



การศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชของแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากมูลหนอนนกและ  
หนอนนกยักษ์

ทิพย์ฉัตร กรศิริภิญโญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

การศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากมูลหนอนนกและ  
หนอนนกยักษ์



ทิพย์ฉัตร กรศิริภิญโญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

STUDY OF PLANT GROWTH PROMOTING ACTIVITIES OF ACTINOMYCETES ISOLATED  
FROM MEALWORM AND SUPERWORM FRASS



THIPPHAYACHAT KONSIRIPHINYO

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

2024

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา  
วิทยานิพนธ์ของ ทิพยฉัตร กรศิริภิญโญ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์  
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงตา จุลศิริกุล)

..... ประธาน  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนากร แสงสง่า)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงตา จุลศิริกุล)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาตรี คงเจริญสุนทร)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภรณ์ ศรีปรีชาศักดิ์)

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อุษาวดี ตันติวรานุกษ์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ  
การศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัย  
บูรพา

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทวัส แจ่มเอียด)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

62910058: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

คำสำคัญ: แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช, แอคติโนมัยสปีท, มูลหนอนนก, มูลหนอนนกยักษ์

ทิพย์ฉัตร กรศิริภิญโญ : การศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชของแอคติโนมัยสปีทที่คัดแยกจากมูลหนอนนกและหนอนนกยักษ์. (STUDY OF PLANT GROWTH PROMOTING ACTIVITIES OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM MEALWORM AND SUPERWORM FRASS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ดวงตา จุลศิริกุล, ปร.ด. ปี พ.ศ. 2567.

ในปัจจุบันหนอนนกและหนอนนกยักษ์เริ่มเป็นที่นิยมในการนำมาเป็นอาหารสัตว์เลี้ยงหลายชนิด จึงมีการเพาะเลี้ยง และขยายพันธุ์ให้ได้ในปริมาณมากเพื่อผลิตเป็นอาหารสัตว์ในเชิงพาณิชย์ ทำให้มูลของหนอนนก และหนอนนกยักษ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีปริมาณมากขึ้น และกลายเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยคุณลักษณะของมูลหนอนนกและหนอนนกยักษ์มีลักษณะแห้ง เนื้อละเอียดคล้ายเนื้อทราย นิยมนำมาใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ โดยพบว่าสามารถเพิ่มธาตุอาหารปรับปรุงดินให้เหมาะสมต่อการปลูกพืช ช่วยลดการใช้ปุ๋ยเคมี ซึ่งทำให้มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังพบว่าในมูลหนอนนก และหนอนนกยักษ์มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช และมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ ในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดแยก และศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชของแอคติโนมัยสปีทซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPB) จากมูลของหนอนนก และหนอนนกยักษ์ โดยพบว่าสามารถคัดแยกแอคติโนมัยสปีทได้จำนวน 24 ไอโซเลต ซึ่งคัดแยกได้จากมูลหนอนนก 10 ไอโซเลต และคัดแยกได้จากมูลหนอนนกยักษ์ 14 ไอโซเลต เมื่อนำแอคติโนมัยสปีททั้ง 24 ไอโซเลต มาทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช พบว่า สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA สร้างเอนไซม์ ACC Deaminase สร้างสารไซโตไคน์ และสามารถละลายฟอสเฟตได้แตกต่างกัน โดยมีแอคติโนมัยสปีท 20 ไอโซเลต สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ ( $23.58 \pm 0.02$  ถึง  $309.15 \pm 0.06$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 22 ไอโซเลต สามารถสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ได้ 18 ไอโซเลต สามารถสร้างสารไซโตไคน์ (5.00±0.50 ถึง 22.50±0.50 มิลลิเมตร) และ 8 ไอโซเลต สามารถละลายฟอสเฟตได้ (13.00±0.00 ถึง 25.00±0.50 มิลลิเมตร) เมื่อทดสอบการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวปทุมธานี 1 โดยแช่เมล็ดข้าวในสารละลายแอคติโนมัยสปีทที่คัดแยกได้ทั้ง 24 ไอโซเลต พบว่าอัตราการงอกของเมล็ดข้าวที่แช่ในสารละลายแอคติโนมัยสปีทใกล้เคียงชุดควบคุม โดยแอคติโนมัยสปีท ไอโซเลต ZA2 ZA4 และ ZA8 สามารถส่งเสริมการงอกของข้าวปทุมธานี 1 ได้สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ไอโซเลตที่ไม่แสดงกิจกรรมการสร้างฮอร์โมนพืช IAA มีอัตราการงอกต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงลักษณะ

การเจริญของราก พบว่าเมล็ดข้าวที่แช่ในสารละลายแอกติโนมัยสีทไอโซเลตที่มีการสร้างฮอร์โมนพืช IAA รากจะมีความยาว และมีความหนามากกว่ารากของเมล็ดข้าวในชุดควบคุม และชุดที่ไม่มีการสร้างฮอร์โมนพืช IAA โดยแอกติโนมัยสีท 6 ไอโซเลต ได้แก่ TM1 TM4 TM6 TM8 ZA1 และ ZA3 แสดงกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชทั้ง 4 กิจกรรม เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าคล้ำยคลึงทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ พบว่าแอกติโนมัยสีททั้ง 6 ไอโซเลต เป็นแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าในมูลหอนนกและหอนนกกยัักษ์ มีแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ได้โดยตรง หรือคัดแยกเฉพาะแบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่ม PGPB มาใช้ประโยชน์ ทำให้เกิดมูลค่าเพิ่มของมูลหอนนกซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ได้จากการเพาะเลี้ยงหอนนกและหอนนกกยัักษ์อีกประการด้วย

62910058: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCES; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCES)

KEYWORDS: Plant growth promoting bacteria, Actinomycetes, Mealworm frass, Superworm frass

THIPPHAYACHAT KONSIRIPHINYO : STUDY OF PLANT GROWTH PROMOTING ACTIVITIES OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM MEALWORM AND SUPERWORM FRASS. ADVISORY COMMITTEE: DUANGTA JLSIRIKUL, Ph.D. 2024.

In the present, mealworm and superworm have become popular choices as food for many types of pets. This popularity has led to increased cultivation and breeding efforts to produce them in large quantities for commercial animal feed production. Consequently, there is a greater abundance of mealworm frass and superworm frass from cultivation, which has become the agricultural waste material. The frass from mealworm and superworm has a dry, sand-like texture and is often utilized as organic fertilizer. It has been found that this frass can enhance soil nutrient content, improve soil suitability for plant growth, and reduce chemical fertilizer usage, which is safe for environmental and human health. Additionally, the mealworm and superworm frass contains various beneficial bacteria that promote plant growth and have potential for use as biofertilizers. The objectives of this research are to isolate and study the plant growth promoting activities of actinomycetes, that is the plant growth promoting bacteria (PGPB) from mealworm frass and superworm frass. The result showed that a total of 24 isolates of actinomycetes were separated, with 10 isolates from mealworm frass and 14 isolates from superworm frass. When these 24 isolates were tested for their plant growth promoting activities, it was found that they exhibited different activities including IAA plant hormone production, ACC Deaminase enzyme production, siderophore production, and phosphate-solubilizing activity at varying levels. Among these, 20 isolates were capable of producing IAA plant hormone (ranging from  $23.58 \pm 0.02$  to  $309.15 \pm 0.06$   $\mu\text{g/ml}$ ), 22 isolates were able to produce ACC Deaminase enzyme, 18 isolates were capable of producing siderophores (ranging from  $5.00 \pm 0.50$  to  $22.50 \pm 0.50$  mm.), and eight isolates were able to solubilize phosphate (ranging from

13.00±0.00 to 25.00±0.50 mm.). Furthermore, when testing their seed germination promoting activity in Pathum Thani 1 rice by soaking in the actinomycetes 24 isolates solutions, it was found that isolates ZA2, ZA4, and ZA8 showed the highest promoting activity of germination, but was not significantly different from the control. While the isolates that did not exhibit IAA plant hormone production showed significantly lower germination rates than the control group. However, when considering root growth characteristics, it was observed that rice seeds soaked in actinomycetes isolates that produced IAA plant hormone had longer and thicker roots compared to seeds in the control group and isolates that did not produce IAA plant hormone. The six actinomycetes isolates (TM1, TM4, TM6, TM8, ZA1, and ZA3), which exhibited plant growth promotion in all four activities tested, were used to compare genetic similarity based on the partial 16S rRNA gene sequence analysis and phylogenetic relationship. The results indicated the highly sequence similarity between the six actinomycetes isolate and actinomycetes in the genus *Streptomyces*. Therefore, this research demonstrates that actinomycetes present in the mealworm and superworm frass was the plant growth promoting bacteria, that can be directly utilized as organic fertilizers or selectively isolated the PGPB group for use as beneficial bacteria. That will be adding value to the agricultural byproduct obtained from mealworm and superworm cultivation.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณา ความอนุเคราะห์ และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงตา จุลศิริกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.จันทรา อินทนนท์ และคุณนันทน์ อินทนนท์ ที่มอบทุนการศึกษา และให้คำปรึกษาแนะนำข้อคิด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนากร แสงสง่า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาตรี คงเจริญสุนทร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภรณ์ ศรีปรีชาศักดิ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ แนวคิด คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ยิ่ง ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้กรุณาให้การอบรมสั่งสอน ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ ทักษะ ประสบการณ์ที่ดี และมีคุณค่ายิ่งแก่ข้าพเจ้าจนประสบความสำเร็จ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้สนับสนุนการวิจัย ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และสถานที่ทำวิจัย ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์มูล หอนอนก และมูลหอนอนกยักษ์ และศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดข้าวปทุมธานี 1 ในการวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อเกียรติศักดิ์ กรศิริภิญโญ คุณแม่ผ่องศรี กรศิริ ภิญโญ และญาติพี่น้อง ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

คุณค่า และประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูทเวทิตาแต่ บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

ทิพย์ฉัตร กรศิริภิญโญ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	2
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.6 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย.....	3
1.7 สถานที่ดำเนินการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 หนอนนก (Mealworm: <i>Tenebrio molitor</i> ).....	4
2.2 หนอนนกยักษ์ (Superworm: <i>Zophobas atratus</i> ).....	6
2.3 Plant growth promoting bacteria (PGPB).....	7
2.3.1 กลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยตรง.....	8
2.3.2 กลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยทางอ้อม.....	11
2.4 แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes).....	15

2.4.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยสีท .....	15
2.4.2 วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสีท.....	15
2.4.3 โคลนียของแอกติโนมัยสีท .....	16
2.4.4 การส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชของแอกติโนมัยสีท.....	17
2.5 การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA .....	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
3.1 ตัวอย่างสำหรับการคัดแยกแอกติโนมัยสีทใช้ในการวิจัย .....	23
3.2 พืชที่ใช้ในการวิจัย .....	23
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัย .....	23
3.4 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการวิจัย.....	23
3.5 สารเคมีและสารละลายที่ใช้ในการวิจัย .....	24
3.6 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	25
3.7 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	26
3.7.1 การคัดแยกแอกติโนมัยสีทจากมูลหอนนกกและมูลหอนนกกยักษ์ .....	26
3.7.2 การตรวจสอบแอกติโนมัยสีท.....	27
3.7.3 การเก็บรักษาสายพันธุ์แอกติโนมัยสีท.....	27
3.7.4 การเลือกเซลล์ในระดับการเจือจางที่เหมาะสม ด้วยวิธีการเจือจางตัวอย่างลำดับส่วน แบบ 10 เท่า (Tenfold dilution) .....	28
3.7.5 การทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชจากแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้.....	28
3.7.6 การศึกษาประสิทธิภาพของแอกติโนมัยสีทในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว ปทุมธานี 1 ( <i>Oryza sativa</i> L. cv. Pathum Thani 1) .....	29
3.7.7 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์.....	30
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย.....	35
4.1 การคัดเลือกแอกติโนมัยสีท และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ .....	35

4.2 การทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชจากแอคติโนมัยซีท์ที่คัดแยกได้ .....	44
4.2.1 การทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA .....	44
4.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase .....	47
4.2.3 การทดสอบการสร้างสารไซโตไคน์ .....	56
4.2.4 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต .....	59
4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีท์ในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวปทุมธานี 1 ( <i>Oryza sativa</i> L. cv. Pathum Thani 1).....	62
4.4 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์.....	74
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	77
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	77
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	78
ภาคผนวก.....	79
ภาคผนวก ก.....	80
ภาคผนวก ข.....	87
ภาคผนวก ค.....	91
บรรณานุกรม.....	99
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	115

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สารละลายที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA .....	32
ตารางที่ 2 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส .....	33
ตารางที่ 3 รายชื่อแอกติโนมัยสีทไอโซเลตต่าง ๆ ที่คัดแยกได้จากมูลหอนนกและหอนนกยักษ์... 36	36
ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอกติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลต..... 37	37
ตารางที่ 5 ความสามารถในการสร้างฮอริโมนพืช IAA ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลตต่าง ๆ..... 45	45
ตารางที่ 6 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลตต่าง ๆ..... 49	49
ตารางที่ 7 การทดสอบการสร้างสารไซโตไคโรวอร์ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลตต่าง ๆ .....	57
ตารางที่ 8 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแอกติโนมัยสีทไอโซเลตต่าง ๆ..... 60	60
ตารางที่ 9 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวปทุมธานี 1 โดยแอกติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลต .....	63
ตารางที่ 10 ค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลตต่าง ๆ เทียบกับแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล EzBioCloud..... 75	75

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของหนอนนก.....	5
ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของหนอนนกกักซ์.....	7
ภาพที่ 3 กลไกหลักการออกฤทธิ์ของจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช.....	10
ภาพที่ 4 กลไกหลักการออกฤทธิ์ของสารควบคุมทางชีวภาพของจุลินทรีย์.....	14
ภาพที่ 5 วัฏจักรชีวิตของแอคติโนมัยซีท.....	16
ภาพที่ 6 ตัวอย่างโคโลนีของแอคติโนมัยซีท.....	17
ภาพที่ 7 การทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ ACC Deaminase และฮอร์โมนพืช IAA ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชโดยแบคทีเรีย PGPB.....	18
ภาพที่ 8 กลไกในการขนส่งขนส่งเหล็กเข้าสู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์โดยไซโตโครพอร์.....	20
ภาพที่ 9 การละลายฟอสเฟตในดินโดยจุลินทรีย์.....	22
ภาพที่ 10 การตรวจสอบแบคทีเรียแกรมลบด้วยเทคนิค Potassium hydroxide test.....	27
ภาพที่ 11 การคำนวณ Halo zone index.....	29
ภาพที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2 ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต TM1 ถึง TM4.....	38
ภาพที่ 13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2 ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต TM5 ถึง TM8.....	39
ภาพที่ 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2 ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต TM9 ถึง ZA2.....	40
ภาพที่ 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2 ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต ZA3 ถึง ZA6.....	41
ภาพที่ 16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2 ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต ZA7 ถึง ZA10.....	42

ภาพที่ 17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2 ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต ZA11 ถึง ZA14 .....	43
ภาพที่ 18 การสร้างฮอริโมนพืช IAA ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต TM1 ถึง TM6 .....	45
ภาพที่ 19 การสร้างฮอริโมนพืช IAA ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต TM7 ถึง ZA2.....	46
ภาพที่ 20 การสร้างฮอริโมนพืช IAA ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต ZA3 ถึง ZA8 .....	46
ภาพที่ 21 การสร้างฮอริโมนพืช IAA ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต ZA9 ถึง ZA14.....	47
ภาพที่ 22 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต TM1 ถึง TM4.....	50
ภาพที่ 23 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต TM5 ถึง TM8.....	51
ภาพที่ 24 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต TM9 ถึง ZA2.....	52
ภาพที่ 25 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต ZA3 ถึง ZA6 .....	53
ภาพที่ 26 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต ZA7 ถึง ZA10.....	54
ภาพที่ 27 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต ZA11 ถึง ZA14.....	55
ภาพที่ 28 ความสามารถในการสร้างสารไซเคโตรโอฟอร์ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลตต่าง ๆ.....	58
ภาพที่ 29 ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลตต่าง ๆ.....	61
ภาพที่ 30 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต TM1 ถึง TM2.....	64
ภาพที่ 31 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต TM3 ถึง TM5.....	65
ภาพที่ 32 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต TM6 ถึง TM7.....	66
ภาพที่ 33 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต TM8 ถึง TM10 .....	67
ภาพที่ 34 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต ZA1 ถึง ZA3.....	68
ภาพที่ 35 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต ZA4 ถึง ZA5.....	69
ภาพที่ 36 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต ZA6 ถึง ZA7.....	70
ภาพที่ 37 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต ZA8 ถึง ZA9.....	71
ภาพที่ 38 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต ZA10 ถึง ZA12 .....	72
ภาพที่ 39 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอกติโนมัยสปีทไอโซเลต ZA13 ถึง ZA14 .....	73

ภาพที่ 40 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์แบบ Neighbour-Joining ของแอดดีโนมีสที่ 6 ไอโซเลต กับ  
แอดดีโนมีสสายพันธุ์ใกล้เคียง ..... 76



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมีการพัฒนาและประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยอินทรีย์ใหม่ ๆ มาใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ลดการใช้ปุ๋ยเคมี และรักษาสิ่งแวดล้อม ซึ่งแมลงเป็นสัตว์กลุ่มหนึ่งที่มัลมีสารอาหารจำนวนมากในรูปแบบที่พืชดูดซึมได้ง่าย โดยมีรายงานการศึกษาการใช้มูลของแมลงและตัวอ่อนของแมลงซึ่งให้ผลเทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ยเคมี เช่น การใช้มูล และซากตักแตนเพื่อเพิ่มปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนในดิน (Fielding et al., 2013) การใช้มูลฝั่มเสริมไนโตรเจนในดิน (Mishra et al., 2013) การใช้ของเหลวที่มดขับถ่ายเป็นแหล่งไนโตรเจนเสริมทางใบแก่พืช (Pinkalski et al., 2018) หรือการใช้มูลหนอนนกเป็นปุ๋ยอินทรีย์ และช่วยส่งเสริมความทนทานต่อสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม (Poveda et al., 2019) เป็นต้น

หนอนนก (Mealworm) และหนอนนกยักษ์ (Superworm) เป็นตัวอ่อนของแมลงปีกแข็งชนิด *Tenebrio molitor* และ *Zophobas atratus* ตามลำดับ นิยมเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ระยะตัวหนอนเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะสัตว์เศรษฐกิจสวยงาม เช่น ปลา นก สัตว์เลี้ยงคลาน รวมถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็กหลายชนิด เช่น แฮมสเตอร์ หรือ กระรอก เนื่องจากมีโปรตีนสูง ส่วนผลพลอยได้จากการเพาะเลี้ยงหนอนนก คือมูล ถูกนำมาใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์เพื่อปรับปรุงดินให้เหมาะต่อการปลูกพืช รักษาสิ่งแวดล้อม และช่วยลดการใช้ปุ๋ยเคมี (โสภณ บุญล้ำ, 2556) โดยจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางธาตุอาหารพบว่า มูลหนอนนก 1 กิโลกรัม มีไนโตรเจน 50 กรัม ฟอสฟอรัส 20 กรัม และโพแทสเซียม 17 กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณธาตุอาหารที่พบในมูลสัตว์ปีก หรือปุ๋ยคอกทั่วไป (Houben et al., 2020) นอกจากนี้ มีรายงานการวิจัย พบว่า ในมูลหนอนนกกมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช และมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ (Poveda et al., 2019)

Plant growth promoting bacteria (PGPB) เป็นกลุ่มแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยผ่านกลไกทั้งทางตรงและทางอ้อม กลไกเหล่านี้ ได้แก่ การตรึงไนโตรเจน (Dobbelaere et al., 2003) การละลายฟอสเฟต (Rodríguez et al., 2006) การสร้างสารไซโตไคน์ (Matthijs et al., 2007) การสร้างฮอร์โมนพืช (Egamberdieva, 2009) และการสร้างเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate Deaminase (ACC Deaminase) (Glick et al., 2007) โดยมีรายงานว่าพบ PGPB ในมูลหนอนนก (Poveda et al., 2019) และแบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่ม PGPB ได้แก่ แอคติโนมัยซีท (Naik et al., 2019) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการคัดแยกและทดสอบการ

ส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากมูลของหนอนนกทั้ง 2 ชนิดนี้มาก่อน ดังนั้น การคัดแยกและทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากมูลของ หนอนนกทั้ง 2 ชนิด จะทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของมูลหนอนนกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตใน พืชซึ่งเป็นการสร้างมูลค่าให้มูลหนอนนกได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดแยกและศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชของแอคติโนมัยสีท จากมูลของหนอนนกและหนอนนกยักษ์

## 1.3 สมมติฐานของการวิจัย

มูลของหนอนทั้ง 2 ชนิด มีแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ของพืช

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

ได้แอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และทำให้เกิด มูลค่าเพิ่มของมูลหนอนนก และหนอนนกยักษ์ที่เป็นผลผลิตพลอยได้จากการเลี้ยงหนอนนก และ หนอนนกยักษ์

## 1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1.5.1 การคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากมูลหนอนนก (Mealworm: *T. molitor*) และมูล หนอนนกยักษ์ (Superworm: *Z. atratus*) ที่ได้จาก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

1.5.2 การทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชจากแอคติโนมัยสีทที่คัดแยก ได้

1.5.2.1 การทดสอบการผลิตฮอโมนพืช IAA

1.5.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase

1.5.2.3 การทดสอบการผลิตไซโตไคน์

1.5.2.4 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

1.5.3 การศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว ปทุมธานี 1

1.5.4 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์

### 1.6 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ตุลาคม 2564 ถึง ธันวาคม 2566

### 1.7 สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ BS2106 อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตบางแสน จังหวัดชลบุรี



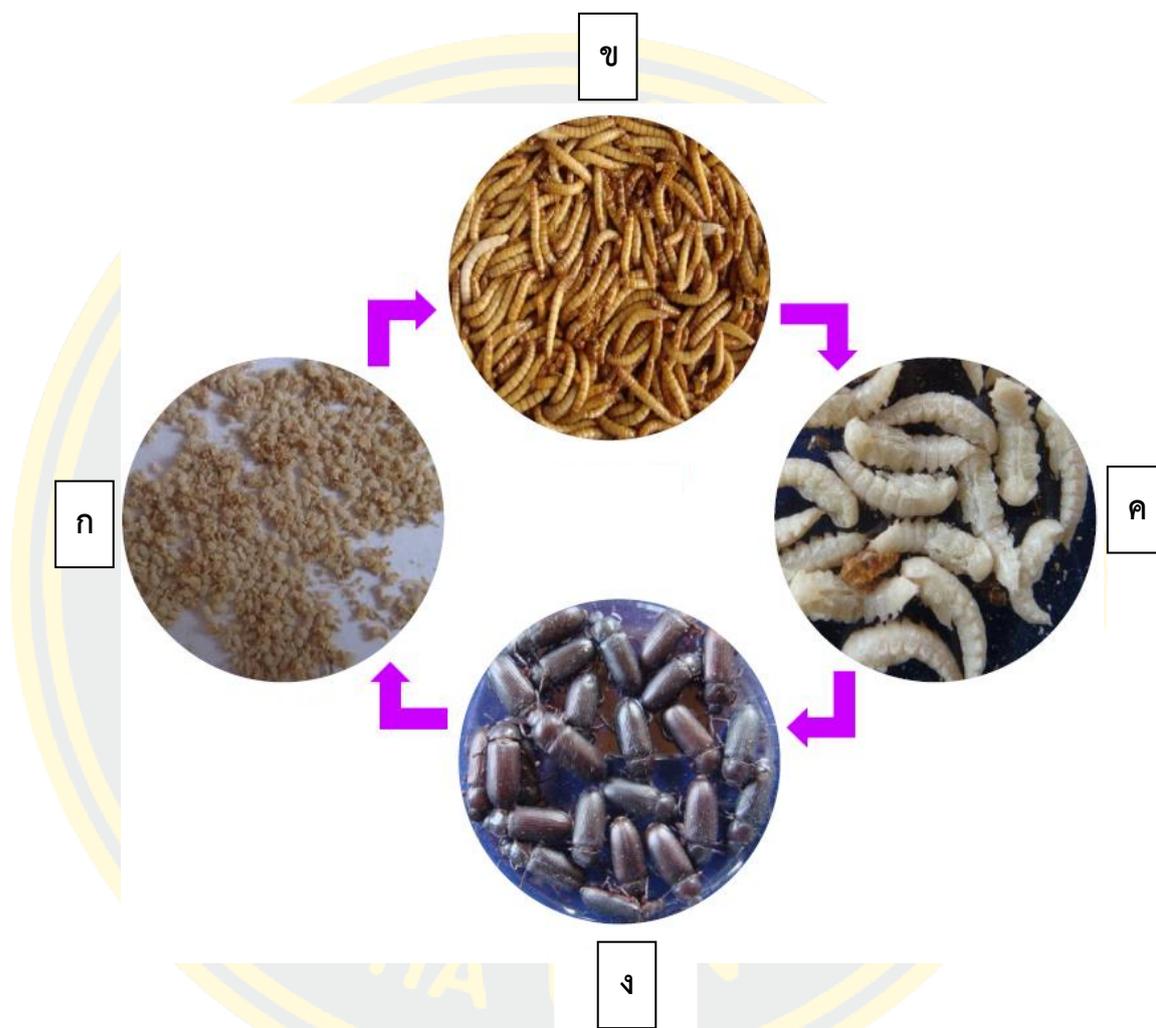
## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 หนอนนก (Mealworm: *Tenebrio molitor*)

หนอนนก (*T. molitor*) มีชื่อสามัญว่า Mealworm เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยหนอนนกเป็นตัวอ่อนของแมลงปีกแข็งที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปยุโรป จัดอยู่ในอันดับ Coleoptera วงศ์ Tenebrionidae สกุล *Tenebrio* และด้วยวงจรชีวิตของหนอนนก (ภาพที่ 1) ในช่วงเป็นตัวหนอนที่มีระยะเวลา 2 ถึง 3 เดือน ประกอบกับมีคุณค่าทางโภชนาการสูง หนอนนกกจึงมีศักยภาพสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ (ยุพา หาญบุญทรง และคณะ, 2561) หนอนนกเป็นหนอนที่ไม่สามารถเจริญเติบโตสืบพันธุ์และวางไข่ได้เองตามธรรมชาติของประเทศไทย เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม (ณัฐภาวิศิษฏ์วิทยากร และ ธนศักดิ์ ฟันไรสงค์, 2548) แต่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงและจัดการได้ง่าย ปัจจุบันมีการนำหนอนนกไปเป็นอาหารสัตว์หลายชนิด เช่น ใช้เป็นอาหารนก สัตว์น้ำ สัตว์สวยงาม และสัตว์ป่า เป็นต้น และเริ่มเป็นที่นิยมในการนำมาเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์เพื่อผลิตเป็นอาหารสัตว์เชิงการค้า (จิราภรณ์ เสวงนา และ ทศนีย์ แจ่มจรรยา, 2544) ทำให้มูลของหนอนนกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายในฟาร์มมีปริมาณมากและกลายเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยคุณลักษณะของมูลหนอนนกลักษณะแห้ง เนื้อละเอียดคล้ายเนื้อทราย มีธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมสูง เช่นเดียวกับมูลไก่ มูลหมู และมูลไส้เดือน (ปัทมาวดี คุณวัลลี และ เทวี มณีรัตน์, 2564) นอกจากนี้มูลหนอนนกสามารถปลดปล่อยแร่ธาตุอย่างรวดเร็วเมื่อใส่ลงในดิน ส่งผลต่อความเป็นกรดเป็นด่างของดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน ไนโตรเจนรวม ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มขึ้นด้วย (Houben et al., 2020) ทำให้มีการนำมูลหนอนนกมาใช้ประโยชน์สำหรับการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช จากการศึกษาของ เทวี มณีรัตน์ และ ปัทมาวดี คุณวัลลี (2566) จากการใช้มูลหนอนนกเพื่อเป็นปุ๋ยในการปลูกดาวเรืองพบว่า จำนวนดอกต่อต้น น้ำหนักสดและเส้นผ่านศูนย์กลางของดอก มีค่าใกล้เคียงและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการใช้ปุ๋ยเคมี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของปัทมาวดี คุณวัลลี และ เทวี มณีรัตน์ (2564) พบว่าการใช้มูลหนอนนกสามารถให้ผลผลิตเทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ยเคมีในการผลิตพริกหยวกพันธุ์คัด-ม.อ. เช่นเดียวกับการศึกษาของปรีชวณี พิบำรุง (2564) พบว่าการใส่ปุ๋ยอัดเม็ดมูลหนอนนก ปุ๋ยอัดเม็ดมูลจิ้งหรีด และปุ๋ยอัดเม็ดมูลหนอนนกผสมหินฟอสเฟต ให้ผลผลิตข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ไม่แตกต่างกันกับการใช้ปุ๋ยเคมี และกรรมวิธีที่ใช้ปุ๋ยที่มีส่วนประกอบของมูลแมลงที่ช่วยเพิ่มธาตุอาหารหลักและเพิ่มอินทรีย์วัตถุในดิน ซึ่งเป็นการปรับโครงสร้างดินให้ดีขึ้น นอกจากนี้การใช้มูลหนอนนกเป็นส่วนประกอบในวัสดุเพาะสำหรับผักและไม้ผล ยังสามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการนำไนโตรเจน

ไปใช้ประโยชน์ ลดปริมาณแคลเซียมที่มีอยู่ในวัสดุปลูก เป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ (Nogalska et al., 2023) และมีรายงานการวิจัยที่พบว่า ในมูลหนอนนกมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช และมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ (Poveda et al., 2019)



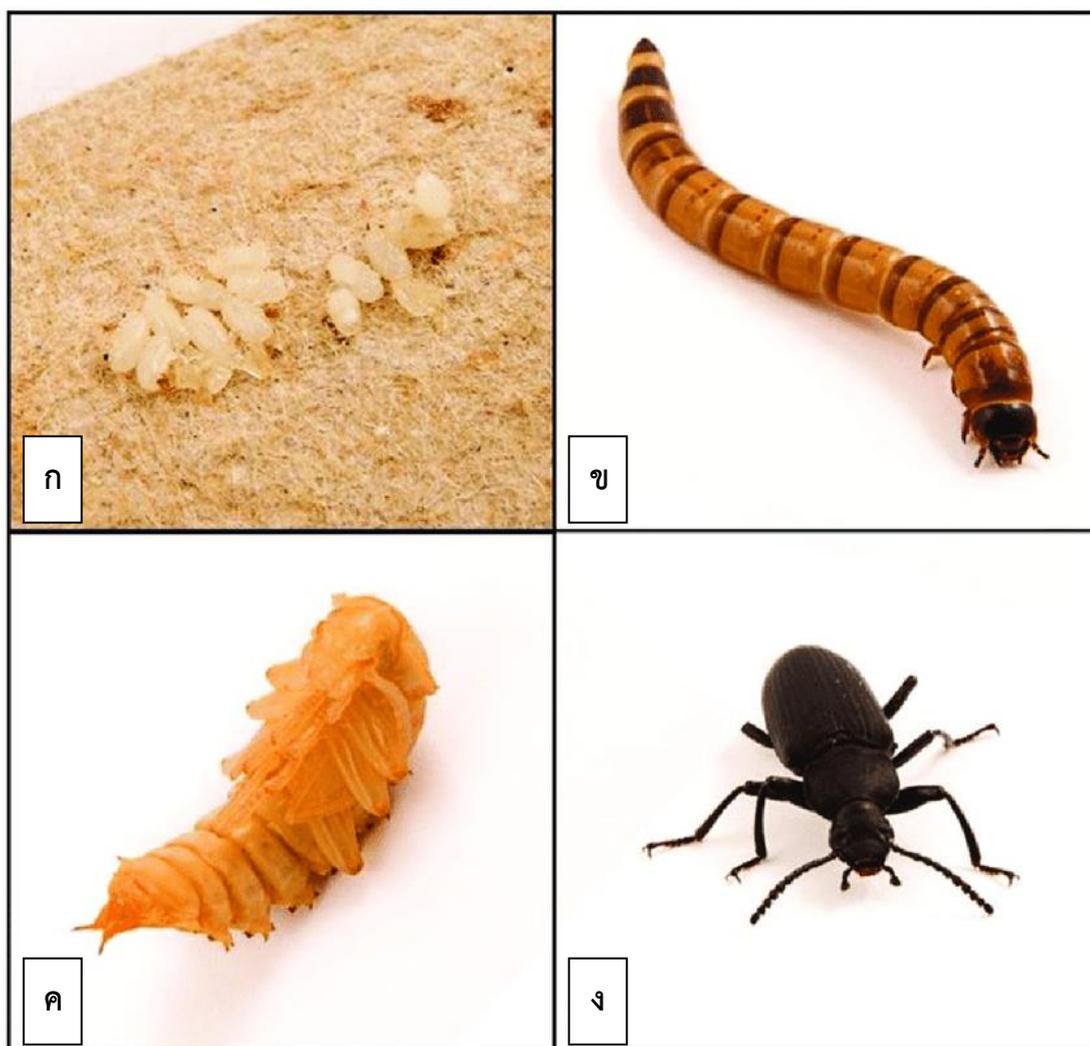
ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของหนอนนก

(ก) ไข่ (ข) หนอน (ค) ดักแด้ (ง) ตัวเต็มวัย  
ที่มา: สุภาวดี โภยตุล และ เจษฎา อีสหะ (2552)

## 2.2 หนอนนกยักษ์ (Superworm: *Zophobas atratus*)

หนอนนกยักษ์ (*Z. atratus*) มีชื่อสามัญว่า Superworm มีต้นกำเนิดจากอเมริกากลางและอเมริกาใต้ จัดอยู่ในอันดับ Coleoptera วงศ์ Tenebrionidae สกุล *Zophobas* มีรูปร่างและสีคล้ายคลึงหนอนนกมาก ต่างกันตรงที่มีขนาดใหญ่กว่าหนอนนก ประมาณ 3 ถึง 4 เท่า และมีสีเข้มกว่าหนอนนกมาก ในธรรมชาติดำรงชีวิตอยู่ตามใต้ใบไม้ ขอนไม้ หรือรากไม้ อาศัยกินซากพืชซากสัตว์ สามารถเคลื่อนไหวได้คล่องแคล่วว่องไว ลำตัวยาวเรียว ยาวประมาณ 55 มิลลิเมตร ตัวโตเต็มวัยเป็นด้วงปีกแข็งสีดำ ขนาดลำตัวยาวประมาณ 35 ถึง 40 มิลลิเมตร (กรสิริ ศรีนิล, 2553) เป็นแมลงที่ถูกมนุษย์นำมาใช้เพาะเลี้ยง และใช้ให้เกิดประโยชน์โดยการนำไปเป็นอาหารสำหรับสัตว์เลื้อยขนาดเล็ก เช่น นก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็ก (Jabir et al., 2012; Park et al., 2013)

วงจรชีวิตของหนอนนกยักษ์ (ภาพที่ 2) ตัวเต็มวัยเพศเมียจะวางไข่ตามซอกหรือรอยแตกของไม้ โดยวางไข่เป็นฟองเดี่ยว หรือเป็นกลุ่ม ไข่มีลักษณะวงรีสีขาวนวล มีขนาดยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ตัวหนอนมีรูปร่างลักษณะเป็นทรงกระบอก ลำตัวมีลายเป็นแถบสีน้ำตาล ระยะหนอน มีระยะเวลาประมาณ 6 ถึง 12 เดือน ระยะหนอนในระยะสุดท้ายจะไม่เข้าระยะดักแด้ ถ้าอยู่ร่วมกับหนอนยักษ์ตัวอื่นๆ แต่จะเข้าระยะดักแด้ เมื่อได้อยู่เพียงลำพังเท่านั้น โดยใช้ระยะเวลาในการเป็นดักแด้ 10 ถึง 14 วัน จึงออกจากดักแด้เป็นตัวเต็มวัยที่มีสีขาวนวล และหลังจากนั้นประมาณ 2 วัน จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเข้มขึ้นจนเป็นสีดำในที่สุด ตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 2 ถึง 3 เดือน ตัวหนอน และตัวเต็มวัยกินอาหารได้หลากหลายชนิด ได้แก่ ข้าวโอ๊ต ถั่วเหลือง แป้งจากธัญพืช และได้รับน้ำจากผัก และผลไม้ต่าง ๆ ที่ไม่มีสารฆ่าแมลง เช่น แครอท กัลย ส้ม เป็นต้น (กรสิริ ศรีนิล, 2553)



ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของหนอนนกยักซ์

(ก) ไข่ (ข) หนอน (ค) ตัวดักแด้ (ง) ตัวเต็มวัย

ที่มา: Rumbos and Athanassiou (2021)

### 2.3 Plant growth promoting bacteria (PGPB)

Plant growth promoting bacteria หรือ PGPB หมายถึง กลุ่มแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต ความแข็งแรง และทนทานของพืช ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ดีขึ้น (de-Bashan et al., 2012) เช่น ช่วยตรึงไนโตรเจนในอากาศ (Nitrogen fixation) ผลิตฮอร์โมนพืช (Phytohormones) เช่น กรดอินโดลอะซิติก (Indole-3-acetic acid; IAA) หรือที่รู้จักกันโดยทั่วไปในชื่อฮอร์โมนออกซิน (Auxin) ซึ่งกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ การแบ่งเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ นอกจากนี้ยังผลิตเอนไซม์บางชนิด เช่น เอนไซม์ ACC Deaminase ที่จะลดความเข้มข้นของเอทิลีน (Ethylene) ที่พืชผลิตขึ้นเนื่องจากความเครียด ทำให้ความเสียหายที่พืช

ได้รับจากความเครียดลดลง (Glick, 2012) สร้างเอนไซม์ไคตินเนส (Chitinase) และ กลูคาเนส (Glucanase) ย่อยเส้นใยราโรคพืช ผลิตภัณฑ์ชีวเวช (Antibiotic) ที่มีฤทธิ์ต้านโรคพืชได้ และผลิตสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น ไซเดอโรฟอรั (Siderophore) ซึ่งมีสมบัติเพิ่มการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์พืช โดยการแย่งจับธาตุเหล็กบริเวณรอบรากพืช ทำให้ราโรคพืชไม่สามารถนำธาตุเหล็กไปใช้ได้ PGPB นั้นอาจอาศัยอยู่บริเวณดินรอบ ๆ ราก (Rhizosphere) บริเวณผิวราก (Rhizoplane) หรืออยู่ในเซลล์ราก (Endophyte) ก็ได้ ซึ่งเป็นที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่ปล่อยออกมาจากพืช (Plant exudates) เช่น กรดอะมิโน หรือน้ำตาลหลายชนิด จึงเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์สำหรับแบคทีเรีย ดังนั้นจึงอาจเรียกชื่อแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ชื่อหนึ่งว่า Plant growth promoting rhizobacteria หรือ PGPR (Gratão et al., 2005) โดยทั่วไป PGPB หรือการจะเรียกจุลินทรีย์ใด ๆ ว่าเป็น PGPB จะต้องคำนึงว่ามีบทบาทต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชตามกลไกดังต่อไปนี้ (Glick et al., 1999) คือ กลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตทางตรง (ภาพที่ 3) และ กลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตทางอ้อม (ภาพที่ 4) ได้แก่

### 2.3.1 กลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยตรง

#### 2.3.1.1 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

ธาตุไนโตรเจนมีความสำคัญต่อพืชมาก จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนและเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย ( $\text{NH}_4$ ) และไนเตรท ( $\text{NO}_3^-$ ) ที่เป็นประโยชน์ต่อพืช จุลินทรีย์กลุ่มนี้ผลิตเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) เพื่อช่วยเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนดังกล่าว เพื่อที่พืชจะนำไปใช้ได้ (Raja et al., 2006)

#### 2.3.1.2 ความสามารถในการเปลี่ยนรูปธาตุฟอสฟอรัสในดิน

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช กระตุ้นและเร่งการเจริญเติบโตของรากพืช ส่งผลต่อการควบคุมการออกดอก ออกผล และการสร้างเมล็ด และยังมี ความสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ทั้งการสังเคราะห์แสง การกักเก็บ และถ่ายโอนพลังงาน และกระบวนการหายใจของพืช แต่เนื่องจากธาตุฟอสฟอรัสละลายน้ำได้ไม่ดี และอยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์แก่พืช พืชนำไปใช้ไม่ได้ โดยทั่วไปในดินส่วนใหญ่การละลายน้ำของฟอสฟอรัสขึ้นอยู่กับ ค่า pH ของดิน และชนิดของดิน ในดินกรดมีออกไซด์อิสระและไฮดรอกไซด์ของพวกอะลูมิเนียม และเหล็ก ที่ตรึงฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปของอะลูมิเนียมฟอสเฟต ( $\text{AlPO}_4$ ) และ เฟอร์ริกฟอสเฟต ( $\text{FePO}_4$ ) ในสภาพดินต่างฟอสฟอรัสจะถูกตรึงโดยแคลเซียม ทำให้เกิดไตรแคลเซียมฟอสเฟต ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) สารประกอบเหล่านี้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้น้อย จุลินทรีย์กลุ่มนี้จึงมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนรูปของธาตุอาหารต่าง ๆ ในดิน รวมทั้งมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนรูปฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (สุภาพร จันรุ่งเรือง และคณะ, 2553) กลไกในการเปลี่ยนรูปฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์กับพืช เกิดจากจุลินทรีย์สร้างกรดอินทรีย์ (Organic acid) ชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็น

สารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีฤทธิ์เป็นกรด เช่น กรดออกซาลิก (Oxalic acid) กรดมาลิก (Malic acid) กรดกลูโคนิก (Gluconic acid) กรดซิตริก (Citric acid) กรดซัคซินิก (Succinic acid) และ เอนไซม์ฟอสฟาเทส (Phosphatase) (Vyas & Gulati, 2009) ที่สามารถละลายเกลือฟอสเฟต เป็นการเพิ่มฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์และพืชสามารถดูดซึมไปใช้ได้ดียิ่งขึ้น (Alori et al., 2017) ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต และการพัฒนาของพืช หากพืชขาดฟอสฟอรัสจะทำให้ลำต้นแคระแกร็น ไม่ผลิดอกออกผล และการเจริญหยุดชะงัก

### 2.3.1.3 ความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช

การผลิตฮอร์โมนพืชโดย PGPB เช่น ออกซิน (Auxin) ไซโตไคนิน (Cytokinin) และจิบเบอเรลลิน (Gibberellin) เป็นต้น เป็นกลไกที่สำคัญในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของพืช โดยรายงานเกี่ยวกับการผลิตฮอร์โมนพืชจาก PGPB ส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปที่บทบาทของกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA ซึ่งช่วยกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ (Cell elongation) การแบ่งเซลล์ (Cell division) และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (Cell differentiation) (Shahab et al., 2009; Weyens et al., 2009)

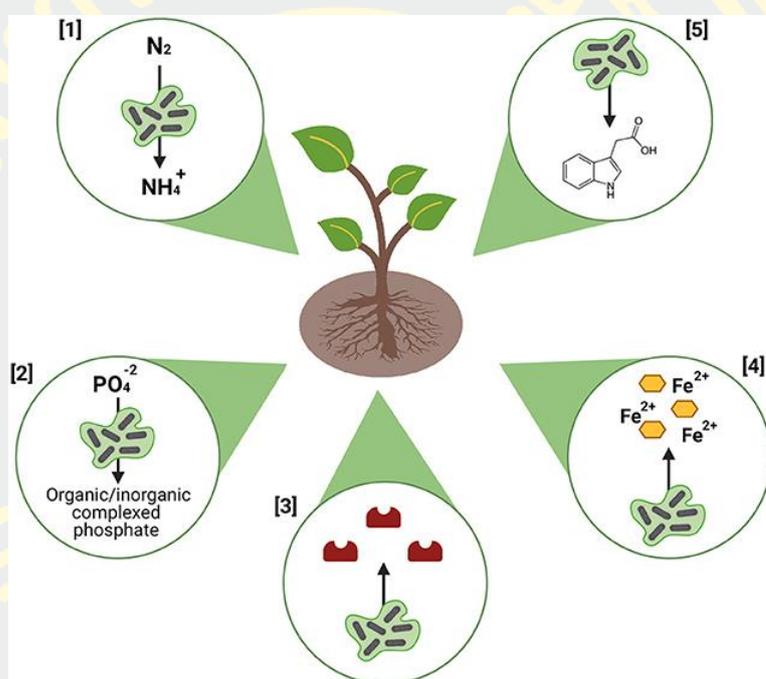
### 2.3.1.4 ความสามารถในการลดความเข้มข้นของเอทิลีน

เอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชเพียงตัวเดียวที่อยู่ในรูปก๊าซ โดยพืชสร้างขึ้นเพื่อใช้ควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนาการต่าง ๆ เช่น การออกดอก การสุกของผล มีผลต่อการเหี่ยว และการร่วงของใบด้วย อย่างไรก็ตามระดับของเอทิลีนที่ปริมาณสูงเกินไปจะยับยั้งการงอก และการยืดยาวของรากพืช ทำให้การสังเคราะห์ออกซินลดน้อยลงไปด้วย (Glick et al., 2007; Hardoim et al., 2008) การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase จากแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจะเปลี่ยน ACC ไปเป็นแอมโมเนียและ  $\alpha$ -ketobutyrate ทำให้การผลิตเอทิลีนจาก ACC ในพืชลดลง และช่วยฟื้นฟูพืชให้กลับมาเจริญเติบโตและพัฒนาได้ตามปกติ (Ojuederie et al., 2019)

### 2.3.1.5 ความสามารถในการผลิตไซโตโรฟอรัส

ธาตุเหล็กจัดเป็นธาตุอาหารที่มีปริมาณมากบนพื้นผิวโลก แต่โดยทั่วไปธาตุเหล็กอยู่ในรูปของสารประกอบที่ละลายน้ำได้ยากหรือไม่สามารถละลายน้ำได้ ความสามารถในการละลายน้ำของธาตุเหล็กมีประมาณ 10 ถึง 18% ที่ pH 7.4 ซึ่งปริมาณของการละลายได้นั้นไม่เพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจากความต้องการธาตุเหล็กเพื่อการอยู่รอด จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินจึงต้องผลิตสารที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อธาตุเหล็กสูง ซึ่งเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (0.5 ถึง 1.5 กิโลดาลตัน) ที่เรียกว่า ไซโตโรฟอรัส (Mahmoud & Abd-Alla, 2001) โดยพบว่าในสภาพแวดล้อมที่ไม่มีธาตุเหล็ก หรือมีธาตุเหล็กในปริมาณน้อย จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดที่มีความสามารถในการสร้างไซโตโรฟอรัสจะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างไซโตโรฟอรัสมากขึ้น ในทางกลับกันการสร้างถูกยับยั้งเมื่อในสภาพแวดล้อมที่มีปริมาณของธาตุเหล็กมากขึ้น ยกเว้นในกลุ่มของแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* ซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาพที่ไม่มีธาตุเหล็ก (หนึ่ง เตียอำรุง และ นันทกร บุญเกิด, 2539) Mahmoud

and Abd-Alla (2001) รายงานว่า *Pseudomonas putida* สามารถผลิตไซโตไคน์โรฟอรินได้ในปริมาณมาก และมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมราสาเหตุโรครดพืช *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นราที่ทำให้เกิดโรครดในมะเขือเทศ และสายพันธุ์กลาย (Mutant) ของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างไซโตไคน์โรฟอรินได้น้อย ไม่สามารถป้องกันโรครดเน่าคอดิน (Damping off) จากรา *Pythium* ได้ ดังนั้นสารไซโตไคน์โรฟอรินช่วยนำธาตุเหล็กไปให้พืชใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น โดยเปลี่ยนรูปของธาตุเหล็กให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้



ภาพที่ 3 กลไกหลักการออกฤทธิ์ของจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช

[1] การตรึงไนโตรเจน [2] การละลายฟอสเฟต [3] การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase

[4] การสร้างสารไซโตไคน์โรฟอริน [5] การสร้างฮอร์โมนพืช

ที่มา: Silva et al. (2022)

## 2.3.2 กลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยทางอ้อม

### 2.3.2.1 การแข่งขัน (Competition)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Antagonistic microorganisms) หรือที่เกษตรกรมักเรียกว่า เชื้อดี ซึ่งหมายถึงจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งหรือควบคุมจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช มีความสามารถในการเจริญเติบโตแข่งขันกับเชื้อโรคพืช เพื่อความอยู่รอดได้ดี ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตจนก่อให้เกิดโรคพืช หรือทำให้เกิดโรคน้อยลง เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ที่ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญหรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ พืชจะเจริญเติบโต แข็งแรง มีผลผลิตสูงขึ้น การแข่งขันที่พบมาก คือ การนำเอาธาตุอาหารหรือสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในดิน หรือในสภาพแวดล้อมนั้นมาใช้ประโยชน์ในการเจริญ ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญเข้าทำลายพืช เช่น แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งจะทำงานผ่านกลไกการผลิตสารไซโตโรพอร์ ช่วยในการจับยึดธาตุเหล็กในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่ารา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ทำให้ราดังกล่าวไม่สามารถทำลายรากของข้าวสาลี ช่วยให้ข้าวสาลีเจริญเป็นปกติ ให้ผลผลิตดีขึ้น และการที่รา *Trichoderma* (Pi2) สามารถลดปริมาณรา *Phytophthora* spp. ได้ เนื่องมาจากการเป็นปฏิปักษ์อย่างสูงของรา *Trichoderma* (Pi2) ซึ่งไปแก่งแย่งแข่งขัน ขัดขวาง และยับยั้งการเจริญของรา *Phytophthora* spp. อีกทั้งการเจริญที่รวดเร็วกว่าจึงสามารถเจริญปกคลุมรา *Phytophthora* spp. (กัทลิวัลย์ สุขช่วย และคณะ, 2553)

### 2.3.2.2 ความสามารถในการชักนำพืชให้เกิดความต้านทานโรค

เชื้อจุลินทรีย์ เช่น รา หรือแบคทีเรีย โดยเฉพาะกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค เมื่อถูกนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคแล้ว สามารถชักนำหรือกระตุ้นให้สร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ (He et al., 2002) เช่น ราชนิด *Colletotrichum magna* ซึ่งก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในพืชพวกแตง เมื่อเกิดการกลายพันธุ์จะเจริญอยู่ในพืชแต่ไม่ทำให้เกิดโรค และยังช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิมได้ หรือในกรณีของแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรงที่มีชีวิตอยู่ สามารถชักนำให้พืชสร้างสาร Tomatine ปลดปล่อยออกมาที่บริเวณราก ทำให้รากมะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *P. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้ (Brown et al., 2007)

### 2.3.2.3 ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ (Antibiotic)

ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย PGPB ได้แก่ Agrocine 84 ผลิตจาก *Agrobacterium radiobacter* K84 (McCardell & Pootjes, 1976) agrocine 434 ผลิตจาก *Agrobacterium* spp. (Donner et al., 1993) 2, 4-diacetylphloroglucinol ผลิตจาก *P. fluorescens* VSMKU3054 (Suresh et al., 2022) และ Herbicolin ผลิตจาก *Pantoea agglomerans* (Matilla et al., 2023) เป็นต้น ใช้ในการควบคุมโรคพืชได้

#### 2.3.2.4 ความสามารถในการผลิตสารเมแทบอลิต์

*P. fluorescens* สามารถสังเคราะห์ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) ซึ่งทำให้แบคทีเรียมีความสามารถในการต้านการเจริญของราสาเหตุโรคพืชบางชนิดได้ ตัวอย่างเช่น สามารถยับยั้ง *Thielabiopsis basicola* ซึ่งเป็นราสาเหตุก่อให้เกิดโรครากเน่าของต้นยาสูบได้ (Ramette et al., 2003) ในบางรายงานกล่าวว่า จุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์รวมทั้ง *Cladosporium werneckii* *Pseudomonas cepacia* และ *P. solanacearum* สามารถย่อยสลายสารประกอบกรดฟูซาริก (Fusaric acid) ได้ ซึ่งสารประกอบกรดฟูซาริกสร้างจากรา *Fusarium* สามารถก่อให้เกิดความเสียหายในพืชได้ (Ramamoorthy et al., 2001)

#### 2.3.2.5 ความสามารถในการควบคุมโรคพืช

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ และคณะ (2554) ได้ตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomona myriotylum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าในผักสลัดโดยใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ ECO 008 และ SSWC 11A0 และ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC 021 และ SSMIX 023 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียเขตรากพืชที่แยกได้จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ ECO 008 ทำให้เส้นใยของเชื้อ *Pythium myriotylum* มีการเจริญที่บิดเบี้ยวผิดปกติไปจากเดิม ในขณะที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC 021 และ SSMIX 023 ทำให้เส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* มีการแตกแขนงอย่างผิดปกติ รวมทั้งพบการเคลื่อนที่ของ Cytoplasm ที่ผิดปกติไปจากเดิมส่งผลให้บริเวณส่วนปลายเส้นใยแตก Domenech et al. (2006) ได้ทำการประยุกต์ใช้ *Chryseobacterium balustinum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* และ *P. fluorescens* ร่วมกันในการช่วยควบคุมเชื้อก่อโรคเหี่ยวและโรคเน่าคอดินในมะเขือเทศ และพริกไทย โดยพบว่าการใช้เชื้อร่วมกันได้ผลดีกว่าการใช้เชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง นอกจากนี้ *Trichoderma harzianum* สามารถควบคุมโรคพืชต่าง ๆ ได้โดยเฉพาะราในดิน เช่น *Pythium* และ *Phytophthora* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคโคนเน่า เป็นต้น (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2563)

#### 2.3.2.6 การควบคุมโดยชีววิธีผ่านภาวะการเป็นปรสิต

ภาวะการเป็นปรสิตเป็นภาวะเบียดเบียนของสิ่งมีชีวิตหนึ่งต่อสิ่งมีชีวิตอื่น เชื้อก่อโรคพืชบางชนิดอาจมีปรสิตเข้าทำลายเซลล์ได้โดยตรง มนุษย์จึงใช้เชื้อปรสิตเหล่านี้เป็นตัวควบคุมโรคด้วยชีววิธี ปรสิตที่ทำลายรากล่อโรคพืชเรียกว่า ไมคอร์พาราไรต์ (Mycoparasite) บางชนิดเป็นปรสิตต่อราหลายชนิดที่ก่อโรคพืช และนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช เช่น *Sphaerellopsis filum* สามารถลดการเกิดโรคราสนิม (Rust) ที่เกิดจากรา *Puccinia* sp. และ *Uromyces* sp. ราในสกุล *Trichoderma* เป็นไมคอร์พาราไรต์ที่มีประสิทธิภาพสูง และผลิตเป็นการค้าในรูปแบบสปอร์ เช่น *Trichoderma lignorum* เป็นปรสิตทำลายเส้นใยรา *Rhizoctonia solani* โดยนิยมใช้สปอร์ของ *T.*

*lignorum* ผสมกับดินปลูกเมล็ดพืชตระกูลส้ม เพื่อป้องกันโรคให้กับต้นอ่อนในระหว่างการงอก และการเจริญเติบโต *Trichoderma* หลายชนิด สามารถทำลายรา *Rhizoctonia bataticola* และ *Armillaria mellea* (บรรเจิด อินทวงศ์ และ จิระเดช แจ่มสว่าง, 2529) รา *Trichoderma* ชนิดที่ผลิตเป็นการค้าและใช้งานแล้ว ได้แก่ *T. harzianum* และ *T. hamatum* ไมคอร์ไรซาไซตัสชนิดอื่น เช่น *Pythium oligandrum* และ *Pythium nunn* เป็นปรสิตใน *Pythium* spp. ชนิดอื่น ซึ่งเป็นเชื้อโรคในดินที่สำคัญที่ก่อให้เกิดโรคเน่าคอดิน โดยกลไกการเป็นปรสิตของราคือการใช้เส้นใยเข้าไปพันรัดเส้นใยราโรคพืช และสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของราสาเหตุโรคพืช เช่น Chitinase, Laminarinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, Protease และ Lipase เป็นต้น (Bashan & de-Bashan, 2005; Compant et al., 2005; Intana, 2003) นอกจากนี้ ยังพบว่ารา *Coniothyrium minitans* และ *Sporidesmium sclerotivorum* เป็นปรสิตของรากกลุ่มสร้าง Sclerotium ซึ่งเป็นส่วนขยายพันธุ์ของรากกลุ่มนี้หลายชนิด เช่น *Sclerotinia minor* และ *Sclerotium cepivorum* ที่ก่อโรคในผักกาดหอม (Scragg, 2005)

### 2.3.2.7 ความสามารถในการช่วยให้พืชมีความทนทานในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

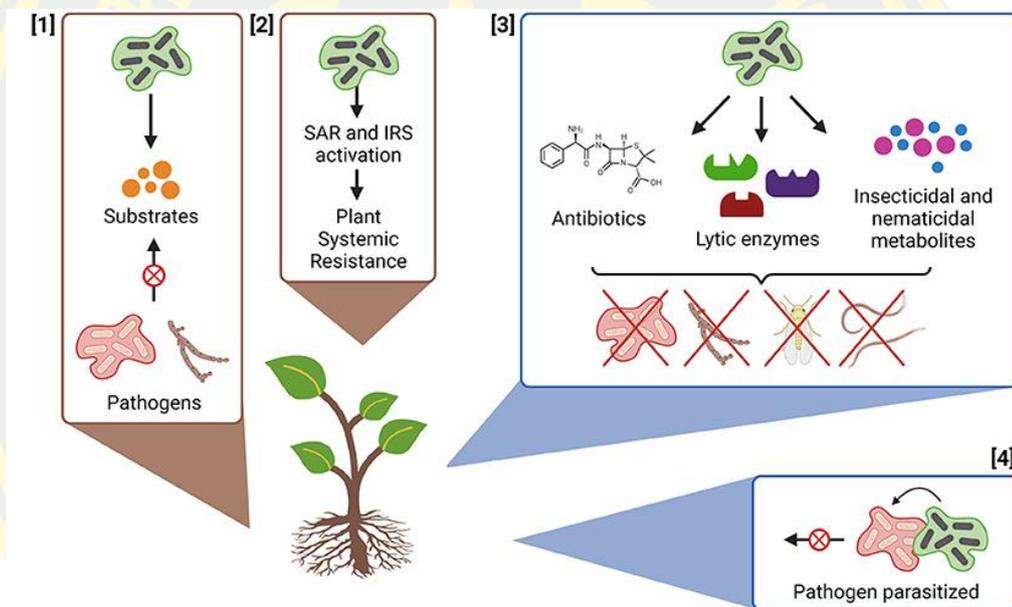
ต่าง ๆ

(1) ความเค็ม ทำให้สภาวะแวดล้อมในดินไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ทำให้ดินมีเนื้อแน่นทึบ รากพืชชอนไชยาก แร่ธาตุบางอย่างละลายออกมาจากดินจนเป็นพิษต่อพืช ผลของความเค็มทำให้พืชขาดน้ำ พืชต่าง ๆ ปรับตัวเข้ากับสภาพความเค็มได้ต่างกัน หากพืชที่ทนไม่ได้จะแสดงลักษณะอาการต่าง ๆ ดังนี้ การเจริญเติบโตลดลง ใบสีเข้มขึ้น ใบหนาขึ้น ปลายใบไหม้ ม้วนงอ ผลผลิตลดลง และถ้าปรับตัวไม่ได้จะตายในที่สุด (วิจิตพล มีแก้ว และคณะ, 2553) แบคทีเรียทนเค็มสามารถเจริญในสภาวะแวดล้อมที่มีเกลือ เนื่องจากภายในเซลล์ของแบคทีเรียทนเค็มมีปริมาณความเข้มข้นของไอออนของเกลือต่ำ ( $\text{Na}^+$  และ  $\text{K}^+$ ) ดังนั้นแบคทีเรียทนเค็มจึงต้องปรับสมดุลของสารละลายภายในเซลล์กับภายนอกเซลล์ โดยการนำไอออนของเกลือ ( $\text{Na}^+$  และ  $\text{K}^+$ ) จากภายนอกเซลล์เข้ามาภายในเซลล์แล้วนำไปใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ (ศิริลักษณ์ นามวงษ์, 2553) ส่งผลให้ไอออนของเกลือในดินลดลง สภาวะแวดล้อมในดินเหมาะสมต่อการเจริญของพืชมากขึ้น

(2) ภาวะความเครียดจากการเกิดออกซิเดชัน (Oxidative stress) โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำลายส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์เยื่อหุ้มเซลล์ และกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน เป็นต้น การเพิ่มขึ้นของอนุมูลออกซิเจนที่เป็นพิษนั้นเป็นผลจากการเกิดความเครียด ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโต และปริมาณผลผลิตของพืชลดลง อย่างไรก็ตามไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นสามารถถูกกำจัดโดยเอนไซม์คะตาเลส (Catalase) หรือเพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) โดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช

สามารถผลิตเอนไซม์คิตาเลสหรือเพอร์ออกซิเดสได้ ก็สามารถช่วยพืชกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกจากเซลล์พืชได้ (นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล, 2554)

(3) ภาวะความเครียดจากโลหะหนัก (Heavy metal stress) โลหะหนักจัดอยู่ในจำพวกธาตุที่พืชไม่ต้องการ และเป็นสารพิษซึ่งปนเปื้อนในดิน ได้แก่ ตะกั่ว (Pb) สังกะสี (Zn) นิกเกิล (Ni) และแคดเมียม (Cd) เป็นต้น จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืชส่วนใหญ่สามารถช่วยลดปริมาณโลหะหนักได้ โดยการสร้างสารไซโตโครฟออร์ นอกจากนี้ธาตุเหล็กแล้วสารไซโตโครฟออร์ยังสามารถจับกับโลหะหนักชนิดอื่นได้ เช่น อะลูมิเนียม (Al) แคดเมียม ตะกั่ว และทองแดง (แก่ง เจียมกิจวัฒนา และ วสุ ปฐมอารีย์, 2558)



ภาพที่ 4 กลไกหลักการออกฤทธิ์ของสารควบคุมทางชีวภาพของจุลินทรีย์

[1] การแข่งขัน [2] การชักนำพืชให้เกิดความต้านทานโรค

[3] การผลิตสารปฏิชีวนะ [4] การควบคุมโดยชีววิธีผ่านภาวะการเป็นปรสิต

ที่มา: Silva et al. (2022)

## 2.4 แอคติโนมัยสีท (Actinomycetes)

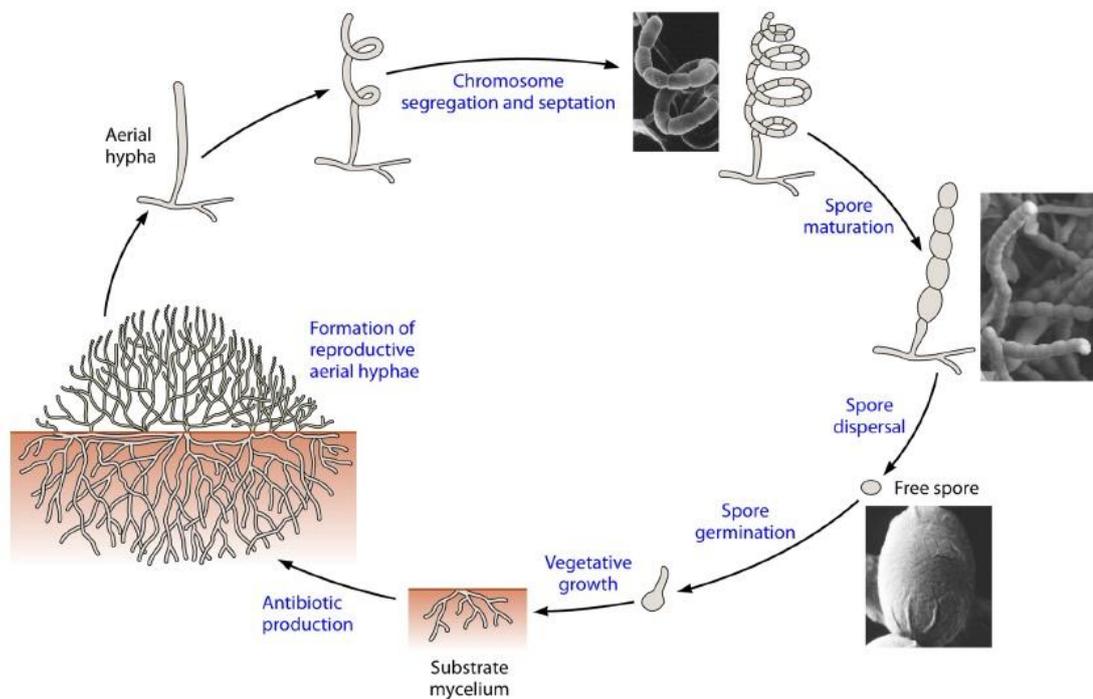
### 2.4.1 ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างลักษณะเป็นเส้นใยที่มีการแตกแขนงกิ่งก้านในช่วงเวลาหนึ่งของชีวิต และเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีปริมาณเบส G+C สูงกว่า 50 mol% นอกจากนี้ แอคติโนมัยสีทยังมีความหลากหลายของสารเมแทบอลิต์ที่เซลล์สร้างขึ้น ซึ่งเป็นสารที่สามารถนำไปใช้เป็นสารออกออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ โดยสามารถกล่าวได้ว่า ในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากจุลินทรีย์นับ 10,000 ชนิดนั้น ประมาณ 2 ใน 3 สร้างมาจากแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีท และมีแอคติโนมัยสีทจำนวนหนึ่งที่ถูกนำมาผลิตเป็นยาที่สำคัญในการบำบัดรักษาโรค และแอคติโนมัยสีทยังมีบทบาทที่สำคัญในทางนิเวศวิทยาช่วยให้มีการหมุนเวียนของสารต่าง ๆ ในธรรมชาติ ในกลุ่มแอคติโนมัยสีททั้งหมด สกุล *Streptomyces* เป็นสกุลที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางและมีจำนวนมากที่สุด (รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2552)

แอคติโนมัยสีท เป็นชื่อเรียกสมาชิกของแบคทีเรียที่อยู่ในชั้น Actinobacteria ซึ่งประกอบด้วย 16 อันดับ ได้แก่ Actinomycetales, Actinopolysporales, Bifidobacteriales, Catenulisporales, Corynebacteriales, Frankiales, Glycomycetales, Jiangellales, Kineosporiales, Micrococcales, Micromonosporales, Propionibacteriales, Pseudonocardiales, Streptomycetales, Streptosporangiales และ Incertae sedis (Ludwig et al., 2012) โดยพบว่าแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* ซึ่งจัดอยู่ในอันดับ Streptomycetales วงศ์ Streptomycetaceae เป็นกลุ่มที่มีจำนวนสมาชิกมากกว่า 550 species จึงเป็นสกุลที่มีความหลากหลายอย่างมาก (Kämpfer, 2012)

### 2.4.2 วัฏจักรชีวิตของแอคติโนมัยสีท

วัฏจักรชีวิตทั่วไปของแบคทีเรียแอคติโนมัยสีทคือ เมื่อสปอร์ตกลงในบริเวณที่มีอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะเกิดการงอกเป็นเส้นใย ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 10 ชั่วโมง จากนั้นอีกประมาณ 8 ชั่วโมง เริ่มมีการสร้างเส้นใยเจริญลงด้านล่างของอาหาร เรียกเส้นใยลักษณะเช่นนี้ว่า เส้นใยใต้ผิวอาหาร (Substrate mycelium) เส้นใยเหล่านี้จะมีการแตกแขนงขยายวงกว้างและอัดตัวอย่างหนาแน่น หลังจากนั้นจะมีการสร้างเส้นใยเจริญพื้นผิวของโคโลนีชูขึ้นในอากาศ เรียกเส้นใยนี้ว่า เส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) เมื่อเจริญจนกระทั่งถึงประมาณวันที่ 3 เส้นใยอากาศจะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสปอร์ (Spore) รูปร่างต่าง ๆ และเมื่อเจริญประมาณถึงวันที่ 7 สปอร์จะมีสีต่าง ๆ เห็นได้อย่างชัดเจน และในช่วงที่สปอร์เจริญพบว่าแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ผลิตสาร Geosmin (Tran-1,10 dimethyl decalol) ที่มีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายกลิ่นดิน (Garth odor) จากนั้นเมื่อสปอร์เจริญเต็มที่จะหลุดร่วงไปตกที่มีอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็จะงอกเป็นโคโลนีใหม่เริ่มวงชีวิตใหม่ต่อไป (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสิท

ที่มา: Barka et al. (2016)

### 2.4.3 โคลนีย์ของแอกติโนมัยสิท

โคลนีย์ของแอกติโนมัยสิทเกิดจากการรวมตัวของเส้นใย (ภาพที่ 6) โคลนีย์อาจยกสูงขึ้น (Raise) หรือแบน (Flat) หรือปกคลุมด้วยชั้นที่คล้ายหนังสัตว์ และมีตั้งแต่โคลนีย์ที่อ่อนมากและละเอียด ไปจนถึงโคลนีย์ที่แข็งมาก ๆ นอกจากนี้ยังมีสีขาว เหลือง ส้ม กุหลาบ แดง ม่วง เขียว น้ำเงิน น้ำตาล และดำ ผิวหน้าโคลนีย์อาจเรียบ (Smooth) เป็นสันนูน (Ridged) เหี่ยวย่น (Wrinkled) เป็นเม็ด (Granular) หรืออาจพบเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัส (Squamous) บางโคลนีย์อาจอัดกันแน่น หรืออาจมีหลายโซนของการเจริญในลักษณะของโคลนีย์ที่เป็นวง ๆ หรือกระจายออกจากจุดศูนย์กลางในลักษณะรัศมี และมักจะมีสองโซน ส่วนขนาดของโคลนีย์จะขึ้นอยู่กับอายุและสภาวะการเจริญ (รัตนกรรณ์ ศรีวิบูลย์, 2548) ขนาดของแอกติโนมัยสิทมีขนาดใกล้เคียงกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ซึ่งจะมีขนาดเล็กกว่ารา (Isaac et al., 1995) และกิงจันท์ มะลิซ้อน (2555) ได้อธิบายว่าขนาดโคลนีย์ของแอกติโนมัยสิทมีตั้งแต่เท่าปลายเข็มหมุดจนถึงเส้นผ่านศูนย์กลางความยาว 1 เซนติเมตร ในขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางโคลนีย์ราไม่น้อยกว่า 3 เซนติเมตร และอาจมีความแตกต่างกันได้ตั้งแต่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตรขึ้นไปจนถึงหลายเซนติเมตร



ภาพที่ 6 ตัวอย่างโคโลนีของแอกติโนมัยซีท

ที่มา: Maiti and Mandal (2019)

#### 2.4.4 การส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชของแอกติโนมัยซีท

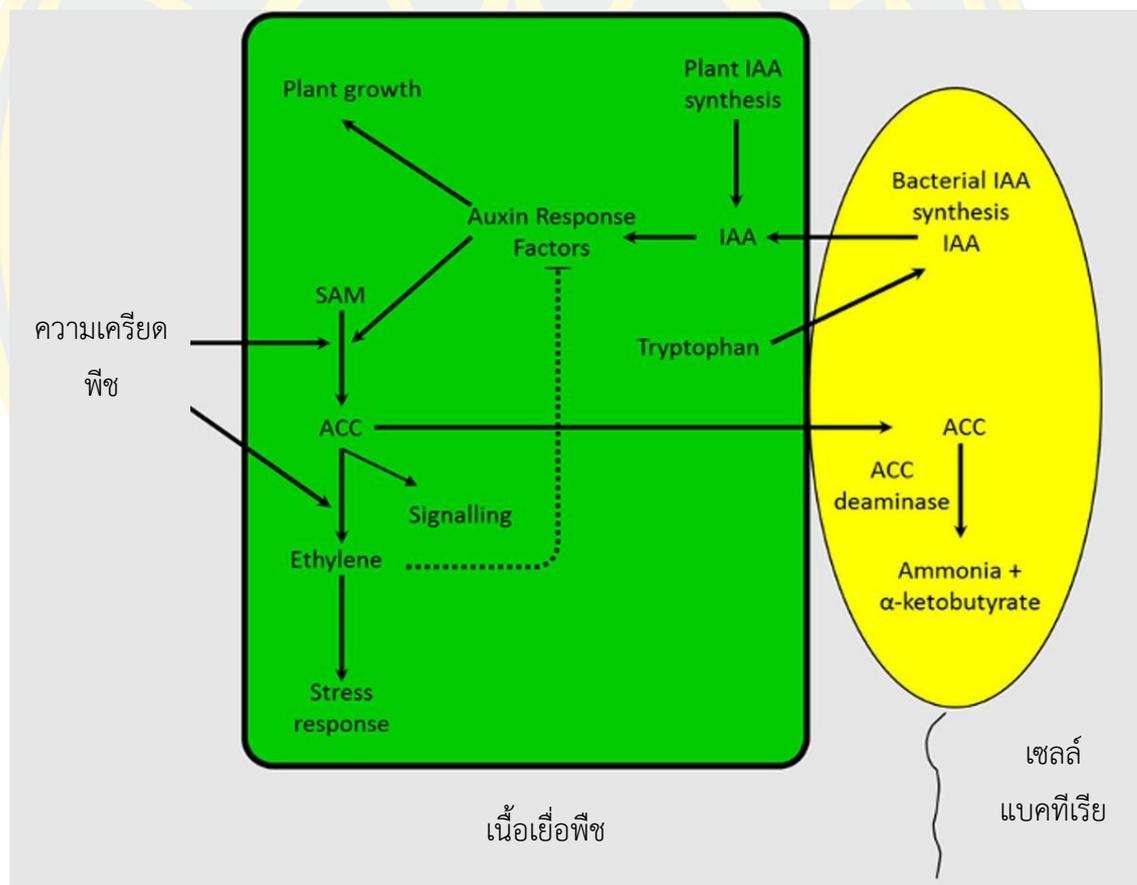
##### 2.4.4.1 การสร้างฮอร์โมนพืช IAA

IAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Phytohormones) จัดเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน สร้างขึ้นที่บริเวณราก (Root) ใบเลี้ยง (Cotyledons) และใบอ่อน (Young leaf) (Ljung et al., 2001) IAA ถูกผลิตขึ้นจากพืช รา และแบคทีเรียบางชนิด มีบทบาทสำคัญในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Li et al., 2018) โดยจะกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ การออกของเมล็ด การเกิดรากและการเจริญเติบโตของต้นอ่อน (Egamberdieva, 2009) นอกจากนี้ยังมีสารสังเคราะห์หลายชนิดที่มีคุณสมบัติคล้าย 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) ที่พืชและจุลินทรีย์สามารถสร้างขึ้นได้เองโดยอาศัยสารตั้งต้น (Precursor) คือ ทริปโตแฟน (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 et al., 2013) ดังนั้นหากเติม Tryptophan ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่มีความสามารถในการผลิต IAA ผลิต IAA ได้ (Spaepen et al., 2007) มีรายงานวิจัยของ Hariharan et al. (2014) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง IAA และการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชโดยแอกติโนมัยซีทคัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นข้าวที่เก็บจากนาข้าวในเขตภาคใต้ของรัฐทมิฬนาฑู (Tamil Nadu) ประเทศอินเดียพบว่า *Streptomyces* sp. VSMGT1014 สร้าง IAA ได้ 15.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่เหมาะสมคือในอาหารสูตร International Streptomyces Project 2 (ISP2) ซึ่งเติม L-tryptophan ความเข้มข้น 0.5% pH 8.0 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลล์พืช และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวเพิ่มขึ้นคือ ความยาวราก 52% และความยาวลำต้น 54.55% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับแอคติโนมัยสีท

#### 2.4.4.2 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase

ACC Deaminase เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างจากกลุ่มแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPB) ถูกควบคุมการสร้างโดยยีน *acdS* (Govindasamy et al., 2008) มีคุณสมบัติช่วยการกระตุ้นการเจริญเติบโตพืชโดยการลดระดับเอทิลีนในพืช ACC Deaminase จะย่อยสลาย 1-amincyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เอทิลีนให้กลายเป็นแอมโมเนียและ  $\alpha$ -ketobutyrate (ภาพที่ 7) จากนั้นแบคทีเรียจะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน (Glick et al., 2007; Honma & Shimomura, 1978)

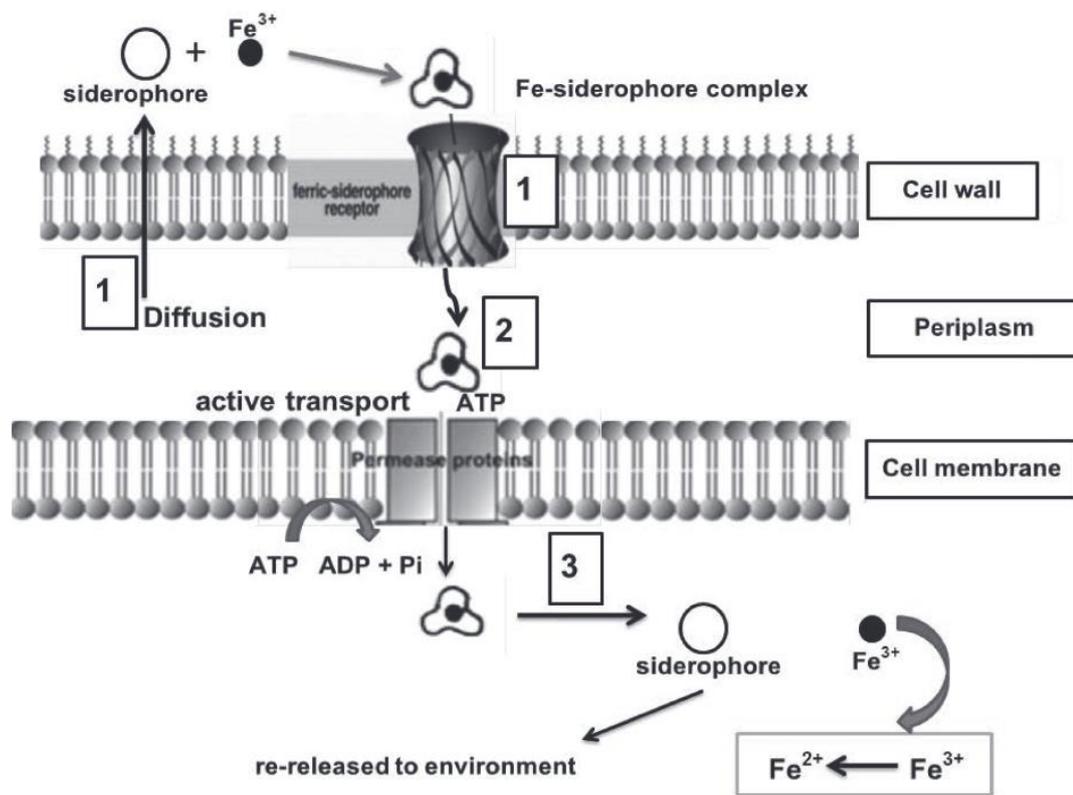


ภาพที่ 7 การทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ ACC Deaminase และฮอร์โมนพืช IAA ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชโดยแบคทีเรีย PGPB  
ที่มา: Gamalero and Glick (2015)

#### 2.4.4.3 การสร้างสารไซเดอโรพอร์

ไซเดอโรพอร์เป็นสารธรรมชาติแบบเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) มีความจำเพาะต่อการจับกับเฟอร์ริกไอออน ( $Fe^{3+}$ ) พืชและจุลินทรีย์จะผลิตไซเดอโรพอร์ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีธาตุเหล็กอยู่จำกัด ธาตุเหล็กจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในกระบวนการเมแทบอลิซึมในการขนส่งอิเล็กตรอน ตามธรรมชาติธาตุเหล็กมีความสามารถละลายน้ำได้ต่ำ ทำให้พืชและจุลินทรีย์ไม่สามารถนำธาตุเหล็กมาใช้ได้ ซึ่งสารไซเดอโรพอร์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมานั้นจะช่วยให้ธาตุเหล็กอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้โดยจะเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเฟอร์รัสไอออน ( $Fe^{2+}$ ) ทำให้พืชและจุลินทรีย์สามารถนำธาตุเหล็กไปใช้ได้ ดังนั้นไซเดอโรพอร์จึงมีความสำคัญต่อการเจริญของพืชและจุลินทรีย์ (Ahmed & Holmström, 2014)

โดยทั่วไปในสภาวะปกติหากมีเหล็กในสิ่งแวดล้อมปริมาณมาก จุลินทรีย์จะสามารถดึงเหล็กที่อยู่ในที่อยู่ภายนอกเข้ามาใช้โดยตรงโดยกระบวนการซึมผ่านตามปกติ แต่เมื่อใดปริมาณเหล็กในสิ่งแวดล้อมมีน้อยกลไกการขนส่งขนส่งเหล็กด้วยไซเดอโรพอร์จึงเกิดขึ้น (ภาพที่ 8) เริ่มจากการสร้างสารไซเดอโรพอร์ขึ้นมาภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ และถูกปล่อยออกสิ่งแวดล้อมด้วยกระบวนการแพร่ (Diffusion) ผ่านผนังเซลล์ และขณะเดียวกันก็มีการสร้างโปรตีนที่เป็นตัวรับ (Receptor) บริเวณผนังเซลล์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเฟอร์ริกไอออนที่รวมตัวกับไซเดอโรพอร์ หรือ Ferric siderophore การสังเคราะห์ของโปรตีนตัวรับชนิดนี้ถูกเหนี่ยวนำจากสภาวะขาดเหล็กภายในเซลล์ เมื่อไซเดอโรพอร์จับกับเฟอร์ริกไอออน จะเกิดเป็นสารเชิงซ้อนของเหล็กไซเดอโรพอร์ (Fe-siderophore complex) ที่สามารถจับกับโปรตีนตัวรับ จากนั้นจะถูกส่งผ่านผนังเซลล์โดยการลำเลียงแบบใช้พลังงาน (Active transport) เข้ามายังบริเวณไซโทพลาสซึม และระบบภายในจะแยกและดึงเหล็กออก โดยบริเวณโมเลกุลที่เป็นลิแกนด์ที่เชื่อมต่อกับเฟอร์ริกไอออน ( $Fe^{3+}$ ) จะถูกสลายด้วยเอนไซม์ หรือเฟอร์ริกไอออนจะถูกปลดปล่อยโดยปฏิกิริยารีดักชัน เฟอร์ริกไอออนถูกเปลี่ยนเป็นเฟอร์รัสไอออน ( $Fe^{2+}$ ) ส่วนของโมเลกุลไซเดอโรพอร์จะถูกส่งออกไปภายนอกอีกครั้งเพื่อจับกับเหล็กตัวใหม่ กลไกข้างต้นจะดำเนินไปจนกระทั่งเมื่อภายในเซลล์มีเหล็กปริมาณมากเพียงพอ จะมีการสร้างโปรตีน repressor ไปควบคุมการสังเคราะห์ทางชีวภาพของไซเดอโรพอร์และโปรตีนตัวรับสำหรับ Ferric siderophore เป็นอันสิ้นสุดกลไก (มานิตา คำแจ่ม และ วสุ ปฐมอารีย์, 2557)



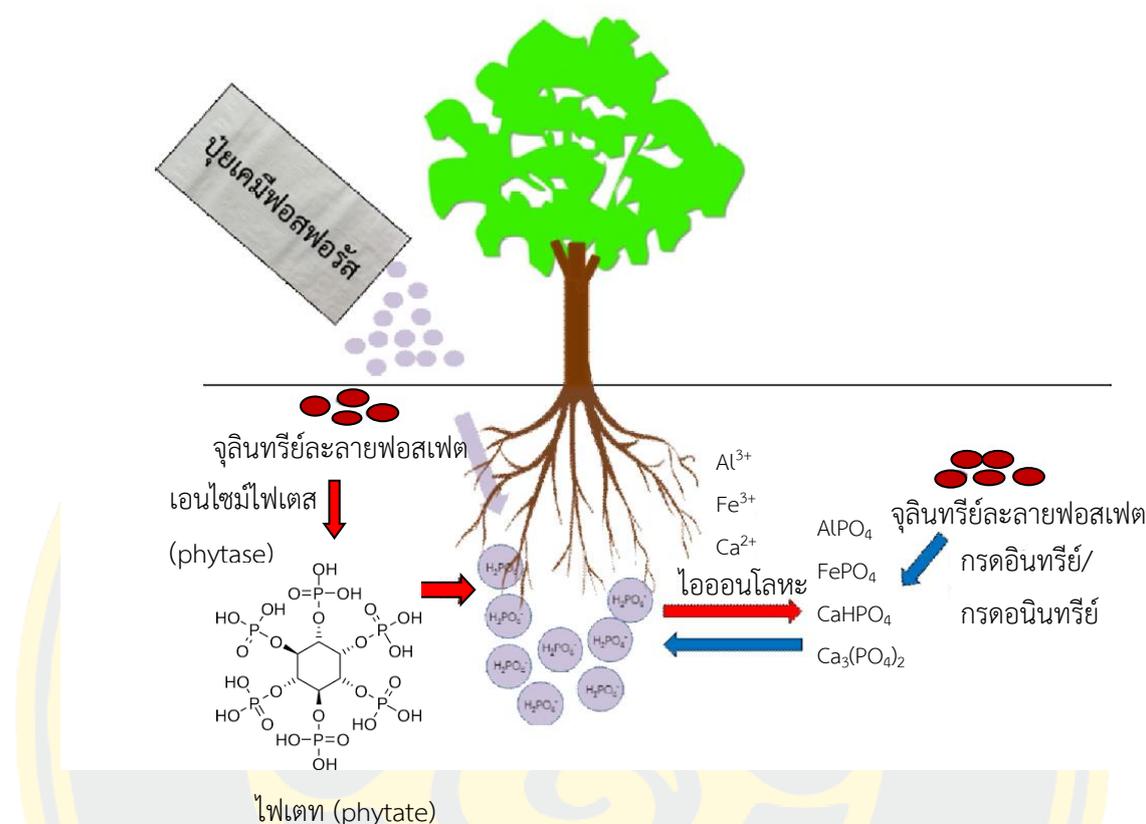
ภาพที่ 8 กลไกในการขนส่งขนส่งเหล็กเข้าสู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์โดยไซเดอโรฟอร์  
ที่มา: มานิตา คำแจ่ม และ วสุ ปฐมอารีย์ (2557)

#### 2.4.4.4 ความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช (Richardson, 1994) โดยฟอสฟอรัสจะทำให้พืชมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแป้ง การตรึงไนโตรเจน การออกดอก การออกผลและเมล็ด และการสุกของผล (Brady & Weil, 2008; Mehrvarz et al., 2008) พืชที่ขาดธาตุฟอสฟอรัสจะทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงัก ลำต้นแคระแกร็น ผอม สูง ใบมีขนาดเล็กลง จำนวนใบลดลง และเป็นสีเขียวเข้มออกน้ำเงิน (Brady & Weil, 2008) ดินในประเทศไทยโดยภาพรวมพบว่ามีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำ (Chinabut, 2003) การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสจึงเป็นสิ่งจำเป็น การขาดธาตุฟอสฟอรัสในดินเป็นปัจจัยทางด้านเคมีที่สำคัญในการกำหนดผลผลิต การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายได้ (Soluble phosphate fertilizer) เป็นการทดแทนปริมาณฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในปริมาณน้อยในดิน แต่อย่างไรก็ตามปุ๋ยฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำได้ที่ใส่ลงไปดินจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับไอออนในดิน และมีการเปลี่ยนแปลงจากฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำได้ไปอยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช (McLaughlin et al., 1988; Stevenson, 1986) ดังนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่จึงเพิ่มปริมาณการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในแปลงที่ใช้

เพาะปลูกเป็นเท่าตัวเพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดีขึ้น ทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของฟอสเฟตอยู่ในดินเป็นจำนวนมาก PGPB มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารต่าง ๆ ในดิน รวมถึงสามารถเปลี่ยนแปลงฟอสเฟตในรูปที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ในดินให้อยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้ ทำให้พืชดึงไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโต อีกทั้ง PGPB เองก็เป็นแหล่งของฟอสเฟตอินทรีย์ ซึ่งมีศักยภาพที่จะปลดปล่อยฟอสฟอรัสให้เป็นประโยชน์กับพืช นอกจากนี้ PGPB ยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของรากพืชในการดูดซับฟอสเฟต โดยเรียก PGPB ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตนี้ว่า Phosphate solubilizing bacteria (PSB) ซึ่งถือเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้ในการเปลี่ยนรูปของฟอสเฟตในดิน เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (de Freitas et al., 1997; Rodríguez & Fraga, 1999)

โดยปกติจุลินทรีย์ในดินจะสร้างเอนไซม์ไฟเตส (Phytase) เพื่อย่อยสลายไฟเตท (Phytate) และปลดปล่อยฟอสฟอรัสซึ่งพืชสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต (ภาพที่ 9) จุลินทรีย์บางกลุ่มมีความสามารถในการละลายสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตโดยสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น (Rashid et al., 2004; Whitelaw, 1999) และกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดไนตริก และกรดซัลฟูริก (Azam & Memon, 1996) ออกมานอกเซลล์เพื่อละลายสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตที่อยู่ในดินให้เป็นฟอสฟอรัสที่ละลายอยู่ในสารละลายดินในรูปโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) และไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) ทำให้พืชสามารถใช้ประโยชน์ได้ซึ่งเป็นการช่วยลดการใส่ปุ๋ยเคมีฟอสเฟต และทำให้ต้นทุนการเพาะปลูกพืชลดลงอีกด้วย



ภาพที่ 9 การละลายฟอสเฟตในดินโดยจูลินทรีย์

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2564)

## 2.5 การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA

ยีน 16S rRNA มีลักษณะเป็นโครงสร้างทุติยภูมิของ RNA ที่ไม่มีการแปลรหัส แต่มีหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนโดยจะรวมกับ rRNA และโปรตีนหลายชนิดเป็นไรโบโซม ซึ่งไรโบโซมจะมีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในโปรคาริโอต (Prokaryote) มีขนาด 70S ประกอบด้วยสองหน่วยย่อยคือ หน่วยขนาดใหญ่ 50S (Large subunit) ประกอบด้วย ชนิด 23S rRNA ขนาดประมาณ 2,904 นิวคลีโอไทด์และ 5S rRNA ขนาดประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์รวมอยู่กับโปรตีน 34 ชนิด และหน่วยขนาดเล็ก 30S (Small subunit) ประกอบด้วย ชนิด 16S rRNA ขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์รวมอยู่กับโปรตีน 21 ชนิด (ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์, 2547) ยีน 16S rRNA นิยมถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของโปรคาริโอต เนื่องจากความเหมาะสมของโมเลกุลที่มีขนาด 1,500 นิวคลีโอไทด์ รวมทั้งมีส่วนของบริเวณอนุรักษ์และความผันแปรเพียงพอสำหรับจัดกลุ่มหรือบอกความสัมพันธ์ (Fukuda et al., 2016)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 ตัวอย่างสำหรับการคัดแยกแอกติโนมัยสีทใช้ในการวิจัย

3.1.1 มูลหนอนนก (Mealworm: *T. molitor*)

3.1.2 มูลหนอนนกยักษ์ (Superworms: *Z. atratus*)

จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

#### 3.2 พืชที่ใช้ในการวิจัย

ข้าวปทุมธานี 1 (*Oryza sativa* L. cv. Pathum Thani 1) จากศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวชลบุรี

#### 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

(แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก)

3.3.1 อาหารแข็งสูตร Chrom azurol S agar (CAS)

3.3.2 อาหารแข็งสูตร Humic acid-vitamin agar (HV)

3.3.3 อาหารแข็งสูตร International streptomyces project No. 2 agar (ISP2)

3.3.4 อาหารแข็งสูตร Mannitol soya agar (MS)

3.3.5 อาหารแข็งสูตร Minimal medium (MM)

3.3.6 อาหารแข็งสูตร Nutrient agar (NA)

3.3.7 อาหารแข็งสูตร Pikovskaya's agar (PVK)

3.3.8 อาหารแข็งสูตร Starch casein agar (SCA)

3.3.9 อาหารแข็งสูตร Water agar (WA)

3.3.10 อาหารแข็งสูตร Yeast extract-dextrose agar (YD)

3.3.11 อาหารเหลวสูตร Yeast extract-dextrose broth (YD)

#### 3.4 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการวิจัย

3.4.1 Ampicillin

3.4.2 Cyclohexamide

### 3.5 สารเคมีและสารละลายที่ใช้ในการวิจัย

(แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข)

- 3.5.1 1-amiocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)
- 3.5.2 Agar
- 3.5.3 Ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )
- 3.5.4 Ammonium sulfate ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )
- 3.5.5 Biotin
- 3.5.6 Calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ )
- 3.5.7 Calcium pantothenate
- 3.5.8 Casein
- 3.5.9 Chrom azurol S
- 3.5.10 Dipotassium phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
- 3.5.11 Disodium hydrogenphosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 3.5.12 Ethanol (EtOH)
- 3.5.13 Fe III solution
- 3.5.14 Ferrous sulfate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.5.15 Ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ )
- 3.5.16 Ferric chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.5.17 Glucose
- 3.5.18 Glycerol
- 3.5.19 Hexadecyltrimethyl ammonium bromide
- 3.5.20 Humic acid
- 3.5.21 Hydrochloric acid (HCl)
- 3.5.22 Inositol
- 3.5.23 ISP medium No. 2 (TM MEDIA)
- 3.5.24 L-asparagine
- 3.5.25 L-tryptophan
- 3.5.26 Magnesium sulphate heptahydrate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.5.27 Mannitol
- 3.5.28 Monopotassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 3.5.29 MOPS

- 3.5.30 Niacin
- 3.5.31 Nutrient agar (TM MEDIA)
- 3.5.32 P-aminobenzoic acid
- 3.5.33 Pikovskaya's agar (HIMEDIA)
- 3.5.34 Potassium chloride (KCl)
- 3.5.35 Potassium hydroxide (KOH)
- 3.5.36 Potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>)
- 3.5.37 Pyridoxin
- 3.5.38 Riboflavin
- 3.5.39 Salkowski's reagent
- 3.5.40 Sodium chloride (NaCl)
- 3.5.41 Sodium hydroxide (NaOH)
- 3.5.42 Sodium hypochlorite (NaOCl)
- 3.5.43 Soluble starch
- 3.5.44 Soybean extract
- 3.5.45 Sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- 3.5.46 Thiamine hydrochlorid
- 3.5.47 Yeast extract

### 3.6 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- 3.6.1 กระจกช้ำระ
- 3.6.2 กระจกวัด pH
- 3.6.3 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- 3.6.4 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope)
- 3.6.5 กล้องถ่ายรูป (Camera)
- 3.6.6 เครื่อง Thermal cycle (Mastercycler nexus GSX1 Eppendorf)
- 3.6.7 เครื่องแก้ว (ปิเกตอร์ ขวดรูปชมพู่ กระจบอกลง หลอดทดลอง ขวดเก็บสาร แห่งแก้วสามเหลี่ยม)
- 3.6.8 เครื่องเขย่า (Shaker)
- 3.6.9 เครื่องชั่งแบบละเอียด (Analytical balance)
- 3.6.10 เครื่องชั่งแบบหยาบ (Balance for approximate weighing)

- 3.6.11 เครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติ (Automatic micropipette)
- 3.6.12 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.6.13 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Micro Centrifuge)
- 3.6.14 เครื่องผสมสาร (Vortex)
- 3.6.15 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 3.6.16 จานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Petri dish)
- 3.6.17 ชุด TIANamp Genomic DNA Kit
- 3.6.18 ชุด GeneJet™ PCR Purification Kit
- 3.6.19 ไซริงค์กรองสาร (Syringe filter membranes pore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร)
- 3.6.20 ไซริงค์ฉีดยา (Syringe)
- 3.6.21 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส
- 3.6.22 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 3.6.23 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow clean bench)
- 3.6.24 ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ถึง 10 องศาเซลเซียส
- 3.6.25 ปากคีบ (Forcep)
- 3.6.26 ไมโครปิเปตทิป (Pipette tip for micropipette)
- 3.6.27 ไมโครเวฟ
- 3.6.28 สำลี
- 3.6.29 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
- 3.6.30 หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร (Microcentrifuge tube)
- 3.6.31 หลอดหยด (Dropper)
- 3.6.32 ท่วงเชี่ยเชื้อ (Inoculating loop)
- 3.6.33 อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)
- 3.6.34 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)

### 3.7 วิธีการดำเนินการวิจัย

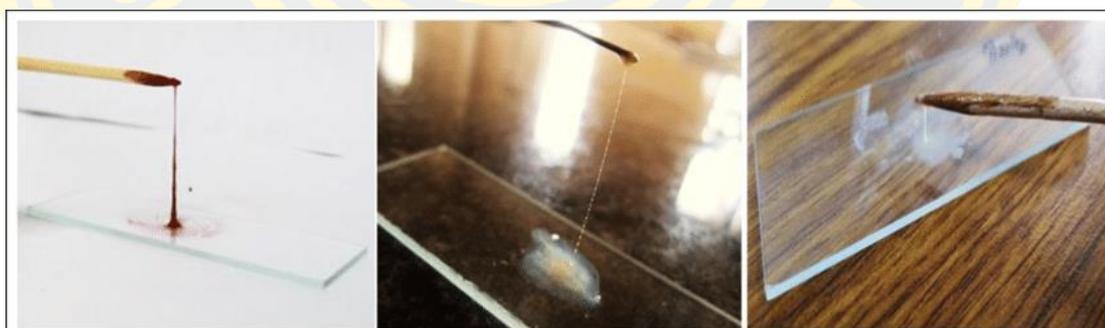
#### 3.7.1 การคัดแยกแอกติโนมัยซีทจากมูลหอนนกกและมูลหอนนกกยักษ์

นำมูลหอนนกกและมูลหอนนกกยักษ์ที่ได้จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำการเจือจางลำดับส่วนแบบ 10 เท่า จนได้ตัวอย่างความเจือจางที่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-7}$  นำตัวอย่างความเจือจางละ 100 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งสำหรับคัด

แยกแอสโคสปอร์ตามวิธีการของ Indananda (2013) สูตร Humic acid-vitamin agar (HV) Starch casein agar (SCA) Water agar (WA) และ Nutrient agar (NA) ซึ่งใส่ยาปฏิชีวนะ Cycloheximide ความเข้มข้น 50% สำหรับยับยั้งการเจริญของรา และ Ampicillin ความเข้มข้น 50% สำหรับยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $29 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน โดยเลือกเก็บโคโลนีของแอสโคสปอร์บนอาหารที่มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น ปุยฟู ผงแป้ง หยักย่นคล้ายหนังสัตว์ บางชนิดมีการสร้างหยดน้ำ เป็นต้น ทุก ๆ 7 วัน นำไปทำให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการทดสอบด้วยวิธี Streak plate บนอาหารแข็งสูตร Mannitol soya agar (MS) (Kieser et al., 2000)

### 3.7.2 การตรวจสอบแอสโคสปอร์

ตรวจสอบแอสโคสปอร์ โดยยืนยันการเป็นแบคทีเรียแกรมลบด้วยเทคนิค Potassium hydroxide test (Talib & Abeid Abiess, 2019) (ภาพที่ 10) จากนั้น นำแบคทีเรียที่ผ่านการยืนยัน แกรมแล้วมา Streak plate บนอาหารแข็งสูตร International Streptomyces Project No.2 agar (ISP2) (Shirling & Gottlieb, 1966) เพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ สีของ เส้นใยอากาศ สีของเส้นใยใต้ผิวอาหาร สีสปอร์ และสีรงควัตถุชนิดละลายน้ำ โดยเทียบกับแผ่นสีมาตรฐาน “ISCC NBS color charts” (Kelly, 1964) โดยแอสโคสปอร์ไฮโอเล็ตที่ได้จากมูลหนอนนกให้ชื่อเป็น TM และได้จากมูลหนอนนกยักษ์ให้ชื่อเป็น ZA



ภาพที่ 10 การตรวจสอบแบคทีเรียแกรมลบด้วยเทคนิค Potassium hydroxide test

ที่มา: Anil et al. (2019)

### 3.7.3 การเก็บรักษาสายพันธุ์แอสโคสปอร์

ทำการเก็บรักษาสายพันธุ์แอสโคสปอร์ 2 วิธี คือ การถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ โดยเก็บรักษา สายพันธุ์แอสโคสปอร์ในอาหารแข็งผิวหน้าเอียงสูตร ISP2 ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดแก้วฝาเกลียวที่ปิด ฝาสนิท (Nakasone et al., 2004) และ การเก็บรักษาเชื้อด้วยความเย็น โดยเก็บรักษาแอสโคสปอร์ ใน Glycerol 20% แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส (Gorman & Adley, 2004)

3.7.4 การเลือกเซลล์ในระดับการเจือจางที่เหมาะสม ด้วยวิธีการเจือจางตัวอย่างลำดับส่วนแบบ 10 เท่า (Tenfold dilution)

นำแอสคิตโนมัยสีทสายพันธุ์บริสุทธิ์ มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Yeast extract-dextrose agar (YD) (Xiang et al., 2009) ด้วยวิธี Cross streak แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $29 \pm 2$  องศาเซลเซียส 7 วัน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Yeast extract-dextrose broth (YD) บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ  $29 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 4 วัน จากนั้นนำมาทำการเจือจางตัวอย่างลำดับส่วนแบบ 10 เท่า จนได้ตัวอย่างความเจือจางที่  $10^{-1}$  จนถึง  $10^{-6}$  นับจำนวนโคโลนีเพื่อเลือกเซลล์ในระดับความเจือจางที่เหมาะสม ด้วยวิธีการ Plate count โดยนำเซลล์แขวนลอยแต่ละระดับการเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร YD นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $29 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีเพื่อเลือกเซลล์ในระดับการเจือจางที่เหมาะสม (30 ถึง 300 โคโลนี)

3.7.5 การทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชจากแอสคิตโนมัยสีทที่คัดแยกได้

3.7.5.1 การทดสอบการสร้างฮอว์โมนพืช IAA

นำเซลล์จากระดับความเจือจางที่เหมาะสมในข้อ 3.7.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YD 10 มิลลิลิตร ที่เติม Tryptophan ความเข้มข้น 2% บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ  $29 \pm 2$  องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นเวลา 7 วัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที แยกเอาส่วนใส 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย Salkowsky' reagent 4 มิลลิลิตร นำไปบ่มในที่มืด 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการสร้าง IAA (Ahmad et al., 2008) และนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้น 5 ถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

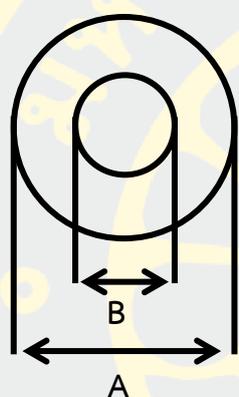
3.7.5.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase

นำแอสคิตโนมัยสีทที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YD ตามวิธีการในข้อ 3.7.4 มาตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ด้วยวิธี Simple streak บนอาหารแข็ง 3 แบบ คือ สูตร Minimal medium (MM) (Hopwood, 1967) สูตร MM ที่เติม Ammonium Sulfate ความเข้มข้น 0.1% และสูตร MM ที่เติม ACC ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $29 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นสังเกตการเกิดโคโลนีของแอสคิตโนมัยสีท ถ้าสามารถสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ได้จะเกิดโคโลนีของแอสคิตโนมัยสีทบนอาหารแข็งทั้ง 3 สูตร

3.7.5.3 การทดสอบการสร้างสารไซโตไคน์

นำแอสคิตโนมัยสีทที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YD ตามวิธีการในข้อ 3.7.4 มาเลี้ยงในอาหารเหลว YD บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ  $29 \pm 2$

องศาเซลเซียส 3 ถึง 4 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็น 5 นาที เทสารละลาย ส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงใน ตะกอนเซลล์และผสมให้เข้ากัน ได้เป็นเซลล์แขวนลอยสำหรับการทดสอบ นำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 15 ไมโครลิตร หยดบนอาหารแข็งสูตร Chrom azurol S (CAS) (Schwyn & Neilands, 1987) บ่ม ที่อุณหภูมิ  $29 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจสอบการเกิด และวัดขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางบริเวณสีส้มรอบโคโลนี (Halo zone) และคำนวณ Halo index (ภาพที่11) โดยการนำ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรวม (เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี + Halo zone) หารด้วยขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางของโคโลนี



A = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรวม  
(เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี + Halo zone)

B = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

$$\text{Halo zone index} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรวม}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}$$

ภาพที่ 11 การคำนวณ Halo zone index

#### 3.7.5.4 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีการเดียวกันกับข้อ 3.7.7 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร หยดบนอาหารแข็งสูตร Pikovskaya's (PVK) (Pikovskaya, 1948) บ่มที่อุณหภูมิ  $29 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจสอบการเกิด และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณสี รอบโคโลนี (Solubilization zone) และคำนวณ Solubilization index ด้วยวิธีการเดียวกันกับข้อ 3.7.5.3

#### 3.7.6 การศึกษาประสิทธิภาพของแอกติโนมัยสีทในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว

ปทุมธานี 1 (*Oryza sativa* L. cv. Pathum Thani 1)

##### 3.7.6.1 การฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ดข้าว

ล้างเมล็ดข้าวด้วยน้ำสะอาดจากนั้นทำฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ดข้าวด้วย Ethanol ความเข้มข้น 70% เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ด้วย Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 1% เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างให้สะอาดอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แช่เมล็ดข้าวในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เป็นเวลา 24

ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการล้างฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ดมาแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอสคิตโนมัยสีห์แต่ละไอโซเลต ซึ่งประกอบด้วยไอโซเลต TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, TM7, TM8, TM9, TM10, ZA1, ZA2, ZA3, ZA4, ZA5, ZA6, ZA7, ZA8, ZA9, ZA10, ZA11, ZA12, ZA13 และ ZA14 โดยนำเซลล์จากระดับความเจือจางที่เหมาะสมในข้อ 3.7.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แช่เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตามวิธี Rungin et al. (2012)

### 3.7.6.2 การทดสอบอัตราการงอกของเมล็ด

การทดลองนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 25 ชุดการทดลองคือ เมล็ดข้าวที่แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอสคิตโนมัยสีห์แต่ละไอโซเลต ซึ่งประกอบด้วยไอโซเลต TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, TM7, TM8, TM9, TM10, ZA1, ZA2, ZA3, ZA4, ZA5, ZA6, ZA7, ZA8, ZA9, ZA10, ZA11, ZA12, ZA13, ZA14 และเมล็ดข้าวชุดที่ไม่มีการแช่อาหารเลี้ยงเชื้อแอสคิตโนมัยสีห์ (ชุดควบคุม) ซึ่งทำการทดลองชุดละ 30 เมล็ด (ทำการทดลอง 5 ซ้ำ) โดยแต่ละชุดการทดลองจะนำเมล็ดข้าวมาเรียงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษชำระ ที่เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 3 วันและอีก 4 วัน ในที่มีแสง (Ramadoss et al., 2013) บันทึกจำนวนเมล็ดข้าวที่งอก สังเกต และเปรียบเทียบลักษณะราก คำนวณอัตราการงอก (Germination rate) โดยคิดเป็นร้อยละของเมล็ดที่งอกเทียบกับจำนวนเมล็ดข้าวทั้งหมด และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการงอกของแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้ Tukey Multiple ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ( $P$ -value < 0.05) ด้วยโปรแกรม Minitab (เวอร์ชัน 19)

### 3.7.7 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์

3.7.7.1 การสกัดจีโนมดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยชุด TIANamp Genomic DNA Kit

1) นำแอสคิตโนมัยสีห์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีกิจกรรมสังเคราะห์ยูเรอิกเตปโตในพืช ได้แก่ การสร้างฮอร์โมนพืช IAA การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase การสร้างสารไซโตคอกิน และ การละลายฟอสเฟต มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวสูตร YD เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน จากนั้นนำเซลล์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง

2) ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องผสมสาร (Vortex) เป็นเวลา 30 วินาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำกลั่นทิ้ง โดยทำการล้างเซลล์ซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อให้ได้เซลล์ที่สะอาด

3) เติม Buffer GA ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ RnaseA ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4) เติม Protinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง

5) เติม Buffer GB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (Spin down) 5 วินาที

6) เติม AbEtOH ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 5 วินาที

7) ย้ายสารละลายจากข้อ 6) ลงใน Spin Columns CB3 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีแล้วเทสารละลายใน Collection tube ที่ตั้ง

8) เติม Buffer GD ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ที่ตั้ง

9) เติม Buffer PW ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ที่ตั้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

10) ย้ายส่วนของ Spin Columns CB3 ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Ultrapure water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร โดยเติมลงตรงกลางกระดากทรงของ Spin Columns CB3 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จะได้ส่วนใสที่ถูกกรองใน Microcentrifuge tube

11) นำไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์เอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.7.7.2 ตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอ และผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

เตรียมถาดรองเจลวางบนพื้นเรียบ ชั่งผงอะกาโรสจำนวน 0.4 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ เติม Buffer 0.5X TAE ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำให้อะกาโรสละลายในไมโครเวฟ แล้วนำออกมาวางทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงถึงประมาณ 60 ถึง 55 องศาเซลเซียส เทอะกาโรสลงในถาดรองเจลที่เตรียมไว้ พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นรอให้เจลแข็งตัว หลังจากเจลแข็งตัว นำถาดไปวางใน Electrophoresis chamber เติม Buffer 0.5X TAE ลงไปจนท่วมเจล ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ (DNA sample) หรือผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ 6X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ Ultrapure water ปริมาตร 3 ไมโครลิตร หยอดดีเอ็นเอหรือผลิตภัณฑ์ PCR ใส่ในช่องเจล (DNA

marker จะหยอดเป็นลำดับสุดท้าย) เมื่อหยอดตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ปิดฝา Electrophoresis chamber แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ Power supply ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอหรือผลิตภัณฑ์ PCR ภายใต้เครื่อง UV Transilluminator แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb Ladder)

3.7.7.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction; PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และไพรเมอร์ 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Tedsree et al., 2022) โดยเตรียมส่วนผสมสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด (ตารางที่ 1) ใส่ลงในหลอด PCR microtube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร นำ PCR microtube ลงในเครื่อง Thermal cycle ตั้งโปรแกรมปฏิกิริยา PCR โดยใช้ปฏิกิริยาและอุณหภูมิตามตารางที่ 2 ปรับตามวิธีการของ Indananda et al. (2010) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสตามวิธีข้อ 3.7.10.2 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำให้บริสุทธิ์

**ตารางที่ 1** สารละลายที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Taq DNA polymerase (Vivantis)	0.15
10X ViBuffer A	1.5
2 มิลลิโมลาร์ dNTP mixture (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1.5
50 มิลลิโมลาร์ MgCl <sub>2</sub>	0.6
10 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ 27F	0.37
10 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ 1492R	0.37
ดีเอ็นเอเทมเพลต	1
Ultrapure water	9.51
รวม	15

ตารางที่ 2 ขั้นตอนของปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอร์เรส

ขั้นตอนปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	
Pre-denaturation	94	4	
Denaturation	94	1	} 35 รอบ
Annealing	60	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	4	

#### 3.7.7.4 การเตรียมผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยชุด GeneJet™ PCR Purification

Kit

ตัดเจลบริเวณที่มีแถบ PCR ขนาดที่ต้องการใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Binding Buffer ปริมาตร 1 เท่าของ PCR บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนขึ้นไอน้ำละลาย จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ดูดสารละลายใส่ลงใน GeneJET purification column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน Collection tube ที่เติม Wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ที่เติม Wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ซ้ำอีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ที่เติม Wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อขจัด Wash buffer ที่ตกค้างให้หมด ย้ายส่วนของ Spin columns ใส่ลงใน Microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร เติม Ultrapure water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บริเวณตรงกลางแผ่นกรอง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้ส่วนใสที่ถูกกรองใน Microcentrifuge tube นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้บริสุทธิ์ไปตรวจสอบโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสตามวิธีข้อ 3.2.7.2

#### 3.2.7.5 การวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองทิศทางโดยบริษัท เอทีจีซี จำกัด ประเทศไทย ตรวจสอบความตรงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall et al., 2011) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบค่าคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบค่าคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) แล้วสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์แบบ Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987) ในโปรแกรม MEGA X (Kumar et al., 2018)

โดยใช้ *Kitasatospora niigatensis* DSM 44781<sup>T</sup> เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (outgroup) คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมโดยใช้แบบจำลอง Kimura two-parameter (K2P) (Kimura, 1980) และวิเคราะห์ค่าสถิติความเชื่อมั่นของแผนภูมิ Bootstrap 1,000 รอบ



## บทที่ 4

### ผลและอภิปรายผลการวิจัย

#### 4.1 การคัดเลือกแอกติโนมัยสีท และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

ผลการคัดแยกและทำให้เชื้อบริสุทธิ์พบว่า สามารถคัดแยกแอกติโนมัยสีทที่มีลักษณะแตกต่างกันได้ 24 ไอโซเลต ในจำนวนนี้คัดแยกได้จากอาหารสูตร HV 5 ไอโซเลต อาหารสูตร SCA 4 ไอโซเลต และอาหารสูตร WA 2 ไอโซเลต ส่วนอาหารสูตร NA คัดแยกได้ 13 ไอโซเลต (ตารางที่ 3) โดยแอกติโนมัยสีทไอโซเลตที่ได้จากมูลหอนอนนก จำนวน 10 ไอโซเลต ให้ชื่อเป็น TM1 ถึง TM10 และจากมูลหอนอนนกยักษ์จำนวน 14 ไอโซเลต ให้ชื่อเป็น ZA1 ถึง ZA14 การวิจัยนี้ได้ใช้อาหารคัดแยกที่มีความจำเพาะต่อการเจริญเติบโตของแอกติโนมัยสีท จำนวน 2 สูตร ได้แก่ HV และ SCA เนื่องจาก Van Hop et al. (2011) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของแอกติโนมัยสีทในประเทศเวียดนาม รายงานไว้ว่า HV และ SCA เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแอกติโนมัยสีท โดย HV เป็นอาหารที่เหมาะสมในการคัดแยกแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* อาหารสูตรดังกล่าวประกอบไปด้วยกรดฮิวมิกซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญของแอกติโนมัยสีท สามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต ในขณะที่ราและแบคทีเรียอื่นๆ จะนำกรดฮิวมิกไปใช้ได้ยาก (Hayakawa & Nonomura, 1987) และเพื่อเพิ่มความหลากหลายในการคัดแยกแอกติโนมัยสีท จึงใช้อาหารคัดแยกที่ใช้โดยทั่วไปในการคัดแยกแบคทีเรียอีกจำนวน 2 สูตร ได้แก่ WA และ NA และจะเติมยาปฏิชีวนะ Cycloheximide ความเข้มข้น 50% และ Ampicillin ความเข้มข้น 50% ในอาหารเพื่อยับยั้งเจริญของราและแบคทีเรียแกรมลบตามลำดับ โดยเลือกอาหารสูตร HV ที่เติมยาปฏิชีวนะเช่นเดียวกับที่ Goudjal et al. (2013) ใช้คัดแยกแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากรากของพืช 5 ชนิดที่เก็บตัวอย่างในพื้นที่ ซาฮารา ประเทศแอลจีเรียและคัดแยกแอกติโนมัยสีทได้จำนวน 27 ไอโซเลต ส่วนอาหาร SCA และ WA ที่เติมยาปฏิชีวนะเลือกใช้เช่นเดียวกับ Indananda (2013) ที่คัดแยกแอกติโนมัยสีทได้จำนวน 66 ไอโซเลตจากพืชสมุนไพรและพืชปลูกของไทย ส่วนอาหาร NA ที่เติมยาปฏิชีวนะเลือกใช้เช่นเดียวกับ อรุมา เรืองวงษ์ และ เบญจวรรณ ใจจันทร์ (2560) ที่ใช้คัดแยกแอกติโนมัยสีทจากดินรอบรากของต้นมะเขือเทศได้ 42 ไอโซเลต แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $29 \pm 2$  องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแอกติโนมัยสีทอยู่ในช่วง 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส (Barka et al., 2016) ประมาณ 1 เดือน เพื่อให้แอกติโนมัยสีทเจริญเติบโตและได้แอกติโนมัยสีทที่มีความหลากหลาย เมื่อทำให้แบคทีเรียที่คัดแยกได้บริสุทธิ์แล้วนำมาคัดเลือกแอกติโนมัยสีทจากสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยยืนยันแกรมแบคทีเรียด้วยเทคนิค Potassium hydroxide test ตามวิธีของ Anil et al. (2019) ที่ตรวจสอบแกรมแบคทีเรียด้วยเทคนิค Potassium hydroxide test

โดยถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สารละลายจะไม่เกิดความเหนียวขึ้น ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบ สารละลายจะเกิดความเหนียวขึ้น โดยพบว่าแบคทีเรียทั้ง 24 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากสารละลายไม่เกิดความเหนียวขึ้น จากนั้นนำแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมา Streak plate บนอาหารแข็งสูตร ISP2 พบว่าแอกติโนมัยสียแต่ละไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เช่น ลักษณะของสีของสปอร์ และการสร้างรงควัตถุ ผลการวิจัยพบว่า สามารถจัดกลุ่มตามสีของสปอร์ได้ 4 กลุ่ม (ตารางที่ 4) โดยกลุ่มที่มีสปอร์สีขาวเป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายมากที่สุด ซึ่งคิดเป็น 45.83% ของจำนวนสมาชิกทั้งหมด รองลงมาคือ กลุ่มที่มีสปอร์สีเทา (37.50%) ซึ่งสอดคล้องกับ งานวิจัยของ รัชณี มิ่งมา และ กรรณิการ์ ดวงมาลย์ ในปี 2564 ที่รายงานการคัดเลือกแอกติโนมัย แบคทีเรียจากดินสวนมะพร้าวที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่าสามารถจัด กลุ่มตามสีสปอร์บนอาหาร ISP2 ได้ทั้งสิ้น 5 กลุ่มส่วนใหญ่สร้างสปอร์สีขาว (36.8%) รองลงมาคือสี เทา (26.3%) นอกจากนี้ขนาดของโคโลนี และผิวหน้าโคโลนีก็จะมีขนาดแตกต่างกัน เช่น ปุยฟู ผงแป้ง หยักย่นคล้ายหนังสัตว์ บางชนิดมีการสร้างหยดน้ำ เป็นต้น (ภาพที่ 12 ถึง ภาพที่ 17)

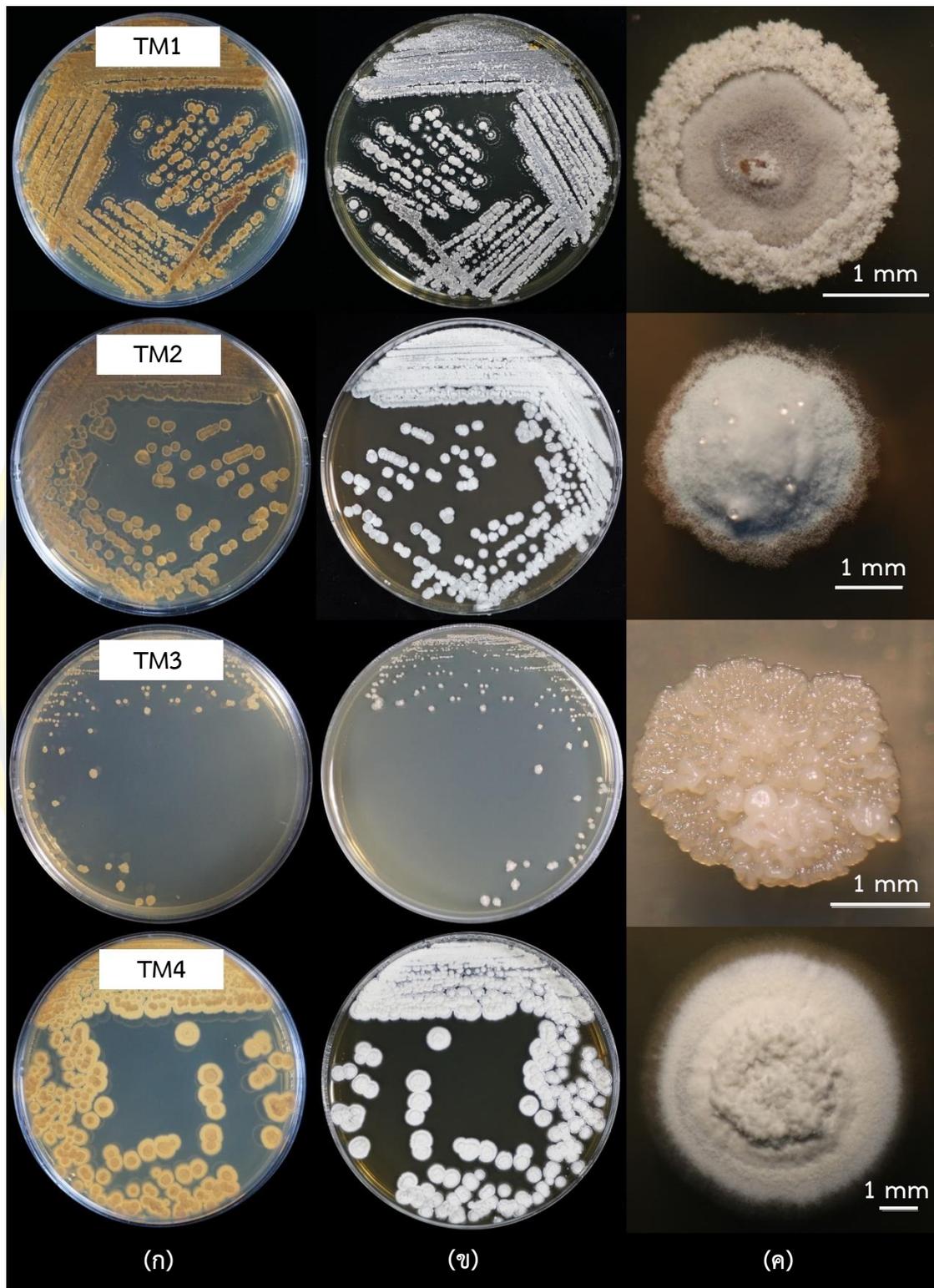
**ตารางที่ 3** รายชื่อแอกติโนมัยสียไอโซเลตต่าง ๆ ที่คัดแยกได้จากมูลหอนนกกและหอนนกกยักษ์

ไอโซเลต	แหล่งคัดแยก	อาหารคัดแยก	จำนวน (ไอโซเลต)
TM1 TM2 TM3 TM6 TM8		NA	5
TM4 TM5	มูลหอนนกก	HV	2
TM7		WA	1
TM9 TM10		SCA	2
ZA1 ZA2 ZA5 ZA6 ZA9		NA	8
ZA10 ZA13 ZA14			
ZA3 ZA4 ZA12	มูลหอนนกกยักษ์	HV	3
ZA11		WA	1
ZA7 ZA8		SCA	2
	รวม		24

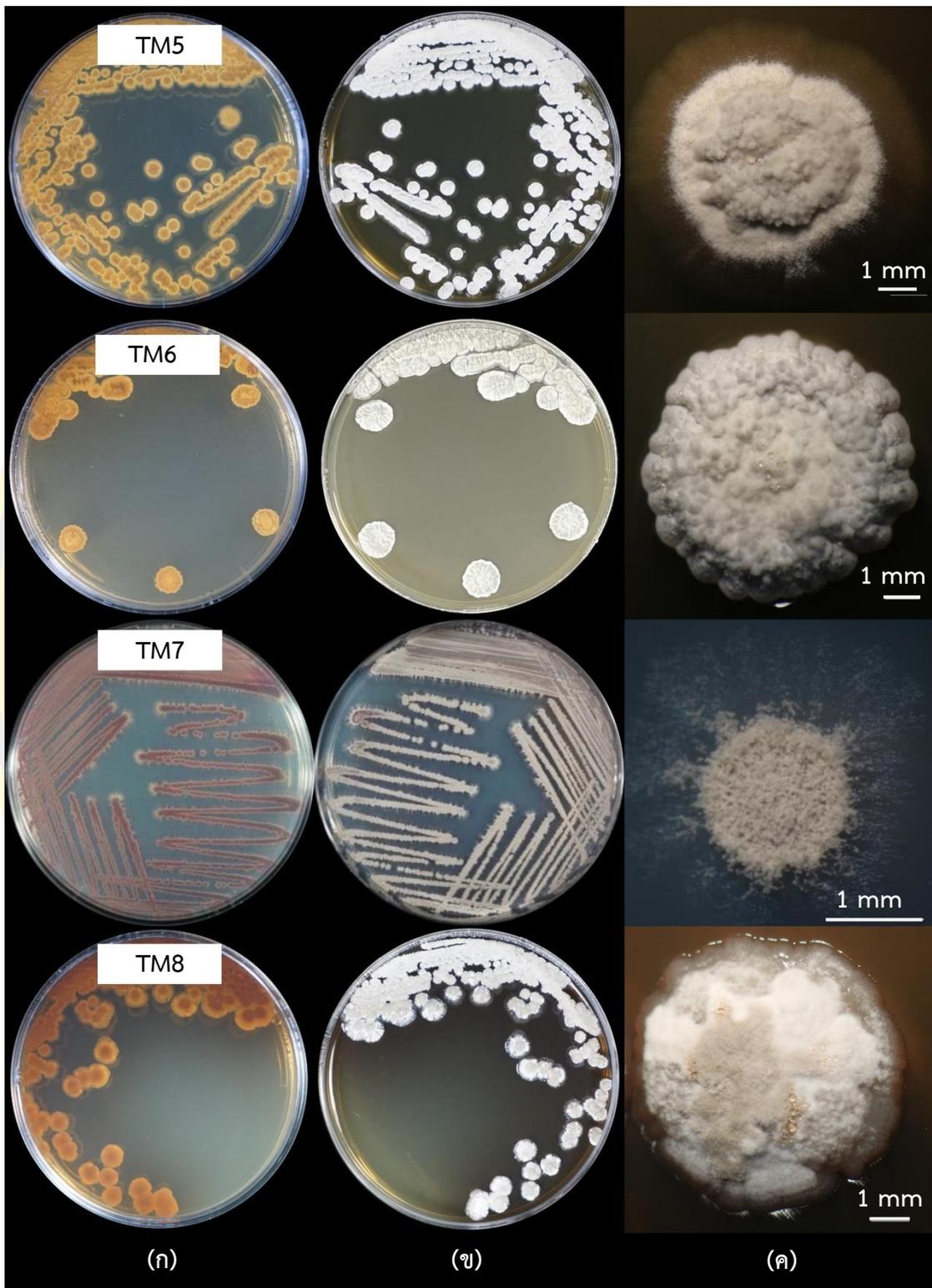
ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลต

ไอโซเลต	ลักษณะสัณฐานวิทยา			
	สีเส้นใยใต้ไมวอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	สีสปอร์	สีรงควัตถุชนิดละลายน้ำ
TM1	Moderate yellow	Light brownish gray	Pale yellow	Deep yellowish brown
TM2	Light yellow	White	Grayish pink	-
TM3	Light yellow	White	Grayish pink	-
TM4	Light yellow	White	White	-
TM5	Moderate yellow	White	White	-
TM6	Light yellow	White	White	Light yellowish brown
TM7	Light yellow	White	Light olive gray	Strong red
TM8	Yellowish white	White	White	Deep brown
TM9	Vivid reddish orange	-	Brownish orange	-
TM10	Yellowish white	White	White	Dark brown
ZA1	Light yellow	White	Grayish pink	-
ZA2	Light yellowish brown	White	Pale purple	-
ZA3	Yellowish white	Yellowish gray	White	-
ZA4	Yellowish white	Yellowish gray	White	-
ZA5	Light gray	-	Brownish black	-
ZA6	Yellowish white	White	White	Dark brown
ZA7	Light yellow	White	Grayish pink	-
ZA8	Light yellow	White	Light olive gray	Strong red
ZA9	Dark yellowish brown	Yellowish gray	White	-
ZA10	Yellowish white	White	White	Dark brown
ZA11	Vivid reddish orange	-	Brownish orange	-
ZA12	Yellowish white	White	White	-
ZA13	Strong brown	-	Dark grayish brown	-
ZA14	Deep yellowish brown	White	Grayish greenish yellow	-

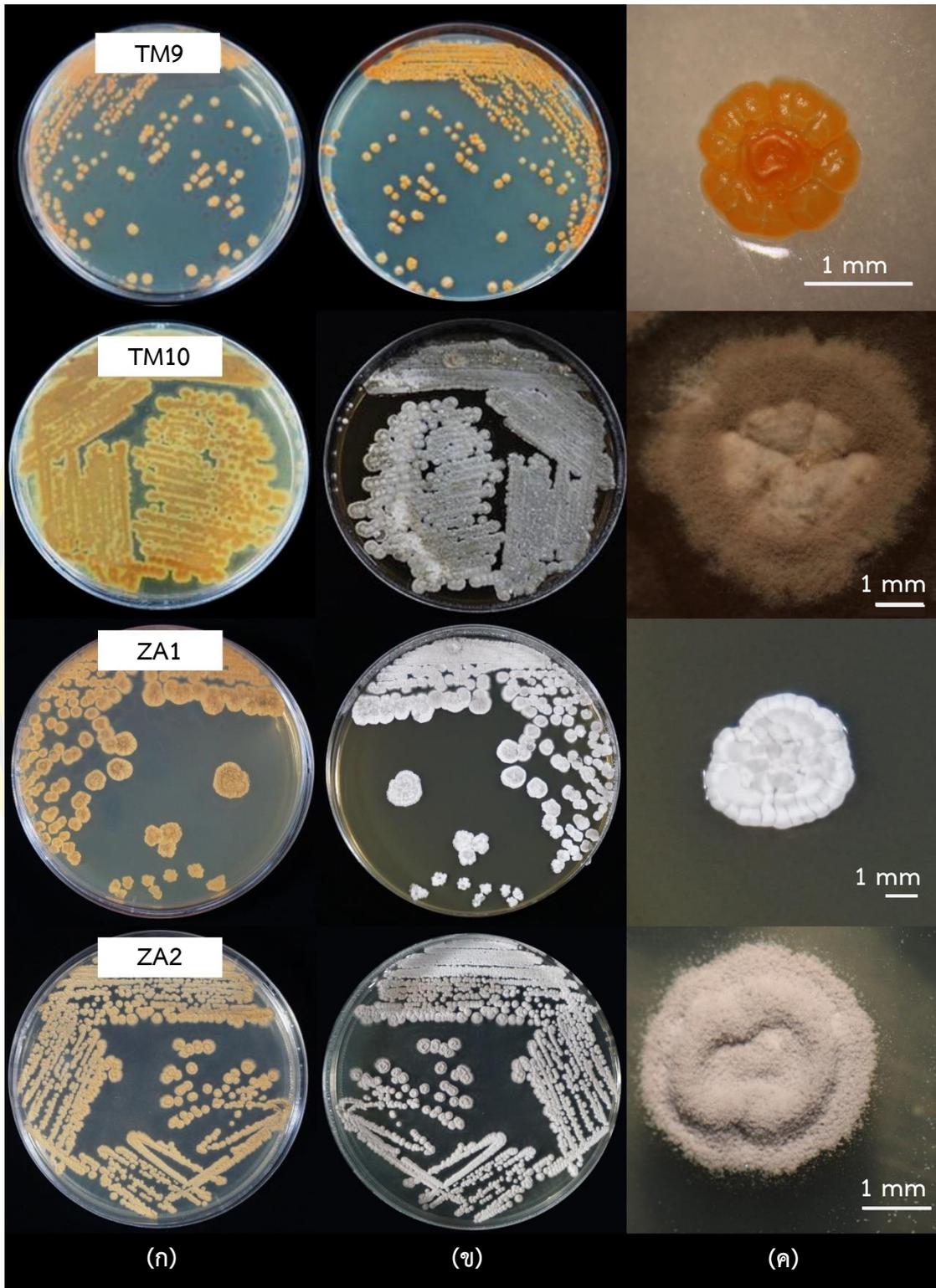
“หมายเหตุ” สัญลักษณ์ (-) คือ ไม่สร้าง



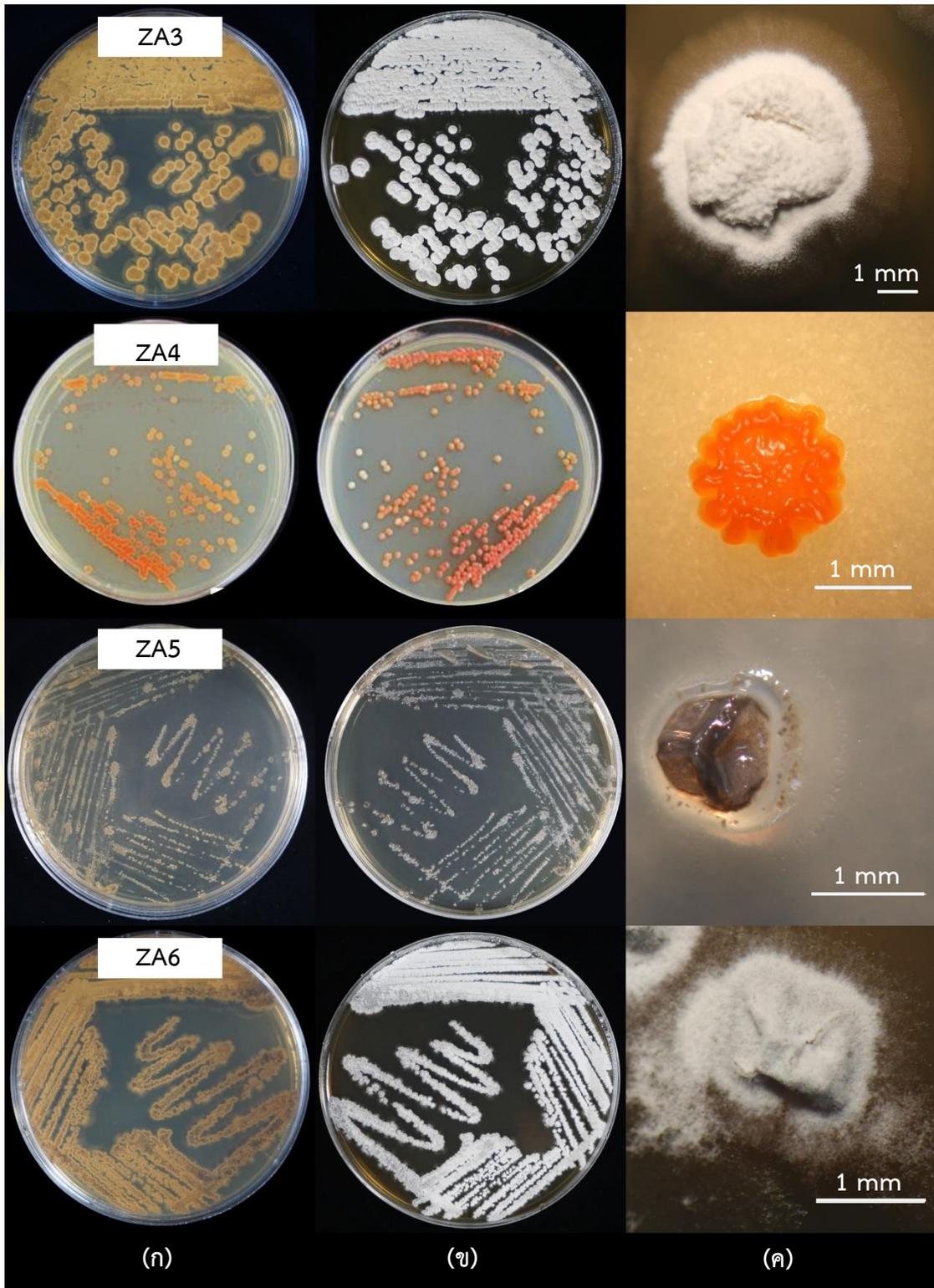
ภาพที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2 ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต TM1 ถึง TM4  
 (ก) ด้านหลังจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข) ด้านหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ค) โคลนเดี่ยว



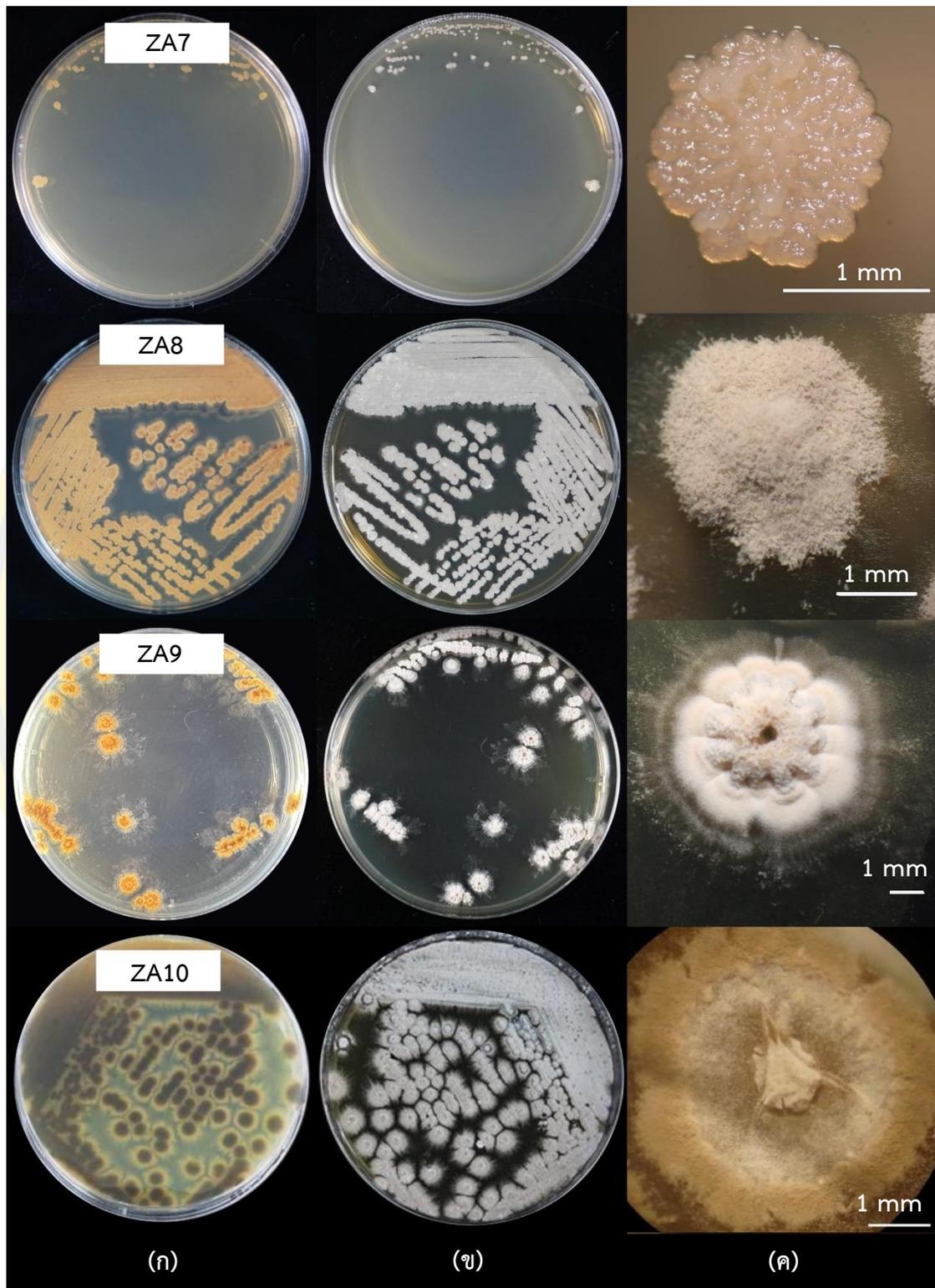
ภาพที่ 13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2 ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต TM5 ถึง TM8  
 (ก) ด้านหลังจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข) ด้านหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ค) โคลนเดี่ยว



ภาพที่ 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2 ของแอกติโนมัยสีทไฮโซเลต TM9 ถึง ZA2  
 (ก) ด้านหลังจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข) ด้านหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ค) โคลนเดี่ยว

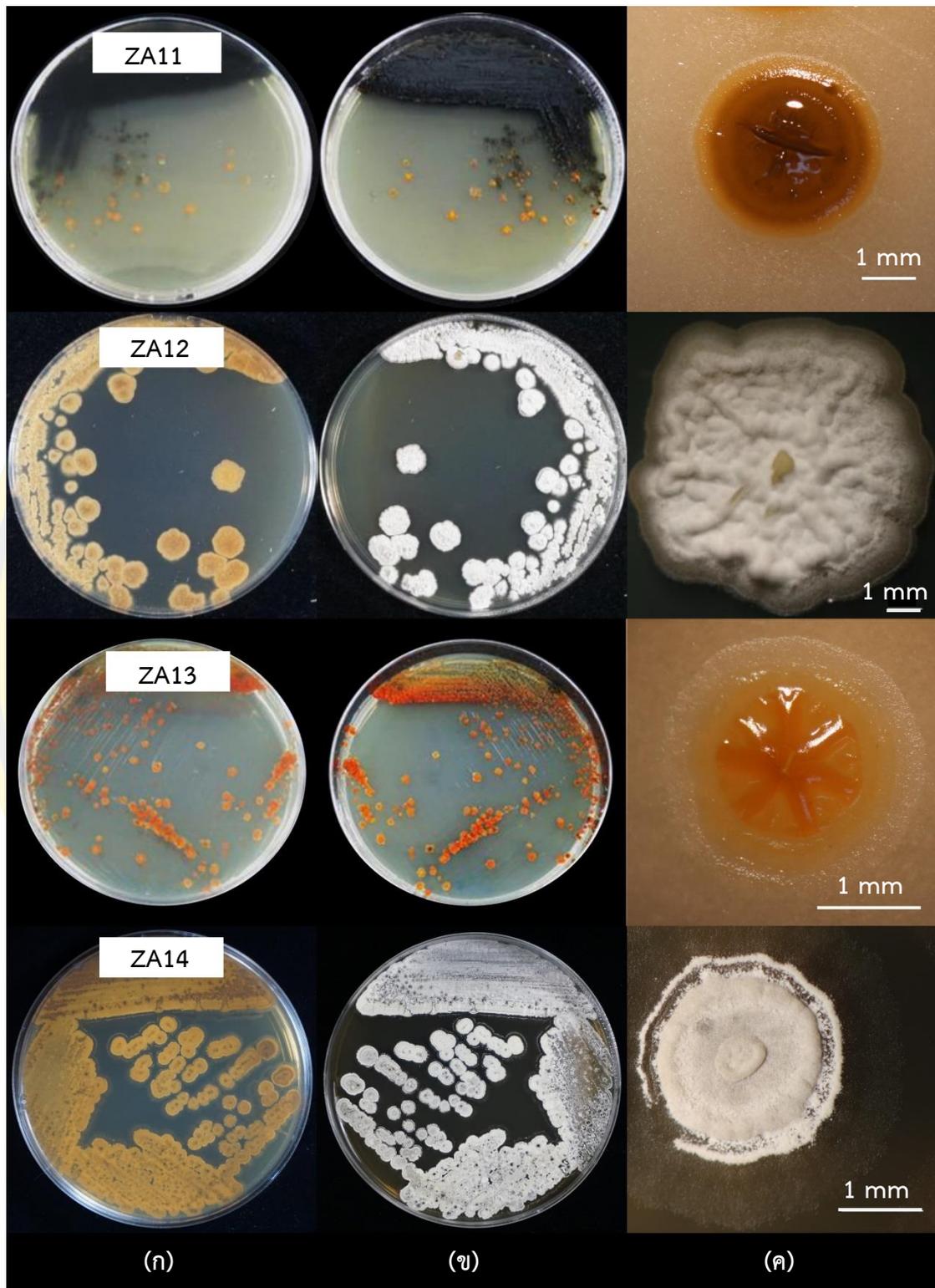


ภาพที่ 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2 ของแอกติโนมัยซีทไฮโซเลต ZA3 ถึง ZA6  
 (ก) ด้านหลังจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข) ด้านหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ค) โคลนเดี่ยว



ภาพที่ 16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2 ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต ZA7 ถึง ZA10

(ก) ด้านหลังจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข) ด้านหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ค) โคลนเดี่ยว



ภาพที่ 17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2 ของแอคติโนมัยซีทไฮสเลต ZA11 ถึง ZA14  
 (ก) ด้านหลังจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข) ด้านหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ค) โคลนเดี่ยว

## 4.2 การทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชจากแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้

### 4.2.1 การทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA

ผลการทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YD ที่มี Tryptophan พบว่ามีแอคติโนมัยซีท 20 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ โดยการนำอาหารเหลวสูตร YD ที่มี Tryptophan ความเข้มข้น 2% ที่เลี้ยงแอคติโนมัยซีทไอโซเลตต่าง ๆ มาเติมสารละลาย Salkowsky's reagent จะเกิดการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีชมพู (ภาพที่ 18 ถึง ภาพที่ 21) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร (Ahmad et al., 2008) และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA พบว่าแอคติโนมัยซีทไอโซเลต ZA4 สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ สูงสุดอยู่ที่  $309.15 \pm 0.06$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ รัชนี้ มิ่งมา และ กรณิการ์ ดวงมาลย์ (2564) ทดสอบความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินสวนมะพร้าว พบว่าจากจำนวน 38 ไอโซเลต มี 17 ไอโซเลต สร้างฮอร์โมนพืช IAA ปริมาณ 1.34 ถึง 10.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Sameera et al. (2018) ทดสอบความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินปลูกต้นกาแฟ พบว่าจากจำนวน 32 ไอโซเลต มี 27 ไอโซเลต สร้างฮอร์โมนพืช IAA ปริมาณ 17.36 ถึง 109.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Gopalakrishnan et al. (2014) พบว่าแอคติโนมัยซีทไอโซเลต CAI-85 คัดแยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนบริเวณรอบรากหยีน้ำ (*Pongamia pinnata*) สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงถึง 43.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับ *Streptomyces* sp. PT2 คัดแยกได้จากส่วนรากหญ้าทะเลทราย (*Panicum turgidum*) สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 127 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Goudjal et al., 2014) มีการรายงานว่าแอคติโนมัยซีทที่สร้างฮอร์โมนพืช IAA สามารถใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช โดยเกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ด และการเจริญของราก Goudjal et al. (2013) รายงานว่า IAA ที่สกัดได้จาก *Streptomyces* ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดมะเขือเทศและการยืดยาวของราก

ฮอร์โมนพืช IAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Phytohormones) จัดเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน สร้างขึ้นที่บริเวณราก ใบเลี้ยง และใบอ่อน (Ljung et al., 2001) IAA ถูกผลิตขึ้นจากพืช รา และแบคทีเรียบางชนิด มีบทบาทสำคัญในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Li et al., 2018) โดยจะกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ การงอกของเมล็ด การเกิดราก และการเจริญเติบโตของต้นอ่อน (Egamberdieva, 2009)

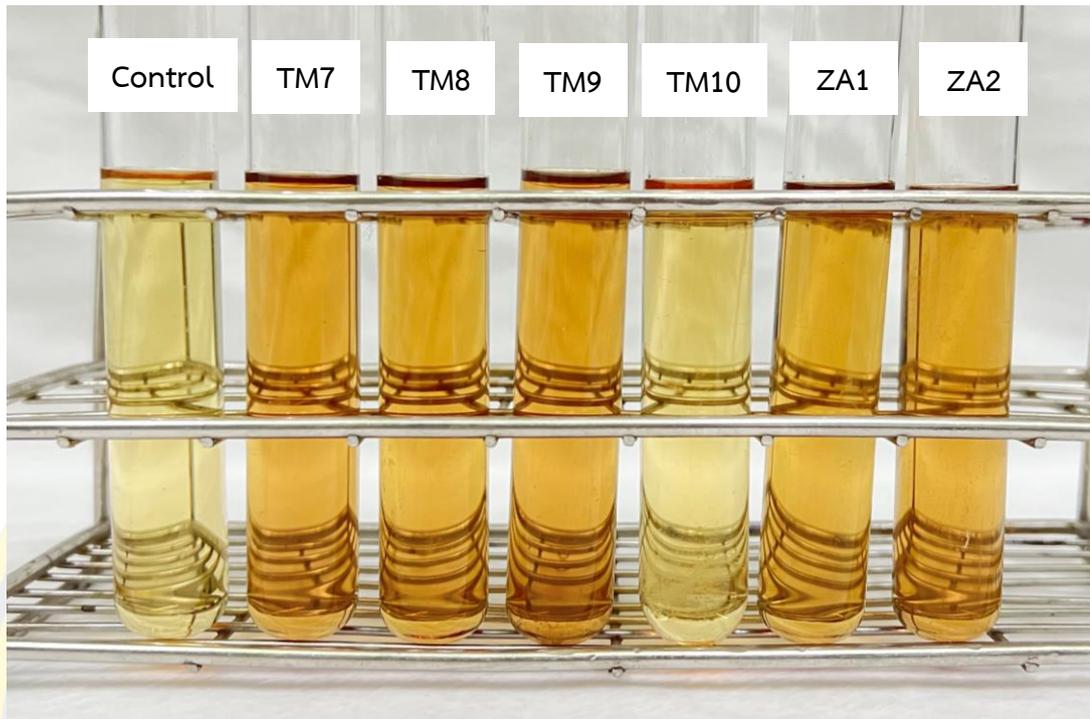
ตารางที่ 5 ความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลตต่าง ๆ

ไอโซเลต	ความเข้มข้น IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไอโซเลต	ความเข้มข้น IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
TM1	110.02±0.05	ZA1	61.67±0.08
TM2	-	ZA2	100.08±0.08
TM3	102.54±0.01	ZA3	56.86±0.04
TM4	77.26±0.02	ZA4	309.15±0.06
TM5	61.64±0.01	ZA5	186.77±0.02
TM6	141.07±0.02	ZA6	52.03±0.08
TM7	144.23±0.05	ZA7	166.47±0.06
TM8	41.91±0.04	ZA8	229.23±0.09
TM9	132.44±0.07	ZA9	115.67±0.06
TM10	-	ZA10	-
		ZA11	117.94±0.07
		ZA12	116.91±0.05
		ZA13	-
		ZA14	23.58±0.02

“หมายเหตุ” ค่าความเข้มข้น IAA แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 18 การสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต TM1 ถึง TM6



ภาพที่ 19 การสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลต TM7 ถึง ZA2



ภาพที่ 20 การสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลต ZA3 ถึง ZA8



ภาพที่ 21 การสร้างฮอร์โมนพืช IAA ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต ZA9 ถึง ZA14

#### 4.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase

ผลทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase บนอาหารแข็งสูตร MM พบว่ามีแอคติโนมัยซีท 22 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ได้ (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 22 ถึง ภาพที่ 29) โดยชุดเซลล์แอคติโนมัยซีทไอโซเลตต่าง ๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร YD มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MM MM ที่เติม Ammonium Sulfate ความเข้มข้น 0.1% (ชุดควบคุม) และ MM ที่เติม ACC ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ด้วยวิธี Simple streak แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งเกิดการเจริญเติบโตแสดงถึงความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase

เอนไซม์ ACC Deaminase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยให้พืชเจริญเติบโตและพัฒนาโดยการลดระดับเอทิลีน เอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชที่อยู่ในรูปของก๊าซสามารถพบได้ในพืชเกือบทุกชนิด (Alori & Babalola, 2018) เอทิลีนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาหลายอย่างในพืช (Ahemad & Kibret, 2014) เอทิลีนเป็นฮอร์โมนการเจริญเติบโตที่ได้รับการกำหนดให้เป็นฮอร์โมนความเครียด (Gamalero & Glick, 2015) ความเครียดทางชีวภาพ และสิ่งมีชีวิต เช่น ความเสียหายของแมลงและไส้เดือนฝอย ภัยแล้งหรือน้ำท่วม การปรากฏตัวของโลหะ สารเคมี (ทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์) แสงอัลตราไวโอเลต อุณหภูมิสูง บาดแผลทางกล ตลอดจนจรรยาและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทำให้การผลิตเอทิลีนเพิ่มขึ้นในพืช (Ali et al., 2014) อย่างไรก็ตามการผลิตที่เกินระดับขีดจำกัดในพืชส่งผลต่อการ

เจริญเติบโตของหน่อและรากของพืชในทางลบ แต่เอนไซม์ ACC Deaminase จะลดระดับเอทิลีนโดยการเปลี่ยน ACC (สารตั้งต้นของเอทิลีน) เป็นแอมโมเนียและ  $\alpha$ -Ketobutyrate และด้วยเหตุนี้จึงช่วยฟื้นฟูการเจริญเติบโตของพืชให้เป็นตามปกติ (Olanrewaju et al., 2017) ก่อนหน้านี้การใช้แบคทีเรียที่มีการสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase กับพืชโดยทั่วไปจะลดความเข้มข้นของเอทิลีนที่พืชผลิตขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากความเครียด และลดความเสียหายที่พืชได้รับความเครียด (Glick, 2012)

แอกติโนมัยสียที่คัดแยกจากมูลหนอนนก และมูลหนอนนกยักษ์ ในงานวิจัยนี้สามารถสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ จิราวรรณ สิทธิสวนจิก (2563) รายงานว่าแอกติโนมัยสียที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือน และผักบุงทะเลไอโซเลต BBUU144 BBUU161 BBUU500 และแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* ATCC 17484 สามารถสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ได้ โดยสามารถเจริญเติบโตในอาหารแข็งที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียวได้แก่ อาหารแข็งสูตร MM MM ที่เติม Ammonium sulfate ความเข้มข้น 0.1% (ชุดควบคุม) และ MM ที่เติม ACC ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ และเช่นเดียวกับงานวิจัยของ El-Tarabily (2008) พบว่าแอกติโนมัยสียที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบรากต้นมะเขือเทศจำนวน 17 ไอโซเลตสามารถเจริญเติบโต และสร้างสปอร์บนอาหารแข็งสูตร DF ที่เติม Ammonium sulfate และ DF ที่เติม ACC ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ มีรายงานการทดสอบผลของแอกติโนมัยสียที่สร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ต่อการเจริญเติบโตของข้าวหอมมะลิไทยพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) โดยการปลูก (Inoculated) *Streptomyces* sp. GMKU 336 เข้าไปในเมล็ดข้าวหอมมะลิไทยพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 พบว่า *Streptomyces* sp. GMKU 336 เพิ่มการเจริญเติบโตของพืชอย่างมีนัยสำคัญ และลดเอทิลีนภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือ (Sodium chloride 150 มิลลิโมลาร์) แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* sp. GMKU 336 ที่สร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของข้าวและเพิ่มความทนทานต่อเกลือโดยการลดระดับเอทิลีนโดยการทำงานของเอนไซม์ ACC Deaminase (Jaemsaeng et al., 2018; Sumi & Arka Pratim, 2022)

ตารางที่ 6 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลตต่าง ๆ

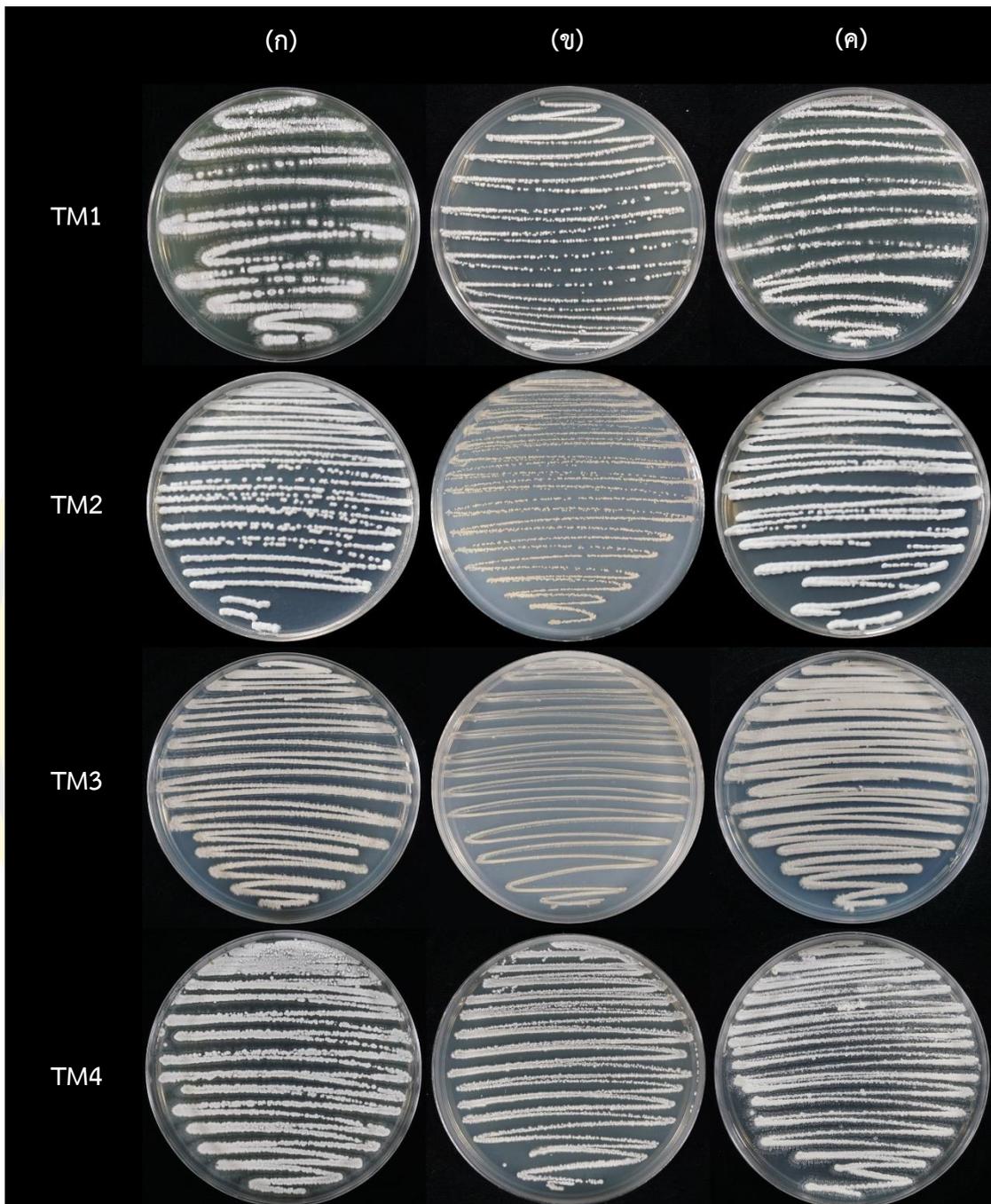
ไอโซเลต	MM	MM + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1%	MM + ACC 0.3 มิลลิโมลาร์	ไอโซเลต	MM	MM + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1%	MM + ACC 0.3 มิลลิโมลาร์
TM1	+	+	+	ZA1	+	+	+
TM2	+	+	+	ZA2	+	+	+
TM3	+	+	+	ZA3	+	+	+
TM4	+	+	+	ZA4	+	-	-
TM5	+	+	+	ZA5	+	+	+
TM6	+	+	+	ZA6	+	+	+
TM7	+	+	+	ZA7	+	+	+
TM8	+	+	+	ZA8	+	-	-
TM9	+	+	+	ZA9	+	+	+
TM10	+	+	+	ZA10	+	+	+
				ZA11	+	+	+
				ZA12	+	+	+
				ZA13	+	+	+
				ZA14	+	+	+

“หมายเหตุ” สัญลักษณ์ (-) คือ ไม่เกิดโคโลนีของแอคติโนมัยซีทบนอาหาร

MM คือ อาหารแข็งสูตร MM

MM + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1% คือ อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ความเข้มข้น 0.1%

MM + ACC 0.3 มิลลิโมลาร์ คือ อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม ACC ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

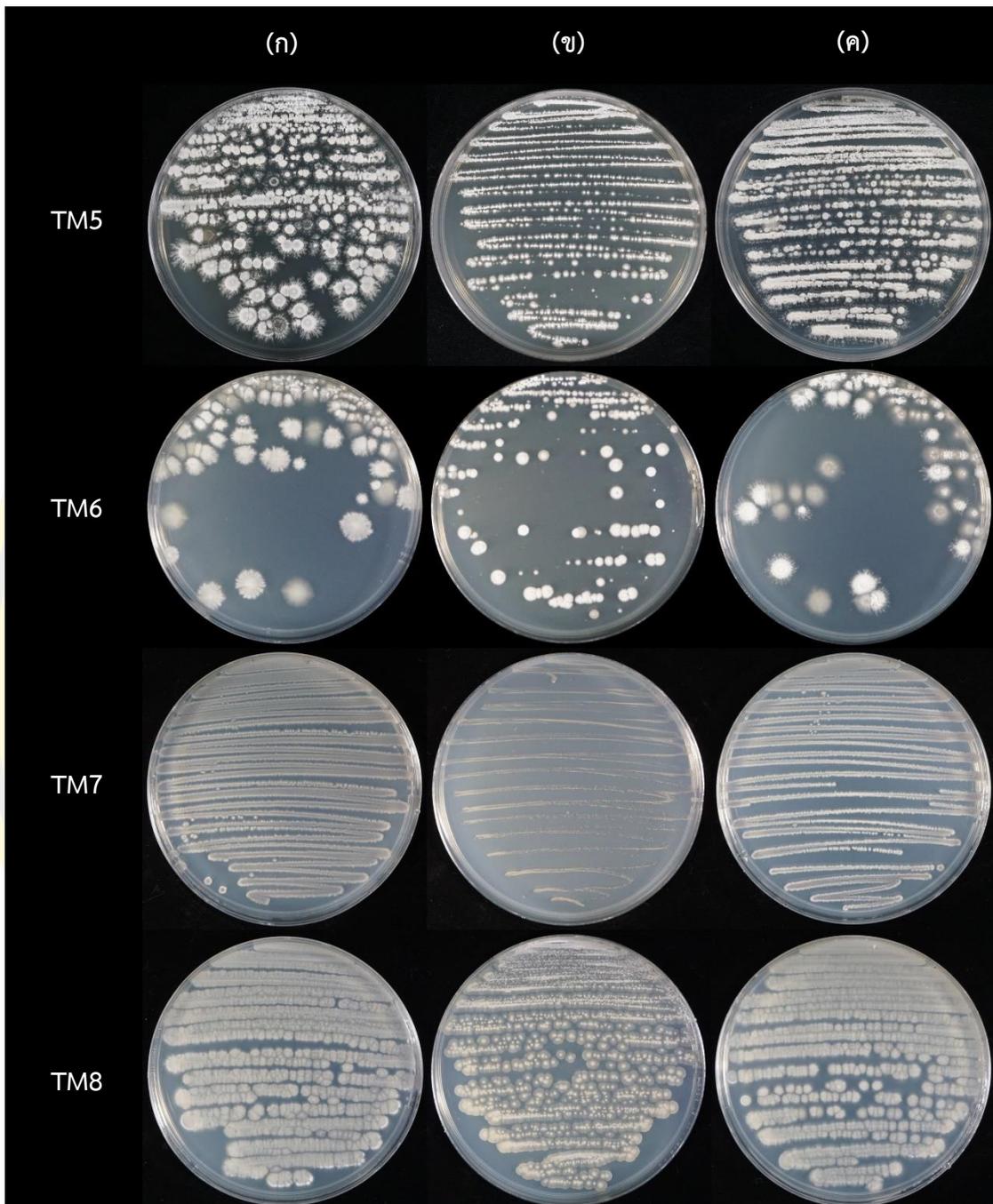


ภาพที่ 22 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต TM1 ถึง TM4

(ก) อาหารแข็งสูตร MM

(ข) อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้น 0.1%

(ค) อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม ACC ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

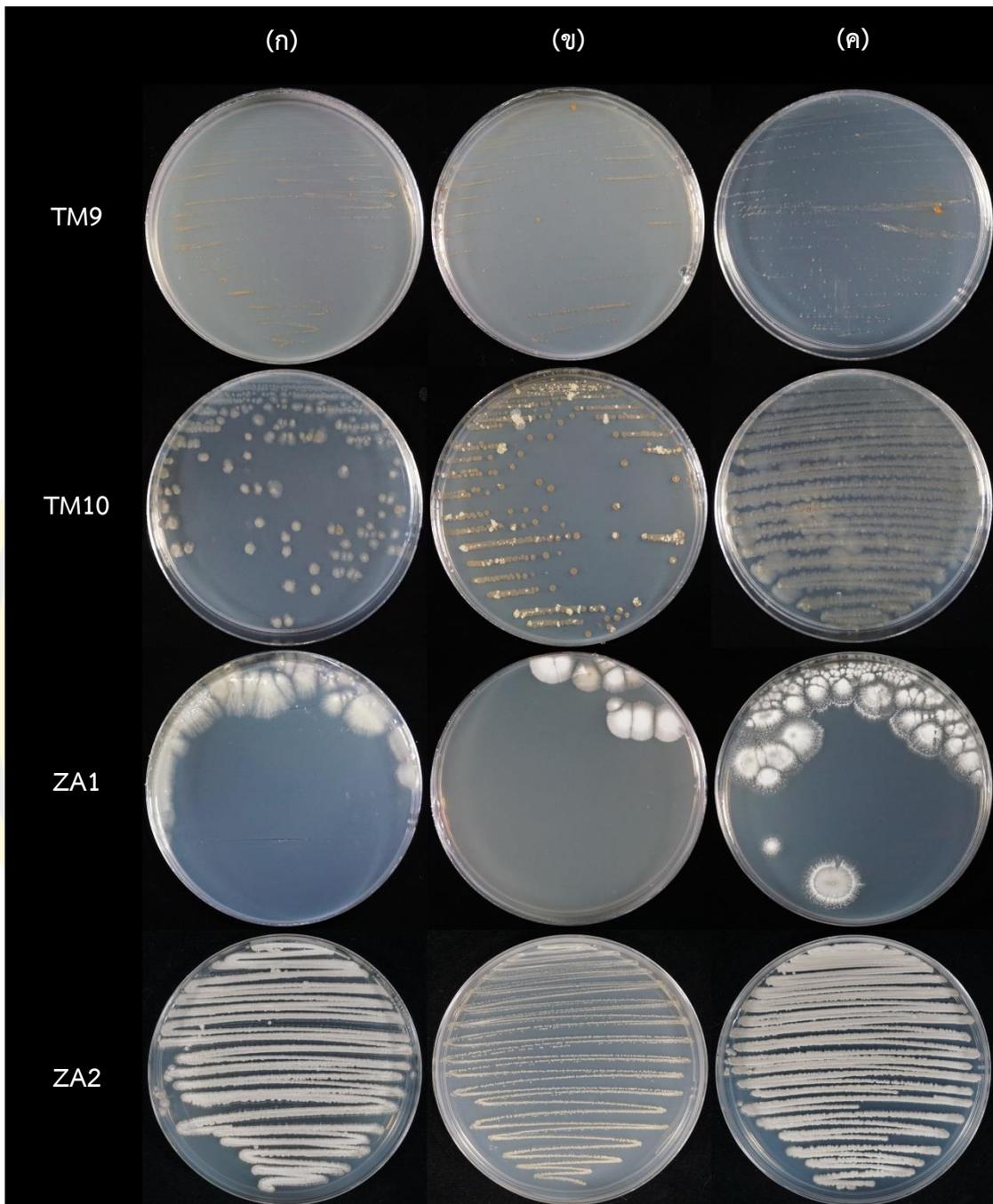


ภาพที่ 23 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกคิโนมายซีทไอโซเลต TM5 ถึง TM8

(ก) อาหารแข็งสูตร MM

(ข) อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้น 0.1%

(ค) อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม ACC ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

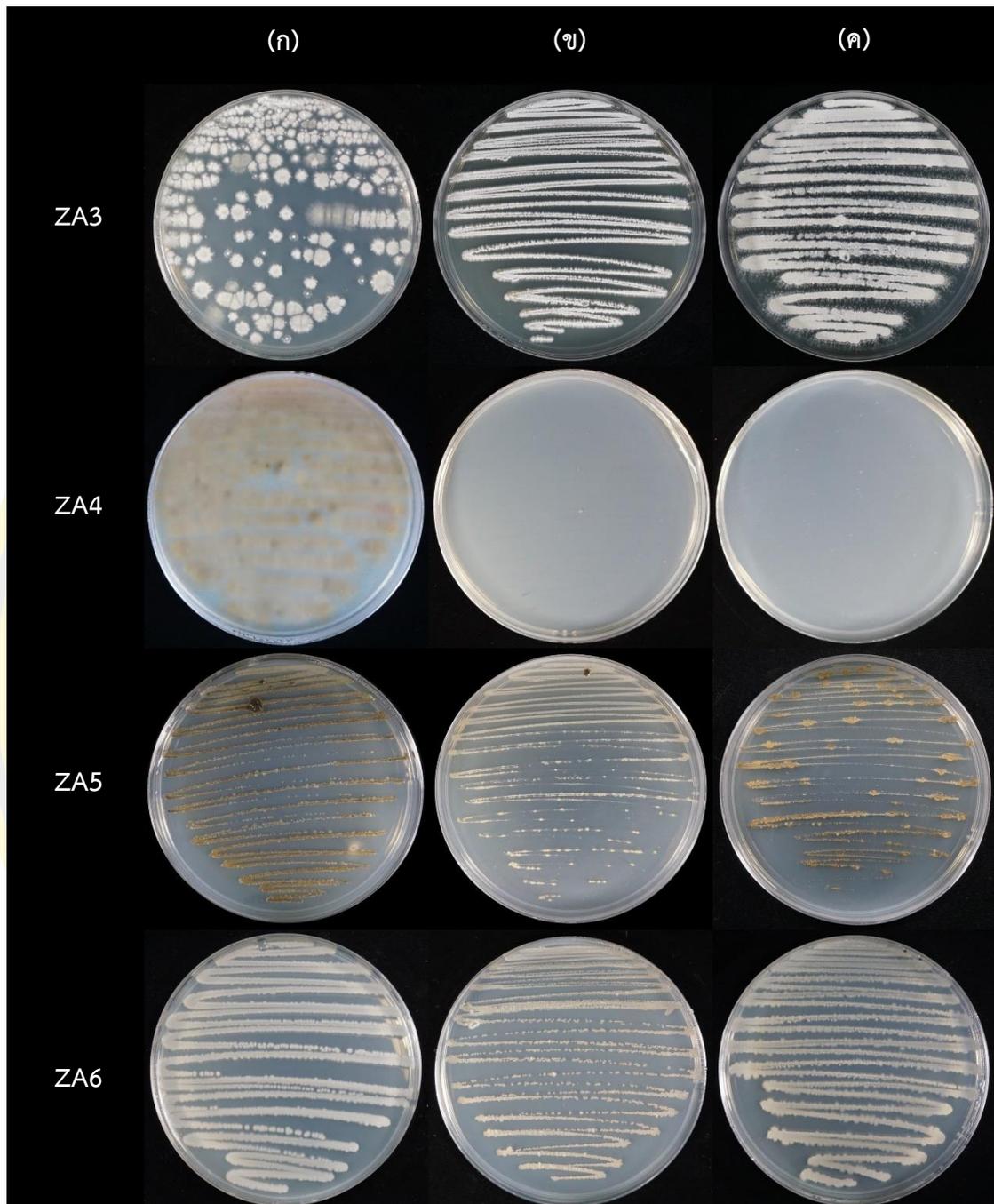


ภาพที่ 24 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกติโนมัยซีฟไฮโซเลต TM9 ถึง ZA2

(ก) อาหารแข็งสูตร MM

(ข) อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้น 0.1%

(ค) อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม ACC ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

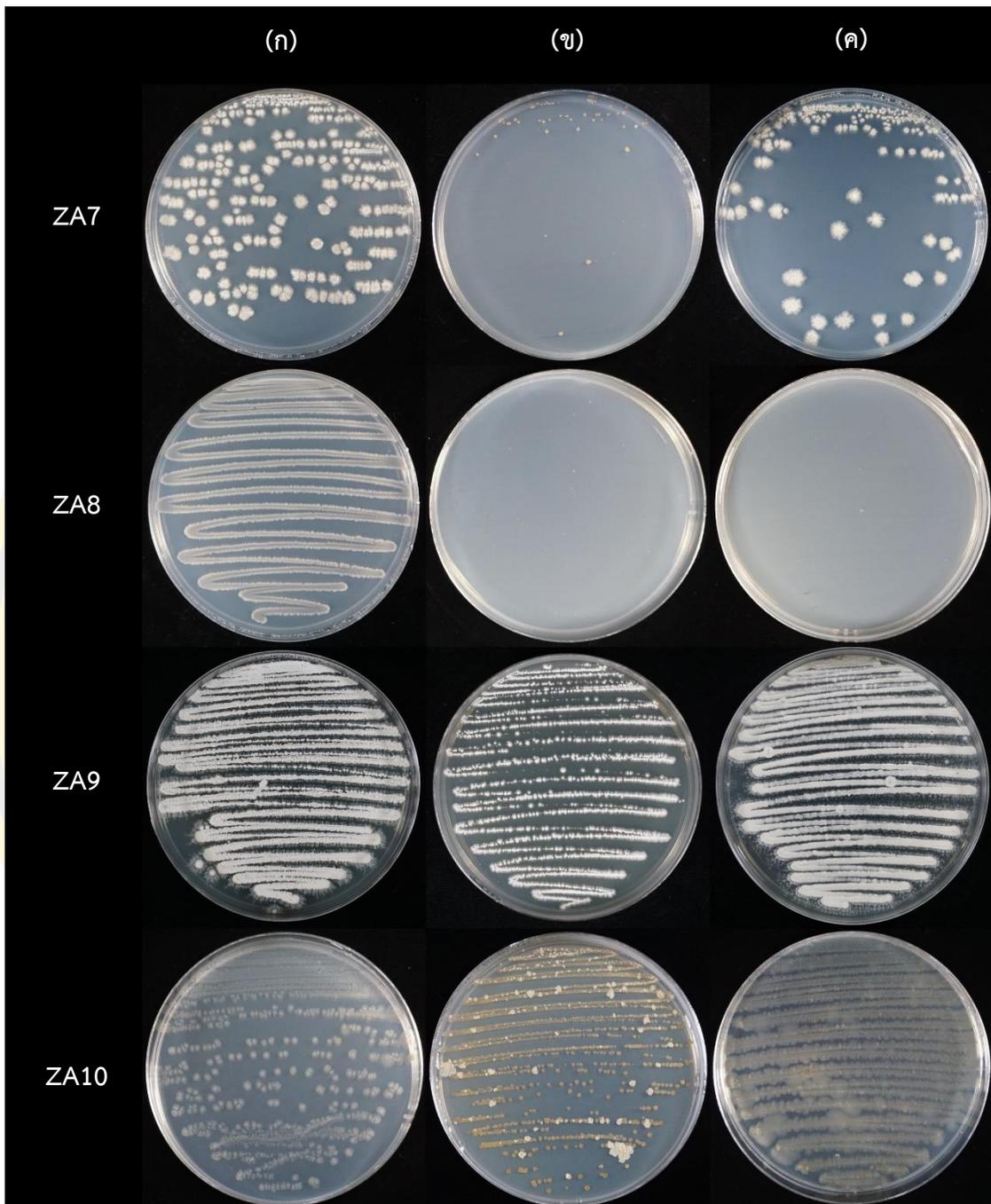


ภาพที่ 25 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต ZA3 ถึง ZA6

(ก) อาหารแข็งสูตร MM

(ข) อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้น 0.1%

(ค) อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม ACC ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

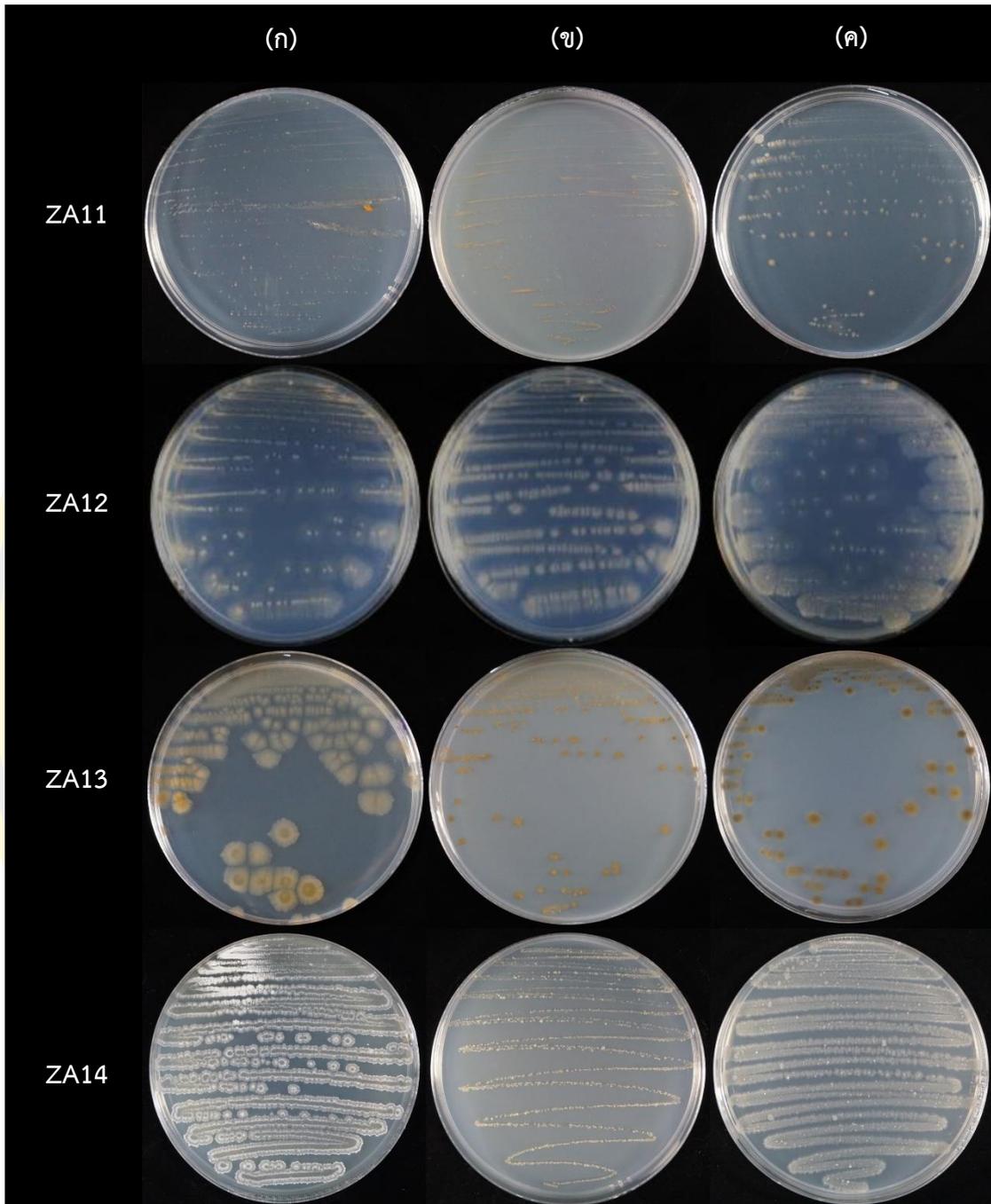


ภาพที่ 26 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต ZA7 ถึง ZA10

(ก) อาหารแข็งสูตร MM

(ข) อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้น 0.1%

(ค) อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม ACC ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 27 การสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต ZA11 ถึง ZA14

(ก) อาหารแข็งสูตร MM

(ข) อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้น 0.1%

(ค) อาหารแข็งสูตร MM ที่เติม ACC ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

#### 4.2.3 การทดสอบการสร้างสารไซเดอโรฟอร์

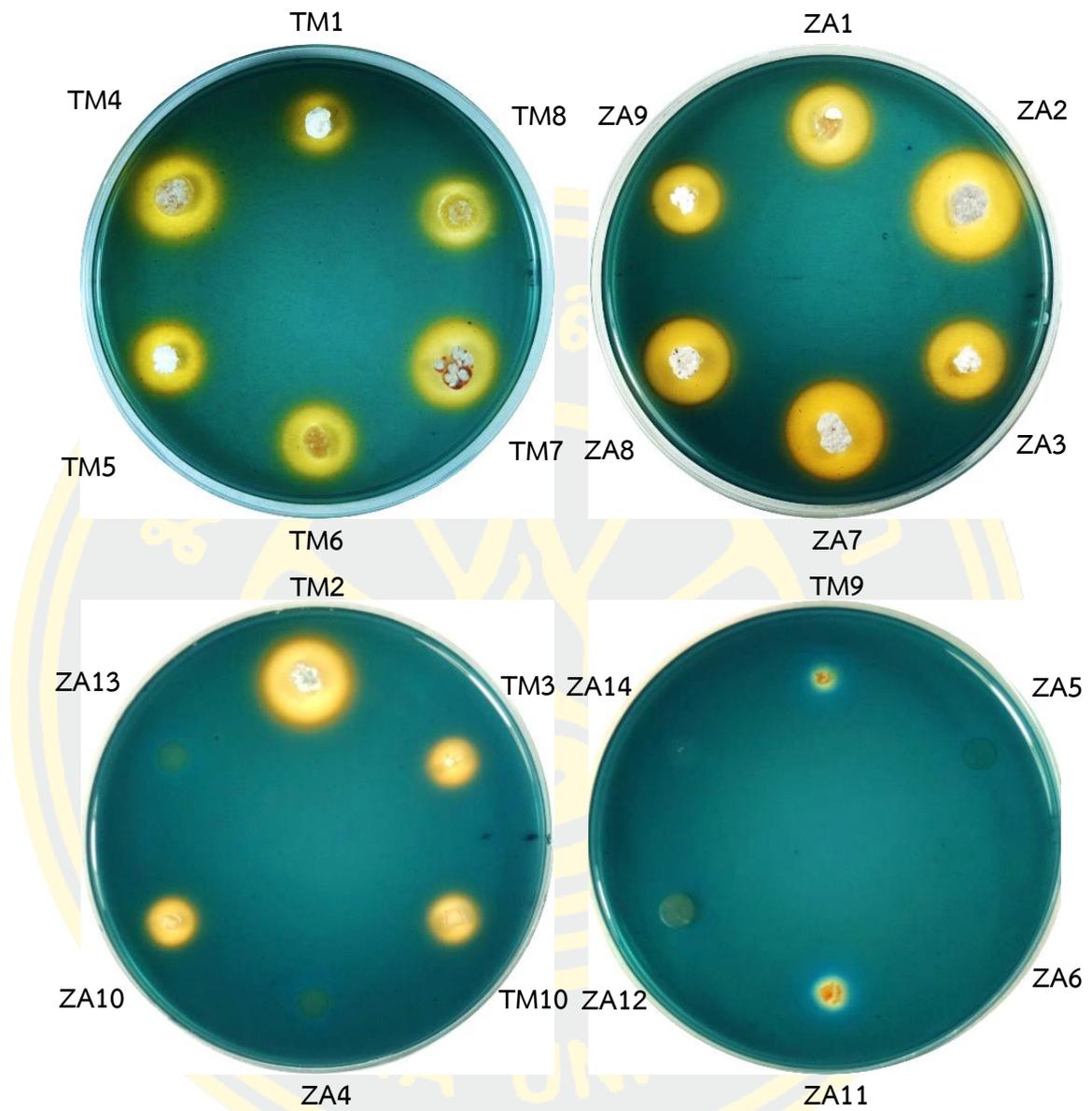
ผลการทดสอบการสร้างสารไซเดอโรฟอร์ บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร CAS พบว่ามีแอกติโนมัยสีท 18 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสารไซเดอโรฟอร์ได้ โดยหยดเซลล์แขวนลอยแอกติโนมัยสีทไอโซเลตต่าง ๆ บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร CAS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เกิด Halo zone หรือบริเวณสีส้มรอบ ๆ โคโลนี แสดงถึงความสามารถในการสร้างสารไซเดอโรฟอร์ (ภาพที่ 29) เมื่อวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Halo zone พบว่าแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกจากมูลหอนนง และหอนนงยักษ์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Halo zone ตั้งแต่ 5 ถึง 22.5 มิลลิเมตร โดยไอโซเลต ZA2 สามารถสร้างสารไซเดอโรฟอร์ได้สูงที่สุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Halo zone อยู่ที่  $22.50 \pm 0.50$  มิลลิเมตร โดยมี Halo zone index อยู่ที่ 3.21 (ตารางที่ 7) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ รัชณี มิ่งมา และ กรรณิการ์ ดวงมาลย์ (2564) ทดสอบความสามารถในการสร้างสารไซเดอโรฟอร์ของแอกติโนมัยสีทที่แยกจากดินสวนมะพร้าว จำนวน 38 ไอโซเลต พบว่ามีจำนวน 25 ไอโซเลต สามารถสร้างไซเดอโรฟอร์ได้ Halo zone มีขนาดความกว้างไม่เกิน 10 มิลลิเมตร และ Himaman et al. (2016) คัดแยกแอกติโนมัยสีท จำนวน 477 ไอโซเลต จากยูคาลิปตัสพบว่ามีจำนวน 464 ไอโซเลต สามารถสร้างไซเดอโรฟอร์ได้ โดยในจำนวนนี้ 153 ไอโซเลต Halo zone มีขนาดความกว้างมากกว่า 20 มิลลิเมตร มีรายงานการทดสอบผลของแอกติโนมัยสีทที่สร้างสารไซเดอโรฟอร์ต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่ว พบว่านอกจากจะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช โดยแย่งจับเหล็กได้ดีกว่าจุลินทรีย์ก่อโรคพืช (Gopalakrishnan et al., 2011) นอกจากนี้ไซเดอโรฟอร์ยังสามารถจับกับอนุมูลโลหะหนักอื่น ทำให้ธาตุเหล่านี้ละลายได้ดีขึ้น เช่น ทำให้โมลิบดีนัม (Molybdenum) ละลายได้มากขึ้นในดินที่เป็นกรด (Duhme-Klair et al., 2003)

ไซเดอโรฟอร์เป็นสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เพื่อดักจับธาตุเหล็กในดินก่อนจะนำเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต โดยธาตุเหล็กทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม นอกจากนี้ไซเดอโรฟอร์มีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม ทางตรงคือพืชสามารถนำธาตุเหล็กที่จับอยู่กับไซเดอโรฟอร์เข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนทางอ้อมคือเมื่อแบคทีเรียสร้างไซเดอโรฟอร์จับธาตุเหล็กในดิน ทำให้ปริมาณธาตุเหล็กในดินลดน้อยลงจึงทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคพืชที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงขาดธาตุเหล็กทำให้ไม่สามารถเจริญและก่อโรคได้ (Hopkinson & Morel, 2009)

ตารางที่ 7 การทดสอบการสร้างสารไฮเดรโอโรฟอว์ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลตต่าง ๆ

ไอโซเลต	ขนาด Halo zone (มิลลิเมตร)	Halo zone index	ไอโซเลต	ขนาด Halo zone (มิลลิเมตร)	Halo zone index
TM1	12.00±0.87	2.40	ZA1	15.00±0.87	2.50
TM2	17.00±0.50	2.83	ZA2	22.50±0.50	3.21
TM3	10.00±1.32	2.50	ZA3	16.00±1.00	2.67
TM4	20.00±4.08	2.86	ZA4	-	-
TM5	16.00±0.50	2.67	ZA5	-	-
TM6	16.00±1.32	2.29	ZA6	-	-
TM7	20.00±0.50	2.00	ZA7	20.00±0.87	2.86
TM8	17.00±0.00	2.43	ZA8	16.00±1.00	2.67
TM9	5.00±0.50	1.67	ZA9	14.00±0.87	2.80
TM10	10.00±0.87	2.50	ZA10	10.00±0.00	2.50
			ZA11	6.00±0.00	1.50
			ZA12	-	-
			ZA13	-	-
			ZA14	-	-

“หมายเหตุ” ขนาดของ Halo zone แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน  
สัญลักษณ์ (-) คือ ไม่สร้าง



ภาพที่ 28 ความสามารถในการสร้างสารไฮเดรโอฟอร์ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลตต่าง ๆ

#### 4.2.4 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

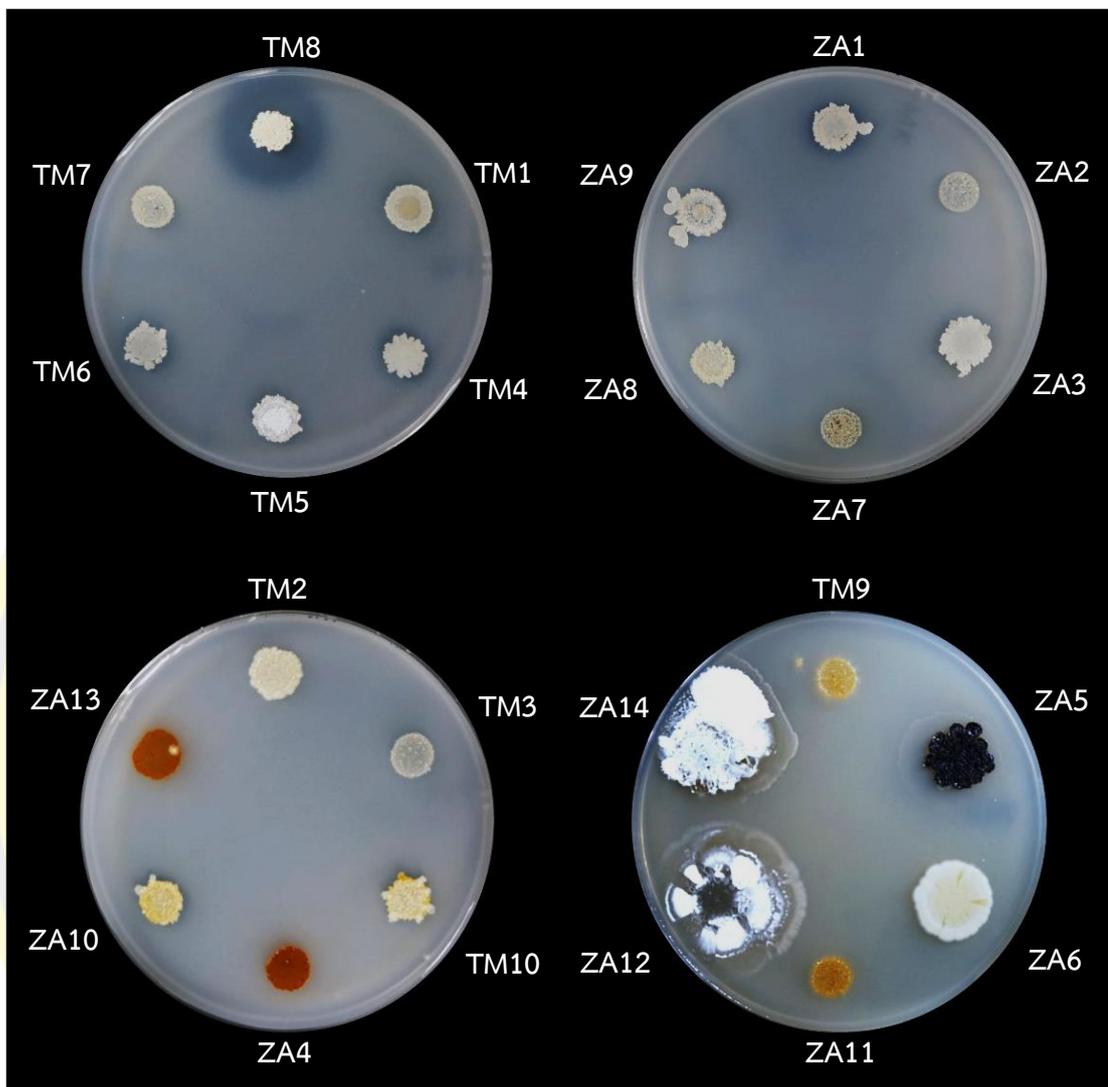
ผลการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร PVK พบว่ามีแอกติโนมัยสีท 8 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ โดยหยดเซลล์แขวนลอยแอกติโนมัยสีทไอโซเลตต่าง ๆ บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร PVK นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เกิด Solubilization zone หรือบริเวณใสรอบ ๆ โคลนนี้แสดงถึงความสามารถในการละลายฟอสเฟต (ภาพที่ 29) เมื่อวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Solubilization zone พบว่าแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกจากมูลหอนอนก และหอนอนกยักษ์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Solubilization zone ตั้งแต่ 13 ถึง 25 มิลลิเมตร โดยไอโซเลต TM8 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้สูงสุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Solubilization zone อยู่ที่  $25.00 \pm 0.50$  มิลลิเมตร โดยมี Solubilization index อยู่ที่ 2.78 (ตารางที่ 8) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าแอกติโนมัยสีทในงานวิจัยนี้สามารถละลายฟอสเฟตได้ดี เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ รัชนิ มิ่งมา และ กรรณิการ์ ดวงมัลย์ (2564) ที่ทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแอกติโนมัยสีทที่แยกจากดินสวนมะพร้าว จำนวน 38 ไอโซเลต พบว่ามีจำนวน 9 ไอโซเลต มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ พบว่า ไอโซเลต RM17 ละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุด มีขนาดความกว้างของ Solubilization zone เท่ากับ 11.5 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลต R17 (8.5 มิลลิเมตร) และ R17 (7.5 มิลลิเมตร) ตามลำดับ และ Chaiarn et al. (2018) ได้แยกแบคทีเรียและแอกติโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตจำนวน 320 ไอโซเลต จากดินรอบรากพืชพบว่า Solubilization zone มีความกว้างอยู่ในช่วง 13.3 ถึง 63 มิลลิเมตร

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช หากพืชขาดฟอสฟอรัสจะทำให้ลำต้นแคระแกร็น และการเจริญหยุดชะงัก แอกติโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตสามารถนำไปใช้ด้านการเกษตร มีรายงานว่าช่วยเพิ่มชีวมวลต้นข้าวสาลีและเพิ่มการดูดซึมธาตุอาหาร (Jog et al., 2014) และแก้ปัญหาดินขาดธาตุฟอสฟอรัสได้ (Sharma et al., 2013)

ตารางที่ 8 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแอกติโนไมซีทไอโซเลตต่าง ๆ

ไอโซเลต	ขนาด Solubilization zone (มิลลิเมตร)	Solubilization index	ไอโซเลต	ขนาด Solubilization zone (มิลลิเมตร)	Solubilization index
TM1	14.00±0.00	1.40	ZA1	14.00±0.50	1.56
TM2	-	-	ZA2	-	-
TM3	-	-	ZA3	16.00±0.50	1.45
TM4	14.00±0.00	1.56	ZA4	-	-
TM5	-	-	ZA5	-	-
TM6	15.00±0.50	1.67	ZA6	-	-
TM7	-	-	ZA7	-	-
TM8	25.00±0.50	2.78	ZA8	-	-
TM9	-	-	ZA9	-	-
TM10	13.00±0.00	1.18	ZA10	13.00±0.00	1.18
			ZA11	-	-
			ZA12	-	-
			ZA13	-	-
			ZA14	-	-

“หมายเหตุ” ขนาด Solubilization zone แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน  
สัญลักษณ์ (-) คือ ไม่สร้าง



ภาพที่ 29 ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแอคติโนมัยซีทไฮโซเลตต่าง ๆ

#### 4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวปทุมธานี 1 (*Oryza sativa* L. cv. Pathum Thani 1)

ผลการศึกษาการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวปทุมธานี 1 โดยการนำเมล็ดข้าวไปฆ่าเชื้อพื้นผิวแล้วนำมาแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดข้าวแช่มาในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลตเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำเมล็ดข้าวมาเรียงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษชำระและน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยมีชุดควบคุมคือเมล็ดข้าวที่แช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 3 วันและอีก 4 วัน ในที่มีแสง สังเกตการงอกพร้อมบันทึกผล และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอก พบว่ามีอัตราการงอกใกล้เคียงชุดควบคุม โดยแอคติโนมัยสีทไอโซเลต ZA2 ZA4 และ ZA8 สามารถส่งเสริมการงอกของข้าวปทุมธานี 1 ได้สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่แอคติโนมัยสีทไอโซเลต TM10 ZA10 และ ZA13 มีอัตราการงอกต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9)

แต่จากผลการศึกษาการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวปทุมธานี 1 พบว่าแอคติโนมัยสีทที่มีการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ซึ่งอาจมีอัตราการงอกเท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุม ก็ตามจะเห็นได้ว่ารากจะมีความยาวและมีความหนากว่าชุดควบคุมและแอคติโนมัยสีทไอโซเลตที่ไม่มีการสร้างฮอร์โมนพืช IAA (ภาพที่ 30 ถึง ภาพที่ 39) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gopalakrishnan et al. (2014) ที่ได้ทำการศึกษาแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในข้าว พบว่าข้าวที่ถูกส่งเสริมการเจริญเติบโตด้วยแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CAI-85 และ CAI-93 มีน้ำหนักใบข้าว น้ำหนักเมล็ดข้าว และน้ำหนักแห้งรวม มากที่สุด เมื่อมาดูรากของข้าวที่ถูกส่งเสริมการเจริญเติบโตด้วยแอคติโนมัยสีททั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่ได้ถูกส่งเสริมการเจริญเติบโต มีรากยาวและหนากว่าข้าวที่ไม่ได้ถูกส่งเสริมการเจริญเติบโต และเมื่อดูการทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในหลอดทดลองพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ สร้างฮอร์โมนพืช IAA มากที่สุดเป็นลำดับ 1 และ 2

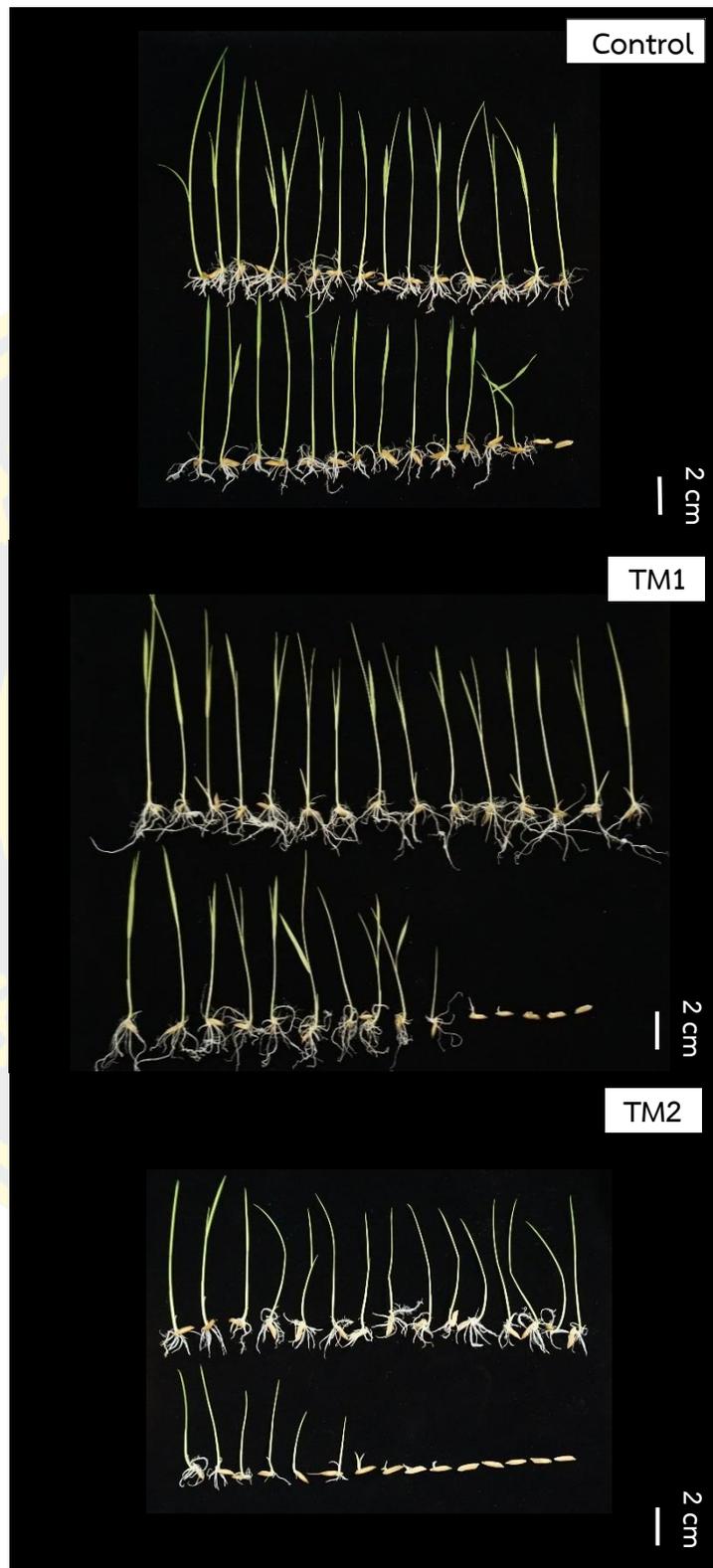
ตารางที่ 9 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวปทุมธานี 1 โดยแอคติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลต

ไอโซเลต	อัตราการงอกของ เมล็ดข้าว (%)	ความยาวและ ความหนาของ ราก	ไอโซเลต	อัตราการงอกของ เมล็ดข้าว (%)	ความยาวและ ความหนาของ ราก
Control	92.67±0.84	+	ZA1	94.00±0.45	++
TM1	92.67±0.84	+++	ZA2	96.67±0.71	+++
TM2	84.67±0.89	+	ZA3	87.33±0.84	++
TM3	88.67±0.55	+++	ZA4	96.67±1.00	+++
TM4	90.00±1.23	+++	ZA5	92.67±0.45	+++
TM5	92.67±1.30	+++	ZA6	94.00±0.84	++
TM6	88.67±1.82	++	ZA7	95.33±1.14	+++
TM7	94.67±1.14	+++	ZA8	96.67±1.00	+++
TM8	85.33±2.07	+++	ZA9	93.33±1.00	+++
TM9	86.00±0.84	+++	ZA10	77.33±2.49*	+
TM10	81.33±1.14*	+	ZA11	92.00±0.55	+++
			ZA12	95.33±0.55	+++
			ZA13	69.33±1.92*	+
			ZA14	92.67±1.30	+++

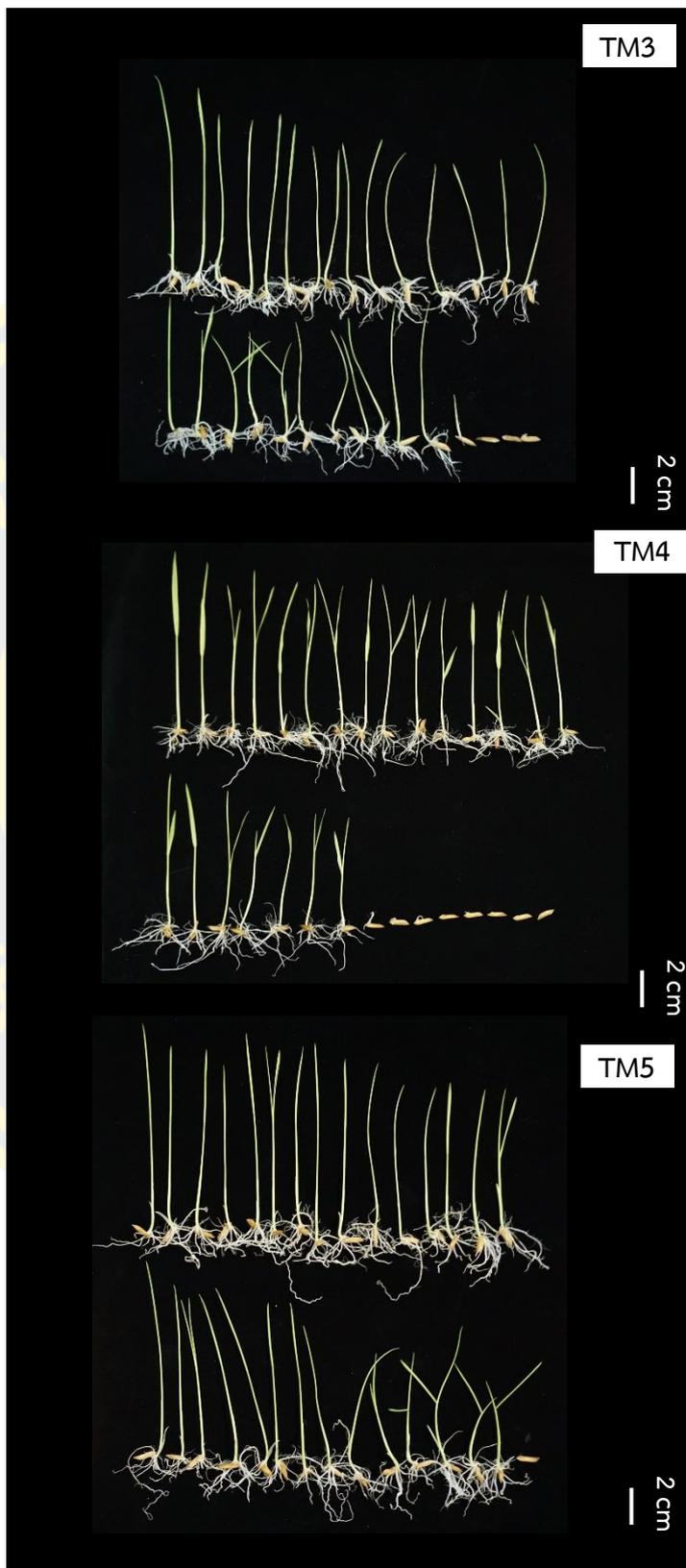
“หมายเหตุ” อัตราการงอกของเมล็ดข้าว แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัญลักษณ์ (\*) คือ มีอัตราการงอกต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P-value < 0.05)

สัญลักษณ์ (+) คือ รากมีความยาว และความหนาน้อย (++) คือ รากมีความยาว และ ความหนาปานกลาง (+++) คือ รากมีความยาว และความหนามาก



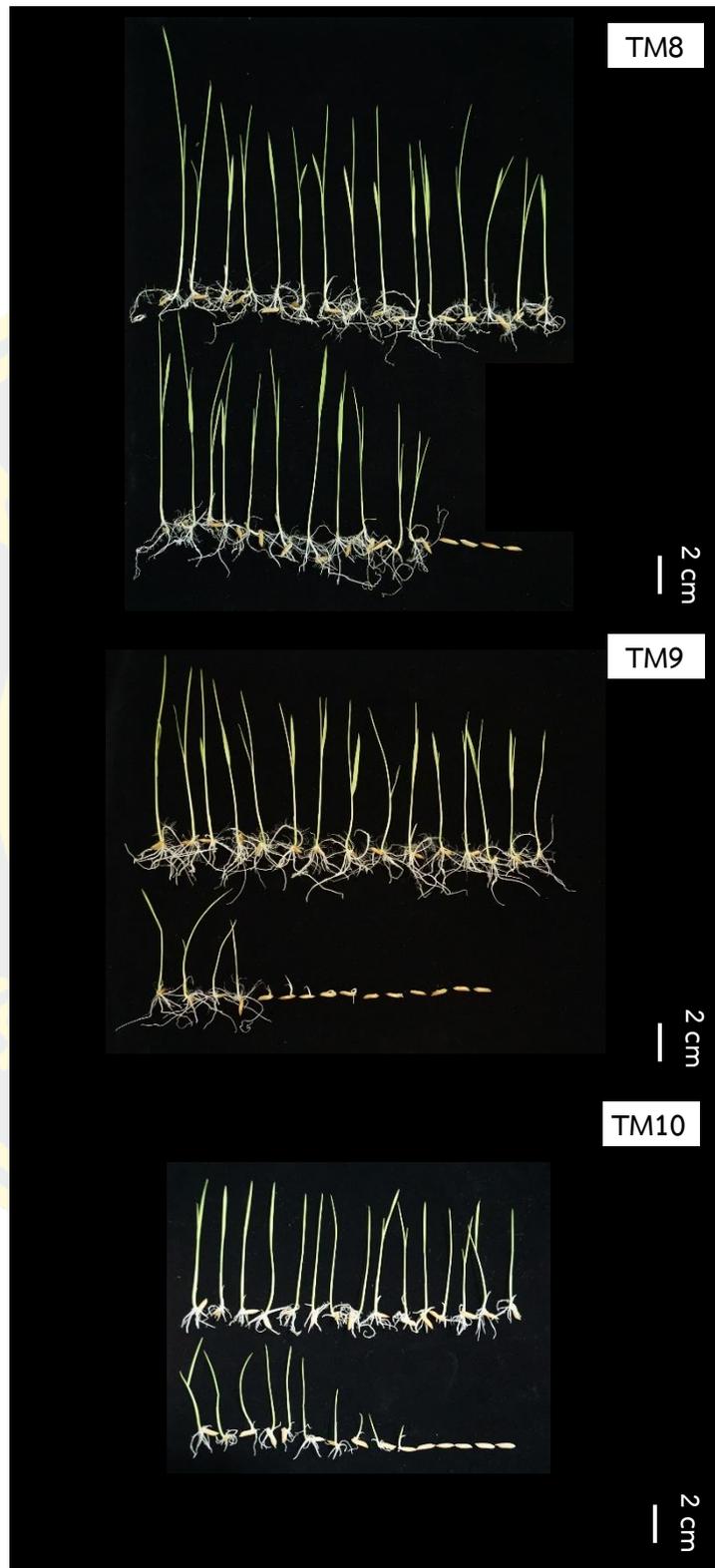
ภาพที่ 30 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลต TM1 ถึง TM2



ภาพที่ 31 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลต TM3 ถึง TM5



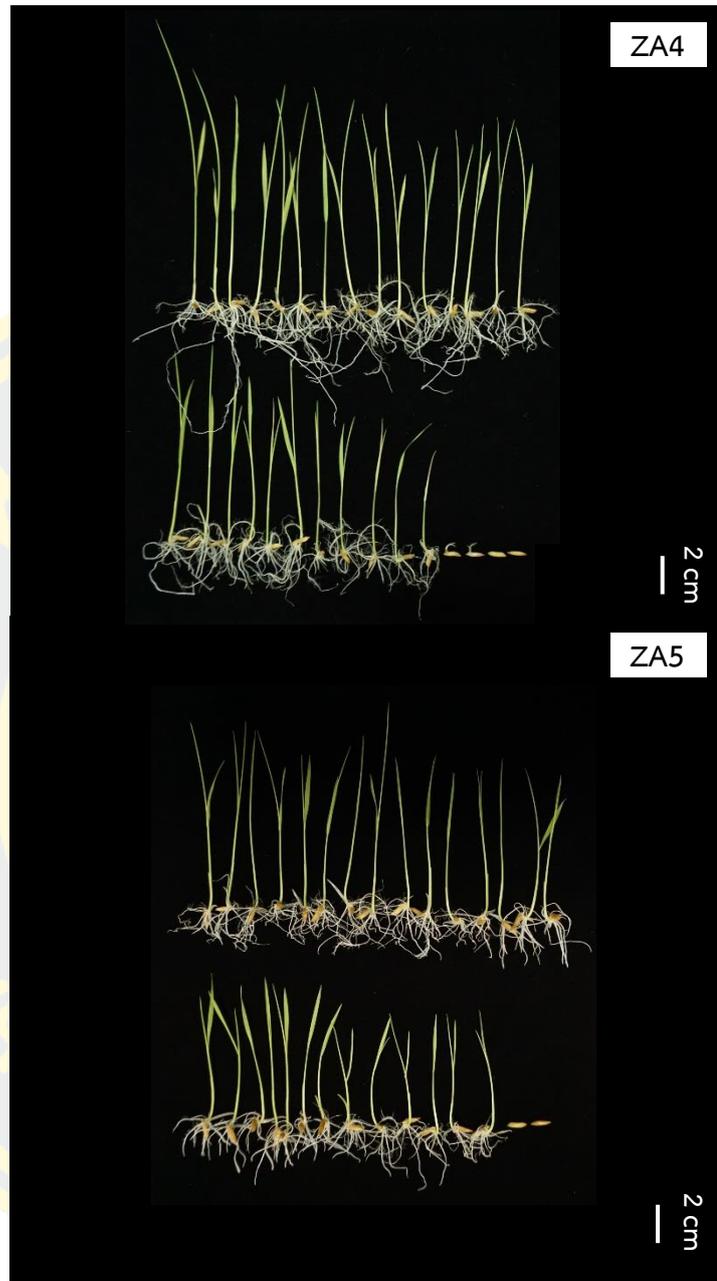
ภาพที่ 32 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอคติโนมัยซีทไฮโซเลต TM6 ถึง TM7



ภาพที่ 33 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลต TM8 ถึง TM10



ภาพที่ 34 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลต ZA1 ถึง ZA3



ภาพที่ 35 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอคติโนมัยซีทไฮโซเลต ZA4 ถึง ZA5



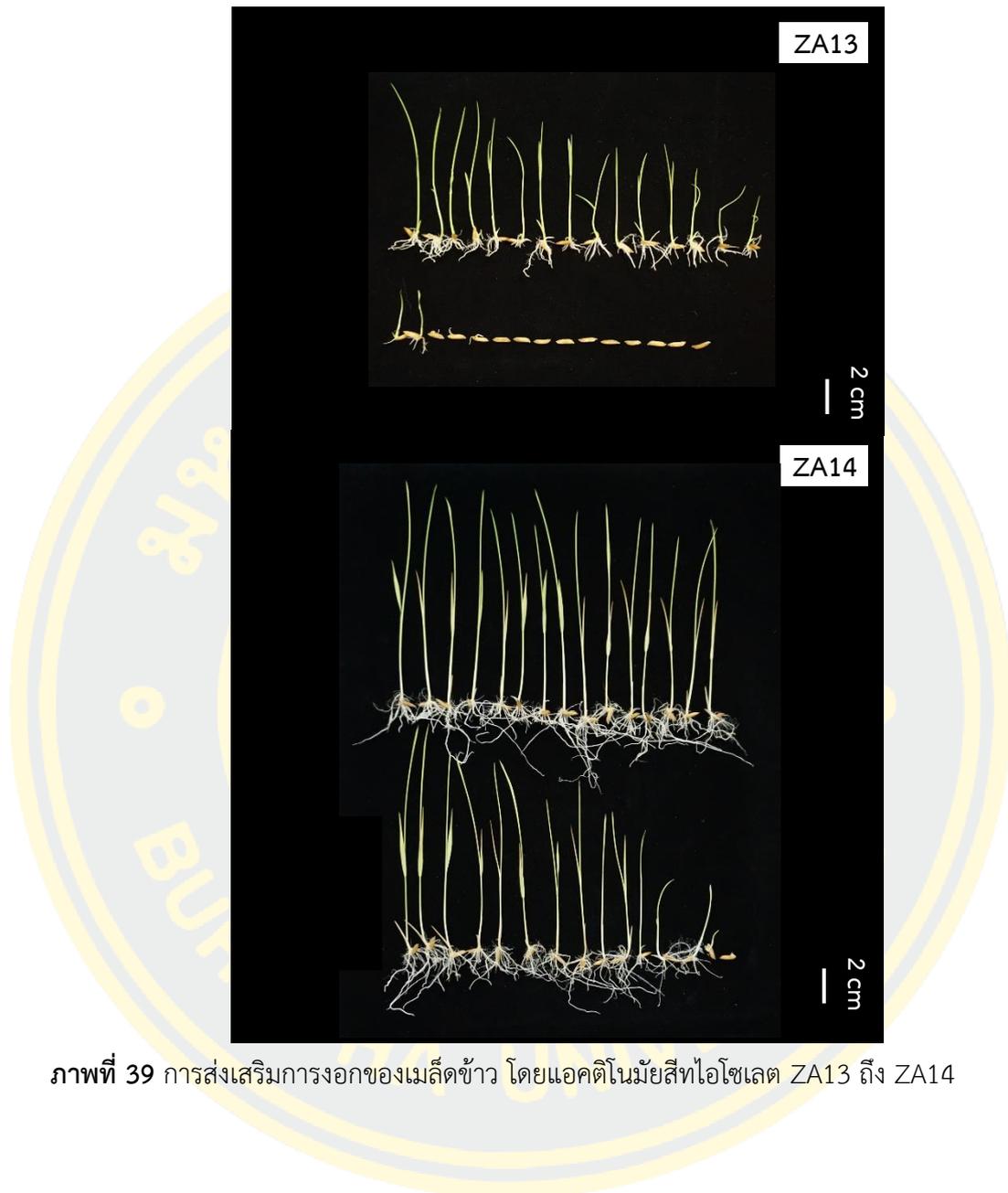
ภาพที่ 36 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลต ZA6 ถึง ZA7



ภาพที่ 37 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอคตินอไมล์ซีทไอโซเลต ZA8 ถึง ZA9



ภาพที่ 38 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลต ZA10 ถึง ZA12



ภาพที่ 39 การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว โดยแอกติโนมัยซีทไอโซเลต ZA13 ถึง ZA14

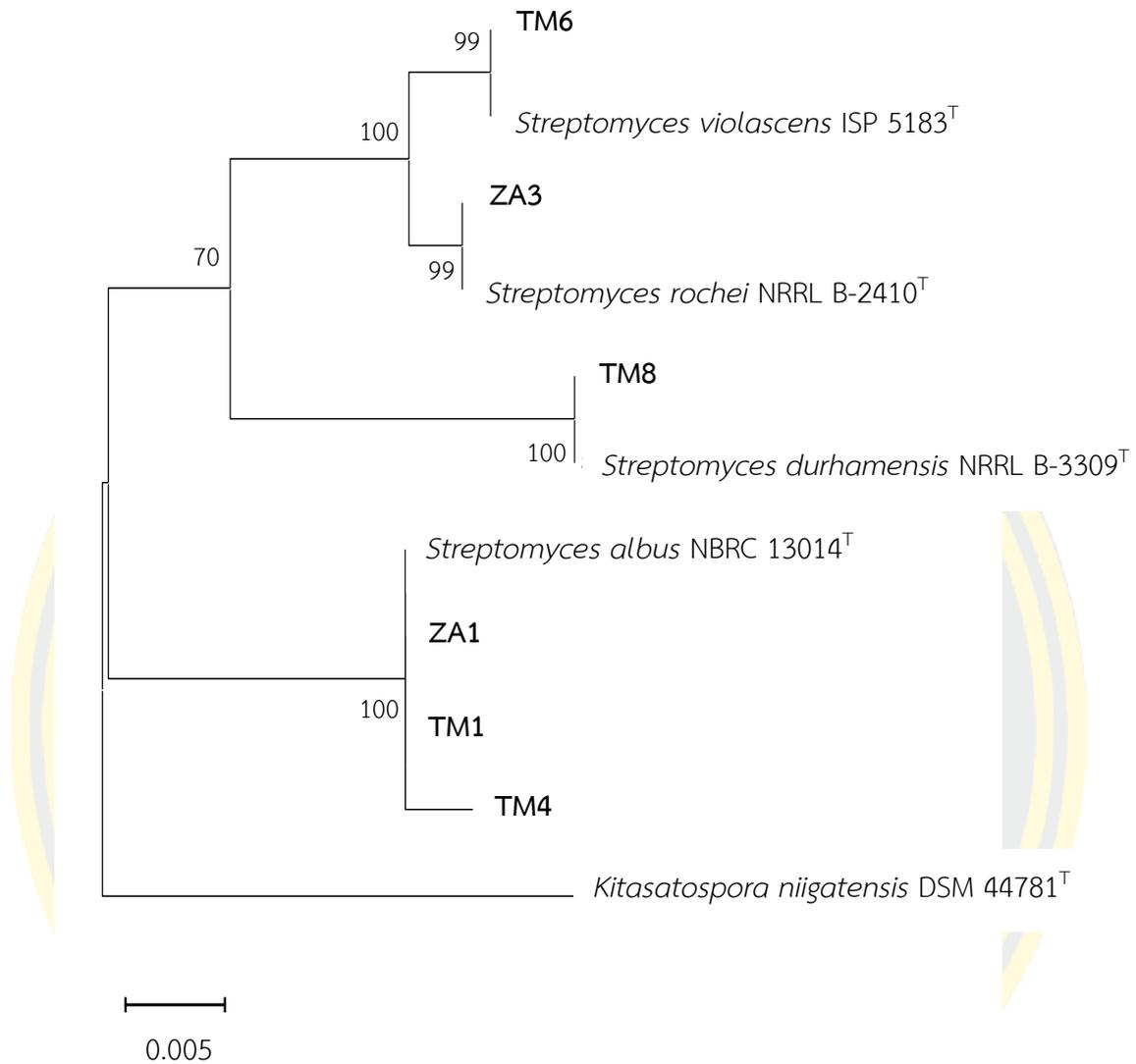
#### 4.4 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์

ผลการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทในระดับสกุลโดยใช้นิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยนำแอกติโนมัยซีทที่มีกิจกรรมสังเคราะห์เจริญเติบโตในพืชครบทั้ง 4 กิจกรรม ได้แก่ แอกติโนมัยซีทไอโซเลต TM1 TM4 TM6 TM8 ZA1 และ ZA3 มาสกัดดีเอ็นเอแล้วนำเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ในหลอดทดลองด้วยเครื่อง Thermal cycle นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบโดย Agarose gel electrophoresis และเตรียมผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาเปรียบเทียบค่าคล้ายคลึงของลำดับเบสในฐานข้อมูล EzBioCloud (Yoon et al., 2017) พบว่า แอกติโนมัยซีททั้ง 6 ไอโซเลต เมื่อนำมาเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EzBioCloud มีค่าความคล้ายคลึงมากกับแอกติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* (ตารางที่ 10) โดยแอกติโนมัยซีทไอโซเลต TM1 TM4 และ ZA1 มีค่าความคล้ายคลึง *S. albus* NBRC 13014<sup>T</sup> เท่ากับ 99.86 99.43 และ 99.85% ตามลำดับ ไอโซเลต TM6 มีค่าความคล้ายคลึง *S. violascens* ISP 5183<sup>T</sup> เท่ากับ 100% ไอโซเลต TM8 มีค่าความคล้ายคลึง *S. durhamensis* NRRL B-3309<sup>T</sup> เท่ากับ 100% และไอโซเลต ZA3 มีค่าความคล้ายคลึง *S. rochei* NRRL B-2410<sup>T</sup> เท่ากับ 100% จากนั้นสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์แบบ Neighbour-Joining โดยใช้ *Kitasatospora niigatensis* DSM 44781<sup>T</sup> เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (outgroup) คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมโดยใช้แบบจำลอง Kimura two-parameter (K2P) และวิเคราะห์ค่าสถิติความเชื่อมั่นของแผนภูมิ Bootstrap 1,000 รอบ พบว่าแอกติโนมัยซีททั้ง 6 ไอโซเลต มีวิวัฒนาการชาติพันธุ์ร่วมกับสมาชิกแอกติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* (ภาพที่ 40) ดังนั้นผลการวิเคราะห์ลักษณะโดยใช้ทั้งสัณฐานวิทยา ร่วมกับการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์จึงทำให้สามารถระบุได้ว่า แอกติโนมัยซีทไอโซเลต TM1 TM4 TM6 TM8 ZA1 และ ZA3 เป็นสมาชิกของสกุล *Streptomyces* โดยมีรายงานว่าสมาชิกในสกุล *Streptomyces* มีประสิทธิภาพและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยการตรึงไนโตรเจน สร้างสารแอมโมเนีย สร้างสารไซโตไคน์ สร้างฮอร์โมนพืช IAA สร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ละลายฟอสเฟต และช่วยการป้องกันเชื้อโรคที่มากับดิน (Amaresan et al., 2018; Chouyia et al., 2022; Jog et al., 2014) สมาชิกในสกุล *Streptomyces* ยังแสดงให้เห็นถึงการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยการส่งเสริมศักยภาพในการเพิ่มผลผลิตของพืชหลายชนิด (El-Tarabily, 2008; Sadeghi et al., 2012)

**ตารางที่ 10** ค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงใน

ฐานข้อมูล EzBioCloud

ไฮโซเลต	แบคทีเรีย	ลำดับฐานข้อมูล	ค่าความคล้ายคลึง (%)	ค่าความต่าง	GC rich (%)	อ้างอิง
TM1 (1394 bp)	<i>Streptomyces albus</i> NBRC 13014 <sup>T</sup>	BBQG01000088	99.86	2/1393	59.5	Waksman and Henrici (1943)
TM4 (1402 bp)	<i>Streptomyces albus</i> NBRC 13014 <sup>T</sup>	BBQG01000088	99.43	8/1398	59.4	Waksman and Henrici (1943)
TM6 (1404 bp)	<i>Streptomyces violascens</i> ISP 5183 <sup>T</sup>	AY999737	99.64	5/1392	59.5	Pridham et al. (1958)
TM8 (1198 bp)	<i>Streptomyces durhamensis</i> NRRL B-3309 <sup>T</sup>	JNXR01000068	100.00	0/1198	58.1	Gordon and Lapa (1966)
ZA1 (1365 bp)	<i>Streptomyces albus</i> NBRC 13014 <sup>T</sup>	BBQG01000088	99.85	2/1365	59.5	Waksman and Henrici (1943)
ZA3 (1335 bp)	<i>Streptomyces rochei</i> NRRL B-2410 <sup>T</sup>	MUMD01000370	100.00	0/1334	59.1	Berger et al. (1953)



**ภาพที่ 40** แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์แบบ Neighbour-Joining ของแอกติโนมัยซี 6 ไอโซเลต กับแอกติโนมัยซีสายพันธุ์ใกล้เคียง และใช้ *Kitasatospora niigatensis* DSM 44781<sup>T</sup> เป็น Outgroup ใช้ค่า Bootstrap (%) 1,000 ครั้ง ระยะห่างการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.005

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแอสโคสปอร์จากมูลหนอนนก และหนอนนกยักษ์ คัดแยกแอสโคสปอร์ได้จำนวน 24 ไอโซเลต คัดแยกได้จากมูลหนอนนก 10 ไอโซเลต ให้ชื่อเป็น TM และคัดแยกได้จากมูลหนอนนกยักษ์ 14 ไอโซเลต ให้ชื่อเป็น ZA เมื่อนำแอสโคสปอร์ทั้ง 24 ไอโซเลต มาทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช พบว่า สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA สร้างเอนไซม์ ACC Deaminase สร้างสารไซโตไคน์ และสามารถละลายฟอสเฟตได้แตกต่างกัน โดยมีแอสโคสปอร์ 20 ไอโซเลต (TM1 TM3 TM4 TM5 TM6 TM7 TM8 TM9 ZA1 ZA2 ZA3 ZA4 ZA5 ZA6 ZA7 ZA8 ZA9 ZA10 ZA11 และ ZA14) สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้อยู่ในช่วง  $23.58 \pm 0.02$  ถึง  $309.15 \pm 0.06$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไอโซเลตที่สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ดีที่สุดคือ ZA4 มีแอสโคสปอร์ 22 ไอโซเลต (TM1 TM2 TM3 TM4 TM5 TM6 TM7 TM8 TM9 TM10 ZA1 ZA2 ZA3 ZA5 ZA6 ZA7 ZA9 ZA10 ZA11 ZA12 ZA13 และ ZA14) ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase ได้ มีแอสโคสปอร์ 18 ไอโซเลต (TM1 TM2 TM3 TM4 TM5 TM6 TM7 TM8 TM9 TM10 ZA1 ZA2 ZA3 ZA7 ZA8 ZA9 ZA10 และ ZA11) ที่สามารถสร้างสารไซโตไคน์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Halo zone อยู่ในช่วง  $5.00 \pm 0.50$  ถึง  $22.50 \pm 0.50$  มิลลิเมตร โดยมี Halo zone index อยู่ในช่วง 1.50 ถึง 3.21 ไอโซเลตที่สร้างสารไซโตไคน์ได้ดีที่สุดคือ ZA2 และมีแอสโคสปอร์ 8 ไอโซเลต (TM1 TM4 TM6 TM8 TM10 ZA1 ZA3 และ ZA10) ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Solubilization zone อยู่ในช่วง  $13.00 \pm 0.00$  ถึง  $25.00 \pm 0.50$  มิลลิเมตร โดยมี Solubilization index อยู่ในช่วง 1.18 ถึง 2.78 ไอโซเลตที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดคือ TM8 จากแอสโคสปอร์ที่สามารถคัดแยกได้ 24 ไอโซเลต มีแอสโคสปอร์ 6 ไอโซเลต ที่แสดงกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชทั้ง 4 กิจกรรมคือ แอสโคสปอร์ไอโซเลต TM1 TM4 TM6 TM8 ZA1 และ ZA3

การส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวปทุมธานี 1 จากแอสโคสปอร์ที่คัดแยกได้พบว่าเมล็ดข้าวที่แช่ในสารละลายแอสโคสปอร์ที่คัดแยกได้ทั้ง 24 ไอโซเลต มีอัตราการงอกใกล้เคียงชุดควบคุมอยู่ในช่วง 84.67 ถึง 96.67% โดยแอสโคสปอร์ไอโซเลต ZA2 ZA4 และ ZA8 สามารถส่งเสริมการงอกของข้าวปทุมธานี 1 ได้สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ไอโซเลตที่ไม่แสดงกิจกรรมการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้แก่แอสโคสปอร์ไอโซเลต TM10 ZA10 และ ZA13 มีอัตราการงอกต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาลักษณะการเจริญของราก

พบว่าเมล็ดข้าวที่แช่ในสารละลายแอสโคดีโนไมด์ไฮโอไซเลตที่มีการสร้างฮอร์โมนพืช IAA รากจะมีความยาว และมีความหนาแน่นมากกว่ารากของเมล็ดข้าวในชุดควบคุม และชุดที่ไม่มีการสร้างฮอร์โมนพืช IAA

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของแอสโคดีโนไมด์จากผลการทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชจากแอสโคดีโนไมด์ที่คัดแยกได้ จำนวน 24 ไฮโอไซเลต พบว่ามีเพียงแอสโคดีโนไมด์จำนวน 6 ไฮโอไซเลต ที่มีกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชครบทั้ง 4 กิจกรรม คือ แอสโคดีโนไมด์ไฮโอไซเลต TM1 TM4 TM6 TM8 229 ZA1 และ ZA3 ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแอสโคดีโนไมด์เหล่านี้มาทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,198 ถึง 1,404 คู่เบส พบว่า ไฮโอไซเลต TM1 TM4 TM6 TM8 ZA1 และ ZA3 มีองค์ประกอบของเบส G และ C มาก (GC rich) อยู่ในช่วง 58.1 ถึง 59.5% เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่า แอสโคดีโนไมด์ทั้ง 6 ไฮโอไซเลต มีค่าความคล้ายคลึงมากที่สุดกับแอสโคดีโนไมด์ในสกุล *Streptomyces* โดยมีค่าความเหมือน ระหว่าง 99.43 ถึง 100% เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ มาสร้างเป็นแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์แบบ Neighbour-Joining พบว่าแอสโคดีโนไมด์ทั้ง 6 ไฮโอไซเลต มีวิวัฒนาการชาติพันธุ์ร่วมกับสมาชิกแอสโคดีโนไมด์ในสกุล *Streptomyces* โดย ไฮโอไซเลต TM1 TM4 และ ZA1 ถูกจัดอยู่ในคลดเดียวกันกับ *S. albus* NBRC 13014<sup>T</sup> โดยมีค่าสถิติความเชื่อมั่นของแผนภูมิ 100% ในขณะที่ไฮโอไซเลต TM6 มีความใกล้ชิดกับ *S. violascens* ISP 5183<sup>T</sup> ส่วนไฮโอไซเลต TM8 มีความใกล้ชิดกับ *S. durhamensis* NRRL B-3309<sup>T</sup> และไฮโอไซเลต ZA3 มีความใกล้ชิดกับ *S. rochei* NRRL B-2410<sup>T</sup> ซึ่งมีศักยภาพภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ตามในการระบุชนิดที่แน่นอนของแอสโคดีโนไมด์เหล่านี้ต้องมีศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าในมูลหนอนนกและหนอนนกยักษ์ มีแอสโคดีโนไมด์ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ได้โดยตรง หรือคัดแยกเฉพาะแบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่ม PGPB มาใช้ประโยชน์ ทำให้เกิดมูลค่าเพิ่มของมูลหนอนนก และหนอนนกยักษ์ที่เป็นผลผลิตพลอยได้จากการเลี้ยงหนอนนกและหนอนนกยักษ์ อีกประการด้วย

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการขยายการวิจัยเพิ่มเติม เพื่อทดสอบกิจกรรมของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจนครบวงจรชีวิต ในสภาพโรงเรือนและแปลงปลูกพืช



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

## 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดแยกแอกติโนมัยสีท

### 1.1 Humic acid-vitamin agar (HV)

Humic acid	1.0	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	กรัม
KCl	1.71	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	980	มิลลิลิตร
Agar	18.0	กรัม
B-vitamins	10	มิลลิลิตร
pH	7.2	

หมายเหตุ ละลาย Humic acid ใน NaOH ความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล 10 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส เติม B-vitamins 10 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากันอย่างช้า ๆ

### 1.2 Starch casein agar (SCA)

Soluble starch	10.0	กรัม
Casein	0.30	กรัม
KNO <sub>3</sub>	2.00	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.00	กรัม
NaCl	2.00	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	0.02	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 1.3 Water agar (WA)

Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Agar ในน้ำกลั่น ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 1.4 Nutrient agar (NA)

Nutrient agar (TM MEDIA)	28.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Nutrient agar ในน้ำกลั่น ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแอสคิโนมายซีท

### 2.1 Mannitol soya agar (MS)

Mannitol	20.0	กรัม
Soybean extract	20.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2.2 International Streptomyces Project No. 2 (ISP2)

ISP medium No. 2 (TM MEDIA)	20.5	กรัม
น้ำกลั่น	490	มิลลิลิตร
pH	6.2±0.2	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2.3 Yeast extract-dextrose agar (YD)

Yeast extract	10.0	กรัม
D-glucose	10.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2.4 Yeast extract-dextrose broth (YD)

Yeast extract	10.0	กรัม
D-glucose	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบกิจกรรมการสังเคราะห์การเจริญเติบโตในพืช

#### 3.1 การทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA

Yeast extract-dextrose broth + L-tryptophan ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร (YD + L-tryptophan 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ปริมาณที่ต้องการเตรียม 720 มิลลิลิตร

Yeast extract	7.2	กรัม
D-glucose	7.2	กรัม
น้ำกลั่น	698.4	มิลลิลิตร
Tryptophan (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	14.4	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้เดือดแล้วแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9.7 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใส่ Tryptophan หลอดละ 200 ไมโครลิตร ในตู้ปลอดเชื้อ

#### 3.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC Deaminase

Minimal medium agar (MM)

L-asparagine	0.5	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	กรัม
KOH	0.3	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 3.3 การทดสอบการสร้างสารไซโตโรเฟอร์

#### Chrom azurol S agar (CAS)

##### 3.4.1 Preparation of CAS Indicator Solution

Chrom azurol S	0.06	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร
Fe III solution	10	มิลลิลิตร
HDTMA	40	มิลลิลิตร

ละลาย Chrom azurol S ในน้ำกลั่น จะได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นเติม Fe III solution จะได้สารละลายสีม่วง เติม HDTMA อย่างช้า ๆ จะได้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม นำ CAS Indicator Solution ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

##### 3.4.2 Preparation of Basal Agar Medium

ปริมาณที่ต้องการเตรียม 100 มิลลิลิตร

MOPS	3.0	กรัม
NaCl	0.05	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.03	กรัม
NH <sub>4</sub> Cl	0.01	กรัม
L-asparagine	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	83	มิลลิลิตร
Agar	1.5	กรัม

ละลาย MOPS NaCl KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> NH<sub>4</sub>Cl และ L-asparagine ละลายในน้ำ นำไปปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย NaOH จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 88 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เติม Agar ละลายด้วยความร้อน หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

##### 3.4.3 Preparation of CAS Agar Plates

CAS Indicator Solution	10	มิลลิลิตร
Basal Agar Medium	88	มิลลิลิตร
Glucose ความเข้มข้น 50%	2	มิลลิลิตร

นำ CAS Indicator Solution Basal Agar Medium และ Glucose ไปปรับ  
 อุณหภูมิในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติม Glucose ใน  
 Basal Agar Medium และเติม CAS Indicator Solution อย่างช้า ๆ พร้อมเขย่าอย่างช้า  
 ๆ และไม่ให้เกิดฟอง จากนั้นเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นสีน้ำเงิน

### 3.4 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

#### Pikovskaya's agar (PVK)

Pikovskaya's agar (HIMEDIA)	31.3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Pikovskaya's agar ในน้ำกลั่นปริมาตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย  
 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส  
 เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิจัย

## การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิจัย

### 1. สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล 100 มิลลิลิตร

NaOH	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย NaOH ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วเติมลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ในขวด 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

### 2. B-vitamins

Thiamine hydrochlorid	0.5	กรัม
Riboflavin	0.5	กรัม
Niacin	0.5	กรัม
Pyridoxin	0.5	กรัม
Inositol	0.5	กรัม
Calcium Pantothenate	0.5	กรัม
P-Aminobenzoic acid	0.5	กรัม
Biotin	0.25	กรัม
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	10	มิลลิลิตร

ละลายวิตามินทั้งหมด ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยฟิวเจอร์ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

### 3. สารละลาย KOH ความเข้มข้น 3%

สารละลาย KOH ความเข้มข้น 3% 100 มิลลิลิตร

KOH	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย KOH ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วเติมลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ในขวด 50 ml จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 4. สารละลาย L-tryptophan ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลาย L-tryptophan ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 10 มิลลิลิตร

L-tryptophan	0.10	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

นำ L-tryptophan ละลายในน้ำกลั่น (อุ่น) จากนั้นนำมากรองด้วยฟیلเตอร์ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

#### 5. Salkowski's reagent

Salkowski's reagent 300 มิลลิลิตร

FeCl <sub>3</sub>	3.60	กรัม
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (7.9 โมลาร์)	130	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	170	มิลลิลิตร

ละลาย FeCl<sub>3</sub> ในน้ำกลั่น จากนั้นค่อย ๆ เติม H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ลงไปช้า ๆ จะได้ปริมาตร ทั้งหมด 300 มิลลิลิตร เก็บสารละลายใส่ขวดสีชา

#### 6. สารละลาย H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ความเข้มข้น 7.9 โมลาร์

สารละลาย H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ความเข้มข้น 7.9 โมลาร์ จาก Conc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (Conc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 18.38 โมลาร์)

Conc H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	214.908	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

เติม Conc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ในขวด แล้ว 200 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

#### 7. สารละลาย (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ความเข้มข้น 1%

สารละลาย (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ความเข้มข้น 1 % 250 มิลลิลิตร

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร

ละลาย (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วเติมลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี น้ำกลั่นอยู่ในขวด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 250 มิลลิลิตร

### 8. สารละลาย ACC ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

สารละลาย ACC ความเข้มข้น 0.30 มิลลิโมลาร์ 3 มิลลิลิตร

ACC	0.09	กรัม
น้ำกลั่น	3	มิลลิลิตร

ละลาย ACC ในน้ำกลั่นจนสารละลายให้เข้ากัน

### 9. Fe III Solution

Fe III Solution 100 มิลลิลิตร

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0027	กรัม
HCl (10 มิลลิโมลาร์)	100	มิลลิลิตร

ละลาย  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ใน HCl จนสารละลายให้เข้ากัน

### 10. สารละลาย HDTMA

สารละลาย HDTMA 40 มิลลิลิตร

Hexadecyltrimethyl ammonium bromide	0.0729	กรัม
น้ำกลั่น	40	มิลลิลิตร

ละลาย Hexadecyltrimethyl ammonium bromide ในน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 11. สารละลาย Glucose ความเข้มข้น 50%

สารละลาย Glucose ความเข้มข้น 50% 100 มิลลิลิตร

Glucose	50	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย Glucose ในน้ำกลั่น จากนั้นนำมากรองด้วยฟิลเตอร์ขนาด 0.2 ไมโครเมตร



**ภาคผนวก ค**

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสีทไฮโซเลตต่าง ๆ



250 260 270 280 290 300  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM4 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM6 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM8 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 ZA1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 ZA3 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*S. albus* CAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACG  
*S. violascens* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*S. durhamensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*S. rochei* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*K. niigatensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

310 320 330 340 350 360  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM4 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM6 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM8 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 ZA1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 ZA3 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*S. albus* GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG  
*S. violascens* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*S. durhamensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*S. rochei* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*K. niigatensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

370 380 390 400 410 420  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM4 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM6 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM8 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 ZA1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 ZA3 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*S. albus* CAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGA  
*S. violascens* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*S. durhamensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*S. rochei* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*K. niigatensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

430 440 450 460 470 480  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM4 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM6 .....|AA.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TM8 .....|AA.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 ZA1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 ZA3 .....|AA.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*S. albus* AGCGCGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
*S. violascens* .....|AA.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*S. durhamensis* .....|AA.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*S. rochei* .....|AA.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
*K. niigatensis* .....|A.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

490 500 510 520 530 540

TM1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

TM4 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

TM6 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

TM8 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

ZA1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

ZA3 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*S. albus* AATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCC-GGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCT

*S. violascens* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*S. durhamensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*S. rochei* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*K. niigatensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

550 560 570 580 590 600

TM1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

TM4 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

TM6 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

TM8 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

ZA1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

ZA3 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*S. albus* TGTTCGCGTC-GGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAG

*S. violascens* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*S. durhamensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*S. rochei* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*K. niigatensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

610 620 630 640 650 660

TM1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

TM4 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

TM6 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

TM8 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

ZA1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

ZA3 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*S. albus* GCTAGAGTTCGGCAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCA

*S. violascens* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*S. durhamensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*S. rochei* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*K. niigatensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

670 680 690 700 710 720

TM1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

TM4 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

TM6 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

TM8 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

ZA1 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

ZA3 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*S. albus* GGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAG

*S. violascens* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*S. durhamensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*S. rochei* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

*K. niigatensis* .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

730 740 750 760 770 780

TM1  
 TM4  
 TM6  
 TM8  
 ZA1  
 ZA3  
*S. albus*  
*S. violascens*  
*S. durhamensis*  
*S. rochei*  
*K. niigatensis*

790 800 810 820 830 840

TM1  
 TM4  
 TM6  
 TM8  
 ZA1  
 ZA3  
*S. albus*  
*S. violascens*  
*S. durhamensis*  
*S. rochei*  
*K. niigatensis*

850 860 870 880 890 900

TM1  
 TM4  
 TM6  
 TM8  
 ZA1  
 ZA3  
*S. albus*  
*S. violascens*  
*S. durhamensis*  
*S. rochei*  
*K. niigatensis*

910 920 930 940 950 960

TM1  
 TM4  
 TM6  
 TM8  
 ZA1  
 ZA3  
*S. albus*  
*S. violascens*  
*S. durhamensis*  
*S. rochei*  
*K. niigatensis*

```

          970      980      990      1000      1010      1020
TM1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM4      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM6      .....CGTC.G.....C.G.CG.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM8      .....AT.....GT.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA3      .....A.C.G.....C.G.T.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. albus GAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGATGGCTGTCGT
S. violascens .....CGTC.G.....C.G.CG.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. durhamensis .....AT.....GT.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. rochei   .....A.C.G.....C.G.T.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
K. niigatensis .....CTG.....TCAG.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

          1030      1040      1050      1060      1070      1080
TM1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM4      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM6      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|C
TM8      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|T
ZA1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA3      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|C
S. albus   CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCTGTGT
S. violascens .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|N.N
S. durhamensis .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|T
S. rochei   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|C
K. niigatensis .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|T

```

```

          1090      1100      1110      1120      1130      1140
TM1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM4      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM6      .....GGC.....---.T.GT.C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|C
TM8      .....TGC.....C---.GT.A.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|A.C
ZA1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA3      .....GGC.....---.T.GT.C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|C
S. albus   TGCCAGCAACTCCTTTTCGGGGAGGTTGGGGACTCACGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGG
S. violascens .....GGC.....---.T.GT.C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|C
S. durhamensis .....TGC.....C---.GT.A.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|A.C
S. rochei   .....GGC.....---.T.GT.C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|C
K. niigatensis .....G-----TA.T..C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|A

```

```

          1150      1160      1170      1180      1190      1200
TM1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM4      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM6      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM8      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA3      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. albus   AGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCT
S. violascens .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. durhamensis .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. rochei   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
K. niigatensis .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|A

```

```

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
TM1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM4      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM6      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM8      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA3      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. albus  ACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGT
S. violascens .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. durhamensis .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. rochei   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
K. niigatensis .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
TM1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM4      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM6      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM8      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA3      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. albus  CTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCA
S. violascens .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. durhamensis .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. rochei   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
K. niigatensis .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
TM1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM4      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM6      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM8      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA3      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. albus  GATCAGCATTTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACGTCAC
S. violascens .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. durhamensis .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. rochei   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
K. niigatensis .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
TM1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM4      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM6      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TM8      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA1      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ZA3      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. albus  GAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGTCGTCGAAGG
S. violascens .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. durhamensis .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. rochei   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
K. niigatensis .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

                                1450      1460
                                .....|.....|.....|.....|
TM1                               -----
TM4                               -----
TM6                               -----
TM8                               -----
ZA1                               -----
ZA3                               -----
S. albus      TGGGACTGGCGATTGGGACG
S. violascens .....A.....
S. durhamensis .....A.....
S. rochei     .....A.....
K. niigatensis .....CA.....

```



## บรรณานุกรม

- กรมวิชาการเกษตร. (2564). *คู่มือ...ป่วยชีวภาพ*. กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กรสิริ ศรีนิล. (2553). *ชีววิทยาและอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงหนอนนกยักษ์ Zophobas morio Fabricius และศักยภาพในการเป็นอาหารของมวนพินาต Eocanthecona furcellata (Wolff)* [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่].
- กัทลีวัลย์ สุขช่วย สันุชัย พันธโชติ และ จุฑารัตน์ ทิพย์ชู. (2553). *การคัดเลือกและประสิทธิภาพของเชื้อรา Trichoderma spp. ในการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเกลี้ยง (Citrus sinensis) ที่เกิดจากเชื้อรา Phytophthora parasitica ในสภาพห้องปฏิบัติการ* [รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์]. สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.
- กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน. (2555). *ความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในดิน Biodiversity of Actinobacteria in Soil* [รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์]. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- แก่ง เจียมกิจวัฒนา และ วสุ ปฐมอารีย์. (2558). *การประยุกต์ใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชร่วมกับเทคโนโลยีไฟโตเอกซ์แทรกชันเพื่อบำบัดสารโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดิน*. *วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 31(1), 219-234.
- จักรพงษ์ หรั่งเจริญ ถนิมนันต์ เจนอักษร และ พรหมมาศ คูหากาญจน์. (2554). *การยับยั้งการเจริญของเชื้อ Pythium myriotylum โดยแบคทีเรียเขตรากพืชจากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน*. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 16(1), 22-31.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. (2563). *ไตรโคเดอร์มา: เชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช*. *ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน*.
- จิราวรรณ สิทธิสวนจิก. (2563). *การศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชของแอคติโนมัยซีท์กับแบคทีเรีย Pseudomonas putida ในข้าวภายใต้สภาวะความเค็ม* [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยบูรพา].
- จิราภรณ์ เสวะนา และ ทศนีย์ แจ่มจรรยา. (2544). *การเลี้ยงหนอนนก (Tenebrio molitor L.) ในเชิงอุตสาหกรรม*. *วารสารแก่นเกษตร*, 29(4), 194-200.
- ณัฐวิภา วิเศษวิทยากร และ ธนศักดิ์ ฟิ้นโรสงค์. (2548). *หนอนนกทางเลือกสำหรับอาหารสัตว์น้ำ*. *วารสารศูนย์บริการวิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, 13(2), 9-16.
- เทวี มณีรัตน์ และ ปัทมาวดี คุณวัลลี. (2566). *การใช้ประโยชน์ของเหลือจากกระบวนการผลิตหนอน*

- มอดรำข้าวสาลี *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) สู่ความเป็นไปได้ในการผลิตดอกดาวเรืองอินทรี. *วารสารเกษตรและอาหาร มรวอ.*, 2(1), 29-35.
- นุชนาถ วุฒิประดิษฐ์กุล. (2554). ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และระบบต้านการเกิดออกซิเดชันในพืช. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข*, 39(2), 172-181.
- บรรเจิด อินหว่าง และ จิระเดช แจ่มสว่าง. (27-29, มกราคม, 2529). *การควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศ (Sclerotium rolfsii) โดยจุลินทรีย์จากดินเกษตรกรรม*. [Poster presentation], การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 24 ภาคโปสเตอร์ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน 27-29 มกราคม 2529 สาขาประมง สาขาสิ่งแวดล้อม สาขาสังคมศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาพืช-สัตว์ สาขาวิศวกรรมศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย.
- ปรัชวณี พิบำรุง. (2564). ผลการใช้ปุ๋ยหมักมูลจิ้งหรีดและมูลหนอนนกอัดเม็ดต่อสมบัติดินและผลผลิตข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1. *วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร*, 39(1), 52-64.
- ปัทมาวดี คุณวัลลี และ เทวี มณีรัตน์. (2564). เปรียบเทียบการใส่มูลหนอนมอดรำข้าวสาลีและปุ๋ยเคมีต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของพริกหยวกพันธุ์คัด-ม.อ. *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.*, 16(1), 47-56.
- มานิตา คำแจ่ม และ วสุ ปฐมอารีย์. (2557). สารไซโตโรเฟอร์จากจุลินทรีย์. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว*, 30(1), 229-247.
- ยุพา หาญบุญทรง, ทศนีย์ แจ่มจรรยา, นพชนม์ ทับทิม และ ลำไย อิทธิจันทร์. (2561). *คู่มือการเพาะเลี้ยงแมลงที่เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ในฟาร์มที่ได้มาตรฐาน* (พิมพ์ครั้งที่ 2). สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ.
- รัชณี มิ่งมา และ กรรณิการ์ ดวงมาลย์. (2564). การคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียจากดินสวนมะพร้าวที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช. *วารสารเกษตร*, 37(3), 337-348.
- รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์. (2552). *แอคติโนมัยซีท (Actinomycete)*. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. (2547). *ชีววิทยาของเซลล์*. เอสพรีนติ้งเฮ้า.
- วิจิตพล มีแก้ว, ญัฐพล ชันธปราบ และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2553). การปรับตัวของพืชภายใต้สภาวะที่มีความเค็ม. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์*, 10(2), 28-37.
- ศิริลักษณ์ นามวงษ์. (2553). ศักยภาพของแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางทางเทคโนโลยีชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 15(2), 122-132.
- สุภาพร จันทร์รุ่งเรือง, เบญจมาศ รสโสภา และ กรรณิการ์ สัจจาพันธ์. (2553). ผลของแบคทีเรียละลายพอสเพต *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2. *วิทยาสารกำแพงแสน*, 8(1), 1-14.

- สุภาวดี โกยกุล และเจษฎา อีสหะ. (2552). *การเพาะเลี้ยงหนอนนก*. คณะเทคโนโลยีการเกษตรและ  
อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ.
- โสภณ บุญล้ำ. (2556). *คู่มือเพาะเลี้ยงหนอนนก*. โครงการคลินิกเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏ สุ  
ราษฎร์ธานี.
- หนึ่ง เตียอำรุง และนันทกร บุญเกิด. (2539). ธาตุเหล็ก ซิเตอร์โรฟอร์ และ จุลินทรีย์. *วารสารเทคโนโลยี  
สุนารี*, 3, 95-100.
- อรอุมา เรืองวงษ์ และเบญจวรรณ ใจจันทร์. (2560). การใช้แอกติโนมัยซีทจากดินเพื่อยับยั้งเชื้อ  
แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉียวของมะเขือเทศ. *วารสารเกษตร*,  
33(1), 49-59.
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth  
promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University -  
Science*, 26(1), 1-20.
- Ahmad, F., 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.
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: roles  
and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196-208.
- Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by  
plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase.  
*Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 160-167.
- Alori, E. T., & Babalola, O. O. (2018). Microbial Inoculants for Improving Crop Quality and  
Human Health in Africa. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-12.
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and  
its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-8.
- Amaresan, N., Kumar, K., Naik, J. H., Bapatla, K. G., & Mishra, R. K. (2018). Chapter 8 -  
*Streptomyces* in plant growth promotion: mechanisms and role. In B. P. Singh,  
V. K. Gupta, & A. K. Passari (Eds.), *New and Future Developments in Microbial  
Biotechnology and Bioengineering* (pp. 125-135). Elsevier.
- Anil, K. K. M., Chandan, S., & Shivaraju, H. P. (2019). Potential antimicrobial and  
antioxidant activity of *Saraca Indica* and *Clerodendrum Paniculatum* from  
western ghats, shimoga, India. *International Journal of Environmental Health*

and Technology, 1(3), 91-99.

Azam, F., & Memon, G. (1996). Soil organisms. *Soil science*, 200-232.

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & Wezel, G. P. v. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.

Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2005). Plant growth-promotion. In D. Hillel (Ed.), *Encyclopedia of soils in the environment* (pp. 103-115). Elsevier, Oxford.

Berger, J., Jampolsky, L. M., & Goldberg, M. W. (1953). *A guide to the classification of the actinomycetes and their antibiotics* (S. A. W. Lechevalier & H. A. Baltimore, Eds.). The Williams & Wilkins.

Brady, N. C., & Weil, R. R. (2008). *The nature and properties of soils* (Vol. 13). Prentice Hall Upper Saddle River.

Brown, D. G., Swanson, J. K., & Allen, C. (2007). Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 2777-2786.

Chaihar, M., Pathom-Aree, W., Sujada, N., & Lumyong, S. (2018). Characterization of phosphate solubilizing *Streptomyces* as a biofertilizer. *Chiang Mai Journal of Science*, 45(2), 701-716.

Chinabut, N. (2003). *A soil testing service for farmers in Thailand, using mobile laboratories*. Food & Fertilizer Technology Center.

Chouyia, F. E., Fiorentino, N., Roupheal, Y., Ventorino, V., Fechtali, T., Visconti, D., Cozzolino, E., Idbella, M., Giordano, M., & Fagnano, M. (2022). Assessing the effect of P-solubilizing bacteria and mycorrhizal fungi on tomato yield and quality under different crop rotations. *Scientia Horticulturae*, 293, 1-12.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951-4959.

de Freitas, J. R., Banerjee, M. R., & Germida, J. J. (1997). Phosphate-solubilizing

- rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 24(4), 358-364.
- de-Bashan, L. E., Hernandez, J.-P., & Bashan, Y. (2012). The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology*, 61, 171-189.
- 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.
- Domenech, J., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., Ramos, B., & Gutierrez-Mañero, J. (2006). Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *BioControl*, 51, 245-258.
- Donner, S. C., Jones, D. A., McClure, N. C., Rosewarne, G. M., Tate, M. E., Kerr, A., Fajardo, N. N., & Clare, B. G. (1993). Agrocin 434, a new plasmid encoded agrocin from the biocontrol *Agrobacterium* strains K84 and K1026, which inhibits biovar 2 agrobacteria. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42(3), 185-194.
- Duhme-Klair, A.-K., de Alwis, D. C. L., & Schultz, F. A. (2003). Electrochemistry of molybdenum (VI)-catecholamide siderophore complexes in aqueous solution. *Inorganica Chimica Acta*, 351, 150-158.
- 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. (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.
- Fielding, D. J., Trainor, E., & Zhang, M. (2013). Diet influences rates of carbon and nitrogen mineralization from decomposing grasshopper frass and cadavers. *Biology and Fertility of Soils*, 49(5), 537-544.
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M. (2016). Molecular approaches to studying microbial communities: Targeting the 16S ribosomal RNA gene. *Journal of UOEH*, 38(3), 223-232.

- Gamalero, E., & Glick, B. R. (2015). Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiology*, 169(1), 13-22.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 1-15.
- Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G., & Penrose, D. M. (1999). *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*. World Scientific.
- 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, 227-242.
- Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B. K., Sandeep, D., Vidya, M. S., Deepthi, K., & Rupela, O. (2011). Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. *Crop Protection*, 30(8), 1070-1078.
- Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., Bandikinda, P., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Rupela, O., Kudapa, H., Katta, K., & 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.
- Gordon, M. A., & Lapa, E. W. (1966). Durhamycin, a Pentaene Antifungal Antibiotic from *Streptomyces durhamensis* sp. n. *Applied Microbiology*, 14(5), 754-760.
- Gorman, R., & Adley, C. C. (2004). An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-85^{\circ}\text{C}$  for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 306-310.
- Goudjal, Y., Toumatia, O., Sabaou, N., Barakate, M., Mathieu, F., & Zitouni, A. (2013). Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(10), 1821-1829.
- 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.
- Gratão, P. L., Prasad, M. N. V., Cardoso, P. F., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2005). Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *17*, 53-64.
- Hall, T., Biosciences, I., & Carlsbad, C. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, *2*(1), 60-61.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, *16*(10), 463-471.
- 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*, 158-171.
- Hayakawa, M., & Nonomura, H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, *65*(5), 501-509.
- He, C. Y., Hsiang, T., & Wolyn, D. J. (2002). Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, *51*(2), 225-230.
- 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.
- Honma, M., & Shimomura, T. (1978). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, *42*(10), 1825-1831.
- Hopkinson, B. M., & Morel, F. M. M. (2009). The role of siderophores in iron acquisition by photosynthetic marine microorganisms. *BioMetals*, *22*(4), 659-669.
- Hopwood, D. A. (1967). Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriological Reviews*, *31*(4), 373-403.
- Houben, D., Daoulas, G., Faucon, M.-P., & Dulaurent, A.-M. (2020). Potential use of

- mealworm frass as a fertilizer: Impact on crop growth and soil properties. *Scientific Reports*, 10(1), 4659.
- Indananda, C. (2013). *Characterization and identification of novel taxa, plant growth promoting properties and new compound from endophytic actinomycetes* [Doctoral dissertation, Kasetsart University].
- Indananda, C., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Takahashi, Y., Duangmal, K., & Thamchaipenet, A. (2010). Actinophytocola oryzae gen. nov., sp. nov., isolated from the roots of Thai glutinous rice plants, a new member of the family Pseudonocardaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(5), 1141-1146.
- Intana, W. (2003). *Selection and development of Trichoderma spp. for high glucanase, antifungal metabolites producing and plant growth promoting isolates for biological control of cucumber damping-off caused by Pythium spp* [Doctoral dissertation, Kasetsart University].
- Isaac, J. T., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1995). Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron*, 15(2), 427-434.
- Jabir, M. D. A. R., Razak, S. A., & Vikineswary, S. (2012). Nutritive potential and utilization of super worm (*Zophobas morio*) meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African Journal of Biotechnology*, 11, 6592-6598.
- Jaemsaeng, 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(1), 1950.
- Jog, R., Pandya, M., Nareshkumar, G., & Rajkumar, S. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology*, 160(4), 778-788.
- 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.

- Kelly, K. L. (1964). *Inter society color council national bureau of standards color name charts illustrated with centroid colors*. US Government Printing Office.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces genetics* (Vol. 291). John Innes Foundation Norwich.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*, 111-120.
- Korasick, D. A., Enders, T. A., & Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, *64*(9), 2541-2555.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, *35*(6), 1547-1549.
- 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). Springer New York.
- Mahmoud, A. L. E., & Abd-Alla, M. H. (2001). Siderophores production by some microorganisms and their effect on Bradyrhizobium-mung bean symbiosis. *International Journal of Agriculture and Biology*, *3*(2), 157-162.
- Maiti, P. K., & Mandal, S. (2019). Majority of actinobacterial strains isolated from kashmir himalaya soil are rich source of antimicrobials and industrially important biomolecules. *Advances in Microbiology*, *9*, 220-238.
- Matilla, M. A., Evans, T. J., Martín, J., Udaondo, Z., Lomas-Martínez, C., Rico-Jiménez, M., Reyes, F., & Salmond, G. P. C. (2023). Herbicolin a production and its modulation

- by quorum sensing in a *Pantoea agglomerans* rhizobacterium bioactive against a broad spectrum of plant-pathogenic fungi. *Microbial Biotechnology*, 16(8), 1690-1700.
- 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.
- McCardell, B. A., & Pootjes, C. F. (1976). Chemical nature of agrocin 84 and its effect on a virulent strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10(3), 498-502.
- Mclaughlin, M. J., Alston, A. M., & Martin, J. K. (1988). Phosphorus cycling in wheat pasture rotations. I. The source of phosphorus taken up by wheat. *Soil Research*, 26(2), 323-331.
- Mehrvarz, S., Chaichi, M. R., & Alikhani, H. A. (2008). Effect of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on forage and grain quality of barely (*Hordeum vulgare* L.). *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 3(6), 822-828.
- Mishra, A., Afik, O., Cabrera, M. L., Delaplane, K. S., & Mowrer, J. E. (2013). Inorganic nitrogen derived from foraging honey bees could have adaptive benefits for the plants they visit. *PLOS ONE*, 8(7), 1-6.
- Naik, K., Mishra, S., Srichandan, H., Singh, P. K., & Sarangi, P. K. (2019). Plant growth promoting microbes: Potential link to sustainable agriculture and environment. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 1-12.
- Nakasone, K. K., Peterson, S. W., & Jong, S. C. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. In G. M. Mueller, G. F. Bills, & M. S. Foster (Eds.), *Biodiversity of Fungi* (pp. 37-47). Academic Press.
- Nogalska, A., Przemieniecki, S. W., Krzebietke, S. J., Załuski, D., Kosewska, A., Skwierawska, M., & Sienkiewicz, S. (2023). The effect of mealworm frass on the chemical and microbiological properties of horticultural peat in an incubation experiment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(1), 21.
- Ojuederie, O. B., Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2019). Plant Growth Promoting

- Rhizobacterial Mitigation of Drought Stress in Crop Plants: Implications for Sustainable Agriculture. *Agronomy*, 9(11), 1-29.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197.
- Park, H., Jung, B. H., Han, T., Lee, Y. B., Kim, S.-H., & Kim, N. J. (2013). Taxonomy of introduced commercial insect, *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae) and a comparison of DNA barcoding with similar tenebrionids, *Promethis valgipes* and *Tenebrio molitor* in Korea. *Journal of Sericultural and Entomological Science*, 51(2), 185-190.
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17, 362-370.
- Pinkalski, C., Jensen, K. M. V., Damgaard, C., & Offenberg, J. (2018). Foliar uptake of nitrogen from ant faecal droplets: an overlooked service to ant-plants. *Journal of Ecology*, 106(1), 289-295.
- Poveda, J., Jiménez-Gómez, A., Saati-Santamaría, Z., Usategui-Martín, R., Rivas, R., & García-Fraile, P. (2019). Mealworm frass as a potential biofertilizer and abiotic stress tolerance-inductor in plants. *Applied Soil Ecology*, 142, 110-122.
- Pridham, T. G., Hesseltine, C. W., & Benedict, R. G. (1958). A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Applied Microbiology*, 6(1), 52-79.
- Raja, P., Uma, S., Gopal, H., & Govindarajan, K. (2006). Impact of bio inoculants consortium on rice root exudates, biological nitrogen fixation and plant growth. *Journal of Biological Sciences*, 6(5), 815-823.
- 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), 1-7.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., & Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20(1), 1-11.

- Ramette, A., Moëgne-Loccoz, Y., & Défago, G. (2003). Prevalence of fluorescent pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. *FEMS Microbiology Ecology*, 44(1), 35-43.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., & Latif, F. (2004). Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(2), 187-196.
- Richardson, A. E. (1994). Soil microorganisms and phosphorus availability. In C. E. Pankhurst, B. M. Doube, V. V. S. R. Gupta, & P. R. Grace (Eds.), *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems* (pp. 50-62). CSIRO Publications.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4), 319-339.
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(1), 15-21.
- Rumbos, C. I., & Athanassiou, C. G. (2021). The superworm, *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae): A 'sleeping giant' in nutrient sources. *Journal of Insect Science*, 21(2).
- 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, 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, 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.
- Sameera, B., Prakash, H. S., & Nalini, M. S. (2018). Actinomycetes from the coffee plantation soils of Western Ghats: diversity and enzymatic potentials.

- International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(8), 3599-3611.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal CAS assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160, 47-56.
- Scragg, A. (2005). *Environmental biotechnology* (2nd ed.). OXFORD university press New York.
- Shahab, S., Ahmed, N., & Khan, N. S. (2009). Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. *African Journal of Agricultural Research*, 4(11), 1312-1316.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 1-14.
- Shirling, E. T., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*, 16(3), 313-340.
- Silva, G. d. C., Kitano, I. T., Ribeiro, I. A. d. F., & Lacava, P. T. (2022). The potential use of actinomycetes as microbial inoculants and biopesticides in agriculture [Review]. *Frontiers in Soil Science*, 2, 1-20.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448.
- Stevenson, F. J. (1986). *Cycles of soils: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. John Wiley & Sons.
- Sumi, P., & Arka Pratim, C. (2022). Studies on endophytic actinobacteria as plant growth promoters and biocontrol agents. In N. H. Wael (Ed.), *Actinobacteria* (pp. Ch. 3). IntechOpen.
- Suresh, P., Rekha, M., Gomathinayagam, S., Ramamoorthy, V., Sharma, M. P., Sakthivel, P., Sekar, K., Valan Arasu, M., & Shanmugaiah, V. (2022). Characterization and assessment of 2, 4-diacetylphloroglucinol (DAPG)-producing *Pseudomonas fluorescens* VSMKU3054 for the management of tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microorganisms*, 10(8), 1-26.
- Talib, R. A., & Abeid Abiess, A. A. (2019). Application of a rapid method for gram differentiation of human pathogenic and non-pathogenic bacteria without

- staining. *Indian Journal of Public Health Research & Development*, 10(4), 1673–1675.
- Tedsree, N., Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B., & Tanasupawat, S. (2022). Diversity and antimicrobial activity of plant growth promoting endophytic actinomycetes isolated from Thai Orchids. *Environment and Natural Resources Journal*, 20(4), 379-392.
- Van Hop, D., Sakiyama, Y., Binh, C. T. T., Otoguro, M., Hang, D. T., Miyadoh, S., Luong, D. T., & Ando, K. (2011). Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. *The Journal of Antibiotics*, 64(9), 599-606
- Vyas, P., & Gulati, A. (2009). Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology*, 9(1), 1-15.
- Waksman, S. A., & Henrici, A. T. (1943). The nomenclature and classification of the Actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 46(4), 337-341.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Newman, L., & Vangronsveld, J. (2009). Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in Biotechnology* 27(10), 591-598.
- Whitelaw, M. A. (1999). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 69, pp. 99-151). Academic Press.
- Xiang, S.-H., Li, J., Yin, H., Zheng, J.-T., Yang, X., Wang, H.-B., Luo, J.-L., Bai, H., & Yang, K.-Q. (2009). Application of a double-reporter-guided mutant selection method to improve clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *Metabolic Engineering*, 11(4), 310-318.
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613-1617.





