การจำแนกชนิดและฤทธิ์ต้านจุลชีพของแบคทีเรียก่อโรคในแมลง จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ปรมาภรณ์ ม่วงปัทม์

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มิถุนายน 2560
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การจำแนกชนิดและฤทธิ์ต้านจุลชีพของแบคทีเรียก่อโรคในแมลง
จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์"
ของ นางสาวปรมาภรณ์ ม่วงปัทม์
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิตย์)

.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.อัญชลี ฐานวิสัย)

.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ)

.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงกมล ขันธเลิศ)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล)
รองคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ ปฏิบัติราชการแทน
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

2 ธ.ค. 2560

ประกาศคุณูปการ

การจัดทำวิทยานิพนธ์เรื่อง การจำแนกชนิดและฤทธิ์ต้านจุลชีพของแบคทีเรียก่อโรคในแมลงจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ สามารถสำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก ดร.อัญชลี ฐานวิสัย ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าคอยให้คำแนะนำปรึกษาในการทำจัดวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิตย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงกมล ขันธเลิศ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการตรวจข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ และภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนในส่วนของอุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณ นางสาวชไมพร ฟักรักษา นายมนวรรธน์ สุวรรณโรจน์ นางสาวเต็มศิริ อยู่ยังเกตุ นางสาวชุติมา สาหร่าย นางสาวพิชามณช์ จันธุ นางสาวพรสุวรรณ อ้ายวงค์ นางสาววิภาณี มีศิลป์ และนายปัณณวัฒน์ ทิมภู ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างดิน

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณสมาชิกครอบครัวทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจและสนับสนุนในทุก ๆ ด้านเพื่อให้การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นไปอย่างสมบูรณ์

ปรมาภรณ์ ม่วงปัทม์

ชื่อเรื่อง	การจำแนกชนิดและฤทธิ์ต้านจุลชีพของแบคทีเรียก่อโรคในแมลงจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
ผู้วิจัย	ปรมาภรณ์ ม่วงปัทม์
ประธานที่ปรึกษา	ดร.อัญชลี ฐานวิสัย
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท. ม. สาขาวิชาจุลชีววิทยา, นเรศวร, 2559
คำสำคัญ	ฤทธิ์ต้านจุลชีพ, ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*

บทคัดย่อ

Xenorhabdus และ *Photorhabdus* หรือแบคทีเรียที่ก่อโรคในแมลง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae และมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพา (Symbiosis) กับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Entomopathogenic nematode หรือ EPNs) แบคทีเรียทั้ง 2 สกุล สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิดรวมถึงสารต้านจุลชีพ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* และศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล ทำการเก็บตัวอย่างดิน 550 ตัวอย่าง จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ 24 ไอโซเลต แบ่งเป็น *Steinernema* จำนวน 3 ไอโซเลต และ *Heterorhabditis* จำนวน 21 ไอโซเลต จากนั้นจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 28S rDNA สำหรับ *Steinernema* และ Internal transcribed spacer (ITS) สำหรับ *Heterorhabditis* จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้เป็น *S. websteri* จำนวน 2 ไอโซเลต *S. kushidai* 1 ไอโซเลต *H. indica* จำนวน 7 ไอโซเลต *H. baujardi* จำนวน 5 ไอโซเลต และ *H. zealandica* จำนวน 1 ไอโซเลต สำหรับแบคทีเรียที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งหมด 24 ไอโซเลต เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *recA* พบว่าเป็นแบคทีเรีย *X. stockiae* จำนวน 2 ไอโซเลต *X. japonica* จำนวน 1 ไอโซเลต *P. luminescens* subsp. *akhurstii* จำนวน 20 ไอโซเลต และ *P. temperata* subsp. *temperata* จำนวน 1 ไอโซเลต

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพ ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยใช้ส่วนของ Whole cell suspension ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 16 สายพันธุ์ด้วยวิธี disc diffusion พบว่ามีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* 11 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอย่างน้อย 1 สายพันธุ์ จึงนำแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลตมาศึกษาโดยนำไปสกัดหยาบด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยใช้ ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Photorhabdus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างน้อย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* ATCC® 20475, PB36 *S. aureus* (MRSA) และ PB57 *S. aureus* (MRSA) ในทางตรงกันข้ามสารสกัดจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้เพียงสายพันธุ์เดียว ได้แก่ *P. aeruginosa* ATCC® 27853

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร รวมทั้งทราบถึงฤทธิ์ต้านจุลชีพของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสารต้านจุลชีพที่แบคทีเรียผลิตขึ้นเพื่อที่อาจจะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมยาต่อไปได้

Title	IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA FROM MAE WONG NATIONAL PARK
Author	Paramaporn Muangpat
Advisor	Aunchalee Thanwisai, Ph.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Apichat Vitta, Ph.D. Assistant Professor Sitthirat Sitthisak, Ph.D.
Academic Paper	Thesis M.Sc. in Microbiology Naresuan University, 2016
Keyword	Antimicrobial activity, Entomopathogenic nematode, *Xenorhabdus, Photorhabdus*

ABSTRACT

Xenorhabdus and *Photorhabdus* or entomopathogenic bacteria are Gram-negative, rod- shaped belonging to Enterobacteriaceae family and symbiotically associated with entomopathogenic nematodes (EPNs). Both genus of bacteria are able to produce several bioactive compounds including antimicrobial compounds. Therefore, the objectives of this study were to study the diversity of entomopathogenic nematodes and *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria and to study the antimicrobial activity of both bacteria. By collecting 550 soil samples from Mae Wong National Park, Kamphaeng Phet Province, twenty- four isolates of entomopathogenic nematode were identified. It was divided into 2 genus which composed of *Steinernema* (3 isolates) and *Heterorhabditis* (21 Isolates). Then species identification of the EPNs was performed based on analyzing a partial region of 28S rDNA gene for *Steinernema* and internal transcribed spacer (ITS) for *Heterorhabditis*. It was found that *S. websteri* (2 isolates), *S. kushidai* (1 Isolate), *H. indica* (7 isolates), *H. baujardi* (5 isolates) and *H. zealandica* (1 isolate) were identified. For bacterial identification based on analyzing a partial *recA* gene, *X. stockiae* (2 isolates), *X. Japonica* (1 isolate), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (20 isolates) and *P. temperata* subsp. *temperata* (1 isolate)

The study of antimicrobial activity of *Xerorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria using whole cell suspension against 16 strains of pathogenic bacteria by disc diffusion method. It was found that eleven isolates of *Xerorhabdus* and *Photorhabdus* had efficiency in inhibiting the growth of at least one strain of pathogenic bacteria. Subsequencely, crude compounds from 11 isolates of bacteria were extracted through rotary evaporator using ethyl acetate as a solvent. Crude extracts from *Photorhabdus* could inhibit at least 3 strains of pathogenic bacteria including *S. aureus* ATCC® 20475, PB36 *S. aureus* (MRSA) and PB57 *S. aureus* (MRSA). In contrast, the extracts from *Xenorhabdus* could inhibit only 1 strain of pathogenic bacteria that is *P. aeruginosa* ATCC® 27853.

This study presents diversity of entomopathogenic nematode as well as *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria isolated from the soil samples in Mae Wong National Park, Kamphaeng Phet Province. In addition, antimicrobial activity of these 2 bacteria genera against pathogenic bacteria is demonstrated. However, further study on antimicrobial compounds produced by these bacteria is suggested for the benefits of pharmaceutical industry.

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	จุดมุ่งหมายของการวิจัย	3
	ขอบเขตการวิจัย	3
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Entomophatogenic Nematodes)	5
	แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*	16
3	**วิธีการดำเนินการวิจัย**	28
	แผนผังการทดลอง	28
	การเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง (Galleria *mellonella*)	29
	การเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร	29
	การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	30
	แยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ออกจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	32
	จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	33
	จำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*	37
	ศึกษาสายพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย	42
	การเตรียมเซลล์แบคทีเรียก่อโรคสำหรับใช้ในวิธี Disc diffusion	47
	การคัดกรองแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค	48

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจาก crude compound ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*	49
	การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay	50
4	ผลการวิจัย	55
	การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน	55
	การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	56
	ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	60
	ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	63
	การแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	64
	การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*	65
	ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*	69
	การศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีคัดกรอง	72
	การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจจาก Crude compound ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ด้วยวิธี Disc diffusion	79

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ . หน้า

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียดื้อยาได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียดื้อยาได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay 88

5 บทสรุป 91

สรุปผลการวิจัย 91

อภิปรายผล 92

ข้อเสนอแนะ 96

บรรณานุกรม 97

ภาคผนวก 136

ประวัติผู้วิจัย 152

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 99 ชนิด 6

2 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 28 ชนิด 11

3 แบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* จำนวน 26 ชนิด 17

4 แบคทีเรียสกุล *Photorhabdus* จำนวน 5 ชนิด 18

5 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 44 ชนิด จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *28S rRNA*..... 43

6 ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 21 ชนิด จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal Transcribed Spacer (ITS)..... 45

7 แบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 23 ชนิด จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA*..... 46

8 แบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 14 ชนิด จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA*..... 47

9 ยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ทำ Disc diffusion..... 49

10 ค่าความเข้มข้นของ Crude compound จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต สำหรับใช้ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay (2 fold serial dilution)..... 52

11 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรู แมลง *Steinernema* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร 57

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

12 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* จำนวน 13 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร 58

13 ลักษณะดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จากตัวอย่างดินทั้งหมด 550 ตัวอย่าง 63

14 ค่าอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และความชื้น ที่พบและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 550 ตัวอย่าง 64

15 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร 66

16 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร 67

17 ผลจากการคัดกรองด้วย Whole cell suspension ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ (แผ่น Disc มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร)... 73

18 ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีคัดกรอง 77

19 สรุปผลจากการคัดกรองด้วย Whole cell suspension ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ด้วยวิธี Disc diffusion 78

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

20 ผลจากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย crude compound ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ*Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ (แผ่น Disc มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร) 81

21 ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการศึกษาฤทธิ์ของ แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อแบคทีเรียก่อโรคด้วย Crude compound..... 83

22 สรุปผลจากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย crude compound ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disc diffusion 84

23 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) 89

24 Accession number ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* 139

25 Accession number ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis*..... 140

26 น้ำหนัก crude compound (กรัม) ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *Photorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต 141

27 น้ำหนัก crude compound (กรัม) ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต สำหรับใช้ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay..... 142

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

1 ลักษณะริมฝีปากของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema anarium* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)..... 10

2 ลักษณะริมฝีปากของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis mexicana* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)..... 12

3 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 13

4 Phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ที่พบในประเทศไทย โดยใช้ยีน *recA* 22

5 Phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* ที่พบในประเทศไทย โดยใช้ยีน *recA* 23

6 โครงสร้างของสาร Secondary metabolites ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Photorhabdus* 26

7 โครงสร้างของสาร Secondary metabolites ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* 27

8 แผนผังการทดลอง 28

9 การเตรียมอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำอาหาร (A) ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ (B) และการเจริญของหนอนกินรังผึ้ง (C) 29

10 การเก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร บริเวณช่องเย็น ขุดดินใส่ถุงพลาสติก (A) วัดอุณหภูมิ (B) วัดอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด ด่าง และความชื้น (C) และปิดปากถุงเพื่อรักษาความชื้นของดิน (D)..... 30

11 การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินด้วยตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งโดยวิธี Baiting technique เทดินใส่กล่อง (A) วางหนอนจำนวน 5 ตัว ลงในกล่องดิน (B) และเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน (C) 31

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

12 การล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งด้วยวิธี White trap ตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งที่ตายแล้ว (A) ซากหนอนกินรังผึ้งถูกวางบนกระดาษกรอง (B) และวางไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 2 – 3 สัปดาห์ (C) 32

13 ตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณยีน 28S rDNA ของ *S. websteri* (accession Number841762.1) 35

14 ตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณยีน 18S rRNA และยีน ITS ของ *H. safricana* (accession number EF488006.1) สีเขียวแสดงบริเวณที่ทั้ง 4 ไพรเมอร์สามารถจับได้ ตัวอักษรสีดำ คือ บริเวณยีน *18S rRNA*, สีแดง คือ บริเวณยีน Internal สีเขียว คือ บริเวณยีน Internal transcribed spacer II และสีน้ำเงิน คือ บริเวณยีน *28S rRNA*..... 36

15 ตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณยีน *recA* ของ *X. bovienii* SS-2004 (accession number NC_013892.1) สีเหลืองแสดงบริเวณยีน recA ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส..... 40

16 ตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณยีน *recA* ของ *P. luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 (accession number NC_005127.1) สีเหลืองแสดงตำแหน่งของยีน recA ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส 41

17 แผนที่แสดงบริเวณที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร..... 55

18 Maximum likelihood tree ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล Steinernema โดยใช้ ยีน *28S rRNA* วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0 วิธี Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)..... 61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
19	Maximum likelihood tree ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล Heterorhabditi โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal transcribed spacer วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0 วิธี Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)	62
20	ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NBTA แบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* (A) และแบคทีเรียสกุล *Photorhabdus* (B)	64
21	Maximum likelihood tree ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* โดยใช้ยีน *recA* (588 คู่เบส) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEFA version 7.0 วิธี Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)	70
22	Maximum likelihood tree ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* โดยใช้ยีน *recA* (588 คู่เบส) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEFA version 7.0 วิธี Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)	71
23	ตัวอย่างผลจากการทำ Disc diffusion ด้วยวิธีคัดกรองด้วย Whole cell suspension ของแบคทีเรีย *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW1.2_TH) (1), *P. luminescens subsp.akhurstii* (bMW4.5_TH) (2), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW8.1_TH) (3), *X. japonica* (bMW12.3_TH) (4) และ *X. stockiae* (bMW16.3_TH) (5) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค PB57 *S. aureus* (A)	79
24	ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย Crude compound แบคทีเรีย *P. temperata subsp. temperata* (bMW27.4_TH) (1), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW49.3_TH) (2), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW56.5_TH) (3) และ *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW59.2_TH) (4) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ATCC® 20475 (A), PB57 *S. aureus* (B),PB1 E. coli(C) และ AB322 *A. baumannii* (D)	87

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

25 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay ของ P. luminescens subsp. akhurstii (bMW1.2_TH) (A), P. *luminescens* subsp. akhurstii (bMW8.1_TH) (B), P. *luminescens subsp. akhurstii* (bMW49.3_TH) (C), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW56.5_TH) (D), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW59.2_TH) (E), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW59.5_TH) (F), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW90.1_TH) (G), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW103.2_TH) (H) และ bMW27.4_TH *P. temperata subsp. temperata* (I) ต่อแบคทีเรียก่อโรค PB36 *S. Aureus*..... 90

26 การเก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร ตามเส้นทางสำรวจธรรมชาติ (A) (B)..... 143

27 การเก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร บริเวณช่องเย็น (A) (B)..... 144

28 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย Crude compound ของแบคทีเรีย *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW1.2_TH) (1), *P. Luminescens subsp. akhurstii* (bMW8.1_TH) (2), *X. stockiae* (bMW16.3_TH) (3), *X. stockiae* (bMW16.5_TH) (4), Antibiotic disc (P) และ Negative control (N) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ATCC® 20475 (A), PB57 *S. aureus* (B) และ PB36 *S. aureus* (C) 145

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

29 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย crude compound ของแบคทีเรีย *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW59.5_TH) (9), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW90.1_TH) (10), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW103.2_TH) (11), Antibiotic disc (P) และ Negative control (N) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค AB320 *A. baumannii* (A), PB57 *S. aureus* (B), *S. aureus* ATCC® 20475 (C), PB36 *S. aureus* (D) และ *E. faecalis* ATCC® 51299 (E) 146

30 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay ของ *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW1.2_TH) (A), *P. luminescens* subsp. akhurstii (bMW8.1_TH) (B), P. luminescens subsp. akhurstii (bMW49.3_TH) (C), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW56.5_TH) (D), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW59.2_TH)(E) และ *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW59.5_TH) (F) ต่อแบคทีเรียดื้อยา PB36 *S. Aureus* (แถว A และ B), PB57 *S. aureus* (แถว C และ D) และ S. aureus ATCC® 20475 (แถว E และ F) โดยหลุมที่ 9 คือ Positive control; อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MHB และเชื้อก่อ โรค หลุมที่ 10 คือ DMSO control; ใส่ DMSO (Dimethyl sulfoxide) แทน crude compound จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* และหลุมที่ 11 คือ Negative control; อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MHB เพียงอย่างเดียว..... 147

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

31 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay ของ *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW90.1_TH) (A), P. luminescens subsp. Akhurstii (bMW103.2_TH) (B) และ *P. temperata subsp. temperata* (bMW27.4_TH) (C) ต่อแบคทีเรียดื้อยา PB36 *S. aureus* (แถว A และ B), PB57 *S. aureus* (แถว C และ D) และ *S. aureus* ATCC® 20475 (แถว E และ F) โดยหลุมที่ 9 คือ Positive control; อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MHB และเชื้อก่อโรค หลุมที่ 10 คือ DMSO control; ใส่ DMSO (Dimethyl sulfoxide) แทน crude compound จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* และหลุมที่ 11 คือ Negative control; อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MHB เพียงอย่างเดียว 148

32 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay ของ *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW1.2_TH) (A), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW8.1_TH) (B), *P. Luminescens subsp. akhurstii* (bMW49.3_TH) (C), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW56.5_TH) (D), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW59.2_TH) (E), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW 59.5_TH) (F), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW90.1_TH) (G), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW103.2_TH) (H) และ *P. temperata subsp. temperata* (bMW27.4_TH) (I) ต่อแบคทีเรียก่อโรค PB57 *S. Aureus* 149

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

33 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay ของ *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW1.2_TH) (A), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW8.1_TH) (B), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW49.3_TH) (C), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW56.5_TH) (D), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW59.2_TH) (E), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW59.5_TH) (F), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW90.1_TH) (G), *P. luminescens subsp. akhurstii* (bMW103.2_TH) (H) และ *P. temperata subsp. temperata* (bMW27.4_TH) (I) ต่อแบคทีเรียก่อโรค S. aureus ATCC® 20475 150

34 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay ของ *P. temperata subsp. temperata* (bMW27.4_TH) ต่อแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* ATCC® 35218 และ PB30 *P. aeruginosa* (B).. 151

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นหนอนตัวกลม อยู่ในไฟลัม Nematoda ชั้น Chromadorea ตระกูล Rhabditida มี 2 สกุลที่มีบทบาทสำคัญต่อการก่อโรคในแมลง คือ *Steinernema* จัดอยู่ในวงศ์ Steinernemetidae และ *Heterorhabditis* จัดอยู่ในวงศ์ Heterorhabditidae โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 สกุล มีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* อาศัยแบบพึ่งพา (Symbiosis) อยู่ภายในลำไส้ของตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (Infective juvenile) โดยแบคทีเรีย *Xenorhabdus* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* และแบคทีเรีย *Photorhabdus* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 สกุลสามารถก่อโรคในแมลงได้โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระยะติดต่อ (Infective juvenile) ที่อยู่ในดินไชเข้าสู่ตัวอ่อนแมลงอาศัย (Host) ผ่านรูเปิดทางธรรมชาติ เช่น ปาก ทวารหนัก และรูหายใจ หรือไชเข้าสู่ผิวหนังโดยตรงไปยังบริเวณช่องว่างกลางลำตัว (Hemocoel) ของตัวอ่อนแมลงอาศัย หลังจากนั้นจะปล่อยแบคทีเรียออกมายังระบบเลือด (Hemolymph) ของตัวอ่อนแมลงอาศัย โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลสามารถผลิตสารพิษ (Toxin) และสารปฏิชีวนะ (Antibiotic) ส่งผลให้ตัวอ่อนแมลงอาศัยตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง ด้วยภาวะเลือดเป็นพิษ (Septicemia) ในขณะเดียวกันนั้นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะกินแบคทีเรีย และซากตัวอ่อนแมลงอาศัยเป็นอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (Wang, & Gaugler, 1998, pp. 313-318)

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae มีรูปร่างแท่ง (Rod shape) เคลื่อนที่ได้โดยใช้แส้รอบตัว (Peritrichous flagella) เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในแมลง (Entomophathogenic bacteria) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* บนอาหาร Nutrient bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride agar (NBTA) จะมีโคโลนีสีน้ำเงิน ขอบไม่เรียบ ลักษณะโค้งนูน (Convex) หรือนูนตรงกลางเล็กน้อย (Umbonate) และแผ่กว้าง (Swarming) ในขณะที่แบคทีเรีย *Photorhabdus* จะมีโคโลนีสีเขียว ขอบเรียบ โค้งนูน (Entire) หรือนูนตรงกลางเล็กน้อย (Umbonate) (Thanwisai et al., 2012, p. e43835)

ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* จำนวน 99 ชนิด และ *Heterorhabditis* จำนวน 28 ชนิด (Thanwisai et al., 2012, pp. e43835; Malan et al., 2014, pp. 139-151; Cimen et al., 2014, pp. 337-353; Cimen et al., 2015, pp. 415-427; Nthenga et al., 2014, pp. 475-494; Cimen et al., 2016, pp. 148-158; Abate et al., 2016, pp. 235-255; Malan et al., 2016, pp. 262-268; Půža et al., 2017, pp. 20-34; San-Blas et al., 2016, pp. 200-214) และมีรายงานการค้นพบแบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus* จำนวน 26 ชนิด และ *Photorhabdus* จำนวน 5 ชนิด ตามลำดับ (Ferreira et al., 2013a, pp.3220-3224; Kuwata et al., 2013, pp.1690-1695; Ferreira et al., 2014, pp.1540-1545; Kämpfer et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา โดยในปี ค.ศ. 1982 Akhurst ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพที่แยกได้จาก *X. luminescens, X. nematophila* A24 และ *Xenorhabdus* sp. Q1 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Shigella sonei* ในปี ค.ศ. 1996 Genhui Chen ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพที่แยกได้จากแบคทีเรีย *X. nematophila, X. bovienii* และ *P. luminescens* พบว่าสารต้านจุลชีพที่ผลิตได้ในรูปของ Primary form สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 32 ชนิด ในปี ค.ศ. 2012 Inman และ Holmes พบว่า *X. nematophila* สามารถสร้างสารต้านแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน และไม่ทนต่อความร้อนได้ โดยเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion สารต้านจุลชีพที่ทนความร้อนมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ และในปีค.ศ.2014 Grundmann et al. ได้แยกสาร Chaiyaphumines จาก *Xenorhabdus* sp. 61.4 จากจังหวัดชัยภูมิ ประเทศไทย มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อปรสิต (Antiparasitics) โดยสามารถฆ่า *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย

การศึกษาครั้งนี้เลือกอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร ประเทศไทย เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* เนื่องจากการศึกษาในเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติของประเทศไทยยังมีน้อย รวมทั้งภายในเขตอุทยานแห่งชาติยังเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ และมีหลากหลายทางธรรมชาติสูง คาดว่าน่าจะพบความหลากหลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditi* ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 28S rDNA และ Internal Transcribed Spacer (ITS) ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล ทำการจำแนกชนิดโดย

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Recombinase A (*recA*) (Lloyd, & Sharp, 1993, pp. 399-407) ศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* และศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นความรู้พื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมทางการแพทย์ต่อไป

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal Transcribed spacer (ITS) สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* หรือ 28S rDNA สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema*

2. เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA*

3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenic tree) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่มีการอาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพา

4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินอย่างน้อย 110 จุด แต่ละจุดเก็บดิน 5 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดอย่างน้อย 550 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ได้มาแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยใช้ตัวอ่อนของหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) เป็นเหยื่อล่อ (Baiting) แล้วแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยนำน้ำเลือด (Hemolymph) ของซากตัวอ่อนของหนอนกินรังผึ้งมา Cross steak เพื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride agar (NBTA) ทำการจำชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เมื่อทราบชนิดแล้วนำไปศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ และศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 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 สายพันธุ์ และ *Staphylococcus aureus* จำนวน 3 สายพันธุ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความหลากหลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร

2. ทราบถึงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenic tree) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

3. ทราบถึงประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Entomophatogenic Nematodes)

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นหนอนตัวกลม สามารถใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด (Capinera, & Epsky, 1992, pp. 525-532) พบได้ทั่วไปในดินธรรมชาติและดินที่ใช้ทำการเกษตรทั่วโลก (Hominick et al., 1996, pp. 317-331; 2002, pp. 115-143) โดย The United States Environmental Protection Agency (EPA) ได้รับรองว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวงศ์ Steinernematidae และ Heterorhabditidae มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์เลือดอุ่น พืช และสิ่งแวดล้อม (Kaya, & Gaugler, 1993, pp. 181-206) จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชแบบวิธีทางชีวภาพ (Biological control) แทนการใช้สารเคมีซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

1. **ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล** *Steinernema*

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จัดอยู่ในไฟลัม Nematodes ชั้น Chromadorea ตระกูล Rhabditida วงศ์ Steinernemetidae (Travassos, 1927, pp. 20-21) ในปี ค.ศ. 1923 Steiner ได้รายงานการค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นครั้งแรกที่ประเทศเยอรมนี ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinername* จะมีแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* อาศัยอยู่ภายในลำไส้ (Foregut) ซึ่งเป็นการอาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (Symbiosis) ปัจจุบันมีรายงานไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* ทั้งหมด จำนวน 99 ชนิด (ตาราง 1)

ตาราง 1 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 99 ชนิด

Genus	Species	References
Steinernema	*kraussei*	Travassos, 1927
	affine	Wouts et al., 1982
	arenarium	Wouts et al., 1982
	carpocapsae	Wouts et al., 1982
	feltiae	Wouts et al., 1982
	glaseri	Wouts et al., 1982
	intermedium	Poinar, 1985
	rarum	Doucet, 1986
	kushidai	Mamiya, 1988
	ritteri	Doucet, & Doucet, 1990
	scapterisci	Nguyen, & Smart, 1990
	caudatum	Xu et al., 1991
	longicaudum	Shen, & Wang, 1991
	neocurtillae	Nguyen, & Smart, 1992
	cubana	Mracek et al., 1994
	puertoricense	Roman, & Figueroa, 1994
	riobrave	Cabanillas et al., 1994
	bicornutum	Tallosi et al., 1995
	oregonense	Liu and Berry, 1996
	abbasi	Elawad, 1997
	ceratophorum	Jian et al., 1997
	karii	Waturu et al., 1997
	monticolum	Stock et al., 1997
	siamkayai	Stock et al., 1998
	tami	Luc et al., 2000
	thermophilum	Ganguly, & Singh, 2000

ตาราง 1 (ต่อ)

Genus	Species	References
Steinernema	*loci*	Phan et al., 2001
	pakistanense	Shahina et al., 2001
	sangi	Phan et al., 2001
	thanhi	Phan et al., 2001
	asiaticum	Anis et al., 2002
	diaprepesi	Nguyen, & Duncan, 2002
	anatoliense	Hazir et al., 2003
	scarabaei	Stock, & Koppenhofer, 2003
	websteri	Cutler, & Stock, 2003
	weiseri	Mracek et al., 2003
	apuliae	Triggiani et al., 2004
	guangdongense	Qiu et al., 2004
	hermaphroditum	Stock, Griffin, & Chaerani, 2004
	jollieti	Spiridonov et al., 2004
	litorale	Yoshida, 2004
	aciari	Qiu et al., 2005
	akhursti	Qiu et al., 2005
	beddingi	Qiu et al., 2005
	robustispiculum	Phan et al., 2005
	silvaticum	Sturhan et al., 2005
	serratum	Lengyel et al., 2005
	yirgalemense	Nguyen et al., 2005
	serratum	Lengyel et al., 2005
	ashiuense	Phan et al., 2006
	backanense	Phan et al., 2006
	cumgarense	Phan et al., 2006
	eapokense	Phan et al., 2006

ตาราง 1 (ต่อ)

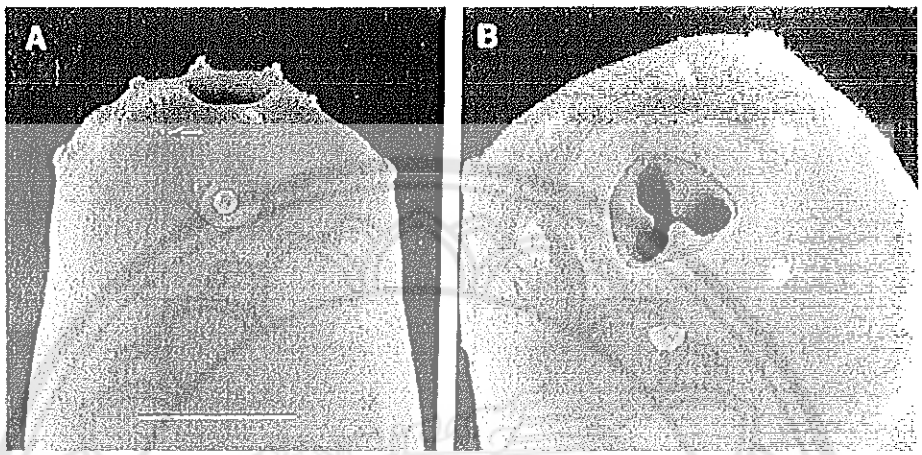
Genus	Species	References
Steinernema	*hebeiense*	Chen, 2006
	khoisanae	Nguyen et al., 2006
	leizhouense	Nguyen et al., 2006
	sasonense	Phan et al., 2006
	sichuanense	Mracek et al., 2006
	costaricense	Uribe-Lorio et al., 2007
	puntauvense	Uribe-Lorio et al., 2007
	texanum	Nguyen et al., 2007
	cholashanense	Nguyen et al., 2008
	colombiense	Lopez-Nunez et al., 2008
	ichnusae	Tarasco et al., 2008
	australe	Edgington et al., 2009
	boemarei	Lee et al., 2009
	unicornum	Edgington et al., 2009
	xueshanense	Mrácek et al., 2009
	brazilense	Nguyen et al., 2010
	minutum	Maneesakorn et al., 2010
	schliemanni	Spiridonov et al., 2010
	arasbaranense	Nikdel et al., 2011
	citrae	Stokwe et al., 2011
	everestense	Khatri et al., 2011
	lamjungense	Khatri et al., 2011
	meghalayensis	Ganguly et al., 2011
	nepalense	Khatri et al., 2011
	phyllophagae	Nguyen, & Buss, 2011
	pui	Qiu et al., 2011
	surkhetense	Khatri et al., 2011

ตาราง 1 (ต่อ)

Genus	Species	References
Steinernema	*vulcanicum*	Clausi et al., 2011
	cameroonense	Kanga et al., 2012
	changbaiense	Ma et al., 2012
	ethiopiense	Tamiru et al., 2012
	nyetense	Kanga et al., 2012
	tielingense	Ma et al., 2012
	bifurcatum	Shahina et al., 2014
	xiebinense	Ma et al., 2012
	huense	Phan et al., 2014
	innovationi	Cimen et al., 2014
	sacchari	Nthenga et al., 2014
	tophus	Cimen et al., 2014
	balochiense	Fayyaz et al., 2015
	fabii	Abate et al., 2016
	beitlechemi	Cimen et al., 2016
	biddulphi	Cimen et al., 2016
	jeffreyense	Malan et al., 2016
	goweni	San-Blas et al., 2016
	pwaniensis	Půža et al., 2017

2. ลักษณะของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema*

ตัวเต็มวัยไม่มี Stylet เพศผู้และเพศเมียแยกกัน (Amphimictic) มีริมฝีปาก 6 ริมฝีปากเชื่อมติดกัน (ภาพ 1)



ภาพ 1 ลักษณะริมฝีปากของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema anarium* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ที่มา: Nguyen, & Smart, 1992, pp. 466-477

ลักษณะทั่วไปของเพศผู้ ขนาดลำตัวจะเล็กกว่าเพศเมีย หางแหลมงอ มี Spicule 1 คู่ แยกออกจากกัน มี Testis 1 อัน มี Gubernacum ยาว ไม่มี Bursa สำหรับเพศเมีย หางกลม รังไข่มี 2 อัน แยกไปด้านหน้าและด้านท้ายของลำตัว (Amphidelphic) ปลายงอเล็กน้อย Vulva อยู่กึ่งกลางลำตัว ตั้งอยู่บนเนิน (Protuberance) ไม่มีแผ่นปิด Vulva (Epiptygma)

3. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis*

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จัดอยู่ในไฟลัม Nematodes ชั้น Chromadorea ตระกูล Rhabditida วงศ์ Heterorhabditidae (Poinar, 1976, pp. 463-470) ในปี ค.ศ. 1975 Poinar ได้รายงานการค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นครั้งแรกที่ประเทศออสเตรเลีย สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จะมีแบคทีเรียสกุล *Photohabdus* อาศัยอยู่ภายในลำไส้ (Foregut) ซึ่งเป็นการอาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (Symbiosis) ปัจจุบันมีรายงานไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 28 ชนิด (ตาราง 2)

ตาราง 2 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 28 ชนิด

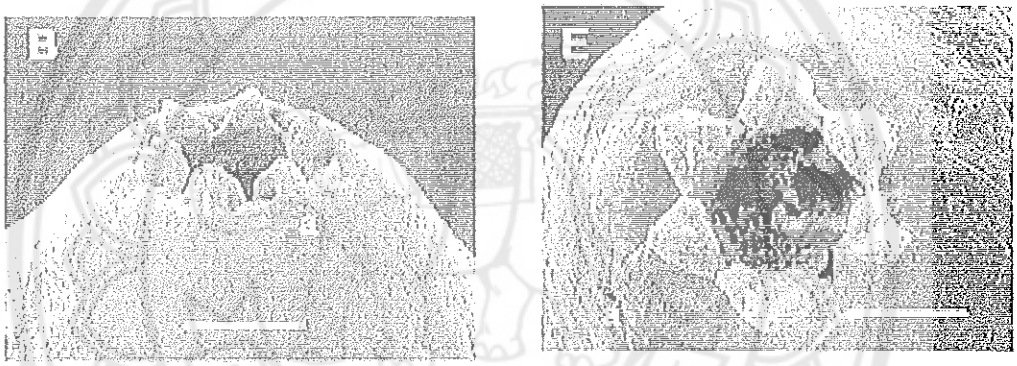
Genus	Species	References
Heterorhabditis	*bacteriophora*	Poinar, 1976
	hambletoni	Poinar, 1976
	heliothidis	Poinar et al., 1977
	hoptha	Poinar, 1979
	zealandica	Poinar, 1990
	indica	Poinar et al., 1992
	argentinensis	Stock, 1993
	hawaiiensis	Gardner et al., 1994
	hepialius	Stock et al., 1996
	marelatus	Liu and Berry, 1996b
	taysearae	Shamseldean et al., 1996
	downesi	Stock et al., 2002
	baujardi	Phan et al., 2003
	mexicana	Nguyen et al., 2004
	amazonensis	Andalo et al., 2006
	floridensis	Nguyen et al., 2006a
	safricana	Malan et al., 2008
	brevicaudis	Plichta et al., 2009
	georgiana	Plichta et al., 2009
	gerrardi	Plichta et al., 2009
	megidis	Stock et al., 2009
	poinari	Stock et al., 2009
	sonorensis	Stock et al., 2009
	atacamensis	Edgington et al., 2011
	beicherriana	Li et al., 2012
	noenieputensis	Malan et al., 2014

ตาราง 2 (ต่อ)

Genus	Species	References
Heterorhabditis	*somsookae*	Maneesakorn et al., 2015
	pakistanense	Shahina et al., 2017

4. ลักษณะของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis*

ตัวเต็มวัยไม่มี Stylet มีริมฝีปาก 6 ริมฝีปาก แยกจากกันชัดเจน มีระบบสืบพันธุ์ในรุ่นที่ 1 เป็นแบบ Hermaphroditic ส่วนในรุ่นที่ 2 เป็นแบบ Amphimictic (ภาพ 2)



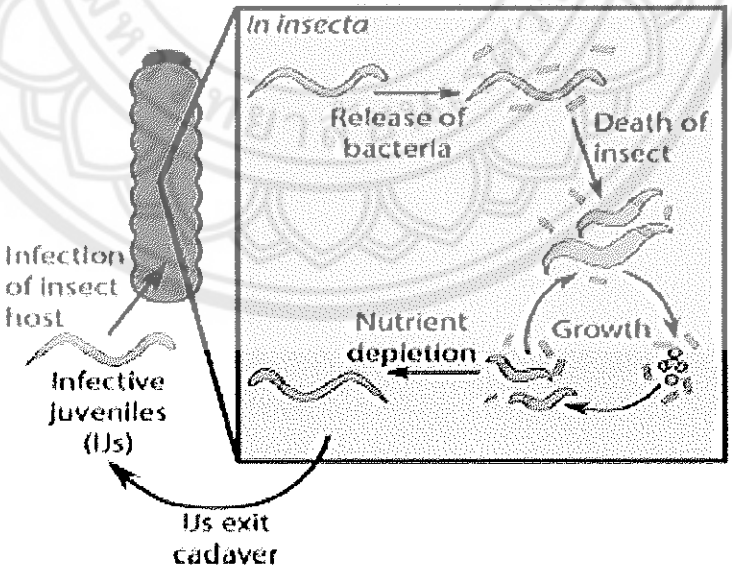
ภาพ 2 ลักษณะริมฝีปากของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis mexicana* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ที่มา: Nguyen et al., 2004, pp. 231-244

ลักษณะทั่วไปของเพศผู้ ลำตัวจะมีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย หางแหลมงอ มี Spicule 1 คู่ แยกออกจากกัน มี Testis 1 อัน มี Gubernacum ยาว มี Bursa ทำหน้าที่โอบล้อมรอบตัวเมียเวลาสืบพันธุ์ สำหรับเพศเมียเป็นแบบ Hermaphroditic female และ Amphimictic female โดย Hermaphroditic female มีขนาดใหญ่กว่า ทั้ง 2 แบบ มีรังไข่ 2 อัน แยกไปด้านหน้าและด้านท้ายของลำตัว (Amphidelphic) ปลายงอเล็กน้อย Vulva อยู่กึ่งกลางลำตัว ตั้งอยู่บนเนิน (Protuberance) ไม่มีแผ่นปิด Vulva (Epiptygma)

5. วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล

วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงใช้ระยะเวลา 10-12 วัน ให้ลูกหลาน 2-3 ชั่วรุ่น เริ่มตั้งแต่ระยะเข้าทำลาย (Infective stage) ไชเข้าสู่ตัวอ่อนของแมลงอาศัยผ่านรูเปิดทางธรรมชาติ เช่น ปาก รูหายใจ และทวารหนัก (Kaya, & Gaugler, 1993, pp. 181-206) หรือไชเข้าสู่ผิวหนังโดยตรงไปที่บริเวณช่องว่างกลางลำตัว (Hemocoel) แล้วปล่อยแบคทีเรียออกมายังน้ำเลือด (Hemolymph) โดยแบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วทำให้ตัวอ่อนของแมลงอาศัยตายภายใน 48 ชั่วโมง ด้วยภาวะเลือดเป็นพิษ (Septicemia) และแบคทีเรียยังมีการผลิตสาร Secondary metabolites ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Antibiotic เพื่อป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญได้ ในขณะเดียวกันไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะมีการเจริญเติบโตจากการกินซากตัวอ่อนของแมลงอาศัยและแบคทีเรีย (Burman, 1982, pp. 62-70) จากนั้นพัฒนาไปเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย โดยเพศเมียรุ่นที่ 1 จะวางไข่ และฟักเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 แล้วลอกคราบเป็นระยะที่ 2, 3 และ 4 ส่วนรุ่นที่ 2 จะฟักเป็นตัวภายในตัวแม่ (Endotokia matricida) แล้วลอกคราบเป็นระยะที่ 2 โดยในช่วงปลายของระยะที่ 2 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะหยุดกินอาหาร และเก็บแบคทีเรียไว้ในลำไส้ จากนั้นลอกคราบเป็นระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะเข้าทำลาย แล้วออกจากซากตัวอ่อนของแมลงอาศัย เพื่อหาตัวอ่อนของแมลงอาศัยตัวใหม่ต่อไป (ภาพ 3)



ภาพ 3 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ที่มา: Murfin et al., 2015, pp. e00076-15

6. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการกระจายตัวและการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

อัตราการกระจายตัวและการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก หรือปัจจัยภายใน เช่น อุณหภูมิ ลักษณะดิน ความชื้น รังสี พฤติกรรม และลักษณะทางกายภาพ เป็นต้น (Kaya, 1990, pp. 93-115) มีรายงานการพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ทั่วโลก ยกเว้นเขตทวีปแอนตาร์กติกา (Hominick et al., 1996, pp. 317-331) โดยความชื้นในดินเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เนื่องจากต้องการน้ำเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ ความชื้นที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 8- 25 % (Grant, & Villani, 2003, pp. 80-87) พบอาศัยได้ทั้งในดินร่วน ดินร่วนปนทราย ดินทราย หรือแม้กระทั่งดินเหนียว แต่พบว่าอัตราการอยู่รอดและการเคลื่อนที่จะดีเมื่ออยู่ในดินร่วนปนทราย (Kung et al., 1990, pp. 440–445) นอกจากนี้อุณหภูมิยังเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ และการอยู่รอด ช่วงอุณหภูมิที่เหมาสมอยู่ระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส (Kaya, & Stock, 1997, pp. 281-324) สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ pH10 หรือมากกว่า อาจเป็นอันตรายต่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Kaya, 1990, pp. 93-115) ในปี ค.ศ. 1979 Gauler, & Boush ได้รายงานว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. carpocapsae* ในระยะติดต่อ ไวต่อรังสีอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ทำให้ยับยั้งการสืบพันธุ์และการเจริญพัฒนาไปเป็นระยะต่าง ๆ ได้ รวมถึงเมื่อได้รับรังสีเป็นเวลา 7 นาที มีผลต่อการลดอัตราการก่อโรคในหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) อย่างไรก็ตามไม่มีผลต่อการอัตตาการตายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระยะติดต่อ

7. การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

การจำแนกชนิด (Species) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง สามารถแยกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) ดูลักษณะโครงสร้างภายนอกในตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย รวมถึงในระยะติดต่อ (Infective stage) การจำแนกด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดคือสามารถแยกได้ในระดับสกุล (Genus) เท่านั้น เนื่องจากในระดับชนิด (Species) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีความคล้ายคลึงกันมาก จึงได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ เพื่อใช้ในการศึกษา โดยได้มีการนำเอาเทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามาใช้ในการจำแนกระดับชนิด (Species) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* ตัวอย่างเช่น การจำแนกชนิด (Species) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) ในการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26 rDNA และ Internal Transcribed Spacer (ITS)

เทคนิคนี้สามารถจำแนกชนิด (Species) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* ได้ แต่ต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวนมาก (Nasmith et al., 1996, pp. 15-25) นอกจากนี้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) มีบริเวณ 18S rDNA พบว่าสามารถจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ระหว่างสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* แต่ไม่สามารถแยกในระดับชนิด (Species) เนื่องจากยีนมีความแปรผันต่ำ (Blaxter et al., 1998, pp. 71-75) อย่างไรก็ตามยังมีอีกหลายยีนที่ถูกนำมาใช้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจำแนกชนิด (Species) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวน 28S rDNA ของไรโบโซม ซึ่งสามารถจำแนกระดับชนิด (Species) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* ได้ (Stock et al., 2001, pp. 877-889; Nguyen et al., 2010, pp. 8-20; Thanwisai et al., 2012, pp. e43835) และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA ของไรโบโซม ซึ่งเป็น Non coding gene ที่มีความผันแปรสูง ซึ่งสามารถจำแนกระดับชนิด (Species) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ได้ (Hominick et al., 1997, pp. 271-298; Thanwisai et al., 2012, p. e43835) นอกจากนี้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ยังสามารถนำไปวิเคราะห์เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้อีกด้วย (Adams et al., 1998, pp. 22-39; Nguyen et al., 2001, pp. 73-82; 2004, pp. 231-244; Stock et al., 2001, pp. 877-889; Thanwisai et al., 2012, p. e43835)

8. การประยุกต์ใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวงศ์ Steinernematidae และ Heterorhabditidae ได้รับรองจาก The United States Environmental Protection Agency (EPA) ว่ามีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์เลือดอุ่น พืช และสิ่งแวดล้อม (Kaya, & Gaugler, 1993, pp. 181-206) จึงได้นำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชแบบวิธีทางชีวภาพ (Biological control) แทนการใช้สารเคมีที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดย Georgia, & Manweiler (1994) ได้นำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เช่น หนอนกระทู้ (Army worms) หนอนเจาะลำต้น (Stem borrers) ด้วงหมัด (Flea beetles) ด้วงกินราก (Root weevils) หนอนรังหรือหนอนใย (Web worms)

สำหรับในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2534 วัชรี สมสุข ได้ประสบความสำเร็จในการนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. carpocapsae* ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายกลุ่ม เช่น หนอนกินใต้ผิวเปลือกลองกอง (*Cossus* และ *Microchlora*) ด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuate*) และโดยเฉพาะแมลงศัตรูสำคัญในพืชเศรษฐกิจ เช่น กลุ่มหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera เช่น หนอนกระทู้ผัก

(*Spodoptera litura*) และกลุ่มหนอนด้วงในอันดับ Coleptera เช่น ด้วงงวงอ่อน (*Otiorhynchus sulcatus*) เป็นต้น

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน (Rod-shape) จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เคลื่อนที่ด้วยแส้รอบตัว (Peritrichous flagella) สามารถเจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตร์ทได้ (Farmer et al., 1989, pp. 1594-1600) แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* และ*Heterorhabditis* ตามลำดับ

1. **แบคทีเรีย *Xenorhabdus***

จากการรายงานของ George, & Thomas (1965) พบแบคทีเรียอยู่ในลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* แบคทีเรียชนิดนี้ถูกจัดให้อยู่ในสกุล *Achromobacter* วงศ์ Enterobacteriaceae ให้ชื่อเป็น *Achormobacter nematophilus* ต่อมาในปี ค.ศ. 1979 George และ Thomas ได้จัดแบคทีเรีย *Achormobacter nematophilus* ให้อยู่ในสกุล *Xenorhabdus* โดยแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถสร้างสารเรืองแสง (Bioluminescens) ให้ผลการทดสอบ Catalase เป็นลบ และมี 2 ระยะ คือระยะปฐมภูมิ (Primary form) และทุติยภูมิ (Secondary form) (Akhurst, & Boemare, 1988, pp. 1834-1844) ในระยะปฐมภูมิ (Primary form) เป็นระยะที่มี Intracellular inclusion ที่เป็น Crytralline protein รวมถึงสามารถสร้างสารที่ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเกิดการพัฒนาแบบอาศัยเพศ (Sexual reproduction) และสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Antibiotic) ชนิดอื่นได้ (Forst et al., 1997, pp. 47-72) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride agar (NBTA) ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในระยะปฐมภูมิ มีสีน้ำเงินหรือน้ำตาล เนื่องจากดูดซึมสีของ Bromothymol blue ลักษณะโคโลนีขอบไม่เรียบ แผ่กว้าง (Swarming) และมีลักษณะโค้งนูน (Covex) หรือนูนตรงกลางโคโลนีเล็กน้อย (Umbonate) (Thanwisai et al., 2012, p. e43835) ปัจจุบันมีรายงานการพบแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* จำนวน 26 ชนิด (ตาราง 3)

ตาราง 3 แบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* จำนวน 26 ชนิด

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., 2006
	doucetiae	Tailliez et al., 2006
	griffiniae	Tailliez et al., 2006
	hominickii	Tailliez et al., 2006
	koppenhoeferi	Tailliez et al., 2006
	kozodoii	Tailliez et al., 2006
	mauleonii	Tailliez et al., 2006
	miraniensis	Tailliez et al., 2006
	romanii	Tailliez et al., 2006
	stockiae	Tailliez et al., 2006
	indica	Somvanshi et al., 2006
	vietnamensis	Tailliez et al., 2010
	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. แบคทีเรีย *Photorhabdus*

ในปี ค.ศ. 1976 Poinar ได้แยกแบคทีเรียจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* และให้ชื่อเป็น *Xenorhabdus luminescens* ต่อมาพบว่ามีคุณสมบัติแตกต่างจากแบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus* คือสามารถสร้างสารเรืองแสง (Bioluminescens) และให้ผลการทดสอบ Catalase เป็นบวก จึงได้จัดให้อยู่ในสกุล *Photorhabdus* โดยแบคทีเรียชนิดนี้มี 2 ระยะ คือ ระยะปฐมภูมิ (Primary form) และทุติยภูมิ (Secondary form) (Akhurst, & Boemare, 1988, pp. 1834-1844) โดยในระยะปฐมภูมิ (Primary form) เป็นระยะที่มี Intracellular inclusion ที่เป็น Crystral protein สร้างสารที่ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเกิดการพัฒนาแบบอาศัยเพศ (Sexual reproduction) สร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Antibiotic) ชนิดอื่น (Forst et al., 1997, pp. 47-72) และสร้างสารเรืองแสง (Akhurst, & Boemare, 1990, pp. 75-90) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride agar (NBTA) ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย จะเป็นสีเขียวขอบเรียบ และมีลักษณะโค้งนูน (Covex) หรือนูนตรงกลางโคโลนีเล็กน้อย (Umbonate) (Thanwisai et al., 2012, p. e43835) ปัจจุบันมีรายงานการพบแบคทีเรียสกุล *Photorhabdus* จำนวน 5 ชนิด (ตาราง 4)

ตาราง 4 แบคทีเรียสกุล *Photorhabdus* จำนวน 5 ชนิด

Genus	Species and subspecies	References
Photorhabdus	*luminescens*	Thomas, & Poinar, 1979
	luminescens subsp. *luminescens*	Thomas, & Poinar, 1979
	luminescens subsp. *akhurstii*	Fischer-Le Saux et al., 1999
	luminescens subsp. *laumondii*	Fischer-Le Saux 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

ตาราง 4 (ต่อ)

Genus	Species and subspecies	References
	luminescens subsp. *sonorensis*	Orozco, & Stock, 2013
	luminescens subsp. *namnaonensis*	Glaeser et al., 2016
Photorhabdus	*asymbiotica*	Fischer-Le Saux et al., 1999
	asymbiotica subsp. *asymbiotica*	Fischer-Le Saux et al.,1999
	asymbiotica subsp. *australis*	Akhurst et al., 2004
Photorhabdus	*temperata*	Fischer-Le Saux et al., 1999
	temperata subsp. *temperate*	Fischer-Le Saux et al., 1999
	temperata subsp. *thracensis*	Hazir et al., 2004
	temperata subsp. *cinerea*	Tóth, & Lakatos, 2008
	temperata subsp. *khanii*	Tailliez et al., 2010
	temperata subsp. *tasmaniensis*	Tailliez et al., 2010
	temperata subsp. *stackebrandtii*	An, & Grewal, 2011
Photorhabdus	*zealandica*	Ferreira et al., 2014
Photorhabdus	*heterorhabditis*	Ferreira et al., 2014

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

3.1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test)

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีไม่สามารถแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในระดับชนิดได้ทุกชนิด อย่างไรก็ตามการทดสอบ Catalase และ Bioluminascence สามารถใช้แยกของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ได้ในระดับสกุลได้ โดยแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ให้ผลลบทั้งสองการทดสอบ ในขณะที่แบคทีเรีย *Photorhabdus* ให้ผลบวกทั้งสองการทดสอบ (Akhurst, & Boemare, 1988, pp. 751-761)

3.2 การใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา

3.2.1 DNA-DNA hybridization

ในปี ค.ศ. 1984 Grimont et al. (1984) ได้ใช้เทคนิค DNA-DNA hybridization ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยคุณสมบัติในการจับคู่เบส (G:C, A:T) ด้วยพันธะไฮโดรเจนอย่างจำเพาะของดีเอ็นเอ มาใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรีย *X. nematophilus* และ *P. luminescens* ต่อมาในปี ค.ศ. 1990 Putz et al. ได้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ได้ 5 ชนิด ได้แก่ *X. nematophila, X. bovienii, X. poinarii, X. beddingii* และ *X. luminescens*

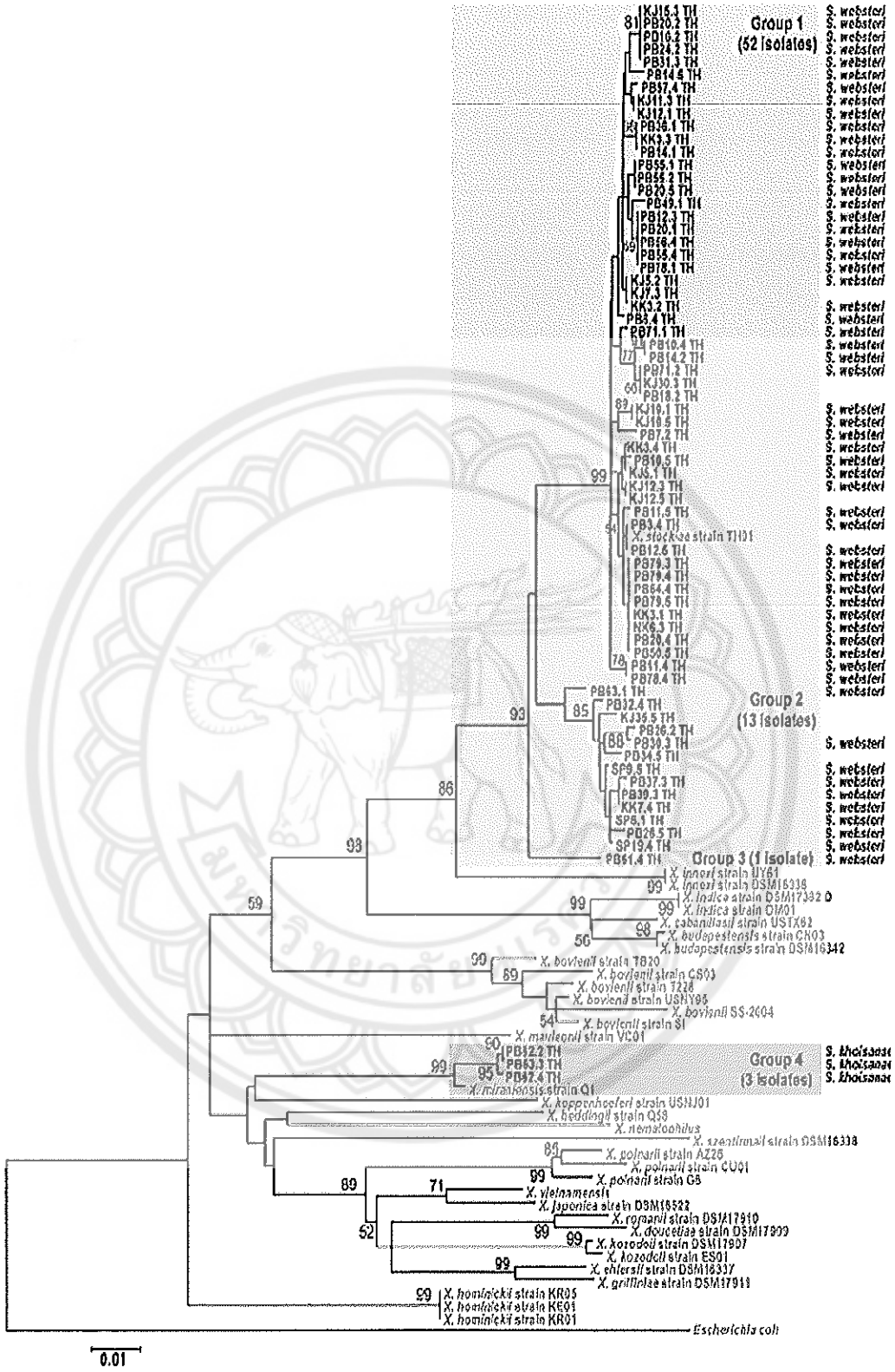
3.2.2 Molecular typing

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ด้วยเทคนิค Molecular typing เช่น การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism หรือ RFLP), Random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sequences

ในปี ค.ศ. 1997 Brunel et al. (1997) ได้ศึกษาการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cfo*I, *Hinf*I, *Rsa*I, *Dde*I, *Sau3A*I, *Alu*I, *Hae*III และ *Msp*I ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่า เอนไซม์ *Cfo*I, *Alu*I และ *Hae*III สามารถแยกความแตกต่างในระดับชนิด ได้ 5 ชนิด ต่อมาได้มีการนำเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพียงเอนไซม์เดียวตัดลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ได้ 5 ชนิดคือ *X. budapestensis, X. ehlersii, X. innexi, X. szentirmaii* และ *X. indica* (Lengyel et al., 2005, pp. 115-122; Somvanshi et al., 2006, pp. 519-525) และจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Photorhabdus* ได้ 2 ชนิด คือ *P. luminescens* subsp. *kayaii* และ *P. luminescens* subsp. *thracensis* (Hazir et al., 2004, pp. 36-42) ต่อมาในปี ค.ศ. 2006 Tailliez et al. (2006) ได้ศึกษาการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sequences พบว่า สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* ได้ 10 ชนิด ได้แก่ *X. cabanillasii, X. doucetiae, X. griffiniae, X. hominickii, X. mauleonii, X. koppenhoeferi, X. miraniensis, X. kozodoii, X. romanii* และ *X. stockiae* อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลโดยใช้เทคนิคนี้จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด และยังไม่สามารถแยกในระดับชนิดได้ทุกชนิด

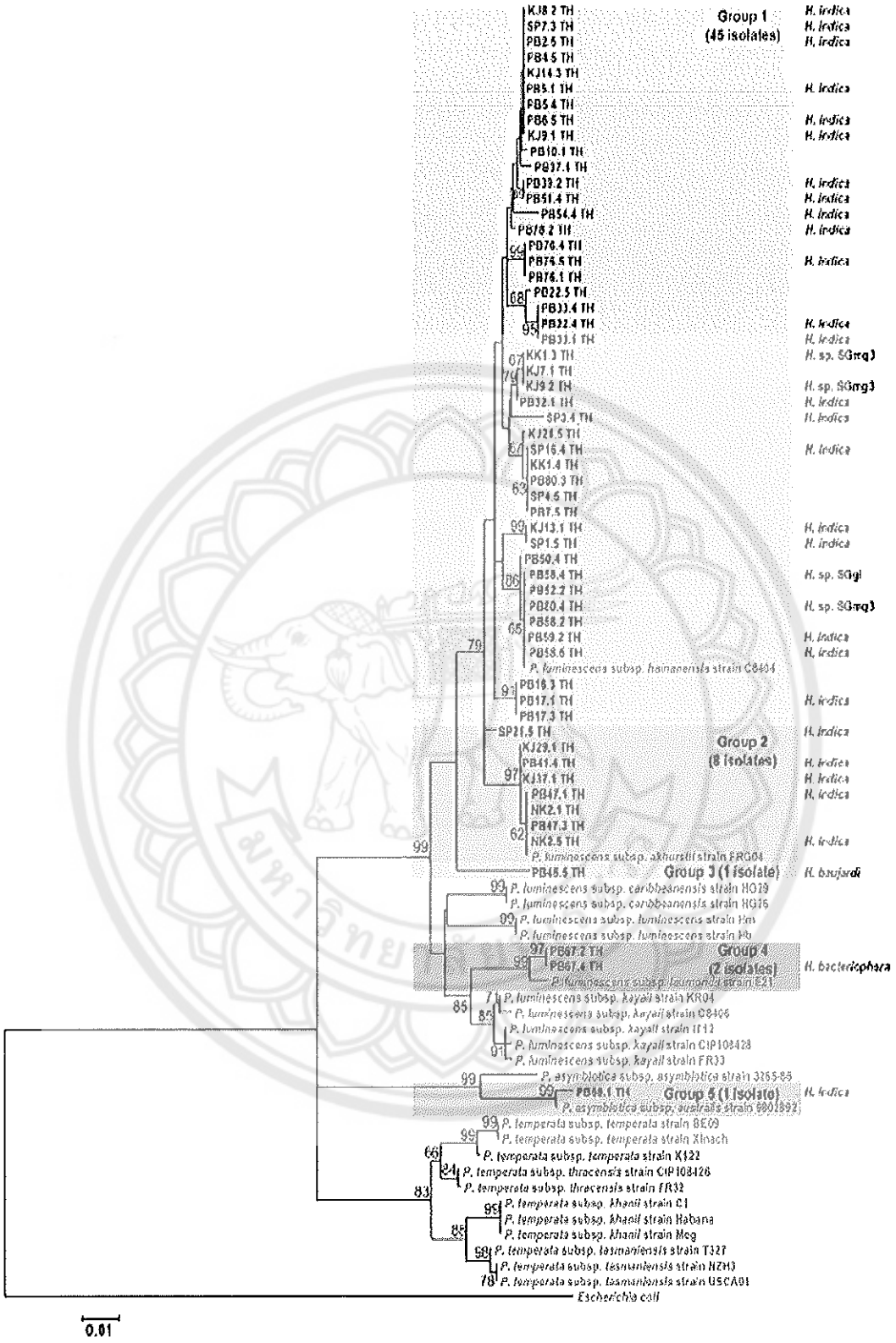
3.2.3 DNA sequencing

ยีนที่นิยมนำมาใช้จำแนกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ได้แก่ 16S rRNA, *asd*, *ompR*, *recA* และ *sarC* (Sergeant et al., 2006, p. 5895) ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกคงที่หรือมีความผันแปรน้อย (housekeeping genes) โดยในปี ค.ศ. 1999 Fischer-Le Saux และคณะ ได้วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* เพื่อแยกความแตกต่างของแบคทีเรีย *P. luminescens*, *P. temperata* และ *P. asymbiotica* พบว่า ไม่สามารถแยก *P. luminescens* subsp. *luminescens* และ *P. aymbiotica* ได้ ต่อมา Tailliez et al. (2010) ได้มีการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 21 ชนิด และ *Photorhabdus* จำนวน 14 ชนิด โดยใช้ยีน *16S rRNA*, *rplB*, *gyrB*, *gltX*, dnaN และ *recA* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *gyrB*, *dnaN* และ *recA* สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลได้ทุกชนิด สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *16S rRNA* และ *rplB* ไม่เหมาะสมในการจำแนกถึงระดับชนิด เพราะเป็นยีนที่มีความแปรผันต่ำ (conserved gene) นอกจากนี้ยังพบการเกิด Horizontal gene transfer ในยีน *gltX* จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการจำแนกชนิด ต่อมา Thanwisai et al. (2012) ได้ใช้ยีน *recA* ในการแยกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลที่พบในประเทศไทย ซึ่งพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลได้ทุกชนิดที่พบในประเทศไทย (ภาพ 4 และ 5) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกใช้ยีน *recA* ในการนำมาจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลนี้



ภาพ 4 Phylogenetic tree **ของแบคทีเรีย** *Xenorhabdus* **ที่พบในประเทศไทย โดยใช้ยีน** *recA*

ที่มา:Thanwisai et al., 2012, p. e43835



ภาพ 5 Phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* ที่พบในประเทศไทย โดยใช้ยีน *recA*

ที่มา: Thanwisai et al., 2012, p. e43835

3. สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ที่สร้างจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

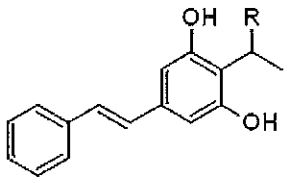
แบคทีเรียทั้ง 2 สกุลสามารถสังเคราะห์สาร Secondary metabolites ได้หลายชนิด (ภาพ 6 และ 7) เช่น Benzylideneacetone ที่แยกได้จาก *X. nematophila* และ *X. bovienii* เป็นสารโมเลกุลขนาดเล็ก ทนความร้อน มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคในพืช (Gram-negative plant-pathogen bacteria) รวมถึงได้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง (Ji et al., 2004, pp. 241-248) Phospholipase A2 inhibitor ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Immunosuppression ในตัวอ่อนแมลง พร้อมทั้งเพิ่มความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Kwon, & Kim, 2008, pp. 36-41) xenocoumacins 1 และ 2 ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *X. nematophila* มีคุณสมบัติเป็น Antiulcer และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ นอกจากนั้น Xenocoumacins 1 ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา (Antifungal) (McInerney et al., 1991, pp. 785-795) และสาร Chaiyaphumines ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. 61.4 ซึ่งแยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Sterinernema* จากจังหวัดชัยภูมิ มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อปรสิต (Antiparasitics) โดยสามารถฆ่า *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย (Grundmann et al., 2014, pp. 779-783) สำหรับแบคทีเรีย *Photorhabdus* สามารถสร้างสาร secondary metabolize เช่น Carbapenems, Photobactin, 2- isopropyl- 5- [(*E*) - 2- phenylethenyl] benzene-1,3-diol (IPS) และ 2-ethyl-5-[(*E*)-2-phenylethenyl] benzene-1,3-diol (ES) ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ Stilbenes มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิด รวมถึงแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่เป็นสายพันธุ์ดื้อยา (Hu et al., 2006, pp. 4677- 4681) นอกจากนี้ 3,5-dihydroxy-4-isopropylstibene ที่แยกได้จาก *P. luminescens* ยังสามารถต้านการเจริญของเชื้อรา และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Phenol oxidase ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของแมลงได้อีกด้วย (Richard et al., 1988, pp.1602-1605; Eleftherianos et al., 2007, pp. 1721-1728) ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 Ahn et al. สามารถแยก 1,3-dimethoxy-8-hydroxy-9,10-anthreaquinone และ 3-methoxychry-sazine ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม Anthraquinones ได้จาก *P. temperata* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่าตัวอ่อนของยุงรำคาญ (*Culex pipiens pallens*)

ในปี ค.ศ. 1982 Akhurst ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพที่แยกได้จาก *X. luminescens, X. nematophila* A24 และ *Xenorhabdus* sp. Q1 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* และแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* และ *Shigella sonei* ในปี ค.ศ. 1996 Genhui Chen

ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพที่แยกได้จาก *X. nematophila*, *X. bovienii* และ *P. luminescens* พบว่าสารต้านจุลชีพที่ผลิตได้ในรูปของ Primary form สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 32 ชนิด นอกจากนั้นยังพบว่า Cell free supernatants ของแบคทีเรีย *X. nematophila* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้ดีที่สุด

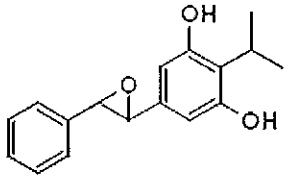
ในปี ค.ศ. 2008 Furgani et al. พบว่า สารปฏิชีวนะที่สร้างจาก *X. nematophila*, X. *budapestensis* และ *X. szentirmaii* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus*, *E. coli* และ *K. pneumoniae* โดยพบว่าเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิด มีความไวต่อสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ตามลำดับ ในปี ค.ศ. 2012 Inman, & Holmes พบว่า *X. nomatophila* สามารถสร้างสารต้านจุลชีพที่ทนต่อความร้อน และไม่ทนต่อความร้อนได้ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion สารต้านจุลชีพที่ทนความร้อนมีประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพได้ดีกว่าซึ่งสารต้านจุลชีพทั้ง 2 ชนิด สามารถต้านได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ต่อมาในปี 2014 Fang et al. พบว่าสารสกัดจากแบคทีเรีย *X. nematophila* ให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora capsici* และ *Botrytis cinerea*

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลในการควบคุมแมลงหรือราทางการเกษตร เช่น ปี ค.ศ. 2003 Abdel-Razek et al. ได้ทำการศึกษาความสามารถในการก่อพิษของแบคทีเรีย *X. nematophila* และ *P. luminescens* ต่อหนอนใยผัก *(Plutella xylostella)* พบว่าเซลล์แขวนลอยของ *X. nematophila* ที่ความเข้มข้น $5.5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำลายหนอนใยผักได้ร้อยละ 40 และเซลล์แขวนลอยของ *P. luminescens* ที่ความเข้มข้น $4x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำลายหนอนใยผักได้ร้อยละ 60 ในปี ค.ศ. 2009 Bussaman et al. ทดสอบ *X. nematophila* X1 ในการยับยั้งการเจริญของไรไข่ปลา (*Luciaphorus perniciosus*) พบว่าเซลล์แขวนลอยที่ความเข้มข้น $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการเจริญของไรไข่ปลาเพศเมียได้ร้อยละ 88.34 หลังผ่านการทดสอบไป 3 วัน และในปี ค.ศ. 2013 Clive et al. พบว่า *P. luminescens* สามารถสร้าง trans-cinnamic acid (TCA) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา โดยยับยั้งการเจริญของ *Fusicladium effusum* ที่ก่อให้เกิดโรคในถั่วพีแคน เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัมต่อลิตร

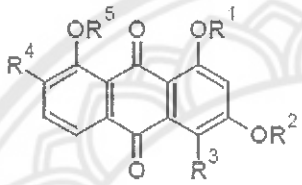


ES R = H
IPS R = *Me*

Stilbenes

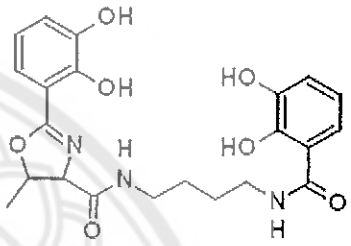


eIPS

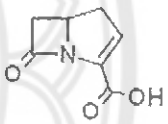


	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
AQ-256	H	H	H	H	H
AQ-270a	Me	H	H	H	H
AQ-270b	H	Me	H	H	H
AQ-284a	Me	Me	H	H	H
AQ-284b	H	Me	H	H	Me
AQ-300	H	Me	OH	H	Me
AQ-314	Me	Me	H	OMe	H

Anthraquinones



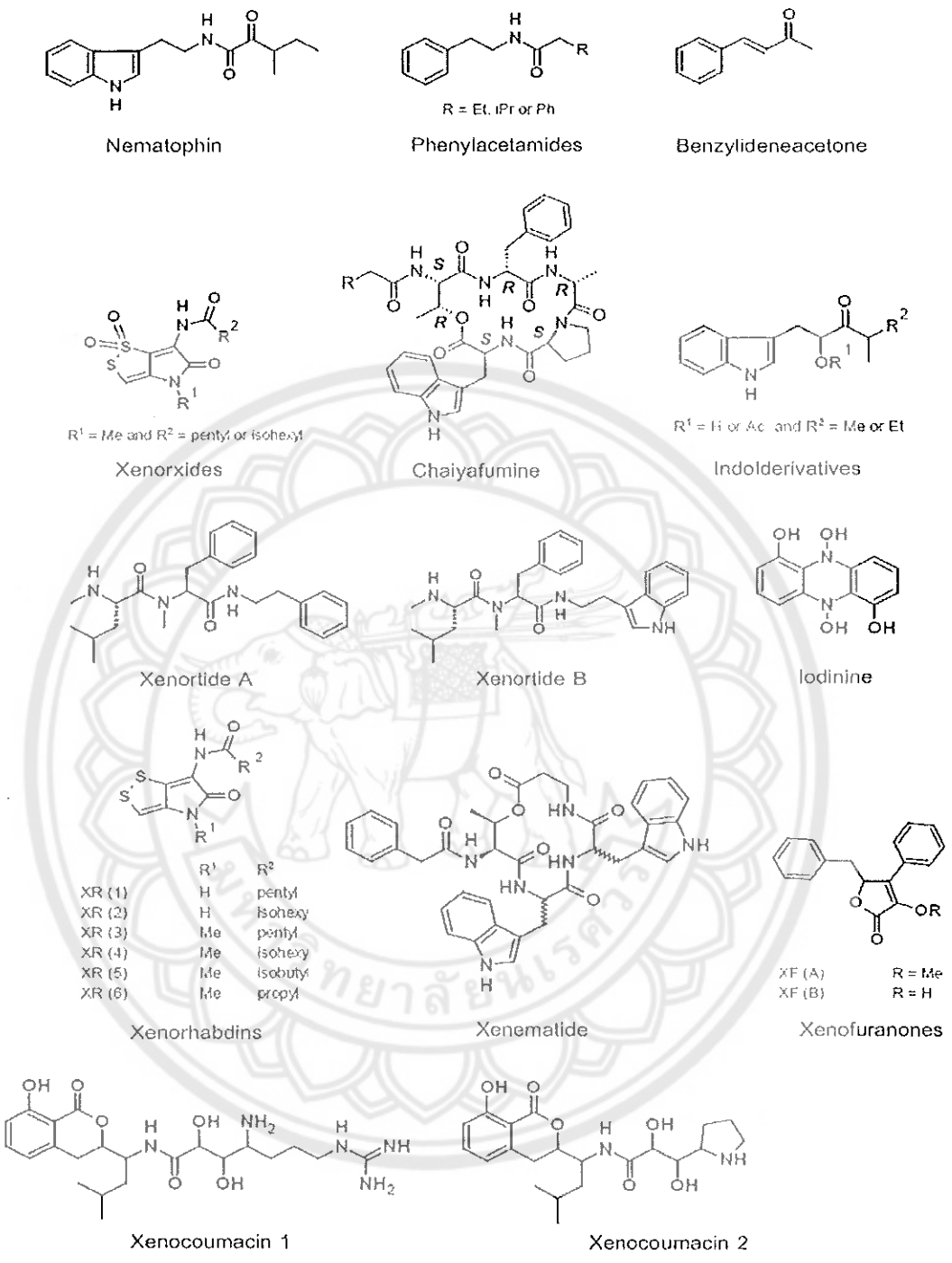
Photobactin



Carbapeneme backbone

ภาพ 6 โครงสร้างของสาร Secondary metabolites ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Photorhabdus*

ที่มา: Brachmann, 2009



ภาพ 7 โครงสร้างของสาร Secondary metabolites ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus*

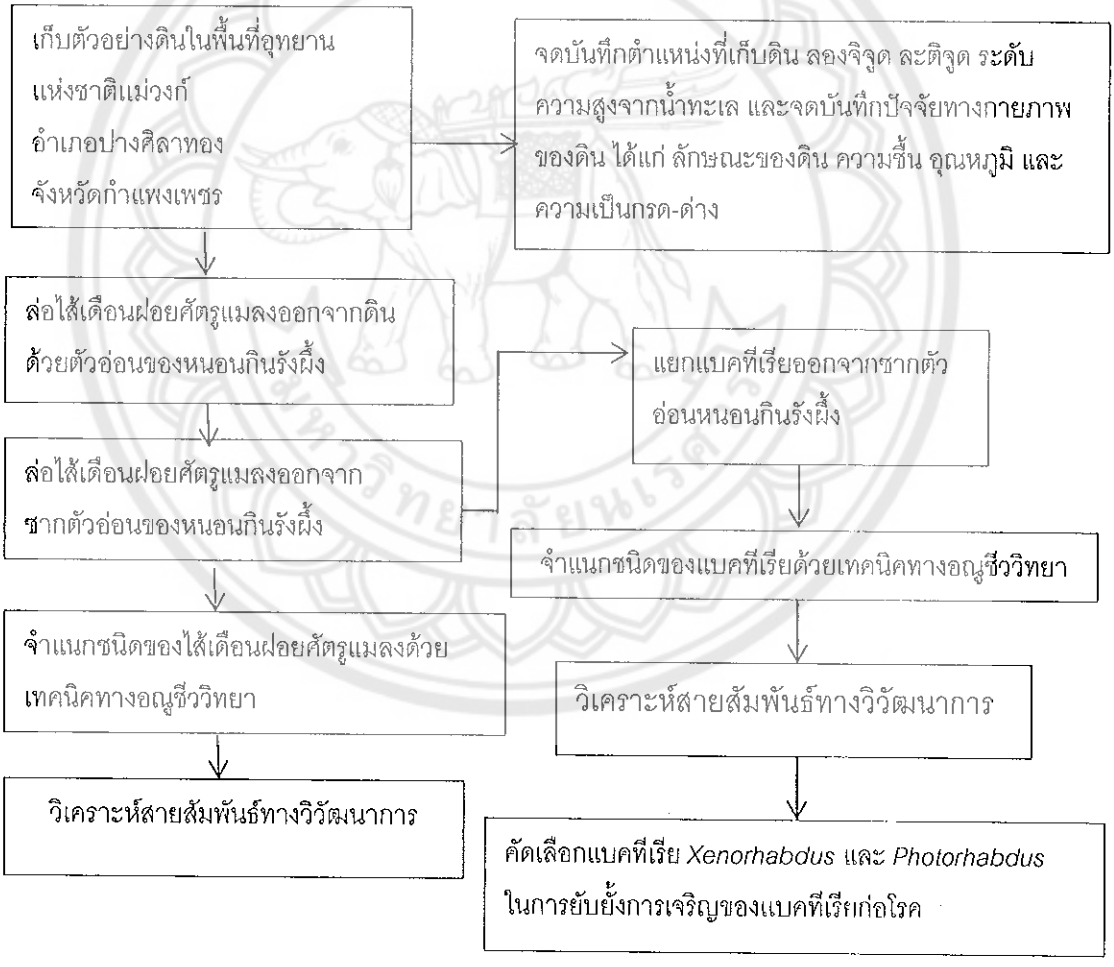
ที่มา: ดัดแปลงจาก Brachmann, 2009; Grunmann et al., 2014, pp. 779-783

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

แผนผังการทดลอง

ศึกษาความหลากหลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร พร้อมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยได้มีการออกแบบการทดลองดังภาพ 8



ภาพ 8 แผนผังการทดลอง

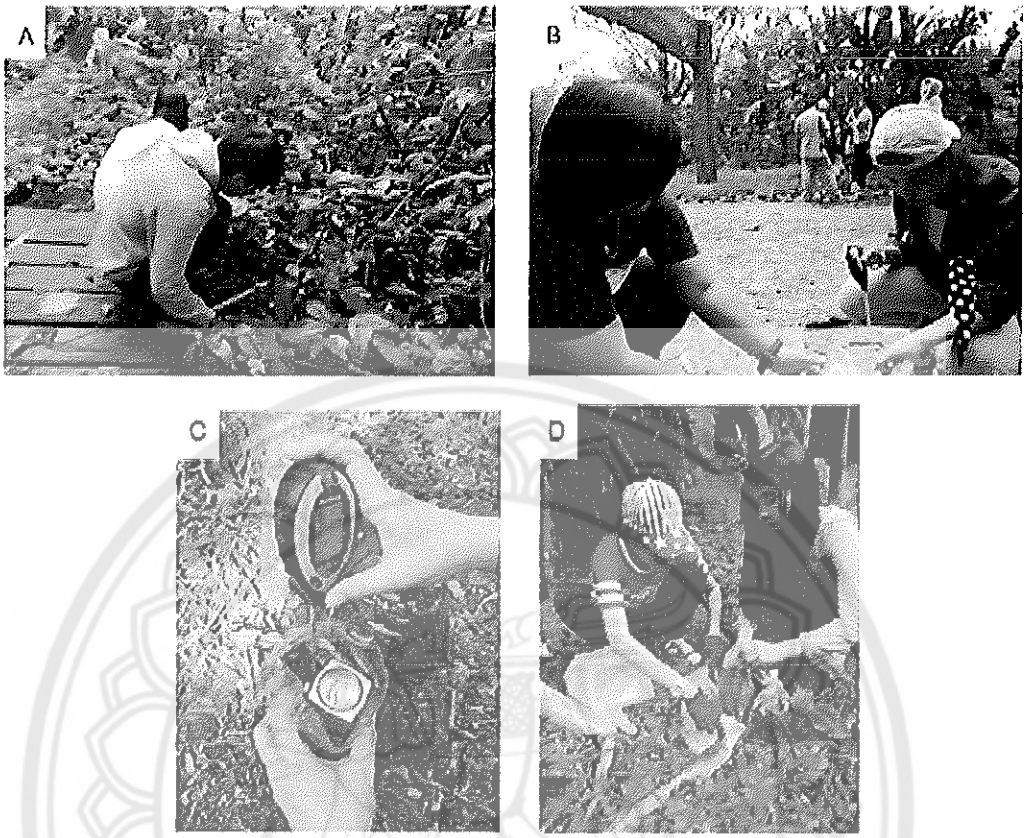
การเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*)

ตัวอ่อนของหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) ถูกเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นเหยื่อล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดิน ทำการเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง โดยนำไข่ของหนอนกินรังผึ้งประมาณ 200-300 ฟอง ใส่ลงในกล่องพลาสติกที่มีอาหาร ประกอบด้วย แป้งสาลี 200 กรัม น้ำผึ้ง 100 มิลลิลิตร กลีเซอรอล 100 มิลลิลิตร และผงยีสต์ 50 กรัม ผสมให้เข้ากัน ปิดด้วยฝาปิดที่ด้านบนเป็นตาข่ายลวดเพื่อให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ (ภาพ 9) เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนการล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินต่อไป

ภาพ 9 การเตรียมอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำอาหาร (A) ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ (B) และการเจริญของหนอนกินรังผึ้ง (C)

การเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร

เก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร ประเทศไทย สุ่มเก็บตัวอย่าง 110 จุด แต่ละจุดเก็บดินจำนวน 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละประมาณ 500 กรัม โดยเก็บที่ความลึกจากผิวหน้าดินประมาณ 10 เซนติเมตร ใส่ในถุงพลาสติก จดบันทึกวันเวลา ปัจจัยทางกายภาพของดิน เช่น อุณหภูมิ (Temperature) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความชื้น (Moisture) และตำแหน่งที่เก็บดิน เช่น ลองจิจูด ละติจูด และระดับความสูงจากน้ำทะเล พร้อมทั้งถ่ายรูปแต่ละจุดที่เก็บตัวอย่างดิน จากนั้นนำตัวอย่างดินมาทดลองต่อ ณ ห้องห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

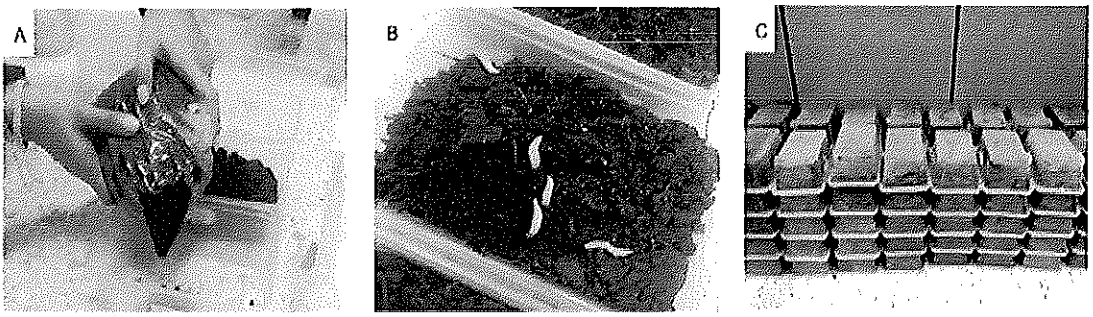


ภาพ 10 เก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร
บริเวณ ช่องเย็น ขุดดินใส่ถุงพลาสติก (A) วัดอุณหภูมิ
(B) วัดอุณหภูมิค่าความเป็นกรด ด่าง และความชื้น
(C) และปิดปากถุงเพื่อรักษาความชื้นของดิน (D)

การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

1. ล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากดิน

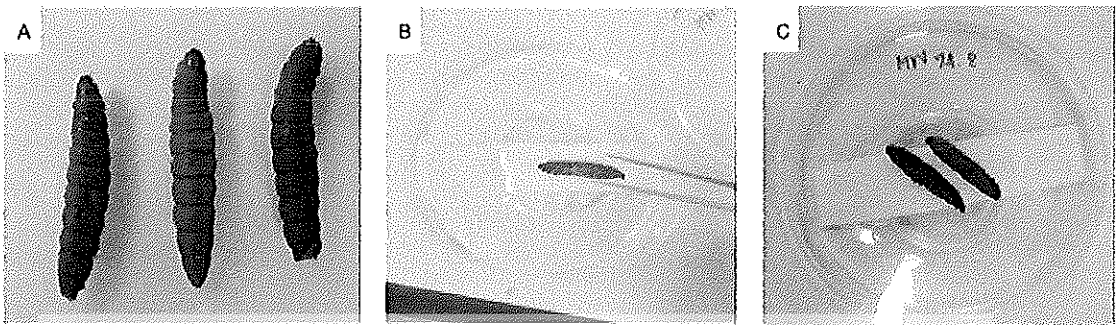
แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินด้วยตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง โดยวิธี Baiting technique (Beding, & Akhurst, 1975, pp. 109-110) นำตัวอย่างดินที่ได้ใส่ลงในกล่องพลาสติก จากนั้นวางตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งบนผิวดิน จำนวน 5 ตัว ปิดฝากล่อง แล้ววางกล่องแบบกลับหัว เพื่อให้ตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งไชเข้าไปในตัวอย่างดิน เป็นการเพิ่มโอกาสให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะเข้าทำลายไชเข้าไปยังตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง วางกล่องดินไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน (ภาพ 11) จากนั้นเก็บซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งที่ตาย โดยตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งที่ตายด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะเข้าทำลายจะมีลักษณะเฉพาะคือ มีสีแดงหรือสีดำและไม่เน่า



ภาพ 11 การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินด้วยตัวอ่อนหนอน**กินรังผึ้ง** โดย**วิธี** Baiting technique **เทดินใส่กล่อง** (A) **วางหนอนจำนวน** 5 ตัว ลงในกล่องดิน (B) และเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน (C)

2. **ล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง**

ล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งด้วยวิธี White trap (White, 1927, pp. 302-303) โดยเริ่มจากการเตรียมจานเพาะเชื้อขนาดเล็ก (33 x 10 **มิลลิเมตร**) วางคว่ำลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดปกติ (90 x 15 มิลลิเมตร) วางกระดาษกรองพาดบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กให้เป็นสะพาน เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ**ขนาดปกติ** จากนั้นวางซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งที่แยกได้ลงบนกระดาษกรอง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง**เป็นเวลา** 15-20 วัน ตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะติดต่อ (Infective juvenile) จะออกมาจากซาก**ของ**ตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง ลงไปอยู่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ภาพ 12) ตรวจดูไส้เดือน**ฝอยศัตรู**แมลงระยะติดต่อภายใต้กล้องสเตอริโอ เก็บไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในขวดพลาสติก (culture flask) จากนั้นล้างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้สะอาด เก็บไส้เดือนฝอย**ศัตรูแมลง**ระยะติดต่อที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส



ภาพ 12 การล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากซากตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งด้วยวิธี White trap ตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งที่ตายแล้ว (A) ซากหนอนกินรังผึ้งถูกวางบนกระดาษกรอง (B) และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ (C)

3. เพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

เพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยตัดกระดาษกรองวางลงในจานเพาะเชื้อขนาดเล็ก (33 x 10 มิลลิเมตร) จากนั้นวางตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้งที่มีชีวิตอยู่ลงบนจานเพาะเชื้อขนาดเล็ก หยดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงลงไปบนตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง ปิดฝาจานเพาะเชื้อด้วยพาราฟิล์ม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะติดต่อจะไชเข้าสู่ตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง แล้วนำซากตัวอ่อนของหนอนกินรังผึ้งที่ตายแล้วไปทำ White trap เพื่อแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

แยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ออกจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ออกจากน้ำเลือดของซากหนอนกินรังผึ้งด้วยวิธี Cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride agar (NBTA agar) โดยเริ่มจากนำซากหนอนกินรังผึ้งมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ (95-100%) ใช้คีบ (Forcep) ปลายแหลมฉีกปล้องที่ 3 นำห่วงเขี่ยเชื้อแตะน้ำเลือดมา Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA agar (Akhurst, 1980, pp. 303-309) ปิดด้วยพาราฟิล์ม และเก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 3-4 วัน โคโลนีของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จะมีสีน้ำเงิน และแบคทีเรีย *Photorhabdus* จะมีโคโลนีสีเขียว คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

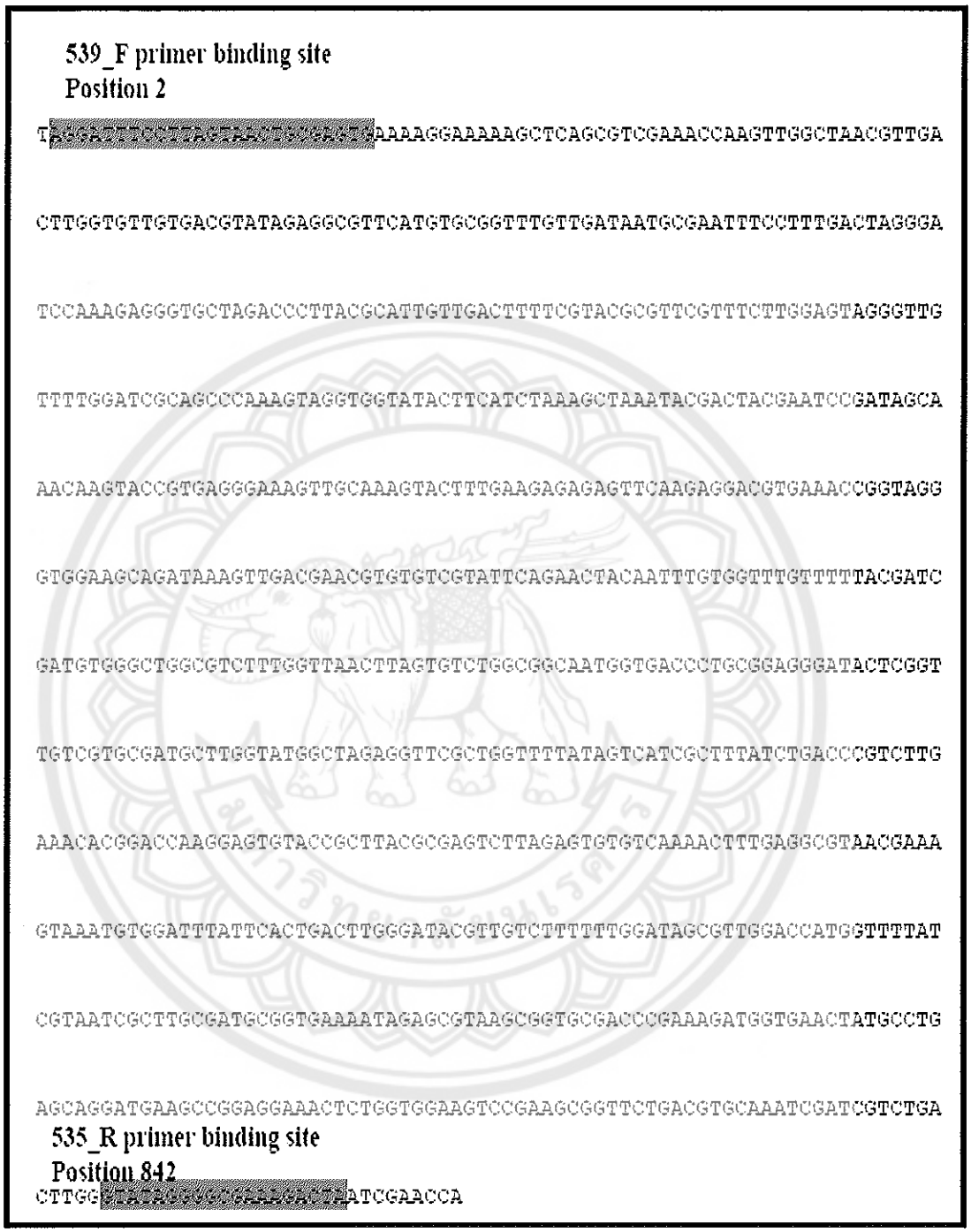
1. **สกัดดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง**

เติมสาร ATL buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จากนั้นบดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วย Sterile tip ขนาด 1,000 ไมโครลิตร เมื่อบดจนเซลล์แตกแล้วเติม ATL buffer เพิ่มอีก 40 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน นำไปแช่แข็งที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์ Proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร นำไปบ่มด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (บริษัท Memment, ประเทศเยอรมัน) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส อีก 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองที่มี NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 6.5 ไมโครลิตร เติมไอโซโพพานอล (100%) ที่เก็บไว้ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งแล้วจึงล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนบนทิ้ง ปล่อยทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 15 ไมโครลิตร ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส โดยใช้ความเข้มข้นของเจลร้อยละ 0.8 ในสารละลาย TBE buffer (0.5X) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส จากนั้นย้อมเจลด้วยเอธิเดียม โบรไมด์ ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

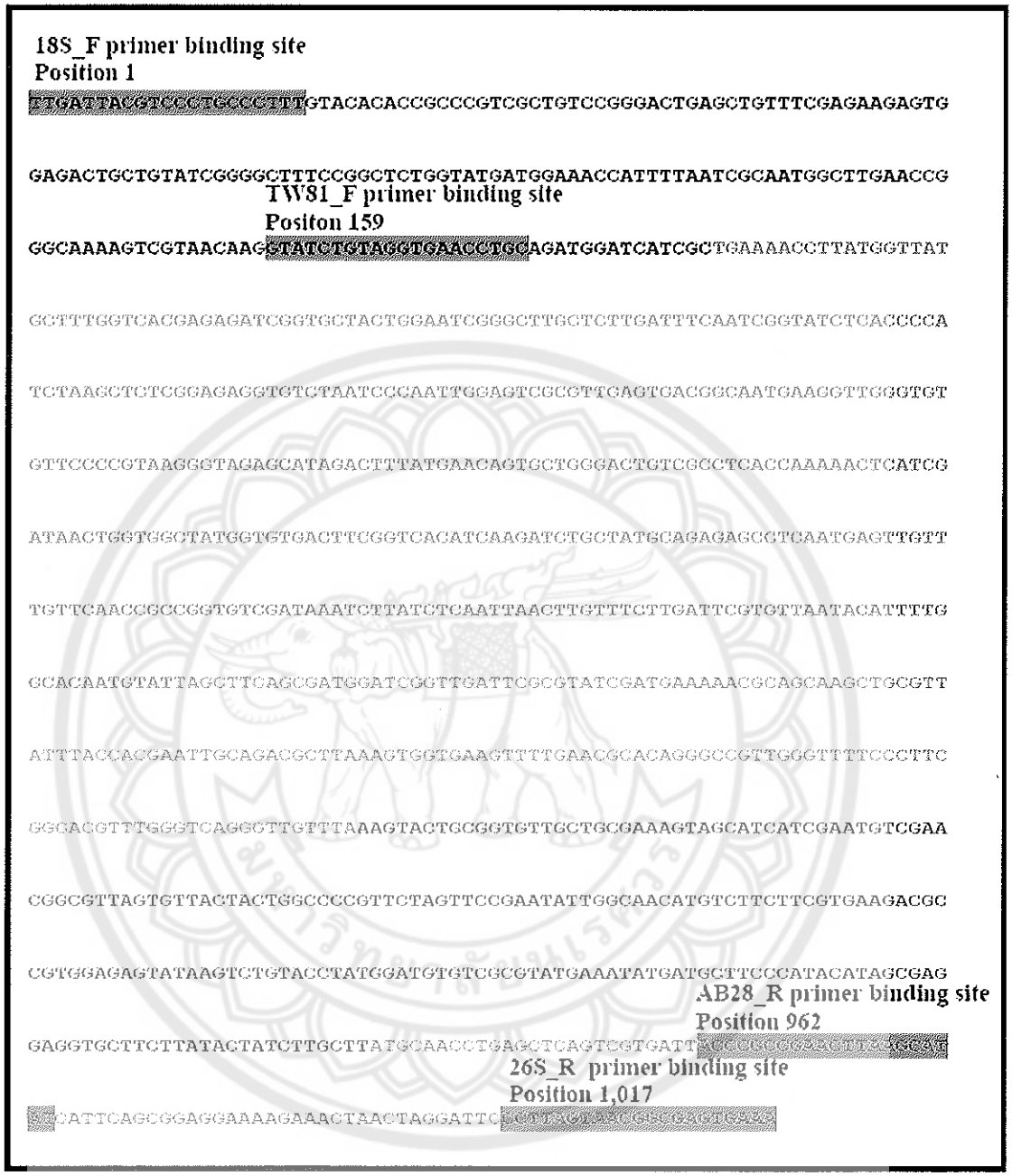
2. **เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค** Polymerase chain reaction (PCR) **ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง**

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สำหรับองค์ประกอบของ PCR reagent ประกอบด้วย Buffer (1X) $MgCl_2$ ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 มิลลิโมลาร์ ไพร์เมอร์ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.8 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA Polymerase ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 3.9 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Veriti® Thermal Cycler, บริษัท AB Applied Biosystems, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 28S rDNA โดยใช้ไพร์เมอร์ 539_F (5'-GGATTTCCT TAGTAACTGCGAGTG- 3') และ 535_R (5' - TAGTCTTTCGCCCCTATACCCTT- 3')

(Stock et al., 2001, pp. 877-889) ความยาวของผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 870 คู่เบส (ภาพ 13) โดย Thermal Cycling ที่ใช้ คือ 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 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และจำนวน 1 รอบ สำหรับ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribe spacer (ITS) ไพร์เมอร์ที่ใช้ คือ 18S_F (5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3') และ 26S_R (5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3') ความยาวของผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 1,000-1,100 คู่เบส หรือ TW81_F (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC- 3') และ AB28_R (5' - ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT- 3') ความยาวของผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 800-850 คู่เบส (ภาพ 14) โดย Thermal Cycling คือ 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 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และจำนวน 1 รอบ สำหรับ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นตรวจสอบความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ได้เพิ่มปริมาณแล้วด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส โดยใช้ความเข้มข้นของเจลร้อยละ 1.2 ในสารละลาย TBE buffer (0.5X) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต



ภาพ 13 ตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ 28S rDNA ของ *S. websteri* (accession number AY841762.1)



ภาพ 14 ตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA และ Internal Transcribes spacer (ITS) ของ *H. safricana* (accession number EF488006.1) สีเขียวแสดงบริเวณที่ทั้ง 4 ไพรเมอร์ สามารถจับได้ ตัวอักษรสีดำ คือ บริเวณยีน *18S rRNA*, สีแดง คือ บริเวณยีน Internal transcribed spacer I ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ บริเวณยีน *5.8S rRNA* สีเขียว คือ บริเวณยีน Internal transcribed spacer II และสีน้ำเงิน คือ บริเวณยีน *28S rRNA*

3. การทำให้ดีเอนเอบริสุทธิ์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เหมือนกับการทดลองในข้อ 2 แต่เพิ่มปริมาตรเป็น 30 ไมโครลิตร ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., ประเทศไต้หวัน) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ย้อมแถบเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตัดเจลในตำแหน่งที่ต้องการใส่หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Gel/PCR buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เจลละลาย ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ย้ายส่วนผสมมาลงใน DFH column ที่วางอยู่บนหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายด้านล่าง นำ DFH column กลับมาวางไว้ด้านบนของหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติม W1 buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน DFH column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายด้านล่าง เติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงใน DFH column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ DFH column แห้ง จากนั้นย้าย DFH column ใส่ลงด้านบนของหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 12-15 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง DFH column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5-20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ตกลงมาในหลอดทดลอง ตรวจสอบเจลอีกครั้งด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส นำส่งบริษัท Macrogen Inc. Service ประเทศเกาหลี เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

จำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

1. สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

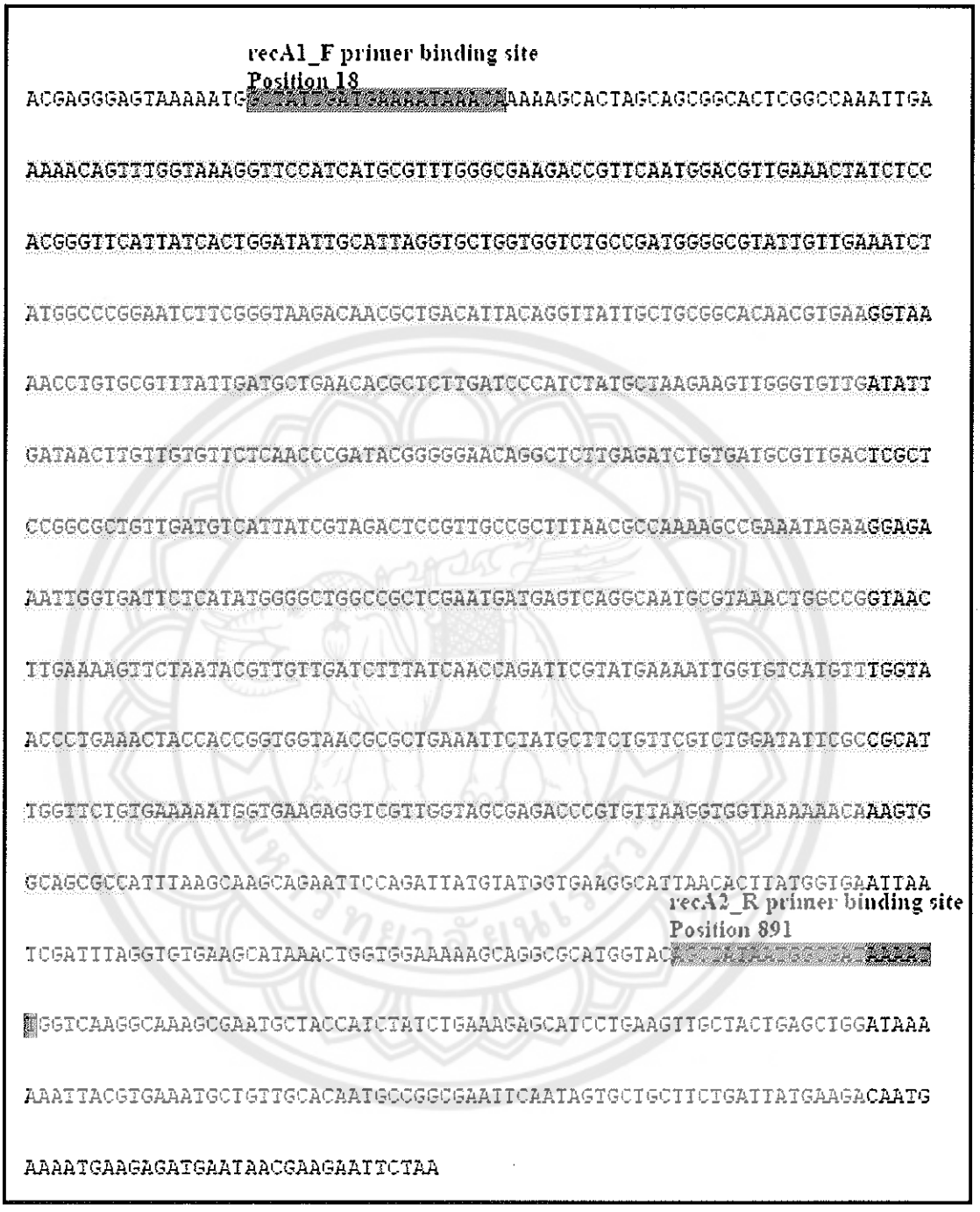
สกัดดีเอนเอแบคทีเรียด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit (Blood/Culture cell) เพาะเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดมาปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบน (supernatant) ทิ้ง เติม GT buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสาร (vortex) ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม Proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (บริษัท Memment, ประเทศเยอรมัน) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม GB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมแอลกอฮอล์ (100%) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดลงใน GD column ที่อยู่บน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centurion, C2012, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ความเร็ว 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 เวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายด้านล่าง เติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน GD column ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 3 นาที เพื่อให้ GD column แห้ง หลังจากนั้นย้าย GD column ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง GD column ตั้งทิ้งไว้ 5-20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกลงมา ตรวจสอบดีเอนเอด้วยเทคนิคเจลอะกาโรสอิเลคโตรโฟริซิส โดยใช้ความเข้มข้นของเจลร้อยละ 0.8 ในสารละลาย TBE buffer (0.5X) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส จากนั้นย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

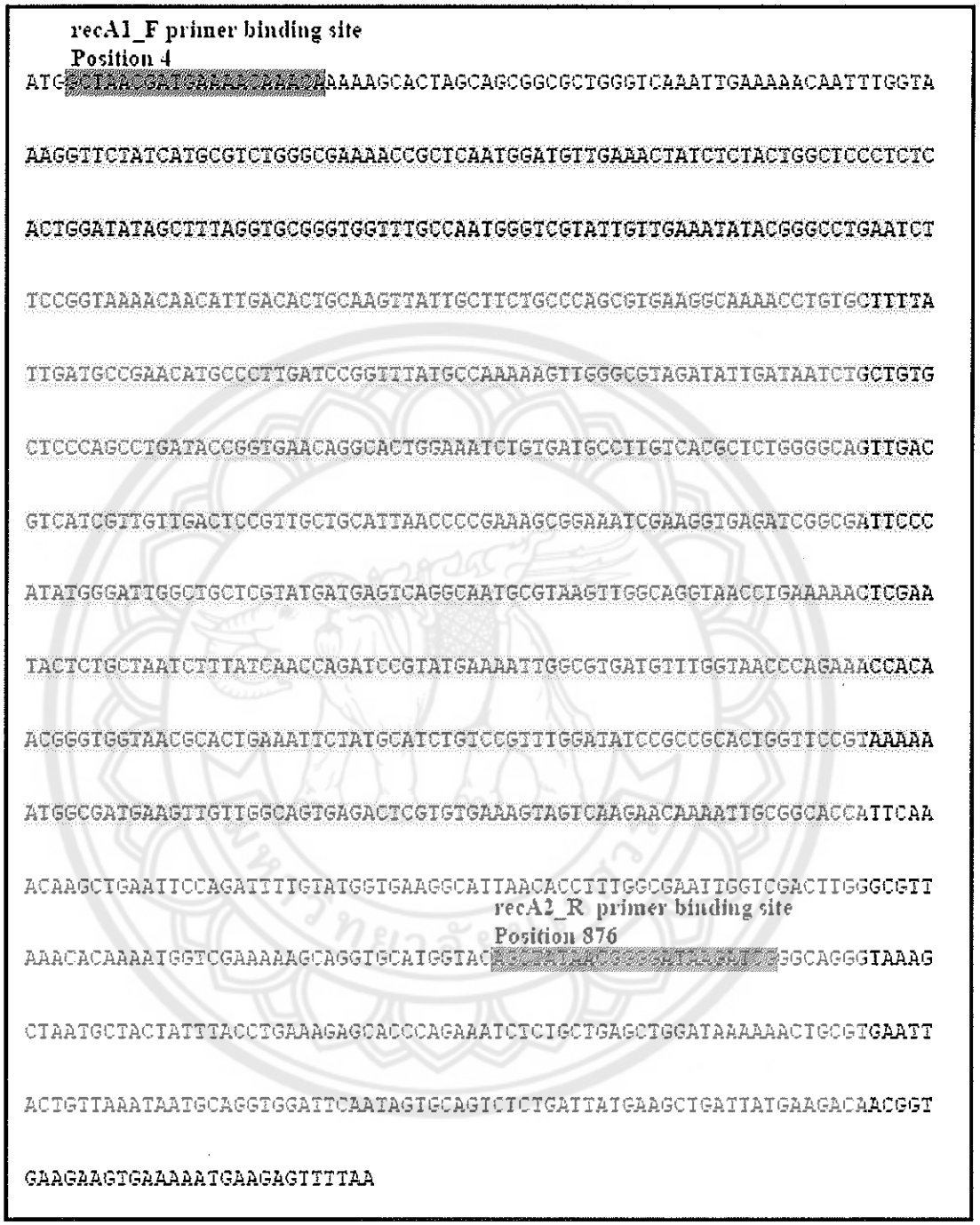
2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร องค์ประกอบของ PCR reagent ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียประกอบด้วย buffer (1X) $MgCl_2$ ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 มิลลิโมลาร์ ไพร์เมอร์ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.8 ไมโครโมลาร์ Taq DNA Polymerase ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดีเอ็นเอของแบคทีเรียปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 5.5 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Veriti® Thermal Cycler, บริษัท AB Applied Biosystems, ประเทศสหรัฐอเมริกา) บริเวณยีน *recA* ด้วยไพร์เมอร์ recA_F (5'-GCTATTGATGAAAATAAACA-3') และ recA_R (5'-RATTTTRTCWCCRTTRTAGCT-3') (Taillliez et al., 2001, pp. 1921-1937) ความยาวของผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 890 คู่เบส (ภาพ 15 และ 16) โดย Thermal Cycling แตกต่างกันระหว่างแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล หากเป็นแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ใช้ Thermal Cycling จำนวน 1 รอบ สำหรับ Pre-denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จำนวน 30 รอบ สำหรับ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และจำนวน 1 รอบ สำหรับ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที (Thanwisai et al., 2012, pp. e43835) สำหรับ Thermal Cycling ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* ใช้ Thermal Cycling จำนวน 1 รอบ สำหรับ Pre-denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 30 รอบ สำหรับ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 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, p. e43835) จากนั้นทำการตรวจสอบความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ได้เพิ่มปริมาณแล้วด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส โดยใช้ความเข้มข้นของเจลร้อยละ 1.2 ในสารละลาย TBE buffer (0.5X) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส จากนั้นย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต



ภาพ 15 ตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณยีน *recA* ของ *X. bovienii* SS-2004 (accession number NC_013892.1) สีเหลืองแสดงบริเวณยีน *recA* ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส



ภาพ 16 ตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณยีน *recA* ของ *P. luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 (accession number NC_005126.1) สีเหลืองแสดงตำแหน่งของยีน *recA* ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส

3. **การทำให้ดีเอนเอบริสุทธิ์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์** (DNA sequencing) **ของแบคทีเรีย**

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เหมือนกับการทดลองในข้อ 2 แต่เพิ่มปริมาตรรวมเป็น 30 ไมโครลิตร ทำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., ประเทศไต้หวัน) เติมสารละลาย Gel/PCR buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ ดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน DFH column ที่วางอยู่บนหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายด้านล่าง นำ DFH column กลับมาวางไว้ด้านบนของหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน DFH column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ DFH column แห้ง จากนั้นย้าย DFH column ใส่ลงด้านบนของหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 12-15 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง DFH column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5-20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ตกลงมาในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส นำส่งบริษัท Macrogen Inc. Service ประเทศเกาหลีเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

4. **การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์**

ตรวจสอบความถูกต้องของนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม SeqManII (DNASTAR inc., Wisconsin, USA) เทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย ด้วยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS หรือ 28S rDNA และ recA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) **ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย**

ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 28S rDNA และสกุล *Heterorhabditis* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ Internal Transcribed spacer (ITS) วิเคราะห์ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* จากฐานข้อมูล NCBI (ตาราง 5 และ 6) และแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล ด้วยลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์ *recA* วิเคราะห์ร่วมกับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* (ตาราง 7 และ

8) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 6.0 (Tamura et al., 2013, pp.2725-2729) สร้าง Maximum likelihood tree ด้วยวิธี Kimura-2-parameter ที่มีค่า Bootstrap 1,000 ครั้ง

ตาราง 5 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 44 ชนิด จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *28S rRNA*

ลำดับ	ชนิด (Species)	Accession No
1	*Steinernema ceratophorum*	AF331888.1
2	*Steinernema bicornutum*	AF331904.1
3	*Steinernema neocurtillae*	FJ263674.1
4	*Steinernema unicornum*	GU191462.1
5	*Steinernema weiseri*	GU569059.1
6	*Steinernema kushidai*	AF331897.1
7	*Steinernema abbasi*	FJ935791.1
8	*Steinernema feltiae*	GU569049.1
9	*Steinernema ashiuense*	FJ165550.1
10	*Steinernema riobravis*	AF331893.1
11	*Steinernema ichnusae*	EU421130.1
12	*Steinernema cholashanense*	EF520284.1
13	*Steinernema akhursti*	KF289902.1
14	*Steinernema everestense*	HM000104.1
15	*Steinernema monticolum*	GU395647.1
16	*Steinernema yirgalemense*	AY748451.1
17	*Steinernema tophus*	KJ701240.1
18	*Steinernema innovation*	KJ578794.1
19	*Steinernema lamjungense*	HM000102.1
20	*Steinernema hermaphroditum*	AY598358.1
21	*Steinernema scarabaei*	AY172023.1
22	*Steinernema puertoricense*	AF331903.1
23	*Steinernema glaseri*	JQ362414.1

ตาราง 5 (ต่อ)

ลำดับ	ชนิด (Species)	Accession No
24	*Steinernema aciari*	GU395637.1
25	*Steinernema brazilense*	FJ410326.1
26	*Steinernema apuliae*	GU569044.1
27	*Steinernema jollieti*	GU569051.1
28	*Steinernema puntauvense*	EF187018.2
29	*Steinernema websteri*	AY841762.1
30	*Steinernema oregonense*	AF331891.1
31	*Steinernema kraussei*	GU569053.1
32	*Steinernema riobrave*	GU177834.1
33	*Steinernema texanum*	EF152569.1
34	*Steinernema khoisanae*	DQ314289.1
35	*Steinernema phyllophagae*	FJ666054.1
36	*Steinernema sangi*	GU569057.1
37	*Steinernema diaprepesi*	GU177829.1
38	*Steinernema arenarium*	AF331892.1
39	*Steinernema karii*	AF331902.1
40	*Steinernema cubanum*	AF331889.1
41	*Steinernema longicaudum*	AF331894.1
42	*Steinernema boemarei*	GU569046.1
43	*Steinernema xueshanense*	FJ666053.1
44	*Steinernema pakistanense*	JX068824.1

ตาราง 6 ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 21 ชนิด จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal Transcribed Spacer (ITS)

ลำดับ	ชนิด (Species)	Accession No
1	*Heterorhabditis zealandica*	EF530041.1
2	*Heterorhabditis bacteriophora*	EU598237.1
3	*Heterorhabditis marelatus*	AY321479.1
4	*Heterorhabditis safricana*	EF488006.1
5	*Heterorhabditis amazonensis*	DQ665222.1
6	*Heterorhabditis indica*	KF247222.1
7	*Heterorhabditis downesi*	EF042442.1
8	*Heterorhabditis mexicana*	EF043444.1
9	*Heterorhabditis atacamensis*	HM230723.1
10	*Heterorhabditis baujardi*	AF548768.1
11	*Heterorhabditis georgiana*	EU099032.1
12	*Heterorhabditis floridensis*	DQ372922.1
13	*Heterorhabditis sonorensis*	KC633187.1
14	*Heterorhabditis taysearae*	EF043443.1
15	*Heterorhabditis argentinensis*	AF029706.1
16	*Heterorhabditis hawaiiensis*	AF029707.1
17	*Heterorhabditis hepialius*	AF029709.1
18	*Heterorhabditis gerradi*	FJ152545.1
19	*Heterorhabditis* brevicaudis	EF067889.1
20	*Heterorhabditis noenieputensis*	JN620538.1
21	*Heterorhabditis megidis*	AY321480.1

ตาราง 7 แบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 23 ชนิด จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA*

ลำดับ	ชนิด (Species)	Accession No
1	*Xenorhabdus ishibashi*	AB630947.1
2	*Xenorhabdus kozodoii*	FJ823405.1
3	*Xenorhabdus cabanillasii*	FJ823422.1
4	*Xenorhabdus indica*	FJ823420.1
5	*Xenorhabdus poinarii*	FJ823408.1
6	*Xenorhabdus vietnamensis*	GU481051.1
7	*Xenorhabdus szentirmaii*	FJ823416.1
8	*Xenorhabdus ehlersii*	FJ823398.1
9	*Xenorhabdus griffiniae*	FJ823399.1
10	*Xenorhabdus romanii*	FJ823403.1
11	*Xenorhabdus budapestensis*	FJ823418.1
12	*Xenorhabdus doucetiae*	FJ823402.1
13	*Xenorhabdus japonica*	FJ823400.1
14	*Xenorhabdus megdalenensis*	JF798401.1
15	*Xenorhabdus miraniensis*	FJ823414.1
16	*Xenorhabdus mauleonii*	FJ823417.1
17	*Xenorhabdus hominickii*	FJ823410.1
18	*Xenorhabdus stockiae*	FJ823425.1
19	*Xenorhabdus beddingii*	FJ823415.1
20	*Xenorhabdus koppenhoeferi*	FJ823413.1
21	*Xenorhabdus innexi*	FJ823423.1
22	*Xenorhabdus nematophilus*	AF127333.1
23	*Xenorhabdus khoisanae*	JX623979.1

ตาราง 8 แบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 14 ชนิด จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA*

ลำดับ	ชนิด (Species)	Accession No
1	*Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii*	FJ861994.1
2	*Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii*	FJ861999.1
3	*Photorhabdus luminescens* subsp. *caribbeanensis*	FJ862003.1
4	*Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens*	FJ862000.1
5	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1
6	*Photorhabdus luminescens* subsp. *noenieputensis*	JQ424881.1
7	*Photorhabdus luminescens* subsp. *thracensis*	FJ862015.1
8	*Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*	FJ862014.1
9	*Photorhabdus temperata* subsp. *khanii*	FJ862011.1
10	*Photorhabdus temperata* subsp. *tasmaniensis*	FJ862008.1
11	*Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea*	KF740654.1
12	*Photorhabdus temperata* subsp. *stackebrandtii*	KF740655.1
13	*Photorhabdus asymbiotica* subsp. *australis*	FJ862018.1
14	*Photorhabdus asymbiotica* subsp. *asymbiotica*	FJ862017.1

การเตรียมเซลล์แบคทีเรียก่อโรคสำหรับใช้ในวิธี Disc diffusion

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 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 สายพันธุ์ และ *Staphylococcus aureus* จำนวน 3 สายพันธุ์ บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มด้วยตู้บ่มเชื้อ (Incubator Model 1565, บริษัท Sheldon Manufacturing, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาละลายในสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปรับความขุ่นของเซลล์ให้ได้ 0.08-0.13 (0.5 MacFarland standard) (Seier-Petersen et al., 2014, pp. 343-348) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (DU®730 Life Science UV, บริษัท Beckman coulter, ประเทศสหรัฐอเมริกา) จากนั้นเจือจางแบคทีเรียลงทีละ 10 เท่าจนถึงระดับความเจือจาง 10^{-6}

ดูดสารละลายแบคทีเรียที่ระดับความเจือจาง 10^{-5}-10^{-6} จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (Spreader) ทิ้งไว้สักครู่ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง โดยแต่ละความเจือจางทำ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณหาค่า Colony forming unit (CFU/ml) เพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรคให้ได้เท่ากับ 10^{8} โดยใช้สูตร

[จำนวนโคโลนีเฉลี่ย * ส่วนกลับของความเจือจางที่นำมาทดสอบ] / ปริมาตรของสารที่ใช้ในการ spread]

การคัดกรองแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

1. **การเตรียม** Whole cell Suspension และ Cell-free supernatant ของ**แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus***

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* บนอาหาร NBTA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยเครื่องเขย่า (Shaker AK85, บริษัท Infors HT, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที แบ่งเซลล์แบคทีเรียออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน ส่วนแรกเป็น Whole cell Suspension ส่วนที่ 2 เตรียมเป็น Cell-free supernatant โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centurion, C2012, ประเทศสหรัฐอเมริกา) เก็บส่วนใส (Supernatant) มากรองด้วยตัวกรองขนาด 0.20 ไมโครเมตร

2. **ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี** Disc diffusion

ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในส่วน suspension ของแบคทีเรียก่อโรคที่ได้เตรียมไว้ในข้างต้นมาป้ายให้ทั่วอาหาร MHA จากนั้นนำส่วน Whole cell suspension และ Cell-free supernatant ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 1 หยดลงแผ่น Disc ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (เตรียมจากกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 3) ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้แผ่น disc แห้งพอหมาด ๆ จากนั้นจึงคีบแผ่น Disc ด้วยคีมคีบ (Forcep) ปากแหลม วางลงบนจานอาหาร MHA ที่ป้ายเชื้อแบคทีเรียก่อโรค บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (Positive control)

ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจาก crude compound ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

นำแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในขั้นตอนการคัดกรอง ไปสกัด crude compound โดยใช้ ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำ crude compound ที่ได้มาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Disc diffusion

1. **สกัด crude compound จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus***

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* บนอาหาร NBTA ในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Luria-Bertani broth ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 180 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเติม ethyl acetate ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนใสด้านบน ประมาณ 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator (Buchi, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) ละลายสารด้วย ethyl acetate ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร จากนั้นย้ายสารละลายลงในถ้วยตวง (beaker) ที่ปราศจากเชื้อและทราบน้ำหนัก นำไปไว้ในตู้ดูดควันเพื่อให้ ethyl acetate ระเหย นำส่วนสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก และละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บสารสกัดหยาบใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนถัดไป

ตาราง 9 ยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ทำ Disc diffusion

Bacteria	Antibiotic Disc
Acinetobacter baumannii (Clinical isolate)	Tigecycline
Staphylococcus aureus (*S. aureus* ATCC® 20475 และ Clinical isolate)	Vancomycin
Enterococcus faecalis ATCC® 51299	Ampicillin
Escherichia coli (*E. coli* ATCC® 35218 และ Clinical isolate)	Ceftazidime 30
Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa* ATCC® 27853 และ Clinical isolate)	Ceftazidime 30
Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae* ATCC® 700603 และ Clinical isolate)	Ceftazidime/clavulanic acid

2. **ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี** Disc diffusion

ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในส่วน suspension ของแบคทีเรียก่อโรคที่ได้เตรียมไว้มาป้ายให้ทั่วอาหาร MHA จากนั้นนำส่วน crude compound ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* หยดลงบน Disc ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (เตรียมจากกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 3) ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้แผ่น disc แห้งพอหมาดๆ คีบแผ่น Disc วางลงบนจานอาหาร MHA ที่ป้ายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตผลการยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (Positive control) (ตาราง 9)

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

สกัด Crude compound จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต อีกครั้งเพื่อใช้ในการทดลองหา MIC และ MBC โดยใช้วิธีเดิมที่ได้อธิบายไว้ในข้างต้น

1. **เตรียมเซลล์แบคทีเรียก่อโรค**

นำแบคทีเรียก่อโรคที่คัดเลือกจากผลการทำ Disc diffusion จำนวน 5 สาย**พันธุ์** ได้แก่ PB36 *S. aureus*, PB57 *S. aureus*, *S. aureus* ATCC® 20475, PB30 *P. aeruginosa* **และ** *E. coli* ATCC® 35218 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) นำไปบ่มด้วย**ตู้บ่มเชื้อ** (Incubator Model 1565, บริษัท Sheldon Manufacturing, ประเทศสหรัฐอเมริกา) **ที่อุณหภูมิ** 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวมาละลายในสารละลาย Mueller Hinton broth (MHB) ปรับความขุ่นของเซลล์ให้ได้ 0.08-0.13 (0.5 MacFarland standard) (Seier-Petersen et al., 2014) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (DU®730 Life Science UV, บริษัท Beckman coulter, ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพื่อให้ได้แบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml หลังจากนั้นเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller Hinton broth (MHB) ในอัตราส่วน 1:100 ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ CFU/ml

2. **การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้** (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth (MHB) ใส่ลงใน 96 well microtiter plate จำนวน 11 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตสารละลาย crude compound จาก

แบคทีเรีย *Photorhabdus* ลงในหลุมที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน เจือจางสารละลายเป็น 2 เท่าจากหลุมที่ 2 ถึงหลุมที่ 8 ความเข้มข้นของ crude compound แต่ละหลุมแสดงดังตาราง 12 จากนั้นเติมแบคทีเรียก่อโรคที่เตรียมไว้ใส่ลงในหลุมที่ 1 ถึง หลุมที่ 8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของสารละลาย crude compound แต่ละหลุมแสดงในตาราง 12 สำหรับหลุมที่ 9, 10 และ 11 ใช้เป็น control โดยหลุมที่ 9 จะไม่ใส่สารละลาย crude compound จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* หลุมที่ 10 ใส่ DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แทนสารละลาย crude compound จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* และหลุมที่ 11 ใส่ Mueller Hinton broth (MHB) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพียงอย่างเดียว ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกหลุมที่ใสและไม่มีตะกอนของเชื้อเป็นความเข้มข้นที่หลุมนั้นเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (Torrungruang et al., 2007, pp. 1-10) ความเข้มข้นของ Crude compound ในการศึกษา MIC ของแต่ละหลุมแสดงดังตาราง 10

3. **การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้** (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

ปิเปตสารละลายจากหลุมที่ 1-11 จากการทดลอง MIC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร MHA ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) (Torrungruang et al., 2007, pp. 1-10)

ตาราง 10 ค่าความเข้มข้นของ Crude compound จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต สำหรับใช้ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay (2 fold serial dilution)

รหัส	แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ	ความเข้มข้นของ crude compound (mg/ml)							
		หลุมที่ 1	หลุมที่ 2	หลุมที่ 3	หลุมที่ 4	หลุมที่ 5	หลุมที่ 6	หลุมที่ 7	หลุมที่ 8
bMW1.2_TH	*S. aureus* ATCC® 20475 (MRSA)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
	PB36 *S. aureus* (MRSA)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
	PB57 *S. aureus* (MRSA)	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.98
bMW8.1_TH	*S. aureus* ATCC® 20475 (MRSA)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
	PB36 *S. aureus* (MRSA)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
	PB57 *S. aureus* (MRSA)	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78
bMW27.4_TH	*S. aureus* ATCC® 20475 (MRSA)	55	27.5	13.75	6.88	3.44	1.72	0.86	0.43
	PB36 *S. aureus* (MRSA)	55	27.5	13.75	6.88	3.44	1.72	0.86	0.43
	PB57 *S. aureus* (MRSA)	55	27.5	13.75	6.88	3.44	1.72	0.86	0.43
	E. coli ATCC® 35218 (β-lactamase)	55	27.5	13.75	6.88	3.44	1.72	0.86	0.43
	PB30 *P. aeruginosa* (MDR)	55	27.5	13.75	6.875	3.44	1.72	0.86	0.43

ตาราง 10 (ต่อ)

รหัส	แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ	ความเข้มข้นของ crude compound (mg/ml)							
		หลุมที่ 1	หลุมที่ 2	หลุมที่ 3	หลุมที่ 4	หลุมที่ 5	หลุมที่ 6	หลุมที่ 7	หลุมที่ 8
bMW49.3_TH	*S. aureus* ATCC® 20475 (MRSA)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
	PB36 *S. aureus* (MRSA)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
	PB57 *S. aureus* (MRSA)	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.98
bMW56.5_TH	*S. aureus* ATCC® 20475 (MRSA)	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.98
	PB36 *S. aureus* (MRSA)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
	PB57 *S. aureus* (MRSA)	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.98
bMW59.2_TH	*S. aureus* ATCC® 20475 (MRSA)	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.98
	PB36 *S. aureus* (MRSA)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
	PB57 *S. aureus* (MRSA)	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.98
bMW59.5_TH	*S. aureus* ATCC® 20475 (MRSA)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
	PB36 *S. aureus* (MRSA)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
	PB57 *S. aureus* (MRSA)	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.98

ตาราง 10 (ต่อ)

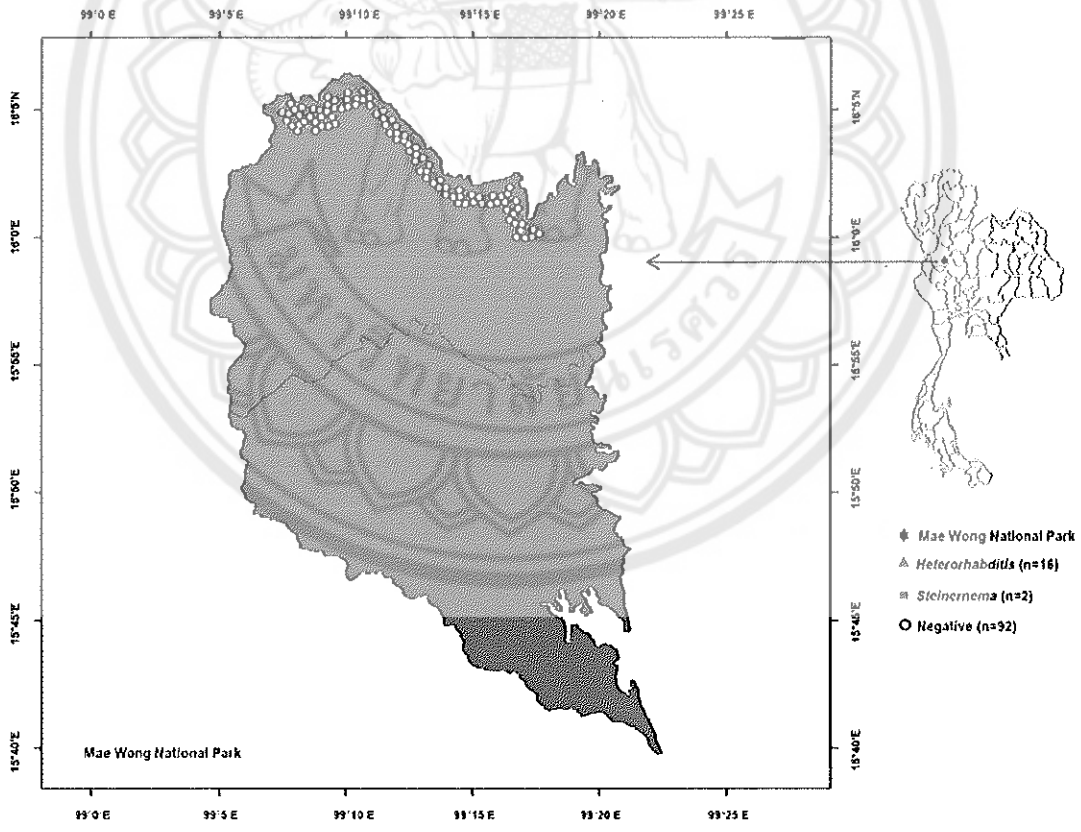
รหัส	แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ	ความเข้มข้นของ crude compound (mg/ml)							
		หลุมที่ 1	หลุมที่ 2	หลุมที่ 3	หลุมที่ 4	หลุมที่ 5	หลุมที่ 6	หลุมที่ 7	หลุมที่ 8
bMW90.1_TH	*S. aureus* ATCC® 20475 (MRSA)	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.98
	PB36 *S. aureus* (MRSA)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
	PB57 *S. aureus* (MRSA)	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.98
bMW103.2_TH	*S. aureus* ATCC® 20475 (MRSA)	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.98
	PB36 *S. aureus* (MRSA)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
	PB57 *S. aureus* (MRSA)	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.98

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 110 บริเวณ จำนวนดิน 550 ตัวอย่าง จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ภาพ 17) สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธี Baiting technique ได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต แบ่งเป็น 2 สกุล คือ *Steinernema* จำนวน 3 ไอโซเลต และ *Heterorhabditis* จำนวน 21 ไอโซเลต สามารถนำไปจำแนกชนิดได้เพียง 16 ไอโซเลต ส่วนอีก 8 ไอโซเลต นั้นพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราและโปรโตซัวจึงยังไม่สามารถจำแนกในระดับชนิดได้



ภาพ 17 แผนที่แสดงบริเวณที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งสองสกุลด้วยวิธี PCR โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *28S rRNA* ผลผลิต PCR ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 870 คู่เบส และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน Internal transcribed spacer (ITS) ผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 850 คู่เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งสองสกุลเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานแล้วในฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี BLASTN พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 2 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S. websteri* (accession number JF503100.1) ซึ่งมีค่าความเหมือน (Similarity) อยู่ที่ 99% และอีก 1 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S. kushidai* (accession number AF331897.1) ซึ่งมีค่าความเหมือนมากถึง 99% (ตาราง 11) สำหรับการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 7 ไอโซเลต พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. indica* (accession number KU945293.1) ซึ่งมีค่าความเหมือน (Similarity) มากถึง 99% ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 5 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. baujardi* (accession number AF548768.1) มีค่าความเหมือนอยู่ที่ 99% และอีก 1 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. zealandica* (accession number KT715757.1) ซึ่งมีค่าความเหมือนมากถึง 100% (ตาราง 12)

ตาราง 11 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
eMW12.3_TH	*Steinernema kushidai*	AF331897.1	1171	100%	0	99%
eMW16.3_TH	*Steinernema websteri* strain AS1	JF503100.1	1150	100%	0	99%
eMW16.5_TH	*Steinernema websteri* strain AS1	JF503100.1	1150	100%	0	99%

ตาราง 12 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* จำนวน 13 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

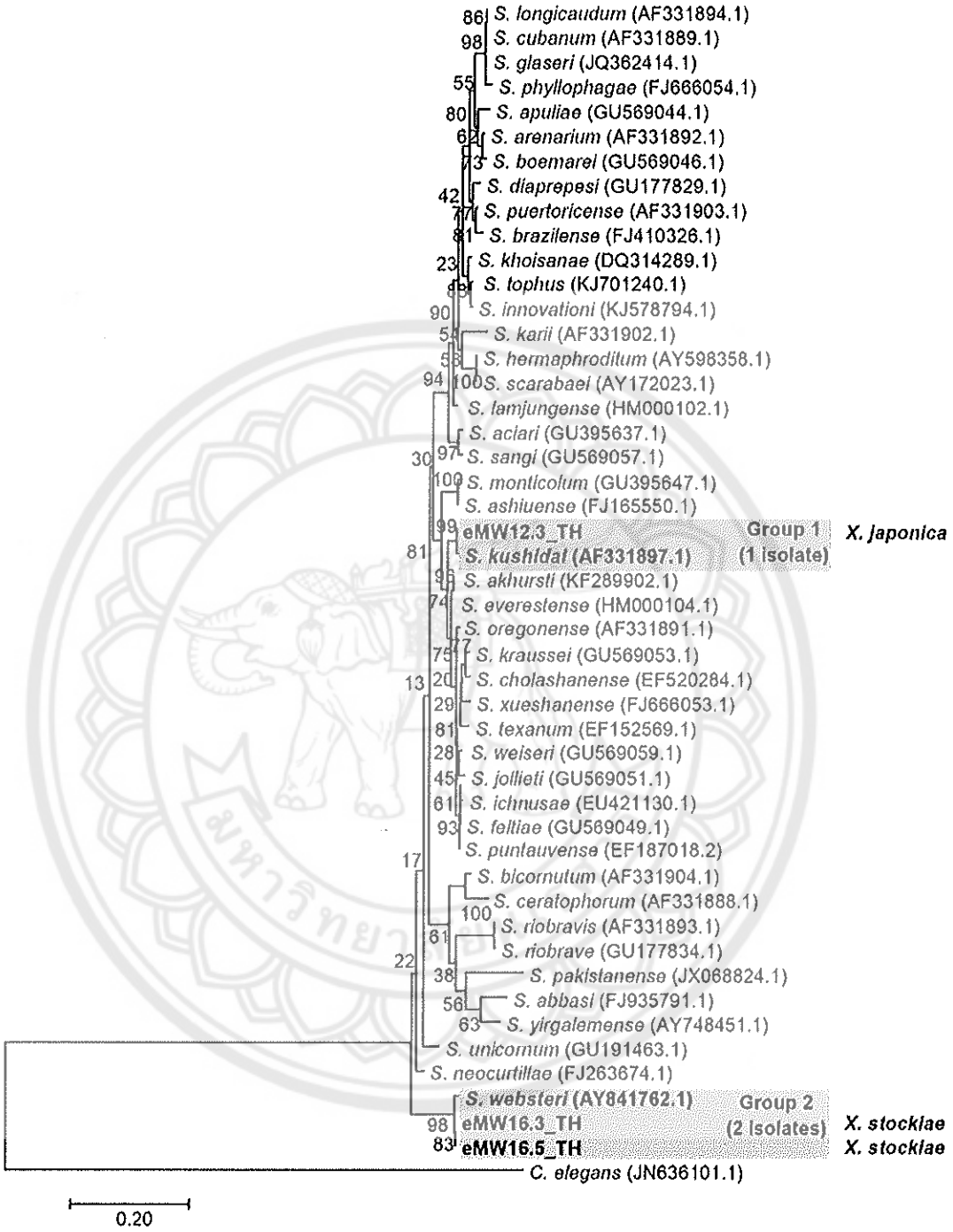
Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
eMW27.4 TH	*Heterorhabditis zealandica*	KT715757.1	1169	99%	0	100%
eMW29.2_TH	*Heterorhabditis baujardi*	AF548768.1	1169	100%	0	99%
eMW38.3_TH	*Heterorhabditis indica*	KU945293.1	1142	100%	0	99%
eMW49.3_TH	*Heterorhabditis indica*	KU945293.1	1142	100%	0	99%
eMW49.4_TH	*Heterorhabditis indica*	KU945293.1	1142	100%	0	99%
eMW54.1_TH	*Heterorhabditis indica*	KU945293.1	1142	100%	0	99%
eMW56.5_TH	*Heterorhabditis indica*	KU945293.1	1142	100%	0	99%
eMW59.2_TH	*Heterorhabditis indica*	KU945293.1	1142	100%	0	99%
eMW59.5_TH	*Heterorhabditis indica*	KU945293.1	1142	100%	0	99%
eMW74.2_TH	*Heterorhabditis baujardi*	AF548768.1	1169	99%	0	99%
eMW90.1_TH	*Heterorhabditis baujardi*	AF548768.1	1169	99%	0	99%

ตาราง 12 (ต่อ)

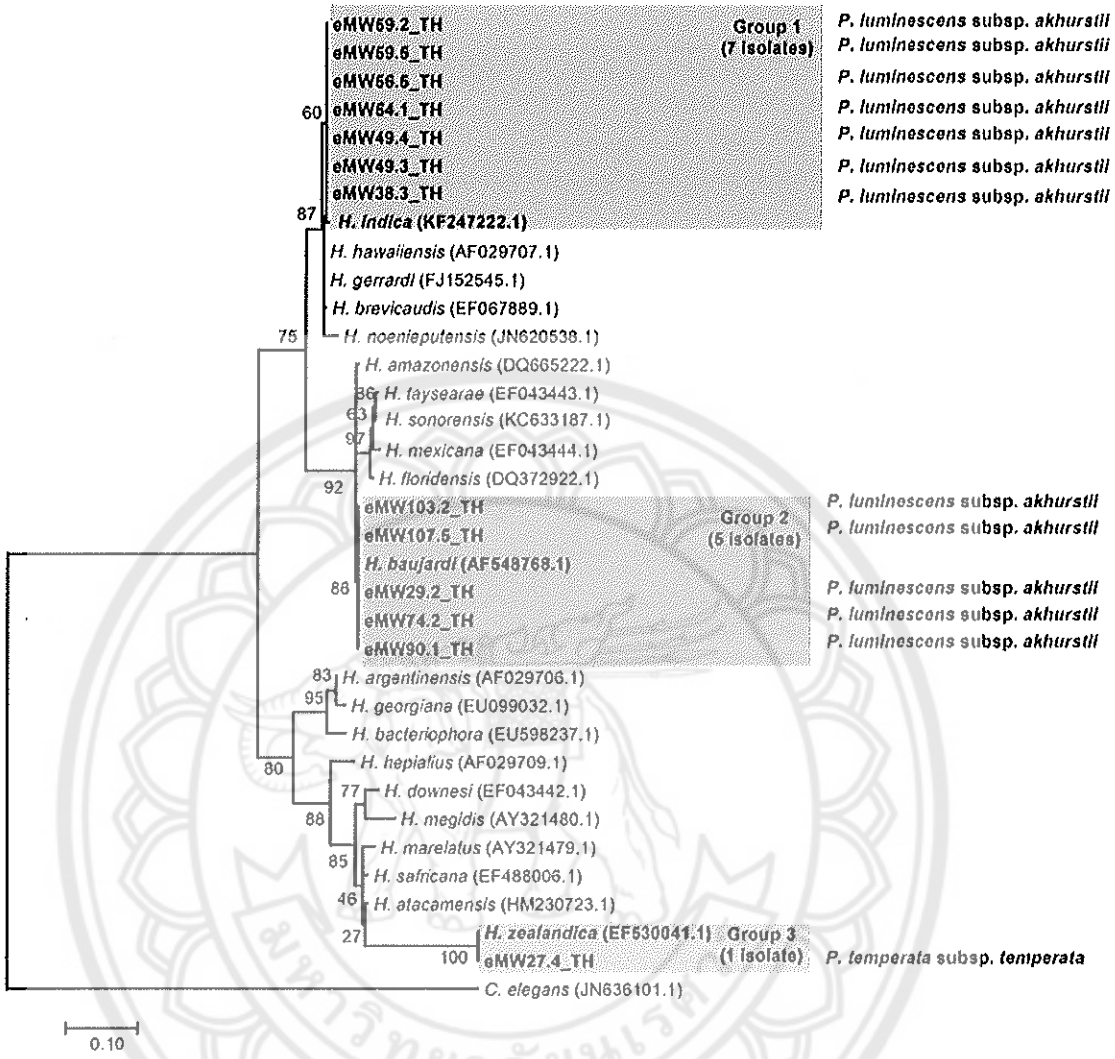
Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
eMW103.2_TH	*Heterorhabditis baujardi*	AF548768.1	1117	99%	0	99%
eMW107.5_TH	*Heterorhabditis baujardi*	AF548768.1	1169	99%	0	99%

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยการทำ Maximum likelihood tree โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7.0 วิเคราะห์ด้วย Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA ความยาว 870 คู่เบส สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ความยาว 850 คู่เบส สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 3 ไอโซเลต มี 2 ไอโซเลต ที่มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri* และ 1 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. kushidai* (ภาพ 18) สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล*Heterorhabditis* จำนวน 13 ไอโซเลต มี 7 ไอโซเลต ที่มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* 5 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. baujardi* และ 1 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. zealandica* (ภาพ 19)



ภาพ 18 Maximum likelihood tree ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* โดยใช้ ยีน *28S rRNA* วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0 วิธี Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)



ภาพ 19 Maximum likelihood tree ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal transcribed spacer วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0 วิธี Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)

ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของดินและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จำนวน 24 ไอโซเลต พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้จากดินร่วนมากที่สุดจำนวน 19 ไอโซเลต (79.17%) รองลงมาเป็นดินร่วนปนทราย 4 ไอโซเลต (16.67%) และดินทราย 1 ไอโซเลต (4.17%) และไม่สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้จากดินเหนียว ในส่วนของปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ พบว่าอุณหภูมิของดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีค่าเท่ากันอยู่ในช่วง 14-31 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ในช่วง 6.0-7.0 และ 5.6-7.1 ตามลำดับ ค่าความชื้นของดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ในช่วงร้อยละ 1.0-7.5 และ 1.0-8.0 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติของอุณหภูมิและค่าความชื้นของดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง พบว่า แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P-value* = 0.59 และ 0.71) สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P-value* = 0.38) (ตาราง 13 และ 14)

ตาราง 13 ลักษณะดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จากตัวอย่างดินทั้งหมด 550 ตัวอย่าง

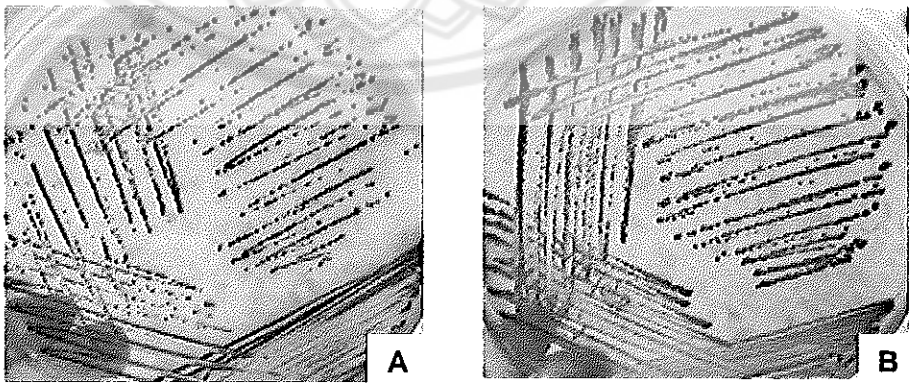
ลักษณะดิน	ดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	ดินที่ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง
ดินร่วน	19 (79.17%)	361 (68.63%)
ดินร่วนปนทราย	4 (16.67%)	161 (30.61%)
ดินทราย	1 (4.16%)	1 (0.19%)
ดินร่วนปนทรายปนหิน	0 (0%)	1 (0.19%)
ดินร่วนปนหิน	0 (0%)	1 (0.19%)
ดินร่วนปนเหนียว	0 (0%)	1 (0.19%)
รวม	24 (4.36%)	526 (95.63%)

ตาราง 14 ค่าอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และความชื้น ที่พบและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 550 ตัวอย่าง

ค่าพิสัยของปัจจัยทางกายภาพของดิน	ดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (n=24)	ดินที่ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (n=526)	*P*-value
อุณหภูมิ (°C)	14-31	14-31	0.59
(ค่าเฉลี่ย)	(22.8)	(22.6)	
ความเป็นกรด-ด่าง	6.0-7.0	5.6-7.1	0.38
(ค่าเฉลี่ย)	(6.7)	(6.7)	
ความชื้น (%)	1.0-7.5	1.0-8.0	0.71
(ค่าเฉลี่ย)	(2.0)	(2.3)	

การแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

จากการสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NBTA ทั้งหมด 24 ไอโซเลต พบโคโลนีสีน้ำเงิน ลักษณะโค้งนูน (Covex) หรือนูนตรงกลางโคโลนีเล็กน้อย (Umbonated) จำนวน 3 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นแบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus* และโคโลนีสีเขียว ลักษณะโค้งนูน (Covex) หรือนูนตรงกลางโคโลนีเล็กน้อย ขอบเรียบ จำนวน 21 ไอโซเลต จำแนกเป็นแบคทีเรียในสกุล *Photorhabdus* (ภาพ 20)



ภาพ 20 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NBTA แบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* (A) และแบคทีเรียสกุล *Photorhabdus* (B)

การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีจำนวนทั้งสิ้น 24 ไอโซเลต แยกเป็นแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต และเป็นแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต

จำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองสกุลด้วยวิธี PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นบางส่วนของยีน *recA* โดยผลผลิต PCR ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 890 คู่เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้งสองสกุลมาทำ BLASTN เพื่อเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานแล้วในฐานข้อมูล NCBI สำหรับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต พบว่า 1 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *X. japonica* ซึ่งมีค่าความเหมือน 98% และอีก 2 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *X. stockiae* ซึ่งมีค่าความเหมือน 97% (ตาราง 15) สำหรับแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต พบว่ามี 8 ไอโซเลตที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* มากถึง 99% และอีกจำนวน 12 ไอโซเลตที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* ซึ่งมีค่าความเหมือนอยู่ระหว่าง 97-99% และอีก 1 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. temperata* subsp. *temperata* โดยมีค่าความเหมือน 99% (ตาราง 16)

ตาราง 15 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
bMW12.3_TH	*Xenorhabdus japonica* strain DSM16522	FJ823400.1	1079	100%	0	98%
bMW16.3_TH	*Xenorhabdus stockiae* strain 858516	JX485977.1	1038	100%	0	97%
bMW16.5_TH	*Xenorhabdus stockiae* strain 858516	JX485977.1	1038	100%	0	97%

ตาราง 16 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

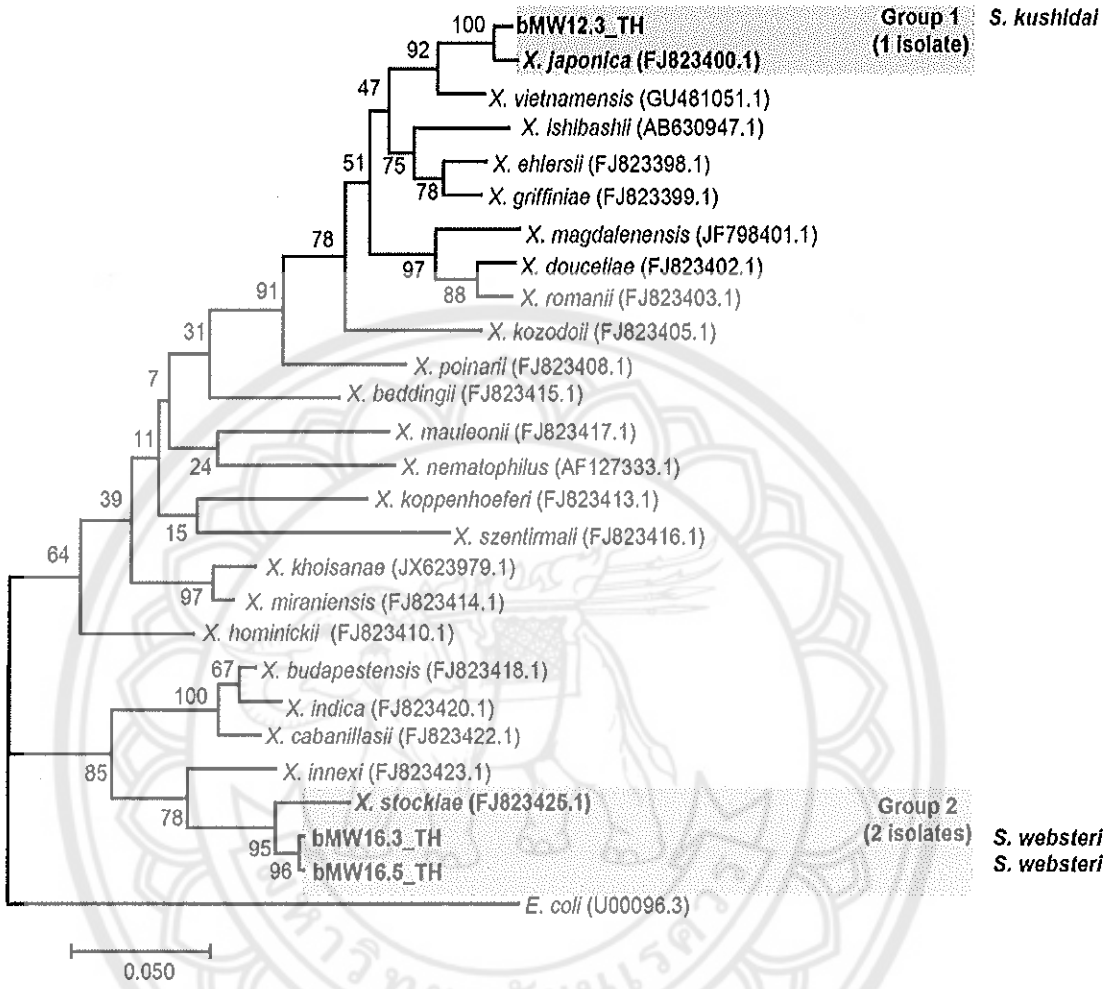
Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
bMW1.2_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain LB06	LN835348.1	1110	99%	0	99%
bMW4.4_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain LB06	LN835348.1	1056	99%	0	99%
bMW4.5_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain LB06	LN835348.1	1110	99%	0	99%
bMW8.1_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain LB06	LN835348.1	1110	99%	0	99%
bMW27.4_TH	*Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* strain K122	FJ862014.1	1102	100%	0	99%
bMW29.2_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04	FJ862005.1	1033	100%	0	97%
bMW29.4_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *ak*hurstii strain FRG04	FJ862005.1	1033	100%	0	97%
bMW38.3_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain LB06	LN835348.1	1100	99%	0	99%
bMW49.3_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain LB06	LN835348.1	1106	99%	0	99%
bMW49.4_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04	FJ862005.1	1127	100%	0	99%
bMW54.1_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain LB06	LN835348.1	1100	99%	0	99%

ตาราง 16 (ต่อ)

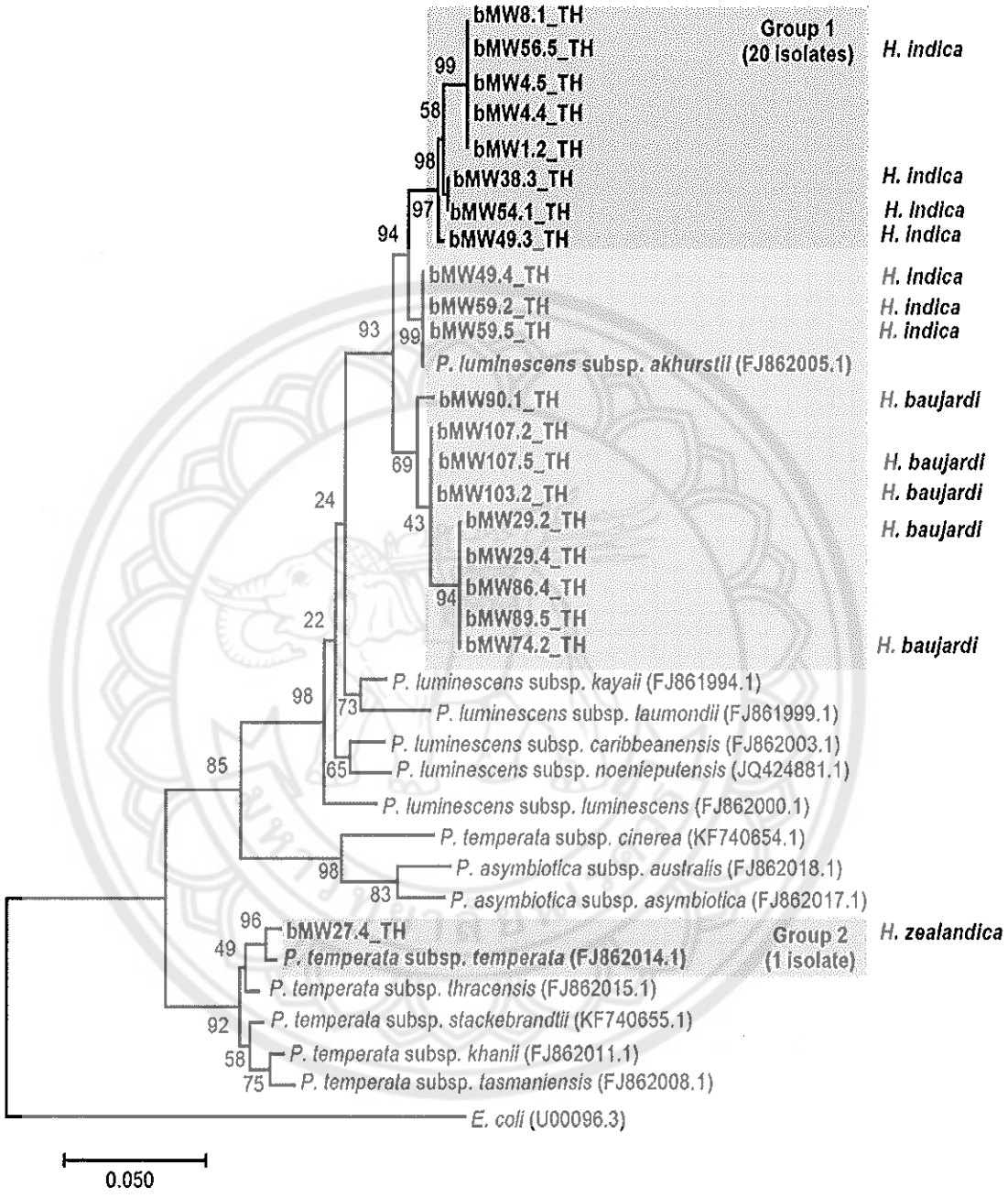
Code	Maximum identity to	Accession number	BLASTN Total score	BLASTN Query coverage	BLASTN E value	BLASTN Identity
bMW56.5_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain LB06	LN835348.1	1112	99%	0	99%
bMW59.2_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04	FJ862005.1	1127	100%	0	99%
bMW59.5_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04	FJ862005.1	1127	100%	0	99%
bMW74.2_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04	FJ862005.1	1035	100%	0	97%
bMW86.4_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04	FJ862005.1	1035	100%	0	97%
bMW89.5_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04	FJ862005.1	1035	100%	0	97%
bMW90.1_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04	FJ862005.1	1058	100%	0	98%
bMW103.2_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04	FJ862005.1	1046	100%	0	97%
bMW107.2_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04	FJ862005.1	1046	100%	0	97%
bMW107.5_TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04	FJ862005.1	1046	100%	0	97%

ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยการทำ Maximum likelihood tree โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7.0 วิเคราะห์ด้วย Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *rec*A ความยาวประมาณ 890 คู่เบส สำหรับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต มี 2 ไอโซเลต ที่มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *X. stockiae* และอีก 1 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *X. japonica* (ภาพ 20) ส่วนแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต มี 20 ไอโซเลต ที่มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* และอีก 1 ไอโซเลต มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* (ภาพ 21)



ภาพ 21 Maximum likelihood tree ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* โดยใช้ยีน *recA* (588 คู่เบส) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEFA version 7.0 วิธี Kimura-2- parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)



ภาพ 22 Maximum likelihood tree ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* โดยใช้ยีน *recA* (588 คู่เบส) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEFA version 7.0 วิธี Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)

การศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีคัดกรอง

จากการนำส่วน Whole cell suspension และ Cell-free supernatant ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จำนวนทั้งหมด 24 ไอโซเลต มาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 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 สายพันธุ์ และ *Staphylococcus aureus* จำนวน 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าส่วน Whole cell suspension ของแบคทีเรีย *X. stockiae* จำนวน 2 ไอโซเลต (bMW16.3_TH และ bMW16.5_TH) และ *Photorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต ได้แก่ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* จำนวน 8 ไอโซเลต (bMW1.2_TH, bMW8.1_TH, bMW49.3_TH, bMW56.5_TH, bMW59.2_TH, bMW59.5_TH, bMW90.1_TH และ bMW103.2_TH) และ *P. temperata* subsp. *temperata* จำนวน 1 ไอโซเลต (bMW27.4_TH) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอย่างน้อย 1 สายพันธุ์ (ตาราง 17 และตาราง 19) ภาพตัวอย่างผลจากการทำ Disc diffusion ด้วยวิธีคัดกรองดังภาพ 23 ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีคัดกรอง ดังตาราง 18

ตาราง 17 ผลจากการคัดกรองด้วย Whole cell suspension ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ*Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ (แผ่น Disc มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร)

No	Bacteria code	Clear zone (mm)							
		AB320 *A. baumannii*	AB321 *A. baumannii*	AB322 *A. baumannii*	AB324 *A. baumannii*	*S. aureus* ATCC® 20475	PB36 *S. aureus*	PB57 *S. aureus*	*E. faecalis* ATCC® 51299
1	bMW1.2_TH	6	6	6	6	6	15	13	6
2	bMW4.4_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
3	bMW4.5_TH	6	6	6	6	6	15	13	6
4	bMW8.1_TH	6	6	6	6	6	15	12	6
5	bMW12.3_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
6	bMW16.3_TH	6	6	6	6	6	10	11	6
7	bMW16.5_TH	8	6	6	7	6	6	6	6
8	bMW27.4_TH	6	6	6	6	12	10	6	6
9	bMW29.2_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
10	bMW29.4_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
11	bMW38.3_TH	6	6	6	6	6	6	16	6
12	bMW49.3_TH	6	6	6	6	6	6	16	6

ตาราง 17 (ต่อ)

No	Bacteria code	Clear zone (mm)							
		P. aeruginosa ATCC® 27853	PB30 *P. aeruginosa*	*E. coli* ATCC® 35218	PB1 *E. coli*	PB231 *E.coli*	*K. pneumoniae* ATCC® 700603	PB5 *K. pneumoniae*	PB21 *K. pneumoniae*
1	bMW1.2_TH	6	6	6	8	6	6	6	6
2	bMW4.4_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
3	bMW4.5_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
4	bMW8.1_TH	6	6	6	8	6	6	6	6
5	bMW12.3_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
6	bMW16.3_TH	6	6	6	8	8	7.5	6	8
7	bMW16.5_TH	6	6	6	6	9	8	6	7
8	bMW27.4_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
9	bMW29.2_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
10	bMW29.4_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
11	bMW38.3_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
12	bMW49.3_TH	6	6	6	6	6	6	6	6

ตาราง 17 (ต่อ)

No	Bacteria code	Clear zone (mm)							
		AB320 *A. baumannii*	AB321 *A. baumannii*	AB322 *A. baumannii*	AB324 *A. baumannii*	*S. aureus* ATCC® 20475	PB36 *S. aureus*	PB57 *S. aureus*	*E. faecalis* ATCC® 51299
13	bMW49.4_TH	6	6	6	6	6	6	11	6
14	bMW54.1_TH	6	6	6	6	6	6	12	6
15	bMW56.5_TH	6	6	6	6	6	8	6	6
16	bMW59.2_TH	6	6	6	6	6	12	6	6
17	bMW59.5_TH	6	6	6	6	6	8	6	6
18	bMW74.2_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
19	bMW86.4_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
20	bMW89.5_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
21	bMW90.1_TH	6	6	6	6	6	6	8	6
22	bMW103.2_TH	6	6	6	6	6	7	8	6
23	bMW107.2_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
24	bMW107.5_TH	6	6	6	6	6	6	6	6

ตาราง 17 (ต่อ)

No	Bacteria code	Clear zone (mm)							
		P. aeruginosa ATCC® 27853	PB30 *P. aeruginosa*	*E. coli* ATCC® 35218	PB1 *E. coli*	PB231 *E. coli*	*K. pneumoniae* ATCC® 700603	PB5 *K. pneumoniae*	PB21 *K. pneumoniae*
13	bMW49.4_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
14	bMW54.1_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
15	bMW56.5_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
16	bMW59.2_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
17	bMW59.5_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
18	bMW74.2_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
19	bMW86.4_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
20	bMW89.5_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
21	bMW90.1_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
22	bMW103.2_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
23	bMW107.2_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
24	bMW107.5_TH	6	6	6	6	6	6	6	6

ตาราง 18 ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการศึกษาฤทธิ์ของ แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีคัดกรอง

Bacteria	Antibiotic Disc	Clear Zone (mm)
AB320 *Acinetorbacter baumannii* (XDR)	Tigecycline	12
AB321 *Acinetorbacter baumannii* (MDR)	Tigecycline	15
AB322 *Acinetorbacter baumannii* (MDR)	Tigecycline	15
AB324 *Acinetorbacter baumannii* (XDR)	Tigecycline	15
Escherichia coli ATCC® 35218 (β-lactam)	Ceftazidime 30	27
PB1 *Escherichia coli* (ESBL+MDR)	Amoxicillin	ND
PB231 *Escherichia coli* (ESBL+CRE)	Amoxicillin	ND
Klebsiella pneumoniae ATCC® 700603 (ESBL)	Ceftazidime/clavulanic acid	22
PB5 *Klebsiella pneumoniae* (ESBL+MDR)	Ceftazidime/clavulanic acid	21
PB21 *Klebsiella pneumoniae* (ESBL+CRE)	Ceftazidime/clavulanic acid	19
Pseudomonas aeruginosa ATCC® 27853	Ceftazidime 30	16
PB30 *Pseudomonas aeruginosa* (MDR)	Ceftazidime 30	21
Staphylococcus aureus ATCC® 20475 (MRSA)	Vancomycin	17
PB36 *Staphylococcus aureus* (MRSA)	Ampicillin	10
PB57 *Staphylococcus aureus* (MRSA)	Ampicillin	14
Enterococcus fecalis ATCC® 51299 (MDR)	Ampicillin	30

หมายเหตุ: MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)

MDR (Multidrug resistant)

CRE (Carbapenem resistant Enterobacteriaceae)

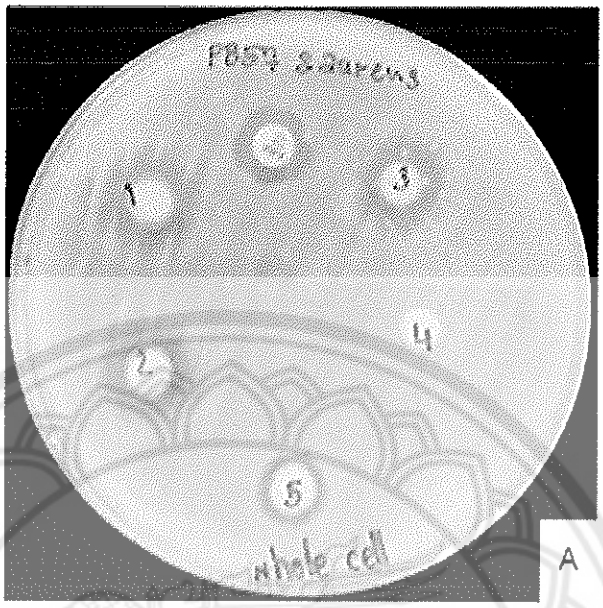
ESBL (Extended-spectrum beta-lactamases)

XDR (Extensively drug resistant)

ND (Not determined)

ตาราง 19 สรุปผลจากการคัดกรองด้วย Whole cell suspension ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ*Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disc diffusion

ชนิดของแบคทีเรีย	รหัสแบคทีเรีย	แบคทีเรียก่อโรคที่ถูกยับยั้งการเจริญ
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW1.2_TH และ bMW8.1_TH	1. PB1 *E. coli* 2. PB36 *S. aureus* 3. PB57 *S. aureus*
X. stockiae	bMW16.3_TH	1. PB36 *S. aureus* 2. PB57 *S. aureus* 3. PB1 *E. coli* 4. PB231 *E. coli* 5. *K. pneumoniae* ATCC® 700603 6. PB21 *K. pneumoniae*
X. stockiae	bMW16.5_TH	1. AB320 *A. baumannii* 3. AB324 *A. baumannii* 4. PB231 *E. coli* 5. *K. pneumoniae* ATCC® 700603 6. PB21 *K. pneumoniae*
P. temperata subsp. *temperata*	bMW27.4_TH	1. *S. aureus* ATCC® 20475 2. PB36 *S. aureus*
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW49.3_TH	3. PB57 *S. aureus*
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW56.5_TH, bMW59.2_TH และ bMW59.5_TH	1. PB36 *S. aureus*
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW90.1_TH	1. PB57 *S. aureus*
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW103.2_TH	1. PB36 *S. aureus* 2. PB57 *S. aureus*



ภาพ 23 ตัวอย่างผลจากการทำ Disc diffusion ด้วยวิธีคัดกรองด้วย Whole cell suspension ของแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW1.2_TH) (1), *P. luminescens* subsp.*akhurstii* (bMW4.5_TH) (2), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW8.1_TH) (3), *X. japonica* (bMW12.3_TH) (4) และ *X. stockiae* (bMW16.3_TH) (5) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค PB57 *S. aureus* (A)

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจาก Crude compound **ของแบคทีเรีย** *Xenorhabdus* **และ** *Photorhabdus* **ด้วยวิธี** Disc diffusion

จากการนำ Crude compound มาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 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 สายพันธุ์ และ*Staphylococcus aureus* จำนวน 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disc diffusion

พบว่า crude compound จาก *P. temperata* subsp. *temperata* (bMW27.4_TH) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้มากที่สุดถึง 10 สายพันธุ์ ได้แก่ AB320 *A. baumannii* (XDR), AB321 *A. baumannii*, AB322 *A. baumannii*, *S. aureus* ATCC® 20475, PB36 *S. aureus*, PB57 *S. aureus*, *E. coli* ATCC® 35218, PB1 *E. coli*, PB30 *P. aeruginosa* และ *E. faecalis* ATCC® 51299 รองลงมาเป็นแบคทีเรีย *X. stockiae* (bMW16.3_TH และ bMW16.5_TH)

ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียดื้อยาได้เพียงสายพันธุ์เดียว ได้แก่ *P. aeruginosa* ATCC® 27853 (ตาราง 20 และตาราง 22) ภาพตัวอย่างผลจากการทำ Disc diffusion จาก Crude compound ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* ดังภาพ 24 ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการศึกษาฤทธิ์ของ แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อแบคทีเรียก่อโรคด้วย Crude compound ดังตาราง 21

ตาราง 20 ผลจากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย crude compound ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ*Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ (แผ่น Disc มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร)

No	Bacteria code	Clear zone (mm)							
		AB320 *A. baumannii*	AB321 *A. baumannii*	AB322 *A. baumannii*	AB324 *A. baumannii*	*S. aureus* ATCC® 20475	PB36 *S. aureus*	PB57 *S. aureus*	*E. faecalis* ATCC® 51299
1	bMW1.2_TH	6	7.5	6	6	22	17	19	15
2	bMW8.1_TH	6	6	6	6	19	16	16.5	14
3	bMW16.3_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
4	bMW16.5_TH	6	6	6	6	6	6	6	6
5	bMW27.4_TH	7.5	8	7	6	25	24	22	19
6	bMW49.3_TH	6	6.5	8	6	17	17	16	12
7	bMW56.5_TH	7	6.5	7.5	6	15	16	14	10
8	bMW59.2_TH	8.5	8.5	9	6	18	18	15	17
9	bMW59.5_TH	9	6	8.5	6	12	13	11.5	11
10	bMW90.1_TH	6	6	6	6	16	19	16	13
11	bMW103.2_TH	6	6	6	6	14	17	14	12

ตาราง 20 (ต่อ)

No	Bacteria code	Clear zone (mm)							
		P. aeruginosa ATCC® 27853	PB30 *P. aeruginosa*	*E. coli* ATCC® 35218	PB1 *E. coli*	PB231 *E.coli*	*K. pneumoniae* ATCC® 700603	PB5 *K. pneumoniae*	PB21 *K. pneumoniae*
1	bMW1.2_TH	12	6	6	6	6	6	6	6
2	bMW8.1_TH	11	6	6	6	6	6	6	6
3	bMW16.3_TH	18	6	6	6	6	6	6	6
4	bMW16.5_TH	11	6	6	6	6	6	6	6
5	bMW27.4_TH	6	7	8.5	9	6	6	6	6
6	bMW49.3_TH	8.5	6	6	6	6	6	6	6
7	bMW56.5_TH	6.5	6	6	6	6	6	6	6
8	bMW59.2_TH	10	6.5	6	6	6	6	6	6
9	bMW59.5_TH	10.5	6	6	6	6	7	6	6
10	bMW90.1_TH	7.5	6	6	6	6	6	6	6
11	bMW103.2_TH	6	6	6	6	6	6	6	6

ตาราง 21 ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ผลของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการศึกษาฤทธิ์ของ แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ต่อแบคทีเรียก่อโรคด้วย Crude compound

Bacteria	Antibiotic Disc	Clear Zone (mm)
AB320 *Acinetorbacter baumannii* (XDR)	Tigecycline	13
AB321 *Acinetorbacter baumannii* (MDR)	Tigecycline	18
AB322 *Acinetorbacter baumannii* (MDR)	Tigecycline	19
AB324 *Acinetorbacter baumannii* (XDR)	Tigecycline	13.5
Escherichia coli ATCC® 35218 (β-lactam)	Ceftazidime 30	29
PB1 *Escherichia coli* (ESBL+MDR)	Ceftazidime 30	14.5
PB231 *Escherichia coli* (ESBL+CRE)	Ceftazidime 30	ND
Klebsiella pneumoniae ATCC® 700603 (ESBL)	Ceftazidime/clavulanic acid	21
PB5 *Klebsiella pneumoniae* (ESBL+MDR)	Ceftazidime/clavulanic acid	21
PB21 *Klebsiella pneumoniae* (ESBL+CRE)	Ceftazidime/clavulanic acid	22
Pseudomonas aeruginosa ATCC® 27853	Ceftazidime 30	22
PB30 *Pseudomonas aeruginosa* (MDR)	Ceftazidime 30	21.5
Staphylococcus aureus ATCC® 20475	Vancomycin	19
PB36 *Staphylococcus aureus* (MRSA)	Vancomycin	16.5
PB57 *Staphylococcus aureus* (MRSA)	Vancomycin	17
Enterococcus fecalis ATCC® 51299 (MDR)	Ampicillin	34

หมายเหตุ: MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)

MDR (Multidrug resistant)

CRE (Carbapenem resistant Enterobacteriaceae)

ESBL (Extended-spectrum beta-lactamases)

XDR (Extensively drug resistant)

ND (Not determined

ตาราง 22 สรุปผลจากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย crude compound ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 16 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disc diffusion

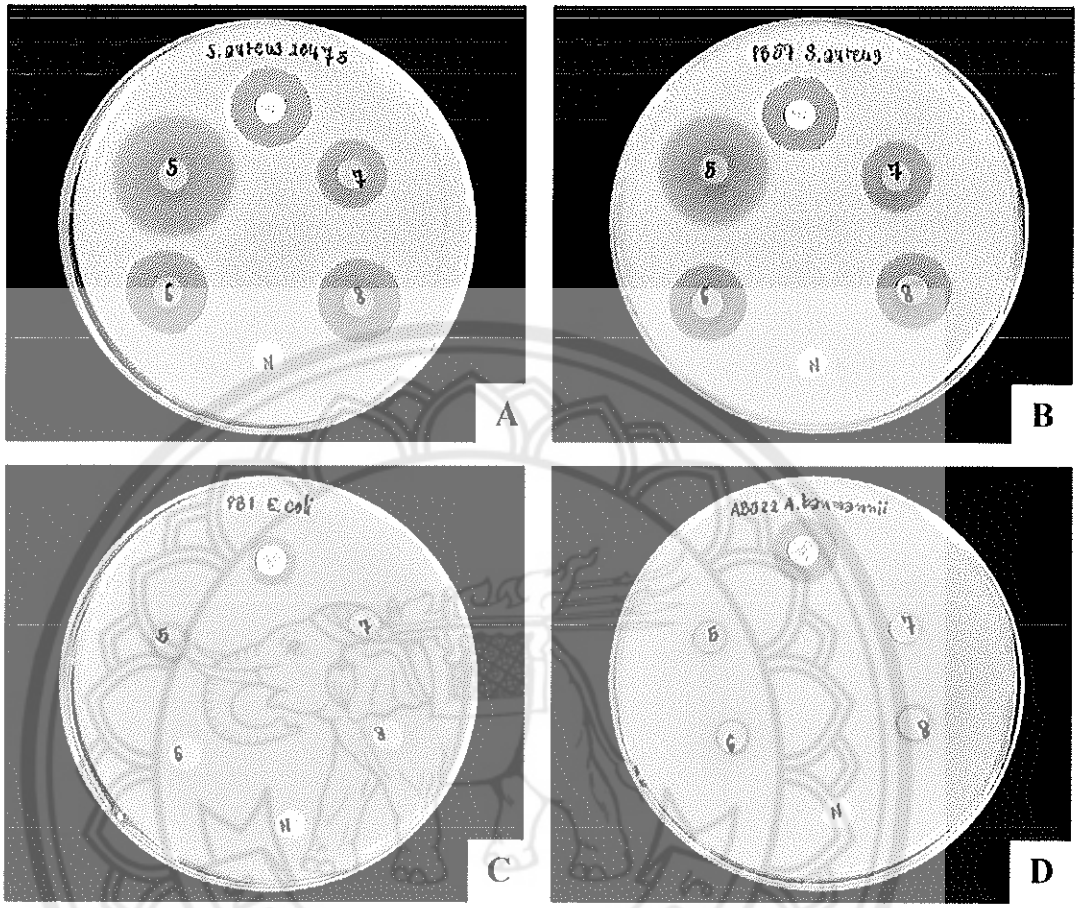
ชนิดของแบคทีเรีย	รหัสแบคทีเรีย	แบคทีเรียก่อโรคที่ถูกยับยั้งการเจริญ
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW1.2_TH	1. AB321 *A. baumannii* 2. *S. aureus* ATCC® 20475 3. PB36 *S. aureus* 4. PB57 *S. aureus* 5. *E. faecalis* ATCC® 51299 6. *P. aeruginosa* ATCC® 27853
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW8.1_TH	1. *S. aureus* ATCC® 20475 2. PB36 *S. aureus* 3. PB57 *S. aureus* 4. *E. faecalis* ATCC® 51299 5. *P. aeruginosa* ATCC® 27853
X. stockiae	bMW16.3_TH และ bMW16.5_TH	1. *P. aeruginosa* ATCC® 27853
P. temperata subsp. *temperata*	bMW27.4_TH	1. AB320 *A. baumannii* 2. AB321 *A. baumannii* 3. AB322 *A. baumannii* 4. *S. aureus* ATCC® 20475 5. PB36 *S. aureus* 6. PB57 *S. aureus* 7. *E. coli* ATCC® 35218 8. PB1 *E. coli* 9. PB30 *P. aeruginosa* 10. *E. faecalis* ATCC® 51299

ตาราง 22 (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	รหัสแบคทีเรีย	แบคทีเรียก่อโรคถูกยับยั้งการเจริญ
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW49.3_TH	1. AB321 *A. baumannii* 2. AB322 *A. baumannii* 3. *S. aureus* ATCC© 20475 4. PB36 *S. aureus* 5. PB57 *S. aureus* 6. *E. faecalis* ATCC© 51299 7. *P. aeruginosa* ATCC© 27853
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW56.5_TH	1. AB320 *A. baumannii* 2. AB321 *A. baumannii* 3. AB322 *A. baumannii* 4. *S. aureus* ATCC© 20475 5. PB36 *S. aureus* 6. PB57 *S. aureus* 7. *P. aeruginosa* ATCC© 27853 8. *E. faecalis* ATCC© 51299
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW59.2_TH	1. AB320 *A. baumannii* 2. AB321 *A. baumannii* 3. AB322 *A. baumannii* 4. *S. aureus* ATCC© 20475 5. PB36 *S. aureus* 6. PB57 *S. aureus* 7. *P. aeruginosa* ATCC© 27853 8. *E. faecalis* ATCC© 51299 9. PB30 *P. aeruginosa*

ตาราง 22 (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	รหัสแบคทีเรีย	แบคทีเรียก่อโรคที่ถูกยับยั้งการเจริญ
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW59.5_TH	1. AB320 *A. baumannii*
		2. AB322 *A. baumannii*
		3. *S. aureus* ATCC® 20475
		4. PB36 *S. aureus*
		5. PB57 *S. aureus*
		6. *P. aeruginosa* ATCC® 27853
		7. *K. pneumoniae* ATCC® 700603
		8. *E. faecalis* ATCC® 51299
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW90.1_TH	1. *S. aureus* ATCC® 20475
		2. PB36 *S. aureus*
		3. PB57 *S. aureus*
		4. *E. faecalis* ATCC® 51299
		5. *P. aeruginosa* ATCC® 27853
P. luminescens subsp. *akhurstii*	bMW103.2_TH	1. *S. aureus* ATCC® 20475
		2. PB36 *S. aureus*
		3. PB57 *S. aureus*
		4. *E. faecalis* ATCC® 51299



ภาพ 24 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย Crude compound แบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* (bMW27.4_TH) (1), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW49.3_TH) (2), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW56.5_TH) (3) และ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW59.2_TH) (4) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ATCC® 20475 (A), PB57 *S. aureus* (B), PB1 *E. coli*(C) และ AB322 *A. baumannii* (D)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) **และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้** (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) **โดยวิธี** Broth micro dilution assay

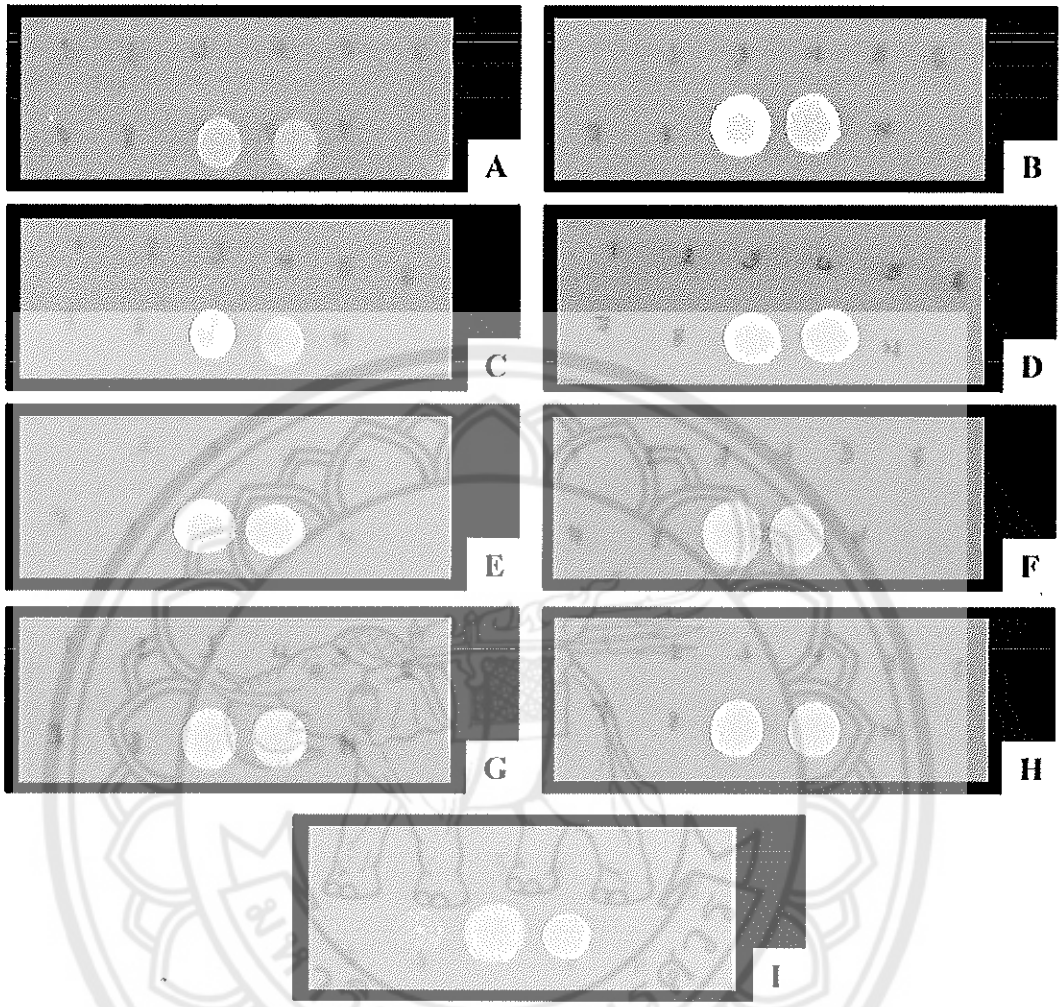
จากการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียได้ โดยใช้ Crude compound ของแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* (bMW27.4_TH) พบว่าค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรีย *S. aureus* จำนวน 3 สายพันธุ์ มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.86 mg/ml ค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC® 35218 มีค่าเท่ากันคือ 1.72 mg/ml และค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรีย PB30 *P. aeruginosa* มีค่าเท่ากับ 1.72 และ 3.44 mg/ml ตามลำดับ

จากการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC® 20475 โดยใช้ Crude compound ของแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* พบว่ามี 4 ไอโซเลต (bMW1.2_TH, bMW8.1_TH, bMW49.3_TH และbMW59.5_TH) มีค่า MIC และ MBC เท่ากัน คือ 1.95 mg/ml แบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* จำนวน 2 ไอโซเลต คือ bMW56.5_TH และ bMW90.1_TH มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 3.90 และ 7.81 mg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีอีก 2 ไอโซเลต (bMW59.2_TH และ bMW103.2_TH) ที่มาค่า MIC เท่ากันคือ 3.90 mg/ml และมีค่า MBC เท่ากับ 7.81 และ 15.62 mg/ml ตามลำดับ

จากการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย PB36 *S. aureus* โดยใช้ Crude compound ของแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* ทุกไอโซเลต (bMW1.2_TH, bMW8.1_TH, bMW49.3_TH, bMW56.5_TH, bMW59.2_TH, bMW59.5_TH bMW90.1_TH และ bMW103.2_TH) มีค่า MIC และ MBC เท่ากัน คือ 1.95 mg/ml นอกจากนี้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย PB57 *S. aureus* โดยใช้ Crude compound ของแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* พบว่ามี 4 ไอโซเลต (bMW1.2_TH, bMW56.5_TH, bMW59.2_TH และ bMW103.2_TH) ที่มีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 3.90 mg/ml *P. luminescens* subsp. *akhurstii* จำนวน 2 ไอโซเลต (bMW8.1_TH และ bMW59.5_TH) มีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 3.12 mg/ml และ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* ไอโซเลต bMW49.3_TH และ bMW90.1_TH มีค่า MIC เท่ากันคือ 1.95 mg/ml และมีค่าค่า MBC เท่ากับ 0.98 และ 3.90 mg/ml ตามลำดับ ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ ดังตาราง 23 ภาพผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ดังภาพ 25

ตาราง 23 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

Bacterial list (Code)	Concentration of inhibition (mg/ml)									
	S. aureus ATCC® 20475		PB36 *S. aureus* (MRSA)		PB57 *S. aureus* (MRSA)		*E. coli* ATCC® 35218		PB30 *P. aeruginosa* (MDR)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
P. luminescens subsp. *akhurstii* (bMW1.2_TH)	1.95	1.95	1.95	1.95	3.90	3.90	-	-	-	-
P. luminescens subsp. *akhurstii* (bMW8.1_TH)	1.95	1.95	1.95	1.95	3.12	3.12	-	-	-	-
P. temperata subsp. *temperata* (bMW27.4_TH)	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	1.72	1.72	1.72	3.44
P. luminescens subsp. *akhurstii* (bMW49.3_TH)	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	0.98	-	-	-	-
P. luminescens subsp. *akhurstii* (bMW56.5_TH)	3.90	3.90	1.95	1.95	3.90	3.90	-	-	-	-
P. luminescens subsp. *akhurstii* (bMW59.2_TH)	3.90	7.81	1.95	1.95	3.90	3.90	-	-	-	-
P. luminescens subsp. *akhurstii* (bMW59.5_TH)	1.95	1.95	1.95	1.95	3.12	3.12	-	-	-	-
P. luminescens subsp. *akhurstii* (bMW90.1_TH)	7.81	7.81	1.95	1.95	1.95	3.90	-	-	-	-
P. luminescens subsp. *akhurstii* (bMW103.2_TH)	3.90	15.62	1.95	1.95	3.90	3.90	-	-	-	-



ภาพ 25 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay ของ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW1.2_TH) (A), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW8.1_TH) (B), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW49.3_TH) (C), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW56.5_TH) (D), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW59.2_TH) (E), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW59.5_TH) (F), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW90.1_TH) (G), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW103.2_TH) (H) และ bMW27.4_TH *P. temperata* subsp. *temperata* (I) ต่อแบคทีเรียก่อโรค PB36 *S. aureus*

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร ประเทศไทย จำนวน 550 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557 ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2558 สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินได้ทั้งสิ้น 24 ไอโซเลต แบ่งเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 3 ไอโซเลต และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 21 ไอโซเลต โดยส่วนใหญ่พบว่าสามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้จากตัวอย่างดินร่วน ที่ช่วงอุณหภูมิ 14-31 องศาเซลเซียส

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสุกล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* ทำโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA และ Internal Transcribed Spacer (ITS) ตามลำดับ และเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLASTN พบว่า สามารถจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* ได้ 2 ชนิด ได้แก่ *S. websteri* (2 ไอโซเลต) และ *S. kushidai* (1 ไอโซเลต) และจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ได้ 3 ชนิด ได้แก่ *H. indica* (7 ไอโซเลต) *H. baujardi* (5 ไอโซเลต) และ *H. zealandica* (1 ไอโซเลต)

จำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน recombinase A (*recA*) และเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLASTN พบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ได้ 2 ชนิด ได้แก่ *X. stockiae* (2 ไอโซเลต) และ *X. japonica* (1 ไอโซเลต) และจำแนกแบคทีเรีย *Photorhabdus* ได้ 2 ชนิด ได้แก่ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (20 ไอโซเลต) และ *P. temperata* subsp. *temperata* (1 ไอโซเลต)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* พบว่าแบคทีเรีย *X. stockiae* ทุกไอโซเลต อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri* และแบคทีเรีย *X. japonica* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. kushidai* สำหรับแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 ชนิด คือ *H. indica* และ *H. baujardi* และแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. zealandica*

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลตและ *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต ต่อแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 16 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าส่วน whole cell suspension ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *Photorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอย่างน้อย 1 สายพันธุ์ จึงนำแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลต มาศึกษาต่อโดยนำไปสกัด Crude compound โดยใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย จากนั้นทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า Crude compound จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* ทุกไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ สำหรับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้เพียงสายพันธุ์เดียว คือ *P. aeruginosa* ATCC® 27853 จากการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ ด้วย Crude compound ของแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (8 ไอโซเลต) พบว่าค่า MIC อยู่ในช่วง 1.95-3.90 mg/ml และค่า MBC อยู่ในช่วง 1.95-15.62 mg/ml นอกจากนี้ Crude compound ของแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* มีค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรีย *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ ต่ำสุดเท่ากับ 0.86 mg/ml มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ATCC® 35218 และ PB30 *P. aeruginosa* ได้เท่ากันคือ 1.72 mg/ml และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย *E. coli* ATCC® 35218 และ PB30 *P. aeruginosa* ได้เท่ากับ 1.72-3.44 mg/ml ตามลำดับ

อภิปรายผล

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร โดยใช้ตัวอ่อนของหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) เป็นเหยื่อล่อ ได้ทั้งหมด จำนวน 24 ไอโซเลต จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA และ Internal Transcribed Spacer (ITS) ตามลำดับ พบว่าสามารถจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri* (2 ไอโซเลต) *H. indica* (7 ไอโซเลต) และ *H. baujardi* (5 ไอโซเลต) สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 3 ชนิด มีรายงานการค้นพบในไทยและทั่วโลกดังนี้ *S. websteri* พบได้ในหลายจังหวัดของประเทศไทย เช่น กาญจนบุรี ขอนแก่น เพชรบูรณ์ นครนายก นครสวรรค์ และอุทัยธานี (Thanwisai et al., 2012, pp. e43835; Vitta, 2015, pp. 564-573) รวมถึงในประเทศจีน โคลอมเบีย เปรู และตุรกี (Cutler, & Stock, 2003, pp. 215-224; López-Núñez et al., 2007, pp. 333-341; Lee et al., 2010, pp. 67-74; Gokce et al., 2015, pp. 167-174) ไส้เดือนฝอยศัตรู

แมลง *H. indica* พบได้ในจังหวัดกาญจนบุรี เพชรบูรณ์ นครนายก และสุพรรณบุรี ของประเทศไทย (Thanwisai et al., 2012, pp. e43835) รวมถึงในประเทศอินเดีย ไอซ์แลนด์ มาเลเซีย ปากีสถาน ศรีลังกา เวียดนาม ออสเตรเลีย และอิสลาเอล (Poinar et al., 1992, pp. 467-472; Constant et al., 1998, pp. 667-672; Mason et al., 1995, pp. 337-345; Shahina et al., 1998, pp. 41-50; Amarasinghe et al., 1994, pp. 277-286; Phan et al., 2003, pp. 367-382; Akhurst et al., 2004, 1301-1310; Lee et al., 2010, pp. 67-74) และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. baujardi* พบได้ในจังหวัดเพชรบูรณ์ และหนองคาย ของประเทศไทย (Thanwisai et al., 2012, pp. e43835; ทัชชา ยิ้มถิน, 2557) รวมถึงในประเทศเวียดนาม และบราซิล (Phan et al., 2003, pp. 367-382; Dolinski et al., 2008, pp. 150-159) นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. kushidai* และ *H. zealandica* ซึ่งเป็นชนิดที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศไทย ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. kushidai* มีรายงานครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น (Kushida et al., 1987, pp. 144-149) และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. zealandica* มีรายงานครั้งแรกที่ประเทศนิวซีแลนด์ (Poinar, 1990, pp. 23-61)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง พบว่าจากการศึกษาครั้งนี้พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในตัวอย่างดินร่วนมากที่สุด (79.17%) รองลงมาเป็นดินร่วนปนทราย (16.67%) และดินทรายน้อยที่สุด (4.16%) แต่ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในตัวอย่างดินเหนียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thanwisai et al. (2012, p. e43835) สำหรับปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความชื้น พบว่าอุณหภูมิที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ที่ 14-31 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิที่ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ที่ 14-31 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมีผลต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Hazir et al. 2003, pp. 181-202) แต่อย่างไรก็ตามอัตราการมีชีวิตรอดขึ้นก็ยังขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธ์ และแหล่งที่พบอีกด้วย (ทัชชา ยิ้มถิน, 2557) ค่าความเป็นกรด-ด่างที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ที่ 6.0-7.0 ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ที่ 5.6-7.1 โดยค่าความเป็นกรดด่างมีผลต่อการอยู่รอด และความสามารถในการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (ชไมพร ฟักรักษา, 2557; ทัชชา ยิ้มถิน, 2557) และค่าความชื้นที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ที่ 1.0-7.5% ในขณะที่ค่าความชื้นที่ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่ที่ 1.0-8.0% โดยค่าความชื้นมีผลต่อการอยู่รอดเนื่องจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ในสภาวะที่มีความชื้นต่ำมาก ๆ (Grant and Villani, 2003, pp. 80-87) ค่าปัจจัยทางกายภาพต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าอุณหภูมิและค่าความชื้นของดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแตกต่างอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติกับอุณหภูมิและค่าความชื้นของดินที่ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และค่าความเป็นกรด-ด่างของดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าความเป็นกรด-ด่างของดินไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* สามารถดูลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง Nutrient bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride agar (NBTA) แบคทีเรีย *Xenorhabdus* มีลักษณะโคโลนีเป็นสีน้ำเงิน ขอบไม่เรียบ แผ่กว้าง และมีลักษณะโค้งนูน ส่วนแบคทีเรีย *Photorhabdus* ลักษณะโคโลนีเป็นสีเขียวขอบเรียบ และมีลักษณะโค้งนูน (Thanwisai et al., 2012, p. e43835) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test) ไม่สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลได้ทุกชนิด ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน recombinase A (*recA*) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลได้ทุกชนิด สามารถจำแนกเป็นแบคทีเรีย *X. stockiae* จำนวน 2 ไอโซเลต *P. luminescens* subsp. *akhurstii* จำนวน 20 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล มีรายงานการค้นพบในประเทศไทยและทั่วโลกดังนี้ *X. stockiae* พบได้ในหลายจังหวัดของประเทศไทย เช่น กาญจนบุรี ขอนแก่น สุพรรณบุรี และเพชรบูรณ์ (Thanwisai et al., 2012, p. e43835; Tailliez et al., 2006, pp. 2805-2818) แบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* พบได้ในจังหวัดกาญจนบุรี เพชรบูรณ์ และสุพรรณบุรี ของประเทศไทย (Thanwisai et al., 2012, p. e43835) รวมถึงในประเทศคิวบา อิสราเอล ออสเตรเลีย (Fischer-Le Saux et al., 1999, pp. 1645-1656) นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบแบคทีเรียอีก 2 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย *X. japonica* และ *P. temperata* subsp. *temperata* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศไทย โดยแบคทีเรีย *X. japonica* มีรายงานครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น (Kushida et al., 1987, pp. 144-149) ส่วนแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* มีรายงานการพบที่ประเทศรัสเซีย เบลเยี่ยม และไอร์แลนด์ (Tailliez et al., 2010, pp. 1921-1937)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ซึ่งอาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพา พบว่าแบคทีเรีย *X. stockiae* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri* ซึ่งต่างจากรายงานของ Tailliez et al. (2006, pp. 2805-2818) ที่กล่าวว่าแบคทีเรีย *X. stockiae* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* แต่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thanwisai et al. (2012, p. e43835) แบคทีเรีย *X. japonica* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. kushidai* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kushida et al. (1987, pp. 144-149) แบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรู

แมลง *H. indica* และ *H. baujardi* สอดคล้องกับงานวิจัยของ Fischer-Le Saux et al. (1999, pp. 1645-1656) และThanwisai et al. (2012, p. e43835) และแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. zealandica* แตกต่างจากรายงานที่ผ่านมาที่พบว่าแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. megidis* (Tailliez et al. 2006, pp. 2805-2818) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเป็นครั้งแรกที่แบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperate* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. zealandica*

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จำนวน 24 ไอโซเลต ต่อแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 16 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าส่วน whole cell suspension ของแบคทีเรีย *X. stockiae* จำนวน 2 ไอโซเลต *P. luminescens* subsp. *akhurstii* จำนวน 8 ไอโซเลต และ *P. temperata* subsp. *temperata* จำนวน 1 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอย่างน้อย 1 สายพันธุ์ สอดคล้องกับงานวิจัยของมนวรรธน์ สุวรรณโรจน์ (2557) ที่กล่าวว่าส่วนของ whole cell suspension ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เนื่องจากเป็นส่วนของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิต โดยแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตสามารถสร้างสาร secondary metabolites ได้ในสภาวะที่ขาดอาหาร หรือมีการแย่งชิงอาหารกับแบคทีเรียอื่น ๆ (Akhurst, 1982, pp.3061-3065) จากนั้นจึงนำแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลต มาศึกษาต่อโดยนำไปสกัด crude compound ด้วย ethyl acetate และทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion อีกครั้ง พบว่า crude compound จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* ทุกไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญต่อ *S. aureus* ATCC® 20475, PB36 *S. aureus* และ PB57 *S. aureus* โดยเฉพาะ *P. temperata* subsp. *temperata* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ถึง 10 สายพันธุ์ ส่วนแบคทีเรีย *Xenorhabdus* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้เพียงสายพันธุ์เดียว คือ *P. aeruginosa* ATCC® 27853 มีรายงานการศึกษาก่อนหน้าของ Inman, & Holmes (2012, pp.708-709) กล่าวว่าสาร metabolite ที่หลั่งออกมาจาก Phase I ของแบคทีเรีย *P. luminescens* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 11 สายพันธุ์ จากแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทั้งสิ้น 28 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus, B. megaterium, B. subtilis, B. subtilis* (Antibiotic-producing strain), *Micrococcus luteus, Moraxella catarrhalis, Neisseria sicca, Neisseria subflava, Sporosarcina ureae, S. epidermidis*, และ *S. simulans* ต่อมาในปี 2014 Fang et al. รายงานว่าแบคทีเรีย *Xenorhabdus* สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นโปรตีนและกลุ่มที่ไม่ใช่โปรตีน รวมทั้งยังได้ศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรีย *X. nematophila* โดยใช้สารสกัดจากเมทานอลในการยับยั้งการเจริญของ *P. capsici* และ *B. cinerea* ซึ่งเป็นเชื้อราที่เป็นปัญหาสำคัญ

ในสินค้าส่งออก เช่น ผัก ผลไม้ ในประเทศจีน โดยพบว่าสารสกัดจากเมทานอลของ *X. nematophila* ให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด จากการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ ด้วย Crude compound ของแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (8 ไอโซเลต) พบว่าค่า MIC อยู่ในช่วง 1.95-3.90 mg/ml และค่า MBC อยู่ในช่วง 1.95-15.62 mg/ml นอกจากนี้ crude compound ของแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* มีค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรีย *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ต่ำสุดเท่ากับ 0.86 mg/ml มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ATCC® 35218 และ PB30 *P. aeruginosa* ได้เท่ากัน คือ 1.72 mg/ml และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย *E. coli* ATCC® 35218 และ PB30 *P. aeruginosa* ได้เท่ากับ 1.72-3.44 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ HU และคณะ (2006) ที่พบว่าแบคทีเรีย *Photorhabdus* สามารถสร้างสารในกลุ่มของ Stilbenes ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิด รวมถึงแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่เป็นสายพันธุ์ดื้อยา นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า 3,5-dihydroxy-4-isopropylstibene ที่แยกได้จาก *P. luminescens* ยังสามารถต้านการเจริญของเชื้อรา และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Phenol oxidase ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของแมลงได้อีกด้วย (Richard et al., 1988, pp.1602-1605; Eleftherianos et al., 2007, pp. 1721-1728)

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ DMSO (dimethyl sulfoxide) เป็นตัวทำละลาย Crude compound ซึ่ง DMSO เป็นสารละลายที่ละลายได้ทั้งสารประกอบที่มีขั้วและไม่มีขั้ว อาจจะทำให้สารบางชนิดไม่ละลายออกมา การใช้น้ำปราศจากเชื้อเป็นตัวทำละลาย Crude compound อาจเป็นอีกวิธีหนึ่งที่อาจทำให้สารประกอบที่มีขั้วละลายออกมาได้ดี ซึ่งสารประกอบนี้อาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้เช่นกัน นอกจากนี้อาจมีการใช้สารละลาย Methanol และ Ethanol เป็นตัวทำละลายเพิ่มเติม ซึ่งคาดว่าสารละลายแต่ละชนิดมีการละลายกลุ่มของสารประกอบได้ต่างกัน อาจทำให้พบสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาในขั้นต่อไปถึงการพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะ เนื่องจากพบว่ามีแบคทีเรียหลายไอโซเลตที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดื้อยาได้ดี ในการศึกษาขั้นต่อไปจะนำแบคทีเรียไอโซเลตที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดื้อยาไปหาสารประกอบบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดื้อยา และหาโครงสร้างของสารประกอบเพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. (2544). ชีววิทยาของไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง *Heterorhabditis* sp. Thai isolate และการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียม. *วารสารข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา, 11*(3), 14-26.

บัญชา ชิณศรี, นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, วัชรี สมสุข และพิมลพร นันทะ. (3-5 กุมภาพันธ์ 2542). อิทธิพลของเนื้อดินและความชื้นต่อการอยู่รอดและการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (All Strain). ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37: สาขาพืช สาขาส่งเสริมนิเทศศาสตร์เกษตร* (หน้า 326-332). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณีจันทร์ เมฆธน. (5-7 กุมภาพันธ์ 2544). ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Entomopathogenic Nematode) สายพันธุ์ใหม่ในประเทศไทย. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39: สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม* (หน้า 189-196). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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. https://doi.org/10.1163/15685411-00002956

Adams, B. J., Burnell, A. M., & Powers, T. O. (1998). A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. *Journal of Nematology, 30*(1), 22-39. Retrieved November 2, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques. *Nucleic Acids Research, 25*(22), 4692-4693. Retrieved November 2, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Akhurst, R. J. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*, *121*, 303-309. Retrieved November 2, 2015, from https://doi.org/10.1099/00221287-121-2-303

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. Retrieved November 12, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

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

Akhurst, R. J., & Boemare, N. E. (1988). A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophillus* to species. *Journal of General Microbiology, 134*(7), 1835-1845. Retrieved November 21, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Akhurst, R. J., & Boemare, N. E. (1990). Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In R. Gaugler, & H.K. Kaya (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (pp. 75-87). Boca Raton, USA: CRC Press.

Akhurst, R. J., Bedding, R. A., Bull, R. M., & Smith, D. R. J. (1992). An epizootic of Heterorhabditis spp. (Heterorhabditidae: Nematoda) in sugar cane scarabaeids (Coleoptera). *Fundamental and Applied Nematology, 15*(1), 71-73. Retrieved November 22, 2015, from http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:36438

Akhurst, R., & Dunphy, G. B. (1993). Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes, and their insect hosts. In N. Beckage, S. Thompson, & B. Federici (Eds.), *Parasites and Pathogens of Insects* (pp. 1-23). New York, NY: Academic Press.

Akhurst, R. J., Boemare, N. E., Janssen, P. H., Peel, M. M., Alfredson, D. A., & Beard, C. E. (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. Retrieved November 12, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Amarasinghe, L. D., Hominick, W. M., Briscoe, B. R., & Reid, A. P. (1994). Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in Sri Lanka. *Journal of Helminthology, 68*, 277-286. Retrieved November 5, 2015, from https://doi.org/10.1017/S0022149X00001498

An, R., & Grewal, P. S. (2010). *Photorhabdus temperata* subsp. *stackebrandtii* subsp. nov. (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *Current Microbiology, 61*(4), 291-297. Retrieved November 21, 2015, from http://doi.org/10.1007%2Fs00284-010-9610-9

An, R., & Grewal, P. S. (2011). *Photorhabdus luminescens* subsp. *kleinii* subsp. nov. (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *Current Microbiology, 62*(2), 539-543. Retrieved November 22, 2015, from http://doi.org/10.1007%2Fs00284-010-9741-z

Andaló, V., Nguyen, K. B., & Moino, A. (2006). *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas Brazil. *Nematology, 8*(6), 853-867. Retrieved November 24, 2015, from http://doi.org/10.1163/156854106779799286

Anis, M., Shahina, F., Reid, A. P., & Rowe, J. (2002). *Steinernema asiaticum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Pakistan. *International Journal of Nematology, 12*(2), 220-231. Retrieved November 23, 2015, from http://www.pjn.com.pk/ images/EPN%20publications/7.pdf

Balcerzak, M. (1991). Comparative studies on parasitism caused by entomogenous nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora.* The roles of the nematode-bacterial complex, and of the associated bacteria alone, in pathogenesis. *Acta Parasitologica Polonica, 36*(4), 175-181.

Bedding, R. A., & Akhurst, R. J. (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematology, 21*(1), 109-116. Retrieved November 2, 2015, from http://doi.org/10.1163/187529275x00419

Bedding, R. A., Akhurst, R. J., & Kaya, H. K. (1993). Future prospects for entomogenous and entomopathogenic nematodes. In R. A. Bedding, R. J. Akhurst & H. K. Kaya (Eds.), *Nematodes and Biological Control of Insect Pests* (pp. 11-20). East Melbourne, Australia: CSIRO Publications.

Bedding, R. A., & Molyneux, A. (1982). Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematology, 28*(3), 354-359. Retrieved November 10, 2015, from http://doi.org/10.1163/187529282x00402

Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Lui, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, J. R., ... Thomas, K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature, 392*, 71-75. Retrieved November 2, 2015, from http://doi.org/10.1038/32160

Boemare, N. E. (2002). Biology, taxonomy and systematics. In R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic Nematology* (pp. 35-56). New York, NY: CABI Publishing.

Boemare, N. and Akhurst, R. J. (1988). Biochemical and physiological characterization of colony from variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *Journal of General Microbiology, 134*, 751-761.

Boemare, N. E., Boyer-Giglio, M. H., Thaler, J. O., Akhurst, R. J., & Brehelin, M. (1992). Lysogeny and bacteriocinogeny in *Xenorhabdus nematophilus* and other *Xenorhabdus* spp. *Applied and Environmental Microbiology, 58*(9), 3032-3037. Retrieved December 2, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Boemare, N., Thaler, J. O., & Lanois, A. (1997). Simple bacteriological tests for phenotypic characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* phase variants. *Symbiosis, 22*(1), 167-175. Retrieved November 20, 2015, from https://www.researchgate.net/publication/283868306_Simple_bacteriological_tests_for_phenotypic_characterization_of_Xenorhabdus_and_Photorhabdus_phase_variants

Brachmann, A. O. (2009). Isolation and identification of natural products and biosynthetic pathways from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* (Doctoral dissertation). Saarbrücken: Saarland University. Retrieved November 12, 2015, from http://scidok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2010/2696/pdf/Dissertation_Alexander_Brachmann_online.pdf

Burman, M. (1982). *Neoaplectana carpocapsae*: Toxin production by axenic insect parasitic nematodes. *Nematology, 28*(1), 62-70. Retrieved November 2, 2015, from http://doi.org/10.1163/18 7529282X00510

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

Capinera, J. L., & Epsky, N. D. (1992). Potential for biological control of soil insects in the Caribbean basin using entomopathogenic nematodes. *Florida Entomologist, 75*(4), 525-532. Retrieved November 12, 2015, from http://doi.org/10.2307/3496134

Chen, S., Li, X., Yan, A., Spiridonov, S. E., & Moens, M. (2006). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema hebeiense* sp n Rhabditida Steinernematidae, from North China. *Nematology, 8*(4), 563-574. Retrieved November 2, 2015, from http://doi.org/10.1163/1568541 06778614056

Ciche, T. A., Blackburn, M., Carney, J. R., & Ensign, J. C. (2003). Photobactin: A catechol siderophore produced by *Photorhabdus luminescens*, an entomopathogen mutually associated with *Heterorhabditis bacteriophora* NC1 nematodes. *Applied and Environmental Microbiology, 69*(8), 4706- 4713. Retrieved March 20, 2017, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Cimen, H., Lee, M. M., Hatting, J., Hazir, S., & Stock, S. P. (2014). *Steinernema tophus* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Zootaxa, 3821*(3), 337-353. Retrieved March 2, 2017, from http://doi.org/10.11646/zootaxa. 3821.3.3.

Cimen, H., Lee, M. M., Hatting, J., Hazir, S., & Stock, S. P. (2015). *Steinernema innovationi* n. sp. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode species from South Africa. *Journal of Helminthology, 89*(4), 415-427. Retrieved March 25, 2017, from http://doi.org/10.1017/S0022149X14000182

Cimen, H., Půža. V., Nermuť, J., Hatting, J., Ramakuwela, T., & Hazir, S. (2016a). *Steinernema biddulphi* n. sp., a New Entomopathogenic Nematode (Nematoda: Steinernematidae) from South Africa. *Journal of nematology, 48*(3), 148-158. Retrieved March 15, 2017, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Çimen, H., Půža. V., Nermuť, J., Hatting, J., Ramakuwela, T., Faktorová, L., & Hazir, S. (2016b). *Steinernema beitlechemi* n. sp., a new entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae) from South Africa. *Nematologica, 18*(4), 439-453. Retrieved March 2, 2017, from http://doi.org/10.1163/15685411-00002968

Clausi, M., Longo, A., Rappazzo, G., Tarasco, E., & Vinciguerra, M. T. (2011). *Steinernema vulcanicum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode species from Sicily (Italy). *Nematology, 13*(4), 409-423. Retrieved December 2, 2015, from http://doi.org/10.1163/138855410X526868

Constant, P., Marchay, L., Fischer-Le Saux, M., Briand-Panoma, S., & Mauleon, H. (1998). Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Guadeloupe Islands. *Fundamental and Applied Nematology, 21*(6), 667-672. Retrieved December 2, 2015, from http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/fan/010017648.pdf

Couche, G. A., & Gregson, R. P. (1987). Protein inclusions produced by the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *nematophilus*. *Journal of Bacteriology, 169*(11), 5279-5288. Retrieved December 2, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Couche, G. A., Lehbach, P. R., Forage, R .G., Cooney, B. C., Smith, D. R, & Gregson, R. P. (1987). Occurrence of intracellular inclusions and plasmids in *Xenorhabdus* spp. *Journal of General Microbiology, 133*, 967-973. Retrieved December 21, 2015, from http://doi.org/ 10.1099/00221287-133-4-967

Cutler, C. G., & Stock, S. P. (2003*). Steinernema websteri* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from China. *Nematologia Mediterranea, 31*(2), 215-224.

Dolinski, C., Kamitami, F., Machado, I. R., & Winter, C. E. (2008). Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memrias do Instituto Oswaldo Cruz, 103*(2), 150-159. Retrieved November 2, 2015, from http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000200005

Doucet, M. M. A., & Doucet, M. E. (1990). *Steinernema ritteri* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) with a key to the species of the genus. *Nematology, 36*(1), 257-265. Retrieved November 2, 2015, from http://doi.org/10.1163/002925990X00257

Doucet, M. M. A., & Gabarra, R. (1994). On the occurrence of *Steinernema glaseri* Steiner, 1929 (Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976. (Heterorhabditidae) in Cotalogue, Spain. *Fundamental and Applied Nematology, 17*(5), 441-443. Retrieved November 2, 2015, from http://horizon.documentation.ird.fr/ exl-doc/pleins_textes/fan/40782.pdf

Doucet, M. M. A., Bertolotti, M. A., & Doucet, M. E. (2003). Morphometric and molecular studies of isolates of *Steinernema rarum* (Doucet, 1986) Mamaya, 1988 (Nematoda: Steinernematidae) from the province of Córdoba, Argentina. *Journal of Nematode Morphology and Systematics, 6*(1), 27-36.

Doucet, M. M. A. (1986). A new species of *Neoaplectana* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) from Cordoba, Argentina. *Revue de Numatologie, 9*(4), 317-323. Retrieved November 14, 2015, from http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_5/pt5/nemato/25483.pdf

Edgington, S., Buddie, A. G., Moore, D., France, A., Merino, L., & Hunt, D. J. (2011). *Heterorhabditis atacamensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from the Atacama Desert, Chile. *Journal of Helminthology, 85*(4), 381-394. Retrieved November 23, 2015, from http://doi.org/10.1017/S0022149X10000702

Edgington, S., Buddie, A. G., Tymo, L. M., France, A., Merino, L., & Hunt, D. J. (2009a). *Steinernema unicornum* sp. n. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Tierra del Fuego, Chile. *Journal of Nematode Morphology and Systematics, 12*(2), 113-131. Retrieved November 10, 2015, from http://revistaselectronicas.ujaen.es/index.php/jnms/article/view/779

Edgington, S., Buddie, A. G., Tymo, L., Hunt, D. J., Nguyen, K. B., France, A. I., ... Loreto M. (2009b). *Steinernema australe* n. sp. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Isla Magdalena, Chile. *Nematology, 11*(5), 699-717. Retrieved November 9, 2015, from http://doi.org/10.1163/156854108X399326

Ehlers, R-U., Deseo, K. V., & Stackebrandt, E. (1991). Identification of *Steinernema* spp. (Nematoda) and their symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. from Italian and German soils. *Nematology, 37*(10), 360-366. Retrieved November 1, 2015, from http://doi.org/10.1163/18752 9291X00358

Elawad, S., Ahmad, W., & Reid, A. P. (1997). *Steinernema abbasi* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from the Sultanate of Oman. *Fundamental and Applied Nematology, 20*(5), 435-442. Retrieved December 2, 2015, from http://horizon.documentation.ird.fr/ exl-doc/pleins_textes/fan/010012335.pdf

Emelianoff, V., Le Brun, N., Pages, S., Stock, P., Tailliez, P., Moulia, C., ... Sicard M. (2008). Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). *Journal of Invertebrate Pathology, 98*(2), 211-217. Retrieved November 7, 2015, from http://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.006

Fang, X., Zhang, M., Tang, Q., Wang, Y., & Zhang, X. (2014). Inhibitory effect of *Xenorhabdus nematophila* TB on plant pathogens *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea* in vitro and in planta. *Scientific Reports, 4*(4300). Retrieved November 5, 2015, from http://doi.org/10.1038/srep04300

Farmer, J. J. 3rd., Jorgensen, J. H., Grimont, P. A., Akhurst, R. J., Poinar, G. O. Jr., Ageron, E., ... Hickman-Brenner F. W.(1989). *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology, 27*(7), 1594-1600. Retrieved November 6, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Fayyaz, S., Khanum, T. A., Ali, S., Solangi, G. S., Gulsher, M., & Javed, S. (2015). *Steinernema balochiense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Pakistan. *Zootaxa, 3904*(3), 387-402. Retrieved November 6, 2015, from http://doi.org/10.11646/zootaxa.3904.3.4

Ferreira, T., Van Reenen, C. A., Endo, A., Spröer, C., Malan, A. P., & Dicks, L. M. T. (2013a). Description of *Xenorhabdus khoisanae* sp. nov., the symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema khoisanae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63*(9), 3220-3224. Retrieved November 12, 2015, from http://doi.org/ 10.1099/ijs.0.049049-0

Ferreira, T., Van Reenen, C., Pages, S., Tailliez, P., Malan, A. P., & Dicks, L. M. T. (2013b). *Photorhabdus luminescens* subsp. *noenieputensis* subsp. nov., a symbiotic bacterium associated with a novel *Heterorhabditis* species related to *Heterorhabditis indica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63*(5), 1853-1858. Retrieved November 8, 2015, from http://doi.org/10.1099/ijs.0.044388-0

Ferreira, T., Van Reenen, C. A., Endo, A., Tailliez, P., Pagès, S., Spröer, C., ... Dicks, L. M. (2014). *Photorhabdus heterorhabditis* sp. nov., a symbiont of the entomopathogenic nematode Heterorhabditis zealandica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64*(5), 1540-1545. Retrieved November 28, 2015, from http://doi.org/1 0.1099/ijs.0. 059840-0

Fischer, P., & Führer, E. (1990). Effect of acidicty on the entomophilic nematode *Steinernema kraussei* Steiner. *Biology and Fertility of Soils, 9*(2), 174-177. Retrieved November 8, 2015, from http://doi.org/10.1007/BF00335803

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 Bacteriology, 49*(4), 1645-1656. Retrieved November 28, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., & Stackebrandt, E. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. Bugsthat Kill Bugs. *Annual Review of Microbiology, 51*, 47-72. Retrieved November 28, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Ganguly, S., & Kumar, S. (2009, 13, February). Description of a new species of *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae: Rhabditida) from Meghalaya. Retrieved December 20, 2014, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/224612058

Ganguly, S., & Singh, L. K. (2000). *Steinernema thermophilum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from India. *International Journal of Nematology, 10*(2), 183-191. Retrieved November 28, 2015, from https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/ 20013117438

Ganguly, S., Rathour, K. S., Kumar, S., & Singh, M. (2011). *Steinernema meghalayensis* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Northeastern Hilly Region of India. *Indian Journal of Nematology, 41*(1), 83-97. Retrieved November 2, 2015, from http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijn&volume=41&issue=1&article=016

Gardner, S. L., Stock, S. P., & Kaya, H. K. (1994). A new species of *Heterorhabditis* from the Hawaiian islands. *Journal of Parasitology, 80*(1), 100-106. Retrieved November 28, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Gaugler, R., & Boush, G. M. (1978). Effects of ultraviolet radiation and sunlight on the nematode *Neoaplectana carpocapsae*. *Journal of Invertebrate Pathology, 32*(3), 291-296. Retrieved November 28, 2015, from http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(78)90191-X

Gaugler, R., Lewis, E., & Stuart, R. J. (1997). Ecology in the service of biological control: The case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia, 109*(4), 483 - 489. Retrieved November 8, 2015, from http://doi.org/10.1007/s004420050108

Gaugler, R. (Ed.). (2002). *Entomopathogenic Nematology*. New York, NY: CABI.

Gerrard, J. G., Joyce, S. A., Clarke, D. J., Ffrench-Constant, R. H., Nimmo, G. R., Looke, D. F. M., ... Waterfield, N. R. (2006). Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*. *Emerging Infectious Diseases, 12*(10), 1562-1564. Retrieved December 28, 2015, from http://doi.org/ 10.3201/eid1210.060464

Gerrard, J. G., Waterfield, N, R., Vohra, R., & Ffrench-Constant, R. H. (2004). Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: An emerging bacterial pathogen. *Microbes and Infection, 6*(2), 229-237. Retrieved November 28, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Gibson, T., Farrugia, D., Barrett, J., Chitwood, D. J., Rowe, J., Subbotin, S., ... Dowton, M. (2011). The mitochondrial genome of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Genome, 54*(7), 565–574. Retrieved November 8, 2015, from http://doi.org/10.1139/G11-024

Glaeser, S. P., Tobias, N. J., Thanwisai, A., Chantratita, N., Bode, H. B., & Kämpfer, P. (2016). *Photorhabdus luminescens* subsp. *namnaonensis* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis baujardi* nematodes in Nam Nao district of central Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Retrieved March 18, 2017, from http://doi.org/10.1099/ijsem.0.001761

Gokce, C., Erbas, Z., Yilmaz, H., Demirbag, Z., & Demir, L. (2015). A new entomopathogenic nematode species from Turkey, *Steinernema websteri* (Rhabditida: Steinernematidae), and its virulence. *Turkish Journal of Biology, 39*(1), 167-174. Retrieved January 12, 2015, from https://www.researchgate. net/publication/273339130_A_new_entomopathogenic_nematode_species_from Turkey_Steinernema_websteri_Rhabditida_Steinernematidae_and_its_virulence

Grant, J. A., & Villani, M. G. (2003). Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. *Environmental Entomology, 32*(1), 80-87. Retrieved November 18, 2015, from https://doi.org/10.1603 /0046-225X-32.1.80

Grewal, P., Ehlers, R-U., & Shapiro-Ilan, D. I. (Eds.). (2005). *Nematodes as Biocontrol Agents*. UK: CABI.

Grewal, P. S., Selvan, S., & Gaugler, R. (1994). Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology, 19*(4), 245-253. Retrieved November 18, 2015, from http://dx.doi.org/10.1016/0306-4565(94)90047-7

Griffin, C. T., Boemare, N. E., & Lewis, E. E. (2005). Biology and behaviour. In P. S. Grewal, R. U. Ehlers, D. Shapiro-Ilan (Eds.), *Nematodes as Biocontrol Agents* (pp. 47-59). Wallingford, UK: CABI.

Griffin, C. T., Chaerani, R., Fallon, D., Reid, A. P., & Downes, M. J. (2000). Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* indica in Indonesia. *Journal of Helminthology, 74*(2), 143-150. Retrieved November 8, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Grimont, P. A. D., Steigerwalt, A. G., Boemare, N., Hickman-Brenner, F. W., Deval, C., Grimom, F., & Brenner, D. J. (1984). Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic study of the genus Xenorhabdus. *International Journal of Systematic Bacteriology, 34*, 378-388. Retrieved November 8, 2015, from http://doi.org/10.1099/00207713-34-4-378

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. Retrieved November 28, 2015, from http://doi.org/10.1021/ np4007525

Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., & Keskin, S. (2003). Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology, 27*, 181-202. Retrieved November 9, 2015, from https://www.researchgate.net/publication/284778693_Entomopathogenic_nematodes_Steinernematidae_and_Heterorhabditidae_for_biological_control_of_soil_pests

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. Retrieved November 2, 2015, from http://doi.org/10.1078/0723-2020-00255

Hazir, S., Stock, S. P., & Keskin, N. (2003). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema anatoliense* n. sp (Rhabditida: Steinernematidae), from Turkey. *Systematic Parasitology, 55*(3), 211-220. Retrieved November 25, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Hazir, S., Stock, S. P., Kaya, H. K., Koppenhöfer, A. M., & Keskin, N. (2001). Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology, 77*(4), 243-250. Retrieved November 25, 2015, from http://doi.org/10.1006/jipa. 2001.5029

Herbert, E. E., & Goodrich-Blair, H. (2007). Friend and foe: The two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nature Reviews Microbiology, 5*(8), 634–646. Retrieved November 15, 2015, from http://doi.org/10.1038/nrmicro1706

Hominick, W. M. (2002). Biogeography. In R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic Nematology* (pp. 115 -143). UK: CABI.

Hominick, W. M., Briscoe, B. R., del Pino, F. G., Heng, J., Hunt, D. J., Kozodoy, E., ... Yoshida, M. (1997). Biosystematics of entomopathogenic nematodes: Current status, protocols and definitions. *Journal of Helminthology, 71*(4), 271-298. Retrieved November 28, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Hominick, W. M., Reid, A. P., Bohan, D. A., & Briscoe, B. R. (1996). Entomopathogenic nematodes: Biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science and Technology, 6*(3), 317- 331. Retrieved November 28, 2015, from http://dx.doi.org/10.1080/09583159631307

Hu, K. J., Li, J. X., Li, B., Webster, J. M., & Chen, G. H. (2006). A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, Photorhabdus luminescens (Enterobacteriaceae). *Bioorganic and Medicinal Chemistry, 14*, 4677- 468. Retrieved November 8, 2015, from http://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.01.025

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. Retrieved November 27, 2015, from http://doi.org/10.3923/ pjbs.2012.997.1000

Iraki, K., Salah, N., Sansour, M. A., Segal, D., Glazer, I., Johnigk, S. A., ... Ehlers, R. U. (2000.) Isolation and characterization of two entomopathogenic nematode strains, *Heterorhabditis indica* (Nematoda, Rhabditida), from the West Bank, Palestinian Territories. *Journal of Applied Entomology, 124*(9-10), 375–380. Retrieved November 9, 2015, from http://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2000.00450.x

Ji, D., Yi. Y, Kang, G. H., Choi, Y. H., Kim, P., Baek, N. I., & Kim, Y. (2004). Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Letters, 239*(2), 241-248. Retrieved November 11, 2015, from http://doi.org/ 10.1016/j.femsle.2004.08.041

Jian, H., Reid, A. P., & Hunt, D. J. (1997). *Steinernema ceratophorum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic from north east China. *Systematic Parasitology, 37*, 115-125. Retrieved November 8, 2015, from http://doi.org/ 10.1023/A:1005798031746

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*. Retrieved January 6, 2017, from http://doi.org/10.1099/ ijsem.0.001770

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. Retrieved November 16, 2015, from http://hdl.handle.net/1854/LU-2977386

Karimi, J., Kharazi-Pakdel, A., Yoshiga, T., Koohi Habibi, M., & Hassani-Kakhki, M. (2011). Characterization of *Xenorhabdus* (γ-Proteobacteria) strains associated bacteria with the *Steinernema* (Nematoda: Steinernematidae) isolates from Iran. *Journal of Entomological Society of Iran, 31*(1), 57-69. Retrieved November 26, 2015, from http://journals.areo.ir/article_105443_86b7b0b219b3163822eb6b9d28bf2689.pdf

Kary, N. E., Niknam, Gh., Griffin, C. T., Mohammadi, S. A., & Mohammadi, M. (2009). A survey of entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the North-West of Iran. *Nematology, 11*(1), 107-116. Retrieved November 26, 2015, from http://doi.org/10.1163/156854108X398453

Kaya, H. K. (1990). Soil ecology. In R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (pp. 93-115). Boca Raton, FL: CRC Press.

Kaya, H. K. (1977). Development of the DD-136 strain of *Neoapleclana carpocapsae* at constant temperatures. *Journal of nematology, 9*(4), 346-349. Retrieved from Retrieved November 26, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Kaya, H. K., & Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology, 38*, 181-206. Retrieved November 6, 2015, from http://doi.org/10.1146/annurev.en.38.010193.001145

Kaya, H. K., & Stock, S. P. (1997). Techniques in insect nematology. In L. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology* (pp. 281-324). San Diego CA: Academic.

Khatri-Chhetri, H. B., Waeyenberge, L., Spiridonov, S., Manandhar, H. K., & Moens, M. (2011a). Two new species of *Steinernema* Travassos, 1927 with short intective juveniles from Nepal. *Russian Journal of Nematology, 19*(1), 53-74. Retrieved November 6, 2015, from https://www.researchgate.net/publication/235969567_Two_new_species_of_Steinemema_Travassos_1927_with_short_infective_juveniles_from_Nepal

Khatri-Chhetri, H. B., Waeyenberge, L., Spiridonov, S., Manandhar, H. K., & Moens, M. (2011b). *Steinernema everestense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from Pakhribas, Dhankuta, Nepal. *Nematology, 13*(4), 443-462. Retrieved November 8, 2015, from http://doi.org/10.1163/138855410X526859

Khatri-Chhetri, H. B., Waeyenberge, L., Spiridonov, S., Manandhar, H. K., & Moens, M. (2011c). *Steinernema lamjungense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from Lamjung district, Nepal. *Nematology, 13*(5), 589-605. Retrieved November 2, 2015, from http://doi.org/10.1163/138855410X533644

Koppenhofer, A. M., Kaya, H. K., & Taormino, S. (1995). Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *Journal of Invertebrate Pathology, 65*(2), 193-199. Retrieved December 26, 2015, from http://dx.doi.org/10.1006/ jipa.1995.1028

Kumar, K. S. V., Vendan, K. T., & Nagaraj, S. B. (2014). Isolation and Characterization of Entomopathogenic Symbiotic Bacterium, *Photorhabdus luminescens* of *Heterorhabditis indica* from Soils of Five Agro Climatic Zones of Karnataka. *Biosciences Biotechnology Research Asia, 11*(1), 129-139. Retrieved from Retrieved November 2, 2015, from http://www.biotech-asia.org/?p=6473

Kung, S. P., Gaugler, R., & Kaya, H. K. (1990). Influence of Soil pH and Oxygen on Persistence of *Steinernema* spp. *Journal of Nematology, 22*(4), 440-445. Retrieved November 6, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Kung, S. P., Gaugler, R., & Kaya, H. K. (1991). Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology, 57*(2), 242-249. Retrieved November 12, 2015, from http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(91)90123-8

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. Retrieved November 8, 2015, from http://doi.org/10.1099/ ijs.0.041145-0

Kuwata, R., Shigematsu, M., Yoshiga, T., Yoshida, M., & Kondo, E. (2006). Phylogenetic analyses of Japanese Steinernematid nematodes and their associating *Xenorhabdus* bacteria. *Japanese Journal of Nematology, 36*(2), 75-85. Retrieved November 2, 2015, from http://doi.org/10.1099/ijs.0.041145-0

Kwon, B., & Kim, Y. (2008). Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of Bacillus thuringiensis against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology. 101*(1), 36-4. Retrieved November 6, 2015, from https://doi.org/ 10.1093 /jee/101.1.36

Lang, G., Kalvelage, T., Peters, A., Wiese, J., & Imhoff, J. F. (2008). Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. *Journal of Natural Products, 71*(6), 1074-1077. Retrieved November 9, 2015, from https://doi.org/10.1021/ np800053n

Lee, M. M., Sicard, M., Skeie, M., & Stock, S. P. (2009). *Steinernema boemarei* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern France. *Systematic Parasitology, 72*(2), 127-141. Retrieved December 26, 2015, from https://doi.org/ 10.1007/s11230-008-9166-2

Lee, M. M., & Stock, S. P. (2010). A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. (Gamma-Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology, 104*, 67-74. Retrieved November 26, 2015, from https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.01.005

Lengyel, K., Lang, E., Fodor, A., Szallas, 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. Retrieved November 2, 2015, from https://doi.org/10.1016/ j.syapm.2004.10.004

Li, J. X., Chen, G. H., Wu, H. M., & Webster, J. M. (1995). Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *Journal of Natural Products, 58*(7), 1081-1086. Retrieved November 18, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Liu, J., & Berry, R. E. (1996a). *Steinernema oregonensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Oregon, USA. *Fundamental and Applied Nematology, 19*(4), 375-380. Retrieved November 26, 2015, from https://www.researchgate.net/publication/32970439_Steinernema_oregonensis_n_sp_Rhabditida_Steinernematidae_from_Oregon_USA

Liu, J., & Berry, R. E. (1996b). *Heterorhabditis marelatus* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Oregon. *Journal of Invertebrate Pathology, 67*(1), 48-54. Retrieved November 26, 2015, from http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1996.0008

Liu, J., Berry, R., Poinar, G., & Moldenke, A. (1997). Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* Species and Strains as Determined by Comparison of Partial 16s rRNA Gene Sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 47*(4), 948-951. Retrieved November 2, 2015, from https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-948

Li, J., Chen, G., & Webster, J. M. (1996). N-(Indol-3-ylethyl)-2'-hydroxy-3'-methylpentanamide, a Novel Indole Derivative from *Xenorhabdus nematophilus*. *Journal of Natural Products, 59*, 1157-1158. Retrieved November 2, 2015, from http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/np960396l

Lloyd, A. T., & Sharp, P. M. (1993). Evolution of the recA gene and the molecular phylogeny of bacteria. *Journal of Molecular Evolution, 37*(4), 399-407. Retrieved November 22, 2015, from https://doi.org/10.1007/BF00178869

López-Núñez, J. C., Cano, L., Gongora-B, C. E., & Stock, S. P. (2007). Diversity and evolutionary relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Central Andean region of Colombia. *Nematology, 9*(3), 333-341. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1163/156854107781351972

López-Núñez, J. C., Plichta, K., Gongora Botero, C. E., & Stock, P. S. (2008). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense* n. sp. Nematoda: Steinernematidae, from Colombia. *Nematology, 10*(4), 561-574. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1163/156854108784513879

Luc, P. V., 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. Retrieved November 12, 2015, from https://www.cabdirect.org/ cabdirect/abstract/20001701413

Ma, J., Chen, S., Clercq, P. D., Han, R., & Moens, M. (2012a). *Steinernema changbaiense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematodes from Northeast China. *Russian Journal of Nematology, 20*(2), 97-112. Retrieved November 2, 2015, from https://www.researchgate.net/publication/235969636_Steinernema_changbaiense_sp_n_Rhabditida_Steinernematidae_a_new_species_of_entomopathogenic_nematode_from_Northeast_China

Ma, J., Chen, S., Clercq, P. D., Waeyenberge, L., Han, R., & Moens, M. (2012b). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema xinbinense* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), from north China, *Nematology, 14*(6), 723-736. Retrieved December 2, 2015, from https://doi.org/10.1163/156854112X627273

Ma, J., Chen, S., Li, X., Han, R., Khatri-Chhetri, H. B., Clercq, P. D., & Moens, M. (2012c). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema tielingense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), from north China. *Nematology, 14*(3), 321-338. Retrieved November 22, 2015, from https://doi.org/10.1163/156854111X594983

Malan, A. P., Knoetze, R., & Tiedt, L. (2014). *Heterorhabditis noenieputensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Journal of Helminthology, 88*(2), 139-151. Retrieved November 23, 2015, from https://doi.org/10.1017/ S0022149X12000806

Malan, A. P., Knoetze, R., & Tiedt, L. (2016). *Steinernema jeffreyense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Journal of Helminthology, 90*(3), 262-268. Retrieved March 22, 2017, from https://doi.org/10.1017/S0022 149X15000097

Malan, A. P., Nguyen, K. B., Waal, J. Y. de., & Tiedt, L. (2008). *Heterorhabditis safricana* n.sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology, 10*, 381-396. Retrieved November 22, 2015, from https://doi.org/10.1163/15685410 8783900258

Mamiya, Y. (1988). *Steinernema kushidai* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) associated with scarabaeid beetle larvae from Shizuoca, Japan. *Applied Entomology and Zoology, 23*(3), 313-320. Retrieved November 23, 2015, from https://doi.org/10.1303/aez.23.313

Maneesakorn, P., Grewal, P. S., & Chandrapatya, A. (2010). *Steinernema minutum* sp. nov. (Rhabditida: Steinernamatidae): A new entomopathogenic nematode from Thailand. *International Journal of Nematology, 20*(1), 27-42. Retrieved November 2, 2015, from https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/ 20103306464

Maneesakorn, P., An, R., daneshvar, H., Taylor, K., Bai, X., Adam, B. J., ... Chandrapatya, A. (2011). Phylogenetic and cophylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditis: Rhabditida) and their symbiotic bacteria (Photorhabdus: Enterobacteriaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution, 59*(2), 271-280. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.02.012

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. Retrieved November 24, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

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. Retrieved November 25, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Molyneux, A. S. (1986). *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. temperature and aspects of behaviour and infectivity. *Experimental Parasitology, 62*(2), 169-180. Retrieved November 21, 2015, from http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894(86)90021-4

Molyneux, A. S., & Bedding, R. A. (1984). Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blow fly *Lucilia cuprina*. *Nematologica, 30*(3), 358-356. Retrieved November 20, 2015, from https://doi.org/ 10.1163/187529284X00266

Mrácek, Z., Hernandez, E. A., & Boemare, N. E. (1994*). Steinernema cubana* sp. (Nematoda Rhabditida: Steinernematidae) and the preliminary characterization of its associated bacterium. *Journal of Invertebrate Pathology, 64*(2), 123-129. Retrieved December 2, 2015, from http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1994.1080

Mrácek, Z., Nguyen, K. B., Tailliez, P., Boemare, N., & Chen, Sh. (2006). *Steinernema sichuanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, East Tibetan Mts., China. *Journal of Invertebrate Pathology, 93*(3), 157-169. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/ 10.1016/j.jip.2006.06.007

Mrácek, Z., Qi-Zhi, L., & Nguyen, K. B. (2009). *Steinernema xueshanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Yunnan, southeast Tibetan Mts., China. *Journal of Invertebrate Pathology, 102*(1), 69-78. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.05.006

Mrácek, Z., Sturhan, D., & Reid, A. (2003). *Steinernema weiseri* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. *Systematic Parasitology, 56*(1), 37-47. Retrieved November 22, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Nasmith, C. G., D. Speranzini, R. Jeng,, & M. Hubbes. (1996). RFLP analysis of PCR-amplified ITS and 26S ribosomal RNA genes of selected entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Journal of Nematology, 28*(1), 15-25. Retrieved November 2, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Nguyen, K. B., & Buss, E. A. (2011). *Steinernema phyllophagae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Florida, USA. *Nematology, 13*(4), 425-442. Retrieved November 24, 2015, from https://doi. org/10.1163/138855410X520927

Nguyen, K. B., & Duncan, L. W. (2002). *Steinernema diaprepese* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) a parasite of the citrus root weevil Diaprepes abbreviatus (L). *Journal of Nematology, 34*(2), 159-170. Retrieved November 21, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Nguyen, K. B., & Smart, G. C. Jr. (1990). *Steinernema scapterisci* n. sp. (Steinernematidae: Nematoda). *Journal of Nematology, 22*(2), 187-199. Retrieved November 12, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Nguyen, K. B., & Smart, G. C. (1992). *Steinernema neocurtillis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) and a key to species of the genus *Steinernema*. *Journal of nematology, 24*, 463-477. Retrieved November 12, 2015, from http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9324332

Nguyen, K. B., & Smart, G. C. Jr. (1996). Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditida). *Journal of Nematology, 28*(3), 286-300. Retrieved November 2, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Nguyen, K. B., Ginarte, C. M, Leite, L. G, Santos, J. M., & Harakava, R. (2010). *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology, 103*(1), 8-20. Retrieved November 22, 2015, from https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.09.004

Nguyen, K. B., Gozel, U., Koppenhöfer, H. S., & Adams, B. J. (2006a). *Heterorhabditis floridensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Florida. *Zootaxa, 1177*, 1-19. Retrieved December 2, 2015, from https://www.researchgate.net/publication/220032938_Heterorhabditis_floridensis_n_sp_Rhabditida_Heterorhabditidae_from_Florida

Nguyen, K. B., Malan, A. P., & Gozel, U. (2006b). *Steinernema khoisanae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology, 8*, 157-175. Retrieved November 26, 2015, from https://doi.org/10.1163/156854106777998728

Nguyen, K. B., Maruniak, J., & Adams, B. J. (2001). Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. *Journal of Nematology, 33*(2-3), 73-82. Retrieved November 25, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Nguyen, K. B., Puza, V., & Mrácek, Z. (2008). *Steinernema cholashanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, Chola Shan Mts., China. *Journal of Invertebrate Pathology, 97*(3), 251-264. Retrieved November 14, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Nguyen, K. B., Qiu, L., Zhou, Y., & Pang, Y. (2006b). *Steinernema leizhouense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China. *Russian Journal of Nematology, 14*(2), 101-118. Retrieved November 2, 2015, from https://www.researchgate.net/publication/287740582_Steinernema_leizhouense_sp_n_Nematoda_Steinernematidae_a_new_entomopathogenic_nematode_from_southern_China

Nguyen, K. B., Shapiro-Ilan, D. I., Stuart, R.J., McCoy, C. W., James, R. R., & Adams, B. J. (2004). *Heterorhabditis mexicana* sp. (Heterorhabditidae: Rhabditida) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. *Nematology, 6*(2), 231-244. Retrieved November 2, 2015, from https://doi.org/10.1163/1568541041218031

Nguyen, K. B., Stuart, R, Andallo, V., Gozel, U., & Roger, M. E. (2007). *Steinernema texanum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode fron Texas, USA. *Nematology, 9*(3), 379-396. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/ 10.1163/156854107781352025

Nguyen, K. B., Tesfamariam, M., Gozel, U., Gaugler, R., & Adams, B. J. (2005). *Steinernema yirgalemense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Ethiopia. *Nematology, 6*(6), 839-856. Retrieved December 20, 2015, from https://doi.org/10.1163/1568541044038605

Nikdel, M., Niknam, G., & Ye, W. (2011). *Steinernema arasbaranense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from arasbaran forests, Iran. *Nematologia Mediterranea, 39*, 17-28. Retrieved November 2, 2015, from http://journals.fcla.edu/nemamedi/article/view/87044

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. Retrieved November 1, 2015, from https://doi.org/10.1007/ BF00360889

Nthenga, I., Knoetze, R., Berry, S., Tiedt, l. R., & Malan, A. P. (2014). *Steinernema sacchari* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology, 16*(4), 475-494. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1163/15685411-00002780

Orozco, R. A., Hill, T., & Stock, S. P. (2013). Characterization and phylogenetic relationships of *Photorhabdus* subsp. *sonorensis* (γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae), the Bacterial symbiont of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis sonorensis* (Nematode: Heterorhabditidae). *Current Microbiology, 61*(1), 291-297. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1007/s00284-012-0220-6

Phan, K. L., Mrácek, Z., Puza, V., Nermut, J., & Jarosova, A. (2014). *Steinernema huense* sp. n., a new entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae) from Vietnam. *Nematology, 16*, 761-775. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1163/15685411-00002806

Phan, K.L., Nguyen, N.C., & Moens, M. (2001a). *Steinernema loci* sp. n. and *Steinernema thanhi* sp n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vietnam. *Nematology, 3*(6), 503-514. Retrieved November 1, 2015, from https://doi.org/10.1163/156854101753389112

Phan, K.L., Nguyen, N.C., & Moens, M. (2001b). *Steinernema sangi* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vietnam. *Russian Journal of Nematology, 9*(1), 1-7. Retrieved November 1, 2015, from https://biblio.ugent.be/publication/169258

Phan, K. L., Spiridonov, S. E., Subbotin, S. A., & Moens, M. (2006a). Four new species of *Steinernema* Travassos, 1928 with short infective juveniles from Vietnam. *Russian Journal of Nematology, 14*(1), 11-29. Retrieved November 12, 2015, from https://www.researchgate.net/publication/235685196_Four_new_species_of_Steinemema_Travassos_1928_with_short_infective_juveniles_from_Vietnam

Phan K. L., Subbotin S. A., Nguyen N. C., & M. Moens. (2003). *Heterorhabditis baujardi* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. *Nematology, 5*(3), 367-382. Retrieved November 22, 2015, from https://doi.org/10.1163/ 156854103769224368

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. Retrieved November 1, 2015, from https://doi.org/10.1007/s11230-004-1373-x

Phan, L. K., Takemoto, S., & Futai, K. (2006b). *Steinernema ashiuense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Japan. *Nematology, 8*(5), 681-690. Retrieved November 1, 2015, from https://doi.org/10.1163/156854106778877901

Pizano, G. A., Agullera, M. M., Monterio, A. R., & Ferroy, L. C. C. B. (1985). Incidente de *Neoaplectana glaeri* Steiner, 1929 Nematoda: Steinernematidae) Parasitan ob ovo de Migdolus frynus (West wood, 1963) Coleoptera: Cerambycidae). *Society of Brisilian Nematology, 1*, 13-15.

Plichta, K. L., Joyce, S. A., Clarke, D., Waterfield, N., & Stock, S. P. (2009). *Heterorhabditis gerrardi* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): The hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: gamma-Proteobacteria). *Journal of Helminthology, 83*(4), 309-320. Retrieved November 2, 2015, from https://doi.org/10.1017/S00221 49X09222942

Poinar, G. O. Jr. (Ed.). (1979). *Nematodes for biological control of insects*. (unpaged). Boca Raton, FL: CRC.

Poinar, G. O. Jr. (1985). *Neoaplectana intermedia* n. sp. (Steinernematidae: Nematoda) from South Carolina. *Revue de Nematology, 8*, 321-327. Retrieved from Retrieved November 12, 2015, from https://www.researchgate.net/publication/32986154_Neoplectana_intermedia_n_sp_Steinernematidae_Nematoda_from_South_Carolina

Poinar, G.O. Jr. (1990). Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, FL: CRC.

Poinar, G. O. Jr. (1990). Biology and Taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae, In R. Gaughler and H. K. Kaya (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (pp. 23-61), Boca Raton, FL: CRC.

Poinar, G. O. Jr., Karunakar, G. K., & David, H. (1992). *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida: Nematoda) from India: Separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. *Fundamental and Applied Nematology, 15*(5), 467-472.

Poinar, G. O. Jr., & Himswok, H. P. T. (1967). *Neoaplectazza* parasitism of larvae of the greated wax moth (*Galleria mellonella*). *Journal of Invertebrate Pathology, 9*, 241-246. Retrieved November 12, 2015, from http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(67)90012-2

Poinar, G. O. Jr., & Thomas, G. M. (1966). Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of thenematode, DD-136. *Parasitology, 56*(2), 385-390. Retrieved November 2, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Poinar, G. O. Jr. & Thomas, G. M. (1990). Taxonomy and biology of steinernematidae and Heterorhabditidae. In R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (pp. 23-61). Boston: CRC.

Poinar, G. O. Jr., Thomas, G. M., & Hess, R. (1976). Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. Fam.). *Nematologica, 21*(4), 463-470. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1163/187529275X00239

Putz, J., Meinert, F., Wyss, U., Ehlers, R. U., & Stackebrandt, E. (1990). Development and application of oligonucleotide probes for molecular identification of *Xenorhabdus* species. *Applied and Environmental Microbiology, 56*(1), 181-186. Retrieved November 12, 2015, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Půža, V., Nermut, J., Mráček, Z., Gengler, S., & Haukeland, S. (2017). *Steinernema pwaniensis* n. sp., a new entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae) from Tanzania. *Journal of helminthology, 91*(1), 20-34. Retrieved December 12, 2015, from https://doi.org/10.1017/S0022149X15001157

Qiu, L., Fang, Y., Zhou, Y., Pang, Y., & Nguyen, K. B. (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), 1-20. Retrieved November 12, 2015, from http://dx.doi.org/10.11646/ zootaxa.704.1.1

Qiu, L., Hu, X., Zhou, Y., Mei, S., Nguyen, K.B., & Pang, Y. (2005). *Steinernema akhursti* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from Yunnan, China. *Journal of Invertebrate Pathology, 90*(3), 151-160. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.09.004

Qiu L., Hu, X., Zhou, Y., Pang, Y., & Nguyen, K. B. (2005a). *Steinernema beddingi* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Yunan, China. *Nematology, 7*(5), 737-749. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1163/156854105 775143026

Qiu, L., Yan, X., Zhou, Y., Nguyen, K.B., & Pang, Y. (2005b). *Steinernema aciari* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Guangdong, China. *Journal of Invertebrate Pathology, 88*(1), 58-69. Retrieved November 12, 2015, from http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2004.09.004

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. Retrieved November 12, 2015, from http://www.mapress.com/zootaxa/2011 /f/zt02767p013.pdf

Rainey, F. A., Ehlers, R. U., & Stackebrandt, E. (1995). Inability of the polyphasic approach to systematics to determine the relatedness of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus. International Journal of Systematic Bacteriology, 45*(2), 379-381. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-379

Reid, A. P., & Hominick, W. M. (1992). Restriction fragment length polymorphisms within the ribosomal DNA repeat unit of British entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *Parasitology, 105*(2), 317-323. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/ 10.1017/S0031182000074242

Román, J., & Figueroa, W. (1994). *Steinernema puertoricensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico, 78*, 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. Retrieved March 12, 2017, from https://doi.org/10.11646/zootaxa.4067.2.5

Shahina, F., Anis, M., Reid, A. P., Rowe, J., & Maqbool, M. A. (2001). *Steinernema pakistanense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Pakistan. *International Journal of Nematology, 11*(1), 124-133. Retrieved November 12, 2015, from https://www.researchgate.net/publication/266174649_Steinernema_pakistanense_sp_N_Rhabditida_Steinernematidae_from_Pakistan

Shahina, F., Anis, M., Zainab, S., & Maqbool, M. A. (1998). Entomopathogenic nematodes in soil samples collected from Sindh. Pakistan. *Pakistan Journal of Nematology, 16*(1), 41-50. Retrieved November 12, 2015, from www.pjn.com.pk/files/vol%2016% 20no.%201/pdf/4.pdf

Shahina, F., Tabassum, K. A., Salma, J., Mehreen, G., Knoetze, R. (2017). Heterorhabditis pakistanense n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae) a new entomopathogenic nematode from Pakistan. *Journal of Helminthology, 91*(2). 222-235. Retrieved March 12, 2017, from https://doi.org/10.1017/ S0022149X16000158

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

Shen, C. P., & Wang, G. H. (1991). Description and study of an entomopathogenic nematode: *Steinernema longicaudum* sp. nov. In Proceedings of the First National Academy Symposium. *Young and Middle Aged Science and Technology Works, Plant Protection* (pp. 220-231). Beijing: Chinese Science and Technology.

Smits, P. H. (1996). Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology, 6*, 379-387. Retrieved November 11, 2015, from http://dx.doi.org/10.1080/ 09583159631352

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*, 519-525. Retrieved November 12, 2015, from http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2006.01.004

Spiridonov, S. E., Krasomil-Osterfeld, K. & Moens, M. (2004). *Steinernema jollieti* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from the American Midwest. *Russian Journal of Nematology, 12*(1), 85-95.

Spiridonov, S. E., & Moens, M. (1999). Two previously unreported species of steinernematids from woodlands in Belgium. *Russian Journal of Nematology, 7*(1), 39-42.

Spiridonov, S. E., Waeyenberge, L., & Moens, M. (2010). *Steinernema schliemanni* sp n. (Steinernematidae; Rhabditida), a new species of Steinernematids of the `monticolum' group from Europe. *Russian Journal of Nematology, 18*(2), 175-190. Retrieved November 12, 2015, from https://biblio.ugent.be/publication/1182559

Stock, S. P. (1993). A new species of the genus *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (Nematoda: Heterorhabditidae) parasitizing *Graphognathus* sp. larvae (Coleoptera: Curculionidae) from Argentina. *Research and Reviews in Parasitology, 53*(3-4), 103-107. Retrieved November 12, 2015, from http://bibliotecavirtual.ranf.com/es/catalogo_imagenes/grupo.cmd?path=1001825

Stock, S. P., & Koppenhofer, A. M. (2003). *Steinernema scarabaei* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a natural pathogen of scarab beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) from New Jersey, USA. *Nematology, 5*(2), 191-204. Retrieved November 2, 2015, from https://doi.org/10.1163/156854103767139680

Stock, S. P., Strong, D. R., & 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), 585-592. Retrieved November 12, 2015, from http://www.documentation.ird.fr/hor/ fdi:010007640

Stock, S. P., Campbell, J. F., & Nadler, S. A. (2001). Phylogeny of *Steinernema* Travassos 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology, 87*(4), 877-889. Retrieved December 12, 2015, from https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0877:POSTCS]2.0.CO;2

Stock, S. P., Choo, H. Y., & Kaya, H. K. (1997). An entomopathogenic nematode *Steinernema monticolum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Korea with a key to other species. *Nematologica, 43*(1), 15-29. Retrieved December 12, 2015, from https://doi.org/10.1163/ 004725997X00025

Stock, S. P., Griffin, C. T., & Burnell, A. M. (2002). Morphological characterisation of three isolates of *Heterorhabditis* Poinar, 1976 from the Irish group (Nematoda: Rhabditida: Heterorhabditidae) and additional evidence supporting their recognition as a distinct species, H. downesi n. sp. *Systematic Parasitology, 51*(2), 95-106. Retrieved December 2, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Stock, S. P., Griffin, C. T., & 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. *Nematology, 6*(3), 401 - 412. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1163/156854 1042360555

Stock, P. S., Pryor, B. M., & Kaya, H. K. (1999). Distribution of entomopathogenic nematodes (Steirnematidae and Heterorhabditidae in natural habitats in California, USA). *Biodiversity and Conservation, 8*(4), 535-549. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/ 10.1023/A:1008827422372

Stock, S. P., Rivera-Orduno, B., & Flores-Lara, Y. (2009). *Heterorhabditis sonorensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae) in natural habitats in California. *Journal of Invertebrate Pathology, 100*, 175-184.

Stock, S. P., Somsook, V., & Reid, A. P. (1998). *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), anentomopathogenic nematode from Thailand. *Systematic Parasitology, 41*(2), 105-113. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1023/A:10 06087017195

Stokwe, N. F., Malan, A. P., Nguyen, K. B., Knoetze, R., & Tiedt, L. (2011). *Steinernema citrae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology, 13*(5), 569-587. Retrieved November 12, 2015, from https://dspace.nwu.ac.za/handle/10394/7752

Stuart, R. J., & Gaugler, R. (1994). Patchiness in populations of entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology, 64*(1), 39-45. Retrieved November 12, 2015, from http://dx.doi.org/ 10.1006/jipa.1994.1066

Sturhan, D., Spiridonov, S. E., & Mrácek Z. (2005). *Steinernema silvaticum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. *Nematology, 7*(2), 227-241. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1163/1568541054879629

Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pages, 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. temperate* 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*, 1921-1937. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1099/ ijs.0.014308-0

Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pages, S., & Boemare, N. (2010). Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved proteincoding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60*, 1921-1937. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1099/ijs.0.014308-0

Tailliez, P., Pages, S., Edgington, S., Tymo, L. M., & Buddie, A. G. (2012). Description of *Xenorhabdus magdalenensis* sp. nov., the symbiotic bacterium associated with *Steinernema austral*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62*, 1761-1765. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1099/ijs.0.034322-0

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. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1099/ijs.0.64287-0

Tallosi, B., & Ehlers, R. (1995). *Steinernema bicornutum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vojvodina, Yugoslavia. *Russian Journal of Nematology, 3*, 71-80.

Tamiru, T., Waeyenberge, L., Hailu, T., Ehlers, R. U., Puza, V., & Mrácek, Z. (2012). *Steinernema ethiopiense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Ethiopia. *Nematology, 14*(6), 741-757. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1163/156854112X627282

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. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1093/molbev/mst197

Tangchitsomkid, N., & Sontirat, S. (1998). Occurrence of Entomopathogenic Nematodes in Thailand. *Kasetsart Journal, Natural Sciences, 32*(3), 347-354. Retrieved November 12, 2015, from https://kasetsartjournal.ku.ac.th/kuj_files/2008/A0804281124113027.pdf

Tarasco, E., Mrácek, Z., Nguyen, K. B., & Triggiani, O. (2008). *Steinernema ichnusae* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Sardinia Island (Italy). *Journal of Invertebrate Pathology, 99*(2), 173-185. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.05.001

Thanwisai, A. (2012). *Isolation of entomopathogenic nematodes and associated Xenorhabdus/Photorhabdus spp. In Thailand* (Doctoral dissertation). Bangkok: Mahidol University.

Thanwisai, A., Tandhavanant, S., Saiprom, N., Waterfield, N. R., Ke Long, P., Bode, H. B., ... Chantratita N. (2012). Diversity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. and their symbiotic entomopathogenic nematodes from Thailand. *Plos One, 7*(9), e43835. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043835

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. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1099/00207713-29-4-352

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. Retrieved November 12, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Tóth, T., & Lakatos, T. (2008). *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis* nematodes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58*, 2579-2581. Retrieved November 12, 2015, from https://doi.org/10.1099/ijs. 0.2008/000273-0

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

Triggiani, O., Mrácek, Z., & Reid, A., (2004). *Steinernema apuliae* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae): a new entomopathogenic nematode from southern Italy. *Zootaxa, 460*(1), 1-12. Retrieved November 24, 2015, from http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.460.1.1

Uribe-Lorío, L., Mora, M., & Stock, S. P. (2007). *Steinernema costaricense* n. sp. and *Steinernema puntauvense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), two new entomopathogenic nematodes from Costa Rica. *Systematic Parasitology, 68*(3), 167-172. Retrieved November 10, 2015, from https://doi.org/10.1007/s11230-007-9098-2

Volgyi, A., Fodor, A., Szentirmai, A., & Forst, S. (1998). Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus. Applied and Environmental Microbiology, 64*(4), 1188-1193. Retrieved November 23, 2015, from https://www.ncbi. nlm.nih.gov

Wallace, H. R. (1958). Movement of eelworms. *Annals of Applied Biology, 46*(1), 74-85. Retrieved November 11, 2015, from https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1958.tb02180.x

Waturu, C. N., Hunt, D.J., & Reid, A. P. (1997). *Steinernema karii* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Kenya. *International Journal of Nematology, 7*, 68-75. Retrieved November 15, 2015, from http://www.cabi.org/isc/abstract/19971701143

Webster, J. M., Chen, G., Hu, K., & Li, J. (2002). Bacterial metabolites. In R. Gaugler (Ed), *Entomopathogenic Nematology* (pp. 99-114). UK: CAB International.

Weiser, J. (1955). *Neoplectana carpocapsae* n. sp. (Anguillulata: Steinernematidae) Novycizopasnik housenik Oválese jableeneho, Carpapsa pomonella L. Vest. Ceskoslov. *Spolecnosti Zoology, 19*, 44-52.

Weissfeld, A. S., Halliday, R. J., Simmons, D. E., Trevino, E. A., Vance, P. H., Caroline, M., ... Harper, J. (2005). *Photorhabdus asymbiotica*, a pathogen emerging on two continents that proves that there is no substitute for a well-trained clinical microbiologist. *Journal of Clinical Microbiology, 43*(8), 4152-4155. Retrieved November 14, 2015, from https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4152-4155.2005

White, G. F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science, 66*(1706), 302-303. Retrieved November 18, 2015, from https://doi.org/10.1126/science.66.1709.302-a

Wouts, W. M., Mrácek, Z., Gerdin, S., & Bedding, R. A. (1982). Neoaplectana Steiner, 1929, a junior synonym of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Rhabditida). *Systematic Parasitology, 4*(2), 147-154. Retrieved November 26, 2015, from https://doi.org/10.1007/ BF00018998

Xu, Z., Wang, G., & Li, X. (1991). A new species of the genus *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae). *Zoological Research, 12*, 17-20. Retrieved November 24, 2015, from http://www.zoores.ac.cn/EN/Y1991/V12/I1/17

Yoshida, M. (2004). *Steinernema litorale* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Japan. *Nematology, 6*(6), 819-838. Retrieved November 28, 2015, from https://doi.org/10.1163/1568541044038650

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. 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 µm) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

2. การเตรียม Luria-Bertani (LB) broth

ส่วนประกอบอาหาร (สำหรับ 1 ลิตร)

Luria-Bertani (LB) broth (Caisson LABS, USA)	25 กรัม

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

3. การเตรียม Tryptone soya agar (TSA)

ส่วนประกอบอาหาร (สำหรับ 1 ลิตร)

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

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

4. 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

5. การเตรียม 10X TBE buffer

ส่วนประกอบ (สำหรับ 1 ลิตร)

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

Boric acid 55 กรัม

EDTA 7.5 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ลิตร จากนั้นจึงค่อยๆ ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ลิตร

6. **การเตรียม อะกาโรสเจล ความเข้มข้ม** 1.2%

ละลายอะกาโรสเจลใน1X TBE buffer โดยใช้ความร้อน ตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล

ภาคผนวก ข Accession number

ตาราง 24 Accession number ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

ลำดับที่	รหัส	ชนิด	Accession number
1	bMW1.2_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436903.1
2	bMW4.4_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436908.1
3	bMW4.5_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436909.1
4	bMW8.1_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436910.1
5	bMW12.3_TH	*X. japonica*	KY404049.1
6	bMW16.3_TH	*X. stockiae*	KY404050.1
7	bMW16.5_TH	*X. stockiae*	KY404051.1
8	bMW27.4_TH	*P. temperata* subsp. *temperata*	KY436905.1
9	bMW29.2_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436906.1
10	bMW29.4_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436907.1
11	bMW38.3_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436914.1
12	bMW49.3_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436915.1
13	bMW49.4_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436916.1
14	bMW54.1_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436917.1
15	bMW56.5_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436919.1
16	bMW59.2_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436920.1
17	bMW59.5_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436921.1
18	bMW74.2_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436923.1
19	bMW86.4_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436918.1
20	bMW89.5_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436922.1
21	bMW90.1_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436904.1
22	bMW103.2_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436911.1
23	bMW107.2_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436912.1
24	bMW107.5_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	KY436913.1

ตาราง 25 Accession number ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis*

ลำดับที่	รหัส	ชนิด	Accession number
1	eMW12.3_TH	*S. kushidai*	KY454617.1
2	eMW16.3_TH	*S. websteri*	KY454618.1
3	eMW16.5_TH	*S. websteri*	KY454619.1
4	eMW27.4_TH	*H. zealandica*	KY471364.1
5	eMW29.2_TH	*H. baujardi*	KY471372.1
6	eMW38.3_TH	*H. indica*	KY471365.1
7	eMW49.3_TH	*H. indica*	KY471366.1
8	eMW49.4_TH	*H. indica*	KY471367.1
9	eMW54.1_TH	*H. indica*	KY471368.1
10	eMW56.5_TH	*H. indica*	KY471369.1
11	eMW59.2_TH	*H. indica*	KY471370.1
12	eMW59.5_TH	*H. indica*	KY471371.1
13	eMW74.2_TH	*H. baujardi*	KY471373.1
14	eMW90.1_TH	*H. baujardi*	KY471374.1
15	eMW103.2_TH	*H. baujardi*	KY471375.1
16	eMW107.5_TH	*H. baujardi*	KY471376.1

ภาคผนวก ค น้ำหนัก crude compound (กรัม)

ตาราง 26 น้ำหนัก crude compound (กรัม) ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *Photorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต

ลำดับ	รหัสแบคทีเรีย	ชนิดของแบคทีเรีย	น้ำหนัก (กรัม)
1	bMW1.2_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.17
2	bMW8.1_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.21
3	bMW16.3_TH	*X. stockiae*	0.23
4	bMW16.5_TH	*X. stockiae*	0.34
5	bMW27.4_TH	*P. temperata* subsp. *temperata*	0.22
6	bMW49.3_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.18
7	bMW56.5_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.20
8	bMW59.2_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.25
9	bMW59.5_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.21
10	bMW90.1_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.17
11	bMW103.2_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.20

ตาราง 27 น้ำหนัก crude compound (กรัม) ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 9 ไอโซเลต สำหรับใช้ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay

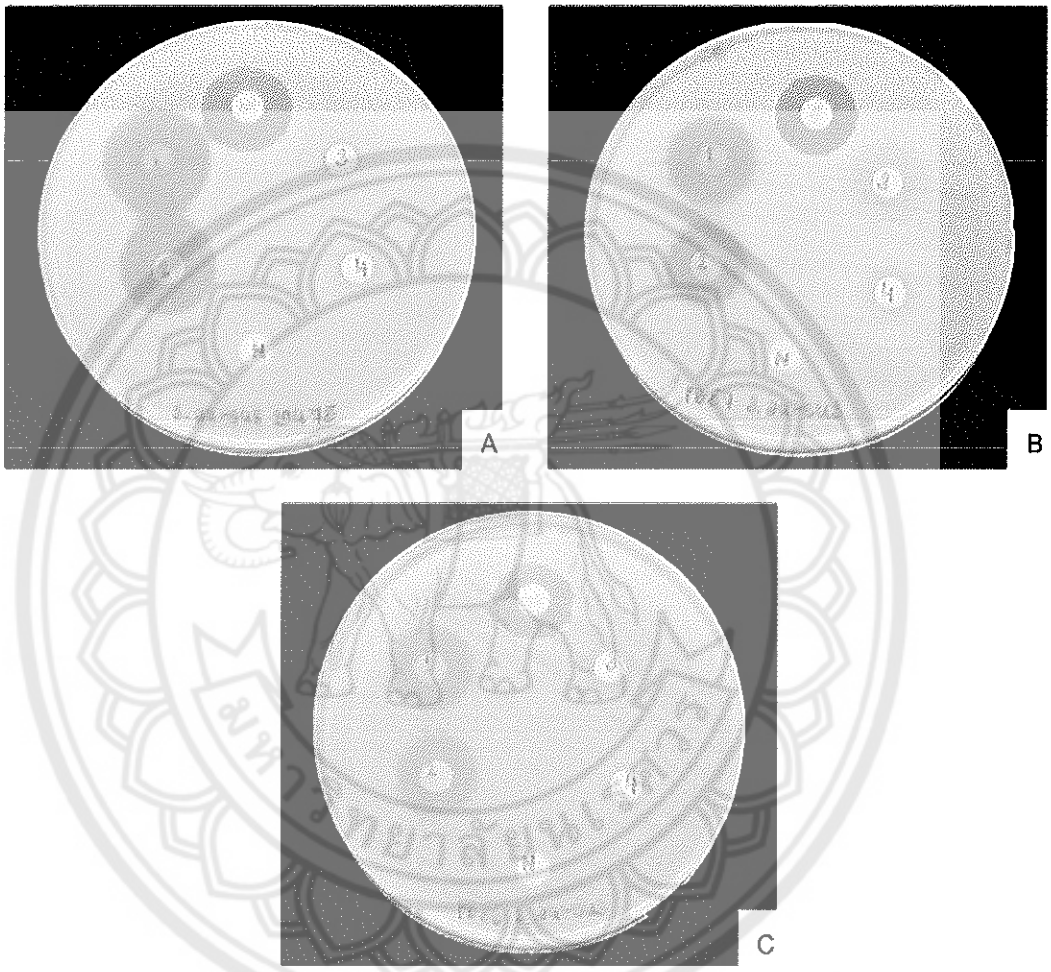
ลำดับ	รหัสแบคทีเรีย	ชนิดของแบคทีเรีย	น้ำหนัก (กรัม)
1	bMW1.2_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.35
2	bMW8.1_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.30
3	bMW27.4_TH	*P. temperata* subsp. *temperata*	0.22
4	bMW49.3_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.44
5	bMW56.5_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.25
6	bMW59.2_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.28
7	bMW59.5_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.30
8	bMW90.1_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.25
9	bMW103.2_TH	*P. luminescens* subsp. *akhurstii*	0.26

ภาคผนวก ง สถานที่เก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

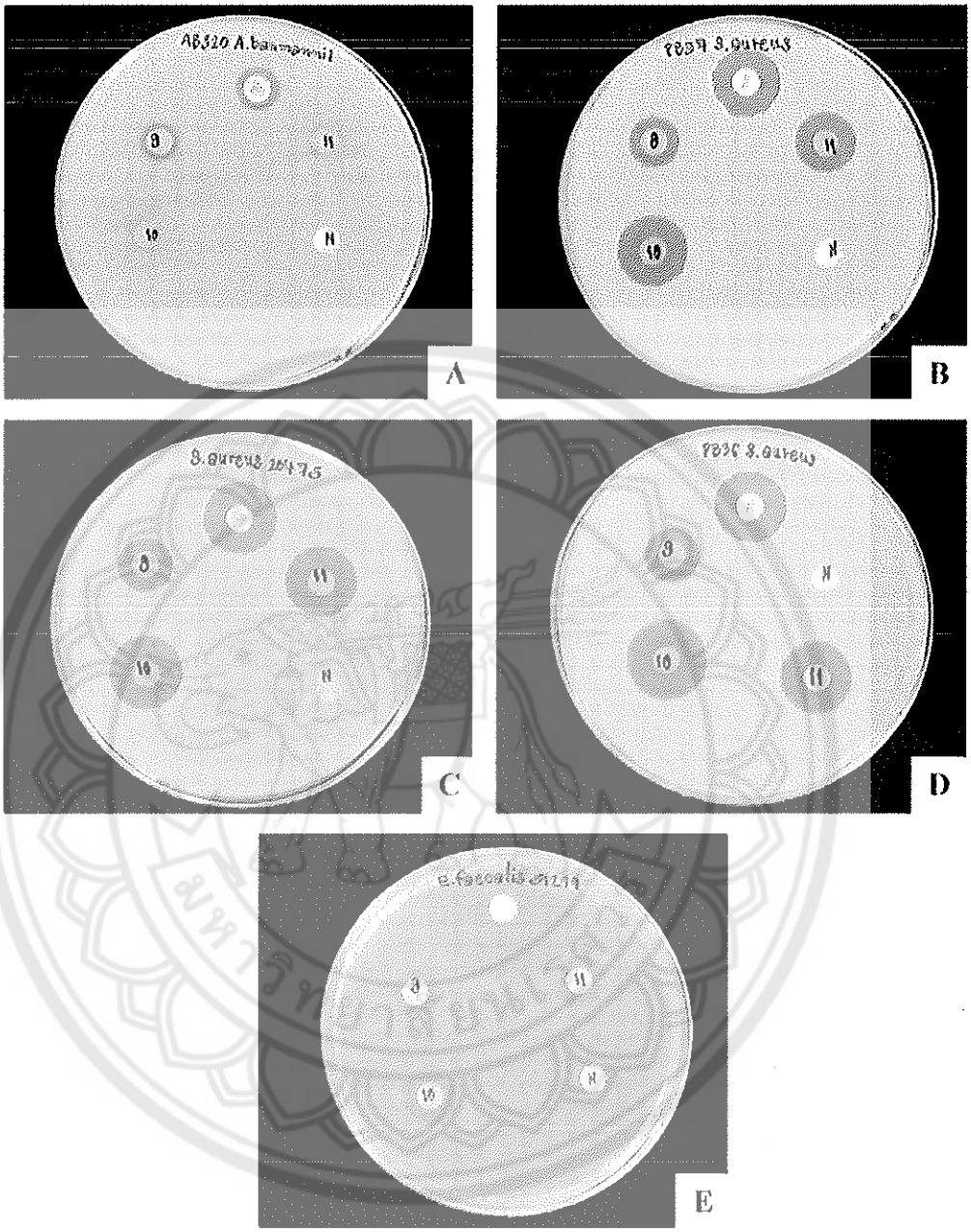
ภาพ 26 การเก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร ตามเส้นทางสำรวจธรรมชาติ (A) (B)

ภาพ 27 การเก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร บริเวณช่องเย็น (A) (B)

ภาคผนวก จ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย crude compound ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Disc diffusion

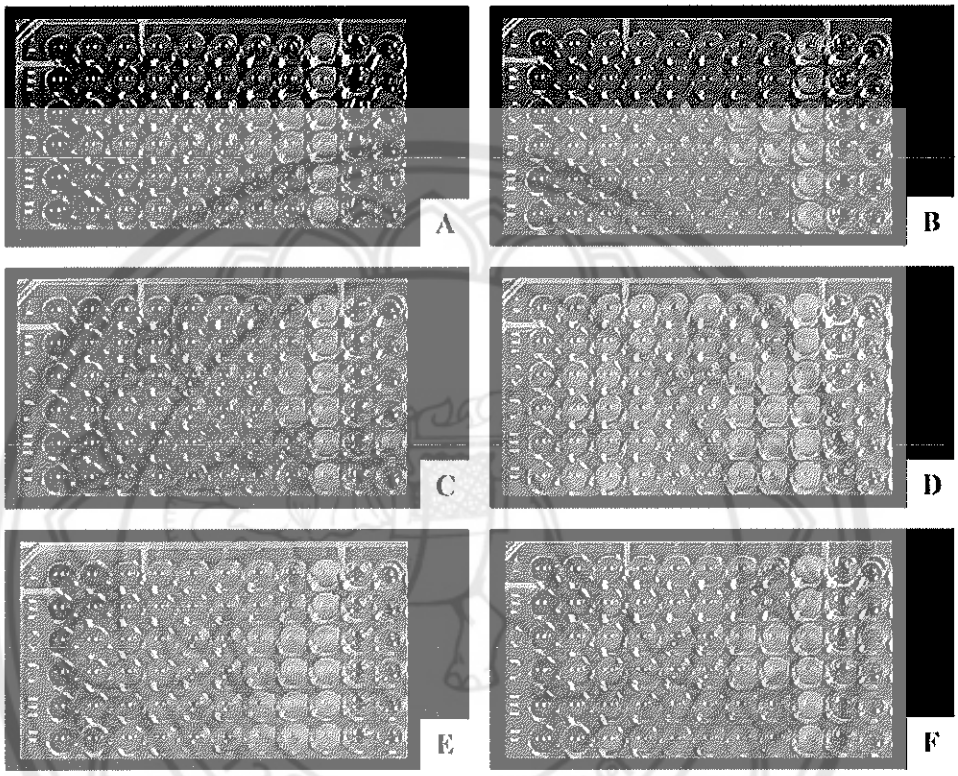


ภาพ 28 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย Crude compound ของแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW1.2_TH) (1), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW8.1_TH) (2), *X. stockiae* (bMW16.3_TH) (3), *X. stockiae* (bMW16.5_TH) (4), Antibiotic disc (P) และ Negative control (N) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ATCC® 20475 (A), PB57 *S. aureus* (B) และ PB36 *S. aureus* (C)

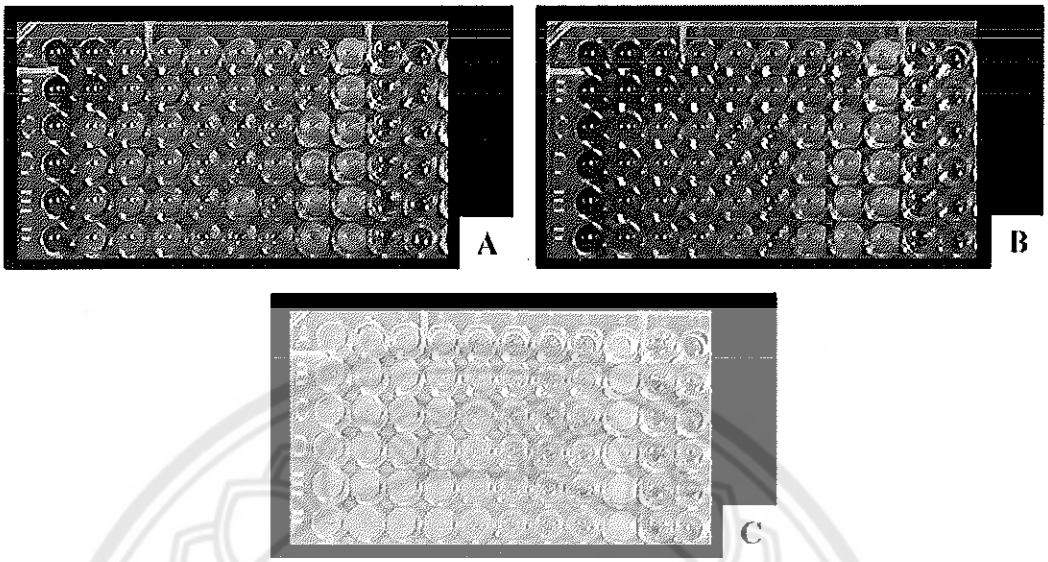


ภาพ 29 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย crude compound ของแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW59.5_TH) (9), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW90.1_TH) (10), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW103.2_TH) (11), Antibiotic disc (P) และ Negative control (N) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค AB320 *A. baumannii* (A), PB57 *S. aureus* (B), *S. aureus* ATCC® 20475 (C), PB36 *S. aureus* (D) และ *E. faecalis* ATCC® 51299 (E)

ภาคผนวก ฉ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี Broth micro dilution assay (2 fold serial dilution) ด้วย crude compound ของแบคทีเรีย *Photorhabdus*

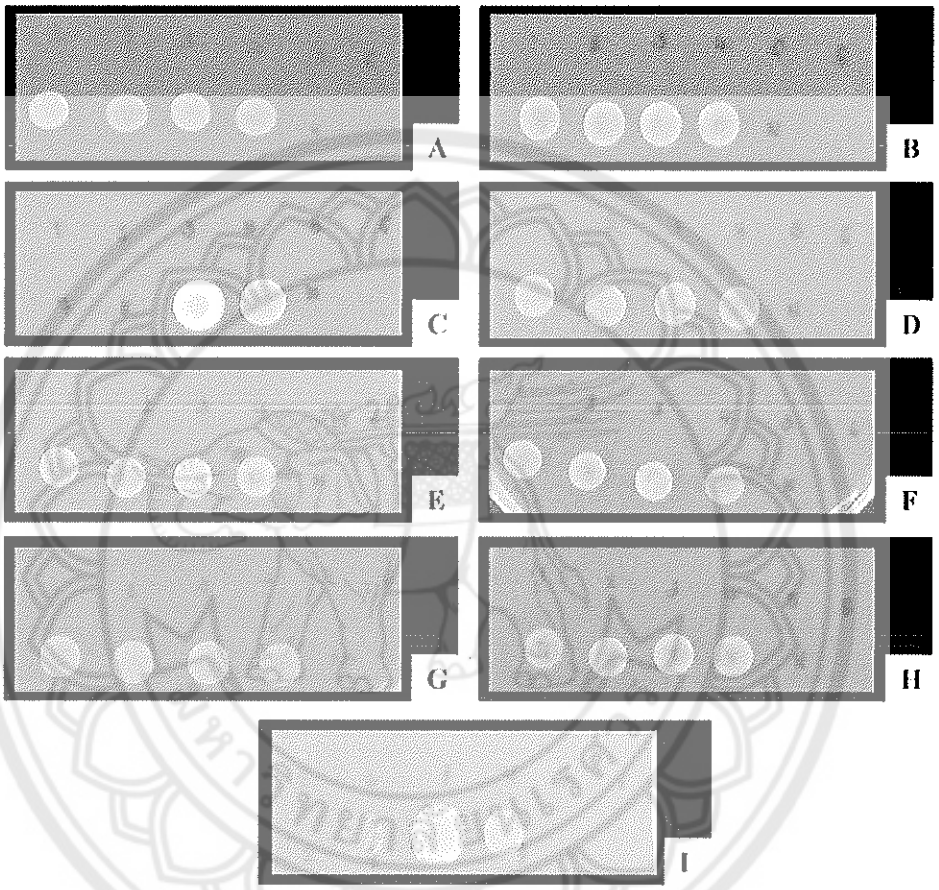


ภาพ 30 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay ของ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW1.2_TH) (A), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW8.1_TH) (B), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW49.3_TH) (C), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW56.5_TH) (D), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW59.2_TH)(E) และ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW59.5_TH) (F) ต่อแบคทีเรียดื้อยา PB36 *S. aureus* (แถว A และ B), PB57 *S. aureus* (แถว C และ D) และ *S. aureus* ATCC® 20475 (แถว E และ F) โดยหลุมที่ 9 คือ Positive control; อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MHB และเชื้อก่อ โรค หลุมที่ 10 คือ DMSO control; ใส่ DMSO (Dimethyl sulfoxide) แทน crude compound จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* และหลุมที่ 11 คือ Negative control; อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MHB เพียงอย่างเดียว

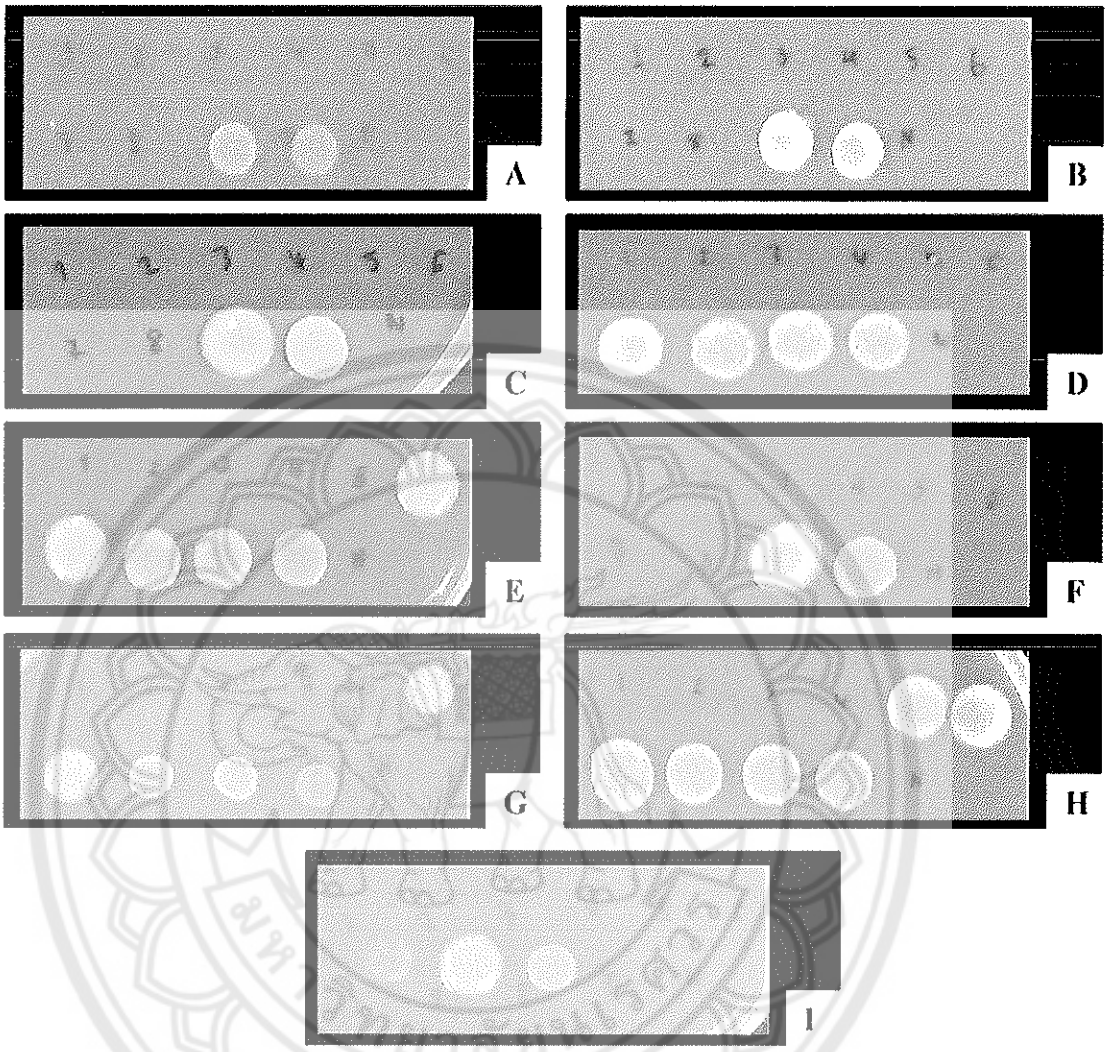


ภาพ 31 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay ของ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW90.1_TH) (A), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW103.2_TH) (B) และ *P. temperata* subsp. *temperata* (bMW27.4_TH) (C) ต่อแบคทีเรียดื้อยา PB36 *S. aureus* (แถว A และ B), PB57 *S. aureus* (แถว C และ D) และ *S. aureus* ATCC® 20475 (แถว E และ F) โดยหลุมที่ 9 คือ Positive control; อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MHB และเชื้อก่อโรค หลุมที่ 10 คือ DMSO control; ใส่ DMSO (Dimethyl sulfoxide) แทน crude compound จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* และหลุมที่ 11 คือ Negative control; อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MHB เพียงอย่างเดียว

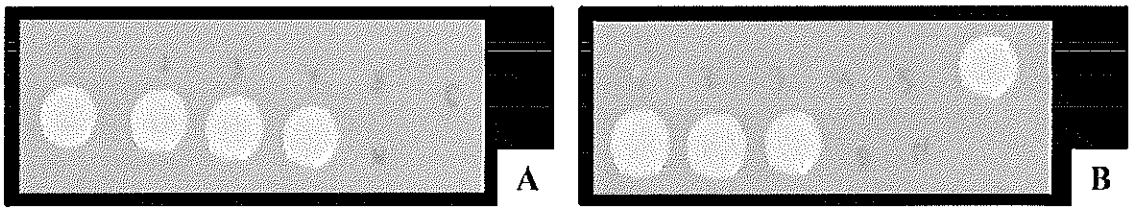
ภาคผนวก ช ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay (2 fold serial dilution) ด้วย crude compound ของแบคทีเรีย *Photorhabdus*



ภาพ 32 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay ของ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW1.2_TH) (A), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW8.1_TH) (B), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW49.3_TH) (C), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW56.5_TH) (D), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW59.2_TH) (E), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW 59.5_TH) (F), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW90.1_TH) (G), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW103.2_TH) (H) และ *P. temperata* subsp. *temperata* (bMW27.4_TH) (I) ต่อแบคทีเรียก่อโรค PB57 *S. aureus*



ภาพ 33 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth micro dilution assay ของ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW1.2_TH) (A), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW8.1_TH) (B), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW49.3_TH) (C), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW56.5_TH) (D), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW59.2_TH) (E), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW59.5_TH) (F), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW90.1_TH) (G), *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (bMW103.2_TH) (H) และ *P. temperata* subsp. *temperata* (bMW27.4_TH) (I) ต่อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ATCC® 20475



ภาพ 34 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) **โดยวิธี** Broth micro dilution assay **ของ** *P. temperata* subsp. *temperata* (bMW27.4_TH) **ต่อแบคทีเรียก่อโรค** *E. coli* ATCC® 35218 (A) และ PB30 *P. aeruginosa* (B)