

รายงานการวิจัย

เรื่อง

แอกติโนมัยซีทที่ส่งเสริมการเจริญของพืชและลักษณะทางอนุกรมวิธานของ
เชื้อเหล่านั้น

Plant growth promoting actinomycetes and their taxonomic position



ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2553

คณะวิทยาศาสตร์

RCH
OR
๘๒
A๓5

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สงขมญ..... ๑ 419๑ ๒๐-1

เลขทะเบียน..... 115555

เอกสารเป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ ๒๕๕๓

วัน,เดือน,ปี..... ๒๕๕๓

b. 12313105

ไม่วารณิตยงตงสึน อึกทงห้มมึให้ดัดแปลงเนื้อหา และตองอ้งอึงถึงเจ้าของเอกสารทุกคร้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร. จิตติ ท่าวัว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	แอคติโนมัยซีทที่ส่งเสริมการเจริญของพืชและลักษณะทางอนุกรมวิธานของเชื้อเหล่านั้น
(ภาษาอังกฤษ)	Plant growth promoting actinomycetes and their taxonomic position
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปี 2553	จำนวนเงิน 60,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี	เดือนตุลาคม 2552 ถึง กันยายน 2553
ผู้ดำเนินการวิจัย	ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว
โทรศัพท์	สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ 02-3298400 ต่อ 235

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน 50 ไอโซเลต แยกจากดินบริเวณแปลงเพาะปลูกพืช ในเขตจังหวัดราชบุรี เชื้อแอคติโนมัยซีทเหล่านี้สามารถถูกจัดกลุ่มโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี รวมทั้งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เป็น 5 กลุ่ม เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 1 สร้างเส้นใยอากาศสีชมพูอมขาว สร้างสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 2 สร้างเส้นใยอากาศสีเทาดำ สร้างสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 3 สร้างเส้นใยอากาศสีเขียวอมเทา (greenish gray) เส้นใยอาหารสี เขียวอมเทา (light greenish gray) ไม่มีการสร้างรงควัตถุและลักษณะของสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 4 สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำเงินอ่อน (pale blue) เส้นใยอาหารสีเขียวยอ่อน (pale green) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบมีการสร้างสปอร์แบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 5 ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร โดยตรง ได้คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีมาทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในช่วง 16S rRNA gene พบว่าเชื้อไอโซเลต PT1-14 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces parvulus* DSM 40048^T มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.7 จากการศึกษาครั้งนี้ พบเชื้อที่แสดงกิจกรรมยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบจำนวน 43 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 86 โดยเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PT1-14 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างมีนัยสำคัญ การทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติก ทำโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ในกรดเปอร์คลอริก การย่อยสลายฟอสเฟตและการสร้างสารซีเดอโรฟอร์ททดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง Yeast extract-Malt extract ที่เติมแคลเซียมฟอสเฟต ร้อยละ 15 และบนอาหารแข็ง chromo azulol S ตามลำดับ ผลที่ได้พบว่ามีเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ 20 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 40 เชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติย่อยสลายฟอสเฟต 13 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 26 และที่สามารถผลิตสารซีเดอโรฟอร์ทได้ 33 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 66 การใช้ประโยชน์จากเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชที่แยกได้ในครั้งนี้ยังมีศักยภาพ ต้องการการศึกษาต่อไปเพื่อนำไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้

Abstract

Fifty actinomycete isolates were isolated from cultivated field soils in Ratchaburi province, Thailand. These isolates could be grouped by morphological, physiological, biochemical characteristics including the antimicrobial activity into five groups. The actinomycetes in group I produced pinkish white aerial mycelia that usually bear long chain of spores in spiral type. Group II produced grayish black aerial mycelia that usually bear long chain of spores in spiral type. Group III produced greenish grey aerial mycelia that usually bear long chain of spores in spiral type. Group IV produced pale blue aerial mycelia with spiral chain of spores. Group V could not produce the aerial mycelia. This group produced single spore directly on orange substrate mycelia. The selected antibiotic-producing actinomycete, isolate PT1-14 was identified into the genus level by using 16S rDNA sequence-based phylogenetic analyses. The results showed that the actinomycete isolate PT1-14 formed a clade with *Streptomyces parvulus* DSM 40048^T at similarity percentage of 99.7.

In this study, forty three actinomycete isolates (86%) exhibited the antimicrobial activities. The isolate PT1-14 showed the significant ability to inhibit the growth of the test microorganisms. Indole-3-acetic acid (IAA) production was assayed by colorimetrically using ferric chloride-perchloric acid reagent. Phosphate-solubilization and siderophore production were tested qualitatively by plating the actinomycete strain in yeast extract-malt extract agar supplemented with 15% calcium phosphate and chrome azulol S agar, respectively. The results showed that twenty isolates (40%) could produce IAA. The ability to solubilize precipitated

phosphate was positively exhibited by thirteen isolates (26%). Thirty three isolates (66%) positively could produce siderophore. Potential use to these plant growth promoting actinomycete isolates need further study in enhancing plant growth.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย	7
3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ	7
3.1.1 การเก็บตัวอย่าง	7
3.1.2 การแยกเชื้อ	7
3.1.3 การเก็บรักษาเชื้อที่บริสุทธิ์	7
3.1.4 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น	7
3.1.4.1 การคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์	7
3.1.4.2 การคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารซีเตโรฟออร์	8
3.1.4.3 การคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการสลายสารประกอบฟอสเฟต	8
3.1.4.4 การคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการสร้างกรดอิน โดลอะเซติก	8
3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อ	8
3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี	8
3.2.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ	9
3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	10
4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ	10
4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยซีท	10
4.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PT1-14	24
4.4 ผลการศึกษาการสร้างสารออกซินธรรมชาติ	25
4.5 ผลการศึกษาการสร้างสารซิคโคโรพอร์	25
4.6 ผลการศึกษาการย่อยสลายพอลิเฟต	26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง	32



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีท	6
2	แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้แต่ละไอโซเลต	10
3	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP 2	16
4	แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท	19
5	แสดงผลรูปคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อแอคติโนมัยซีท	27



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	แสดงเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PT1-1	11
2	แสดงเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PT3-6	12
3	แสดงเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PT1-14	13
4	แสดงเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PT2-4	14
5	แสดงเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PT3-9	15
6	แสดงลักษณะตำแหน่งของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PT1-14 บน Phylogenetic trees	24
7	แสดงผลการศึกษาการสร้างสารออกซินธรรมชาติจากเชื้อตัวแทนไอโซเลต PT1-1	25
8	แสดงผลการศึกษาการสร้างสารซีเคอโรฟอรของเชื้อตัวแทนไอโซเลต PT1-14	26
9	แสดงผลการศึกษาการสร้างสารซีเคอโรฟอรของเชื้อตัวแทนไอโซเลต PT2-3	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC = American Type Culture Collection

B. subtilis = *Bacillus subtilis*

C. albicans = *Candida albicans*

CAS = Chrome Azurol S

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

E. coli = *Escherichia coli*

EtOAc = ethyl acetate

IAA = Indole acetic acid

ISP = International *Streptomyces* Project

PT = Photharam

M. luteus = *Micrococcus luteus*

MHA = Mueller-Hinton Agar

nm = nanometer

NSA = Non-*Streptomyces* Actinomycetes

Ps. Aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

RFLP = Restriction fragment length polymorphism

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

TSB = Tryptic soya broth

UV = Ultraviolet

μL = microlitre

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ปัญหาที่ท้าทายและความสำคัญของปัญหา

เกษตรกรรมถือเป็นพื้นฐานสำคัญของประเทศ เนื่องจากประเทศไทยมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ จึงทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ตั้งแต่เกิดการปฏิวัติอุตสาหกรรมในช่วงต้นศตวรรษที่ 20 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในด้านต่างๆ มีการเจริญและพัฒนาเป็นอย่างรวดเร็ว นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบเทคนิคและกลยุทธ์ต่างๆ เพื่อปรับปรุง พัฒนาคุณภาพชีวิตของมนุษย์ให้ดีขึ้น แต่ในการพัฒนานั้นมีทั้งข้อดีและข้อเสียมากมาย เนื่องจากได้มีการใช้เทคโนโลยีที่ไม่ถูกต้อง การขาดการเผยแพร่ความรู้ที่ถูกต้องให้กับผู้ใช้เทคโนโลยีนั้น รวมทั้งมีเรื่องธุรกิจเข้ามาเกี่ยวข้อง จึงทำให้เกิดผลเสียในด้านต่างๆ ตามมามากมาย สิ่งที่เห็นเด่นชัดคือ ผลกระทบด้านเกษตรกรรมและสภาพแวดล้อม ในช่วง 50 ปี ที่ผ่านมาเกษตรกรรมของประเทศถูกคุกคามโดยการใช้เทคโนโลยีที่ไม่ถูกต้อง เช่นการใช้สารเคมีในการเกษตรเกินความจำเป็นส่งผลให้สิ่งมูลฐานของระบบนิเวศทั้งดิน น้ำ อากาศเกิดมลพิษ เลยทำให้ระบบห่วงโซ่อาหารถูกตัดตอนไปมากเนื่องจากความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ลดลงเนื่องจากถูกพิษจากสารเคมีที่ใช้ในการเกษตร ซึ่งในที่สุดก็กลับมาส่งผลกระทบต่อเกษตรกรรมเอง เนื่องจากผลผลิตที่ได้น้อยลงและใช้ต้นทุนในการประกอบเกษตรกรรมมากขึ้น

จากผลกระทบต่างๆ ที่กล่าวมานักวิทยาศาสตร์จึงพยายามหาทางเลือกใหม่เพื่อฟื้นฟูสภาพแวดล้อมทางการเกษตร จึงได้ริเริ่มทำให้เกษตรกรพยายามลดการใช้สารเคมีและหันมาประกอบอาชีพเกษตรกรรมโดยยึดหลักความพอเพียงและเกษตรอินทรีย์มากขึ้น โครงการวิจัยชิ้นนี้เป็นโครงการหนึ่งเพื่อช่วยส่งเสริมให้เกิดการลดใช้สารเคมีทางการเกษตร จึงพยายามค้นหาวิธีทางชีวภาพต่างๆ เพื่อมาลดปัญหาดังกล่าว โดยเห็นว่าจุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในด้านต่างๆ สูง จุลินทรีย์ในดินมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญของพืช เนื่องจากเป็นผู้ย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ได้ดีจึงช่วยเพิ่มความสมบูรณ์แก่ดิน จุลินทรีย์บางพวกสามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่ช่วยกำจัดศัตรูพืช อีกทั้งยังสามารถสร้างสารและเอนไซม์บางชนิดเพื่อช่วยให้พืชดูดซึมธาตุอาหารต่างๆ ในดินดีขึ้น เช่น สามารถผลิตฮอร์โมนพืช (phytohormones) สารซิเดโรฟอร์ (siderophore) ช่วยกระตุ้นกระบวนการตรึงไนโตรเจน และย่อยสลายสารฟอสเฟต เป็นต้น ท่วมกลางกลุ่มของจุลินทรีย์เหล่านี้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทจัดเป็นเชื้อกลุ่มสำคัญที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีและมีการกระจายตัวสูงที่สุดในดิน (Berdy, 2005)

แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือมีไมซีเลียมแตกกิ่งก้าน และสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidiospore หรือ conidia ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม แต่ถ้าสปอร์ที่สร้างมีถุงหุ้มเรียก sporangiospore อยู่ใน sporangium สปอร์ที่สร้างนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทนความร้อนได้ไม่มาก (ขึ้นอยู่กับแต่ละสกุล) แต่ทนความแห้งได้ดีจึงสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน ประโยชน์ของแอสโคไมซีตโน้มัยซีทส์ที่รู้จักกันดีคือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอสโคไมซีตโน้มัยซีทส์ (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอสโคไมซีตโน้มัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอสโคไมซีตโน้มัยซีทส์ทั้งหมด เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น เช่น *Streptoverticillium*, *Kitasatospora*, *Actinomadura*, *Saccharothrix*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Nonomuria*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Amycalotopsis*, *Kibdellosporangium*, *Pseudonocardia*, *Actinosporangium*, *Streptosporangium*, *Spirillospora*, *Planobispora*, *Planomonospora* เป็นต้น (Bérdy, 2005) แอสโคไมซีตโน้มัยซีทส์สามารถพบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป โดยเฉพาะในดินบนบก สิ่งมีชีวิตชนิดนี้ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตด้วยการย่อยสลายซากพืชและสัตว์เพื่อเปลี่ยนเป็นสารอาหารในการดำรงชีพ การสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์กำจัดศัตรูพืชได้ดีจึงเป็นกลยุทธ์หนึ่งที่สำคัญในการส่งเสริมการเจริญของพืช นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อแอสโคไมซีตโน้มัยซีทส์สามารถสร้างสารซีเคโรฟอร် ช่วยตรึงไนโตรเจน และย่อยสลายสารประกอบฟอสเฟตได้เป็นอย่างดีอีกด้วย

ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการวิจัยเพื่อค้นหาเชื้อแอสโคไมซีตโน้มัยซีทส์ที่มีประสิทธิภาพช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดี ตลอดจนศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของเชื้อดังกล่าวเพื่อใช้เป็นข้อมูลและแหล่งทรัพยากร (วัตถุดิบ) ในการศึกษาและพัฒนาการเกษตรอินทรีย์ให้เกิดผลเชิงรูปธรรมอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อแยกแบคทีเรียกลุ่มแอสโคไมซีตจากดินในสภาพธรรมชาติที่สมบูรณ์ และคัดเลือกเชื้อแอสโคไมซีตโน้มัยซีทส์ที่สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดี
- 1.2.2 เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสโคไมซีตโน้มัยซีทส์ที่แยกได้
- 1.2.3 เพื่อตรวจสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชในด้านต่างๆ เช่น การสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ การสร้างฮอร์โมนพืช การผลิตซีเคโรฟอร် การเปลี่ยนสารต่างๆ ในขบวนการตรึงไนโตรเจน และการย่อยสลายสารประกอบฟอสเฟต

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อค้นหาเชื้อแอสโคไมซีตโน้มัยซีทส์ที่มีสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดีและเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อดังกล่าว ตลอดจนตรวจสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชในด้านต่างๆ เช่น การสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคพืช การสร้างฮอร์โมนพืช การผลิตซิเคโรฟอรั การเปลี่ยนสารต่างๆ ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน และการย่อยสลายสารประกอบฟอสเฟตของเชื้อที่แยกได้เหล่านั้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์

อาจค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดีและสามารถคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท เพื่อเก็บไว้เป็นทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตหรือพัฒนาเป็นสารปฏิชีวนะและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์หัวเชื้อสำหรับใช้ทางการเกษตรเพื่อลดปัญหาการใช้สารเคมีเกินควรในอนาคต ตลอดจนทราบข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติด้านต่างๆของเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่คัดเลือกผลิตได้ ซึ่งสามารถนำไปให้หน่วยงานของรัฐและเอกชนที่มีศักยภาพเพื่อพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้ให้เป็นประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป

1.5 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนาทางการเกษตรและวิทยาศาสตร์ สาธารณสุขด้านการค้นคว้าวิจัยสายปฏิชีวนะชนิดใหม่และการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ เพื่อลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรอันเป็นแนวทางหนึ่งเพื่อช่วยลดปัญหามลพิษจากสารเคมีตกค้างและช่วยปรับปรุงคุณภาพชีวิตให้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์แตกกิ่งก้านสาขาและมีลักษณะโคโลนีคล้ายเชื้อราแต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส จึงจัดเป็น prokaryote ผนังเซลล์ประกอบด้วย muramic acid และ diaminopimelic acid ซึ่งต่างจากผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งประกอบไปด้วย chitin และ glucans แอกติโนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินทั่วไป พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ในดินร้อยละ 10-50 คือเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ตามกองปุ๋ยหมักหรือวัตถุเน่าเปื่อย ดินตะกอนใต้น้ำ ใต้ทะเลสาบ ทั้งในดินชั้นบนและดินชั้นล่างหรือแม้แต่ในส่วนลึกของหน้าดิน ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรของแอกติโนมัยซีทส์ ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพของดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน (Goodfellow and Williams, 1983)

แอกติโนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ได้มากมายซึ่งมีประโยชน์ทั้งทางด้านเภสัชกรรม การแพทย์ อุตสาหกรรม และโดยเฉพาะทางเกษตรกรรม เนื่องจากแอกติโนมัยซีทส์มักกระจายตัวอยู่ตามดินที่อุดมสมบูรณ์ จึงมีผู้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าเชื้อกลุ่มนี้อาจสามารถเป็นตัวส่งเสริมการเจริญของพืชได้ จึงได้เกิดการศึกษาประโยชน์ในด้านนี้อย่างกว้างขวางและพบว่ามีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญของพืชจริง โดยเชื้อกลุ่มนี้สามารถสร้างสารบางอย่างเช่น ฮอว์โมนพืช สารซิเคโรพอร์ รวมทั้งสารที่ช่วยในกระบวนการตรึงไนโตรเจน และย่อยสลายสารประกอบฟอสเฟตได้นั่นเอง

การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ในระดับสกุลอาศัยลักษณะทางพีโนไทป์และจีโนไทป์ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (Chemotaxonomic characteristics) (ตารางที่ 1) เช่น Whole-cell sugar, Phospholipid type ตลอดจน diaminopemilic acid type เป็นต้น ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้ออื่นๆ (Holt, 1989) ลักษณะความคล้ายคลึงทาง DNA (DNA-DNA hybridization) และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคในระดับโมเลกุล ได้แก่ การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA และ RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ตลอดจนการนำระบบชีวสารสนเทศ (Bioinformatic) มาเพื่อช่วยตัดสินใจการจำแนกอนุกรมวิธานให้ถูกต้องและแม่นยำขึ้น

ดังที่กล่าวมาข้างต้น โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะค้นหาเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทส์ที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชและเพื่อตรวจสอบลักษณะทางอนุกรมวิธานระดับสกุล ตลอดจนตรวจสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชในด้านต่างๆ ตามที่กล่าวมาข้างต้น ผลการศึกษาวิจัยที่ได้จากโครงการนี้เป็นผลการวิจัยเบื้องต้นที่จะช่วยในการพัฒนาเกษตรอินทรีย์ให้มีการพัฒนาอย่างยั่งยืน และเป็นรูปธรรมต่อไปในอนาคตและถือเป็นการช่วยเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขีดความสามารถหรือทางเลือกของนักวิจัยไทย ในการเรียนรู้การวิจัยเกี่ยวกับการนำทรัพยากร
จุลินทรีย์จากธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์เพื่อช่วยสร้างความแข็งแกร่งด้านการวิจัยของประเทศ
ต่อไป

ปัจจุบันได้มีการรณรงค์ให้เกิดการใช้สารเคมีทางการเกษตรลงเพื่อลดปัญหาสารเคมี
ตกค้างในพืชและสิ่งแวดล้อมอันจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยรวม เกษตรอินทรีย์
เป็นแนวทางลดปัญหาทางหนึ่งและถูกจัดเข้าเป็นนโยบายของแผนการวิจัยระดับชาติลำดับต้นๆ
แนวทางของเกษตรอินทรีย์นั้นเป็นการนำเอาธรรมชาติบำบัดธรรมชาติยังผลให้เกิดความฟื้นตัว
และยั่งยืนของสภาพแวดล้อม การวิจัยเกี่ยวกับเกษตรอินทรีย์จึงเริ่มมีบทบาทมากขึ้นในปัจจุบัน
อาทิเช่นการนำจุลินทรีย์ธรรมชาติที่มีประโยชน์มาใช้ในการเกษตร ทั้งทางด้านส่งเสริม
การเจริญของพืช การควบคุมทางชีวภาพ เป็นต้น

แบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชมักเป็นแบคทีเรียที่มีการดำรงชีพอย่างอิสระใน
ดินและบริเวณรากพืชโดยเป็นตัวช่วยให้เกิดกระบวนการตรึงไนโตรเจนในดิน ช่วยย่อยสลาย
สารประกอบฟอสเฟต และผลิตสารปฏิชีวนะต่างๆ รวมทั้งฮอร์โมนพืช (Verma et al., 2001;
Glick et al., 1997; Duponnois et al., 2000) นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในกระบวนการควบคุมทาง
ชีวภาพได้เป็นอย่างดี (Compant et al., 2005) แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีการวิจัย
เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้สามารถสร้างสาร
ปฏิชีวนะได้ดีที่สุด (Bérdy, 2005) ดังที่แสดงในตารางที่ 1

และเมื่อเร็วๆ นี้ ได้มีการค้นพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชเป็นอีก
แหล่งหนึ่งที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีซึ่งกลไกนี้อาจเป็นกลไกหนึ่งช่วยป้องกันการติด
เชื้อหรือการบุกรุกจากศัตรูพืช (Castillo et al., 2002; Pullen et al., 2002; Webber et al., 1981)
ยกตัวอย่างเช่น พบว่าเชื้อ *Streptomyces* อาจเป็นตัวการหนึ่งช่วยทำให้พืชมีการพัฒนารากและ
ปมรากได้ดี (Ranjcet et al., 2002) เชื้อแอคติโนมัยซีทในเนื้อเยื่อพืชที่แยกได้จากรากต้นข้าวสาลี
สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชโดยการสร้างสารยับยั้งเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* var.
tritici ได้ดี (Coombs et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อในกลุ่ม Non-Streptomycete
Actinomycetes (NSA) เป็นเชื้ออีกกลุ่มหนึ่งที่มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้
ดีและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการควบคุมทางชีวภาพได้ด้วย (Khalet et al., 2006)
เป็นต้น ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนางานวิจัยทางด้านนี้ให้ดียิ่งขึ้นจึงควรเร่งการหาทรัพยากร
จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดีเพื่อเป็นวัตถุดิบในการพัฒนาการ
เกษตรของประเทศในอนาคตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีท

Compounds	Strains	Activity	References
SF 2809	<i>Dactylosporangium</i> sp.	Chymase inhibitor	Tani <i>et al.</i> , 2004
Madurastatins A ₁ , A ₂ , A ₃	<i>Actinomadura madurae</i> IFM 0745	Antibacterial activity	Harada <i>et al.</i> , 2004
Diketopiperazine Sch 725418	<i>Micromonospora</i> sp.	Antimicrobial activity	Yang <i>et al.</i> , 2004
Ansamitocin	<i>Actinosynnema pretiosum</i>	Antibacterial activity	Lu <i>et al.</i> , 2004
IB-0028	<i>Actinomadura</i> sp.	Cytotoxic activity	Malet-Cascon <i>et al.</i> , 2003
Nocathiacin I, II, III	<i>Nocardia</i> sp. WW-12651	Antibacterial activity	Li <i>et al.</i> , 2003
3-O-mycarosylerythronolide B	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Antibacterial activity	Cevallos <i>et al.</i> , 2003
Chandrananimycins A-C	<i>Actinomadura</i> sp.	Antibacterial activity	Rajendra <i>et al.</i> , 2003
Bafilomycin C1	<i>Kitasatospora cheerisanensis</i>	Antibacterial activity	Moon <i>et al.</i> , 2003
R 176502	<i>Micromonospora</i> sp.	Antimicrobial activity	Laakso <i>et al.</i> , 2003
Kosinostatin	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial activity	Furumi <i>et al.</i> , 2002
Hibarimicins	<i>Microbispora</i> sp.	Anticancer activity	Cho <i>et al.</i> , 2002
Propeptin	<i>Microbispora</i> sp.	Prolyl Endopeptidase inhibitor	Esumi <i>et al.</i> , 2002
SB-219383	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial activity	Greenwood <i>et al.</i> , 2002
Isochromanquinone	<i>Micromonospora</i> sp. SA246	Cytotoxic activity	Yeo <i>et al.</i> , 2002
Asterobactin	<i>Nocardia asteroides</i>	Antibacterial activity	Nemoto <i>et al.</i> , 2002
Cetoniaeytone A	<i>Actinomyces</i> sp.	Cytotoxic activity	Schlörke <i>et al.</i> , 2002
Dithiolyrrolone	<i>Saccharorrix</i> sp. SA233	Antimicrobial activity	Lamari <i>et al.</i> , 2002
Fluoroindolocarbazoles	<i>Saccharotrix aerocolonigenes</i>	Antibacterial activity	Lam <i>et al.</i> , 2001
Ammocidin	<i>Saccharorrix</i> sp.	Apoptosis inducer	Murakami <i>et al.</i> , 2001
Paraflavins	<i>Saccharorrix</i> sp.	Antitumor	Vertesy <i>et al.</i> , 2001
Tyropeptins A and B	<i>Kitasatospora</i> sp. MK 993-d12	Proteasome inhibitor	Momose <i>et al.</i> , 2001
Brasilinolide B	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Antifungal	Mikami <i>et al.</i> , 2000
Arisostatin A and B	<i>Micromonospora</i> sp. TP-A0316	Antibacterial activity	Igarashi <i>et al.</i> , 2000
Nocardiones A and B	<i>Nocardia</i> sp. TP-A0248	Tyrosine phosphatase inhibitors	Otani <i>et al.</i> , 2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บ ได้แก่ ดินในสภาพธรรมชาติที่สมบูรณ์ ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการเก็บตัวอย่างประมาณ 5 ตัวอย่าง คาดว่าจะสามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ได้ประมาณ 50 ไอโซเลต และจะทำการคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืชได้เพื่อที่จะนำมาทำการศึกษาต่อไป

การเก็บตัวอย่างดินจะทำการเก็บตัวอย่างดินและตะกอนดินได้ทะเลปริมาณ 500 กรัม และรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงกระบวนการแยกเชื้อ และทำการวัด pH ของดินตามวิธีของ Enokita et al. (1986)

3.1.2 การแยกเชื้อ

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ ทำโดยนำตัวอย่างดินมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและผ่านกระบวนการ physical treatment และ chemical treatment ที่จำเพาะต่อเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ จากนั้นทำการแยกเชื้อทำโดยวิธี Spread plate (Tortora et al., 1995) โดยนำตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเจือจางถึงระดับ 100 และ 1000 เท่า คูดสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ยบนอาหาร humic acid-vitamin agar และ/หรืออาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในแต่ละสกุลซึ่งผสมสารปฏิชีวนะ บ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 21 วัน เลือกเก็บโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละสกุล ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract – Malt extract agar

3.1.3 การเก็บรักษาเชื้อที่บริสุทธิ์

ทำการเก็บรักษาเชื้อในรูปแบบอาหารเยือกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษาด้วยกระบวนการ deep freeze ใน 10% glycerol

3.1.4 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น

3.1.4.1 การคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast extract – malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยวยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสารและแพร่สารนั้นเข้าไปในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ด้วยจุลินทรีย์ทดสอบ

5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยลากจูลินทรีย์ทดสอบให้ซิดและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อมากที่สุด แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจูลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่จูลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้

3.1.4.2 การคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารซิดโรเฟอร์ (Siderophore)

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร Tryptic soya broth (TSB) บนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นนำของเหลวชั้นบน (supernatant) มาหยดลงบนอาหาร Chrome Azurol S (CAS) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารที่เกิดขึ้น

3.1.4.3 การคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการสลายสารประกอบฟอสเฟต

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร Pikoskaya's medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน สังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีเชื้อ

3.1.4.4 การคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการสร้างกรดอินโดลอะเซติก (IAA)

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร Tryptic soya broth (TSB) ที่มีการเติมกรดอะมิโนทริปโตแฟนปริมาณ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นนำของเหลวชั้นบน (supernatant) มาทดสอบด้วย Salkowski reagent สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารที่เกิดขึ้น

3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อ

3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (ISP) ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shirling and Gottlieb, 1966) ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจสอบลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี จะทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975) การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง และการใช้แหล่งคาร์บอน (Shirling and Gottlieb, 1966) จากการศึกษานี้จะสามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

ทำการคัดเลือกเชื้อที่แสดงคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่ดีที่สุดมา การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene โดยนำ DNA ที่แยกได้ (Tamaoka, 1994) มาเพิ่มปริมาณ DNA ในช่วง 16S rDNA โดยใช้ Universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) 16S rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการเปรียบเทียบ และ alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank/EMBL/DDBJ โดยใช้ BLAST n program และ alignment software (ในกรณีนี้ใช้ CLUSTAL W program package) จัดลงข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ใน MEGA software program version 2.1 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์

นำน้ำหมักเชื้อของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธี agar diffusion (Lorian, 1980) วิธีการทดสอบมีขั้นตอนดังนี้ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้ปั่นสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำ disc ที่หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 μ l/disc ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำ disc control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณแหล่งเพาะปลูกในเขตจังหวัดราชบุรี มาทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท พบว่าสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลต จากดินตัวอย่างที่มีระดับความเป็นกรด-ด่างในช่วง 6.2-7.3 ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้แต่ละไอโซเลต

ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัด	พีเอช	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ดินแหล่งเพาะปลูก	ราชบุรี	7.3	PT1	PT1-1, PT1-2, PT1-3, PT1-4, PT1-5, PT1-6, PT1-7, PT1-8, PT1-9, PT1-10, PT1-11, PT1-12, PT1-13, PT1-14, PT1-15, PT1-16, PT1-17, PT1-18, PT1-19, PT1-20, PT1-21, PT1-22, PT1-23, PT1-24
ดินแหล่งเพาะปลูก	ราชบุรี	6.2	PT2	PT2-1, PT2-2, PT2-3, PT2-4, PT2-5, PT2-6, PT2-7, PT2-8, PT2-9, PT2-10, PT2-11, PT2-12, PT2-13, PT2-14, PT2-15, PT2-16
ดินแหล่งเพาะปลูก	ราชบุรี	6.8	PT3	PT3-1, PT3-2, PT3-3, PT3-4, PT3-5, PT3-6, PT3-7, PT3-8, PT3-9, PT3-10

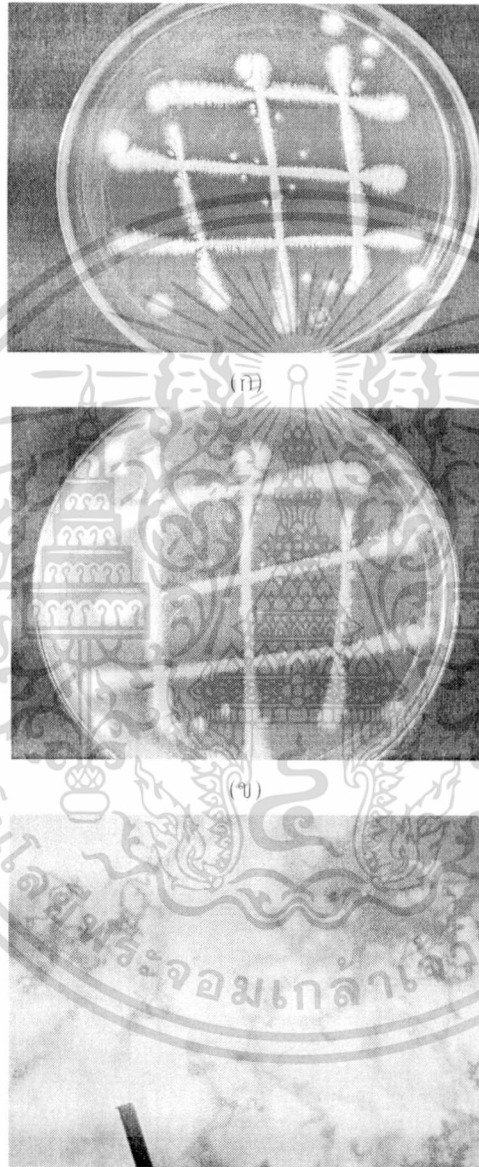
4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีท

ในจำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 50 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญได้ดีในอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสีชมพูอมขาว (pinkish white) เส้นใยอาหารสีชมพูอมเทา (pinkish gray) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยา มีลักษณะคล้ายกับเชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 1) มีสมาชิก 10 ไอโซเลต ได้แก่ PT1-1, PT1-2, PT1-3, PT1-4, PT1-5, PT2-5, PT2-6, PT2-7, PT2-8 และ PT2-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 6 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 4-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ รวมทั้งสามารถเปลี่ยนเป็นกรดที่เป็นไนไตรท์ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารพิษที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *M. luteus* ได้ (ตารางที่ 3 และ 4)



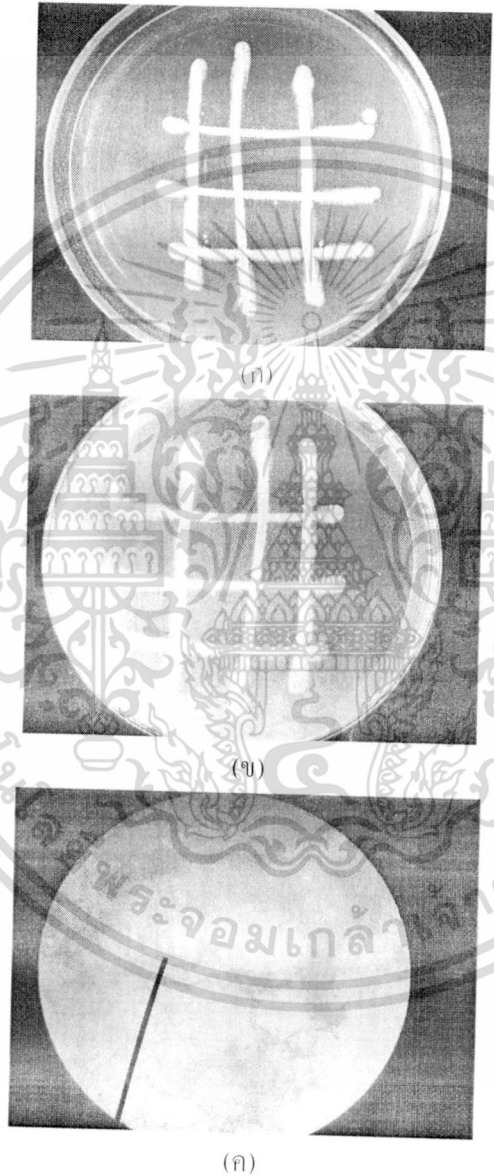
(ค)

รูปที่ 1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PT1-1

ก) เส้นใยอากาศ ข) เส้นใยอาหาร ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสเพอร์จิลที่มีสีที่สร้างเส้นใยอากาศ สีชมพูอมขาว (pinkish white) เส้นใยอาหารสีชมพูเข้ม (deep pink) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว จากข้อมูลทางพันธุกรรมพบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อแอสเพอร์จิลในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 2) มีสมาชิก 10 ไอโซเลต ได้แก่ PT1-10, PT1-11, PT1-12, PT1-13, PT2-12, PT2-13, PT2-14, PT2-15, PT3-5, PT3-6 สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 4 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เจลาติน และไม่สามารถเปลี่ยนในเครทเป็นไนไตรท์ แต่สามารถย่อยแป้งได้ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* และ *M. luteus* ได้ (ตารางที่ 3 และ 4)



รูปที่ 2 เชื้อแอสเพอร์จิลไอโซเลต PT3-6 ก) เส้นใยอากาศ ข) เส้นใยอาหาร ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 สร้างเส้นใยอากาศสีเขียวอมเทา (greenish gray) เส้นใยอาหารสีเขียวอมเทา (light greenish gray) ไม่มีการสร้างรงควัตถุและลักษณะของสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาพบว่า มีลักษณะคล้ายกับเชื้อแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 3) มีสมาชิก 10 ไอโซเลต ได้แก่ PT1-14, PT1-15, PT1-16, PT1-17, PT1-18, PT1-19, PT1-20, PT1-21, PT3-7, PT3-8.

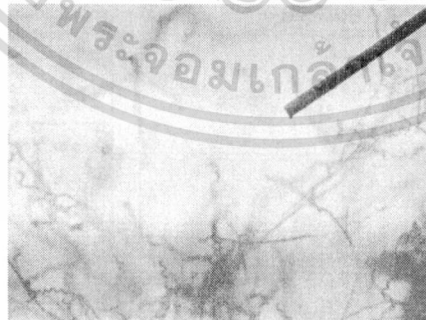
สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 5 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม ตกตะกอนโปรตีนในนม รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและแป้งได้ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus* และ *C. albicans* ได้ (ตารางที่ 3 และ 4)



(ก)



(ข)



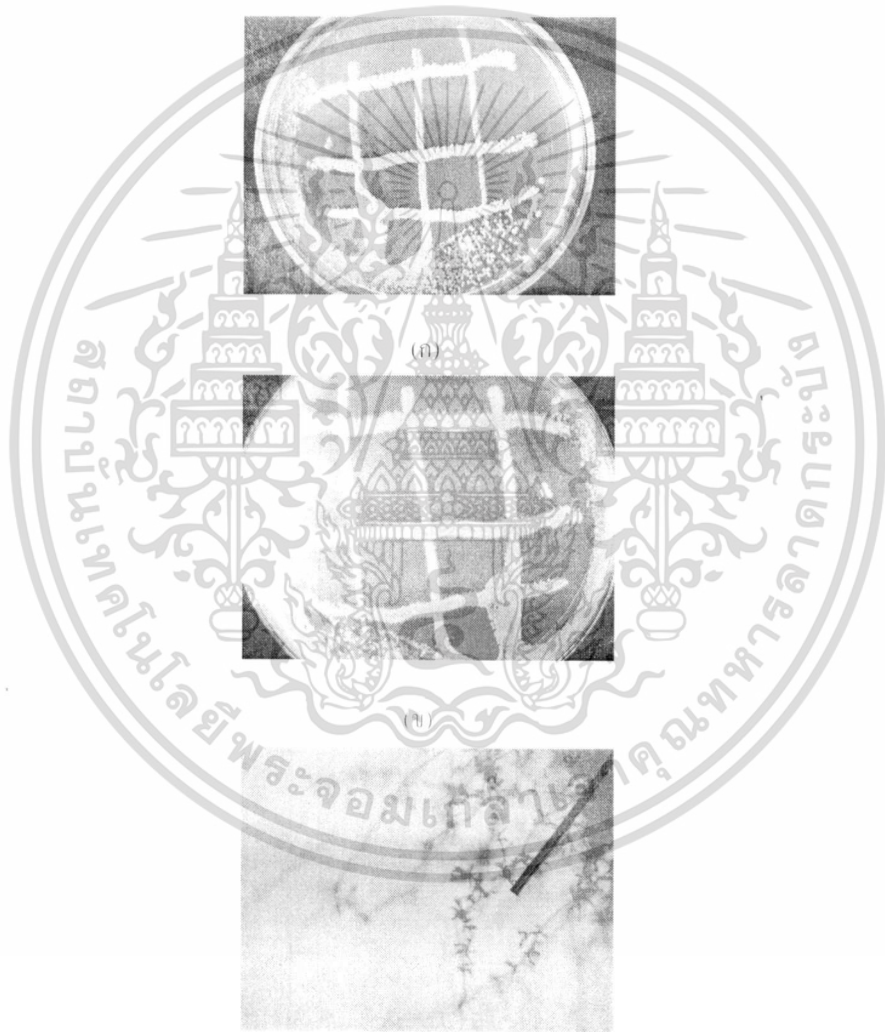
(ค)

รูปที่ 3 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PT1-14 ก) เส้นใยอากาศ ข) เส้นใยอาหาร ค) สปอร์
(กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกคิโนมายซีท์ที่เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 สามารถสร้างเส้นใยอากาศสีน้ำเงินอ่อน (pale blue) เส้นใยอาหารสีเขียวอ่อน (pale green) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบมีการสร้างสปอร์แต่ไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัด ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อในกลุ่มนี้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าอยู่ในสกุลใด ต้องทำการศึกษาด้านอื่นประกอบต่อไป (รูปที่ 3) มีสมาชิก 13 ไอโซเลต ได้แก่ PT1-6, PT1-7, PT1-8, PT1-9, PT2-1, PT2-2, PT2-3, PT2-4, PT 2-16, PT3-1, PT3-2, PT3-3, PT3-4

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 2 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม ตกตะกอน โปรตีนในนม ย่อยสลายแป้งและเจลาติน รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *M. luteus* ได้ (ตารางที่ 4 และ 5)



(ก)

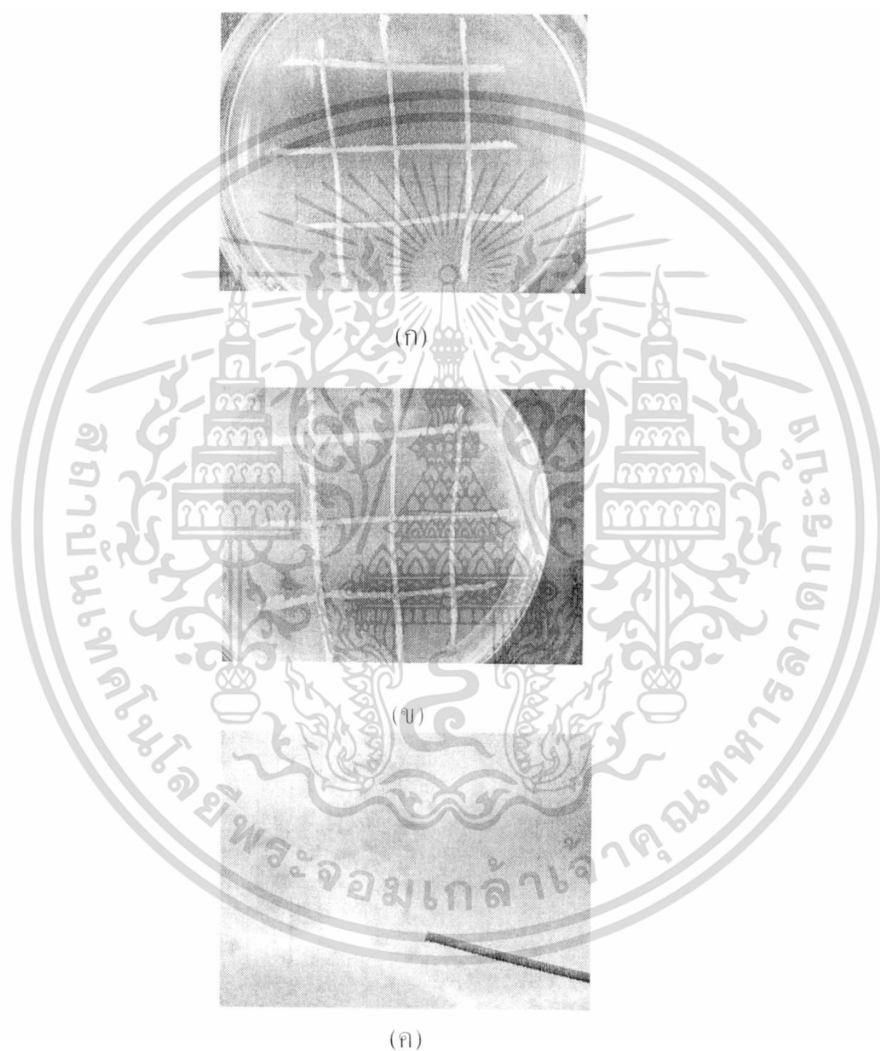
รูปที่ 4 เชื้อแอกคิโนมายซีท์ไอโซเลต PT2-4 ก) เส้นใยอากาศ ข) เส้นใยอาหาร ค) สปอร์

(กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมเหลือง (brilliant orange yellow) ไม่สร้างเส้นใยอากาศ มีการสร้างรงควัตถุเป็นสีเหลืองและสปอร์เป็นสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 5) มีสมาชิก 7 ไอโซเลต ได้แก่ PT1-22, PT1-23, PT1-24, PT2-10, PT2-11, PT3-9, PT3-10

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 3 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-8 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 30 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม ตกตะกอน โปรตีนในนม ย่อยสลายแป้ง รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้



รูปที่ 5 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PT3-9

ก) เส้นใยอากาศ ข) เส้นใยอาหาร ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP 2

กลุ่มที่	ไอโซเลต	การเจริญ	สีของโคโลนี ด้านบน	สีของโคโลนี ด้านล่าง	รงควัตถุ	สปอร์
1	PT1-1	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูอมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-2	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูอมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-3	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูอมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-4	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูอมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-5	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูอมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT2-5	ปานกลาง	สีชมพูอมขาว	สีชมพูอมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT2-6	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูอมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT2-7	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูอมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT2-8	ปานกลาง	สีชมพูอมขาว	สีชมพูอมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT2-9	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูอมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
2	PT1-10	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูเข้ม	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-11	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูเข้ม	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-12	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูเข้ม	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-13	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูเข้ม	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT2-12	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูเข้ม	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT2-13	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูเข้ม	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT2-14	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูเข้ม	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT2-15	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูเข้ม	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT3-5	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูเข้ม	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT3-6	ดี	สีชมพูอมขาว	สีชมพูเข้ม	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะสัญญาณวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	ไอโซเลต	การเจริญ ^a	สีของโคโลนีด้านบน ^b	สีของโคโลนีด้านล่าง ^c	รงกัวัตถุ ^d	สปอร์
3	PT1-14	ดี	สีเขียวอมเทา	สีเขียวมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-15	ดี	สีเขียวมเทา	สีเขียวมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-16	ดี	สีเขียวมเทา	สีเขียวมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-17	ดี	สีเขียวมเทา	สีเขียวมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-18	ดี	สีเขียวมเทา	สีเขียวมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-19	ดี	สีเขียวมเทา	สีเขียวมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-20	ดี	สีเขียวมเทา	สีเขียวมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT1-21	ดี	สีเขียวมเทา	สีเขียวมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT3-7	ดี	สีเขียวมเทา	สีเขียวมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	PT3-8	ดี	สีเขียวมเทา	สีเขียวมเทา	-	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
4	PT1-6	ดี	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น
	PT1-7	ดี	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น
	PT1-8	ดี	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น
	PT1-9	ดี	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น
	PT2-1	ดี	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น
	PT2-2	ปานกลาง	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น
	PT2-3	ดี	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น
	PT2-4	ดี	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น
	PT2-16	ปานกลาง	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น
	PT3-1	ปานกลาง	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น
	PT3-2	ปานกลาง	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น
	PT3-3	ปานกลาง	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น
	PT3-4	ดี	สีน้ำเงินอ่อน	สีเขียวอ่อน	-	โซ่ตรงสายสั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

115555

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	ไอโซเลต	การเจริญ ^a	สีของโคโลนี ด้านบน ^b	สีของโคโลนี ด้านล่าง ^c	รงควัตถุ ^d	สปอร์
5	PT1-22	๑๒	สีส้มอม เหลือง	สีส้มอมเหลือง	เหลือง	สปอร์เดี่ยว
	PT1-23	๑๒	สีส้มอม เหลือง	สีส้มอมเหลือง	เหลือง	สปอร์เดี่ยว
	PT1-24	๑๒	สีส้มอม เหลือง	สีส้มอมเหลือง	เหลือง	สปอร์เดี่ยว
	PT2-10	๑๒	สีส้มอม เหลือง	สีส้มอมเหลือง	เหลือง	สปอร์เดี่ยว
	PT2-11	๑๒	สีส้มอม เหลือง	สีส้มอมเหลือง	เหลือง	สปอร์เดี่ยว
	PT3-9	๑๒	สีส้มอม เหลือง	สีส้มอมเหลือง	เหลือง	สปอร์เดี่ยว
	PT3-10	๑๒	สีส้มอม เหลือง	สีส้มอมเหลือง	เหลือง	สปอร์เดี่ยว

หมายเหตุ a = การเจริญบนอาหารต่างๆ โดยรวม

b = สีโคโลนีด้านบนของเชื้อในอาหารต่างๆ โดยรวม

c = สีโคโลนีด้านล่างของเชื้อในอาหารต่างๆ โดยรวม

d = สีรงควัตถุที่ละลายน้ำในอาหารต่างๆ โดยรวม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

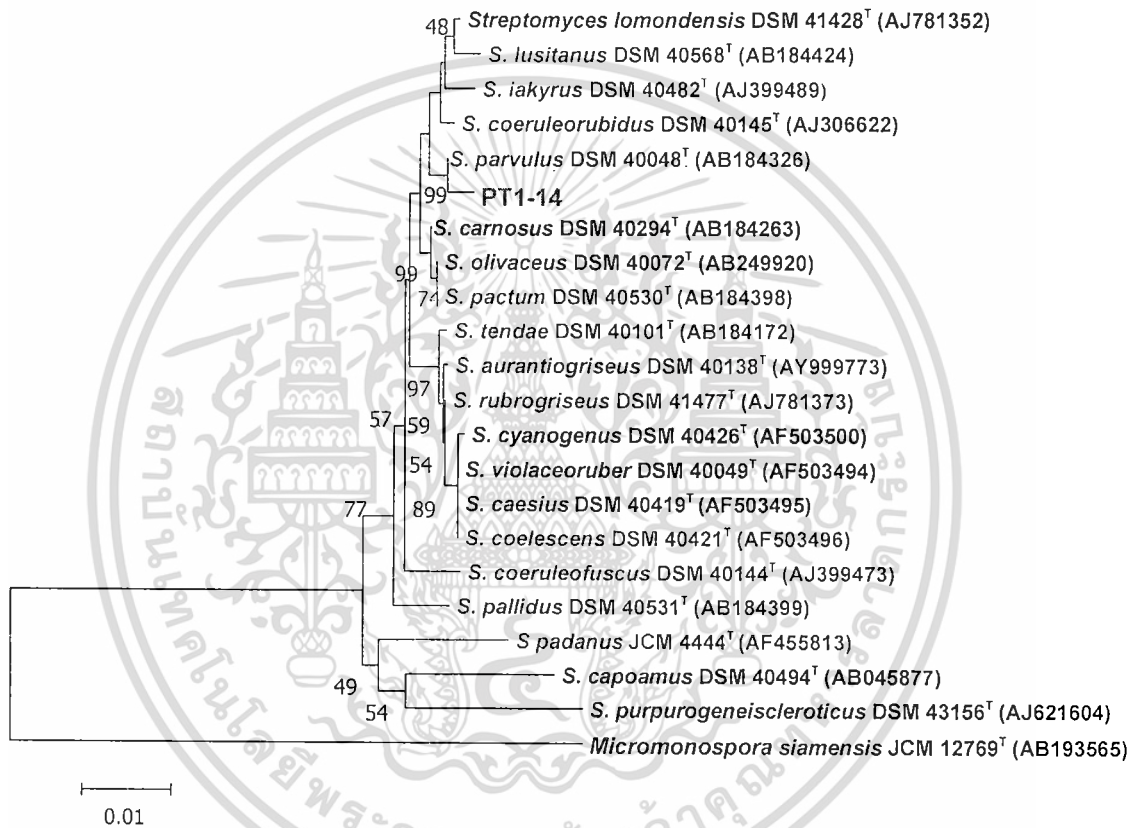
ตารางที่ 4 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนไมซีตา

กลุ่มที่	รหัสชื่อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)								พีเอช				อุณหภูมิ (° C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)				
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				<i>B.subtilis</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>
1	PT1-1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	24	18	-	-	-
	PT1-2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	15	13	-	-	-
	PT1-3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	21	16	-	-	-
	PT1-4	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	24	18	-	-	-
	PT1-5	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	22	11	-	-	-
	PT2-5	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	24	18	-	-	-
	PT2-6	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	22	18	-	-	-
	PT2-7	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	24	12	-	-	-
	PT2-8	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18	23	18	-	-	-
PT2-9	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	26	18	-	-	-	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PT1-14

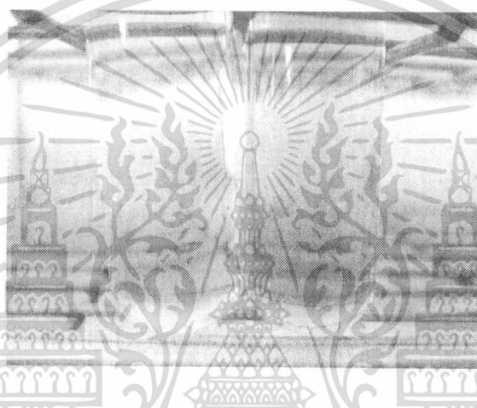
ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสโคไมซีตที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อไอโซเลต PT1-14 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces parvulus* DSM 40048^T มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.7 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99 (ดังรูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงลักษณะตำแหน่งของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลต PT1-14 บน Phylogenetic tree

4.4 ผลการศึกษาการสร้างสารออกซินธรรมชาติ (Indole-3-acetic acid production)

จากการศึกษาการผลิตสารออกซินธรรมชาติ (Indole-3-acetic acid) จากเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยนำเอาเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร Glucose Peptone Broth (GPB) พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีท 20 ไอโซเลต ได้แก่ PT1-1, PT1-2, PT1-3, PT1-4, PT1-5, PT2-5, PT2-6, PT2-7, PT2-8, PT2-9, PT1-10, PT1-11, PT1-12, PT1-13, PT2-12, PT2-13, PT2-14, PT2-15, PT3-5, PT3-6 ที่มีการสร้างกรดอินโดลอะซีติกได้ คิดเป็นร้อยละ 40 ของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด โดยเชื้อไอโซเลต PT1-1 แสดงผลการผลิตกรดอินโดลอะซีติกได้ดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 5

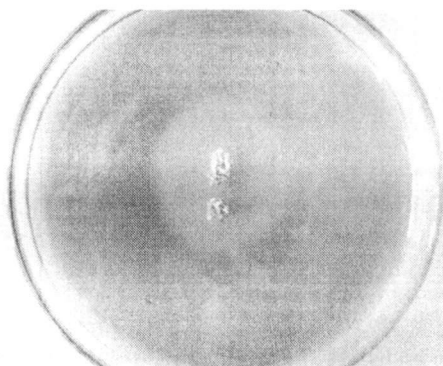


รูปที่ 7. แสดงผลการศึกษาการสร้างสารออกซินธรรมชาติจากเชื้อตัวแทนไอโซเลต PT1-1

4.5 ผลการศึกษาการสร้างสารซิดอโรเฟอร์ (Siderophores production)

จากการศึกษาการผลิตสารซิดอโรเฟอร์ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยนำเอาเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร Carbon utilization medium (ISP9) พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีท 33 ไอโซเลต ได้แก่ PT1-10, PT1-11, PT1-12, PT1-13, PT2-12, PT2-13, PT2-14, PT2-15, PT3-5, PT3-6, PT1-14, PT1-15, PT1-16, PT1-17, PT1-18, PT1-19, PT1-20, PT1-21, PT3-7, PT3-8, PT1-6, PT1-7, PT1-8, PT1-9, PT2-1, PT2-2, PT2-3, PT2-4, PT 2-16, PT3-1, PT3-2, PT3-3, PT3-4 ที่สามารถสร้างสารซิดอโรเฟอร์ได้ คิดเป็นร้อยละ 66 ของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด โดยเชื้อไอโซเลต PT1-14 แสดงผลการผลิตสารซิดอโรเฟอร์ได้ดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8. แสดงผลการศึกษาศึกษาการสร้างสารซิงโครฟอรของเชื้อตัวแทนไอโซเลต PT1-14

4.6 ผลการศึกษการย่อยสลายฟอสเฟต (Phosphate - solubilizing assay)

จากการศึกษการย่อยสลายฟอสเฟต (Phosphate) จากเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยนำเอาเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร Yeast extract - Malt extract agar พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีท 13 ไอโซเลต ได้แก่ PT1-6, PT1-7, PT1-8, PT1-9, PT2-1, PT2-2, PT2-3, PT2-4, PT2-16, PT3-1, PT3-2, PT3-3, PT2-3 ที่มีการย่อยสลายฟอสเฟตได้ กลายเป็นรัศมี 26 ของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด โดยเชื้อไอโซเลต PT2-3 แสดงผลการย่อยฟอสเฟตได้ดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 5



รูปที่ 9. แสดงผลการศึกษการศึกษการสร้างสารซิงโครฟอรของเชื้อตัวแทนไอโซเลต PT2-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลสรุปคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อแอคติโนมัยซีทในการวิจัยนี้

รหัสเชื้อ	คุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช		
	การผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA production)*	การผลิตสารซิดอโรฟอร์ (Siderophore production, มิลลิเมตร) **	การย่อยสลายฟอสเฟต (Rock phosphate - solubilization, มิลลิเมตร)***
PT1-1	+++	-	-
PT1-2	+	-	-
PT1-3	++	-	-
PT1-4	+	-	-
PT1-5	++	-	-
PT2-5	++	-	-
PT2-6	+	-	-
PT2-7	+++	-	-
PT2-8	++	-	-
PT2-9	++	-	-
PT1-10	++	13	-
PT1-11	++	18	-
PT1-12	+++	16	-
PT1-13	+	12	-
PT2-12	++	8	-
PT2-13	++	8	-
PT2-14	+	10	-
PT2-15	+-	9	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลสรุปคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อแอคติโนมัยซีทในการวิจัยนี้ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	คุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช		
	การผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA production)*	การผลิตสารซิเดอโรฟอร์ (Siderophore production, มิลลิเมตร) **	การย่อยสลายฟอสเฟต (Rock phosphate - solubilization, มิลลิเมตร)***
PT3-5	+++	15	-
PT3-6	++	33.4	-
PT1-14	+	39.8	-
PT1-15	-	9	-
PT1-16	-	28.5	-
PT1-17	-	21	-
PT1-18	-	22	-
PT1-19	-	20	-
PT1-20	-	14	-
PT1-21	-	14	-
PT3-7	-	17	-
PT3-8	-	12	-
PT1-6	-	11	6.1
PT1-7	-	28.5	7.5
PT1-8	-	11.5	5.5
PT1-9	-	14	4.8
PT2-1	-	25	4.2
PT2-2	-	57	4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลสรุปคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อแอคติโนมัยซีทในการวิจัยนี้ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	คุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช		
	การผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA production)*	การผลิตสารซิดอโรฟอรั (Siderophore production, มิลลิเมตร) **	การย่อยสลายฟอสเฟต (Rock phosphate - solubilization, มิลลิเมตร)***
PT2-3	-	14	16.8
PT2-4	-	16	4.5
PT2-16	-	21	7
PT3-1	-	15	5
PT3-2	-	28.5	5
PT3-3	-	13	5
PT3-4	-	21	7
PT1-22	-	-	6
PT1-23	-	-	10
PT1-24	-	-	11.5
PT2-10	-	-	12
PT2-11	-	-	6.8
PT3-9	-	-	7
PT3-10	-	-	8.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินบริเวณแหล่งเพาะปลูก จังหวัดราชบุรี สามารถทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลต และได้ทำการศึกษาลักษณะ ลักษณะทางวิทยาและการเจริญของเชื้อพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้นั้นสามารถเจริญได้ดีในอาหาร Yeast extract - Malt extract agar และสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ในโทนสีเทา ชมพูขาว น้ำเงินอ่อน และเหลือง สร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ในโทนสีชมพู และเหลือง น้ำตาล ลักษณะของสปอร์ที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายของภาพ 1,000 เท่า มีลักษณะขดเป็นเกลียวเป็นส่วนใหญ่ บางชนิดเป็นสปอร์เดี่ยว ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถจัดกลุ่ม เชื้อแอคติโนมัยซีทออกเป็น 5 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างเส้นใยอากาศสีชมพูอมขาว (pinkish white) เส้นใยอาหารสีชมพูอมเทา (pinkish gray) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาว แบบเกลียว

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสร้างเส้นใยอากาศ สีชมพูอมขาว (pinkish white) เส้นใยอาหารสีชมพูเข้ม (deep pink) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว

กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสร้างเส้นใยอากาศสีเขียวอมเทา (greenish gray) เส้นใยอาหารสีเขียวอมเทา (light greenish gray) ไม่มีการสร้างรงควัตถุและลักษณะของสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว

กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างเส้นใยอากาศสีน้ำเงินอ่อน (pale blue) เส้นใยอาหารสีเขียวอ่อน (pale green) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบมีการสร้างสปอร์แต่ไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัด

กลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมเหลือง (brilliant orange yellow) ไม่สร้างเส้นใยอากาศ มีการสร้างรงควัตถุเป็นสีเหลืองและสปอร์เป็นสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร

จากการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แสดงคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืชที่ดี คือ ไอโซเลต PT1-14 มาทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene พบว่า เชื้อ แอคติโนมัยซีทไอโซเลต PT1-14 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces parvulus* DSM 40048^T มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากเชื้อแอคติโนมัยสัท พบว่ามี 43 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 86 ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ การสร้างสารออกซินธรรมชาติ (Indole-3-acetic acid) จากเชื้อแอคติโนมัย สัท พบว่ามี 20 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 40 ที่มีการสร้างกรดอินโดลอะซิดิกได้ดี คุณสมบัติการย่อย สลายฟอสเฟตพบเชื้อแอคติโนมัยชนิดทั้งหมด 13 ไอโซเลต ที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟตคิดเป็นร้อย ละ 26 สำหรับการสร้างสารซีเคอโรฟอรั พบเชื้อจำนวน 33 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 66 ที่สามารถ สร้างสารซีเคอโรฟอรัได้

จากงานวิจัยนี้สามารถนำความรู้ที่ได้รับไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนา ผลิตภัณฑ์ที่ส่งเสริมการเจริญของพืชได้ต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

1. จากการวิจัยครั้งนี้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสัทที่มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้เป็น อย่างดี จึงควรมีการวิจัยต่อเพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเหล่านี้ถึงระดับสกุลและสปีชีส์
2. เชื้อบางไอโซเลตมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้น่าสนใจมาก จึงควรนำไปทำการ วิจัยต่อในเชิงประยุกต์เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ส่งเสริมการเจริญของพืชได้ต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- Bérdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiotics*. 58: 1-26.
- Castillo UF, Strobel GA, Ford et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiol* 2002; 148: 2675-2685.
- Cevallos, A. and Guerriero. A. 2003. Isolation and Structure of a New Macrolide Antibiotic, Erythromycin G, and a Related Biosynthetic Intermediate from a Culture of *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Antibiotics*. 56: 280-288.
- Cho, S.I., Fukazawa, H., Honma, Y., Kajiura, T., Hori, H., Igarashi, Y., Furumai, T., Oki, T. and Uehara, Y. 2002. Effects of Hibarimicins and Hibarimicin-Related Compounds Produced by *Microbispora* on v-Src Kinase Activity and Growth and Differentiation of Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells. *J. Antibiotics*. 55: 270-278.
- Coombs JT, Michelsen PP, Franco CMM. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biol. Control* 2004; 29: 359-366.
- Duponnois R, Founoune H, Lesueur et al. Ectomycorrhization of six *Acacia auriculiformis* provenances from Australia, Papua New Guinea and Senegal in Glasshouse conditions: effect on the plant growth and on the multiplication of plant parasitic nematodes. *Aust. J. Eep. Agr* 2000; 40: 443-450.
- Esumi, Y., Suzuki, Y., Itoh, Y., Uramoto, M., Kimura, K. I., Goto, M., Yoshihama, M. and Ichikawa, T. 2002. Propeptin, a New Inhibitor of Prolyl Endopeptidase Produced by *Microbispora*. II. Determination of Chemical Structure. *J. antibiot*. 55: 296-300.
- Furumai, T., Igarashi, Y., Higuchi, H., Saito, N. and Oki, T. 2002. Kosinostatin, a Quinocycline Antibiotic with Antitumor Activity from *Micromonospora* sp. TP-A0468. *J. Antibiotics*. 55: 128-133.
- Glick BR, Bashan Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv* 1997; 15: 353-378.
- Goodfellow, M. and Williams. S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol*. 37: 189-216.
- Greenwood, R. C. and Gentry, D. R. 2002. Confirmation of the Antibacterial Mode of Action of SB-219383, a Novel Tyrosyl tRNA Synthetase Inhibitor from *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics*. 55: 423-426.
- Harada, K., Tomita, K., Fujii, K., Masuda, K., Mikami, Y., Yazawa, K. and Komaki, H. 2004. Isolation and Structural Characterization of Siderophores, Madurastatins, Produced by a Pathogenic *Actinomadura madurae*. *J. Antibiotics*. 57: 125-135.
- Holt, J. G. 1989. Filamentous Actinomycetes and Related Bacteria. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4, pp. 2333-2450. Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

- Igarashi, Y., Takagi, K., Kan, Y., Fujii, K., Harada, K. I., Furumai, T. and Oki, T. 2000. Arisostatins A and B, New Members of Tetrocarcin Class of Antibiotics from *Micromonospora* sp. TP-A0316. II. Structure Determination. *J. Antibiotics*. 53: 233-240.
- Khaled A. El-Tarabily and Krishnapillai Sivasithamparam. 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1505-1520.
- Lam, K. S., Schroeder, D. R., Veitch, J. M., Colson, K. L., Matson, J. A., Rose, W. C., Doyle, T. W. and Forenza, S. 2001. Production, Isolation and Structure Determination of Novel Fluoroindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. *J. Antibiotics*. 54: 1-9.
- Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. and Tillequin, F. P. 2002. New Dithiopyrrolone Antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiotics*. 55: 696-701.
- Leet, J. E., Li, W., Ax, H. A., Matson, J. A., Huang, S., Huang, R., Cantone, J. L., Drexler, D., Dalterio, R. A. and Lam, K. S. 2003. Nocathiacins, New Thiazolyl Peptide Antibiotics from *Nocardia* sp. II. Isolation, Characterization, and Structure Determination. *J. Antibiotics*. 56: 232-242.
- Lu, C., Bai, L. and Shen, Y. 2004. A Novel Amide N-Glycoside of Ansamitocins from *Actinosynnema pretiosum*. *J. Antibiotics*. 57: 348-350.
- Maskey, R. P., Li, F. C., Qin, S., Fiebig, H. H. and Laatsch, H. 2003. Chandrananimycins A-C: Production of Novel Anticancer Antibiotics from a Marine *Actinomadura* sp. Isolate M048 by Variation of Medium Composition and Growth Conditions. *J. Antibiotics*. 56: 622-629.
- Mikami, Y., Komaki, H., Imai, T., Yazawa, K., Nemoto, A., Tanaka, Y. and Grafe, U. 2000. A New Antifungal Macrolide Component, Brasilinolide B, Produced by *Nocardia brasiliensis*. *J. Antibiotics*. 53: 70-74.
- Momose, I., Sekizawa, R., Hashizume, H., Kinoshita, N., Homma, Y., Hamada, M., Inuma, H. and Takeuchi, T. 2001. Tyropeptins A and B, New Proteasome Inhibitors Produced by *Kitasatospora* sp. MK993-dF2. I. Taxonomy, Isolation, Physico-chemical Properties and Biological Activities. *J. Antibiotics*. 54: 997-1003.
- Moon, S. S., Hwang, W. H., Chung, Y. R. and Shin, J. 2003. New Cytotoxic Bafilomycin C1-amide Produced by *Kitasatospora cheerisamensis*. *J. Antibiotics*. 56: 856-861.
- Murakami, R., Tomikawa, T., Shin-ya, K., Shiozaki, J., Kajiura, T., Kinoshita, T., Miyajima, A., Seto, H. and Hayakawa, Y. 2001. Ammocidin, a New Apoptosis Inducer in Ras-dependent Cells from *Saccharothrix* sp. I. Production, Isolation and Biological Activity. *J. Antibiotics*. 54: 710-717.
- Nemoto, A., Hoshino, Y., Yazawa, K., Ando, A., Mikami, Y., Komaki, H., Tanaka, Y. and Grafe, U. 2002. Asterobactin, a New Siderophore Group Antibiotic from *Nocardia asteroides*. *J. Antibiotics*. 55: 593-597.
- Otani, T., Sugimoto, Y., Aoyagi, Y., Igarashi, Y., Furumai, T., Saito, N., Yamada, Y.,

- Asao, T. and Oki, T. 2000. New Cdc25B Tyrosine Phosphatase Inhibitors, Nocardiones A and B. Produced by *Nocardia* sp. TP-A0248: Taxonomy, Fermentation, Isolation, Structural Elucidation and Biological Properties. *J. Antibiotics*. 53: 337-344.
- Ranjeet K. Tokala, Janice L. Strap, Carina M. Jung, Don L. Crawford, Michelle Hamby Salove, Lee A. Deobald, J. Franklin Bailey, and M. J. Morra. 2002. Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the Pea Plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol*. 68(5): 2161–2171.
- Saroj K. Mishra, William H. Tall, Alan R. Punam and Stanley K. Ries. 1987. Plant growth regulatory metabolites from novel actinomycetes. *Journal of Plant Growth Regulation*. 6, p. 75-83
- Stéphane Compant, Brion Duffy, Jerzy Nowak, Christophe Clément, and Essaïd Ait Barka. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, p. 4951-4959.
- Tani, M., Harimaya, K., Gyobu, Y., Sasaki, T., Takenouchi, O., Takashi, A., Kawamura, A., Kamimura, T. and Harada, T. 2004. SF2809 Compounds, Novel Chymase Inhibitors from *Dactylosporangium* sp. *J. Antibiotics*. 57: 89-96.
- Verma SC, Jagdish KL, Anil KT. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol* 2001; 91: 127–141.
- Vertesy, L., Barbone, F. P., Cashmen, E., Decker, H., Ehrlich, K., Jordan, B., Knauf, M., Schummer, D., Segeth, M. P., Wink, J. and Seibert, G. 2001. Pluraflavins, Potent Antitumor Antibiotics from *Saccharothrix* sp. DSM 12931. *J. Antibiotics*. 54: 718-729.
- Yang, S. W., Chan, T. M., Terracciano, J., Loebenberg, D., Chen, G., Patel, M., Gullo, V., Pramanik, B. and Chu, M. 2004. Structure Elucidation of a New Diketopiperazine Sch 725418 from *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics*. 57: 345-347.
- Yeo, W. H., Yun, B. S., Kim, Y. H., Yu, S. H., Kim, H. M., Yoo, I. D. and Kim, Y. H. 2002. GTRI-BB, a New Cytotoxic Isochromanquinone Produced by *Micromonospora* sp. SA-246. *J. Antibiotics*. 55: 511-515.