สำหรับผู้วิจัย

รหัสโครงการ .....

(เฉพาะเจ้าหน้าที่ สกอ.)

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชนฐานราก
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ชื่อโครงการย่อยที่ 1
ศึกษาสภาวะเหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตกรดอินโดลแอซีติกจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากข้าวไร่พื้นเมือง
Study on the optimization for increase production of indole acetic acid from bacterial endophyte isolated from indigenous upland rice

ภายใต้ชุดโครงการ
แบคทีเรียเอนโดไฟท์ผลิตกรดอินโดลแอซีติกที่แยกได้จากข้าวไร่พื้นเมืองและผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของข้าว
Indole acetic acids (IAA)-producing bacterial endophyte isolated from indigenous upland rice and its effect on rice growth

คณะผู้วิจัย
ดร.เสาวภา เขียนงาม (หัวหน้าโครงการ) (มหาวิทยาลัยศิลปากร)
ดร.ศิรพรรณ สุคนธสิงห์ (ผู้ร่วมวิจัย) (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)
นางสาวพิมพ์ใจ มีตุ้ม (ผู้ร่วมวิจัย) (มหาวิทยาลัยศิลปากร)

หัวหน้าโครงการ หรือ ผู้ประสานงานโครงการ
ชื่อ อาจารย์ ดร. เสาวภา เขียนงาม
หน่วยงานต้นสังกัด คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยศิลปากร
สถานที่ติดต่อ เลขที่ 1 หมู่ 3 ตำบลสามพระยา อำเภอชะอำ
จังหวัดเพชรบุรี 76120
โทรศัพท์ 032-594037-8 โทรสาร 032-594037-8
โทรศัพท์เคลื่อนที่ 081-2936604
E-mail: khianngam_s@silpakorn.edu

คำนำ

รายงานวิจัยฉบับนี้เป็นการศึกษาที่ประยุกต์ใช้องค์ความรู้ในคุณสมบัติเคมีของฮอร์โมนพืชที่ผลิตได้จากแบคทีเรียเพื่อการผลิตข้าว และเพื่อเป้าหมายในการนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในแปลงนาเกษตรกร โดยมุ่งหวังให้เกิดการพัฒนาองค์ความรู้ที่มาจากฐานทรัพยากร และมีการนำมาใช้อย่างคุ้มค่า โดยเฉพาะกับการเกษตรเพื่อเพิ่มผลผลิต และลดผลกระทบที่จะเกิดกับสิ่งแวดล้อม นอกจากเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตข้าวในปัจจุบันแล้ว ยังมุ่งหวังให้เป็นแนวทางการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันของข้าวไทยภายใต้การผลิตที่คำนึงถึงความปลอดภัยของผู้ผลิตและผู้บริโภค ซึ่งการศึกษาผลในระดับแปลงเป็นเป้าหมายต่อไปในการดำเนินการวิจัยเพื่อให้บรรลุตามเป้าประสงค์ของโครงการ และชุดโครงการวิจัย

คณะผู้วิจัย
สิงหาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) โดยการประสานงานของเครือข่ายบริหารการวิจัยอุดมศึกษาภาคกลางตอนล่าง งบประมาณปี พ.ศ. 2560

ขอขอบคุณ มูลนิธิชัยพัฒนา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์บุคลากรในโครงการศูนย์สาธิตพืชไร่และพืชสวนอันเนื่องมาจากพระราชดำริเข้าร่วมโครงการวิจัย และให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลประกอบการดำเนินการโครงการวิจัย

ขอขอบคุณเกษตรกรผู้ปลูกข้าวในพื้นที่ตำบลท่าแร้ง อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลการปลูกข้าวและแนวปฏิบัติของการปลูกข้าวในพื้นที่

ขอขอบคุณนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ร่วมทำงานวิจัยในครั้งนี้

ท้ายที่สุดขอขอบคุณ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี ที่ได้ให้การสนับสนุนการวิจัยของนักวิชาการในหน่วยงาน

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2561

ชื่อโครงการ ศึกษาสภาวะเหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตกรดอินโดลแอซีติกจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากข้าวไร่พื้นเมือง

บทคัดย่อ

ไอโซเลท RD4-1-1 เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากข้าวไร่พันธุ์พื้นเมือง สามารถผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้ 49.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *Curvularia* sp. ที่ 52.14±3.92 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ 16s rRNA gene และการสร้างลำดับวิวัฒนาการถูกระบุว่าเป็น *Enterobacter cancerogenus* RD4-1-1 ซึ่งถูกคัดเลือกเพื่อเพิ่มการผลิตกรดอินโดลแอซีติก หลังการหาสภาวะที่เหมาะสมภายใต้การเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ที่ประกอบด้วย 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของแอลทริปโตเฟน แมนนิทอล 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยความเป็นกรดด่าง 6.5 ความเข้มข้นเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที นาน 3 วัน แบคทีเรียผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้เพิ่มขึ้นถึง 161.39±2.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ยังสามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กรดอินโดลแอซีติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อได้นานถึง 1 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรดอินโดลแอซีติกถูกยืนยันจากการสกัดและวิเคราะห์ผ่านโครมาโทรกราฟีแผ่นบาง รอยจุดสีของตัวอย่าง RD4-1-1 มีความใกล้เคียงกับสาระละลายมาตรฐานกรดอินโดลแอซีติกที่ R_f 0.79 และ 0.80 ตามลำดับ นอกจากนี้กรดอินโดลแอซีติกจากแบคทีเรียความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมล เมื่อทดสอบกับข้าวพันธุ์ กข 31 สามารถแสดงการกระตุ้นต่อรากข้าวได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า *E. cancerogenus* RD4-1-1 สามารถเพิ่มผลผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้หลังผ่านการหาสภาวะเหมาะสม โดยกรดอินโดลแอซีติกที่ได้มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญของข้าวพันธุ์ กข 31

คำสำคัญ : แบคทีเรียเอนโดไฟท์ กรดอินโดลแอซิติก สภาวะการเลี้ยงแบคทีเรีย *Enterobacter cancerogenus*

Research Title Study on the optimization for increase production of indole acetic acid from bacterial endophyte isolated from indigenous upland rice

Abstract

The RD4-1-1 was endophytic bacteria isolated from the indigenous upland rice seed, which produced indole acetic acid (IAA) as 49.21 µg/ml and evaluated against *Curvularia* sp. as 52.14%±3.92. The isolate was selected for increase IAA production, which was identified as *Enterobacter cancerogenus* RD4-1-1 by nucleotide sequence of 16S rRNA gene and phylogenetic tree. After optimization, IAA production increased as 161.39±2.52 µg/ml when the Nutrient broth (NB) medium was supplemented with L-tryptophan 500 µg/ml, mannitol 1 % at pH 6.5, 1% of inoculum and incubated at 30 ºC, 150 rpm for 3 days. That, the sterile IAA product was stored for 1 month at 4 ºC. IAA was confirmed by extraction and subsequent thin layer chromatography analysis. The color spot of RD4-1-1 sample was found to close with a spot of standard IAA with R_f value at 0.79 and 0.80, respectively. Further, IAA of bacteria at 2.5 µM concentration was demonstrated to display stimulatory effect on growth of rice RD 31, which could significantly enhance root emergence of rice over the control treatment. Overall, the results of this study indicate that *E. cancerogenus* RD4-1-1 can produce IAA up-scale after optimization and had potential for stimulatory effect on growth of rice RD 31.

Keywords : Endophytic bacteria, Indole-3- acetic acid, Bacterial culture conditions, *Enterobacter cancerogenus*

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
หน้าปก	1
หัวหน้าโครงการ	2
คำนำ	3
กิตติกรรมประกาศ	4
บทคัดย่อภาษาไทย	5
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	6
สารบัญเรื่อง	7
สารบัญตาราง	8
สารบัญภาพ	9
สารบัญภาพภาคผนวก	10
บทที่ 1 ความเป็นมาและวัตถุประสงค์	11
ข้อมูลของโครงการ	11
ข้อมูลของหัวหน้าโครงการ	11
คณะผู้วิจัย	11
วัตถุประสงค์ของโครงการ	12
หลักการและเหตุผล	12
ผลการดำเนินงานตลอดโครงการ	12
ดัชนีชี้วัดความสำเร็จ	15
งบประมาณโครงการ	16
หนังสือแสดงความเห็นเกี่ยวกับผลการดำเนินการของโครงการจากชุมชน/ท้องถิ่นที่ร่วมโครงการ	17
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	25
บทที่ 4 ผลการดำเนินงาน	31
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการดำเนินการ	41
บทที่ 6 สรุปผลการดำเนินงานและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	48

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 6.1	ตารางสรุปผลงานวิจัยตลอดโครงการ	14
ตารางที่ 1	แบคทีเรียเอนโดไฟท์และบทบาทในการกระตุ้นการเจริญของพืช	21
ตารางที่ 2	การผลิต plant growth regulators (PGRs) โดย rhizobacteria และการตอบสนองต่อพืช	23
ตารางที่ 3	ลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ RD4-1-1	32
ตารางที่ 4	ผลความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย RD4-1-1	33
ตารางที่ 5	ประสิทธิภาพ IAA ของ RD4-1-1 ต่อการเจริญของราก ลำต้น และการเกิดโรคของข้าวพันธุ์ กข 31	40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 1	โครงสร้างทางเคมีของ indole-3-acetic acid (IAA)	18
ภาพที่ 2	วิถีการสังเคราะห์ IAA จากแบคทีเรียที่ทราบกลไก เส้นประแสดงปฏิกิริยาที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์	19
ภาพที่ 3	การขีดแบคทีเรียความยาว 0.5 cm ในแต่ละส่วนที่ทำการแบ่งบนอาหาร PDA และการวางชิ้นวุ้นราสาเหตุโรคพืช	27
ภาพที่ 4	การวัดรัศมีของเชื้อสาเหตุโรคพืชโดย (ภาพ A) รัศมีของโรคพืชในจานมาตรฐาน (ภาพ B) รัศมีของราโรคพืชที่ถูกทดสอบกับแบคทีเรีย	28
ภาพที่ 5	พันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองที่ถูกนำมาคัดแยกหาแบคทีเรียเอนโดไฟท์	31
ภาพที่ 6	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยเลนส์ตากำลังขยาย 100X (a) และลักษณะโคโลนี (b) ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ RD 4-1-1	32
ภาพที่ 7	Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships between RD4-1-1 and known *Enterobacter.* Based on 1000 resamplings, bootstrap percentages above 50% are shown. Bar, 0.002 substitutions per nucleotide position	33
ภาพที่ 8	ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่ออาหาร 7 ชนิดที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย RD4-1-1	34
ภาพที่ 9	ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่อความเข้มข้น 4 ระดับของอาหาร NB	35
ภาพที่ 10	ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่ออาหาร NB ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ	35
ภาพที่ 11	ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่อระดับ L-tryptophan ในอาหาร NBM	36
ภาพที่ 12	ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่อระดับ pH ต่างๆ ในอาหาร NBM+500 µg/ml ของ L-tryptophan	37
ภาพที่ 13	ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (วัน)	37
ภาพที่ 14	ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่อปริมาณหัวเชื้อ (%) RD4-1-1 ในอาหาร NBM+500 µg/ml ของ L-tryptophan pH 6.5	38
ภาพที่ 15	ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่อสภาพในการเก็บผลิตภัณฑ์ 4 รูปแบบ ในระยะเวลาแต่ละสัปดาห์	39
ภาพที่ 16	Thin layer chromatography (TLC) ของสารละลายมาตรฐาน IAA และสารละลายแบคทีเรีย RD4-1-1 (a) และแสดงระยะทางเพื่อหาค่า R_f (b)	39

สารบัญภาพภาคผนวก

ภาพภาคผนวกที่		หน้า
ภาพภาคผนวกที่ 1	หน้าปกเล่มบทคัดย่อในการนำเสนอผลงาน	49
ภาพภาคผนวกที่ 2	บทคัดย่อในการนำเสนอผลงาน	50
ภาพภาคผนวกที่ 3	การรับรางวัลชนะเลิศการนำเสนอผลงานแบบปากเปล่าของนักศึกษา	51

บทที่ 1
ความเป็นมาและวัตถุประสงค์

1) ข้อมูลของโครงการ

ชื่อโครงการ ศึกษาสภาวะเหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตกรดอินโดลแอซีติกจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากข้าวไร่พื้นเมือง

Study on the optimization for increase production of indole acetic acid from bacterial endophyte isolated from indigenous upland rice

ระยะเวลาของโครงการ 10 เดือน

งบประมาณรวม 137,158.00 บาท

2) ข้อมูลของหัวหน้าโครงการ

ดร.เสาวภา เขียนงาม

Dr. Saowapar Khianngam

สาขาความชำนาญ	จุลชีววิทยา เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
หน่วยงานต้นสังกัด	คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร
สถานที่ติดต่อ	มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี ตำบลสามพระยา อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
โทรศัพท์	0-3259-4038 โทรสาร 0-3259-4038
โทรศัพท์เคลื่อนที่	0-81-2936604
E-mail:	khianngam_s@silpakorn.edu, k_saowapar@yahoo.com

หน้าที่ : ศึกษาสภาวะเหมาะสมในการผลิตกรดอินโดลแอซีติก และทดสอบการเก็บรักษาในโครงการย่อยที่ 1 สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 50 เปอร์เซ็นต์

ลายมือชื่อ.....

(ดร.เสาวภา เขียนงาม)

3) คณะผู้วิจัย

<u>ผู้ร่วมโครงการ</u>

ดร.ศิรพรรณ สุคนธสิงห์

Dr. Siraphan Sukhonthasing

สาขาความชำนาญ	จุลชีววิทยา เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
หน่วยงานต้นสังกัด	ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
สถานที่ติดต่อ	คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์	02-579-8574
โทรสาร	02-579-8571
โทรศัพท์เคลื่อนที่	0-86-5337939
E-mail:	cvtsrp@ku.ac.th

หน้าที่ : ศึกษาลักษณะของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ ในโครงการย่อยที่ 1 สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 20 เปอร์เซ็นต์

ลายมือชื่อ.....

(ดร.ศิรพรรณ สุคนธสิงห์)

นางสาวพิมพ์ใจ มีตุ้ม

Miss Pimjai Meetum

สาขาความชำนาญ จุลชีววิทยา โรคพืช

หน่วยงานต้นสังกัด คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

สถานที่ติดต่อ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี ตำบลสามพระยา อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

โทรศัพท์ 0-3259-4038

โทรสาร 0-3259-4038

โทรศัพท์เคลื่อนที่ 0-87-7931518

E-mail: pim_jai13@ hotmail.com

หน้าที่ : วิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลแอซีติก และทดสอบทางเคมีบางประการ ในโครงการย่อยที่ 1 สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 30 เปอร์เซ็นต์

ลายมือชื่อ.....

(นางสาวพิมพ์ใจ มีตุ้ม)

4) วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาสภาวะเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากข้าวไร่พื้นเมืองเพื่อเพิ่มการผลิต IAA และทดสอบการเก็บรักษา IAA ให้นานยิ่งขึ้น

5) หลักการและเหตุผล

จุลินทรีย์เป็นทรัพยากรทางชีวภาพ ซึ่งบางกลุ่มก่อประโยชน์แก่พืช หรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น การสร้างกรดอินโดลแอซีติก (Indole acetic acid, IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินธรรมชาติที่สำคัญ เป็นของแข็ง และไม่มีสี ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ และกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช ในพืชบางชนิดมีความจำเป็นต้องใช้ IAA เป็นอย่างมากเพื่อใช้ในระยะเริ่มต้นในการเปลี่ยนแปลงเซลล์เพื่อสร้างอวัยวะ แต่ถ้าหากมีมากเกิน สำหรับพืชบางชนิดก็อาจทำให้เกิดการยับยั้งการพัฒนาของเซลล์พืชได้ หากพืชได้รับ IAA ในระดับที่เหมาะสมก็เท่ากับเป็นการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Harikrishnan et al., 2014) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิต IAA ได้ ทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท เชื้อรา และยีสต์ (Khan et al., 2014; Nutaratat et al., 2015; Syamsia et al., 2015) แต่ปริมาณการผลิตได้ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นจากสภาวะการเลี้ยง แหล่งอาหาร และปริมาณสารตั้งต้นที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น

ในปัจจุบันเกษตรกรให้ความสำคัญกับการใช้ IAA ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช แต่ทั้งนี้ IAA ส่วนใหญ่เป็นสารสังเคราะห์ทางเคมี ออกฤทธิ์รุนแรง ซึ่งเป็นการยากต่อการควบคุมของพืช และมีราคาแพง เพราะมีการนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นเพื่อเป็นการอนุรักษ์การเกษตรกรรมอย่างยั่งยืน โดยการลดปุ๋ยเคมี ยาฆ่าแมลง และสารเติมแต่งต่างๆ การเลือกใช้วิธีทางชีวภาพจึงมีความน่าสนใจ ซึ่งก็คือการเลือกใช้สารทุติยภูมิที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์ (Leveau and Lindow, 2005; Kukavica et al., 2007)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่เป็นอันตรายหรือก่อโรคให้แก่พืช จากตัวอย่างเมล็ดข้าวไร่พันธุ์พื้นเมือง เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติบางประการที่ก่อให้เกิดประโยชน์กับพืชพบว่าสามารถผลิต IAA และมีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราโรคพืชบางสายพันธุ์ ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนา และเพิ่มปริมาณการผลิต IAA จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ให้เป็นผลิตภัณฑ์ การปรับหาสภาวะเหมาะสม เช่น ปริมาณสารตั้งต้นของ L-tryptophan, แหล่งสารอาหาร และสภาวะการเพาะเลี้ยง รวมทั้งวิธีการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ IAA จากจุลินทรีย์ให้นานมากขึ้น จึงเป็นสิ่งสำคัญและน่าสนใจ

6) ผลการดำเนินงานตลอดโครงการ

1. แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเมล็ดข้าวไร่พันธุ์พื้นเมือง เมื่อนำออกมาจาก stock culture และทดสอบการผลิตฮอร์โมน IAA พบว่ายังมีการสร้างฮอร์โมนในปริมาณใกล้เคียงเดิมเทียบเท่ากับการคัดเลือกเริ่มต้น

2. ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

3. ได้ทำการทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ และส่งเสริมการผลิต IAA ให้ได้ปริมาณสูงขึ้นเรียบร้อยแล้ว

4. ศึกษาสภาวะการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ IAA จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์

5. ทำการแยก IAA ให้บริสุทธิ์อย่างหยาบ และทำการยืนยันผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบางเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

6. ทดสอบคุณสมบัติบางประการที่ส่งผลต่อการส่งเสริมการเจริญของพืช

7. สรุปผลโครงการ และนำผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ไปเผยแพร่ให้เกษตรกร ชุมชน (*ผลรายงานอยู่ในแผนงานวิจัย)*

ตารางที่ 6.1 ตารางสรุปผลงานวิจัยตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	แผนงานวิจัย	นักวิจัยที่รับผิดชอบ	ผลงานตลอดโครงการ
1. เพื่อศึกษาสภาวะเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากข้าวไร่พื้นเมืองเพื่อเพิ่มการผลิต IAA และทดสอบการเก็บรักษา IAA ให้นานยิ่งขึ้น	1.1 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA ได้สูงสุด	1. ดร. เสาวภา เขียนงาม	1.1 ได้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้สูงที่สุด
	1.2 บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรีย	1. ดร. เสาวภา เขียนงาม 2. ดร. ศิรพรรณ สุคนธสิงห์	1.2 ทราบสายพันธุ์แบคทีเรีย
	1.3 ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ และส่งเสริมการผลิต IAA ให้ได้ปริมาณสูงขึ้น	1. ดร. เสาวภา เขียนงาม 2. นางสาวพิมพ์ใจ มีตุ้ม	1.3 ได้สภาวะเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและส่งเสริมการผลิต IAA
	1.4 ศึกษาสภาวะการเก็บรักษา IAA	1. ดร. เสาวภา เขียนงาม	1.4 ได้สภาวะในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ IAA
	1.5 ทำการยืนยันผลิตภัณฑ์ IAA จากแบคทีเรียด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี	1. ดร. เสาวภา เขียนงาม	1.5 ยืนยันผลิตภัณฑ์ IAA จากแบคทีเรียที่ผลิต
	1.6 ทดสอบ IAA กับผลการงอกของข้าวในเบื้องต้น	1. ดร. เสาวภา เขียนงาม 2. นางสาวพิมพ์ใจ มีตุ้ม	1.6 IAA จากแบคทีเรียสามารถนำไปช่วยในการเจริญของพืชได้

7) ดัชนีชี้วัดความสำเร็จ (โปรดระบุถึงสิ่งที่ได้รับเมื่อสำเร็จโครงการตามดัชนีชี้วัดความสำเร็จในข้อเสนอโครงการฉบับสมบูรณ์ และแสดงหลักฐานประกอบแนบมาด้วย)

ผลงาน	ดัชนีชี้วัดความสำเร็จ	หลักฐานประกอบ
1. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ (โปรดระบุ)		
2. เทคโนโลยีใหม่ (โปรดระบุ)		
3. กระบวนการใหม่ (โปรดระบุ)		
4. องค์ความรู้ (โปรดระบุ)		
5. การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์		
6. การใช้ประโยชน์เชิงสาธารณะ 6.1 การฝึกอบรม 6.2 การถ่ายทอดเทคโนโลยี	จำนวน.....-.....ครั้ง ครั้งที่.....-..... วันที่ .....-..... สถานที่ .....-..... ผู้เข้ารับการอบรม คือ .....-..... จำนวน ...-..... คน	
7. การผลิตนักศึกษา 7.1 ปริญญาตรี 7.2 ปริญญาโท 7.3 ปริญญาเอก	ระดับปริญญาตรี จำนวน.....2.....คน ได้แก่ 1. นางสาวณัฐดา สว่างงาม รหัสประจำตัว 11580232 2. นายณัฐพล ขันนพคุณ รหัสประจำตัว 11580233	กำลังดำเนินการเพื่อเตรียมสอบจุลนิพนธ์
8. ทรัพย์สินทางปัญญา (อนุสิทธิบัตร/ สิทธิบัตร / ลิขสิทธิ์ ฯลฯ)	จำนวน....-.... เรื่อง 1. ประเภท IP..... เรื่อง..... สถานะ (อยู่ระหว่างการยื่นคำขอจดทะเบียน/ ได้รับ IP แล้ว) ..... 2. ประเภท IP..... เรื่อง.....สถานะ.....	
9. บทความทางวิชาการ 9.1 วารสารในประเทศ 9.2 วารสารในระดับนานาชาติ 9.3 เอกสารเผยแพร่	จำนวน...-.....เรื่อง ชื่อเรื่อง..-..... ชื่อวารสาร....-..... ปีที่พิมพ์.....-.....	
10. การเสนอผลงานในการประชุม 10.1 การประชุมระดับชาติ 10.2 การประชุมระดับนานาชาติ	การประชุมระดับชาติ (นำเสนอแบบ oral) จำนวน...1.....ครั้ง ชื่อการประชุม “ The 5th Regional Undergraduate Conference on Agricultural Science and Technology” (RUCA V) วันที่ 22-23 มีนาคม 2561 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา จ.สงขลา	- แนบหน้าปก, บทคัดย่อ, ภาพถ่าย การรับรางวัลชนะเลิศการนำเสนอในภาคผนวก

8) งบประมาณโครงการ

รายการ	งบประมาณจาก สกอ จำนวนเงิน (บาท)
1. หมวดค่าตอบแทน (ค่าตอบแทนผู้วิจัย)	-
2. หมวดค่าจ้าง (ผู้ช่วยวิจัยและเจ้าหน้าที่อื่นๆ ให้ระบุจำนวน อัตรา คุณวุฒิ และคิดอัตราค่าจ้างตามที่กำหนด)	-
3. หมวดค่าวัสดุ	
3.1 วัสดุเกษตร	5,256
3.2 วัสดุวิทยาศาสตร์	67,158
3.3 วัสดุสำนักงาน	5,332
3.4 วัสดุเชื้อเพลิง	6,156
3.5 วัสดุอื่น ๆ	5,129
4. ค่าเดินทางระหว่างปฏิบัติการในโครงการ	17,500
5. ค่าจัดหาข้อมูล และค่าทำรายงาน	5,627
6. ค่าจ้างวิเคราะห์หรือทดสอบตัวอย่าง	25,000
7. อื่นๆ (โปรดระบุ)	
รวม (บาท)	137,158
	หนึ่งแสนสามหมื่นเจ็ดพันหนึ่งร้อยห้าสิบแปดบาทถ้วน

หนังสือแสดงความเห็นเกี่ยวกับผลการดำเนินการของโครงการจากชุมชน/ท้องถิ่นที่ร่วมโครงการ

วันที่ ....5.....เดือน..เมษายน.....พ.ศ. ....2561.....

เรื่อง ความเห็นเกี่ยวกับผลการดำเนินการของโครงการ อิทธิพลของกรดอินโดลแอซีติกที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวไร่พื้นเมืองต่อการเจริญเติบโตของข้าว

เรียน เลขาธิการคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ข้าพเจ้า...นายไสว แจ่มแจ้ง.....ตำแหน่ง.....เจ้าหน้าที่สำนักบริหารโครงการ ประจำโครงการศูนย์สาธิตพืชไร่และพืชสวนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ..... หน่วยงาน/องค์กร.....มูลนิธิชัยพัฒนา..... ในฐานะผู้เข้าร่วมโครงการมีความคิดเห็นเกี่ยวกับผลการดำเนินการของโครงการดังนี้

ควรนำเสนอแก่เกษตรกรควรมีแปลงเปรียบเทียบในแก้
เกษตรกรในพื้นที่เพื่อให้เห็นข้อดีข้อเสียที่เกิดขึ้น

องค์ความรู้ที่ได้รับจากผู้วิจัยเป็นประโยชน์ต่อข้าพเจ้า ดังนี้

- ☑ องค์ความรู้ที่ได้รับสอดคล้องกับความต้องการ / แก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้
- ☑ องค์ความรู้ที่ได้รับสามารถนำไปประยุกต์ใช้เข้ากับการปฏิบัติงานจริงได้
- ☑ องค์ความรู้ที่ได้รับสามารถนำไปพัฒนาเทคโนโลยีใหม่/ต่อยอด/ขยายผลได้
- ☑ องค์ความรู้ที่ได้รับก่อให้เกิดรายได้/สร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลิตภัณฑ์/พัฒนาคุณภาพชีวิต/ยกระดับความเป็นอยู่ให้ดีขึ้นได้
- ☐ อื่น ๆ ระบุ .....

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

ขอแสดงความนับถือ

(ลงชื่อ).....

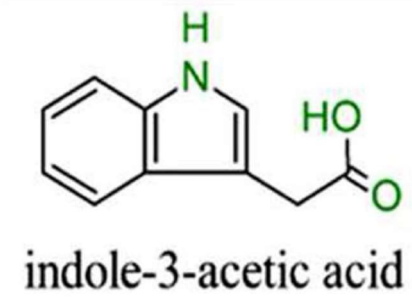
(นายไสว แจ่มแจ้ง)

(ตำแหน่ง) เจ้าหน้าที่บริหารโครงการฯ

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กรดอินโดลแอซีติก

ในปี ค.ศ. 1880 ชาร์ล ดาร์วิน ได้เสนอว่าการเจริญเติบโตของพืชถูกควบคุมด้วยสารบางอย่างซึ่งมีการส่งผ่านผลการควบคุมจากส่วนหนึ่งของพืชไปยังส่วนอื่นๆ ของพืช (Darwin and Darwin, 1880) อีกครึ่งศตวรรษต่อมาเรียกสารนี้ว่า “ออกซิน (auxin)” ออกซินมีโครงสร้างทางเคมีคือ indole-3-acetic acid (IAA) (ภาพที่ 1) ((Went and Thimann, 1937) ไฟโตฮอร์โมนออกซิน (phytohormoneauxin) เป็นกุญแจสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืชหลายอย่างประกอบโดย ช่วยเพิ่มการยืดยาวของราก จำนวนขนรากและรากแขนง ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการนำสารอาหารเข้าสู่รากพืช นอกจากนี้ IAA ยังมีบทบาทกระตุ้นการแบ่งเซลล์ เพิ่มการเลือกผ่านของน้ำเข้าสู่เซลล์ ลดแรงดันเซลล์ เพิ่มการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ชักนำการสังเคราะห์โปรตีน และชักนำดอกและผล (Woodward and Bartel, 2005)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ indole-3-acetic acid (IAA) (Olanrewaju et al., 2017)

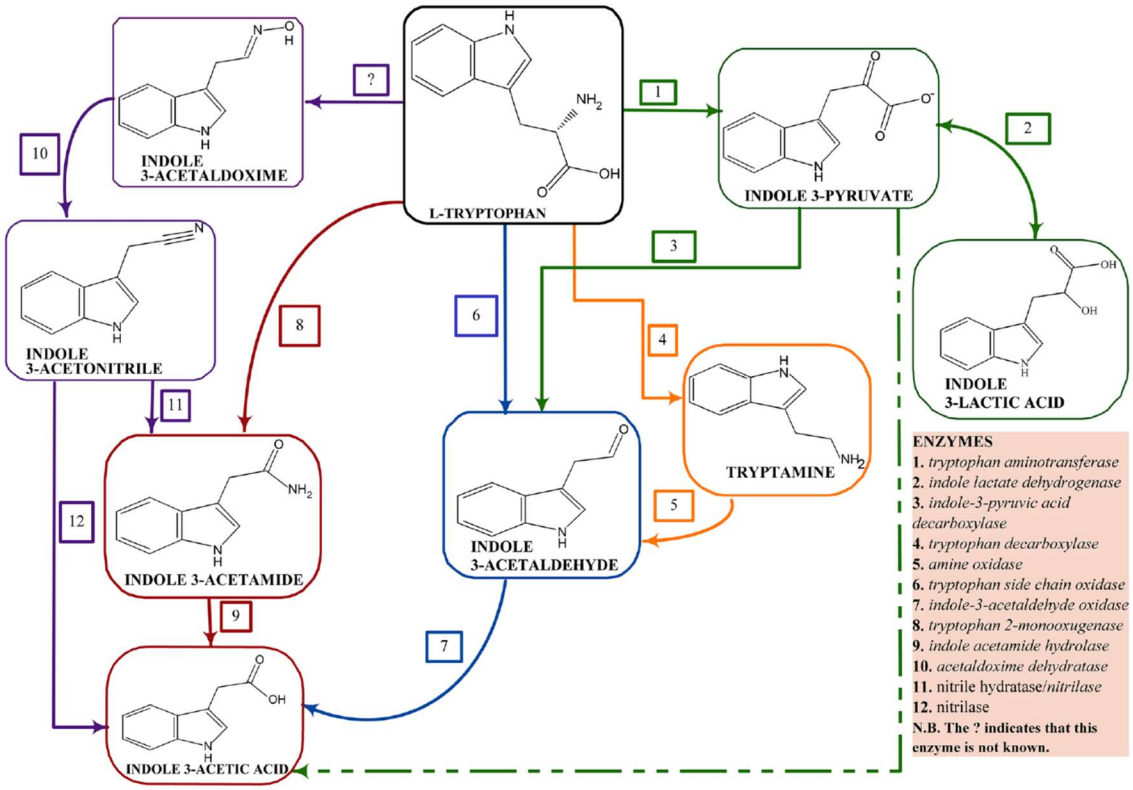
ในพืช IAA ถูกสังเคราะห์มาจาก tryptophan ผ่านตัวกลางหลายตัว โดย Mano and Nemoto (2012) ได้สรุปวิถีชีวสังเคราะห์ (biosynthesis pathway) ของ IAA ว่าผ่านวิถีชีวสังเคราะห์หลักอยู่ 2 วิถี คือ tryptophan (Trp)-independent pathway และ trp-dependent pathway โดยชีวสังเคราะห์ของ IAA ใน trp-dependent pathway ซึ่งสังเคราะห์เริ่มต้นจาก tryptophan นี้ผ่านตัวกลางแตกต่างกันไป ได้แก่ indole-3-acetamide (IAM), indole-3-pyruvicacid (IPA), tryptamine (TAM) และ indole-3-acetaldoxime (IAOX) ส่วนชีวสังเคราะห์ของ IAA ใน trp-independent pathway จะมี indole-3-glycerol phosphate หรือ indole เป็นสารตั้งต้น แต่ยังมีความรู้เพียงเล็กน้อยสำหรับการสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถีนี้

ในชีวสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี IAM มีเอนไซม์สำคัญ คือ indole-3-acetamide hydrolase ถูกกำหนดให้สร้างโดยยีนส์ *AM1* ซึ่งการสังเคราะห์ผ่านวิถีนี้มีการกระจายอย่างกว้างขวางในอาณาจักรพืชทั้งในกลุ่ม monocots และกลุ่ม dicots ในขณะที่ชีวสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี IPA จะมียีนส์ *TAA1/TIR2* เข้ามามีส่วนร่วมใน

การเปลี่ยน Trp เป็น IPA พบเอ็นไซม์ค่อนข้างจำเพาะสำหรับพืชตระกูล Brassiscaceae และในชีวสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี TAM ควบคุมด้วยยีนส์ *YUCs* ซึ่งยังมีความคลุมเครือในบทบาทของยีนส์นี้ สำหรับวิถี IAOX ควบคุมด้วยยีนส์ *CYP79B2* และ *CYP79B3* ไม่พบวิถีนี้ในพืชทั่วไปพบเฉพาะในพืชตระกูล Brassiscaceae (Bak et al., 1998)

ฮอร์โมน IAA สามารถพบได้ทั่วไปในพืชชั้นสูง สาหร่าย มอส และไลเคนส์ นอกจากกลุ่มพืชแล้ว ยังพบว่ามีจุลินทรีย์อีกหลายชนิดที่สามารถผลิต IAA ได้ โดยเฉพาะกลุ่มที่เจริญอยู่บริเวณรอบรากพืช และจุลินทรีย์มีชีวิตที่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช ที่เรียกว่า endophyte (Lin and Xu 2013; Mohite, 2013)

การสังเคราะห์ IAA จากแบคทีเรียสามารถอธิบายได้จากภาพที่ 2 โดยการเกิดขึ้นของ IAA จากแบคทีเรียอย่างน้อยต้องผ่านกระบวนการสังเคราะห์ 3 วิถีด้วยกัน โดยแต่ละวิถีจะมีสารตัวกลางสำคัญที่ต่างกันออกไป วิถีที่พบได้แก่ the indole pyruvic acid (IPy A), the indole acetamide (IAM), the indole acetaldoxime (IAOx)/indoleacetonitrile (IAN), the indole acetaldehyde (IAH) และ the tryptamine ทั้งนี้แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งการสังเคราะห์ดังกล่าวมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตและบทบาทหน้าที่ในการเจริญเติบโต (Olanrewaju et al., 2017)



ภาพที่ 2 วิถีการสังเคราะห์ IAA จากแบคทีเรียที่ทราบกลไก เส้นประแสดงปฏิกิริยาที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (Olanrewaju et al., 2017)

จุลินทรีย์ endophyte

จุลินทรีย์ endophyte หมายถึงจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื่อเยื่อพืช โดยไม่ทำให้เกิดโรคและมีความสัมพันธ์กับพืชแบบ mutualistic symbiosis จุลินทรีย์ endophyte สร้างสารประกอบหรือปฏิกิริยาบางชนิดกับพืชที่อาศัย ทำให้พืชเกิดความต้านทานโรค ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งในทางตรงข้าม จุลินทรีย์ endophyte ได้รับประโยชน์จากพืชโดยอาศัยสารอาหารต่างๆจากพืช และดำรงชีวิตอยู่ภายในเซลล์พืช นอกจากนี้ จุลินทรีย์ endophyte บางสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ และสามารถใช้เป็น biological control agents โดยเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช (Chanway, 1998)

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบจากพืชหลายสปีชีส์ พบว่ามีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยจีนัสที่พบบ่อย ได้แก่ *Pseudomonas, Bacillus* และ *Azospirillum* โดยสามารถคัดแยกได้จากผิวหรือด้านในเนื้อเยื่อของพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าให้ประโยชน์กับพืชที่อาศัย เช่น กระตุ้นการเจริญเติบโต ตรึงไนโตรเจน ป้องกันโรค เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียเอนโดไฟท์ยังให้ผลิตผลพลอยได้เป็นสารอื่นๆ เช่น วิตามิน สารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งมีความจำเป็นต่อพืชได้อีกด้วย เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Phetcharat and Duangpaeng (2012) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อเมล็ดข้าวอินทรีย์ พบกลุ่มจีนัส *Pseudomonas, Bacillus*, *Azotobacter* และ *Enterobacter* ที่สามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA ได้ปริมาณ 10-14.58 µg/ml ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเพื่อปรับปริมาณผลผลิตให้มากขึ้นในอนาคต

Prasad and Dagar (2014) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จาก fruits like avacado และ black grapes พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 6 ไอโซเลท อยู่ในจีนัส *Bacillus* และสามารถผลิต IAA ได้ทั้งหมด โดยทั้งนี้บางไอโซเลตสามารถผลิต siderophore หรือเอนไซม์ไลเปส หรือโปรติเอสได้ จากการทดลองจะเห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์ที่สำคัญทางอุตสาหกรรม

Khan et al. (2014) ใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญกับต้นมะเขือเทศ โดยแบคทีเรียดังกล่าวเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Sphingomonas* sp. LK11 ที่สามารถผลิตฮอร์โมนพืช gibberellins (GAs) และ IAA (11.23 ± 0.93 µM/ml) ได้ จากผลการทดลองพบว่าต้นมะเขือเทศมีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสังเกตจากความยาวลำต้น ปริมาณคลอโรฟิลล์ น้ำหนักแห้งของลำต้นและราก ดังนั้นไฟโตฮอร์โมนที่ผลิตจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์สามารถช่วยเพิ่มการเจริญของพืชได้

Raheem et al. (2017) คัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากผิวใบและผิวรากของข้าว พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมน IAA ในช่วง 11.50 ± 0.77 ถึง 38.80 ± 1.35 ug/ml เมื่อถูกระบุเอกลักษณ์พบว่าเป็น *Micrococcus yunnanensis* RWL- 2, *Micrococcus luteus* RWL- 3, *Enterobacter soli* RWL-4, *Leclercia adecarboxylata* RWL- 5, *Pantoea dispersa* RWL- 6 และ *Staphylococcus epidermidis* RWL-7 ผู้วิจัยได้ทำการประเมินผลต่อการเจริญของข้าว พบว่ากลุ่มแบคทีเรียเอนโดไฟท์ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้

Santoyo et al. (2016) ได้ทำการรวบรวมข้อมูลแบคทีเรียกลุ่มเอนโดไฟท์ที่เคยมีรายงานในการผลิตสารที่เป็นประโยชน์ต่อพืชดังตารางที่ 1 จากข้อมูลจะเห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวที่อาศัยอยู่กับพืชก็สามารผลิตสารที่มีประโยชน์ให้กับพืชได้เช่นกัน

นอกจากแบคทีเรียกลุ่มเอนโดไฟท์แล้ว ยังมีรายงานการผลิตฮอร์โมนและสารที่มีประโยชน์ต่อพืชจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งที่เกี่ยวข้องกับพืช เช่น บริเวณรอบรากพืช (ตารางที่ 2) (Hayat et al., 2010) ดังนั้นจากข้อมูลจึงทำให้เห็นว่าแบคทีเรียเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งสำคัญในการผลิตฮอร์โมน และสารมีประโยชน์กับพืช

ตารางที่ 1 แบคทีเรียเอนโดไฟท์และบทบาทในการกระตุ้นการเจริญของพืช

Endophyte species	Genome size Mb (Replicons)	Host plant	Plant growth-promoting traits
Azoarcus sp. BH72	4.37(1 chr, 0 pl)	Rice	Nitrogen fixation
Azospirillum lipoferum 4B	6.85(1 chr, 6 pl)	Rice, maize, wheat	Nitrogen fixation, phytohormone secretion
Azospirillum sp. B510	7.6(1 chr, 6 pl)	Rice	Nitrogen fixation, phytohormone secretion
Burkholderia phytofirmans PsJN	8.2(2 chr, 1 pl)	Potato, tomato, maize, barley, onion, canola, grapevine	IAA synthesis, ACC deaminase
Burkholderia spp. KJ006	6.6(3 chr, 1 pl)	Rice	ACC deaminase, *nif* gene cluster, antifungal action (indirect PGP)
Enterobacter cloacae ENHKU01	4.7(1 chr, 0 pl)	Pepper	Unkwon role in PGP
Enterobacter sp. 638	4.67(1 chr, 1 pl)	Poplar	Siderophore, IAA, acetoin and 2,3-butanediol synthesis, antifungal action (indirect PGP)
Gluconacetobacter diazotrophicus PaI5	3.9(1 chr, 2 pl)	Sugarcane, rice, coffe, tea	Nitrogen fixation, auxin synthesis
Klebsiella pneumoniae 342	5.9(1 chr, 2 pl)	Maize, wheat	Nitrogen fixation
Pseudomonas putida W619	5.77(1 chr, 0 pl)	Poplar	IAA synthesis, ACC deaminase
Pseudomonas stuzeri A1501	4.5(1 chr, 0 pl)	Rice	Nitrogen fixation
Serratia proteamaculans 568	5.5(1 chr, 1 pl)	Soybean	IAA synthesis, ACC deaminase, acetoin and 2,3-butanediol synthesis
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	4.57(1 chr, 0 pl)	Poplar	IAA synthesis, ACC deaminase

สภาวะเหมาะสมในการผลิต IAA

IAA จากจุลินทรีย์เป็นสารทุติยภูมิที่เกิดขึ้นจากขบวนการเมแทบอไลท์ L-tryptophan จะผลิตได้ดีเมื่อใช้สารตั้งต้นในช่วงแบคทีเรียเจริญเติบโตได้สูงที่สุด (Log phase) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณการผลิต IAA จะเกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรีย โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และปริมาณสารตั้งต้นของ L-tryptophan เป็นต้น

Sachdev et al. (2009) คัดแยก *Klebsiella pneumonia* ได้จากดินบริเวณรอบรากข้าวสาลี โดยแบคทีเรียแสดงการผลิต IAA ได้สูงสุดที่ 27.5 mg/l ในสภาวะที่มี L-tryptophan (1 mg/ml) เป็นสารตั้งต้น และมีความเข้มข้น NaCl 0.5%, pH 8.0, บ่มที่ 37 ^{o}C นาน 72 ชม. จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของ IAA กับการงอกของเมล็ด moth bean ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าความยาวรากมากขึ้น (ประมาณ 92.71%) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และการทดลองในระดับกระถางพบว่าความยาวราก และความสูงของลำต้นพืชเพิ่มขึ้น

เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงได้ข้อสรุปว่า IAA จากแบคทีเรียสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเกษตรกรรมได้ ซึ่งการนำไปใช้จริงในแปลงทดสอบ ควรมีปริมาณ IAA ในระดับที่มากพอสมควร ดังนั้นการทดลองโดยปรับปัจจัยทั้งหลายสามารถเพิ่มปริมาณการผลิต IAA เช่นเดียวกับงานของ Khamna et al (2010) ที่รายงานการปรับปรุงการผลิต IAA จาก *Streptomyces* CMU-H009 โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งหลายที่ทำให้แบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณการผลิต IAA จาก 143 µg/ml เป็น 300 µg/ml ได้

Patil et al. (2011) รายงานสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต IAA ของแบคทีเรีย *Acetobacter diazotrophicus* L1 โดยพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครส และชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลาย รวมทั้งการให้อากาศทำให้แบคทีเรียมีการผลิต IAA ได้สูงขึ้น (26.28 µg/ml) โดยสูตรอาหารที่ใช้ คือ อาหาร basal (pH 6.0) ที่เติมซูโครส (12% w/v), yeast extract (0.05 g/l), L-tryptophan (1.2 g/l) และ NH_4Cl (0.1% w/v) ที่ 200 rpm จากนั้นเมื่อทำการทดสอบกับข้าวโพดพบว่ามวลชีวภาพของรากและลำต้นเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Apine and Jadhav (2011) ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มการผลิต IAA จากแบคทีเรีย *Pantoea agglomerans* PVM พบว่าในอาหารควรประกอบด้วย meat extract 8 g/l และ L-tryptophan 1g/l ที่ pH 7.0 และทำเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 48 ชม. แบคทีเรียจึงสามารถผลิต IAA ได้สูงที่สุด 2.191 g/l ผลการทดสอบกับพืช *Nicotiana tobacum* พบว่า IAA ช่วยชักนำรากมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้น IAA จากแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในงานการเกษตร โดยสภาวะการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิต IAA.ใช้อาหารอย่างง่าย ราคาไม่แพง และสามารถผลิต IAA ได้ในช่วงระยะเวลาสั้น สามารถนำไปเพิ่มปริมาณการผลิตได้

Sudha et al. (2012) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต IAA ของ *Rhizobium* sp. และ *Bacillus* sp. โดยคัดเลือกปัจจัยสภาวะการเพาะเลี้ยง เช่น pH อุณหภูมิ และสารตั้งต้น

Mohite (2013) ศึกษาคุณสมบัติของ rhizosphere bacteria ต่อการกระตุ้นการเจริญของพืช โดยทำการศึกษาสภาวะในการผลิต IAA จากปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และความเข้มข้นของ L-tryptophan จากนั้นนำ IAA ที่ได้ทดสอบกับพืชในกระถาง พบว่า IAA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียมีประสิทธิภาพต่อการกระตุ้นการเจริญของพืช

Dasri et al. (2014) ศึกษาสภาวะเหมาะสมเพื่อการผลิต IAA จากแบคทีเรียไอโซเลท DPY-05 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยศึกษาจากปัจจัย อาหารเลี้ยงเชื้อ pH อุณหภูมิ สภาวะการให้อากาศ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง พบว่าแบคทีเรียให้ค่า IAA ได้สูงที่สุด 67.18 µg/ml เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร King-B ที่มี L-tryptophan 2.5 mM, pH 7.0 และ 37 °C ในสภาวะนิ่ง (static condition) นาน 6 วัน

Nutaratat et al. (2017) เพิ่มการผลิต IAA ในแบคทีเรีย *Enterobacter* sp. DMKU-RP206 ได้ถึง 13.4 เท่า (5,561.7 mg/l) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงอาหาร TSB ที่ประกอบด้วย 0.85% แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน, 1.3% yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน, 1.1% L-Tryptophan, 0.4% NaCl, pH 5.8 บ่มที่ 30 ºC ด้วย 200 rpm

ตารางที่ 2 การผลิต plant growth regulators (PGRs) โดย rhizobacteria และการตอบสนองต่อพืช (Hayat et al., 2010)

PGPR	PGRs	Crops	Responses
Kluyvera ascorbata SUD 165	Siderophores, indole-3-acetic acid	Canola, tomato	Both strains decreased some plant growth inhibition by heavy metals (nickel, lead, zinc)
Rhizobium leguminosarum	Indole-3-acetic acid	Rice	Inoculation with *R. leguminosarum* had significant growth promoting effects on rice seedlings.
Rhizobium leguminosarum	Indole-3-acetic acid	Rice	Growth promoting effects upon inoculation on axenically grown rice seedlings were observed
Azotobacter sp.	Indole-3-acetic acid	Maize	Inoculation with strain efficient in IAA production had significant growth promoting effects on maize seedlings.
Rhizobacterial isolates	Auxins	Wheat, rice	Inoculation with rhizobacterial isolates had significant growth promoting effects on wheat and rice
Rhizobacteria (unidentified)	Indole-3-acetic acid	Brassica	Significant correlation between auxin production by PGPR in vitro and growth promotion of inoculated rapeseed seedlings in the modified jar experiments were observed
Rhizobacteria (unidentified)	Indole-3-acetic acid	Wheat, rice	Rhizobacterial strains active in IAA production had relatively more positive effects on inoculated seedlings.
Pseudomonas fluorescens	Siderophores, indole-3-acetic acid	Groundnut	Involvement of ACC deaminase and siderophore production promoted nodulation and yield of groundnut
Rhizobacteria (Unidentified)	Auxin, indole-3-acetic acid, acetamide	Wheat	Strain produced highest amount of auxin in non-sterilized soil and caused maximum increase in growth yield
Azospirillum brasilense A3, A4, A7, A10, CDJA *Bacillus circulans* P2, *Bacillus* sp. P3,*Bacillus magaterium* P5, *Bacillus*. Sp. Psd7 *Streptomyces anthocysnicus* *Pseudomonas aeruginosa* Psd5 *Pseudomonas pieketti* Psd6, *Pseudomonas fluorescens* MTCC103,	Indole-3-acetic acid,	Rice	All the bacterial strains increased rice grain yield over uninoculated control
Azospirillum lipoferum strains 15		Wheat	Promoted development of wheat root system even under crude oil contamination in pot experiment in growth chamber
Pseudomonas denitrificans *Pseudomonas rathonis*	Auxin	Wheat, maize	All the bacterial strains had been found to increase plant growth of wheat and maize in pot experiments
Azotobacter sp. *Pseudomonas* sp.	Indole-3-acetic acid	Sesbenia, mung bean	Increasing the concentration of tryptophane from 1 $mgml^{-1}$ to 5 $mgml^{-1}$ resulted in decreased growth in both crops
Pseudomonas sp.	Indole-3-acetic acid	Wheat	A combined bio-inoculation of diacetyl-phloreglucinol producing PGPR and AMF and improved the nutritional quality of wheat grain
Bacillus cereus RC 18, *Bacillus licheniformis* RC08, *Bacillus megaterium* RC07, *Bacillus subtilis* RC11, *Bacillus*. OSU-142, *Bacillus* M-13, *Pseudomonas putida* RC06, *Paenibacillus polymyxa* RC05 and RC14	Indole-3-acetic acid	Wheat, spinach	All bacterial strains were efficient in indole acetic acid (IAA) production and significantly increased growth of wheat and spinach
Mesorhizobium loti MP6,	Chrom-azurol, siderophore (CAS), hydrocyanic acid (HCN), indole-3-acetic acid	Brassica	*Mesorhizobium loti* MP6-coated seeds enhanced seed germination, early vegetative growth and grain yield as compared to control
Pseudomonas tolaasii ACC23, *Pseudomonas fluorescens* ACC9, *Alcaligenes* sp. ZN4, *Mycobacterium sp. ACC14,*	Siderophores, iIndole-3-acetic acid	Brassica	PGPR strains protect canola plant against the inhibitory effects of cadmium
Bacillus sp. *Paenibacillus* sp.	Indole-3-acetic acid	Rice	The isolate SVPR 30, i.e. strain of *Bacillus* sp., proved to be efficient in promoting a significant increase in the root and shoot parts of rice plants
Streptomyces acidiscabies E13	Hydroxamate siderophores	Cowpea	*S. acidiscabies* promoted cowpea growth under nickel stress

จากรายงานที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหาร แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน เกลือแร่ รวมทั้งสภาวะ pH อุณหภูมิ และอากาศที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการศึกษาหาสภาวะเหมาะสมสำหรับแบคทีเรียแต่ละชนิดเพื่อเพิ่มการผลิตผลิตภัณฑ์จึงมีความสำคัญ

นอกจากการเพิ่มการผลิต IAA ให้สูงขึ้นจากสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล้ว การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ IAA ที่ได้ ก็เป็นสิ่งสำคัญ โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ ได้แก่ อุณหภูมิ แสง และลักษณะของผลิตภัณฑ์ Abraham et al. (2015) แสดงการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *Enterobacter cloacae* JAS7 ในรูปแบบผง 2 แบบ ที่เตรียมโดย saw dust/soil/5 % molasses (15:5:1) และ saw dust/soil/nutrients (carbon, nitrogen and phosphorus) โดยใช้ fly ash เป็นที่ยึดให้กับแบคทีเรีย (immobilization) เพื่อใช้สำหรับเพิ่มปริมาณเซลล์ จากนั้นทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนาน 12 สัปดาห์ และทำการทดสอบปริมาณเชื้อและผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองแสดงถึงข้อดีในการเก็บรักษาปริมาณเซลล์และผลิตภัณฑ์ที่สูงได้ มีอายุการเก็บรักษาและปกป้องผลิตภัณฑ์จากสิ่งแวดล้อมได้ยาวนานขึ้น

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อสำคัญ

1.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1.1.1 หลอดทดลอง (Test Tube) ขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง×ยาว) 13x100 และ 16×150 มิลลิเมตร

1.1.2 ขวดรูปชมพู่หรือฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.1.3 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

1.1.4 แผ่น slide

1.1.5 Autopipette ขนาด 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร

1.1.6 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Inoculating loop)

1.1.7 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

1.1.8 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

1.1.9 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker)

1.1.10 ตู้เย็น (Refrigerator)

1.1.11 ตู้แช่แข็ง (Freezer)

1.1.12 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)

1.1.13 ตู้ฆ่าเชื้อภายใต้ความร้อนแห้ง (Hot air oven)

1.1.14 เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge)

1.1.15 เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

1.1.16 เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท (Microplate reader)

1.1.17 ตู้ปลอดเชื้อ (Biological safety cabinet)

1.1.18 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)

1.1.19 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

1.2 สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อสำคัญ

1.2.1 L-tryptophan (Wako)

1.2.2 $FeCl_3$ (HAZARDOUS 220)

1.2.3 35% $HClO_4$ (KEMAUS KA359)

1.2.4 3-Indole acetic acid (Sigma-Aldrich)

1.2.5 D-Mannitol (Fluka)

1.2.6 ชุดย้อมสีแกรมแบคทีเรีย

1.2.7 แอลกอฮอล์ 70 และ 95%

1.2.8 Nutrient broth (NB) [Difco™]

1.2.9 Potato dextrose broth (PDB) [Difco™]

1.2.10 Luria-Bertani broth (LB), [Difco]

1.2.11 Tryptic soy broth (TSB), [Difco]

1.2.12 ผงวุ้น (Agar)

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์

นำ stock culture ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท RD4-1-1 ที่ถูกเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 ºC ออกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 25 ml ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 100 ml ทำการเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 30 ºC นาน 3 วัน

นำ culture broth ที่ได้มาทำการเขี่ยเชื้อ (streak plate) ลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่ 30 ºC นาน 3 วัน เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ (pure culture) และคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว subculture ลงบนอาหาร NA slant เก็บเป็น stock เพื่อใช้ในการทดลองถัดไป โดยเก็บในตู้เย็น 4 ºC โดยทุก 2 สัปดาห์จะทำการ subculture

2.2 การทดสอบการผลิตกรดอินโดลแอซีติก (IAA)

2.2.1 <u>การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ RD 4-1-1</u>

เขี่ย RD4-1-1 จาก NA slant มาทำการปรับความขุ่นในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้เท่ากับสารละลายเทียบความขุ่น 0.5 McFarland standard ($1.5x10^8$ cfu/ml) จากนั้นดูดมา 250 µl (1% ปริมาณหัวเชื้อ) ใส่ในฟลาสก์ขนาด 100 ml ที่บรรจุอาหาร NB + 100 µg/ml ของ L-tryptophan ปริมาตร 25 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC โดยใช้ความเร็วรอบ 150 rpm นาน 3 วัน

2.2.2 <u>การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลแอซีติก</u>

นำ culture broth จากข้อ 2.2.1 มาทำการปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 30 นาที ทำการเก็บส่วนน้ำใส (supernatant) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ IAA

ปฏิกิริยาในการทดสอบ คือ ดูด supernatant ปริมาตร 70 µl ใส่ลงในหลุม Microplate เติมสารละลาย Salkovskis [(1 ml ของ 0.5 M $FeCl_3$ ใน 49 ml ของ 35% perchloric acid ($HClO_4$)] ปริมาตร 140 µl เขย่า และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร ด้วย Microplate reader ค่าที่ได้จากการวัดสามารถนำมาคำนวณปริมาณ IAA ได้ จากกราฟมาตรฐาน IAA (10-100 µg/ml) โดยกลุ่มควบคุม (Blank) คือ อาหาร NB + 100 µg/ml ของ L-tryptophan ที่ไม่มีแบคทีเรีย (ดัดแปลงวิธีของ Phetcharat and Duangpaeng, 2012)

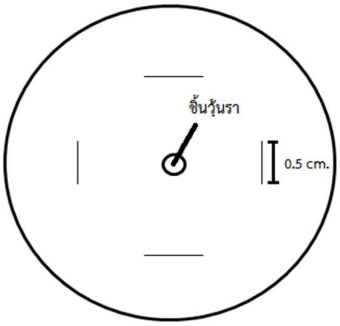
2.3 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

เชื้อราโรคพืช 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Curvularia* sp., *และ Fusarium* sp. ถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ทำการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมระบุจีนัส และเตรียมนำไปใช้เพื่อการทดลองถัดไป โดยราดังกล่าวถูกคัดแยกได้จากตัวอย่างเมล็ดข้าวในแปลงของเกษตรกร

วิธีการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช กระทำได้ดังต่อไปนี้

2.3.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA มาขีดแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ใช้ loop เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย RD4-1-1 มาขีดลงบนอาหาร PDA บริเวณตรงกลางของแต่ละส่วนที่แบ่งไว้ โดยให้ความยาวในการขีด ประมาณ 0.5 cm. (ภาพที่ 3) ดังนั้น 1 จานอาหาร PDA มีทั้งหมด 4 ขีด (ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ)

2.3.2 ใช้ cork borer ขนาด 6 mm. นำชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรคที่เตรียมไว้มาวางไว้ตรงกลางจานอาหารเพาะเชื้อ (ภาพที่ 3) บ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC นาน 7 วัน ทำการวัดความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชของแบคทีเรีย โดยวัดรัศมีการเจริญของราที่ถูกทดสอบกับแบคทีเรียบน PDA ทั้งนี้ในการทดสอบแต่ละครั้งจะมีจานอาหารมาตรฐานของราที่เป็นสาเหตุโรคพืช โดยนำชิ้นวุ้นราวางบนจานอาหารแข็ง PDA ปกติ บ่มในสภาวะเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบ

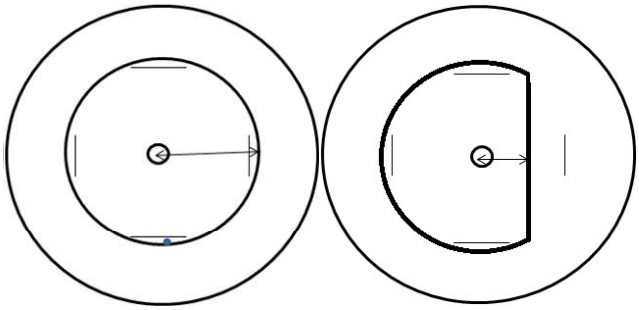


ภาพที่ 3 การขีดแบคทีเรียความยาว 0.5 cm ในแต่ละส่วนที่ทำการแบ่งบนอาหาร PDA และการวางชิ้นวุ้นราสาเหตุโรคพืช

2.3.3 คำนวณความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชกับแบคทีเรียทดสอบ โดยคำนวณจากสูตร (ดัดแปลงจากวิธีของ Jitendra and Kulkarni, 2013)

$$\text{ความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช (\%)} = \left(\frac{\text{รัศมีของเชื้อราที่จานอาหารมาตรฐาน} - \text{รัศมีราโรคพืชที่ถูกทดสอบกับจุลินทรีย์}}{\text{รัศมีของเชื้อราที่จานอาหารมาตรฐาน}} \right) \times 100$$

วิธีการวัดรัศมีแสดงดังภาพที่ 4 หาค่าเฉลี่ย



ภาพ A ภาพ B

ภาพที่ 4 การวัดรัศมีของเชื้อสาเหตุโรคพืชโดย (ภาพ A) รัศมีของโรคพืชในจานมาตรฐาน (ภาพ B) รัศมีของราโรคพืชที่ถูกทดสอบกับแบคทีเรีย

2.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น การติดสีแกรม รูปร่าง การจัดเรียงตัว (Barrow and Feltham, 1993) และลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง เช่น ขนาด สี รูปร่าง เป็นต้น

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา โดยศึกษาการเจริญเติบโตที่สภาวะต่างๆ เช่น ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือ NaCl เป็นต้น ในขณะที่ลักษณะทางชีวเคมีทดสอบ Catalase, Oxidase, Indole production, Methyl red (MR), Voges-Proskauer (VP), Simmons' citrate, Triple sμgar iron, Nitrate Reduction, การทดสอบการย่อยสารตั้งต้นชนิดต่างๆ และ Acid production from carbohydrates รวมทั้งการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 15 ชนิด ตามวิธีของ Nokhal and Schlegal (1983)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene sequence (Khianngam *et al*., 2012) ส่งวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ จากนั้นทำการสร้างลำดับวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ตามวิธีของ Felsenstein, 1985; Saitou & Nei, 1987 ; Thompson et al., 1997

2.5 การหาสภาวะเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและเพิ่มการผลิต IAA

การทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มการผลิต IAA จะพิจารณาจากปัจจัยต่างๆ ดังนี้ โดยในแต่ละการทดลองของแต่ละปัจจัยจะทำอย่างละ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2.5.1 <u>ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ</u> ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียตามวิธีข้อ 2.2.1 โดยเลือกใช้อาหาร 7 สูตร ดังต่อไปนี้ ทั้งนี้ในอาหารแต่ละสูตร มีการเติม 100 μg/ml ของ L-tryptophan ลงไป ปรับ pH อาหารเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC โดยใช้ความเร็วรอบ 150 rpm นาน 3 วัน และใช้ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 1%

2.5.1.1 Nutrient broth (NB) [*อาหารกลุ่มควบคุม*]

2.5.1.2 Potato dextrose broth (PDB)

2.5.1.3 Luria-Bertani broth (LB)

2.5.1.4 Tryptic soy broth (TSB)

2.5.1.5 N1 (1 L ประกอบด้วย $NaNO_3$ 2 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 g, $CaCO_3$ 2 g and glucose 10 g) (Jeyanthi and Ganesh, 2013)

2.5.1.6 N2 (1 L ประกอบด้วย KH_2PO_4 3 g, K_2HPO_4 0.6 g, $(NH_4)_2Cl_2$ 2 g, NaCl 0.5 g, glucose 0.8 g and $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 g) (Sudha et al., 2012)

2.5.1.7 ผงปรุงอาหารรสไก่ (Knor 5 g/L)

2.5.2 ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เลือกสูตรอาหารจากข้อ 2.5.1 ที่แบคทีเรียสามารถเจริญและผลิต IAA ได้ดีที่สุด โดยเตรียมความเข้มข้นทั้งหมดเป็น 4 แบบ คือ 25, 50 75 และ 100 % ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดิม ที่อุณหภูมิ 30 ºC ความเร็วรอบ 150 rpm นาน 3 วัน

2.5.3 แหล่งคาร์บอน จากอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากข้อ 2.5.2 ทำการเพิ่มแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 1% ลงไป โดยเลือกใช้แหล่งคาร์บอน ดังต่อไปนี้ cellulose, fructose, galactose, glucose, glycerol, lactose, mannitol, starch, sucrose และ xylose เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนลงไป

2.5.4 ความเข้มข้นของ L-tryptophan จากสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 2.5.3 แล้ว จะทำการหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ L-tryptophan ซึ่งเป็นสารตั้งต้นชักนำการผลิต IAA โดยเลือกใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 25-500 µg/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เติม L-tryptophan

2.5.5 ระดับ pH ทำการปรับระดับ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากสูตรอาหารในข้อ 2.5.4 ด้วยระดับ pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 โดยกลุ่มควบคุมคือ pH ระดับ 7.0

2.5.6 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เมื่อได้ระดับ pH ที่เหมาะสมแล้วจะทำการศึกษาปัจจัยด้านเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยบ่มแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสม แล้วทำการบ่มเป็นเวลานาน 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน

2.5.7 ความเข้มข้นของปริมาณหัวเชื้อ เตรียมหัวเชื้อในปริมาณ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมจากข้อ 2.5.6 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่หัวเชื้อลงไป

2.6 สภาวะการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ IAA จากแบคทีเรีย

นำ culture broth ของแบคทีเรีย RD4-1-1 ภายหลังการหาสภาวะที่เหมาะสมแล้ว มาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave (Sterile, S) และส่วนที่สองไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Non-sterile, NS) โดยทั้งสองส่วนแบ่งเก็บเป็น 2 หลอด หลอดที่ 1 ทำการห่อหุ้มด้วยฟอยล์ เพื่อเป็นตัวแทนในสภาวะมืด (Dark, D) หลอดที่ 2 ไม่หุ้มฟอยล์ คือตัวแทนสภาวะที่มีแสงปกติ (Light, L) และเก็บทั้งหมดไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 ºC แต่ละสัปดาห์จะถูกนำมาวัดปริมาณ IAA เพื่อสังเกตค่าคงตัวของผลิตภัณฑ์เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน

2.7 การยืนยันผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

นำ culture broth ที่ผ่านการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต IAA มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm นาน 15 นาที ดูดส่วนน้ำใสมาปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้ pH เท่ากับ 2.5 แล้วเติม Ethyl Acetate อัตราส่วน 1:1 ลงในกรวยแยกขนาด 500 ml ทำการเขย่าจนแยกชั้น ไขเอาส่วนล่างทิ้ง และเทส่วนบนใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 ml นำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator จนแห้ง และทำการละลายด้วย methanol เพื่อเตรียมเป็นตัวอย่าง (Bharucha et al., 2013)

การยืนยันผลิตภัณฑ์ IAA ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) ทำโดยหยดสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน IAA ลงไปบนแผ่น TLC แบบ Silica gel 60 F254 (Merck) ประมาณ 3 µl (ความเข้มข้น 15 µg/µl) โดยใช้ระบบตัวพาสารเป็น Hexane : Ethyl Acetate : Acetic acid ในอัตราส่วน 4.5 : 5.0 : 0.5 (ml) (ดัดแปลงจาก Jeyanthi and Ganesh, 2013) คำนวณหาค่า R_f จากสูตร ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{Distance travelled by the solute}}{\text{Distance travelled by the solvent}}$$

2.8 ทดสอบคุณสมบัติบางประการที่ส่งผลต่อการเจริญของข้าว

2.8.1 การเตรียม IAA

นำ culture broth ของแบคทีเรียที่ผ่านการหาสภาวะเหมาะสมแล้ว มาทำการฆ่าเชื้อ โดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ºC นาน 15 นาที ทำการวิเคราะห์ปริมาณ IAA และเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 2.5 µM โดยที่ IAA สังเคราะห์ก็เตรียมด้วยวิธีเดียวกัน

2.8.2 การทดสอบ IAA กับข้าว

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 3 ทรีทเม้นท์ คือ กลุ่มควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) (T1), กลุ่ม IAA สังเคราะห์ความเข้มข้น 2.5 µM (T2) และกลุ่ม IAA จากตัวอย่างแบคทีเรียความเข้มข้น 2.5 µM (T3) โดยแต่ละทรีทเม้นท์ ทำอย่างละ 3 ซ้ำ (R1-R3) 1 ซ้ำใช้เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 31 จำนวน 100 เมล็ด เมล็ดข้าวแต่ละซ้ำจะถูกบรรจุในขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์

นำตัวอย่างข้าวในขวดมาทำการแช่สารละลายแต่ละทรีทเม้นต์ด้วยปริมาตร 50 ml นาน 10 ชั่วโมง และทำการเพาะลงบนกระดาษเพาะแถวละ 10 เมล็ด จำนวน 10 แถว ของแต่ละตัวอย่าง วางในกล่องเพาะเมล็ด นาน 10 วัน

บันทึกผล คำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกของราก ยอด และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม R (R Core Team, 2017)

บทที่ 4
ผลการดำเนินงาน

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ และการผลิตกรดอินโดลแอซีติก (IAA) เริ่มต้น

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ถูกคัดแยกมาจากเมล็ดข้าวไร่พันธุ์พื้นเมือง (ภาพที่ 5) ที่ปลูกในบริเวณโรงเรือน คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร โดยให้รหัสแบคทีเรียไอโซเลทเป็น RD4-1-1 ถูกเก็บเป็น stock culture ในตู้แช่แข็ง ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

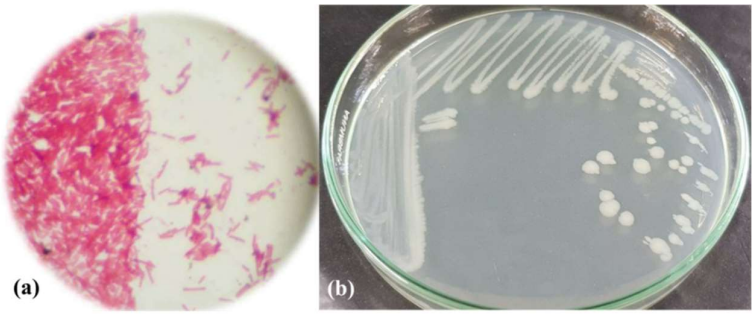
ภาพที่ 5 พันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองที่ถูกนำมาคัดแยกหาแบคทีเรียเอนโดไฟท์

หลังจากนำแบคทีเรียออกมาจาก stock แล้ว ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อวัดปริมาณฮอร์โมนกรดอินโดลแอซีติก (IAA) ในอาหารเหลวสูตร NB + 100 µg/ml ของ L-tryptophan บ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC โดยใช้ความเร็วรอบ 150 rpm นาน 3 วัน แบคทีเรียเอนโดไฟท์ RD4-1-1 แสดงการผลิต IAA ปริมาณ 49.21 µg/ml ซึ่งถือว่าเป็นปริมาณฮอร์โมนเริ่มต้นก่อนการหาสภาวะเหมาะสมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้

นอกจากนี้แบคทีเรีย RD4-1-1 ยังมีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราโรคพืช คือ *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp. ด้วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 52.14±3.92 และ 11.67±3.82 ตามลำดับ

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท RD 4-1-1 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง (ภาพที่ 6 (a)) ลักษณะโคโลนีสีครีมขาว, รูปร่าง irregular, ขอบ lobate, ผิว smooth และ ความสูงโคโลนีเป็นแบบ flat (ภาพที่ 6 (b)) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC นาน 2 วัน



ภาพที่ 6 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยเลนส์ตากำลังขยาย 100X (a) และลักษณะโคโลนี (b) ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ RD 4-1-1

เมื่อทำการทดสอบด้วยลักษณะทางชีวเคมี และสรีรวิทยา โดยภาพรวมจะเห็นได้ว่า RD4-1-1 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี pH และอุณหภูมิค่อนข้างกว้าง คือ pH 4.0-9.0 และอุณหภูมิ 20-40 ºC นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการเจริญด้วยแหล่งคาร์บอนที่มีน้ำตาลได้หลากหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3 จากข้อมูลสามารถใช้เป็นปัจจัยเบื้องต้น เพื่อคัดเลือกนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเพื่อผลิต IAA

ตารางที่ 3 ลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ RD4-1-1

Characteristics	RD4-1-1	Characteristics	RD4-1-1	Characteristics	RD4-1-1
Growth in %NaCl	0-9	Starch	+	D-Maltose	+
Growth in pH	4-9	L-Tyrosine	+	D-Mannitol	+
Growth at temp (°C)	20-40	Tween 20	+	D-Mannose	+
Catalase	+	Tween 80	-	D-Melibiose	+
Oxidase	-	Urea	-	D-Melezitose	-
Methyl red	-	**Acid from :**		Methyl-D-Glucoside	+
Voges-Proskauer	-	D-Cellobiose	+	Raffinose	+
Citrate	+	D-Fructose	+	L-Rhamnose	w
Triple sugar iron	-	D-Galactose	+	D-Ribose	+
Nitrate reduction	+	D-Glucose	w	D-Sorbitol	+
Hydrolysis of :		Glycerol	+	L-Sorbose	-
L-Arginine	+	Inositol	+	Sucrose	+
Casein	-	Inulin	w	D-Trehalose	+
Gelatin	-	Lactose	+	D-Xylose	+

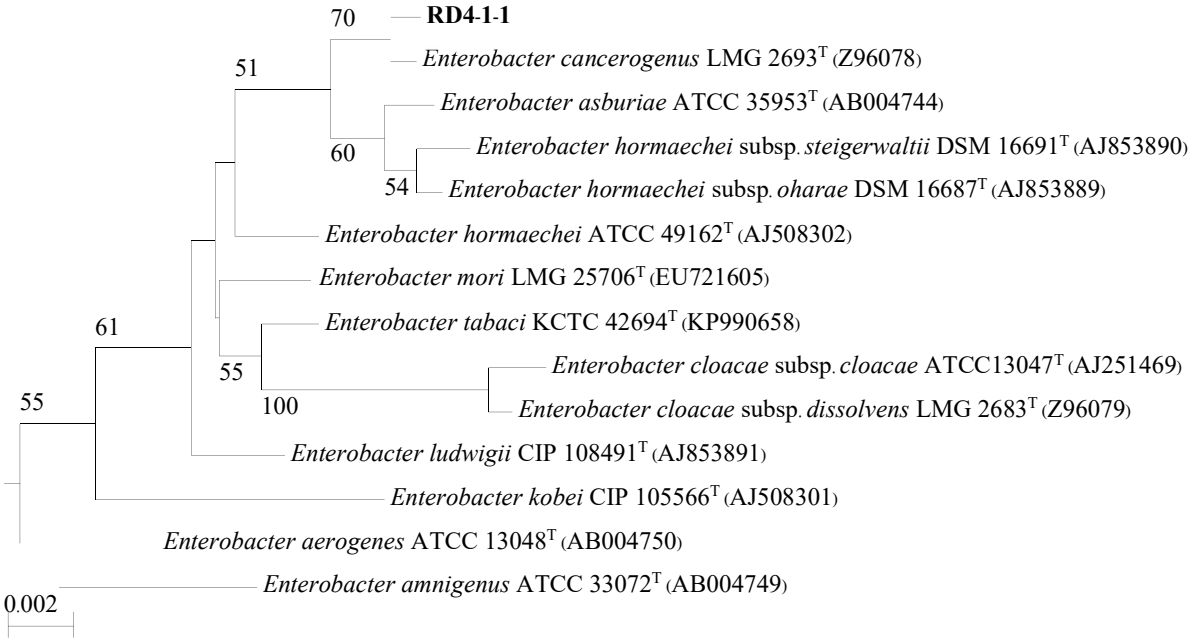
+ = positive, - = negative, w = weakly positive

นอกจากนี้ แบคทีเรียไอโซเลท RD 4-1-1 ถูกทดสอบความสามารถต่อความไวของยาปฏิชีวนะ ตามวิธีการของ Nokhal and Schlegal (1983) พบว่ามีความไวต่อยา Ceftazidime, Ceftriaxone, Chloramphenicol, Piperacillin/Tazobactam และ Tetracycline ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย RD4-1-1

Antibiotic	RD4-1-1	Antibiotic	RD4-1-1	Antibiotic	RD4-1-1
Amikacin	I	Ceftazidime	S	Kanamycin	R
Amoxicillin	R	Ceftriaxone	S	Piperacillin/Tazobactam	S
Ampicillin	R	Cephalothin	R	Streptomycin	R
Bacitracin	R	Chloramphenicol	S	Tetracycline	S
Carbenicillin	I	Erythromycin	R	Vancomycin	R

S = Susceptible (>13 mm); I = Intermediate sensitive (10-12 mm); R = Resistant (<10 mm)



ภาพที่ 7 Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships between RD4-1-1 and known *Enterobacter.* Based on 1000 resamplings, bootstrap percentages above 50% are shown. Bar, 0.002 substitutions per nucleotide position

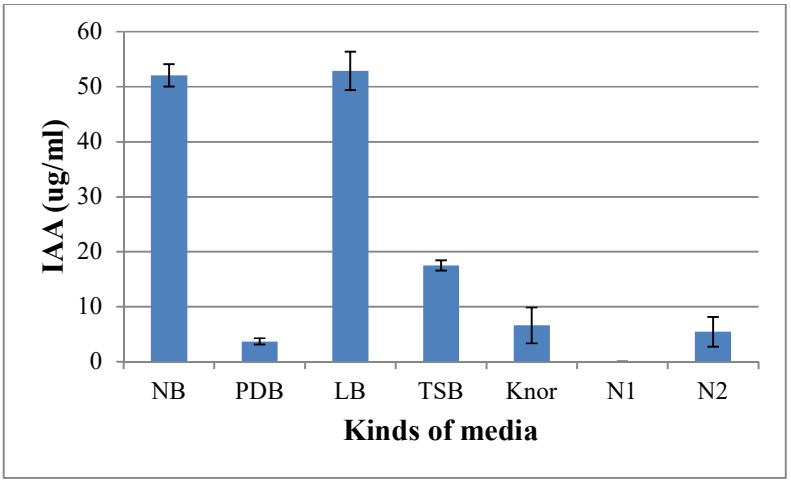
ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene sequence ของ RD 4-1-1 ด้วย primer 785F (5'GGATTAGATACCCTGGTA'3) และ 907R (5'CCGTCAATTCMTTTRAGTTT'3) พบว่า RD4-1-1 (1,452 nt) ถูกระบุว่าเป็น *Enterobacter cancerogenus* (ภาพที่ 7) ด้วย 99.5% similarity โดย Jha and Patel

(2012) ได้เคยรายงานว่า *E. cancerogenus* MSA2 เป็นแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช *Jatropha curcas* ได้

3. การหาสภาวะเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อเพิ่มการผลิต IAA

3.1 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

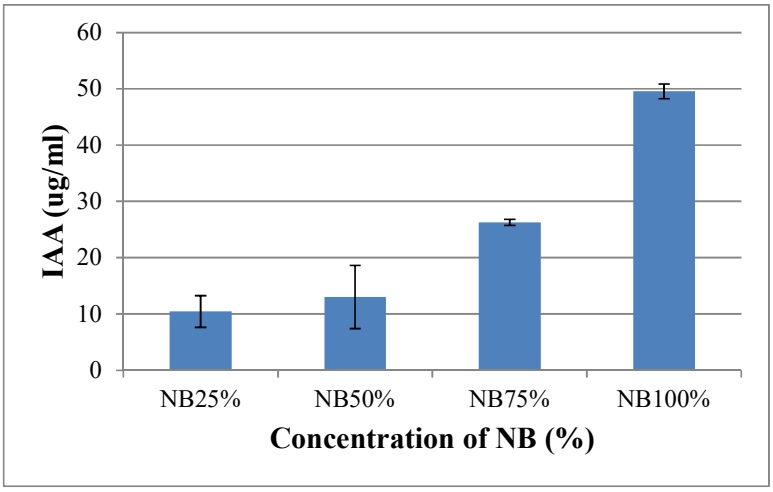
อาหารเลี้ยงเชื้อ 7 ชนิด ถูกทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย RD4-1-1 เพื่อเพิ่มการผลิต IAA โดยอาหารทุกชนิดมีสารตั้งต้น L-tryptophan ปริมาณ 100 µg/ml เป็นส่วนผสม และถูกปรับ pH เท่ากับ 7.0 แบคทีเรียถูกบ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC ความเร็วรอบ 150 rpm นาน 3 วัน ผลการทดสอบพบว่าอาหาร NB และ LB ให้ค่าการผลิต IAA ได้สูงที่สุด เท่ากับ 52.08±2.01 µg/ml และ 52.88±3.45 µg/ml ตามลำดับ โดยให้ค่าการผลิตที่ใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วในด้านราคา รวมทั้งใช้อาหารสูตร NB เป็นกลุ่มควบคุมตั้งแต่เริ่มต้นแล้ว ผู้วิจัยจึงได้เลือกอาหาร NB เพื่อทำการทดลองในปัจจัยอื่นๆ ต่อไป ทั้งนี้จากผลการทดลองพบว่าอาหาร N1 ไม่พบการผลิต IAA ในขณะที่อาหาร TSB, Knor, N2 และ PDB ให้การผลิต IAA เท่ากับ 17.51±0.94, 6.61±3.27, 5.46±2.72 และ 3.69±0.57 µg/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่ออาหาร 7 ชนิดที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย RD4-1-1

3.2 ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

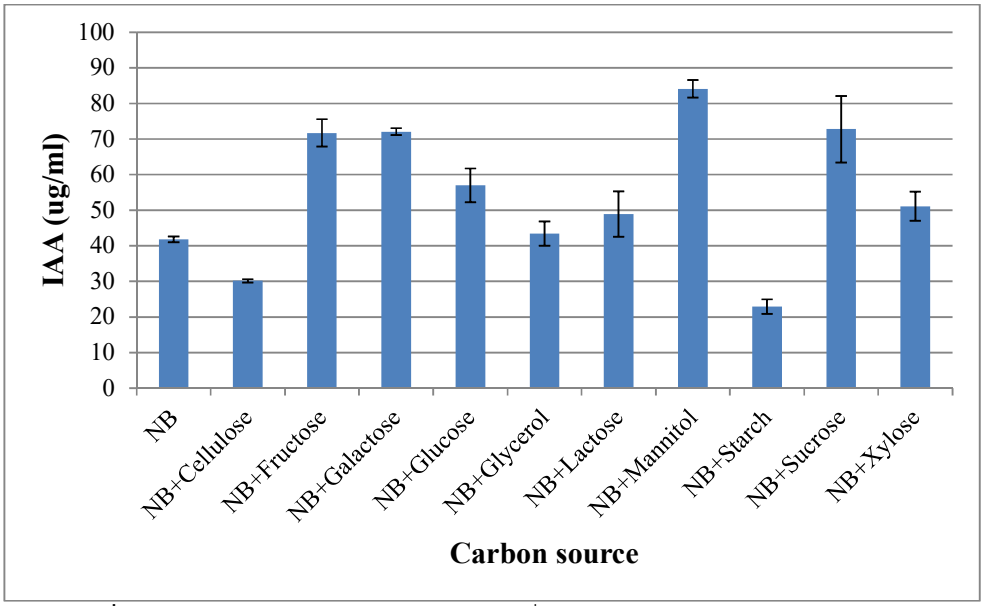
หลังจากคัดเลือกสูตรอาหาร NB มาทำการเพาะเลี้ยงแล้ว เพื่อเป็นการลดปัจจัยทางด้านราคา ผู้วิจัยได้ทำการลดสัดส่วนของปริมาณความเข้มข้นของ NB เป็น 25, 50 และ 75 % โดยมีความเข้มข้น 100% (13 g/L) เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าให้การผลิต IAA เท่ากับ 10.43±2.79, 13.03±5.62, 26.28±0.53 และ 49.57±1.32 µg/ml ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ NB สูงขึ้น ปริมาณการผลิต IAA ก็มีผลเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 9) ซึ่งผลที่ได้ผู้วิจัยได้คัดเลือกระดับความเข้มข้น 100% เพื่อใช้ในการศึกษาถัดไป



ภาพที่ 9 ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่อความเข้มข้น 4 ระดับของอาหาร NB

3.3 แหล่งคาร์บอน

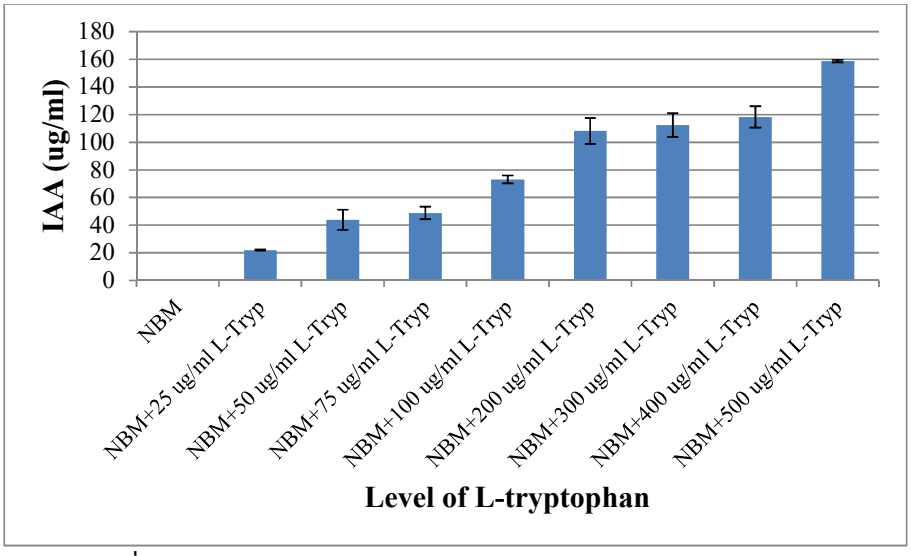
จากปัจจัยที่เลือกคืออาหาร NB สัดส่วน 100% (กลุ่มควบคุม) ถูกเพิ่มแหล่งคาร์บอนไปอีก 10 ชนิด พบว่าอาหาร NB ที่มี Cellulose (30.15±0.49 µg/ml) และ Starch (22.93±2.06 µg/ml) เป็นองค์ประกอบให้ปริมาณการผลิต IAA ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อาจเป็นไปได้เนื่องจากแหล่งคาร์บอนทั้ง 2 มีโมเลกุลใหญ่ แบคทีเรียนำไปใช้ได้ยาก ในขณะที่ Fructose, Galactose, Glucose, Glycerol, Lactose, Sucrose และ Xylose ให้ค่าเท่ากับ 71.71±3.84, 72.05±0.97, 56.95±4.74, 43.43±3.43, 48.92±6.39, 72.78±9.34 และ 51.09±4.1 µg/ml ตามลำดับ โดยอาหาร NB ที่มี Mannitol เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ปริมาณการผลิต IAA ได้สูงที่สุดคือ 84.07±2.45 µg/ml (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่ออาหาร NB ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ

3.4 ความเข้มข้นของ L-tryptophan

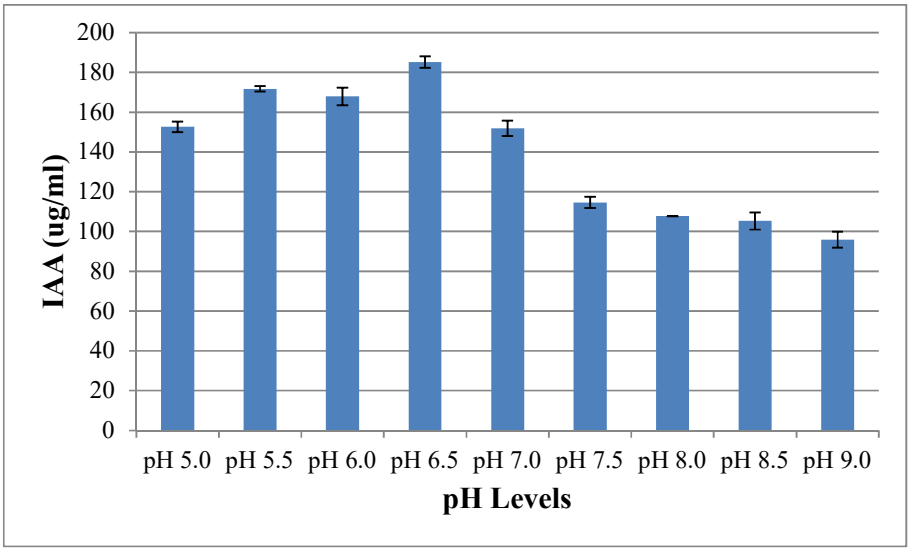
ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบระดับความเข้มข้นของ L-tryptophan ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการชักนำการผลิต IAA โดยจากภาพที่ 11 เมื่อไม่มี L-tryptophan ไม่พบการผลิต IAA แต่เมื่อมีการเพิ่มระดับ L-tryptophan ด้วยความเข้มข้นระดับ 25-500 µg/ml ในอาหาร NB ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาล Mannitol (NBM) พบว่าการผลิต IAA ของแบคทีเรีย RD4-1-1 ก็เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยพบการผลิตที่ 22.09±0.45 ถึง 158.63±0.91 µg/ml จากกราฟมีความเป็นไปได้ว่าหากมีการเพิ่มระดับ L-tryptophan มากขึ้นก็น่าจะมีการสังเคราะห์ปริมาณ IAA เพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่จากการทดลองนี้ผู้วิจัยได้คัดเลือกระดับความเข้มข้นที่ 500 µg/ml เพื่อนำไปใช้ในการทดลองถัดไป



ภาพที่ 11 ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่อระดับ L-tryptophan ในอาหาร NBM

3.5 ระดับ pH

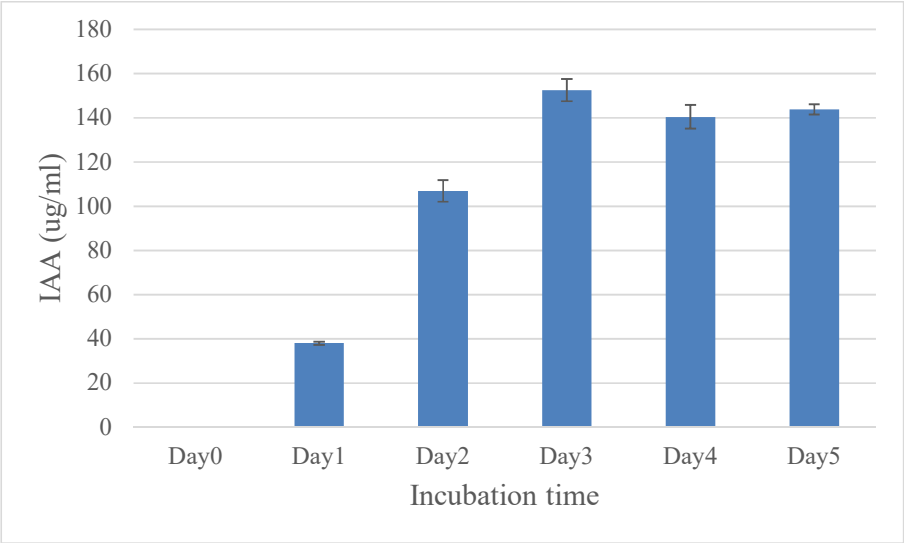
อาหารสูตร NBM+500 µg/ml ของ L-tryptophan ถูกปรับระดับ pH เป็น 5.0-9.0 โดยกลุ่มควบคุม คือ ระดับ pH 7.0 ซึ่งให้ค่าการผลิต IAA เท่ากับ 151.86±3.90 µg/ml จากผลการทดลอง ระดับ pH 6.5 ให้ค่าการผลิต IAA สูงที่สุดถึง 185.24±2.91 µg/ml เป็นที่สังเกตว่าช่วงระดับ pH ค่อนข้างเป็นกรด (pH 5.0-6.0) ให้ค่าช่วงการผลิต (152.61±2.62 ถึง 167.95±4.46 µg/ml) สูงกว่าค่าระดับ pH ที่เป็นเบส (pH 7.5-9.0) คือ 95.87±3.97 ถึง 114.62±2.83 µg/ml (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่อระดับ pH ต่างๆ ในอาหาร NBM+500 µg/ml ของ L-tryptophan

3.6 ระยะเวลาในการบ่มเพาะเชื้อ

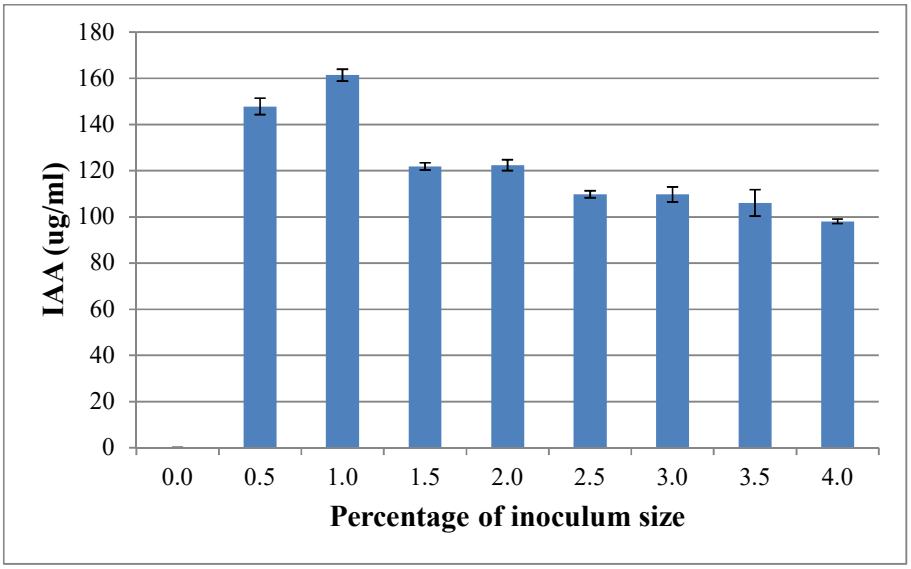
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญเพื่อเพิ่มการผลิต IAA ยิ่งหากใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงน้อย แล้วได้ผลิตภัณฑ์มากก็ย่อมส่งผลดี การทดลองได้ทำการบ่มเพาะแบคทีเรีย RD4-1-1 เป็นเวลา 5 วัน พบว่าการบ่มเป็นเวลานาน 3 วัน ให้ผลในการผลิต IAA ได้สูงที่สุด คือ 152.01±5.01 µg/ml และลดลงเล็กน้อยในวันที่ 4 (140.47±5.39 µg/ml) และ 5 (143.80±2.28 µg/ml) ตามลำดับ (ภาพที่ 13) ดังนั้น การบ่มในระยะเวลา 3 วัน คือช่วงเวลาที่ดีที่สุดสำหรับ RD4-1-1



ภาพที่ 13 ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (วัน)

3.7 ความเข้มข้นของปริมาณหัวเชื้อ

ปริมาณหัวเชื้อของจุลินทรีย์มีผลต่อการเพิ่มระดับการผลิตฮอร์โมน ในการทดลองได้ทำการปรับระดับความเข้มข้นของหัวเชื้อ RD4-1-1 เป็น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBM+ 500 µg/ml ของ L-tryptophan โดยมี pH เท่ากับ 6.5 ค่า IAA พบมากเมื่อใส่ระดับหัวเชื้อที่ 0.5 (147.79±3.55 µg/ml) และ 1.0% (161.39±2.52 µg/ml) และค่อยๆ ลดลง เมื่อมีปริมาณหัวเชื้อเพิ่มมากขึ้น จาก 121.79±1.55 เป็น 98.05±1.03 µg/ml ที่ระดับความเข้มข้น 1.5-4.0 เปอร์เซ็นต์หัวเชื้อ (**ภาพที่ 14)**

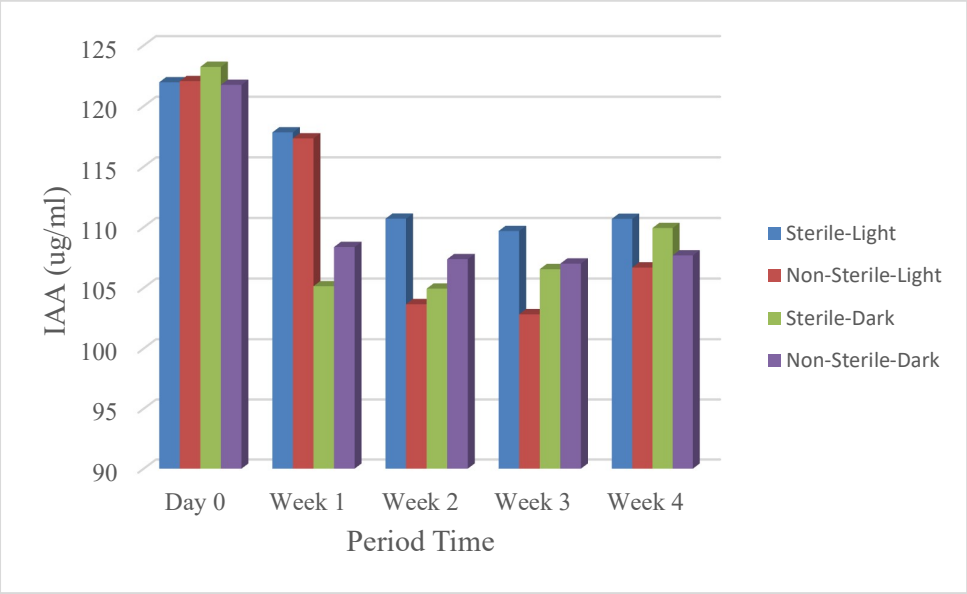


ภาพที่ 14 ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่อปริมาณหัวเชื้อ (%) RD4-1-1 ในอาหาร NBM+500 µg/ml ของ L-tryptophan pH 6.5

4. สภาวะการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ IAA จากแบคทีเรีย

ผลิตภัณฑ์ IAA ของแบคทีเรีย RD4-1-1 ถูกทดสอบความเสถียรเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ โดยผลิตภัณฑ์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave (Sterile, S) และกลุ่มที่สองไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Non-sterile, NS) ในแต่ละกลุ่มจะแบ่งย่อยออกเป็นอีก 2 หลอด โดยหลอดที่ 1 ทำการห่อหุ้มด้วยฟอยล์ เพื่อเป็นตัวแทนในสภาวะมืด (Dark, D) หลอดที่ 2 ไม่หุ้มฟอยล์ คือตัวแทนสภาวะที่มีแสงปกติ (Light, L) ทุกตัวอย่างเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C ทุกสัปดาห์จะนำผลิตภัณฑ์มาวัดปริมาณ IAA ที่มีอยู่

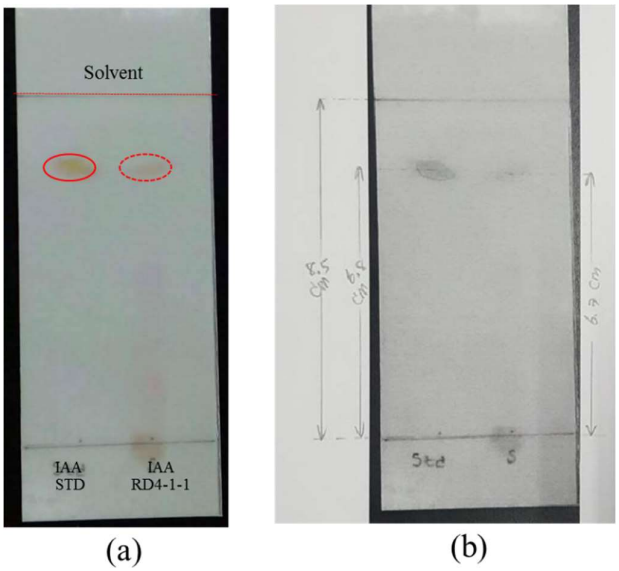
พบว่าผลิตภัณฑ์ IAA ในการเก็บรักษาทั้ง 4 แบบ คือ Sterile-Light (SL), Non-Sterile-Light (NSL), Sterile-Dark (SD) และ Non-Sterile-Dark (NSD) ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ มีปริมาณผลิตภัณฑ์ลดลง เท่ากับ 9.24, 12.60, 10.79 และ 11.55% ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่ยังคงเหลืออยู่ก็มีมากกว่า 85% ในการเก็บทุกรูปแบบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่ 4 °C ฮอร์โมน IAA ของ RD4-1-1 มีความคงตัว ทั้งนี้ในรูปแบบปลอดเชื้อ (S) มีความสูญเสียผลิตภัณฑ์น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ฆ่าเชื้อ (NS) **(ภาพที่ 15)**



ภาพที่ 15 ปริมาณ IAA (µg/ml) ต่อสภาพในการเก็บผลิตภัณฑ์ 4 รูปแบบ ในระยะเวลาแต่ละสัปดาห์

5. การยืนยันผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

หลังจากการหาสภาวะเหมาะสมเพื่อเพิ่มผลผลิตของผลิตภัณฑ์ IAA จาก RD4-1-1 แล้ว ผู้วิจัยได้ทำการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนั่นคือ IAA โดยใช้วิธี TLC และหาค่า R_f พบว่า สารมาตรฐาน IAA และสารละลายแบคทีเรีย RD4-1-1 มีการเคลื่อนที่ในระดับใกล้เคียงกัน จากรอยจุดสีชมพูที่วงไว้ตามภาพที่ 16 (a) เมื่อทำการคำนวณหาค่า R_f เท่ากับ 0.80 และ 0.79 ตามลำดับ (ภาพที่ 16 (b)) ซึ่งใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นตัวอย่างจากสารละลายแบคทีเรีย RD4-1-1 ที่เกิดขึ้นนั่นคือ IAA



ภาพที่ 16 Thin layer chromatography (TLC) ของสารละลายมาตรฐาน IAA และสารละลายแบคทีเรีย RD4-1-1 (a) และแสดงระยะทางเพื่อหาค่า R_f (b)

6. ทดสอบคุณสมบัติบางประการที่ส่งผลต่อการเจริญของข้าว

IAA จากแบคทีเรีย RD4-1-1 ที่ความเข้มข้น 2.5 µM ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพต่อการเจริญของราก ยอด และการเกิดโรคของข้าวพันธุ์ กข 31 เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน IAA และกลุ่มควบคุมคือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากตารางที่ 5 กรดอินโดลแอซีติกของ RD4-1-1 มีผลกระตุ้นการเจริญของรากมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่น้อยกว่าสารมาตรฐาน IAA ซึ่งให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่ในขณะที่ผลการกระตุ้นของยอดใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า IAA ของ RD4-1-1 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญของรากข้าวพันธุ์ กข 31 ได้

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพ IAA ของ RD4-1-1 ต่อการเจริญของราก ยอด และการเกิดโรคของข้าวพันธุ์ กข 31

ทรีตเมนต์	เปอร์เซ็นต์เกิดราก	เปอร์เซ็นต์เกิดยอด	เปอร์เซ็นต์เกิดโรค
RD4-1-1	90.00 ± 1.00[b] (3.45%)	42.00 ± 18.03 (0.79%)	5.67 ± 0.58 (-67.91%)
IAA Synthetic	93.00 ± 1.73[a] (6.70%)	70.67 ± 25.00 (69.59%)	2.33 ± 1.15 (-86.81%)
H_2O sterile	87.00 ± 1.00[c]	41.67 ± 30.44	17.67 ± 15.18
Mean	90.00	51.44	8.55
F-test	**	Ns	Ns
P-value	0.0038	0.33	0.16

หมายเหตุ; Ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

a,b,c อักษรที่แตกต่างในคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปรียบเทียบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการดำเนินงาน

ก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเมล็ดข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกในบริเวณโรงเรือน คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร พบแบคทีเรียหลายไอโซเลทที่มีคุณสมบัติที่ก่อให้เกิดประโยชน์กับพืชแตกต่างกันออกไป แต่ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ รหัสไอโซเลท RD4-1-1 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตกรดอินโดลแอซีติกที่เป็นฮอร์โมนกลุ่มออกซินสำคัญสำหรับพืช ซึ่งผลิตได้เท่ากับ 49.21 µg/ml รวมทั้งเมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืชคือ *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp. ซึ่งคัดแยกได้จากแปลงข้าวของเกษตรกร พบว่าแบคทีเรีย RD4-1-1 ให้ผลต่อการยับยั้ง *Curvularia* sp. มากกว่า 50% (52.14±3.92) แต่ถึงแม้จะให้ผลในการยับยั้งต่อ *Fusarium* sp. ค่อนข้างน้อย ผลที่เกิดขึ้นก็มีแนวโน้มในทางที่ดีหากนำไปใช้ในพื้นที่แปลงเกษตรกรจริง จากคุณสมบัติที่กล่าวมาของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท RD4-1-1 จะเห็นได้ว่าสามารถผลิตสารที่ก่อให้เกิดประโชน์กับพืชได้ รวมทั้งเป็นแบคทีเรียกลุ่มเอนโดไฟท์ ตามที่ Chanway, (1998) กล่าวว่าเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อประโยชน์ให้กับพืช และสร้างสารที่สำคัญ ดังนั้นแบคทีเรียไอโซเลทนี้ที่แยกได้มาจากข้าว หากนำไปใช้ประโยชน์กับข้าว ก็น่าจะทำให้เกิดผลในทางที่ดีได้มากขึ้นด้วย

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ RD4-1-1 ถูกทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี 16S rRNA gene sequence พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (similarity) ที่ 99.5% กับแบคทีเรียในจีนัส *Enterobacter cancerogenus* โดยอ้างอิงจาก Logan et al. (2009) หากแบคทีเรียมี ≤97 % similarity จะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แบคทีเรีย RD4-1-1 จึงถูกระบุว่าเป็น *E. cancerogenus* RD4-1-1

จากข้อมูลรายงานที่ผ่านมาพบว่ากลุ่มแบคทีเรียในจีนัส *Enterobacter* เป็นแบคทีเรียกลุ่มเอนโดไฟท์ที่พบได้ในพืชหลากหลายชนิด (Torres et al., 2008; Nutaratat et al., 2017) โดยที่ *E. cancerogenus* มีรายงานว่าเป็นเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิตสารที่มีประโยชน์ต่อพืชได้ เช่น El-Awady et al., 2015 กล่าวว่า *E. cancerogenus* E1 ซึ่งเป็นเอนโดไฟท์แยกได้จากส่วนลำต้นของ *Sesuvium verrucosum* พบว่าสามารถผลิตฮอร์โมน IAA ได้ ในขณะที่ Rani et al. (2011) รายงานว่า *E. cancerogenus* เป็นแบคทีเรียกระตุ้นการเจริญของพืช (plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)) สามารถผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืชได้ นอกจากนี้ Jha et al. (2012) คัดแยก *E. cancerogenus* MSA2 จากดินบริเวณรอบรากของพืช *Jatropha cucas* พบว่ามีความสามารถในการผลิต ACC deaminase, phytase, IAA, siderophore, การผลิตแอมโมเนียและการย่อยฟอตเฟส รวมทั้งมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของพืชที่ทดสอบ ดังนั้นตามที่รายงาน *E. cancerogenus* มีคุณสมบัติในการผลิตสารที่มีประโยชน์ต่อการกระตุ้นการเจริญของพืชที่แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่แต่ละสายพันธุ์ (strain) รวมทั้งเป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไป รวมทั้งในกลุ่มแบคทีเรียเอนโดไฟท์ด้วย ดังนั้นความเป็นไปได้ที่จะนำ *E. cancerogenus* RD4-1-1 ไปเพิ่มสภาวะในการผลิต IAA เพื่อนำไปใช้ประโยชน์กับพืช รวมทั้งผลความไวต่อยาปฏิชีวนะ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความปลอดภัย และสามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์กับพืชได้

การหาสภาวะเหมาะสมโดยอาศัยปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน สารตั้งต้น สภาวะ pH และอุณหภูมิ เพื่อให้แบคทีเรียเจริญเติบโต และเพิ่มการผลิต IAA ให้ได้ปริมาณมากขึ้นนั้น จากผลการทดลองภายใต้การเลี้ยง *E. cancerogenus* RD4-1-1 ในอาหารเหลว NB ที่เพิ่มแหล่งคาร์บอนคือ 1% mannitol, ปริมาณ L-tryptophan เป็น 500 µg/ml ด้วย pH 6.5 ปริมาณหัวเชื้อ 1% บ่มที่ 30 ºC นาน 3 วัน ทำให้การผลิต IAA เพิ่มขึ้น 3.28 เท่า ทั้งนี้จากรายงานที่ผ่านมาพบ *Enterobacter* sp. DMKU-RP206 เพิ่มการผลิต IAA ได้ถึง 13.4 เท่า (5,561.7 mg/L) เมื่อใช้ 0.85% แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน, 1.3% yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน, 1.1% L-tryptophan, 0.4% NaCl, pH 5.8 บ่มที่ 30 ºC ด้วย 200 rpm (Nutaratat et al., 2017) ทั้งนี้ในกลุ่มจีนัสที่ใกล้เคียงกันตามลำดับวิวัฒนาการ Apine and Jadhav (2011) รายงานว่า *Pantoea agglomerans* PVM ผลิต IAA ได้ถึง 2.191 g/l ด้วยแหล่งไนโตรเจน meat extract 8 g/l และ 1 g/l ของ L-tryptophan ที่ pH 7.0, 30 ºC นาน 48 ชม. ในขณะที่จีนัสอื่น เช่น *Pseudomonas putida* UB1 ต้องอาศัย L-tryptophan 0.2 mg/ml, sucrose 0.5%, $(NH_4)_2SO_4$ 10 mg/ml ที่ pH 7.5 นาน 96 ชม. ในการเพิ่มผลผลิต IAA (Bharucha et al., 2013) และ Harikrishnan et al. (2014) ต้องการเพิ่ม IAA จาก *Streptomyces* sp. VSMGT1014 โดยต้องเลี้ยงในอาหาร ISP2 และ 0.5% L-tryptophan ที่ pH 8.0 บ่มที่ 30 ºC ดังนั้นจากงานวิจัยจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการเจริญ และผลิต IAA ได้ต่างกัน โดยมีความสามารถในการใช้แหล่งอาหารคาร์บอน ไนโตรเจน และสภาวะในการเจริญที่แตกต่างกันออกไป ถึงแม้ *E. cancerogenus* RD4-1-1 ที่ผ่านการหาสภาวะเหมาะสมจะมีปริมาณ IAA น้อยกว่าตัวอื่นๆ แต่ด้วยปริมาณดังกล่าวก็สามารถนำกลับไปใช้กับพืชได้เช่นกัน

การทดสอบการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ IAA โดยเปรียบเทียบปัจจัย คือ การฆ่า/ไม่ฆ่าเชื้อ และปัจจัยแสง/มืด เนื่องจากหากทำผลิตภัณฑ์ไปใช้ทดสอบกับพืช ควรอยู่ในรูปที่มีผลิตภัณฑ์ IAA อย่างเดียวคือการทำให้ปราศจากเชื้อ เพื่อป้องกันของเสียอื่นที่เกิดขึ้นหากแบคทีเรียยังมีชีวิตอยู่ และปัจจัยของแสงซึ่งส่งผลต่อความเสถียรของ IAA (Phetcharat and Duangpaeng, 2012) ผลการทดลองที่แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ SL, NSL, SD และ NSD พบว่าในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ปริมาณ IAA ยังคงมีเหลืออยู่มากกว่า 85% โดยเมื่อเปรียบเทียบจะเห็นได้ว่าในสภาพปราศจากเชื้อจะพบความเสถียรของ IAA มากกว่าสภาพที่ไม่ปลอดเชื้อ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเก็บรักษาในสภาพที่เชื้อมีชีวิตอยู่ เชื้ออาจผลิตสารหรือของเสียอะไรบางอย่างซึ่งอาจมีผลต่อการทำลาย IAA ได้ในบางส่วน ทั้งนี้ในสภาพมีแสงในระดับอุณหภูมิ 4 ºC สามารถเก็บรักษา IAA ได้

การยืนยันผลิตภัณฑ์ IAA ที่เกิดภายหลังการหาสภาวะที่เหมาะสมของ *E. cancerogenus* RD4-1-1 พบว่าสามารถยืนยันผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้ว่าคือ IAA ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรีย เนื่องจากสารตัวอย่างจากแบคทีเรียมีค่า R_f ใกล้เคียงกับ R_f ของสารละลายมาตรฐาน IAA

สารละลายเชื้อ *E. cancerogenus* RD4-1-1 ภายหลังการหาสภาวะที่เหมาะสมถูกนำมาฆ่าเชื้อ และเจือจาง IAA ให้ได้ระดับ 2.5 uM (ผ่านการทดสอบระดับที่เหมาะสมกับข้าวจากโครงการย่อยที่ 2) ก่อนนำไปแช่เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 31 แล้วสังเกตการเจริญของราก ยอด และการเกิดโรค ผลสรุปแสดงให้เห็นว่า IAA จาก *E. cancerogenus* RD4-1-1 สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญของรากได้ดี รวมถึงลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้มากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งผลที่ได้มีทิศทางเดียวกับรายงานอื่นที่ผ่านมาของประสิทธิภาพ IAA ที่ได้จากกลุ่มแบคทีเรีย (Apine and Jadhav, 2011; Bharucha et al., 2013)

บทที่ 6
สรุปผลการดำเนินงานและข้อเสนอแนะ

กล่าวโดยสรุปได้ว่า *E. cancerogenus* RD4-1-1 เป็นแบคทีเรียกลุ่มเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิต IAA และผลิตสารปฏิปักษ์ต่อโรคพืชได้ ภายหลังการหาสภาวะเหมาะสมโดยการเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่มีแหล่งคาร์บอน ปริมาณสารชักนำ และสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม แบคทีเรียสามารถเพิ่มผลผลิต IAA ได้ โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถเก็บรักษาได้นานมากกว่า 1 เดือนในสภาพที่ทำให้ปลอดเชื้อและเก็บในระดับที่อุณหภูมิ 4 ºC ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถยืนยันผลด้วยวิธี TLC ที่คำนวณได้จากค่า R_f รวมทั้ง IAA ที่ได้เมื่อถูกเจือจางด้วยความเข้มข้น 2.5 µM และนำไปทดสอบกับข้าวพันธุ์ กข 31 พบว่าสามารถกระตุ้นการงอกของรากได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งจะเห็นได้ว่า IAA ที่ได้จาก *E. cancerogenus* RD4-1-1 มีประสิทธิภาพในระดับหนึ่งที่จะนำไปใช้กับข้าวได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการทดสอบเพิ่มเติม หากต้องการนำ IAA จาก *E. cancerogenus* RD4-1-1 ไปใช้กับข้าวพันธุ์อื่นๆ เพราะพันธุ์ข้าวและสภาวะการปลูกที่ต่างกัน ก็มีผลต่อระดับปริมาณในการนำ IAA ไปใช้กับพืช
2. การทดสอบดังกล่าวเป็นงานที่อยู่ในระดับห้องปฏิบัติการ หากต้องการผลที่นำไปใช้ในแปลงควรมีการวิจัยเพิ่มในระดับแปลงจริง
3. ควรมีการเพิ่มระดับปริมาณการผลิต IAA จากข้อมูลสภาวะเหมาะสมที่ได้ เพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ในแปลงพื้นที่จริงได้

เอกสารอ้างอิง

Abraham, J., Silambarasan, S. 2015. Plant growth promoting bacteria *Enterobacter asburiae* JAS5 and *Enterobacter cloacae* JAS7 in mineralization of endosulfan. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 175:3336-3348.

Apine, O. A., and Jadhav, J. P. 2011. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. *J. Appl. Microbiol*. 110: 1235-1244.

Bak, S., Nielson, H. L., and Halkier, B. A. 1998. The presence of CYP79 homologues in glucosinolate-producing plants shows evolutionary conservation of the enzymes in the conversion of amino acid to aldoxime in the biosynthesis of cyanogenicglucosides and glucosinolated. *Plant. Mol. Biol*. 38:725-734.

Barrow, G. I., and Feltham, R. K. A. 1993. Cowan and Steel' s manual for the identification of medical bacteria, 3rd ed. Cambridge : Cambridge University press.

Bharucha, U., Patel, K., Trivedi, U. B. 2013. Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). Agric. Res. (DOI 10.1007/s40003-013-0065-7)

Chanway, C. P. 1998. Bacterial endophytes: ecology and practical implication. *Sydowia*. 50:149-170.

Darwin, C. and Darwin F. 1880. The power of movement in plants. London: John Murry.

Dasri, K., Kaewharn, J., Kanso, S., and Sangchanjiradet, S. 2014. Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by rhizobacteria isolated from epiphytic orchids. *KKU. Res. J.* 19:268-275.

El-Awady, M. A. M., Hassan, M. M., and Al-Sodany, Y. M. 2015. Isolation and characterization of salt tolerant endophytic and rhizospheric plant growth-promoting bacteria (PGPB) associated with the halophyte plant (*Sesuvium verrucosum*) grown in KSA. *IJASBT*. 3:552-560.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783–791.

Harikrishnan, H., Shanmugaiah, V., and Balasubramanian, N. 2014. Optimization for production of indole acetic acid (IAA) by plant growth promoting *Streptomyces* sp. VSMGT1014 isolated from rice rhizosphere. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3:158-171.

Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., and Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol*. 60:579-598.

Jeyanthi, V. , and Ganesh, P. 2013. Production, optimization and characterization of phytohormone indole acetic acid by *Pseudomonas fluorescence*. *IJPBA*. 4:514-520.

Jitendra, D., and Nikhilesh, K. 2013. Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic bacteria of soybean (*Glycine max* (L) Merril). *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol*. 1:62-69.

Jha, C. K., Patel, B., and Saraf, M. 2012. Stimulation of the growth of Jatropha curcas by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* MSA2. *World. J. Microbiol. Biotechnol*. 28:891-899.

Khamna. S., Yokota. A., Peberdy, J. F., and Lumyong, S. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizo-sphere soils. *Eur. Asia. J. BioSci*. 4:23-32.

Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. –M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., Al-Khiziri, S., Ullah, I., Ali, L., Jung, H. –Y., and Lee, I. –J. 2014. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *J. Microbiol*. 52:689-695.

Khianngam, S., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A., Kim, K. K., Lee, K. C, Lee J. S. 2012. *Cohnella thailandensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium from Thai soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 60:2284-2287.

Kukavica, B., Mitrović, A., Mojović, M., and Veljović-Jovanović, S. 2007. Effect of indole-3-acetic acid on pea root growth, peroxidase profiles and hydroxyl radical formation. *Ach. Biol. Sci., Belgrade* 59:319-326.

Leveau, J. H. J., and Lindow, S. E. 2005. Utilization of plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Env. Microbiol*. 71:2365-2371.

Lin, L., and Xu, X. 2013. Indole-3-acetic acid production by endophytic *Streptomyces* sp. En-1 isolated from medicinal plants. *Curr. Microbiol*. 67:209-217.

Logan, N. A., Berge, O., Bishop, A. H., Busse, H. –J., de Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L., Salkinoja-Salonen, M. S., Seldin, L., and Ventosa, A. 2009. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2114-2121.

Mano, Y. and Nemoto, K. 2012. The pathway of auxin biosynthesisin plants. *J. Exp. Bot*. 63:1-20.

Mohite, B. 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *J. Soil. Sci. Plant. Nut*.13:638-649.

Nokhal, T. H., and Schlegel, H. G. 1983. Taxonomic study of *Paracoccus denitrificans*. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 33:26-37.

Nutaratat, P., Amsri, W., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., and Limtong, S. 2015. Indole-3-acetic acid production by newly isolated red yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 61:1-9.

Nutaratat, P., Monprasit, A., Srisuk, N. 2017. High-yield production of indole-3-acetic acid by *Enterobacter* sp. DMKU-RP206, a rice phyllosphere bacterium that possesses plant growth-promoting traits. *3 Biotech*. 7:305.

Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., and Babalola, O. O. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World. J. Microbiol. Biotechnol*. 33:197.

Patil, N. B., Gajbhiye, M., ahiwale, S. S., gunjal, A. B., Kapadnis, B. P. 2011. Optimization of indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from sugarcane. *Int. J. Env. Sci.* 2:307-314.

Phetcharat, P., and Duangpaeng, A. Screening of endophytic bacteria from organic rice tissue for indole acetic acid production. *Procedia. Eng*. 32:177-183.

Prasad, M. P., and Dagar, S. 2014. Identification and characterization of endophytic bacteria from fruits like Avacado and Black grapes. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3:937-947.

Raheem, S., Muhammad, W., Latif, H. A., Khadija, Al-H., Sang-Mo, K., Chang-Woo, S., and In-Jung, L. 2017. Indole acetic acid production and plant growth promoting potential of bacterial endophytes isolated from rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *Article in Acta Biologica Hungarica*. 68: 175-186.

Rani, M. U., Arundhathi and Reddy, G. 2011. *Bacillus cereus* and *Enterobacter cancerogenus* screened for their efficient plant growth promoting traits rhizobacteria (PGPR) and antagonistic traits among sixteen bacterial isolates from rhizospheric soils of Pigeon Pea. *Afr. J. Microbiol. Res*. 5:2090-2094.

R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

Sachdev, D. P., Chaudhari, H. G., Kasture, V. M., Dhavale, D. D. 2009. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumonia* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. Indian. J. Exper. Biol. 47:993-1000.

Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*. 4: 406–425.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B. R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res*. 183:92-99.

Sudha, M., Shyamala Gowri, R., Prabhavathi, P., Astapriya, P., Yamuna Devi, S., and Saranya, A. 2012. Production and optimization of indole acetic acid by indigenous micro flora using agro waste as substrate. *Pak. J. Biol. Sci*. 15:39-43.

Syamsia, Kuswinanti, T., Syam, E., and Masniawati, A. 2015. The potency of endophytic fungal isolates collected from local aromatic rice as indole acetic acid (IAA) producer. *Procedia. Food. Sci*. 3:96-103.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res*. 25: 4876–4882.

Torres, A. R., Araújo, W. L., Cursino, L., Hungria, M., Plotegher, F., Mostasso, F. L., and Azevedo, J. L. 2008. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. *J. Microbiol*. 46:373-379.

Went, F. W., and Thimann, K. V. 1937. Phytohormones: Macmillan, NewYork.

Woodward, A. W., and Bartel, B. 2005 Auxin: regulation, action and interaction. *Annal. Botany*. 95:707-735.

ภาคผนวก

ภาพภาคผนวกที่ 1 หน้าปกเล่มบทคัดย่อในการนำเสนอผลงาน

การหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตกรดอินโดลแอซีติกจาก *Enterobacter cancerogenus* RD4-1-1

ณัฐพล ขันนพคุณ, ณัฐดา สว่างงาม, ปณิดา ดวงแก้ว, พิมพ์ใจ มีตุ้ม, พรรณธิภา ณ เชียงใหม่ และเสาวภา เขียนงาม

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี สามพระยา ชะอำ เพชรบุรี 76120

E-mail : khianngam_s@silpakorn.edu

บทคัดย่อ

ไอโซเลต RD4-1-1 เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกมาจากเมล็ดข้าวไร่พันธุ์พื้นเมือง ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ถูกระบุว่าเป็น *Enterobacter cancerogenus* โดยแบคทีเรียแสดงความสามารถในการผลิตกรดอินโดลแอซีติก ซึ่งเป็นฮอร์โมนสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของพืช ที่ความเข้มข้น 49.209 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มการผลิตกรดอินโดลแอซีติก โดยศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของสารตั้งต้นแอล-ทริปโตเฟน ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย สภาวะอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาในการบ่ม พบว่าเมื่อนำ *E. cancerogenus* RD4-1-1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ที่มีน้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน และแอล-ทริปโตเฟนความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเป็นกรดด่าง 7.0 ด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์หัวเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณกรดอินโดลแอซีติกได้ถึง 3.43 เท่า กรดอินโดลแอซีติกภายหลังการหาสภาวะที่เหมาะสมจะถูกทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของลำต้น ความยาวราก และอัตราการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ RD 31 โดยผลที่ได้ให้ผลทางบวกเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *E. cancerogenus* RD4-1-1 เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมสามารถเพิ่มการผลิตกรดอินโดลแอซีติก ซึ่งมีศักยภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ RD 31 ได้

คำสำคัญ

กรดอินโดลแอซีติก, แบคทีเรียเอนโดไฟท์, สภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย, ส่งเสริมการเจริญของพืช

แหล่งทุน

ทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชนฐานรากประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

ภาพภาคผนวกที่ 2 บทคัดย่อในการนำเสนอผลงาน

ภาพภาคผนวกที่ 3 การรับรางวัลชนะเลิศการนำเสนอผลงานแบบปากเปล่าของนักศึกษา