



การศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนแบคทีเรียในการควบคุมโรคและการส่งเสริมการเจริญ  
ของมะนาว



ปัญชานันท์ พิมพานุวัตร

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยา  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การศึกษาประสิทธิภาพของแอคทีโนแบคทีเรียในการควบคุมโรคและการส่งเสริมการเจริญ  
ของมะนาว



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยา  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนแบคทีเรียในการควบคุมโรคและการส่งเสริม  
การเจริญของมะนาว"  
ของ ปิณชาน์ พิมพานุวัตร  
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

**คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์**

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธสิน)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นารัตน์ นานแก้ว)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพรรณ สารินทร์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญเรือง คำศรี)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน  
(ดร.ศิริวรรณ วิชัย)

**อนุมัติ**

.....  
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนแบคทีเรียในการควบคุมโรคและการส่งเสริมการเจริญของมะนาว
ผู้วิจัย	ปัญชานันท์ พิมพานันท์
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2564
คำสำคัญ	แอคติโนแบคทีเรีย การควบคุมโรค การส่งเสริมการเจริญ มะนาว

### บทคัดย่อ

มะนาวเป็นพืชสกุลส้มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โรคที่พบในมะนาวมีสาเหตุมาจากราและแบคทีเรียโดยโรคแคงเกอร์เป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญที่เกิดกับมะนาวมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*X. axonopodis* pv. *citri*) เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้สารประกอบคอปเปอร์ในการควบคุม กำจัดและลดการเกิดโรค ทำให้เกิดการต้านทานของเชื้อต่อสารเคมีที่ใช้ การใช้วิธีการทางชีวภาพโดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยเฉพาะแบคทีเรียรอบรากพืชกลุ่มของแอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกอาศัยบริเวณรอบรากพืชและในพืชเป็นอีกทางเลือกที่เป็นไปได้ในการควบคุมโรคเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี ผลการนำเอาแอคติโนแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 22 ไอโซเลท จากห้องปฏิบัติการ MD330 มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชตระกูลส้มพบว่า ไอโซเลท Bar 14 สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด เมื่อนำน้ำเลี้ยงมาทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. alternata* และ *Aspergillus* sp. และแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* 3 สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์ในมะกรูด มะนาวและส้มโอ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสเท่ากับ  $29.00 \pm 0.00$ ,  $26.67 \pm 0.58$ ,  $29.00 \pm 0.00$ ,  $26.67 \pm 0.58$  และ  $24.33 \pm 0.58$  มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดหยาบมาทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยใช้ปริมาณสารความเข้มข้น  $30 \mu\text{g}/\text{Disc}$  พบว่าการทดสอบในเชื้อรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส  $14.00 \pm 0.00$  และ  $13.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ Nystatin ( $100 \mu\text{g}/\text{disc}$ ) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส  $8.00 \pm 0.00$  และ  $5.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ การทดสอบในแบคทีเรียพบว่า มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสเท่ากับ  $13.00 \pm 0.00$ ,  $15.00 \pm 0.00$  และ  $15.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยมีประสิทธิภาพดีกว่าคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ ( $300 \mu\text{g}/\text{disc}$ ) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ในทางการเกษตรซึ่งผลพบว่าไม่ปรากฏโซนใส

ผลการเปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคด้วยการเปรียบเทียบค่า MFC และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา พบว่าไม่สามารถหาค่า MFC ได้เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (5 mg/ml) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *A. lunata* และ *Aspergillus sp.* เท่ากับ 54.54% และ 53.13% และ 62.50% ตามลำดับ

ผลการเปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคด้วยการเปรียบเทียบค่า MBC พบว่าสารสกัดหยาบของไอโซเลท Bar14 มีศักยภาพสูงกว่าคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ เนื่องจากไม่พบการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการทดสอบ (5 µg/ml) ในขณะที่คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบ (500 µg/ml) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชของไอโซเลท Bar14 พบว่าสามารถผลิตสาร IAA เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 broth ที่มี 0.2% L- tryptophan โดยมีปริมาณ IAA เท่ากับ 0.026 µg/ml มีความสามารถในการสร้างสารไซโตไคน์โดยให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีส้มเท่ากับ  $11.67 \pm 0.58$  มิลลิเมตร และไม่สามารถในการละลายสารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์ เมื่อนำน้ำเลี้ยงของไอโซเลท Bar14 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งโรคแคงเกอร์และส่งเสริมการเจริญของมะนาว พบว่าการแช่เมล็ดในน้ำเลี้ยงของไอโซเลท Bar14 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นการงอกและส่งเสริมการเจริญในระยะเพาะเมล็ดได้ดีกว่าสารละลาย IAA ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยการแช่เมล็ดมะนาวในน้ำเลี้ยงมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 94.44% และพบว่าของต้นกล้ามะนาวมีการเจริญดีกว่าการแช่ในสารละลาย IAA โดยมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งและน้ำหนักสดเท่ากับ 0.14 และ 0.22 กรัม ตามลำดับ ผลต่อการเจริญของมะนาวในระยะการปักชำกิ่ง พบว่า มีจำนวนกิ่ง ความยาวกิ่งและใบใหม่เพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยเท่ากับ 1.75 กิ่ง, 12.50 มม. และ 6 ใบ และการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในใบมะนาวพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0 และไม่มีความรุนแรงโรค การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติพบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของสารสกัดไอโซเลท Bar14 พบว่าที่ความเข้มข้น 50 µg/ml มีเซลล์รอดชีวิต 92.40% ผลการศึกษาบ่งชี้ว่ามีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติต่อการนำไปใช้ผลการวิจัยสรุปได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำไอโซเลท Bar14 ไปพัฒนาเพื่อนำไปใช้ควบคุมโรคแคงเกอร์และส่งเสริมการเจริญของมะนาว

<b>Title</b>	INVESTIGATING THE POTENTIAL OF ACTINOBACTERIA TO PREVENT DISEASE AND PROMOTING THE GROWTH OF CITRUS
<b>Author</b>	PIYACHA PIMPANUWAT
<b>Advisor</b>	Assistant Professor Nareeluk Nakaew, Ph.D.
<b>Academic Paper</b>	M.Sc. Thesis in Microbiology, Naresuan University, 2021
<b>Keywords</b>	Actinobacteria Control disease Plant growth promoting Lemon

### ABSTRACT

Lime is one of the most common commercial citrus. However, the common disease of this fruit was frequently caused by numerous fungi and bacteria. Typically, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*X. axonopodis* pv. *citri*) which is bacteria that is a causative agent of canker disease of many citrus varieties, i.e., kaffir lime, lime, and pomelo. The most farmers used a copper compound product to control, eliminate, and decrease the diseases leading to a problem like chemical resistance. Hence, the biological control using antagonistic microorganisms such as rhizosphere bacteria are the alternative solution. One of the most useful rhizosphere bacteria is Actinobacteria. It is a gram-positive bacterium that live in the soil rhizosphere.

A total of 22 isolates of Actinobacteria obtained from the Microbial Biotechnology Research Unit, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University were evaluated for their antagonistic activities against pathogenic microorganisms in the citrus.

Isolate Bar14 showed the most potent antagonistic activity against all test microorganisms (*A. alternata*, *Aspergillus* sp. and 3 isolates of *X. axonopodis* pv. *citri*). Based on the agar well diffusion assay, the culture broth of

isolate Bar14 exhibited inhibition zones  $29.00\pm 0.00$ ,  $26.67\pm 0.58$ ,  $29.00\pm 0.00$ ,  $26.67\pm 0.58$  and  $24.33\pm 0.58$  mm. diameter against *A. alternata*, *Aspergillus* sp. and 3 isolates of *X. axonopodis* pv. *citri*. respectively.

The paper disc diffusion method used the crude extract (30  $\mu\text{g}/\text{disc}$ ) of isolate Bar14 gave inhibition zones  $14.00\pm 0.00$ ,  $13.00\pm 0.00$ ,  $13.00\pm 0.00$ ,  $15.00\pm 0.00$  and  $15.00\pm 0.00$  mm. diameter against the same pathogenic isolates respectively. While copper hydroxide (a common anti-canker substance) with the same concentration does not present an inhibition zone.

The comparative results of potential inhibitory effects of crude extract against fungi by Minimum Fungicidal Concentration (MFC) assay and Percent inhibition. The highest concentration used (5 mg/ml) show that the percentage of the inhibition against *A. lunata* and *Aspergillus* sp. were 54.54% and 53.13% respectively. When we compared the inhibitory efficiency of crude extracts derived from isolate Bar 14 to copper hydroxide, the minimum bactericidal concentration (MBC) of the extracts was 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In comparison, copper hydroxide could not inhibit bacterial growth even at its highest tested concentration (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The strain was also assessed for the presence of plant growth promoting activity, such as auxin indole-3-acetic acid (IAA) production, siderophore production and phosphate solubilization. The production of IAA was 0.026  $\mu\text{g}/\text{ml}$  when culture in ISP2 broth supplemented with 0.2% L- tryptophan. Isolate Bar14 showed a positive reaction for siderophore production with 11.67 $\pm$ 0.58 mm-sized orange. The test for phosphate solubilization, did not produce any halo.

*In vivo* biocontrol efficacy of the isolate Bar 14 against *X. axonopodis* pv. *citri* in lime were tested. The results showed that after soaking lime seeds in the isolate Bar 14 culture broth or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  IAA solution at 4C for 24 h, the culture broth showed a greater enhancement of the lime seed germination. Lime seeds soaked in the culture broth for 24 h offered 94.44% seed germination. The effect of presoaking seeds in culture broth on seedling growth resulted in higher values of fresh weight and dry weight than IAA (0.22 and 0.14 g. respectively). The results of

several stem cutting, stem cutting length, and new leaf had an average of 1.75 stem cutting, 12.50 mm. and 6 leaves. The inhibition of canker disease in lemon leaves showed a percentage of disease incidence of 0 and no disease severity. Lastly, the MTT assay of crude extract of isolate Bar14 showed that at a concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$ , 92.40% of cells survived. The results indicated that it was safe for cells. Our findings suggest that isolate Bar14 would be a promising biocontrol agent to suppress canker disease and promote the better growth in lime.





## ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ผศ.ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้อุทิศส่วสละเวลาอันมีค่ามาเป็นทีปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณ คณะกรรมการวิทยานิพนธ์ อันประกอบไปด้วย รศ.ดร.ศิริพรรณ สารินทร์ และ ผศ.ดร.บุญเรือง คำศรี กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ศิริวรรณ วิชัย กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า กราบขอบพระคุณ คณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่านที่กรุณาประสาทวิชาความรู้และให้คำปรึกษาด้วยดีเสมอมา รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง พี่ เพื่อนและน้องๆ ของผู้วิจัยที่ ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแต่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรมในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในมะนาว การส่งเสริมการเจริญของพืช และเพื่อความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำเลี้ยงและสารสกัดของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียไปใช้ทดแทนสารเคมีที่มีการใช้ในปัจจุบัน อีกทั้งยังรวมถึงผู้ที่สนใจบ้างไม่มากก็น้อย

ปัญชาน์ พิมพานุวัตร

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ถ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการศึกษา.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. มะนาว.....	5
2. การขยายพันธุ์ของมะนาว.....	5
3. ความสำคัญของพืชเศรษฐกิจของมะนาว.....	6
4. โรคที่เกิดกับมะนาว.....	7
5. การควบคุมโรคทางเกษตรกรรม.....	11
6. วิธีทางชีววิธี.....	11
7. แอคติโนแบคทีเรีย.....	12
8. แอคติโนแบคทีเรียในธรรมชาติ.....	13

9. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนแบคทีเรีย .....	14
10. ลักษณะทั่วไปของแอกติโนแบคทีเรีย .....	15
11. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนแบคทีเรีย .....	16
13. อาหารสำหรับการเจริญของแอกติโนแบคทีเรีย .....	21
14. ความสำคัญของแอกติโนแบคทีเรีย .....	21
15. แอกติโนแบคทีเรียในบทบาท Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) .....	23
16. ความสามารถในการควบคุมโรคพืช .....	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย .....	28
3.1 การแยกเชื้อราก่อโรคในมะนาวที่ใช้ในงานวิจัย .....	28
3.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย .....	28
3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงจากแอกติโนแบคทีเรียในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี Agar well diffusion .....	30
3.3.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย .....	30
3.3.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ .....	30
3.3.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ .....	31
3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากแอกติโนแบคทีเรียในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี Disc Diffusion .....	32
3.4.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย .....	32
3.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากแอกติโนแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ รา .....	32
3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากแอกติโนแบคทีเรียในการยับยั้ง แบคทีเรีย .....	33

3.5 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียที่ฆ่าเชื้อรา (Minimal Fungicidal Concentration; MFC) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา .....	33
3.6 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อ แบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และการทดสอบหาค่าความ เข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Bactericidal Concentration; MBC).....	34
3.7 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช .....	34
3.7.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารไซเดอโรฟออร์ (Siderophore).....	35
3.7.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างสาร Indole-3-acetic acid (IAA) .....	35
3.7.3 การทดสอบความสามารถในการละลายสารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์ (Phosphate solubilization) .....	35
3.7.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างแอมโมเนีย .....	36
3.8 การประเมินศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดของแอคติโนแบคทีเรียในการ ยับยั้งโรคและส่งเสริมการเจริญของมะนาว .....	36
3.8.1 การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดมะนาว .....	36
3.8.2 การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดของแอคติโนแบคทีเรียต่อการเจริญของ มะนาวในระยะการเพาะเมล็ด .....	36
3.8.3 การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดของแอคติโนแบคทีเรียต่อการเจริญของ มะนาวในระยะปักชำกิ่ง .....	37
3.8.4 ประเมินศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ใน ใบมะนาว .....	37
3.8.5 การประเมินศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการนำไปใช้ในการ เคลือบของผลมะนาว .....	38

3.9 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดโดยวิธี MTT assay.....	39
3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	40
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	41
4.1 การแยกเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp. ที่ก่อโรคในมะนาวที่ใช้ในการทดสอบงานวิจัย .....	41
4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชตระกูลส้ม .....	42
4.2.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Agar well diffusion .....	42
4.2.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Disc Diffusion .....	43
4.2.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถฆ่าเชื้อรา (Minimal Fungicidal Concentration; MFC) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา 44	
4.2.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์ในมะกรูด มะนาวและส้มโอ โดยวิธี Agar well diffusion.....	47
4.2.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ที่เป็นสาเหตุของโรคในมะกรูด มะนาวและส้มโอ โดยวิธี Disc Diffusion.....	48
4.2.6 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Bactericidal Concentration; MBC).....	49
4.3 ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช .....	49
4.3.1 ความสามารถในการสร้างสารไซโตโรพอร .....	50
4.3.2 ความสามารถในการสร้างสาร IAA.....	50

4.3.3	ความสามารถในการละลายสารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์ .....	52
4.3.4	ความสามารถในการสร้างแอมโมเนีย .....	53
4.4	การประเมินศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท Bar14 ในการยับยั้งโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและส่งเสริมการเจริญของมะนาว .	53
4.4.1	ผลของน้ำเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดมะนาว.....	53
4.4.2	การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงของแอคติโนแบคทีเรียต่อการเจริญของมะนาวใน ระยะการเพาะเมล็ด .....	55
4.4.3	การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงของแอคติโนแบคทีเรียต่อการเจริญของมะนาวใน ระยะการปักชำกิ่ง.....	57
4.5	ศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท Bar14 ในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ ในใบมะนาว .....	59
4.6	การประเมินศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการนำไปใช้ในการเคลือบ ของผลมะนาว .....	59
4.7	ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดโดยวิธี MTT assay .....	61
บทที่ 5	บทสรุป.....	62
	สรุปผลการวิจัย.....	62
	อภิปรายผลการวิจัย .....	64
	ข้อเสนอแนะ .....	68
	บรรณานุกรม .....	69
	ภาคผนวก.....	81
	ประวัติผู้วิจัย .....	122

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดผนังเซลล์และน้ำตาลในผนังเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรีย .....	20
ตาราง 2 สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากสเตรปโตมัยซีทสปีสี่ชนิดต่างๆ .....	22
ตาราง 3 เชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา .....	28
ตาราง 4 เชื้อราทดสอบที่ใช้ในการศึกษาก่อโรคใบจุด .....	29
ตาราง 5 เชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการศึกษาก่อโรคในมะกรูด มะนาว และส้มโอ .....	30
ตาราง 6 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Agar well diffusion .....	42
ตาราง 7 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเชื้อรา <i>A. lunata</i> และ <i>Aspergillus</i> sp. โดยวิธี Disc Diffusion .....	43
ตาราง 8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. lunata</i> .....	44
ตาราง 9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp. ....	46
ตาราง 10 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> จากมะกรูด มะนาวและส้มโอ .....	47
ตาราง 11 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ของแอคติโนแบคทีเรียเมื่อทดสอบโดยวิธี Disc Diffusion .....	48
ตาราง 12 ค่าเฉลี่ยโซนการสร้างสารไซเดอโรพอร์เมื่อทดสอบบนอาหาร CAS agar .....	50
ตาราง 13 ปริมาณการสร้างสาร IAA ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....	51
ตาราง 14 ค่าเฉลี่ยและโซนการละลายสารประกอบฟอสเฟตในทริยิบนอาหาร Pikovskaya's agar .....	52

ตาราง 15 ผลการศึกษาค่าเฉลี่ยของน้ำเลี้ยงต่อการเจริญของมะนาวในระยะการเพาะเมล็ด	55
ตาราง 16 ผลการศึกษาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งในระยะการเพาะเมล็ด	57
ตาราง 17 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อรา <i>A. lunata</i> บนอาหาร PDA	87
ตาราง 18 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp. บนอาหาร PDA	88
ตาราง 19 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> จากมะกรูด บนอาหาร NA	89
ตาราง 20 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> จากมะนาว บนอาหาร NA90	
ตาราง 21 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> จากส้มโอ บนอาหาร NA	91
ตาราง 22 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อรา <i>A. lunata</i> บนอาหาร PDA	92
ตาราง 23 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp. บนอาหาร PDA	93
ตาราง 24 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> จากมะกรูด บนอาหาร NA	94
ตาราง 25 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> จากมะนาว บนอาหาร NA95	
ตาราง 26 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> จากส้มโอ บนอาหาร NA	96
ตาราง 27 ค่าเฉลี่ยโชนการสร้างสารไฮเดรโอโรฟออร์เมื่อทดสอบบนอาหาร CAS agar	97
ตาราง 28 ปริมาณการสร้างสาร IAA ( $\mu\text{g/ml}$ ) ในอาหาร ISP2 broth ที่มี 0.2% L-tryptophan	98
ตาราง 29 ปริมาณการสร้างสาร IAA ( $\mu\text{g/ml}$ ) ในสารสกัด	99
ตาราง 30 การละลายสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya's agar	101
ตาราง 31 ความสามารถในการสร้างแอมโมเนียในอาหาร Peptone water	102
ตาราง 32 ผลของน้ำเลี้ยงต่อเปอเซ็นต์การงอกของเมล็ดมะนาว	103



ตาราง 33 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ ความยาวรากในระยะการเพาะเมล็ด .....	104
ตาราง 34 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ จำนวนรากในระยะการเพาะเมล็ด .....	105
ตาราง 35 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ จำนวนใบในระยะการเพาะเมล็ด .....	106
ตาราง 36 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งในระยะเพาะเมล็ด .....	107
ตาราง 37 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ น้ำหนักแห้งในระยะเพาะเมล็ด .....	108
ตาราง 38 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ ความยาวรากในระยะการปักชำกิ่ง .....	109
ตาราง 39 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ จำนวนกิ่งก่อนปลูก .....	110
ตาราง 40 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ จำนวนกิ่งหลังปลูก .....	111
ตาราง 41 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ จำนวนใบก่อนปลูก .....	112
ตาราง 42 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ จำนวนใบหลังปลูก .....	113
ตาราง 43 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ จำนวนรากก่อนปลูก .....	114
ตาราง 44 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ จำนวนรากหลังปลูก .....	115

ตาราง 45 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อ  
ความยาวกิ่งที่เพิ่มขึ้นหลังปลูก..... 116

ตาราง 46 สารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในใบมะนาว ..... 117

ตาราง 47 สารสกัดแอคติโนแบคทีเรียใช้ในการเคลือบของผลมะนาว ..... 119



## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 ตัวอย่างการเกิดโรคในมะนาวจากเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> .....	9
ภาพ 2 ตัวอย่างการเกิดโรคในมะนาวจากเชื้อ <i>A. alternata</i> .....	10
ภาพ 3 ตัวอย่างการเกิดโรคในมะนาวจากเชื้อ <i>Aspergillus</i> sp.....	10
ภาพ 4 วงจรชีวิตของเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย.....	14
ภาพ 5 การจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย Class Actinobacteria โดยใช้ข้อมูลลำดับเบส .....	15
ภาพ 6 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง .....	16
ภาพ 7 การสร้างสปอร์เดี่ยว .....	17
ภาพ 8 ลักษณะสปอร์เป็นสาย A: การสร้างแบบ disporous ของ Microbispora.....	18
ภาพ 9 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ Streptomyces .....	18
ภาพ 10 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร .....	19
ภาพ 11 กลไกการขนส่งเหล็กเข้าสู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์ .....	25
ภาพ 12 วัฏจักรไนโตรเจน.....	26
ภาพ 13 วัฏจักรฟอสฟอรัส.....	27
ภาพ 14 ตำแหน่งการเจาะหลุมในงานอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหยอดน้ำเลี้ยง (ก) และ ตำแหน่งการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสในงานอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ (ข).....	31
ภาพ 15 ตำแหน่งการเจาะหลุมในงานอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหยอดน้ำเลี้ยง (ก) และ ตำแหน่งการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสในงานอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ (ข).....	32
ภาพ 16 ตำแหน่งการวางแผ่น Antibiotic Assay Paper Discs ในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ก) และตำแหน่งการวัดขนาดรัศมีโซนการยับยั้งในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข).....	33
ภาพ 17 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา.....	34

ภาพ 18 การทดลองในใบมะนาวจำนวน 4 ชุดการทดลอง.....	38
ภาพ 19 การทดลองบนผลมะนาวจำนวน 4 ชุดการทดลอง.....	39
ภาพ 20 ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน.....	41
ภาพ 21 ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X.....	42
ภาพ 22 โซนการยับยั้งเชื้อรา <i>A. lunata</i> และ <i>Aspergillus</i> sp. โดยวิธี Agar well diffusion.....	43
ภาพ 23 ผลการยับยั้งเชื้อรา <i>A. lunata</i> และ <i>Aspergillus</i> sp. ของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Disc Diffusion.....	44
ภาพ 24 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. lunata</i> ของสารสกัดจากไอโซเลท Bar14.....	45
ภาพ 25 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. lunata</i> ของสารสกัดจากไอโซเลท TM32.....	45
ภาพ 26 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp. ของสารสกัดจากไอโซเลท Bar1446.....	45
ภาพ 27 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp. ของสารสกัดจากไอโซเลท TM32.....	46
ภาพ 28 โซนการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> โดยวิธี Agar well diffusion.....	47
ภาพ 29 โซนการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียโดยวิธี Disc Diffusion.....	49
ภาพ 30 การสร้างสารไฮเดรโอโรเฟอร์บนอาหาร CAS agar.....	50
ภาพ 31 การสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ของแอคติโนแบคทีเรียเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 broth ที่มี 0.2% L-tryptophan.....	51
ภาพ 32 การละลายสารประกอบฟอสเฟตอนินทรีย์บนอาหาร Pikovskaya's agar.....	52
ภาพ 33 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลท Bar14 ต่อการงอกของเมล็ดมะนาว.....	54
ภาพ 34 ผลของน้ำเลี้ยงต่อการเจริญของมะนาวในระยะการเพาะเมล็ด.....	56

ภาพ 35 ผลของน้ำเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียต่อการเจริญของมะนาวในระยะการเพาะปักชำกิ่ง.....58

ภาพ 36 ศักยภาพของสารสกัดแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลท Bar14 ในการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์ในใบมะนาว.....59

ภาพ 37 ศักยภาพของสารสกัดแอกติโนแบคทีเรียในการนำไปใช้ในการเคลือบของผลมะนาว.....60

ภาพ 38 กราฟมาตรฐานปริมาณ IAA บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml..... 100

ภาพ 39 สารสกัดแอกติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในใบมะนาว..... 118



# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาของปัญหา

มะนาว (Lemon) หรือ *Citrus aurantifolia* อยู่ในวงศ์ Rutaceae ที่มีต้นกำเนิดมาจากแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทางตอนเหนือของประเทศอินเดีย เป็นไม้ผลตระกูลส้มปัจจุบันพบว่าการปลูกมากกว่า 30 ประเทศทั่วโลก (Ali et al., 2017) จากอัตราการเพิ่มของประชากรและการขยายตัวของเศรษฐกิจ รวมถึงภาคอุตสาหกรรม ทำให้มะนาวเป็นวัตถุดิบที่มีความสำคัญทางการค้าเป็นที่ต้องการของตลาดตลอดทั้งปี ทำให้มะนาวมีมีมูลค่าการส่งออกมะนาวต่อปีสูงที่เกิดการสูญเสียต่อเศรษฐกิจจากกระบวนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยวทั้งแบคทีเรีย เชื้อราและไวรัส (Ladaniya, 2008) จากการเกิดโรคของมะนาวทำให้เกิดการสูญเสียถึงร้อยละ 18 – 25 (Makavana, Makwana, Kukadiya, & Joshi, 2018)

มะนาวที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทยมีแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดเพชรบูรณ์ นครสวรรค์ กาญจนบุรี สมุทรสาคร นครปฐม และเชียงใหม่ เป็นต้น ซึ่งมะนาวเป็นพืชที่มีประโยชน์และคุณค่า สามารถใช้ปรุงเป็นอาหารและเครื่องดื่ม มีสรรพคุณทางยา เพราะมีวิตามินซีสูงสามารถใช้เป็นยาสมุนไพร ทำให้ภาคอุตสาหกรรมมีการใช้มะนาวเป็นวัตถุดิบมีความต้องการมะนาวสูงขึ้นทุกปี ทำให้มะนาวมีบทบาทสำคัญทางการค้าของเศรษฐกิจที่มีความต้องการสูงตลอดทั้งปี โดยเฉพาะฤดูแล้งทำให้ราคาสูงกว่าปกติถึง 5-10 เท่า ทำให้มะนาวมีมีมูลค่าสูง (รวิ เสฐฐภักดี และคณะ, 2553)

ปัญหาที่เกิดกับมะนาวเป็นการระบาดของโรคสามารถพบได้ทั้งกลุ่มของเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส (Al-Sadi, Queiroz, Donkersley, Nasehi, & Elliot, 2017) เช่น โรครากเน่าและโคนเน่าเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. ทำให้รากฝอยและรากแขนง มีสีน้ำตาลถึงดำ เปลือกลำต้น โดยเฉพาะบริเวณโคนจะปริแตกออก โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum acutatum* ทำให้เกิดจุดแผลบริเวณใบ ลำต้นและผล ที่ทำให้เกิดใบร่วง (Javed, Ahmad, Anwar, Javed, & Zia, 2007) โดยเฉพาะโรคแคงเกอร์เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. เป็นโรคที่เกิดกับพืชตระกูลมะนาวทำให้เกิดโรคบริเวณใบ ลำต้นและผล ซึ่งเมื่อเป็นมากจะทำให้ใบร่วงและสามารถตายได้ (Al-Sadi et al., 2017; Ali et al., 2017) และเชื้อรา *Alternaria alternata* และ *Aspergillus* sp. ที่ก่อโรคใบจุดบริเวณผล ใบและกิ่งเมื่อปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลานาน จะเกิดการย่อยสลายทำให้ต้นพืชตระกูลมะนาวยืนต้นตายได้ (Timmer, 2003; Munis, 2016) พืชส่วนใหญ่ที่เกิดโรค ได้แก่ มะนาว ส้ม และองุ่น (Al-Sadi et al., 2017)

โรคที่เกิดขึ้นจะมีผลในเชิงพาณิชย์ที่สำคัญทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจมาจากผลผลิตที่ไม่เหมาะสมกับการค้าทั้งในประเทศและต่างประเทศ (Abubaker, 2016; Derso, & Sijam, 2007)

การควบคุมโรคในมะนาวนิยมทำโดยการกำจัดและลดความรุนแรงของโรค ส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมี โดยการฉีดพ่นบริเวณที่เกิดโรคด้วย สารประกอบเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ ยาฆ่าเชื้อราและสารเคมีอื่นๆ ทำให้สามารถลดความเสียหายจากการเกิดโรคได้ นอกจากนี้คือการเผาทำลาย แต่ทั้งนี้ยังสามารถ เกิดโรคขึ้นได้อีกเมื่อไม่มีการดูแลรักษาที่ดี ซึ่งการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืชในปริมาณมาก ใช้ซ้ำเป็นเวลานาน การใช้อย่างไม่เหมาะสมหรือไม่ถูกวิธี มีผลทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคมมีความต้านทานเพิ่มมากขึ้น ทำให้การควบคุมไม่มีประสิทธิภาพหรือได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร (De Waard et al., 2003) อีกทั้งสารเคมีที่ใช้ยังส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศทั้งทางบก ทางน้ำและทางอากาศที่yakต่อการชะล้าง การทำลายและการย่อยสลาย จึงเกิดการสะสม ตกค้าง และเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมที่จะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรได้รับหรือสัมผัสสารเคมีต่างๆ เข้าสู่ภายในร่างกายจากทางปาก ผิวหนัง และการหายใจ จึงเกิดปัญหาการเจ็บป่วยทั้งในระยะสั้นและระยะยาว (De Waard et al., 2003; Smith, Evans, & El-Hiti, 2008)

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีการควบคุมโรคพืชที่มีความปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งวิธีทางชีววิธีที่นำมาใช้ในทางการเกษตร มีผลต่อการควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญของพืชเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเพื่อทดแทนและลดการใช้สารเคมี เนื่องจากมีต้นทุนต่ำและลดการใช้ทรัพยากรต่างๆ (Arumugam Sathya et al., 2017) ปัจจุบันมีการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืช โดยมีกลไกในการสร้างสารปฏิชีวนะ การแข่งขัน ซึ่งพบว่าสามารถควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด ได้แก่ โรครากเน่าและโคนเน่า โรคแอนแทรคโนส โรคเมล็ดเน่าและโรคแคงเกอร์ แต่พบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาสามารถทำให้เกิดโรคได้เมื่อใช้ปริมาณมากและระยะเวลา และเกิดการต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ควบคุม และยังไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพได้ (Ghazanfar, Raza, Raza, & Qamar, 2018) จึงจำเป็นต้องมีการใช้เชื้อจุลินทรีย์บริเวณดินหรือในกลุ่มของ (Biological Control Agents; BCAs) จากการศึกษาโดยเฉพาะแบคทีเรียรอบรากพืชกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่มีความสำคัญในดินทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์รวมถึงสารอาหารต่างๆ ที่ช่วยในการปรับปรุงดิน มีความสัมพันธ์และส่งเสริมการเจริญกับพืช (Arumugam Sathya, Rajendran Vijayabharathi, & Subramaniam Gopalakrishnan, 2017) โดย ส่วนใหญ่พบว่า จี นัส *Streptomyces* (Čihák et al., 2017; Arumugam Sathya et al., 2017) มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิดและมีประสิทธิภาพ (Puttaswamygowda, Olakkaran, Antony, & Kizhakke Purayil, 2019) และมีศักยภาพในการควบคุมและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยตรงจากสารอาหารหรือการกระตุ้นจากฮอร์โมน เช่น การผลิต Indole

acetic acid (IAA) Cytokinins และ Gibberellins ความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบฟอสเฟต ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านทางการเกษตร อดสาหกรรมและอื่นๆ (Panchanathan Manivasagan, Venkatesan, Sivakumar, & Kim, 2014)

จากเหตุผลข้างต้นทำให้เห็นความสำคัญของการนำจุลินทรีย์แอคติโนแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญของมะนาว ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของแอคติโนแบคทีเรียในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชและการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคมะนาว เพื่อประเมินศักยภาพในการนำไปใช้ทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตร

### จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาความสามารถของแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคมะนาว
2. เพื่อศึกษาความสามารถของแอคติโนแบคทีเรียในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของมะนาว
3. เพื่อประเมินความเป็นไปได้ของการนำเอาน้ำเลี้ยงหรือสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียไปใช้ทดแทนการใช้สารเคมีกลุ่มของคอปเปอร์

### ขอบเขตของงานวิจัย

ทดสอบความสามารถของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากพืชสมุนไพรรักษาโรค ได้แก่ วานหางจรเข้ สเลดพังพอนตัวผู้ ขมิ้น ไพล มะกรูด ต้นข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวพันธุ์ลิ้มผิว ข้าวหอมนิลสุตะบุตร ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวญี่ปุ่น ต้นข้าวหอมปทุมและ *Streptomyces sioyaensis* DSM 40032<sup>T</sup> ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคมะนาวทั้งเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus* sp. และ *Alternaria alternata* TISTR3435 และแบคทีเรีย ได้แก่ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ซึ่งเป็นสาเหตุโรค Canker ในมะกรูด มะนาว และส้มโอ จำนวนทั้งหมด 3 สายพันธุ์ โดยวิธี Agar well diffusion assay ด้วยการใช้ น้ำเลี้ยง (Supernatant) และวิธี Agar disc diffusion assay โดยใช้สารสกัดหยาบจากนั้นนำสารสกัดหยาบมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Minimum Bactericidal Concentration (MBC), Minimal Fungicidal Concentration (MFC) นำค่าที่ได้ไปใช้ในการทดสอบยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในต้นพืช

ทดสอบความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Rhizosphere: PGPR) ได้แก่ การสร้างสารไซเดอโรฟออร์ (Siderophore), Indole-3-acetic acid (IAA) และการละลายสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟต (Phosphate solubilization)



การประเมินความเป็นไปได้ของสารสกัดและน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรค และส่งเสริมการเจริญของมะนาว ได้แก่ การศึกษาการเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดมะนาว การส่งเสริมการเจริญของมะนาวในระยะเมล็ดถึงต้นกล้า การประเมินศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการควบคุมโรคบนใบมะนาว และการประเมินศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียบนผิวของผลมะนาว ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของมนุษย์ด้วยสารสกัดโดยวิธี MTT assay เพื่อประเมินความปลอดภัยในการนำไปใช้



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. มะนาว

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle

ชื่ออื่น ส้มมะนาว (ภาคกลาง) ส้มนาว (ภาคใต้) โกรยชะม้ (เขมร-สุรินทร์) หมากฟ้า (ไทยใหญ่-แม่ฮ่องสอน)

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะนาว

ไม้พุ่มสูง 2-4 เมตร กิ่งอ่อนมีหนาม ใบเป็นใบประกอบใบเดี่ยว เรียงสลับกัน รูปไข่ รูปวงรี กว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 4-8 เซนติเมตร เนื้อใบมีจุดน้ำมันกระจาย

ดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อออกที่ปลายกิ่งและซอกใบ กลีบดอกสีขาว มีกลิ่นหอม

ผลกลม สด ฉ่ำน้ำ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.5-5 ซม. เปลือกบาง เรียบ สีเขียว เป็นมัน มีต่อมน้ำมันกระจายทั่วไปที่ผิวผล เมื่อสุกสีเหลือง ภายในผลแบ่งเป็นห้องแบบครึ่งมีเมล็ดเป็นเยื่อ บาง ๆ รูปยาวรีขนาดเล็กจำนวนมาก ภายในมีน้ำรสเปรี้ยวบรรจุอยู่ เมล็ดกลมรี สีขาว มีหลายเมล็ด น้ำจากผลมะนาวที่โตเต็มที่รสเปรี้ยวจัด เปลือกผลมีรสขม (Narang & Jiraungkoorskul, 2016)

#### 2. การขยายพันธุ์ของมะนาว

##### การเพาะเมล็ด

การขยายพันธุ์มะนาวโดยการเพาะเมล็ด ส่วนใหญ่ไม่นิยมทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้ได้ต้นต่อที่แข็งแรงและมีรากแก้ว สามารถใช้เป็นต้นตอในการขยายพันธุ์ต้นต่อไปได้

##### วิธีการขยายพันธุ์ของมะนาวด้วยการเพาะเมล็ด

1. นำเมล็ดมะนาวไปล้างกับน้ำเย็นให้สะอาด
2. ตากเมล็ดมะนาวกับแดดจัดๆ เพื่อให้เมล็ดมะนาวแห้ง
3. แช่เมล็ดมะนาวในน้ำหรือเดมฮอร์โมนเร่งรากทิ้งไว้ประมาณ 1 คืน
4. กระจายพืชชูรองถาดพลาสติกประมาณ 2-3 แผ่น จากนั้นนำเมล็ดมะนาวมาวางเรียงบนกระดาษทิชชู
5. คลุมเมล็ดมะนาวด้วยกระดาษทิชชูอีกชั้น พรมน้ำจันกระดาษทิชชูชุ่ม ปิดฝากล่อง จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 2-3 วัน อย่าทิ้งให้กระดาษทิชชูแห้ง

6. เมื่อรากเริ่มงอก เตรียมดินลงในกระถาง วางเมล็ดมะนาวลงปลูก กลบดินให้แน่น รดน้ำพอชุ่ม วางกระถางข้างหน้าต่าง ให้มีแดดส่องถึง

7. รดน้ำต้นมะนาวพอประมาณ ไม่ต้องชุ่มมาก แต่ก็พยายามอย่าให้ต้นมะนาวขาดน้ำ

#### **การตอนกิ่ง**

สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากแม้มีพันธุ์ดีแค่ต้นเดียว

#### **วิธีการขยายพันธุ์ของมะนาวด้วยการตอนกิ่ง**

1. นำกิ่งมะนาว มาทำการตัดใบให้มีก้านด้านบนใบเล็กน้อย ส่วนด้านล่างก้านใบให้ยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร (ตัดใบออกครึ่งหนึ่ง เพื่อลดการคายน้ำ)
2. กรีดเปลือกหุ้มก้านด้านของใบ เพื่อเพิ่มพื้นที่ในการออกราก 1-3 หน้า
3. นำกิ่งไปจุ่มในน้ำหรือเติมฮอร์โมนเร่งราก แล้วเอาไปผึ่งลมให้แห้ง
4. นำไปใส่ไว้ในถุงร้อน มัดหนึ่งข้างให้ถุงร้อนพองโป่งออก ให้ใบไม่กระทบถุง
5. นำไปตั้งไว้ในที่ร่ม โดนแสงบ้างเล็กน้อย ประมาณ 1 เดือน มะนาวจะเริ่มออกรากหรือเริ่มติดตายอด (Singh, 2018)

#### **การชำกิ่ง**

การตัดส่วนของกิ่งพันธุ์มะนาวที่มีสภาพต้นที่สมบูรณ์ นำมาโดยต้นใหม่จะชำสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดรากและยอด พัฒนาเป็นต้นใหม่ โดยต้นใหม่จะมีลักษณะเหมือนต้นใหม่ทุกประการ

#### **วิธีการขยายพันธุ์ของมะนาวด้วยการตอนกิ่ง**

1. กิ่งมะนาวความยาวประมาณ 6 – 9 นิ้ว ขนาดของกิ่งประมาณ 1 นิ้ว โดยรอยตัดควรอยู่บนข้อและใกล้กับข้อกิ่งมะนาวจะต้องมีข้อจำนวน ประมาณ 3 – 5 ข้อ และมีใบอยู่ 4-6 ใบ
2. ใช้คัตเตอร์กรีดบริเวณโคนกิ่งในแนวตั้งความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร 3-4 รอย สำหรับการงอกของราก
3. นำกิ่งมะนาวแช่ลงในน้ำที่ผสมสารป้องกันเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นแช่ลงในฮอร์โมนเร่งราก
4. นำกิ่งฝังกิ่งลึก ½ ส่วน ของความยาวกิ่ง (กดบริเวณโคนกิ่งให้แน่น)
5. นำไปตั้งไว้ในที่ร่ม โดนแสงบ้างเล็กน้อย ประมาณ 1 เดือน มะนาวจะเริ่มออกราก

### **3. ความสำคัญของพืชเศรษฐกิจของมะนาว**

มะนาวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมีความต้องการในตลาดสูงตลอดปี ซึ่งมะนาวนำมาใช้เป็นวัตถุดิบต่างๆ มากมาย จึงทำให้มะนาวมีบทบาทสำคัญทางการค้า โดยเฉพาะในฤดูแล้งที่

จะมีผลผลิตของมะนาวออกสู่ตลาดน้อย เนื่องจากคุณภาพของวัตถุดิบ (Khan & Fakhar-ud-Din, 2018) ที่เกิดจากโรค การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล (Mughal, 2004)

มะนาวเป็นพืชตระกูลส้มมีการเก็บเกี่ยวเป็นอันดับสองถึง 130947.0 ตันต่อปีจากพื้นที่กว่า 14,415,2323 เฮกตาร์ ซึ่งมีการส่งออกของมะนาวทั่วโลกอยู่ที่ 2892,300,000 ตัน (Khan & Fakhar-ud-Din, 2018) การผลิตมะนาวในประเทศไทยอยู่ที่ 981,530 ตันในปี 2017 ลดลงจาก 984,323 ตันในปีที่แล้วซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลง 0.28% (Khan & Fakhar-ud-Din, 2018)

#### 4. โรคที่เกิดกับมะนาว

สามารถเกิดได้จากทั้งแบคทีเรียเชื้อรา และไวรัส เช่น โรครากเน่าและโคนเน่า จากเชื้อรา *Phytophthora* ที่จะทำลายต้นอ่อนและทำให้ภูมิคุ้มกันต่ำ ใบเหลืองซีด กิ่งแห้ง ใบร่วงเรื่อยๆ และพืชยืนต้นตาย โรคกรีนนิ่งที่เกิดจากไวรัส *Citrus tristeza virus* ใบจะเป็นลักษณะสีเหลืองซีด (ใบแก้ว) จากแบคทีเรียโดยเฉพาะโรคแคงเกอร์ที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สามารถเกิดบาดแผลได้ทั้งบริเวณต้น กิ่ง ใบ และผล มีลักษณะเป็นสีน้ำตาล เมื่อปล่อยให้แห้งเป็นเวลานานจะเกิดเป็นสีดำ ขนาดบาดแผลประมาณ 10 มม. (Ryan, 2011) และเชื้อราที่สำคัญ ได้แก่ *Alternaria alternata* และ *Aspergillus* sp. เป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคราดำ สามารถเกิดบาดแผลได้ทั้งบริเวณต้น กิ่ง ใบ และผล ลักษณะเป็นบาดแผลขนาดเล็กและจะเกิดการขยายใหญ่ขึ้น ซึ่งทั้งแบคทีเรียและเชื้อราที่กล่าวมาทำให้เกิดโรคโดยเฉพาะในพืชตระกูลส้มที่เป็นโรคสำคัญส่งผลเสียหายเศรษฐกิจ

##### โรคแคงเกอร์

เชื้อสาเหตุ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อนสั้น ขนาด  $0.5-0.75 \times 1.5-2.0$  ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดย monotrichous flagellum ไม่มีสปอร์ การเจริญบน Nutrient agar (NA) โคโลนีสีเหลือง ลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบเป็นมัน เชื้อไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลต่างๆ ให้เป็นกรดและแก๊ส ไม่สร้างสารอินโดล เกิดแก๊สไฮโดเจนซัลไฟด์ ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตมาก (strictly aerobe) สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และย่อย (hydrolyzed) แป้งและเจลาติน (gelatin) ได้ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนในช่วงอุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส

##### สายพันธุ์ของโรคแคงเกอร์

การระบาดของโรคแคงเกอร์ในพืชพบได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับพืชและตัวก่อโรค ได้แก่

1. แคงเกอร์ A (Asiatic canker) พบได้ในแถบเอเชีย อเมริกาใต้ โอเชียเนีย และสหรัฐอเมริกา ก่อโรคโดย *X. axonopodis* pv. *citri* มีความรุนแรงมากที่สุดและก่อโรคในพืชหลายชนิดในตระกูล *Citrus* spp.

2. แคนเกอร์ B (Cancrosis B) พบได้ในแถบอเมริกาใต้ ก่อโรคโดย *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*.

3. แคนเกอร์ C (Mexican lime cancrrosis) พบได้ในประเทศบาฮิล ก่อโรคโดย *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*.

4. แคนเกอร์ D (Citrus bacteriosis) พบได้ในเม็กซิโก ก่อโรคโดย *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*.

5. แคนเกอร์ E (Citrus bacterial spot) ก่อโรคโดย *X. campestris* pv. *citrumelo* (Cubero & Graham, 2002)

### ลักษณะอาการ

อาการที่ใบ อาการเริ่มแรกจะเป็นจุดสีเหลืองใสขนาดเล็กที่ด้านท้องใบ จากนั้นจะขยายโตขึ้นพร้อมกับมีขอบนูนมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ มีสีคล้ำขึ้น ค่อนข้างกลม ตอนกลางจะเป็นแอ่งบุ๋มลง บริเวณรอบแผลมักล้อมรอบด้วยวงสีเหลืองเป็นมัน (halo) ลักษณะแผลจะแตกเป็นสะเก็ดมีลักษณะขรุขระมองดูคล้ายเปลือกไม้ที่แตก ขนาดแผลประมาณ 2-3 เซนติเมตร

อาการบนผล แผลมีลักษณะนูนและแตก (cratered look) เมื่อเกิดการตกสะเก็ด มักเกิดรอยบุ๋มกินลึกลงไปใผล มักพบ bacterial exudate สีเหลืองไหลเยิ้มออกมาจากผล วงสีเหลืองรอบแผลจะเห็นได้ไม่ชัดเจนเท่าอาการที่พบบนใบ

อาการบนกิ่งและก้าน อาการจะคล้ายกับที่พบบนใบ แต่แผลจะขยายลามออกไปจนรอบหรือไม่ก็ยาวไปตามกิ่ง แผลจะพูนแข็งเป็นสะเก็ดและมีสีน้ำตาล ไม่พบวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ

### การติดต่อและการแพร่ระบาดของโรค

สามารถเข้าทางปากใบและทางบาดแผล ซึ่งเกิดจากการการเสียดสีของกิ่งหรือใบ หรือบาดแผลที่เกิดจากการทำลายของแมลง เชื้อสาเหตุของโรคจะสามารถเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชจากช่องทางตามธรรมชาติ พัฒนาทำให้เกิดบาดแผลเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิระหว่าง 20 - 30 องศาเซลเซียส และมีความชื้นที่เหมาะสมอาการเริ่มแรกที่จะปรากฏเป็นแผลที่ใบใช้เวลาประมาณ 4 - 7 วัน โดยเฉพาะในฤดูฝน จะเหมาะสมแก่การเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย ถ้าสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การแสดงอาการของโรคจะใช้เวลามากกว่า 60 วัน (Pruvost, Boher, Brocherieux, Nicole, & Chiroleu, 2002)

โรคแคนเกอร์เป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะในพื้นที่แถบเขตร้อนและกึ่งร้อน ซึ่งเป็นโรคที่เกิดได้ในพืชตระกูลส้ม ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคและเกิดผลเสียต่อผลผลิต จึงจำเป็นต้องมีการดูแลรักษาและจัดการโรค เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคแคนเกอร์ (Ngoc, Verniere, Pruvost, Kositcharoenkul, & Phawichit, 2007)



ภาพ 1 ตัวอย่างการเกิดโรคในมะนาวจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

### โรคใบจุด

#### เชื้อสาเหตุ *Alternaria alternata* (*A. alternata*)

*Alternaria alternata* เป็นเชื้อราโคโลนีสีดำ หรือเขียวมะกอกเข้ม conidiophore เกิดขึ้นเดี่ยวๆ หรือเกิดเป็นกลุ่มเล็กๆ มีเส้นเดี่ยวหรือแตกแขนง มีทั้งลักษณะตรงหรือโค้ง หรือเป็นข้อหักไปหักมา สปอร์มีสีอ่อนถึงสีน้ำตาลปนเหลือง ผนังเรียบขนาด  $3-6 \times 50$  ไมครอน สปอร์มีรูปร่างหลายแบบคือ obclavate, obpyriform, ovoid หรือ ellipsoidal ผนังเรียบหรือขรุขระ มีผนังกั้นสปอร์ตามขวางหรือมากกว่า 8 septate และมีผนังกั้นตามยาวหรือเฉียงหลาย septate สปอร์มีขนาด  $20 - 63 \times 9 - 18$  ไมครอน (Troncoso-Rojas & Tiznado-Hernández, 2014)

#### ลักษณะอาการ

อาการที่ใบ จุดมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ แผลจะขยายใหญ่ขึ้น โดยจะเกิดบริเวณใบล่างก่อนแล้วลามไปสู่ใบยอด ใบที่เป็นใบที่เป็นโรคเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และร่วงได้

อาการบนผล เชื้ออาจเข้าทำลายที่ปลายกิ่งก้าน และช่อดอก มักถูกเชื้อเข้าทำลายเมื่อผลใกล้แก่แล้ว ผลเป็นจุดน้ำตาลหรือดำ หรืออาจจุดเล็กๆ ชุ่มน้ำ เห็นขอบชัดเจนและขยายไปทั่วผล

อาการบนกิ่งและก้าน ผลที่ลำต้นของกล้าพืชและจะขยายใหญ่รอบก้าน ผลมีขนาดไม่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตรขึ้นไป และลึกประมาณ 5-6 มิลลิเมตร (Richardson, 1996)

#### การติดต่อและการแพร่ระบาดของโรค

สามารถเข้าทำลายทางปากใบของพืช อาศัยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ลม ปลิวไปตามลม พบในอากาศ อุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญ การสร้างสปอร์ และการงอกของสปอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 22 – 24 องศาเซลเซียส (Troncoso-Rojas & Tiznado-Hernández, 2014)



ภาพ 2 ตัวอย่างการเกิดโรคในมะนาวจากเชื้อ *A. alternata*

### เชื้อสาเหตุ *Aspergillus sp.*

*Aspergillus sp.* เป็นเชื้อราโคโลนีสีเขียว บางชนิดอาจมีสีน้ำตาลจนถึงดำ สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สร้าง conidia มีรูปร่างกลม สร้างโคนิเดียต่อกันเป็นสายยาวไม่แตกกิ่งก้าน เส้นใยไม่มีสี และมีผนังกัน ส่วนก้านชูโคนิเดียจะเจริญโป่งออกมาเป็นเวสิเคิล (vesicle) สปอร์เกิดต่อกันเป็นลูกโซ่ มีขนาด 3 X 15 - 20 ไมครอน (Munis et al., 2016)

### ลักษณะอาการ

อาการที่ใบ จุดมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ แผลจะขยายใหญ่ขึ้น

อาการบนผล เชื้ออาจเข้าทำลายที่ปลายกิ่งก้าน และช่อดอก มักถูกเชื้อเข้าทำลายเมื่อผลใกล้แก่แล้ว แผลเป็นจุดน้ำตาลหรือดำ และอาจขยายไปทั่วผล

อาการบนกิ่งและก้าน แผลที่ลำต้นของกล้าพืชและจะขยายใหญ่รอบก้าน

### การติดต่อและการแพร่ระบาดของโรค

สามารถเข้าทำลายทางปากใบของพืช อาศัยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ลม ปลิวไปตามลม พบในอากาศ อุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญ การสร้างสปอร์ และการงอกของสปอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30 – 37 องศาเซลเซียส (Mousavi, 2016)



ภาพ 3 ตัวอย่างการเกิดโรคในมะนาวจากเชื้อ *Aspergillus sp.*

## 5. การควบคุมโรคทางเกษตรกรรม

ในพื้นที่เกษตรกรรมทั่วโลกประมาณร้อยละ 80 มีการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืช มีหลากหลายประเภทที่ครอบคลุมถึง ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าหนอนหรือปรสิต สารเหล่านี้อยู่ในกลุ่มของยาฆ่าแมลงออร์กาโนคลอรีน (OC) ใช้ในการควบคุมโรคได้หลายชนิด (Aktar, Sengupta, & Chowdhury, 2009) แต่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนและตกค้างในสิ่งแวดล้อมสูงถึงร้อยละ 99.9 ซึ่งมีเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ของสารเคมีที่ใช้ในการฉีด พ่น หยอดหรือหว่านจะไปมีผลต่อศัตรูพืช เพราะส่วนใหญ่จะติดอยู่บริเวณลำต้นพืช ปลิวไปในอากาศหรือถูกชะล้างด้วยน้ำ ทำให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม (Aktar et al., 2009) แต่ทั้งนี้การใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อพืชผลทางการเกษตร ในการช่วยลดการสูญเสียและเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรด้วยเช่นกัน ทำให้เห็นความสำคัญของการเลือกใช้วิธีทางชีววิธีในการควบคุมโรคพืชและศัตรูพืชเพื่อนำมาทดแทนการใช้สารเคมี เป็นวิธีที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Vurukonda, Giovanardi, & Stefani, 2018) แม้จะมีผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น แต่ในทางการเกษตรยังมีการใช้สินค้าเพียงร้อยละ 1 ซึ่งการใช้วิธีทางชีววิธีนี้มีกลไกการทำงานในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่แตกต่างจากการใช้สารเคมี ทำให้มีประสิทธิภาพที่มากกว่าและมีแนวโน้มที่จะทำการวิจัยให้มีศักยภาพเพิ่มมากขึ้น (Fravel, 2005)

## 6. วิธีทางชีววิธี

วิธีทางชีววิธี คือ การใช้สิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์มายับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคเพื่อไม่ให้สร้างความเสียหายต่อพืช โดยการลดปริมาณเชื้อสาเหตุของโรค เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ เรียกว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งจะมีกลไกการยับยั้งหรือควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืชอยู่ 4 รูปแบบ คือ

1. การทำลายชีวิต (Antibiosis) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ ที่สามารถทำลายเชื้อโรคได้
2. การแข่งขัน (Competition) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการเจริญเติบโต แข่งขันกับเชื้อโรค ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตและเข้าทำลายพืชได้
3. การเป็นปรสิต (Parasitism) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการเข้าไปอาศัย และเจริญอยู่ในเชื้อก่อโรคพืช ดูดกินสารอาหาร ทำให้เชื้อก่อโรคพืชอ่อนแอและตาย
4. การชักนำให้ต้านทานต่อโรค (Induced host resistance) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการกระตุ้นความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค ทำให้การนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชแทนการใช้สารเคมีเพื่อลดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม (El-Wakeil, Gaafar, & Sallam, 2013)



การใช้วิธีทางชีววิธีจึงมีความสำคัญที่จะนำมาประยุกต์ใช้ทางการเกษตร เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและยังมีการทิ้งสารตกค้างเป็นมลพิษต่อดินน้อย จากการศึกษา พบเชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่สามารถพบได้ในดินและบริเวณรากพืช มีการนำมาใช้เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ชนิดกว้าง ด้วยความสามารถในการเพิ่มความต้านทานโรคและการเป็นปรสิตกับพืช ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ทั้งทางการเกษตร (Ghazanfar et al., 2018) ดังนั้นการใช้แอคติโนแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม อุตสาหกรรม และเกษตรกรรม

การใช้แอคติโนแบคทีเรียทางการเกษตร โดยเฉพาะกลุ่มที่อยู่บริเวณรอบรากพืชในดิน *Streptomyces Micromonospora* และ *Nocardia* มีความสำคัญในการสร้างสารปฏิชีวนะต้านต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้ (Gesheva, 2002)

Gesheva (2002) ศึกษาการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวโดยการใช้แอคติโนแบคทีเรียแยกได้จากดินทางการเกษตร นำมาใช้ในการควบคุมโรคมะนาว สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium digitatum* นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคกับพืชชนิดอื่นได้อีกด้วย (Shojaee, Shahidi Bonjar, Shahdaei, & Bonjar, 2014)

Yuan (1995) ทำการศึกษา *Streptomyces lydicus* WYEC108 ที่มีศักยภาพในการเป็นเชื้อปฏิชีวนะในหลอดทดลองกับเชื้อราพืชต่างๆ โดยใช้สปอร์ของ WYEC108 เคลือบเมล็ดถั่วเพื่อป้องกันจากการบุกรุกของ *P. ultimum* ในดิน ในขณะที่เมล็ดควบคุมไม่เคลือบผิว เกิดการติดเชื้อรา *P. ultimum* ภายใน 48 ชั่วโมงหลังปลูก 100% พบว่าเมล็ดเคลือบติดเชื้อราน้อยกว่า 40% เมื่อนำมาปลูกในดินหลังจากนั้น 96 ชั่วโมงมีการงอกของเมล็ดน้อยกว่า 30% (Yuan & Crawford, 1995b)

Nemec (1996) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Streptomyces griseovirdis* ที่มีสามารถในการลดการเกิดรากเน่าสั้มที่เกิดจาก *Phytophthora* และยังสามารถลดการเน่าในรากผักชีฝรั่งที่เกิดจาก *Pythium* และ *Fusarium* spp. (Nemec, Datnoff, & Strandberg, 1996)

## 7. แอคติโนแบคทีเรีย

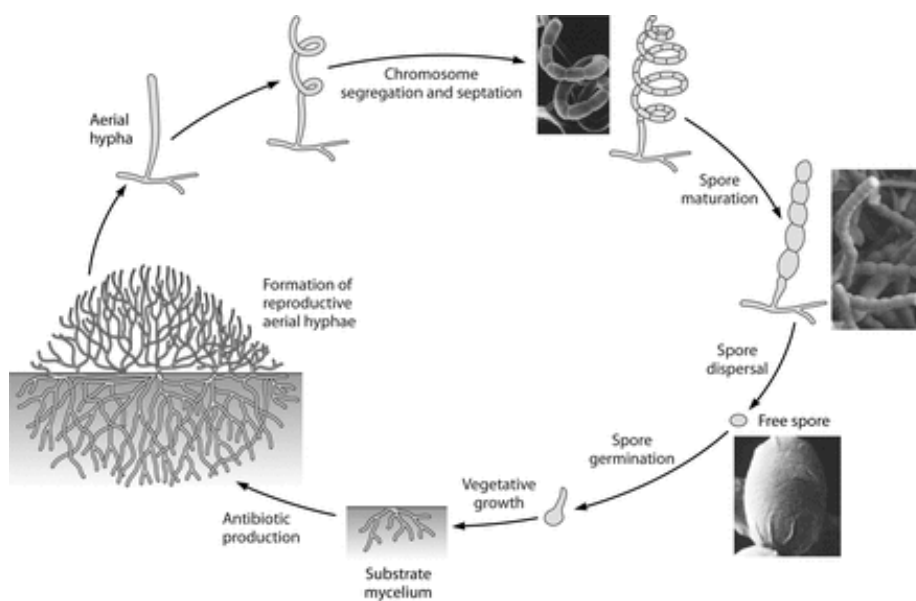
แอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะร่วมกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เรียกว่า fungi imperfect จะมีการสร้างเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) ลักษณะโคโลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะโตช้าและมีลักษณะคล้ายผงแป้ง เรียบ นูน ขรุขระ เหนียวข้น และติดที่ผิวของอาหารอย่างเหนียวแน่น โคโลนีมีหลายสี เช่น ขาว เทา เขียว ดำ และขาวเทา อีกทั้งยังสามารถสร้างรงควัตถุสีต่างๆ เช่น เหลือง ส้มและแดง และยังสามารถสร้างสปอร์ได้หลากหลายรูปแบบ (Sowani, Kulkarni, Zinjarde, & Javdekar, 2017)

ภายในจีโนมมีปริมาณของเบสกวีนีนกับไซโตซีน (G+C) อยู่ที่ประมาณ 55-78 เปอร์เซ็นต์ ผนังเซลล์ประกอบด้วย Mucopeptide (N-acetyl glucosamine กับ N-acetyl muramic acid); 2,6-Diaminopimelic acid; Glutamic acid, Alanine และ Glycine (Keith F. Chater, 2016; H.P, Olakkaran, Antony, & Siva, 2019)

## 8. แอคติโนแบคทีเรียในธรรมชาติ

แอคติโนแบคทีเรียสามารถพบได้ในธรรมชาติที่มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในดิน น้ำจืด และน้ำเค็ม อากาศ โคลน มูลสัตว์ อากาศ บริเวณรอบรากพืช และในพืช สามารถพบมากได้ในบริเวณที่มีการสะสมสารอินทรีย์ เช่น ดินที่เพาะปลูก ป่าชายเลน ดินตะกอนใต้ทะเล ดินเป็นแหล่งที่สูงสุดในการพบเชื้อแอคติโนแบคทีเรียขึ้นอยู่กับสภาพทางภูมิศาสตร์ ประเภทของดิน อุณหภูมิ การระบายอากาศและความชื้นในดิน พบว่าหากแอคติโนแบคทีเรียอยู่ในสภาวะไม่เหมาะสมจะทำให้พบปริมาณของแอคติโนแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ซึ่งแอคติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบ saprophyte เป็น chemoorganotroph ที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ เช่น เศษดิน แป้ง และเซลลูโลส แต่บางชนิดก็เป็นปรสิตทั้งในพืชและในสัตว์

วงจรชีวิตของแอคติโนแบคทีเรีย เริ่มจากสปอร์ของแอคติโนแบคทีเรีย เจริญเป็นเส้นใย และทำการแทรกเส้นใยลงไปในการอาหาร (substrate mycelium) จากนั้นจะมีการเจริญของเส้นใยในอากาศเป็นแนวตั้งทางอากาศ และกลายเป็นเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) จากนั้นเส้นใยจะมีการเริ่มขดเป็นเกลียว และอาจมีหรือไม่มีการสร้างผนังกันจนได้เป็นสายสปอร์ (ภาพ 4) สปอร์ของแอคติโนแบคทีเรียจะมีความทนต่อสภาพสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้มากกว่าเส้นใย เนื่องจาก สปอร์ของแอคติโนแบคทีเรียสามารถสร้างได้ทั้งเหนือผิวอาหารและใต้อาหารมีผนังเซลล์ที่หนากว่า และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งการเจริญในสภาวะที่เหมาะสมของแอคติโนแบคทีเรียจะอยู่ในสภาพความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 6.5-8.0 สามารถเจริญได้ดีที่เป็นกลาง อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ในค่าความดันออสโมซิสที่สูงได้ เมื่อเกิดการรวมตัวกันของเส้นใยจะทำให้เกิดเป็นโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรีย (Keith F. Chater, 2016)



ภาพ 4 วงจรชีวิตของเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย

ที่มา: Japan, 1997

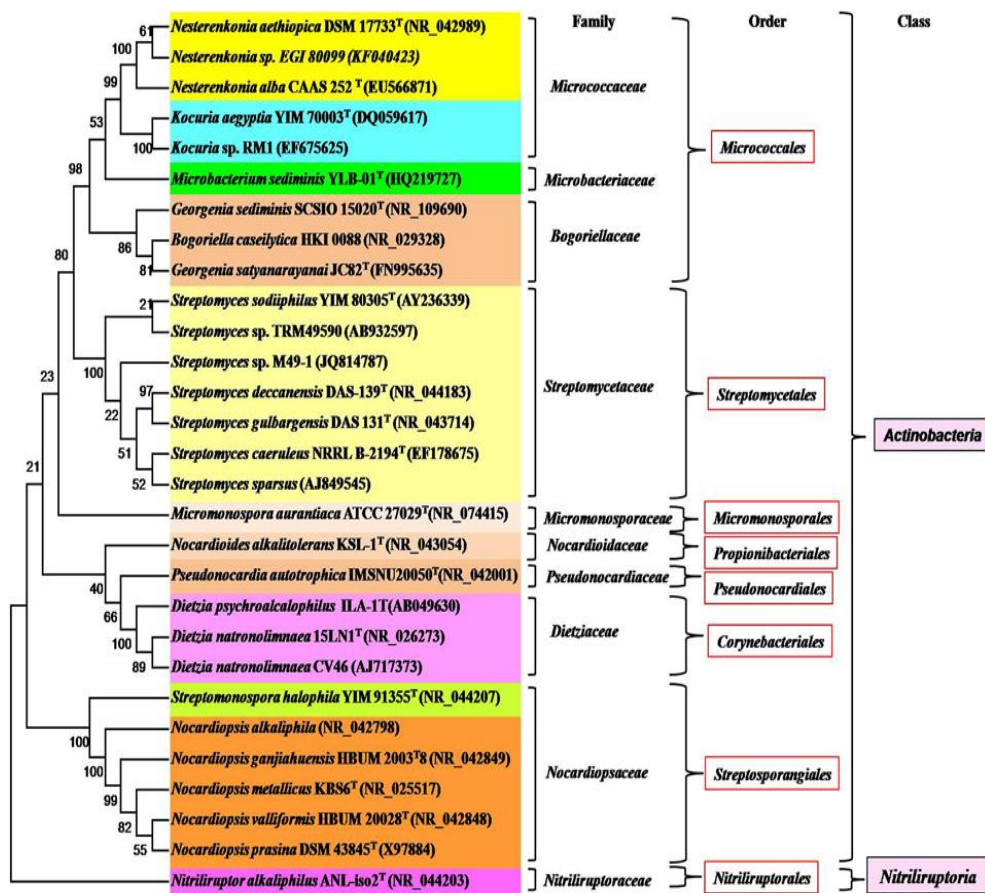
แอกติโนแบคทีเรียที่พบมากที่สุด在地 คือสกุล *Streptomyces* พบประมาณ 70-90% รองลงมา คือ *Nocardia* พบประมาณ 10-30% และ *Micromonospora* พบประมาณ 1-15% นอกจากนี้ยังสามารถพบแอกติโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำ ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Micromonospora* และ *Streptomyces* ยังสามารถพบแอกติโนแบคทีเรียจากแหล่งอื่นๆ (Keith F. Chater, 2016) ได้แก่ พื้นดินในเหมืองยูเรเนียม (Schmidt et al., 2009) หินและกรวดในเขตแอนตาร์กติก (Hirsch, Mevs, M Kroppenstedt, Schumann, & Stackebrandt, 2004) และในไลเคน (González, Ayuso-Sacido, Anderson, & Genilloud, 2005)

#### 9. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนแบคทีเรีย

การพิสูจน์และการจัดจำแนกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสกุล จะใช้ข้อมูลจากองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ องค์ประกอบและไอโซเมอร์ของ Diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์ และชนิดของน้ำตาลในเซลล์ องค์ประกอบของ Phospholipid ชนิดของกรดไขมัน และชนิดของ Menaquinone (Barka et al., 2015) รวมทั้งการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น การงอกของสปอร์ การแตกกิ่งของเส้นใย การรวมตัวของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ การสร้างรงควัตถุ (P. Manivasagan, Venkatesan, Sivakumar, & Kim, 2013) ศึกษาเส้นใยอาหาร

และเส้นใยอากาศโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope)

การพิสูจน์เอกลักษณ์อาศัยข้อมูลทางด้าน 16S rRNA ใช้ในการจำแนกแอกติโนแบคทีเรียถึงระดับสปีชีส์ โดยการนำมาสร้าง Phylogenetic tree พบว่าสามารถแบ่งแอกติโนแบคทีเรียได้มากกว่า 100 สกุล (ดังภาพ 5)



ภาพ 5 การจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย Class Actinobacteria โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสบนยีน 16S rRNA

ที่มา: Japan, 1997

## 10. ลักษณะทั่วไปของแอกติโนแบคทีเรีย

แอกติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ Streptomyces ที่มีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นมากที่สุด และกลุ่มอื่นๆ คือ Non-Streptomyces เป็นแอกติโนแบคทีเรียที่หายาก มีอยู่

ประมาณ 100 สกุล มีความหลากหลายของรูปร่าง นิเวศวิทยา และสายวิวัฒนาการ (Miyadoh, 1997) ประกอบด้วย 5 แฟมิลี ได้แก่ Micromonosporaceae, Streptosporangiaceae, Pseudonocardiaceae, Thermomonosporaceae และ Other (unclassified) species

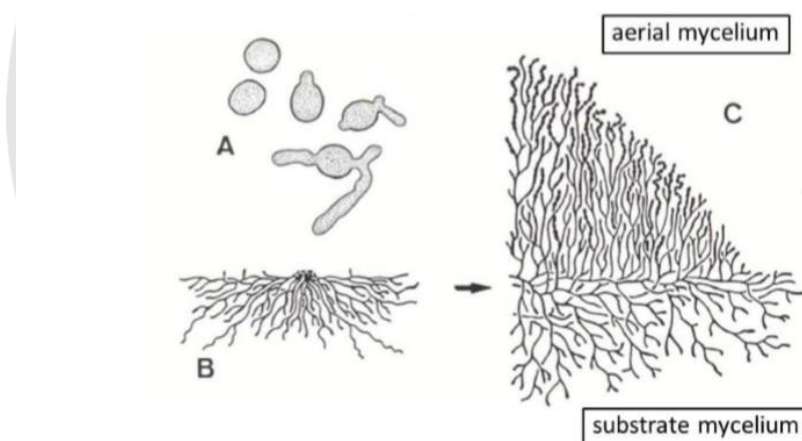
### การศึกษาลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียในการจัดจำแนกหมวดหมู่เบื้องต้น

ศึกษาลักษณะของแอกติโนแบคทีเรีย ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางจີโนมไทป์

## 11. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนแบคทีเรีย

### โคโลนี

โคโลนีของแอกติโนมัยซีทเกิดจากการรวมตัวกันของเส้นใย (mycelium) ที่หนาแน่น จากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนี เช่น การสร้างสปอร์ จากการสร้างผนังกัน แต่มีบางสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ได้แก่ *Micromonospora* และ *Actinoplanes*



ภาพ 6 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

A: อับสปอร์พัฒนาเป็นเส้นใย B: เส้นใยอาหารเจริญและแทงเส้นใยลงไปในอาหาร (Substrate mycelium) C: เส้นใยอากาศเจริญและชูในอากาศ มีการสร้างสปอร์ (Aerial mycelium)

ที่มา: Japan, 1997

ลักษณะโคโลนีอาจมีแบบยกตัวขึ้น (raised) แบนราบ (flat) หรืออาจจะมีลักษณะคล้ายหนัง (leathery layer) อาจจะอ่อนนุ่มและเหนียว ไปจนถึงแข็ง ผิวหน้าของโคโลนีอาจมีลักษณะเรียบ

ขรุขระ นูน เป็นเม็ดเล็ก หรือเป็นเกล็ด ขนาดโคโลนีจะขึ้นอยู่กับสปีชีส์ อายุ สภาวะการเจริญเติบโต ตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลางระดับมิลลิเมตรถึงเซนติเมตร

## 12. โครงสร้างภายในของเส้นใย

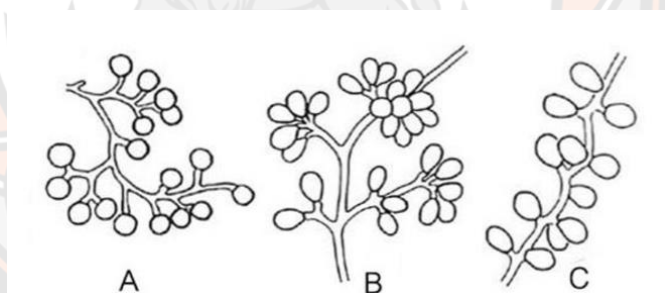
เส้นใยเดี่ยวมีขนาดประมาณ 0.4-1.2 ไมโครเมตร มีผนังกัน และเจริญออกทางด้านปลาย แตกแขนง

### สปอร์ของแอกติโนแบคทีเรีย

การสร้างสปอร์ของแอกติโนแบคทีเรียมีการสร้างสปอร์ 3 ชนิด ได้แก่

#### 1. สปอร์เดี่ยว

แอกติโนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์เดี่ยว เรียกว่า monosporous พบหลายสกุล เช่น ในสกุล Micromonospora ก้านชูสปอร์ (sporophore) มีการสร้างสปอร์บนเส้นใยอาหาร (Kamoto, 1989) สกุล Thermomonospora สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศที่ปลายก้านชูสปอร์ และ Saccharomonospora มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายเส้นใยอากาศ และมีก้านชูสปอร์ไม่แตกแขนง (McCarthy, 1989)



ภาพ 7 การสร้างสปอร์เดี่ยว

A: Micromonospora B: Thermomonospora C: Saccharomonospora

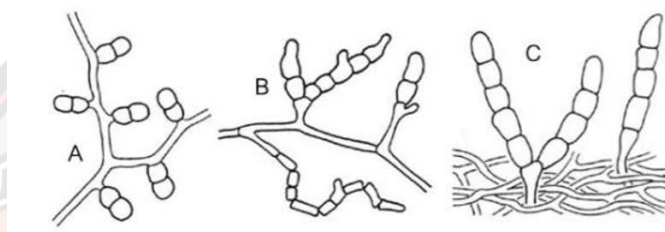
ที่มา: Japan, 1997

#### 2. สปอร์เป็นสาย

สปอร์เป็นสายหรือสปอร์คู่หรือ bispora ในสกุล Microbispora มีการสร้างสปอร์รูปทรงรี 2 สปอร์ สปอร์แบบ oligosporous เป็นสปอร์สายสั้นๆ คือ 7-10 สปอร์ต่อสาย จำนวน

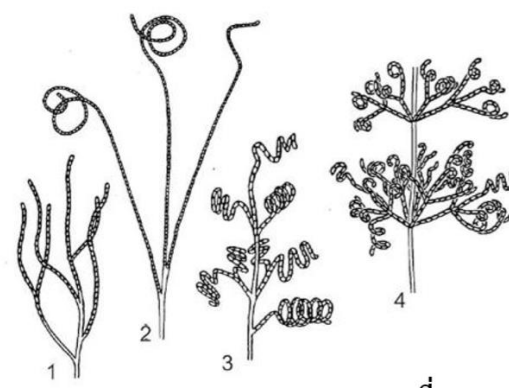
สปอร์ที่พบน้อยที่สุด คือ 3 สปอร์ และมากที่สุด คือ 30 สปอร์ ความแตกต่างของสปอร์จัดได้ 4 ลักษณะ คือ

- Rectiflexibiles: สายโซ่ของสปอร์เป็นแบบเส้นตรงหรือโค้งงออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม
- Retinaculiaperti: สายโซ่จะเป็นห่วง (hooks) แบบห่วงเปิดแบบสั้น หรือม้วนเป็นวงกลมประมาณ 1-3 วง
- Spira: สายโซ่แบบเกลียว แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ แบบปิดหรือแบบเกลียวอัดกันแน่น และ แบบเปิด เกลียวยาวและขยายออก
- Verticillati: สายโซ่แบบเกลียวกันหอย และมีการแตกกิ่ง



ภาพ 8 ลักษณะสปอร์เป็นสาย A: การสร้างแบบ disporous ของ *Microbispora*  
B และ C: การสร้างสปอร์ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena* และ *Catellatospora*  
ตามลำดับ

ที่มา: Japan, 1997

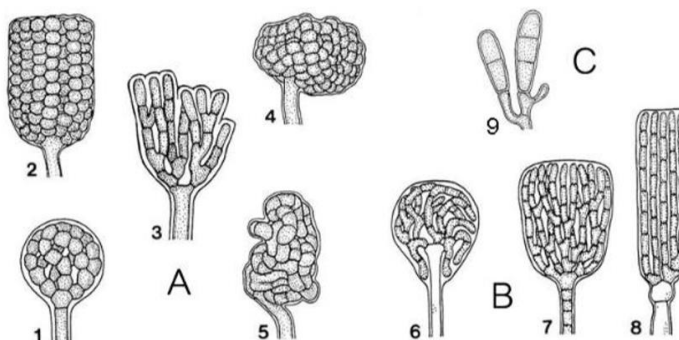


ภาพ 9 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces*

ที่มา: Japan, 1997

- กลุ่มที่สร้างสปอร์บนเส้นใยอาหาร ประกอบด้วย สกุล Actinoplanes, Pilimelia และ Dactylosporangium

- กลุ่มที่สร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศ ประกอบด้วย สกุล Planomonospora, Planobispora, Planatetraspora, Streptosporangium, Kutzneria และ Spirillospora



ภาพ 10 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร

- A: สกุล Actinoplanes (รวมถึง Ampullariella) 1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3. เป็นพู่  
4. กิ่งทรงกลม 5. ไม่เป็นรูปทรง B: สกุล Pilimelia 6. ทรงรี 7. รูปทรงระฆัง 8. ทรงกระบอก  
C: สกุล Dactylosporangium 9. รูปทรงกระบอก

ที่มา: Japan, 1997

#### องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์

1. Diaminopimelic acid (Gopalakrishnan et al.) ซึ่งมี 2 ไอโซเมอร์ คือ LL-DAP และ meso-DAP

2. ชนิดน้ำตาลภายในเซลล์ ใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (Paper Chromatography) โดยการใช้ n-butanol:น้ำ:เฟริดีน:โทลูอิน ในอัตราส่วน 5:3:3:4 (v/v) เป็น mobile phase



ตาราง 1 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดผนังเซลล์และน้ำตาลในผนังเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรีย

ชนิดผนังเซลล์	รูปแบบของกรดอะมิโนและน้ำตาล
I	L-diaminopimelic acid ไกลซีน
II	Meso* diaminopimelic acid ไกลซีน
III	meso diaminopimelic acid ไม่พบไกลซีน
IV	meso diaminopimelic acid อะราบิโนส กาแลคโตส ไม่พบไกลซีน

\*อาจพบในรูปของ 3-hydroxy diaminopimelic acid

Phospholipid เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์และสัมพันธ์ต่อการเป็นเยื่อเลือกผ่าน มีความสำคัญในการจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทในระดับสกุล ประกอบด้วย 5 รูปแบบ ได้แก่

1. PI ประกอบด้วย Phospholipid แทบทุกชนิด ยกเว้น Phosphatidylethanolamine (PE), Methyl-Phosphatidylethano (Methyl-PE), OH- Phosphatidylethanolamine (OH-PE), Phosphatidylcholine (PC) และ Phospholipid ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu)
2. PII ประกอบด้วย Methyl-Phosphatidylethanolamine (Methyl-PE), Phosphatidylethanolamine (PE), OH- Phosphatidylethanolamine (OH-PE) ไม่มี Phosphatidylcholine (PC) และ Phospholipid ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu)
3. PIII ประกอบด้วย Phosphatidylcholine (PC) อาจมีหรือไม่มี Phosphatidylethanolamine (PE) และไม่มี Phospholipid ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu)
4. แบบ PIV ประกอบด้วย Phosphatidylethanolamine (PE) และ Phospholipid ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) แต่ไม่มี Phosphatidylcholine (PC)
5. แบบ Isoprenoid quinones อยู่ในพลาสมาเมมเบรนที่มีความสำคัญในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนใน กระบวนการหายใจ แบ่งเป็น 2 ชนิด Menaquinone และ Ubiquinone

### ลักษณะทางจีโนมไทป์

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ประกอบด้วย DNA และ RNA โดยที่ RNA ประกอบด้วย mRNA, tRNA และ rRNA โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ rRNA พิสูจน์ความแตกต่างของดีเอ็นเอ โดยการเปรียบเทียบการเรียงลำดับเบส และศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

### 13. อาหารสำหรับการเจริญของแอกติโนแบคทีเรีย

เนื่องจากแอกติโนแบคทีเรียมีหลายชนิดจึงมีความต้องการสารอาหารที่หลากหลาย ดังนั้นองค์ประกอบของอาหารจึงยากที่จะเป็นสูตรที่มีความจำเพาะ โดยที่การเจริญของเชื้อแอกติโนแบคทีเรียจะต้องการแหล่งคาร์บอนสารอนินทรีย์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจน และเกลือที่ใช้การเจริญ ดังนั้นในการเจริญจึงจำเป็นต้องอาศัยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ได้แก่

แหล่งคาร์บอน เช่น cellobiose, glucose, glycerol และ trehalose เป็นต้น

แหล่งไนโตรเจน เช่น ammonium, L-arginine, L-asparagine และ nitrate หรือ บางส่วนสามารถย่อย esculin, casein, gelatin และ hypoxanthine เป็นต้น

ในการแยกเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการแยกเชื้อจำเป็นต้องมีการเติมยาปฏิชีวนะ สำหรับการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น Nystatin และ Cycloheximide เป็นต้น ช่วยในการเจริญของสเตรปโตมัยซิส นอกจากนี้ ยังจำเป็นต้องมีการพรีทรีทเมนต์ (pre-treatment) เช่น นำมาเจือจางในน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ อบอุ่นด้วยความร้อน หรือมีการใช้เครื่องอัลตราโซนิค เพื่อช่วยกำจัดแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ

### 14. ความสำคัญของแอกติโนแบคทีเรีย

แอกติโนแบคทีเรียเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สำคัญ มีความสามารถในการสร้างสาร Secondary metabolite หรือ Bioactive compound ได้หลายชนิด ซึ่งสารที่ผลิตออกมาจะมีผลต่อทั้งแบคทีเรียและเชื้อราในบางชนิดที่จะสามารถนำไปใช้งานในด้านต่างๆ ได้แก่

#### ด้านการแพทย์

ยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้ในการรักษาโรคทั้งในคนและสัตว์ โดยสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ผลิตจากเชื้อในสกุล *Streptomyces* ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (Nawani et al., 2013) ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากสเตรปโตมัยซิสสปีชีส์ต่างๆ

สารปฏิชีวนะ	สปีชีส์	จุลินทรีย์ที่ยับยั้ง
Amphoetericin B	<i>S. nodusus</i>	เชื้อรา (Rodrigues & Henriques, 2017)
Chloramphenicol	<i>S. venezuela</i>	แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ (Fernández-Martinez et al., 2014)
Erythromycin	<i>S. erythraeus</i>	แบคทีเรียแกรมบวก (Subathra Devi, Saini, Rastogi, Jemimah Naine, & Mohanasrinivasan, 2015)
Kanamycin	<i>S. kanamyceticus</i>	แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ โปรโตซัว (Krause, Serio, Kane, & Connolly, 2016)
Neomycin	<i>S. fradiae</i>	แบคทีเรียแกรมลบ (Dulmage, 1953)
Streptomycin	<i>S. griseus</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Woodruff, 2014)
Tetramycin	<i>S. viridifaciens</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Innes & Allan, 2001)
Vancomycin	<i>S. orientalis</i>	แบคทีเรียแกรมบวก (Jeong et al., 2013)

Elbendary et al. (2018) แยกเชื้อแอกติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างดินทางการเกษตรที่ประเทศอียิปต์ เมื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Diffusion method พบว่ามี 12 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ *S. aureus*, *E.coli*, *Bacillus cereus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. Typhi* และยับยั้งเชื้อรา ได้แก่ *C. albicans*, *A. niger* และ *A. flavus* แสดงให้เห็นว่าแอกติโนแบคทีเรียเป็นแหล่งของยาปฏิชีวนะ (Elbendary et al., 2018)

#### ด้านอุตสาหกรรม

มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถนำมาใช้งานได้หลากหลายทางอุตสาหกรรม ได้แก่ การย่อยสลายวัสดุติด โรงงานซักฟอก การฟอกหนัง โดยใช้เอนไซม์ต่างๆ เช่น chitinase, cellulase, amylase, protease, xylanase, lipases, asparaginase, pectinases และ Glucoisomerase เป็นต้น (Mukhtar, Zaheer, Aiysha, Malik, & Mehnaz, 2018; Nawani et al., 2013)

Nascimento et al. (2003) แยกเชื้อแอกติโนแบคทีเรียจากดินที่ประเทศบราซิลได้ทั้งหมด 162 ไอโซเลท เพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ Xylanase โดยพบว่า ไอโซเลท AMT-3 หรือ *Streptomyces malaysiensis* เป็นเชื้อที่ให้ clear zone ในอาหาร xylan ได้กว้างที่สุด (Semêdo et al., 2001)

#### **ด้านการเกษตร**

##### **ควบคุมรักษาโรคพืช**

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC108 ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและเมล็ดเน่าของข้าวโพด พบว่า *S. lyticus* WYEC108 มีความสามารถในการสร้างสารที่เป็น Extracellular antifungal metabolite ที่ยับยั้งการงอกของเชื้อรา *Pythium ultimum* และทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา (Yuan & Crawford, 1995a)

##### **การย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ**

มีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของอินทรีย์วัตถุ โดยเฉพาะพืชและสัตว์ โดยที่แอกติโนแบคทีเรียจะมีการเจริญซึ่กว่าแบคทีเรียและเชื้อรา ที่จะสามารถย่อยสลายสารโมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่ กรดอินทรีย์ น้ำตาลชนิดต่างๆ แป้ง ไขมัน และโปรตีน

##### **ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตในรูปที่พืชนำไปใช้ได้**

สกุล *Nocardia* และแอกติโนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช คือ *Frankia* ที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ (D. Krumholz, S. Chval, McBride, & Tisa, 2003) และ *Streptomyces griseus* ที่แยกได้จากดินที่เป็นกรดในการละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ (Hamdali, Hafidi, Virolle, & Ouhdouch, 2008)

### **15. แอกติโนแบคทีเรียในบทบาท Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR)**

แอกติโนแบคทีเรียมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยการส่งเสริมการเจริญทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยใช้กลไกในการส่งเสริมการเจริญของพืชและการป้องกัน สำหรับกลไกในการส่งเสริมการเจริญทางตรง เป็นการปัจจัยหรือสารที่สำคัญ เช่น

##### **ความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช (Phytohormone)**

การผลิตฮอร์โมนพืชหรือสารควบคุมการเจริญของพืช เป็นกลไกสำคัญในการกระตุ้นการเจริญของพืช จากการสร้างสารออกมาได้แก่ Indole Acetate Acid (IAA), Cytokinins, Gibberellins และ สารยับยั้งการผลิต Ethylene (ACC Deaminase) (A. Sathya, R. Vijayabharathi, & S. Gopalakrishnan, 2017) ฮอร์โมนพืชที่สำคัญส่วนใหญ่ คือ Auxin ได้แก่ Indole acetic acid (IAA) ที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช เป็นผลิตภัณฑ์จากการสลายของ L-tryptophan โดยการกระตุ้นการยืดยาวของเซลล์ การเกิดราก การงอกของเมล็ดและการเจริญของ

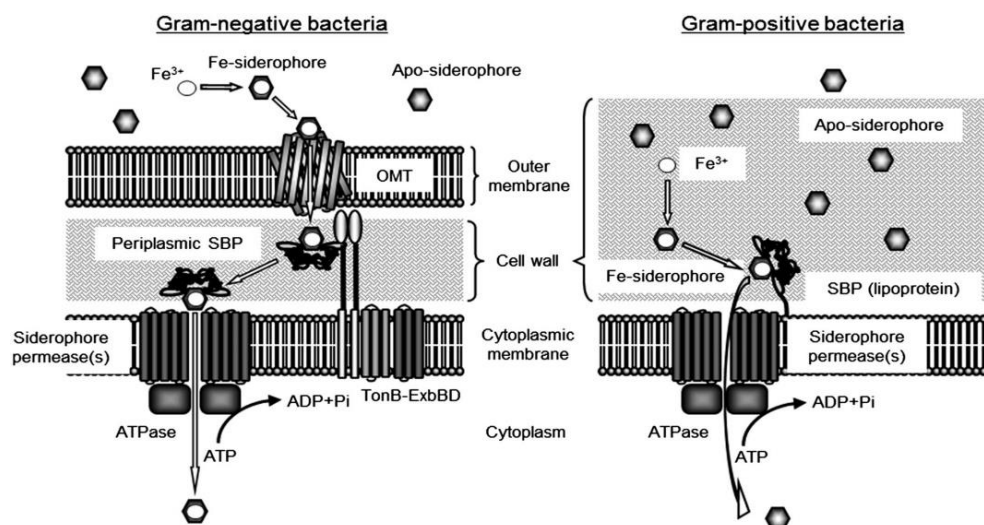
ต้นอ่อน ในธรรมชาติจุลินทรีย์ร้อยละ 80 ของแบคทีเรียรอบรากพืชสามารถหลั่ง IAA ได้ (N Johri, Sharma, & Viridi, 2003) พบว่า *Streptomyces* spp. ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืชเป็นแหล่งของ IAA ที่ดี เนื่องจากบริเวณรากพืชประกอบด้วยสารอาหารจำนวนมากใช้ในการหลั่งออกมาของรากที่จำเป็นสำหรับ *Streptomyces* เพื่อใช้ในการสังเคราะห์และปล่อย IAA ออกมา *Streptomyces* spp. มีหลายสปีชีส์ที่สามารถผลิต IAA เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ เช่น *S. olivaceoviridis*, *S. rimosus*, *S. Rochei*, *S. griseoviridis* และ *S. lydicus* โดยจะไปเพิ่มการงอกของเมล็ด การยืดยาวของรากและน้ำหนักแห้งของราก (El-Batanony, 2009)

### การผลิตซีเดอโรฟอรัส

ธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบพื้นฐานในธรรมชาติของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปธาตุเหล็กจะอยู่ในรูปสารประกอบที่ละลายน้ำได้ยาก หรือไม่สามารละลายน้ำ ความสามารถในการละลายของเหล็กที่ pH 7.4 ซึ่งปริมาณของการละลายไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ดังนั้น จุลินทรีย์ที่อยู่ในดินจึงต้องผลิตสารที่มีความเจาะจงต่อธาตุเหล็กซึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (0.5 - 1.5 กิโลดาลตัน) (Sun, Lu, & Gao, 2011)

ในดินธาตุเหล็กจะพบเป็น ferric ion ( $Fe^{3+}$ ) ซึ่งจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยได้โดยตรง ดังนั้น จุลินทรีย์จึงต้องผลิตซีเดอโรฟอรัส เป็นสารประกอบที่มีค่า affinity สูง สำหรับ  $Fe^{3+}$  และอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนที่นำเข้าสู่เซลล์ได้ ซีเดอโรฟอรัสของจุลินทรีย์ถูกแบ่งออกเป็นกลุ่ม ได้แก่ Hydroxamates catecholates และ Carboxylates ในดินที่มีแอกติโนแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Streptomyces* มีการรายงานความสามารถในการผลิตซีเดอโรฟอรัส ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืชโดยการแย่งจับธาตุเหล็กในดินบริเวณรอบรากพืช (Carrillo-Castañeda et al., 2002; Sun et al., 2011)

แบคทีเรีย PGPR สามารถป้องกันการแพร่พันธุ์ของเชื้อโรคพืชด้วยการผลิตซีเดอโรฟอรัส โดยซีเดอโรฟอรัสจะไปจับกับธาตุเหล็กบริเวณรอบๆ รากพืช ดังนั้นผลจากการขาดธาตุเหล็กจะสามารถป้องกันเชื้อราสาเหตุของโรคพืชได้ คือทำให้เชื้อราสาเหตุของโรคพืชไม่สามารถแพร่พันธุ์ได้ แต่พืชจะไม่ได้รับผลกระทบจากการลดลงของธาตุเหล็กในบริเวณนั้น เพราะพืชสามารถเจริญได้ในที่มีความเข้มข้นของธาตุเหล็กต่ำ โดยนักวิทยาศาสตร์พบว่า สภาพแวดล้อมที่มีธาตุเหล็กน้อยจะกระตุ้นให้จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดสร้างซีเดอโรฟอรัสขึ้น และเมื่อมีธาตุเหล็กมากขึ้นการสร้างจะถูกยับยั้ง (ภาพ 11) (Ahemad & Kibret, 2014; Hassani, Durán, & Hacquard, 2018)

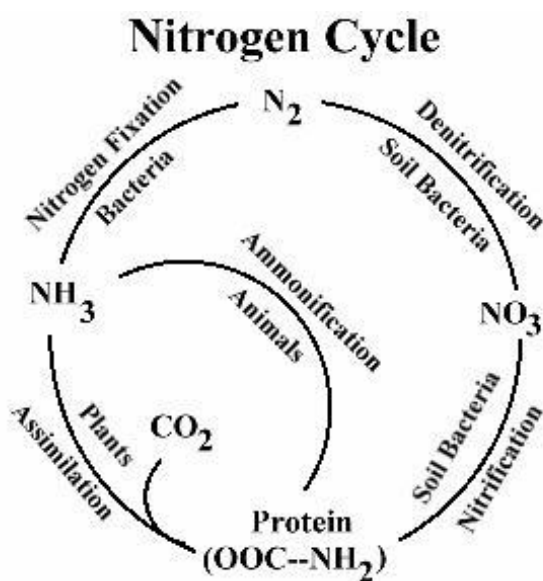


ภาพ 11 กลไกการขนส่งเหล็กเข้าสู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์

### ความสามารถในการตรึงธาตุไนโตรเจน

ไนโตรเจน เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสารอาหารสำหรับพืช ซึ่งกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ ได้แก่ Rhizobiaceae, Bradirhizobiaceae และ Phyllobacteriaceae ที่มีความสามารถในการตรึงธาตุไนโตรเจน พบว่านอกจาก *Frankia* ที่มีความสามารถในการตรึงธาตุไนโตรเจนให้พืช (Benson, D Vanden, & Potter, 2004; A. Sathya et al., 2017) ยังมีรายงานของ Sellstedt (2013) เอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces* มีความสามารถในการตรึงธาตุไนโตรเจน สามารถเจริญในอาหารที่มี N-free medium ที่มีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญของพืช (Sellstedt & Richau, 2013)

สารอินทรีย์ไนโตรเจน ปุ๋ยไนโตรเจนและก๊าซไนโตรเจนที่มีถึง 79 เปอร์เซ็นต์ของก๊าซทั้งหมดในบรรยากาศและในดิน รวมถึงในน้ำ ซึ่งสำหรับจุลินทรีย์บางชนิดจะเกิดกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) สามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจน ( $N_2$ ) จากชั้นบรรยากาศให้อยู่ในรูปแอมโมเนีย ( $NH_3$ ) โดยที่พืชและจุลินทรีย์จะนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยการดูดซึม (Assimilation) เอาแอมโมเนียไปใช้ประโยชน์ในการสร้างโปรตีนในการเจริญเติบโตได้ และแอมโมเนียยังเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของสารประกอบไนโตรเจนต่างๆ เช่น กระบวนการแอมโมนิฟิเคชัน (Ammonification) ที่เกิดจากพืชหรือสัตว์ขับถ่ายของเสียออกมา และถูกย่อยสลายเปลี่ยนเป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจนกลับมาเป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจน เป็นแอมโมเนียเข้าสู่กระบวนการไนตริฟิเคชัน (Nitrification) เป็นการออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ ( $NO_2^-$ ) และออกไซด์เป็นไนเตรท ( $NO_3^-$ ) (ภาพ 12)



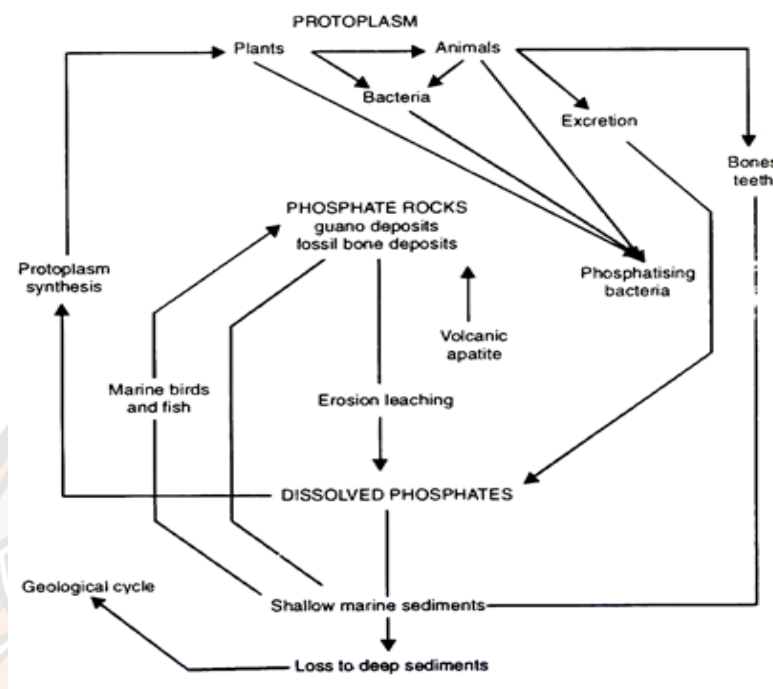
ภาพ 12 วงจรไนโตรเจน

#### การย่อยสลายฟอสเฟต

ฟอสฟอรัสเป็นสารอาหารที่สำคัญของพืชเป็นอันดับ 2 ถัดจากไนโตรเจน หน้าที่สำคัญของฟอสฟอรัสคือเป็นแหล่งพลังงานของพืช ฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในธรรมชาติอยู่ในรูปสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ (Tao, Tian, Cai, & Xie, 2008) ฟอสเฟตที่มีอยู่ในดินมีระดับต่ำ สารอินทรีย์ฟอสเฟตที่มีอยู่ในดินส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ Inositol phosphate (Soil phytate) ที่ถูกสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ และพืชที่มีความเสถียรมากที่สุดในสารอินทรีย์ฟอสเฟตในดิน การให้ฟอสเฟตในทางชีวภาพโดยการย่อยสลายของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและแอกติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ฟอสเฟต (Nandimath, Karad, Gupta, & Kharat, 2017) ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต (PSM) แบคทีเรียที่มีจุลินทรีย์ที่เด่นที่ละลายแร่ฟอสเฟตในธรรมชาติเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ (Sharma, Sayyed, Trivedi, & Gobi, 2013)

ฟอสฟอรัสในดินพบได้ 2 รูปแบบ คือ สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ซึ่งสารอนินทรีย์ส่วนใหญ่อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำหรือละลายช้า การเปลี่ยนรูปของฟอสเฟตในดินที่ไม่ละลายให้เป็นอนินทรีย์ฟอสเฟตในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Phosphate solubilization) ทำให้ฟอสเฟตจะเปลี่ยนจากอนินทรีย์ฟอสเฟตเป็นอนินทรีย์ฟอสเฟต เมื่อพืชและสัตว์ตายจะถูกย่อยสลายเป็นอนินทรีย์ฟอสเฟตในดิน พืชจะดูดกลับไปใช้ และส่วนที่เหลือจะถูกเปลี่ยนเป็นสารอนินทรีย์ฟอสเฟตในรูปออร์โทฟอสเฟต (Orthophosphate) โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ ที่เรียกว่า Mineralization ซึ่งอนินทรีย์ฟอสเฟตบางส่วนจะถูกนำไปใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์กลายเป็นอนินทรีย์ฟอสเฟตภายในเซลล์ เรียกว่า

Immobilization นอกจากนี้อนินทรีย์ฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ง่าย จะกลายเป็นอนินทรีย์ฟอสเฟตที่ละลายยาก (ภาพ 13)



ภาพ 13 วัฏจักรฟอสฟอรัส

## 16. ความสามารถในการควบคุมโรคพืช

เชื้อโรคพืชโดยปกติจะถูกยับยั้งด้วยสารเคมีสังเคราะห์ แต่การใช้สารเคมีที่มากเกินไปทำให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม มากไปกว่านั้นประสิทธิภาพในการกำจัดจะลดลง เนื่องจากมีการพัฒนาของเชื้อโรคที่ทนทาน จึงมีการพัฒนาสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่มีศักยภาพ และความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม โดยการใช้จุลินทรีย์มาลดผลกระทบที่เกิดจากสารต้านจุลินทรีย์ที่เป็นสารสังเคราะห์ (A. Sathya et al., 2017)

จากที่กล่าวมาข้างต้นทำให้มีความน่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตรที่เป็นตัวขับเคลื่อนเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยนำไปพัฒนาและส่งเสริมการเจริญของพืช ลดต้นทุนการผลิต และช่วยรักษาสุขภาพของพืชผลทางการเกษตรในด้านต่างๆ โดยการประยุกต์ใช้ศักยภาพของแอคติโนแบคทีเรียที่มีปฏิสัมพันธ์กับพืชด้วยกลไกต่างๆ ที่กล่าวมา ทำให้มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การแยกเชื้อราก่อโรคในมะนาวที่ใช้ในงานวิจัย

นำใบมะนาวทำการล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 2-3 นาที นำไปทำการแช่ใน 10% Clorox เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง และทำการตัดใบมะนาวด้วยวิธีปราศจากเชื้อ (Sterilization) โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณที่มีรอยแผลสีดำให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Medium (DRBC) บ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และทำการ Restreak เชื้อรา เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์ก่อนนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) และลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X ร่วมกับการใช้เทคนิคทางอณูวิทยาโดยศึกษาลำดับเบสของยีน ITS

#### 3.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแอกติโนแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 22 ไอโซเลท ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส บนอาหาร Hickey-Tresner (HT) agar ห้องปฏิบัติการ MD330 ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ดังตาราง 3

#### ตาราง 3 เชื้อแอกติโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แหล่งที่มา	ไอโซเลท	คัดแยกโดย
1. ดินรอบรากพืช		
- ว่างหางจระเข้	Alo8	(Pimpanuwat, Phuengphak, Mayuwang, Sungthong, & Nakaew, 2016)
- สเลตพังพอนตัวผู้	Bar14	(Pimpanuwat et al., 2016)
- ขมิ้น	TM13 และ TM32	(Nareeluk Nakaew, Rangjaroen, & Sungthong, 2015)
- ไพล	Zin13	(Pimpanuwat et al., 2016)
- มะกรูด	Cit6 และ Cit11	(Pimpanuwat et al., 2016)

แหล่งที่มา	ไอโซเลท	คัดแยกโดย
2. พีช		
- ข้าวหอมนิล	HN3 HN4 HN23 HN28 HN29 HN30 และ HN32	(N. Nakaew & Sungthong, 2018)
- ข้าวเหนียวพันธุ์ลิ้มผ้า	LPR1 และ LPR3	(N. Nakaew & Sungthong, 2018)
- ข้าวหอมนิลสุตะบุตร	HNS3 และ HNS8	(N. Nakaew & Sungthong, 2018)
- ข้าวไรซ์เบอร์รี่	RBRP4	(N. Nakaew & Sungthong, 2018)
- ข้าวญี่ปุ่น	JPN1	(N. Nakaew & Sungthong, 2018)
- ต้นข้าวหอมปทุม	Spt2	(Karn Yaempongsa, Songkran Chuakrut, Siripun Sarin, & Nakaew, 2017)
3. German collection of Microorganisms and Cell culture	<i>Streptomyces sioyaensis</i> DSM 40032 <sup>T</sup>	-

เชื้อราทดสอบที่ใช้ในการศึกษามีจำนวน 2 สายพันธุ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ดังตาราง 4

ตาราง 4 เชื้อราทดสอบที่ใช้ในการศึกษาก่อโรคใบจุด

ไอโซเลท	แหล่งที่มา
1. <i>Aspergillus</i> sp.	งานวิจัยนี้
2. <i>Alternaria alternata</i> TISTR3435	ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัย นเรศวร

เชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการศึกษามีจำนวน 3 สายพันธุ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส บนอาหาร Hickey-Tresner (HT) agar ดังตาราง 5

ตาราง 5 เชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการศึกษาก่อโรคในมะกรูด มะนาว และส้มโอ

ไอโซเลท	แหล่งที่มา
1. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> โรค Canker จากมะกรูด จำนวน 1 สายพันธุ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
2. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> โรค Canker จากมะนาว จำนวน 1 สายพันธุ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
3. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> โรค Canker จากส้มโอ จำนวน 1 สายพันธุ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

### 3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงจากแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Agar well diffusion

#### 3.3.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรียบนอาหาร HT agar ทั้งหมด 22 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นบริเวณที่มีเชื้อเจริญอยู่ นำขึ้นรู้นจำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงในอาหาร ISP2 broth ทำการบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน เมื่อครบกำหนดนำไปทำการปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บส่วนใส (Supernatant) สำหรับเก็บไว้สำหรับทดสอบในครั้งต่อไป

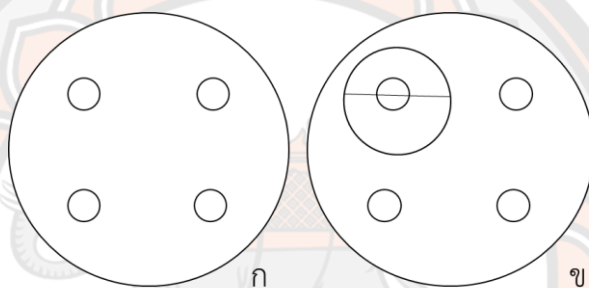
#### 3.3.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

สำหรับเชื้อรา เลี้ยงเชื้อราทดสอบลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

สำหรับเชื้อแบคทีเรีย เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบบนอาหาร Nutrient Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแต่ละเชื้อลงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียเทียบเท่ากับ McFarland 0.5

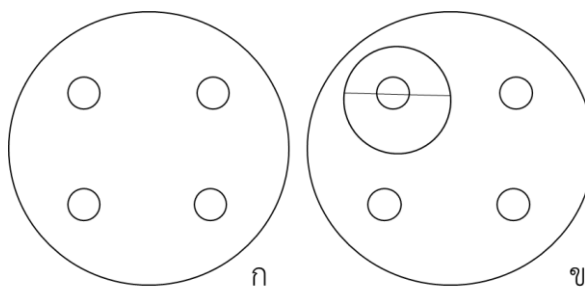
### 3.3.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์

สำหรับเชื้อรา ทำการทดสอบโดยการเจาะหลุมโดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จานละ 4-6 หลุม สำหรับหยอดน้ำเลี้ยง จากข้อ 3.3.1 ลงในหลุม ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นใช้สารละลายสปอร์เชื้อราจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เชื้อรามีการเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมา Spread ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ชุดควบคุม) (ภาพ11) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส จนเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สังเกตโซนการยับยั้ง (Inhibition zone) โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อราเจริญ (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) (Himaman, Thamchaipenet, Pathom-aree, & Duangmal, 2016) ดังภาพ 14



ภาพ 14 ตำแหน่งการเจาะหลุมในจานอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหยอดน้ำเลี้ยง (ก) และตำแหน่งการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสจานอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ (ข)

สำหรับการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ทำการทดสอบโดยใช้ไม้พ่นสำลีจุ่มลงในอาหารเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรียทดสอบปริมาณเชื้อเทียบเท่ากับ McFarland 0.5 ป้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ทำการเจาะหลุมโดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะหลุมจานละ 4-6 หลุม สำหรับหยอดน้ำเลี้ยง จากข้อ 3.3.1 ลงในหลุม ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตโซนการยับยั้ง (Inhibition Zone) โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญ (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) ดังภาพ 15



ภาพ 15 ตำแหน่งการเจาะหลุมในจานอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหยอดน้ำเลี้ยง (ก) และตำแหน่งการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสจานอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ (ข)

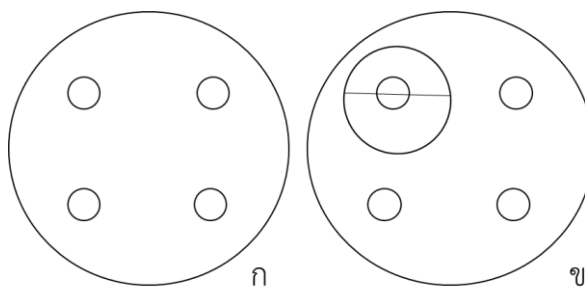
### 3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Disc Diffusion

#### 3.4.1 การเตรียมสารสกัดเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงหรือมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ จากข้อ 3.2.2 ในอาหาร ISP2 broth บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นเติมตัวทำละลาย (Ethyl acetate) ลงในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นทำการแยกส่วนของ Ethyl acetate ออกมาทำการระเหย ด้วยเครื่อง Evaporator ภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บส่วนที่เหลือซึ่งเป็นสารสกัด (Crude extract) นำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

#### 3.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อรา

นำสารสกัด จากข้อ 3.4.1 มาทำการละลายและทำการเจือจางด้วยสาร Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นที่ 50 mg/ml และทำการหยดลงบนแผ่น Antibiotic Assay Paper Discs เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร ปริมาตร 25  $\mu$ l/Disc ทิ้งให้แผ่น Disc แห้งพอหมาดๆ ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมา Spread สปอร์เชื้อราลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และนำแผ่น Disc ลงมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และชุดควบคุม Spread สปอร์เชื้อราไม่มีการวางแผ่น Disc ทำการบ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส จนเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เทียบกับชุดควบคุมที่เป็นจานอาหารเลี้ยงแต่เชื้อรา โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเชื้อรา (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) เปรียบเทียบกับกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน Nystatin ความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml และ Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Himaman et al., 2016) ดังภาพ 16



ภาพ 16 ตำแหน่งการวางแผ่น Antibiotic Assay Paper Discs ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ก) และ ตำแหน่งการวัดขนาดรัศมีโซนการยับยั้งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข)

### 3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งแบคทีเรีย

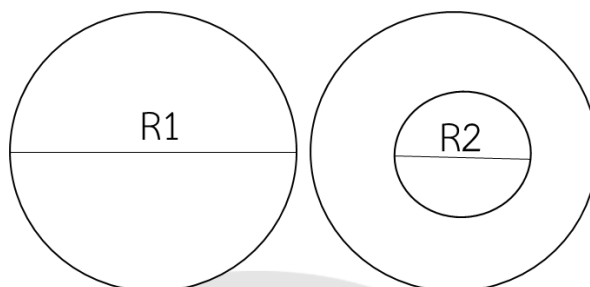
ใช้ไม้พันสำลีจุ่มลงในสารละลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบ จากข้อ 3.2.2 นำมาทำการป้าย (Swab) ให้ทั่วอาหาร NA จากนั้นนำสารสกัด จากข้อ 3.2.1 มาทำการละลายและเจือจางด้วย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ให้มีที่ความเข้มข้นที่ 50 mg/ml และทำการหยดลงบนแผ่น Antibiotic Assay Paper Discs เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร ปริมาตร 25  $\mu$ l/Disc ทิ้งให้แผ่น Disc แห้งพอหมาดๆ ประมาณ 30 นาที จากนั้นใช้คีมคีบ (Forcep) คีบวางลงบนจานอาหาร NA ที่ทำการป้ายแบคทีเรียแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตโซนการยับยั้ง (Inhibition zone) โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญ (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) เปรียบเทียบกับกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน Tetracycline ความเข้มข้น 30  $\mu$ g/ml และ Dimethyl sulfoxide (DMSO)

### 3.5 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียที่ฆ่าเชื้อรา (Minimal Fungicidal Concentration; MFC) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา

นำสารสกัดจากข้อ 3.4.1 มาละลายด้วย DMSO แล้วเจือจางในอาหาร PDA ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ทำการเพาะเชื้อราลงตรงกลางจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส จนเชื้อราในชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดซึ่งทำการวางเชื้อราลงกลางจานอาหาร PDA เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การฆ่าเชื้อราเพื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถการฆ่าเชื้อรา (Prakash et al., 2013) คำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา} = [(R1 - R2)/R1] \times 100$$

เมื่อ R1 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราในงานอาหารเลี้ยงชุดควบคุม และ R2 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราในงานอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ



ภาพ 17 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

**3.6 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Bactericidal Concentration; MBC)**

นำสารสกัดมาทำการละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ทำการเจือจางด้วยอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นต่างๆ ใน Microtiterplate (96-well) ในแถวที่ 1-10 โดยแถวที่ 11 และ 12 เป็น Negative control ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และ DMSO เพียงอย่างเดียว (ทำ 2 ซ้ำ) เติมเชื้อแบคทีเรียทดสอบลงไปทุกแถว หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยสังเกตหลุมที่ใสและไม่มีตะกอนของเชื้อที่กั้นหลุม ถือว่าความเข้มข้นที่หลุมนั้นเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration; MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay ทำการปิเปตเชื้อแบคทีเรียจาก Microtiterplate (96-well) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร NA (ทำ 3 ซ้ำ) เปรียบเทียบกับสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ บ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อตรวจดูการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA

**3.7 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช**

นำเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร HT agar บ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 22 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ ความสามารถในการสร้างสารไซโตไคน์ ความสามารถในการสร้าง

สาร IAA ความสามารถในการละลายสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟต และความสามารถในการสร้างแอมโมเนีย

### 3.7.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารไซเดอโรฟอร์ (Siderophore)

ใช้ห้วงเขี่ยเชื้อตะเชื้อแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร HT agar บ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพาะลงบนอาหาร Chrome Azurol S (CAS) agar (Arora & Verma, 2017) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ตรวจวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสีส้มที่เกิดขึ้นรอบๆ โคลนีย์ของแอกติโนแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) (Tamreihao et al., 2016)

### 3.7.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างสาร Indole-3-acetic acid (IAA)

เพาะเชื้อแอกติโนแบคทีเรียบนอาหาร HT agar บ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ ใช้ปลายของ Pasteur pipette ตัดชิ้นวัุ้นใส่ลงในอาหาร ISP2 broth ที่มี 0.2% L-tryptophan ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ในที่ไม่มีแสง อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ตูดส่วนใสด้านบนมาปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ และปิเปตสารละลาย Salkowski reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (0.5M  $\text{FeCl}_3$  ใน 35 มิลลิลิตร หรือ 35%  $\text{HClO}_4$  2 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สังเกตสีถ้ามี IAA อยู่ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของปริมาณ IAA ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำมาเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย IAA ที่มีความเข้มข้น 10 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตัดแปลงวิธีการมาจาก (Rebecca, 2012) ตัวควบคุม คือ อาหารที่ไม่มีมีการเพาะเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย

### 3.7.3 การทดสอบความสามารถในการละลายสารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์ (Phosphate solubilization)

ใช้ห้วงเขี่ยเชื้อตะเชื้อแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร HT agar บ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพาะลงบนอาหาร Pikovskaya's agar เพื่อดูการสลายฟอสเฟต ทำการบ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตถ้ามีการย่อยสลายฟอสเฟตจะเกิดโซนใส (Clear zone) รอบๆ เชื้อแอกติโนแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) (Chaiarn, Pathom-aree, Sujada, & Lumyong, 2018) และคำนวณหา ค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการละลาย จากสูตร ดังนี้ (Ammar, 2016) และหาสัดส่วนการละลายสารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์ จากอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคลนีย์



### 3.7.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างแอมโมเนีย

เพาะเชื้อแอกติโนแบคทีเรียบนอาหาร HT agar นาน 1 สัปดาห์ บ่มที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส ใช้ปลายของ Pasteur pipette ตัดชิ้นวุ้นเชื้อแอกติโนแบคทีเรียใส่ลงในอาหาร Peptone water บ่มบนเครื่องเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นทำการเติม Nessler's reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร สังเกตการเปลี่ยนสีถ้าสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลถึงเหลือง แสดงว่าให้ผลบวก (Tamreihao et al., 2016) ตัวควบคุมคือ อาหารที่ไม่มีการเพาะเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย

### 3.8 การประเมินศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดของแอกติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคและส่งเสริมการเจริญของมะนาว

คัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลทที่มีความสามารถในการยับยั้ง *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ทั้ง 3 สายพันธุ์ และมีศักยภาพในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชมาทำการประเมินศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดในการยับยั้งโรคแคงเกอร์และส่งเสริมการเจริญของมะนาว ดังต่อไปนี้

#### 3.8.1 การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดมะนาว

คัดเลือกเมล็ดมะนาวโดยทำการสุ่มเมล็ดที่มีขนาดเท่าๆกัน โดยใช้เมล็ดมะนาว 6 เมล็ดต่อการทดลอง นำเมล็ดมะนาวมาแช่ในน้ำเลี้ยงของเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย จากข้อ 3.2.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บใส่ใน Moist chamber เป็นเวลา 15 วัน เปรียบเทียบกับการแช่ในสารละลาย IAA (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) โดยมีชุดควบคุม เช่น น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (Thilagam & Hemalatha, 2019) และอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth การทดลองแบ่งเป็น 4 การทดลองและทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เมื่อครบกำหนดนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การงอก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอก} = (\text{จำนวนเมล็ดที่งอก} \times 100) / \text{จำนวนเมล็ดที่เพาะ}$$

#### 3.8.2 การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดของแอกติโนแบคทีเรียต่อการเจริญของมะนาวในระยะการเพาะเมล็ด

คัดเลือกเมล็ดมะนาว ทำการสุ่มเมล็ดมะนาวที่มีขนาดเท่าๆกัน แต่ละการทดลองใช้เมล็ดมะนาว 6 เมล็ด นำเมล็ดมะนาวมาแช่ในน้ำเลี้ยงของเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย จากข้อ 3.3.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการแช่ในสารละลาย IAA (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) โดยมีชุดควบคุม เช่น น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth จากนั้นนำมาเพาะในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง โดยทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ทำการศึกษาเป็นเวลา 1 เดือน เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นทำการศึกษาความยาวราก (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) จำนวนราก (หน่วยเป็นราก) จำนวนใบ

(หน่วยเป็นใบ) น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง โดยเทียบกับชุดควบคุมที่ทำการแช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (Giassi, Kiritani, & Kupper, 2016)

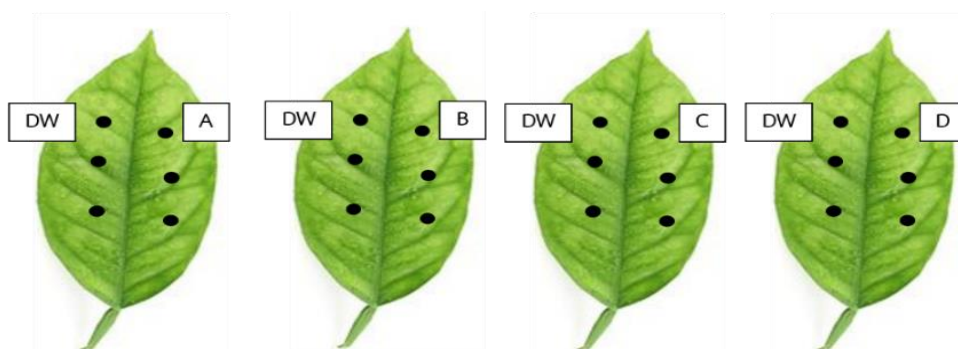
### 3.8.3 การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงและสารสกัดของแอคติโนแบคทีเรียต่อการเจริญของมะนาวในระยะปักชำกิ่ง

คัดเลือกกิ่งมะนาวที่ไม่มีการเป็นโรครากไม่แก่หรืออ่อนจนเกินไป ความยาวประมาณ 15 เซนติเมตร เฉือนบริเวณกิ่งด้านล่างเป็นแนวเอียง เหลือใบ 4 ใบต่อกิ่งก่อนนำไปทำการทดสอบ นำกิ่งของต้นมะนาวมาแช่ในน้ำเลี้ยงของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย จากข้อ 3.3.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสารละลาย IAA (100 µg/ml) โดยมีชุดควบคุม เช่น น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth จากนั้นนำมาเพาะในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง โดยทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ทำการศึกษาเป็นเวลา 1 เดือน เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นทำการศึกษาคความยาวราก (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) จำนวนราก (หน่วยเป็นราก) จำนวนใบ (หน่วยเป็นใบ) โดยเทียบกับชุดควบคุมที่ทำการแช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (Giassi, Kiritani, & Kupper, 2016)

### 3.8.4 ประเมินศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในใบมะนาว

คัดเลือกใบมะนาวที่มีขนาดเท่าๆกัน ไม่แก่หรืออ่อนจนเกินไป แต่ละการทดลองใช้ใบมะนาว 3 ใบ จำนวน 4 การทดลอง นำใบมะนาวมาล้างด้วยน้ำประปา จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอกโดยแช่ในคลอรีน 10% เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้ออีก 2 - 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นใช้เข็มจิ้มใบให้เกิดแผล หยดสารสกัดเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย จากข้อ 3.3.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อจุดแผล อีกซีกใบหนึ่งของใบเป็นชุดควบคุมโดยหยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนการหยดเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (ภาพที่ 18) และหยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียทดสอบปริมาณเชื้อเทียบเท่ากับ McFarland 0.5 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อจุดแผลเก็บใบมะนาวใน Moist chamber ที่ใส่ในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อให้มีความชื้นที่เหมาะสมแก่การเกิดโรค ทำการบ่มเป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้องในที่ที่ไม่มีแสง บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงโรค โดยทำทั้งหมด 6 จุดต่อใบ (Hastuti, Lestari, Suwanto, & Saraswati, 2012) การทดลองแบ่งเป็น 4 การทดลองและทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ โดยเทียบกับชุดควบคุมที่ทำการแช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = (\text{จำนวนใบที่พบโรค} \times 100) / \text{จำนวนใบทั้งหมด}$$



ภาพ 18 การทดลองในใบมะนาวจำนวน 4 ชุดการทดลอง

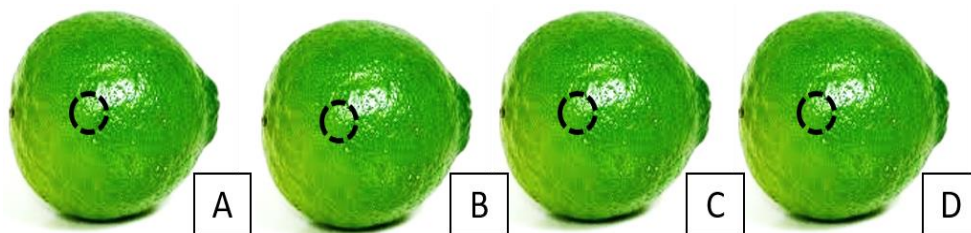
- หมายเหตุ: (A) สารสกัด strain Bar 14 ความเข้มข้น 1 mg/ml กับ สารละลายแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จากมะนาว  
 (B) สารสกัด strain Bar 14 ความเข้มข้น 1 mg/ml  
 (C) การใช้เข็มจิ้มใบให้เกิดรอยแผล  
 (D) สารละลายแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จากมะนาว

### 3.8.5 การประเมินศักยภาพของสารสกัดแอกติโนแบคทีเรียในการนำไปใช้ในการเคลือบของผลมะนาว

การคัดเลือกผลมะนาวสายพันธุ์แป้นพิจิตร ทำการเลือกผลมะนาวที่ไม่เป็นโรคขนาดเท่าๆกัน ไม่แก่หรืออ่อนจนเกินไป แต่ละการทดลองใช้ผลมะนาว 3 ผล จำนวน 4 การทดลอง

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบลงบนผิวมะนาว ทำให้เกิดแผลที่ผิวมะนาวโดยการเอาเข็มเขี่ยป้ายบนผิวมะนาว โดยนำไม้พันสำลีจุ่มเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่มีปริมาณเชื้อเทียบเท่ากับ McFarland 0.5 บำยบริเวณที่เป็นแผล ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำผลมะนาวไปจุ่มสารสกัดที่เตรียมไว้ จากข้อ 3.4.1 ที่นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml และเติม 0.02 % Tween 80 เพื่อลดแรงตึงผิว ทำการเคลือบบนผิวผลมะนาว โดยทำการแช่ผลมะนาวเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นผึ่งให้แห้ง บรรจุใส่กล่อง สังเกตการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่มีการปลูกเชื้อทุกๆ 7 วัน เก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือนที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Berg, Marten, Minkwitz, & Brückner, 2001) ออกแบบการทดลองแบ่งเป็น 4 การทดลองและทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ โดยเทียบกับชุดควบคุมที่ทำการแช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = (\text{จำนวนผลที่พบโรค} \times 100) / \text{จำนวนผลทั้งหมด}$$



ภาพ 19 การทดลองบนผลมะนาวจำนวน 4 ชุดการทดลอง

- หมายเหตุ: (A) สารสกัด strain Bar 14 ความเข้มข้น 1 mg/ml กับ สารละลายแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จากมะนาว  
 (B) สารสกัด strain Bar 14 ความเข้มข้น 1 mg/ml  
 (C) การใช้ Cork borer ให้เกิดรอยแผล  
 (D) สารละลายแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จากมะนาว

### 3.9 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดโดยวิธี MTT assay

เลี้ยงเชื้อแอกติโนแบคทีเรียบนอาหาร HT agar ที่มีอายุประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นใช้ปลายของ Pasteur pipette ตัดชิ้นวุ้นเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย จากนั้นเตรียมสารสกัดของเชื้อแอกติโนแบคทีเรียโดยการเลี้ยงในอาหาร ISP2 broth บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน จากนั้นทำการส่งสารสกัดไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของมนุษย์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดโดยวิธี MTT assay ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) สารสกัด Bar14 นำเซลล์  $5 \times 10^5$  cells/well มาบ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 50 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  โดยเซลล์ควบคุมคือเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารสกัดและมีตัวทำละลาย 0.1% DMSO แล้วบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม MTT แล้วบ่มต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูด supernatant ทิ้งแล้วเติม DMSO เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ formazan แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์จะแสดงออกมาในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต โดยการคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตของเซลล์จะเทียบกับเซลล์ควบคุมที่คิดเป็นร้อยละ 100 หากความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ความเข้มข้น 100 และ 50  $\mu\text{g/ml}$

### 3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เก็บข้อมูลและทำการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One -Way ANOVA) ที่ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยใช้โปรแกรม Statistics Package for Social Sciences (SPSS) เวอร์ชัน 23



## บทที่ 4

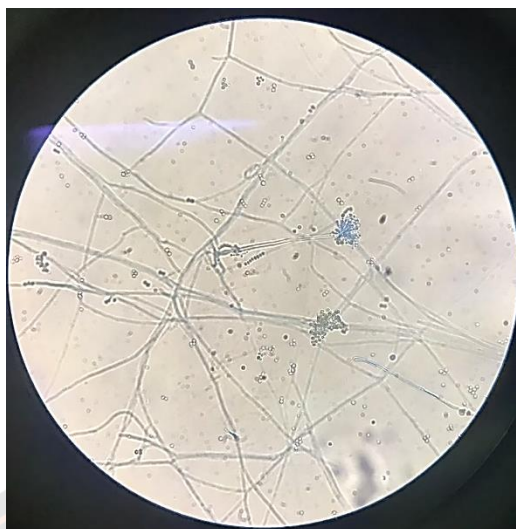
### ผลการวิจัย

#### 4.1 การแยกเชื้อรา *Aspergillus* sp. ที่ก่อโรคในমনาวที่ใช้ในการทดสอบงานวิจัย

เชื้อราที่แยกได้จากใบมนาวที่เป็นโรค เมื่อนำมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีลักษณะโคโลนีสีเทาดำ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่าสปอร์ต่อกันเป็นโซ่ เส้นใยไม่มีสี มีผนังกัน ก้านชูเป็นก้านยาว ไม่แตกกิ่งที่บริเวณปลายโปร่งออกเป็นเวสสิเคิล โคนิเดียต่อกันเป็นสายยาวไม่แตกกิ่งก้าน ผลการศึกษาลำดับเบสของยีน ITS เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Blast พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Aspergillus* sp. โดยมี % Similarity เท่ากับ 99% เมื่อทำการศึกษาพบว่าเป็นเชื้อราก่อโรคในมนาว



ภาพ 20 ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน



ภาพ 21 ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X

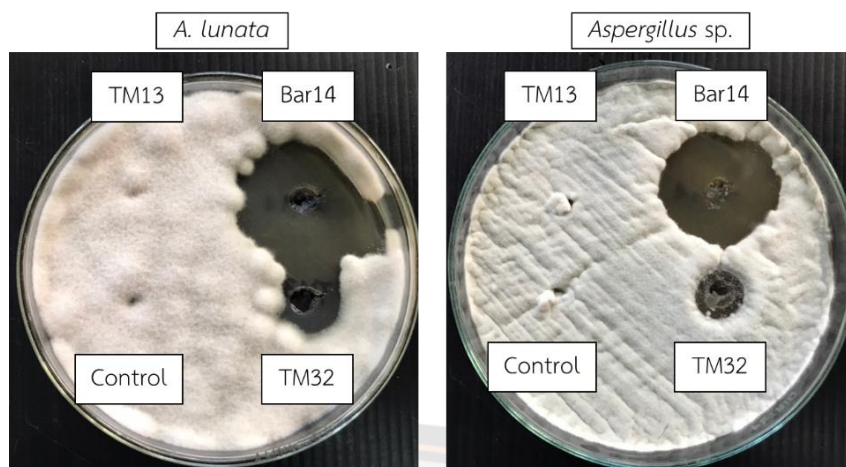
#### 4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชตระกูลส้ม

##### 4.2.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Agar well diffusion

ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Agar well diffusion โดยมีเชื้อราทดสอบ 2 สายพันธุ์ คือ เชื้อรา *A. lunata* และ *Aspergillus sp.* พบว่ามี 3 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้คือ ไอโซเลท Bar14, Spt2 และ Tm32 โดยไอโซเลท Bar14 มีความสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเท่ากับ  $29.00 \pm 0.00$  และ  $26.67 \pm 0.58$  เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *A. lunata* และ *Aspergillus sp.* ตามลำดับ ดังตาราง 6 ภาพ 22

ตาราง 6 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Agar well diffusion

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเชื้อรา (มม.) $\pm$ SD	
	<i>A. lunata</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
Bar14	$29.00 \pm 0.00^a$	$26.67 \pm 0.58^a$
Spt2	$5.00 \pm 0.00^b$	$0.00 \pm 0.00^b$
Tm32	$8.00 \pm 0.00^b$	$7.00 \pm 0.00^b$



ภาพ 22 โชนการยับยั้งเชื้อรา *A. lunata* และ *Aspergillus sp.* โดยวิธี Agar well diffusion

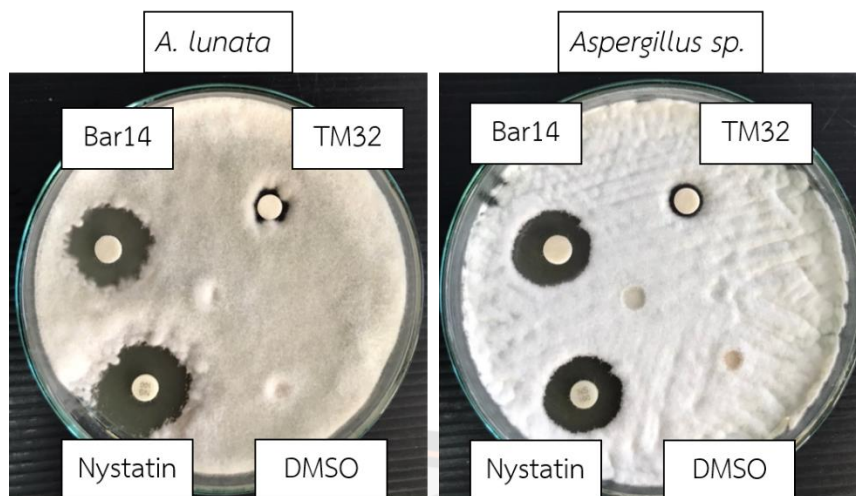
#### 4.2.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Disc Diffusion

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดหยาบของแอคติโนแบคทีเรียโดยวิธี Disc Diffusion พบว่าไอโซเลท Bar14 ยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดีที่สุดทั้งเชื้อรา *A. lunata* และ *Aspergillus sp.* ดังตาราง 7 และ ภาพ 23

ตาราง 7 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโชนการยับยั้งเชื้อรา *A. lunata* และ *Aspergillus sp.* โดยวิธี Disc Diffusion

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโชนการยับยั้งเชื้อรา (มม.) $\pm$ SD	
	สายพันธุ์ก่อโรคเชื้อรา <i>A. lunata</i>	สายพันธุ์ก่อโรคเชื้อรา <i>Aspergillus sp.</i>
Bar14 ความเข้มข้น (30 $\mu$ g/Disc)	14.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	13.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
Tm32 ความเข้มข้น (30 $\mu$ g/Disc)	7.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	7.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
DMSO (30 $\mu$ l/Disc)	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
Nystatin (100 $\mu$ g/Disc)	8.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	5.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>





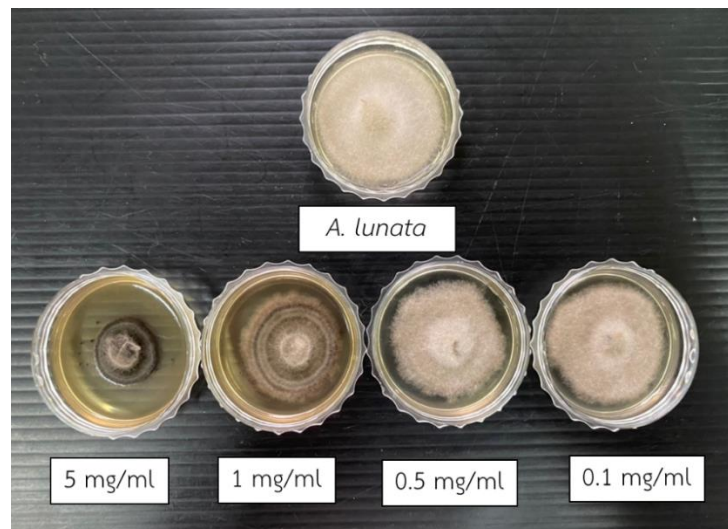
ภาพ 23 ผลการยับยั้งเชื้อรา *A. lunata* และ *Aspergillus sp.* ของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Disc Diffusion

#### 4.2.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถฆ่าเชื้อรา (Minimal Fungicidal Concentration; MFC) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา

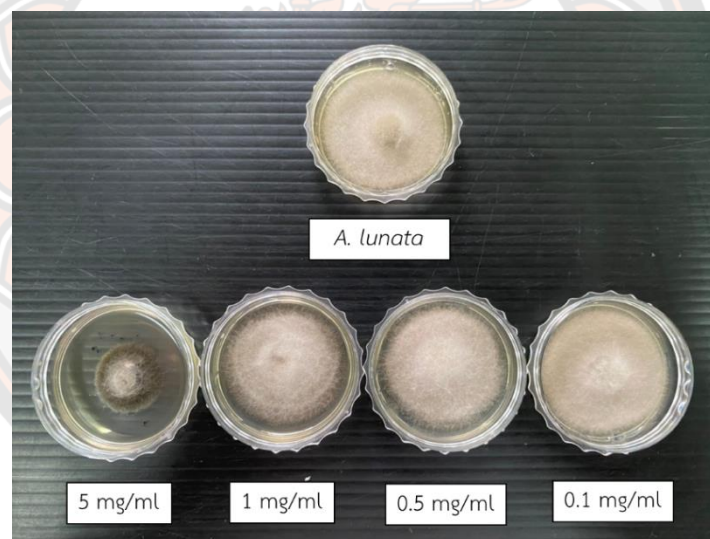
ผลการทดสอบพบว่าไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (5 mg/ml) สารสกัดจากไอโซเลท Bar14 และ TM32 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *A. lunata* เท่ากับ 54.54% และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus sp.* เท่ากับ 53.13% และ 62.50% ตามลำดับ ดังตาราง 8 และ 9 (ภาพที่ 24, 25, 26 และ 27)

#### ตาราง 8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. lunata*

ความเข้มข้น ของสารสกัด	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. lunata</i>			
	5 mg/ml	1 mg/ml	0.5 mg/ml	0.1 mg/ml
Bar14	54.54%	24.24%	21.21%	15.15%
TM32	54.54%	24.24%	12.12%	3.03%



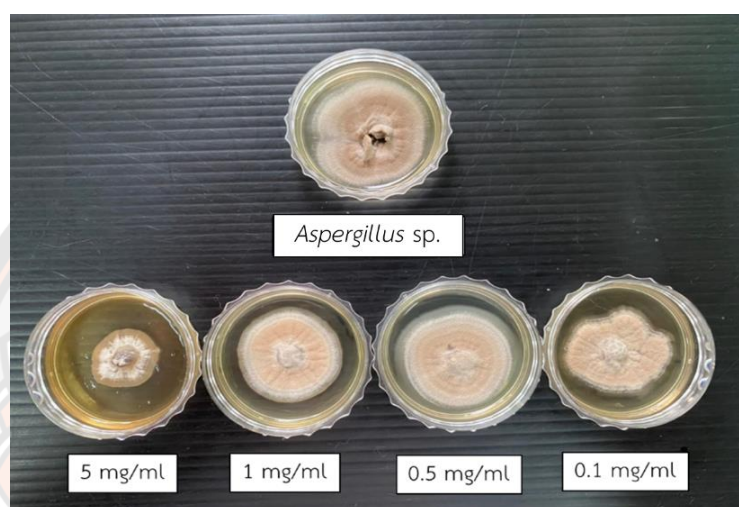
ภาพ 24 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. lunata* ของสารสกัดจากไอโซเลท Bar14



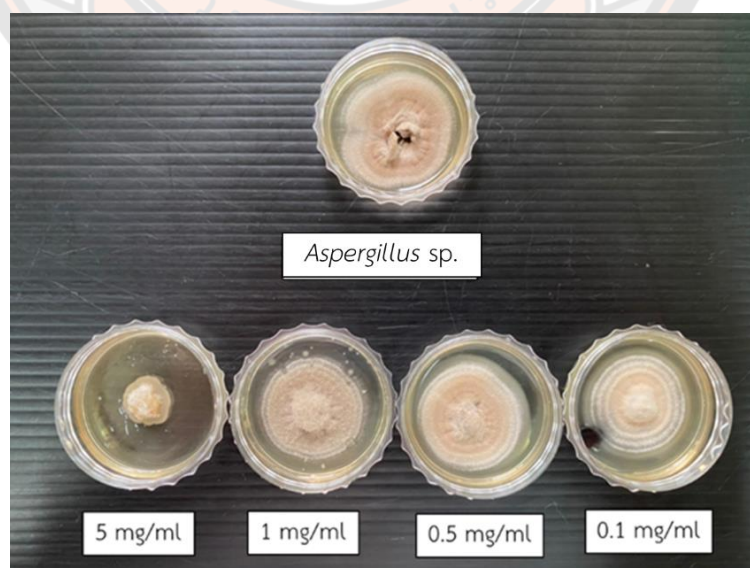
ภาพ 25 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. lunata* ของสารสกัดจากไอโซเลท TM32

ตาราง 9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp.

ความเข้มข้น ของสารสกัด	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp.			
	5 mg/ml	1 mg/ml	0.5 mg/ml	0.1 mg/ml
Bar14	53.13%	37.50%	18.52%	18.52%
TM32	62.50%	25.00%	15.63%	15.63%



ภาพ 26 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ของสารสกัดจากไอโซเลท Bar14



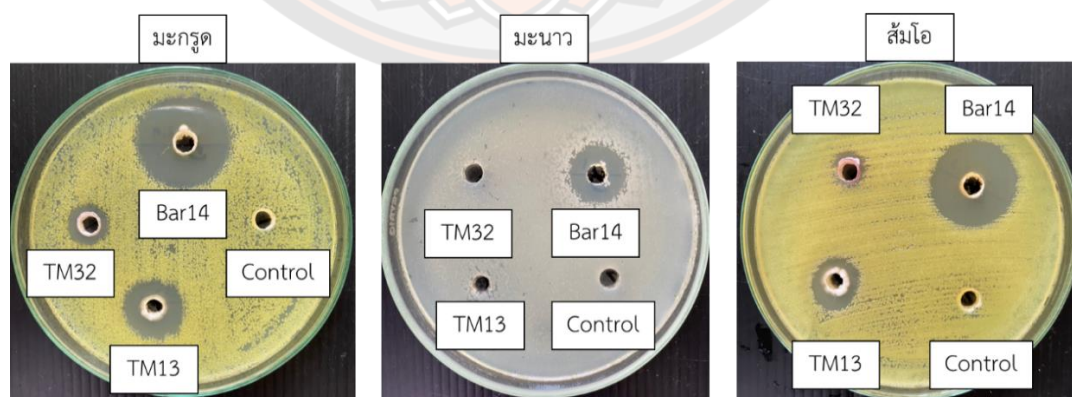
ภาพ 27 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ของสารสกัดจากไอโซเลท TM32

#### 4.2.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์ในมะกรูด มะนาวและส้มโอ โดยวิธี Agar well diffusion

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์ในมะกรูด มะนาว และส้มโอ พบว่า ไอโซเลท Bar14 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ  $29.00 \pm 0.00$ ,  $26.67 \pm 0.58$  และ  $24.33 \pm 0.58$  มม. ตามลำดับ ดังตารางที่ 10 ภาพที่ 28

ตาราง 10 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากมะกรูด มะนาวและส้มโอ

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (มม.) $\pm$ SD		
	สายพันธุ์ก่อโรคในมะกรูด	สายพันธุ์ก่อโรคในมะนาว	สายพันธุ์ก่อโรคในส้มโอ
Bar14	$29.00 \pm 0.00^a$	$26.67 \pm 0.58^a$	$24.33 \pm 0.58^a$
Cit6	$0.00 \pm 0.00^b$	$2.33 \pm 0.58^b$	$0.00 \pm 0.00^b$
TM13	$11.00 \pm 0.00^c$	$0.00 \pm 0.00^c$	$13.33 \pm 0.57^c$
Tm32	$8.00 \pm 0.00^c$	$0.00 \pm 0.00^c$	$7.00 \pm 0.00^c$



ภาพ 28 โซนการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี Agar well diffusion

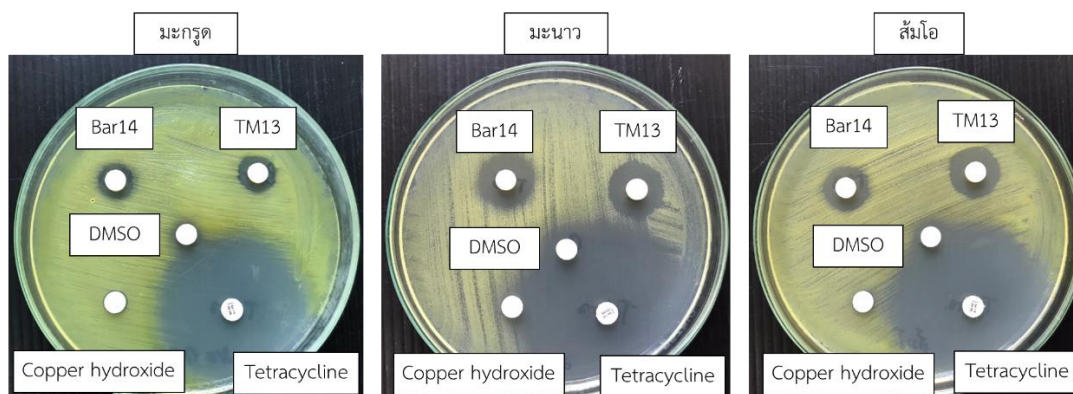
จากนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลทที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์จากวิธี Agar well ที่มีความสามารถสูงสุดในการยับยั้ง *X. axonopodis* pv. *citri* ทั้ง 3 สายพันธุ์ จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ Bar14, TM13, และ TM32 มาทำการทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Disc Diffusion ในการทดสอบต่อไป

#### 4.2.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เป็นสาเหตุของโรคในมะกรูด มะนาวและส้มโอ โดยวิธี Disc Diffusion

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์ในมะกรูด มะนาวและส้มโอ พบว่า ไอโซเลท Bar14 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ  $13.00 \pm 0.00$ ,  $15.00 \pm 0.00$  และ  $15.00 \pm 0.00$  มม. ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ Tetracycline พบว่าสามารถให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ  $39.00 \pm 0.00$ ,  $40.00 \pm 0.00$  และ  $40.00 \pm 0.00$  มม. ตามลำดับ ดังตารางที่ 11 ภาพที่ 29

ตาราง 11 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของแอกติโนแบคทีเรียเมื่อทดสอบโดยวิธี Disc Diffusion

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (มม.) $\pm$ SD		
	สายพันธุ์ก่อโรค ในมะกรูด	สายพันธุ์ก่อโรคใน มะนาว	สายพันธุ์ก่อโรค ในส้มโอ
Bar14	$13.00 \pm 0.00^a$	$15.00 \pm 0.00^a$	$15.00 \pm 0.00^a$
ความเข้มข้น (30 $\mu$ g/Disc)			
TM13	$11.00 \pm 0.00^a$	$15.00 \pm 0.00^a$	$14.00 \pm 0.00^a$
ความเข้มข้น (30 $\mu$ g/Disc)			
DMSO (30 $\mu$ l/Disc)	$0.00 \pm 0.00^b$	$0.00 \pm 0.00^b$	$0.00 \pm 0.00^b$
Tetracycline (30 $\mu$ g/Disc)	$39.00 \pm 0.00^c$	$40.00 \pm 0.00^c$	$40.00 \pm 0.00^c$
Copper hydroxide (300 $\mu$ g/Disc)	$0.00 \pm 0.00^b$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00^b$



ภาพ 29 โชนการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียโดยวิธี Disc Diffusion

#### 4.2.6 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Bactericidal Concentration; MBC)

ผลการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท Bar14 ที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุโรคแคงเกอร์ โดยพบว่า ผลการทดสอบในสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในมะกรูด และมะนาว มีค่า MIC และ MBC น้อยกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทดสอบ ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) และผลการทดสอบในสายพันธุ์ที่ก่อโรคในส้มโอมีค่า MIC เท่ากับ  $5 \mu\text{g/ml}$  ค่า MBC  $10 \mu\text{g/ml}$  และสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท TM13 พบว่า ผลการทดสอบในสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในมะกรูด มีค่า MIC เท่ากับ  $20 \mu\text{g/ml}$  ค่า MBC  $25 \mu\text{g/ml}$  ในสายพันธุ์ที่ก่อโรคในมะนาว มีค่า MIC และ MBC น้อยกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทดสอบ ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) และในสายพันธุ์ที่ก่อโรคในส้มโอมีค่า MIC และ MBC มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ ( $500 \mu\text{g/ml}$ ) และสารละลายคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ มีค่า MIC และ MBC มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ ( $500 \mu\text{g/ml}$ ) ในแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์

#### 4.3 ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช

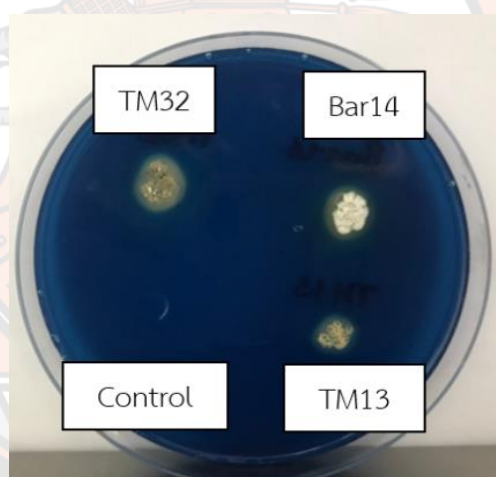
ทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 22 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช

#### 4.3.1 ความสามารถในการสร้างสารไซเตอโรฟอรั

แอกติโนแบคทีเรียที่สร้างไซเตอโรฟอรั จะพบไซนีสีสัมรอบๆโคโลนี ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางไซนีสีสัม ผลการวิจัย พบว่า แอกติโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไซเตอโรฟอรัได้จะเกิดการเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีส้มรอบๆโคโลนี คือไอโซเลท Bar14 และ TM32 ดังตาราง 12 และ ภาพ 30

ตาราง 12 ค่าเฉลี่ยไซนีสัมการสร้างสารไซเตอโรฟอรัเมื่อทดสอบบนอาหาร CAS agar

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยขนาดโคโลนี แอกติโนแบคทีเรีย (มม.)	ค่าเฉลี่ยขนาดไซนีสัม การสร้างสารไซเตอโรฟอรั (มม.) $\pm$ SD
Bar14	5	11.67 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>
Tm32	5	20.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>



ภาพ 30 การสร้างสารไซเตอโรฟอรับนอาหาร CAS agar

#### 4.3.2 ความสามารถในการสร้างสาร IAA

ผลการทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 broth ที่เติม 0.2% L-tryptophan พบว่า มีแอกติโนแบคทีเรีย 7 ไอโซเลทที่สามารถสังเคราะห์ IAA ได้ โดยพบว่าผลจากการนำน้ำเลี้ยงและสารสกัดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หลังการเติมสารละลาย Salkowsky's reagent เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงเหลือง เทียบกับสารละลายมาตรฐานพบว่าน้ำเลี้ยงของไอโซเลท TM13 ให้

ปริมาณ IAA สูงสุดเท่ากับ  $0.041 \pm 0.00$   $\mu\text{g/ml}$  ดังตาราง 13 (ภาพ 31) และเมื่อทำการวัดปริมาณ IAA ในสารสกัดพบว่า ในสารสกัดของทุกไอโซเลทไม่มี IAA อาจเนื่องจาก ความเข้มข้นของการละลาย สารสกัดด้วย DMSO หรือโดนตัวทำละลาย Ethyl acetate และกระบวนการระเหยออกด้วยเครื่อง Evaporator ภายใต้อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสที่ไม่เหมาะสม จึงไม่นำไปทดสอบในการ ส่งเสริมต่อการเจริญของมะนาว

ตาราง 13 ปริมาณการสร้างสาร IAA ( $\mu\text{g/ml}$ )

ไอโซเลท	ปริมาณสาร IAA ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	ในน้ำเลี้ยง	ในสารสกัด
Alo8	$0.020 \pm 0.00^a$	$0.00 \pm 0.00^a$
Bar14	$0.026 \pm 0.00^a$	$0.00 \pm 0.00^a$
Cit6	$0.011 \pm 0.00^b$	$0.00 \pm 0.00^a$
Cit11	$0.018 \pm 0.00^b$	$0.00 \pm 0.00^a$
TM13	$0.041 \pm 0.00^c$	$0.00 \pm 0.00^a$
Tm32	$0.038 \pm 0.00^c$	$0.00 \pm 0.00^a$
Zin13	$0.031 \pm 0.00^c$	$0.00 \pm 0.00^a$



ภาพ 31 การสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ของแอคติโนแบคทีเรียเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 broth ที่มี 0.2% L-tryptophan

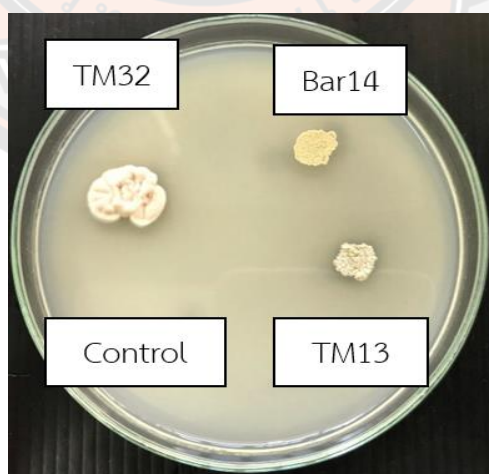


### 4.3.3 ความสามารถในการละลายสารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์

ผลการทดสอบความสามารถในการละลายสารประกอบฟอสเฟตของแอกติโนแบคทีเรียบนอาหาร Pikovskaya's agar โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (Solubilization zone) บริเวณรอบโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรีย พบว่า ไอโซเลท TM13 สามารถละลายฟอสเฟตได้โดยให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสเท่ากับ  $6.67 \pm 0.58$  มม. และมีอัตราการส่วนการละลายสารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์เท่า 1.33 ดังตาราง 14 ภาพ 32

ตาราง 14 ค่าเฉลี่ยและโซนการละลายสารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์บนอาหาร Pikovskaya's agar

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแอกติโนแบคทีเรีย (มม.)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (มม.) $\pm$ SD	อัตราการส่วนการละลายสารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์
Bar14	6	$0.00 \pm 0.00^a$	$0^a$
TM13	7	$13.67 \pm 0.58^b$	$1.33^b$
Tm32	10	$0.00 \pm 0.00^a$	$0^a$



ภาพ 32 การละลายสารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์บนอาหาร Pikovskaya's agar

#### 4.3.4 ความสามารถในการสร้างแอมโมเนีย

ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างแอมโมเนียเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Peptone water ที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า แอคติโนแบคทีเรีย จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ Alo8, Bar14, Cit6, Cit11, Sio, Spt2, TM13, TM32 และ Zin13 ผลิตแอมโมเนียได้

#### 4.4 การประเมินศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท Bar14 ในการยับยั้งโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและส่งเสริมการเจริญของมะนาว

จากการทดสอบพบว่า ไอโซเลท Bar14 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. lunata* และ *Aspergillus* sp. และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ทั้ง 3 สายพันธุ์จากมะนาว มะกรูดและส้มโอได้ดีที่สุด รวมถึงความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ การสร้างสารไซโตโรพอร์ การสร้างฮอร์โมน IAA และการสร้างแอมโมเนีย ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกไอโซเลท Bar14 มาทำการประเมินศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดในการยับยั้งโรคที่เกิดจากแบคทีเรียและส่งเสริมการเจริญของมะนาว และเนื่องจากในสารสกัดไม่มี IAA ดังนั้นไม่นำสารสกัดมาทำการทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดมะนาวและการส่งเสริมการเจริญในระยะการเพาะเมล็ดและปักชำกิ่ง

##### 4.4.1 ผลของน้ำเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดมะนาว

เมล็ดมะนาวที่ผ่านการแช่ในน้ำเลี้ยงเทียบกับชุดควบคุมที่ทำการแช่ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ สารละลาย IAA (100  $\mu\text{g/ml}$ ) และอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอกในน้ำเลี้ยงมากกว่าน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเท่ากับ 94.44%, 37.26% 66.67% และ 38.89% ตามลำดับ (Thilagam & Hemalatha, 2019) ดังภาพ 33 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลท Bar14 มีความสามารถในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดมะนาวดีที่สุด





ภาพ 33 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลท Bar14 ต่อการงอกของเมล็ดมะนาว

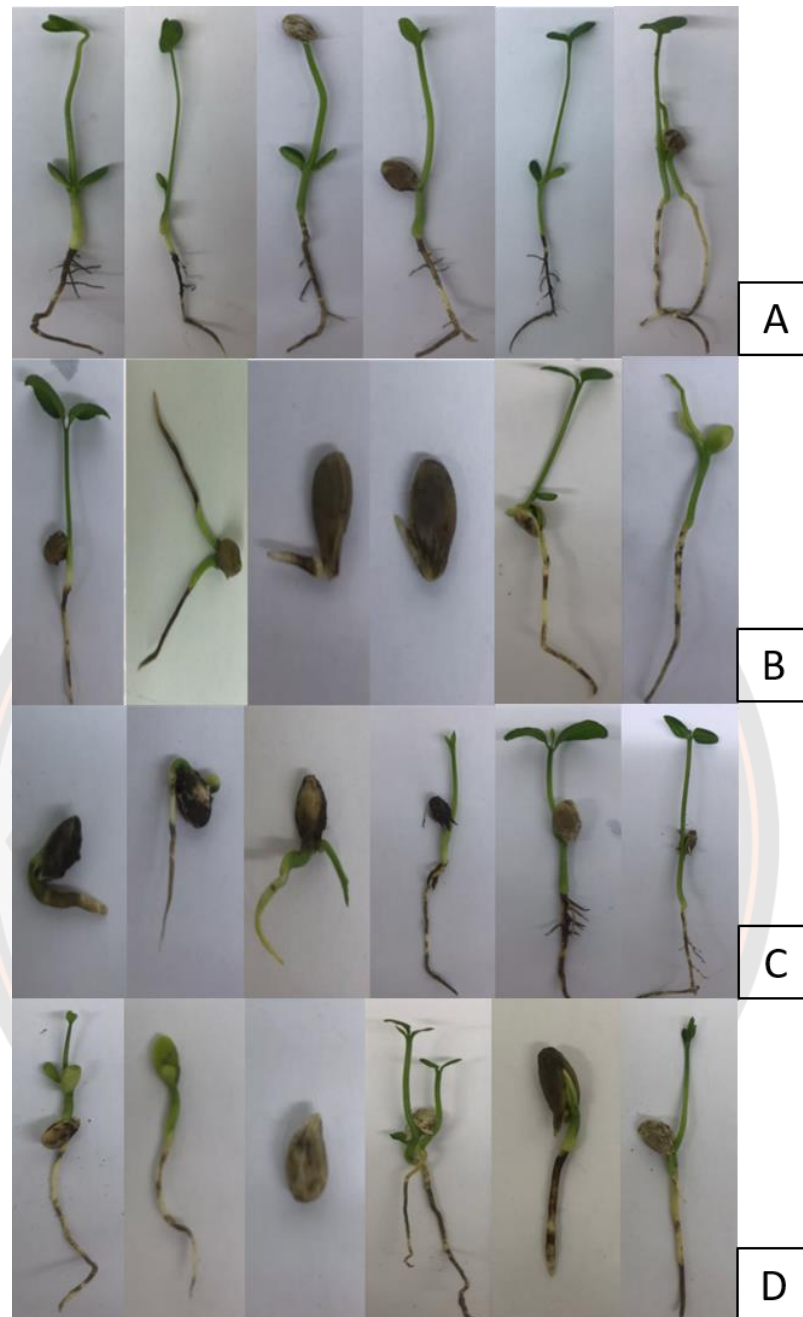
- หมายเหตุ: (A) น้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14  
 (B) น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ  
 (C) สารละลาย IAA (100 µg/ml)  
 (D) อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth

#### 4.4.2 การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงของแอกติโนแบคทีเรียต่อการเจริญของมะนาวใน ระยะการเพาะเมล็ด

ผลการนำเมล็ดมะนาวที่ผ่านการแช่ในน้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14 เทียบกับชุดควบคุม ที่ทำการแช่ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ, สารละลาย IAA (100 µg/ml) และอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทำการศึกษาความยาวรากที่ผ่านการแช่ในน้ำเลี้ยง พบว่าให้ค่าเฉลี่ยของความยาวรากเท่ากับ 25.33 มิลลิเมตร จำนวนรากมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.50 มิลลิเมตร และจำนวนใบให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.44 ใบ (ตาราง 15) ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.22 และ 0.14 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 16) โดยเทียบกับชุดควบคุมที่ทำการแช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ สารละลาย IAA (100 µg/ml) และอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth จึงสามารถสรุปได้ว่า น้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14 สามารถกระตุ้นการเจริญของเมล็ดมะนาวได้ดีกว่าการแช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ, สารละลาย IAA (100 µg/ml) และอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth ดังภาพ 34

ตาราง 15 ผลการศึกษาค่าเฉลี่ยของน้ำเลี้ยงต่อการเจริญของมะนาวในระยะการเพาะเมล็ด

การทดลอง	ค่าเฉลี่ยความยาวราก (มม.) ±SD	ค่าเฉลี่ยจำนวนราก (ราก) ±SD	ค่าเฉลี่ยจำนวน ใบ (ใบ) ±SD
น้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14	25.33±8.90 <sup>a</sup>	1.17±0.41 <sup>a</sup>	2.44±0.81 <sup>a</sup>
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	13.00±2.67 <sup>b</sup>	0.67±0.51 <sup>a</sup>	1.39±0.53 <sup>a</sup>
สารละลาย IAA (100 µg/ml)	11.50±4.67 <sup>b</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	0.89±0.34 <sup>b</sup>
อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth	24.30±6.21 <sup>a</sup>	0.83±0.41 <sup>a</sup>	2.22±0.81 <sup>a</sup>



ภาพ 34 ผลของน้ำเลี้ยงต่อการเจริญของมะนาวในระยะการเพาะเมล็ด

- หมายเหตุ: (A) น้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14  
 (B) น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ  
 (C) สารละลาย IAA (100  $\mu\text{g/ml}$ )  
 (D) อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth

ตาราง 16 ผลการศึกษาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งในระยะเวลาเพาะเมล็ด

การทดลอง	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด (กรัม) $\pm$ SD	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง (กรัม) $\pm$ SD
น้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14	0.22 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
สารละลาย IAA (100 $\mu$ g/ml)	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.06 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>

#### 4.4.3 การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงของแอกติโนแบคทีเรียต่อการเจริญของมะนาวในระยะการปักชำกิ่ง

ผลการนำกิ่งของต้นมะนาวที่ผ่านการแช่ในน้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14 เทียบกับชุดควบคุมที่ทำการแช่ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ, สารละลาย IAA (100  $\mu$ g/ml) และอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทำการศึกษา พบว่า ผลของน้ำเลี้ยงต่อมะนาวในระยะการเพาะปักชำกิ่ง พบว่า มีจำนวนกิ่ง ความยาวกิ่งและใบใหม่เพิ่มขึ้น โดยเฉลี่ยเท่ากับ 1.75 กิ่ง, 12.50 มม. และ 6 ใบ ตามลำดับ ดังภาพ 35



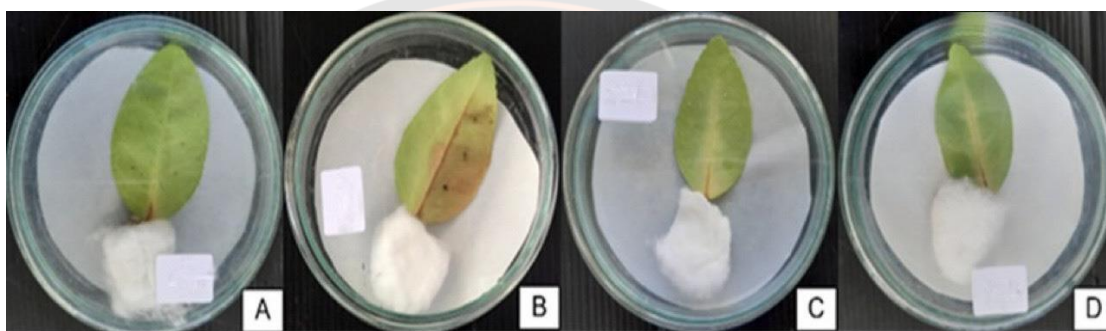


ภาพ 35 ผลของน้ำเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียต่อการเจริญของมะนาวในระยะเวลาเพาะปักชำกิ่ง

- หมายเหตุ: (A) น้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14  
 (B) น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ  
 (C) สารละลาย IAA (100 µg/ml)  
 (D) อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth

#### 4.5 ศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท Bar14 ในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในใบมะนาว

ผลการทดสอบศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์ในใบมะนาว เมื่อทำการศึกษาเป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ทุกชุดการทดลองมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0 และไม่มีความรุนแรงโรค จากการที่ไม่มีรอยโรคเกิดขึ้นที่ใบของมะนาวทั้งชุดควบคุมและชุดทดสอบ อาจเนื่องมาจากสภาวะที่ทำการทดลองไม่เหมาะสมกับการเกิดโรค เช่น อุณหภูมิหรือความชื้น ดังภาพ 36



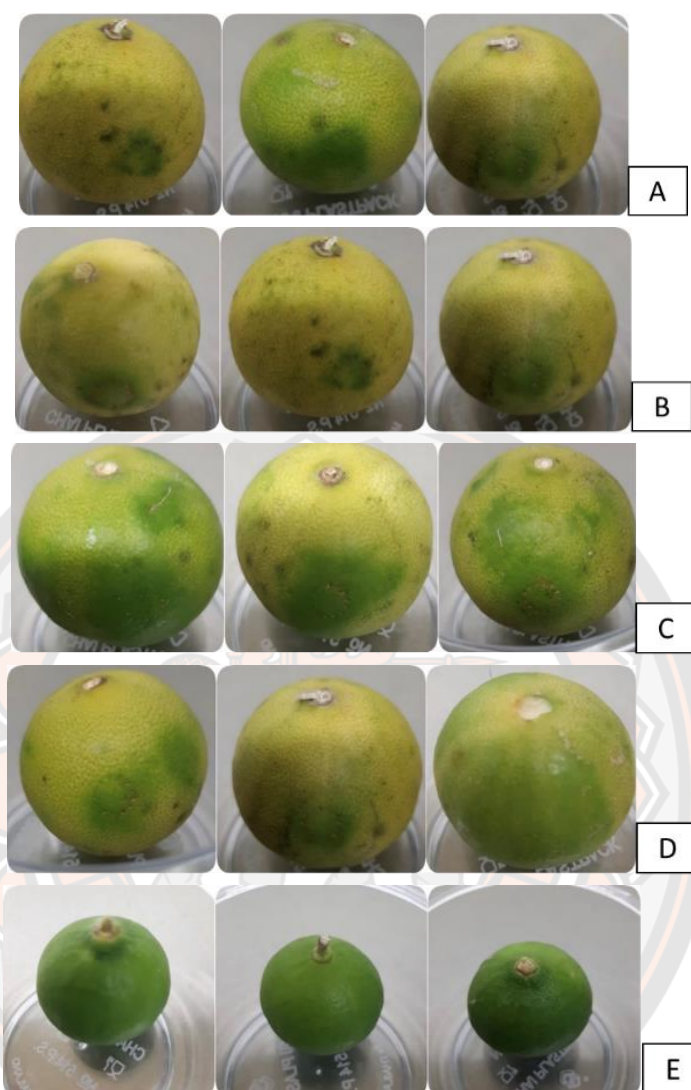
ภาพ 36 ศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท Bar14 ในการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์ในใบมะนาว

- หมายเหตุ: A สารสกัดไอโซเลท Bar14 ความเข้มข้น 1 mg/ml กับ สารละลายแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จากมะนาว (ชุดทดสอบ)  
 B สารสกัดไอโซเลท Bar14 ความเข้มข้น 1 mg/ml (ชุดควบคุม)  
 C การใช้เข็มจิ้มใบให้เกิดรอยแผล (ชุดควบคุม)  
 D สารละลายแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จากมะนาว (ชุดควบคุม)

#### 4.6 การประเมินศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการนำไปใช้ในการเคลือบของผลมะนาว

ผลการทดสอบสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคแคงเกอร์บนผลมะนาว เมื่อทำการศึกษาเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ไม่มีรอยโรคเกิดขึ้นที่ผลของมะนาว ทั้งชุดควบคุมและชุดทดสอบ เมื่อทำการทดสอบที่อุณหภูมิห้อง ดังภาพ 37 อาจเกิดจากสภาวะที่ทำการทดลองที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิหรือความชื้นในการเกิดโรค โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีผลต่ออัตราการเกิดโรคได้ต่ำกว่าที่อุณหภูมิห้อง



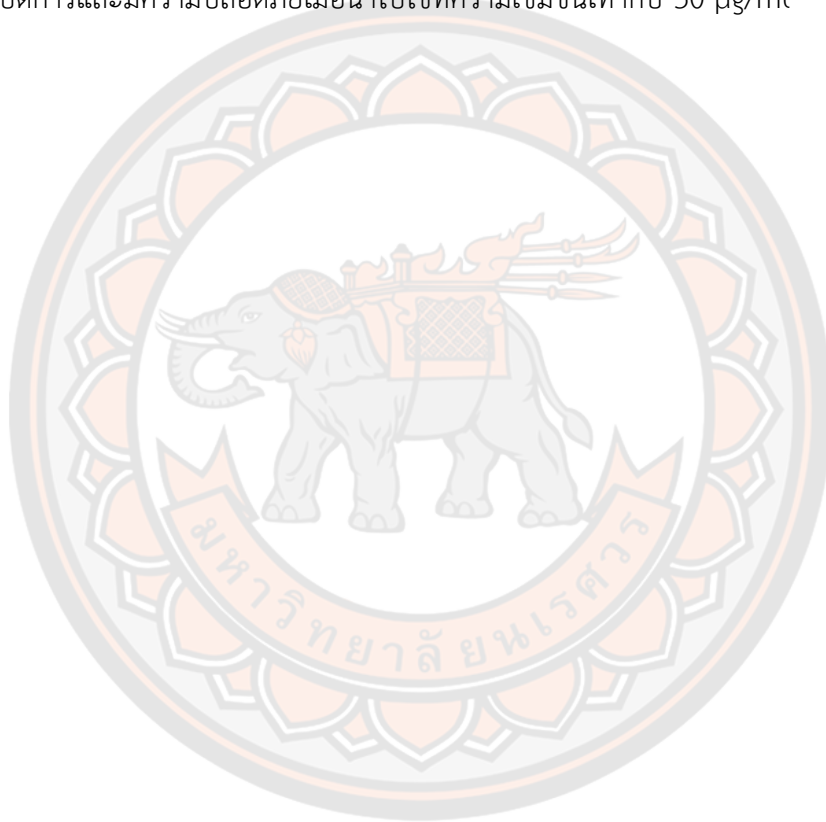


ภาพ 37 ศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการนำไปใช้ในการเคลือบของผลมะนาว

- หมายเหตุ: A สารสกัดไอโซเลท Bar14 ความเข้มข้น 1 mg/ml กับ สารละลายแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จากมะนาว (ชุดทดสอบ)  
 B สารสกัดไอโซเลท Bar14 ความเข้มข้น 1 mg/ml (ชุดควบคุม)  
 C การใช้เข็มจิ้มใบให้เกิดรอยแผล (ชุดควบคุม)  
 D สารละลายแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จากมะนาว (ชุดควบคุม)  
 E ผลมะนาว (ชุดควบคุม)

#### 4.7 ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดโดยวิธี MTT assay

ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดโดยวิธี MTT assay พบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของสารสกัด Bar14 พบว่าที่ความเข้มข้น 50 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  มีเซลล์รอดชีวิต 92.40% และ 82.19% และ ตามลำดับ ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าสารสกัด Bar14 มีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติเมื่อนำไปใช้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50  $\mu\text{g/ml}$  จากผลการวิจัยสรุปได้ว่ามีความเป็นไปได้ในการที่จะพัฒนาสารสกัดหยาบจากไอโซเลท Bar14 เพื่อใช้ในการป้องกันโรคแคงเกอร์ในต้นมะนาว และป้องกันโรคแคงเกอร์บนผิวของผลมะนาว เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ดีในห้องปฏิบัติการและมีความปลอดภัยเมื่อนำไปใช้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50  $\mu\text{g/ml}$



## บทที่ 5

### บทสรุป

#### สรุปผลการวิจัย

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแอสเพอริลลัสแบคทีเรียทั้งหมด 22 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Agar well diffusion พบว่าแอสเพอริลลัสแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. lunata* ได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท Bar14 และรองลงมาคือไอโซเลท TM32 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง เท่ากับ  $29.00 \pm 0.00$  และ  $8.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อทดสอบกับเชื้อรา *Aspergillus* sp. พบว่ามี 2 ไอโซเลทให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ  $26.67 \pm 0.58$  และ  $7.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดหยาบของทั้ง 2 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าที่ความเข้มข้น (30  $\mu\text{g}/\text{Disc}$ ) ไอโซเลท Bar14 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง *A. lunata* และ *Aspergillus* sp. เท่ากับ  $14.00 \pm 0.00$  และ  $13.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ และไอโซเลท TM32 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อรา *A. lunata* และ *Aspergillus* sp. เท่ากับ  $7.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน Nystatin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ความเข้มข้นเท่ากับ 100  $\mu\text{g}/\text{Disc}$  พบว่ามีศักยภาพใกล้เคียงกันโดยสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. lunata* และ *Aspergillus* sp. ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเท่ากับ  $13.00 \pm 0.00$  และ  $10.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อรา *A. lunata* โดยใช้ความเข้มข้นสูงสุด 5 mg/ml ในการทดสอบพบที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 100% (ไม่สามารถหาค่า MFC ได้) โดยที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ของสารสกัดจากไอโซเลท Bar14 และ TM32 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 45.45% เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *Aspergillus* sp ไม่สามารถหาค่า MFC โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราเท่ากับ 46.88% และ 37.50% ตามลำดับ

การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อแอสเพอริลลัสแบคทีเรีย 22 ไอโซเลทในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในตระกูลมะนาว มาทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่ามีแอสเพอริลลัสแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ได้แก่ Bar14, TM13 และ TM32 ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในมะกรูด มะนาวและส้มโอได้ โดยไอโซเลท Bar14 ยับยั้งได้ดีที่สุดโดยให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเท่ากับ  $23.00 \pm 0.00$ ,  $20.67 \pm 0.58$  และ  $18.33 \pm 0.58$  มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดของทั้ง 3 ไอโซเลทมาทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ก่อโรคในมะกรูด มะนาวและส้มโอ ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า

ไอโซเลท Bar14 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุดโดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 30 µg/Disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเท่ากับ  $13.00 \pm 0.00$ ,  $15.00 \pm 0.00$  และ  $15.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ และรองลงมาคือไอโซเลท TM13 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเท่ากับ  $11.00 \pm 0.00$ ,  $15.00 \pm 0.00$  และ  $14.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ เทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน Tetracycline (30 µg/ml) โซนการยับยั้งเท่ากับ  $39.00 \pm 0.00$ ,  $40.00 \pm 0.00$  และ  $40.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ไม่สามารถหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากทั้ง 2 ไอโซเลท เนื่องจากยังพบการเจริญของเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการทดสอบ 5 µg/ml

การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่าแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถสร้างไซโตไคน์จะมีโซนสีส้มรอบๆโคโลนี พบจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ Bar14 และ TM32 โดยมีโซนสีส้มเท่ากับ  $11.67 \pm 0.58$  และ  $20.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 broth ที่มี 0.2% L-tryptophan พบว่าแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลทที่สามารถผลิต IAA ได้แก่ Alo8, Bar14, Cit6, Cit11, TM13, TM32 และ Zin13 คือ ไอโซเลท TM13 ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 0.041 µg/ml ความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya's agar แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท TM13 ที่สามารถย่อยสารประกอบฟอสเฟตเกิดโซนใสเท่ากับ 1.67 มิลลิเมตร สัดส่วนการละลายเท่ากับ 1.33 และความสามารถในการสร้างแอมโมเนีย พบว่าเชื้อแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 22 ไอโซเลท สามารถสร้างแอมโมเนียในอาหาร Peptone water ได้

การประเมินศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท Bar14 ในการยับยั้งโรคและส่งเสริมการเจริญของมะนาว พบว่า ผลของน้ำเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดมะนาวและระยะเวลาเพาะเมล็ดที่ผ่านการแช่ในน้ำเลี้ยงเทียบกับชุดควบคุมที่ทำการแช่ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดมะนาวในน้ำเลี้ยงมากกว่าน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเท่ากับ 94.44% และ 37.26% ตามลำดับ และระยะเวลาเพาะเมล็ดพบว่าให้ค่าเฉลี่ยของความยาวรากเท่ากับ 25.33 มิลลิเมตร จำนวนรากมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.06 ราก และจำนวนใบให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.44 ใบ ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.22 และ 0.14 ตามลำดับ โดยเทียบกับชุดควบคุมที่ทำการแช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ พบว่าให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.18 และ 0.05 จึงสามารถสรุปได้ว่าน้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14 สามารถกระตุ้นการเจริญของพืชได้ดีกว่าการแช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และผลของน้ำเลี้ยงต่อมะนาวในระยะเวลาเพาะปักชำกิ่ง พบว่า มีจำนวนกิ่ง ความยาวกิ่งและใบใหม่เพิ่มขึ้น โดยเฉลี่ยเท่ากับ 1.75, 12.50 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลท Bar14 มีสารอาหารที่เหมาะสมแก่การเจริญ เช่น วิตามิน โปรตีนและแร่ธาตุต่างๆ มากกว่าและน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ การทดสอบศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคแคงเกอร์

ในใบมะนาวและการนำไปใช้ในการเคลือบของผลมะนาว พบว่า ไม่มีรอยโรคเกิดขึ้นที่ใบและผลของมะนาว เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเกิดโรคเช่นกัน อาจเนื่องมาจากสภาพที่ทำการทดลองที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิหรือความชื้นในการเกิดโรค ทำให้ชุดควบคุมยังไม่เกิดโรคเช่นกัน

ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดโดยวิธี MTT assay พบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) ของสารสกัด Bar14 ด้วยวิธี MTT assay พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  มีเซลล์รอดชีวิต 92.40% และ 82.19% และ ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัด Bar14 มีความปลอดภัยเมื่อนำไปใช้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50  $\mu\text{g/ml}$

### อภิปรายผลการวิจัย

การทดสอบความสามารถของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากพืชสมุนไพร ได้แก่ ว่านหางจระเข้ สเลดพังพอนตัวผู้ ขมิ้น ไพล มะกรูด ต้นข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวพันธุ์ลิ้มฟัว ข้าวหอมนิลสุตะบุตร ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวญี่ปุ่น ต้นข้าวหอมปทุมและ *Streptomyces sioyaensis* DSM 40032<sup>T</sup> พบว่าผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรียโดยวิธี Agar well diffusion และสารสกัดเชื้อแอคติโนแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคแคงเกอร์ในพืชสกุลส้ม ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gao et al., (2014) ทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อรา *A. alternata* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดน้ำตาลหรือส้มบนใบมะนาว ผลการวิจัย พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 163 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. alternata* ได้ 56.7% บนใบที่เกิดโรค และเมื่อทดสอบบนใบก่อนจะเกิดโรค พบว่า สามารถยับยั้งการเกิดโรคของเชื้อรา *A. alternata* บนใบมะนาวได้เท่ากับ 46.05% เมื่อทำการระบุสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจาก 16S rDNA ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces microflavus* มากที่สุด พบว่าแอคติโนแบคทีเรียบางไอโซเลตยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคแคงเกอร์โดยการผลิตสารในกลุ่มของยาปฏิชีวนะในกลุ่มของสเตรปโตมัยซิน ทำให้สามารถยับยั้งการเกิดโรคจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากมะกรูด มะนาว และส้มโอ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wattana et al., (2016) ทำการทดสอบโดยใช้น้ำเลี้ยงที่มีการผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต 22-4 ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *X. axonopodis* pv. *citri* มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 31.25  $\mu\text{g/ml}$  (Wattana-Amorn, Charoenwongsa, Williams, Crump, & Apichaisataienchote, 2016) นอกจากนี้งานวิจัยของ Ohnishi et al. (2008) พบว่าโรคแคงเกอร์มีความไวต่อยา Streptomycin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ความเข้มข้น 0.03–0.42  $\mu\text{g/mL}$ . (Ohnishi et al., 2008) ยาปฏิชีวนะ Tetracyclines มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์ชนิดกว้าง

(Broad-spectrum) ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดนี้มีความสามารถในการยับยั้งโปรตีนภายในเซลล์ที่ไปจับกับ aminoacyl-tRNA ที่ไรโบโซมทำให้สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก (Chopra, 2001)

แอกติโนแบคทีเรียโดยเฉพาะกลุ่มของ *Streptomyces* spp. เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อพืชที่อาศัยอยู่ มีลักษณะเป็นเส้นใยและสร้างสปอร์ในธรรมชาติ ในสภาพที่ไม่เหมาะสมสามารถอยู่รอดได้โดยอาศัยการสร้างสปอร์ และจะเจริญขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพที่เหมาะสมแก่การเจริญ แอกติโนแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับพืชจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์บริเวณรอบรากพืช *Streptomyces* สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลากหลายชนิดในกระบวนการเมทาบอลิซึม (K. F. Chater, Biró, Lee, Palmer, & Schrempf, 2010) เช่น เอนไซม์ที่ย่อยสลายสารในกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ เช่น amylase, chitinase, cellulase, invertase, lipase, keratinase, peroxidase, pectinase, protease, phytase และ xylanase (Hamedi & Mohammadipanah, 2015) ที่สามารถย่อยสลายและนำเข้าสู่กระบวนการ ABC transporters (Thompson et al., 2010) ทำให้แอกติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืชสมุนไพรมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เกิดจากความสามารถในการสร้างสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิเอนไซม์ เช่น Chitinase และ  $\beta$ -1, 3-glucanase ใช้ย่อยสลายเส้นใยของเชื้อรา ทำให้เซลล์เกิดความผิดปกติจนไม่สามารถเจริญต่อได้ (Prapagdee, Kuekulvong, & Mongkolsuk, 2008)

แอกติโนแบคทีเรียที่สร้างไซเดอโรฟอรัส ผลการวิจัย พบว่าแอกติโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไซเดอโรฟอรัสได้จะเกิดการเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีส้มรอบๆโคโลนี จากการผลการทดสอบความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญ ความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอรัสบนอาหาร CAS agar ประกอบด้วย CAS solution, สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3$  solution) และ Hexadecyl Trimethylammonium Bromide (HDTMA solution) ซึ่งจะรวมตัวเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน เมื่อสารประกอบถูกดึงเฟอร์ริกไอออน ( $\text{Fe}^{3+}$ ) สีของอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีส้มหรือเหลือง เกิดจากการผลิตไซเดอโรฟอรัส ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อแอกติโนแบคทีเรียอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีธาตุเหล็กในปริมาณต่ำ (Lee, Postmaster, Soon, Keast, & Carson, 2012) แอกติโนแบคทีเรียจึงสร้างไซเดอโรฟอรัสออกมา เพื่อจับธาตุเหล็กและขนส่งเข้าเซลล์ เพื่อให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยพบแอกติโนแบคทีเรียที่สามารถสร้างไซเดอโรฟอรัส ได้แก่ *Actinomadura madurae*, *Nocardia asteroides* และ *Streptomyces griseus* โดยแอกติโนแบคทีเรียจะสร้างไซเดอโรฟอรัสทั้งชนิด Hydroxamate และ Salicylate

การละลายสารประกอบฟอสเฟตของแอกติโนแบคทีเรียบนอาหาร Pikovskaya's agar จะเกิดโซนใสบริเวณรอบโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรีย การละลายสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตโดยจุลินทรีย์นั้นมีหลายกลไกเกี่ยวข้อง แต่ส่วนใหญ่มาจากการสร้างกรดอินทรีย์มวลโมเลกุลต่ำ

ซึ่งจุลินทรีย์จะผลิตกรดออกมาแล้วเปลี่ยนรูปฟอสเฟตที่อยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้ (Teodosieva, Bojinova, & Nedialkova, 2006)

การสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ในอาหาร ISP2 broth ที่เติม 0.2% L-tryptophan พบว่า แอคติโนแบคทีเรียมีการสร้างฮอร์โมน IAA ในน้ำเลี้ยง หลังการเติมสารละลาย Salkowsky's reagent เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงเหลือง IAA เป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่งในกลุ่มออกซิน กลไกการสร้างฮอร์โมน IAA จะได้จากการย่อยสลาย L-tryptophan ของแบคทีเรียได้แก่ สภาพแวดล้อมที่มีสถานะเครียด (ดินเป็นกรด ความเครียดออสโมติก (Osmotic stress) และปริมาณจำกัดของคาร์บอน (Carbon limitation) (Spaepen, Vanderleyden, & Remans, 2007) IAA ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมา มีผลไปกระตุ้นการเจริญของพืช โดยไปกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการแบ่งเซลล์ ในการยืดยาวของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับธาตุอาหารจากดินของพืช (Mohite, 2013) แอคติโนแบคทีเรีย พบว่า มีความสามารถในการสร้าง IAA โดยเฉพาะในจีนัส *Streptomyces* spp. ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืชเป็นแหล่งของ IAA และ *Streptomyces* หลายสปีชีส์ เช่น *S. olivaceoviridis*, *S. rimosus*, *S. Rochei*, *S. griseoviridis* และ *S. lydicus* จากบริเวณรอบรากต้นมะเขือเทศ มีความสามารถในการสร้าง IAA โดยจะไปเพิ่มการงอกของเมล็ด การยืดยาวของรากและน้ำหนักแห้งของราก (El-Tarabily, Nassar, & Sivasithamparam, 2008) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Khamna et al., (2009) ได้แยกเชื้อแอคติโนแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากพืชได้ทั้งหมด 445 ไอโซเลท มี 36 ไอโซเลท (8.1%) ที่สามารถสร้าง IAA อยู่ในช่วง 5.5–144 µg/ml อยู่ในจีนัส *Actinomadura*, *Nonomurea* และ *Streptomyces*

การสร้างแอมโมเนียในอาหาร Peptone water มีความสำคัญในการสร้างสารอาหารให้แก่แบคทีเรีย เชื้อแอคติโนแบคทีเรียสามารถสร้างแอมโมเนียได้ที่ระดับต่างกัน โดยพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Anwar, Ali, & Sajid, 2016) Anwar et al., (2016) ได้แยกแอคติโนแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากข้าวและมะเขือเทศได้ 98 ไอโซเลท มี 6 ไอโซเลท (6.1%) ที่สามารถสร้างแอมโมเนียได้ โดยอยู่ในจีนัส *Streptomyces* และจากงานวิจัยของ Ashokvardhan et al., (2015) ได้แยกแอคติโนแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากพริกได้ทั้งหมด 72 ไอโซเลท มี 25 ไอโซเลท (34.7%) ที่สามารถสร้างแอมโมเนียได้ในระดับต่างกัน ในการสร้างแอมโมเนียโดยการตรึงธาตุไนโตรเจนในอากาศจากเชื้อแอคติโนแบคทีเรียและเกิดการเปลี่ยนรูปเป็นแอมโมเนียในดินที่มีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญของพืช (Mazumdar, 2019)

การประเมินศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดของแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคและส่งเสริมการเจริญของมะนาว พบว่า แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces* spp. เป็นจุลินทรีย์หรือเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคที่เกิดจากบริเวณดินและอากาศที่เป็นศัตรูของพืช

ทั้งแบคทีเรียและเชื้อราที่สามารถทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรคได้ (Vurukonda, 2018) พบว่า โดยเฉพาะน้ำเลี้ยงของแอคติโนแบคทีเรียจะมีการผลิตสารเมตาบอไลซึมที่สามารถส่งเสริมการเจริญและความแข็งแรงของพืช โดยการเพิ่มสารอาหารและยับยั้งการเกิดโรคในพืช (Brader, 2014) ทำให้ศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งโรคและส่งเสริมการเจริญทั้งการงอกของเมล็ดในระยะการเพาะเมล็ด และระยะการเพาะปักชำกิ่งของมะนาว มีรายงานพบว่าการนำเมล็ดมะนาวที่ผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว ทำการเก็บรักษาในน้ำที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที และทำการแช่ลงใน 1% 8-hydroxyquinoline (8HQ) ซัลเฟตเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปตากแห้ง และทำการเก็บรักษาโดยแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดได้ดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส (Orbovic et al., 2013) จากการศึกษาพบว่าการนำเมล็ดมะนาวไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ด (Orbovic et al., 2013) นอกจากนี้ ยังพบว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาคุณภาพได้และก่อให้เกิดโรคช้ากว่าที่อุณหภูมิสูง (Chaudhary, 2016) ซึ่งโดยทั่วไป พบว่า เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมขยายสายพันธุ์ของมะนาวโดยวิธีการปักชำกิ่ง (Hrishikesh Tavanandi, 2014) ซึ่งหากต้นที่แยกมา ไม่มีการเกิดโรค ก็จะส่งผลให้ต้นใหม่ไม่มีการเกิดโรคเช่นกัน หรืออาจเกิดได้ภายหลังในสภาวะที่เหมาะสมแก่การเกิดโรค จากที่กล่าวมาข้างต้น จะพบว่า แอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญบริเวณรอบรากพืชที่แสดงให้เห็นว่า มีศักยภาพในการยับยั้งโรคและส่งเสริมการเจริญของพืชได้

ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดโดยวิธี MTT assay พบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) ของสารสกัดไอโซเลท Bar14 บ่งชี้ว่าสารสกัดมีความปลอดภัยที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50 µg/ml ซึ่งการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเป็นการทดสอบทางโมเลกุลเพื่อต้องการทราบการรอดชีวิตของเซลล์หลังสิ้นสุดการทดลอง (Stoddart, 2011)

การควบคุมทางชีวภาพและห่วงโซ่อาหารที่มีความสัมพันธ์กับการส่งเสริมการเจริญของพืช ช่วยเพิ่มศักยภาพในดินและผลผลิตทางการเกษตร มีผลในการควบคุมผลผลิตทั้งในระดับการทดลองพื้นที่ขนาดใหญ่ และทางการค้า เป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องการเพิ่มและพัฒนาเชื้อแอคติโนแบคทีเรียให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืช ผักและผลไม้ทางการเกษตรให้สามารถมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น อีกทั้งยังลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร (Vurukonda, 2018) จากการศึกษาแอคติโนแบคทีเรียเป็นส่วนสำคัญของพืชที่สามารถส่งเสริมการเจริญ เสริมสร้างและป้องกันพืชที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Rafii, 1988) ซึ่งในการศึกษารั้งนี้ พบว่า แอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากพืชสมุนไพรมีความสามารถในการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร จากการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชและความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช ดังนั้นปริมาณธาตุอาหารและสิ่งแวดล้อมของดินจึงเป็นปัจจัยหนึ่งในการ



สร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช ดังนั้น การใช้ streptomycetes เป็นตัวแทนทางชีวภาพของจุลินทรีย์ที่มีเป้าหมายในการทำลายศัตรูพืชที่เป็นกลุ่ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารเคมี (Qin, 2011)

### ข้อเสนอแนะ

1. การทดสอบการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชในน้ำเลี้ยงและการยับยั้งโรคแคงเกอร์ที่เกิดจากทั้งเชื้อรา 2 สายพันธุ์ และแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ อาจสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงมากกว่าสารสกัด รวมถึงอาจลดการใช้สารเคมีในกลุ่มคอปเปอร์ได้อีกด้วย
2. การหาค่า MFC ในเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ ควรใช้สารสกัดของแอคติโนแบคทีเรียที่ความเข้มข้นมากกว่า 5 mg/ml เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้
3. การหาค่า MIC และ MBC ในการทดสอบใช้สารสกัดที่ค่าความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 500 µg/ml พบว่า ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียโรคแคงเกอร์ในมะนาวได้ จึงจำเป็นต้องมีการหาค่าความเข้มข้นที่มากขึ้น เพื่อใช้ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียโรคแคงเกอร์ในมะนาว เพื่อเป็นประโยชน์แก่การนำไปใช้ทดแทนสารเคมี
4. การทดสอบความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช การหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดไอโซเลท Bar14 และสารละลาย IAA (100 µg/ml) ที่เหมาะสมในการส่งเสริมการเจริญของพืช จะสามารถนำไปประยุกต์และปรับใช้ได้หลายด้าน เช่น การศึกษาและวัดการสร้างสารละลาย IAA ที่เหมาะสมแก่การเจริญของพืชได้
5. การประเมินศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดของแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคใบไหม้และผลมะนาว ซึ่งในการศึกษาผลของน้ำเลี้ยงและสารสกัดต่อปอเช่นต์การงอกของเมล็ดมะนาวควรมีตัวแปรควบคุมเพิ่มขึ้น เช่น สารเคมีในกลุ่มคอปเปอร์
6. การทดสอบศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในใบและผลมะนาว ควรใช้น้ำเลี้ยงร่วมการทดสอบด้วยเพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งและทำซ้ำเพื่อยืนยันผลอีกครั้ง
7. การทดสอบ MTT assay ควรทำการทดสอบร่วมกับเซลล์อื่นเพิ่มเติมด้วย เช่น เซลล์บริเวณผิวหนัง เนื่องจาก เซลล์บริเวณผิวหนังที่มีการสัมผัสกับสารกลุ่มคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดการระคายเคือง เกิดเป็นรอยถลอก และผิวหนังอักเสบได้



บรรณานุกรม

## บรรณานุกรม

- รวี เสฐฐภักดี และคณะ. (2553). คู่มือประกอบการฝึกอบรมโครงการปลูกมะนาวและการผลิตมะนาว  
นอกฤดู: การขยายพันธุ์มะนาวเชิงการค้า. นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต  
กำแพงแสน
- Abubaker, M. (2016). First report of citrus bacterial canker disease in lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) in Gadaref State-Eastern Sudan. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7, 254-274.
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Aktar, M. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), 1-12. doi: 10.2478/v10102-009-0001-7
- Al-Sadi, A., Queiroz, R., Donkersley, P., Nasehi, A., & Elliot, S. (2017). Plant Protection: Lime Diseases and Insect Pests (pp. 149-166).
- Ali, M., Hasan, M., Lia, R., Akter, A., Sumi, M., Hossain, M., . . . Sikdar, D. (2017). Isolation and characterization of a canker disease causing pathogen from *Citrus aurantifolia* and evaluation of its biological control measure. *Journal of Entomology*, 5, 1526-1532.
- Ammar, A. (2016). Synergism between *Saccharomyces cerevisiae* and isolated *Rhizobium leguminosarum* induces the nodulation and productivity of *Vicia faba*. 21, 1-12.
- Anwar, S., Ali, B., & Sajid, I. (2016). Screening of Rhizospheric Actinomycetes for Various In-vitro and In-vivo Plant Growth Promoting (PGP) Traits and for Agroactive Compounds. *Frontiers in microbiology*, 7, 1334-1334. doi: 10.3389/fmicb.2016.01334
- Arora, N. K., & Verma, M. (2017). Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. *3 Biotech*, 7(6), 381-381. doi: 10.1007/s13205-017-1008-y

- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., . . . van Wezel, G. P. (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 80(1), 1-43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15
- Benson, D., D Vanden, B., & Potter, D. (2004). Actinorhizal symbioses: diversity and biogeography. 15.
- Berg, G., Marten, P., Minkwitz, A., & Brückner, S. (2001). Efficient biological control of fungal plant diseases by *Streptomyces* sp. DSMZ 12424. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 108, 1-10.
- Carrillo-Castañeda, G., Juárez Muños, J., peralta-vidua, J., Gomez, E., J Tiemannb, K., Duarte-Gardea, M., & Gardea-Torresdey, J. (2002). Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Advances in Environmental Research - ADV ENVIRON RES*, 6, 391-399. doi: 10.1016/S1093-0191(02)00054-0
- Chaihan, M., Pathom-aree, W., Sujada, N., & Lumyong, S. (2018). Characterization of phosphate solubilizing *Streptomyces* as a biofertilizer. *Chiang Mai Journal of Science*, 45, 701-716.
- Chater, K. F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000 Research*, 5, 2795-2795. doi: 10.12688/f1000research.9534.1
- Chater, K. F., Biró, S., Lee, K. J., Palmer, T., & Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev*, 34(2), 171-198. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x
- Čihák, M., Kamenik, Z., Šmídová, K., Bergman, N., Benada, O., Kofroňová, O., . . . Bobek, J. (2017). Secondary Metabolites Produced during the Germination of *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in microbiology*, 8, 2495-2495. doi: 10.3389/fmicb.2017.02495
- Cubero, J., & Graham, J. H. (2002). Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and environmental microbiology*, 68(3), 1257-1264. doi: 10.1128/aem.68.3.1257-1264.2002

- D. Krumholz, G. S. Chval, M., McBride, M., & Tisa, L. (2003). Germination and physiological properties of Frankia spores. *Plant and Soil*, 254. doi: 10.1023/A:1024911231889
- De Waard, M. A., Georgopoulos, S., Hollomon, D. W., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N. N., & Schwinn, F. J. (2003). Chemical Control of Plant Diseases: Problems and Prospects. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 403-421. doi: 10.1146/annurev.py.31.090193.002155
- Derso, E., & Sijam, K. (2007). Citrus canker: A new disease of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) and sour orange (*C. aurantium*) in Ethiopia. <http://dx.doi.org/10.1051/fruits:2007002>, 62. doi: 10.1051/fruits:2007002
- Dulmage, H. T. (1953). The production of neomycin by *Streptomyces fradiae* in synthetic media. *Applied microbiology*, 1(2), 103-106.
- El-Batanony, N. (2009). Field Response of Snap Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) To N<sub>2</sub>-fixers *Bacillus Circulans* and Arbuscular Mycorrhizal Fungi Inoculation Through Accelerating Rock Phosphate and Feldspar Weathering. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3, 844-852.
- El-Tarabily, K., Nassar, A., & Sivasithamparam, K. (2008). Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Applied Soil Ecology*, 39, 161-171. doi: 10.1016/j.apsoil.2007.12.005
- El-Wakeil, N., Gaafar, N., & Sallam, A. (2013). Side Effects of Insecticides on Natural Enemies and Possibility of Their Integration in Plant Protection Strategies (pp. 1-56).
- Elbendary, A. A., Hessain, A. M., El-Hariri, M. D., Seida, A. A., Moussa, I. M., Mubarak, A. S., . . . El Jakee, J. K. (2018). Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1), 44-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.003>
- Fernández-Martínez, L. T., Borsetto, C., Gomez-Escribano, J. P., Bibb, M. J., Al-Bassam, M. M., Chandra, G., & Bibb, M. J. (2014). New insights into chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(12), 7441-7450. doi: 10.1128/AAC.04272-14

- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and Implementation of Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43 (1), 337-359. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924
- Gesheva, V. (2002). Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. *European Journal of Soil Biology*, 38 (1), 85-88. doi: [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01125-6](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01125-6)
- Ghazanfar, M., Raza, M., Raza, W., & Qamar, M. (2018). TRICHODERMA AS POTENTIAL BIOCONTROL AGENT, ITS EXPLOITATION IN AGRICULTURE: A REVIEW. 2, 2617-1279.
- Giassi, V., Kiritani, C., & Kupper, K. C. (2016). Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*, 190, 46-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.006>
- González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., & Genilloud, O. (2005). Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS microbiology ecology*, 54, 401-415. doi: 10.1016/j.femsec.2005.05.004
- Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., Bandikinda, P., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Rupela, O., . . . Varshney, R. K. (2014). Evaluation of Streptomyces strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research*, 169(1), 40-48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.008>
- H.P, G., Olakkaran, S., Antony, A., & Siva, A. (2019). Present Status and Future Perspectives of Marine Actinobacterial Metabolites (pp. 307-319).
- Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M.-J., & Ouhdouch, Y. (2008). Rock phosphate-solubilizing actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2565-2575. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2565-2575. doi: 10.1007/s11274-008-9817-0
- Hamed, J., & Mohammadipanah, F. (2015). Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(2), 157-171.

- Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, 6(1), 58-58. doi: 10.1186/s40168-018-0445-0
- Hastuti, R. D., Lestari, Y., Suwanto, A., & Saraswati, R. (2012). Endophytic *Streptomyces* spp. as Biocontrol Agents of Rice Bacterial Leaf Blight Pathogen (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *HAYATI Journal of Biosciences*, 19(4), 155-162. doi: <https://doi.org/10.4308/hjb.19.4.155>
- Himaman, W., Thamchaipenet, A., Pathom-aree, W., & Duangmal, K. (2016). Actinomycetes from Eucalyptus and their biological activities for controlling Eucalyptus leaf and shoot blight. *Microbiological Research*, 188-189, 42-52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.011>
- Hirsch, P., Mevs, U., M Kroppenstedt, R., Schumann, P., & Stackebrandt, E. (2004). Cryptoendolithic Actinomycetes from Antarctic Sandstone Rock Samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two Isolates Related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. *Systematic and applied microbiology*, 27, 166-174. doi: 10.1078/072320204322881781
- Innes, C. M., & Allan, E. J. (2001). Induction, growth and antibiotic production of *Streptomyces viridifaciens* L-form bacteria. *J Appl Microbiol*, 90(3), 301-308.
- Japan, T. S. f. A. (1997). *Atlas of Actinomycetes*: Asakura Publishing Co., Ltd
- Javed, N., Ahmad, R., Anwar, S., Javed, M., & Zia, A. (2007). CITRUS DISEASES AND THEIR MANAGEMENT.
- Jeong, H., Sim, Y. M., Kim, H. J., Lee, D.-W., Lim, S.-K., & Lee, S. J. (2013). Genome Sequence of the Vancomycin-Producing *Amycolatopsis orientalis* subsp. *orientalis* Strain KCTC 9412T. *Genome announcements*, 1(3), e00408-00413. doi: 10.1128/genomeA.00408-13
- Karn Yaempongsa, Songkran Chuakrut, Siripun Sarin, & Nakaew, N. (2017). Isolation and evaluation of endophytic actinobacteria from rice for plant growth promoting and its antagonistic activity on *Pyricularia* sp.: นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 13: วิจัยและนวัตกรรม ขับเคลื่อนเศรษฐกิจและสังคม.
- Khan, M., & Fakhar-ud-Din, M. (2018). Citrus Greening Disease (Huanglongbing) a Perilous Threat to Global Citrus Industry. *Journal of Horticulture*, 05. doi: 10.4172/2376-0354.1000e110

- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(6), a027029. doi: 10.1101/cshperspect.a027029
- Ladaniya, M. S. (2008). 3 - POSTHARVEST LOSSES. In M. S. Ladaniya (Ed.), *Citrus Fruit* (pp. 67-78). San Diego: Academic Press.
- Lee, J., Postmaster, A., Soon, H. P., Keast, D., & Carson, K. C. (2012). Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia. *Biometals*, 25(2), 285-296. doi: 10.1007/s10534-011-9503-9
- Makavana, J., Makwana, P. J., Kukadiya, V. D., & Joshi, A. M. (2018). Post-Harvest Losses of Lemon Fruits: An Assessment of Microbial Floral Strength during Post-Harvest Handling. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, 1184-1188. doi: 10.20546/ijcmas.2018.705.144
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., & Kim, S.-K. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*, 169(4), 262-278. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.014>
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., & Kim, S. K. (2013). RETRACTED: Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiol Res*, 168(6), 311-332. doi: 10.1016/j.micres.2013.02.002
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13, 638-649. doi: 10.4067/S0718-95162013005000051
- Mughal, S. M. (2004). Symptomatology, detection, distribution and management of virus and virus-like diseases of citrus in Pakistan. *Proceedings of the 1st International Conference on Citriculture*, 97-105.
- Mukhtar, S., Zaheer, A., Aiysha, D., Malik, K., & Mehnaz, S. (2018). Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 10, 316-319. doi: 10.4172/jpb.1000456
- Munis, M., Liaquat, F., Arif, S., Ashraf, M., Chaudhary, H., & Farooq, A. (2016). *Aspergillus niger* Causes Fruit Rot of Lemon and Grapefruit in Pakistan. *Plant Disease*, 100. doi: 10.1094/PDIS-02-16-0199-PDN



- N Johri, B., Sharma, A., & Viridi, J. (2003). Rhizobacterial Diversity in India and Its Influence on Soil and Plant Health. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 84, 49-89. doi: 10.1007/b11036.
- Nakaew, N., Rangjaroen, C., & Sungthong, R. (2015). Utilization of rhizospheric Streptomyces for biological control of *Rigidoporus* sp. causing white root disease in rubber tree. *European Journal of Plant Pathology*, 142(1), 93-105. doi: 10.1007/s10658-015-0592-0
- Nakaew, N., & Sungthong, R. (2018). Seed phytochemicals shape the community structures of cultivable actinobacteria-inhabiting plant interiors of Thai pigmented rice. *Microbiologyopen*, 7(4), e00591. doi: 10.1002/mbo3.591
- Nandimath, A. P., Karad, D. D., Gupta, S. G., & Kharat, A. S. (2017). Consortium inoculum of five thermo-tolerant phosphate solubilizing Actinomycetes for multipurpose biofertilizer preparation. *Iranian journal of microbiology*, 9(5), 295-304.
- Narang, N., & Jiraungkoorskul, W. (2016). Anticancer Activity of Key Lime, Citrus aurantifolia. *Pharmacognosy reviews*, 10(20), 118-122. doi: 10.4103/0973-7847.194043
- Nawani, N., Aigle, B., Mandal, A., Bodas, M., Ghorbel, S., & Prakash, D. (2013). Actinomycetes: role in biotechnology and medicine. *BioMed research international*, 2013, 687190-687190. doi: 10.1155/2013/687190
- Nemec, S., Datnoff, L. E., & Strandberg, J. (1996). Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Protection*, 15(8), 735-742. doi: [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(96\)00048-8](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(96)00048-8)
- Ngoc, L. B. T., Verniere, C., Pruvost, O., Kositcharoenkul, N., & Phawichit, S. (2007). First Report in Thailand of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri-A\* Causing Citrus Canker on Lime. *Plant Dis*, 91(6), 771. doi: 10.1094/pdis-91-6-0771a
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., . . . Horinouchi, S. (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol*, 190(11), 4050-4060. doi: 10.1128/jb.00204-08

- Pimpanuwat, P., Phuengphak, P., Mayuwang, P., Sungthong, R., & Nakaew, N. (2016). Antimicrobial activities of Actinobacteria derived from Thai herb Rhizosphere (pp. 257): The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference in “Natural Resource and Bio-based Innovative Products”.
- Prakash, S., Ramasubburayan, R., Jinitha Mary, C., Palanisamy, I., Chandrasekaran, K., Palavesam, A., & Immanuel, G. (2013). Screening and partial purification of antifungal metabolite from *Streptomyces rochei* MSA1 4 : An isolate from marine mining soil of Southwest coast of India. *Indian Journal of Marine Sciences*, 42, 888-897.
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C., & Mongkolsuk, S. (2008). Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int J Biol Sci*, 4(5), 330-337. doi: 10.7150/ijbs.4.330
- Pruvost, O., Boher, B., Brocherieux, C., Nicole, M., & Chiroleu, F. (2002). Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Leaf Lesions Under Tropical Environmental Conditions and Simulated Splash Dispersal of Inoculum. *Phytopathology*, 92, 336-346. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.4.336
- Puttaswamygowda, G. H., Olakkaran, S., Antony, A., & Kizhakke Purayil, A. (2019). Chapter 22 - Present Status and Future Perspectives of Marine Actinobacterial Metabolites. In V. Buddolla (Ed.), *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* (pp. 307-319): Academic Press.
- Rebecca, J. (2012). Study on IAA production by *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere soil. *International Journal of Agriculture and food Science Technology*, 3, 21-27.
- Richardson, M. J. (1996). Seed mycology. *Mycological Research*, 100(4), 385-392. doi: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80133-X](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80133-X)
- Rodrigues, C. F., & Henriques, M. (2017). Liposomal and Deoxycholate Amphotericin B Formulations: Effectiveness against Biofilm Infections of *Candida* spp. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 6(4), 62. doi: 10.3390/pathogens6040062

- Sathya, A., Vijayabharathi, R., & Gopalakrishnan, S. (2017). Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech*, 7(2), 102-102. doi: 10.1007/s13205-017-0736-3
- Sathya, A., Vijayabharathi, R., & Gopalakrishnan, S. (2017). Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech*, 7(2), 102. doi: 10.1007/s13205-017-0736-3
- Schmidt, A., Haferburg, G., Schmidt, A., Lischke, U., Merten, D., Ghergel, F., . . . Kothe, E. (2009). Heavy metal resistance to the extreme: Streptomyces strains from a former uranium mining area. *Geochemistry*, 69, 35-44. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemer.2007.11.002>
- Sellstedt, A., & Richau, K. (2013). Sellstedt A, Richau KH.. Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic Frankia. *FEMS Microbiol Lett* 342: 179-186. *FEMS microbiology letters*, 342. doi: 10.1111/1574-6968.12116
- Semêdo, L., Linhares, A. A., Gomes, R. C., Manfio, G., S Alviano, C., F Linhares, L., & Coelho, R. (2001). Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. *Microbiological research*, 155, 291-299. doi: 10.1016/S0944-5013(01)80007-0
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 587-587. doi: 10.1186/2193-1801-2-587
- Shojaee, N., Shahidi Bonjar, G. H., Shahdaei, S., & Bonjar, L. (2014). Biological control of citrus green mould, *Penicillium digitatum*, by antifungal activities of Streptomyces isolates from agricultural soils. *African Journal of Microbiology Research*, 8, 1501-1509. doi: 10.5897/AJMR2013.6289
- Singh, K. (2018). Propagation of citrus species through cutting: A review.

- Smith, K., Evans, D. A., & El-Hiti, G. A. (2008). Role of modern chemistry in sustainable arable crop protection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1491), 623-637. doi: 10.1098/rstb.2007.2174
- Sowani, H., Kulkarni, M., Zinjarde, S., & Javdekar, V. (2017). Chapter 7 - *Gordonia* and Related Genera as Opportunistic Human Pathogens Causing Infections of Skin, Soft Tissues, and Bones. In K. Kon & M. Rai (Eds.), *The Microbiology of Skin, Soft Tissue, Bone and Joint Infections* (Vol. 2, pp. 105-121): Academic Press.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*, 31(4), 425-448. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x
- Subathra Devi, C., Saini, A., Rastogi, S., Jemimah Naine, S., & Mohanasrinivasan, V. (2015). Strain improvement and optimization studies for enhanced production of erythromycin in bagasse based medium using *Saccharopolyspora erythraea* MTCC 1103. *3 Biotech*, 5(1), 23-31. doi: 10.1007/s13205-013-0186-5
- Sun, H.-Q., Lu, X.-M., & Gao, P.-J. (2011). The Exploration of the Antibacterial Mechanism of FE(3+) against Bacteria. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 42(1), 410-414. doi: 10.1590/S1517-83822011000100050
- Tamreihao, K., Ningthoujam, D. S., Nimaichand, S., Singh, E. S., Reena, P., Singh, S. H., & Nongthomba, U. (2016). Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. *Microbiological Research*, 192, 260-270. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.08.005>
- Tao, G.-C., Tian, S.-J., Cai, M.-Y., & Xie, G.-H. (2008). Phosphate-Solubilizing and -Mineralizing Abilities of Bacteria Isolated from Soils1 1 Project supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, the Ministry of Education of the P.R. China. *Pedosphere*, 18(4), 515-523. doi: [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(08\)60042-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(08)60042-9)

- Teodosieva, R., Bojinova, D., & Nedialkova, K. (2006). Rock phosphate solubilization by soil bacteria. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 41, 297-302.
- Thilagam, R., & Hemalatha, N. (2019). Plant growth promotion and chilli anthracnose disease suppression ability of rhizosphere soil actinobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 126. doi: 10.1111/jam.14259
- Thompson, B. J., Widdick, D. A., Hicks, M. G., Chandra, G., Sutcliffe, I. C., Palmer, T., & Hutchings, M. I. (2010). Investigating lipoprotein biogenesis and function in the model Gram-positive bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 77(4), 943-957.
- Troncoso-Rojas, R., & Tiznado-Hernández, M. E. (2014). Chapter 5 - *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot). In S. Bautista-Baños (Ed.), *Postharvest Decay* (pp. 147-187). San Diego: Academic Press.
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 952. doi: 10.3390/ijms19040952
- Wattana-Amorn, P., Charoenwongsa, W., Williams, C., Crump, M. P., & Apichaisataienchote, B. (2016). Antibacterial activity of cyclo(L-Pro-L-Tyr) and cyclo(D-Pro-L-Tyr) from *Streptomyces* sp. strain 22-4 against phytopathogenic bacteria. *Nat Prod Res*, 30(17), 1980-1983. doi: 10.1080/14786419.2015.1095747
- Woodruff, H. B. (2014). Selman A. Waksman, winner of the 1952 Nobel Prize for physiology or medicine. *Applied and environmental microbiology*, 80(1), 2-8. doi: 10.1128/AEM.01143-13
- Yuan, W. M., & Crawford, D. L. (1995a). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl Environ Microbiol*, 61(8), 3119-3128.
- Yuan, W. M., & Crawford, D. L. (1995b). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 3119.



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยนครพนม

## ภาคผนวก ก สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1. Starch-Casein agar (SCA)

Soluble starch	10.00	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.00	กรัม
$\text{KNO}_3$	2.00	กรัม
Casein (free vitamin)	0.30	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
$\text{CaCO}_3$	0.02	กรัม
Nacl	2.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
การเตรียมอาหาร Starch-Casein agar		

ซึ่งสารและละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ฟลาสก์ ฟลาสก์ปริมาตรละ 350 มิลลิลิตร ปิดจุกฟลาสก์ด้วยสำลีและนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้ควรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ก่อนเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 8 มิลลิลิตร

### 2. Hickey Trensler agar

Soluble starch	2.00	กรัม
Peptone	0.40	กรัม
Beef extract	0.20	กรัม
Yeast extract	0.20	กรัม
Agar	15.00	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียมอาหาร Hickey Trensler agar

สำหรับใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสารและละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ฟลาสก์ ฟลาสก์ละปริมาตร 350 มิลลิลิตร ปิดจุกฟลาสก์ด้วยสำลีและนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้ควรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้

เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ก่อนเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 8 มิลลิลิตร

สำหรับใส่หลอดทดลอง ซึ่งสารและละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนผงวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดหลอดทดลองด้วยสำลีและนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไ้อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้ควรเอียงหลอดและตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

### 3. CAS agar

ส่วนประกอบ A (Blue dye)

- ชั่งสาร CAS 0.06 กรัม ใน ddH<sub>2</sub>O 50 มิลลิลิตร
- ชั่งสาร FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.0027 กรัม ใน 10 มิลลิลิตรของ 10 mM HCl
- ชั่งสาร HDTMA 0.073 กรัม ใน ddH<sub>2</sub>O 40 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบ B (Mixture solution)

1. เตรียมสารละลาย Minimal Media<sup>9</sup> (MM9) Salt solution stock
  - ชั่งสาร KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15.00 กรัม NaCl 25 NH<sub>4</sub>Cl 50.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร
2. เตรียม 20% Glucose stock
  - ละลาย glucose 20.00 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
3. NaOH stock
  - ละลาย NaOH 25.00 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร มี pH ประมาณ 12
4. สารละลาย Casamino Acid
  - สารละลาย Casamino acid 3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 27 มิลลิลิตร และทำการสกัดด้วย 3% 8-hydroxyquinone ในคลอโรฟอร์มเพื่อนำธาตุเหล็กออกและนำไปกรอง

ส่วนประกอบ C (Cas agar)

1. เติม MM9 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 750 มิลลิลิตร
2. ละลาย Piperazine-N,N'bis (2-ethanesulfonic acid) 32.24 กรัม (PIPES จะไม่ละลายที่ค่า pH ต่ำกว่า 5 ควรให้ค่า pH สูงถึง 6 แล้วค่อยๆเติม PIPES ช้าๆ พร้อมคนให้เข้ากัน โดยที่ค่า pH จะลดลงเมื่อเป็นสารละลาย ขณะที่คนให้เข้ากัน ระวังอย่าให้ค่า pH ขึ้นสูงถึง 6.8 เพราะจะทำให้สารละลายกลับมาเป็นสีเขียว )
3. เติม Bacto agar 15.00 กรัม



4. นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้ควรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส
5. เติมสารละลาย Casamino acid ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 20% glucose ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน MM9 กับ PIPES จึงทำการผสมให้เข้ากัน
6. เติมสารละลาย Blue dye 100 มิลลิลิตรและทำการคนให้เข้ากัน ทำการ Pour plates ด้วยวิธี Aseptic technique

#### 4. ISP medium No.2

Yeast extract	4.00	กรัม
Malt extract	10.00	กรัม
Dextrose	4.00	กรัม
Agar	20.00	กรัม

การเตรียมอาหาร ISP medium No.2

ซั่งสารและละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ฟลาสก์ ฟลาสก์ละปริมาตร 350 มิลลิลิตร ปิดจุกฟลาสก์ด้วยสำลีและนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้ควรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ก่อนเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 8 มิลลิลิตร

#### 5. Nutrient agar

Peptone	5.00	กรัม
Beef extract	3.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียมอาหาร Nutrient agar

ซั่งสารและละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนผงงุ่นละลาย แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดหลอดทดลองด้วยสำลีและนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้ควรเอียงหลอดและตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

#### 6. Pototo dextrose agar (PDA)

Pototo dextrose agar	4.00	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียมอาหาร Pototo dextrose agar

ซังสารและละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ฟลาสก์ ฟลาสก์ละปริมาตร 350 มิลลิลิตร ปิดจุกฟลาสก์ด้วยสำลีและนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้ควรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ก่อนเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 8 มิลลิลิตร

#### 7. ISP medium no.2 broth ที่มี tryptophan 0.2 %

Yeast extract	4.00	กรัม
Malt extract	10.00	กรัม
Glucose	4.00	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียมอาหาร ISP medium no.2 broth ที่มี tryptophan 0.2 %

ซังสารและละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนผงวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดหลอดทดลองด้วยสำลีและนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้ควรตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

#### 8. Pikovskaya's agar

Yeast extract	0.50	กรัม
Dextrose	10.00	กรัม
Calcium phosphate	5.00	กรัม
Ammonium sulphate	5.00	กรัม
Potassium chloride	0.20	กรัม
Magnesium sulphate	0.10	กรัม
Manganese sulphate	0.0001	กรัม
Ferrous sulphate	0.0001	กรัม
Agar	15.00	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียมอาหาร Pikovskaya's agar

ซังสารและละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ฟลาสก์ ฟลาสก์ละปริมาตร 350 มิลลิลิตร ปิดจุกฟลาสก์ด้วยสำลีและนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้ควรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ก่อนเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 8 มิลลิลิตร

#### 9. Peptone water 1%

Peptone water	10.00	กรัม
---------------	-------	------

Distilled water 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหาร Peptone water 1%

ละลาย Peptone water 10.00 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีก่อนนำมาใช้ควรตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

#### 10. Nessler's reagent

Potassium iodide (KI) 5 กรัม

Sodium hydroxide (NaOH) 14.4 กรัม

Mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) 2.2 กรัม

การเตรียม Nessler's reagent

1. ละลาย Potassium iodide (KI) 5 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร
2. ละลาย Sodium hydroxide (NaOH) 14.4 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 40 มิลลิลิตร
3. Mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) 2.2 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 35 มิลลิลิตร

นำสารละลาย Mercuric chloride เติมลงใน Potassium iodide ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร จนกระทั่งเกิดตะกอนสีส้ม จึงทำการเติม Sodium hydroxide ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร 100 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน ก่อนนำมาใช้

ภาคผนวก ข ข้อมูลดิบ

1. ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Agar well diffusion

1.1 ความสามารถในการการยับยั้งเชื้อรา

ตาราง 17 ค่าเฉลี่ยโซนการยับยั้งเชื้อรา *A. lunata* บนอาหาร PDA

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ค่าเฉลี่ยโซนการยับยั้ง (มม.) $\pm$ SD
Alo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	29	29	29	29.00 $\pm$ 0.00
Cit6	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	5	5	5	5.00 $\pm$ 0.00
TM13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Tm32	8	8	8	8.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00

ตาราง 18 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. บนอาหาร PDA

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้ง (มม.) $\pm$ SD
Alo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	27	27	26	26.67 $\pm$ 0.58
Cit6	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
TM13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Tm32	7	7	7	7.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00

## 1.2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

ตาราง 19 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากมะกรูด บนอาหาร NA

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้ง (มม.) $\pm$ SD
Alo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	29	29	29	29.00 $\pm$ 0.00
Cit6	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
TM13	11	11	11	11.00 $\pm$ 0.00
Tm32	8	8	8	8.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00

ตาราง 20 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากมะนาว บนอาหาร NA

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้ง (มม.) $\pm$ SD
Alo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	26	27	27	26.67 $\pm$ 0.58
Cit6	2	3	2	2.33 $\pm$ 0.58
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
TM13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Tm32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00

ตาราง 21 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากส้มโอ บนอาหาร NA

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้ง (มม.) $\pm$ SD
Alo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	23	23	24	24.33 $\pm$ 0.58
Cit6	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
TM13	13	13	14	13.33 $\pm$ 0.58
Tm32	7	7	7	7.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00



## 2. ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion

### 2.1 ความสามารถในการการยับยั้งเชื้อรา

ตาราง 22 ค่าเฉลี่ยโซนการยับยั้งเชื้อรา *A. lunata* บนอาหาร PDA

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ค่าเฉลี่ยโซนการยับยั้ง (มม.) $\pm$ SD
Alo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	14	14	14	14.00 $\pm$ 0.00
Cit6	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	5	5	5	5.00 $\pm$ 0.00
TM13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Tm32	7	7	7	7.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00

ตาราง 23 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. บนอาหาร PDA

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้ง (มม.) $\pm$ SD
A lo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	13	13	13	13.00 $\pm$ 0.00
Cit6	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
TM13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Tm32	7	7	7	7.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00

## 2.2 ความสามารถในการการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

ตาราง 24 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากมะกรูด บนอาหาร NA

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้ง (มม.) $\pm$ SD
Alo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	13	13	13	13.00 $\pm$ 0.00
Cit6	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
TM13	11	11	11	11.00 $\pm$ 0.00
Tm32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00

ตาราง 25 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากมะนาว บนอาหาร NA

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้ง (มม.) $\pm$ SD
Alo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	15	15	15	15.00 $\pm$ 0.00
Cit6	2	3	2	2.33 $\pm$ 0.58
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
TM13	15	15	15	15.00 $\pm$ 0.00
Tm32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00

ตาราง 26 ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากส้มโอ บนอาหาร NA

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ค่าเฉลี่ยโชนการยับยั้ง (มม.) $\pm$ SD
Alo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	15	15	15	15.00 $\pm$ 0.00
Cit6	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
TM13	14	14	14	14.00 $\pm$ 0.00
Tm32	7	7	7	7.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00

### 3. ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช

#### 3.1 ความสามารถในการสร้างสารไซเตอโรพอร์

ตาราง 27 ค่าเฉลี่ยไซนการสร้างสารไซเตอโรพอร์เมื่อทดสอบบนอาหาร CAS agar

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ค่าเฉลี่ยสร้างสารไซเตอโรพอร์ (มม.) $\pm$ SD
Alo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	2	1	2	1.67 $\pm$ 0.58
Cit6	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
TM13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Tm32	2	2	2	2.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00

## 3.2 ความสามารถในการสร้างสาร IAA

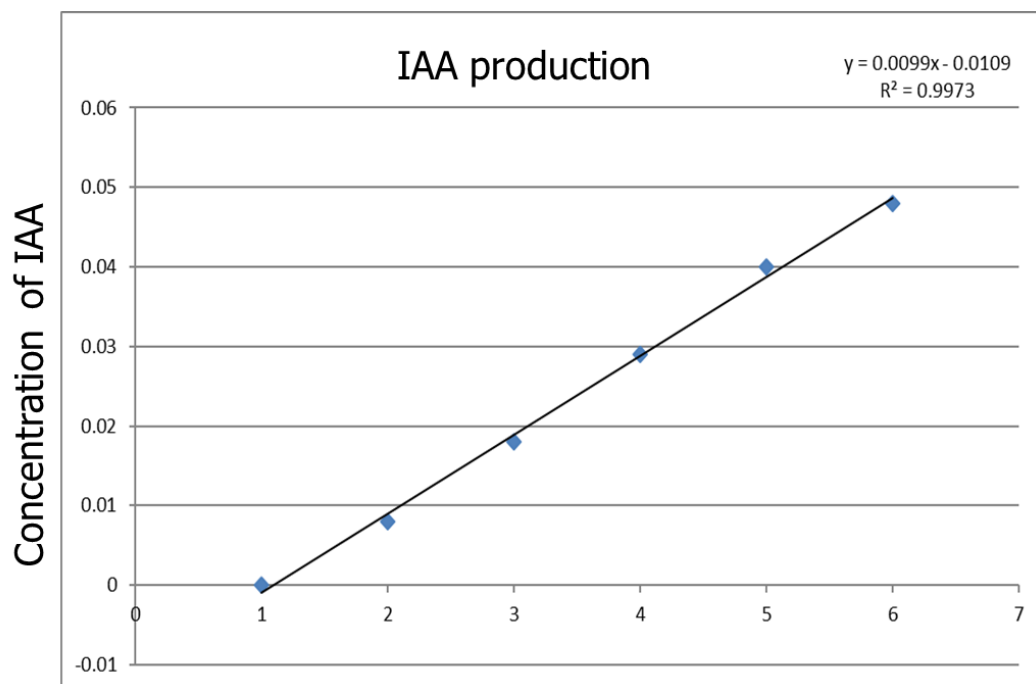
ตาราง 28 ปริมาณ การสร้างสาร IAA ( $\mu\text{g/ml}$ ) ในอาหาร ISP2 broth ที่มี 0.2% L- tryptophan

ไอโซเลข	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ปริมาณ IAA ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ SD
Alo8	0.020	0.020	0.020	0.020 $\pm$ 0.00
Bar14	0.026	0.026	0.026	0.026 $\pm$ 0.00
Cit6	0.011	0.011	0.011	0.011 $\pm$ 0.00
Cit11	0.018	0.018	0.018	0.018 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
TM13	0.041	0.041	0.041	0.041 $\pm$ 0.00
Tm32	0.038	0.038	0.038	0.038 $\pm$ 0.00
Zin13	0.031	0.031	0.031	0.031 $\pm$ 0.00

ตาราง 29 ปริมาณการสร้างสาร IAA ( $\mu\text{g/ml}$ ) ในสารสกัด

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ปริมาณ IAA ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ SD
Alo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit6	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
TM13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Tm32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00





ภาพ 38 กราฟมาตรฐานปริมาณ IAA บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$



### 3.3 ความสามารถในการละลายสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟต

ตาราง 30 การละลายสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya's agar

ไอโซ เลข	ครั้ง ที่1	ครั้ง ที่2	ครั้ง ที่3	ค่าเฉลี่ยของการละลายสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟต (มม.) $\pm$ SD
Alo8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Bar14	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit6	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Cit11	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN23	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN28	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN29	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN30	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HN32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
HNS8	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
JPN1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR1	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
LPR3	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
RBRP4	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Sio	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Spt2	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
TM13	7	7	6	6.67 $\pm$ 0.58
Tm32	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Zin13	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00

### 3.4 ความสามารถในการสร้างแอมโมเนีย

ตาราง 31 ความสามารถในการสร้างแอมโมเนียในอาหาร Peptone water

ไอโซเลท	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	การสร้างแอมโมเนีย
Alo8	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก
Bar14	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก
Cit6	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก
Cit11	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก
HN3	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
HN4	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
HN23	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
HN28	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
HN29	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
HN30	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
HN32	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
HNS3	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
HNS8	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
JPN1	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
LPR1	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
LPR3	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
RBRP4	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ	ผลลบ
Sio	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก
Spt2	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก
TM13	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก
Tm32	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก
Zin13	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก	ผลบวก

4 การประเมินศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดของแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคและส่งเสริมการเจริญของมะนาว

4.1 การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดต่อเปอเซ็นต์การงอกของเมล็ดมะนาว

ตาราง 32 ผลของน้ำเลี้ยงต่อเปอเซ็นต์การงอกของเมล็ดมะนาว

การทดลอง	ก่อนปลูก 6 เมล็ด (จำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ)			หลังปลูก 6 เมล็ด (จำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ)			เปอเซ็นต์การงอก
น้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14							
ครั้งที่	1	2	3	1	2	3	
1 วัน	6	6	6	0	0	0	
7 วัน	6	6	6	5	4	4	
14 วัน	6	6	6	5	5	5	
15 วัน	6	6	6	6	6	5	94.44%
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ							
ครั้งที่	1	2	3	1	2	3	
1 วัน	6	6	6	0	0	0	
7 วัน	6	6	6	0	2	1	
14 วัน	6	6	6	0	2	2	
15 วัน	6	6	6	1	2	3	37.26%
สารละลาย IAA (100 µg/ml)							
ครั้งที่	1	2	3	1	2	3	
1 วัน	6	6	6	3	2	0	
7 วัน	6	6	6	4	3	0	
14 วัน	6	6	6	4	3	0	
15 วัน	6	6	6	4	3	0	66.67%
อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth							
ครั้งที่	1	2	3	1	2	3	
1 วัน	6	6	6	3	2	0	
7 วัน	6	6	6	4	3	0	
14 วัน	6	6	6	4	3	0	
15 วัน	6	6	6	4	3	0	38.89%

#### 4.2 การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงต่อมะนาวในระยะการเพาะเมล็ดและปักชำกิ่ง

ตาราง 33 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อความยาวรากในระยะการเพาะเมล็ด

การทดลอง	ความยาวราก (มม.) (6 เมล็ด จำนวน 3 ซ้ำ)						
จำนวนเมล็ด	1	2	3	4	5	6	ค่าเฉลี่ย±SD
<b>น้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14</b>							
ครั้งที่ 1	25	15	25	10	5	2	13.67±9.83
ครั้งที่ 2	32	25	32	24	25	37	29.17±5.27
ครั้งที่ 3	42	45	53	40	19	0	33.17±19.79
<b>น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ</b>							
ครั้งที่ 1	47	20	44	35	32	35	35.50±9.57
ครั้งที่ 2	2	1	7	1	5	0	2.67±2.73
ครั้งที่ 3	5	0	0	0	0	0	0.83±2.04
<b>สารละลาย IAA (100 µg/ml)</b>							
ครั้งที่ 1	0	0	0	0	0	0	0.00±0.00
ครั้งที่ 2	2	1	1	6	35	40	9.00±18.24
ครั้งที่ 3	39	43	23	5	12	0	24.40±17.82
<b>อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth</b>							
ครั้งที่ 1	0	0	0	0	0	0	0.00±0.00
ครั้งที่ 2	32	35	30	39	40	31	35.20±4.23
ครั้งที่ 3	42	34	24	59	50	21	41.80±14.84

ตาราง 34 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อจำนวน รากในระยะการเพาะเมล็ด

การทดลอง	จำนวนราก (ราก) (6 เมล็ด จำนวน 3 ซ้ำ)							ค่าเฉลี่ย±SD
จำนวน เมล็ด	1	2	3	4	5	6		
น้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14								
ครั้งที่ 1	1	2	1	1	1	1	1.17±0.40	
ครั้งที่ 2	1	2	1	1	1	1	1.17±0.40	
ครั้งที่ 3	1	2	1	1	1	1	1.17±0.40	
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ								
ครั้งที่ 1	1	0	1	1	0	1	0.67±0.51	
ครั้งที่ 2	1	0	1	1	0	1	0.67±0.51	
ครั้งที่ 3	1	0	1	1	0	1	0.67±0.51	
สารละลาย IAA (100 µg/ml)								
ครั้งที่ 1	1	1	1	1	1	1	1.00±0.00	
ครั้งที่ 2	1	1	1	1	1	1	1.00±0.00	
ครั้งที่ 3	1	1	1	1	1	1	1.00±0.00	
อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth								
ครั้งที่ 1	1	1	1	1	1	0	0.83 ±0.41	
ครั้งที่ 2	1	1	1	1	1	0	0.83 ±0.41	
ครั้งที่ 3	1	1	1	1	1	0	0.83 ±0.41	

ตาราง 35 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อจำนวนใบ  
ในระยะเวลาเพาะเมล็ด

การทดลอง	จำนวนใบ (ใบ) (6 เมล็ด จำนวน 3 ซ้ำ)							
จำนวน	1	2	3	4	5	6	ค่าเฉลี่ย±SD	
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ								
ครั้งที่ 1	5	4	4	3	2	2	3.33±1.21	
ครั้งที่ 2	2	0	0	0	0	0	0.33±0.82	
ครั้งที่ 3	0	0	0	0	0	0	0.00±0.00	
น้ำเลี้ยงไอโซเลท Bar14								
ครั้งที่ 1	2	4	0	0	0	0	1.00±1.51	
ครั้งที่ 2	4	2	6	2	4	4	3.67±1.51	
ครั้งที่ 3	2	4	4	4	2	0	2.67±1.03	
สารละลาย IAA (100 µg/ml)								
ครั้งที่ 1	0	0	0	0	0	0	0.00±0.00	
ครั้งที่ 2	0	0	0	4	2	2	1.33±1.63	
ครั้งที่ 3	2	2	2	2	0	0	1.33±1.03	
อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth								
ครั้งที่ 1	2	2	0	0	0	0	0.67±1.03	
ครั้งที่ 2	4	4	4	4	2	2	3.33±1.03	
ครั้งที่ 3	4	4	2	2	2	0	2.33±1.51	

ตาราง 36 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งในระยะเพาะเมล็ด

การทดลอง	น้ำหนักสดในระยะเพาะเมล็ด						ค่าเฉลี่ย±SD
	1	2	3	4	5	6	
จำนวนเมล็ด							
น้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14							
ครั้งที่ 1	0.2576	0.2589	0.2017	0.2029	0.2011	0.2	0.22±0.03
ครั้งที่ 2	0.2495	0.2387	0.2198	0.2276	0.2079	0.1989	0.22±0.02
ครั้งที่ 3	0.2567	0.2505	0.2497	0.2459	0.1879	0.1287	0.22±0.05
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ							
ครั้งที่ 1	0.2385	0.2498	0.2359	0.2455	0.3245	0.2130	0.25±0.04
ครั้งที่ 2	0.2318	0.2340	0.1462	0.1459	0.1204	0.1101	0.16±0.05
ครั้งที่ 3	0.091	0.111	0.117	0.121	0.132	0.0931	0.11±0.02
สารละลาย IAA (100 µg/ml)							
ครั้งที่ 1	0.1132	0.1097	0.1121	0.109	0.126	0.114	0.11±0.00
ครั้งที่ 2	0.1598	0.1345	0.1402	0.218	0.222	0.2143	0.18±0.04
ครั้งที่ 3	0.0978	0.1527	0.1497	0.1053	0.1127	0.1512	0.13±0.03
อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth							
ครั้งที่ 1	0.1167	0.1231	0.1227	0.1233	0.1121	0.121	0.12±0.00
ครั้งที่ 2	0.2156	0.2174	0.2289	0.2098	0.2201	0.168	0.21±0.02
ครั้งที่ 3	0.2317	0.2287	0.2234	0.2347	0.21182	0.2172	0.23±0.01



ตาราง 37 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อน้ำหนักแห้งในระยาะเพาะเมล็ด

การทดลอง	น้ำหนักแห้งในระยาะเพาะเมล็ด						
จำนวน	1	2	3	4	5	6	ค่าเฉลี่ย±SD
น้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14							
ครั้งที่ 1	0.1666	0.1797	0.1401	0.1643	0.1567	0.1432	0.16±0.01
ครั้งที่ 2	0.171	0.157	0.1554	0.1165	0.0974	0.0477	0.12±0.05
ครั้งที่ 3	0.1816	0.1840	0.1879	0.1831	0.0831	0.0935	0.15±0.05
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ							
ครั้งที่ 1	0.0686	0.0212	0.0582	0.0382	0.0894	0.0369	0.05±0.02
ครั้งที่ 2	0.0832	0.0569	0.0214	0.0417	0.0163	0.0434	0.04±0.02
ครั้งที่ 3	0.0163	0.0535	0.0631	0.0643	0.0438	0.0177	0.04±0.02
สารละลาย IAA (100 µg/ml)							
ครั้งที่ 1	0.0474	0.0438	0.06322	0.0196	0.0409	0.0776	0.05±0.02
ครั้งที่ 2	0.057	0.011	0.643	0.1034	0.1178	0.108	0.17±0.23
ครั้งที่ 3	0.0437	0.0265	0.0634	0.075	0.0157	0.052	0.05±0.02
อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth							
ครั้งที่ 1	0.0463	0.0535	0.109	0.0703	0.0578	0.523	0.06±0.19
ครั้งที่ 2	0.0811	0.0527	0.0834	0.0728	0.0414	0.0379	0.06±0.02
ครั้งที่ 3	0.0298	0.0261	0.0884	0.0534	0.0645	0.0177	0.05±0.03





ตาราง 40 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อจำนวนกิ่ง  
หลังปลูก

การทดลอง	จำนวนกิ่งใหม่หลังปลูก						
จำนวนวัน	1	7	14	21	28	30	ค่าเฉลี่ย±SD
น้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14							
ครั้งที่ 1	3	2	2	0	0	0	1.17±0.75
ครั้งที่ 2	3	1	1	1	1	1	1.33±0.82
ครั้งที่ 3	5	3	1	1	1	1	2.00±1.67
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ							
ครั้งที่ 1	0	0	0	0	0	0	0.00±0.00
ครั้งที่ 2	0	0	0	0	0	0	0.00±0.00
ครั้งที่ 3	0	1	1	0	0	0	0.33±0.52
สารละลาย IAA (100 µg/ml)							
ครั้งที่ 1	0	2	2	2	2	2	1.67±0.82
ครั้งที่ 2	0	0	0	0	0	0	0.00±0.00
ครั้งที่ 3	0	0	0	0	0	0	0.00±0.00
อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth							
ครั้งที่ 1	0	2	2	1	1	1	1.17±0.75
ครั้งที่ 2	0	1	3	1	1	1	1.17±0.98
ครั้งที่ 3	0	1	1	1	1	1	0.83±0.41

ตาราง 41 ผลของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14 ต่อจำนวนใบก่อนปลูก

การทดลอง	จำนวนใบก่อนปลูก						ค่าเฉลี่ย±SD
	1	7	14	21	28	30	
จำนวนวัน	1	7	14	21	28	30	ค่าเฉลี่ย±SD
น้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท Bar14							
ครั้งที่ 1	3	3	3	3	3	3	3.00±0.00
ครั้งที่ 2	3	4	4	4	4	4	3.83±0.41
ครั้งที่ 3	3	3	3	3	3	3	3.00±0.00
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ							
ครั้งที่ 1	3	1	1	1	1	1	1.33±0.82
ครั้งที่ 2	3	2	2	2	2	2	2.17±0.41
ครั้งที่ 3	3	2	2	2	2	2	2.17±0.41
สารละลาย IAA (100 µg/ml)							
ครั้งที่ 1	3	2	2	1	1	0	1.50±1.05
ครั้งที่ 2	3	3	2	2	0	0	1.67±1.37
ครั้งที่ 3	3	2	2	1	1	0	1.50±1.05
อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 broth							
ครั้งที่ 1	3	2	2	1	0	0	1.33±1.21
ครั้งที่ 2	3	3	2	2	1	1	2.00±0.89
ครั้งที่ 3	3	2	2	0	0	0	1.17±1.33







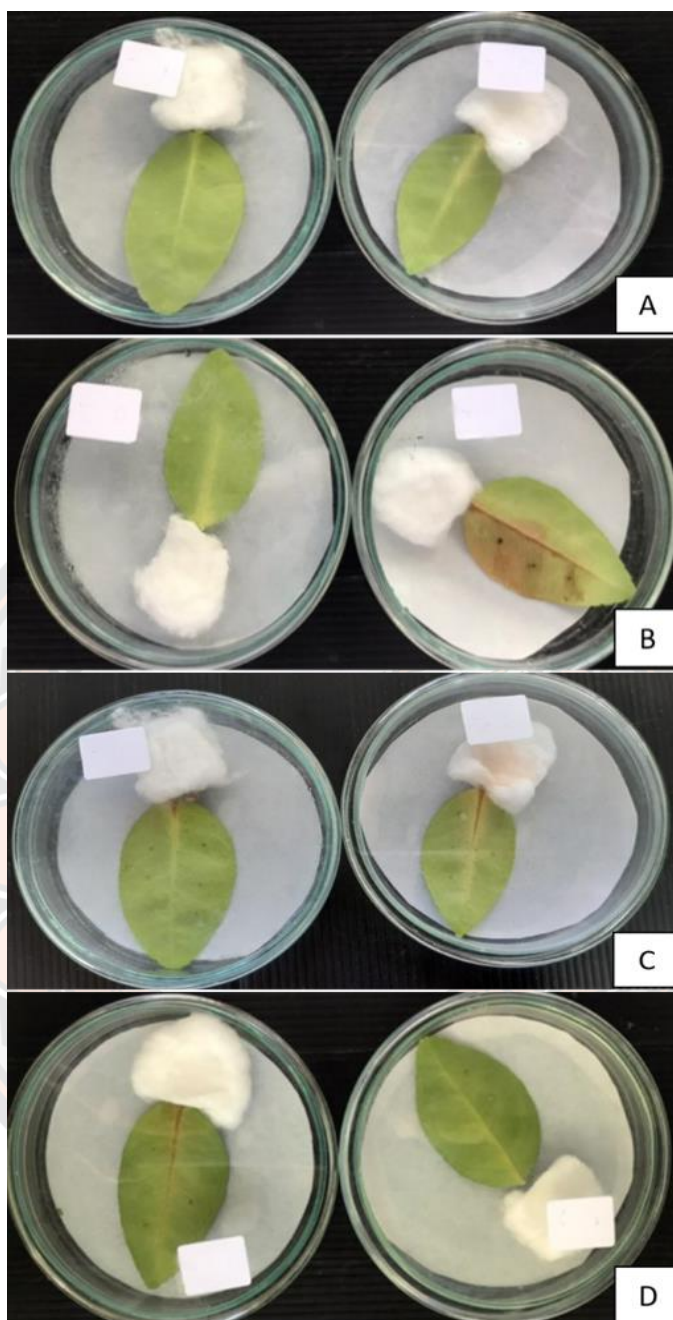




### 4.3 ประเมินศักยภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในใบมะนาว

ตาราง 46 สารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในใบมะนาว

การทดลอง	จำนวนวัน	
	7 วัน	14 วัน
ภาพ A สารสกัดไอโซเลท Bar14 (1 mg/ml) กับ สารละลายแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์		
ครั้งที่ 1	ไม่เกิดโรค	ไม่เกิดโรค
ครั้งที่ 2	ไม่เกิดโรค	ไม่เกิดโรค
ครั้งที่ 3	ไม่เกิดโรค	ไม่เกิดโรค
ภาพ B สารสกัดไอโซเลท Bar14 (1 mg/ml) (ชุดควบคุม)		
ครั้งที่ 1	ไม่เกิดโรค	ไม่เกิดโรค
ครั้งที่ 2	ไม่เกิดโรค	ไม่เกิดโรค
ครั้งที่ 3	ไม่เกิดโรค	ไม่เกิดโรค
ภาพ C การใช้เข็มฉีดยาใบให้เกตรอยแผล (ชุดควบคุม)		
ครั้งที่ 1	ไม่เกิดโรค	ไม่เกิดโรค
ครั้งที่ 2	ไม่เกิดโรค	ไม่เกิดโรค
ครั้งที่ 3	ไม่เกิดโรค	ไม่เกิดโรค
ภาพ D สารละลายแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ (ชุดควบคุม)		
ครั้งที่ 1	ไม่เกิดโรค	ไม่เกิดโรค
ครั้งที่ 2	ไม่เกิดโรค	ไม่เกิดโรค
ครั้งที่ 3	ไม่เกิดโรค	ไม่เกิดโรค



ภาพ 39 สารสกัดแอคติโนแบคทีเรียในการยับยั้งโรคแคงเกอร์ในใบมะนาว

- หมายเหตุ: A สารสกัดไอโซเลท Bar14 ความเข้มข้น 1 mg/ml กับ สารละลายแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จากมะนาว (ชุดทดสอบ)  
 B สารสกัดไอโซเลท Bar14 ความเข้มข้น 1 mg/ml (ชุดควบคุม)  
 C การใช้เข็มจิ้มใบให้เกิดรอยแผล (ชุดควบคุม)  
 D สารละลายแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์จากมะนาว (ชุดควบคุม)







ประวัติผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยสุรินทร์