โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สำนักพระราชวัง
Plant Genetic Conservation Project as The Royal Initiation of
Her Royal highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG)
The Bureau of The Royal Household

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง

การศึกษาสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชและคุณลักษณะของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย ที่ได้จากเขตพื้นที่เขื่อนอุบลรัตน์

Determination of plant growth promoting compounds and characterization of endophytic bacteria isolated from Ubolratana Dam

ชื่อผู้วิจัย

ดร.วิยะดา มงคลธนารักษ์
หัวหน้าโครงการ
นางสาววรรณภา บุตรโคตร
ผู้ช่วยวิจัย

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ISBN .....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งในการสนับสนุนนักวิจัย ในด้านการทำงานวิจัย เป็นโครงการต่อเนื่องที่ทำติดต่อกันเป็นเฟสๆ ละ 3 ปี ทำให้นักวิจัยมีความคิดต่อยอด และสามารถพัฒนางานเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง รวมทั้งสนับสนุนนักศึกษาระดับบัณฑิต และมหาบัณฑิต ให้มีความเชี่ยวชาญในการทำงานวิจัย ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง โดยได้รับความช่วยเหลือ และทุนสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งเป็นทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (กฟผ.) โรงไฟฟ้าพลังน้ำภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เขื่อนอุบลรัตน์ อ.อุบลรัตน์ จ.ขอนแก่น ที่ช่วยเหลือในด้านสถานที่ การสำรวจและเก็บตัวอย่าง รวมถึงปราชญ์ชาวบ้านที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับพืชที่เก็บตัวอย่างมาคัดแยก เพื่อให้ได้สายพันธุ์แบคทีเรียมาใช้ในงานวิจัยต่อเนื่อง ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงของทุกหน่วยงานที่ให้การสนับสนุนมาเป็นอย่างดี นอกจากนี้ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำวิจัย และผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวอาทิตยา ภูนบทอง และนางสาววรรณภา บุตรโคตร ซึ่งเป็นผู้ช่วยวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จ ลุล่วงเป็นอย่างดี จึงขอขอบคุณผู้สนับสนุนทุกฝ่าย ไว้ ณ ที่นี้

บทคัดย่อ

สารเร่งการเจริญเติบโตของพืช เป็นสารที่พืชผลิตขึ้นเพื่อกระตุ้นกระบวนการงอกของเมล็ด การเจริญของลำต้น มีทั้งเป็นฮอร์โมน สารระเหยต่างๆ โดยสารเหล่านี้สามารถพบได้ในกิจกรรมของจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน จึงเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting microorganisms) แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มนี้มีอยู่หลายพันธุ์ ทั้งที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับพืช (Endophytic bacteria) หรืออาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบๆ รากพืช (rhizobacteria) เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่คัดแยกมาและมีประสิทธิภาพในการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโต แบ่งออกเป็นกลุ่ม คือ กลุ่มที่ผลิตสารอินโดลอะซิติกแอซิด ซึ่งเป็นสารฮอร์โมนพืชช่วยกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ และการแบ่งเซลล์ ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพ คือ UD270 เป็นไอโซเลตที่เจริญได้ดี ผลิตสารอินโดลอะซิติกแอซิดได้ดีที่อุณหภูมิ 35°C ที่เวลา 48-60 ชั่วโมง และต้องอาศัยทริปโตแฟนในการกระตุ้นการผลิตสาร ปริมาณที่เหมาะสมคือ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อีกหนึ่งกลุ่มคือ กลุ่มผลิตสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคพืช ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพ คือ UD288 แต่กลับพบแบคทีเรียนี้ สามารถผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตอื่นๆ ได้ดีกว่าไอโซเลต UD270 สารเหล่านั้น ได้แก่ สารอะซีโทอิน ซึ่งเป็นสารระเหย ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการเจริญของพืช (plant growth promoter) ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ด โดยจะย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ใช้เป็นพลังงานสำหรับการเจริญของต้นอ่อน สามารถละลายฟอสเฟตได้ ซึ่งพืชใช้เป็นแหล่งอาหาร จึงเป็นการช่วยหาอาหารให้แก่พืช และสามารถผลิตแอมโมเนียได้ ซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารให้กับพืชเช่นกัน และเป็นส่วนสำคัญในวัฏจักรไนโตรเจนอีกด้วย ดังนั้นเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต น่าจะสามารถนำมาใช้ร่วมกัน เพื่อช่วยในการส่งเสริมการเจริญของพืชทั้งในด้านการเจริญเติบโตและการป้องกันโรคได้เป็นอย่างดี

Abstract

Plant growth promoting compounds are substances produced directly from plants to promote seed germination and growth of stem. There are hormones and volatile compounds which are also produced by various microorganisms. The endophytic bacteria or rhizobacteria are groups of plant growth promoting bacteria. Therefore, isolated endophytic bacteria in the previous study were investigated to be plant growth promoting strains. There were 2 groups; the first group was an Indole Acetic Acid (IAA) producing strain, UD270. This strain had IAA production at the optimum temperature of 35°C for 48-60 hours. It needed the tryptophan as a substrate for IAA production; the optimum concentration of tryptophan was 3 mg/ml. The IAA is a substance for cell elongation, cell division and cell differentiation. Another group was a antimicrobial producing strain, UD288, that inhibited plant pathogens. Surprisingly, this strain also produced other plant growth promoting compounds better than UD270. It produced acetoin which is volatile agent for plant growth promoter, amylase which involve in seed germination as this enzyme degrades starch to glucose for energy production. Moreover, it had phosphate solubilization that has a role of nutrient for plants; and produced ammonia that is a nitrogen source in nitrogen cycle. These 2 strains had potential activity which may work together to promote plant growth in growth promotion and plant disease inhibition.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1. ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
2. วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
3. ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
1. ความสำคัญของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช	3
2. กระบวนการกระตุ้นการเจริญเติบโตพืชของแบคทีเรียกลุ่ม PGRB	4
3. ความสัมพันธ์ของการอาศัยอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียและพืช	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
1. สายพันธุ์เอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ	13
2. ศึกษาคุณสมบัติด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช	13
3. ศึกษาคุณสมบัติด้านการทนต่อสภาวะต่างๆ	14
4. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืช	15
5. ทดสอบการย่อยสลายสารประกอบกลุ่มที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ	15
6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสาร indole acetic acid (IAA)	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
1. การคัดเลือสายพันธุ์เอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีมาทดสอบ	17
2. ทดสอบความสามารถในการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช	17
3. ทดสอบสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย	22
4. ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืชของเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย	24
5. ทดสอบการย่อยสลายสารจำพวก polycyclic aromatic hydrocarbon	26
6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินโดลอะซิติกแอซิดของเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย	26

หน้า
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 32
เอกสารอ้างอิง 35
ภาคผนวก 39

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สรุปประสิทธิภาพของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่คัดเลือกมาใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งเป็นไอโซเลตที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรค และผลิตเอนไซม์บางชนิดได้ 18

ตารางที่ 2 การผลิตสารชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย 20

ตารางที่ 3 ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3%) 23

ตารางที่ 4 สารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืชที่ได้จากเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion 25

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 โครงสร้าง ferrioxamine B 6
ภาพที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์ IAA 9
ภาพที่ 3 เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร Pikovskayas agar ทั้ง 20 ไอโซเลต 19
ภาพที่ 4 การทดสอบการผลิตแอมโมเนียในอาหาร Peptone broth 19
ภาพที่ 5 เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลต ทดสอบการผลิตอะซีโทอิน ในอาหาร MR-VP 21
ภาพที่ 6 เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลต ที่ทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส 21
ภาพที่ 7 การทดสอบการผลิตอินโดลอะซีติกแอซิด 21
ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียในอาหารที่มีสาร polycyclic aromatic hydrocarbon ชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบ 27
ภาพที่ 9 การผลิตกรดอินโดลอะซิติกแอซิดของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต 28
ภาพที่ 10 ความเข้มข้นของทริปโตแฟนต่อการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลต UD270 และการผลิตกรดอินโดลอะซิติกแอซิดที่เวลาต่างๆ 29
ภาพที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลต UD270 และการผลิตกรดอินโดลอะซิติกแอซิดที่เวลาต่างๆ 31

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่มีวงชีวิตอยู่ร่วมกันกับพืช มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชในด้านสารอาหาร ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ หรือลดสารพิษที่มีอยู่ในดิน พืชชนิดหนึ่งๆ มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่หลายชนิด จุลินทรีย์บางชนิดมีความจำเพาะต่อชนิดของพืช บางชนิดสามารถอาศัยอยู่ในพืชได้หลายชนิด ไม่เจาะจงต่อเจ้าบ้าน เนื่องจากปัจจุบันมีเชื้อก่อให้เกิดโรคต่างๆ กับพืชมากมาย และมีการสะสมสารพิษในดินจำนวนมาก ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงด้านผลผลิตทางการเกษตร ทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหา คือ ดัดแปลงปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีขึ้น มีการใช้ปุ๋ยชีวภาพในการปรับปรุงดิน เพิ่มแร่ธาตุอาหารในดินให้กับพืช อีกทางเลือกหนึ่ง คือ การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ทำให้พืชสามารถใช้สารอาหารได้ดี มีการปรับตัวให้สามารถทนต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มที่เป็น plant growth promoting bacteria (PGPB) เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่บริเวณรอบๆ รากของพืช เรียกว่า Rhizobacteria และเชื้อที่อาศัยอยู่ภายในพืช เรียกว่า เอ็นโดไฟต์ (Endophytes) ดังนั้นการศึกษาเชื้อเอ็นโดไฟติก ซึ่งมีทั้งเชื้อรา และแบคทีเรีย เป็นสิ่งสำคัญอีกด้านหนึ่งในการพัฒนาเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร โดยอาศัยความสัมพันธ์ของพืชกับจุลินทรีย์ในการอยู่ร่วมกัน ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษาถึงกลไกความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องระหว่างพืชกับจุลินทรีย์

เชื้อเอ็นโดไฟต์ เป็นจุลินทรีย์ที่เข้าไปอาศัย และเพิ่มจำนวนเป็นโคโลนี หรือเป็นกลุ่มไบโอฟิล์ม อยู่ภายในเซลล์พืช (Ulrich et al., 2008) โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อพืช โดยพบว่าพืช 300,000 ชนิด จะมีเชื้อเอ็นโดไฟต์อยู่อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ซึ่งความสัมพันธ์หรือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเอ็นโดไฟต์กับพืช ยังคงไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานว่าเชื้อเอ็นโดไฟต์หลายชนิดผลิตสารเมตาบอไลท์ที่ป้องกันเชื้อก่อโรคให้กับพืช และสารเมตาบอไลท์ที่พบยังสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในคน และสัตว์ได้อีกด้วย (Strobel et al., 2004) นอกจากนี้เชื้อเอ็นโดไฟต์ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืช โดยมีกิจกรรมทั้งทางตรง และทางอ้อม วิธีทางตรง คือ เชื้อจะผลิตฮอร์โมน (phytohormones) เช่น auxin, cytokinin หรือ ผลิตเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ซึ่งจะลดปริมาณเอทิลลีนในพืช (Madhaiyan et al., 2006) ส่วนวิธีทางอ้อม คือ ช่วยเพิ่มการนำเข้าของสารอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสเฟต หรือเหล็ก และช่วยป้องการติดเชื้อก่อโรค โดยการผลิตสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อปฏิปักษ์ ผลิตไซเดอร์โรฟอร์ และสารประกอบอื่นๆ เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช (Costa and Loper, 1994)

เอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย มีรายงานหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Enterobacter*, *Rahnella*, *Rhodanobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Phyllobacterium* พบว่ามีการผลิตสาร indole acetic acid (IAA) ในบางสายพันธุ์ และบางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนมาใช้ได้

(Khan and Doty, 2009) สาร IAA มีบทบาทในการป้องกันพืชจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น มีความเป็นกรด อุณหภูมิสูง แรงดันออสโมซิส รังสีต่างๆ และช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ด้วย (Bianco et al., 2006) สาร ACC เป็นสารที่พบได้จากเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย ซึ่งมีหน้าที่ส่งเสริมการเจริญของรากพืชให้ยาวมากขึ้น โดยควบคุมปริมาณเอทิลลีน ของพืช ดังนั้นบทบาทของเชื้อเอ็นโดไฟต์จึงเป็น plant growth promoting bacteria (PGPB) ได้เป็นอย่างดี แต่อย่างไรก็ตามกลไกการตอบสนอง และการแสดงออกของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียจะแตกต่างกัน ตามความจำเพาะของพืชที่อาศัย โดยบางสายพันธุ์จะมีความจำเพาะต่อโฮสต์ บางสายพันธุ์สามารถเข้าอยู่อาศัยในพืชได้หลายชนิด (Long et al., 2008)

จากความสำคัญและความสามารถของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย จึงนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืชในเขตพื้นที่อนุรักษ์พันธุกรรมพืช เขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น (วิยะดา และศิริวรรณ, 2553) มาทดสอบความสามารถในการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อปฏิปักษ์ได้ดี (วิยะดา และคณะ, 2554) จากข้อมูลการศึกษาทำให้ทราบถึงคุณลักษณะเด่นของเชื้อในกลุ่มนี้ และเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์กับพืชในระดับกระถาง เรือนทดลอง หรือแปลงทดลองต่อไป จะเห็นได้ว่าจากความหลากหลายทางชีวภาพของป่า พืช และจุลินทรีย์ เป็นแหล่งทรัพยากรที่มีคุณค่า ควรนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งต่อชุมชนที่อาศัยในพื้นที่นั้นๆ และต่อสังคมเศรษฐกิจในด้านต่างๆ ดังนั้นในโครงการนี้มุ่งเน้นศึกษาประโยชน์ของเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียในด้านคุณลักษณะของเชื้อที่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืช

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 ศึกษาการผลิตสารชีวภาพที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ ความสามารถในการละลายฟอสเฟต การผลิตแอมโมเนีย เป็นต้น

2.2 ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ทนต่อความเป็นเกลือสูง ทนต่อโลหะ หรือสารพิษ เป็นต้น

3. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ได้สายพันธุ์เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่ผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช และได้ข้อมูลประเภทของสารชีวภาพที่เชื้อผลิตขึ้น

3.2 ได้ทราบคุณลักษณะของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อ

3.3 ได้ผลงานวิจัยที่นำไปเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการ หรือตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ความสำคัญของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช

จุลินทรีย์ก่อโรคในพืชเป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจ และความเสถียรของระบบนิเวศทั่วโลก ในหลายปีที่ผ่านมาพบความรุนแรงของการเกิดโรคมากขึ้นกับผลผลิตทางการเกษตร ทำให้มีการใช้สารเคมีในเกษตรกรรมมากขึ้น ซึ่งสารเคมีก่อให้เกิดผลกระทบเชิงลบ เช่น การพัฒนาการดื้อของเชื้อก่อโรคต่อสารเคมีที่ใช้ ผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมทั้งระบบ เช่น ดิน น้ำ อากาศ (Gerhardson, 2002) นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นในการใช้สารกำจัดศัตรูพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนา ส่งผลต่อเศรษฐกิจของประเทศ สูญเสียสมดุลทางการค้า และความต้องการของผู้บริโภคที่ต้องการอาหารที่ปราศจากสารกำจัดศัตรูพืช ทำให้อาหารเหล่านี้มีราคาสูง จึงควรมุ่งสนับสนุนการใช้สารชีวภาพทดแทนการใช้สารเคมีกับผลผลิตทางการเกษตรเหล่านี้ ปัจจุบันการควบคุมทางชีวภาพจึงได้รับความสนใจและเป็นทางเลือกเพื่อลดการใช้สารเคมีในการเกษตร (Compant et al., 2005) วรรณกรรมหลายเรื่องมีการอธิบายประสิทธิภาพการใช้แบคทีเรียร่วมกับพืช และสารที่แบคทีเรียผลิตออกมาเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช Plant growth-promoting bacteria (PGPB) พบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกัน ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของ PGPB ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจะอาศัยอยู่บริเวณผิวของราก และสามารถเกาะติดกับดินที่อยู่บริเวณรอบๆ รากพืชซึ่งเรียกว่า Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)

Gray และ Smith (2005) อธิบายไว้ว่า PGPR สามารถเข้าไปอาศัยภายในรากพืชได้เรียกกลุ่มนี้ว่า เอ็นโดไฟต์ คือกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถอาศัยภายในชั้นเนื้อเยื่อชั้นนอก (Cortex) จนไปถึงระบบท่อลำเลียง (Vasicular system) ตามลำดับ PGPR เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต ส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิต โดยแบคทีเรียสามารถผลิตฮอร์โมนบางชนิด ตรึงไนโตรเจนให้กับพืช สร้างสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคให้กับพืช ได้แก่ การผลิต siderophores เพื่อแย่งจับเหล็กไม่ให้เชื้อก่อโรคนำไปใช้ สังเคราะห์สารปฏิชีวนะ, เอนไซม์ หรือสารประกอบ fungicidal และยังสามารถละลายแร่ธาตุฟอสเฟต สารอาหารชนิดอื่นๆ ให้กับพืชได้ จะเห็นว่าเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟต์ สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนเริ่มต้นที่บริเวณรากของพืชแต่เชื้อเหล่านี้อาจจะสามารถเจริญเข้าไปได้ในส่วนอื่นๆ ที่นอกจากบริเวณรอบๆรากพืชได้ เช่น บริเวณผิวใบของพืช (Hallman et al., 1997) PGPR เป็นกลุ่มของแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ ส่วนใหญ่จะอยู่ในสกุล *Pseudomonas, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Burkholderia, Gluconacetobacter* และ *Serratia* เป็นต้น กลุ่ม PGPR สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. พวกที่มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืช หรือที่เรียกว่าความสัมพันธ์แบบ Symbiosis คือแบคทีเรียจำพวกที่สามารถเข้าสู่รากพืชแล้วเกิดกระบวนการต่างๆ ที่จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้

2. พวกที่อาศัยแบบอิสระในดิน (Free-living form) จะพบอยู่ใกล้ๆ บริเวณรากพืช โดยแบคทีเรียจำพวก PGPR นี้จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ช่วยให้ผลผลิตของพืชสูงขึ้น

2. กระบวนการกระตุ้นการเจริญเติบโตพืชของแบคทีเรียกลุ่ม PGRB

การกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ทำได้ 2 ทาง คือ โดยทางตรงและทางอ้อม ได้แก่

2.1 กระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยทางตรง

2.1.1 ช่วยย่อยธาตุฟอสฟอรัสในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ ทำให้พืชสามารถนำไปใช้ได้มากขึ้น ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยจะทำให้พืชมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแป้ง กระบวนการถ่ายทอดพันธุกรรม การตรึงไนโตรเจน การออกดอก การออกผลและเมล็ด และการสุกของผล เนื่องจากธาตุฟอสฟอรัสละลายได้ไม่ดี และมักจะอยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์แก่พืช พืชนำไปใช้ไม่ได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับ pH ของดิน และชนิดของดิน ในดินกรดจะมีออกไซด์อิสระและไฮดรอกไซด์ของพวก Al และ Fe ที่ตรึงฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปของ aluminum phosphate ($AlPO_4$) และ ferric phosphate ($FePO_4$) ในสภาพดินด่างฟอสฟอรัสจะถูกตรึงโดย Ca ทำให้เกิด calcium orthrophosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) สารประกอบเหล่านี้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้น้อย จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนรูปของธาตุอาหารต่างๆ ในดิน รวมทั้งมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนรูปฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (สุภาพร และคณะ, 2553)

2.1.2 สร้างปุ๋ยไนโตรเจนให้กับพืช ธาตุไนโตรเจนมีความสำคัญต่อพืชมาก จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถตรึงไนโตรเจน และเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย และไนเตรท ที่เป็นประโยชน์ต่อพืช จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะผลิตเอ็นไซม์ไนโตรจิเนส เพื่อช่วยเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนดังกล่าว และกรดอะมิโนที่พืชนำไปใช้ได้ (Raja et al., 2006)

2.1.3 ผลิตฮอร์โมนพืช (phytohormones) เช่น Auxin, Cytokinin, Gibberelin เป็นต้น การผลิตฮอร์โมนพืชโดย PGPB เป็นกลไกที่สำคัญในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของพืช โดยรายงานเกี่ยวกับการผลิต phytohormones จาก PGPB ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่บทบาทของกลุ่ม Auxins ได้แก่ indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ (cell elongation), การแบ่งเซลล์ (cell division) และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (cell differentiation) (Shahab et al., 2009; Weyens et al., 2009)

2.1.4 ช่วยลดความเข้มข้นของเอทธิลีน (Ethylene) ในพืช เนื่องจากเอทธิลีนเป็นฮอร์โมนพืชเพียงตัวเดียวที่อยู่ในรูปแก๊ส โดยพืชสร้างขึ้นเพื่อใช้ควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาการต่างๆ เช่น การออกดอก, การสุกของผล และมีผลต่อการเหลืองและการร่วงของใบด้วย ถ้าระดับของเอทธิลีนมีปริมาณที่สูงเกินไปก็จะสามารถยับยั้งการงอกและการยืดยาวของรากพืชได้ (Hardoim et al., 2008)

2.1.5 สามารถผลิตซิเดอร์โรฟอร์ (Siderophores) ธาตุเหล็กจัดเป็นธาตุอาหารที่มีปริมาณมากบนพื้นผิวโลก แต่โดยทั่วไปธาตุเหล็กอยู่ในรูปของสารประกอบที่ละลายน้ำได้ยาก หรือไม่สามารถละลายน้ำได้เลย ความสามารถในการละลายน้ำของเหล็กมีประมาณ 10^{-18} ที่ pH 7.4 ซึ่งปริมาณของการละลายได้นั้นไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ดังนั้นจากความต้องการเพื่อการอยู่รอด จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในดินจึงต้องผลิตสารที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อธาตุเหล็กสูง ซึ่งเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (0.5-1.5 กิโลดาลตัน) ที่เรียกว่า ซิเดอร์โรฟอร์ ขึ้นมา โดยนักวิทยาศาสตร์พบว่าในสภาพแวดล้อมที่ขาดธาตุเหล็ก หรือมีธาตุ

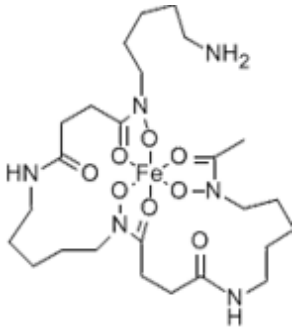
เหล็กในปริมาณน้อย จะกระตุ้นให้จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดมีการสร้างซิเดอร์โรฟอร์มากขึ้น ในทางกลับกันการสร้างจะถูกยับยั้งเมื่อในสภาพแวดล้อมที่มีปริมาณของธาตุเหล็กมากขึ้น ยกเว้นในกลุ่มของแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* ซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาพที่ไม่มีธาตุเหล็กอยู่เลย *Pseudomonas putida* สามารถผลิตซิเดอร์โรฟอร์ได้ในปริมาณมาก และมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในมะเขือเทศ บางรายงานกล่าวว่า mutant ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างซิเดอร์โรฟอร์ได้น้อยนั้น จะไม่สามารถป้องกันโรค damping off จากเชื้อรา *Phythium* ได้

ดังนั้นสารซิเดอร์โรฟอร์นี้ ช่วยนำธาตุเหล็กไปให้พืชใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น กลไกทั่วไปของการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์โดยโมเลกุลซิเดอร์โรฟอร์นั้น ประกอบไปด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอนคือ ขั้นแรกเริ่มจากแบคทีเรียสังเคราะห์โมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์ จากนั้นจึงแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกไปสู่สิ่งแวดล้อม ขั้นต่อมาซิเดอร์โรฟอร์เข้าจับกับธาตุเหล็ก เมื่อโมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์เข้าจับกับธาตุเหล็กแล้ว โมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์จะจับกับโปรตีนที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งทำหน้าที่เป็น receptor protein จากนั้นจะถูกขนย้ายผ่านเข้ามายังผนังเซลล์ โดยกระบวนการ active transport กล่าวคือ สาร ATP ที่ผนังเซลล์จะเป็นตัวกระตุ้นให้โปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มี ATP เกาะอยู่แล้ว ส่งผ่านพลังงานทำให้ธาตุเหล็กเข้าสู่ภายในส่วนของ cytoplasm ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับแต่ละชนิดของซิเดอร์โรฟอร์ว่ามีความจำเพาะเจาะจงต่างกันไปกับโปรตีนต่างๆ ที่ผนังเซลล์ เมื่อโมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์ที่จับธาตุเหล็กถูกนำผ่านเข้ามายังผนังเซลล์แล้ว ขั้นสุดท้ายคือ ธาตุเหล็กก็จะถูกปลดปล่อยออกจากโมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์โดยบริเวณโมเลกุลที่เป็น ligand ที่เชื่อมกับธาตุเหล็กจะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ esterase จะเข้าทำปฏิกิริยากับซิเดอร์โรฟอร์กลุ่ม entorebaccin หรือธาตุเหล็กอาจถูกปลดปล่อยโดยปฏิกิริยาเคมีแบบ reduction เมื่อธาตุเหล็กถูกปลดปล่อยออกจากโมเลกุลซิเดอร์โรฟอร์แล้ว ส่วนที่เป็นโมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์เอง อาจถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปจากเดิมหรือไม่ก็ได้ แล้วจึงถูกปลดปล่อยออกสู่นอกเซลล์ไปสู่สิ่งแวดล้อมเพื่อจับกับธาตุเหล็กต่อไป (Compant et al., 2005) อย่างไรก็ตามพืชบางชนิดสามารถเข้าจับและปลดปล่อยโมเลกุลเชิงซ้อนของเหล็กกับซิเดอร์โรฟอร์ และนำเหล็กไปใช้ได้ สารอาหารจากเหล็กเพิ่มขึ้นส่งผลให้การเจริญของพืชเพิ่มขึ้นด้วย (Bashan and de-Bashan, 2005) นอกจากนี้ยังเป็นการจำกัดปริมาณธาตุเหล็กที่เป็นประโยชน์ของเชื้อก่อโรคพืช ทำให้สามารถป้องกันการแพร่พันธุ์ และการขยายจำนวนของเชื้อก่อโรคพืชได้ โดยซิเดอร์โรฟอร์จะไปจับกับธาตุเหล็กที่อยู่บริเวณรอบๆ รากพืช ส่งผลให้เกิดการขาดธาตุเหล็กของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชไม่สามารถแพร่พันธุ์ได้นั่นเอง แต่พืชจะไม่ได้รับผลกระทบจากการลดลงของธาตุเหล็กในบริเวณนั้นเพราะว่า พืชสามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นของธาตุเหล็กต่ำๆ น้อยกว่า (ประมาณ 1000 เท่า) ของจุลินทรีย์

ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างซิเดอร์โรฟอร์

***Streptomyces* sp.** แบคทีเรียกลุ่มนี้จะสร้างซิเดอร์โรฟอร์จำพวกที่เรียกว่า Ferrioxamine ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของ diamines และ carboxylic acid (ดังภาพที่ 1) ปัจจุบันพบว่า Ferrioxamine มีด้วยกันทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ Ferrioxamine A_1, A_2, B, D_1, D_2, E, G, H และ I นอกจาก Ferrioxamine จะ

พบในแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* แล้วยังพบในสกุลอื่นๆ ด้วย เช่น *Arthrobacter, Chromobacterium, Pseudomonads* และ *Erwinia herbicola* เป็นต้น



ภาพที่ 1 โครงสร้าง ferrioxamine B

***Bacillus* sp.** แบคทีเรียในกลุ่มนี้ที่นิยมศึกษา ได้แก่ *Bacillus megaterium* ซึ่งสร้างซิเดอร์โรฟอร์ที่ชื่อ Schizokinen ส่วน *B. subtilis* นั้นสร้างซิเดอร์โรฟอร์ชื่อ DHB-glycine การนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์ด้วย Schizokinen พบว่ามีบทบาทร่วมกับซิเดอร์โรฟอร์กลุ่มอื่นด้วย เช่น Ferrioxamine และในขณะเดียวกัน DHB-glycine ก็มีบทบาทร่วมกับสารประกอบที่มีกลุ่มของ phenol ด้วย (Teaumroong and Boonkerd, 1996)

2.2 กระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยทางอ้อม

2.2.1 ช่วยในการควบคุมโรคพืช ทั้งโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช เช่น จักรพงษ์ และคณะ (2554) ได้ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium myriotylum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าในผักสลัดโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ ECO 008 และ SSWC 110 และ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC 021 และ SSMIX 023 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียเขตรากพืชที่แยกได้จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ ECO 008 ทำให้เส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* มีการเจริญที่บิดเบี้ยวผิดรูปไปจากเดิม ในขณะที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC 021 และ SSMIX 023 ทำให้เส้นใยของเชื้อ*P. myriotylum* มีการแตกแขนงอย่างผิดปกติ รวมทั้งพบการเคลื่อนที่ของ cytoplasm ที่ผิดปกติไปจากเดิม ส่งผลให้บริเวณส่วนปลายเส้นใยแตก

2.2.2 ผลิตสารปฏิชีวนะ (Antibiotic) ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชได้ ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย PGPB ได้แก่ agrocin 84, agrocin 434, 2,4-diacetylphloroglucinol, herbicolin, oomycin, phenazines, pyoluteorin, pyrrolnitrin เป็นต้น (Bashan and de-Bashan, 2005)

2.2.3 ผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เช่น chitinase, laminarinase, Q-1,3-glucanase, protease และ lipase เป็นต้น (Bashan and de-Bashan, 2005; Compant et al., 2005)

2.2.4 ผลิตสาร Antifungal metabolites เช่น *Pseudomonas fluorescens* สามารถสังเคราะห์ hydrogen cyanide ซึ่งทำให้ *Pseudomonas* สายพันธุ์นี้มีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดได้ ตัวอย่างเช่น สามารถยับยั้ง *Thielabiopsis basicola* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าดำในยาสูบได้ (Ramette et al., 2003) ในบางรายงานกล่าวว่า จุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์รวมทั้ง *Cladosporium werneckii*, *Pseudomonas cepacia* และ *P. solanacearum* สามารถย่อยสลายสารประกอบ fusaric acid ได้ ซึ่งสารประกอบ fusaric acid ตัวนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความเสียหายในพืชหลังจากที่พืชถูกเข้าทำลายโดย *Fusarium* (Ramamoorthy et al., 2001)

2.2.5 ช่วยให้พืชมีความทนทานในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เช่น

- ความเค็ม ทำให้สภาวะแวดล้อมในดินไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ทำให้ดินมีเนื้อแน่นทึบ รากพืชชอนไชยาก แร่ธาตุบางอย่างละลายออกมาจากดินจนเป็นพิษต่อพืช ผลของความเค็มทำให้พืชขาดน้ำ พืชต่างๆ ปรับตัวเข้ากับสภาพความเค็มได้ต่างกัน หากพืชที่ทนไม่ได้จะแสดงลักษณะอาการต่างๆ ดังนี้ การเจริญเติบโตลดลง ใบสีเข้มขึ้น ใบหนาขึ้น ปลายใบไหม้ ปลายใบม้วนงอ ผลผลิตลดลง และถ้าปรับตัวไม่ได้จะตายในที่สุด (วิชิตพล และคณะ, 2553) แบคทีเรียทนเค็มสามารถเจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือเนื่องจากว่าภายในเซลล์ของแบคทีเรียทนเค็มมีปริมาณความเข้มข้นของไอออนของเกลือต่ำ (Na^+และ K^+) ดังนั้นแบคทีเรียทนเค็มจึงต้องปรับสมดุลของสารละลายภายในเซลล์กับภายนอกเซลล์ โดยการนำไอออนของเกลือ (Na^+และ K^+) จากภายนอกเซลล์เข้ามาภายในเซลล์แล้วนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ (ศิริลักษณ์, 2553) ส่งผลให้ไอออนของเกลือในดินลดลง สภาวะแวดล้อมในดินเหมาะสมต่อการเจริญของพืชมากขึ้น

- ภาวะความเครียดจากการเกิดออกซิเดชัน (oxidative stress) โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำลายส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์ เยื่อเมมเบรน และกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน เป็นต้น การเพิ่มขึ้นของอนุพันธ์ออกซิเจนที่เป็นพิษนั้นเป็นผลจากการเกิดความเครียด ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตและปริมาณผลผลิตของพืชลดลง อย่างไรก็ตามไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นสามารถถูกกำจัดโดยเอนไซม์คะตาเลส (catalase) หรือเพอร์ออกซิเดส (peroxidase) ที่พบในเพอร์ออกซิโซมของเซลล์ใบพืช แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับพืชสามารถผลิตเอนไซม์คะตาเลสหรือเพอร์ออกซิเดสได้ก็จะสามารถช่วยพืชกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกจากเซลล์พืชได้ (นุชนาถ, 2554)

- ภาวะความเครียดจากโลหะหนัก (heavy metal stress) โลหะหนักจัดอยู่ในจำพวกธาตุที่พืชไม่ต้องการและเป็นสารพิษซึ่งปนเปื้อนในดิน ได้แก่ ตะกั่ว (Pb) สังกะสี (Zn) นิกเกิล (Ni) และแคดเมียม (Cd) เป็นต้น จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืชส่วนใหญ่สามารถช่วยลดปริมาณโลหะหนักได้ กระบวนการต่างๆ ของจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะคือ 1) กระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์สามารถใช้โลหะหนักบางประเภทเป็นสารอาหาร (micronutrients) กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อมีปริมาณโลหะหนักในระบบไม่มาก 2) กระบวนการดูดซับหรือดูดติดผิว (adsorption) บริเวณผนังเซลล์ (outer membrane) ของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการดูดติดผิวด้วยกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange) ระหว่างผนังเซลล์จุลินทรีย์กับประจุของโลหะหนัก แล้วทำการเปลี่ยนโลหะหนักชนิดนั้นๆ ให้อยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษลดลงด้วยกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (Khan et al., 2009; Ma

et al., 2011; Rajkumar et al., 2009) ตัวอย่าง Rajkumar และ Freitas (2008) ได้นำแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และ *Pseudomonas jessenii* ที่แยกได้จากดิน (serpentine soil) มาใช้ส่งเสริมการเจริญของต้นละหุ่งที่ปลูกในดินที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก ได้แก่ nickel, copper และ zinc พบว่า *Pseudomonas* sp. มีความสามารถในการละลาย zinc ได้ดีกว่า *Pseudomonas jessenii* ในขณะที่ *Pseudomonas jessenii* มีความสามารถในการละลาย nickel และ copper ได้ดีกว่า *Pseudomonas* sp. นอกจากนี้ต้นละหุ่งยังมีน้ำหนักรากและลำต้นเพิ่มขึ้นด้วย

3. ความสัมพันธ์ของการอาศัยอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียและพืช

3.1 แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับพืชกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช

ออกซินในพืชมีลักษณะทางเคมีเป็นสาร Indole-3-acetic acid หรือเรียกย่อๆ ว่า IAA โดยปกติพืชสังเคราะห์ IAA ที่ใบอ่อน จุดกำเนิดของใบ และเมล็ดซึ่งกำลังเจริญเติบโต นอกจากนี้แบคทีเรีย เชื้อรา และสาหร่ายบางชนิดก็สามารถสังเคราะห์ IAA ได้

3.1.1 การสังเคราะห์ Indole-3-acetic acid (IAA) โดยแบคทีเรีย

มีรายงานว่าแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับพืชบางชนิดสามารถสังเคราะห์ IAA และส่งออกมานอกเซลล์แบคทีเรีย แล้วพืชอาศัยสามารถนำ IAA นั้นไปใช้ในการช่วยการเจริญเติบโตได้ ซึ่งการสังเคราะห์ IAA ในแบคทีเรียนั้น มีกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Tryptophan) เป็นสารตั้งต้น (Precursor) ซึ่งแบคทีเรียจะมีกระบวนการผลิต 5 วิธี (ภาพที่ 2) ดังนี้ (Spaepen et al., 2007)

1. Indole-3-acetamide (IAM) pathway เป็นแนวทางที่ดีที่สุดที่พบในแบคทีเรีย มี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเอนไซม์ tryptophan-2-monooxygenase (IaaM) จะเปลี่ยนทริปโตเฟนเป็น IAM ขั้นที่สอง IAM จะเปลี่ยนเป็น IAA โดยเอนไซม์ IAM hydrolase (IaaH)

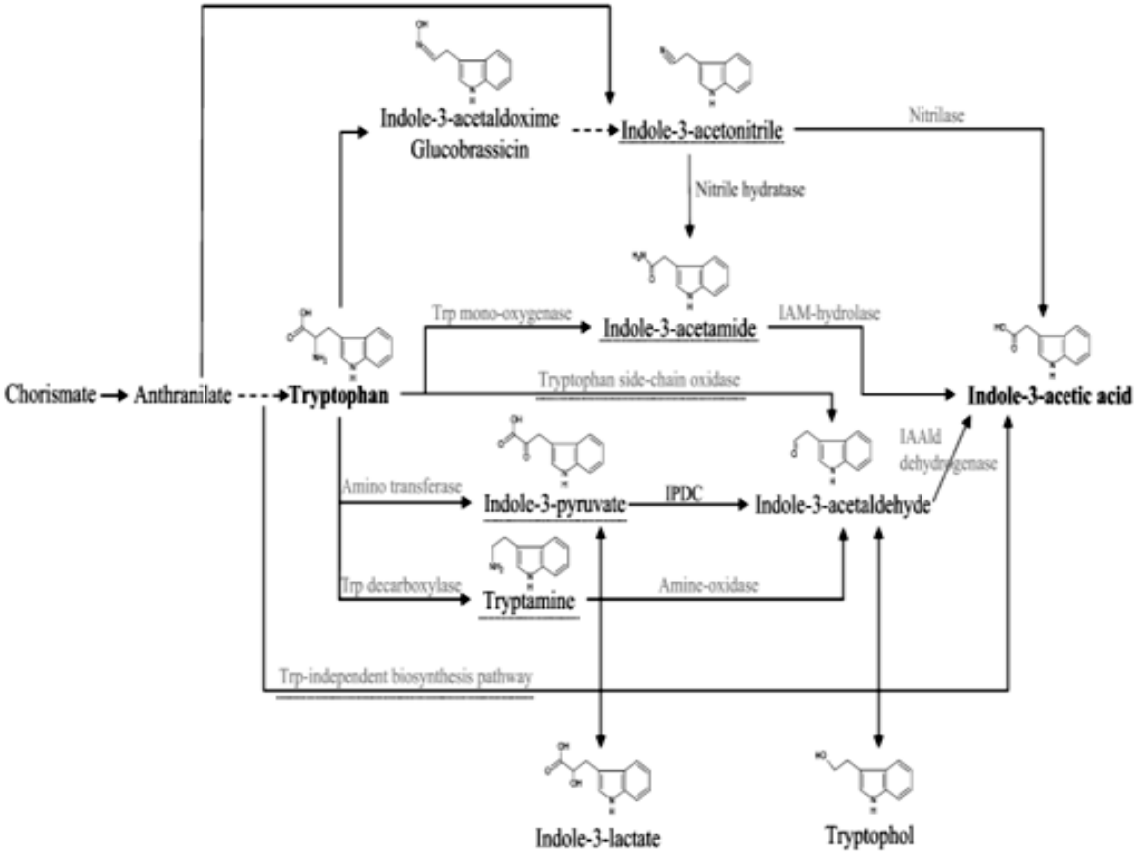
2. Indole-3-pyruvate (IPyA) pathway เป็นแนวทางหลักในการสังเคราะห์ IAA ในพืช โดยในแบคทีเรียจะใช้เอนไซม์ในการเปลี่ยนสารตั้งต้นต่างๆ แตกต่างไปจากพืช ขั้นแรกทริปโตเฟนจะเปลี่ยนเป็น IPyA โดยเอนไซม์ aminotransferase จากนั้น IPyA ถูกเปลี่ยนเป็น indole-3-acetaldehyde (IAAld) โดยเอนไซม์ indole-3-pyruvate decarboxylase (IPDC) และในขั้นสุดท้าย IAAld จะถูกออกซิไดซ์ได้เป็น IAA

3. Trypamine (TAM) pathway วิธีนี้พบได้ทั้งในพืชและในแบคทีเรีย โดยในแบคทีเรียใช้ทริปโตเฟนเปลี่ยนเป็น TAM โดยเอนไซม์ tryptophan decarboxylases จากนั้นขั้นสุดท้าย TAM จะเปลี่ยนเป็น IAAld โดยเอนไซม์ amine oxidase

4. Tryptophan side-chain oxidase (TSO) pathway พบในแบคทีเรีย *Pseudomonase fluorescens* CH10 โดยทริปโตเฟนจะเปลี่ยนเป็น IAAld และสามารถออกซิไดซ์ได้เป็น IAA

5. Indole-3-acetonitrile (IAN) pathway วิธีนี้ขั้นตอนสุดท้ายจะได้ IAN ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็น IAA โดยเอนไซม์ nitrilase แต่การเปลี่ยนทริปโตเฟนเป็น IAN ทำได้ 2 ทางคือ ผ่าน indole-3-acetaldoxime และ glucoblassicin นอกจากนี้ยังพบว่าพืชสามารถสังเคราะห์ IAN ได้โดยไม่ต้องใช้ tryptophan เป็นสารตั้งต้น แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถสังเคราะห์ IAA ได้โดยไม่ต้องใช้ทริปโตเฟน เป็น

สารตั้งต้น (Tryptophan-independent pathway) แต่ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดถึงกลไกหรือเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ IAA



ภาพที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์ IAA จากแบคทีเรีย (Spaepen et al., 2007)

3.1.2 การตอบสนองของพืชต่อ IAA

1. การตอบสนองในระดับเซลล์ IAA ทำให้เกิดการขยายตัวของเซลล์ (Cell enlargement) โดยกระตุ้นให้เซลล์สร้างผนังเซลล์มากขึ้น เช่น ทำให้เกิดการขยายตัวของใบ การยืดยาวของราก นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้ในบางกรณี เช่น กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเยื่อเจริญ (cambium) กระตุ้นให้เกิดท่อน้ำและท่ออาหาร กระตุ้นให้เกิดรากจากการปักชำพืช แล้วยังกระตุ้นให้เกิดแคลลัส (Callus) ในการเพาะเลี้ยง

2. การตอบสนองของอวัยวะหรือพืชทั้งต้น เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของพืชต่อแสงหรือแรงโน้มถ่วง การติดผล ป้องกันการร่วงของผลและใบ ควบคุมการออกดอกของพืชปกติ

3.1.3 การตอบสนองของแบคทีเรียต่อ IAA

IAA เป็นสารที่แบคทีเรียผลิตแล้วส่งออกมานอกเซลล์ พบว่า IAA เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ (signaling molecule) ระหว่างพืชและแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับพืช เพื่อให้พืชและแบคทีเรียอยู่ร่วมกันและส่งเสริมซึ่งกันและกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า IAA ช่วยให้แบคทีเรียทนต่อสภาวะไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ เช่น การศึกษาของ Bianco et al. (2006) ได้ศึกษาใน *Escherichia coli* K-12 โดยการส่งถ่ายยีนที่ผลิตสาร IAA

พบว่าเซลล์ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนสามารถตอบสนองในสภาวะไม่เหมาะสม ได้แก่ ความร้อน ความเย็น รังสียูวี แรงดันออสโมติก ความเป็นกรด และภาวะออกซิเดทีฟ และสารที่เป็นพิษต่อแบคทีเรีย เช่น สารปฏิชีวนะ และสารชะล้าง (detergent) เป็นต้น โดยการผลิต trehalose, lipopolysaccharide (LPS), exopolysaccharide (EPS) และสร้างไบโอฟิล์ม เป็นการยืนยันว่า IAA สามารถเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของแบคทีเรีย

3.2 แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับพืชกับการต่อต้านเชื้อปฏิปักษ์ให้แก่พืชเจ้าบ้าน

ปัจจุบันมีการค้นคว้าหาวิธีการควบคุมโรคพืชใหม่ๆ เพื่อลดปัญหาอันตรายจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่เพิ่มขึ้น โดยส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาใช้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับว่าใช้ได้ผลดี มีการศึกษากลไกการควบคุมโรค และระบบการควบคุมโรคโดยวิธีต่างๆ โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา เชื้อแบคทีเรียมักเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรคพืชโดยการแก่งแย่งอาหาร การยับยั้ง ทำลาย และการเป็นปรสิต งานวิจัยด้านการควบคุมโรคโดยชีววิธีส่วนใหญ่มักจะเน้นการศึกษาการควบคุมโรคที่ทำลายส่วนของพืชที่อยู่ใต้ดินมากกว่าเชื้อโรคที่เข้าทำลายส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงในการนำไปเป็นกลยุทธ์ในการป้องกันกำจัดโรค เพราะใช้ได้ผลดีจนถึงขั้นทำในระดับการค้า ในธรรมชาติมีเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืช ที่เรียกว่า เชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) ซึ่งมีกลไกควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้ 4 ลักษณะ คือ

3.2.1 การแข่งขัน (competition)

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีความสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่างๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโต หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ พืชจะเจริญเติบโตแข็งแรง มีผลผลิต สูงขึ้น การแข่งขันที่พบมากคือ การนำเอาธาตุอาหารหรือสารต่างๆ ที่มีอยู่ในดินหรือในสภาพแวดล้อมนั้นมาใช้ประโยชน์ในการเติบโต ทำให้เชื้อโรคขาดสาร ไม่สามารถเจริญเติบโตเข้าทำลายพืช เช่น เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* จะผลิตสาร siderophore ช่วยในการจับยึดธาตุเหล็กในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ทำให้เชื้อรานี้ไม่สามารถทำลายรากของข้าวสาลี ช่วยให้ข้าวสาลีเจริญเป็นปกติ และให้ผลผลิตดีขึ้น

3.2.2 การทำลายชีวิต (antibiosis)

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจคัดเลือกมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้น จะเน้นคุณสมบัติการทำลายชีวิตของเชื้อโรคเป็นส่วนใหญ่ โดยเชื้อปฏิปักษ์นี้มีความสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนี้สำเร็จเป็นครั้งแรกโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 ผลิตสารแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ที่มีชื่อว่า agrocin 84 ไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* biotype 1 และ 2 สาเหตุโรค crown gall ของพืชได้

3.2.3 การเป็นปรสิต (parasitism)

เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (parasite) เข้าไปเจริญอาศัย ทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบได้ไม่มากนัก การใช้ควบคุมโรคพืชยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนปฏิกิริยาแบบการทำลายชีวิต เช่น *Erwinia*

urediniolytica เข้าทำลาย pedicel ของสปอร์เชื้อราสนิม หรือเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม

3.2.4 การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance)

เป็นอีกกลไกที่น่าศึกษา เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา หรือแบคทีเรีย โดยเฉพาะพวกที่เคยเป็นเชื้อโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคแล้ว สามารถจะชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น การเกิดกลายพันธุ์ในยีนเดียวของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพืชพวกแตง จะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะเจริญอยู่ในพืช ช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิมได้ หรือในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรงที่มีชีวิตอยู่ สามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine ปลดปล่อยออกมาที่บริเวณราก ทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *P. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้

3.3 การใช้กลุ่มจุลินทรีย์ (microbial consortium) ในการส่งเสริมการเจริญและต่อต้านเชื้อปฏิปักษ์

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืช แต่ข้อจำกัดที่สำคัญอย่างหนึ่งของวิธีนี้คือ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ควบคุมโรคให้กับพืชมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ทำให้กลไกการยับยั้งเกิดขึ้นได้ไม่เต็มที่ อาจส่งผลให้จุลินทรีย์ปลดปล่อยสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรค (biocontrol agents) ออกมาได้น้อยเมื่อสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนไป ทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชลดลง การใช้กลุ่มจุลินทรีย์หรือจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกันจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการปรับปรุงข้อจำกัดนี้ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช (Dunne et al., 1998)

Kannan and Sureendar (2009) ได้ทดลองใช้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีแทนการใช้สารเคมี นอกจากจะเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมแล้วยังช่วยปรับปรุงดินและพืชในดินด้วย การทดลองนี้ใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่คัดแยกจากต้น *Santalum album, Tamarindus indica* และ *Alilanthus* โดยอาศัยคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชจำนวน 5 สายพันธุ์ นำกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้มาทดสอบดังนี้ การละลายฟอสเฟต (phosphate solubilizer) บนอาหาร Pikovskaya's agar, การตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixer) โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase), การย่อยสลายสารอินทรีย์ (heterotrophic member), การสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชที่ช่วยเร่งการเจริญ (growth hormone producer) โดยการวัดระดับการสังเคราะห์ IAA และการต้านเชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) ได้แก่ *Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* และ *Alternaria* sp. โดยวิธี dual-plate assay และ cross-streaking technique พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์สามารถส่งเสริมการเจริญของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill) ซึ่งเป็นพืชอาศัยที่ใช้ทดสอบได้เป็นอย่างดี และพืชยังสามารถต้านทานต่อเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* แสดงให้เห็นว่าการใช้กลุ่มจุลินทรีย์ PGPR ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญและการควบคุมโรคให้กับพืชอาศัย

Raja et al. (2006) ศึกษาผลของจุลินทรีย์เดี่ยวแต่ละชนิดและกลุ่มจุลินทรีย์ ได้แก่ *Azospirillum lipoferum*-Az 204, *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* และ *Pseudomonas fluorescens* Pf-1 ต่อการขยายรากและการเจริญของต้นข้าวภายใต้สภาวะการปลูกแบบ hydroponic ซึ่งสิ่งที่สนใจศึกษาคือ total sugar, reducing sugar, amino nitrogen content, plant growth promoting substances ภายในรากพืช และความสามารถในการตรึงไนโตรเจน จากการศึกษานี้พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์มีความสำคัญในการช่วยเพิ่มการเจริญของพืชได้ดีกว่าจุลินทรีย์เดี่ยวแต่ละชนิด จึงเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้

แต่อย่างไรก็ตามในการนำไปใช้ประโยชน์จริงในเกษตรกรรมต่างๆ ควรมีการศึกษาผลกระทบที่จะเกิดขึ้นกับสิ่งแวดล้อม ผลกระทบต่อระบบนิเวศวิทยา การควบคุมปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ ซึ่งควรมีการศึกษาการก่อให้เกิดโรคกับสิ่งมีชีวิตด้วย ซึ่งรายงานวิจัยในด้านนี้ไม่ค่อยพบ หรือมีรายงานน้อย อาจเนื่องจากการทดลองส่วนใหญ่ทำเพียงแค่ในเรือนทดลองปลูกเท่านั้น ยังไม่ได้ดำเนินการในพื้นที่จริง ดังนั้นควรคำนึงถึงผลกระทบในด้านต่างๆ ก่อนนำไปใช้จริง

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. สายพันธุ์เอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ

เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย จำนวน 20 ไอโซเลต ได้แก่ UD15, 25, 41, 44, 50, 57, 66, 136, 169, 205, 247, 270, 288, 292, 306, 317, 343, 392, 405 และ 412 ซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์คัดแยกได้จากพืชในบริเวณเขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น เก็บไว้ใน 20% glycerol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำมาเลี้ยงบนอาหาร NA เพื่อนำมาใช้ศึกษาในการโครงการนี้

2. ศึกษาคุณสมบัติด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

2.1 ทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส (Amylase activity)

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตไปเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth บ่มเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแต่ละไอโซเลตปริมาตร 10µl มาหยดลงบนอาหาร starch agar นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแต่ละจานอาหารมาเททับด้วยสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ประมาณ 15-30 นาที เทสารละลายไอโอดีนออก สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีการสร้างเอนไซม์อะไมเลสก็จะเกิดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อ

2.2 ทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilization)

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตไปเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth บ่มเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแต่ละไอโซเลตปริมาตร 10 µl มาหยดลงบนอาหาร Pikovskaya’s agar (Himedia) นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีการละลายฟอสเฟตก็จะเกิดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อ

2.3 ทดสอบการผลิตแอมโมเนีย (Ammonia production)

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตไปเลี้ยงใน sterile peptone broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยด Nessler’s reagent ลงไปในหลอดทดลอง สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีการผลิตแอมโมเนียในหลอดทดลองก็จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

2.4 ทดสอบการผลิตอะซีโตอิน (Acetoin production)

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตไปเลี้ยงในอาหาร MR-VP broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ปิเปตเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย α-naphthol (5%) ใน absolute ethanol และเติม 40% KOH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีการผลิตอะซีโตอินในหลอดทดลองก็จะเปลี่ยนเป็นสีแดง

2.5 ทดสอบการผลิตอินโดลอะซีติกแอซิด (Indole acetic acid)

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตไปเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ที่มี 3 mg/ml ของ L-tryptophan นำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บเอาส่วนใส 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Salkowski's reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีการผลิต IAA ในหลอดทดลองก็จะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือสีแดง ถ้าเชื้อไอโซเลตใดให้ผลบวก นำมาวัดปริมาณการสร้างอินโดลอะซีติกแอซิด นำส่วนใสของเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ที่มี 3 mg/ml ของ L-tryptophan ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PC ($FeCl_3/H_2SO_4$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร

3. ศึกษาคุณสมบัติด้านการทนต่อสภาวะต่างๆ

3.1 ทดสอบการทนต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตไปเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม 30% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไป 500 µl บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ปิเปตสารละลายเชื้อ 10 µl หยดลงบนอาหาร Nutrient agar แล้วนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีจุลินทรีย์เจริญบริเวณที่หยดสารละลายเชื้อไว้ แสดงว่าเชื้อสามารถทนต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้

3.2 ทดสอบการทนต่อเกลือ (NaCl)

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตไปเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth บ่มเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแต่ละไอโซเลตปริมาตร 10 µl มาหยดลงบนอาหาร Nutrient agar ที่มี 3% NaCl นำจานอาหารไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีจุลินทรีย์เจริญบริเวณที่ใส่เชื้อไว้ แสดงว่าเชื้อสามารถทนต่อเกลือได้

3.3 ทดสอบการทนต่อโลหะหนัก

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตไปเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth บ่มเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแต่ละไอโซเลตปริมาตร 10 µl มาหยดลงบนอาหาร Nutrient agar ที่มี 1 mM ของโลหะหนักแต่ละชนิด ได้แก่ ferric chloride ($FeCl_3$), mercury chloride ($HgCl_2$), copper sulfate ($CuSO_4$), zing sulfate ($ZnSO_4$), manganese sulfate ($MnSO_4$), nikel sulfate ($NiSO_4$), aluminium sulfate ($AlSO_4$), silver sulfate ($AgSO_4$), cobalt sulfate ($CoSO_4$), cadmium sulfate ($CdSO_4$) และ lead nitrate ($Pb(NO_3)_2$) นำจานอาหารไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีจุลินทรีย์เจริญบริเวณที่ใส่เชื้อไว้ แสดงว่าเชื้อสามารถทนต่อโลหะหนักชนิดนั้นได้

4. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

4.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคพืช

แบคทีเรียก่อโรคพืชที่ใช้ทดสอบคือ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* โดยเลี้ยงในอาหาร LB บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ swab เชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืชที่เตรียมเป็นสารละลายแขวนลอยที่ปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 MacFarland ลงบนผิวหน้าอาหาร Nutrient agar จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาเจาะเป็นหลุม สำหรับการเตรียมเชื้อที่จะทดสอบการผลิตสารออกฤทธิ์แต่ละ ไอโซเลตโดยเลี้ยงในอาหาร LB บ่มเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 10 นาที เก็บส่วนใสมากรองผ่านฟิลเตอร์ขนาด 0.45 µm จากนั้นนำส่วนใสที่ผ่านการกรองไปทดสอบ โดยปิเปตปริมาตร 50 µl มาใส่ในหลุมที่เจาะเตรียมไว้ เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่เชื้อ นำจานอาหารไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงและวัดขนาดโซนใสที่เกิดขึ้น

4.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืช

ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion โดยวางชิ้นวุ้นของเชื้อราที่ใช้ทดสอบคือ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* และ *Sclerotium rolfsii* Sacc. ไว้ตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหาร potato dextrose agar นำจานอาหารไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ cork borer มาเจาะเป็นหลุมรอบเชื้อรา โดยให้แต่ละจุดมีระยะห่างจากเชื้อราเท่าๆ กัน เตรียมเชื้อที่จะทดสอบการผลิตสารออกฤทธิ์แต่ละไอโซเลตโดยเลี้ยงในอาหาร LB บ่มเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 10 นาที เก็บส่วนใสไปทดสอบ โดยปิเปตปริมาตร 50 µl ใส่ในหลุมที่เตรียมไว้ เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแต่เชื้อราเจริญอยู่ นำจานอาหารไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงและวัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนจานอาหารทดสอบ (Fungal growth) และอาหารควบคุม (Control growth) จากนั้นนำมาหาค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \left\{1 - \left(\frac{\text{Fungal growth}}{\text{Control growth}}\right) \times 100\right\}$$

5. ทดสอบการย่อยสลายสารประกอบกลุ่มที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตในอาหาร Nutrient broth บ่มเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ จากนั้นย้ายเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร Minimal medium ที่มี polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ชนิดต่างๆ ได้แก่ pyrogallol, sodium benzoate, phenanthrene, p-chlorophenol, toluene ที่มีความเข้มข้น 400 µM เปรียบเทียบการเจริญในอาหาร

Minimal medium ที่มีกลูโคสอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาวัด OD ที่ 600 nm ในช่วงเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสาร indole acetic acid (IAA)

เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารอินโดลอะซีติกแอซิด นำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตสารชีวภาพ โดยทดสอบดังนี้

6.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตสาร IAA ของไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพ

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth บ่มเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ จากนั้นย้ายมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ที่มี L-tryptophan (3 mg/ml) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 600 นาโนเมตร และวัดกิจกรรมของการผลิตสาร IAA โดยเก็บเอาส่วนใส 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

6.2 ศึกษาปริมาณของทริปโตแฟนที่เหมาะสมต่อการสร้างสาร IAA

ทดสอบผลของ L-tryptophan ต่อการผลิตสาร indole acetic acid (IAA) โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ที่มีปริมาณ L-tryptophan ต่างกัน ดังนี้ 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15 mg/ml บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง ครั้งละ 2 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บเอาส่วนใส 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

6.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth บ่มเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ จากนั้นย้ายเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ที่มี L-tryptophan ในปริมาณที่เหมาะสมปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะต่างกันดังนี้ บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 600 นาโนเมตร และวัดกิจกรรมของการผลิตสาร IAA โดยเก็บเอาส่วนใส 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกสายพันธุ์เอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีมาทดสอบ

เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียทำการคัดแยก และเก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมด จำนวน 401 ไอโซเลต จากพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ในเขตเขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น ซึ่งเชื้อทั้งหมดนำมาทดสอบการผลิตสารชีวภาพในด้านสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อปฏิปักษ์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งและให้ผลชัดเจน จำนวน 41 ไอโซเลต โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albican* ได้อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ จึงทดสอบสารสกัดหยาบของเชื้อทั้งหมด โดยทำการสกัดสารชีวภาพด้วยตัวทำละลายเอธิลอะซีเตต พบว่าไอโซเลตที่ให้สารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพดี จำนวน 10 ไอโซเลต นอกจากนี้เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปส และ โปรติเอสอีกด้วย พบว่าบางไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส และโปรติเอสได้ (วิยะดา และคณะ, 2554) ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์นำมาศึกษาในงานวิจัย จึงทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพดีทั้งในด้านการผลิตสารออกฤทธิ์ และการผลิตเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งสรุปกิจกรรมของไอโซเลตต่างๆ จำนวน 20 ไอโซเลต เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชต่อไป (ตารางที่ 1)

2. ทดสอบความสามารถในการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช

เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่คัดเลือกมา จำนวน 20 ไอโซเลต นำมาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเชื้อลงบนอาหาร Pikovskayas agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ จะเกิดบริเวณใสขึ้นรอบๆ โคโลนี (ภาพที่ 3) จำนวน 12 ไอโซเลต (ตารางที่ 2) ซึ่งจะมีขนาดของโซนใสใกล้เคียงกัน แต่ที่เด่นที่สุด คือ UD41 และ UD205 ส่วนความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ได้แก่ โปรตีนต่างๆ ซากพืช ซากสัตว์ เพื่อให้เกิดแอมโมเนียหรือแอมโมเนียม ซึ่งพืชหรือจุลินทรีย์อื่นสามารถนำไปใช้ได้ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ จึงทำการทดสอบโดยใช้อาหาร 4% peptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาการบ่มเชื้อ นำมาทำปฏิกิริยากับ Nessler's reagent จะปรากฏสีเหลืองเกิดขึ้น (ภาพที่ 4) แสดงว่าเชื้อมีการใช้เปปโตน เปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนีย โดยไอโซเลตที่ให้ผลชัดเจน ได้แก่ UD247 และ UD343

การผลิตอะซีโทอิน (Acetoin) ซึ่งเป็นสารระเหย (volatile compound) ที่พืชใช้เป็นฟีโรโมน และพบผลิตจากเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* sp. จัดเป็นสาร plant growth promoter โดยทดสอบเลี้ยงเชื้อในอาหาร MR-VP หลังจากบ่มให้เชื้อเจริญแล้ว นำมาทำปฏิกิริยากับ 5% α-naphthol และ 40% KOH จะปรากฏเป็นสีแดงขึ้น (ภาพที่ 5) ซึ่งเชื้อจำนวน 15 ไอโซเลต สามารถผลิตอะซีโทอินได้ (ตารางที่ 2) ส่วนการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการงอกของเมล็ดพืช โดยพืชจะผลิตจิบเบอร์เรลลิน (Gibberellins) มากระตุ้น

ตารางที่ 1 สรุปประสิทธิภาพของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่คัดเลือกมาใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งเป็นไอโซเลตที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรค และผลิตเอนไซม์บางชนิดได้

ลำดับที่	ไอโซเลต (UD)	Esterase enzyme	Lipase enzyme	Protease enzyme	Antimicrobial activity*
1	15	+2	+3	-	ND
2	25	-	+1	+3	E, B
3	41	-	+1	-	E, B
4	44	+3	+1	+2	ND
5	50	-	+3	+2	E, S
6	57	+1	-	+2	S, C
7	66	-	-	+2	E, C
8	136	+1	-	+2	P, C
9	169	-	-	+3	P
10	205	-	-	+1	B, C
11	247	-	+3	-	ND
12	270	+2	+3	+1	ND
13	288	-	+3	+2	ND
14	292	+2	+4	+1	ND
15	306	-	+1	+2	P, C
16	317	+2	+2	+3	ND
17	343	+3	+2	+1	ND
18	392	+3	-	-	ND
19	405	+2	+3	+1	ND
20	412	-	+2	+1	E, B

หมายเหตุ +1 คือ ความกว้างของ halo/clear zone ที่เกิดขึ้นขนาด 0.1-0.9 เซนติเมตร

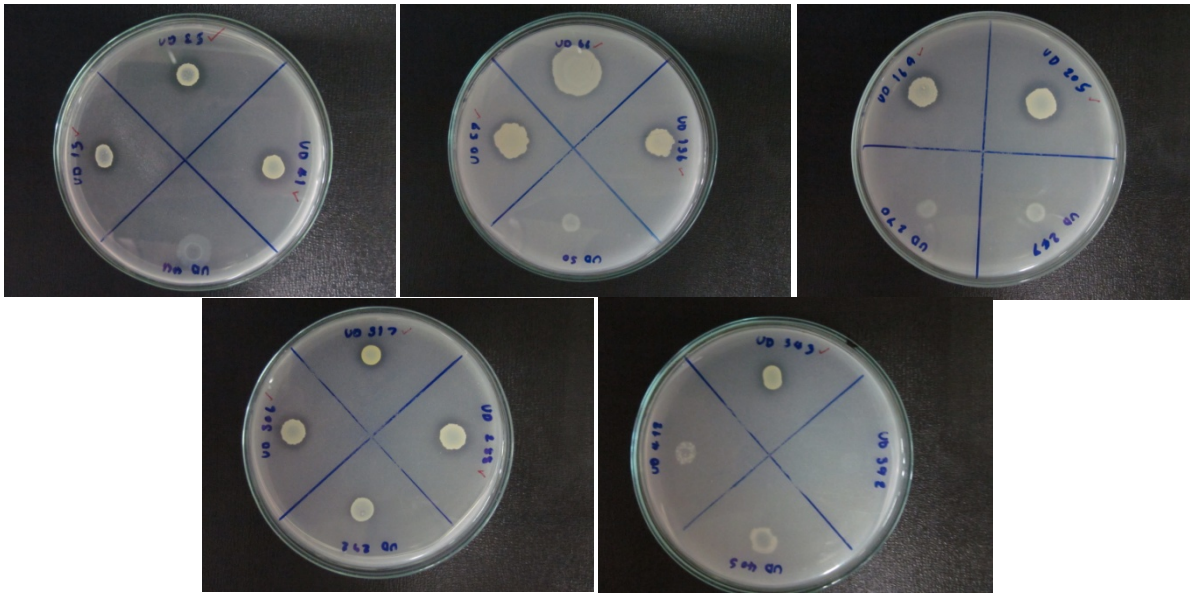
+2 คือ ความกว้างของ halo/clear zone ที่เกิดขึ้นขนาด 1.1-1.9 เซนติเมตร

+3 คือ ความกว้างของ halo/clear zone ที่เกิดขึ้นขนาด 2.1-2.9 เซนติเมตร

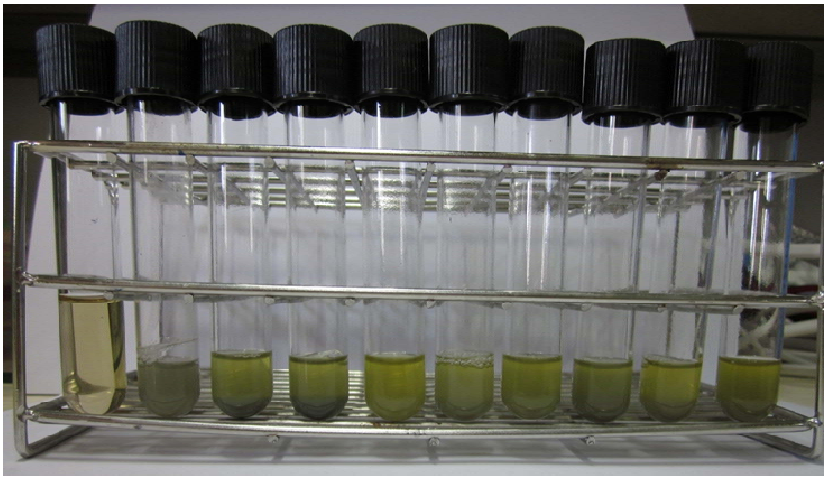
+4 คือ ความกว้างของ halo/clear zone ที่เกิดขึ้นขนาด 3.1-3.9 เซนติเมตร

- คือ ไม่มีความกว้างของ halo/clear zone เกิดขึ้นบริเวณรอบโคโลนี

* คือฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ E = *E. coli*, B = *B. cereus*, S = *S. aureus*, P = *P. aeruginosa*, C = *C. albican*, ND = ไม่ได้ทดสอบในรูปสารสกัดหยาบ



ภาพที่ 3 เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร Pikovskayas agar ทั้ง 20 ไอโซเลต พบบางไอโซเลตสามารถละลายฟอสเฟตจากอาหารได้เกิดเป็นบริเวณใสรอบๆ โคโลนี



ภาพที่ 4 การทดสอบการผลิตแอมโมเนียในอาหาร peptone broth โดยไอโซเลตที่มีการใช้เปปโตนแล้วเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย จะเกิดสีเหลืองเกิดขึ้น ได้แก่ UD 25, UD 41, UD 50, UD 66, UD 136, UD 205, UD 288 และ UD 306 (หลอดที่ 3 จากซ้ายไปขวาตามลำดับ) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการใส่เชื้อ (หลอดที่ 1) และอาหารเลี้ยงเชื้อทำปฏิกิริยากับ Nessler's reagent ไม่เกิดสีเหลือง (หลอดที่ 2)

ตารางที่ 2 การผลิตสารชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย

ลำดับที่	ไอโซเลต	Phosphate solubilization (mm)*	Ammonia production	Acetoin	Amylases
1	UD 15	1.13	-	+2	+4
2	UD 25	1.15	+1	+2	+3
3	UD 41	2.0	+1	+2	+3
4	UD 44	-	+1	-	-
5	UD 50	-	+1	-	+2
6	UD 57	1.38	+1	+2	+3
7	UD 66	0.63	-	+2	+3
8	UD 136	1.25	-	+2	+4
9	UD 169	1.38	-	+1	+3
10	UD 205	2.0	+1	+2	+4
11	UD 247	-	+2	-	-
12	UD 270	-	-	-	-
13	UD 288	1.25	+1	+2	+3
14	UD 292	-	-	+2	+4
15	UD 306	1.25	-	+2	+2
16	UD 317	1.38	+1	+2	-
17	UD 343	0.88	+2	+2	-
18	UD 392	-	-	-	-
19	UD 405	-	-	+1	+2
20	UD 412	-	-	+1	+2

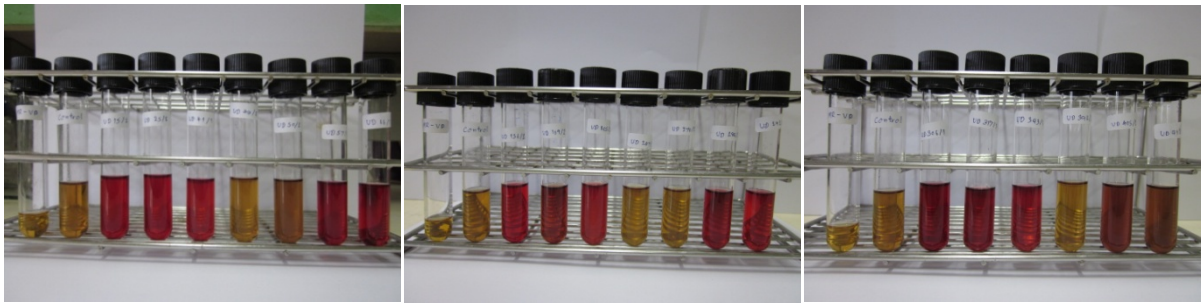
หมายเหตุ +1 คือ การเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ทดสอบ พบน้อย

+2 คือ การเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ทดสอบ พบปานกลาง

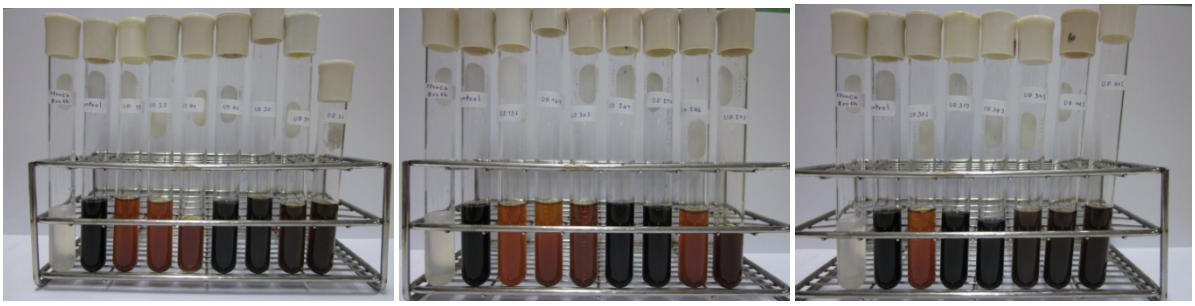
+3 คือ การเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ทดสอบ พบมาก

+4 คือ การเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ทดสอบ พบมากที่สุด

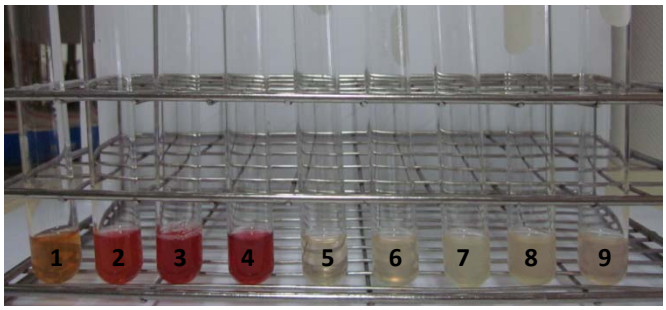
* หมายถึง ขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ โคโลนี



ภาพที่ 5 เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลต ทดสอบการผลิตอะซีโทอินในอาหาร MR-VP เมื่อทำปฏิกิริยากับ 5% α-naphthol และ 40% KOH ไอโซเลตที่สามารถผลิตสารอะซีโทอิน เกิดปฏิกิริยาเป็นสีแดง ในขณะที่หลอดที่มีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำปฏิกิริยายังคงมีสีเหลืองเหมือนเดิม (หลอดที่ 1 และ 2)



ภาพที่ 6 เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลตที่ทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยไอโซเลตที่สามารถย่อยแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีน เกิดสีจางลงจากหลอดควบคุมที่มีสีน้ำเงินเข้ม (หลอดที่ 2) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแป้งเป็นองค์ประกอบเป็นหลอดเปรียบเทียบ (หลอดที่ 1)



ภาพที่ 7 การทดสอบการผลิตอินโดลอะซีติกแอซิด โดยปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกจะเกิดสีแดงขึ้น ซึ่งทดสอบในอาหาร NB ที่มีทริปโตแฟนเป็นส่วนประกอบ ของไอโซเลต UD205, UD44, UD247 และ UD270 (1-4) ตามลำดับ และในอาหาร NB ของไอโซเลตต่างๆ (6-9) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทริปโตแฟนแต่ไม่มีเชื้อเป็นหลอดควบคุม (5)

ให้มีการสร้างเอนไซม์อะไมเลสมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ใช้เป็นพลังงานในการเจริญเติบโตของต้นอ่อน โดยทดสอบเลี้ยงเชื้อในอาหาร 1% soluble starch บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน เชื้อที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส จะย่อยแป้งในอาหาร ทำให้สีที่เกิดขึ้นจางลง (ภาพที่ 6) พบว่าค่าผลทดสอบเป็น +3 และ +4 เป็นจำนวนมากถึง 10 ไอโซเลต จากจำนวน 14 ไอโซเลตที่ให้ผลบวก (ตารางที่ 2) ส่วนปัจจัยสุดท้ายที่ทดสอบการผลิตสารเร่งการเจริญของพืชนั้น คือ การทดสอบการสร้างสารอินโดลอะซีติกแอซิด โดยทดสอบเบื้องต้นกับเชื้อทั้ง 20 ไอโซเลต ด้วยปฏิกิริยาการสร้างอินโดลกับสาร Kovac's reagent เมื่อทำปฏิกิริยาเกิดสีแดงขึ้นบนผิวหน้าอาหาร แสดงว่ามีสารในกลุ่มอินโดล ซึ่งพบเพียง 6 ไอโซเลต เท่านั้นที่มีการสร้าง ได้แก่ UD44, UD50, UD247, UD270, UD392 และ UD412 โดยที่ไอโซเลต UD44, UD247 และ UD270 ที่ให้ผลชัดเจน จึงนำ 3 ไอโซเลตดังกล่าว มาทดสอบปฏิกิริยาการสร้างกรดอินโดลอะซีติกแอซิดที่จำเพาะ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB และ NB ที่มีทริปโตแฟนเป็นส่วนประกอบ ปรากฏว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถผลิตกรดอินโดลอะซีติกแอซิดได้ดี เฉพาะในอาหารที่มีทริปโตแฟนเป็นส่วนประกอบเท่านั้น โดยเปรียบเทียบกับไอโซเลต UD205 ซึ่งใช้เป็น negative control พบปฏิกิริยาเป็นสีส้ม ไม่ชัดเจน (ภาพที่ 7)

3. ทดสอบสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย

เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียอาศัยอยู่ร่วมกับพืช หากเชื้อสามารถเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสม หรือสภาวะเครียดได้ อาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชที่ดีขึ้นด้วย จากการทดลองทดสอบการเจริญบนอาหารที่มี 3% NaCl หลังจากการบ่มเชื้อ พบว่าเชื้อทั้งหมด 20 ไอโซเลต สามารถเจริญเติบโตได้ (ภาคผนวก ก) โดยพบโคโลนีเกิดขึ้นตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรก นอกจากนี้การทดสอบการทนต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็น oxidative stress เป็นสารพิษที่ทำลายเซลล์ โดยเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน และไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ทำให้เซลล์ถูกทำลาย สารนี้ยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม toxic reactive oxygen ที่มีผลต่อเซลล์เมมเบรน โปรตีน และดีเอ็นเอ หากพืชได้รับสารในกลุ่มนี้ โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะมีผลทำลายการรับรู้ของส่วนใบพืช (leaf senescence) ส่งผลต่อเมตาบอลิซึมและการกระตุ้นต่างๆ พืชมีกลไกในการตอบสนองสารกลุ่มนี้เช่นเดียวกัน ดังนั้นหากเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย มีกลไกการกำจัดสารดังกล่าว ก็จะเป็นผลดีต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียเอง และพืชสามารถคงคุณสมบัติการกระตุ้นจากใบได้ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชเช่นกัน จากการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว แล้วเติมสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3%) ลงไปในหลอด บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบเกิดปฏิกิริยาฟองก๊าซหรืออากาศเกิดขึ้น เกิดความร้อนโดยหลอดทดลองร้อน (ภาคผนวก ก) แต่ละไอโซเลตมีปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน สรุปได้ดังตารางที่ 3 หลังจากบ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้ว ทำการย้ายเชื้อด้วยลูปมาลงบนอาหาร NA นำไปบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ปรากฏว่ามีเพียง 2 ไอโซเลตเท่านั้น คือ UD247 และ UD270 ที่สามารถเจริญเติบโตได้ ในขณะที่บางไอโซเลต (UD57) พบการเจริญในเวลา 24 ชั่วโมงแรก แต่การเจริญพบน้อย อาจเกิดจากเซลล์ถูกทำลาย มีความผิดปกติของเซลล์เมมเบรน หรือดีเอ็นเอ บางไอโซเลตพบการเจริญหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้แก่ UD136 และ UD169 สรุปได้ว่า ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพต่อสภาวะ oxidative stress นี้ คือ UD247 และ UD270

ตารางที่ 3 ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3%) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ลำดับที่	ไอโซเลต	ผลการทดลอง
1	UD 15	อาหารเลี้ยงชื้อภายในหลอดใส มีฟองอากาศเยอะ และมีเศษเซลล์
2	UD 25	
3	UD 41	
4	UD 44	อาหารเลี้ยงชื้อภายในหลอดขุ่น และมีฟองอากาศเล็กน้อย
5	UD 50	
6	UD 57	อาหารเลี้ยงชื้อภายในหลอดใส มีฟองอากาศเยอะ และมีเศษเซลล์
7	UD 66	อาหารเลี้ยงชื้อภายในหลอดใส มีฟองอากาศ
8	UD 136	อาหารเลี้ยงชื้อภายในหลอดใส มีฟองอากาศเยอะ และมีเศษเซลล์
9	UD 169	อาหารเลี้ยงชื้อภายในหลอดใส มีฟองอากาศเยอะ
10	UD 205	
11	UD 247	อาหารขุ่น ไม่มีฟองอากาศ
12	UD 270	อาหารขุ่น มีฟองอากาศเล็กน้อย
13	UD 288	อาหารเลี้ยงชื้อภายในหลอดใส มีฟองอากาศเยอะ และมีเศษเซลล์
14	UD 292	อาหารเลี้ยงชื้อภายในหลอดใส มีฟองอากาศเยอะ
15	UD 306	
16	UD 317	อาหารขุ่น มีฟองอากาศเล็กน้อย
17	UD 343	อาหารเลี้ยงชื้อภายในหลอดใส มีฟองอากาศเล็กน้อย
18	UD 392	อาหารขุ่น มีฟองอากาศเล็กน้อย
19	UD 405	
20	UD 412	

นอกจากนี้การทดสอบการทนต่อโลหะต่างๆ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของพืช เนื่องจากมีการสะสมของแร่ธาตุโลหะในดินจำนวนมากขึ้น โดยความเป็นพิษขึ้นอยู่กับการจับกับสารอื่นๆ เป็นรูปแบบต่างๆ เช่น รูปออกไซด์ รูปไนเตรต รูปซัลเฟต เป็นต้น ทำให้ความสามารถในการละลายได้แตกต่างกัน ส่งผลต่อการกระจายของโลหะ หรือสะสมอยู่ในดินแหล่งนั้นๆ จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนรูปโลหะเหล่านี้ บางชนิดสามารถใช้หรือจับกับโลหะได้ เช่น ผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์ เพื่อให้พืชได้ใช้โลหะที่จำเป็น และเป็นการป้องกันเชื้อก่อโรค เนื่องจากขาดธาตุเหล็กที่จำเป็น เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่คัดเลือกมา เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีโลหะผสมอยู่ ปรากฏว่าที่ความเข้มข้น 1 mM ของสารโลหะเกือบทุกชนิด แบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถเจริญเติบโตได้อย่างดี (ภาคผนวก ก) ยกเว้นโลหะ Nikel sulfate ที่มีเพียงไอโซเลต UD44 และ UD317 เท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียตามธรรมชาติ มีศักยภาพสามารถทนต่อโลหะได้หลายชนิด อาจเนื่องจากเชื้อใช้โลหะในปริมาณน้อย เป็นแหล่งแร่ธาตุในการเจริญเติบโต จึงควรศึกษาถึงขีดความสามารถในการต้านทานต่อโลหะ โดยศึกษาความเข้มข้นสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้

4. ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืชของเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย

จากข้อมูลที่ได้ว่าเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียนี้สามารถผลิตสารชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ ดังนั้นจึงทดสอบกับเชื้อก่อโรคในพืช เพื่อเป็นปัจจัยหนึ่งในการส่งเสริมการเจริญของพืช หากพืชไม่ถูกเชื้อก่อโรคเข้าทำลาย พืชจะสร้างสารเมตาบอไลซ์ที่จำเป็นต่อการเจริญเท่านั้น เชื้อก่อโรคพืชที่นำมาทดสอบในการทดลองนี้ ได้แก่ เชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเน่าดำ โรคใบทองในผักกาดหอม เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* และ *Sclerotium rolfsii* Sacc. ซึ่งก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ และโรคโคนเน่าในพริก ตามลำดับ เป็นตัวอย่างโรคพืชที่นำมาทดสอบเบื้องต้น เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการสร้างสารชีวภาพ ปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียครึ่งหนึ่ง (10 ไอโซเลต) พบการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* และ *Sclerotium rolfsii* Sacc. ในขณะที่ 4 ไอโซเลต พบการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพ ได้แก่ UD136, UD205 และ UD288 (ตารางที่ 4)

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาการผลิตสารชีวภาพที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช การทนต่อสภาวะเครียดในสิ่งแวดล้อม และการผลิตสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืชนั้น สรุปได้ว่า ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก เป็นไอโซเลตที่ผลิตสารช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชที่เป็นกรดอินโดลอะซิติกแอซิด ได้แก่ UD44, UD247 และ UD270 แต่ไม่สามารถผลิตสารชีวภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืชได้ กลุ่มที่สอง เป็นไอโซเลตที่ผลิตสารชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช สามารถผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตอื่นๆ ได้ เช่น อะไมเลส การละลายฟอสเฟต เป็นต้น แต่ไม่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกแอซิดได้ ได้แก่ UD136, UD205 และ UD288 เนื่องจากในงานวิจัยนี้มุ่งเป้าหมายที่ไอโซเลตที่สามารถผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้เชื้อทดสอบเฉพาะกลุ่มแรกเท่านั้น ในการศึกษาปัจจัยและสภาวะการเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินโดลอะซิติกแอซิด

ตารางที่ 4 สารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืชที่ได้จากเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion

ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชชนิดต่างๆ ของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย		
	Xanthomonas[1]	*Sclerotium*[2]	*Fusarium*[2]
UD 15	21.25	32	-
UD 25	15.25	35	-
UD 41	18.50	30	-
UD 44	-	-	-
UD 50	-	-	-
UD 57	-	38	-
UD 66	16.75	34	-
UD 136	16.00	40	18
UD 169	16.50	36	-
UD 205	20.00	38	-
UD 247	-	-	-
UD 270	-	-	-
UD 288	21.00	34	33
UD 292	-	-	15
UD 306	15.00	36	14
UD 317	-	-	-
UD 343	-	-	-
UD 392	-	-	-
UD 405	-	-	-
UD 412	-	-	-

หมายเหตุ 1 = ความกว้างของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้ง (มิลลิเมตร)

2 = ร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (%)

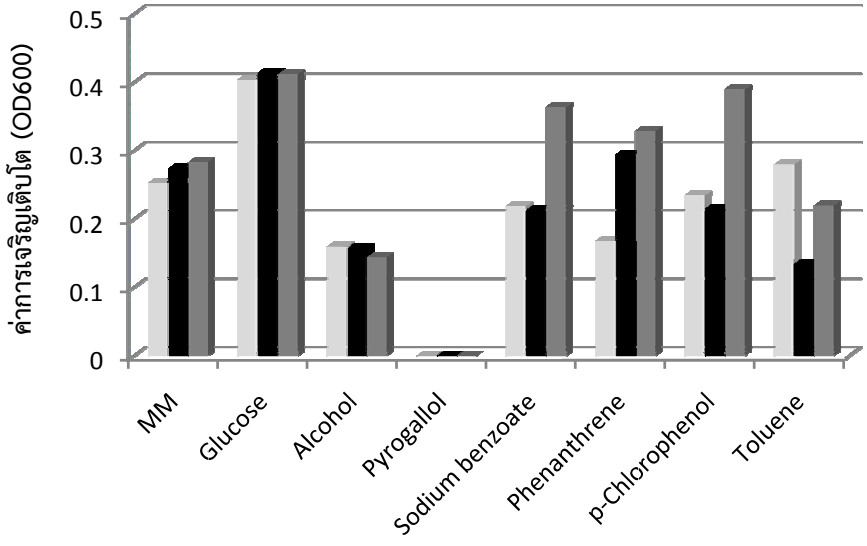
(-) หมายถึง ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญ

5. ทดสอบการย่อยสลายสารจำพวก polycyclic aromatic hydrocarbon

แหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ในธรรมชาติ บางชนิดยากต่อการย่อยสลายตามธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโต ทำให้พืชหรือสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีแหล่งสารจำกัด ย่อยสลายยาก ส่งผลต่อการอยู่รอด สูญเสียสายพันธุ์ ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต จุลินทรีย์เป็นกลุ่มที่มีการปรับตัวต่อการใช้แหล่งสารอาหาร บางชนิดทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายที่ดีในระบบนิเวศน์ ส่งเสริมให้สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่บริเวณนั้นๆ มีความอุดมสมบูรณ์ด้วย นอกจากนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ย่อยสลายวัสดุย่อยสลายยากในอุตสาหกรรมต่างๆ เพื่อเป็นการกำจัดสารทางชีวภาพ ลดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม สาร polycyclic aromatic hydrocarbon ที่นำมาทดสอบมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน โดยมีฟีนอลเป็นองค์ประกอบทั้งสิ้น (ภาคผนวก ก) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต คือ UD44, UD247 และ UD270 ในอาหารเหลวที่มีสารประกอบชนิดต่างๆ ผสมอยู่ เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหารชนิดต่างๆ ด้วยการวัดค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีตัวควบคุม คือ อาหารที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ พบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต มีการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อยในช่วง 24 – 48 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ไอโซเลต UD270 มีการเจริญใกล้เคียงกับการเจริญในอาหารที่มีกลูโคส (ภาพที่ 8) แสดงว่าเชื้อมีการเจริญเติบโต ใช้แหล่งคาร์บอนจากสารประกอบที่มีอยู่ในอาหารได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร p-chlorophenol รองลงมาคือ sodium benzoate และ phenanthrene แต่ไม่พบการเจริญของเชื้อเลยในอาหารที่มี pyrogallol เป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้เล็กน้อยในอาหารที่เป็น minimal medium โดยไม่มีแหล่งคาร์บอนใดๆ เลย อาจเป็นเพราะว่าเชื้อที่คัดแยกมาเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชตามธรรมชาติ บางครั้งอาจเข้าไปอาศัยอยู่ในพืชด้วย ทำให้เชื้อไม่ต้องการแหล่งอาหารสมบูรณ์มาก และอาจใช้แหล่งอาหารอื่นๆ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นแหล่งคาร์บอนได้

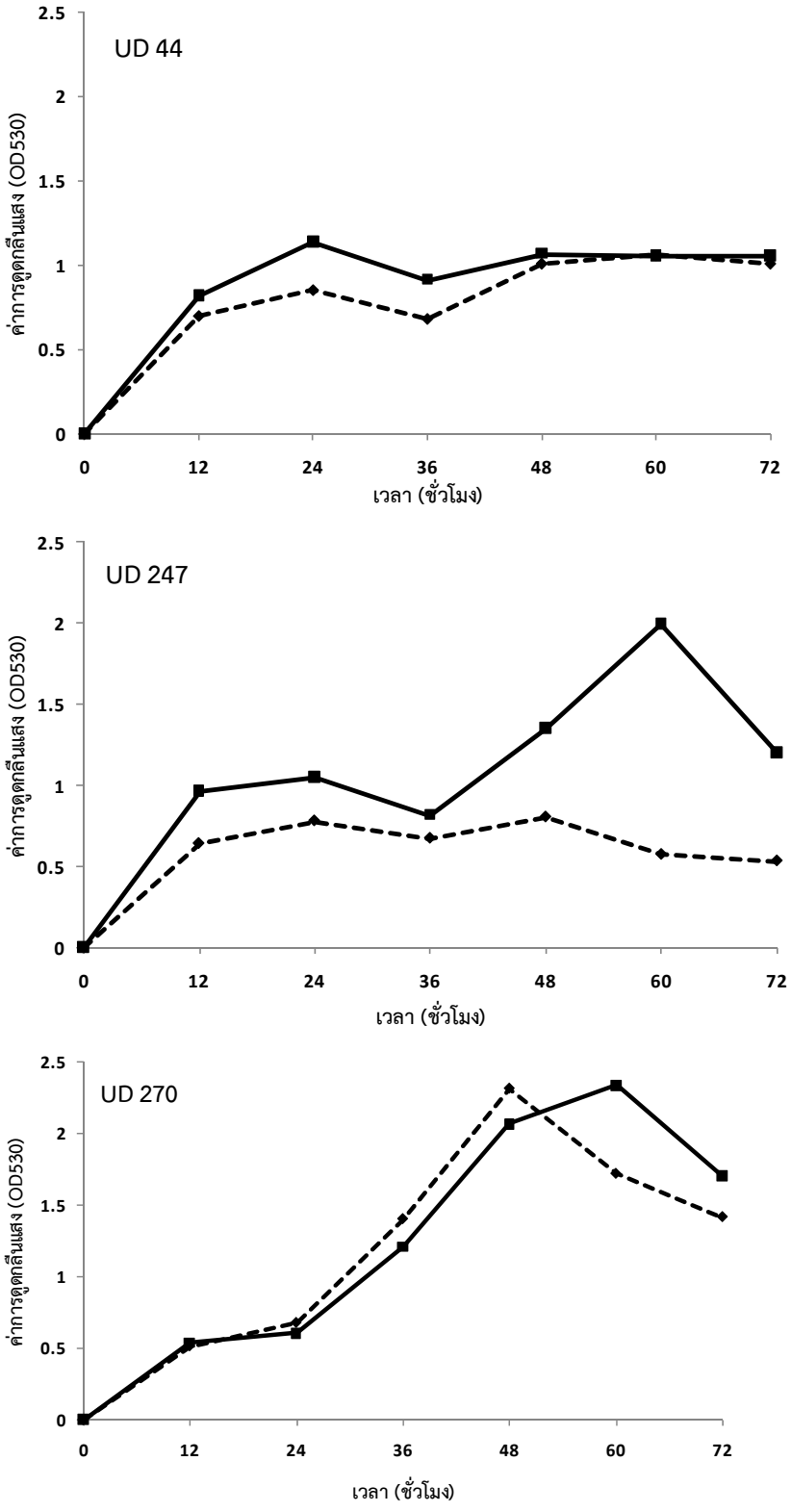
6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินโดลอะซีติกแอซิดของเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย

แหล่งสารตั้งต้นที่สำคัญต่อการผลิตกรดอินโดลอะซีติกแอซิดนั้น คือ กรดอะมิโนชนิดทริปโตแฟน ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้เมตาบอลิซึมนี้ในการเปลี่ยนสารทริปโตแฟนให้เกิดกรดขึ้น โดยมีเอนไซม์หลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง ขึ้นอยู่กับสารตัวกลางในแต่ละเส้นทาง (pathway) แบคทีเรียส่วนน้อยสามารถสร้างกรดอินโดลอะซีติกแอซิดได้ โดยไม่ต้องอาศัยทริปโตแฟน เรียกว่า tryptophan independent ซึ่งจะเป็นข้อดีและเหมาะสมต่อสภาวะที่เป็นธรรมชาติอย่างยิ่ง จึงศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย กับการสร้างสาร IAA ในไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพ จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ UD44, UD247 และ UD270 ผลการทดลองพบว่าไอโซเลต UD44 และ UD247 มีการเจริญเติบโต และการสร้างสาร IAA ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยการเจริญเติบโต จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก แล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยและคงที่ (ภาพที่ 9) ส่วนสาร IAA ถูกผลิตขึ้นพร้อมๆ กับการเจริญ แล้วเริ่มคงที่ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.6 -1.0 สำหรับไอโซเลต UD270 เชื้อมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า ส่งผลให้การผลิตสาร IAA สูงขึ้นเรื่อยๆ ตามการเจริญของแบคทีเรีย โดยพบสาร IAA สูงที่สุดที่เวลา 60 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ แสดงให้เห็นว่า การผลิตสาร IAA ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต แปรผันโดยตรงกับการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่ละไอโซเลตสามารถผลิตสารได้ในปริมาณไม่เท่ากัน

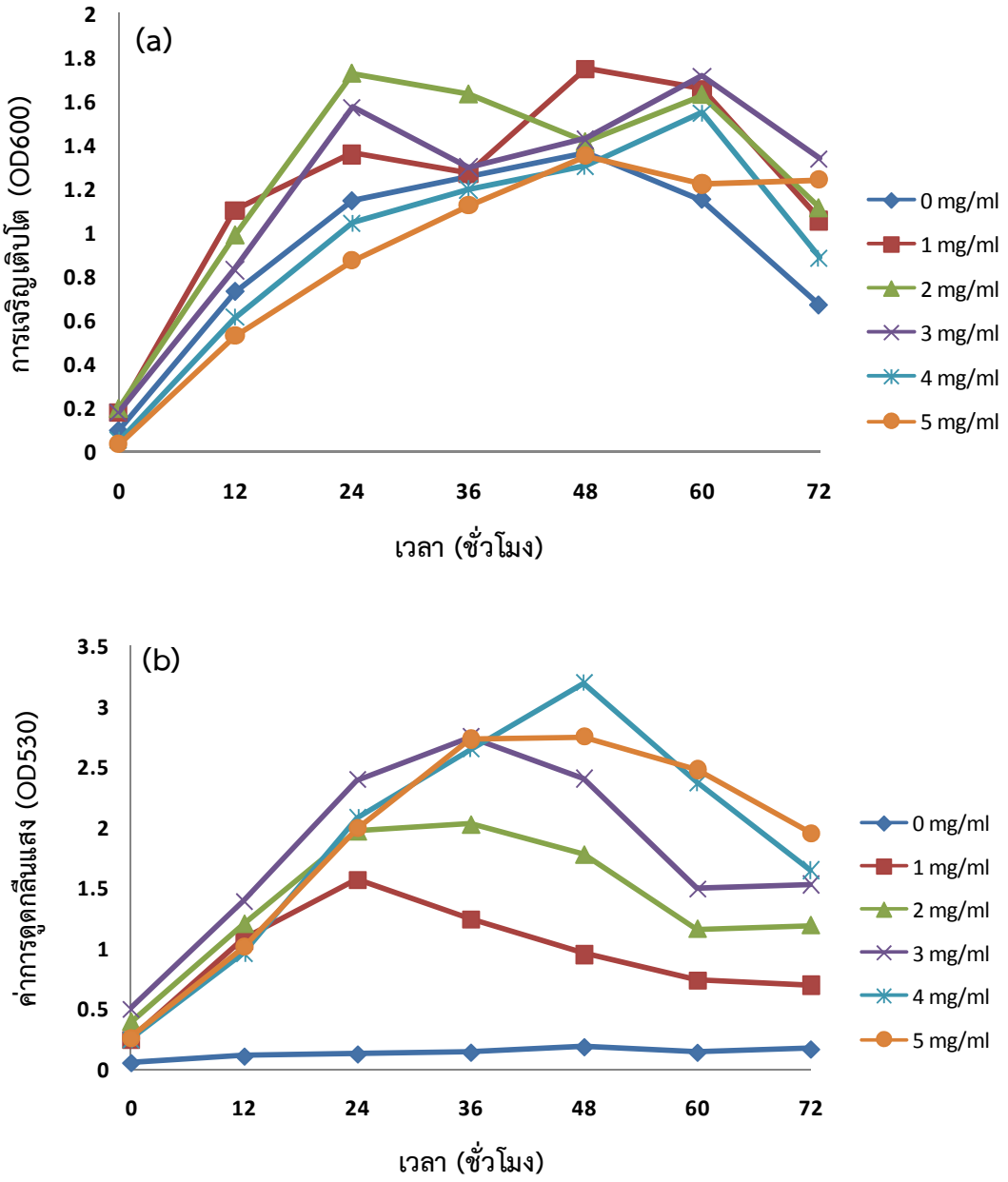


ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียในอาหารที่มีสาร polycyclic aromatic hydrocarbon ชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบ ทดสอบกับเชื้อไอโซเลต UD44 (white bar), UD247 (black bar) และ UD270 (gray bar) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหาร minimal medium (MM) และ minimal medium ที่มีสารอื่นๆ

ดังนั้นเชื้อไอโซเลต UD270 เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการผลิตสาร IAA นำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร IAA ในการทดลองต่อไป โดยศึกษาปริมาณของทริปโตแฟนที่เหมาะสม และเชื้อแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้แหล่งทริปโตแฟนในการสร้างสาร IAA หรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตของเชื้อที่เวลาต่างๆ กัน ปรากฏว่า เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อในทุกสภาวะ (ภาพที่ 10, a) หลังจากนั้นเชื้อค่อยๆ เพิ่มจำนวนขึ้น จนกระทั่ง 60 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อจึงเริ่มลดปริมาณลงเรื่อยๆ โดยสภาวะที่มีการเจริญของเชื้อมากที่สุด คือ สภาวะที่มีปริมาณทริปโตแฟน ในช่วง 1-3 mg/ml แต่อย่างไรก็ตามการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกันในทุกสภาวะ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสาร IAA ที่ผลิตออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าหากไม่มีทริปโตแฟนเป็นแหล่งสารตั้งต้น เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต UD270 ไม่สามารถผลิตสาร IAA ได้ โดยสาร IAA ที่ถูกตรวจพบจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นในอาหารที่มีทริปโตแฟนสูงขึ้นด้วย (ภาพที่ 10, b) จะเห็นว่าปริมาณสาร IAA จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ หากปริมาณสารทริปโตแฟนอยู่ในช่วง 1-2 mg/ml สาร IAA เริ่มลดลง ตรงกันข้ามกับอาหารที่มีทริปโตแฟนอยู่ในช่วง 3-5 mg/ml ปริมาณสาร IAA คงเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเวลา 60 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งปริมาณทริปโตแฟนในช่วง 3-5 mg/ml ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก จึงเลือกความเข้มข้นของทริปโตแฟนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสาร IAA ที่ 3 mg/ml ในการศึกษาต่อไป

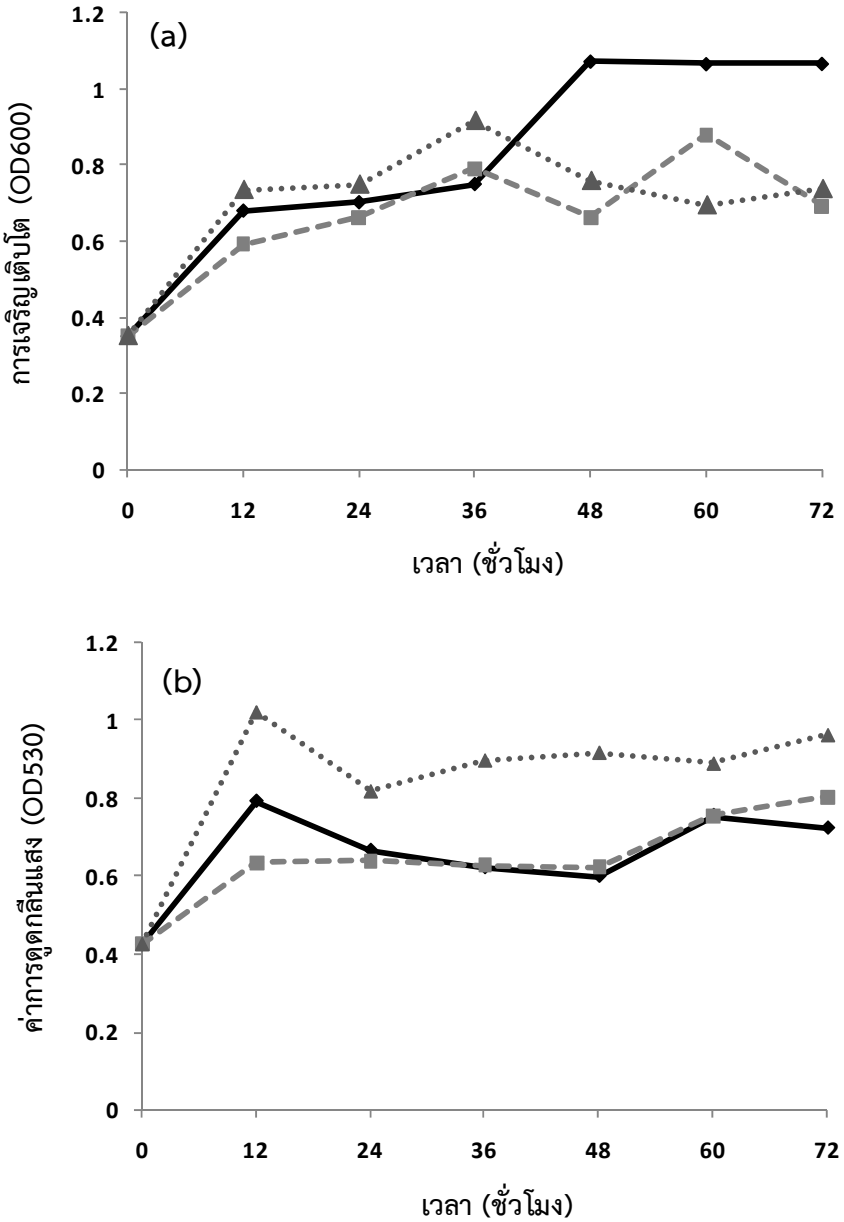


ภาพที่ 9 การผลิตกรดอินโดลอะซิติกแอซิดของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีทริปโตแฟน วัดการเจริญเติบโต (เส้นทึบ) และวัดกรดอินโดลอะซิติกแอซิด (เส้นประ) ที่เวลาต่างๆ



ภาพที่ 10 ความเข้มข้นของทริปโตแฟนต่อการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลต UD270 (a) และต่อการผลิตกรดอินโดลอะซิติกแอซิด (b) ที่เวลาต่างๆ

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร IAA เป็นการทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในการทนต่ออุณหภูมิสูงได้หรือไม่ และยังคงผลิตสาร IAA ได้หรือไม่ เนื่องจากในสภาพแวดล้อมปัจจุบัน อุณหภูมิสูงขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลกระทบต่อประชากรสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกัน โดยศึกษาการเจริญและการผลิตสาร IAA ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต UD270 ที่อุณหภูมิต่างๆ ในอาหารที่มีทริปโตแฟนปริมาณ 3 mg/ml พบว่า เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 30°C และ 35°C (ภาพที่ 11, a) ในขณะที่ที่อุณหภูมิห้อง มีการเจริญเติบโตเป็นช่วงๆ แสดงถึงการปรับตัว และมีการเพิ่มจำนวนเมื่อเซลล์มีความพร้อม เพราะอุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงกลางวัน และกลางคืน ในขณะที่การผลิตสาร IAA เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่หลังจากนั้น ทั้งที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 30°C (ภาพที่ 11, b) สำหรับอุณหภูมิ 35°C ปริมาณสาร IAA ที่ตรวจพบมีปริมาณสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆ โดยตลอดช่วงของการเลี้ยงเชื้อพบปริมาณสาร IAA อยู่ในช่วง 0.8 -1 OD530 แสดงให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต UD270 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ให้ผลผลิตของสาร IAA สูงที่สุดเช่นกัน อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิมีผลต่อการกระตุ้นการสร้าง IAA หรือผลของ IAA อาจเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียในการทนต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้น



ภาพที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลต UD270 (a) และการผลิตกรดอินโดลอะซิติกแอซิด (b) ที่เวลาต่างๆ โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (เส้นทึบ) อุณหภูมิ 30°C (เส้นประ) และอุณหภูมิ 35°C (เส้นประจุด)

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับพืช สามารถผลิตสารชีวภาพที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งได้แก่ สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และสารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช เชื้อจำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ UD15, UD25, UD41, UD57, UD66, UD136, UD169, UD205, UD288, UD292, UD306, UD317, UD343 ที่พบการผลิตสารอะซีโทอิน และเอนไซม์อะไมเลส ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่สามารถละลายฟอสเฟต และผลิตแอมโมเนียได้ด้วย เชื้อที่สามารถผลิตอะซีโทอินได้ จะเป็นจีนัสที่สามารถสร้างสปอร์ได้ เพื่อทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Xiao et al., 2009) และสอดคล้องกับรายงานเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากใบของต้นโกงกาง โดยเชื้อที่ได้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในจีนัส *Bacillus* (Gayathri et al., 2010) ซึ่งเชื้อทั้ง 13 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน และมีการสร้างสปอร์ จึงจัดอยู่ในจีนัส *Bacillus* เช่นกัน เชื้อ *Bacillus* ส่วนใหญ่ใช้ในการควบคุมโรคพืช (biocontrol) เนื่องจากสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรค ได้แก่ iturinA, fengycin, surfactin และมีการศึกษายีนที่ควบคุมการผลิตสารเหล่านี้ จึงทำให้เชื้อ *Bacillus* นำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ เพื่อใช้ควบคุมโรคต่างๆ ของพืช (Perez-Garcia et al., 2011) ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรคพืชได้ดี คือ UD288 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อ *Bacillus* sp. เนื่องจากสารในกลุ่ม lipopeptide ที่ผลิตได้จากเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรคมากขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกิดกับราก ซึ่งการกระตุ้นดังกล่าว เรียกว่า induced systemic resistance (ISR) ได้แก่ surfactin และ fengycin แต่การกระตุ้นยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด อาจเกิดจากโปรตีนจำเพาะที่อยู่บริเวณเซลล์เมมเบรนของพืช ในการรับสารกระตุ้นดังกล่าว หรืออาจเกิดจากกลไกความสัมพันธ์ระหว่างชุมชนจุลินทรีย์ที่เรียกว่า cell-cell communication (quorum sensing) โดยมีการผลิตสารบางชนิดเพื่อควบคุมความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค ดังนั้นการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งนี้ด้วย และการศึกษาชนิดของสารชีวภาพ เป็นสิ่งสำคัญทำให้ทราบถึงกลไกการทำงาน ส่งผลต่อการนำไปใช้ให้เกิดประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เชื้ออีกกลุ่มที่มีประสิทธิภาพ คือ ไอโซเลต UD270 ซึ่งได้ทำการบ่งชี้ 16S rRNA เพียงบางส่วน (500 bp) เป็นเชื้อ *Lysinibacillus* sp. (data not shown) มีคุณสมบัติในการผลิตสาร IAA ได้ดีที่สุด ซึ่งสาร IAA จะเป็น phytohormone ที่ช่วยกระตุ้นการยืดของเซลล์ การแบ่งเซลล์ ทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดี แต่พบสิ่งที่น่าสนใจว่าไอโซเลต UD270 ไม่สามารถผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชอื่นๆ ได้เลย เช่น ไม่สามารถละลายฟอสเฟตได้ ไม่ผลิตอะซิโตอิน ไม่ผลิตแอมโมเนีย เป็นต้น ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *Lysinibacillus fusiformis* ที่สามารถผลิต phytohormones ได้หลายชนิด ได้แก่ IAA, gibberellic acid (GA), abscisic acid (ABA) สามารถตรึงไนโตรเจนได้ แต่ไม่สามารถละลายฟอสเฟต ไม่สามารถผลิตไซเดอร์โรฟอร์ ไม่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส และ ACC deaminase (Sgroy et al., 2009) แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์นี้จัดเป็นกลุ่ม plant

growth promoting bacteria ที่มีหน้าที่ส่งเสริมการเจริญของพืชโดยตรง และการผลิตสาร IAA ของไอโซเลต UD270 ต้องการทริปโตแฟนเป็นสับสเตรต ซึ่งกลไกการสังเคราะห์ไม่พบมีรายงาน ในกลุ่ม *Bacillus* พบว่า *B. amyloliquefaciens* FZB42 มีการสังเคราะห์ IAA เช่นกัน โดยต้องการปริมาณทริปโตแฟนที่ความเข้มข้น 5mM แต่กลไกในการสังเคราะห์ยังไม่แน่ชัด เนื่องจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ใน IPA pathway และ IAM pathway ไม่ถูกตรวจพบ (Idris et al., 2007) ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ เช่น *Paenibacillus polymyxa* (Lebuhn et al., 1997) และ *Rhodococcus fascians* พบการสังเคราะห์ IAA ด้วย IPA pathway คือ เปลี่ยน tryptophan เป็น indole 3-pyruvic acid เป็น indole 3-acetaldehyde แล้วได้ IAA (Vandeputte et al., 2005) ในขณะที่ IAM pathway เป็นการเปลี่ยน tryptophan เป็น indole 3-acetamide ได้ IAA พบได้ในเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* (Spaepen et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์ที่เป็นกลุ่มผลิตสาร IAA ได้โดยไม่ต้องการทริปโตแฟนด้วย ซึ่งสาร IAA สามารถส่งเสริมการยืดยาวของราก การเจริญของลำต้นแล้ว ยังส่งเสริมให้พืชมีความต้านทานต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้อีกด้วย โดยมีผลต่อการกระต้น หรือการยับยั้งการแสดงออกของยีน การสังเคราะห์เอนไซม์ การสร้างเม็ดสี และเมตาบอลิซึม (Tsavkelova et al., 2006) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ไอโซเลต UD44, UD247 และ UD270 ที่สามารถผลิตสาร IAA ได้ สามารถทนต่อ oxidative stress (H_2O_2) ได้ และทนต่อสารที่มีหมู่ฟีนอลเป็นองค์ประกอบได้ดี ไอโซเลต UD44 ยังสามารถทนต่อสภาวะที่มีโลหะนิกเกิลได้ที่ความเข้มข้น 1 mM ด้วย ส่วนโลหะชนิดอื่นๆ ควรมีการศึกษาถึงความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่เชื้อเอ็นโดไฟติกจะทนได้

เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้ง 2 กลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อเด่น จำนวน 2 ไอโซเลต คือ UD270 และ UD288 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ นำไปศึกษาต่อยอดในโครงการต่อไป ในด้านการนำไปใช้ประโยชน์ ความจำเพาะต่อพืช และด้านองค์ความรู้ หากสายพันธุ์ที่ได้ไม่เคยมีรายงานข้อมูลดังกล่าวมาก่อน รวมถึงการศึกษาความสามารถของเชื้อผสมของ 2 สายพันธุ์ ทำให้มีประโยชน์ในการส่งเสริมพืชทั้งทางตรง และทางอ้อม

ข้อเสนอแนะ

1. เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสามารถนำไปใช้ได้จริงในธรรมชาติ จึงควรศึกษาความจำเพาะหรือการเข้าอยู่อาศัยร่วมกับพืช เป็นข้อมูลในการนำไปใช้กับพืชต่างๆ
2. ความทนต่อโลหะในธรรมชาติเป็นสิ่งสำคัญต่อการบำบัดหรือลดการสะสมของโลหะในดิน ซึ่งวิธีทางชีวภาพโดยใช้พืชและจุลินทรีย์น่าจะเป็นวิธีที่ดีทั้งในด้านประสิทธิภาพ และสิ่งแวดล้อม จึงควรศึกษาปริมาณความเข้มข้นของโลหะที่แบคทีเรียทนได้ และศึกษากลไกการต่อต้านหรือทนต่อโลหะนั้นๆ
3. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร IAA ควรศึกษาอุณหภูมิที่สูงกว่านี้ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้เนื่องจากปัจจุบันอุณหภูมิสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 35-40°C
4. จากผลการทดลองได้เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย 2 กลุ่มเด่น คือ กลุ่มที่ผลิตสาร IAA ซึ่งเป็นสาระสำคัญต่อการส่งเสริมการเจริญของพืช และกลุ่มที่ผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืชได้ แต่ไม่สามารถผลิตสาร IAA ได้ ดังนั้นหากมีการใช้เชื้อผสมระหว่าง 2 กลุ่ม น่าจะเป็นต่อการส่งเสริมการเจริญ

ของพืช โดยจำเป็นต้องศึกษาการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรีย 2 ชนิดว่าเป็นอย่างไร ร่วมถึงผลกระทบต่อการผลิตสารชีวภาพด้วย เพราะจุลินทรีย์บางชนิดผลิตสารยับยั้งเชื้ออีกกลุ่มไม่ให้เจริญเติบโตได้ ก็จะไม่เป็นผลดีในการผลิตกล้าเชื้อที่เป็นเชื้อผสม

5. ควรทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้จริงในระดับห้องปฏิบัติการหรือเรือนทดลอง
6. ควรศึกษาชนิดของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีในแต่ละด้าน เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาการอยู่ร่วมกัน หรือการใช้ประโยชน์ร่วมกันของแบคทีเรีย 2 กลุ่ม

เอกสารอ้างอิง

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ ถนิมนันต์ เจนอักษร และ พรหมมาศ คูหากาญจน์. (2554) การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium myriotylum* โดยแบคทีเรียเขตรากพืชจากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 16(1): 22-31

วิชิตพล มีแก้ว ณัฐพล ขันธปราบ และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2553) การปรับตัวของพืชภายใต้สภาวะที่มีความเค็ม. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ 10(2): 28-37

วิยะดา มงคลธนารักษ์ และ ศิริวรรณ กองแสน. (2553) ความหลากหลายของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย ในเขตพื้นที่เขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น. รายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิยะดา มงคลธนารักษ์ จิระวดี โพธิ์ชัย และอาทิตยา ภูนบทอง. (2554) การศึกษาสารทางชีวภาพของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่ได้จากเขตพื้นที่เขื่อนอุบลรัตน์ รายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล. (2554) ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระบบต้านการเกิดออกซิเดชันในพืช. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 39(2): 172-181

ศิริลักษณ์ นามวงษ์. (2553) ศักยภาพของแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางทางเทคโนโลยีชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 15(2): 122-132

สุภาพร จันรุ่งเรือง เบญจมาส รสโสภา และ กรรณิการ์ สัจจาพันธ์. (2553) ผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Ss01 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรีย์ 2. วิทยาสารกำแพงแสน 8(1): 1-14

Bashan Y, de-Bashan LE (2005) Plant growth-promoting In: Encyclopedia of soils in the environment. U.K. 1: 103-115

Bianco C, Imperlini E, Calogero R et al. (2006) Indole 3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. Arch Microbiol 185: 373-382

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Ait Barka E (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanism of action, and future prospects. Appl Environ Microbiol 71: 4951-4959

Costa JM, Loper JE (1994) Characterization of siderophore production by the biological control agent *Enterobacter cloacae*. Molecular plant-microbe interactions 7: 440-448

Dunne C, Moenne-Loccoz Y, McCarthy J, Higgins P, Powell J, Dowling DN, O'Gara F (1998) Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium*-mediated damping-off of sugar beet. Plant Pathology 47: 299-307

Gayathri S, Saravanan D, Radhakrishnan M, Balagurunathan R, Kathiresan K (2010) Bioprospecting potential of fast growing endophytic bacteria from leaves of mangrove and salt-marsh plant species. Ind J Biotechnol 9: 397-402

Gerhardson B (2002) Biological substitutes for pesticides. Trends Biotechnol 20: 338-343

Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. Soil Biol Biochem 37: 395-412

Hallman J, Quadt-Hallman A, Mahafee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. Can J Microbiol 43: 895-914

Hardoim PR, Overbeek LSV, Elsas JDV (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol 16 (10): 463-471

Idris EE, Iglesias DJ, Talon M, Borriss R (2007) Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 MPMI 20: 619-626

Kannan V, Sureendar R (2009) Synergistic effect of beneficial rhizosphere microflora in biocontrol and plant growth promotion. J Basic Microbiol 49: 158-164

Khan Z, Doty S (2009) Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. Plant Soil doi 10.1007/s11104-009-9908-1

Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M (2009) Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. Environ Chem Lett 7: 1-19

Lebuhn M, Heulin T, Hartmann A (1997) Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. FEMS (Fed Eur Microbiol Soc) Microbiol Ecol 22: 325-334

Long H, Schmidt D, Baldwin I (2008) Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in commom growth responses. PLoS ONE 3(7): 1-10: e2702

Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H (2011) Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. Biotechnol Adv 29: 248-258

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu J, Sa T (2006) Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase containing *Methylobacterium fujisawaense*. Planta 224: 268-278

Perez-Garcia A, Romero D, Vicente A (2011) Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. Curr Opi Biotechnol 22: 187-193

Raja P, Uma S, Govindarajan K (2006) Impact of inoculants consortium on rice root exudates, biological nitrogen fixation and plant growth. J Biol Sci 6(5): 815-823

Rajkumar M, Ae N, Freitas H (2009) Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. Chemosphere 77: 153-160

Rajkumar M, Freitas H (2008) Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinuscom munisin* soil contaminated with heavy metals. Chemosphere 71: 834-842

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: 1-11

Ramette A, Moenne-Loccoz Y, Defago 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 Microbiol Ecol 44: 35-43

Sgroy V, Cassán F, Masciarelli O, Del Papa M.F, Lagares A, Luna V (2009) Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. Appl Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s00253-009-2116-3

Shahab S, Ahmed N, Khan NS (2009) Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSPs. Afr J Agric Res 4 (11): 1312-1316

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. FEMS Microbiol Rev : 1-24

Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J (2004) Natural products from endophytic microorganisms. J Nat Prod 67: 257-268

Teaumroong N, Boonkerd N (1996) Iron element, siderophores and microbes. Suranaree J. Sci. Technol. 3: 95-100

Tsavkelova EA, Klimova SY, Cherdyntseva TA, Netrusov AI (2006) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. Appl Biochem Microbiol 42: 117-126

Ulrich K, Ulrich A, Ewald D (2008) Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. FEMS Microbiol Ecol 63: 169-180

Vandeputte O, Oden S, Mol A, Vereecke D, Goethals K, El Jaziri M, Prinsen E (2005) Biosynthesis of auxin by the gram positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds specific to infect plant tissues. Appl Environ Microbiol 71: 1169-1177

Weyens N, der-Lelie DV, Taghavi S, Newman L, Vangronsveld J (2009) Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. Trends Biotechnol 27(10): 591-598

Xiao Z, Ma C, Xu P, Lu J (2009) Acetoin catabolism and acetylbutanediol formation by *Bacillus pumilus* in a chemically defined medium. PLoS ONE 4(5): e5627

ภาคผนวก ก

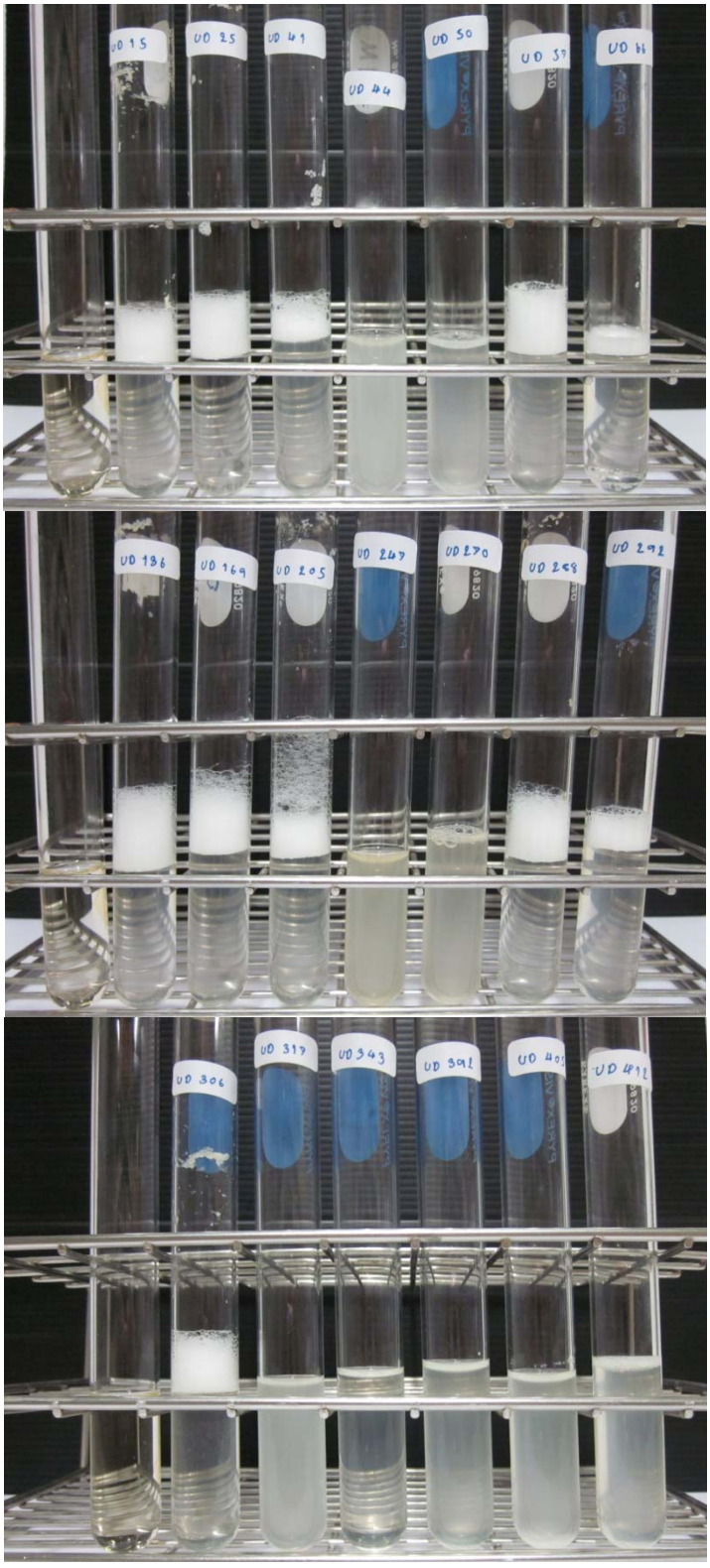
ตาราง ก ความสามารถของเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียต่อการเจริญบนอาหารที่มี 3% NaCl และ 3% H_2O_2

ลำดับที่	ไอโซเลต	3% NaCl		3% H_2O_2			
		1 day	2 days	1 day		2 days	
1	UD 15	++	++	-	+	-	+
2	UD 25	++	++	-	-	-	-
3	UD 41	++	++	-	-	-	-
4	UD 44	++	++	-	-	-	-
5	UD 50	++	++	-	-	-	-
6	UD 57	++	++	++	-	++	-
7	UD 66	++	++	-	-	-	-
8	UD 136	++	++	-	++	-	++
9	UD 169	++	++	-	-	-	++
10	UD 205	++	++	-	-	-	-
11	UD 247	++	++	++	++	++	++
12	UD 270	++	++	++	++	++	++
13	UD 288	++	++	-	-	+	-
14	UD 292	++	++	-	-	-	-
15	UD 306	++	++	-	-	-	-
16	UD 317	++	++	-	-	-	-
17	UD 343	++	++	-	-	-	-
18	UD 392	++	++	-	-	-	-
19	UD 405	++	++	-	-	-	-
20	UD 412	++	++	-	-	-	-

หมายเหตุ: + หมายถึง การเจริญบนผิวหน้าอาหารเพียงเล็กน้อย

++ หมายถึง การเจริญบนผิวหน้าอาหารมีมาก

- หมายถึง ไม่พบการเจริญบนผิวหน้าอาหาร



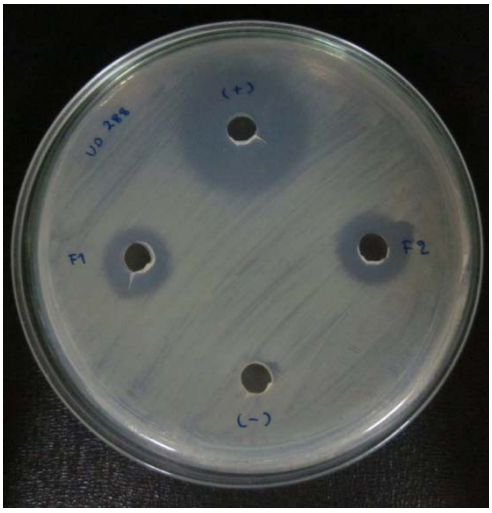
ภาพ ก ปฏิกิริยาระหว่างเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลต ในอาหาร NB ที่มีสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ บ่มนาน 2 ชั่วโมง เรียงลำดับเชื้อตามตาราง ก ซึ่งเชื้อบางไอโซเลตเกิดฟองอากาศ บางไอโซเลตขุ่น เจริญได้เล็กน้อย เปรียบเทียบกับหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเชื้อ (หลอดแรกของทุกภาพ)

ตาราง ข ความสามารถของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 1 mM ของโลหะต่างๆ ผสมอยู่ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

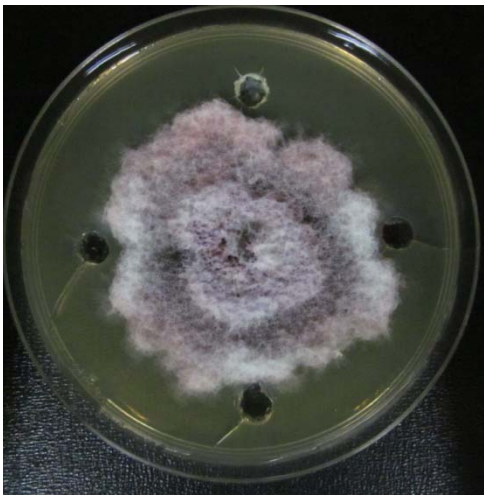
ลำดับที่	ไอโซเลต	โลหะชนิดต่างๆ (1 mM)										
		Ferric chloride	Copper sulfate	Zing sulfate	Manganese sulfate	Nikel sulfate	Aluminium sulfate	Silver sulfate	Lead nitrate	Cobalt sulfate	Mercury chloride	Cadmium sulfate
1	UD 15	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
2	UD 25	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
3	UD 41	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
4	UD 44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	UD 50	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
6	UD 57	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
7	UD 66	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
8	UD 136	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
9	UD 169	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
10	UD 205	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

ตาราง ข (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลต	โลหะชนิดต่างๆ (1 mM)										
		Ferric chloride	Copper sulfate	Zing sulfate	Manganese sulfate	Nikel sulfate	Aluminium sulfate	Silver sulfate	Lead nitrate	Cobalt sulfate	Mercury chloride	Cadmium sulfate
11	UD 247	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
12	UD 270	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
13	UD 288	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
14	UD 292	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
15	UD 306	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
16	UD 317	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	UD 343	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
18	UD 392	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
19	UD 405	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
20	UD 412	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+



การยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ด้วยสารชีวภาพที่ได้จากเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียไอโซเลต UD288 (หลุมซ้าย และขวา) เปรียบเทียบกับสารปฏิชีวนะ (หลุมบน) และอาหารเลี้ยงเชื้อ (หลุมล่าง)

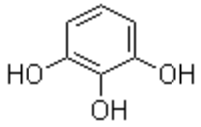
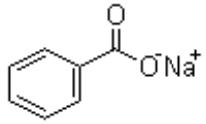
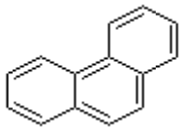
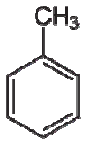


การยับยั้งเชื้อ *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* ด้วยสารชีวภาพที่ได้จากเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียไอโซเลต UD288 (หลุมซ้าย และขวา) เปรียบเทียบกับสารปฏิชีวนะ (หลุมบน) และอาหารเลี้ยงเชื้อ (หลุมล่าง)

การยับยั้งเชื้อ *Sclerotium rolfsii* Sacc. ด้วยสารชีวภาพที่ได้จากเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียไอโซเลต UD136 โดยใช้เซลล์ (หลุมขวา) และส่วนใส (หลุมซ้าย) เปรียบเทียบกับสารปฏิชีวนะ (หลุมบน) และอาหารเลี้ยงเชื้อ (หลุมล่าง)

ภาพ ข ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรคพืชของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียในอาหารเหลว เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตาราง ค โครงสร้างของสารประกอบต่างๆ ในกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbon

ชื่อสารประกอบ	**สูตรทางเคมี** (Molecular Formula)	**โครงสร้าง** (Molecular structure)
Pyrogallol, 1,2,3-Benzenetriol, 1,2,3-Trihydroxybenzene	$C_6H_6O_3$	
Sodium benzoate, Benzoic acid sodium salt	$C_7H_5NaO_2$	
Phenanthrene	$C_{14}H_{10}$	
p-Chlorophenol	ClC_6H_4OH	
Toluene	$C_6H_5CH_3$	

แหล่งที่มา : http://www.chemblink.com/index.htm

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Methyl red-Voges-Proskauer (MR-VP) broth

Polypeptone	7	กรัม
Glucose	5	กรัม
Dipotassium phosphate	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

2. Minimal Medium

KH_2PO_4	1	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
NaCl	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.7	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	4	กรัม
Na-citrate.$2H_2O$	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

3. Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

4. Peptone broth

Peptone	40	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

5. Starch agar

Soluble starch	2	กรัม
Nutrient agar	1000	มิลลิลิตร

6. Tryptone broth

Peptone หรือ pancreatic digest of casein		
Trypticase	20	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

สารเคมี

1. 20% glycerol

Glycerol	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

2. 5% α–napthol

alpha-napthol	5	กรัม
Ethyl alcohol (absolute)	100	มิลลิลิตร

3. 40% Potassium hydroxide

Potassium hydroxide	40	กรัม
Creatin	0.005	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4. Iodine solution

Potassium iodide (KI)	4	กรัม
Iodine crystals	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

เก็บในขวดสีชา

5. Kovac's reagent

Pure amyl หรือ isoamyl alcohol	150	มิลลิลิตร
p-Dimethylaminobenzaldehyde	20	กรัม
Concentrated HCl	40	กรัม

6. McFarland nephelometer barium sulfate standard 0.5

Barium chloride (1%)	0.05	มิลลิลิตร
H_2SO_4 (1%)	9.95	มิลลิลิตร

7. Nessler's reagent

Potassium iodide	50	กรัม
Potassium hydroxide (50%)	400	มิลลิลิตร
Mercuric chloride (saturated)		
น้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย	35	มิลลิลิตร

เติม Mercuric chloride (saturated) ลงในสารละลาย KI ที่ถูกละลายด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย จนกระทั่งเกิดตะกอนขึ้น จึงเติม KOH ลงไป ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

8. PC solution

$FeCl_3$	12	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 7.9M ในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

9. Salkowski reagent

0.5 M $FeCl_3$	2	มิลลิลิตร
35% perchloric acid	98	มิลลิลิตร