

การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทส์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของข้าว

SCREENING OF RICE-GROWTH PROMOTING ACTINOMYCETES



T133006



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 133006
วัน,เดือน,ปี 16 ก.ย. 2557

b. 1263153X
i.

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2556

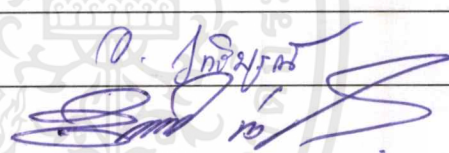
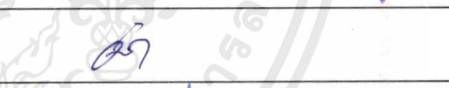


SCREENING OF RICE-GROWTH PROMOTING ACTINOMYCETES



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2013

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดเลือกแอกติโนมัยซีส์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของข้าว Screening of rice-growth promoting actinomycetes
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกฤติกา เคยประสิทธิ์ นายอังกฤช ภูัวร์ประเสริฐ
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2556
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.อัจฉรา ธรรมรัตน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2556

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.อารี กุทธิบูรณ์	
กรรมการ ผศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ	
กรรมการ ดร.อัจฉรา ธรรมรัตน์	
กรรมการ ดร.สมพิศ สอนโยธา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดเลือกแอคติโนมัยซีส์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของข้าว Screening of rice-growth promoting actinomycetes
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกฤติกา เคยประสิทธิ์ นายอังกฤช ภู่วรประเสริฐ
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2556
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.อัจฉรา ธรรมรัตน์

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีส์จำนวน 89 ไอโซเลต ที่คัดแยกโดย ผศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ นำมาคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของข้าว ซึ่งในจำนวนเชื้อทั้งหมดนั้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีส์จำนวน 35 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวจากการทดสอบด้วยวิธี seedling bioassay พบว่ามีจำนวน 10 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวได้ดี และอีก 25 ไอโซเลตเป็นการทดสอบเพื่อหาสารออกฤทธิ์ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวด้วยวิธีอื่น ได้แก่ การทดสอบการผลิตสารอินโดลอะซิติกซึ่งมีจำนวน 10 ไอโซเลต การทดสอบการผลิตสารซิเดอรโรฟอร์จำนวน 8 ไอโซเลต และการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายพอสเฟสจำนวน 7 ไอโซเลต จากนั้นคัดเลือกแอคติโนมัยซีส์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในข้าว โดยการนำเชื้อแอคติโนมัยซีส์มาทดสอบด้วยวิธี Dual Culture Technique กับเชื้อ *Pyricularia grisea* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ก่อโรคใบไหม้ และทดสอบหาสายพันธุ์ที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* X3 และ *Xanthomonas oryzae* X4 ที่ก่อโรคขอบใบแห้ง พบว่ามีแอคติโนมัยซีส์จำนวน 9 ไอโซเลต ที่ยับยั้งเชื้อรา มีเชื้อแอคติโนมัยซีส์จำนวน 8 ไอโซเลตและ 5 ไอโซเลตที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* X3 และ *Xanthomonas oryzae* X4 ตามลำดับ จากนั้นนำแอคติโนมัยซีส์ที่คัดเลือกมาทดสอบหาลักษณะทางฟีโนไทป์และทางชีวเคมีจำนวน 21 ไอโซเลต พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยซีส์ที่สร้างเส้นใยในอาหารจำนวน 21 ไอโซเลต สร้างเส้นใยในอากาศจำนวน 19 ไอโซเลตและสร้างรงควัตถุจำนวน 12 ไอโซเลต และจากการทดสอบทางชีวเคมีด้วยวิธีต่างๆ พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีส์จำนวน 16 ไอโซเลต 13 ไอโซเลต 5 ไอโซเลตและ 13 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในนม การย่อยสลายแป้ง การรีดิวซ์ไนเตรทและการย่อยสลายเจลาติน ตามลำดับ จากข้อมูลทั้งหมดทำให้ทราบว่า ไอโซเลต VT4-3 และ G6-9 เป็นไอโซเลตที่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ต่อไป เนื่องจากมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวและสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวได้ดี ทั้ง 2 ไอโซเลต

คำสำคัญ : แอคติโนมัยซีส์, การส่งเสริมการเจริญของข้าว, จุลินทรีย์ที่ก่อโรคในข้าว

Report Title	Screening of rice-growth promoting actinomycetes
Student	Krittika Koeiprasit Ingrid Phuvorprasert
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2013
Advisor	Asst. Prof. Dr. Jitti Thawai
Co- Advisor	Dr. Uschara Thamarat

Abstract

Actinomycetes 89 strains can be use to a rice growth promoter, so we found 35 of 89 actinomycete strains successful in seedling bioassay so 10 isolates produced more than other isolate and 25 isolates left was separated 3 method and the result 10 isolated produced indole-3-acetic acid, 8 isolates produced siderophore 7 isolates can degrade phosphate. And all of 89 isolates actinomycetes strains was use in Dual Culture Technique, To test about bacteria Inhibitor (*Pyricularia grisea* : cause of Rice blast disease and *Xanthomonas oryzae* X3 , X4 : cause of leaf blight disease) we found 9 isolates be mold inhibitor 8 isolates can inhibit *Xanthomonas oryzae* X3, 5 isolates can inhibit *Xanthomonas oryzae* X4. Finally we characteristic our 89 isolates of actinomycetes strains then found 19 isolates aerial mycelium type 21 isolates under medium mycelium 12 isolates produce pigment and in Biochemical control we found 16 isolates can digest milk protein (casein) 13 isolates digest starch 5 isolates reduce Nitrate 13 isolates can digest gelatin, And finally we found the most proper isolate VT4-3 and G6-9 that can be apply to be a rice growth promoter because both of isolate have all potential that we need especially a bacteria inhibitor and hormone producer.

Keywords : Actinomycetes, Rice growth promoter, Rice disease

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำปัญหาพิเศษเรื่อง การคัดเลือกแอกติโนมัยซีสท์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของข้าว คณะผู้จัดขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและให้ความอนุเคราะห์เชื้อแอกติโนมัยซีสท์ 89 ไอโซเลตสำหรับการทดลอง ขอขอบพระคุณ ดร.อัจฉรา ธรรมรัตน์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมอย่างยิ่งสำหรับการสละเวลาในการให้คำปรึกษา คำแนะนำ มิว่าจะเป็นการจัดทำรูปเล่มรายละเอียดเกี่ยวกับเนื้อหา แหล่งสืบค้นข้อมูลต่างๆ การเลือกรูปแบบวิธีการที่เหมาะสม และอื่นๆ และขอขอบพระคุณคณะกรรมการทั้ง 2 ท่าน ได้แก่ รศ.อารี ฤทธิบุรณ์ และ ดร.สมพิศ สอนโยธา ที่กรุณาให้คำแนะนำ ซึ่งจุดบกพร่องแก้ไขข้อผิดพลาดที่คณะผู้จัดทำมองข้ามไปหลายจุด ซึ่งทำให้ปัญหาพิเศษเล่มนี้มีคุณภาพและมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณอาจารย์สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และให้คำแนะนำที่ดีมาโดยตลอด จนสามารถทำให้ปัญหาพิเศษครั้งนี้สำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดี ทางคณะผู้จัดทำซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง กราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สิ่งสำคัญที่ขาดไม่ได้เลยนั่นก็คือคุณพ่อ คุณแม่ ผู้เป็นบุพการีและทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด ขอขอบคุณนายทศพล เลิศพิภพเมธา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการจัดทำรูปเล่ม ตลอดจนช่วยตรวจทานข้อผิดพลาดต่างๆ และขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับความสำเร็จในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ ซึ่งไม่ได้กล่าวนามไว้ทุกท่าน

คณะผู้จัดทำ

พฤษภาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูปภาพ	VII
1. บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตโครงการพิเศษ	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เชื้อแอคติโนมัยซีท (Actinomycetes) (Isaac, S. and D. Jennings. 1995)	4
2.2 กรดอินโดลอะซิติก (IAA)	11
2.3 ซิเดอริโอฟอร์ (Siderophores)	13
2.4 วิธี cross hatch streak (ดร. กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน, 2555)	14
2.5 โรคใบไหม้ในข้าว (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, กรมการข้าว)	14
2.6 เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคใบไหม้ในข้าว	16
2.7 โรคขอบใบแห้ง	17
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	
3.1.1 อุปกรณ์	18
3.1.2 สารเคมี	19
3.2 วิธีการทดลอง	
3.2.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการส่งเสริมการเจริญของข้าว: ด้วยวิธี seeding bioassay	19
3.2.2 ตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อที่มีการผลิตกรดอินโดลอะซิติก ซิเดอริโอฟอร์ และการย่อยสลายฟอสเฟต	
3.2.2.1 การตรวจสอบกรดอินโดลอะซิติก (IAA) (Nassar, A.H.,2005)	20
3.2.2.2 การตรวจสอบสารซิเดอริโอฟอร์ (Schwyn,B. และ Neiland,J.B.,1986)	20
3.2.2.3 การตรวจสอบเชื้อที่มีคุณสมบัติการย่อยฟอสเฟต (Freitas, J.R.,1997)	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับใช้ภายในมหาวิทยาลัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ปฏิบัติกับเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าว : ด้วยวิธี dual culture technique	21
3.2.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ปฏิบัติกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค	21
3.2.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี	22
4. ผลการวิจัย	
4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าว ด้วยวิธี Seedling Bioassay	30
4.2 การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อ Actinomycetes ที่มีการผลิตกรดอินโดลอะซิติก ซิเดอโรพอร์และการย่อยสลายฟอสเฟต	30
4.2.1 การทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติก	30
4.2.2 การทดสอบการผลิตสารซิเดอโรพอร์	30
4.2.3 การย่อยสลายฟอสเฟต	33
4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ปฏิบัติกับเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าว <i>Pyricularia grisea</i> : ด้วยวิธี dual culture technique	34
4.4 ผลการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ Actinomycetes กับเชื้อแบคทีเรีย <i>Xanthomonas oryzae</i> X3, X4	37
4.5 การจัดกลุ่มเชื้อ : นำเชื้อ Actinomycetes ที่คัดเลือกได้มาทดสอบทางชีวเคมีและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	40
4.5.1 การทดสอบทางชีวเคมี	40
4.5.1.1 การทดสอบการย่อยโปรตีนในนม	40
4.5.1.2 ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction)	41
4.5.1.3 ความสามารถในการย่อยแป้ง	42
4.5.1.4 ความสามารถในการสลายเจลาติน	43
4.5.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	45
5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	58
อ้างอิง	60
ภาคผนวก ก.	63
ภาคผนวก ข.	65

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรีย	9
4.1 ตารางสรุปผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีการส่งเสริมการเจริญของข้าวด้วยวิธี Seedling Bioassay	23
4.1.1 ผลการทดสอบ Seedling growth and evaluation test (Seedling Bioassay)	25
4.1.2 ผลการทดสอบ Seedling growth and evaluation test (Seedling Bioassay)	26
4.1.3 ผลการทดสอบ Seedling growth and evaluation test (Seedling Bioassay)	27
4.1.4 ผลการทดสอบ Seedling growth and evaluation test (Seedling Bioassay)	28
4.1.5 ผลการทดสอบ Seedling growth and evaluation test (Seedling Bioassay)	29
4.2 แสดงผลการทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จำนวน 10 ไอโซเลต โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแดง (OD) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร	30
4.3 แสดงผลการย่อยฟอสเฟตของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จำนวน 7 ไอโซเลต	34
4.4 ค่าการยับยั้งเชื้อรา <i>P.grisea</i> ของเชื้อ Actinomycetes	36
4.5 ผลการทดสอบเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> X3, X4	37
4.6 ค่าความสามารถในการย่อยโปรตีนในนมของเชื้อ Actinomycetes (Clear zone)	40
4.7 แสดงประสิทธิภาพการย่อยแป้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ โดยคำนวณอัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์	42
4.8 แสดงผลการทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติก การผลิตสารซีเดอรโรฟอร์ การย่อยสลายฟอสเฟตของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์	44
4.9 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของข้าว	45
4.10 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ	47
4.11 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า	53
4.12 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า	54
4.13 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า	55
4.14 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า	56

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่	หน้า
2.1 ภาพแสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ Actinomycetes (isolate GMKU095) โดยการส่องดูด้วยกล้อง SEM (scanning electron microscope)	
2.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อ Actinomycetes บนอาหาร oatmeal agar	6
2.3 ภาพแสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ Actinomycetes (isolate GMKU095) โดยการส่องดูด้วยกล้อง SEM (scanning electron microscope) มีลักษณะเป็น oval shape แบบมีผิวสปอร์แบบ spiny	7
2.4 สูตรโครงสร้างของ IAA	11
2.5 ลักษณะการผลิตสารซีเตอร์โรฟอร์ของแบคทีเรียในดิน	13
2.6 วิธีการทำ cross hatch streak	14
2.7 ภาพซ้าย Panicle with neck blast. (Courtesy APS) ภาพขวา Mature blast lesions showing necrotic (dead) borders. (Courtesy APS)	15
2.8 ภาพแสดงอาการของโรคใบไหม้ในข้าว	15
2.9 ลักษณะสปอร์ (conidia) ของเชื้อ <i>Pyricularia grisea</i> . (Courtesy P.J. Landschoot)	17
2.10 แสดงอาการของโรคขอบใบแห้ง	17
4.1 แผนภูมิความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีการงอก อัตราการเจริญของต้นกล้า น้ำหนักแห้งของต้นกล้า และจำนวนต้นกล้าทั้งหมดกับเชื้อแอกติโนมัยซีทิส และ Control	24
4.2 แผนภูมิแสดงผลการทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติก ของเชื้อแอกติโนมัยซีทิส โดยวัดค่า O.D. ที่ 530 นาโนเมตร	31
4.3 แสดงประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลอะซิติกของเชื้อแอกติโนมัยซีทิส ซึ่งมีการเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีแดง	32
4.4 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทิสที่มีความสามารถในการผลิตสาร ซีเตอร์โรฟอร์	33
4.5 แสดงประสิทธิภาพการย่อยฟอสเฟตในอาหาร Pikovskaya's medium (PVA) (Pikovskaya, 1948) ของเชื้อแอกติโนมัยซีทิสรหัส NR9-13, G4-9 และ G5-8	34
4.6 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทิสในการยับยั้งเชื้อรา <i>P.grisea</i>	35
4.7 แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> X3 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทิสสายพันธุ์ต่างๆ	38
4.8 แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas oryzae</i> X4 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทิสสายพันธุ์ต่างๆ	39
4.9 แสดงประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนในนมของเชื้อแอกติโนมัยซีทิส	41
4.10 แสดงประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction) ของเชื้อแอกติโนมัยซีทิส	41

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปภาพที่	หน้า
4.11 แสดงประสิทธิภาพในการย่อยแบ่งของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์	43
4.12 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ	46
4.13 แสดงลักษณะการเจริญ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและรงควัตถุของเชื้อ แอกติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak	48
4.14 แสดงลักษณะการเจริญ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและรงควัตถุของเชื้อ แอกติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak	49
4.15 แสดงลักษณะการเจริญ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและรงควัตถุของเชื้อ แอกติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak	50
4.16 แสดงลักษณะการเจริญ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและรงควัตถุของเชื้อ แอกติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak	51
4.17 แสดงลักษณะการเจริญ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและรงควัตถุของเชื้อ แอกติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak	52
4.18 แสดงลักษณะการเจริญ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและรงควัตถุของเชื้อ แอกติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak	53

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการปลูกข้าวมากที่สุดเมื่อเทียบกับการทำเกษตรชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ข้าวยังเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญในการส่งออกต่างประเทศ ซึ่งมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจด้านการเกษตรเป็นอย่างมาก จากข้อมูล ปี 2555พบว่า ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งออกข้าวเป็นอันดับ 3 ของโลก รองจากประเทศอินเดียและเวียดนาม โดยมีผลผลิตที่ส่งออกจำนวน 6.931 ล้านตัน (สมาคมผู้ส่งออกข้าว, 2556) อย่างไรก็ตามปัญหาที่ยังพบได้จากการปลูกข้าวคือ โรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น เชื้อรา เชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส เป็นต้น ทำให้เกษตรกรจำเป็นต้องนำสารเคมีทางการเกษตรมาใช้ในการกำจัดและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่มาทำลายต้นข้าวและทำให้ผลผลิตเสียหาย ซึ่งทำให้เกิดสารพิษตกค้างทั้งในพืชและสิ่งแวดล้อมโดยรอบ ไม่ว่าจะเป็นในดินหรือแหล่งน้ำทางการเกษตร ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการกำจัดและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในข้าวได้คือการควบคุมทางชีวภาพ หรือ biological control ซึ่งเป็นวิธีที่นำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการกำจัดและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ ซึ่งทำให้ไม่เกิดสารพิษตกค้างต่อพืชทางการเกษตรและสิ่งแวดล้อมโดยรอบนอกจากนี้ยังช่วยให้เกษตรกรลดค่าใช้จ่ายในการนำสารเคมีมาใช้ในการกำจัดเชื้อก่อโรคอีกด้วย

ข้าว เป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยมีการเพาะปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทยและเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศ ในปี2540-2541ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวทั้งหมด 57.172 ล้านไร่ ในแต่ละปีความเสียหายซึ่งเกิดจากโรคและแมลงคิดเป็นมูลค่า 4,000-5,000 ล้านบาท โดยโรคสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายและระบาดอย่างกว้างขวางคือ โรคไหม้จากเชื้อ *Pyricularia grisea* โดยเชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายต้นข้าวทั้งในระยะต้นกล้า ระยะแตกกอ และระยะออกรวง (ประพาส, 2531)

ปัจจุบันมีการนำเชื้อแอคติโนมัยซีทส์มาศึกษาเพื่อหาสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ และมีความสามารถในการผลิตสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น การผลิตสารอินโดลอะซิติก ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืช การผลิตสารซิเตอร์โรฟอรัสซึ่งเป็นสารเมทาบอลไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่จุลินทรีย์ทั้งเชื้อแบคทีเรียหรือราผลิตออกมาเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็กหรือมีในปริมาณต่ำมาก และการย่อยสลายฟอสเฟตในดินซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับพืชเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

นอกจากนี้สาเหตุสำคัญที่ทำให้ข้าวมีการเจริญเติบโตได้ไม่ดีเนื่องจากมีโรคข้าวที่เกิดจากจากเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส ไฟโตพลาสมาและไส้เดือนฝอย ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถทำให้ข้าวแสดงอาการผิดปกติได้ชัดเจนที่ใบ ลำต้น กาบใบ รวงหรือเมล็ด (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2556) ดังนั้นการกำจัดและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในข้าวด้วยวิธีทางชีวภาพ (biological control) ซึ่งเป็นการนำเชื้อที่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคมานำ จึงเป็นหนทางหนึ่งในการควบคุมสาเหตุของโรค

โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจึงเรียกว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อพืชแต่จะมีฤทธิ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยการผลิตสารปฏิชีวนะ หรือการเจริญเพื่อแย่งอาหารและยึดครองพื้นที่ส่วนต่างๆ ของพืช จึงเป็นวิธีหนึ่งในการช่วยลดการใช้สารเคมี ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว คือ เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยสีท (Actinomycetes) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเฉพาะในดินและรอบรากพืช แอกติโนมัยสีท (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารในสิ่งแวดล้อม บางชนิดสามารถย่อยสลายฟอสฟอรัสในดินให้มาอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำมาใช้ได้ บางชนิดสามารถผลิตสารที่ช่วยควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช ทำให้เจริญได้ดีหรือทนต่อสภาวะที่แห้งแล้งได้ (Bacon *et al.*, 2001; Boddey *et al.*, 2003 Crawford *et al.*, 1993; Demain, 2000; Goodfellow and Simpson, 1987; Lazzarini *et al.*, 2000; Miyadoh, 1993)

แอกติโนมัยสีท(Actinomycetes)เป็นเชื้อจุลินทรีย์อีกกลุ่มที่มีการนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืช เนื่องจากเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ซึ่งในปัจจุบันมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ผลิตมาจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ (Goodfellow *et al.*, 1988)

Samac *et al.* (2003) รายงานว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. ที่อาศัยอยู่กับรากพืชในกลุ่ม alfalfa สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ป้องกันการเกิดโรคใบจุดได้ดี และได้นำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชอื่นๆ ที่เกี่ยวกับระบบรากและเมล็ด

Gesheva (2002) ได้ใช้เชื้อแอกติโนมัยสีท ในกลุ่ม *Streptomyces* และ *Micromonospora* ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย และเชื้อราซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ beta-lactams, polyethers, nonpolyenic macrolides azalomycin B แอกติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากในดิน สามารถผลิตเอนไซม์ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ที่ช่วยย่อยสลายสารต่างๆ เช่น ลิกนิน ไคติน เซลลูโลส เป็นต้น นอกจากนี้บางชนิดสามารถย่อยสลายยาปราบศัตรูพืช เช่น diuron (Castillo *et al.*, 2006) และalachlor ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชที่มีพิษรุนแรง (Sette *et al.*, 2005) และย่อยสลายยาฆ่าแมลง lindane (gamma-hexachloro cyclohexane) (Benimeli *et al.*, 2008)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีความสามารถส่งเสริมการเจริญของข้าว เพื่อเป็นความรู้ในการนำเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ไปใช้ประโยชน์ในด้าน biological control ในข้าว และลดการใช้สารเคมีในการผลิตเพื่อลดต้นทุนให้แก่เกษตรกรต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1.2.1 เพื่อคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าว

1.2.2 เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้

1.3 ขอบเขตโครงการพิเศษ

ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของข้าวด้วยวิธีดังต่อไปนี้

1.3.1 คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการส่งเสริมการเจริญโดยการทดสอบด้วยวิธี seeding bioassay

1.3.2 คัดเลือกเชื้อที่มีการผลิตกรดอินโดลอะซิติกซีเคอร์โรฟออร์และการย่อยสลายสารฟอสเฟต

1.3.3 คัดเลือกสายพันธุ์ปฏิปักษ์ (เชื้อราก่อโรคไหม้) ทดสอบโดยวิธี dual culture technique

1.3.4 คัดเลือกสายพันธุ์ปฏิปักษ์ (เชื้อแบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้ง) ทดสอบโดยทดสอบโดยวิธี dual culture technique

1.3.5 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ และชีวเคมีของแอคติโนมัยซีทส์ที่ได้จากการคัดเลือก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกไปใช้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคไหม้ในข้าวได้

1.4.2 สามารถลดการใช้สารเคมีในการผลิตข้าว โดยใช้วิธี biological control แทนเพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการผลิตและลดสารเคมีตกค้างในพืชและสิ่งแวดล้อม

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยซีสท์(Actinomycetes) (Isaac, S. and D. Jennings. 1995)

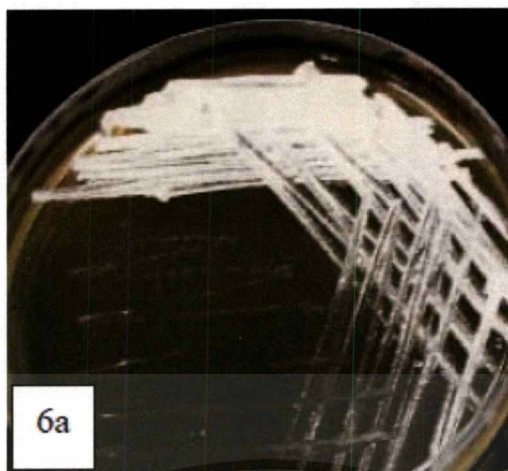
2.1.1 ลักษณะทั่วไป

เชื้อแอคติโนมัยซีสท์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก บางชนิดติดสี acid fast ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา มีความแตกต่างจากเชื้อรา คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสและไม่มีไมโทคอนเดรีย และที่สำคัญเชื้อแอคติโนมัยซีสท์จะถูกยับยั้งการเติบโตได้โดยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเติบโตของ แบคทีเรีย แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา (Cross and Goodfellow, 1973; Alexander, 1991) ในปี ค.ศ. 1997 Stackebrandt และคณะได้เสนอการจัดหมวดหมู่ของเชื้อแบคทีเรียแบบใหม่ โดยอาศัยความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16s rRNA โดยเชื้อแอคติโนมัยซีสท์จัดอยู่ใน Class Actinobacteria วงศ์ Actinomycetales

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แอคติโนมัยซีสท์จัดเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายฟังไจแต่มีขนาดเล็กกว่าคือมีขนาดประมาณ 0.5 – 1.5 ไมโครเมตร ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า apical region และ intercalary region สร้างผนังกันเส้นใยแบบต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อการแตกสาขาของเส้นใยเป็นแบบ monopodial เป็นแบบที่พบได้บ่อยที่สุด พบใน *Streptomyces* แบบ dichotomous branch พบใน *Actinobifida* และแบบ verticillate พบใน *Streptoverticillium* แอคติโนมัยซีสท์ส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใย 2 ชนิด คือ primary (substrate) mycelium และ secondary (aerial) mycelium ใน *Streptomyces* aerial mycelium มีลักษณะต่างจาก substrate mycelium อย่างชัดเจนคือ

1. aerial mycelium จะมีลักษณะของเส้นใยที่บางกว่า substrate mycelium
2. aerial mycelium มักจะมีสีเข้ม สร้าง insoluble pigment รวมกันที่ผนังหุ้มชั้นนอกปรากฏเป็นสีเทาเมื่อมีการสะท้อนแสง
3. มีการแตกสาขา (branching) น้อยกว่า substrate mycelium
4. ลักษณะของ aerial mycelium ส่วนใหญ่จะไม่มี การเจริญแบบแทงลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. มีการสร้างสปอร์ และ fragmentation ของเส้นใย
6. aerial layer มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic



ภาพที่ 2.1: ภาพแสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ Actinomycetes (isolate GMKU095) โดยการส่องดูด้วยกล้อง SEM (scanning electron microscope)
ที่มา : กรรณิการ์ ดวงมาลย์ และคณะ, 2552

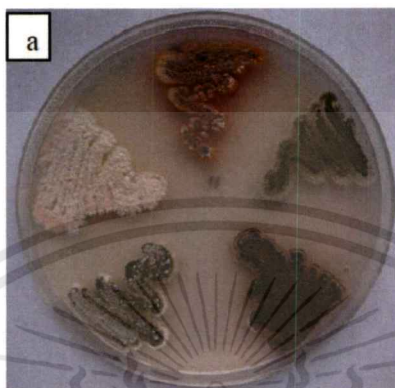
2.1.3 สรีรวิทยา

ปกติเซลล์จะติดสีแกรมบวกแต่ถ้ามีอายุมากอาจเป็นแกรมผันแปรได้ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง (surface culture) และในอาหารเหลว (submerge culture) มีลักษณะต่างกันคือการเจริญในอาหารเหลวเซลล์จะเจริญจับกันเป็นกลุ่มของเส้นใยที่เรียกว่า pellets แต่สำหรับ เชื้อบางชนิด เช่น *Norcadia corallina* เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีการเขย่าให้อากาศเชื้อจะมีลักษณะเป็นรูปแท่ง (rod) มีการแบ่งเซลล์แบบ binary fission และแบบ fragmentation เมื่อหยุดการเจริญในขณะที่การเจริญบนอาหารแข็งที่มีส่วนประกอบของอาหารเช่นเดียวกับในอาหารเหลวเชื้อเจริญแบบสร้างเส้นใย (filamentous form) ในลักษณะที่ยึดติดแน่นกับผิวหน้าอาหารวุ้น และมี fragmentation ของเส้นใยเมื่อมีอายุมากขึ้น

โดยทั่วไปผิวโคโลนีจะมีลักษณะเรียบ หรือขรุขระ มีหลายสี ได้แก่ ขาว แดง เหลือง เขียว น้ำเงินและม่วง (Metting, 1992) สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกสกุลของเชื้อได้ ซึ่งสีของโคโลนีที่เห็นเป็นสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบนและสามารถเปลี่ยนตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ อาหารที่นิยมใช้เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทให้สร้างสปอร์ คือ ISP2 (International *Streptomyces* Project) ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งจะมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อสามารถพบได้ 3 แบบคือ

1. โคโลนีแบบหยาบหรือเรียบยึดเกาะกับผิวหน้าอาหารอย่างหลวม ๆ เป็นการสร้าง aerial mycelium ปกคลุมผิวหน้าอาหาร มักพบในแอกติโนมัยซีทที่มีการเจริญในระยะ transient mycelial มีการเจริญของ mycelia ที่ไม่แน่นอน
2. โคโลนีไม่มี substrate mycelium มี aerial mycelium ที่ยึดเกาะกับอาหารด้วยส่วนที่ยึดเกาะพิเศษที่เรียกว่า holdfast

3. โคโลนีมีลักษณะเกาะกันแน่นคล้ายแผ่นหนัง aerial mycelium ค่อนข้างโป่งและยึดกับ substrate ด้วยเส้นใยที่แทงลงไปใ้อาหารโดยเส้นใยที่อยู่เหนืออาหารเรียกว่า aerial mycelium และเส้นใยที่อยู่ภายใต้อาหารเรียกว่า substrate mycelium สำหรับในอาหารเหลวเรียกเส้นใยที่อยู่บนผิวอาหารว่า generative mycelium และเส้นใยที่อยู่ในอาหารว่า vegetative mycelium



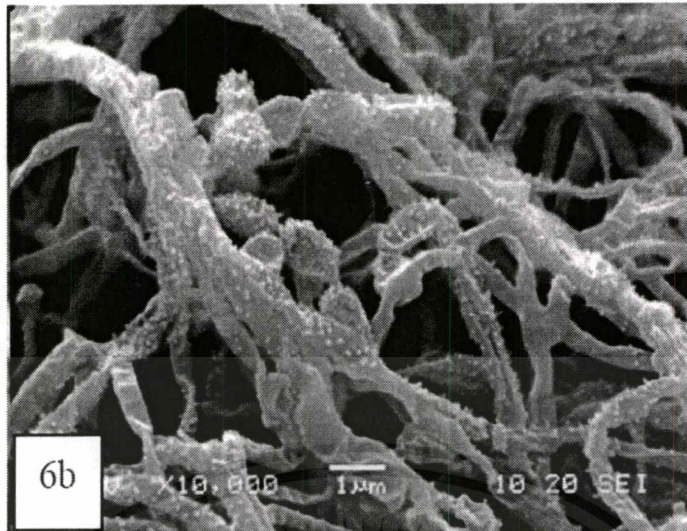
ภาพที่ 2.2: ลักษณะการเจริญของเชื้อ Actinomycetes บนอาหาร oatmeal agar
ที่มา : กรรณิการ์ ดวงมาลย์ และคณะ, 2552

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของแอคตินอมัยซีสที่โดยทั่วไปพบได้ 2 แบบ คือแบบ mycelium fragmentation และแบบ sporulation ในพวก *Streptomyces* spp. จะมีการสร้างเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษตามความยาว aerial conidia เกิดจากการขยายตัวของเซลล์และมีผนังหนาขึ้นเรียกว่า chlamydospore หรือ arthrospore มักพบแบบเดี่ยว ๆ (single spore) หรือต่อกันเป็นสายโซ่ (chain) ในพวก *Actinoplanes armenicus* สามารถสร้างสปอร์ได้ 2 แบบ คือ สปอร์แบบมี flagella เรียกว่า zoospore ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ และสร้างสปอร์แบบ *Streptomyces* - type คือ สร้าง arthrospore บน aerial mycelium ในการสร้างสปอร์แบบใดนั้นมักขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เชื้อเจริญอยู่ เชื้อ *Kitasatoa* spp. และ *Pilimolia* spp. มักจะพบมีการสร้างสปอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ภายใน vesicle และแบบเคลื่อนที่ไม่ได้มีลักษณะต่อกันเป็นสายโซ่ ใน *Micromonospora* spp. สร้างสปอร์แบบ chlamydospore เป็นคู่ที่ตำแหน่งปลายเส้นใย บริเวณ intercalary และบริเวณ interminate (Mendez et al., 1985)

ลักษณะการสร้างสปอร์ของแอคตินอมัยซีสสามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบคือ

1. Endogenous formation เป็นสปอร์ที่มีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดีอยู่ภายใน cytoplasm ของเส้นใยเดิม (parent hyphae) พบในพวก thermophilic actinomycetes เช่น *Thermoactinomyces* และ *Actinobifida*

2. Exogenous formation แอคตินอมัยซีสส่วนใหญ่สร้างสปอร์แบบ exogenous โดยเฉพาะ *Streptomyces* spp.



ภาพที่ 2.3: ภาพแสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ Actinomycetes (isolate GMKU095) โดยการส่องดูด้วยกล้อง SEM (scanning electron microscope) มีลักษณะเป็น oval shape แบบมีผิวสปอร์แบบ spiny ที่มา : กรรณิการ์ ดวงมาลย์ และคณะ 2552

2.1.4 ประโยชน์ของแอกติโนแบคทีเรีย (กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน, 2555)

ประโยชน์ของแอกติโนมัยซีสที่รู้จักกันดีคือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ สารสี หรือสารอื่นๆ ได้ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอกติโนมัยซีส (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีสที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนมัยซีสทั้งหมด (McCarthy and Williams, 1990) เอนไซม์ที่แอกติโนแบคทีเรียสามารถผลิตได้มีหลายชนิดได้แก่ xylanase, cellulose, amylase และ chitinase เป็นต้น เอนไซม์ amylase ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีหลายชนิดที่สามารถผลิต amylase ได้ ได้แก่ *Micromonospora*, *Nocardia* และ *Streptomyces* (Das, 1996) เอนไซม์ amylase สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่น การลดความหนืดของแป้งในอุตสาหกรรมทอผ้า การเพิ่มหรือการผลิตสารให้ความหวานในอุตสาหกรรมเบียร์ หรือเครื่องดื่ม เป็นต้น ส่วนเอนไซม์ chitinase ที่มีคุณสมบัติในการย่อยไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของรา หรือเป็นองค์ประกอบของ exoskeleton ของพวก arthropod จินส์ที่สามารถผลิต chitinase ได้ได้แก่ *Streptomyces* (Dahiya, 2006) เอนไซม์ chitinase สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้เช่น นำมาทำ protoplast ของราเพื่อศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ของรา การสังเคราะห์สารต่างๆ การนำมาเป็น สารควบคุมทางชีวภาพเช่นใช้ควบคุมราที่ก่อโรคพืช และการนำมาย่อยสลายของเสียทางอุตสาหกรรมการแช่แข็งอาหารทะเลเป็นการเพิ่มมูลค่าของของเสียในอุตสาหกรรม เป็นต้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่เกิดโดยแอกติโนแบคทีเรียที่มีรายงานในช่วงปี ค.ศ. 2003-2005 แสดงดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรีย

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	แอคติโนแบคทีเรีย	กิจกรรมการยับยั้ง
Abyssomicins	<i>Verrucosipora</i> sp.	Antibacterial
Aureoverticillactam	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	Anticancer
Bonactin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; antifungal
Caprolactones	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Chandrananimycins	<i>Actinomadura</i> sp..	Antialgal; antibacterial; anticancer; antifungal
Chinikomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Chloro dihydroquinones	Novel actinobacteria	Antibacterial; anticancer
Diazepinomicin	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial; anticancer; antiflammatory
3,6-disubstituted indoles	<i>Streptomyces</i> sp..	Anticancer
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial
Gutingimycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Helquinoline	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacterial
Himalomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Komodoquinone A	<i>Streptomyces</i> sp.	Neuritogenic activity
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacterial
Marinomycins	<i>Marinispora</i>	Antibacterial; anticancer
Mechercharmucins	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer
Sporalides	<i>Salinispora tropica</i>	Unknown biological activity
Trioxacarcins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anticancer; antimalarial

ที่มา: Lam, 2006

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Castillo และคณะ (2003) รายงานว่าสารปฏิชีวนะ kakadumycins ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. NRRL 30566 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ส่วนสารปฏิชีวนะ meroparamycin ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. MAR01 สามารถยับยั้งได้ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบและ *Candida albicans* (El-Naggar et al., 2006) หรือ *Streptomyces padanus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ fungichromin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ได้

Shih และคณะ (2003) รายงานว่า แอคติโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากในดิน สามารถผลิตเอนไซม์ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ที่ช่วยย่อยสลายสารต่างๆ เช่น ลิกนิน ไคติน เซลลูโลส เป็นต้น นอกจากนี้บางชนิดสามารถย่อยสลายยาปราบศัตรูพืช เช่น diuron (Castillo et al., 2006) และ alachlor ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชที่มีพิษรุนแรง (Sette et al., 2005) และย่อยสลายยาฆ่าแมลง lindane (gamma-hexachloro cyclohexane)

Benimeli และคณะ (2008) แอคติโนแบคทีเรียสามารถผลิตวิตามินได้หลายชนิด เช่น *Streptomyces olivaceus* ผลิตวิตามิน B12 (Maitra and Roy, 1960) Strzelczyk and Leniarska (1985) รายงานว่าแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบบรอก ราก และดินอิสระสามารถผลิตกลุ่มของวิตามินบีได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตโทอะมีน ไบโอฟลาวิน ฟลาโวโปรตีน วิตามินบี 12 และโคเอนไซม์ เอ (Santos et al., 1976)

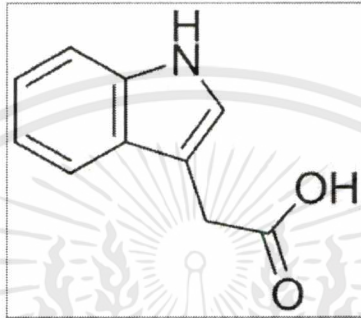
Dhanasekaran และคณะ (2009) คัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของ actinomycetes ในดินจากเมือง Vellar Estuary, Annagkoil และ Tamil Nadu ประเทศอินเดียพบว่า เมื่อจัดจำแนกกลุ่มประชากรของ actinomycetes ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และคุณสมบัติทางเคมี ส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายคลึงกับจิ้นัส *Streptomyces* ซึ่งเป็นดินจากเมือง Vellar Estuary จากรายงานของ Mishra (2007) ศึกษาลักษณะโคโลนีของไอโซเลต actinomycetes ทั้งหมด 159 ไอโซเลต ลักษณะโคโลนียกตัวนูน บางโคโลนีมีสีเทาหรือสีขาว โคโลนีมีลักษณะแบน บางโคโลนีสีเหลือง คล้ายผงแป้ง สีสปอร์ส่วนใหญ่สีขาว รองลงมาคือสีเทา สีครีมและสีเหลืองตามลำดับ งานวิจัยของ Gesheva (2002) คัดแยกแอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces*, *Micromonospora* และ *Nocardia* จากดินบริเวณรอบบรอกพีชตระกูลส้ม (*Citrus limon* และ *C. sinensis*) และคัดแยกได้ *Streptomyces hygroscopicus* ซึ่งสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ polyethers, azalomycin B และ nonpolyenic macrolide antibiotics

2.2 กรดอินโดลอะซิติก (IAA)

ออกซินธรรมชาติ (Natural auxin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

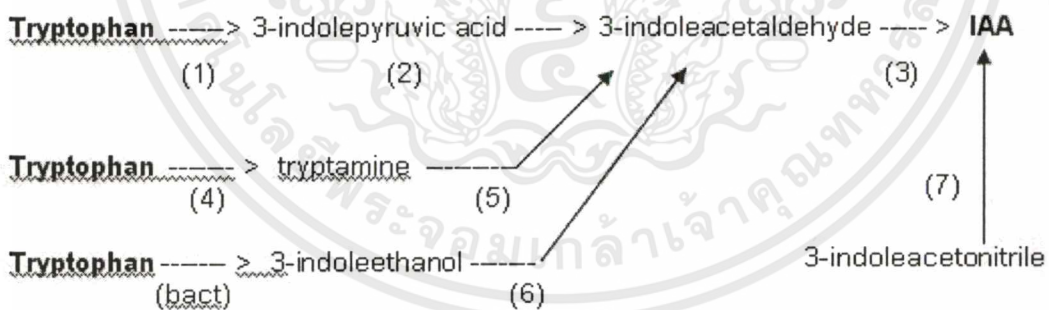
พืชสังเคราะห์ออกซินขึ้นมาเพื่อใช้ควบคุมการเจริญเติบโตนอกจากนั้นแบคทีเรีย เชื้อรา และสาหร่ายบางชนิดก็สังเคราะห์ออกซินได้ IAA เป็นออกซิน ที่สังเคราะห์ขึ้นในธรรมชาติกล่าวได้ว่าเป็น ออกซินธรรมชาติตัวเดียวในพืช มีรายงานถึงสารหลายชนิดในพืช ที่กระตุ้นการเจริญเติบโตเหมือนกับ ออกซิน เช่น indolepyruvic acid, indoleacetaldehyde ฯลฯ สารเหล่านี้มักมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับ IAA อาจเป็นสารต้นกำเนิด (precursors) ของ IAA และจะแสดงออกถึงปฏิกิริยาของออกซินก็ต่อเมื่อเปลี่ยนรูป ไปเป็นออกซินแล้ว



ภาพที่ 2.4: สูตรโครงสร้างของ IAA

ที่มา : http://th.swewe.com/word_show.htm/?71312_1/

การสังเคราะห์ IAA : สารต้นกำเนิดของ IAA คือกรดอะมิโน (tryptophan) ปกติในพืชจะมี 2 แนวทางในการสังเคราะห์ IAA จาก tryptophan คือ



(1) = transamination (2) = decarboxylation (3) = aldehyde dehydrogenase (4) = decarboxylation (5) = deamination (6) = indoleethanol oxidase (7) = nitrilase

ในพืชบางชนิดอาจมีความแตกต่างกันบ้าง เช่นในพืชตระกูลแตงมีการสังเคราะห์ indoleacetaldehyde จาก indoleethanol ในพืชวงศ์ Brassicaceae มีการสร้างสาร glucobrassicin จาก tryptophan แล้วเปลี่ยนเป็น indoleacetonitrile และ IAA ในที่สุดแบคทีเรียจะเปลี่ยน tryptophan ไปเป็น indoleethanol แล้วพืชจะเปลี่ยนสารนี้เป็น IAA อีกที

การควบคุมปริมาณของ IAA ในพืช : สารพวกฮอร์โมนในต้นพืชนั้นจะถูกควบคุมปริมาณอย่างเข้มงวดเพราะถ้ามีมากเกินไปก็จะเกิดผลเสียต่อพืชได้ การควบคุมปริมาณของออกซินในส่วนต่างๆของพืชนั้นเป็นเรื่องที่ซับซ้อนเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการ ขั้นตอนของการควบคุมมีดังนี้

1. การควบคุมในระดับของการสังเคราะห์ IAA ในส่วนต่างๆของพืช : ปกติสารทริปโตเฟนอิสระ (free-tryptophan) ในพืชจะมีปริมาณต่ำ และพบว่ารูป D-tryptophan นั้นจะเกิดปฏิกิริยาได้ดี กว่ารูป L-tryptophan จึงมีการเปลี่ยนจาก L-tryptophan ไปเป็น D-tryptophan ก่อนที่จะสังเคราะห์ต่อไปจนได้ IAA ขั้นตอนการเปลี่ยนจาก L-tryptophan ไปเป็น D-tryptophan ก็เป็นจุดสำคัญในการควบคุมการสังเคราะห์ IAA

2. การเกาะยึดของออกซินกับสารอื่น : เกิดเป็น bound auxin ซึ่งมีหลายรูปแบบ โดยทั่วไปเป็นรูปที่เก็บสะสมของ IAA ที่สามารถปลดปล่อยออกมาได้อีก (โดยจะต้องผ่านกระบวนการเช่น hydrolysis, enzymolysis หรือ autolysis ก่อน)หรืออาจเป็นผลที่เกิดจากการลดความเป็นพิษของ IAA ที่มีมากเกินไป เช่น auxin peptide ซึ่งไม่สามารถกลับกลับคืนเป็นออกซินอิสระได้อีก รูปของออกซินสะสมได้แก่ auxinglycoester ในเมล็ดและอวัยวะสะสมอาหารและ ascorbigen, glucobrassicin ในพืชวงศ์ Brassicaceae

3. การทำลาย IAA (Destruction of IAA) โดยเอนไซม์ หรือโดยแสง : การสลายตัวโดยเอนไซม์ (Enzymatic destruction) : โดยเอนไซม์ IAA oxidase ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์พวก peroxidase ปฏิกิริยานี้เป็นการทำลาย IAA อย่างถาวร การทำงานของเอนไซม์นี้จะถูกกระตุ้นโดยสาร monophenols (เช่น p-caumaric acid, 2,4-dichlorophenol ฯลฯ) แต่จะถูกยับยั้งโดยสาร ortho diphenols (เช่น pyrogallol, chlorogenic acid) การสลายตัวโดยแสง (Photooxidation) : เป็นการสลายตัวของ IAA โดยแสง จะต้องใช้แสงสูงมาก ผลที่ได้คือ 3-methyleneoxindole, 3-indolealdehyde จากการทดลองพบว่าแสงสีแดงกระตุ้นการเจริญของตายอดแต่ยับยั้งการยึดตัวของลำต้นส่วนที่อยู่ใต้ตายอดลงมาเป็นเพราะว่าแสงสีแดงไปกระตุ้นการสังเคราะห์ kaempferol ในลำต้น (ซึ่งสารนี้เป็น co-factor ของ IAA oxidase) และยังกระตุ้นการสร้าง quercetin (ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง IAA oxidase) ในใบ

4. ควบคุมโดยการลำเลียงออกซินออกจากบริเวณที่มีการสังเคราะห์ ไปยังส่วนอื่นๆของพืชทำให้ปริมาณออกซินในจุดนั้นๆไม่สูงเกินไป

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Haagen Smit et al. (1946) แยกบริสุทธิ์ IAA จากเอ็นโดสเปอร์มของเมล็ดข้าวโพดอ่อน (immature corn grain) แสดงให้เห็นว่ามี IAA ในพืชชั้นสูง และ ต่อมาก็พบในพืชอื่นอีกจำนวนมาก (หลังจากนั้นก็พบว่า IAA เป็นออกซินธรรมชาติชนิดเดียวที่พบในพืช) ต่อมาก็มีการศึกษาค้นคว้าอีกมากเกี่ยวกับการ เคลื่อนย้าย, ผลต่อการเจริญเติบโตและการเบี่ยงเบนของราก, การช่มของตายอด ฯลฯระหว่าง

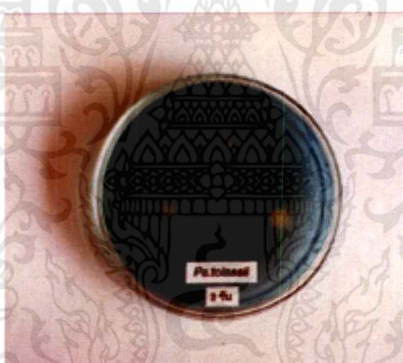
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สงครามโลกครั้งที่ 2 ได้ค้นพบออกซินหลายชนิด ที่สำคัญคือ 2,4-D ซึ่งเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูงๆจะทำให้พืชตายได้ โดยเฉพาะพืชใบกว้างจึงมีการนำมาใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชกันอย่างกว้างขวาง

2.3 ซิเดอโรโฟร์ (Siderophores)

เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดหนึ่งแบบเมทาบอลไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่จุลินทรีย์ทั้งเชื้อแบคทีเรียหรือราผลิตออกมาเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็กหรือมีในปริมาณต่ำมาก ปกติแล้วจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน และใช้ออกซิเจนได้บ้าง (aerobic and facultative anaerobic microorganism) สามารถผลิตซิเดอโรโฟร์ได้แทบทั้งสิ้น ซิเดอโรโฟร์ มีโครงสร้างหลายลักษณะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ปัจจุบันสามารถทราบลักษณะโครงสร้างทางเคมีแล้วไม่น้อยกว่า 200 โครงสร้างจำแนกได้เป็น 3 ประเภทคือ

1. ไฮดรอกซามาต (hydroxamate) หรือ ไธโอไฮดรอกซามาต (thiohydroxamate)
2. คาเทโคเลต (catecholate) หรือ ฟีนอเลต (phenolate)
3. คาร์บอกซิเลต (carboxylate)



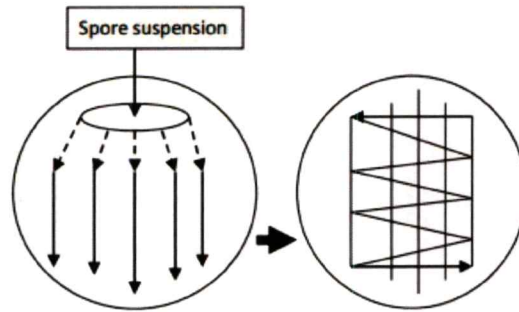
ภาพที่ 2.5 : ลักษณะการผลิตสารซิเดอโรโฟร์ของแบคทีเรียในดิน
ที่มา : รศ.ดร.เฉลิม เรืองวิริยะชัย

2.4 วิธี cross hatch streak (ดร. กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน, 2555)

เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาสีของกลุ่มสปอร์และสีของ substrate mycelium โดยวิธี cross hatch streak method ดังนี้

1. นำ isolate *Actinobacteria* มาทำการ cross hatch streak ลงบนอาหาร Oatmeal agar plate โดยเตรียม spore suspension ของ isolate *Actinobacteria* ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 2 ml

2. ปิเปต spore suspension 0.05 ml ที่เตรียมไว้หยดลงบนผิวหน้าอาหาร Oatmeal agar plate แล้วใช้ loop ฆ่าเชื้อและหยด spore suspension ลากเป็นแนวยาวขนานกัน 5 แถว หลังจากนั้นใช้ loop ฆ่าเชื้อขีดลากเชื่อเป็นเส้นคดเคี้ยวไปมาเชื่อมต่อระหว่าง 5 แถว ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6: วิธีการทำ cross hatch streak

ที่มา : ดร. กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน, 2555

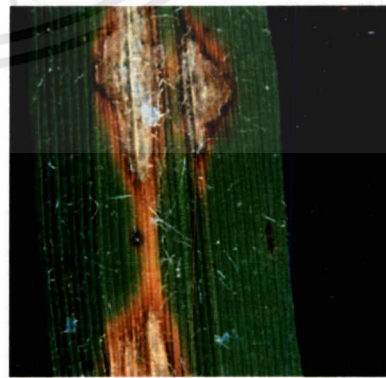
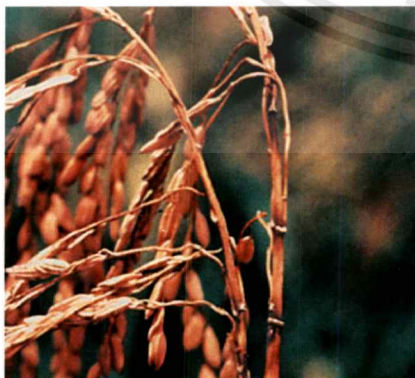
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 37 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-7 วัน ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วบันทึกผลดังนี้ สีของกลุ่มสปอร์ที่เจริญเหนืออาหาร สังเกตและบันทึกสีของ substrate mycelium โดยใช้ loop พลิกโคโลนีที่แผ่กระจายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.5 โรคใบไหม้ในข้าว(สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว,กรมการข้าว)

โรคใบไหม้ในข้าว (Rice blast Disease)สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Pyricularia grisea* Sacc. พบมากในน่าน้ำฝน ข้าวพันธุ์พื้นเมืองไวต่อช่วงแสง พบส่วนใหญ่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้

ลักษณะอาการ

1. ระยะกล้า ใบมีแผล จุดสีน้ำตาลคล้ายรูปตา มีสีเทาอยู่ตรงกลางแผลความกว้างของแผลประมาณ 2-5 มิลลิเมตร และความยาวประมาณ 10-15 มิลลิเมตร แผลสามารถขยายลุกลามและกระจายทั่วบริเวณใบ ถ้าโรครุนแรงกล้าข้าวจะแห้งพุบตาย อาการคล้ายถูกไฟไหม้



ภาพที่ 2.7: ภาพข้าว Panicle with neck blast. (Courtesy APS)

ภาพขวา Mature blast lesions showing necrotic (dead) borders. (Courtesy APS)

ที่มา : <http://www.growrice.info/index.php/rice-blast/>

2. ระยะแตกกอ อากาศพบได้ที่ใบ ข้อต่อของใบ และข้อต่อของลำต้น ขนาดแผลจะใหญ่กว่าที่พบในระยะกล้า แผลลุกลามติดต่อกันได้ที่บริเวณข้อต่อ ใบจะมีลักษณะซ้ำสีน้ำตาลดำ และมักหลุดจากกาบใบ

3. ระยะคอรวง (ระยะออกรวง) ถ้าข้าวเพิ่งจะเริ่มให้รวง เมื่อถูกเชื้อราเข้าทำลาย เมล็ดจะลีบหมด แต่ถ้าเป็นโรคตอนรวงข้าวแก่ใกล้เก็บเกี่ยว จะปรากฏรอยแผลซ้ำสีน้ำตาลที่บริเวณคอรวง ทำให้เปราะหักง่าย รวงข้าวร่วงหล่นเสียหายมาก



ภาพที่ 2.8: ภาพแสดงอาการของโรคใบไหม้ในข้าว

ที่มา : <http://www.growrice.info/index.php/rice-blast/>

การแพร่ระบาด

พบโรคใบไหม้ในแปลงต้นข้าวที่หนาแน่นทำให้อับลม ถ้าใส่ปุ๋ยสูงและมีสภาพแห้งในตอนกลางวันและชื้นจัดในตอนกลางคืน น้ำค้างยาวนานถึงตอนสายราว 9 โมง ถ้าอากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิประมาณ 22-25 องศาเซลเซียส ลมแรงจะช่วยให้โรคแพร่กระจายได้ดี

2.6 เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคใบไหม้ในข้าว *Pyricularia grisea*

2.6.1 สันฐานวิทยา

ลักษณะของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในข้าว ที่ประเทศญี่ปุ่นและไต้หวันได้ถูกอธิบายโดย Shira Sawada และ Nishi kado ดังนี้ เกิด mycelium ทั้งบนอาหารและ ใต้อาหาร ขนาดของ hypha 1.5^{μ} ไมโครเมตรเป็นเส้นใยแบบมีผนังกัน สร้าง conidia (spore เคลื่อนที่ได้) มี 1 นิวเคลียส สีดำ เส้นใยมีลักษณะใส ขนาด $14 \times 40 \times 6^{-13}$ ไมโครเมตรแต่ส่วนมากจะประมาณ $19-23 \times 7^{\mu}$ ไมโครเมตร ส่วนของฐาน ขนาด 4.8^{-10} ไมโครเมตรโดย สปอร์นั้นจะเจริญจาก apical หรือ basal cell น้อยมากที่จะเจริญจาก middle cell

Nishikado ได้อธิบายลักษณะทางกายภาพของ spore ของ *P.grisea* ไว้ว่า มีขนาดประมาณ $16-33 \times 5^{\mu}$ ไมโครเมตรโดยทั่วไปจะเป็น $22-27 \times 7^{\mu}$ ไมโครเมตรบนฐาน (basal) ขนาดประมาณ 1.2-1.8 ไมโครเมตร , basal cell 4.8-11.5 ไมโครเมตร middle cell 1.8-11.5 cell apical cell 6^{-14} ไมโครเมตร โดย spore ของ *P.grisea* ที่พบจากพืชทั่วไป ก็ไม่แตกต่างทางด้านอื่นนอกจากความยาวของ spore จาก ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

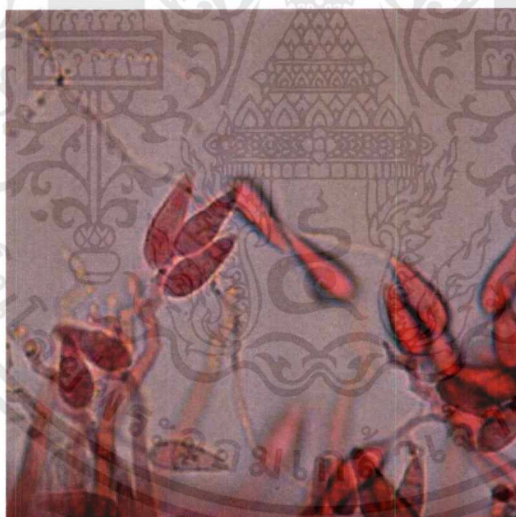
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบในข้าวที่มีปัญหา โดยเมื่อนำ 39 ไอโซเลตแบ่งเป็น 9 กลุ่ม มาทดสอบในอาหารที่ต่าง ๆ กัน พบว่า 4 กลุ่ม isolates spore สั้น และ อีก 5 ไอโซเลตมีขนาดยาวกว่า 26.8-29.9 ไมโครเมตรสรุปคือ แหล่ง carbon ที่ต่างกันทำให้ความยาวของ spore ต่างกัน

Mijan Hossain ได้สังเกต hypha ที่เป็นสีดำ และนำมาตรวจสอบ ทัวไปจะกว้าง 1-5.2 ไมโครเมตร Ramakrisan ได้ทดสอบ นำเชื้อ *P. grisea* ไปทดสอบในหลายๆ อาหาร เช่น oat meal agar , french bean agar และ อาหาร ที่ใส่ส่วนสกัดของพืชที่มันชอบขึ้นลงไป ผลคือ เชื้อเจริญได้ดีในอาหารที่มี ส่วนสกัดของพืชที่มันชอบนั้นก็คือข้าวที่เป็นโรค และ Sun et ทดสอบในอาหาร corn meal & rice straw agar พบว่าเกิด spore มาก Awoderu ได้ทดสอบ อัตราการเจริญที่ดีที่สุดนั้นอยู่ในอาหาร potato dextrose agar ในขณะที่สปอร์จะเยอะในอาหาร 1% starch yeast agar & Leonin agar

2.6.2 สรีรวิทยา

อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญและเกิด mycelia นั้นคือ 25-30 องศาเซลเซียสต่ำสุดคือ 8-9 องศาเซลเซียสและสูงสุดเป็น 51-52 องศาเซลเซียสและเมื่ออุณหภูมิ > 37 องศาเซลเซียสเชื้อจะเริ่ม เจริญช้า พบว่า *P. grisea* จะเจริญได้ดีที่อาหารที่มี hydrogen-ion ประมาณ 5-10 pH 4.4 โดย pH ที่ 2.35-2.9 จะหยุดโต เหมาะสมที่สุด ในช่วง 4.4 สร้างสปอร์ที่ pH 4.6-6.45 แต่สปอร์จะงอกที่ 4.6-5.45



ภาพที่ 2.9: ลักษณะสปอร์ (conidia) ของเชื้อ *Pyricularia grisea*. (Courtesy P.J. Landschoot)

ที่มา : http://chaleeprom.com/pd/ant00_rice_rice_blast_fungi_pyricularia_grisea_20130105_172308_98985.html

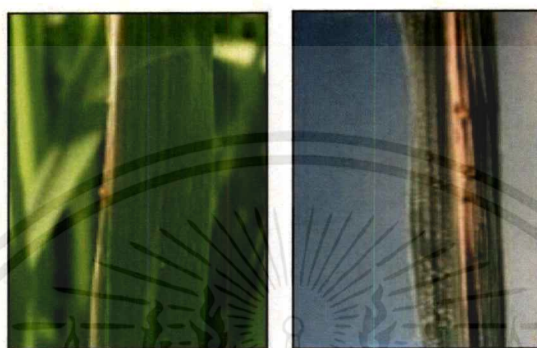
2.7 โรคขอบใบแห้ง

เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ลักษณะแผลที่เด่นชัดเมื่อ โรคลุกลามแล้ว จะเป็นทางสีเหลืองยาวตามใบข้าว บริเวณแผลมีลักษณะฉ่ำน้ำ ที่แผลมีหยดน้ำสีครีมข้น (bacterial ooze) ลักษณะกลมๆเท่าหัวเข็มหมุด แผลนี้เมื่อนานไปจะเปลี่ยนเป็นสีเทาหรือน้ำตาล ขอบใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

าวจะแห้ง อุณหภูมิที่พอเหมาะ และอากาศมีความชื้นสูง เช่นในช่วงปลายปีตั้งแต่เดือน ตุลาคม ไปจนถึง ธันวาคม นี้ จะเป็นปัจจัยแวดล้อมเสริมให้มีการระบาดของโรคไปทั่วภาคกลางของประเทศ ซึ่งกำลังอยู่ในฤดูปลูกข้าวรอบใหม่ปลายปี ดังนั้น ชาวนา จึงควรต้องระวังป้องกันการแพร่กระจายของโรคในระยะแตกกอหรือก่อนข้าวตั้งท้องก่อนที่โรคจะลุกลามไปถึงข้าวออกรวง เพราะจะทำให้ผลผลิตข้าวเสียหาย โดยเฉพาะโรคใบไหม้ ชาวนาจะต้องควบคุมโรคในระยะใบให้ได้ก่อนที่โรคจะลุกลามไปถึงระยะออกรวง



อาการโรคขอบใบแห้ง มีเชื้อโรคออกมาของแผล

ภาพที่2.10: แสดงอาการของโรคขอบใบแห้ง

ที่มา : http://chaleeprom.com/pd/ant00_rice_rice_blast_fungi_pyricularia_grisea_20130105_172308_98985.html

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centifuge)
2. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
3. ตู้ chamber
4. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
5. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)
6. เตาให้ความร้อน (Hot plate)
7. เครื่องวัด pH
8. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (ABSORPTION SPECTROPHOTOMETER)
9. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
10. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
11. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Balance 0.0001) และเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Balance 0.01)
12. กล้องจุลทรรศน์
13. ฟลาสก์ ขนาด 250 , 500 มิลลิลิตร
14. ปีกเกอร์ ขนาด 50 , 250 , 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
15. ขวดเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ(Duran)ขนาด 100 , 250 และ 500 มิลลิลิตร
16. กระบอกตวง ปริมาตร 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
17. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
18. หลอดทดลองและจานเพาะเลี้ยงเชื้อ
19. ตะเกียงแอลกอฮอล์
20. ลูบเชื้อเชื้อ
21. แท่งแก้วคนสาร
22. จุกยาง
23. Rack
24. สำลี ซ้อนตักสาร
25. ปิเปตขนาด 1 , 5 และ 10 มิลลิลิตร
26. UV Transilluminator

27. กระดาษเลเบลล์

3.1.2 สารเคมี

Copper sulphate.5H₂O, Ferrous sulphate.7H₂O, Manganese chloride.7H₂O, Zinc sulphate.7H₂O ; Basal mineral salts agar : Ammonium sulphate, Monopotassium phosphate, Dipotassium phosphate.3H₂O, Magnesium sulphate.7H₂O, Diced potatoes, Glucose, Dextrose, Sodium chloride, Peptone, Yeast extract, Dextrose, Calcium phosphate, Ammonium sulphate, Potassium chloride, Magnesium sulphate, Manganese sulphate, Ferrous sulphate, Proteose peptone, Dipotassium hydrogen phosphate, Magnesium sulphate heptahydrate,

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการส่งเสริมการเจริญของข้าว: ด้วยวิธี seedling bioassay

3.2.1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อแอกติโนมัยซีตส์ 89 ไอโซเลตมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารแข็ง A-9 ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.2.1.2 การเตรียมสารละลาย sporesuspension

เตรียมสารละลายผสมของ tween 80 ที่มีความเข้มข้น 0.05% NaCl 0.01 % น้ำกลั่น 500 ml. นำเชื้อที่เลี้ยงไว้แช่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายผสม ปริมาตร 5 ml. จากนั้นนำไปเทียบความขุ่นโดยเทียบกับสารละลาย McFarland standard No.05 ที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.2.1.3

3.2.1.3 การเตรียมความขุ่นมาตรฐาน

เตรียมสารละลายที่มีความขุ่นมาตรฐาน McFarland standard No.05 โดยใช้ 1.175% BaCl₂.2H₂O ปริมาตร 0.5 ml. ผสมกับ 1% H₂SO₄ ปริมาตร 99.5 ml. (โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ, 2551, URL) นำไปวัดความขุ่นด้วย Spectrophotometer ให้ค่า OD₆₂₅ ระหว่าง 0.08-0.10 เกือบ McFarland standard No.05 ไว้ในหลอดทดลองจุกเกลียวที่อุณหภูมิห้องในที่มืด (อายุไม่เกิน 6 เดือน) ก่อนใช้เทียบความขุ่น ต้องเขย่าให้เข้ากันทุกครั้ง

3.2.1.4 การเตรียมการเพาะกล้าข้าว

นำเมล็ดข้าวที่แยกไว้ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย sporesuspension จากนั้นแช่เมล็ดข้าวไว้ 2 ชั่วโมง นำดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในถ้วยพลาสติกแล้วคืบเมล็ดลงในถ้วยพลาสติกด้วยละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 เมล็ด หยอดสารละลาย sporesuspension ที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.1.2 ที่จะทดสอบลงไปปริมาณที่เท่ากันทุกหลุม จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ทำการเพาะกล้าข้าวและควบคุมการให้น้ำในปริมาณที่เท่ากัน เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยการวัดค่าการเจริญในด้านต่างๆ เช่น เปอร์เซ็นต์การงอก ขนาดของต้นกล้า น้ำหนักของต้นกล้า เพื่อนำมาคำนวณเป็น Seedling growthand evaluation test เปรียบเทียบกับ control โดยใช้วิธีการเดียวกันแต่ไม่ได้ใช้สารแขวนลอยในการเพาะกล้าข้าว

3.2.2ตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อที่มีการผลิตกรดอินโดลอะซิติก ชิเดอโรฟอร์และการย่อยสลายฟอสเฟต

3.2.2.1 การตรวจสอบกรดอินโดลอะซิติก (IAA) (Nassar, A.H.,2005)

เตรียม L-tryptophan ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 น้ำหนักต่อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธีการกรอง เติมนอนอาหาร glucose peptone broth (GPB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำเชื้อที่ต้องการทดสอบมา 2 ลูบ ใส่ลงไปแล้วปิดด้วยฟลอยด์ลูมิเนียม จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $12,000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมากรองด้วยกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร โดยการเก็บตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการกรองไว้ในแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำส่วนใสที่ได้จากการกรองมา 3 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง แล้วเติม Salkovski's reagent 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 30 นาที ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีเหลืองเป็นสีแดง หากเปลี่ยนสีแดงว่ามีกรดอินโดลอะซิติก

3.2.2.2 การตรวจสอบสารชิเดอโรฟอร์ (Schwyn,B. และ Neiland,J.B.,1986)

ทำการเตรียมอาหาร ISP9 ที่มีส่วนผสมของ casamino acid 0.45 กรัม ในอาหาร 900 มิลลิลิตรและปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง เท่ากับ 6.8-7.0 จากนั้นเตรียมสารละลาย Iron (III) solution (โดยเตรียมได้จาก $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกับ HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) และเตรียมสารละลาย chromo azulol S (CAS solution) โดยชั่ง CAS60.5 มิลลิกรัมมาละลายกับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลาย Hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA solution) โดยชั่ง HDTMA 72.9 มิลลิกรัมละลายในสารละลายน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เมื่อเตรียมครบ 3 ชนิดแล้ว นำสารละลาย Iron (III) solution มา 10 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย CAS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำมาผสมกับสารละลาย HDTMA 40 มิลลิลิตร จนครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนของอาหาร ISP9 และสารละลายผสม 100 มิลลิลิตร มาผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วรออาหาร ISP9 กับสารละลายผสมเย็นลงเหลือเพียง 50 องศาเซลเซียส นำสารละลายผสม 100 มิลลิกรัม ผสมกับอาหาร ISP9 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันจนครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยขั้นตอนการผสมต้อง

อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อทั้งหมด จากนั้นเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รอให้อาหารแข็งเป็นวุ้น แล้วด้วยอย่างเชื้อที่ใช้ทดสอบมา Streak บริเวณกลางอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการสร้างสารซีเคอร์โรฟออร์ จากลักษณะการเกิดส่วนใสสีเหลืองบนอาหาร โดยวัดเป็นหน่วยมิลลิเมตร

3.2.2.3 การตรวจสอบเชื้อที่มีคุณสมบัติการย่อยฟอสเฟต (Freitas, J.R.,1997)

ทำการเตรียมอาหาร Pikovskaya's medium (PVA) (Pikovskaya, 1948) ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.2 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเลี้ยง รอให้แข็งเป็นวุ้น จากนั้นนำตัวอย่างเชื้อที่ใช้ทดสอบมา Streak บริเวณกลางอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสารฟอสเฟต จากลักษณะการเกิดส่วนใสบนอาหาร โดยวัดเป็นหน่วยมิลลิเมตร

3.2.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ปฏิชีวนะต่อเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าว : ด้วยวิธี dual culture technique

ทำการทดสอบ โดยนำเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาต่อเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงร่วมกับเชื้อสาเหตุของโรค Control ได้แก่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค (*P.grisea*) โดยทำตามวิธี dual culture ซึ่งเป็นการนำเชื้อที่คัดเลือกได้มาทดสอบว่าเป็นปฏิชีวนะกับสาเหตุของโรค โดยดูการเจริญบนอาหาร PDA ทำแบบแบ่งจานเพาะเชื้อ (Plate) เป็น 2 ฝั่ง จากนั้นเขียนเชื่อมาวางไว้ให้ห่างกัน 6 cm. ตรวจสอบผลโดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับ control

3.2.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ปฏิชีวนะต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ทำการทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) โดยใช้วิธีการ streak plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสารและแพร่สารเข้าสู่วุ้นอาหาร จากนั้นทำการตรวจสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากต้นข้าวที่เป็นโรคข้าว 2 ชนิด ได้แก่ *Xanthomonas oryzae*X3 และ *Xanthomonas oryzae* X4 โดยทำการลากเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบให้ชิดและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อให้มากที่สุด จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้

3.2.5 การจัดกลุ่มเชื้อ : นำเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดเลือกได้มาทดสอบทางชีวเคมีและศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.2.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ทำการตรวจสอบลักษณะการเจริญโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (IPS) ชนิดต่างๆ โดยวิธี Crosshatch Streak (Shiring and Gottlieb, 1996) ตรวจสอบการทดลองโดยการดูรูปร่าง การเรียงตัว การทำการเจริญของเชื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีโดยทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1977) การสลายเจลาติน และการรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975)



บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าว ด้วยวิธี Seedling Bioassay

เมื่อทำการทดสอบเพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวด้วย วิธี Seedling Bioassay ของเชื้อแอคติโนมัยซีท์จำนวน 89 ไอโซเลตโดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร A-9 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการ pre-germ เมล็ดข้าวด้วยสารละลาย sporesuspension ของเชื้อและทำการเพาะกล้าข้าวเป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีท์จำนวน 10 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวสูงกว่าค่า Control โดยวัดจากค่าการเจริญต่างๆ เช่น เปอร์เซ็นต์การงอก น้ำหนักของต้นกล้า ขนาดของต้นกล้า ซึ่งสายพันธุ์ที่มีค่าสูงกว่า Control ได้แก่ NR8-8*, PP2R-9-3, PP2R-4-1, G3-8, G4-9, G4-A1, G10-1, G8-6, G6-9 และ VT4-3 ซึ่งมีค่าการเจริญต่างๆดังนี้

ตารางที่ 4.1 ตารางสรุปผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่มีการส่งเสริมการเจริญของข้าว ด้วยวิธี Seedling Bioassay

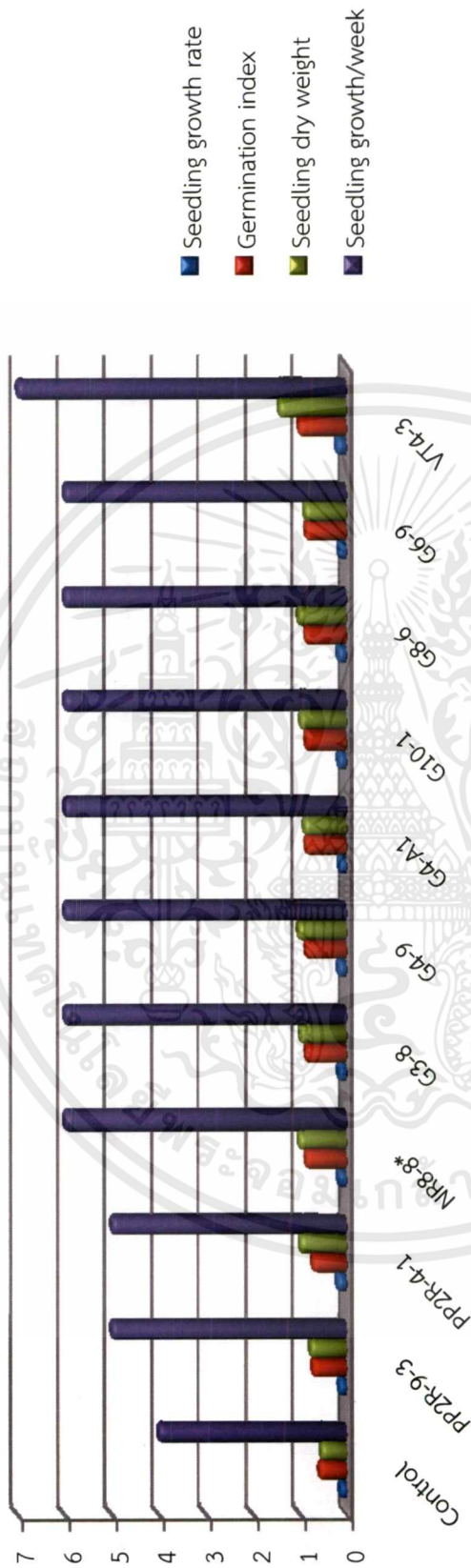
รหัสเชื้อ	Seedling growthand evaluation test			
	Seedling growth rate	Germination index	Seedling dry weight	Seedling growth/week
Control	0.1349	0.5714	0.5397	4
PP2R-9-3	0.1527	0.7142	0.7634	5
PP2R-4-1	0.1965	0.7142	0.9823	5
NR8-8*	0.1682	0.8571	1.0094	6
G3-8	0.1640	0.8571	0.9841	6
G4-9	0.1702	0.8571	1.0211	6
G4-A1	0.1485	0.8571	0.8910	6
G10-1	0.1622	0.8571	0.9731	6
G8-6	0.1702	0.8571	1.0210	6
G6-9	0.1465	0.8571	0.8790	6
VT4-3	0.2041	1.0000	1.4286	7

ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ กรรณิการ์ ดวงมาลย์และคณะ พบว่าการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลต K8S3 แซ่เมล็ดข้าวทำให้ต้นข้าวมีการงอกได้ดีที่สุดดังนั้นจึงได้เลือกไอโซเลต K8S3 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแบบบ่มเขย่า เป็นเวลา 1 วันและนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฟอกแล้วมาแช่ในเซลล์แขวนลอยของเชื้อเป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นจึงนำมาปลูกในถาดบรรจุทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 100 เมล็ดต่อ 1 ถาดเทียบกับชุดควบคุมซึ่งแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาทีหลังจากปลูกไว้เป็นเวลา 7 วันจึงนำมาวัดความสูง

ของต้นพบว่าค่าความสูงเฉลี่ยของชุดควบคุมมีค่าความสูงของต้นข้าวเท่ากับ 3.95 เซนติเมตรในขณะที่ความสูงของเมล็ดข้าวที่แช่ในเซลล์แขวนลอยของไอโซเลท K8S3 ให้ค่าความสูงของต้นข้าวเท่ากับ 5.03 เซนติเมตรซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าให้ค่าความสูงที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนั้นไอโซเลทดังกล่าวน่าจะมีประสิทธิภาพดีในการช่วยทำให้ข้าวมีการเจริญได้รวดเร็วขึ้นและมีศักยภาพในการนำไปใช้ในแปลงข้าวต่อไปและสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ วราภรณ์ ภูภักติพันธ์และสุดฤดี ประเทืองวงศ์ พบว่ากรรมวิธีที่คลุกเมล็ดข้าวด้วย suspension ของเชื้อผสมที่เลี้ยงร่วมกันระหว่าง SP007s+Spt360+D10 (ประมาณ 10^8 CFU/ml) ข้าวทั้งพันธุ์ต้านทาน (สุพรรณบุรี 1) และอ่อนแอ (ขาวดอกมะลิ) มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดเมื่ออายุ 14 วันโดยมีความสูงต้น 12.2 และ 7.6 เซนติเมตรตามลำดับ



แผนภูมิความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีการออก อัตราการเจริญของต้นกล้า น้ำหนักแห้งของต้นกล้า และ จำนวนต้นกล้าทั้งหมด กับเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ และ Control



ภาพที่ 4.1 แผนภูมิความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีการออก อัตราการเจริญของต้นกล้า น้ำหนักแห้งของต้นกล้า และจำนวนต้นกล้าทั้งหมด กับเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ และ Control

ตารางที่ 4.1.1 ผลการทดสอบ Seedling growthand evaluation test (Seedling Bioassay)

รหัสเชื้อ	Seedling growthand evaluation test			
	Seedling growth rate	Germination index	Seedling dry weight	Seedling growth/week
1. Control	0.1349	0.5714	0.5397	4
2. D31SR-9-7	0.2964	0.7142	1.4820	5
3. G3-6	0.1164	0.4285	0.3491	3
4. DCWR-9-10	0.3619	0.7142	1.8094	5
5. NR8-8*	0.1682	0.8571	1.0094	6
6. PP2R-4-1	0.1205	0.7142	0.6023	5
7. CP2R-9-2	0.1198	0.4285	0.3593	3
8. PCWR-4-1	0.0601	0.5714	0.2403	4
9. PCWR-4-3	0.0906	0.7142	0.4532	5
10. PCWR-4-5	0.2540	0.4285	0.7621	3
11. PCWR-4-8	0.2383	0.5714	0.4765	2
12. PCWR-4-9	0.1130	0.5714	0.4520	4
13. PCWR-8-3	0.1126	0.7142	0.5632	5
14. PCWR-8-4	0.0754	0.8571	0.4523	6
15. PCWR-9-3	0.1521	0.4285	0.4564	3
16. DCWR-9-6	0.0595	0.8571	0.3567	6
17. DCWR-4-1	0.1523	0.2857	0.3045	2
18. DCWR-4-3	0.2347	0.4285	0.7040	3
19. DCWR-4-5	0.1703	0.2857	0.3406	2
20. PCWR-4-6	0.1431	0.5714	0.5722	4

ตารางที่ 4.1.2 ผลการทดสอบ Seedling growthand evaluation test (Seedling Bioassay)

รหัสเชื้อ	Seedling growthand evaluation test			
	Seedling growth rate	Germination index	Seedling dry weight	
			Seedling growth/week	
21. DCWR-4-7	0.1969	0.1969	0.5908	3
22. DCWR-8-1	0.1514	0.1514	0.6054	4
23. DCWR-8-3	0.1767	0.1767	0.5302	3
24. DCWR-9-3	0.0527	0.0527	0.1053	2
25. DCWR-9-4	0.1091	0.1091	0.5453	5
26. PCWR-9-10	0.1009	0.1009	0.5043	5
27. PCWR-9-8	0.1053	0.1053	0.4210	4
28. AT2L-1	0.0709	0.0709	0.2126	3
29. AT2L-11	0.1724	0.1724	1.0343	6
30. AT2L-14	0.1093	0.1093	0.5463	5
31. NR7-9	0.0981	0.0981	0.4905	5
32. NR8-13	0.1135	0.1135	0.4539	4
33. DCWR-9-6	0.1025	0.1025	0.3074	3
34. DCWR-9-7	0.1070	0.1070	0.3210	3
35. DCWR-9-SW	0.1314	0.1314	0.3943	3
36. AT1L-9	0.1196	0.1196	0.4783	4
37. PT1L-5	0.1231	0.1231	0.4925	4
38. SPL-32	0.3684	0.3684	1.8420	5
39. SPL-5	0.1969	0.1140	0.3421	3
40. SL2-32	0.1514	0.1027	0.2054	2

ตารางที่ 4.1.3ผลการทดสอบ Seedling growthand evaluation test(Seedling Bioassay)

รหัสเชื้อ	Seedling growthand evaluation test			
	Seedling growth rate	Germination index	Seedling dry weight	
			Seedling growth/week	
41. SL2-8	0.1357	0.7142	0.6783	5
42. UP2R-8-2	0.1337	0.4285	0.4012	3
43. UP2R-4-2	0.1150	0.5714	0.4598	4
44. UP2S-4-1	0.1330	0.4285	0.3989	3
45. UP2S-9-3	0.0850	0.5714	0.3400	4
46. CP2R-9-2	0.0974	0.5714	0.3895	4
47. PP2R-9-3	0.1527	0.7142	0.7634	5
48. PP2R-8-4	0.1065	0.7142	0.5327	5
49. PP2R-8-1	0.1184	0.5714	0.4734	4
50. PP2R-4-7	0.0949	0.7142	0.4743	5
51. PP2R-4-3	0.0809	0.7142	0.4043	5
52. PP2R-4-1	0.1965	0.7142	0.9823	5
53. G1-7	0.1014	0.5714	0.4054	4
54. G1-8	0.1309	0.7142	0.6546	5
55. G2-5	0.0698	0.7142	0.3490	5
56. G2-8	0.1098	0.7142	0.5489	5
57. G2-11	0.2015	0.8571	1.2092	6
58. D31SR-9-5	0.1071	0.1025	0.3212	3
59. PCWR-4-7	0.1458	0.5714	0.5830	4
60. G3-1	0.1239	0.5714	0.4956	4

ตารางที่ 4.1.4 ผลการทดสอบ Seedling growthand evaluation test (Seedling Bioassay)

รหัสเชื้อ	Seedling growthand evaluation test			
	Seedling growth rate	Germination index	Seedling dry weight	
Seedling growth/week				
61. D31SR-4-5	0.1091	0.5714	0.4364	4
62. G3-8	0.1640	0.8571	0.9841	6
63. G4-8	0.1073	0.5714	0.4290	4
64. G4-9	0.1702	0.8571	1.0211	6
65. D31SR-4-4	0.1007	0.5714	0.4028	4
66. NR7-8	0.1483	0.5714	0.5931	4
67. G4-A1	0.1485	0.8571	0.8910	6
68. G10-1	0.1622	0.8571	0.9731	6
69. G3-7	0.1325	0.5714	0.5300	4
70. G8-6	0.1702	0.8571	1.0210	6
71. G6-12	0.1131	0.5714	0.4523	4
72. G6-9	0.1465	0.8571	0.8790	6
73. G5-8	0.0846	0.7142	0.4232	5
74. G6-5	0.1222	0.7142	0.6112	5
75. NR8-15	0.1167	0.1025	0.3502	3
76. NR-9-12	0.0700	0.1025	0.2100	3
77. NR-9-13	0.1035	0.1025	0.3105	3
78. NR-10-1	0.1070	0.1025	0.3211	3
79. D31SR-4-2	0.1078	0.7142	0.5389	5
80. D31SR-4-6	0.1468	0.7142	0.7338	5

ตารางที่ 4.1.5 ผลการทดสอบ Seedling growthand evaluation test (Seedling Bioassay)

รหัสชื่อ	Seedling growthand evaluation test		
	Seedling growth rate	Germination index	Seedling dry weight
81. PP2R-9-2	0.1331	0.5714	0.5322
82. DCWR-9-9	0.1441	0.1025	0.4322
83. DCWR-9-8-1	0.1605	0.1025	0.4814
84. DCWR-9-1	0.1649	0.8571	0.9891
85. DCWR-8-6	0.1306	0.7142	0.6532
86. UP2R-4-4	0.0922	0.7142	0.4609
87. VT4-3	0.2041	1.000	1.4286
88. AT2L-12	0.1284	0.7142	0.6419
89. LB-S-1-5	0.1325	0.5714	0.5301
90. AY19-1S	0.0844	0.7142	0.4218

หมายเหตุ อัตราการเจริญของต้นกล้า(Seedling growth rate) = $\frac{\text{น้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน (Seedling dry weight)}}{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ (Seedling growth)}}$

ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ (Germination index) = $\frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนต้นกล้าที่งอก)}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะ}}$

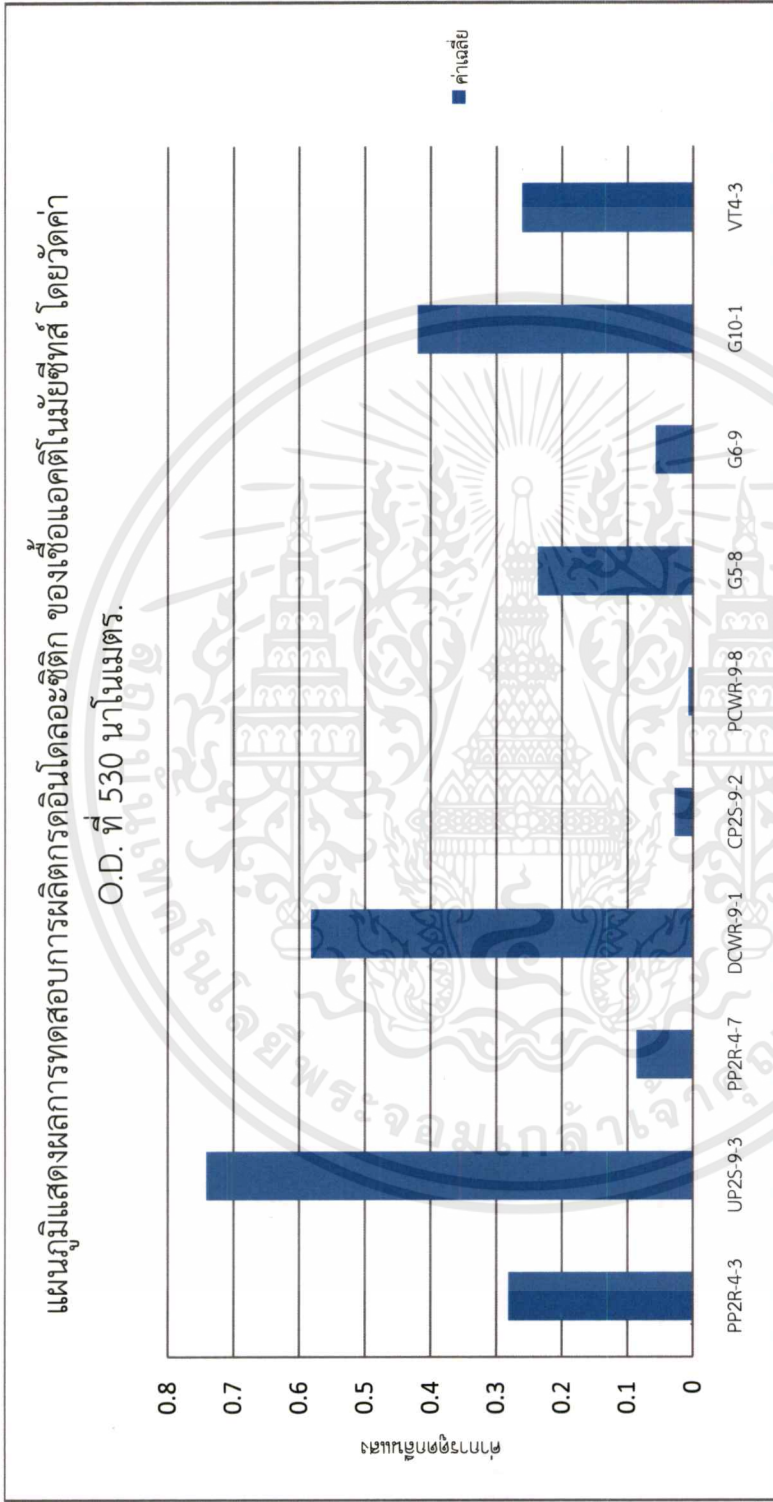
4.2 การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อ Actinomycetes ที่มีการผลิตกรดอินโดลอะซิติก ซิเตอร์โรฟอร์ และการย่อยสลายฟอสเฟต

1. การทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติก

จากการทดลองนำเชื้อแอกติโนมัยซีทส์จำนวน 89 ไอโซเลตมาเลี้ยงในอาหาร glucose peptone broth (GPB) ที่มี L-tryptophan ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงและหยด Salkovski's reagent 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 30 นาที พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีเหลืองเป็นสีแดงจำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ PP2R-4-3 , UP2S-9-3 , PP2R-4-7, DCWR-9-1 , CP2S-9-2 , PCWR-9-8 , G5-8 , G6-9 , G10-1 และ VT4-3 ดังตารางแสดงผลที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์จำนวน 10 ไอโซเลต โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแดง (OD) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	OD 530 nm.		
		ก่อนทดสอบ	หลังทดสอบ	ค่า OD สุทธิ
PP2R-4-3	ISP-2	0.433	0.714	0.281
UP2S-9-3	ISP-2	0.479	1.220	0.741
PP2R-4-7	ISP-2	0.087	0.173	0.086
DCWR-9-1	ISP-2	0.335	0.917	0.582
CP2S-9-2	ISP-2	0.118	0.146	0.028
PCWR-9-8	ISP-2	0.369	0.376	0.007
G5-8	ISP-2	0.207	0.444	0.237
G6-9	ISP-2	0.099	0.156	0.057
G10-1	ISP-2	0.249	0.669	0.420
VT4-3	ISP-2	0.429	0.690	0.261



ภาพที่ 4.2 แผนภูมิแสดงผลการทดสอบการผลิตอินโดลอะซิติก ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ โดยวัดค่า O.D. ที่ 530 นาโนเมตร

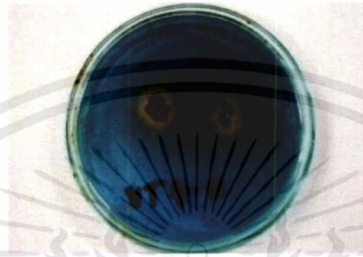
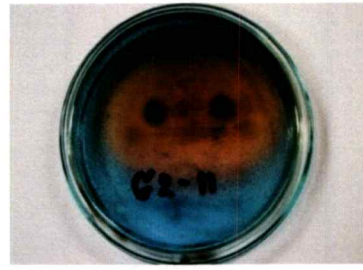
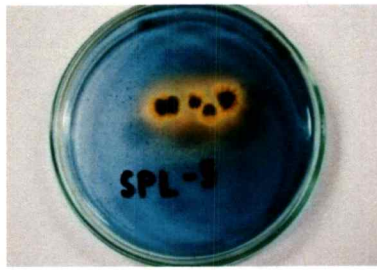


ภาพที่ 4.3 แสดงประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลอะซิติกของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ ซึ่งมีการเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีแดง

จากผลการทดลองที่ได้พบว่ามีแอคติโนมัยซีท 10 ไอโซเลตจากทั้งหมดที่ทำการทดลอง 89 ไอโซเลต สามารถผลิตสาร IAA หรือ Indole-3-acetic acid ซึ่ง IAA นั้นเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่ม Auxin มีหน้าที่เร่งการเจริญเติบโตของพืชในส่วนของลำต้นและราก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอคติโนมัยซีทส์มีความสามารถในการเป็น PGP หรือ plant growth promoting ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Subramaniam G. (2014) ที่กล่าวว่า แอคติโนมัยซีทส์ที่พบได้ทั่วไปในดินนั้น มีส่วนในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยมีการนำมาทดสอบการสร้างสารต่างๆ เช่น ซิเดอรอโรฟอร์ โคตินีนส เซลลูเลส โปรตีนเนส β -1,3-glucanase และ IAA หรือ Indole-3-acetic acid โดยวิธีการที่ใช้ทดสอบการสร้าง IAA นำมาจาก protocol ของ Patten and Glick (1996)

2. การทดสอบการผลิตสารซิเดอรอโรฟอร์

จากการทดสอบการผลิตสารซิเดอรอโรฟอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จำนวน 89 ไอโซเลต โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP-9 ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จำนวน 8 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตสารซิเดอรอโรฟอร์ ได้แก่ SL2-3 , SPL-5 , VT4-3 , PP2R-9-3 , G1-7 , NR9-13 , PP2R-4-3 และ G2-11



ภาพที่ 4.4 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่มีความสามารถในการผลิตสารซีเตอโรโพร

จากผลการทดลองพบเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ จำนวน 8 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการผลิตสารซีเตอโรโพร โดยไอโซเลต G2-11 มีการผลิตสารซีเตอโรโพรสูงที่สุดที่ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อแอกติโนมัยซีทส์สกุล *Streptomyces* โดยสารซีเตอโรโพรมีหน้าที่ในการทำให้ธาตุเหล็กเกิดการละลายและถูกดูดซึมโดยพืชได้ เนื่องจากธาตุเหล็กมีความสำคัญในการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Christian O. (2008) ที่พบแอกติโนมัยซีทส์สกุล *Streptomyces* ที่ผลิตสาร siderophore ขึ้นมาเพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยธาตุเหล็กจะมีผลในการผลิต ฮอร์โมน Auxin ของพืชเช่น IAA

3. การย่อยสลายฟอสเฟต

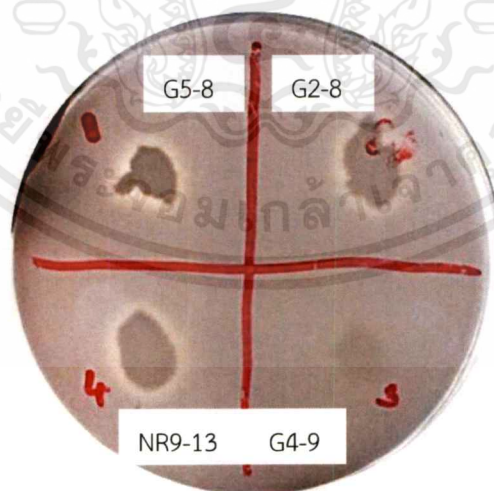
จากการทดลองนำเชื้อแอกติโนมัยซีทส์มาเพาะเลี้ยงในจานอาหาร Pikovskaya's medium (PVA) (Pikovskaya, 1948) ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.2 โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน พบว่ามีเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่สามารถย่อยฟอสเฟตในอาหาร PVA โดยการผลิต clear zone ลงในอาหารจำนวน 24 ไอโซเลตและมีจำนวน 7 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการย่อยฟอสเฟตในปริมาณสูง ได้แก่ G3-8 , G4-9 , G4-A1 , G3-7 , G5-8 , NR9-13 และ AY15-19

ฟอสเฟต ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}) เป็นสารประกอบของ ฟอสฟอรัสซึ่งเป็นธาตุที่สำคัญในการเจริญเติบโตของพืช แต่ฟอสฟอรัสนั้นละลายน้ำได้ยากถึงแม้ในดินจะมีฟอสฟอรัสมากก็ไม่สามารถนำไปใช้ได้ จากการทดลองพบว่า มีเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ จำนวน 7 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการเพิ่มการละลายฟอสเฟตโดยไอโซเลต NR9-13 มีการย่อยสลายฟอสเฟตได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ

Subramaniam G. (2014) ที่ระบุว่า มี Actinomycetes ที่สามารถย่อยฟอสฟอรัสให้เป็นฟอสเฟตซึ่งส่งผลในการเจริญเติบโตของพืช เป็น PGP (plant growth promoting)

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการย่อยฟอสเฟตของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์จำนวน 7 ไอโซเลต

รหัสเชื้อ	อาหาร	อัตราการเจริญ
G3-8	PVA	+++
G4-9	PVA	+++
G4-A1	PVA	+++
G3-7	PVA	+++
G5-8	PVA	+++
NR9-13	PVA	+++
AY15-19	PVA	+++

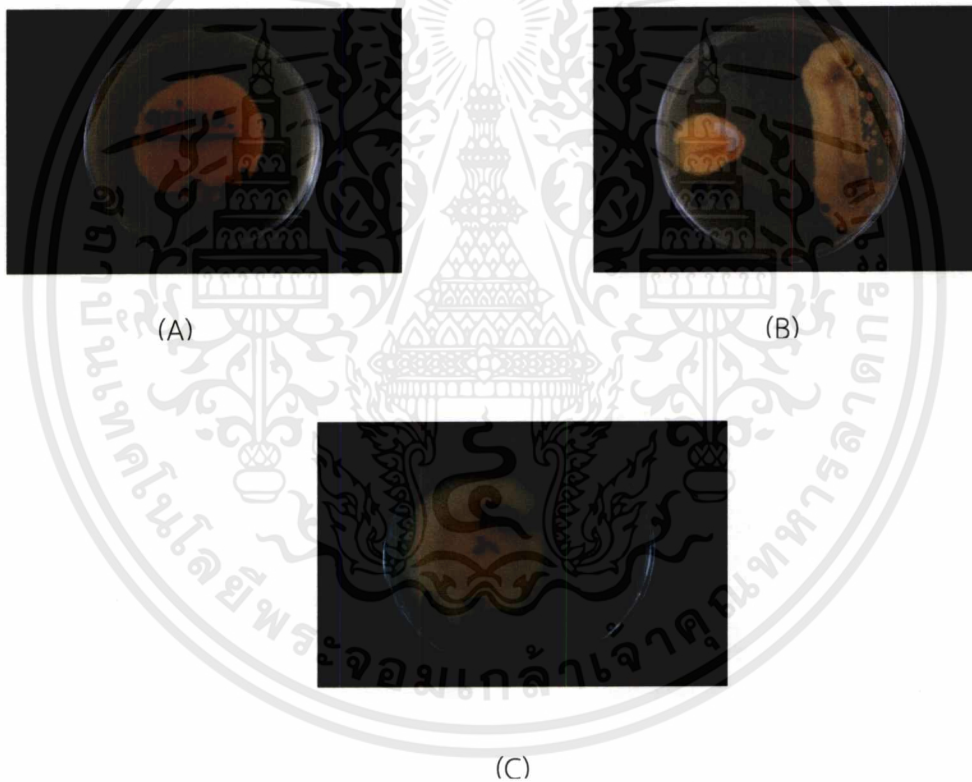


ภาพที่ 4.5 แสดงประสิทธิภาพการย่อยฟอสเฟตในอาหาร Pikovskaya's medium (PVA) (Pikovskaya, 1948) ของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์รหัส NR9-13, G4-9 และ G5-8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ปฏิชีวนะต่อเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าว *Pyricularia grisea* : ด้วยวิธี dual culture technique

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *P.grisea* ด้วยวิธี dual culture technique โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีตส์จำนวน 89 ไอโซเลตในอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันเพื่อให้เชื้อแพร่สารยับยั้งลงในอาหาร จากนั้นเลี้ยงเชื้อรา *P.grisea* โดยให้มีระยะห่างจากเชื้อแอคติโนมัยซีตส์ 2 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากผลการทดลองพบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยซีตส์จำนวน 9 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *P.grisea* ได้เมื่อเทียบกับเชื้อ Control ได้แก่ AT1L-19 , SPL-32 , DCWR-9-SW , PP2R-8-4 , NR9-12 , SPL-5 , NR7-9 , PP2R-4-3 และ VT4-3 ดังตารางที่ 4.4



ภาพที่ 4.6 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีตส์ในการยับยั้งเชื้อรา *P.grisea*

- (A) : ภาพของเชื้อรา *P.grisea* ที่เจริญในจานอาหาร (Control) ขนาด 5.0 cm.
 (B) : ภาพของเชื้อรา *P.grisea* และเชื้อแอคติโนมัยซีตส์รหัส VT4-3 ที่เจริญอยู่ในจานอาหารร่วมกันซึ่งเชื้อรามีขนาด 2.5 cm.
 (C) : ภาพของเชื้อรา *P.grisea* ที่เจริญในจานอาหาร (Control) ขนาด 5.0 cm.

ตารางที่ 4.4 ค่าการยับยั้งเชื้อรา *P.grisea* ของเชื้อ Actinomycetes

รหัสเชื้อ	ค่าการเจริญของเชื้อรา <i>P.grisea</i> (cm.)
Control	5.0
AT1L-19	3.0
SPL-32	4.2
DCWR-9-SW	3.1
PP2R-8-4	3.0
NR9-12	3.3
SPL-5	3.5
NR7-9	4.0
PP2R-4-3	3.3
VT4-3	2.5

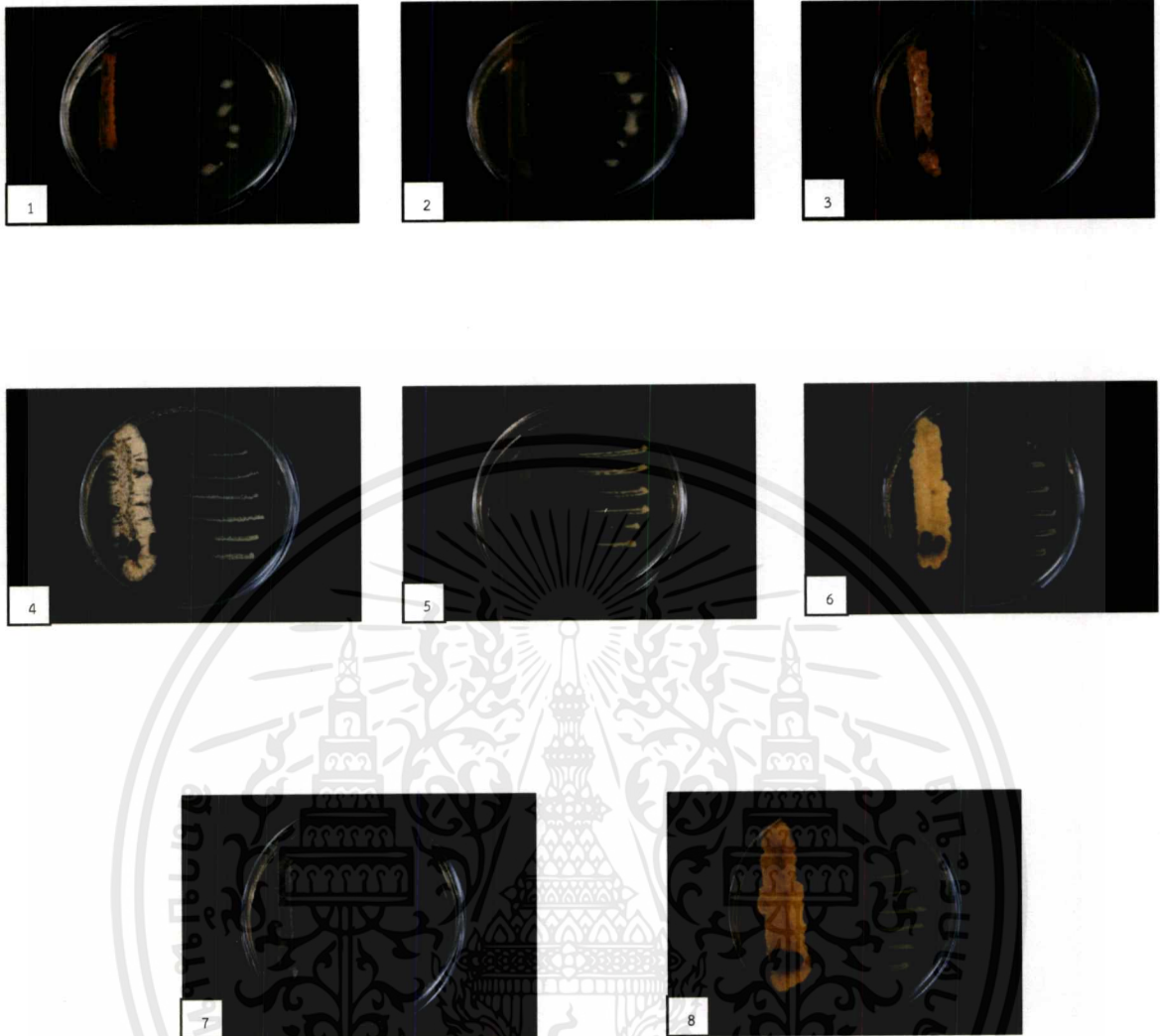
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ Actinomycetes กับเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* X3, X4

จากการทดสอบโดยนำเชื้อแอกติโนมัยซีทส์จำนวน 89 ไอโซเลตบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันจนเชื้อแพร่สำรยับยั้งลงอาหาร นำมาเพาะเลี้ยงกับเชื้อ *Xanthomonas oryzae* X3 และ X4 ในจานอาหารเดียวกัน โดยให้เชื้อ *Xanthomonas oryzae* เจริญตั้งฉากกับเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน พบว่ามีเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* X38 ไอโซเลตได้แก่ G6-9 , G2-8 , G3-6 , D31SR-4-6 , DCWR-9-SW , PCWR-4-6 , DCWR-9-6 และ D31SR-9-2 เชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* X4 จำนวน 5 ไอโซเลตได้แก่ PCWR-4-1 , D31SR-4-6 , DCWR-4-1 , G6-9 และ G8-6

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas oryzae* X3, X4

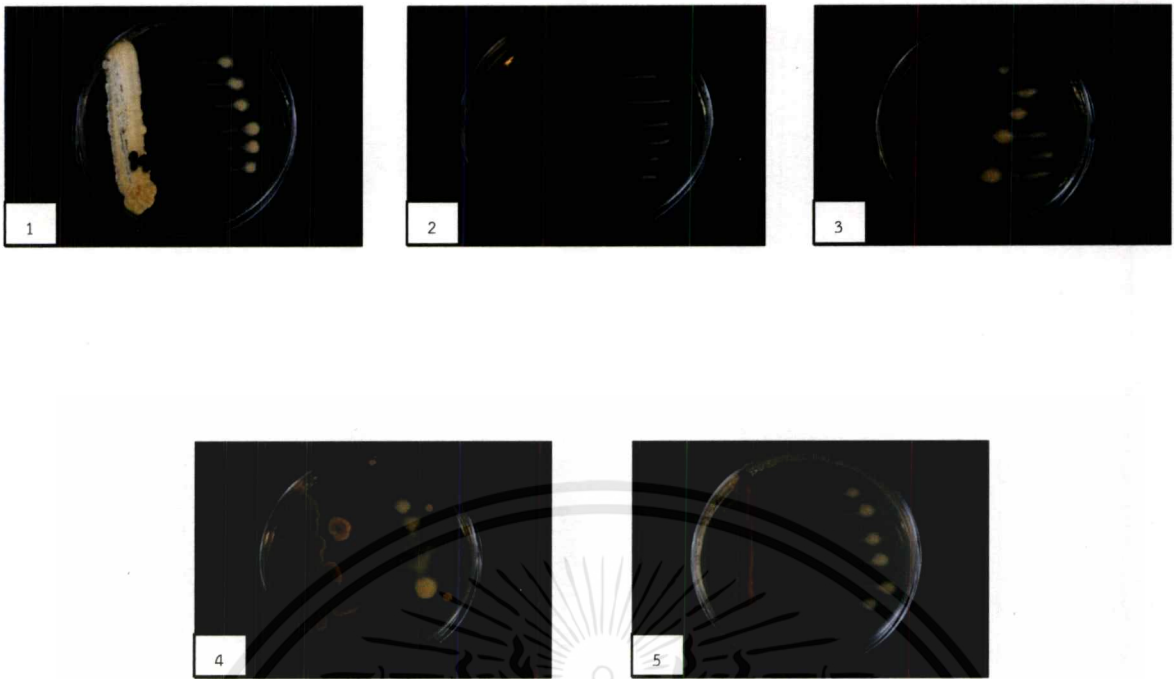
รหัสเชื้อ	ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคใบจุดสายพันธุ์ต่างๆ
G6-9	<i>Xanthomonas oryzae</i> X3
G2-8	<i>Xanthomonas oryzae</i> X3
G3-6	<i>Xanthomonas oryzae</i> X3
D31SR-4-6	<i>Xanthomonas oryzae</i> X3
DCWR-9-SW	<i>Xanthomonas oryzae</i> X3
PCWR-4-6	<i>Xanthomonas oryzae</i> X3
DCWR-9-6	<i>Xanthomonas oryzae</i> X3
D31SR-9-2	<i>Xanthomonas oryzae</i> X3
PCWR-4-1	<i>Xanthomonas oryzae</i> X4
D31SR-4-6	<i>Xanthomonas oryzae</i> X4
DCWR-4-1	<i>Xanthomonas oryzae</i> X4
G6-9	<i>Xanthomonas oryzae</i> X4
G8-6	<i>Xanthomonas oryzae</i> X4



ภาพที่4.7แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas oryzae* X3 ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ

หมายเหตุ

- 1) รหัสเชื้อ D31SR-9-2
- 2) รหัสเชื้อ DCWR-9-6
- 3) รหัสเชื้อ PCWR-4-6
- 4) รหัสเชื้อ G3-6
- 5) รหัสเชื้อ D31SR-4-6
- 6) รหัสเชื้อ G6-9
- 7) รหัสเชื้อ DCWR-9-SW
- 8) รหัสเชื้อ G2-8



ภาพที่4.8แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas oryzae* X4 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ

หมายเหตุ

- 1) รหัสเชื้อ G6-9
- 2) รหัสเชื้อ PCWR-4-1
- 3) รหัสเชื้อ D31SR-4-6
- 4) รหัสเชื้อ G8-6
- 5) รหัสเชื้อ DCWR-4-1

จากผลการคัดเลือกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทส์ที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *Pyricularia grisea* และเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* สายพันธุ์ X3, X4 พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่เราคัดเลือกมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* และเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* สายพันธุ์ X3, X4 ซึ่งส่งผลให้การเจริญของเชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวลดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับค่า control ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทส์มีศักยภาพในการผลิตสาร Secondary Metabolite ซึ่งอาจจะเป็นสารที่ใช้ในขบวนการป้องกันตัวเอง (self-defense) จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ยกตัวอย่างเช่น สารปฏิชีวนะ (สาร Erythromycin, Candicidin และ Cycloheximide) ซึ่งเป็นสารยับยั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย ที่ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อแอกติโนมัยซีทส์สกุล *Streptomyces* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Lam, 2006 โดยระบุว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทส์ที่มีรายงานในช่วงปี ค.ศ. 2003-2005 แสดงดังตารางที่ 2.1 (Lam, 2006)

4.5 การจัดกลุ่มเชื้อ : นำเชื้อ Actinomycetes ที่คัดเลือกได้มาทดสอบทางชีวเคมีและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

4.5.1 การทดสอบทางชีวเคมี

เมื่อนำเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ จำนวน 21 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าว มาทำการทดสอบทางด้านชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบการย่อยโปรตีนในนม ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท และ ความสามารถในการย่อยแป้ง ได้ผลการทดลองดังนี้

4.5.1.1 การทดสอบการย่อยโปรตีนในนมของเชื้อ Actinomycetes

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ในอาหาร skimmed milk agar ที่ค่า pH 7.0-7.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่ามีเชื้อที่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม โดยผลิต clear zone ภายในอาหาร จำนวน 16 ไอโซเลตนำมาหา Clear zone (Protease) = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส / ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ซึ่งสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในนมได้ดีที่สุด ได้แก่ SL2-32 และ UP2R-4-1

ตารางที่ 4.6 ค่าความสามารถในการย่อยโปรตีนในนมของเชื้อ Actinomycetes (Clear zone)

รหัสเชื้อ	Clear zone (Protease)
G3-1	5.86
NR9-13	1.19
G2-11	4.52
PP2R-4-3	2.27
UP2R-4-1	8.97
SL2-32	13.45
PT1L-5	7.08
SPL-5	2.57
AY1S-19	6.97
G10-1	2.01
G4-A1	3.69
DCWR-9-SW	1.57
G5-8	0.16
SL2-8	1.33
G1-7	2.28
G4-9	0.54



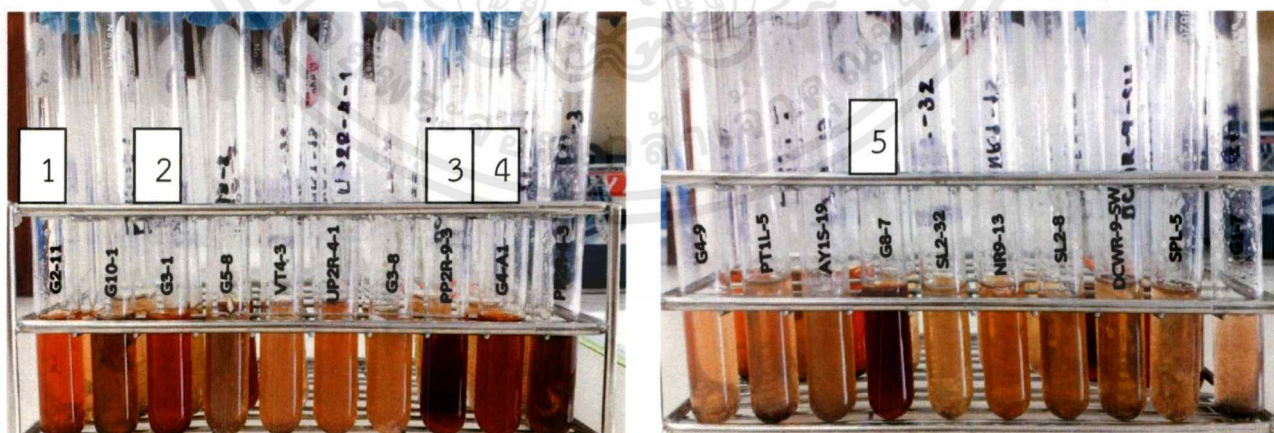
ภาพที่4.9แสดงประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนในนมของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

หมายเหตุ: A แสดงการย่อยโปรตีนของไอโซเลตSL2-32

: B แสดงการย่อยโปรตีนของไอโซเลตUP2R-4-1

4.5.1.2 ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction)

เมื่อทำการทดสอบเชื้อแอคติโนมัยซีทส์โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเปปโตโนโพแทสเซียมไนเตรท บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ทำการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรทโดยการหยดกรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic acid) ปริมาตร 2 หยด และสารละลายไดเมทิลแทปทิลลามีน (N,N-dimethyl-1-naphthylamine) ปริมาตร 3 หยด สังเกตผลการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร โดยไนเตรทจะเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ ซึ่งจะมีสีชมพูหรือแดง พบว่าสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงได้แก่ G4-A1 , PP2R-9-3 , G3-1 , G2-11 , และ G8-7



ภาพที่4.10แสดงประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

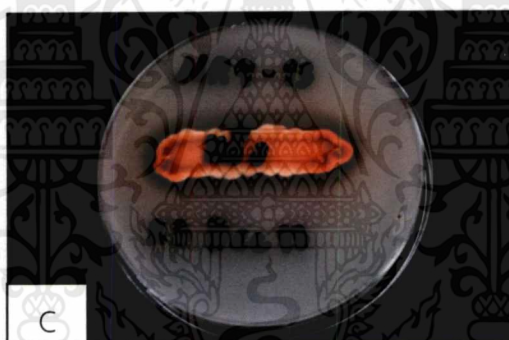
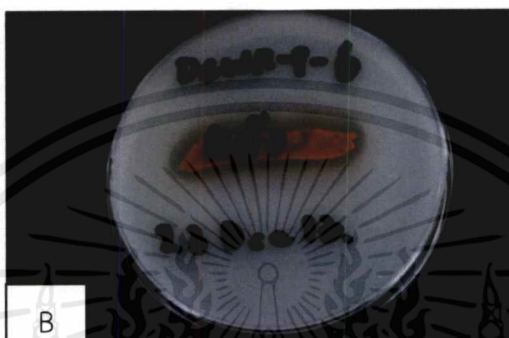
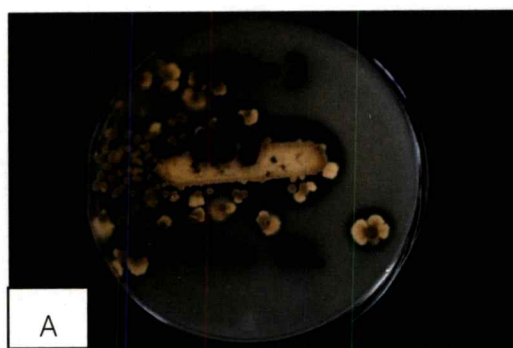
หมายเหตุ จากรูปหมายเลข 1-5 แสดงการรีดิวซ์ไนเตรท โดยอาหารมีการเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูเข้มและสีแดง

4.5.1.3 ความสามารถในการย่อยแป้ง

หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยซีสทีในอาหาร starch agar โดยการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าเชื้อแอสคิโนมัยซีสทีที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง โดยผลิต clear zone ภายในอาหารมีจำนวนทั้งหมด 18 ไอโซเลตจากนั้นนำมาหา Clear zone (amylase) = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส / ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ซึ่งเชื้อแอสคิโนมัยซีสทีที่มีความสามารถในการย่อยแป้งดีที่สุดได้แก่ VT4-3 , NR9-13 และ DCWR-9-6

ตารางที่ 4.7 แสดงประสิทธิภาพการย่อยแป้งของเชื้อแอสคิโนมัยซีสที โดยคำนวณอัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์

รหัสเชื้อ	อาหาร	Clear zone (amylase)
SL2-8	ISP-4	1.25
G5-8	ISP-4	1.38
G4-A1	ISP-4	1.22
DCWR-9-6	ISP-4	2.00
PP2R-8-4	ISP-4	1.28
NR9-13	ISP-4	2.10
SPL-5	ISP-4	1.34
VT4-3	ISP-4	3.98
G1-7	ISP-4	1.38
G10-1	ISP-4	1.42
DCWR-9-SW	ISP-4	1.16
PP2R-8-1	ISP-4	1.25
NR7-9	ISP-4	1.21
PP2R-4-7	ISP-4	1.40
UP2R-4-1	ISP-4	1.24
G4-7	ISP-4	1.68
G1-8	ISP-4	1.83
PP3R-4-3	ISP-4	1.32



ภาพที่ 4.11 แสดงประสิทธิภาพในการย่อยแป้งของเชื้อแอคติโนมัยซีตัส

- (A) แสดงประสิทธิภาพในการย่อยแป้งของไอโซเลต VT4-3
- (B) แสดงประสิทธิภาพในการย่อยแป้งของไอโซเลต DCWR-9-6
- (C) แสดงประสิทธิภาพในการย่อยแป้งของไอโซเลต NR9-13

4.5.1.4 ความสามารถในการสลายเจลาติน

นำแอคติโนมัยซีตัสจำนวน 21 ไอโซเลตมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว บลูเลียนเจลาติน (Boullion gelatin broth) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ตรวจสอบผลโดยการนำหลอดอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเมื่อมีการสลายเจลาตินโดยเชื้อแอคติโนมัยซีตัส จะทำให้อาหารมีลักษณะเหลว ซึ่งมีเชื้อแอคติโนมัยซีตัสจำนวน 13 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการสลายเจลาตินในอาหาร ได้แก่ NR9-13 , G4-9 , UP2R-9-3 , DCWR-9-1 , SPL-32 , SPL-5 , PP2R-4-7 , G5-8 , DCWR-9-8 , G3-8 , G2-11 , G1-7 และ VT4-3

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบการผลิตกรดอินทรีย์ การผลิตสารซีเดอโรฟอรัส การย่อยสลายฟอสเฟตของเชื้อแอคติโนมัยซีทีส

รหัสเชื้อ	ผลิตสาร IAA	ผลิตสาร Siderophore	เพิ่มการละลาย Phosphate
G3-8	-	-	+
G4-9	-	-	+
G4-A1	-	-	+
G8-7	-	-	+
G5-8	+	-	+
NR9-13	-	+	+
AY1S-19	-	-	+
SL2-32	-	+	-
SPL-5	-	+	-
VT4-3	+	+	-
PP2R-9-3	-	+	-
G1-7	-	+	-
PP2R-4-3	+	+	-
G2-11	-	+	-
UP2S-9-3	+	-	-
PP2R-4-7	+	-	-
DCWR-9-1	+	-	-
CP2S-9-2	+	-	-
PCWR-9-8	+	-	-
G6-9	+	-	-
G10-1	+	-	-

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของข้าว

รหัสเชื้อ	ย่อยสลายโปรตีนในนม	ย่อยสลายแป้ง	ริ้วสีในเตรท	สลายเจลาติน
G3-8	-	-	-	-
G4-9	+	-	-	+
G4-A1	+	+	+	-
G3-7	-	-	+	-
G5-8	+	+	-	+
NR9-13	+	+	-	+
AY1S-19	+	-	-	-
SL2-32	-	+	-	+
SPL-5	+	+	-	+
VT4-3	-	+	-	+
PP2R-9-3	+	+	+	+
G1-7	+	+	-	-
PP2R-4-3	+	-	-	-
G2-11	-	-	+	+
UP2S-9-3	-	+	-	+
PP2R-4-7	-	-	-	+
DCWR-9-1	-	-	-	+
CP2S-9-2	-	-	-	-
PCWR-9-8	-	-	-	+
G6-9	+	+	-	-
G10-1	+	-	-	-

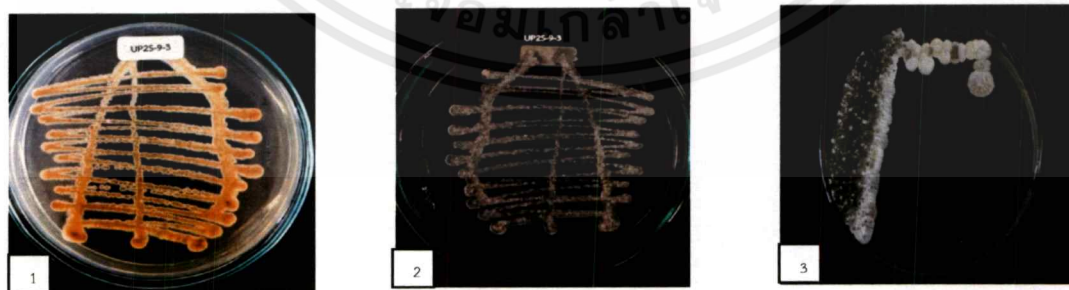
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่คัดเลือกได้ซึ่งมีฤทธิ์ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวจำนวน 21 ไอโซเลตจากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP-2 ที่ค่า pH 6.8 – 7.0 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นสังเกตลักษณะต่างๆของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศ และ สีสรงควัตถุ แสดงผลดังตารางที่ 4.10

พบว่าเชื้อที่สามารถสร้างเส้นใยในอาหารจำนวน 21 ไอโซเลตแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ สีเส้นใยในอาหารสีเหลืองจำนวน 18 ไอโซเลตคือ UP2S-9-3 , PP2R-4-7 , DCWR-9-1 , DCWR-9-8 , SPL-32 , PP2R-9-3 , G10-1 , PP2R-4-7 , DCWR-9-1 , DCWR-9-8 , G8-7 , G5-8 , DCWR-9-SW , PP2R-4-3 , G4-1 , VT4-3 , PTL1-5 และ PP2R-9-3 สีเส้นใยในอาหารสีชมพู คือ NR9-13 สีเส้นใยในอาหารสีเหลืองน้ำตาล คือ UP2S-9-3 และ สีเส้นใยในอาหารสีครีม คือ G10-1

นอกจากนี้ยังมีการสร้างสีเส้นใยในอากาศและสีรงควัตถุ ซึ่งแอกติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสีเส้นใยในอากาศได้มีจำนวนทั้งหมด 21 ไอโซเลตแบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างสีเส้นใยในอากาศสีขาว ได้แก่ NR9-13 , PP2R-4-7 , DCWR-9-1 , DCWR-9-8 , SPL-32 , G10-1 , PP2R-4-7 , PCWR-9-1 , DCWR-9-8 , G5-8 , DCWR-9-SW , G4-1 , VT4-3 , PTL1-5 และ PP2R-9-3

กลุ่มที่สร้างเส้นใยในอากาศสีเทา ได้แก่ PP2R-9-3 กลุ่มที่สร้างเส้นใยในอากาศสีขาวเทา ได้แก่ UP2S-9-3 กลุ่มที่สร้างเส้นใยในอากาศสีเหลือง ได้แก่ G8-7 และ PP2R-4-3 กลุ่มที่สร้างเส้นใยในอากาศสีครีม ได้แก่ G4-A1 เชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสีรงควัตถุลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มีจำนวน 12 ไอโซเลตแบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างสีรงควัตถุสีชมพู ได้แก่ NR9-13 กลุ่มที่สร้างสีรงควัตถุสีน้ำตาล ได้แก่ DCWR-9-1 , PP2R-9-3 , G10-1 , UP2S-9-3 , PP2R-4-7 และ DCWR-9-8 กลุ่มที่สร้างสีรงควัตถุสีเหลือง ได้แก่ G5-8 , DCWR-9-SW และ G10-1 กลุ่มที่สร้างสีรงควัตถุสีเหลืองอ่อน ได้แก่ VT4-3 และสุดท้ายกลุ่มที่สร้างสีรงควัตถุสีเหลืองน้ำตาลอ่อน ได้แก่ G4-1



ภาพที่ 4.12 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ

หมายเหตุ

- 1) แสดงลักษณะสีเส้นใยในอาหารของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์รหัส UP2S-9-3
- 2) แสดงลักษณะสีเส้นใยในอากาศของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์รหัส UP2S-9-3
- 3) แสดงลักษณะการเจริญของโคโลนิบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์รหัส UP2S-9-3

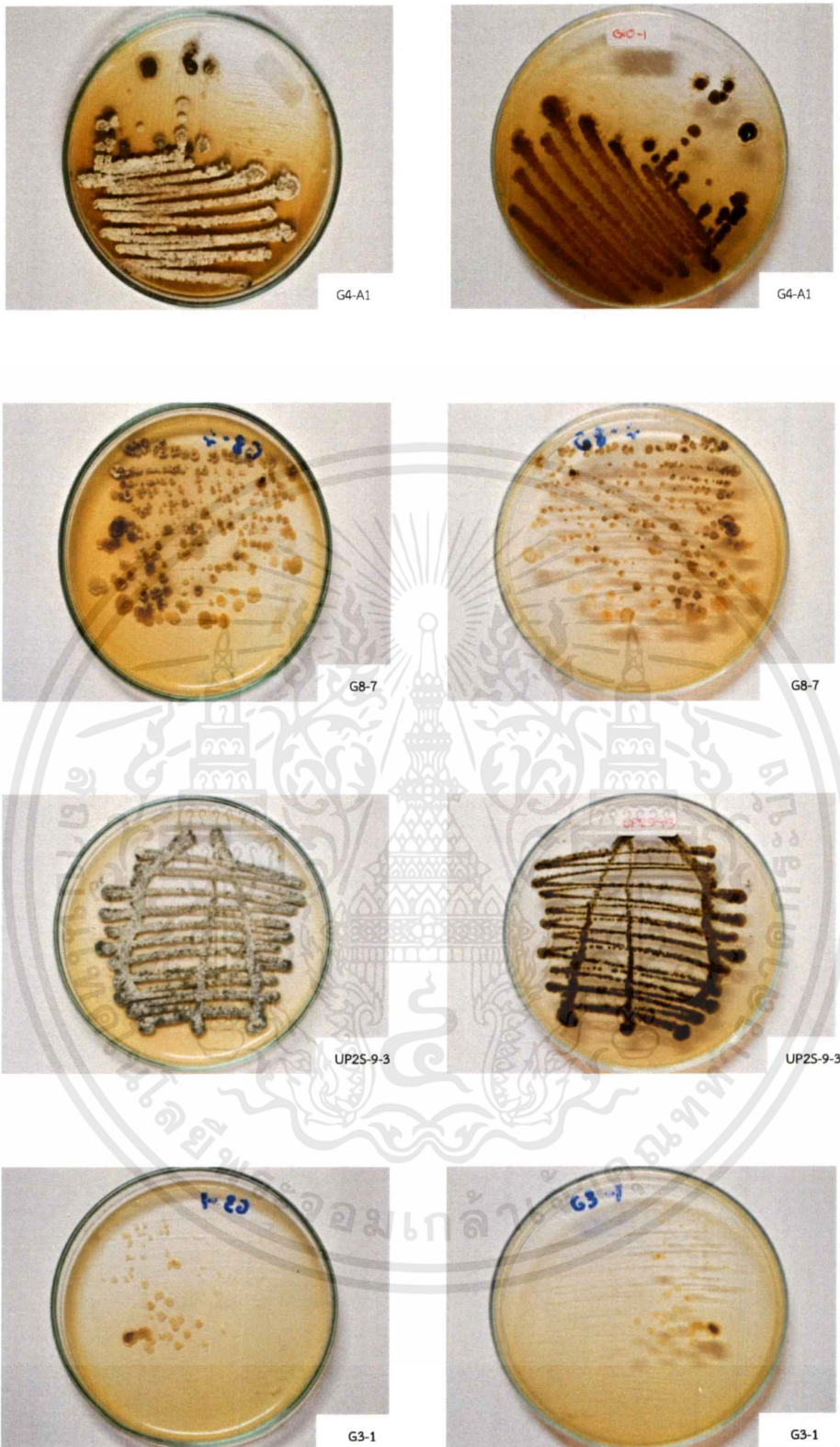
ตารางที่ 4.10 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	สีเส้นใยในอาหาร	สีเส้นใยในอากาศ	สีรงควัตถุ
NR9-13	ISP-2	ชมพู	ขาว	ชมพู
UP2S-9-3	ISP-2	เหลือง	ขาวเทา	-
PP2R-4-7	ISP-2	เหลือง	ขาว	-
DCWR-9-1	ISP-2	เหลือง	ขาว	น้ำตาล
DCWR-9-8	ISP-2	เหลือง	ขาว	-
SPL-32	ISP-2	เหลือง	ขาว	-
PP2R-9-3	ISP-2	เหลือง	เทา	น้ำตาล
G4-A1	ISP-2	เหลือง	ขาว	น้ำตาล
UP2S-9-3	ISP-2	เหลือง น้ำตาล	ขาว	น้ำตาล
PP2R-4-7	ISP-2	เหลือง	ขาว	น้ำตาล
PCWR-9-1	ISP-2	เหลือง	ขาว	-
PCWR-9-8	ISP-2	เหลือง	ขาว	น้ำตาล
G8-7	ISP-2	เหลือง	เหลือง	-
G5-8	ISP-2	เหลือง	ขาว	เหลือง
DCWR-9-SW	ISP-2	เหลือง	ขาว	เหลือง
PP2R-4-3	ISP-2	เหลือง	เหลือง	-
G4-1	ISP-2	เหลือง	ขาว	เหลือง น้ำตาลอ่อน
VT4-3	ISP-2	เหลือง	ขาว	เหลืองอ่อน
G10-1	ISP-2	ครีม	ครีม	เหลือง
PTL1-5	ISP-2	เหลือง	ขาว	-
PP2R-9-3	ISP-2	เหลือง	ขาว	-

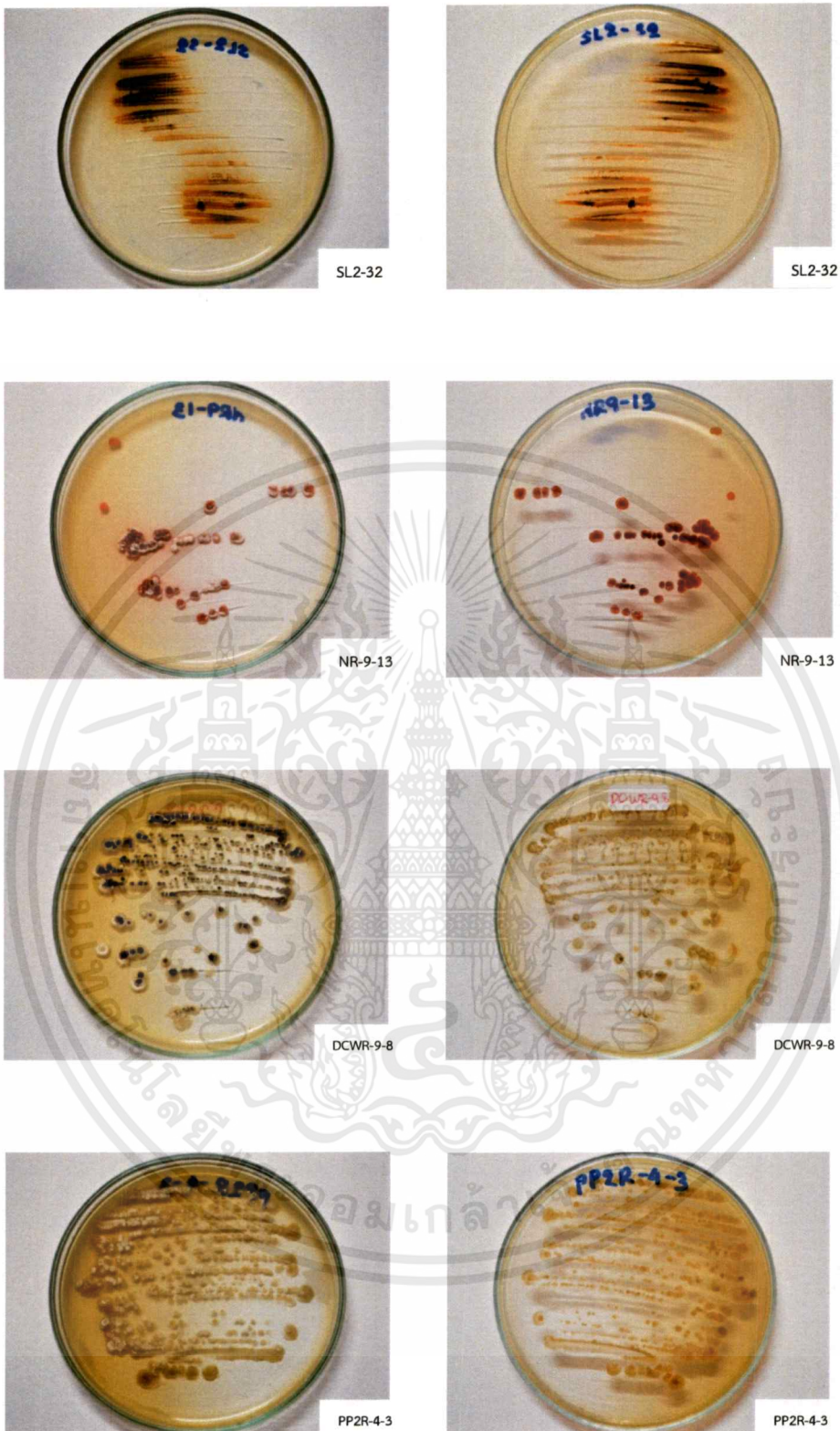


ภาพที่ 4.13 แสดงลักษณะการเจริญ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและรวงควัตุของเชื้อแอสเพอริลลัส-
ซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

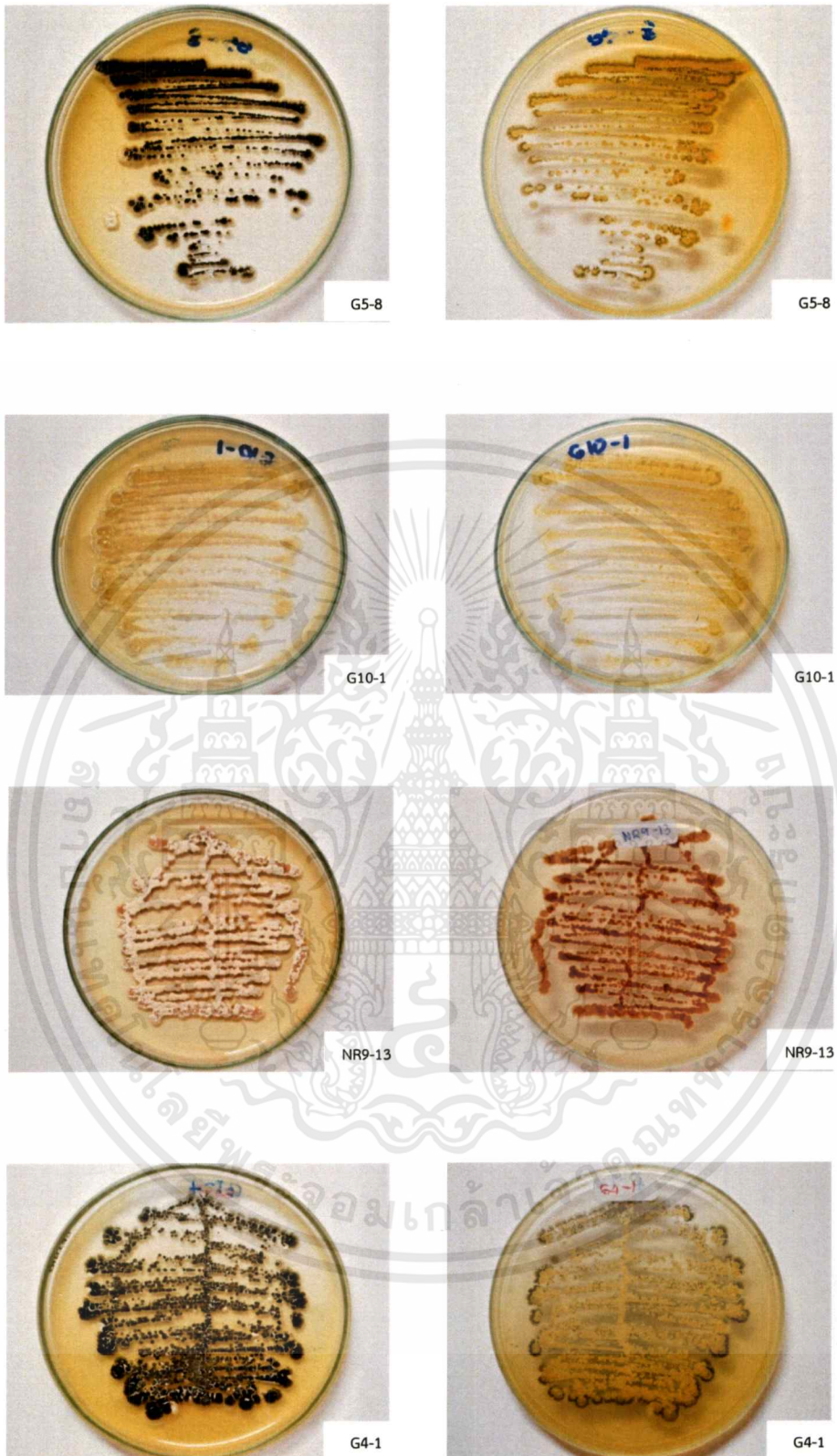


ภาพที่ 4.14 แสดงลักษณะการเจริญ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและรวงควัตุของเชื้อแอกติโนมัย-ซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak



ภาพที่ 4.15 แสดงลักษณะการเจริญ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและรงควัตถุของเชื้อแอกติโนมัย-ซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



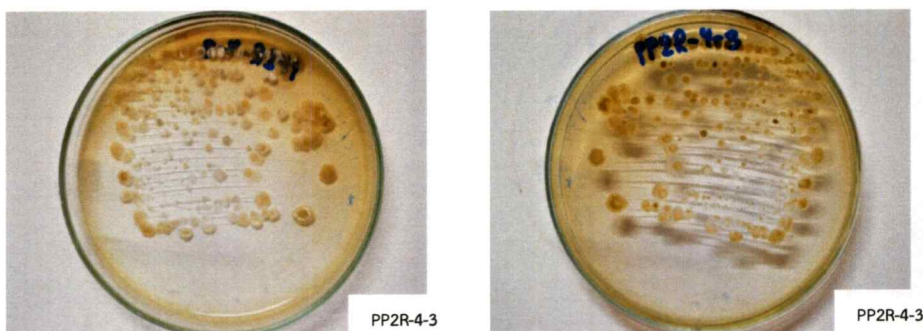
ภาพที่ 4.16 แสดงลักษณะการเจริญ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและรงควัตถุของเชื้อแบคทีเรียชนิดสปอร์สายพันธุ์ต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.17 แสดงลักษณะการเจริญ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและรงควัตถุของเชื้อแอกติโนมัย-ซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak


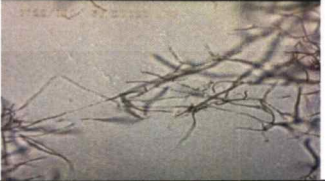

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



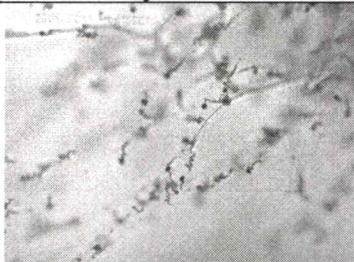
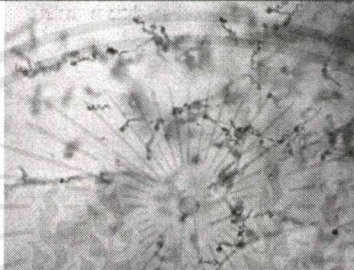

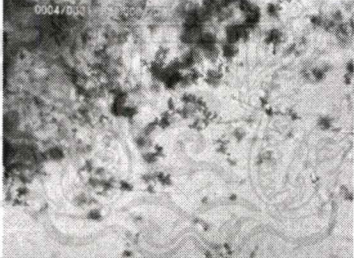


ภาพที่ 4.18 แสดงลักษณะการเจริญ สีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและรงควัตถุของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 โดยใช้วิธี Cross-hatch Streak

จากการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของข้าว 21 ไอโซเลตมาทดสอบหาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 400 เท่าเพื่อศึกษาลักษณะของสปอร์ พบว่า มีเชื้อแอกติโนมัยซีทส์จำนวน 17 ไอโซเลตที่คาดว่าจะอยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีลักษณะของสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาว (Long chain) ได้แก่ ไอโซเลต NR9-13, UP2S-9-3, PP2R-4-7, DCWR-9-1, DCWR-9-8, SPL-32, PP2R-9-3, G10-1, PP2R-4-7, DCWR-9-8, G5-8, PP2R-4-3, G4-1, VT4-3, PTL1-5, PP2R-9-3 และ G8-7 และอีก 3 ไอโซเลตคาดว่าจะอยู่ในสกุล *Micromonospora* ซึ่งมีลักษณะของสปอร์สร้างสปอร์แบบเดี่ยว (Single spore) ได้แก่ ไอโซเลต UP2S-9-3, PCWR-9-1 และ G10-1

ตารางที่ 4.11 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า

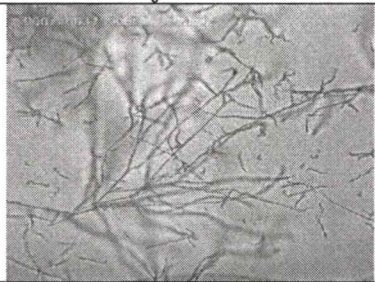
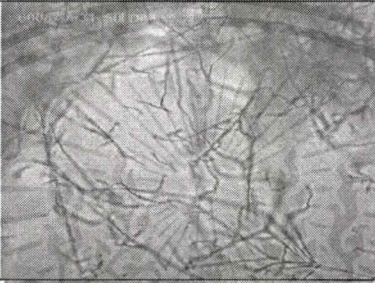


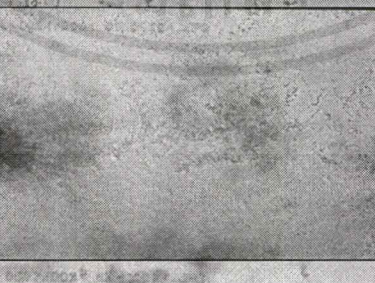

รหัสเชื้อ	รูปภาพ	สายพันธุ์
PTL1-5		<i>Streptomyces</i> sp.
PP2R-9-3		<i>Streptomyces</i> sp.
G8-7		<i>Streptomyces</i> sp.

ตารางที่ 4.12 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า

รหัสเชื้อ	รูปภาพ	สายพันธุ์
NR9-13		<i>Streptomycessp.</i>
UP2S-9-3		<i>Streptomycessp.</i>
PP2R-4-7		<i>Streptomycessp.</i>
DCWR-9-1		<i>Streptomycessp.</i>
DCWR-9-8		<i>Streptomyces sp.</i>
SPL-32		<i>Streptomycessp.</i>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



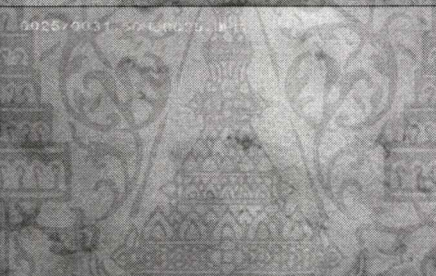
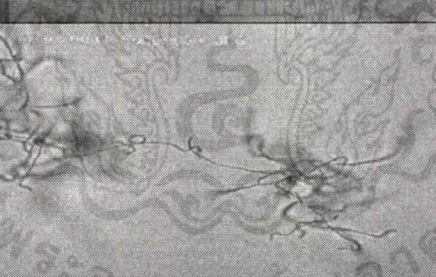

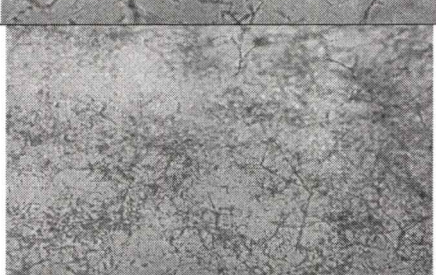
ตารางที่ 4.13 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 400 เท่า

รหัสเชื้อ	รูปภาพ	สายพันธุ์
PP2R-9-3		<i>Streptomyces sp.</i>
G10-1		<i>Streptomyces sp.</i>
UP2S-9-3		<i>Micromonospora</i>
PP2R-4-7		<i>Streptomyces sp.</i>
PCWR-9-1		<i>Micromonospora</i>
DCWR-9-8		<i>Streptomyces sp.</i>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ ส่วนหนึ่ง โดยคุณอาจนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า

รหัสเชื้อ	รูปภาพ	สายพันธุ์
G5-8		<i>Streptomyces sp.</i>
DCWR-9-SW		<i>Micromonospora</i>
PP2R-4-3		<i>Streptomyces sp.</i>
G4-1		<i>Streptomyces sp.</i>
VT4-3		<i>Streptomyces sp.</i>
G4-A1		<i>Micromonospora</i>

จากผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา การจัดเรียงตัวและการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ การสลายโปรตีนในนม การย่อยแป้ง ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท การย่อยสลายเจลาติน ซึ่งผลการทดลองพบว่า มีเชื้อแอกติโนมัยซีตส์จำนวน 17 ไอโซเลตที่คาดว่าจะอยู่ในสกุล *Streptomyces* ดังนี้ PP2R-4-7 , DCWR-9-8 , G5-8 , PP2R-4-3 , G4-1 , VT4-3 , PT1L-5 , PP2R-9-3 , G8-1 , NR9-13 , UP2S-9-3 , PP2R-4-7 , DCWR-9-1, DCWR-9-8 , SPL-32 , PP2R-9-3 และ G10-1 และ 4 ไอโซเลต ที่คาดว่าจะอยู่ในสกุล *Micromonospora* ดังนี้ UP2S-9-3 , PCWR-9-1 , DCWR-9-SW และ G4-A1 ซึ่งจากผลการทดลองของ กรรณิการ์ ดวงมาลย์และคณะ ได้ทำการศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อ การเจริญที่ อุณหภูมิต่างๆ ความเป็นกรดต่าง การสร้างรงควัตถุ ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่ง ไนโตรเจน ความสามารถในการย่อยสลายแป้ง การสลายโปรตีนในนม การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ ไนเตรท การเจริญในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรทระดับต่างๆ และศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์ รวมไปถึงการจัดทำสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ทำให้สามารถยืนยันสายพันธุ์ที่แท้จริงได้ ซึ่งเราคาดว่าในอนาคตจะมีการนำเชื้อแอกติโนมัยซีตส์ไอโซเลตต่างๆ ไปศึกษาเพื่อยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อในรายละเอียด อื่นๆต่อไป



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทส์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของข้าวทั้งหมด 89 ไอโซเลต พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวโดยทดสอบด้วยวิธี seedling bioassay ทั้งหมด 10 ไอโซเลต ได้แก่ NR8-8*, PP2R-9-3, PP2R-4-1, G3-8, G4-9, G4-A1, G10-1, G8-6, G6-9 และ VT4-3 ซึ่งแอคติโนมัยซีทส์รหัส VT4-3 มีอัตราการเจริญของต้นกล้าและดัชนีการงอกสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ control ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Pyricularia grisea*, *Xanthomonas oryzae* x3 และ *Xanthomonas oryzae* x4 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในข้าว และโรคขอบใบแห้ง ตามลำดับ พบว่ามีแอคติโนมัยซีทส์ 9 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* พบแอคติโนมัยซีทส์ 8 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *Xanthomonas oryzae* x3 และ 5 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *Xanthomonas oryzae* x4 โดยไอโซเลต VT4-3 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* ได้ดีที่สุดในขณะที่ไอโซเลต G6-9 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* x3 และ *Xanthomonas oryzae* x4 ได้ดีทั้ง 2 สายพันธุ์

จากตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีการผลิตกรดอินโดลอะซิติก การผลิตสารซิติเดอโรฟอรัสและการย่อยสลายฟอสเฟตทั้งหมด 89 ไอโซเลต พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ จำนวน 10 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซิติก โดยไอโซเลต UP2S-9-3 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดที่ค่า O.D.530 นาโนเมตร มีเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ จำนวน 8 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการผลิตสารซิติเดอโรฟอรัส โดยไอโซเลต G2-11 มีการผลิตสารซิติเดอโรฟอรัสสูงที่สุด และมีเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ จำนวน 7 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตโดยไอโซเลต NR9-13 มีการย่อยฟอสเฟตได้มากที่สุดเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวและการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวทั้งหมด 6 วิธี และคัดเลือกมา 21 ไอโซเลตเพื่อทำการทดสอบทางชีวเคมีและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ จำนวน 16 ไอโซเลต ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมได้ โดยไอโซเลต SL2-32 มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในนมได้ดีที่สุด, 5 ไอโซเลต ที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรท ได้แก่ G4-A1, PP2R-9-3, G3-1, G2-11, และ G8-7, 18 ไอโซเลต ที่สามารถย่อยสลายแป้งได้, 13 ไอโซเลต ที่สามารถสลายเจลาตินได้ ซึ่งไอโซเลต NR9-13 และ VT4-3 มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งและสามารถสลายเจลาตินทั้ง 2 ไอโซเลต

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จำนวน 21 ไอโซเลต มีเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จำนวน 17 ไอโซเลตที่คาดว่าจะอยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีลักษณะของสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาว (Long chain) และอีก 3 ไอโซเลต ซึ่งคาดว่าจะอยู่ในสกุล *Micromonospora* ซึ่งมีลักษณะของสปอร์สร้างสปอร์แบบเดี่ยว (Single spore) และจากการตรวจสอบการสร้างสีเส้นใยในอาหาร สีเส้นใยในอากาศและสีรงควัตถุ พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างเส้นใยในอาหารจำนวน 21 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ สีเส้นใยในอาหารสีเหลืองจำนวน 18 ไอโซเลต สีเส้นใยในอาหารสีชมพู 1 ไอโซเลต สีเส้นใยในอาหารสีเหลือง น้ำตาล 1 ไอโซเลต และสีเส้นใยในอาหารสีครีม 1 ไอโซเลต มีเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถในการสร้างสีเส้นใยในอากาศ จำนวน 19 ไอโซเลตแบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างสีเส้นใยในอากาศสีขาว 14 ไอโซเลต กลุ่มที่สร้างเส้นใยในอากาศสีเทา 1 ไอโซเลต กลุ่มที่สร้างเส้นใยในอากาศสีขาวเทา 1 ไอโซเลต กลุ่มที่สร้างเส้นใยในอากาศสีเหลือง 2 ไอโซเลต และ กลุ่มที่สร้างเส้นใยในอากาศสีครีม 1 ไอโซเลต มีเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถในการสร้างสีรงควัตถุ จำนวน 12 ไอโซเลต แบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างสีรงควัตถุสีน้ำตาล 6 ไอโซเลต กลุ่มที่สร้างสีรงควัตถุสีชมพู 1 ไอโซเลต กลุ่มที่สร้างสีรงควัตถุสีเหลือง 3 ไอโซเลต กลุ่มที่สร้างสีรงควัตถุสีเหลืองอ่อน 1 ไอโซเลต กลุ่มที่สร้างสีรงควัตถุสีเหลืองน้ำตาลอ่อน 1 ไอโซเลต

ข้อเสนอแนะ

จากข้อมูลทั้งหมดทำให้ทราบว่าไอโซเลต VT4-3 และ G6-9 เป็นไอโซเลตที่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ต่อไปเนื่องจากมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวและสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวได้ดีทั้ง 2 ไอโซเลต



เอกสารอ้างอิง

โลกความรู้สารานุกรม. ๒๕๔๗. กรดอินโดลอะซิติก (ออนไลน์). แหล่งสืบค้น

:http://th.swewe.com/word_show.htm/?71312_1/. ๒๐พฤษภาคม ๒๕๕๗

วิชา ชาลีพรหม. ๒๕๕๒. โรคในพืช. (ออนไลน์).แหล่งสืบค้น:

http://chaleeprom.com/pd/ant00_rice_rice_blast_fungi_pyricularia_grisea_20130105_172308_98985.html. ๒๐พฤษภาคม ๒๕๕๗

ข่าวจากไทยรัฐ. ๒๕๕๕. โรคใบไหม้. (ออนไลน์).แหล่งสืบค้น:<http://www.growrice.info/index.php/rice-blast/>. ๒๐พฤษภาคม ๒๕๕๗

กรรณิการ์ ดวงมาลัย และคณะ. 2552. โครงการ การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทกลุ่มปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว Screening of actinomycete antagonists against rice diseases pathogen. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กัญญศิริ มณีสุวรรณ. 2541. การคัดเลือกจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่มาจากดินที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน. 2555. ความหลากหลายของแอกติโนมัยซีทที่เรียในดิน Biodiversity of Actinobacteria in Soil. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

จักรพงษ์ หรั่งเจริญณินันต์ เจนอักษรและพรหมมาศ คูหากาญจน์. 2554. การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium myriotylum* โดยแบคทีเรียเขตรากพืชจากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน Growth Suppression of *Pythium myriotylum* by Rhizobacteria Isolated from Hydroponics. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จิตติ ทำไว และคณะ. 2552. การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะและอนุกรมวิธานของแอกติโนมัยซีทที่แยกจากดินภูเขาทางภาคตะวันตกและดินป่าชายเลน Screening of Antibiotic-Producing Actinomycetes and Taxonomy of Actinomycetes isolated from Western Mountainous Area Soils and Mangrove Forest Soils. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปาริชาติ สติธรรมพนาดุสิต อธิวัฒน์และวิลาวรรณ เชื้อบุญ. 2555. ประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ TU-Orga1 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าว Wfficency of New Antagonistic Bacterium TU-Orga1 Enhanced Growth and Controlled Bacterial Leaf Blight in rice. Thai Journal of Science and Technology ปีที่ 1 ฉบับที่ 3 กันยายน - ธันวาคม 2555.

วราภรณ์ ภูักักดีพันธุ์และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2552. การผสมเชื้อปฏิปักษ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคขอบใบแห้ง และส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าว. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. 14 -17 มีนาคม 2552. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ศิริภรณ์ สุขวโรทัย. 2550. การคัดแยกแอกติโนมัยซีดที่ผลิตเซลลูโลสและสารปฏิชีวนะ Isolation of cellulose and antibiotic producing actinomycetes. สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุทธินันต์ คำนา และศ.ดร.สายสมร ล้ายอง. 2553ความหลากหลายทางชีวภาพและเมแทโบไลต์ทุติยภูมิของแอกติโนมัยซีดจากดินรอบรากพืชสมุนไพรบางชนิด Biodiversity and secondary metabolites of actinomycetes from rhizosphere soils of some medicinal plants. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Arai, T. 1975. Culture media for Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan.

Benimeli, C.S., Fuentes, M.S., Abate, C.M., Amoroso, M.J. 2008. Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp.M7 and its effects on Zea mays growth. Int. Biodeter. Biodegr. 61(3), 233-239.

Castillo A. E.; J. Rojas; R. Monteros Solito; I. Nardelli y G. Guasch. 2003. Métodos para determinar Carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-metilcarbamato). Agrotecnia (Argentina) 10: 15-20.

Christian O. Dimkpa, Aleš Svatoš b, Paulina Dabrowska, Andre Schmidt, Wilhelm Boland Erika Kothe. 2008. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. Journal of Chemosphere. 21 : 19-25.

Deborah A. Samac, Amy M. Willert, Matthew J. McBride, Linda L. Kinkel Effects of. 2003. antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa. Applied Soil Ecology. 55-66

De Freitas J R, Banerjee M R & Germida J J, 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus*), *Biol. Fertil. Soils*, 24 : 358-364.

Dhanasekaran, D., S. Selvamani, A. Panneerselvam and N. Thajuddin, 2009. Isolation and characterization of actinomycetes in vellar estuary, annagkoil, tamil nadu. Afr. J. Biotechnol., 8: 4159-4162.

- Gesheva V. 2002. *Rhizosphere microflora* of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. *Europ. J. Soil Biol.* 38:85-88.
- Haagen-Smit AJ, Dandliker WB, Wittwer SH, Murneek AE. 1946. Isolation of 3-indoleacetic acid from immature corn kernels. *Am. J. Bot.* ;33:118-120.
- Isaac, S. and Jennings, D. 1995. *Microbial Culture*. Bios Scientific. Publishers UK. 133
- Kevin R. Oldenburg, Kham T. Vo, Beatrice Ruhland, Peter J. Schatz and Zhengyu Yuan. 1996. A Dual Culture Assay for Detection of Antimicrobial Activity. Affymax Research Institute, 4001 Miranda Avenue, Palo Alto, California 94904.
- MEENA B.S. 2005. Morphological and molecular variability of rice blast pathogen *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. Department of plant pathology college of agriculture, Dharwad University of Agricultural Sciences, Dharwad – 580 005.
- Rathore Pragma, Ara Yasmin, Joshi Anshula. 2012. An insight into agricultural properties of actinomycetes. Sanghvi Institute of Management & Science, Rau, Indore- 453331, (M.P.), INDIA, 9 : 7-12
- Schwyn B, Neilands JB. 1996. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Journal of Analytical Biochemistry* 49 : 47-56
- Shih, H.D., Lui, Y.C., Hsu, F.L., Mulabagal, V., Dodda, R. and Huang, J.W. 2003. Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51: 95-99
- Shirling, E.D. and Gottlieb, D. 1996. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 16 ; 313-340
- Subramaniam Gopalakrishnan, Srinivas Vadlamudi, Prakash Bandikinda, Arumugam Sathya, Rajendran Vijayabharathi, Om Rupela, Himabindu Kudapa, Krishnamohan Katta, Rajeev Kumar Varshney. 2013. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Journal of Microbiological Research*. 42 : 40-48

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Carbon Utilization Agar (ISP MEDIUM NO.9) (Shirling E.B. and Gottlieb D.,1966)

Pridham and Gottlieb trace salts

Copper sulphate.5H ₂ O	0.0064 กรัม
Ferrous sulphate.7H ₂ O	0.0011 กรัม
Manganese chloride.7H ₂ O	0.0079 กรัม
Zinc sulphate.7H ₂ O	0.0015 กรัม
Sterile water	100 มิลลิลิตร

Basal mineral salts agar

Ammonium sulphate	2.640 กรัม
Monopotassium phosphate	2.380 กรัม
Dipotassium phosphate.3H ₂ O	5.650 กรัม
Magnesium sulphate.7H ₂ O	1.000 กรัม
Pridham and Gottlieb trace salts	1.0 มิลลิลิตร
Agar	15.000 กรัม
Sterile water	900 มิลลิลิตร

Final pH (at25°C) 7.0±0.2

นำไปฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปผสมกับอาหาร

Carbon sources

Glucose	10.000 กรัม
Sterile water	100 มิลลิลิตร

ทำการฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปผสมกับอาหาร
ISP-9 ปริมาตร 900 ml

2. Glucose Peptone Broth

Peptic digest of animal tissue	20.000 กรัม
Dextrose	10.000 กรัม
Sodium chloride	5.000 กรัม
Distilled deionized water	1,000 มิลลิลิตร
Final pH (at 25°C) 7.2±0.2	

3. Pikovskaya's medium (Pikovskaya, 1948)

Yeast extract	0.500 กรัม
Dextrose	10.000 กรัม
Calcium phosphate	5.000 กรัม
Ammonium sulphate	0.500 กรัม

Potassium chloride	0.200 กรัม
Magnesium sulphate	0.100 กรัม
Manganese sulphate	0.0001 กรัม
Ferrous sulphate	0.0001 กรัม
Distilled deionized water	1,000 มิลลิลิตร

4. Yeast Malt extract agar (ISP-2)

Malt extract	10 กรัม
Glucose	4 กรัม
Yeast extract	4 กรัม
Agar	18 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
pH 7.0	



ภาคผนวก ข.
การเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นมาตรฐาน (McFaland standard No.05)

1.175% $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.5 มิลลิลิตร

1% H_2SO_4

99.5 มิลลิลิตร

วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer OD 625 ระหว่าง 0.08-0.10 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด ก่อนใช้เทียบความเข้มข้นต้องเขย่าก่อนทุกครั้ง

2. การทดสอบรีดิวซ์ไนเตรท

A สารละลาย Sulfanilic acid

0.8 กรัม ในนอร์มอล กรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร

B สารละลาย Alphanaphthylamine

0.5 กรัม ในนอร์มอล กรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร

วิเคราะห์ผลโดยหยดสารละลาย A และสารละลาย B ลงในหลอดทดลองที่มีเชื้อทดสอบ จะเกิดสีแดง แต่ถ้าการทดสอบไม่เกิดสีแดงซึ่งเกิดจากไนโตรทเพี้ยนไปเป็นแอมโมเนียมและก๊าซไนโตรเจน ต้องทดสอบขั้นที่สองโดยเติมผงสังกะสีลงไป หากเกิดสีแดงแสดงว่ายังมีไนเตรทอยู่ (Shirling และ Gottlieb, 1996)

