รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช

Screening of Soil Bacteria for Plant Growth Promoting Activity

ดร.สมพิศ สอนโยธา

ดร.อัจฉรา ธรรมรัตน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณสนับสนุนทุนวิจัยด้วยเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช

Screening of Soil Bacteria for Plant Growth Promoting Activity

ดร.สมพิศ สอนโยธา

ดร.อัจฉรา ธรรมรัตน์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

12740640

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณสนับสนุนทุนวิจัยด้วยเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช
แหล่งเงิน งบประมาณสนับสนุนทุนวิจัยด้วยเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ 2557 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2556 ถึงตุลาคม 2557
หัวหน้าโครงการ ดร.สมพิศ สอนโยธา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ผู้ร่วมโครงการวิจัย ดร.อัจฉรา ธรรมรัตน์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 73 ไอโซเลท และเชื้อบาซิลลัสจำนวน 56 ไอโซเลท แยกจากดินรอบรากต้นข้าวจากศูนย์บริการและถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตรประจำตำบลศาลากลาง อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรี ดินบริเวณรากข้าว จังหวัดสระบุรี และจากหน่วยวิจัยทางเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แสดงกิจกรรมยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ จำนวน 17 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 23.29 โดยไอโซเลท G8-6 DCWR-9-1 D315R-9-6 และเชื้อบาซิลลัสจำนวน 11 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 19.64 โดยไอโซเลท E-4B51 I17 และ I1 พบว่าสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างมีนัยสำคัญ การทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติก ทำโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของสารเฟอร์ริกคลอไรด์ กรดเปอร์คลอริกที่ใช้ในการทดสอบ การย่อยสลายฟอสเฟตและการสร้างสารซิเดอโรฟอร์ ทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัสบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง Yeast extract-malt extract และ Nutrient agar ตามลำดับ โดยเติมแคลเซียมฟอสเฟตร้อยละ 15 ลงบนอาหารแข็ง และบนอาหารแข็ง chromo azurol S ตามลำดับ ผลที่ได้พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ 18 ไอโซเลทคิดเป็นร้อยละ 24.66 ส่วนเชื้อบาซิลลัสที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ 19 ไอโซเลทคิดเป็นร้อยละ 33.93 เชื้อแอคติโนมัย สีทที่สามารถผลิตสารซิเดอโรฟอร์ได้ 62 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 84.93 ส่วนเชื้อบาซิลลัส 21ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 37.5 และเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติย่อยสลายฟอสเฟต 2 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 2.74 ส่วนบาซิลลัส 7 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ12.5 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท NR8-15 NR9-13 AM6 DH315-4-15 DH31L-4-17 U039R-4-6 LB-5-1-3 AT2L-11 PCWR-4-3 PP2R-4-11 PP2R-8-1 AT2L-14 PCWR-8-1 DCWR-8-5 และพบเชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I5 I15 B-4B44 C-5B46 สามารถผลิตได้ทั้งกรดอินโดลอะซิติกและซิเดอโรฟอร์ การใช้ประโยชน์จากเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัสที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญซองพืชที่แยกได้ในครั้งนี้ต้องการการศึกษาต่อไป เพื่อนำไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้

คำสำคัญ : แอคติโนมัยสีท กรดอินโดลอะซิติก ซิเดอโรฟอร์ ฟอสเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Screening of soil bacteria for plant growth promoting activity

Researcher: Dr.Sompit Sornyotha, Department of Biology Faculty of Science KMITL

Dr.Uschara Thumarat, Department of Biotechnology Faculty of Agro-Industry Prince of Songkla University

ABSTRACT

Seventy three actinomycete isolates and fifty six *Bacillus* isolates were isolated from soils in Agricultural Technology Transfer and Service Center, Salakang District, Nonthaburi province, Saraburi province and ACTINOBACTERIAL RESEARCH UNIT, Faculty of Science King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. The generic identities of these isolates were determined by using a procedure of morphological analysis.

In this study, 17 actinomycete isolates (23.29%) and 11 *Bacillus* isolates (19.64%) inhibit microbial growth. The actinomycete isolates are G8-6 DCWR-9-1 D315R-9-6 and the *Bacillus* isolates are E-4B51 I17 and I1 showed the significant ability the growth of microorganism. The indole-3-acetic acid (IAA) production test was assayed by colorimetrically using ferric chlorideperchloric acid reagent. Phosphate solubilization and siderophore production were tested qualitatively by plating the actinomycete and *Bacillus* strain in yeast extract-malt extract agar supplemented with 15% calciumphosphate and chrome azurol S agar, respectively. The results show that 18 actinomycete isolates (24.66%) and 19 *Bacillus* isolates (33.93%) could produce IAA. There are 62 actinomycete isolates (84.93%) and 21 *Bacillus* isolates (37.5%) are positively could produce siderophore. The ability to solubilize precipitated phosphate was positively exhibited by 2 actinomycete isolates (2.74%) and 7 *Bacillus* isolates (12.5%). The actinomycete isolates NR8-15 NR9-13 AM6 DH315-4-15 DH31L-4-17 U039R-4-6 LB-5-1-3 AT2L-11 PCWR-4-3 PP2R-4-11 PP2R-8-1 AT2L-14 PCWR-8-1 DCWR-8-5 and *Bacillus* isolates I5 I15 B-4B44 C-5B46 were positively to IAA and siderophore producing traits. The actinomycete and *Bacillus* benefit are promoting plant growth and need further more study in enhancing plant growth.

Keywords : Actinomycetes Phosphate Indole-3-acetic acid Siderophore

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีต้องขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เป็นอย่างสูงในการอนุเคราะห์สถานที่วิจัยและอุปกรณ์ในการทำวิจัย รวมถึง ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว ในการอนุเคราะห์สารเคมีและการให้คำปรึกษาในด้านต่างๆ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังจากแหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณสนับสนุนทุนวิจัยด้วยเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ดร.สมพิศ สอนโยธา

ดร.อัจฉรา ธรรมรัตน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....i

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ii

กิตติกรรมประกาศ.....iii

สารบัญ.....iv

สารบัญตาราง.....vii

สารบัญภาพ.....vii

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....2

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....3

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5

2.1 การควบคุมโดยชีวิธี.....5

2.2 ออกซิน.....6

2.3 ซิดอร์โรฟอร์.....8

2.4 ฟอสเฟต.....9

2.5 เชื้อแอคติโนมัยสีท.....11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 เชื้อบาซิลลัส....17

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย....22

3.1 อุปกรณ์....22

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ....22

3.3 สารเคมี....22

3.4 วิธีการทดลอง....22

3.4.1 การเก็บตัวอย่างดิน การทดสอบดินตัวอย่างและวิธีการเตรียมดินตัวอย่าง....23

3.4.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทและกลุ่มบาซิลลัส....24

3.4.3 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ....24

3.4.4 ตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อที่มีการผลิตกรดอินโดลอะซิติก....24
ซิเดอโรฟอร์และการย่อยสลายสารฟอสเฟต

3.4.5 การคัดเลือกสายพันธุ์ปฏิปักษ์กับเชื้อก่อโรคพืช....26

บทที่ 4 ผลการวิจัย....27

4.1 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าว....27

4.2 ผลการตรวจสอบสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ....27

4.3 ผลการศึกษาการสร้างสารออกซินธรรมชาติ....63

4.4 ผลการศึกษาการสร้างสารซิเดอโรฟอร์....63

4.5 ผลการศึกษาการย่อยสลายฟอสเฟต....64

4.6 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ....67

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ....71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย.....73

6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้.....73

เอกสารอ้างอิง.....74

ภาคผนวก.....79

ประวัตินักวิจัย.....80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 รหัสเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง....28

4.2 รหัสเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง....29

4.3 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีท....45
บนอาหาร yeast extract – malt extract agar

4.4 ลักษณะการเจริญ สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อบาซิลลัส....62
บนอาหาร Nutrient agar

4.5 สรุปผลการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีทในงานวิจัยนี้....65

4.6 สรุปผลการศึกษาเชื้อบาซิลลัสในงานวิจัยนี้....66

4.7 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยสีท....67

4.8 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อบาซิลลัส....68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 เส้นใยเชื้อแอคติโนมัยสีท....12

2.2 สีและลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง....14

2.3 ลักษณะของสปอร์เป็นสายโซ่สั้น ๆ....15

2.4 ลักษณะการสร้างสปอร์ภายในถุงหุ้มที่เจริญจากเส้นใยอาหารและอากาศรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร....16

2.5 ลักษณะของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ*Bacillus* spp....20

4.1 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท AM5....30

4.2 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PCWR-4-3....31

4.3 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท DH315N-4-17....32

4.4 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท AT2L-14....33

4.5 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท G5-8....34

4.6 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PP2R-4-11....35

4.7 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PP2R-8-1....36

4.8 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท D315R-9-6....37

4.9 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท DCWR-9-1....38

4.10 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท G8-6....39

4.11 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PCWR-8-1....40

4.12 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท DH315-4-15....41

4.13 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PP2R-9-2....42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.14 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท DH31N-4-12....43

4.15 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท LB-5-1-3....44

4.16 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I1....46

4.17 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I5....47

4.18 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I7....48

4.19 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I12....49

4.20 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I15....50

4.21 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B5....51

4.22 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B16....52

4.23 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B30....53

4.24 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B42....54

4.25 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B44....55

4.26 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B45....56

4.27 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B46....57

4.28 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B47....58

4.29 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B49....59

4.30 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B50....60

4.31 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B53....61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย ทั้งนี้เพราะการเกษตรส่วนใหญ่ของประเทศปลูกข้าวเป็นพืชหลักปัจจุบันข้าวยังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและนอกประเทศ แต่ข้าวที่ผลิตได้ต่อไร่ส่วนมากยังมีผลผลิตต่อไร่ในปริมาณต่ำการผลิตข้าวในปัจจุบันเกษตรกรจึงมีความจำเป็นต้องใช้ปุ๋ยเคมีมากขึ้นเนื่องจากมีข้อดีคือ ออกฤทธิ์เร็ว มีประสิทธิภาพแน่นอนและเห็นผลชัดเจน สะดวกในการซื้อ การใช้และการเก็บรักษา แต่มีข้อเสียบางประการคือ ต้องใช้เป็นประจำและต่อเนื่องทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง ทำให้ต้องเพิ่มอัตราการใช้สารเคมีหรือเปลี่ยนชนิดของสารเคมีทำให้ต้นทุนในการผลิตเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย การใส่ปุ๋ยเคมีให้กับข้าวนับว่ามีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวเป็นอย่างยิ่งถ้าหากใช้ในปริมาณที่มากเกินหรือต่อเนื่องจะเป็นการสิ้นเปลือง อีกทั้งยังมีผลกระทบในระยะยาวต่อความอุดมสมบูรณ์ของดินเพราะการใช้ปุ๋ยเคมีติดต่อกันเป็นเวลานานๆจะทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมทำลายความอุดมสมบูรณ์ของแร่ธาตุในดิน ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินเช่น เชื้อราแบคทีเรียแอคติโนมัยสีทและสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่อาศัยอยู่ในดินมีจำนวนลดลง ทำให้เกิดความไม่สมดุลกัน อีกทั้งยัง เกิดสารพิษตกค้างในดิน น้ำ ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมีสารพิษตกค้างไปด้วย จากสาเหตุดังกล่าวส่งผลให้ดินเสื่อมคุณภาพลงและเกิดปัญหาดินมีสภาพเป็นกรด ดินจับตัวกันเป็นก้อนแข็ง ทำให้ไม่สามารถปลูกพืชให้ได้ผลผลิตสูง อีกทั้งโรคพืชยังระบาดได้ง่ายอีกด้วย(จิระเดช, 2538) ดังนั้นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจึงเป็นแนวทางที่ได้รับความสนใจสำหรับการควบคุมโรคพืชทั้งในปัจจุบันและอนาคต โดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการลดปริมาณและลดกิจกรรมของเชื้อสาเหตุโรคพืชจนทำให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ เป็นวิธีการหนึ่งในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน (integrated pest management) โดยการใช้วิธีที่ให้ผลดีสูงสุดทั้งทางด้านเศรษฐกิจ ความปลอดภัยและความยั่งยืน รวมเอาวิธีทางกายภาพ ทางเคมีและทางชีวภาพเข้าไว้ด้วยกัน เพื่อควบคุมผลที่เกิดจากศัตรูพืชและส่งเสริมปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตที่ได้ กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมผลที่เกิดจากศัตรูพืชและส่งเสริมปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะพบในดินบริเวณรอบรากพืช (รัชนีมิ่งมา, 2552)เช่นเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยสีทและเชื้อกลุ่มบาซิลลัส เป็นต้น โดยจะพบว่าเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยสีทและเชื้อกลุ่มบาซิลลัส บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็น plant growth promotion rhizobacteria (PGPR) (จรัญ ประจันบาล, 2551) สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช บริเวณลำต้น ตา ใบและราก ทำให้พืชเกิดการแบ่งตัวและยืดตัวของเซลล์ในบริเวณต่าง ๆ มีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น และยังสามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้ เพื่อนำไปช่วยในการเจริญเติบโตของรากในระยะแรก ช่วยเร่งให้พืชแก่เร็ว ช่วยให้ดอก ผล การงอกของเมล็ดพืชสมบูรณ์ ช่วยให้รากพืชดูดซึมฟอสฟอรัสได้มากขึ้น และเป็นสารที่จำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืชอีกด้วยนอกจากนี้พบว่าเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สามารถผลิตsecondary metabolite ซึ่งมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส สารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช (Goodfellow และคณะ,1988) ลดการเกิดโรคและกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ดี จึงสามารถนำมาพัฒนาเป็นสารฆ่าเชื้อที่ก่อโรคพืชได้ต่อไป และสารซิเดอโรฟอร์ เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นและปล่อยออกมา เพื่อไปจับกับเหล็ก ทำให้เกิดการละลายและการขนส่งเหล็กเข้าสู่เซลล์พืช ซึ่งเหล็กจะไปช่วยกระตุ้นให้การหายใจและการปรุงอาหารของพืชสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากประโยชน์ที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น จึงเป็นเหตุผลที่ทำให้เกิดการศึกษาขึ้นในครั้งนี้ เนื่องจากเห็นว่าเมื่อทำการศึกษาเรื่อง การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทและกลุ่มบาซิลลัสจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าวที่ผลิตฮอร์โมนพืชอินโดลอะซิติก แอซิดซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช สามารถนำการศึกษาในครั้งนี้ไปก่อให้เกิดประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นทรัพยากรจุลินทรีย์ในงานวิจัยและปฏิบัติงานต่อไป อีกทั้งยังใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพทดแทนปุ๋ยเคมีช่วยลดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมและช่วยลดต้นทุนทางการเกษตร ส่งเสริมให้การเกษตรของไทยมุ่งสู่ความเป็นเกษตรอินทรีย์เพิ่มมากขึ้นในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินบริเวณรากข้าวที่มีคุณสมบัติในการผลิตฮอร์โมนIndole acetic acid (IAA)

1.2.2 เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยการตรวจสอบคุณสมบัติในการผลิตซิเดอโรฟอร์และการย่อยสลายสารฟอสเฟตตลอดจนความสามารถในการผลิตสารต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืช

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากข้าว ระยะออกรวงหรือแตกกอ (Himadri Bhusan Bal และคณะ,2012) จากศูนย์บริการและถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตรประจำตำบลศาลากลาง อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรีและดินบริเวณรากข้าว จังหวัดสระบุรี โดยเลือกเก็บส่วนของดินบริเวณขอบของแปลงปลูกข้าว ซึ่งมีความลึกประมาณ 15 เซนติเมตร ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 5 บริเวณ โดยกำหนดบริเวณเก็บตัวอย่างดินดังนี้ A,B,C,D และ E บริเวณละ 5 ต้น ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากข้าวควรถอนต้นข้าวขึ้นมาจากแปลงปลูกอย่างระมัดระวัง ไม่ควรให้รากข้าวขาดและเก็บใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ โดยดินที่เก็บมาทั้งหมดก่อนนำมาคัดแยกเชื้อจะถูกนำมาผึ่งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำมาทำการคัดแยกเชื้อที่ต้องการ การคัดแยกกลุ่มเชื้อตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มแอคติโนมัยสีทและกลุ่มบาซิลลัสจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าว โดยการเตรียมสารละลายของดินตัวอย่างและทำการเจือจางสารละลายดิน แต่ละตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ กลุ่มบาซิลลัสทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-6} และ กลุ่มแอคติโนมัยสีททำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{0}-10^{-4} จากนั้นทำการกระจายเชื้อด้วยวิธี spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกลุ่มบาซิลลัสSpread เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) pH 7.0 ส่วนกลุ่มแอคติโนมัยสีท Spread เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project-2 (ISP-2) agar pH 7.3 จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่ต้องการ โดยกลุ่มบาซิลลัสจะเลือกโคโลนีที่มีลักษณะมันวาว อาจมีสีขาว, ครีม, เหลือง ส่วนกลุ่มแอคติโนมัยสีทจะเลือกโคโลนีที่ทึบแสง ซึ่งอาจมีสีเทา, ดำ, เขียว, ชมพู, ส้ม, เหลืองที่มีลักษณะเป็นปุยคล้ายกำมะหยี่เมื่อมองด้วยตาเปล่า โคโลนีคล้ายหนังสัตว์ หรือโคโลนีทึบแสงที่ผิวหน้าย่น ขรุขระที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อมาแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี Cross streak technique เพื่อใช้ในการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของเชื้อต่อไป ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อที่มีการผลิตฮอร์โมน Indole acetic acid (IAA) โดยการนำเชื้อ ที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสารตั้งต้น L-tryptophane บ่มจนครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm. เพื่อวัดการเจริญของเชื้อบาซิลลัส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกจากส่วนของส่วนใส และนำส่วนใสที่ได้มาทดสอบกับ Salkowski reagent ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีเหลืองเป็นสีชมพู หากพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสีของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย แสดงว่าเชื้อทดสอบมีคุณสมบัติในการผลิตฮอร์โมน Indole acetic acid และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อที่มีการสร้างสาร Siderophore โดยการนำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาขีดเป็นเส้นเดี่ยว ๆ บนอาหารที่มีส่วนผสมของเหล็ก เมื่อครบเวลาบ่มตรวจสอบประสิทธิภาพการสร้างสาร Siderophoreจากลักษณะการเกิดส่วนใสสีเหลืองบนอาหาร ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อที่มีการย่อยสลายสาร Phosphate โดยการนำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาขีดเป็นเส้นเดี่ยว ๆ บนอาหารที่มีส่วนผสมของ Phosphate เมื่อครบเวลาบ่มตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสาร Phosphate จากลักษณะการเกิดส่วนใสบนอาหาร ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ปฏิปักษ์กับเชื้อราก่อโรคไหม้ โดยวิธี dual culture technique ซึ่งเป็นการเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบร่วมกับเชื้อราก่อโรค บ่มจนกระทั่งเส้นใยเชื้อราเจริญเต็มที่ ตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราที่เกิดขึ้น ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ปฏิปักษ์กับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยการเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract – malt extract agar โดยขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยวยาวตามแนวนอน บ่มอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม จากนั้นนำแบคทีเรียก่อโรคมาขีดเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวเชื้อที่ต้องการทดสอบ เมื่อครบเวลาบ่ม ตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่เกิดขึ้น จากการวัดระยะทางจากแนวของเชื้อทดสอบถึงระยะที่แบคทีเรียก่อโรคสามารถเจริญได้

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 คัดแยกกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทและกลุ่มบาซิลลัสจากตัวอย่าง

1.4.1.1 นำตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยดินบริเวณรอบรากต้นข้าวจากศูนย์บริการและถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตรประจำตำบลศาลากลาง อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรีและดินบริเวณรากข้าว จังหวัดสระบุรี มาคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทและบาซิลลัสตามวิธีเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยกบนอาหารที่ต่างกัน

1.4.1.2 คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทและบาซิลลัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.4.1.3 แยกเชื้อที่คัดเลือกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และเก็บสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทและ บาซิลลัสที่แยกได้ไว้ทำการทดลองในขั้นต่อไป

1.4.2 ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแอคติโนมัยสีทและบาซิลลัสเบื้องต้น

1.4.2.1 ทดสอบลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัส

1.4.2.2 ทดสอบการสร้างสารออกซินธรรมชาติ

1.4.2.3 ทดสอบการสร้างสารซิเดอโรฟอร์

1.4.2.4 ทดสอบการย่อยสลายฟอสเฟต

1.4.2.5 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทและกลุ่มบาซิลลัสไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการผลิตฮอร์โมน Indole acetic acid (IAA) สารซิเดอโรฟอร์ สารต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคพืช ตลอดจนความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟต

1.5.2 นำเชื้อแอคติโนมัยสีทและบาซิลลัสไอโซเลทที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวสูงสุดนำมาใช้ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพทดแทนปุ๋ยเคมีลดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม ลดต้นทุนทางการเกษตร และช่วยเพิ่มผลผลิตให้ได้ปริมาณที่มากขึ้นได้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.3 อาจพบเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทและกลุ่มบาซิลลัสสายพันธุ์ใหม่ที่สร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เป็นทรัพยากรจุลินทรีย์ สำหรับใช้วิจัยต่อไป

1.5.4 เพื่อส่งเสริมให้การเกษตรของไทยมุ่งสู่ความเป็นเกษตรอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การควบคุมโดยชีววิธี

การควบคุมโดยชีววิธี หมายถึง การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์รวมถึงสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในการลดปริมาณและลดกิจกรรมของเชื้อสาเหตุโรคพืชจนทำให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการหนึ่งในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน (integrated pest management) โดยการใช้วิธีที่ให้ผลดีสูงสุดทั้งทางด้านเศรษฐกิจ ความปลอดภัยและความยั่งยืน รวมเอาวิธีทางกายภาพ ทางเคมีและทางชีวภาพเข้าไว้ด้วยกัน เพื่อควบคุมผลที่เกิดจากศัตรูพืชและส่งเสริมปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตที่ได้ เชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมผลที่เกิดจากศัตรูพืชและส่งเสริมปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะพบในบริเวณรากพืช (rhizophere) หมายถึง บริเวณแคบ ๆ ของดินที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของรากพืชที่มีชีวิตอยู่และมีผลกระทบต่อการดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์ สาเหตุที่พบประชากรของจุลินทรีย์อยู่ในบริเวณรากพืชจำนวนมาก เนื่องจากสารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่รากพืชขับออกมาสู่ดินจะกลายเป็นอาหารและพลังงานสำหรับจุลินทรีย์(Barea *et al.*, 2005) นอกจากจะช่วยส่งเสริมการเจริญและการพัฒนาของรากยังเพิ่มธาตุอาหารบางชนิดที่จำเป็นสำหรับพืชเช่นไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

2.1.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปริมาณจุลินทรีย์ที่พบบริเวณรากพืช

จุลินทรีย์ที่พบบริเวณรากพืชจะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้

-ชนิดของพืช มีอิทธิพลในการกำหนดประชากรและกิจกรรมของจุลินทรีย์ในบริเวณรากพืช

-อายุของพืช พืชที่อายุมากจะปล่อยสารต่าง ๆออกมาเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ได้มากกว่าพืชอายุน้อย ๆ

-ระยะห่างจากผิวของราก ระดับประชากรและระดับของจุลินทรีย์จะมีมากในบริเวณที่ติดกับราก และน้อยลงเมื่ออยู่ห่างออกไปจากผิวราก

2.1.2 ลักษณะของการควบคุมโรคของเชื้อปฏิปักษ์

การควบคุมโรคของเชื้อปฏิปักษ์แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะSingh และ Faull (1988) ดังนี้

2.1.2.1. การแข่งขัน (competition) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่างๆเช่นแย่งแหล่งอาหารและที่อยู่อาศัยการเป็นไมโครพาราสิตโดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถเป็นพาราสิตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ใช้ธาตุอาหารอากาศและการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่าทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโตในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์การแข่งขันที่พบมากคือการนำธาตุอาหารหรือสารต่างๆที่มีอยู่มาใช้ทำให้เชื้อก่อโรคพืชขาดสารอาหารไม่สามารถเจริญเติบโตและเข้าทำลายพืชได้และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยังสามารถดึงธาตุเหล็กมาใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิตได้ดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชโดยการสร้างสารซิเดอร์โรฟอร์ (siderophore) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม ligands ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีความจำเพาะเจาะจงต่อธาตุเหล็กสูง สามารถละลายได้ในน้ำ เป็นแหล่งเก็บสะสมธาตุเหล็กของสิ่งมีชีวิต พบว่าในสภาพแวดล้อมที่ขาดธาตุเหล็กหรือมีในปริมาณน้อยจะกระตุ้นให้จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดมีการสร้างซิเดอร์โรฟอร์มากขึ้น

2.1.2.2.การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) ผลิตผลจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) เพื่อยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โทษได้ สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้โดยทั่วไปแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จะมีการผลิตสารปฏิชีวนะภายหลังจากที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ดังกล่าวเริ่มมีการสร้างสปอร์เนื่องจากเป็นกลไกในการป้องกันตัวเองจากสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้น Oejijono, Line และ Dragar (1993) พบว่ากลไกในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชของเชื้อ*Acinetobacter* sp., *B. polymyxa, B. subtilis, Pseudomonas cepacia* และ *P.putida*เป็นการสร้างสารปฏิชีวนะมากกว่าการสร้างสาร siderophore นอกจากนี้พบว่าเชื้อ*B. subtilis* A13 สร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ถึง 9 ชนิดส่วนใหญ่เป็นสารพวก polypeptide เช่น bacilysocinสามารถยับยั้งเชื้อ*Candida pseudotropicalis* และ*Cryptococcus neoformans* (Tamehiro, Hosoyan, Okamoto, Ubukata, Hamada, Naganawa and Ochi, 2002) และ iturin สามารถยับยั้งเชื้อ*Botrytiscinerea*, *Erwinia carotovora* และ*Ralstonia solanacearum* (Silva, 1992)โดยสารปฏิชีวนะมีผลยับยั้งการสร้างเซลล์เมมเบรนเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเซลล์เมมเบรนและการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิคทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารปฏิชีวนะ (สายใจอ่อนแก้ว, 2542)นอกจากนี้ยังมีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อีกหลายชนิดที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้เช่น *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., *Gliocladium* spp. และ*Myrothecium* spp. เป็นต้น

2.1.2.3 การเป็นปรสิต (parasitism) คือการที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเจริญอยู่ใกล้เคียงหรือบนส่วนของเชื้อโรคพืชแล้วเข้าทำลายเพื่อใช้อาหารหรือสารประกอบต่างๆจากเชื้อสาเหตุโรคพืชปรสิตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasite) แบ่งเป็น 2 พวกคือ necrotrophic mycoparasite เป็นพวกที่ต้องฆ่าหรือทำให้เชื้อโรคตายก่อนจึงจะสามารถใช้อาหารจากเส้นใยหรือสปอร์การฆ่าอาจเกิดขึ้นโดยสร้างสารพิษหรือเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อโรคเช่นเอนไซม์ chitinase และ glucanase พวกที่สองคือ biotrophic mycoparasite เป็นพวกที่เจริญสัมผัสอยู่กับเส้นใยของเชื้อราโรคพืชแล้วแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในโดยไม่ทำให้ตายกระบวนการเป็นปรสิตมักจะพบในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายโดยเฉพาะการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคตัวอย่างเอนไซม์หลักที่พบคือ chitinase และ glucanase

2.1.3 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่พัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช

ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่พัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืชเช่น เชื้อรา *Trichoderma* sp. ,*Chaetomium* sp. และ *Gliocladium* sp. และแบคทีเรีย *Bacillus* sp. , *Pseudomonas* sp. และ *Streptomyces* sp. (จิระเดช, 2538ก) ตัวอย่างวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เช่น การใช้เชื้อรา *Trichoderma* ในการป้องกันกำจัดโรคพืช (จิระเดช, 2538; จิระเดชและบรรเจิด, 2529 ; จิระเดชและวรรณวิไล, 2534; องอาจและคณะ, 2534; จิระเดชและคณะ, 2536; สุธามาศและคณะ, 2537; สุภาพรและคณะ, 2537) และการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* กำจัดหนอนแมลงศัตรูพืช (จริยา ,2538 ; อัจฉรา,2538) เป็นต้น

2.2 ออกซิน Auxin (indole-3-acetic acid , IAA)

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถส่งเสริมและกระตุ้นการเจริญเติบโตที่ทำให้พืชเกิดการแบ่งตัวและยืดตัวของเซลล์ในช่วงลำต้นของพืช โดยการผลิตออกซินและเป็นสารประเภทกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มแรกที่ถูกค้นพบโดยมนุษย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 ประวัติโดยสังเขป

ในปี ค.ศ. 1880 ชาร์ล ดาวิน (Charles Darwin) พบว่าการเคลื่อนที่เข้าหาแสงของส่วนยอดของต้นอ่อนของหญ้าคานารีจะไม่เกิดขึ้นหากส่วนของยอดอ่อนถูกเด็ดออกไป ซึ่งในขณะที่ยอดอ่อนของพืชยังอยู่ถ้าได้รับแสงในแถบใดของยอด ส่วนของยอดอ่อนหรือส่วนของเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ปกคลุมส่วนยอดของต้นอ่อนมักจะโค้งงอเข้าหาแสงเสมอ สรุปได้ว่าต้องมีสารบางอย่างที่ได้รับการลำเลียงลงมาจากส่วนยอด ซึ่งก่อให้เกิดการโค้งงอของยอดอ่อนเข้าหาแสง ในปี ค.ศ. 1928 Frits Went ทดลองโดยตัดยอดอ่อนของ *Avena* sp. แล้วนำไปวางไว้บนแผ่นวุ้น ให้สารที่สร้างจากยอดแพร่ผ่านลงไปสู่วุ้น จากนั้นนำวุ้นไปวางบริเวณที่ถูกตัดยอดออกไปปรากฏว่าสามารถโค้งเข้าหาแสงได้ตามปกติเช่นเดียวกับที่ไม่ถูกตัดยอด (นพดล , 2537) ต่อมามีการศึกษาเพิ่มเติม พบว่า สารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช กระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ กระตุ้นการเกิดรากและการเจริญส่วนต่าง ๆ ของพืช คือสารออกซิน ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในพืชได้แก่ IAA (indole-3-acetic acid) สารนี้จะสร้างบริเวณที่ปลายยอด ใบอ่อนและเมล็ด

2.2.2 กลไกที่พืชใช้ควบคุมปริมาณของ IAA

ปัจจุบันออกซินที่เกิดขึ้นในธรรมชาติมี 3 ชนิดคือIAA (indole-3-acetic acid) เป็นสารที่พบในธรรมชาติมากที่สุด 4-chloro IAA (4- chloro indooleacetic acid) และ PAA (phenylacetic acid) ซึ่งกลไกที่พืชใช้ควบคุมปริมาณของ IAA ได้แก่

- ควบคุมอัตราการสังเคราะห์สาร IAA

- เปลี่ยนสาร IAA ให้ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ชั่วขณะ โดยไปจับกับโมเลกุลอื่นและเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์เรียกว่า conjugated auxins หรือ bound auxins เช่นอยู่ในรูป peptide คือ Indoleacetyl aspartic acid หรือรูป ester คือ IAA – inositol และ IAA – glucoside โดยทั่วไป IAA สามารถได้รับการปลดปล่อยออกจากอนุพันธ์ได้โดย hydrolase enzymes ดังนั้นการเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์คือการเปลี่ยนไปในรูปที่สารเก็บไว้ใช้ในการงอก เมื่อได้รับการลำเลียงออกมาทางท่อลำเลียงน้ำสู่ยอดของกล้าและใบอ่อน

- สลายตัวโดยเอนไซม์ โดยผ่านขบวนการออกซิเดชั่นใช้ออกซิเจนและสูญเสียกลุ่มคาร์บอกซิลไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเอนไซม์ที่สำคัญคือ IAA oxidase แต่ออกซินสังเคราะห์จะไม่ถูกทำลายโดย conjugated auxins และ IAA oxidase (นพดล, 2537)

2.2.3 คุณสมบัติของการเคลื่อนที่ของออกซิน

IAA มีความสามารถในการทำหน้าที่ของฮอร์โมนโดยตรงคือ มีการลำเลียงจากอวัยวะหรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ โดยในลำต้นจะลำเลียงผ่านทางเซลล์ที่มีชีวิตคือ phloem parenchyma และ cell parenchyma ที่อยู่รอบvascular bundles หากมีการให้ IAA หรือสารออกซินสังเคราะห์อื่นๆ จากภายนอกผ่านผิวใบที่สมบูรณ์ก็จะมีการลำเลียงผ่านทาง sieve tubes ซึ่งต่างจากการลำเลียงสารอื่น เช่น น้ำตาล หรือสารละลายอื่น ๆ จะลำเลียงผ่านทางท่อน้ำและท่ออาหาร

คุณสมบัติของการเคลื่อนที่ของออกซิน มีดังนี้

- ออกซินเคลื่อนที่ช้าประมาณ 1 เซนติเมตรต่อชั่วโมงทั้งในรากและลำต้น เมื่อเทียบแล้วยังเร็วกว่าการแพร่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การเคลื่อนที่ของออกซินเป็นแบบมีขั้ว ในลำต้นจะเคลื่อนที่จากยอดไปยังโคนต้นเสมอ การเคลื่อนที่ในรากก็เช่นเดียวกัน แต่เป็นแบบ acropetal คือจากโคนรากไปสู่ปลายราก

- การเคลื่อนที่จำเป็นต้องใช้พลังงาน หากให้สารยับยั้งการสร้างสารให้พลังงานหรือเกิดการขาดออกซิเจนจะทำให้ออกซินเคลื่อนที่ไม่ได้ สารแอนติออกซินเป็นสารที่กีดขวางการลำเลียงออกซินได้แก่ 2,3,5,-triidobenzoic acid (TIBA) และ naphthythalamic acid (NPA) แต่สารทั้งสองไม่ได้เกี่ยวข้องกับขบวนการเมทาบอลิซึมที่ทำให้เกิดพลังงาน (นพดล , 2537)

2.3 ซิเดอร์โรฟอร์(siderophore)

การสังเคราะห์ออกซินมีหลายกลไกที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช (Glick *et al*., 1999) ได้แก่ การสังเคราะห์และปลดปล่อยsiderophoreซึ่งเป็นธาตุเหล็กที่สำคัญสำหรับเซลล์สิ่งมีชีวิตต่างๆโดยเชื้อจุลินทรีย์จะปลดปล่อยออกมา เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็กหรือมีในปริมาณที่ต่ำมาก และในดินธาตุเหล็กมักอยู่ในรูปที่เซลล์นำไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ส่วนใหญ่แบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนและใช้ออกซิเจนได้บางสามารถสังเคราะห์และปลดปล่อยสารที่เรียกว่าsiderophore ซึ่งมีสมบัติจำเพาะในการจับกับธาตุเหล็ก (Fe3+) แล้วนำเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ประโยชน์ในกิจกรรมต่างๆของเซลล์จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับพืชคุณสมบัติดังกล่าวจึงช่วยปกป้องพืชจากจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้เนื่องจากจุลินทรีย์ก่อโรคพืชมีความสามารถในการแข่งขันและนำธาตุเหล็กไปใช้ประโยชน์ได้น้อยกว่าจุลินทรีย์ที่สามารถปลดปล่อยสาร siderophore

2.3.1 ความสำคัญของธาตุเหล็ก

ธาตุเหล็กมีความสำคัญทางด้านเป็นแหล่งให้พลังงาน และมีความจำเป็นต่อกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์แทบทุกชนิด ยกเว้นพวกแลคโตบาซิลลัสบางสายพันธุ์ที่ไม่จำเป็นต้องใช้ธาตุเหล็กในการดำรงชีวิต ธาตุเหล็กพบมากเป็นอันดับที่ 4 ของธาตุทั้งหมดบนโลก มีค่า oxidation state เปลี่ยนแปลงในช่วง -2 ถึง +6 พบว่า ค่า oxidation state ช่วง +2 ถึง +3 มีบทบาทสำคัญต่อระบบทางชีวภาพ เช่น ขนส่งอิเล็กตรอน องค์ประกอบสำคัญของเลือด เป็นต้น

2.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างซิเดอโรฟอร์กับเหล็ก

สภาวะที่มีออกซิเจนและมีค่าความเป็นกรด – ด่างเป็นกลาง เหล็กมีความสามารถในการละลายต่ำมาก คือ มีความเข้มข้นน้อยกว่า 10-17 โมลาร์ เนื่องจากสามารถรวมตัวกับไฮดรอกไซด์ ซิลิเกต และฟอสเฟต เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายน้ำได้น้อยมาก ดังนั้นสภาวะเช่นนี้จุลินทรีย์จะผลิตซิเดอโรฟอร์ออกมานอกเซลล์ ทำให้เกิดการละลาย การเข้าจับและลำเลียงเหล็กจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่เซลล์ เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

2.3.3 การจัดจำแนกซิเดอโรฟอร์

ซิเดอร์โรฟอร์จำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

2.3.3.1 Cathecolamides หรือ Cathecolate siderophores (CS) พบได้เฉพาะในแบคทีเรีย เช่น *Bacillus* ได้แก่ *Bacillus megaterium* และ *B. subtilis* สร้างซิเดอโรฟอร์ที่ชื่อ Schizokinen และ DHBglycine ตามลำดับ

2.3.3.2 Hydroxamates หรือ Hydroxamate siderophores (HS) พบในสิ่งมีชีวิตที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรา เช่นแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces*จะสร้างซิเดอร์โรฟอร์ที่เรียกว่า Ferrioxamine ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของ diamines และ carboxylic acid ปัจจุบันพบว่า Ferrioxamine มีด้วยกันทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ Ferrioxamine A1, A2, B, D1, D2, E, G, H และ I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(หนึ่งเตียอำรุง และนันทกร บุญเกิด, 2539) โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์ สามารถจับยึดธาตุเหล็กในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุโรคพืชทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้

2.3.4 กระบวนการแยกซิเดอโรฟอร์

การนำซิเดอโรฟอร์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ ต้องผ่านกระบวนการแยกทางเคมีต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคทางวิทยาศาสตร์ดังต่อไปนี้ ได้แก่ liquid phase extraction หรือ solid phase extraction หรือ chromatography (ion-exchange ทั้ง cation และ anion รวมทั้ง gel permeation)

2.3.5 การประยุกต์ใช้ซิเดอโรฟอร์

2.3.5.1 ด้านการแพทย์

กรณีที่ผู้ป่วยมีธาตุเหล็กในร่างกายมากเกินไป (ในส่วนของฮีโมโกลบิน) โดยเฉพาะผู้ที่เป็นโรคb-thalassaemiaนั้น ปัจจุบันวงการแพทย์สมัยใหม่ได้ทำการรักษาโรคนี้ด้วยการฉีดยาชนิดหนึ่งที่มีชื่อว่า Desferral ซึ่งเป็นtrihydroxamates siderophore desferrioxamine-B แทนการถ่ายเลือดแต่ยังมีปัญหาและมีผลข้างเคียงอยู่บ้าง ปัจจุบันพยายามหาไซเดอโรฟอร์ตัวใหม่มาใช้ทดแทน Desferral

2.3.5.2 ด้านการเกษตร

สรุปแนวทางที่ซิเดอโรฟอร์มีอิทธิพลต่อวงจรชีวิตของพืชดังนี้

- ซิเดอโรฟอร์มีบทบาทในดิน ทำให้เกิดการละลายและการขนส่งเหล็กเข้าสู่พืชได้
- ซิเดอโรฟอร์จากจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืช ใช้ในการคาดคะเนปริมาณเหล็กในแหล่งที่อยู่อาศัยและปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคพืชที่ต้องการธาตุเหล็ก
- ซิเดอโรฟอร์สามารถทำงานร่วมกับ antibiotic, ฮอร์โมน และ lytic activities บริเวณรากพืช ทำให้มีการเร่งหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้

2.3.5.3 ด้านสิ่งแวดล้อม

นอกจากซิเดอโรฟอร์จะจับกับเหล็กได้ดีแล้ว (Kf ประมาณ 1018-1051) ยังมีความสามารถในการจับกับโลหะหนักอื่นๆได้ดีอีกด้วยเช่น นิกเกิล(Ni) สังกะสี(Zn)ทองแดง(Cu) อะลูมิเนียม(Al) โครเมียม(Cr) แกลเลียม(Ga) แมงกานีส(Mn) วานาเดียม(V) และโมลิบดินัม(Mo) เป็นต้น ดังนั้นจึงอาศัยคุณสมบัติในข้อนี้นำมาใช้ในการลดความเป็นพิษของโลหะหนักบางชนิดที่ปนเปื้อนทั้งในน้ำและในดิน (http://chemsci.kku.ac.th/chalerm/research.htm)

2.4 ฟอสเฟต

การย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟตฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารพืชหลักที่สำคัญหากในดินขาดแคลนธาตุนี้จะมีสาเหตุจากรูปของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สำหรับพืช (HPO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$) มีปริมาณน้อยพืชไม่สามารถดูดดึงไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเพียงพอทั้งที่ในดินมีธาตุฟอสฟอรัสอยู่ปริมาณมาก แต่ส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้สาเหตุเกิดจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาการตรึงการตกตะกอนทางเคมีสูงและละลายออกมาได้ยาก ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตรึงและตกตะกอนของธาตุฟอสฟอรัสในดินที่สำคัญคือความเป็นกรดเป็นด่างของดินนอกจากนี้ธาตุฟอสฟอรัสยังแพร่กระจายไปสู่รากพืชได้ช้าเพราะการเคลื่อนที่ในดินนั้นต่ำพืชที่มีระบบรากที่ไม่แข็งแรงหรือไม่สามารถขอนไชไปยังแหล่งที่มีธาตุนี้ละลายอยู่ก็จะแสดงอาการขาดธาตุฟอสฟอรัส แบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต (Phosphate Solubilizing Bacteria; PSB) ที่ถูกตรึงอยู่ในดินและหินแร่ในธรรมชาติให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชมีอยู่หลายชนิดเช่น*Bacillus,Pseudomonas, Thiobacillus* โดยแบคทีเรียจะสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาละลายฟอสฟอรัส (มุกดา, 2547) พบว่า*Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการละลายฟอสเฟตพบได้ในดินทั่วๆไปและมีความเหมาะสมในแง่ของการนำไปประยุกต์ใช้กับสิ่งแวดล้อมเพราะคุณสมบัติการสร้าง endospore ซึ่งทำให้มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมสูงกว่าเซลล์ปกติ ปัจจุบันมีหลายประเทศให้ความสนใจและนำเอาแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการละลายฟอสเฟตมาผลิตเป็นผงเชื้อจุลินทรีย์ในรูปของปุ๋ยชีวภาพ(biofertilizer) เช่น *B. megaterium* var phosphaticum ทั้งนี้อาจใช้ในลักษณะเชื้อผสมเพื่อเพิ่มความหลากหลายของธาตุอาหารพืชเช่น*Azotobacter* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนขายเป็นการค้า

2.4.1 แหล่งกำเนิดของหินฟอสเฟต

หินฟอสเฟตเป็นหินแร่ที่พบในธรรมชาติและมีธาตุฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญ หินฟอสเฟตที่พบส่วนใหญ่อยู่ในรูปของแร่อะพาไทต์แบ่งตามแหล่งกำเนิดออกเป็น 3 ลักษณะคือ

-เกิดจากหินอัคนี

-เกิดจากการสะสมของมูลนกและมูลค้างคาว

-แบบหินตะกอนภาคพื้นมหาสมุทร

แหล่งหินฟอสเฟตที่พบในประเทศไทยมีขนาดเล็กพบตามถ้ำและเทือกเขาหินปูนในหลายจังหวัดของประเทศหินฟอสเฟตที่พบส่วนใหญ่เป็นแบบที่เกิดจากการสะสมของมูลนกและมูลค้างคาวหินฟอสเฟตเป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตปุ๋ยเคมีฟอสฟอรัสและสามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยเพิ่มธาตุฟอสฟอรัสในดินได้โดยตรงเพื่อทดแทนหรือใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีฟอสฟอรัสเพราะมีราคาถูกปุ๋ยหินฟอสเฟตที่เหมาะสมกับการนำมาใช้เป็นปุ๋ยควรมีปริมาณฟอสฟอรัสรูปที่เป็นประโยชน์ไม่น้อยกว่า 3 เปอร์เซ็นต์และมีปริมาณฟอสเฟตทั้งหมดไม่น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ (ธงชัย, 2546: 123-142) ปุ๋ยหินฟอสเฟตที่ใช้ในการเกษตรมีอัตราการละลายของฟอสฟอรัสรูปที่เป็นประโยชน์จากหินฟอสเฟตค่อนข้างช้าและมีปริมาณน้อยจึงอาจไม่เพียงพอกับความต้องการของพืชและพบว่าพืชสามารถนำฟอสฟอรัสจากปุ๋ยเคมีหรือหินฟอสเฟตไปใช้ได้เพียง 10-25 เปอร์เซ็นต์ของฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้เท่านั้นส่วนที่เหลือจะถูกตรึงอยู่ในดินอย่างรวดเร็วพืชนำไปใช้ได้ยาก (คณาจารย์ภาควิชาปฐพี, 2548: 294-306; Tisdale *et al.*, 1985: 189-248) ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถละลายฟอสเฟตจากรูปที่ไม่ละลายให้กลายเป็นฟอสเฟตในรูปที่เป็นประโยชน์สำหรับพืชจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ได้มีผู้สนใจศึกษา

2.4.2 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟอสเฟตและแหล่งสารประกอบฟอสเฟต

เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟอสเฟตและแหล่งสารประกอบฟอสเฟต ดังนี้

-*Bacillus* sp. *Bacilluspulvifaciens*และ*Bacillus megaterium* พบได้ทั่วไปใน Mineral

-*Bacilluscirculans* *Bacillussubtilis* และ*Bacillusmycoides* พบได้ทั่วไปใน Tricalcium phosphate

-*Bacillusmesentericus* *Bacillusfluorescence* พบได้ทั่วไปใน Calcium phosphate

-*Streptomyces* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 เชื้อแอคติโนมัยสีท (Actinomycetes)

แอคติโนมัยสีท เป็นแบคทีเรียจำพวกหนึ่งที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อรามีการเจริญเป็นเส้นใย และมีการสร้างสปอร์ แต่ขนาดเซลล์เล็กเท่ากับแบคทีเรีย พบว่ามักยึดเกาะแน่นในโคโลนีที่จมอยู่ในอาหารที่เจริญอยู่ ส่วนของเส้นใยที่สัมผัสกับอากาศแห้งจะมีการเปลี่ยนรูปไปเป็นสปอร์ ซึ่งใช้ในการแพร่พันธุ์เช่นเดียวกันกับเชื้อรา

เชื้อแอคติโนมัยสีทจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก พบอยู่มากมายในธรรมชาติสามารถแยกได้จากดินทั้งในเขตร้อนและเขตหนาว เจริญได้ในดินที่เป็นกลางหรือเป็นด่างมากกว่าในดินที่เป็นกรดน้ำและจากส่วนต่าง ๆ ของพืชมีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม ท่อนหรือเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา อาจเป็นเส้นสายที่มีการแตกแขนงของเส้นใย เพื่อสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศหรืออาจจะเป็นเส้นสายที่มีการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ โครงสร้างของสปอร์มีทั้งแบบที่มีถุงหุ้มและไม่มีถุงหุ้ม ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน บางชนิดไม่ต้องการออกซิเจนหรือต้องการก็เพียงเล็กน้อย และมีปริมาณเบสกวานีนกับไซโตซีนสูง (high G-C content มากกว่าร้อยละ 50) แอคติโนมัยสีทสามารถผลิตฮอร์โมนพืชอินโดลอะซิติก แอซิด (IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ช่วยใน การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ปริมาณของแบคทีเรียแอคติโนมัยสีทที่พบในดินขึ้นอยู่กับชนิดและสภาพของดิน เช่น ในดินทั่วไป 1กรัม ที่มีสภาพความเป็นกรดและมีปริมาณอินทรียวัตถุในดินจะพบแอคติโนมัยสีท ประมาณ 10^5-10^8เซลล์ แต่ถ้าเป็นดินที่มีสภาพแห้งและมีสภาวะเป็นด่างจะพบแอคติโนมัยสีทในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูง โดยอาจพบได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในดินนั้น ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม*Streptomyces*ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นมากที่สุด El-Tarabily *et al.* (2008) รายงานว่าแอคติโนมัยสีท *Micromonospora endolithica* ที่คัดแยกจากดินและมีความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยภายในรากและดินรอบรากต้นถั่ว(*Phaseolus vulgaris* L.) สามารถละลายฟอสเฟตในดินในรูปที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนาไปใช้ได้และส่งเสริมการเจริญของต้นถั่ว eandro Figueiredo de และคณะ(2010)ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแยกและคัดเลือก *Actinomycetes* ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากดินบริเวณรากว่านราชินี โดยเก็บดินตัวอย่างจากเทือกเขา Mantiqueira ตั้งอยู่ที่รัฐเซาเปาลู ประเทศบราซิล มาทำการทดลองพบว่า *Actinomyces*spp.จำนวน 103 Isolate มีคุณสมบัติในการผลิต Indole acitic acid จำนวน 36%มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟต จำนวน 2% และยังสามารถผลิตกรดซิตริกได้จำนวน 24% แอคติโนมัยสีทที่อาศัยบริเวณดินรอบรากพืชพบว่ามีบทบาทช่วยส่งเสริมการเจริญแก่พืชช่วยให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคที่มีรายงานไว้เช่น *Micromonospora carbonacea* สามารถเข้าอยู่อาศัยในรากกะหล่ำและในดินห่างจากบริเวณรอบราก4 เซนติเมตรและช่วยป้องกันพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อ*Sclerotinia minor* (El-Tarabily *et al.*, 2000) Gesheva (2002) คัดแยกแอคติโนมัยสีทสกุล*Streptomyces*, *Micromonospora* และ*Nocardia*จากดินบริเวณรอบรากพืชตระกูลส้ม (*Citrus limon*และ*C. sinensis*) และได้ทำการคัดแยก*Streptomyces hygroscopicus* ซึ่งสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สาคัญหลายชนิดได้แก่ polyethers, azalomycin B และ nonpolyenic macrolide antibiotics Buchanan และ Gibbons (1974) แบ่งแอคติโนมัยสีทเป็น 8 ตระกูล (families) คือ Actinomycetaceae ; Actinoplanaceae ; Dermatophilaceae ; Frankiaceae ; Micromonosporaceae ; Mycobacteriaceae ; Nocardiaceae และ Streptomycetaceae แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างสายเซลล์ที่แตกกิ่งก้านได้ ในบางตระกูลสายเซลล์จะพัฒนาเป็นเส้นใยคล้ายเชื้อราแต่มีขนาดเล็กกว่า สามารถสร้างสายเซลล์ที่แตกกิ่งก้านได้ บางตระกูลจะพบการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหาร (aerial hypha) และหรือเส้นใยที่เจริญอยู่ใน

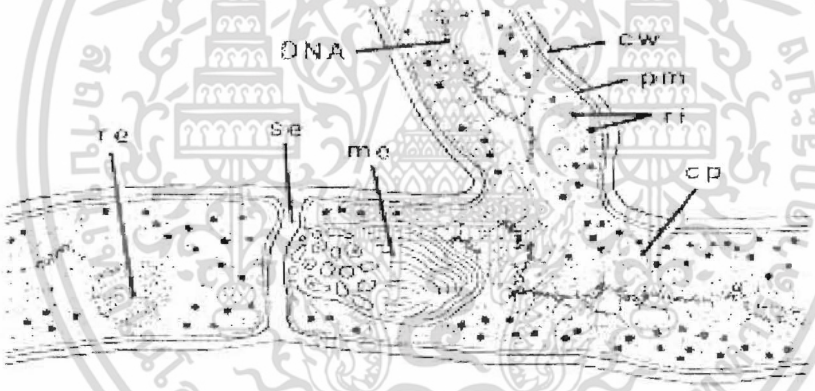
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร (substrate hypha) ในลักษณะเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายมีจำนวนสปอร์ต่าง ๆ กัน สายสปอร์อาจมีลักษณะตรง เป็นวงหรือขดเป็นเกลียว และสายสปอร์อาจจะเกิดเดี่ยวๆ จากเส้นใยหรือเกิดเป็นกลุ่มจากจุดเดียวกันของเส้นใย (verticillate) บางสกุลมีสปอร์เกิดอยู่ภายใน sporangium (Buchanan และ Gibbon,1974)ในแอคติโนมัยสีทแต่ละกลุ่มมีส่วนประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกันออกไปเช่น รูปแบบของน้ำตาล ซึ่งใช้เป็นหลักในการจำแนกจีนัสของเชื้อแอคติโนมัยสีท (Yamagushi , 1965; Buchanan และ Gibbon,1974 ; Davis,1959) โดยปกติแบคทีเรียใน order นี้ย้อมติดสีแกรมบวก ยกเว้นพวก mycobacteria จะเป็น acid-fast และสมาชิกบางตัวในตระกูล *Nocardiaceae*เป็น weakly-acid-fast ส่วนใหญ่เป็น aerobe ยกเว้นบางสกุลในตระกูล Actinomycetaceae ที่อาจจะเป็น anaerobe ; facultative aerobe หรือ aerobe

2.5.1 ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสีท

2.5.1.1เส้นใย (mycelium)

ลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายราแต่มีขนาดเล็กกว่าคือ มีขนาดประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตรประกอบด้วยส่วนของ apical region และ intercalary region สร้างผนังกั้นเส้นใยแบบต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อภายในประกอบด้วยออร์แกแนลต่าง ๆ คือ ไซโตพลาสซึม ไรโบโซมและมีนิวเคลียสที่ไม่มีเยื่อหุ้ม (prokaryote) การแตกสาขาของเส้นใยเป็นแบบ monopodial พบได้บ่อยที่สุดแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใย 2 ชนิดคือ primary (substrate) mycelium และ secondary (aerial) mycelium



รูปที่ 2.1 เส้นใยเชื้อแอคติโนมัยสีท

cp = ไซโตพลาสซึม , pm = พลาสมาเมมเบรน , cw = ผนังเซลล์ , me = มีโซโซม , se = septum , ri = ไรโบโซม , DNA = นิวคลีออยด์ , re = รีเวิร์สเมททีเรียล

ที่มา

www.google.co.th/search?hl=th&site=imghp&tbm=isch&source=hp&biw=1440&bih=766&oq=สีและลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.2 โคโลนี (colony)

โคโลนีมีลักษณะนูนหรือแบนติดกับอาหารเป็นแผ่นราบผิวหน้าอาจจะเรียบ แตก ขรุขระ นูน เหี่ยวย่นหรือเป็นเม็ดเล็ก ๆ โคโลนีของแต่ละชนิดมีสีที่แตกต่างกัน เช่น ขาว แดง ส้ม ชมพูอ่อน น้ำตาล เหลืองและดำ เป็นต้น การเจริญของโคโลนีอาจเป็นแผ่นยาวตามรอยขีดหรือขึ้นเป็นกระจุกอัดแน่นหรือ ขึ้นเป็นจุด ๆ กระจาย ๆ หรือผสมกันสองแบบ ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง (surface culture) และในอาหารเหลว (submerge culture) มีลักษณะที่ต่างกันคือ การเจริญของเชื้อในอาหารเหลวเซลล์จะเจริญจับกันเป็นกลุ่มของเส้นใยที่มีรูปร่างเป็นเม็ด(pellets) โดย pellet ที่เกิดขึ้นจะจำกัดการขนถ่ายมวลสาร (mass transfer) และทำให้เกิดsolute gradient ขึ้นภายใน pellet เซลล์ที่อยู่ในส่วนกลางจะถูกจำกัดธาตุอาหารและเมื่อ pellet เพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น การเจริญก็จะเกิดเฉพาะส่วนพื้นผิวภายนอกเท่านั้นส่วนการเจริญบนอาหารแข็ง เชื้อเจริญแบบสร้างเส้นใยในลักษณะที่ยึดติดแน่นกับผิวหน้าอาหารวุ้นและมีการขาดออกเป็นท่อนของเส้นใยเมื่อมีอายุมากขึ้น โดยทั่วไปลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งจะมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของเชื้อสามารถพบได้ 3 แบบ

-โคโลนีแบบหยาบหรือเรียบยึดเกาะกับผิวหน้าอาหารอย่างหลวม ๆ เป็นการสร้างเส้นใยอากาศปกคลุมผิวหน้าอาหาร มักพบในแอคติโนมัยสีทที่มีการเจริญในระยะ transient mycelia มีการเจริญของไมซิเลียที่ไม่แน่นอน

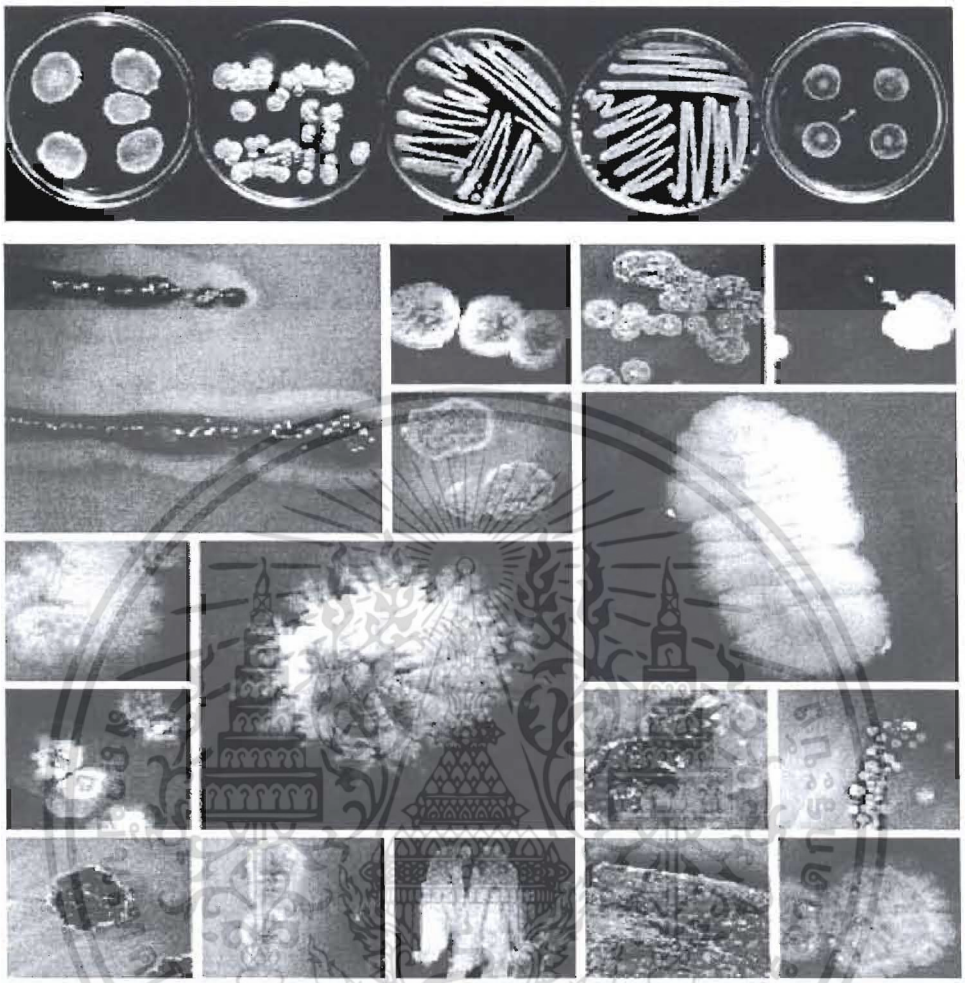
-โคโลนีไม่มีเส้นใยอาหาร แต่มีเส้นใยอากาศที่สามารถยึดเกาะกับอาหารด้วยส่วนยึดเกาะพิเศษเรียกว่า holdfast

-โคโลนีมีลักษณะเกาะกันแน่นคล้ายแผ่นหนังเส้นใยอากาศค่อนข้างโป่งและยึดกับอาหารด้วยเส้นใยที่แทงลงไปในอาหาร โดยเส้นใยที่อยู่เหนืออาหารเรียกว่า เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) และเส้นใยที่อยู่ภายใต้อาหารเรียกว่า เส้นใยอาหาร(substrate mycelium) สำหรับในอาหารเหลวเรียกเส้นใยที่อยู่บนผิวอาหารเรียกว่า generative mycelium และเรียกเส้นใยที่อยู่ในอาหารว่า vegetative mycelium

2.5.1.2 สปอร์ (spore)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของแอคติโนมัย สีทพบ 2 แบบคือ แบบหลุดของเส้นใยไมซีเลียมและ แบบสร้างสปอร์ พวก *Streptomyces*spp. จะสร้างเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษตามความยาวเส้นใยอากาศโคนิเดีย (aerial conidia) เกิดจากการขยายตัวของเซลล์และมีผนังหนาขึ้นเรียกว่า chlamydospore หรือ arthrospore มักพบแบบเดี่ยว ๆ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ส่วนพวก *Actinoplanes armenicus* สามารถสร้างสปอร์ได้ 2 แบบคือ แบบมีแฟลกเจลลาเรียกว่า zoospore สามารถเคลื่อนที่ได้ และแบบ *streptomyces*-type คือ สร้าง arthrospore บนเส้นใยอากาศขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เชื้อเจริญอยู่ ลักษณะของสปอร์ที่สร้างขึ้นมีความแตกต่างกันจึงใช้ลักษณะรูปร่าง การเจริญของสปอร์เป็นปัจจัยในการจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีท สปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทแบ่งเป็น 2 ชนิดตามความสามารถในการเคลื่อนที่ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



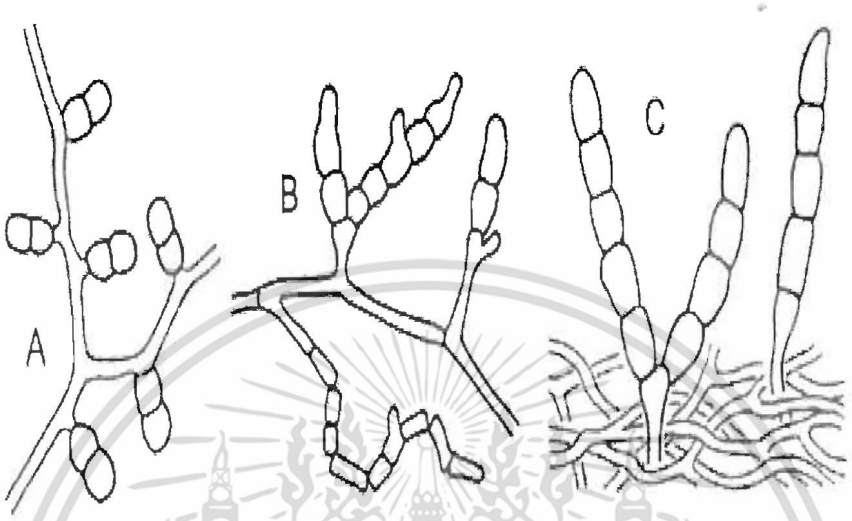
รูปที่ 2.2 สีและลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง
ที่มา http://www.rspg.org/microbiology/micro_01.htm

-Planospore หรือ Zoospore สปอร์ชนิดที่เคลื่อนที่ได้จะอาศัยแฟลกเจลลาแบบ monotrichous polytrichous และ peritrichous ในการเคลื่อนที่ในน้ำหรือของเหลวเช่น สปอร์ของ*Actinosynnema Actinoplanes*และ *Ampullariella* เป็นต้น

-Aplanospore หรือ Conidia สปอร์ชนิดที่เคลื่อนที่ไม่ได้ซึ่งลักษณะผิวนอกของสปอร์จะมีหลายลักษณะเช่น มีผิวเรียบ/ผิวขรุขระ มีปุ่มปม มีลักษณะคล้ายกำมะหยี่หรือมีลักษณะคล้ายทรงกระบอก สปอร์แต่ละชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีทมีการเจริญและพัฒนาอยู่บนก้านชูสปอร์ทั้งที่มีลักษณะเป็นก้านชูอันเดียวหรือแตกกิ่งก้านสาขา ซึ่งอาจแตกมาจากเส้นใยที่เจริญลงไปในอาหารหรือเส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร ส่วนถุงหุ้มสปอร์พบว่า ถูกสร้างอยู่บนก้านชูสปอร์ตรงบริเวณเกือบปลายหรือบริเวณปลายสุดของเส้นใย สภาวะที่ต้องมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศถุงหุ้มสปอร์จะแตกออกและปลดปล่อยสปอร์ออกมา โดยทั่วไปถุงหุ้มสปอร์จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-50 ไมโครเมตร ถุงหุ้มสปอร์มีหลายลักษณะเช่น ทรงกรวย ทรงกระบอกและทรงกลม เป็นต้น



รูปที่ 2.3 ลักษณะของสปอร์เป็นสายโซ่สั้น ๆ

A : การสร้างแบบ disporous ของ *Microbispora*

B และ C : การสร้างสปอร์ oligosporous ของ*Nocardia brevicatena* และ*Catellatospora* ตามลำดับ

ที่มา กิ่งจันทน์ , 2555

2.5.2 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีท (Classification of the actinomyces)

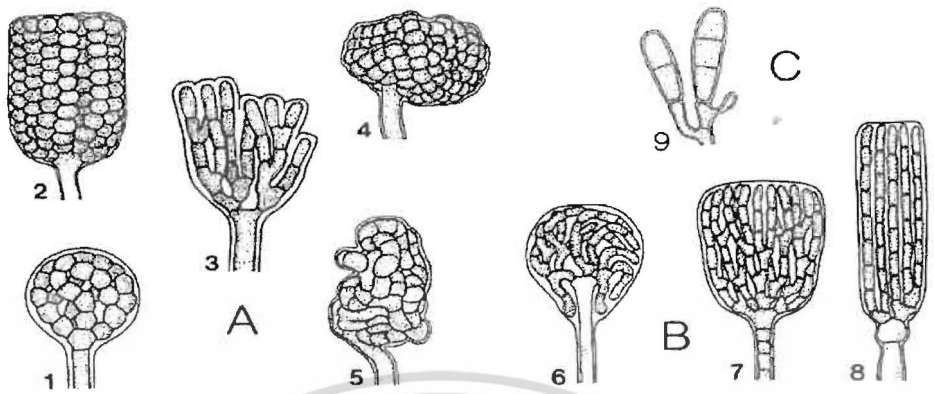
การแยกเพื่อคัดเลือกชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินต้องกำจัดหรือจำกัดการเจริญของเชื้อราและการกระจายของแบคทีเรียในอาหารที่ใช้แยก ทำได้โดยการควบคุมองค์ประกอบของอาหาร เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือในตัวอย่างดินก่อนที่จะนำมาแยกเชื้อ (Porter,1971) องค์ประกอบของอาหารที่ควบคุมเพื่อให้เชื้อแอคติโนมัยสีทเจริญได้ดีกว่าเชื้ออื่น ๆ (El-NakeebและLechavalier,1963) ส่วนการคัดเลือกเชื้อบนอาหารแข็งที่นิยมใช้กันมากคือ cross streak plate (Waksman, 1959)

2.5.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะการสร้างเส้นใยในการเจริญในอาหาร International Streptomyces Project (ISP) โดยดูลักษณะเส้นใย เช่น เส้นใยอากาศ การเกิดกระบวนการแตกกิ่งก้านของเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหารดูลักษณะการสร้างสปอร์โดยดูลักษณะของสปอร์ที่เกิดขึ้นว่าเป็นแบบเดี่ยว ๆ เป็นสายยาวหรือเป็นสายสั้น ๆ ตลอดถึงจำนวนของสปอร์ต่อสายบนก้านชูสปอร์ รวมถึงดูลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปร่างของเส้นใย และดูรูปร่างและขนาดของสปอร์แรงเจียม รวมถึงดูจำนวนสปอร์แรงจิโอสปอร์ต่อสปอร์แรงเจียม



รูปที่ 2.4 ลักษณะการสร้างสปอร์ภายในถุงหุ้มที่เจริญจากเส้นใยอาหารและอากาศรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร

A: สกุล*Actinoplanes* (รวมถึง*Ampullariella*) 1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3เป็นพู4. กึ่งทรงกลม 5. ไม่เป็นรูปทรง

B: สกุล*Pilimelia* 6. ทรงรี 7. รูปทรงระฆัง 8. ทรงกระบอก

C: สกุล*Dactylosporangium* 9. รูปทรงกระบอก

ที่มา: Atlas of Actinomycetes (1997)

2.5.2.2 ลักษณะการเจริญบนอาหาร

ดูระยะการเจริญเติบโตบนอาหาร International Streptomyces Project (ISP) เพื่อศึกษาลักษณะสีของเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร รวมถึงการสร้างเม็ดสีที่ละลายในอาหาร

2.5.2.3 ลักษณะทางจีโนไทป์

ตรวจสอบความคล้ายคลึงกันของสายดีเอ็นเอและปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีนบนสายดีเอ็นเอ

2.5.2.4 ประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท

2.5.2.4.1 แอคติโนมัยซิท (Actinomycetes) แอคติโนมัยซิทจะมีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าเชื้อราและแบคทีเรีย เจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศพอเพียง เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 65-75 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงเกินกว่า 75 องศาเซลเซียส มักจะไม่พบเชื้อแอคติโนมัยซิท ลักษณะของเชื้อที่พบบนกองปุ๋ยหมักจะเจริญเป็นกลุ่ม เห็นเป็นจุดสีขาวคล้ายๆ ผงปูน หลังจากอุณหภูมิสุงขึ้นจนสูงมากเชื้อแอคติโนมัยซีทมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรียสาร เช่น เซลลูโลส ลิกนิน ไคติน และโปรตีน ที่มีอยู่ในกองปุ๋ยหมักขณะที่อุณหภูมิสูง โดยเชื้อแอคติโนมัยซิทที่มักพบเสมอในกองปุ๋ยหมักได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พวก *Thermoactionalmyces sp.* และ *Thermomonospora sp.* ซึ่งเป็นพวกที่สามารถผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพและอาจพบ *Streptomyces sp.* และ *Micropolyspora sp.* ในกองปุ๋ยได้(http://chemsci.kku.ac.th/chalerm/research.htm)

2.5.2.4.2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่า *Sclerotium rolfsii*

2.5.2.4.3 แอคติโนมัยสีทบางชนิด เช่น *Streptomycetes rubiginosus, streptomycetes bambergensis* และ *Streptomycetes violaceoniger* สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถช่วยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นน้ำตาลฟรุกโทสได้ ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์แอคติโนมัยสีทช่วยผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม เช่น การใช้แอคติโนมัยสีทชนิด Thermomonospora ผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ไซแลนที่ทำงานที่อุณหภูมิสูงซึ่งเอนไซม์นี้มีประโยชน์ในการผลิตน้ำตาลไซโลสจากซังข้าวโพด

2.5.2.4.4 การใช้แอคติโนมัยสีทบางชนิดในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารพิษชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์ย่อยสลายสารพิษอะลิฟาติก-อะโรมาติก โคโพลีเอสเตอร์ส (Aliphatic-Aromotic Copolyesters และ 1,4-ไดออกเซน(1,4-Dioxane) ทางการแพทย์และเภสัชกรรมก็ใช้ประโยชน์จาก แอคติโนมัยสีท เช่นใช้ผลิตสารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสและใช้ผลิตสารต้านมะเร็งและสารกดระบบภูมิคุ้มกัน ทางการเกษตรมีการใช้แอคติโนมัยสีทในการผลิตสารฆ่าแมลง สารฆ่าวัชพืช และสารกดภูมิคุ้มกัน

2.5.2.4.5 การใช้แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ *Streptomyces lydicus* WYEC 108 ในการควบคุมศัตรูพืช และควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชที่เกิดกับรากและเมล็ด ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยแอคติโนมัยสีทชนิดหนึ่ง คือ *Streptoverticillium albireticculi* และค้นพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถต่อต้านเชื้อราที่ก่อโรคที่อยู่ในดินบางอย่างได้ ซึ่งการค้นพบนี้จึงอาจนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชได้ในอนาคต แบคทีเรียแอคติโนมัยสีท เป็นตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่มีคุณประโยชน์ต่อวงการแพทย์และยา เกษตรกรรมและอุตสาหกรรม รวมถึงต่อวัฏจักรของระบบนิเวศ (Science in action 5, 4(เมษายน 2552) : 23)(http://chemsci.kku.ac.th/chalerm/research.htm)

2.6 เชื้อบาซิลลัส (*Bacillus*)

Bacillus คือแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นท่อนอาจพบเป็นท่อนเดียวหรือต่อกันเป็นสายย้อมติดสีแกรมบวกอยู่ในวงศ์ Bacillaceae สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาต้องการออกซิเจนในการเจริญบางชนิดเป็น *facultative anaerobe* เชื้อบาซิลลัสพบอยู่ทั่วไปในทุกสภาพแวดล้อมส่วนมากพบอยู่ในดินเชื้อบาซิลลัสสามารถสร้างสปอร์ได้ดังนั้นสปอร์จึงลอยไปตกตามที่ต่างๆซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตหากไปตกในที่มีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่น สภาพที่มีความร้อน ความแห้งแล้ง สารเคมีและสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ก็สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมและรอจนสามารถเจริญได้ (พรพรรณ อู่สุวรรณ, 2007) สภาพแวดล้อมที่ต่างกันทำให้เชื้อบาซิลลัสมีความหลากหลาย ได้แก่ พวกที่ต้องการออกซิเจน(aerobes) ไม่ต้องการออกซิเจนเป็นบางช่วง(facultative anaerobes) เจริญได้ในสภาพกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(acidophiles) สภาพด่าง (alkalophiles)สภาพที่มีความเค็ม(halophiles) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophiles) อุณหภูมิสูง(thermophiles) และพวกที่ใช้สารเคมีอนินทรีย์ในการเจริญ (chemolithotrophs) เป็นต้น เชื้อบาซิลลัสมีคุณสมบัติเป็น plant growth promotion rhizobacteria (PGPR)(จรัญประจันบาล, 2551)ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดพืชให้สูงขึ้นและส่งเสริมการเจริญทางด้าน vegetative growth เช่นความสูง พื้นที่ใบจำนวนของ tillers และส่งเสริมการเจริญทางด้าน reproductive growth เช่นเพิ่มขนาดความยาวของผลเพิ่มน้ำหนักผลผลิตให้สูงขึ้น ลดการเกิดโรคโดยการชักนำหรือกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อรา เชื้อบาซิลลัสมีกลไกในการควบคุมโรคพืชหลายวิธีได้แก่ การแข่งขันกับเชื้อโรคพืชและการผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายชีวิตพบว่าเชื้อ*B. subtilis* สายพันธุ์ AP01 สามารถเข้าครอบครองพื้นที่ก่อนการเจริญเติบโตของเชื้อรา*Fusarium roseum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวและโคนเน่าของกล้วยไม้ และเชื้อ*Pythium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้มโอ เมื่อนำ*B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และ NSRS 89-26 คลุกเมล็ดข้าวหรือแช่เมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถลดความรุนแรงของโรคขอบใบแห้งสาเหตุจากเชื้อ*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* จากระดับความรุนแรงของโรค 94 เป็น 19 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับนอกจากนั้นยังสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวที่สำคัญ 7 ชนิดคือ*Pyricularia oryzae*, *Cercospora oryzae*, *Thanatephoruscucumeris*, *Curvularia oryzae*, *Acrocylindrium oryzae*, *Rhynchosporium oryzae* และ*Alternariapadwickii* (Charigkapakorn, Noonim, Aneckachi และ Warensahd, 1991) นอกจากนี้นลินีจาริกภากร, พาณีหนูนิ่ม, บุญมีวารินสอาด, พิรุณจันทนกุลและมนูญ เอนกชัย (2534) ทำการทดสอบการควบคุมโรคโดยวิธีการคลุกเมล็ดพบว่า*B. Subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-26 ช่วยลดอัตราการเกิดโรคของเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าได้ดีไม่มีผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การงอกและความแข็งแรงของเมล็ดต้นกล้าเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมล็ดที่ไม่มีการคลุกเชื้อแบคทีเรียและมีความเหมาะสมที่จะใช้ในสภาพที่มีโรคระบาดหรือมีโรคที่ติดมากับเมล็ดสูง Shoda (2000) ยังพบว่า*B. subtilis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิดเช่นbacillomycin, iturin, mycosubtilin, bacilysin, fengymycin และ mycobacillin ขึ้นอยู่กับอาหารที่เหมาะสมในขณะที่เชื้อ*B. subtilis* สายพันธุ์ FR-2 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ Iturin A ที่มีฤทธิ์ต่อต้านโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราในแตงกวาโรคใบไหม้และโรคกาบใบแห้งของข้าว (Pusey, 1989) Rytter, Lukezic, Craig and Moorman (1989) รายงานว่าเชื้อ *B. subtilis* เข้าไปเจริญและทำลายสปอร์ของเชื้อราสนิมในพืชพวกไม้ดอก เชื้อ*B. subtilis* ยังมีความสามารถในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) โดยการผลิตสาร toxic metabolite บางชนิดที่เป็นประโยชน์ในการชักนำหรือกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotinia sclerotirum* (นลินี จาริกภากร, พาณีหนูนิ่ม, บุญมี วารินสะอาดและมนูญ เอนกชัย, 2535) Eldoksch, Atteia and Abdel-Moity (2001) พบว่า *B.subtilis* สามารถลดความรุนแรงของโรคราสนิมในข้าวสาลีได้ถึง 57.14 เปอร์เซ็นต์เนื่องจากมีการสร้างสารปฏิชีวนะเช่น subtilin, bacillin, bacillomycin, subtenolin, mycosubtilin, toximycin, bacitracin, xanthobacidin, iturin,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

subtilosin และ subsporin complex ขณะที่ Niranjan Raj, Chaluvaraju, Amruthesh and Shetty (2003)

เชื้อ *Bacillus cereus* UW85 สามารถดึงธาตุแคลเซียมจากดินมาใช้ในการสร้างสปอร์ในเซลล์แล้วยังปลดปล่อยแอมโมเนียออกมาทำให้สภาพดินเป็นด่างทำให้เชื้อ *Phytophthora* spp. ไม่สามารถสร้าง zoospore ได้ (Gilbert, Handelsman and Parke, 1990) นอกจากนี้ Handelsman, Raffel, Mester, Wunderlich and Grau, (1990) ยังพบว่าเชื้อ*B. Cereus* UW85 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะซึ่งมีผลต่อการอยู่รอดของ zoospore ขณะที่ Tokala (2002) พบว่า*Streptomyces lydicus* WYEC108 สามารถเจริญครอบครองบริเวณรากพืชตระกูลถั่วได้ดีโดยการสร้างเส้นใยและสปอร์บริเวณรากพืชทำให้ลดการเข้าทำลายจากเชื้อ *Rhizoctonia solani*

2.6.1 ลักษณะของเชื้อบาซิลลัส

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) รูปร่างเป็นท่อน ทรงกระบอก (rodshaped) อาจเป็นท่อนเดียวหรือต่อกันเป็นสายมีขนาด 0.5-2.5x1.2-10 ไมโครเมตร (Claus andBerkeley, 1986 ; Turnbull, Kramer and Melling, 1990 ; Rosovitz, Voskuil and Chamblis, 1998)ต้องการออกซิเจนในการหายใจบางครั้งเจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน(facultative anaerobe) สร้างสปอร์ภายในเซลล์(endospore forming) ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเจริญได้ในอาหารหลายชนิดและเติบโตได้ดีในอุณหภูมิปกติและ pH เป็นกลางและสามารถเคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella

2.6.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อบาซิลลัส

Bacillus spp. มีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาลักษณะโคโลนีมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมคุณภาพและปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ อายุโคโลนีและจำนวนโคโลนีต่อจานอาหารที่เลี้ยงซึ่งมีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ในสภาพแวดล้อมเดียวกันลักษณะโคโลนีสามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ (Rosovitz *et al.*, 1998) เช่นเมื่อเลี้ยงในอาหาร casein agar เชื้อ *B. megaterium* ให้โคโลนีมีสีเหลืองเชื้อ *B. firmus* ให้โคโลนีสีชมพูเชื้อ*B. licheniformis* ให้โคโลนีสีแดงถึงน้ำตาลเชื้อ*B. pumilus* ให้โคโลนีสีเหลืองอ่อนเชื้อ*B. sphaericus* ให้โคโลนีสีชมพูและเชื้อ*B. subtilis* ให้โคโลนีสีชมพูเหลืองส้มหรือน้ำตาล เซลล์ของแบคทีเรียสกุล*Bacillus* ประกอบด้วย cytoplasmic membrane และcellwall ส่วน cell wall ประกอบด้วย peptidoglycan หลายชั้น anionic polymers ทำให้ผนังเซลล์มีความเหนียวบริเวณผิวหน้าของ cell wall เป็นชั้นของ paracrystalline cell wall surface layers (S layers)ประกอบด้วยโปรตีน*Bacillus* spp. ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาแบบ peritrichousflagella มีประโยชน์ในการตรวจจำแนก*B. cereus, B.thuringiensis* และ*B. sphaericus* (Turnbull *et al.*, 1990) แบคทีเรียสกุล Bacillus สร้างสปอร์ภายในเซลล์เมื่ออาหารมีจำกัดเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase และอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมทำให้สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เช่นความร้อนแสง UV และสารเคมีต่างๆรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์และตำแหน่งการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ใช้จำแนก*Bacillus*ได้เป็น 3 กลุ่ม (สุรางค์สุธิราวุธ, 2538) คือ

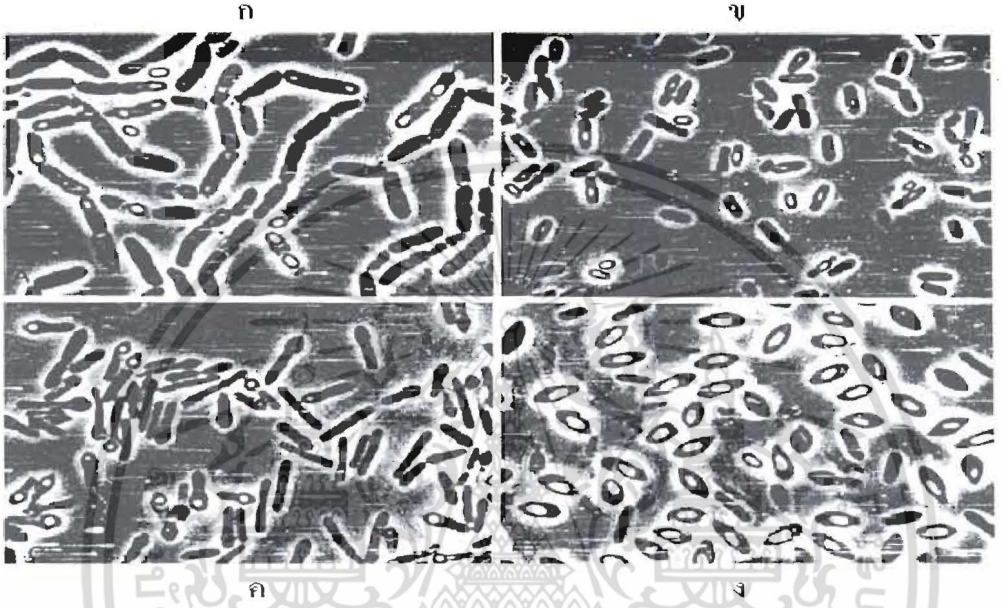
กลุ่มที่ 1 เซลล์ไม่โป่งพองสปอร์เป็นรูปวงรีหรือรูปทรงกระบอกตำแหน่งสปอร์อยู่ตรงกลางหรือค่อนไปทางปลายเซลล์กลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย (รูปที่ 2.6กและข) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 1A : เซลล์มีขนาดใหญ่กว้างมากกว่า 1 ไมโครเมตรภายใน protoplasm จะมีแกรนูลที่ไม่ติดสีแกรมทำให้เห็นเซลล์ไม่ติดสีเป็นช่วงๆได้แก่*B.megaterium, B.cereus, B.cereus* var. *mycoides, B. thuringiensis* และ*B.anthracis*

กลุ่มที่ 1B : ขนาดเซลล์กว้างน้อยกว่า 1 ไมโครเมตรเช่น*B. subtilis, B. pumilis, B. licheniformis, B. firmus* และ*B.coagulans* เป็นต้น

กลุ่มที่ 2 เซลล์โป่งพองสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ตำแหน่งอยู่กลางหรือปลายเซลล์ (รูปที่2.6ค) ได้แก่*B. circulans, B. macerans, B. polymyxa, B. alvei, B. laterosporus, B. brevis, B.popilliae, B. larvae, B. stearothermophilus* และ*B. lentimorbus*



กลุ่มที่ 3 สปอร์ทำให้เซลล์โป่งออกหรือบางครั้งไม่โป่งสปอร์รูปร่างกลมตำแหน่งอยู่ปลายหรือค่อนไปทางปลายเซลล์ (รูปที่ 2.6ง) เช่น*B. sphaericus*

รูปที่ 2.5 ลักษณะของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ*Bacillus* spp.

กลุ่มที่ 1 (กและข) กลุ่มที่ 2 (ค) กลุ่มที่ 3 (ง)

ที่มา: Sneath *et.al.* (1986)

2.6.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อบาซิลลัส

Bacillus spp. สามารถสร้างเอนไซม์ catalase จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างจากแบคทีเรียสกุล*Clostridium* และ*Sporolactobacillus* ได้แบคทีเรียสกุล Bacillus ต้องการสารอาหารและสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 ต้องการอาหารธรรมดาทั่วไปที่มีส่วนประกอบไม่ซับซ้อน

กลุ่มที่ 2 ต้องการอาหารที่มีส่วนประกอบซับซ้อน

กลุ่มที่ 3 ต้องการอาหารเฉพาะสำหรับการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆที่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต*Bacillus* spp.จะสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊สยกเว้น*B. polymyxa*และ*B. macerans* ที่สร้างแก๊สด้วยและคาร์โบไฮเดรตชนิดเดียวกันอาจจะให้แก๊สที่แตกต่างกันเช่น*B.subtilis*, *B.cereus* และ *B.licheniformis* เจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสแล้วได้ 2,3-butanediol และ glycerol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacillus spp. ทุกชนิดเจริญได้ดีในที่ๆมีออกซิเจนบางชนิดจำเป็นต้องมีออกซิเจนจึงจะสามารถเจริญได้เช่น*B. subtilis*, *B. brevis*, *B. firmus* และ*B. Sphaericus* ส่วน*B.cereus*, *B. athracis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa* และ*B. coagulans* บางครั้งสามารถเจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน*Bacillus* spp. ส่วนใหญ่สามารถตรึงไนโตรเจนและสามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ (Turnball *etal*., 1990)

Bacillus spp. สามารถเจริญได้ดีที่ pH เป็นกลางหรือกรดเล็กน้อยแต่*B. alcalophilus* สามารถเจริญได้ที่ pH 9-10 ขณะที่*B. acidocaldarius*สามารถเจริญได้ที่ pH 2-6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ*Bacillus* spp. อยู่ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียสขณะที่*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B.stearothermophilus*,*B. brevis* และ*B. acidocaldarius* ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 55องศาเซลเซียส

2.6.4 นิเวศวิทยาของเชื้อบาซิลลัส

Bacillus spp. พบได้ทั่วไปในธรรมชาติเช่นดินน้ำอากาศฝุ่นพืชเศษซากพืชแม้แต่ในอาหารนมและธัญญาหาร (Claus and Berkeley, 1986) *Bacillus* spp. พบได้ทุกสภาพแวดล้อมเพราะสปอร์ที่แบคทีเรียสร้างทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันทำให้ขนิดของ*Bacillus* spp. มีความหลากหลายเช่นพวกที่ต้องการออกซิเจน (aerobes) ไม่ต้องการออกซิเจนเป็นบางช่วง (facultative anaerobes) เจริญได้ในสภาพกรด (acidophiles) สภาพด่าง(alkalophiles) สภาพที่มีความเค็ม (halophiles) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophiles) อุณหภูมิสูง(thermophiles) และพวกที่ใช้สารเคมีอนินทรีย์ในการเจริญ (chemolithotrophs) (Claus andBerkeley, 1986) ส่วนใหญ่เป็นพวกที่เจริญอยู่ในดินแต่บางครั้งพบ*B. subtilis* และ*B. Licheniformis*อยู่ในน้ำทะเลและน้ำกร่อย (Rosovitz *et al*., 1998)

Bacillus spp. ที่พบจะแตกต่างกันตามชนิดของดินเช่น*B. subtilis*, *B. licheniformis* และ*B. cereus* ไม่ต้องการสารประกอบในอาหารมากนักสามารถพบได้ในดินที่มีธาตุอาหารต่ำ*B. polymyxa* และ *B. azotofixans* พบในดินรอบๆรากพืชที่มีธาตุอาหารส่วน*B. macerans* และ*B. circulans* ต้องการสารประกอบอาหารที่ซับซ้อนและพบในเศษซากพืชที่ย่อยสลาย (Priest, 1989 อ้างถึงใน Rosovitz *et al*., 1998) *B. licheniformis*, *B. subtilis* และ*B. pumilus* พบในน้ำทะเลที่สะอาด

Bacillus spp. หลายชนิดสามารถเจริญได้แม้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่นในสภาพแวดล้อมที่มียูเรียสูงพบในอาหารแช่แข็งในน้ำพุร้อนที่เป็นกรดและดินรอบๆบริเวณนั้นเท่านั้น (Priest, 1989 อ้างถึงใน Rosovitz *et al*., 1998) ในอาหารที่ต้องผ่านขบวนการให้ความร้อนเช่นน้ำตาลจากบีท (beet sugar) และอาหารกระป๋องเป็นต้น (Priest, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ; memmert 854 Schwabach w. GERMANY

3.1.2 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ; HIRAYAMA รุ่น HA-300 MIV

3.1.3 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Airflow) ; HOLTEN

3.1.4เครื่องชั่งสาร (balance) ; Sartorius รุ่น TE 313S

3.1.5 เครื่องวัดค่าพีเอช(pH meter) ; CLEAN รุ่น PH 200 & PH 500

3.1.6 บีกเกอร์ขนาด 250,500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.7 หลอดทดลองและจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.1.8 ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร

3.1.9 กระบอกตวงปริมาตร 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์ลูปเขี่ยเชื้อและสไลด์

3.1.11 แท่งแก้วคนสารและแท่งแก้วงอ

3.1.12 จุกยางและช้อนตักสาร

3.1.13 สำลีและผ้าก๊อซ

3.1.14 เครื่องเขย่า (Shaker) ; FIRSTEK SCIENTIFIC รุ่น ORBITAL SHAKER OSI-501

3.1.15 ไมโครปิเปตปริมาตร 100 -1,000 ไมโครลิตร

3.1.16 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (*Bright* field Microscope); OLYMPUS รุ่น CHO3

3.1.17 microcentrifuge tube

3.1.18 เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) ; Kurzzeit

3.1.19 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ; HERMLE รุ่น Z36 HK

3.1.20 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ; Astell Hearson

3.1.21 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectophotometer) ; UNICO รุ่น UV-2800 A

3.1.22 เตาไมโครเวฟ ; Sumsung รุ่น m1913

3.1.23 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ; EUROTHERM รุ่น TEDS-4

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 Yeast extract –malt extract agar, ISP medium no. 2

3.2.2 Nutrient agar(NA)

3.2.3 Nutrient broth(NB)

3.2.4 Carbon utilization medium, ISPmedium no. 9

3.2.5 Potato Dextrose Agar, PDA

3.3 สารเคมี

3.3.1 NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์

3.3.2 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

3.3.3 สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)

3.3.4 วุ้น (agar)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 กลูโคส (glucose)

3.3.6 ทรีส-ไฮโดรเจนคลอไรด์ (tris-HCl)

3.3.7 แอลทริปโตเฟน (L-tryptophane)

3.3.8 เปปโตน (peptone)

3.3.9 Salkowski reagent

3.3.10 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3.3.11 แอมโมเนียมซัลเฟต$(NH_4)_2SO_4$

3.3.12 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4)

3.3.13 แมกนีเซียมซัลเฟต $(MgSO_4.7H_2O)$

3.3.14 กรดคาซามิโน (casamino acid)

3.3.15 คอปเปอร์ซัลเฟต $(CuSO_4.5H_2O)$

3.3.16 ไอออนซัลเฟต $(FeSO_4.7H_2O)$

3.3.17 แมงกานีสคลอไรด์ $(MnCl_2.4H_2O)$

3.3.18 ซิงค์ซัลไฟด์ $(ZnSO_4.H_2O)$

3.3.19 ไอออนคลอไรด์ $(FeCl_3.6H_2O)$

3.3.20 ไฮโดรคลอริก (HCL)

3.3.21 โครโมอะซูรอล เอส (Chromo azurol S)

3.3.22 เฮกซะไดซิลไตรเมทิลลาโมเนียมโบรไมด์ (Hexadecyltrimethylamonium bromide)

3.3.23 กลีเซอรอล (Glycerol)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเก็บตัวอย่างดิน การทดสอบดินตัวอย่างและวิธีการเตรียมดินตัวอย่าง

3.4.1.1 เก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวระยะออกรวงหรือแตกกอ (Himadri Bhusan Bal และคณะ, 2012) บริเวณขอบของแปลงที่มีความลึก 15 เซนติเมตร โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 5 บริเวณ โดยกำหนดบริเวณเก็บตัวอย่างดังนี้ A, B, C, D และ Eบริเวณละ 5 ต้น โดยการเก็บตัวอย่างควรถอนต้นข้าวขึ้นมาจากแปลงอย่างระมัดระวังอย่าให้รากขาดและเก็บใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ

3.4.1.2 ตรวจสอบคุณสมบัติของดิน

ตรวจสอบคุณสมบัติของดินบริเวณที่เก็บตัวอย่างเช่น สีและลักษณะของดินรวมทั้งทำการวัดค่า pH ของดินบริเวณที่เก็บตัวอย่างต้นข้าว โดยใช้กระดาษลิตมัสวัดค่า pH จุ่มลงในดินทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาทีจึงเก็บผล แยกแต่ละบริเวณA, B, C, D และ E ตามลำดับ

3.4.1.3 การเตรียมดินตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างดิน โดยการเขย่าต้นข้าวเพื่อให้ดินบริเวณรอบนอกรากข้าวออก จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบ ๆ รากข้าว นำมาแผ่ให้กระจายบนถาด นำไปผึ่งลมให้แห้งประมาณ 3 วัน เพื่อให้แบคทีเรียบางส่วนที่ไม่ต้องการตายไปและเพื่อให้ดินตัวอย่างแห้งจะได้น้ำหนักแห้งของดินตัวอย่าง เก็บใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อโดยแยกเป็นบริเวณ A,B,C,D และ E ตามลำดับ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียสระหว่างรอการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทและกลุ่มบาซิลลัส

3.4.2.1 การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีท

ชั่งตัวอย่างดินบริเวณรากข้าว 1 กรัมต่อน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตรเพื่อให้ได้ดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}จากนั้นเจือจางต่อจนถึงระดับความเจือจาง 10^{-4}และนำตัวอย่างดินระดับความเจือจาง 10^{-2}-10^{-4}มา 0.1 มิลลิลิตรทำการ spread ลงบนอาหาร ZSSE agar ที่ประกอบด้วย soluble starch 5 กรัม, KNO_3 1 กรัม, soil extracts 1,000 มิลลิลิตร, Agar 10 กรัม pH 7.2 ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ nystatin 100 มิลลิกรัมต่อลิตรและ nalidixic 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Zhang,2011) บ่มที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ทำการทดลองซ้ำสองครั้งต่อระดับความเจือจาง คัดเลือกโคโลนีบนจานอาหารที่มีลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยดูการเจริญ สี ลักษณะผิวของโคโลนี จากนั้นทำการแยกโคโลนีเดี่ยวโดยลากแต่ละไอโซเลทลงบนอาหารYeast extract –malt extract agar , ISP medium no.2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันนำเชื้อที่คัดเลือกได้ไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อต่อไป

3.4.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส

ชั่งตัวอย่างดินบริเวณรากข้าว 1 กรัมต่อ NaCl 0.85 % 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผสมให้เข้ากันประมาณ 1-2 นาที และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างดินมาเจือจางต่อถึงระดับความเข้มข้นที่ 10^{-1}-10^{-6}นำตัวอย่างดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}-10^{-6}มา 0.1 มิลลิลิตร ทำการ spread ลงบนอาหาร Nutrient agar(NA)pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-2 วันทำการทดลองซ้ำสองครั้งต่อระดับความเจือจาง คัดเลือกโคโลนีบนจานอาหารที่มีลักษณะของเชื้อบาซิลลัส โดยดูการเจริญ สีและลักษณะของโคโลนี จากนั้นทำการแยกโคโลนีเดี่ยวโดยลากแต่ละไอโซเลท ลงบนอาหาร Nutrient agar(NA)pH 7.0 แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-2 วันนำเชื้อที่คัดเลือกได้ไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อต่อไป

3.4.3 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ (Morphological and cultural characteristics)

3.4.3.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยสีท

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (ISP) โดยวิธี crosshatch streak ตรวจผลโดยดูการเจริญ และสีของโคโลนีทั้งด้านบนและด้านล่าง รงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) ตรวจดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ

3.4.3.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อกลุ่มบาซิลลัส

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน Nutrient agar โดยวิธี cross streak ตรวจผลโดยดูการเจริญ สีและลักษณะของโคโลนีทั้งด้านบนและด้านล่าง ตรวจดูลักษณะรูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.4 ตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อที่มีการผลิตกรดอินโดลอะซิติกซิเดอโรฟอร์และการย่อยสลายสารฟอสเฟต

3.4.4.1 ตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อที่มีการผลิตกรดอินโดลอะซิติก(IAA)

โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้จากแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทและบาซิลลัสมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี tryptophan ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 - 14 วัน จากนั้นนำเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บาซิลลัสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองและเติม Salkowski reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตรบ่มปฏิกิริยาไว้ประมาณ 30 นาที สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หากสารละลายเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีเหลืองเป็นสีชมพู แสดงว่าแบคทีเรียที่ทดสอบมีการผลิตฮอร์โมน Indole acetic acid (IAA) ขึ้นจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

3.4.4.2 ตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อที่มีการผลิตสารซิเดอโรฟอร์ (Schwyn,B. และ Neiland,J.B.,1986)

โดยเตรียมอาหาร ISP9 และ NA ที่มีส่วนผสมของ casamino acid 0.45 กรัม ในอาหาร 900 มิลลิลิตรและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.8-7.0 จากนั้นเตรียมสารละลาย Iron (III) solution (โดยเตรียมได้จากการชั่ง $FeCl_3.6H_2O$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรผสมกับ HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) และเตรียมสารละลาย chromo azurol S (CAS solution) โดยชั่ง CAS 0.0605 กรัมมาละลายกับน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลาย Hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA solution) โดยชั่ง HDTMA 0.0729 กรัมละลายกับน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เมื่อเตรียมครบ 3 ชนิดแล้วนำสารละลาย Iron (III) solution มา 10 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย CAS solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตรแล้วนำมาผสมกับสารละลาย HDTMA 40 มิลลิลิตรจนครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนของอาหาร ISP9 / NA และสารละลายผสม 100 มิลลิลิตรมาผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วรออาหาร ISP9 กับสารละลายผสมเย็นลงเหลือเพียง 50 องศาเซลเซียส นำสารละลายผสม 100 มิลลิลิตรผสมกับอาหาร ISP9 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันจนครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยขั้นตอนการผสมต้องอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อทั้งหมด จากนั้นแล้วเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รอให้อาหารแข็งเป็นวุ้น แล้วนำตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ ขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยว ๆ บริเวณกลางอาหาร โดยเชื้อ แอคติโนมัยสีทจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเวลา 14 วันและเชื้อบาซิลลัสจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเวลา 5 วัน จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพการสร้างสารซิเดอโรฟอร์จากการเกิดส่วนใสสีเหลืองบนอาหาร โดยวัดเป็นหน่วยมิลลิเมตร

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

โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract- malt extract agar หรือ Nutrient agar ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลาย K_2HPO_4ความเข้มข้น ร้อยละ 10 น้ำหนักต่อปริมาตร 50 มิลลิลิตรและเตรียมสาร $CaCl_2$ความเข้มข้นร้อยละ 10 น้ำหนักต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อเตรียม 3 ชนิดนำไปผ่านหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วรออาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract- malt extract agar กับสารละลายทั้งสองเย็นลงเหลือประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงนำสารละลายทั้งสองเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วคนอาหารให้เข้ากัน โดยขั้นตอนการผสมต้องอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อทั้งหมด แล้วเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รอให้อาหารแข็งเป็นวุ้น นำตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ ขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยว ๆ บริเวณกลางอาหาร โดยส่วนของเชื้อแอคติโนมัยสีทนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน ส่วนเชื้อบาซิลลัสจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารฟอสเฟตจากลักษณะการเกิดส่วนใสบนอาหาร โดยวัดเป็นหน่วยมิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5 การคัดเลือกสายพันธุ์ปฏิปักษ์กับเชื้อก่อโรคพืช

3.4.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคไหม้

ทดสอบโดยวิธี dual culture technique โดยนำแบคทีเรียในกลุ่ม PGP strain มาทดสอบ โดยนำแต่ละสายพันธุ์มาต่อเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อสาเหตุโรค Control ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค (*P. grisea*) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบการยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคของเชื้อทดสอบ

3.4.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืช

ทดสอบโดยทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast extract- malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยวยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง โดยเชื้อแอคติโนมัยสีทนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 14 วัน ส่วนเชื้อบาซิลลัสบ่มนาน 2 วันเพื่อให้เชื้อผลิตสารและแพร่สารนั้นเข้าในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ด้วยแบคทีเรียที่แยกจากต้นข้าวที่เป็นโรคข้าว 2 ชนิดได้แก่ *Xanthomonas* sp. *X3* และ*Xanthomonas* sp. *X4*โดยลากจุลินทรีย์ทดสอบให้ชิดและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อมากที่สุด แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่จุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าว

4.1.1 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีท

เมื่อทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าวพันธุ์ กข. 11จากศูนย์บริการและถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตรประจำตำบลศาลากลาง อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรี จำนวน 15 ตัวอย่าง ดินบริเวณรอบรากต้นข้าว จังหวัดสระบุรี จำนวน 5 ตัวอย่างและจากสถาบันวิจัยเชื้อแอคติโนมัยสีท คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ได้ทำการคัดเลือกเชื้อจำนวน 73 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าวพันธุ์ กข. 11 จากศูนย์บริการและถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตรประจำตำบลศาลากลาง อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรี จำนวน 9 ไอโซเลท เชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าว จังหวัดสระบุรี จำนวน 2 ไอโซเลท และเชื้อแอคติโนมัยสีทจากสถาบันวิจัยเชื้อแอคติโนมัยสีท คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวน 62 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4.1

4.1.2 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อบาซิลลัส

เมื่อทำการแยกและคัดเลือกเชื้อบาซิลลัสจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าวพันธุ์ กข. 11จากศูนย์บริการและถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตรประจำตำบลศาลากลาง อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรี จำนวน 15 ตัวอย่าง ดินบริเวณรอบรากต้นข้าว จังหวัดสระบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกเชื้อ บาซิลลัสที่ได้ทำการคัดเลือกเชื้อจำนวน 56 ไอโซเลทได้แก่ เชื้อบาซิลลัสจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าวพันธุ์ กข. 11 จากศูนย์บริการและถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตรประจำตำบลศาลากลาง อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรี จำนวน 41 ไอโซเลท เชื้อบาซิลลัสจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าว จังหวัดสระบุรี จำนวน 15 ไอโซเลทดังแสดงในตารางที่ 4.2

4.2 ผลการตรวจสอบสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ

4.2.1 ผลการตรวจสอบสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีท

เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยสีท 15 ไอโซเลทมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยง Yeast extract-malt extract agar เพื่อตรวจสอบการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยดูจากการมองเห็นหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งนาน 14 วัน เพื่อตรวจสอบการเจริญ สีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร และลักษณะสปอร์ของเชื้อ ดังตารางที่ 4.3

4.2.2 ผลการตรวจสอบสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อบาซิลลัส

เมื่อนำเชื้อบาซิลลัส 16 ไอโซเลทมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยง Nutrient agar เพื่อตรวจสอบการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยดูจากการมองเห็นหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งนาน 5 วัน เพื่อตรวจสอบการเจริญ สีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร ลักษณะรูปร่าง และการติดสีแกรมของเชื้อ ดังตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 รหัสเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

รหัสตัวอย่าง	สถานที่	รหัสเชื้อ
AM*	นนทบุรี	AM1 , AM2 , AM3 , AM4 , AM5 , AM6 , AM7 , AM8 , AM9
	สระบุรี	AM10 ,AM11
G	สถาบันวิจัยเชื้อแอคติโนมัยสีท คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	G2-8 , G10-1 ,G1-8 , G1-7 , G6-5 , G2-5 , G5-8 , G4-8 , G8-6 G4-A1 , G6-12 , G3-6
NR		NR7-8 ,NR8-15 , NR9-13 , NR10-1
DSR		DSR-4-5 , DSR-4-9 , DSR-4-4
PCWR		PCWR-4-7 , PCWR-4-6 , PCWR-4-3 , PCWR-8-1
DCWR		DCWR-9-1 ,DCWR-8-4, DCWR-8-6, DCWR-9-6, DCWR-8-5
D315R		D315R-9-6 , D315R-9-5 , D315R-4-6 , D315R-9-2 , D315R-4-5 , D315R-4-4
VT		VT4-3
LB		LB-5-1-5 , LB-5-1-3
UP2R		UP2R-4-4
PD2R		PD2R-9-2
P039R		P039R-4-18
DH31N		DH31N-4-12 , DH31N-9-13 , DH31N-9-10 , DH31N-4-11 , DH31N-4-9 , DH31N-9-15
DH315		DH315-4-17 , DH315-4-15 , DH315-4-8
DH31L		DH31L-4-17 , DH31L-4-23
DH039		DH039-9-13 , DH039-9-15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 รหัสเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง(ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	สถานที่	รหัสเชื้อ
P31SS	สถาบันวิจัยเชื้อแอคติโนมัยสีท คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	P31SS-9-1
U039R		U039R-4-6
AY		AY15-19
PP2R		PP2R-9-2 , PP2R-4-11 , PP2R-8-1 , PP2R-4-7
AT2L		AT2L-11 , AT2L-14

หมายเหตุ AM* = เชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากข้าว ของจังหวัดนนทบุรีและสระบุรี

ตารางที่ 4.2 รหัสเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

รหัสตัวอย่าง	สถานที่	รหัสเชื้อ
I*	สระบุรี	I1 , I2 , I3 , I4 , I5 , I6 , I7 , I8 , I9 , I10 , I11 , I12 , I13 , I14 , I15
A , B , C , D , E*	นนทบุรี	A-6 B5 , A-6 B6 , B-5 B7 , B-4 B9 , B-4 B10 , B-6 B12 , C-4 B16 , D-6 B21 , D-5 B23 , D-4 B24 , E-4 B29 , E-4 B30 , E-4 B31 , E-4 B32 , E-4 B33 , E-4 B34 , E-4 B35 , E-4 B36, D-5 B37 , D-5 B38 , D-4 B39 , D-6 B40 , D-6 B41 , B-6 B42 , B-6 B43 , B-4 B44 , A-4 B45 , C-5 B46 , A-4 B47 , C-5 B48 , C-4 B49 , C-4 B50 , E-4 B51 , E-2 B53 , E-3 B54 , C-2 B56 , B-2 B57 , B-2 B59 , A-2 B60 , A-3 B61 , D-3 B62 , B-4 B63

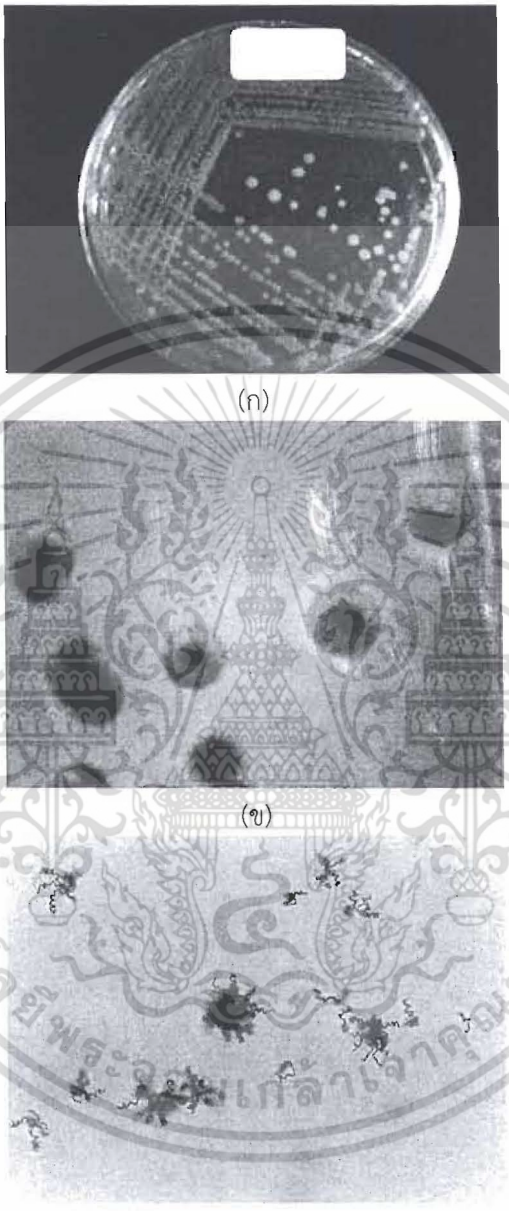
หมายเหตุ I* = เชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากข้าว ของจังหวัดสระบุรี

A , B , C , D , E*= เชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากข้าว บริเวณตำแหน่งต่าง ๆ ของจังหวัดนนทบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีท

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท AM5 เจริญได้ดีในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีแดงอมชมพู เส้นใยอาหารสีส้มแดง ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบการสร้างสปอร์แบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว ดังรูปที่ 4.1



(ก)

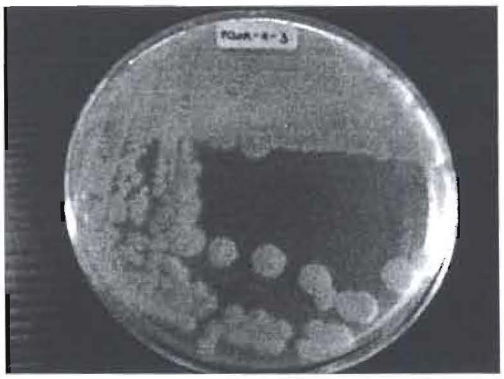
(ข)

(ค)

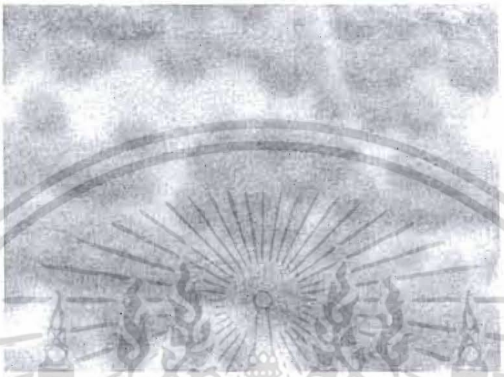
รูปที่4.1 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท AM5
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PCWR-4-3เจริญได้ดีในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาว เส้นใยอาหารสีครีม ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบการสร้างสปอร์แบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว ดังรูปที่ 4.2

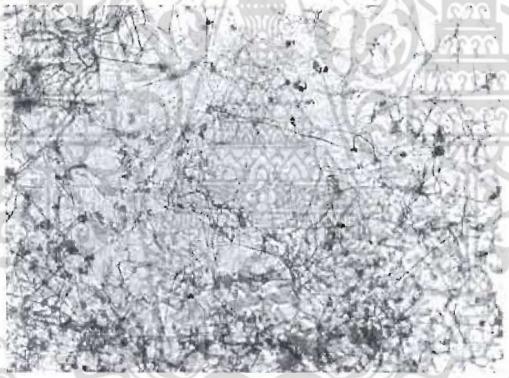
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

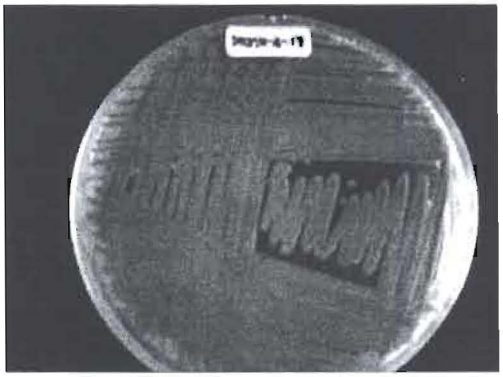


(ค)

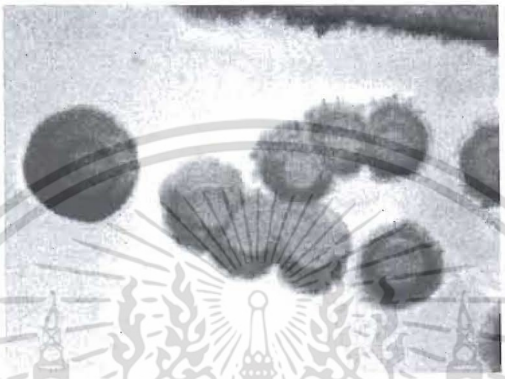
รูปที่4.2 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PCWR-4-3
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท DH315N-4-17 เจริญได้ดีในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา เส้นใยอาหารสีครีมน้ำตาล ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบการสร้างสปอร์แบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว ดังรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



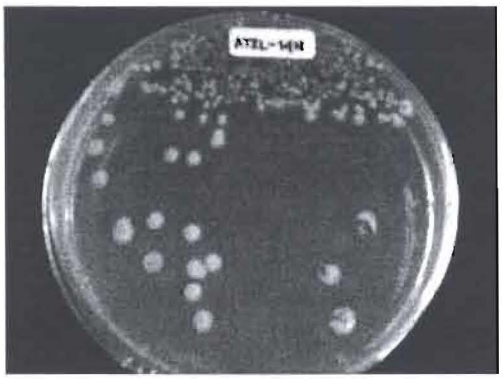
(ข)

(ค)

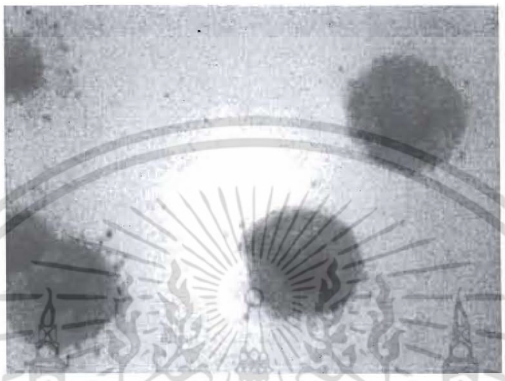
รูปที่4.3 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท DH315N-4-17
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท AT2L-14 เจริญได้น้อยในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา เส้นใยอาหารสีครีม ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบการสร้างสปอร์เดี่ยว ดังรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

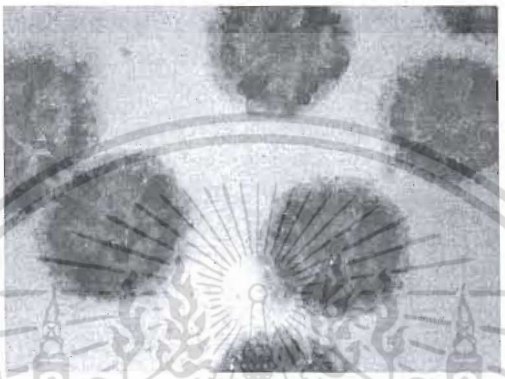
(ค)

รูปที่4.4 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท AT2L-14
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท G5-8 เจริญได้ดีในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาว เส้นใยอาหารสีน้ำตาล ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบการสร้างสปอร์แบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว ดังรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



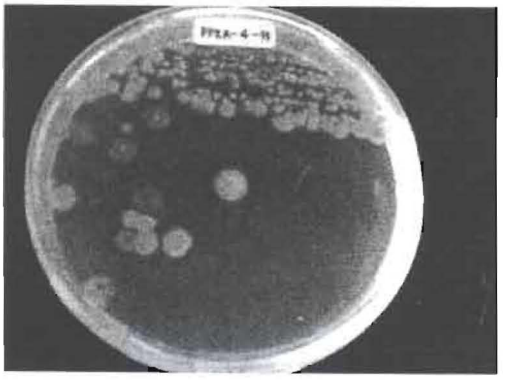
(ข)

(ค)

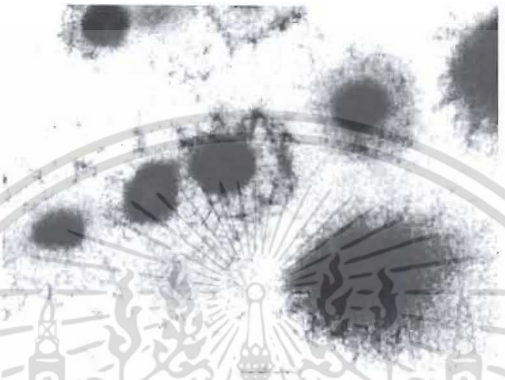
รูปที่4.5 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท G5-8
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PP2R-4-11 เจริญได้ดีในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา เส้นใยอาหารสีขาวครีม ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบการสร้างสปอร์เป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



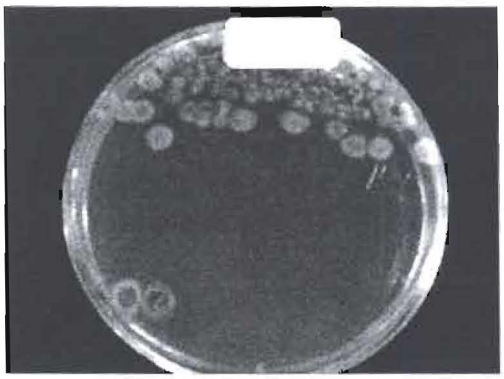
(ข)

(ค)

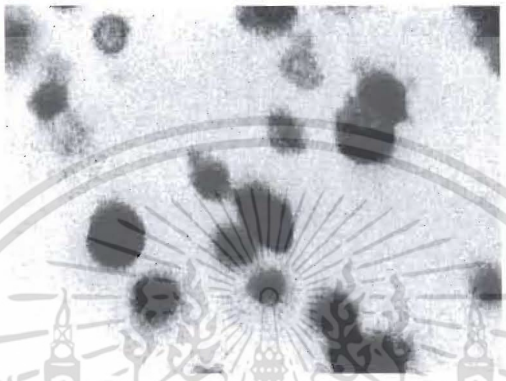
รูปที่4.6 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PP2R-4-11
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PP2R-8-1 เจริญได้น้อยในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา เส้นใยอาหารสีครีมน้ำตาล ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบการสร้างสปอร์เป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 4.7

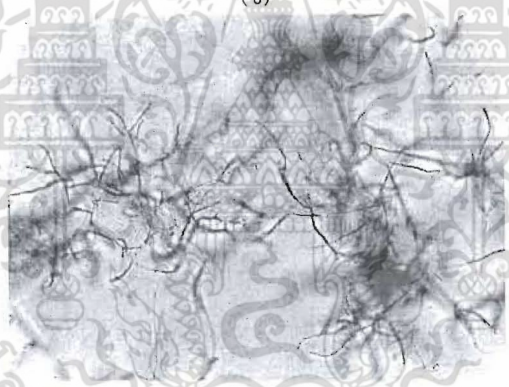
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

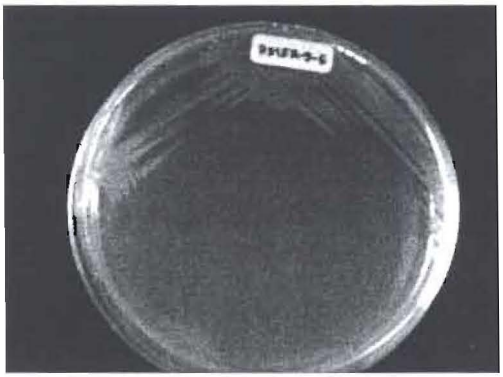


(ค)

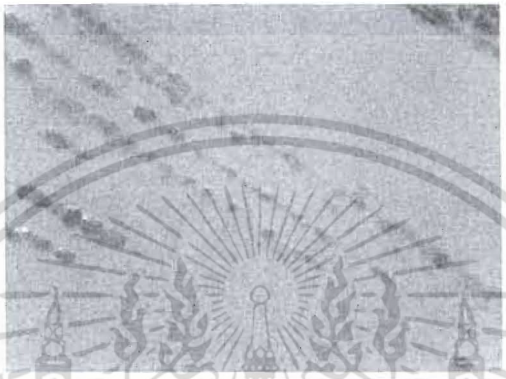
รูปที่4.7 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PP2R-8-1
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท D315R-9-6 เจริญได้น้อยในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีส้ม เส้นใยอาหารสีส้ม ไม่มีการสร้างรงควัตถุ ไม่พบการสร้างสปอร์ในวันที่ทำการตรวจผลการทดลอง จึงยังไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัดดังรูปที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

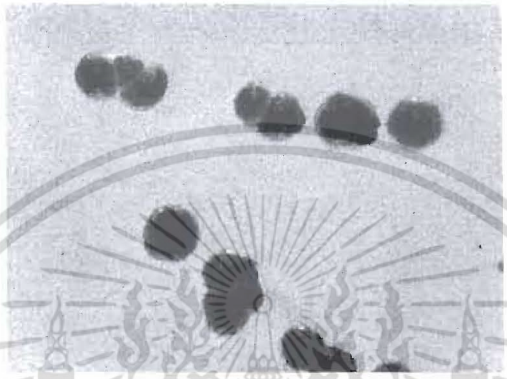
(ค)

รูปที่4.8 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท D315R-9-6
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท DCWR-9-1 เจริญได้น้อยในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาล เส้นใยอาหารสีน้ำตาลถึงดำ ไม่มีการสร้างรงควัตถุ ไม่พบการสร้างสปอร์ในวันที่ทำการตรวจผลการทดลอง จึงยังไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัด ดังรูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



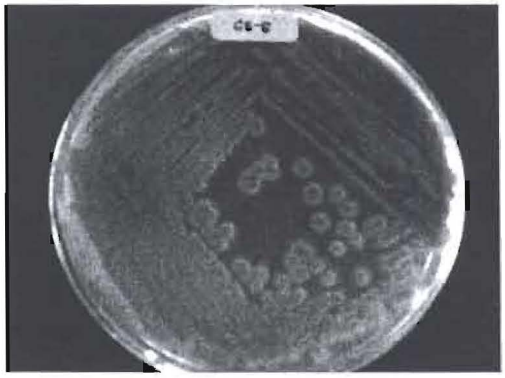
(ข)

(ค)

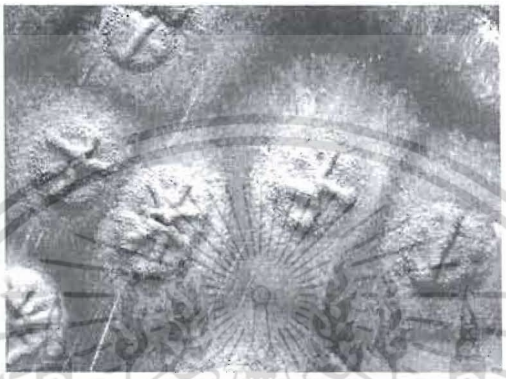
รูปที่4.9 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท DCWR-9-1
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท G8-6 เจริญได้ดีในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีครีม เส้นใยอาหารสีน้ำตาล ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบการสร้างสปอร์เป็นแบบโซ่ยาวแบบเกลียว ดังรูปที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



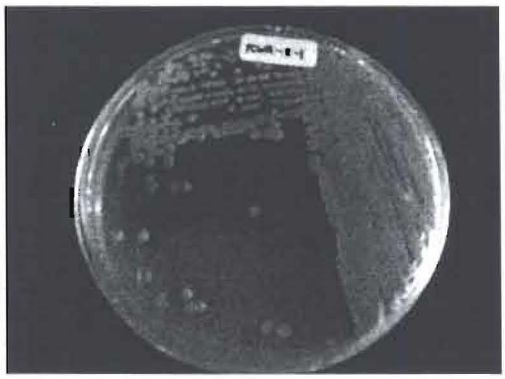
(ข)

(ค)

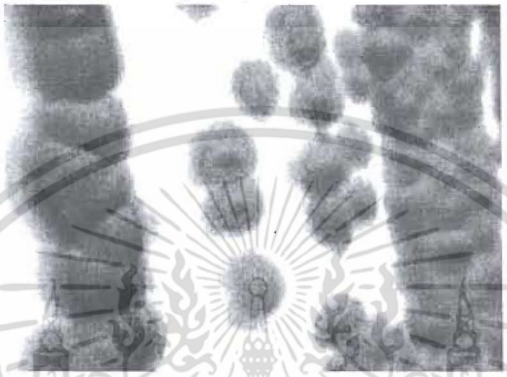
รูปที่4.10 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท G8-6
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PCWR-8-1 เจริญได้ดีในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาว เส้นใยอาหารสีครีมน้ำตาล สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลพบการสร้างสปอร์เป็นแบบโซ่ยาวแบบเกลียวดังรูปที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

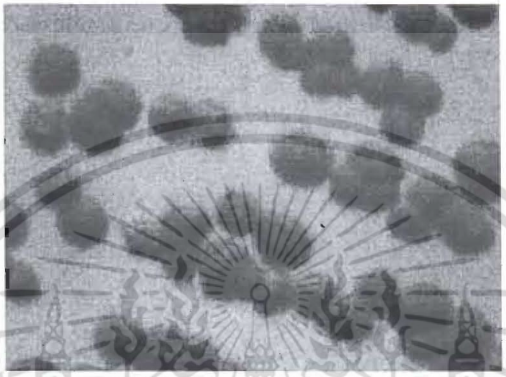
(ค)

รูปที่4.11 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PCWR-8-1
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท DH315-4-15 เจริญได้ดีในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา เส้นใยอาหารสีเขียวเข้ม สร้างรงควัตถุสีเขียวขี้ม้าพบการสร้างสปอร์เป็นแบบโซ่ยาวแบบเกลียว ดังรูปที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



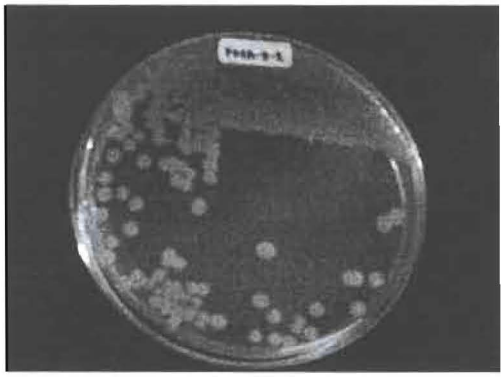
(ข)

(ค)

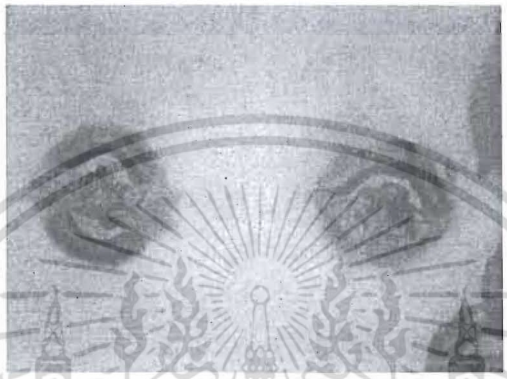
รูปที่4.12 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท DH315-4-15
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PP2R-9-2 เจริญได้ดีในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีครีม เส้นใยอาหารสีครีม ไม่มีการสร้างรงควัตถุ ไม่พบการสร้างสปอร์ในวันที่ทำการตรวจผลการทดลอง จึงยังไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัด ดังรูปที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

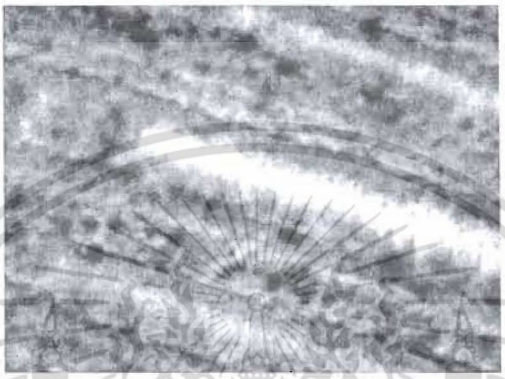
(ค)

รูปที่4.13 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PP2R-9-2
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

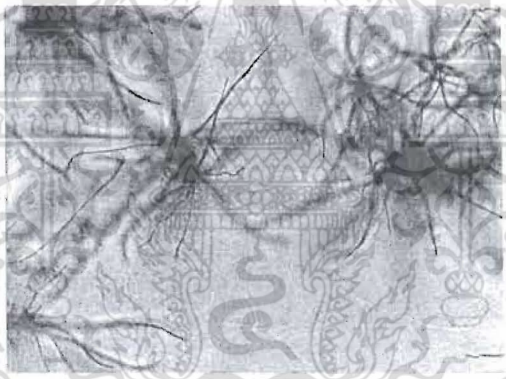
เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท DH31N-4-12 เจริญได้ดีในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา เส้นใยอาหารสีครีมน้ำตาล ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบการสร้างสปอร์เป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



(ข)

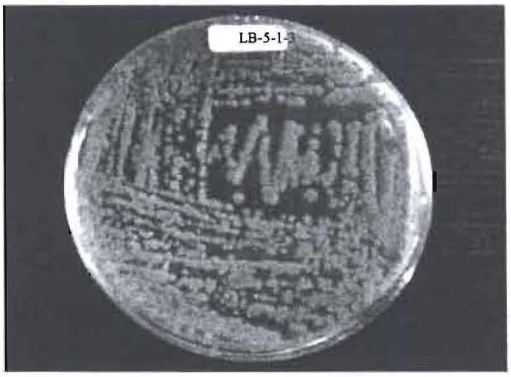


(ค)

รูปที่4.14 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท DH31N-4-12
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

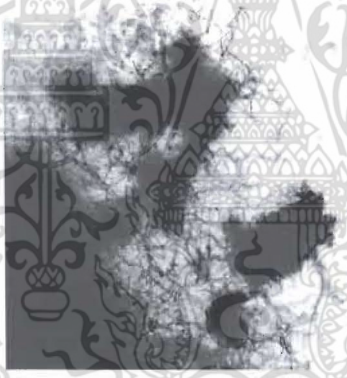
เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท LB-5-1-3 เจริญได้ดีในอาหาร ISP-2 มีการสร้างเส้นใยอากาศสีครีม เส้นใยอาหารสีเทาอ่อน ไม่มีการสร้างรงควัตถุ พบการสร้างสปอร์เป็นแบบโซ่ยาวแบบเกลียว ดังรูปที่ 4.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่4.15 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท LB-5-1-3
ก) การเจริญในอาหาร ISP-2 ข) ลักษณะโคโลนี (กำลังขยาย 100 เท่า) ค) สปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.3 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract – malt extract agar

รหัสเชื้อ	การเจริญ	ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ	ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุที่สร้าง
AM5	ดี	แดงอมชมพู (strong red, 4.0R 4.5/12.0)	ส้มแดง (deep pink, 1.9R 6.0/11.1)	-
PCWR-4-3	ดี	ขาว (light gray, 3.0Y 7.5/ 0.06)	ครีม (pale yellow, 4.2Y 8.9/3.6)	-
DH315N-4-17	ดี	เทา (medium gray, 3.0Y 5.5/ 0.06)	ครีมน้ำตาล (strong yellow, 4.0Y 7.2/l).5)	-
AT2L-14	น้อย	เทา (medium gray, 3.0Y 5.5/ 0.06)	ครีม (pale yellow, 4.2Y 8.9/3.6)	-
G5-8	ดี	ขาว (yellowish white, ·U Y 9.2/1.3)	น้ำตาล (deep yellow, 4.0 Y 6.0/9.5)	-
PP2R-4-11	ดี	เทา (medium gray, 3.0Y 5.5/ 0.06)	ขาวครีม (light yellow, 4.0 Y 8.8/6.6)	-
PP2R-8-1	น้อย	เทา (medium gray, 3.0Y 5.5/ 0.06)	ครีมน้ำตาล (brilliant yellow, 4.0 Y 8.8/9.5)	-
D315R-9-6	น้อย	ส้ม (vivid orange yellow, 9.0YR 7.2/16+)	ส้ม (vivid orange yellow, 9.0YR 7.2/16+)	-
DCWR-9-1	น้อย	น้ำตาล (light olive brown, 2.5 Y 5.0/8.4)	น้ำตาลถึงดำ (moderate olive brown, 2.5 Y 3.5 + /6+)	-
G8-6	ดี	ครีม (light yellow, 4.0 Y 8.8/6.6)	น้ำตาล (deep yellow, 4.0 Y 6.0/9.5)	-
PCWR-8-1	ดี	ขาว (yellowish white, ·U Y 9.2/1.3)	ครีมน้ำตาล (strong yellow, 4.0Y 7.2/l).5)	น้ำตาล
DH315-4-15	ดี	เทา (medium gray, 3.0Y 5.5/ 0.06)	เขียวเข้ม (moderate olive green, 5.0GY 3.5/ 5.2)	เขียวขี้ม้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

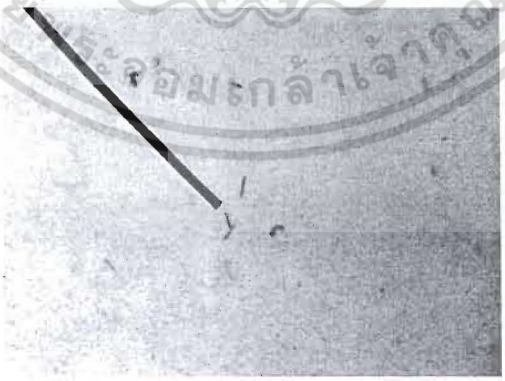
ตารางที่4.3 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract – malt extract agar(ต่อ)

รหัสเชื้อ	การเจริญ	ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ	ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุที่สร้าง
PP2R-9-2	ดี	ครีม (light yellow, 4.0 Y 8.8/6.6)	ครีม (light yellow, 4.0 Y 8.8/6.6)	-
DH31N-4-12	ดี	เทา (medium gray, 3.0Y 5.5/ 0.06)	ครีมน้ำตาล (strong yellow, 4.0Y 7.2/l).5)	-
LB-5-1-3	ดี	ครีม (light yellow, 4.0 Y 8.8/6.6)	เทาอ่อน (light gray, 3.0Y 7.5/ 0.06)	-

ลักษณะการเจริญ สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อบาซิลลัส

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I1 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีค่อนข้างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาว ทึบแสง ย้อมแกรมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม + รูปร่างท่อน ดังรูปที่ 4.16

(ก)



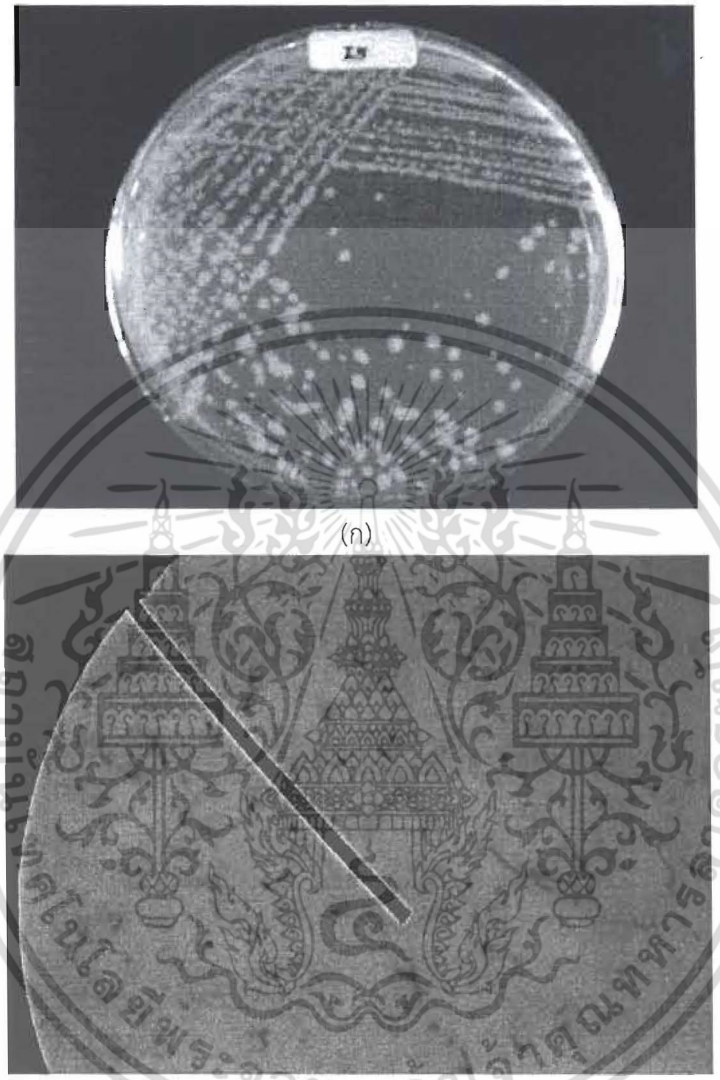
(ข)

รูปที่4.16 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I1

ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I5 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีค่อนข้างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวถึงครีม ทึบแสง ย้อมแกรมติดสีแดงของ safraninแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม – รูปร่างกลม ดังรูปที่ 4.17



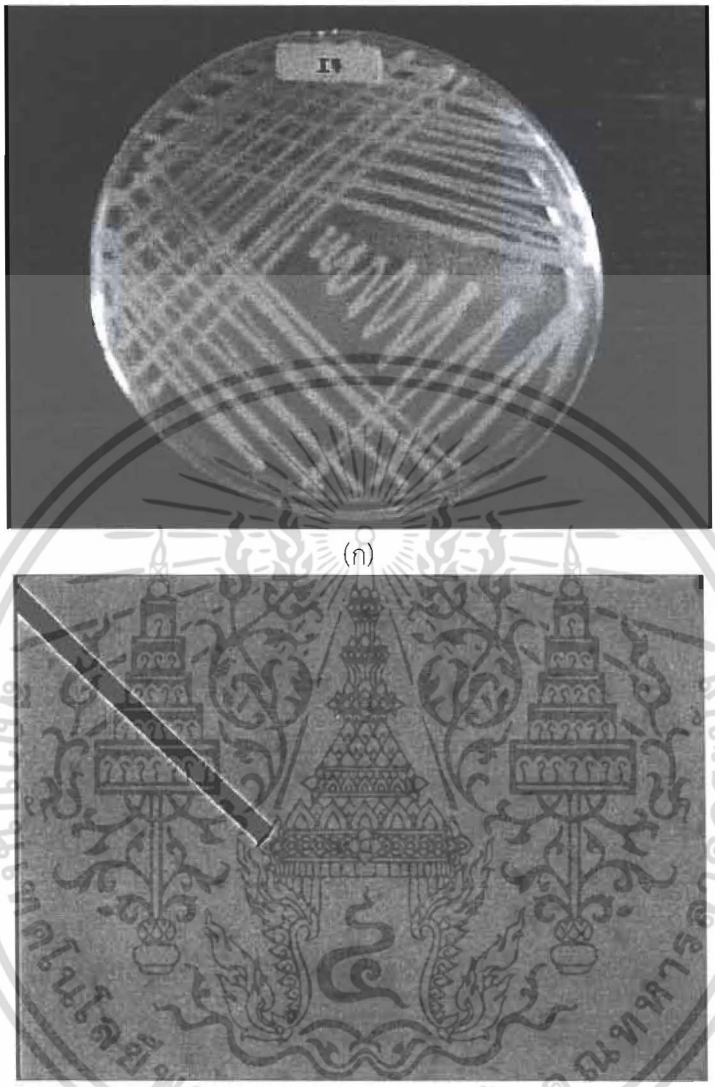
(ก)

(ข)

รูปที่4.17เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I5
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I7 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปกลมหรือไม่แน่นอน แบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร ขอบเป็นหยัก สีขาวถึงครีม มันวาว ทึบแสง ย้อมแกรมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม + รูปร่างท่อน ดังรูปที่4.18



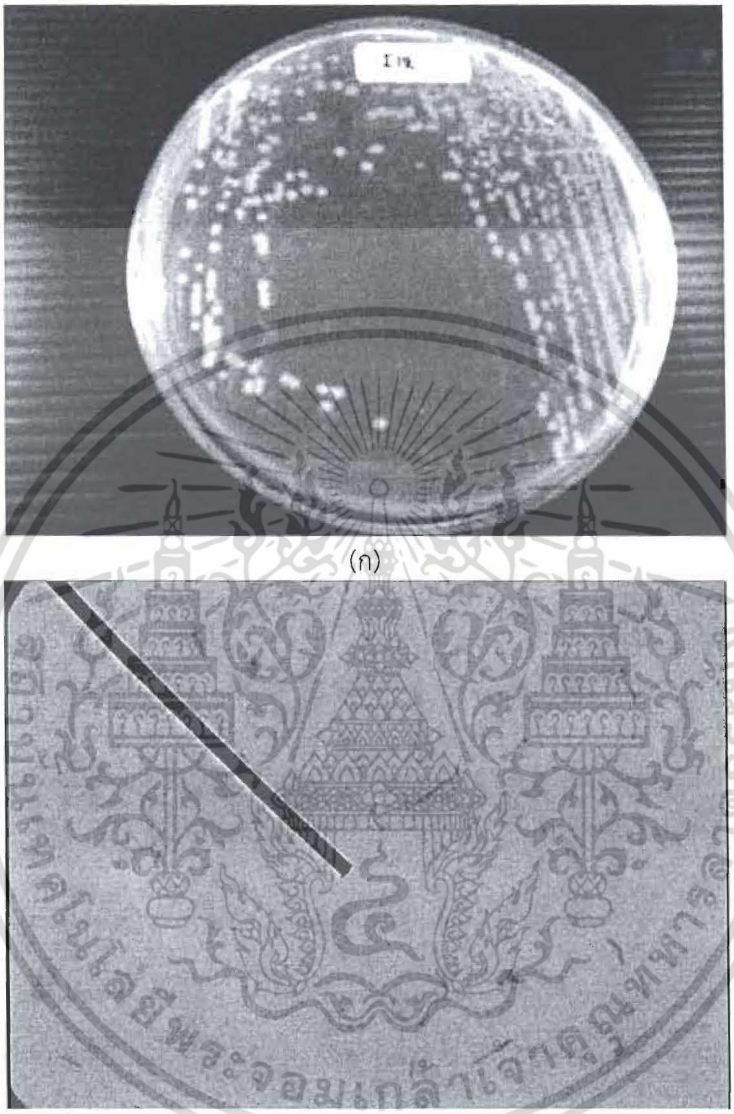
(ก)

(ข)

รูปที่4.18 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I7
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I12 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาว ถึงครีม มันวาว ทึบแสง ย้อมแกรมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม + รูปร่างท่อน ดังรูปที่4.19



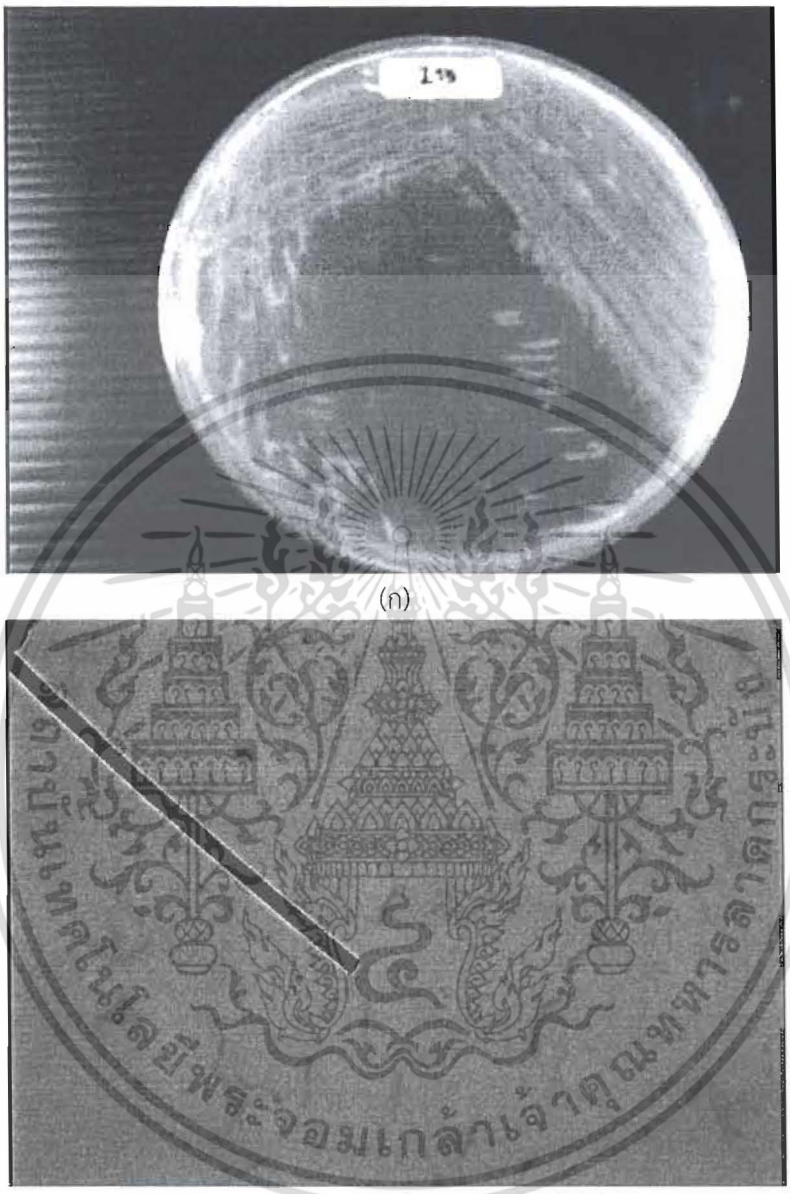
(ก)

(ข)

รูปที่4.19 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I12
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I15 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ลักษณะเป็นเส้นใย กระจัดกระจาย สีขาว ทึบแสง ย้อมแกรมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม + รูปร่างท่อน ดังรูปที่4.20



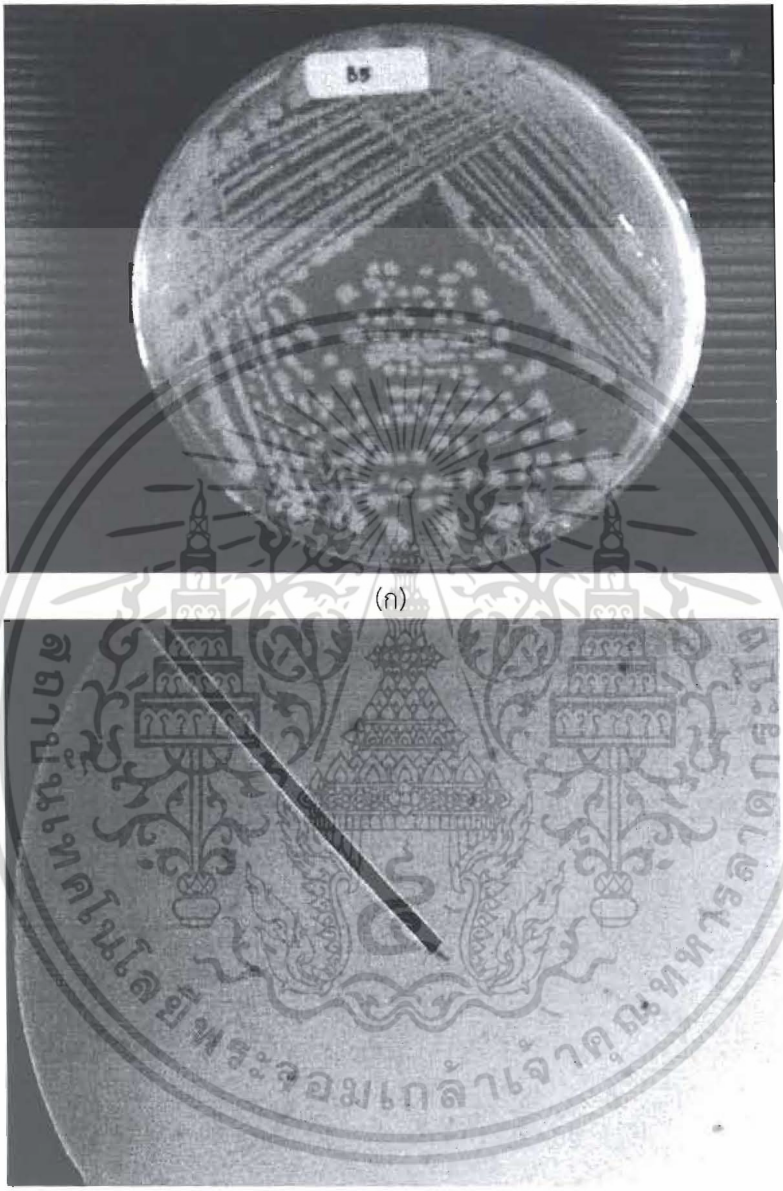
(ก)

(ข)

รูปที่4.20 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท I15
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B5 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน แบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร ขอบเรียบ สีขาว ผิวด้านทึบแสง ย้อมแกรมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม + รูปร่างท่อน ดังรูปที่4.21



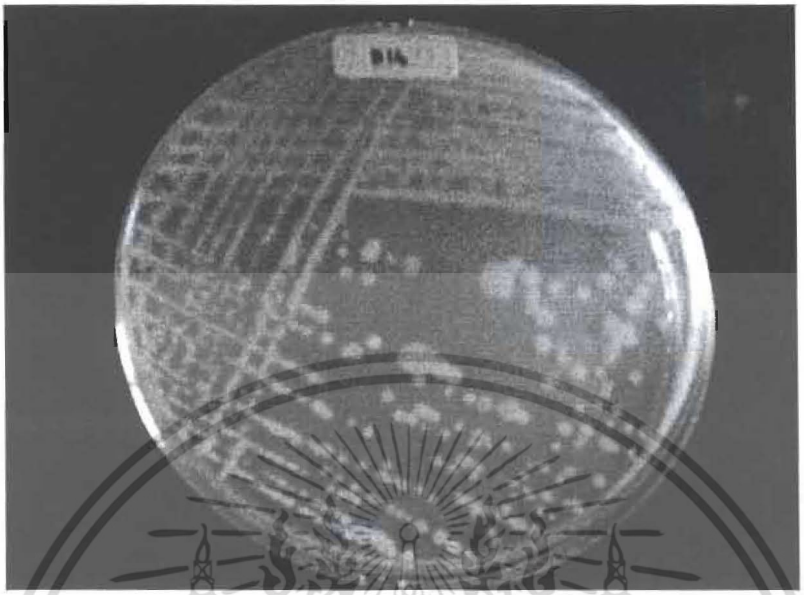
(ก)

(ข)

รูปที่4.21 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B5
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B16 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน โค้งนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร ขอบหยัก สีขาวถึงครีม ย้อมแกรมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม + รูปร่างท่อน ดังรูปที่4.22



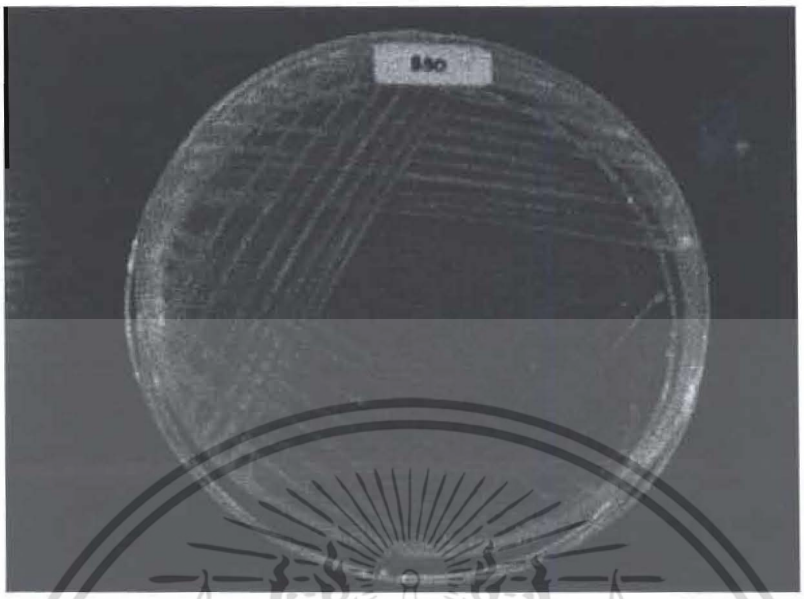
(ก)

(ข)

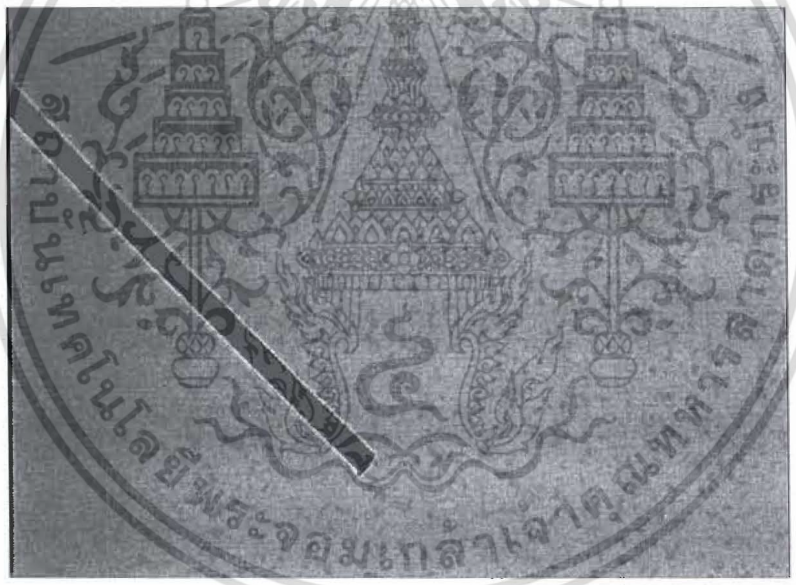
รูปที่4.22 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B16
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B30 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปร่างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวใส ย้อมแกรมติดสีแดงของ safranin แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม - รูปร่างกลม ดังรูปที่4.23



(ก)

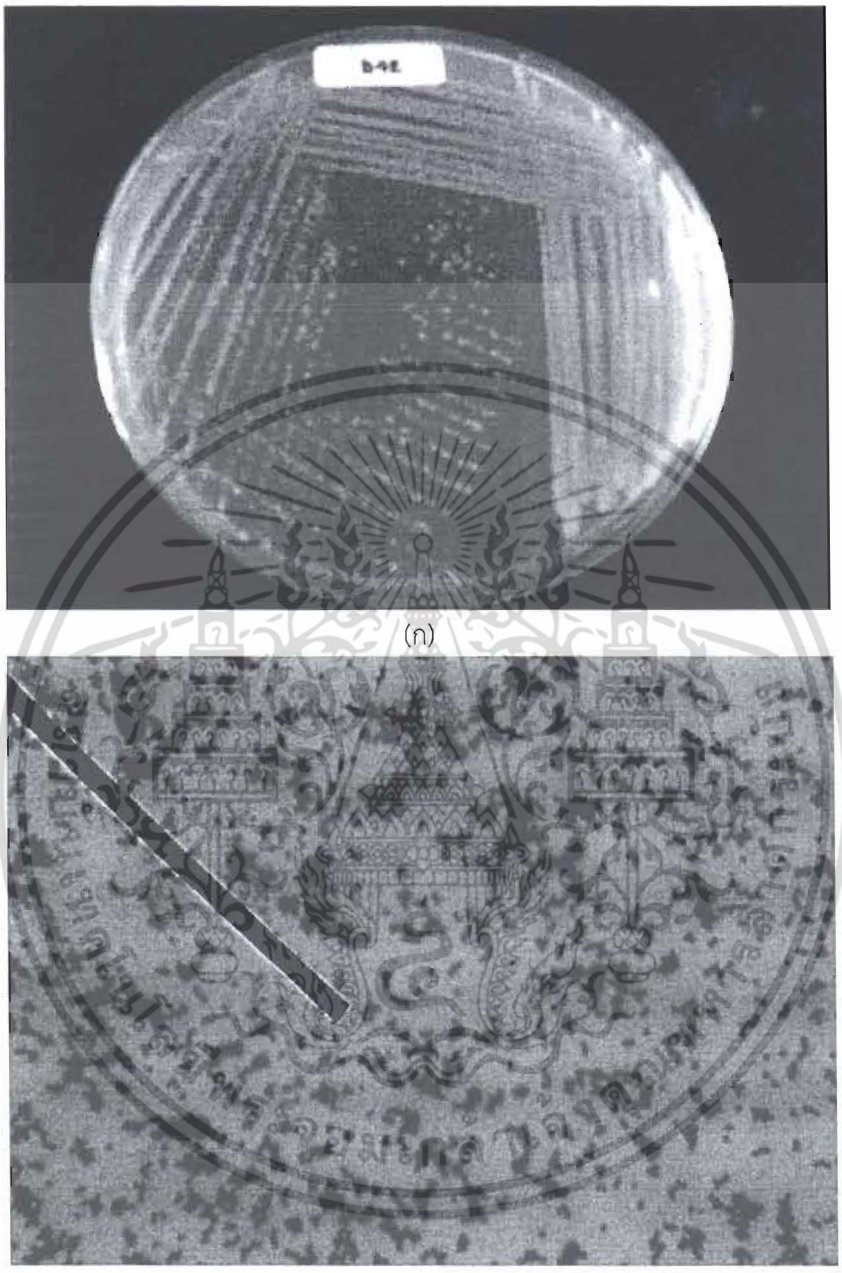


(ข)

รูปที่4.23 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B30
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B42 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปร่างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวถึงครีม ย้อมแกรมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม + รูปร่างกลม ดังรูปที่ 4.24



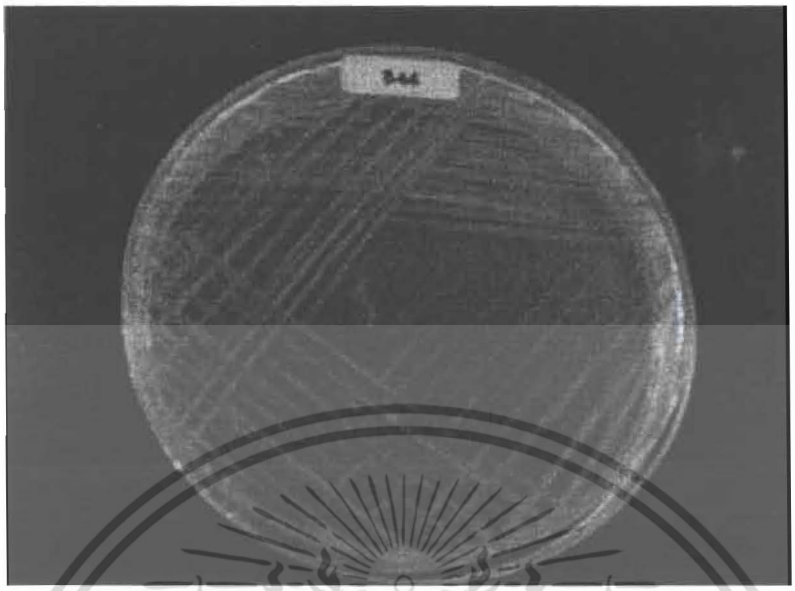
(ก)

(ข)

รูปที่4.24 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B42
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B44 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปร่างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวใส ย้อมแกรมติดสีแดงของ safranin แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม - รูปร่างกลม ดังรูปที่4.25



(ก)

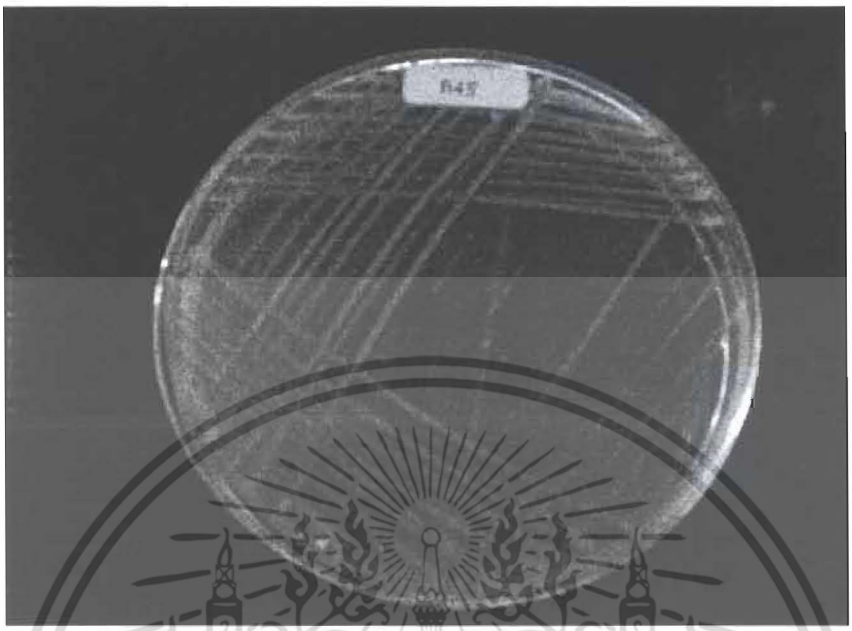
(ข)

รูปที่4.25 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B44

ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B45 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปร่างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวถึงครีม ทึบแสง ย้อมแกรมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม + รูปร่างท่อน ดังรูปที่4.26



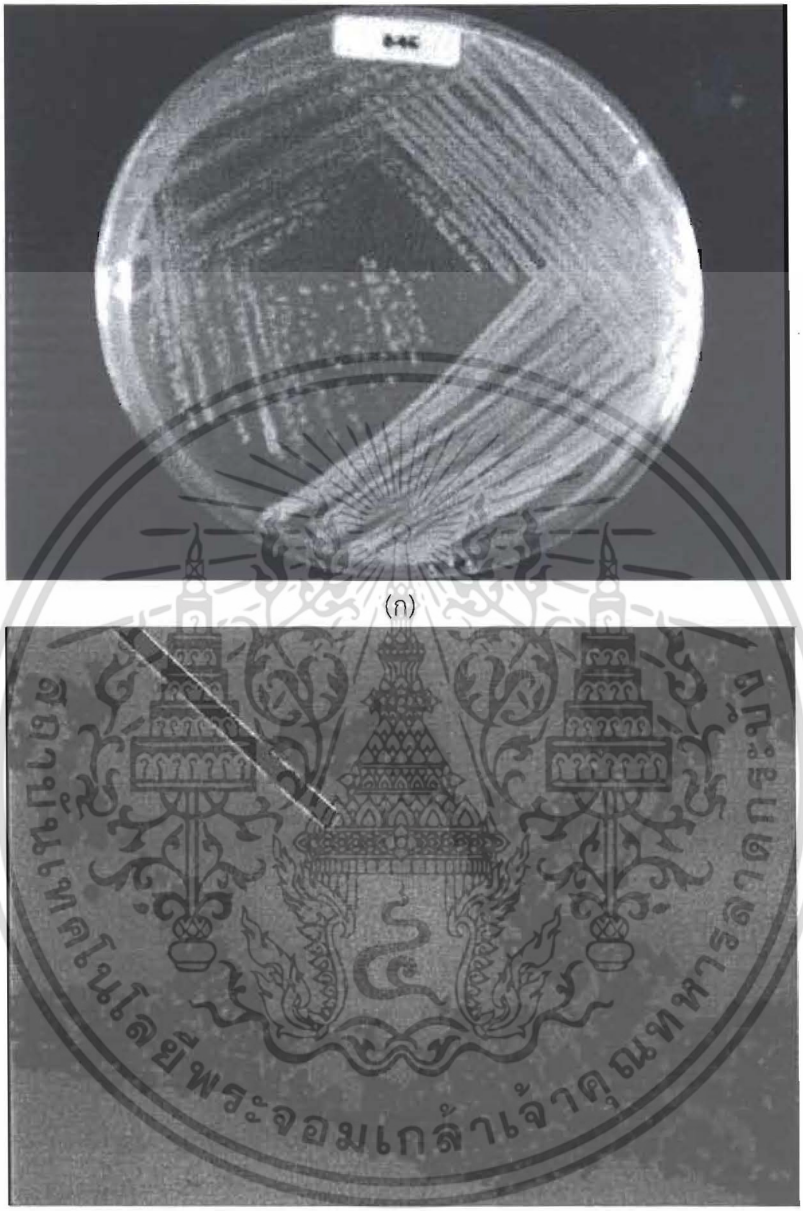
(ก)

(ข)

รูปที่4.26 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B45
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B46 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปร่างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีเหลือง ทึบแสง ย้อมแกรมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม + รูปร่างกลม ดังรูปที่4.27



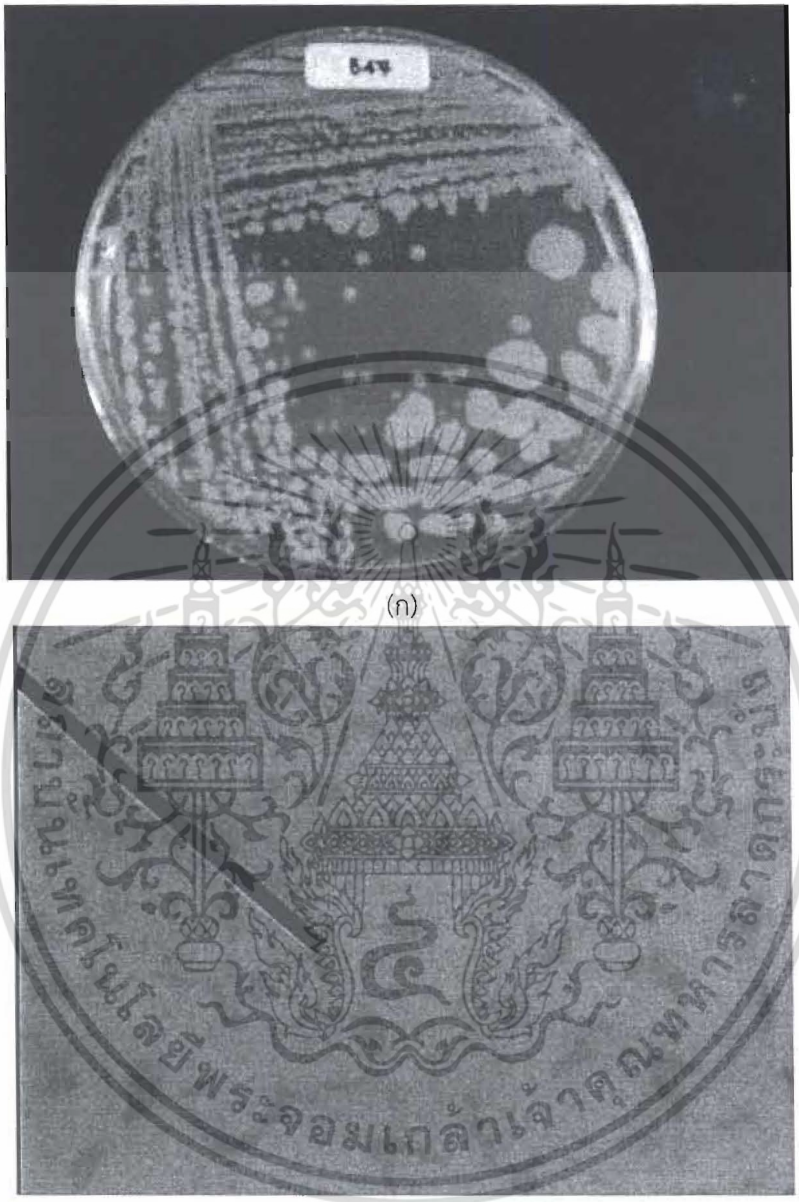
(ก)

(ข)

รูปที่4.27 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B46
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B47 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน แบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร ขอบเป็นหยัก สีขาวถึงครีม ทึบแสง ย้อมแกรมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม + รูปร่างกลม ดังรูปที่4.28



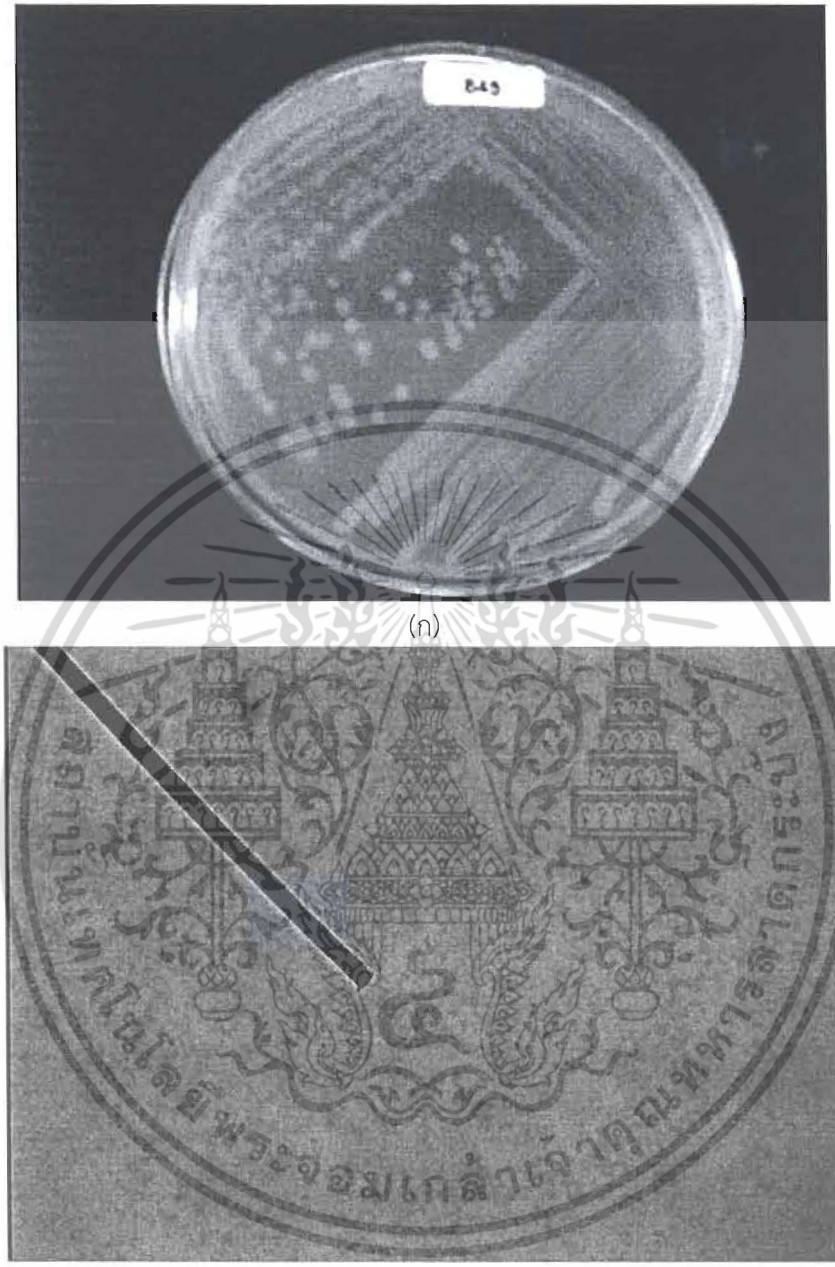
(ก)

(ข)

รูปที่4.28 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B47
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B49 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปร่างกลม นูนตรงกลาง ขอบเรียบ สีขาว ย้อมแกรมติดสีแดงของ safranin แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม - รูปร่างกลม ดังรูปที่4.29



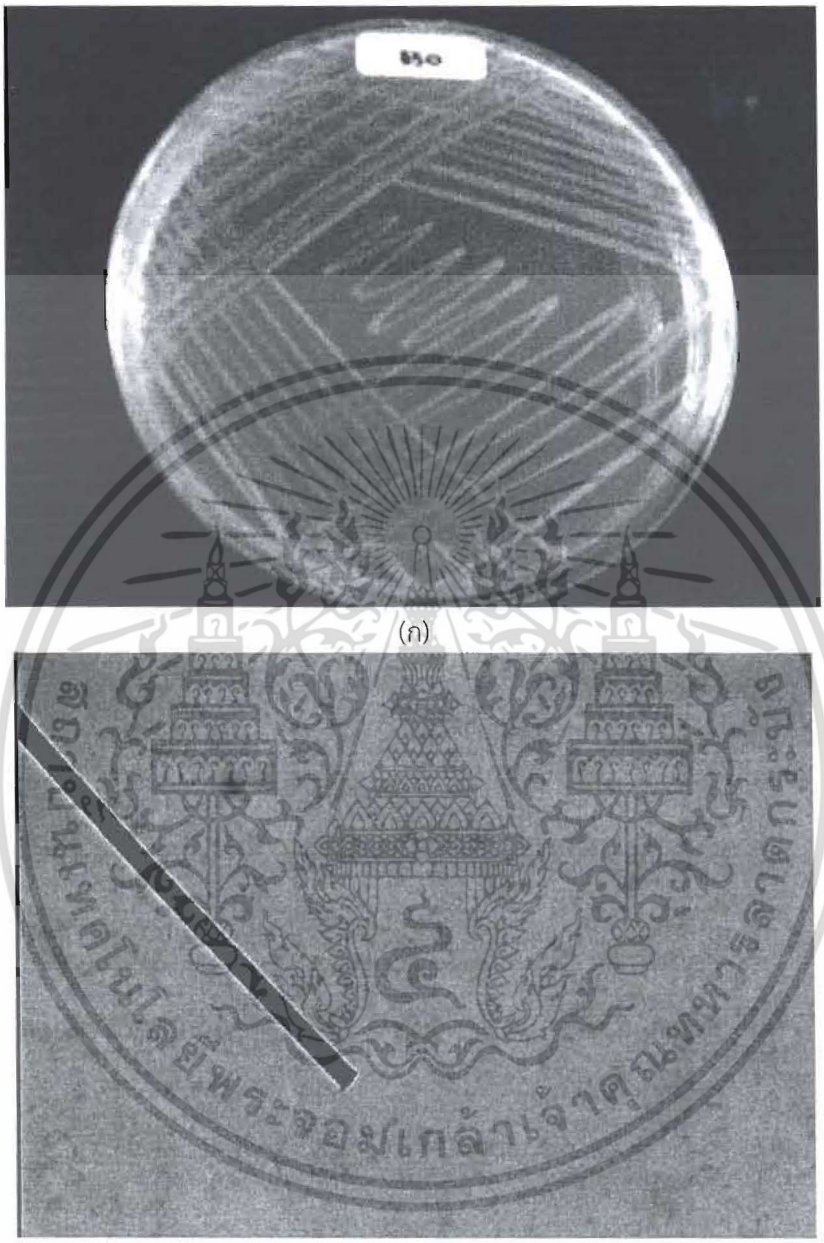
(ก)

(ข)

รูปที่4.29 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B49
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B50 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปร่างกลม โค้งนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร ขอบเรียบ สีขาว ย้อมแกรมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม + รูปร่างท่อน ดังรูปที่4.30



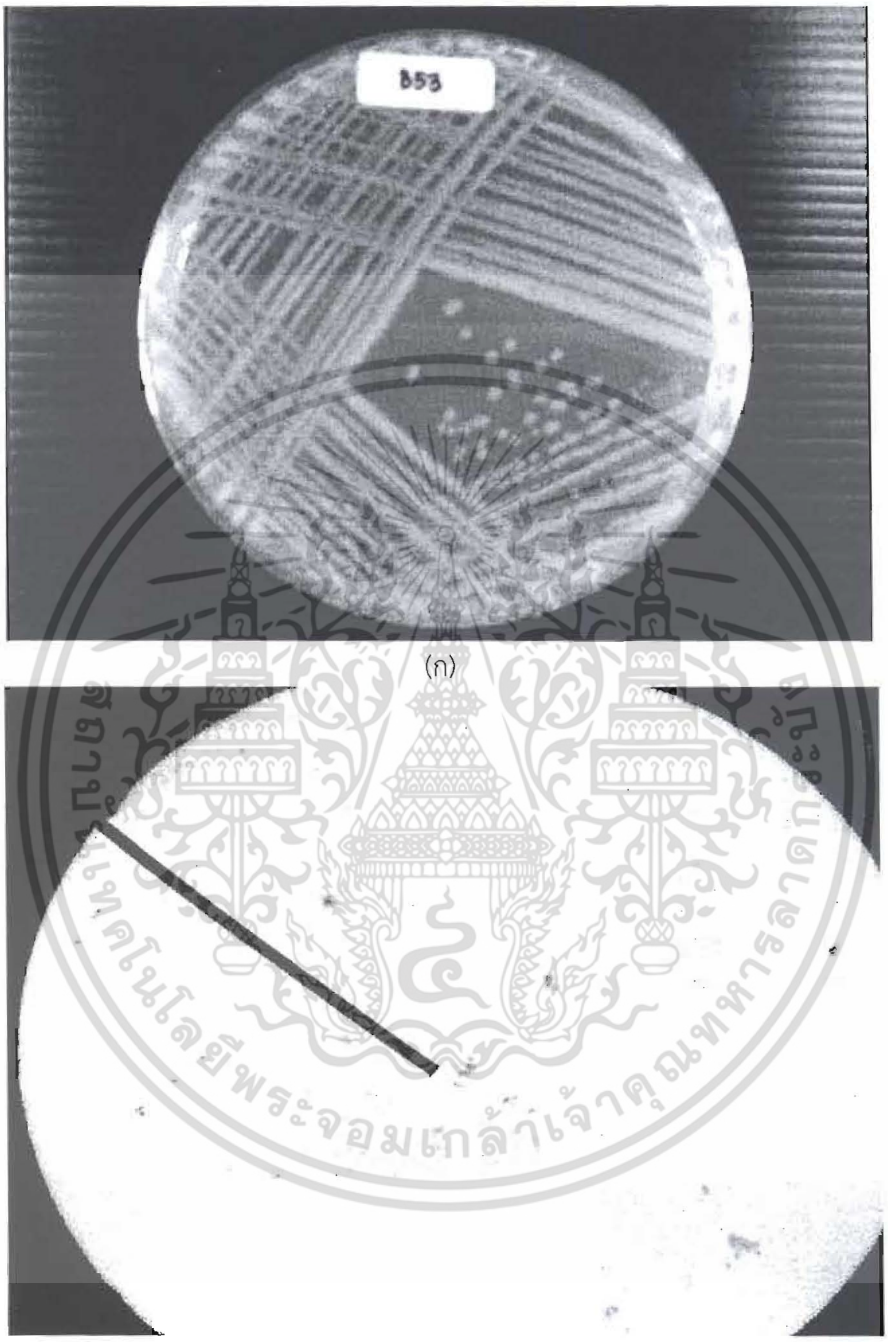
(ก)

(ข)

รูปที่4.30 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B50
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B53 เจริญได้ดีในอาหาร NA โคโลนีรูปร่างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวถึงครีม ทึบแสง ย้อมแกรมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรม + รูปร่างกลม ดังรูปที่4.31



(ก)

(ข)

รูปที่4.31 เชื้อบาซิลลัสไอโซเลท B53
ก) การเจริญในอารหาร NA ข) ลักษณะเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.4 ลักษณะการเจริญ สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อบาซิลลัสบนอาหาร Nutrient agar

ชื่อ	การเจริญ	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	การติดสีแกรมและรูปร่าง
I1	ดี	โคโลนีค่อนข้างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาว ทึบแสง	แกรม +, ท่อน
I5	ดี	โคโลนีค่อนข้างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวถึงครีม ทึบแสง	แกรม -, กลม
I7	ดี	โคโลนีรูปกลมหรือไม่แน่นอน แบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร ขอบเป็นหยัก สีขาวถึงครีม มันวาว ทึบแสง	แกรม +, ท่อน
I12	ดี	โคโลนีรูปกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวถึงครีม มันวาว ทึบแสง	แกรม +, ท่อน
I15	ดี	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ลักษณะเป็นเส้นใยกระจัดกระจาย สีขาว ทึบแสง	แกรม +, ท่อน
B5	ดี	โคโลนีรูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน แบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร ขอบเรียบ สีขาว ผิวด้านทึบแสง	แกรม +, ท่อน
B16	ดี	โคโลนีรูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน โค้งนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร ขอบหยัก สีขาวถึงครีม	แกรม +, ท่อน
B30	ดี	โคโลนีรูปร่างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวใส	แกรม – ,กลม
B42	ดี	โคโลนีรูปร่างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวถึงครีม	แกรม +, กลม
B44	ดี	โคโลนีรูปร่างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวใส	แกรม – ,กลม
B45	ดี	โคโลนีรูปร่างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวถึงครีม ทึบแสง	แกรม +, ท่อน
B46	ดี	โคโลนีรูปร่างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีเหลือง ทึบแสง	แกรม +, กลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.4 ลักษณะการเจริญ สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อบาซิลลัสบนอาหาร Nutrient agar(ต่อ)

ชื่อ	การเจริญ	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	การติดสีแกรมและรูปร่าง
B47	ดี	โคโลนีรูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน แบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร ขอบเป็นหยัก สีขาวถึงครีม ทึบแสง	แกรม +, กลม
B49	ดี	โคโลนีรูปร่างกลม นูนตรงกลาง ขอบเรียบ สีขาว	แกรม – ,กลม
B50	ดี	โคโลนีรูปร่างกลม โค้งนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร ขอบเรียบ สีขาว	แกรม +, ท่อน
B53	ดี	โคโลนีรูปร่างกลม นูนสูงทั้งโคโลนี ขอบเรียบ สีขาวถึงครีม ทึบแสง	แกรม + ,กลม

4.3 ผลการศึกษาการสร้างสารออกซินธรรมชาติ (Indole-3-acetic acid production)

4.3.1 ผลการศึกษาการสร้างสารออกซินธรรมชาติจากเชื้อแอคติโนมัยสีท

จากการศึกษาการผลิตสารออกซินธรรมชาติ (Indole-3-acetic acid) จากเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยนำเอาเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว ISP-2 ที่มีส่วนผสมของ tryptophan ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสีท 17 ไอโซเลทที่มีการสร้างกรดอินโดลอะซิติกได้คิดเป็นร้อยละ 23.28 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด โดยเชื้อไอโซเลท PP2R-4-11และ AT2L-14 แสดงผลการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ดีที่สุด ส่วนเชื้อไอโซเลทNR8-15 DH31L-4-17 AT2L-11 PP2R-8-1 และ PCWR-8-1 แสดงผลการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ดี ในขณะที่เชื้อไอโซเลทNR9-13 AM5 AM6 DH315-4-15 U039R-4-6 LB-5-1-3 D315R-4-4 PCWR-4-3 PP2R-4-7 และ DCWR-8-5 แสดงผลการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้น้อย ดังแสดงในตารางที่ 4.5

4.3.2 ผลการศึกษาการสร้างสารออกซินธรรมชาติจากเชื้อบาซิลลัส

จากการศึกษาการผลิตสารออกซินธรรมชาติ (Indole-3-acetic acid) จากเชื้อบาซิลลัส โดยนำเอาเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่มีส่วนผสมของ tryptophan ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีเชื้อบาซิลลัส 19 ไอโซเลท ที่มีการสร้างกรดอินโดลอะซิติกได้คิดเป็นร้อยละ 33.93 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมด โดยเชื้อไอโซเลทA-6 B6 B-5 B7 B-4 B44 A-2 B60 และ A-3 B61 แสดงผลการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ดีที่สุด ส่วนเชื้อไอโซเลทI3 I5 I15 C-5 B46 B-2 B59 D-3 B62 และ B-4 B63 แสดงผลการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ดีในขณะที่เชื้อไอโซเลทI6 I14 E-4 B35 D-6 B40 D-6 B41 C-4 B50 และ E-3 B54 แสดงผลการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้น้อย ดังแสดงในตารางที่ 4.6

4.4 ผลการศึกษาการสร้างสารซิเดอโรฟอร์ (Siderophores production)

4.4.1 ผลการศึกษาการสร้างสารซิเดอโรฟอร์จากเชื้อแอคติโนมัยสีท

จากการศึกษาการผลิตสารซิเดอโรฟอร์จากเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยนำเอาเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร Carbon utilization medium (ISP-9) พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีท 62 ไอโซเลทที่สามารถสร้างสาร ซิเดอโรฟอร์ได้ คิดเป็นร้อยละ 84.93 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด โดยเชื้อไอโซเลทPP2R-8-1 PP2R-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4-11และPCWR-4-3 แสดงผลการผลิตสารซิเดอโรฟอร์ได้ดีที่สุดส่วนเชื้อไอโซเลทDH315-4-15 LB-5-1-3 AT2L-11AT2L-14 PCWR-8-1 G3-6 และ DCWR-8-5 แสดงผลการผลิตสารซิเดอโรฟอร์ได้ดีในขณะที่เชื้อไอโซเลทG2-8 G10-1 NR7-8NR8-15 G1-8 DSR-4-5 DSR-4-4 G1-7 G6-5 G2-5 G5-8 G4-8 G8-6 G4-A1 AM1 AM2 AM3 AM4 NR9-13 PCWR-4-7 DCWR-9-1 NR10-1 VT4-3 DCWR-8-4 DCWR-8-6 AM5 AM6 UP2R-4-4 D315R-4-6 D315R-9-2 P039R-4-18 DH31N-4-12 DH315-4-17 DH31L-4-17 DH31N-9-13 DH31N-9-10 DH31N-4-11 DH039-9-13 P31SS-9-1 U039R-4-6 AM8 AY15-19 D315R-4-5 G6-12 DH31N-4-9 PP2R-9-2 DH31L-4-23 DH31N-9-15 DH039-9-15 AM10 AM11 และ DCWR-9-6 แสดงผลในการผลิตสารซิเดอโรฟอร์ได้น้อย ดังแสดงในตารางที่ 4.5

4.4.2 ผลการศึกษาการสร้างสารซิเดอโรฟอร์จากเชื้อบาซิลัส

จากการศึกษาการผลิตสารซิเดอโรฟอร์จากเชื้อบาซิลลัส พบว่า มีเชื้อบาซิลลัส 21 ไอโซเลทที่สามารถสร้างสารซิเดอโรฟอร์ได้ คิดเป็นร้อยละ 37.5 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมด โดยเชื้อ ไอโซเลทI12 I15 และ A-6 B5 แสดงผลการผลิตสารซิเดอโรฟอร์ได้ดีที่สุดส่วนเชื้อไอโซเลทD-6 B21 D-4 B24 E-4 B34 B-4 B44 และ A-5 B47 แสดงผลการผลิตสารซิเดอโรฟอร์ได้ดีในขณะที่เชื้อไอโซเลท I5 I10 C-4 B16 E-4 B32 D-5 B37 B-6 B42 B-6 B43 A-4 B45 C-5 B46 C-4 B49 E-4 B51 E-2 B53 และ B-2 B57 แสดงผลในการผลิตสารซิเดอโรฟอร์ได้น้อย ดังแสดงในตารางที่ 4.6

4.5 ผลการศึกษาการย่อยสลายฟอสเฟต (Phosphate- solubilizing assay)

4.5.1 ผลการศึกษาการย่อยสลายฟอสเฟตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท

จากการศึกษาการย่อยสลายฟอสเฟตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยนำเอาเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร Yeast extract-Malt extract agar พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีท 2 ไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้ คิดเป็นร้อยละ 2.74 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดโดยเชื้อไอโซเลทPP2R-9-2 แสดงผลการย่อยสลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดส่วนเชื้อไอโซเลทDH039-9-13 แสดงผลการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ดี ในขณะที่เชื้ออีก 71 ไอโซเลทไม่แสดงผลการย่อยสลายฟอสเฟต ดังแสดงในตาราง ที่ 4.5

4.5.2 ผลการศึกษาการย่อยสลายฟอสเฟตจากเชื้อบาซิลลัส

จากการศึกษาการย่อยสลายฟอสเฟตจากเชื้อบาซิลลัส พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 7 ไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้ คิดเป็นร้อยละ 12.5 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมดโดยเชื้อไอโซเลท B-6 B42 แสดงผลการย่อยสลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดส่วนเชื้อไอโซเลทI2 I9 E-2 B53 C-2 B56 C-4 B50 และ D-5 B23 แสดงผลการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ดีในขณะที่เชื้ออีก 49 ไอโซเลทไม่แสดงผลการย่อยสลายฟอสเฟต ดังแสดงในตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 สรุปผลการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีทในงานวิจัยนี้

รหัสเชื้อ	คุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช		
	การผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA production,(นาโนเมตร)*	การผลิตสารซิเดอโรฟอร์ (Siderophore production, (มิลลิเมตร)**	การย่อยสลายฟอสเฟต (Rock phosphate-solubilization, (มิลลิเมตร)***
NR8-15	0.064	0.40	-
NR9-13	0.064	0.55	-
VT4-3	-	1.25	-
AM5	0.178	0.20	-
AM6	0.018	2.00	-
DH315-4-15	0.150	3.25	-
DH31L-4-17	0.264	0.20	-
DH039-9-13	-	1.75	1.25
U039R-4-6	0.074	1.75	-
LB-5-1-3	0.112	3.75	-
PP2R-9-2	-	0.30	3.25
AT2L-11	0.020	3.25	-
PCWR-4-3	0.037	17.00	-
PP2R-4-11	0.206	26.50	-
PP2R-8-1	0.009	30.00	-
AT2L-14	0.157	7.50	-
PCWR-8-1	0.042	3.75	-
G3-6	-	5.50	-
DCWR-8-5	0.057	3.85	-
D315R-4-4	0.213	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 สรุปผลการศึกษาเชื้อบาซิลลัสในงานวิจัยนี้

รหัสเชื้อ	คุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช		
	การผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA production,(นาโนเมตร)*	การผลิตสารซิเดอโรฟอร์ (Siderophore production, (มิลลิเมตร)**	การย่อยสลายฟอสเฟต (Rock phosphate-solubilization, (มิลลิเมตร)***
I2	-	-	1.41
I5	0.258	1.75	-
I9	-	-	1.48
I12	-	10.00	-
I15	0.166	7.75	-
A-6 B5	-	15.50	-
A-6 B6	0.350	-	-
B-5 B7	0.206	-	-
B-6 B42	-	1.00	1.65
B-4 B44	0.336	3.25	-
C-5 B46	0.142	2.25	-
C-4 B50	0.040	-	1.25
E-2 B53	-	2.00	1.45
C-2 B56	-	-	1.42
B-2 B59	0.141	-	-
A-2 B60	0.175	-	-
A-3 B61	0.151	-	-
B-4 B63	0.122	-	-

หมายเหตุ * = วัดค่าความเข้มข้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

** = วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสสีเหลือง (มิลลิเมตร)

*** = วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

4.6.1 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ในจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ 73 ไอโซเลท พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 17 ไอโซเลท สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ คิดเป็นร้อยละของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด พบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. X3 *Xanthomonas* sp. X4 และเชื้อรา *P.grisea*ได้ปริมาณใกล้เคียงกัน โดยมีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas* sp. X3 จำนวน 8 ไอโซเลทและมีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas* sp. X4 จำนวน 7 ไอโซเลต ในขณะที่มีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P.grisea*จำนวน 9 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4.7

4.6.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อบาซิลลัส

ในจำนวนเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้ 56 ไอโซเลต พบว่ามีเชื้อบาซิลลัสจำนวน 11 ไอโซเลท สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ คิดเป็นร้อยละ 19.64 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมด พบว่า เชื้อบาซิลลัสมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. X3 *Xanthomonas* sp. X4 และเชื้อรา *P.grisea*ได้ปริมาณใกล้เคียงกัน โดยมีเชื้อบาซิลลัสที่ สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas* sp. X3 จำนวน 4 ไอโซเลทและมีเชื้อบาซิลลัสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas* sp. X4ทั้งหมดจำนวน 6 ไอโซเลท ในขณะที่มีเชื้อบาซิลลัสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ เชื้อรา *P.grisea* จำนวน 6 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยสีท

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	Xanthomonas sp. X3	*Xanthomonas* sp. X4	*P.grisea*
G2-8	-	-	1.00
G10-1	-	-	3.00
DSR-4-4	10.00	-	-
G5-8	16.33	8.67	-
G8-6	26.33	31.33	-
AM4	-	-	0.50
DCWR-9-1	7.00	23.67	-
D315R-9-6	12.00	18.67	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยสีท(ต่อ)

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	Xanthomonas sp. X3	*Xanthomonas* sp. X4	*P.grisea*
LB-5-1-5	-	-	7.00
D315R-4-6	-	6.00	-
DH31N-4-12	18.00	7.33	1.50
DH315-4-17	26.33	-	-
DH315-4-15	11.00	14.67	-
LB-5-1-3	-	-	7.00
PP2R-4-11	-	-	1.00
PP2R-8-1	-	-	2.00
PCWR-8-1	-	-	3.00

หมายเหตุ - = ไม่มีการยับยั้งเกิดขึ้น

ตารางที่ 4.8 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อบาซิลลัส

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	Xanthomonas sp. X3	*Xanthomonas* sp. X4	*P.grisea*
I1	11.67	15.67	1.50
I7	-	17.33	6.00
I12	-	5.00	-
A-6 B5	-	-	2.00
C-4 B16	-	-	0.50
E-4 B30	8.33	5.00	-
B-4 B44	10.67	-	-
A-4 B45	-	-	7.00
A-5 B47	-	-	1.00
C-4 B49	8.67	5.33	-
E-4 B51	-	19.33	-

หมายเหตุ - = ไม่มีการยับยั้งเกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกของเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีท 17 ไอโซเลทที่มีการสร้างกรดอินโดลอะซิติกได้คิดเป็นร้อยละ 23.28 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดและมีเชื้อบาซิลลัส 19 ไอโซเลทที่มีการสร้างกรดอินโดลอะซิติกได้คิดเป็นร้อยละ 33.93 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของLeandro Figueiredo de และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแยกและคัดเลือก Actinomycetesที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากดินบริเวณรากว่านราชินี โดยเก็บดินตัวอย่างจากเทือกเขา Mantiqueira ตั้งอยู่ที่รัฐเซาเปาลูประเทศบราซิลมาทำการทดลองพบว่า *Actinomyces*spp. จำนวน 103 Isolate มีคุณสมบัติในการผลิต Indole acitic acid จำนวน 36% และมีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟต จำนวน 2% และยังสามารถผลิตกรดซิตริกได้ จำนวน 24%

จากผลการทดสอบการสร้างสารซิเดอโรฟอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีท 62 ไอโซเลทที่สามารถสร้างสารซิเดอโรฟอร์ได้ คิดเป็นร้อยละ 84.93 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดและมีเชื้อบาซิลลัส 21 ไอโซเลทที่สามารถสร้างสารซิเดอโรฟอร์ได้ คิดเป็นร้อยละ 37.5 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสุทธินันต์ คำนา(2009)ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพและเมแทโบไลต์ทุติยภูมิของเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินรอบรากพืชสมุนไพรบางชนิดพบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 45 ไอโซเลท คิดเป็น 27.5 % สามารถสร้างสารซิเดอโรฟอร์ได้

จากผลการทดสอบการย่อยสลายสารฟอสเฟตของเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีท 2 ไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้ คิดเป็นร้อยละ 2.74 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดและมีเชื้อบาซิลลัส7 ไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้ คิดเป็นร้อยละ 12.5 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมดซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ El-Tarabily et al. (2008) พบว่าแอคติโนมัยสีท Micromonospora endolithica ที่คัดแยกจากดินและมีความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยภายในรากและดินรอบรากต้นถั่ว (Phaseolus vulgaris L.) สามารถละลายฟอตเฟตในดินในรูปที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้และส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วได้

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 17 ไอโซเลท สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ คิดเป็นร้อยละ 23.29 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดและมีเชื้อบาซิลลัสจำนวน 11 ไอโซเลต สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ คิดเป็นร้อยละ 19.64 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (2553) เกี่ยวกับการคัดแยกและวิเคราะห์ลักษณะของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทในการเป็นผู้ผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคเพื่อการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และการเกษตร โดยการนำพืชสมุนไพร snakevine มาคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท ได้พบ S. munumbiอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของsnakevine และ S. munumbi สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ munumbicins ที่ออกฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียก่อโรควัณโรคสายพันธุ์ที่ดื้อยา รวมทั้งออกฤทธิ์ต่อต้านปรสิตที่ก่อโรคไข้จับสั่น ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ นอกจากนี้เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทในสกุล Streptomyces ชนิดอื่นๆยังสามารถสร้างสารต่อต้านราก่อโรค Rhizoctonia solani ซึ่งทำให้เกิดอาการเน่าของเมล็ด ราก ผล และใบ รวมทั้งต่อต้านราก่อโรค Fusarium moniliforme

เมื่อทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของทั้งเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นข้าว พบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท LB-5-1-5, PP2R-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัสจากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากต้นข้าว 3 แหล่ง ได้แก่จากศูนย์บริการและถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตรประจำตำบลศาลากลาง อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรี ดินบริเวณรอบรากต้นข้าว จังหวัดสระบุรีและจากสถาบันวิจัยเชื้อแอคติโนมัยสีท คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัสที่น่าสนใจได้ 73 และ 56 ไอโซเลทตามลำดับ

การศึกษาการสร้างสารออกซินธรรมชาติ (Indole-3-acetic acid) จากเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัส ในส่วนเชื้อแอคติโนมัยสีทพบว่า 2 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 11.76 ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้มีประสิทธิภาพ การผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ดีที่สุด 5 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 29.41 ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้มีประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ดีและอีก 10 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 58.82 ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้มีประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้น้อย ในขณะที่ 56 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 76.71ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่ไม่พบการผลิตกรดอินโดลอะซิติก ส่วนเชื้อบาซิลลัสพบว่า 5 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 26.32 ของเชื้อบาซิลลัสที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้มีประสิทธิภาพ การผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ดีที่สุด 7 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 36.84 ของเชื้อบาซิลลัสที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้มีประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ดีและอีก 7 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 36.84 ของเชื้อบาซิลลัสที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้มีประสิทธิภาพการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้น้อย ในขณะที่ 37 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 66.07 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่ไม่พบการผลิตกรดอินโดลอะซิติก

การศึกษาการสร้างสารซิเดอโรฟอร์จากเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัส ในส่วนของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ทั้งหมด 73 ไอโซเลท พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีท 62 ไอโซเลทที่สามารถสร้างสารซิเดอโรฟอร์ได้ คิดเป็นร้อยละ 84.93 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด ในขณะที่อีก 11ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 15.07ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่ไม่พบการสร้างสารซิเดอโรฟอร์ส่วนของเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลทพบว่า มีเชื้อบาซิลลัส 21 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างสารซิเดอโรฟอร์ได้ คิดเป็นร้อยละ 37.5 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมด ในขณะที่อีก 35 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 62.5 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมดที่ไม่พบการสร้างสารซิเดอโรฟอร์

การศึกษาการย่อยสลายสารฟอสเฟตจากเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัส ในส่วนของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ทั้งหมด 73 ไอโซเลท พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีท 2 ไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายสารฟอสเฟตได้ คิดเป็นร้อยละ 2.74 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด ในขณะที่อีก 71 ไอโซเลทคิดเป็นร้อยละ 97.26ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่ไม่พบการย่อยสลายสารฟอสเฟตส่วนของเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลทพบว่า มีเชื้อบาซิลลัส 7 ไอโซเลทที่สามารถสร้างซิเดอโรฟอร์ได้ คิดเป็นร้อยละ 12.5 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมด ในขณะที่อีก 49 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 87.5 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมดที่ไม่พบการย่อยสลายสารฟอสเฟต

การศึกษาการฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบจากเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อบาซิลลัส ในส่วนของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ทั้งหมด 73 ไอโซเลท พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสีท 17ไอโซเลทที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดสอบได้ คิดเป็นร้อยละ 23.29ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด ในขณะที่อีก 56 ไอโซเลทคิดเป็นร้อยละ 76.71 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่ไม่พบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยมีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas* sp. X3 จำนวน 8 ไอโซเลท มีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas* sp. X4 จำนวน 7 ไอโซเลท และมีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P.grisea*จำนวน 9 ไอโซเลทส่วนเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลท พบว่า มีเชื้อบาซิลลัส 11 ไอโซเลทที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ คิดเป็นร้อยละ 19.64 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมด ในขณะที่อีก 45 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 80.36 ของเชื้อบาซิลลัสทั้งหมดที่ไม่พบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยมีเชื้อบาซิลลัสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas* sp. X3 จำนวน 4 ไอโซเลท มีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas* sp. X4 จำนวน 6 ไอโซเลท และมีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้ง การเจริญของเชื้อรา *P.grisea* จำนวน 6 ไอโซเลท

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถนำความรู้ที่ได้รับจากการศึกษาเรื่อง การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทและกลุ่มบาซิลลัสจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าวที่ผลิตฮอร์โมนพืชอินโดลอะซิติก แอซิด ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ใช้เป็นแนวทางในงานวิจัยด้านอื่น ๆ ต่อไป และสามารถนำมาประยุกต์ใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพทดแทนปุ๋ยเคมี ช่วยลดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม ช่วยลดต้นทุนและส่งเสริมการเจริญของพืชในทางเกษตร ส่งเสริมให้การเกษตรของไทยมุ่งสู่ความเป็นเกษตรอินทรีย์เพิ่มมากขึ้นในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

การนำเสนอแบบโปสเตอร์

1. Uschara Thumarat[1,*], Chitti Thawai [2], Somphit Sornyotha [2], Korakoch Khomhwan[2], Kemjinan Terdtoonkanka [2], Jidapa Mahaponjarern [2] and Fusako Kawai[3]. 2014. Isolation and characterization of rhizobacteria for plant growth promoting activity. The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 26-29 November 2014, Chaing Rai,Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกษม ธเนศวรสรรค์ ณัฐวรรณ อยู่ลออ และ ธเนศ สุริยะรังสี. 2552. การคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากดิน. โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เกษม สร้อยทอง. 2532. การใช้ *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวโดยชีววิธี. วารสารโรคพืช. 9(1): 28-33.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538ก. จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชในรูปชีวภัณฑ์ : ผลิตภัณฑ์ที่ต้องพิจารณา ตอนที่ 1. วารสารเคหการเกษตร. 19(4) : 141-148.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538ง. การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา : ตอนที่ 1 หลักการและบทบาท. วารสารเคหการเกษตร. 19(8) : 141-145.

จิระเดช แจ่มสว่าง และคณะ. 2536. ประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma harzianum*) พันธุ์กลายที่ต้านทานเบนโนมิลในการควบคุมโรคโคนต้นเน่าของมะเขือเทศซึ่งเกิดจากเชื้อราสเคลอโรเทียม (*Sclerotium rolfsii*). หน้า 34. ในการประชุมวิชาการครั้งที่ 11 เรื่องเทคนิคของวิธีการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. นครปฐม : ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิระเดช แจ่มสว่าง และบรรเจิด อินหว่าง. 2529. การควบคุมโรคเน่าระดับดินไรซ็อกโทเนียของฝ้ายโดยวิธีคลุกเมล็ดด้วยจุลินทรีย์. วารสารโรคพืช. 6(3-4) : 63-72.

จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล เกษนรา. 2534. การผลิตและทดสอบคุณภาพของผงเชื้อรา *Trichoderma harzianum*. วิทยาสารเกษตรศาสตร์. 25 : 169-176.

จริยา จันทร์ไพแสง. 2538. ความหลากหลายของพันธุ์ *Bacillus thuringiensis*ที่พบในประเทศไทย. หน้า 141-150. ในสมคิด ดิสถาพร (ผู้รวบรวม). เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.

นันทวุฒิ นิยมวงษ์ นันทวุฒิ ฉัตรอุทัย และนาวิน เนสุสินธุ์. 2548. การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะจากดิน. โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พรพรรณ อู่สุวรรณ. 2550. การใช้เชื้อ Bacillus spp. และ Streptomyces spp. ในการควบคุมโรคเชื้อรา ในองุ่น. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรรณลดา ติตตะบุตร. 2551. การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. *Streptomyces* spp : แบคทีเรียคุณค่าสงจากธรรมชาติ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและหน่วยความร่วมมือการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และเทคโนโลยีชีวภาพ

แห่งมหาวิทยาลัยมหิดลและมหาวิทยาลัยโอซาก้า (MU-OU : CRC) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วิพัฒน์ นันบัญญัติและ เอกภพ สกุลกิจกาญจน์. 2549. การตรวจสอบลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากป่าชายเลน. โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า

คุณทหารลาดกระบัง.

วราภรณ์ ฉุยฉายนันธพร ศิลป์สมบูรณ์ และ ขนิษฐา สมตระกูล. 2550. ผลของแบคทีเรียที่สังเคราะห์กรดอินโดลอะซีติก ที่คัดแยกจากวัชพืชต่อการเจริญเติบโตระยะต้นกล้าของพืชเศรษฐกิจ. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์.

สุธามาศ อินตะสอน และคณะ. 2537. ประสิทธิภาพของส่วนผสมผงเชื้อราไตรโคเดอร์มา เมื่อใช้ร่วมกับ

สารเคมีควบคุมเชื้อราต่อโรคเน่าของต้นกล้าส้มเขียวหวานที่เกิดจากเชื้อราไฟทอฟทอราพาราซิติกา. หน้า 144-161. ในรายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช ครั้งที่ 32. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภาพร อวรัญและคณะ. 2537. การใช้ส่วนผสมของผงเชื้อราไตรโคเดอร์มาร่วมกับสารเคมีควบคุมเชื้อราในการควบคุมโรคเน่าของกล้าทุเรียน ซึ่งเกิดจากเชื้อราไฟทอฟทอรา พัลมิวอรา. หน้า 162-179. ในรายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช ครั้งที่ 32. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมคิด ดิสถาพร. 2540. การป้องกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี. กรมวิชาการเกษตร.

สายใจ อ่อนแก้ว. 2542. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวของ *Bacillus* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หนึ่ง เตียอำรุง และนันทกร บุญเกิด. 2539. ธาตุเหล็ก ซิเดอร์โรฟอร์ และจุลินทรีย์. วารสารเทคโนโลยี

สุรนารี. 3(2) : 95-100.

องอาจ เติมเกียรติไพศาล และคณะ. 2534. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ดินเพื่อควบคุมโรครากเน่าไฟทอฟทอราของส้มเขียวหวานโดยชีววิธี. หน้า 319-330. ในรายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช ครั้งที่ 29. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2538. การผลิตและการนำ *Bacillus thuringiensis*ไปใช้ในสภาพไร่. หน้า 200-202.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสมคิด ดิสถาพร (ผู้รวบรวม). เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.

Baker, K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogents. Annu.Rev. Phytopathol. 26 : 67-85. อ้างถึงใน สมคิด ดิสถาพร. 2540. การป้องกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี. กรมวิชาการเกษตร.

Berdy, JC. 1995. Bioactive microbial metabolites. J. Antibiot. 58:1-28

Buchanan, R.E. and N.E. Gbbons. 1974. Order Actinomycetales, pp. 675-881. *In* S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Ravin and R.Y. Stanier. (eds.). Bergey's manual of determinative bacteria. Vol 4. Williams and Wikin, Baltimore, USA.

Cross, T and M. Goodfeiiow. 1973.Taxonomy and classification of the actiomycetes, pp. 254-261. In G. Sykes and Skiner. Actiomycetes : Characteristics and Practical Importance. Academic Press, London.

Davis, G.H.G. 1959. The classification of certain filamentous bacteria with respect to their chemical composition. J. Gen. Microbiol. 21 : 612-621.

El-Nakeeb, M.A. and H.A. Lechavalier. 1963. Selective isolation of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol. 11 : 75-77.

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

Goodfellow, M. , S.T. Williams and M. Mordarski. 1988. Actinomycas in biotechnology. Academic Press Limited, London. 501 p.

Kelner, A. 1948. A method for investigating large microbial populations for antibiotic activity. J. Bacteriol. 56 : 157-162.

Kieser, T., Bibb, M.J., Battner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A. (2007) In "Practical Streptomyces Genetics" John Innes Centre, Norwick, England.

Leandro Figueiredo de . 2010. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. Laboratório de Microbiologia do Solo, C.P. 09 – 13418-900 –Piracicaba, SP - Brasil.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lechavalier, H.A. and C.T. Corke. 1953. The replica plate method for screening antibiotic-producing
organisms. Appl. Microboil. 1 : 110-112.

Lederberg, J. and E.M. Lederberg. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants.
J. Bacteriol. 63 : 339-406.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. (2009) In "Brock Biology of Microorganism" Twelfth edition. Pearson, Benjamin Cummings, Pearson Education, Inc.

Nassar, A.H. and Khaled, A.E-T. 2005. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate
of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. Biology and Fertility of Soils. 42, 97-108.

Oejijono, M., Line, A., and Dragar, C. (1993). Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. Soil Biol Biochem. Exeter : Pergamon Ptess. 25: 247-250.

Porter, J.N. 1971. Prevalence and distribution of antibiotic producing actinomycstes. Adv. Appl.
Microbiol. 14 : 73-92.

Sahaya Mary. R. 2011. Biocontrol Potential of Selected Actinomycete and its Metabolites against
Rhizoctonia solani.. Department of Microbiology, Sri Nalamani Yadhava College, Kodikurichi,
Tenkasi,Tirunelveli Dist ,Tamil Nadu, India.

Schwyn, B. and Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination
of siderophares. Analytical Biochemistry. 160, 47-55.

Singh, and J.L. Faull. 1988. Antagonism and biological control. 167-177. In K.G. Mukerji and K.L. Garg
(editor). Biocontrol of Plant Diseases. Volume II. Florida : CRC Press.

Vanek, Z. , L. Dolezilova and Z. Rehacek. 1958. Formation of a mixture of antibiotic substances
Including antibiotics of a polyene character by strains of actinomycetes freshly isolated from soil samples. J. Gen. Microbiol. 18 : 649-657.

V. Shanmugaiah, N. Mathivanan, N. Balasubramanian and P.T. Manoharan. 2008. Optimization of
cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

from rice rhizosphere soil. Department of Botany, Vivekananda College, Thiruvedakam

West-625217, Tamil Nadu, India.

Waksman, S.A. 1959. The Actinomycetes Vol. I : Nature, Occurrence and Activities. The Williams and

Wilkins Company, Baltimore. 327 p.

Weinstein, M.J. , G.M. Luedemann, E.M. oden and G.H. Wagman. 1964 Gentamicin, a new broad-

spectrum antibiotic complex. Antimicrob. Agents Chemother. 1963 : 1-7.

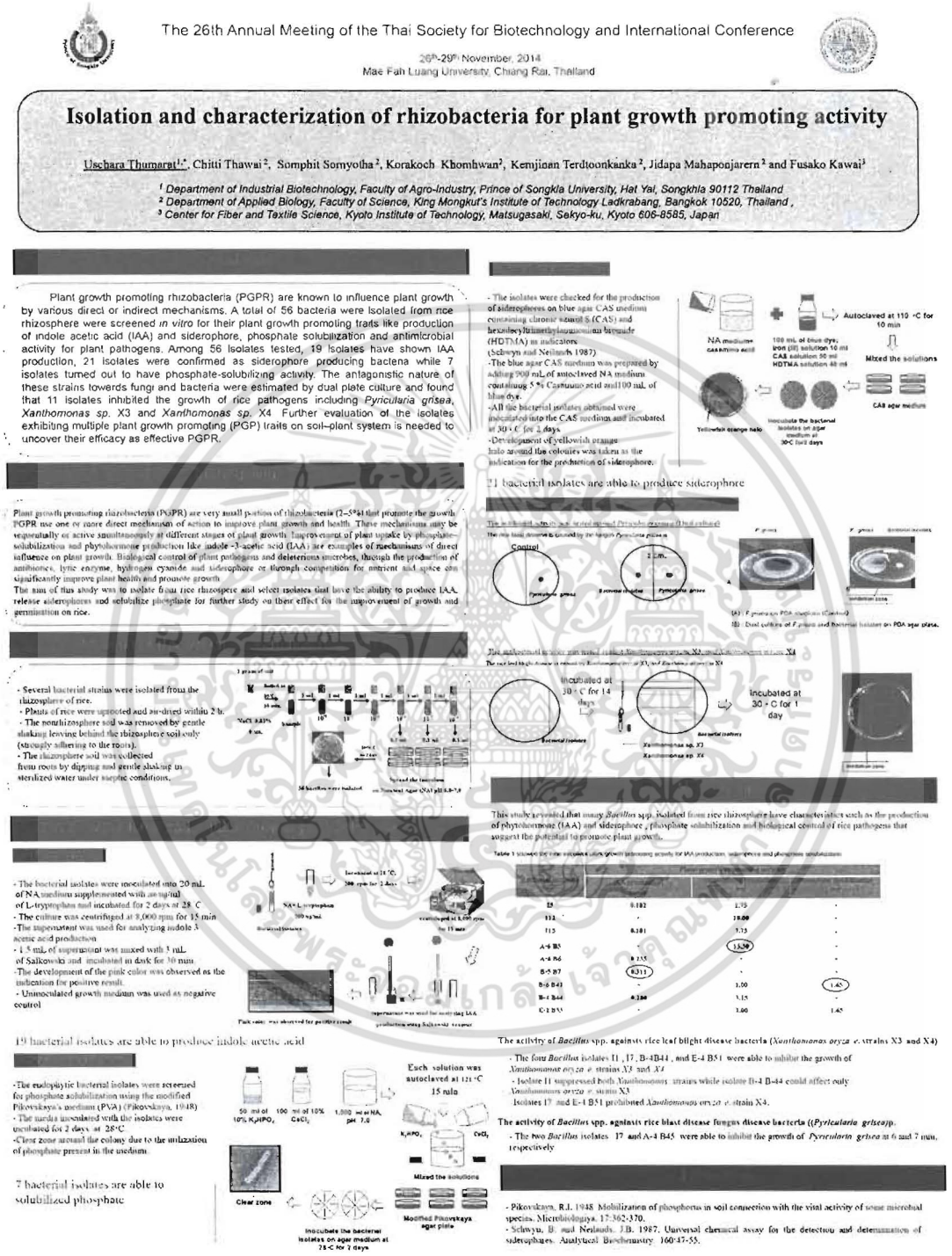
Yamaguchi, T. 1965. Comprison of the cell-wall composition of morphologically distinct Actinomycetes.

J. of Bacteriol. 89 : 445-453.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

1.โปสเตอร์การนำเสนองานวิจัยในงานประชุมวิชาการ The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 26-29 November 2014, Chaing Rai,Thailand



The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference

26th-29th November, 2014
Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand

Isolation and characterization of rhizobacteria for plant growth promoting activity

Uschara Thumarat[1,*], Chitti Thawai [2], Somphit Somyotha [2], Korakoch Khomhwan[2], Kemjinan Terdtoonkanka [2], Jidapa Mahaponjarern [2] and Fusako Kawai[3]

[1] Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand
[2] Department of Applied Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand ,
[3] Center for Fiber and Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are known to influence plant growth by various direct or indirect mechanisms. A total of 56 bacteria were isolated from rice rhizosphere were screened *in vitro* for their plant growth promoting traits like production of indole acetic acid (IAA) and siderophore, phosphate solubilization and antimicrobial activity for plant pathogens. Among 56 isolates tested, 19 isolates have shown IAA production, 21 isolates were confirmed as siderophore producing bacteria while 7 isolates turned out to have phosphate-solubilizing activity. The antagonistic nature of these strains towards fungi and bacteria were estimated by dual plate culture and found that 11 isolates inhibited the growth of rice pathogens including *Pyriculuria grisea*, *Xanthomonas sp.* X3 and *Xanthomonas sp.* X4. Further evaluation of the isolates exhibiting multiple plant growth promoting (PGP) traits on soil–plant system is needed to uncover their efficacy as effective PGPR.

21 bacterial isolates are able to produce siderophore

19 bacterial isolates are able to produce indole acetic acid

7 bacterial isolates are able to solubilized phosphate

The activity of *Bacillus* spp. against rice leaf blight disease bacteria (*Xanthomonas oryza e.* strains X3 and X4)

- The four *Bacillus* isolates I1 , I7 , B-4B44 , and E-4 B51 were able to inhibit the growth of *Xanthomonas oryza e.* strains *X3* and *X4*
- Isolate I1 suppressed both *Xanthomonas* strains while isolate B-4 B44 could affect only *Xanthomonas oryza e.* strain X3
- Isolates I7 and E-4 B51 prohibited *Xanthomonas oryza e.* strain X4.

The activity of *Bacillus* spp. against rice blast disease fungus disease bacteria (*Pyriculuria grisea*)sp.

- The two *Bacillus* isolates I7 and A-4 B45 were able to inhibit the growth of *Pyriculuria grisea* at 6 and 7 mm, respectively

- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. Microbiologiya. 17:362-370.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry. 160:47-55.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. นางสาว สมพิศ สอนโยธา
   Miss Somphit SORNYOTHA
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน : 3 7007 00276 89 9
3. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง เลขที่ 3 หมู่ที่ 2 ถนนฉลองกรุง แขวงลำปาทิว เขตลาดกระบัง กรุงเทพ 10520
   โทรศัพท์ : 02-329-8400-11 ต่อ 6258
   โทรสาร : 02-329-8427
   อีเมล์ : kssomphi@kmitl.ac.th
4. ประวัติการศึกษา
   2008 : Ph.D. (Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi)
   2003 : M.Sc. (Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi)
   2000 : B.Sc. (Major of Biotechnology, Faculty of Industrial Technology, Silpakorn University)
5. ประสบการณ์งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และ/หรือที่ผ่านมา ทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย
   1) การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะของ multifunctional enzyme จาก *Paenibacillus curdlanolyticus* สายพันธุ์ B-6 (หัวหน้าโครงการ)
   2) การผลิตโบรมิเลนจากแกนสับปะรด (หัวหน้าโครงการ)
   3) การผลิตเอนไซม์เชิงซ้อน (เซลลูโลโซม) ที่มีศักยภาพสูงต่อการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (ผู้ร่วมโครงการ)
   4) Identification of microbial isolates producing cellulases and xylanases degrading biomass for C-4, C-5 or C-6 bio-based chemicals production (ผู้ร่วมโครงการ)

<u>PUBLICATIONS</u>

Scientific Journals:

(1) **Sornyotha, S.**, Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K., 2007, "Purification and detection of linamarin from cassava root cortex by high performance liquid chromatography", Food Chemistry, Vol.104, pp.1750-1754.

(2) **Sornyotha, S.**, Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K., 2008, "Extraction, purification and characterization of linamarase from cassava root parenchyma of the high-cyanogen cultivar KU-50", KMUTT Research and Development Journal, Vol. 31, pp. 523-537.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) **Sornyotha, S.**, Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K., 2010, "An efficient treatment for detoxification process of cassava starch by plant cell wall-degrading enzymes", Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 109, pp. 9-14.

(4) Tachaapaikoon, C., Tanasupawat, S., Pason, P., **Sornyotha, S.**, Waeonukul, R., Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K. (2012) "*Paenibacillus xylaniclasticus* sp. nov., a xylanolytic-cellulolytic bacterium isolated from sludge in anaerobic digester", Journal of Microbiology, Vol. 50, pp. 349-400.

Proceeding/Conferences /Symposiums:

(1) **Sornyotha, S.**, Ratanakhanokchai, K. and Kyu, K. L., 2003, "Study on the binding of the polysaccharide-binding protein (P195), subunit of xylanosome from *Bacillus circulans* B6 to insoluble substrate", The 41st Kasetsart University Annual Conference, February 3-7, The Kasetsart University, Bangkok, Thailand, pp. 144-152.

(2) **Sornyotha, S.**, Ratanakhanokchai, K. and Kyu, K. L., 2005, "Comparison of different extraction buffers for extraction of cyanide-releasing enzyme from cassava root", The 1st International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agriculture Product, March 22-25, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand, pp. 1-13.

(3) **Sornyotha, S.**, Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K., 2008, "Reduction of linamarin content in cassava root by using xylanase and cellulase", The Pure and Applied Chemistry International Conference, January 30-February 1, Sofitel Centara Grand, Bangkok, Thailand, pp. 221-227.

(4) **Sornyotha, S.**, Tachaapaikoon, C., Chimtong, S., Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K., 2011, "Production of high value-added products from core pineapple", Agricultural Science Journal, Vol.42:2 (suppl.), pp.589-592.

(5) Tachaapaikoon, C., Buakhaw, S., **Sornyotha, S.**, Pason, P., Kyu, K. L., Kosugi, A., Mori, Y. and Ratanakhanokchai, K., 2011, "Thermostable plant cell wall degrading enzymes from thermophilic anaerobic bacterium, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* EPPO5", Agricultural Science Journal, Vol.42:2 (suppl.), pp.77-80.

(6) Pason, P., Tachaapaikoon, C., **Sornyotha, S.**, Waeonukul, R.,, Kyu, K. L., Kosugi, A., Mori, Y. and Ratanakhanokchai, K., 2011, "Purification and characterization xylanase subunit (280 kDa) of multienzyme complex from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6", Agricultural Science Journal, Vol.42:2 (suppl.), pp.97-100.

(7) **Sornyotha, S.**, Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K. and Karita, S., 2011, "Identifcation of enzyme subunits that produce from *Paenibacillus* sp. TW-1", Present at the 25th meeting cellulose research, Miho village, Ibaraki, Japan.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(8) Shirasaki, R., Karita, S., **Sornyotha, S.** and Ratanakhanokchai, K., 2012, "Novel carbohydrate-binding modules from *Paenibacillus* sp. TW-1", The annual meeting of Japanese society of cellulase, Japan.

(9) **Sornyotha, S.** Karita, S., Tachaapaikoon C. and Ratanakhanokchai, K., 2013, "Affinity isolation and rapid identification of carbohydrate-binding proteins of xylanolytic-cellulolytic multienzyme complexs from *Paenibacillus xylaniclasticus* TW1 by MALDI-TOF/TOF MS", The 1st International Symposium on Microbial Technology for Food and Energy Security, November 25-27, The Rama Gardens Hotel, Bangkok, Thailand, pp. 281-287.

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวอัจฉรา ธรรมรัตน์
   ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms. Uschara Thumarat
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3900900728716
3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   สาขาวิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
   สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถ. ฉลองกรุง
   เขตลาดกระบัง กรุงเทพ 10520
   โทรศัพท์ 02-3298400-11 ต่อ 237 โทรสาร 02-329-8427
   Email: ktuschar@kmitl.ac.th
4. ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
Ph.D	Applied Microbiology	Kyoto Institute of Technology	2012
วท.ม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2008
วท.บ.	ชีววิทยา (เกียตรนิยม)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2005

5. ประสบการณ์งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และ/หรือที่ผ่านมา ทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพ
   ในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

ไม่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้