

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีสภาพภูมิประเทศและสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูก ดังนั้นประชากรส่วนใหญ่ภายในประเทศจึงประกอบอาชีพเกษตรกรรม ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น พืชตระกูลแตง พืชตระกูลพริก พืชตระกูลถั่ว มันสำปะหลัง และมะเขือเทศ ปัญหาหลักที่เกษตรกรประสบในการเพาะปลูก คือการถูกรบกวนจากจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

สำหรับแบคทีเรียก่อโรคพืชที่พบเป็นประจำ ได้แก่ *Ralstonia solanacearum* จะก่อโรคในมะเขือเทศทำให้เกิดโรคเหี่ยวจากแบคทีเรีย (Tans et al., 2001) นอกจากนี้เชื้อ *Ralstonia solanacearum* ยังเป็นสาเหตุของโรคโคนเน่าสีน้ำตาลในมันฝรั่งด้วยเช่นกัน (Ozakman and Schaad, 2003) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* เป็นสาเหตุของโรคเน่าจากแบคทีเรียในพืชตระกูลแตง (Burdman et al., 2005) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ทำให้เกิดโรคจุด และโรคขอบใบแห้งจากแบคทีเรียในมะเขือเทศ และพริก (Bonas et al., 1993) *Colletotrichum capsici* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนสในพริก (ลักขณา วรณภีร์, 2536 อ้างจาก Giatgong, 1980) สำหรับในกลุ่มเชื้อราก่อโรคพืช ได้แก่ *Fusarium oxysporum* ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในกล้วย (Gordon and Martyn, 1997)

จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นเกษตรกรได้มีการใช้สารเคมีทางการเกษตรเช่น ยาฆ่าเชื้อรา หรือสารเคมีต่างๆ ในการแก้ไขปัญหา และควบคุมโรคพืช ซึ่งการใช้สารเคมีทางการเกษตรในระยะยาวนั้นจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค สิ่งแวดล้อม และเกษตรกร ทำให้เกิดปัญหาด้านสารพิษตกค้าง การดื้อของเชื้อก่อโรคต่อสารเคมีควบคุมโรค การสะสมของสารเคมีในห่วงโซ่อาหารเพราะน้ำที่ไหลผ่านแปลงเกษตรที่มีการฉีดพ่นสารเคมีจะไหลลงไปสู่แหล่งน้ำธรรมชาติทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีในระบบนิเวศ สิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำอาจได้รับผลกระทบโดยตรงจากสารเคมี นอกจากนี้สารเคมีเหล่านี้อาจจะไปสะสมอยู่ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตต่างๆ และถ่ายทอดไปยังสิ่งมีชีวิตที่อยู่ด้านบนของห่วงโซ่อาหารได้และการใช้สารเคมีทางการเกษตรนั้นยังถือเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตอีกด้วย ในปัจจุบันจึงได้มีการหันมาใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ แทนการใช้สารเคมีทาง

การเกษตร ซึ่งเป็นการนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ลดความเสี่ยงในการเกิดสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อก่อโรคพืชที่ทนต่อสารเคมี และไม่ส่งผลกระทบต่อความสมดุลในระบบนิเวศ

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีเส้นสายคล้ายเชื้อรา ส่วนใหญ่จะพบในดินทั่วไป ซึ่งเชื้อแอคติโนมัยซีทมีความสามารถในการควบคุมโรคพืช หรือผลิตสารทุติยภูมิ เช่น สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (Kunoh, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Streptomyces* ยังมีความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อรา และแบคทีเรียได้ เช่น *Streptomyces violaceusniger* ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะในการต่อต้านเชื้อ *Fusarium oxysporum* ที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในกล้วย (Getha and Vikineswary, 2002) ตามข้อมูลของ Antibiotic Literature Database รายงานว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็น กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทางสรีรวิทยาและเป็นแหล่งของการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญต่อการแพทย์และเกษตรกรรม และได้มีการวิจัยและค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ประมาณ 30 ชนิดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท (Lazzarini et al., 2000)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะแยกหาเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินในบริเวณเขตอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา (อพ.สธ.) เขื่อนสิรินธร อำเภอพิบูลมังสาหาร จังหวัดอุบลราชธานี และศึกษาความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช คน และสัตว์

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 2.1 เพื่อคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินในบริเวณเขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี
- 2.2 เพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืช คน และสัตว์
- 2.3 เพื่อบ่งชี้ชนิดของแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืช คน และสัตว์

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่อยู่ใน Order *Actinomycetales* ซึ่งประกอบด้วย 8 กลุ่มได้แก่ *Actinomycetaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Frankiaceae*, *Actinoplanaceae*, *Dermatophilaceae*, *Nocardiaceae*, *Streptomycetaceae* และ *Micromonosporaceae* แอกติโนมัยสีทสร้างสปอร์ และเส้นใยคล้ายเชื้อรา (Kalakoutski and Agre, 1976) เส้นใยที่สร้างอาจเป็นเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) มีลักษณะพอมบางยาวแตกกิ่งก้านสาขาซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะในวงศ์ *Streptomycetaceae* แต่เส้นใยจะมีขนาดสั้นในวงศ์ *Mycobacteriaceae* และวงศ์ *Actinomycetaceae* บางวงศ์เส้นใยจะหักเป็นท่อนสั้นๆเช่นวงศ์ *Nocardiaceae* (Buchanan and Gibbons, 1974) เส้นใยของแอกติโนมัยสีทจะมีสัณฐานวิทยาเหมือนกับเส้นใยของเชื้อราแต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าคือประมาณ 0.5-1.0 ไมโครเมตร (Alexander, 1977) มีการสร้างสปอร์ซึ่งอาจจะสร้างจากเส้นใยอาหารหรือเส้นใยอากาศ สปอร์ที่สร้างอาจเป็นสปอร์เดี่ยวๆเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายสปอร์ โดยอาจเห็นสายสปอร์เป็น linear, loop หรือเป็นแบบ spiral ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Buchanan and Gibbons, 1974)

นอกจากนี้ยังพบว่าแอกติโนมัยสีทเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียสและพบว่าส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส (Alexander, 1977) แต่มีบางพวกที่เป็น thermophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 45-60 องศาเซลเซียส มีความสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในซากอินทรีย์วัตถุ เช่น *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* และ *Thermomonospora* (Lacey, 1997) นอกจากนี้ยังมีความสำคัญทางการค้าคือสามารถย่อยสลาย aliphatic-aromatic copolyester (Kleeberget al., 1998) สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (Okami and Hotta, 1988) และเอนไซม์ชนิดต่างๆ (เทพิน เดชนันท์รัตน์, 2546 อ้างจาก Peczynska-Czoch and Mordarski, 1988)

2. วิธีการแยกเชื้อแอกติโนมัยสีท

การแยกแอกติโนมัยสีทจากดินเพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ จำเป็นต้องลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งทำได้โดยการเติมสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และเชื้อรา หรือควบคุมองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Hayakawa and Nonomura (1989) แยกเชื้อ โดยการนำดินที่แห้งมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:10 และเจือจางต่อในสารละลาย phosphate buffer (pH 7.0) ที่มี yeast extract เข้มข้น 6% และ SDS เข้มข้น 0.05% ให้มีความเจือจาง 1:100 และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วเจือจางต่อในน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างดินที่เจือจางมากลี่ยลงบนอาหาร humic acid vitamin agar ซึ่งเติม cycloheximide 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งวิธีนี้ทำให้เชื้อแอกติโนมัยสีทสามารถแข่งขันกับเชื้อแบคทีเรียทั่วไป มีโอกาสตรวจพบได้สูงขึ้นประมาณ 40% และแบคทีเรียทั่วไปลดลงประมาณ 90% จากเดิมที่แยกด้วยวิธีธรรมดาโดยพบว่า yeast extract ช่วยให้มีปริมาณของแอกติโนมัยสีทเพิ่มขึ้น ส่วน SDS ทำให้เชื้อแบคทีเรียทั่วไปลดลง

Hayakawa et al. (1991) แยกเชื้อแอกติโนมัยสีทโดยใช้วิธีแช่ดินในสารละลายฟีนอล 1.5% เป็นเวลา 40 นาทีแล้วกลี่ยเชื้อลงบนอาหาร humic acid vitamin agar ทำให้สัดส่วนของเชื้อในสกุล *Micromonospora* เพิ่มขึ้นจาก 3% เมื่อแยกด้วยวิธีธรรมดาเป็น 44% ของเชื้อแอกติโนมัยสีททั้งหมดที่ขึ้นบนอาหาร และเชื้อสกุล *Microbispora* เพิ่มขึ้นจาก 1% เมื่อแยกด้วยวิธีธรรมดาเป็น 12% ของเชื้อแอกติโนมัยสีททั้งหมดที่ขึ้นบนอาหาร และถ้ามีการเติม tunicamycin และ nalidixic acid ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าสัดส่วนของเชื้อในสกุล *Micromonospora* เพิ่มขึ้น เป็น 97% โดยที่ไม่พบเชื้อสกุล *Microbispora* ส่วนการอบดินที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมงแล้วแช่ในฟีนอล 1.5% พบเชื้อในสกุล *Micromonospora* น้อยกว่า 1% แต่พบว่าเชื้อสกุล *Microbispora* เพิ่มขึ้นจาก 1% เมื่อแยกด้วยวิธีธรรมดาเป็น 66% ของแอกติโนมัยสีททั้งหมดที่ขึ้นบนอาหาร

3. สารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นโดยแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทผลิตสารปฏิชีวนะหลากหลาย ซึ่งสองในสามของสารปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ในปัจจุบันผลิตโดยแอกติโนมัยสีทซึ่งยับยั้งการเจริญหรือฆ่าแบคทีเรียอื่น ยีสต์ และรา (Alexander, 1977) บางชนิดสามารถใช้รักษามนุษย์และสัตว์ได้ (Nolan and Cross, 1988) เชื่อว่าการผลิตสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยสีทอาจมีผลต่อระบบนิเวศวิทยาในดิน เนื่องจากการเพาะปลูกที่ใช้ยากำจัดศัตรูพืช ทำให้ดินเสื่อมคุณภาพและสารพิษตกค้างอยู่ในดิน สารปฏิชีวนะเหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์อย่างกว้างขวางเนื่องจากเป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ มีความเป็นพิษน้อย ย่อยสลายได้ง่าย และราคาถูกกว่าสารประกอบที่สร้างขึ้นจากปฏิกิริยาเคมี

(Goodfellow, 1985) นอกจากสารปฏิชีวนะ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ยังสามารถผลิตสารที่ช่วยส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น thiamineriboflavin flavoprotein วิตามินบี 12 และ coenzyme A (Santos et al., 1976) เป็นต้น ตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่มีขายในท้องตลาดทั้งยามาเชื้อแบคทีเรีย และราหลายชนิดที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย และเป็นยาที่ผลิตจากเชื้อใน genus *Streptomyces* ได้แก่ streptomycin, spectinomycin, neomycin, tetracycline, chlorotetracycline, erythromycin, clindamycin, nystatin, amphotericin B และ chloramphenicol เป็นต้น จึงได้มีการคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น คัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารต่อต้านเชื้อราโดยสารปฏิชีวนะจะทำลายผนังเซลล์ของรา (Ouhdouch et al., 2001) สารต่อต้านเชื้อราหลายชนิดเช่น nikkomycin และ polyoxin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไคตินซินเทสของเชื้อรา (Nolan and Cross, 1988)

Miyadoh (1993) ได้รายงานการศึกษาว่า ประมาณ 70% ของสารปฏิชีวนะที่มีการตีพิมพ์ตั้งแต่ปี 1984-1993 สามารถแยกได้จากเชื้อ Actinomycetes เมื่อเทียบกับสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ และรา เมื่อคิดสัดส่วนของสารปฏิชีวนะที่ได้จาก Actinomycetes พบว่าได้จากสกุล *Streptomyces* ประมาณ 75%

ตารางที่ 1 ยาปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อ *Streptomyces* (Brock and Madigan, 1988)

| Chemical class | Common name | Produced by |
|-----------------|-------------------|---------------------------|
| Aminoglycosides | Streptomycin | <i>S. griseus</i> |
| | Spectinomycin | <i>S. treptomycesspp.</i> |
| | Neomycin | <i>S. fradiae</i> |
| Tetracyclines | Tetracycline | <i>S. aureofaciens</i> |
| | ChlorTetracycline | <i>S. aureofaciens</i> |
| Macrolides | Erythromycin | <i>S. erythreus</i> |
| | Clindamycin | <i>S. lincoinesis</i> |
| Polyenes | Nystalin | <i>S. noursei</i> |
| | Amphocetin | <i>S. nodosus</i> |
| Miscellaneous | Chloraamphenicol | <i>S. venezuelae</i> |

4. การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีท

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt et al., 1994) ได้แบ่งประเภทของเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์เป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ Nocardioforms, Multilocular sporangia, Actinoplanetes, Streptomycetes, Maduromycetes, Thermomonospora, Thermoactinomycetes และกลุ่มที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มต่างๆข้างต้นได้

Group 22 Nocardioforms

เป็นกลุ่มที่เส้นใยมีการแตกหักเป็นแท่งหรือกลมบางชนิดสามารถสร้างโคนิเดีย แอคติโนมัยซีทกลุ่มนี้ทุกสกุลเป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ เชื้อในกลุ่มนี้มีผนังเซลล์เป็น

แบบ I (LL-DAP และ glycine) ที่ผนังเซลล์จะมี mycolic acid และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type A (Arabinose และ Galactose) แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1 ผนังเซลล์มี mycolic acid เป็นองค์ประกอบ

กลุ่มย่อยที่ 2 *Pseudonocardia* และสกุลอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

กลุ่มย่อยที่ 3 *Nocardioidea* และ *Terrabacter*

กลุ่มย่อยที่ 4 *Promicromonospora* และสกุลอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

Group 23 Genera with multilocular sporangia

เชื้อในกลุ่มนี้ใช้ลักษณะ multilocular sporangium เป็นหลักในการจำแนกประเภทแยกออกจากเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มอื่นๆ แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 สกุลดังนี้ *Dermatophilus*, *Geodermatophilus* และ *Frankia* โดยมีลักษณะแตกต่างกันคือเชื้อสกุล *Geodermatophilus* ซึ่งมีเส้นสาขาง่ายๆที่ยังไม่พัฒนามากนัก thullus ทั้งหมดสร้างเป็น sporangium ส่วนสกุล *Dermatophilus* เส้นสาขามีการพัฒนามากขึ้น มีการสร้าง multilocular sporangium แบบยาว และสกุล *Frankia* มีการสร้าง sporangium และ filament ทั้งบริเวณ intercalary swelling ตอนปลายหรือบนกิ่ง lateral branches ทั้ง 3 สกุลจะไม่พบการสร้างเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศ (aerial mycelium)

Group 24 Actinoplanetes

แอคติโนมัยสีทในกลุ่ม Actinoplanetes มีทั้งสิ้น 5 สกุลดังนี้ *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Pilimelia*, *Dactylosporangium* และ *Micromonospora* เชื้อในกลุ่มนี้ส่วนมากอยู่ในน้ำเพราะเป็นกลุ่มที่มีสปอร์เคลื่อนที่ได้ในน้ำในช่วงหนึ่งของวงชีวิตยกเว้น *Micromonospora* ลักษณะสำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือเส้นใยเจริญโดยไม่มีการแตกหัก มีการแตกกิ่งก้านแล้วสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยที่มีผนังกัน เส้นใยมีการพัฒนาน้อยคือจะเห็นเพียงบางๆ เชื้อในกลุ่มนี้มี DAP ที่ผนังเซลล์แบบ III (Meso-DAP และ OH-DAP) และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type D (xylose และ arabinose) *Micromonospora* สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile spore) เกิดขึ้นเดี่ยวๆ ไม่มีก้านหรือมีเพียงสั้นๆ มักพบรวมเป็นกลุ่มมีลักษณะกลมรูปไข่หรือวงรี ผนังหนบบางครั้งพบคุ่มหรือหนามที่ผนังพวกที่สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (motile spore) ใน sporangia หรือ vesicles ซึ่งมีการพัฒนาให้ไปอยู่ที่ส่วนปลายของ sporangiophore มีทั้งขนาดสั้นและยาว สปอร์มักถูกสร้างอยู่ใน sporangium ที่ถูกปกคลุมไว้ด้วยกิ่งก้านที่แตกหักหรือบางทีก็เป็นเส้นใยของ sporogenous hyphae ตรงหรือขดเป็นเกลียว ส่วนของ mutisporous sporangia มีหลายรูปร่าง

Group 25 Streptomycetes and related genera

แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุลดังนี้ *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Kineosporia* และ *Sporichthya* ลักษณะที่สำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือเส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกัน มี

เส้นใยชูขึ้นมาในอากาศและเมื่อเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายโซ่มีจำนวนตั้งแต่ 3 สปอร์ขึ้นไป ผิวของโคโลนีมีลักษณะขุ่นเมื่อมีอายุมากที่ผิวหน้าของเส้นใยมีลักษณะเป็นฝุ่นผงซึ่งก็คือสปอร์ที่สร้างขึ้นนั่นเอง เชื้อในกลุ่มนี้มี DAP ที่ผนังเซลล์เป็นแบบ I (LL-DAP)

Group 26 Maduromycetes

แอกติโนมัยสิตในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 7 สกุลดังนี้ *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetrastora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora* และ *Streptosporangium* กลุ่มนี้เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ สร้างเส้นใยราบที่มีการแตกแขนงไม่มีสปอร์ มีเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศซึ่งมีการสร้าง arthrospore ที่มีลักษณะเป็นสายสั้นหรือใน sporangia ที่มีหนึ่งสปอร์ถึงหลายสปอร์ ผนังเซลล์เป็นแบบ III (meso-DAP) น้ำตาลในเซลล์เป็นแบบ type B คือน้ำตาล 3-O-methyl-D-galactose (madurose)

กลุ่มย่อยที่ 1 *Streptosporangium*

กลุ่มย่อยที่ 2 *Actinomadura*

Group 27 Thermomonospora and related genera

แอกติโนมัยสิตในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุลดังนี้ *Thermomonospora*, *Actinosynnema*, *Nocardiosis* และ *Streptoalloteichus* กลุ่มนี้เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ และสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยที่แตกกิ่งก้านชูขึ้นในอากาศ ผนังเซลล์เป็นแบบ III (meso-DAP) ไม่มี mycolic acid แต่มี menaquinone ที่มี isoprenoid จำนวน 9-10 หน่วย (MK-9, MK-10) การเรียงตัวและลักษณะของสปอร์จะแตกต่างกันไปตามแต่ละสกุล

Group 28 Thermoactinomyces

กลุ่มนี้มีเพียง 1 สกุลคือ *Thermoactinomyces* ซึ่งเป็นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงเชื้อในกลุ่มนี้จะมีเอ็นโดสปอร์อย่างแท้จริงทนความร้อนได้ดี และมีคุณสมบัติของเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรียครบถ้วนมี G+C Content ต่ำกว่าพวกแอกติโนมัยสิตต่างๆ ไป แต่ไปมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อในสกุล *Bacillus* และมีการพัฒนาสร้างเส้นใยอย่างดี มีสัณฐานวิทยาที่ต่างจากเชื้อ *Bacillus* นอกจากนั้นกลุ่มนี้มีการสร้างเส้นใยชูขึ้นมาในอากาศ เช่น *T. dichotomus* มีสีเหลืองส่วนพวกอื่นจะมีสีขาว ทุกสปีชีส์ต้องการอากาศในการเจริญ และเป็นพวกที่ชอบย่อยสลายเศษซากเกือบทั้งหมดเป็นพวกที่ชอบเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูงเจริญได้ไม่ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส ผนังเซลล์กลุ่มนี้เป็นแบบที่ III แต่จะไม่มีน้ำตาลและกรดอะมิโนที่เป็นชนิดจำเพาะสำหรับการจัดจำแนก ส่วน menaquinone เป็นแบบไม่อิ่มตัวเช่น MK-7 หรือ MK-9 ในสปอร์มี dipicolinic acid อยู่ด้วย

Group 29 Other genera

แอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุลดังนี้ *Glycomyces*, *Kibdelosporangium*, *Kitasatosporia* และ *Saccharothrix* เป็นกลุ่มที่ยังหาความสัมพันธ์กับแอกติโนมัยซีทกลุ่มอื่นๆไม่ได้

4.1 ลักษณะทางเคมีที่ใช้จัดจำแนกแอกติโนมัยซีท

พิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของแอกติโนมัยซีทโดยดูจากชนิดของ DAP ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์และชนิดของน้ำตาลในเซลล์ทั้งหมด (whole cell hydrolysate) สามารถจำแนกชนิดขององค์ประกอบของผนังเซลล์แอกติโนมัยซีทได้เป็น 4 รูปแบบ

ตารางที่ 2 รูปแบบผนังเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยซีท (Lechevalier & Lechevalier, 1970)

| Cell wall type | | Whole cell sugar pattern | |
|----------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Type | Major wall amino acid | type | diagnostic sugar |
| I | LL-DAP | - | - |
| II | Meso-DAP | D | xylose, arabinose |
| III | Meso-DAP | B | madurose, no arabinose or xylose |
| | | C | None |
| IV | Meso-DAP | A | arabinose, galactose, no xylose |

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณเขตพื้นที่รับผิดชอบการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (กฟผ.) เขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ทำการเก็บตัวอย่างดินจำนวน 3 ครั้ง ในเดือนมกราคม มีนาคม และกรกฎาคม ในการเก็บตัวอย่างดินจะใช้ปลั๊กตึกเศษใบไม้บริเวณผิวหน้าดินออก จากนั้นจึงตัดดินใส่ไว้ในถุงพลาสติก โดยจะเลือกเก็บตัวอย่างดินที่มีความแตกต่าง และหลากหลายเช่น ดินจอมปลวก ดินกอไผ่ ดินโคนต้นสน ดินที่มีการทับถมกันของใบไม้ ดินข้างเส้นทางเดินในป่า เป็นต้น

1.1 การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของดิน

1.1.1 การตรวจวัดปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน (Horwitz, 2000)

ปริมาณความชื้นในดิน หรือ “water content” เป็นค่าที่แสดงสัดส่วนของน้ำหนักน้ำต่อน้ำหนักของดิน ซึ่งค่านี้จะแสดงในรูปของร้อยละ (%) ของน้ำหนักดินที่ใช้วิเคราะห์ ขั้นตอนการหาปริมาณน้ำในดินมีดังนี้

พับ aluminum foil ให้มีลักษณะเป็นถ้วย นำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (ทศนิยม 3 ตำแหน่ง, W1) ใส่ตัวอย่างดินลงในถ้วย aluminium foil ประมาณ 1-2 กรัม จดบันทึกน้ำหนักที่ได้ (ทศนิยม 3 ตำแหน่ง, W2) นำถ้วย aluminium foil ที่มีดินอยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ทำการอบซ้ำจนได้น้ำหนักที่คงที่ ชั่งน้ำหนักที่คงที่ในครั้งสุดท้ายนี้ (ทศนิยม 3 ตำแหน่ง, W3) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณน้ำในดิน (%WC) จากสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำในดิน (\%WC)} = (W2-W3)/(W2-W1) \times 100$$

เมื่อ W1 คือน้ำหนักถ้วย aluminum foil (กรัม)

W2 คือน้ำหนักดิน และถ้วย aluminum foil ก่อนอบ (กรัม)

W3 คือน้ำหนักดิน และถ้วย aluminum foil หลังอบ (กรัม)

1.1.2 การตรวจวัดค่า pH ของตัวอย่างดิน (Horwitz, 2000)

ค่าความเป็นกรดต่าง แสดงถึงระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนของสารตัวอย่างที่ต้องการวัด โดยทั่วไปความเป็นกรดต่างในดินตะกอนมีค่าลดลงตามความลึก การลดลงของความเป็นกรดต่างตามความลึกนั้น อาจเกิดเนื่องจากผลผลิตของแบคทีเรีย เช่น คาร์บอน ไดออกไซด์ และผลจากกระบวนการ sulfate reduction โดยจุลินทรีย์บางชนิด การวัดความเป็นกรดต่างของดินมีขั้นตอนดังนี้

ชั่งตัวอย่างดินมาประมาณ 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร กวนให้เนื้อดินและน้ำผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที วัดค่าความเป็นกรดต่างจากสารละลายใส่ที่อยู่ส่วนบนด้วย pH meter

2. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินมาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม 5-7 วัน ก่อนนำมาทำการแยกหาเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยผ่านกระบวนการ pretreatment และ non-pretreatment ตัวอย่างดินดังนี้

2.1 การแยกเชื้อโดยใช้วิธี non-pretreatment (Seong et al., 2001)

นำดินที่ผ่านการผึ่งแห้ง 5 กรัม มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ด้วยวิธี ten-fold dilution ให้ได้ความเจือจางต่างๆ กัน ไปเปิดสารละลายดินในแต่ละความเจือจางมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร starch casein nitrate agar (SCA) ที่เติม cycloheximide 100 mg/L และ nalidixic 50 mg/L บ่มที่อุณหภูมิ 28°C นาน 7-21 วัน

2.2 การแยกเชื้อโดยอาศัยการ pretreatment ในสารละลาย SDS และ yeast extract

วิธีนี้นิยมใช้แยกเชื้อในจินัส *Streptomyces* รวมถึงจินัสแอคติโนมัยซีทอื่นๆ โดยแบคทีเรียทั่วไปจะถูกยับยั้งหรือทำลาย (Hayakawa & Nonomura, 1989)

นำดินที่ผ่านการผึ่งแห้ง 5 กรัม มาแขวนลอยในสารละลายที่ประกอบด้วย 0.05% SDS และ 6% yeast extract นำไปบ่มใน water bath ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการเจือจางด้วยวิธี ten-fold dilution ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเจือจางต่างๆ กัน ไปเปิดสารละลายดินในแต่ละความเจือจางมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร starch casein nitrate agar (SCA) ที่เติม cycloheximide 100 mg/L และ nalidixic 50 mg/L บ่มที่อุณหภูมิ 28°C นาน 7-21 วัน

2.3 การแยกเชื้อโดยอาศัยการ pretreatment ด้วยการอบดินที่ 120°C นาน 1 ชั่วโมง

วิธีนี้ช่วยเพิ่มสัดส่วนการเจริญของเชื้อในกลุ่ม rare actinomycetes รวมถึงเชื้อในจินัส *Spirilliplanes* (Tamura et al., 1997; Hayakawa et al., 1991)

นำดินตัวอย่างไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 120^oซ. นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางตัวอย่างดินด้วยวิธี ten-fold dilution ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเจือจางต่างๆ กัน ไปเปิดสารละลายดินในแต่ละความเจือจางมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร starch casein nitrate agar (SCA) ที่เติม cycloheximide 100 mg/L และ nalidixic 50 mg/L บ่มที่อุณหภูมิ 28^oC นาน 7-21 วัน

2.4 การแยกเชื้อโดยอาศัยการ pretreatment ใน 1.5% phenol นาน 20 นาที

วิธีนี้ช่วยเพิ่มสัดส่วนการเจริญของเชื้อในกลุ่ม *Micromonospora* (Hayakawa et al., 1991) นำดินที่ผ่านการผึ่งแห้งมา 5 กรัม เติมลงในฟลask ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีสารละลาย 1.5% phenol ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำสารแขวนลอยของดินไปแช่ในน้ำ water bath อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการเจือจางด้วยวิธี ten-fold dilution ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเจือจางต่างๆ กัน ไปเปิดสารละลายดินในแต่ละความเจือจางมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร starch casein nitrate agar (SCA) ที่เติม cycloheximide 100 mg/L และ nalidixic 50 mg/L บ่มที่อุณหภูมิ 28^oC นาน 7-21 วัน

เลือกโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยสิทที่เจริญบนอาหาร SCA ในแต่ละวิธีที่มีลักษณะแตกต่างกัน เก็บเชื้อที่ได้บนอาหารเลี้ยง ISP2 สำหรับใช้ในระยะเวลาสั้น และเก็บเชื้อในกลีเซอรอล 20% ที่ -70^oซ. สำหรับใช้ในระยะเวลา

3. การคัดเลือกหาเชื้อแอกติโนมัยสิทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยสิทในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ใช้วิธีการทดสอบ 2 วิธี ได้แก่ perpendicular-streak method (Selvin et al., 2009) และ dual culture method (Taechowisan et al., 2005)

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบในกลุ่มแบคทีเรีย ได้แก่ *Ralstonia solanacearum* ที่แยกได้จากมันฝรั่ง (Rs P) และที่แยกได้จากมะเขือเทศ (Rs T), *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ที่แยกได้จาก แตงกวา จังหวัดนครปฐม (Aac CU), ผลแตงโม จังหวัดราชบุรี (Aac WS) และใบแตงโม จังหวัดสุพรรณบุรี (Aac SK), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* และ *Salmonella enteritica* serovar Typhimurium สำหรับในกลุ่มเชื้อรา ได้แก่ *Fusarium oxysporum* ที่แยกได้จาก melon, *Sclerotium rolfii* ที่แยกได้จากถั่วพุ่ม, *Colletotrichum capsici* ที่แยกได้จาก ผลพริก, *Colletotrichum gloeosporioides* ที่แยกได้จากมะม่วง และ *Candida albicans* สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และราก่อโรคพืชได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร.

พิศาล ศิริขรรค์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และเชื้อแบคทีเรียก่อโรคคน และสัตว์ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. เสาวนิต ทองพิมพ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.1 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งด้วยวิธี **perpendicular streak**

ทำการขีดเชื้อแอสคิโนมัยซีท ลงในงานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Mueller–Hinton agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°C. นาน 5 วัน ขีดลากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืช ได้แก่ Rs P, Rs T, Aac CU. Aac WS, Aac SK และเชื้อก่อโรคคน-สัตว์ ได้แก่ MRSA, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritica* serovar Typhimurium, *Streptococcus agalactiae* และ *Candida albicans* ให้ตั้งฉากกับโคโลนิของเชื้อแอสคิโนมัยซีท วัดบริเวณการยับยั้ง หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 28°C สำหรับเชื้อก่อโรคพืช และบ่มที่อุณหภูมิ 35°C สำหรับเชื้อก่อโรคคน-สัตว์ นาน 18–24 ชั่วโมง (Ndonde & Semu., 2000; Ceylan et al., 2008)

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งด้วยวิธี **dual culture**

เลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยซีท โดย ขีดเชื้อลงบนผิวหน้าของอาหาร ISP2 agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°C. นาน 5 วัน ใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะชั้นวุ้นบริเวณขอบเชื้อ นำไปวางบนงานอาหาร ISP2 agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 28°C. นาน 5 วัน จากนั้นจึงใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะเชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides* ที่เจริญอยู่ก่อนแล้วบนอาหาร PDA นำแผ่น agar disc ไปวางในงานอาหาร ISP2 agar ให้ห่างจากเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่เจริญอยู่ก่อนแล้วเป็นระยะทาง 25 มิลลิเมตร สำหรับงานควบคุมให้นำ agar disc ของเชื้อราก่อโรคพืช ไปวางตำแหน่งตรงกลางงานอาหาร ISP2 agar ทำการบ่มงานอาหาร ISP2 agar ที่อุณหภูมิ 28°C. เป็นเวลา 3–8 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา วัดระยะทางการยับยั้ง เพื่อคำนวณหา เปอร์เซ็นต์ inhibition (Taechowisan et al., 2005)

$$\% \text{ Inhibition} = (A-B)/A \times 100$$

A = รัศมีของเชื้อราในงานอาหารควบคุม

B = รัศมีของเชื้อราในงานอาหารทดสอบ

4. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้มาจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และทางเคมีของเชื้อ ตามลักษณะที่บรรยายใน Atlas of Actinomycetes (Miyadoh et al., 1997) และ Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Williams et al., 1989)

4.1 ศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงบนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP) ตามวิธีการที่ได้รายงานไว้โดย Shirling & Gottlieb (1966) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C. เป็นเวลา 14 วัน สังเกตลักษณะของโคโลนี สีของ aerial mycelium สีของ substrate mycelium และ diffusible pigment

4.2 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้อง phase contrast microscope

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ISP2 agar โดยขีดลากเชื้อตามแบบ cross-hatch จากนั้นเสียบ cover slip ปลอดเชื้อที่ผ่านการ autoclave ทำมุม 45 องศา ด้วยเทคนิค incline slide culture (Williams & Davies, 1967) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28°C. เป็นเวลา 7-14 วัน นำกระจกปิดสไลด์ (cover slips) ไปศึกษาลักษณะสายโซ่สปอร์ของเชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด phase contrast microscope

4.3 ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ (chemotaxonomy)

ทำการวิเคราะห์ diaminopimelic acid (DAP) และรูปแบบน้ำตาล (whole-cell sugar) ตามวิธีของ (Hasegawa et al., 1983; Becker et al., 1964)

4.3.1 การเตรียมเซลล์สำหรับวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์

เจาะเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหาร ISP2 อายุ 5 วัน ด้วย cork borer ขนาด 6 มิลลิเมตร จำนวน 6 ชิ้น ลงในอาหาร ISP2 broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง นำเซลล์มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C. นานข้ามคืน

4.3.2 การวิเคราะห์ชนิดของ 2,6 diaminopimelic acid (DAP)

ชั่งเซลล์แห้งหนัก 50 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เดิมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไป autoclave 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปวิเคราะห์ DAP ด้วยวิธี thin layer chromatography โดยไปเปิดสารละลายเซลล์ที่ผ่านการย่อยมา 1.5 ไมโครลิตร spot ลงใน cellulose TLC plate หรือ cellulose Whatman No. 1 (20x20 cm.) แต่ละจุดให้ห่างกัน 1 เซนติเมตร เว้นขอบซ้าย ขวาไว้ 1 เซนติเมตร

และขอบล่าง 2.5 เซนติเมตร สำหรับสารมาตรฐานใช้ 0.01 M DL-DAP ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำแผ่น TLC จุ่มลงในอ่างซึ่งมีตัวชะประกอบด้วย เมธานอล น้ำ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มอล และไพรีดีน ในอัตราส่วน 80:26:4:10 (v/v) สารละลายตัวชะจะซึมผ่าน และนำสารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่ขึ้นไปบนแผ่นเซลลูโลส โดยใช้เวลานานประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจน solvent front เคลื่อนที่ขึ้นไปห่างจากขอบบนของแผ่น TLC ประมาณ 2 เซนติเมตร นำแผ่น TLC มาผึ่งให้แห้ง จากนั้นสเปรย์ 0.2% ninhydrin ที่ละลายในบิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ ด้วย atomizer จากนั้นนำแผ่น TLC ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง และ solvent front คำนวณหาค่า R_f เพื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน DL-DAP ถ้าตัวอย่างเป็น meso-DAP จะนำไปวิเคราะห์น้ำตาลต่อไป

4.3.3 การวิเคราะห์น้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์

ซึ่งเซลล์แห้งหนัก 50 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดสอบแล้วเติมกรดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิตร นำไปย่อยที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลของผนังเซลล์ด้วยวิธี thin layer chromatography โดยไปเปิดสารละลายเซลล์ที่ผ่านการย่อยมา 1 ไมโครลิตร spot ลงบน cellulose TLC plate หรือ cellulose Whatman No.1(20x20 cm.) โดยให้แต่ละจุดห่างกัน 1.5 เซนติเมตร เว้นขอบซ้าย ขวาไว้ 1 เซนติเมตร และขอบล่าง 2.5 เซนติเมตร สำหรับสารมาตรฐานมี 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ น้ำตาล แรมโนส ไซโลส แมนโนส และกาแลคโตส กลุ่มที่ 2 คือน้ำตาล ไรโบส, อะราบิโนส และกลูโคส น้ำตาลแต่ละชนิดมีเข้มข้น 0.1 % (w/v) นำแผ่น TLC จุ่มลงในอ่างซึ่งมีสารละลายตัวชะประกอบด้วย บิวทานอล น้ำ ไพรีดีน และโทลูอีน ในอัตราส่วน 10: 6: 6: 1 (v/v) สารละลายตัวชะจะซึมผ่านและนำสารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่ขึ้นไปบนแผ่นเซลลูโลส โดยใช้เวลานานประมาณ 4 ชั่วโมง หรือจน solvent front เคลื่อนที่ขึ้นไปห่างจากขอบบนของแผ่น TLC ประมาณ 2 เซนติเมตร นำแผ่น TLC มาผึ่งให้แห้ง จากนั้นสเปรย์ด้วยสารละลาย 3.25% phthalic acid (w/v) ที่ละลายใน water-saturated n-butanol ที่มี aniline ผสมอยู่ด้วย 0.02% (v/v) จากนั้นนำแผ่น TLC ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จะปรากฏแถบสีของน้ำตาลชนิดต่างๆ ขึ้น ทำการเปรียบเทียบสีและตำแหน่งของแถบที่เกิดกับสารมาตรฐานของน้ำตาลชนิดต่างๆ

บทที่ 4

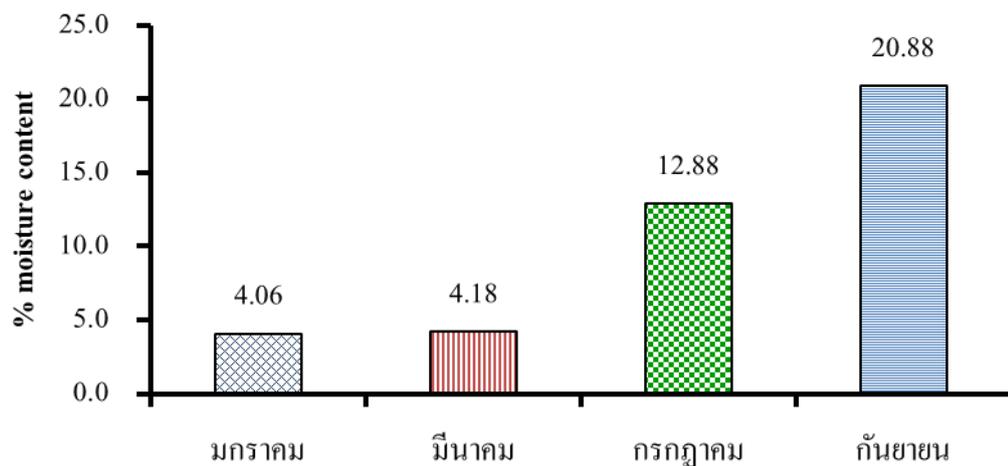
ผลการวิจัยและอภิปราย

1. คุณสมบัติทางกายภาพของดิน

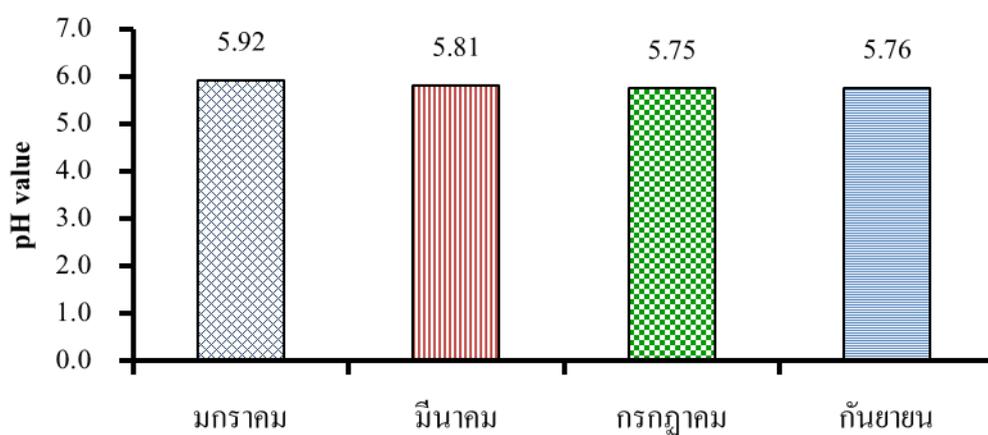
ตัวอย่างดินทั้งหมดจำนวน 81 ตัวอย่าง จากการเก็บ 4 ครั้ง ในเดือนมกราคม มีนาคม และ กรกฎาคม บริเวณเขตพื้นที่รับผิดชอบการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (กฟผ.) เขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ตัวอย่างดินมีลักษณะแตกต่างกัน และหลากหลาย เช่น ดินจอมปลวก ดินกอไผ่ ดินไถลี้ล้าธาร ดินที่มีการทับถมกันของใบไม้ ดินข้างเส้นทางเดินในป่า เป็นต้น ซึ่งแสดงลักษณะตัวอย่างดินใน (ตารางผนวก ก1) การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน 81 ตัวอย่าง ประกอบด้วย การตรวจวัดปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน การตรวจวัดค่า pH ของตัวอย่างดิน และการตรวจวัดอุณหภูมิของตัวอย่างดิน แสดงในรูปที่ 1-3 ตามลำดับ เปรียบเทียบความชื้นเฉลี่ยในตัวอย่างดินสูงสุดเท่ากับ 20.88 ในการเก็บครั้งที่ 4 เดือน กันยายน ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน ในระหว่างเก็บตัวอย่างมีฝนตกตลอดเวลา และต่ำสุดเท่ากับ 4.06 ในการเก็บครั้งที่ 1 เดือน มกราคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาว ค่าพีเอชเฉลี่ยของตัวอย่างดินในการเก็บทั้ง 4 ครั้ง มีค่าไม่ต่างกัน ซึ่งอยู่ระหว่าง 5.75-5.92 มีสภาพเป็นกรดอ่อน และค่าอุณหภูมิเฉลี่ยของตัวอย่างดิน ในการเก็บทั้ง 4 ครั้ง มีค่าไม่ต่างกัน ซึ่งอยู่ระหว่าง 22.80-28.63 °ซ

2. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดิน

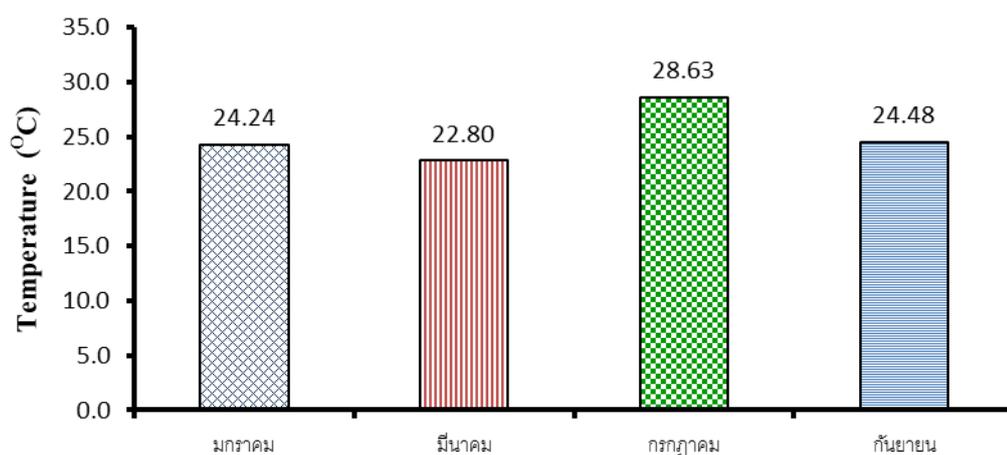
การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินเขื่อนสิรินธร โดยใช้อาหาร SCA ในการเพาะเลี้ยงแสดงในรูปที่ 4 สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 129 ไอโซเลท และนับจำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมดในตัวอย่างดินมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.00×10^5 โคโลนีต่อกรัมดินแห้ง Goodfellow and Williams (1983) รายงานว่าเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าในที่แห้งค่อนข้างแห้ง มีชีวมีค และมี calcareous พบจำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีทค่อนข้างโดดเด่นกว่าเชื้อประจำถิ่น (microflora) มีจำนวน 10^6 ต่อกรัมดินแห้ง แสดงให้เห็นว่าจำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีทที่พบในดินบริเวณเขื่อนสิรินธรมีจำนวนน้อยกว่างานวิจัยคนอื่น เป็นผลมาจากลักษณะตัวอย่างดินที่เก็บมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 5.75-5.92 ซึ่งมีสภาพเป็นกรดอ่อน จึงไม่ค่อยเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเชื้อแอคติโนมัยซีท จากรายงานของ (Williams and Wellington, 1982; Goodfellow and Williams, 1983) ได้รายงานไว้ว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่ เป็นเชื้อในกลุ่ม chemo organotrophic, aerobic, mesophilic และสภาพพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญจะค่อนข้างเป็นกลาง



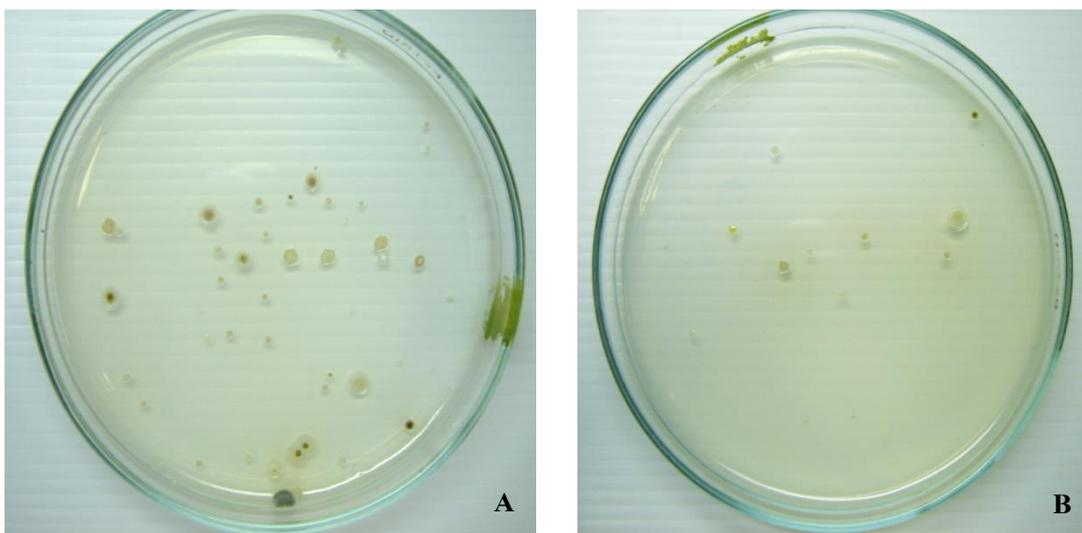
รูปที่ 1 ปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินบริเวณเขื่อนสิริกิติ์จากการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง



รูปที่ 2 ค่าพีเอชในตัวอย่างดินบริเวณเขื่อนสิริกิติ์จากการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง



รูปที่ 3 ค่าอุณหภูมิในตัวอย่างดินบริเวณเขื่อนสิริกิติ์จากการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง

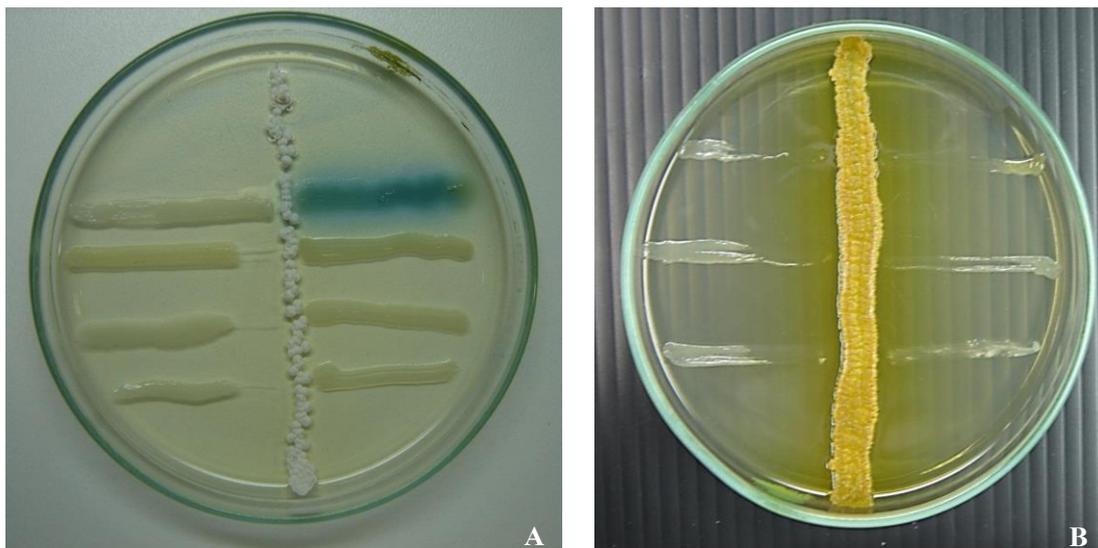


รูปที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยสัที่แยกจากดินบนอาหาร SCA; (A) ความเจือจางที่ 10^{-3} (B) ความเจือจางที่ 10^{-4} บ่มที่อุณหภูมิ 28°C . เป็นเวลา 7 วัน

3. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยสัในการยับยั้งเชื้อก่อโรค คน สัตว์ พืช

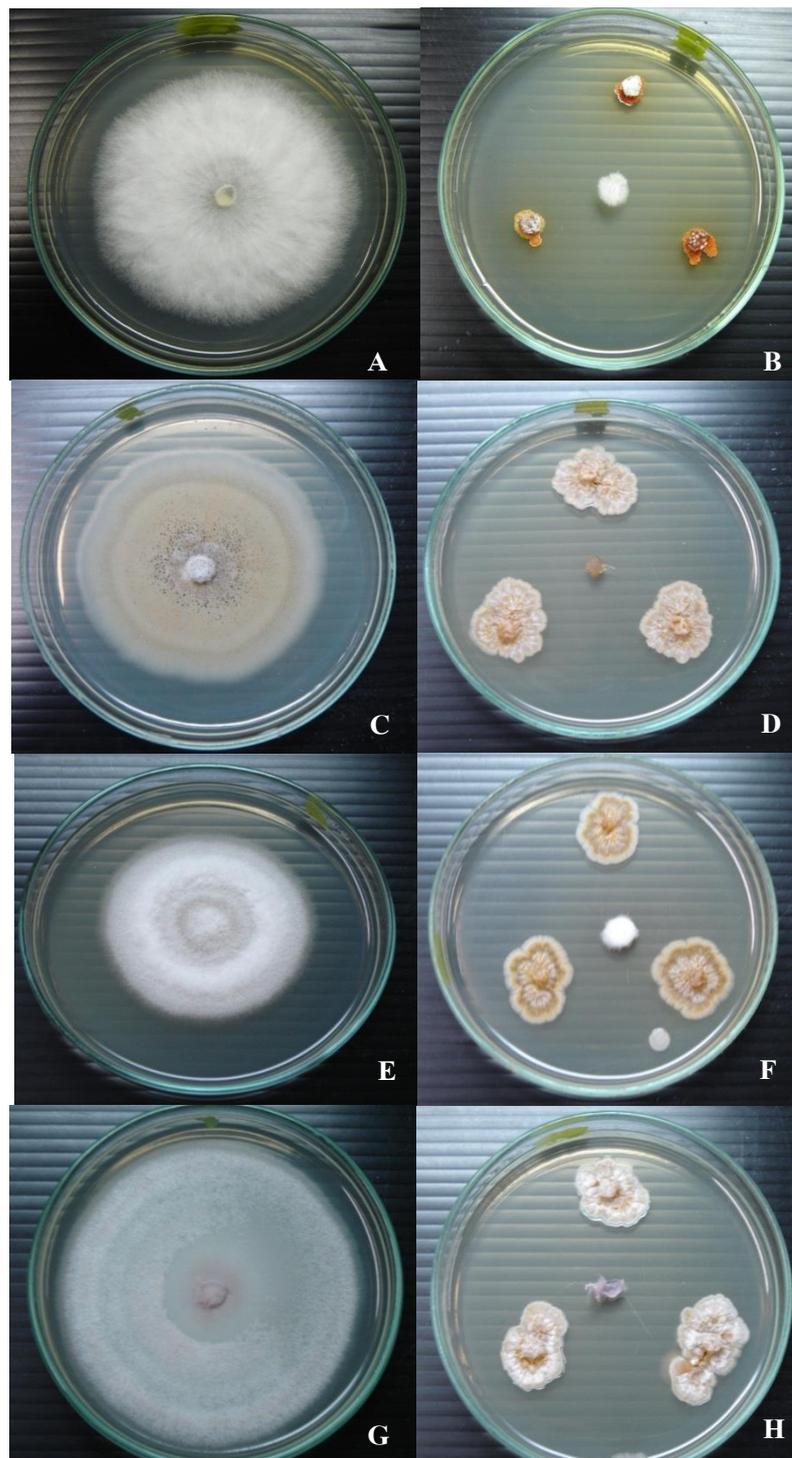
นำเชื้อแอกติโนมัยสัจำนวน 129 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรค ด้วยวิธี perpendicular streak (รูปที่ 5) และวิธี dual culture (รูปที่ 6) พบว่า 37 ไอโซเลท (29%) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา สาเหตุโรค คน สัตว์ พืช มี 8 ไอโซเลท (6%) สามารถยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียทดสอบ มี 48 ไอโซเลท (37%) สามารถยับยั้งเฉพาะเชื้อราทดสอบ และ 36 ไอโซเลท (28%) ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ นอกจากนี้ 93 ไอโซเลท (72%) จากทั้งหมด 129 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคน้อย 1 ชนิด ดังแสดงในตารางผนวก ก1 และรูปที่ 7 ซึ่งผลการทดลองใกล้เคียงกับ Alexander (1977) กล่าวว่า เชื้อ *Streptomyces* ที่แยกได้จากดิน มากกว่า 75% สามารถผลิตยาปฏิชีวนะได้ แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างดินที่เก็บจากเขื่อนสิรินธร เป็นแหล่งดินที่มีศักยภาพในการแยกเชื้อแอกติโนมัยสัที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค คน สัตว์ พืช

เมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่า 18 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สายพันธุ์ AacCU 16 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สายพันธุ์ AacWS 18 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สายพันธุ์ AacSK 25 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) 33 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ RsT 34 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ Rs P 40 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* 71 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *C. capsici* 63 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* 41 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum* ซึ่งแสดงในรูปที่ 8

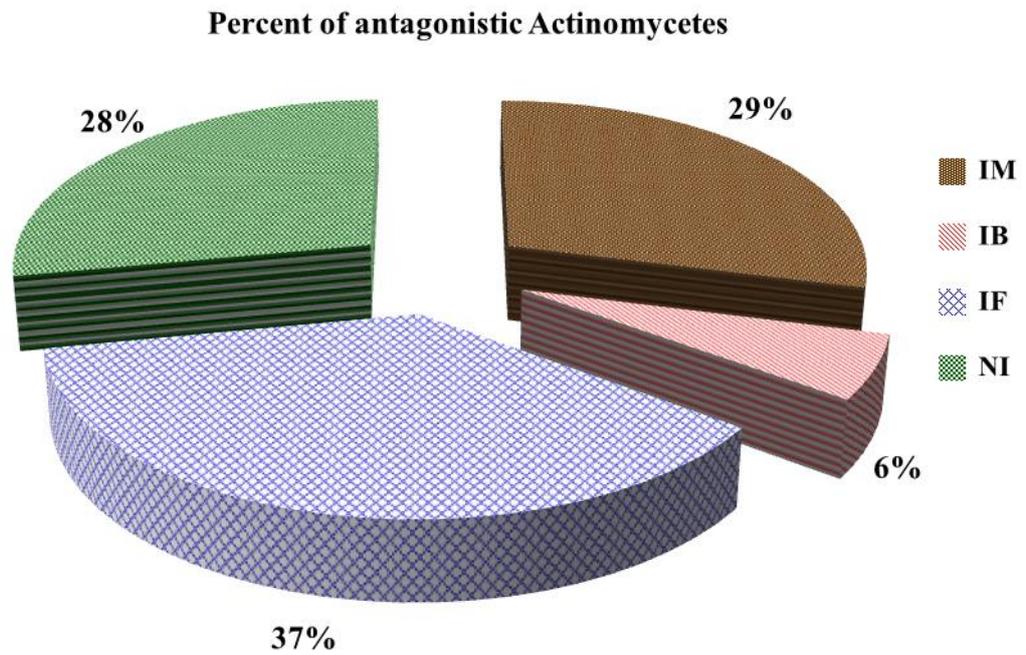


รูปที่ 5 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรค คน สัตว์ พืช ของเชื้อแอคติโนมัยสิท ด้วยวิธี perpendicular streak technique; (A) เชื้อก่อโรคคน สัตว์ (B) เชื้อก่อโรคพืช

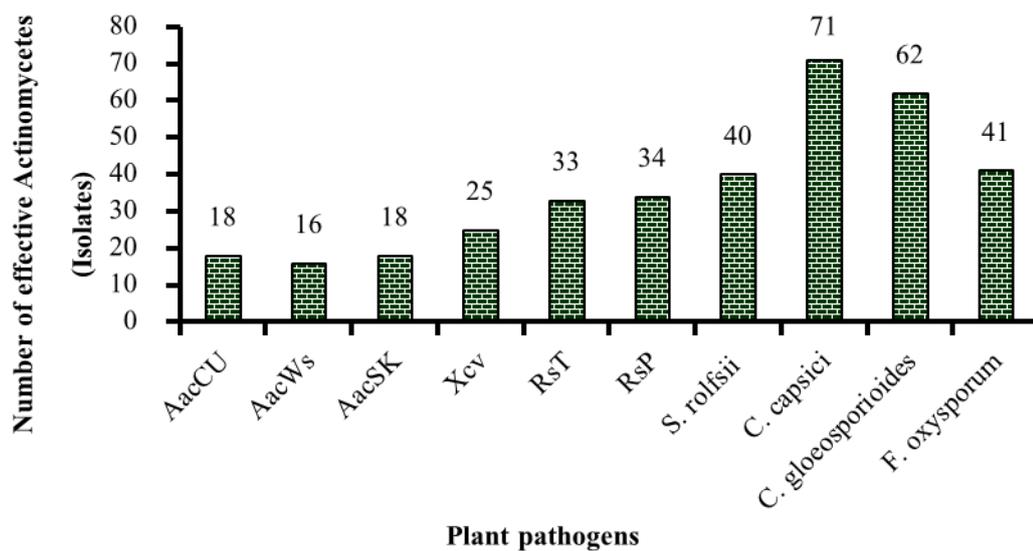
ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราสาเหตุโรค คน สัตว์ พบว่า 21 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* 16 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ MRSA 26 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* 20 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *S. agalactia* 2 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* 11 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* 4 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *E. coli* 6 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ดังแสดงในรูปที่ 9



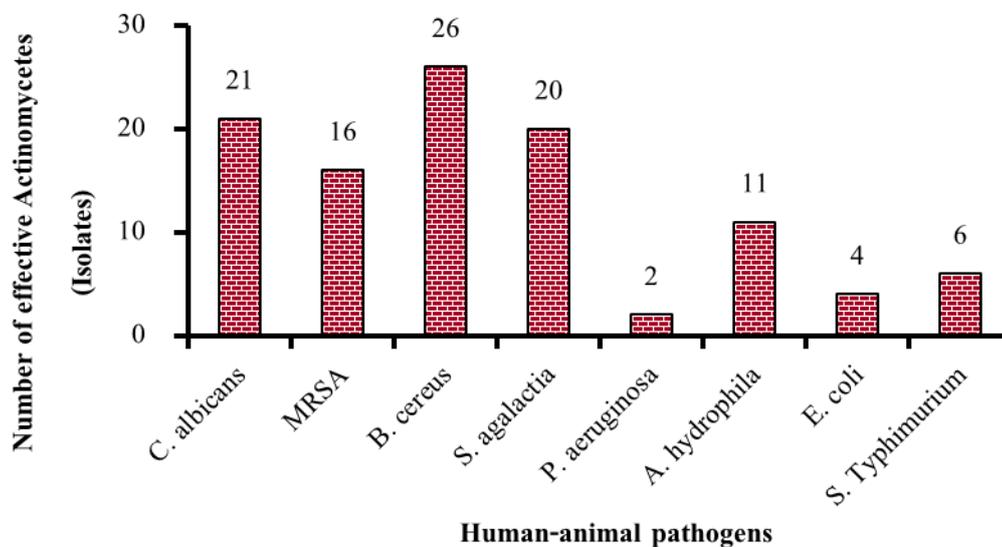
รูปที่ 6 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชด้วยวิธี Dual culture techniques;
 (A-B) *Sclerotium rolfsii*, (C-D) *Colletotrichum capsici*; (E-F) *C. gloeosporioides*
 (G-H) *Fusarium oxysporum*



รูปที่ 7 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อปฏิชีวนะแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (IM) ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรีย (IB) ยับยั้งเฉพาะเชื้อรา (IF) ไม่ยับยั้ง (NI)



รูปที่ 8 จำนวนเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคพืช



รูปที่ 9 จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคคน-สัตว์

คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพสูง ทั้ง 15 ไอโซเลท โดยใช้เกณฑ์ แสดงระยะทางการยับยั้งมากกว่า 30 มิลลิเมตร จากการทดสอบวิธี perpendicular streak (Ndonde and Semu, 2000) และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 75% จากวิธี Dual culture (Alimuddin et al., 2011) พบว่า 14 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้งแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรค และ 1 ไอโซเลท สามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อราทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้เชื้อที่คัดเลือกบางไอโซเลท เช่น ไอโซเลท S23, S34 และ S80 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราทดสอบทั้ง 4 ชนิด คือ *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides* และ *Fusarium oxysporum* ได้ 100 % ซึ่งผลการยับยั้งดีกว่าการทดลองของ Getha et al. (2005) ที่ใช้เชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ g10 ในการยับยั้งเชื้อ *Fusarium oxysporum* race 1, 2, และ 4 ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งระหว่าง 80-94% เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพสูงทั้ง 15 ไอโซเลท จะนำไประบุในระดับจีโนมต่อไป

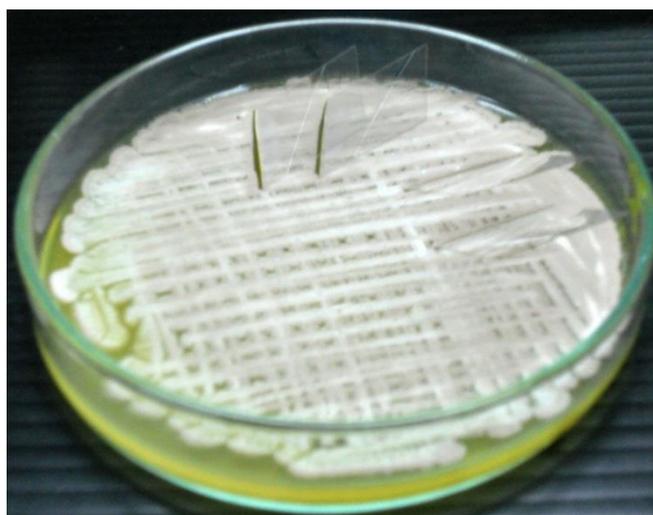
ตารางที่ 3 การยับยั้งเชื้อก่อโรค คน สัตว์ พืช ของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพสูง ทั้ง 15 ไอโซเลท ที่คัดเลือกได้จากดินเขื่อนสิรินธร

| Isolates | ระยะทางการยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | | | | | | | | | | เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง | | | |
|----------|-------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------------------|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| S13 | 13 | 10 | 12 | 26 | 20 | 21 | 0 | 32 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 93 | 100 | 100 | 89 |
| S15 | 0 | 0 | 0 | 20 | 28 | 28 | 5 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 93 | 96 | 86 |
| S19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 11 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 96 | 100 |
| S23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| S24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 15 | 15 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 96 | 100 |
| S27 | 13 | 13 | 12 | 24 | 10 | 14 | 3 | 32 | 37 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 97 | 57 | 75 | 75 |
| S34 | 21 | 14 | 15 | 16 | 16 | 6 | 6 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| S36 | 11 | 14 | 17 | 21 | 20 | 18 | 10 | 34 | 30 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 90 | 93 | 90 |
| S53 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 13 | 0 | 0 | 16 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 90 | 86 | 100 |
| S80 | 29 | 33 | 32 | 30 | 31 | 28 | 0 | 0 | 20 | 28 | 16 | 30 | 14 | 27 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| S83 | 19 | 15 | 14 | 23 | 10 | 14 | 16 | 28 | 27 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 94 | 94 | 94 |
| S84 | 7 | 3 | 3 | 6 | 30 | 5 | 0 | 0 | 20 | 10 | 0 | 0 | 0 | 11 | 100 | 90 | 91 | 84 |
| S85 | 4 | 12 | 9 | 23 | 17 | 14 | 5 | 23 | 30 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 90 | 94 | 94 | 93 |
| S111 | 12 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 25 | 0 | 3 | 10 | 0 | 30 | 0 | 0 | 100 | 100 | 96 | 100 |
| S113 | 30 | 25 | 25 | 16 | 28 | 29 | 20 | 0 | 5 | 17 | 0 | 30 | 26 | 16 | 100 | 100 | 94 | 100 |

4. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสิต

4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการศึกษาลักษณะของโคโลนีด้วยตาเปล่า รวมถึงลักษณะของสายโซ่สปอร์จากการทำ incline slide technique ดังแสดงในรูปที่ 10 แล้วนำไปส่องกล้อง Phase contrast microscope พบว่า เชื้อแอคติโนมัยสิตที่มีประสิทธิภาพจำนวน 15 ไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร ISP2 แสดงสีของเส้นใย และลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2

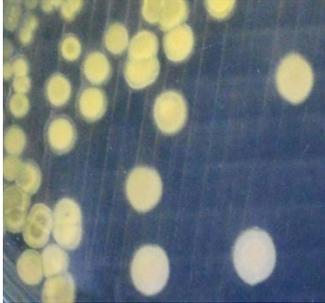
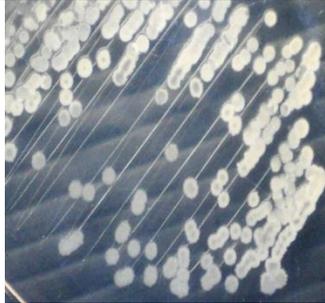


รูปที่ 10 การทำ incline slide culture technique

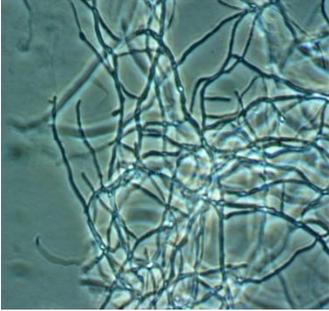
4.2 การจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ (chemotaxonomy)

นำเชื้อแอคติโนมัยสิตทั้ง 15 ไอโซเลต มาวิเคราะห์หาชนิดของ 2,6-diaminopimelic acid (DAP) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสิตจำนวน 9 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต S15, S24, S27, S36, S53, S85, S111 และ S113 มีชนิดของ DAP เป็น LL-DAP และเชื้อแอคติโนมัยสิตจำนวน 5 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต S13, S19, S23, S34 และ S80 มีชนิดของ DAP เป็น Meso-DAP ซึ่งแสดงในรูปที่ 11 จากรายงานการจัดจำแนกแบคทีเรียของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 4 แสดงให้เห็นว่า แอคติโนมัยสิตส่วนใหญ่ ที่มีชนิดของ 2,6-diaminopimelic acid (DAP) เป็นแบบ LL-DAP จะจัดจำแนกอยู่ในจีนัส *Streptomyces* ซึ่งเชื้อในจีนัส *Streptomyces* มีลักษณะของสายโซ่สปอร์ 3 แบบ ได้แก่ rectiflexibles, retinaculiaperti และ spirales ซึ่งแอคติโนมัยสิตทั้ง 9 ไอโซเลตนี้มีคุณลักษณะตรงกับเชื้อในจีนัส *Streptomyces* และแอคติโนมัยสิตอีก 5 ไอโซเลต เป็นแบบ Meso-DAP จึงจัดอยู่ในกลุ่ม non-*Streptomyces*

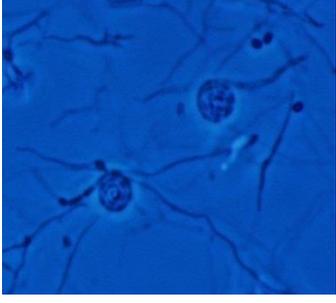
ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงบนอาหาร ISP-2 ซึ่งบ่มที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-14 วัน

| Isolates | Color of colony | Digital camera | | Spore chain | Colony characters |
|----------|---|---|--|---|---|
| | | Top view | Bottom view | | |
| S13 | AM: เหลือง SM: เหลือง SC: ขาว DP: เหลือง |  |  |  Open spirals | โคโลนีรูปร่างกลม(Circular) ระดับความนูนค่อนข้างหนา (Raised) ผิวหน้าเป็นวงแหวน ซ้อนกันหลายชั้น(Concentrically ringed) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |
| S15 | AM: ขาว SM: ขาว SC:เทา DP: - |  |  |  Open spirals | โคโลนีรูปร่างกลม(Circular) ระดับความนูนค่อนข้างหนา (Raised) ผิวหน้าเป็นสันนูน รัศมี ออกจากศูนย์กลาง (Radiately ridged) ขอบโคโลนีเป็นคลื่น โค้ง หรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |

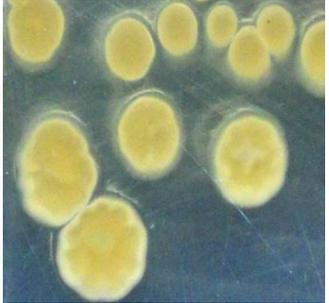
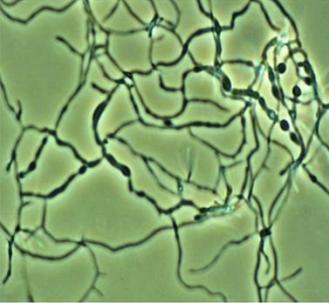
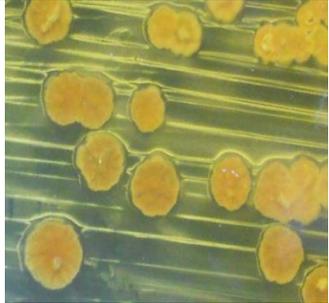
ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงบนอาหาร ISP-2 ซึ่งบ่มที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-14 วัน (ต่อ)

| Isolates | Color of colony | Digital camera | | Spore chain | Colony characters |
|----------|---|--|---|---|---|
| | | Top view | Bottom view | | |
| S19 | AM: เหลือง SM: เหลือง SC: ขาว DP: เหลือง |  |  |  สปอร์อยู่ภายในเส้นใย | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) โคโลนีนูน มีรูอยู่ตรงกลาง (Crateriform) ผิวหน้าโคโลนี เป็นรอยย่น (Rugose) ขอบ โคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้า เพียงเล็กน้อย (Undulate) |
| S23 | AM: น้ำตาลเข้ม SM: น้ำตาลอ่อน SC: ขาว DP: น้ำตาล |  |  | - | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) โคโลนีนูน มีรูอยู่ตรงกลาง (Crateriform) ผิวหน้าเป็นวง แหวนซ้อนกันหลายๆ ชั้น (Concentrically ringed) ขอบ โคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้า เพียงเล็กน้อย (Undulate) |

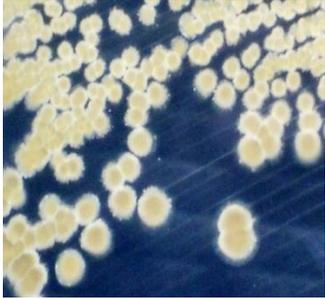
ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงบนอาหาร ISP-2 ซึ่งบ่มที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-14 วัน (ต่อ)

| Isolates | Color of colony | Digital camera | | Spore chain | Colony characters |
|----------|---|---|--|---|---|
| | | Top view | Bottom view | | |
| S24 | AM: น้ำตาล SM: น้ำตาลเข้ม SC: เทา DP: น้ำตาล |  |  |  Open spirals | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) โคโลนีมีรูอยู่ตรงกลาง (Crateriform) ผิวหน้าเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายๆ ชั้น (Concentrically ringed) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |
| S27 | AM: ขาว SM: เหลือง SC: เทา DP: เหลือง |  |  |  Closed spirals | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) ระดับความนูนค่อนข้างหนา (Raised) ผิวหน้าโคโลนีเรียบ (Entire) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงบนอาหาร ISP-2 ซึ่งบ่มที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-14 วัน (ต่อ)

| Isolates | Color of colony | Digital camera | | Spore chain | Colony characters |
|----------|---|---|--|---|---|
| | | Top view | Bottom view | | |
| S34 | AM: น้ำตาล SM: เหลือง SC: เทา DP: เหลือง |  |  |  สปอร์อยู่ภายในเส้นใย | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) โคโลนีมีรูอยู่ตรงกลาง (Crateriform) ผิวหน้าเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายๆ ชั้น (Concentrically ringed) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |
| S36 | AM: ขาว SM: เหลือง SC: ขาว DP: เหลือง |  |  |  Open spirals | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) ระดับความนูนค่อนข้างหนา (Raised) ผิวหน้าเป็นสันนูน รัศมีออกจากศูนย์กลาง (Radiately ridged) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |

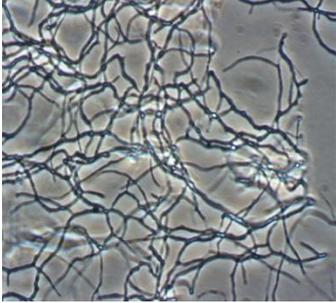
ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงบนอาหาร ISP-2 ซึ่งบ่มที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-14 วัน (ต่อ)

| Isolates | Color of colony | Digital camera | | Spore chain | Colony characters |
|----------|--|--|---|---|---|
| | | Top view | Bottom view | | |
| S53 | AM: ขาว SM: เหลือง SC: เทา DP: - |  |  |  Open spirals | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) ระดับความนูนค่อนข้างหนา (Raised) ผิวหน้าโคโลนีเรียบ (Entire) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |
| S80 | AM: เหลือง SM: เหลือง SC: ขาว DP: - |  |  | - | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) ระดับความนูนค่อนข้างหนา (Raised) ผิวหน้าโคโลนีเป็นรอยขุ่น (Rugose) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |

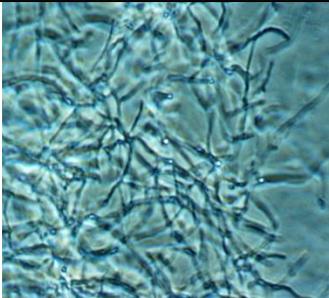
ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงบนอาหาร ISP-2 ซึ่งบ่มที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-14 วัน (ต่อ)

| Isolates | Color of colony | Digital camera | | Spore chain | Colony characters |
|----------|--|--|---|--|---|
| | | Top view | Bottom view | | |
| S83 | AM: ขาว SM: เหลือง SC: เทา DP: เหลือง |  |  |  Open spirals | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) ระดับความนูนค่อนข้างหนา (Raised) ผิวหน้าโคโลนีเรียบ (Entire) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |
| S84 | AM: ขาว SM: เหลืองขาว SC: เทา DP:- |  |  |  Open spirals | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) ระดับความนูนค่อนข้างหนา (Raised) ผิวหน้าโคโลนีเรียบ (Entire) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงบนอาหาร ISP-2 ซึ่งบ่มที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-14 วัน (ต่อ)

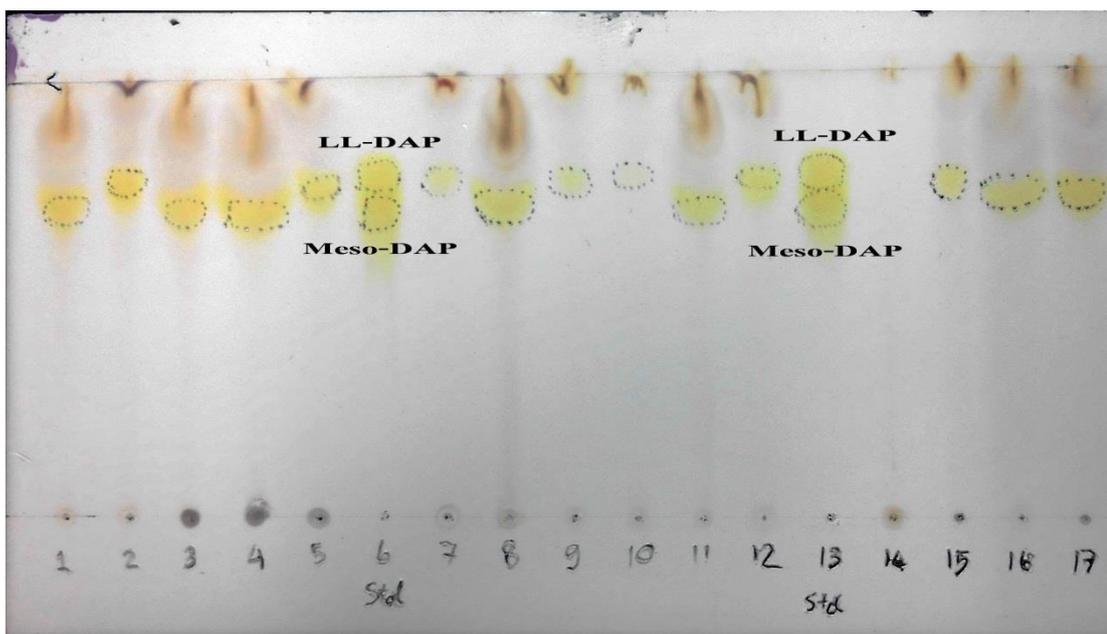
| Isolates | Color of colony | Digital camera | | Spore chain | Colony characters |
|----------|---|--|---|--|---|
| | | Top view | Bottom view | | |
| S85 | AM: ขาว SM: เหลือง SC: เทา DP: เหลือง |  |  |  Open spirals | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) ระดับความนูนค่อนข้างหนา (Raised) ผิวหน้าโคโลนีเรียบ (Entire) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |
| S111 | AM: เหลือง SM: เหลือง SC: เหลือง DP: - |  |  |  สปอร์อยู่ภายในเส้นใย | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) โคโลนีนูนมีรูอยู่ตรงกลาง (Crateriform) ผิวหน้าเป็นสันนูนรัศมีออกจากศูนย์กลาง (Radiately ridged) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงบนอาหาร ISP-2 ซึ่งบ่มที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-14 วัน (ต่อ)

| Isolates | Color of colony | Digital camera | | Spore chain | Colony characters |
|----------|--|---|--|---|---|
| | | Top view | Bottom view | | |
| S113 | AM: น้ำตาลอ่อน SM: เหลือง SC: เทา DP: - |  |  |  สปอร์อยู่ภายในเส้นใย | โคโลนีรูปร่างกลม (Circular) โคโลนีมีรูอยู่ตรงกลาง (Crateriform) ผิวหน้าเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายๆ ชั้น (Concentrically ringed) ขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) |

หมายเหตุ:

AM: Aerial mycelium, SM: Substrate mycelium, SC: Spore color, DP: Diffusible pigment



รูปที่ 11 ชนิดของ 2,6-diaminopimelic acid (DAP) ของเชื้อแอคติโนมัยสิทโดยวิธี thin layer chromatography แถวที่ 1: ไอโซเลท S13 แถวที่ 2: ไอโซเลท S15 แถวที่ 3: ไอโซเลท S19 แถวที่ 4: ไอโซเลท S23 แถวที่ 5: ไอโซเลท S24 แถวที่ 6 และ 13: สารละลายมาตรฐานประกอบด้วย LL-DAP และ meso-DAP แถวที่ 7: ไอโซเลท S27 แถวที่ 8: ไอโซเลท S34 แถวที่ 9: ไอโซเลท S36 แถวที่ 10: ไอโซเลท S53 แถวที่ 11: ไอโซเลท S80 แถวที่ 12: ไอโซเลท S83 แถวที่ 14: ไอโซเลท S84 แถวที่ 15: ไอโซเลท S85 แถวที่ 16: ไอโซเลท S111 และแถวที่ 17: ไอโซเลท S113

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการแยกและคัดเลือกหาเชื้อแอกติโนมัยสีทจากดินบริเวณเขตพื้นที่รับผิดชอบการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (กฟผ.) เขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) โดยทำการเก็บตัวอย่างดินทั้งสิ้น 4 ครั้ง ในเดือนมกราคม มีนาคม กรกฎาคม และกันยายน ได้ตัวอย่างดินทั้งหมดจำนวน 81 ตัวอย่าง พบว่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยในตัวอย่างดินสูงสุดเท่ากับ 20.88 ในการเก็บครั้งที่ 4 เดือน กันยายน ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน ในระหว่างเก็บตัวอย่างมีฝนตกตลอดเวลา และต่ำสุดเท่ากับ 4.06 ในการเก็บครั้งที่ 1 เดือน มกราคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาว ค่าพีเอชเฉลี่ยของตัวอย่างดินในการเก็บทั้ง 4 ครั้ง มีค่าไม่ต่างกัน ซึ่งอยู่ระหว่าง 5.75-5.92 มีสภาพเป็นกรดอ่อน และค่าอุณหภูมิเฉลี่ยของตัวอย่างดิน ในการเก็บทั้ง 4 ครั้ง มีค่าไม่ต่างกัน ซึ่งอยู่ระหว่าง 22.80-28.63 °ซ และสามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 129 ไอโซเลท

เมื่อนำเชื้อแอกติโนมัยสีททั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยวิธี perpendicular streak และวิธี dual culture พบว่า 37 ไอโซเลท (29%) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา สาเหตุโรค คน สัตว์ พืช มี 8 ไอโซเลท (6%) สามารถยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียทดสอบ มี 48 ไอโซเลท (37%) สามารถยับยั้งเฉพาะเชื้อราทดสอบ และ 36 ไอโซเลท (28%) ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ นอกจากนี้ 93 ไอโซเลท (72%) จากทั้งหมด 129 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคอย่างน้อย 1 ชนิด

คัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ใช้ทดสอบ ได้เชื้อแอกติโนมัยสีทดังกล่าวรวม 15 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท S13, S15, S19, S23, S24, S27, S34, S36, S53, S80, S83, S84, S85, S111 และ S113 มาจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับองค์ประกอบเคมีของเซลล์ พบว่าเชื้อแอกติโนมัยสีท 10 ไอโซเลท คือ S15, S24, S27, S36, S53, S83, S84, S85, S111 และ S113 มีชนิดของ DAP เป็น LL-DAP และมีลักษณะของสายโซ่สปอร์ 3 กลุ่ม ได้แก่ rectiflexibles, retinaculiaperti และ spirales ซึ่งคุณลักษณะดังกล่าวตรงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* และเชื้อ 5 ไอโซเลท ได้แก่ S13, S19, S23, S34 และ S80 เป็นแบบ Meso-DAP จึงจัดอยู่ในกลุ่ม non-*Streptomyces*

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

1. ควรทำการทดสอบยืนยันชนิดเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้และมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลร่วมด้วย
2. ควรศึกษาทางเคมีถึงชนิดและโครงสร้างโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแอคติโนมัยสีทผลิต
3. ควรทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อและสารที่เชื้อแอคติโนมัยสีทผลิตซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โรคพืช ในพืชเป้าหมายด้วย

เอกสารอ้างอิง

- เทพิน เดชนันท์รัตน์. (2546). การคัดแยกแอกติโนมัยซีทที่สร้างสารต่อต้านเชื้อรา และศึกษาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) และ Ribotyping. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาพันธุศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ลักษณา วรรณภีร์. (2536). การผลิตการตลาดพริก: โรคแมลงศัตรูพริกและการป้องกันกำจัด. กรมส่งเสริมการเกษตร.
- Alexander, M. (1977). **Introduction to Soil Microbiology**. 2nd ed. Wiley&Sons, New York.
- Alimuddin, Widada, J., Asmara, W., & M, M. (2011). Antifungal Production of a Strain of Actinomycetes spp Isolated from the Rhizosphere of Cajuput Plant: Selection and Detection of Exhibiting Activity Against Tested Fungi. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 16(1), 1-10.
- Becker, B., Lechevalier, M.P., Gordon, R.E. and Lechevalier, H.A. (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. **Appl Microbiol**, 12, 421-423.
- Bonas, U., Conrads-Strauch, J., & Balbo, I. (1993). Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. **Molecular & General Genetics: MGG**, 238(1-2), 261-269.
- Brock, T.D. and Madigan, M.T., **Biology of Microorganisms 6th ed.**, Prentices-Hall International, Inc., USA.(1991).
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. (1974). Order *Actinomycetales*, pp. 657-861. In S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Ravin and R.Y. Stanier, eds.
- Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G., &Kopelowitz, J. (2005). Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. **Plant Disease**, 89(12), 1339-1347.
- Ceylan, O., Gulten, O. and Aysel U. (2008). Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **Eur Asia J BioSci**, 2, 73-82.
- Getha, K., & Vikineswary, S. (2002). Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: Indirect evidence for the role of

- antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 303–310.
- Getha, K., Vikineswary, S., Wong, W. H., Seki, T., Ward, A., & Goodfellow, M. (2005). Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 32(1), 24–32.
- Goodfellow, M., and Williams, S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. **Annu Rev Microbiol**, 37, 187-216.
- Gordon, T. R., & Martyn, R. D. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review of Phytopathology**, 35, 111-128.
- Hasegawa, T., Takizawa, M. and Tanida, S.(1983) A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 29, 319–322.
- Hayakawa, M. and Nonomura, H. (1989). A new method for the intensive isolation of actinomycetes from soil. **Actinomycetologica**, 3, 95-104.
- Hayakawa, M., & Nonomura, H. (1989). A New Method for the Intensive Isolation of Actinomycetes from Soil. *Actinomycetologica*, 3(2), 95–104.
- Hayakawa, Masayuki, Sadakata, T., Kajiura, T., & Nonomura, H. (1991). New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 72(5), 320-326.
- Hayward, A.C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annu Rev Phytopathol**, 29, 65-87.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, ninth ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA
- Horwitz, W. 2000. **Official methods of analysis of AOAC International**. edition 17. Gaithersburg, Md. USA.
- Kalakoutski, L.V. and N.S. Agre. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. **Bacteriol. Rev.** 40: 469-524.
- Kleeberg, I., Hetz, C., Kroppenstedt, R.M., Muller, R.J., Deckwer, W.D. (1998). Biodegradation of aliphatic–aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (3), 1731–1735.

- Kunoh, H. (2002). Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents. **Journal of General Plant Pathology**, **68**(3),249-252.
- Lacey, J. (1997). Actinomycetes in composts. **Ann. Environ. Med.** 4: 113-121
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., &Marinelli, F. (2000). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, **78**(3-4), 399-405.
- Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **20**(4), 435–443.
- Miyadoh, S. (1993). Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. *Actinomycetol*, **7**(2), 100–106.
- Miyadoh, S., Hamada M., Hotta T., Seino A., Vobis G. and Yokota A., editors.(1997). **Atlas of Actinomycetes**. Japan: Asakura Publishing Co., Ltd
- Ndonde, M.J.M. andSemu, E. (2000). Preliminary characterization of some *Streptomyces* species from four Tanzanian soils and their antimicrobial potential against selected plant and animal pathogenic bacteria. **World J Microbiol Biotechnol**, **16**, 595-599.
- Nolan, R.D. and R. Cross. 1988. **Isolation and screening of actinomycetes**, pp. 1-32.
- Okami, Y. and A.K. Hotta. 1988. **Search and discovery of new antibiotics**, pp. 33-67.
- Ouhdouch, Y., M. Barakate and C. Finance. 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. **Eur. J. Soil. Biol.** **37**: 69-74.
- Ozakman, M., & Schaad, N. W. (2003). A real-time BIO-PCR assay for detection of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in asymptomatic potato tubers. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **25**(3), 232–239.
- Santos, P.S., E.J. Abad, A.G. Paguaia and B.S. Lat. (1976). Vitamin B12 and antibiotics of actinomycetes isolated by a selective method from soil samples. **Phillip J. Sci.** **103**: 208-220
- Selvin, J., Shanmughapriya, S., Gandhimathi, R., Seghal, K.G., Rajeetha, R.T., Natarajaseenivasan, K. and Hema, T.A. (2009). Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardioopsis dassonvillei* MAD08. **Appl Microbiol Biotechnol**, **83**, 435-445.

- Seong, C. N., Choi, J.H. and Baik, K. (2001). An improved selective isolation of rare actinomycetes from forests. **J Microbiol**, **39**, 17-23.
- Shirling, E.B., Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. **Int J Syst Bacteriol**, **16**, 313-340.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. and Lumyong, S. (2005). Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology**, **151**, 1691-1695.
- Tamura, T., Hayakawa, M. and Hatano, K. (1997). A new genus of the order Actinomycetales, *Spirilliplanes* gen. nov., with description of *Spirilliplanes yamanashiensis* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol**, **47**, 97-102.
- Tans-Kersten, J., Huang, H., & Allen, C. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. **Journal of Bacteriology**, **183**(12), 3597 -3605.
- Williams, S.T., Sharpe, M.E., Holt, J.G. Muray., G.E., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Moulder, J.W. Pfenning, N.P., Sneath, H.A., and Staley, J.T. (1989) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4**. Williams & Wilkins, Baltimore
- Williams, S.T., Wellington, E.M.H., (1982). Actinomycetes. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keency, O.R. (Eds.), Methods of Soil Analysis, part 2, **Chemical and Microbiological properties**, 2nd ed. American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, pp. 969–987.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติตัวอย่างดิน

ตารางผนวก ก1 ลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติของตัวอย่างดิน

| ลำดับ | ครั้ง | เส้นทาง/ ตัวอย่าง | ลักษณะตัวอย่างดิน | T(°C) | pH | เปอร์เซ็นต์ ความชื้น | เชื้อ ทั้งหมด |
|-------|-------|----------------------|---|-------|------|-------------------------|--------------------|
| 1 | 1 | 1/1 | ดินในสำนักสงฆ์โนน หินกอง เป็นดินทราย | 27 | 6.32 | 0.181 | 1×10^5 |
| 2 | 1 | 1/2 | ดินทางข้ามห้วย | 25.5 | 6.46 | 1.727 | 4.6×10^5 |
| 3 | 1 | 1/3 | ดินปลวกตอไม้ | 26 | 5.87 | 1.478 | 4.1×10^5 |
| 4 | 1 | 1/4 | ดินข้างทาง | 28 | 6.51 | 0.452 | 2.55×10^5 |
| 5 | 1 | 1/5 | ดินผสมหิน | 28.5 | 6.03 | 0.900 | 6.5×10^5 |
| 6 | 1 | 1/6 | ดินในหลุม | 28 | 5.69 | 0.286 | 1.65×10^5 |
| 7 | 1 | 1/7 | ดินข้างทางเป็นดินร่วน ปนทราย | 30 | 5.88 | 0.290 | 1.35×10^5 |
| 8 | 1 | 1/8 | ดินใกล้บริเวณไฟไหม้ เป็นดินร่วนปนทราย | 28 | 5.41 | 0.183 | 2.1×10^5 |
| 9 | 1 | 2/1 | ดินในธารน้ำไหล | 21 | 6.35 | 21.523 | 4.2×10^4 |
| 10 | 1 | 2/2 | ดินบริเวณป่าห้วย | 23 | 6.14 | 1.041 | 2.6×10^5 |
| 11 | 1 | 2/3 | ดินบริเวณที่เคยเป็นธาร น้ำลักษณะเป็นดินทราย | 20 | 6.14 | 1.369 | 4.15×10^4 |
| 12 | 1 | 2/4 | ดินจอมปลวก | 21 | 6.28 | 2.017 | 1.95×10^5 |
| 13 | 1 | 2/5 | ดินในน้ำนิ่งเป็นดิน ทราย | 20.5 | 6.45 | 22.561 | 4.65×10^4 |
| 14 | 1 | 2/6 | ดินรอบต้นไม้ยืนต้น และข้างโขดหินเป็นดิน ทรายปนใบไม้ | 26 | 6.17 | 1.199 | 6.1×10^5 |
| 15 | 1 | 2/7 | ดินใกล้ธารน้ำและโขด หินเป็นดินทรายปนใบ ไม้ | 24 | 6.32 | 0.840 | 2.77×10^5 |
| 16 | 1 | 2/8 | ดินใกล้ธารน้ำเป็นดิน ทรายปนรากไม้ | 20 | 5.97 | 12.857 | 3.3×10^4 |

ตารางผนวก ก1 ลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติของตัวอย่างดิน (ต่อ)

| ลำดับ | ครั้ง | เส้นทาง/ ตัวอย่าง | ลักษณะตัวอย่างดิน | T(°C) | pH | เปอร์เซ็นต์ ความชื้น | เชื้อ ทั้งหมด |
|-------|-------|----------------------|--|-------|------|-------------------------|--------------------|
| 17 | 1 | 3/1 | ดินจอมปลวกใหญ่เป็น ดินทราย | 22 | 5.28 | 1.503 | 1.8×10^5 |
| 18 | 1 | 3/2 | ดินใต้ซอกหิน | 21 | 5.13 | 1.191 | 1.25×10^5 |
| 19 | 1 | 3/3 | ดินรอบต้นแดงแซง | 22.5 | 5.24 | 0.773 | 3.75×10^4 |
| 20 | 1 | 3/4 | ดินหน้าผาใกล้ธารน้ำ เป็นดินร่วนปนทราย | 22 | 5.44 | 11.757 | 3.75×10^5 |
| 21 | 1 | 3/5 | ดินจอมปลวกเก่าใน ต้นไม้ | 25 | 5.28 | 1.100 | 6.5×10^5 |
| 22 | 2 | 1/1 | ดินบริเวณต้นสาบเสือ เป็นดินผสมหิน | 24 | 6.45 | 1.101 | 2.85×10^5 |
| 23 | 2 | 1/2 | ดินริมธารน้ำเป็นดิน ทราย | 21 | 6.74 | 14.628 | 2.45×10^4 |
| 24 | 2 | 1/3 | ดินที่เคยเป็นธารน้ำเป็น ดินร่วน | 22 | 6.77 | 2.649 | 3.75×10^5 |
| 25 | 2 | 1/4 | ดินซอกหินปนรากไม้ | 23 | 6.19 | 2.065 | 1.04×10^6 |
| 26 | 2 | 1/5 | ดินบริเวณดงหญ้าแฝก เป็นดินร่วนสีเทา | 26 | 6.09 | 0.898 | 3.2×10^5 |
| 27 | 2 | 1/6 | ดินบริเวณกอไผ่ | 23 | 5.44 | 1.404 | 7.1×10^4 |
| 28 | 2 | 1/7 | ดินในธารน้ำเป็นดิน ทรายละเอียด | 20 | 5.55 | 23.965 | 1×10^4 |

ตารางผนวก ก1 ลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติของตัวอย่างดิน (ต่อ)

| ลำดับ | ครั้ง | เส้นทาง/ ตัวอย่าง | ลักษณะตัวอย่างดิน | T(°C) | pH | เปอร์เซ็นต์ ความชื้น | เชื้อ ทั้งหมด |
|-------|-------|----------------------|--------------------------------------|-------|------|-------------------------|--------------------|
| 29 | 2 | 2/1 | ดินข้างทางมีรากไม้ปน | 21 | 5.93 | 2.950 | 5.4×10^5 |
| 30 | 2 | 2/2 | ดินใต้ขอนไม้ผุ | 22 | 5.89 | 0.546 | 4.85×10^5 |
| 31 | 2 | 2/3 | ดินตะกอนจากธารน้ำ อยู่บนแผ่นดิน | 22 | 6.20 | 0.785 | 1.2×10^5 |
| 32 | 2 | 2/4 | ดินใต้ต้นเคยหนาม | 21.5 | 5.72 | 3.074 | 3.85×10^4 |
| 33 | 2 | 2/5 | ดินในโพรงไม้เป็นเนื้อ ไม้ที่ผุพัง | 20 | 5.78 | 7.910 | 9.4×10^4 |
| 34 | 2 | 2/6 | ดินบริเวณต้นเปลือย มีสีดำเข้ม | 24.5 | 5.23 | 3.185 | 8.3×10^4 |
| 35 | 2 | 2/7 | ดินทรายใกล้ริมน้ำ | 23 | 5.41 | 0.245 | 4.5×10^3 |
| 36 | 2 | 2/8 | ดินจอมปลวก แข็ง มีสีแดงเข้ม | 22 | 5.56 | 8.394 | 3.5×10^4 |
| 37 | 2 | 2/9 | ดินปนทราย | 21.5 | 5.54 | 1.550 | - |
| 38 | 2 | 2/10 | ดินใต้ชะง่อนหิน เป็น ดินร่วน | 23 | 5.09 | 3.052 | - |
| 39 | 2 | 2/11 | ดินกอไผ่ปนรากไม้ | 22 | 5.51 | 4.312 | - |

ตารางผนวก ก1 ลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติของตัวอย่างดิน (ต่อ)

| ลำดับ | ครั้ง | เส้นทาง/ ตัวอย่าง | ลักษณะตัวอย่างดิน | T(°C) | pH | เปอร์เซ็นต์ ความชื้น | เชื้อ ทั้งหมด |
|-------|-------|----------------------|---------------------------|-------|------|-------------------------|----------------------|
| 40 | 2 | 3/1 | ดินบนเนินหิน | 28 | 5.05 | 0.654 | 1.02x10 ⁵ |
| 41 | 2 | 3/2 | ดินบริเวณที่โคนไฟ ไหม้ | 26.5 | 6.01 | 0.215 | 1.34x10 ⁵ |
| 42 | 3 | 1/1 | ดินข้างทาง | 27 | 6.25 | 13.250 | - |
| 43 | 3 | 1/2 | ดินข้างโหนดหิน | 26.5 | 5.90 | 18.315 | - |
| 44 | 3 | 1/3 | ดินข้างต้นไม้ | 28 | 5.61 | 7.697 | - |
| 45 | 3 | 1/4 | ดินทรายใต้ต้นไม้ | 28 | 5.93 | 11.038 | 1.39x10 ⁵ |
| 46 | 3 | 1/5 | ดินจอมปลวก | 28 | 5.56 | 4.849 | - |
| 47 | 3 | 1/6 | ดินข้างทาง | 30 | 5.47 | 8.732 | 1.17x10 ⁵ |
| 48 | 3 | 1/7 | ดินข้างหิน | 29 | 5.66 | 10.954 | - |
| 49 | 3 | 1/8 | ดินจอมปลวก | 29 | 5.74 | 8.026 | - |
| 50 | 3 | 2/1 | ดินใต้ต้นไม้ | 29 | 5.69 | 11.044 | - |
| 51 | 3 | 2/2 | ดินข้างธารน้ำ | 29 | 5.94 | 36.088 | - |
| 52 | 3 | 2/3 | ดินใต้ต้นไม้เปลี่ยน | 28 | 5.98 | 10.462 | 1.18x10 ⁵ |
| 53 | 3 | 2/4 | ดินใต้ต้นไม้ | 28.5 | 6.14 | 10.886 | - |
| 54 | 3 | 2/5 | ดินใต้ต้นไม้ | 30 | 5.89 | 7.206 | - |

ตารางผนวก ก1 ลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติของตัวอย่างดิน (ต่อ)

| ลำดับ | กระเบื้อง | เส้นทาง/ ตัวอย่าง | ลักษณะตัวอย่างดิน | T(°C) | pH | เปอร์เซ็นต์ ความชื้น | เชื้อ ทั้งหมด |
|-------|-----------|----------------------|-----------------------|-------|------|-------------------------|----------------------|
| 55 | 3 | 2/6 | ดินทรายลําธาร | 28 | 5.98 | 7.257 | - |
| 56 | 3 | 2/7 | ดินขี้งลําธาร | 28 | 5.30 | 9.522 | - |
| 57 | 3 | 2/8 | ดินทางนํ้าไหล | 33 | 5.45 | 23.452 | 9.15x10 ⁴ |
| 58 | 3 | 2/9 | ดินไต้ต้นหญ้ําคา | 29 | 5.98 | 13.011 | - |
| 59 | 3 | 3/1 | ดินไต้ต้นไผ่ | 28 | 6.01 | 17.011 | 5.8x10 ⁴ |
| 60 | 3 | 3/2 | ดินใกล้ธารนํ้า | 28.5 | 5.32 | 15.881 | 7.7x10 ⁴ |
| 61 | 3 | 3/3 | ดินไต้ต้นไม้ | 28 | 5.11 | 12.829 | - |
| 62 | 4 | 1/1 | ดินปนทราย | 24 | 6.18 | 18.089 | 7.9x10 ⁴ |
| 63 | 4 | 1/2 | ดินร่วนสีดํา | 24.5 | 4.51 | 25.312 | |
| 64 | 4 | 1/3 | ดินกอไผ่ | 24.5 | 5.89 | 22.869 | |
| 65 | 4 | 1/4 | ดินเหนียวสีดํา | 24 | 5.52 | 23.973 | 6.3x10 ⁴ |
| 66 | 4 | 1/5 | ดินร่วนปนรํากไม้ | 24 | 5.74 | 26.443 | |
| 67 | 4 | 1/6 | ดินรอบต้นไม้ใหญ่ | 25 | 6.01 | 16.996 | |
| 68 | 4 | 1/7 | ดินร่วนปนทราย | 24 | 5.66 | 22.071 | |
| 69 | 4 | 2/1 | ดินข้างทางเป็นดินร่วน | 24 | 5.53 | 16.652 | |
| 70 | 4 | 2/2 | ดินร่วนปนทราย | 25 | 5.75 | 14.109 | |

ตารางผนวก ก1 ลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติของตัวอย่างดิน (ต่อ)

| ลำดับ | ครั้ง | เส้นทาง/ ตัวอย่าง | ลักษณะตัวอย่างดิน | T(°C) | pH | เปอร์เซ็นต์ ความชื้น | เชื้อ ทั้งหมด |
|-------|-------|----------------------|--------------------|-------|------|-------------------------|--------------------|
| 71 | 4 | 2/3 | ดินร่วนมีรากไม้ปน | 24 | 5.82 | 9.475 | - |
| 72 | 4 | 2/4 | ดินปนทราย | 25 | 5.57 | 12.841 | - |
| 73 | 4 | 2/5 | ดินสีดามีรากไม้ปน | 25 | 5.71 | 29.374 | 6.95×10^4 |
| 74 | 4 | 2/6 | ดินร่วนปนทราย | 25 | 5.73 | 19.432 | |
| 75 | 4 | 2/7 | ดินทรายสีน้ำตาล | 26 | 5.76 | 24.174 | 5.0×10^4 |
| 76 | 4 | 3/1 | ดินร่วนสีดำ | 25 | 5.64 | 23.573 | |
| 77 | 4 | 3/2 | ดินซอกหินสีแดงอิฐ | 24 | 5.60 | 21.143 | 5.85×10^4 |
| 78 | 4 | 3/3 | ดินร่วนปนรากไม้ | 24.5 | 6.48 | 20.380 | |
| 79 | 4 | 3/4 | ดินเหนียวสีดำ | 24 | 6.25 | 28.645 | |
| 80 | 4 | 3/5 | ดินร่วนปนดินลูกรัง | 24 | 6.28 | 20.370 | |
| 81 | 4 | 3/6 | ดินร่วนสีดำ | 24 | 5.63 | 21.762 | 3.6×10^4 |

ภาคผนวก ข
ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรค พืช คน สัตว์

ตารางผนวก ข 1 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแอคติโนมัยสิตที่แยกจากดินเขื่อน
สิรินธร (ต่อ)

| ไอโซเลต | ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------------------|-----|-----|-----|
| | ระยะทางการยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | | | | | | | | | | เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| S15 | 0 | 0 | 0 | 20 | 28 | 28 | 5 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 93 | 96 | 86 |
| S16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 47 | 52 |
| S18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 11 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 96 | 100 |
| S20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 83 | 100 | 92 | 68 |
| S21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 77 | 0 | 0 |
| S22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 65 | 0 | 0 | 0 |
| S23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| S24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 15 | 15 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 96 | 100 |
| S25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 27 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 76 | 100 | 82 | 94 |
| S27 | 13 | 13 | 12 | 24 | 10 | 14 | 3 | 32 | 37 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 97 | 57 | 75 | 75 |
| S28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 63 | 40 | 0 |

ตารางผนวก ข 1 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดินเขื่อน
สิรินธร (ต่อ)

| ไอโซเลท | ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------------------|-----|-----|-----|
| | ระยะทางการยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | | | | | | | | | | เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| S29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 73 | 72 | 53 | |
| S32 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 87 | 89 | 66 | |
| S33 | 18 | 0 | 10 | 25 | 13 | 9 | 0 | 7 | 22 | 30 | 15 | 28 | 0 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S34 | 21 | 14 | 15 | 16 | 16 | 6 | 6 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| S35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 83 | 93 | 67 | |
| S36 | 11 | 14 | 17 | 21 | 20 | 18 | 10 | 34 | 30 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 90 | 93 | 90 | |
| S37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 | 58 | 56 | |
| S38 | 5 | 4 | 6 | 13 | 4 | 6 | 0 | 10 | 5 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 52 | 53 | 65 | 86 |
| S39 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 15 | 4 | 10 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 | 0 | 0 | |
| S41 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 78 | 67 | 100 | 65 | |
| S42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 97 | 97 | 82 | 84 | |

ตารางผนวก ข 1 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดินเขื่อน
สิรินธร (ต่อ)

| ไอโซเลท | ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---------------------------------------|----|---|---|----|----|---|----|----|----|----|----|----|-----|-----------------------|----|-----|----|
| | ระยะทางการยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | | | | | | | | | | เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| S43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 67 | 0 | 58 | |
| S44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S45 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S46 | 5 | 3 | 0 | 0 | 10 | 10 | 5 | 10 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S47 | 11 | 10 | 8 | 8 | 20 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 | 0 | 0 | 0 | |
| S48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 67 | 0 | 58 | |
| S44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S49 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 36 | 0 | |
| S50 | 0 | 0 | 0 | 8 | 6 | 5 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 0 | |
| S51 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 73 | 76 | 0 | |
| S52 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53 | 0 | 0 | |
| S53 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 13 | 0 | 0 | 16 | 4 | 0 | 0 | 0 | 100 | 90 | 86 | 100 | |
| S54 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 66 | 0 | 0 | 0 | |

ตารางผนวก ข 1 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดินเขื่อน
สิรินธร (ต่อ)

| ไอโซเลท | ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--|---|---|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|-----------------------|----|----|----|
| | ระยะทางการยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | | | | | | | | | | เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| S55 | 9 | 7 | 9 | 16 | 5 | 0 | 0 | 20 | 24 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 64 | 0 | 61 |
| S56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S57 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S58 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 66 | 0 | 0 | 0 |
| S59 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 52 | 0 | 51 | 0 |
| S60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S61 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 | 54 | 37 | 51 |
| S62 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 41 | 34 | 0 |
| S63 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 11 | 0 |
| S64 | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S65 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S66 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 25 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 52 | 20 | 0 |
| S67 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S68 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 43 | 15 | 0 |

ตารางผนวก ข 1 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดินเขื่อน
สิรินธร (ต่อ)

| ไอโซเลท | ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------------------|----|----|----|
| | ระยะทางการยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | | | | | | | | | | เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| S83 | 19 | 15 | 14 | 23 | 10 | 14 | 16 | 28 | 27 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 94 | 94 | 94 |
| S84 | 7 | 3 | 3 | 6 | 30 | 5 | 0 | 0 | 20 | 10 | 0 | 0 | 0 | 11 | 100 | 90 | 91 | 84 |
| S85 | 4 | 12 | 9 | 23 | 17 | 14 | 5 | 23 | 30 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 90 | 94 | 94 | 93 |
| S86 | 0 | 0 | 0 | 18 | 20 | 20 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 59 | 59 | 47 | 0 |
| S87 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S88 | 0 | 0 | 0 | 11 | 15 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S89 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 54 | 67 | 0 | 0 |
| S83 | 19 | 15 | 14 | 23 | 10 | 14 | 16 | 28 | 27 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 94 | 94 | 94 |
| S84 | 7 | 3 | 3 | 6 | 30 | 5 | 0 | 0 | 20 | 10 | 0 | 0 | 0 | 11 | 100 | 90 | 91 | 84 |
| S85 | 4 | 12 | 9 | 23 | 17 | 14 | 5 | 23 | 30 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 90 | 94 | 94 | 93 |
| S86 | 0 | 0 | 0 | 18 | 20 | 20 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 59 | 59 | 47 | 0 |
| S87 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S88 | 0 | 0 | 0 | 11 | 15 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S89 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 54 | 67 | 0 | 0 |

ตารางผนวก ข 1 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแอคติโนมัยสิตที่แยกจากดินเขื่อน
สิรินธร (ต่อ)

| ไอโซเลต | ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---------------------------------------|---|---|----|---|----|---|----|----|----|----|----|----|----|-----------------------|-----|-----|----|
| | ระยะทางการยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | | | | | | | | | | เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| S90 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 62 | 58 | 0 | 54 |
| S91 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 57 | 0 | 57 |
| S92 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 72 | 42 | 0 | 0 | |
| S93 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 9 | 10 | 11 | 0 | 12 | 0 | 0 | 77 | 95 | 100 | 88 |
| S94 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S95 | 0 | 0 | 0 | 5 | 6 | 40 | 0 | 7 | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 | 0 | 93 | 86 | 73 | 91 |
| S96 | 3 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 24 | 25 | 22 | 0 | 22 | 0 | 0 | 51 | 100 | 85 | 72 |
| S97 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S98 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S99 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53 | 0 | 0 |
| S100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 34 | 0 | 0 |
| S101 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S102 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S103 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 88 | 76 | 0 |

ตารางผนวก ข 1 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดินเขื่อน
สิรินธร (ต่อ)

| ไอโซเลท | ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค | | | | | | | | | | | | | | เปอร์เซ็นต์ การยับยั้ง | | | |
|---------|---------------------------------------|----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------------------|----|----|----|
| | ระยะทางการยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| S118 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 45 | 39 | 52 | 0 |
| S119 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 44 | 0 | 53 | 0 |
| S120 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S121 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 41 | 74 | 63 |
| S123 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S124 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 44 | 0 | 0 |
| S125 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 5 | 10 | 0 | 5 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 88 | 93 | 94 | 86 |
| S126 | 12 | 10 | 11 | 21 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 58 | 74 | 50 |
| S127 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 42 | 66 | 0 |
| S128 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 3 | 5 | 18 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 91 | 67 | 67 |
| S129 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 5 | 0 | 25 | 15 | 30 | 0 | 30 | 10 | 14 | 0 | 48 | 61 | 0 |

หมายเหตุ;

(1) Aac CU (2) Aac WS (3) Aac SK (4) XCV (5) Rs T (6) Rs P (7) *C. albicans* (8) MRSA (9) *B. cereus* (10) *S. agalactia* (11) *P. aeruginosa* (12) *A. hydrophila* (13) *E. coli* (14) *S. Typhimurium*, (15) *S. rolfisii* (16) *C. capsici* (17) *C. gloeosporioides* (18) *F. oxysporum*