สำหรับผู้วิจัย

รหัสโครงการ .....
(เฉพาะเจ้าหน้าที่ สกอ.)

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชนฐานราก
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ชื่อโครงการย่อยที่ 2
ศึกษารูปแบบการผลิตกรดอินโดลแอซิติกจากแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับเกษตรกร
Study on production pattern of indole acetic acid (IAA) produced by bacteria that suitable for farmers

ภายใต้ชุดโครงการ
การใช้ประโยชน์กรดอินโดลแอซีติกที่ผลิตโดยแบคทีเรียเพื่อการปลูกข้าว
Utilization of indole acetic acid (IAA) produced by bacteria for rice planting

คณะผู้วิจัย
ดร.เสาวภา เขียนงาม (หัวหน้าโครงการ) (มหาวิทยาลัยศิลปากร)
รศ. ดร.พรรณธิภา ณ เชียงใหม่ (ผู้ร่วมวิจัย) (มหาวิทยาลัยศิลปากร)
ดร.ศิรพรรณ สุคนธสิงห์ (ผู้ร่วมวิจัย) (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)
นางสาวพิมพ์ใจ มีตุ้ม (ผู้ร่วมวิจัย) (มหาวิทยาลัยศิลปากร)
นางสาวชนาพร ตระกูลแจะ (นักวิจัยรุ่นใหม่) (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

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

รายงานวิจัยฉบับนี้เป็นการศึกษาหารูปแบบการเตรียมผลิตภัณฑ์กรดอินโดลแอซีติก (IAA) อย่างง่ายจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกษตรกรสามารถเตรียม และนำไปใช้ได้เอง เนื่องจากก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาเพิ่มปริมาณการผลิต IAA จากแบคทีเรียแต่เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งเป็นไปได้ยากหากเกษตรกรจะนำไปเตรียมเอง ดังนั้นหากต้องการส่งเสริมให้เกษตรกรสามารถพึ่งพาตัวเอง และลดการใช้สารเคมี ทางผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพื่อหาชุดรูปแบบอย่างง่าย เพื่อให้เกษตรกรสามารถผลิตและนำไปจัดการใช้ได้เองภายในแปลง โดยสามารถติดต่อขอคำแนะนำ และกล้าเชื้อได้จากทีมผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย
มีนาคม 2562

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) โดยการประสานงานของเครือข่ายบริหารการวิจัยอุดมศึกษาภาคกลางตอนล่าง งบประมาณปี พ.ศ. 2561

ขอขอบคุณเกษตรกรผู้ปลูกข้าว คุณประกอบ รุ่งสว่าง ตำบลทับใต้ อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้แปลงปลูกข้าว รวมทั้งให้ความร่วมมือในการนำฮอร์โมนไปใช้ในพื้นที่การปลูกข้าวของตนเอง

ท้ายที่สุดขอขอบคุณ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี ที่ได้ให้การสนับสนุนการวิจัยของนักวิชาการในหน่วยงาน

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2561

ชื่อโครงการ ศึกษารูปแบบการผลิตกรดอินโดลแอซิติกจากแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับเกษตรกร

บทคัดย่อ

Enterobacter cancerogenus RD4-1-1 เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตกรดอินโดลแอซีติก และมีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *Curvularia* sp. ถูกนำมาศึกษาหาวิธีการในการผลิต IAA อย่างง่ายให้กับเกษตรกร การทดลองเริ่มต้นทำในสภาพปลอดเชื้อได้ผลิตภัณฑ์ IAA เท่ากับ 276.182 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากการเตรียมอาหารด้วยวิธีการต้ม potato dextrosebroth (PDB) ที่ประกอบด้วย 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของแอลทริปโตเฟนนาน 15 นาที ใช้หัวเชื้อที่ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที นาน 3 วัน ทั้งนี้ข้อมูลดังกล่าวถูกนำมาเป็นต้นแบบในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต IAA ในสภาพที่ไม่ปลอดเชื้อ โดยเตรียม PDB ที่ประกอบด้วย 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของแอลทริปโตเฟนลงในขวดน้ำพลาสติก และใช้ชุดปั้มลมในการให้อากาศ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน ปริมาณการผลิต IAA ลดลง เหลือ 73.624 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงทั้ง 2 สภาวะถูกยืนยันว่าเป็น IAA ด้วยวิธีโครมาโทรกราฟีแผ่นบาง ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมในรูปแบบไม่ปลอดเชื้อซึ่งเป็นต้นแบบให้เกษตรกรนำไปใช้ถูกเจือจางความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 ไมโครโมลาร์เพื่อใช้แช่เมล็ดสำหรับนาหว่าน พบว่า IAA ที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถส่งเสริมการงอกในแปลงนาได้ดีกว่าการแช่ด้วยน้ำเปล่า

คำสำคัญ : แบคทีเรียเอนโดไฟท์ กรดอินโดลแอซิติก *Enterobacter cancerogenus*

Research Title Study on production pattern of indole acetic acid (IAA) produced by bacteria that suitable for farmers

Abstract

An endophytic bacteria *Enterobacter cancerogenus* RD4-1-1 showed antagonistic effect against *Curvularia* sp. Investigation of a simple way to produce indole acetic acid (IAA) for agricultural extension were studied. The IAA productivity was 276.182 microgram per milliliter in potato dextrose broth supplemented with 500 microgram per milliliter of L-tryptophan using 1% inoculums by aseptic techniques and incubated at 30 °C for 3 days with 150 rpm on a rotary shaker. Non-aseptic fermentation was examined by the previous aseptic culture condition. The aseptic production was performed in potato dextrose broth supplemented with 500 microgram per milliliter of L-tryptophan in plastic bottle with air pump incubated at room temperature for 3 days. The aseptic productivity of IAA was decreased to be 73.624 microgram per milliliter. The IAA productions of aseptic and non-aseptic were confirmed by Thin layer chromatography (TLC). The prototype IAA product was diluted to 2.5 micromolar and used as seed soaking for paddy sow field with significantly increase seed germination compared with water soaking.

Keywords : Endophytic bacteria, Indole-3- acetic acid, *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	14
หลักการและเหตุผล	14
ผลการดำเนินงานตลอดโครงการ	15
ดัชนีชี้วัดความสำเร็จ	17
งบประมาณโครงการ	18
หนังสือแสดงความเห็นเกี่ยวกับผลการดำเนินการของโครงการจากชุมชน/ท้องถิ่นที่ร่วมโครงการ	19
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	27
บทที่ 4 ผลการดำเนินงาน	32
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการดำเนินการ	42
บทที่ 6 สรุปผลการดำเนินงานและข้อเสนอแนะ	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	50

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 6.1	ตารางสรุปผลงานวิจัยตลอดโครงการ	16
ตารางที่ 1	แบคทีเรียเอนโดไฟท์และบทบาทในการกระตุ้นการเจริญของพืช	23
ตารางที่ 2	การผลิต plant growth regµlators (PGRs) โดย rhizobacteria และการตอบสนองต่อพืช	24
ตารางที่ 3	คะแนนการงอกโผล่พ้นดินและความสูงของข้าวนาสวน กข 43 ที่ทำการแช่เมล็ดและพ่นแปลงด้วย2.5 µM IAA	41

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 1	โครงสร้างทางเคมีของ indole-3-acetic acid (IAA)	20
ภาพที่ 2	วิถีการสังเคราะห์ IAA จากแบคทีเรียที่ทราบกลไก เส้นประแสดงปฏิกิริยาที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์	21
ภาพที่ 3	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยเลนส์ตากำลังขยาย 100X (a) และลักษณะโคโลนี (b) ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ RD 4-1-1	32
ภาพที่ 4	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 5	ปริมาณ IAA (µg/ml) จากอาหารที่ใช้รูปแบบการปรับหัวเชื้อในของเหลว 3 แบบ คือ DW, PW และ 0.9%NaCl	34
ภาพที่ 6	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/ml) จากการเตรียมหัวเชื้อทั้ง 3 รูปแบบ ที่เก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 ºC นาน 5 สัปดาห์	34
ภาพที่ 7	ปริมาณ IAA (µg/ml) จากหัวเชื้อ 3 รูปแบบ ที่เก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 ºC ที่เติมลงในอาหารใหม่ทุกสัปดาห์	35
ภาพที่ 8	ปริมาณ IAA (µg/ml) จากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอย่างง่าย 3 ชนิด คือ NB, PDB และ PW	36
ภาพที่ 9	ปริมาณ IAA (µg/ml) จากอาหารสูตร PDB ที่ใช้หัวเชื้อใน 3 รูปแบบ	36
ภาพที่ 10	ปริมาณ IAA (µg/ml) จากการเลี้ยงในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน ในระดับ L-tryptophan 100, 500 และ 1,000 µg/ml	37
ภาพที่ 11	ปริมาณ IAA (µg/ml) ที่เลี้ยงใน PDB จากรูปแบบการเตรียมอาหาร 3 แบบ ในระยะเวลาทั้งหมด 5 วัน	37
ภาพที่ 12	การต่อชุดปั๊มลมกับขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB	38
ภาพที่ 13	ปริมาณ IAA (µg/ml) ของแบคทีเรียที่เตรียมในรูปแบบไม่ปลอดเชื้อ ก่อนการฆ่าเชื้อ (BA) และหลังการฆ่าเชื้อ (AA) รวมทั้งสภาวะการคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 ºC	39
ภาพที่ 14	Thin layer chromatography (TLC) ของสารละลายมาตรฐาน IAA และสารละลายจากแบคทีเรีย	40

สารบัญภาพภาคผนวก

ภาพภาคผนวกที่		หน้า
ภาพภาคผนวกที่ 1	การเตรียมอาหาร PDB สูตรอย่างง่ายที่ทำการต้มที่ 100 ºC นาน 15 นาที แล้วบรรจุลงในขวดน้ำพลาสติก	51
ภาพภาคผนวกที่ 2	การผลิต IAA ในสภาพไม่ปลอดเชื้อในระยะเวลา 1-3 วัน	52
ภาพภาคผนวกที่ 3	การเตรียมผลิตภัณฑ์ IAA จากรูปแบบการเตรียมในสภาพไม่ปลอดเชื้อ โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 2.5 µM และนำไปฉีดพ่นในแปลงนา	52

บทที่ 1
ความเป็นมาและวัตถุประสงค์

1) ข้อมูลของโครงการ

ชื่อโครงการ ศึกษารูปแบบการผลิตกรดอินโดลแอซิติกจากแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับเกษตรกร
Study on production pattern of indole acetic acid (IAA) produced by bacteria that suitable for farmers

ระยะเวลาของโครงการ 10 เดือน

งบประมาณรวม 200,000.00 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 : ทดสอบรูปแบบการผลิตกรดอินโดลแอซิติกจากแบคทีเรีย ให้เหมาะสมกับเกษตรกร
สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 40 เปอร์เซ็นต์

ลายมือชื่อ.....
(ดร.เสาวภา เขียนงาม)

3) คณะผู้วิจัย

ผู้ร่วมโครงการ

รศ.ดร. พรรณธิภา ณ เชียงใหม่

Assoc. Prof. Dr. Pantipa Na Chiangmai

สาขาความชำนาญ วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช)

หน่วยงานต้นสังกัด: คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

สถานที่ติดต่อ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี ตำบลสามพระยา อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
โทรศัพท์ 032-594038
โทรสาร 032-594038
โทรศัพท์เคลื่อนที่ 0-81-1995360
E-mail: mchiangmai@gmail.com, nachiangmai@silpakorn.edu
หน้าที่ : ทดสอบกรดอินโดลแอซีติกที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกับการเจริญเติบโตของข้าว
สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 30 เปอร์เซ็นต์

ลายมือชื่อ.....
(รศ. ดร.พรรณธิภา ณ เชียงใหม่)

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 : ร่วมวิจัยการทดสอบรูปแบบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกที่เหมาะสมกับเกษตรกร
สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 10 เปอร์เซ็นต์

ลายมือชื่อ.....
(ดร.ศิรพรรณ สุคนธสิงห์)

นางสาวพิมพ์ใจ มีตุ้ม
Miss Pimjai MeetμM
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 : ร่วมวิจัยการทดสอบรูปแบบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกที่เหมาะสมกับเกษตรกร
สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 10 เปอร์เซ็นต์

ลายมือชื่อ.....
(นางสาวพิมพ์ใจ มีตุ้ม)

นางสาวชนาพร ตระกูลแจะ
Miss Chanaporn Trakunjae
สาขาความชำนาญ จุลชีววิทยา
หน่วยงานต้นสังกัด: ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเอนไซม์และจุลินทรีย์ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร
สถานที่ติดต่อ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพ 10900
โทรศัพท์ 02-942-8600-3 ต่อ 703
โทรศัพท์เคลื่อนที่ 0-95-0592200
E-mail: aapcpt@ku.ac.th
หน้าที่ : ร่วมวิจัยการทดสอบรูปแบบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกที่เหมาะสมกับเกษตรกร
สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 10 เปอร์เซ็นต์

ลายมือชื่อ.....
(นางสาวชนาพร ตระกูลแจะ)

4) วัตถุประสงค์ของโครงการ

ศึกษารูปแบบการผลิตที่เหมาะสมกับการผลิตระดับแปลงของกรดอินโดลแอซีติกจากแบคทีเรียสำหรับเกษตรกร (การผลิตระดับแปลง หมายถึง มีการผลิตที่เน้นความสามารถในการดำเนินการได้เองโดยเกษตรกรหรือชุมชน ที่อาจมีโอกาสในการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงกว่าในห้องปฏิบัติการด้วยเช่นเดียวกัน)

5) หลักการและเหตุผล

กรดอินโดลแอซีติก (Indole acetic acid, IAA) เป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินธรรมชาติที่สำคัญ เป็นของแข็ง และไม่มีสี ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ และกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช ในพืชบางชนิดมีความจำเป็นต้องใช้ IAA เป็นอย่างมากเพื่อใช้ในระยะเริ่มต้นในการเปลี่ยนแปลงเซลล์เพื่อสร้างอวัยวะ แต่ถ้าหากมีมากเกินไป สำหรับพืชบางชนิดก็อาจทำให้เกิดการยับยั้งการพัฒนาของเซลล์พืชได้ ดังนั้นหากพืชได้รับ IAA ในระดับที่เหมาะสมก็เท่ากับเป็นการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Harikrishnan et al., 2014)

IAA ที่เกษตรกรนำมาใช้กับพืชโดยส่วนใหญ่ถูกนำเข้ามาจากต่างประเทศ ทำให้มีราคาค่อนข้างสูง มากไปกว่านั้นผลิตภัณฑ์ดังกล่าวส่วนใหญ่ยังอยู่ในรูปสารเคมีสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์รุนแรง และยากต่อการควบคุมเมื่อนำไปใช้กับพืช ดังนั้นแนวทางแก้ไขปัญหาในปัจจุบันเพื่อให้ทิศทางการเกษตรกรรมเป็นไปอย่างปลอดภัย มีความก้าวหน้าและยั่งยืนได้นั้น จึงได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้เพื่อแก้ปัญหาหรือบรรเทาความเสียหายของพืช โดยแนวทางเลือกดังกล่าวคือการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทดแทนการใช้สารเคมี อาทิเช่น การใช้ IAA ที่ผลิตได้จากทรัพยากรชีวภาพ (Leveau and Lindow, 2005; Kukavica et al., 2007)

กลุ่มจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท เชื้อรา และยีสต์ เป็นทรัพยากรทางชีวภาพที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการผลิต IAA ได้ (Khan et al., 2014; Nutaratat et al., 2015; Syamsia et al., 2015) ทั้งนี้บางสายพันธุ์ยังถูกรายงานเพิ่มเติมว่ามีความสามารถด้านอื่นที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชด้วย เช่น การช่วยตรึงไนโตรเจน การเป็นปฏิปักษ์ต่อโรคพืชและแมลง สามารถผลิตไซเดอโรฟอร์ และสามารถย่อยสลายฟอสฟอรัสได้ เป็นต้น (Hayat et al., 2010) ดังนั้นผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกในการนำไปใช้ ซึ่งจุลินทรีย์หนึ่งสายพันธุ์อาจให้ผลมากกว่าหนึ่งประการในการส่งเสริมการเจริญของพืช และมีความปลอดภัย

จากงานวิจัยที่ผ่านมาทางคณะผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเมล็ดข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองไอโซเลท RD4-1-1 ซึ่งมีความสามารถในการผลิต IAA ได้ดี และเมื่อนำไปทดสอบในห้องปฏิบัติการในระยะงอกและต้นอ่อนของข้าว พบว่ามีแนวโน้มที่ดีในการช่วยส่งเสริมการเจริญของข้าว (ที่มาจากการศึกษาวิจัยของกลุ่มวิจัยทั้งที่ได้รับทุนและไม่ได้ทุนจาก สกอ. ก่อนหน้านี้) ภายหลังเมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มจีนัส *Enterobacter cancerogenus* ซึ่งก่อนหน้านี้เคยมีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (Jha and Patel, 2012) ดังนั้นจึงมั่นใจในความปลอดภัยถ้านำไปใช้ให้เกิดประโยชน์กับพืช

แต่อย่างไรก็ตามการนำ IAA จากแบคทีเรียไปทดสอบกับการเจริญของข้าวของคณะผู้วิจัยยังทำอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการ และวิธีการเตรียมผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจากแบคทีเรียยังอยู่ในระดับปลอดเชื้อไม่ว่าจะเป็นการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมหัวเชื้อ และการนำผลิตภัณฑ์ไปใช้กับพืช ด้วยเหตุนี้หากต้องการสนับสนุนให้

เกษตรกรลดการใช้สารเคมี และหันมาใช้ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่สามารถจัดการได้เองจึงดูเป็นเรื่องยาก ดังนั้น เป้าหมายในงานวิจัยนี้จึงต้องการทดสอบการเตรียมผลิตภัณฑ์ IAA จากแบคทีเรียในรูปแบบอย่างง่ายสำหรับเกษตรกรแบบไม่ปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิต IAA ของแบคทีเรียในสภาวะที่ต้องใช้จริง รวมทั้งทำการเปรียบเทียบความสามารถของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมทั้งรูปแบบปลอดเชื้อ และไม่ปลอดเชื้อในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว โดยผลวิจัยที่เกิดขึ้นสามารถนำไปถ่ายทอดให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกข้าวในพื้นที่อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ได้

6) ผลการดำเนินงานตลอดโครงการ

1. *E. cancerogenus* RD4-1-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเมล็ดข้าวไร่พันธุ์พื้นเมือง ถูกนำออกมาจาก stock culture และทดสอบการผลิตฮอร์โมน IAA เริ่มต้น พบว่ายังมีการสร้างฮอร์โมนในปริมาณใกล้เคียงเดิมเทียบเท่ากับการคัดเลือกเริ่มต้น

2. ศึกษารูปแบบการเตรียมผลิตภัณฑ์ IAA อย่างง่ายในระดับห้องปฏิบัติการในสภาพปลอดเชื้อ โดยเริ่มต้นศึกษาจาก 3 องค์ประกอบที่สำคัญ คือ รูปแบบการเตรียมหัวเชื้อในสภาพของเหลว อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอย่างง่าย และสภาวะเพาะเลี้ยงในการผลิต IAA ซึ่งหมายรวมถึง ระดับสารตั้งต้น อากาศ ระยะเวลาในการเลี้ยง และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. ศึกษารูปแบบการเตรียม IAA ในรูปแบบอย่างง่ายที่เกษตรกรสามารถนำไปเตรียมใช้ได้เองในสภาพไม่ปลอดเชื้อ โดยใช้ข้อมูลจากผลการทดลองข้อ 2

4. ทำการยืนยันผลิตภัณฑ์ IAA ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง โดยเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงในสภาพของข้อ 2 และ 3

5. ทดสอบคุณสมบัติบางประการของ IAA (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้) ที่เตรียมได้จากข้อที่ 3 ไปทำการแช่เมล็ดข้าว และทำการฉีดพ่นในแปลงนา

6. สรุปผลโครงการ นำผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการ และแปลงนา ไปเผยแพร่ให้เกษตรกร ชุมชน (*ผลรายงานอยู่ในแผนงานวิจัย*)

ตารางที่ 6.1 ตารางสรุปผลงานวิจัยตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	แผนงานวิจัย	นักวิจัยที่รับผิดชอบ	ผลงานตลอดโครงการ
ศึกษารูปแบบการผลิตที่เหมาะสมกับการผลิตระดับแปลงของกรดอินโดลแอซีติกจากแบคทีเรียสำหรับเกษตรกร	1.1 นำแบคทีเรียออกจาก stock และวิเคราะห์ปริมาณ IAA	1. ดร. เสาวภา เขียนงาม	1.1 แบคทีเรียเอนโดไฟต์ยังมีความสามารถในการผลิต IAA ได้
	1.2 ศึกษารูปแบบการเตรียมผลิตภัณฑ์ IAA อย่างง่ายในระดับห้องปฏิบัติการในสภาพปลอดเชื้อ	1. ดร. เสาวภา เขียนงาม 2. ดร. ศิรพรรณ สุคนธสิงห์ 3. นางสาวชนาพร ตระกูลแจะ	1.2 ได้ข้อมูลการผลิต IAA อย่างง่ายจาก 3 ปัจจัย คือ รูปแบบการเตรียมหัวเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอย่างง่าย และสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อ
	1.3 ศึกษารูปแบบการเตรียม IAA ในรูปแบบอย่างง่ายที่เกษตรกรสามารถนำไปเตรียมใช้ได้เองในสภาพไม่ปลอดเชื้อ	1. ดร. เสาวภา เขียนงาม 2. นางสาวพิมพ์ใจ มีตุ้ม	1.3 ได้ผลิตภัณฑ์ IAA ที่ได้จากการเตรียมในสภาพที่ไม่ปลอดเชื้อ
	1.4 ทำการยืนยันผลิตภัณฑ์ IAA จากแบคทีเรียด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี	1. ดร. เสาวภา เขียนงาม	1.4 ยืนยันผลิตภัณฑ์ IAA จากแบคทีเรียที่ผลิต
	1.5 ทดสอบคุณสมบัติของ IAA ที่เตรียมได้จากในสภาพไม่ปลอดเชื้อในแปลงนาทดลอง	1. ดร. เสาวภา เขียนงาม 2. รศ.ดร.พรรณธิภา ณ เชียงใหม่	1.5 IAA สามารถนำไปใช้ได้จริงในแปลงนาทดสอบ
	1.6 เผยแพร่งานวิจัยให้กับเกษตรกร และชุมชน	1. ดร. เสาวภา เขียนงาม 2. รศ.ดร.พรรณธิภา ณ เชียงใหม่ 3. นางสาวพิมพ์ใจ มีตุ้ม	1.6 เกษตรกรได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิต IAA ในรูปแบบอย่างง่ายในสภาพไม่ปลอดเชื้อ

7) ดัชนีชี้วัดความสำเร็จ (โปรดระบุถึงสิ่งที่ได้รับเมื่อสำเร็จโครงการตามดัชนีชี้วัดความสำเร็จในข้อเสนอโครงการฉบับสมบูรณ์ และแสดงหลักฐานประกอบแนบมาด้วย)

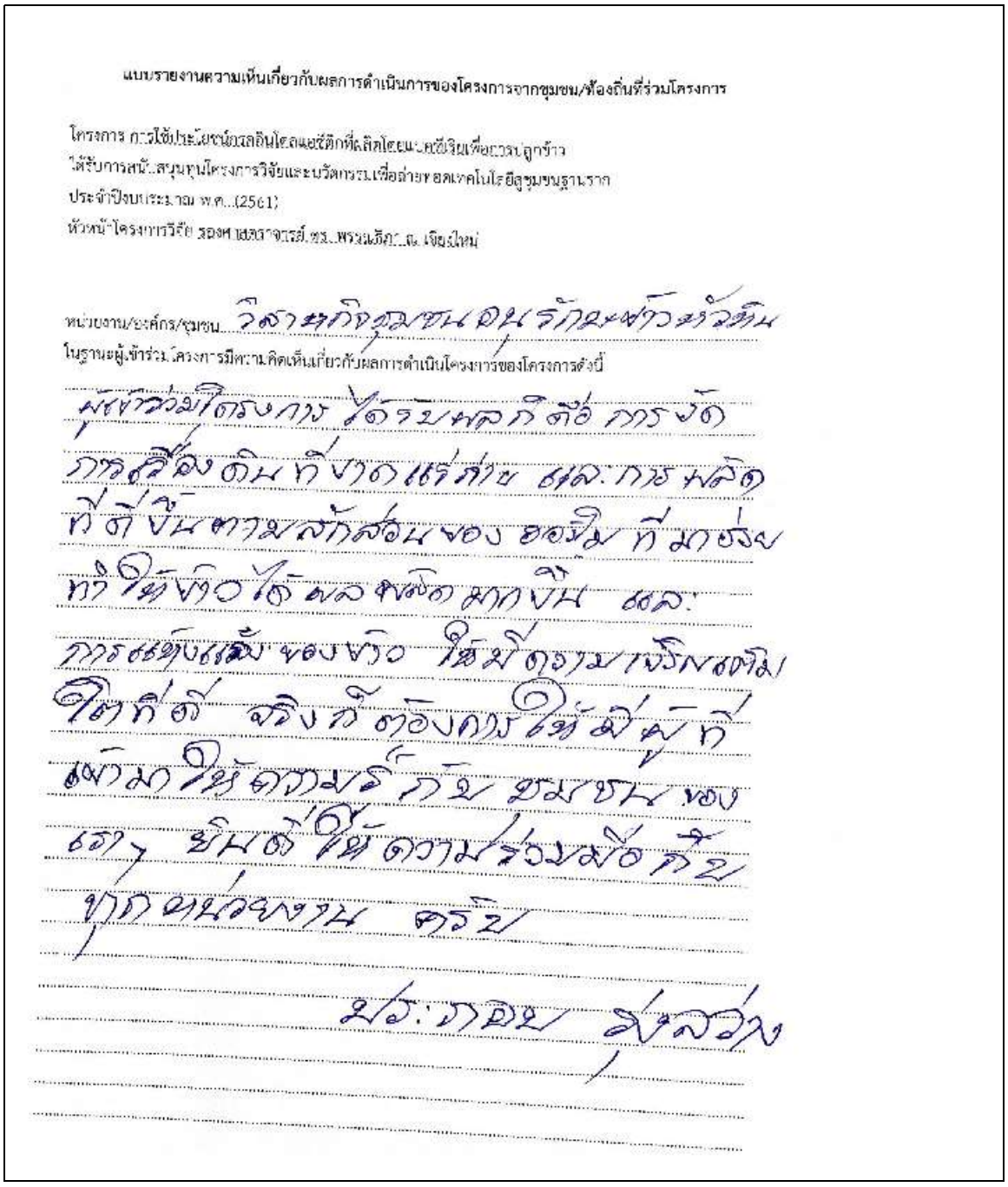
ผลงาน	ดัชนีชี้วัดความสำเร็จ	หลักฐานประกอบ เช่น รายงานวิจัย
1. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ (โปรดระบุ)	-	
2. เทคโนโลยีใหม่ (โปรดระบุ)	-	
3. กระบวนการใหม่ (โปรดระบุ)	-	
4. องค์ความรู้ (โปรดระบุ)	โครงการที่ 2 ได้รูปแบบการเตรียม IAA แบบพาสเจอร์ไรซ์อย่างง่าย เพื่อให้เกษตรกรสามารถเตรียมเพื่อใช้ในแปลงได้เอง	ภาพประกอบการเตรียมผลิตภัณฑ์ IAA อย่างง่าย
5. การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ 5.1 เพิ่มรายได้ 5.2 ลดต้นทุนการผลิต 5.3 ทดแทนการนำเข้า 5.4 เพิ่มการส่งออก 5.5 การถ่ายทอดเทคโนโลยี 5.6 อื่นๆ	-	
6. การใช้ประโยชน์เชิงสาธารณะ 6.1 การฝึกอบรม 6.2 การถ่ายทอดองค์ความรู้ 6.3 การกระจายรายได้ 6.4 ดัชนีความสุข 6.5 สุขภาวะ 6.6 การแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อม 6.7 อื่นๆ	-	
7. การผลิตนักศึกษา 7.1 ปริญญาตรี 7.2 ปริญญาโท 7.3 ปริญญาเอก	- จำนวน.....คน ชื่อ..... จำนวน.....คน ชื่อ..... จำนวน.....คน ชื่อ.....	
8. ทรัพย์สินทางปัญญา (อนุสิทธิบัตร/ สิทธิบัตร / ลิขสิทธิ์ ฯลฯ)	-	
9. บทความทางวิชาการ 9.1 วารสารในประเทศ	 จำนวน.....เรื่อง	

ผลงาน	ดัชนีชี้วัดความสำเร็จ	หลักฐานประกอบ เช่น รายงานวิจัย
9.2 วารสารในระดับนานาชาติ 9.3 เอกสารเผยแพร่	ชื่อเรื่อง..... ชื่อวารสาร..... ปีที่พิมพ์.....	
10. การเสนอผลงานในการประชุม 10.1 การประชุมระดับชาติ 10.2 การประชุมระดับนานาชาติ	- จำนวน.....ครั้ง ชื่อการประชุม.....วันที่..... สถานที่.....	

8) งบประมาณโครงการ

รายการ	งบประมาณจาก สกอ จำนวนเงิน (บาท)
1. หมวดค่าตอบแทน (ค่าตอบแทนผู้วิจัย) ค่าทำงานนอกเวลาราชการในวันหยุดราชการ โครงการวิจัยที่ 2 (420 บาท x 5 คน x 4 วัน)	8,400
รวมหมวดค่าตอบแทน	**8,400**
2. หมวดค่าจ้าง (ผู้ช่วยวิจัยและเจ้าหน้าที่อื่นๆ)	-
รวมหมวดค่าจ้าง	**-**
3. หมวดค่าวัสดุ 3.1 วัสดุวิทยาศาสตร์ (สารเคมีเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ชักนำ IAA จากจุลินทรีย์ ตรวจสอบปริมาณ IAA จากจุลินทรีย์, IAA สังเคราะห์เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน และนำมาเปรียบเทียบผลที่มีต่อพืชในห้องปฏิบัติการ, อาหารเลี้ยงเชื้อ)	50,000
3.2 วัสดุเชื้อเพลิง (น้ำมันในการเดินทางไปทำการวิจัยระหว่างสถาบัน)	12,000
3.3 วัสดุอื่น ๆ เช่น อุปกรณ์นำมาประกอบเพื่อการเลี้ยงจุลินทรีย์อย่างง่าย	10,000
รวมหมวดค่าวัสดุ	**72,000**
4. ค่าเดินทางระหว่างปฏิบัติการในโครงการ	-
5. ค่าจัดหาข้อมูล และค่าทำรายงาน	-
6. ค่าจ้างวิเคราะห์หรือทดสอบตัวอย่าง	-
7. อื่นๆ (โปรดระบุ)	-
รวม (บาท)	**80,400**
	แปดหมื่นสี่ร้อยบาทถ้วน

หนังสือแสดงความเห็นเกี่ยวกับผลการดำเนินการของโครงการจากชุมชน/ท้องถิ่นที่ร่วมโครงการ



แบบรายงานความเห็นเกี่ยวกับผลการดำเนินการของโครงการจากชุมชน/ท้องถิ่นที่ร่วมโครงการ

โครงการ การใช้ประโยชน์จากแอนโธไซยานินจากดอกอัญชันเพื่อการเคลือบผิวเมล็ดข้าว
ได้รับการสนับสนุนทุนโครงการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชนฐานราก
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. (2561)
หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณเลิศ ณ เชียงใหม่

หน่วยงาน/องค์กร/ชุมชน วิสาหกิจชุมชนอินทรีย์ข้าวหอมมะลิแดง
ในฐานะผู้เข้าร่วมโครงการมีความคิดเห็นเกี่ยวกับผลการดำเนินโครงการของโครงการดังนี้

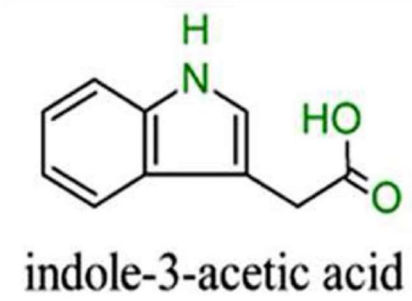
ผู้เข้าร่วมโครงการได้รับผลดีต่อการปลูกข้าวที่ดีขึ้นตามสัดส่วนของธาตุที่มากขึ้น ผลการงอกของข้าวให้มีความเข้มข้นที่ดี สิ่งที่ต้องการใช้ผู้ที่ต้องการใช้ความรู้ความชำนาญของเรา ยินดีให้ความร่วมมือกับทางหน่วยงานครับ

ผอ. บายัย สังสวัง

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)

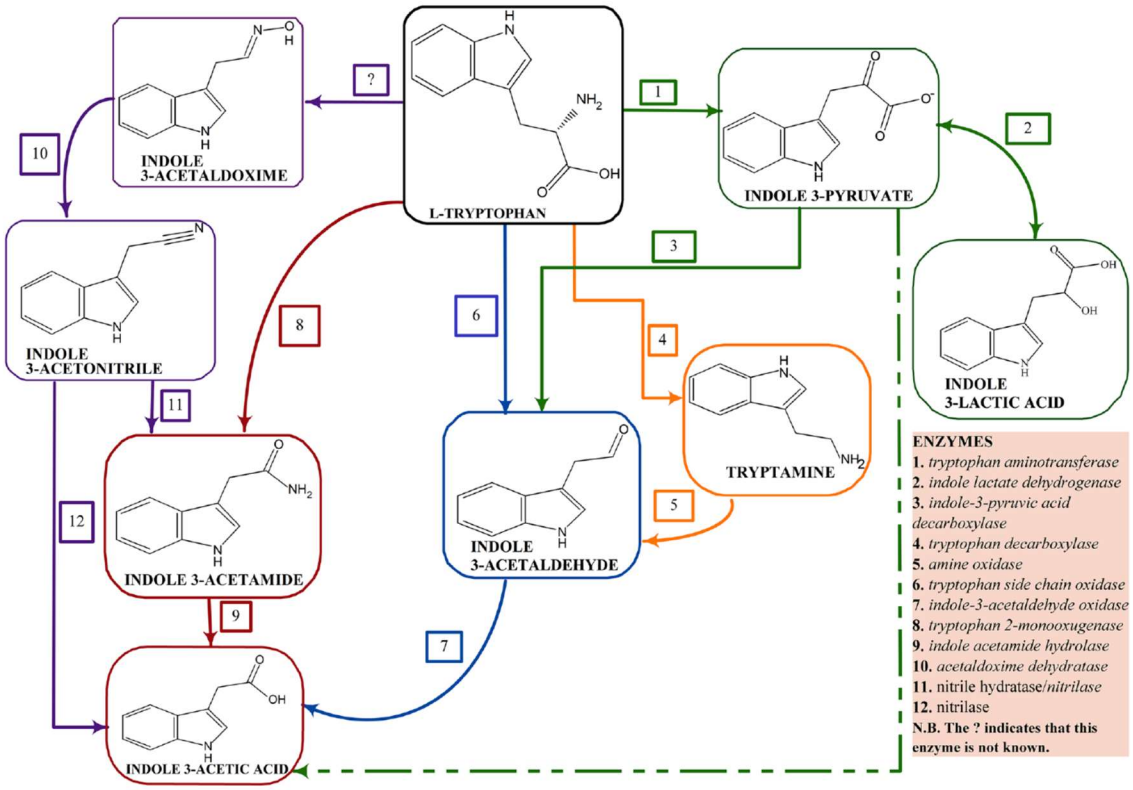
ในพืช IAA ถูกสังเคราะห์มาจาก tryptophan ผ่านตัวกลางหลายตัว โดย Mano and Nemoto (2012) ได้สรุปวิถีชีวสังเคราะห์ (biosynthesis pathway) ของ IAA ว่าผ่านวิถีชีวสังเคราะห์หลักอยู่ 2 วิถี คือ tryptophan (Trp)-independent pathway และ trp-dependent pathway โดยชีวสังเคราะห์ของ IAA ใน trp-dependent pathway ซึ่งสังเคราะห์เริ่มต้นจาก 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

Fu et al. (2015) รายงานว่า IAA สามารถพบได้จากพืช เนื่องจากเป็นฮอร์โมนที่พืชสามารถสร้างใช้เองได้ นอกจากนี้ยังพบได้จากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรีย และเชื้อรา แต่อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานว่า หากพืชที่สามารถสร้าง IAA ได้เองนั้น พบว่ามีปัญหาต่อการติดเชื้อสาเหตุโรคพืช ส่งผลให้พืชเกิดความเครียด จะทำให้สภาวะจากการผลิต IAA จากพืชเองอยู่ในสภาวะที่ไม่สมดุล ส่งผลให้กระบวนการในการพัฒนาเซลล์พืชถูกยับยั้ง และเป็นสาเหตุให้เกิดก้อน tumor และ gall ในพืชได้ นอกจากนี้สภาวะเครียดในรูปแบบของการขาดน้ำก็มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการผลิตของฮอร์โมนต่าง ๆ ภายในต้นพืช รวมทั้งออกซิน (Zhu, 2002; Abdoli et al., 2013) ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นการพิจารณาเสริม IAA ให้กับพืชจึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยแหล่งของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่เป็นสารทางชีวภาพถูกผลิตได้มาจากจุลินทรีย์ ทั้งนี้การเลือกจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารดังกล่าวจึงควรพิจารณาถึงความปลอดภัยเมื่อใช้กับพืช โดยมั่นใจว่าเมื่อนำไปใช้แล้วไม่ก่อให้เกิดปัญหาซ้ำให้กับพืช โดยส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่ถูกพิจารณาใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น จุลินทรีย์กลุ่มเอนโดไฟท์

จุลินทรีย์ endophyte หมายถึงจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื่อเยื่อพืช โดยไม่ทำให้เกิดโรคและมีความสัมพันธ์กับพืชแบบ mutualistic symbiosis จุลินทรีย์ endophyte สร้างสารประกอบหรือปฏิกิริยาบางชนิดกับพืชที่อาศัย ทำให้พืชเกิดความต้านทานโรค ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งในทางตรงข้าม จุลินทรีย์ endophyte ได้รับประโยชน์จากพืชโดยอาศัยสารอาหารต่างๆจากพืช และดำรงชีวิตอยู่ภายในเซลล์พืช นอกจากนี้จุลินทรีย์ 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 μg/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

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

สภาวะเหมาะสมในการผลิต IAA และการนำไปใช้กับพืช

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 pneumoniae* ได้จากดินบริเวณรอบรากข้าวสาลี โดยแบคทีเรียแสดงการผลิต IAA ได้สูงสุดที่ 27.5 mg/l ในสภาวะที่มี L-tryptophan (1 mg/ml) เป็นสารตั้งต้น และมีความเข้มข้น NaCl 0.5%, pH 8.0, บ่มที่ 37 °C นาน 72 ชม. จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของ IAA กับการงอกของเมล็ด moth bean ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าความยาวรากมากขึ้น (ประมาณ 92.71%) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และการทดลองในระดับกระถางพบว่าความยาวราก และความสูงของลำต้นพืชเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน 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 $^{\circ}$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

จากรายงานที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหาร แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนเกลือแร่ 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

ทั้งนี้จากข้อมูลข้างต้นโดยสรุปจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียเป็นแหล่งของ IAA ที่สำคัญ และสามารถนำไปใช้เพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชหลากหลายชนิดได้ โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีวิธีการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต IAA สำหรับการนำไปใช้ แต่อย่างไรก็ตามขั้นตอนการเตรียมเพื่อผลิต IAA ยังอยู่ในห้องปฏิบัติการซึ่งอยู่ในระดับปลอดเชื้อ ดังนั้นหากผลการทดลองมีแนวโน้มไปในทางที่ดี การเพิ่มผลผลิตของ IAA เพื่อเอาไปใช้ในระดับแปลงจึงเป็นสิ่งที่ต้องทำลำดับถัดไป เพื่อเป็นแนวทางให้กับเกษตรกรสามารถเตรียมและนำไปใช้ได้เอง

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)

1.1.20 เครื่องปั้มลมมือถือ 2,500 วัตต์

1.1.21 สายยาง

1.1.22 วาล์วปรับแรงลม

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 ชุดย้อมสีแกรมแบคทีเรีย

1.2.6 แอลกอฮอล์ 70 และ 95%

1.2.7 Nutrient broth (NB) [Difco™]

1.2.8 Potato dextrose broth (PDB) [Difco™]

1.2.9 ผงวุ้น (Agar)

1.2.10 SodiuM Chloride (NaCl) [Ajax]

1.2.11 Peptone [Difco™]

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>การวิเคราะห์ปริมาณ IAA</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 ศึกษารูปแบบการเตรียม IAA ในสภาพปลอดเชื้อ

การเตรียมชุดการผลิต IAA ในขั้นนี้ผู้วิจัยจะทำการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการแบบปลอดเชื้อก่อน โดยทดสอบองค์ประกอบสำคัญ 3 อย่างด้วยกัน เพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปเตรียมใช้ได้เองอย่างง่ายในลักษณะแบบสำเร็จรูป ประกอบด้วยหัวข้อ ดังนี้

2.3.1 หัวเชื้อ (Inoculum)

ทดสอบการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียโดยการปรับหัวเชื้อลงในของเหลว 3 ชนิด คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (DW), Peptone water (PW) และ 0.9% NaCl โดยใช้ระดับความขุ่นของเชื้อและอาหารในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิต IAA เช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณ IAA

ศึกษาความคงตัวของปริมาณแบคทีเรีย และความสามารถในการผลิต IAA จากรูปแบบหัวเชื้อในของเหลว 3 ชนิดที่ถูกเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C โดยทุกสัปดาห์จะทำการตรวจสอบปริมาณหัวเชื้อที่คงเหลืออยู่ด้วยวิธีการ spread plate พร้อมทั้งนำไปใช้เพื่อเตรียมลงในอาหารใหม่ เพื่อดูความสามารถของแบคทีเรียที่เหลืออยู่ในการเจริญเติบโตเพื่อผลิต IAA ทำจนครบ 5 สัปดาห์

2.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Medium)

หลังจากที่ได้รูปแบบหัวเชื้อในของเหลวในสภาวะที่ดีที่สุดแล้วจากข้อ 2.3.1 ผู้วิจัยจะนำรูปแบบหัวเชื้อที่ดีที่สุดมาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อหาปริมาณ IAA จากอาหาร 3 ชนิด คือ NB, PDB (มันฝรั่ง 20 g/100 ml) และ PW (5 g/1 l) เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิต IAA จากรูปแบบอาหารอย่างง่ายที่ให้ค่า IAA ดีที่สุด นอกจากนี้เมื่อได้อาหารชนิดที่ดีที่สุดแล้วจะทำการทดสอบกับรูปแบบหัวเชื้อจากของเหลว 3 ชนิดในข้อ 2.3.1 ซ้ำ เพื่อเป็นการทดสอบว่าไม่ว่าจะเป็นหัวเชื้อในรูปแบบใดอาหารชนิดนี้ก็สามารถให้ค่าการผลิต IAA ได้ดีที่สุด

2.3.3 สภาวะในการเพาะเลี้ยง (Cultural condition)

ผู้วิจัยเลือกศึกษาจาก 4 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของ L-tryptophan, การมีอากาศ, ระยะเวลาในการเลี้ยง และรูปแบบการเตรียมอาหาร

2.3.3.1 *ความเข้มข้นของ L-tryptophan* หลังจากได้ชนิดอาหารที่เหมาะสมแล้ว จะทำการทดสอบระดับของสารตั้งต้นที่ 100, 500 และ 1000 µg/ml

2.3.3.2 *การมีอากาศ* การทดลองในส่วนนี้จะทำการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต IAA ในสภาพที่ไม่มีอากาศ คือการวางไว้ในตู้บ่มเชื้อ 30 °C ในสภาพนิ่ง และสภาพที่มีอากาศโดยบ่มที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 30 °C

2.3.3.3 *ระยะเวลาในการเลี้ยง* ทำการบ่มแบคทีเรียเพื่อผลิต IAA เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 1-5 วัน โดยแต่ละวันต้องทำการวิเคราะห์หาปริมาณ IAA

2.3.3.4 *รูปแบบการเตรียมอาหาร* ทดสอบการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave เปรียบเทียบกับอาหารที่ผ่านการต้ม 100 °C นาน 15 และ 30 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์หาปริมาณ IAA

2.4 ศึกษารูปแบบการเตรียม IAA อย่างง่ายในสภาพไม่ปลอดเชื้อ

หลังจากได้รูปแบบการผลิต IAA อย่างง่ายในรูปแบบปลอดเชื้อแล้ว ในขั้นตอนนี้จะทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารในสภาพที่ไม่ปลอดเชื้อ โดยใช้ชุดรูปแบบหัวเชื้อที่เหมาะสม (ข้อ 2.3.1) เติมลงในอาหาร (ข้อ 2.3.2) ปริมาตร 1,000 ml ที่บรรจุในขวดพลาสติกขนาด 1,500 ml ทั้งนี้ทำการให้อากาศโดยใช้ชุดปั้มลมที่ต่อกับสายยางโดยมีวาล์วปรับลมเป็นจุดปรับความแรงของอากาศ แล้วต่อเข้ากับขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณ IAA

ก่อนนำ IAA ไปใช้กับการทดสอบกับพืชหรืองานอื่นๆ ผู้วิจัยจะทำการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ IAA ที่ได้ด้วยวิธีการ Autoclave เพื่อป้องกันการรบกวนจากตัวเชื้อแบคทีเรียกับงานวิจัย และทำการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ IAA เป็นระยะเวลานาน 5 สัปดาห์

2.5 การยืนยันผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

นำ culture broth ของแบคทีเรีย RD4-1-1 ในสภาวะการเลี้ยงแบบปลอดเชื้อ (ข้อ 2.3) และสภาวะที่เลี้ยงแบบไม่ปลอดเชื้อ (ข้อ 2.4) 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

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

2.6 ทดสอบผลิตภัณฑ์ IAA ในแปลงเกษตรกร

ผลิตภัณฑ์ IAA ที่เตรียมได้ในสภาพไม่ปลอดเชื้อก่อนนำมาใช้งานกับพืชจะทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave เสียก่อน แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 2.5 µM (ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากโครงการย่อยที่ 1 เมื่อทดสอบกับพืชในระดับห้องปฏิบัติการ)

การทดลองเริ่มต้นด้วยการใช้ผลิตภัณฑ์ IAA 2.5 µM แช่ข้าวนาสวน พันธุ์ กข 43 หนึ่งคืน บ่มเมล็ดจนงอกตุ่มราก จากนั้นจึงทำการหว่านลงในแปลง และทำการพ่นในระยะต้นอ่อนด้วย 2.5 µM IAA

การศึกษามีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complely randomized design; CRD) จำนวน 2 ซ้ำ เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำการแช่ข้าวด้วยน้ำเปล่า และไม่ได้ทำการพ่นฮอร์โมนในระยะต้นอ่อน พื้นที่ศึกษา 300 ตารางเมตรต่อซ้ำ

การบันทึกข้อมูลความสามารถในการโผล่พ้นดินภายหลังการหว่านในแปลงโดยการให้คะแนนการโผล่พ้นดิน (Emergence score) และข้อมูลความสูงภายหลังการแช่และการพ่นที่อายุต่าง ๆ ของต้นอ่อนข้าว

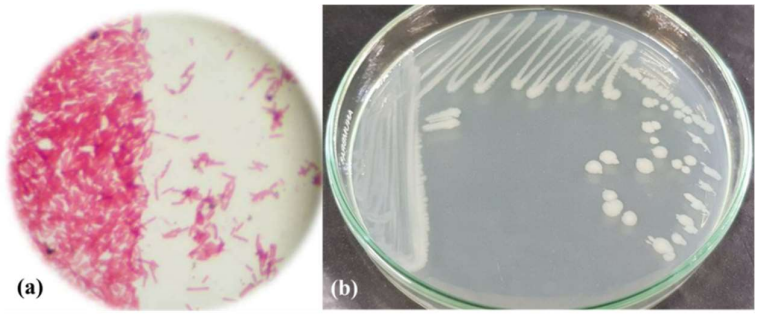
ดำเนินการวิจัย ณ แปลงเกษตรกร ตำบลทับใต้ อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างเดือน มกราคม – มีนาคม 2562

บทที่ 4
ผลการดำเนินงาน

1. ข้อมูลแบคทีเรียเอนโดไฟท์ RD4-1-1 และการผลิตกรดอินโดลแอซีติก (IAA) เริ่มต้น

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ RD4-1-1 ถูกคัดแยกมาจากเมล็ดข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกในบริเวณโรงเรือน คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร ถูกเก็บเป็น stock culture ในตู้แช่แข็ง ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

ข้อมูลเบื้องต้นภายหลังการพิสูจน์เอกลักษณ์ พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง (ภาพที่ 3 (a)) ลักษณะโคโลนีสีครีมขาว, รูปร่าง irregµlar, ขอบ lobate, ผิว smooth และ ความสูงโคโลนีเป็นแบบ flat (ภาพที่ 3 (b)) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC นาน 2 วัน



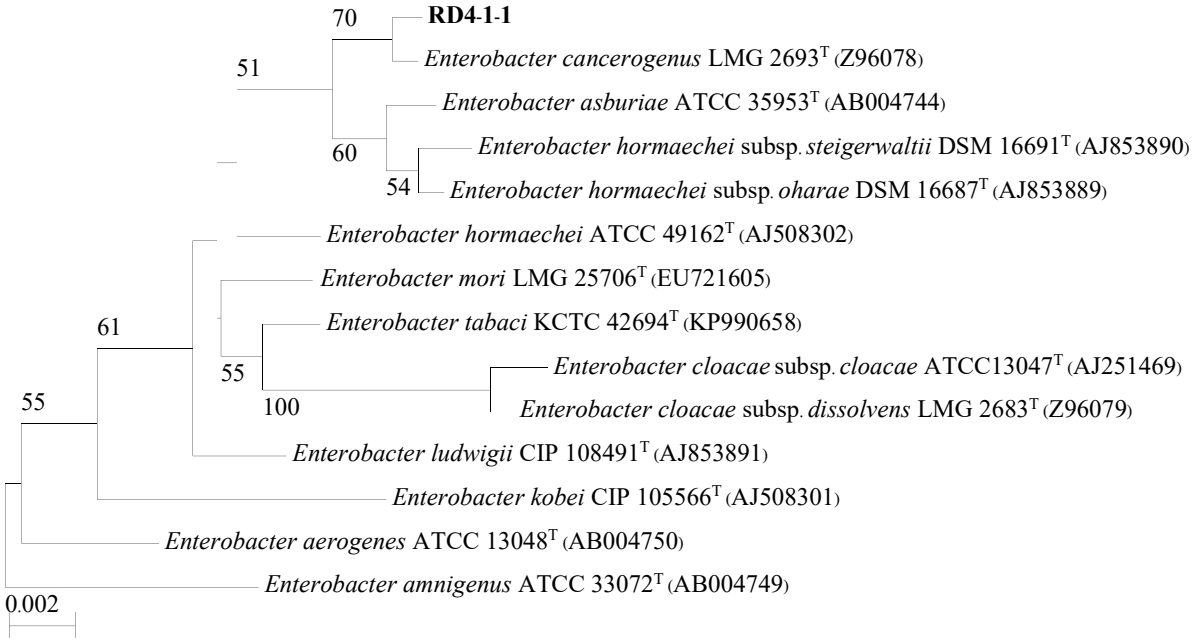
ภาพที่ 3 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยเลนส์ตากำลังขยาย 100X (a) และลักษณะโคโลนี (b) ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ RD 4-1-1

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 4) ด้วย 99.5% similarity โดย Jha and Patel (2012) ได้เคยรายงานว่า *E. cancerogenus* MSA2 เป็นแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช *Jatropha curcas* ได้

นอกจากนี้ *E. cancerogenus* RD 4-1-1 ถูกทดสอบความสามารถต่อความไวของยาปฏิชีวนะ ตามวิธีการของ Nokhal and Schlegal (1983) พบว่ามีความไวต่อยา Ceftazidime, Ceftriaxone, Chloramphenicol, Piperacillin/Tazobactam และ Tetracycline ดังนั้นจึงมั่นใจได้ระดับหนึ่งว่าเชื้อแบคทีเรียมีความปลอดภัยสามารถนำมาใช้งานได้

ด้านประโยชน์กับพืช *E. cancerogenus* RD 4-1-1 มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราโรคพืช คือ *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp. ด้วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 52.14±3.92 และ 11.67±3.82 ตามลำดับ และภายใต้การเลี้ยงด้วย 1% หัวเชื้อในอาหารเหลว NB + 100 µg/ml L-tryptophan บ่มที่ 30 ºC โดยใช้

ความเร็วรอบ 150 rpm นาน 3 วัน แบคทีเรียเอนโดไฟท์ RD4-1-1 แสดงการผลิต IAA ปริมาณ 49.21 µg/ml ซึ่งถือว่าเป็นปริมาณฮอร์โมนเริ่มต้น



ภาพที่ 4 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

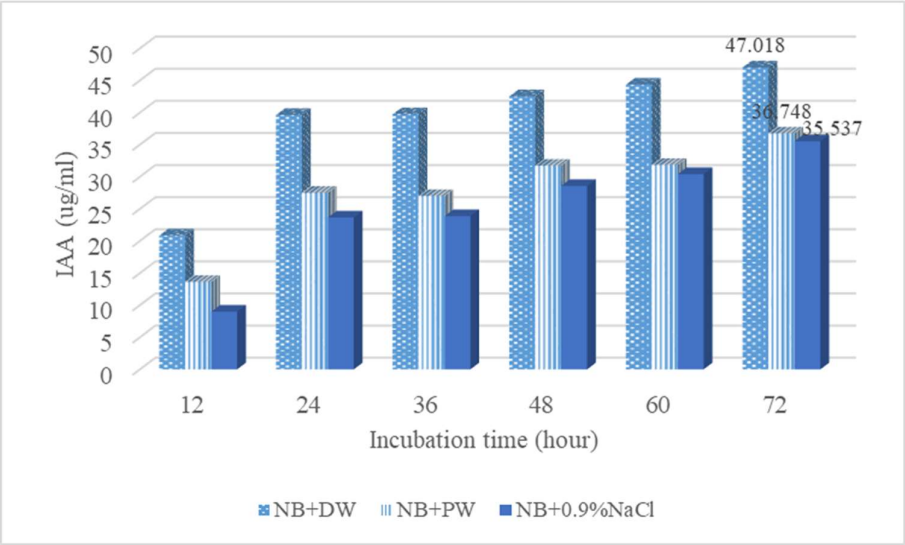
2. ศึกษารูปแบบการเตรียม IAA ในสภาพปลอดเชื้อ

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต IAA ของแบคทีเรีย ได้แก่ รูปแบบการเตรียมหัวเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอย่างง่าย และสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยวัตถุประสงค์ในการวิจัยเพื่อให้เกษตรกรสามารถเตรียมใช้ได้เองอย่างไม่ยุ่งยาก โดยเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนเบื้องต้นเพื่อนำไปสู่การคัดเลือกสภาวะที่ดีและง่ายที่สุด ดังนั้นการทดลองทั้งหมดยังอยู่ในสภาพที่ปลอดเชื้อ

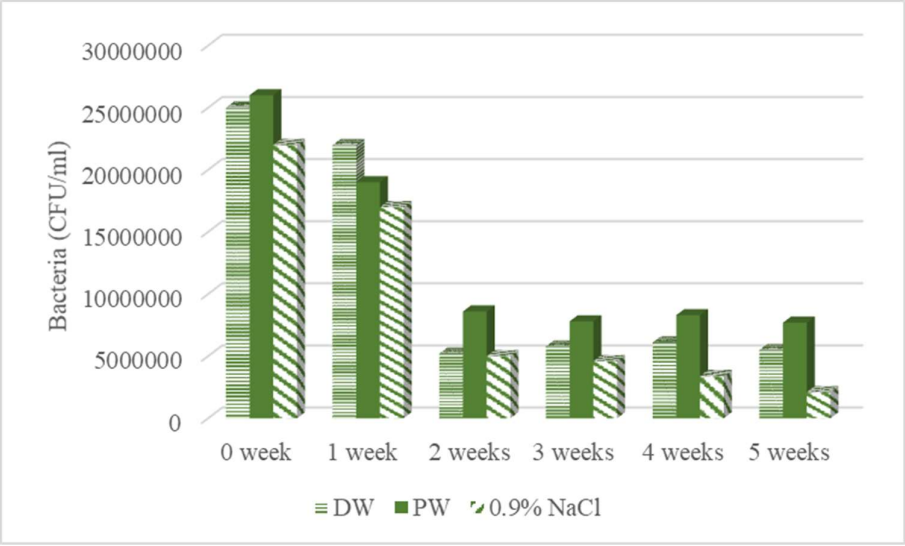
2.1 รูปแบบหัวเชื้อ

E. cancerogenus RD 4-1-1 ถูกนำมาปรับความขุ่นเชื้อในของเหลว 3 แบบคือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (DW), Peptone water (PW) และ 0.9% NaCl และใช้ 1% หัวเชื้อจากของเหลวแต่ละชนิดเติมลงในอาหาร NB+ 100 µg/ml L-tryptophan บ่มที่ 30 ºC โดยใช้ความเร็วรอบ 150 rpm นาน 3 วัน

จากการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ทุก 12 ชม. พบว่าเวลาที่ 72 ชม. (3 วัน) แบคทีเรียแสดงค่าการผลิต IAA ได้สูงที่สุดจากอาหารที่ใช้การปรับหัวเชื้อทั้ง 3 รูปแบบ โดยรูปแบบหัวเชื้อจาก DW ให้ค่าการผลิต IAA ได้ดีที่สุด คือ 47.018 µg/ml ถัดมาคือ PW และ 0.9%NaCl ที่ 36.748 และ 35.537 µg/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ปริมาณ IAA (µg/ml) จากอาหารที่ใช้รูปแบบการปรับหัวเชื้อในของเหลว 3 แบบ คือ DW, PW และ 0.9%NaCl

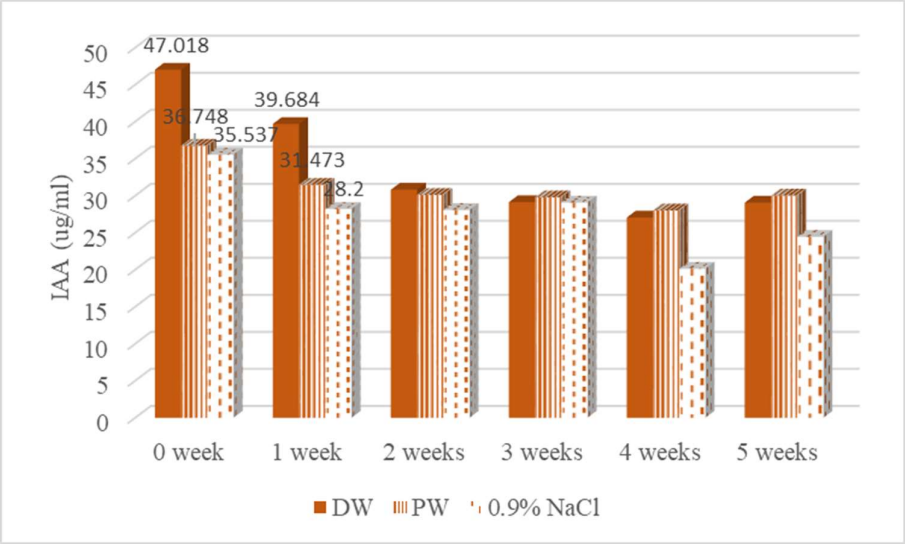


ภาพที่ 6 ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/ml) จากการเตรียมหัวเชื้อทั้ง 3 รูปแบบ ที่เก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 ºC นาน 5 สัปดาห์

ผลการศึกษาความคงตัวของปริมาณแบคทีเรีย และความสามารถในการผลิต IAA จากการเตรียมหัวเชื้อทั้ง 3 รูปแบบ ที่เก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 ºC พบว่าความคงตัวของปริมาณแบคทีเรียจากรูปแบบการเตรียมหัวเชื้อทั้ง 3 แบบ แสดงได้จากภาพที่ 6 โดยเมื่อผ่านสัปดาห์แรกแบคทีเรียลดลงประมาณ 1.14-1.34 เท่าจากทั้ง 3 รูปแบบของการเตรียมหัวเชื้อ และลดลงเป็นอย่างมาก 2.21-4.23 เท่าในสัปดาห์ที่ 2

เมื่อศึกษาผลของแบคทีเรียในการผลิต IAA จากรูปแบบหัวเชื้อทั้ง 3 แบบซึ่งเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 ºC โดยการเติมลงในอาหารใหม่ทุกสัปดาห์ พบว่าเมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ปริมาณ IAA จากทั้ง 3 รูปแบบของหัวเชื้อให้ค่าการผลิต IAA ลดลง (ภาพที่ 7) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณหัวเชื้อที่ลดลงเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 6)

ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเตรียมหัวเชื้อทั้ง 3 รูปแบบ สามารถใช้ในการผลิต IAA ได้ ซึ่งแนะนำว่าไม่ควรเก็บหัวเชื้อดังกล่าวไว้เกิน 2 สัปดาห์ แต่อย่างไรก็ตามทางผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือก DW เป็นของเหลวที่ใช้สำหรับการเตรียมหัวเชื้อ เนื่องจากง่าย สะดวก และประหยัด

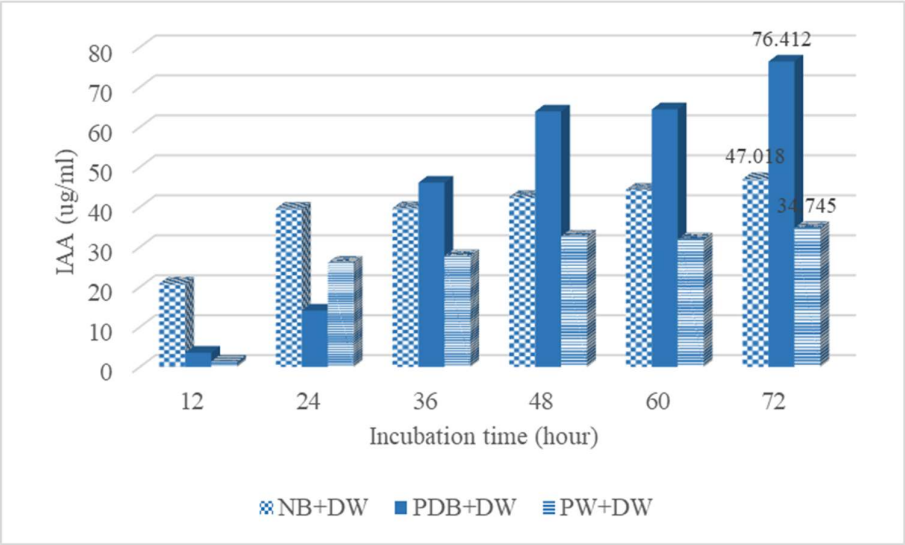


ภาพที่ 7 ปริมาณ IAA (µg/ml) จากหัวเชื้อ 3 รูปแบบ ที่เก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 ºC ที่เติมลงในอาหารใหม่ทุกสัปดาห์

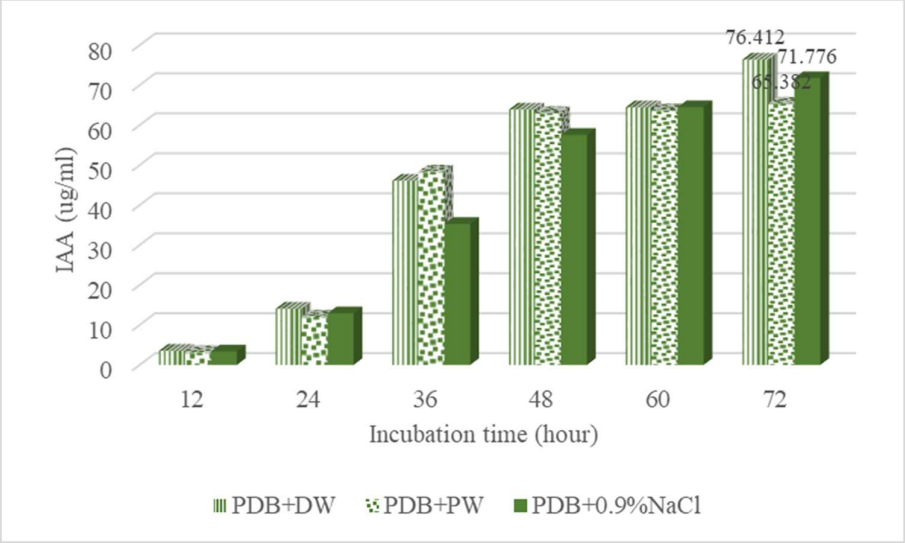
2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

หลังจากได้รูปแบบการเตรียมหัวเชื้อใน DW แล้ว การผลิต IAA ถูกศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอย่างง่าย 3 ชนิด คือ NB, PDB และ PW จากภาพที่ 8 พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารแต่ละชนิดนาน 3 วัน แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตและผลิต IAA ได้ดีที่สุดจากอาหารสูตร PDB ที่เตรียมได้เอง คือ 76.412 µg/ml ถัดมาคือ NB (47.018 µg/ml) และ PW (34.745 µg/ml) ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการทดลองผู้วิจัยจึงเลือกอาหารสูตร PDB ที่เกษตรกรสามารถเตรียมใช้ได้เองคือ มันฝรั่ง 20 g ต่อน้ำ 100 ml

เพื่อเป็นการยืนยันผลในการผลิต IAA จากอาหารสูตร PDB กับการใช้รูปแบบการเตรียมหัวเชื้อ 3 แบบ พบว่าการเตรียมหัวเชื้อทั้ง 3 รูปแบบให้การผลิต IAA ใกล้เคียงกัน คือ 76.412, 71.776 และ 65.382 µg/ml จาก DW, 0.9% NaCl และ PW ตามลำดับ (ภาพที่ 9) แต่อย่างไรก็ตามรูปแบบการเตรียมใน DW ให้ค่าการผลิตสูงสุด



ภาพที่ 8 ปริมาณ IAA (µg/ml) จากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอย่างง่าย 3 ชนิด คือ NB, PDB และ PW



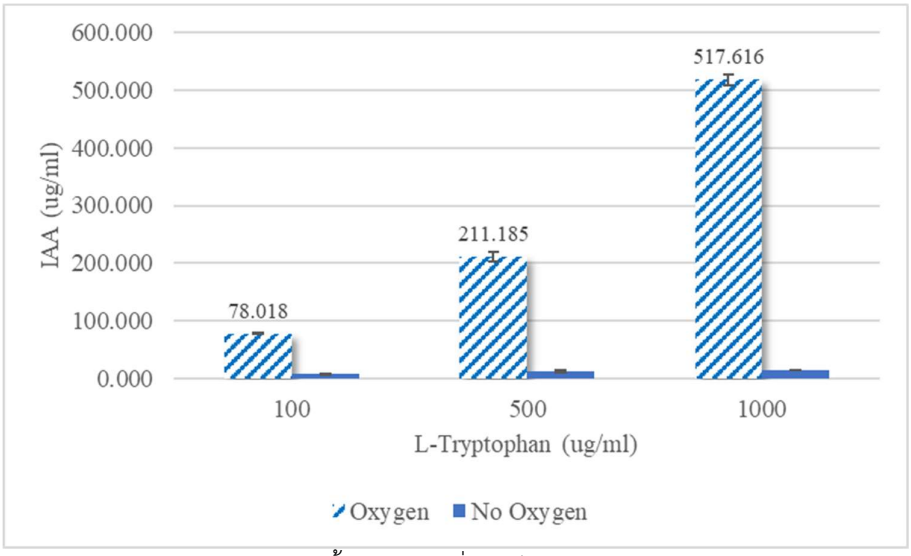
ภาพที่ 9 ปริมาณ IAA (µg/ml) จากอาหารสูตร PDB ที่ใช้หัวเชื้อใน 3 รูปแบบ

2.3 สภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

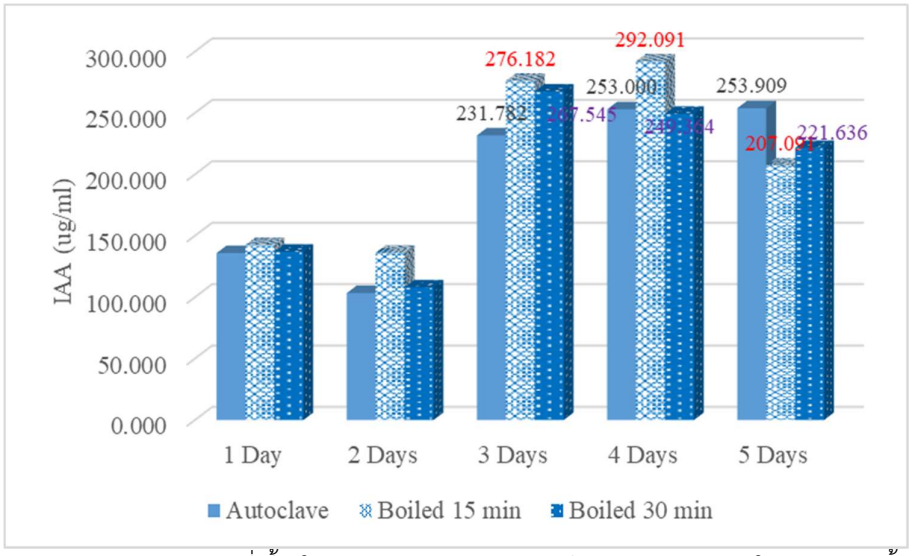
สภาวะที่สำคัญในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิต IAA มีหลายปัจจัย แต่ในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกมา 4 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น L-tryptophan, การมีอากาศ, ระยะเวลาในการเลี้ยง และรูปแบบการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทั้งนี้การศึกษาอยู่ภายใต้การเลี้ยงในอาหาร PDB ที่ใช้หัวเชื้อจาก DW บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C

จากภาพที่ 10 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ L-tryptophan ในอาหารเลี้ยงเชื้อการผลิต IAA ก็เพิ่มสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามสภาวะการเลี้ยงต้องมีอากาศ แบคทีเรียจึงสามารถเจริญและผลิต IAA ได้ ในทางตรงกันข้ามหากวางฟลาสก์ทิ้งไว้ในสภาวะนิ่ง คือเท่ากับมีอากาศน้อย ถึงจะมีการเพิ่มปริมาณ L-tryptophan แต่แบคทีเรียก็ไม่สามารถเจริญ และผลิต IAA ได้

จากการทดลองนี้ผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้นระดับกลาง คือ 500 µg/ml ในสภาวะมีอากาศ เพื่อใช้ในการศึกษาในข้อถัดไป



ภาพที่ 10 ปริมาณ IAA (µg/ml) จากการเลี้ยงในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน ในระดับ L-tryptophan 100, 500 และ 1,000 µg/ml



ภาพที่ 11 ปริมาณ IAA (µg/ml) ที่เลี้ยงใน PDB จากรูปแบบการเตรียมอาหาร 3 แบบ ในระยะเวลาทั้งหมด 5 วัน

จากการเตรียมอาหาร PDB ใน 3 รูปแบบ คือ การฆ่าเชื้อแบบ autoclave, การต้มที่ 100 ºC นาน 15 นาที และ 30 นาที และทำการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิต IAA เป็นเวลานาน 5 วัน พบว่า

PDB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบบ autoclave ให้ปริมาณ IAA ได้สูงที่สุด และเท่ากันในวันที่ 4 และ 5 คือ 253.000 และ 253.909 µg/ml ในขณะที่ PDB ที่เตรียมจากวิธีการต้มนาน 15 นาที พบว่าให้ค่า IAA ดีที่สุดในวันที่ 4 คือ 292.091 µg/ml ถัดมาคือวันที่ 3 คือ 276.182 µg/ml และ PDB ที่ผ่านการต้มนาน 30 นาที ให้ค่า IAA ได้ดีที่สุดในวันที่ 3 คือ 267.545 µg/ml และค่อยๆลดลงในวันที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

จากผลทดลองแสดงให้เห็นว่าการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต้มนาน 15 นาที อาจทำให้คุณประโยชน์ของสารอาหารเหลือได้มากกว่าวิธีการฆ่าเชื้อแบบอื่น จึงทำให้แบคทีเรียสามารถดึงสารอาหารมาใช้ในการเจริญเติบโต และผลิต IAA ได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามเป็นที่สังเกตว่าในวันที่ 3 ของการเลี้ยงในทุกวิธี ก็พบปริมาณ IAA ในระดับสูงแล้ว เพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อน และไม่ให้เสียเวลา ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ระยะเวลา 3 วันในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต IAA

2.3 ศึกษารูปแบบการเตรียม IAA อย่างง่ายในสภาพไม่ปลอดเชื้อ

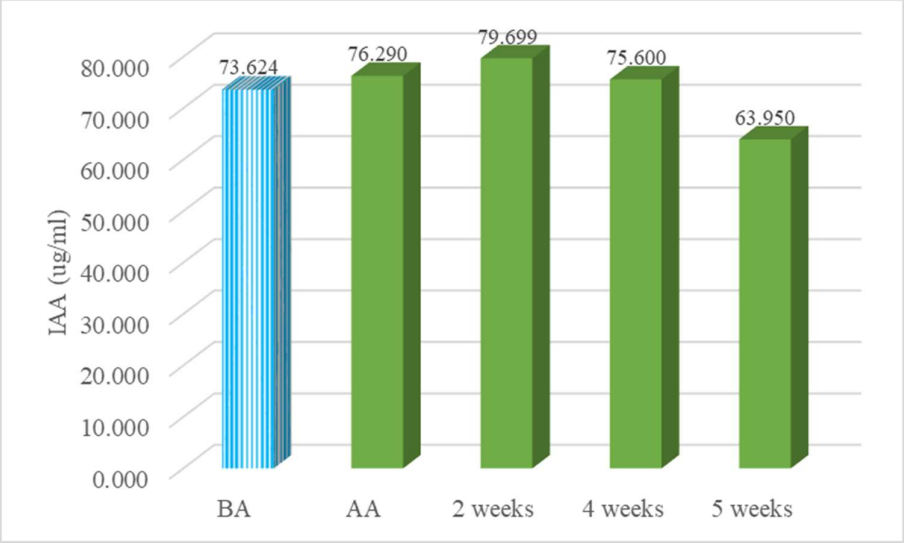
จากการศึกษารูปแบบการผลิต IAA อย่างง่ายในระดับปลอดเชื้อแล้ว พบว่าการเตรียมหัวเชื้อควรอยู่ในรูปแบบ DW ในอาหาร PDB + 500 µg/ml L-tryptophan โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 ºC, 150 rpm นาน 3 วัน เพื่อผลิต IAA

ดังนั้นในการทดลองนี้ผู้วิจัยจะทำการเตรียมรูปแบบชุดการผลิต IAA อย่างง่ายในระดับไม่ปลอดเชื้อสำหรับให้เกษตรกรนำไปใช้ โดยเริ่มเตรียมอาหารสูตร PDB (มันฝรั่ง 20 g/100 ml) + 500 µg/ml L-tryptophan ด้วยวิธีการต้มที่ 100 ºC นาน 15 นาที ปริมาตร 1,000 ml แล้วบรรจุลงในขวดน้ำพลาสติกขนาด 1,500 ml ที่ผ่านการลวกด้วยน้ำอุ่นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม 1% (10 ml) หัวเชื้อที่เตรียมจาก DW โดยใช้กระบอกฉีดยา และทำการให้อากาศด้วยชุดปั้มลมที่ต่อเข้ากับสายยาง และใช้วาล์วในการปรับแรงลม แสดงได้ดังภาพที่ 12 ทำการเลี้ยงเป็นเวลานาน 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

ภาพที่ 12 การต่อชุดปั้มลมกับขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB

หลังจากเลี้ยงเป็นระยะนาน 3 วัน และทำการเก็บตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ IAA พบว่าค่า IAA เท่ากับ 73.624 µg/ml (ภาพที่ 13) ซึ่งลดลงเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อาจเนื่องมาจากปัญหาเรื่องอากาศ และการปนเปื้อน

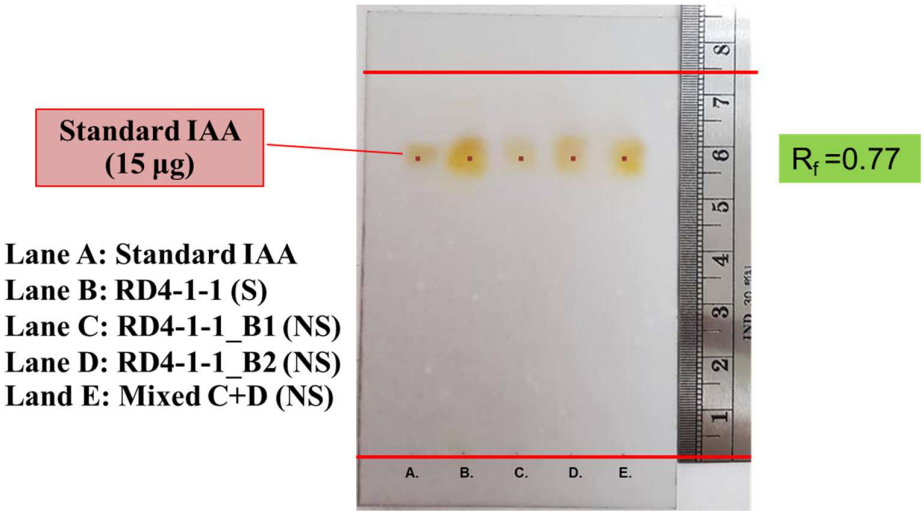
อย่างไรก็ตามการนำ IAA ไปใช้ในงานวิจัยในขั้นตอนอื่นๆ เพื่อเป็นการป้องกันการรบกวนจากเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนเพื่อให้เหลือแต่ผลิตภัณฑ์ IAA อย่างเดียวในการทดลอง ผู้วิจัยจึงทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave พบว่าค่า IAA ยังมีความคงอยู่ที่ 76.290 µg/ml นอกจากนี้ผู้วิจัยยังทำการศึกษาหาสภาวะคงตัวของผลิตภัณฑ์ IAA ที่เก็บไว้ในตู้เย็น 4 ºC ทุกๆ สัปดาห์เป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ พบว่า IAA ที่ได้จากแบคทีเรียมีความคงตัว และเริ่มลดลงเพียงเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 5 (ภาพที่ 13) ดังนั้นผลิต IAA จึงมีความคงตัวในระดับหนึ่งหากเกษตรกรเตรียมไว้ และยังไม่ได้นำไปใช้งาน



ภาพที่ 13 ปริมาณ IAA (µg/ml) ของแบคทีเรียที่เตรียมในรูปแบบไม่ปลอดเชื้อ ก่อนการฆ่าเชื้อ (BA) และหลังการฆ่าเชื้อ (AA) รวมทั้งสภาวะการคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 ºC

2.4 การยืนยันผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

หลังจากการศึกษารูปแบบการเตรียม IAA อย่างง่ายในระดับปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนั่นคือ IAA โดยใช้วิธี TLC และหาค่า R_f พบว่า สารมาตรฐาน IAA และสารละลายจากแบคทีเรียทั้งในสภาพที่เลี้ยงแบบปลอดเชื้อ (S) และแบบไม่ปลอดเชื้อ (NS) มีการเคลื่อนที่ในระดับใกล้เคียงกัน เมื่อทำการคำนวณหาค่า R_f เท่ากับ 0.77 (ภาพที่ 14) ดังนั้นตัวอย่างจากสารละลายแบคทีเรียที่เลี้ยงในทั้ง 2 สภาวะนั้น นั่นคือ IAA



ภาพที่ 14 Thin layer chromatography (TLC) ของสารละลายมาตรฐาน IAA และสารละลายจากแบคทีเรีย

2.5 ทดสอบผลิตภัณฑ์ IAA ในแปลงเกษตรกร

ผลการศึกษาอิทธิพลของ IAA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียในการศึกษาระดับแปลง (ตารางที่ 3) การงอกของข้าวที่โผล่พ้นดินภายหลัง 7 วันหลังการแช่เมล็ดจากการสังเกตการโผล่ของยอดเหนือดิน (Shoot score_7) พบว่าไม่แตกต่างกันระหว่างการแช่ด้วยน้ำเปล่า (3.17) และการแช่ด้วย IAA (3.00) แต่เมื่อทำการประเมินอีกครั้งที่ระยะ 11 วันหลังการแช่เมล็ด (Shoot score_11) พบว่ามีการงอกของเมล็ดที่แช่ด้วย IAA (4.33) สูงกว่าการแช่ด้วยน้ำเปล่า (3.50) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามภายหลังการงอกได้ทำการประเมินความสูง พบว่าที่อายุการงอก 14 วันหลังการหว่าน (sowing) ไม่มีความแตกต่างระหว่างการพ่นหรือไม่พ่นด้วย IAA รวมทั้งหลังจากนั้นที่ได้มีการพ่นฮอร์โมน IAA อีก 2 ครั้ง คือที่ อายุ 4 สัปดาห์และ 6 สัปดาห์หลังการหว่าน และทำการวัดผลที่ความสูงที่ข้าวอายุ 35 วัน (5 สัปดาห์หลังการหว่า) และ 49 วัน (7 สัปดาห์หลังการหว่าน) ตามลำดับ ต่างไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างความสูงของข้าว

ตารางที่ 3 คะแนนการงอกโผล่พ้นดินและความสูงของข้าวนาสวน กข 43 ที่ทำการแช่เมล็ดและพ่นแปลงด้วย 2.5 µM IAA

Treatment	Shoot score_7	Shoot score_11	High_14	High_35	High_49
Soaking by water/no spray	3.17±0.71	3.50±0.24 b	20.62±0.01	31.16±0.23	36.80±0.28
2.5 µM RD4-1-1	3.00±0.47	4.33±0.00 a	20.48±1.22	31.48±0.40	36.18±2.44
Mean	3.085	3.915	20.55	31.32	36.49
P-value (F-test)	0.925 (ns)	0.046 (*)	0.89 (ns)	0.434 (ns)	0.753 (ns)
CV (%)	19.86	3.42	4.21	1.05	4.76

Shoot score analyzed via transformed to logarithm

หมายเหตุ ns, ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ข้อมูลคะแนนการงอก (Root score; คะแนนระหว่าง 1-5 โดย 1 หมายถึงมีการงอกน้อยที่สุดและ 5 หมายถึงมีการงอกมากที่สุด) มีการแปลงข้อมูลโดยการ take logarithm ก่อนการนำไปวิเคราะห์สถิติแต่มีการนำเสนอข้อมูลเป็นค่าคะแนนการงอกการการแปลงข้อมูล

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการดำเนินงาน

Enterobacter cancerogenus RD4-1-1 เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเมล็ดข้าวไร่พันธุ์พื้นเมือง ที่มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืชคือ *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp. รวมทั้งมีความสามารถในการผลิต IAA ซึ่งเป็นฮอร์โมนกลุ่มออกซินสำคัญสำหรับพืช จากข้อมูลรายงานที่ผ่านมาพบเชื้อกลุ่มจีนัส *Enterobacter* ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งบางสปีชีส์ยังพบว่าเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชได้ (Torres et al., 2008; Nutaratat et al., 2017) ดังนั้นการใช้สิ่งมีชีวิตที่มาจากพืช และก่อผลดีให้กับพืช ซึ่งในที่นี้ความหมายคือเอนโดไฟท์ (Chanway, 1998) แล้วนำกลับไปใช้กับพืช ก็น่าจะส่งผลต่อตัวพืชเช่นเดียวกัน

จากข้อมูลเบื้องต้น *E. cancerogenus* RD4-1-1 แสดงความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีความปลอดภัยในระดับหนึ่งเมื่อนำมาใช้งาน ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถนำมาใช้ได้กับพืชจริง โดยจากข้อมูลรายงาน เช่น El-Awady et al. (2005) พบ *E. cancerogenus* E1 จากเนื้อเยื่อส่วนลำต้นของ *Sesuvium verrucosum* ซึ่งแสดงความสามารถในการผลิต 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, การผลิตแอมโมเนีย และการย่อยฟอตเฟส รวมทั้งมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของพืชที่ทดสอบ ดังนั้นการนำ *E. cancerogenus* ไปใช้กับพืชโดยเกษตรกรจึงมีความปลอดภัยในระดับหนึ่ง

การเตรียมชุดการผลิต IAA อย่างง่ายในระดับปลอดเชื้อจากการเตรียมรูปแบบหัวเชื้อในลักษณะของเหลวเพื่อให้เกษตรกรสามารถดูดนำไปใช้ได้ง่าย สามารถใช้ได้ทั้งในรูปแบบ DW, PW และ 0.9%NaCl แต่ผู้วิจัยแนะนำให้ใช้เป็น DW เนื่องจากสามารถเตรียมได้ง่าย สะดวก ประหยัด รวมทั้งไม่มีสี สามารถปรับความขุ่นเริ่มต้นได้ง่าย และสม่ำเสมอ นอกจากนี้ หากได้เตรียมและนำไปใช้แล้ว ควรเก็บในตู้เย็นภายใต้อุณหภูมิ 4 °C แต่อย่างไรก็ตามไม่แนะนำให้เก็บเกิน 2 สัปดาห์ เนื่องจากปริมาณของแบคทีเรียและความสามารถในการผลิต IAA ลดต่ำลง ซึ่งสืบเนื่องมาจากของเหลวทั้ง 3 แบบไม่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแค่เพียงตัวทำละลายเชื้อเท่านั้น

PDB เป็นอาหารที่แสดงค่าการผลิต IAA ได้สูงที่สุด เนื่องมาจากในมันฝรั่งมีสารอาหารที่เป็นทั้งแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน วิตามิน และเกลือแร่ให้กับแบคทีเรียได้ (Kumar et al., 2018) นอกจากนี้ยังเป็นอาหารสูตรอย่างง่ายที่เกษตรกรสามารถเตรียม และนำไปใช้ได้เอง

ปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต IAA จากการทดลอง ได้แก่ การมีอากาศ หากพบว่ามีอากาศน้อยหรือไม่มี *E. cancerogenus* RD4-1-1 จะไม่สามารถเจริญ และผลิต IAA ได้ ทั้งนี้ระดับความเข้มข้นของสารตั้งต้นในการชักนำการผลิต IAA ก็สำคัญ ยิ่งมีมากขึ้น แบคทีเรียก็สามารถผลิต IAA ได้มากขึ้นตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้งานได้อย่างรวดเร็ว ผู้วิจัยแนะนำให้เลี้ยงเพียง 3 วัน ด้วยความเข้มข้นระดับกลางของสารตั้งต้น คือ 500 µg/ml ของ L-tryptophan นอกจากนี้การ

เตรียมอาหาร PDB ด้วยการฆ่าเชื้อแบบต้มที่อุณหภูมิ 100 ºC นาน 15 นาที เพียงพอสำหรับการนำสูตรอาหารไปใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในการผลิต IAA เนื่องจากความร้อน และเวลาไม่นานมากนัก ถ้าเทียบกับวิธีอื่น ดังนั้นคุณค่าทางอาหารจึงน่าจะคงเหลือได้มากกว่า

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต IAA ในสภาพไม่ปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 3 วันโดยใช้ชุดปั๊มลมเพื่อให้อากาศนั้น แบคทีเรียสามารถผลิต IAA ได้ แต่ปริมาณที่ได้มีขนาดลดลงเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากกปัญหาในเรื่องการควบคุมอากาศ และการปนเปื้อนที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น

การยืนยันผลิตภัณฑ์ IAA ที่เกิดภายใต้การเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และไม่ปลอดเชื้อของ *E. cancerogenus* RD4-1-1 พบว่าสามารถยืนยันผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้ ว่าคือ IAA ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรีย เนื่องจากสารตัวอย่างจากแบคทีเรียมีค่า R_f เท่ากับ R_f ของสารละลายมาตรฐาน IAA

ผลการนำผลิตภัณฑ์ IAA ที่เตรียมได้ในรูปแบบอย่างง่ายไปใช้ พบอิทธิพลต่อการเพิ่มการงอกของข้าวที่โผล่พ้นดินจากอิทธิพลของการแช่เมล็ดด้วยสารละลายผลิตภัณฑ์ IAA นี้ แต่ไม่พบความสามารถในการส่งเสริมความสูง แต่อย่างไรก็ตามในการทำนาแบบการหว่านความสูงเพียงอย่างเดียวไม่สามารถประเมินความสามารถในการเจริญเติบโตของข้าวได้ แต่ต้องประเมินไปจนถึงความสามารถในการให้ผลผลิต

การงอกได้ของเมล็ดเป็นระยะที่มีความสำคัญที่ต้องอาศัยระบบควบคุมที่ซับซ้อนทั้งปัจจัยภายในและภายนอกและฮอร์โมนพืชก็มีรายงานการนำมาใช้เพื่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดเช่นเดียวกับการใช้สารอินทรีย์อื่น ๆ (Belwal *et al*., 2015) การนำเมล็ดไปแช่สารละลายหรือน้ำเปล่าก่อนถือเป็นการเตรียมการงอกของเมล็ดส่วนหนึ่ง การงอกโผล่พ้นดินหมายถึงการเจริญเติบโตของ coleoptile ที่งอกจากเมล็ดซึ่งจำเป็นต้องอาศัยน้ำเพื่อกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ ด้วยเหตุนี้ การศึกษาในระดับที่บันทึกลักษณะการโผล่พ้นดินจึงอาจได้รับผลกระทบเนื่องจากอิทธิพลของการใช้ IAA ในการปฏิบัติจริงของการปลูกข้าวแบบนาหว่าน เกษตรกรจะมีการแช่เมล็ดก่อนการปลูกซึ่งช่วยส่งเสริมการงอก การใช้ฮอร์โมนอาจมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตหรือสร้างความแข็งแรงของยอดสำหรับการโผล่พ้นดินโดยเฉพาะเมื่อมีปัญหาการขาดน้ำหรือสภาวะความเครียดเนื่องจากความเค็มในนาข้าวในระยะระหว่างการงอกด้วยเช่นกัน ทั้งนี้เพราะทั้งความเค็มและดินแห้งแล้งทำให้ศักย์ของน้ำในดินลดลง (Song *et al*., 2005) ต่างส่งผลต่อการออสโมซีสของน้ำต่อการงอกของเมล็ดไม่ต่างกัน และส่งผลต่อการงอกในที่สุดไม่ต่างกับการดูดความชื้นออกจากเมล็ด (Maraghni *et al*., 2010) การเสริมออกซินจะช่วยลดภาวะความเครียดของพืชและส่งเสริมการงอกได้ (Khan *et al*., 2004) ทั้งนี้การแช่เมล็ดอาจส่งผลเพียงการงอกแม้จะไม่ได้มีผลยาวนานไปกว่านั้น แต่การส่งเสริมการเจริญเติบโตในระยะแรกจะทำให้พืชสามารถปรับตัวในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสมได้มากขึ้น การงอกหรือการโผล่พ้นดินของ coleoptile ได้เร็ว การเจริญเติบโตได้เร็วขึ้นและลักษณะอื่น ๆ เหล่านั้นที่เป็นผลสืบเนื่องที่จะส่งผลกระทบต่อผลผลิตของพืชได้ในที่สุด (McKell, 1972; Yousof and El-Saidy, 2014) ด้วยเหตุนี้ การศึกษาในระยะการงอกจึงมีความสำคัญเพราะอาจสามารถทำนายไปยังโอกาสในการสร้างผลผลิตสุดท้ายของพืช การแช่เมล็ดเป็นการกระตุ้นการงอกของเมล็ด (seed priming) วิธีการหนึ่งที่มีวัตถุประสงค์ทั้งเพื่อทำลายการพักตัวของเมล็ดและลดระยะเวลาระหว่างการเพาะและการงอกต้นอ่อน (Parera and Cantliffe, 1994) หลาย ๆ ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการงอก ทั้งระยะเวลาที่ใช้ระหว่างการงอกเปอร์เซ็นต์การงอกหรือเปอร์เซ็นต์การงอกโผล่พ้นดินของ coleoptile รวมทั้งลักษณะบ่งชี้ต่าง ๆ ที่แสดงประสิทธิภาพและความแข็งแรงของการงอกและของต้นอ่อน จึงเป็นชุดของลักษณะที่ใช้ในการประเมินผลที่มี

ความสำคัญในการศึกษาทั้งอิทธิพลเนื่องจากความเครียดจากการขาดน้ำในดินและอิทธิพลของการใช้ IAA ในครั้งนี้ (Kaw and Khush, 1986; Gorai et al., 2009) ทั้งนี้มีรายงานที่มีการใช้ IAA ต่อการเพิ่มความแข็งแรงของเมล็ดในสภาพแล้งน้ำด้วยเช่นกัน (Saeidi et al., 2014)

บทที่ 6
สรุปผลการดำเนินงานและข้อเสนอแนะ

กล่าวโดยสรุปได้ว่าการศึกษาการเตรียมรูปแบบการผลิต IAA อย่างง่ายของ *E. cancerogenus* RD4-1-1 ในสภาพไม่ปลอดเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางให้เกษตรกรสามารถนำไปผลิตใช้ได้เองนั่น มีความเป็นไปได้ โดยเกษตรกรสามารถเริ่มต้นด้วยตนเองจากการเตรียมอาหาร PDB ซึ่งเป็นสูตรอย่างง่าย รวมทั้งการให้อากาศจากชุดปั้มลมที่สามารถหาซื้อได้ทั่วไปในท้องตลาด แต่ทั้งนี้ในส่วนของหัวเชื้อแบคทีเรีย และสารตั้งต้น L-tryptophan เกษตรกรสามารถขอรับได้จากทีมผู้วิจัย แต่อย่างไรก็ตามข้อควรระวังที่สำคัญสำหรับกระบวนการผลิตดังกล่าวคือเรื่องของการให้อากาศที่เหมาะสม และการปนเปื้อน ทั้งนี้ผลของการใช้ผลิตภัณฑ์ IAA กับข้าวโดยการแช่เมล็ดก่อนการหว่านข้าว ช่วยเพิ่มการงอกของต้นอ่อนข้าวในระดับแปลงได้ ดังนั้นตั้งแต่ขั้นตอนการผลิต จนถึงการนำไปใช้ จะเห็นได้ว่าเกษตรกรสามารถจัดการได้ด้วยตนเองเป็นส่วนใหญ่ การวิจัยที่เกิดขึ้นจึงเป็นการส่งเสริมให้เกษตรกรพึ่งพาตัวเอง และใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติแทนการใช้สารเคมีที่มีความรุนแรง

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากการเตรียมหัวเชื้อในรูปแบบของเหลวมีอายุในการเก็บรักษาเพียง 2 สัปดาห์ ดังนั้นหากเตรียมในรูปแบบอื่น เช่น การทำให้แห้งในรูปแบบผง ด้วยวิธี lyophilization อาจทำให้ใช้งานได้ง่าย รวมทั้งสามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานขึ้น

2. อากาศเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย หากสามารถปรับความแรงของอากาศให้เหมาะสมกับภาชนะที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียในแต่ละครั้ง ย่อมส่งผลให้การผลิต IAA จากแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้น

3. การทดลองดังกล่าวผู้วิจัยยังเป็นผู้กระทำ ดังนั้นเพื่อให้ตรงตามวัตถุประสงค์เพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปเตรียมเพื่อใช้ได้เองนั่น เกษตรกรจึงควรลงมือนำไปทดลองใช้ได้ด้วยตนเอง ซึ่งในขั้นตอนนี้มีกลุ่มตัวแทนเกษตรกรให้ความสนใจ สำหรับทดลอง และนำไปใช้ในฤดูกาลถัดไปสำหรับการปลูกข้าว

เอกสารอ้างอิง

Abdoli, A., Saeidi, M., Jalali-Honarmand, S., and Azhand, M. 2013. The effect of foliar application of Indole-3- Acetic Acid (IAA) and roles of ear photosynthesis on grain yield production of two wheat cμltivars (*Triticum aestivum* L.) under post anthesis water deficit. *Int. Res. J. Appl. Basic Sci*. 4:1406-1413.

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.

Belwal, T., Bisht, A., Bhatt, I. D. and Rawal, R. R. 2015. Influence of seed priming and storage time on germination and enzymatic activity of selected Berberis species. Plant Growth Regulution, 77: 189-199.

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.

Fu, S., -F., Wei, J. –Y., Chen, H., -W., Liu, Y., -Y., Lu, H., -Y., Chou, J., -Y. 2015. Indole-3-acetic acid: a widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling. Behavior*. 10:e1048052-1-9.

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.

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.

Kaw, R. , N. , and Khush, G. , S. 1986. Combining ability for low-temperature tolerance in rice. Proceedings International Rice Genetics Symposium, Los Baños, Philippines, pp 593-612.

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., µllah, 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.

Khan, M. A., Gul, B. and Weber, D. J. 2004. Action of palnt growth regulators and salinity on seed germination of Ceratoides lanata. Canadian Journal of Botany, 82: 37-42.

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.

KµMar, A., Asthana, M., Gupta, A., Nigam, D., and Mahajan, S. 2018. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Penicillium*. Chapter III. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. *Doi : http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3-00003-X*

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.

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

Maraghni, M., Gorai, M. and Neffati, M. 2010. Seed germination at different temperatures and water stress levels, and seedling emergence from different depths of Ziziphus lotus. South African Journal of Botany, 76: 453-459.

McKell, C. M. 1972. Seedling vigor and seedling establishment. P. 74-89. In: McKell, C. M. and Youngner, V. B. (eds.). The biology and utilization of grasses. Academic Press, New York and London.

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 bacteriμM 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.

Parera, C., A., and Cantliffe, D. J. 1994. Pre-sowing seed priming. *Hortic. Rev.* 16: 109-141.

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 sμgarcane. *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.

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.

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

Song, J., Feng, G., Tian, C., and Zhang, F. 2005. Strategies for adaptation of Suaeda physophora, Haloxylon ammodendron and Haloxylon persicum to saline environment during seed germination stage. Annual of Botany, 96: 399-405.

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.

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.

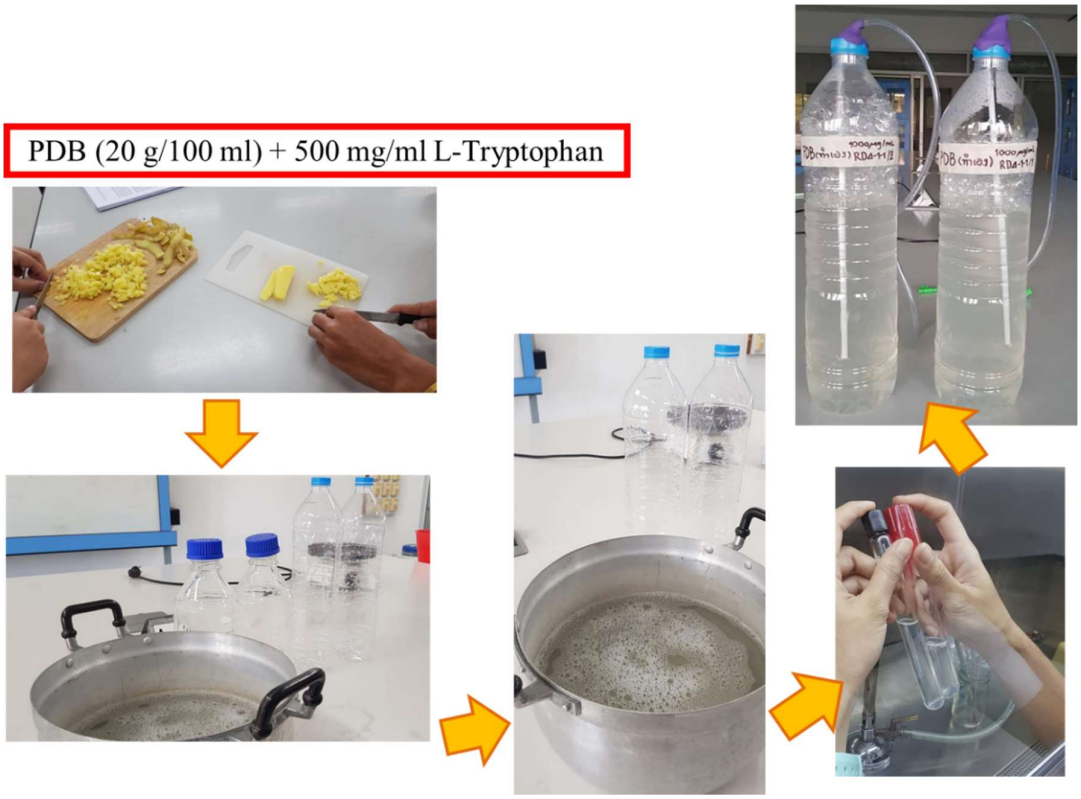
Went, F. W., and Thimann, K. V. 1937. Phytohormones: Macmillan, NewYork.

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

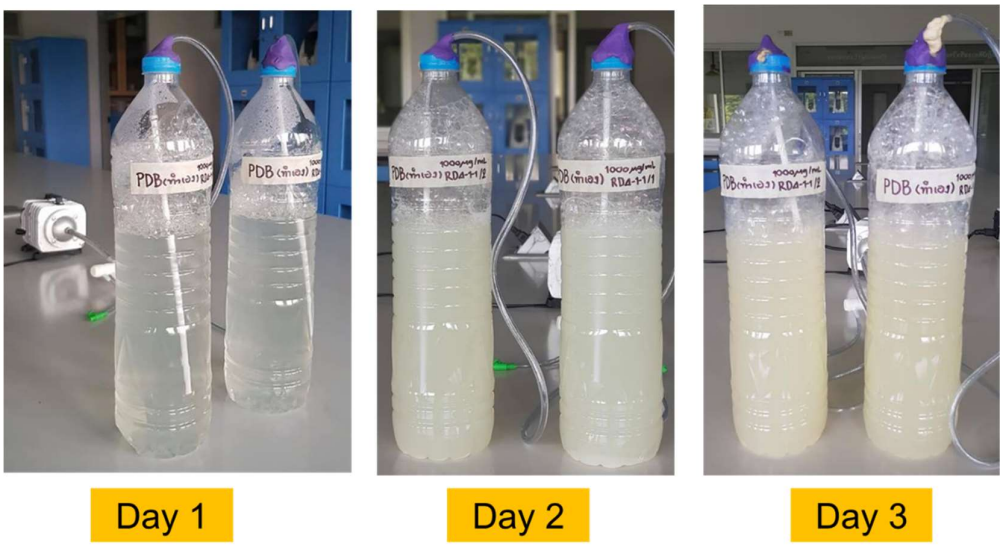
Yousof, F. I. and El-Saidy, A. E. A. 2014. Application of salicylic acid to improve seed vigor and yield of some bread wheat cultivars (Triticum aestivum L.) under salinity stress. Research Journal of Seed Science, 7(2): 52-62

Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual. rev. plant. Physiol. Plant. Mol. Boil*. 53: 247-273.

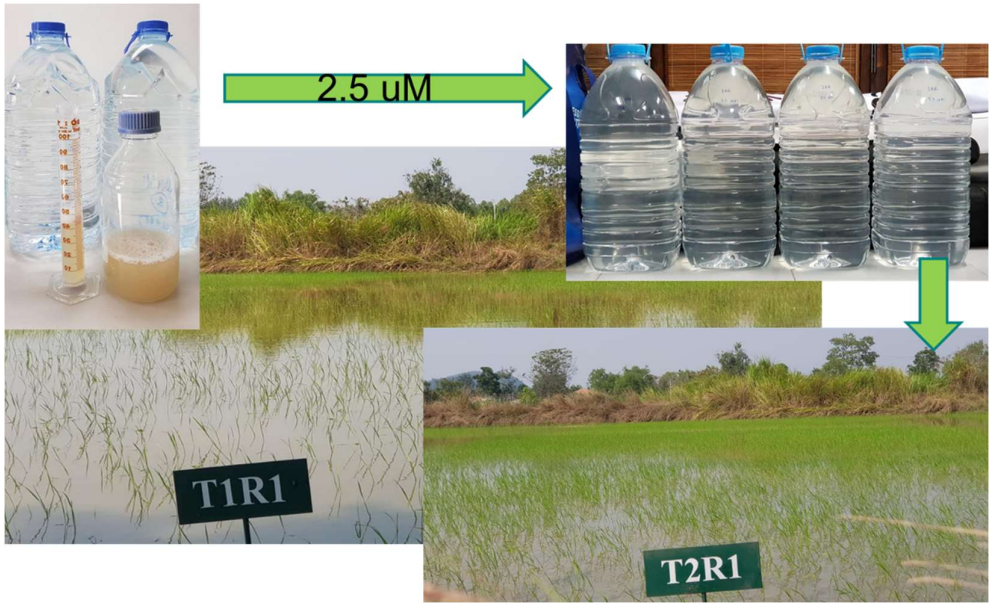
ภาคผนวก



ภาพภาคผนวก 1 การเตรียมอาหาร PDB สูตรอย่างง่ายที่ทำการต้มที่ 100 °C นาน 15 นาที แล้วบรรจุลงในขวดน้ำพลาสติก



ภาพภาคผนวก 2 การผลิต IAA ในสภาพไม่ปลอดเชื้อในระยะเวลา 1-3 วัน



ภาพภาคผนวก 3 การเตรียมผลิตภัณฑ์ IAA จากรูปแบบการเตรียมในสภาพไม่ปลอดเชื้อ โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 2.5 µM และนำไปฉีดพ่นในแปลงนา