ เพื่อน รุ่นน้องทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยาและคณะอื่น ๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีอย่างเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ กำลังใจและให้การสนับสนุนตลอดจนสำเร็จการศึกษา

นายชนภัทร เทศนา  
(Chanaphat Thetsana)

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง	
2.1 เครื่องมือ วัสดุและเคมีภัณฑ์	14
2.2 วิธีดำเนินการทดลอง	17
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
3.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	21
3.2 ผลการตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง	23
3.3 การตรวจสอบผลการสกัด gDNA ด้วยวิธี gel electrophoresis	26
3.4 การเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 16S rRNA	27
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	36
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	45
ภาคผนวก ข สูตรและวิธีการเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลาย	47
ภาคผนวก ค ตาราง	49

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 2.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	16
ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการทำ PCR	19
ตารางที่ 2.3 สภาวะของอุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR ในแต่ละขั้นตอนเพื่อเพิ่มจำนวนยีน	20
ตารางที่ 3.1 การจัดกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ actinomycetes ที่เจริญบนอาหาร ISP-2	21
ตารางที่ 3.2 การจัดกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของ actinomycetes	24
ตารางที่ 3.3 การผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบในอาหารแข็งด้วยวิธี agar plug และ cross streak	25
ตารางที่ 3.4 ข้อมูลการระบุสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกันด้วยโปรแกรม Blastn	29
ตารางที่ 3.5 จุลินทรีย์อ้างอิงในการทำ neighbor joining phylogenetic tree	34



## สารบัญภาพ

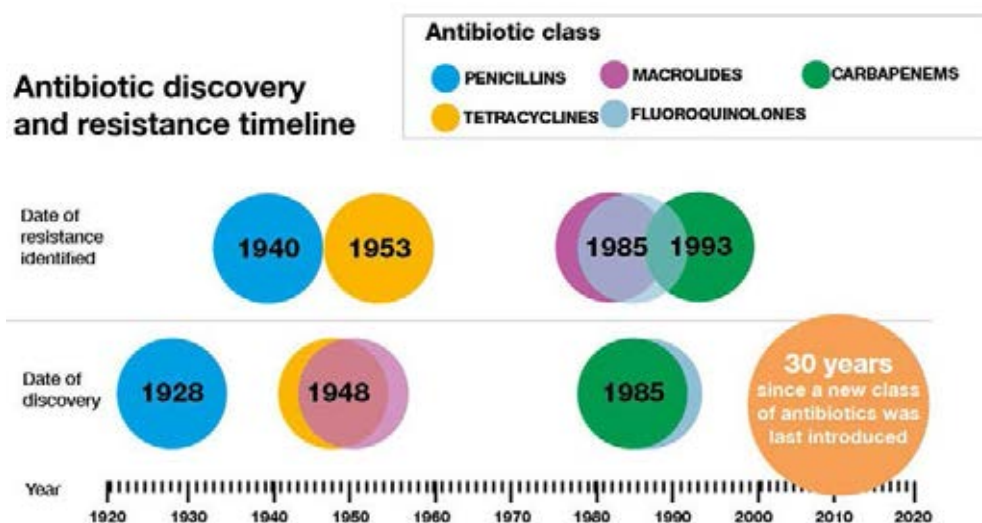
รูปที่	หน้า
รูปที่ 1.1 ปีที่มีการค้นพบกลุ่มของยาปฏิชีวนะ และปีที่มีการค้นพบว่าจุลินทรีย์คือตัวยาปฏิชีวนะกลุ่มนั้น	1
รูปที่ 1.2 เส้นใยของ actinomycetes	3
รูปที่ 1.3 รูปแบบการสร้างสายสปอร์ของ actinomycetes ในสกุลต่างๆ	3
รูปที่ 1.4 วงจรชีวิตของ <i>Streptomyces</i>	4
รูปที่ 1.5 ชื่อของยาต้านจุลินทรีย์และบริเวณที่มีการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ	5
รูปที่ 1.6 โครงสร้างของยาต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก <i>Streptomyces</i>	6
รูปที่ 1.7 ความสัมพันธ์ของ <i>Streptomyces</i> กับสิ่งมีชีวิตอื่นในสิ่งแวดล้อม	7
รูปที่ 1.8 ความสัมพันธ์ของ actinomycetes กับมด	8
รูปที่ 1.9 ความสัมพันธ์ของ actinomycetes และแบคทีเรียอื่นๆ กับพืช	9
รูปที่ 1.10 จำนวนของ actinomycetes ในแต่ละสกุลที่คัดแยกมาจากมูลสัตว์	10
รูปที่ 1.11 กระบวนการระบุชนิดของ actinomycetes	11
รูปที่ 1.12 Molecular identification โดยใช้ 16s rRNA sequencing	12
รูปที่ 3.1 ตัวอย่างลักษณะของ actinomycetes ที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด ISP-2	22
รูปที่ 3.2 บริเวณยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งด้วยวิธี agar plug	23
รูปที่ 3.3 ผลการสกัด gDNA ด้วยวิธี gel electrophoresis ชุดที่ 1	26
รูปที่ 3.4 ผลการสกัด gDNA ด้วยวิธี gel electrophoresis ชุดที่ 2	27
รูปที่ 3.5 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ชุดที่ 1	27
รูปที่ 3.6 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ชุดที่ 2	28
รูปที่ 3.7 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ชุดที่ 3	28
รูปที่ 3.8 ผลการทำ Blastn บริเวณ 16S rRNA ของ WC45	30
รูปที่ 3.9 ผลการทำ Blastn บริเวณ 16S rRNA ของ WC102	31
รูปที่ 3.10 ผลการทำ Blastn บริเวณ 16S rRNA ของ WC115	32
รูปที่ 3.11 ต้นไม้วิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA	33

## บทที่ 1

### บทนำ

#### การดื้อยาต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial resistance)

การดื้อยาต้านจุลินทรีย์เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ไวรัส และปรสิต มีกลไกในการดื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์ เมื่อมีการให้ยาต้านจุลินทรีย์ เช่น ยาปฏิชีวนะ ยาต้านเชื้อรา และยาต้านไวรัส ซึ่งการดื้อยาด้านจุลินทรีย์มีสาเหตุมาจาก การใช้ยาต้านจุลินทรีย์ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม การไม่ใช้ยาต้านจุลินทรีย์ตามคำสั่งของแพทย์ การใช้ยาต้านจุลินทรีย์ในปศุสัตว์ต่างๆ ในปริมาณที่มากเกินไป การควบคุมการติดเชื้อที่ไม่มีประสิทธิภาพของสถานพยาบาล ความสะอาดและสุขอนามัยที่ไม่ดี หรือแม้กระทั่งการขาดการพัฒนา และการวิจัยยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ ซึ่งการดื้อยาต้านจุลินทรีย์ส่งผลกระทบต่อคนในทุกเพศทุกวัย ยิ่งไปกว่านั้นยังส่งผลกระทบต่อให้มีอัตราการติดเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งทำให้การรักษาเป็นไปได้ยาก และใช้เวลานานขึ้น รวมทั้งทำให้มีอัตราการเสียชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้น (World Health Organization, 2018) อีกทั้งปัจจุบันมีการค้นพบยาปฏิชีวนะในกลุ่มใหม่น้อยลงอย่างมาก ซึ่งในช่วงระยะเวลา 30 ปีหลังจากที่ผ่านมานั้นไม่มีการค้นพบยาปฏิชีวนะในกลุ่มใหม่เพิ่มเติม (รูปที่ 1.1) จึงมีการคาดการณ์ว่าในปีคริสต์ทศวรรษ 2050 จะมีผู้เสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะมากถึงกว่า 10 ล้านคนทั่วโลก (Public Health England, 2015) ดังนั้นการค้นพบสารจากธรรมชาติ ที่สามารถนำมาใช้เป็นยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ อาจเป็นอีกหนึ่งทางเลือกหนึ่งที่สำคัญในการแก้ไขการดื้อยาต้านจุลินทรีย์ และผลกระทบต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากการดื้อยาต้านจุลินทรีย์



รูปที่ 1.1 ปีที่มีการค้นพบกลุ่มของยาปฏิชีวนะ และปีที่มีการค้นพบว่าจุลินทรีย์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มนั้น (Public Health England, 2015)

## ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural product) จากจุลินทรีย์

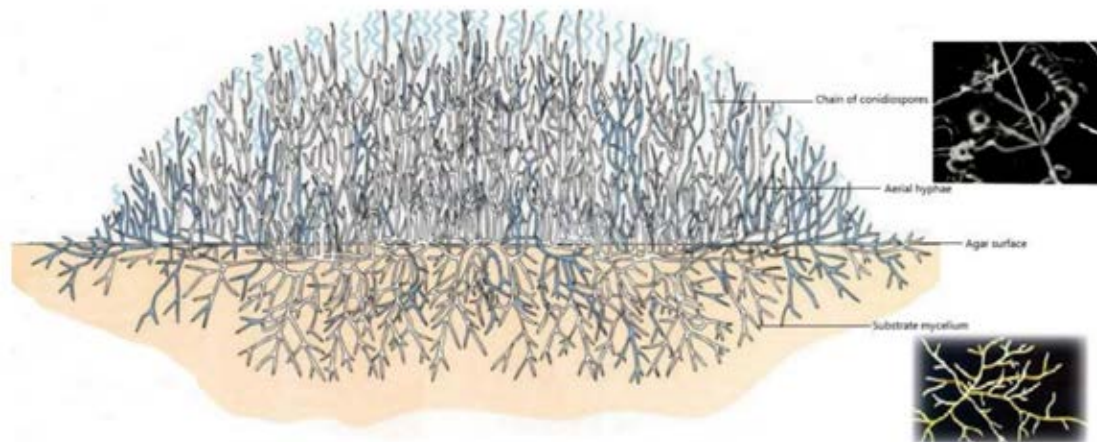
ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากจุลินทรีย์ อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการแก้ไขการดื้อยาต้านจุลินทรีย์ และผลกระทบต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากการดื้อยาต้านจุลินทรีย์ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งจุลินทรีย์ คือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรีย และรา สามารถพบได้จากในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย เป็นแหล่งที่มาของสารจากธรรมชาติที่สำคัญ และได้ถูกนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ทั้งด้านการแพทย์ ปศุสัตว์ และการเกษตร (Katz L. et al., 2016) โดยสารจากธรรมชาติ หรือสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นสารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมาในช่วงระยะหนึ่งของการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก และไม่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Joyce et al., 2011; Ruiz et al., 2010) การผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิในธรรมชาติบางชนิดมีจุดประสงค์เพื่อความอยู่รอดของจุลินทรีย์ เช่น การยับยั้งหรือกำจัดสิ่งมีชีวิตอื่นในสภาพที่ไม่เหมาะสม หรือมีสารอาหารไม่เพียงพอ เป็นต้น (Ades et al., 1999; Ruiz et al., 2010)

สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมินั้นสามารถผลิตได้จากทั้งพืช และจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนมากได้มีการพัฒนา และนำมาเป็นยารักษาโรค โดยสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิส่วนมากได้มาจากกลุ่มจุลินทรีย์จำพวกแอคติโนมัยซีท (actinomycetes) เป็นหลัก ซึ่งส่วนมากมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค จุลินทรีย์กลุ่ม actinomycetes เป็นแหล่งที่มาสำคัญของสารชนิดต่างๆ ในธรรมชาติ จึงอาจนำไปสู่การค้นพบยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ แต่ในความจริงนั้นพบว่ามีจุลินทรีย์เพียง 1% เท่านั้นที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงโดยวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นยังคงมีจุลินทรีย์อีกถึงกว่า 99% ที่ยังไม่ถูกค้นพบ (Davies, 1999) การค้นพบแหล่งที่มาใหม่ของ actinomycetes อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญ ที่จะเพิ่มโอกาสในการค้นหาสารจากธรรมชาติ ที่สามารถนำมาใช้เป็นยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ได้ในอนาคต

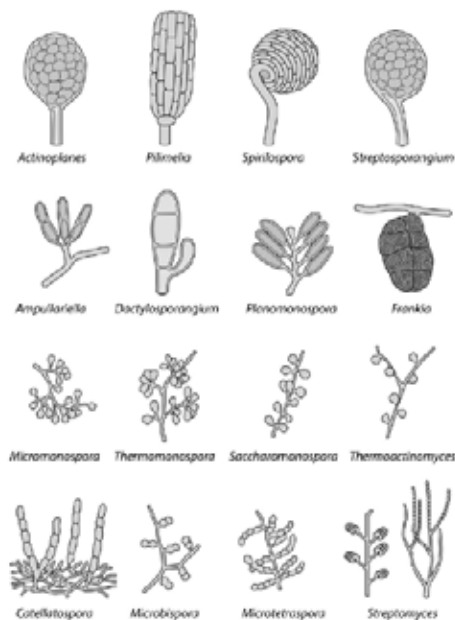
## แอคติโนมัยซีท

แบคทีเรียในกลุ่ม actinomycetes เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณของกวานีน และไซโทซีน (%G+C content) ในจีโนม (genome) สูง และสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน น้ำจืด และน้ำทะเล (Barka et al., 2016) โดยความหนาแน่นของประชากรแบคทีเรียในกลุ่มของ actinomycetes ขึ้นอยู่กับแหล่งที่อยู่อาศัยและสภาวะแวดล้อม โดยพบว่าในดิน 1 กรัมมี actinomycetes ประมาณ  $10^6$ - $10^9$  เซลล์ และส่วนมากอยู่ในสกุลของ *Streptomyces* ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 95 ของ actinomycetes ที่คัดแยกจากดิน (Goodfellow et al., 1983) อีกทั้ง actinomycetes มีลักษณะการดำรงชีวิตหลากหลายรูปแบบ มีทั้งจำพวกที่สามารถก่อโรคได้ในสัตว์ หรือพืช เช่น สกุล *Corynebacterium*, *Mycobacterium* และ *Nocardia* เป็นต้น หรืออาศัยอยู่ร่วมกับพืช เช่น สกุล *Frankia* หรืออาศัยอยู่ทั่วไปในดินหรือแหล่งน้ำ เช่น สกุล *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*

และ *Salinispora* (Barka et al., 2016) ซึ่ง actinomycetes เหล่านี้เป็นแหล่งที่มาสำคัญของการค้นพบสารจากธรรมชาติ หรือสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิจำนวนมาก (Chandra et al., 2014) โดยร้อยละ 80 ของยาต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตได้จาก actinomycetes ผลิตมาจาก actinomycetes ในสกุล *Streptomyces* (Ilic et al., 2007) และอีกหนึ่งลักษณะสำคัญที่ทำให้ actinomycetes มีความแตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ คือ actinomycetes มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความหลากหลาย ทั้งลักษณะของเส้นใย (mycelium) (รูปที่ 1.2) และสปอร์ (รูปที่ 1.3) (Barka et al., 2016)



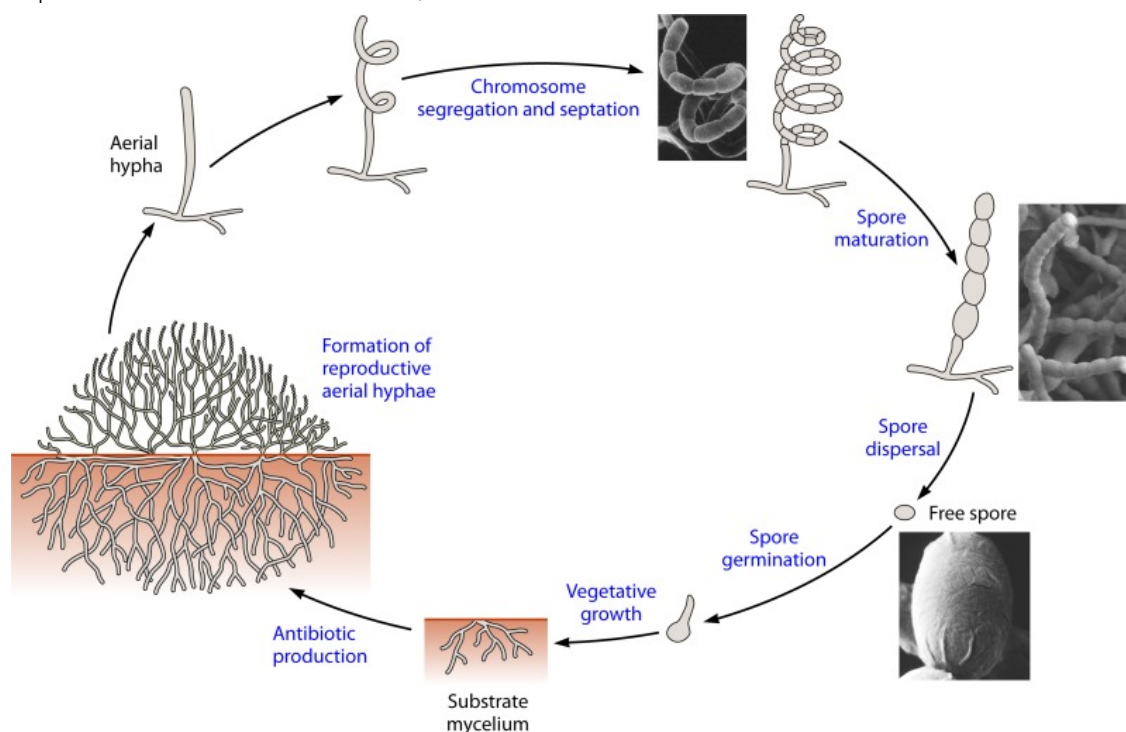
รูปที่ 1.2 เส้นใยของ actinomycetes (An et al., 2006)



รูปที่ 1.3 รูปแบบการสร้างสายสปอร์ของ actinomycetes ในสกุลต่างๆ (Barka et al., 2016)

## *Streptomyces*

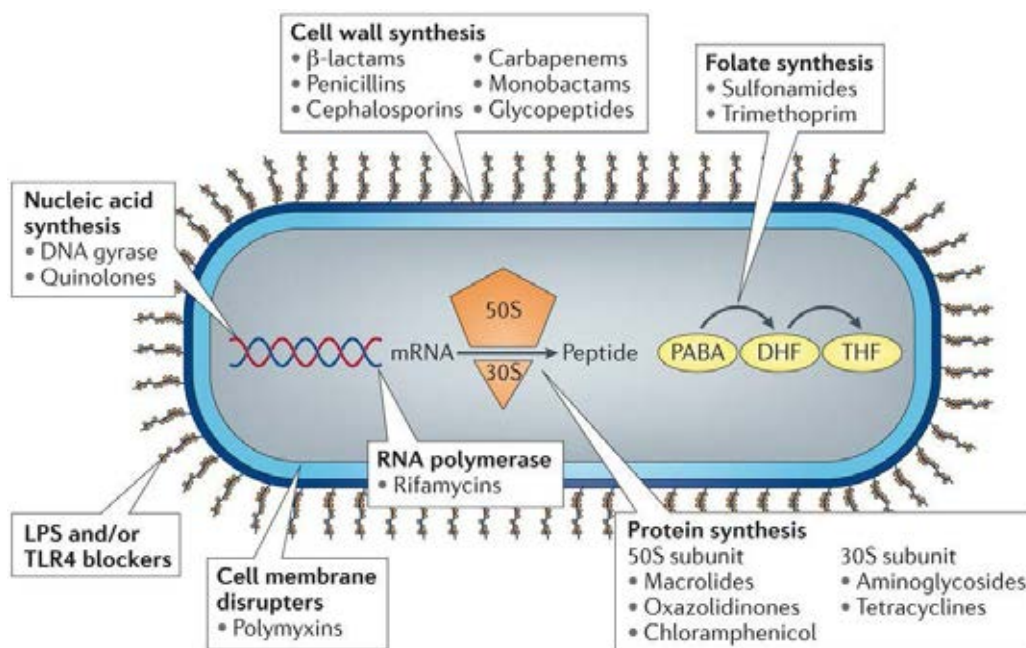
แบคทีเรียในจีนัส *Streptomyces* มีวงจรชีวิตคล้ายกับกลุ่มของราเส้นใย (รูปที่ 1.4) โดยจากสปอร์อิสระจะเจริญกลายเป็น substrate mycelium โดยมีการเจริญที่ส่วนปลายของเส้นใย (Flårdh, 2003) และเมื่ออยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสม เช่น สถานะที่สารอาหารลดลงจะส่งผลให้ substrate mycelium จึงมีการเปลี่ยนแปลงเส้นใยที่เจริญบนผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ และชูเส้นใยขึ้นไปในอากาศเรียกว่า aerial mycelium ซึ่งจะพัฒนาเป็นก้านชูสปอร์ และเกิดการสร้างผนังกัน ทำให้แต่ละเซลล์พัฒนาไปเป็นสปอร์ ซึ่งมักเป็นสายยาว และเป็นช่วงหนึ่งในวงจรชีวิตที่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นยาต้านจุลินทรีย์ (Bibb, 2005) เนื่องจากสถานะขาดสารอาหารส่งผลกระทบบังคับให้ส่วนของ substrate mycelium เกิดการย่อยสลายด้วยกระบวนการ programmed cell death (PCD) ทำให้มีการสะสมของกรดอะมิโน น้ำตาล นิวคลีโอไทด์ และไขมันเกิดขึ้นรอบบริเวณที่เกิดการย่อยสลายของ substrate mycelium (Miguélez et al., 1999) ซึ่งเป็นสารอาหารของจุลินทรีย์อื่นๆ จึงทำให้ต้องมีการผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นยาต้านจุลินทรีย์เพื่อป้องกันสารอาหารนั้นๆ



รูปที่ 1.4 วงจรชีวิตของ *Streptomyces* (Barka et al., 2016)

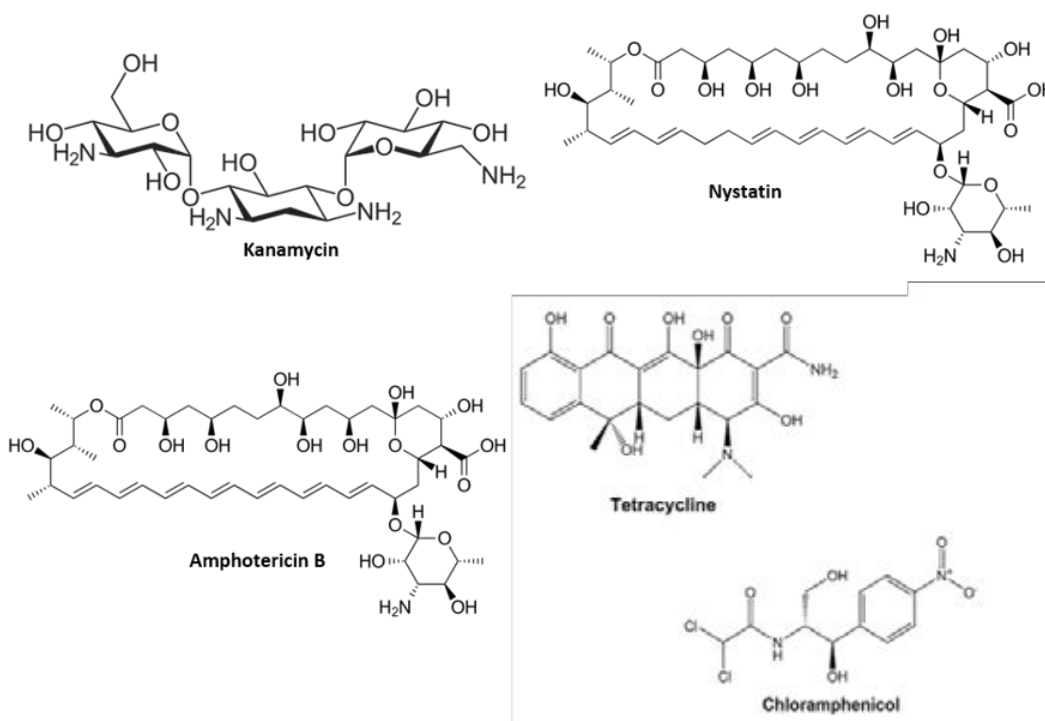
## ยาต้านจุลินทรีย์จาก actinomycetes

แบคทีเรียในกลุ่ม actinomycetes มีช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตที่มีการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นยาต้านจุลินทรีย์ (Bibb, 2005) ในช่วง 5 ทศวรรษที่ผ่านมา มีการค้นพบว่ายาต้านจุลินทรีย์มากถึง 12,000 ชนิด และพบอีกว่าร้อยละ 70 ถูกผลิตมาจาก actinomycetes โดยยาต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือกำจัดจุลินทรีย์มีกระบวนการทำงานที่หลากหลาย (รูปที่ 1.5) เช่น การยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ การยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน การยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โฟเลต การยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์กรดคลอิก ยับยั้งการประกอบโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ การยับยั้งการประกอบโครงสร้างของลิพอโพลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) และการยับยั้งการประกอบโครงสร้างของ toll-like receptor 4 (TLR4) ซึ่งมีหลายชนิดที่ผลิตได้จาก actinomycetes ในสกุลของ *Streptomyces* (รูปที่ 1.6) เช่น tetracycline ที่ผลิตโดย *Streptomyces rimosus* มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการแปลรหัส (translation) ที่บริเวณ 50s ribosomal subunits หรือ chloramphenicol ที่ผลิตโดย *Streptomyces venezuelae* มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยป้องกันไม่ให้ aminoacyl-tRNA มาจับที่บริเวณ A ของ 50s ribosomal subunits หรือ amphotericin B ที่ผลิตโดย *Streptomyces nodosus* และ nystatin ที่ผลิตโดย *Streptomyces noursei* ซึ่งจับกับ ergosterol ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของรา หรือ kanamycin ที่ผลิตโดย *Streptomyces kanamyceticus* ซึ่งป้องกันไม่ให้ tRNA มาจับที่บริเวณ A ของ 30s ribosomal subunits (Katz L. et al., 2016)



รูปที่ 1.5 ชื่อของยาต้านจุลินทรีย์และบริเวณที่มีการออกฤทธิ์ยาต้านจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ (Brown, 2015)





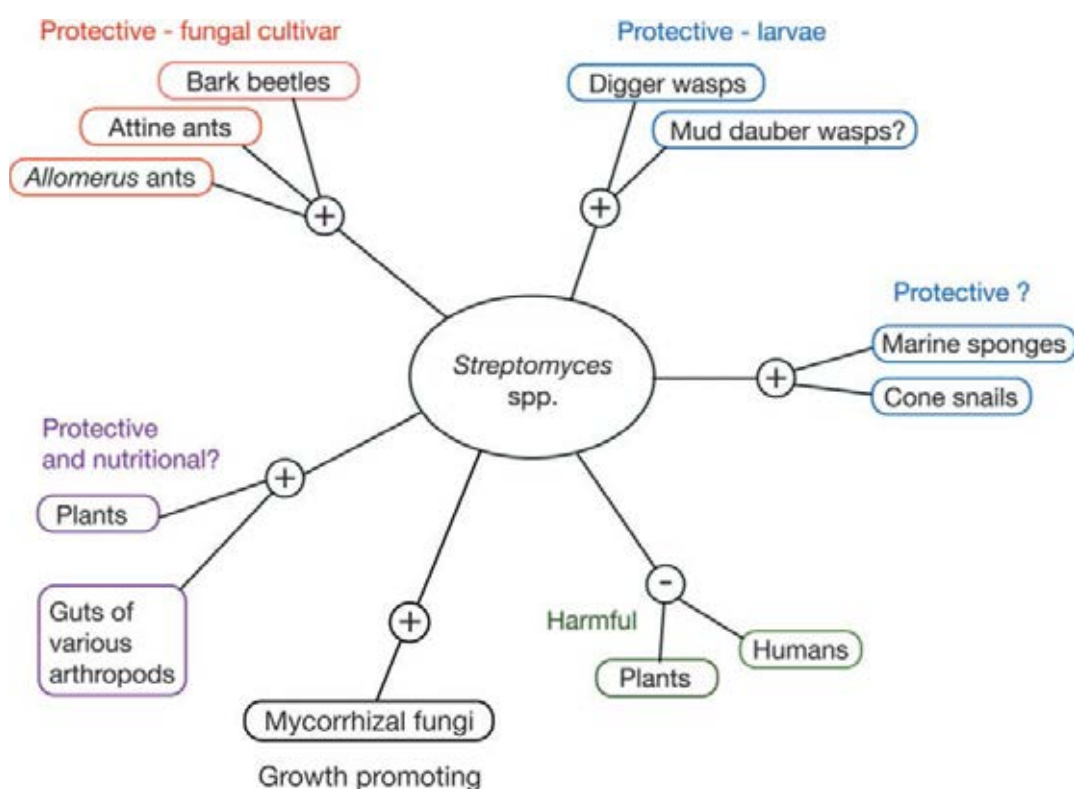
รูปที่ 1.6 โครงสร้างของยาต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* (Katz L. et al., 2016)

### Actinomycetes กับการค้นพบสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิชนิดใหม่

การค้นหายาสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิชนิดใหม่จาก actinomycetes เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำไปสู่การค้นพบยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ในอนาคตได้ ซึ่งโดยทั่วไปในน้ำทะเล และดิน เป็นบริเวณที่สามารถพบ actinomycetes ได้จำนวนมาก อีกทั้งการค้นพบสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ที่มีฤทธิ์เป็นยาต้านจุลินทรีย์จาก actinomycetes ที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเล และดินได้มีการค้นหามาเป็นระยะเวลาอันยาวนาน (Manivasagan et al., 2014) การค้นพบ actinomycetes จากแหล่งดังกล่าวในปัจจุบัน จึงพบแต่เพียงสายพันธุ์เดิมที่ได้มีการค้นพบไปแล้ว และมีจุลินทรีย์เพียง 1% เท่านั้น ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงโดยวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการได้ (Davies, 1999) จึงควรศึกษา และค้นหายาสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิชนิดใหม่ ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และผลิตจาก actinomycetes ในสิ่งแวดล้อมอื่น เพื่อเพิ่มโอกาสในการค้นพบยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่

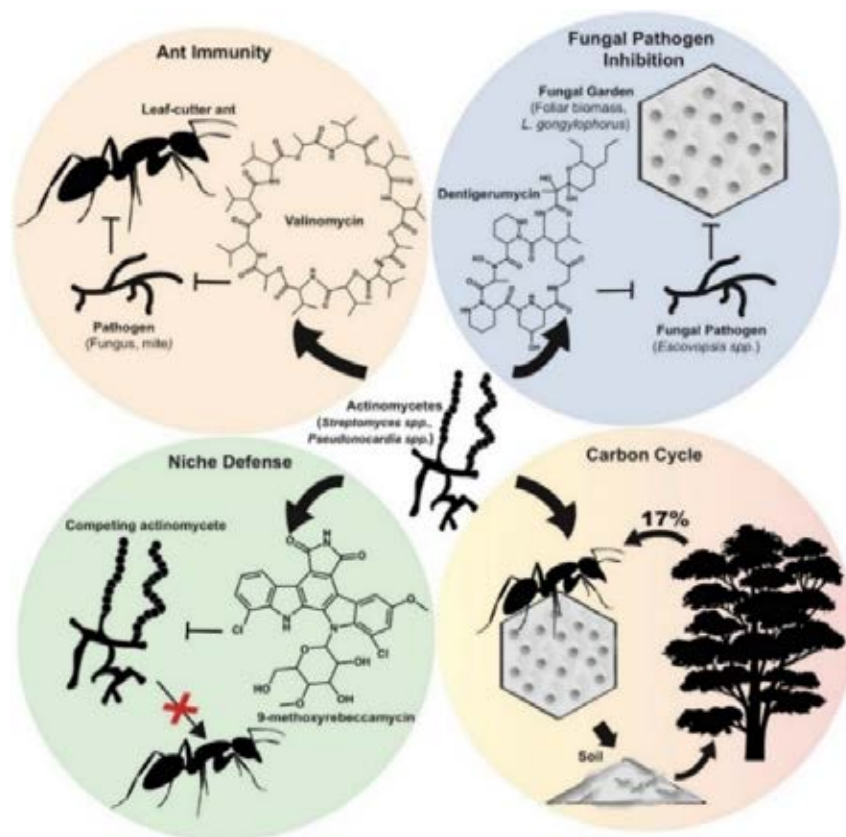
## ความสัมพันธ์ของ actinomycetes กับสิ่งมีชีวิตอื่น

Actinomycetes มีความสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดในสิ่งแวดล้อม (รูปที่ 1.7) รวมถึงแมลง เช่น มดซึ่งอยู่อาศัยร่วมกับแบคทีเรียในกลุ่ม actinomycetes สกุล *Pseudonocardia* (รูปที่ 1.8) ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เพื่อช่วยยับยั้งเชื้อสกุล *Escovopsis* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในราที่อาศัยอยู่กับมดตัดใบ (leaf-cutting ants) (Currie et al., 2003) สามารถผลิตสาร valinomycin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งราที่ก่อโรคในมด (Behie et al., 2017) หรือตัวงเปลือกไม้ ซึ่งพบ actinomycetes ในตัวอ่อน ดักแด้ และทางเดินอาหารของตัวเต็มวัย ทำหน้าที่ที่ย่อยสลายเซลลูโลสเป็นแหล่งของคาร์บอนให้ตัวงเปลือกไม้ (Morales-Jimenez et al., 2013)



รูปที่ 1.7 ความสัมพันธ์ของ *Streptomyces* กับสิ่งมีชีวิตอื่นในสิ่งแวดล้อม (Seipke et al., 2012)

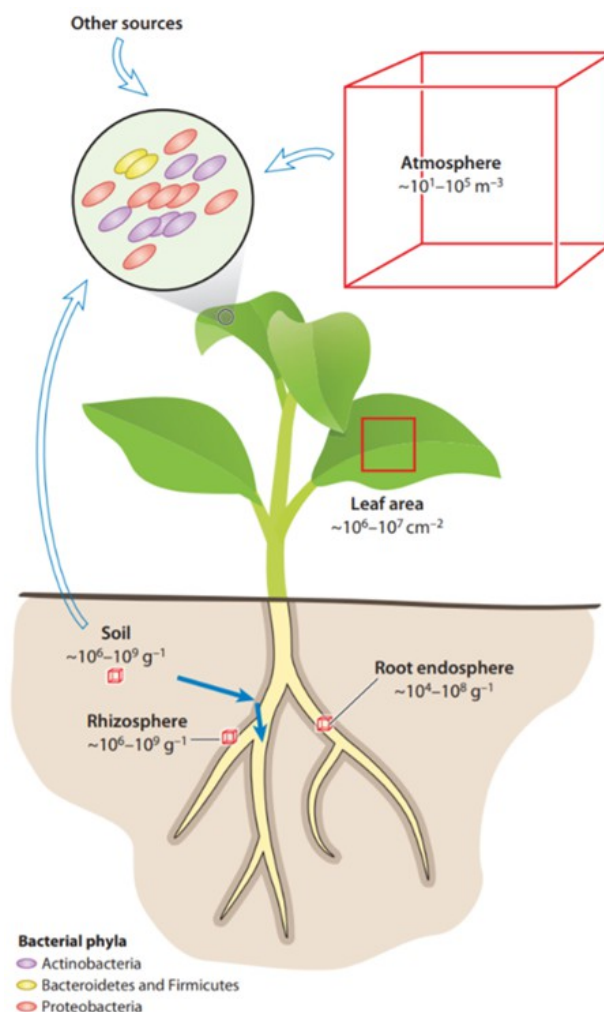




รูปที่ 1.8 ความสัมพันธ์ของ actinomycetes กับมด (Behie et al., 2017)

Actinomycetes มีความสัมพันธ์กับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง โดยพบอยู่บริเวณทางเดินอาหารเป็นส่วนมาก ส่งผลให้เมื่อทำการศึกษา metagenome ของตัวอย่างที่เป็นเยื่อเมือก และอุจจาระ จึงพบ actinomycetes อยู่ด้วย (Eckburg et al., 2005) บางชนิดก่อโรค เช่น สกุล *Nocardia* ที่ก่อโรคทั้งในคน และสัตว์ หรือการก่อโรคในคนของสกุล *Rhodococcus* spp. ที่ส่วนมากจะก่อโรคกับผู้ป่วยที่อยู่ในสถานะที่ภูมิคุ้มกันถูกยับยั้ง หรือภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วย HIV หรือผู้ป่วยโรค systemic lupus erythematosus (SLE) (McNeil et al., 1994)

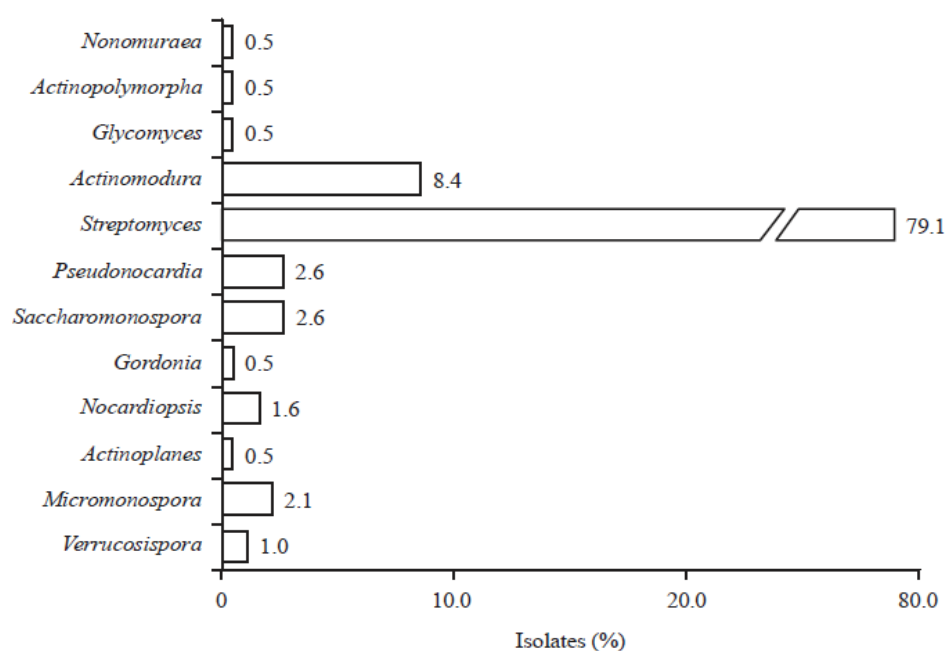
Actinomycetes มีความสัมพันธ์กับพืช พบอยู่ในหลากหลายรูปแบบ ทั้งก่อโรคในพืช หรืออาศัยอยู่ร่วมกันในรูปแบบพึ่งพาอาศัยกัน (รูปที่ 1.9) (Bulgarelli et al., 2013) โดยการอยู่ในรูปแบบพึ่งพาอาศัยกัน actinomycetes อาจมีผลช่วยในการเจริญของพืชทั้งทางตรง และทางอ้อม เช่น การป้องกันอันตรายจากจุลินทรีย์อื่น โดยการผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นยาต้านจุลินทรีย์ และสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิอื่นๆ (Fenton et al., 1992)



รูปที่ 1.9 ความสัมพันธ์ของ actinomycetes และแบคทีเรียอื่นๆ กับพืช (Bulgarelli et al., 2013)

Actinomycetes มีความสัมพันธ์กับมูลสัตว์ เช่น actinomycetes สกุล *Streptomyces* ที่พบในมูลของวัว ซึ่งได้ถูกนำมาทำเป็นปุ๋ยคอก และปุ๋ยหมัก (Mokni-Tlili et al., 2010) หรือการพบ *Streptomyces* sp. ในมูลของแกะ (Lu et al., 2013) หรือการที่ค้นพบ *Actinomyces ruminicola* จากตัวอย่างที่นำมาจากกระเพาะอาหารส่วนรูเมน (rumen) ของวัว (An et al., 2006) หรือการค้นพบ actinomycetes จำนวน 191 ไอโซเลทจากมูลของสัตว์ 4 ชนิด ได้แก่ แพะ ม้า กวาง และเม่น ซึ่งพบว่าอยู่ในสกุลของ *Streptomyces* sp. คิดเป็นร้อยละ 79.1 ของ actinomycetes ที่คัดแยกได้ทั้งหมด (Low A.L.M et al., 2015) (รูปที่ 1.10) และมีการค้นพบ *Streptomyces tritolerans* ซึ่งคัดแยกมาจากทางเดินอาหารของไส้เดือน (*Eisenia foetida*) และได้รับการระบุว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่ (Aruna et al., 2008) นอกจากนี้มีงานวิจัยที่พบ actinomycetes จำนวน 25 ไอโซเลทที่คัดแยกมาจากปุ๋ยมูลไส้เดือนทางการค้า 5 ชนิด ที่มีเครื่องหมายการค้าของประเทศไทย พบว่าทุกไอโซเลทจัดอยู่ในสกุลของ *Streptomyces* (Ruanpanun et al., 2016) ซึ่งปุ๋ยมูลไส้เดือน เกิดจากการนำเอามูลของวัวนมที่ถูก

นำมาย่อยให้มีขนาดเล็กกลง ทำความสะอาด และกำจัดแก๊สมีเทนออก เนื่องจากไส้เดือน ไม่สามารถอยู่ได้ในสภาวะที่มีแก๊สมีเทน โดยเมื่อนำมาเลี้ยงไส้เดือน มูลของวัวนมจะเข้าสู่ทางเดินอาหารของไส้เดือน และออกมาเป็นมูลไส้เดือน ซึ่งมูลไส้เดือนที่ได้นั้นคิดเป็นร้อยละ 60 ของน้ำหนักมูลวัวนมที่ใช้เลี้ยง (Bankhagarden's Earthworm Farming Processes, 2015) โดยปุ๋ยมูลไส้เดือนนั้นมีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ในดินได้เป็นจำนวนมากถึง 5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่มีปุ๋ยมูลไส้เดือนในดิน (Edwards et al., 1977) เพราะไส้เดือนช่วยปรับสมดุลของสารอินทรีย์ในดิน และเพิ่มประสิทธิภาพในการนำสารอาหารในดินไปเป็นพลังงาน เพื่อใช้ในกิจกรรมต่างๆ ของจุลินทรีย์ (Syers et al., 1984) ดังนั้นการสนใจที่จะระบุชนิดของ actinomycetes ทำให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ actinomycetes กับพืช และอาจทำให้ค้นพบ actinomycetes สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิชนิดใหม่

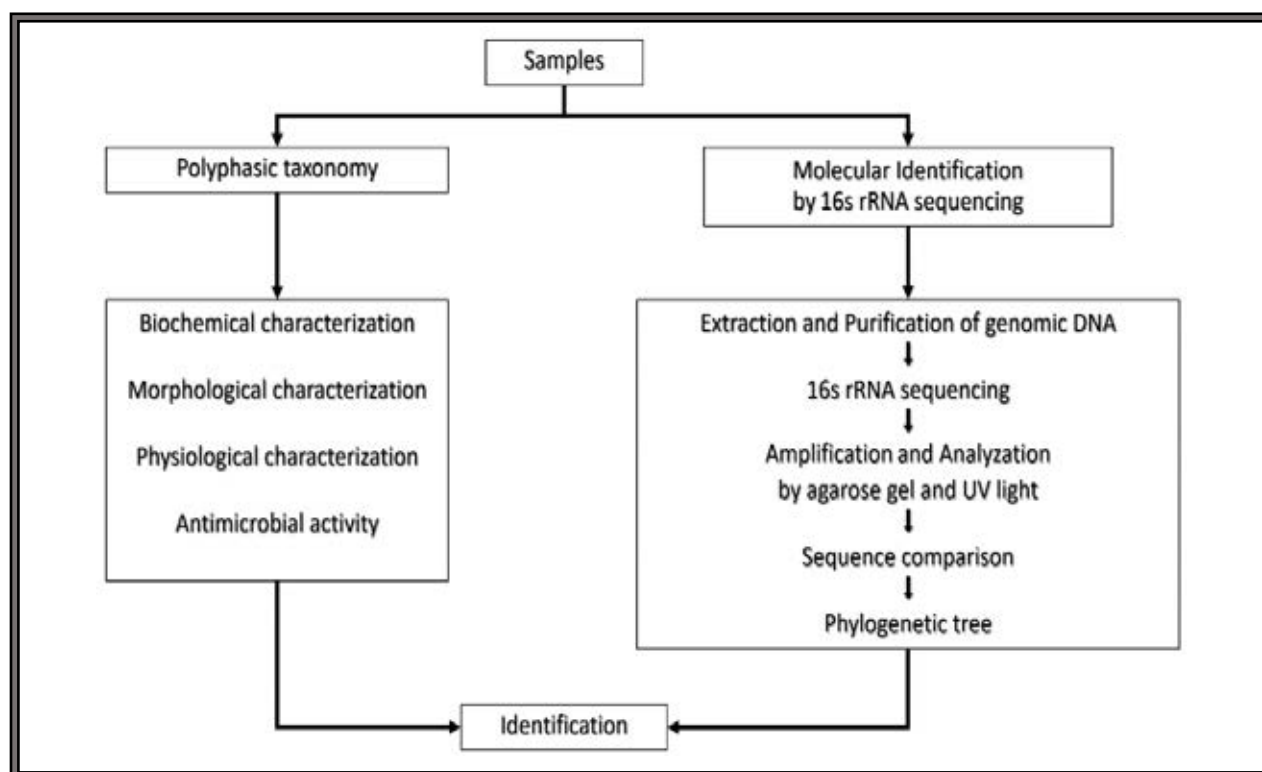


รูปที่ 1.10 จำนวนของ actinomycetes ในแต่ละสกุลที่คัดแยกมาจากมูลสัตว์ (Low A.L.M et al., 2015)

### การระบุชนิดของ actinomycetes

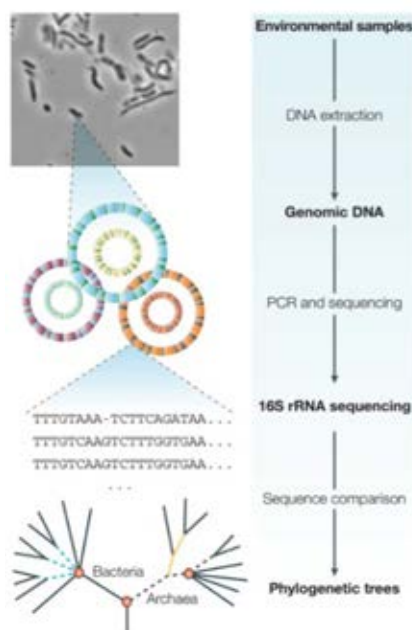
วิธีแยกเพื่อการระบุชนิด (identification) ของ actinomycetes สามารถทำได้โดย เริ่มจากการหาบริเวณที่สนใจที่คาดว่าจะมี actinomycetes อาศัยอยู่ แล้วจึงนำตัวอย่างจากบริเวณดังกล่าว มาคัดแยกเพื่อหาเชื้อบริสุทธิ์ (isolation) แล้วจึงสามารถนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ไประบุชนิด หรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งแบ่งเป็น 2 วิธีหลัก คือ วิธี polyphasic taxonomy และวิธี molecular Identification (รูปที่ 1.11)

วิธี polyphasic taxonomy เป็นหนึ่งในวิธีการระบุชนิด หรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดยศึกษาข้อมูลในหลากหลายด้านของจุลินทรีย์ มีทั้งลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี เริ่มต้นด้วยการนำจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทต่างๆ เช่น tryptone-yeast extract agar (ISP-1), yeast mold differential agar (ISP-2), oatmeal agar (ISP-3), starch inorganic salts agar (ISP-4), glycerol asparagine agar (ISP-5), peptone yeast extract iron agar (ISP-6), tyrosine agar (ISP-7), starch-casein agar และ nutrient agar media เป็นต้น (Shirling et al., 1966) และทดสอบด้วยกระบวนการทางชีวเคมี และสรีรวิทยา เช่น methyl red and Voges-Proskauer test, การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Isik et al., 1999) การย่อยสลายแป้ง และเจลาติน (Waksman, 1961) การทดสอบช่วงของอุณหภูมิ และสภาวะความเป็นกรดหรือด่าง ที่เหมาะสมกับการเจริญ การใช้แหล่งของคาร์บอน และไนโตรเจน (Qinyuan Li et al., 2016) การศึกษา diaminopimelic acid ที่เป็นองค์ประกอบภายในผนังเซลล์ (Hasegawa et al., 1983) และการตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแข็งด้วยวิธี cross streak (Lemos et al., 1985) และวิธี agar-plug (Jose et al., 2013) ซึ่งกระบวนการดังกล่าว จะแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างจุลินทรีย์แต่ละชนิดได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 1.11 กระบวนการระบุชนิดของ actinomycetes

วิธีทาง molecular Identification โดยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA (รูปที่ 1.12) ด้วยกระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ universal primers (Nilsson et al., 2002) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และสร้าง phylogenetic tree (Managamuri et al., 2017) เพื่อแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ที่สนใจกับจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล และเปรียบเทียบค่าทางสถิติต่างๆ เพื่อการระบุชนิดของ actinomycetes ที่สนใจ



รูปที่ 1.12 Molecular identification โดยใช้ 16s rRNA sequencing (Tringe et al., 2005)

### อนาคตของการค้นพบสารจากธรรมชาติ

การค้นพบสารจากธรรมชาติในอนาคตนั้นมีปัจจัยสำคัญ ที่จะเป็นแรงผลักดันให้การค้นพบสารจากธรรมชาติจากจุลินทรีย์ก้าวต่อไปได้ ได้แก่ การเรียนรู้ว่าจุลินทรีย์นั้นมีจีโนมที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นกลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite gene cluster: SMGCs) สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่ได้ (Katz L. et al., 2016) อีกทั้งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ค้นพบตัวอย่างจากดินเพียงส่วนหนึ่งในสิ่งแวดล้อมเท่านั้น (Baltz, 2005, 2007) จึงยังคงมีบริเวณอื่นๆ ในสิ่งแวดล้อมอีกจำนวนมาก ที่ยังไม่ถูกค้นหา SMGCs จึงทำให้มีโอกาสค้นพบ SMGCs ใหม่ ๆ เพิ่มเติมได้อีก (Katz et al., 2016; Milshteyn et al., 2014; Owen et al., 2015; Smanski et al., 2016) และปัจจัยสุดท้าย คือการที่ปัจจุบันมีเทคโนโลยี และกระบวนการที่ทันสมัยในการตรวจสอบ และค้นหา อีกทั้งความรู้ และความเข้าใจในด้านการแพทย์ที่เพิ่มมากขึ้น จึงอาจส่งผลให้การค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ อาจกลับมาสู่ยุคทองได้อีกครั้งในอนาคต (Baltz, 2005, 2007)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจ ที่จะระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน ซึ่งเป็นแหล่งศึกษาใหม่ที่คาดว่าจะพบ actinomycetes ที่ผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ โดยนำ actinomycetes ที่คัดแยกจากปุ๋ยมูลไส้เดือนโดย นางสาวภารวี อุดมศรีพันธุ์ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง และวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์

### **วัตถุประสงค์ของโครงการ**

เพื่อระบุชนิดของ actinomycetes ที่คัดแยกมาจากปุ๋ยมูลไส้เดือน และทดสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง

### **ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

เพื่อนำไปสู่การค้นพบ actinomycetes ชนิดใหม่ หรืออาจนำไปสู่การค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ ที่สามารถนำไปใช้ด้านการแพทย์ และเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

## บทที่ 2

### เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

#### 2.1 เครื่องมือ วัสดุและเคมีภัณฑ์

##### 2.1.1 เครื่องมือ

- 1) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2) เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3) เครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ (gel documentation system) รุ่น FireReader V10 ของบริษัท UVITEC ประเทศอังกฤษ
- 4) เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ รุ่น ss-325 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น
- 5) เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (centrifuge) รุ่น MIKRO 185 ของบริษัท Hettich zentrifugen ประเทศเยอรมัน
- 6) เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนขนาดเล็ก (spin down) รุ่น MYSPIN G ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 7) เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 8) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermocycler) รุ่น T100™ Thermal Cycler ของบริษัท Bio-rad ประเทศออสเตรเลีย
- 9) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 10) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (digital pH meter) รุ่น FE20 FiveEasy™ ของบริษัท Mettler Toledo™ ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 11) เครื่องอุ่นหลอดทดลอง (heating block) รุ่น MD-MINI ของบริษัท Gibthai ประเทศไทย
- 12) ตู้ชีวนิรภัย (biosafety cabinet) รุ่น V6-T ของบริษัท แล็บ ไมโคร ประเทศไทย
- 13) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electric Co. ประเทศญี่ปุ่น
- 14) ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (incubator) รุ่น INE500 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

- 15) ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
- 16) ไมโครปิเปตต์ 10 100 และ 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Eppendorf research plus ประเทศเยอรมัน
- 17) ไมโครเวฟ ของบริษัทโตชิบา ประเทศไทย
- 18) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WNB14 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

### 2.1.2 วัสดุ

- 1) จานเพาะเชื้อพลาสติก (plastic plate) ของบริษัท Greiner bio-one ประเทศไทย
- 2) เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex ประเทศสหรัฐอเมริกา และบริษัท DURAN ประเทศเยอรมัน
- 3) ทิปขนาด 10 100 และ 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท ไชเนอจี ประเทศไทย
- 4) หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร ของบริษัท แลบบคอนเนคชั่น ประเทศไทย
- 5) หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร ของบริษัท F.L. medical s.r.l. ประเทศอิตาลี

### 2.1.2 เคมีภัณฑ์

- 1) 85% glycerol ของบริษัท Emsure ประเทศเยอรมัน
- 2) Yeast extract ของบริษัท Difo Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3) Malt extract ของบริษัท Himedia Laboratories ประเทศอินเดีย
- 4) Agar ของบริษัท พัฒนาสินเอนเตอร์ไพรส์ ประเทศไทย
- 5) Glucose monohydrate ของบริษัท Merck ประเทศไทย
- 6) Casamino acid ของบริษัท BD ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 7) Magnesium chloride hexahydrate ของบริษัท Emsure ประเทศเยอรมัน
- 8) TES ของบริษัท Merck ประเทศไทย
- 9) Beef extract ของบริษัท Himedia Laboratories ประเทศอินเดีย
- 10) Casein enzyme hydrolysate ของบริษัท Himedia Laboratories ประเทศอินเดีย
- 11) Starch ของบริษัท Ajax Finechem Pty Limited ประเทศออสเตรเลีย
- 12) Chloramphenicol ของบริษัท Pacific Science ประเทศไทย
- 13) SERVA DNA Stain G ของบริษัท SERVA Electrophoresis GmbH ประเทศเยอรมัน
- 14) Agarose (molecular biology grades) บริษัท Vivantis Technologies ประเทศมาเลเซีย
- 15) Tris ของบริษัท Bio-Rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา



- 16) Sodium chloride ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 17) SDS ของบริษัท Bio-Rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 18) EDTA disodium salt dihydrate ของบริษัท VWR Life Science ประเทศสหรัฐอเมริกา

### 2.1.3 น้ำ

- 1) น้ำสำหรับเตรียมบัฟเฟอร์คือ น้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 1 (purified water type I)
- 2) น้ำสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อคือ น้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 2 (purified water type II)
- 3) น้ำสำหรับงานทางอณูชีววิทยาคือ PCR Grade Water โดยเป็นน้ำปราศจากนิวคลีเอส และ โปรตีเอส ของบริษัท Biotechrabbit ประเทศเยอรมัน

### 2.1.4 เอนไซม์และรีเอเจนท์ทางอณูวิทยา

- 1) 6X loading dye ของบริษัท Biotechrabbit ประเทศเยอรมัน
- 2) DNA มาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kb DNA Ladder) ของบริษัท Biotechrabbit ประเทศเยอรมัน
- 3) Proteinase K ของบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 4) RNase ของบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 5) Tryptic soy broth (TSB) ของบริษัท BD ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 6) KOD One™ PCR Master Mix ของบริษัท TOYOBO ประเทศญี่ปุ่น

### 2.1.5 โอลิโกนิวคลีโอไทด์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์หรือไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนบริเวณ 16S rRNA (ตารางที่ 2.1) ผลิตจากบริษัท Integrated DNA Technologies (IDT)

#### ตารางที่ 2.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับ (5' ถึง 3')	อุณหภูมิหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	การนำไปใช้งาน
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	53.2	PCR, sequencing
518F	CCAGCAGCCGCGTAATACG	52.0	Sequencing
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	54.6	PCR

## 2.2 วิธีดำเนินการทดลอง

### 2.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำ actinomycetes ที่คัดแยกมาจากปุ๋ยมูลไส้เดือนโดย นางสาวภาววี อุตมศรีพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด ISP-2 ดังแสดงในภาคผนวก ก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และติดตามการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ สีของ substrate mycelium, สีของ aerial mycelium, สารมีสี (pigment) ที่ถูกผลิตขึ้น และสีของสปอร์

### 2.2.2 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์

นำ actinomycetes ที่คัดแยก และเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด ISP-2 ที่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเห็นสปอร์เจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงนำมาทำสารแขวนลอยสปอร์โดยหยดน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนผิวด้านบนสปอร์ นำลูปพลาสติกปราศจากเชื้อถูบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งให้ทั่ว เพื่อให้สปอร์หลุดออกจนหมด ปิเปตสารแขวนลอยสปอร์ทั้งหมดแบ่งเป็นสองส่วน โดยส่วนแรกปิเปตสารแขวนลอยสปอร์ 10 ไมโครลิตร หยดลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) เพื่อนับจำนวนสปอร์ และคำนวณปริมาณของสปอร์ที่มี และส่วนที่สองปิเปตสารแขวนลอยสปอร์มาปริมาณ 900 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) ที่มี 85% glycerol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร มีความเข้มข้นสุดท้าย คือ 20 % glycerol แล้วนำสารแขวนลอยสปอร์ไปเก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 2.2.3 ตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง

นำ actinomycetes บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด MR5 ดังแสดงในภาคผนวก ก มาทดสอบฤทธิ์การต้านต่อจุลินทรีย์ทดสอบชนิดต่างๆ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* ซึ่งนำมาจากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยวิธี agar plug โดยนำสารแขวนลอยสปอร์ของ actinomycetes ที่เก็บอยู่ใน 20% glycerol มาปรับให้มีความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 1,200 ไมโครลิตร และดูดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรลงให้ทั่วบริเวณผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด MR5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด Mueller Hinton (MH) ดังแสดงในภาคผนวก ก โดยบ่มแบบเขย่าข้ามคืนภายใต้ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนำเชื้อทดสอบมาปริมาณ 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ หลอมเหลว MH ที่มีปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำมา pour plate และเจาะรูเพื่อนำ actinomycetes บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด MR5 ที่บ่มมาเป็นเวลา 7 วันมาใส่ลงในแต่ละช่องของเชื้อทดสอบที่ทำการเจาะรูไว้ โดยมียา

ปฏิชีวนะ คือ chloramphenicol 30 ไมโครกรัม เป็นชุดควบคุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกต และวัดขนาดของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

## 2.2.4 กระบวนการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA, gDNA)

นำ actinomycetes ที่คัดแยกมาสกัด gDNA ด้วยวิธี salting out เริ่มต้นจากนำ actinomycetes ที่คัดแยกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด tryptic soy broth (TSB) ดังแสดงในภาคผนวก ก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าข้ามคืนภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ actinomycetes ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB มาปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงเติม SET buffer ดังแสดงในภาคผนวก ข ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม lysozyme ความเข้มข้น 100 mg/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำมาเติม proteinase K ความเข้มข้น 20 mg/ml ปริมาตร 15 ไมโครลิตร และเติม 10% SDS ดังแสดงในภาคผนวก ข ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงนำมาเติม sodium chloride ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ดังแสดงในภาคผนวก ข ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนเหนือตะกอน (supernatant) ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนเหนือตะกอนใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของส่วนเหนือตะกอนที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จึงนำมาเติม 70% ethanol ดังแสดงในภาคผนวก ข ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และดูส่วนของ 70% ethanol ออกจนหมด แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยการทิ้งไว้ข้ามคืน สุดท้ายจึงนำมาเติม TE buffer ดังแสดงในภาคผนวก ข ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Pospiech et al., 1995)

## 2.2.5 การตรวจสอบผลการสกัด gDNA ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

นำ gDNA ที่สกัดมาด้วยวิธี salting out มาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วย 0.8% (w/v) อะกาโรสเจล ทำโดยเตรียมจาก agarose ผสมกับบัฟเฟอร์ 1X Tris Acetate EDTA ดังแสดงในภาคผนวก ข และละลาย agarose จนหมดโดยให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงพอให้หลังมือสัมผัสได้และย้อมสีเจลด้วย SERVA DNA Stain G 0.8 ไมโครลิตรต่อ 20 มิลลิลิตรเจล จากนั้นเทลงในถาดพิมพ์เจล เมื่อเจลแข็งตัวนำไปใส่ลง

ในเครื่องมือทำ gel electrophoresis แล้วเติมบัฟเฟอร์ 1XTAE จนท่วมเจล ต่อมานำ DNA ตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร มาผสมกับสีย้อม 6X DNA gel loading dye บนแผ่นพาราฟิล์ม แล้วนำลงในหลุมของเจลที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และใช้ DNA มาตรฐาน 1 kb DNA Ladder สำหรับชี้วัดขนาดของผลที่ได้ จากนั้นเริ่มการทำ gel electrophoresis โดยตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าให้คงที่ไว้ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำ เจลไปตรวจสอบผลการเรืองแสงของ DNA ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

## 2.2.6 การเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 16S rRNA

นำ gDNA มาเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 16S rRNA ด้วยกระบวนการ PCR โดยใช้ส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 2.2 ปฏิบัติการจะดำเนินในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสถานะอุณหภูมิในขั้นตอนต่างๆของปฏิกริยา ได้แก่ ขั้นตอนปฏิกริยาแยกสาย DNA ต้นแบบ (denaturation) ขั้นตอนการจับของไพรเมอร์จับกับ DNA ต้นแบบ (annealing) ขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ (extension) และขั้นสิ้นสุดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ (final-extension) ตามที่กำหนดดังแสดงในตารางที่ 2.3 ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำไปตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis ด้วย 1% (w/v) อะกาโรสเจล และตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าให้คงที่ไว้ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำเจลไปตรวจสอบผลการเรืองแสงของ DNA ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบของปฏิกริยาการทำ PCR

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปฏิกริยาสารใน 50 ไมโครลิตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำ	-	20	-
KOD One™ PCR Master Mix	2X	25	1X
Forward primer	100 ไมโครโมลาร์	1.5	0.3 ไมโครโมลาร์
Backward primer	100 ไมโครโมลาร์	1.5	0.3 ไมโครโมลาร์
DNA ต้นแบบ	4-100 นาโนกรัมต่อ ไมโครลิตร	2.0	50-200 นาโนกรัมต่อ ไมโครลิตร

ตารางที่ 2.3 สภาวะของอุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR ในแต่ละขั้นตอนเพื่อเพิ่มจำนวนยีน

ขั้นตอนของปฏิกิริยา	สภาวะการทำ PCR		จำนวนรอบ (cycle)
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
Denaturation	98	10 วินาที	45
Annealing	55	5 วินาที	
Extension	68	8 วินาที	
Final extension	72	4 นาที	1
	4	ไม่มีกำหนด	

### 2.2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Bionics ประเทศเกาหลี การตรวจสอบคุณภาพของลำดับ DNA โดยใช้โปรแกรม SnapGene (<https://www.snapgene.com/>) การเปรียบเทียบลำดับของ DNA ศึกษาโดยใช้ blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) โดยโปรแกรม MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>)

### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

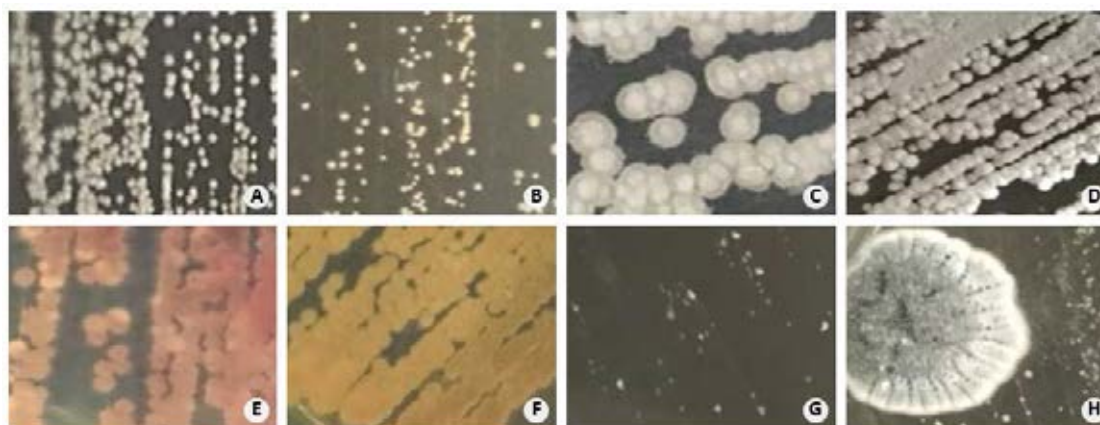
##### 3.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ actinomycetes ที่คัดแยกมาจากปุ๋ยมูลไส้เดือน โดยนางสาวภาวิ อุดมศรีพันธุ์ จำนวนทั้งหมด 96 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด ISP-2 ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำไปใช้สำหรับการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Streptomyces* (Siddique et al., 2014) และทำบ่มภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบการเจริญ actinomycetes ทั้งหมด 86 ไอโซเลท เนื่องจากมีการปนเปื้อนของรา หรือแบคทีเรียชนิดอื่น และไม่มีการเจริญจำนวน 10 ไอโซเลท เมื่ออาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ สีของ substrate mycelium, สีของ aerial mycelium, สารมีสีที่ถูกผลิตขึ้น และสีของสปอร์ จัดกลุ่มได้เป็น 27 กลุ่ม แสดงดังตารางที่ 3.1 ซึ่งพบว่าการสร้าง substrate mycelium ในอาหารเลี้ยงเชื้อและ aerial mycelium บนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์ และผิวโคโลนีคล้ายก้ำมะหยี่ มีสีของโคโลนีและสปอร์ที่แตกต่างกัน โดยบางไอโซเลทสามารถผลิตสารมีสี (pigment) และสารมีสีที่ละลายน้ำได้ (soluble pigment) (รูปที่3.1)

ตารางที่ 3.1 การจัดกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ actinomycetes ที่เจริญบนอาหาร ISP-2

กลุ่มที่	ลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด ISP-2			Pigment	Soluble pigment	ไอโซเลท (WC)
	Substrate mycelium	Aerial mycelium	สีของสปอร์			
1	สีเหลืองอ่อน	สีน้ำตาล	สีเทา	-	-	2
2	สีเหลืองอ่อน	สีน้ำตาล	สีขาว	-	-	15
3	สีเหลืองอ่อน	สีแดง	สีขาว	-	-	6, 58
4	สีเหลืองอ่อน	สีแดง	สีแดง	-	-	16, 86, 110
5	สีเหลืองอ่อน	สีแดง	สีแดง	สีแดง	-	34
6	สีเหลืองอ่อน	สีแดง	สีเทา	-	-	81
7	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีขาว	-	-	38, 50-51, 72, 80, 83, 85
8	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีขาว	สีแดง	-	71
9	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีเทา	-	-	10, 26, 40
10	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีเทา	สีแดง	-	88, 116
11	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีเทา	สีเหลือง	สีเหลือง	45
12	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีขาว	-	-	11, 33, 39, 41

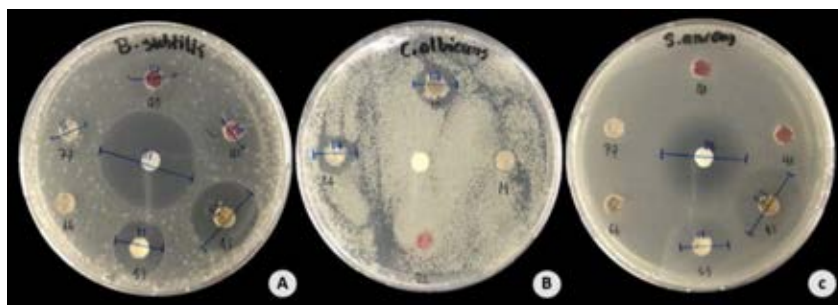
กลุ่มที่	ลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด ISP-2			Pigment	Soluble pigment	ไอโซเลท (WC)
	Substrate mycelium	Aerial mycelium	สีของสปอร์			
13	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีเทา	-	-	19-21, 30, 32, 42, 46-48, 61, 64, 66, 74-77, 93, 95, 115, 117
14	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีเทา	สีแดง	-	22
15	สีขาว	สีขาว	สีขาว	-	-	29, 53, 82, 84, 89, 107
16	สีขาว	สีขาว	สีขาว	สีแดง	-	114
17	สีขาว	สีขาว	สีเทา	-	-	24, 27, 69, 101-102
18	สีขาว	สีขาว	สีเทา	สีแดง	-	119
19	สีขาว	สีขาว	สีเทา	สีน้ำตาล	-	44
20	สีขาว	สีเทา	สีขาว	-	-	55,118
21	สีขาว	สีเทา	สีเทา	-	-	37, 52, 54, 57, 97, 104-105, 121-122
22	สีขาว	สีเทา	สีเทา	สีเทาดำ	-	109
23	สีขาว	สีแดง	สีเทา	สีแดง	-	36
24	สีขาว	สีชมพู	สีขาว	-	-	92
25	สีขาว	สีเหลือง	สีขาว	-	-	120
26	สีเทา	สีเทา	สีเทา	-	-	78, 87
27	สีเทา	สีขาว	สีขาว	-	-	49



รูปที่ 3.1 ตัวอย่างลักษณะของ actinomycetes ที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด ISP-2 โดย A คือ substrate mycelium สีขาว, B คือ substrate mycelium สีเหลือง, C คือ สปอร์สีขาว, D คือ สปอร์สีเทา, E คือ pigment สีแดง, F คือ pigment และ soluble pigment สีเหลือง, G คือ ไม่มีการเจริญ และ H คือ การปนเปื้อนจากกรา

### 3.2 ผลการตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง

จากการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของ actinomycetes สามารถเก็บสปอร์ และเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ ใน 20% glycerol ได้ 69 ไอโซเลท ดังตารางที่ 1 ภาคผนวก ค เนื่องจากระหว่างทำการทดลอง มีบางไอโซเลทที่มีการเจริญที่ช้า หรือไม่มีเจริญเป็นจำนวนทั้งสิ้น 8 ไอโซเลท และมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเป็นจำนวนทั้งสิ้น 9 ไอโซเลท โดยปรับให้มีความเข้มข้นของสปอร์อยู่ที่ระหว่าง  $10^6$ - $10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร และนำสารแขวนลอยสปอร์ของ 69 ไอโซเลท มาตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 5 ชนิด คือ *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ในอาหารแข็ง จากนั้นสังเกต และวัดขนาดของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นโดยวัดจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น ได้ผลดังตารางที่ 2 ภาคผนวก ค พบว่า actinomycetes สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้จำนวน 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. Subtilis* ได้จำนวน 12 ไอโซเลท และสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ได้จำนวน 29 ไอโซเลท และพบว่า actinomycetes ไอโซเลท WC45, WC53 และ WC89 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้จำนวนมากที่สุด คือ 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, และ *C. albicans* อีกทั้งได้นำผลการตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ มาจัดกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยาและของความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ actinomycetes ที่เจริญบนอาหาร ISP-2 ดังแสดงในตารางที่ 3.2 เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแข็งด้วยวิธี cross streak ของนางสาวภาววี อุดมศรีพันธุ์ (อุดมศรีพันธุ์, 2558) พบว่ามีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.3 เนื่องจากเมื่อสังเกตขนาดของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นมีขนาดที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในการทดสอบที่แตกต่างกัน ซึ่งมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน จึงส่งผลต่อการเจริญของ actinomycetes อีกทั้งอาจมีปัจจัยอื่นที่มีผลร่วมด้วย เช่น ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่ม เป็นต้น



รูปที่ 3.2 บริเวณยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งด้วยวิธี agar plug โดย A คือ WC40, 41, 45, 53, 66 และ 77 บนอาหาร MR5 ทดสอบกับ *B. subtilis* บนอาหาร MHA, B คือ WC10, 19, 22 และ 24 บนอาหาร MR5 ทดสอบกับ *C. albicans* บนอาหาร MHA และ C คือ WC40, 41, 45, 53, 66 และ 77 บนอาหาร MR5 ทดสอบกับ *S. aureus* บนอาหาร MHA



ตารางที่ 3.2 การจัดกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของ actinomycetes

กลุ่ม ที่	ลักษณะของโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด ISP-2			Pigment	Soluble pigment	การยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบ	ไอโซเลท (WC)
	Substrate mycelium	Aerial mycelium	สีของสปอร์				
1	สีเหลืองอ่อน	สีน้ำตาล	สีเทา	-	-	B, C	2
2	สีเหลืองอ่อน	สีน้ำตาล	สีขาว	-	-	-	15
3	สีเหลืองอ่อน	สีแดง	สีขาว	-	-	-	6, 58
4	สีเหลืองอ่อน	สีแดง	สีแดง	-	-	C	86, 110
5	สีเหลืองอ่อน	สีแดง	สีแดง	-	-	B, C	16
6	สีเหลืองอ่อน	สีแดง	สีแดง	สีแดง	-	C	34
7	สีเหลืองอ่อน	สีแดง	สีเทา	-	-	-	81
8	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีขาว	-	-	-	50-51, 72, 80, 83
9	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีขาว	-	-	none	38, 85
10	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีขาว	สีแดง	-	none	71
11	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีเทา	-	-	-	26
12	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีเทา	-	-	C	10
13	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีเทา	-	-	B	40
14	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีเทา	สีแดง	-	-	88
15	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีเทา	สีแดง	-	C	116
16	สีเหลืองอ่อน	สีขาว	สีเทา	สีเหลือง	สีเหลือง	B, S, C	45
17	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีขาว	-	-	-	11, 39
18	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีขาว	-	-	none	33
19	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีขาว	-	-	B	41
20	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีเทา	-	-	-	20, 32, 42, 46-48, 61, 74, 76, 95
21	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีเทา	-	-	none	30, 75
22	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีเทา	-	-	C	21, 64, 66, 115, 117
23	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีเทา	-	-	B	93
24	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีเทา	-	-	B, S	19
25	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีเทา	-	-	B, C	77
26	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีเทา	สีแดง	-	S	22
27	สีขาว	สีขาว	สีขาว	สีแดง	-	C	114
28	สีขาว	สีขาว	สีขาว	-	-	-	29, 84
29	สีขาว	สีขาว	สีขาว	-	-	none	82
30	สีขาว	สีขาว	สีขาว	-	-	C	107
31	สีขาว	สีขาว	สีขาว	-	-	B, S, C	53, 89
32	สีขาว	สีขาว	สีเทา	-	-	-	27
33	สีขาว	สีขาว	สีเทา	-	-	C	24, 69, 101
34	สีขาว	สีขาว	สีเทา	-	-	B, S, C	102
35	สีขาว	สีขาว	สีเทา	สีแดง	-	none	119
36	สีขาว	สีขาว	สีเทา	สีน้ำตาล	-	-	44

กลุ่ม ที่	ลักษณะของโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด ISP-2			Pigment	Soluble pigment	การยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบ	ไอโซเลท (WC)
	Substrate mycelium	Aerial mycelium	สีของสปอร์				
37	สีขาว	สีเทา	สีขาว	-	-	-	55
38	สีขาว	สีเทา	สีขาว	-	-	C	118
39	สีขาว	สีเทา	สีเทา	-	-	-	54, 57, 97, 122
40	สีขาว	สีเทา	สีเทา	-	-	C	37, 52, 104-105, 121
41	สีขาว	สีเทา	สีเทา	สีเทาดำ	-	C	109
42	สีขาว	สีแดง	สีเทา	สีแดง	-	B	36
43	สีขาว	สีชมพู	สีขาว	-	-	none	92
44	สีขาว	สีเหลือง	สีขาว	-	-	-	120
45	สีเทา	สีเทา	สีเทา	-	-	none	78
46	สีเทา	สีเทา	สีเทา	-	-	C	87
47	สีเทา	สีขาว	สีขาว	-	-	-	49

- ไม่ได้ทดสอบ

none ไม่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

B: *B. subtilis*

S: *S. aureus*

C: *C. albicans*

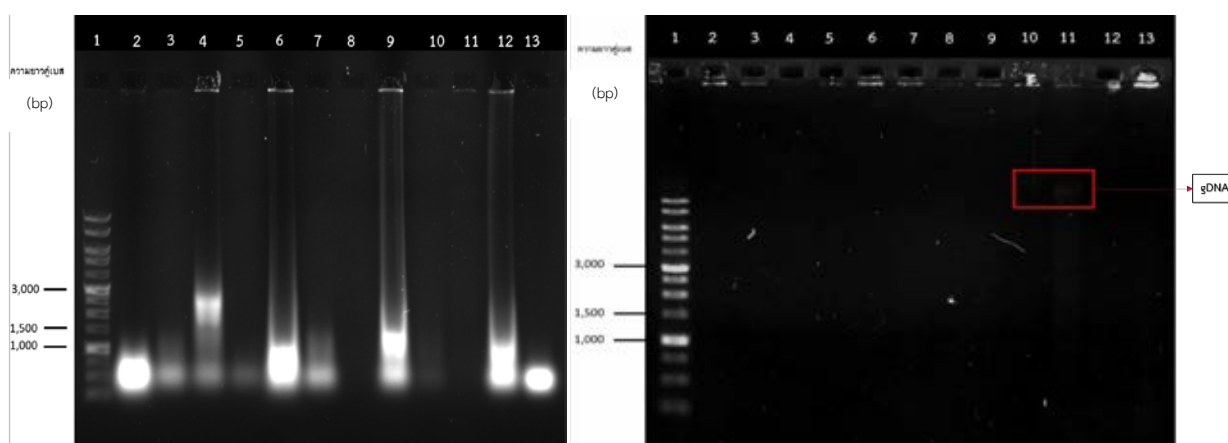
### ตารางที่ 3.3 การผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบในอาหารแข็งด้วยวิธี agar plug และ cross streak

การ ยับยั้ง (ชนิด)	ชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบ					ไอโซเลทที่ยับยั้ง (WC)	
	S. <i>aureus</i>	E. <i>coli</i>	P. <i>aeruginosa</i>	B. <i>subtilis</i>	C. <i>albicans</i>	วิธี agar plug	วิธี cross streak
0						30, 33, 38, 71, 75, 78, 82, 85, 92, 96, 119	21, 22, 24, 26, 30, 32-34, 36-41, 47, 49, 50, 52, 54-55, 57, 61, 64, 92, 96-97, 118, 122
1	✓					22	-
		✓				-	46
				✓		36, 40, 41, 93	9
					✓	10, 21, 24, 34, 37, 52, 64, 66, 69, 86, 87, 101, 104-105, 107, 109-110, 114-118, 121	2, 10, 16, 58, 66, 69, 71, 75-76, 78, 82-83, 85-87, 101, 104, 107, 109-110, 114-117, 121
2	✓			✓	✓	19, 102	-
				✓	✓	2, 16, 77	119, 120
3	✓			✓	✓	45, 53, 89	19, 77, 93, 102
	✓	✓			✓	-	53
	✓	✓		✓		-	65
4	✓	✓		✓	✓	-	45, 89

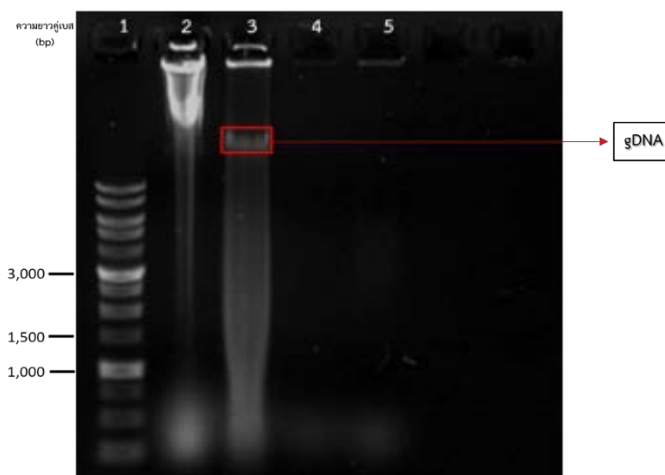
### 3.3 การตรวจสอบผลการสกัด gDNA ด้วยวิธี gel electrophoresis

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่า actinomycetes บางไอโซเลทมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน แต่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่แตกต่างกัน อีกทั้ง actinomycetes บางไอโซเลทมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่เหมือนกัน แต่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องระบุสายพันธุ์โดยกระบวนการทางอณูวิทยา และตรวจสอบความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการของแต่ละไอโซเลทโดยวิธีการสร้าง phylogenetic tree ซึ่งอาศัย ยีน 16S rRNA ในการวิเคราะห์

โดยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ได้นำ actinomycetes จำนวน 45 ไอโซเลท ที่ผ่านการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ และพบว่ามีสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่ดีมาสกัด gDNA ได้จำนวน 16 ไอโซเลท โดยคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่มีขนาดของบริเวณยับยั้งที่กว้าง หรือยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิด และนำ gDNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบผลการสกัด gDNA ด้วยวิธี gel electrophoresis ซึ่งพบว่ามีปริมาณของ RNA ปริมาณมาก จึงเติม RNase A และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาตรวจสอบผลการสกัด gDNA ด้วยวิธี gel electrophoresis อีกรอบหนึ่ง (รูปที่ 3.3 และ 3.4) แต่ยังคงพบว่า มีเพียง WC93, 107 และ 109 ที่มีแถบของ gDNA ที่สกัดได้ ส่วนไอโซเลทที่เหลืออาจมีปริมาณของ gDNA ที่น้อยมาก จึงไม่เห็นแถบของ gDNA ที่สกัดได้ คาดว่าอาจมีสาเหตุมาจากความผิดพลาดระหว่างการสกัด หรือ gDNA อาจละลายใน TE buffer ได้ไม่หมดก่อนนำมาตรวจสอบด้วย gel electrophoresis แก้ไขได้ด้วยการใช้ TE buffer ที่อุ่น และทำให้ละลายจนหมดก่อนนำไปตรวจสอบด้วย gel electrophoresis



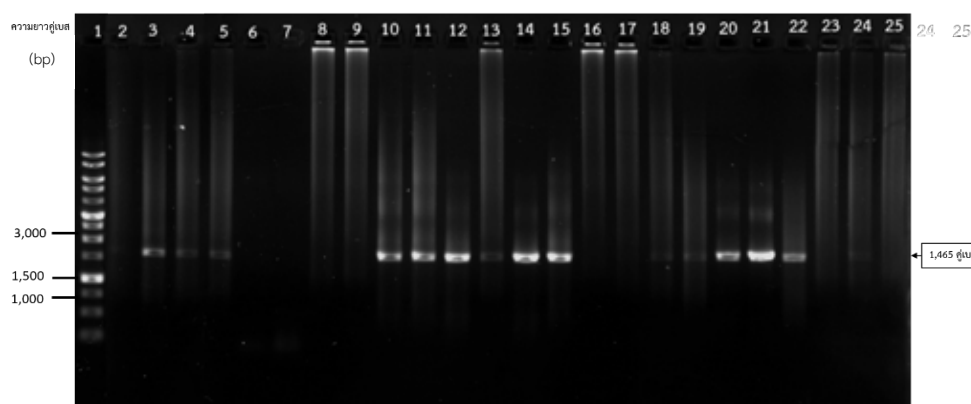
รูปที่ 3.3 ผลการสกัด gDNA ด้วยวิธี gel electrophoresis ชุดที่ 1 (ซ้าย) ผลการสกัด gDNA ก่อนเติม RNase A (ขวา) ผลการสกัด gDNA หลังเติม RNase A โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% กำหนดให้ เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2 คือ WC10; เลนที่ 3 คือ WC19; เลนที่ 4 คือ WC36; เลนที่ 5 คือ WC69; เลนที่ 6 คือ WC87; เลนที่ 7 คือ WC89; เลนที่ 8 คือ WC102; เลนที่ 9 คือ WC105; เลนที่ 10 คือ WC107; เลนที่ 11 คือ WC109; เลนที่ 12 คือ WC115 และ เลนที่ 13 คือ WC121



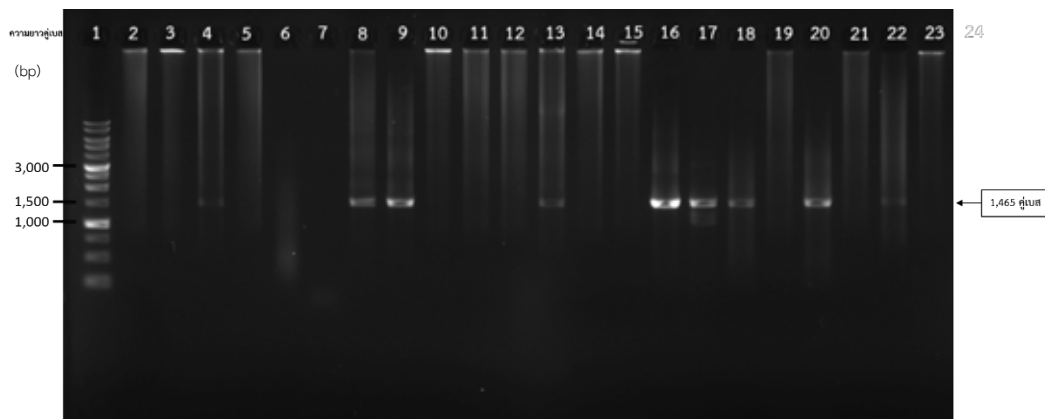
รูปที่ 3.4 ผลการสกัด gDNA ด้วยวิธี gel electrophoresis ชุดที่ 2 ผลการสกัด gDNA หลังเติม RNase A โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% กำหนดให้ เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2 คือ WC53; เลนที่ 3 คือ WC93; เลนที่ 4 คือ WC110 และ เลนที่ 5 คือ WC117

### 3.4 การเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 16S rRNA

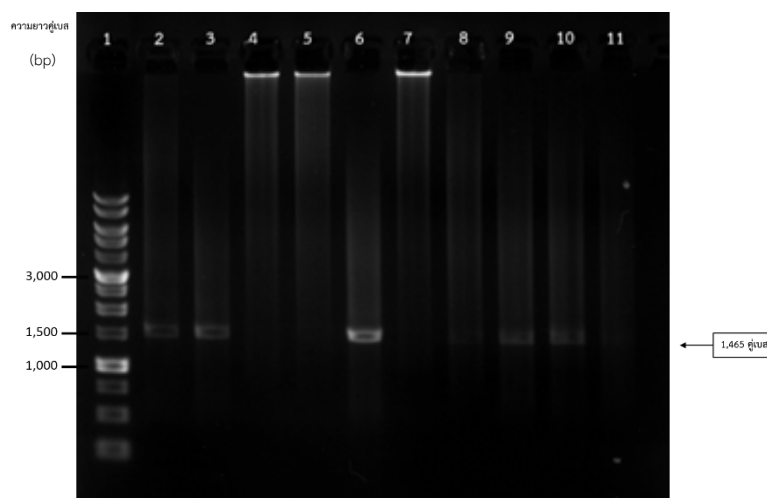
จากการสกัด gDNA ของ actinomycetes ได้นำ 16 ไอโซเลท มาเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 16S rRNA ด้วยการทำให้ PCR โดยไพรเมอร์ 27F และ 1492R โดยแต่ละไอโซเลททำ 2 ปฏิกริยา แต่ละปฏิกริยามีปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis (รูปที่ 3.5, 3.6 และ 3.7)



รูปที่ 3.5 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ชุดที่ 1 โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% กำหนดให้ เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2 คือ WC10 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 3 คือ WC10 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 4 คือ WC19 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 5 คือ WC19 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 6 คือ WC36 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 7 คือ WC36 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 8 คือ WC69 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 9 คือ WC69 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 10 คือ WC87 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 11 คือ WC87 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 12 คือ WC89 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 13 คือ WC89 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 14 คือ WC102 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 15 คือ WC102 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 16 คือ WC105 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 17 คือ WC105 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 18 คือ WC107 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 19 คือ WC107 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 20 คือ WC109 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 21 คือ WC109 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 22 คือ WC115 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 23 คือ WC115 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 24 คือ WC121 หลอดทดลองที่ 1 และ เลนที่ 25 คือ WC121 หลอดทดลองที่ 2



รูปที่ 3.6 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ชุดที่ 2 โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2 คือ WC10 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 3 คือ WC10 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 4 คือ WC19 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 5 คือ WC19 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 6 คือ WC36 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 7 คือ WC36 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 8 คือ WC53 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 9 คือ WC53 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 10 คือ WC69 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 11 คือ WC69 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 12 คือ WC87 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 13 คือ WC87 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 14 คือ WC89 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 15 คือ WC89 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 16 คือ WC93 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 17 คือ WC93 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 18 คือ WC102 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 19 คือ WC102 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 20 คือ WC105 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 21 คือ WC105 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 22 คือ WC107 หลอดทดลองที่ 1 และ เลนที่ 23 คือ WC107 หลอดทดลองที่ 2



รูปที่ 3.7 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ชุดที่ 3 โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% กำหนดให้เลนที่ 1 คือ DNA สำหรับชี้วัดขนาดของยีน; เลนที่ 2 คือ WC109 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 3 คือ WC109 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 4 คือ WC110 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 5 คือ WC110 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 6 คือ WC115 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 7 คือ WC115 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 8 คือ WC117 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 9 คือ WC117 หลอดทดลองที่ 2; เลนที่ 10 คือ WC121 หลอดทดลองที่ 1; เลนที่ 11 คือ WC121 หลอดทดลองที่ 2

จากรูปที่ 3.5, 3.6 และ 3.7 แสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ได้จำนวน 12 ไอโซเลท จาก 16 ไอโซเลท โดยมี 4 ไอโซเลท ที่มีผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ในปริมาณที่ต่ำหรือไม่มี ได้แก่ WC36, WC69, WC110 และ WC117 จึงได้นำผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ทั้ง 12 ไอโซเลท ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Bionics โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 518F ซึ่งสามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rRNA ได้จำนวน 2 ไอโซเลท คือ WC115 และ WC102 เนื่องจากอีก 10 ไอโซเลท มีคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ที่ต่ำหรืออาจมีปริมาณของผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ที่น้อยเกินไป นอกจากนี้ได้นำข้อมูลของ WC45 ซึ่งได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาจากงานวิจัยก่อนหน้า (Kanchanabanca et al., 2018) มาร่วมในการวิเคราะห์ผลด้วย นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ WC45, WC102 และ WC115 มาระบุสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม Blastn (รูปที่ 3.8, 3.9 และ 3.10) ได้สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงจากฐานข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 3.4 อย่างไรก็ตามเนื่องจากเกิดการปนเปื้อนในอาหาร TSB ที่เลี้ยงเชื้อก่อนการสกัด gDNA พบว่า WC102 ใกล้เคียงกับสกุล *Micrococcus* จึงไม่นำมาวิเคราะห์ต่อ

ตารางที่ 3.4 ข้อมูลการระบุสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันด้วยโปรแกรม Blastn

Isolate	Closest relative	Accession number	Identity (%)
WC45	<i>Streptomyces antibioticus</i> strain CSSP528	<a href="#">NR_043348.1</a>	99.88
WC102	<i>Micrococcus aloeverae</i> strain AE-6	NR_134088.1	99.77
WC115	<i>Streptomyces tendae</i> strain ATCC 19812	<a href="#">NR_025871.2</a>	100.00

จากการวิเคราะห์สายพันธุ์ของ actinomycetes ที่เพาะเลี้ยงได้พบว่า actinomycetes ที่คัดแยกมามีความใกล้เคียงกับ actinomycetes ที่คัดแยกมาจากน้ำทะเลและดิน ซึ่งไม่พบว่ามีรายงานการพบ หรือคัดแยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน โดยพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทั้ง 2 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลท WC45 มีความใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Streptomyces antibioticus* CSSP528 โดยมี %identity เท่ากับ 99.88% ซึ่งคัดแยกได้จากดินตะกอน มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ สีของ substrate mycelium และสีของ aerial mycelium บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งหลายชนิด เช่น starch agar, glucose asparagine agar เป็นต้น ที่คล้ายกับ WC45 คือ มีสีของ substrate mycelium สีเหลือง และมีสีของ aerial mycelium สีเทาขาว (Shuna Fu et al., 2016) และพบว่ามีรายงานถึงความสามารถในการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ เช่น actinomycin ที่ใช้เป็นยาเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็ง (Collett et al., 1974) เป็นต้น

*Streptomyces antibioticus* strain CSSP528 16S ribosomal RNA, partial sequence

Sequence ID: [NR\\_043348.1](#) Length: 1494 Number of Matches: 1 Range 1: 193 to 759

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1042 bits(564)	0.0	567/568(99%)	1/568(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  CGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG 60
          |||
Sbjct 193 CGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG 252
Query 61  ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA 120
          |||
Sbjct 253 ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA 312
Query 121 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGAC 180
          |||
Sbjct 313 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGAC 372
Query 181 GCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGAAGAAGCGAAA 240
          |||
Sbjct 373 GCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGAAGAAGCGAAA 432
Query 241 GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGT 300
          |||
Sbjct 433 GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGT 492
Query 301 AGGGCGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACAGT 360
          |||
Sbjct 493 AGGGCGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACAGT 552
Query 361 CGGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCTAGCTAGAGTG 420
          |||
Sbjct 553 CGGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCTAGCTAGAGTG 612
Query 421 TGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACA 480
          |||
Sbjct 613 TGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACA 672
Query 481 CCGGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTAAGGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA 540
          ||
Sbjct 673 CC--GGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTAAGGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA 731
Query 541 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC 568
          |||
Sbjct 732 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC 759

```

รูปที่ 3.8 ผลการทำ Blastn บริเวณ 16S rRNA ของ WC45

*Micrococcus aloeverae* strain AE-6 16S ribosomal RNA, partial sequenceSequence ID: [NR\\_134088.1](#) Length: 1411 Number of Matches: 1 Range 1: 276 to 909

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1171 bits(634)	0.0	634/634(100%)	0/634(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  GAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT 60
          |||
Sbjct 276 GAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT 335
Query 61  GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCGACGACGCCGCGTGAGGGATGACGGC 120
          |||
Sbjct 336 GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCGACGACGCCGCGTGAGGGATGACGGC 395
Query 121 CTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGA 180
          |||
Sbjct 396 CTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGA 455
Query 181 AGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTATCCGG 240
          |||
Sbjct 456 AGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTATCCGG 515
Query 241 AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGGTTTGTGCGCTCTGTCGTGAAAGTCCGGGGC 300
          |||
Sbjct 516 AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGGTTTGTGCGCTCTGTCGTGAAAGTCCGGGGC 575
Query 301 TTAACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATT 360
          |||
Sbjct 576 TTAACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATT 635
Query 361 CCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCT 420
          |||
Sbjct 636 CCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCT 695
Query 421 CTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT 480
          |||
Sbjct 696 CTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT 755
Query 481 GGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCGCGC 540
          |||
Sbjct 756 GGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCGCGC 815
Query 541 CGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAG 600
          |||
Sbjct 816 CGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAG 875
Query 601 GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCAT 634
          |||
Sbjct 876 GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCAT 909

```

## รูปที่ 3.9 ผลการทำ Blastn บริเวณ 16S rRNA ของ WC102

*Streptomyces tendae* strain ATCC 19812 16S ribosomal RNA, complete sequence



Sequence ID: [NR\\_025871.2](#) Length: 1526 Number of Matches: 1 Range 1: 451 to 1021

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1055 bits(571)	0.0	571/571(100%)	0/571(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  AGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG    60
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 451 AGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG    510
Query 61  TAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACAG    120
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 511  TAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACAG    570
Query 121 TCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGT    180
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 571  TCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGT    630
Query 181 TCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAAC    240
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 631  TCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAAC    690
Query 241 ACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA    300
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 691  ACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA    750
Query 301 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTGGGCACTAGGTGTGGGC    360
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 751  GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTGGGCACTAGGTGTGGGC    810
Query 361 AACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGG    420
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 811  AACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGG    870
Query 421 CCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGC    480
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 871  CCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGC    930
Query 481 TTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATCAGA    540
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 931  TTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATCAGA    990
Query 541 GATGGTGCCCCCTTGTGGTCGGGTGTACAGG 571
          ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 991  GATGGTGCCCCCTTGTGGTCGGGTGTACAGG 1021

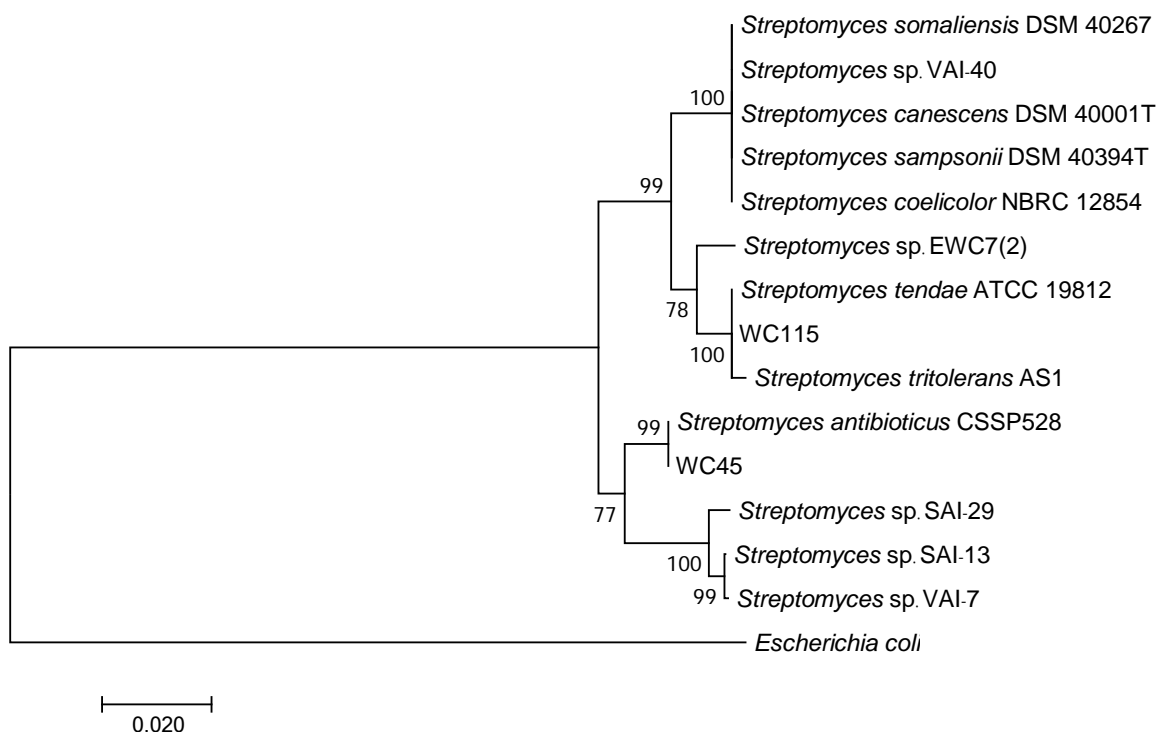
```

### รูปที่ 3.10 ผลการทำ Blastn บริเวณ 16S rRNA ของ WC115

ส่วน WC115 มีความใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Streptomyces tendae* ATCC 19812 โดยมี %identity เท่ากับ 100.00% พบว่ามีรายงานถึงความสามารถในการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ เช่น nikkomycins (Lohr et al., 1989) ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการสังเคราะห์ไคติน (chitin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของรา (Zhang et al., 1999) จึงมีความน่าสนใจอย่างมากที่จะทดสอบความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นรา เนื่องจากในการทดลองนี้ไม่ได้ทดสอบความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นรา ดังนั้นอาจทำให้ค้นพบความสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ในอนาคต

โดยไอโซเลท WC102 และ WC115 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความแตกต่างกันเล็กน้อยกับ actinomycetes ที่มีความใกล้เคียงที่สุด อาจมีสาเหตุมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองที่แตกต่างกัน ซึ่งมีองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันส่งผลต่อการเจริญของ actinomycetes ให้แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความแตกต่างกัน ยิ่งไปกว่านั้นทั้งสองไอโซเลทมีรายงานการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งรา หรือใช้เป็นยาเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็ง ซึ่งยังไม่ได้ทำการทดลองในงานวิจัยนี้ จึงน่าสนใจที่จะทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อค้นหาความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งรา หรือความสามารถในการรักษาโรคมะเร็ง เพื่อเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

เมื่อนำ WC45 และ WC105 ไปศึกษาความใกล้เคียงกับ *Streptomyces* ที่คัดแยกได้จากไส้เดือนและปุ๋ยมูลไส้เดือนโดยทำ neighbor joining phylogenetic tree ของ 16S rRNA ด้วยโปรแกรม MEGA7 (รูปที่ 3.11) โดยจุลินทรีย์ที่นำมาอ้างอิงประกอบการทำ neighbor joining phylogenetic tree ดังแสดงในตารางที่ 3.5



รูปที่ 3.11 Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง WC45 และ WC115 กับสายพันธุ์ของ *Streptomyces* ที่แยกจากปุ๋ยมูลสัตว์ โดยมี *Escherichia coli* NR\_024570.1 เป็น out-group และตัวเลขบนกิ่งสาขาบ่งชี้ร้อยละของจำนวนครั้งที่ได้ผลอยู่ในกิ่งสาขาเดิมจากการทำซ้ำทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap

ตารางที่ 3.5 จุลินทรีย์อ้างอิงในการทำ neighbor joining phylogenetic tree

Reference strain	Source	Size (bp)	Accession number	Reference
<i>Streptomyces somaliensis</i> strain DSM 40267	Earthworm gut	1,480	AJ007400.1	(Aruna et al., 2008)
<i>Streptomyces</i> sp. strain VAI40	Earthworm cast	1,472	KM220611	(Sreevidya et al., 2016)
<i>Streptomyces canescens</i> strain DSM 40001T	Rhizosphere	1,476	Z76684.1	(Hain et al., 1997)
<i>Streptomyces sampsonii</i> strain DSM 40394T	Rhizosphere	1,476	Z76680.1	(Hain et al., 1997)
<i>Streptomyces</i> sp. strain EWC7(2)	Earthworm cast	1,441	GQ340692.2	(Kumar et al., 2012)
<i>Streptomyces tendae</i> strain ATCC 19812	Soil	1,526	NR_025871.2	(Takeuchi et al., 1996)
<i>Streptomyces tritolerans</i> strain AS1	Earthworm gut	1,485	EU623448.1	(Aruna et al., 2008)
<i>Streptomyces antibioticus</i> strain CSSP528	Soil	1,494	NR_043348.1	(Shuna Fu et al., 2016)
<i>Streptomyces</i> sp. strain SAI-29	Rhizosphere	1,474	KM220608	(Sreevidya et al., 2016)
<i>Streptomyces</i> sp. strain SAI-13	Rhizosphere	1,460	KM220609	(Sreevidya et al., 2016)
<i>Streptomyces</i> sp. strain VAI-7	Earthworm cast	1,475	KM220610	(Sreevidya et al., 2016)
<i>Streptomyces coelicolor</i> strain NBRC 12854	Soil	1,476	NR_112305.1	(Kutzner et al., 1959)
<i>Escherichia coli</i> strain U 5/41	-	1,450	NR_024570.1	(Cilia et al., 1996)

จากการทำ neighbor joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของ *Streptomyces* ที่มีรายงานว่าคัดแยกได้จากไส้เดือนและปุ๋ยมูลไส้เดือน พบว่าไอโซเลท WC45 ไม่มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces* รายงานว่าคัดแยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน แต่ WC115 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces tritolerans* AS1 ที่มีรายงานว่าคัดแยกได้จากทางเดินอาหารของไส้เดือน (*Eisenia foetida*) ซึ่งสามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและราที่ก่อโรคในพืชได้ เช่น *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* และ *Aspergillus flavus* (Aruna et al., 2008) ซึ่งมีความน่าสนใจอย่างมาก เนื่องจากในการทดลองไม่ได้ทดสอบความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราที่ก่อโรคในพืช จึงมีความเป็นไปได้ที่ WC115 อาจมีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราที่ก่อโรคในพืชได้ในอนาคต

จากการทดลองที่ได้นำบางไอโซเลทมาระบุชนิดนั้น คาดว่าในอนาคตควรนำไอโซเลทอื่นๆ มาระบุชนิดเพิ่มเติม โดยจากการจัดกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยาและของความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่า WC45 และ WC102 ไม่ถูกจัดกลุ่มร่วมกับไอโซเลทอื่น แต่ WC115 ถูกจัดกลุ่มอยู่ร่วมกับ WC21, WC64, WC66 และ WC117 ซึ่งทำให้คาดว่า WC21, WC64, WC66 และ WC117 ถ้านำไประบุชนิดอาจพบว่าเป็นชนิดเดียวกันกับ WC115 ดังนั้นในอนาคตถ้าต้องการนำไอโซเลทอื่นๆ มาระบุชนิดเพิ่มเติม ควรนำไอโซเลทที่อยู่ในกลุ่มอื่น

นอกเหนือจากไอโซเลทที่จัดกลุ่มอยู่ร่วมกับ WC45 และ WC102 จึงทำให้เหลืออีกอย่างน้อย 44 ไอโซเลท ที่ควรนำมาระบุชนิดเพิ่มเติมในอนาคต

โดยจากการระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน พบว่ามีความน่าสนใจ เนื่องจากมีการค้นพบจุลินทรีย์จำนวนมาก และบางส่วนสามารถระบุชนิดได้ว่าอยู่ในสกุลของ *Streptomyces* อีกทั้งพบว่ามี ความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ซึ่งยาด้านจุลินทรีย์ที่ผลิตได้จาก actinomycetes ส่วนมากผลิตมาจากสกุล *Streptomyces* ดังนั้นการระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน อาจเป็นการเพิ่มความรู้และความเข้าใจความสัมพันธ์ของ actinomycetes กับปุ๋ยมูลไส้เดือน อีกทั้งอาจนำไปสู่การค้นพบ actinomycetes ชนิดใหม่ หรือการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ซึ่งจะนำไปสู่การค้นพบยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ ที่สามารถนำไปใช้ด้านการแพทย์ และเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษา actinomycetes ที่คัดแยกมาจากปุ๋ยมูลไส้เดือนโดย นางสาวภาวิ อุดมศรีพันธุ์ จำนวน ทั้งหมด 96 ไอโซเลท สามารถนำมาเจริญใหม่ได้ทั้งหมด 86 ไอโซเลท เนื่องจากมีการปนเปื้อนของรา หรือ แบคทีเรียชนิดอื่น และไม่พบการเจริญจำนวน 10 ไอโซเลท ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ actinomycetes บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ISP-2 สามารถจัดได้เป็น 27 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ สีของ substrate mycelium, สีของ aerial mycelium, สารมีสีที่ถูกผลิตขึ้น และสีของสปอร์ และนำมาเก็บสปอร์ สามารถเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ใน 20% glycerol ได้จำนวน 69 ไอโซเลท เนื่องจากระหว่างทำการทดลอง มี บางไอโซเลทที่มีการเจริญที่ช้า หรือไม่มีเจริญเป็นจำนวนทั้งสิ้น 8 ไอโซเลท และมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิด อื่นเป็นจำนวนทั้งสิ้น 9 ไอโซเลท จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์ของ 69 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แข็งชนิด MR5 เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ด้วยวิธี agar plug ในอาหารเลี้ยง เชื้อแข็งชนิด MH พบว่า actinomycetes สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้จำนวน 6 ไอโซเลท สามารถ ยับยั้งการเจริญของ *B. Subtilis* ได้จำนวน 12 ไอโซเลท และสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ได้จำนวน 29 ไอโซเลท อีกทั้งพบว่า actinomycetes ไอโซเลท WC45, WC53 และ WC89 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ทดสอบได้จำนวนมากที่สุด คือ 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, และ *C. Albicans* โดยการ วิเคราะห์ยีน 16S rRNA ได้นำ actinomycetes จำนวน 45 ไอโซเลท มาสกัด gDNA เนื่องจากอีก 24 ไอโซเลท ปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสารแขวนลอยสปอร์ที่เก็บไว้ จึงนำเพียง 45 ไอโซเลท ที่ผ่านการตรวจสอบ ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ มาสกัด gDNA ได้จำนวน 16 ไอโซเลท โดยคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่มี ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่ดี โดยสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ได้จำนวน 12 ไอโซเลท เนื่องจากอีก 4 ไอโซเลท มีผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ในปริมาณ ต่ำ ได้แก่ WC36, WC69, WC110 และ WC117 ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 518F ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้แค่ 2 ไอโซเลท คือ WC115 และ WC102 เนื่องจากอีก 10 ไอโซเลท มีคุณภาพของ ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ที่ต่ำหรืออาจมีปริมาณของผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ที่น้อยเกินไป นอกจากนี้ได้นำข้อมูลของ WC45 ซึ่งได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาจากงานวิจัยก่อนหน้า โดยจากการวิเคราะห์ สายพันธุ์ของ actinomycetes ด้วยโปรแกรม Blastn พบว่า WC115 มีความใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Streptomyces tendae* ATCC 19812 โดยมี %identity เท่ากับ 100.00% พบว่ามีรายงานถึงความสามารถในการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ เช่น nikkomycins ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราได้ และ WC45 มีความใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Streptomyces antibioticus* CSSP528 โดยมี %identity เท่ากับ 99.88% ซึ่งคัดแยกได้จากดินตะกอน มี ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเล็กน้อย และพบว่ามีรายงานถึงความสามารถในการผลิตสารเมตาบอไลต์-

หัตถิยภูมิ เช่น actinomycin ที่ใช้เป็นยาเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็ง และเนื่องจากเกิดการปนเปื้อนในอาหาร TSB ที่เลี้ยงเชื้อก่อนการสกัด gDNA พบว่า WC102 ใกล้เคียงกับสกุล *Micrococcus* จึงไม่นำมาวิเคราะห์ต่อ เมื่อทำ neighbor joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของ *Streptomyces* ที่มีรายงานว่าคัดแยกได้จากไส้เดือนและปุ๋ยมูลไส้เดือน พบว่า WC45 ไม่มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces* sp. strain VAI-7 ที่มีรายงานว่าคัดแยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน แต่ WC115 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces tritolerans* AS1 ที่มีรายงานว่าคัดแยกได้จากทางเดินอาหารของไส้เดือน (*Eisenia foetida*) และผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและราที่ก่อโรคในพืชได้ ดังนั้นการระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน อาจเป็นการเพิ่มความรู้และความเข้าใจความสัมพันธ์ของ actinomycetes กับปุ๋ยมูลไส้เดือน อีกทั้งอาจนำไปสู่การค้นพบ actinomycetes ชนิดใหม่ หรือการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ซึ่งจะนำไปสู่การค้นพบยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ ที่สามารถนำไปใช้ด้านการแพทย์ และเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

### เอกสารอ้างอิง

- ภารวี อุดมศรีพันธุ์. การคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก actinomycetes ที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2558.
- Ades, L. C., et al. (1999). Aortic dissection, patent ductus arteriosus, iris hypoplasia and brachytelephalangy in a male adolescent. *Clinical Dysmorphology*, 8(4), 269-276.
- An, D., et al. (2006). *Actinomyces ruminicola* sp. nov., isolated from cattle rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(9), 2043-2048.
- Aruna, et al. (2008). First report of antimicrobial spectra of novel strain of *Streptomyces tritolerans* (strain AS1) isolated from earthworm gut (*Eisenia foetida*) against plant pathogenic bacteria and fungi. *Current Research in Bacteriology*, 1, 46-55.
- Baltz. (2005). Antibiotic discovery from actinomycetes : will a renaissance follow the decline and fall? *SIM News*, 55, 186-196.
- Baltz. (2007). Antimicrobials from actinomycetes: Back to the future. 2, 125-131.
- Bankhagarden's Earthworm Farming Processes. (2015). Bankhagarden's earthworm farming processes. Retrieved from <http://bankhagarden.thaiportal.net>
- Barka, E. A., et al. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria (vol 80, pg 1, 2016). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(4).
- Behie, Scott W., et al. (2017). Molecules to Ecosystems: actinomycete natural products in situ. *Frontiers in Microbiology*, 7(2149).
- Bibb, Mervyn J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 8(2), 208-215.
- Brown, David. (2015). Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? *Nature Reviews Drug Discovery*, 14, 821.
- Bulgarelli, D., et al. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 807-838.

- Chandra, G., et al. (2014). Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *Fems Microbiology Reviews*, 38(3), 345-379.
- Cilia, V., et al. (1996). Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Molecular Biology and Evolution*, 13(3), 451-461.
- Collett, M. S., et al. (1974). Morphological changes accompanying actinomycin production in *Streptomyces antibioticus*. *Journal of Ultrastructure Research*, 46(3), 452-465.
- Currie, Cameron R., et al. (2003). Ancient Tripartite Coevolution in the Attine Ant-Microbe Symbiosis. *Science*, 299(5605), 386.
- Davies, J. (1999). Millennium bugs. *Trends in Cell Biology*, 9(12), M2-5.
- Eckburg, Paul B., et al. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1635-1638.
- Edwards, C. A., et al. (1977). *Biology of earthworms* (1 ed.): Chapman and Hall
- Fenton, A. M., et al. (1992). Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(12), 3873-3878.
- Flärdh, Klas. (2003). Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, 6(6), 564-571.
- Goodfellow, et al. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37(1), 189-216.
- Hain, T., et al. (1997). Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(1), 202-206.
- Hasegawa, Toru, et al. (1983). A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 29(4), 319-322.



- Ilic, S. B., et al. (2007). Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Microbiology*, 76(4), 421-428.
- Isik, K., et al. (1999). *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2), 833-837.
- Jose, Polpass, et al. (2013). Diverse Actinomycetes from Indian Coastal Solar Salterns - A Resource for Antimicrobial Screening. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7, 2569-2575.
- Joyce, S. A., et al. (2011). The regulation of secondary metabolism and mutualism in the Insect pathogenic bacterium *photorhabdus luminescens*. *Advances in Applied Microbiology*, 76, 1-25.
- Kanchanabanca, C., et al. (2018, 22-23 November 2018). *Potential antimicrobial producers isolated from worm cast*. Paper presented at the Proceeding of the 30th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2018), Thailand.
- Katz L., et al. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(2-3), 155-176.
- Katz, M., et al. (2016). Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(2-3), 129-141.
- Kumar, Dr Vijay, et al. (2012). Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 205-214.
- Kutzner, H. J., et al. (1959). *Streptomyces coelicolor* Mueller and *Streptomyces violaceoruber* Waksman and Curtis, two distinctly different organisms. *Journal of Bacteriology*, 78, 528-538.
- Lemos, Manuel L., et al. (1985). Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microbial Ecology*, 11(2), 149-163.
- Lohr, Dorothee, et al. (1989). Continuous cultivation of *Streptomyces tendae* in different media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 274-279.

- Low A.L.M, et al. (2015). Axonomic Diversity and Antimicrobial Activities of Actinomycetes from Manure Composts. *Research Journal of Microbiology*, 10, 13-522.
- Lu, Y., et al. (2013). Isolation and characterization of fatty acid methyl ester (FAME)-producing *Streptomyces* sp. S161 from sheep (*Ovis aries*) faeces. *Letters in Applied Microbiology*, 57(3), 200-205.
- Managamuri, U., et al. (2017). Isolation, identification, optimization, and metabolite profiling of *Streptomyces sparsus* VSM-30. *3 Biotech*, 7(3), 217.
- Manivasagan, P., et al. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*, 169(4), 262-278.
- McNeil, M. M., et al. (1994). The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(3), 357-417.
- Miguélez, Elisa M., et al. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of Cell Biology*, 145(3), 515-525.
- Milshcheyn, A., et al. (2014). Mining the metabiome: identifying novel natural products from microbial communities. *Chemistry & Biology*, 21(9), 1211-1223.
- Mokni-Tlili, S., et al. (2010). Exploitation of biological wastes for the production of value-added hydrolases by *Streptomyces* sp. MSWC1 isolated from municipal solid waste compost. *Waste Management & Research*, 28(9), 828-837.
- Morales-Jimenez, J., et al. (2013). Nitrogen-fixing and uricolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus rhizophagus* and *Dendroctonus valens* (Curculionidae: Scolytinae). *Microbial Ecology*, 66(1), 200-210.
- Nilsson, W. B., et al. (2002). Detection and identification of bacterial pathogens of fish in kidney tissue using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48(3), 175-185.

- Owen, J. G., et al. (2015). Multiplexed metagenome mining using short DNA sequence tags facilitates targeted discovery of epoxyketone proteasome inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 112(14), 4221-4226.
- Pospiech, Andreas, et al. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends in Genetics*, 11(6), 217-218.
- Public Health England. (2015). Health matters: antimicrobial resistance. London, England: PHE.
- Qinyuan Li, et al. (2016). Cultural, Physiological, and Biochemical Identification of Actinobacteria. *Basics and Biotechnological Applications*.
- Ruanpanun, Pornthip, et al. (2016). Potential of actinomycetes isolated from earthworm castings in controlling root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of General Plant Pathology*, 82(1), 43-50.
- Ruiz, B., et al. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2), 146-167.
- Seipke, R. F., et al. (2012). *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 862-876.
- Shirling, E. B., et al. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species<sup>1</sup>. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16(3), 313-340.
- Shuna Fu, et al. (2016). Screening and identification of a *Streptomyces* sp . with antifungal activity. *International Journal of Science*, 3.
- Siddique, Samia, et al. (2014). Isolation, characterization and celection of avermectin-producing *Streptomyces avermitilis* strains from soil samples. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(6).
- Smanski, Michael J., et al. (2016). Leveraging ecological theory to guide natural product discovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(2), 115-128.

- Sreevidya, M., et al. (2016). Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. *Brazilian journal of microbiology*, 47(1), 85-95.
- Syers, J. K., et al. (1984). Earthworms and soil fertility. *Plant and Soil*, 76(1), 93-104.
- Takeuchi, T., et al. (1996). Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. *International journal of systematic bacteriology*, 46(2), 476-479.
- Tringe, S. G., et al. (2005). Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 805-814.
- Waksman. (1961). *The actinomycetes, classification, identification and descriptions of genera and species* (Vol. 2). Baltimore: Williams and Wilkins.
- World Health Organization. (2018). Antimicrobial resistance. *Geneva, Switzerland: WHO*.
- Zhang, D., et al. (1999). Polyoxins and nikkomycins: progress in synthetic and biological studies. *Current Pharmaceutical Design*, 5(2), 73-99.

## ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. ISP2 / Yeast Malt Agar (YM Agar) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Dextrose	10.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม

ละลายในน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ให้มีค่าเท่ากับ  $6.2 \pm 0.2$  แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. MR5 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Casamino acid	0.1	กรัม
Potassium sulfate ( $K_2SO_4$ )	0.25	กรัม
Magnesium chloride hexahydrate ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )	10.12	กรัม
TES	5.73	กรัม
Trace element solution	2.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม

ละลายในน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ให้มีค่าเท่ากับ 7.6 แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 3. Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Beef extract	2.0	กรัม
Casein enzyme hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม

ละลายในน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ให้มีค่าเท่ากับ  $7.3 \pm 0.2$  แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 4. Mueller Hinton agar (MHA) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

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

ละลายในน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ให้มีค่าเท่ากับ  $7.3 \pm 0.2$  แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 5. Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tryptone	17.0	กรัม
Soytone	3.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.5	กรัม

ละลายในน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ให้มีค่าเท่ากับ  $7.3 \pm 0.2$  แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

## สูตรและวิธีการเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลาย

## 1. 50X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ทริสอะซิเตต	242.28	กรัม
กรดอะซิติก	57.88	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ กรดเอทิลีนไดอามีนเตตระอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำและปรับให้ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

## 2. 1X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

50X TAE buffer	20	มิลลิลิตร
น้ำ	980	มิลลิลิตร

## 3. Trace element solution ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ซิงค์ (II) คลอไรด์	10.0	มิลลิกรัม
ไอรอน (III) คลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต	5.0	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต	0.1	มิลลิกรัม
แมงกานีส (II) คลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต	0.25	มิลลิกรัม
โซเดียมเตตระโบเรตเดคะไฮเดรต	10.12	มิลลิกรัม
แอมโมเนียมเฮปตะโมลิบเดต	5.73	มิลลิกรัม

ละลายในน้ำและเติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

## 4. 5M NaCl ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

โซเดียมคลอไรด์	292.2	กรัม
----------------	-------	------

ละลายในน้ำและเติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

## 5. 0.5M NaCl ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

โซเดียมคลอไรด์	29.22	กรัม
----------------	-------	------

ละลายในน้ำและเติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร



**6. 75mM NaCl ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร**

0.5M NaCl	150	มิลลิลิตร
-----------	-----	-----------

ละลายในน้ำและเติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

**7. 25mM EDTA pH8 1000 มิลลิลิตร**

0.5M EDTA	50	มิลลิลิตร
-----------	----	-----------

ละลายในน้ำและเติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

**8. 0.5M Tris-HCl pH 7.5 1000 มิลลิลิตร**

Tris	6.06	กรัม
------	------	------

ละลายในน้ำและเติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

**9. 20mM Tris-HCl pH7.5 1000 มิลลิลิตร**

0.5M Tris-HCl pH 7.5	40	มิลลิลิตร
----------------------	----	-----------

ละลายในน้ำและเติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

**10. 10% SDS 1000 มิลลิลิตร**

SDS	100	กรัม
-----	-----	------

ละลายในน้ำและเติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

**11. 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 จากนั้นเติมน้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 1 ปริมาตร 915 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป  
นึ่งด้วย เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

**12. TE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร**

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

นำสารละลายมาผสมกัน จากนั้นเติมน้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 1 ปริมาตร 978 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป  
นึ่งด้วย เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

## ภาคผนวก ค

ตารางที่ 1 ผลความเข้มข้นสปอร์ของ actinomycetes ในการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์

ไอโซเลข	ความเข้มข้นของสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	ไอโซเลข	ความเข้มข้นของสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	ไอโซเลข	ความเข้มข้นของสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)
WC2	$7.70 \times 10^7, 8.47 \times 10^7$	WC50	$4.08 \times 10^7$	WC92	$3.38 \times 10^7$
WC5	$7.22 \times 10^6$	WC52	$1.70 \times 10^8$	WC93	$3.90 \times 10^7$
WC10	$5.54 \times 10^7$	WC53	$6.32 \times 10^7$	WC94	$1.25 \times 10^7$
WC16	$6.93 \times 10^7$	WC54	$7.95 \times 10^7$	WC96	$9.23 \times 10^7$
WC19	$5.25 \times 10^7$	WC55	$1.23 \times 10^8$	WC97	$1.04 \times 10^8$
WC21	$1.68 \times 10^8$	WC57	$5.39 \times 10^8$	WC101	$1.13 \times 10^8$
WC22	$1.69 \times 10^8$	WC58	$4.25 \times 10^8$	WC102	$6.14 \times 10^7$
WC24	$8.55 \times 10^7$	WC61	$1.09 \times 10^8$	WC104	$1.44 \times 10^8$
WC26	$6.61 \times 10^7$	WC64	$5.76 \times 10^7$	WC105	$2.60 \times 10^8$
WC29	$1.70 \times 10^7$	WC66	$1.85 \times 10^8$	WC107	$1.31 \times 10^8$
WC30	$4.36 \times 10^7$	WC69	$6.51 \times 10^7$	WC109	$1.83 \times 10^8$
WC32	$1.60 \times 10^8$	WC71	$1.66 \times 10^8$	WC110	$1.71 \times 10^8$
WC33	$1.28 \times 10^8$	WC75	$6.40 \times 10^7$	WC114	$6.98 \times 10^7$
WC34	$1.55 \times 10^8$	WC76	$7.58 \times 10^7$	WC115	$6.10 \times 10^7$
WC36	$1.12 \times 10^8$	WC74	$1.15 \times 10^7$	WC116	$9.23 \times 10^7$
WC37	$1.41 \times 10^8$	WC77	$1.43 \times 10^8$	WC117	$1.01 \times 10^8$
WC38	$1.57 \times 10^8$	WC78	$1.07 \times 10^8$	WC118	$1.70 \times 10^8$
WC39	$1.77 \times 10^8$	WC81	$8.33 \times 10^6$	WC119	$1.91 \times 10^8$
WC40	$3.14 \times 10^8$	WC82	$1.19 \times 10^8$	WC120	$1.32 \times 10^8$
WC41	$4.50 \times 10^7$	WC83	$7.31 \times 10^6$	WC121	$2.05 \times 10^8$
WC45	$1.02 \times 10^8$	WC85	$1.26 \times 10^8$	WC122	$1.28 \times 10^8$
WC46	$2.93 \times 10^7$	WC86	$6.14 \times 10^7$		
WC47	$7.72 \times 10^7$	WC87	$1.60 \times 10^8$		
WC49	$2.02 \times 10^8$	WC89	$6.75 \times 10^7$		

ตารางที่ 2 ขนาดของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบชนิดต่างๆ ด้วยวิธี agar plug ของแต่ละไอโซเลท

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
WC2	-	-	-	8±0.00	12±0.47
WC10	-	-	-	-	16±1.62
WC16	-	-	-	10±0.00	16±2.62
WC19	11±0.47	-	-	15±0.47	-
WC21	-	-	-	-	12±0.50
WC22	7±0.47	-	-	-	-
WC24	-	-	-	-	14±0.00
WC26					
WC30	-	-	-	-	-
WC32					
WC33	-	-	-	-	-
WC34	-	-	-	-	15±1.50
WC36	-	-	-	8±0.47	-
WC37	-	-	-	-	8±1.25
WC38	-	-	-	-	-
WC39					
WC40	-	-	-	14±0.00	-
WC41	-	-	-	7±5.25	-
WC45	23±2.05	-	-	23±1.25	25±0.47
WC46					
WC47					
WC49					
WC50					
WC52	-	-	-	-	10±0.94
WC53	15±0.82	-	-	15±2.87	21±1.89
WC54					

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
WC55					
WC57					
WC58					
WC61					
WC64	-	-	-	-	17±0.82
WC66	-	-	-	-	18±1.00
WC69	-	-	-	-	10±0.00
WC71	-	-	-	-	-
WC75	-	-	-	-	-
WC76					
WC77	-	-	-	10±1.00	14±0.94
WC78	-	-	-	-	-
WC82	-	-	-	-	-
WC83					
WC85	-	-	-	-	-
WC86	-	-	-	-	16±0.94
WC87	-	-	-	-	10±3.30
WC89	7±0.47	-	-	9±0.47	7±0.47
WC92	-	-	-	-	-
WC93	-	-	-	7±0.00	-
WC96	-	-	-	-	-
WC97					
WC101	-	-	-	-	14±0.50
WC102	8±0.47	-	-	10±0.47	-
WC104	-	-	-	-	20±3.74
WC105	-	-	-	-	7±0.47
WC107	-	-	-	-	10±0.47
WC109	-	-	-	-	10±0.47

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
WC110	-	-	-	-	13±0.82
WC114	-	-	-	-	12±2.87
WC115	-	-	-	-	7±0.00
WC116	-	-	-	-	16±2.16
WC117	-	-	-	-	15±0.00
WC118	-	-	-	-	14±4.78
WC119	-	-	-	-	-
WC120					
WC121	-	-	-	-	11±0.94
WC122					

- หมายถึง ไม่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ