



การศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชของแอคติโนมัยซีทกับแบคทีเรีย

Pseudomonas putida ในข้าวภายใต้สภาวะความเค็ม

COMPARATIVE STUDY OF PLANT GROWTH PROMOTING ACTIVITY OF
ACTINOMYCETES AND *Pseudomonas putida* IN RICE UNDER SALINE CONDITION

จิราวรรณ สิทธิสวนจิก

มหาวิทยาลัยบูรพา

2563



1054561741

BUU_Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50



59910007_1054561741

การศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชของแอคติโนมัยซีทกับแบคทีเรีย
Pseudomonas putida ในข้าวภายใต้สภาวะความเค็ม

จิราวรรณ สิทธิสวนจิก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา



1054561741

BUU-IThesis 59910007 thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

COMPARATIVE STUDY OF PLANT GROWTH PROMOTING ACTIVITY OF
ACTINOMYCETES AND *Pseudomonas putida* IN RICE UNDER SALINE CONDITION

JIRAWAN SITISUANJIK

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGICAL SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE
BURAPHA UNIVERSITY

2020

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

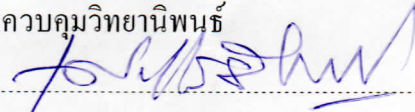


1054561741

BUU_Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ จิราวรรณ สิทธิสวนจิก ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

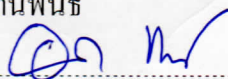
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์



..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

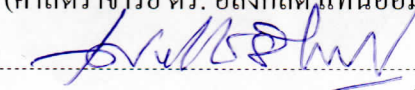
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสรมฐวัชร นำศาสตร์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธาน

(ศาสตราจารย์ ดร. อลงกต แทนออมทอง)



..... กรรมการ

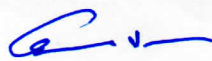
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสรมฐวัชร นำศาสตร์)



..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงตา จุลศิริกุล)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพา



..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 15 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2563



59910007: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีท/ ออกซิน/ ข้าวขาวดอกมะลิ 105/ เอนไซม์ ACCD/ สภาวะความเค็ม

จรรยาบรรณ สิทธิสวนิจ : การศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโต
พืชของแอคติโนมัยซีทกับแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* ในข้าวภายใต้สภาวะความเค็ม.

(COMPARATIVE STUDY OF PLANT GROWTH PROMOTING ACTIVITY OF
ACTINOMYCETES AND *Pseudomonas putida* IN RICE UNDER SALINE CONDITION)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ ปี พ.ศ. 2563.

ปัญหาดินเค็มเป็นปัญหาสำคัญในการทำการเกษตรในประเทศไทยประการหนึ่ง ความ
เค็มของดินจะส่งผลให้พืชชะงักการเจริญเติบโตและส่งผลให้ผลผลิตของพืชตกต่ำ กลยุทธ์หนึ่งที่จะ
ช่วยพืชให้สามารถทนทานต่อสภาวะความเค็มของดินได้คือการใช้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติส่งเสริม
การเจริญเติบโตของพืช (PGPB) ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ จึงได้นำแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากมูล
ไส้เดือนและผักนึ่งทะเลจำนวน 38 ไอโซเลต และ *P. putida* ATCC 17484 มาคัดกรองและเลือกสาย
พันธุ์ที่สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA และ/หรือเอนไซม์ ACCD ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มี
สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 200-1,000 มิลลิโมลาร์ได้ และนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปศึกษา
ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) และจัด
จำแนกแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่คัดเลือกด้วยยีน 16S rRNA ผลการคัดกรองจากคุณสมบัติสร้าง
ฮอร์โมนพืช IAA และ/หรือเอนไซม์ ACCD ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายเกลือโซเดียม
คลอไรด์ 200-1,000 มิลลิโมลาร์ได้ พบว่าแอคติโนมัยซีทจำนวน 3 ไอโซเลตคือ BBUU144,
BBUU161 และ BBUU500 และ *P. putida* ATCC 17484 ถูกคัดเลือกสำหรับผลการส่งเสริมการ
เจริญเติบโตพบว่า BBUU500 ที่คัดแยกจากผักนึ่งทะเลสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวขาว
ดอกมะลิ 105 ได้ดีที่สุดในเมื่อเปรียบเทียบกับ BBUU144, BBUU161 และ *P. putida* ATCC 17484 ผล
การจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทที่ถูกคัดเลือกทั้ง 3 ไอโซเลตพบว่า เป็นสมาชิกของสกุล *Streptomyces*
การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์และ *P. putida* ATCC 17484 เป็นแบคทีเรีย
ที่มีคุณสมบัติเป็น PGPB และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวที่เจริญในสภาวะดินเค็มได้



1054561741

BUU_1Thesis_59910007_thesis / recv : 04042563 12:52:56 / seq: 50

59910007: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCES; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCES)

KEYWORDS: ACTINOMYCETES/ IAA/ acdS GENE/ ACC DEAMINASE/ SALINE
CONDITION

JIRAWAN SITISUANJIK : COMPARATIVE STUDY OF PLANT GROWTH
PROMOTING ACTIVITY OF ACTINOMYCETES AND *PSEUDOMONAS PUTIDA* IN RICE
UNDER SALINE CONDITION. ADVISORY COMMITTEE: SAETHAWAT CHAMSART,
2020.

Soil salinity is a serious problem in agriculture in Thailand which suppresses the productivity of crop plants. One of the strategies to enable plants to tolerate saline soils is to use the plant growth-promoting bacteria (PGPB). In this study, 38 actinomycetes isolated from earthworm castings and beach morning-glory, with *P. putida* ATCC 17484 were used to screen and select the strains that were able to produce indole-3-acetic acid (IAA) and/or 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD) in the broth media supplemented with 200-1,000 mM NaCl solution. The selected strains were used to study the capability of promoting the growth of rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). To identify the selected actinomycetes in the genus level, 16S rRNA gene was analyzed. The results of screening for producing IAA and/or ACCD in the presence of 200-1000 mM of NaCl solution, three actinomycetes including BBUU144, BBUU161 and BBUU500 and *P. putida* ATCC 17484 were selected. For the results of promoting the growth of plant, BBUU500 isolated from beach morning-glory has shown the most ability to promote the growth of rice plants when the compare with BBUU144, BBUU161 and *P. putida* ATCC 17484. The result of the identification reveals that 3 selected actinomycetes belong to the genus *Streptomyces*. This study shows that three *Streptomyces* and *P. putida* ATCC 17484 are PGPB and can promote the growth of rice plant grown in saline soil conditions.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ดร. จันทรา อินทนนท์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร นำศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คุณนันทน์ อินทนนท์ ที่มอบทุนการศึกษาและค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ตลอดการศึกษา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา และผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจสอบแก้ไขและวิจารณ์ผลงานทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วาสนิ พงษ์ประยูร และศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวชลบุรีที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการทำวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่สนับสนุนด้านการเรียน ให้กำลังใจ และให้การช่วยเหลือผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยแอกติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria Research Unit) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่คอยให้คำปรึกษาและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนสนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษาประเภททุนบางส่วน จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และได้รับทุนสนับสนุนโดยสภาวิจัยแห่งชาติ (2559A10802197) จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูคุณเวทิตาแต่ บุพการีบูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

จิราวรรณ สิทธิสวนจิก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	3
1.6 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย.....	3
1.7 สถานที่ทำการวิจัย	4
บทที่ 2	5
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 แอติโนมัยสีท (Actinomycetes).....	5
2.2 แอคติโนมัยสีทเอนโคไฟต์.....	12
2.3 กรดอินโดล-3-แอซิดิก (Indole-3-acetic acid; IAA)	13
2.4 เอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase	15



1054561741

BUU-IThesis 59910007 thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

2.5 ดินเค็ม (Saline Soil)	18
2.6 การจัดจำแนกแบคทีเรีย	23
บทที่ 3	29
วิธีดำเนินการวิจัย	29
3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	29
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	31
บทที่ 4	40
ผลและอภิปรายผลการวิจัย	40
4.1 การทำให้บริสุทธิ์.....	40
4.2 ผลการคัดเลือกแอกติโนมัยสีทที่สร้างฮอร์โมนพืช IAA.....	46
4.3 ผลคัดเลือกแอกติโนมัยสีทที่มียีน <i>acdS</i>	55
4.4 ผลตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD.....	60
4.5 ผลการคัดเลือกแอกติโนมัยสีทที่ทนเค็ม	69
4.6 ผลการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ และวัดการเจริญเติบโต โดยหาน้ำหนักแห้ง	71
4.7 ผลการศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าวขาวดอกมะลิ 105 (<i>Oryza sativa</i> L. cv. KDML105)	78
4.8 ผลการจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทในระดับสกุล.....	88
บทที่ 5	103
สรุปผลการวิจัย	103
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	103
5.2 ข้อเสนอแนะ	105
ภาคผนวก	105



ภาคผนวก ก	107
ภาคผนวก ข	107
ภาคผนวก ค	127
ภาคผนวก ง.....	136
ภาคผนวก จ	167
ภาคผนวก ฉ	166
ภาคผนวก ช	195
ภาคผนวก ซ.....	216
บรรณานุกรม	233
ประวัติย่อของผู้วิจัย	246



1054561741

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ปริมาณเกลือในดินที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช.....	18
ตารางที่ 2 หมายเลขรหัสแบคทีเรียแอกติโนมัยสีท.....	32
ตารางที่ 3 การออกแบบการทดลองปลูกข้าวในสภาวะโรงเรือน	37
ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร MS	41
ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร MS	44
ตารางที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร YD	49
ตารางที่ 7 ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร YD	51
ตารางที่ 8 ความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแอกติโนมัยสีท	53
ตารางที่ 9 ค่าความคล้ายคลึงของยีน acdS	58
ตารางที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร ๑.....	61
ตารางที่ 11 ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๑.....	62
ตารางที่ 12 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว Minimal medium ทั้ง 3 ชนิด	65
ตารางที่ 13 การตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD	67
ตารางที่ 14 ความสามารถในการทนเค็มของแบคทีเรีย.....	70
ตารางที่ 15 การตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียด้วยวิธี Plate count.....	71
ตารางที่ 16 การสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์	75
ตารางที่ 17 การเจริญของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์	76
ตารางที่ 18 เปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105.....	78
ตารางที่ 19 การเจริญของต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๑	81

ตารางที่ 20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ89

ตารางที่ 21 ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ...91

ตารางที่ 22 ค่าความคล้ายคลึงระหว่างแอคติโนมัยสีทกับสกุล *Streptomyces* ชนิดต่าง ๆ96



1054561741

BUU-IThesis 59910007 thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 อันดับ (Order) ต่าง ๆ ของแบคทีเรียในชั้น (Class) Actinobacteria	6
ภาพที่ 2 วงชีวิตของแอกติโนมัยสีย.....	7
ภาพที่ 3 การสร้างโคโลนีบนอาหารแข็งของแอกติโนมัยสีย.....	8
ภาพที่ 4 รูปร่างและลักษณะผิวสปอร์	10
ภาพที่ 5 ลักษณะสปอร์แบบต่าง ๆ ที่พบในแอกติโนมัยสีย	11
ภาพที่ 6 การทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ ACCD และฮอร์โมนพืช IAA	16
ภาพที่ 7 การตอบสนองของการเจริญเติบโตพืชต่อความเค็มสองระยะ	20
ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ Intraclass ของ Class Actinobacteria.....	26
ภาพที่ 9 องค์ประกอบของ Phylogenetic tree	27
ภาพที่ 10 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร MS และ NA.....	43
ภาพที่ 11 การย้อมแกรมแบคทีเรีย.....	45
ภาพที่ 12 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร YD	48
ภาพที่ 13 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	55
ภาพที่ 14 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน <i>acdS</i>	57
ภาพที่ 15 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ยีน <i>acdS</i>	59
ภาพที่ 16 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร YD.....	60
ภาพที่ 17 การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD ของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MM.....	64
ภาพที่ 18 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว Minimal medium ทั้ง 3 ชนิด	65
ภาพที่ 19 การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD ของแบคทีเรียในอาหารเหลว MM.....	66
ภาพที่ 20 การตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD	68
ภาพที่ 21 โคโลนีบนอาหารแข็งสูตร YD ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 0-1,000 มิลลิโมลาร์	70



1054561741

BUU_1Thesis_59910007_thesis / rev: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพที่ 22 การตรวจสอบการเจริญในระดับเชื้อจากที่เหมาะสมด้วยวิธี Plate count.....72

ภาพที่ 23 การสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแบคทีเรียที่เรียกที่ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์74

ภาพที่ 24 การสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์77

ภาพที่ 25 การเจริญของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์77

ภาพที่ 26 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105.....79

ภาพที่ 27 ความยาวรากต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ.....83

ภาพที่ 28 ความยาวลำต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ.....83

ภาพที่ 29 น้ำหนักสตรากต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ84

ภาพที่ 30 น้ำหนักสกลำต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ84

ภาพที่ 31 น้ำหนักแห้งรากต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ85

ภาพที่ 32 น้ำหนักแห้งลำต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ85

ภาพที่ 33 การเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ86

ภาพที่ 34 แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ 87

ภาพที่ 35 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร ISP388

ภาพที่ 36 ลักษณะของสปอร์จากกล้อง SEM ของแอกติโนมัยสีท BBUU144.....92

ภาพที่ 37 ลักษณะของสปอร์จากกล้อง SEM ของแอกติโนมัยสีท BBUU161.....93

ภาพที่ 38 ลักษณะของสปอร์จากกล้อง SEM ของแอกติโนมัยสีท BBUU500.....93

ภาพที่ 39 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 16S rRNA95

ภาพที่ 40 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของแอกติโนมัยสีท BBUU144 กับ *Streptomyces*99

ภาพที่ 41 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของแอกติโนมัยสีท BBUU161 กับ *Streptomyces*100

ภาพที่ 42 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของแอกติโนมัยสีท BBUU500 กับ *Streptomyces*101

ภาพที่ 43 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของแอกติโนมัยสีทกับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ102



1054561741

BUU_1Thesis_59910007_thesis / rcv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ดินเค็มในประเทศไทยพบทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และพื้นที่ชายฝั่งทะเล (สมศรี อรุณินท์, 2539) และด้วยสถานการณ์ในปัจจุบันที่สภาพภูมิอากาศมีการเปลี่ยนแปลงมากขึ้นจึงมีแนวโน้มที่จะเกิดภาวะดินเค็มมากขึ้นซึ่งจะส่งผลกระทบต่อพื้นที่เกษตรกรรม พืชที่ปลูกในพื้นที่ดินเค็มจะตอบสนองความเครียดโดยสร้างเอทิลีนสูงขึ้นและเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น ใบเหลือง หลุดร่วงและเอทิลีนยังไปยับยั้งการเจริญเติบโต ทำให้พืชลักษณะแคระแกร็นและผลผลิตต่ำ ซึ่งเกษตรกรมักแก้ปัญหาความเค็มของดินโดยใช้สารเคมีร่วมกับการใช้ปุ๋ยเคมีหรือปุ๋ยชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืช จึงทำให้ต้นทุนการผลิตสูงและเมื่อมีการใช้สารเคมีเป็นเวลานานอาจจะทำให้ความสมบูรณ์ของดินลดลง ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะใช้กลุ่มแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria; PGPB) เพื่อช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและลดความเครียดของพืชจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเช่น ภายใต้อากาศดินเค็ม โดยคุณสมบัติการเป็น PGPB นั้นจะพิจารณาจากการที่แบคทีเรียมีคุณสมบัติใดคุณสมบัติหนึ่งคือความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (Dobbelaere et al., 2003) สามารถย่อยสลายสารประกอบฟอสเฟต การสร้างสารกลุ่มไซเคโอโรฟออร์ (Matthijs et al., 2007) การสร้างเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD) (Glick, 2014) และการสร้างฮอร์โมนพืชได้ (Saleem et al., 2007) โดยพบว่า PGPB ที่สร้างเอนไซม์ ACCD ได้จะไปเปลี่ยนสารตั้งต้นของเอทิลีนให้กลายเป็นแอมโมเนียและ α -ketobutyrate ส่งผลให้ปริมาณของเอทิลีนในพืชลดลงช่วยให้พืชเจริญเป็นปกติได้ (Honma & Shimomura 1978; Glick et al., 1998, 2007) นอกจากนี้ PGPB ที่มีคุณสมบัติในการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ยังช่วยเพิ่มความยาวของรากพืช ทำให้รากสามารถชอนไชและดูดซึมสารอาหารภายในดินได้ดีขึ้น (Patten & Glick, 1996) และ PGPB ที่มีการศึกษามากแล้วคือ แบคทีเรีย *Pseudomonas putida* และพบว่า *P. putida* นั้นเป็นแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมนพืช IAA และเอนไซม์ ACCD ได้ภายใต้สภาวะการมีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ (Mayak et al., 1999) แต่หากความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงจนถึงระดับหนึ่งจะพบว่า *P. putida* จะมีการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ลดลง (Deshwal & Kumar, 2013) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงได้พยายามค้นหา PGPB จากกลุ่มแบคทีเรียแอคคิโนมายซีท เนื่องจากพบรายงานว่า แอคคิโนมายซีท



1054561741

BUU-1Thesis 59910007 thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ส่วนใหญ่มักเป็นแบคทีเรียทนเค็ม (Waksman, 1959) เช่นพบรายงานว่า แอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* บางชนิดสามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ภายใต้สภาวะการมีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้สูงกว่าสภาวะการไม่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ และยังพบอีกว่าบางชนิดช่วยส่งเสริมการเจริญของข้าวสาลีที่ปลูกในดินที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่ (Egamberdieva, 2009; Sadeghi et al., 2012) นอกจากนี้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าแบคทีเรียแอคติโนมัยสีท *S. filipinensis* ที่สามารถสร้างทั้งฮอร์โมนพืช IAA และเอนไซม์ ACCD สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศได้ดีกว่า *S. atrovirens* ที่สร้างเอนไซม์ ACCD เพียงอย่างเดียว (El-Tarabily, 2008) อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานว่า แอคติโนมัยสีทที่สร้างทั้งฮอร์โมนพืช IAA และเอนไซม์ ACCD สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชภายใต้สภาวะการมีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงทำการคัดกรองแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากมูลไส้เดือนและรากผักบุ้งทะเลที่มีคุณสมบัติทนเค็ม สร้างเอนไซม์ ACCD และ/หรือสร้างฮอร์โมนพืช IAA เพื่อนำแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้ไปศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวภายใต้สภาวะการมีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์โดยเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *P. putida*

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชของแอคติโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติสร้างฮอร์โมนพืช IAA และ/หรือเอนไซม์ ACCD ได้กับแบคทีเรีย *P. putida* ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

ประสิทธิภาพการสร้างฮอร์โมนพืช IAA และ/หรือเอนไซม์ ACCD ของแอคติโนมัยสีทและแบคทีเรีย *P. putida* ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จะมีผลต่อความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แอคติโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติเป็น PGPB ชนิดใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นและสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวที่เจริญในสภาวะความเค็ม

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.5.1 เลือกใช้แอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากสองแหล่งคือมูลไส้เดือนจำนวน 30 ไอโซเลต และจากรากผักบุ้งทะเลจำนวน 8 ไอโซเลต (แอกติโนมัยสีทคัดแยกโดยผู้ช่วยวิจัยในโครงการวิจัยปี 2554 และโครงการวิจัยปี 2559 ของจันทรา อินทนนท์) และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 (The American Type Culture Collection) ซึ่งแบคทีเรียทั้งหมดเก็บรักษาไว้ในหน่วยวิจัยแอกติโนมัยสีท (Actinobacteria Research Unit) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

1.5.2 ศึกษาความสามารถในการทนเค็มใช้โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ (0-7% w/v)

1.5.3 อาหารที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย

1.5.3.1 อาหารเหลว Minimal medium ใช้เพื่อตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD

1.5.3.2 อาหารเหลว Yeast extract-Dextrose (YD) ใช้เพื่อตรวจสอบการผลิตฮอร์โมนพืช IAA หาระดับการเงื้องางของเซลล์ที่เหมาะสม และตรวจสอบการเจริญของแอกติโนมัยสีทภายใต้สภาวะการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์

1.5.3.3 เลือกใช้อาหารเหลวสูตร YD อาหารแข็งสูตร YD, International *Streptomyces* Project (ISP) สูตรที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 9, Mannitol Soya (MS) และ Nutrient Agar (NA) เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

1.5.4 ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเป็น PGPB ของแอกติโนมัยสีทกับแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML105)

1.5.5 ระบุและวิเคราะห์ยีน *acdS* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ ACCD โดยใช้วิธีพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR)

1.5.6 จัดจำแนกแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทในระดับสกุลโดยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ด้วยวิธีพีซีอาร์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยการสร้างแผนภูมिवิวัฒนาการชาติพันธุ์ (Phylogenetic tree)

1.6 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

เดือนธันวาคม พ.ศ. 2560 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2563

1.7 สถานที่ทำการวิจัย

หน่วยวิจัยแอกติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria Research Unit) ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตบางแสน จังหวัดชลบุรี



1054561741

BUU_1Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

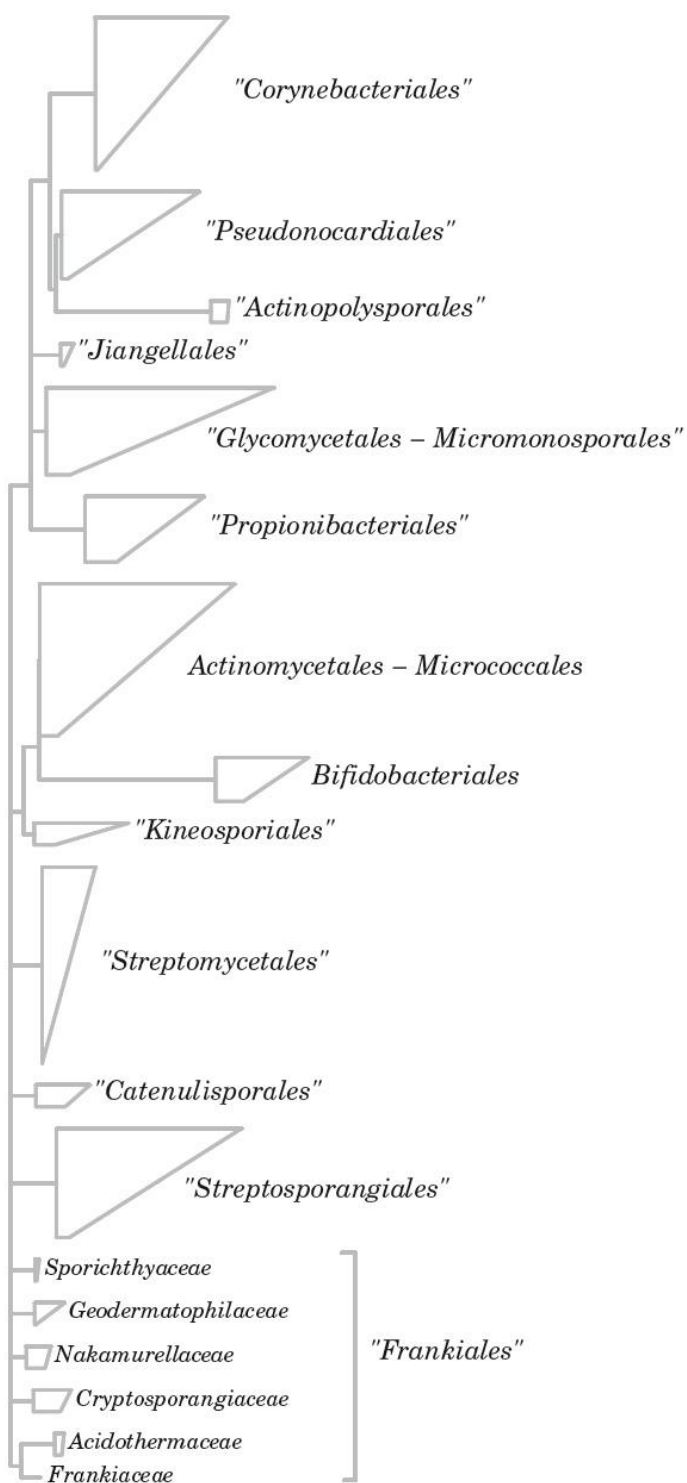
2.1 แอคติโนมัยสิท (Actinomycetes)

แอคติโนมัยสิทเป็นชื่อเรียกสมาชิกของแบคทีเรียที่อยู่ในชั้น (Class) Actinobacteria ซึ่งประกอบด้วย 16 อันดับ (Order) ได้แก่ Actinomycetales, Actinopolysporales, Bifidobacteriales, Catenulisporales, Corynebacteriales, Frankiales, Glycomycetales, Jiangellales, Kineosporiales, Micrococcales, Micromonosporales, Propionibacteriales, Pseudonocardiales, Streptomycetales, Streptosporangiales และ Incertae sedis (ภาพที่ 1) (Ludwig et al., 2012) ซึ่งแอคติโนมัยสิทในสกุล (Genus) *Streptomyces* จัดอยู่ในอันดับ Streptomycetales, วงศ์ (Family) Streptomycetaceae (Hong et al., 2009) เป็นกลุ่มที่มีจำนวนสมาชิกมากกว่า 550 ชนิด (Species) จึงเป็นสกุลที่มีความหลากหลายอย่างมาก (Kämpfer, 2012) ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสิทคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) ที่มีปริมาณเบสกวานีน (Guanine; G) และไซโตซีน (Cytosine; C) ในดีเอ็นเอมากกว่า 55% (Dhananjeyan et al., 2010) และมีการเจริญเป็นเส้นใย (Mycelium) บางชนิดมีการสร้างสปอร์ (Spore) คล้ายเชื้อรา (Barka et al., 2016)



1054561741

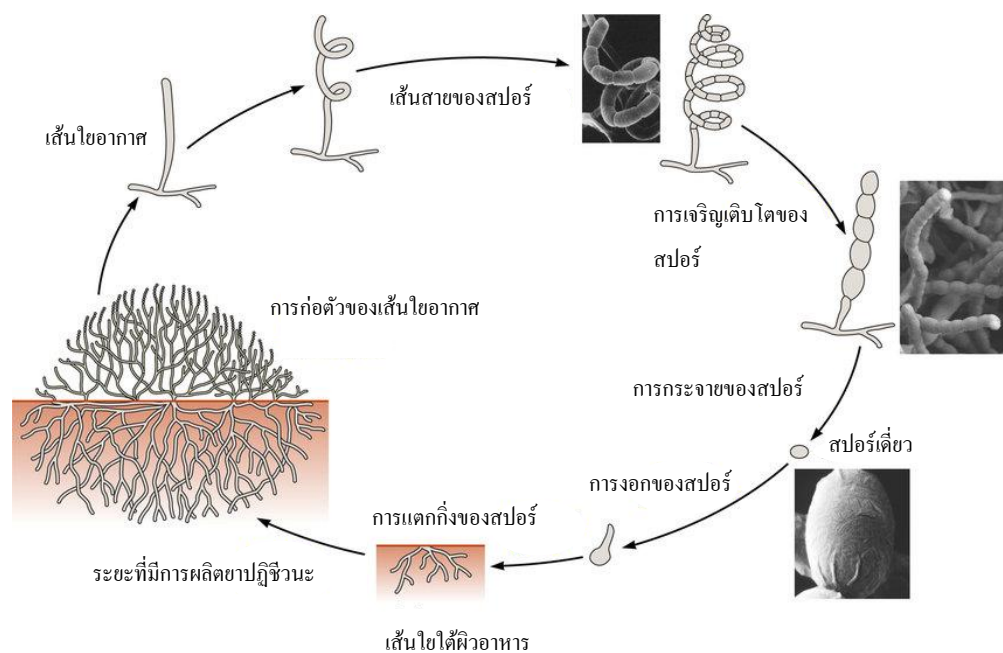
BUU-IThesis 59910007 thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50



ภาพที่ 1 อันดับ (Order) ต่าง ๆ ของแบคทีเรียในชั้น (Class) Actinobacteria
ที่มา: Ludwig et al. (2012)

2.1.1 วงชีวิต

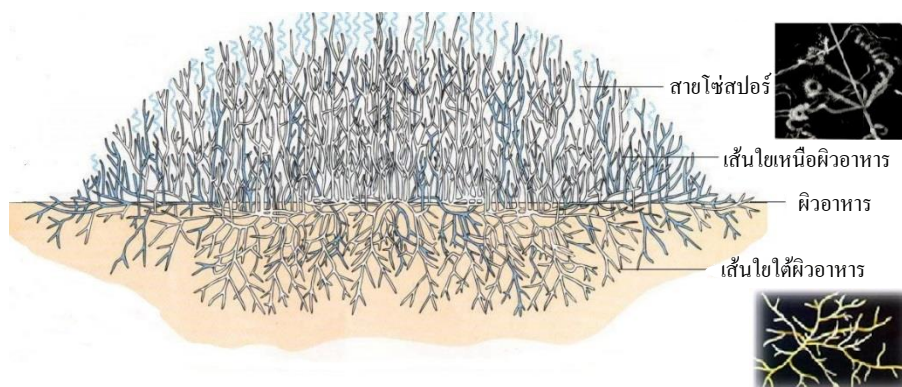
แอสคิโนมัยซีทมีวงชีวิตเริ่มเมื่อสปอร์ตกลงในบริเวณที่มีอาหารเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต สปอร์จะเกิดการงอกเป็นเส้นใยแทรกกลงไปในอาหาร เรียกว่า เส้นใยใต้ผิวอาหาร (Substrate mycelium) เส้นใยเหล่านี้จะมีการแตกแขนงขยายวงกว้างและอัดตัวอย่างหนาแน่นแล้ว โผล่พ้นผิวโคโลนีชูขึ้นในอากาศเรียกว่า เส้นใยเหนือผิวอาหาร (Aerial mycelium) แล้วเกิดการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นสปอร์ที่เห็นลักษณะรูปร่างและสีต่าง ๆ เมื่อสปอร์เจริญเต็มที่ จะหลุดร่วงไปตกที่มีอาหารที่เหมาะสมก็จะงอกเป็น โคลอนีใหม่เริ่มวงชีวิตใหม่ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วงชีวิตของแอสคิโนมัยซีท
ที่มา: Barka et al. (2016)

2.1.2 การสร้างโคโลนี

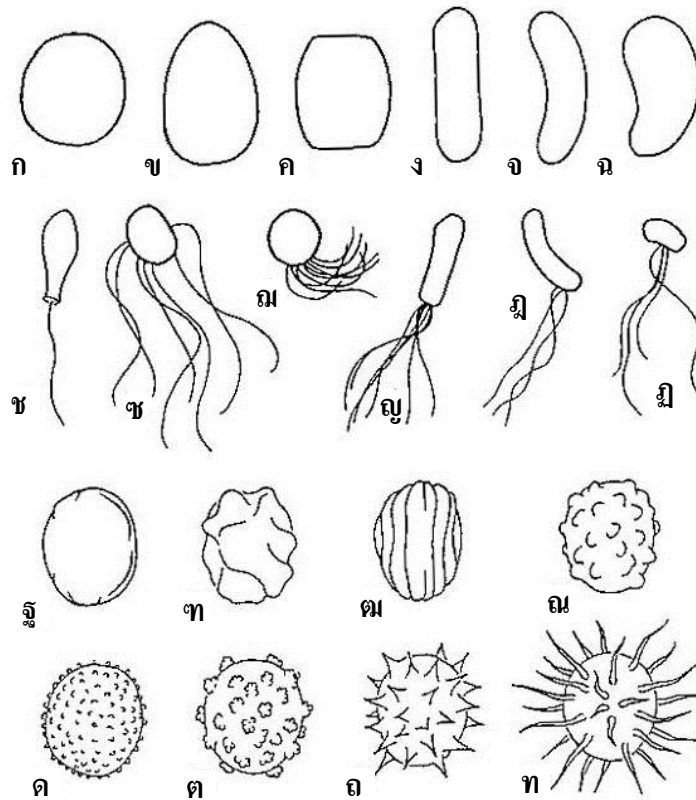
การสร้างโคโลนีของแอกติโนมัซสีทอาจจะเริ่มจากสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่หักหรือบางส่วนของโคโลนีเดิมตกลงในบริเวณหรือสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญแล้วเกิดการรวมตัวของเส้นใยเป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น (ภาพที่ 3) การสร้างโคโลนีอาจมีลักษณะแบน (Flat) หรือยกสูงขึ้น (Raise) หรือปกคลุมด้วยชั้นที่คล้ายหนังสัตว์ ลักษณะของโคโลนีที่อ่อนมากไปจนถึงโคโลนีที่แข็งแรงมาก และโคโลนียังมีสีที่แตกต่างกันเช่น สีขาว (White), สีแดง (Red), สีเหลือง (Yellow), สีส้ม (Orange), สีม่วง (Purple), สีเขียว (Green), สีน้ำเงิน (Blue), สีน้ำตาล (Brown) และสีดำ (Black) เป็นต้น ลักษณะผิวหน้าโคโลนีอาจเรียบ (Smooth), เป็นสันนูน (Ridged), เขี่ยย่น (Wrinkled), เป็นเม็ด (Granular) หรือเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัส (Squamous) การเจริญของโคโลนีอาจเป็นแผ่นยาวตามรอยขีดหรือขึ้นเป็นกระจุกอัดแน่นหรือขึ้นเป็นจุด ๆ กระจาย ๆ หรือผสมกันสองแบบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่มีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร ขนาดโคโลนีที่แตกต่างกันยังขึ้นอยู่กับอายุ สภาวะการเจริญ และสปีชีส์ (Species) (สุจรรยา ฉายแสง, 2556)



ภาพที่ 3 การสร้างโคโลนีบนอาหารแข็งของแอกติโนมัซสีท
ที่มา: Li et al. (2016)

2.1.3 การสร้างสปอร์

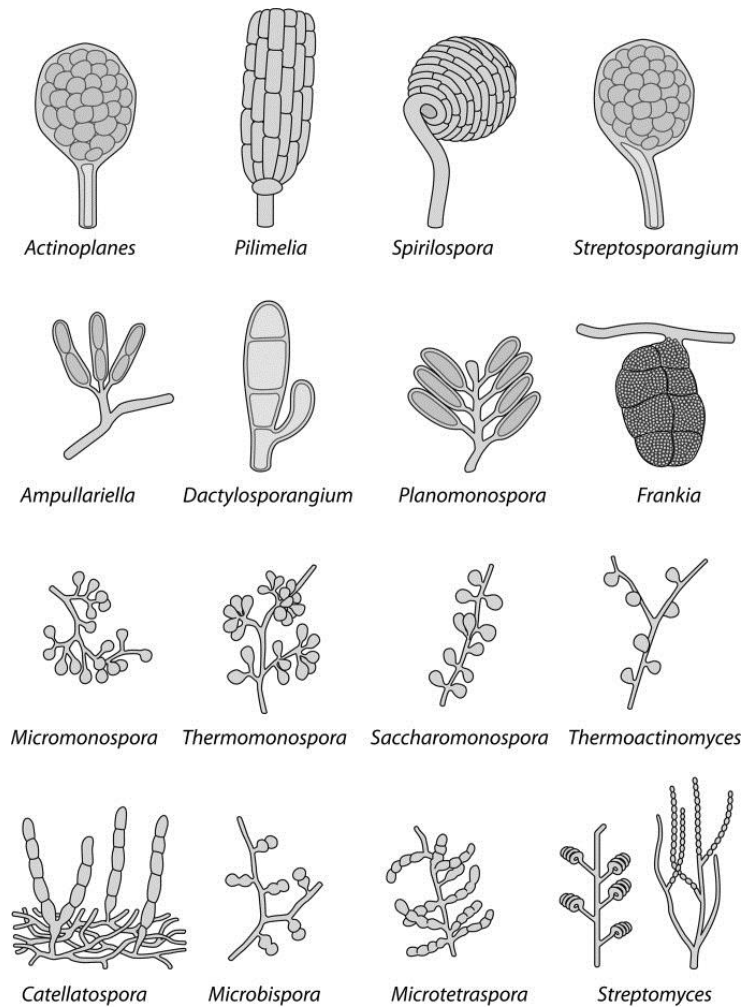
การสร้างสปอร์ของแอกติโนมัยสีทอาจเกิดขึ้นเดี่ยว ๆ หรือเกิดเป็นเส้นสายสั้น ๆ มีรูปร่างหรือผิวสปอร์ที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4) (สุจรรยา ฉายแสง, 2556) บางชนิดมีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า โคนิดิโอสปอร์ (Conidiospore) หรือโคนิเดีย (Conidia) สปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (Flagella) และสปอร์ที่มีถุงหุ้ม (Sporangia) การสร้างสปอร์สามารถสร้างบนเส้นใยได้ผิวหนังหรือเส้นใยเหนือผิวหนัง แอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*, *Micropolyspora* และ *Thermoactinomyces* มีการสร้างเส้นใยได้ผิวหนัง สกกุล *Streptomyces* สร้างเส้นใยเหนือผิวหนัง การสร้างสปอร์อาจสร้างเป็นสายสั้น ๆ เช่น สมาชิกที่อยู่ในสกุล *Actinomadura*, *Saccharopolyspora* และ *Sporichthya* บางสกุลมีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวประมาณ 100 สปอร์ เช่นสกุล *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Kitasatospora* และ *Streptoverticillium* (Barka et al., 2016) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 รูปร่างและลักษณะสปอร์

ก. กลม (Globose), ข. รูปไข่ (Ovoid), ค. รูปแท่งสั้นอ้วน (Doliform), ง. รูปแท่ง (Rod-shape), จ. รูปแท่งโค้ง (Allantoid), ฉ. รูปไต (Reniform), ช. มีแฟลกเจลลา 1 อันที่ปลายเซลล์ (Monopolarmonotrichous), ช. มีแฟลกเจลลารอบเซลล์ (Peritrichous), ฉ. มีแฟลกเจลลาหลายอัน (Polytrichous), ฉ. มีแฟลกเจลลาหลายอันที่ปลายขั้วเซลล์ (Monopolarpolytrichous, Lophotrichous), ฉ. มีแฟลกเจลลาหลายอันใกล้ขั้วเซลล์ (Subpolarpolytrichous), ฉ. มีแฟลกเจลลาหลายอันที่ด้านข้างเซลล์ (Lateral polytrichous), ฐ. สปอร์เรียบ (Smooth), ฑ. สปอร์หยาบไม่เป็นระเบียบ (Irregular rugose), ฒ. สปอร์หยาบบนขนาน (Parallel rugose), ณ. สปอร์เป็นปุ่มๆ (Warty), ด. สปอร์เป็นตุ่มเล็กๆ (Tuberculate), ต. สปอร์เป็นตุ่มมีดอก (Verrucose), ถ. สปอร์มีหนามแหลม (Spiny), ท. สปอร์มีขน (Hairy)

ที่มา: Li et al. (2016)



ภาพที่ 5 ลักษณะสปอร์แบบต่าง ๆ ที่พบในแอกติโนมัยซีท

ที่มา: Barka et al. (2016)

2.1.4 แหล่งที่อยู่อาศัย

แอกติโนมัยซีทมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในธรรมชาติ และสภาพแวดล้อมทางนิเวศวิทยาที่หลากหลายสามารถอาศัยอยู่ในดิน น้ำจืด น้ำทะเล และอากาศ (Barka et al., 2016) และดินบริเวณรอบรากพืช (Rhizosphere) (Anwar et al., 2016) บางกลุ่มยังอาศัยภายในช่องว่างระหว่างเซลล์เนื้อเยื่อพืชเรียกว่า เอนโดไฟต์ (Endophytes) (Masand et al., 2015)

2.2 แอคติโนมัยสิทธิ์เอนโดไฟต์

เอนโดไฟต์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ ได้แก่ แอคติโนมัยสิทธิ์ แบคทีเรีย และเชื้อรา (Strobel & Daisy, 2003) มีวงจรชีวิตเพียงบางช่วงของชีวิตหรืออาจอยู่อาศัยทั้งชีวิตภายในช่องว่างระหว่างเซลล์เนื้อเยื่อพืช โดยไม่ก่อให้เกิดโรคและเป็นอันตรายต่อพืชซึ่งเอนโดไฟต์จะเข้าไปเพิ่มจำนวนและอาศัยภายในช่องว่างระหว่างเซลล์เนื้อเยื่อพืชหรืออาจอยู่ในส่วนราก ลำต้น กิ่ง หรือใบ โดยใช้ชีวิตร่วมกับพืช คือสร้างความสัมพันธ์อยู่ร่วมกันแบบอิงอาศัย (Symbionts) กับพืช และช่วยส่งเสริมการเจริญและการลดความเครียดพืชจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (Qin et al., 2011)

แอคติโนมัยสิทธิ์ที่เป็นเอนโดไฟต์จะเรียกว่า เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสิทธิ์ (Endophytic Actinomycetes) (Matsumoto & Takahashi, 2017) สามารถพบแพร่หลายในธรรมชาติในพืชที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมทั้งทางน้ำและบนบก สามารถคัดแยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืชเช่น ราก (Indananda et al., 2011), ลำต้น (Xing et al., 2013), ใบ (Zhu et al., 2012), ผล (Du et al., 2013) และเมล็ด (Li et al., 2012) มีความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชได้ โดยสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Phytohormones) เช่น IAA (Auxins) (Goudjal et al., 2014), จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) และเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase (Xing et al., 2012) เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถสร้างไซเดอโรฟออร์ (Siderophore) (Nimnoi et al., 2010) และช่วยในการตรึงไนโตรเจน มีรายงานพบว่าในสกุล *Frankia* ที่คัดแยกได้จากปมรากของพืชตระกูลสน (*Comptonia peregrine*) สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศเปลี่ยนไปเป็นธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้เช่นเดียวกับไรโซเบียมที่พบในปมรากพืชตระกูลถั่ว (Okazaki, 2004) และในสกุล *Streptomyces*, *Streptoverticillium* และ *Streptosporangium* คัดแยกได้จากรากกล้วยในประเทศจีนสามารถทำหน้าที่เป็นตัวแทนควบคุมทางชีวภาพ (Biological control) (Cao et al., 2005) และช่วยป้องกันเชื้อโรคพืช (El-Tarabily, 2003) บางชนิดยังเป็นยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) ได้อีกด้วย (Akshatha et al., 2014)

2.3 กรดอินโดล-3-แอซิติค (Indole-3-acetic acid; IAA)

เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Phytohormones) จัดเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่ม ออกซิน (IAA) สร้างขึ้นที่บริเวณราก (Root) ใบเลี้ยง (Cotyledons) และใบอ่อน (Young leaf) (Ljung et al., 2001) ถูกผลิตขึ้นจากพืช เชื้อรา และแบคทีเรียบางชนิด มีบทบาทสำคัญในการช่วย ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Li et al., 2018) โดยจะกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ การงอก ของเมล็ด การเกิดรากและการเจริญเติบโตของต้นอ่อน (El-Tarabily, 2008) นอกจากนี้ยังมีสาร สังเคราะห์หลายชนิดที่มีคุณสมบัติคล้าย IAA เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร ได้แก่ NAA (1-Naphthylacetic acid), IBA 4-(Indol-3-butyric acid), 2, 4-D (2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid) และ 4-CPA (4-Chlorophenoxyacetic acid) ส่วน IAA ธรรมชาติ (Natural auxins) ที่พืชและ จุลินทรีย์สามารถสร้างขึ้นได้โดยอาศัยสารตั้งต้น (Precursor) คือ ทริปโตเฟน (Tryptophan) เช่น Indole-3-acetic acid (IAA), Indole-3-butyric acid (IBA), 4-Chloroindole-3-acetic acid (4-Cl-IAA) และ 2-Phenylacetic acid (PAA) (Korasick., 2013) ดังนั้นหากเติม Tryptophan ลงในอาหารเลี้ยง เชื้อจะมีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิต IAA ได้ (Spaepen et al., 2007) มีรายงานวิจัยของ Hariharan et al. (2014) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง IAA และการ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยแอสคิโนมัลลิตักดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นข้าวที่เก็บ จากนาข้าวในเขตภาคใต้ของรัฐทมิฬนาฑู (Tamil Nadu) ประเทศอินเดียพบว่า *Streptomyces* sp. VSMGT1014 สร้างฮอร์โมนพืชออกซินได้ 15.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่เหมาะสมคือ ในอาหาร ISP2 ที่เติม 0.5% L-tryptophan ระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่า pH เท่ากับ 8 และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวเพิ่มขึ้นคือ ความยาวราก 52% และความ ยาวลำต้น 54.55% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

แบคทีเรียที่สังเคราะห์ IAA ได้พบในหลากหลายสกุล ได้แก่ *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Xanthomonas*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Calothrix*, *Chlorogloeopsis*, *Cylindrospermum*, *Gloeotheca*, *Nostoc*, *Plectonema*, และ *Synechocystis* (Tsavkelova et al., 2006) แต่ปริมาณการสร้างแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิด สกุล และ สภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียอาศัยอยู่โดยพบรายงานของ Shan et al. (2018) รายงานผลการศึกษา แบคทีเรียแอสคิโนแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 46 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากส่วนของใบ ลำต้น และ รากของต้นชา (*Camellia sinensis*) 15 สายพันธุ์ที่ปลูกในมณฑลฝูเจี้ยน (Fujian) ประเทศจีนพบว่า

สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้จำนวน 43 ไอโซเลตหรือคิดเป็น 93.5% และความเข้มข้น IAA อยู่ในช่วง 2.2 ถึง 43.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่ง *Microbacterium testaceum* XY051 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้มากที่สุดคือ 43.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ *Piscicoccus intestinalis* XY145 และ *Streptomyces levis* XY006 สร้างได้ 18.7 และ 12.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และรายงานของ Toumatia et al. (2016) รายงานว่า แอคติโนมัยซีท *Streptomyces mutabilis* IA1 ซึ่งคัดแยกได้จากดินในทะเลทรายซาฮารา (Sahara) สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 74.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Khamna et al. (2009) รายงานว่า แอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* CMU-H009 ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากตะไคร้ (*Cymbopogon citrates*) สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงถึง 143.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (El-Tarabily & Sivasithamparam 2006; Sadeghi et al., 2012) และ Anwar et al. (2016) คัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณรอบต้นข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) และมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) ในรัฐปัญจาบ (Punjab) ประเทศปากีสถานโดยการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ด้วยวิธี Colorimetric Analysis ที่มีความเข้มข้น L-tryptophan 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า แอคติโนมัยซีท *Streptomyces nobilis* WA-3, *Streptomyces kunmingensis* WC-3 และ *Streptomyces enissocaesilis* TA-3 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 79.5, 79.23 และ 69.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของ L-tryptophan 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบรายงานที่เรียกบางชนิดนอกจากสร้าง IAA ได้แล้วยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชได้ เช่นรายงานของ Patten and Glick (2002) พบว่า แบคทีเรีย *Pseudomonas putida* GR12-2 สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA และส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้า Canola มีการงอกของเมล็ดเพิ่มขึ้นถึง 35-50% และพบว่า แอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ในสภาวะความเค็ม เช่นรายงานของ Sadeghi et al. (2012) รายงานว่า แอคติโนมัยซีท *Streptomyces* ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืชจำนวนมากสร้างฮอร์โมนพืช IAA สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ภายใต้สภาวะความเค็มได้

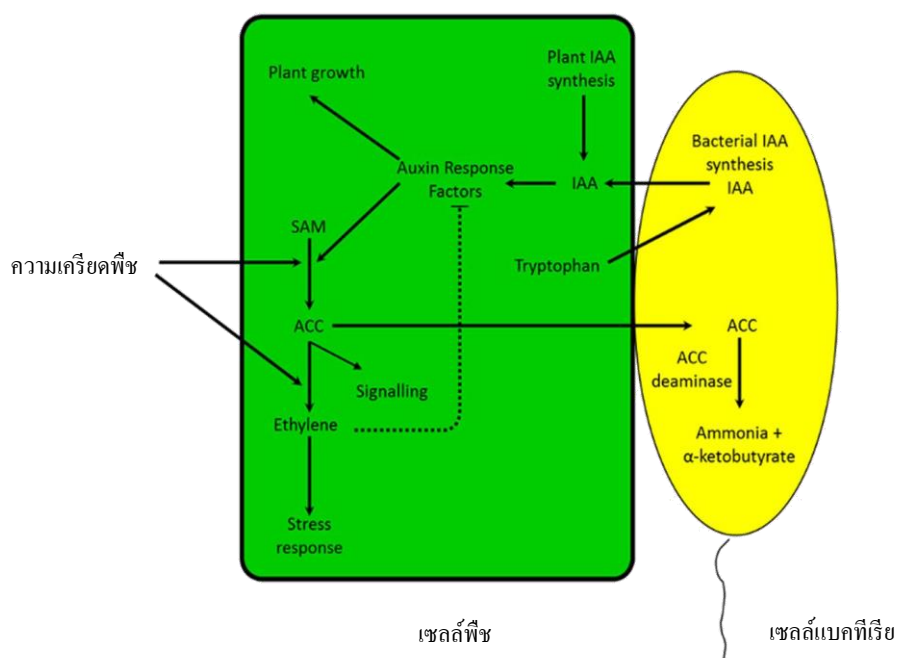
2.4 เอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase

เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างได้จากกลุ่มแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria; PGPB) ช่วยการกระตุ้นการเจริญเติบโตพืชคือ การลดระดับเอทิลีนในพืชโดยจะย่อยสลาย 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เอทิลีนให้กลายเป็นแอมโมเนียและ α -ketobutyrate จากนั้นแบคทีเรียจะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (Honma & Shimomura, 1978; Glick, 1998) ซึ่งเอนไซม์ ACC deaminase (ACCD) ถูกควบคุมการสร้างโดยยีน *acdS* (Govindasamy et al., 2008)

PGPB ที่สร้างเอนไซม์ ACCD ได้จะอาศัยอยู่บริเวณพื้นผิวดรากและเมล็ดพืช บางชนิดอาจพบได้บนใบไม้ ดอกไม้ หรือภายในช่องว่างระหว่างเซลล์เนื้อเยื่อพืช (Glick et al., 1998) เช่น *Agrobacterium genomovars*, *Azospirillum lipoferum*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Pseudomonas*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sinorhizobium meliloti* และ *Variovorax paradoxus* (Belimov et al., 2001; Blaha et al., 2006; Rasche et al., 2006; Duan et al., 2009; Chernin & Glick., 2012) ซึ่งจำนวนแบคทีเรียรอบรากพืช (Rhizosphere) จะสูงกว่าในดิน 1-1,000 เท่า เนื่องจากรากจะหลั่งสาร (Root exudates) ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาล กรดอินทรีย์ และกรดอะมิโน สารเหล่านี้จะเป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรีย (Glick, 2014)

กระบวนการสร้างเอทิลีนในพืชเริ่มต้นจากกรดอะมิโนเมไธโอนีน (Methionine) ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่พืชสังเคราะห์ได้เองถูกเปลี่ยนไปเป็น S-adenosyl methionine (SAM) ต่อมา SAM จะถูกเปลี่ยนไปเป็น ACC ด้วยเอนไซม์ ACC synthase และในขั้นตอนสุดท้าย ACC จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทิลีนด้วยเอนไซม์ ACC oxidase (Glick et al., 2007) การควบคุมระดับเอทิลีนในพืชจะทำให้พืชเจริญได้อย่างเป็นปกติในสภาวะที่ต้องเผชิญกับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่น ความแห้งแล้ง น้ำท่วม สภาวะดินเค็ม และสภาวะที่มีการปนเปื้อนของสารพิษ ทำให้พืชมีระดับเอทิลีนสูงขึ้น ดังนั้นการใช้ PGPB ที่สร้างเอนไซม์ ACCD จะย่อยสลาย ACC ทำให้ระดับของ ACC นอกเซลล์พืชลดลง พืชจึงต้องขับ ACC ออกจากเซลล์มากขึ้นเพื่อรักษาสมดุลของระดับ ACC บริเวณภายในและภายนอกเซลล์ให้ใกล้เคียงกัน การที่ ACC ถูกขับออกนอกเซลล์มากขึ้นทำให้สารตัวกลางในการสังเคราะห์เอทิลีนภายในเซลล์พืชลดลง การสังเคราะห์เอทิลีนในเซลล์พืชจึงลดลงตามไปด้วยทำให้พืชยังคงเจริญได้ตามปกติ (Arshad et al., 2007) นอกจากนี้ Tryptophan ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ IAA ในพืชบางส่วนจะถูกแบคทีเรียนำไปใช้ การสังเคราะห์ IAA ของพืชและแบคทีเรียจะช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์และการขยายตัวของเซลล์พืชแล้วยังไปกระตุ้นให้ SAM

เปลี่ยนเป็น ACC ในพืชเพิ่มขึ้น และแบคทีเรียสังเคราะห์ IAA มากเกินไปจะทำให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตพืช อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์ IAA ของพืชและแบคทีเรียไม่ได้เกิดขึ้นจากปริมาณเอทิลีนในพืชสูงขึ้น และปริมาณเอทิลีนในพืชสูงจะไปยับยั้งการส่งสัญญาณของ IAA (IAA signal transduction) ทำให้การแสดงออกของเอนไซม์ ACC synthase ที่กระตุ้น โดย IAA ถูกกำกั (ภาพที่ 6) ในพืชที่มีปฏิสัมพันธ์กับ PGPB ที่สร้างเอนไซม์ ACCD และฮอร์โมน IAA ปริมาณเอทิลีนจะน้อยกว่าพืชที่มีปฏิสัมพันธ์กับ PGPB ที่สร้างฮอร์โมน IAA ได้เพียงอย่างเดียว PGPB ที่สร้างเอนไซม์ ACCD จะทำให้ปริมาณเอทิลีนในพืชลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการส่งสัญญาณของ IAA ลดลงด้วย และ PGPB ที่สร้างเอนไซม์ ACCD และฮอร์โมน IAA จะส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชได้ โดยเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ ACC synthase ด้วยฮอร์โมน IAA และทำให้ปริมาณเอทิลีนลดลงด้วยเอนไซม์ ACCD จึงสรุปได้ว่า การทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ ACCD และฮอร์โมน IAA คือลดปริมาณเอทิลีนในพืชและส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช (Glick, 2014; Gamalero & Glick, 2015)



ภาพที่ 6 การทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ ACCD และฮอร์โมนพืช IAA ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชโดยแบคทีเรีย PGPB
ที่มา: Gamalero and Glick (2015)

Pastor et al. (2016) ตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD ในอาหารที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียวพบว่า แบคทีเรีย *P. putida* PCI2 สามารถการเจริญในอาหารที่มี ACC ได้ดีกว่าอาหารที่ไม่มี ACC ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า *P. putida* PCI2 สร้างเอนไซม์ ACCD ได้ และ รายงานวิจัยของ Nadeem et al. (2010) พบว่า *P. putida* W2 สร้างเอนไซม์ ACCD ได้ $364 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ และสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 6.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ภายใต้อุณหภูมิและความชื้นได้ และ Wang et al. (2018) รายงานว่า *P. putida* WMQ-7 สร้างเอนไซม์ ACCD ได้ 0.671 ยูนิตต่อไมโครกรัม สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลีได้ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ

Anwar et al. (2016) รายงานว่า แอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบต้นข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) และต้นมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) สร้างเอนไซม์ ACCD ได้คือ *S. mutabilis* WD-3 สร้างเอนไซม์ ACCD ได้สูงสุดคือ 1.9 มิลลิโมลต่อลิตร ในขณะที่ *S. djakartensis* TB-4, *Streptomyces* sp. WA-1, *S. kunmingensis* WC-3 และ *S. nobilis* WA-3 สร้างเอนไซม์ ACCD ได้ 1.81, 1.65, 1.59 และ 1.29 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ และ El-Tarabily. (2008) ยังรายงานว่ แอคติโนมัยซีท *S. filipinensis* และ *S. atrovirens* สามารถสร้างเอนไซม์ ACCD ได้และ *S. filipinensis* ยังสร้างฮอร์โมนพืช IAA สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ *S. albovinaceus* ไม่สร้างฮอร์โมนพืช IAA และ *S. globosus* ไม่สร้างทั้งเอนไซม์ ACCD และฮอร์โมนพืช IAA

Qin et al. (2015) รายงานว่า แอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* ที่คัดแยกได้จากเมล็ดพืชน้ำมันสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) คือ ไอโซเลต KLBMP 1213 และ KLBMP 1234 สร้างเอนไซม์ ACCD ได้ 3.86 และ $75.25 \mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังคัดแยกได้จากส่วนลำต้นจำนวน 5 ไอโซเลตคือ KLBMP 1036, KLBMP 1040, KLBMP 1051, KLBMP 1076 และ KLBMP 1200 สร้างเอนไซม์ ACCD ได้ 9.80, 28.59, 17.20, 19.13 และ $17.83 \mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ตามลำดับ และแอคติโนมัยซีทสกุล *Kibdelosporangium* คัดแยกได้จากรากพืชน้ำมันสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) คือ ไอโซเลต KLBMP 1111^T สร้างเอนไซม์ ACCD ได้ $0.092 \mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Xing et al.,2012)

2.5 ดินเค็ม (Saline Soil)

คือสถานะที่มีปริมาณเกลือปะปนอยู่ในดินมากเกินไป เกลือที่พบส่วนใหญ่ในดินเค็มคือเกลือแกง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และมีชื่อทางแร่วิทยาว่า แร่เฮไลต์ (Halite) โดยมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ ธาตุโซเดียม และธาตุคลอรีนในรูปคลอไรด์ เมื่อมีในปริมาณมากในดินจะส่งผลทำให้เป็นอุปสรรคต่อการเพาะปลูก การเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชลดลง เนื่องจากพืชที่ปลูกอยู่ในพื้นที่ดินเค็มจะเกิดสภาวะการขาดน้ำ มีอาการของใบไหม้ พืชจะได้รับพิษของไอออนต่าง ๆ ที่ละลายออกมาเกินความต้องการและขาดสมดุลของธาตุอาหารพืช นอกจากนี้ความเค็มจะทำให้เกิดการฟุ้งกระจายของดิน ทำให้โครงสร้างดินไม่อยู่ตัว ดินจะแน่น น้ำซึมผ่านได้ยาก และรากพืชจะไซซอนได้ยาก ซึ่งอิทธิพลของเกลือจะทำให้พืชปกติไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แต่พืชทนเค็มและพืชชอบความเค็มจะเจริญเติบโตได้ (เอิบ เขียวรัตน์, 2550)

วิธีวัดความเค็มของดินมีหลายวิธีแต่นิยมใช้ทั่วไปแล้วค่าที่ใช้กำหนดความเข้มข้นของความเค็มที่วัดได้มักใช้ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (Electrical conductivity; EC) มีหน่วยเป็นเดซิซีเมนเมตร (dS/m) ค่าการนำไฟฟ้าของดินที่สกัดได้จากดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (Electrical conductivity at Saturation extract; ECe) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมาใช้ประเมินปริมาณเกลือและอิทธิพลของเกลือในดินต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณเกลือในดินที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช (สมศรี อรุณินท์, 2539)

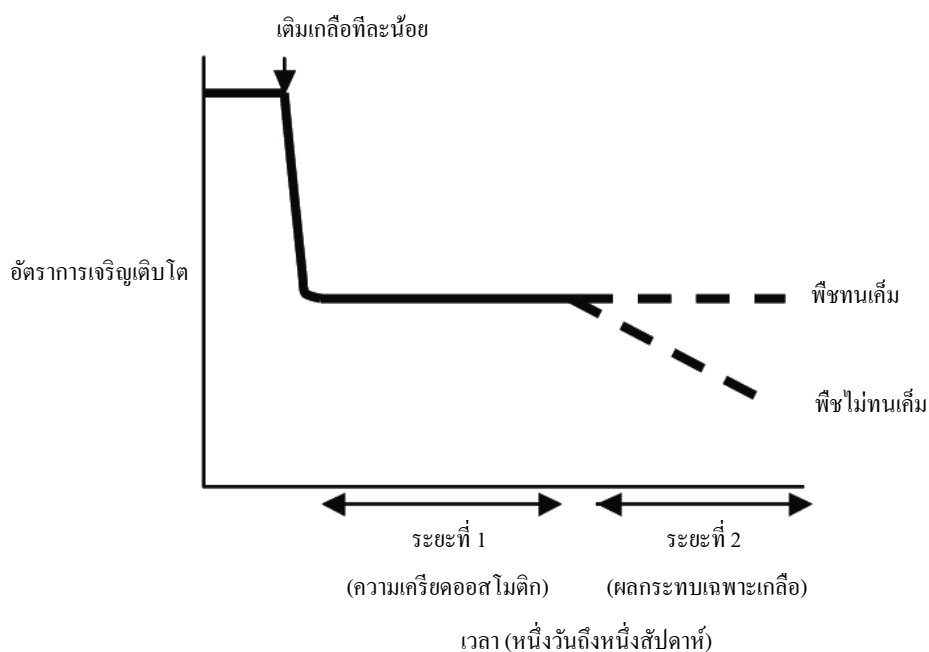
ECe (dS/m)	เกลือในดิน (%)	ระดับความเค็ม	อิทธิพลต่อพืช
2	< 0.1	ไม่เค็ม	ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช
2-4	0.1-0.2	เค็มเล็กน้อย	มีผลต่อพืชที่ไม่ทนเค็ม
4-8	0.2-0.4	เค็มปานกลาง	มีผลต่อพืชหลายชนิด
8-16	0.4-0.8	เค็มมาก	พืชทนเค็มเท่านั้นที่ยังเจริญเติบโตได้ดี
16	> 0.8	เค็มจัด	พืชทนเค็มน้อยชนิดหรือพืชชอบเกลือที่เจริญเติบโตได้ดี

2.5.1 ผลกระทบของความเค็มต่อพืช (Salinity effect on plant)

ความเค็มมีผลต่อพืชในสองวิธีหลักคือ ความเข้มข้นเกลือในดินสูง ทำให้ความสามารถในการดูดซึมน้ำของรากลดลง และความเข้มข้นเกลือที่สะสมภายในพืช อาจเป็นพิษทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมี เช่น การดูดซึมสารอาหาร ผลกระทบเหล่านี้จะทำให้การเจริญเติบโตและการอยู่รอดของพืชลดลง ซึ่งถูกอธิบายไว้ในแบบจำลองสองเฟสที่อธิบายถึงความเครียดจากเกลือของออสโมติก (Osmotic) และไอออน (Ionic effects) แสดงดังภาพที่ 7 (Munns, 1995)

2.5.1.1 ความเค็มในดินที่มีปริมาณมากเกินไป จะส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตพืช เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือในดินสูงจะทำให้ความสามารถในการดูดซึมของพืชลดลง พืชจึงต้องใช้พลังงานมากกว่าปกติเพื่อดูดน้ำและธาตุอาหารมาใช้ในการเจริญเติบโต เช่น การสะสมโซเดียมมากเกินไปในผนังเซลล์สามารถนำไปสู่ความเครียดจากความดันออสโมติก (Osmotic pressure) และการตายของเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว เกลือในดินทำให้น้ำในดินมีแรงดันออสโมติกเพิ่มขึ้นและความต่างศักย์ของน้ำ (Water potential) ลดลงจะทำให้เซลล์พืชมีอาการขาดน้ำและอาจถึงตายได้ เพราะน้ำจะไหลจากบริเวณที่มีความต่างศักย์สูง (เกลือเจือจาง) ไปสู่บริเวณที่มีความต่างศักย์ที่ต่ำกว่า (เกลือเข้มข้น) หากดินมีเกลือในสารละลายดินเข้มข้นกว่าในพืช ความเป็นประโยชน์ของน้ำในดินจะลดลง ทำให้พืชไม่สามารถดูดน้ำจากดินได้ ส่งผลกระทบต่อการงอกและการเจริญเติบโต พืชแสดงอาการเฉา หรือขอบใบไหม้ (Munns, 2002)

2.5.1.2 ความเข้มข้นของเกลือที่สะสมในพืชสูงอาจเป็นพิษ เพราะปริมาณไอออนที่มากเกินไป (Ion-excess effect) เมื่อเข้าสู่พืช พืชเกิดการสะสมไอออนพิษเช่น โซเดียม (Na^+), แมกนีเซียม (Mg^{+2}), คลอไรด์ (Cl^-), คาร์บอเนต (CO_3^{-2}) และซัลเฟต (SO_4^{-2}) จะยับยั้งกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมีต่าง ๆ เช่น กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ความเป็นพิษของเกลือส่วนใหญ่เกิดจากการสะสมโซเดียมและคลอไรด์ มักเกิดขึ้นในใบแก่ ทำให้เกิดการหลุดร่วงของใบ



ภาพที่ 7 การตอบสนองของการเจริญเติบโตพืชต่อความเค็มสองระยะ (Two-phase growth response to salinity)

ที่มา: Läuchli and Grattan (2007)

2.5.2 การใช้แบคทีเรียลดความเครียดพืชที่เกิดจากสภาวะความเค็ม

การแก้ไขปัญหาดินเค็มด้วยการลดความเป็นพิษที่เกิดจากความเค็มสูงโดยอาศัยกลุ่มแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria; PGPB) เช่น *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas syringae*, *P. fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Azospirillum*, *Achromobacter piechaudii* และ *Bacillus insolitus* (Dimkpa et al., 2009) ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืช (Rhizosphere) และในรากพืช (Endorhizosphere) จะช่วยจัดการธาตุอาหารควบคุมโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชผ่านกลไกทางตรงและทางอ้อม การเจริญเติบโตของพืชโดยทางอ้อมจะลดหรือควบคุมเชื้อโรคพืชและทางตรงจะผลิตฮอร์โมนพืช (Phytohormone) และการสร้างไซโตไคน์ (Kohler et al., 2006) ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อรา *Arbuscular mycorrhizal* ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชภายใต้ความเค็ม (Cho et al., 2006) และรายงานวิจัยของ Kohler et al. (2006) แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของแบคทีเรีย *P. mendocina* ช่วยปรับปรุงดิน แบคทีเรีย *P. alcaligenes* PsA15, *Bacillus polymyxa* BcP26 และ *Mycobacterium phlei* MbP18 สามารถทนต่ออุณหภูมิและความเข้มข้นของเกลือสูง ทำให้สามารถเจริญได้ในสภาวะแห้งแล้งและความเค็ม

(Egamberdiyeva, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรีย *P. putida* Rs198 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของฝ้ายภายใต้สภาวะความเค็มได้ (Yao et al., 2010) และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Arthrobacter* sp. สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลีภายใต้สภาวะความเค็มได้ (Upadhyay et al., 2012)

Wang et al. (2019) รายงานว่า แอคติโนมัยซีท *Streptomyces chartreusis* WZS021 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 30.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ้อยภายใต้สภาวะความแห้งแล้ง

Jaemsaeng et al. (2018) รายงานว่าแอคติโนมัยซีท *Streptomyces* sp. GMKU 336 คัดแยกได้จากรากพืชสมุนไพร *Clerodendrum serratum* (L.) Moon สามารถสร้างเอนไซม์ ACCD ได้ 2.85 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate mg protein}^{-1}\text{h}^{-1}$ และส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าวขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) ภายใต้สภาวะความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 150 มิลลิโมลาร์

Detraksa (2018) รายงานผลการศึกษาศึกษาแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นอ้อยและข้าว โดยคัดกรองแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA พบว่า *Streptomyces* sp. AS13-2 และ *Streptomyces* sp. AS14-2 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงสุดคือ 17.17 และ 29.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ *Streptomyces* sp. AS14-2 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ้อยมีความยาวราก ลำต้น น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุมคือไม่ได้รับเชื้อ

Palaniyandi et al. (2014) ศึกษาแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท *Streptomyces* sp. PGPA39 ช่วยลดความเครียดพืชจากสภาวะความเค็มและสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ ('Micro Tom' tomato) พบว่า *Streptomyces* sp. PGPA39 สร้างฮอร์โมนพืช IAA 6.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่ไม่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์และสร้างเอนไซม์ ACCD ได้ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 180 มิลลิโมลาร์ ต้นที่ได้รับเชื้ออัตราการเติบโตที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับเชื้อ และการเจริญลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมคือ ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์และไม่ได้รับเชื้อ

Yan et al. (2014) ศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum* L.) ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 90 และ 190 มิลลิโมลาร์พบว่า ต้นมะเขือเทศที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *P. putida* UW4 เจริญเติบโตสูงกว่าต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับเชื้อ และระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ทั้งในต้นที่ไม่ได้รับเชื้อและต้นที่ได้รับเชื้อ ความยาวลำต้น มวลน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลง แต่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 90 มิลลิโมลาร์ ต้นที่ได้รับเชื้อ ความยาวลำต้นเพิ่มสูงขึ้น 34.3 มิลลิเมตร ซึ่ง

ยาวกว่าต้นที่ไม่ได้รับเชื้อที่ความเข้มข้นเกลือเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ในสถานะที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 190 มิลลิโมลาร์ ความยาวลำต้น 22.7 มิลลิเมตร ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับต้นที่ไม่ได้รับเชื้อ

Qin et al. (2014) รายงานว่าแอคติโนมัยซีท *Streptomyces* sp. KLBMP 5084 สร้างฮอร์โมนพืช IAA และสร้างเอนไซม์ ACCD ได้ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Limonium sinense* ในสถานะที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 100 และ 250 มิลลิโมลาร์ พบว่าในสถานะที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 100 และ 250 มิลลิโมลาร์ ต้น *L. sinense* ที่ได้รับเชื้อมีความยาวรากและใบเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับเชื้อ

Sadeghi et al. (2012) ศึกษากิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชของ *Streptomyces* ในการสร้างฮอร์โมนพืช IAA และไซโตไคน์ภายใต้สภาวะดินเค็มพบว่า *Streptomyces* ไอโซเลต C ในสถานะที่ไม่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 2.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 300 มิลลิโมลาร์ สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 4.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวสาลี โดยอัตราการงอก ความยาวลำต้น และน้ำหนักแห้งราก ลำต้น เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ



1054561741

2.6 การจัดจำแนกแบคทีเรีย

การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทจะใช้วิธีอนุกรมวิธานแบบโพลีฟาสิก (Polyphasic taxonomy) ซึ่งประกอบไปด้วย การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) สรีรวิทยา (Physiology) อนุกรมวิธานทางเคมี (Chemotaxonomy) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ โดยวิธีทางเคมีและสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (Phylogenetic tree) จากยีน 16S rRNA และ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของจีโนมของแบคทีเรียโดยวิธีทำ DNA-DNA hybridization

2.6.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาคือ การศึกษาลักษณะรูปร่าง ขนาด สีของเส้นใยทั้งเหนือผิวอาหารและใต้ผิวอาหารของสปอร์ รงควัตถุที่สร้างขึ้น ลักษณะของเส้นสายสปอร์ การสร้างซุโอสปอร์ (Zoospores) ใน Vesicles หรือในอับสปอร์หรือไม่ การเคลื่อนที่ของสปอร์ รวมทั้งรูปร่าง และลักษณะผิวของสปอร์ ซึ่งการศึกษาผิวสปอร์และโครงสร้างที่ละเอียดจะศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning electron microscope; SEM) (รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2552)

2.6.2 การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA

ยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) มีลักษณะเป็น โครงสร้างทุติยภูมิของอาร์เอ็นเอที่ไม่มี การแปลรหัส แต่มีหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนร่วมกับไรโบโซมอลของโปรตีนหลายชนิดรวมเป็นไรโบโซม โดยไรโบโซมจะมีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ในโพรแคริโอต (Prokaryote) มีขนาด 70S ซึ่งประกอบด้วยสองหน่วยย่อยคือ หน่วยขนาดใหญ่ 50S (Large subunit) ได้แก่ชนิด 23S rRNA ขนาดประมาณ 2,904 นิวคลีโอไทด์และ 5S rRNA ขนาดประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์รวมอยู่กับโปรตีน 34 ชนิด และหน่วยขนาดเล็ก 30S (Small subunit) ได้แก่ชนิด 16S rRNA ขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์ รวมอยู่กับโปรตีน 21 ชนิด (ลัดดา, 2547)

ยีน 16S rRNA นิยมถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากความเหมาะสมของโมเลกุลที่มี 1,500 นิวคลีโอไทด์ รวมทั้งมีส่วนของบริเวณอนุรักษ์และความผันแปรเพียงพอสำหรับจัดกลุ่มหรือบอกความสัมพันธ์ ซึ่งหากยีนมีความผันแปรสูงหรือเกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) จะทำให้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์สูญหายไป และไม่สามารถทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Alignment) ได้ เนื่องจากในการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์คือ การเปรียบเทียบหาส่วนที่เหมือนและต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์

แบคทีเรียจะมียีน 16S rRNA ที่มีรหัสสำหรับโมเลกุลไรโบโซมซึ่งมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิดและบางช่วงของสายดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ที่มีลำดับเบสเหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิด ซึ่งส่วนที่เหมือนกันนี้สามารถนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ (Primer) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR amplification) ซึ่งถือว่าเป็นสากล (Universal primers) โดยไพรเมอร์ 1 คู่นี้สามารถขยายเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ได้จากแบคทีเรียทุกชนิดที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ทำการศึกษา

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในแอคติโนมัยซีท *Streptomyces* พบว่าตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 982 ถึง 998 ซึ่งมีความยาว 16 คู่เบสเป็นส่วนที่มีความแตกต่างกันสูงในแต่ละชนิดเรียกบริเวณนี้ว่า อัลฟา (Alpha region หรือ Variable region) และภายในบริเวณอัลฟายังประกอบด้วยบริเวณแกมมา (Gamma region) คือ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 170 ถึง 200 ซึ่งจะพบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างได้อีกระยะหนึ่งที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1,102 ถึง 1,122 ซึ่งเรียกบริเวณเบตา (Beta region) (Stackebrandt et al., 1991a; 1991b) ช่วงที่แตกต่างกันของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอ นั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย

Duan et al. (2019) คัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ได้แก่ไอโซเลต NEAU-A15^T, NEAU-A13 และ NEAU-C4 โดยทำการตรวจสอบและจัดจำแนกโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของลำดับยีน 16S rRNA แสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Glycomyces*

Watanabe et al. (2003) คัดแยกแอคติโนมัยซีทจากทางเดินอาหารของปลวกจำนวน 5 สกุล ได้แก่ *Heterosiphonia japonica*, *Neotermes koshunensis*, *Reticulitermes speratus*, *Coptotermes formosanus* และ *Odontotermes formosanus* โดยนำมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า สามารถคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากทางเดินอาหารได้ จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในบริเวณ 16S rRNA และพบว่าแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้เป็นแอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces*

Kataoka et al. (1997) ได้ทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียจำนวน 89 สายพันธุ์ในสกุล *Streptomyces* เพื่อศึกษาลำดับตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ความยาว 120 bp บริเวณอัลฟาของยีน 16S rRNA (rDNA) และออกแบบคู่ไพรเมอร์บริเวณปลาย 5' ของ 16S rRNA ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1 ถึง 20 (Sense primer) และ 481 ถึง 500 (Antisense primer) เพื่อเพิ่มปริมาณบริเวณอัลฟาของยีน 16S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่าความแตกต่างของบริเวณดังกล่าวสามารถจำแนก *Streptomyces* ในแต่ละชนิดได้

การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในระดับสกุล (Genus) แต่ละชนิดใช้หลักการคำนวณหาความน่าจะเป็นจากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงเมื่อคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงแต่ละกลุ่มรวมกัน สามารถแสดงผลในรูปแบบตารางเปรียบเทียบความคล้ายคลึง โดยค่าความคล้ายคลึงนี้สามารถนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม EZbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/login>) และใช้โปรแกรม MEGA7 เพื่อสร้างเป็นผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ได้ (Phylogenetic tree) การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทในระดับสกุลโดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA เป็นที่นิยมกันมากที่สุดในการใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ใช้สำหรับสายวิวัฒนาการของแบคทีเรียและอนุกรมวิธาน โดยมีสาเหตุดังนี้

2.6.2.1 มีอยู่ในเกือบทุกแบคทีเรียและมักจะอยู่เป็น Multigene family หรือ Operons

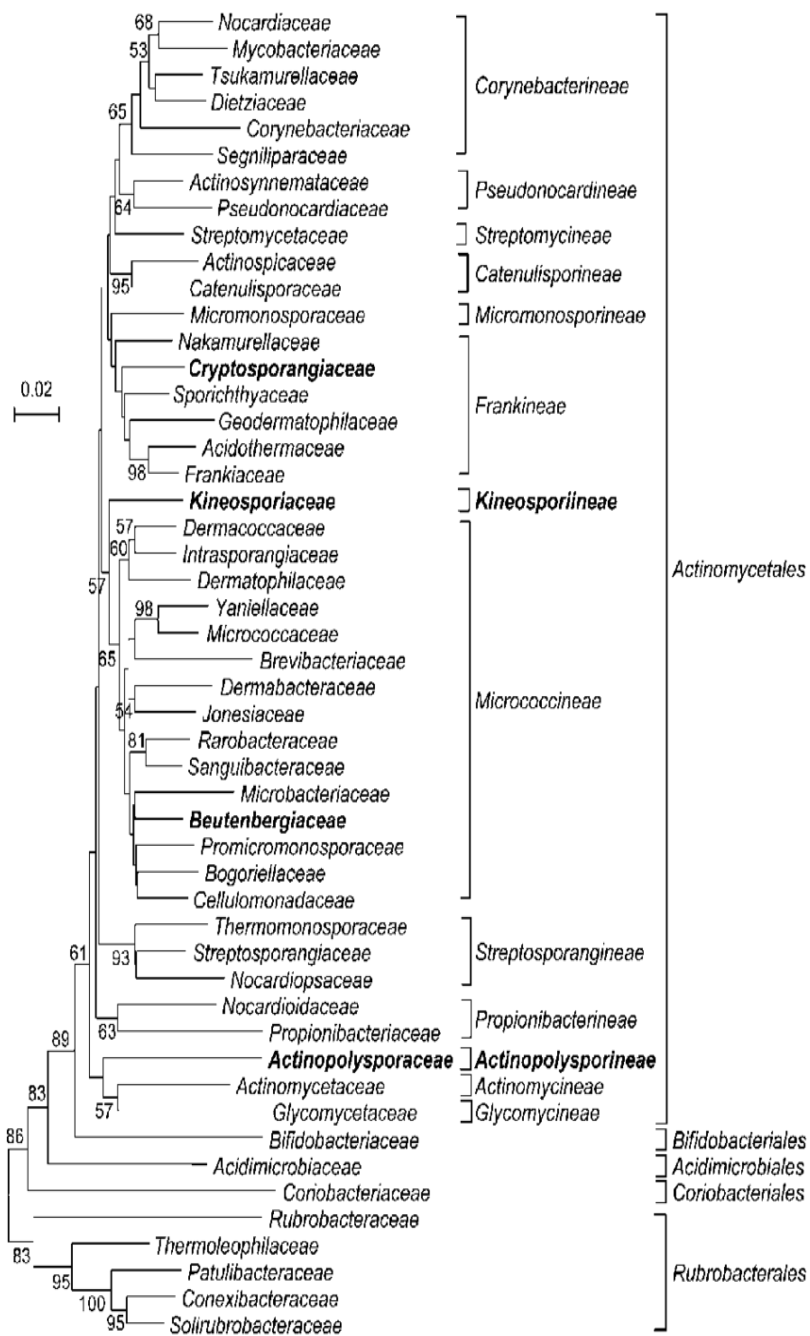
2.6.2.2 การทำงานของยีน 16S rRNA เมื่อเวลาผ่านไปจะไม่เปลี่ยนแปลง แต่ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับไปแบบสุ่ม แสดงให้เห็นว่ามีการวิวัฒนาการเกิดขึ้น

2.6.2.3 ยีน 16S rRNA มีขนาดใหญ่พอสำหรับจัดเก็บข้อมูลทางพันธุกรรม

(Indananda, 2013)

ดังนั้นการศึกษาสายวิวัฒนาการที่อยู่บนพื้นฐานของยีน 16S rRNA จะมีเพิ่มมากขึ้นในระบบอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์บนพื้นฐานของ 16S *ribosomal DNA* ยังช่วยให้การตรวจสอบข้อเท็จจริงของวิวัฒนาการพื้นฐานของแบคทีเรียสำหรับการระบุตัวตนหรือจัดจำแนก

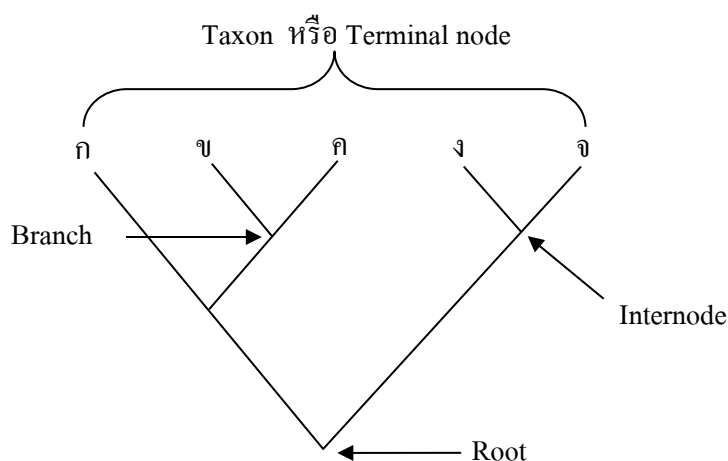
การวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA (Genetic similarities) ทำให้ในปัจจุบันนี้มีการใช้ค่าความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA เป็นตัวบ่งชี้การเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ โดยหากค่าความคล้ายคลึงของยีนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 97% เมื่อเทียบกับข้อมูลชนิดของแบคทีเรียที่เป็นที่รู้จักทั้งหมดที่มีในอนุกรมวิธาน จะได้รับการพิจารณาให้เป็นชนิดใหม่ และชนิดที่ค่าความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA มากกว่าหรือเท่ากับ 97% พบว่ายังไม่เป็นที่ชัดเจนว่าเป็นชนิดใหม่ ซึ่งค่าความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA มักนำมาพิจารณาพร้อมกับค่าเปอร์เซ็นต์การจับกันของ DNA ที่เกิดจากการทำ DNA hybridization (Amann et al., 1992; Stackebrandt & Goebel, 1994; Vandamme et al., 1996; Stackebrandt et al., 2002; Gevers et al., 2005; Janda & Abbott, 2007)



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ Intraclass ของ Class Actinobacteria แสดงให้เห็นทั้ง 5 Order คือ Actinomycetales, Bifidobacteriales, Acidimicrobiales, Coriobacteriales และ Rubrobacteria บนพื้นฐานการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA
ที่มา: Zhi et al. (2009)

2.6.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (Phylogenetics)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการชาติพันธุ์เป็นการศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยใช้แผนภาพคล้ายต้นไม้ โดยใช้ความรู้ทางชีววิทยาและวิวัฒนาการความสัมพันธ์ และสามารถเปลี่ยนแปลงได้ถ้ามีความรู้ใหม่เรียกว่า Phylogeny หรือ Evolutionary tree โดยมีสมมุติฐานหลักว่า สิ่งมีชีวิตที่มีข้อมูลทางโมเลกุลเหมือนกัน (Homologous) มีบรรพบุรุษร่วมกันแล้วค่อย ๆ มีการมีการเปลี่ยนแปลงไปตามการเวลา จึงมีการแยกออกจากกันครั้งละสองกิ่ง แต่ละจุดที่แยกออกจากกันเกิดได้อย่างอิสระ ซึ่ง Phylogenetic tree ประกอบไปด้วยส่วนต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 องค์ประกอบของ Phylogenetic tree

ที่มา: สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2552)

กลุ่มของ Taxon หรือหน่วยอนุกรมวิธานแยกมาจากบรรพบุรุษร่วม (Common ancestor) เดียวกันเรียกว่า เคลด (Clade) หรือ Monophyletic group ซึ่ง Taxon ที่อยู่ใกล้กัน เรียกว่า Sister taxon มีจุดที่เป็นบรรพบุรุษร่วมกัน ส่วน Taxon ที่มีบรรพบุรุษร่วมมากกว่าหนึ่งจุดไม่จัดเป็นเคลด เรียกว่า Paraphyletic group

การสร้างผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้หลักฐานทางโมเลกุล การสร้างผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยอาศัย Character-based จะใช้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่ ๆ นับจำนวนการกลายพันธุ์ (Mutation) ที่เกิดขึ้น มี 2 วิธี

2.6.3.1 Maximum parsimony เริ่มจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบรรพบุรุษสร้าง tree โดยหาความเป็นไปได้ที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบรรพบุรุษจนถึงปัจจุบัน การเปรียบเทียบลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์จะเลือกเฉพาะตำแหน่งที่พบการแทนที่เบสเดียวกันอย่างน้อย 2 ตัวอย่างหรือเกิดการแทนที่เบสที่ตำแหน่งนั้นอย่างน้อย 2 ครั้ง

2.6.3.2 Maximum likelihood ใช้โมเดลของความน่าจะเป็นเพื่อเลือก Tree ที่ดีที่สุดมีความเป็นไปได้มากที่สุดสร้าง Tree ทุกแบบแล้วเปรียบเทียบความน่าจะเป็น โดยพิจารณาจากลำดับเบสทั้งหมด

แต่ไม่ว่าจะเลือกใช้วิธีใดก็มีโอกาสเกิดความคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นจึงเพิ่มความเชื่อมั่นด้วยการทำ Bootstrap การสร้าง Tree ด้วยวิธีนี้คือ Clustering based method โดยดูจาก Distance matrix แล้วเริ่มจับคู่ที่เหมือนกันมากที่สุด นิยมใช้วิธี Neighbor joining เป็นวิธีที่ค่อย ๆ ลดขนาดของเมทริกซ์ลง เพื่อให้อัตราการเกิดวิวัฒนาการถูกต้องจะมีการปรับค่า Distance ใหม่ (สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, 2552)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML105)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก)

- 3.1.2.1 อาหารสูตร Mannitol soya (MS)
- 3.1.2.2 อาหารสูตร Nutrient agar (NA)
- 3.1.2.3 อาหารสูตร Yeast extract-dextrose agar (YD)
- 3.1.2.4 อาหารสูตร Tryptone yeast extract broth (ISP1)
- 3.1.2.5 อาหารสูตร Yeast malt agar (ISP2)
- 3.1.2.6 อาหารสูตร Oatmeal agar (ISP3)
- 3.1.2.7 อาหารสูตร Inorganic salt starch agar (ISP4)
- 3.1.2.8 อาหารสูตร Glycerol asparagine agar (ISP5)
- 3.1.2.9 อาหารสูตร Peptone yeast extract iron agar (ISP6)
- 3.1.2.10 อาหารสูตร Tyrosine agar (ISP7)
- 3.1.2.11 อาหารสูตร Carbon utilization agar (ISP9)
- 3.1.2.12 อาหารสูตร Minimal medium (MM)
- 3.1.2.13 อาหารสูตร Yeast extract-dextrose (YD)

3.1.3 สารเคมีและสารละลายที่ใช้ทดสอบ (แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก)

- 3.1.3.1 Normal saline solution
- 3.1.3.2 Sodium chloride
- 3.1.3.3 L-tryptophan
- 3.1.3.4 Salkowski's reagent
- 3.1.3.5 สารละลายคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)



1054561741

BUU_1Thesis 59910007 thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

3.1.3.6 สารละลายซาฟรานิน (Safranin O)

3.1.3.7 สารละลายไอโอดีน

3.1.3.8 95% Ethanol

3.1.3.9 Sodium hypochlorite

3.1.4 วัสดุอุปกรณ์

3.1.4.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow clean bench)

3.1.4.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.1.4.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3.1.4.4 เครื่องเขย่า (Shaker)

3.1.4.5 เครื่องชั่งแบบละเอียด (Analytical balance)

3.1.4.6 เครื่องชั่งแบบหยาบ (Balance for approximate weighing)

3.1.4.7 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.1.4.8 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Mastercycler nexus GSX1 Eppendorf)

3.1.4.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.1.4.10 เครื่องผสมสาร (Vortex)

3.1.4.11 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)

3.1.4.12 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope)

3.1.4.13 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope)

3.1.4.14 กล้องถ่ายรูป (Camera)

3.1.4.15 เครื่องแก้ว (บีกเกอร์, ขวดรูปชมพู่, กระจกดวง, กรวยกรอง, งานเพาะเชื้อ, หลอดทดลอง, ขวดเก็บสาร, แท่งแก้วสามเหลี่ยม)

3.1.4.16 กระจกสไลด์ (Microscope slide)

3.1.4.17 กระจกปิดสไลด์ (Cover slide)

3.1.4.18 หัวเข็มเชื้อ (Inoculating loop)

3.1.4.19 ปากคีบ (Forcep)

3.1.4.20 ฟิล์มกรองสาร (Syringe filter membranes pore ขนาด 0.22 ไมครอน)

3.1.4.21 กระดาษกรอง (Filter paper whatman No.2)

3.1.4.22 เครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติ (Automatic micropipette)

- 3.1.4.23 ไมโครปิเปตทิป (Pipette tip for micropipette)
- 3.1.4.24 หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร
(Microcentrifuge tube)
- 3.1.4.25 อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)
- 3.1.4.26 หลอดหยด (Dropper)
- 3.1.4.27 หลอดนึ่งยา
- 3.1.4.28 กระดาษชำระ
- 3.1.4.29 สำลี
- 3.1.4.30 กระจกพลาสติกและดิน
- 3.1.4.31 โรงเรือนสำหรับปลูกข้าว

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การทำให้เชื้อบริสุทธิ์

นำแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทที่เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสในหน่วยวิจัยแอกติโนมัยสีทที่เรียกว่าจำนวน 38 ไอโซเลต ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้คัดแยกภายใต้โครงการวิจัยของ จันทรา อินทนนท์ ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 และพ.ศ. 2559 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้อาหารแข็งสูตร MS และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 (ATCC: The American Type Culture Collection) เติบโตบนอาหารแข็งสูตร NA สำหรับหมายเลขรหัสของแอกติโนมัยสีทไอโซเลตต่าง ๆ ใช้รหัสเป็น BBUU (Biology-Burapha University) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 หมายเลขรหัสแบคทีเรียแอกติโนมัยสีท

BBUU	แหล่งคัดแยก	จำนวน (ไอโซเลต)	คัดแยกปี
105, 112, 114, 118, 134, 144, 145, 146, 149, 150, 151, 155/1, 155/2, 157, 160, 161, 162, 163, 164, 165/1, 165/2, 166, 168, 179, 180, 186, 187, 190, 192, 195	มูลไส้เดือน	30	โครงการวิจัยของ จันทรา อินทนนท์ ในปี พ.ศ. 2559
500, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909	รากผักบุ้ง ทะเล	8	โครงการวิจัยของ จันทรา อินทนนท์ ในปี พ.ศ. 2554
	รวม	38	

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร MS โดยนำห้วงเยื่อและสปอร์เชื้อจาก Stock culture ที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 20% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสลงบนอาหารด้วยด้วยวิธี Cross streak แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เลี้ยงแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 บนอาหารแข็งสูตร NA โดยนำห้วงเยื่อและเชื้อจาก Stock culture ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียสลงบนอาหารด้วยด้วยวิธี Cross streak แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

3.2.2 การย้อมแกรมแบคทีเรีย

เตรียมสไลด์สำหรับการย้อมแกรม โดยใช้หลอดหยคน้ำลงไปที่สไลด์ 1 หยด แล้วนำห่วงเย็บเชื้อและโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารแข็ง ลงบนสไลด์เกลี่ยออกให้เป็นฟิล์มบาง ๆ เย็บให้เชื่อมสมกับน้ำกระจายเข้ากันดีทิ้งไว้ในอากาศให้แห้ง จึงนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟโดยหงายด้านที่มีเชื้อขึ้นให้เปลวไฟผ่านด้านล่างของสไลด์ 2-3 ครั้ง หยดสารละลายคริสตัลไวโอเลต จนท่วมสไลด์ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นและหยดสารละลายไอโอดีนจนท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกโดยค่อย ๆ หยด 95% Ethanol เที่ยงสไลด์ไปจนกระทั่งสีม่วงเริ่มจางแล้วจึงรีบล้างออกด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายซาฟรานินให้ท่วมทิ้งไว้ 30 วินาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น ซับด้วยกระดาษชำระทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2557)

3.2.3 คัดเลือกแอกติโนมัยสัที่สร้างฮอร์โมนพืช IAA

3.2.3.1 คัดเลือกไอโซเลตที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารแข็งสูตร YD โดยนำแอกติโนมัยสัที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 บนอาหารแข็งสูตร NA มาเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร YD ด้วยวิธี Cross streak แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันและตรวจสอบการเจริญเติบโต

3.2.3.2 ทำ Serial dilution โดยนำแอกติโนมัยสัที่เจริญเติบโตได้บนอาหารแข็งสูตร YD และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 เจือจางเซลล์เป็น 10^{-1} - 10^{-6} ในอาหารเหลว YD จากนั้นนับจำนวนโคโลนีเพื่อเลือกกระดับการเจือจางที่เหมาะสมด้วยวิธีการ Plate count

3.2.3.3 คัดเลือกไอโซเลตที่สร้างฮอร์โมนพืช IAA โดยใช้เซลล์ในกระดับการเจือจางที่เหมาะสมตามข้อ 3.2.3.2 มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YD ที่มี Tryptophan 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดโดยเขย่าตลอดเวลาที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอาส่วนใส (Supernatant) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดใหม่และเติมสารละลาย Salkowsky reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตรนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการสร้าง IAA ตามวิธีของ Ahmad et al. (2008) และนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้น 5 ถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังภาพภาคผนวก ค-2

3.2.4 คัดเลือกแอกติโนมัยสัที่มียีน *acdS*

นำแอกติโนมัยสัที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.3 มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (DNA Extraction) ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป TIANamp Genomic DNA Kit และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ Specific ATT082 Sense primer (5'- CAGTCCAACCACACSGCSCAG -3') และ ATT082 Anti-sense primer (5'- GCCATSGACTTSCCCTCGTASAC -3') (Indananda, 2013) แล้วทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริสุทธิ์โดยชุด GeneJet™ PCR Purification Kit และส่งวิเคราะห์ผลที่บริษัท First Base Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ คล้ายคลึงกัน โดยใช้โปรแกรม BLASTN ในฐานข้อมูล NCBI (www.ncbi.nih.gov/blast)

3.2.5 ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD

3.2.5.1 คัดเลือกอาหารที่แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดี โดยนำแอกติโนมัยสัที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YD จากนั้นเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตร YD และอาหารแข็งสูตร ISP2, ISP3, ISP4 และ ISP5 (ทำ 3 ซ้ำ) ด้วยวิธี Cross streak แล้วจึงนำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบการเจริญเติบโตเพื่อคัดเลือกอาหาร

3.2.5.2 ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD ในอาหารที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียว (Honma & Shimomura, 1978)

3.2.5.2.1 ตรวจสอบบนอาหารแข็งโดยชุดเซลล์ในเพลทอาหารที่เจริญดีที่สุด 1 ลูกปมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Minimal medium (Hopwood, 1967) Minimal medium ที่เติม 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ Minimal medium ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรรวม 20 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) ด้วยวิธี Simple streak แล้วจึงนำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นตรวจสอบการเจริญเติบโต

3.2.5.2.2 ตรวจสอบในอาหารเหลวโดยชุดเซลล์ในเพลทอาหารที่เจริญดีที่สุด 1 ลูกปมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Minimal medium ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์ Minimal medium ที่เติม 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ Minimal medium ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วันแล้วจึงเก็บเซลล์นำไปล้างด้วย 0.9% Normal saline และชุดเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรไปเลี้ยงซ้ำในอาหารแบบเดิมอีกครั้ง (ทำ 3 ซ้ำ) คัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว Minimal medium ที่เติม ACC (El-Tarabily, 2008) และตรวจสอบการเจริญเติบโตโดยการหาน้ำหนักแห้ง



3.2.5.3 ตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD

นำเชื้อแอกติโนมัยสีทและแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ที่เจริญในอาหารเหลว YD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาล้างเซลล์ด้วย 0.9% Normal Saline และดูดเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปเลี้ยงในอาหาร Minimal medium ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 2,4-Dinitro-phenylhydrazine นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ α -ketobutyrate ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1.0 มิลลิโมล (Jaemsaeng et al., 2018) แสดงดังภาพภาคผนวก ง-7

3.2.6 คัดเลือกแอกติโนมัยสีทที่ทนเค็ม

นำแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.3 และข้อ 3.2.5 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 บนอาหารแข็งสูตร NA มาเลี้ยงในอาหารสูตรที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.2.5.1 โดยเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 0-1,000 มิลลิโมลาร์ (0-7% w/v) ด้วยวิธี Cross streak ทำ 3 ซ้ำและนำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบการทนเค็ม

3.2.7 ตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ และวัดเจริญเติบโตโดยหาน้ำหนักแห้ง

3.2.7.1 นำเซลล์แบคทีเรียซึ่งคัดเลือกได้ในข้อ 3.2.6 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ล้างด้วยสารละลาย 0.9% Normal saline แล้วจึงดูดเซลล์แขวนลอย 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลวสูตร YD ที่มี Tryptophan 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ (Sadeghi et al., 2012) นำไปบ่มในที่มืดบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ตามวิธีการในข้อ 3.2.3.3

3.2.7.2 หาน้ำหนักแห้ง โดยกรองเซลล์จากข้อ 3.2.7.1 ผ่านกระดาษกรอง แล้วนำแผ่นกระดาษกรองวางบนเพลทแก้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง

3.2.8 การศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าวขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa*

L. cv. KDML105)

3.2.8.1 การฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ด

ล้างเมล็ดข้าวด้วยน้ำสะอาด จากนั้นทำการฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ดด้วย 70% Ethanol เป็นเวลา 5 นาทีและ 1% NaOCl เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างให้สะอาดอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ แช่เมล็ดข้าวในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการล้างฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ดมาแช่ในสารละลายสปอร์แอคติโนมัยสิท ไอโซเลต BBUU144, ไอโซเลต BBUU161 (10^4 CFU/ml), ไอโซเลต BBUU500 (10^3 CFU/ml) และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 (10^6 CFU/ml) เป็นเวลา 4 ชั่วโมงตามวิธี Rungin et al. (2012)

3.2.8.2 การทดสอบอัตราการงอกของเมล็ด

นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการแช่ในสารละลายสปอร์แอคติโนมัยสิทและแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลองคือ เมล็ดที่แช่ในสารละลายสปอร์แอคติโนมัยสิททั้งหมด 3 ไอโซเลตได้แก่ BBUU144, BBUU161, BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ชุดที่เมล็ดไม่มีการแช่สารละลายสปอร์ (ชุดควบคุม) ซึ่งทำการทดลองชุดละ 30 เมล็ด (ทำ 5 ซ้ำ) โดยแต่ละชุดการทดลองจะนำเมล็ดที่แช่และไม่ถูกแช่ในสารละลายสปอร์มาเรียงในเพลทที่มีกระดาษชำระและเติมสารละลายความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 3 วันและอีก 4 วันในที่มืด (Ramadoss et al., 2013) สังเกตการงอกของเมล็ด พร้อมบันทึกจำนวนเมล็ดข้าวที่งอกทุกวัน และเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการทดลองจึงคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การงอก (Germination percentage) ดังนี้

$$\text{Germination rate (\%)} = \frac{\text{Number of seeds germinated}}{\text{Total number of seeds}} \times 100$$

3.2.8.3 การปลูกข้าวในสภาวะโรงเรือน

3.2.8.3.1 การเตรียมต้นกล้าข้าว

นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ดแล้วมาปลูกในถาดพลาสติกที่รองด้วยกระดาษชำระ ทำในสภาวะปลอดเชื้อ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน และอีก 4 วัน ในที่มีแสง จึงคัดเลือกต้นข้าวที่มีความแข็งแรงมาทำการตัดปลายรากด้วยเทคนิคปลอดเชื้อและแช่ในสารละลายสปอร์แอคติโนมัยสีทไอโซเลต BBUU144, ไอโซเลต BBUU161 (10^4 CFU/ml), ไอโซเลต BBUU500 (10^3 CFU/ml) และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 (10^6 CFU/ml) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายต้นข้าวไปปลูกในดินภายใต้สภาวะโรงเรือน

3.2.8.3.2 การเตรียมดิน

ชั่งดิน 1 กิโลกรัมที่มีการเติมความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ ใส่ถุงพลาสติกแล้วนำมาตั้งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำดินมาพักให้เย็นแล้วใส่ดิน 10 กรัม ลงไป ในกระถางพลาสติกขนาด 5 x 5 x 5 เซนติเมตร

3.2.8.3.3 การปลูกข้าวภายใต้สภาวะโรงเรือน

การทดลองวิธีละ 4 ซ้ำ ซึ่งจะปลูกต้นข้าวจำนวน 1 ต้นต่อกระถาง (1 ซ้ำการทดลองคือ 4 กระถาง) โดยมีชุดควบคุมคือชุดที่ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อและแบ่งการทดลองออกเป็น 15 ชุดแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การออกแบบการทดลองปลูกข้าวในสภาวะโรงเรือน

ชุดที่	แบคทีเรีย	ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	
1	ไม่ได้รับเชื้อ	0	} ชุดควบคุม
2	ไม่ได้รับเชื้อ	75	
3	ไม่ได้รับเชื้อ	150	
4	BBUU144	0	
5	BBUU144	75	
6	BBUU144	150	
7	BBUU161	0	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชุดที่	แบคทีเรีย	ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)
8	BBUU161	75
9	BBUU161	150
10	BBUU500	0
11	BBUU500	75
12	BBUU500	150
13	<i>P. putida</i> ATCC 17484	0
14	<i>P. putida</i> ATCC 17484	75
15	<i>P. putida</i> ATCC 17484	150

โดยแต่ละชุดการทดลองถูกนำมาเก็บรักษาไว้ในสภาวะโรงเรือนระยะเวลา 30 วัน รดน้ำวันละ 1 ครั้งและเมื่อครบ 15 วันจึงใส่ปุ๋ย และเมื่อครบระยะเวลา 30 วัน จึงวัดความยาวราก ความยาวลำต้น และชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง โดยการหาค่าน้ำหนักแห้งจะนำต้นข้าวไปอบที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.2.9 การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทในระดับสกุล

3.2.9.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษารูปร่างลักษณะ โคโลนี สีของสปอร์ และรงควัตถุที่สร้างขึ้นบนอาหารแข็ง โดยนำแอกติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YD, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, ISP7 และ ISP9 ด้วยวิธี วิธี Cross streak แล้วนำไปป่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน จึงตรวจสอบผลด้วยวิธี Color Harmony Manual (Jacobson et al., 1958) ศึกษาเส้นใย และการสร้างสปอร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ SEM

3.2.9.2 16S *rRNA* gene

สกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสำเร็จ TIANamp Genomic DNA Kit (TIANGEN Biotech (Beijing) Co.,LTD., ประเทศจีน) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ Primer 1F และ 1530R (Kataoka et al., 1997) เพิ่มปริมาณยีน 16S *rRNA* ในหลอดทดลองด้วยเครื่อง PCR นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบโดย Agarose gel electrophoresis และเตรียมผลิตภัณฑ์ PCR

ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสำเร็จ GeneJet™ PCR Purification Kit ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ที่บริษัท First Base Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย แล้วนำมาเปรียบเทียบค่าคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูล EZbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการในโปรแกรม MEGA7 โดยใช้ Maximum Parsimony, Maximum Likelihood และ Neighbour-Joining Method (Saitou & Nei, 1987)

3.2.10 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลทางสถิติในโปรแกรม Minitab (เวอร์ชัน 18) ใช้ผลการวิเคราะห์ ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดทดลอง โดยใช้ Tukey Multiple ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การทำให้บริสุทธิ์

ผลการนำแอกติโนมัยสีทจำนวนทั้งหมด 38 ไอโซเลตและแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 มาทำให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตร MS และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 บนอาหารแข็งสูตร NA ด้วยวิธีการ Cross streak จากนั้นตรวจสอบการเป็นแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทเบื้องต้นด้วยการย้อมแกรมพบว่า ได้แอกติโนมัยสีทเป็นโคโลนีเดี่ยว และโคโลนีที่บริสุทธิ์จำนวนทั้งหมด 35 ไอโซเลต ซึ่งโคโลนีส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใยได้ผิวหนังอาหารเป็นสีครีม เส้นใยเหนื่อผิวหนังอาหารเป็นสีขาว สปอร์เป็นสีเทา และรงควัตถุเป็นสีชมพู (ตารางที่ 4, 5 และภาพภาคผนวก ข-1) โดยทุกไอโซเลตแสดงลักษณะการเจริญเป็นโคโลนีเหมือนกับแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* ที่มีทั้งเส้นใยได้ผิวหนังอาหารและเส้นใยเหนื่อผิวหนังอาหาร (กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน, 2555) เมื่อนำไอโซเลตที่บริสุทธิ์มาตรวจสอบการเป็นแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทเบื้องต้นด้วยการย้อมแกรมพบว่า ดิสคิม่วงของคริสตัล ไวโอเลต ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2557) (ภาพภาคผนวก ข-2) และพบว่ามีจำนวน 3 ไอโซเลตคือ BBUU905, BBUU908 และ BBUU909 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็งสูตร NA พบว่า โคโลนีมีลักษณะเป็นสีครีม และไม่สร้างสปอร์ (ภาพที่ 10) การย้อมแกรมพบว่า ดิสคิม่วงของซาฟรานินเหมือนแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Lim et al., 2010) (ภาพที่ 11)



1054561741

BUU-IThesis 59910007 thesis / recv : 04042563 12:52:56 / seq : 50

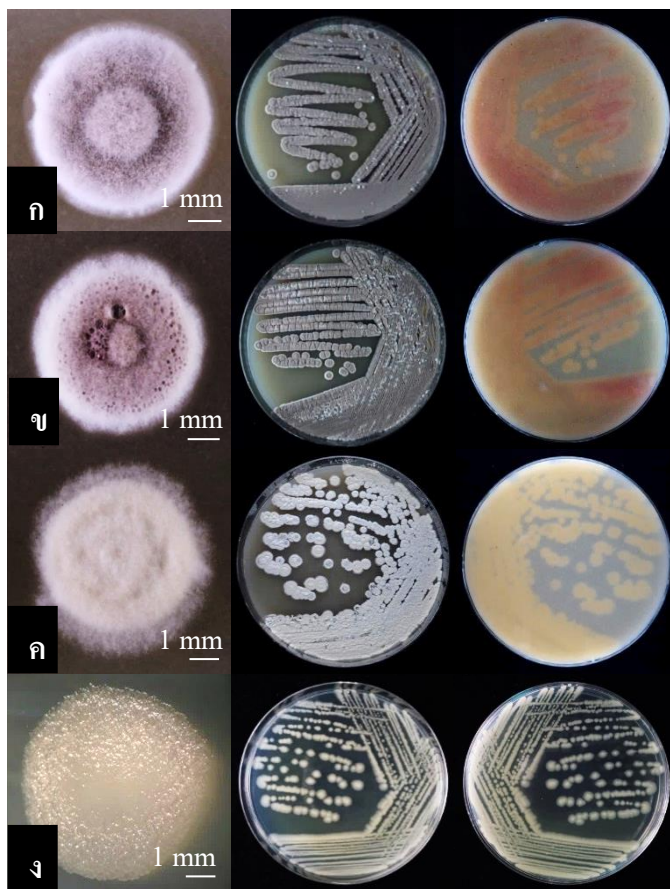
ตารางที่ 4 ลักษณะทางสีพื้นฐานวิทยาของแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร MS อายุ 7 วัน

ลำดับที่	ไอโซเลต	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งสูตร MS			
		เส้นใยได้ผิว อาหาร	เส้นใยเหนือผิว อาหาร	สปอร์	รงควัตถุ
1	BBUU105	Cream	White	Gray	Ultra pink
2	BBUU112	Cream	White	Gray	Ultra pink
3	BBUU114	Cream	White	Gray	Ultra pink
4	BBUU118	Cream	White	Battleship gray	Ultra pink
5	BBUU134	Cream	White	Gray	Ultra pink
6	BBUU144	Cream	White	Gray	Ultra pink
7	BBUU145	Persian orange	White	Gray	Ultra pink
8	BBUU146	Cream	White	Gray	-
9	BBUU149	Cream	White	Gray	-
10	BBUU150	Cream	White	Taupe gray	-
11	BBUU151	Cream	White	Gray	Ultra pink
12	BBUU155/1	Chamoieess	White	White	Taupe
13	BBUU155/2	Chamoieess	White	White	Taupe
14	BBUU157	Cream	White	Gray	Ultra pink
15	BBUU160	Cream	White	Gray	Ultra pink
16	BBUU161	Cream	White	Gray	Ultra pink
17	BBUU162	Cream	White	Gray	Ultra pink
18	BBUU163	Cream	White	Gray	Ultra pink
19	BBUU164	Cream	White	Battleship gray	Ultra pink
20	BBUU165/1	Cream	White	Gray	Ultra pink
21	BBUU165/2	Cream	White	Gray	Ultra pink
22	BBUU166	Cream	White	Battleship gray	Ultra pink
23	BBUU168	Carrot orange	White	Gray	Camel

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลต	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งสูตร MS			
		เส้นใยไต้ผิว อาหาร	เส้นใยเหนื่อผิว อาหาร	สปอร์	รงควัตถุ
24	BBUU179	Cream	White	Battleship gray	-
25	BBUU180	Camel	White	Gray	Ecru
26	BBUU186	Cream	White	Cadet gray	-
27	BBUU187	Camel	White	Gray	Ecru
28	BBUU190	Cream	White	Gray	Ecru
29	BBUU192	Umber	Taupe	Umber	-
30	BBUU195	Cream	White	Gray	Ecru
31	BBUU500	Cream	White	White	-
32	BBUU903	Cream	White	Battleship gray	-
33	BBUU904	Cream	White	Taupe gray	-
34	BBUU906	Cream	White	Gray	Golden yellow
35	BBUU907	Cream	White	Battleship gray	-

“หมายเหตุ” สัญลักษณ์ (-) คือ ไม่สร้าง



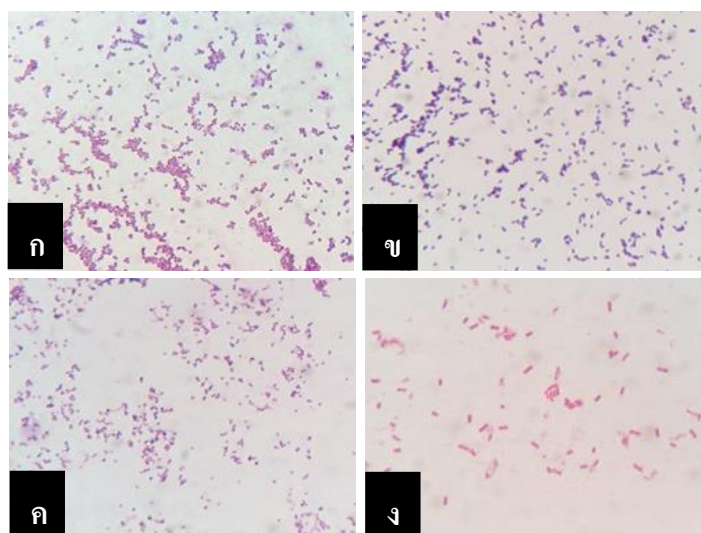
ภาพที่ 10 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ของแอกติโนมัยสีทและแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 บนอาหารแข็งสูตร NA (ก) คือ ไอโซเลต BBUU144 (ข) คือ ไอโซเลต BBUU161 (ค) คือ ไอโซเลต BBUU500 และ (ง) คือ แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร MS
อายุ 7 วัน

ลำดับที่	ไอโซเลต	การเจริญเติบโตบนอาหาร	การสร้างสปอร์
1	BBUU105	ดีมาก	ดีมาก
2	BBUU112	ดีมาก	ดีมาก
3	BBUU114	ดีมาก	ดีมาก
4	BBUU118	ดีมาก	ดีมาก
5	BBUU134	ดีมาก	ดีมาก
6	BBUU144	ดีมาก	ดีมาก
7	BBUU145	ปานกลาง	ดี
8	BBUU146	ดีมาก	ดีมาก
9	BBUU149	ดีมาก	ปานกลาง
10	BBUU150	ดีมาก	ดีมาก
11	BBUU151	ดีมาก	ดีมาก
12	BBUU155/1	ปานกลาง	ดี
13	BBUU155/2	ดีมาก	ดีมาก
14	BBUU157	ดีมาก	ดีมาก
15	BBUU160	ดีมาก	ดีมาก
16	BBUU161	ดีมาก	ดีมาก
17	BBUU162	ดีมาก	ดีมาก
18	BBUU163	ดีมาก	ดีมาก
19	BBUU164	ดีมาก	ดีมาก
20	BBUU165/1	ดีมาก	ดีมาก
21	BBUU165/2	ปานกลาง	ดี
22	BBUU166	ดีมาก	ดีมาก
23	BBUU168	ดี	ดี
24	BBUU179	ดีมาก	ดีมาก

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลต	การเจริญเติบโตบนอาหาร	การสร้างสปอร์
25	BBUU180	ดีมาก	ดีมาก
26	BBUU186	ดีมาก	ดี
27	BBUU187	ปานกลาง	ดี
28	BBUU190	ดี	ดี
29	BBUU192	ดีมาก	น้อย
30	BBUU195	ดีมาก	ดีมาก
31	BBUU500	ดีมาก	ดีมาก
32	BBUU903	ดีมาก	ดีมาก
33	BBUU904	ดีมาก	ดีมาก
34	BBUU906	ดีมาก	ดีมาก
35	BBUU907	ดีมาก	ดีมาก



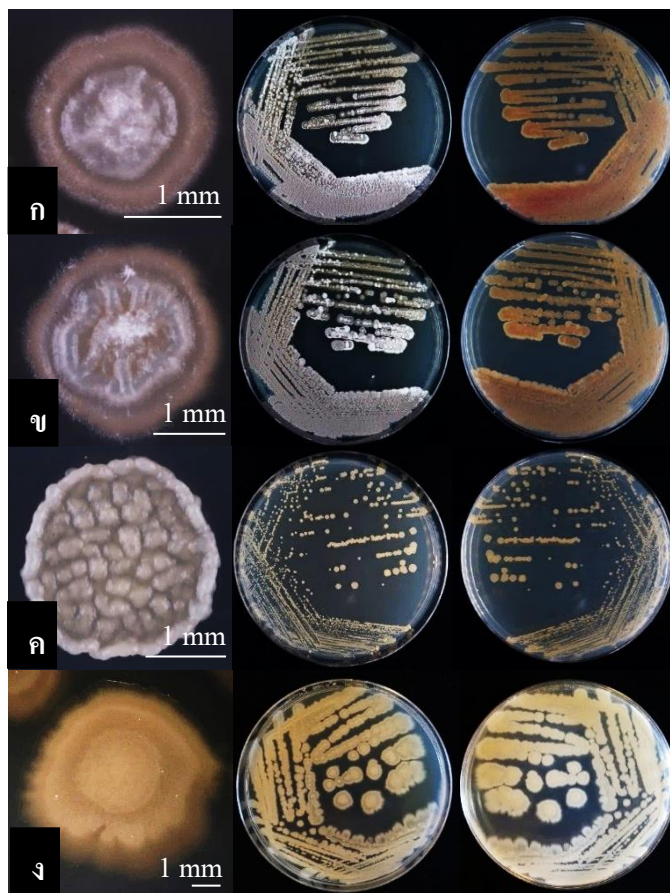
ภาพที่ 11 การย้อมแกรมแบคทีเรียแกรมบวก (ก) คือ ไอโซเลต BBUU168 (ข) คือ ไอโซเลต BBUU500 (ค) คือ ไอโซเลต BBUU907 และ (ง) คือ *E. coli* แบคทีเรียแกรมลบ

4.2 ผลการคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สร้างฮอร์โมนพืช IAA

ผลการตรวจสอบการเจริญเติบโต โดยคัดเลือกแอคติโนมัยสีทไอโซเลตที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารแข็งสูตร YD พบว่า แอคติโนมัยสีทจำนวนทั้งหมด 35 ไอโซเลตสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารแข็งสูตร YD ส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใยได้ผิวอาหารเป็นสีครีม (Cream) เส้นใยเหนือผิวอาหารเป็นสีขาว สปอร์เป็นสีเทา และไม่สร้างรงควัตถุ (ตารางที่ 6, 7 และภาพภาคผนวก ก-1)

ผลการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ในอาหารเหลวสูตร YD ที่มี Tryptophan 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ด้วยสารละลาย Salkowsky' reagent ตามวิธีของ Ahmad et al. (2008) พบว่า สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้จำนวน 27 ไอโซเลต ความเข้มข้น IAA อยู่ในช่วง 1.36 ถึง 15.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าแอคติโนมัยสีทที่มีความเข้มข้น IAA มากกว่าหรือเท่ากับ 7.00 (+++) ได้แก่ ไอโซเลต BBUU144 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงสุดคือ 15.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไอโซเลต BBUU149 คือ 9.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น IAA อยู่ในช่วง 4.00-6.00 (++) จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ BBUU145, BBUU150, BBUU162, BBUU164, BBUU165/1, BBUU180, BBUU187, BBUU500, BBUU903 และ BBUU907 ความเข้มข้น IAA อยู่ในช่วง 1.00-3.00 (+) จำนวน 15 ไอโซเลต ได้แก่ BBUU112, BBUU114, BBUU118, BBUU134, BBUU151, BBUU160, BBUU161, BBUU163, BBUU165/2, BBUU166, BBUU186, BBUU190, BBUU192, BBUU904 และ BBUU906 โดยพบว่าสามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงกว่าแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ที่สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้เพียง 1.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gopalakrishnan et al. (2014) พบว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลต CAI-85 คัดแยกได้จากปุยหมักมูลไส้เดือน (*Eisenia foetida*) บริเวณรอบรากพืช (*Pongamia pinnata*) สร้างฮอร์โมน IAA ได้สูงถึง 43.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับ *Streptomyces* sp. PT2 คัดแยกได้จากส่วนรากของ *Panicum turgidum* สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 127 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ *Streptomyces ramulosus* EUSKR2S82 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 28.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Goudjal et al., 2014; Himaman et al., 2016) ในขณะที่แบคทีเรีย *P. putida* FA-56 และ *P. putida* FA-8 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 23.02 และ 13.92 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Hernández-Montie et al., 2017) และ *P. putida* Ws3 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 4.83 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Marzban et al., 2016) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ด้วยวิธี Colorimetric Analysis เป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้นเท่านั้น มีรายงานวิจัยของ Bharucha et al. (2013) พบว่าแบคทีเรีย *P. putida* UB1 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงสุดคือ 591.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงยืนยันผลการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ด้วยวิธีการสกัด IAA และ Thin-layer

chromatography (TLC) พบว่า จุดสีชมพูที่แยกออกมามีค่า Rf สอดคล้องกับ IAA มาตรฐานที่มีค่า Rf เดียวกันคือ 0.36 และแอกติโนมัยสีท *Streptomyces* ASU14 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงสุด 2,256 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า Rf คือ 0.90 (Abd-Alla et al., 2013) จากการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ยังพบว่ามีแอกติโนมัยสีทจำนวน 8 ไอโซเลตไม่สร้างฮอร์โมนพืช IAA คือ BBUU105, BBUU146, BBUU155/1, BBUU155/2, BBUU157, BBUU168, BBUU179 และ BBUU195 (ตารางที่ 8) ดังนั้นจึงคัดเลือกแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนจำนวน 30 ไอโซเลตที่สามารถสร้างและไม่สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ และคัดแยกได้จากรากผักบุ้งทะเลคือ ไอโซเลต BBUU500 สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงสุด และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ไปทำการตรวจสอบการมียีน *acdS* ในขั้นต่อไป



ภาพที่ 12 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร YD บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) คือไอโซเลต BBUU144 (ข) คือไอโซเลต BBUU161 (ค) คือ ไอโซเลต BBUU500 และ (ง) คือ แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484

ตารางที่ 6 ลักษณะทางสีพื้นฐานวิทยาของแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร YD อายุ 7 วัน

ลำดับที่	ไอโซเลต	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งสูตร YD			
		เส้นใยได้ผิว อาหาร	เส้นใยเหนือผิว อาหาร	สปอร์	รงควัตถุ
1	BBUU105	Cream	White	Gray	-
2	BBUU112	Cream	White	Gray	-
3	BBUU114	Cream	White	Gray	-
4	BBUU118	Cream	White	Gray	-
5	BBUU134	Cream	White	Battleship gray	-
6	BBUU144	Cream	White	Gray	Ultra pink
7	BBUU 145	Cream	White	Taupe gray	-
8	BBUU146	Cream	White	Gray	-
9	BBUU149	Vanilla	Army green	White	-
10	BBUU150	Cream	White	Gray	-
11	BBUU151	Cream	White	Taupe gray	-
12	BBUU155/1	Camel	White	Gray	-
13	BBUU155/2	Camel	White	Taupe gray	-
14	BBUU157	Cream	White	Gray	-
15	BBUU160	Cream	White	Gray	-
16	BBUU161	Cream	White	Gray	Ultra pink
17	BBUU162	Cream	White	Gray	-
18	BBUU163	Cream	White	Gray	-
19	BBUU164	Cream	White	Battleship gray	-
20	BBUU165/1	Cream	White	Battleship gray	-
21	BBUU165/2	Cream	White	Gray	-
22	BBUU166	Camel	White	Taupe gray	-
23	BBUU168	Cream	White	Gray	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลต	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งสูตร YD			
		เส้นใยไต้ผิว อาหาร	เส้นใยเหนื่อผิว อาหาร	สปอร์	รงควัตถุ
24	BBUU 179	Cream	White	Cadet gray	-
25	BBUU180	Cream	White	Taupe gray	-
26	BBUU186	Camel	White	Gray	-
27	BBUU187	Camel	White	Gray	-
28	BBUU190	Camel	White	Gray	-
29	BBUU192	Chamoisee	Umber	Umber	-
30	BBUU195	Eggshell	White	Battleship gray	-
31	BBUU500	Cream	White	White	-
32	BBUU903	Cream	White	Battleship gray	Olive
33	BBUU904	Cream	White	Taupe gray	-
34	BBUU906	Cream	White	Gray	Ecru
35	BBUU907	Cream	White	Battleship gray	-

- “หมายเหตุ” 1. ลำดับที่ 1 ถึง 30 คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนและลำดับที่ 31 ถึง 35 คัดแยกได้จาก
ผักบั้งทะเล
2. สัญลักษณ์ (-) คือ ไม่สร้าง

ตารางที่ 7 ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร YD
อายุ 7 วัน

ลำดับที่	ไอโซเลต	การเจริญเติบโตบน อาหาร	การสร้างสปอร์
1	BBUU105	ดีมาก	ดีมาก
2	BBUU112	ดีมาก	น้อยมาก
3	BBUU114	ดีมาก	ดีมาก
4	BBUU118	ดีมาก	ดีมาก
5	BBUU134	ดีมาก	ดีมาก
6	BBUU144	ดีมาก	ดีมาก
7	BBUU145	ดีมาก	ดีมาก
8	BBUU146	ดีมาก	น้อยมาก
9	BBUU149	ดีมาก	น้อย
10	BBUU150	ดีมาก	ปานกลาง
11	BBUU151	ดีมาก	ดี
12	BBUU155/1	ดีมาก	น้อย
13	BBUU155/2	ดีมาก	ปานกลาง
14	BBUU157	ดีมาก	ดีมาก
15	BBUU160	ดีมาก	น้อย
16	BBUU161	ดีมาก	ดีมาก
17	BBUU162	ดีมาก	น้อย
18	BBUU163	ดีมาก	ดี
19	BBUU164	ดีมาก	ปานกลาง
20	BBUU165/1	ดีมาก	ปานกลาง
21	BBUU165/2	ดีมาก	ปานกลาง
22	BBUU166	ดีมาก	ดี
23	BBUU168	ดีมาก	ปานกลาง



1054561741

BBU-1Thesis 59910007 thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลต	การเจริญเติบโตบน อาหาร	การสร้างสปอร์
24	BBUU179	ดีมาก	ดีมาก
25	BBUU180	ดีมาก	ดีมาก
26	BBUU186	ดีมาก	น้อยมาก
27	BBUU187	ดี	ปานกลาง
28	BBUU190	ดีมาก	ดี
29	BBUU192	ดีมาก	ปานกลาง
30	BBUU195	ดีมาก	น้อย
31	BBUU500	ดีมาก	น้อยมาก
32	BBUU903	ดีมาก	ดี
33	BBUU904	ดีมาก	ดี
34	BBUU906	ดีมาก	ดี
35	BBUU907	ดีมาก	ดี

ตารางที่ 8 ความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแอคติโนไมยีสิต

ลำดับที่	ไอโซเลต	ความเข้มข้น IAA ($\mu\text{g/ml}$)	การสร้าง IAA
1	BBUU105	-	-
2	BBUU112	2.52 \pm 0.00	+
3	BBUU114	3.62 \pm 0.00	+
4	BBUU118	3.06 \pm 0.00	+
5	BBUU134	3.62 \pm 0.00	+
6	BBUU144	15.71 \pm 0.01	+++
7	BBUU145	4.12 \pm 0.01	++
8	BBUU146	-	-
9	BBUU149	9.21 \pm 0.00	+++
10	BBUU150	4.01 \pm 0.00	++
11	BBUU151	2.31 \pm 0.04	+
12	BBUU155/1	-	-
13	BBUU155/2	-	-
14	BBUU157	-	-
15	BBUU160	1.81 \pm 0.08	+
16	BBUU161	3.09 \pm 0.00	+
17	BBUU162	4.01 \pm 0.00	++
18	BBUU163	1.65 \pm 0.00	+
19	BBUU164	4.41 \pm 0.00	++
20	BBUU165/1	4.77 \pm 0.00	++
21	BBUU165/2	2.23 \pm 0.00	+
22	BBUU166	3.00 \pm 0.01	+
23	BBUU168	-	-
24	BBUU179	-	-
25	BBUU180	4.19 \pm 0.00	++

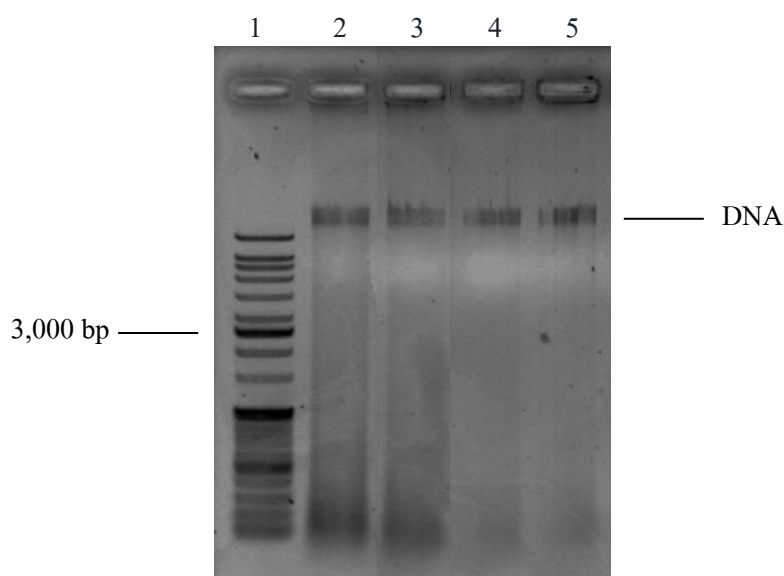
ตารางที่ 8 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลต	ความเข้มข้น IAA ($\mu\text{g/ml}$)	การสร้าง IAA
26	BBUU186	3.56 \pm 0.00	+
27	BBUU187	4.17 \pm 0.00	++
28	BBUU190	3.32 \pm 0.00	+
29	BBUU192	3.05 \pm 0.00	+
30	BBUU195	-	-
31	BBUU500	6.27 \pm 0.00	++
32	BBUU903	5.09 \pm 0.00	++
33	BBUU904	1.36 \pm 0.00	+
34	BBUU906	1.74 \pm 0.00	+
35	BBUU907	5.48 \pm 0.00	++

- “หมายเหตุ”** 1. ความเข้มข้น IAA ($\mu\text{g/ml}$) (+++) คือ ≥ 7.00 , (++) คือ 4.00-6.00, (+) คือ 1.00-3.00 และ (-) คือ ไม่สร้างฮอร์โมนพืช IAA และ $\mu\text{g/ml}$ คือ หน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ลำดับที่ 1 ถึง 30 คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนและลำดับที่ 31 ถึง 35 คัดแยกได้จากผักนึ่งทะเล

4.3 ผลคัดเลือกลูกแอคติโนมัยสีทที่มียีน *acdS*

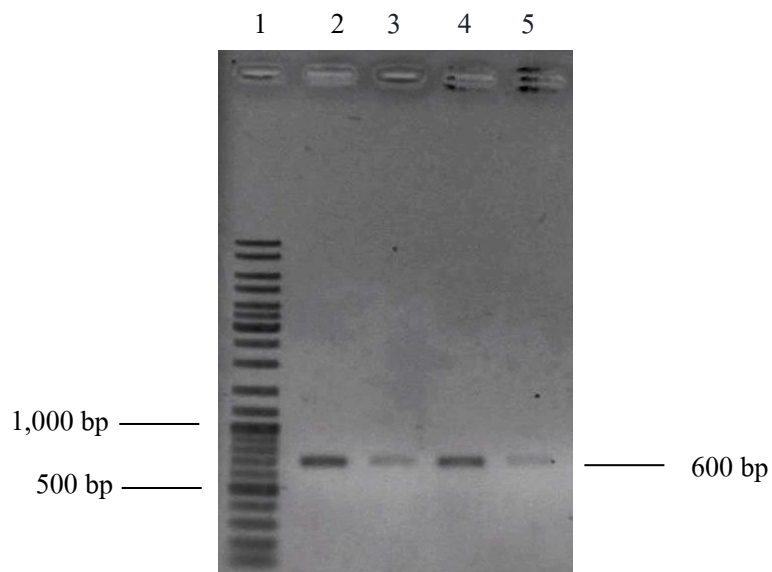
ผลการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป TIANamp Genomic DNA Kit โดยนำแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนจำนวน 30 ไอโซเลตได้แก่ BBUU105, BBUU112, BBUU114, BBUU118, BBUU134, BBUU144, BBUU145, BBUU146, BBUU149, BBUU150, BBUU151, BBUU155/1, BBUU155/2, BBUU157, BBUU160, BBUU161, BBUU162, BBUU163, BBUU164, BBUU165/1, BBUU165/2, BBUU166, BBUU168, BBUU179, BBUU180, BBUU186, BBUU187, BBUU190, BBUU192 และ BBUU195 คัดแยกได้จากรากผักบุ้งทะเลได้แก่ ไอโซเลต BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 พบว่าสามารถสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอได้บริสุทธิ์ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 13) ก่อนจะทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธีพีซีอาร์



ภาพที่ 13 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

- ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Ladder
- ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอของไอโซเลต BBUU105
- ช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอของไอโซเลต BBUU114
- ช่องที่ 4 คือ ดีเอ็นเอของไอโซเลต BBUU118
- ช่องที่ 5 คือ ดีเอ็นเอของไอโซเลต BBUU144

ผลการสกัดดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *acdS* โดยใช้ชุด Degenerate primer ATT082F และ ATT082R ซึ่งออกแบบโดย Indananda (2013) พบว่า แอคติโนมัยสีทจำนวน 10 ไอโซเลตคือ BBUU105, BBUU114, BBUU118, BBUU134, BBUU144, BBUU145, BBUU157, BBUU168, BBUU179 และ BBUU187 สามารถเพิ่มปริมาณได้และเป็นแถบเดี่ยวที่มีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 14) และเมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของทั้ง 10 ไอโซเลตนี้หาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ขนาดระหว่าง 618-664 นิวคลีโอไทด์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีค่าความคล้ายคลึง 93-99% กับเอนไซม์ ACCD ที่พบในแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* (ตารางที่ 9 และภาพภาคผนวก ง-3) แล้วเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของแอคติโนมัยสีทไอโซเลต BBUU114, BBUU157, BBUU168, BBUU179 และ BBUU187 ไปสร้างผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อเป็นการยืนยันผลการจัดจำแนกด้วยยีน *acdS* ยังพบที่มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* และยังมีความสัมพันธ์กับ *Pseudomonas fluorescens* F113 และ *P. putida* UW4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่ามียีน *acdS* (Shah et al., 1998; Hontzeas et al., 2004; Govindasamy et al., 2008) และจากผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจะสังเกตเห็นได้ว่ามีเชื้อรา *Fusarium solani* เป็นตัวแสดงความแตกต่างที่อยู่นอกกลุ่มอย่างชัดเจน (ภาพที่ 15) จากผลนี้จึงคัดเลือกไอโซเลต BBUU144 ที่มีคุณสมบัติมีการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *acdS* และไม่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *acdS* ได้แก่ BBUU161, BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ไปตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD ในอาหารที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียว



ภาพที่ 14 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *acdS*

ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Ladder

ช่องที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไอโซเลต BBUU105

ช่องที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไอโซเลต BBUU114

ช่องที่ 4 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไอโซเลต BBUU118

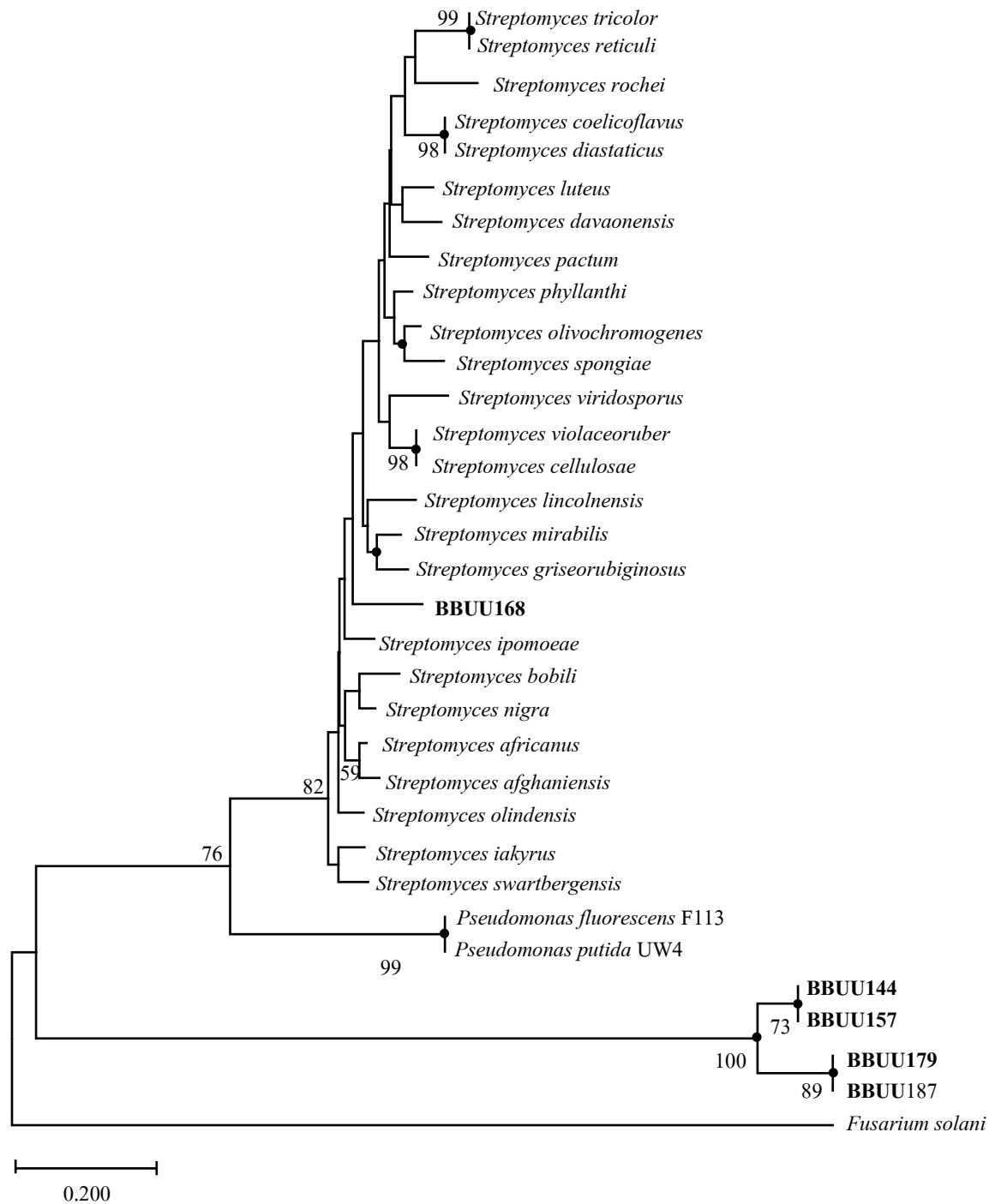
ช่องที่ 5 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไอโซเลต BBUU134



1054561741

ตารางที่ 9 ค่าความคล้ายคลึงยีน *accs* ของแอสคิตินัมยีสที่ทั้งหมด 10 ไอโซเลต เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ ACCD ในฐานะข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTX

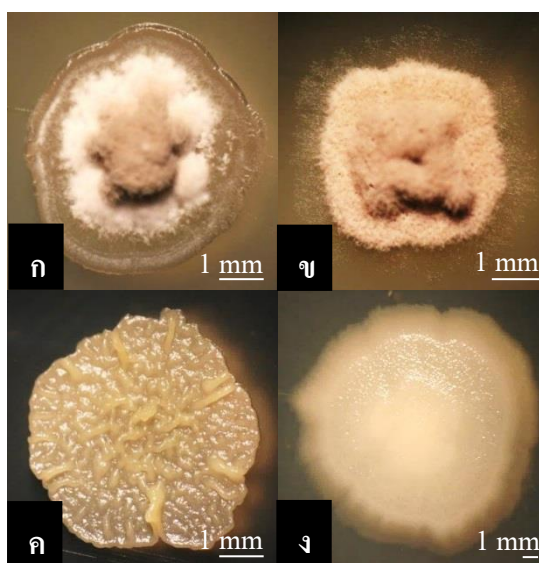
ไอโซเลต	ความยาว		ค่าความคล้ายคลึง	แบคทีเรีย	ลำดับฐานข้อมูล
	นิวคลีโอไทด์	กรดอะมิโน			
BBUU105	663	338	99%	<i>Streptomyces diastaticus</i>	WP_1.102927227.1
BBUU114	628	338	99%	<i>Streptomyces</i> sp. NRRLL WC-3753	KPC74208.1
BBUU118	657	338	99%	<i>Streptomyces</i> sp. CCM_MD2014	WP_061445412.1
BBUU134	662	338	94%	<i>Streptomyces</i> sp. CC71	WP_062138637.1
BBUU144	648	338	94%	<i>Streptomyces</i> sp. MBT28	WP_046250179.1
BBUU145	659	342	97%	<i>Streptomyces durhamensis</i>	WP_031166018.1
BBUU157	618	338	93%	<i>Streptomyces</i> sp. NRRLL WC-3795	WP_031017214.1
BBUU168	664	341	94%	<i>Streptomyces griseoruber</i>	WP_1.055633434
BBUU179	661	344	93%	<i>Streptomyces afghaniensis</i>	WP_020274037.1
BBUU187	661	350	94%	<i>Streptomyces swartbergensis</i>	WP_086604037.1



ภาพที่ 15 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ยีน *acdS* ของแอกติโนมัยซีท โดยใช้ Neighbor-Joining method สัญลักษณ์ • หมายถึง ตำแหน่งซ้ำกับ Maximum Likelihood method และ Maximum Parsimony method

4.4 ผลตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD

ผลการคัดเลือกอาหารที่เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดี โดยนำแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้คือมีการเพิ่มปริมาณยีน *acdS* ได้คือไอโซเลต BBUU144 และ ไม่มีการเพิ่มปริมาณยีน *acdS* คือ ไอโซเลต BBUU161, ไอโซเลต BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YD จากนั้นนำมาเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตร YD, ISP2, ISP3, ISP4 และ ISP5 ระยะเวลา 7 วันพบว่าแสดงผลในตารางที่ 10 และ 11 โดยไอโซเลต BBUU144, BBUU161, BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สามารถเจริญได้ดีมากในอาหารแข็งสูตร YD, ISP3 และ ISP5 แอกติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลตมีการสร้างสปอร์ได้ดีมากในอาหารแข็งสูตร ISP3 แต่ในอาหารแข็งสูตร YD พบว่ามีเพียงไอโซเลต BBUU144 และ BBUU161 สร้างสปอร์ได้ดีมาก ส่วนไอโซเลต BBUU500 สร้างสปอร์ได้น้อยมาก (ภาพที่ 16) นอกจากนี้ยังพบว่า แอกติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลตสร้างสปอร์ได้น้อยมากในอาหารแข็งสูตร ISP5 ในขณะที่แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ในทุกสูตรอาหาร (ภาพภาคผนวก ง-4) ดังนั้นจึงเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร YD เป็นระยะเวลา 7 วันไปทำการทดลองต่อไป



ภาพที่ 16 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร YD บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส อายุ 7 วัน (ก) คือ ไอโซเลต BBUU144 (ข) คือ ไอโซเลต BBUU161 (ค) คือ ไอโซเลต BBUU500 และ (ง) คือ แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484

ตารางที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ อายุ 7 วัน

แบคทีเรีย	อาหารสูตร	ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตรต่าง ๆ			
		เส้นใยได้ผิว อาหาร	เส้นใยเหนือผิว อาหาร	สปอร์	รงควัตถุ
BBUU144	YD	Cream	White	Gray	Ultra pink
	ISP2	Vanilla	White	Gray	Ultra pink
	ISP3	Cream	White	Gray	Ultra pink
	ISP4	Cream	White	Gray	Deep pink
	ISP5	Isabelline	White	Gray	Deep pink
BBUU161	YD	Cream	White	Gray	Ultra pink
	ISP2	Vanilla	White	Gray	Ultra pink
	ISP3	Cream	White	Gray	Ultra pink
	ISP4	Cream	White	Gray	Deep pink
	ISP5	Isabelline	White	Gray	Deep pink
BBUU500	YD	Cream	White	White	-
	ISP2	Cream	White	White	-
	ISP3	Cream	White	White	-
	ISP4	Eggshell	White	White	-
	ISP5	Cream	White	White	-

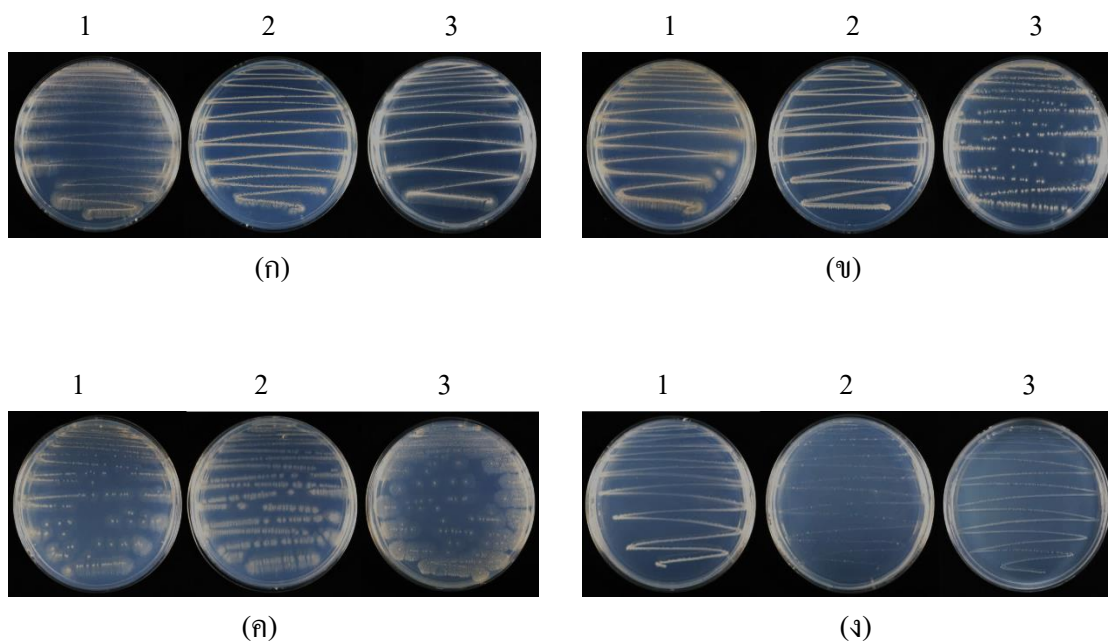
“หมายเหตุ” สัญลักษณ์ (-) คือ ไม่สร้าง

ตารางที่ 11 ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ อายุ 7 วัน

แบคทีเรีย	อาหารสูตร	การเจริญเติบโตบนอาหาร	การสร้างสปอร์
BBUU144	YD	ดีมาก	ดีมาก
	ISP2	ดีมาก	ดีมาก
	ISP3	ดีมาก	ดีมาก
	ISP4	ดีมาก	ปานกลาง
	ISP5	ดีมาก	น้อยมาก
BBUU161	YD	ดีมาก	ดีมาก
	ISP2	ดีมาก	ดีมาก
	ISP3	ดีมาก	ดีมาก
	ISP4	ดีมาก	ปานกลาง
	ISP5	ดีมาก	น้อยมาก
BBUU500	YD	ดีมาก	น้อยมาก
	ISP2	ดี	น้อย
	ISP3	ดีมาก	ดีมาก
	ISP4	ดีมาก	น้อย
	ISP5	ดีมาก	น้อยมาก
<i>P. putida</i> ATCC 17484	YD	ดีมาก	-
	ISP2	ปานกลาง	-
	ISP3	ดีมาก	-
	ISP4	น้อย	-
	ISP5	ดีมาก	-

“หมายเหตุ” สัญลักษณ์ (-) คือ ไม่สร้าง

ผลการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD ในอาหารแข็งและอาหารเหลวที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียว โดยการนำแอกติโนมัยสีททั้งหมด 3 ไอโซเลตคือ BBUU144, BBUU161, BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 มาเลี้ยงในอาหารที่ใช้ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD พบว่า แอกติโนมัยสีททั้งหมด 3 ไอโซเลตและแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารแข็ง Minimal medium (MM) (Hopwood, 1967) อาหาร MM ที่เติม 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ชุดควบคุม) และอาหาร MM ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 17) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ El-Tarabily (2008) พบว่าแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบรากต้นมะเขือเทศจำนวน 17 ไอโซเลตสามารถเจริญเติบโตและสร้างสปอร์บนอาหารแข็ง DF ที่เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ DF ที่เติม ACC 3 มิลลิโมลาร์ เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *P. putida* PCI2 มีการเจริญได้ดีในอาหารที่มี ACC ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียว เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มี ACC พบว่า *P. putida* PCI2 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Pastor et al., 2016) ซึ่งการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD บนอาหารแข็งไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่าแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACCD ได้จริงหรือไม่ จึงทำการตรวจสอบในอาหารเหลวที่มี ACC ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียว โดยการหาน้ำหนักแห้งพบว่า แอกติโนมัยสีททั้งหมด 3 ไอโซเลตมีการเจริญในอาหาร 3 ชนิดไม่แตกต่างกัน และมีความสามารถในการเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 (ตารางที่ 12 และภาพที่ 18) แอกติโนมัยสีทสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร MM และอาหาร MM ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์ แต่ในอาหาร MM ที่เติม 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ มีการเจริญได้น้อย (ตารางภาคผนวก ง-1 และภาพภาคผนวก ง-5) ซึ่งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเหลว MM ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์ จะต้องมีการเจริญเติบโตสูงกว่าในอาหารเหลว MM ดังนั้นจึงต้องเลี้ยงแบคทีเรียไว้ในอาหารเหลวทั้ง 3 ชนิดระยะเวลาานานมากกว่า 1 เดือน จากผลการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD แสดงให้เห็นว่า แอกติโนมัยสีทไอโซเลต BBUU144, BBUU161, BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สามารถเปลี่ยน ACC โดยใช้เอนไซม์ ACCD ให้เป็นแอมโมเนียและ Ketobutyrate สามารถนำไปใช้เพื่อดำรงชีวิตและเจริญได้ (ภาพที่ 19) ดังนั้นจึงนำแอกติโนมัยสีททั้งหมด 3 ไอโซเลตและแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ไปตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD ต่อไป



ภาพที่ 17 การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD ของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MM

(ก) ไอโซเลต BBUU144

(ข) ไอโซเลต BBUU161

(ค) ไอโซเลต BBUU500

(ง) แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484

1 คือ อาหาร MM

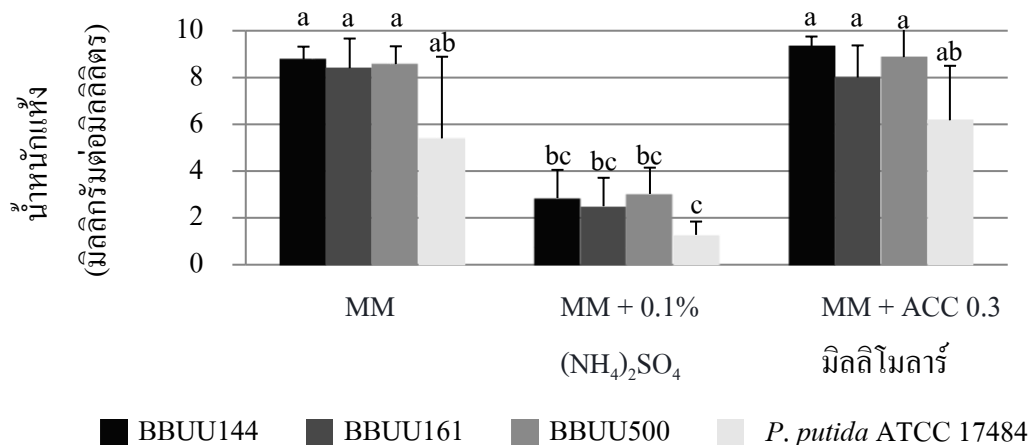
2 คือ อาหาร MM ที่เติม 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

3 คือ อาหาร MM ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์

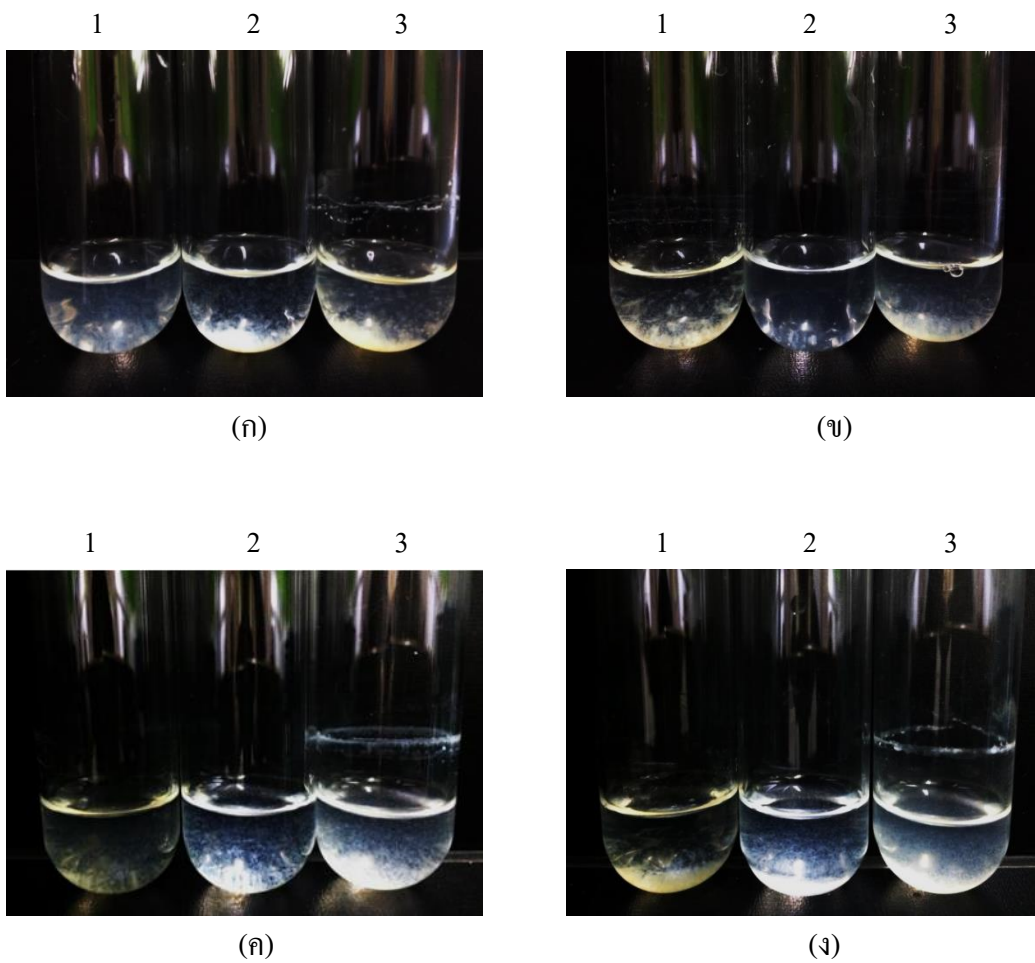
ตารางที่ 12 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว Minimal medium ทั้ง 3 ชนิดระยะเวลา 30 วัน โดยการหาค่าน้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

แบคทีเรีย	การเจริญเติบโตในอาหารเหลว MM		
	อาหาร MM	อาหาร MM ที่เติม 0.1% (NH ₄) ₂ SO ₄	อาหาร MM ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์
BBUU144	8.775±0.544 ^a	2.850±1.266 ^{bc}	9.325±0.759 ^a
BBUU161	8.400±1.203 ^a	2.500±1.214 ^{bc}	8.000±1.122 ^a
BBUU500	8.575±0.427 ^a	3.025±1.372 ^{bc}	8.875±2.175 ^a
<i>P. putida</i> ATCC 17484	5.400±3.488 ^{ab}	1.275±0.568 ^c	6.175±2.326 ^{ab}

“หมายเหตุ” อักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 18 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว Minimal medium ทั้ง 3 ชนิด



ภาพที่ 19 การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD ของแบคทีเรียในอาหารเหลว MM

(ก) ไอโซเลต BBUU144

(ข) ไอโซเลต BBUU161

(ค) ไอโซเลต BBUU500

(ง) แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484

1 คือ อาหาร MM

2 คือ อาหาร MM ที่เติม 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

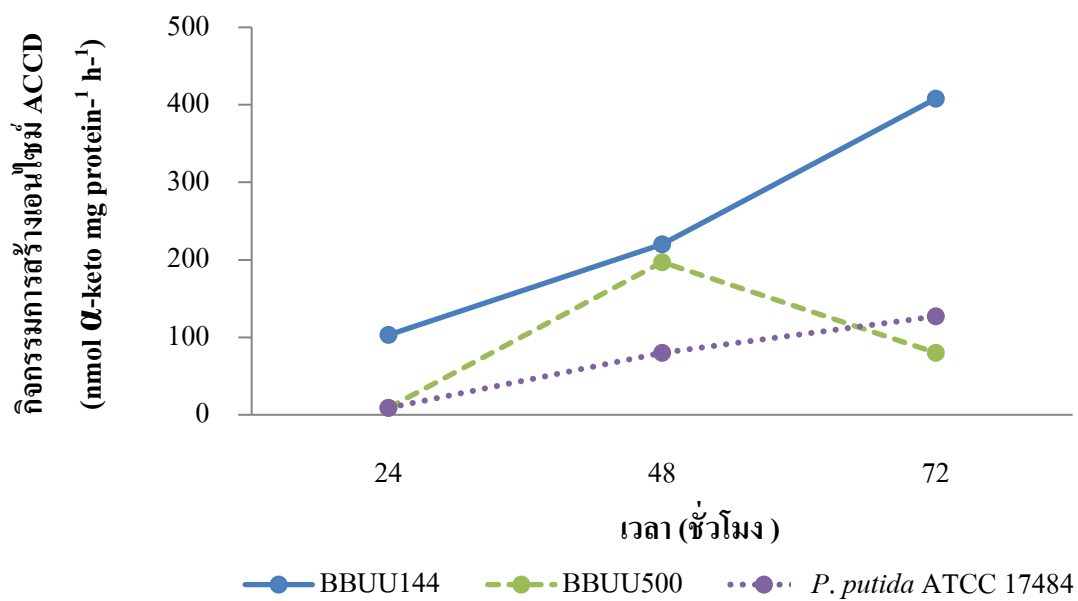
3 คือ อาหาร MM ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์

ผลการตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD ในอาหารเหลว MM ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่า ไอโซเลต BBUU144, ไอโซเลต BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 มีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD ซึ่งไอโซเลต BBUU144 มีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD ได้ดีที่สุดคือ 103.000, 220.100 และ 407.500 nmol α -keto mg protein⁻¹ h⁻¹ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ และมีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD ได้ดีกว่าไอโซเลต BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ในขณะที่ไอโซเลต BBUU161 ไม่พบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD (ตารางที่ 13) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Qin et al. (2015) รายงานว่า แอคติโนมัยสิทาคัดแยกได้จากต้นสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) ทั้งหมด 19 ไอโซเลตอยู่ในสกุล *Streptomyces*, *Nonomuraea*, *Micrococcus* และ *Kibdelosporangium* สร้างเอนไซม์ ACCD ได้ 3.86 ถึง 75.82 μ mol mg⁻¹ h⁻¹ แบคทีเรีย *P. putida* 4, *P. putida* 11, *P. putida* 108 และ *P. putida* 159 สร้างเอนไซม์ ACCD ได้ 2.305, 2.409, 5.030 และ 2.981 μ M α -ketobutyrate mg protein⁻¹ h⁻¹ ตามลำดับ (Jalili et al., 2009) และ *P. putida* สร้างเอนไซม์ ACCD ได้ 186 nmol/h (Ullah & Bano, 2019) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง กิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD ของไอโซเลต BBUU144 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 จะเพิ่มขึ้น แต่ไอโซเลต BBUU500 พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD จะลดลงที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 20 และภาพภาคผนวก ง-6)

ตารางที่ 13 การตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD

แบคทีเรีย	กิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD (nmol α -keto mg protein ⁻¹ h ⁻¹)		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
BBUU144	103.000±1.874 ^a	220.100±1.679 ^a	407.500±3.378 ^a
BBUU161	-	-	-
BBUU500	9.400±1.135 ^b	196.700±3.914 ^{ab}	79.600±3.462 ^b
<i>P. putida</i> ATCC 17484	9.400±2.703 ^b	79.600±4.622 ^b	126.500±0.976 ^b

- “หมายเหตุ” 1. อักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
 2. สัญลักษณ์ (-) คือ ไม่สร้าง



ภาพที่ 20 การตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD

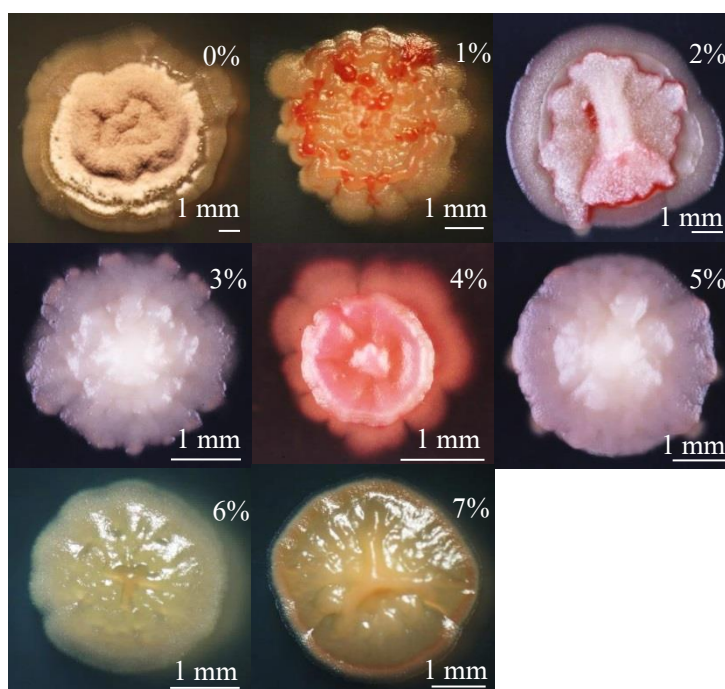
4.5 ผลการคัดเลือกแอคติโนมัยสิทธิ์ที่ทนเค็ม

ผลการคัดเลือกแอคติโนมัยสิทธิ์ที่ทนเค็ม โดยการนำแอคติโนมัยสิทธิ์ทั้งหมด 3 ไอโซเลต คือ BBUU144, BBUU161, BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 มาเลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร YD ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่คัดเลือกได้และเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 0-1,000 มิลลิโมลาร์ (0-7% w/v) พบว่าไอโซเลต BBUU144 (ภาพที่ 21) และไอโซเลต BBUU161 สามารถทนเค็มได้ 7% ไอโซเลต BBUU500 ทนเค็มได้ 6% และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ทนเค็มได้ 5% (ตารางที่ 14 และภาพภาคผนวก จ-1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gopalakrishnan et al. (2014) รายงานว่า แอคติโนมัยสิทธิ์ไอโซเลต CAI-13, CAI-85, CAI-93, CAI-140, CAI-155 และ KAI-180 คัดแยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (*Eisenia foetida*) จากพืชสมุนไพร 6 ชนิด ได้แก่ *Allium sativum*, *Pongamia pinnata*, *Azadirachta indica*, *Melia azedarach*, *Thevetia peruviana* และ *Oryza sativa* สามารถทนเค็มได้ 8% แต่ไอโซเลต CAI-13 และ CAI-93 ทนเค็มได้สูงถึง 10 และ 12% ตามลำดับ นอกจากนี้งานวิจัยของ Qin et al. (2014) ยังพบว่า แอคติโนมัยสิทธิ์ที่คัดแยกได้จากใบของ *Limonium sinense* (Girard) Kuntze คือ *Streptomyces* sp. KLBMP 5084 สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA และเอนไซม์ ACCD ทนเค็มได้ 7% ส่วน *Streptomyces* sp. PGPA39 และ *Streptomyces* sp. PGPA42 ทนเค็มได้ 6% (Palaniyandi et al., 2014) งานวิจัยของ Jaemsaeng et al. (2018) พบว่า *Streptomyces* sp. GMKU 336 คัดแยกได้จากพืชสมุนไพรสามารถสร้างเอนไซม์ ACCD แต่ไม่สร้างฮอร์โมนพืช IAA ทนเค็มได้ 6% และแบคทีเรีย *P. putida* R4 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้เพียงอย่างเดียวทนเค็มได้ 5% (Egamberdieva et al., 2015) เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ He et al. (2018) พบว่า *P. putida* Rs-198 ทนเค็มได้ 5% จากผลการคัดเลือกแอคติโนมัยสิทธิ์ที่ทนเค็มทั้ง 3 ไอโซเลต และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สามารถทนเค็มได้จึงถูกนำไปตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 14 ความสามารถในการทนเค็มของแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	การสร้างฮอร์โมนพืช IAA	การสร้างเอนไซม์ ACCD	ความสามารถในการทนเค็ม
BBUU144	+++	+	7%
BBUU161	+	-	7%
BBUU500	++	+	6%
<i>P. putida</i> ATCC 17484	+	+	5%

“หมายเหตุ” สัญลักษณ์ (+) คือ สร้าง, (-) คือ ไม่สร้าง



ภาพที่ 21 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BBUU144 บนอาหารแข็งสูตร YD ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 0-1,000 มิลลิโมลาร์ (0-7% w/v) อายุ 7 วัน

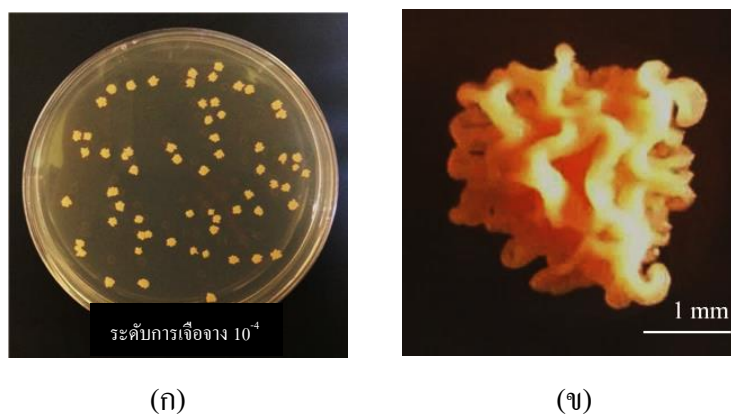
4.6 ผลการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ และวัดการเจริญเติบโตโดยหาน้ำหนักแห้ง

ผลการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ โดยเลือกเซลล์ในระดับเจือจางที่เหมาะสมและตรวจนับจำนวนโคโลนีของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BBUU144, BBUU161, BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร YD ด้วยวิธี Plate count ซึ่งระดับการเจือจางที่เหมาะสมควรมีการเจริญของโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีหรือ Colony forming unit (CFU) พบว่า ไอโซเลต BBUU144 และ BBUU161 มีการเจริญของจำนวนโคโลนีที่เหมาะสมในระดับการเจือจางที่ 10^{-4} คือ 1.71×10^6 และ 5.00×10^6 CFU/ml ตามลำดับ ไอโซเลต BBUU500 ในระดับการเจือจางที่ 10^{-3} คือ 4.50×10^5 CFU/ml และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ในระดับการเจือจางที่ 10^{-6} คือ 4.20×10^8 CFU/ml (ตารางที่ 15 และภาพที่ 22)

ตารางที่ 15 การตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียด้วยวิธี Plate count

ระดับการเจือจาง	จำนวนโคโลนี (CFU/ml)			
	BBUU144	BBUU161	BBUU500	<i>P. putida</i> ATCC 17484
10^{-1}	-	-	-	-
10^{-2}	-	-	-	-
10^{-3}	-	-	4.50×10^5	-
10^{-4}	1.71×10^6	5.00×10^6	5.67×10^5	-
10^{-5}	4.60×10^6	4.67×10^6	3.33×10^6	-
10^{-6}	1.57×10^7	2.67×10^7	1.11×10^7	4.20×10^8

“หมายเหตุ” สัญลักษณ์ (-) คือ ไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้

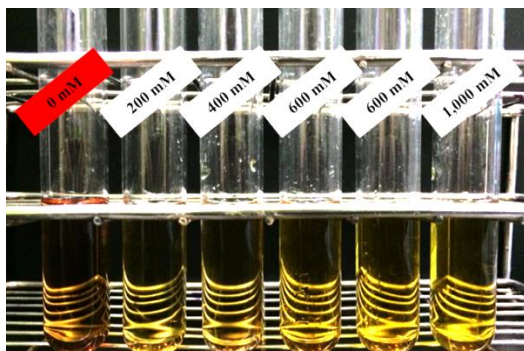


ภาพที่ 22 การตรวจสอบการเจริญในระดับเจือจางที่เหมาะสมของแอคติโนมัยซีท ไอโซเลต BBUU144 ด้วยวิธี Plate count
 (ก) การเจริญของจำนวนโคโลนีที่เหมาะสมในระดับการเจือจางที่ 10^{-4}
 (ข) ลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร YD

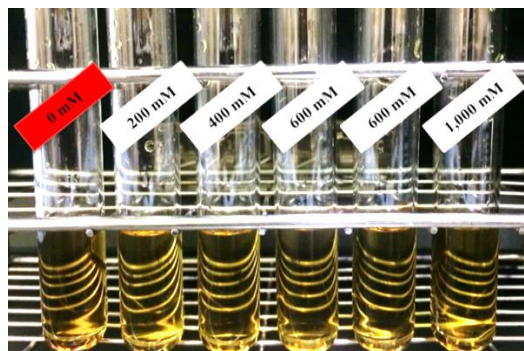
ผลการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA โดยนำเซลล์ในระดับเจือจางที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว YD ที่เติม Tryptophan 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์พบว่า แบคทีเรียที่มีการสร้างฮอร์โมนพืช IAA สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีส้มอมชมพู และสารละลายที่ไม่มีการสร้างฮอร์โมนพืช IAA จะไม่เปลี่ยนสีหรือยังคงสีน้ำตาลอมเหลืองของอาหาร เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร (ภาพที่ 23) โดยที่ในสถานะที่ไม่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ แอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลตคือ BBUU144 BBUU161 และ BBUU500 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 15.711, 3.094 และ 6.269 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 1.074 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 200, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ ไอโซเลต BBUU500 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงสุดคือ 5.913, 7.966 และ 10.960 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ นั่นคือความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช IAA จะสูงขึ้น เมื่อระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ *Streptomyces* ไอโซเลต C สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงสุดคือ 4.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 300 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0 มิลลิโมลาร์สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 2.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sadeghi et al., 2012) ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 400 มิลลิโมลาร์ แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงสุดคือ 17.182 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อ

ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นคือ 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ การสร้างฮอร์โมนพืช IAA จะค่อย ๆ ลดลงคือ 5.584 และ 4.752 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 16) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Egamberdieva et al. (2015) รายงานว่า *P. putida* R4 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 8.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5% หรือ 257 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่า ในสภาพที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ไอโซเลต BBUU161 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้น้อยที่สุด (ภาพที่ 24 และภาพภาคผนวก ฉ-1)

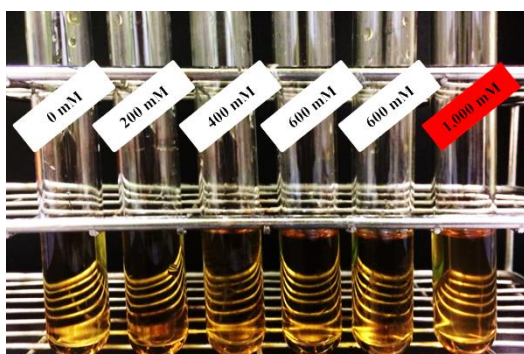
ผลการตรวจสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ พบว่า ไอโซเลต BBUU144 สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดมีน้ำหนักแห้งคือ 23.614, 64.143, 82.214, 109.129 และ 147.971 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 17) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sadeghi et al. (2012) พบว่า แอคติโนมัยซีท *Streptomyces* ไอโซเลต C สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 300 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 800 มิลลิโมลาร์ แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 มีการเจริญเติบโตสูงสุดคือ 109.329 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันกับ ไอโซเลต BBUU144 และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 จะลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1,000 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ความสามารถในการเจริญเติบโตของไอโซเลต BBUU144 BBUU161 และ BBUU500 จะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 25 และภาพภาคผนวก ฉ-2) จากผลการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ภายใต้สภาพที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ ซึ่งมีผลแตกต่างกันของแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลตและแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 จึงถูกนำไปศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าวขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) ต่อไป



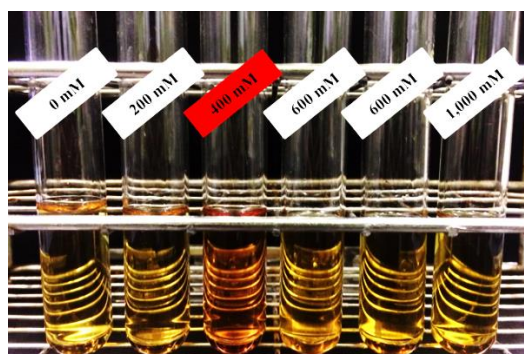
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 23 การสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นละลายโซเดียมคลอไรด์

0-1,000 มิลลิโมลาร์

(ก) ไอโซเลต BBUU144

(ข) ไอโซเลต BBUU161

(ค) ไอโซเลต BBUU500

(ง) แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484

ตารางที่ 16 การสร้างฮอว์โมนพืช IAA ของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์

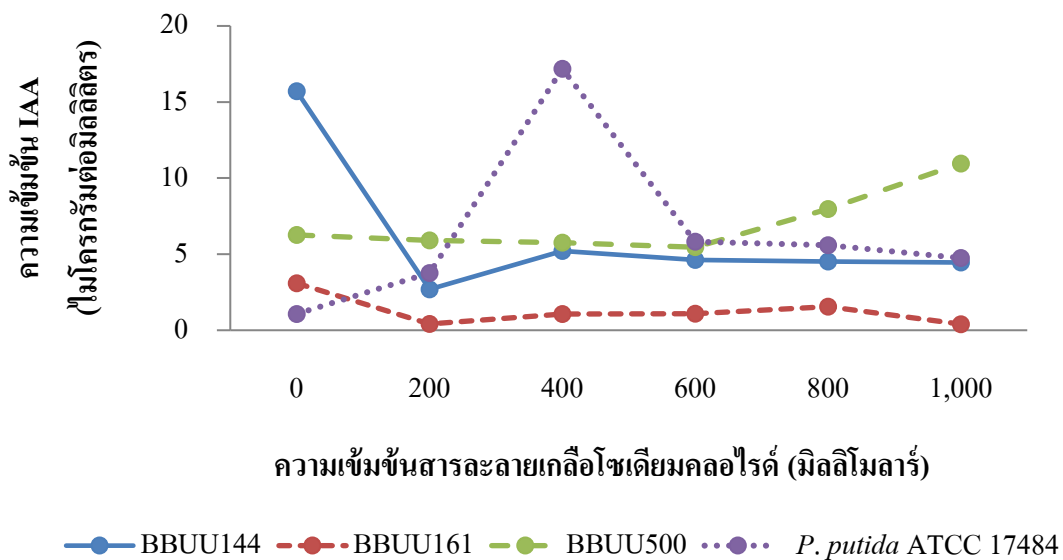
แบคทีเรีย	ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)					
	0	200	400	600	800	1,000
BBUU144	15.711±0.032 ^d	2.691±0.024 ^b	5.208±0.035 ^b	4.617±0.017 ^b	4.524±0.027 ^b	4.463±0.012 ^b
BBUU161	3.094±0.010 ^c	0.409±0.004 ^c	1.067±0.009 ^b	1.094±0.015 ^c	1.557±0.001 ^c	0.403±0.015 ^c
BBUU500	6.269±0.002 ^b	5.913±0.007 ^a	5.752±0.010 ^b	5.456±0.004 ^{ab}	7.966±0.008 ^a	10.960±0.070 ^a
<i>P. putida</i> ATCC 17484	1.074±0.015 ^d	3.765±0.011 ^b	17.182±0.124 ^a	5.819±0.011 ^a	5.584±0.008 ^b	4.752±0.008 ^b

“หมายเหตุ” อักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

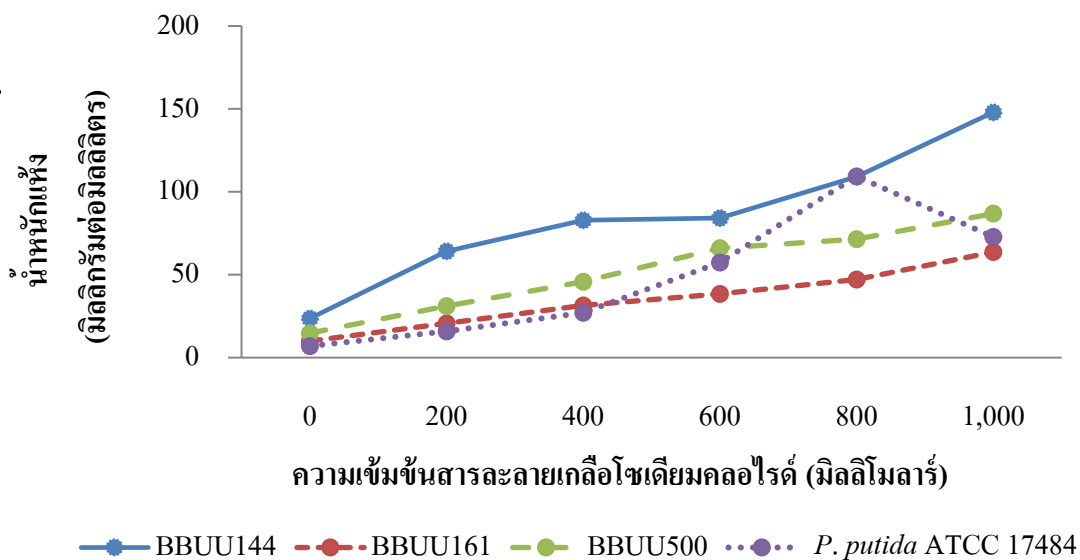
ตารางที่ 17 การเจริญของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์ โดยทำหน้าที่แห่ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

แบคทีเรีย	ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)					
	0	200	400	600	800	1,000
BBUU144	23.614±2.491 ^a	64.143±13.537 ^a	82.886±17.875 ^a	84.214±15.827 ^a	109.129±32.726 ^a	147.971±13.274 ^a
BBUU161	10.000±1.985 ^c	20.671±2.819 ^{bc}	31.429±2.147 ^c	38.443±19.411 ^c	47.129±29.252 ^b	63.657±24.915 ^b
BBUU500	14.786±3.706 ^b	31.114±5.295 ^b	45.686±1.669 ^b	66.029±4.807 ^{ab}	71.400±6.573 ^{ab}	86.829±2.083 ^b
<i>P. putida</i> ATCC 17484	6.957±3.863 ^c	15.771±4.032 ^c	27.114±2.864 ^c	57.314±15.936 ^{bc}	109.329±34.167 ^a	72.886±23.756 ^b

“หมายเหตุ” อักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 24 การสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโกลีโคเตียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 25 การเจริญของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโกลีโคเตียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์

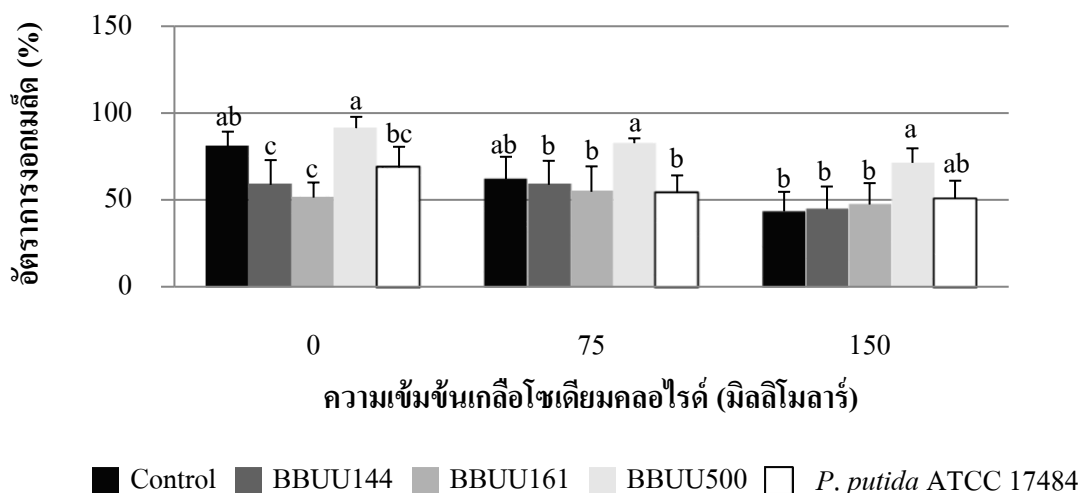
4.7 ผลการศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าวขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML105)

ผลการศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อดูผลทั้งทางด้านเชิงบวกในการกระตุ้นการเจริญและผลเชิงลบในการยับยั้งการเจริญของเมล็ดข้าว โดยเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำมาวางในเพลทที่มีความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยวัดเปอร์เซ็นต์อัตราการงอกเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ผ่านการแช่สารละลายสปอร์ (ชุดควบคุม) ซึ่งชุดการทดลองที่ผ่านการแช่ในสารละลายสปอร์ไอโซเลต BBUU144 (10^4 CFU/ml), BBUU 161 (10^4 CFU/ml), BBUU500 (10^3 CFU/ml) และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 (10^6 CFU/ml) พบว่า ผลของแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลตและแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 มีผลต่อการเจริญของเมล็ดข้าวโดยมีค่าเปอร์เซ็นต์อัตราการงอกของเมล็ดแตกต่างกัน (ตารางที่ 18) โดยเมล็ดที่ถูกแช่ด้วยสารละลายสปอร์ไอโซเลต BBUU500 มีอัตราการงอกของเมล็ดสูงกว่าไอโซเลต BBUU144, ไอโซเลต BBUU161, แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 และชุดควบคุม ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 26)

ตารางที่ 18 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105

แบคทีเรีย	ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)		
	0	75	150
Control	80.667±8.628 ^{ab}	62.000±1.824 ^{ab}	43.333±11.304 ^b
BBUU144	58.666±14.258 ^c	58.667±13.864 ^b	44.667±13.038 ^b
BBUU161	51.333±8.692 ^c	54.667±14.644 ^b	47.333±12.338 ^b
BBUU500	91.333±6.498 ^a	82.667±2.789 ^a	71.333±8.367 ^a
<i>P. putida</i> ATCC 17484	68.667±11.926 ^{bc}	54.000±10.111 ^b	50.667±10.382 ^{ab}

“หมายเหตุ” อักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 26 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105

ผลการศึกษากการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในสภาวะโรงเรือน โดยนำต้นข้าวที่มีความแข็งแรงมาทำการตัดปลายรากด้วยเทคนิคปลอดเชื้อและแช่ในสารละลาย สปอร์ไอโซเลต BBUU144 (10^4 CFU/ml), BBUU161 (10^4 CFU/ml), BBUU500 (10^3 CFU/ml) และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 (10^6 CFU/ml) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นศึกษากการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในกระถางที่มีดินที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 30 วัน จึงวัดผลการเจริญของต้นข้าวโดยวัดความยาวราก ลำต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งพบว่า แสดงดังตารางที่ 19 ไอโซเลต BBUU500 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวมีความยาวราก ความยาวลำต้น น้ำหนักสดลำต้น และน้ำหนักแห้งของรากและลำต้นเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวที่ไม่ได้รับเชื้อ (ชุดควบคุม) ที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ โดยไอโซเลต BBUU500 ส่งเสริมความยาวลำต้นสูงสุดคือ 40.508, 36.875 และ 30.208 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 28) น้ำหนักแห้งลำต้นสูงสุดคือ 0.381, 0.293 และ 0.233 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 32) นอกจากนี้ยังพบว่า ต้นข้าวที่ได้รับเชื้อ ไอโซเลต BBUU500 มีน้ำหนักแห้งรากสูงสุดคือ 0.108 และ 0.093 กรัม ที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 31) และต้นข้าวที่ได้รับเชื้อ ไอโซเลต BBUU144, BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 มีความยาวรากเพิ่มขึ้นสูงกว่าต้นข้าวที่ไม่ได้รับเชื้อ (ภาพที่ 27) ในขณะที่ต้นข้าวที่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับเชื้อมีน้ำหนักสดรากไม่

แตกต่างกัน (ภาพที่ 29) แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 มีน้ำหนักสดลำต้นสูงสุดคือ 2.165, 1.626 และ 1.698 กรัม ที่ระดับความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 30) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Jaemsaeng et al. (2018) พบว่า แอคติโนมัยสีท *Streptomyces* sp. GMKU 336 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตความยาวราก ลำต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นข้าวขาวดอกมะลิ105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) ภายใต้สภาวะความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 0 และ 150 มิลลิโมลาร์ และรายงานวิจัยของ Tamreihao et al. (2018) พบว่า แอคติโนมัยสีท *Streptomyces* sp. MBRL 10 สามารถส่งเสริมอัตราการงอก ค้ำนี้ความแข็งแรงของเมล็ด ความยาวรากและลำต้นของข้าว (*Oryza sativa*) ได้สูงสุด



1054561741

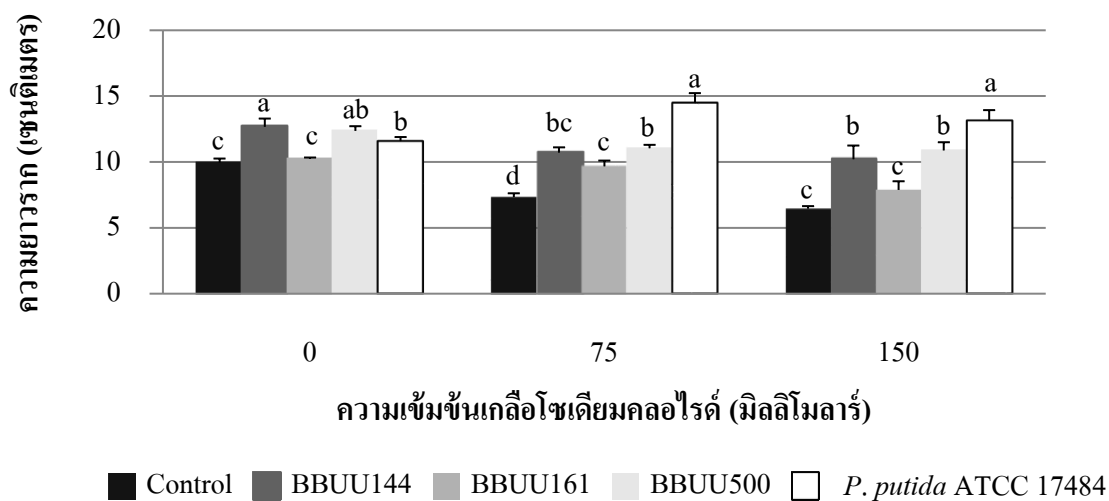
ตารางที่ 19 การเจริญของต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ ภายใต้สภาวะ
โรงเรือน ระยะเวลา 30 วัน

แบคทีเรีย	ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)		
	0	75	150
ความยาวราก (เซนติเมตร)			
Control	9.958±0.302 ^c	7.333±0.289 ^d	6.458±0.191 ^c
BBUU144	12.667±0.629 ^a	10.708±0.402 ^{bc}	10.208±1.041 ^b
BBUU161	10.250±0.090 ^c	9.667±0.439 ^c	7.875±0.661 ^c
BBUU500	12.358±0.359 ^{ab}	11.042±0.260 ^b	10.875±0.625 ^b
<i>P. putida</i> ATCC 17484	11.592±0.302 ^b	14.475±0.753 ^a	13.150±0.788 ^a
ความยาวลำต้น (เซนติเมตร)			
Control	32.508±0.898 ^{bc}	26.958±0.473 ^d	19.958±0.711 ^b
BBUU144	33.000±1.841 ^{bc}	29.833±0.946 ^{cd}	20.708±1.018 ^b
BBUU161	32.267±1.130 ^c	32.083±0.564 ^{bc}	21.917±1.377 ^b
BBUU500	40.508±0.605 ^a	36.875±1.639 ^a	30.208±1.063 ^a
<i>P. putida</i> ATCC 17484	36.258±2.131 ^b	34.058±2.043 ^{ab}	33.708±2.557 ^a
น้ำหนักสดราก (กรัม)			
Control	1.101±0.288 ^a	0.899±0.187 ^a	0.666±0.099 ^a
BBUU144	1.240±0.227 ^a	1.053±0.031 ^a	0.808±0.033 ^a
BBUU161	1.151±0.068 ^a	0.987±0.027 ^a	0.695±0.045 ^a
BBUU500	1.290±0.134 ^a	1.083±0.067 ^a	0.861±0.039 ^a
<i>P. putida</i> ATCC 17484	1.250±0.091 ^a	0.816±0.220 ^a	0.865±0.220 ^a
น้ำหนักสดลำต้น (กรัม)			
Control	1.374±0.123 ^c	0.755±0.152 ^c	0.506±0.053 ^d
BBUU144	1.382±0.095 ^c	0.943±0.021 ^{bc}	0.769±0.097 ^c
BBUU161	1.350±0.039 ^c	1.212±0.107 ^{ab}	0.613±0.084 ^{cd}
BBUU500	1.816±0.109 ^b	1.525±0.257 ^a	1.257±0.157 ^b
<i>P. putida</i> ATCC 17484	2.165±0.076 ^a	1.626±0.187 ^a	1.698±0.087 ^a

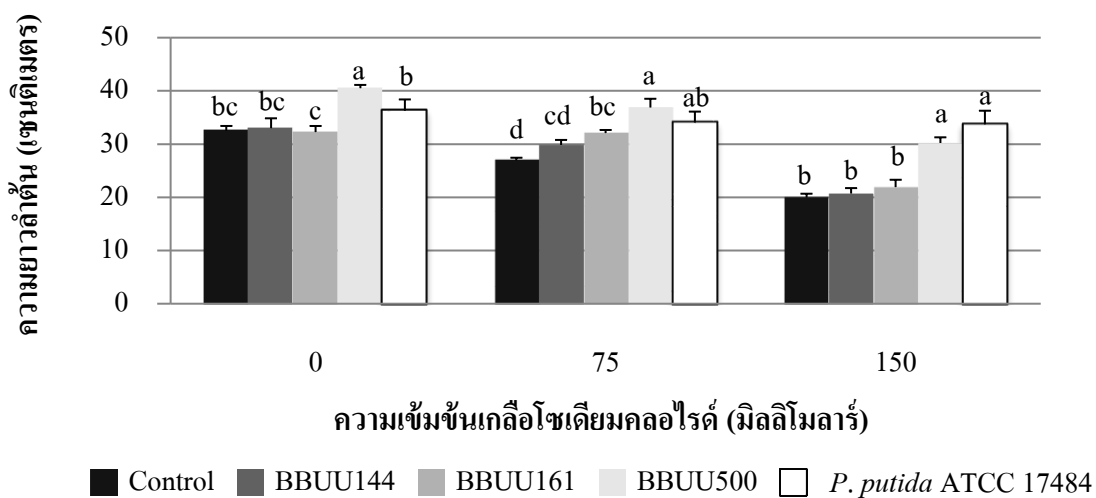
ตารางที่ 19 (ต่อ)

แบคทีเรีย	ความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)		
	0	75	150
น้ำหนักแห้งราก (กรัม)			
Control	0.104±0.029 ^a	0.085±0.008 ^{bc}	0.062±0.012 ^b
BBUU144	0.122±0.017 ^a	0.104±0.002 ^{ab}	0.082±0.006 ^{ab}
BBUU161	0.112±0.016 ^a	0.090±0.004 ^{abc}	0.078±0.002 ^{ab}
BBUU500	0.125±0.029 ^a	0.108±0.001 ^a	0.093±0.010 ^a
<i>P. putida</i> ATCC 17484	0.109±0.005 ^a	0.077±0.014 ^c	0.096±0.009 ^a
น้ำหนักแห้งลำต้น (กรัม)			
Control	0.229±0.010 ^c	0.147±0.021 ^c	0.125±0.020 ^b
BBUU144	0.259±0.024 ^c	0.172±0.007 ^{bc}	0.133±0.008 ^b
BBUU161	0.271±0.003 ^{bc}	0.224±0.024 ^{abc}	0.131±0.021 ^b
BBUU500	0.381±0.057 ^a	0.293±0.056 ^a	0.233±0.031 ^a
<i>P. putida</i> ATCC 17484	0.346±0.013 ^{ab}	0.251±0.027 ^{bc}	0.283±0.017 ^a

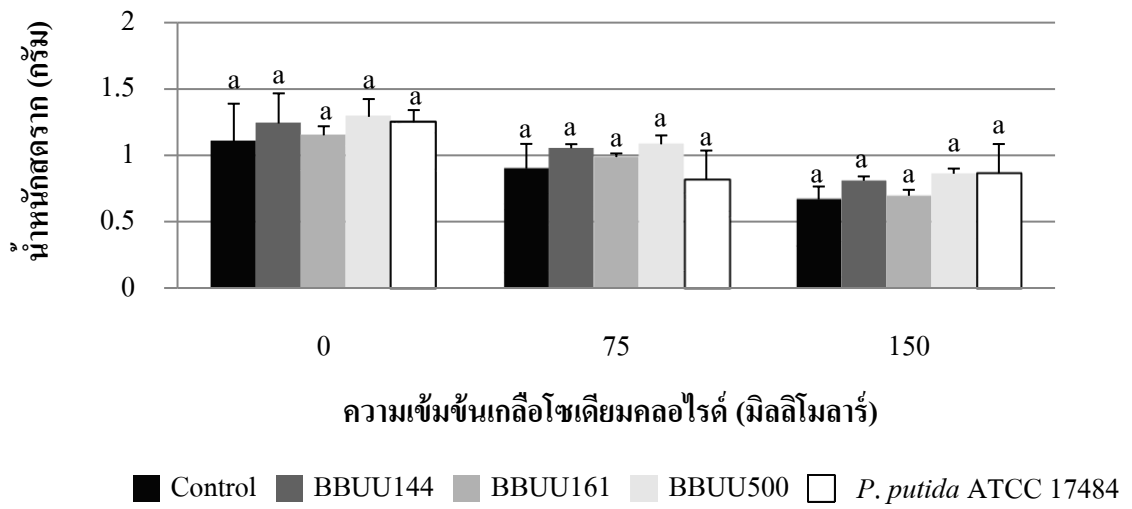
“หมายเหตุ” อักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



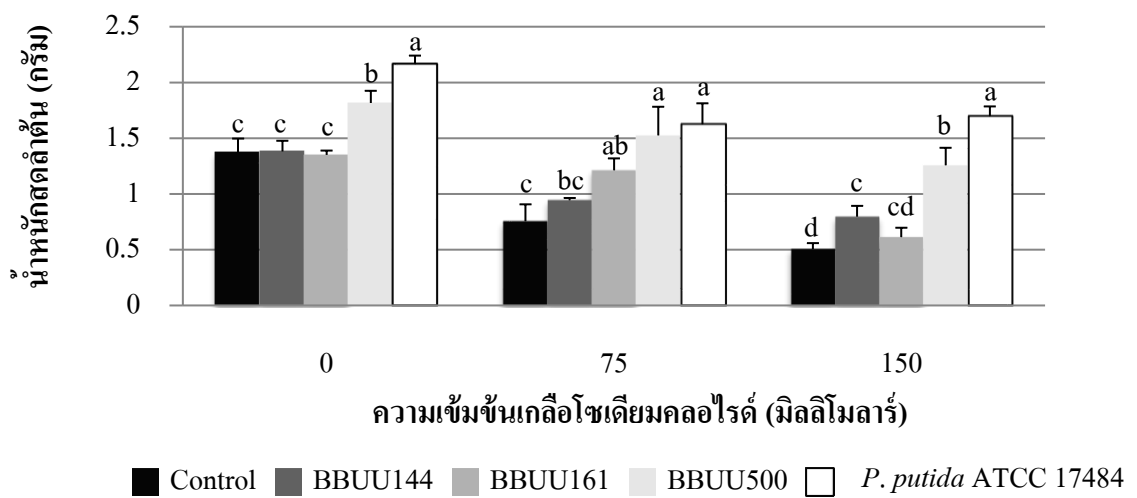
ภาพที่ 27 ความยาวรากต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเชื้อรา *Phytophthora blight* ต่าง ๆ



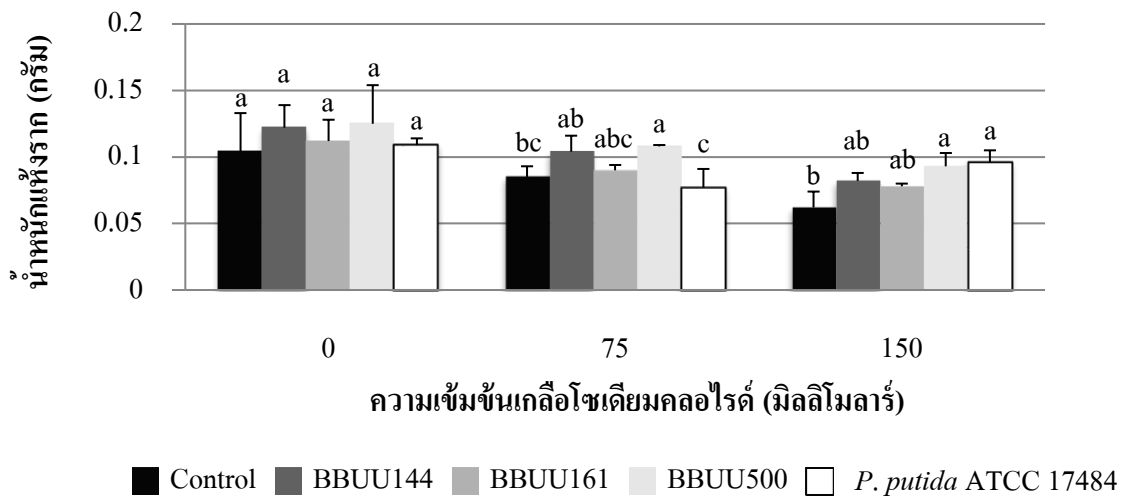
ภาพที่ 28 ความยาวลำต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเชื้อรา *Phytophthora blight* ต่าง ๆ



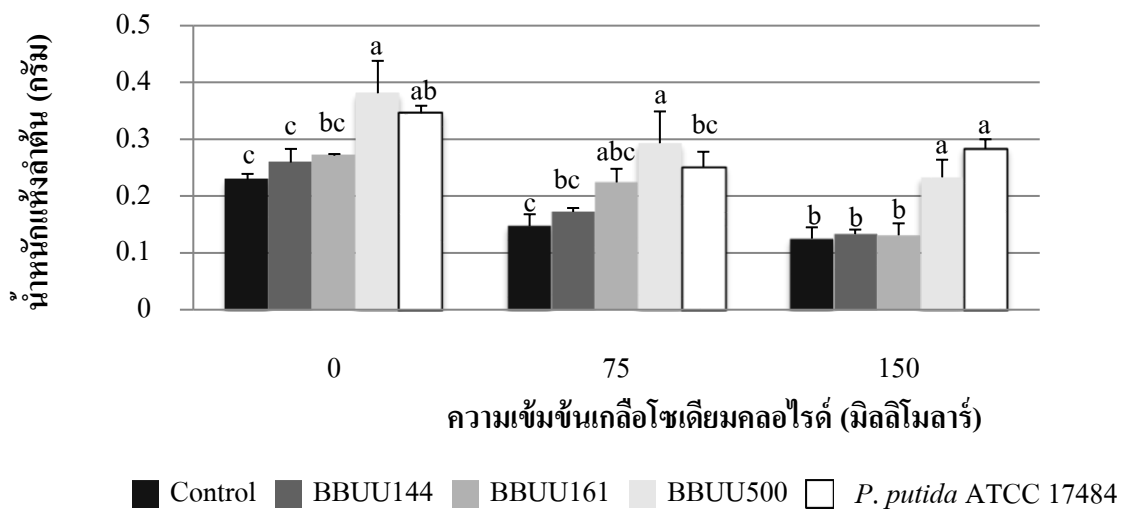
ภาพที่ 29 น้ำหนักสตรากต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือไซเตียมคลอไรด์ต่างๆ



ภาพที่ 30 น้ำหนักสตรากต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือไซเตียมคลอไรด์ต่างๆ



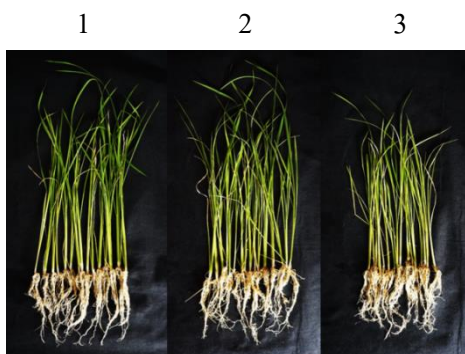
ภาพที่ 31 น้ำหนักแห้งรากต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ต่าง ๆ



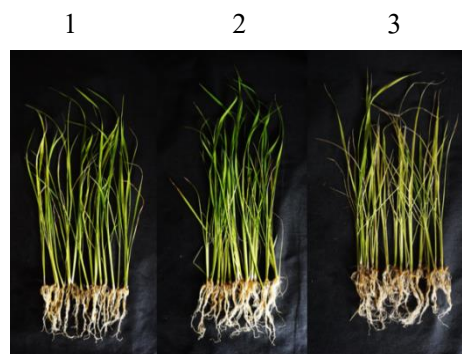
ภาพที่ 32 น้ำหนักแห้งลำต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ต่าง ๆ



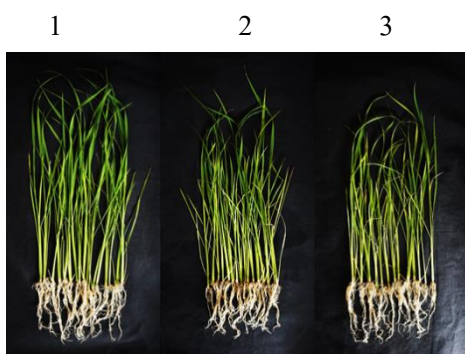
1054561741



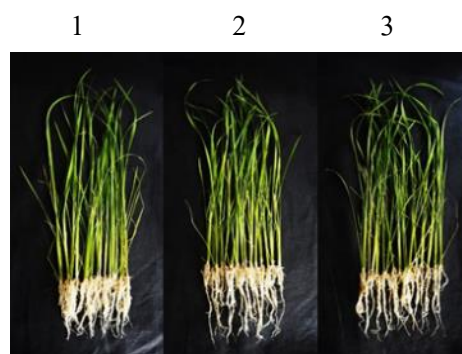
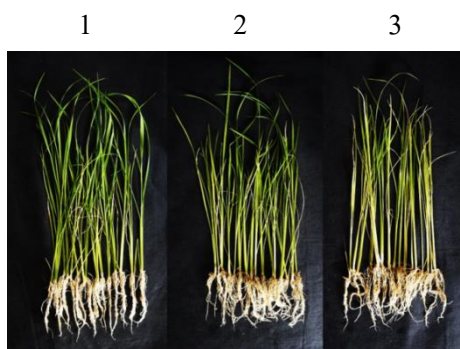
(ก) ไอโซเลต BBUU144



(ข) ไอโซเลต BBUU161

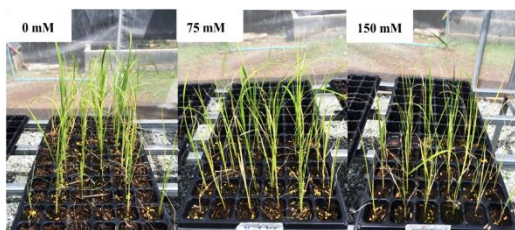


(ค) ไอโซเลต BBUU500

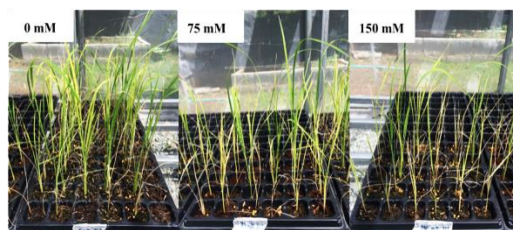
(ง) แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484

(จ) ไม่คลุกเชื้อแบคทีเรีย (ชุดควบคุม)

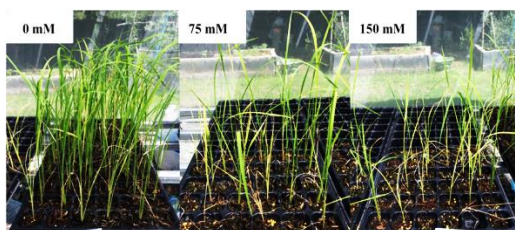
ภาพที่ 33 การเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ ภายใต้สภาวะโรงเรือนระยะเวลา 30 วัน ซึ่งมีระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ดังนี้ หมายเลข 1 คือ 0 มิลลิโมลาร์, 2 คือ 75 มิลลิโมลาร์และ 3 คือ 150 มิลลิโมลาร์



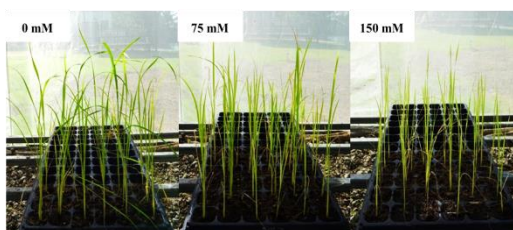
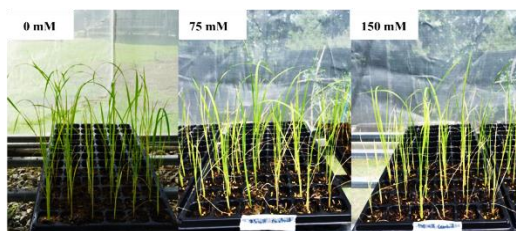
(ก) ไอโซเลต BBUU144



(ข) ไอโซเลต BBUU161



(ค) ไอโซเลต BBUU500

(ง) แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484

(จ) ไม่คลุกเชื้อแบคทีเรีย (ชุดควบคุม)

ภาพที่ 34 แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าวที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ ภายใต้อาณาบริเวณโรงเรือนระยะเวลา 30 วัน

4.8 ผลการจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทในระดับสกุล

ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและตรวจสอบการเจริญเติบโตบนอาหารแข็งสูตร YD, ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, ISP7 และ ISP9 พบว่าแสดงดังตารางที่ 20 และ 21 แอกติโนมัยสีทไอโซเลต BBUU144 BBUU161 และ BBUU500 สามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ ดิบบนอาหารสูตร ISP3 ในเวลา 21 วัน ซึ่งรวดเร็วกว่าอาหารแข็งสูตรอื่น ๆ (ภาพที่ 35) โดยลักษณะ สัณฐานวิทยาของไอโซเลต BBUU 144 และ BBUU161 มีการสร้างรงควัตถุสีชมพู บนอาหารสูตร YD, ISP1, ISP2 และ ISP3 แต่ยังสร้างรงควัตถุสีชมพู บนอาหารสูตร ISP4 และ ISP5 ส่วน ไอโซเลต BBUU500 ไม่สร้างรงควัตถุบนอาหารทุกชนิด (ภาพภาคผนวก ซ-1) แอกติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลตที่เจริญได้รวดเร็วนบนอาหารสูตร ISP 3 จึงเลือกไปเพื่อทำการวิเคราะห์ลักษณะสปอร์ด้วย กล้อง SEM พบสปอร์เป็นสายยาว มีการแตกแขนง มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ๆ (Rod-shape) ขนาด ประมาณ 1 ไมโครเมตร (ภาพที่ 36, 37 และ 38) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในสกุล *Streptomyces* spp. และ *Frankia* spp. ผิวสปอร์เรียบ ซึ่งลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ถือว่าเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการจัดอนุกรมวิธานของแอกติโนมัยสีท (Barka et al., 2016) แต่อย่างไรก็ตามลักษณะสปอร์ สามารถบ่งบอกได้เพียงว่าแอกติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลตเป็นสมาชิกของชั้น (Class) Actinobacteria ซึ่งหากต้องการจัดจำแนกในระดับสกุล จำเป็นต้องใช้การวิเคราะห์หีน 16S rRNA และสร้างแผนภูมิ วิวัฒนาการชาติพันธุ์ต่อไป



ภาพที่ 35 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร ISP3 บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศา เซลเซียส อายุ 21 วัน (ก) คือ ไอโซเลต BBUU144, (ข) คือ ไอโซเลต BBUU161 และ (ค) คือ ไอโซเลต BBUU500

ตารางที่ 20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ อายุ 21 วัน

ไอโซเลต	อาหารสูตร	ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ			
		เส้นใยใต้ผิว อาหาร	เส้นใยเหนือผิว อาหาร	สปอร์	รงควัตถุ
BBUU144	YD	Cream	White	Gray	Ultra pink
	ISP1	Cream	White	Gray	Ultra pink
	ISP2	Vanilla	White	Gray	Ultra pink
	ISP3	Cream	White	Gray	Ultra pink
	ISP4	Cream	White	Gray	Deep pink
	ISP5	Isabelline	White	Gray	Deep pink
	ISP6	Cream	White	Gray	-
	ISP7	Eggshell	White	Gray	-
	ISP9	Eggshell	White	Gray	-
BBUU161	YD	Cream	White	Gray	Ultra pink
	ISP1	Cream	White	Gray	Ultra pink
	ISP2	Vanilla	White	Gray	Ultra pink
	ISP3	Cream	White	Gray	Ultra pink
	ISP4	Cream	White	Gray	Deep pink
	ISP5	Isabelline	White	Gray	Deep pink
	ISP6	Cream	White	Gray	-
	ISP7	Eggshell	White	Gray	-
	ISP9	Eggshell	White	Gray	-

ตารางที่ 20 (ต่อ)

ไอโซเลต	อาหารสูตร	ลักษณะสีฐานวิทยานอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ			
		เส้นใยใต้ผิว อาหาร	เส้นใยเหนือผิว อาหาร	สปอร์	รงควัตถุ
	YD	Cream	White	White	-
	ISP1	Cream	White	White	-
	ISP2	Cream	White	White	-
	ISP3	Cream	White	White	-
BBUU500	ISP4	Eggshell	White	White	-
	ISP5	Cream	White	White	-
	ISP6	Cream	White	White	-
	ISP7	Cream	White	White	-
	ISP9	Cream	White	White	-

“หมายเหตุ” สัญลักษณ์ (-) คือ ไม่สร้าง

ตารางที่ 21 ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ
อายุ 21 วัน

ไอโซเลต	อาหารสูตร	การเจริญเติบโตบนอาหาร	การสร้างสปอร์
BBUU144	YD	ดีมาก	ดีมาก
	ISP1	ดีมาก	ดีมาก
	ISP2	ดีมาก	ดีมาก
	ISP3	ดีมาก	ดีมาก
	ISP4	ดีมาก	ดีมาก
	ISP5	ดีมาก	น้อยมาก
	ISP6	ดีมาก	ดีมาก
	ISP7	ดีมาก	ดีมาก
	ISP9	ดีมาก	ดีมาก
BBUU161	YD	ดีมาก	ดีมาก
	ISP1	ดีมาก	ดีมาก
	ISP2	ดีมาก	ดีมาก
	ISP3	ดีมาก	ดีมาก
	ISP4	ดีมาก	ดีมาก
	ISP5	ดีมาก	น้อยมาก
	ISP6	ดีมาก	ดี
	ISP7	ดีมาก	ดีมาก
	ISP9	ดีมาก	ดีมาก

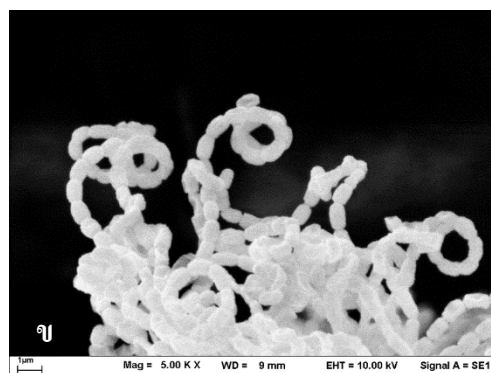
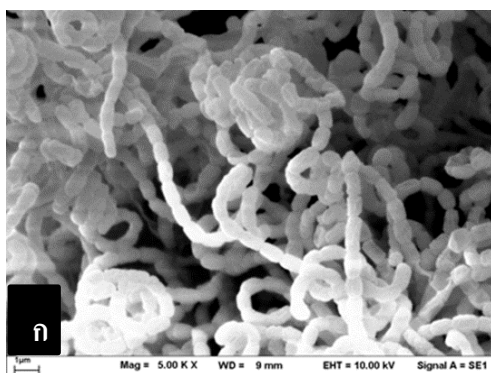


1054561741

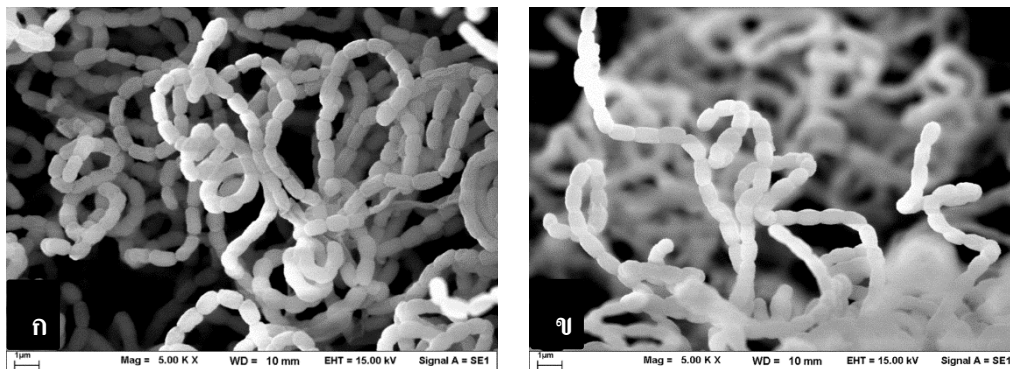
BUU_1Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ตารางที่ 21 (ต่อ)

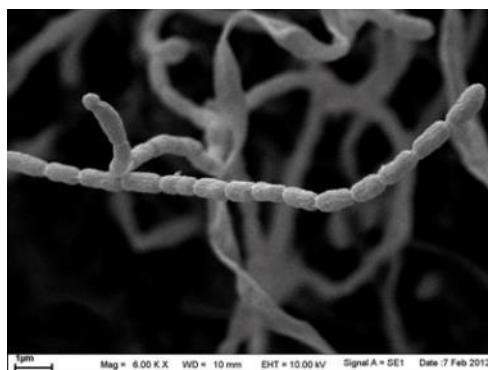
ไอโซเลต	อาหารสูตร	การเจริญเติบโตบนอาหาร	การสร้างสปอร์
	YD	ดีมาก	น้อยมาก
	ISP1	ดีมาก	ดีมาก
	ISP2	ดี	ดีมาก
	ISP3	ดีมาก	ดีมาก
BBUU500	ISP4	ดีมาก	ปานกลาง
	ISP5	ดีมาก	น้อยมาก
	ISP6	ดี	ดี
	ISP7	ดีมาก	ดีมาก
	ISP9	ดีมาก	ปานกลาง



ภาพที่ 36 ลักษณะของสปอร์จากกล้อง SEM ของแอสเพอริลลัส BBUU144 บนอาหารแข็งสูตร ISP3 บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน
 (ก) สปอร์เป็นสายยาว มีการแตกแขนง (Brached mycelia)
 (ข) สปอร์เรียงตัวเป็นสายยาวมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ๆ ขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร ผิวสปอร์เรียบ

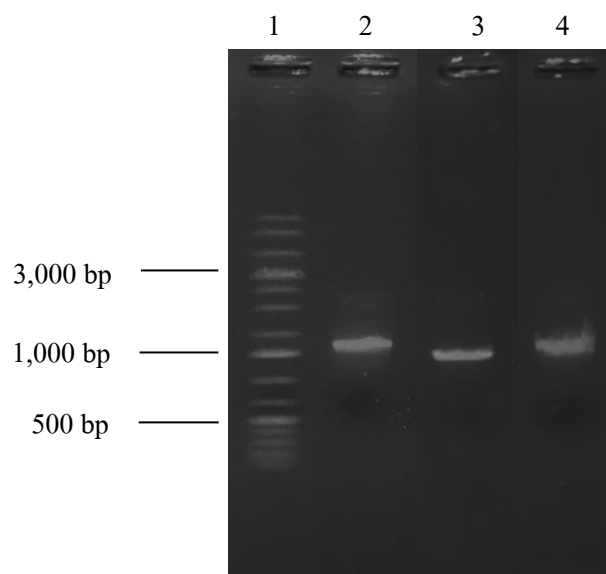


ภาพที่ 37 ลักษณะของสปอร์จากกล้อง SEM ของแอกติโนมัยสีท BBUU161 บนอาหารแข็งสูตร ISP3 บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน
 (A) สปอร์เป็นสายยาว มีการแตกแขนง (Brached mycelia)
 (B) สปอร์เรียงตัวเป็นสายยาวมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ๆ ขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร
 ผิวสปอร์เรียบ



ภาพที่ 38 ลักษณะของสปอร์จากกล้อง SEM ของแอกติโนมัยสีท BBUU500 บนอาหารแข็งสูตร ISP3 บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน สปอร์มีลักษณะเป็นรูปแท่งสั้น ๆ เรียงตัวเป็นเส้นยาว ผิวสปอร์เรียบ ขนาดประมาณ 0.9 ไมโครเมตร

ผลการวิเคราะห์ลักษณะโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยการนำดีเอ็นเอไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้ Primer 1F และ 1530R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ได้แทบเดียว (ภาพที่ 39) แล้วเมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของแอกติโนมัยสิต BBUU144, BBUU161 และ BBUU500 ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ EZbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) พบว่า นิวคลีโอไทด์มีขนาด 944-1,440 ของยีน 16S rRNA ซึ่งแอกติโนมัยสิต BBUU144 มีค่าคล้ายคลึงสูงสุด 99.68% กับ *Streptomyces coelicoflavus* NBRC 15399 แอกติโนมัยสิต BBUU161 มีคล้ายคลึงสูงสุด 99.63% กับ *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* NRRL B-1773 และแอกติโนมัยสิต BBUU500 มีคล้ายคลึงสูงสุด 98.71% กับ *Streptomyces flavalbus* NEAU-QY24 (ตารางที่ 22) และเมื่อนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์มาสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์พบว่าแอกติโนมัยสิตทั้ง 3 ไอโซเลตมีวิวัฒนาการชาติพันธุ์ร่วมกับสมาชิกของแอกติโนมัยสิตในสกุล *Streptomyces* (ภาพที่ 43) ดังนั้นผลการวิเคราะห์ลักษณะ โดยใช้ทั้งสัณฐานวิทยา ร่วมกับการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์จึงทำให้สามารถระบุได้ว่า BBUU144, BBUU161 และ BBUU500 เป็นสมาชิกของสกุล *Streptomyces*



ภาพที่ 39 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 16S rRNA

ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Ladder

ช่องที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแอกติโนมัยสีท BBUU500

ช่องที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแอกติโนมัยสีท BBUU144

ช่องที่ 4 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแอกติโนมัยสีท BBUU161



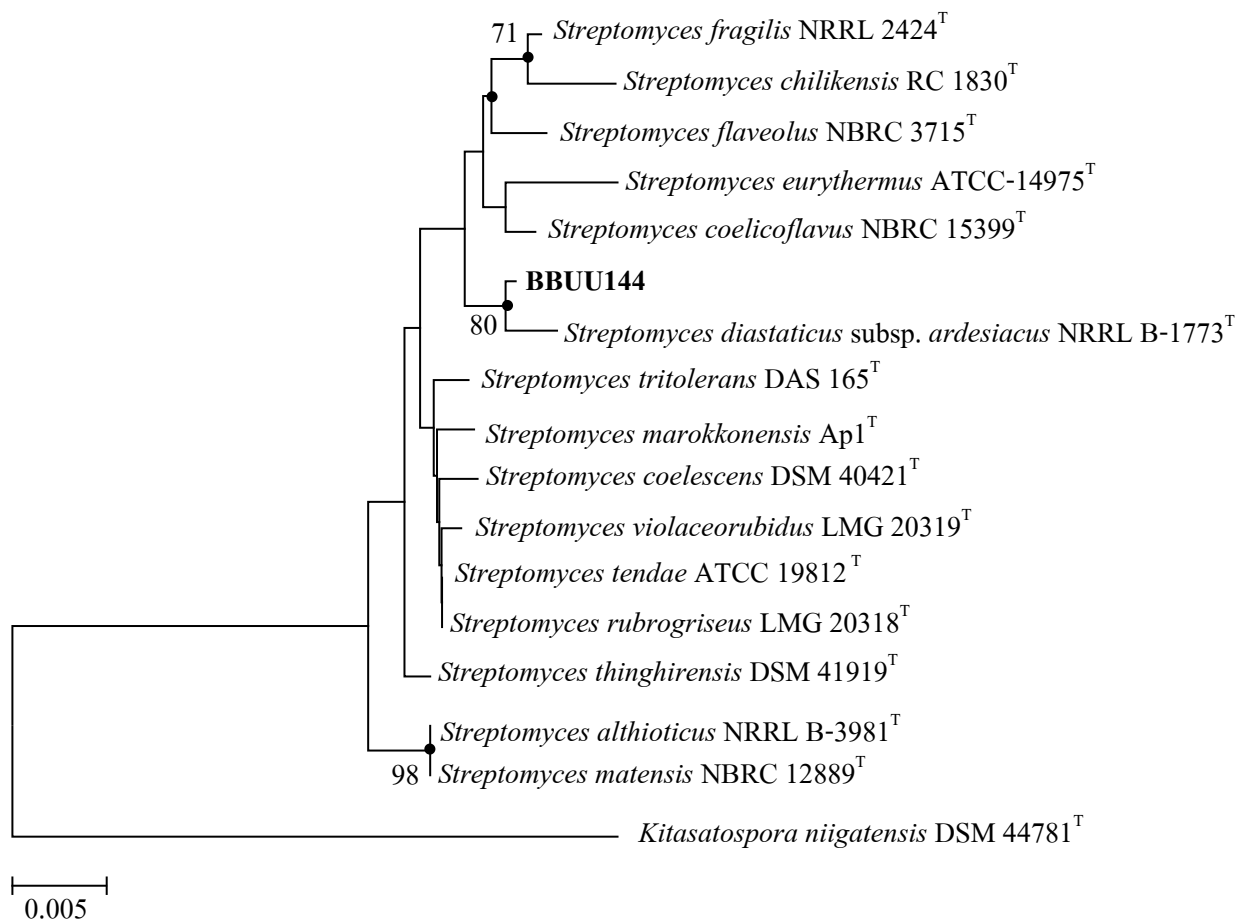
1054561741

ตารางที่ 22 ค่าความคล้ายคลึงระหว่างแอสกีโทไมซีตา BBUU144, BBUU161 และ BBUU500 กับสกุล *Streptomyces* ชนิดต่าง ๆ

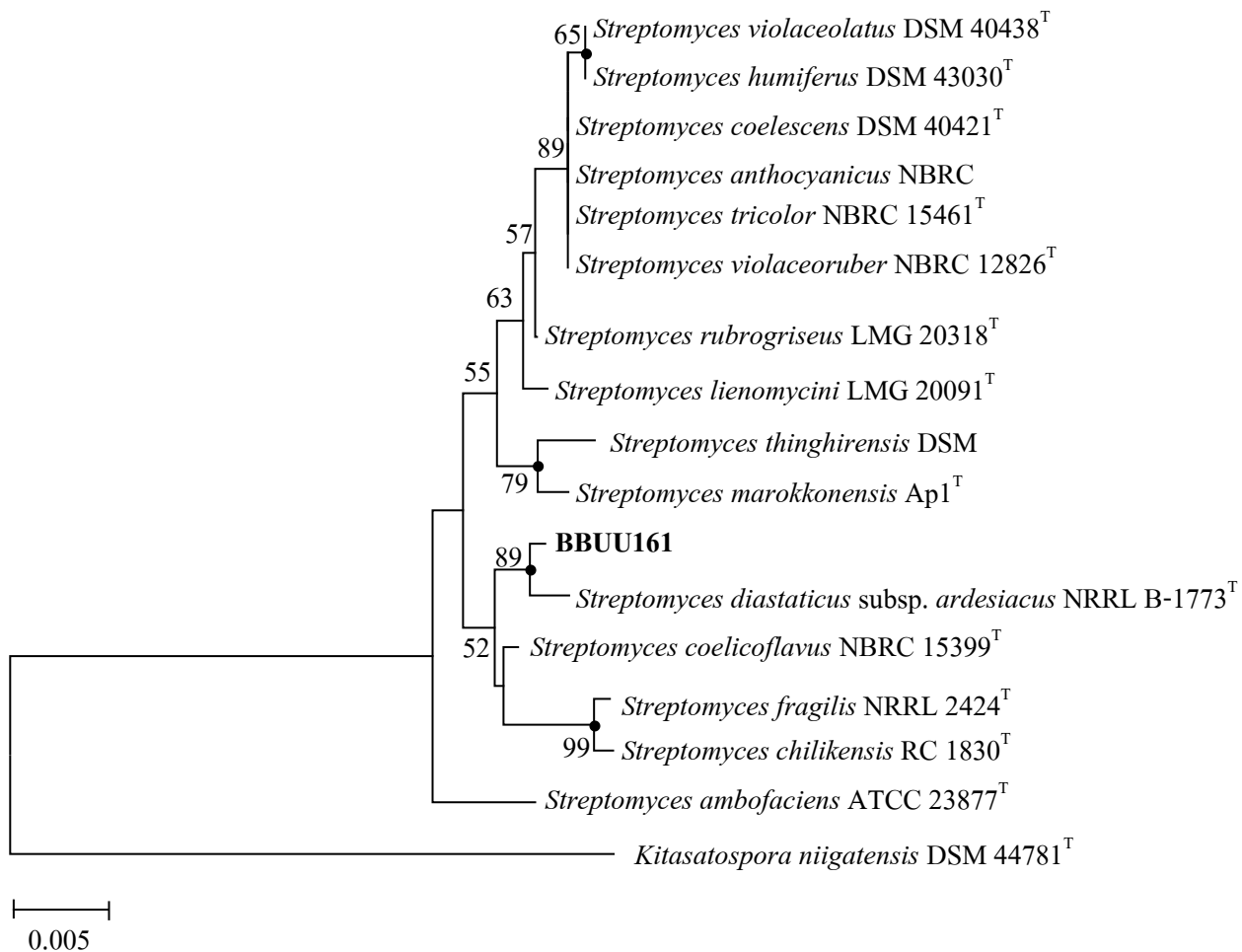
แอสกีโทไมซีตา	แบคทีเรีย	ค่าความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์	ค่าความเหมือน (%)	ลำดับฐานข้อมูล
BBUU144 (944 bp)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	3/944	99.68	AB184650
	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i>	5/944	99.47	DQ026631
	<i>Streptomyces fragilis</i>	6/941	99.36	AY999917
	<i>Streptomyces chilikensis</i>	8/941	99.15	JN050256
	<i>Streptomyces rubrogriseus</i>	10/941	98.94	AJ781373
	<i>Streptomyces tendae</i>	11/942	98.83	D63873
	<i>Streptomyces tritolerans</i>	11/942	98.83	DQ345779
	<i>Streptomyces violaceorubridus</i>	11/941	98.83	AJ781374
	<i>Streptomyces thinghirensis</i>	12/942	98.73	FM202482
	<i>Streptomyces althioiticus</i>	12/935	98.72	AY999791
	<i>Streptomyces matensis</i>	12/935	98.72	AB184221
	<i>Streptomyces eurythermus</i>	13/943	98.62	D63870
	<i>Streptomyces coelestis</i>	13/942	98.62	AF503496
	<i>Streptomyces marokkonensis</i>	13/942	98.62	AJ965470

ตารางที่ 22 (ต่อ)

แอดดีโนมียีสท์	แบคทีเรีย	ค่าความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์	ค่าความเหมือน (%)	ลำดับฐานข้อมูล
BBUU500 (1,440 bp)	<i>Streptomyces flavalbus</i>	18/1,394	98.71	KY328641
	<i>Streptomyces lannensis</i>	28/1,390	97.99	AB562508
	<i>Streptomyces lanatus</i>	29/1,392	97.92	AB184845
	<i>Streptomyces filipinensis</i>	30/1,392	97.84	AB184198
	<i>Streptomyces curacoi</i>	31/1,392	97.77	KQ948008
	<i>Streptomyces durhamensis</i>	31/1,392	97.77	JNXR01000068
	<i>Streptomyces panaciradicis</i>	31/1,392	97.77	KF971876
	<i>Streptomyces yaanensis</i>	32/1,392	97.70	JQ307192
	<i>Streptomyces actinomycinicus</i>	31/1,348	97.70	LC069046
	<i>Streptomyces gibvifuscus</i>	32/1,383	97.69	KM229362
	<i>Streptomyces sasae</i>	33/1,390	97.63	HQ267987
	<i>Streptomyces echinatus</i>	34/1,392	97.56	AB184126
	<i>Streptomyces xiangtanensis</i>	34/1,362	97.50	KX263683



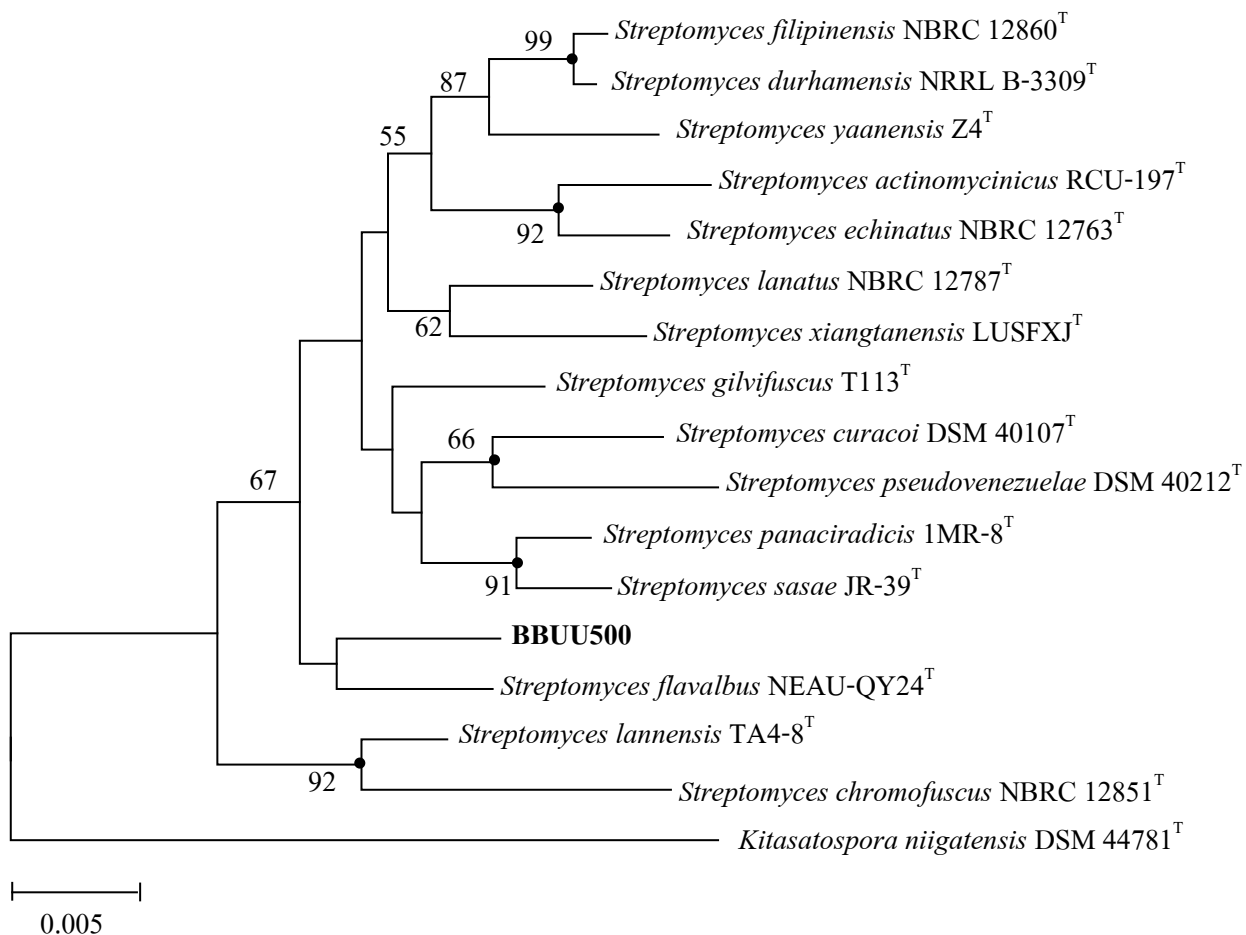
ภาพที่ 40 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Neighbor-Joining method ของแอกติโนมัยซีท BBUU144 กับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ และใช้ *Kitasatospora niigatensis* DSM 44781^T เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่นอกกลุ่ม (Outgroup) ใช้ค่า Bootstrap (%) 1,000 ครั้งระยะห่างของการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.005 สัญลักษณ์ • หมายถึง ตำแหน่งซ้ำกับ Maximum Likelihood method และ Maximum Parsimony method



ภาพที่ 41 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Neighbor-Joining method ของแอกติโนมัยซีท BBUU161 กับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ และใช้ *Kitasatospora niigatensis* DSM 44781^T เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่นอกกลุ่ม (Outgroup) ใช้ค่า Bootstrap (%) 1,000 ครั้ง ระยะห่างของการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.005 สัญลักษณ์ • หมายถึง ตำแหน่งซ้ำกับ Maximum Likelihood method และ Maximum Parsimony method

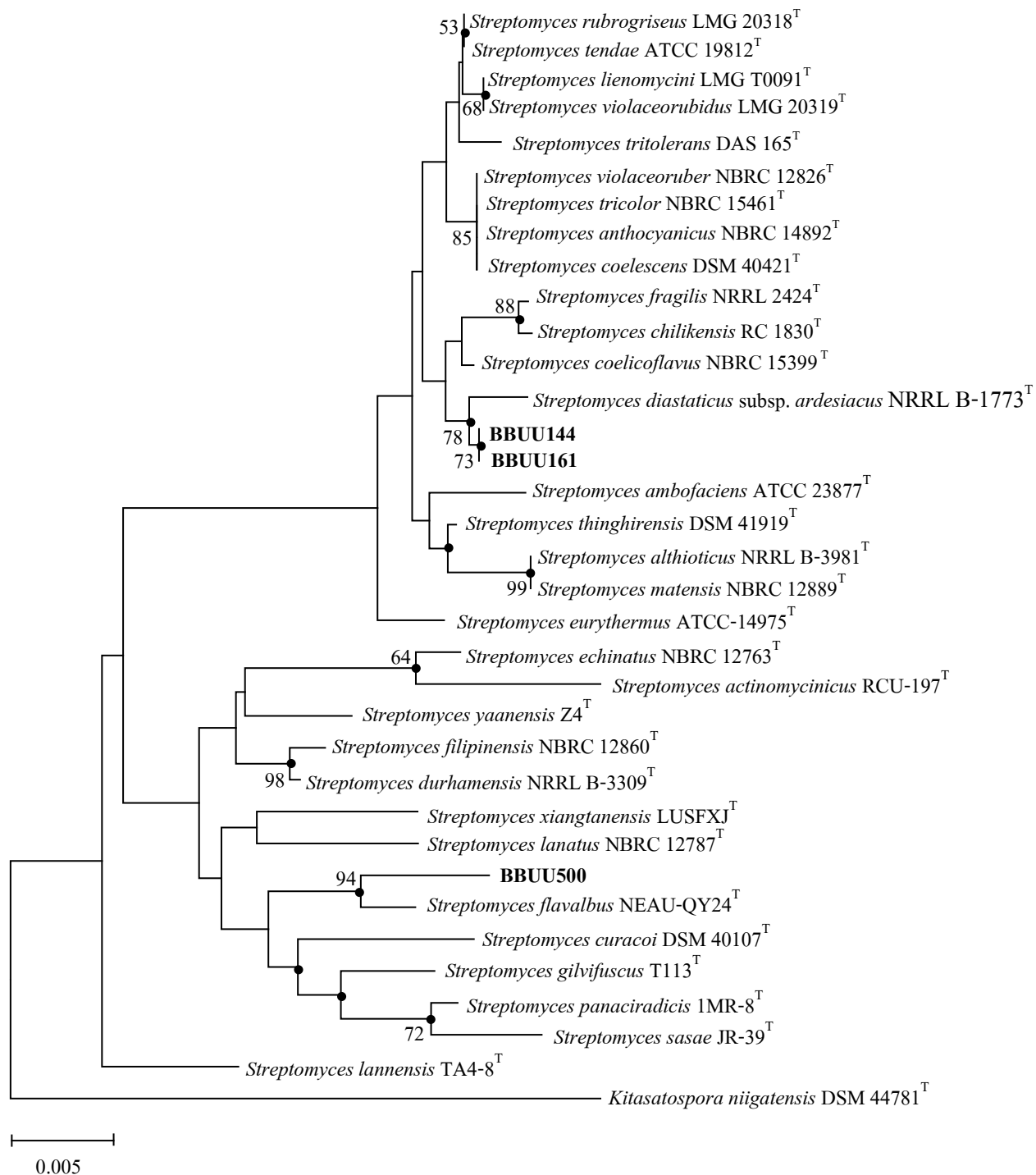


1054561741



ภาพที่ 42 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Neighbor-Joining method ของแอกติโนมัยซีท BBUU500 กับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ และใช้ *Kitasatospora niigatensis* DSM 44781^T เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่นอกกลุ่ม (Outgroup) ใช้ค่า Bootstrap (%) 1,000 ครั้ง ระยะห่างของการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.005 สัญลักษณ์ • หมายถึง ตำแหน่งซ้ำกับ Maximum Likelihood method และ Maximum Parsimony method





ภาพที่ 43 แผนภูมิมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Neighbor-Joining method ของแอกติโนมัยซีทากับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง



1054561741

BUU_1Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 แอคติโนมัยสีททั้งหมด 38 ไอโซเลตในโครงการวิจัยของ จันทรา อินทนนท์ ในปี พ.ศ. 2559 คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนจำนวน 30 ไอโซเลตและจากรากผักบุ้งทะเลจำนวน 8 ไอโซเลต ในปี พ.ศ. 2554 แอคติโนมัยสีททั้งหมดใช้รหัสเป็น BBUU (Biology-Burapha University) สำหรับการทำให้บริสุทธิ์พบว่า แอคติโนมัยสีทจำนวน 35 ไอโซเลตและแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เมื่อตรวจสอบการเป็นแบคทีเรียแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นด้วยการย้อมแกรมพบว่า ดิสคิม่วงของคริสตัลไวโอเลต ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ดิสคิม่วงของซาฟรานินเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

5.1.2 ตรวจสอบการฮอร์โมนพืช IAA แอคติโนมัยสีทสามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ จำนวน 27 ไอโซเลตพบว่า ไอโซเลต BBUU144 BBUU161 และ BBUU500 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 15.711, 3.094 และ 6.269 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 1.074 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

5.1.3 ตรวจสอบการมียีน *acdS* โดยใช้ชุด Degenerate primer ATT082F และ ATT082R ซึ่งออกแบบโดย Indananda (2013) พบว่า แอคติโนมัยสีทจำนวน 10 ไอโซเลตคือ BBUU105, BBUU114, BBUU118, BBUU134, BBUU144, BBUU145, BBUU157, BBUU168, BBUU179 และ BBUU187 สามารถเพิ่มปริมาณได้และเป็นแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ มีค่าความคล้ายคลึง 93-99% กับเอนไซม์ ACCD ที่พบในแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* ซึ่ง ไอโซเลต BBUU144 เพิ่มปริมาณยีนได้และเป็นแถบเดียวที่มีขนาด 648 นิวคลีโอไทด์ มีค่าความเหมือนสูงสุด 94% กับ *Streptomyces* sp. MBT28

5.1.4 ตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD ในอาหารที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียว

5.1.4.1 การคัดเลือกอาหารที่แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดี พบว่า ไอโซเลต BBUU144, BBUU161, BBUU500 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สามารถเจริญได้ดีมากบนอาหารแข็ง สูตร YD ระยะเวลา 7 วัน

5.1.4.2 ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD ในอาหารแข็งและอาหารเหลว Minimal medium (MM) ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียว พบว่า ไอโซเลต BBUU144, BBUU500, BBUU161 และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 เจริญเติบโตได้ในอาหารแข็ง 3 ชนิด คือ MM, MM ที่เติม 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ MM ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์ได้ เมื่อตรวจสอบการเจริญในอาหารเหลวโดยการหาน้ำหนักแห้ง พบว่าแอกติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลตเจริญเติบโตในอาหารทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่าแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484

5.1.4.3 ตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD ในอาหารเหลว MM ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่า ไอโซเลต BBUU144 สร้างเอนไซม์ ACCD สูงสุดคือ 103.000, 220.100 และ 407.500 nmol α -keto mg protein⁻¹ h⁻¹ ตามลำดับ

5.1.5 ตรวจสอบความสามารถในการทนเค็มเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-7% พบว่า ไอโซเลต BBUU144 และ BBUU161 ทนเค็มได้ 7% ไอโซเลต BBUU500 ทนเค็มได้ 6% และแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 ทนเค็มได้ 5%

5.1.6 ตรวจสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ในสภาวะที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ พบว่า ไอโซเลต BBUU500 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงคือ 7.966 และ 10.690 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงที่สุดคือ 17.182 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 400 มิลลิโมลาร์ สำหรับการเจริญเติบโตโดยการหาน้ำหนักแห้งพบว่า เมื่อระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ไอโซเลต BBUU144, BBUU161 และ BBUU500 สามารถเจริญเติบโตได้สูงขึ้น และที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์ ไอโซเลต BBUU144 สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุด ในขณะที่แบคทีเรีย *P. putida* ATCC มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 800 มิลลิโมลาร์และค่อย ๆ ลดลง เมื่อความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น

5.1.7 ผลการศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าวขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) พบว่า เมล็ดข้าวที่ถูกแช่ในสารละลายสปอร์ไอโซเลต BBUU500 มีอัตราการงอก เมล็ด ความยาวราก ความยาวลำต้น น้ำหนักสดลำต้น น้ำหนักของแห้งรากและลำต้นเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวที่ไม่ได้รับเชื้อ (ชุดควบคุม) ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์

5.1.8 การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทในระดับสกุล โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ไอโซเลต BBUU144 BBUU161 และ BBUU500 สามารถเจริญได้ดีและสร้างสปอร์ภายในเวลา 3 สัปดาห์บนอาหารแข็งสูตร ISP3 ลักษณะสปอร์เมื่อตรวจด้วยกล้อง SEM พบสปอร์เป็นสายยาวมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ๆ ขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร ผิวสปอร์เรียบ การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์จากลำดับดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ขนาด 944-1,440 นิวคลีโอไทด์ พบว่า BBUU144, BBUU161 และ BBUU500 มีวิวัฒนาการชาติพันธุ์ร่วมกับสมาชิกของแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces*

5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาต่อไปจะควรทำการจัดจำแนกไอโซเลตที่เหลือและนำทุกไอโซเลตตรวจสอบการเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์การเจริญเติบโตพืช รวมทั้งตรวจสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อที่จะให้ได้ผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไปในอนาคต



1054561741

ภาคผนวก



1054561741

BUU_Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาคผนวก ก

**การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมีหรือสารละลาย
และเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม**



1054561741

BUU_Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

1. สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Mannitol soya agar (MS)

Mannitol	20	กรัม
Soybean	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ โรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Nutrient agar (NA)

Nutrient agar	28	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ โรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 Yeast extract-Dextrose (YD)

Yeast extract	10	กรัม
D-glucose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ โรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 Yeast extract-dextrose agar (YD)

Yeast extract	10	กรัม
D-glucose	10	กรัม

Agar	20.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่ง
ฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ โรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศา
เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 Tryptone yeast extract broth (ISP1)

Casein enzymic hydrolysate	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Agar	20	กรัม
pH (25 องศาเซลเซียส)	7.0±0.2	
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่ง
ฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ โรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศา
เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.6 Yeast malt agar (ISP2)

Peptic digest of animal tissue	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Agar	20	กรัม
pH (25 องศาเซลเซียส)	6.2±0.2	
น้ำกลั่น	490	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 490 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่ง
ฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ โรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศา
เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.7 Oatmeal agar (ISP3)

Oat Meal	20	กรัม
Agar	18	กรัม
Trace salts solution	1	มิลลิลิตร
Ferric sulphate heptahydrate	0.001	กรัม
Manganese chloride tetrahydrate	0.001	กรัม
Zinc sulphate heptahydrate	0.001	กรัม
pH (25 องศาเซลเซียส)	7.3±0.2	
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.8 Inorganic salt starch agar (ISP4)

Agar	20	กรัม
Soluble starch	10	กรัม
Calcium carbonate	2	กรัม
Ammonium molybdate	2	กรัม
Di-potassium phosphate	1	กรัม
Magnesium sulphate	1	กรัม
Sodium chloride	1	กรัม
Ferrous sulphate	0.001	กรัม
Manganous chloride	0.001	กรัม
Zinc sulphate	0.001	กรัม
pH (25 องศาเซลเซียส)	7.2±0.2	
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.9 Glycerol asparagine agar (ISP5)

Agar	20	กรัม
L- asparagine	1	กรัม
Di-potassium phosphate	1	กรัม
Ferric sulphate heptahydrate	0.001	กรัม
Magnesium chloride heptahydrate	0.001	กรัม
Zinc sulphate heptahydrate	0.001	กรัม
Trace salt soln. (ml)	1	กรัม
pH (25 องศาเซลเซียส)	7.4±0.2	
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดคือน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดและเติม Glycerol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.10 Peptone yeast extract iron agar (ISP6)

Agar	15	กรัม
Sodium thiosulphate	0.08	กรัม
Dipotassium phosphate	1	กรัม
Ferric ามิลลิโมลาร์อนิอุม citrate	0.05	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Proteose peptone	5	กรัม
Peptic digest of animal tissue	15	กรัม
pH (25 องศาเซลเซียส)	6.7±0.2	
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดคือน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.11 Tyrosine agar (ISP7)

Agar	20	กรัม
Trace salt solution (ml)	1	กรัม
Sodium chloride	0.5	กรัม
Magnesium sulphate 7H ₂ O	0.5	กรัม
Dipotassium phosphate	0.5	กรัม
L-Tyrosine	0.5	กรัม
L-Asparagine	1	กรัม
Sodium tartarate	1.77	มิลลิกรัม
Manganese chloride 4H ₂ O	1.80	มิลลิกรัม
Boric acid	2.85	มิลลิกรัม
Zinc chloride	0.02	มิลลิกรัม
Sodium molybclate 2H ₂ O	0.025	มิลลิกรัม
Cobalt chloride 6H ₂ O	0.04	มิลลิกรัม
Copper chloride 2H ₂ O	0.027	มิลลิกรัม
Ferrous sulphate 7H ₂ O	1.36	มิลลิกรัม
pH (25 องศาเซลเซียส)	7.3±0.1	
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดและเติม

Glycerol ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.12 Carbon utilization ager (ISP9)

Agar	15	กรัม
Dipotassium phosphate	5.65	กรัม
Monopotassium phosphate	2.38	กรัม
Amิลลิ โมลาร์ onium sulphate	2.64	กรัม
Magnesium phosphate	1	กรัม
Manganese chloride	0.0079	กรัม

Copper sulphate	0.0064	กรัม
Zinc sulphate	0.0015	กรัม
Ferrous sulphate	0.0011	กรัม
pH (25°C)	7.0±0.2	
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.13 Minimal medium

K_2HPO_4	0.50	กรัม
$MgSO_4 \cdot 6H_2O$	0.20	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.14 Minimal medium agar

K_2HPO_4	0.50	กรัม
$MgSO_4 \cdot 6H_2O$	0.20	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
Agar	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผสมส่วนทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมสารเคมีและสารละลาย

2.1 Stock tryptophan 10 mg/ml

L-tryptophan	0.10	กรัม
--------------	------	------

ชั่ง L-tryptophan 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองด้วยฟیلเตอร์ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

2.2 เตรียม Salkowski's reagent

FeCl ₃	3.60	กรัม
7.9 M H ₂ SO ₄	130	มิลลิลิตร
ปริมาตรที่ต้องการเตรียม	300	มิลลิลิตร

นำ FeCl₃ 3.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 170 มิลลิลิตรจากนั้นค่อย ๆ เติม 7.9 M H₂SO₄ ปริมาตร 130 มิลลิลิตร ลงไปช้า ๆ จะได้ปริมาตรทั้งหมด 300 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ขวดสีชา

2.4 เตรียม Stock ความเข้มข้นเกลือ 1 M

ชั่ง NaCl 5.8 กรัม ละลายในอาหารเหลว YD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.5 เตรียมความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (800, 600, 400, 200 และ 0 มิลลิโมลาร์)

โดยเจือจางจาก Stock

ความเข้มข้นเกลือ	1,000	มิลลิโมลาร์
ความเข้มข้นเกลือเริ่มต้น	1,000	มิลลิโมลาร์
ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ	800	มิลลิโมลาร์
ปริมาตรที่ต้องการเตรียม	10	มิลลิลิตร

สูตรเคมีในการคำนวณ

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$1,000 \text{ mM} \times V_1 = 800 \text{ mM} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{800 \text{ mM} \times 10 \text{ ml}}{1,000 \text{ ml}}$$

$$1,000 \text{ ml}$$

$$V_1 = 8 \text{ ml}$$

เปิดความเข้มข้นเกลือจาก Stock 1,000 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ปรับ ปริมาตรด้วยอาหารเหลว YD ให้เท่ากับ 10 ml (การเตรียมความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 600, 400, 200 และ 0 มิลลิโมลาร์ จำนวนดังเช่นสูตรเคมีข้างต้น)

2.6 เตรียม Stock ACC

ต้องการความเข้มข้น	0.30	โมล
ชั่ง ACC 0.09 กรัม ละลายในน้ำกลั่น	3	มิลลิลิตร

2.7 เตรียม Stock $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้นเกลือ 1 M

ต้องการความเข้มข้น	1	โมล
ชั่ง $(NH_4)_2SO_4$ 13.214 กรัม ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

2.8 เตรียม 0.1% (w/v) 2,4-Dinitro-phenylhydrazine (เตรียมใน 2 M HCl)

ชั่ง 2,4-Dinitro-phenylhydrazine 0.2 กรัม ละลายใน 2 M HCl ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

2.9 เตรียม 2 M HCl

เตรียม 2 M HCl จาก Conc HCl ปริมาตร 500 mL

ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc HCl) = 12 โมล

เติม Conc HCl 83.333 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มี น้ำกลั่นอยู่ในขวดแล้วครึ่งขวด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2.10 เตรียม 0.56 M HCl

เตรียม 0.56 M HCl จาก Conc HCl ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc HCl) = 12 โมล

เติม Conc HCl 23.333 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มี น้ำกลั่นอยู่ในขวดแล้วครึ่งขวด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3. เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

3.1.1 นำเซลล์แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลวสูตร YD ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทอาหารทิ้ง

3.1.2 ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำกลั่นทิ้งโดยทำการล้างเซลล์ซ้ำ 2 รอบเพื่อให้ได้เซลล์ที่สะอาด

3.1.3 เซลล์ที่ล้างแล้วถูกนำมาบดเซลล์ด้วยไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen) ในโกร่งที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นดูดเซลล์ที่บดละเอียดใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.1.4 เติม Lysis buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อบ่มเซลล์และทำให้เซลล์แตก โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำลาย RNA ด้วยการเติม RNase-A บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.1.5 เติม 2% SDS ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน

3.1.6 เติม Phenol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อย่อยสลายโปรตีน นำไปเขย่าบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาทีแล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3.1.7 ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 3M NaCH₃COOH 0.1 เท่าของปริมาตรดีเอ็นเอและเติม Isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรดีเอ็นเอที่ได้ ทำการกลับหลอดเบา ๆ เพื่อให้สารละลายผสมกัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

3.1.8 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

3.1.9 ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสตามวิธีข้อ 3.3

3.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้ชุดสำเร็จ TIANamp Genomic DNA Kit

3.2.1 นำเซลล์แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลวสูตร YD ปริมาณ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทอาหารทิ้ง

3.2.2 ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรนำไปเข้าบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำกลั่นทิ้งโดยทำการล้างเซลล์ซ้ำ 2 รอบเพื่อให้ได้เซลล์ที่สะอาด

3.2.3 เติม Buffer GA ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

3.2.4 เติม RNase ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำไปเข้าบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาทีแล้วนำไปปั่นบนเครื่องเขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.5 เติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปเข้าบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาทีแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง

3.2.6 เติม Buffer GB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเข้าบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาทีแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.2.7 เติม Ab EtOH ปริมาตร 200 μ l นำไปเข้าบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาที

3.2.8 ย้ายสารละลายจากข้อ 3.2.7 ลงใน Spin Columns CB3 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีแล้วเทสารละลายใน Collection tube ทิ้ง

3.2.9 เติม Buffer GD ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน Spin Columns CB3 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีแล้วเทสารละลายใน Collection tube ทิ้ง

3.2.10 เติม Buffer PW ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน Spin Columns CB3 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีแล้วเทสารละลายใน Collection tube ทิ้ง (ทำซ้ำ 2 รอบ)

3.2.11 ย้ายส่วนของ Spin Columns CP3 ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Buffer TE ปริมาตร 25 ไมโครลิตรปั่นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีจึง

นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาทีจะได้ ส่วนใสที่ถูกรองแล้วในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์

3.2.12 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีข้อ 3.3

3.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.3.1 เตรียมถาดรองเจลวางบนพื้นเรียบ

3.3.2 ชั่งผงอะกาโรสจำนวน 0.4 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ เติม Electrophoresis buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.3.3 ปิดขวดรูปชมพู่ ด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์พร้อมเจาะรู ทำให้อะกาโรสละลาย ในไมโครเวฟ แล้วนำออกมาวางทิ้งไว้ให้อุณหภูมิตกลงถึงประมาณ 60-55 องศาเซลเซียส

3.3.4 เทอะกาโรสลงในถาดรองเจลที่เตรียมไว้ พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ วางหวี ลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดรองเจล ให้ซี่ของหวีอยู่ห่างจากปลายของเจลประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นรอให้เจลแข็งตัว

3.3.5 หลังจากเจลแข็งตัว นำถาดไปวางใน Electrophoresis chamber เทปฟเฟอร์ (0.5 TAE) ลงไปจนท่วมเจล ให้บัฟเฟอร์ท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 3 มิลลิเมตรแล้วค่อย ๆ ดึงหวีออก

3.3.6 ผสม DNA sample หรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ 6X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อปริมาตร 3 ไมโครลิตร หยอด ตัวอย่างใส่ในช่องที่ 2 ของเจลเป็นต้นไป โดยใช้ไมโครปิเปต (ช่องแรกใส่ DNA marker)

3.3.7 เมื่อหยอดตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ปิดฝา Electrophoresis chamber แล้วต่อ ขั้วไฟฟ้าเข้ากับ Power supply ตั้ง Voltage mini-gel ที่ 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อ Bromphenol blue เคลื่อนที่ไปได้ประมาณ 80% ของความยาวเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

3.3.8 ย้อมเจลด้วย Ethidium bromide (EtBr) 10 นาที

3.3.9 ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำเปล่า 2-3 ครั้ง แล้วจึงนำไปเข้าเครื่อง UV Transilluminator

3.3.10 แล้วตรวจผลการสกัดดีเอ็นเอและผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บันทึกภาพด้วยกล้อง ดิจิตอล

3.4 การเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยชุด *TIANamp Genomic DNA Kit (TIANGEN)*

3.4.1 นำดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดใส่ลงใน Spin Columns CP3 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน Collection tube ที่

3.4.2 เติม Buffer GD ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน Collection tube ที่

3.4.3 ล้าง Spin Columns CP3 โดยเติม Buffer PW ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายที่ไหลผ่าน Collection tube ที่ (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

3.4.4 ย้ายส่วนของ Spin Columns CP3 ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร 3.4.5 เติม Buffer TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยเติมให้ตรงกับแผ่นกรองใน Spin Columns CP3 เพื่อชะดีเอ็นเอที่ติดอยู่ตรงแผ่นกรอง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

3.4.6 นำหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ที่มี Spin Columns CP3 ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้ส่วนใสที่ถูกกรองแล้วในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์

3.4.7 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีข้อ 3.3

3.5 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *acdS* ด้วยวิธีการทำ PCR

การเพิ่มปริมาณของยีน โดยใช้คู่ไพรมอร์ Degenerate Primer ATT082F และ ATT082R ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ของยีน *acdS* โดยเตรียมส่วนผสมสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด (ตารางที่ 1) ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน คูดใส่ลงใน PCR microtube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ตามด้วย DNA template 2 ไมโครลิตรใส่ PCR microtube ลงในเครื่อง Thermal cycle ตั้งโปรแกรมปฏิกิริยา PCR โดยใช้ปฏิกิริยาและอุณหภูมิตามตารางที่ 2 ปรับตามวิธีการของ Indananda (2010) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสตามวิธีข้อ 3.3

ตารางที่ 1 สารละลายที่ใช้เป็นองค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR

สารละลาย	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.1
Dream Taq Buffer	2.6
DMSO	2.0
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	0.4
Primer-F	0.5
Primer-R	0.5
DNA	2.0
Sterile H ₂ O (DW)	23.0
Total	20

- “หมายเหตุ” 1. *Taq* DNA polymerase ใส่เป็นลำดับสุดท้าย
 2. การหาปริมาตรน้ำ (DW) นำปริมาตรสารทั้งหมด - ปริมาตรสารที่คำนวณไว้
 (ไม่มีปริมาตรน้ำ)

ตารางที่ 2 ปฏิกริยา PCR ในแต่ละรอบ

ขั้นตอนปฏิกริยา PCR	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	
Pre-denaturation	94	180	
Denaturation	94	30	} จำนวน 30 รอบ
Annealing	55	30	
Extension	72	90	
Final-extension	72	240	

3.6 การเตรียมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์จากเจลโดยชุด *TIANGel Midi*

DNA Purification Kit

3.6.1 ตัดเจลบริเวณที่มีแถบพีซีอาร์ขนาดที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.6.2 เติม Buffer PN ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อน้ำหนักอะกาโรสเจล 0.1 กรัม

3.6.3 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าอะกาโรสเจลละลายผสมกับ Buffer PN เป็นเนื้อเดียวกัน

3.6.4 เตรียม Spin Column CA2 ด้วยการเติม Buffer BL ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีแล้วเทสารละลายใน Collection tube ที่ตั้ง

3.6.5 คูดสารละลายจากข้อ 3.6.3 ใส่ลงใน Spin Column CA2 แล้วตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน Collection tube ที่ตั้ง

3.6.6 ล้าง Spin Column CA2 โดยเติม Buffer PW ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไป ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ไหลผ่าน Collection tube ที่ตั้ง (ทำซ้ำ 2 รอบ)

3.6.7 ย้ายส่วนของ Spin Column CA2 ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.6.8 เติม Buffer EB ปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยเติมให้ตรงกับแผ่นกรองใน Column เพื่อชะผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ติดอยู่ตรงแผ่นกรอง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที

3.6.9 นำหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ที่มี Spin Column CA2 ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้ส่วนใสที่ถูกกรองในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร

3.6.10 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่บริสุทธิ์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีข้อ 3.3

ภาคผนวก ข

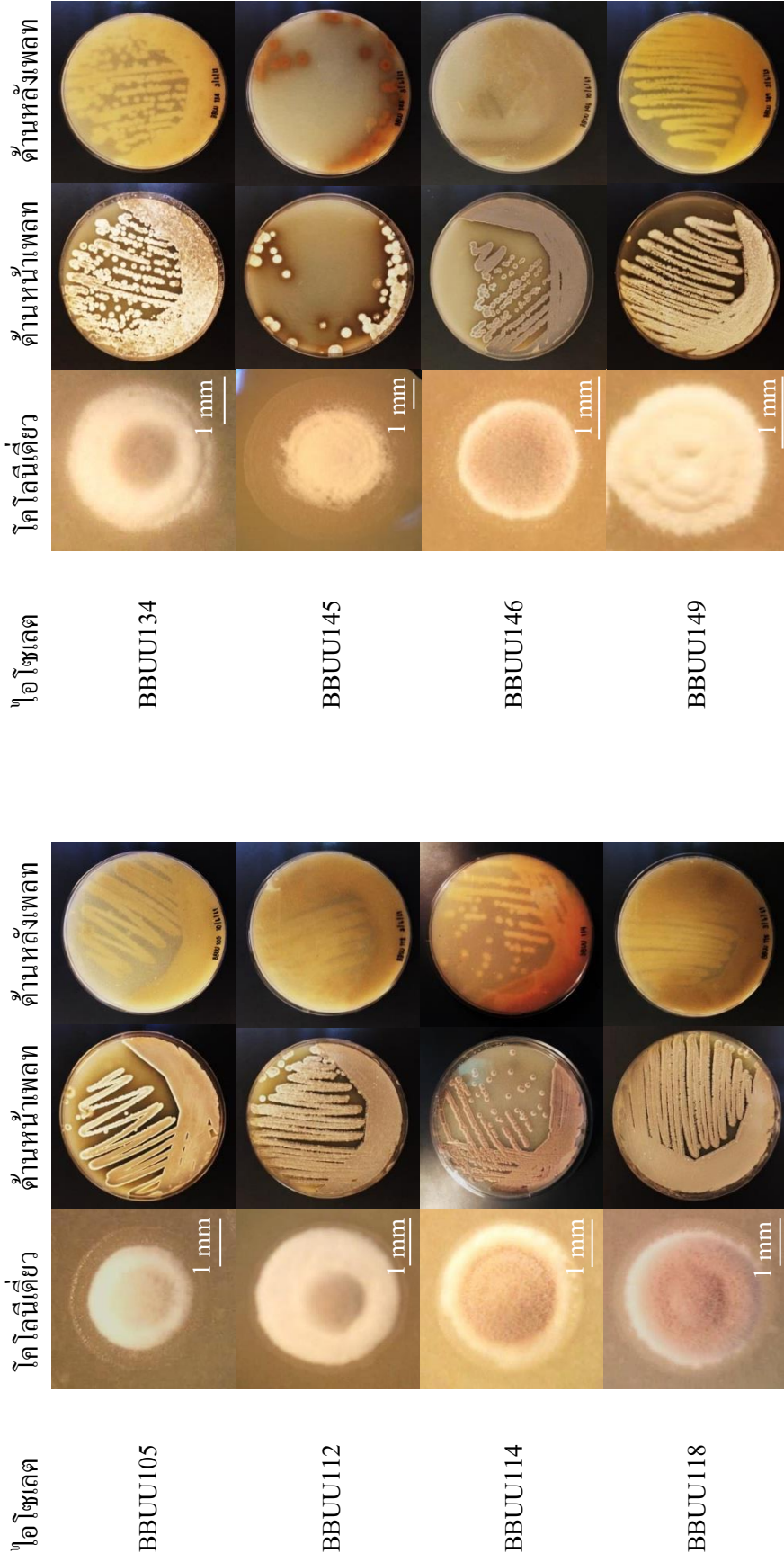
**ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร MS
และการย้อมแกรมแบคทีเรีย**



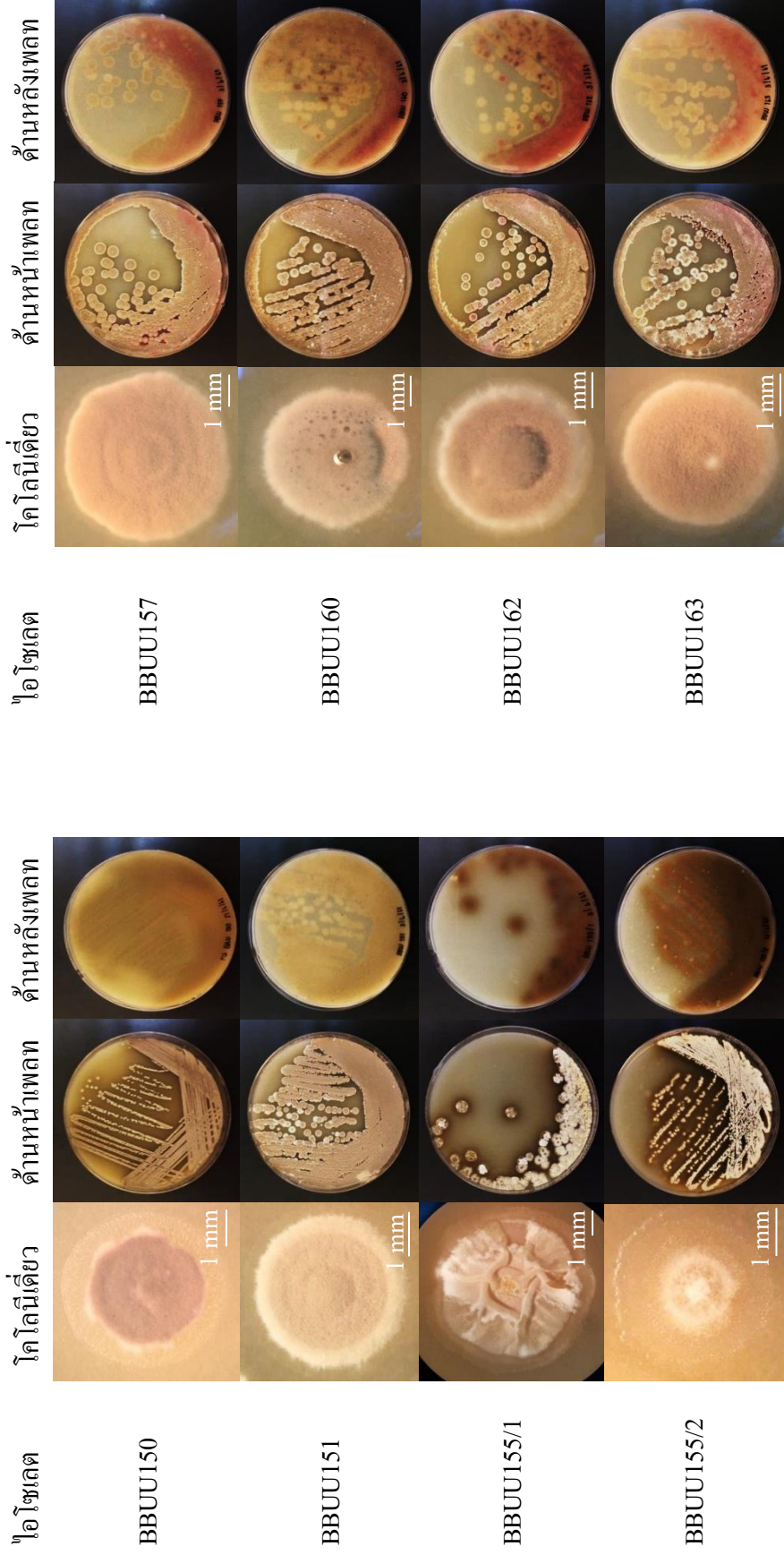
1054561741

BUU_Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

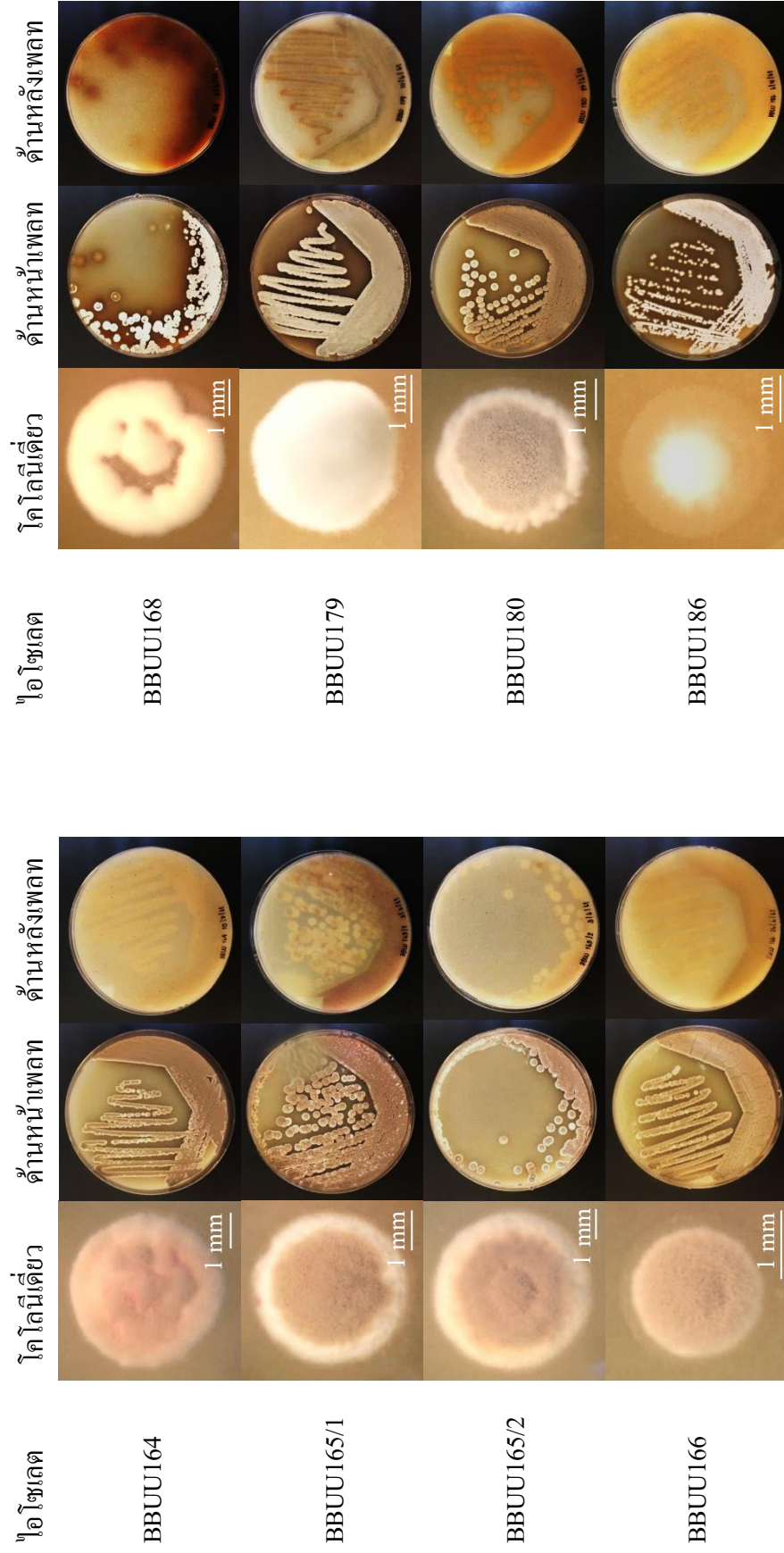
ภาพภาคผนวก ข-1 ลักษณะทางถิ่นฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีตบนอาหารแข็งสูตร MS อายุ 7 วัน



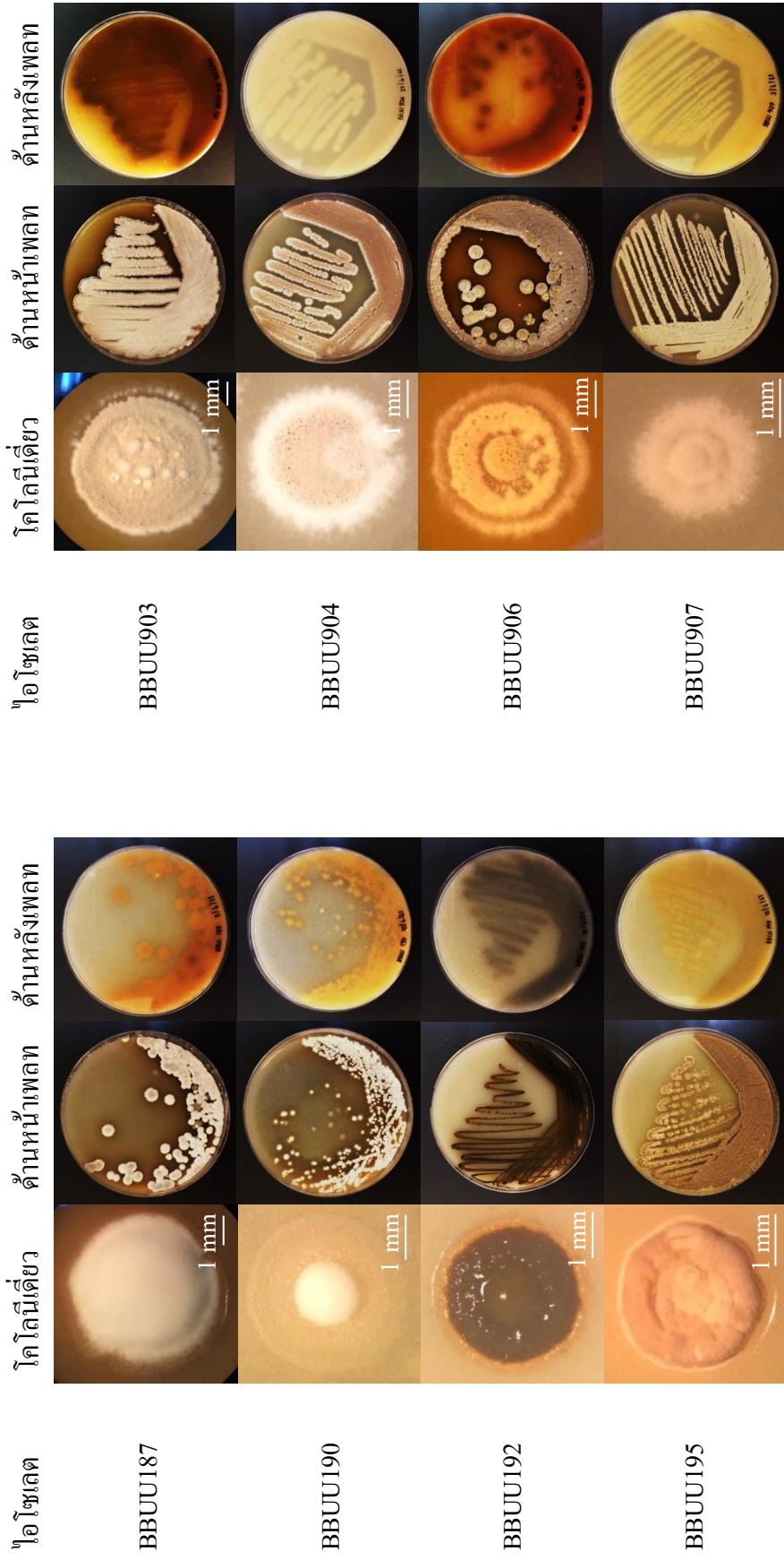
ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)



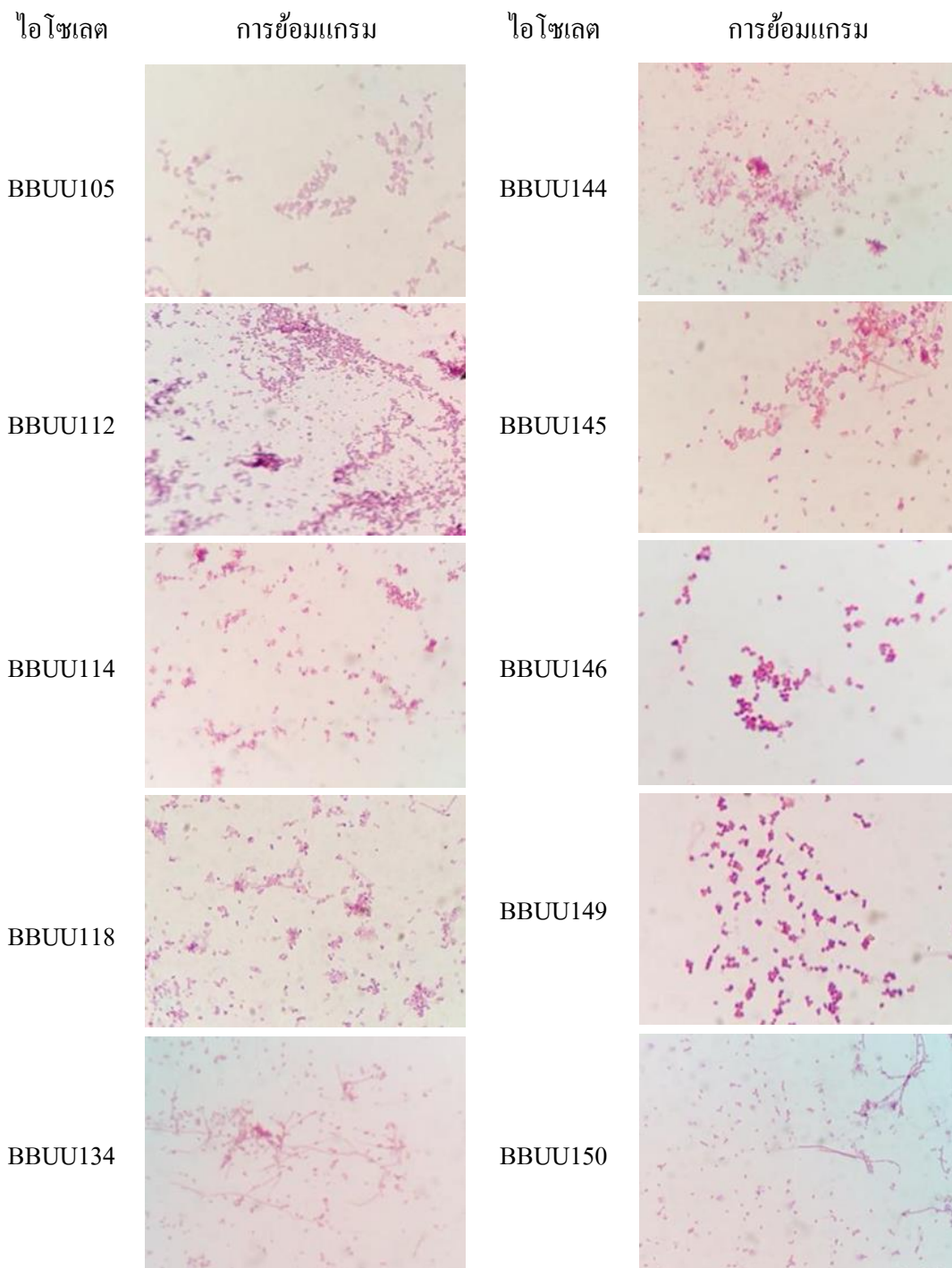
ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)



ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)



ภาพภาคผนวก ข-2 การย้อมแกรม (Gram staining) กำลังขยาย 100 เท่า



1054561741

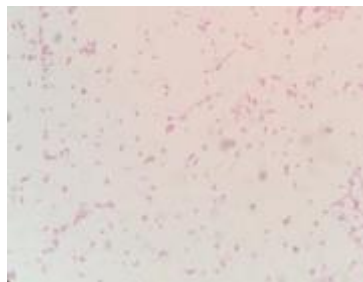
BUU_1Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

ไอโซเลต

การย้อมแกรม

BBUU151



BBUU155/1



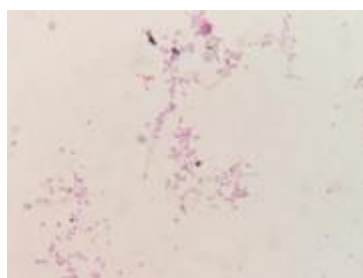
BBUU155/2



BBUU157



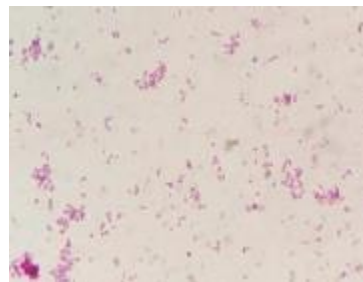
BBUU160



ไอโซเลต

การย้อมแกรม

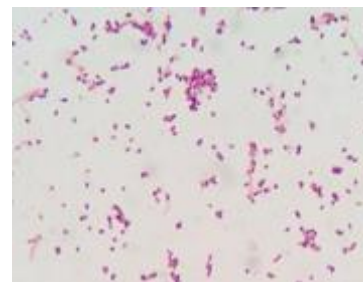
BBUU161



BBUU162



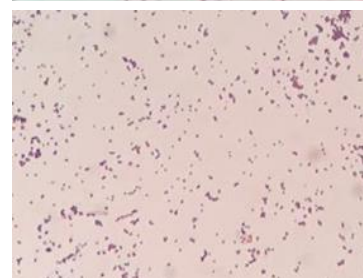
BBUU163



BBUU164






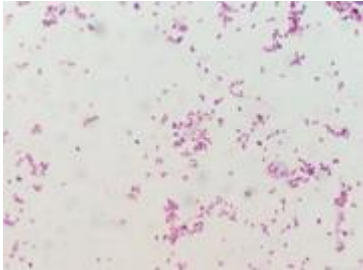
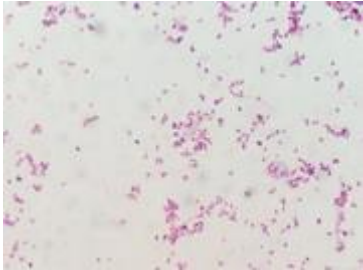
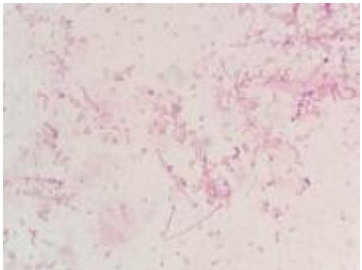
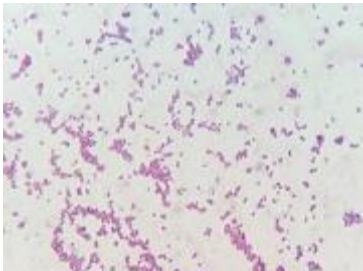
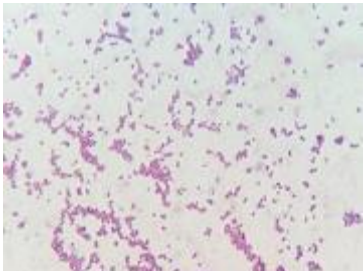
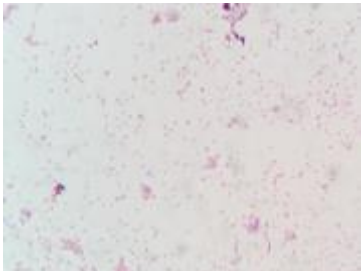
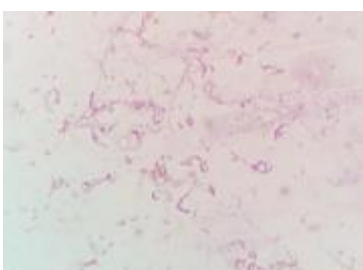
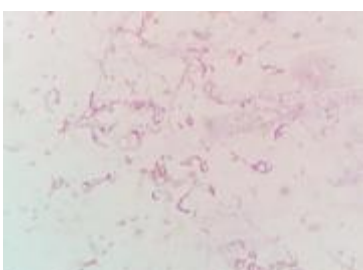

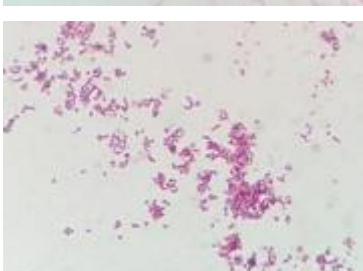
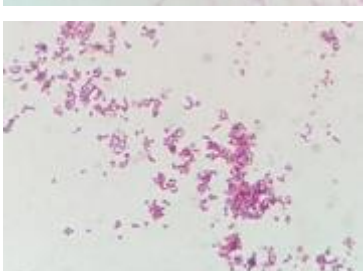

BBUU165/1



1054561741

BUU_1Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพภาคผนวก ข-2 (ต่อ)


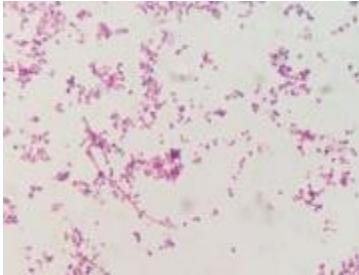
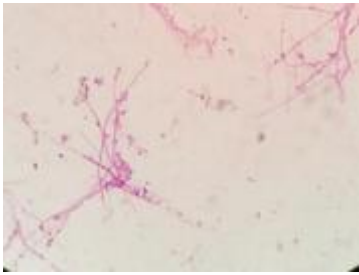
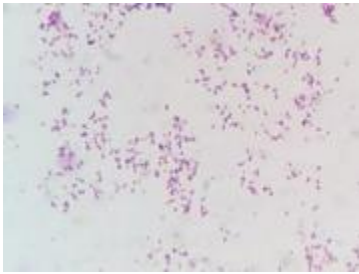
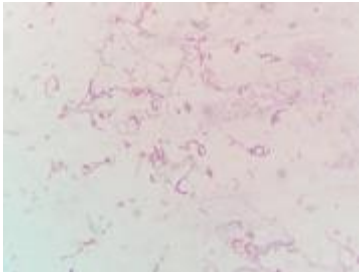
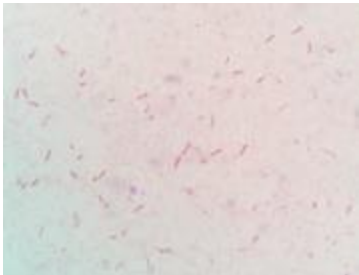
	ไอโซเลต	การย้อมแกรม	ไอโซเลต	การย้อมแกรม
BBUU165/2			BBUU186	
BBUU166			BBUU187	
BBUU168			BBUU190	
BBUU179			BBUU192	
BBUU180			BBUU195	



1054561741

BUU_1Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

ไอโซเลต	การย้อมแกรม	ไอโซเลต	การย้อมแกรม
BBUU500		BBUU906	
BBUU903		BBUU907	
BBUU904		แบคทีเรีย <i>P. putida</i> ATCC 17484	

ภาคผนวก ค

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็งสูตร YD

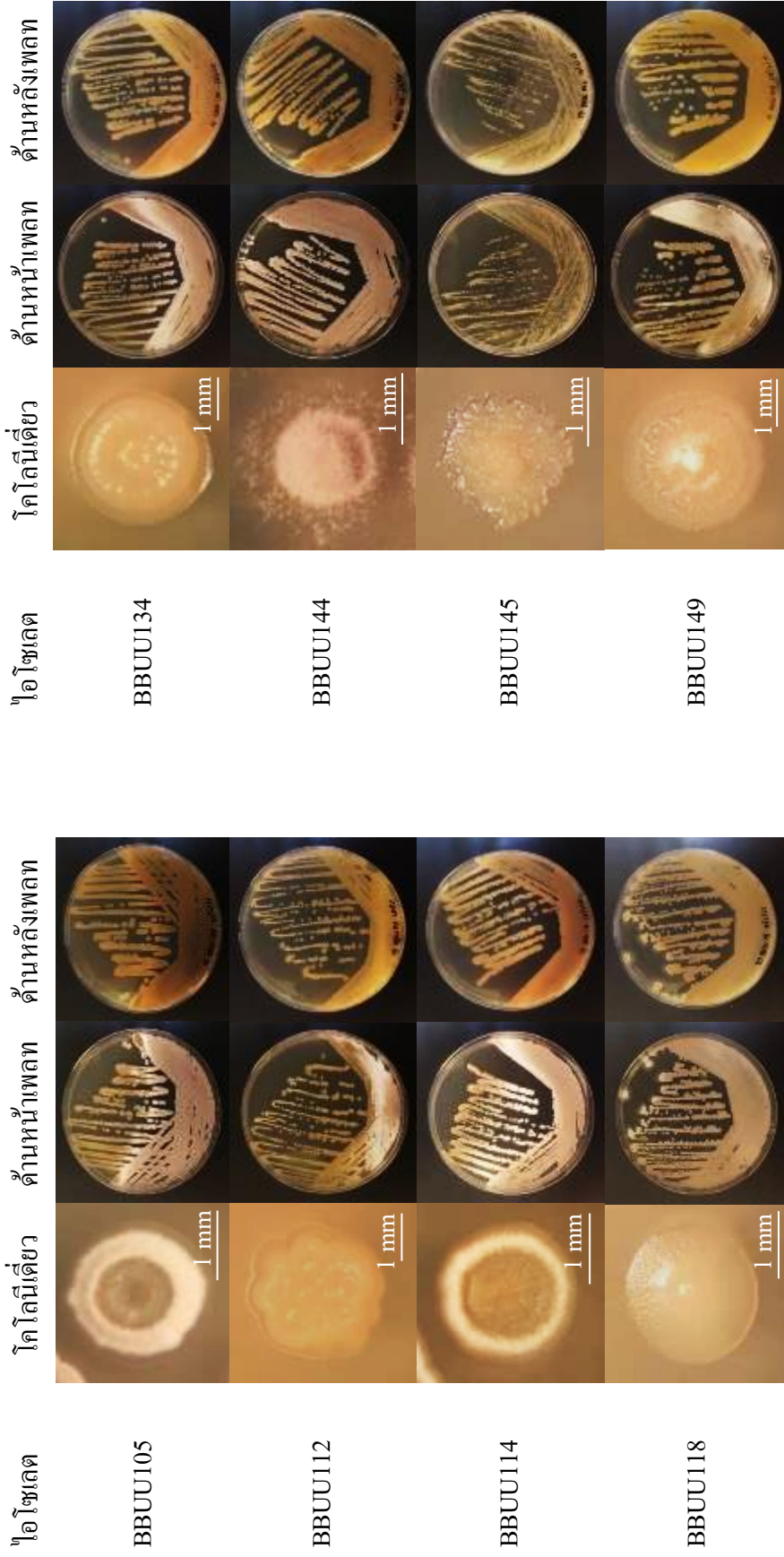
และกราฟมาตรฐานของ IAA



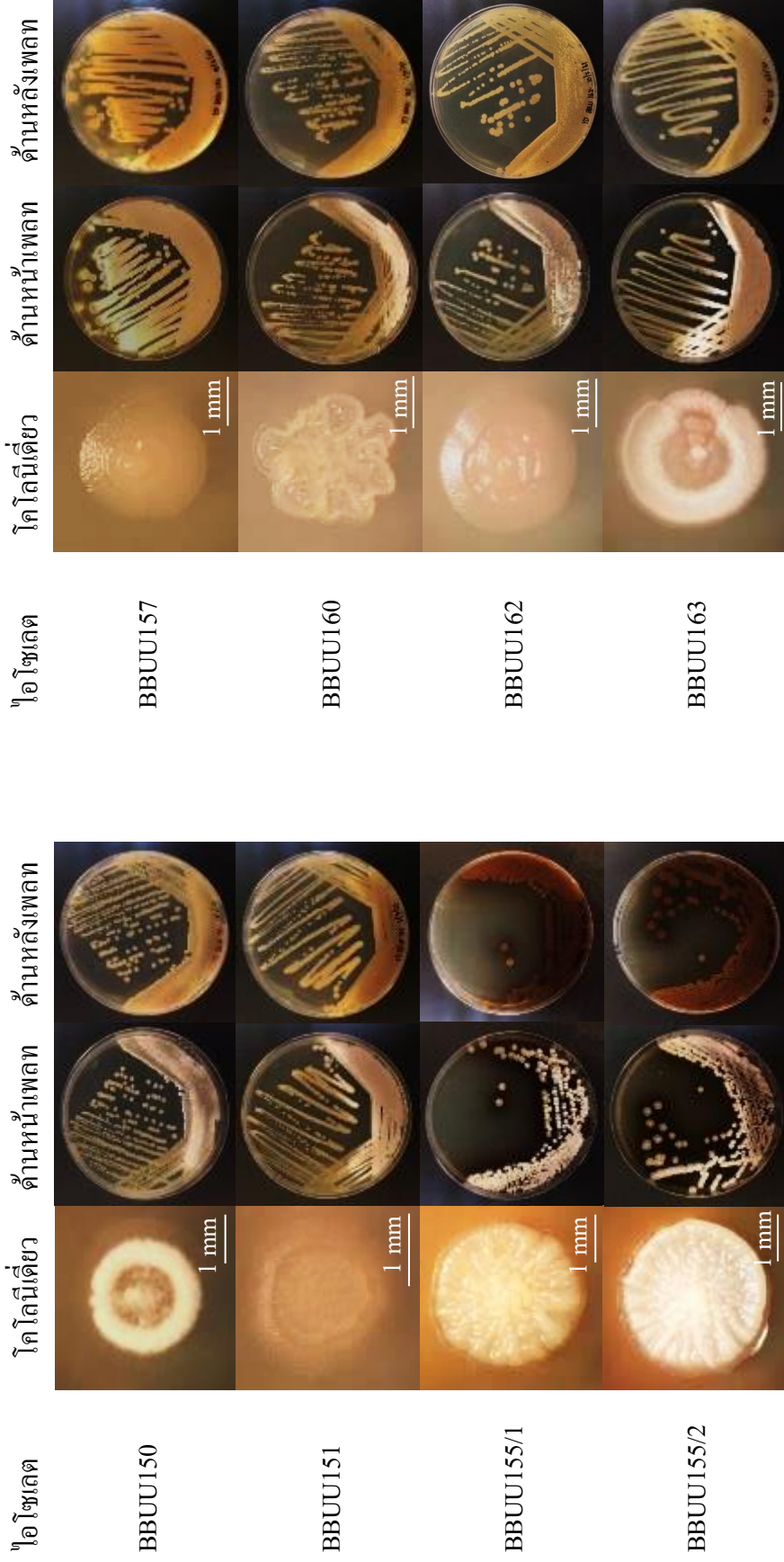
1054561741

BUU_Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพภาคผนวก ค-1 ลักษณะทางถิ่นฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีตบนอาหารแข็งสูตร YD อายุ 7 วัน



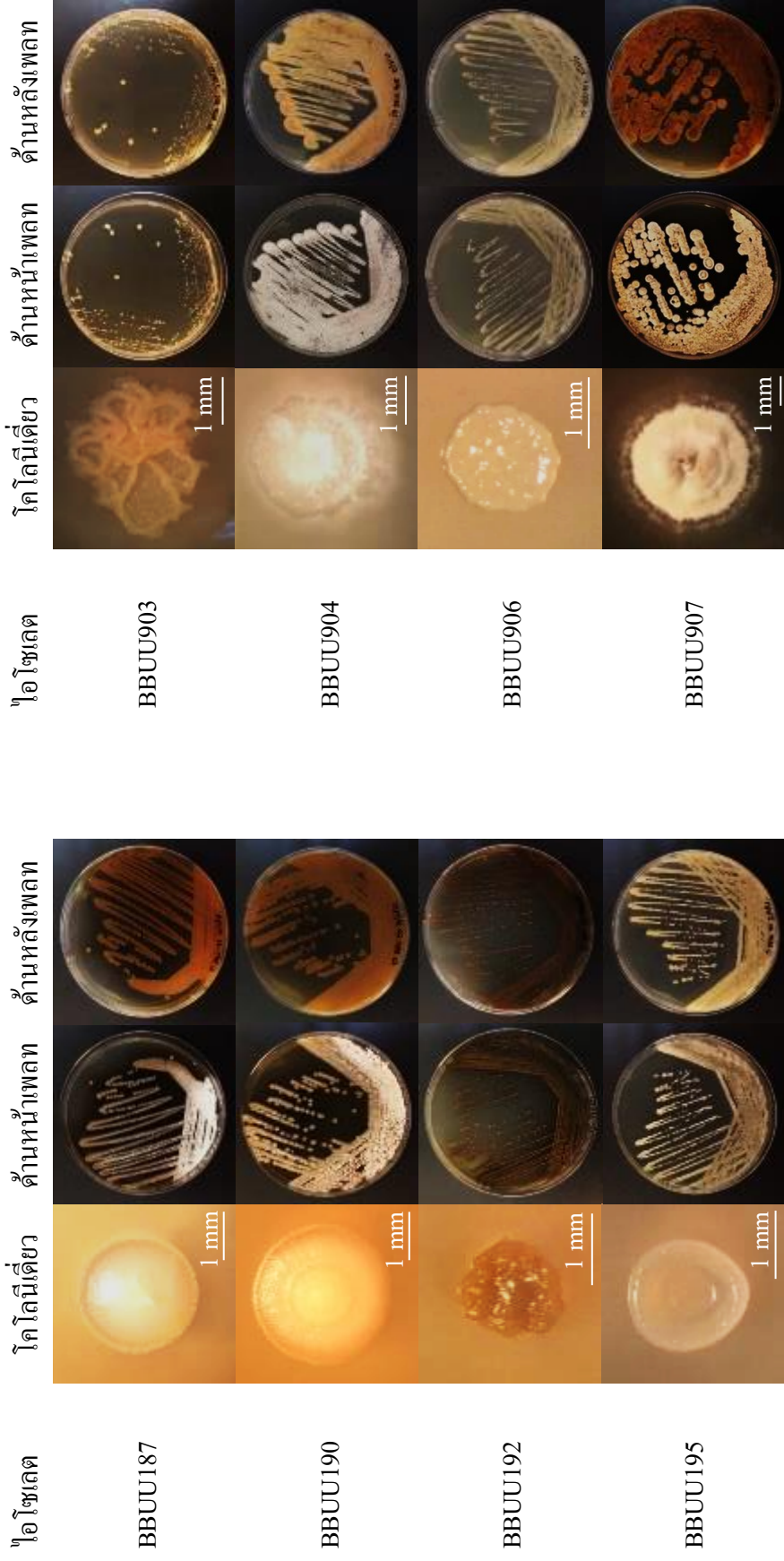
ภาพภาคผนวก ค-1 (ต่อ)



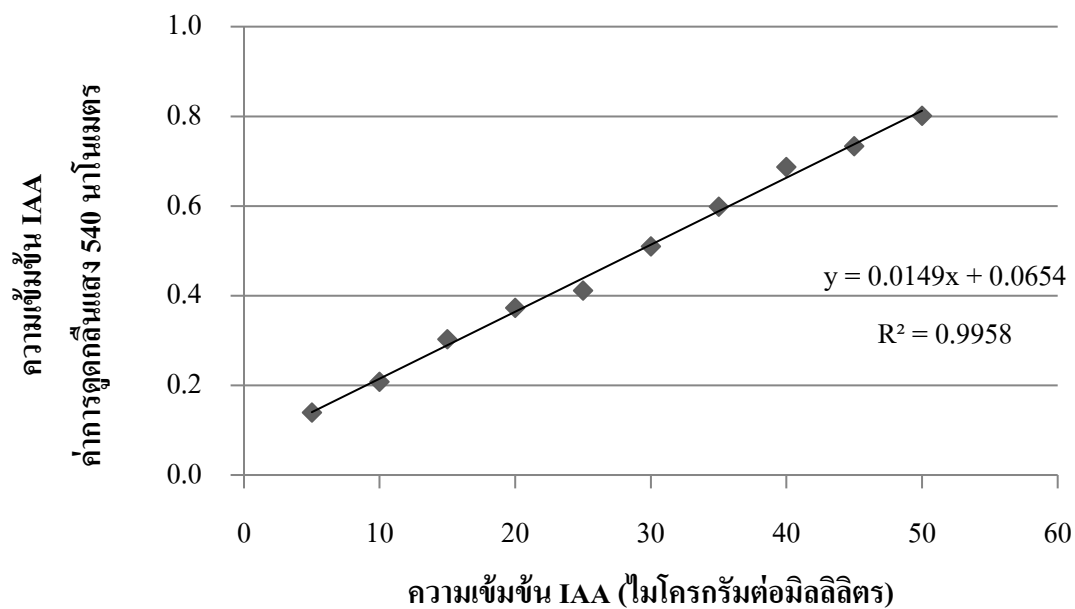
ภาพภาคผนวก ค-1 (ต่อ)



ภาพภาคผนวก ค-1 (ต่อ)



ภาพภาคผนวก ค-2 กราฟมาตรฐานของ IAA ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้น 5 ถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาคผนวก ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *acdS*, ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *acdS* ที่แปลงเป็นกรดอะมิโน, แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแอกติโนมัยีสิต, ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ของแบคทีเรีย, ข้อมูลการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว Minimal medium ทั้ง 3 ชนิด, กิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD และกราฟมาตรฐานของ α -ketobutyrate



1054561741

BUU_1Thesis_59910007_thesis / recv : 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพภาคผนวก ง-1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *acdS* ของแอกติโนมัยสีท

1. ไอโซเลต BBUU105

1 GCGGGGGGGC GTTCGGCGGC GCGGGCTGCG CTGCGTGCTG GTGCAGGAGA
 51 GCTGGGTGGA CTGGCCCGAC GCCGTGTACG ACAAGGTCGG CAACATCCTG
 101 GTCTCCCGGC TCGCCGGGGC CGACGTGCGG CTGGTGAGGG CCGGGTTCGG
 151 GATCGGCTTC AAGGAGAGCT GGGAACAGGC CCTCAAGGAG GTCGAGGACG
 201 CGGGAGGCAA GCCGTACGCC ATCCCCGCCG GCGCCTCCGA CCATCCGCTC
 251 GCGGGGCTCG GCTTCGCCGG CTGGGCGTAC GAGGTCGCCG AGCAGGAGAG
 301 GGAAGTGGGC GTCTTCTTCG ACACCGTTCG GGTCTGCTCG GTGACCGGTT
 351 CCACCCAGGC CGGCATGGTG GCCGGGTTCC GCGCCCTGGA GGAGGCGGGC
 401 GGGCGGCCCC GCGCGTTCGT CGGCATCGAC GCGTCCGCGG ACCCCGCCCC
 451 CACCCGCGAG CAGATCGCCC GGATCGCCGA CCGCACGGGG CGGCTCATCG
 501 GCGTGAGCGG CGCACTCAG GAGGCGGACG TCGAACTCGA CGAGCGGTAC
 551 CACGCGGGCA CGTACGGCAT TCCCGACGAC ACCACCCTCG CGGCGATGCG
 601 GCTCGCCGCC CGGACCGAGG GCATGGTCAC CGACCCGGTC TACGAGGGCA
 651 GTTCGATGGC AAA

2. ไอโซเลต BBUU114

1 CTGCGCTGCG TGCTGGTGCA GGAGAGCTGG GTGGACTGGC CCGACGCCGT
 51 GTACGACAAG GTCGGCAACA TCCTGGTCTC CCGGCTCGCC GGGGCCGACG
 101 TGCGGCTGGT GAGGGCCGGG TTCGGGATCG GCTTCAAGGA GAGCTGGGAA
 151 CAGGCCCTCA AGGAGGTCGA GGACGCGGGA GGCAAGCCGT ACGCCATCCC
 201 CGCCGGCGCC TCCGACCATC CGCTCGGCGG GCTCGGCTTC GCCGGCTGGG
 251 CGTACGAGGT CGCCGAGCAG GAGAGGGAAC TGGGCGTCTT CTTCGACACC
 301 GTCGTGGTCT GCTCGGTGAC CGGTTCCACC CAGGCCGGCA TGGTGGCCGG
 351 GTTCCGCGCC CTGGAGGAGG CGGGCGGGCG GCCCCGGCGC GTCGTGCGCA
 401 TCGACGCGTC CGCGGACCCC GCCCGCACCC GCGAGCAGAT CGCCCGGATC
 451 GCCGACCGCA CGGGGCGGCT CATCGGCGTG AGCGGCGCAC TCACGGAGGC

ภาพภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

501 GGACGTCGAA CTCGACGAGC GGTACCACGC GGGCACGTAC GGCATTCCCC
 551 ACGACACCAC CCTCGCGGCG ATGCGGCTCG CCGCCCGGAC CGAGGGCATG
 601 GTCACCGACC CGGTCTACGA GGGCAAGT

3. ไอโซเลต BBUU118

1 GGCCCCCCCC CGGCGGGCCT GCGCTGCGTG CTGGTGCAGG AGAGCTGGGT
 51 GGA CTGGCCC GACGCCGTGT ACGACAAGGT CGGCAACATC CTGGTCTCCC
 101 GGCTCGCCGG GGCCGACGTG CGGCTGGTGA GGGCCGGGTT CGGGATCGGC
 151 TTCAAGGAGA GCTGGGAACA GGCCCTCAAG GAGGTCGAGG ACGCGGGAGG
 201 CAAGCCGTAC GCCATCCCCG CCGGCGCCTC CGACCATCCG CTCGGCGGGC
 251 TCGGCTTCGC CGGCTGGGCG TACGAGGTCG CCGAGCAGGA GAGGGAAGT
 301 GCGTCTTCT TCGACACCGT CGTGGTCTGC TCGGTGACCG GTTCCACCCA
 351 GGCCGGCATG GTGGCCGGGT TCCGCGCCCT GGAGGAGGCG GGCGGGCGGC
 401 CCCGGCGCGT CGTCGGCATC GACGCGTCCG CGGACCCCGC CCGCACCCGC
 451 GAGCAGATCG CCCGGATCGC CGACCGCACG GGGCGGCTCA TCGGCGTGAG
 501 CGGCGCACTC ACGGAGGCGG ACGTGGAAGT CGACGAGCGG TACCACGCGG
 551 GCACGTACGG CATTCCCGAC GACACCACCC TCGCGGCGAT GCGGCTCGCC
 601 GCCCGGACCG AGGGCATGGT CACCGACCCG GTCTACGAGG GCAAGTCGAT
 651 GGCAAAA

4. ไอโซเลต BBUU134

1 GCCCGTCGCT GTGCGACGCG CGGGCTGCGC TCGTGCTGG TGCAGGAGAG
 51 CTGGGTGGAC TGGCCCGACG CCGTGTACGA CAAGGTCGGC AACATCCTGG
 101 TCTCCCGGCT CGCCGGGGCC GACGTGCGGC TGGTGAGGGC CGGGTTCGGG
 151 ATCGGCTTCA AGGAGAGCTG GGAACAGGCC CTCAAGGAGG TCGAGGACGC
 201 GGGAGGCAAG CCGTACGCCA TCCCCGCCGG CGCTCCGAC CATCCGCTCG
 251 GCGGGCTCGG CTTCGCCGGC TGGGCGTACG AGGTCGCCGA GCAGGAGAGG

ภาพภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

301 GAACTGGGCG TCTTCTTCGA CACCGTCGTG GTCTGCTCGG TGACCGGTTC
 351 CACCCAGGCC GGCATGGTGG CCGGGTTCCG CGCCCTGGAG GAGGCGGGCG
 401 GGCGGCCCCG GCGCGTCGTC GGCATCGACG CGTCCGCGGA CCCC GCCCGC
 451 ACCGCGGAGC AGATCGCCCG GATCGCCGAC CGCACGGGGC GGCTCATCGG
 501 CGTGAGCGGC GCACTCACGG AGGCGGACGT CGAACTCGAC GAGCGGTACC
 551 ACGCGGGCAC GTACGGCATT CCCGACGACA CCACCCTCGC GGCGATGCGG
 601 CTCGCCGCC GGACCGAGGG CATGGTCACC GACCCGGTCT ACGAGGGCAA
 651 GTCGATGGCA AA

5. ไอโซเลต BBUU144

1 GGGACGCGCG GGCTGCGCTG CGTGCTGGTG CAGGAGAGCT GGGTGGACTG
 51 GCCCGACGCC GTGTACGACA AGGTCGGCAA CATCCTGGTC TCCCGGCTCG
 101 CCGGGGCCGA CGTGCGGCTG GTGAGGGCCG GGTTCCGGAT CGGCTTCAAG
 151 GAGAGCTGGG AACAGGCCCT CAAGGAGGTC GAGGACGCGG GAGGCAAGCC
 201 GTACGCCATC CCCGCCGGCG CCTCCGACCA TCCGCTCGGC GGGCTCGGCT
 251 TCGCCGGCTG GGCGTACGAG GTCGCCGAGC AGGAGAGGGA ACTGGGCGTC
 301 TTCTTCGACA CCGTCGTGGT CTGCTCGGTG ACCGGTTCCA CCCAGGCCGG
 351 CATGGTGGCC GGGTTCCGCG CCCTGGAGGA GGCGGGCGGG CGGCCCCGGC
 401 GCGTCGTCGG CATCGACGCG TCCGCGGACC CCGCCCGCAC CCGCGAGCAG
 451 ATCGCCCGGA TCGCCGACCG CACGGGGCGG CTCATCGGCG TGAGCGGCGC
 501 ACTCACGGAG GCGGACGTCG AACTCGACGA GCGGTACCAC GCGGGCACGT
 551 ACGGCATTCC CGACGACACC ACCCTCGCGG CGATGCGGCT CGCCGCCCGG
 601 ACCGAGGGCA TGGTCACCGA CCCGGTCTAC GAGGGCAAGT CGATGGAA

6. ไอโซเลต BBUU145

1 TCGGGGGCCC GGGGGGGGAC GAAGGTGCGT GCTGGTGCAG GAGAAGTTGG
 51 GTCGAAGTGG CCGGACGCCG TGACGACAA GGTCGGCAAC ATCCTGATCA

ภาพภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

101 GCCGGCTCGC CGGGGCCGAG GTGCGGTTGG TCGGGCGGG GTTCGGGATC
 151 GACTTCAAGG AGAGCTGGGA GCAGGCGTTG CGGGACGTCG AGGCGGCGGG
 201 CGGCAGGCCG TACGCCATCC CCGCCGGCGC CTCCGACCAC CCGCTCGGCG
 251 GCCTCGGCTT CGCCCCTGG GCGTACGAGG TCGCCGACA GGAACGGCAG
 301 TCGGGCGTCT TCTTCGACAC GGTGGTCGTG TGCTCGGTGA CCGGGTCCAC
 351 GCAGGCGGGC ATGGTCGCGG GATTCCGGGC GCTCGAAGAG GCCGGCGGAC
 401 GCGGGCGGCG CGTGATCGGC ATCGACGCGT CCGCCGAACC CGCCGCCACC
 451 CATGAGCAGA TCACCCGGAT CGCCCAGCC ACCGGCGAAC TCACCCGGCGT
 501 CGAGGAAGAG CTGACGGAAG TAGACGTCGA ACTGGACGCG CGGTACCACG
 551 CGGGCACGTA CGGCATCCCC GACGAGTCCA CCCTGGAAGC GATGCGGCTG
 601 GCCGCCCGGA CGGAGGGCAT GGTCACCGAC CCGGTCTACG AGGGAGTTCC
 651 CATGGCAA

7. ไอโซเลต BBUU157

1 GTGCTGGTGC AGGAGAGCTG GGTGGACTGG CCCGACGCCG TGTACGACAA
 51 GGTCGGCAAC ATCCTGGTCT CCCGGCTCGC CGGGGCCGAC GTGCGGCTGG
 101 TGAGGGCCGG GTTCGGGATC GGCTTCAAGG AGAGCTGGGA ACAGGCCCTC
 151 AAGGAGGTCG AGGACGCGGG AGGCAAGCCG TACGCCATCC CCGCCGGCGC
 201 CTCCGACCAT CCGCTCGGCG GGCTCGGCTT CGCCGGCTGG GCGTACGAGG
 251 TCGCCGAGCA GGAGAGGGAA CTGGGCGTCT TCTTCGACAC CGTCGTGGTC
 301 TGCTCGGTGA CCGGTTCCAC CCAGGCCGGC ATGGTGGCCG GGTTCCGCGC
 351 CCTGGAGGAG GCGGGCGGGC GGCCCCGGCG CGTCGTCGGC ATCGACGCGT
 401 CCGCGGACCC CGCCCGCACC CGCGAGCAGA TCGCCCGGAT CGCCGACCGC
 451 ACGGGCGGC TCATCGGCGT GAGCGGCGCA CTCACGGAGG CGGACGTCGA
 501 ACTCGACGAG CGGTACCACG CGGGCACGTA CGGCATTCCC GACGACACCA
 551 CCCTCGCGGC GATGCGGCTC GCCGCCCGGA CCGAGGGCAT GGTCACCGAC
 601 CCGGTCTACG AGGGCAAG

ภาพภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

8. ไอโซเลต BBUU168

1 GGGGGCCCCG GGGCCCCGCG CCGGGCTCAG TCGTCCTGG TGCAGGAGAG
 51 CTGGGTGGAG TGGCCGACT CCGTGTACGA CAAGGTCGGC AACATCCTCA
 101 TCAGCAGGCT GGCGGGAGCC GACGTACGGC TGGTGCGGGC CGGGTTCGGG
 151 ATCGGGTTCA AGGAGAGCTG GGAAGTGGCG CTGCGCGAGG TCGAGGAGTC
 201 CGGCGGCAAG CCGTACGCCA TCCCGGCCGG CGCTCCGAC CACCCGCTCG
 251 GCGGCCTCGG CTTCGCGGGC TGGGCCTATG AAGTCGCCGA GCAGGAACGG
 301 CAGTCGGACG TCTTCTTCGA CACGGTCATC GTCTGCTCGG TGACCGGGTC
 351 GACCCAGGCC GGCATGGTCG CCGGGTTCGC CGCGCTGGAG CAGGCCGGCG
 401 GCCGTGCGCG CCGCGTCATC GGCATCGACG CCTCGGCCAA GCCACCGAG
 451 ACCCGCGAAC AGATCGCCCG CATCGCCAC CGCACCGGCC GACTCATAGG
 501 CGTCGAGCGG GAGCTGACCG TCGACGACGT AGAACTCGAC GAGCGCTACC
 551 ACGCGGGCAT CTACGGCATC CCGGACGACA CCACCCTGGC GGCGATGCGC
 601 CTCGCGGCC GCACCGAGGG CATGGTGACG GACCCGGTCT ACGAGGGCAA
 651 GTCCGATGGC AAAA

9. ไอโซเลต BBUU179

1 GCCCGGGGCT TCGCGGGGA CGGGCTCAGT GCGTGCTCGT GCAGGAGAGT
 51 TGGGTGGACT GGCCCGACGC CGTGTACGAC AAGGTCGGCA ACATCCTGAT
 101 CAGCCGGCTG GCCGGGGCCG ATGTGCGGCT GGTGAAGGCC GGCTTCGGCA
 151 TCGGCTTCAA GGAGAGCTGG GAGCGGGCGC TCCGGGAGGT CGAGGAGGGC
 201 GCGGGGAAGC CGTACGCCAT CCCGGCCGGG GCCTCCGACC ATCCGCTCGG
 251 CGGACTCGGC TTCGCCGGGT GGGCGCATGA GGTGGCCGAG CAGGAGCGGG
 301 AGCTGGGCGT CTTCTTCGAC ACCGTCGTGG TGTGCTCGGT GACCGGGTCG
 351 ACCCAGGCCG GCATGGTCGC CGGGTTCGCC GCGCTGGAGG AGGCGGGCGG
 401 GCGGGCCCGG CGGGTGCTCG GCATCGACGC CTCGGCGAAG CCGGCCGCGA
 451 CCCGCGGTCA GATCGCCCGT ATCGCCGACC GCACCGGCCA GTCATCGGC

ภาพภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

501 TTGAAGCGTG AGCTGACCGA GCGGACGTC GAACTCGACG AGCGGTACCA
 551 CGCGGGTGTC TACGGCGTCC CCGACGAGGC GACCCTGGCG GCGATGCGGC
 601 TCGCCGCCCG GACGGAGGGG ATGGTCACCG ACCCCGTCTA CGAGGGCAGT
 651 TCCATGGCAA A

10. ไอโซเลต BBU87

1 GGCCCGGGCG TTTCGCCGGG GCGGGCTCAG TCGTGCTCG TGCAGGAGAG
 51 TTGGGTGGAC TGGCCCGACG CCGTGTACGA CAAGGTCGGC AACATCCTGA
 101 TCAGCCGGCT GGCCGGGGCC GATGTGCGGC TGGTGAAGGC CGGCTTCGGC
 151 ATCGGCTTCA AGGAGAGCTG GGAGCGGGCG CTCCGGGAGG TCGAGGAGGG
 201 CGGCGGAAG CCGTACGCCA TCCCGGCCGG GGCCTCCGAC CATCCGCTCG
 251 GCGGACTCGG CTTCGCCGGG TGGGCGCATG AGGTGGCCGA GCAGGAGCGG
 301 GAGCTGGGCG TCTTCTTCGA CACCGTCGTG GTGTGCTCGG TGACCGGGTC
 351 GACCCAGGCC GGCATGGTCG CCGGGTTCGC CGCGCTGGAG GAGGCGGGCG
 401 GCGGGGCCCG GCGGGTGCTC GGCATCGACG CCTCGGCGAA GCCGGCCGCG
 451 ACCCGCGGTC AGATCGCCCG TATCGCCGAC CGCACCGGCC AGCTCATCGG
 501 CTTGAAGCGT GAGCTGACCG AGGCGGACGT CGAACTCGAC GAGCGGTACC
 551 ACGCGGGTGT CTACGGCGTC CCCGACGAGG CGACCCTGGC GGCGATGCGG
 601 CTCGCCGCC GGACGGAGGG GATGGTCACC GACCCCGTCT ACGAGGGCAA
 651 GTCCATGGCA A

ภาพภาคผนวก ง-2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *acdS* ที่แปลงเป็นกรดอะมิโนของแอกติโนมัยซีท

1. ไอโซเลต BBUU105

1 MPSVRAASRI AARVVSSGMP YVPAWYRSSS STSASVSAPL TPMSRPVRS
 51 IRAICSRVRA GSADASMPTT RRGPPASSR ARNPATMPAW VEPVTEQTTT
 101 VSKKTPSSLS CSATSYAQPA KSPSPGWSE APAGMAYGLP PASSTSLRAC
 151 SQLSLKPIP N PALTSRTSAP ASRETRMLPT LSYTASGQST QLSCTSTQRS
 201 PRRRTPPR

2. ไอโซเลต BBUU114

1 MPSVRAASRI AARVVSSGMP YVPAWYRSSS STSASVSAPL TPMSRPVRS
 51 IRAICSRVRA GSADASMPTT RRGPPASSR ARNPATMPAW VEPVTEQTTT
 101 VSKKTPSSLS CSATSYAQPA KSPSPGWSE APAGMAYGLP PASSTSLRAC
 151 SQLSLKPIP N PALTSRTSAP ASRETRMLPT LSYTASGQST QLSCTSTQR

3. ไอโซเลต BBUU118

1 MPSVRAASRI AARVVSSGMP YVPAWYRSSS STSASVSAPL TPMSRPVRS
 51 IRAICSRVRA GSADASMPTT RRGPPASSR ARNPATMPAW VEPVTEQTTT
 101 VSKKTPSSLS CSATSYAQPA KSPSPGWSE APAGMAYGLP PASSTSLRAC
 151 SQLSLKPIP N PALTSRTSAP ASRETRMLPT LSYTASGQST QLSCTSTQRR
 201 PAAGG

4. ไอโซเลต BBUU134

1 MPSVRAASRI AARVVSSGMP YVPAWYRSSS STSASVSAPL TPMSRPVRS
 51 IRAICSRVRA GSADASMPTT RRGPPASSR ARNPATMPAW VEPVTEQTTT
 101 VSKKTPSSLS CSATSYAQPA KSPSPGWSE APAGMAYGLP PASSTSLRAC
 151 SQLSLKPIP N PALTSRTSAP ASRETRMLPT LSYTASGQST QLSCTSTQRS
 201 PRVAQRR



1054561741

BUU_1Thesis 59910007 thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพภาคผนวก ง-2 (ต่อ)

5. ไอโซเลต BBUU144

1 MPSVRAASRI AARVVSSGMP YVPAWYRSSS STSASVSAPL TPMSRPVRS
 51 IRAICSRVRA GSADASMPTT RRGPPASSR ARNPATMPAW VEPVTEQTTT
 101 VSKKTPSSLS CSATSYAQPA KSPPSGWSE APAGMAYGLP PASSTSLRAC
 151 SQLSLKPIP N PALTSRTSAP ASRETRMLPT LSYTASGQST QLSCTSTQRS
 201 PRV

6. ไอโซเลต BBUU145

1 MPSVRAASRI ASRVDSSGMP YVPAWYRASS STSTSVSSSS TPVSSPVARA
 51 IRVICSWVAA GSADASMPIT RRRRPPASSS ARNPATMPAC VDPVTEHTTT
 101 VSKKTPDCRS CAATSYAQRA KPRPPSGWSE APAGMAYGLP PAASTSRNAC
 151 SQLSLKSIPN PARTNRTSAP ASRLIRMLPT LSYTASGHFD PTSPAPARTF
 201 VPPRAP

7. ไอโซเลต BBUU157

1 MPSVRAASRI AARVVSSGMP YVPAWYRSSS STSASVSAPL TPMSRPVRS
 51 IRAICSRVRA GSADASMPTT RRGPPASSR ARNPATMPAW VEPVTEQTTT
 101 VSKKTPSSLS CSATSYAQPA KSPPSGWSE APAGMAYGLP PASSTSLRAC
 151 SQLSLKPIP N PALTSRTSAP ASRETRMLPT LSYTASGQST QLSCTS

8. ไอโซเลต BBUU168

1 MVAGFAALEQ AGGRARRVIG IDASAKPTET REQIARIAHR TGRLIGVERE
 51 LTVDDVELDE RYHAGIYGIP DDTTLAAMRL AARTEGMVTD PVYEGKSDGK

ภาพภาคผนวก ง-2 (ต่อ)

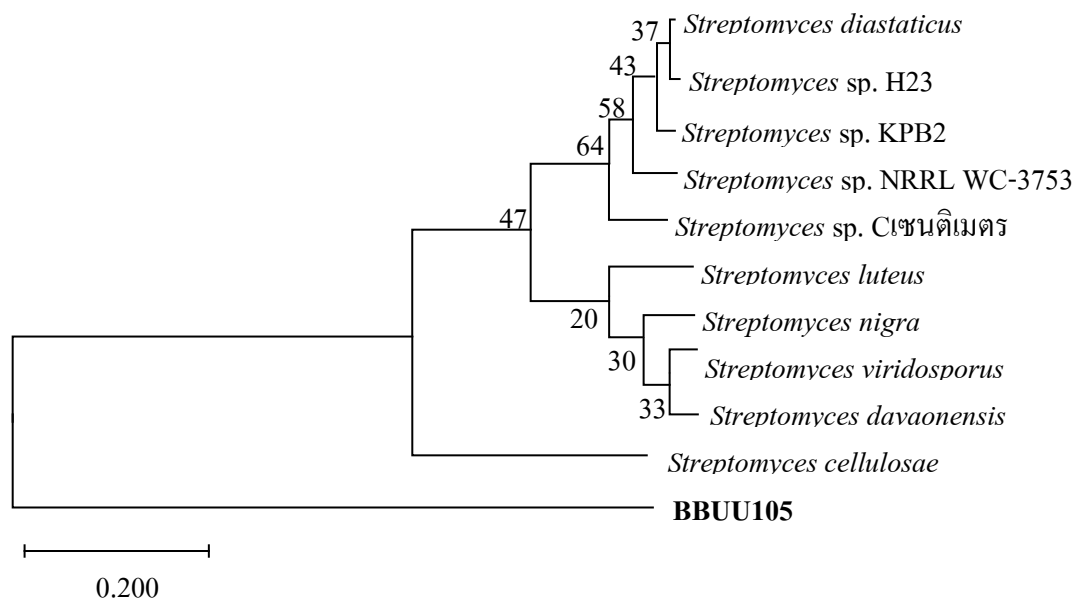
9. ไอโซเลต BBUU179

1 MPSTRRARPP ASSSAANPAT MPAWVDPVTE HTTTVSKKTP SSRSCSATSC
51 AHPAKSPPS GWSEAPAGMA YGFPPSSTS RSARSQSLK PMPKPAFTSR
101 TSAPASRLIR MLPTLSYTAS GQSTQLSCTS TH

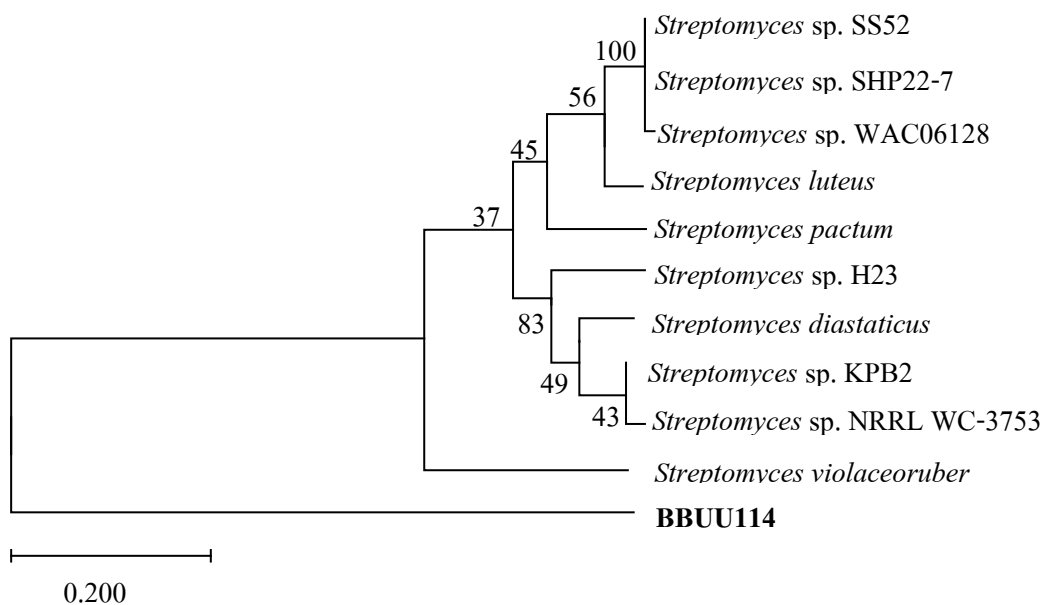
10. ไอโซเลต BBUU87

1 MPSTRRARPP ASSSAANPAT MPAWVDPVTE HTTTVSKKTP SSRSCSATSC
51 AHPAKSPPS GWSEAPAGMA YGFPPSSTS RSARSQSLK PMPKPAFTSR
101 TSAPASRLIR MLPTLSYTAS GQSTQLSCTS TH

ภาพภาคผนวก ง-3 แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแอสโคดีโนมัยซีท

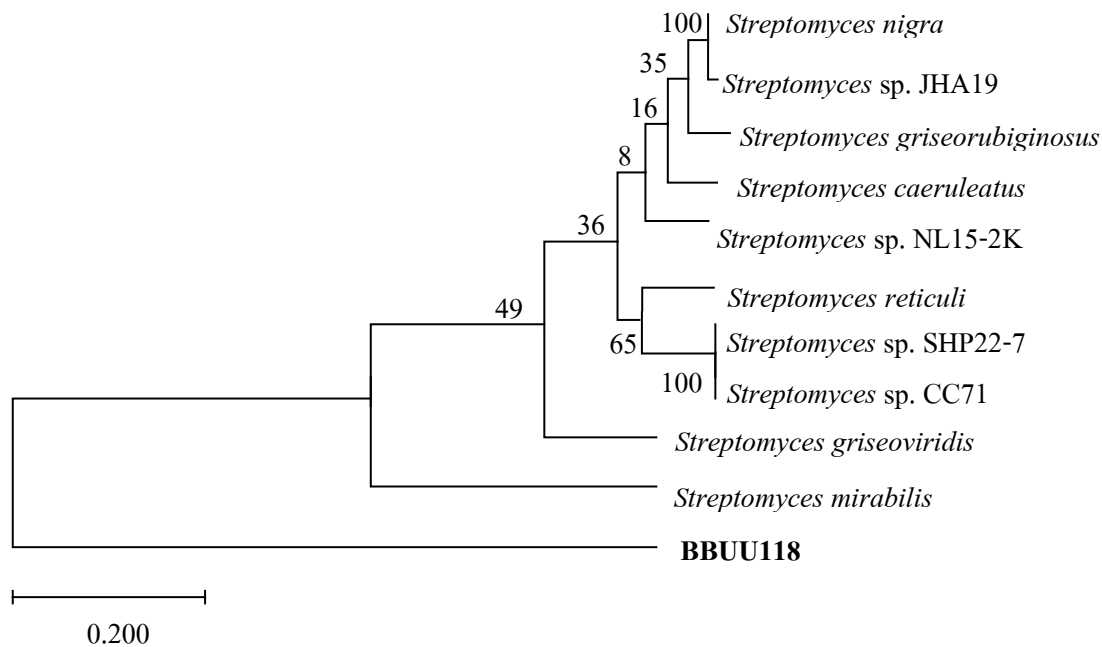


ภาพที่ 1 ไอโซเลต BBUU 105

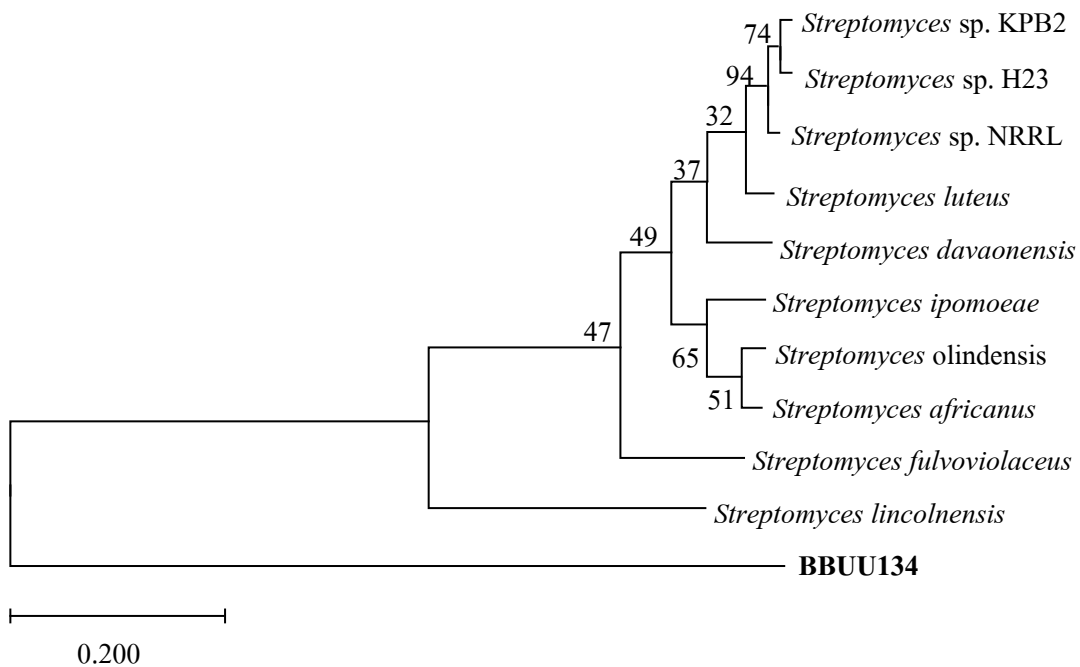


ภาพที่ 2 ไอโซเลต BBUU 114

ภาพภาคผนวก ง-3 (ต่อ)

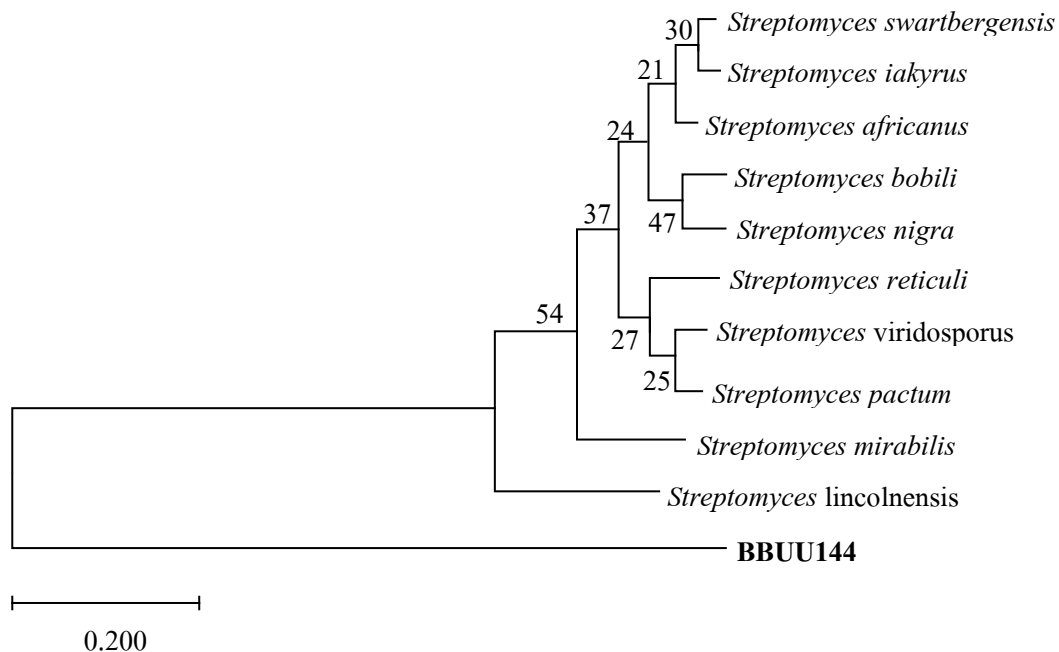


ภาพที่ 3 ไอโซเลต BBUU 118

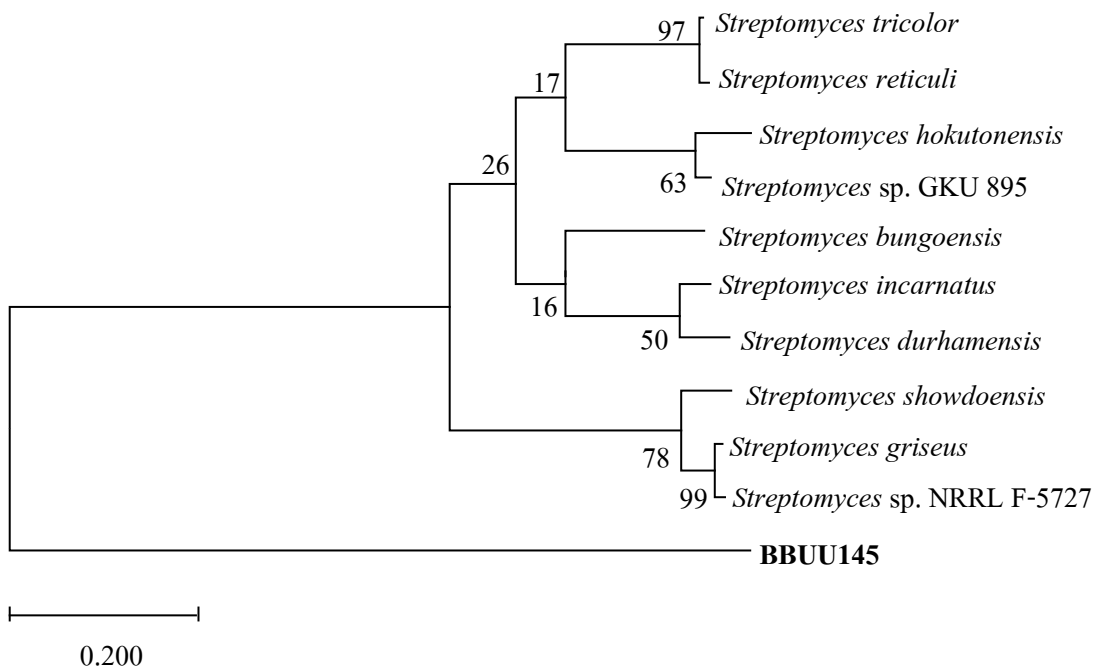


ภาพที่ 4 ไอโซเลต BBUU 134

ภาพภาคผนวก ง-3 (ต่อ)

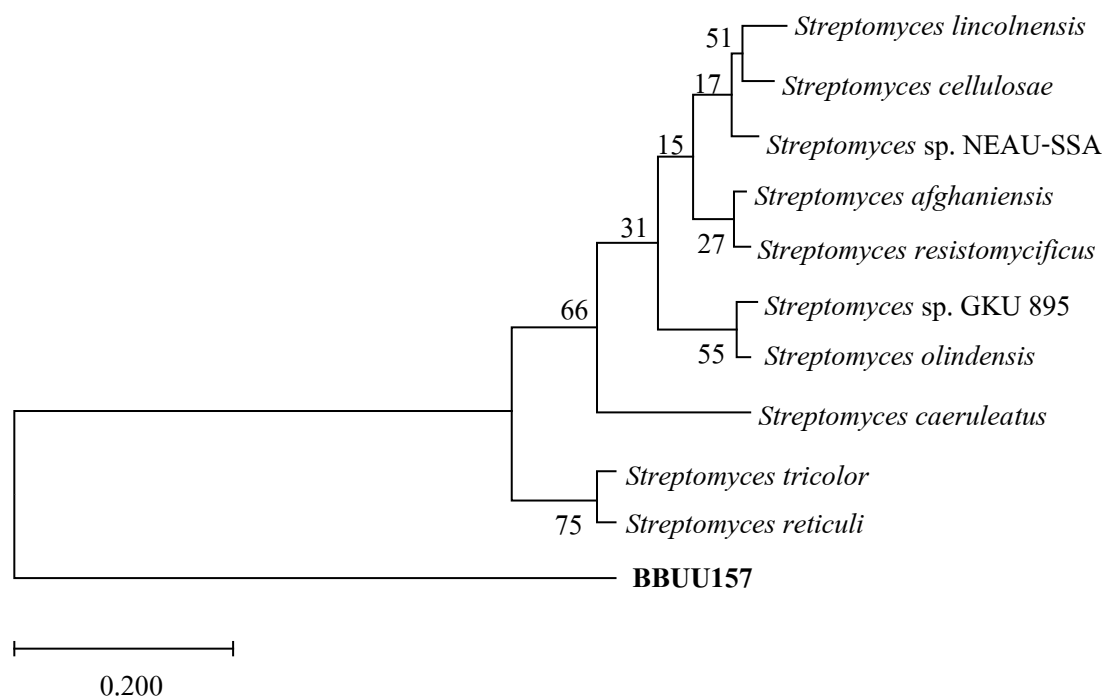


ภาพที่ 5 ไอโซเลต BBUU 144

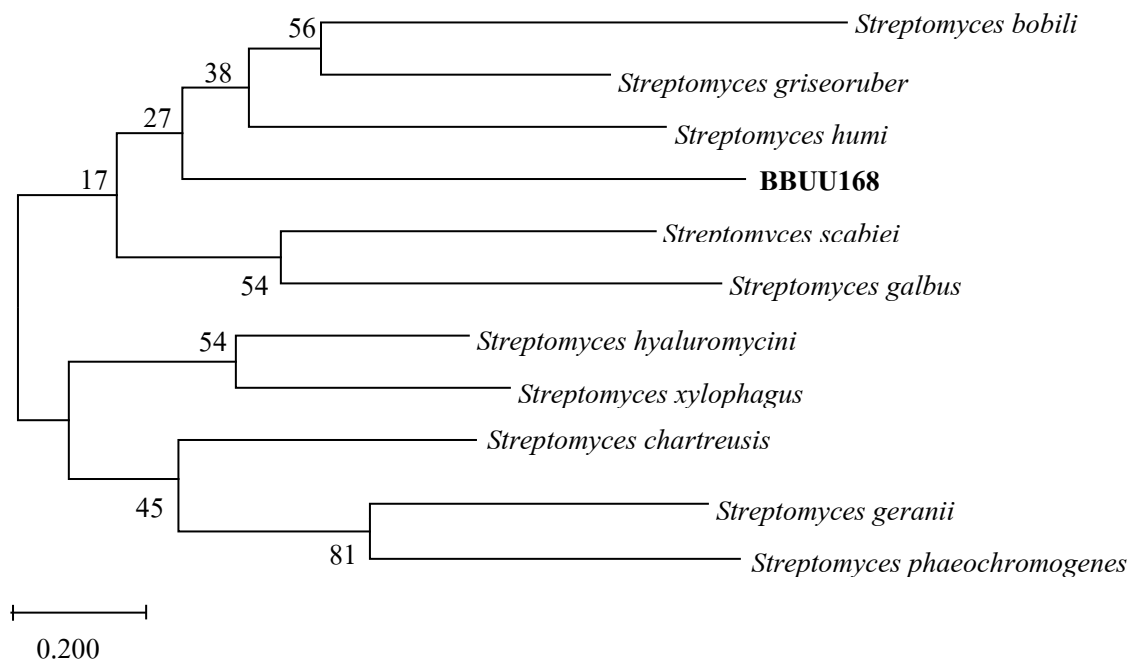


ภาพที่ 6 ไอโซเลต BBUU 145

ภาพภาคผนวก ง-3 (ต่อ)

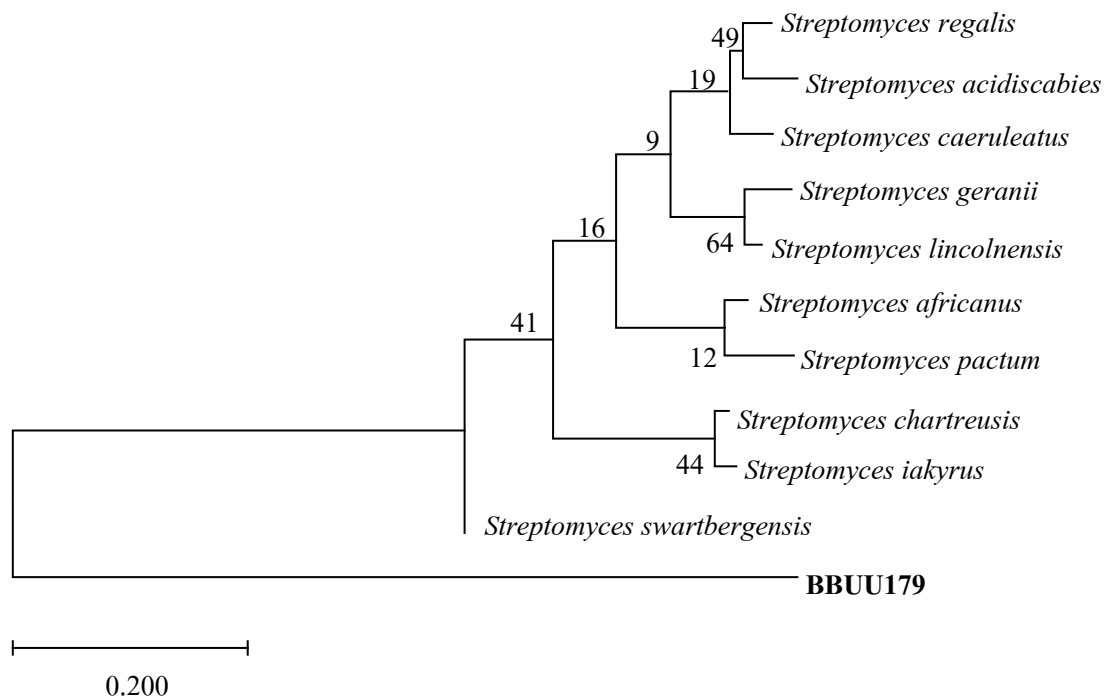


ภาพที่ 7 ไอโซเลต BBUU 145

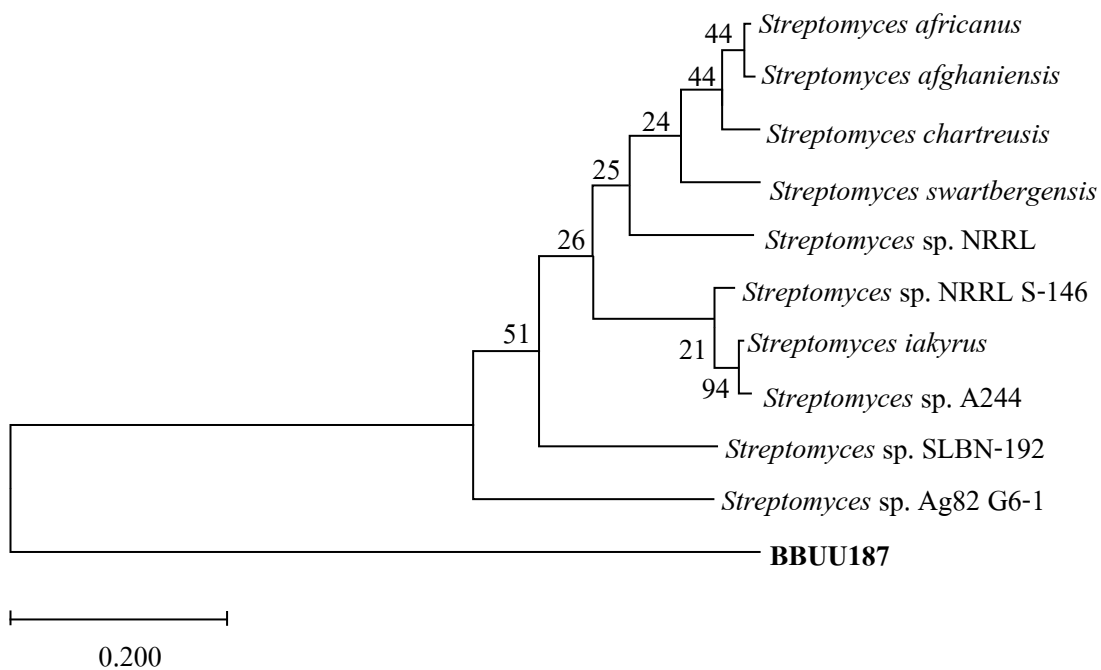


ภาพที่ 8 ไอโซเลต BBUU 168

ภาพภาคผนวก ง-3 (ต่อ)

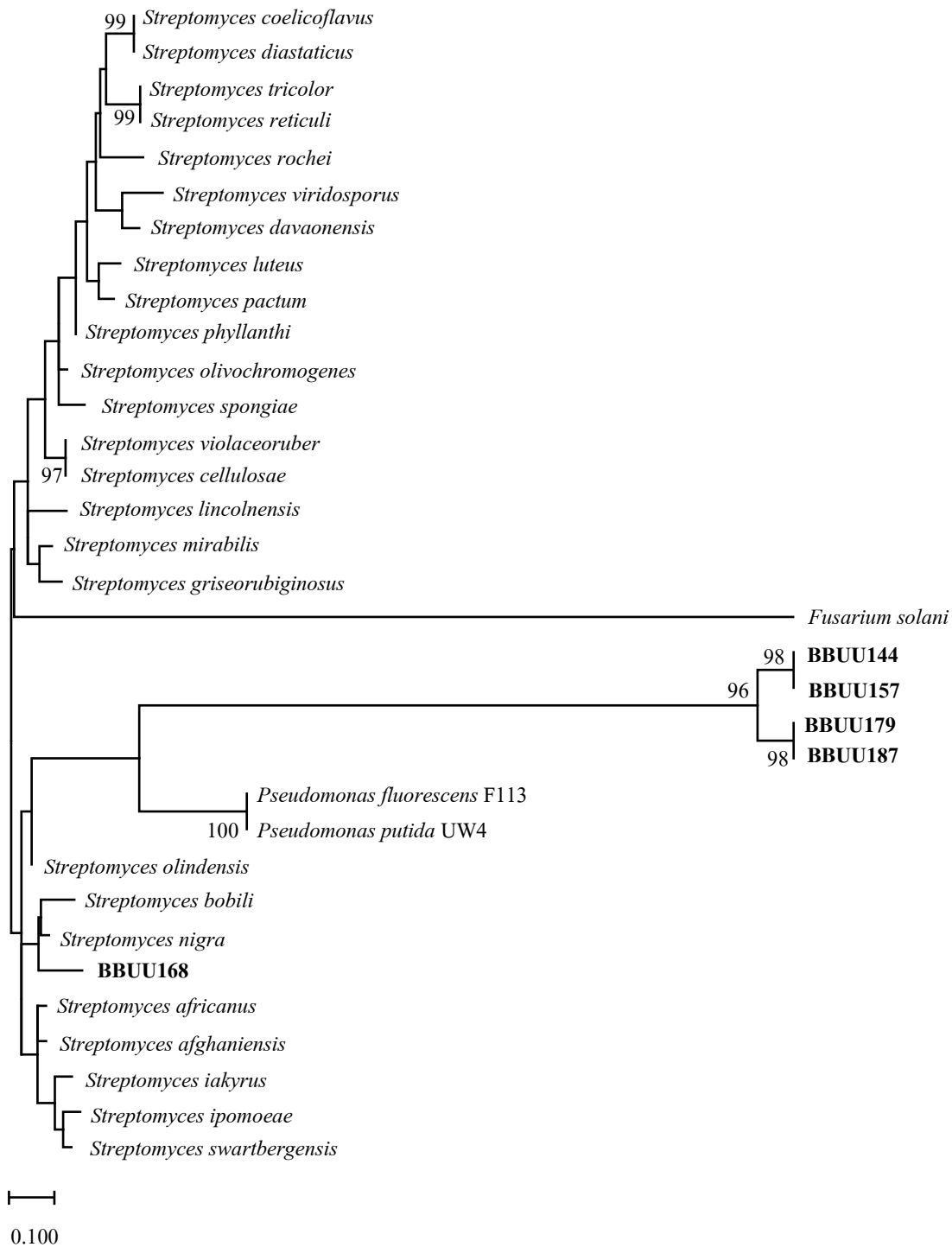


ภาพที่ 9 ไอโซเลต BBUU 179

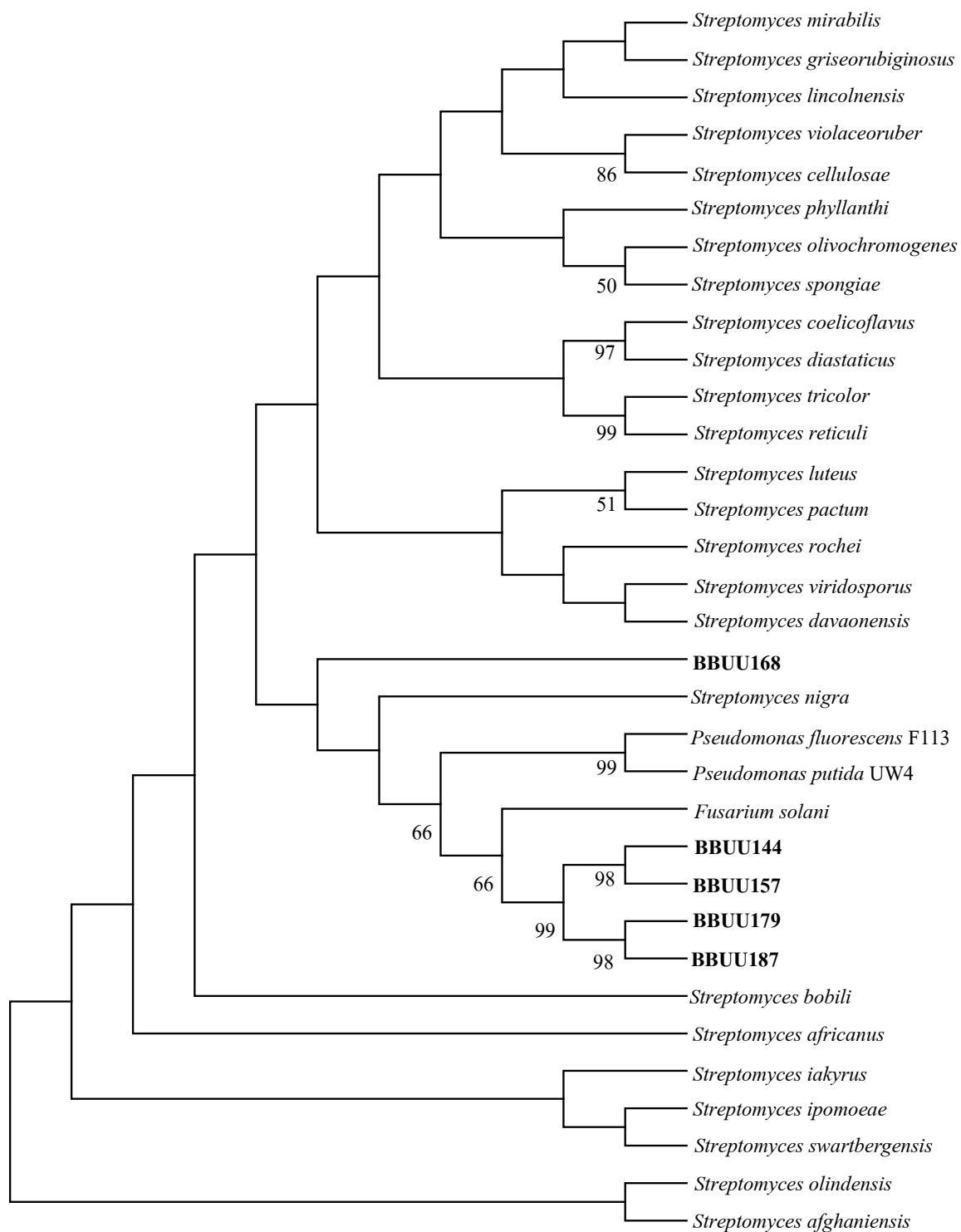


ภาพที่ 10 ไอโซเลต BBUU 187

1054561741
 BUU_1Thesis_59910007_thesis / rev: 04042563 12:52:56 / seq: 50



ภาพที่ 11 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Maximum Likelihood method ของแอกคิโนมายซีท
 กับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ

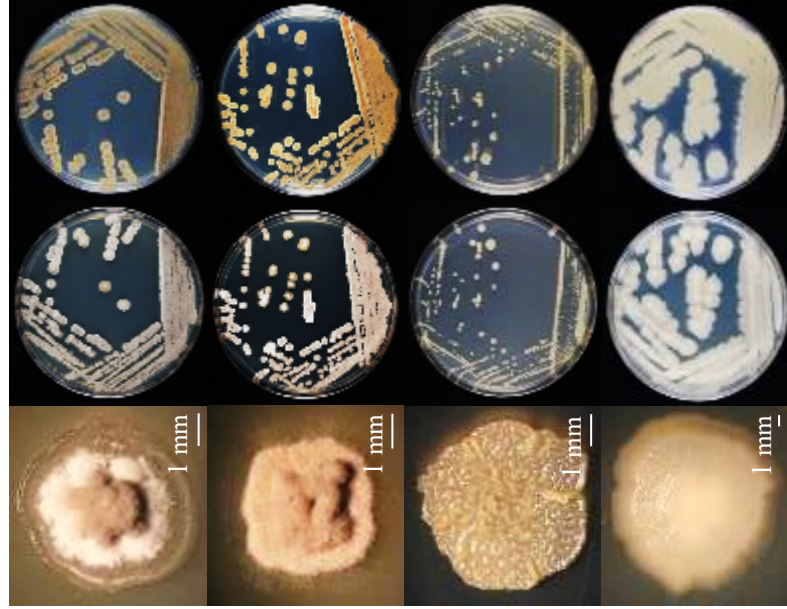


ภาพที่ 12 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Maximum Parsimony method ของแอกติโนมัยสีท
กับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง

ภาพภาคผนวก ง-4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ อายุ 7 วัน

แบคทีเรีย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตร YD
โตโตนี้เดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



BBUU114

BBUU161

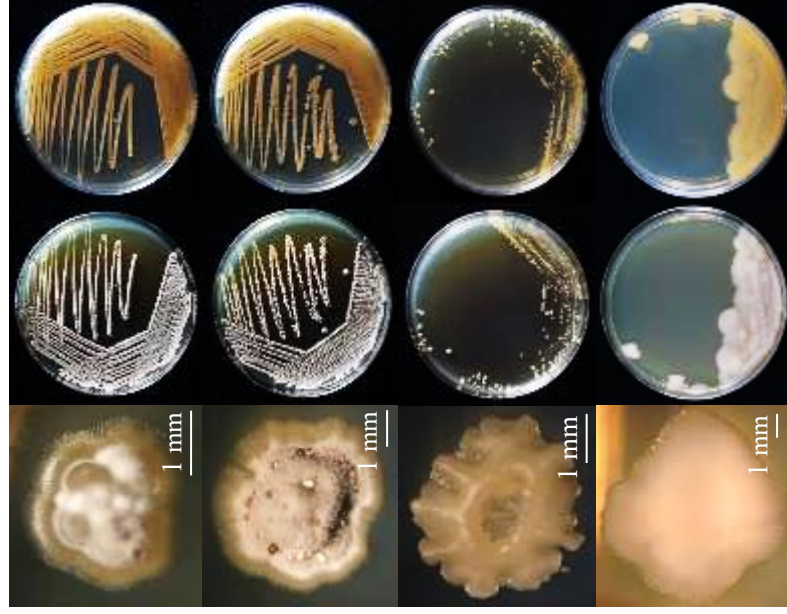
BBUU500

P. putida

ATCC 17484

แบคทีเรีย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตร ISP2
โตโตนี้เดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



BBUU114

BBUU161

BBUU500

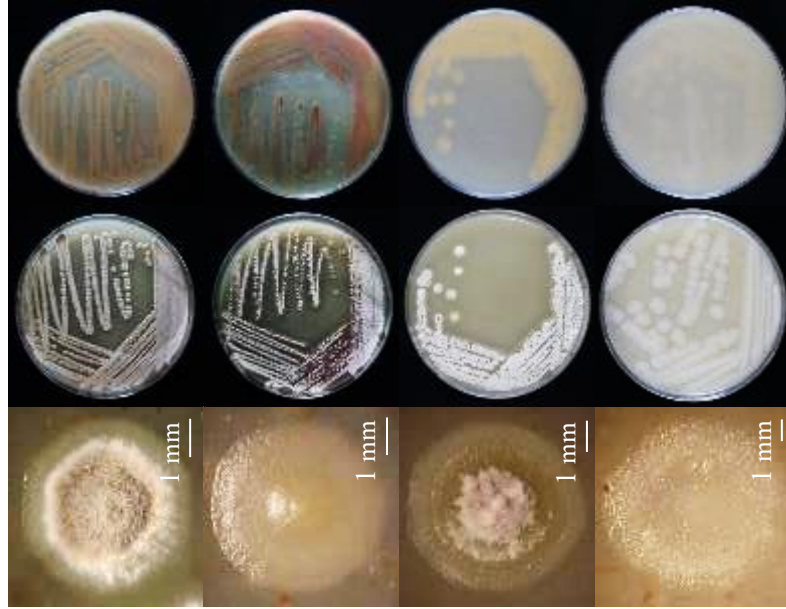
P. putida

ATCC 17484

ภาพภาคผนวก ง-4 (ต่อ)

แบคทีเรีย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตร ISP3
โคโคไนด์เดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



BBUU114

BBUU161

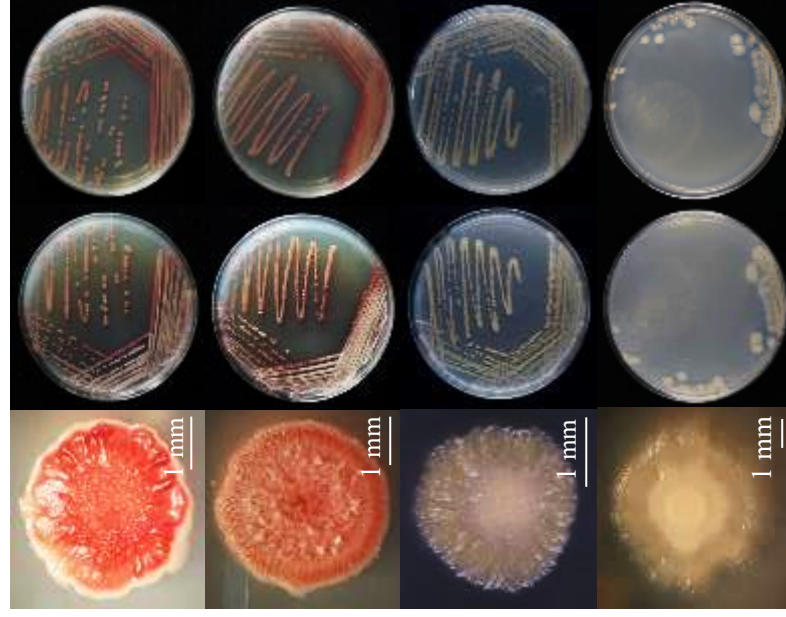
BBUU500

P. putida

ATCC 17484

แบคทีเรีย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตร ISP4
โคโคไนด์เดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



BBUU114

BBUU161

BBUU500

P. putida

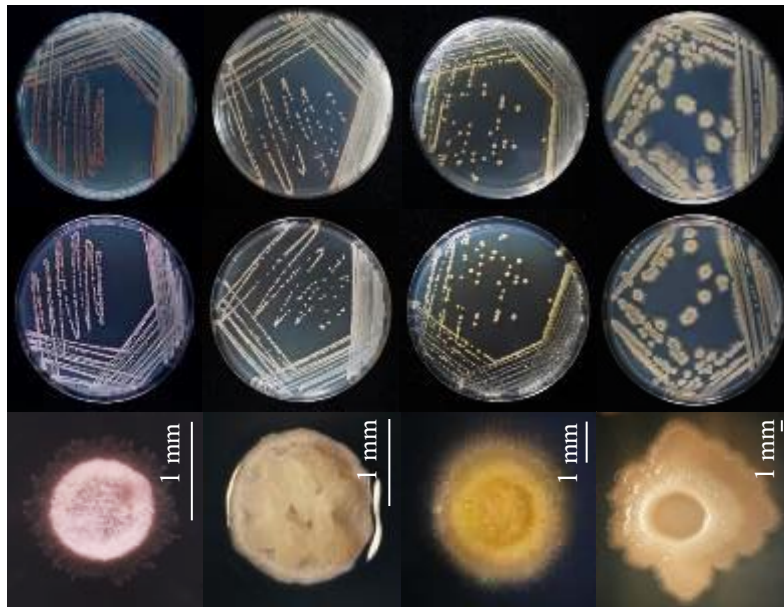
ATCC 17484

ภาพภาคผนวก ง-4 (ต่อ)

แบคทีเรีย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตร ISP5

โคโลนีเดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



BBUU114

BBUU161

BBUU500



ตารางภาคผนวก ง-1 ข้อมูลการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว Minimal medium พง 3 ชนิด ระยะเวลา 30 วัน โดยการหาค่าหน้าหนักแห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)

แบคทีเรีย	อาหารเหลว	หลอดที่	การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย				S.D.
			น้ำหนักก่อนอบ	น้ำหนักหลังอบ	น้ำหนักแห้ง	ค่าเฉลี่ย	
MM		1	0.175	0.166	0.009		
		2	0.179	0.170	0.009	0.009	0.001
		3	0.176	0.168	0.008		
		4	0.173	0.165	0.009		
BBUU144		1	0.177	0.175	0.002		
		2	0.176	0.173	0.004	0.003	0.001
		3	0.174	0.173	0.001		
		4	0.176	0.172	0.004		
MM ที่เติม ACC	0.3 มิลลิโมลาร์	1	0.179	0.170	0.009		
		2	0.173	0.165	0.008	0.009	0.001
		3	0.179	0.170	0.010		
		4	0.184	0.174	0.010		

ตารางภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

แบบที่เรีย	อาหารเหลว	หลอดที่	การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย			
			น้ำหนักก่อนอบ	น้ำหนักหลังอบ	น้ำหนักแห้ง	S.D.
MM		1	0.171	0.162	0.009	
		2	0.171	0.163	0.008	0.001
		3	0.180	0.170	0.010	0.008
		4	0.174	0.167	0.007	0.001
BBUU161		1	0.179	0.178	0.002	
	MM ที่เติม 0.1%	2	0.177	0.173	0.004	0.001
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3	0.181	0.177	0.004	0.003
		4	0.179	0.177	0.001	
MM ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์		1	0.179	0.172	0.007	
		2	0.180	0.173	0.007	0.008
		3	0.179	0.170	0.009	0.001
		4	0.178	0.169	0.009	

ตารางภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	อาหารเหลว	หลอดที่	การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย			
			น้ำหนักก่อนอบ	น้ำหนักหลังอบ	น้ำหนักแห้ง	S.D.
MM		1	0.175	0.167	0.008	
		2	0.180	0.171	0.009	0.000
		3	0.173	0.163	0.009	0.000
		4	0.175	0.166	0.008	
BBUU500		1	0.175	0.170	0.005	
	MM ที่เติม 0.1%	2	0.176	0.174	0.002	0.001
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3	0.177	0.175	0.002	0.003
		4	0.176	0.173	0.003	
MM ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์		1	0.181	0.171	0.009	
		2	0.176	0.168	0.008	0.002
		3	0.173	0.161	0.012	0.009
		4	0.181	0.174	0.007	

ตารางภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	อาหารเหลว	หลอดที่	การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย			
			น้ำหนักก่อนอบ	น้ำหนักหลังอบ	น้ำหนักแห้ง	S.D.
	MM	1	0.171	0.169	0.002	
		2	0.178	0.169	0.009	0.003
		3	0.175	0.167	0.008	0.005
		4	0.171	0.169	0.003	
<i>P. putida</i> ATCC 17484	MM ที่เติม 0.1% (NH ₄) ₂ SO ₄	1	0.178	0.177	0.001	
		2	0.174	0.172	0.002	0.001
		3	0.175	0.176	0.001	0.001
		4	0.178	0.179	0.001	
	MM ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์	1	0.173	0.165	0.008	
		2	0.172	0.170	0.003	0.006
		3	0.172	0.165	0.007	0.002
		4	0.176	0.168	0.007	

ตารางภาคผนวก ง-2 ข้อมูลการตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD

ไอโซเลต	เวลา (ชั่วโมง)	หลอดที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร					การสร้าง ACCD
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	S.D.	
BBUU144	24	1	0.010	0.017	0.016			
		2	0.017	0.017	0.013			
		3	0.013	0.014	0.016	0.014	0.002	0.103
		4	0.015	0.016	0.014			
		5	0.011	0.011	0.012			
		6	0.011	0.012	0.011			
	48	1	0.020	0.018	0.018			
		2	0.023	0.024	0.023			
		3	0.019	0.021	0.021	0.019	0.002	0.220
		4	0.021	0.022	0.022			
		5	0.021	0.019	0.018			
		6	0.020	0.021	0.022			
	72	1	0.029	0.026	0.025			
		2	0.022	0.022	0.021			
		3	0.025	0.020	0.020	0.027	0.003	0.408
		4	0.020	0.020	0.024			
		5	0.024	0.022	0.026			
		6	0.029	0.031	0.029			



1054561741

BUU_1Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

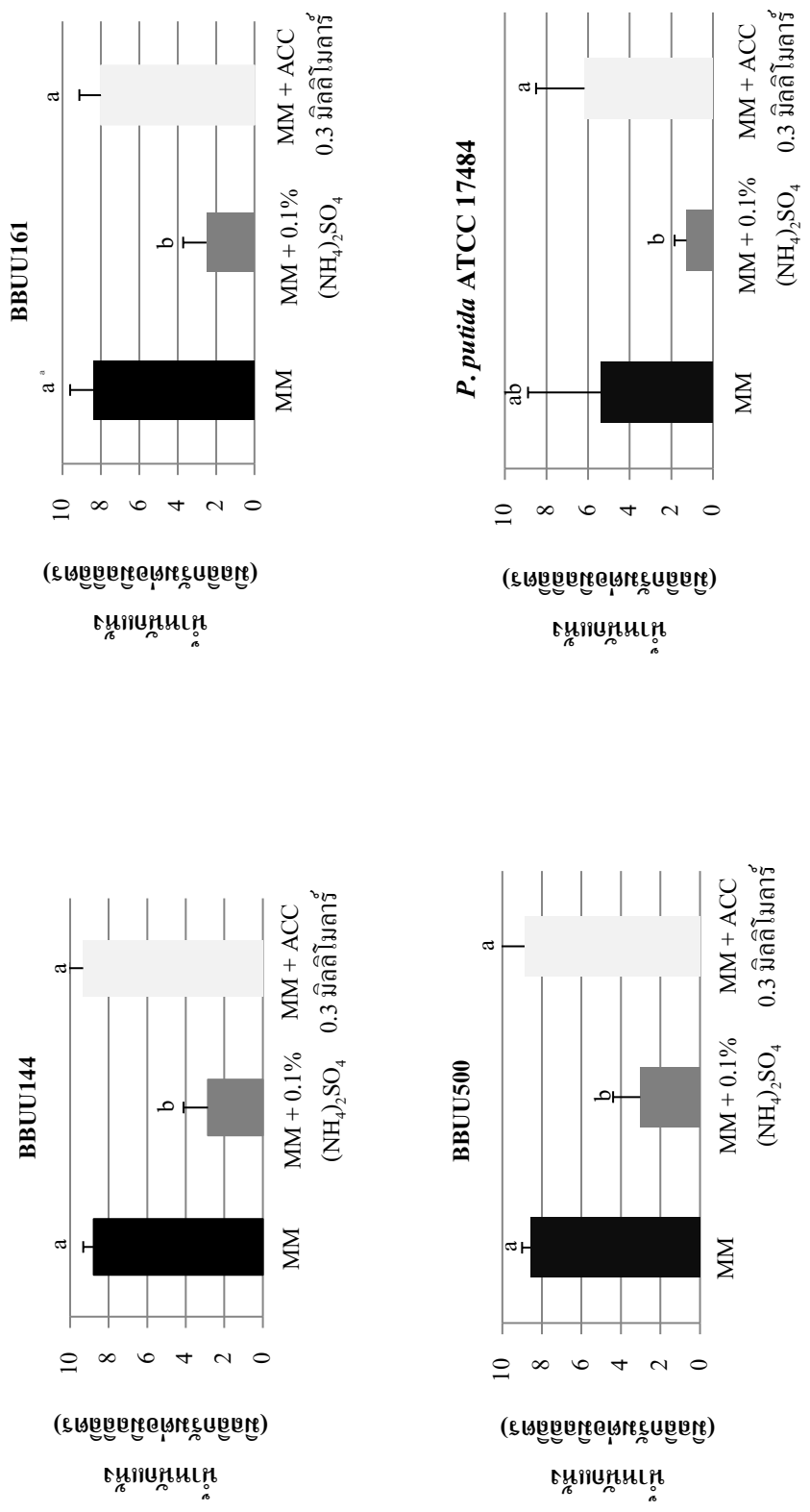
ตารางภาคผนวก ง-2 (ต่อ)

ไอโซเลต	เวลา (ชั่วโมง)	หลอดที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร					การสร้าง ACCD
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	S.D.	
BBUU500	24	1	0.009	0.010	0.009			
		2	0.008	0.009	0.010			
		3	0.008	0.009	0.010	0.010	0.001	0.009
		4	0.007	0.009	0.010			
		5	0.009	0.010	0.012			
		6	0.013	0.010	0.012			
	48	1	0.014	0.011	0.012			
		2	0.011	0.016	0.019			
		3	0.013	0.015	0.017	0.018	0.004	0.197
		4	0.017	0.021	0.020			
		5	0.023	0.021	0.023			
		6	0.021	0.02	0.022			
	72	1	0.016	0.016	0.016			
		2	0.015	0.014	0.015			
		3	0.010	0.012	0.015	0.013	0.003	0.080
		4	0.006	0.008	0.007			
		5	0.010	0.013	0.011			
		6	0.017	0.013	0.018			

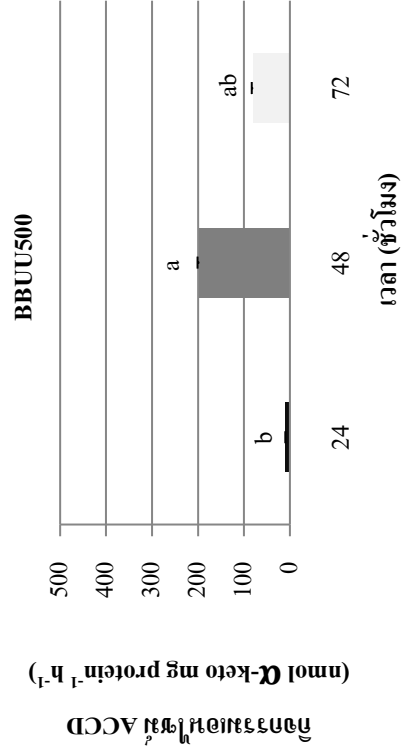
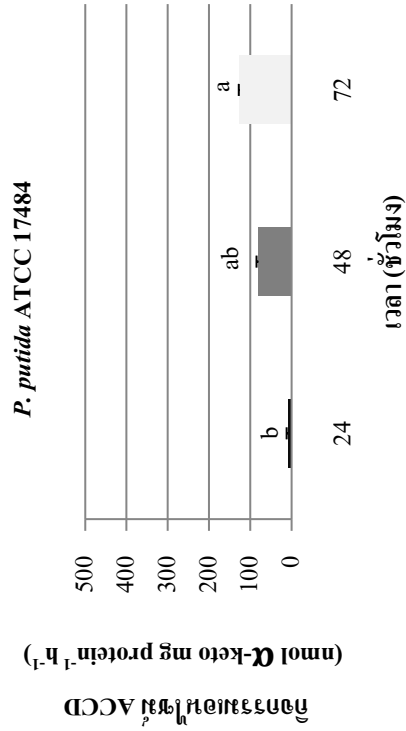
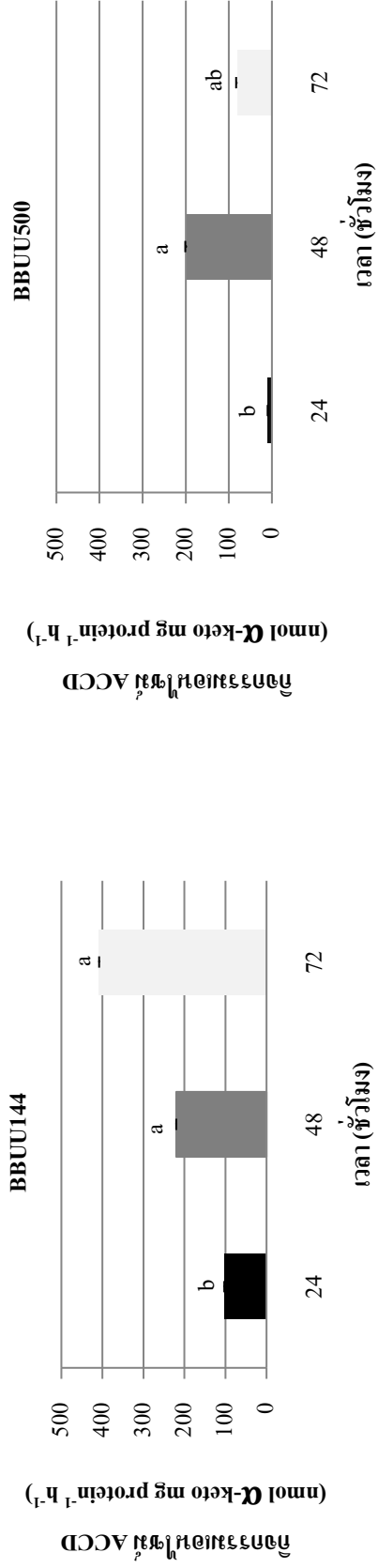
ตารางภาคผนวก ง-2 (ต่อ)

แบคทีเรีย	เวลา (ชั่วโมง)	หลอดที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร					การสร้าง ACCD
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	S.D.	
<i>P. putida</i> ATCC 17484	24	1	0.007	0.005	0.005			
		2	0.012	0.012	0.013			
		3	0.012	0.013	0.010	0.010	0.003	0.009
		4	0.011	0.013	0.011			
		5	0.006	0.009	0.007			
		6	0.009	0.010	0.010			
	48	1	0.010	0.010	0.008			
		2	0.011	0.012	0.007			
		3	0.010	0.009	0.009	0.013	0.005	0.080
		4	0.014	0.015	0.014			
		5	0.024	0.021	0.018			
		6	0.012	0.016	0.018			
	72	1	0.017	0.016	0.017			
		2	0.017	0.013	0.014			
		3	0.014	0.015	0.014	0.015	0.001	0.127
		4	0.015	0.015	0.013			
		5	0.013	0.015	0.014			
		6	0.013	0.015	0.015			

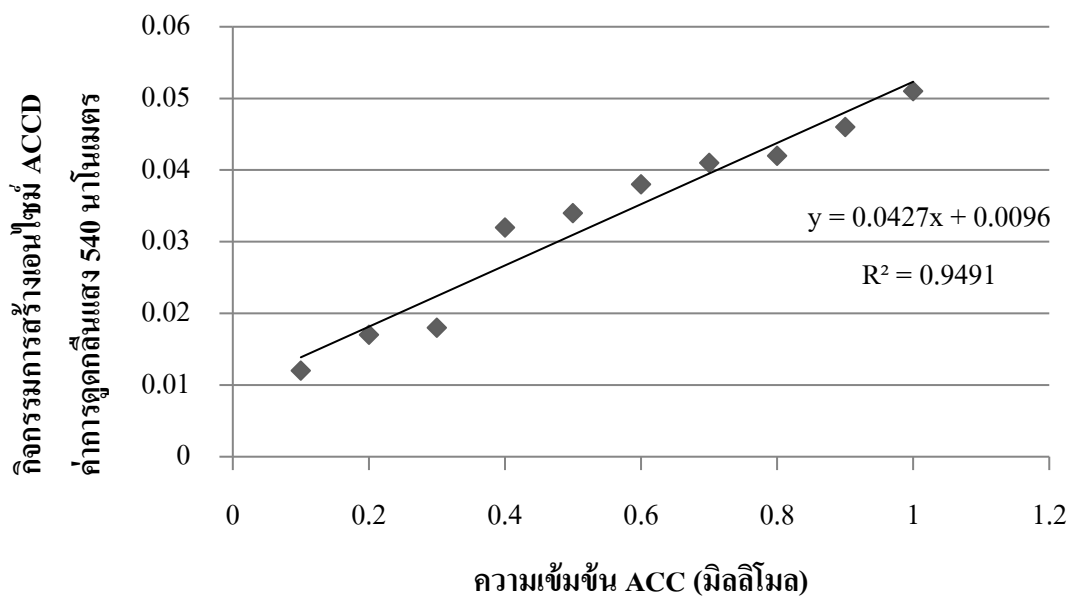
ภาพภาคผนวก 3-5 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเหลว Minimal medium ที่ 3 ชนิด ระยะเวลา 30 วัน โดยการหาหน้าหนักแห้ง



ภาพภาคผนวก 3-6 การตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD



ภาพภาคผนวก ง-7 กราฟมาตรฐานของ α -ketobutyrate ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1.0 มิลลิโมล



ภาคผนวก จ

**ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร YD ที่เติม
เกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์ (0-7% w/v)**



1054561741

BUU_1Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

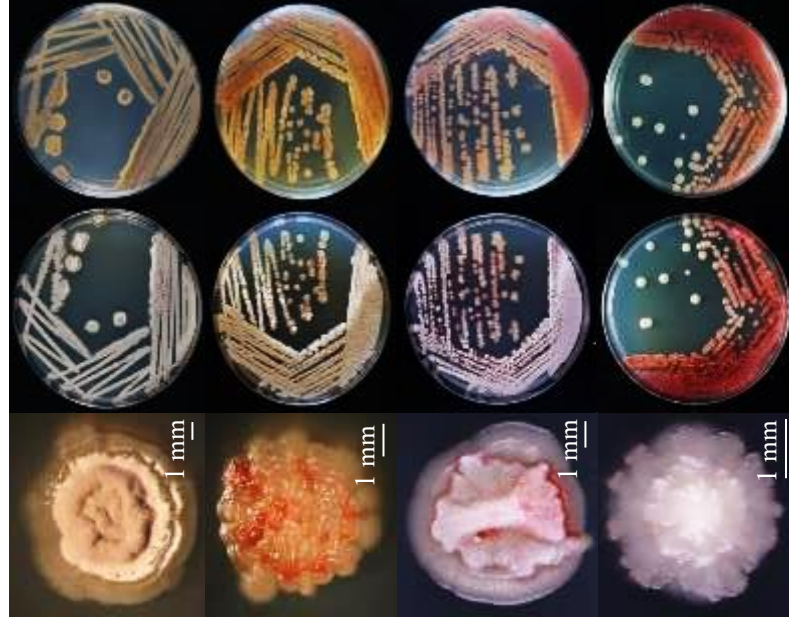
ภาพภาคผนวก จ-1 การเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร YD ที่เติมเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์ (0-7% w/v) อายุ 7 วัน

เกลือ NaCl

ไอโซเลต BBUU144

โคโลนีเดี่ยว

ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



0%

1%

2%

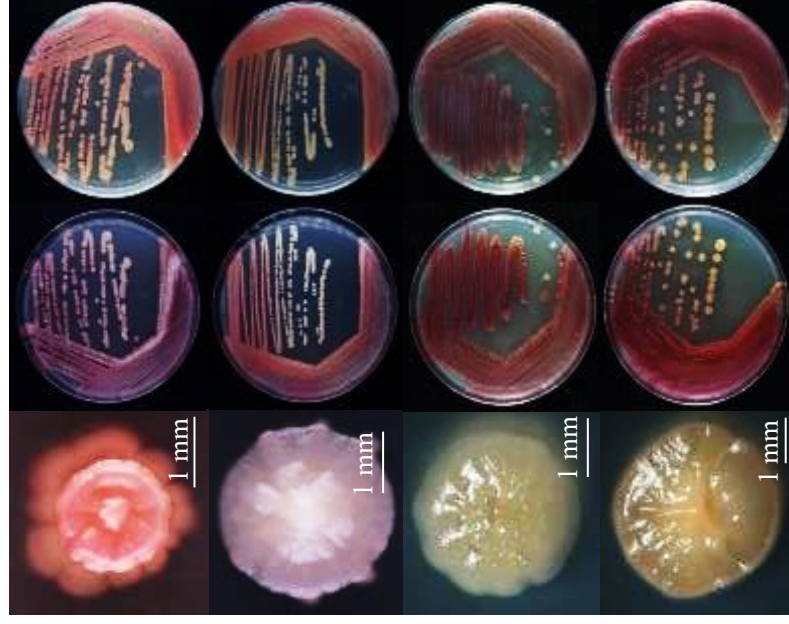
3%

เกลือ NaCl

ไอโซเลต BBUU144

โคโลนีเดี่ยว

ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



4%

5%

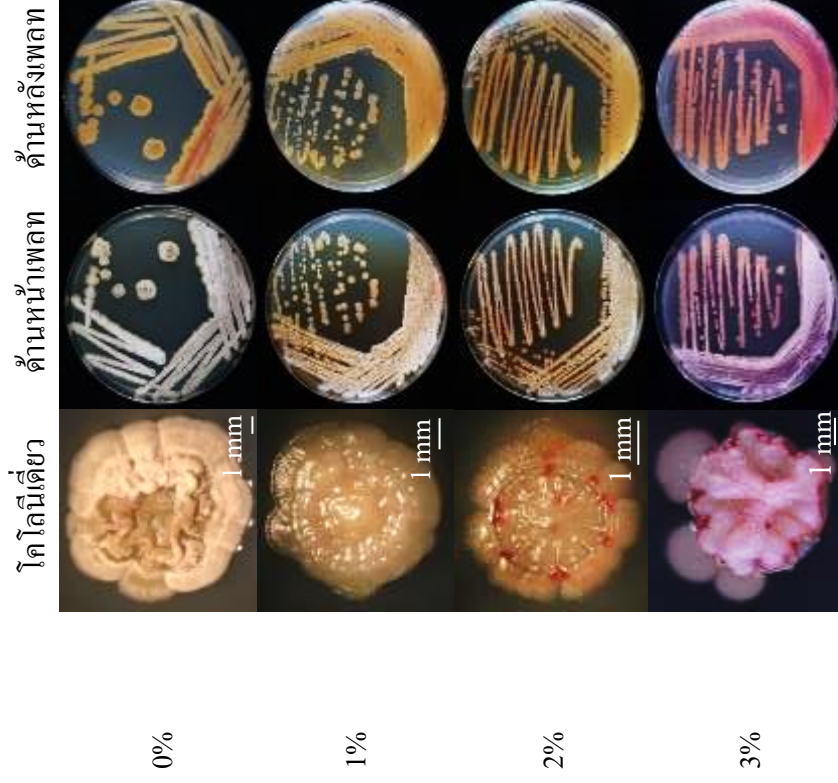
6%

7%

ภาพภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

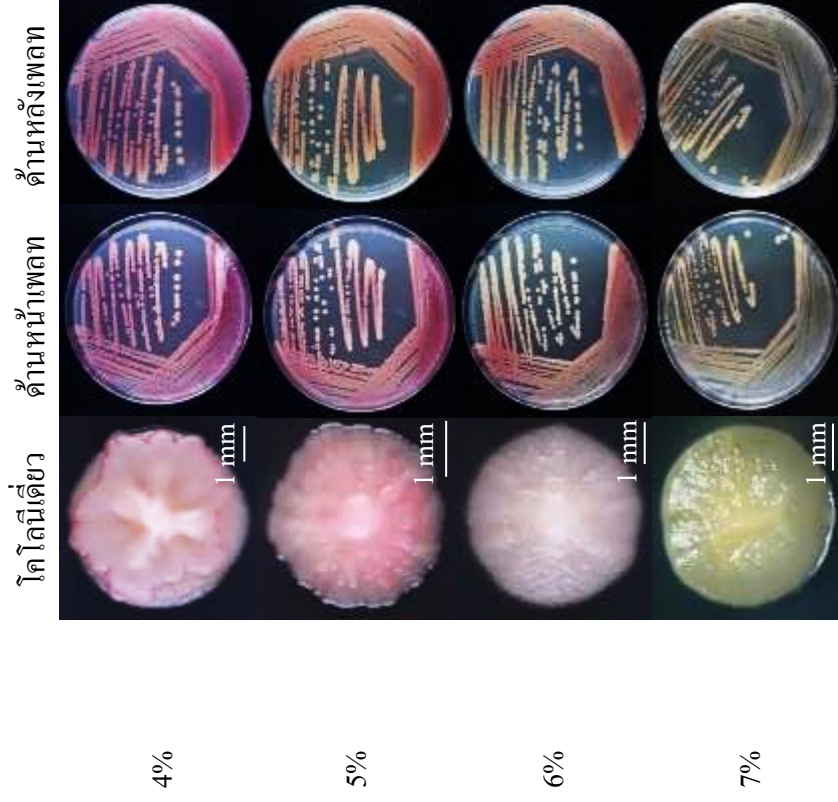
เกลือ NaCl

ไอโซเลต BBUB161



เกลือ NaCl

ไอโซเลต BBUB161



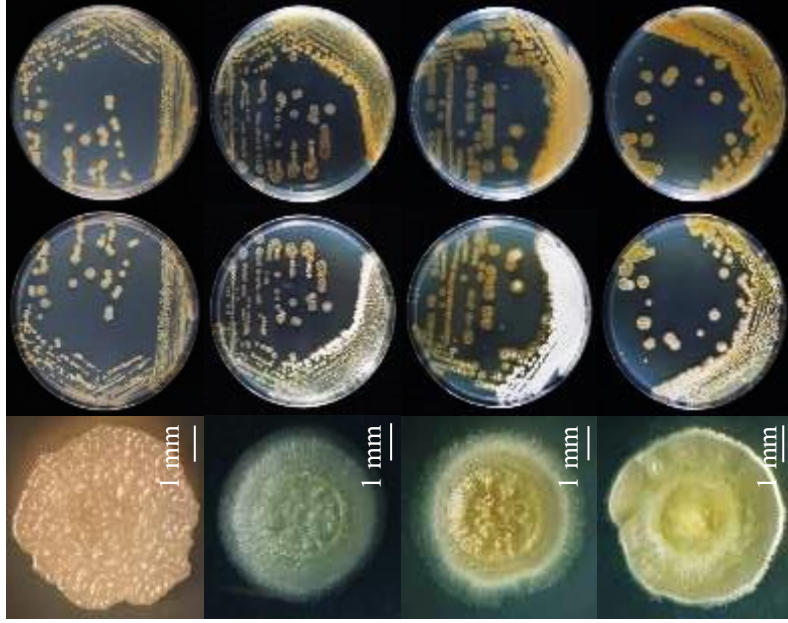
ภาพภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

เกลือ NaCl

ไอโซเลต BBUB500

โคโลนีเดี่ยว

ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



0%

1%

2%

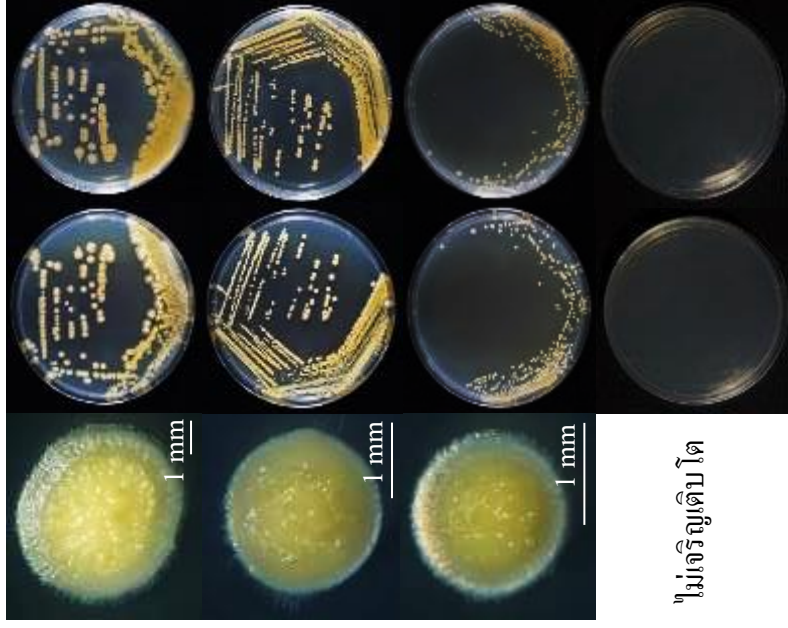
3%

เกลือ NaCl

ไอโซเลต BBUB500

โคโลนีเดี่ยว

ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



4%

5%

6%

7%

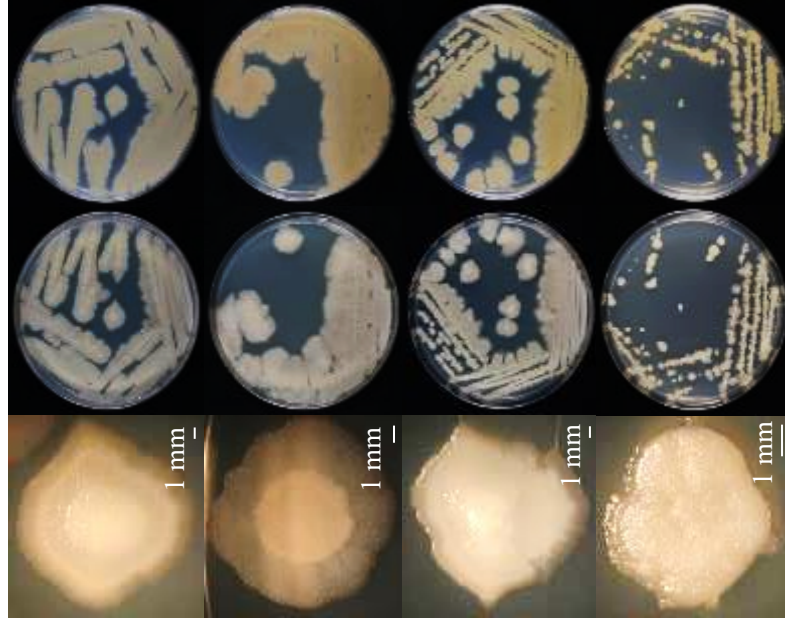
ไม่เจริญเติบโต

ภาพภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

เกลือ NaCl

แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484

โคโลนีเดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



0%

1%

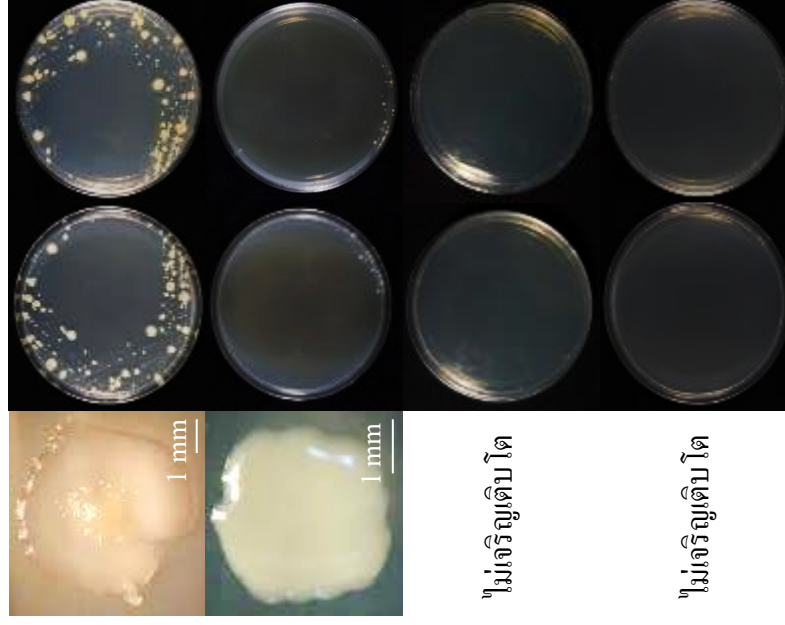
2%

3%

เกลือ NaCl

แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484

โคโลนีเดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



4%

5%

6%

7%

ไม่เจริญเติบโต

ไม่เจริญเติบโต

ภาคผนวก ฉ

**การสร้างหอโรมนพีช IAA และการเจริญของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มี
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์**



1054561741

BUU-IThesis 59910007 thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ตารางภาคผนวก ฉ-1 ข้อมูลการสร้างสารโอมิโนพีซ IAA ของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารละลาย
โซเดียมคลอไรด์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530
นาโนเมตร

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBUU144			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	S.D.
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0 มิลลิโมลาร์	1	0.314	0.313	0.313	15.711	0.032
	2	0.315	0.314	0.313		
	3	0.249	0.252	0.252		
	4	0.276	0.278	0.279		
	5	0.282	0.281	0.281		
	6	0.340	0.342	0.342		
	7	0.265	0.265	0.264		
	8	0.323	0.323	0.325		
	9	0.328	0.328	0.330		
200 มิลลิโมลาร์	1	0.102	0.103	0.101	2.691	0.024
	2	0.091	0.091	0.091		
	3	0.108	0.108	0.109		
	4	0.148	0.144	0.144		
	5	0.082	0.084	0.086		
	6	0.147	0.144	0.143		
	7	0.082	0.087	0.081		
	8	0.099	0.100	0.099		
	9	0.091	0.092	0.092		

ตารางภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBUU144			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	S.D.
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
400 มิลลิโมลาร์	1	0.199	0.195	0.198	5.208	0.035
	2	0.107	0.108	0.108		
	3	0.124	0.124	0.124		
	4	0.126	0.123	0.125		
	5	0.173	0.175	0.172		
	6	0.100	0.198	0.198		
	7	0.106	0.106	0.107		
	8	0.174	0.179	0.173		
	9	0.113	0.115	0.112		
600 มิลลิโมลาร์	1	0.156	0.154	0.155	4.617	0.017
	2	0.132	0.130	0.132		
	3	0.132	0.131	0.131		
	4	0.104	0.104	0.103		
	5	0.151	0.150	0.150		
	6	0.131	0.129	0.127		
	7	0.159	0.151	0.159		
	8	0.123	0.120	0.120		
	9	0.130	0.130	0.130		

ตารางภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBUU144			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	S.D.
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
800 มิลลิโมลาร์	1	0.106	0.107	0.107	4.524	0.027
	2	0.120	0.120	0.199		
	3	0.189	0.188	0.188		
	4	0.135	0.136	0.137		
	5	0.15	0.152	0.151		
	6	0.118	0.117	0.117		
	7	0.125	0.121	0.123		
	8	0.103	0.104	0.102		
	9	0.124	0.122	0.125		
1,000 มิลลิโมลาร์	1	0.136	0.134	0.134	4.463	0.012
	2	0.132	0.133	0.138		
	3	0.140	0.140	0.139		
	4	0.124	0.123	0.123		
	5	0.130	0.130	0.126		
	6	0.147	0.147	0.144		
	7	0.111	0.111	0.110		
	8	0.123	0.123	0.123		
	9	0.149	0.143	0.149		

ตารางภาคผนวก ฉ-1 (ต่อ)

ระดับสารละลาย ไซโตคินินคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBUU161			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	S.D.
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0 มิลลิโมลาร์	1	0.123	0.122	0.122	3.094	0.010
	2	0.108	0.109	0.110		
	3	0.107	0.107	0.107		
	4	0.118	0.118	0.118		
	5	0.115	0.114	0.113		
	6	0.115	0.114	0.115		
	7	0.124	0.124	0.124		
	8	0.103	0.103	0.103		
	9	0.092	0.091	0.091		
200 มิลลิโมลาร์	1	0.069	0.067	0.067	0.409	0.004
	2	0.074	0.073	0.073		
	3	0.068	0.068	0.068		
	4	0.076	0.076	0.076		
	5	0.072	0.070	0.071		
	6	0.069	0.069	0.069		
	7	0.075	0.073	0.073		
	8	0.078	0.077	0.077		
	9	0.068	0.068	0.068		

ตารางภาคผนวก ฉ-1 (ต่อ)

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBUU161			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	S.D.
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
400 มิลลิโมลาร์	1	0.071	0.071	0.070	1.067	0.009
	2	0.072	0.073	0.073		
	3	0.075	0.075	0.075		
	4	0.082	0.082	0.082		
	5	0.081	0.081	0.081		
	6	0.079	0.078	0.079		
	7	0.095	0.094	0.094		
	8	0.088	0.087	0.087		
	9	0.090	0.090	0.089		
600 มิลลิโมลาร์	1	0.086	0.087	0.087	1.094	0.015
	2	0.074	0.073	0.073		
	3	0.054	0.054	0.054		
	4	0.085	0.085	0.084		
	5	0.064	0.064	0.064		
	6	0.092	0.092	0.092		
	7	0.096	0.096	0.096		
	8	0.099	0.099	0.099		
	9	0.086	0.087	0.087		

ตารางภาคผนวก ฉ-1 (ต่อ)

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBUU161			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	S.D.
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
800 มิลลิโมลาร์	1	0.079	0.079	0.078	1.557	0.001
	2	0.073	0.072	0.072		
	3	0.093	0.094	0.093		
	4	0.093	0.093	0.093		
	5	0.096	0.096	0.096		
	6	0.080	0.079	0.080		
	7	0.088	0.089	0.090		
	8	0.095	0.095	0.095		
	9	0.100	0.101	0.101		
1,000 มิลลิโมลาร์	1	0.072	0.073	0.073	0.403	0.015
	2	0.053	0.052	0.053		
	3	0.061	0.061	0.061		
	4	0.055	0.057	0.057		
	5	0.084	0.083	0.083		
	6	0.058	0.057	0.059		
	7	0.095	0.094	0.095		
	8	0.084	0.084	0.084		
	9	0.081	0.081	0.081		

ตารางภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

ระดับสารละลาย ไซโตคัลโลไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBU500			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	S.D.
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0 มิลลิโมลาร์	1	0.159	0.158	0.158	6.269	0.002
	2	0.156	0.156	0.156		
	3	0.160	0.161	0.162		
	4	0.160	0.161	0.161		
	5	0.161	0.162	0.162		
	6	0.161	0.160	0.160		
	7	0.155	0.155	0.155		
	8	0.157	0.157	0.158		
	9	0.158	0.159	0.159		
200 มิลลิโมลาร์	1	0.156	0.156	0.157	5.913	0.007
	2	0.148	0.146	0.146		
	3	0.160	0.160	0.160		
	4	0.165	0.165	0.166		
	5	0.156	0.156	0.154		
	6	0.156	0.156	0.156		
	7	0.151	0.151	0.151		
	8	0.144	0.144	0.144		
	9	0.147	0.148	0.148		

ตารางภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBU500			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	S.D.
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
400 มิลลิโมลาร์	1	0.153	0.152	0.152	5.752	0.010
	2	0.155	0.155	0.155		
	3	0.160	0.160	0.161		
	4	0.164	0.165	0.164		
	5	0.151	0.152	0.152		
	6	0.140	0.140	0.140		
	7	0.134	0.134	0.135		
	8	0.156	0.158	0.157		
	9	0.145	0.146	0.147		
600 มิลลิโมลาร์	1	0.149	0.150	0.150	5.456	0.004
	2	0.153	0.152	0.153		
	3	0.146	0.147	0.146		
	4	0.147	0.148	0.148		
	5	0.143	0.143	0.143		
	6	0.139	0.147	0.146		
	7	0.140	0.140	0.140		
	8	0.143	0.143	0.143		
	9	0.150	0.150	0.150		

ตารางภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBU500			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	S.D.
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
800 มิลลิโมลาร์	1	0.172	0.172	0.172	7.966	0.008
	2	0.182	0.182	0.182		
	3	0.181	0.189	0.183		
	4	0.184	0.184	0.184		
	5	0.191	0.191	0.190		
	6	0.196	0.197	0.197		
	7	0.173	0.173	0.173		
	8	0.190	0.190	0.190		
	9	0.185	0.185	0.185		
1,000 มิลลิโมลาร์	1	0.195	0.195	0.195	10.960	0.070
	2	0.214	0.214	0.214		
	3	0.201	0.201	0.201		
	4	0.171	0.171	0.171		
	5	0.357	0.356	0.356		
	6	0.214	0.214	0.214		
	7	0.196	0.195	0.195		
	8	0.169	0.169	0.169		
	9	0.342	0.342	0.341		

ตารางภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	แบคทีเรีย <i>P. putida</i> ATCC 17484			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	S.D.
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0 มิลลิโมลาร์	1	0.080	0.082	0.082	1.074	0.015
	2	0.079	0.080	0.078		
	3	0.098	0.100	0.096		
	4	0.057	0.057	0.057		
	5	0.071	0.070	0.069		
	6	0.082	0.080	0.080		
	7	0.106	0.108	0.108		
	8	0.072	0.071	0.072		
	9	0.088	0.088	0.087		
200 มิลลิโมลาร์	1	0.123	0.122	0.123	3.765	0.011
	2	0.110	0.110	0.111		
	3	0.132	0.132	0.131		
	4	0.119	0.119	0.119		
	5	0.127	0.126	0.125		
	6	0.102	0.102	0.102		
	7	0.117	0.116	0.116		
	8	0.138	0.138	0.138		
	9	0.128	0.128	0.127		

ตารางภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	แบคทีเรีย <i>P. putida</i> ATCC 17484			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	S.D.
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
400 มิลลิโมลาร์	1	0.374	0.376	0.374	17.182	0.124
	2	0.121	0.121	0.126		
	3	0.454	0.454	0.455		
	4	0.339	0.340	0.342		
	5	0.297	0.275	0.275		
	6	0.333	0.334	0.333		
	7	0.497	0.500	0.499		
	8	0.152	0.153	0.154		
	9	0.334	0.334	0.334		
600 มิลลิโมลาร์	1	0.167	0.167	0.167	5.8189	0.011
	2	0.162	0.161	0.162		
	3	0.162	0.162	0.162		
	4	0.155	0.155	0.155		
	5	0.150	0.150	0.150		
	6	0.130	0.130	0.130		
	7	0.146	0.146	0.146		
	8	0.149	0.149	0.149		
	9	0.149	0.149	0.149		

ตารางภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	แบคทีเรีย <i>P. putida</i> ATCC 17484			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	S.D.
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
800 มิลลิโมลาร์	1	0.155	0.154	0.154	5.584	0.008
	2	0.141	0.142	0.142		
	3	0.146	0.145	0.145		
	4	0.148	0.150	0.149		
	5	0.141	0.141	0.141		
	6	0.155	0.155	0.155		
	7	0.163	0.163	0.163		
	8	0.142	0.142	0.142		
	9	0.146	0.146	0.146		
1,000 มิลลิโมลาร์	1	0.136	0.137	0.137	4.752	0.008
	2	0.153	0.153	0.153		
	3	0.135	0.135	0.135		
	4	0.127	0.126	0.128		
	5	0.135	0.136	0.135		
	6	0.127	0.126	0.127		
	7	0.137	0.137	0.137		
	8	0.140	0.140	0.140		
	9	0.135	0.134	0.134		

ตารางภาคผนวก จ-2 ข้อมูลการเจริญของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์
0-1,000 มิลลิโมลาร์ โดยหาน้ำหนักแห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBUU144			ค่าเฉลี่ย	S.D.
		น้ำหนักกระดาศกรอง				
		ก่อนอบ	หลังอบ	นน. แห้ง		
0 มิลลิโมลาร์	1	0.177	0.198	0.021	0.024	0.002
	2	0.174	0.196	0.022		
	3	0.175	0.199	0.024		
	4	0.174	0.196	0.021		
	5	0.179	0.205	0.026		
	6	0.182	0.209	0.027		
	7	0.178	0.202	0.024		
200 มิลลิโมลาร์	1	0.176	0.243	0.068	0.064	0.014
	2	0.178	0.249	0.071		
	3	0.183	0.266	0.082		
	4	0.179	0.251	0.073		
	5	0.167	0.226	0.059		
	6	0.187	0.242	0.055		
	7	0.174	0.215	0.041		
400 มิลลิโมลาร์	1	0.171	0.268	0.097	0.083	0.018
	2	0.170	0.230	0.060		
	3	0.173	0.272	0.099		
	4	0.169	0.268	0.099		
	5	0.174	0.253	0.079		
	6	0.177	0.236	0.059		
	7	0.177	0.265	0.088		

ตารางภาคผนวก จ-2

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBUU144			ค่าเฉลี่ย	S.D.
		น้ำหมักกระดาศกรอง				
		ก่อนอบ	หลังอบ	นน. แห้ง		
600 มิลลิโมลาร์	1	0.171	0.256	0.085	0.084	0.016
	2	0.177	0.268	0.091		
	3	0.180	0.291	0.111		
	4	0.177	0.260	0.083		
	5	0.179	0.242	0.064		
	6	0.179	0.246	0.067		
	7	0.177	0.265	0.088		
800 มิลลิโมลาร์	1	0.180	0.292	0.112	0.109	0.033
	2	0.166	0.303	0.137		
	3	0.173	0.317	0.144		
	4	0.172	0.309	0.137		
	5	0.168	0.238	0.070		
	6	0.175	0.275	0.100		
	7	0.182	0.245	0.064		
1,000 มิลลิโมลาร์	1	0.181	0.312	0.131	0.148	0.013
	2	0.170	0.310	0.141		
	3	0.179	0.338	0.159		
	4	0.180	0.345	0.165		
	5	0.168	0.304	0.136		
	6	0.175	0.335	0.160		
	7	0.183	0.328	0.145		

ตารางภาคผนวก จ-2

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBUU161			ค่าเฉลี่ย	S.D.
		น้ำหมักกระดาศกรอง				
		ก่อนอบ	หลังอบ	นน.แห้ง		
0 มิลลิโมลาร์	1	0.177	0.187	0.010	0.010	0.002
	2	0.175	0.187	0.012		
	3	0.170	0.183	0.012		
	4	0.177	0.189	0.011		
	5	0.179	0.186	0.008		
	6	0.177	0.185	0.009		
	7	0.180	0.188	0.008		
200 มิลลิโมลาร์	1	0.179	0.201	0.022	0.021	0.003
	2	0.179	0.195	0.016		
	3	0.178	0.201	0.023		
	4	0.176	0.200	0.024		
	5	0.177	0.197	0.019		
	6	0.179	0.199	0.020		
	7	0.178	0.199	0.021		
400 มิลลิโมลาร์	1	0.176	0.206	0.029	0.031	0.002
	2	0.178	0.209	0.030		
	3	0.176	0.204	0.029		
	4	0.177	0.210	0.033		
	5	0.177	0.209	0.033		
	6	0.187	0.218	0.031		
	7	0.180	0.215	0.035		

ตารางภาคผนวก จ-2

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBUU161			ค่าเฉลี่ย	S.D.
		น้ำนักกระดาศกรอง				
		ก่อนอบ	หลังอบ	นน. แห่ง		
600 มิลลิโมลาร์	1	0.175	0.222	0.047	0.038	0.019
	2	0.181	0.225	0.044		
	3	0.169	0.227	0.058		
	4	0.172	0.236	0.064		
	5	0.176	0.199	0.023		
	6	0.178	0.195	0.017		
	7	0.181	0.198	0.017		
800 มิลลิโมลาร์	1	0.174	0.216	0.042	0.047	0.029
	2	0.176	0.220	0.044		
	3	0.177	0.197	0.020		
	4	0.177	0.203	0.026		
	5	0.178	0.204	0.025		
	6	0.172	0.245	0.073		
	7	0.174	0.273	0.100		
1,000 มิลลิโมลาร์	1	0.175	0.256	0.081	0.064	0.025
	2	0.171	0.269	0.098		
	3	0.178	0.260	0.082		
	4	0.183	0.241	0.058		
	5	0.182	0.241	0.059		
	6	0.185	0.218	0.032		
	7	0.176	0.210	0.035		

ตารางภาคผนวก จ-2

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBUU500			ค่าเฉลี่ย	S.D.
		น้ำหนักกระดาศกรอง				
		ก่อนอบ	หลังอบ	นน.แห้ง		
0 มิลลิโมลาร์	1	0.178	0.190	0.013	0.015	0.004
	2	0.174	0.184	0.011		
	3	0.183	0.203	0.019		
	4	0.175	0.187	0.012		
	5	0.183	0.203	0.019		
	6	0.175	0.187	0.012		
	7	0.182	0.199	0.017		
200 มิลลิโมลาร์	1	0.180	0.212	0.033	0.031	0.005
	2	0.172	0.202	0.031		
	3	0.179	0.218	0.039		
	4	0.178	0.212	0.035		
	5	0.177	0.204	0.027		
	6	0.174	0.197	0.023		
	7	0.178	0.208	0.030		
400 มิลลิโมลาร์	1	0.182	0.231	0.048	0.046	0.002
	2	0.175	0.220	0.046		
	3	0.175	0.218	0.043		
	4	0.181	0.226	0.046		
	5	0.177	0.224	0.047		
	6	0.181	0.226	0.045		
	7	0.170	0.216	0.046		

ตารางภาคผนวก จ-2

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	ไอโซเลต BBU500			ค่าเฉลี่ย	S.D.
		น้ำหนักกระดาศกรอง				
		ก่อนอบ	หลังอบ	นน.แห้ง		
600 มิลลิโมลาร์	1	0.171	0.236	0.065	0.066	0.005
	2	0.168	0.231	0.063		
	3	0.175	0.237	0.062		
	4	0.174	0.240	0.066		
	5	0.169	0.230	0.061		
	6	0.177	0.250	0.073		
	7	0.175	0.248	0.073		
800 มิลลิโมลาร์	1	0.179	0.243	0.063	0.071	0.007
	2	0.178	0.248	0.069		
	3	0.177	0.245	0.068		
	4	0.176	0.242	0.066		
	5	0.178	0.261	0.083		
	6	0.176	0.251	0.075		
	7	0.178	0.252	0.074		
1,000 มิลลิโมลาร์	1	0.177	0.262	0.086	0.087	0.002
	2	0.175	0.265	0.091		
	3	0.191	0.276	0.086		
	4	0.180	0.265	0.084		
	5	0.181	0.268	0.087		
	6	0.173	0.260	0.088		
	7	0.174	0.261	0.088		

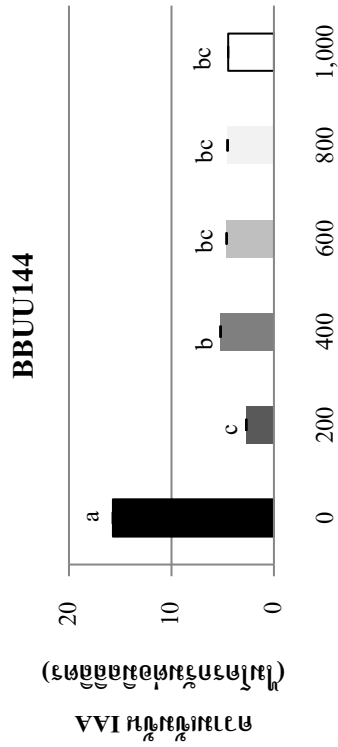
ตารางภาคผนวก จ-2

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	แบคทีเรีย <i>P. putida</i> ATCC 17484			ค่าเฉลี่ย	S.D.
		น้ำหมักกระดาษกรอง				
		ก่อนอบ	หลังอบ	นน. แห้ง		
0 มิลลิโมลาร์	1	0.168	0.173	0.005	0.007	0.004
	2	0.173	0.177	0.003		
	3	0.181	0.187	0.006		
	4	0.179	0.183	0.003		
	5	0.172	0.185	0.013		
	6	0.177	0.184	0.007		
	7	0.177	0.189	0.011		
200 มิลลิโมลาร์	1	0.181	0.192	0.011	0.016	0.004
	2	0.176	0.195	0.020		
	3	0.179	0.201	0.022		
	4	0.177	0.194	0.017		
	5	0.176	0.192	0.016		
	6	0.170	0.183	0.013		
	7	0.177	0.189	0.012		
400 มิลลิโมลาร์	1	0.173	0.201	0.028	0.027	0.003
	2	0.176	0.206	0.030		
	3	0.177	0.198	0.022		
	4	0.163	0.190	0.027		
	5	0.179	0.208	0.029		
	6	0.179	0.205	0.026		
	7	0.178	0.206	0.028		

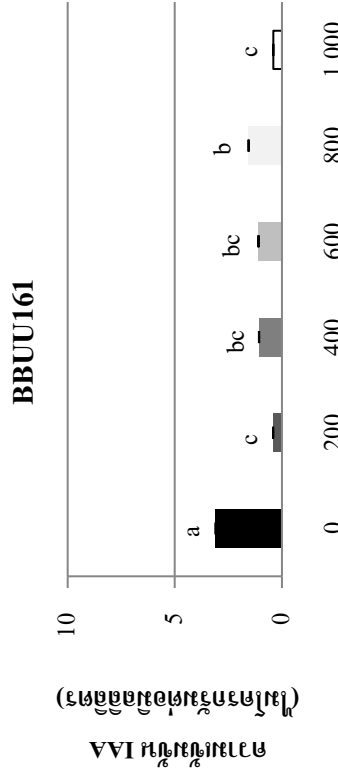
ตารางภาคผนวก จ-2

ระดับสารละลาย โซเดียมคลอไรด์	หลอดที่	แบคทีเรีย <i>P. putida</i> ATCC 17484			ค่าเฉลี่ย	S.D.
		น้ำหมักกระดาษกรอง				
		ก่อนอบ	หลังอบ	นน. แห้ง		
600 มิลลิโมลาร์	1	0.180	0.249	0.069	0.057	0.016
	2	0.182	0.258	0.076		
	3	0.181	0.256	0.076		
	4	0.177	0.218	0.041		
	5	0.176	0.218	0.042		
	6	0.176	0.219	0.043		
	7	0.184	0.238	0.054		
800 มิลลิโมลาร์	1	0.174	0.274	0.100	0.109	0.034
	2	0.174	0.253	0.080		
	3	0.176	0.279	0.104		
	4	0.177	0.350	0.174		
	5	0.178	0.315	0.136		
	6	0.178	0.266	0.088		
	7	0.176	0.260	0.085		
1,000 มิลลิโมลาร์	1	0.179	0.230	0.051	0.073	0.024
	2	0.176	0.221	0.044		
	3	0.184	0.284	0.100		
	4	0.173	0.272	0.099		
	5	0.179	0.230	0.051		
	6	0.173	0.253	0.079		
	7	0.180	0.265	0.086		

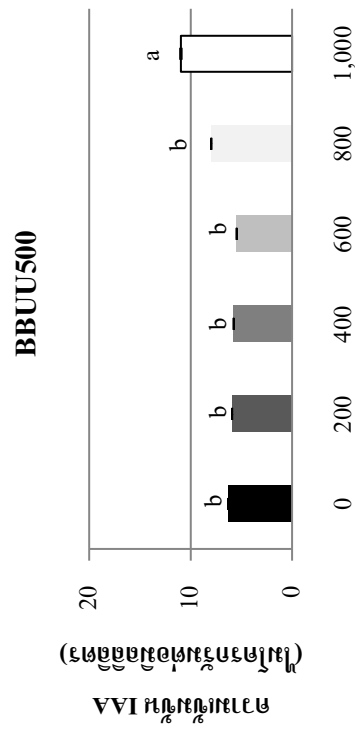
ภาพภาคผนวก ก-1 การสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารละลายไซโตคอกโลไรต์ 0-1,000 มิลลิโมลาร์



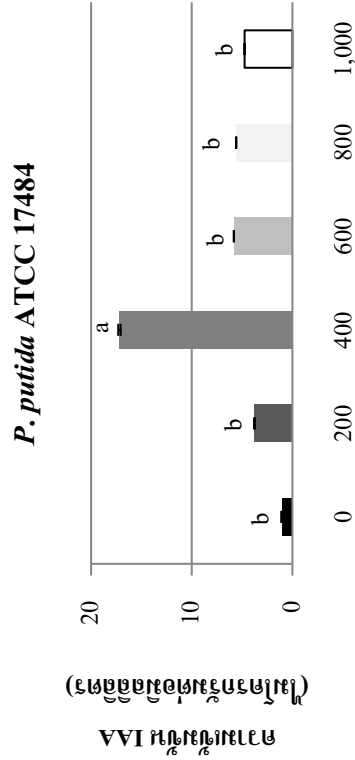
ความเข้มข้นสารละลายไซโตคอกโลไรต์ (มิลลิโมลาร์)



ความเข้มข้นสารละลายไซโตคอกโลไรต์ (มิลลิโมลาร์)



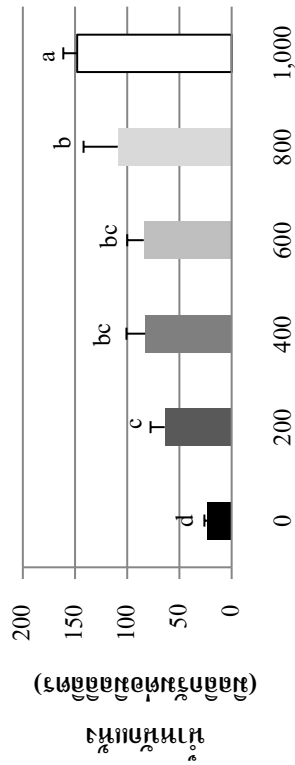
ความเข้มข้นสารละลายไซโตคอกโลไรต์ (มิลลิโมลาร์)



ความเข้มข้นสารละลายไซโตคอกโลไรต์ (มิลลิโมลาร์)

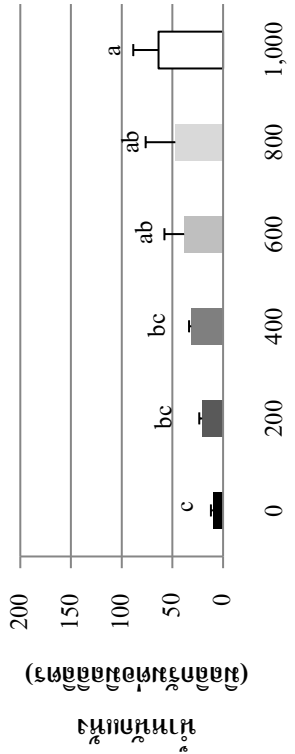
ภาพภาคผนวก ก-2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์

BBUU144



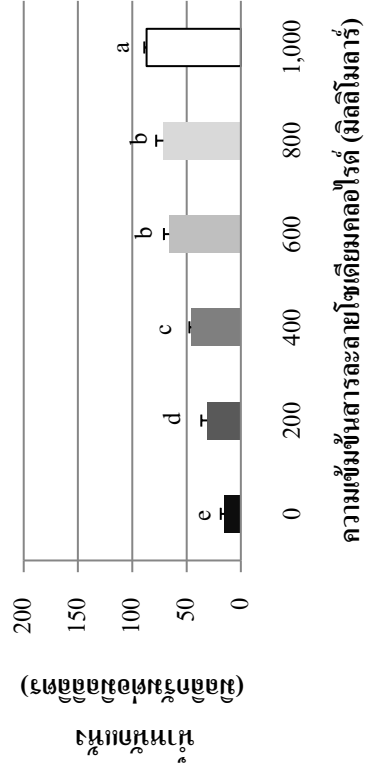
ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)

BBUU161



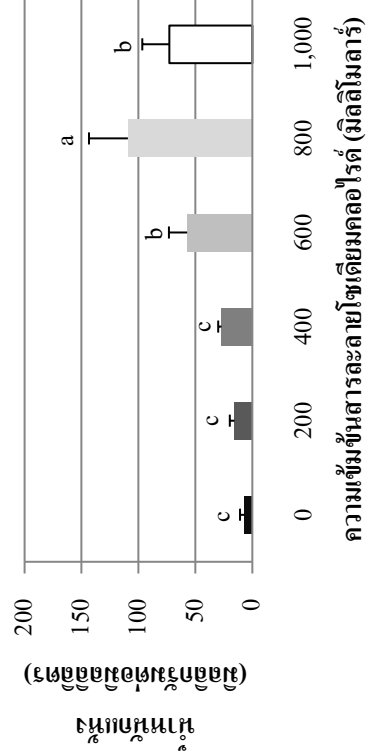
ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)

BBUU500



ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)

***P. putida* ATCC 17484**



ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)

ภาคผนวก ข

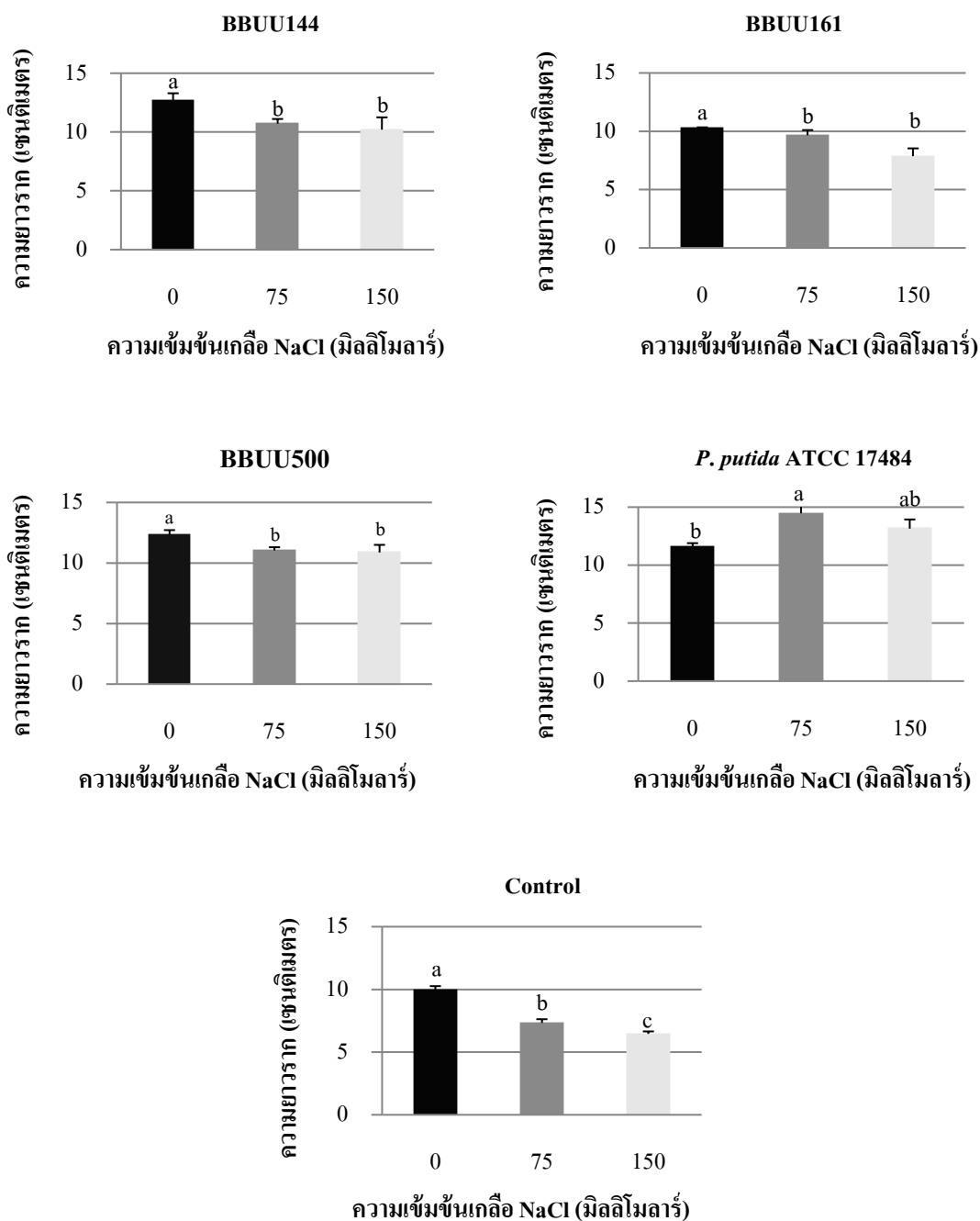
กราฟและข้อมูลผลของแบคทีเรียสังเคราะห์การเจริญเติบโตของ
ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML105)
ที่ระดับความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ



1054561741

BUU-IThesis 59910007 thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

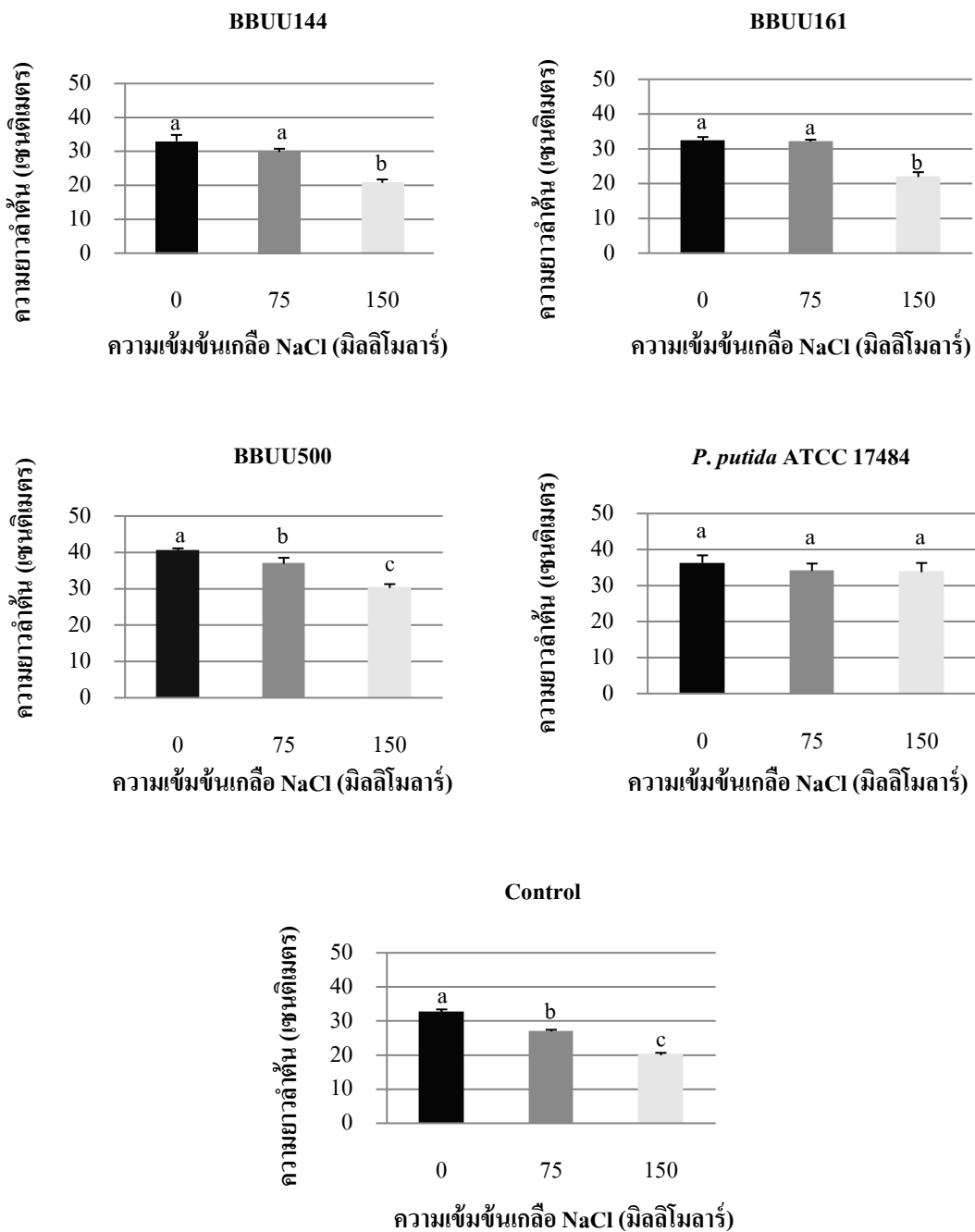
ภาพภาคผนวก ข-1 แบบที่เรียงเสริมการเจริญเติบโตข้าวขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) ที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ



1054561741

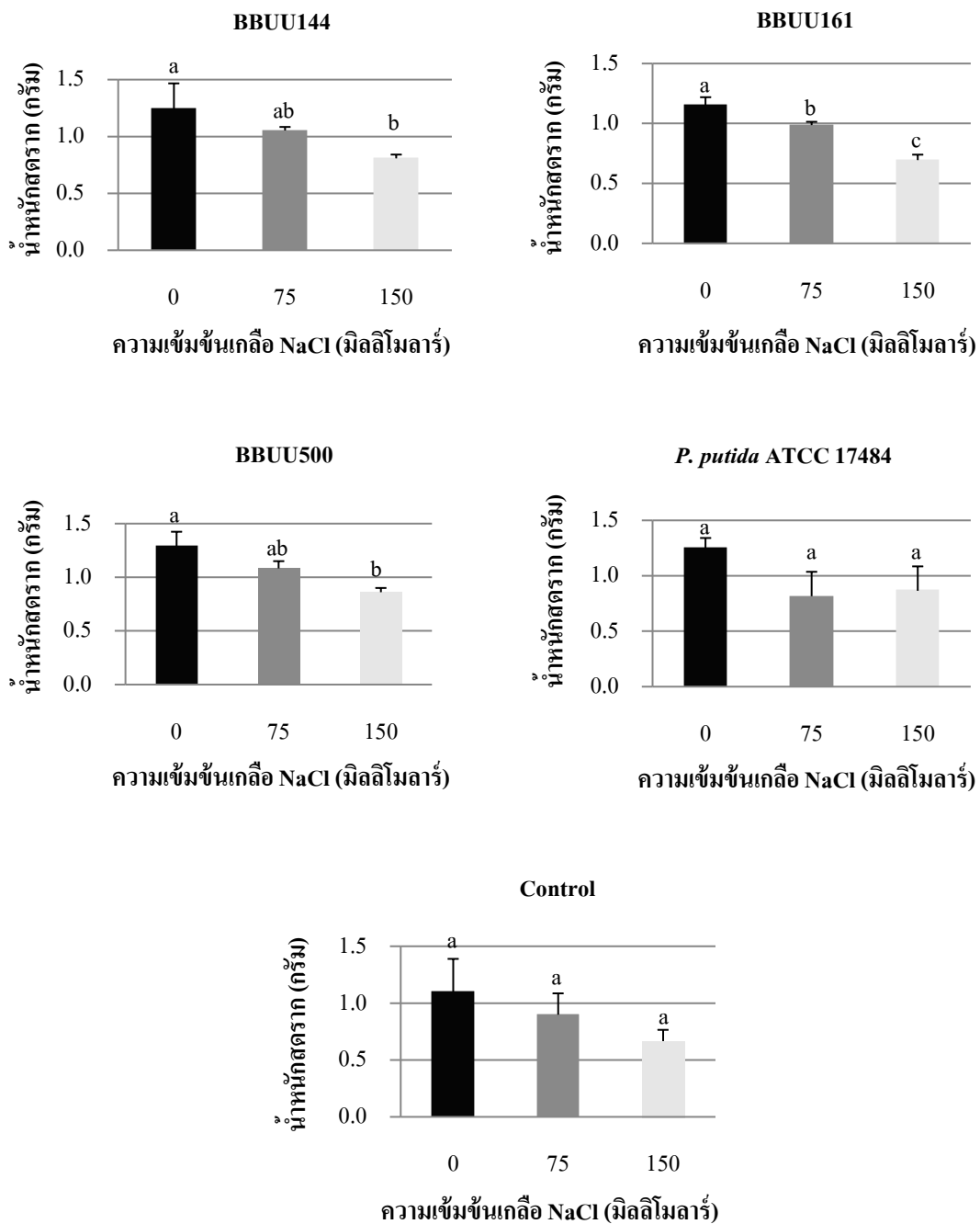
BUU_1Thesis_59910007_thesis / rev: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)



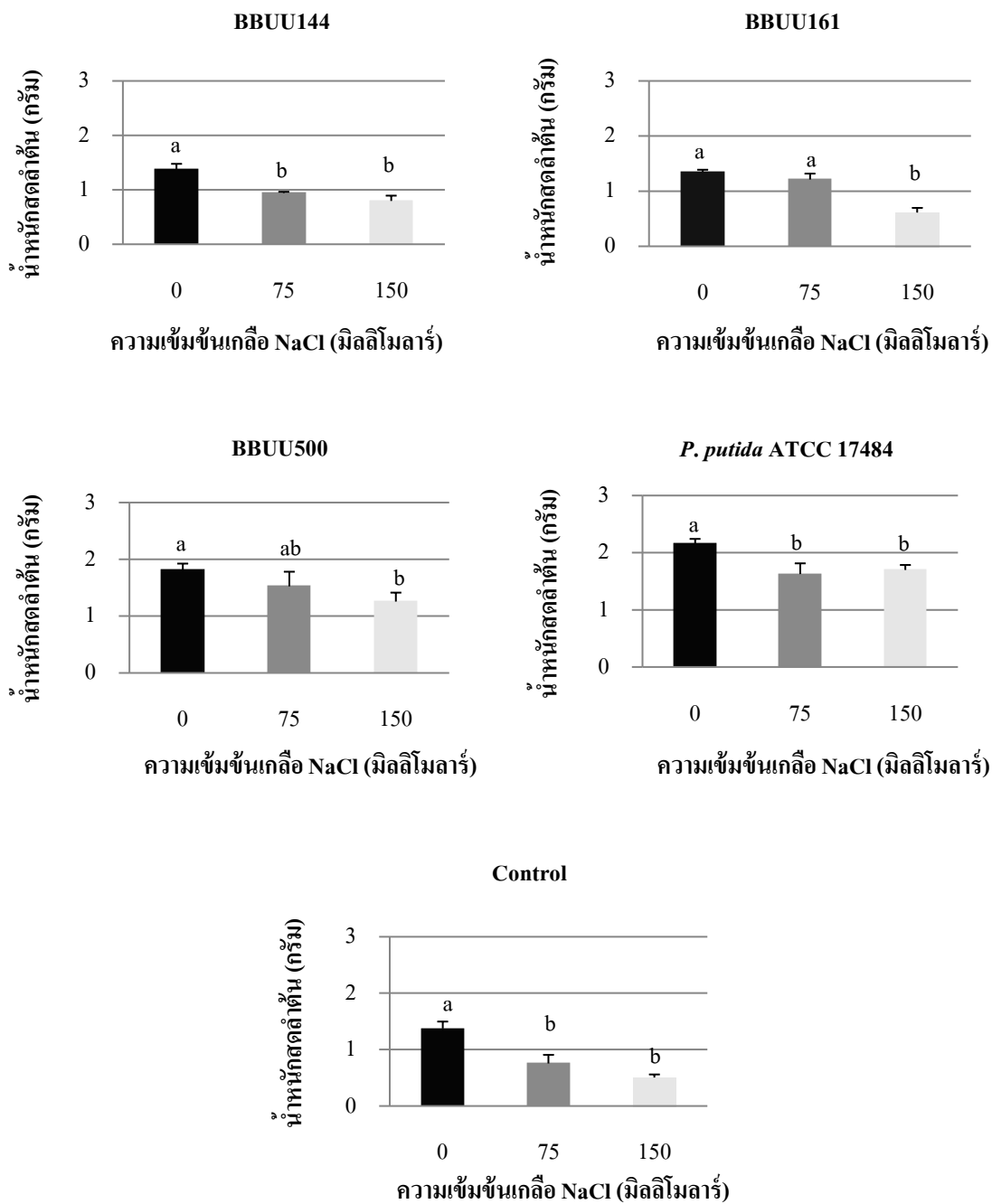
1054561741

ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)



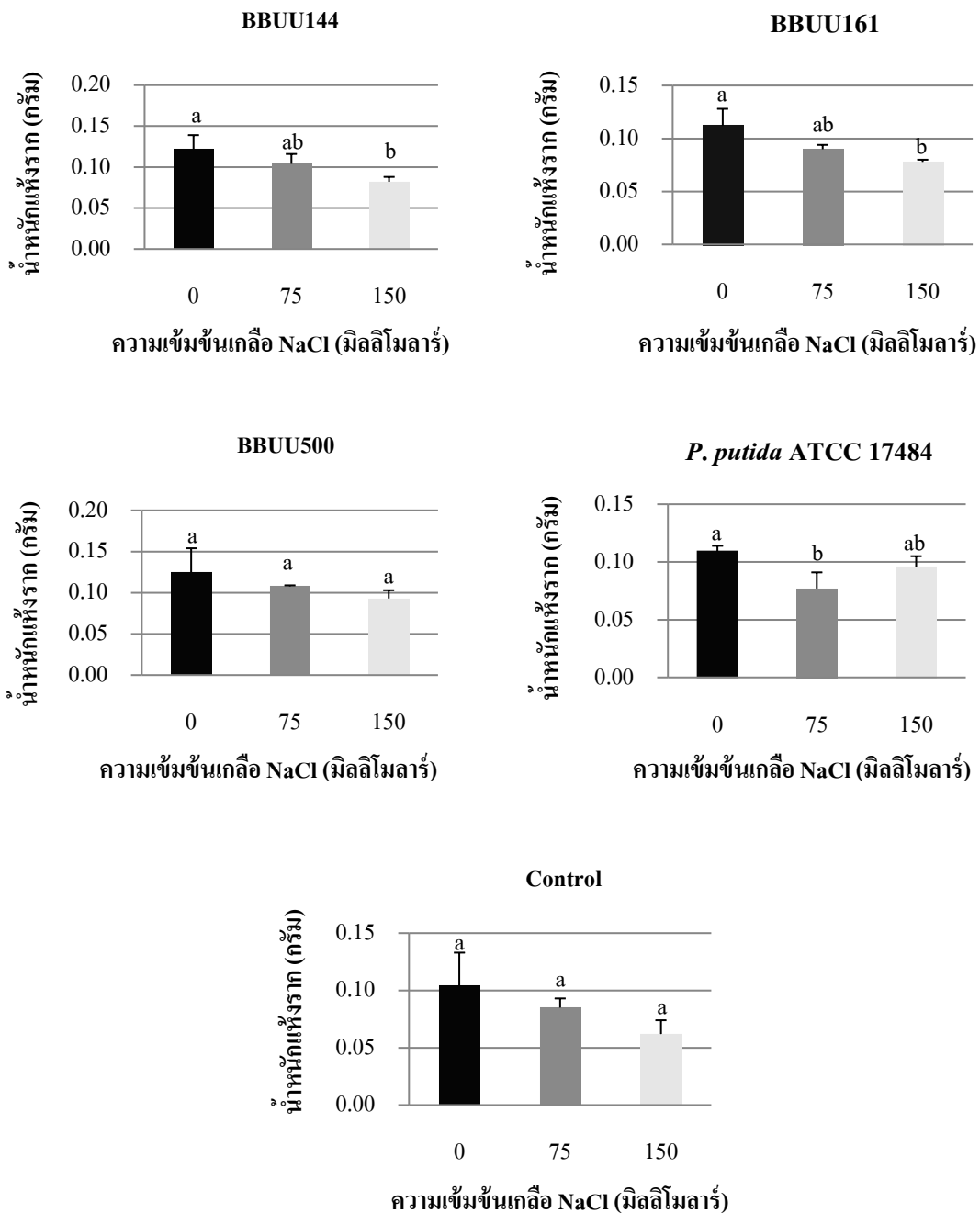
1054561741

ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)



1054561741

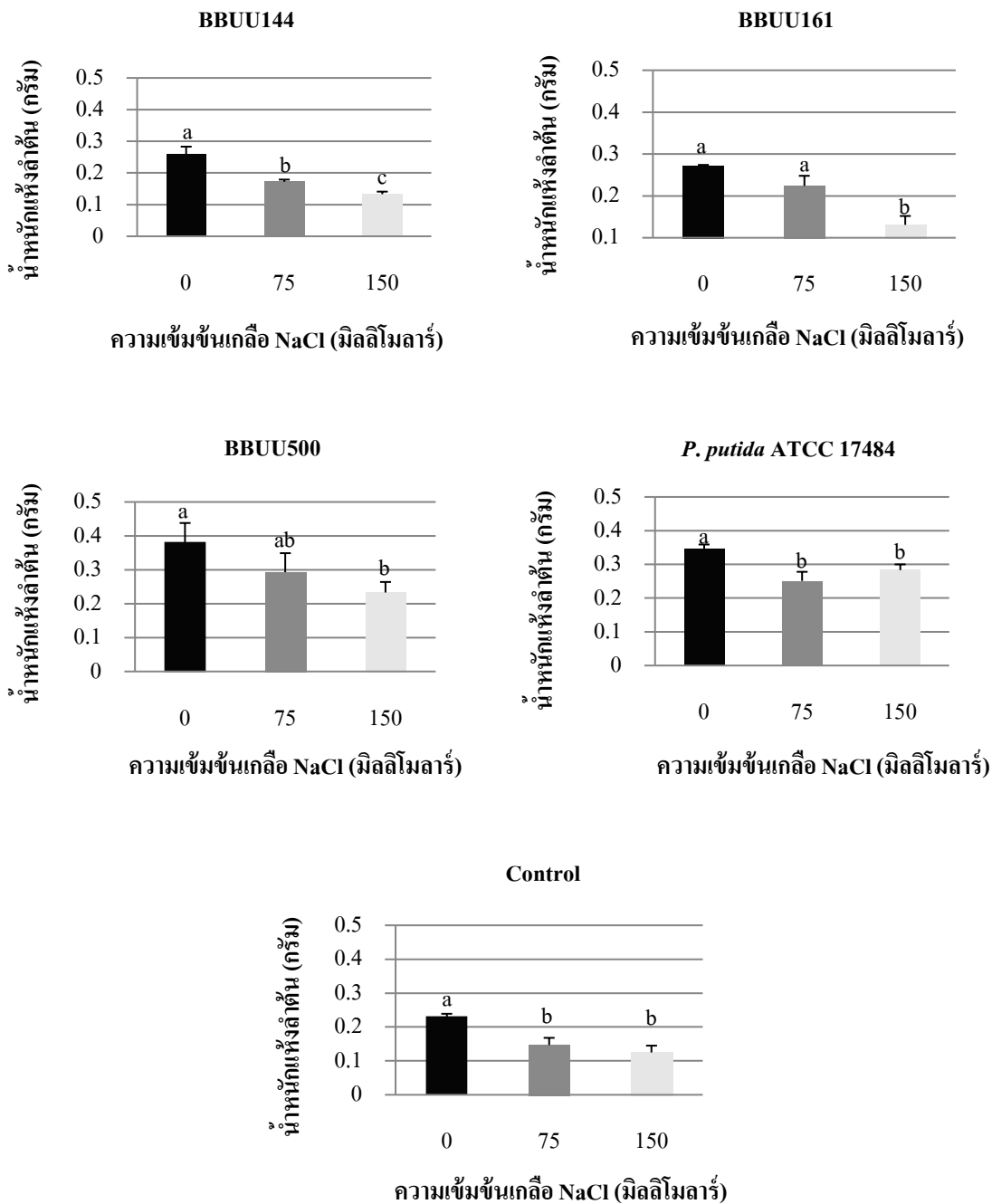
ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)



1054561741

BUU-IThesis 59910007 thesis / rev: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)



1054561741

ตารางภาคผนวก ข-1 ข้อมูลผลแบบคที่เรียตั้งเสริมการเจริญเติบโตข้าวจากอภะถิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) ที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ

แบบคที่เรีย	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	ชุดที่	ความยาว (เซนติเมตร)	ราคา	ค่าเฉลี่ย	S.D.	ค่าเฉลี่ย	S.D.
0		1	10.300		33.475			
		2	9.725	9.958	0.302	32.350	32.508	0.898
		3	9.850			31.700		
75		1	7.000		27.500			
		2	7.500	7.333	0.289	26.625	26.958	0.473
		3	7.500			26.750		
150		1	6.500		19.750			
		2	6.250	6.458	0.191	19.375	19.958	0.711
		3	6.625			20.750		

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

แบบที่เรียก	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	จุดที่	ความยาว (เซนติเมตร)		
			ราคา	ค่าเฉลี่ย	S.D.
		1	12.000	32.000	
	0	2	13.250	12.667	0.629
		3	12.750	31.875	33.000
				35.125	1.841
		1	10.875	30.250	
BBU144	75	2	10.250	10.708	0.402
		3	11.000	28.750	29.833
				30.500	0.946
		1	11.375	20.250	
	150	2	9.375	10.208	1.041
		3	9.875	21.875	20.708
				20.000	1.018

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

แบบที่เรียก	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	จุดที่	ความยาว (เซนติเมตร)		
			ราคา	ค่าเฉลี่ย	S.D.
		1	10.150	33.075	
	0	2	10.275	10.250	0.090
		3	10.325	32.750	1.130
		1	10.125	32.625	
BBUU161	75	2	9.250	9.667	0.439
		3	9.625	32.125	0.564
		1	8.125	20.500	
	150	2	7.125	7.875	0.661
		3	8.375	22.000	1.377

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

แบบที่เรีย	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	ชนิดที่	ความยาว (เซนติเมตร)	ราคา	ค่าเฉลี่ย	S.D.	ลำดับ	ค่าเฉลี่ย	S.D.
	0	1	12.500	40.250					
		2	12.625	40.075	12.358	0.359	40.075	40.508	0.605
		3	11.950	41.200					
		1	11.250	38.375					
BBUU500	75	2	10.750	35.125	11.042	0.260	35.125	36.875	1.639
		3	11.125	37.125			37.125		
		1	10.875	30.250			30.250		
	150	2	10.250	29.125	10.875	0.625	29.125	30.208	1.063
		3	11.500	31.250			31.250		

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	จุดที่	ความยาว (เซนติเมตร)		
			ราคา	ค่าเฉลี่ย	S.D.
		1	11.700		37.400
	0	2	11.825	11.592	37.575
		3	11.250		33.800
<hr/>					
<i>P. putida</i>		1	13.825		32.300
ATCC 17484	75	2	14.300	14.475	33.575
		3	15.300		36.300
<hr/>					
		1	12.375		36.150
	150	2	13.950	13.150	33.925
		3	13.125		31.050
<hr/>					
				ค่าเฉลี่ย	S.D.
				36.258	2.131
				34.058	2.043
				33.708	2.557

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

แบบที่เรีย	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	จุดที่	น้ำหนักสด (กรัม)		
			ราคา	ค่าเฉลี่ย	S.D.
		1	1.213	1.456	
	0	2	1.479	1.416	1.382
		3	1.027	1.275	0.095
		1	1.077	0.939	
BBUU144	75	2	1.064	0.925	0.943
		3	1.019	0.966	0.021
		1	0.775	0.867	
	150	2	0.808	0.835	0.796
		3	0.841	0.685	0.097

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

แบบที่เรียก	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	จุดที่	น้ำหนักสด (กรัม)		
			ราก	ค่าเฉลี่ย	S.D.
			ลำดับ	ค่าเฉลี่ย	S.D.
		1	1.139	1.802	
	0	2	1.398	1.931	0.109
		3	1.332	1.714	
		1	1.121	1.630	
BBUU500	75	2	1.005	1.712	0.257
		3	1.123	1.232	
		1	0.846	1.118	
	150	2	0.905	1.427	0.157
		3	0.832	1.225	

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	จุดที่	น้ำหนักสด (กรัม)		
			ราก	ค่าเฉลี่ย	S.D.
			ลำดับ	ค่าเฉลี่ย	S.D.
		1	1.355	2.251	
	0	2	1.189	2.107	0.076
		3	1.206	2.136	
<i>P. putida</i>		1	1.055	1.654	
ATCC 17484	75	2	0.773	1.426	0.187
		3	0.622	1.796	
		1	1.059	1.726	
	150	2	0.910	1.767	0.087
		3	0.627	1.601	

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

แบบที่เรีย	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	จุดที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)		
			ราก	ค่าเฉลี่ย	S.D.
		1	0.136	0.232	
	0	2	0.079	0.104	0.029
		3	0.099	0.218	0.010
				0.236	
		1	0.076	0.128	
	75	2	0.089	0.085	0.008
		3	0.091	0.142	0.021
				0.170	
		1	0.076	0.116	
	150	2	0.060	0.062	0.012
		3	0.051	0.111	0.020
				0.148	

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

แบบที่เรีย	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	จุดที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)		
			ราคา	ค่าเฉลี่ย	S.D.
		1	0.128	0.277	
	0	2	0.135	0.122	0.016
		3	0.103	0.232	
		1	0.106	0.168	
BBUU144	75	2	0.103	0.104	0.013
		3	0.102	0.180	
		1	0.078	0.142	
	150	2	0.081	0.082	0.006
		3	0.089	0.130	
				ค่าเฉลี่ย	S.D.
				0.259	0.024
				0.172	0.007
				0.133	0.008

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

แบบที่เรีย	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	จุดที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)		
			ราคา	ค่าเฉลี่ย	S.D.
		1	0.101	0.356	
	0	2	0.157	0.125	0.029
		3	0.117	0.447	0.381
				0.341	0.057
		1	0.109	0.307	
BBUU500	75	2	0.107	0.108	0.001
		3	0.109	0.293	0.056
				0.231	
		1	0.089	0.208	
	150	2	0.104	0.093	0.010
		3	0.086	0.268	0.233
				0.224	0.031

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	จุดที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)		
			ราก	ค่าเฉลี่ย	S.D.
		1	0.110	0.350	
	0	2	0.105	0.109	0.005
		3	0.114	0.332	0.346
				0.356	0.013
<i>P. putida</i>		1	0.094	0.261	
ATCC 17484	75	2	0.068	0.077	0.014
		3	0.070	0.221	0.251
				0.272	0.027
		1	0.106	0.284	
	150	2	0.094	0.096	0.009
		3	0.087	0.300	0.283
				0.265	0.017

ภาคผนวก ซ

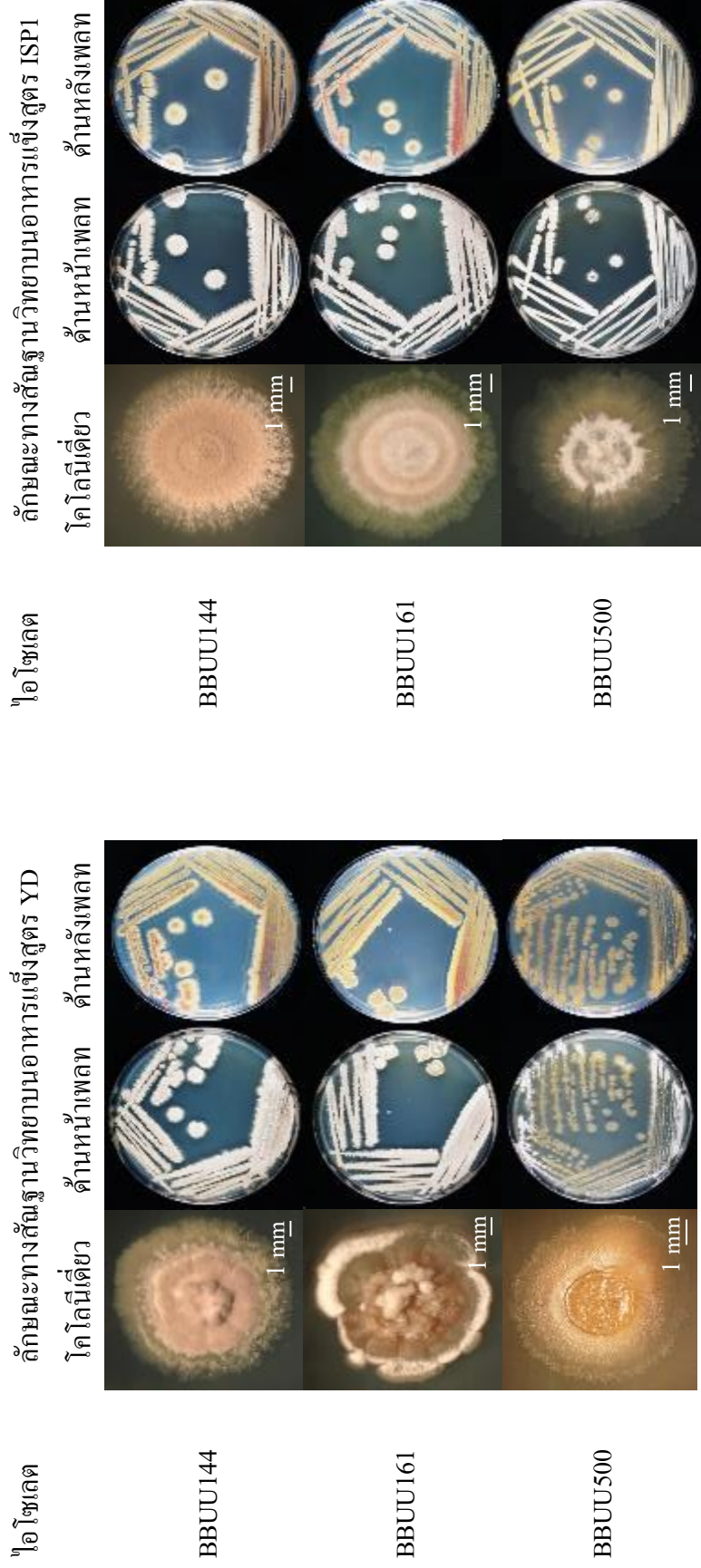
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตร YD, ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, ISP7 และ ISP9 อายุ 21 วัน, ลักษณะของสปอร์จากกล้อง SEM ของแอคติโนมัยสีทบนอาหารสูตรต่าง ๆ และแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของแอคติโนมัยสีทกับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ



1054561741

BUU .iThesis 59910007 thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพภาคผนวก ข-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอสคิตโนเมียสที่พบในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ อายุ 21 วัน



ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

ไอโซเลต

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแรงสูตร ISP2
โตโลนเดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



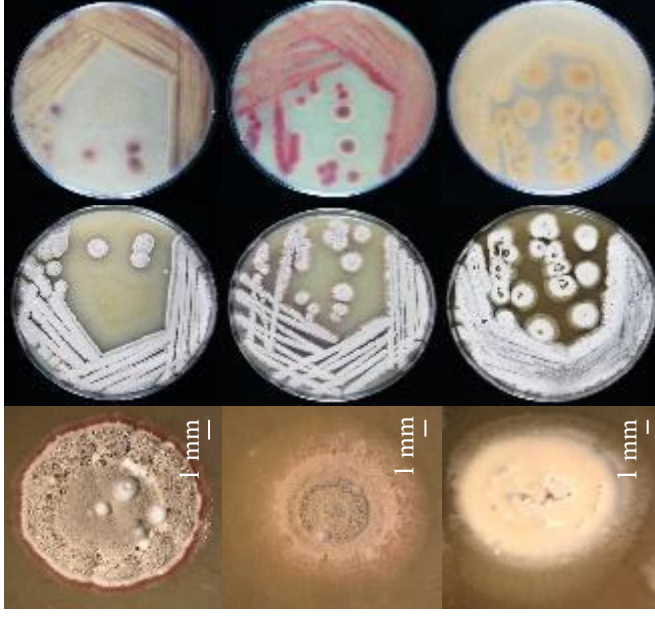
BBUU144

BBUU161

BBUU500

ไอโซเลต

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแรงสูตร ISP3
โตโลนเดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



BBUU144

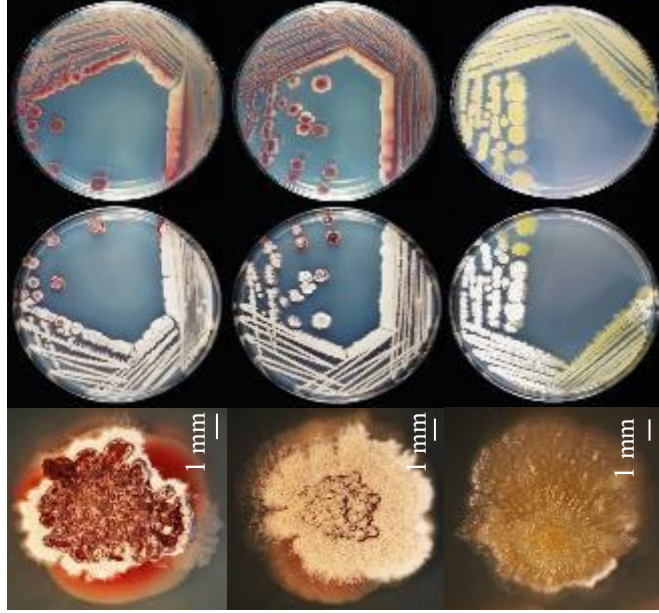
BBUU161

BBUU500

ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

ไอโซเลต

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตร ISP4
โตโลบเดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



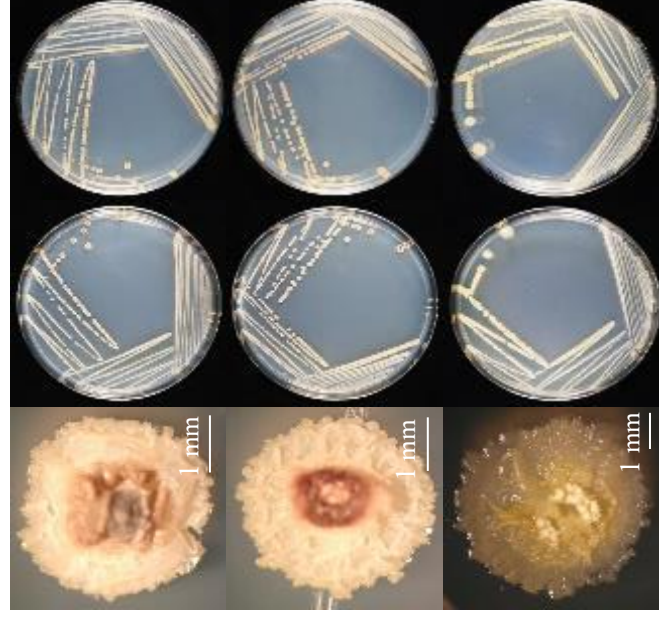
BBUU144

BBUU161

BBUU500

ไอโซเลต

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตร ISP5
โตโลบเดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



BBUU144

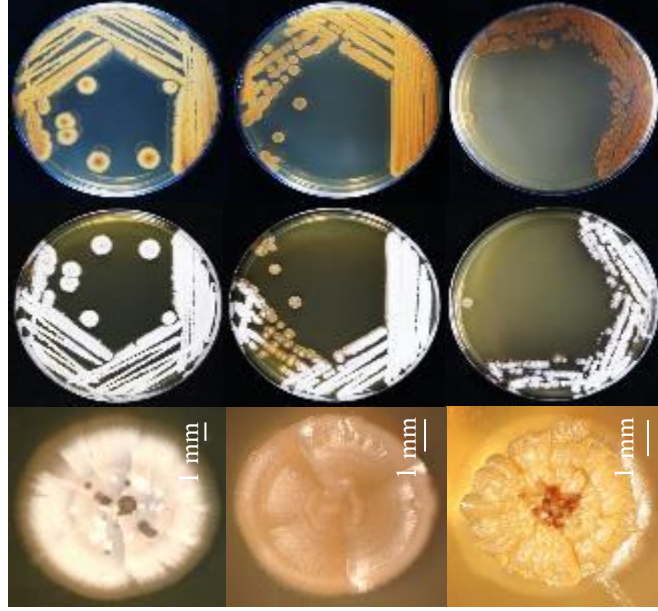
BBUU161

BBUU500

ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

ไอโซเลต

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตร ISP6
โตโลบเดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



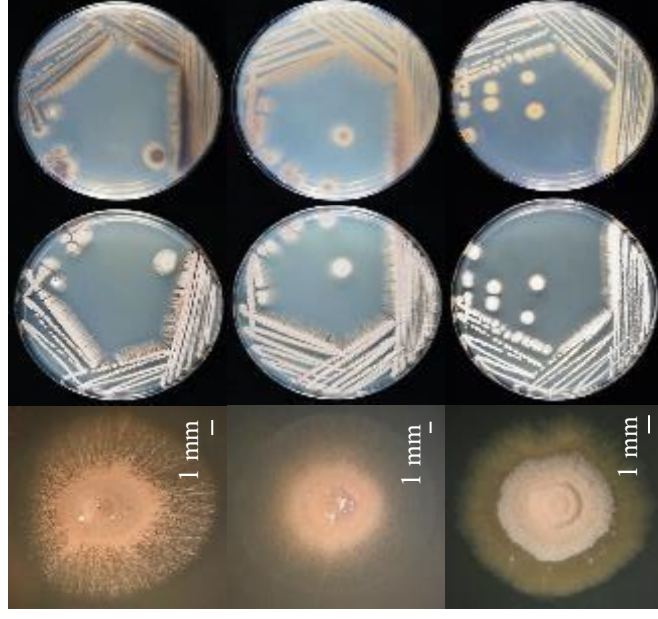
BBUU144

BBUU161

BBUU500

ไอโซเลต

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตร ISP7
โตโลบเดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท



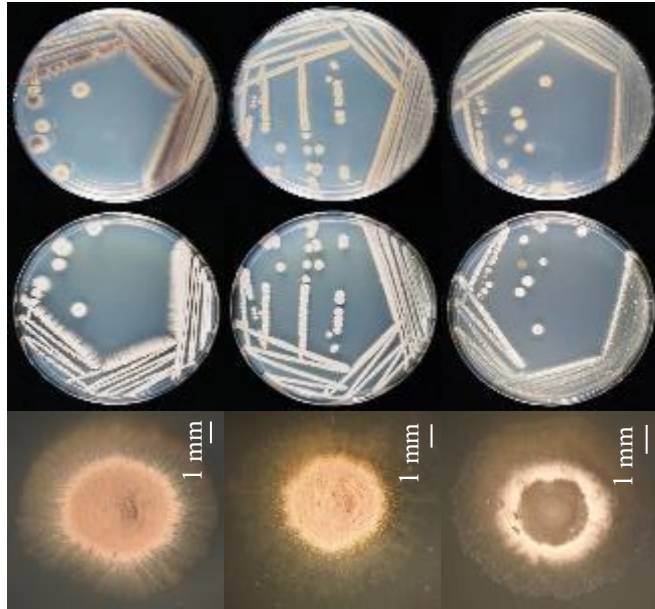
BBUU144

BBUU161

BBUU500

ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

ไอโซเลต
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งสูตร ISP9
โคโลนีเดี่ยว ด้านหน้าเพลท ด้านหลังเพลท

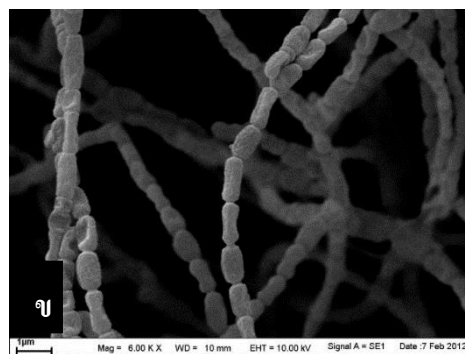
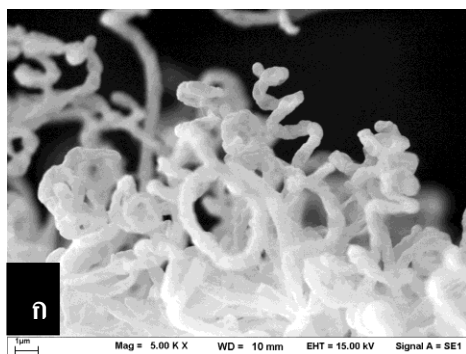


BBUU144

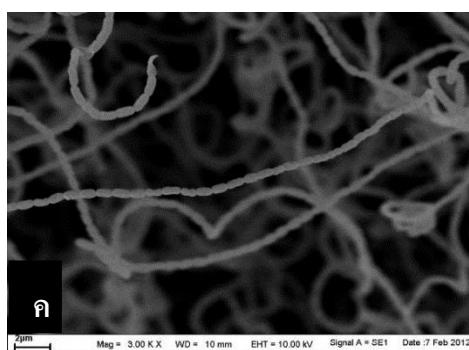
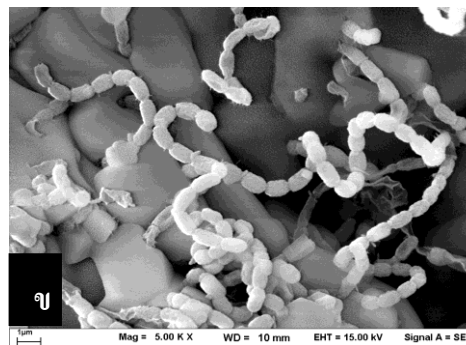
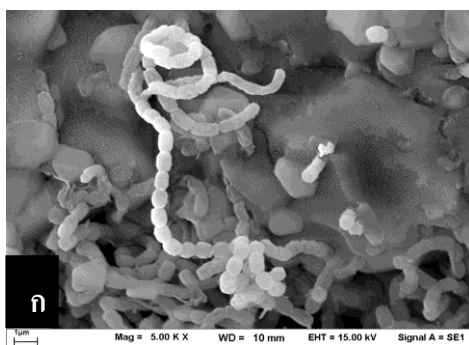
BBUU161

BBUU500

ภาพภาคผนวก ซ-2 ลักษณะของสปอร์จากกล้อง SEM ของแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง
สูตรต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 21 วัน



ภาพที่ 1 อาหารแข็งสูตร ISP2 (ก) แอกติโนมัยสีท BBUU161 และ (ข) แอกติโนมัยสีท BBUU500



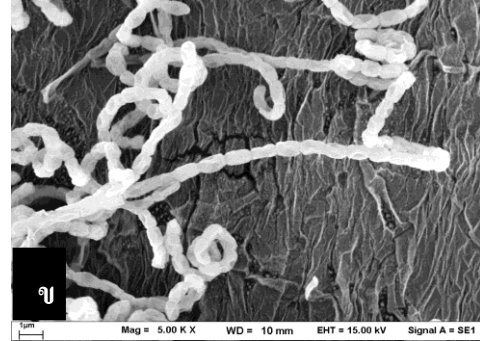
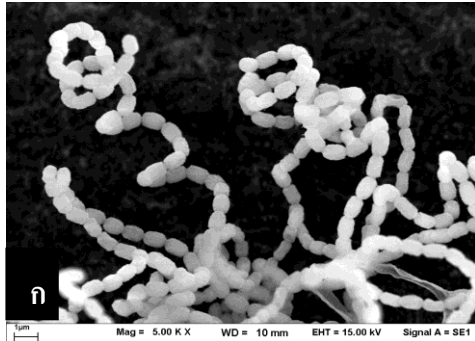
ภาพที่ 2 อาหารแข็งสูตร ISP4 (ก) แอกติโนมัยสีท BBUU161, (ข) แอกติโนมัยสีท BBUU161 และ
(ค) แอกติโนมัยสีท BBUU500



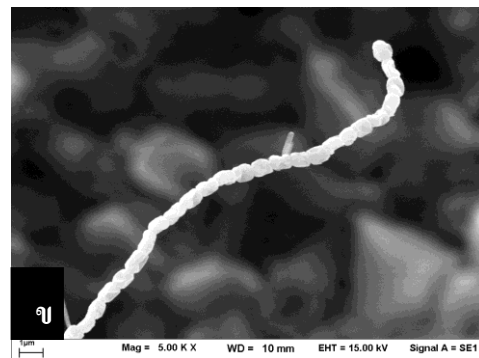
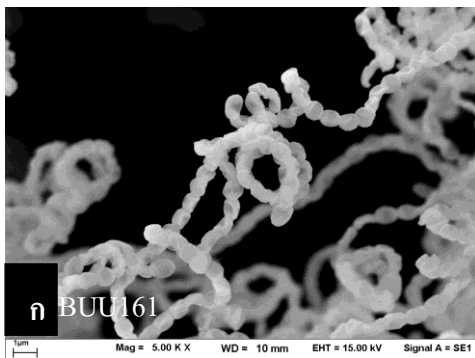
1054561741

BUU_1Thesis_59910007_thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพภาคผนวก ซ-2 (ต่อ)

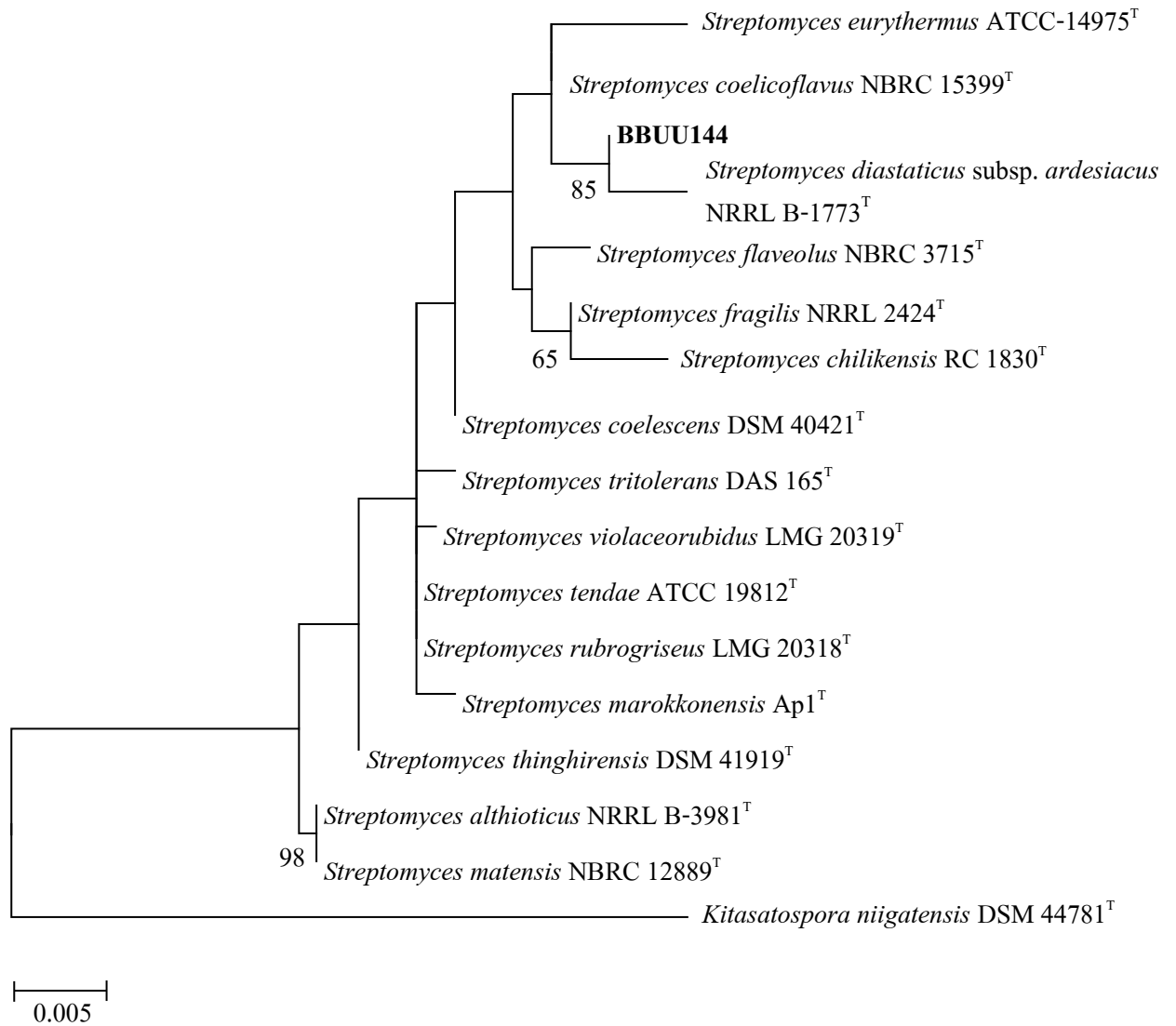


ภาพที่ 3 อาหารแข็งสูตร ISP7 (ก) แอคติโนมัยซีท BBUU144 และ (ข) แอคติโนมัยซีท BBUU161



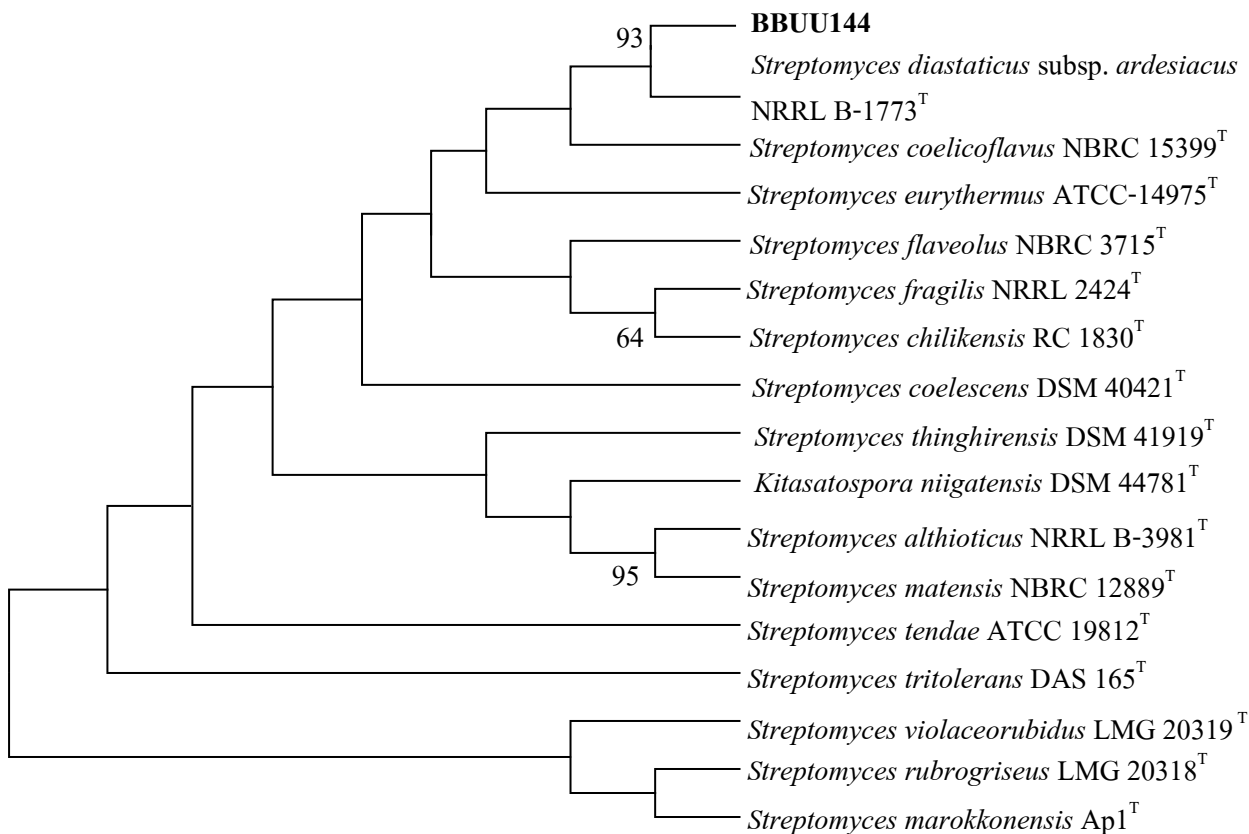
ภาพที่ 4 อาหารแข็งสูตร ISP9 (ก) แอคติโนมัยซีท BBUU144 และ (ข) แอคติโนมัยซีท BBUU161

ภาพภาคผนวก ซ-3 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของแอกติโนมัยสีทกับ *Streptomyces*



ภาพที่ 1 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Maximum Likelihood method ของแอกติโนมัยสีท BBUU144 กับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ

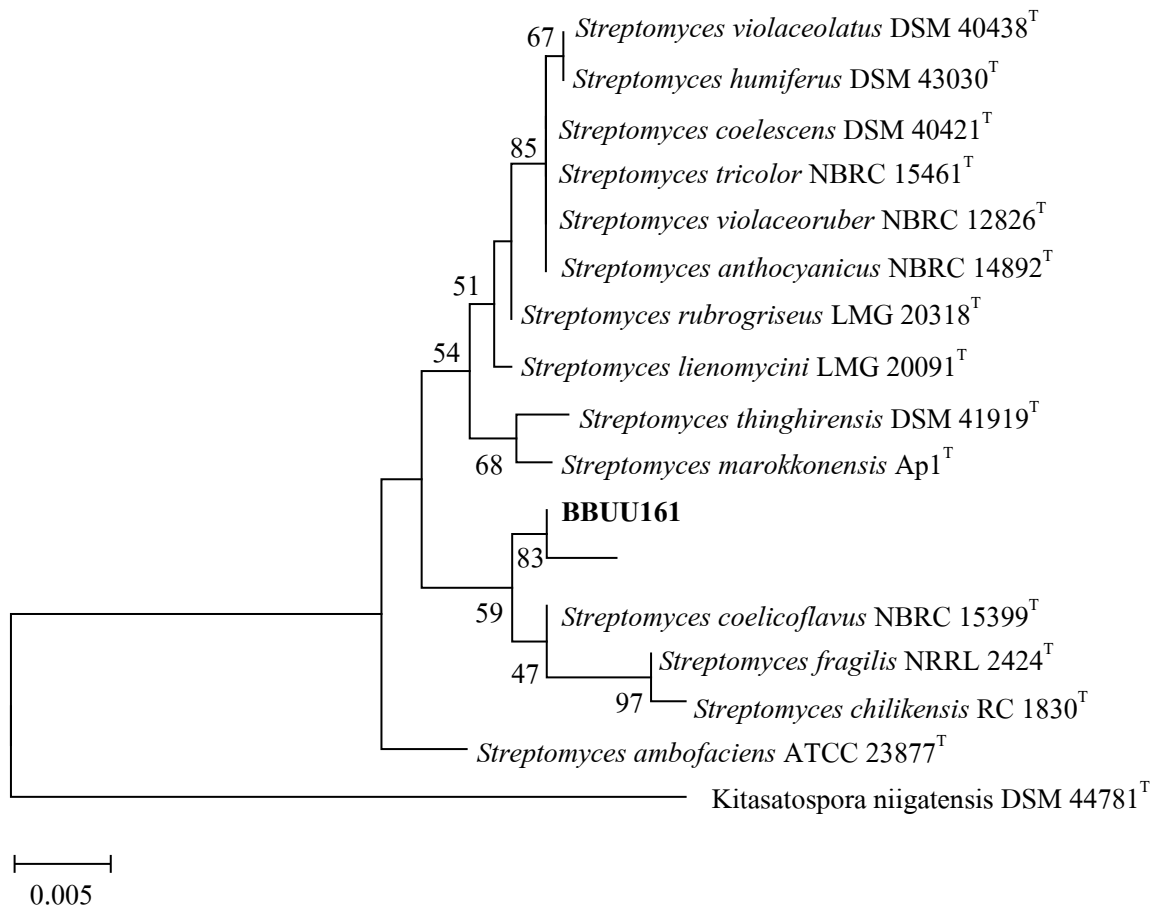
ภาพภาคผนวก ซ-3 (ต่อ)



ภาพที่ 2 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Maximum Parsimony method ของแอกติโนมัยซีท BBUU144 กับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ

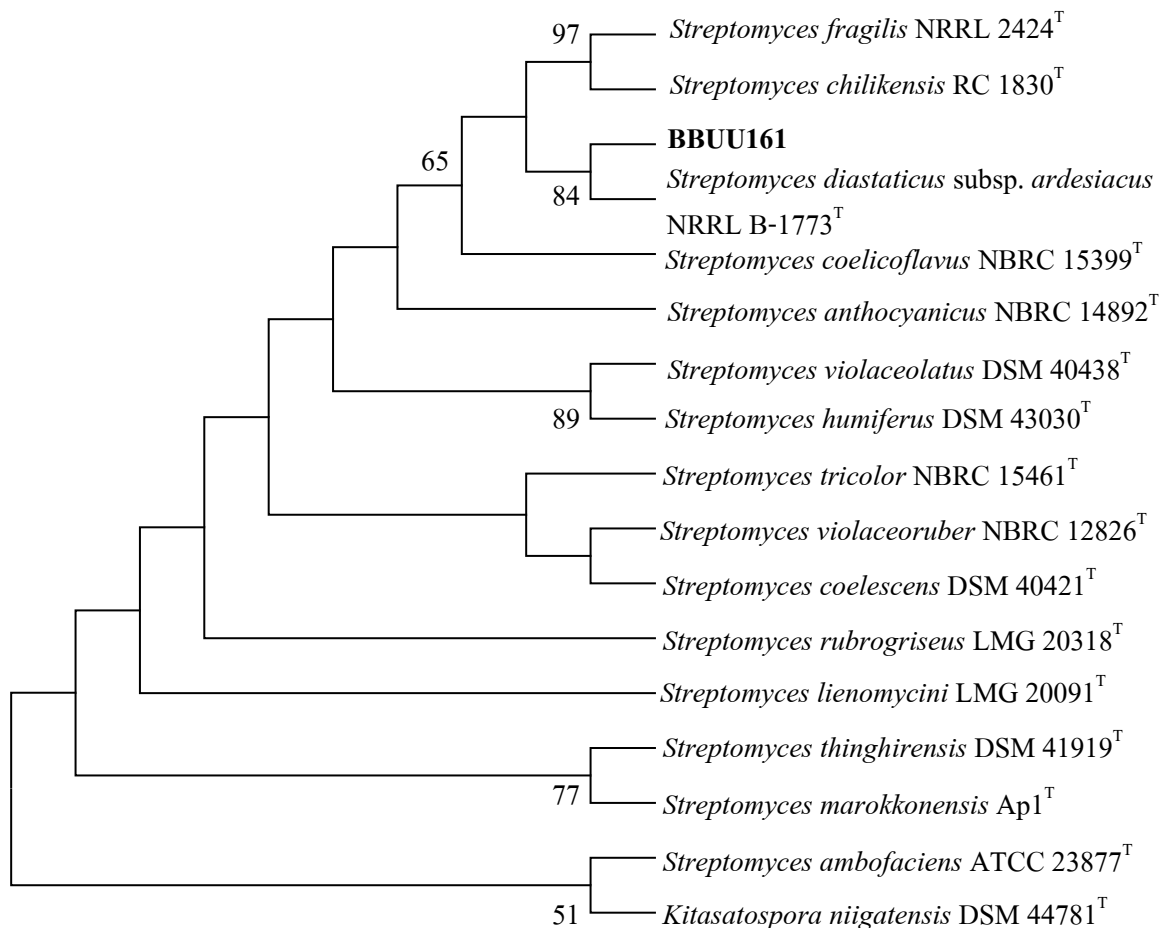
1054561741 BUI 1Thesis 59910007 thesis / rev: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพภาคผนวก ซ-3 (ต่อ)



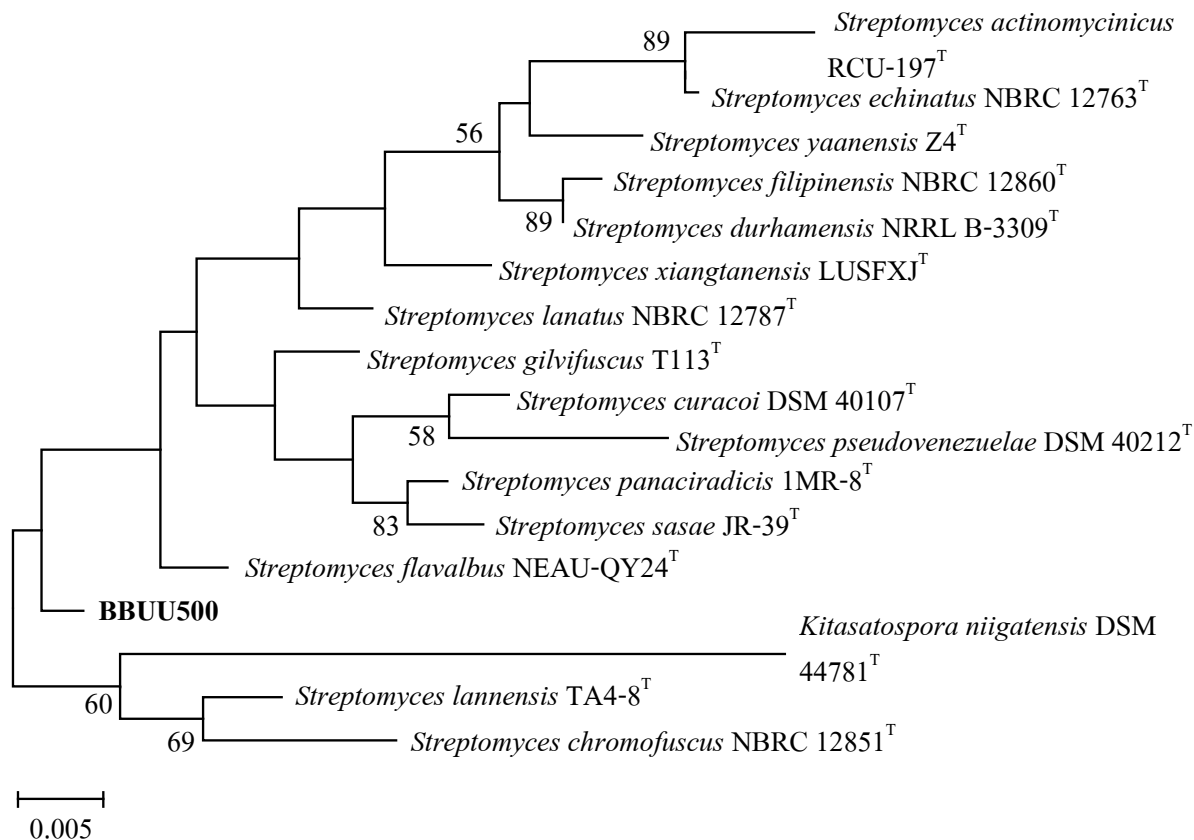
ภาพที่ 3 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Maximum Likelihood method ของแอกติโนมัยซีท BBUU161 กับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ

ภาพภาคผนวก ซ-3 (ต่อ)



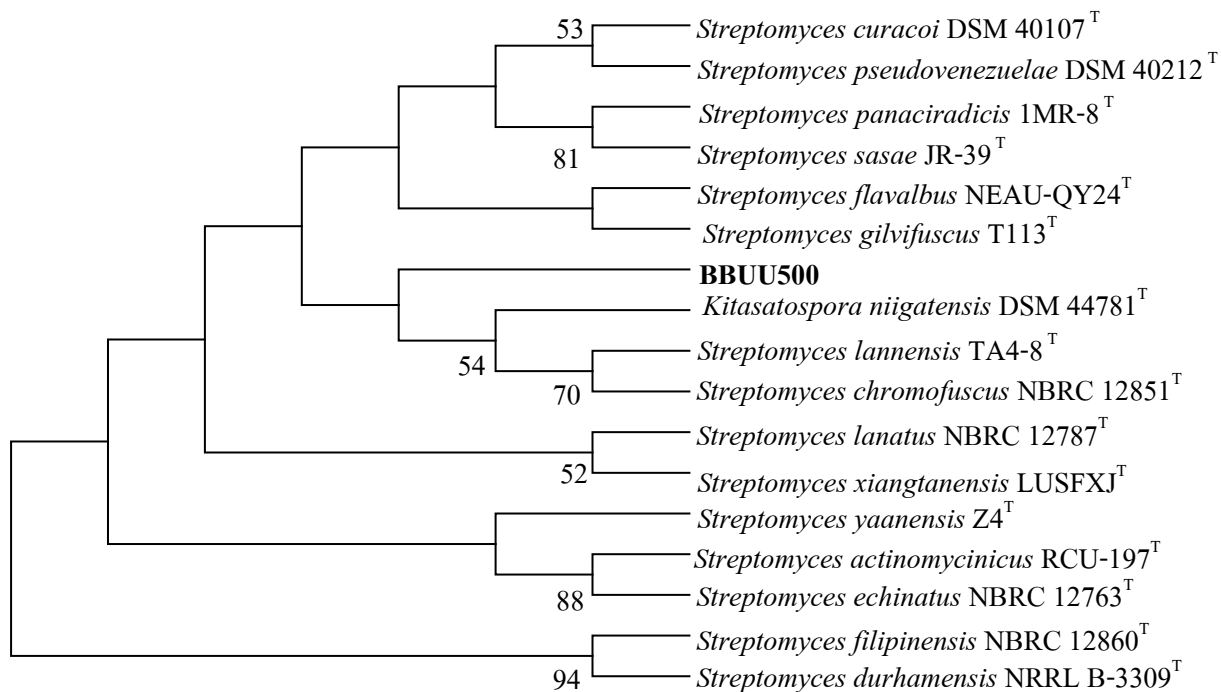
ภาพที่ 4 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Maximum Parsimony method ของแอกติโนมัยสีท BBUU161 กับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ

ภาพภาคผนวก ซ-3 (ต่อ)



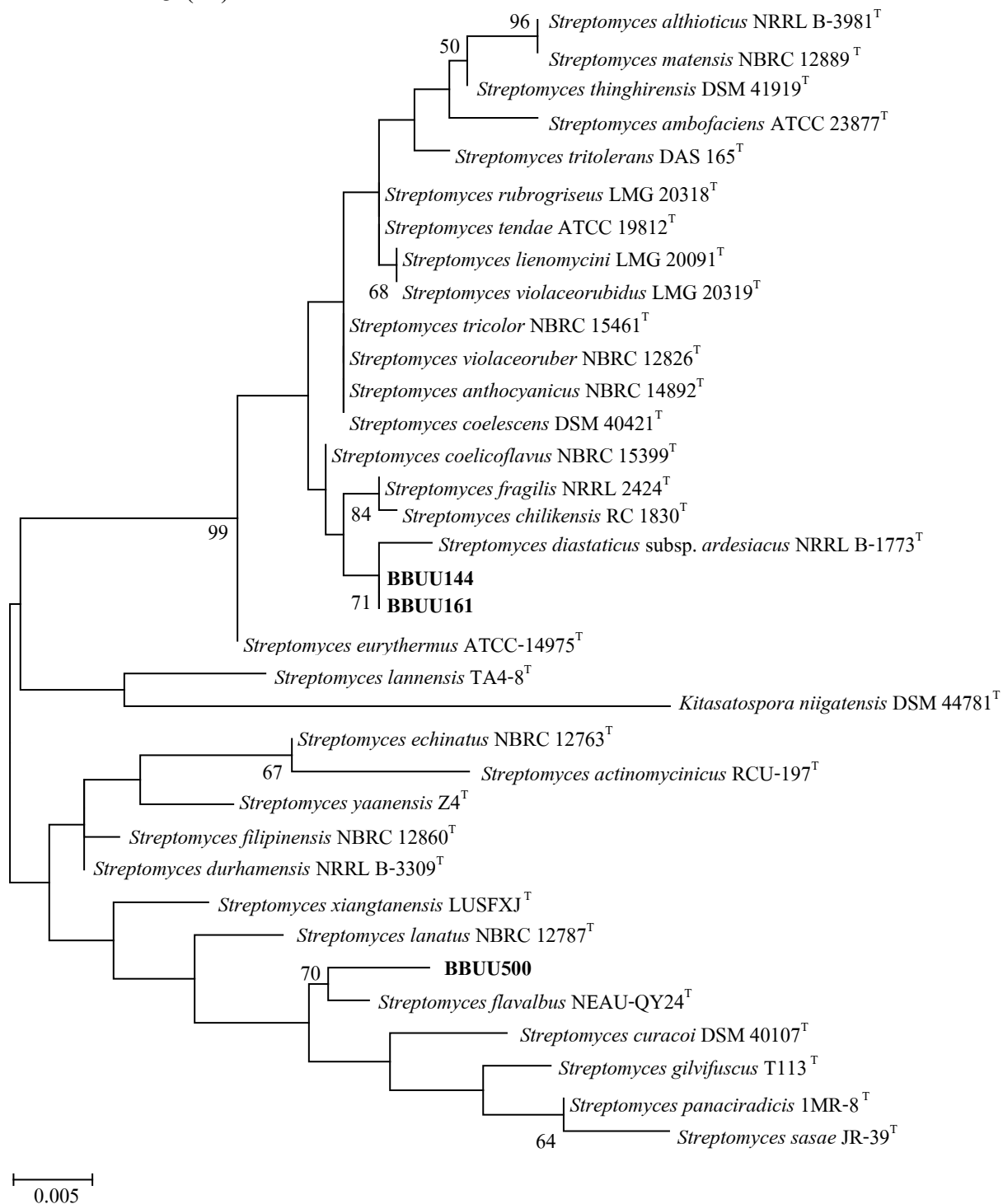
ภาพที่ 5 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Maximum Likelihood method ของแอกติโนมัยซีท BBUU500 กับ Streptomyces สายพันธุ์ต่าง ๆ

ภาพภาคผนวก ซ-3 (ต่อ)



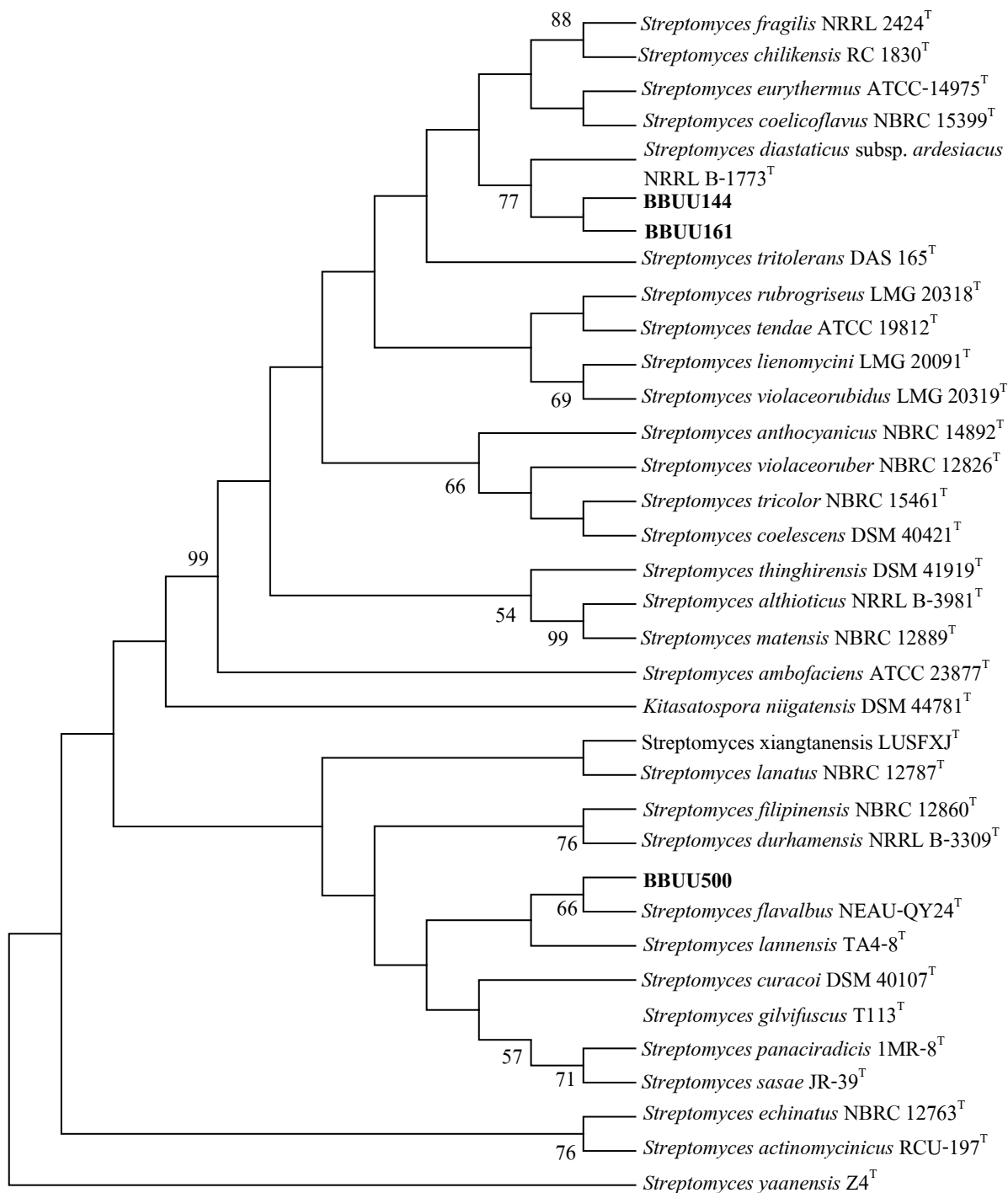
ภาพที่ 6 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Maximum Parsimony method ของแอกติโนมัยซีตา BBUU500 กับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ

ภาพภาคผนวก ซ-3 (ต่อ)



ภาพที่ 7 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Maximum Likelihood method ของแอกติโนมัยซีท กับ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ

ภาพภาคผนวก ซ-3 (ต่อ)



1054561741 BUU_1Thesis 59910007 thesis / recv: 04042563 12:52:56 / seq: 50

ภาพที่ 8 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ Maximum Parsimony method ของแอกติโนมัยซีทากับ Streptomyces สายพันธุ์ต่าง

บรรณานุกรม

- กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน. (2555). ความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียในดิน *Biodiversity of Actinobacteria in Soil*. สาขาวิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2557). *จุลชีววิทยาทั่วไป* (พิมพ์ครั้งที่ 10). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัตนากรณ์ศรีวิบูลย์. (2552). *แอกติโนมัยซีท (Actinomycete)*. ชลบุรี: สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. (2547). *ชีววิทยาของเซลล์*. กรุงเทพฯ: โอเอสพริ้นติ้งเฮ้า.
- สมศรี อรุณินท์. (2539). *ดินเค็มในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: กรมพัฒนาที่ดินกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. (2552). *เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์*. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เอิบ เขียวรัตน์. (2550). *ดินเค็มในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Abd-Alla, M.H., El-Sayed, E.A., & Rasmeay, A.H.M. (2013). Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 3(2), B182-B193.
- Ahmad, I., & Khan, M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173-181.
- Amann, R.I., Zarda, B., Stahl, D.A., & Schleifer, K.H. (1992). Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 3007-3011.
- Anwar, S., Ali, B., & Sajid, I. (2016). Screening of rhizospheric actinomycetes for various in-vitro and in-vivo plant growth promoting (PGP) traits and for agroactive compounds. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1334
- Arshad, M., Saleem, M., & Hussain, S. (2007). Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology*, 25(8), 356-362.

- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J.P., Klenk, H.P., Clement, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G.P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Belimov, A.A., Safronova, V.I., Sergeyeva, T.A., Egorova, T.N., Matveyeva, V.A., Tsyganov, V. E., & Stepanok, V.V. (2001). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1- aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(7), 642-652.
- Bharucha, U., Patel, K., & Trivedi, U.B. (2013). Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research*, 2(3), 215-221.
- Blaha, D., Prigent-Combaret, C., Mirza, M.S., & Moenne-Loccoz, Y. (2006). Phylogeny of the 1- aminocyclopropane-1- carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(3), 455-470.
- Brandl, M.T., & Lindow, S.E. (1996). Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3- acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), 4121-4128.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., & Zhou, S. (2005). Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiology Letters*, 247(2), 147-152.
- Chernin, L., & Glick, B.R. (2012). The use of ACC deaminase to increase the tolerance of plants to various phytopathogens. In D.K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in Agrobiology: Stress Management* (pp. 279-299). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Cho, K., Toler, H., Lee, J., Ownley, B., Stutz, J.C., Moore, J.L., & Augé, R.M. (2006). Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *Journal of Plant Physiology*, 163(5), 517-528.

- Detraksa, J. (2018). Sugarcane seedling growth promotion by Indole Acetic Acid (IAA) producing *Streptomyces* sp. AS14-2 isolated from rhizosphere of sugarcane and rice. *Food and Applied Bioscience Journal*, 6, 179-188.
- Deshwal, V.K., & Kumar, P. (2013). Effect of salinity on growth and PGPR activity of *Pseudomonads*. *Journal of Academia and Industrial Research*, 2(6), 353-356.
- Dhananjeyan, Selvan., N., & Dhanapal., K. (2010). Isolation, Characterization, Screening and antibiotic sensitivity of actinomycetes from locally (Near MCAS) collected soil samples. *Journal of Biological Sciences*, 10(6), 514-519.
- Dimkpa, C., Weinand, T., & Asch, F. (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell & Environment*, 32(12), 1682-1694.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., & Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2), 107-149.
- Du, H.J., Zhang, Y.Q., Liu, H.Y., Su, J., Wei, Y.Z., Ma, B.P., & Yu, L.Y. (2013). *Allonocardiosis opalescens* gen. nov., sp. nov., a new member of the suborder *Streptosporangineae*, from the surface-sterilized fruit of a medicinal plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(3), 900-904.
- Duan, J., Muller, K.M., Charles, T.C., Vesely, S., & Glick, B.R. (2009). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from Southern Saskatchewan. *Microbial Ecology*, 57(3), 423-436.
- Duan, L., Song, W., Jiang, S., Qian, L., Guo, X., Wang, X., & Xiang, W. (2019). *Glycomyces luteolus* sp. nov., a novel actinomycete isolated from rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 112(5), 703-710.
- Egamberdieva, D., Jabborova, D., & Hashem, A. (2015). *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(6), 773-779.
- Egamberdiyeva, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36(2), 184-189.

- Egamberdieva, D. (2009). Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(4), 861-864.
- El-Tarabily, K.A., Nassar, A.H., Hardy, G.E.S.J., & Sivasithamparam, K. (2003). Fish emulsion as a food base for rhizobacteria promoting growth of radish (*Raphanus sativus* L. var. sativus) in a sandy soil. *Plant and Soil*, 252(2), 397-411.
- El-Tarabily, K.A. (2008). Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant and Soil*, 308(1), 161-174.
- El-Tarabily, K.A., & Sivasithamparam, K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7), 1505-1520.
- Gamalero, E., & Glick, B.R. (2015). Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiology*, 169(1), 13-22.
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E. J., & Swings, J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 733-739.
- Glick, B.R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30-39.
- Glick, B.R., Penrose, D.M., & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190(1), 63-68.
- Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., & McConkey, B. (2007). Promotion of plant growth by bacterial ACC Deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26(5-6), 227-242.
- Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., Bandikinda, P., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Rupela, O., & Varshney, R.K. (2014). Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research*, 169(1), 40-48.

- Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour, A., Sabaou, N., Mathieu, F., & Zitouni, A. (2014). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiological Research*, *169*(1), 59-65.
- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Gaikwad, K., & Annapurna, K. (2008). Isolation and characterization of ACC deaminase gene from two plant growth-promoting rhizobacteria. *Current Microbiology*, *57*(4), 312-317.
- Hariharan, H., Vellasamy, S., & Balasubramanian, N. (2014). Optimization for production of Indole acetic acid (IAA) by plant growth promoting *Streptomyces* sp VSMGT1014 isolated from rice rhizosphere. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *3*(8), 158-171.
- He, Y., Wu, Z., Wang, W., Ye, B.-C., Zhang, F., & Liu, X. (2018). Different responses of *Capsicum annuum* L. root and shoot to salt stress with *Pseudomonas putida* Rs-198 inoculation. *Journal of Plant Growth Regulation*, *38*, 799-811.
- Hernández-Montiel, L.G., Chiquito Contreras, C.J., Murillo Amador, B., Vidal Hernández, L., Quiñones Aguilar, E.E., & Chiquito Contreras, R.G. (2017). Efficiency of two inoculation methods of *Pseudomonas putida* on growth and yield of tomato plants. *Journal of soil science and plant nutrition*, *17*, 1003-1012.
- Himaman, W., Thamchaipenet, A., Pathom-Aree, W., & Duangmal, K. (2016). Actinomycetes from Eucalyptus and their biological activities for controlling Eucalyptus leaf and shoot blight. *Microbiological Research*, *188*(189), 42-52.
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q.Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H.P., & Ruan, J.S. (2009). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*, *7*(1), 24-44.
- Honma, M., & Shimomura, T. (1978). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, *42*(10), 1825-1831.
- Hontzeas, N., Zoidakis, J., Glick, B.R., & Abu-Omar, M.M. (2004). Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth

- promotion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1703(1), 11-19.
- Hopwood, D.A. (1967). Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriological Reviews*, 31(4), 373-403.
- Indananda, C., Thamchaipenet, A., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Duangmal, K., & Takahashi, Y. (2011). *Actinoallomurus oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from roots of a Thai jasmine rice plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(4), 737-741.
- Indananda. (2013). *Characterization and identification of novel taxa, plant growth promoting properties and new compound from endophytic actinomycetes*. (Doctor of Philosophy (Genetics)), Department of Genetics Kasetsart University.
- Jacobson, E., Granville, W.C., & Fogs, C.E. (1958). *Color Harmony Manual* (4th Edition). Chicago: Container Corporation of America.
- Jaemsang, R., Jantasuriyarat, C., & Thamchaipenet, A. (2018). Molecular interaction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD)-producing endophytic *Streptomyces* sp. GMKU 336 towards salt-stress resistance of *Oryza sativa* L. cv. KDML105. *Scientific Reports*, 8, 1950.
- Jalili, F., Khavazi, K., Pazira, E., Nejati, A., Rahmani, H.A., Sadaghiani, H.R., & Miransari, M. (2009). Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *Journal of Plant Physiology*, 166(6), 667-674.
- Janda, J. M., & Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Kataoka, M., Ueda, K., Kudo, T., Seki, T., & Yoshida, T. (1997). Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 151(2), 249-255.

- Kämpfer, P. (2012). *Genus Streptomyces*. In M., Goodfellow, P., Kämpfer, H-J., Busse, M.E., Trujillo, K-i., Suzuki, W. Ludwig and W.B., Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2(5), (pp. 1455-1804). New York: Springer.
- Khamna, S., Yokota, A., & Lumyong, S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3- acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 649.
- Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L., & Roldán, A. (2006). Contribution of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* to aggregate stabilization and promotion of biological fertility in rhizosphere soil of lettuce plants under field conditions. *Soil Use and Management*, 22(3), 298-304.
- Korasick, D., Enders, T., & C Strader, L. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64 (9), 2541-2555.
- Läuchli, A., & Grattan, S. (2007). Plant growth and development under salinity stress. *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops* (pp. 1-32). Springer.
- Legault, G.S., Lerat, S., Nicolas, P., & Beaulieu, C. (2011). Tryptophan regulates Thaxtomin A and indole-3- acetic acid production in *Streptomyces scabiei* and modifies its interactions with radish seedlings. *Journal of Phytopathology*, 101(9), 1045-1051.
- Lim, J.Y., Yoon, J.W., & Hovde, C. J. (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 5-14.
- Li, F., Kang, Q., Yao, X., Li, Y., Wei, M., Cao, Y., Deng, Z. (2012). [Chemical-genetics based screening for furanonaphthoquinone producing endophytic actinomycetes from seeds of *Trewia nudiflora*]. *Acta Microbiologica Sinica*, 52(4), 442-8.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016). "Chapter 3: morphological identification of actinobacteria," in *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. eds D. Dhanasekaran and Y. Jiang (InTech).
- Li, M., Guo, R., Yu, F., Chen, X., Zhao, H., Li, H., & Wu, J. (2018). Indole-3- acetic acid biosynthesis pathways in the plant-beneficial bacterium *Arthrobacter pascens* ZZ21. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). 443.

- Ljung, K., Bhalerao, R.P., & Sandberg, G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, 28(4), 465-474.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Kämpfer, P., & Whitman, W.B. (2012). Road map of the phylum Actinobacteria. In M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M.E. Trujillo, K.-i. Suzuki, W. Ludwig & W.B. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Five The Actinobacteria, Part A and B* (pp.1-28). New York, NY: Springer New York.
- Matthijs, S., Tehrani, K.A., Laus, G., Jackson, R.W., Cooper, R.M., & Cornelis, P. (2007). Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-pythium activity. *Environmental Microbiology*, 9(2), 425-434.
- Matsumoto, A., & Takahashi, Y. (2017). Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 70(5), 514-519.
- Masand, M., Jose, P., Menghani, E., & Jebakumar, S. (2015). Continuing hunt for endophytic actinomycetes as a source of novel biologically active metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 1863-1875.
- Marzban, A., Ebrahimipour, G., Karkhane, M., & Teymouri, M. (2016). Metal resistant and phosphate solubilizing bacterium improves maize (*Zea mays*) growth and mitigates metal accumulation in plant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 13-17.
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B.R. (1999). Effect of wild-type and mutant plant growth-promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18(2), 49-53.
- Munns, R., Schachtman, D.P., & Condon, A.G. (1995). The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Functional Plant Biology*, 22, 561-569.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ*, 25(2), 239-250.
- Nadeem, S., Zahir, Z., Naveed, M., z Naeem Asghar, H., & Arshad, M. (2010). Rhizobacteria capable of producing ACC deaminase may mitigate salt stress in wheat. *Soil Science Society of America Journal*, 74(2),533-542.

- Nimnoi, P., Pongsilp, N., & Lumyong, S. (2010). Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 193-203.
- Okazaki, S., Nukui, N., Sugawara, M., & Minamisawa, K. (2004). Rhizobial strategies to enhance symbiotic interactions: rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Microbes and Environments*, 19(2), 99-111.
- Palaniyandi, S.A., Damodharan, K., Yang, S. H., & Suh, J.W. (2014). *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants. *Journal of Applied Microbiology*, 117(3), 766-773.
- Patten, C.L., & Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207-220.
- Patten, C.L., & Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795-3801.
- Pastor, N., Masciarelli, O., Fischer, S., Luna, V., & Rovera, M. (2016). Potential of *Pseudomonas putida* PCI2 for the protection of tomato plants against fungal pathogens. *Current Microbiology*, 73(3), 346-353.
- Qin, S., Xing, K., Jiang, J.H., Xu, L.H., & Li, W.J. (2011). Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), 457-473.
- Qin, S., Zhang, Y.J., Yuan, B., Xu, P.Y., Xing, K., Wang, J., & Jiang, J.H. (2014). Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant and Soil*, 374(1-2), 753-766.
- Qin, S., Miao, Q., Feng, W.-W., Wang, Y., Zhu, X., Xing, K., & Jiang, J.-H. (2015). Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil. *Applied Soil Ecology*, 93, 47-55.

- Ramadoss, D., Lakkineni, V.K., Bose, P., Ali, S., & Annapurna, K. (2013). Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *SpringerPlus*, 2(1), 6.
- Rasche, F., Marco-Noales, E., Velvis, H., Overbeek, L., López, M., D. van Elsas, J., & Sessitsch, A. (2006). Structural characteristics and plant-beneficial effects of bacteria colonizing the shoots of field grown conventional and genetically modified T4- lysozyme producing potatoes. *Plant and Soil*, 289, 123–140.
- Rungin, S., Indananda, C., Suttiviriya, P., Kruasuwan, W., Jaemsaeng, R., & Thamchaipenet, A. (2012). Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102(3), 463-472.
- Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P.A., Javid, M.G., Dalvand, Y., & Askari, H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1503-1509.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., & Bhatti, A.S. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(10), 635-648.
- Shah, S., Li, J., Moffatt, B.A., & Glick, B.R. (1998). Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(9), 833-843.
- Shan, W., Zhou, Y., Liu, H., & Yu, X. (2018). Endophytic actinomycetes from tea plants (*Camellia sinensis*): Isolation, abundance, antimicrobial, and plant-growth-promoting activities. *BioMed Research International*, 2018(2), 1-12.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448.

- Stackebrandt, E., Liesack, W., Webb, R., & Witt, D. (1991a). Towards a molecular identification of *Streptomyces* species in pure culture and in environmental samples. *Actinomycetologica*, 5(1), 38-44.
- Stackebrandt, E., Witt, D., Kemmerling, C., Kroppenstedt, R.M., & Liesack, W. (1991b). Designation of *Streptomyces* 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), 1468-1477.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 4(44), 846-849.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, P., Maiden, M.C., & Whitman, W.B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1043-1047.
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491-502.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67(2), 257-268.
- Tamreihao, K., Nimaichand, S., Chanu, S. B., Devi, K. A., Lynda, R., Jeeniita, N., & Ningthoujam, D.S. (2018). Acidotolerant *Streptomyces* sp. MBRL 10 from limestone quarry site showing antagonism against fungal pathogens and growth promotion in rice plants. *Journal of King Saud University - Science*, 30(2), 143-152.
- Toumatia, O., Compant, S., Yekkour, A., Goudjal, Y., Sabaou, N., Mathieu, F., Zitouni, A. (2016). Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. *South African Journal of Botany*, 105, 234-239.
- Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A., & Netrusov, A.I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 117-126.

- Ullah, A., & Bano, A. (2019). Role of PGPR in the reclamation and revegetation of saline land. *Pakistan Journal of Botany*, 51(1), 27-35.
- Upadhyay, S.K., Singh, J.S., Saxena, A.K., & Singh, D.P. (2012). Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4), 605-611.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Molecular Biology Reviews*, 60(2), 407-438.
- Waksman, S.A. (1959). *The Actinomycetes: Nature, Occurrence and Activities*. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Wang, L., Fu, B., Chen, X., & Wang, W. (2018). Isolation and identification of *Pseudomonas Putida* from *Medicago sativa* rhizosphere soil. *Bangladesh Journal of Botany*, 47(3), 779-784
- Wang, Z., Solanki, M. K., Yu, Z.X., Yang, L.T., An, Q.L., Dong, D.F., & Li, Y.R. (2019). Draft genome analysis offers insights into the mechanism by which *Streptomyces chartreusis* WZS021 increases drought tolerance in sugarcane. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3262-3262.
- Watanabe, Y., Shinzato, N., & Fukatsu, T. (2003). Isolation of actinomycetes from termites' guts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(8), 1797-1801.
- Xing, K., Bian, G. K., Qin, S., Klenk, H.P., Yuan, B., Zhang, Y.J., & Jiang, J.H. (2012). *Kibdelosporangium phytohabitans* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from oil-seed plant *Jatropha curcas* L. containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(2), 433-441.
- Xing, K., Liu, W., Zhang, Y.J., Bian, G.K., Zhang, W.D., Tamura, T., & Jiang, J.H. (2013). *Amycolatopsis jiangsuensis* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from a coastal plant in Jiangsu, China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(2), 433-439.
- Yan, J., Smith, M., Glick, B., & Liang, Y. (2014). Effects of ACC deaminase containing rhizobacteria on plant growth and expression of Toc GTPases in tomato (*Solanum lycopersicum*) under salt stress. *Botany*, 92(11), 775-781.

- Yao, L., Wu, Z., Zheng, Y., Kaleem, I., & Li, C. (2010). Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. *European Journal of Soil Biology*, 46(1), 49-54.
- Zhi, X.Y., Li, W.J., & Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 589-608.
- Zhu, W.Y., Zhao, L.X., Zhao, G.Z., Duan, X.W., Qin, S., Li, J., & Li, W.J. (2012) . *Plantactinospora endophytica* sp. nov., an actinomycete isolated from *Camptotheca acuminata* Decne., reclassification of *Actinaurispora siamensis* as *Plantactinospora siamensis* comb. nov. and emended descriptions of the genus *Plantactinospora* and *Plantactinospora mayteni*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(10), 2435-2442.