ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่แยกได้จากอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก

สุภาวดี พุ่มพิศ

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่แยกได้จากอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก

สุภาวดี พุ่มพิศ

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่แยกได้จากอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก"

ของ สุภาวดี พุ่มพิศ

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ดร.ศรัณย์พร ตัณฑวนันท์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร.อัญชลี ฐานวิสัย)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงกมล ขันธเลิศ)

อนุมัติ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่แยกได้จากอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก

ผู้วิจัย สุภาวดี พุ่มพิศ

ประธานที่ปรึกษา ดร.อัญชลี ฐานวิสัย

กรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ

ประเภทสารนิพนธ์ วิทยานิพนธ์ วท.ม. จุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2564

คำสำคัญ สารสกัดหยาบ, ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค, Xenorhabdus, Photorhabdus

บทคัดย่อ

Xenorhabdus และ *Photorhabdus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน จัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพา (Symbiosis) กับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Entomopathogenic nematode หรือ EPNs) แบคทีเรียทั้ง 2 สกุล สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิดรวมถึงสารต้านจุลชีพ วัตถุประสงค์ในครั้งนี้เพื่อแยกและจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabdistis* และแบคทีเรียพึ่งพา ในพื้นที่อำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก และทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *28S rRNA* พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* (7 ไอโซเลต) *S. surkhetense* (6 ไอโซเลต) *S. hermaphroditum* (2 ไอโซเลต) *S. huense* (1 ไอโซเลต) และ *H. indica* (1 ไอโซเลต) จำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน recombinant A (*recA*) พบแบคทีเรีย *X. stockiae* (8 ไอโซเลต) *X. griffiniae* (1 ไอโซเลต) และ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (4 ไอโซเลต)

จากการศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อแบคทีเรียก่อโรค พบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *X. stockiae* (bNP10.1_TH) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากแบคทีเรีย*Xenorhabdus* ทุกไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีมากในทุกสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจาก *Xenorhabdus* (bNP11.1_TH) ร่วมกับยาปฏิชีวนะ oxacillin หรือ vancomycin ในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย *S. aureus* PB36 (MRSA) แต่พบว่ามีแนวโน้มในการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจาก

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* (bNP15.1_TH) กับยาปฏิชีวนะ Oxacillin (มีค่า FIC=1) ผลการศึกษานี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นทำให้ทราบว่าแบคทีเรีย *Xenorhabdus* สายพันธุ์ไทยสามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด เพื่อใช้ในการค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ต่อไป

Title ANTI-PATHOGENIC BACTERIAL ACTIVITIES FROM *XENORHABDUS* AND *PHOTORHABDUS* FROM NOEN MAPRANG DISTRICT, PHITSANULOK

Author SUPAVADEE PHUMPHIT

Advisor Aunchalee Thanwisai, Ph.D.

Co-Advisor Associate Professor Apichat Vitta, Ph.D.

Academic Paper M.Sc. Thesis in Microbiology, Naresuan University, 2021

Keywords crude compound, antimicrobial activity, Xenorhabdus, Photorhabdus

ABSTRACT

Xenorhabdus and *Photorhabdus* are Gram-negative bacteria, with rod shape. They are belonging to family *Enterobacteriaceae*. They are symbiosis with Entomopathogenic nematode or EPNs. These bacteria can produce several secondary metabolites, including antimicrobial compounds. The objectives of this study aimed to isolate identify entomopathogenic nematodes (EPNs) in genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* and their symbiotic bacteria from Noen Maprang District, Phitsanulok Province, and also evaluate the antibacterial activity of these symbiotic bacteria. The EPNs based on *28S rRNA* analysis was identified as *S. siamkayai* (7 isolates), *S. surkhetense* (6 isolates), *S. hermaphroditum* (2 isolates), *S. huense* (1 isolate), and *H. indica* (1 isolate). Based on *recA* sequencing, *Xenorhabdus* was identified as *X. stockiae* (8 isolates) and *X. griffiniae* (1 isolates). *Photorhabdus* was identified as *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (4 isolates). Antibacterial activity showed that *X. stockiae* ((bNP10.1_TH) extract inhibited several bacterial pathogens. In addition, the bacterial extracts from all *Xenorhabdus* isolates showed strong inhibition against the growth of all *S. aureus* strains. The combination between *Xenorhabdus* (bNP11.1_TH) extract and oxacillin or vancomycin against *S. aureus* strain PB36 (MRSA) exhibited no interaction on checkerboard assay. However, *Xenorhabdus* (bNP15.1_TH) extract in combination with oxacillin determined by checkerboard assay exhibited partially synergistic

interaction with fractional inhibitory concentration (FICI) of 1.0.

This study demonstrates that *Xenorhabdus* showed antibacterial activity. This finding may be useful for further research on the discovery of novel antimicrobial compounds from these bacterial isolates.

ประกาศคุณูปการ

การจัดทำวิทยานิพนธ์เรื่อง ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากแบคทีเรีย Xenorhabdus และ Photorhabdus ที่แยกได้จากอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก สามารถสำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก ดร.อัญชลี ฐานวิสัย ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าคอยให้คำแนะนำปรึกษาในการจัดทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ศรัณย์พร ตัณฑวนันท์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และ รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ดวงกมล ขันธเลิศ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการตรวจข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ และภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนในส่วนของอุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ในการทำวิจัย เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจบ้างไม่มากก็น้อย

สุภาวดี พุ่มพิศ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

ประกาศคุณูปการ ..... ช

สารบัญ ..... ซ

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฑ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

จุดมุ่งหมายของการวิจัย 4

ขอบเขตการวิจัย 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Entomopathogenic nematode) 6

แบคทีเรีย (Bacteria) 12

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 23

เพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* 23

การเก็บตัวอย่างดินจากเขตพื้นที่การเกษตร จังหวัดพิษณุโลก 23

การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากดิน 23

การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอ่อนของหนอนกินรังผึ้งและการเก็บรักษา 24

การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 24

การแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ออกจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 24
การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง.....25
การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* 25
ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย.....27
การทดสอบการแข่งขันการเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งระหว่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema siamkayai* (eNP11.1_TH) และสกุล *Heterorhabditis* indica (eACM14.1_TH).....27
การแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากน้ำเลือดของซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งที่ตายด้วยไส้เดือยฝอยศัตรูแมลงในการทดสอบการเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งระหว่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema siamkayai* (eNP11.1_TH) และสกุล *Heterorhabditis indica* (eACM14.1_TH).....28
การศึกษาประสิทธิภาพของของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 29
การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay 32
Checkerboard determination.....32
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....34
การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดิน.....34
การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง.....35
ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง.....39

ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง.....41
การแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง.....41
การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* 42
ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* 44
การทดสอบการเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งระหว่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema siamkayai* และ*Heterorhabditis indica* 47
การศึกษาฤทธิ์ของ Whole cell culture แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีคัดกรอง.....48
การศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดหยาบของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ด้วยวิธี Disk diffusion 53
การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay 57
Checkerboard determination.....60
บทที่ 5 บทสรุป.....62
สรุปผลการวิจัย.....62
อภิปรายผล 63
บรรณานุกรม.....67
ภาคผนวก.....87
ประวัติผู้วิจัย 117

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ความหลากชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema*.....8

ตาราง 2 ความหลากชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis*.....12

ตาราง 3 ความหลากชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* 15

ตาราง 4 ความหลากชนิดของแบคทีเรีย *Photorhabdus* 18

ตาราง 5 รายชื่อแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการศึกษา จำนวน 16 สายพันธุ์.....29

ตาราง 6 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 29 ไอโซเลตที่แยกได้จากดิน 34

ตาราง 7 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *28S rRNA* ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 16 ไอโซเลต และสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 1 ไอโซเลต ที่แยกได้จาก อำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก.....37

ตาราง 8 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก 43

ตาราง 9 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 4 ไอโซเลต ที่แยกได้จาก อำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก...44

ตาราง 10 การทดสอบการเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* (eNP11.1_TH) และ *H. indica* (eACM14.2_TH) ในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง 47

ตาราง 11 ผลจากการคัดกรองด้วย Whole cell culture ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ (แผ่น Disk มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร).....50

ตาราง 12 ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ต่อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีคัดกรอง 52

ตาราง 13 ผลของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ (แผ่น Disk มีเส้นผ่านศูนย์กลาเท่ากับ 6 มิลลิเมตร) 55

ตาราง 14 ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 16 สายพันธุ์ 56

ตาราง 15 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) 58

ตาราง 16 ผลของการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ *X. stockiae* (bNP11.1_TH) ร่วมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin และ Vancomycin ต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* PB36 61

ตาราง 17 ผลของการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ *X. stockiae* (bNP15.1_TH) ร่วมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin และ Vancomycin ต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* PB36 61

ตาราง 18 น้ำหนักสารสกัด (กรัม) ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 6 ไอโซเลต 90

ตาราง 19 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดิน ที่พื้นที่อำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก 91

ตาราง 20 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และสกุล *Heterorhabditis* 100

ตาราง 21 sequence สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และสกุล *Heterorhabditis* 101

ตาราง 22 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *recA* ของแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* 106

ตาราง 23 sequence สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *recA* ของแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* 107

ตาราง 24 สรุปผลจากการคัดกรองด้วย Whole cell culture ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 16 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disk diffusion..... 111

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 7

ภาพ 2 กลไกการออกฤทธิ์ของยา 20

ภาพ 3 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* จำนวน 16 ไอโซเลต โดยใช้ยีน *28S rRNA* วิเคราะห์โดย Maximum likelihood วิธี Tamura-Nei model (Bootstrap 1,000 ครั้ง) ด้วยโปรแกรมMEGA version 7.0 40

ภาพ 4 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 1 ไอโซเลต โดยใช้ยีน *28S rRNA* วิเคราะห์โดย Maximum likelihood วิธี Tamura-Nei model (Bootstrap 1,000 ครั้ง) ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0 41

ภาพ 5 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NBTA แบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* (A) และแบคทีเรียสกุล *Photorhabdus* (B) 42

ภาพ 6 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต โดยใช้ยีน recA วิเคราะห์โดย Maximum likelihood วิธี Tamura-Nei model (Bootstrap 1,000 ครั้ง) ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0 45

ภาพ 7 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแบคทีเรียในสกุล *Photorhabdus* จำนวน 1 ไอโซเลต โดยใช้ยีน *recA* วิเคราะห์โดย Maximum likelihood วิธี Tamura-Nei model (Bootstrap 1,000 ครั้ง) ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0 46

ภาพ 8 ผลการศึกษาฤทธิ์ของ Whole cell cuture ของแบคทีเรีย *X. stockiae* รหัส bNP7.4_TH(1), bNP10.1_TH(2), bNP10.3_TH(3) และ bNP11.1_TH(4) ต่อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* สายพันธุ์ PB36 (A), *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PB30, *A. baumannii* สายพันธุ์ AB324 (C) และ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC 35218 (D) 49

ภาพ 9 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแบคทีเรีย *X. stockiae* รหัส bNP10.1_TH (1), รหัส bNP10.2_TH (2), รหัส bNP10.3_TH (3), antibiotic disks (P) และ negative control (N) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค สายพันธุ์ ATCC 20475 (A), สายพันธุ์ *S. aureus* PB36 (B), สายพันธุ์ PB57 (C) และแบคทีเรียก่อโรค *K. pneumoniae* สายพันธุ์ PB21 (D) 54

ภาพ 10 ตัวอย่างผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay ของ *X. stockiae* (bNP10.1_TH) (A) และ *X. stockiae* (bNP11.1_TH) (B) ต่อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* PB36 60

ภาพ 11 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแบคทีเรีย *X. stockiae* รหัส bNP10.1_TH (1), รหัส bNP10.2_TH (2), รหัส bNP10.3_TH (3), antibiotic disks (P) และ negative control (N) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *A. baumannii* สายพันธุ์ AB320 (A), สายพันธุ์ AB321 (B), สายพันธุ์ AB322 (C), สายพันธุ์ AB324 (D) 113

ภาพ 12 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี Broth micro dilution assay ของ *X. stockiae* รหัส bNP10.3_TH แถว A, รหัส bNP11.1_TH แถว C, รหัส bNP15.4_TH แถว G และ *Xenorhabdus* sp. รหัส bNP15.1_TH แถว E ต่อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* สายพันธุ์ ATCC 20475 (A) และ สายพันธุ์ PB36 (B) 114

ภาพ 13 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay ของ *X. stockiae* รหัส bNP10.1_TH (A), bNP15.4_TH (D) และ *Xenorhabdus* sp. รหัส bNP15.1_TH (B), รหัส bNP10.3_TH (C) ต่อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* สายพันธุ์ PB36 115

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Xenorhabdus และ *Photorhabdus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) จัดอยู่ในตระกูล (Family) *Enterobacteriaceae* มีรูปร่างแท่ง (Rod-shaped) ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลารอบตัว (Peritrichous flagella) สามารถก่อโรคในแมลงได้ อาศัยอยู่ภายในลำไส้ (foregut) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Entomopathogenic nematode หรือ EPN) ดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) โดยแบคทีเรีย *Xenorhabdus* อาศัยอยู่แบบพึ่งพากับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* ส่วนแบคทีเรีย *Photorhabdus* อาศัยอยู่แบบพึ่งพากับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* (Forst, et al., 1997) โดยแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด อาศัยอยู่ในลำไส้ตัวอ่อนระยะที่ 3 (Infective stage) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ซึ่งเป็นระยะเข้าทำลาย เมื่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะเข้าทำลายนั้นไชเข้าสู่ตัวอ่อนแมลงโดยผ่านปาก ทวารหนัก ผิวหนัง รูหายใจและรูเปิดทางธรรมชาติ ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะเคลื่อนที่ยังช่องว่างภายในลำตัวของตัวอ่อนแมลง จากนั้นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะถูกปล่อยออกมายังระบบเลือดของแมลง (hemolymph) และทำการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว อีกทั้งผลิตสาร toxin หรือสารเคมีต่าง ๆ ที่ทำให้ตัวอ่อนแมลงตายด้วยภาวะโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ภายใน 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังผลิตสาร secondary metabolite ที่มีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ทำหน้าที่ยับยั้งจุลชีพชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในหนอนแมลงไม่ให้เจริญได้อีกด้วย

ปัจจุบันมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (complete genome) ของแบคทีเรีย 2 ชนิดของ *Xenorhabdus* (*X. bovienii* SS-2004 และ *X. nematophila* ATCC 1906) และ 2 ชนิดของ *Photorhabdus* (*P. luminescens* subsp. *laumondii* strain TT01 และ *P. asymbiotica*) แบคทีเรียทั้งสองเหล่านี้มียีนจำนวนมากที่สามารถผลิตสาร secondary metabolite ที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพที่ก่อโรค และฆ่าแมลงศัตรูพืช (Bode, 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารเคมีที่ผลิตโดยแบคทีเรียจาก 2 จีนัส เช่น แบคทีเรีย *Xenorhabdus* ผลิตสาร nematophin, xenocoumacins, xenematide, xenortidas และ indole derivatives และแบคทีเรีย *Photorhabdus* ผลิตสาร isopropylstilbenes, ethylstilbenes, anthraquinones (AQs), และ siderophore photobactin (Bode, 2009)

ปัจจุบันทั่วโลกมีรายงานพบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 26 ชนิด และ *Photorhabdus* จำนวน 19 ชนิด (Sajnaga et al., 2020) ส่วนในประเทศไทยมีรายงานพบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในหลายจังหวัด โดยพบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *X. stockiae*, *X. miraniensis*, *X. ehlersii*, *X. vietnamensis*, *X. indica*, และ *X. japonica* (Tailliez et al., 2006; Fukruksa et al., 2017; Thanwisai et al., 2012; Yooyangket et al., 2018) แบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *P. luminescens, P. asymbiotica* subsp. *australis*, and *P. temperata* subsp. *temperata* (Muangpat et al., 2017; Thanwisai et al., 2012; Yooyangket et al., 2018)

จากรายงานในปี ค.ศ.1982 ของ Akhurst พบว่าสารปฏิชีวนะจากเชื้อแบคทีเรีย *X. luminescens*, *X. nematophilus* A24 และ *Xenorhabdus* sp. Q1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis*, *B. cereus* และ *Staphylococcus aureus* และแกรมลบ เช่น *Escherichia coli, Shigella sonei* ต่อมาในปี ค.ศ. 2008 Furgani และคณะ พบว่าสารปฏิชีวนะที่สร้างจาก *X. nematophila*, *X. budapestensis* และ *X. szentirmaii* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *E. coli,* และ *Klebsiella pneumoniae* และจากรายงานของ Inman และ Holmes เมื่อปี ค.ศ. 2012 พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophila* สามารถผลิตสารต้านจุลชีพทั้งในลักษณะที่ทนต่อความร้อนและไม่ทนต่อความร้อน และสารดังกล่าวยังมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ ล่าสุดในปี ค.ศ. 2014 Grundmann และคณะ ได้แยกสารใหม่ที่เรียกว่า Chaiyaphumines จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. PB61.4 ที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากจังหวัดชัยภูมิ และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum*

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Photorhabdus* และแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ทำการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์และในพื้นที่จังหวัดสระบุรี พบว่าแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดื้อยาได้ 10 สายพันธุ์ (Muangpat et al., 2017; Muangpat et al., 2020)

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (entomopathogenic nematode) ได้แก่ สกุล *Heterorhabditis* และสกุล *Steinernema* ในวงศ์ Heterorhabditidae และ Steinernematidae มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับแบคทีเรีย *Photorhabdus* และ *Xenorhabdus*

ขณะนี้ประเทศไทยค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 12 ชนิด จากจำนวนมากกว่า 120 ชนิด ได้แก่ *S. siamkayai*, *S. websteri*, *S. minutum*, *S. khoisanae*, *S. scarabaei*, *S. glaseri*, *S. riobrave*, *H. indica*, *H. baujardi*, *H. gerrardi*, *H. bacteriophora* และ *H. Somsookae* (Maketon et al., 2011; Maneesakorn et al., 2015; Maneesakorn et al., 2010; Noosidum

et al., 2010; Stock, 1998; Thanwisai et al., 2012; Vitta et al., 2017) นอกจากนี้ยังไม่เคยมีรายงานว่าพบแบคทีเรีย *Photorhabdus* และแบคทีเรีย *Xenorhabdus* อาศัยอยู่ร่วมกัน มีเพียงรายงานว่าพบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ต่างสายพันธุ์กันอาศัยอยู่ร่วมกันเท่านั้น (Ciezki et al., 2019)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย *Photorhabdus* และแบคทีเรีย *Xenorhabdus* โดยเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณอุทยานแห่งชาติ บริเวณข้างทาง ทุ่งนา ไร่ สวนต่าง ๆ (Thanwisai et al., 2012; Glaeser et al., 2017; Muangpat et al., 2017; Yimthin et al., 2021) มาทำการล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากดินด้วยตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) จากนั้นทำการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ซึ่งพบทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และสกุล *Heterorhabditis* และแบคทีเรีย *Photorhabdus* และแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ชนิดเดิมและชนิดใหม่ที่เพิ่งค้นพบในประเทศไทย นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานว่าพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และสกุล *Heterorhabditis* หรือแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และแบคทีเรีย *Photorhabdus* อาศัยอยู่ในตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งตัวเดียวกัน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงทำเพื่อแยกและจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และสกุล *Heterorhabditis* และแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และแบคทีเรียที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *recA* จากนั้นศึกษาดูการแข่งการเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระหว่างสกุล *Steinernema* และสกุล *Heterorhabditis* ที่จำแนกชนิดเรียบร้อยแล้ว และแบคทีเรียที่อาศัยร่วมภายในตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) ที่ตายด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ทำการแข่งขันเข้าทำลายในข้างต้น จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต่อแบคทีเรียก่อโรค 16 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acinetorbacter baumannii* จำนวน 4 สายพันธุ์) *Escherichia coli* จำนวน 3 สายพันธุ์ *Klebsiella pneumoniae* จำนวน 3 สายพันธุ์ *Enterococcus faecalis* จำนวน 1 สายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 2 สายพันธุ์และ *Staphylococcus aureus* จำนวน 3 สายพันธุ์ และนำแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคมาสกัดให้ได้สารสกัดหยาบและทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคอีกครั้ง พร้อมศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นเมื่อนำมาใช้เดี่ยว ๆ และร่วมกันกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้อาจจะเป็นความรู้พื้นฐานในการนำไปศึกษาเพิ่มเติมถึงชนิดของสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคเพื่อประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อสำรวจและจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อยู่ร่วมอาศัยในอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก

2. เพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA

3. เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *recA*

4. เพื่อทดสอบการแข่งขันเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (entomopathogenic nematode)

5. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

6. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* เมื่อใช้เดี่ยวและร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

ขอบเขตการวิจัย

เก็บตัวอย่างดินจากจากอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 44 จุด จุดละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด จำนวน 220 ตัวอย่าง นำมาแยกและจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อยู่ร่วมอาศัย จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA และจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *recA* ทดสอบการเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* และ *Heterorhabditis*

จากนั้นทำการคัดกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 16 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. baumannii* จำนวน 4 สายพันธุ์ *E. coli* จำนวน 3 สายพันธุ์ *K. pneumoniae* จำนวน 3 สายพันธุ์ *E. faecalis* จำนวน 1 สายพันธุ์ *P. aeruginosa* จำนวน 2 สายพันธุ์ และ *S. aureus* จำนวน 3 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* หรือ *Photorhabdus* โดยใช้ส่วนของ whole cell culture จากนั้นเลือกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* หรือ *Photorhabdus* ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ดี มาสกัดสารหยาบและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อการการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 16 สายพันธุ์อีกครั้ง นอกจากนี้ยังศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเมื่อใช้เดี่ยวและใช้ร่วมกันกับยาปฏิชีวนะ พร้อมหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum

Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Entomopathogenic nematode)

1. วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีความสัมพันธ์ในลักษณะพึ่งพาอาศัยกันกับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และแบคทีเรีย *Photorhabdus* (Akhurst, & Boemare, 1988) โดยแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จะอาศัยอยู่ภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* ส่วนแบคทีเรีย *Photorhabdus* จะอาศัยอยู่ภายในถุงเฉพาะของลำไส้ในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* (Bird, & Akhurst, 1983; Martens, & Goodrich-Blair, 2005) โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile) จะเข้าสู่ช่องว่างภายในตัวแมลงผ่านทางรูปาก รูหายใจทางผิวหนัง รูขับถ่ายของแมลง ซึ่งในช่องว่างภายในตัวแมลงจะมีน้ำเลือด จากนั้นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะปล่อยแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* เข้าสู่กระแสเลือดทำให้ตัวอ่อนแมลงตายภายในเวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ (septicemia) ในขณะนั้นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงก็ใช้เซลล์ของแบคทีเรียในการขยายพันธุ์แบบจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (ampimitic) และจะเติบโตอยู่ภายในตัวแมลงได้ถึง 2-3 รุ่น (generation) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะที่สาม (third stage juvenile) จะเริ่มหาอาหารสำรองและดูดกลืนเซลล์แบคทีเรียไว้ในช่อง (lumen) ของลำไส้ส่วนหน้า แล้วออกจากซากแมลงเพื่อหาเหยื่อแมลงตัวต่อไป (Akhurst, & Boemare, 1990) (ภาพ 1)

ภาพ 1 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ที่มา: http://microorganism.expertdoa.com/nematode_1.php

2. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema*

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* ถูกจัดอยู่ในอาณาจักร Animalia ไฟลัม Nematoda ชั้น Chromadorea ตระกูล Rhabditida วงศ์ Steinernematidae และอยู่ในสกุล *Steinernema* sp. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวงศ์ Steinernematidae ถูกพบครั้งแรกที่ประเทศเยอรมัน โดย Gotthold Steiner ในปี ค.ศ.1923 ไส้เดือยฝอยศัตรูแมลงสามารถทำให้แมลงที่เป็นเหยื่อตายได้ภายใน 48 ชั่วโมง โดยซากแมลงที่ตายจะมีผิวเป็นสีดำ ไม่เน่า และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถอาศัยอยู่ในธรรมชาติได้นานถึง 8 เดือน

2.1 ลักษณะทั่วไปของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema*

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* ตัวผู้มีขนาดเล็กกว่าตัวเมีย มีหางแหลมงอ มี spice 1 คู่แยกกัน มี testis 1 อัน มี gubernacum และไม่มี bursa ส่วนตัวเมียมีหางกลม มีรังไข่ 2 อันแยกไปด้านหน้า และด้านท้ายของลำตัวที่ปลายงอเล็กน้อย มี vulva อยู่ที่กึ่งกลางลำตัว โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* จะมีริมฝีปาก 6 อันเชื่อมต่อกัน

2.2 ความหลากชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema*

ปัจจุบันมีรายงานความหลากชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* จากหลายประเทศทั่วโลกจำนวน 100 ชนิด ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ความหลากชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema*

No.	Species	References	Location
1	*S. abbasi*	Elawad et al., 1997	Sultanate of Oman
2	*S. aciari*	Qiu et al., 2005	China
3	*S. affine*	Wouts et al., 1982	Denmark
4	*S. akhursti*	Qiu et al., 2005	China
5	*S. anatoliense*	Hazir et al., 2003	Turkey
6	*S. apuliae*	Triggiani et al., 2004	Italy
7	*S. arasbaranense*	Nikdel et al., 2011	Iran
8	*S. arenarium*	Wouts et al. 1982	Russia
9	*S. ashiuense*	Phan et al., 2006	Japan
10	*S. asiaticum*	Anis et al., 2002	Pakistan
11	*S. australe*	Edgington et al., 2009	Chile
12	*S. backanense*	Phan et al., 2006	Vietnam
13	*S. beddingi*	Qiu et al., 2005	China
14	*S. beitlechemi*	Çimen et al., 2016	South Africa
15	*S. bicornutum*	Tallosi et al., 1995	Serbia
16	*S. biddulphi*	Çimen et al., 2016	South Africa
17	*S. boemarei*	Lee et al., 2009	France
18	*S. borjomiense*	Gorgadze et al., 2018	Georgia
19	*S. brazilense*	Nguyen et al., 2010 Brazil	Brazil
20	*S. cameroonense*	Kanga et al., 2012	Cameroon
21	*S. carpocapsae*	Wouts et al. 1982	Czechoslovakia
22	*S. caudatum*	Xu et al., 1991	China
23	*S. ceratophorum*	Jian et al., 1997	China
24	*S. changbaiense*	Ma et al., 2012	China
25	*S. cholashanense*	Nguyen et al., 2008	China
26	*S. citrae*	Malan et al., 2011	South Africa
27	*S. colombiense*	Lopez-Nunez et al., 2008	Colombia
28	*S. costaricense*	Uribe-Lorío et al., 2007	Costa Rica
29	*S. cubanum*	Mráček et al., 1994	Western Cuba
30	*S. cumgarense*	Phan et al., 2006	Vietnam

No.	Species	References	Location
31	*S. diaprepesi*	Nguyen and Duncan, 2002	Florida
32	*S. eapokense*	Phan et al., 2006	Vietnam
33	*S. ethiopiense*	Tamirou et al., 2012	Ethiopia
34	*S. fabii*	Abate et al., 2016	South Africa
35	*S. feltiae*	Wouts et al. 1982	Denmark
36	*S. glaseri*	Wouts et al., 1982	USA
37	*S. goweni*	San-Blas et al., 2016	Venezuela
38	*S. guangdongense*	Qui et al., 2004	China
39	*S. hebeiense*	Chen et al., 2006	China
40	*S. hermaphroditum*	Stock et al., 2004	Indonesia
41	*S. huense*	Phan et al., 2014	Vietnam
42	*S. ichnusae*	Tarasco et al., 2008	Italy
43	*S. innovationi*	Çimen et al., 2015	South Africa
44	*S. intermedium*	Poinar, 1985	USA
45	*S. jeffreyense*	Malan et al., 2015	South Africa
46	*S. jollieti*	Spiridonov et al., 2004	USA
47	*S. karii*	Waturu et al., 1997	Kenya
48	*S. khoisanae*	Nguyen et al., 2006	South Africa
49	*S. khuongi*	Stock et al., 2019	Florida
50	*S. kraussei*	Travassos 1927	Germany
51	*S. kushidai*	Mamiya, 1988	Japan
52	*S. lamjungense*	Khatri-Chhetri et al., 2011	Nepal
53	*S. leizhouense*	Nguyen et al., 2006	Southern China
54	*S. litchii Steyn*	Steyn et al., 2017	South Africa
55	*S. litorale*	Yoshida, 2004	Japan
56	*S. loci*	Phan et al., 2001	Vietnam
57	*S. longicaudum*	Shen & Wang, 1991	China
58	*S. minutum*	Maneesakorn et al., 2010	Thailand
59	*S. monticolum*	Stock et al., 1997	Korea
60	*S. neocurtillae*	Nguyen and Smart Jr, 1992	USA

No.	Species	References	Location
61	*S. nepalense*	Khatri-Chhetri et al., 2011	Nepal
62	*S. nguyeni*	Malan et al., 2016	South Africa
63	*S. nyetense*	Kanga et al., 2012	Cameroon
64	*S. oregonense*	Liu and Berry, 1996	USA
65	*S. pakistanense*	Shahina et al., 2001	Pakistan
66	*S. papillatum*	San-Blas et al., 2015	Venezuela
67	*S. phyllophagae*	Nguyen and Buss, 2011	USA
68	*S. poinari*	Mráček et al., 2014	Czech Republic
69	*S. puertoricense*	Román and Figueroa, 1994	Puerto Rico
70	*S. pui*	Qiu et al., 2011	China
71	*S. puntauvense*	Uribe-Lorío et al., 2007	Costa Rica
72	*S. pwaniensis*	Puza et al., 2017	Tanzania
73	*S. ralatorei*	Grifaldo-Alcantara et al., 2017	Mexico
74	*S. rarum*	Mamiya, 1988	Argentina
75	*S. riobrave*	Cabanillas et al., 1994	USA
76	*S. riojaense*	Puža et al., 2020	Spain
77	*S. ritteri*	de Doucet & Doucet 1990	Argentina
78	*S. robustispiculum*	Phan et al., 2005	Vietnam
79	*S. sacchari*	Nthenga et al., 2014	South Africa
80	*S. sangi*	Phan et al., 2001	Vietnam
81	*S. sasonense*	Phan et al., 2006	Vietnam
82	*S. scapterisci*	Nguyen and Smart Jr, 1990	Uruguay
83	*S. scarabaei*	Stock and Koppenhöfer, 2003	USA
84	*S. schliemanni*	Spiridonov et al., 2010	Germany, Europe
85	*S. siamkayai*	Stock et al., 1998	Thailand
86	*S. sichuanense*	Mráček et al., 2006	China
87	*S. silvaticum*	Sturhan et al., 2005	Germany, Europe
88	*S. surkhetense*	Khatri-Chhetri et al., 2011	Nepal
89	*S. tami*	Luc et al., 2000	Vietnam
90	*S. taiwanensis*	Tseng et al., 2018	Taiwan

No.	Species	References	Location
91	*S. texanum*	Nguyen et al., 2007	USA
92	*S. thanhi*	Phan et al., 2001	Vietnam
93	*S. tielingense*	Ma et al., 2012	China
94	*S. tophus*	Çimen et al., 2014	South Africa
95	*S. unicornum*	Edgington et al., 2009	Chile
96	*S. xinbinense*	Ma et al., 2012	China
97	*S. xueshanense*	Mráček et al., 2009	China
98	*S. weiseri*	Mráček et al., 2003	Europe
99	*S. yirgalemense*	Nguyen et al., 2004	Ethiopia
100	*S. bertusi*	Katumanyane et al., 2019	South Africa

3. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis*

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* จัดอยู่ในอาณาจักร Animalia ไฟลัม Nematoda ชั้น Chromadorea ตระกูล Rhabditida Heterorhabditidae สกุล *Heterorhabditis* sp.

3.1 ลักษณะทั่วไปของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis*

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* ตัวเมียมี 2 ลักษณะ คือ Hermaphoditic female และ Amphimictic female โดยที่ Hermaphoditic female จะมีตัวขนาดใหญ่กว่าตัวเมียที่เป็น Amphimictic female โดยมีรังไข่ 2 อันแยกไปด้านหน้าและด้านท้ายของลำตัวที่ปลายงอเล็กน้อยมี valva อยู่ที่กึ่งกลางลำตัว เมื่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* โตเต็มวัยจะไม่มี stylet และมีริมฝีปาก 6 อัน แยกออกจากกัน มี labial tooth อยู่บริเวณส่วนหัวมีลักษณะเป็นฟันที่แข็งแรงใช้เจาะเข้าลำตัวของแมลงที่เป็นเหยื่อ

3.2 ความหลากชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis*

ปัจจุบันนี้มีรายงานความหลากชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* จากหลายประเทศทั่วโลก จำนวน 16 ชนิด ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ความหลากชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis*

No.	Species	References	Location
1	*H. amazonensis*	Andaló et al., 2006	Brazil
2	*H. atacamensis*	Edgington et al., 2011	Chile
3	*H. bacteriophora*	Poinar, 1976	South Australia
4	*H. baujardi*	Phan et al., 2003	Vietnam
5	*H. beicherriana*	Li et al., 2012	China
6	*H. downesi*	Stock et al., 2002	Ireland
7	*H. floridensis*	Nguyen et al., 2006	USA
8	*H. georgiana*	Nguyen et al., 2008	Georgia
9	*H. indica*	Poinar et al., 1992	India
10	*H. marelatus*	Liu & Berry, 1996	USA
11	*H. megidis*	Poinar et al., 1987	USA
12	*H. mexicana*	Nguyen et al., 2004	Mexico
13	*H. noenieputensis*	Malan et al., 2014	South Africa
14	*H. safricana*	Malan et al., 2008	South Africa
15	*H. taysearae*	Shamseldean et al., 1996	Egypt
16	*H. zealandica*	Poinar, 1990	New Zealand

แบคทีเรีย (Bacteria)

1. ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของแบคทีเรีย

Xenorhabdus และ *Photorhabdus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) จัดอยู่ในตระกูล (Family) *Enterobacteriaceae* รูปร่างแท่ง (Rod-shaped) ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตร์ทได้ (Farmer et al., 1989) เป็น facultative anaerobic คือสามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะเข้าทำลาย (infective stage juvenile) ในลักษณะพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) โดยแบคทีเรีย *Xenorhabdus* อาศัยอยู่ภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* ส่วนแบคทีเรีย *Photorhabdus* อาศัยอยู่ภายในถุงเฉพาะของลำไส้ในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* (Bird, & Akhurst, 1983; Martens, & Goodrich-Blair, 2005) โดยตัวอ่อนระยะติดต่อของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นตัวพาแบคทีเรียเข้าสู่แมลงผ่านทางปาก รูหายใจ รูขับถ่าย และรูเปิดทางธรรมชาติแล้วจึงเข้าสู่ช่องว่างภายในตัวของแมลง (haemocoel) แล้วทำการปล่อยแบคทีเรียเข้าสู่กระแสเลือด

ของแมลงเพื่อแบคทีเรียจะทำการเพิ่มจำนวนและสร้างสารพิษ (toxic) จนทำให้แมลงเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ (septicemia) แล้วจะตายอย่างรวดเร็วภายใน 24-48 ชั่วโมง (Maketon et al., 2011)

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* มี 2 ระยะ คือ ระยะปฐมภูมิ (primary form) และระยะทุติยภูมิ (secondary form) ซึ่งทั้งสองระยะนี้มีคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกัน (Akhurst, & Boemare, 1988) ในระยะปฐมภูมิจะสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่มีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น Hydroxystilbense และ Polyketides ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์ต่าง ๆ ไม่สามารถย่อยสลายซากตัวอ่อนแมลงได้ (Boemare, 2002) เป็นระยะที่มี intracellular inclusion ที่เป็นผลึกโปรตีน อีกทั้งยังเป็นระยะที่สามารถสร้างสารที่ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเกิดการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และเปลี่ยนแบคทีเรียไปเป็นระยะทุติยภูมิได้ ส่วนแบคทีเรีย *Photorhabdus* มี 2 ระยะเช่นกันกับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* แต่แตกต่างกันในส่วนของการสร้างสารเพราะแบคทีเรีย *Photorhabdus* จะสร้างสารเรืองแสง (luminescens) ในระยะปฐมภูมิ (Leisman, Waukau, & Forst, 1995)

2. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

2.1 แบคทีเรีย *Xenorhabdus*

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* (Bird, & Akhurst, 1983) ได้จัดจำแนกตามอนุกรมวิธานไว้ดังนี้ อาณาจักร Bacteria, ชั้น Gammaproteobacteria, อันดับ Enterobacteriales, วงศ์ *Enterobacteriacea* และสกุล *Xenorhabdus* (Thomas, & Poinar, 1979)

2.1.1 ลักษณะทั่วไป

Xenorhabdus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (rod shape) มีขนาดประมาณ 0.8-2 × 4-10 ไมโครเมตร อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 25 องศาเซลเซียส สามารถเคลื่อนที่ได้ (motile) โดยจะมีแฟลกเจลลาแบบรอบตัว (peritrichous flagellar) ไม่มีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไม่สามารถย่อยสลายยูเรีย และไม่สามารถรีดิวซ์ (reduce) ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ หากนำไปย้อมสีซาฟรานิน (Safranin) จะติดสีแดง (Thomas & Poinar, 1979)

2.1.2 ลักษณะและสีของโคโลนี

เมื่อทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *Xenorhabdus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Bromothymolblue Agar (NBTA) ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียสในห้องมืด เป็นระยะเวลา 3-4 วัน พบว่าแบคทีเรียระยะปฐมภูมิ (primary) มีลักษณะโคโลนีสีน้ำเงินหรือสีน้ำตาลจากการดูดซับสีน้ำเงินของ bromothymol blue โดยโคโลนีมีลักษณะขอบไม่เรียบ (rough) โค้งนูน (covex) หรือนูนตรงกลางของโคโลนีเล็กน้อย (umbonate) และแผ่กว้าง (swarming) (Thanwisai et al., 2012)

2.1.3 วงจรชีวิต

วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* แบ่งเป็น 2 ระยะ ระยะแรกแบคทีเรียจะอาศัยอยู่ในลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยไม่ก่อให้เกิดโรค ระยะที่สองแบคทีเรียจะอาศัยอยู่ในซากของแมลงโดยออกจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าสู่กระแสเลือดของแมลงแล้วก่อให้เกิดภาวะเลือดเป็นพิษทำให้แมลงตาย ซึ่งแมลงที่ตายจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จะมีลักษณะเฉพาะคือ จะไม่เน่าเปื่อย และมีสีดำหรือน้ำตาล (Bode, 2009)

2.1.4 การสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (secondary metabolite)

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้สามารถฆ่าแมลง (insecticidal) ยับยั้งเชื้อรา (antifungal) ยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial) ฆ่าไส้เดือนฝอย (nematicidal) เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ซึ่งสารจะถูกสร้างแตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (Brachmann, & Bode, 2013) เช่น *X. nematophila* ที่สามารถสร้างสารประกอบ benzylideneactone (BZA) ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมีคุณสมบัติทนความร้อน เป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคในพืชได้และยังมีหน้าที่เป็นเอนไซม์ยับยั้ง phospholipase A2 (PLA2) ในการตอบสนองภูมิคุ้มกัน (immune reaction) ของตัวอ่อนแมลง (Kwon, & Kim, 2008) นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารประกอบ xenortides D ที่มีฤทธิ์ในการต้าน *Plasmodium falciparum* และ *Trypanosoma brucei* โดย *X. bovienii* สามารถสร้างสารประกอบ xenocoumacins (XCNs) ที่มี คุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (McInerney et al., 1991) นอกจากนี้ *Xenorhabdus* sp. PB 61.4 สามารถสร้างสาร depsipentapeptides ที่มีชื่อว่า chaiyaphumines A-D (1-4) ที่มีฤทธิ์ต้าน *Plasmodium falciparum* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมาลาเรีย (malaria) และยังสามารถต้านโปรโตซัวอื่นที่ก่อโรคได้อีกด้วย (Grundmann et al., 2014)

2.1.5 ความหลากชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus*

ปัจจุบันมีรายงานความหลากชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จากหลายประเทศทั่วโลก จำนวน 26 ชนิด ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ความหลากชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus*

Genus	Species	References
Xenorhabdus	*nematophila*	Thomas & Poinar, 1979
	bovienii	Akhurst & Boemare, 1988
	poinarii	Akhurst & Boemare, 1988
	beddingii	Akhurst & Boemare, 1988
	japonica	Nishimura et al.,1994
	budapestensis	Lengyel et al., 2005
	ehlersii	Lengyel et al., 2005
	innexi	Lengyel et al., 2005
	szentirmaii	Lengyel et al., 2005
	cabanillasii	Tailliez et al., 2010)
	doucetiae	Tailliez et al., 2010)
	griffiniae	Tailliez et al., 2010)
	hominickii	Tailliez et al., 2010)
	koppenhoeferi	Tailliez et al., 2010)
	kozodoii	Tailliez et al., 2010)
	maeonii	Tailliez et al., 2010)
	miraniensis	Tailliez et al., 2010)
	romanii	Tailliez et al., 2010)
	stockiae	Tailliez et al., 2010)
	indica	Somvanshi et al., 2006
	vietnamensis	Tailliez et al., 2012
	magdalenensis	Tailliez et al., 2012
	ishibashii	Kuwata et al., 2013
	khoisanae	Ferreira et al., 2013
	thuongxuanensis	Kämpfer et al.., 2017
	eapokensis	Kämpfer et al., 2017

2.2 แบคทีเรีย *Photorhabdus*

แบคทีเรีย *Photorhabdus* ที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* (Bird, & Akhurst, 1983) อาณาจักร Bacteria ชั้น Gammaproteobacteria อันดับ Enterobacteriales วงศ์ *Enterobacteriaceae* และสกุล *Photorhabdus* (Boemare et al. 1993)

2.2.1 ลักษณะทั่วไป

Photorhabdus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (rod shape) มีขนาดประมาณ 0.8-2 × 4-10 ไมโครเมตร สามารถเคลื่อนที่ได้ (motile) มีแฟลกเจลลาแบบรอบตัว (peritrichous flagella) หากนำไปย้อมสีซาฟรานิน (Safranin) จะติดสีแดง (Thomas, & Poinar, 1979)

2.2.2 ลักษณะและสีของโคโลนี

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Photorhabdus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Bromothymol blue Triphenyl tetrazolium chloride Agar (NBTA) ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ในห้องมืดเป็นระยะเวลา 3-4 วัน พบว่าแบคทีเรียระยะปฐมภูมิมีลักษณะโคโลนีสีเขียว ขอบไม่เรียบ (rough) โค้งนูน (covex) หรือนูนตรงกลางของโคโลนีเล็กน้อย (umbonate) และมันวาว (Thanwisai et al., 2012)

2.2.3 วงจรชีวิต

วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Photorhabdus* แบ่งเป็น 2 ระยะ ระยะแรก แบคทีเรียจะอาศัยอยู่ในลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยไม่ก่อให้เกิดโรค ระยะที่สองแบคทีเรียจะอาศัยอยู่ในซากของแมลง โดยออกจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าสู่กระแสเลือดของแมลงแล้วก่อให้เกิดภาวะเลือดเป็นพิษทำให้แมลงตาย ซึ่งแมลงที่ตายจากแบคทีเรีย *Photorhabdus* จะมีลักษณะเฉพาะ คือ จะไม่เน่าเปื่อย และมีสีส้ม แดง (Bode, 2009)

2.2.4 การสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (secondary metabolite)

แบคทีเรีย *Photorhabdus* สามารถสร้าง 2-isopropyl-5-(3-phenyl-oxiranyl)-benzene-1,3-diol และมีความสามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* เชื้อดื้อยา *Staphylococcus aureus* (RN4220) และยังสามารถก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) มะเร็งของมนุษย์ เช่น MCF-7 wt, H460 และ Jurkat ได้อีกด้วย (Hu, Webster, & Chen, 2006) นอกจากนี้ยังสร้างสาร transcinnamic acid (tCA) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. fragariae*, *C. acutatum* และ *Fusicladium effusum* เป็นสาเหตุของโรค Pecan scab ในพืช (Brachmann, & Bode, 2013)

2.2.5 ความหลากชนิดของแบคทีเรีย *Photorhabdus*

ปัจจุบันมีรายงานความหลากชนิดของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จากหลาย ประเทศทั่วโลก จำนวน 5 ชนิด ดังแสดงในตาราง 4

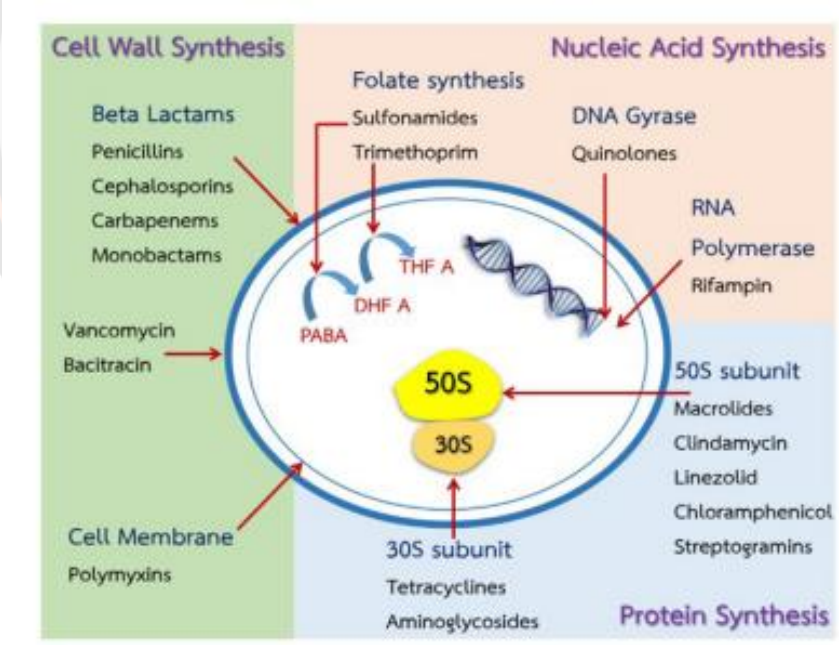
ตาราง 4 ความหลากชนิดของแบคทีเรีย *Photorhabdus*

Genus	Species	References
Photorhabdus	*luminescens*	(Thomas, & Poinar, 1979)
	luminescens subsp. *luminescens*	(Thomas & Poinar, 1979)
	luminescens subsp. *akhurstii*	(Fischer et al., 1999)
	luminescens subsp. *laumondii*	(Fischer et al., 1999)
	luminescens subsp. *kayaii*	(Hazir et al., 2004)
	luminescens subsp. *thracensis*	(Hazir et al., 2004)
	luminescens subsp. *caribbeanensis*	(Tailliez et al., 2010)
	luminescens subsp. *hainanensis*	(Tailliez et al., 2010)
	luminescens subsp. *kleinii*	(An, & Grewal, 2011)
	luminescens subsp. *noenieputensis*	(Ferreira et al., 2013)
	luminescens subsp. *sonorensis*	(Orozco et al., 2013)
	luminescens subsp. *namnaonensis*	(Glaeser et al., 2017)
	asymbiotica	(Fischer et al., 1999)
	asymbiotica subsp. *asymbiotica*	(Fischer et al., 1999)
	asymbiotica subsp. *australis*	(Akhurst et al., 2004)

Genus	Species	References
Photorhabdus	*temperata*	(Fischer et al., 1999)
	temperata subsp. *temperata*	(Tailliez et al., 2010)
	temperata subsp. *thracensis*	(Tailliez et al., 2010)
	temperata subsp. *cinerea*	(Tóth, & Lakatos, 2008)
	temperata subsp. *kayaii*	(Ferreira et al., 2014)
	temperata subsp. *tasmaniensis*	(Ferreira et al., 2014)
	temperata subsp. *stackebrandtii*	(An, & Grewal, 2010)
	zealandica	(Ferreira et al., 2014)
	heterorhabditis	(Ferreira et al., 2014)

ยาต้านแบคทีเรีย

ยาปฏิชีวนะเป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีผลกับเชื้อไวรัส ใช้รักษาโรคหรืออาการที่ติดเชื้อแบคทีเรีย โดยยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เรียกว่า bacteriostatic และยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เรียกว่า bactericidal ซึ่งปกติการออกฤทธิ์ของยาจะครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และมีฤทธิ์ต่อไวรัสบางชนิด เรียกว่า broad spectrum ส่วนออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวมและลบ แต่ไม่มีผลต่อไวรัส เรียกว่า Medium spectrum หากมีการออกฤทธิ์แบบเจาะจงเฉพาะกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง เรียกว่า narrow-spectrum กลไกการออกฤทธิ์ของยาแบ่งออกเป็นหลายกลุ่ม ได้แก่ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis inhibitors) ยับยั้งการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (nucleic acid synthesis inhibitors) ยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมในแบคทีเรีย (antimetabolites) ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (cell wall synthesis inhibitors) และขัดขวางการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane function inhibitors) (ภาพ 2)



ภาพ 2 กลไกการออกฤทธิ์ของยา

ที่มา: Kapoor G, Saigal S, Elongavan A., 2017

1. ยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis inhibitors)

ยาในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยออกฤทธิ์บริเวณไรโบโซม โดยขนาดไรโบโซมของแบคทีเรียเท่ากับ 80S ประกอบด้วยหน่วยย่อย ได้แก่ 30S และ 50S ซึ่งมีขนาดแตกต่างจากไรโบโซมของยูคาริโอตที่มีขนาดเท่ากับ 80S ดังนั้นยาในกลุ่มนี้จึงไม่มีผลกระทบต่อการสร้างโปรตีนนของเซลล์ร่างกายของคน ยาปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ยากลุ่ม aminoglycoside, chloramphenicol, macrolides, streptogramins, tetracyclines และ lincosamides (Etebu, & Arikekpar, 2016)

1.1 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside เช่น streptomycin, gentamicin, tobramycin และ amikacin โดยยาจะซึมผ่านผนังเซลล์และชั้นเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไป ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างโปรตีนโดยจับกับหน่อยย่อยไรโบโซม 30S แทนที่อะตอมของของประจุบวกในชั้นผนังเซลล์

1.2 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม tetracyclines ทำหน้าที่ขัดขวางขบวนการสร้างโปรตีน โดยไปจับกับหน่วยย่อยไร โบโซม 30S เกิดการยับยั้งการรวมตัวกันของ tRNA กับไรโบโซม โดยการออกฤทธิ์ของยา ครอบคลุมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

1.3 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม macrolides เช่น erythromycin, azithromycin และ clarithromycin ออกฤทธิ์ยับยั้งขบวนการ elongation ในระหว่างการสร้างสายโปรตีน โดยแย่งจับส่วน 23S rRNA ซึ่งเป็นองค์ประกอบของหน่วยย่อยไรโบโซม 50S สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด

2. ยากลุ่มที่ออกอฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (nucleic acid synthesis inhibitors)

ยาในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ขัดขวางเอนไซม์ของการสังเคราะห์นิวคลิอิก หรือไปแย่งจับกับกรดนิวคลิอิก และขัดขวางการทำงานของดีเอ็นเอ ยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ ยากลุ่ม quinolones, metronidazole และ rifamycin (Etebu, & Arikekpar, 2016)

2.1 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม quinolones เช่น nalidixic acid, oxolinic, cinoxacin, ciprofloxacin และ monifloxacin เข้าไปจับกับหน่วยย่อย A ของเอนไซม์ DNA gyrase ส่งผลให้เกิดการยับยั้งหน้าที่ของเอนไซม์ในขณะที่จับกับสาย DNA ทำให้กระทบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ

2.2 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม rifamycin เช่น rifampin ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase โดยเข้าไปจับกับหน่วยย่อยเบต้า เกิดการยับยั้งการสร้างสาย mRNA ทำให้การทำหน้าที่ของเซลล์ทำงานผิดปกติ

2.3 ยาปฏิชีวนะ metronidazole โครงสร้างของยามีหมู่ไนโตร (nitro) จึงสามารถทำลายดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้ เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction) โดยเอนไซม์ nitroreductase

3. ยากลุ่มที่ออกอฤทธิ์ยับยั้งเมตาบอลิซึมในแบคทีเรีย (antimetabolites)

ยาในกลุ่มนี้จะรบกวนเมตาบอลิซึม โดยโครงสร้างของยาจะลอกเลียนแบบและเข้าแข่งขัน (competitive inhibitor) แทนที่ปัจจัยภายในเซลล์ที่มีโครงสร้างคล้ายกัน ทำให้ปัจจัยภายในเซลล์ไม่สารถทำหน้าที่ได้ปกติ จึงเกิดการยับยั้งยาเกิดขึ้น ยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ ยากลุ่ม trimethoprim และยา sulfonamides (Etebu, & Arikekpar, 2016)

4. ยากลุ่มที่ออกอฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (cell wall synthesis inhibitors)

ยาในกลุ่มนี้จะขัดขวางการสร้างสาย peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ดั้งนั้นยานี้จึงไม่มีผลต่อเซลล์ยูคาริโอต ส่วนแบคทีเรียที่ไม่สร้างผนังเซลล์ เช่น mycoplasma จะดื้อต่อยากลุ่มนี้โดยธรรมชาติ ยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ ยากลุ่ม β-lactams ยากลุ่ม glycopeptide และยา bacitracin เป็นต้น (Etebu, & Arikekpar, 2016)

4.1 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactams เช่น Penicillins และ Cephalosporin มีองค์ประกอบสำคัญเป็นโครงสร้างวงแหวนของ β-lactams ยากลุ่มนี้จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาย peptidoglycan คือเอนไซม์ในกลุ่ม penicillin binding protein (PBP) จึงเกิดการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์และสุดท้ายทำให้เซลล์ตายในที่สุด

4.2 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม glycopeptide เช่น vancomycin จะเข้าจับกับ D-alanine-D-alanine บริเวณปลายสาย pentapeptide เกิดการยับยั้งเอนไซม์ transglycosylase ซึ่งเป็นตัวนำโมเลกุลต้นกำเนิดไปสร้างสาย peptidoglycan ส่งผลให้การสร้างสาย peptidoglycan หยุดลง (Lambert et, al. 2002)

5. ยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ขัดขวางการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane function inhibitors)

ออกฤทธิ์เปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือยับยั้งหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียตาย เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียมีโครงสร้างคล้ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ยูคาริโอตจึงมีผลข้างเคียงสูง ยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ ยากลุ่ม polymyxins เช่น polymyxin B และ colistin ผลิตมาจากเชื้อ *Baciilus polymyxa* เป็นสาร polypeptide ที่เชื่อมกับกรดไขมันที่มีประจุบวก จึงสามารถจับกับหมู่ฟอตเฟสที่มีประจุลบของ lipopolysaccharide ในชั้นผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ โดยยาในกลุ่มนี้ จะเข้าไปจับกับ phospholipids ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลกระทบกับโครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น การควบคุมสมดุลแรงดันสารภายในและภายนอกเซลล์ (Etebu, & Arikekpar, 2016)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

เพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*

ทำการเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง *G. mellonella* เพื่อใช้ในการล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกมาจากตัวอย่างดินด้วยวิธี Baiting technique ซึ่งอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้งนั้นประกอบด้วยผงยีสต์ 50 กรัม แป้งสาลี 200 กรัม น้ำผึ้ง 100 มิลลิลิตร และกลีเซอรอล 100 มิลลิลิตร จากนั้นรอให้หนอนกินรังผึ้งฟักตัวใช้เวลาประมาณ 10-12 วัน และรอไปอีก 7-8 วันเพื่อให้หนอนกินรังผึ้งโตเต็มวัยและมีการสร้างเส้นใยขึ้นแล้วจึงนำมามาใช้ในการทดลอง

การเก็บตัวอย่างดินจากเขตพื้นที่การเกษตร จังหวัดพิษณุโลก

เก็บตัวอย่างดินจากอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 44 จุด จุดละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 220 ตัวอย่าง โดยวิธีการเก็บตัวอย่างดินจะใช้เสียมขุดดินให้ลึกลงไปจากพื้นดินประมาณ 10 เซนติเมตร แล้วเก็บดินจุดละประมาณ 300-500 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกพร้อมจดบันทึกปัจจัยทางกายภาพของดิน ได้แก่ ความชื้นของดิน ค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน ลักษณะของเนื้อดินและอุณหภูมิของดิน หลังจากนั้นใช้หนังยางมัดปิดถุงพลาสติกเพื่อกันตัวอย่างดินไม่ให้สูญเสียความชื้น และทำการจดบันทึกตำแหน่งของบริเวณที่เก็บดิน ได้แก่ Longtitue Attitude และ Latitiude เสร็จแล้วถ่ายรูปแต่ละบริเวณที่เก็บตัวอย่างดิน จากนั้นนำตัวอย่างดินมาทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากดิน

การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากดินจะใช้วิธี Baiting Technique โดยหลังจากทำการเก็บตัวอย่างดินมาแล้ว จะนำตัวอย่างดินเหล่านั้นมาใส่ลงในกล่องพลาสติกตัวอย่างละกล่อง แล้วนำหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) ใส่ลงในแต่ละกล่องตัวอย่างดิน จำนวน 5 ตัว ต่อ 1 ตัวอย่างดิน แล้วปิดฝากล่องวางกล่องดินแบบกลับหัวทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบระยะเวลา 5 วัน ให้เก็บซากหนอนกินรังผึ้งที่ตายโดยหนอนกินรังผึ้งที่ตายด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะมีลักษณะตายแบบไม่เน่า (ทำการล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากดินซ้ำอีกสองครั้ง) เก็บซากตัวอ่อนแมลงเพื่อไปแยกไส้เดือนฝอยศัตรูต่อไป

การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอ่อนของหนอนกินรังผึ้งและการเก็บรักษา

การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งทำด้วยวิธี White trap (White, 1927) โดยเริ่มจากการเตรียมจานเพาะเชื้อขนาดเล็ก (33 x 10 มิลลิเมตร) วางคว่ำลงบนจานเพาะเชื้อขนาดปกติ (90 x 15 มิลลิเมตร) จากนั้นวางกระดาษกรองลงบนฝาจานเพาะเชื้อเป็นสะพาน แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงบนกระดาษกรองและรอบ ๆ จากนั้นวางซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งที่แยกได้ลงบนกระดาษกรอง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-20 วัน ตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะติดต่อ (Infective juvenile) จะออกมาจากซากของตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งลงไปอยู่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ตรวจดูไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะติดต่อภายใต้กล้องสเตอริโอ (Stereo microscope) ล้างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเก็บไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะติดต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

เพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทำได้โดยการใช้ตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง นำกระดาษกรองวางลงในจานเพาะเชื้อขนาดเล็ก แล้วจึงนำตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งจำนวน 2 ตัว ใส่ลงไปในจานเพาะเชื้อขนาดเล็ก จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นที่มีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงประมาณ 500 ไมโครลิตร หยดลงบนตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง ปิดฝาจานเพาะเชื้อและพันพาราฟิล์มรอบจานเพาะเชื้อแล้วนำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไชเข้าตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง และตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งจะตายภายใน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นสามารถนำซากหนอนกินรังผึ้งไปแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงหรือแยกแบคทีเรียได้

การแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ออกจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

แยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากน้ำเลือดของซากหนอนกินรังผึ้ง โดยเริ่มจากนำซากหนอนกินรังผึ้งมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ (100%) รอให้แห้ง จากนั้นใช้ Forcep ปลายแหลมฉีกปล้องที่ 3 ของซากหนอนกินรังผึ้ง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะส่วนน้ำเลือดมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride agar (NBTA agar) (Akhurst, & Boemare, 1988) ปิดจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์มและเก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 3-4 วัน โคโลนีของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จะมีโคโลนีสีน้ำเงินและแบคทีเรีย *Photorhabdus* จะมีโคโลนีสีเขียว นำโคโลนีเดี่ยวไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) เขย่าด้วย Shaker AK85 (บริษัท Infors HT, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) ที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

1. การสกัด DNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

สกัด DNA จากแบคทีเรียที่แยกได้แต่ละไอโซเลต โดยใช้ชุดสกัด Phire tissue direct PCR master mix บริษัท Thermoscientific โดยเริ่มจากเติม Dilution buffer 20 ไมโครลิตร ผสมกับ DNA release 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ tip บดไส้เดือนฝอยให้ละเอียด เป็นเวลา 7 นาที ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex และนำไป Spindown บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการเก็บ supernatant ที่ -20 องศา เพื่อนำไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *28S rDNA*

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Veriti Thermal Cycler (บริษัท AB Applied Biosystems, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *28S rDNA* โดยใช้ไพร์เมอร์ 539_F (5'GGATTTCCTTAGTAACTGCGAGTG-3') และ 535_R (5'TAGT CTTTCGCCCCTATA CCCTT-3') (Stock & Watson, 2001) ความยาวของผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 850 คู่เบส โดย Thermal Cycling ที่ใช้คือ จำนวน 1 รอบ สำหรับ Pre-denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 35 รอบ สำหรับ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาทีและ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และจำนวน 1 รอบ สำหรับ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ได้เพิ่มปริมาณแล้วด้วยการเทคนิคเจลอะกาโรสอิเลคโทรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis) โดยใช้ความเข้มข้นของเจล 1.2% ในสารละลาย 0.5% TBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide) ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

1. การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit (Blood/Culture cell) โดยเริ่มจากเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และลงในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดมาปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบน (supernatant) ทิ้ง เติม GT buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่า (Vortex) ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็น

เวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม Proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปบ่ม (Waterbath, บริษัท Memment, ประเทศเยอรมัน) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม GB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่ม (Waterbath, บริษัท Memment, ประเทศเยอรมัน) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมแอลกอฮอล์ (100%) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วย้ายสารละลายทั้งหมดลงใน GD column ที่อยู่บน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที ทิ้งสารละลายด้านล่างและนำ GD column กลับมาใส่ใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตรหลอดเดิม เติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายด้านล่างแล้วนำ GD column กลับมา ใส่ใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตรเดิมอีกครั้ง เติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงใน GD column ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ GD column แห้ง หลังจากนั้นย้าย GD column ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution buffer ที่บ่ม (Waterbath, บริษัท Memment, ประเทศเยอรมันนี) ไว้ในอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง GD column ตั้งทิ้งไว้ 5-20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกลงมา ดีเอ็นเอจะถูกตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอะกาโรสอิเลคโทรโฟรีซิสโดยใช้ความเข้มข้นของเจล 0.8 % ในสารละลาย 0.5 % TBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส จากนั้นจะย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ตรวจสอบดีเอ็นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *recA*

ในส่วนของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Veriti Thermal Cycler (บริษัท AB Applied Biosystems, ประเทศสหรัฐอเมริกา) บริเวณยีน *recA* โดยใช้ไพร์เมอร์ *recA*_F (5’-GCTATTGATGAAAATAAACA-3’) และ *recA*_R (5’ –RATTTTRTC WCCRTT RTAGCT-3’) (Stock & Watson, 2001) ความยาวของผลผลิตจะอยู่ที่ 890 คู่เบส โดย Thermal Cycling ที่ใช้จะแตกต่างกันระหว่างแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล หากเป็นแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จะใช้ Thermal Cycling จำนวน 1 รอบ สำหรับ Pre-denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จำนวน 30 รอบ สำหรับ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที และจำนวน 1 รอบ สำหรับ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 7 นาที (Thanwisai et al., 2012) ส่วน Thermal Cycling ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จะใช้ Thermal Cycling จำนวน 1 รอบ สำหรับ Pre-denature ที่อุณหภูมิ

95 องศา เซลเซียส 5 นาที จำนวน 30 รอบ สำหรับ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที และจำนวน 1 รอบ สำหรับ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที (Thanwisai et al., 2012) จากนั้นทำการตรวจสอบความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ได้เพิ่มปริมาณแล้วด้วยเทคนิคเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของเจล 1.2% ในสารละลาย 0.5 % TBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส จากนั้นจะย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เหมือนกับการทดลองในข้อ 3.7.2 และ 3.8.2 สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียตามลำดับ และส่งไปยังบริษัท Macrogen Inc. Service ที่ประเทศเกาหลีใต้เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบส

ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย

สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *28S rDNA* ส่วนของแบคทีเรียนั้นจะทำการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *recA* ตรวจสอบความถูกต้องของนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 2 บริเวณด้วยโปรแกรม SeqManII (DNASTAR inc., Wisconsin, USA) เทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Multiple sequences alignment ด้วย โปรแกรม Clustal W (Thompson et al., 1994) หลังจากนั้นจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียด้วยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *28S rDNA* และ *recA* จากนั้นจะนำไปทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่แล้วใน NCBI (http://blast.ncbi.nlm. nih.gov/Blast.cgi) และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Maximum likelihood ตามวิธี Tamura Nei ด้วย boostrap 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7.0 (Tamura et al., 2013)

การทดสอบการแข่งขันการเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งระหว่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema siamkayai* (eNP11.1_TH) และสกุล *Heterorhabditis* indica (eACM14.1_TH)

ทดสอบการเข้าแข่งขันของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 สกุล โดยเลือกจากสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในไทย ได้แก่ ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema siamkayai* และสกุล *Heterorhabditis* indica ในการศึกษาครั้งนี้เลือกไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* รหัส eNP11.1_TH ที่

แยกได้จากพื้นที่อำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก และสกุล *H. indica* รหัส eACM14.1_TH ที่แยกได้จากพื้นที่การเกษตร จังหวัดเชียงใหม่ มาแข่งขันกัน โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม เริ่มจากเตรียมจานเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร จำนวน 4 จาน พร้อมทั้งวางกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใส่ตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว ลงในแต่ละจาน เพื่อใช้เป็นจานทดสอบ โดยในกลุ่มที่ 1 เป็นจานควบคุมที่ 1 จะทำการใส่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *S. siamkayai* รหัส eNP11.1_TH จำนวน 50 ตัว ลงไปในจานทดสอบ กลุ่มที่ 2 เป็นจานควบคุมที่ 2 ใส่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *H. indica* รหัส eACM14.1_TH จำนวน 50 ตัว กลุ่มที่ 3 เป็นจานควบคุมที่ 3 ไม่มีการใส่ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สกุล และสำหรับกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มทดสอบ โดยจะใส่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *S. siamkayai* รหัส eNP11.1_TH จำนวน 50 ตัว และสกุล *H. indica* รหัส eACM14.1_TH จำนวน 50 ตัว ลงไปในจานทดสอบเดียวกัน จากนั้นปิดฝาจานทดสอบด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตระยะเวลาการตายของตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งในช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งที่ตายด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะมีลักษณะตายแบบ ไม่เน่า และเก็บซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งที่ตายไปแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากน้ำเลือดของซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ที่ตายด้วยไส้เดือยฝอยศัตรูแมลงในการทดสอบการเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งระหว่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema siamkayai* (eNP11.1_TH) และสกุล *Heterorhabditis indica* (eACM14.1_TH)

แยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากน้ำเลือดของซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง โดยเริ่มจากนำซากหนอนกินรังผึ้งมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ (100%) รอให้แห้ง จากนั้นใช้ Forcep ปลายแหลมฉีกปล้องที่ 3 ของซากหนอนกินรังผึ้ง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะส่วนน้ำเลือดมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient bromothymol blue agar (NBTA agar) (Akhurst, & Boemare, 1988) ปิดจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์มและเก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 3-4 วัน สังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรีย *Xenorhabdus* มีโคโลนีสีน้ำเงินและแบคทีเรีย *Photorhabdus* มีโคโลนีสีเขียว

การศึกษาประสิทธิภาพของของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

1. การเตรียมเซลล์แบคทีเรียก่อโรค

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรค 16 สายพันธุ์ จากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้แก่ *A. baumannii* จำนวน 4 สาย *E. coli* จำนวน 3 สายพันธุ์ *K. pneumoniae* จำนวน 3 สายพันธุ์ *E. faecalis* จำนวน 1 สายพันธุ์ *P. aeruginosa* จำนวน 2 สายพันธุ์ และ *S. aureus* จำนวน 3 สายพันธุ์ (ตารางที่ 5) บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) และบ่มด้วยตู้บ่มเชื้อ (Incubator Model 1565 บริษัท Sheldon Manufacturing ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาละลายในสารละลาย 0.85% NaCl ปรับความขุ่นของเซลล์ให้ได้ 0.5 MacFarland standard (Seier-Petersen et al., 2014) จากนั้นเจือจางแบคทีเรียลงทีละ 10 เท่าจนถึงระดับความเจือจาง 10^{-6} ดูดสารละลายแบคทีเรียที่ระดับความเจือจาง 10^{-5}-10^{-6} จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (Spreader) ทิ้งไว้สักครู่จนผิวหน้าอาหารแห้ง โดยแต่ละความเจือจางทำ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณหาค่า Colony forming unit (CFU/ml) เพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรคให้ได้เท่ากับ 10^{8} โดยใช้สูตร

[จำนวนโคโลนีเฉลี่ย*ส่วนกลับของความเจือจางที่นำมาทดสอบ]/ปริมาตรของสารที่ใช้ในการ spread]

ตาราง 5 รายชื่อแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการศึกษา จำนวน 16 สายพันธุ์

ชื่อแบคทีเรีย	สายพันธุ์	ลักษณะการก่อโรค
Acinetobacter baumannii	AB320	Extensively drug resistance (XDR)
	AB321	Multidrug drug resistance (MDR)
	AB322	Multidrug drug resistance (MDR)
	AB324	Extensively drug resistance (XDR)
Escherichia coli	ATCC 35218	Control for β-lactams antibiotics
	PB1	Extended-spectrum beta-lactamase/Multidrug resistant (ESBL+MDR)
	PB231	Extended-spectrum beta-lactamase /Carbapenem-resistance *Enterobacteriaceae*

ชื่อแบคทีเรีย	สายพันธุ์	ลักษณะการก่อโรค
		(ESBL+CRE)
Klebsiella pneumoniae	ATCC 700603	Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)
	PB5	Extended-spectrum beta-lactamase/Multidrug resistance (ESBL+MDR)
	PB21	Extended-spectrum beta-lactamase /Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (ESBL+CRE)
Enterococcus faecalis	ATCC 51299	Vancomycin-resistance
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	Multidrug resistance (MDR)
	PB30	Multidrug resistance (MDR)
Staphylococcus aureus	ATCC 20475	Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
	PB36	Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
	PB57	Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

2. การคัดกรองแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

เตรียม Whole cell culture ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* บนอาหาร NBTA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว Tryptone soya broth (TSB) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยเครื่องเขย่า (Shaker AK85, บริษัท Infors HT, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนดจะได้ส่วนของ Whole cell cuture

3. ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Disk diffusion

ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในส่วน suspension ของแบคทีเรียก่อโรคที่ได้เตรียมไว้ในข้างต้นมาป้ายให้ทั่วอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) จากนั้นนำส่วน Whole cell culture ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 3.12.2 หยดลงแผ่น Disk ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (เตรียมจากกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 3) ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้แผ่น disk แห้งพอหมาด ๆ จากนั้นจึงคีบแผ่น Disk ด้วยคีมคีบปากแหลม (Forcep) วางลงบนจานอาหาร MHA ที่ป้ายเชื้อแบคทีเรียก่อโรค บ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (Positive control)

4. ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดหยาบ (crude compound) ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

นำแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อ โรคในขั้นตอนการคัดกรองไปสกัดเพื่อให้ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude compound) โดยใช้ ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Disc diffusion

4.1 สกัดสารสกัดหยาบ (crude compound) จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* บนอาหาร NBTA ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว TSB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติม ethyl acetate ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนประมาณ 1,000 มิลลิลิตร ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator (Buchi, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) และละลายสารด้วย ethyl acetate ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร จากนั้นย้ายสารละลายลงในถ้วยตวง (beaker) ที่ปราศจากเชื้อและทราบน้ำหนัก และนำไปไว้ในตู้ดูดควันเพื่อให้ ethyl acetate ระเหย เพื่อนำส่วนสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนักและละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นเก็บสารสกัดหยาบที่ได้ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนถัดไป

4.2 ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Disk diffusion

ใช้ไม้พันสำลี (Swab) ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในส่วน suspension ของแบคทีเรียก่อโรคที่ได้ เตรียมไว้มาป้ายให้ทั่วอาหาร MHA จากนั้นนำส่วนสารสกัดหยาบปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* หยดลงบน disk ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (เตรียมจากกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 3) ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้แผ่น disk แห้งพอหมาด ๆ คีบแผ่น disk วางลงบนจานอาหาร MHA ที่ป้ายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (Positive control)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay

1. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth (MHB) ด้วย automatic Pipette ใส่ลงในไมโครไตเตอร์เพลทชนิด 96 หลุม (96 well microtiter plate) จำนวน 11 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นดูดสารละลายสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ลงในหลุมที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันเจือจางสารละลายเป็น 2 เท่าจากหลุมที่ 2 ถึงหลุมที่ 8 จากนั้นเติมแบคทีเรียดื้อยาที่เตรียมไว้ใส่ลงในหลุมที่ 1 ถึง หลุมที่ 8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สำหรับหลุมที่ 9 10 และ 11 ใช้เป็นตัวควบคุม (control) โดยหลุมที่ 9 จะไม่ใส่สารละลายสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* หลุมที่ 10 ใส่ DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แทนสารละลายสารสกัดหยาบและหลุมที่ 11 ใส่ MHB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพียงอย่างเดียว ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกหลุมที่ใสและไม่มีตะกอนของเชื้อเป็นความเข้มข้นที่หลุมนั้นเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (Dhanuthai, & Torrungruang, 2007)

2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

ดูดสารละลายจากหลุมที่ 1-12 จากการทดลอง MIC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร MHA ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา18-24 ชั่วโมง บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Dhanuthai, & Torrungruang, 2007)

Checkerboard determination

ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Cation adjusted Mueller Hinton broth (CA^{2+}MHB) ใส่ลงในไมโครไตเตอร์เพลทชนิด 96 หลุม จำนวน 12 หลุม ปริมาตรหลุมละ100 ไมโครลิตร จากนั้นดูดสารละลายสารสกัดจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ลงในแถวที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันเจือจางสารละลายเป็น 2 เท่าจากแถวที่ 1 ถึงแถวที่ 8 จากนั้นเติมยาปฏิชีวนะ 50 ไมโครลิตรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในแถวที่ 1 ถึงแถวที่ 8 แล้วเติมแบคทีเรีย *S. aureus* PB36 ที่เตรียมไว้ใส่ลงในแถวที่ 1 ถึงแถวที่ 9 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สำหรับแถวที่ 9 และ 10 ใช้เป็นตัวควบคุม โดยแถวที่ 11 จะไม่ใส่สารละลายสารสกัดหรือยาปฏิชีวนะ

(Positive control) และแถวที่ 12 จะไม่ใส่เชื้อ (Negative control) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับการคำนวณหาดัชนี FIC ดังสมการต่อไปนี้ (Timurkaynak et al., 2006; Teethaisong et al., 2018)

$$FIC = \frac{\text{Cons. of A in MIC of A+B}}{\text{MIC of A alone}} + \frac{\text{Cons. of B in MIC of A+B}}{\text{MIC of B alone}}$$

FICI ≤ 0.5	เสริมฤทธิ์กัน (synergistic)
0.5 < FICI > 1	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially synergistic)
FICI = 1	มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive)
1 < FICI ≤ 4	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent)
FIC > 4.0	ต้านฤทธิ์กัน (Antagonistic)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินจากอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลกจำนวน 44 จุด รวม 220 ตัวอย่าง สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธี Baiting technique ได้ทั้งหมด 29 ไอโซเลต (ตารางที่ 6 และ ตารางที่ 18 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินและจุดเก็บตัวอย่างดินที่สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้และแยกไม่ได้ ภาคผนวก ค) อย่างไรก็ตามมีไส้เดือนศัตรูแมลงจำนวน 12 ไอโซเลตที่มีปริมาณน้อย ไม่สามารถนำมาศึกษาต่อในขั้นการจำแนกชนิดด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ดังนั้นจึงทำการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศรัตรูแมลงได้ทั้งหมด 17 ไอโซเลต พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* จำนวน 16 ไอโซเลต และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 1 ไอโซเลต

ตาราง 6 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 29 ไอโซเลตที่แยกได้จากดิน

รหัสที่แยกได้จากดิน	รหัสที่นำไปจำแนกชนิด	รหัสที่นำไปแยกแบคทีเรีย
8.2_TH		√
10.1_TH		√
10.2_TH	√	√
10.3_TH		√
11.1_TH		√
11.2_TH	√	√
13.1_TH	√	√
13.2_TH	√	
13.4_TH		√
13.5_TH	√	
14.2_TH		√
15.1_TH	√	√
15.2_TH	√	√
15.3_TH		√
15.4_TH		√

รหัสที่แยกได้จากดิน	รหัสที่นำไปจำแนกชนิด	รหัสที่นำไปแยกแบคทีเรีย
15.5_TH	√	
16.1_TH	√	
16.2_TH		√
16.5_TH	√	
17.3_TH	√	√
17.4_TH	√	
21.1_TH	√	
21.5_TH		√
22.5_TH		√
24.2_TH	√	
26.2_TH	√	
28.4_TH	√	√
28.5_TH	√	
40.2_TH		√

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นบางส่วนของยีน *28S rRNA* โดยผลผลิตพีซีอาร์ มีขนาดประมาณ 890 คู่เบส และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *28S rRNA* นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 16 ไอโซเลต (ความยาว 591-600 คู่เบส) และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 1 ไอโซเลต (ความยาว 630 คู่เบส) (ตาราง 19 และ 20 ภาคผนวก ง ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์) เทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานแล้วในฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี BLASTN พบว่ามีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 7 ไอโซเลต ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Steinernema siamkayai* (accession number MN194613.1) โดยมีค่าความเหมือน (Similarity) อยู่ระหว่างที่ 99.22%-99.84% ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 4 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Steinernema surkhetense* (accession number MF621005.1) โดยมีค่าความเหมือน (Similarity) เท่ากับ 99% ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 2 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Steinernema hermaphroditum* (accession number MF693228.1) โดยมีค่าความเหมือน (Similarity) เท่ากับ 99.69% และ 100% ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 2 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Steinernema surkhetense* (accession number MH837096.1) โดยมีค่าความเหมือน (Similarity) เท่ากับ 98.31% และ 99.18% และไส้เดือนฝอย

ศัตรูแมลงจำนวนอีก 1 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Steinernema huense* (accession number KF857582.1) โดยมีค่าความเหมือน (Similarity) เท่ากับ 99% นอกจากนี้ยังพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 1 ไอโซเลต ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Heterorhabditis indica* (accession number (MK063805.1) โดยมีค่าความเหมือน (Similarity) เท่ากับ 98.86% (ตาราง 7)

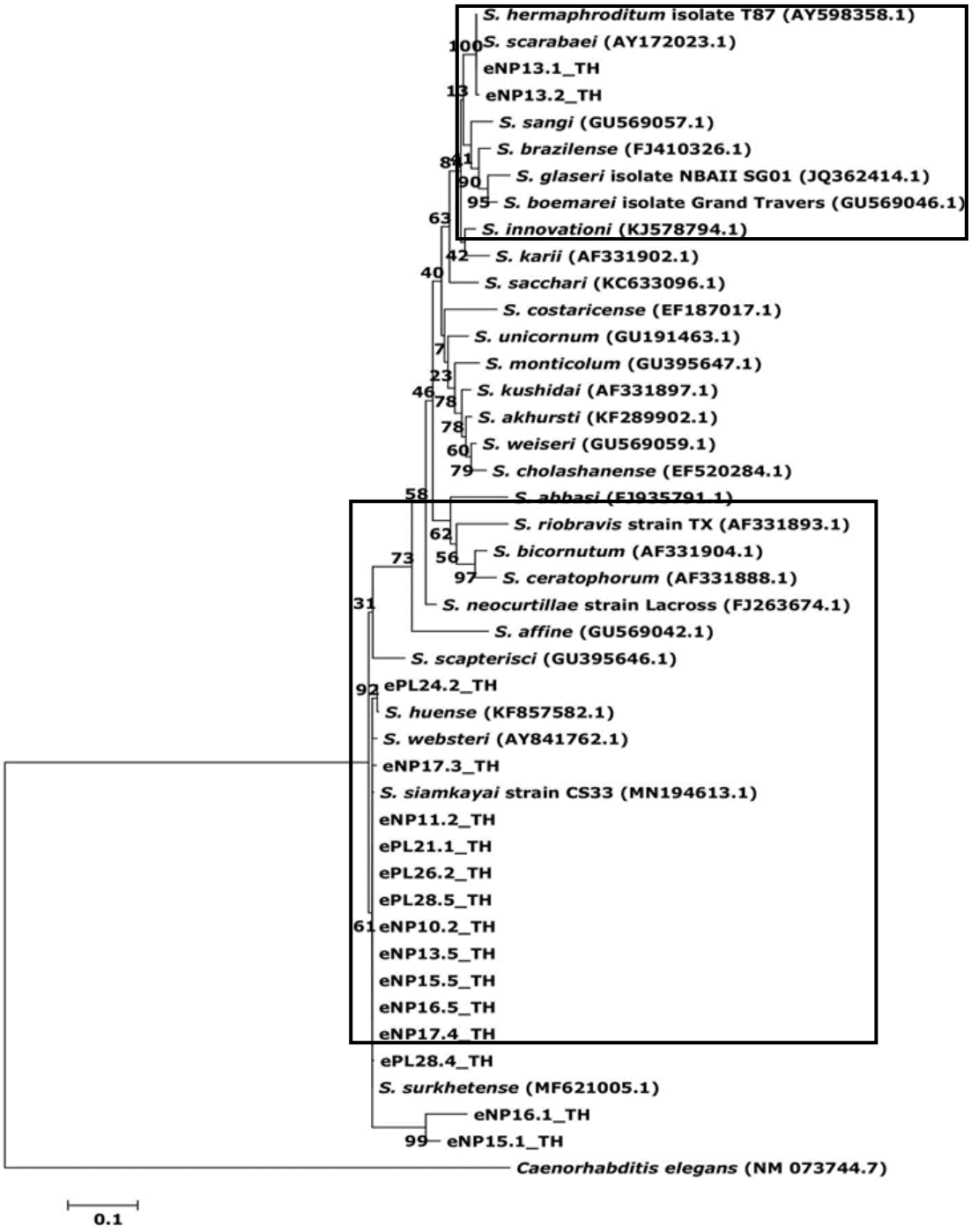
ตาราง 7 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *28S rRNA* ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 16 ไอโซเลต และสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 1 ไอโซเลต ที่แยกได้จาก อำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก

Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
eNP10.2_TH	*Steinernema siamkayai* strain CS33 clone 5a	MN194613.1	1179	100%	0	99.84%
eNP11.2_TH	*Steinernema siamkayai* strain CS33 clone 5a	MN194613.1	1179	100%	0	99.84%
eNP13.1_TH	*Steinernema hermaphroditum* isolate CS34	MF693228.1	1195	99%	0	100%
eNP13.2_TH	*Steinernema hermaphroditum* isolate CS34	MF693228.1	1184	99%	0	99.69%
eNP13.5_TH	*Steinernema siamkayai* strain CS33 clone 5a	MN194613.1	1179	100%	0	99.84%
eNP15.1_TH	*Steinernema surkhetense* isolate CS44	MH837096.1	1096	99%	0	100%
eNP15_2_TH	*Heterorhabditis indica* isolate CH22	MK0638051	1074	96%	0	98.68%
eNP15.5_TH	*Steinernema siamkayai* strain CS33 clone 5a	MN194613.1	1179	100%	0	99.84%
eNP16.1_TH	*Steinernema surkhetense* isolate CS44	MH837096.1	1098	100%	0	100%
eNP16.5_TH	*Steinernema siamkayai* strain CS33 clone 5a	MN194613.1	1179	100%	0	99.84%
eNP17.3_TH	*Steinernema siamkayai* strain CS33 clone 5a	MN194613.1	1157	100%	0	99.22%
eNP17.4_TH	*Steinernema siamkayai* strain CS33 clone 5a	MN194613.1	1179	100%	0	99.84%
ePL21.1_TH	*Steinernema surkhetense* voucher StPTS5	MF621005.1	1258	100%	0	99%
ePL24.2_TH	*Steinernema huense* strain Vie2	KF857582.1	1279	100%	0	99%

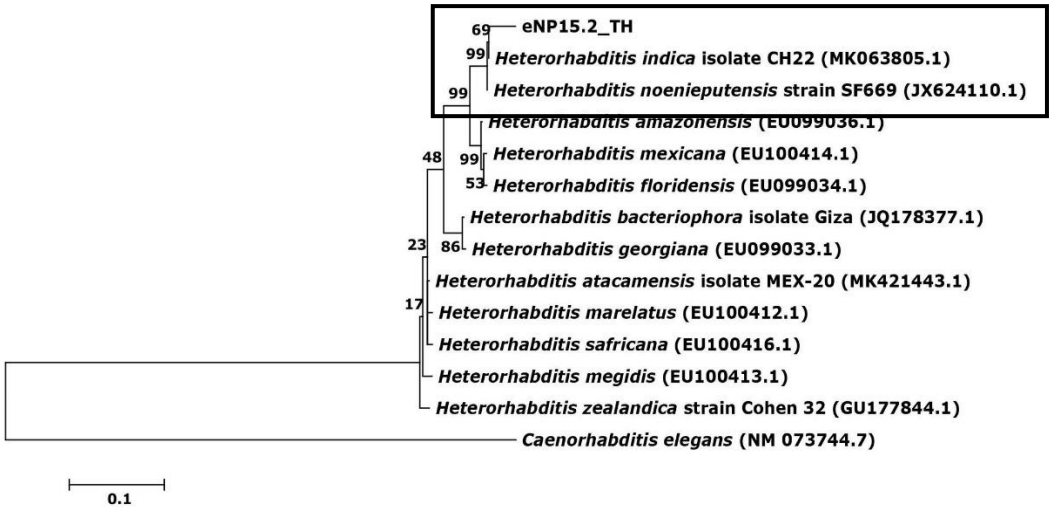
Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
ePL26.2_TH	*Steinernema surkhetense* vouche StPTS5	MF621005.1	1273	100%	0	99%
ePL28.4_TH	*Steinernema surkhetense* vouche StPTS5	MF621005.1	1256	100%	0	99%
ePL28.5_TH	*Steinernema surkhetense* vouche StPTS5	MF621005.1	1263	99%	0	99%

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 16 ไอโซเลต (ความยาว 591-600 คู่เบส) และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 1 ไอโซเลต (ความยาว 630 คู่เบส) ด้วยการวิเคราะห์ Maximum likelihood ด้วยวิธี Tamura-Nei model (Bootstrap 1,000 ครั้ง) จากโปรแกรม MEGA version 7.0 พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 16 ไอโซเลต มี 13 ไอโซเลต ที่มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai S. surkhetense* และ *S. websteri* มีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. hermaphroditum* และ *S. scarabaei* และมีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง อีก 1 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. huense* (ภาพ 3) สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 1 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* (ภาพ 4)



ภาพ 3 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* จำนวน 16 ไอโซเลต โดยใช้ยีน *28S rRNA* วิเคราะห์โดย Maximum likelihood วิธี Tamura-Nei model (Bootstrap 1,000 ครั้ง) ด้วยโปรแกรมMEGA version 7.0



ภาพ 4 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 1 ไอโซเลต โดยใช้ยีน *28S rRNA* วิเคราะห์โดย Maximum likelihood วิธี Tamura-Nei model (Bootstrap 1,000 ครั้ง) ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0

ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของดินและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดินทั้งหมด 220 ตัวอย่าง สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้จำนวน 29 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 13.18 โดยพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้จากดินร่วนมากที่สุดจำนวน 17 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 7.73 และแยกได้จากดินร่วนปนทรายจำนวน 9 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 4.09 ในส่วนของปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ พบว่าอุณหภูมิของดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง มีค่าเท่ากันอยู่ในช่วง 26-31 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ในช่วง 4.4-7.0 และ 1.0-6.9 ตามลำดับ ค่าความชื้นของดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ในช่วงร้อยละ 0.5-8 และ 1.0-7.0 ตามลำดับ (คำนวณจากตารางที่ 18 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินและจุดเก็บตัวอย่างดินที่สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้และแยกไม่ได้ ภาคผนวก ค)

การแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

แยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ได้ 17 ไอโซเลต จากการสังเกตโดยการโคโลนีของแบคทีเรียที่บนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ NBTA พบว่ามีโคโลนีสีน้ำเงิน ลักษณะโค้งนูน (Covex) หรือนูนตรงกลางโคโลนีเล็กน้อย (Umbonated) จำนวน

13 ไอโซเลต ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus* และพบโคโลนีสีเขียว ลักษณะโค้งนูน (Covex) หรือนูนตรงกลางโคโลนีเล็กน้อย ขอบเรียบ จำนวน 4 ไอโซเลต ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในสกุล *Photorhabdus* (ภาพ 5)

ภาพ 5 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NBTA แบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* (A) และแบคทีเรียสกุล *Photorhabdus* (B)

การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

แบคทีเรียที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีทั้งหมด 19 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 15 ไอโซเลต และ *Photorhabdus* จำนวน 4 ไอโซเลตอย่างไรก็ตามได้จำแนกชนิดของแบคทีเรียเพียง 13 ไอโซเลต ยกเว้น *Xenorhabdus* 6 ไอโซเลต (bNP10.2_TH bNP10.3_TH bNP13.1_TH bNP15.1_TH bNP15.4_TH และ bPL28.4_TH) เพิ่มปริมาณดีเอ็นบางส่วนของยีน *recA* โดยผลผลิตพีซีอาร์ มีขนาดประมาณ 890 คู่เบส และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* ขนาดความยาว 646 คู่เบส (ตารางที่ 21, 22 และ 23 ภาคผนวก ง ข้อมูลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้งสองสกุลมาทำ BLASTN เพื่อเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานแล้วในฐานข้อมูล NCBI พบว่าแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 7 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Xenorhabdus stockiae* (accession number FJ823425.1 JX485977.1 และ MK401900.1) ซึ่งมีค่าความเหมือน (Similarity) อยู่ระหว่าง 98.92% - 99.69% แบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน (ตาราง 8) สำหรับแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* (accession number LN835348.1) โดยมีค่าความเหมือน (Similarity) เท่ากับ 98.76% และอีก 1 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Photorhabdus*

luminescens subsp. *akhurstii* (accession number FJ862005.1) โดยมีค่าความเหมือน (Similarity) เท่ากับ 100% (ตาราง 9)

ตาราง 8 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก

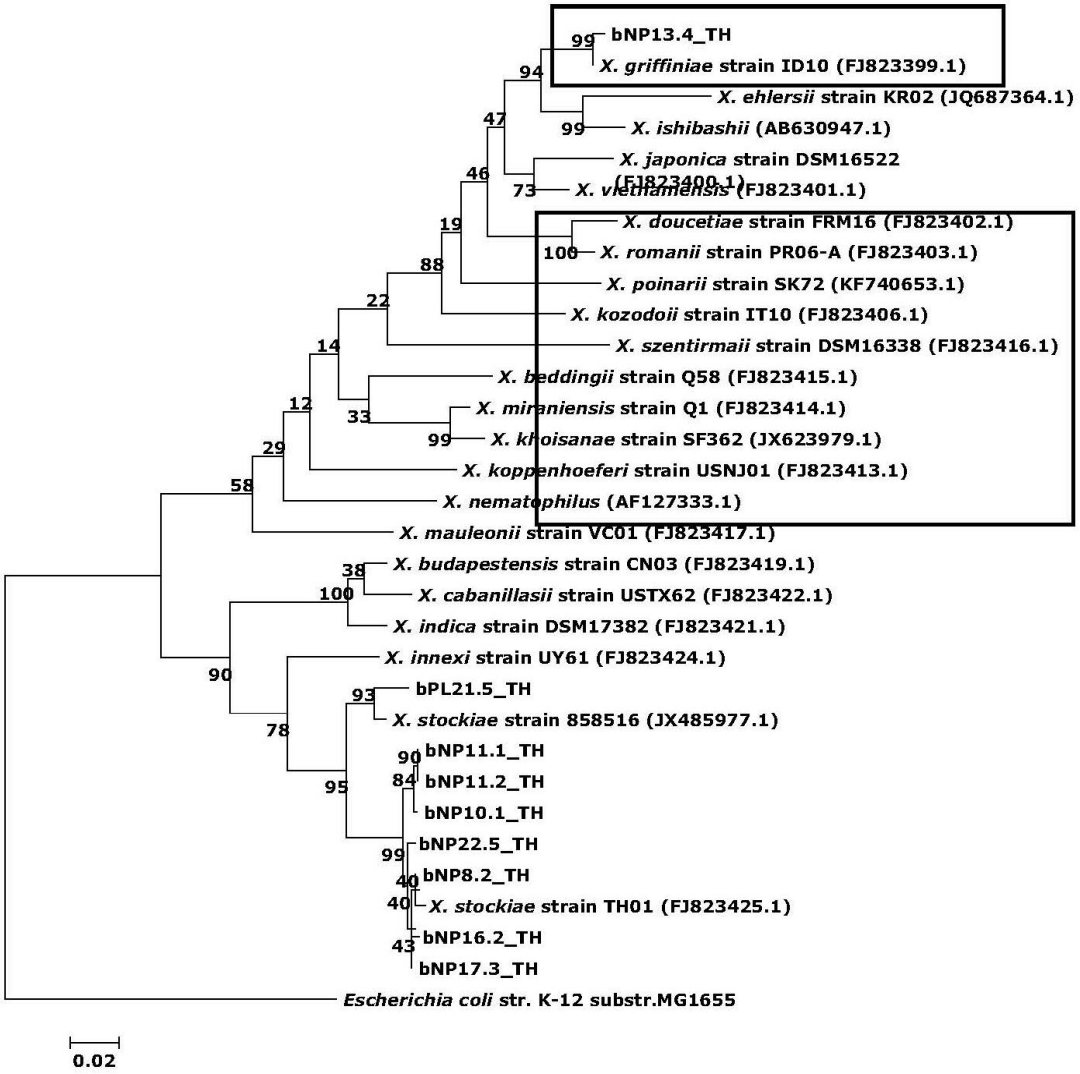
code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
bNP8.2_TH	*Xenorhabdus stockiae* strain TH01	FJ823425.1	1182	100%	0	99.69%
bNP10.1_TH	*Xenorhabdus stockiae* strain CS33	MK401900.1	1160	100%	0	99.07%
bNP11.1_TH	*Xenorhabdus stockiae* strain TH01	FJ823425.1	1155	100%	0	98.92%
bNP11.2_TH	*Xenorhabdus stockiae* strain TH01	FJ823425.1	1155	100%	0	98.92%
bNP13_4_TH	*Xenorhabdus griffiniae* strain ID10	FJ823399.1	1177	100%	0	99.54%
bNP16.2_TH	*Xenorhabdus stockiae* strain TH01	FJ823425.1	1171	100%	0	99.38%
bNP17.3_TH	*Xenorhabdus stockiae* strain TH01	FJ823425.1	1177	100%	0	99.54%
bNP22.5_TH	*Xenorhabdus stockiae* strain CS33	MK401900.1	1173	99%	0	99.53%
bPL21.5_TH	*Xenorhabdus stockiae* strain 858516	JX485977.1	992	100%	0	99%

ตาราง 9 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 4 ไอโซเลต ที่แยกได้จาก อำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก

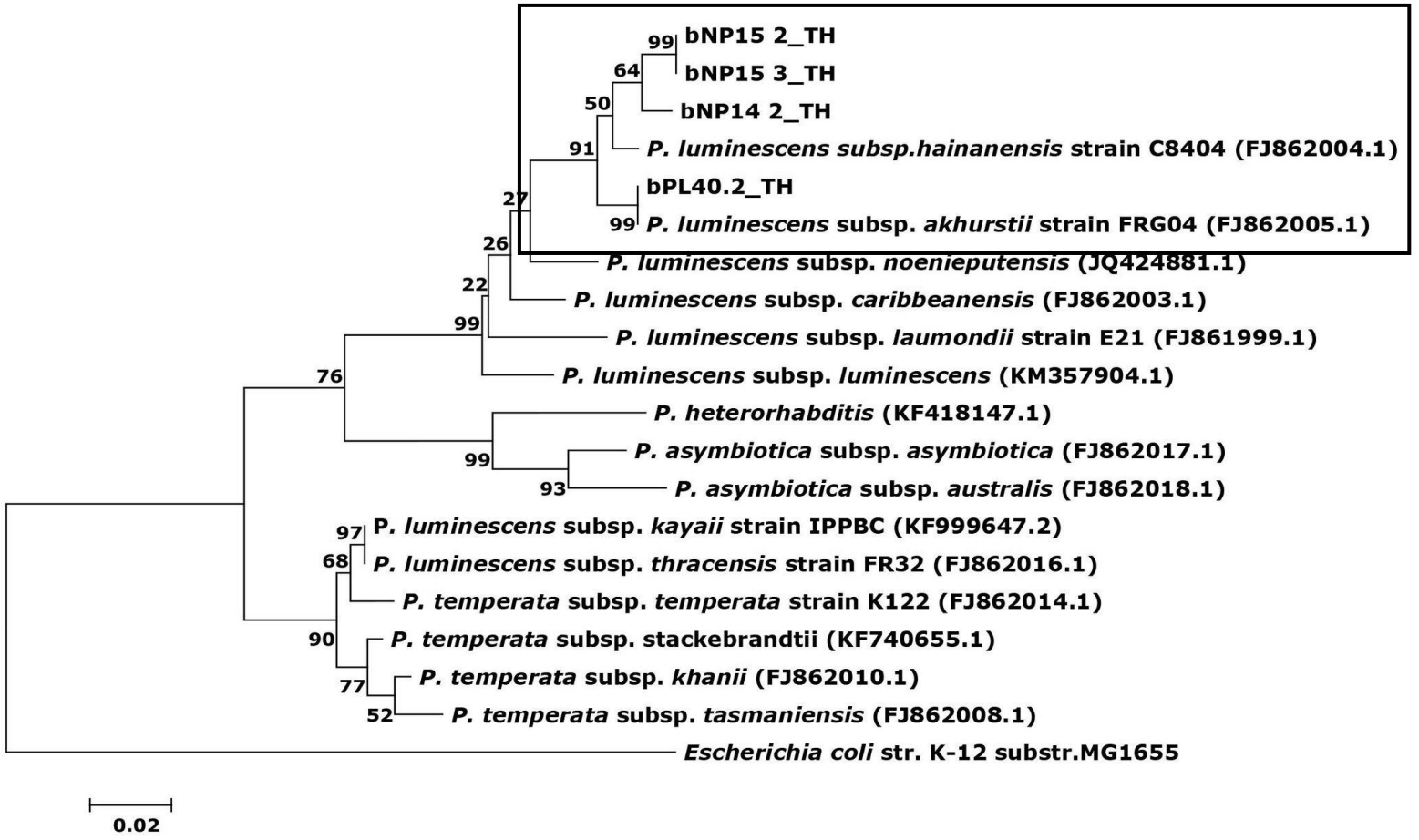
code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
bNP14_2_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	LN835348.1	1146	99%	0	98.76%
bNP15_2_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	LN835348.1	1146	99%	0	98.76%
bNP15_3_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	LN835348.1	1146	99%	0	98.76%
bPL40.2_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04	FJ862005.1	1021	100%	0	100%

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ด้วยการวิเคราะห์ Maximum likelihood ด้วยวิธี Tamura-Nei model (Bootstrap 1,000 ครั้ง) จากโปรแกรม MEGA version 7.0 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *recA* ความยาวประมาณ 646 คู่เบส สำหรับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 7 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *X. stockiae* (ภาพ 6) ส่วนแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 4 ไอโซเลต พบว่า มี 4 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *hainanensis* และ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (ภาพ 7)



ภาพ 6 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต โดยใช้ยีน recA วิเคราะห์โดย Maximum likelihood วิธี Tamura-Nei model (Bootstrap 1,000 ครั้ง) ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0



ภาพ 7 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแบคทีเรียในสกุล *Photorhabdus* จำนวน 1 ไอโซเลต โดยใช้ยีน *recA* วิเคราะห์โดย Maximum likelihood วิธี Tamura-Nei model (Bootstrap 1,000 ครั้ง) ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0

การทดสอบการเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งระหว่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema siamkayai* และ*Heterorhabditis indica*

จากการทดสอบการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแมลง *Steinernema siamkayai* (eNP11.1_TH) และ *Heterorhabditis indica* (eACM14.2_TH) ในตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง สังเกตการตายภายใน 24 และ 48 ชั่วโมง พบตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งตายที่เวลา 24 ชั่วโมง ในกลุ่มควบคุม 1 ที่ใส่เพียงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแมลง *Steinernema siamkayai* (eNP11.1_TH) สามารถแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ได้จากซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง นอกจากนี้พบตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งตายที่เวลา 48 ชั่วโมง ใน 2 กลุ่ม ได้แก่ ในกลุ่มทดสอบที่ใส่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 สกุล ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* เพียงชนิดเดียวจากซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง และกลุ่มควบคุม 2 ที่ใส่เพียงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแมลง *Heterorhabditis indica* (eACM14.2_TH) และสามารถแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จากซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง สำหรับกลุ่มควบคุมตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งไม่ตายที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง จากการทดสอบให้ผลการทดลองเหมือนกันทั้ง 3 ซ้ำ (ตาราง10)

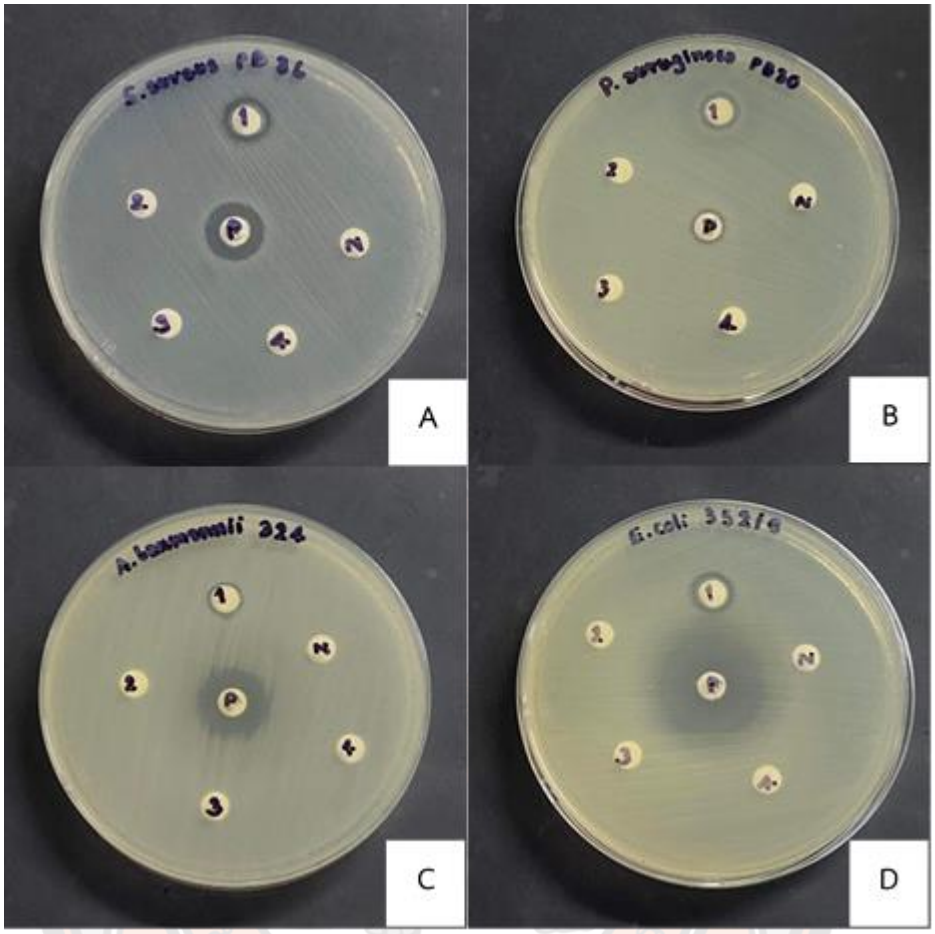
ตาราง 10 การทดสอบการเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* (eNP11.1_TH) และ *H. indica* (eACM14.2_TH) ในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

กลุ่มทดลอง	*S. siamkayai* (eNP11.1_TH)		*H. indica* (eACM14.2_TH)		*S. siamkayai* (eNP11.1_TH) + *H. indica* (eACM14.2_TH)		แบคทีเรียพึ่งพาที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	
กลุ่มควบคุม 1	ตาย	-	-	-	-	-	*Xenorhabdus*
กลุ่มควบคุม 2	-	-	-	ตาย	-	-	*Photorhabdus*
กลุ่มควบคุม 3	-	-	-	-	-	-	-
กลุ่มทดสอบ	-	-	-	-	-	ตาย	*Xenorhabdus*

การศึกษาฤทธิ์ของ Whole cell culture แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีคัดกรอง

จากการนำส่วน Whole cell culture ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวนทั้งหมด 24 ไอโซเลต ที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยที่แยกมาจากตัวอย่างดินในพื้นที่อำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก มาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 16 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. baumannii* จำนวน 4 สายพันธุ์ *E. coli* จำนวน 3 สายพันธุ์ *K. pneumoniae* จำนวน 3 สายพันธุ์ *E. faecalis* จำนวน 1 สายพันธุ์ *P. aeruginosa* จำนวน 2 สายพันธุ์ และ *S. aureus* จำนวน 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disk diffusion (ตารางที่ 24 สรุปผลจากการคัดกรองด้วย Whole cell culture ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 จำนวน ด้วย Disk diffusion ภาคผนวก จ)

พบว่าส่วน Whole cell culture ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ (ตาราง 11) และผลยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการศึกษาฤทธิ์ของ แบคทีเรีย *Xenorhabdus* ต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีคัดกรอง (ตารางที่ 12) และภาพตัวอย่างผลการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคจากส่วน Whole cell culture ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ดังภาพ 8



ภาพ 8 ผลการศึกษาฤทธิ์ของ Whole cell cuture ของแบคทีเรีย *X. stockiae* รหัส bNP7.4_TH(1), bNP10.1_TH(2), bNP10.3_TH(3) และ bNP11.1_TH(4) ต่อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* สายพันธุ์ PB36 (A), *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PB30, *A. baumannii* สายพันธุ์ AB324 (C) และ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC 35218 (D)

ตาราง 11 ผลจากการคัดกรองด้วย Whole cell culture ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ (แผ่น Disk มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร)

Bacteria code	Clear zone (mm)															
	A. baumannii AB320 (XDR)	*A. baumannii* AB321 (MDR)	*A. baumannii* AB322 (MDR)	*A. baumannii* AB324 (XDR)	*Escherichia coli* ATCC 35218 (β-lactam)	*Escherichia coli* PB1 (ESBL+MDR)	*Escherichia coli* PB231 (ESBL+CRE)	*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL)	*Klebsiella pneumoniae* PB5 (ESBL+MDR)	*Klebsiella pneumoniae* PB21 (ESBL+CRE)	*Enterococcus faecalis* ATCC51299	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (MDR)	*Pseudomonas aeruginosa* PB30 (MDR)	*Staphylococcus aureus* ATCC 20475 (MRSA)	*Staphylococcus aureus* PB36 (MRSA)	*Staphylococcus aureus* PB57 (MRSA)
X. stockiae bNP10.1_TH	6	6	6	7	6	8	7	6	9	6	6	6	6	6	6	6
Xenorhabdus sp. bNP10.2_TH	6	6	6	9	6	10	7	6	10	9	6	6	6	7	6	7
Xenorhabdus sp. bNP10.3_TH	6	6	6	8	6	9	8	6	9	6	6	6	6	6	6	8.5
X. stockiae bNP11.1_TH	6	6	6	9	6	9	6	6	9	7	6	6	6	7	6	6
Xenorhabdus sp. bNP13.1_TH	6	6	6	7	6	6	6	6	7.5	6	6	6	6	6	7	6
Xenorhabdus sp. bNP15.1_TH	6	6	6	9	6	9	6	6	9	6	6	6	9	6	6	6

Bacteria code	Clear zone (mm)														
A. baumannii AB320 (XDR)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7
A. baumannii AB321 (MDR)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	8
A. baumannii AB322 (MDR)	6	6	6	7.8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7.5
A. baumannii AB324 (XDR)	10	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Escherichia coli ATCC 35218 (β-lactam)	6	6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Escherichia coli PB1 (ESBL+MDR)	9	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Escherichia coli PB231 (ESBL+CRE)	9.5	9	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 (ESBL)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Klebsiella pneumoniae PB5 (ESBL+MDR)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Klebsiella pneumoniae PB21 (ESBL+CRE)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Enterococcus faecalis ATCC51299	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853 (MDR)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Pseudomonas aeruginosa PB30 (MDR)	8	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Staphylococcus aureus ATCC 20475 (MRSA)	8	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Staphylococcus aureus PB36 (MRSA)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Staphylococcus aureus PB57 (MRSA)	7	8	7.5	9.8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Xenorhabdus sp. bNP15.4_TH	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
X. stockiae bNP17.3_TH	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Xenorhabdus sp. bPL28.4_TH	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

ตาราง 12 ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ต่อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีคัดกรอง

Bacteria	Antibiotic Disc	Clear zone (mm)
Acinetobacter baumannii AB320 (XDR)	Tigecycline	20
Acinetobacter baumannii AB321 (MDR)	Tigecycline	23
Acinetobacter baumannii AB322 (MDR)	Tigecycline	26
Acinetobacter baumannii AB324 (XDR)	Tigecycline	24
Escherichia coli ATCC 35218 (β-lactam)	Ceftazidime 30	29
Escherichia coli PB1 (ESBL+MDR)	Amoxicillin	15
Escherichia coli PB231 (ESBL+CRE)	Amoxicillin	6
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 (ESBL)	Ceftazidime/clavulanic acid	24.5
Klebsiella pneumoniae PB5 (ESBL+MDR)	Ceftazidime/clavulanic acid	21
Klebsiella pneumoniae PB21 (ESBL+CRE)	Ceftazidime/clavulanic acid	24
Enterococcus faecalis ATCC 51299	Ampicillin	30
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (MDR)	Ceftazidime 30	22
Pseudomonas aeruginosa PB30 (MDR)	Ceftazidime 30	12
Staphylococcus aureus ATCC 20475 (MRSA)	Vancomycin	12
Staphylococcus aureus PB36 (MRSA)	Vancomycin	19.5
Staphylococcus aureus PB57 (MRSA)	Vancomycin	19.5

หมายเหตุ: MRSA (Methicilin resistant *Staphylococcus aureus*)
MDR (Multidrug resistant)
CRE (Carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*)
ESBL (Extended-spectrum beta-lactamases)
XDR (Extensively drug resistant)
ND (Not determined)

การศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดหยาบของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ด้วยวิธี Disk diffusion

จากการนำแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จำนวนทั้งหมด 6 ไอโซเลต ได้แก่ *X. stockiae* รหัส bNP10.1_TH, *Xenorhabdus* sp. รหัส bNP10.2_TH, *Xenorhabdus* sp รหัส bNP10.3_TH, *X. stockiae* รหัส bNP11.1_TH, *Xenorhabdus* sp. รหัส bNP15.1_TH และ *Xenorhabdus* sp รหัส bNP15.4_TH ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 16 สายพันธุ์ ได้ผลดี ไปสกัดสารสกัดหยาบและทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 16 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disk diffusion อีกครั้ง

พบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 6 ไอโซเลต มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ดีตั้งแต่ 5 ถึง 14 สายพันธุ์ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบจาก*X. stockiae* รหัส bNP10.1_TH สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกได้ดีที่สุด 14 สายพันธุ์ รองลงมาเป็นสารสกัดหยาบจาก *Xenorhabdus* sp. รหัส bNP10.2_TH และ *Xenorhabdus* sp รหัส bNP10.3_TH สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกได้ 13 สายพันธุ์ และ 11 สายพันธุ์ ตามลำดับ (ตาราง 13) และผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคดังตาราง 14

ภาพ 9 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแบคทีเรีย *X. stockiae* รหัส bNP10.1_TH (1), รหัส bNP10.2_TH (2), รหัส bNP10.3_TH (3), antibiotic disks (P) และ negative control (N) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค สายพันธุ์ ATCC 20475 (A), สายพันธุ์ *S. aureus* PB36 (B), สายพันธุ์ PB57 (C) และแบคทีเรียก่อโรค *K. pneumoniae* สายพันธุ์ PB21 (D)

ตาราง 13 ผลของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ (แผ่น Disk มีเส้นผ่านศูนย์กลาเท่ากับ 6 มิลลิเมตร)

Bacteria code	(Clear zone) (mm)															
	Acinetobacter baumannii strain AB320	*Acinetobacter baumannii* strain AB321	*Acinetobacter baumannii* strain AB322	*Acinetobacter baumannii* strain AB324	*Escherichia coli* ATCC 35218	*Escherichia coli* strain PB1	*Escherichia coli* strain PB231	*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603	*Klebsiella pneumoniae* strain PB5	*Klebsiella pneumoniae* strain PB21	*Enterococcus faecalis* ATCC 51299	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853	*Pseudomonas aeruginosa* strain PB30	*Staphylococcus aureus* ATCC 20475	*Staphylococcus aureus* strain PB36	*Staphylococcus aureus* strain PB57
X. stockiae (bNP10.1_TH)	12	13.5	12	10	12	9	10	10	7	7	15	18	10	12.5	13.5	13.5
Xenorhabdus sp. (bNP10.2_TH)	11	9	10	9	11	8.5	12.5	6	7	9	15	13.5	7	12.5	10	14.5
Xenorhabdus sp. (bNP10.3_TH)	11	10	10	8	11	6	10.5	6	7	6.5	15	15	7	11.5	10	11.5
X. stockiae (bNP11.1_TH)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	15	12.5	6	12	12.5	18.5
Xenorhabdus sp. (bNP15.1_TH)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	11.5	11.5	6	12.5	12.5	10
Xenorhabdus sp. (bNP15.4_TH)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	12.5	12.5	6	12.5	10	10

ตาราง 14 ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 16 สายพันธุ์

Bacteria	Antibiotic Disc	(Clear zone) (mm)
Acinetobacter baumannii AB320 (XDR)	Tigecycline	20
Acinetobacter baumannii AB321 (MDR)	Tigecycline	23
Acinetobacter baumannii AB322 (MDR)	Tigecycline	26
Acinetobacter baumannii AB324 (XDR)	Tigecycline	24
Escherichia coli ATCC 35218 (β-lactam)	Ceftazidime 30	29
Escherichia coli PB1 (ESBL+MDR)	Amoxicillin	15
Escherichia coli PB231 (ESBL+CRE)	Amoxicillin	6
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 (ESBL)	Ceftazidime/clavulanic acid	24.5
Klebsiella pneumoniae PB5 (ESBL+MDR)	Ceftazidime/clavulanic acid	21
Klebsiella pneumoniae PB21 (ESBL+CRE)	Ceftazidime/clavulanic acid	24
Enterococcus faecalis ATCC 51299	Ampicillin	30
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (MDR)	Ceftazidime 30	22
Pseudomonas aeruginosa PB30 (MDR)	Ceftazidime 30	12
Staphylococcus aureus ATCC 20475 (MRSA)	Vancomycin	12
Staphylococcus aureus PB36 (MRSA)	Vancomycin	19.5
Staphylococcus aureus PB57 (MRSA)	Vancomycin	19.5

หมายเหตุ: MRSA (Methicilin resistant *Staphylococcus aureus*)

MDR (Multidrug resistant)

CRE (Carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*)

ESBL (Extended-spectrum beta-lactamases)

XDR (Extensively drug resistant)

ND (Not determined)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay

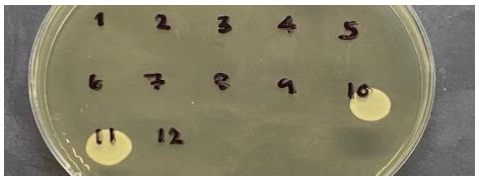
จากการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และฆ่าแบคทีเรีย (MBC) โดยใช้สารสกัดหยาบ ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 6 ไอโซเลต พบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* 6 ไอโซเลต มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.98 – 125 mg/ml และมีค่า MBC อยู่ในช่วง 7.8 – 125 mg/ml ต่อแบคทีเรีย *A. baumannii* 4 สายพันธุ์ โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. (bNP10.2_TH) มีค่า MIC (0.98 mg/ml) และ MBC (7.8 mg/ml) ต่ำสุดต่อ *A. baumannii* AB 321 (MDR) สารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* 6 ไอโซเลต มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.98 – 125 mg/ml และมีค่า MBC อยู่ในช่วง 31.25 – 125 mg/ml ต่อทั้งแบคทีเรีย *E. coli* 3 สายพันธุ์ และ *K. pneumoniae* 3 สายพันธุ์ โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *X. stockiae* (bNP10.1_TH) มีค่า MIC (0.98 mg/ml) และ MBC (31.25 mg/ml) ต่ำสุดต่อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 35218 และสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *X. stockiae* (bNP10.1_TH) มีค่า MIC (0.98 mg/ml) และ MBC ต่ำสุด (62.5 mg/ml) ต่อแบคทีเรีย *K. pneumoniae* ทั้ง 3 สายพันธุ์ สารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* 6 ไอโซเลต มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.98 – 7.8 mg/ml และมีค่า MBC อยู่ในช่วง 1.95 – 15.6 mg/ml ต่อแบคทีเรีย *Enterococcus faecalis* โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *X. stockiae* (bNP11.1_TH) และ *Xenorhabdus* sp. (bNP15.4_TH) มีค่า MIC (0.98 mg/ml) และ MBC (3.9 mg/ml) ต่ำสุด และสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* 6 ไอโซเลตมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.98 – 7.8 mg/ml เท่ากันต่อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* 2 สายพันธุ์ โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. (bNP15.1_TH) มีค่า MIC (0.98 mg/ml) และ MBC (0.98 mg/ml) ต่ำสุดเท่ากันใน *P.* นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* 6 ไอโซเลตมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.98 – 7.8 mg/ml และมีค่า MBC อยู่ในช่วง 0.98 – 62.5 mg/ml ต่อแบคทีเรีย *S. aureus* 3 สายพันธุ์ โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. (bNP15.1_TH) มีค่า MIC (0.98 mg/ml) และ MBC (0.98 mg/ml) ต่ำสุดเท่ากันใน *S. aureus* 3 สายพันธุ์ (ตารางที่ 15 และ ภาพ 9)

.

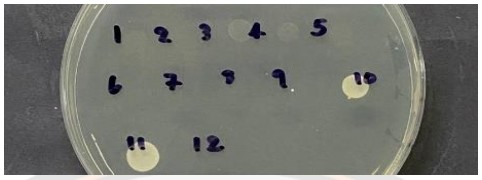
ตาราง 15 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

code	Concentration of inhibition (mg/ml)															
	Acinetobacter baumannii AB320 (XDR)		*Acinetobacter baumannii* AB321 (MDR)		*Acinetobacter baumannii* AB322 (MDR)		*Acinetobacter baumannii* AB324 (XDR)		*Escherichia coli* ATCC 35218 (β-lactam)		*Escherichia coli* PB1 (ESBL+MDR)		*Escherichia coli* PB231 (ESBL+CRE)		*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
X. stockiae (bNP10.1_TH)	7.8	15.6	7.8	15.6	7.8	7.8	0.98	62.5	0.98	31.25	0.98	31.25	0.98	62.5	0.98	62.5
Xenorhabdus sp. bNP10.2_TH	7.8	15.6	0.98	7.8	1.95	15.6	3.9	62.5	7.8	31.25	0.98	62.5	3.9	62.5	0.98	62.5
Xenorhabdus sp. bNP10.3_TH	3.9	31.25	7.8	31.25	3.9	15.6	3.9	31.25	3.9	31.25	31.25	31.25	3.9	62.5	31.25	62.5
X. stockiae bNP11.1_TH	7.8	62.5	7.8	31.25	15.6	62.5	7.8	62.5	1.95	62.5	125	125	125	125	15.6	125
Xenorhabdus sp. bNP15.1_TH	7.8	31.25	3.9	15.6	3.9	31.25	7.8	62.5	1.95	62.5	62.5	62.5	3.9	62.5	7.8	62.5
Xenorhabdus sp. bNP15.4_TH	15.6	62.5	62.5	62.5	15.6	62.5	125	125	125	125	62.5	125	125	125	15.6	125

code	Concentration of inhibition (mg/ml)															
	Klebsiella pneumoniae PB5 (ESBL+MDR)		*Klebsiella pneumoniae* PB21 (ESBL+CRE)		*Enterococcus faecalis* ATCC 51299		*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853		*Pseudomonas aeruginosa* PB30 (MDR)		*Staphylococcus aureus* ATCC 20475 (MRSA)		*Staphylococcus aureus* PB36 (MRSA)		*Staphylococcus aureus* PB57 (MRSA)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
X. stockiae (bNP10.1_TH)	0.98	62.5	0.98	62.5	0.98	15.6	3.91	3.91	0.98	125	0.98	31.25	0.98	0.98	0.98	15.6
Xenorhabdus sp. bNP10.2_TH	7.8	62.5	3.91	62.5	7.8	15.6	7.8	7.8	0.98	62.5	1.95	62.5	0.98	0.98	7.8	15.6
Xenorhabdus sp. bNP10.3_TH	7.8	31.25	7.8	31.25	0.98	7.8	0.98	1.95	7.8	62.5	1.95	15.6	0.98	7.8	0.98	15.6
X. stockiae bNP11.1_TH	15.6	62.5	125	125	0.98	3.9	1.95	3.9	125	125	0.98	3.9	0.98	0.98	0.98	3.9
Xenorhabdus sp. bNP15.1_TH	3.9	62.5	7.8	62.5	0.98	1.95	0.98	0.98	1.95	62.5	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98
Xenorhabdus sp. bNP15.4_TH	62.5	125	125	125	0.98	3.9	3.9	3.9	62.5	125	0.98	3.9	0.98	7.8	0.98	3.9



A



B

ภาพ 10 ตัวอย่างผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay ของ *X. stockiae* (bNP10.1_TH) (A) และ *X. stockiae* (bNP11.1_TH) (B) ต่อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* PB36

Checkerboard determination

จากการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) พบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* PB36 (MRSA) ได้ดี จึงเลือก *Xenorhabdus* จำนวน 2 ไอโซเลต (bNP11.1_TH และ bNP15.1_TH) มาทดสอบการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin และ vancomycin ในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย *S. aureus* PB36 (MRSA) จากผลการศึกษาพบว่าไม่มีการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* bNP11.1_TH กับยาปฏิชีวนะ Oxacillin และ vancomycin โดยมีค่าดัชนี FIC เท่ากับ 2 แปลว่ามีฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent) (ตารางที่ 16) และพบว่าไม่มีการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* bNP15.1_TH กับยาปฏิชีวนะ vancomycin โดยมีค่าดัชนี FIC เท่ากับ 1.5 แปลว่ามีฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent) เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามพบว่าอาจมีการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* bNP15.1_TH กับยาปฏิชีวนะ Oxacillin โดยมีค่าดัชนี FIC เท่ากับ 1 แปลว่าแสดงผลว่ามีแนวโน้มการเสริมฤทธิ์ (Additive) (ตาราง 17)

ตาราง 16 ผลของการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ *X. stockiae* (bNP11.1_TH) ร่วมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin และ Vancomycin ต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* PB36

Combination of agents	MIC in antibiotic (mg/ml)	MIC in combination (A+B)	FIC index	Type of interaction
X. stockiae (bNP11.1_TH)	0.156	0.98	2	Indifferent
Oxacillin		0.156		
X. stockiae strain TH01 (bNP11.1_TH)	0.00625	0.98	2	Indifferent
Vancomycin		0.003125		

ตาราง 17 ผลของการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ *X. stockiae* (bNP15.1_TH) ร่วมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin และ Vancomycin ต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* PB36

Combination of agents	MIC in antibiotic (mg/ml)	MIC in combination (A+B)	FIC index	Type of interaction
Xenorhabdus sp. (bNP15.1_TH)	0.156	0.98	1	Additive
Oxacillin		0.0049		
Xenorhabdus sp. (bNP15.1_TH)	0.00625	0.49	1.5	indifferent
Vancomycin		0.003125		

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างดินจากอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลกจำนวน 220 ตัวอย่าง สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธี Baiting technique ได้ทั้งหมด 29 ไอโซเลต โดยมีไส้เดือนศัตรูแมลงจำนวน 12 ไอโซเลตที่มีปริมาณน้อย ไม่สามารถนำมาศึกษาต่อในขั้นการจำแนกชนิดได้พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในตัวอย่างดินร่วนมากที่สุด

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heteorhabditis* ทำโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *28S rRNA* และเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLASTN พบว่าสามารถจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* ได้ 4 ชนิด ได้แก่ *S. siamkayai* (7 ไอโซเลต) *S. surkhetense* (6 ไอโซเลต) *S. hermaphroditum* (2 ไอโซเลต) *S. huense* (1 ไอโซเลต) และ *H. indica* (1 ไอโซเลต)

จำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* 9 ไอโซเลต และ *Photorhabdus* 4 ไอโซเลต โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน recombinant A (*recA*) และเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLASTN พบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ได้ 2 ชนิด ได้แก่ *X. stockiae* (8 ไอโซเลต) และ *X. griffiniae* (1 ไอโซเลต) และจำแนกแบคทีเรีย *Photorhabdus* ได้ 4 ชนิด คือ *P. luminescens* subsp. *akhurstii*

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* จำนวน 13 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *S. siamkayai S. surkhetense* และ *S. websteri* ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* จำนวน 2 ไอโซเลต ความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *S. hermaphroditum* และ *S. scarabaei* ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* 1 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *S. huense* นอกจากนี้ยังมี *Heterorhabditis* 1 ไอโซเลต ความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *H. indica* และการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย พบว่า*Xenorhabdus* จำนวน 8 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *X. stockiae* แบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 1 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *X. griffiniae* และ *Photorhabdus* จำนวน 4 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *hainaensis* และ *P. luminescens* subsp. *akhurtii*

จากการศึกษาการทดสอบการแข่งขันการเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* มีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนได้ดีกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis*

การศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 16 สายพันธุ์ ด้วยวิธี disk diffution พบว่าการคัดกรองโดยใช้ส่วน Whole cell culture ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จำนวน 24 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ จึงนำแบคทีเรียที่ให้ผลดีที่สุด 6 ไอโซเลต มาศึกษาต่อโดยนำไปสกัดสารหยาบ ด้วย ethyl acetate จากนั้นทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญด้วยวิธี Disk diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *X. stockiae* (bNP10.1_TH) ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุด 14 สายพันธุ์ และพบว่าสารสกัดจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ทุกไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีในทุกสายพันธุ์ และผลจากการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจาก *Xenorhabdus* จำนวน 2 ไอโซเลต (bNP11.1_TH และ bNP15.1_TH) ร่วมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin และ vancomycin ในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย *S. aureus* PB36 (MRSA) พบว่าไม่มีการเสริมฤทธิ์ ยกเว้น การเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* bNP15.1_TH กับยาปฏิชีวนะ Oxacillin ที่มีแนวโน้มในการเสริมฤทธิ์

อภิปรายผล

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินในอำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก โดยใช้ตัวอ่อนของหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) เป็นเหยื่อล่อ ได้ทั้งหมด จำนวน 27 ไอโซเลต จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabdistis* ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 28S rDNA พบว่าสามารถจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* ได้ 4 ชนิด ได้แก่ *S. siamkayai* (7 ไอโซเลต) *S. surkhetense* (6 ไอโซเลต) *S. hermaphroditum* (2 ไอโซเลต) และ *S. huense* (1 ไอโซเลต) จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heteorhabditis* ได้ 1 ชนิด คือ *H. indica* (1 ไอโซเลต) สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 4 ชนิด มีรายงานการค้นพบในไทยและทั่วโลก ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. surkhetense* พบได้ในประเทศ อินเดีย (Bhat et al., 2017) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. huense* พบได้ในประเทศเวียดนาม (Phan et al., 2014) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* พบได้ในจังหวัดกาญจนบุรี เพชรบูรณ์ นครนายก และสุพรรณบุรี ของประเทศไทย (Thanwisai et al., 2012) รวมถึงในประเทศอินเดีย ไอซ์แลนด์ มาเลเซีย ปากีสถาน ศรีลังกา เวียดนาม ออสเตรเลีย และอิสลาเอล (Poiar et al., 1992; Fischer et al., 1998; Mason et al., 1995; Shahina et al.,

1998; Phan et al., 2003; Akhurst et al., 2004; Ma, Geiser-Lee, Deng, and Kolmakov, 2010) อย่างไรก็ตาม *S. hermaphroditum* ยังไม่มีรายงานการค้นพบในประเทศไทย

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง พบว่าจากการศึกษาครั้งนี้พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในตัวอย่างดินร่วนมากที่สุด และพบในดินร่วนปนทรายรองลงมา ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thanwisai และคณะในปี ค.ศ. 2012 สำหรับปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความชื้น พบว่าอุณหภูมิที่สามารถพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ที่ 26-32 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิที่ไม่สามารถพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ที่ 26-32 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน โดยอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมีผลต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Hazir et al., 2003) แต่อย่างไรก็ตามอัตราการอยู่รอดขึ้นก็ยังขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธ์ และแหล่งที่พบอีกด้วย (ทัชชา ยิ้มถิน, 2014) ค่าความเป็นกรด-ด่างที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ที่ 6.4-7.0 โดยค่าความเป็นกรดด่างมีผลต่อการอยู่รอด และความสามารถในการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (ชไมพร ฟักรักษา, 2014 และทัชชา ยิ้มถิน, 2014) และค่าความชื้นที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูมลงอยู่ที่ 0.5-5-5 % ในขณะที่ค่าความชื้นที่ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ที่ 1.0-7.0% โดยค่าความชื้นมีผลต่อการอยู่รอดเนื่องจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ในสภาวะที่มีความชื้นต่ำมาก ๆ (Grant & Villani, 2003) ค่าปัจจัยทางกายภาพต่าง ๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าอุณหภูมิและค่าความชื้นของดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอุณหภูมิและค่าความชื้นของดินที่ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และค่าความเป็นกรด-ด่างของดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าความเป็นกรด-ด่างของดินไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* สามารถสังเกตได้จากลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง Nutrient bromothymol blue agar (NBTA) แบคทีเรีย *Xenorhabdus* มีลักษณะโคโลนีเป็นสีน้ำเงิน ขอบไม่เรียบ แผ่กว้าง และมีลักษณะโค้งนูน ส่วนแบคทีเรีย *Photorhabdus* ลักษณะโคโลนีเป็นสีเขียวขอบเรียบ และมีลักษณะโค้งนูน จำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน recombinase A (*recA*) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลได้ทุกชนิด สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน recombinant A (*recA*) และเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLASTN พบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ได้ 2 ชนิด ได้แก่ *X. stockiae* (8 ไอโซเลต) และ *X. griffiniae* (1 ไอโซเลต) และจำแนกแบคทีเรีย *Photorhabdus* ได้ 4 ชนิด คือ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล มีรายงานการค้นพบในประเทศไทยและทั่วโลกดังนี้ *X. stockiae* พบได้ในหลายจังหวัดของประเทศไทย เช่น กาญจนบุรี ขอนแก่น สุพรรณบุรี และเพชรบูรณ์

(Thanwisai et al., 2012; Tailliez et al., 2006) และสอดคล้องกับการรายงานอื่น ๆ ที่พบแบคทีเรียชนิดนี้เป็นจำนวนมากที่สุดในพื้นที่อื่น ๆ ในประเทศไทย (Tailliez et al., 2006; Tailliez et al., 2010; Maneesakorn et al., 2010; Muangpat et al., 2017; Fukruksa et al., Yooyangket et al., 2018; 2017; Muangpat et al., 2020; Yimthin et al., 2021) แบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* พบได้ในจังหวัดกาญจนบุรี เพชรบูรณ์ สุพรรณบุรี สระบุรี และหลาย ๆ จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย (Thanwisai, et al. 2012; Muangpat et al., 2017; Muangpat et al., 2020; Yimthin et al., 2021) รวมถึงในประเทศคิวบา อิสราเอล ออสเตรเลีย (Fischer et al., 1999) และสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่พบแบคทีเรีย *P. luminescens* supsp. *hainaensis* และ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* เป็นจำนวนมากที่สุดในพื้นที่อื่น ๆ ในประเทศไทยเช่นเดียวกัน (Fukruksa et al., 2017; Thanwisai et al., 2012; Yooyangket et al., 2018; Muangpat et al., 2017; Muangpat et al., 2020; Yimthin et al., 2021)

จากการทดสอบการแข่งขันการเข้าทำลายตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* (ในกลุ่มควบคุม) มีประสิทธิภาพในการเข้าฆ่าตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งได้เร็วกว่า *Heterorhabditis* (กลุ่มควบคุม) อย่างไรก็ตามไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ใช้ในกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมมีจำนวนไม่เท่ากัน กลุ่มควบคุมใส่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* จำนวนมากกว่ากลุ่มทดสอบเป็นสองเท่า (100 ตัว) จึงทำให้ตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งตายใน 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ใส่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* จำนวนน้อยกว่า (ไอโซเลตละ 50 ตัว) พบตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งตายใน 48 ชั่วโมง ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* มีประสิทธิภาพในการฆ่าตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งได้เร็วกว่าขึ้นกับจำนวนหรือชนิดของไส้เดือนฝอย หรือเป็นเพราะในกลุ่มทดสอบเกิดการแข่งขันระหว่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 สกุล คือ *Steinernema* และ *Heterorhabditis* จึงทำให้ใช้เวลาในการฆ่าตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งมากขึ้น

อย่างไรก็ตามในกลุ่มทดสอบพบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* มีประสิทธิภาพในการเข้าฆ่าตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งได้ดีกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* สอดคล้องกับการรายงานที่พบไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* มากกว่า *Heterorhabditis* ในตัวอย่างดินในพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศดิน ((Fukruksa et al., 2017; Thanwisai et al., 2012; Yooyangket et al., 2018; Muangpat et al., 2017; Muangpat et al., 2020; Yimthin et al., 2021) อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ได้ทดสอบในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* สกุลละ 1 ชนิดเท่านั้น อาจต้องทดลองกับหลาย ๆ

ชนิด เพื่อจะให้ทราบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* มีประสิทธิภาพในการเข้าฆ่าตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งได้ดีกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis*

การศึกษาการคัดกรองฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 24 ไอโซเลต ต่อแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 16 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disk diffusion พบว่าส่วน whole cell culture ของแบคทีเรีย *X. stocliae* จำนวน 9 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และพบว่ามีจำนวน 6 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่ให้ผลดีที่สุดจำนวน 6 ไอโซเลต มาศึกษาต่อโดยนำไปสกัดสารหยาบ ด้วย ethyl acetate และทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion อีกครั้ง พบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ทุกไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญต่อ *S. aureus* ATCC 20475, *S. aureus* strain PB36 และ *S. aureus* PB57 โดยเฉพาะ *X. stockiae* รหัส bNP10.1_TH ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ถึง 16 สายพันธุ์ ซึ่งมีรายงานว่าแบคทีเรีย *Xenorhabdus* สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เป็นโปรตีน และกลุ่มที่ไม่ใช่โปรตีน และยังสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาว่าแบคทีเรีย *Xenorhabdus* สามารถผลิตสาร xenocoumacin (Reimer et al., 2009) และ amicoumacin derivatives (Park et al., 2016) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก

จากการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจาก *Xenorhabdus* จำนวน 2 ไอโซเลต (bNP11.1_TH และ bNP15.1_TH) ร่วมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin และ vancomycin ในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย *S. aureus* PB36 (MRSA) พบว่าไม่มีการเสริมฤทธิ์กัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Muangpat และคณะ ในปี ค.ศ. 2021 ที่รายงานว่าสารสกัดหยาบจาก *Photorhabdus* ไม่มีการเสริมฤทธิ์เมื่อทดสอบร่วมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin และ vancomycin ในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย *S. aureus* PB36 (MRSA) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นทำให้ทราบว่าแบคทีเรีย *Xenorhabdus* สายพันธุ์ไทย ผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาเพิ่มเติมถึงสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

Abate, B. A., Malan, A. P., Tiedt, L. R., Wingfield, M. J., Slippers, B., & Hurley, B. P. (2016). *Steinernema fabii* n. sp.(Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology*, *18*(2), 235-255.

Aguera de Doucet, M. (1986). A new species of Neoaplectana Steiner, 1929 (Nematoda: *Steinernematidae*) from Cordoba, Argentina. *Revue de nématologie, 9*(4), 317-323.

Akhurst, R., & Boemare, N. (1988). A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (*Enterobacteriaceae*) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *Microbiology, 134*(7), 1835-1845.

Akhurst, R., & Boemare, N. (1990). Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. Entomopathogenic nematodes *in biological control.*, 75-90.

Akhurst, R. J. (1982). Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *Journal of General Microbiology*, 128(12), 3061-3065.

Akhurst, R., Boemare, N., Janssen, P., Peel, M., Alfredson, D., & Beard, C. (2004). Taxonomy of Australian clinical isolates of the genus *Photorhabdus* and proposal of *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *asymbiotica* subsp. nov. and *P. asymbiotica* subsp. *australis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54*(4), 1301-1310.

Akhurst,, R. J. (1983). Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 33*(1), 38-45.

Anis, M., Shahina, F., Reid, A. P., & Rowe, J. (2002). Steinernema asiaticum sp. n.(Rhabditida: Steinernematidae) from Pakistan. *International Journal of Nematology*, *12*(2).

An, R., & Grewal, P. S. (2010). *Photorhabdus temperata* subsp. *stackebrandtii* subsp. nov.(Enterobacteriales: *Enterobacteriaceae*). *Current microbiology, 61*(4), 291-297.

An, R., & Grewal, P. S. (2011). *Photorhabdus luminescen*s subsp. *kleinii* subsp. nov.(Enterobacteriales: *Enterobacteriaceae*). *Current microbiology, 62*(2), 539-543.

Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A. (2017). *Actinomycetes* benefaction role in soil and plant health. *Microbial pathogenesis*, *111*, 458-467.

Bird, A., & Akhurst, R. (1983). The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *International Journal for Parasitology, 13*(6), 599-606.

Bode, H. B. (2009). Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current opinion in chemical biology, 13*(2), 224-230.

Bode, H. B., Reimer, D., Fuchs, S. W., Kirchner, F., Dauth, C., Kegler, C., & Peter, G. (2012). Determination of the Absolute Configuration of Peptide Natural Products by Using Stable Isotope Labeling and Mass Spectrometry. *Chemistry-A European Journal*, 18, 2342-348.

Boemare, N. (2002). Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *Entomopathogenic nematology*, 35-56.

Boemare, N., Akhurst, R., & Mourant, R. (1993). DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp.(*Enterobacteriaceae*), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 43*(2), 249-255.

Brachmann, A. O., & Bode, H. B. (2013). Identification and bioanalysis of natural products from insect symbionts and pathogens. *Yellow Biotechnology I*, 123-155.

Cabanillas, H., Poinar Jr, G., & Raulston, J. (1994). *Steinernema riobravis* n. sp.(Rhabditida: *Steinernematidae*) from Texas. *Fundamental and Applied Nematology, 17*(2), 123-131.

Chen S, Yan A, Li X, Moens M, Spiridonov S (2006). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema hebeiense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), from North China. Nematol 8:563-574

Ciezki, K., Wesener, S., Jaber, D., Mirza, S., & Forst, S. (2019). ngrA-dependent natural products are required for interspecies competition and virulence in the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus szentirmaii*. *Microbiology, 165*(5), 538-553.

Çimen H, Lee MM, Hatting J, Hazir S, Stock SP (2015) *Steinernema innovationi* n. sp. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode species from South Africa. *J Hel* 89:415–427

Cimen, Harun, Vladimír Puza, Jira Nermut, Justin Hatting, Tshima Ramakuwela, Lucie Faktorova, and Selcuk Hazir. "*Steinernema beitlechemi* n. sp., a new entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae) from South Africa." *Nematology* 18, no. 4 (2016): 439-453.

Doucet, G., Descarries, L., & Garcia, S. (1986). Quantification of the dopamine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience*, *19*(2), 427-445.

De Doucet, M., & Doucet, M. (1990). *Steinernema Ritteri**) N. Sp.(Nematoda: *Steinernematidae*) With a Key To the Species of the Genus. *Nematologica, 36*(1-4), 257-265.

Dhanuthai, K., & Torrungruang, K. (2007). Veruciformni ksantom: prikaz triju slučaja. *Acta stomatologica Croatica, 41*(2), 166-172.

Edgington, S., Buddie, A. G., Tymo, L., Hunt, D. J., Nguyen, K. B., France, A. I., ... & Moore, D. (2009). *Steinernema australe* n. sp.(Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Isla Magdalena, Chile. *Nematology*, *11*(5), 699-717.

Elawad, S., Ahmad, W., & Reid, A. (1997). Steinernema abbasi sp. n.(Nematoda: *Steinernematidae*) from the Sultanate of Oman. *Fundamental and applied Nematology, 20*(5), 435-442.

Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*, *4*(2016), 90-101.

Farmer, J. J. 3rd., Jorgensen, J. H., Grimont, P. A., Akhurst, R. J., Poinar, G. O. Jr., ... Hickman-Brenner F. W. (1989). *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(7), 1594-1600.

Ferreira, T., Van Reenen, C. A., Endo, A., Spröer, C., Malan, A. P., & Dicks, L. M. (2013). Description of *Xenorhabduskhoisanae* sp. nov., the symbiont of the entomopathogenic nematode Steinernema khoisanae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63*(9), 3220-3224.

Ferreira, T., van Reenen, C. A., Endo, A., Tailliez, P., Pages, S., Spröer, C., . . . Dicks, L. M. (2014). *Photorhabdusheterorhabditis* sp. nov., a symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis zealandica*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 64*(5), 1540-1545.

Fischer-Le Saux, M., Viallard, V., Brunel, B., Normand, P., & Boemare, N. E. (1999). Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 49*(4), 1645-1656.

Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., & Stackebrandt, E. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual review of microbiology*, 51(1), 47-72.

Fukruksa, C., Yimthin, T., Suwannaroj, M., Muangpat, P., Tandhavanant, S., Thanwisai, A., & Vitta, A. (2017). Isolation and identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria associated with entomopathogenic nematodes and their larvicidal activity against Aedes aegypti. *Parasites & vectors*, *10*(1), 1-10.

Furgani, G., Boszormenyi, E., Fodor, A., Mathe-Fodor, A., Forst, S., ... Wolf, S. L. (2008). *Xenorhabdus* antibiotics: a comparative analysis and potential utility for controlling mastitis caused by bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 104,745–758.

Gardner, S. L., Stock, S. P., & Kaya, H. K. (1994). A new species of *Heterorhabditis* from the Hawaiian islands. *The Journal of parasitology*, 100-106.

Glaeser, S. P., Tobias, N. J., Thanwisai, A., Chantratita, N., Bode, H. B., & Kämpfer, P. (2017). *Photorhabdusluminescens* subsp. *namnaonensis* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditisbaujardi* nematodes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 67*(4), 1046-1051.

Gorgadze, O., Fanelli, E., Lortkhipanidze, M., Troccoli, A., Burjanadze, M., Tarasco, E., & De Luca, F. (2018). *Steinernema borjomiense* n. sp.(Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Georgia. *Nematology*, *20*(7), 653-669.

Grifaldo-Alcantara, P. F., Alatorre-Rosas, R., Segura-León, O., & Hernandez-Rosas, F. (2017). *Steinernema ralatorei* n. sp. 1 Isolated from Sugarcane Areas at Veracruz, Mexico. *Southwestern Entomologist*, *42*(1), 171-190.

Grundmann, F., Kaiser, M., Schiell, M., Batzer, A., Kurz, M., Thanwisai, A., . . . Bode, H. B. (2014). Antiparasitic Chaiyaphumines from entomopathogenic *Xenorhabdus* sp. PB61. 4. *Journal of natural products, 77*(4), 779-783.

Hazir, S., Keskin, N., Stock, S. P., Kaya, H. K., & Özcan, S. (2003). Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. *Biodiversity & Conservation*, *12*(2), 375-386.

Hazir, S., Stackebrandt, E., Lang, E., Schumann, P., Ehlers, R.-U., & Keskin, N. (2004). Two new Subspecies of *Photorhabdus luminescens*, Isolated from *Heterorhabditis* bacteriophora (Nematoda: *Heterorhabditidae*): *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* subsp. nov. and *Photorhabdus luminescens* subsp. *thracensis* subsp. nov. *Systematic and applied microbiology, 27*(1), 36-42.

Hu, K., Li, J., Li, B., Webster, J. M., & Chen, G. (2006). A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (*Enterobacteriaceae*). *Bioorganic & medicinal chemistry, 14*(13), 4677-4681.

Inman, FL., & Holmes, L. (2012). Effect of heat sterilization on the bioactivity of antibacterial metabolites secreted by *Xenorhabdus nematophila. Pakistan Journal of Biological Science*, 15(20), 997-1000.

Jian, H., Reid, A., & Hunt, D. (1997). *Steinernema ceratophorum* n. sp.(Nematoda: *Steinernematidae*), a new entomopathogenic nematode from north-east China. *Systematic Parasitology, 37*(2), 115-125.

Kanga, F. N., Trinh, P. Q., Waeyenberge, L., Spiridonov, S. E., Hauser, S., & Moens, M. (2012). Two new species of *Steinernema Travassos*, 1927 from the humid forest of southern Cameroon. *Russian Journal of Nematology*, *20*(1), 15-36.

Kämpfer, P., Tobias, N. J., Ke, L. P., Bode, H. B., & Glaeser, S. P. (2017). *Xenorhabdus thuongxuanensis* sp. nov. and *Xenorhabdus eapokensis* sp. nov., isolated from *Steinernema* species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 67*(5), 1107-1114.

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 33(3), 300.

Katumanyane A, Malan AP, Tiedt LR, Hurley BP (2019) *Steinernema bertusi* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematol*. https://doi.org/10.1163/15685411-00003309

Khatri-Chhetri HB, Waeyenberge L, Spiridonov SE, Manandhar HK, Moens M (2011a) *Steinernema lamjungense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from Lamjung district, Nepal. *Nematol* 13:589–605

Kuwata, R., Qiu, L.-h., Wang, W., Harada, Y., Yoshida, M., Kondo, E., & Yoshiga, T. (2013). *Xenorhabdus ishibashii* sp. nov., isolated from the entomopathogenic nematode *Steinernema aciari. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 63*(5), 1690-1695.

Kwon, B., & Kim, Y. (2008). Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of economic entomology, 101*(1), 36-41.

Lambert, M. J., Whipple, J. L., Vermeersch, D. A., Smart, D. W., Hawkins, E. J., Nielsen, S. L., & Goates, M. (2002). Enhancing psychotherapy outcomes via providing feedback on client progress: A replication. *Clinical Psychology & Psychotherapy*, *9*(2), 91-103.

Luc PV, Nguyen KB, Reid AP, Spridonov SE (2000) *Steinernema tami* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Cat Tien forest, Vietnam. *Russian J Nematol* 8:33–43.

Lee, S., & Heo, C. Y. (2009). Corporate social responsibility and customer satisfaction among US publicly traded hotels and restaurants. *International Journal of Hospitality Management*, *28*(4), 635-637.

Leisman, G. B., Waukau, J., & Forst, S. A. (1995). Characterization and environmental regulation of outer membrane proteins in *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology, 61*(1), 200-204.

Lengyel, K., Lang, E., Fodor, A., Szállás, E., Schumann, P., & Stackebrandt, E. (2005). Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family *Enterobacteriaceae*: *Xenorhabdus budapestensis* sp. nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp. nov., *Xenorhabdus innexi* sp. nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. nov. *Systematic and applied microbiology, 28*(2), 115-122.

Liu, J., & Berry, R. E. (1996). *Heterorhabditis marelatusn*. sp.(Rhabditida: *Heterorhabditidae*) from Oregon. *Journal of Invertebrate Pathology, 67*(1), 48-54.

López-Núñez, J. C., Plichta, K., Góngora-Botero, C. E., & Stock, S. P. (2008). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense* n. sp.(Nematoda: Steinernematidae), from Colombia. *Nematology*, *10*(4), 561-574.

Ma, J., Chen, S., De Clercq, P., Moens, M., & Han, R. (2012). *Steinernema changbaiense* sp. n.(Rhabditida: Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematodes from Northeast China. *Russian Journal of Nematology*, *20*(2), 97-112.

Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., & Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the total environment*, *408*(16), 3053-3061.

Maketon, M., Somsook, V., Rattanakorn, P., & Hotaka, D. (2011). Pathogenicity and culture of a *Heterorhabditis indica* isolate from thailand [patogenicidad y cultivo de un aislamiento de *Heterorhabditis indica* de tailandia]. *Nematropica*, 52-61.

Malan, A. P., Knoetze, R., & Moore, S. D. (2011). Isolation and identification of entomopathogenic nematodes from citrus orchards in South Africa and their biocontrol potential against false codling moth. *Journal of invertebrate pathology*, *108*(2), 115-125.

Malan AP, Knoetze R, Tiedt L (2016) *Steinernema nguyeni* n sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematol* 18:571–590

Malan, A. P., Nguyen, K. B., De Waal, J. Y., & Tiedt, L. (2008). *Heterorhabditis safricana* n. sp.(Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology, 10*(3), 381-396.

Malan, L., Hamer, M., Frasure-Smith, N., Steyn, H. S., & Malan, N. T. (2015). Cohort profile: sympathetic activity and ambulatory blood pressure in Africans (SABPA) prospective cohort study. *International Journal of Epidemiology*, 44(6), 1814-1822.

Mamiya, Y. (1988). History of pine wilt disease in Japan. *Journal of nematology, 20*(2), 219.

Mamiya Y (1988) *Steinernema kushidai* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) associated with scarabaeid beetle larvae from Shizuoka, Japan. *App Ent Zool* 23:313–320

Maneesakorn, P., An, R., Grewal, P. S., & Chandrapatya, A. (2015). *Heterorhabditis somsookae* sp. nov.(Rhabditida: *Heterorhabditidae*): a new entomopathogenic nematode from Thailand. *International Journal of Nematology, 25*(1), 1-11.

Maneesakorn, P., Grewal, P., & Chandrapatya, A. (2010). *Steinernema minutum* sp. nov.(Rhabditida: *Steinernematidae*): a new entomopathogenic nematode from Thailand. *International Journal of Nematology, 20*(1), 27-42.

Martens, E. C., & Goodrich‐Blair, H. (2005). The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. *Cellular microbiology, 7*(12), 1723-1735.

Mason, J. M., & Hominick, W. M. (1995). The effect of temperature on infection, development and reproduction of *heterorhabditids*. *Journal of Helminthology*, *69*(4), 337-345.

McInerney, B. V., Taylor, W. C., Lacey, M. J., Akhurst, R. J., & Gregson, R. P. (1991). Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *Journal of Natural Products, 54*(3), 785-795.

Mráček, Z., Hernández, E. A., & Boëmare, N. E. (1994). *Steinernema* cubana sp. n.(Nematoda: *Rhabditida*: *Steinernematidae*) and the preliminary characterization of its associated bacterium. *Journal of Invertebrate Pathology, 64*(2), 123-129.

Mráček Z, Liu QZ, Nguyen KB (2009) *Steinernema xueshanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Yunnan, southeast Tibetan Mts., China. *J Inver Path* 102:69–78.

Mráček Z, Puža V, Nermut' J (2014) *Steinernema poinari* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from the Czech Republic. *Zootaxa* 3760:336-350.

Mráček Z, Sturhan D, Reid A (2003) *Steinernema weiseri* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. *Sys Parasitol* 56:37–47.

Muangpat, P., Yooyangket, T., Fukruksa, C., Suwannaroj, M., Yimthin, T., Sitthisak, S., . . . Bode, H. B. (2017). Screening of the antimicrobial activity against drug resistant bacteria of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* associated with entomopathogenic nematodes from Mae Wong National Park, Thailand. *Frontiers in microbiology, 8*, 1142.

Muangpat, P., Suwannaroj, M., Yimthin, T., Fukruksa, C., Sitthisak, S., Chantratita, N., ... & Thanwisai, A. (2020). Antibacterial activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolated from entomopathogenic nematodes against antibiotic-resistant bacteria. Plos one, 15(6), e0234129.

Nguyen, K., & Buss, E. (2011). *Steinernema phyllophagae* n. sp.(Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Florida, USA. *Nematology*, *13*(4), 425-442.

Nguyen, K. B., & Duncan, L. W. (2002). *Steinernema diaprepesi* n. sp.(Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the citrus root weevil Diaprepes abbreviatus (L)(Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Nematology*, *34*(2), 159.

Nguyen, K. B., Puža, V., & Mráček, Z. (2008). *Steinernema cholashanense* n. sp.(Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, Chola Shan Mountains, China. *Journal of Invertebrate Pathology*, *97*(3), 251-264.

Nguyen KB, Smart GC Jr (1992) *Steinernema neocurtillis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) and a key to species of the genus *Steinernema*. *J Nematol* 24:463–477

Nguyen KB, Stuart RJ, Andalo V, Gozel U, Rogers ME (2007) *Steinernema texanum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Texas, USA. *Nematol* 9:379–396

Nguyen, K., & Smart Jr, G. (1990). *Steinernema scapterisci* n. sp.(Rhabditida: *Steinernematidae*). *Journal of Nematology, 22*(2), 187.

Nguyen, K. B., Gozel, U., K_PPENH_FER, H. S., & ADAMS, B. J. (2006). *Heterorhabditis floridensis* n. sp.(Rhabditida: *Heterorhabditidae*) from Florida. *Zootaxa, 1177*(1), 1-19.

Nguyen KB, Tesfamariam M, Gozel U, Gaugler R, Adams BJ (2004b) *Steinernema yirgalemense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Ethiopia. *Nematol* 6:839–856.

Nikdel, M., Niknam, G., & Ye, W. (2011). Steinernema arasbaranense sp. n.(Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Arasbaran forests, Iran. *Nematologia Mediterranea*.

Nishimura, Y., Hagiwara, A., Suzuki, T., & Yamanaka, S. (1994). *Xenorhabdus japonicus* sp. nov. associated with the nematode *Steinernema kushidai*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 10*(2), 207-210.

Noosidum, A., Hodson, A. K., Lewis, E. E., & Chandrapatya, A. (2010). Characterization of new entomopathogenic nematodes from Thailand: foraging behavior and virulence to the greater wax moth, *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: *Pyralidae*). *Journal of nematology, 42*(4), 281.

Nthenga I, Knoetze R, Berry S, Tiedt LR, Malan AP (2014) *Steinernema sacchari* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematol* 16:475–494

Orozco, R. A., Hill, T., & Stock, S. P. (2013). Characterization and phylogenetic relationships of *Photorhabdus luminescens* subsp. *sonorensis* (γ-Proteobacteria: *Enterobacteriaceae*), the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis sonorensis* (Nematoda: *Heterorhabditidae*). *Current microbiology, 66*(1), 30-39.

Park, W., Yoo, D. H., Jaworski, J., Brzezicki, J., Gnylorybov, A., Kadinov, V., ... & Braun, J. (2016). Comparable long-term efficacy, as assessed by patient-reported outcomes, safety and pharmacokinetics, of CT-P13 and reference infliximab in patients with ankylosing spondylitis: 54-week results from the randomized, parallel-group PLANETAS study. *Arthritis research & therapy*, *18*(1), 1-11.

Phan, K. L., Mráček, Z., Puža, V., Nermut, J., & Jarošová, A. (2014). *Steinernema huense* sp. n., a new entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae) from Vietnam. *Nematology*, *16*(7), 761-775.

Phan KL, Nguyen NC, Moens M (2001c). *Steinernema loci* sp. n. and *Steinernema thanhi* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vietnam. *Nematol* 3:503–514

Phan, K. L., Subbotin, S. A., Nguyen, N. C., & Moens, M. (2003). *Heterorhabditis baujardi* sp. n.(Rhabditida: *Heterorhabditidae*) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. *Nematology, 5*(3), 367-382.

Phan, L. K., Subbotin, S. A., Waeyenberge, L., & Moens, M. (2005). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema robustispiculum* n. sp.(Rhabditida: Steinernematidae), from Chumomray National Park in Vietnam. *Systematic Parasitology*, *60*(1), 23-32.

Phan, L. K., Takemoto, S., & Futai, K. (2006). Steinernema ashiuense sp. n.(Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Japan. *Nematology*, *8*(5), 681-690.

Pham, V. L., Nguyen, K. B., Reid, A. P., & Spiridonov, S. E. (2000). *Steinernema tami* sp. n.(Rhabditida: Steinernematidae) from Cat Tien forest, Vietnam. *Russian Journal of Nematology*, *8*(1), 33-43.

Plichta, K. L., Joyce, S., Clarke, D., Waterfield, N., & Stock, S. (2009). *Heterorhabditis gerrardi* n. sp.(Nematoda: *Heterorhabditidae*): the hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (*Enterobacteriaceae*: γ-Proteobacteria). *Journal of Helminthology, 83*(4), 309-320.

Poiar, H. (1992). Fundamentals of Energetics. *Skolska knjiga, Zagreb*.

Poinar Jr, G. O. (1975). Description and biology of a new insect parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* N. Gen., N. Sp.(Rhabditida; *Heterorhabditidae* N. Fam.). *Nematologica., 21*(4), 463-470.

Poinar Jr, G. O. (1985). *Neoaplectana intermedia* n. sp.(*Steinernematidae*: Nematoda) from South Carolina. *Revue de Nématologie, 8*(4), 321-327.

Puza, V., Campos-Herrera, R., Blanco-Pérez, R., Jakubíková, H., Vicente-Díez, I., & Nermuť, J. (2020). Steinernema riojaense n. sp., a new entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae) from Spain. *Nematology*, *22*(7), 825-841.

Puza V, Nermut J, Mráček Z, Gengler S (2017) *Steinernema pwaniensis* n. sp., a new entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae) from Tanzania. *J Helminth* 91:20–34

Qiu L, Fang YU, Zhou Y, Pang Y, Nguyen KB (2004) *Steinernema guangdongense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China with a note on *S. serratum* (nomen nudum). *Zootaxa* 704:1–20

Qiu, L., Yan, X., Zhou, Y., Nguyen, K. B., & Pang, Y. (2005). Steinernema aciari sp. n.(Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Guangdong, China. *Journal of Invertebrate Pathology*, *88*(1), 58-69.

Qiu L, Zhao J, Wu Z, Lv Z, Pang Y (2011) *Steinernema pui* sp. n. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Yunnan, China. *Zootaxa* 2767:1-13

Reimer, P. J., Baillie, M. G., Bard, E., Bayliss, A., Beck, J. W., Blackwell, P. G., ... & Weyhenmeyer, C. E. (2009). IntCal09 and Marine09 radiocarbon age calibration curves, 0–50,000 years cal BP. Radiocarbon, 51(4), 1111-1150.

Román, J., & Figueroa, W. (1994). *Steinernema puertoricensis* n. sp.(Rhabditida: *Steinernematidae*), a new entomopathogenic nematode from Puerto Rico. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico, 78*(3-4), 167-175.

San-Blas, E., Morales-Montero, P., Portillo, E., Nermut, J., & Puza, V. (2016). *Steinernema goweni* n. sp.(Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Zulia State, Venezuela. *Zootaxa*, *4067*(2), 200-214.

San-Blas E, Portillo E, Nermut' J, Puža V, Morales-Montero P (2015) *Steinernema papillatum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Venezuela. *Nematol* 17:1081-1097

Sajnaga, E., & Kazimierczak, W. (2020). Evolution and taxonomy of nematode-associated entomopathogenic bacteria of the genera Xenorhabdus and Photorhabdus: an overview. *Symbiosis*, *80*(1), 1-13.

Seier-Petersen, M. A., Jasni, A., Aarestrup, F. M., Vigre, H., Mullany, P., Roberts, A., & Agersø, Y. (2014). Effect of subinhibitory concentrations of four commonly used biocides on the conjugative transfer of Tn 916 in *Bacillus subtilis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 69*(2), 343-348.

Shahina F, Anis M, Reid AP, Rowe J, Maqbool MA (2001) *Steinernema pakistanense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Pakistan. *Int J Nematol* 11:124–133

Shahina, F., ANIZ, M., Zainab, S., & Maqbool, M. A. (1998). Entomopathogenic nematodes in soil samples collected form Sindh, Pakistan. *Pak. J. Nematol*, *16*(1), 41-50.

Shamseldean, M., Abou El-Sooud, A., Abd-Elgawad, M., & Saleh, M. (1996). Identification of a new *Heterorhabditis* species from Egypt, *Heterorhabditis taysearae* n. sp.(Rhabditida: *Heterorhabditidae*). *Egyptian Journal of Biological Control, 6*, 129-138.

Shen CP, Wang GH (1991) Description and studies of an entomopathogenic nematode: *Steinernema longicaudum* sp. nov. Proceeding of the first national academy symposium. *Chinese Science and Technology Press*. pp 220–231

Somvanshi, V. S., Lang, E., Ganguly, S., Swiderski, J., Saxena, A. K., & Stackebrandt, E. (2006). A novel species of *Xenorhabdus*, family *Enterobacteriaceae*: *Xenorhabdus indica* sp. nov., symbiotically associated with entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum* Ganguly and Singh, 2000. *Systematic and applied microbiology, 29*(7), 519-525.

Spiridonov, S. E., Reid, A. P., Podrucka, K., Subbotin, S. A., & Moens, M. (2004). Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1-5.8 S-ITS2 region of *rDNA* and morphological features. *Nematology*, 6(4), 547-566.

Steyn WP, Knoetze R, Tiedt LR, Malan AP (2017) *Steinernema litchii* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematol* 19:1157–1177

Stock SP, Campos-Herrera R, El Borai F, Duncan LW (2019) *Steinernema khuongi* n. sp. (Panagrolaimomorpha, Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode species from Florida, USA. *J Helminthol* 93:226–241

Stock, J. H., & Watson, M. W. (2001). Vector autoregressions. *Journal of Economic perspectives, 15*(4), 101-115.

Stock, S. (1998). *Steinernema siamkayai* n. sp.(Rhabditida: *Steinernematidae*), an entomopathogenic nematode from Thailand. *Systematic Parasitology, 41*(2), 105-113.

Stock, S., Choo, H., & Kaya, H. (1997). An entomopathogenic nematode, *Steinernema monticolum* sp. n.(Rhabditida: *Steinernematidae*) from Korea with a key to other species. *Nematologica, 43*(1), 15-29.

Stock, S. P., Griffin, C. T., & Burnell, A. M. (2002). Morphological characterisation of three isolates of *Heterorhabditis* Poinar, 1976 from theIrish group'(Nematoda: Rhabditida: *Heterorhabditidae*) and additional evidence supporting their recognition as a distinct species, H. downesi n. sp. *Systematic Parasitology, 51*(2), 95-106.

Stock SP, Griffin CT, Chaerani R (2004) Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. *Nematolog* 6: 401–412.

Stock, S. P., & Hunt, D. J. (2005). Morphology and systematics of nematodes used in biocontrol. *Nematodes as biocontrol agents*, 3-43.

Stock SP, Koppenhöfer AM (2003) *Steinernema scarabaei* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a natural pathogen of scarab beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) from New Jersey, USA. *Nematol* 5:191–204.

Stock, S. P., Strong, D., & Gardner, S. L. (1996). Identification of *Heterorhabditis* (Nematoda, *Heterorhabditidae*) from California with a New Species Isolated from the Larvae of the Ghost Moth Hepialis-Californicus (Lepidoptera, *Hepialidae*) from the Bodega Bay Natural Reserve. *Fundamental and Applied Nematology, 19*(6).

Sturhan, D., & Liskova, M. (1999). Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in the Slovak Republic. *Nematology*, *1*(3), 273-277.

Sturhan, D., Spiridonov, S., & Mráček, Z. (2005). *Steinernema silvaticum* sp. n.(Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. *Nematology*, *7*(2), 227-241.

Suwannaroj, M., Yimthin, T., Fukruksa, C., Muangpat, P., Yooyangket, T., Tandhavanant, S., ... & Vitta, A. (2020). Survey of entomopathogenic nematodes and associate bacteria in Thailand and their potential to control Aedes aegypti. *Journal of Applied Entomology*, *144*(3), 212-223.

Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pagès, S., & Boemare, N. (2010). Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 60*(8), 1921-1937.

Tailliez, P., Pagès, S., Edgington, S., Tymo, L. M., & Buddie, A. G. (2012). Description of *Xenorhabdus magdalenensis* sp. nov., the symbiotic bacterium associated with *Steinernema australe*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 62*(8), 1761-1765.

Tailliez, P., Pages, S., Ginibre, N., & Boemare, N. (2006). New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 56,2805-2818.

Tamiru, D., Belachew, T., Loha, E., & Mohammed, S. (2012). Sub-optimal breastfeeding of infants during the first six months and associated factors in rural communities of Jimma Arjo Woreda, Southwest Ethiopia. *BMC public health*, 12(1), 1-9.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution, 30*(12), 2725-2729.

Tarasco E, Mráček Z, Nguyen KB, Triggiani O (2008) *Steinernema ichnusae* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Sardinia Island (Italy). *J Inver Path* 99:173–185

Teethaisong, Y., Pimchan, T., Srisawat, R., Hobbs, G., & Eumkeb, G. (2018). Boesenbergia rotunda (L.) Mansf. extract potentiates the antibacterial activity of some β-lactams against β-lactam-resistant *staphylococci*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *12*, 207-213.

Thanwisai, A., Muangpat, P., Dumidae, A., Subkrasae, C., Ardpairin, J., Tandhavanant, S., & Vitta, A. (2021). Identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria in national parks of Thailand, and mosquitocidal activity of Xenorhabdus griffiniae against Aedes aegypti larvae. *Nematology*, *1*(aop), 1-11.

Thanwisai, A., Tandhavanant, S., Saiprom, N., Waterfield, N. R., Long, P. K., Bode, H. B., . . . Chantratita, N. (2012). Diversity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. and their symbiotic entomopathogenic nematodes from Thailand. *PloS one, 7*(9), e43835.

Timurkaynak, F., Can, F., Azap, Ö. K., Demirbilek, M., Arslan, H., & Karaman, S. Ö. (2006). In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *International journal of antimicrobial agents*, *27*(3), 224-228.

Thomas, G. M., & Poinar, G. O. Jr. (1979). Xenorhabdus gen. nov., a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. International Journal of Systematic Bacteriology, 29, 352-360.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research, 22*(22), 4673-4680.

Tóth, T., & Lakatos, T. (2008). *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis nematodes*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 58*(11), 2579-2581.

Travassos, L. (1927). Sobre o genera Oxysomatium. *Boletim Biologico, 5*, 20-21.

Triggiani, O., Mrácek, Z. D. E. N. E. K., & Reid, A. (2004). Steinernema apuliae sp. n.(Rhabditida: Steinernematidae): a new entomopathogenic nematode from southern Italy. *Zootaxa*, *460*(1), 1-12.

Tseng CT, Hou RF, & Tang L. C (2018) *Steinernema taiwanensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Taiwan. *Zootaxa* 4434:466-480.

Uribe-Lorío, L., Mora, M., & Stock, S. P. (2007). *Steinernema costaricense* n. sp. and S. puntauvense n. sp.(Rhabditida: Steinernematidae), two new entomopathogenic nematodes from Costa Rica. *Systematic Parasitology*, *68*(3), 167-182.

Vitta, A., Fukruksa, C., Yimthin, T., Deelue, K., Sarai, C., Polseela, R., & Thanwisai, A. (2017). Preliminary survey of entomopathogenic nematodes in upper northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health, 48*(1), 18-26.

Waturu, C., Hunt, D., & Reid, A. (1997). *Steinernema karii* sp. n.(Nematoda: *Steinernematidae*), a new entomopathogenic nematode from Kenya. *International Journal of Nematology, 7*(1), 68-75.

White, G. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science (Washington), 66*(1709).

Wouts, W., Mráček, Z., Gerdin, S., & Bedding, R. (1982). Neoaplectana STEINER, 1929 a junior synonym of *Steinernema* TRAVASSOS, 1927 (Nematoda; *Rhabditida*). *Systematic Parasitology, 4*(2), 147-154.

XU, Z. F., WANG, G. H., & LI, X. F. (1991). A new species of the genus *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae). *Zoological Research*, *12*(1), 17-20.

Yimthin, T., Cliff, J. M., Phunpang, R., Ekchariyawat, P., Kaewarpai, T., Lee, J. S., ... & Chantratita, N. (2021). Blood transcriptomics to characterize key biological pathways and identify biomarkers for predicting mortality in melioidosis. *Emerging microbes & infections*, *10*(1), 8-18.

Yimthin, T., Fukruksa, C., Muangpat, P., Dumidae, A., Wattanachaiyingcharoen, W., Vitta, A., & Thanwisai, A. (2021). A study on *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolates from Northeastern Thailand: Identification, antibacterial activity, and association with entomopathogenic nematode hosts. *PloS one*, *16*(8), e0255943.

Yooyangket, T., Muangpat, P., Polseela, R., Tandhavanant, S., Thanwisai, A., & Vitta, A. (2018). Identification of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria from Nam Nao National Park in Thailand and larvicidal activity of symbiotic bacteria against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *PloS one*, *13*(4), e0195681.

Yoshida M (2004). *Steinernema litorale* n. sp. (Rhabditida:Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Japan. *Nematol* 6:819–838

Yoshida M, Reid AP, Briscoe BR, Hominick WM (1998) Survey of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Japan. *Fund App Nematol, 21*, 185–198

Zai-fu, X., Guo-han, W., & Xiao-feng, L. (1991). A new species of the genus *Steinernema* (Rhabditida: *Steinernematidae*). *Zoological Research, 12*(1), 17-20.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียม Nutrient bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride agar (NBTA)

ส่วนประกอบอาหาร (สำหรับ 1 ลิตร)

Nutrient agar (Oxoid, Ltd, England) 28 กรัม

Bromothymol blue 0.025 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งอาหารทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 0.004% tetrazolium chloride (โดย tetrazolium chloride ถูกละลายด้วย 90% alcohol และทำการกรองด้วย filter ขนาด 0.22 um) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

การเตรียม Tryptone soya agar (TSA)

ส่วนประกอบอาหาร (สำหรับ 1 ลิตร)

Tryptone soya agar (TSA) (Oxoid, Ltd, England) 40 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

ไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม Muller Hinton agar (MHA)

ส่วนประกอบอาหาร (สำหรับ 1 ลิตร)

Muller Hinton agar (MHA) (Oxoid, Ltd, England) 38 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม Tryptone soya broth (TSB)

ส่วนประกอบอาหาร (สำหรับ 1 ลิตร)

Tryptone soya broth (TSB) (Oxoid, Ltd, England) 30 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

ไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม Mueller Hinton Broth

ส่วนประกอบอาหาร (สำหรับ 1 ลิตร)

Mueller Hinton Broth (HiMedia Laboraries, LLC, India) 22 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

ไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม Mueller Hinton Broth Control Cations

ส่วนประกอบอาหาร (สำหรับ 1 ลิตร)

Mueller Hinton Broth Control Cations (HiMedia Laboraries, LLC, India) 22 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

ไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม 10X TBE buffer

ส่วนประกอบ (สำหรับ 1 ลิตร)

Tris base (Tris (hydroxymethyl) aminomethane) (Oxoid, Lt, England) 108 กรัม

Boric acid 55 กรัม

EDTA 7.5 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ลิตร จากนั้นจึงค่อย ๆ ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ลิตร

การเตรียม อะกาโรสเจล ความเข้มข้ม 1.2%

ละลายอะกาโรสเจล ใน 1X TBE buffer โดยใช้ความร้อน ตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล

ภาคผนวก ข น้ำหนักสารสกัด (กรัม)

ตาราง 18 น้ำหนักสารสกัด (กรัม) ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 6 ไอโซเลต

ลำดับ	รหัสแบคทีเรีย	ชนิดของแบคทีเรีย	น้ำหนัก (กรัม)
1.	bNP10.1_TH	*X. stockiae*	0.40
2.	bNP10.2_TH	*Xenorhabdus* sp.	0.28
3.	bNP10.3_TH	*Xenorhabdus* sp.	0.20
4.	bNP11.1_TH	*X. stockiae*	0.09
5.	bNP15.1_TH	*Xenorhabdus* sp.	0.12
6.	bNP15.4_TH	*Xenorhabdus* sp.	0.15

ภาคผนวก ค ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดิน

ตาราง 19 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดิน ที่พื้นที่อำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก

Site	Sub site	GPS location	pH	Temp (°C)	Moisture	Soil type	Photograph	EPNs
NP1	1	N16° 43’ 18.0”	6.6	26	4.5	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	2	E100° 36’ 38.4”	6.8	26	2	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	3	E 508 m	6.8	26	3.5	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	4		6.8	26	1.5	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	5		1	26	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
NP2	1	N16° 43’ 16.4”	6.4	26	2.5	ร่วน	สวนแก้วมังกร	ไม่พบ
	2	E100° 36’ 38.4”	6.6	26	2.5	ร่วน	สวนแก้วมังกร	ไม่พบ
	3	E 508 m	6.8	26	2	ร่วน	สวนแก้วมังกร	ไม่พบ
	4		6.4	26	4	ร่วน	สวนแก้วมังกร	ไม่พบ
	5		6.6	26	4.5	ร่วน	สวนแก้วมังกร	ไม่พบ
NP3	1	N16° 43’ 16.0”	6.4	26	2.5	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	2	E100° 36’ 39.7”	6.4	26	3.5	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	3	E 506 m	6	26	7	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	4		6.4	26	6	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	5		6.7	26	1.5	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
NP4	1	N16° 43’ 16.4”	4	26	6	ร่วน	สวนทุเรียน	ไม่พบ
	2	E100° 36’ 39.0”	2	26	5.4	ร่วน	สวนทุเรียน	ไม่พบ
	3	E 510 m	3	26	5.8	ร่วน	สวนทุเรียน	ไม่พบ
	4		3	26	6	ร่วน	สวนทุเรียน	ไม่พบ
	5		2	26	6.2	ร่วน	สวนทุเรียน	ไม่พบ
NP5	1	N16° 43’ 42.9”	3	24	5.8	ร่วน	สวนมะขาม	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 39.9”	4	24	5.2	ร่วน	สวนมะขาม	ไม่พบ
	3	E 509 m	4	24	4.8	ร่วน	สวนมะขาม	ไม่พบ
	4		3	24	5.6	ร่วน	สวนมะขาม	ไม่พบ
	5		3	24	5.2	ร่วน	สวนมะขาม	ไม่พบ

Site	Sub site	GPS location	pH	Temp (°C)	Moisture	Soil type	Photograph	EPNs
NP6	1	N16° 43’ 42.7”	3	25	5.8	ร่วน	สวนมะละกอ	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 39.2”	3	25	6.4	ร่วน	สวนมะละกอ	ไม่พบ
	3	E 506 m	4	25	5.8	ร่วน	สวนมะละกอ	ไม่พบ
	4		3	25	6.2	ร่วน	สวนมะละกอ	ไม่พบ
	5		2.5	25	6.2	ร่วน	สวนมะละกอ	ไม่พบ
NP7	1	N16° 43’ 44.9”	4	25	4	ร่วน	สวนเงาะ	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 40.6”	4	25	4.8	ร่วน	สวนเงาะ	ไม่พบ
	3	E 498 m	5.6	25	8	ร่วน	สวนเงาะ	ไม่พบ
	4		5	25	7	ร่วน	สวนเงาะ	ไม่พบ
	5		6	25	4.8	ร่วน	สวนเงาะ	ไม่พบ
NP8	1	N16° 43’ 44.1”	6.2	26	4	ร่วน	สวนครัว	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 40.3”	5.8	26	7.5	ร่วน	สวนครัว	ไม่พบ
	3	E 496 m	6	26	5	ร่วน	สวนครัว	ไม่พบ
	4		6.2	26	7	ร่วน	สวนครัว	ไม่พบ
	5		6.4	26	5	ร่วน	สวนครัว	ไม่พบ
NP9	1	N16° 44’ 44.7”	4.8	26	8	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 17.5”	4.4	27	8	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	3	E 513 m	5	27	7.5	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	4		4.8	28	5.5	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	5		5.4	28	5	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
NP10	1	N16° 42’ 12.7”	5.8	26	4.5	ร่วน	สวนกระเพรา	ไม่พบ
	2	E100° 34’ 08.6”	5.8	27	5.5	ร่วน	สวนกระเพรา	พบ
	3	E 68 m	6.4	27	6	ร่วน	สวนกระเพรา	ไม่พบ
	4		5.2	28	7	ร่วน	สวนกระเพรา	ไม่พบ
	5		5.4	28	7.5	ร่วน	สวนกระเพรา	ไม่พบ

Site	Subsite	GPS location	pH	Temp (°C)	Moisture	Soil type	Photograph	EPNs
NP11	1	N16° 34’ 12.9”	4.4	28	8	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	2	E100° 34’ 08.6”	5	26	7.5	ร่วน	สวนกล้วย	พบ
	3	E 68 m	4.8	28	5.5	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	4		5.4	27	5	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	5		4.4	28	8	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
NP12	1	N16° 42’ 12.9”	5.9	27	6	ร่วน	มันสำปะหลัง	ไม่พบ
	2	E100° 34’ 08.5”	5.8	27	7.5	ร่วน	มันสำปะหลัง	ไม่พบ
	3	E 64 m	4.8	28	8	ร่วน	มันสำปะหลัง	ไม่พบ
	4		5.4	27.5	4	ร่วน	มันสำปะหลัง	ไม่พบ
	5		4.2	28	8	ร่วน	มันสำปะหลัง	ไม่พบ
NP13	1	N16° 42’ 11.4”	6.6	27	1.5	ร่วนปนทราย	สวนมะม่วง	พบ
	2	E100° 34’ 10.1”	6.6	26	4	ร่วนปนทราย	สวนมะม่วง	พบ
	3	E 55 m	6.6	26	3	ร่วนปนทราย	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	4		6.7	27	1.5	ร่วนปนทราย	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	5		6.2	26	5.5	ร่วนปนทราย	สวนมะม่วง	พบ
NP14	1	N16° 42’ 11.8”	6.8	27	5.5	ร่วน	สวนน้อยหน่า	ไม่พบ
	2	E100° 34’ 10.4”	6.5	27	3	ร่วน	สวนน้อยหน่า	ไม่พบ
	3	E 54 m	6.4	27	3.5	ร่วน	สวนน้อยหน่า	ไม่พบ
	4		6	27	5	ร่วน	สวนน้อยหน่า	ไม่พบ
	5		6	27	3	ร่วน	สวนน้อยหน่า	ไม่พบ
NP15	1	N16° 42’ 13.5”	5.9	28	6	ร่วน	สวนมะปราง	พบ
	2	E100° 34’ 10.3”	6.6	28	3	ร่วน	สวนมะปราง	ไม่พบ
	3	E 54 m	6	28	5.5	ร่วน	สวนมะปราง	ไม่พบ
	4		6.6	28	3	ร่วน	สวนมะปราง	ไม่พบ
	5		6.6	28	3	ร่วน	สวนมะปราง	พบ

Site	Sub site	GPS location	pH	Temp (°C)	Moisture	Soil type	Photograph	EPNs
NP16	1	N16° 42’ 05.6”	5	27	8	ร่วน	สวนสัก	พบ
	2	E100° 33’ 57.1”	5.6	27	8	ร่วน	สวนสัก	ไม่พบ
	3	E 55 m	6	27	7	ร่วน	สวนสัก	ไม่พบ
	4		5.8	27	7	ร่วน	สวนสัก	ไม่พบ
	5		5	27	8	ร่วน	สวนสัก	พบ
NP17	1	N16° 42’ 04.3”	6.2	29	4.5	ร่วนปนทราย	มันสำปะหลัง	ไม่พบ
	2	E100° 33’ 56.0”	6.4	28	3	ร่วนปนทราย	มันสำปะหลัง	ไม่พบ
	3	E 57 m	6.2	28	7	ร่วนปนทราย	มันสำปะหลัง	พบ
	4		6.4	28	5	ร่วนปนทราย	มันสำปะหลัง	พบ
	5		6	28	6	ร่วนปนทราย	มันสำปะหลัง	ไม่พบ
NP18	1	N16° 42’ 06.3”	5.4	28	6	ร่วนปนทราย	นาข้าว	ไม่พบ
	2	E100° 33’ 55.9”	6	29	6	ร่วนปนทราย	นาข้าว	ไม่พบ
	3	E 59 m	6.4	28	5..5	ร่วนปนทราย	นาข้าว	ไม่พบ
	4		6.4	28	7	ร่วนปนทราย	นาข้าว	ไม่พบ
	5		6.2	28	6.5	ร่วนปนทราย	นาข้าว	ไม่พบ
NP19	1	N16° 41’ 55.4”	6.9	27	0.5	ร่วน	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	2	E100° 33’ 38.1”	6.8	26	0.5	ร่วน	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	3	E 73 m	6.8	26	1	ร่วน	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	4		6.9	26	1	ร่วน	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	5		6.9	26	0.5	ร่วน	สวนมะม่วง	ไม่พบ
NP20	1	N16° 41’ 54.5”	6.8	27	1	ร่วน	สวนมะพร้าว	ไม่พบ
	2	E100° 33’ 37.4”	6.9	27	1	ร่วน	สวนมะพร้าว	ไม่พบ
	3	E 52 m	6.8	27	0.5	ร่วน	สวนมะพร้าว	ไม่พบ
	4		6.7	27	1	ร่วน	สวนมะพร้าว	ไม่พบ
	5		6.2	27	4.5	ร่วน	สวนมะพร้าว	ไม่พบ

Site	Sub site	GPS location	pH	Temp (°C)	Moisture	Soil type	Photograph	EPNs
NP21	1	N16° 41’ 53.9”	6.7	29	1	ร่วนปนทราย	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
	2	E100° 33’ 34.7”	6.7	29	2	ร่วนปนทราย	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
	3	E 52 m	6.9	29	1	ร่วนปนทราย	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
	4		6.9	29	0.5	ร่วนปนทราย	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
	5		6.8	29	1	ร่วนปนทราย	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
NP22	1	N16° 41’ 53.5”	6.9	28	0.5	ร่วนปนทราย	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
	2	E100° 33’ 34.1”	6.9	28	0.5	ร่วนปนทราย	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
	3	E 52 m	6.9	27	1	ร่วนปนทราย	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
	4		6.9	28	0.5	ร่วนปนทราย	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
	5		6.9	27	1	ร่วนปนทราย	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
NP23	1	N16° 41’ 54.9”	6.7	27	2	ร่วนปนทราย	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	2	E100° 33’ 36.8”	6.9	27	1	ร่วนปนทราย	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	3	E 58 m	6.9	27	3.5	ร่วนปนทราย	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	4		6.8	27	1	ร่วนปนทราย	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	5		6.8	27	1	ร่วนปนทราย	สวนมะม่วง	ไม่พบ
PL19	1	N16° 44’ 55.6”	6.6	28	3.5	ร่วน	สวนหลงรักไทย	ไม่พบ
	2	E100° 36 44.7”	6.8	29	0.5	ร่วน	สวนหลงรักไทย	ไม่พบ
	3	E 514 m	6.6	29	1	ร่วน	สวนหลงรักไทย	ไม่พบ
	4		6.4	28	3.4	ร่วน	สวนหลงรักไทย	ไม่พบ
	5		6.6	28	2.5	ร่วน	สวนหลงรักไทย	ไม่พบ
PL20	1	N16° 44’ 54.3”	6.6	26	2	ร่วน	สวนหลงรักไทย	ไม่พบ
	2	E100° 33’ 44.8”	6.6	27	3	ร่วน	สวนหลงรักไทย	ไม่พบ
	3	E 510 m	6.6	27	3	ร่วน	สวนหลงรักไทย	ไม่พบ
	4		6.4	27	2	ร่วน	สวนหลงรักไทย	ไม่พบ
	5		6.5	27	2	ร่วน	สวนหลงรักไทย	ไม่พบ

Site	Sub site	GPS location	pH	Temp (°C)	Moisture	Soil type	Photograph	EPNs
PL21	1	N16° 44’ 14.8”	6.8	28	1	ร่วน	สวนยาง	พบ
	2	E100° 38’ 36.1”	6.8	28	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	3	E 533 m	6.6	27	2	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	4		6.8	27	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	5		6.8	29	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
PL22	1	N16° 44’ 15.4”	6.8	27	2	เหนียว	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	2	E100° 38’ 46.1”	6.8	28	2.5	เหนียว	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	3	E 542 m	6.8	28	0.5	เหนียว	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	4		6.8	27	1	เหนียว	สวนมะม่วง	ไม่พบ
	5		6.8	29	1	เหนียว	สวนมะม่วง	ไม่พบ
PL23	1	N16° 44’ 13.2”	6.8	28	1.5	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	2	E100° 38’ 50.1”	6.8	28	1	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	3	E 541 m	6.8	28	1	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	4		6.8	28	1	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	5		6.8	28	2	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
PL24	1	N16° 44’ 12.9”	6.4	30	3	ร่วน	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
	2	E100° 38’ 50.1”	6.4	31	4	ร่วน	สวนมันสำปะหลัง	พบ
	3	E 546 m	6.4	31	3	ร่วน	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
	4		6.4	30	3	ร่วน	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
	5		6.8	30	2	ร่วน	สวนมันสำปะหลัง	ไม่พบ
PL25	1	N16° 43’ 34.3”	6.4	28	2	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	2	E100° 39’ 21.7”	6.2	27	3	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	3	E 544 m	6.5	28	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	4		7	28	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	5		6.4	27	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ

Site	Sub site	GPS location	pH	Temp (°C)	Moisture	Soil type	Photograph	EPNs
PL26	1	N16° 43’ 34.3”	6.8	26	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	2	E100° 39’ 21.7”	7	27	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	พบ
	3	E 544 m	6.8	26	0.5	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	4		7	26	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	5		6.8	26	0.5	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
PL27	1	N16° 43’ 33.3”	6.8	26	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	2	E100° 39’ 20.9”	6.6	26	3	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	3	E 547 m	6.8	26	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	4		7	26	0.5	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	5		7	26	0.5	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
PL28	1	N16° 43’ 30.3”	6.8	27	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	2	E100° 39’ 19.2”	6.8	26	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	3	E 557 m	7	27	0.5	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	4		7	27	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	พบ
	5		7	26	0.5	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	พบ
PL29	1	N16° 44’ 12.9”	6.8	27	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	2	E100° 38’ 50.1”	7	27	0.5	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	3	E 546 m	7	27	0.5	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	4		6.8	26	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	5		7	26	0.5	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
PL30	1	N16° 43’ 34.3”	6.4	28	2	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	2	E100° 39’ 21.7”	6.2	27	3	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	3	E 544 m	6.5	28	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	4		7	28	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	5		6.4	27	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ

Site	Sub site	GPS location	pH	Temp (°C)	Moisture	Soil type	Photograph	EPNs
PL31	1	N16° 43’ 29.0”	7	27	0.5	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	2	E100° 39’ 18.4”	7	26	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	3	E 617 m	7	26	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	4		7	26	0.5	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
	5		7	26	1	ร่วน	ป่าเฉลิมพระเกียรติ	ไม่พบ
PL32	1	N16° 43’ 55.7”	6.8	28	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 41.2”	6.8	28	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	3	E 507 m	6.8	29	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	4		6.8	28	2	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	5		6.8	29	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
PL33	1	N16° 43’ 56.2”	6.8	28	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 40.5”	6.8	28	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	3	E 494 m	6.8	27	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	4		6.8	27	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	5		6.8	29	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
PL34	1	N16° 43’ 36.2”	6.8	26	2	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 40.3”	6.8	26	2	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	3	E 503 m	6.8	28	0.5	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	4		6.8	26	2	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
	5		7	27	0.5	ร่วน	สวนกล้วย	ไม่พบ
PL35	1	N16° 43’ 35.6”	7	27	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 24.2”	6.8	28	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	3	E 510 m	7	27	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	4		7	27	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	5		7	29	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ

Site	Sub site	GPS location	pH	Temp (°C)	Moisture	Soil type	Photograph	EPNs
PL36	1	N16° 43’ 35.6”	7	27	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 24.2”	6.8	28	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	3	E 510 m	7	27	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	4		7	27	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	5		7	29	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
PL37	1	N16° 43’ 30.4”	7	27	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 12.2”	7	27	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	3	E 531 m	6.8	27	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	4		7	27	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	5		7	29	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
PL38	1	N16° 43’ 29.7”	7	27	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 12.0”	7	27	1.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	3	E 538 m	6.8	27	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	4		6.8	26	1	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
	5		6.8	28	0.5	ร่วน	สวนยาง	ไม่พบ
PL39	1	N16° 43’ 26.6”	6.8	29	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 07.0”	7	29	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	3	E 525 m	6.8	30	0.5	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	4		6.8	29	1	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
	5		6.8	31	0.5	ร่วน	สวนลำไย	ไม่พบ
PL40	1	N16° 43’ 26.3”	6.6	27	4	ร่วน	สวนขนุน	ไม่พบ
	2	E100° 37’ 06.0”	6.8	27	2	ร่วน	สวนขนุน	ไม่พบ
	3	E 524 m	6.8	27	2	ร่วน	สวนขนุน	ไม่พบ
	4		6.2	27	3.5	ร่วน	สวนขนุน	ไม่พบ
	5		6.6	29	1.5	ร่วน	สวนขนุน	ไม่พบ

ภาคผนวก ง ข้อมูลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตาราง 20 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และสกุล *Heterorhabditis*

Code bacteria	T(U)	C	A	G	Total
ePL21.1 TH	29.8	17.1	24.0	29.1	591.0
ePL24.2 TH	29.7	17.1	24.0	29.2	592.0
ePL26.2 TH	29.9	17.1	24.0	29.1	592.0
ePL28.4 TH	29.8	17.2	23.9	29.0	593.0
ePL28.5 TH	29.9	17.1	24.0	29.1	592.0
eNP10 2 TH	29.8	17.2	23.9	29.0	593.0
eNP11 2 TH	29.8	17.2	23.9	29.0	593.0
eNP13 1 TH	25.7	19.8	23.5	31.0	600.0
eNP13 2 TH	25.7	19.8	23.5	31.0	600.0
eNP13 5 TH	29.8	17.2	23.9	29.0	593.0
eNP15 1 TH	30.0	18.5	23.8	27.7	593.0
eNP15 5 TH	29.8	17.2	23.9	29.0	593.0
eNP16 1 TH	30.7	16.4	23.5	29.4	596.0
eNP16 5 TH	29.8	17.2	23.9	29.0	593.0
eNP17 3 TH	29.8	17.8	23.7	28.6	594.0
eNP17 4 TH	29.8	17.2	23.9	29.0	593.0

ตาราง 21 sequence สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และสกุล *Heterorhabditis*

Code bacteria	sequence
ePL21.1 TH	TTTGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTCA TCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGATA AAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGGG ATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCTTA GAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTGCGATGC GGG
ePL24.2 TH	TTTGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTCA TCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGATGGAAGCAGATA AAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGATCTACAATTTGTGGGTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGG GATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTGGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCT TAGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCGA TGCGGT
ePL26.2 TH	TTTGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTCA TCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGATA AAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGGG ATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCTTA GAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCGATG CGGT
ePL28.4 TH	TTTCGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTC ATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGAT

Code bacteria	sequence
	AAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGG
	GATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCTT
	AGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCGAT
	GCGGG
ePL28.5_TH	TTTGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTCA
	TCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGATA
	AAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGGG
	ATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCTTA
	GAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCGATG
	CGGA
eNP10.2_TH	CTTTGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTC
	ATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGAT
	AAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGG
	GATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCTT
	AGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCGAT
	GCGGT
eNP11.2_TH	CTTTGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTC
	ATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGAT
	AAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGG
	GATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCTT
	AGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCGAT
	GCGG
eNP13.1_TH	CTTTGACTAGAGATCCAAAGCGGGTGCGAGACCCGTACGTGTTGCCGGTTTGTCGTACGCGTTTGCTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTGAGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTT
	CATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGATAGGATGGAAGCAGA

Code bacteria	sequence
	TGAAGTTGACGAACGAGTGTCGTATTCAGGGTTGCATCTTGTGTGCAGTCTGTTCTTGCGGCCGATGTGGGCTGGCGGCTCTGGTCAATGTGCTGTGTCAAGCGTCGATGGTGACCC
	TGCGGAGGGATAATCAGTCGGTCGTACGATGCGTAGTATGGCTAGAGTTTCGCCGGTCTTGAAGTCAGCGCCTCATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGTTTA
	CGCAAGTCTTAGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGCAACGAAAGTGAATGCAGTTTAATCTGCTGACTTGGGATGCGTTGTCTCCTGTGGACGGCGCTGGACCAAGGTTATATCGCGA
	TCGCTTGCGATGCGGT
eNP13 2 TH	CTTTGATTAGAGATCCAAAGCGGGTGCGAGACCCGTACGCGTTGCCGGTTTGTCGTACGCGTTTGCTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTGAGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTT
	CATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGATAGGATGGAAGCAGA
	TGAAGTTGACGAACGAGTGTCGTATTCAGGGTTGCATCTTGTGTGCAGTCTGTTCTTGCGGCCGATGTGGGCTGGCGGCTCTGGTCAATGTGCTGTGTCAAGCGTCGATGGTGACCC
	TGCGGAGGGATAATCAGTCGGTCGTACGATGCGTAGTATGGCTAGAGTTTCGCCGGTCTTGAAGTCAGCGCCTCATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGTTTA
	CGCAAGTCTTAGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGCAACGAAAGTGAATGCAGTTTAATCTGCTGACTTGGGATGCGTTGTCTCCTGTGGACGGCGCTGGACCAAGGTTATATCGCGA
	TCGCTTGCGATGCGG
eNP13 5 TH	CTTTGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTC
	ATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGAT
	AAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGG
	GATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCTT
	AGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCGAT
	GCGGG
eNP15.1_TH	TTTTTCCCCCCTCCAAGGGGGTTTGGGTCCAAACCCCGTGTTCAACCTTTTTCAAAAAATTCTACCTCTCTTGCAAGGGGGTTGTAAAAACCGCATCTCATTTTGGGTGGCCTACTTC
	TTTTAAAGCAAAATACGACTCGGATTCGGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGAT
	AAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGG
	GATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCTT
	AGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCGAT
	GCGGG
eNP15.5_TH	CTTTGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTC
	ATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGAT

Code bacteria	sequence
	AAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGG
	GATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCTT
	AGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCGAT
	GCGGT
eNP16.1_TH	TTTTGGCGTCCTACACAGGGGGGTTAGGACAATAACCCGGTTTGTACTCTTTTTCTAAAAAGATTTTTTTTCTCGCAAGGGGGTGGTTTAAATATCCCAGCTAAATTTGGGTGGCACCT
	TAATTTTAACGCAAATTAGGATTCGGATTCGGGTGGCAAACAAGTACCGGGGGGTAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGGGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCA
	GATAAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGG
	AGGGATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAG
	TCTTAGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTG
	CGATGCGGT
eNP16.5_TH	CTTTGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTC
	ATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGAT
	AAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGG
	GATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCTT
	AGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCGAT
	GCGGC
eNP17.3_TH	CTTTGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTC
	ATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGAT
	AAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGG
	GATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGACACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCTT
	AGAGCTGTGTCAAAACTTTCAGGCGTAACGAAAGTAAATGTCGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCGA
	TGCGGC
eNP17.4_TH	CTTTGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTC
	ATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGAT

Code bacteria	sequence
	AAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGG GATAATCGGTTGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTCGCTGGTCTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGCTTACGCGAGTCTT AGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCACTGACTTGGGATGCGTTGTCTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCGAT GCGGC

ตาราง 22 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *recA* ของแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

Code bacteria	T(U)	C	A	G	Total
bNP8.2_TH	27.6	20.7	25.7	26.0	646.0
bNP10.1_TH	27.7	20.7	26.0	25.5	646.0
bNP11.1_TH	27.9	20.6	26.2	25.4	646.0
bNP11.2_TH	27.9	20.6	26.2	25.4	646.0
bNP13.4_TH	27.1	20.6	26.0	26.3	646.0
bNP16.2_TH	27.6	20.7	25.7	26.0	646.0
bNP17.3_TH	27.4	20.9	25.7	26.0	646.0
bNP22.5_TH	27.6	20.7	25.9	25.9	646.0
bPL21.5_TH	27.6	20.3	26.0	26.2	646.0
bNP14.2_TH	28.0	20.7	24.9	26.3	646.0
bNP15.2_TH	28.5	20.1	25.1	26.3	646.0
bNP15.3_TH	28.5	20.1	25.1	26.3	646.0
bPL40.2_TH	27.1	21.1	25.1	26.8	646.0

ตาราง 23 sequence สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *recA* ของแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus*

Code bacteria	sequence
bNP8.2_TH	CTATTTCTACTGGCTCACTGTCTCTCGATATTGCTTTGGGGGCAGGTGGTTTGCCAATGGGGCGTATTGTTGAAATATACGGGCCTGAGTCTTCCGGTAAGACAACGCTGACTC
	TTCAGGTTATTGCCGCTGCTCAGCGCGAAGGCAGAACATGTGCTTTTATCGATGCTGAACATGCCCTCGATCCGGTTTATGCGAAAAAGCTGGGTGTAGATATTGATAACTTAC
	TGTGTTCTCAGCCTGATACAGGTGAACAAGCGCTGGAAATCTGTGATGCCTTGTCACGCTCTGGTGCAGTTGATGTTATTGTTGTTGACTCCGTTGCTGCATTGACACCAAAAG
	CAGAAATCGAAGGTGAAATCGGTGATTCACATATGGGTCTGGCGGCTCGTATGATGAGCCAGGCAATGCGTAAGCTGGCAGGAAACCTGAAAAACTCGAATACTCTGCTTATCT
	TCATCAACCAAATCCGTATGAAAATTGGGGTTATGTTTGGTAACCCAGAAACGACGACGGGTGGTAATGCACTAAAATTCTACGCATCTGTTCGTTTGGACATCCGCCGTACCG
	GTTCAGTTAAAAATAGTGATGAAGTTGTTGGCAGCGAAACCCGTGTGAAGGTAGTCAAAAACAAAGTTGCAGCACC
eNP10.1_TH	CCATTTCTACTGGCTCACTGTCTCTCGATATTGCTTTGGGGGCAGGTGGTTTGCCAATGGGGCGTATTGTTGAAATATACGGACCTGAGTCTTCCGGTAAGACAACGCTGACTC
	TTCAGGTTATTGCCGCTGCTCAGCGTGAAGGCAGAACATGTGCTTTTATCGATGCTGAACATGCTCTCGATCCGGTTTATGCTAAAAAGCTGGGTGTAGATATTGATAACTTAC
	TGTGTTCTCAGCCTGATACAGGTGAACAAGCGCTGGAAATCTGTGATGCCTTGTCACGCTCTGGTGCAGTTGATGTTATTGTTGTTGACTCCGTTGCTGCATTGACACCAAAAG
	CAGAAATCGAAGGTGAAATCGGTGATTCACATATGGGTCTGGCGGCTCGTATGATGAGCCAGGCAATGCGTAAACTGGCAGGAAACCTGAAAAACTCGAATACTCTGCTTATCT
	TCATCAACCAAATCCGTATGAAAATTGGGGTTATGTTTGGTAACCCAGAAACGACGACGGGTGGTAATGCACTAAAATTCTACGCATCTGTTCGTTTGGACATCCGCCGTACCG
	GTTCAGTTAAAAATAGTGATGAAGTTGTTGGCAGCGAAACCCGCGTGAAGGTAGTCAAAAACAAAGTTGCAGCACC
bNP11.1_TH	CTATTTCTACTGGCTCACTGTCTCTCGATATTGCTTTGGGGGCAGGTGGTTTGCCAATGGGGCGTATTGTTGAAATATACGGACCTGAGTCTTCCGGTAAGACAACGCTGACTC
	TTCAGGTTATTGCCGCTGCTCAGCGTGAAGGCAGAACATGTGCTTTTATCGATGCTGAACATGCTCTCGATCCGGTTTATGCTAAAAAGCTGGGTGTAGATATTGATAACTTAC
	TGTGTTCTCAGCCTGATACAGGTGAACAAGCGCTGGAAATCTGTGATGCCTTGTCACGCTCTGGTGCAGTTGATGTTATTGTTGTTGACTCCGTTGCTGCATTGACACCAAAAG
	CAGAAATCGAAGGTGAAATCGGTGATTCACATATGGGTCTGGCGGCTCGTATGATGAGCCAGGCAATGCGTAAACTGGCAGGAAACCTGAAAAACTCGAATACTCTGCTTATCT
	TCATCAACCAAATCCGTATGAAAATTGGGGTTATGTTTGGTAACCCAGAAACAACGACGGGTGGTAATGCACTAAAATTCTACGCATCTGTTCGTTTGGACATCCGCCGTACCG
	GTTCAGTTAAAAATAGTGATGAAGTTGTTGGCAGCGAAACCCGCGTGAAGGTAGTCAAAAACAAAGTTGCAGCACC
bNP11.2_TH	CTATTTCTACTGGCTCACTGTCTCTCGATATTGCTTTGGGGGCAGGTGGTTTGCCAATGGGGCGTATTGTTGAAATATACGGACCTGAGTCTTCCGGTAAGACAACGCTGACTC
	TTCAGGTTATTGCCGCTGCTCAGCGTGAAGGCAGAACATGTGCTTTTATCGATGCTGAACATGCTCTCGATCCGGTTTATGCTAAAAAGCTGGGTGTAGATATTGATAACTTAC
	TGTGTTCTCAGCCTGATACAGGTGAACAAGCGCTGGAAATCTGTGATGCCTTGTCACGCTCTGGTGCAGTTGATGTTATTGTTGTTGACTCCGTTGCTGCATTGACACCAAAAG
	CAGAAATCGAAGGTGAAATCGGTGATTCACATATGGGTCTGGCGGCTCGTATGATGAGCCAGGCAATGCGTAAACTGGCAGGAAACCTGAAAAACTCGAATACTCTGCTTATCT

Code bacteria	sequence
	TCATCAACCAAATCCGTATGAAAATTGGGGTTATGTTTGGTAACCCAGAAACAACGACGGGTGGTAATGCACTAAAATTCTACGCATCTGTTCGTTTGGACATCCGCCGTACCG
	GTTCAGTTAAAAATAGTGATGAAGTTGTTGGCAGCGAAACCCGCGTGAAGGTAGTCAAAAACAAAGTTGCAGCACC
bNP13.4_TH	CCATCTCTACCGGTTCCCTGTCACTGGATATTGCATTGGGTGCGGGTGGTTTGCCAATGGGCCGGATTGTGGAAATATACGGACCAGAATCTTCCGGTAAAACAACGCTGACCT
	TGCAAGTTATTGCCGCTGCCCAGCGCGAAGGCAGGACTTGTGCTTTTATTGATGCCGAACATGCTCTTGATCCAGTTTATGCGAAAAAACTGGGTGTAGATATTGATAATCTGT
	TGTGTTCTCAGCCTGATACTGGCGAACAGGCATTGGAAATCTGTGATGCCCTATCACGTTCTGGTGCTGTTGATGTGATTATTGTTGACTCTGTTGCAGCATTAACACCAAAAG
	CAGAAATTGAAGGTGAAATCGGCGACTCTCATATGGGCCTGGCTGCACGTATGATGAGCCAAGCGATGCGTAAATTAGCGGGAAATTTGAAAAACTCGAATACCCTGTTGATTT
	TTATCAACCAGATCCGCATGAAAATTGGCGTGATGTTTGGTAACCCAGAAACGACCACAGGTGGTAATGCACTGAAGTTCTACGCATCTGTCCGTTTGGATATTCGCCGCACTG
	GTTCGGTGAAAAATGGCGACGAAGTGGTTGGTAGCGAAACACGTGTGAAAGTAGTCAAGAACAAGGTTGCTGCACC
bNP16.2_TH	CTATTTCTACTGGCTCACTGTCTCTCGATATTGCTTTGGGGGCAGGTGGTTTGCCAATGGGGCGTATTGTTGAAATATACGGGCCTGAGTCTTCCGGTAAGACAACGCTGACTC
	TTCAGGTTATTGCCGCTGCTCAGCGCGAAGGCAGAACATGTGCTTTTATCGATGCTGAACATGCCCTCGATCCGGTTTATGCGAAAAAGCTGGGTGTAGATATTGATAACTTAT
	TGTGTTCTCAGCCTGATACAGGTGAACAAGCGCTGGAAATCTGTGATGCCTTGTCACGCTCTGGTGCAGTTGATGTTATTGTTGTTGACTCCGTTGCTGCATTGACACCAAAAG
	CAGAAATCGAAGGTGAAATCGGTGATTCACATATGGGTCTGGCGGCTCGTATGATGAGCCAGGCAATGCGTAAGCTGGCAGGAAACCTGAAAAACTCGAATACTCTGCTTATCT
	TCATCAACCAAATCCGTATGAAAATTGGGGTTATGTTTGGTAACCCAGAAACGACGACGGGTGGTAATGCACTAAAATTCTACGCATCTGTTCGTTTGGACATCCGCCGTACCG
	GTTCAGTTAAAAATAGTGATGAAGTTGTTGGCAGCGAAACCCGCGTGAAGGTAGTCAAAAACAAAGTTGCAGCACC
bNP17.3_TH	CTATTTCTACTGGCTCACTGTCTCTCGATATTGCTTTGGGGGCAGGTGGTTTGCCAATGGGGCGTATTGTTGAAATATACGGGCCTGAGTCTTCCGGTAAGACAACGCTGACTC
	TTCAGGTTATTGCCGCTGCTCAGCGCGAAGGCAGAACATGTGCTTTTATCGATGCTGAACATGCCCTCGATCCGGTTTATGCGAAAAAGCTGGGTGTAGATATTGATAACTTAC
	TGTGTTCTCAGCCTGATACAGGTGAACAAGCGCTGGAAATCTGTGATGCCTTGTCACGCTCTGGTGCAGTTGATGTTATTGTTGTTGACTCCGTTGCTGCATTGACACCAAAAG
	CAGAAATCGAAGGTGAAATCGGTGATTCACATATGGGTCTGGCGGCTCGTATGATGAGCCAGGCAATGCGTAAGCTGGCAGGAAACCTGAAAAACTCGAATACTCTGCTTATCT
	TCATCAACCAAATCCGTATGAAAATTGGGGTTATGTTTGGTAACCCAGAAACGACGACGGGTGGTAATGCACTAAAATTCTACGCATCTGTTCGTTTGGACATCCGCCGTACCG
	GTTCAGTTAAAAATAGTGATGAAGTTGTTGGCAGCGAAACCCGCGTGAAGGTAGTCAAAAACAAAGTTGCAGCACC
bNP22.5_TH	CTATTTCTACTGGCTCACTGTCTCTCGATATTGCTTTGGGGGCAGGTGGTTTGCCAATGGGGCGTATTGTTGAAATATACGGGCCTGAGTCTTCCGGTAAGACAACGCTGACTC
	TTCAGGTTATTGCCGCTGCTCAGCGCGAAGGCAGAACATGTGCTTTTATCGATGCTGAACATGCCCTCGATCCGGTTTATGCGAAAAAGCTGGGTGTAGATATTGATAACTTAC
	TGTGTTCTCAGCCTGATACAGGTGAACAAGCGCTGGAAATCTGTGATGCCTTGTCACGCTCTGGTGCAGTTGATGTTATTGTTGTTGACTCCGTTGCTGCATTGACACCAAAAG
	CAGAAATTGAAGGTGAAATCGGTGATTCACATATGGGTCTGGCGGCTCGTATGATGAGCCAGGCAATGCGTAAACTGGCAGGAAACCTGAAAAACTCGAATACTCTGCTTATCT

Code bacteria	sequence
	TCATCAACCAAATCCGTATGAAAATTGGGGTTATGTTTGGTAACCCAGAAACGACGACGGGTGGTAATGCACTAAAATTCTACGCATCTGTTCGTTTGGACATCCGCCGTACCG
	GTTCAGTTAAAAATAGTGATGAAGTTGTTGGCAGCGAAACCCGCGTGAAGGTAGTCAAAAACAAAGTTGCAGCACC
bNP17.3_TH	CTATTTCTACTGGCTCACTGTCTCTCGATATTGCTTTGGGGGCAGGTGGTTTGCCAATGGGGCGTATTGTTGAAATATACGGGCCTGAGTCTTCCGGTAAGACAACGCTGACTC
	TTCAGGTTATTGCCGCTGCTCAGCGCGAAGGCAGAACATGTGCTTTTATCGATGCTGAACATGCCCTCGATCCGGTTTATGCGAAAAAGCTGGGTGTAGATATTGATAACTTAC
	TGTGTTCTCAGCCTGATACAGGTGAACAAGCGCTGGAAATCTGTGATGCCTTGTCACGCTCTGGTGCAGTTGATGTTATTGTTGTTGACTCCGTTGCTGCATTGACACCAAAAG
	CAGAAATCGAAGGTGAAATCGGTGATTCACATATGGGTCTGGCGGCTCGTATGATGAGCCAGGCAATGCGTAAGCTGGCAGGAAACCTGAAAAACTCGAATACTCTGCTTATCT
	TCATCAACCAAATCCGTATGAAAATTGGGGTTATGTTTGGTAACCCAGAAACGACGACGGGTGGTAATGCACTAAAATTCTACGCATCTGTTCGTTTGGACATCCGCCGTACCG
	GTTCAGTTAAAAATAGTGATGAAGTTGTTGGCAGCGAAACCCGCGTGAAGGTAGTCAAAAACAAAGTTGCAGCACC
bPL21.5_TH	CCATTTTAACTGGCTCACTGTCTTTCGATATTGCTTTGGGGGCAGGTGGTTTGCCAATGGGGCGTATTGTTGAAATATACGGGCCTGAGTCTTCCGGTAAGACAACGCTGACTC
	TTCAGGTTATTGTTGCTGCCCAGCGCGAAGGCAGAACATGTGCTTTTATCGATGCTGAACATGCCCTCGATCCGGTTTATGCTAAAAAACTGGGTGTAGATATTGATAACTTAC
	TGTGTTCTCAACCTGATACAGGTGAACAGGCGCTGGAAATCTGTGATGCCTTGTCACGTTCTGGTGCGGTTGATGTTATTGTTGTGGACTCCGTTGCTGCATTGACACCAAAAG
	CAGAAATTGAAGGTGAAATCGGTGATTCACATATGGGGCTGGCAGCTCGCATGATGAGTCAGGCAATGCGTAAACTGGCAGGAAACCTGAAAAACTCGAATACCCTGCTGATCT
	TTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGGGTTATGTTTGGTAACCCAGAAACGACAACTGGTGGTAATGCACTGAAATTCTACGCATCTGTTCGTCTGGATATCCGTCGTACCG
	GTTCAGTGAAAAACAGTGATGAAGTTGTTGGCAGCGAAACCCGCGTGAAGGTAGTCAAAAACAAAGTTGCAGCACC
bNP14.2_TH	CTATCTCCACGGGTTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGCGTATTGTTGAAATTTATGGCCCGGAGTCTTCTGGTAAGACAACGCTGACAT
	TACAGGTTATCGCCGCGGCACAACGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCCCTTGATCCTATCTATGCTAAGAAATTGGGCGTTGATATTGATAATCTTTT
	GTGTTCTCAACCCGATACCGGAGAGCAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGACTCCGTTGCTGCCTTAACGCCAAAAGC
	TGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGGCTGGCAGCTCGAATGATGAGCCAGGCAATGCGTAAACTAGCCGGTAACTTGAAAAGCTCTAATACGTTGTTGATCTT
	TATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCGGTAATCCTGAAACCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCGTCTGGATATTCGCCGTATTGG
	TTCTGTGAAAAATGGCGAAGAGGTTGTTGGTAGCGAAACCCGTGTTAAGGTAGTCAAAAACAAAGTGGCAGCGCC
bPL15.2_TH	CTATCTCCACGGGTTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGCGTATTGTTGAAATTTATGGTCCGGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACAT
	TACAGGTTATTGCCGCGGCACAACGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCCCTTGATCCTATCTATGCTAAGAAATTGGGCGTTGATATTGATAATCTGT
	TGTGTTCTCAACCCGATACCGGAGAACAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGACTCCGTTGCTGCCTTAACGCCAAAAG
	CTGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGGCTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAAACTGGCCGGTAATTTGAAAAGCTCTAATACGTTGTTGATCT

Code bacteria	sequence
	TTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTTGGTAATCCTGAAACCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCGTCTGGATATTCGCCGCATTG
	GTTCTGTGAAAAATGGCGAAGAGGTTGTTGGTAGCGAAACCCGTGTTAAGGTAGTCAAAAACAAAGTGGCAGCGCC
bNP15.3_TH	CTATCTCCACGGGTTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGCGTATTGTTGAAATTTATGGTCCGGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACAT
	TACAGGTTATTGCCGCGGCACAACGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCCCTTGATCCTATCTATGCTAAGAAATTGGGCGTTGATATTGATAATCTGT
	TGTGTTCTCAACCCGATACCGGAGAACAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGACTCCGTTGCTGCCTTAACGCCAAAAG
	CTGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGGCTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAAACTGGCCGGTAATTTGAAAAGCTCTAATACGTTGTTGATCT
	TTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTTGGTAATCCTGAAACCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCGTCTGGATATTCGCCGCATTG
	GTTCTGTGAAAAATGGCGAAGAGGTTGTTGGTAGCGAAACCCGTGTTAAGGTAGTCAAAAACAAAGTGGCAGCGCC
bPL40.2_TH	CTATCTCCACGGGTTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGCGTATTGTTGAAATTTATGGCCCGGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACAT
	TACAGGTTATCGCCGCGGCACAACGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCCCTTGATCCTATCTATGCTAAGAAGTTGGGCGTTGATATTGATAATCTGT
	TGTGCTCTCAACCCGATACCGGAGAACAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGACTCCGTAGCTGCCTTAACGCCAAAGG
	CCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGGCTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAAACTGGCCGGTAATTTGAAAAGCTCCAATACGTTGTTGATCT
	TTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCGGTAACCCTGAAACCACAACCGGTGGTAACGCACTGAAATTCTATGCTTCTGTTCGTCTGGATATTCGCCGCATTG
	GTTCTGTGAAAAATGGCGAAGAGGTTGTTGGTAGCGAGACCCGTGTGAAGGTAGTAAAAAACAAAGTGGCAGCGCC

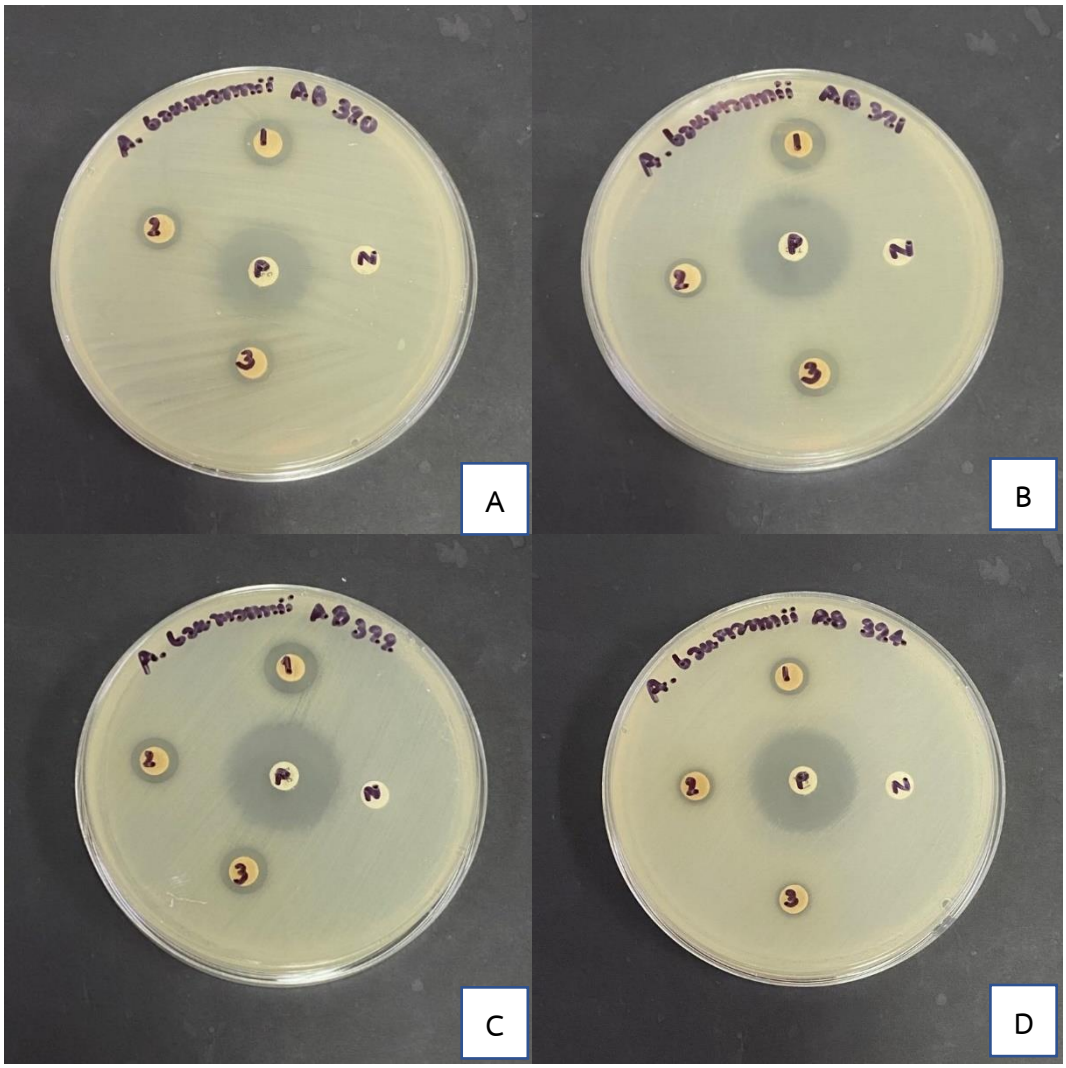
ภาคผนวก จ DISK DIFFUSION

ตาราง 24 สรุปผลจากการคัดกรองด้วย Whole cell culture ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 16 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disk diffusion

รหัสแบคทีเรีย	ชนิดของแบคทีเรีย	แบคทีเรียก่อโรคที่ถูกยับยั้งการเจริญ
bNP7.4_TH	*X. stockiae*	ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 16 สายพันธุ์ได้
bNP10.1_TH	*X. stockiae*	*A. baumannii* (AB324)
		E. coli (PB1 และ PB231)
		K. pneumoniae (PB5)
bNP10.2_TH	*X. stockiae*	*A. baumannii* (AB324)
		E. coli (PB1 และ PB231)
		K. pneumoniae (PB5 และ PB21)
		S. aureus (ATCC 20475 และ PB57)
bNP10.3_TH	*X. stockiae*	*A. baumannii* (AB324)
		E. coli (PB 1และ PB231)
		K. pneumoniae (PB5)
		S. aureus (PB57)
bNP11.1_TH	*X. stockiae*	*A. baumannii* (AB324)
		E. coli (PB1)
		K. pneumoniae (PB 5 และ PB 21)
		S. aureus (ATCC 20475)
bNP11.2_TH	*X. stockiae*	*A. baumannii* (AB324)
		K. pneumoniae (PB5)
bNP13.1_TH	*Xenorhabdus* sp	*A. baumannii* (AB324)
		K. pneumoniae (PB5)
		S. aureus (PB36)
bNP13.2_TH	*Xenorhabdus* sp	ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 16 สายพันธุ์ได้
bNP13.3_TH	*Xenorhabdus* sp	ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 16 สายพันธุ์ได้
bNP13.4_TH	*X. griffniae*	*A. baumannii* (AB321)
bNP13.5_TH	*X. stockiae*	ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 16 สายพันธุ์ได้
bNP15.1_TH	*Xenorhabdus* sp	*A. baumannii* (AB324)
		E. coli (PB1)

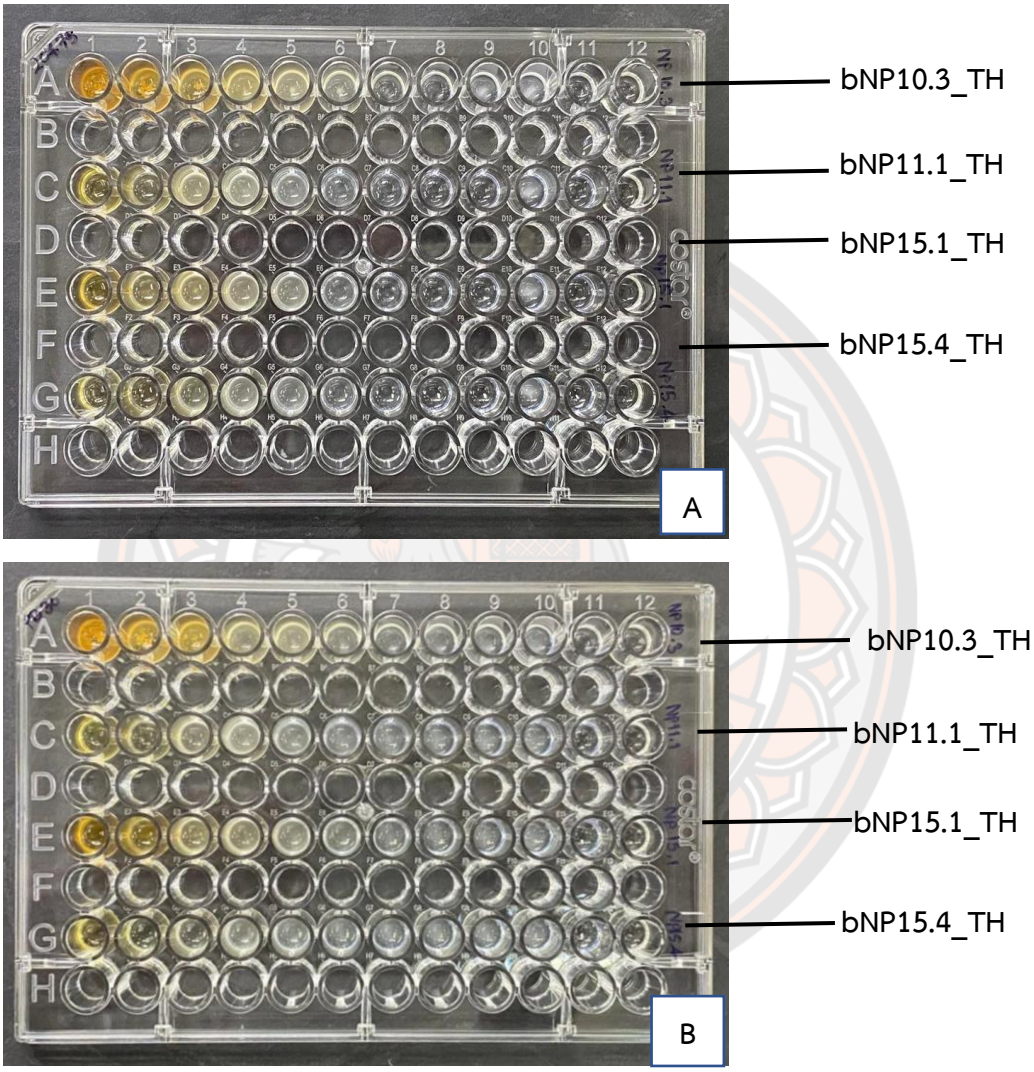
รหัสแบคทีเรีย	ชนิดของแบคทีเรีย	แบคทีเรียก่อโรคที่ถูกยับยั้งการเจริญ
		K. pneumoniae (PB5)
		P. aeruginosa (PB30)
bNP15.2_TH	*P. luminescens*	ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 16 สายพันธุ์ได้
bNP15.3_TH	*P. luminescens*	ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 16 สายพันธุ์ได้
bNP15.4_TH	*Xenorhabdus* sp.	*A. baumannii* (AB324)
		E. coli (PB1และ PB231)
		K. pneumoniae (PB5)
		P. aeruginosa (PB30)
		S. aureus (ATCC 20475 และ PB57)
bNP15.5_TH	*X. stockiae*	*A. baumannii* (AB324)
bNP16.1_TH	*Xenorhabdus* sp.	*A. baumannii* (AB324)
bNP16.2_TH	*X. stockiae*	*A. baumannii* (AB324)
bNP16.3_TH	*Xenorhabdus* sp.	*A. baumannii* (AB324)
bNP16.4_TH	*Xenorhabdus* sp.	ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 16 สายพันธุ์ได้
bNP16.5_TH	*X. stockiae*	*A. baumannii* (AB324)
		E. coli (PB231)
bNP17.3_TH	*X. stockiae*	*A. baumannii* (AB324)
		E. coli (PB231)
bNP17.4_TH	*X. stockiae*	ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 16 สายพันธุ์ได้
bNP20.1_TH	*Xenorhabdus* sp.	ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 16 สายพันธุ์ได้

ภาคผนวก ฉ ฤทธิ์ของสารสกัดจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา ด้วยวิธี Disk diffusion



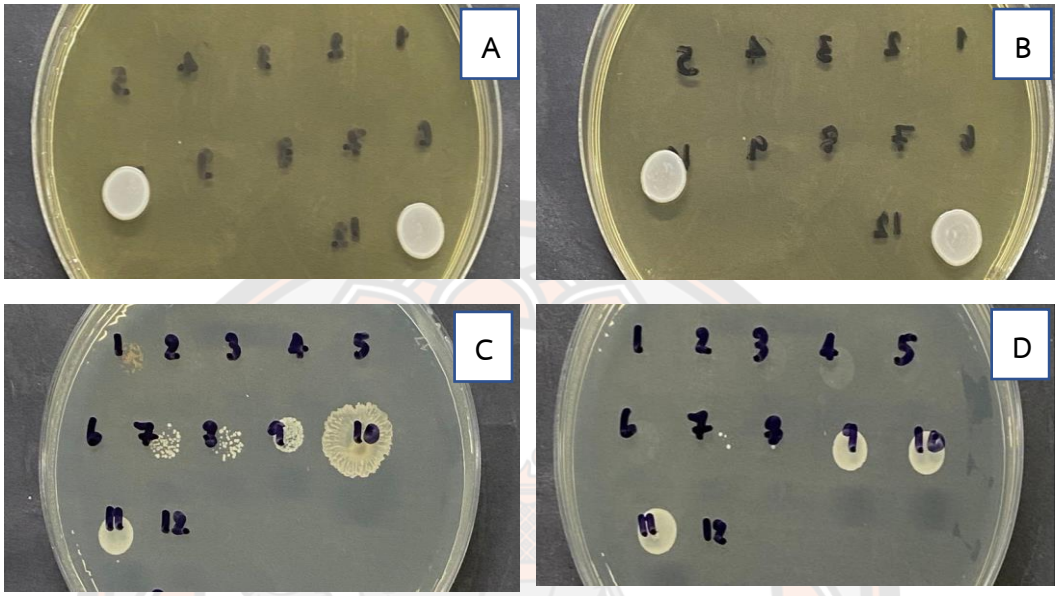
ภาพ 11 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแบคทีเรีย *X. stockiae* รหัส bNP10.1_TH (1), รหัส bNP10.2_TH (2), รหัส bNP10.3_TH (3), antibiotic disks (P) และ negative control (N) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *A. baumannii* สายพันธุ์ AB320 (A), สายพันธุ์ AB321 (B), สายพันธุ์ AB322 (C), สายพันธุ์ AB324 (D)

ภาคผนวก ช ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี Broth micro dilution assay (2-fold serial dilution) ด้วยสารสกัดของแบคทีเรีย Xenorhabdus



ภาพ 12 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยั้บยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี Broth micro dilution assay ของ *X. stockiae* รหัส bNP10.3_TH แถว A, รหัส bNP11.1_TH แถว C, รหัส bNP15.4_TH แถว G และ *Xenorhabdus* sp. รหัส bNP15.1_TH แถว E ต่อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* สายพันธุ์ ATCC 20475 (A) และ สายพันธุ์ PB36 (B)

ภาคผนวก ซ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay (2-fold serial dilution) ด้วยสารสกัดของแบคทีเรีย Xenorhabdus



ภาพ 13 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay ของ *X. stockiae* รหัส bNP10.1_TH (A), bNP15.4_TH (D) และ *Xenorhabdus* sp. รหัส bNP15.1_TH (B), รหัส bNP10.3_TH (C) ต่อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* สายพันธุ์ PB36