

การคัดแยกและการศึกษาคุณลักษณะของแอคติโนมัยซีทที่ส่งเสริมการ
เจริญเติบโตของพืช จากผักตบชวาและแห่นาง

Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting
Actinomycetes from Floating plants, *Eichhornia crassipes* (C.
Mart) Solms and *Azolla* sp.



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานปีการศึกษา 2566 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting
Actinomycetes from Floating plants, *Eichhornia crassipes* (C.
Mart) Solms and *Azolla* sp.



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ **ACADEMIC YEAR 2023** ภาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การคัดแยกและการศึกษาคุณลักษณะของแอคติโนมัยซีทที่ส่งเสริม
การเจริญเติบโตของพืช จากผักตบชวาและแหวนแดง
Isolation and Characterization of Plant Growth
Promoting Actinomycetes from Floating plants,
Eichhornia crassipes (C. Mart) Solms and *Azolla* sp.

ชื่อนักศึกษา

นางสาว ชลธิชา มีพารา รหัสนักศึกษา ๖๓๐๕๐๔๖๕
นางสาว อินธอร อ่อนจันทร์ รหัสนักศึกษา ๖๓๐๕๐๕๓๗

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

ชีววิทยา

ปีการศึกษา

๒๕๖๖

อาจารย์ที่ปรึกษา

รศ.ดร.จิตติ ทำไฉ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา ๒๕๖๖

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. คณิศานต์ กลั่นบุศย์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย กรรมการ	
รศ.ดร.จิตติ ทำไฉ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกและการศึกษาคุณลักษณะของแอกติโนมัยสียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากผักตบชวาและแหนแดง Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Actinomycetes from Floating plants, <i>Eichhornia crassipes</i> (C. Mart) Solms and <i>Azolla</i> sp.
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ชลธิชา มีพารา รหัสนักศึกษา ๖๓๐๕๐๔๖๕ นางสาว อินอรุณ อ่อนจันทร์ รหัสนักศึกษา ๖๓๐๕๐๕๓๗
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	๒๕๖๖
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อทำการคัดแยกแอกติโนมัยสียจากตัวอย่างผักตบชวาและแหนแดงเพื่อค้นหาแอกติโนมัยสียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชที่ดี ผลของการแยกเชื้อพบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยสียได้จำนวน 30 ไอโซเลต (24 สายพันธุ์จากผักตบชวาและ 6 สายพันธุ์จากแหนแดง) การจัดจำแนกเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 4 กลุ่ม โดยพบว่าแอกติโนมัยสียที่แยกได้เป็นสมาชิกของแอกติโนมัยสียสกุล *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* และมี 1 ไอโซเลตเป็นสมาชิกของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จาก การคัดกรองคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 2 รูปแบบ ได้แก่ การสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก (IAA) และการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช ได้แก่ *Colletotrichum capsici* และ *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่ามีเชื้อที่สามารถผลิตสาร IAA ได้จำนวน 27 ไอโซเลต (90%) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* ได้จำนวน 6 ไอโซเลต (20%) และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้จำนวน 7 ไอโซเลต (23.3%) และได้ทำการคัดเลือกเชื้อจำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต EC12, EC14, EC17, EC19, EC22, AZ1, AZ5 และ BC ซึ่งแสดงคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชที่ดี มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA gene พบว่า ไอโซเลต EC12, EC14, EC17, EC19, EC22, AZ5 เป็นแอกติโนมัยสียในสกุล *Streptomyces* โดยไอโซเลต EC12, EC14, EC17 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces albus* NBRC 13014^T ที่ระดับความคล้ายคลึงร้อยละ 99.79 ไอโซเลต EC19, EC22, AZ5 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces rochei* NRRL B-2410^T ที่ระดับความคล้ายคลึงร้อยละ 100 ไอโซเลต BC เป็น

เชื้อในสกุล *Bacillus* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus tequilensis* KCTC 13622^T ที่ระดับความคล้ายคลึงร้อยละ 99.93 และไอโซเลต AZ1 เป็นเชื้อในสกุล *Rhodococcus* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Rhodococcus kroppenstedtii* DSM 44908^T ที่ระดับความคล้ายคลึงร้อยละ 98.68 การศึกษานี้พบว่าไอโซเลต AZ1 มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Rhodococcus* นอกจากนี้จากการวิเคราะห์สารทุติยภูมิที่สกัดจากน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อของทั้ง 8 ไอโซเลต พบว่า สารสกัดหยาบของไอโซเลต EC7 EC12 EC14 EC22 และ BC มีรูปแบบของสารทุติยภูมิที่น่าสนใจ เมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบของสารทุติยภูมิในฐานข้อมูลผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแอคติโนมัยซีทของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

คำสำคัญ : แอคติโนมัยซีท, แหนแดง, ผักตบชวา, แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Actinomycetes from Floating plants, <i>Eichhornia crassipes</i> (C. Mart) Solms and <i>Azolla</i> sp.
Students	Miss Cholticha Meepara Student ID 63050465 Miss Ainthuon Onkhan Student ID 63050537
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Chitti Thawai

Abstract

This study aimed to screen actinomycetes from water hyacinth and *Azolla* sp. samples to find those that could promote good plant growth. The results showed that thirty actinomycete strains were isolated (twenty-four stains from hyacinth and six strains from *Azolla* sp.). The preliminary classification based on morphological characteristics led to grouping these *actinomycetes* into four groups. They belonged to the members of *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, and *Bacillus*. The preliminary screening for their plant growth-promoting abilities, such as the capability of producing indole-3-acetic acid (IAA) and the ability for the growth inhibition of *Colletotrichum capsici* and *Colletotrichum gloeosporioides* revealed that twenty-seven actinomycete strains (90%) could produce IAA, six *actinomycete* strains (20%) could inhibit the growth of *C. capsici*, and seven actinomycete strains (23.3%) could inhibit the growth of *C. gloeosporioides*. Eight microbial strains (EC12, EC14, EC17, EC19, EC22, AZ1, AZ5, and BC) showing good plant growth-promoting properties were selected for their 16S rRNA gene analysis, and we found that the strains EC12, EC14, EC17, EC19, EC22, AZ5 were a member of the genus *Streptomyces*. The *actinomycete* strains, EC12, EC14, and EC17, were closely related to *Streptomyces albus* NBRC 13014^T (99.79% 16S rRNA gene similarity value), and strains EC19, EC22, and AZ5 showed the highest 16S rRNA gene similarity value (100%) with *Streptomyces rochei* NRRL B-2410^T. Strain BC was a member of the genus *Bacillus*, showing the highest 16S rRNA gene similarity value

(100%) with *Bacillus tequilensis* KCTC 13622^T (99.93%). Interestingly, strain AZ1 showed a low 16S rRNA gene similarity value (98.68%) to *Rhodococcus kroppenstedtii* DSM 44908^T, nearly the cutoff point for the recommended threshold values for prokaryotic species delineation, indicating that strain AZ1 might be represented as a new species of the genus *Rhodococcus*. Furthermore, the chemical analysis of the crude extract from the culture broth of eight selected strains revealed that the crude extract of strains EC12, EC22, and BC showed interesting chemical profiles compared with the *actinomycete* natural product profiles database of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC).



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก รศ. ดร. จิตติ ท่าไว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ดร.คณิงกานต์ กลิ่นบุศย์ ประธานกรรมการ และ ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย ที่ได้เข้าร่วมรับฟังการนำเสนอโครงการพิเศษ ตรวจสอบและพิจารณาโครงการพิเศษฉบับนี้ คณะผู้จัดทำขอขอบคุณอาจารย์ทั้งสามท่านเป็นอย่างยิ่ง ที่ให้ความรู้ คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินงานวิจัย และความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ สารเคมี ต่างๆ ที่จำเป็นเพื่อให้โครงการพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ คุณสมัคร แสงจันทร์ คุณวัชรายา มาศแจ้ง และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ ให้คำแนะนำ โดยเฉพาะหน่วยวิจัยแอกติโนมัยสีท ที่อำนวยความสะดวกทั้งสถานที่ อุปกรณ์ จนกระทั่งสารเคมีต่างๆที่จำเป็นต่อโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณ คุณโต้ง คุณนีน คุณเคັก คุณมิ่ง ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และให้คำปรึกษาเกี่ยวกับปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างทำโครงการพิเศษตลอดจนจบโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณ ร.ภ.ก. พุฒิพงศ์ภัทร สีดาสมา ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาใช้ในโครงการพิเศษ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของคณะผู้จัดทำที่กำลังและให้การสนับสนุนเงินทุน ค่าครองชีพในระหว่างการทำโครงการพิเศษและขอความช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณเพื่อนคนสำคัญและเพื่อนๆในสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ที่ให้กำลังใจ แรงแฝกดัน และ คำปรึกษา ทำให้คณะผู้จัดทำสามารถทำโครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ชลธิชา มีพารา

อินธอร อ่อนจันทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 แอคติโนมัยสิท.....	4
2.1.1 แอคติโนมัย.....	4
2.1.2 แอคติโนมัยสิทโดยทั่วไป.....	5
2.1.3 วงจรชีวิตของแอคติโนมัยสิท.....	5
2.1.4 การกระจายตัวของแอคติโนมัยสิท.....	6
2.1.5 การจัดจำแนกแอคติโนมัยสิท.....	7
2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานแอคติโนมัยสิท.....	9
2.2.1 ลักษณะทางพีโนไทป์.....	9
2.2.2 ลักษณะทางจีโนไทป์.....	16
2.3 แขนง.....	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำหรือเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 ความสำคัญของแหวนแดง	18
2.4 ผักตบชวา	19
2.3.1 ความสำคัญของผักตบชวา	19
2.5 การศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช	20
2.5.1 การทดสอบการตรึงไนโตรเจน.....	20
2.5.2 การทดสอบการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์	20
2.5.3 การทดสอบการสร้างสารซีเดอริโอฟอร์	21
2.5.4 การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยสลายฟอสเฟต	21
2.5.5 การทดสอบการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก.....	22
2.5.6 การศึกษาการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ	23
2.6 การสกัดสารทุติยภูมิจาก <i>Actinomyces</i>	21
2.6.1 การเตรียมตัวทำละลายในสารสกัด	24
2.6.2 วิธีการสกัดสารทุติยภูมิ	24
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	26
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	26
3.2 สารเคมี	27
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ.....	30
3.4 การเก็บตัวอย่าง การตัดแยก และการเก็บรักษาแอกติโนมัยสีท.....	30
3.4.1 การเก็บตัวอย่าง	30
3.4.2 การตัดแยกแอกติโนมัยสีท	31
3.4.3 การเก็บรักษาแอกติโนมัยสีท.....	31
3.5 การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอกติโนมัยสีท.....	31
3.5.1 การศึกษาลักษณะทางพีโนไทป์.....	32
3.5.2 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์.....	33
3.6 การศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแอกติโนมัยสีทที่แยกได้...34	
3.6.1 การทดสอบการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation)	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ เมื่ออยู่ในที่เห็นว่าเป็นประโยชน์ทางการศึกษา
 ไม่ว่าจะกรณีใด

3.6.2 การทดสอบการสร้างสารซีเดอโรฟออร์ (Siderophore production).....	34
2.5.5 การทดสอบการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิติค (Indole-3-acetic acid : IAA).....	35
3.6.2 การทดสอบการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (Hydrogen cyanide production).....	35
2.5.6 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืชโดยวิธีการ Dual culture.....	35
3.7 การสกัดสาร.....	36
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	37
4.1 การแยกแอคติโนมัยสีทจากผักตบชวาและแห่นแดง.....	37
4.2 การจำแนกเชื้อเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	38
4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	38
4.2.2 การศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแอคติโนมัยสีท	50
4.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนมัยสีทของไอโซเลตที่คัดเลือก.....	58
4.4 การศึกษารูปแบบของสารทุติยภูมิ.....	68
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	70
5.1 สรุปผลการวิจัย	70
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	71
เอกสารอ้างอิง.....	71
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	82
ภาคผนวก ข สารเคมี.....	89
ภาคผนวก ค กระดาษสีมาตรฐาน NBS/ISCC color system.....	90
ภาคผนวก ง ตารางผลการส่งเสริมการเจริญของพืช	101
ภาคผนวก จ กราฟมาตรฐาน.....	107
ภาคผนวก ฉ การทดสอบการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation).....	108
ภาคผนวก ช การสร้างซีเดอโรฟออร์ (Siderophore production)	111
ภาคผนวก ซ การผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (Hydrogen cyanide production)	110
ภาคผนวก การยับยั้ง <i>Collectotrichum capsici</i> และ <i>Collectotrichum gloeosporioides</i> ด้วยวิธี Dual culture	115
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ภาคผนวก ญ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือก	125
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้	

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 4.1 แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างผักตบชวาและหนวดแดง	35
ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแอคติโนมัยสีท ..	49
ตารางที่ 4.3 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งการของเชื้อรา <i>Collectotrichum capsici</i> และ <i>Collectotrichum gloeosporioides</i>	53
ตารางที่ 4.4 ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สกัดจาก 16S rRNA gene (% similarity) ของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในฐานข้อมูล	57



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 4.1 ไอโซเลต EC1	36
รูปที่ 4.2 ไอโซเลต EC4	36
รูปที่ 4.3 ไอโซเลต EC13.....	37
รูปที่ 4.4 ไอโซเลต EC19	37
รูปที่ 4.5 ไอโซเลต EC20	37
รูปที่ 4.6 ไอโซเลต EC22.....	38
รูปที่ 4.7 ไอโซเลต AZ5.....	38
รูปที่ 4.8 ไอโซเลต EC12.....	38
รูปที่ 4.9 ไอโซเลต EC14.....	39
รูปที่ 4.10 ไอโซเลต EC17.....	39
รูปที่ 4.11 ไอโซเลต EC24.....	39
รูปที่ 4.12 ไอโซเลต EC5.....	40
รูปที่ 4.13 ไอโซเลต EC6.....	40
รูปที่ 4.14 ไอโซเลต EC7.....	41
รูปที่ 4.15 ไอโซเลต EC8.....	41
รูปที่ 4.16 ไอโซเลต EC21.....	41
รูปที่ 4.17 ไอโซเลต EC9.....	42
รูปที่ 4.18 ไอโซเลต EC23.....	42
รูปที่ 4.19 ไอโซเลต EC2.....	42
รูปที่ 4.20 ไอโซเลต EC10.....	43
รูปที่ 4.21 ไอโซเลต EC18.....	43
รูปที่ 4.22 ไอโซเลต EC3.....	44
รูปที่ 4.23 ไอโซเลต EC11.....	44
รูปที่ 4.24 ไอโซเลต EC15.....	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.25 ไอโซเลต EC16.....45

รูปที่ 4.26 ไอโซเลต AZ1.....45

รูปที่ 4.27 ไอโซเลต AZ2.....46

รูปที่ 4.28 ไอโซเลต AZ3.....46

รูปที่ 4.29 ไอโซเลต AZ4.....46

รูปที่ 4.30 ไอโซเลต BC.....47

รูปที่ 4.31 แสดงการย้อมสี Gram stain.....47

รูปที่ 4.32 แสดงตัวอย่างผลการทดสอบการสร้างสารซีเดอร์โรฟอรัสของแอกติโนมัยซีทที่แยกได้.....55

รูปที่ 4.33 แสดงตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยวิธี dual culture55

รูปที่ 4.34 แสดงตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ด้วยวิธี dual culture.....55

รูปที่ 4.35 ไอโซเลต EC12.....58

รูปที่ 4.36 ไอโซเลต EC14.....58

รูปที่ 4.37 ไอโซเลต EC17.....59

รูปที่ 4.38 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต EC12, EC14 และ EC17 บน Phylogenetic tree (Maximum likelihood method).....59

รูปที่ 4.39 ไอโซเลต EC19.....60

รูปที่ 4.40 ไอโซเลต EC22.....61

รูปที่ 4.41 ไอโซเลต AZ5.....61

รูปที่ 4.42 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต EC19, EC22 และ AZ5 บน Phylogenetic tree (Maximum likelihood method).....62

รูปที่ 4.43 ไอโซเลต AZ1.....63

รูปที่ 4.44 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AZ1 บน Phylogenetic tree (Maximum likelihood method).....64

รูปที่ 4.45 ไอโซเลต BC.....65

รูปที่ 4.46 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต BC บน Phylogenetic tree (Maximum likelihood method).....66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นว่าประโยชน์ทางการค้า
 ไม่ว่าการนี้ที่ พงศน์ อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแบบลงเนื้อหา และต้องยังอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.47 แสดงรูปแบบของสารทุติยภูมิของเชื้อไฮโซเลต BC ที่วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC.....67

รูปที่ 4.48 แสดงรูปแบบของสารทุติยภูมิของเชื้อไฮโซเลต EC12 ที่วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC....67

รูปที่ 4.49 แสดงรูปแบบของสารทุติยภูมิของเชื้อไฮโซเลต EC22 ที่วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC....67



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
c°	Degree celsius
ml	Milliliter
w/w	%weight per weight
g/l	Gram per litre
µg/ml	Microgram per milliliter



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พืชทุกชนิดในธรรมชาติมีปฏิสัมพันธ์กับกลุ่มจุลินทรีย์ที่หลากหลาย และแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับพืชสามารถส่งผลที่เป็นอันตรายหรือเป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ (Makino et al., 2022) แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างเส้นใยและสปอร์ มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางทั้งในระบบนิเวศที่อยู่บนบก ในน้ำ และเนื้อเยื่อพืช อีกทั้งยังเป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์ของเบสกวานีน (Guanine) และ ไซโตซีน (Cytosine) ในสารพันธุกรรมสูง โดยมีปริมาณตั้งแต่ 51% ถึงมากกว่า 70% แอคติโนมัยซีทยังมีความสามารถในการผลิตเมทาบอลไลต์ต่างๆ เช่น การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารชีวโมเลกุลและสารทุติยภูมิที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายเช่น สารปฏิชีวนะ เป็นต้น (Alexander, 1977 ; Stacke-brandt and Schumann 2000 ; Ventura et al., 2007) แอคติโนมัยซีทยังมีอิทธิพลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น การสร้างฮอร์โมนที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโต การช่วยตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต การจับธาตุที่สำคัญในดิน เช่น ธาตุเหล็ก และการผลิตสารแอมโมเนีย ไซยาโนเจน แอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ ซัลไฟด์ และคีโตน เพื่อลดอันตรายต่อการเจริญของพืชจากความเครียดทางชีวภาพ (Arumugam Sathya et al. 2017).

ผักตบชวา (*Eichhornia crassipes* (C. Mart) Solms.) มีต้นกำเนิดในแม่น้ำอะเมซอน เป็นพืชน้ำอ้วนที่ถือเป็นหนึ่งในพืชที่สามารถขยายจำนวนได้เร็วและมีปริมาณมากมาก จึงจัดเป็นวัชพืชรุกรานที่แพร่จำนวนได้รุนแรง (Aboul-Enein et al. 2011) เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนจะทำให้ผักตบชวาเหล่านี้สามารถที่จะเจริญเติบโตขยายและแพร่พันธุ์ได้ตลอดทั้งปีโดยผักตบชวาจะมีลำต้นและรากที่สามารถดูดซับสารอาหารได้ดี นอกจากนี้ยังมีรากฝอยที่คอยดักตะกอนที่แขวนลอยมากับน้ำ (อภิชาติ และคณะ 2561) อย่างไรก็ตามผักตบชวามักถูกนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียเนื่องจากมีความสามารถในการดูดซับโลหะหนักได้ดี เป็นแหล่งพลังงานทางชีวภาพที่มีศักยภาพ (Bakrim et al., 2022) และผักตบชวายังมีสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมยาเช่น สารต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา สารต้านอนุมูลอิสระ และยาต้านมะเร็ง (Aboul-Enein et al., 2011)

แหนแดง (*Azolla* sp.) เป็นพืชเฟิร์นน้ำที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำ มักเจริญตามแหล่งธรรมชาติ ในน้ำนิ่ง ท่อระบายน้ำ คลอง แหนแดงมีประโยชน์หลายอย่างและมีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนในอากาศจึงถูกนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับนาข้าว (Veerabahu et al., 2015) แหนแดงเป็นพืชลอยน้ำขนาดเล็กที่ดึงดูดความสนใจเนื่องจากมีมวลชีวภาพที่อุดมด้วยแป้ง มีโปรตีนสูง (Leng et al., 1995; Faskin et al., 1999) และให้ผลผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพสูง (เช่น ไบโอดีเซล (Verma et al., 2015; Yu et al., 2014)) ที่สำคัญผลผลิตชีวมวลของแหนแดงนั้นเทียบได้กับสาหร่ายบางชนิดที่ถือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นพืชพลังงานที่มีศักยภาพสูงพบว่าແຫນແດງมีส่วนช่วยในการปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะไนโตรเจน อินทรีย์วัตถุ รวมถึงไอออนบวกอื่นๆอีกด้วย (Bhuvaneshwari, 2012)

แบคทีเรียบริเวณรากพืชที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่อาศัยบริเวณรากที่มีชีวิตอิสระเกิดขึ้นตามธรรมชาติ มีหน้าที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพิ่มผลผลิต เพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน และลดเชื้อก่อโรคพืช (Vessey, 2003; Kumar et al., 2014) PGPR จะช่วยพืชโดยการผลิตไฟโตฮอร์โมน (phytohormones) เป็นฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโตของพืช เช่น กรดอินโดลอะซิติก (IAA), ไซโตไคนิน และจิบเบอเรลลิน (Marques et al., 2010), การละลายของอนินทรีย์ฟอสเฟต (Jeon et al., 2003), การตรึงไนโตรเจนแบบไม่สมมาตร (Khan, 2005) ผลที่เป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชโดยการผลิตซีเดอโรฟออร์ ยาปฏิชีวนะ และสารประกอบฆ่าเชื้อรา (Lucy et al., 2004; Barriuso et al., 2008; Majeed et al., 2015)

จากข้อมูลข้างต้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นทำการแยกและศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผักตบชวาและແຫນແດງโดยมุ่งเน้นไปที่แบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยสีท ตลอดจนศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นโดยการวิเคราะห์ลำดับยีนช่วง 16S rRNA และศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPA) ของแอกติโนมัยสีทที่แยกได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 คัดแยกแอกติโนมัยสีทจากบริเวณผักตบชวา และແຫນແດງ จำนวน 30 ไอโซเลต
- 1.2.2 ศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชของแอกติโนมัยสีทที่แยกได้
- 1.2.3 อนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอกติโนมัยสีทแสดงกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญของพืชที่ดี

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 คัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทจากผักตบชวา และແຫນແດງในพื้นที่ของจังหวัดฉะเชิงเทรา
- 1.3.2 ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอกติโนมัยสีท ได้แก่ ลักษณะทางพีไทด์ และจีโนมไทป์
- 1.3.3 ทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ และทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อก่อโรคในพืช
- 1.3.4 ทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 1.3.5 การศึกษานี้ใช้เวลาในการศึกษาค้นคว้าและทดลองเป็นระยะเวลา 1 ปี (ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2566 ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2567)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถคัดแยกแอคติโนไมซีทจากผักตบชวาและเห่นแดงได้
- 1.4.2 ทราบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแอคติโนไมซีทที่แยกได้
- 1.4.3 ทราบตำแหน่งอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอคติโนไมซีทที่มีประสิทธิภาพส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่ดี
- 1.4.4 ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับการแยกแอคติโนไมซีทและคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากแอคติโนไมซีท ซึ่งอาจเป็นแนวทางให้กับผู้ที่สนใจนำไปศึกษาและพัฒนาต่อยอดได้ในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยสีท

2.1.1 แอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีท (Actinomycetes) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) ที่มีปริมาณของเบสกวานีนและไซโตรซีน (G+C content) ในดีเอ็นเอสูงมากกว่าร้อยละ 55-78 ตามคู่มือการจัดจำแนกแบคทีเรีย Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume Five (Williams et al., 1989) กลุ่มของแอคติโนมัยสีทจะมีรูปร่างหลากหลาย ตั้งแต่มีรูปร่างเป็นทรงกลม (cocci) รูปแท่ง (bacilli) หรือรูปร่างที่แผ่เป็นเส้นสาย (Filamentous) ที่มีความสามารถแตกแขนงกิ่งก้าน เนื่องจากแอคติโนมัยแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเส้นใยที่แตกกิ่งก้านสร้างสปอร์ได้ จึงทำให้ให้มีลักษณะภายนอกนั้นคล้ายเชื้อรา แต่แอคติโนมัยสีทกับเชื้อรานั้นมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันคือ เชื้อแอคติโนมัยสีทนั้นมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส

โดยโคโลนีของแอคติโนมัยสีทนั้นยังมีความแตกต่างจากโคโลนีของแบคทีเรียปกติอีกด้วย คือโคโลนีจะมีผิวเรียบคล้ายหนังสัตว์ แต่บางชนิดก็จะมีรอยย่นเป็นเส้นใยสั้นๆ หากลองสังเกตด้วยตาเปล่าจะเห็นเป็นผิวหนังกำมะหยี่ นอกจากนั้นยังมีความสามารถในการสร้างรงควัตถุที่หลากหลายสี อาทิเช่น สีแดง เทา เขียว เหลือง ส้ม ม่วง แดง น้ำตาล ม่วง ชมพู และสีดำ เป็นต้น และที่สำคัญไปกว่านั้นแอคติโนมัยสีทยังมีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถจะฆ่าหรือยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในหลายๆชนิด เช่น ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา หรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยกันเอง รวมทั้งไวรัส โปรซัว บางครั้งสารที่สร้างขึ้นอาจจะมีความสามารถในการยับยั้งหรือต่อต้านเซลล์มะเร็ง หรือเซลล์เนื้องอก (Williams et al., 1989)

แอคติโนมัยสีทหลายๆสายพันธุ์ที่มีการพบเห็น ส่วนใหญ่มีถิ่นอาศัยอยู่ในบริเวณของพื้นดิน แต่บางครั้งก็อาจจะพบแพร่กระจายใน แหล่งน้ำเช่น ทะเล น้ำตก โคลนตม ปุ๋ยหมัก หรือรากพืช เป็นต้น ทำให้การคัดแยกแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ที่ได้ตัวอย่างเช่น ตัวอย่างที่ได้มาจากดินจะพบเชื้อในกลุ่มของ *Streptomyces* อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก ร้อยละ 70 – 90 ของแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่พบเจอ ทั้งนี้เนื่องมาจากแอคติโนมัยสีทในสกุลอื่น ๆ นั้นมีปริมาณที่น้อย และเจริญเติบโตได้ช้ากว่าจึงถูกจัดให้แอคติโนมัยสีท ที่นอกจากเหนือจาก *Streptomyces* นั้นเป็นสกุลของแอคติโนมัยที่หายาก ซึ่งจะประกอบไปด้วยสกุล *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Dectylosporangium*, *Microbiospora*, *Nocardia*, *Actinadura*, *Microtetraspora*, *Microbiospor*, และ *Streptosporangium* เป็นต้น (Hayakawa et al., 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 แอคติโนมัยสิทโดยทั่วไป

แอคติโนมัยสิท จัดเป็นโปรคาริโอตเช่นเดียวกับแบคทีเรียทั่วไป แต่แอคติโนมัยสิทนั้นมีความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นอย่างมาก เพียงแค่ตัวอย่างของสกุล *Streptomyces* แค่เพียงสกุลเดียวนั้น ก็ทำให้มองเห็นความหลากหลายของรูปร่างทางสัณฐานวิทยา เริ่มตั้งแต่การสร้างของสปอร์ การเจริญที่มีการแตกแขนงของเส้นสายหรือเส้นใยที่คล้ายกับเชื้อรา การยึดตัวของ Vegetative mycelium (เส้นใยอาหาร) หรือการเกิดเส้นใยเหนืออากาศ (เส้นใยอากาศ) และผนังกันเส้นใยรวมทั้งการแก่ของสปอร์ที่สร้างขึ้น

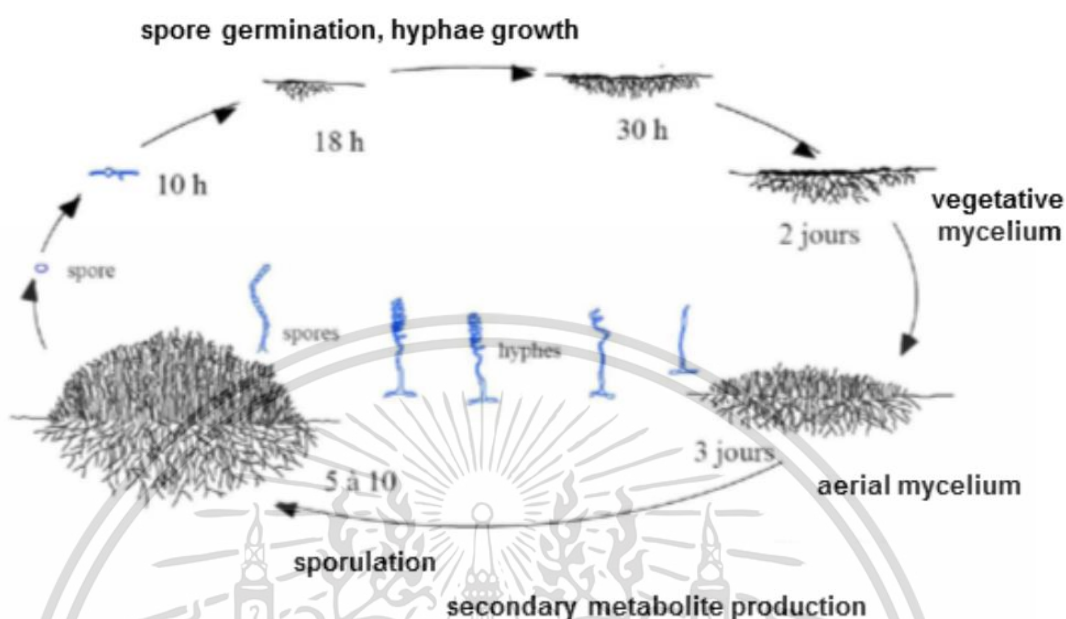
ในเวลาหลายปีที่ผ่านมา มีความเข้าใจทางชีววิทยาของแอคติโนมัยสิทเริ่มจะขยายตัวออกเป็นวงกว้าง และความก้าวหน้าของความรู้นี้ ทำให้มีการเปลี่ยนคำนิยามของคำที่ใช้เรียก แอคติโนมัยสิท จากเดิมที่เคยถูกเรียกว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างเป็นเส้นใย เพราะมีการแตกแขนงของเส้นใยในช่วงชีวิตหนึ่งของวงจรชีวิต มาเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แต่มีปริมาณของเบสกวานีนและไซโตรีซีนสูง (G+C contents) และจากนั้นมีการขยายขอบเขตการจัดกลุ่มทางอนุกรมวิธาน รวมไปถึงแบคทีเรียอีกชนิดที่มีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลม ยกตัวอย่างในสกุลของ *Micrococcus* ด้วย นอกจากนี้ ยังมีข้อมูลที่ทราบกันดีว่าความแตกต่างของคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยานั้น ได้กระตุ้นให้นักวิจัยในหลายๆท่านมีความสงสัยและสนใจเรื่องนี้กันอย่างมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อมีการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งยังคงเป็นสิ่งที่สำคัญที่จะบอกถึงความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา (รัตนารณณ์ ศรีวิบูลย์, 2548) นอกจากนี้การศึกษาลำดับของสายนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA ก็ยังเป็นสิ่งที่บอกความต่างของสกุลในระดับโมเลกุลได้ (Taechowisan et al., 2009)

2.1.3 วงจรชีวิตของแอคติโนมัยสิท

แอคติโนมัยสิทเกือบทุกสกุลจะให้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต รวมทั้งการใช้สารอินทรีย์ มีการสร้าง aerial spore จำนวนมากเพื่ออาศัยในการสืบพันธุ์ (ภาพที่ 1) จะเริ่มจาก สปอร์ที่ถูกลมพัดปลิวตกลงมาสู่ดิน ในบริเวณที่ดินมีความอุดมสมบูรณ์ สปอร์จะงอกเป็นเส้นใยซึ่งจะแทงเข้าไปในบริเวณของพื้นดิน จะเรียกเส้นใยชนิดนี้ว่า เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) โดยเส้นใยเหล่านี้เมื่อแทงเข้าไปในดินหรือใต้พื้นผิวอาหาร จะมีการแตกแขนงออกเป็นวงกว้างเพื่อทำการดูดซับแร่ธาตุอาหารมาทำการสร้างของเส้นใยต่อ ส่วนเส้นใยในอีกชนิดที่สร้างและลอยพื้นผิวของโคโลนี จะเรียกว่า เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) และจะถูกพัฒนาต่อไปเป็น สปอร์บน Sporephores ในระยะของการเจริญเติบโตนี้ อาหารที่มีอยู่จะเป็นปัจจัยที่ถูกจำกัด ทำให้แอคติโนมัยสิทส่วนใหญ่จะทำการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะในการยับยั้งหรือฆ่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นๆ สารดังกล่าวจะมีบทบาทเป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิด Differentiation ซึ่งจะทำให้การเปลี่ยนจาก vegetative cell กลายเป็นสปอร์จำนวนมากที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาศัยอยู่บนก้านชูสปอร์ที่ยื่นออกไปในอากาศ เมื่อสปอร์ถูกพัฒนาเปลี่ยนเป็นสปอร์ที่โตเต็มวัย มันก็จะสามารถแพร่กระจายไปตามลม (วิโรจน์ กนกศิลปกรรม, 2549)



ภาพที่ 2.1 วงจรชีวิตของแอกติโนมัยซีท

ที่มา: Molecular Microbiology of Actinomycetes

2.1.4 การกระจายตัวของแอกติโนมัยซีท

แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่จะอาศัยในธรรมชาติ จะดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ บางชนิดก็จะเป็นเชื้อก่อโรคทั้งในคน สัตว์ รวมไปถึงพืช ทั้งนี้แอกติโนมัยซีทนั้นสามารถที่จะอาศัยอยู่ได้ทั้งตามธรรมชาติ และบางชนิดนั้นก็สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในพืชหรือเนื้อเยื่อของพืชได้

2.1.4.1 การกระจายของแอกติโนมัยซีทตามธรรมชาติ

พื้นดิน โดยเฉพาะดินที่มีอุดมสมบูรณ์ที่เต็มไปด้วยสารอินทรีย์หรือกรดฮิวมิก มักจะเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยทางธรรมชาติที่สำคัญของแอกติโนมัยซีท แอกติโนมัยซีทเหล่านี้จะมีบทบาทในระบบนิเวศที่สำคัญคือ จะเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยเฉพาะสารที่มีโมเลกุลที่ใหญ่เช่น ไคตินและลิกนิน (Alexander, 1977) นอกจากการอาศัยในพื้นดิน ยังสามารถที่จะพบแอกติโนมัยซีทได้ตาม ปุยหมัก โคลตม ตะกอนดิน หรือแหล่งน้ำ และดินบริเวณรอบรากของพืช จำนวนหรือปริมาณของเชื้อแอกติโนมัยซีทนั้นจะขึ้นกับตัวอย่างของดินที่เก็บและชนิดของดินที่เก็บ ลักษณะทางกายภาพของดิน เช่น ความเป็นกรดหรือด่าง รวมไปถึงปริมาณสารอินทรีย์ในดิน ในพื้นที่ทางการเกษตรที่มีปริมาณของฮิวมัสสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนของแอกติโนมัยสีทที่พบเจอก็จะมีเยอะกว่าในดินที่มีปริมาณของฮิวมัสในดินน้อย (Hayakawa *et al.*, 1988)

แอกติโนมัยสีทที่พบได้ในแหล่งน้ำจืด โดย Waksman (1959) ได้อธิบายไว้ว่าในแหล่งน้ำจืดนั้นจะมีแอกติโนมัยสีทอยู่มากมาก ซึ่ง Cross (1981) ได้อธิบายในงานของเขาว่า การแยกแอกติโนมัยสีทในสกุล *Actinoplanes Micromonospora Rhodococcus Thermoactinomyces* และ *Streptomyces* จากแหล่งน้ำจืดนั้น จะเป็นพวกแอกติโนมัยสีทที่ปกติอาศัยอยู่บนดินแต่ถูกชะล้างออกจากพื้นดินแล้วตกลงไปสะสมในบริเวณของแหล่งน้ำจืด (Goodfellow and Haymes, 1984) ส่วน *Actinoplanes* เป็นสกุลที่มีการสร้างของสปอร์จะอยู่ภายในถุงหุ้ม ซึ่งสปอร์เหล่านั้นจะมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมภายนอกได้เป็นอย่างดีได้เป็นเวลานาน และจะถูกปลดปล่อยสปอร์ออกมาเมื่ออยู่ใกล้กับแหล่งน้ำจึงเป็นสาเหตุของการพบแอกติโนมัยสีทในสกุลของ *Actinoplanes* ได้ทั่วไปทั้งในพื้นที่ดินจากแม่น้ำและทะเลสาบ (Makkar and Cross, 1982)

สิ่งแวดล้อมทางท้องทะเล เช่น ตะกอน รวมทั้งสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเล อาทิเช่น เพรียงหัวหอม สาหร่าย และฟองน้ำ เป็นอีกแหล่งที่อยู่อาศัยที่สำคัญของแอกติโนมัยสีทในท้องทะเล ที่สำคัญและมีความหลากหลาย (Bull *et al.*, 2005) แอกติโนมัยสีททางทะเลนั้นพบได้ทั่วไป แต่จะถูกค้นพบมากที่สุดในตะกอน โดยเฉพาะตะกอนดินที่ถูกเก็บตัวอย่างมาจากป่าชายเลน ปริมาณที่มีน้ำจืดและน้ำเค็มมารวมกัน ทำให้มีสารอินทรีย์สูง โดยภายในตะกอนนั้นจะพบแอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora* มากที่สุด (Bredholt, 2008)

นอกจากการกระจายตัวของแอกติโนมัยสีทที่พบได้ในธรรมชาติและ ยังมีบางส่วนพบว่าแอกติโนมัยสีทในบางชนิดนั้น กระจายตัวอยู่รอบบริเวณของรากพืช ซึ่งบริเวณนั้นเป็นบริเวณที่มีอิทธิพลกับรากพืช และยังเป็นบริเวณที่มีกิจกรรมของจุลินทรีย์กับพืชอยู่มากที่สุด โดยในรากของพืชสามารถที่จะหลั่งสารบางชนิดที่มีความสามารถในการกระตุ้น การเจริญเติบโตของแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรค และเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ ในขณะที่สารกระตุ้นนั้นหลังแอกติโนมัยสีทก็จะสร้างสารต้านหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Crawford *et al.*, 1993) เราจะสามารถพบแอกติโนมัยสีทสปิชีส์ที่เกิดใหม่จากดินบริเวณรอบรากพืชได้เช่น *Pseudonocardia rhizophila* (Li *et al.*, 2010) เป็นต้น

2.1.4.2 การกระจายตัวของแอกติโนมัยสีทในต้นพืช (Endophytic actinomycetes)

แอกติโนมัยสีทนั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพืช และยังสามารถที่จะพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืชโดยไม่เป็นอันตรายต่อต้นพืช เนื่องมาจากรากพืชที่สัมผัสกับดิน แอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้จะถูกเรียกว่า เอนโดไฟติแอกติโนมัยสีท (Endophytic actinomycetes) ส่วนการคัดแยกแอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้สามารถทำได้โดยการฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเนื้อเยื่อพืช หรือทำการสกัดจากเนื้อเยื่อพืชด้านใน (Hasegawa *et al.*, 2006; Hallmann *et al.*, 1997)

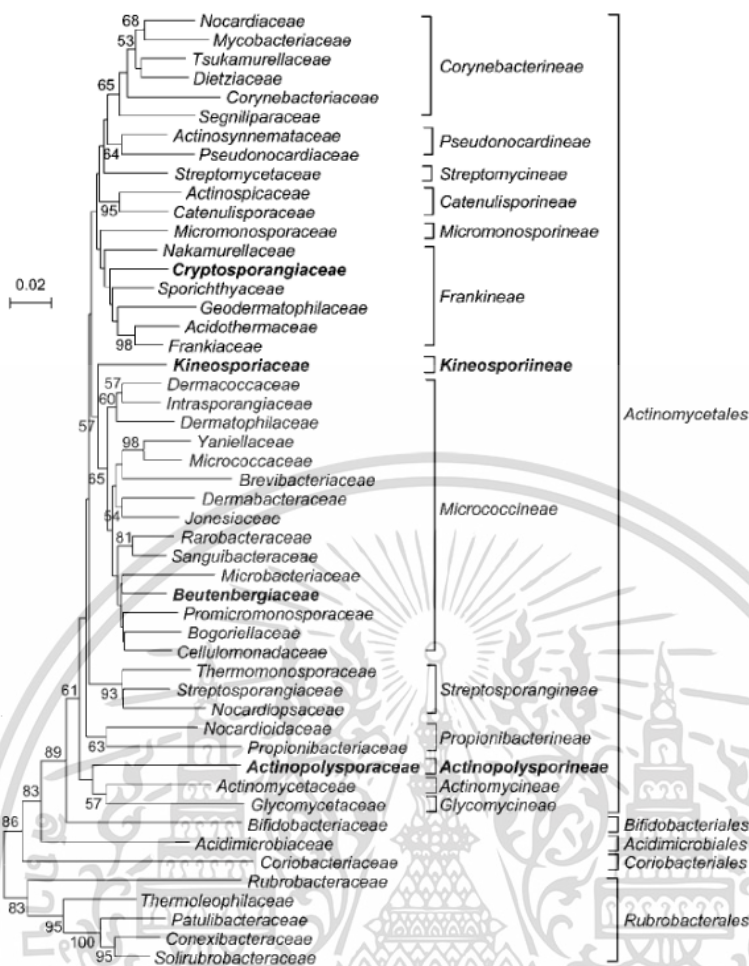
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการขังในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรายงานของ Frankia เป็นเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทสกุลแรกที่มีการพบในปมรากของ *Comptonia peregrina* (Callaham, 1978) ซึ่งมีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนในกลุ่มของพืชที่ไม่ได้อยู่ในพืชตระกูลถั่ว (non-leguminous plants) ส่วนเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทในสกุลอื่นๆที่พบ เช่น *Microbiospora Actinoplanes Streptosporangium Streptoverticillium Nocardia Saccharomonospora* และ *Micromonospora* เป็นต้น (Petrolini et al., 1991; Tian et al., 2004; Cao et al., 2005) จากรายงานของ Sardi et al., (1992) ว่าได้ทำการคัดแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืช พบว่าแอกติโนมัยสีทที่ได้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุลของ *Streptomyces* และที่เหลืออยู่ในสกุลอื่นๆ ส่วน Taechowisan et al., (2003) ได้นำพืชสมุนไพรไทยทั้งหมด 26 ชนิดมาทำการคัดแยกหา เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท ได้ทั้งจำนวน 330 ไอโซเลท พบว่าสกุลส่วนใหญ่เป็น *Streptomyces*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกนั้น ส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะและสารทุติยภูมิอื่นๆที่มีประโยชน์ โดย Taechowisan et al., (2003) ที่ได้นำพืชสมุนไพรไทยทั้งหมด 26 ชนิดมาทำการคัดแยกหา เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท ได้ทั้งจำนวน 330 ไอโซเลทนั้นทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อราจากเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ พบว่าร้อยละ 0.6-13.2 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Colletrichum musae* และ *Fusarium oxysporum* เป็นต้น

2.1.5 การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่ถูกจัดจำแนกให้อยู่ใน Class Actinobacteria Sub-class Actinobacteridae Order Actinomycetales ในปี 2009 ได้มีรายงานวิจัยในการจัดหมวดหมู่แบคทีเรียในคลาสของ Actinobacteria โดยใช้ 16s rRNA gene sequence เข้ามาช่วยในการเปรียบเทียบกับสมาชิกของแอกติโนมัยสีท ที่มีการถูกแบ่งออกทั้งหมดเป็น 13 suborder และ 42 Families



รูปที่ 2.2 ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA gene 16s rRNA gene sequence ของ Actinomycetales ที่มา Willey (2009)

2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานแอกติโนมัยซีท

2.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

ลักษณะทางฟีโนไทป์ คือ ลักษณะต่างๆที่สามารถสังเกตเห็นด้วยตาเปล่า เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยา (Biochemical and physiological characteristic) ลักษณะการเจริญเติบโต (Cultural characteristic) โดยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของแอกติโนมัยซีทนั้น จะต้องมีการศึกษาดังต่อไปนี้

2.2.1.1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่ต่างกันในทุกๆ ของแบคทีเรียมากที่สุด โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่นำมาทำการศึกษา เช่น การแตกกิ่งก้านของเส้น

ใย การสร้างเส้นใยอากาศ การแบ่งตัวของเส้นใย การสร้างสีของรงควัตถุ (Soluble pigment) สีของ

เส้นใยทั้ง 2 ชนิด คือเส้นใยอาหารกับเส้นใยอากาศ และการสร้างสปอร์ที่มีลักษณะแตกต่างกัน

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกทั้งที่ไม่มีเหตุแต่บังเอิญ และต้องอ้างอิงเงาของเอกสารทุกครั้งที่มาใช้

(เช่น ตำแหน่งของการเกิดสปอร์ การเรียงตัวของสปอร์ และชนิดของสปอร์) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถนำข้อแตกต่างนี้ มาใช้ในการจัดจำแนกหมวดหมู่ของแอคติโนมัยซีทในระดับสกุลได้ (Shirling and Gottlieb, 1966) โดยการตรวจดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์ ได้โดยการประยุกต์ใช้กล้องจุลทรรศน์ร่วมด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ที่มีเลนส์ส่องในระยะไกล (long working distance objective lens) ซึ่งเป็นเลนส์วัตถุที่กำลังขยายต่างๆ หรือในกรณีที่มีความต้องการรายละเอียดที่ชัดเจนมากขึ้น อาจจะมีการเลือกใช้กล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอน (Electron microscope)

1. ลักษณะของเส้นใยของแอคติโนมัยซีท

ลักษณะของเส้นใยนั้น สามารถใช้ในการบอกลักษณะของแอคติโนมัยซีทในแต่ละสกุลได้ โดยเส้นใยจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ เส้นใยที่มีการเจริญแทรกตัวลงไปใต้ผิวของอาหารแข็งหรือดิน จะถูกเรียกว่า เส้นใยอาหาร และเส้นใยอีกชนิดจะมีการเจริญที่ชูขึ้นเหนือผิวของอาหารแข็ง ทำให้ถูกเรียกว่า เส้นใยอากาศ โดยทั่วไปแอคติโนมัยซีทในแต่ละสกุลนั้นจะมีการสร้างของเส้นใยทั้งสองชนิด แต่ก็มีแอคติโนมัยซีทในบางสกุลนั้นที่มีการสร้างเฉพาะเส้นใยอาหาร เช่น *Salinispora* และ *Micromonospora* (Vobis, 1997) นอกจากนี้ข้อมูลในข้างต้นนั้น แอคติโนมัยซีทนั้นยังมีการสร้างเส้นใย ที่มีลักษณะต่างกัน คือ บางสกุลของแอคติโนมัยซีทนั้นจะสร้างเส้นใยลักษณะที่หักเป็นท่อนๆ ในขณะที่บางสกุลนั้นสร้างเส้นใยที่มีลักษณะแตกแขนงออกเป็นกิ่งก้าน เป็นต้น

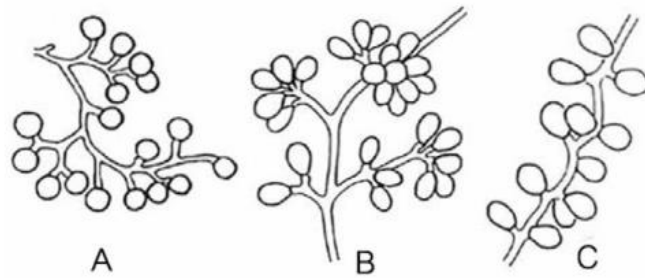
2. ลักษณะของสปอร์ของแอคติโนมัยซีท

ลักษณะของสปอร์ของแอคติโนมัยซีท จะมีทั้งแบบสปอร์ที่ไม่มีถุงหุ้มของสปอร์ (Conidia) และมีถุงหุ้มสปอร์ (Sporangiospore) ส่วนในการจัดเรียงตัวของสปอร์นั้น สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกสกุลของแอคติโนมัยซีทได้ โดยแอคติโนมัยซีทนั้นมักมีการสร้างสปอร์ออกเป็น 3 รูปแบบ ดังต่อไปนี้

(2.1) สปอร์เดี่ยว

มักพบรูปแบบของสปอร์ชนิดนี้ได้ในแอคติโนมัยซีทในหลายๆสกุล ยกตัวอย่างเช่น *Micromonospora* ที่มีการสร้างสปอร์บนเส้นใยของอาหาร เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ สปอร์ที่สร้างนั้นมีทั้งแบบ มีก้านชูสปอร์ ก้านชูสปอร์สั้น และสปอร์ที่อยู่รวมกันแบบเป็นช่อ การสร้างของสปอร์นั้นเริ่มจากการโป่งพองของปลายเส้นใยลงมาถึงผนัง จากนั้นจะมีการกั้นของผนังแล้วค่อยๆมีการสร้างของสปอร์นั้นเกิดขึ้น แอคติโนมัยซีทในสกุลของ *Thermomonospora* สร้างสปอร์เส้นเดี่ยวบนเส้นใยอากาศ ปลายก้านชูสปอร์นั้นจะมีทั้งกึ่งที่มีการแตกแขนงออกไป และบางกึ่งที่ไม่มีการแตกแขนงกลับกัน ใน *Saccharomonospora* นั้นจะมีการสร้างสปอร์สายเดี่ยวบนเส้นใยอากาศเหมือนกัน ต่างกันตรงที่สปอร์นั้นจะมีลักษณะเป็นรูปไข่อยู่บนก้านสปอร์ที่สั้น และก้านชูสปอร์นั้นจะไม่มีการแตกแขนงของกึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 รูปการณ์สร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยสีท

(A) สกุกของ *Micromonospora*

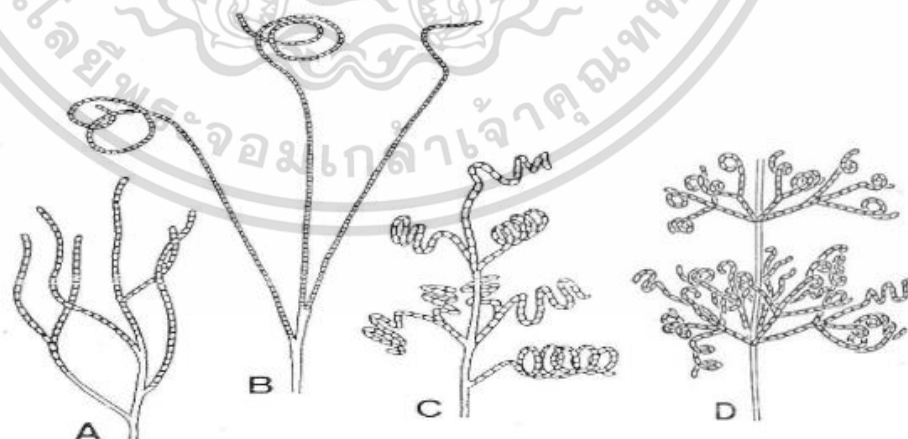
(B) สกุกของ *Thermomonospora*

(C) สกุกของ *Saccharomonospora*

ที่มา Vobis (1997)

(2.2) สปอร์ที่สร้างต่อกันเป็นสายยาว (Spores formed in chains)

สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นสาย เกิดจากผนังกันใยในเส้นใยในแต่ละห้อง ทำให้มีการเกิดเส้นใยที่เปลี่ยนจากสายยาวเป็นสปอร์ ซึ่งแอกติโนมัยสีทนั้น ส่วนใหญ่จะมีการสร้างของสปอร์ในลักษณะดังกล่าว ชื่อเรียกชนิดของสปอร์จะถูกเรียกตามลักษณะของสปอร์ จำนวนของสปอร์ (เช่น สปอร์คู่ (Sisporous), สปอร์สายสั้น (Oligosporous), และสุดท้ายคือสปอร์สายยาว (Polysporous)) และความยาวของสายสปอร์ เป็นต้น



รูปที่ 2.4 ลักษณะรูปร่างสปอร์สายยาวของ *Streptomyces*

เอกสารนี้ (A) ประเภทเกลียวแน่น ส่วนเนปลายของสปอร์จะเป็นปลายปิด: *Reciflexibitres* ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

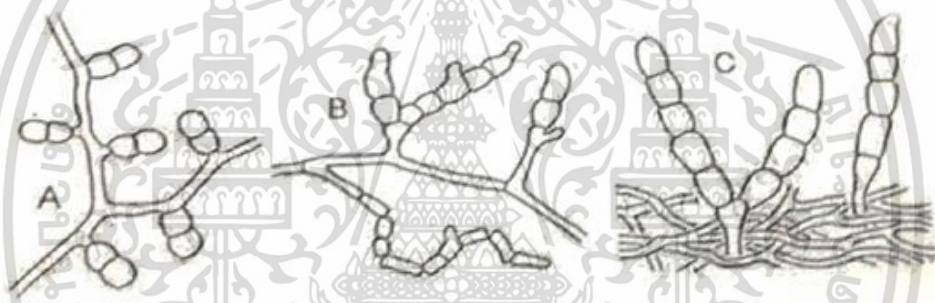
(B) ประเภทแบบหลวม ยึด ด้วยปลายของสาขาสปอร์จะปิดเป็นเกลียว: Retinaculiapertri

(C) ประเภทสายของสปอร์จะเป็นรูปเกลียว: Spira

(D) Verticillati

ที่มา : Vobis (1997)

สปอร์คู่ หรือ Sisorous เป็นคู่ของสปอร์ที่มีการจัดเรียงตัวตามความยาว โดยลักษณะของสปอร์ที่พบจะมีรูปร่างเป็นทรงกลมไปจนถึงรูปไข่ ความกว้างของวงกลมนั้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ที่ 2 ไมโครเมตร และในส่วนของผนังของสปอร์นั้นมีความหนาแน่นกว่าเส้นใย 3-4 เท่า ก้านชูของสปอร์มีลักษณะสั้นมากอยู่บนเส้นใยอากาศ ในการสร้างสปอร์ในช่วงแรกนั้น จะเกิดมาจากการแยกตัวออกทางด้านข้างของเส้นใย จากนั้นทำให้เกิดเป็นแขนงสั้นๆ และเกิดการโปรงพองพร้อมกับการสร้างผนังกันตรงกลางตามแนวขวาง เช่น แอคติโนมัยซีทในสกุลของ *Microbispora*



รูปที่ 2.5 รูปของการสร้างในลักษณะสปอร์สายคู่

(A) สกุลของ *Microbispora*

(B) ลักษณะของสปอร์สายสั้นๆของ *Nocardia brevicatena*

(C) *Catellatospora*

ที่มา Vobis (1997)

สปอร์สายสั้น หรือ Oligosporous ลักษณะของสปอร์จะเป็นสายสั้นๆ ส่วนมากในแต่ละสายจิมสปอร์ประมาณ 7-20 สปอร์ น้อยที่สุดที่มีการพบเจอคือ 3 สปอร์ หรือในบางสายพันธุ์สร้างได้มากที่สุดถึง 30 สปอร์ เช่น *Nocardia brevicatena* มีการสร้างสปอร์สายสั้น จำนวนสปอร์อยู่ประมาณ 2-7 สปอร์ สปอร์ที่อยู่บนเส้นใยของอาหารและเส้นใยอากาศ โดยก้านชูสปอร์และสายของสปอร์ อาจจะเกิดมาจากเส้นใยที่มีการแตกหักเป็นท่อนๆ ส่วน *Saccharopolyspora rectivirgura* มีการสร้างสายสปอร์ ที่มีจำนวนที่น้อยกว่า 5 สปอร์ โดยสปอร์นั้นจะอยู่ที่ด้านข้าง หรือบางครั้งอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรนำเอกสารนี้ไปเผยแพร่หรือใช้เพื่อการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของสปอร์สายสั้น จะมีลักษณะเฉพาะคือจะมีสปอร์อยู่ที่บนเส้นใยอากาศ และจำนวนของสปอร์นั้นจะมีจำนวนที่แตกต่างกันไป *Microtetraspora* จะมีจำนวนของสปอร์อยู่ที่ 4 สปอร์ต่อหนึ่งสาย และ *Actinomadura* มีจำนวนของสปอร์อยู่ที่ 20-40 สปอร์ต่อหนึ่งสาย ส่วนสายของสปอร์นั้นจะมีทั้งแบบเป็นเส้นตรง โค้งงอเป็นรูปตะขอ หรือมีลักษณะเป็นเกลียว เช่น แอคติโนมัยสีทในสกุลของ *Actinomadura pusilla* สายของสปอร์นั้นจะมีลักษณะขดกันเป็นก้อนหนาๆ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกันกับถุงหุ้มสปอร์ ของแอคติโนมัยสีทในสกุลของ *Streptospora* สปอร์ในลักษณะนี้จะถูกเรียกว่า Pseudosporangia แอคติโนมัยสีทในสกุลของ *Catellatospora* จะมีการสร้างสายสปอร์ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงหรือบางครั้งก็เป็นเส้นที่โค้ง มีจำนวนของสปอร์ต่อสายอยู่ที่ 5-30 สปอร์ ซึ่งตำแหน่งของสปอร์จะอยู่บนก้านชูสปอร์ที่เป็นสายสั้น ในส่วนของก้านชูสปอร์นั้นอาจจะมีการแตกแขนงหรือไม่มีการแตกแขนงของกิ่งก็ได้ เป็นต้น

สปอร์สายยาว หรือ Polysporous สปอร์สายสั้นที่สายแล้วรวมตัวกันเป็นสายยาวๆ ยกตัวอย่างแอคติโนมัยสีทในสกุลนี้ คือ *Streptomyces* จะมีการสร้างสปอร์ที่มีจำนวนของสปอร์ที่อยู่บนสาย มากกว่า 50 สปอร์ต่อหนึ่งสาย มักจะเรียกสปอร์ที่เป็นสายยาวแบบนี้ว่า อาร์โทสปอร์ (Arthrospore) ในส่วนของลักษณะของสายสปอร์ที่แตกต่างกันสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกให้เป็นกลุ่มมาตรฐาน การสร้างของสปอร์ในสกุลของ *Streptomyces* จะสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ประกอบด้วย

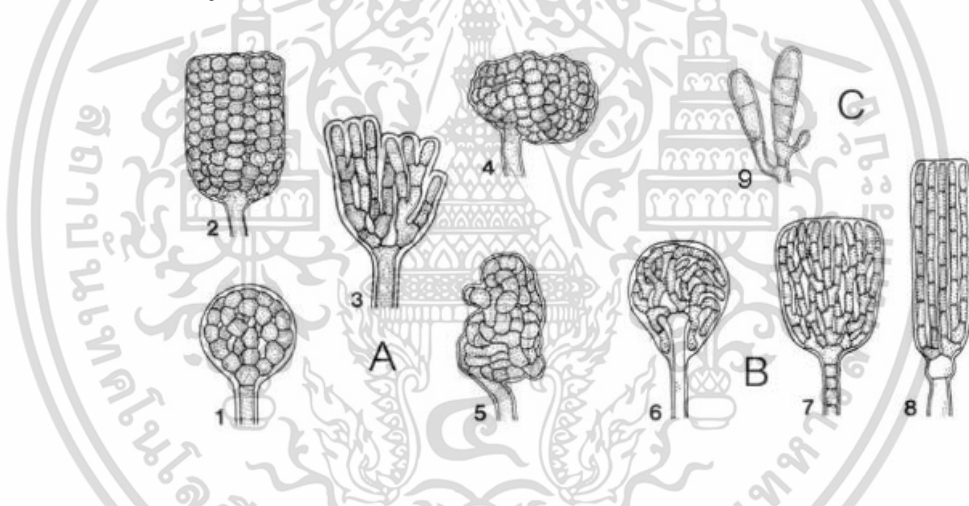
- ก. **Recitlexibiles** สายสปอร์จะมีลักษณะที่เป็นเส้นโค้งหรืองอ บางครั้งก็เป็นเส้นตรง
- ข. **Retinaculiaperti** สายของสปอร์ลักษณะคล้ายรูปตะขอ หรือเป็นเส้นที่หมุนเป็นเกลียว 1-3 รอบ
- ค. **Spira** สายของสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว ซึ่งเกลียว จะมีทั้งหมด 2 แบบ คือเกลียวแบบวงปิดติดกัน และเกลียวที่เป็นวงแต่ไม่ติดกัน ส่วนสายจะมีลักษณะยาวและยืดออกไป
- ง. **Verticillate** สายของสปอร์ขดเป็นก้อนหอย และเส้นจะมีการแตกแขนงออกเป็นข้อๆ

นอกจากนี้ใน แอคติโนมัยสีทในสกุลของ *Streptomyces* ยังมีสมาชิกในกลุ่มของแอคติโนมัยสีทในวงศ์ของ *Pseudonocardiaceae* อีกจำนวนมากที่มีการสร้างของสปอร์ที่เป็นสายยาว เช่น สกุลของ *Pseudonocardia* สร้างทั้งเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ส่วนสายของสปอร์นั้นจะเป็นรูปขิกแซก สกุลของ *Actinopolyspora* สร้างสปอร์สายยาวอยู่บน เส้นใยอากาศ *Kibdelosporangium* มีการสร้างสปอร์สายยาว และมีการสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายถุงหุ้มสปอร์ ที่อยู่บนเส้นใยอากาศ รวมทั้งเส้นใยอากาศจะมีการแตกแขนงออกเป็นกิ่งก้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2.3) สปอร์ที่สร้างอยู่ภายในถุงหุ้ม (Spores formed within sporangia)

แอคติโนมัยซีทในหลากหลายสกุล จะมีการสร้างของสปอร์ที่อยู่ภายในของถุงสปอร์ โดยถุงหุ้มสปอร์ดังกล่าวนั้น จะสร้างขึ้นมาตั้งแต่เริ่มมีการสร้างของสปอร์ จนกระทั่งเข้าสู่ระยะของสปอร์ที่แก่ จึงจะมีการปล่อยของสปอร์ออกจากถุงดังกล่าว ถุงหุ้มของสปอร์แต่ละถุงจะมีความต่างกันตรงที่ขนาดและรูปร่างของถุงหุ้ม โดยจะมีขนาดอยู่ที่ 2 -50 ไมโครเมตรของเส้นผ่านศูนย์กลาง แต่ส่วนใหญ่ถุงหุ้มสปอร์จะมีขนาดอยู่ที่ 10 ไมโครเมตร และจะมีรูปร่างต่างๆ เช่น รูปกระบอง (Clavate) รูปทรงคล้ายท่อ (Tubular) รูปแฉก (Lobate) รูปทรงคล้ายร่ม (Campanulate) รูปทรงคล้ายกะบัง (Campanulate) รูปทรงกระบอก (Cylindrical) รูปนิ้วมือ (Digitata) รูปทรงที่ไม่เป็นรูปเป็นร่าง (Irregular) รูปผลแพร์ (Pyriform) หรือรูปทรงกลม (Globose) ความแตกต่างของถุงหุ้มสปอร์ที่กล่าวในข้างต้นนั้น ทำให้เราสามารถนำมาจัดจำแนกชนิดของสปอร์ที่มีการสร้างภายในถุงหุ้มสปอร์ได้ โดยสังเกตจากจำนวนสปอร์ที่อยู่ภายในของถุงหุ้มสปอร์ จะเรียกว่า Polysporous โครงสร้างจะเป็นสปอร์ที่ชิดกันเป็นวงหรือเรียงตัวขนานกันเป็นแถวเรียงกันอยู่ภายในของถุงหุ้มสปอร์



รูปที่ 2.6 ภาพของถุงหุ้มสปอร์ของแอคติโนมัยซีทของแต่ละสกุล ที่ถูกสร้างขึ้นบนเส้นใยอาหาร ซึ่งถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม

(A) ถุงหุ้มสปอร์ของ *Actinoplanes* รวมทั้งสกุลของ *Ampullariella*

1. ทรงกลม
2. ทรงกระบอก
3. รูปแฉก
4. รูปกิ่งทรงกลม
5. รูปร่างที่ไม่เป็นรูป ไม่แน่นอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

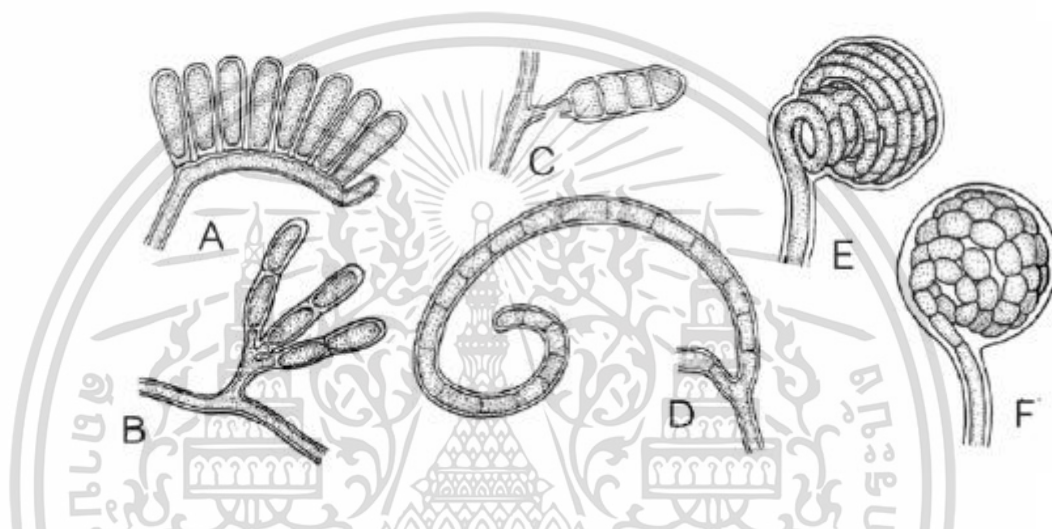
(B) ถุงหุ้มสปอร์ของ *Actinoplanes* รวมทั้งสกุลของ *Ampullariella*

6. รูปไข่

7. รูปประฉิ่ง

8. รูปทรงกระบอก

(C) ถุงหุ้มสปอร์ของ *Dactylosporangium* ซึ่งรูปทรงของถุงหุ้มสปอร์อยู่ในรูปของทรงกระบอกที่บิด Vobis (1997)



รูปที่ 2.7 ถุงหุ้มสปอร์ของแอกติโนมัยซีทของแต่ละสกุล ที่สร้างบนเส้นใยอากาศ

(A) ถุงหุ้มสปอร์แบบโมนอสปอร์ทัลของแอกติโนมัยซีทในสกุลของ *Planomonospora* สปอร์จะมีรูปทรงเป็นทรงกระบอก

(B) ถุงหุ้มสปอร์แบบไดสปอร์ทัลของแอกติโนมัยซีทในสกุลของ *Plabispora* สปอร์จะมีรูปทรงเป็นทรงกระบอก

(C) ถุงหุ้มสปอร์แบบเตตระสปอร์ทัลของแอกติโนมัยซีทในสกุลของ *Planotetraspora* สปอร์จะมีรูปทรงเป็นทรงกระบอก

(D) ถุงหุ้มสปอร์แบบโพลีสปอร์ทัลของแอกติโนมัยซีทในสกุลของ *Planopolyspora* สปอร์จะมีรูปทรงเป็นทรงคล้ายท่อ

(E) ถุงหุ้มสปอร์แบบโพลีสปอร์ทัลของแอกติโนมัยซีทในสกุลของ *Spirillospora* สปอร์จะมีรูปทรงเป็นทรงกลม

(F) ถุงหุ้มสปอร์แบบโพลีสปอร์ทัลของแอกติโนมัยซีทในสกุลของ *Streptosporangium* สปอร์จะมีรูปทรงเป็นทรงกลม

ที่มา Vobis (1997)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ลักษณะทางจีโนมไทด์

การศึกษาลักษณะทางจีโนมไทด์ เป็นการศึกษาข้อมูลที่อยู่ภายในสายพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีความสำคัญต่อการศึกษาในการจัดจำแนกหมวดหมู่ (Systematic) ของแบคทีเรียเป็นอย่างมาก ในการจัดหมวดหมู่นั้น นิยมที่จะนำข้อมูลของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ บนช่วงยีนส์ของ 16s rRNA บนสายดีเอ็นเอ มาทำการศึกษา เพื่อต้องการสืบค้นสายวิวัฒนาการของเชื้อโดยทำการวิเคราะห์จากต้นไม้แห่งสายวิวัฒนาการ หรือ Phylogenetic tree มีขั้นตอนดังนี้

2.2.2.1 การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction : PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) หรือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์นั้น เป็นวิธีที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในเวลาอันรวดเร็ว โดยในวิธีนี้จะต้องอาศัยคุณสมบัติของ เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ (DNA polymerase) เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการต่อสายของดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นโดยจะอาศัยดีเอ็นเอแม่แบบสายสั้นๆ ที่เรียกว่า ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) นอกจากนี้ เอนไซม์ยังมีคุณสมบัติพิเศษอีกอย่างคือ สามารถที่จะทนต่อความร้อนได้มากกว่า 90 องศาเซลเซียส ทำให้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์นั้น สามารถจะปรับอุณหภูมิสูงต่ำได้ตามความต้องการ โดยจะไม่ส่งผลเสียต่อเอนไซม์หรือไม่ทำให้เอนไซม์เกิดเสถียรภาพในการทำงาน และปัจจัยสำคัญในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ ประกอบไปด้วย

1. โคแฟกเตอร์ (Cofactor) ของเอนไซม์ DNA polymerase ได้แก่ Mn หรือ Mg
2. เอนไซม์ DNA polymerase
3. ดีโออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (Deoxyribonucleotide) คือ dATP dTTP dGTP และ dCTP
4. ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่ต้องการจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
5. ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลาย 5' และปลาย 3'

ในกระบวนการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์นั้น มี 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ

(1) การสูญเสียสภาพของดีเอ็นเอ (DNA denaturation)

เป็นการเพิ่มอุณหภูมิในปฏิกิริยาให้สูงขึ้นพอที่จะทำให้สายดีเอ็นเอแม่แบบ ให้เกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ โดยจะให้สายพอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide) ตามธรรมชาติจะมีสองสายที่พันกันเป็นเกลียวดีเอ็นเอ นั้นมีสภาพที่แยกออกจากกัน อุณหภูมิที่จะใช้แยกสายดังกล่าวส่วนใหญ่จะให้ความร้อนอยู่ที่ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเบส (%C+G content) ในสายของดีเอ็นเอ เมื่อมีปริมาณของเบสกวานีนกับไซโตรซีนนั้นจะทำให้สายดีเอ็นเอ นั้นมีความสามารถในการทนความร้อนเพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) การเข้าคู่ของสายดีเอ็นเอแบบแม่กับดีเอ็นเอไพร์เมอร์ (Annealing)

ขั้นตอนนี้จะปรับอุณหภูมิให้ต่ำกว่าขั้นตอนแรก จะเป็นการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมเพื่อต้องการให้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์นั้นเข้าคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบของเรา โดยทั่วไปนั้นในขั้นตอนนี้จะใช้ความร้อนประมาณ 52-58 องศาเซลเซียส ซึ่งการเลือกความร้อนจะขึ้นอยู่กับค่าอุณหภูมิการหลอมเหลว (Melting temperature, TM) ของสายดีเอ็นเอไพร์เมอร์

(3) การต่อสายยาวของดีเอ็นเอ โดยการใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (Extension)

ขั้นตอนที่สาม จะเป็นขั้นตอนเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยจะทำการสังเคราะห์ต่อจากปลายสาย 5' ของไพร์เมอร์จากข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นสายแม่แบบแต่ละสาย โดยจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะสามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิในช่วง 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ควรจะรักษาคุณสมบัติให้อยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาของทั้งสามขั้นตอน

กระบวนการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส จะเป็นการทำงานของขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งจะนับได้เป็น 1 รอบของการทำงาน (One cycle) จะทำให้ได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นหนึ่งเท่าตัว ซึ่งจะประมาณ 30 รอบเมื่อครบจะได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มเป็น 2 เท่า หรือ 10 โมเลกุล โดยทั่วไปรอบของการทำงานนิยมอยู่ที่ 20-35 รอบ

2.2.2.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของช่วงยีน 16s rRNA

สิ่งมีชีวิตสองชนิดที่ไม่มีความคล้ายกันเลย แต่อาจจะมีดีเอ็นเอที่มีความคล้ายกันมาก นอกจากนั้นยังมีไรโบโซมที่มีความคล้ายกัน ซึ่งไรโบโซมนี้จะเป็นออร์แกเนล (Organel) ภายในสิ่งมีชีวิตและมีขนาดที่เล็กมากๆ ไรโบโซมจะมีหน้าที่ที่สำคัญคือ จะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีน องค์ประกอบของไรโบโซมนั้นจะประกอบไปด้วย โปรตีนและไรโบโซมัลลาร์เอ็นเอ (rRNA) ไรโบโซมัลลาร์เอ็นเอจะถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยคำสั่งจากดีเอ็นเอส่วนไรโบโซมัลลาร์เอ็นเอซิสตรอน (rRNA cistron) ซึ่งจะพบได้ในทุกชนิดของแบคทีเรีย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene พบว่ามีค่าคงที่ที่มาก แม้ว่าจะมีการวิวัฒนาการนานและมากแล้ว แต่เมื่อตรวจสอบจะพบว่าสายลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแม้แต่เพียงน้อย ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า แม้สิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดนั้นไม่มีความเหมือนกันเลย และดีเอ็นเอของทั้งสองสิ่งมีชีวิตก็ไม่มีความคล้ายกัน แต่ยังมีสิ่งหนึ่งที่คล้ายกันก็คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไรโบโซมัลลาร์เอ็นเอซิสตรอน (rRNA cistron) ความคล้ายกันนี้สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการวัดความใกล้ชิดระหว่างสิ่งมีชีวิตในระดับสกุล (Gene) ได้ วงศ์ (Family) และลำดับ (Order) ในความคล้ายกันของไรโบโซมัลลาร์เอ็นเอ (rRNA) และไรโบโซมัลลาร์เอ็นเอ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ แคตตาล็อกกิ้ง (rRNA oligonucleotide cataloging) เป็นวิธีใหม่ที่ใช้สำหรับการหาความคล้ายคลึงกันของไรโบโซมัลลาร์เอ็นเอซิสตรอน ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

วิธีการหาลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอจะช่วยในการศึกษาวิเคราะห์หา

ความสัมพันธ์และความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มาจากแหล่งต่างๆ โดยวิธีในการตรวจหาลำดับเบสนั้น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการเรียนการสอนเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ของเอกสารนี้ กรุณาแจ้งให้ทราบล่วงหน้า ไม่อย่างนั้นจะถือว่าผิดกฎหมาย และจะดำเนินการฟ้องร้องดำเนินคดีตามกฎหมายต่อไป

จะมีหลายวิธี แต่วิธีที่เป็นที่นิยมอย่างมากและได้รับการยอมรับคือกระบวนการของ Sanger ซึ่งจะอาศัยการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการต่อสายของดีเอ็นเอ ทำให้สายดีเอ็นเอที่ได้จะเป็นสายดีเอ็นเอสายสั้นๆ จากนั้นทำการติดฉลากสารรังสีที่มีความจำเพาะกับเบสแต่ละชนิดที่ปลายของสายดีเอ็นเอ จากนั้นทำการตรวจสอบลำดับเบสโดยอาศัยการแยกสายดีเอ็นเอโดยจะอาศัยการใช้ไฟฟ้าเป็นตัวช่วย โดยกระแสไฟฟ้าจะผ่านตัวดีเอ็นเอที่อยู่บนแผ่นเจลที่ทำด้วยพอลิเอคริลเลไมด์ (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

ในปัจจุบันนั้นมีการใช้เครื่องมือสำเร็จรูปต่างๆมากมาย เพื่อที่ต่อหารใช้หา ลำดับของเบสบนสายดีเอ็นเอ ทำให้สะดวกและแม่นยำมากขึ้น การติดฉลากบนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเบสแต่ละชนิดอาศัยสารไดดีแอกซีนิวคลีโอไทด์ (dideoxynucleotide: ddG ddA ddT ddC) ที่ส่งผลให้เกิดสีฟลูออเรสเซนซ์ที่มีสีที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถวิเคราะห์ให้ได้ผลลัพธ์ที่รวดเร็วและไม่ต้องใช้สารรังสีที่เป็นอันตราย

2.3 แหนแดง

2.3.1 ความสำคัญของแหนแดง

แหนแดง (Azolla) เป็นเฟิร์นน้ำเล็กๆ พบได้ทั่วไป พบในโตรเจนทางชีวภาพ โดยในการผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจนจากอากาศของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน แหนเป็นพืชลอยน้ำขนาดเล็กที่ดึงดูดความสนใจเนื่องจากมีมวลชีวภาพที่อุดมด้วยแป้ง มีโปรตีนสูง (Leng *et al.*, 1995; Faskin *et al.*, 1999) และให้ผลผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพสูง (เช่น ไบโอดีเซล (Verma *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2014)) ที่สำคัญผลผลิตชีวมวลของแหนนั้นเทียบได้กับสาหร่ายบางชนิดที่ถือเป็นพืชพลังงานที่มีศักยภาพสูง อัตราการตรึงของไนโตรเจนมีปริมาณสูงถึง 300-600 กรัมต่อไร่ ทำให้แหนแดงมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบปริมาณสูง 3-6 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และสามารถที่นำมาใช้เป็นปุ๋ยพืชสดในนาข้าวแทนปุ๋ยที่ได้จากสารเคมี

จากรายงานของ Sanging and Van Hove ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบองค์ประกอบไนโตรเจนและกรดอะมิโนทั้งหมดของสายพันธุ์แหนแดง ได้รายงานว่ แหนแดงในสายพันธุ์ของ *Azolla, microphylla* มีแหล่งกรดอะมิโนที่ดีที่สุด จากสายพันธุ์ทั้ง 4 สายพันธุ์ *microphylla* เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับเลี้ยงสัตว์ ส่วนสายพันธุ์ *Azolla* ทั้งหมดมีส่วนของกรดอะมิโนที่มีความใกล้เคียงไม่ต่างกันมาก กรดอะมิโนที่จำเป็น (55%) กรดอะมิโนที่ไม่มีความจำเป็น (45%) ได้แก่ ไลซีน ลิวซีน อาร์จินีน ไทโรซีนและฟีนิลาลานีน ในส่วนของไทโรซีนและฟีนิลาลานีนนั้นมีกรดอะมิโนที่จำเป็นเป็นหลัก ในขณะที่เมไทโอนีนและซีสทีนนั้นมีปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นเพียงเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ผักตบชวา

2.4.1 ความสำคัญของผักตบชวา

ผักตบชวา (water hyacinth) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms จัดอยู่ในวงศ์ *Pontederiaceae* ผักตบชวาเป็นพืชที่มีการศึกษาวิจัยกันมาอย่างต่อเนื่องทั้งในและนอกประเทศ เรื่องความสามารถในการบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ ในกรณีของสารมลพิษอินทรีย์ พบว่าผักตบชวาสามารถบำบัดอินทรีย์วัตถุและธาตุอาหาร เช่น ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัส รวมทั้งสารฆ่าแมลงบางชนิดด้วย ส่วนสารอนินทรีย์พบว่า ผักตบชวาสามารถสะสมแคดเมียม โครเมียม ทองแดง พรอท ตะกั่ว ซีเซียม สตรอนเทียม และยูเรเนียมได้ในปริมาณสูง มีการนำผักตบชวามาใช้ในการบำบัดสารมลพิษในน้ำเนื่องจากเป็นพืชที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในหลายประการ เช่น มีความสามารถในการดูดซับทั้งสารมลพิษอินทรีย์และอนินทรีย์ในปริมาณสูง การเจริญเติบโตได้เร็วแม้ว่าจะอยู่ในแหล่งน้ำเสีย เป็นพืชที่มีรากยาว และโครงสร้างของรากนั้นเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แบบใช้ออกซิเจน ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในบริเวณรากของผักตบชวามีบทบาทหน้าที่ในการเปลี่ยนอินทรีย์วัตถุ รวมทั้งธาตุอาหารต่างๆที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสียให้กลายเป็นสารประกอบอนินทรีย์ในพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ผักตบชวายังเป็นพืชที่ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี จากงานวิจัยพบว่า ผักตบชวานั้นมีความสามารถในการบำบัดโลหะหนักในน้ำเสีย จากอุตสาหกรรมเซรามิคได้หลายชนิดซึ่งประสิทธิภาพการบำบัดเหล็ก สังกะสี แคดเมียม ทองแดง โครเมียม และโบรอนในน้ำเสีย ซึ่งได้ค่า 99%, 98%, 96%, 88%, 83%, และ 75% ตามลำดับ นอกจากนี้ในงานวิจัยยังพบว่าโลหะหนักจะสะสมในส่วนราก มากกว่าลำต้นและใบถึง 10 เท่า (Elias *et al.*, 2014)

ผักตบชวานั้นจัดเป็นพืชในประเภทของ hyperaccumulator หมายถึง พืชชนิดพิเศษที่สามารถสะสมโลหะหนักได้ในปริมาณที่สูง โดยไม่มีการแสดงอาการผิดปกติออกมา สำหรับกลไกในการดูดโลหะหนักนั้นในผักตบชวา เรียกว่า การสกัดโดยพืช (Phytoextraction) กระบวนการนี้เริ่มจากการที่พืชดูดซึมสารพิษผ่านเข้าทางเซลล์ราก ในขณะที่โลหะหนักบางส่วนจะถูกไว้ในบริเวณส่วนของผนังเซลล์ ต่อมาโลหะหนักจะถูกเคลื่อนย้ายเข้ามาในบริเวณของเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากความต่อเนื่องของเนื้อเยื่อชั้นผิว (epidermis) และส่วนของคอร์เทกซ์ (cortex) ในราก จากนั้นจึงเกิดการเคลื่อนย้ายของโลหะหนักจากรากไปยังส่วนยอด ซึ่งน่าจะเป็นการขับเคลื่อนโดยกระบวนการคายน้ำของพืช เมื่อโลหะมาถึงส่วนยอดของพืช พืชก็จะมีกระบวนการลดความเป็นพิษของโลหะหนัก จากนั้นจึงจะทำการเก็บโลหะไว้ในตำแหน่งที่จะไม่เป็นอันตรายต่อกระบวนการสำคัญในระดับเซลล์ (นัยนันท์ อริยกานนท์, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

เนื่องจากมีแอกติโนมัยสีทอาศัยอยู่ในบริเวณดินรอบรากของพืช และอาจจะพบแอกติโนมัยสีทที่สามารถเจริญเติบโตรวมกันกับพืชได้ มีหลายการวิจัยบอกว่าสามารถที่จะแยกแอกติโนมัยสีทจากบริเวณรากพืช ใบพืช และส่วนอื่นๆของพืช แอกติโนมัยสีทเป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่ช่วยให้พืชเจริญเติบโต โดยจะช่วยในการดูดซึมธาตุอาหาร ละลายแร่ธาตุที่อยู่ในดินที่พืชไม่สามารถนำมาใช้ได้เลย เช่น ฟอสฟอรัส แมกนีเซียมซัลเฟอร์ โพแทสเซียม เหล็ก ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และบางกลุ่มของแอกติโนมัยสีทยังมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (พรรณนภาและคณะ, 2561) นอกจากนี้ยังมีหลายงานวิจัยบอกว่าแอกติโนมัยสีทสามารถควบคุมโรคในพืชได้ (Sreevidya et al., 2016)

2.5.1 การทดสอบการตรึงไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดบนโลก ซึ่งมีวัฏจักรการหมุนเวียนสารเริ่มต้นก๊าซไนโตรเจน สารประกอบอินทรีย์ที่มีอยู่ในพืช สัตว์ จุลินทรีย์ และอินทรีย์วัตถุในดิน และไอออนแอมโมเนียม โดยจุลินทรีย์เป็นตัวกลางที่สำคัญในกระบวนการแลกเปลี่ยนสภาพไนโตรเจนจากรูปแบบหนึ่งไปเป็นอีกรูปแบบหนึ่ง (Sylvia et al., 2005) จุลินทรีย์ในดินที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้นั้นเป็นจุลินทรีย์บางสายพันธุ์เท่านั้น แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนแบบไม่พึ่งพาอาศัย หรือแบบอิสระ (non-symbiotic nitrogen fixation) และจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพาอาศัย (symbiotic nitrogen fixation) (นงลักษณ์ และปรีชา, 2544) จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนแบบไม่พึ่งพาอาศัย ประกอบด้วยแบคทีเรียในสกุล *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus polymyxa*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aulosira*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Gloeotrichia*, *Nostoc*, *Plectonema*, *Schizothrix*, *Tolypothrix*, (สายพิณ, 2547) *Azorhizobium*, *Azospirillum*, (Elmerich et al., 1997) *Bacillus macerans*, *Methylomonas methanitrificans*, *Escherichia coli*, และ *Chlorobium vinosum*, *Chromatium thiosulfatophilum*, *Rhodomicrobium vanniellii*, *Rhodospseudomonas palstris* และ *Rhodospirillum rubrum*, *Ocillatoria* และ *Synechococcus* (นงลักษณ์ และปรีชา, 2544)

2.5.2 การทดสอบการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินบางชนิด สำหรับบางตัว หรือเชื้อรา พืชและแมลงมีความสามารถพิเศษในการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) ไฮโดรเจนไซยาไนด์มีบทบาทที่สำคัญทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในแบคทีเรียในกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ทั้งการแก้ไขเนื้อหาและการใช้ชื่อ หากมีผู้แก้ไขเนื้อหาโดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ วัชพืช แมลง ไล้เดือนฝอย และปลวก ดังนั้นในการเลือกใช้จุลินทรีย์หรือแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ เป็นสารกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพ เพราะเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และการเกษตร (Sehrawat et al., 2022)

2.5.3 การทดสอบการสร้างสารซีเดอโรฟออร์

ธาตุเหล็ก เป็นแร่ธาตุที่สำคัญในกิจกรรมเมตาบอลิซึม และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในหลายชนิด ธาตุเหล็กนั้นมีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อยมาก ซึ่งส่งผลให้จุลินทรีย์นำไปใช้งานได้น้อย ซีเดอโรฟออร์ (Siderophore) เป็นตัวละลายสารประกอบเหล็กที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำ ซีเดอโรฟออร์ประกอบไปด้วย คีเลต เพอร์ริคไอออน สามารถสร้างได้โดยแบคทีเรีย รา รวมไปถึงแอกติโนมัยสัทในบางสกุล หน้าที่ของสารประกอบเหล่านี้ คือจะทำหน้าที่ในการกำจัดเหล็กออกจากสภาวะแวดล้อม หรือทำการตรึงเหล็กไว้ เหล็กนั้นมีความสำคัญและจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ส่งผลให้สร้างสารซีเดอโรฟออร์ (Siderophore) ซึ่งสารดังกล่าวมีความสำคัญในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค และสามารถนำมาดัดแปลงใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพได้ นอกจากนี้ซีเดอโรฟออร์นั้น ยังมีความสามารถในการส่งการเจริญเติบโตของพืชที่ดี ช่วยในการงอกของเมล็ด และส่งผลต่อส่วนต่างๆของพืช หรือบางครั้งยังสามารถควบคุมสิ่งมีชีวิตที่เป็นพิษในดินที่อาจจะเป็นอันตรายหรือก่อโรคทางพืชให้เกิดความเสียหาย (Neilands, 1995)

หลักการทดสอบซีเดอโรฟออร์ ถูกคิดค้นโดย Neilands และ Schwyn ในปีค.ศ. 1986 เป็นที่รู้จักกันในชื่อ CAS assay โดยอาศัยการใช้สีย้อม Chrome Azurol S เป็นตัวอินดิเคเตอร์ CAS จะมีสีส้มเมื่อละลายในสารละลาย แต่หากมีการผสมกับธาตุที่เป็นธาตุเหล็กจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อน แล้วเปลี่ยนสีไปเป็นสีน้ำเงิน เมื่อนำสารละลายนี้ไปผสมในอาหารแข็ง จะทำให้อาหารเขียวมะกอกไปจนถึงสีเงินเข้ม เมื่อนำอาหารนี้ไปทำการเลี้ยงแอกติโนมัยสัท แอกติโนมัยสัทตัวไหนที่มีความสามารถซีเดอโรฟออร์ ซีเดอโรฟออร์มีความจำเพาะกับธาตุเหล็กสูงจะดึงธาตุเหล็กออกจากสีย้อม ทำให้อาหารในรอบโคโลนีนั้นจะเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเข้มเปลี่ยนเป็นสีส้ม ที่แสดงถึงความสามารถในการผลิตซีเดอโรฟออร์ของแอกติโนมัยสัทนั้น (ธนวรรณ และ อธิพันธ์ 2560)

2.5.4 การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยสลายฟอสเฟต

แบคทีเรียละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing bacteria: PSB) มีหน้าที่สำคัญในการช่วยเพิ่มปริมาณแร่ธาตุฟอสเฟตในดินให้กับพืช นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชบางชนิด ด้วยการสร้างกรดอินทรีย์ที่สำคัญและฮอร์โมนในต้นพืชเอง รวมทั้งการปล่อยแร่ธาตุที่เป็นแร่ธาตุที่สำคัญในการเจริญเติบโตและจำเป็นสำหรับต้นพืช (ทัยและอภิญา, 2565) แร่ธาตุฟอสเฟตเป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญอย่างมากรองมาจากไนโตรเจน เพราะมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช แต่พืชในหลายๆชนิดมีความสามารถในการใช้แร่ธาตุชนิดนี้ได้้นี้มาก ทำให้เกิดปัญหาการขาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนสิทธิ์ในทรัพย์สินทางปัญญา ผู้ที่เห็นประโยชน์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟอสเฟตในต้นพืชในภาคของเกษตรกรรมทั่วโลก (ธนวรรณ และอิทธิพัทธ์, 2560) ซึ่งฟอสเฟตนี้จะมี ความสำคัญในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของต้นพืชและในระบบการสืบพันธุ์ของพืช เพราะจะช่วย ให้พืชมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง กระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล ช่วยในการตรึง ไนโตรเจนสำหรับพืชตระกูลถั่ว การออกผลผลิต การออกดอกและการสร้างเมล็ด นอกจากนี้ยังช่วยใน การสุกของผล นอกจากนี้ยังช่วยต้านทานโรคในต้นพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในปี 1950 มีการทดลองนำ แแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตมาใช้ทำปุ๋ยชีวภาพ (Alam et al., 2022)

ทำให้ได้รู้ว่าการเลือกใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตได้ ถือว่าเป็น ทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการเลือกใช้ปุ๋ยที่ทำมาจากจากเคมี การใช้จุลินทรีย์ในกลุ่ม นี้ถือว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณของฟอสเฟตในดิน กลไกของหลักการย่อยสลาย ฟอสเฟตคือ จะมีการสังเคราะห์กรดอินทรีย์บางชนิด ในบรรดากรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ทั้งหมด ประกอบด้วย กลูโคโรนิก กรดฟอร์มิก 2-คีโตกลูโคนิก กรดแลคติก ซิตริก ไกลโคลิก ซัคซินิก ออกซา ลิก และกรดอะซิติก การผลิตกรดอินทรีย์เหล่านี้จะส่งผลทำให้ค่า พีเอช (pH) ลดลง และการลดลง ของค่าพีเอชในดินนั้น จะช่วยกระตุ้นการปลดปล่อยกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟอสเฟต ผ่านกระบวนการออกซิเดชัน ซึ่งเป็นกลไกที่เกิดภายนอกเซลล์ จะเกิดบริเวณของเยื่อหุ้มเซลล์ (Pande et al., 2017)

โดยพืชที่ขาดฟอสเฟตส่วนใหญ่จะมีการประกอบไปด้วย ลำต้นแคระแกร็น ผอม สูง ใบที่ได้มี ขนาดที่เล็ก จำนวนใบลดน้อยลง ใบมีสีเขียวเข้มออกสีน้ำเงิน และร้ายแรงที่สุดคือ ต้นพืชจะมีการหยุด การเจริญเติบโต พื้นที่ในการเกษตรส่วนใหญ่มีปริมาณของฟอสเฟตที่ถูกตรึงในดินเป็นจำนวนมาก ซึ่ง ฟอสเฟตเหล่านั้นมาจาก การสะสมอย่างต่อเนื่องจากการใช้ปุ๋ยสารเคมี โดยฟอสเฟตเหล่านั้นจะเป็น ฟอสเฟตที่อยู่ในรูปที่ละลายน้ำไม่ได้ ทำให้ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช ส่วนยการตรึงและการตกตะกอน ฟอสเฟตนั้นจะขึ้นอยู่กับพีเอชของดิน และชนิดของดินก็มีส่วนด้วย ในดินตะกอนส่วนใหญ่จะมีการตรึง ออกไซด์อิสระและฮดรอกไซด์ของพวก Al และ Fe ที่ถูกตรึงอยู่ในรูปของ Aluminium phosphate ($AlPO_4$) และ Ferric phosphate ($FePO_4$) ในดินที่มีค่าพีเอชมีหรือดินที่เป็นด่าง ฟอสฟอรัสที่อยู่ใน ดินจะถูกตรึงโดยแคลเซียม (Ca) ทำให้เกิดเป็น Calcium orthrophosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) สารประกอบที่อยู่ในรูปดังกล่าวจะละลายน้ำได้น้อย (สุภาพร และคณะ, 2553)

2.5.5 การทดสอบการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติก

สารที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซินมีหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือสาร ออกซิน เป็นสารชนิดแรกที่ค้นพบคือ กรดอินโดล-3-อะซิติก (Indole-acetic acid: IAA) เป็นฮอร์โมน พืชที่สำคัญ และเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นมาเอง (ลิลลี่ และคณะ, 2549) โดยฮอร์โมนกลุ่มออกซินนี้มี หน้าที่หลักในการควบคุมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อและการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมในพืช นอกจากนี้ ยังควบคุมกระบวนการทำงานทางสรีระที่สำคัญ ฮอร์โมนชนิดนี้จะถูกพบได้ในทุกส่วนของต้นพืช

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ความเข้มข้นของฮอโมนจะไม่เท่ากัน มีจากวิจัยที่ทำการทดสอบการสร้าง IAA จากจุลินทรีย์ว่ามีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ที่ถูกแยกจากดินรอบรากพืชสามารถผลิตสาร IAA ได้ในช่วง 1.06 -8.04 $\mu\text{g/ml}$ ยิ่งไปกว่านั้นแบคทีเรียในกลุ่มของแอกติโนมัยซีทที่เป็นเอนโดไฟท์ ที่ถูกแยกออกมาจากรอบรากของต้นพืชทั้งในกลุ่มของ *Streptomyces* และ *non-streptomyces* ก็มีความสามารถในการผลิตสาร IAA ได้เช่นกัน (Khamana et al.,2009; Abd-Alla et al., 2013; Goudjal et al., 2013)

การกระตุ้นให้จุลินทรีย์สร้างฮอโมนออกซินได้นั้น ต้องมีการเติมสารตั้งต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สารนั้นคือ L-Tryptophan โดยเชื้อจะใช้ TRP transaminase หรือการดีคาร์บอกซิลเลชันและเอาหมู่อะมิโนของ L-Tryptophan ออกใช้ Tryptophan เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดอินโดล-3-อะซิติก ซึ่งกรดชนิดนี้มีความสำคัญอย่างมากในการดูดซึมแร่ธาตุอาหารในบริเวณรากของพืช มีส่วนให้รากของพืชนั้นยาวขึ้นและเพิ่มจำนวนขนราก และการตรวจสอบเชิงปริมาณ สามารถทำได้โดยการใช้สวิตแบบสากล โดยใช้สาร Salkowski ซึ่งเป็นสารละลายหลักในกรดเข้มข้น เมื่อสารละลายผสมกับสารตั้งต้นที่เป็น IAA จะเกิดปฏิกิริยาและได้ผลิตภัณฑ์ Tris-(indole-3-acetato) iron (III) จะได้ออกมาเป็นสีชมพูสด (Glickmann and Dessaux, 1994)

2.5.6 การศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

มีรายงานว่าของ Newman et al.(2003) จากการทดลองของพวกเขา พบว่าแอกติโนมัยซีทในหลายสกุลนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ โดย มีการสร้างเอนไซม์มาย่อยสลายไคติน ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเส้นใยรา ส่งผลให้ผลของเซลล์ราที่ได้มีลักษณะที่ผิดปกติ และอาจจะส่งผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Li and Piel. (2002) ว่า สาเหตุอีกอย่างที่ทำให้เชื้อราหยุดการเจริญเติบโตเป็นผลมาจาก แอกติโนมัยซีทนั้นสร้างสารเมแทบอลิต์

2.6 การสกัดสารทุติยภูมิจาก *Actinomyces*

แอกติโนมัยซีทในหลายๆสกุล มีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary Metabolites) ได้หลากหลาย แต่การจะนำสารดังกล่าวนี้มาศึกษานั้นหรือทำการประยุกต์ใช้นั้นในด้านต่างๆนั้น จำเป็นต้องนำสารที่ได้นั้นมาทำการแยกสารออกจากตัวเซลล์ของแอกติโนมัยซีทก่อน และเพื่อให้ได้สารทุติยภูมิที่ต้องการและได้ปริมาณของผลผลิต (Yield) มากที่สุดนั้น จึงจำเป็นต้องมีการเลือกใช้วิธีที่จะสกัดสารให้เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 การเตรียมตัวทำละลายในการสกัด

สารทุติยภูมิ (Secondary Metabolites) ที่ได้จาก *Streptomyces* มีหลายชนิดและมีคุณสมบัติที่หลากหลายมาก การเลือกตัวทำละลายที่จะสามารถดึงเอาสารในเซลล์ออกมาได้ทุกชนิดตามที่ต้องการจึงทำได้ยาก นอกจากนี้ในสารบางชนิดอาจจะเกิดการจับกันเอง ทำให้การละลายของสารแตกต่างกันตามคุณสมบัติการละลายของสารแต่ละชนิด ในการเลือกใช้ตัวทำละลายหลายชนิดในการสกัดสารนั้น อาจจะช่วยทำให้สามารถสกัดสารที่ต้องการได้หรืออาจเลือกใช้ตัวทำละลายที่เป็นแอลกอฮอล์กับน้ำ หรือตัวทำละลายที่มีส่วนผสมระหว่างแอลกอฮอล์และน้ำ เนื่องจากตัวทำละลายดังกล่าวมีความสามารถทำละลายได้ทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ตัวทำละลายประเภทแอลกอฮอล์ที่นิยมใช้ในปัจจุบันยกตัวอย่างเช่น เมทานอล เอทานอล เป็นต้น (ภาควิชาเภสัชวินิฉัย มหาลัยมหิดล, 2546)

2.6.2 วิธีการสกัดสารทุติยภูมิ

การสกัดสารทุติยภูมินั้นสามารถที่จะทำได้หลายวิธี แต่ในการเลือกวิธีที่จะนำมาสกัดสารนั้นต้องดูที่คุณสมบัติของสาร มีความสามารถในการทนความร้อนและชนิดของตัวทำละลายที่ใช้

2.6.2.1 การหมัก หรือการหมักแช่ (Maceration)

การหมักหรือการหมักแช่ เป็นวิธีการสกัดที่ง่ายและมีความสำคัญ แต่ก็มีข้อเสียของวิธีนี้คือ การสกัดสารนั้นจะใช้เวลานาน สิ้นเปลืองตัวทำละลาย และสารที่ได้ออกมานั้นจะมีประสิทธิภาพที่ต่ำ โดยการสกัดโดยการแช่ในตัวทำละลายในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถ โดยจะนำตัวอย่างที่ต้องการสกัดมาทำการเติมน้ำหรือตัวทำละลายที่เลือกไว้ในข้างต้น จากนั้นแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แต่ไม่ควรทิ้งไว้เกิน 48 ชั่วโมงหรือ 2 วัน (กรมวิชาการเกษตร, 2535) ข้อดีของวิธีนี้ คือสารสกัดของจะไม่ถูกกับความร้อนในกระบวนการของการสกัด จึงเหมาะที่จะใช้สกัดสารที่ไม่สามารถทนความร้อนได้ แต่ด้วยข้อเสียที่มีมากทำให้มีการประยุกต์ใช้เครื่องมือต่างๆมาช่วยในกระบวนการสกัดสาร เช่น เครื่องปั่น เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic) มาช่วยในการทำให้เซลล์แตกในข้างต้น เพื่อที่จะให้สารทุติยภูมิออกมาจากเซลล์ได้ง่ายขึ้น (ภาควิชาเภสัชวินิฉัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2546)

2.6.2.2 การสกัดสารในของเหลวด้วยของเหลว (Liquid- liquid Extraction)

เป็นการสกัดสารจากตัวทำละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกตัว ซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก วิธีนี้จะใช้ในการแยกสารประกอบตามการละลายในของเหลวสองชนิดที่ต่างกัน ซึ่งโดยปกติจะเป็นน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ โดยวิธีหลังจากมีการสกัดสารด้วยอะซิโตน (Acetone) จะใช้ส่วนผสมของตัวทำละลายที่มีไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)

(เพียงตัวเดียวหรืออาจจะมีการผสมของปิโตรเลียมอีเธอร์) โดยในการสกัดของสารทุติยภูมิดังกล่าวนี้จะไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ 1. Extractant lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารนั้นจะมีน้ำหนักเบาว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสาร 2. Reffinate lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัดนั้นมีน้ำหนักที่หนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสาร และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารทั่วไป ได้แก่ ไตคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เฮกเซน (hexane) 1-คลอโรบิวเทน (1-Chlorobutane) และทูลูอิน (Toluene) เป็นต้น (Urkude et al., 2019)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Yuparat และ Kannika (2021) ได้ค้นพบแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ สายพันธุ์ DW4-2^T ที่แยกจากแห่น (*Spirodela* sp.) โดยเก็บตัวอย่างจากบ่อเกษตรกรรม ที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร จากนั้นทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและสายวิวัฒนาการของเชื้อ โดยการจัดจำแนกทำให้รู้ว่าแอกติโนมันสีที่อยู่ในสกุลของ *Streptomyces* หลังจากการศึกษาสายพันธุ์ DW4-2^T โดยใช้ 16S rRNA gene sequence มีค่าใกล้เคียงกับ *Streptomyces qinglanensis* DSM 42035^T ถึง 98.5% เมื่อศึกษาลำดับของเบสกวานีนกับไซโตรซีน (G+C content) อยู่ 71.0 mol% และการศึกษาในระดับจีโนมพบว่า สายพันธุ์ DW4-2^T มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากข้อมูลการศึกษาในช่วงต้นนี้สนับสนุนให้ สายพันธุ์ DW4-2^T เป็นตัวแทนของสายพันธุ์ใหม่ของสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีชื่อว่า *Streptomyces spirodelae* sp.

Yasuko และคณะ (2021) ได้รายงานว่า แห่นแดงนั้นมีขนาดเล็ก เจริญเติบโตได้เร็ว และเป็นพืชน้ำที่อุดมไปด้วยแป้งกับโปรตีนภายใน คาดว่าในอนาคตจะเป็นพลังงานและวัสดุชีวภาพที่ดีเยี่ยม ปฏิกริยาระหว่างแห่นกับจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่สำคัญทางชีววิทยาสำหรับการใช้ประโยชน์อย่างมากในการใช้แห่นในอุตสาหกรรม คือการเจริญเติบโตของแห่นส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Acidobacteria*

Rinkal และคณะ (2022) แบททีเรียที่แยกได้ตามธรรมชาติที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด โดยได้แยกจาก *Panchagavya* หมัก (เป็นส่วนผสมที่ได้มาจากวัว ประกอบด้วย มูลวัว, ปัสสาวะ, นม, ไขมัน, ลีมน้ำนม) แบททีเรียที่แยกได้นั้น เมื่อนำไอโซเลต PG-8 มาจัดจำแนกด้วย 16s rRNA ทำให้รู้ว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างเอนโดสปอร์ เรียกว่า *Bacillus* sp. นอกจากนี้ PG-8 แสดงให้เห็นศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในหลายชนิด เช่น มีการสร้างกรดอะซิติก (2.78 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร), กรดจิบเบอเรลลิก (0.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร), แอมโมเนีย (6.51 ไมโครโมล/ มิลลิลิตร), การผลิตเอ็กโซโพลีแซ็กคาไรด์ (2.6% w/v) และการละลายฟอสเฟต (198.27 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นอกจากนี้แบคทีเรียที่แยกได้ยังมีความสามารถในการอยู่รอดภายใต้สภาวะความเครียดอีกด้วย

Fan และคณะ (2023) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยภายในราก (endosphere) ของพืช ซึ่งอาจส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและมีศักยภาพในการช่วยบำบัดทางชีวภาพ ผักตบชวา แอกซารินเป็นเอกสารทสวงนเวสสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับถาดไหนไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า (*Eichhornia crassipes*.) เป็นพืชน้ำที่มีขนาดใหญ่ สามารถปรับตัวให้เข้ากับระบบนิเวศในน้ำได้ ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มาใช้

ทั้งน้ำจืดและน้ำเค็มซึ่งทำให้ผักตบชวานั้นเต็มไปด้วยแบคทีเรียหลากหลายชนิด ทำให้ต้องการที่จะจัดโครงสร้างอนุกรมวิธานของชุมชนเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่อาศัยตามบริเวณต่างๆของผักตบชวา ในการศึกษาครั้งนี้พวกเขาทำการจัดจำแนกเอนโดไฟท์แบคทีเรียจากบริเวณต่างๆโดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับ 16s rRNA และตรวจสอบศักยภาพความเป็นประโยชน์ต่อพืช จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้นั้นมีความหลากหลาย และในการวิเคราะห์ทางอนุกรมวิธานนั้นพบว่าไฟลัมหลักๆที่พบเป็นโปรตีเอส (*Proteobacteria*) และ แอคติโนแบคทีเรีย (*Actinobacteria*) รวมกันมากกว่าร้อยละ 80 สกุลที่มีมากที่สุดในเอนโดสเฟียร์ทั้งในส่วนของใบและลำต้น คือ *Rhizobiaceae* ในส่วนของเนื้อเยื่อสกุลที่พบมากที่สุดคือ *Nannocystis* และ *Nitrospira* จากวงศ์ *Nannocystaceae* และ *Nitrospiraceae* ตามลำดับ แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จาก *E. crassipes* นั้น ส่งเสริมประโยชน์ในกับต้นพืชในหลายการทดลอง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและทำให้พืชสามารถต้านทานต่อความเครียดได้

Sharma และคณะ (2021) ได้บอกว่ารากของพืชนั้นเป็นส่วนเชื่อมต่อสิ่งสำคัญสำหรับปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ ซึ่งรากของพืชนั้นจะเป็นหน้าที่สำคัญในการดูดซึมและกำจัดโลหะหนักออกจากบริเวณที่มีการปนเปื้อน ผักตบชวา (*Eichhornia crassipes.*) เป็นพืชลอยน้ำที่มีขนาดใหญ่ สามารถลอยอยู่ในน้ำได้อย่างเป็นอิสระ นอกจากนี้ยังเป็นพืชที่จัดว่าเป็นพืชที่คอยดูดซึมโลหะหนัก (*Hyperaccumulator*) ที่รู้จักกันอย่างดี เป็นพืชที่มีแนวโน้มว่าจะมีจะมีกลุ่มของจุลินทรีย์ที่หลากหลายอาศัยอยู่ในบริเวณของราก จึงมีการตั้งสมมติฐานว่ารากของผักตบชวานั้นอาจจะสามารถเป็นที่อยู่ที่ดีของจุลินทรีย์ที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชได้ นอกจากนี้ส่งเสริมอาจจะช่วยเพิ่มศักยภาพในการซ่อมแซมส่วนที่ได้รับความเสียหายของพืช

Marcela และ Vanessa (2016) ได้รายงานว่าโดยทั่วไปของแอคติโนแบคทีเรีย (*Actinobacteria*) นั้นจะอาศัยอยู่ที่ไรโซสเฟียร์ (*Rhizosphere*) และเป็นส่วนที่สำคัญเนื่องจากบริเวณนั้นจะปฏิสัมพันธ์กับพืช ปฏิสัมพันธ์นี้ทำให้สามารถจำแนกลักษณะของพวกมันได้ว่าเป็นไรโบโซแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (*plant growth-promoting rhizobacteria: PGPR*) PGPR นั้นมีกลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม นอกจากนี้แอคติโนแบคทีเรียช่วยปรับปรุงสาอาหารและแร่ธาตุ ทั้งยังสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่สังเคราะห์ขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความสามารถในการสร้างสารในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา จากการศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตต่างๆของแอคติโนแบคทีเรีย เช่น การละลายฟอสเฟต การผลิตไซโตโรฟอร และ การตรึงไนโตรเจน นอกจากนี้แอคติโนแบคทีเรียยังเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อมลพิษหรือเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม แต่แอคติโนแบคทีเรียนั้นยังช่วยรักษาสมดุลทางชีวภาพของดิน โดยการร่วมมือกับการหมุนเวียนสารอาหาร ข้อมูลของต้นนั้นจะเกี่ยวข้องกับคุณภาพและผลผลิตโดยตรงของพืช นอกจากนี้จากการศึกษาเพิ่มเติมของจุลินทรีย์เหล่านี้ เช่น การผลิตสารเมตาบอไลต์ ความยืดหยุ่นเมื่อเจริญสภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย และปฏิกิริยาที่เป็นประโยชน์ พร้อมกับการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ส่วนบุคคลเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรนำไปใช้

เสริมฤทธิ์กันกับเชื้อรา *arbuscular mycorrhizal* เมื่อรวบรวมข้อมูลข้างต้นที่กล่าวมานั้น แอคติโนแบคทีเรียถือได้ว่าเป็นปุ๋ยที่ดีที่สุดสำหรับพืชที่เป็นไปได้

Teboho และคณะ (2022) ได้รายงานว่ไรโซสเฟียร์ (rhizosphere) เป็นชั้นฟิล์มบางๆที่ล้อมรอบรากของพืช และเป็นบริเวณที่เกิดกิจกรรมทางชีววิทยา เคมี ชีวภาพที่สำคัญ นอกจากนี้จุลินทรีย์จำนวนมากพยายามที่จะบุกรุกเข้าไปในส่วนของรากพืช และมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช *Bacillus sp.* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณของรากและศักยภาพในการเจริญเติบโตที่โดดเด่นที่สุด นอกจากนั้นยังทนต่อสภาวะแวดล้อม และสร้างสปอร์ที่มีอายุยืนยาว ปฏิกริยาระหว่างพืชกับ *Bacillus sp.* ทำให้สร้างสารเมตาบอไลต์ที่หลากหลาย นำไปสู่การส่งเสริมการเจริญเติบโตและการป้องกันของพืชที่เพิ่มขึ้น

Zineb และคณะ (2022) รายงานว่แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPBs) เป็นพันธมิตรที่แข็งแกร่งสำหรับการเกษตรแบบยั่งยืน แบคทีเรียพวกนี้เป็นทางเลือกที่น่าสนใจแทนปุ๋ยที่ได้จากสารเคมีและยาฆ่าแมลง มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ได้รับการบันทึกไว้อย่างกว้างขวางเกี่ยวกับลักษณะ PGPB แต่ยังมีจุลินทรีย์แอคติโนแบคทีเรียได้มีการจดบันทึก และทำวิจัยมากขึ้นในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมา เนื่องจากความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ผลกระทบของแอคติโนแบคทีเรียที่มีผลต่อสุขภาพ และผลผลิตของพืชอาจจะเป็นทั้งทางตรงและทางอ้อมหรือทั้งสองอย่าง

Elias และคณะ (2014) งานวิจัยพบว่า ผักตบชวานั้นมีความสามารถในการบำบัดโลหะหนักในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเซรามิคได้หลายชนิดซึ่งประสิทธิภาพการบำบัดเหล็ก สังกะสี แคดเมียม ทองแดง โครเมียม และโบรอนในน้ำเสีย ซึ่งได้ค่า 99%, 98%, 96%, 88%, 83%, และ 75% ตามลำดับ นอกจากนี้ในงานวิจัยยังพบว่าโลหะหนักจะสะสมในส่วนราก มากกว่าลำต้นและใบถึง 10 เท่า

Jeya และคณะ (2013) ได้ศึกษาและทำการระบุสายพันธุ์ของ *Streptomyces* ซึ่งทำการแยกจากตัวอย่างดิน จากนั้นทำการศึกษากฎที่ด้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จาก *Streptomyces* นั้นมีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Air flow Laminar)
2. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
3. เครื่องชั่งสารแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)
4. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
8. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
9. เครื่องเขย่า (Shaker)
10. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Ligth microscope)
11. เลนส์ส่องระยะไกล (Long-working distance lens)
12. ปีกเกอร์ (Beaker)
13. ขวดฝาเกลียว (Duran)
14. ลูปเขี่ยเชื้อ (loop)
15. ลวดเขี่ยเชื้อ (Microneedle)
16. หลอดทดลอง (Test tube)
17. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
18. หลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (Microcentrifuge tube, Eppendorf tube)
19. แท่งแก้วรูปตัวแอล (L-Shape Glass Rod)
20. กระดาษกรอง Whatman no.1
21. หลอดพลาสติกทนความเย็น (Cryo tube)
22. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดสเตอริโอ (Stereo microscope)
23. ขวดแก้วรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
24. หลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (Microcentrifuge tube, Eppendorf tube)
25. หลอดพลาสติกทนความเย็น (Cryotube)
26. กรวยแยกสาร (Separatory funnel)
27. ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette)
28. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
29. โถดูดความชื้น (Desiccator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30. เครื่องเขย่า (Shaker)
31. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer)
32. โกร่งบดสาร (Mortar and Pestle)
33. ตู้เย็น (refrigerator)
34. กระดาษลิตมัสวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH Test Strip)
35. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (Ultra-low temperature freezer)
36. เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate Reader)
37. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator)

3.2 สารเคมี

1. วุ้น (Agar)
2. สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)
3. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
4. แป้งที่ละลายน้ำได้ (Soluble starch)
5. กลูโคส (Glucose, $C_6H_{12}O_6$)
6. น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Sterile Water)
7. น้ำ RO (Reverse Osmosis)
8. เปปโตน (Peptone)
9. สารละลายกลีเซอรอล (Glycerol) ความเข้มข้นร้อยละ 20
10. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
11. Malic acid
12. K_2HPO_4
13. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
14. NaCl
15. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
16. Bromothymol blue
17. FeEDTA
18. KOH
19. Biotin
20. Pyridoxal-HCl
21. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
22. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

23. H_3BO_3
24. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
25. $MnSO_4 \cdot H_2O$
26. $Ca_3(PO_4)_2$
27. $(NH_4)_2SO_4$
28. K_2SO_4
29. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
30. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
31. KCl
32. glycine
33. picric acid
34. sodium carbonate
35. tween 20 (Polysorbate 20)
36. เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 (Alcohol 70%)
37. เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (Alcohol 95%)
39. เมทานอล (CH_3OH)

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Colletotrichum capsici*
2. *Colletotrichum gloeosporioides*

3.4 การเก็บตัวอย่าง การคัดแยก และการเก็บรักษาแอคติโนมัยซีท

3.4.1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากผักตบชวา จากลำคลอง ตำบล คลองประเวศ อำเภอบ้านโพธิ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา ($13^{\circ}38'07.4"N$ $101^{\circ}01'57.5"E$) และแหวนแดง จาก 2 แหล่ง ได้แก่ บริเวณนาข้าว ตำบล คลองประเวศ อำเภอบ้านโพธิ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา ($13^{\circ}38'27.3"N$ $101^{\circ}02'09.7"E$) และ บ่อเกษตร บริเวณข้างคณะบริหารธุรกิจ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง แขวงลาดกระบัง เขต ลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร ($13^{\circ}43'46.9"N$ $100^{\circ}47'00.5"E$) โดยตัวอย่างทั้งสองจะถูกส่งมาถึงห้องปฏิบัติการภายใน 24 ชั่วโมงและถูกนำมาใช้คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท หากไม่สามารถส่งตัวอย่างมาถึงได้ในเวลาดังกล่าว ตัวอย่างจะถูกเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ $4^{\circ}C$ ก่อนที่ใช้ในขั้นตอนการคัดแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การคัดแยกแอกติโนมัยสีท

นำตัวอย่างผักตบชวา ขั้นตอนแรกตัดแบ่งส่วนราก และใบแยกออกจากกันเป็นสองส่วน นำทั้งสองส่วนไปทำการบดให้ละเอียดโดยใช้โกร่ง เติมสารละลาย 0.01% tween 80 ปราศจากเชื้อ ลงไปคนผสมทั้งสองอย่างเข้าด้วยกัน หลังจากนั้นจึงดูดสารละลายที่ได้ ปริมาตร 10 ml ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ที่มี 90 ml ของ 0.01% tween 80 ปราศจากเชื้อ ขั้นตอนถัดมาสารละลายที่ได้มาทำการเจือจางในลักษณะ ten-fold serial dilution ตั้งแต่ 10^0 - 10^4 เพื่อที่จะนำมา spread plate ที่ระดับการเจือจาง 10^2 - 10^4 ลงบนอาหาร Starch casein nitrate agar (SCN) และ Zhang's starch soil extract agar (ZSSE) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะนิสตาติน (Nystatin ที่ละลายด้วย DMOS) ความเข้มข้น 40 mg หลังจากนั้นบ่มในตู้บ่ม (incubator) ที่ $30\text{ }^{\circ}\text{C}$

สังเกตลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยโคโลนีจะต้องมีลักษณะ เป็นสีทึบ และเป็นผง เมื่อมองด้วยตาเปล่า ผิวโคโลนีอาจเรียบคล้ายหนังสัตว์ หรือย่นเป็นเส้นใยสั้นๆ สังเกตด้วยตาเปล่าเนื้อจะคล้ายกับกำมะหยี่ โดยแอกติโนมัยสีทมีความสามารถในการสร้างรงควัตถุสีต่างๆ เช่น สีขาว เทา เขียว ส้ม แดง เหลือง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ เป็นต้น เส้นใยที่อัดกันเป็นก้อนแน่น และมักสังเกตเห็นเส้นใยบางส่วนฝังอยู่ในเนื้อวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ (อาจจะพบได้ในบางสกุลของแอกติโนมัยสีทในบางสกุลจะมีการสร้างเพียงเส้นใยอาหาร ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ) ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเดียวกันกับการคัดแยก และเมื่อแอกติโนมัยสีทที่บริสุทธิ์แล้วจะทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ISP 2

3.4.3 การเก็บรักษาแอกติโนมัยสีท

จะทำการเก็บรักษาเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีความบริสุทธิ์และ โดยจะเลือกเก็บไว้ในหลอดอาหารเอียง (slant) ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อไว้ใช้ในการศึกษาในขั้นตอนไป (Working stock) และจะเก็บรักษาด้วยอีกกระบวนการคือ deep freeze ในหลอดที่ 20 % glycerol เป็นการผสมสารป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลาย (Cryoprotective agent) ในขณะแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ และ $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ซึ่งจะสามารถรักษาเชื้อในสภาพที่เย็นจัด และมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน

3.5 การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอกติโนมัยสีท

3.5.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotypic characteristics)

3.5.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ

จะนำเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีความบริสุทธิ์ เลี้ยงลงบนอาหาร ISP2 agar โดยการ crosshatch streaks บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ในตู้บ่ม เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดจะทำตรวจดูลักษณะของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Compound light microscope) ที่กำลังขยาย 40 x หรือ 400 เท่า และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดสเตอริโอ (stereoscopic microscope) จะตรวจสอบลักษณะการเจริญ สีและสีของรงควัตถุ ของเส้นใยทั้ง 2 ชนิดได้แก่ เส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนสิทธิ์ในเนื้อหา หากมีผู้ใดที่เห็นว่าเป็นประโยชน์ในการศึกษา
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อากาศ (Aerial mycelium) เส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) โดยจะจดบันทึกข้อมูลที่ได้ และนำไปเปรียบเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBS/ISCC color system)

3.5.2 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotypic characteristics)

3.5.2.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี colony polymerase chain reaction (cPCR) และ การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ (DNA)

จะทำการคัดเลือกแอสโคสปอร์ที่คัดเลือกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* กับ *Colletotrichum gloeosporioides* ทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง ควบคุมอุณหภูมิอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน หรือสังเกตเห็นโคโลนี (fresh colony) เกิดขึ้น จากนั้นทำการใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ ทำการแยกโคโลนี (single colony) ลงในหลอดไมโครทิวบ์ (micro tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติม TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการผสมโดยการบดขยี้ให้เซลล์ผสมเข้ากับ TE buffer จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยจะเป็นขั้นตอนของการเตรียม master mix มีการเติมไพรเมอร์ 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1541R (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') อย่างละ 5 ไมโครลิตร รวมเป็น 10 ไมโครลิตร Temple (ตัวอย่างเชื้อของเราที่อยู่ในหลอดไมโครทิวบ์) 1 ไมโครลิตร น้ำ Milli Q ปริมาตร 13 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมของ master mix จะอยู่ที่ 50 ไมโครลิตร โดยในขั้นตอนข้างต้นนั้นต้องมีการผสมดูตุนขึ้นลง เพื่อให้สารผสมกันได้ดีตลอดเวลา จากนั้นนำหลอดไมโครทิวบ์ไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal Cycler (T100™ Thermal Cycler) โดยช่วงเริ่มต้นของกระบวนการ (Pre-Denaturation) โดยจะใช้อุณหภูมิประมาณ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที ขั้นตอน ทำให้ดีเอ็นเอนั้นสูญเสียสภาพ (Denaturation) โดยจะใช้อุณหภูมิประมาณ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน Annealing โดยจะใช้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน Extension โดยจะใช้อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที ส่วนในช่วงท้ายของกระบวนการ (Final extension) ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที โดยเครื่องจะทำงานทั้งหมด 40 รอบ (Cao *et al.*, 2020)

3.5.2.2 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ (DNA)

ในการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis โดยเติม 10x TBE buffer ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และเติมอะกาโรส (agarose) 0.15 กรัม ลงในขวดแก้วรูปชามพู่ ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเพื่อละลายอะกาโรสเป็นเวลา จนกว่าจะใสไม่มีเม็ด จากนั้นทำการตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ในที่ที่ไม่มีแสง เสร็จแล้วผสมให้เข้า จากนั้นเทเจลลงในถาด (tray) และปักหวี (comb) ลงไปในเจล ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวในที่มืดประมาณ 30 นาที เมื่อครบเวลาถอดหวี และนำเจลออกจากถาดแล้ววางลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของโครงการวิจัยนี้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นว่าประโยชน์ที่ตนได้รับจากเอกสารนี้ไม่คุ้มค่าที่จะเสียค่าลิขสิทธิ์แล้ว ผู้ยืมสามารถนำเอกสารนี้ไปใช้เพื่อการศึกษาได้โดยไม่ต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้า

ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ที่มีเติม 1x TAE buffer จนท่วมเจล ตอนไปเป็นขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างโดยนำ 6x Loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทำการหยดลงบนแผ่นพาราฟิล์ม และดูดตัวอย่างด้วยออตปิเปต ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับสีย้อม จากนั้นทำการโหลด (Load) ตัวอย่างลงในแต่ละช่อง (well) โดยเว้นช่องที่ 1 ไว้สำหรับใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA marker) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปรันเจล (run gel) ด้วยเครื่อง Owl™ EasyCast™ B2 Mini Gel Electrophoresis Systems ที่ 100 โวลต์ สังเกตการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอ เมื่อถึงแถบที่ 3 ให้ทำการหยุดเครื่อง แล้วตรวจสอบผลโดยสังเกตแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UltraSlime® LED illuminator บันทึกผลการทดลอง

3.5.2.3 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (PCR Purification)

หลังจากตรวจดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้ว จะนำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์ โดยการใช้ชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit ในขั้นตอนแรก จะทำการเติมสารละลาย FADF buffer เป็นปริมาตร 5 เท่าของ PCR product ในหลอดไมโครเซนตริฟิวด์ จากนั้นทำการผสมให้เข้ากัน แล้วนำสารละลายผสมเติมลงใน FADF column ที่อยู่ใน Collection tube ปิดฝา ทำการปั่นเหวี่ยงที่ Centrifuge 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสใน Collection tube ทิ้ง และเติม Washing buffer solution ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน FADF column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสใน Collection tube ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นย้าย FADF column ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์อันใหม่ บ่ม Elution buffer ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในการเติม Elution buffer จะทำการเติม 2 ครั้ง ครั้งแรกนำมาชะดีเอ็นเอโดยหยดลงใน FADF column ปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยจะพยายามเติมลงตรงกลางของหลอด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที จากนั้นทำการเติมครั้งที่สอง บ่มเป็นเวลา 5 นาที และทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการชะด้วยเครื่อง Nanodrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) โดยวัดค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยใช้ค่า A_{260}/A_{280} วัดความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอ (โดยต้องมีความเข้มข้นมากกว่า 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) โดยขั้นตอนนี้จะเป็นขั้นของการ Confirm ก่อนที่จะนำดีเอ็นเอที่ได้ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และก่อนจะทำการวัดด้วยเครื่อง Nanodrop ทุกครั้ง ควรผสมสารให้ผสมกันก่อนที่จะนำตัวอย่างเข้าวัด

3.5.2.4 การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogentic analysis)

เมื่อได้ลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาทำการเปรียบเทียบ (Blast) ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16 s rRNA บนฐานข้อมูล Ezbiocloud (Yoon *et al.*, 2017) นำข้อมูลเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของเจ้าของข้อมูลไว้ก่อน เมื่อข้อมูลที่ได้มาเรียบร้อยแล้วให้นำข้อมูลนี้ไปวิเคราะห์ต่อไป ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิวคลีโอไทด์ 8 ไอโซเลต และสายพันธุ์กรรมที่ใกล้เคียงกันทั้งหมด มาทำการจัดเรียง (multiple alignment) โดยจะใช้โปรแกรม Bioedit (Hall, 1999) มาทำการสร้างต้นไม้สายวิวัฒนาการหรือแผนภูมิต้นไม้ ด้วยวิธีการ Neighbor-Joining, วิธี Maximum Parsimony และ Maximum-Likelihood โดยจะใช้แบบจำลองของ Kimura 2 parameter (Kimura, 1980) ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 11 ที่มีค่าความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง (Felsenstein, 1985)

3.6 การศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้

3.6.1 การทดสอบการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation)

การทดสอบการตรึงไนโตรเจน ทำการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีทบนอาหาร nitrogen-free bromothymol blue (NFb) ในอาหารแข็งและอาหารเหลว (Döbereiner and Day, 1976 ; Döbereiner, 1997) นำไอโซเลตทั้ง 30 ไอโซเลต มาทำการเพาะเลี้ยงโดยการ Streak ลงบนอาหารแข็ง NFb และใส่ในตู้บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน สังเกตการเจริญเติบโตของแอคติโนมัยสีท หากมีการเจริญของแอคติโนมัยสีท แสดงว่าเชื่อมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ (Döbereiner, 1997) สำหรับการยืนยันผลของการตรึงไนโตรเจน จะทำการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีทที่สามารถเจริญบนอาหารแข็งได้ นำแอคติโนมัยสีทดังกล่าวเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NFb นำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 7 -14 วัน สังเกตทุก 2-3 วันจนกว่าจะครบเวลาที่กำหนด หากมีการตรึงไนโตรเจนได้จะเห็นเยื่อ (Pellicle formation) ในอาหารเหลว

3.6.3 การทดสอบการสร้างสารซีเดอโรฟออร์ (Siderophore Production)

ทำการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีททุกไอโซเลต บนอาหารแข็ง ISP 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ในตู้บ่ม เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นใช้ลูป (loop) ตะเชื้อ มาจุดลงบนอาหาร ISP 2 ที่มีการผสมสารละลาย Chrome Azurol S (CAS) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ในตู้บ่ม เป็นเวลา 7-28 วัน ให้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลทดลองทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากมีการสร้างสารซีเดอโรฟออร์มจะเห็นอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆโคโลนีที่ทำการทดสอบเปลี่ยนสีเป็นโซนใสสีเหลือง (Alexander and Zuberer, 1990) ในการบันทึกผลการทดลอง ทำการวัดขนาดของโคโลนีเชื้อที่ทำการทดสอบและโซนการสร้างซีเดอโรฟออร์มร่วมกับโคโลนี นำไปคำนวณค่า Siderophore production index (SPI) (Yamaji et al., 2016).

$$SPI = \frac{\text{Halo zone diameter}}{\text{Growth diameter}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.5 การทดสอบการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก (IAA)

ทำการเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตบนอาหารเลี้ยง ISP 2 broth ที่มีการเติมแอล-ทริปโตแฟน (L-tryptophan) ลงไป 0.5% w/w และนำไปบ่มในสภาวะเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 °C และความเร็วยรอบที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกเซลล์จุลินทรีย์ทิ้ง จากนั้นนำของเหลวชั้นบน (supernatant) ที่ได้ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Salkowski reagent (ภาคผนวก) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มในที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 30 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดขึ้น ให้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หากเชื้อที่ทำการทดสอบมีความสามารถในการสร้างสาร กรดอินโดลอะเซติก (IAA) ได้ จะเห็นสารละลายเป็นสมพูถึงแดง (Anwar and Sajid, 2016)

3.6.6 การผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (Hydrogen Cyanide Production, HCN)

ในการทดสอบการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) ทำตามวิธีการของ Anwar และคณะ (2559) ทำการเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลต บนอาหารแข็ง ISP 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ในตู้บ่ม เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นใช้ loop ตะขอมาจุดลงบนอาหาร ISP2 ที่มีการเติมสารไกลซีน (glycine) 4.4 g/l จากนั้นนำกระดาษกรอง Whatman No. 1 มาจุ่มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2% ในกรดพิคริก 0.5% เป็นเวลา 1 นาที นำกระดาษที่ได้วางไว้ที่โต๊ะฟลอป และนำฟลอปปิดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ในตู้บ่ม เป็นเวลา 7-14 วัน ระดับการเปลี่ยนสีของกระดาษ whatman สำหรับการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ 0 = ไม่มีการเปลี่ยนสี (สีเหลือง) (ไม่มีการผลิต HCN), 1 = สีน้ำตาลแดงปานอ่อน, 2 = สีน้ำตาลแดงปานกลาง, 3 = สีน้ำตาลแดงเข้ม (Sreevidya et al., 2016)

3.6.7. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (Antimicrobial activities)

โดยวิธีการ Dual Cultures

ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนย่อย โดยขั้นตอนแรกคือการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่นำมาทำการทดสอบ ประกอบไปด้วย เชื้อรา ได้แก่ *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มที่ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน ส่วนเชื้อแบคทีเรียทำการเพาะเลี้ยง สุดท้ายคือการเตรียมแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตที่จะทดสอบ ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ISP 2 บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน ขั้นตอนถัดไปคือการทดสอบเชื้อแอกติโนมัยซีทกับจุลินทรีย์ก่อโรค ในการทดสอบกับเชื้อรา จะขีดแอกติโนมัยซีทเป็นเส้นตรงลงบนอาหาร ISP2 โดยให้ห่างจากขอบเพลท 2 cm บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อครบเวลาใช้ไม้ Cork borer เบอร์ 4 เจาะเชื้อร่าก่อก้อนที่ต้องการทดสอบ บริเวณของเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นนำไปวางไว้ตรงข้ามรอยขีดของแอกติโนมัยซีทที่ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเชิงพาณิชย์เท่านั้น เมื่อผู้ยืมเห็นประโยชน์หรือเห็นว่าการคัด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลานำเพลทที่ได้ ออกมาวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้งเชื้อราและคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (PIRG) ดังสมการ (Mahadtanapuk et al.,2007)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (\%PIRG)} = [(R_1 - R_2) / R_1] \times 100$$

โดยที่ R_1 คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของเพลทควบคุม

R_2 คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของเพลททดลอง

3.7 การสกัดสาร

ในการทำการทดลองการสกัดสารจากแอคติโนมัยซีทนั้น ทำการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีททุกไอโซเลตบนอาหารเลี้ยง ISP 2 broth (ไม่เติม Agar) ในพลาสติก ฟลาสกละ 20 มิลลิลิตร โดยจะทำไอโซเลตละ 2 ซ้ำ แล้วทำการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนด จะทำการสกัดสาร โดยเราจะนำฟลาสกทั้ง 2 ฟลาสกของแต่ละไอโซเลต เทรวมกันในกรวยแยกสาร จากนั้นจะทำการ Ethyl acetate จะต้องใช้ 3 เท่าของปริมาตรของตัวอย่างที่ใส่ไป (ตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร : Ethyl acetate 60 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน โดยจะต้องเขย่าแรงๆและเป็นเวลานาน เพื่อต้องการทำการสกัดออกจากเซลล์ของแอคติโนมัยซีทให้ได้มากที่สุด จากนั้นทำการตั้งกรวยแยกสาร สังเกตจะเห็นการแบ่งชั้นชัดเจน ระหว่าง Ethyl acetate ที่ลอยอยู่ด้านบน และตัวอย่างเซลล์ของเรา ทำการทิ้งเซลล์จากนั้นนำของเหลวที่อยู่ด้านบนใส่ในพลาสติก เพื่อนำไปเข้าเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) เพื่อกลั่น Ethyl acetate ออกเหลือไว้เพียงสารที่สกัดจากแอคติโนมัยซีท จากนั้นนำสารที่ได้ใส่ขวดเก็บสารปิดฝาด้วยฟอยล์ เจาะขวดฟอยล์แล้วเก็บไว้ในโถดูดความชื้น

ก่อนการนำสารใส่ในขวดเก็บสารนั้น ควรมีการชั่งควรมีการติดกระดาษแล้วเรียบร้อย ทำการชั่งขวดที่เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง เขียนชื่อตัวอย่าง วันที่สกัดสาร และน้ำหนักของขวดก่อนมีสารและหลังมีสาร

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การแยกแอคติโนมัยซีจากผักตบชวาและแห่นแดง

ผักตบชวาและแห่นแดงจัดเป็นพืชน้ำชนิดหนึ่ง ผักตบชวามีรากเป็นแบบรากฝอยและมีรากย่อยๆ เป็นกระจุกและแห่นแดงที่มีรากฝอยยาวออกจากจุดศูนย์กลางของลำต้น และจากลักษณะการเจริญเป็นแพบนผิวน้ำทำให้เกิดพื้นที่ของรากมากขึ้นทำให้ตะกอนดินและจุลินทรีย์ที่ลอยอยู่ในน้ำไปเกาะติดอยู่บริเวณรากได้มากขึ้น ดังนั้นความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์บริเวณรากของพืชน้ำอาจมีสูง โดยการศึกษาทำการแยกแอคติโนมัยซีในตัวอย่างผักตบชวาที่เก็บจากลำคลอง ตำบลคลองประเวศ อำเภอบ้านโพธิ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา และตัวอย่างแห่นแดงที่เก็บจาก 2 แหล่งได้แก่ บริเวณนาข้าว ตำบลคลองประเวศ อำเภอบ้านโพธิ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา และบ่อเกษตร บริเวณข้างคณะบริหารธุรกิจ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร สามารถแยกแอคติโนมัยซีได้จำนวน 30 ไอโซเลต รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แอคติโนมัยซีที่แยกได้จากตัวอย่างผักตบชวาและแห่นแดง

ชนิดตัวอย่าง	ไอโซเลต	รวม
ผักตบชวา	EC1, EC2, EC3, EC4, EC5, EC6, EC7, EC8 EC9, EC10, EC11, EC12, EC13, EC14, EC15, EC16 EC17, EC18, EC19, EC20, EC21, EC22, EC23, EC24	24
แห่นแดง	AZ1, AZ2, AZ3, AZ4, AZ5, BC	6

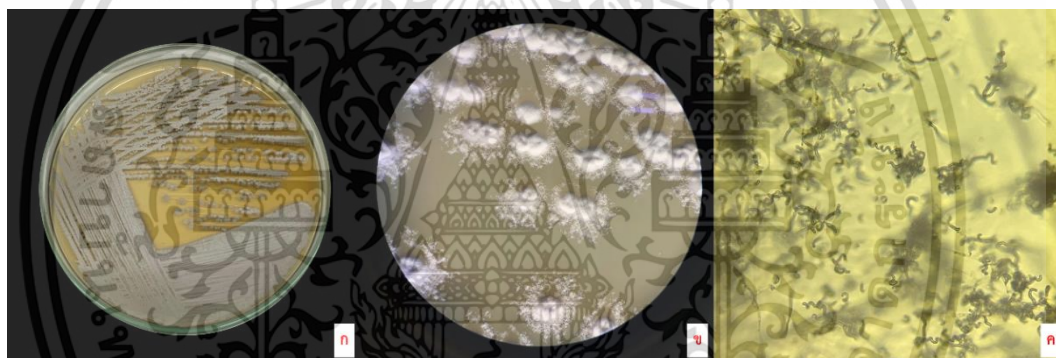
จากผลการแยกแอคติโนมัยซีจากตัวอย่างผักตบชวาและแห่นแดง พบว่าสามารถแยกแอคติโนมัยซีได้มากที่สุดจำนวน 24 ไอโซเลต จากตัวอย่างผักตบชวา และสามารถแยกแอคติโนมัยซีได้จำนวน 6 ไอโซเลต จากแห่นแดง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yadav และคณะ (2023) ที่กล่าวถึงพืชน้ำว่าเป็นแหล่งอาศัยที่ดีสำหรับจุลินทรีย์โดยเฉพาะบริเวณรากซึ่งเป็นจุดสำคัญสำหรับความหลากหลายของจุลินทรีย์ และทำการศึกษากลุ่มของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับผักตบชวาพบว่าในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่โดดเด่นคือจุลินทรีย์กลุ่ม *Actinobacteria* เช่นเดียวกันกับการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องกับพืชลอยน้ำเช่น แห่น ผักตบชวาและจอกของ Pramanic และคณะ (2023) พบว่าหนึ่งในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มักพบคือจุลินทรีย์กลุ่ม *Actinobacteria*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการขังนเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้พิมพ์ใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การจัดกลุ่มจุลินทรีย์เบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการนำจุลินทรีย์ที่แยกได้จำนวน 30 ไอโซเลต มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร *Streptomyces* Project Medium No.2 (ISP2) ด้วยวิธีการ Cross Streak แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วันแล้วทำสังเกตลักษณะของเส้นใยและสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า และสังเกตลักษณะการลักษณะโคโลนีบนอาหารภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดสเตอริโอ (stereoscopic microscope) สามารถจัดกลุ่มจุลินทรีย์เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 แอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์สายเกลียว แบ่งเป็นกลุ่มตามสีของเส้นใยอากาศและสปอร์ (Aerial spore mass) ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเส้นใยอากาศและสปอร์สีเทาเข้ม ได้แก่ ไอโซเลต EC1, EC4, EC13, EC19, EC20 และ EC22 กลุ่มเส้นใยอากาศและสปอร์สีขาวครีม ได้แก่ ไอโซเลต EC12, EC14, EC17 และ EC24

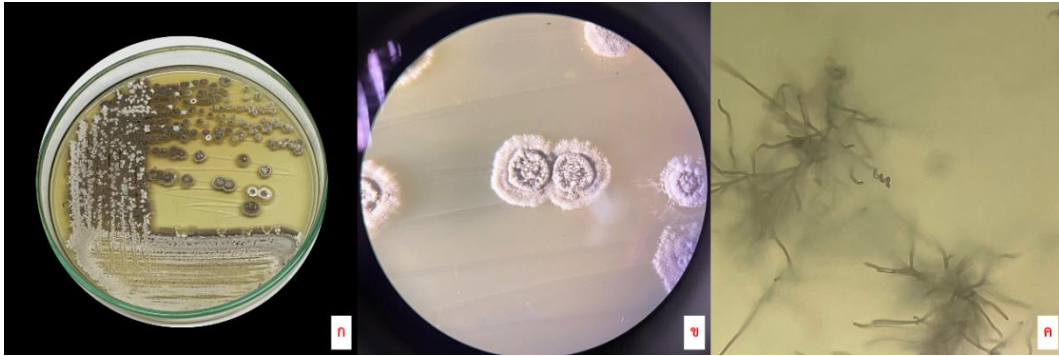


รูปที่ 4.1 ไอโซเลต EC1 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.2 ไอโซเลต EC4 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

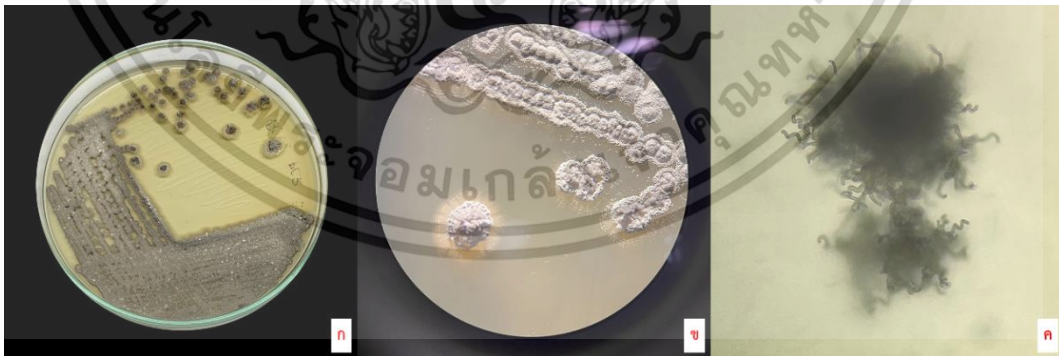
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ไอโซเลต EC13 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

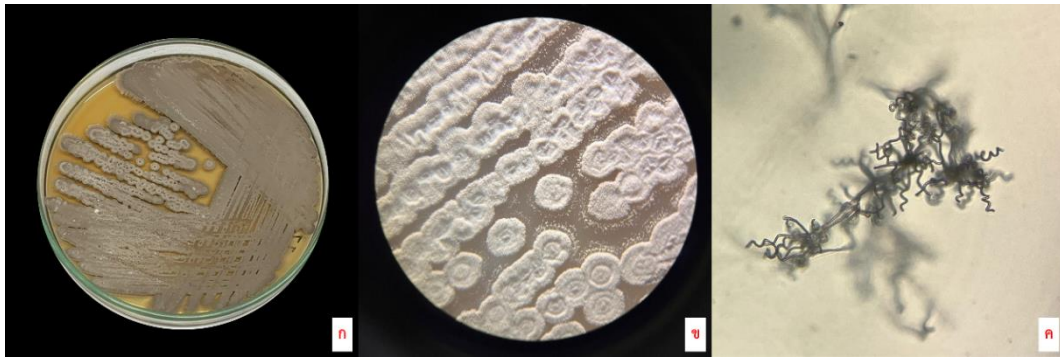


รูปที่ 4.4 ไอโซเลต EC19 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.5 ไอโซเลต EC20 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ไอโซเลต EC22 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.7 ไอโซเลต AZ5 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.8 ไอโซเลต EC12 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ไอโซเลต EC14 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



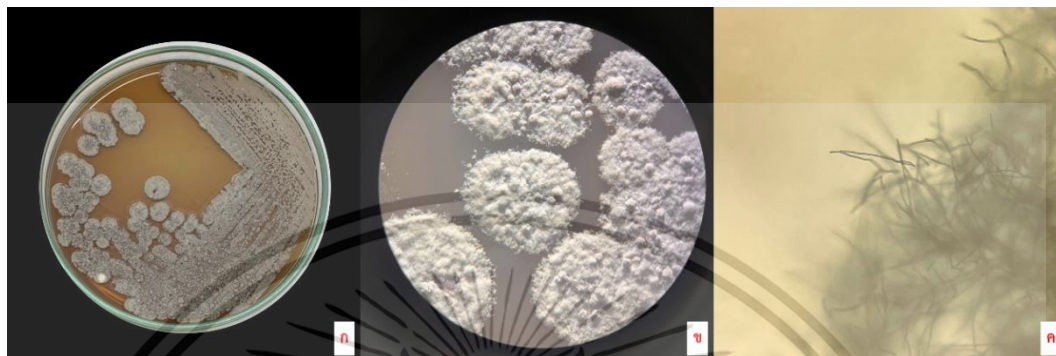
รูปที่ 4.10 ไอโซเลต EC17 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.11 ไอโซเลต EC24 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 แอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์สายตรง แบ่งเป็นกลุ่มตามสีของเส้นใยอากาศและสปอร์ (Aerial spore mass) ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเส้นใยอากาศและสปอร์สีเทาเข้ม ได้แก่ ไอโซเลต EC5, EC6, EC7, EC21 และ EC8 กลุ่มเส้นใยอากาศและสปอร์สีเทาอ่อน ได้แก่ ไอโซเลต EC9 และ EC23 กลุ่มเส้นใยอากาศและสปอร์สีขาว ได้แก่ ไอโซเลต EC2



รูปที่ 4.12 ไอโซเลต EC5 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.13 ไอโซเลต EC6 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ไอโซเลต EC7 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.15 ไอโซเลต EC8 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.16 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต EC21 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 ไอโซเลต EC9 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



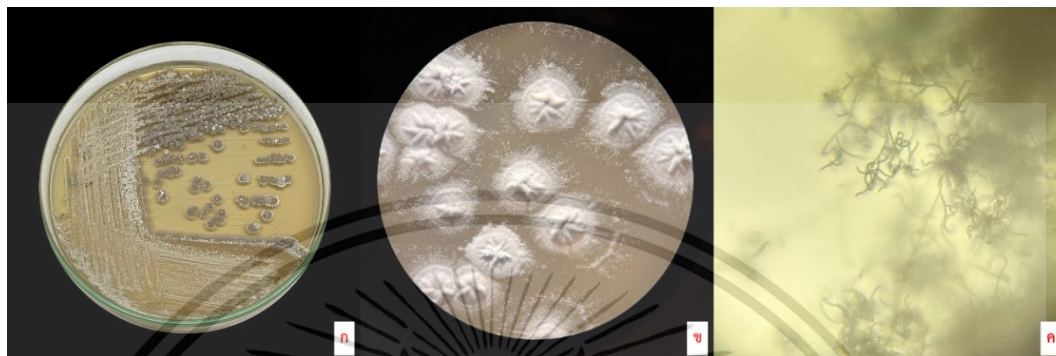
รูปที่ 4.18 ไอโซเลต EC23 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



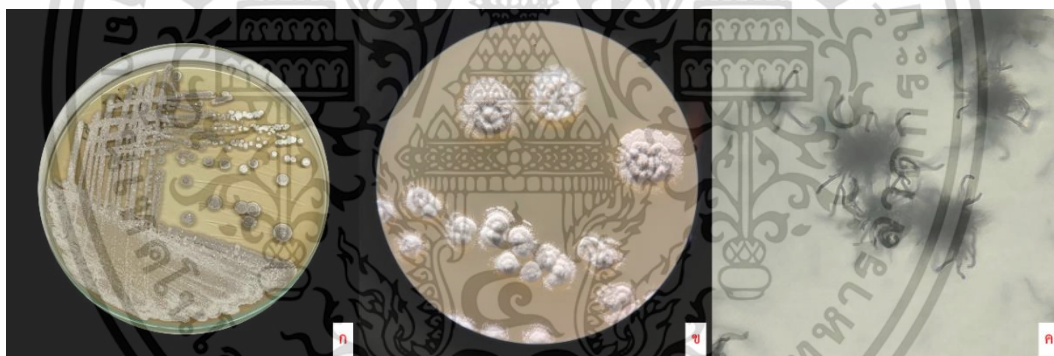
รูปที่ 4.19 ไอโซเลต EC2 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 แอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศและสร้างสปอร์สายตรงปลายโค้งงอ แบ่งเป็นกลุ่มตามสีของเส้นใยอากาศและสปอร์ (Aerial spore mass) ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเส้นใยอากาศและสปอร์สีเทาเข้ม ได้แก่ ไอโซเลต EC10 และ EC18 กลุ่มเส้นใยอากาศและสปอร์สีเทาอ่อน ได้แก่ ไอโซเลต EC3, EC11, EC15 และ EC16



รูปที่ 4.20 ไอโซเลต EC10 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.21 ไอโซเลต EC18 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.22 ไอโซเลต EC3 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต EC3 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

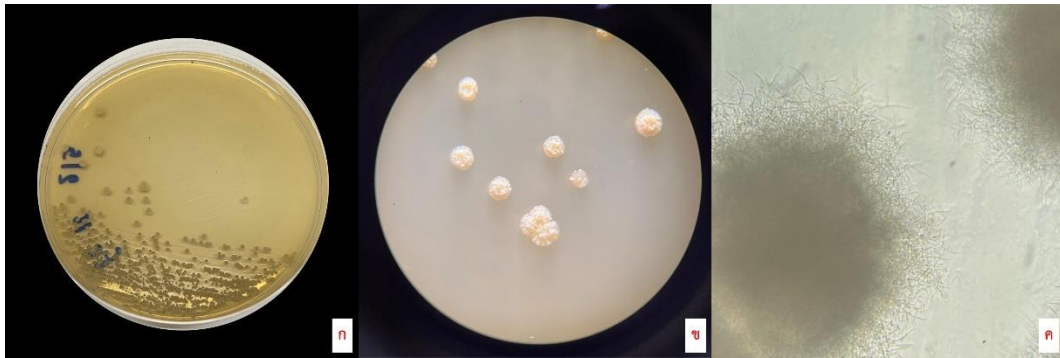


รูปที่ 4.23 ไอโซเลต EC11 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต EC11 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล(long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



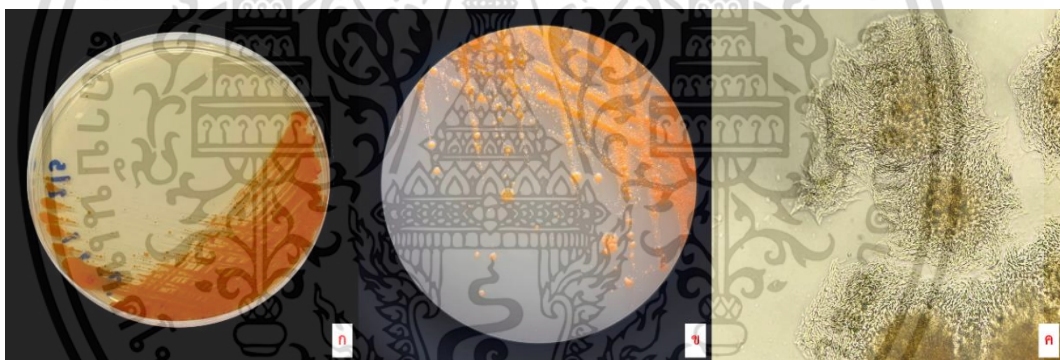
รูปที่ 4.24 ไอโซเลต EC15 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต EC15 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.25 ไอโซเลต EC16 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต EC16 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

กลุ่มที่ 4 แอคติโนมัยสีทเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลมรี ไม่สร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ได้แก่ ไอโซเลต AZ1 โดยไอโซเลตนี้มีโคโลนีสีส้ม (Vivid Reddish Orange) ผิวด้าน ลักษณะเซลล์เดี่ยว ไม่สร้างเส้นใยอาหารและอากาศ



รูปที่ 4.26 ไอโซเลต AZ1 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

กลุ่มที่ 5 แอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ แต่สร้างสปอร์เดี่ยว ได้แก่ ไอโซเลต AZ2, AZ3 และ AZ4 โดยไอโซเลต AZ2 ระยะเวลาเจริญแรกสร้างเส้นใยอาหารสีส้ม (Vivid Orange) จากนั้นในระยะสร้างสปอร์จะสร้างสปอร์สีน้ำตาลมะกอก (Moderate Olive Brown) ไอโซเลต AZ3 ระยะเวลาเจริญแรกสร้างเส้นใยอาหารสีส้ม (Vivid Orange) จากนั้นในระยะสร้างสปอร์สร้างสปอร์สีน้ำตาลมะกอกอมดำ (Black Olive Brown) และไอโซเลต AZ4 ระยะเวลาเจริญแรกสร้างเส้นใยอาหารสีส้ม (Strong Reddish Orange) จากนั้นในระยะสร้างสปอร์จะสร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้มอมส้ม (Deep Reddish Orange)

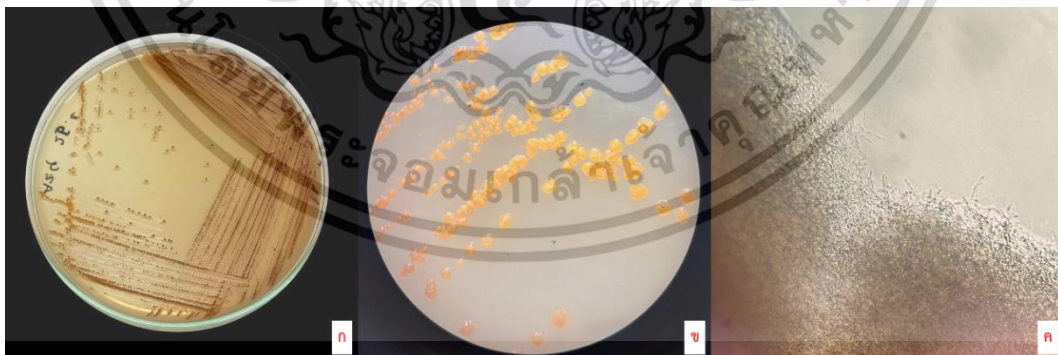
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 ไอโซเลต AZ2 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



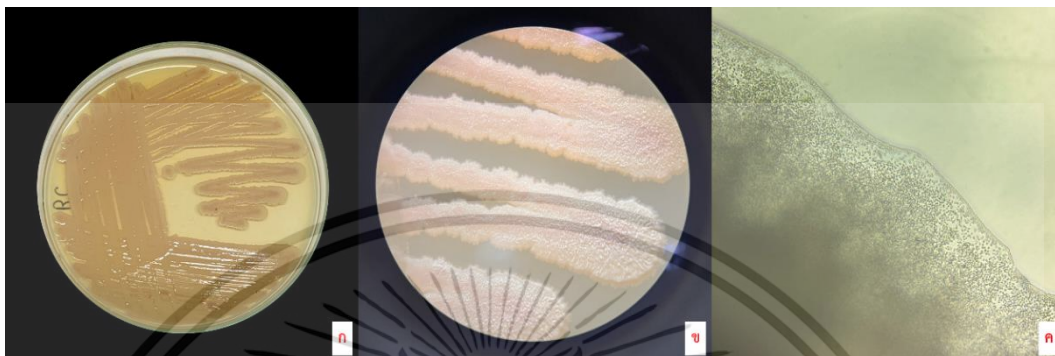
รูปที่ 4.28 ไอโซเลต AZ3 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.29 ไอโซเลต AZ4 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต AZ4 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 6 แบคทีเรียเซลล์เดี่ยว แกรมบวกรูปท่อน ได้แก่ ไอโซเลต BC เชื้อไอโซเลตนี้มีโคโลนีสีเหลืองอ่อนอมชมพู (Pale Yellowish Pink) โคโลนีแผ่ขยายเป็นแผ่นแบนติดผิวอาหาร ขอบโคโลนีหยาบไม่เรียบ เมื่อย้อมสีแกรมพบว่าเซลล์ติดสีม่วง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์เดี่ยว รูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์



รูปที่ 4.30 ไอโซเลต BC (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนี (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.31 แสดงการย้อมสี Gram stain ติดสีน้ำเงินม่วง (Crystal violet) ของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของจุลินทรีย์ที่แยกได้

จากการนำจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 30 ไอโซเลตมาทำการทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วยการทดสอบการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก (Indole-3-acetic acid : IAA) การตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) การสร้างสารซีเดอโรฟออร์ (Siderophore production) การผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (Hydrogen cyanide production) และการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยวิธีการ Dual Cultures ซึ่งจากผลการศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของจุลินทรีย์ที่แยกได้ จำนวน 30 ไอโซเลต พบจุลินทรีย์ที่สามารถสร้าง IAA ได้จำนวน 27 ไอโซเลต คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ไอโซเลต EC1, EC2, EC3, EC4, EC5, EC6, EC7, EC8, EC9, EC10, EC11, EC12, EC13, EC14, EC16, EC17, EC18, EC19, EC20, EC21, EC22, EC23, EC24, AZ1, AZ2, AZ3, AZ5 และ BC พบจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จำนวน 30 ไอโซเลต คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ไอโซเลต EC1, EC2, EC3, EC4, EC5, EC6, EC7, EC8, EC9, EC10, EC11, EC12, EC13, EC14, EC16, EC15, EC17, EC18, EC19, EC20, EC21, EC22, EC23, EC24, AZ1, AZ2, AZ3, AZ4, AZ5 และ BC พบจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารซีเดอโรฟออร์ได้จำนวน 21 ไอโซเลต คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ไอโซเลต EC1, EC2, EC3, EC4, EC8, EC9, EC10, EC11, EC13, EC16, EC15, EC18, EC19, EC20, EC22, EC23, AZ1, AZ2, AZ3, AZ4 และ BC ไม่มีเชื้อที่สามารถสร้างไฮโดรเจนไซยาไนด์ได้ และพบจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ได้จำนวน 6 ไอโซเลต คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ไอโซเลต EC12, EC14, EC17, EC19, AZ5 และ BC ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้จำนวน 7 ไอโซเลต คิดเป็น 23.3 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ไอโซเลต EC12, EC14, EC17, EC19, EC22, AZ5 และ BC ดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแอคติโนมัยสีท

รหัส	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Antifungal activities)		การสร้างสาร IAA ($\mu\text{g/ml}$)	การตรึงไนโตรเจน	การสร้างสารซีเตอโรไฟด์	การสร้างไฮโดรเจนไซยาไนด์
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum capsici</i>				
EC1	-	-	10.07	+	+	-
EC2	-	-	11.49	+	+	-
EC3	-	-	12.92	+	+	-
EC4	-	-	10.57	+	+	-
EC5	-	-	22.17	+	-	-
EC6	-	-	13.63	+	-	-
EC7	-	-	12.67	+	-	-
EC8	-	-	15.68	+	+	-
EC9	-	-	13.57	+	+	-
EC10	-	-	8.59	+	+	-
EC11	-	-	13.15	+	+	-
EC12	-	+	12.26	+	-	-
EC13	-	-	15.52	+	+	-

ตารางที่ 4.2(ต่อ) ผลการศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแอคติโนมัยสีท

รหัส	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Antifungal activities)		การสร้างสาร IAA ($\mu\text{g/ml}$)	การตรึงไนโตรเจน	การสร้างสารซิติเตอร์โรฟอร์	การสร้างไฮโดรเจนไซยาไนด์
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum capsici</i>				
EC14	+	+	8.65	+	-	-
EC15	-	-	-	+	+	-
EC16	-	-	15.20	+	+	-
EC17	+	+	21.82	+	-	-
EC18	-	-	8.87	+	+	-
EC19	+	+	8.55	+	+	-
EC20	-	-	8.62	+	+	-
EC21	-	-	13.72	+	-	-
EC22	-	+	13.39	+	+	-
EC23	-	-	13.13	+	+	-
EC24	-	-	22.02	+	-	-
AZ1	-	-	24.40	+	+	-
AZ2	-	-	20.90	+	+	-

ตารางที่ 4.2(ต่อ) ผลการศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแอคติโนมัยสีท

รหัส	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Antifugal activities)		การสร้างสาร IAA (µg/ml)	การตรึงไนโตรเจน	การสร้างสารซีเตอโรโรฟอรั	การสร้างไฮโดรเจนไซยาไนด์
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum capsici</i>				
AZ3	-	-	13.90	+	+	-
AZ4	-	-	-	+	+	-
AZ5	+	+	15.76	+	-	-
BC	+	+	-	+	+	-

หมายเหตุ : ปริมาณสาร IAA (µg/ml) คำนวณตามสมการ $y = 0.0221x + 0.0487$

การศึกษาการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก (Indole-3-acetic acid : IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่ได้จากการสลาย L-tryptophan ของจุลินทรีย์ ซึ่ง IAA มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของรากและยอดพืช (Myo *et al.*, 2019) โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย Salkowski reagent หลังจากบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากสีเหลืองเป็นสีชมพูถึงแดงและนำไปคำนวณปริมาณสาร IAA จากกราฟมาตรฐานปริมาณสารกรดอินโดล-3-แอซิดิก $\mu\text{g/ml}$ (Indole-3-acetic acid : IAA) พบว่าไอโซเลต AZ1 มีปริมาณสาร IAA มากที่สุดคือ 24.40 $\mu\text{g/ml}$ และไอโซเลต EC15 AZ4 และ BC ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซึ่งจากงานวิจัยของ Lingyan Hu และคณะ (2022) ได้ระบุความเข้มข้นของปริมาณฮอร์โมนออกซินหรือ IAA มีผลต่อการสะสมของแคดเมียมในพืชซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช

การศึกษาการสร้างสารซีเตอร์โรฟอร์ของแอกติโนมัยซีท์ที่คัดแยกได้ด้วยวิธี chrome azurol S (CAS) assay โดยสังเกตการเกิดการเปลี่ยนสีของอาหารรอบๆโคโลนีจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองจนถึงส้มซึ่งเกิดจากการที่ ซีเตอร์โรฟอร์กำจัดเหล็กจากสารประกอบเชิงซ้อน Fe-CAS-hexadecyltrimethylammonium bromide และปลดปล่อยสี CAS ออกมาในอาหารวุ้นแข็งทำให้เกิดการเปลี่ยนสีอาหารจากสีน้ำเงินเป็นสีส้ม (Himpls SD *et al.*, 2019) แล้วคำนวณค่า Siderophore production index (SPI) และพิจารณาผลการทดสอบเป็นบวก (+) ที่ค่า SPI > 1 (Yamaji *et al.*, 2016).

การศึกษาการตรึงไนโตรเจนซึ่งเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยสังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง Nitrogen-free bromothymol blue (NFB) agar ในขั้นตอนตรวจสอบและสังเกตการเกิดเยื่อ (Pellicle formation) ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว Nitrogen-free bromothymol blue (NFB) semi-solid ในขั้นตอนยืนยัน

การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางและถูกนำมาใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืช (Petrikovics I *et al.*, 2015) โดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของกระดาษ Whatman No.1 ที่ผ่านการจุ่มสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2% ในกรดพิคริก 5% จากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากสร้างแก๊สไฮโดรเจนไซยาไนด์ของเชื้อที่ใช้กลืนในอาหาร พบว่าแอกติโนมัยซีท์ทั้ง 30 ไอโซเลตไม่มีการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ เนื่องจากไม่เกิดการเปลี่ยนสีของกระดาษ Whatman No.1

จากผลการศึกษาพบว่ามีความใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Paweena Suksaard และคณะ (2017) ที่ได้ทำการศึกษาการส่งเสริมการเจริญของพืชของแอกติโนมัยซีท์จำนวน 448 ไอโซเลต พบว่ามีแอกติโนมัยซีท์ที่สามารถสร้างสาร IAA ได้จำนวน 228 ไอโซเลต คิดเป็น 50.9 เปอร์เซ็นต์ สร้างสารซีเตอร์โรฟอร์ได้จำนวน 397 ไอโซเลต คิดเป็น 88.6 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ เกณิกา และคณะ (2561) ได้ทำการคัดแยกแอกติโนมัยซีท์ได้จำนวน 144 ไอโซเลต และทำการศึกษาการส่งเสริมการเจริญของพืชพบว่าสามารถสร้างสารซีเตอร์โรฟอร์ได้ 49 ไอโซเลต คิดเป็น 34.027 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำโดยไม่ขออนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทและเชื้อราทดสอบ *Colletotrichum capsici* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ร่วมกันด้วยวิธี dual culture และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%PIRG) พบว่าจากแอคติโนมัยซีททั้งหมด 30 ไอโซเลต เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* มีจำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต EC12 (26.80%), EC14 (17.40%), EC17 (33.40%), EC19 (14.00%), EC22 (20.80%), AZ5 (25.40%) BC (33.40%) เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* มีจำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ EC12 (30.01%), EC14 (37.91%), EC17 (37.91%), EC19 (31.59%), AZ5 (42.02%) และ BC (47.39%) ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังแสดงในตาราง 4.3

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* และ *Colletotrichum gloeosporioides*

รหัส	เปอร์เซนต์การยับยั้ง (%PIRG)	
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum capsici</i>
EC1	-	-
EC2	-	-
EC3	-	-
EC4	-	-
EC5	-	-
EC6	-	-
EC7	-	-
EC8	-	-
EC9	-	-
EC10	-	-
EC11	-	-
EC12	30.01	26.80
EC13	-	-
EC14	37.91	17.40
EC15	-	-
EC16	-	-
EC17	37.91	33.40
EC18	-	-

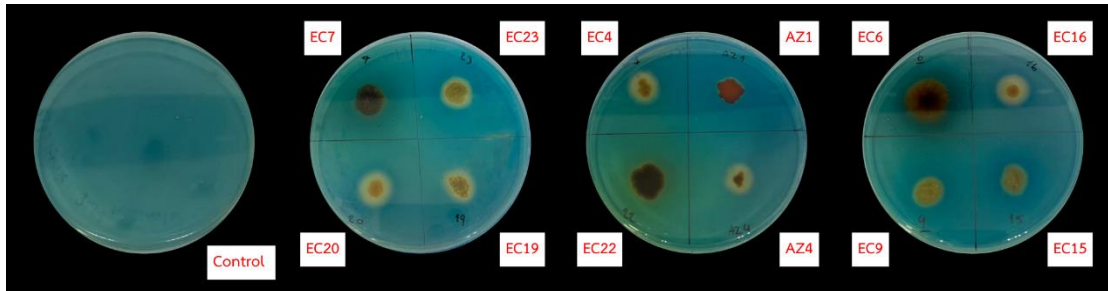
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือนำไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัส	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%PIRG)	
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum capsici</i>
EC19	31.59	14.00
EC20	-	-
EC21	-	-
EC22	-	20.80
EC23	-	-
EC24	-	-
AZ1	-	-
AZ2	-	-
AZ3	-	-
AZ4	-	-
AZ5	42.02	25.40
BC	47.39	33.40

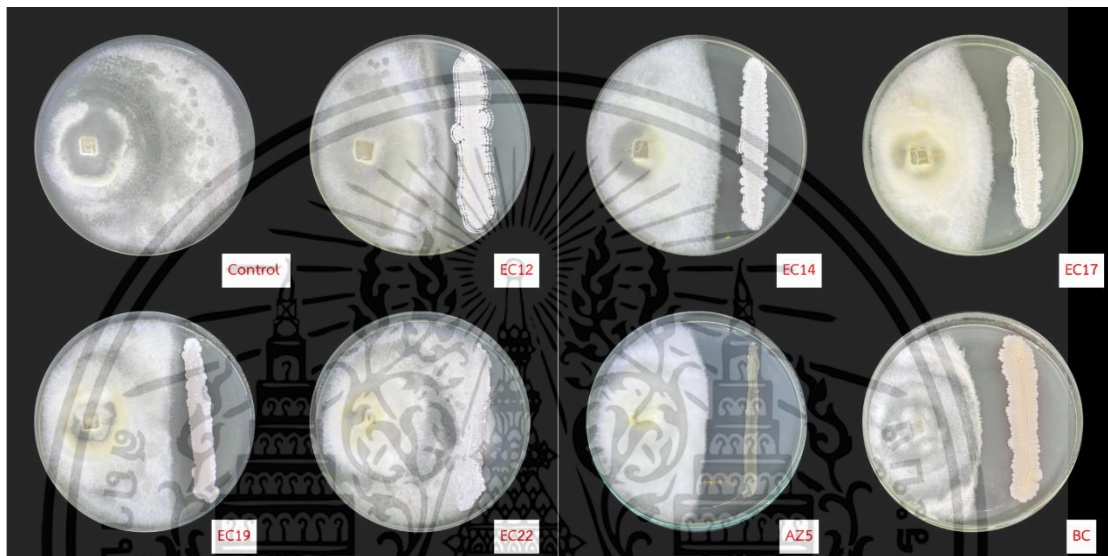
หมายเหตุ: เครื่องหมาย (-) หมายถึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้

จากผลการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของวิฑูรย์และพรทิพย์ (2560) ที่ทำการศึกษการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ด้วยวิธี Dual culture technique จากแอคติโนมัยซีท์ที่คัดแยกได้จำนวน 150 ไอโซเลต พบว่า แอคติโนมัยซีท์ในธรรมชาติมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bungonsiri Intra และคณะ (2011) ที่ทำการศึกษการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสในพืช 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. gloeosporioides* 2 สายพันธุ์และ *C. capsici* จากแอคติโนมัยซีท์ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืชจำนวน 304 ไอโซเลต พบว่าแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง จำนวน 222 ไอโซเลต คิดเป็น 73.0 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถยับยั้งเชื้อราได้ทั้ง 2 ชนิดจำนวน 54 ไอโซเลต คิดเป็น 17.8 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าแอคติโนมัยซีท์ในธรรมชาติเป็นแบคทีเรียที่น่าสนใจที่อาจนำไปประยุกต์ใช้ควบคุมเชื้อราก่อโรคพืชทางการเกษตรได้

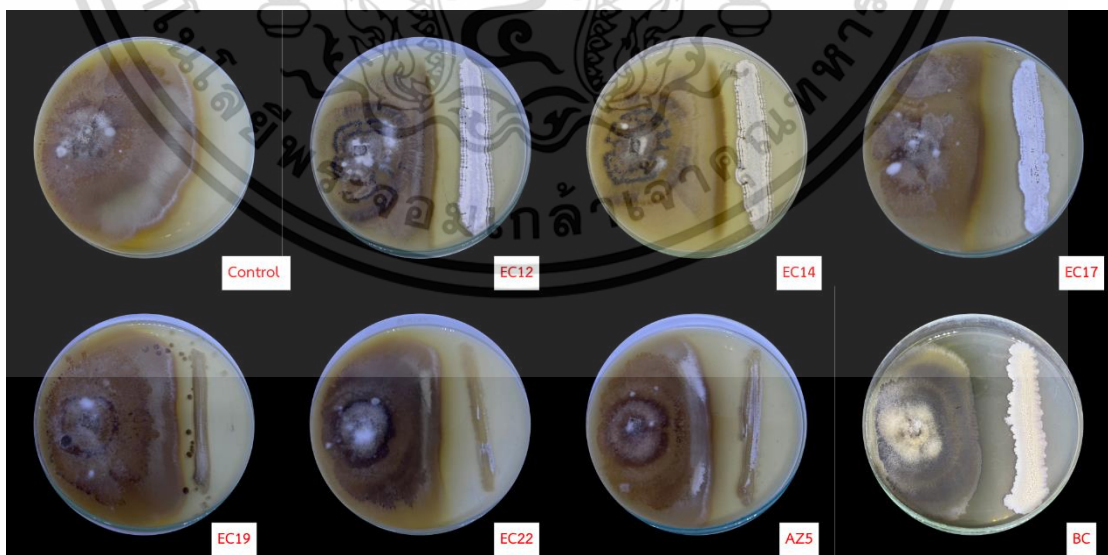
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.32 แสดงตัวอย่างผลการทดสอบการสร้างสารซีเตอร์โรเฟอร์ของแอกติโนไมซีทที่แยกได้



รูปที่ 4.33 แสดงตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยวิธี dual culture



รูปที่ 4.34 แสดงตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsica* ด้วยวิธี dual culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารทงสวนเวสทหการใชงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการคัดกรองคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช จากจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้ง 30 ไอโซเลต จึงทำการคัดเลือกเชื้อจำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต EC12, EC14, EC17, EC19, EC22, AZ1 AZ5 และ BC ซึ่งมีคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชที่ดี โดยไอโซเลต EC12, EC14, EC17, EC19, EC22, AZ5 และ BC มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี ไอโซเลต AZ1 มีคุณสมบัติในการสร้างสาร IAA ได้ดี มาศึกษาอนุกรมวิธานและรูปแบบของสารทุติยภูมิของไอโซเลตดังกล่าว

4.3 การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอกติโนมัยสีทและแบคทีเรียที่คัดเลือก

จากการศึกษาอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต EC12, EC14, EC17, EC19, EC22, AZ1 AZ5 และ BC โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดเลือกเป็นแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยสีท จำนวน 7 ไอโซเลต โดยถูกจัดเป็นสมาชิกของแอกติโนมัยสีทในวงศ์ (family) *Streptomycetaceae* ได้แก่ ไอโซเลต EC12, EC14, EC17, EC19, EC22, AZ5 และวงศ์ *Nocardiaceae* ได้แก่ ไอโซเลต AZ1 สำหรับแบคทีเรียไอโซเลต BC ถูกจัดจำแนกเป็นสมาชิกของวงศ์ *Bacillaceae* (ตารางที่ 4) โดยมีรายละเอียดดังนี้

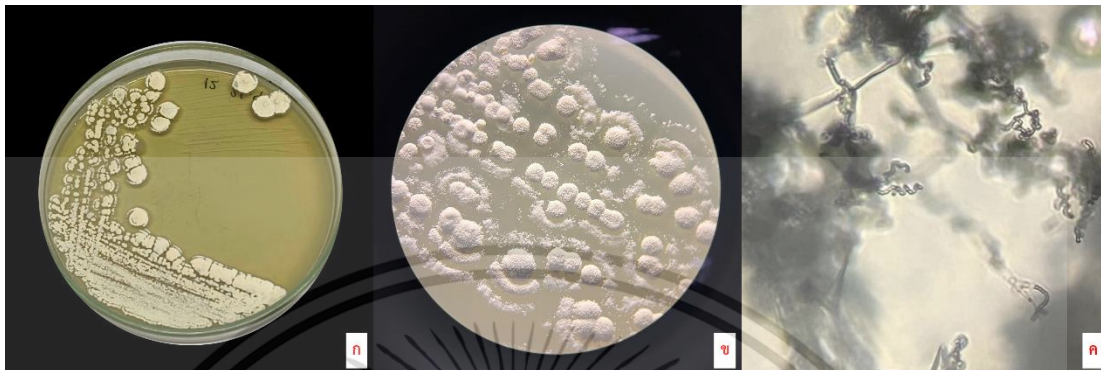
4.3.1 วงศ์ *Streptomycetaceae*

ประกอบด้วยไอโซเลต EC12, EC14, EC17, EC19, EC22, AZ5 โดยถูกจัดเป็นสมาชิกของสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

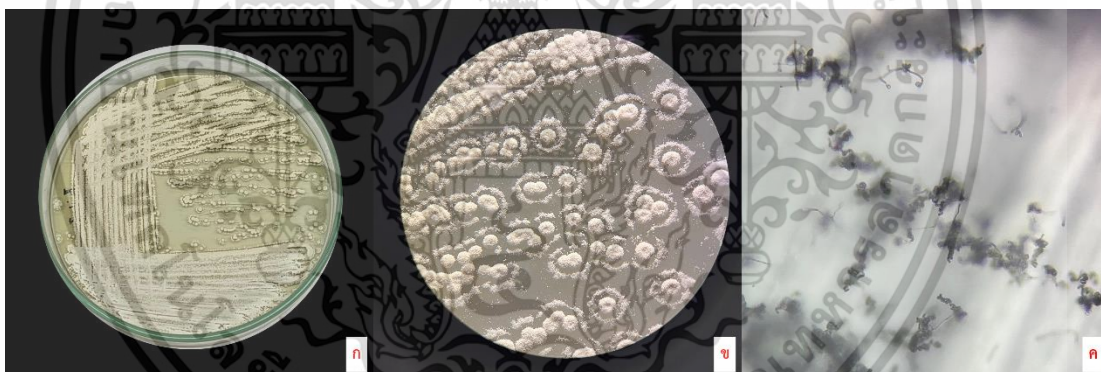
4.3.1.1 แอกติโนมัยสีทจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต EC12, EC14 และ EC17 พบการสร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอ่อน (light olive brown) เส้นใยอากาศและสปอร์สีเหลืองอ่อนถึงขาว (pale yellow to white) ไม่พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำเมื่อเลี้ยงบนอาหาร ISP2 สร้างสปอร์สายยาวขดเป็นเกลียว และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต EC12, EC14 และ EC17 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.38) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces albus* NBRC 13014^T ด้วยค่าระดับความคล้ายคลึงของยีนช่วง 16S rRNA เท่ากับ 99.79% (ตารางที่ 4.5) โดยมีค่ามากกว่า 98.7% ของค่าบังชี้ระดับความเป็นสปีชีส์ใหม่ ที่ถูกกำหนดโดย Chun และคณะ ในปี ค.ศ. 2018 และจากงานวิจัยของ Labeda และคณะ ในปี ค.ศ. 2014 ซึ่งเป็นผู้ค้นพบ *Streptomyces albus* โดยได้อธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Streptomyces albus* ไว้ว่าเชื้อนี้มีการเรียงตัวของสปอร์เป็นสายโซ่แบบเกลียวและสปอร์มีสีขาว และงานวิจัยของ Sharma และคณะ (2014) ได้ระบุว่าลักษณะเส้นใยของ *Streptomyces albus* มีลักษณะขดเป็นเกลียวที่บริเวณปลายของเส้นใยอากาศ และสีของสปอร์เป็นสีขาวและไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวพบว่ามี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ในการนำเอกสารนี้ไปเผยแพร่หรือใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ ขอสงวนสิทธิ์ในสิ่งที่ปรากฏ และไม่รับผิดชอบต่อผู้เสียหายในกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คล้ายคลึงกับไฮโซเลต EC12 EC14 และ EC17 ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ จึงอาจสรุปได้ว่าแอกติโนมัยสีท ทั้ง 3 ไฮโซเลตอาจเป็นสมาชิกของ *Streptomyces albus*



รูปที่ 4.35 ไฮโซเลต EC12 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไฮโซเลต EC12 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



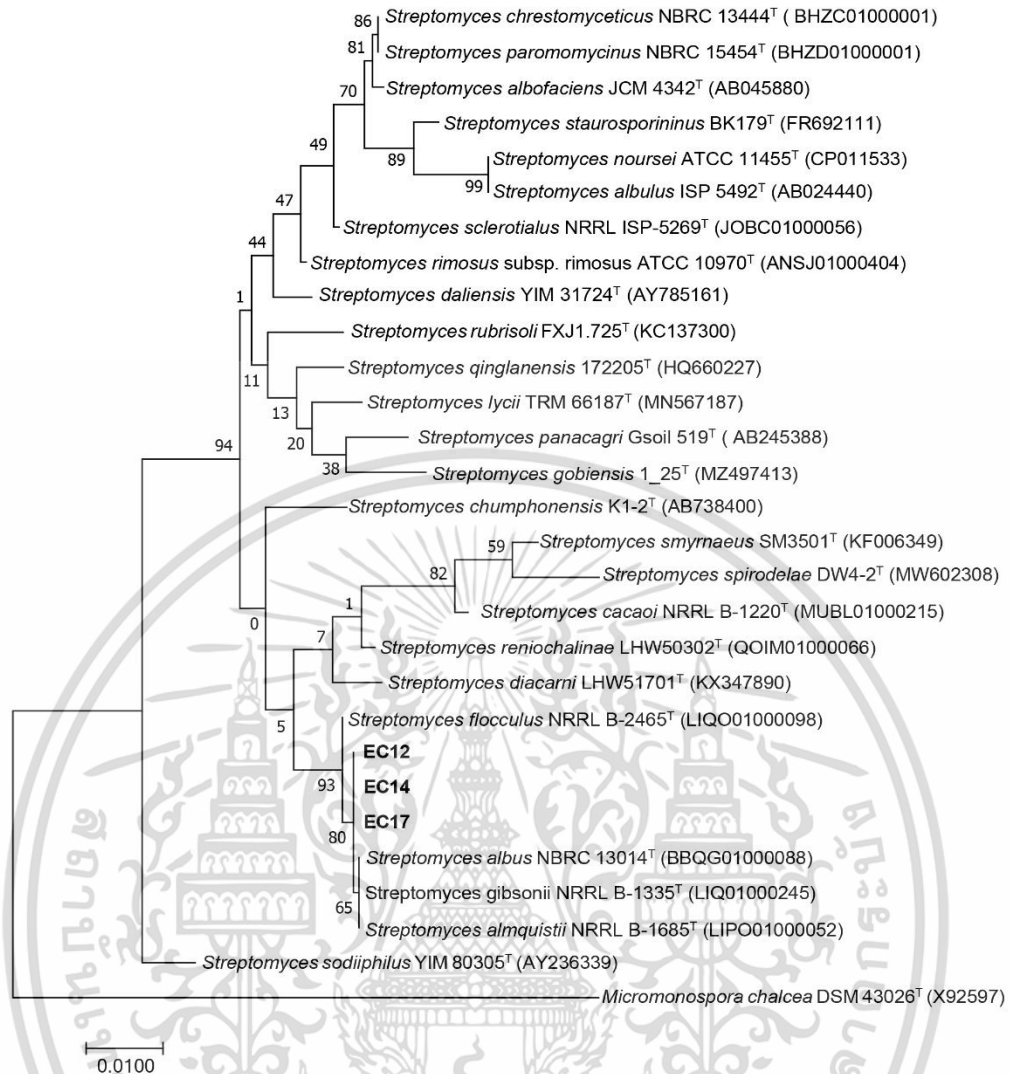
รูปที่ 4.36 ไฮโซเลต EC14 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไฮโซเลต EC14 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.37 ไอโซเลต EC17 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต EC17 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.38 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต EC12, EC14 และ EC17 บน Phylogenetic tree (Maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.2 แอคติโนมัยสีทจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต EC19, EC22 และ AZ5 จากการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแต่ละไอโซเลต พบว่าไอโซเลต EC19 สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown) และเส้นใยอากาศและสปอร์น้ำตาลอมเทา (Brownish Gray) ไม่สร้างรงควัตถุ ละลาย มีการสร้างสปอร์เป็นแบบสายยาวเกลียวคลาย ในขณะที่ไอโซเลต EC22 และ AZ5 สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown) เส้นใยอากาศและสปอร์สีน้ำตาลอมเทา (Brownish Gray) และพบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำน้ำตาลอมเหลือง (Strong Yellowish Brown) โดยทั้งสามไอโซเลตมีการสร้างสปอร์เป็นแบบสายยาวเกลียวเช่นเดียวกัน จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต EC19 EC22 และ AZ5 เป็นแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.42) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces rochei* NRRL B-2410^T ด้วยค่าระดับความคล้ายคลึงของยีนช่วง 16S rRNA เท่ากับ 100.00% (ตารางที่ 4.5) โดยมีค่ามากกว่า 98.7% ของค่าบ่งชี้ระดับความเป็นสปีชีส์ใหม่ ที่ถูกกำหนดโดย Chun และคณะ ในปี ค.ศ. 2018 จากการเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของทั้งสามไอโซเลตกับ *Streptomyces rochei* ที่มีการรายงานไว้จากงานวิจัยของ Hisayuki และคณะ ในปี ค.ศ. 2021 ซึ่งได้ระบุว่า *Streptomyces rochei* มีโคโลนีสีเทา การเรียงตัวของสปอร์เป็นสายโซ่แบบเกลียวและผิวของสปอร์เรียบ และจากการอธิบายลักษณะสัณฐานวิทยาเพิ่มเติมจากข้อมูลงานวิจัยของ Kämpfer ในปี 2012 และ Sharma และคณะ (2014) โดยระบุว่า *S. rochei* สามารถสร้างเส้นใยอาหารในโทนของสีแดง และอาจมีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีน้ำตาลอมแดง ด้วยลักษณะทางฟิโนไทป์ดังกล่าวพบที่มีความคล้ายคลึงกันลักษณะสัณฐานวิทยาของไอโซเลต EC19, EC22 และ AZ5 ที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซเลต EC19, EC22 และ AZ5 สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ ซึ่ง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kanini และคณะ (2013) ที่ระบุว่า *Streptomyces rochei* จัดเป็นแอคติโนมัยสีทที่มีศักยภาพในการต่อต้านเชื้อราก่อโรคในพืชได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



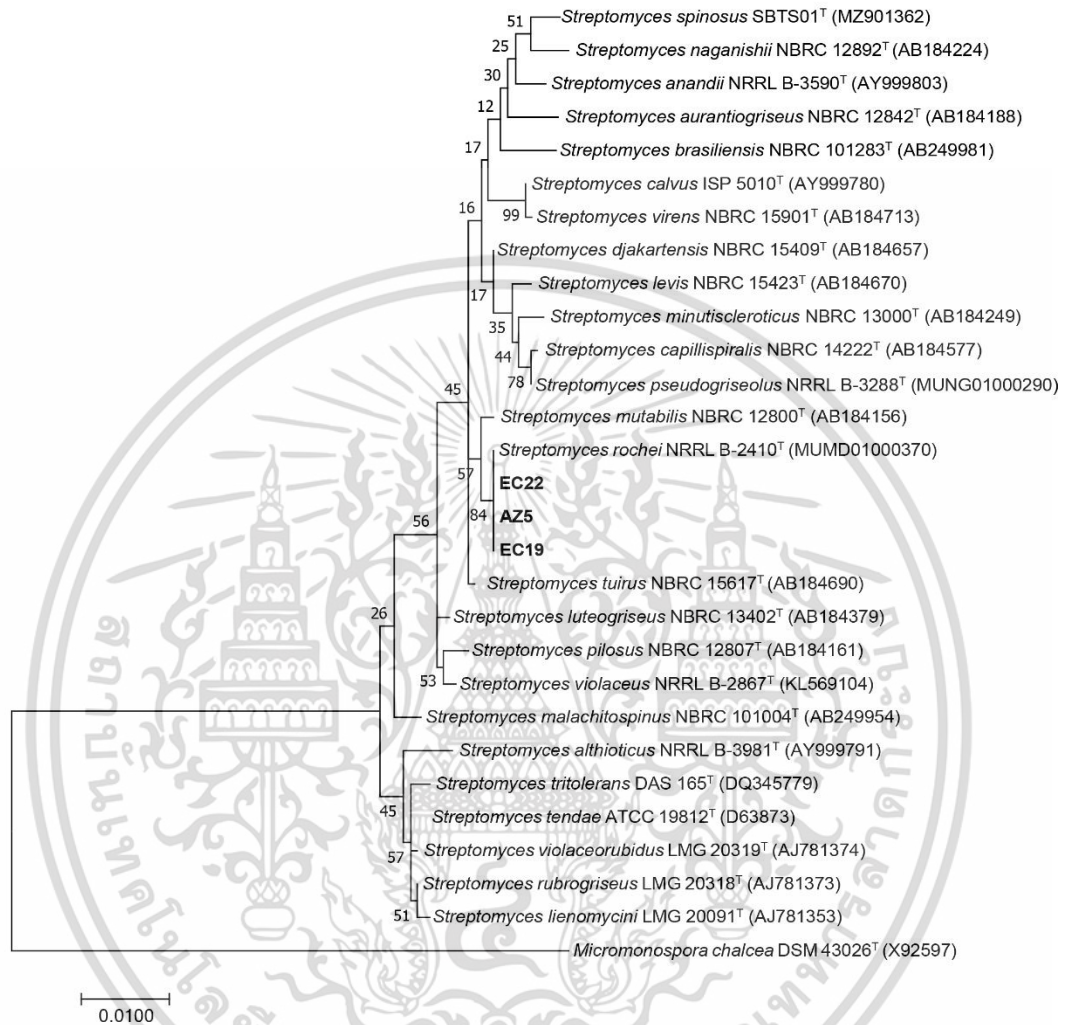
รูปที่ 4.39 ไอโซเลต EC19 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต EC19 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.40 ไอโซเลต EC22 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต EC22 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.41 ไอโซเลต AZ5 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต AZ5 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



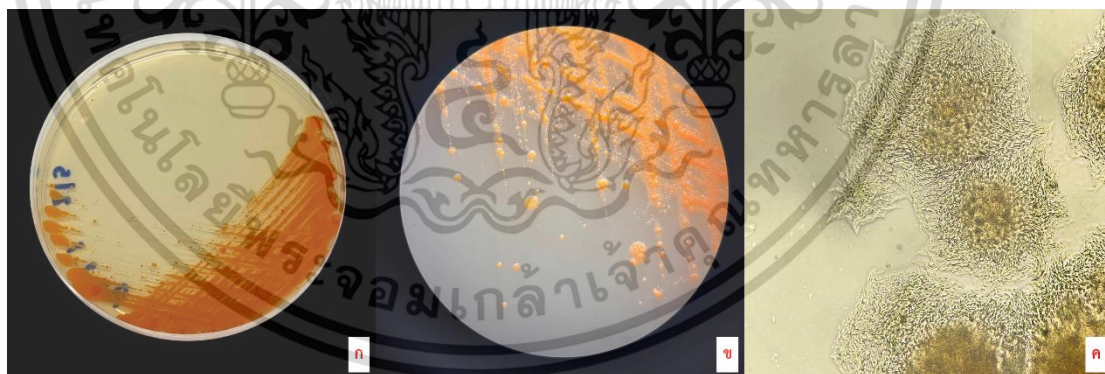
รูปที่ 4.42 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต EC19, EC22 และ AZ5 บน Phylogenetic tree (Maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 วงศ์ *Nocardiaceae*

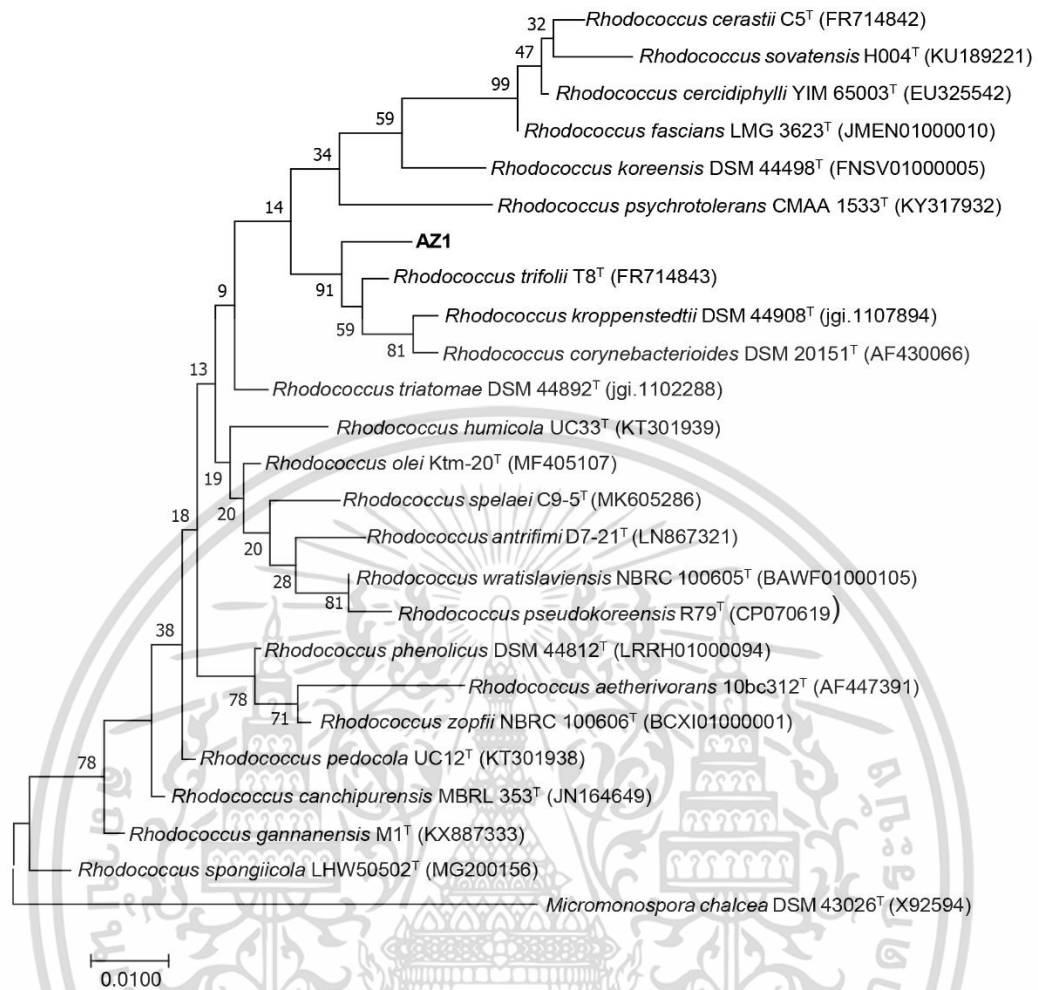
ประกอบด้วยไอโซเลต AZ1 ซึ่งถูกจัดเป็นสมาชิกของสกุล *Rhodococcus* มีรายละเอียดดังนี้

ไอโซเลต AZ1 เป็นแอคติโนแบคทีเรียที่ก่อตัวเป็นโคโลนีสีส้ม (Vivid Reddish Orange) ผิวโคโลนีมีลักษณะด้าน เซลล์ของไอโซเลตนี้เป็นเซลล์เดี่ยวรูปร่างกลม ไม่สร้างเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศและไม่สร้างสปอร์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต AZ1 เป็นแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Rhodococcus* (รูปที่ 4.44) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Rhodococcus kroppenstedtii* DSM 44908^T ด้วยค่าระดับความคล้ายคลึงของยีนช่วง 16S rRNA เท่ากับ 98.68% (ตารางที่ 4.5) โดยมีค่าน้อยกว่า 98.7% ของค่าบ่งชี้ระดับความเป็นสปีชีส์ใหม่ ที่ถูกกำหนดโดย Chun และคณะ ในปี ค.ศ. 2018 นอกจากนี้งานวิจัยของ Mayilraj และคณะ (2006) ได้ระบุว่า *Rhodococcus kroppenstedtii* มีลักษณะของโคโลนีสีส้มอมแดงขนาดเล็ก นูนและเรียบเนียน มีรูปร่างเซลล์กลมและคล้ายแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวพบว่าไอโซเลต AZ1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับ *Rhodococcus kroppenstedtii* แต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ที่แตกต่างจาก *Rhodococcus kroppenstedtii* โดยสิ้นเชิง ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต AZ1 มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Rhodococcus* ทั้งนี้ควรทำการศึกษา ลักษณะทางอนุกรมวิธานอย่างละเอียดต่อไป



รูปที่ 4.43 ไอโซเลต AZ1 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต AZ1 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้น ใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



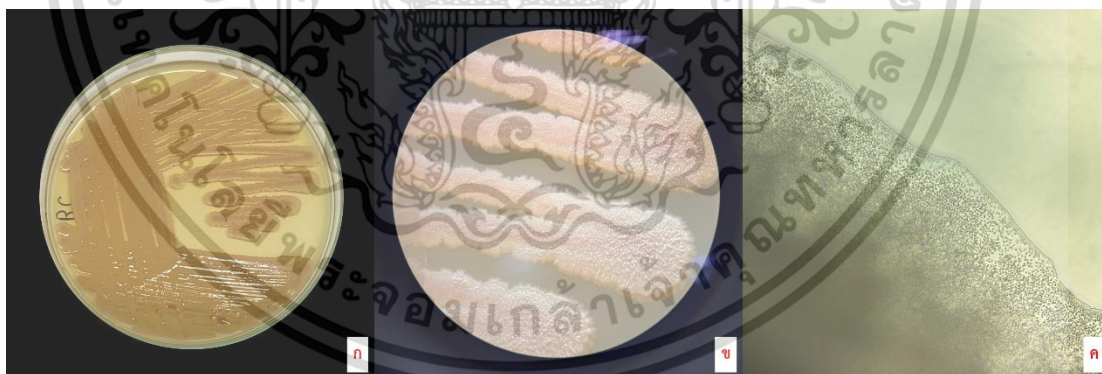
รูปที่ 4.44 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AZ1 บน Phylogenetic tree (Maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 วงศ์ *Bacillaceae*

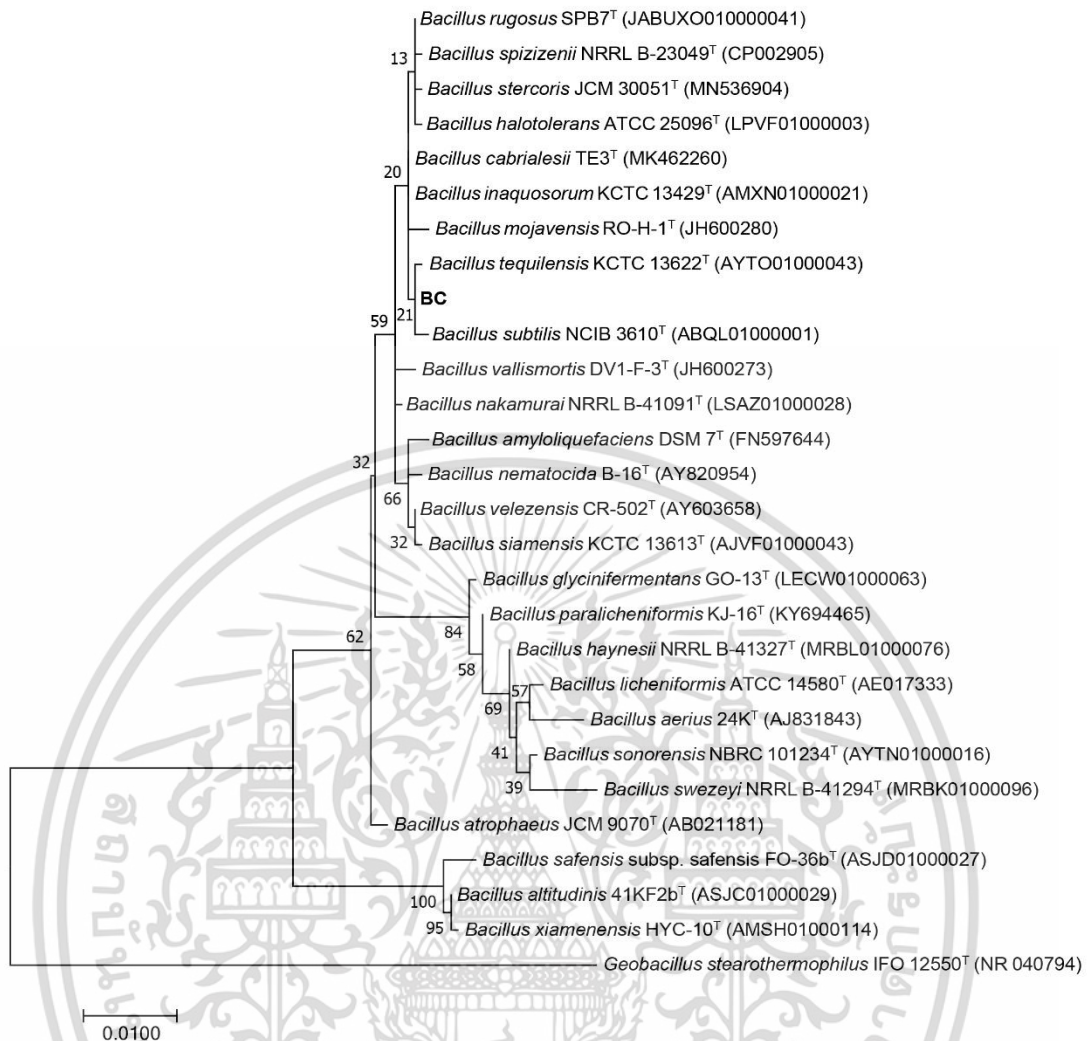
ประกอบด้วยแบคทีเรีย จำนวน 1 ไอโซเลต คือ BC ถูกจัดเป็นสมาชิกของสกุล *Bacillus* โดยมีรายละเอียดทางอนุกรมวิธาน ดังนี้

ไอโซเลต BC เป็นแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ก่อตัวเป็นโคโลนีสีเหลืองอ่อนอมชมพู (Pale yellowish pink) โคโลนีแผ่ขยายเป็นแผ่นแบนติดผิวอาหาร ขอบโคโลนีหยักไม่เรียบ เมื่อย้อมสีแกรมพบว่าเซลล์ติดสีม่วง จึงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว รูปท่อน สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต BC เป็นสมาชิกของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* (รูปที่ 4.47) โดยมีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus tequilensis* KCTC 13622^T ที่ระดับความคล้ายคลึงเท่ากับ 99.93% (ตารางที่ 4.5) โดยมีค่ามากกว่า 98.7% ของค่าบ่งชี้ระดับความเป็นสปีชีส์ใหม่ ที่ถูกกำหนดโดย Chun และคณะ ในปี ค.ศ. 2018 จากงานวิจัยของ Gatson และคณะ (2006) ได้ทำการอธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Bacillus tequilensis* ไว้ว่าเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลม เรียบ สีเหลือง พบการสร้างสปอร์ เซลล์รูปร่างเป็นท่อน รวมทั้งมีการรายงานของ Karthika และคณะ (2022) ว่า *Bacillus tequilensis* สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีศักยภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสามารถสร้างสารทุติยภูมิที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชได้นี้ สอดคล้องกับคุณสมบัติของไอโซเลต BC ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้



รูปที่ 4.45 ไอโซเลต BC (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต BC (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.46 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต BC บน Phylogenetic tree (Maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สกัดจาก 16S rRNA gene (% similarity) ของแอกติโนมัยซีทที่แยกได้เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในฐานะข้อมูล

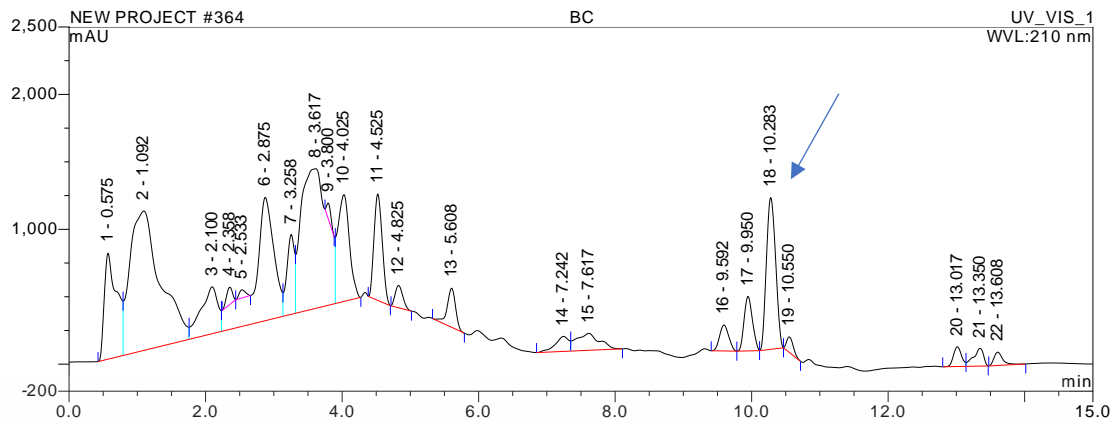
รหัส	สายพันธุ์อ้างอิงที่ใกล้เคียงมากที่สุด	% similarity	ความยาว (bp)
EC12	<i>Streptomyces albus</i> NBRC 13014 ^T	99.79	1,512
EC14	<i>Streptomyces albus</i> NBRC 13014 ^T	99.79	1,550
EC17	<i>Streptomyces albus</i> NBRC 13014 ^T	99.79	1,504
EC19	<i>Streptomyces rochei</i> NRRL B-2410 ^T	100.00	1,525
EC22	<i>Streptomyces rochei</i> NRRL B-2410 ^T	100.00	1,583
AZ1	<i>Rhodococcus kroppenstedtii</i> DSM 44908 ^T	98.68	1,566
AZ5	<i>Streptomyces rochei</i> NRRL B-2410 ^T	100.00	1,559
BC	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 ^T	99.93	1,582

จากผลการแยกและศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอกติโนมัยซีทในการศึกษาค้นคว้า พบว่าสอดคล้องกับการทดลองและงานวิจัยของ Dede และคณะ (2020) ที่ศึกษาจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืชจากบริเวณรอบรากต้นมะกอก โดยพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นแอกติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* นอกจากนี้ผลการศึกษาค้นคว้านี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Asmita และคณะ (2023), Hong และคณะ (2009) และ Lee และคณะ (2005) ที่ทำการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องกับพืชลอยน้ำเช่น แหน ผักตบชวา และจอก พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่พบและมีความโดดเด่นที่สุดคือสกุล *Bacillus* รวมถึงยังพบจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่นๆ เช่น Actinobacteria โดยพบแอกติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* มากที่สุด

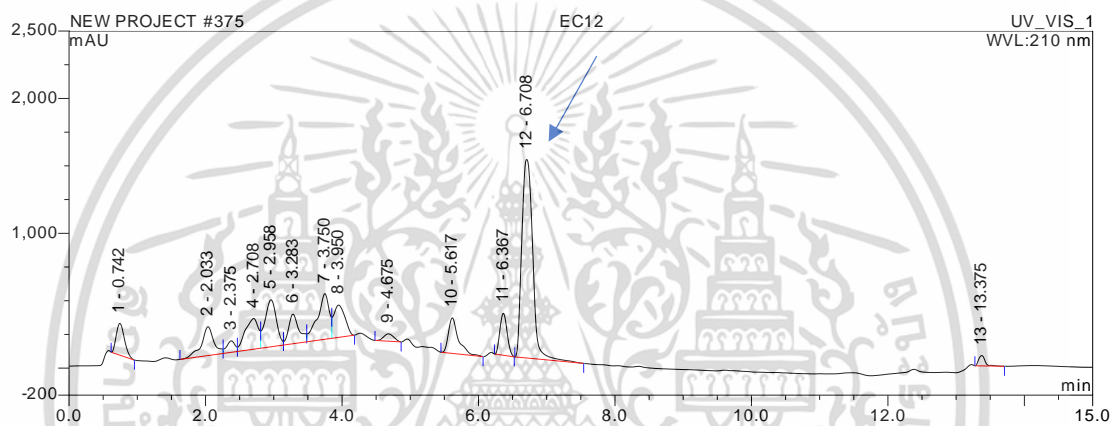
4.4 การศึกษารูปแบบของสารทุติยภูมิจากสารสกัดหยาบที่สร้างในน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อ

จากการนำแอกติโนมัยซีทที่คัดเลือกจำนวน 8 ไอโซเลตมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร *Streptomyces* Project Medium No.2 (ISP2) broth ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน และนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต แล้วทำการศึกษารูปแบบของสารทุติยภูมิจากสารสกัดหยาบ โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสารทุติยภูมิของแอกติโนมัยซีทของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) พบว่าสารสกัดหยาบจากแอกติโนมัยซีทที่มีรูปแบบของสารทุติยภูมิที่น่าสนใจ ได้แก่ ไอโซเลต BC, EC12 และ EC22

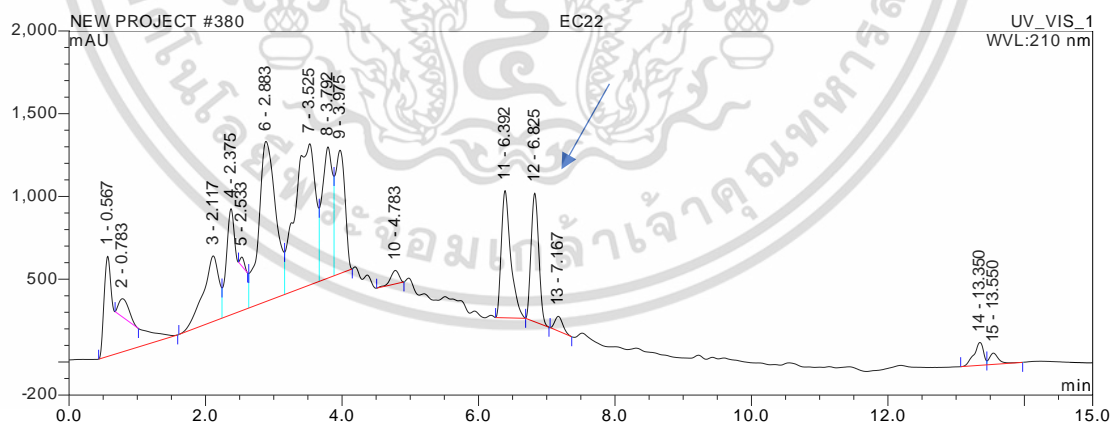
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.47 แสดงรูปแบบของสารทุติยภูมิของไอโซเลต BC ที่วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC



รูปที่ 4.48 แสดงรูปแบบของสารทุติยภูมิของไอโซเลต EC12 ที่วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC



รูปที่ 4.49 แสดงรูปแบบของสารทุติยภูมิของไอโซเลต EC12 ที่วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกจุลินทรีย์จำนวน 30 ไอโซเลตได้จากตัวอย่างผักตบชวาที่เก็บได้จากลำคลอง ตำบลคลองประเวศ อำเภอบ้านโพธิ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 24 ไอโซเลต และแยกจากตัวอย่างหนวดแดงที่เก็บจาก 2 แหล่งได้แก่ บริเวณนาข้าว ตำบลคลองประเวศ อำเภอบ้านโพธิ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา และบ่อเกษตร บริเวณข้างคณะบริหารธุรกิจ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 4 ไอโซเลต จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานสามารถจัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่มที่ 1 เป็นแอกติโนมัยสปีทที่สร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ สร้างสปอร์สายเกลียว
- กลุ่มที่ 2 เป็นแอกติโนมัยสปีทที่สร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ สร้างสปอร์สายตรง
- กลุ่มที่ 3 เป็นแอกติโนมัยสปีทที่สร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ สร้างสปอร์สายตรงปลายโค้งงอ
- กลุ่มที่ 4 เป็นแอกติโนมัยสปีทเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลมรี ไม่สร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ
- กลุ่มที่ 5 เป็นแอกติโนมัยสปีทที่สร้างเส้นใยอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างสปอร์เดี่ยว
- กลุ่มที่ 6 เป็นแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว แกรมบวก รูปร่างท่อน

จากการศึกษาคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแอกติโนมัยสปีทจำนวน 30 ไอโซเลต พบว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสาร IAA ได้จำนวน 27 ไอโซเลต (ร้อยละ 90) สามารถตรึงไนโตรเจนได้จำนวน 30 ไอโซเลต (ร้อยละ 100) สามารถสร้างสารซีเคอร์โรฟอรได้จำนวน 21 ไอโซเลต (ร้อยละ 70) และไม่มีจุลินทรีย์ใดที่สามารถสร้างไฮโดรเจนไซยาไนด์ได้ ตลอดจนพบจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ได้จำนวน 6 ไอโซเลต (ร้อยละ 20) และคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (%PIRG) ได้ดังนี้ ไอโซเลต EC12 มีค่าการยับยั้งร้อยละ 26.80, EC14 มีค่าการยับยั้งร้อยละ 17.40, EC17 มีค่าการยับยั้งร้อยละ 33.40, EC19 มีค่าการยับยั้งร้อยละ 14.00, EC22 มีค่าการยับยั้งร้อยละ 20.80, AZ5 มีค่าการยับยั้งร้อยละ 25.40, BC มีค่าการยับยั้งร้อยละ 33.40 และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้จำนวน 7 ไอโซเลต (23.3%) และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%PIRG) ได้ดังนี้ ไอโซเลต EC12 มีค่าการยับยั้งร้อยละ 30.01, EC14 มีค่าการยับยั้งร้อยละ 37.91, EC17 มีค่าการยับยั้งร้อยละ 37.91, EC19 มีค่าการยับยั้งร้อยละ 31.59, AZ5 มีค่าการยับยั้งร้อยละ 42.02 และ BC มีค่าการยับยั้งร้อยละ 47.39 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อและการคัดกรองคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชพบแอกติโนมัยสปีทที่มีคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่ดีมี จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต EC12, EC14, EC17, EC19, EC22, AZ1, AZ5 และ BC โดยไอโซเลต EC12, EC14, EC17, EC19, EC22, AZ5 และ BC มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี ไอโซเลต AZ1 มี

คุณสมบัติในการสร้างสาร IAA ได้ดี (24.40 $\mu\text{g/ml}$) ดังนั้นจึงคัดเลือกไปศึกษาอนุกรมวิธานและรูปแบบของสารทุติยภูมิของไอโซเลตดังกล่าว โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (% similarity) พบว่าแอกติโนมัยสียที่คัดเลือกมาจำนวน 8 ไอโซเลต เป็นแอกติโนมัยสียที่จัดอยู่ใน 2 วงศ์ ได้แก่ *Streptomycetaceae* *Nocardiaceae* โดยแบ่งเป็น 2 สกุล คือ สกุล *Streptomyces* ได้แก่ ไอโซเลต EC12, EC14, EC17 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces albus* NBRC 13014^T (99.79%) ไอโซเลต EC19, EC22 และ AZ5 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces rochei* NRRL B-2410^T (100%) และสกุล *Rhodococcus* ได้แก่ ไอโซเลต AZ1 มีความคล้ายคลึงกับ *Rhodococcus kroppenstedtii* DSM 44908^T (98.68%) และเป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Bacillaceae* 1 สกุล คือ สกุล *Bacillus* ได้แก่ ไอโซเลต BC มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus tequilensis* KCTC 13622^T (99.93%) และจากการวิเคราะห์รูปแบบของสารทุติยภูมิของสารสกัดเชื้อทั้ง 8 ไอโซเลตด้วยเทคนิค HPLC พบว่า ไอโซเลต BC, EC12 และ EC22 มีรูปแบบของสารทุติยภูมิที่น่าสนใจ ดังนั้นจากผลการศึกษาพบว่าผักตบชวาและแห่นางแดงเป็นแหล่งที่อยู่ของแอกติโนมัยสียที่มีความหลากหลาย และจุลินทรีย์ที่พบมีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชและมีความสามารถด้านการควบคุมทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช *Colletotrichum* spp. ได้ดี และจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลต AZ1 มีแนวโน้มที่เป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Rhodococcus*

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษานี้พบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยสียจากตัวอย่างผักตบชวาและแห่นางแดงเพียง 30 ไอโซเลต และจากการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อราก่อโรคในพืช พบว่ามีไอโซเลตที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเพียง 7 ไอโซเลต และในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าเป็นแอกติโนมัยสียที่อยู่ในสกุลเดียวกันถึง 6 ไอโซเลตโดยแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ ซึ่งจากการศึกษาของ Pramanic และคณะ (2023) พบว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ที่อาศัยร่วมกันกับผักตบชวาและแห่นางแดง มีความเป็นไปได้ว่าบริเวณที่เก็บตัวอย่างเพื่อคัดแยกนั้นอยู่ในเขตชุมชนอาจมีสิ่งปนเปื้อนหรือมลพิษในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง รวมถึงการเก็บและขนส่งตัวอย่าง ด้วยสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลให้แอกติโนมัยสียที่คัดแยกได้ไม่มีความหลากหลายเท่าที่ควร ดังนั้นการเก็บตัวอย่างในการศึกษาถัดไปควรเก็บตัวอย่างในบริเวณที่ใกล้เคียงสภาพธรรมชาติมากที่สุด ในการศึกษาถัดไปควรมีการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ และลักษณะทางจีโนมไทป์เพื่อยืนยันความใกล้เคียงของสายพันธุ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene เนื่องจากจากการศึกษานี้พบว่าไอโซเลต AZ1 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Rhodococcus* และศึกษาแยกสารทุติยภูมิของเชื้อไอโซเลต BC, EC12 และ EC22 ให้บริสุทธิ์

และนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมีเพิ่มเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของงานวิจัยในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกณิกา ลิพันธ์ นันทนา สีสุข และ กรรณิการ์ ดวงมาลย์. 2561. การส่งเสริมการเจริญพืชและกิจกรรมการยับยั้งเชื้อราโดยแอคติโนมัยซีตจากป่าพรุคันจูลี. ใน การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 3 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตศรีราชา วันที่ 30 สิงหาคม พ.ศ. 2561 (หน้า 156-165). ชลบุรี: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตศรีราชา

จิตติ ท่าไฉ. 2557. แอคติโนแบคทีเรีย I เทคนิคการแยกและคัดเลือกเชื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : แดเน็กซ์เนเจอร์ครีปรินซ์.

ทศพล นำปนัสก์. 2559. การผลิต indole-3-acetic acid โดยราเอนโดไฟท์สกุล *Colletotrichum* ที่แยกได้จากต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและผลต่อการเจริญของพืช. ปรินญาวิทยาสตร มหาลยบัณชิต สาขาจุลชีววิทยาประยุกต์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป, พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นัยนันทน์ อริยกานนท์. 2558. การฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมโดยพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. สายพิน ไชยนันท์. 2547. จุลินทรีย์ดิน. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สุภาพร จันรุ่งเรือง, เบญจมาศ รสโสภา และ กรรณิการ์ สัจจาพันธ์. 2553. ผลของแบคทีเรียละลายพอฟเตด *Burkholderia sp.* สายพันธุ์ Rs01 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2. วิทยาสารกำแพงแสน. 8: 1-14.

ลิลลี่ กาวีต๊ะ, มาลี ณ นคร, ศรีสม สุวรรณวงศ์, และสุริยา ตันติวิวัฒน์. 2549. สรีวิทยาของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

วิทวัส แจ้งเอี่ยม และ พรทิพย์ พลาดีศย์เลิศ. (2560). รายงานการวิจัย เรื่อง การศึกษาการยับยั้งเชื้อราคอลลีโทริคัมที่ก่อโรคในพืช จากเชื้อแอคติโนมัยซีตส์. ชลบุรี: คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

วิกิพีเดีย. 2560 ผักตบชวา. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : <https://th.wikipedia.org/wiki/> [14 ธันวาคม 2560]

อรุณ ชายชัยเชาว์วิวัฒน์, สุวินัย เกิดทับทิม, และสมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. การนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในระบบเกษตรกรรมแบบยั่งยืน. (ปรินญาบัณชิต คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, คณะมนุษยศาสตร์. มหาลยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา และมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 2559)

Alexander, D.B., Zuberer, D.A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fert Soils* **12**, 39–45

(1991). <https://doi.org/10.1007/BF00369386>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือสงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- AbdElgawad, H., Abuelsoud, W., Mahmoud, M. Y., Madany, Selim, S., Zinta, G., Ahmed, S. M., Mousa and Wael N. Hozzein. 2020. Actinomycetes Enrich Soil Rhizosphere and Improve Seed Quality as well as Productivity of Legumes by Boosting Nitrogen Availability and Metabolism. *Biomolecules*. 10(12): 1675.
- Alam, F., Khan, A. and Fa, S. 2022. Phosphate solubilizing bacteria optimize wheat yield in mineral phosphorus applied alkaline soil. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 21: 339-348.
- Abd Alla, H.I. (2011) Formulation and Evaluation of some local Alternatives in controlling post-harvest pests PhD. Thesis, Fac. Of Ain shams unv. PP: 211.
- Bull, S., Shambrook, C., James, W. and Brooks, J.(2005) Towards an Understanding of Mental Toughness in Elite English Cricketers. *Journal of Applied Sport Psychology*, 17(3), 209-227
- Cao M., Fu Y., Guo Y., Pan J. Chlamydomonas (Chlorophyceae) colony PCR. *Protoplasma*. 2009; 235:107–110. doi: 10.1007/s00709-009-0036-9. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
- Dede, A., Güven, K., & Şahin, N. (2020). Isolation, plant growth-promoting traits, antagonistic effects on clinical and plant pathogenic organisms and identification of actinomycetes from olive rhizosphere. **Microbial Pathogenesis**, 143, 104134. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104134>
- Döbereiner J, Day JM “Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites”. In: Newton WE, Nyman CJN (eds) Proc 1st “Int Symp Nitrogen Fixation.” Washington: Pullman, Washington State University Press, pp 518-538, 1976.
- Döbereiner J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil biology and biochemistry*. 29: 771-774
- Elias, S. H., Mohamed, M., Anuar, A. N., Muda, K., Hassan, M. A. H. M., Othman, M. N., Chelliapan, S., 2014. Water hyacinth bioremediation for ceramic industry wastewater treatment-Application of rhizofiltration system. *Sains Malaysiana* 43(9): 1397-1403.

- Elmerich, C., Zamaroczy, M. D., Arsene, F., Pereg, L., Paquelin, A., and Kaminski, A., Regulation of *nif* gene expression and nitrogen metabolism in *Azospirillum*., *Soil Biology and Biochemistry* 29 (1997) 847-852
- Fan D, Schwinghamer T, Liu S, Xia O, Ge C, Chen Q, Smith DL. Characterization of endophytic bacteriome diversity and associated beneficial bacteria inhabiting a macrophyte *Eichhornia crassipes*. *Front Plant Sci.* 2023 Jun 19;14:1176648. doi: 10.3389/fpls.2023.1176648. PMID: 37404529; PMCID: PMC10316030.
- Fasakin, E.A.; Balogun, A.M.; Fasuru, B.E. Use of Duckweed, *Spirodela Polyrhiza* L. Schleiden, as a Protein Feedstuff in Practical Diets for Tilapia, *Oreochromis Niloticus* L. *Aquac. Res.* 1999, 30, 313–318. [Google Scholar]
- Felsenstein, J. 1985. “Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap.” *Evolution.* 39(4): 783-791.
- Franco-Correa, Marcela, and Vanessa Chavarro-Anzola. ‘Actinobacteria as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria’. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, InTech, 11 Feb. 2016. Crossref, doi:10.5772/61291.
- Gatson, JW., Benz, BF., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., & Hart, ME. (2006) *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **56(Pt 7)**, 1475 - 1484. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63946-0> PMID: 16825615.
- Glickmann, E. and Dessaux, Y. 1995. “A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria.” *Applied and Environmental Microbiology.* 61(2): 793-796.
- Goudjal. Y., Toumatiaa, O., Yekkoura, A., Sabaoua, N., Mathieuc, F., and Zitouni, A (2014). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of *Algerian sahara*. *Microbiological Res.*169, 59-65. Doi: 10.1016/j.micres.2013.06.014
- Goodfellow, M. and Williams, E. (1986) New strategies for the selective isolation of industrially important bacteria. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **4**, 213–262.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Hall, T. A. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med*. 2006 Apr;12(4):466-72. doi: 10.1038/nm1389. Epub 2006 Mar 19. PMID: 16550188.
- Hayakawa, M., Ishizawa, K., & Nonomura, H. (1988). Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. *Journal of Fermentation Technology*, **66(4)**, 367 - 373. [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(88\)90001-5](https://doi.org/10.1016/0385-6380(88)90001-5)
- Hayakawa, M., Momose, Y., Kajiura, T., Yamazaki, T., Tamura, T., Hatano, K. and Nonomura, H. (1995) A selective isolation method for *Actinomadura viridis* in soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **79**, 287–289.
- Himpsl, S. D., & Mobley, H. L. T. (2019). Siderophore Detection Using Chrome Azurol S and Cross-Feeding Assays. *Proteus Mirabilis*, **2021**, 97–108. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9601-8_10 PMID: 31309499
- Hong, K., Gao, A., Xie, Q., Gao, H., Zhuang, L., Yu, H., Yao, X., Goodfellow, M. & Ruan, J. (2009). Actinomycetes for marine drug discovery isolation from Mangrove soils and plants in China. *Microbiological Research*. **Mar Drugs**, **7(1)**, 24 -44. <http://dx.doi.org/10.3390/md7010024> PMID: 19370169
- Hu, L., Chen, H., Zhang, G., Yu, Z., Yan, K., Zhan, F., He, Y. 2022. Effects of Auxin at Different Concentrations on the Growth, Root Morphology and Cadmium Uptake of Maize (*Zea mays* L.). *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, **91(9)**, 1-12. DOI:10.32604/phyton.2022.020041
- Intra, B., Mungsuntisuk, I., Nihira, T. et al. (2011). Identification of *actinomycetes* from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. *BMC Res Notes*, **4**, 98. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-98>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Jeya, K.R., Kiruthika, K. and Veerapagu, M. 2013. "Isolation of antibiotic producing *Streptomyces* sp. from soil of Perambalur district and a study on the antibacterial activity against clinical pathogens." *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 5(3) : 1207-1211.
- Kanini GS, Katsifas EA, Savvides AL, Karagouni AD. (2023). *Streptomyces rochei* ACTA1551, an indigenous Greek isolate studied as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. **Biomed Res Int**, 2013, 387230. <https://doi.org/10.1155/2013/387230> Epub 2013 May 20. PMID: 23762841; PMCID: PMC3671524.
- Karthika S, Remya M, Varghese S, Dhanraj ND, Sali S, Rebello S, Jose SM, Jisha MS. (2022). *Bacillus tequilensis* PKDN31 and *Bacillus licheniformis* PKDL10 -As double headed swords to combat *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* induced tomato wilt. *Microb Pathog.* 2022 Nov;172:105784. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105784. PMID: 36122853.
- Kimura, M. 1980. "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences." *Journal of Molecular Evolution.* 16(2): 111-120.
- Komaki, H. (2021) Reclassification of 15 *Streptomyces* species as synonyms of *Streptomyces albogriseolus*, *Streptomyces althoticus*, *Streptomyces anthocyanicus*, *Streptomyces calvus*, *Streptomyces griseoincarnatus*, *Streptomyces mutabilis*, *Streptomyces pilosus* or *Streptomyces rochei*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 71(3),. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004718> Epub 2021 PMID: 33646935
- Labeda, D, P., Doroghazi J, R., Ju, K, S., Metcalf, W, W. (2014) Taxonomic evaluation of *Streptomyces albus* and related species using multilocus sequence analysis and proposals to emend the description of *Streptomyces albus* and describe *Streptomyces pathocidini* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, 64(Pt 3), 894 - 900. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.058107-0> PMID: 24277863 PMCID: PMC4851252.
- Lee , J., Lee , J., Jung, H., & Hwang, B. (2005). *Streptomyces koyangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces 4 -phenyl - 3 -butenoic acid. **Int J Syst Evol Microbiol**, 55, 257 -262. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63168-0> PMID: 15653884

- Leng, R.A.; Stambolie, J.H.; Bell, R. Duckweed—A Potential High-protein Feed Resource for Domestic Animals and Fish. *Livest. Res. Rural Dev.* 1995, 7, 36. [Google Scholar]
- Li, A and piel, J. 2002. A gene cluster from a marine Streptomyces encoding the biosynthesis of aromatic spiroketal polyketide grisiorhodin A. *Chemistry and Biology* 9: 1017-1026
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. InTech. doi: 10.5772/61461
- Mayilraj, S., Krishnamurthi, S., Saha, P., & Saini, HS. (2006) *Rhodococcus kroppenstedtii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a cold desert of the Himalayas, India. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(Pt 5), 979 - 982. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63831-0> PMID: 16627641.
- Metha, S., and Nautiyal, C. S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing bacteria. *Current Microbiology* 43: 51-56.
- Mundie, D. A. 1995. The NBC/ISCC Color System/ David A. Mundie Pittsburgh, PA: Polymath Systems 535.6 dc- 20. [Online]. Available: <http://www.anthus.com/Colors/Cent.html>
- Myo, E.M., Ge, B., Ma, J., Cui, H., Liu, B., Shi, L., Jiang, M., & Zhang, K. (2019). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. *BMC Microbiol*, 19(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1528-1> PMID: 31286877
PMCID: PMC6615096
- Newman, D.J., Cragg, G.M., and Snader, K.M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1951-2001. *Journal of Natural Product* 66: 1022-1037
- Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M. and Kaushik, S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15: 379-391
- Panigraha, S., Mohanty, S. and Rath, C.C. 2020. Characterization of endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* MG00145 isolated from *Ocimum sanctum* with dole Acetic Acid (IAA) production and plant growth promoting capabilities against selected crops. *South African Journal of Botany*, 134: 17-26.

- Paweena Suksaard , Wasu Pathom-aree and Kannika Duangmal. (2017). Diversity and Plant Growth Promoting Activities of Actinomycetes from Mangroves. *Chiang Mai J. Sci.*, 44(4), 1210-1223.
- Petrikovics, I., Budai, M., Kovacs, K., & Thompson, D, E. (2015). Past, present and future of cyanide antagonism research: From the early remedies to the current therapies. *World J Methodol*, 5(2), 88-100.
<https://doi.org/10.5662%2Fwjmv5.i2.88> PMID: 26140275 PMCID: PMC4482825
- Pramanic, A., Sharma, S., Dhanorkar, M., Prakash, O. & Singh, P. (2023). Endophytic microbiota of floating aquatic plants: recent developments and environmental prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 96 <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03543-1>
- Rakeshkumar Yadav, Vinay Rajput, and Mahesh D. (2023). Water Hyacinth microbiome: metagenomic cues from environment and functionality in urban aquatic bodies. <https://doi.org/10.1101/2023.03.09.531941>
- Rinkal B. G., Vikram H. R., Rakeshkumar R. P. and Kiransinh N. R. (2022). Plant Growth-Promoting Activity of Bacillus sp. PG-8 Isolated from Fermented Oanchagavya and Its Effect on the Growth of Arachis hypogea. *Front. Agron.* 2022, 4, 805454.
- Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 8(4), 6 – 9
- Sanginga, N., Van Hove, C. Amino acid composition of azolla as affected by strains and population density. *Plant Soil* 117, 263–267 (1989).
<https://doi.org/10.1007/BF02220720>
- Sreevidya, M. & Gopalakrishnan, Subramaniam & Kudapa, Hima & Varshney, Rajeev. (2016). Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47. 85-95. 10.1016/j.bjm.2015.11.030.
- Sadhana Jaiswal, P. K. Singhal. Isolation and Biochemical Characterization of Bacteria Present In Roots of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart) Solm.) In Robertson Lake Jabalpur. *Research J. Science and Tech.* 2011; 3(3): 164-168.
- Saimee, Y and Duangmal, *Streptomyces spirodelae* sp. Nov., isolated from duckweed. (Bachelor's degree thesis. Lasetsart University, 2021)

- Sathavonmanee, P. 2019. PGPR คืออะไร. [Online]. เข้าถึงได้จาก <https://shop.grotech.co/blog/pgpr>
- Sharma, A., Gautam, S., & Saxena, S. (2014). Streptomyces. Encyclopedia of Food Microbiology, 560–566. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00326-8
- Sharma R, Kumar A, Singh N, Sharma K. 16S rRNA gene profiling of rhizospheric microbial community of Eichhornia crassipes. Mol Biol Rep. 2021 May;48(5):4055-4064. doi: 10.1007/s11033-021-06413-x. Epub 2021 May 22. PMID: 34021896.
- Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G., and Zuberer, D. A., *Principles and Applications of Soli Microbiology*. 2nd (The United States of America, 2005, pp. 222-430)
- Teboho T., Lerato N., Motumiseng M., and Fidele T. (2022). Bacillus for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned?. Plants, 11(19), 2482.
- Taechowisan T., Lumyong S. (2003). Activity of endophytic actinomycetes from roots of *Zingiber officinale* and *Alpinia galena* against phytopathogenic fungi. *Ann. Microbiol.* 53, 291–298. [Google Scholar]
- Taechowisan T., Peberdy J. F., Lumyong S. (2003). Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 381–385 10.1023/A:1023901107182 [CrossRef] [Google Scholar]
- Urkude, R., Dhurvey, V., & Kochhar, S. 2019. “Pesticide Residues in Beverages.” Quality Control in the Beverage Industry. 17: 529-560.
- Velho-Pereira S., & Kamat, NM. (2013). Actinobacteriological research in India. *Indian J Exp Biol*, 51(8), 573 - 596. PMID: 24228382.
- Verma, R.; Suthar, S. Utility of Duckweeds as Source of Biomass Energy: A Review. *Bioenerg. Res.* 2015, 8, 1589–1597. [Google Scholar] [CrossRef]
- Vobis, G. (1997). Morphology of Actinomycetes. In Atlas of Actinomycetes, pp. 180-190 (edited by Miyadoh, S.). The Society for Actinomycetes Japan. Asakura Publishing.
- Williams, S. T., and Cross, T. 1971. Chapter XI Actinomycetes. 295-334. In C. Booth. *Methods in Microbiology*. Academic Press.

- Yamaji, K., Nagata, S., Haruma, T., Ohnuki, T., Kozaki, T., Watanabe, N., & Nanba, K. (2016). Root endophytic bacteria of a (^{137}Cs) and Mn accumulator plant, *Eleutherococcus sciadophylloides*, increase (^{137}Cs) and Mn desorption in the soil. *Journal of Environmental Radioactivity*, 153, 112 – 119.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.12.015> PMID: 26760221
- Yu, C.; Sun, C.; Yu, L.; Zhu, M.; Xu, H.; Zhao, J.; Ma, Y.; Zhou, G. Comparative Analysis of Duckweed Cultivation with Sewage Water and SH Media for Production of Fuel Ethanol. *PLoS ONE* 2014, 9, e115023. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
- Yasuko Y., Kyosuke Y., Ayaka M., Yasuhiro T., Xian-Ying M., Junko H, Kazuo S., Noriyuki S., Manabu F., Tadashi T., Kazuhiro M., Michihiko I., Masaaki M., Yoichi K. and Hideyuki T. “Novel Plant-Associated Acidobacteria Promotes Growth of Common Floating Aquatic Plants, Duckweeds” *Microorganism* 9 (2021)
<https://www.mdpi.com/2076-2607/9/6/1133>.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. 2017. “Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies.” *International Journal of Systematic and Evolutionary*. 67(5):1613-1617.
- Zineb, F. B., Merabet, C. and Tsaki, H. “Plant Growth Promoting Actinobacteria, the Most Promising Candidates as Bioinoculants?” *Agron* 2022, 4.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับคัดแยกเชื้อ

Starch casein nitrate agar (SCN) เติมยาปฏิชีวนะ

Soluble starch	10	กรัม
Sodium caseinate	1	กรัม
KNO ₃	2	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.0-7.2		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เติมยาปฏิชีวนะ Nystatin 40 มิลลิกรัม (ละลายใน 100% DMSO) ผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ในอาหารขณะอุณหภูมิประมาณ 50 °C

Zhang's Starch soil extract agar (ZSSE) ที่เติมยาปฏิชีวนะ

Soluble starch	5	กรัม
KNO ₃	1	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.5	กรัม
Agar	18	กรัม
Soil extract solution*	1000	มิลลิลิตร
pH 7.0-7.2		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เติมยาปฏิชีวนะ Nystatin 40 มิลลิกรัม (ละลายใน 100% DMSO) ผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ในอาหารขณะอุณหภูมิประมาณ 50 °C

* Soil extract solution

ดิน	1000	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน นำส่วนใสที่ปราศจากตะกอนดินมาใช้ในการทำอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารตรวจสอบลักษณะการเจริญ

Yeast extract – malt extract agar (ISP 2)

Glucose	4	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.0-7.2		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารทดสอบการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation)

Nitrogen-free bromothymol blue (NFB) agar

Malic acid	5	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02	กรัม
Micronutrient solution*	2	กรัม
Bromothymol blue (5 g/L ใน 0.2 N KOH)	2	กรัม
FeEDTA solution (16.4 g/L)	4	กรัม
Vitamin solution*	1	กรัม
KON	4.5	กรัม
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.2 ± 0.2		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nitrogen-free bromothymol blue (NFB) semo-solid medium

อาหาร NFB ที่เติม Agar 6-8 กรัม/ลิตร

* Micronutrient solution

CuSO ₄ .5H ₂ O	0.04	กรัม
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.12	กรัม
MgSO ₄ .H ₂ O	1.4	กรัม
H ₃ BO ₃	1	กรัม
MnSO ₄ .H ₂ O	1.175	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

* Vitamin solution

Biotin	10	มิลลิกรัม
Pyridoxal – HCl	20	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เติม vitamin solution เป็นสารตัวสุดท้าย โดยทำการกรองด้วย Filter-sterilize ในอาหารขณะอุณหภูมิประมาณ 50 °C

อาหารทดสอบการสร้างซิดอโรฟอร์ (Siderophore production)

Chrome Azurol S (CAS) agar

Basal medium (ISP 2)	900	มิลลิลิตร
Casamino acid	0.45	กรัม
Blue dye solution*	100	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*** Blue dye solution**

Solution I: 1 mM FeCl₂•6H₂O 5 mL + 10 mM HCl 5 mL

Solution II: Chrome Azurol S 0.06 g. ในน้ำกลั่น 50 mL

Solution III: Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) 72.9 mg ในน้ำกลั่น 40 mL

นำทั้ง 3 Solution ผสมกันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที รอให้เย็นแล้วผสมลงในอาหารขณะอุณหภูมิ 50 °C

อาหารทดสอบการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (Hydrogen Cyanide production : HCN)

Yeast extract – malt extract agar (ISP 2) เติม 4.4 g/L ของ glycine

Glucose	4	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Agar	18	กรัม
Glycine	4.4	กรัม/ลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.0-7.2		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารทดสอบการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก (Indole-3-acetic acid : IAA)

Yeast extract – malt extract broth (ISP 2) broth เติม L-Tryptophan 0.5%

Glucose	4	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
L-Tryptophan	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0-7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารสำหรับการสกัดสารสกัด

Yeast extract – malt extract broth (ISP 2) Broth

Glucose	4	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0-7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมี

Agarose gel 0.8% (stained gel)

Agarose	0.8	กรัม
1X TBE or TAE buffer	100	มิลลิลิตร
SYBR safe DNA gel stain	1	ไมโครลิตร

TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8)	10	มิลลิลิตร
1 mM Na ₂ -EDTA (pH 8)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น หรือ น้ำ 18 โอห์ม	980	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Nessler's reagent

KI		
Saturated HgCl ₂ solution	20	มิลลิลิตร
50 % KOH	400	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Salkowski's reagent

0.5 M FeCl ₃ .6H ₂ O	2	มิลลิลิตร
35 % Perchloric acid	98	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

กระดาศสีมาตรฐาน NBS/ISCC color system












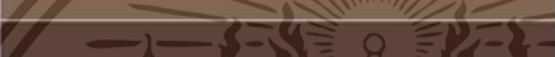
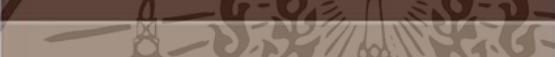

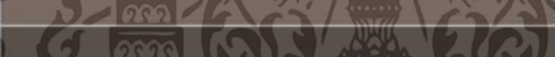









กระดาศสีมาตรฐาน NBS/ISCC color system (Mundie, 1995)

Hex	Color	Name
#ffb5ba		Vivid_Pink
#ea9399		Strong_Pink
#e4717a		Deep_Pink
#f9ccca		Light_Pink
#dea5a4		Moderate_Pink
#c08081		Dark_Pink
#ead8d7		Pale_Pink
#c4aead		Grayish_Pink
#eae3e1		Pinkish_White
#c1b6b3		Pinkish_Gray
#be0032		Vivid_Red
#bc3f4a		Strong_Red
#841b2d		Deep_Red
#5c0923		Very_Deep_Red
#ab4e52		Moderate_Red
#722f37		Dark_Red
#3f1728		Very_Dark_Red
#ad8884		Light_Grayish_Red
#905d5d		Grayish_Red
#543d3f		Dark_Grayish_Red
#2e1d21		Blackish_Red
#8f817f		Reddish_Gray
#5c504f		Dark_Reddish_Gray


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#282022		Reddish_Black
#ffb7a5		Vivid_Yellowish_Pink
#f99379		Strong_Yellowish_Pink
#e66721		Deep_Yellowish_Pink
#f4c2c2		Light_Yellowish_Pink
#d9a6a9		Moderate_Yellowish_Pink
#c48379		Dark_Yellowish_Pink
#ecd5c5		Pale_Yellowish_Pink
#c7ada3		Grayish_Yellowish_Pink
#c2ac99		Brownish_Pink
#e25822		Vivid_Reddish_Orange
#d9603b		Strong_Reddish_Orange
#aa381e		Deep_Reddish_Orange
#cb6d51		Moderate_Reddish_Orange
#9e4732		Dark_Reddish_Orange
#b4745e		Grayish_Reddish_Orange
#882d17		Strong_Reddish_Brown
#56070c		Deep_Reddish_Brown
#a87c6d		Light_Reddish_Brown
#79443b		Moderate_Reddish_Brown
#3e1d1e		Dark_Reddish_Brown
#977f73		Light_Grayish_Reddish_Brown
#674c47		Grayish_Reddish_Brown
#43302e		Dark_Grayish_Reddish_Brown

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#f38400		Vivid_Orange
#fd943f		Brilliant_Orange
#ed872d		Strong_Orange
#be6516		Deep_Orange
#fab57f		Light_Orange
#d99058		Moderate_Orange
#ae6938		Brownish_Orange
#80461b		Strong_Brown
#593319		Deep_Brown
#a67b5b		Light_Brown
#6f4e37		Moderate_Brown
#422518		Dark_Brown
#958070		Light_Grayish_Brown
#635147		Grayish_Brown
#3e322c		Dark_Grayish_Brown
#8e8279		Light_Brownish_Gray
#5b504f		Brownish_Gray
#28201c		Brownish_Black
#f6a600		Vivid_Orange_Yellow
#ffc14f		Brilliant_Orange_Yellow
#eaa221		Strong_Orange_Yellow
#c98500		Deep_Orange_Yellow
#fbc97f		Light_Orange_Yellow
#e3a857		Moderate_Orange_Yellow






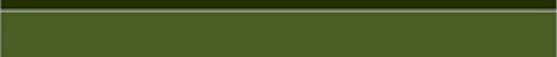
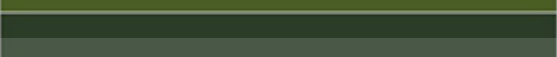


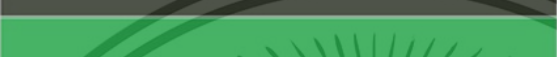








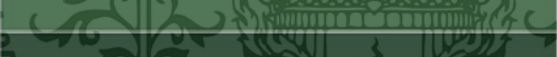

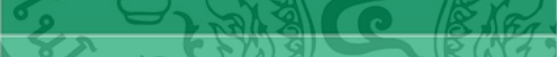



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#be8a3d		Dark_Orange_Yellow
#fad6a5		Pale_Orange_Yellow
#996515		Strong_Yellowish_Brown
#654522		Deep_Yellowish_Brown
#c19a6b		Light_Yellowish_Brown
#826644		Moderate_Yellowish_Brown
#4b3621		Dark_Yellowish_Brown
#ae9b82		Light_Grayish_Yellowish_Brown
#7e6d5a		Grayish_Yellowish_Brown
#483c32		Dark_Grayish_Yellowish_Brown
#f3c300		Vivid_Yellow
#fada5e		Brilliant_Yellow
#d4af37		Strong_Yellow
#af8d13		Deep_Yellow
#f8de7e		Light_Yellow
#c9ae5d		Moderate_Yellow
#ab9144		Dark_Yellow
#f3e5ab		Pale_Yellow
#c2b280		Grayish_Yellow
#a18f60		Dark_Grayish_Yellow
#f0ead6		Yellowish_White
#bfb8a5		Yellowish_Gray
#967117		Light_Olive_Brown
#6c541e		Moderate_Olive_Brown




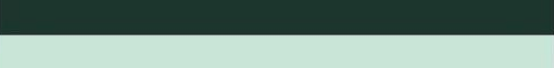

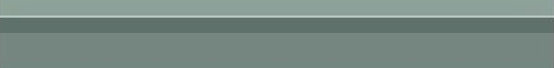

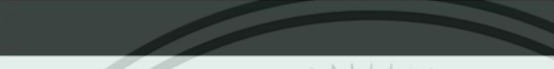


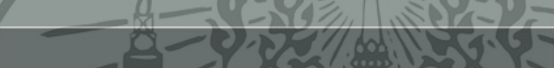








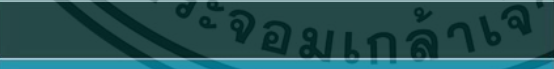




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#3b3121		Dark_Olive_Brown
#dcd300		Vivid_Greenish_Yellow
#e9e450		Brilliant_Greenish_Yellow
#beb72e		Strong_Greenish_Yellow
#9b9400		Deep_Greenish_Yellow
#eae679		Light_Greenish_Yellow
#b9b459		Moderate_Greenish_Yellow
#98943e		Dark_Greenish_Yellow
#ebe8a4		Pale_Greenish_Yellow
#b9b57d		Grayish_Greenish_Yellow
#867e36		Light_Olive
#665d1e		Moderate_Olive
#403d21		Dark_Olive
#8c8767		Light_Grayish_Olive
#5b5842		Grayish_Olive
#363527		Dark_Grayish_Olive
#8a8776		Light_Olive_Gray
#57554c		Olive_Gray
#25241d		Olive_Black
#8db600		Vivid_Yellow_Green
#bdda57		Brilliant_Yellow_Green
#7e9f2e		Strong_Yellow_Green
#467129		Deep_Yellow_Green
#c9dc89		Light_Yellow_Green





















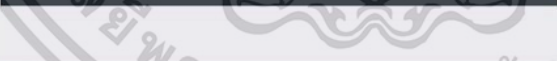
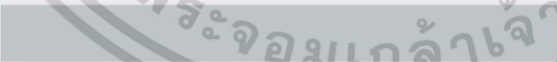


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#8a9a5b		Moderate_Yellow_Green
#dadfb7		Pale_Yellow_Green
#8f9779		Grayish_Yellow_Green
#404f00		Strong_Olive_Green
#232f00		Deep_Olive_Green
#4a5d23		Moderate_Olive_Green
#2b3d26		Dark_Olive_Green
#515744		Grayish_Olive_Green
#31362b		Dark_Grayish_Olive_Green
#27a64c		Vivid_Yellowish_Green
#83d37d		Brilliant_Yellowish_Green
#44944a		Strong_Yellowish_Green
#00622d		Deep_Yellowish_Green
#003118		Very_Deep_Yellowish_Green
#b6e5af		Very_Light_Yellowish_Green
#93c592		Light_Yellowish_Green
#679267		Moderate_Yellowish_Green
#355e3b		Dark_Yellowish_Green
#173620		Very_Dark_Yellowish_Green
#008856		Vivid_Green
#3eb489		Brilliant_Green
#007959		Strong_Green
#00543d		Deep_Green
#8ed1b2		Very_Light_Green

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#6aab8e		Light_Green
#3b7861		Moderate_Green
#1b4d3e		Dark_Green
#1c352d		Very_Dark_Green
#c7e6d7		Very_Pale_Green
#8da399		Pale_Green
#5e716a		Grayish_Green
#3a4b47		Dark_Grayish_Green
#1a2421		Blackish_Green
#dfede8		Greenish_White
#b2beb5		Light_Greenish_Gray
#7d8984		Greenish_Gray
#4e5755		Dark_Greenish_Gray
#1e2321		Greenish_Black
#008882		Vivid_Bluish_Green
#00a693		Brilliant_Bluish_Green
#007a74		Strong_Bluish_Green
#00443f		Deep_Bluish_Green
#96ded1		Very_Light_Bluish_Green
#66ada4		Light_Bluish_Green
#317873		Moderate_Bluish_Green
#004b49		Dark_Bluish_Green
#002a29		Very_Dark_Bluish_Green
#0085a1		Vivid_Greenish_Blue





















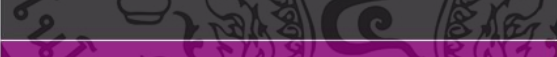



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#239eba		Brilliant_Greenish_Blue
#007791		Strong_Greenish_Blue
#2e8495		Deep_Greenish_Blue
#9cd1dc		Very_Light_Greenish_Blue
#66aabc		Light_Greenish_Blue
#367588		Moderate_Greenish_Blue
#004958		Dark_Greenish_Blue
#002e3b		Very_Dark_Greenish_Blue
#00a1c2		Vivid_Blue
#4997d0		Brilliant_Blue
#0067a5		Strong_Blue
#00416a		Deep_Blue
#a1caf1		Very_Light_Blue
#70a3cc		Light_Blue
#436b95		Moderate_Blue
#00304e		Dark_Blue
#bcd4e6		Very_Pale_Blue
#91a3b0		Pale_Blue
#536878		Grayish_Blue
#36454f		Dark_Grayish_Blue
#202830		Blackish_Blue
#e9e9ed		Bluish_White
#b4bcc0		Light_Bluish_Gray
#81878b		Bluish_Gray






















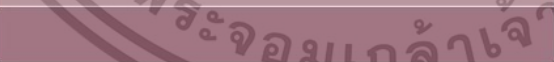






เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#51585e	Dark_Bluish_Gray
#202428	Bluish_Black
#30267a	Vivid_Purplish_Blue
#6c79b8	Brilliant_Purplish_Blue
#545aa7	Strong_Purplish_Blue
#272458	Deep_Purplish_Blue
#b3bce2	Very_Light_Purplish_Blue
#8791bf	Light_Purplish_Blue
#4e5180	Moderate_Purplish_Blue
#252440	Dark_Purplish_Blue
#c0c8e1	Very_Pale_Purplish_Blue
#8c92ac	Pale_Purplish_Blue
#4c516d	Grayish_Purplish_Blue
#9065ca	Vivid_Violet
#7e73b8	Brilliant_Violet
#604e97	Strong_Violet
#32174d	Deep_Violet
#dcd0ff	Very_Light_Violet
#8c82b6	Light_Violet
#604e81	Moderate_Violet
#2f2140	Dark_Violet
#c4c3dd	Very_Pale_Violet
#9690ab	Pale_Violet
#554c69	Grayish_Violet

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#9a4eae		Vivid_Purple
#d399e6		Brilliant_Purple
#875692		Strong_Purple
#602f6b		Deep_Purple
#401a4c		Very_Deep_Purple
#d5badb		Very_Light_Purple
#b695c0		Light_Purple
#86608e		Moderate_Purple
#563c5c		Dark_Purple
#301934		Very_Dark_Purple
#d6cadd		Very_Pale_Purple
#aa98a9		Pale_Purple
#796878		Grayish_Purple
#50404d		Dark_Grayish_Purple
#291e29		Blackish_Purple
#e8e3e5		Purplish_White
#bfb9bd		Light_Purplish_Gray
#8b8589		Purplish_Gray
#5d555b		Dark_Purplish_Gray
#242124		Purplish_Black
#870074		Vivid_Reddish_Purple
#9e4f88		Strong_Reddish_Purple
#702963		Deep_Reddish_Purple
#54194e		Very_Deep_Reddish_Purple

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#b784a7		Light_Reddish_Purple
#915c83		Moderate_Reddish_Purple
#5d3954		Dark_Reddish_Purple
#341731		Very_Dark_Reddish_Purple
#aa8a9e		Pale_Reddish_Purple
#836479		Grayish_Reddish_Purple
#ffc8d6		Brilliant_Purplish_Pink
#e68fac		Strong_Purplish_Pink
#de6fa1		Deep_Purplish_Pink
#efbbcc		Light_Purplish_Pink
#d597ae		Moderate_Purplish_Pink
#c17e91		Dark_Purplish_Pink
#e8ccd7		Pale_Purplish_Pink
#c3a6b1		Grayish_Purplish_Pink
#ce4676		Vivid_Purplish_Red
#b3446c		Strong_Purplish_Red
#78184a		Deep_Purplish_Red
#54133b		Very_Deep_Purplish_Red
#a8516e		Moderate_Purplish_Red
#673147		Dark_Purplish_Red
#38152c		Very_Dark_Purplish_Red
#af868e		Light_Grayish_Purplish_Red
#915f6d		Grayish_Purplish_Red
#f2f3f4		White
#b9b8b5		Light_Gray
#848482		Medium_Gray
#555555		Dark_Gray
#222222		Black

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
ตารางผลการส่งเสริมการเจริญของพืช

ตารางผลการทดสอบการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก (Indole-3-acetic acid : IAA)

รหัส	IAA	ปริมาณสาร IAA ($\mu\text{g/ml}$)	รหัส	IAA	ปริมาณสาร IAA ($\mu\text{g/ml}$)
EC1	+	10.07	EC16	+	15.20
EC2	+	11.49	EC17	+	21.82
EC3	+	12.92	EC18	+	8.87
EC4	+	10.57	EC19	+	8.55
EC5	+	22.17	EC20	+	8.62
EC6	+	13.63	EC21	+	13.72
EC7	+	12.67	EC22	+	13.39
EC8	+	15.68	EC23	+	13.13
EC9	+	13.57	EC24	+	22.02
EC10	+	8.59	AZ1	+	24.40
EC11	+	13.15	AZ2	+	20.90
EC12	+	12.26	AZ3	+	13.90
EC13	+	15.52	AZ4	-	-
EC14	+	8.65	AZ5	+	15.76
EC15	-	-	BC	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ผลบวก เกิดการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีชมพูถึงแดง

- หมายถึง ผลลบ ไม่เกิดการเปลี่ยนสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผลการทดสอบการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation)

รหัส	ตรวจสอบ (NFB Agar)	ยีนยัน (NFB Semi-solid)	รหัส	ตรวจสอบ (NFB Agar)	ยีนยัน (NFB Semi-Solid)
EC1	+	+	EC16	+	+
EC2	+	+	EC17	+	+
EC3	+	+	EC18	+	+
EC4	+	+	EC19	+	+
EC5	+	+	EC20	+	+
EC6	+	+	EC21	+	+
EC7	+	+	EC22	+	+
EC8	+	+	EC23	+	+
EC9	+	+	EC24	+	+
EC10	+	+	AZ1	+	+
EC11	+	+	AZ2	+	+
EC12	+	+	AZ3	+	+
EC13	+	+	AZ4	+	+
EC14	-	+-	AZ5	+	+
EC15	+	+	BC	+	+

หมายเหตุ 1) ตรวจสอบ ผลบวก (+) พบการเจริญบนอาหาร NFB Agar

2) ยีนยัน ผลบวก (+) พบ Pellicle formation ในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผลการทดสอบการสร้างสารซิดอโรฟอร์ (Siderophore production)

รหัส	Halo zone	Halo zone diameter (mm)	Growth diameter (mm)	SPI
EC1	+	1.53	0.8	1.91
EC2	+	1	0.73	1.37
EC3	+	1.23	1.16	1.0
EC4	+	1.6	0.83	1.93
EC5	-	-	-	-
EC6	-	-	-	-
EC7	-	-	-	-
EC8	+	1.23	0.93	1.32
EC9	+	1.43	1.13	1.27
EC10	+	1.46	1	1.46
EC11	+	1.46	0.9	1.62
EC12	-	-	-	-
EC13	+	1.46	1	1.46
EC14	-	-	-	-
EC15	+	1.46	1.23	1.19
EC16	+	1.46	0.7	2.09
EC17	-	-	-	-
EC18	+	1.46	1.3	1.12
EC19	+	1.33	0.96	1.39
EC20	+	1.43	0.73	1.96
EC21	-	-	-	-
EC22	+	1.76	1.36	1.29
EC23	+	1.4	1.06	1.32
EC24	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัส	Halo zone	Halo zone diameter (mm)	Growth diameter (mm)	SPI
AZ1	+	1.36	1.03	1.32
AZ2	+	1.33	0.6	2.22
AZ3	+	1	0.5	2.00
AZ4	+	1.2	0.63	1.90
AZ5	-	-	-	-
BC	+	5.43	4.56	1.19

หมายเหตุ + หมายถึง ผลบวก เกิดบริเวณสีเหลืองหรือส้มรอบโคโลนี

- หมายถึง ผลลบ ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร

ตารางผลการทดสอบการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (Hydrogen cyanide production)

รหัส	สี	ระดับ HCN	รหัส	สี	ระดับ HCN
EC1	เหลือง	0	EC16	เหลือง	0
EC2	เหลือง	0	EC17	เหลือง	0
EC3	เหลือง	0	EC18	เหลือง	0
EC4	เหลือง	0	EC19	เหลือง	0
EC5	เหลือง	0	EC20	เหลือง	0
EC6	เหลือง	0	EC21	เหลือง	0
EC7	เหลือง	0	EC22	เหลือง	0
EC8	เหลือง	0	EC23	เหลือง	0
EC9	เหลือง	0	EC24	เหลือง	0
EC10	เหลือง	0	AZ1	เหลือง	0
EC11	เหลือง	0	AZ2	เหลือง	0
EC12	เหลือง	0	AZ3	เหลือง	0
EC13	เหลือง	0	AZ4	เหลือง	0
EC14	เหลือง	0	AZ5	เหลือง	0
EC15	เหลือง	0	BC	เหลือง	0

หมายเหตุ การเปลี่ยนสีของกระดาษ Whatman 0 = ไม่มีการเปลี่ยนสี (สีเหลือง) (ไม่มีการผลิต

HCN), 1 = สีน้ำตาลแดงอ่อน (มีการผลิต HCN), 2 = สีน้ำตาลแดงปานกลาง (มีการผลิต HCN),
 3 = สีน้ำตาลแดงเข้ม (มีการผลิต HCN)
 เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากไม่มีเหตุใดแต่ส่งเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางการผลทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsica* ด้วยวิธีการ

Dual Cultures

รหัส	R1 (mm)	R2 (mm)	%PIRG	รหัส	R1 (mm)	R2 (mm)	%PIRG
Control	50						
EC1	50	-	-	EC16	50	-	-
EC2	50	-	-	EC17	50	33.3	
EC3	50	-	-	EC18	50	-	-
EC4	50	-	-	EC19	50	43	
EC5	50	-	-	EC20	50	-	-
EC6	50	-	-	EC21	50	-	-
EC7	50	-	-	EC22	50	39.6	
EC8	50	-	-	EC23	50	-	-
EC9	50	-	-	EC24	50	-	-
EC10	50	-	-	AZ1	50	-	-
EC11	50	-	-	AZ2	50	-	-
EC12	50	36.6		AZ3	50	-	-
EC13	50	-	-	AZ4	50	-	-
EC14	50	41.3		AZ5	50	37.3	
EC15	50	-	-	BC	50	33.3	

หมายเหตุ - หมายถึง ผลลบ ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางการผลทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วย
วิธีการ Dual Cultures

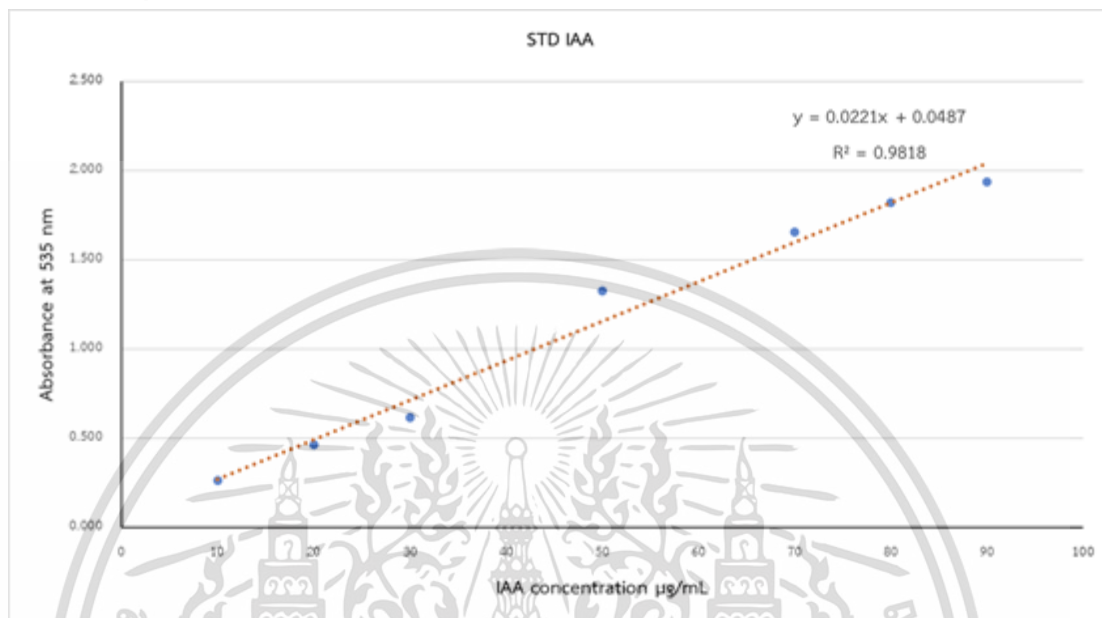
รหัส	R1 (mm)	R2 (mm)	%PIRG	รหัส	R1 (mm)	R2 (mm)	%PIRG
Control	63.3						
EC1	63.3	-	-	EC16	63.3	-	-
EC2	63.3	-	-	EC17	63.3	39.3	
EC3	63.3	-	-	EC18	63.3	-	-
EC4	63.3	-	-	EC19	63.3	43.3	
EC5	63.3	-	-	EC20	63.3	-	-
EC6	63.3	-	-	EC21	63.3	-	-
EC7	63.3	-	-	EC22	63.3	-	
EC8	63.3	-	-	EC23	63.3	-	-
EC9	63.3	-	-	EC24	63.3	-	-
EC10	63.3	-	-	AZ1	63.3	-	-
EC11	63.3	-	-	AZ2	63.3	-	-
EC12	63.3	44.3		AZ3	63.3	-	-
EC13	63.3	-	-	AZ4	63.3	-	-
EC14	63.3	39.3		AZ5	63.3	36.7	
EC15	63.3	-	-	BC	63.3	33.3	

หมายเหตุ - หมายถึง ผลลบ ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

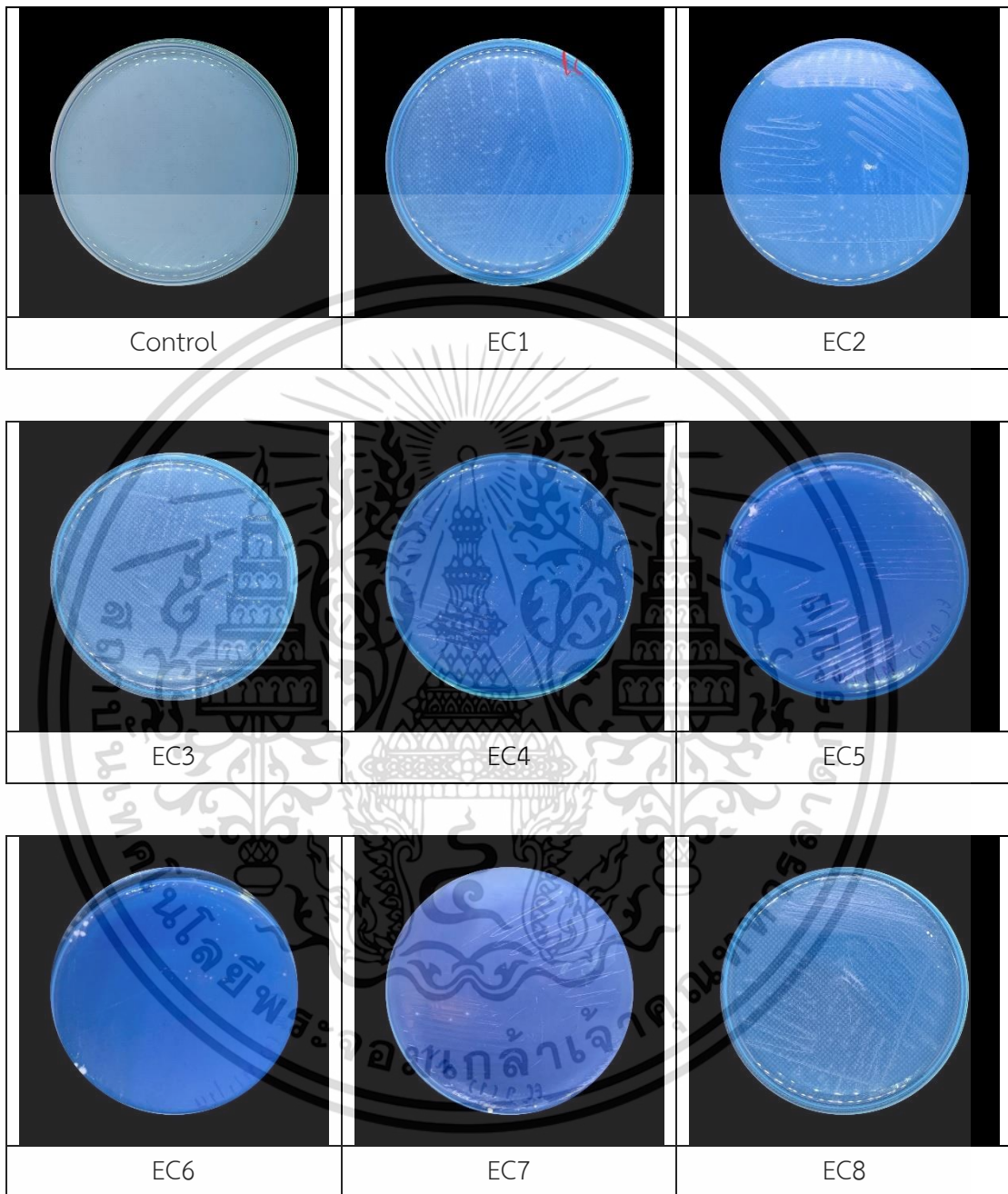
ภาคผนวก จ

กราฟมาตรฐาน

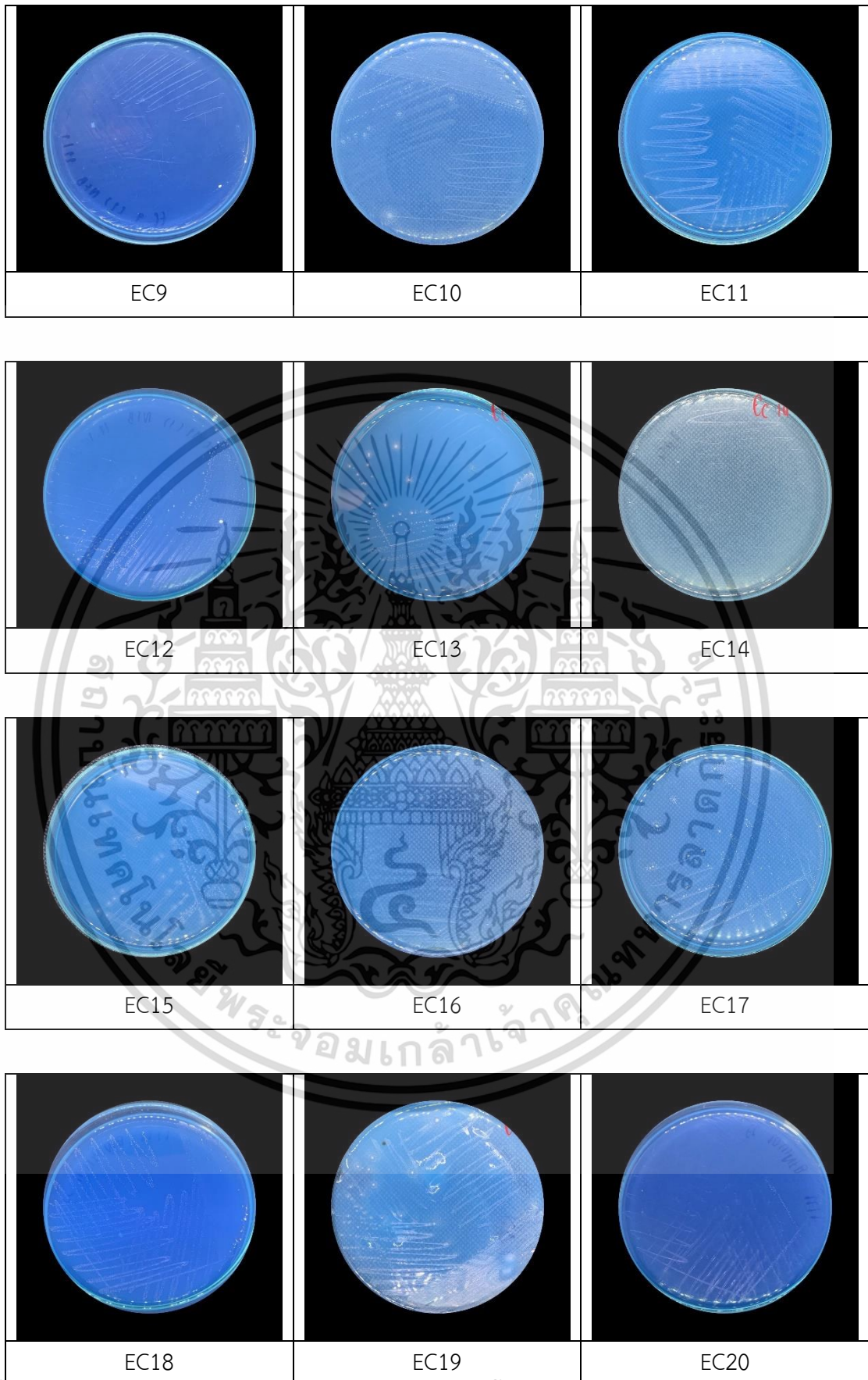
กราฟมาตรฐานปริมาณสารกรดอินโดล-3-แอซิติค $\mu\text{g/ml}$ (Indole-3-acetic acid : IAA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

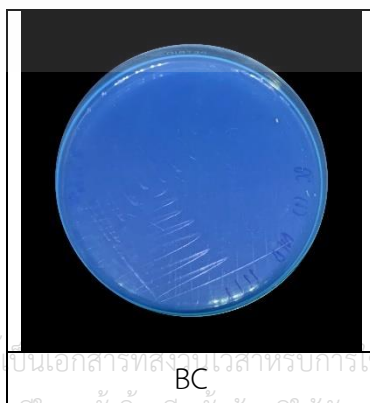
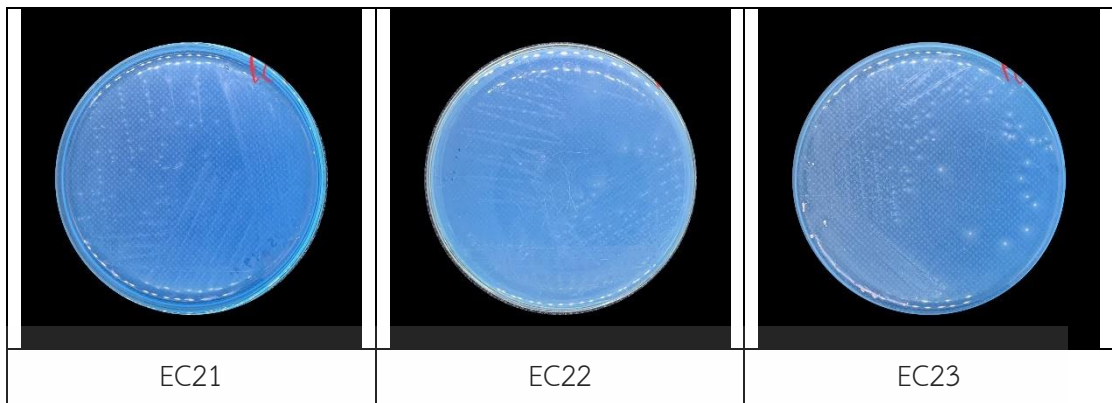
ภาคผนวก ฉ
การทดสอบการตรึงไนโตรเจน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

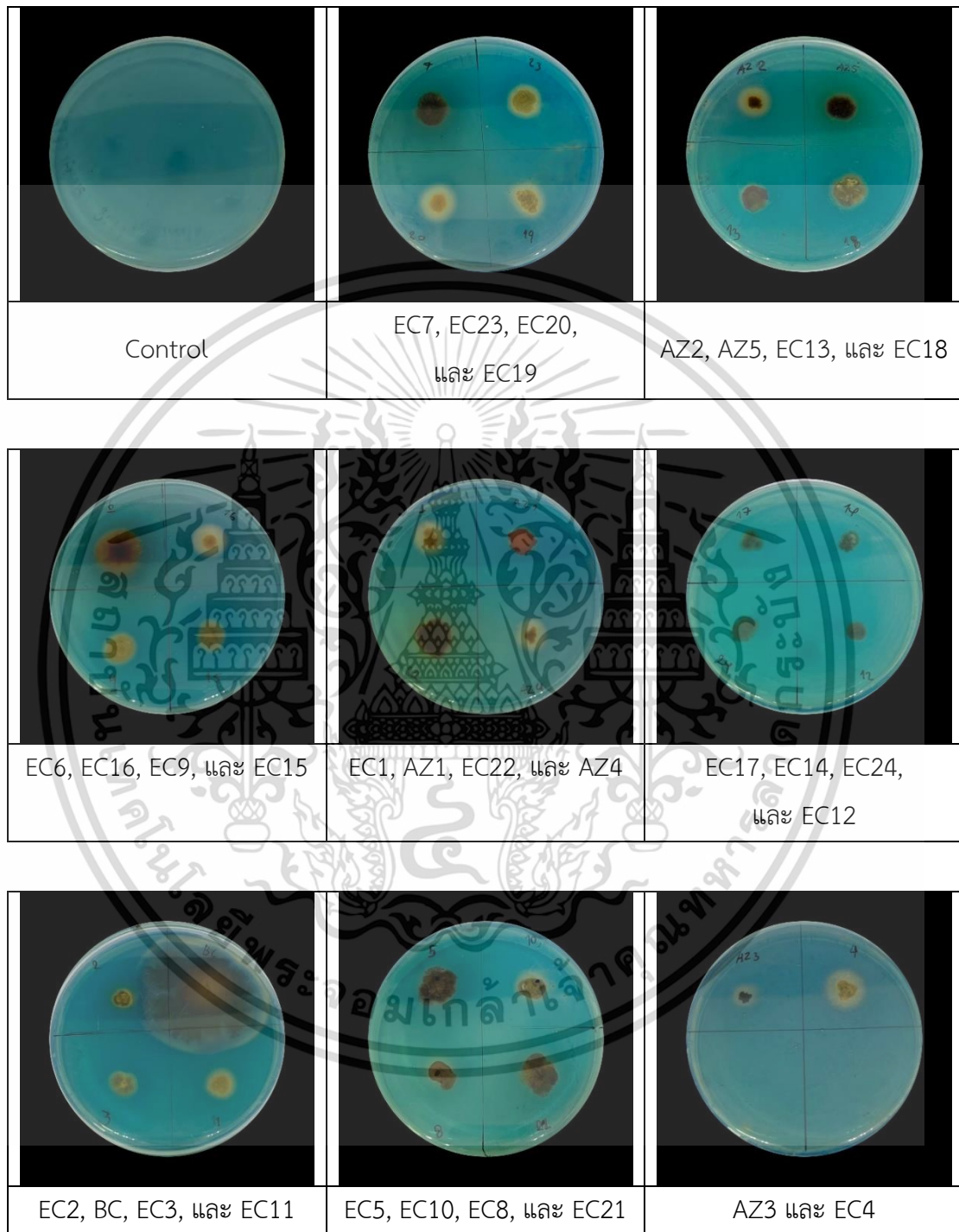


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



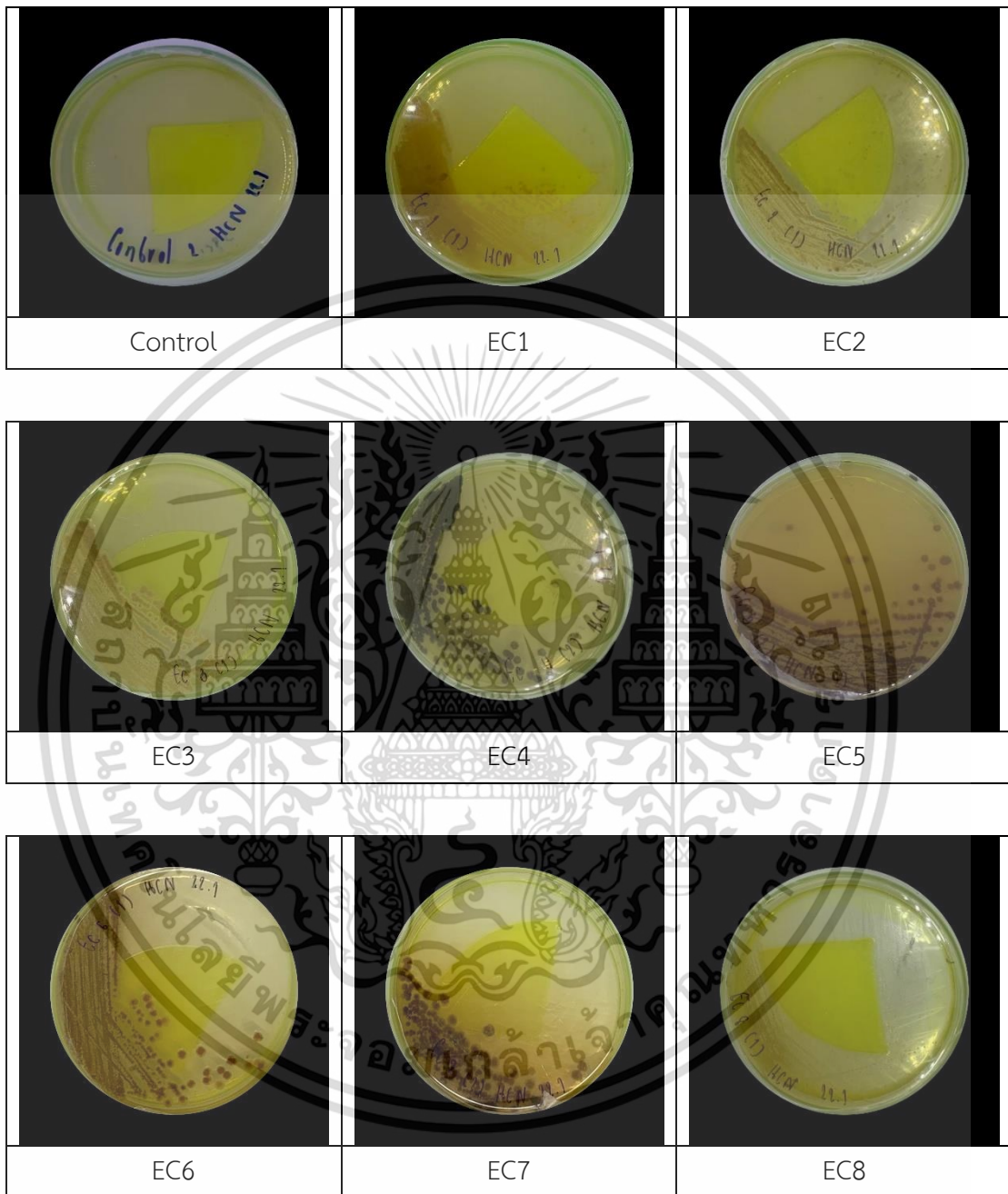
เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับครูอาจารย์ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การสร้างสารซิดอโรฟออร์ (Siderophore production)

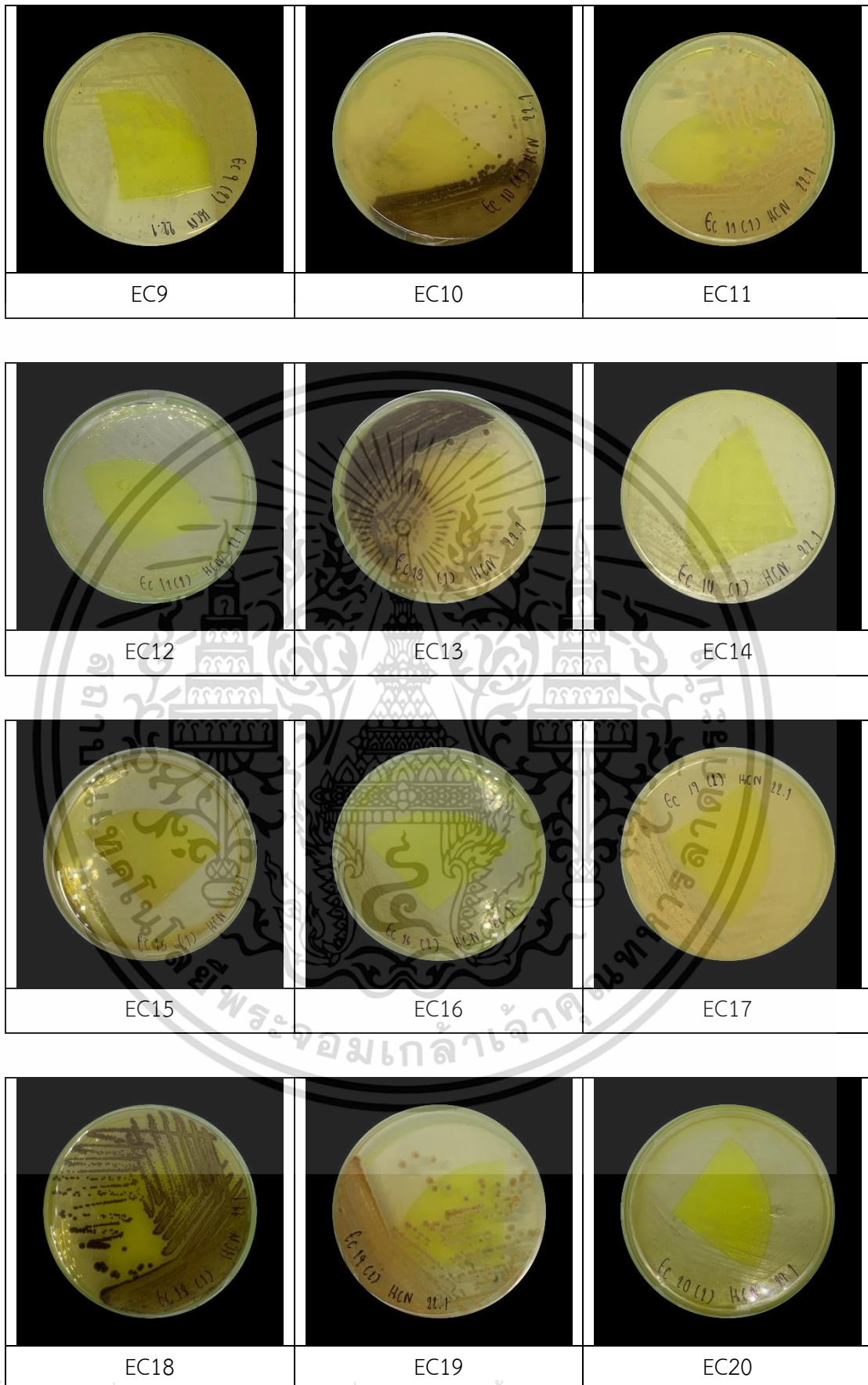


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

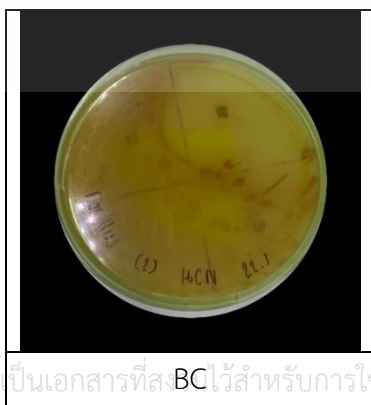
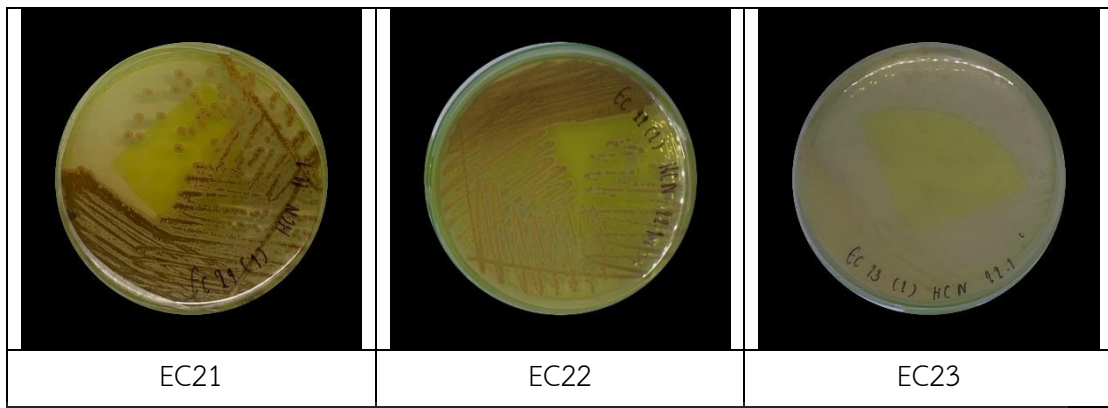
ภาคผนวก ข
การผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

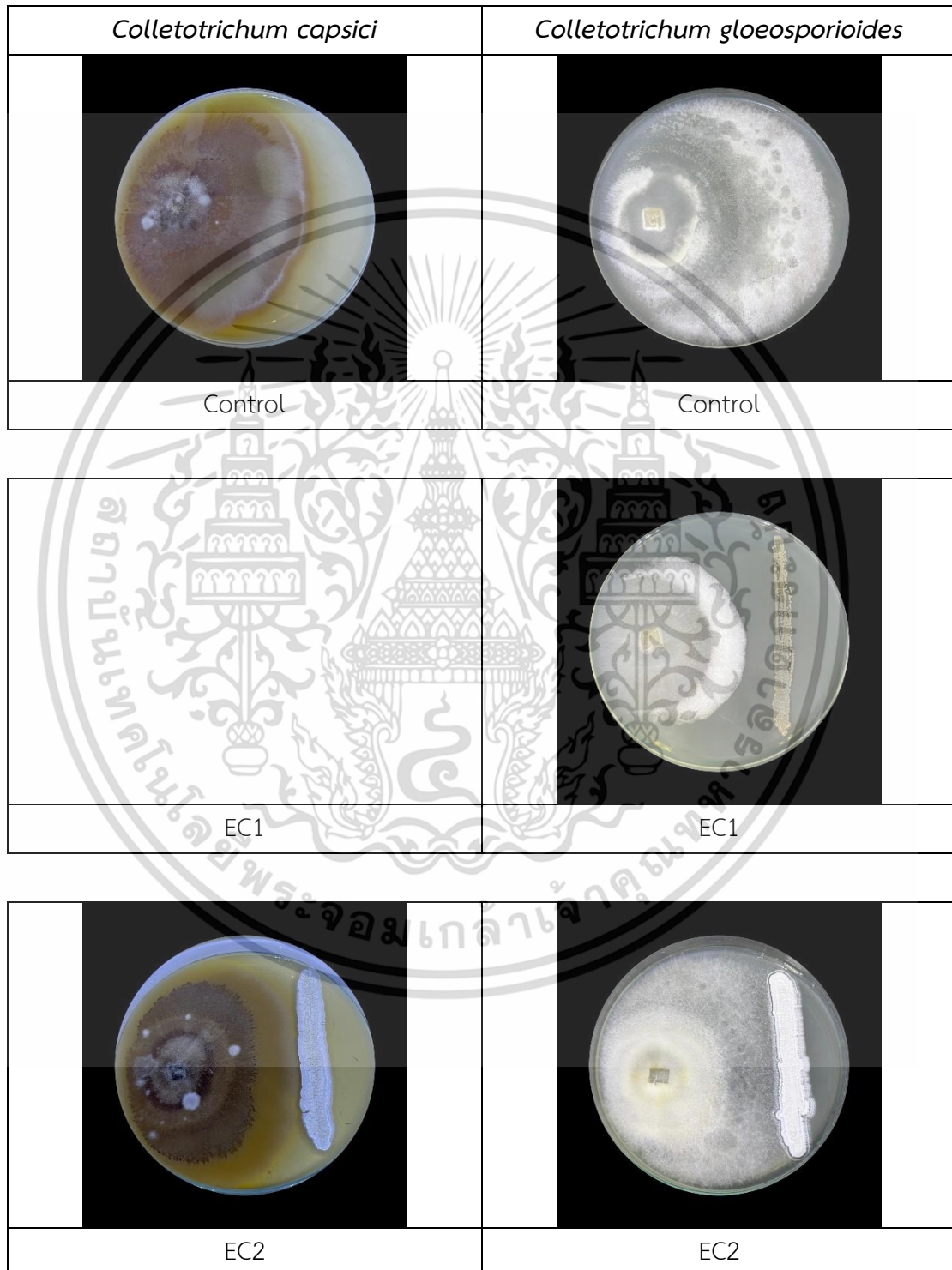


เอกสารนี้เป็นเอกสารทสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

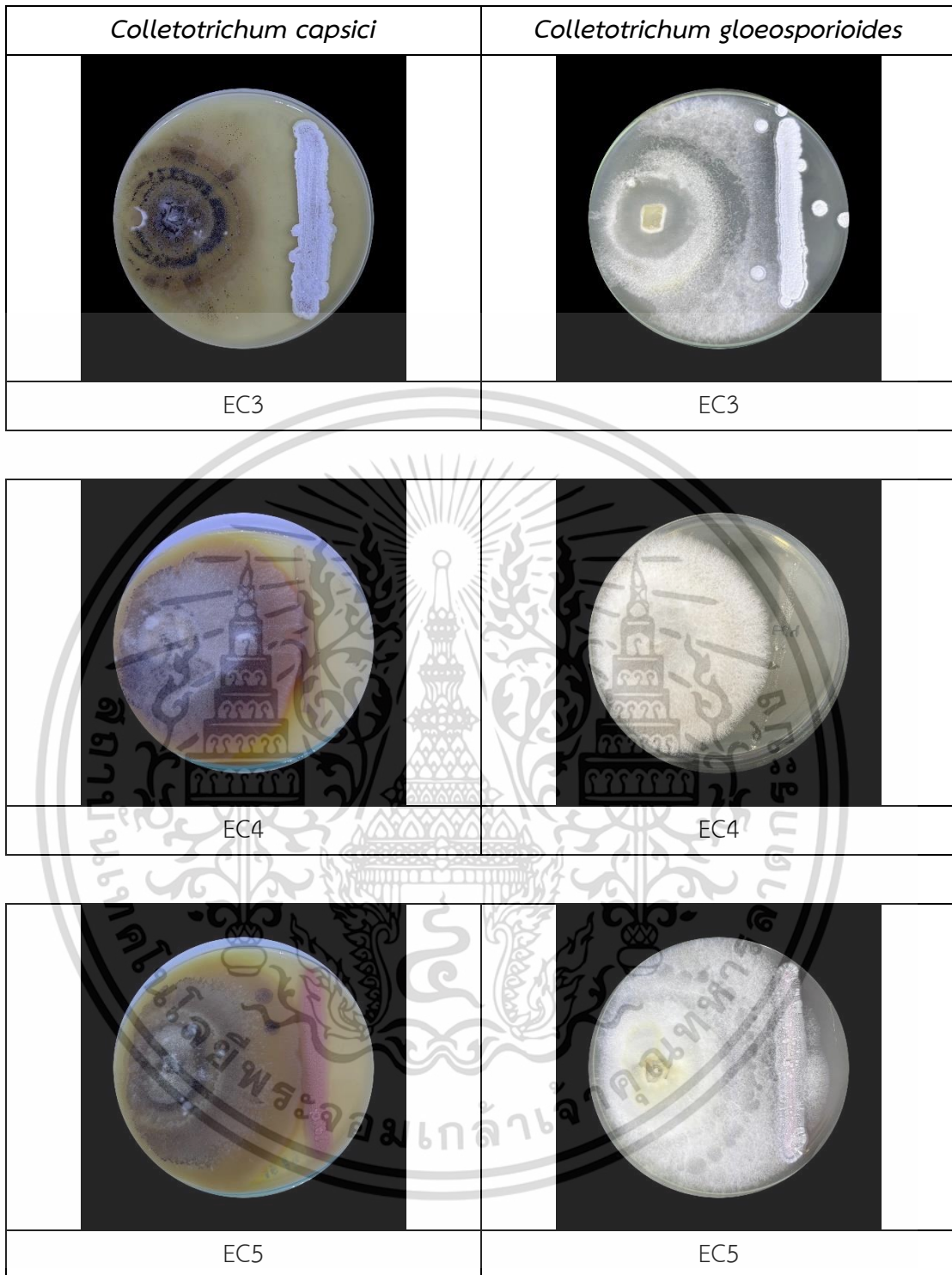


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงBCไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

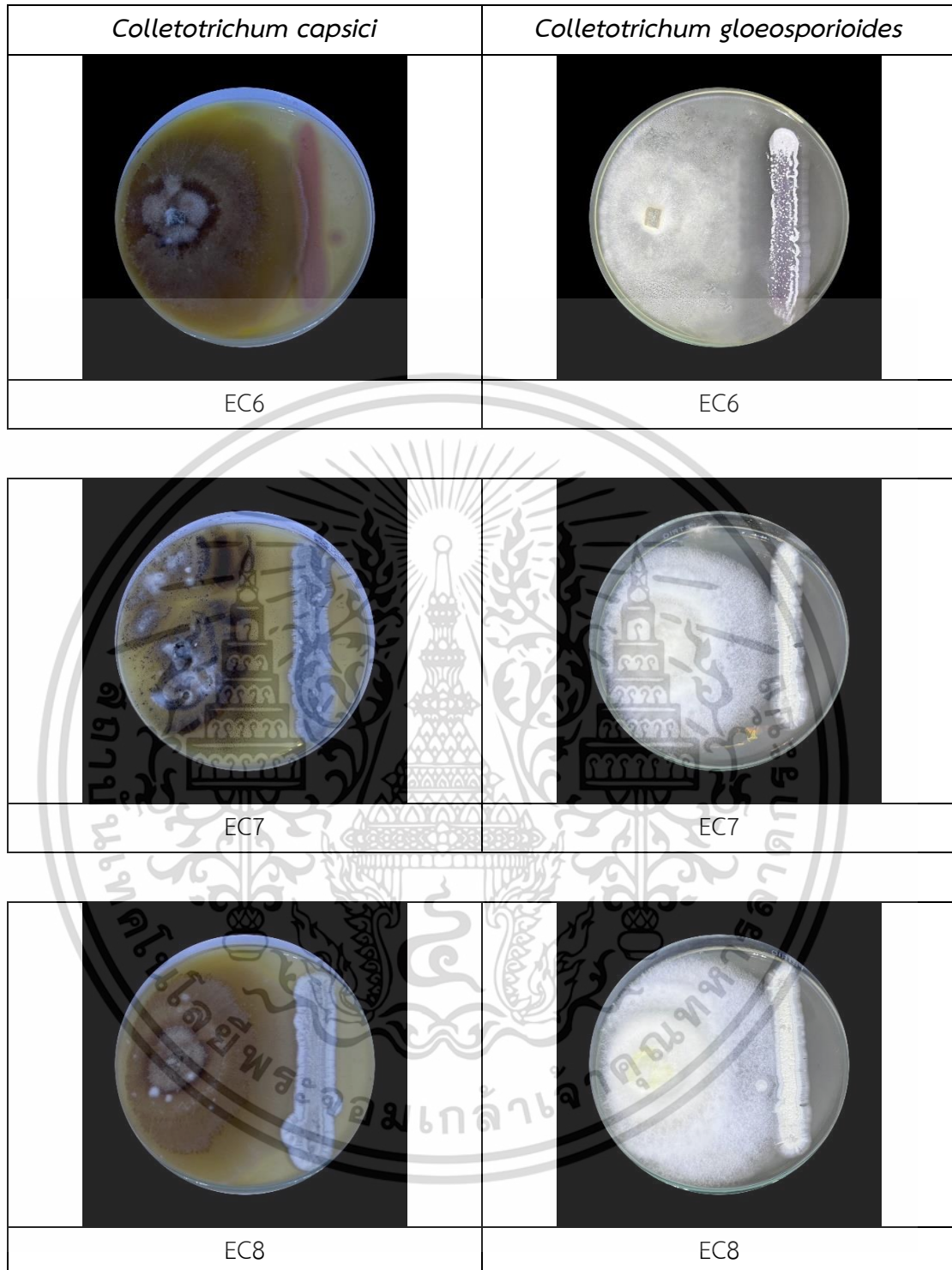
ภาคผนวก ฅ
 การทดสอบการยับยั้ง *Colletotrichum capsici* และ
Colletotrichum gloeosporioides ด้วยวิธี Dual culture



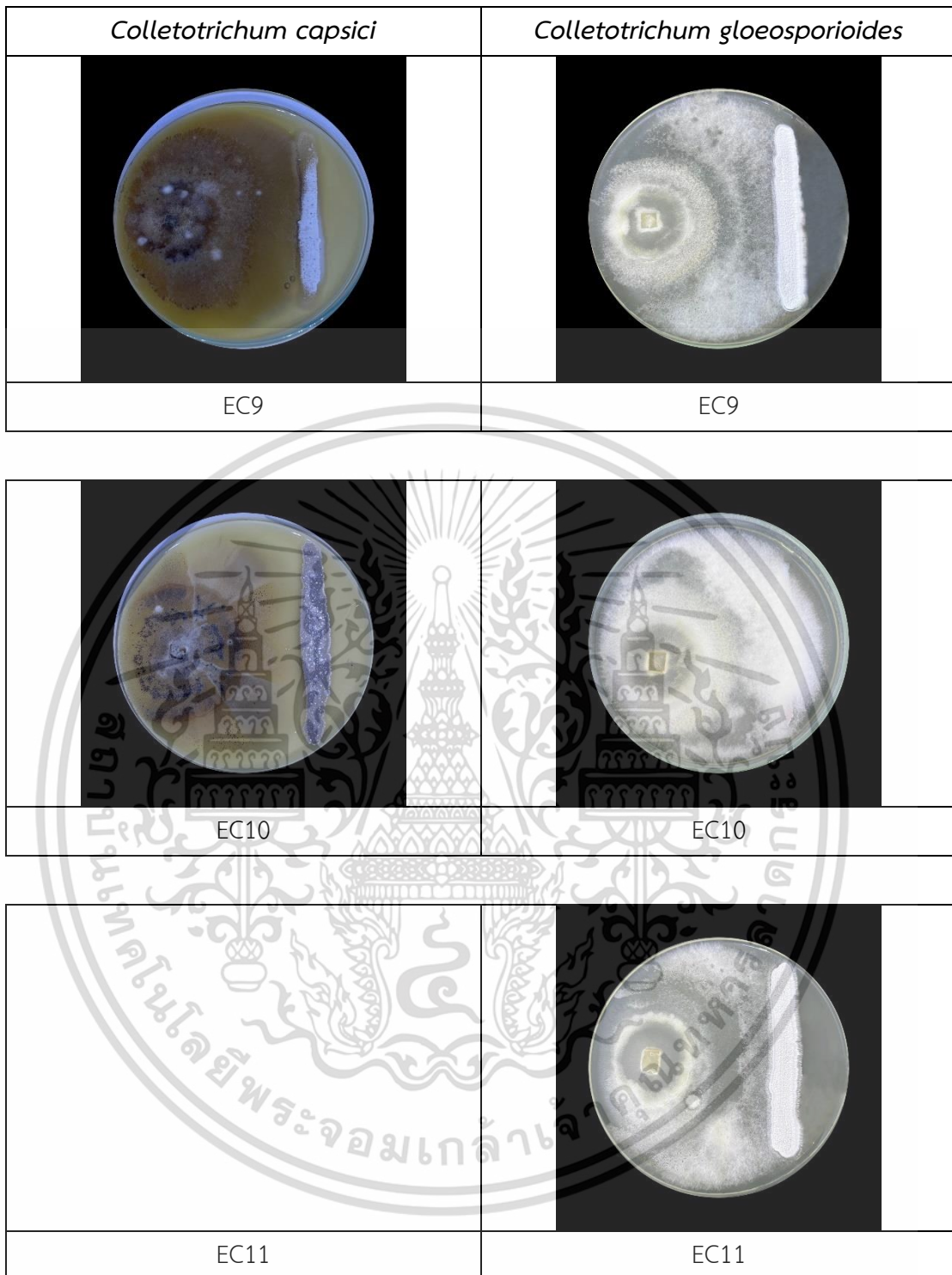
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



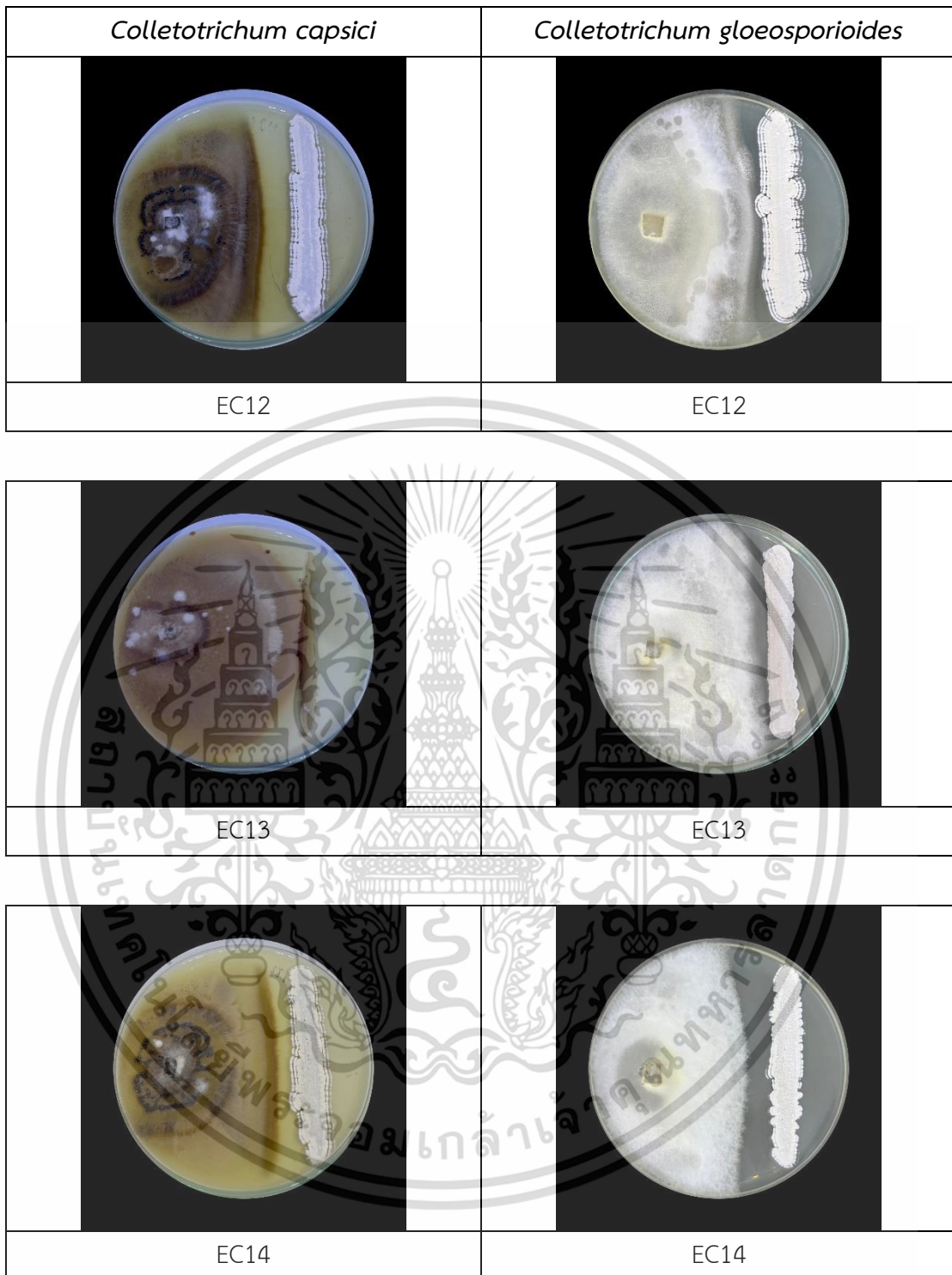
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



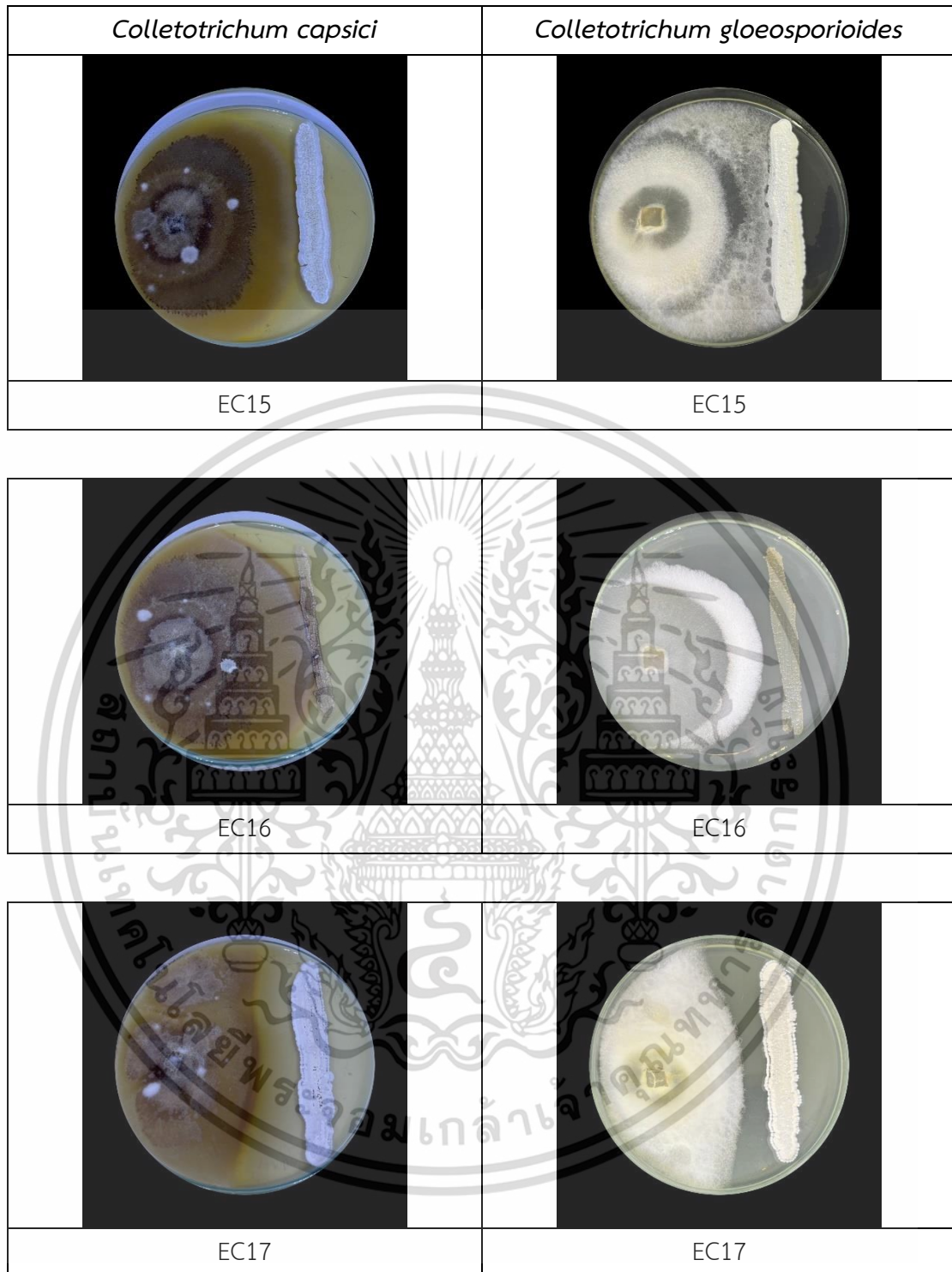
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



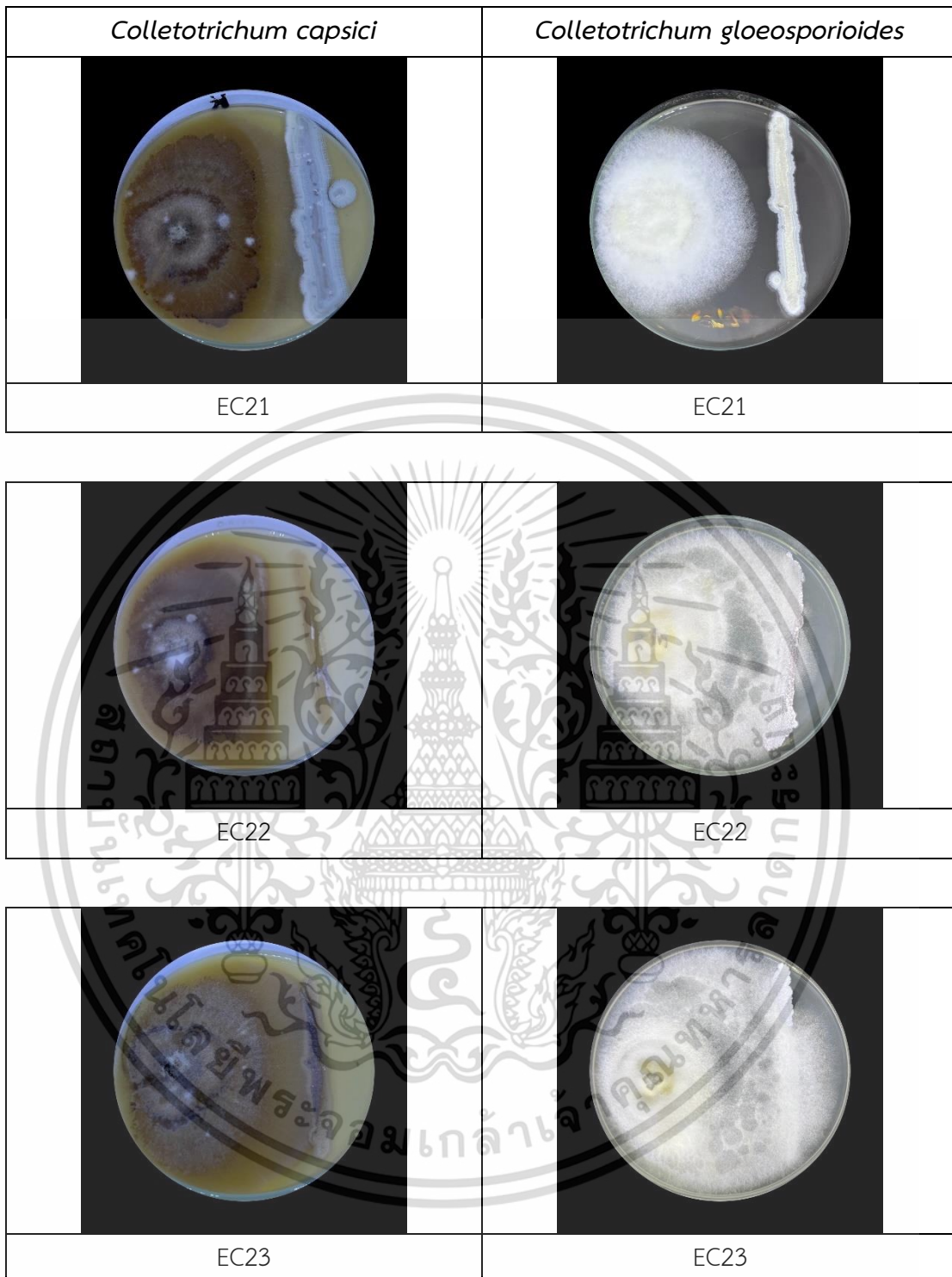
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



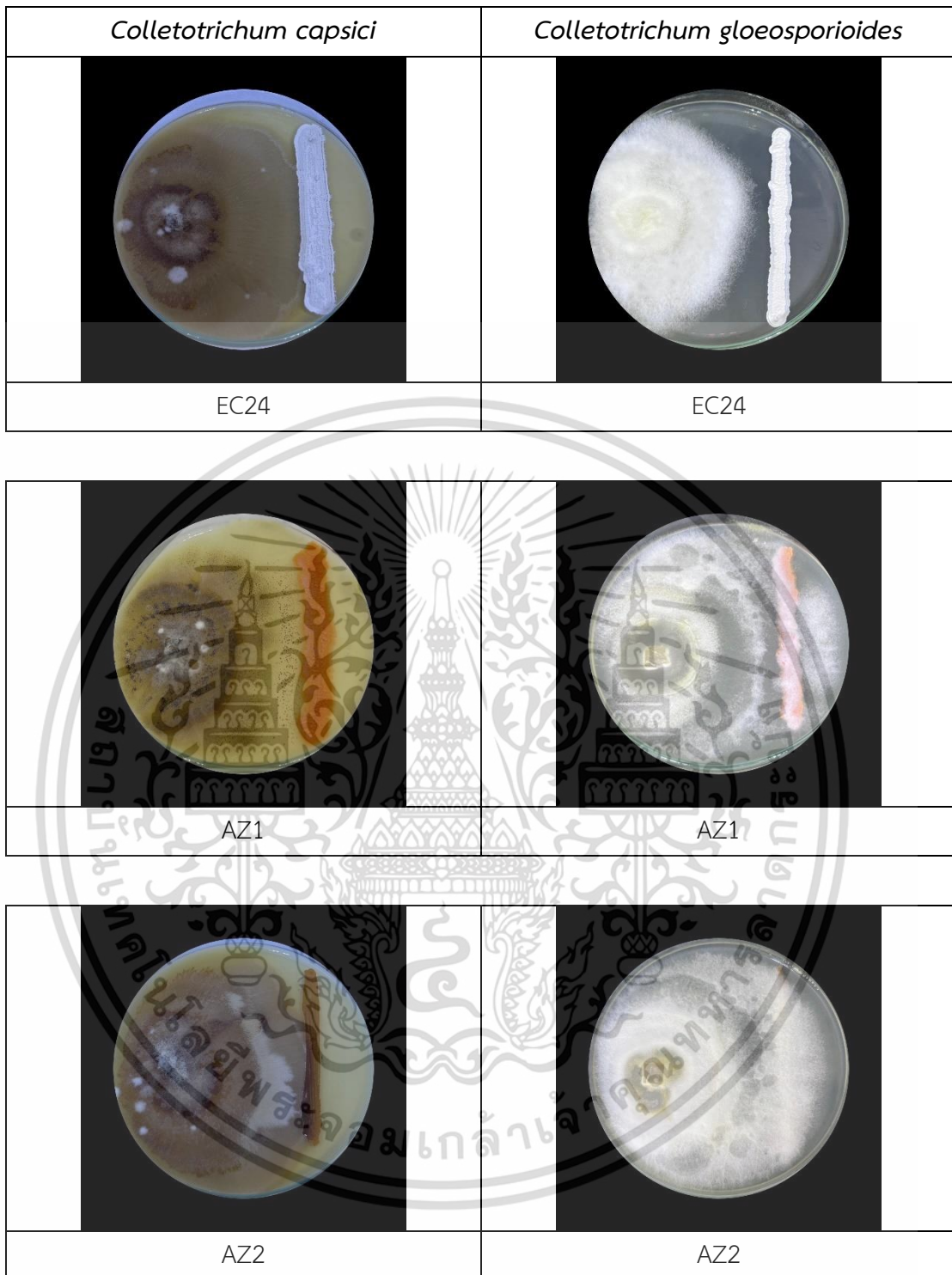
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



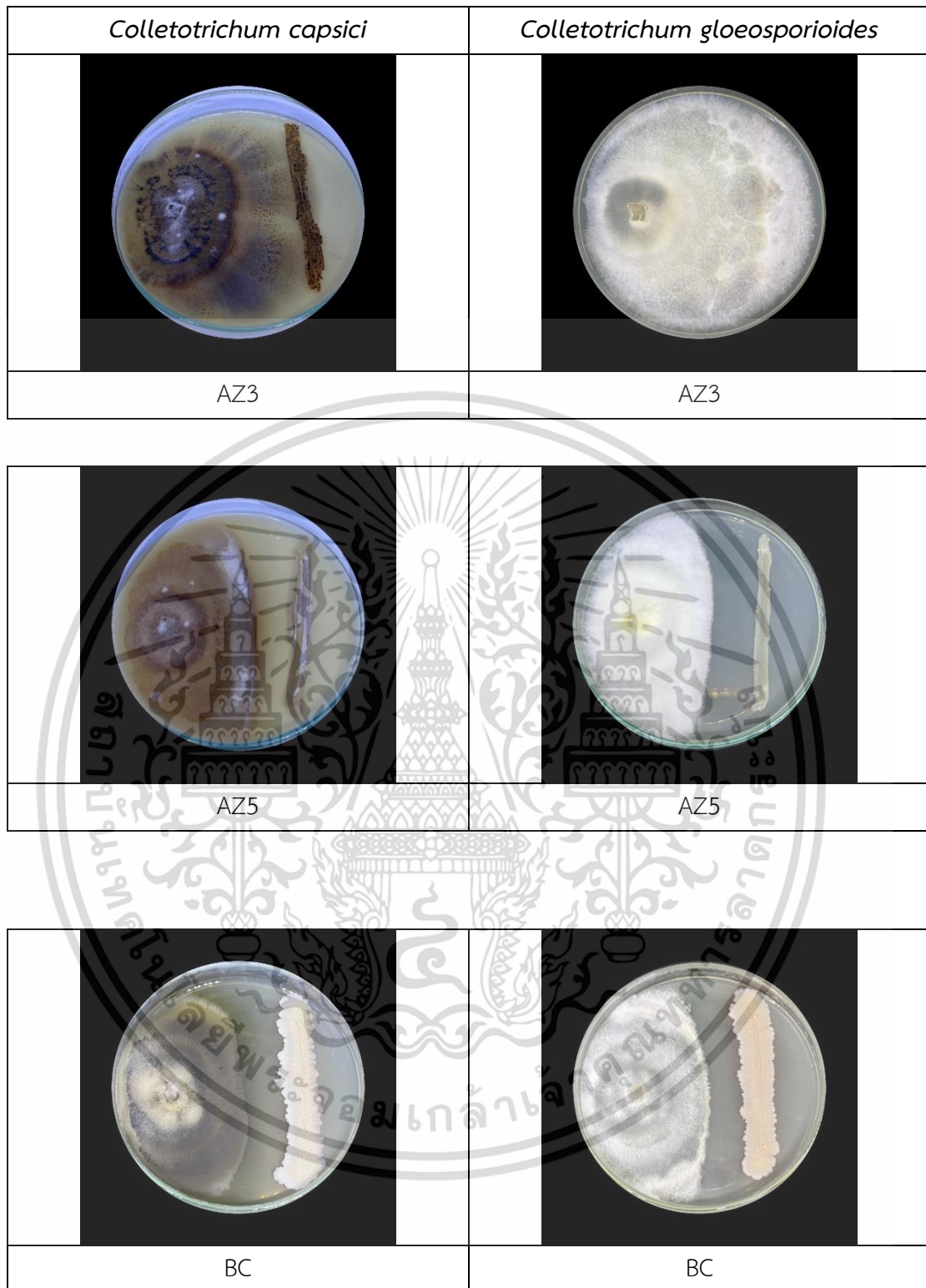
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ญ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสีท์ที่คัดเลือก

>EC12

GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGA
 AGCCGCTTCGGTGGTGGATTAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACT
 CTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACGGGATCGCATGGTCTCCGTG
 TGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCT
 ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCG
 ACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCGAGT
 GACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTG
 CGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAA
 AGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGCAGGGGAGATT
 GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGAT
 CTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG
 TAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCGGCATTCCACGTCGTCCGTGCCGACG
 TAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGG
 GGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGC
 TTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCAT
 GGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTC
 TGTGTTGCCAGCAACTCCTTTTAGGAGGTTGGGACTCACGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGG
 AGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAA
 TGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTC
 GGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGC
 TGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACC
 CGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGGAGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGAC
 GAAGTCTGTCTTTATACACATCTGACGCTGCCGACGAGTGT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

>EC14

CGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTTACGACTTCGTCCCAATCGCCAGTCCCACCTTC
 GACGATCCCTCCCACAAGGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGA
 CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGC
 GACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGAGATT
 CGCTCCACCTCACGGCATCGCAGCTCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGAC
 ATAAGGGGCATGATGACTTGACGTGTCGTCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCCG
 TGAGTCCCCAACCTCCTAAAAGGAGTTGCTGGCAACACAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGG
 ACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACA
 AGGGGGGCGGTATCTCTACGGCTTTCGGGTGTATGTCAAGCCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGC
 GTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCT
 TGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACGACGTGGAATGC
 CGCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCC
 CACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCTCC
 TGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATCCAATCTCCCCTGCCGAACTCTAGCCTGCC
 CGTATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGCGACAAGCCGCCTAC
 GAGCTCTTACGCCCAATAATTCGGGACAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
 CGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCGCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGT
 TTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCA
 ATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCCG
 CCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCTTGGTAGGCCATCACCCACCAACAAGCTGATAGG
 CCGCGGGCTCATCCTGCACCGCCGGAGCTTTCACACGAGACCATGCGATCCCGTGTGCATATC
 CGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTTGTCCAGAGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTACTC
 ACCCGTTCGCCACTAATCCACCACCGAAGCGGCTTCATCGTTGACTTGCATGTGTTAAGCACGC
 CGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAACCTCACTGTTACCTTGTACGACTTCCTGAGCCA
 GGATCAAAC

>EC17

GGCATACGAGATCTAGTACGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTTCGTCCCA
 ATCGCCAGTCCCACCTTCGACGATTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTA
 CCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGC
 TGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเป็นเจ้าของเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิใช่อยู่ใต้เงื่อนไขลิขสิทธิ์
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GACCGGCTTTTTGAGATTGCTCCACCTCACGGCATCGCAGCTCATTGTACCGGCCATTGTAGCA
 CGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGAGTTG
 ACCCCGGCAGTCTCCCGTGAGTCCCCAACCTCCTAAAAGGAGTTGCTGGCAACACAGGACAAGG
 GTTGCCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCA
 CCTGTACACCGACCACAAGGGGGGCCGTATCTCTACGGCTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGA
 AGGTTCTTCGCTTTCGCTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
 CCTTTGAGTTTTAGCCTTTCGCGCCGTAATCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCA
 CGGACGACGTGGAATGCCGCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTAT
 CTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTC
 GCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATCCAATCTCCCCTG
 CCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGA
 CGCGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTCGCACCCCTACGTAT
 TACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTCTTCTGTCAGGTACCGTCACTCGCGCTTCT
 TCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCACGCGGCGTGCCTGCATCAGG
 CTTGCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGT
 CCCAGTGTGGCCGGTCCGCCCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCTTGGTAGGCCATCACCCC
 ACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCACCCGCGGAGCTTTCACACGGAGACCATG
 CGATCCCGTGTATATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTTGTCCCAGAGTGCAGGGCAGAT
 TGCCACGCTGTTACTCACCCGTTCCGCCACTAATCCACCACCGAAGCGGCTTCATCGTTGACTTG
 CATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCG

>EC19

GCAGAAGACGGCATAAGAGATTACTCACGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGG
 GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTGAACGATGAACCACTTCGGTGG
 GGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTG
 GAAACGGGGTCTAATAACCGGATACTGATCCTCGCAGGCATCTGCGAGGTTGAAAGCTCCGGCG
 GTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACG
 GGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGG
 ATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG
 AAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGG
 AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCCGGGGCTTAA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การเชิงพาณิชย์เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT
 AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATAC
 TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 AACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTG
 CCCCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
 CGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCG
 GAAAACCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCAGC
 TCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGGCCAGCA
 GGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGAC
 GACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGA
 GCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCA
 ACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTT
 CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCA
 ACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCTG

>EC22

TACGAGATAACAGCGCTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCTCAGGACGAACG
 CTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAA
 CGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAA
 TACCGGATACTGATCCTCGCAGGCATCTGCGAGGTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCC
 CGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGA
 GAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
 GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG
 TTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTA
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
 AGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCCGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGT
 CGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGC
 AGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCG
 AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAG
 GTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGT
 ACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGG
 CTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCCTGGAGAC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของโครงการแข่งขันเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยูทิลิตีนาใช้ขอระเบียนที่นักการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AGGGTCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATG
 TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGT
 GGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCA
 TGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA
 GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAA
 GTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
 ACCGCCCGTACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAG
 GGAGCTGTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAACAGTTGAGTTTGA
 TCCTGGCTCAGGAAGTCGTAACAAGGTAACAGTTGAGTTTGATCCTGGC

>AZ1

TACACATGAACACTCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCTCAGGACGAACGCTGG
 CGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGTGCGCAACGGG
 TGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCTTGGGAACTGGGTCTAATACC
 GGATATGACCATGGGATGCATGTTCTGTGGTGGAAAGCTTTTGGCGGTGTGGGATGGCCCCGCGG
 CCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGG
 CGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
 TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA
 AACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGC
 TCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCGTCTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGTTGGCTTGCAGGCGATA
 CGGGCAGACTTGAGTATTTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATA
 TCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGAAATAACTGACGCTGAGGAGCGAAAG
 CGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGT
 GGGTTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGG
 CCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAA
 TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGT
 CCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCGGATTATGCCGGGGACTCGCA
 GGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGT
 CCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAA
 TCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGG

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนลิขสิทธิ์การเชิงงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเนื้อหาเบีเซอกระโฮชนด้นการศึกษ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
 ACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCTAACCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAAG
 GTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACACTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAG
 ACGCGTAGTAATCTCGTATGCCGTCTTCTGCT

>AZ5

TACGAGATAACATGGAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGTACGACTTCGTG
 CCAATCGCCAGTCCCACCTTCGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTG
 TTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAA
 TGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACT
 GAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCACCTCGCGGTATCGCAGCTCATTGTACCGGCCATTGTAG
 CACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGT
 TGACCCCGGCGGTCTCCCGTGAGTCCCCAGCACCACAAGGGCCTGCTGGCAACACGGGACAAG
 GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACC
 ACCTGTACACCGACCACAAGGGGGACCCTGTCTCCAGGGTTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGG
 TAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCAATTAAGCCACATGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA
 TTCCTTTGTAGTTTTAGCCTTTCGCGCCGTAATCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGG
 CACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACCTAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGT
 ATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCT
 TCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCC
 TACCGAACTCTAGCCTGCCGTATCGACTGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACC
 GACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTTCGCGCCCTACG
 TATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTT
 CTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTTCGCTGCATCA
 GGTTTTCGCCATTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCA
 GTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTGTAGCCGTTACC
 TCACCAACTAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCACCGCCGGAGCTTTCGAACCTCGCAGAT
 GCCTGCGAGGATCAGTATCCGGTATTAGACCCGTTTCCAGGGCTTGTCCCAGAGTGCAGGGCA
 GATTGCCACGTGTTACTACCCGTTCCGCACTAATCCCCACCGAAGTGGTTCATCGTTTCGACTT
 GCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCCTGAGCCCTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCC
 ACGAGACTCCATGTTA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

>BC

TCTACACATGAACACTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCTCAGGACGAACGC
 TGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCG
 GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
 GCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTT
 ACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGT
 AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
 GCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
 AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACC
 TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAG
 AGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCG
 ACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACC
 TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCA
 GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
 TCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGGTGGT
 GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
 GATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
 GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAG
 AACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGC
 AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA
 ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCG
 GTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCTGTCT
 CTTATACACATCTGACGCTGCCGACGAGTGTTTCATGTGTAGATCT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 11 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2567

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว ชลธิชา มีนทร์ รหัสประจำตัว 63050465

นาย/นาง/นางสาว อธิษฐาน อ่อนจันทร์ รหัสประจำตัว 63050537

นาย/นาง/นางสาว รหัสประจำตัว

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา ศึกษาศาสตร์ สาขาวิชา ศึกษาศาสตร์ ภาควิชา ศึกษาศาสตร์

ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การคัดเลือกและเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากผักตบชวา และ Azolla sp.

ชื่อภาษาอังกฤษ Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Actinomyces from Floating plants, Eichhonia crassipes (C. Mart) Solms and Azolla sp.

ปีการศึกษา 2566

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 2.45 % หรือโปรแกรม Turnitin %

ลงชื่อ ชลธิชา มีนทร์

ลงชื่อ อธิษฐาน อ่อนจันทร์

ลงชื่อ

(ชลธิชา มีนทร์)

(อธิษฐาน อ่อนจันทร์)

()

นักศึกษา

นักศึกษา

นักศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าพเจ้า ศ. / (รศ.) / ผศ. / ดร. / อ. ดร. จิตต์ ภาโว..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ..... ลงชื่อ..... ลงชื่อ.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้