



การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตไซเดอโรฟออร์และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของแอคติโนมัยซีทที่คัด
แยกจากมูลไส้เดือนและผักนึ่งทะเล กับแบคทีเรียซูดอโมแนส พุดิด้า ภายใต้สภาวะความเค็ม

COMPARATIVE STUDY OF SIDEROPHORE PRODUCTION AND ANTIBACTERIAL
ACTIVITY OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM EARTHWORM CASTINGS
AND BEACH MORNING-GLORY AND *Pseudomonas putida* UNDER SALINE CONDITION

ทิวากรณ์ กนกฉันท

มหาวิทยาลัยบูรพา

2563



3696644678

BUU_1Thesis_59910008_thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28



59910008_3696644678

การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตไซเคอโรฟออร์และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของแอคติโนมัยสีทที่คัด
แยกจากมูลไส้เดือนและผักบุงทะเล กับแบคทีเรียซูโดโมแนส พุดิต้า ภายใต้สภาวะความเค็ม

ทิวากรณ์ กนกกลิ่นท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

COMPARATIVE STUDY OF SIDEROPHORE PRODUCTION AND ANTIBACTERIAL
ACTIVITY OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM EARTHWORM CASTINGS
AND BEACH MORNING-GLORY AND *Pseudomonas putida* UNDER SALINE CONDITION

TIRAPORN KANOKCHAN

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

2020

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

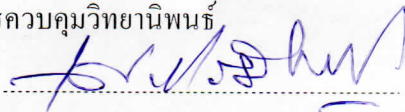


363644678

BURU .IThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ทิราภรณ์ กนกพันธ์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

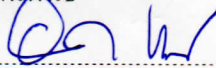
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์



อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

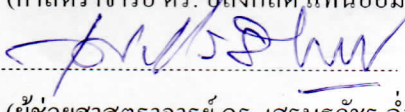
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสริมฐวัชร นำศาสตร์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์




ประธาน

(ศาสตราจารย์ ดร. อลงกลด แทนอมทอง)



กรรมการ


(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสริมฐวัชร นำศาสตร์)



กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงตา จุลศิริกุล)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพา



คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 15 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2563



389644678

59910008: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

คำสำคัญ: ไชเคอโรฟออร์/ สภาวะความเค็ม/ แอคติโนมัยสีท/ Antibacteria

ทิตรากรณ กนกนันท์ : การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตไชเคอโรฟออร์และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากมูลไส้เดือนและผักบุ้งทะเล กับแบคทีเรียชูโดโมแนส พุดิต้า ภายใต้สภาวะความเค็ม. (COMPARATIVE STUDY OF SIDEROPHORE PRODUCTION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM EARTHWORM CASTINGS AND BEACH MORNING-GLORY AND *Pseudomonas putida* UNDER SALINE CONDITION) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เศรษฐวัชร จำาสาศตรปี พ.ศ. 2563.

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างสารไชเคอโรฟออร์ของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากมูลไส้เดือนและผักบุ้งทะเล โดยเปรียบเทียบกับ *P. putida* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ นำแอคติโนมัยสีททั้ง 35 ไอโซเลต ตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและจัดจำแนกในระดับสกุลโดยใช้ยีน 16S rRNA ตรวจสอบการสร้างสารไชเคอโรฟออร์บนอาหารแข็ง Chrome azurol S (CAS) และบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส 3 สัปดาห์ ผลพบว่าเกิดวงใสสีส้มรอบ ๆ โคลินิของ *P. putida* และแอคติโนมัยสีท ทั้ง 35 ไอโซเลต และไอโซเลต BBUU157 ที่คัดแยกจากมูลไส้เดือน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสสีส้มใหญ่สุด (4.70 เซนติเมตร) รองลงมาคือไอโซเลต BBUU500 ที่คัดแยกจากผักบุ้งทะเล (4.40 เซนติเมตร) ในขณะที่ *P. putida* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.20 เซนติเมตร และเมื่อนำทั้งสามสายพันธุ์เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS ที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 200-1,000 มิลลิโมลาร์ พบว่า ไอโซเลต BBUU500 สร้างไชเคอโรฟออร์ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 400 มิลลิโมลาร์ ได้เท่ากับสภาวะที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในขณะที่ ไอโซเลต BBUU157 และ *P. putida* สร้างไชเคอโรฟออร์ได้ลดลง ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่า 23 ไอโซเลตมีฤทธิ์ต้าน *B. cereus* 4 ไอโซเลตมีฤทธิ์ต้าน *E. coli* 2 ไอโซเลตมีฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* และ 15 ไอโซเลตมีฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA มีค่าความเหมือนกับสกุล *Streptomyces* 28 ไอโซเลต สกุล *Kitasatospora* 3 ไอโซเลต สกุล *Micromonospora* 1 ไอโซเลต และอีก 3 ไอโซเลต เกิดการปนเปื้อนไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้

59910008: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCES; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCES)

KEYWORDS: ACTINOMYCETES/ ANTIBACTERIA/ SALINITY/ SIDEROPHORES

TIRAPORN KANOKCHAN : COMPARATIVE STUDY OF SIDEROPHORE PRODUCTION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM EARTHWORM CASTINGS AND BEACH MORNING-GLORY AND *PSEUDOMONAS PUTIDA* UNDER SALINE CONDITION. ADVISORY COMMITTEE: SAETHAWAT CHAMSART, 2020.

The objectives of this study were to compare the capability of producing siderophore of actinomycetes isolated from earthworm castings and beach morning-glory with *P. putida* on the media supplemented with 0-1,000 mM NaCl solution. A total of 35 actinomycetes were tested antagonistic activity and identified in the genus level by using 16S rRNA. To elucidate ability of siderophore production, the bacteria were cultured on Chrome azurol S (CAS) and incubated at 27 °C for 3 weeks. The results showed that a total of 35 actinomycetes and *P. putida* appeared orange halo zone around the colonies. The BBUU157 isolated from earthworm castings was observed the widest halo zone diameter (4.70 cm.) and BBUU500 isolated from beach morning-glory was the second widest diameter (4.40 cm.) while *P. putida* showed 2.20 centimeters in diameter. Three bacteria strains were cultured on CAS supplemented with NaCl concentration 200-1,000 mM. The results showed that BBUU500 in the presence of 400 mM NaCl was able to produce siderophore at the same level as the controlled BBUU500 while BBUU157 and *P. putida* in presence of 400 mM NaCl was able to produce siderophore less than the controlled BBUU157 and *P. putida*. For the results of antagonistic actinomycetes, 23 isolates showed activity against *B. cereus*, 4 isolates against *E. coli*, 2 isolates against *P. aeruginosa* and 15 isolates against *S. aureus*. For the results of the identification of 16S rRNA gene sequence showed that 28 isolates is similar to *Streptomyces*, 3 isolates was similar to *Kitasatospora*, and 1 isolate was similar to *Micromonospora* while 3 isolates were contaminated and could not be analyzed.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณา ความอนุเคราะห์ และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร น้าศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.จันทรา อินทนนท์ และคุณ นันทน อินทนนท์ ที่มอบทุนการศึกษา และให้คำปรึกษาคำแนะนำข้อคิด วิธีหรือแนวทางในการทำวิจัยและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ เป็นอย่างดียิ่งมาโดยตลอด รวมทั้งยังให้ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อลงกลด แทนอมทอง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงตา จุลศิริกุล ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ แนวคิด คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ยิ่ง รวมทั้งบุคคลที่ผู้วิจัยได้อ้างอิงทางวิชาการตามที่ปรากฏในบรรณานุกรม

ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้กรุณาให้การอบรมสั่งสอน ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ทักษะ ประสบการณ์ที่ดีและมีคุณค่ายิ่งแก่ผู้วิจัยจนประสบความสำเร็จในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนค่าธรรมเนียมทางการศึกษาบางส่วนสำหรับบัณฑิตศึกษา จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ข้าพเจ้าขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณนางสาวจิราวรรณ สิทธิสวนจิก และนางสาวทิพย์ฉัตร กรศิริภิญโญ ที่ให้การช่วยเหลือให้คำปรึกษาตลอดจนกำลังใจที่ดีในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับมิตรภาพและความช่วยเหลือ รวมถึงท่านอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ที่มีส่วนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบเป็นเป็นเครื่องบูชาพระคุณแก่บิดา มารดาที่ให้กำลังใจ เลี้ยงดู และอบรมสั่งสอนผู้วิจัยอย่างดียิ่งมาโดยตลอด

ทิวาภรณ์ กนกฉันท

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉุ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
สมมติฐานของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
บทที่ 2	5
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
แอกติโนมัยสีท	5
ไซโตโรเฟอร์.....	12
คินเค็ม	17
การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีท	18
บทที่ 3	27
การดำเนินการวิจัย	27
จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	27

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	27
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	28
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	28
บทที่ 4	37
ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย.....	37
ตารางที่ 17 ค่าความเหมือนของ BBUU500 กับสมาชิกแอกติโนมัยสีทสกุล <i>Streptomyces</i>	63
บทที่ 5	68
สรุปผลการวิจัย	68
ภาคผนวก	70
ภาคผนวก ก	71
ภาคผนวก ข	77
ภาคผนวก ค	81
ภาคผนวก ง.....	90
ภาคผนวก จ	94
ภาคผนวก ฉ	102
ภาคผนวก ช	109
ภาคผนวก ซ.....	119
ภาคผนวก ฌ	128
ภาคผนวก ญ	137
ภาคผนวก ณ	140
ภาคผนวก ด	143
บรรณานุกรม.....	150
ประวัติย่อของผู้วิจัย	158

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 อิทธิพลของเกลือในดินต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตพืช	18
ตารางที่ 2 องค์ประกอบของผนังเซลล์แอคติโนมัยซีท	20
ตารางที่ 3 phospholipid ของแอคติโนมัยซีท	23
ตารางที่ 4 รายชื่อแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท.....	29
ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร MS	38
ตารางที่ 6 การย้อมแกรม.....	40
ตารางที่ 7 การผลิตไซเคอโรฟอรัภายใต้สภาวะปกติ	41
ตารางที่ 8 การเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์บนอาหารสูตรต่าง ๆ	44
ตารางที่ 9 การทนเค็มในเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0-7%).....	45
ตารางที่ 10 ระดับการเจริญที่เหมาะสม.....	46
ตารางที่ 11 การเจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์	47
ตารางที่ 12 การผลิตไซเคอโรฟอรัในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์.....	50
ตารางที่ 13 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	53
ตารางที่ 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP ของไอโซเลต BBUU157	55
ตารางที่ 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP ของไอโซเลต BBUU500	56
ตารางที่ 16 ค่าความเหมือนของแอคติโนมัยซีทกับแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใกล้เคียง	59
ตารางที่ 17 ค่าความเหมือนของ BBUU500 กับสมาชิกแอคติโนมัยซีทสกุล <i>Streptomyces</i>	63
ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ fatty acids ของไอโซเลต BBUU500	66



369644678

BUU_1Thesis_59910008_thesis / rev: 02042563 18:44:30 / seq: 28

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1	อันดับต่าง ๆ ของแบคทีเรียในชั้น Actinobacteria	6
ภาพที่ 2	การสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีทาที่ 2-2 การสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีท	7
ภาพที่ 3	ตัวอย่างลักษณะสปอร์แบบต่าง ๆ ที่พบในแอกติโนมัยซีท	9
ภาพที่ 4	วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยซีท	10
ภาพที่ 5	โครงสร้างของไซเดอโรฟอรั	14
ภาพที่ 6	โครงสร้างของ Desferrioxamine B และ E	15
ภาพที่ 7	กลุ่มยีน <i>desABCD</i> และการสังเคราะห์ Desferrioxamine	16
ภาพที่ 8	องค์ประกอบของผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีท	20
ภาพที่ 9	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรีย	38
ภาพที่ 10	การผลิตไซเดอโรฟอรัของแอกติโนมัยซีทภายใต้สภาวะปกติ	43
ภาพที่ 11	การเจริญบนอาหารแข็งสูตร YD	44
ภาพที่ 12	การเจริญบนอาหารแข็งสูตร ISP2	44
ภาพที่ 13	การเจริญเติบโตในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ของไอโซเลต BBUU157	47
ภาพที่ 14	การเจริญเติบโตในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ของไอโซเลต BBUU500	48
ภาพที่ 15	การเจริญเติบโตในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ของ <i>P. putida</i> ATCC 17484	48
ภาพที่ 16	การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์	49
ภาพที่ 17	การผลิตไซเดอโรฟอรัในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ของไอโซเลต BBUU157	51
ภาพที่ 18	การผลิตไซเดอโรฟอรัในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ของไอโซเลต BBUU500	51
ภาพที่ 19	การผลิตไซเดอโรฟอรัในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ของ <i>P. putida</i> ATCC 17484	52
ภาพที่ 20	การเปรียบเทียบการผลิตไซเดอโรฟอรัในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์	52
ภาพที่ 21	ลักษณะสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไอโซเลต BBUU157	56

ภาพที่ 22 ลักษณะสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไอโซเลต BBUU500 57

ภาพที่ 23 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ Neighbor-Joining method ของแอกติโนมัยซีท62

ภาพที่ 24 diaminopimelic acid ของไอโซเลต BBUU50064

ภาพที่ 25 น้ำตาลในผนังเซลล์ของไอโซเลต BBUU500.....65

ภาพที่ 26 Phospholipid ของไอโซเลต BBUU500.....67

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ความเค็มส่งผลให้สภาวะแวดล้อมในดินไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้รากพืชชอนไชยากและแร่ธาตุบางอย่างละลายออกมาจากดินจนเป็นพิษต่อพืช พืชแต่ละชนิดปรับตัวเข้ากับสภาพความเค็มได้ต่างกัน หากพืชปรับตัวไม่ได้พืชอาจจะตายได้ (วิชิตพล มีแก้ว และคณะ, 2553) ทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหา คือ การใช้ปุ๋ยชีวภาพในการปรับปรุงดิน การเพิ่มแร่ธาตุอาหารในดินให้กับพืช และการตัดแปลงปรับปรุงพันธุพืชให้มีความต้านทานต่อสิ่งแวดล้อมได้ดียิ่งขึ้น อีกทางเลือกหนึ่ง คือ การประยุกต์ใช้วิธีทางธรรมชาติ โดยใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria, PGPB) กลุ่มที่อาศัยอยู่บริเวณรอบๆ รากพืช เรียกว่า ไรโซแบคทีเรีย (Rhizobacteria) และอาศัยอยู่ภายในพืช เรียกว่า เอนโดไฟต์ (Endophytes) PGPB เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมและป้องกันพืชจากความเครียดต่าง ๆ เช่น ความเค็ม เชื้อก่อโรคพืช รวมทั้งการใช้ปุ๋ยเคมีเร่งการเจริญเติบโตของพืช แบคทีเรียทนเค็มสามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือ เนื่องจากภายในเซลล์มีปริมาณความเข้มข้นของไอออนของเกลือต่ำ (Na^+ และ K^+) ดังนั้นแบคทีเรียทนเค็มจึงมีการปรับสภาวะภายในเซลล์กับภายนอกเซลล์ให้เกิดสมดุล โดยการนำไอออนของเกลือ (Na^+ และ K^+) จากภายนอกเข้ามาภายในเซลล์เพื่อนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ ส่งผลให้ไอออนของเกลือในดินลดลง ทำให้สภาวะแวดล้อมในดินเหมาะสมต่อการเจริญของพืชมากขึ้น (ศิริลักษณ์ นามวงษ์, 2553) PGPB ที่อาศัยอยู่ภายในพืช แม้ว่าความสัมพันธ์หรือปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างเอนโดไฟต์กับพืชยังคงไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานว่าเอนโดไฟต์หลายชนิดผลิตสารเมแทบอลิไทต์ที่ป้องกันเชื้อก่อโรคให้กับพืชและสารเมแทบอลิไทต์ที่พบยังสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในคนและสัตว์ได้อีกด้วย (Strobel et al., 2004) PGPB ที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนเป็นผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุต่าง ๆ ผ่านกระบวนการย่อยโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ของไส้เดือน ซึ่งมูลไส้เดือนประกอบด้วยธาตุอาหารที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม มีรายงานพบ แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซีทในมูลไส้เดือน (Huang et al., 2013; Pathma & Sakthivel, 2013) การใช้แบคทีเรียกลุ่ม PGPB เช่น *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. ถือว่าเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่ใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยผ่านกลไกทั้งทางตรงและทางอ้อม กลไกเหล่านี้ได้แก่ ผลิตฮอร์โมนพืช

ละลายธาตุอาหาร ควบคุมการดูดซึมสารอาหาร ชักนำระบบความต้านทานในพืช ผลิตภัณฑ์ชีวณะ และไซเดอโรฟอรั (Siderophore) PGPB ที่สามารถผลิตไซเดอโรฟอรัได้จะมีส่วนช่วยในการลดการเจริญหรือลดเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช โดยไปแย่งจับธาตุเหล็กกับจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ส่งผลให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากขาดแคลนธาตุเหล็กซึ่งเป็นแร่ธาตุที่สำคัญในการเจริญ (Neilands, 1995) ไซเดอโรฟอรัยังมีส่วนช่วยในการละลายและขนส่งธาตุเหล็กไปยังพืช และยังมีผลทางอ้อมในการกระตุ้นการสังเคราะห์สารต้านจุลชีพ (Antimicrobial compounds) โดยทำให้สารประกอบเหล่านี้ง่ายต่อการนำไปใช้ (Dikin et al., 2007) การผลิตไซเดอโรฟอรัในสภาวะความเค็ม พบว่า ความเค็มมีอิทธิพลต่อการผลิตไซเดอโรฟอรั ของ *Chromohalobacter salexigens* เมื่อความเข้มข้นของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ต่ำสุดจะผลิตไซเดอโรฟอรัได้มากที่สุด และผลิตได้ลดลงเมื่อความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น (Argandona et al., 2010; Shrivastava & Kumar, 2011) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า *Streptomyces* มีประสิทธิภาพในการผลิตไซเดอโรฟอรัเพิ่มขึ้น เมื่อมีปริมาณของเกลือ โซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น (Sadeghi et al., 2012) จะเห็นได้ว่าความเค็มมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตไซเดอโรฟอรัแตกต่างออกไปตามชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไปถึงอิทธิพลของความเค็มที่มีผลกับการผลิตไซเดอโรฟอรั ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการผลิตไซเดอโรฟอรัและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของแอคติโนมัยสิทกับ *P. putida* ATCC 17484 ภายใต้สภาวะความเค็ม

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไซเดอโรฟอรัและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของแอคติโนมัยสิท ที่คัดแยกจากมูลไส้เดือนและผักนึ่งทะเล กับ *P. putida* ATCC 17484 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายเกลือ โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์

3. สมมติฐานของการวิจัย

สารละลายเกลือ โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จะมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตไซเดอโรฟอรัและแอคติโนมัยสิทมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ได้แอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตไซเดอโรฟอรัภายใต้สภาวะความเค็มและมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ซึ่งในอนาคตอาจจะนำแบคทีเรียนี้ไปใช้ประโยชน์ร่วมกับการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

5. ขอบเขตของการวิจัย

1. แบคทีเรียแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกไว้แล้ว โดยผู้ช่วยวิจัยในโครงการวิจัยของจันทรานินทนนท์ โดยมาจากสองแหล่ง คือ จากมูลไส้เดือนจำนวน 30 ไอโซเลต และจากผักบุงทะเลจำนวน 8 ไอโซเลต และ *P. putida* ATCC 17484 จากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ประเทศสหรัฐอเมริกา (The American Type Culture Collection) โดยแบคทีเรียเหล่านี้เก็บรักษาไว้ในหน่วยวิจัยแอคติโนมัยสีท (Actinobacteria Research Unit) ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตไซเดอโรฟอรัและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* และ *S. aureus*

2. ใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 0-7% (w/v) และสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์

3. อาหารที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย อาหารแข็ง Chrome azurol S (CAS) ใช้เพื่อตรวจสอบการผลิตไซเดอโรฟอรั อาหารเหลวสูตร Yeast Extract-Dextrose (YD) ใช้หาระดับการเจริญของเซลล์ที่เหมาะสมและตรวจสอบการเจริญของแอคติโนมัยสีทภายใต้สภาวะการเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ อาหารแข็งสูตร International *Streptomyces* Project (ISP) สูตรที่ 2, 3, 4 และ 5, Mannitol Soya (MS) ใช้เพื่อศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและจัดจำแนก อาหารสูตร Nutrient Agar (NA) และ Nutrient broth (NB) ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

4. จัดจำแนกแอคติโนมัยสีทในระดับสกุล โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ยีน 16S rRNA และแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (Phylogenetic tree)

6. ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2560 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2563

7. สถานที่ดำเนินการวิจัย

หน่วยวิจัยแอกติโนแบคทีเรีย (BS2106) อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตบางแสน จังหวัดชลบุรี



369644678

BUU-IThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

บทที่ 2

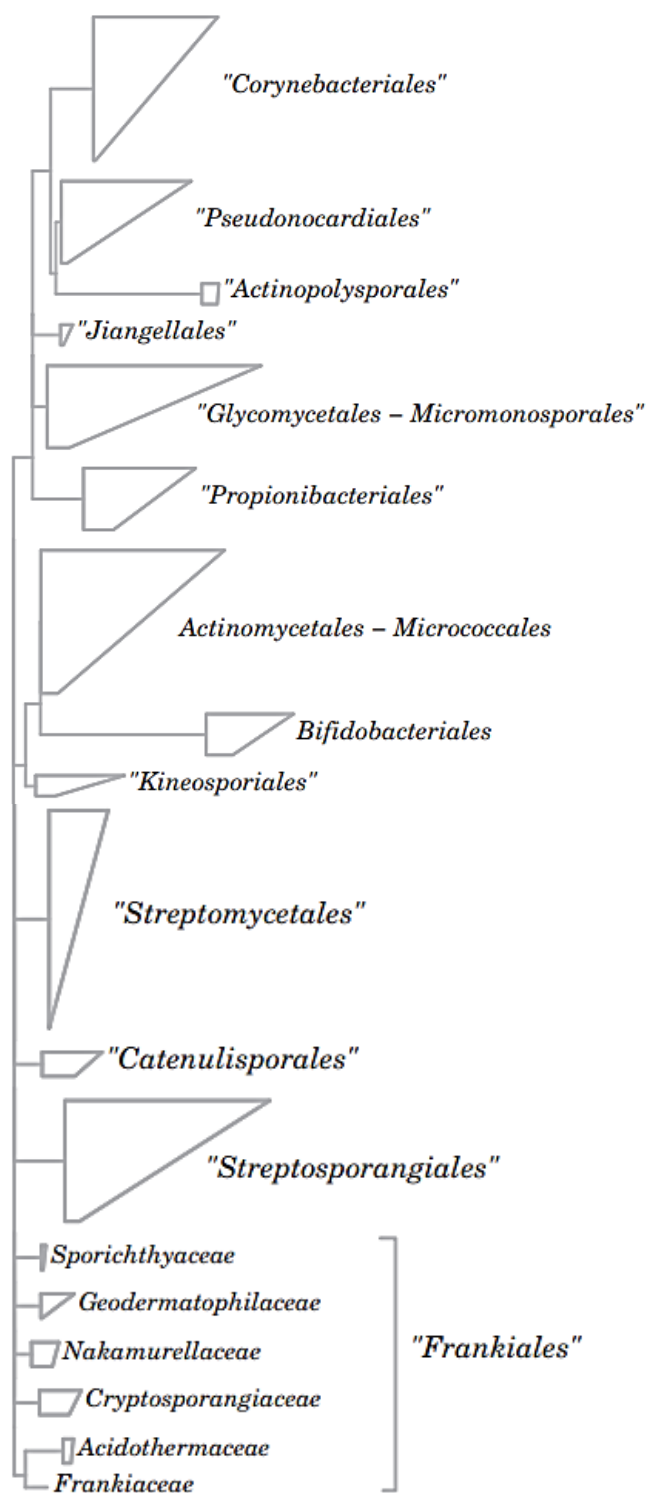
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. แอคติโนมัยสีท (Actinomycetes)

แอคติโนมัยสีทเป็นชื่อเรียกสมาชิกของแบคทีเรียที่อยู่ในชั้น (Class) Actinobacteria ประกอบด้วย 16 อันดับ (Order) ได้แก่ Actinomycetales, Actinopolysporales, Bifidobacteriales, Catenulisporales, Corynebacteriales, Frankiales, Glycomycetales, Jiangellales, Kineosporiales, Micrococcales, Micromonosporales, Propionibacteriales, Pseudonocardiales, Streptomycetales, Streptosporangiales และ Incertae sedis ภาพที่ 1 (Ludwig et al., 2012)

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกวานีน (Guanine; G) และไซโตซีน (Cytosine; C) ในดีเอ็นเอสูง และสร้างเส้นใยที่มีลักษณะคล้ายเชื้อรา ที่มีการแตกแขนง และมีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์ การเกิดลักษณะนี้ถือเป็นรูปแบบหนึ่งของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Barka et al., 2016)

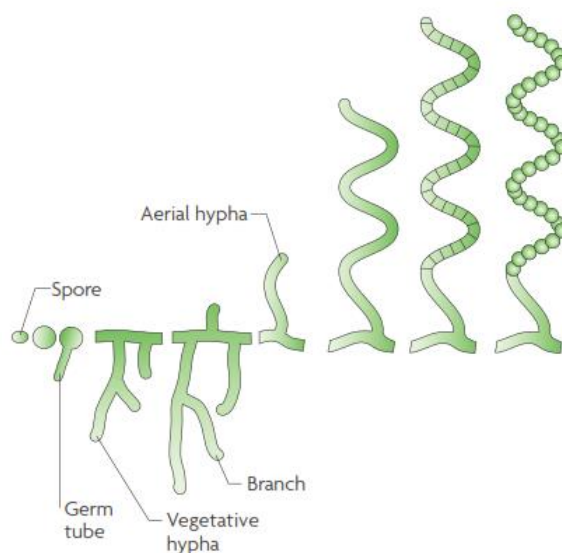
ในกลุ่มสมาชิกของแอคติโนมัยสีททั้งหมด พบว่า แอคติโนมัยสีทในวงศ์ (Family) Streptomycetaceae อันดับ Streptomycetales สกุล (Genus) *Streptomyces* เป็นสกุลที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง โดยพบมากที่สุดในดินทุกประเภท ซึ่งจำนวนสมาชิกในสกุลนี้มีมากกว่า 550 ชนิด (Species) จึงเป็นสกุลที่มีความหลากหลายอย่างมาก (Kämpfer, 2012)



ภาพที่ 1 อันดับต่าง ๆ ของแบคทีเรียในชั้น Actinobacteria (Ludwig et al., 2012)

1.1 โคลนีย์ของแอสคิโนมัยซีท

โคลนีย์ของแอสคิโนมัยซีทเกิดจากการรวมตัวกันของเส้นใย ทำให้เส้นใยมีความหนาแน่นเกิดเป็น โคลนีย์ แอสคิโนมัยซีทส่วนใหญ่จะสร้างเส้นใย 2 ชนิด คือ เส้นใยใต้ผิวอาหาร (Substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (Aerial mycelium) หรืออาจสร้างเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหารอย่างเดียว การสร้างโคลนีย์เริ่มจากเส้นใยใต้ผิวอาหาร จะเจริญบนผิวอาหารก่อน หลังจากนั้นเส้นใยจะแทรกลงไปใต้ผิวอาหาร เมื่อโคลนีย์เจริญขึ้น เส้นใยเหนือผิวอาหารจะยื่นขึ้นไปในอากาศ ซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับอากาศโดยตรง และจะเกิดการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์บนเส้นใยเหนือผิวอาหาร (ภาพที่ 2) (รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2548; Flardh & Buttner, 2009; Barka et al., 2016)



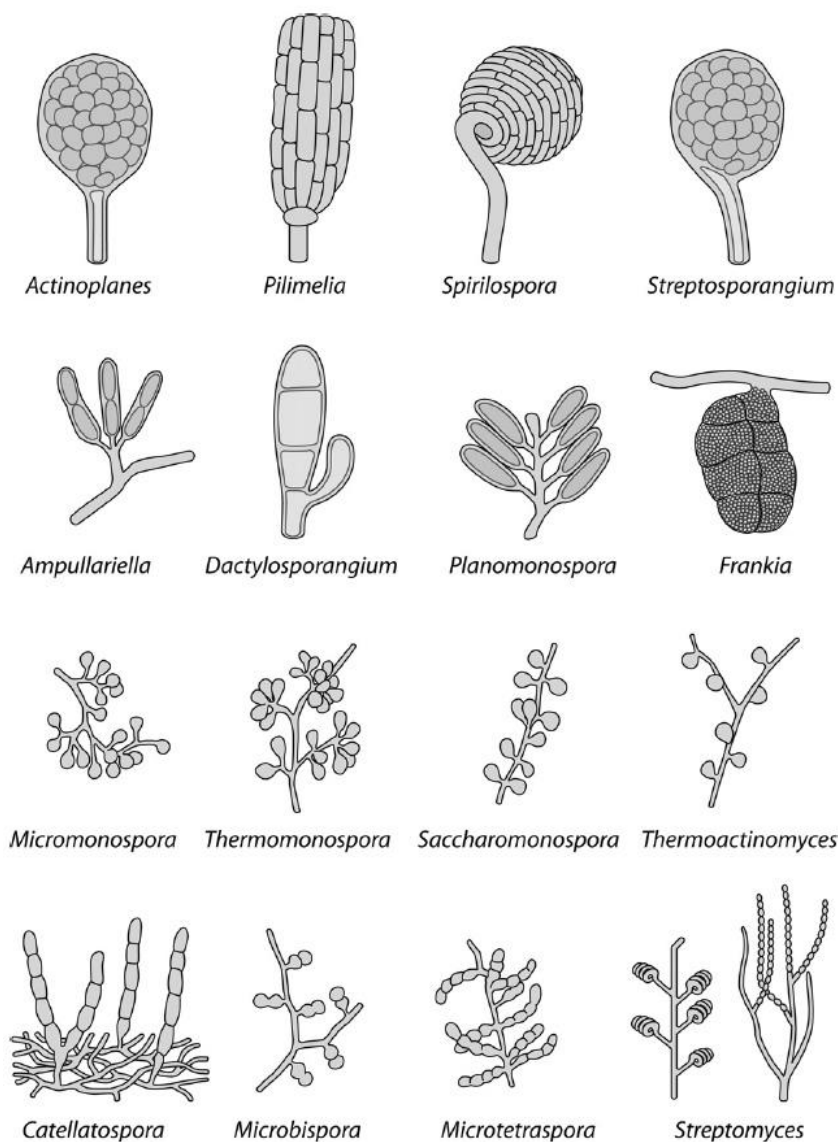
ภาพที่ 2 การสร้างโคลนีย์ของแอสคิโนมัยซีท (Flardh & Buttner, 2009)

โคลนีย์ของแอสคิโนมัยซีทอาจยกสูงชัน (Raise) หรือแบน (Flat) หรือปกคลุมด้วยชั้นที่คล้ายหนังสัตว์ และมีตั้งแต่โคลนีย์ที่อ่อนมากและละเอียด ไปจนถึงโคลนีย์ที่แข็งแรงมาก นอกจากนี้ยังมีโคลนีย์ที่แตกต่างกันออกไป เช่น สีขาว สีเหลือง สีส้ม สีแดง สีม่วง สีเขียว สีน้ำเงิน สีน้ำตาล และสีดำ ผิวหน้าโคลนีย์อาจเรียบ (Smooth) เป็นสันนูน (Ridged) เหี่ยวย่น (Wrinkled) เป็นเม็ด (Granular) หรืออาจพบเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัส (Squamous) บางโคลนีย์อาจอัดกันแน่น หรืออาจมีหลายโซนของการเจริญในลักษณะของโคลนีย์ที่เป็นวง ๆ (รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2548)

1.2 สปอร์ของแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทสามารถสร้างสปอร์บนเส้นใยเหนือผิวอาหารและเส้นใยใต้ผิวอาหาร หรือสร้างบนเส้นใยชนิดใดชนิดหนึ่ง บางชนิดสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า โคนิดิโอสปอร์ (Conidiospore) หรือ โคนิดีย (Conidia) ไปจนถึงสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (Flagella) และอยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ (Sporangia) (รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2548; Barka et al., 2016) โดยแอกติโนมัยสีทในสกุล *streptomyces* จะสร้างสปอร์บนเส้นใยเหนือผิวอาหาร (Barka et al., 2016) สปอร์อาจเกิดขึ้นเดี่ยว ๆ หรือเกิดเป็นสายสั้น ๆ โดยทั่วไปจะมีความหนาแน่นมากกว่าเส้นใย แต่ในบางชนิดที่มีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวมักจะมียาวเท่า ๆ กับขนาดของเส้นใย ลักษณะสปอร์ที่เกิดขึ้นจะมีรูปร่างหรือผิวสปอร์ที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งสามารถใช้จัดจำแนกชนิดของแอกติโนมัยสีทได้ เช่น ผิวสปอร์เรียบ (Smooth) ผิวสปอร์เป็นปุ่ม ๆ (Warty) ผิวสปอร์มีหนามแหลม (Spiny) ผิวสปอร์มีขน (Hairy) และผิวสปอร์หยาบ (Rugose) (รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2548; Dietz & Mathews, 1972)

แอกติโนมัยสีทแต่ละสกุลจะผลิตสปอร์แตกต่างกันออกไป สกุล *Micromonospora*, *Salinispora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora*, และ *Promicromonospora* จะผลิตสปอร์ที่แยกออกจากกัน สกุล *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Sporichthya*, และ *Nocardia* spp. บางชนิด จะผลิตสปอร์เป็นสายสั้น ๆ (Short spore chains) สกุล *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Kitasatospora*, *Streptovercillium*, และ *Nocardia* spp. บางชนิด จะผลิตสปอร์เป็นสายยาวมากกว่า 100 สปอร์ และสกุล *Frankia* บางชนิด จะผลิตสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้ม (ภาพที่ 3) (Barka et al., 2016) สกุล *Streptomyces* จะผลิตสปอร์เรียงตัวเป็นเส้นตรง (Rectus-flexibilis) เป็นรูปเปิด (relinaculam-apertum) เป็นเกลียวปิดหรือเกลียวเปิด (Spira) หรือเป็นช่อ (Verticillate) (Pridham et al., 1958)



ภาพที่ 3 ตัวอย่างลักษณะสปอร์แบบต่าง ๆ ที่พบในแอคติโนมัยซีท (Barka et al., 2016)

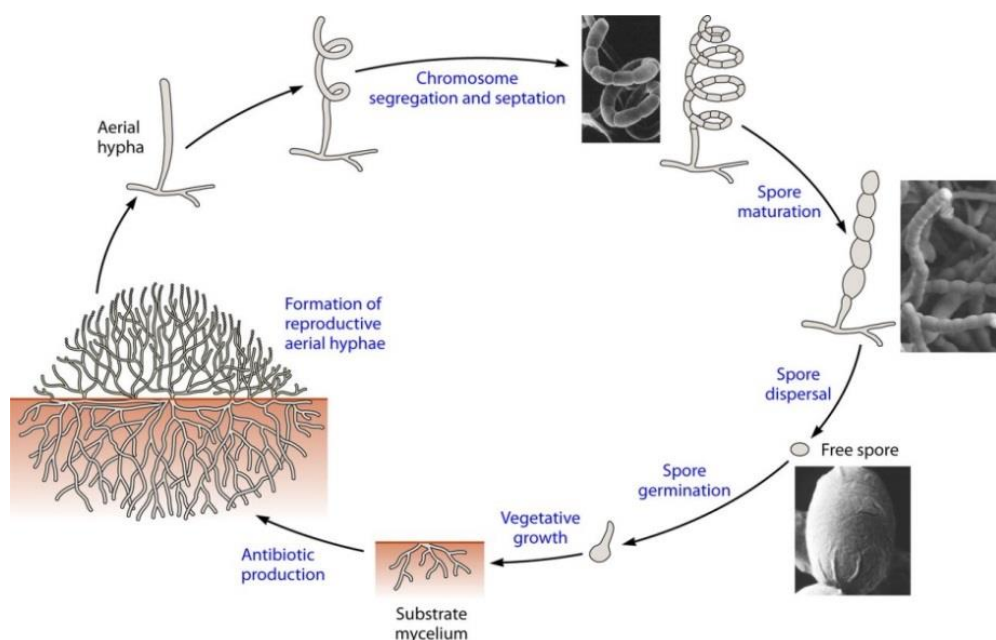
1.3 การผลิตเมลานินของแอคติโนมัยซีท

เมลานิน (Melanin) หรือ เมลานอยด์ (Melanoid) สามารถนำมาใช้ในการศึกษาอนุกรมวิธานได้ (รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2548) เมลานินเป็นโพลีเมอร์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปจะมีสีดำหรือน้ำตาล เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบ Phenolic และ สารประกอบ Indolic แอคติโนมัยซีทจะผลิตรงควัตถุ (Pigments) ซึ่งอาจเป็นสีแดง (Red) สีเหลือง (Yellow) สีส้ม (Orange) สีชมพู (Pink) สีนํ้าตาล (Brownish) สีนํ้าตาลเข้ม (Distinct

brown) สีเขียวน้ำตาล (Greenish brown) สีน้ำเงิน (Blue) หรือสีดำ (Black) ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย อาหารที่ใช้เลี้ยง และจำนวนวันเวลาที่เลี้ยง (Barka et al., 2016)

1.4 วัฏจักรชีวิต

แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่เจริญโดยอาศัยออกซิเจนและสารอินทรีย์ มีการสร้างสปอร์จำนวนมากเพื่อแพร่พันธุ์ เมื่อสปอร์ปลิวไปตกลงในบริเวณหรือสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญ สปอร์ก็จะเริ่มมีการงอกเป็นเส้นใยแทรกลงไปใต้ผิวอาหาร เส้นใยใต้ผิวอาหารจะมีการแตกแขนงและขยายวงกว้างเพื่อดูดซึมธาตุอาหาร หลังจากนั้นจะสร้างเส้นใยเหนือผิวอาหาร โพล์ฟิวโคไลนี ซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับอากาศ เมื่อมีการเจริญหนาแน่นขึ้น จะพัฒนาเป็นสายสปอร์จำนวนมาก เกิดการคองเป็นรูปต่าง ๆ และเกิดการแตกหัก เมื่อสปอร์พัฒนาเต็มที่ที่สามารถแพร่กระจายไปตามลม เมื่อสปอร์ตกไปในสภาวะที่เหมาะสมจะงอกเป็นเส้นใยเริ่มวงจรชีวิตใหม่ ดังแสดงในภาพที่ 4 (Barka et al., 2016)



ภาพที่ 4 วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยซีท (Barka et al., 2016)

1.5 แอคติโนมัยสีทจากมูลไส้เดือน

แอคติโนมัยสีทแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวางทั้งบนบกและในน้ำ ได้แก่ ดิน น้ำจืด น้ำทะเล และอากาศ (Barka et al., 2016) และสามารถเข้าไปอาศัยภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ของเนื้อเยื่อพืช เรียกว่า เอนโดไฟต์ (Endophytes) (Schulz & Boyle 2006; Hirsch & Mauchline, 2012)

แอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือน ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุต่าง ๆ ผ่านกระบวนการย่อยโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ของไส้เดือน ประกอบด้วยธาตุอาหารที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม (Parthasarathi et al., 2007; Huang et al., 2013; Pathma & Sakthivel, 2013) รวมทั้งสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ เอนไซม์ จุลินทรีย์ และฮอร์โมนส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Singh et al., 2018) พบการรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ในมูลไส้เดือน เช่น จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต (Gopal et al., 2009) แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Pathma & Sakthivel, 2013) แบคทีเรียต้านรา (Pathma & Sakthivel, 2013; Yasir et al., 2009) และแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ (Pathma & Sakthivel, 2013; Singh et al., 2015) ความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่กล่าวมานี้ ช่วยปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดิน ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและต้านทานเชื้อก่อโรคในดิน (Arancon et al., 2006; Chaoui et al., 2003; Singh et al., 2008; Pathma & Sakthivel, 2012) มีการรายงานการพบ แอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* ในมูลไส้เดือน (Parthasarathi et al., 2007; Gopalakrishnan et al., 2011; Gopalakrishnan et al., 2012; Pathma & Sakthivel, 2012; Singh et al., 2015) ซึ่ง *Streptomyces* ที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือน จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยการผลิต siderophores, indole-3-acetic acid และการละลายฟอสเฟต (Gopalakrishnan et al., 2011; Gopalakrishnan et al., 2014; Singh et al., 2015)

1.6 แอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์

เอนโดไฟต์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เข้าไปอาศัยและเพิ่มจำนวนภายในเนื้อเยื่อพืช โดยไม่ทำอันตรายหรือส่งผลเสียต่อพืช (Ulrich et al., 2008) สามารถพบได้ทุกส่วนของพืชทุกวงศ์ทั่วโลก เป็นได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา การอยู่ร่วมกันของเอนโดไฟต์และต้นพืชจะช่วยให้ต้นพืชและเอนโดไฟต์ได้ประโยชน์ร่วมกัน โดยพืชจะให้สารอาหารกับเอนโดไฟต์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนเอนโดไฟต์ก็จะช่วยปกป้องพืชจากจุลินทรีย์ก่อโรค ช่วยในการดูดซึมอาหารและแร่ธาตุ ช่วยในการเจริญเติบโต และช่วยให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้ดีขึ้น (Reiter & Sessitsch,

2006) ดังนั้นจึงทำให้เชื่อว่าต้นพืชที่มีเอนโดไฟต์อาศัยอยู่จะเจริญเติบโตและแข็งแรงกว่าต้นพืชที่ไม่มีเอนโดไฟต์ นอกจากนี้เอนโดไฟต์ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืช ผ่านกลไกทั้งทางตรง (Direct mechanisms) และทางอ้อม (Indirect mechanisms) วิธีทางตรง คือ จะผลิตฮอร์โมนพืช (Phytohormones) เช่น ออกซิน (Auxin) ไซโตไคนิน (Cytokinin) จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) หรือ ผลิตเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ซึ่งจะลดปริมาณเอทิลีนในพืช ช่วยสลายฟอสเฟตและตรึงไนโตรเจน ส่วนวิธีทางอ้อม คือ จะผลิตเอนไซม์ ปล่อยสารต่อต้านจุลินทรีย์ เช่น ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) และผลิตไซเคอร์โรฟอรัส (Siderophore) ซึ่งเป็นสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และยังผลิตสารประกอบอื่น ๆ เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช (Ulrich et al., 2008) เอนโดไฟต์เป็นแบคทีเรียที่พบในดินทั่วไป เช่น *Pseudomonas*, *Burkholderia* และ *Bacillus* โดยจะผลิตสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) หรือสารปฏิชีวนะ เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และมีกลไกการทำงานเหมือนกับแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่อาศัยอยู่บริเวณรอบ ๆ รากพืช (Plant growth promoting rhizobacteria; PGPR) นอกจากนี้ เอนโดไฟต์ยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะความเค็มได้อีกด้วย (Kumar et al., 2015) และสารเมแทบอลิท์ที่พบยังสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในคนและสัตว์ได้อีกด้วย (Strobel et al., 2004) แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่จะพบในสกุล *Actinosynnema*, *Actinomadura*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Streptomyces* และ *Nocardia* (Combs & Franco, 2003) มีการรายงานพบแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์สกุล *Streptomyces* ในพืชหลากหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี (Coombs et al., 2004; Misk & Franco, 2011; Sadeghi et al., 2012) ถั่ว (Cao et al., 2005) มะเขือเทศ (Tan et al., 2006; Fialho de Oliveira et al., 2010) ถั่วเขียว (Nimnoi et al., 2010) ถั่ว (Misk & Franco, 2011) ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Rungin et al., 2012) อ้อย (Kruasuwat & Thamchaipenet, 2016) แปะก๊วย (Yan et al., 2018) และสามารถพบแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ได้ทั้งส่วนราก ลำต้น และใบ ของพืช (Kaur et al., 2013)

2. ไซเคอร์โรฟอรัส

ไซเคอร์โรฟอรัสเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ และเป็นสารธรรมชาติแบบเมแทบอลิท์ ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) มีความจำเพาะต่อการจับกับไอออนเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ผลิตได้จากพืช และจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีธาตุเหล็กอยู่จำกัด ธาตุเหล็กจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในกระบวนการเมแทบอลิซึมในการขนส่งอิเล็กตรอน ตามธรรมชาติธาตุเหล็กมีความสามารถละลายได้ต่ำ ทำให้จุลินทรีย์และพืชไม่สามารถนำธาตุเหล็กมาใช้ได้ ซึ่งสารไซเคอร์โรฟอรัสที่จุลินทรีย์ผลิต

ขึ้นมาจะช่วยทำให้ธาตุเหล็กอยู่ในรูปที่ละลายน้ำ โดยจะเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไอออนเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ทำให้จุลินทรีย์และพืชสามารถนำธาตุเหล็กไปใช้ได้ ดังนั้นไซเดอโรฟอรัสจึงมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Ahmed & Holmström, 2014)

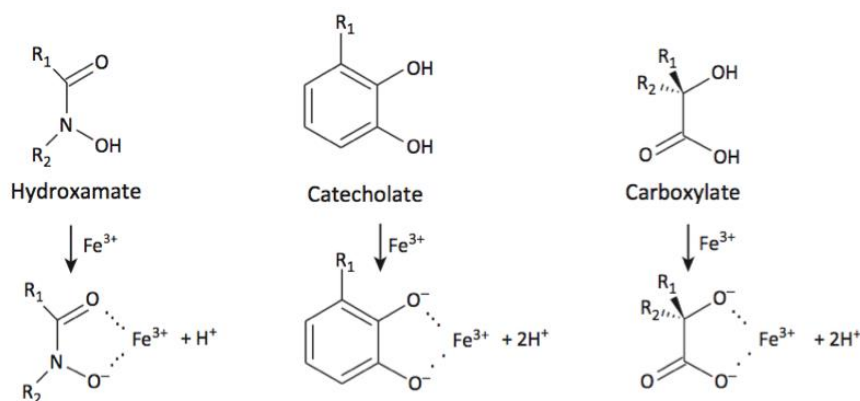
PGPB จะสามารถควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคพืช และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยการผลิตไซเดอโรฟอรัสไปจับกับธาตุเหล็ก บริเวณดินรอบ ๆ รากพืช ทำให้เชื้อก่อโรคพืชไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากขาดธาตุเหล็ก ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่สำคัญที่ใช้ในการเจริญ และถึงแม้ว่าเชื้อก่อโรคพืชจะสามารถผลิตไซเดอโรฟอรัสได้ แต่ก็จะมีประสิทธิภาพในการจับธาตุเหล็กได้ต่ำกว่าเชื้อกลุ่ม PGPB ดังนั้นปริมาณธาตุเหล็กบริเวณดินรอบ ๆ รากพืชจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช ส่งผลให้พืชไม่เกิดความเสียหาย PGPB จะผลิตไซเดอโรฟอรัส ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า Iron-siderophore complex พืชจะมีกลไกการจับโครงสร้างนี้และลำเลียงเข้าไปในเซลล์พืช จากนั้นจะปลดปล่อยธาตุเหล็กออกจากโครงสร้างของไซเดอโรฟอรัส ทำให้พืชสามารถนำธาตุเหล็กไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ (ศิริวรรณ รุ่งอินทร์, 2555)

โครงสร้างและลักษณะทางเคมีของไซเดอโรฟอรัสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ Hydroxamates, Catecholates และ Carboxylates โดยจัดจำแนกตามหมู่ฟังก์ชันและประเภทของลิแกนด์ที่ล้อมรอบ แต่ละกลุ่มฟังก์ชันจะมีอะตอมของออกซิเจน 2 อะตอม หรือมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่ทำหน้าที่สร้างพันธะกับธาตุเหล็ก (ภาพที่ 5)

1. Hydroxamates ผลิตจากแบคทีเรียและฟังไจ โดยไซเดอโรฟอรักรุ่นนี้ ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยลิแกนด์ของ Hydroxamates 3 คู่ที่มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน ซึ่งอยู่ในรูปของ R-CO-NH-OH โดย R จะเป็นกรดอะมิโน หรืออนุพันธ์ของกรดอะมิโน ไซเดอโรฟอรักรุ่นนี้มีความเสถียรค่อนข้างสูง และมีความจำเพาะในการจับธาตุเหล็กแล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแบบ Octahedral complex

2. Catecholates หรือเรียกไซเดอโรฟอรักรุ่นนี้ว่า Phenolates ซึ่งอยู่ในรูปของสารประกอบ Benzenediols ผลิตจากแบคทีเรียเท่านั้น ไซเดอโรฟอรักรุ่นนี้ Catecholates มีความสามารถในการจับธาตุเหล็กได้แน่นกว่า Hydroxamates ซึ่งอาจเป็นเพราะความแตกต่าง Stereoisomer ที่มีอยู่ในสารประกอบเชิงซ้อนชนิดนั้น ๆ

3. Carboxylates จะอยู่ในรูปของ RCOOR' จับกับธาตุเหล็กแล้วเกิดเป็นสารประกอบ Coordination ของธาตุเหล็กกับกลุ่มของ Carboxyl และ Hydroxyl ซึ่งไซเดอโรฟอรักรุ่นนี้ผลิตจากฟังไจในกลุ่ม Zygomycota (Mucorales) และแบคทีเรียอีกสองสามชนิด ได้แก่ *Rhizobium meliloti* และ *Staphylococcus hyicus* (มานิตา คำแจ่ม และ วสุ ปฐมอารีย์, 2557)



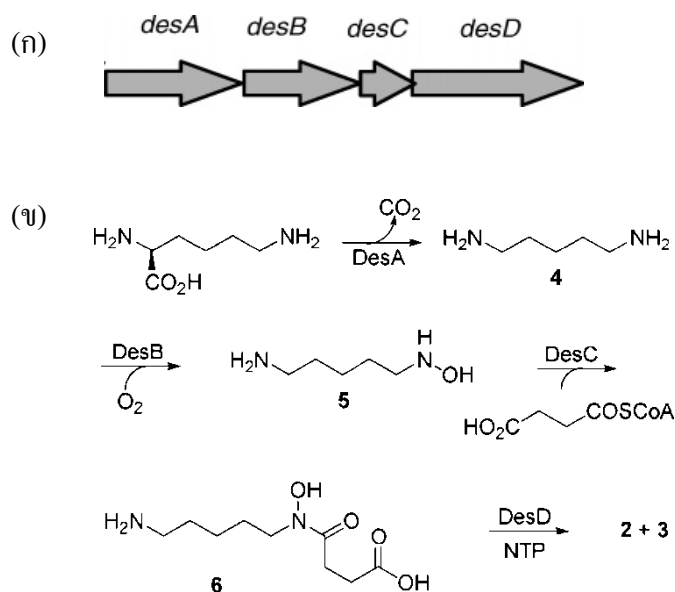
ภาพที่ 5 โครงสร้างของไซเคอโรฟอรั (Go'rska et al., 2014)

กลไกทั่วไปของการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์โดยโมเลกุลไซเคอโรฟอรั ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอนคือ

1. ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์จะสังเคราะห์โมเลกุลของไซเคอโรฟอรัและโปรตีนตัวรับที่มีความจำเพาะเจาะจงกับธาตุเหล็ก โดยไซเคอโรฟอรัจะแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกสู่สิ่งแวดล้อม
2. ไซเคอโรฟอรัจับกับธาตุเหล็กและจับกับ โปรตีนตัวรับ แล้วถูกดึงกลับเข้ายังเซลล์โดยกระบวนการ Active transport
3. ธาตุเหล็กจะถูกปลดปล่อยออกจากโมเลกุลของไซเคอโรฟอรั ส่วนไซเคอโรฟอรัจะถูกส่งออกไปภายนอกเซลล์

จุลินทรีย์จะสังเคราะห์โมเลกุลของไซเคอโรฟอรัและแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกสู่สิ่งแวดล้อม เมื่อไซเคอโรฟอรัจับกับธาตุเหล็กแล้ว ไซเคอโรฟอรัก็จะจับกับโปรตีนตัวรับที่ทำหน้าที่เป็น Receptor จากนั้นจะถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ Active transport เข้าไปยัง Cytoplasm จะเกิดการแยกและดึงธาตุเหล็กออก และไซเคอโรฟอรัจะถูกส่งออกไปยังนอกเซลล์เพื่อจับกับธาตุเหล็กตัวใหม่ ซึ่งกลุ่มของไซเคอโรฟอรัที่มีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนตัวรับที่ทำหน้าที่เป็น Receptor (ศิริวรรณ รุ่งอินทร์, 2555; มานิตา คำแจ่ม และ วสุ ปฐมอารีย์, 2557)

แอกติโนมัยซีตสกุล *Streptomyces* ผลิตไซเคอโรฟอรั ที่เรียกว่า Desferal หรือ Desferrioxamine ซึ่งเป็นไซเคอโรฟอรักลุ่ม Hydroxamates ได้แก่ *Streptomyces avermitillis*, *Streptomyces scabies* และ *Streptomyces ambofaciens* (Barona-Gomez et al., 2006) นอกจากนี้



ภาพที่ 7 (ก) กลุ่มยีน *desABCD* และ (ข) การสังเคราะห์ Desferrioxamine (Barona-Gomez et al., 2004)

นอกจาก Ferrioxamine จะพบในแอคติโนมัยซีตสกุล *Streptomyces* แล้วยังพบในสกุลอื่นๆ ด้วย เช่น *Arthrobacter*, *Chromobacterium*, *Pseudomonads* และ *Erwinia herbicola* เป็นต้น และ *B. subtilis* สามารถผลิตไซเคอร์โรฟอร์ ชื่อ DHB-glycine โดยการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์จะมีบทบาทร่วมกับสารประกอบที่มีกลุ่มของ Phenol (Teaumroong & Haselwandter, 1996)

มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาและอธิบายเกี่ยวกับความสามารถของไซเคอร์โรฟอร์ที่ได้จากจุลินทรีย์ในการยับยั้งและควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาแบบชีววิธีต่อเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคพืช โดยการใช้ *P. putida* ที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติบริเวณรากพืช พบว่าสามารถผลิตไซเคอร์โรฟอร์ได้ในปริมาณมาก และเพิ่มระดับการจับธาตุเหล็กให้กับจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Loper & Henkels, 1999) มีรายงานพบ Strepcibactin ซึ่งเป็นไซเคอร์โรฟอร์กุ่ม Catecholates กลุ่มใหม่ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. YM5-799 (Matsuo et al., 2011) การผลิตไซเคอร์โรฟอร์ในสภาวะความเค็ม พบว่า ประสิทธิภาพการผลิตไซเคอร์โรฟอร์จะลดลงในสภาวะที่มีความเค็มเพิ่มขึ้น Argandona et al., (2010) รายงานว่า ความเค็มมีอิทธิพลต่อความต้องการธาตุเหล็กในการเจริญของ *Chromohalobacter salexigens* ซึ่งจะผลิตไซเคอร์โรฟอร์ได้มากที่สุด เมื่อความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ำสุด และผลิตได้ลดลงตามความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์

ที่เพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับ Shrivastava and Kumar (2011) ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตไซเดอโรฟออร์ พบว่า การผลิตไซเดอโรฟออร์ลดลง เมื่อความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น เชื่อว่าจะไม่สามารถผลิตไซเดอโรฟออร์ได้โดยที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 7.5% อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยที่พบว่าประสิทธิภาพการผลิตไซเดอโรฟออร์ของจุลินทรีย์บางชนิดเพิ่มขึ้นในสถานะที่มีความเค็ม Sadeghi et al. (2012) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไซเดอโรฟออร์ของ *Streptomyces* ในสถานะที่มีความเค็ม พบว่า การผลิตไซเดอโรฟออร์ของ *Streptomyces* เพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น จะเห็นได้ว่าความเค็มมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตไซเดอโรฟออร์แตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ ดังนั้นจะต้องมีการศึกษาต่อไปถึงอิทธิพลของความเค็มที่มีผลกับการผลิตไซเดอโรฟออร์

3. ดินเค็ม

ดินเค็ม (Saline soil) หมายถึง ดินที่มีปริมาณเกลือที่ละลายอยู่ในสารละลายดินมากเกินไป ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งมีจะผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยความเค็มจะส่งผลให้สภาวะแวดล้อมในดินไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช พืชเกิดอาการขาดน้ำ และมีการสะสมไอออนที่เป็นพิษในพืช เช่น Na^+ และ Cl^- ทำให้รากพืชชอนไชยากและแร่ธาตุบางอย่างละลายออกมาจากดินจนเป็นพิษต่อพืช อาจรุนแรงถึงทำให้พืชตายได้ เนื่องจากเกิดความไม่สมดุลของธาตุอาหารพืช พืชแต่ละชนิดปรับตัวเข้ากับสภาพความเค็มได้ต่างกัน หากพืชปรับตัวไม่ได้พืชอาจจะตายได้ (วิจิตพล มีแก้ว และคณะ, 2553) แบคทีเรียทนเค็มสามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือเนื่องจากภายในเซลล์มีปริมาณความเข้มข้นของไอออนของเกลือต่ำ (Na^+ และ K^+) ดังนั้นแบคทีเรียทนเค็มจึงมีการปรับสภาวะภายในเซลล์กับภายนอกเซลล์ให้เกิดสมดุล โดยการนำไอออนของเกลือ (Na^+ และ K^+) จากภายนอกเข้ามาภายในเซลล์เพื่อนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ ส่งผลให้ไอออนของเกลือในดินลดลง ทำให้สภาวะแวดล้อมในดินเหมาะสมต่อการเจริญของพืชมากขึ้น (ศิริลักษณ์ นามวงษ์, 2553)

ตารางที่ 1 อิทธิพลของเกลือในดินต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช (Ghosh et al., 2016)

ระดับความเค็ม ของดิน	เค็มน้อย	เค็มปานกลาง	เค็มมาก	เค็มจัด
การนำไฟฟ้า (dS/ m)	2-4	4-8	8-16	>16
เกลือในดิน (%)	0.1-0.2	0.2-0.4	0.4-0.8	>0.8
การเจริญเติบโต ของพืช	พืชไม่ทนเค็ม ไม่สามารถ เจริญเติบโตได้	พืชหลายชนิด ไม่สามารถ เจริญเติบโตได้	เฉพาะพืชทน เค็มสามารถ เจริญเติบโตได้	เฉพาะพืชชอบ เกลือสามารถ เจริญเติบโตได้

4. การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีย

การจำแนกประเภทแบคทีเรีย (Classification) มีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดความมีระบบ แสดงความสัมพันธ์และความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตในแง่ของการศึกษา โดยใช้อนุกรมวิธาน แบบพอลิฟาสิก (Polyphasic taxonomy) (Vandamme et al., 1996) ซึ่งประกอบด้วยการศึกษา ดังต่อไปนี้

4.1 การจัดจำแนกลักษณะฟีโนไทป์ (Phenotypic characteristics)

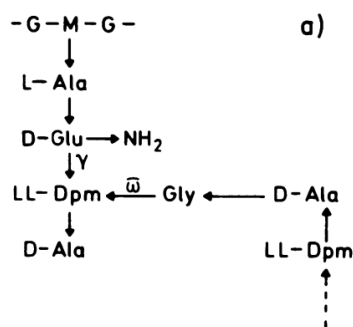
การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ไม่ได้มุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ ดังนั้น จึงได้รวมการศึกษาลักษณะทางเคมี (Chemotaxonomic characteristics) เข้ามาด้วย เนื่องจาก ลักษณะทางเคมีเป็นการประยุกต์ใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของ เซลล์ เพื่อจำแนกเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งถือว่าจำเป็นต่อการพัฒนาการจำแนกเชื้อแบคทีเรียในปัจจุบัน และมักจะถูกแยกออกจากลักษณะฟีโนไทป์ในบทความอนุกรมวิธาน การศึกษาหรือการจำแนก ลักษณะฟีโนไทป์แบบดั้งเดิม มักจะถูกใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจะสามารถ อธิบายอนุกรมวิธานตั้งแต่สปีชีส์ (Species) สกุล (Genus) และวงศ์ (Family) (Vandamme et al., 1996) ลักษณะฟีโนไทป์ของแบคทีเรีย ประกอบด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological) ลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiological) และลักษณะทางชีวเคมี (Biochemical) ซึ่งลักษณะเหล่านี้ไม่ มีความสัมพันธ์กับลักษณะจีโนไทป์ (Genotypic characteristics) แต่สามารถใช้อธิบายเพื่อให้รู้ถึง อนุกรมวิธานได้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียประกอบไปด้วยทั้งตัวเซลล์ คือ รูปร่าง

(Shape) เอนโดสปอร์ (Endospore) แฟลกเจลลา (Flagella) การย้อมสีแกรม (Gram staining) และ โคโลนี ได้แก่ สี ขนาด และรูปร่าง ลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี จะประกอบด้วย การเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่างกัน ค่า pH ความเข้มข้นของเกลือ หรือสภาพอากาศ การผลิตสารต่าง ๆ เช่น สารต้านจุลชีพ (Antimicrobial agents) การผลิตเอนไซม์และกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ รวมทั้งการผลิตสารเมแทบอลิต์ เป็นต้น (Vandamme et al., 1996) สกุล *Streptomyces* จะมีช่วง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 25-35 °C และช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการ เจริญเติบโตที่ pH 6.5-8.0 (Kämpfer, 2012) อาหารที่เป็นมาตรฐาน (standard) สำหรับใช้ในการ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีท สกุล *Streptomyces* คือ International Streptomyces Project (ISP) ได้แก่ ISP2 (Yeast extract-malt extract agar), ISP 3 (Oatmeal agar), ISP 4 (Inorganic salts-starch agar) และ ISP5 (Glycerol-asparagine agar) (Shirling & Gottlieb, 1966)

4.1.1 ลักษณะทางเคมี

4.1.1.1 องค์ประกอบของผนังเซลล์ (Cell wall composition)

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีเพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) หลากหลายประเภท และเรียงตัวเป็นแบบหลายชั้น (Multilayered) ซึ่งอาจมีความจำเพาะต่อสกุล หรือสปีชีส์นั้น ๆ (Vandamme et al., 1996; Kämpfer, 2012) เพปทิโดไกลแคนในผนังเซลล์ของ แบคทีเรียแกรมบวกจะประกอบด้วยสาย Heteropolysaccharide หรือที่เรียกว่า “Sugar backbone” มีน้ำตาล 2 ชนิด คือ *N*-acetylglucosamine และ *N*-acetylmuramic acid เรียงตัวสลับกัน เชื่อมต่อกัน ด้วยพันธะ β -1,4 และ Oligopeptide จะเรียงตัวสลับกันระหว่าง D-amino และ L-amino แทนกลุ่ม คาร์บอกซิลในตำแหน่ง Muramic acid ในสกุล *Streptomyces* จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโน 4 ชนิด คือ Alanine, Glutamic acid, Glycine และ Diaminopimelic acid (DAP; A₂pm) เรียงตัวแบบ L-Ala-D-Glu-LL-A₂pm-D-Ala (ภาพที่ 8) (Kämpfer, 2012) DAP ในแอคติโนมัยซีทสามารถพบได้ 2 รูปแบบ คือ LL และ DL/ (meso)-DAP แต่ในสกุล *Streptomyces* จะพบ DAP เป็นแบบ LL-DAP เท่านั้น (ตารางที่ 1) (Lechevalier & Lechevalier, 1970) โครงสร้างของน้ำตาลในส่วนเพปทิโดไกล แคนในผนังเซลล์นี้ พบว่า สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดอนุกรมวิธานที่ (Uchida & Aida, 1979)



ภาพที่ 8 องค์ประกอบของผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีท (Schleifer & Kandler, 1972)

4.1.1.2 Whole cell sugar

น้ำตาลในผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีท ประกอบด้วย Arabinose, Galactose, Xylose และ Madorose สามารถจัดจำแนกน้ำตาลในผนังเซลล์ออกเป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 2) *Streptomyces* จะถูกจัดอยู่ในกลุ่ม C ซึ่งจะไม่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ (Lechevalier & Lechevalier, 1970) และในบางครั้งมีการรายงานพบน้ำตาล Arabinose, Galactose และ Xylose นอกจากนี้ยังพบน้ำตาล Glucose, Mannose และ Ribose ในปริมาณเล็กน้อย (Kämpfer, 2012)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของผนังเซลล์แอกติโนมัยซีท (Lechevalier & Lechevalier, 1970)

กลุ่มของผนังเซลล์	องค์ประกอบของผนังเซลล์	กลุ่มของน้ำตาล	แอกติโนมัยซีท (สกุล)
I	LL-DAP; Glycine,	C (ไม่มีน้ำตาล)	<i>Streptomyces (Streptoverticillium,</i> <i>Chainia, Actinopycnidium,</i> <i>Actinosporangium,</i> <i>Elytrosporangium),</i> <i>Microellobosporia, Sporichthya,</i> <i>Intrasporangium</i>
II	meso-DAP; Glycine;	D (Arabinose, Xylose)	<i>Actinoplanes, Amorphosporangium,</i> <i>Ampullariella, Dactylosporangium,</i> <i>Micromonospora</i>

ตารางที่ 2 (ต่อ)

กลุ่มของผนังเซลล์	องค์ประกอบ ของผนังเซลล์	กลุ่มของน้ำตาล	แอกติโนมัยซีท (สกุล)
III	meso-DAP,	B (Madurose, ไม่มี Arabinose หรือ Xylose)	<i>Actinomadura</i> (madurae-type), <i>Microbispora</i> , <i>Streptosporangium</i> ; <i>Spirillospora</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Dermatophilus</i>
		C (ไม่มีน้ำตาล)	<i>Actinomadura</i> (dassonvillei- type), <i>Thermoactinomyces</i> , <i>Actinobifida</i> , <i>Geodermatophilus</i>
IV	meso-DAP;	A (Arabinose; Galactose, ไม่มี Xylose)	<i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Micropolyspora</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Thermomonospora</i>
V	Lysine; Ornithine	ไม่มีน้ำตาล	<i>Actinomyces</i> (Israeli-type)
VI	Lysine; Aspartic acid;	ไม่มีน้ำตาล	<i>Actinomyces</i> (bovis-type), <i>Rothia</i> , <i>Oerskovia</i> , <i>Arthrobacter</i>
VII	DAB; Lysine; Aspartic acid;	ไม่มีน้ำตาล	<i>Erysipelothrix</i>
VIII	Aspartic acid;	ไม่มีน้ำตาล	<i>Cellulomonas</i>
IX	meso-DAP	ไม่มีน้ำตาล	<i>Mycoplana</i>

“หมายเหตุ” DAP = 2, 4 -diaminopimelic acid

DAB = 2, 6 -diaminobutyric acid

4.1.1.3 กรดไขมัน (Fatty acid)

ในเซลล์แบคทีเรียมีลิพิด (Lipids) อยู่หลากหลายชนิด ซึ่งองค์ประกอบหลักของลิพิด คือ ไขมันมีขั้ว (Polar lipids) โดยจะเรียงตัว 2 ชั้น (Lipid bilayer) ในเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียและมีการนำมาศึกษาเพื่อใช้ในการจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรีย กรดไขมันประกอบด้วยลิพิด และลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharides) กรดไขมันถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการจัดจำแนกอนุกรมวิธาน พบโครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันที่แตกต่างกันมากกว่า 300 ชนิด เช่น ความหลากหลายของความยาวโซ่ ตำแหน่งของพันธะคู่ และกลุ่มตัวแทนที่ ซึ่งมีการพิสูจน์แล้วว่าเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับลักษณะอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย (Vandamme et al., 1996) สมาชิกของสกุล *Streptomyces* จะสังเคราะห์กรดไขมันที่กิ่ง (Branched) สุดท้าย โดยมี 2-methylbutyrate เป็นสารประกอบเริ่มต้นที่ทำให้เกิดกิ่งของกรดไขมันชนิด Anteiso ที่มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนเป็นเลขคี่เท่านั้น และมี Isovalerate และ Isobutyrate เป็นสารประกอบเริ่มต้นที่ทำให้เกิดกิ่งของกรดไขมันชนิด Iso ที่มีเลขอะตอมของคาร์บอนเป็นเลขคู่และเลขคี่ ตามลำดับ (Kämpfer, 2012)

4.1.1.4 Phospholipid

ลิพิดของ *Streptomyces* ประกอบด้วย Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylinositol และ Phosphatidylinositol mannosides (Kämpfer, 2012) Phospholipid ของแอคติโนมัยซีทสามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม แยกจากการมีและไม่มี Nitrogenous phospholipids ในวงศ์ *Streptomycetaceae* จะมี Phospholipid ในกลุ่มที่ II คือจะมี Phosphatidylethanolamine (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ยังพบ ความแปรปรวนของ Phospholipid ในแต่ละกลุ่ม เช่น Phosphatidyl inositol, Inositol mannosides, Phosphatidyl methylethanolamine, Acyl phosphatidyl glycerol (APG) และ Diphosphatidyl glycerol (DPG) (Lechevalier et al., 1977; Kämpfer, 2012) ความแตกต่างของชนิด Phospholipid สามารถใช้ในการจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทในแต่ละสกุลได้ (Barka et al., 2016)

ตารางที่ 3 Phospholipid ของแอกติโนมัยสีท (Lechevalier et al., 1977)

กลุ่มของ phospholipid	ชนิดของ phospholipid	แอกติโนมัยสีท (สกุล)
PI	ไม่มี Nitrogenous phospholipids	<i>Actinomadura (madurae, pelletieri), Corynebacterium, Microtetraspora and Nocardioides</i>
PII	Phosphatidyl ethanolamine	<i>Actinoplanes, Chainia, Dactylosporangium, Microellobosporia, Micromonospora, Micropolyspora (brevicatena), Mycobacterium, Nocardia (all species examined but autotrophica), Streptomyces and Streptovercillium</i>
PIII	Phosphatidyl choline	<i>actinomadura (dassonvillei), Micropolyspora (faeni), Nocardia (autotrophica), and Pseudonocardia</i>
PIV	Glucosamine (GluNU)	<i>Intrasporangium, Microbispora and Streptosporangium</i>
PV	Phosphatidyl glycerol	<i>Promicromonospora and Oerskovia</i>

4.1.1.5 ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (Isoprenoid quinones)

ไอโซพรีนอยด์ควิโนน เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cytoplasmic membranes) ของ Prokaryotes มีบทบาทสำคัญในการขนส่งอิเล็กตรอน (Electron transport) oxidative phosphorylation และอาจเกิดการลำเลียงแบบใช้พลังงาน (Active transport) ไอโซพรีนอยด์ควิโนน มีโครงสร้างหลักที่สำคัญ 2 กลุ่ม คือ Naphthoquinones และ Benzoquinones โดยก่อนหน้านี้สามารถแบ่ง Naphthoquinone ออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ Phylloquinones หรือวิตามิน K₁ จะพบในส่วนที่เป็นสีเขียวของพืช ซึ่งจะเกิดขึ้นน้อยในแบคทีเรีย และเมนาควิโนน (menaquinones) หรือ วิตามิน K₂ (Collins & Jones, 1981; Vandamme et al., 1996) สมาชิกในสกุล *Streptomyces* จะมีโครงสร้าง Menaquinones ที่ซับซ้อนมาก ประกอบไปด้วย Tetra hydrogenated

MK-9(H₄), Hexa hydrogenated MK-9(H₆) และ Octa hydrogenated MK-9(H₈) (Collins & Jones, 1981; Kämpfer, 2012) การสังเคราะห์ควิโนนจะเกิดขึ้นที่แขนงข้าง (Side chains) ของไอโซพรีนอยด์ที่มีการอิมตัวในตำแหน่งที่ 3 ของวงแหวน Naphthoquinone ในการจัดจำแนกเมนาควิโนนสามารถจัดจำแนกได้จาก ความแตกต่างของจำนวนไอโซพรีนอยด์ ความแตกต่างของระดับปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation) และตำแหน่งของ Isoprene ที่เกิดการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenated) เมนาควิโนนของ *Streptomyces* มีการเติมไฮโดรเจนในสายโซ่ของไอโซพรีนอยด์ และมี 3-4 Isoprene ที่มีการอิมตัว (Kämpfer, 2012) และการเกิดแขนงข้าง ที่มีความหลากหลาย เช่น ความแตกต่างของ ความยาว (Length) ความอิมตัว (Saturation) และปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน ดังที่กล่าวมานี้สามารถใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับอนุกรมวิธานได้ (Vandamme et al., 1996)

4.2. การจัดจำแนกลักษณะจีโนไทป์ (*Genotypic characteristics*)

การศึกษาลักษณะจีโนไทป์คือการศึกษาดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) (Vandamme et al., 1996) โดยศึกษา DNA-DNA hybridization (DDH), DNA G+C content และการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย และมี 2 วิธีที่เป็น “Gold standards” ที่มีบทบาทสำคัญ สำหรับการจัดจำแนกชนิดของ Prokaryotes คือ DNA-DNA hybridization และการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA (Ramasamy et al., 2014; Stackebrandt & Eber, 2006)

ยีน 16S rRNA เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพในทางอนุกรมวิธาน เนื่องจากมีความหลากหลาย มีการอนุรักษ์สูง มีความเสถียร และได้รับการถ่ายโอนยีนมาจากแบคทีเรียชนิดอื่น (Horizontal gene transfer; HGT) ลำดับยีน 16S rRNA ถูกใช้เป็นเกณฑ์สำหรับการจัดจำแนกใน Prokaryotes (Ramasamy et al., 2014) ค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับยีน 16S rRNA มีบทบาทสำคัญในการกำหนดลำดับใหม่และในการจัดจำแนกไอโซเลต (Chun et al., 2007) Stackebrandt and Goebel (1994) ซึ่งให้เห็นว่าค่าลำดับความคล้ายคลึงกันของยีน 16S rRNA ที่ 97% ควรเป็นขอบเขตสำหรับการจัดจำแนกสปีชีส์ของ Prokaryotes ซึ่งเป็นที่ยอมรับของนักจุลชีววิทยาต่อมา Stackebrandt and Ebers (2006) เสนอค่าลำดับความคล้ายคลึงกันของยีน 16S rRNA ที่ 98.7-99% แม้ว่าข้อเสนอนี้จะต้องมีการตรวจสอบต่อไป แต่เห็นได้ชัดว่าควรใช้ค่าลำดับความคล้ายคลึงกันของยีน 16S rRNA ในระดับที่ต่ำในการจัดจำแนก Prokaryotes (Chun et al., 2007) ดังนั้น

ไอโซเลตที่มีค่าความเหมือนลำดับเบสของยีน 16S rRNA $\leq 98.7\%$ จะได้รับการพิจารณาให้เป็นตัวแทนสปีชีส์ใหม่ (Novel species) (Stackebrandt & Ebers, 2006; Ramasamy et al., 2014) อย่างไรก็ตาม ยีน 16S rRNA ยังมีข้อจำกัดหลายประการในการจัดจำแนกอนุกรมวิธาน คือ (1) ในบางสกุลมีบริเวณอนุรักษ์อยู่ในระดับสูง เช่น ในสกุล *Brucella* ที่ยีนไม่มีความแตกต่างกันมากกว่า 1% (2) พบความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ในหลาย ๆ rRNA operon ในจีโนมเดียวกัน และ (3) ยีน 16S rRNA อาจได้รับการถ่ายโอนยีนมาจากแบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งอาจบิดเบือนความสัมพันธ์ระหว่างลำดับในแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (Ramasamy et al., 2014) ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยทั่วไป ผลลัพธ์ที่ได้จะเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลหรือ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์กับสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงที่สุด ในการเปรียบเทียบจะเลือกเฉพาะสปีชีส์หรือสกุล ที่มีการเผยแพร่ชื่ออย่างถูกต้อง (Ramasamy et al., 2014) สามารถตรวจสอบรายชื่อที่มีการเผยแพร่อย่างถูกต้องได้ทางวารสาร International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) (Chun et al., 2007) และลำดับเบสของยีน 16S rRNA ต้องตรงกับสายพันธุ์ต้นแบบใน List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature; LPSN (<http://www.bacterio.net/index.html>) (Ramasamy et al., 2014) การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ จะสร้างจากสายพันธุ์ต้นแบบ (Type strains) หรือสกุลต้นแบบ (Type genus) ของตัวแทนจากวงศ์ (Zhi et al., 2009) และอาศัยความเชี่ยวชาญในด้านอนุกรมวิธานของ Prokaryote ที่อาจมีการซับซ้อน และใช้ความละเอียดอย่างมาก เนื่องจากฐานข้อมูลโดยทั่วไปจะประกอบด้วยลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ใช่เฉพาะสายพันธุ์ต้นแบบ (Non-Type strains) และอาจมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการผิดพลาด การศึกษาในปัจจุบันจึงได้มีการสร้างฐานข้อมูลบนเว็บไซต์ที่มีการรวบรวมลำดับยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ต้นแบบทั้งหมด ซึ่งจะช่วยให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA ทั้งหมดของ Prokaryotes EzTaxon (<http://www.eztaxon.org/>) เป็นฐานข้อมูลบนเว็บไซต์ที่รวบรวมลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ต้นแบบ และใช้ในการจัดจำแนกจะพิจารณาจากค่าความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์แบบคู่ผสม (Pairwise nucleotide) รวมถึงการวิเคราะห์วิวัฒนาการชาติพันธุ์ ระบบฐานข้อมูลที่พัฒนาขึ้นนี้ช่วยให้ผู้ใช้สามารถค้นหาความคล้ายคลึงกัน เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้มากกว่า 2 ชุด (Multiple sequence alignment) และวิเคราะห์วิวัฒนาการชาติพันธุ์ได้หลากหลาย โดยสามารถทำงานร่วมกับลำดับยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ต้นแบบทั้งหมดในการจัดจำแนก Prokaryotes ได้อย่างถูกต้องและน่าเชื่อถือ ซึ่ง EzTaxon ในรุ่นปัจจุบันจะเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W เลือก PHYMLIP package และช่องว่าง (gaps) ทั้งหมดที่เกิดขึ้น

ในการเปรียบเทียบ (Alignment) จะถูกลบโดยอัตโนมัติ (Chun et al., 2007) การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ มี 3 วิธี คือ Neighbour-joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987), Maximum-parsimony (MP) (Fitch, 1971) และ Maximum-likelihood (ML) (Felsenstein, 1981) สร้างในโปรแกรม MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software) (Kumar et al., 2016) ระยะทาง (Distance matrix) จะวิเคราะห์จากแบบจำลองของ Kimura's two-parameter (Kimura, 1980) การวิเคราะห์ Bootstrap จะทำซ้ำ 1,000 ครั้ง ยกเว้นใน ML ทำซ้ำเพียง 100 ครั้ง (Zhi et al., 2009)

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 1.1 แอคติโนมัยซีท 38 ไอโซเลต
- 1.2 *P. putida* ATCC 17484
- 1.3 *B. cereus*
- 1.4 *E. coli* ATCC 25922
- 1.5 *P. aeruginosa*
- 1.6 *S. aureus*

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 2.1 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (pipette) (ยี่ห้อ Gilson) และทิป
- 2.2 งานเพาะเชื้อแบคทีเรีย
- 2.3 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C ยี่ห้อ Sanden
- 2.4 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C ถึง 10 °C ยี่ห้อ Sanden
- 2.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Daihan Scientific CO.,LTD รุ่น Wise Spin
- 2.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Micro Centrifuge) บริษัท Lio Lab International CO., LTD รุ่น LM- 60
- 2.7 เครื่องนึ่งความดันไอน้ำหรือหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Tomy Seiko CO., LT รุ่น SS-3250
- 2.8 เครื่องเขย่า (Vortex) บริษัท Scientific Industries รุ่น Vortex-Genie 2
- 2.9 ตู้บ่มตัวอย่าง รุ่น BD 115 WTE binder
- 2.10 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Clean Bench) รุ่น UVUB 1200 Biohazard
- 2.11 ไมโครเวฟ ยี่ห้อซาร์ป รุ่น R-219
- 2.12 เครื่องชั่งแบบหยาบ บริษัท ไฮแอนดิฟิค โปรโมชั่น จำกัด รุ่น Sartorius CP3202S
- 2.13 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 2.14 เครื่องเขย่า Orbital Shaker รุ่น OS-900

- 2.15 เครื่อง PCR บริษัท Eppendorf
- 2.16 กระดาษวัด pH
- 2.17 กล้องสเตอริโอ รุ่น Olympus sz6
- 2.18 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- 2.19 สำลี
- 2.20 Aluminum foil
- 2.21 กล้องถ่ายรูปโซนี่ a5100

3. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ
(สูตรอาหารต่าง ๆ แสดงวิธีเตรียมการในภาคผนวก ก)
- 3.2 สารเคมี
(สูตรสารเคมีต่าง ๆ แสดงวิธีเตรียมการในภาคผนวก ข)
- 3.3 ไพรมอร์
(1F และ 1530R)

4. วิธีการดำเนินการวิจัย

4.1 การทำให้เชื้อบริสุทธิ์

นำแบคทีเรียแอกติโนมัยสียที่คัดแยกไว้แล้ว มาจากสองแหล่ง คือ จากมูลไส้เดือน จำนวน 30 ไอโซเลต และจากผักบุงทะเล จำนวน 8 ไอโซเลต คัดแยกภายใต้โครงการวิจัยของ จันทรานิพนธ์ ในปีงบประมาณ 2554 และปี 2559 แบคทีเรียแอกติโนมัยสียทั้ง 38 ไอโซเลต ทำให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็งสูตร MS ด้วยวิธี Cross streak จากนั้นทำการย้อมสีแกรมเพื่อบ่งชี้ ลักษณะของแอกติโนมัยสียในเบื้องต้น โดยตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เปรียบเทียบกับ *Bacillus subtilis* (แบคทีเรียแกรมบวก) และ *E. coli* ATCC 25922 (แบคทีเรียแกรมลบ) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ *P. putida* ATCC 17484 บนอาหารแข็งสูตร NA สำหรับ รายชื่อของแอกติโนมัยสียไอโซเลตต่าง ๆ ให้รหัสเป็น BBUU (Biology-Burapha University) แสดงไว้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 รายชื่อแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท

BBUU	แหล่งคัดแยก	จำนวน (ไอโซเลต)	ผู้คัดแยก
105, 112, 114		3	
118		1	
179, 180, 186, 187, 190, 192, 195		7	ภายใต้ โครงการวิจัยของ จันทรา อินทนนท์ ในปีงบประมาณ 2554 และปี 2559
134, 144, 145, 146, 149, 150, 151, 155/1, 155/2, 157, 160, 161, 162, 163, 164, 165/1, 165/2, 166, 168	มูลไส้เดือน	19	
500, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909	ผักบุงทะเล	8	
รวม		38	

4.2 คัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตไซเดอโรฟอรัได้ในอาหาร CAS

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และเจริญเติบโตในอาหารแข็ง สูตร MS และ *P. putida* ATCC 17484 เจริญเติบโตในอาหารแข็งสูตร NA มาทดสอบการผลิตไซเดอโรฟอรั ด้วยวิธี Agar plug diffusion โดยเจาะชิ้นวุ้น (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร) ตรงบริเวณที่มีเชื้อเจริญหนาแน่น นำชิ้นวุ้นไปวางในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง CAS และนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตรวจสอบการเกิดโซนสีส้มรอบ ๆ โคโลนี และวัดขนาดของโซนสีส้ม (Halozone) จากนั้นคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากมูลไส้เดือนและผักบุงทะเลที่ผลิตโซนสีส้มได้มากที่สุดไปศึกษาในสภาวะความเค็ม

4.3 คัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ทนเค็มและตรวจสอบการทนเค็มของ *P. putida* ATCC

17484

4.3.1 คัดเลือกอาหาร

นำแอคติโนมัยสีทไอโซเลตที่ผลิตไซเดอโรฟอร์ได้ดีที่สุดที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนและผักบุงทะเล มาเลี้ยงในอาหารแข็ง 5 ชนิด สูตร YD, ISP2, ISP3, ISP4 และ ISP5 แล้วจึงนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ เพื่อคัดเลือกอาหาร จากนั้นนำไปตรวจสอบการทนต่อความเค็ม

4.3.2 ตรวจสอบการทนต่อความเค็ม

นำแอคติโนมัยสีทไอโซเลตที่ผลิตไซเดอโรฟอร์ได้ดีที่สุดที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนและผักบุงทะเล มาเลี้ยงในอาหารสูตรที่คัดเลือกไว้ โดยวิธี Cross streak ที่เค็มเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหาร 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7% (w/v) แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกผลการเจริญเติบโตในการทนต่อความเค็ม

4.4 การศึกษาการเจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์และหาน้ำหนักแห้ง

4.4.1 เลือกลงเซลล์ในระดับการเจือจางที่เหมาะสม ด้วยวิธีการทำ Serial dilution

เจือจางเซลล์แอคติโนมัยสีทไอโซเลตที่ผลิตไซเดอโรฟอร์ได้ดีที่สุดที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนและผักบุงทะเล และ *P. putida* ATCC 17484 เป็น 10^{-1} - 10^{-6} จุดเซลล์แขวนลอยแต่ละระดับการเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตรที่คัดเลือกไว้ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนับจำนวนโคโลนีเพื่อเลือกระดับการเจือจางที่เหมาะสม

4.4.2 การหาน้ำหนักแห้ง

นำเซลล์แอคติโนมัยสีทและ *P. putida* ATCC 17484 ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม มาล้างเซลล์ด้วย 0.9% Normal saline solution จนสะอาด แล้วจึงจุดเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ นำหลอดทดลองไปเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นกรองเซลล์ผ่านกระดาษกรอง วางบนจานเพาะเชื้อ อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง (Sadeghi et al., 2012)

4.5 การศึกษาการผลิตไซโคโรฟอรภายใต้สภาวะความเค็ม

นำแอสคิโนมัซีทไอโซเลตที่ผลิตไซโคโรฟอรได้ดีที่สุดที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือน และผักบุ้งทะเล และ *P. putida* ATCC 17484 มาทดสอบการผลิตไซโคโรฟอร ด้วยวิธี Agar plug diffusion โดยเจาะชิ้นวุ้น (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) ตรงบริเวณที่มีเชื้อเจริญหนาแน่น นำชิ้นวุ้นไปวางในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง CAS ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ และนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตรวจสอบการเกิดโซนสีส้มรอบ ๆ โคลโลนี และวัดขนาดของโซนสีส้ม (Halozone)

4.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

4.6.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรีย *B. cereus*, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกลโคโลนีลงในอาหาร NB บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาเจือจางให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No.0.5 (1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) โดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.08

4.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion

เตรียมอาหารแข็ง NA ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดที่ปรับความขุ่นไว้เกลี่ยให้ทั่วบนผิวอาหาร NA ตัดชิ้นวุ้น (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) ของแอสคิโนมัซีท นำชิ้นวุ้นไปวางในจานเพาะเชื้อ แล้วนำจานเพาะเชื้อ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นตรวจสอบการเกิดวงใส และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone)

4.7 การจัดจำแนกแอสคิโนมัซีทในระดับสกุล

4.7.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำแอสคิโนมัซีทไอโซเลตที่ผลิตไซโคโรฟอรได้ดีที่สุดที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนและผักบุ้งทะเล มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP2, ISP3, ISP4 และ ISP5 บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ เส้นใยได้ผิวอาหาร เส้นใยเหนือผิวอาหาร สีของสปอร์ และสิ่งรบกวน เปรียบเทียบกับ Color Harmony Manual (Jacobson et al., 1958) จากนั้นเลือกอาหารสูตร ISP ที่แต่ละไอโซเลตมีการผลิต

สปอร์มาศึกษาลักษณะของสปอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

4.7.2 ลักษณะทางเคมี

4.7.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

นำแอกติโนมัยซีทไอโซเลตที่ผลิตไซเคโอโรฟอร์ได้ดีที่สุดที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนและผักบุงทะเล ที่ตรวจสอบความบริสุทธิ์แล้ว มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ (Erlenmayer flask) ที่มีอาหารเหลวสูตร YD เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นดูดเซลล์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทอาหารทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย 0.9% Normal saline solution นำไปเขย่า (Vortex) เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำทิ้ง (ทำซ้ำจนน้ำใส) นำเซลล์ที่ได้ใน Microcentrifuge บดเซลล์ด้วยไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen) ในโกร่งที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำเซลล์ที่บดละเอียด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Lysis buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม RnaseA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เติม 2% SDS ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดผสมให้เข้ากัน เติม Phenol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอด Microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม 3M NaCH₂COOH ปริมาตร 0.1 เท่า ของปริมาตรดีเอ็นเอ กลับหลอดผสมให้เข้ากัน เติม Isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรดีเอ็นเอ กลับหลอดผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง เติม 70% Ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Sterile H₂O ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.7.2.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยชุด TIANamp Genomic DNA

Kit

นำแอกติโนมัยสีทไฮโซเลตที่ผลิตไซเดอโรฟอร์ได้ดีที่สุดจากมูลไส้เดือนและผักบุงทะเลที่ตรวจสอบความบริสุทธิ์แล้ว มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ที่มีอาหารเหลวสูตร YD เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นดูดเซลล์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทอาหารทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย Buffer PW ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่า เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เท Buffer PW ทิ้ง (ทำซ้ำจน Buffer PW ใส) นำเซลล์ที่ได้ใน Microcentrifuge tube เติม Buffer GA ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติม RnaseA ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำไปเขย่า เป็นเวลา 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บน Shaker ที่เขย่าได้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Protinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปเขย่า เป็นเวลา 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส บน Shaker ที่เขย่าได้ เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง เติม Buffer GB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่า เป็นเวลา 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส บน Shaker ที่ไม่เขย่า เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (Spin down) 5 วินาที เติม AbEtOH ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่า เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 5 วินาที เทส่วนใสใส่ลงใน Spin Columns CB3 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ทิ้ง เติม Buffer GD ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ทิ้ง เติม Buffer PW ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วย้ายส่วนของ Spin Columns CB3 ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยเติมตรงกลางกระดวยกรองของ Spin Columns CB3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จะได้ส่วนใสที่ถูกรองใน Microcentrifuge tube ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.7.2.3 ตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอและผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

ชั่งผงอะกาโรส 0.4 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ เติม Buffer 0.5X TAE ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ละลายอะกาโรสในไมโครเวฟ นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อุ่น หมูมิลดลง เทอะกาโรสลงในถาดรองเจลที่เตรียมไว้ พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ รอให้เจลแข็งตัว แล้วดึงหัวออก นำเจลไปวางใน Electrophoresis chamber เท Buffer 0.5X TAE ลงไปให้ท่วมเจล ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ (DNA sample) หรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ Loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมกับ Sterile H₂O ปริมาตร 3 ไมโครลิตร หยอดดีเอ็นเอหรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ใส่ในช่องเจล (DNA marker จะหยอดเป็นลำดับสุดท้าย) เมื่อหยอดเสร็จเรียบร้อยแล้ว ปิดฝา Electrophoresis chamber แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ Power supply ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV Transilluminator แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb Ladder)

4.7.2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ 1F (5'-TCACGGAGAGTTTGATCCTG-3') และไพรเมอร์ 1530R (5'-AAGGAGATCCAGCCGCA-3') (Kataoka et al., 1997) สารเคมีที่ใช้ทำพีซีอาร์ ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร, (10X) Buffer A ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, (50 มิลลิโมลาร์) MgCl₂ ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร, (2 มิลลิโมลาร์) dNTP mixture ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, (10 ไมโครโมลาร์) ไพรเมอร์ 1F และไพรเมอร์ 1530R ปริมาตร 0.37 ไมโครลิตร, (500U) Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.15 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 15 ไมโครลิตร ด้วย Sterile H₂O ทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ในหลอดทดลองด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีขั้นตอนดังนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ Final-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวนรอบทั้งหมด 2-34 รอบ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปทำให้บริสุทธิ์

4.7.2.5 การเตรียมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยชุด TIANgel Midi DNA

Purification Kit

ตัดชิ้นวุ้นแถบพีซีอาร์ ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube เติม Buffer PN ปริมาตร 1 เท่าของพีซีอาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนชิ้นวุ้นละลาย จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น คูดสารละลายใส่ลงใน Spin Columns CA2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน Collection tube ที่เติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ที่เติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ซ้ำอีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ที่เติม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เปิดฝา Spin Columns CA2 เป็นเวลา 10 นาที ย้ายส่วนของ Spin Columns CA2 ใส่ลงใน 1.5 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube เติม Sterile H₂O ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บริเวณตรงกลาง แผ่นกรอง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้ส่วนใสที่ถูกกรองใน Microcentrifuge tube ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้บริสุทธิ์ไปตรวจสอบโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.7.2.6 การวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่บริสุทธิ์แล้ว ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงด้วยไพรมอร์ 1F และ 1530R โดยส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท First Base Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับค่าคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Ezbiocloud และนำไปสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ในโปรแกรม MEGA โดยใช้วิธี Neighbour-Joining Method (Saitou & Nei, 1987), Maximum likelihood และ Maximum parsimony วิเคราะห์ Bootstrap 1,000 ครั้ง กำหนดระยะห่างระหว่างลำดับเบสโดยใช้ Kimura two-parameter (K2P) (Kimura, 1980)

4.8. การเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียแอกติโนมัยสิท

แบคทีเรียที่บริสุทธิ์จะมีการเก็บรักษาไว้เพื่อให้มีชีวิตอยู่ได้นาน เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาครั้งต่อไป สามารถเก็บแบคทีเรียแอกติโนมัยสิทโดยตัดชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ลงใน 20 เฟอร์เซนต์ กลีเซอรอลที่เตรียมไว้ แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้ผลการวิเคราะห์ ANOVA และ Tukey's multiple ในโปรแกรม Minitab 17 และนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จำนวนได้จากผลการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งหากมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะได้ค่า $P < 0.05$



3639644678

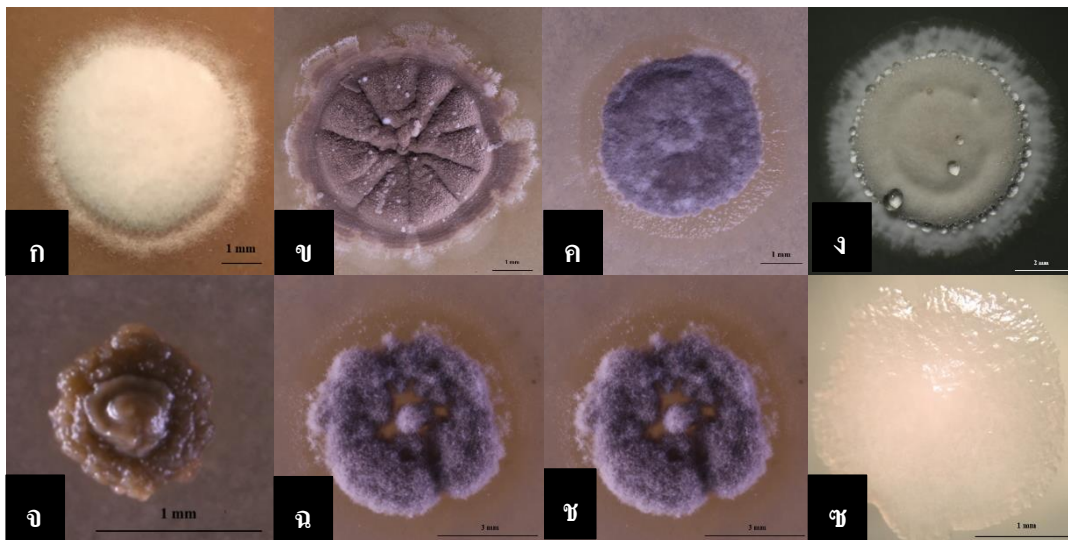
BUU_1Thesis_59910008_thesis / rcv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. การทำให้เชื้อบริสุทธิ์

แอกคิโนมายซีทส่วนใหญ่จะสร้างเส้นใย 2 ชนิด คือ เส้นใยใต้ผิวหนังและเส้นใยเหนือผิวหนัง หรืออาจสร้างเฉพาะเส้นใยใต้ผิวหนังอย่างเดียว เมื่อเส้นใยเกิดการรวมตัวทำให้เส้นใยมีความหนาแน่นเกิดเป็นโคโลนี จากนั้นเส้นใยจะเปลี่ยนรูปแบบไปเป็นสปอร์ (Barka et al., 2016) โคโลนีของแอกคิโนมายซีทจะมีสีที่แตกต่างกันออกไป เช่น สีขาว สีเหลือง สีส้ม สีแดง สีม่วง สีเขียว สีน้ำเงิน สีน้ำตาล และสีดำ (รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2548) แอกคิโนมายซีทจะผลิตรงควัตถุ ซึ่งอาจเป็นสีแดง สีเหลือง สีส้ม สีชมพู สีน้ำตาล สีน้ำเงิน หรือสีดำ ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียอาหารที่ใช้เลี้ยง และจำนวนวันเวลาที่เลี้ยง (Barka et al., 2016) จากการนำแบคทีเรียแอกคิโนมายซีท 38 ไอโซเลต มาตรวจสอบความบริสุทธิ์บนอาหารแข็งสูตร MS พบว่า เจริญเติบโตได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลต ดังรายชื่อในภาคผนวก ก และตัวอย่างความบริสุทธิ์ของแอกคิโนมายซีทแสดงในภาพที่ 9 และพบ 3 ไอโซเลต ไม่เจริญเติบโต ได้แก่ BBUU905, BBUU908 และ BBUU909 แอกคิโนมายซีทมีการสร้างเส้นใยใต้ผิวหนัง สีเหลือง (Cream และ olive) สีเทา (Davy' grey) และสีน้ำตาล (Bistre, camel, Chamoisee, Ercu, Fulvous, Khaki และ Raw umber) สร้างเส้นใยเหนือผิวหนัง สีขาว (White) และสีส้ม (Fulvous) สร้างสปอร์สีเทา (Ash grey, Battleship grey, Cool grey, Grey และ Silver) สีเขียว (Army green) สีเหลือง (Lemon chiffon) และสีน้ำตาล (Raw umber) และสร้างรงควัตถุ สีชมพู (Ultra pink) สีน้ำตาล (Camel, Ecrú, Fallow, Khaki และ Tan) และสีเหลือง (Golden yellow) (ตารางที่ 5) โดยเปรียบเทียบสีกับ Color Harmony Manual (Jacobson et al., 1958) และจากการนำแอกคิโนมายซีททั้ง 35 ไอโซเลต มาข้อมแกรม เพื่อบ่งชี้ลักษณะของแอกคิโนมายซีทในเบื้องต้น พบว่า ข้อมแกรมดัดสีม่วงทั้งหมด ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เช่นเดียวกับ *B. subtilis* (ตารางที่ 6) (ภาพภาคผนวก ง) และจากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ *P. putida* ATCC 17484 บนอาหารสูตร NA พบว่า *P. putida* ATCC 17484 มีความบริสุทธิ์ ไม่สร้างสปอร์ (ภาพที่ 9ข) (Weller, 2007) และข้อมแกรมดัดสีแดง ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เช่นเดียวกับ *E. coli* (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 9 (ก-ช) ตัวอย่างความบริสุทธิ์ของแอกติโนมัยสีท และ (ซ) *P. putida* ATCC 17484

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร MS

แอกติโนมัยสีท	เส้นใยใต้ผิว อาหาร	เส้นใยเหนือผิวอาหาร	สปอร์	รงควัตถุ
BBUU105 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU112 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU114 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU118 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU134 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU144 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU145 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU146 ¹	Davy's gray	White	Cool grey	-
BBUU149 ¹	Khaki	White	Davy's gray	-
BBUU150 ¹	Khaki	White	Davy's gray	-
BBUU151 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU155/1 ¹	Olive	White	Army green	Ecru

ตารางที่ 5 (ต่อ)

แอกติโนมายีสัท	เส้นใยได้ผิว อาหาร	เส้นใยเหนือผิวอาหาร	สปอร์	รงควัตถุ
BBUU155/2 ¹	Olive	White	Army green	Khaki
BBUU157 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU160 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU161 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU162 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU163 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU164 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU165/1 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU165/2 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU166 ¹	Cream	White	Grey	Ultra pink
BBUU168 ¹	Bistre	White	Sliver	Camel
BBUU179 ¹	Khaki	White	Ash gray	-
BBUU180 ¹	Camel	White	Army green	Ecu
BBUU186 ¹	Raw umber	White	Battleships gray	Tan
BBUU187 ¹	Raw umber	White	Sliver	Ecu
BBUU190 ¹	Raw umber	White	Battleships gray	Ecu
BBUU192 ¹	Davy's gray	Fulvous	Raw umber	-
BBUU195 ¹	Khaki	White	Davy's gray	Ecu
BBUU500 ²	Cream	White	White	-
BBUU903 ²	Ecu	White	Lemon chiffon	-
BBUU904 ²	Cream	White	Grey	-
BBUU905 ²	-	-	-	-
BBUU906 ²	Chamoisee	White	Battleships gray	Golden yellow
BBUU907 ²	Ecu	White	Lemon chiffon	-
BBUU908 ²	-	-	-	-



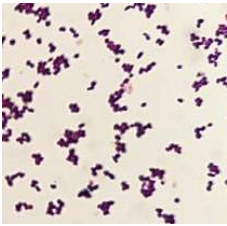
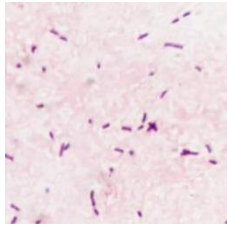
ตารางที่ 5 (ต่อ)

แอกติโนมัยสีท	เส้นใยใต้ผิว อาหาร	เส้นใยเหนือผิว อาหาร	สปอร์	รงควัตถุ
BBUU909 ²	-	-	-	-

“หมายเหตุ”¹ หมายถึง คัดแยกจากมูลไส้เดือน, ² หมายถึง คัดแยกจากผักบุ้งทะเล;

- หมายถึง ไม่เจริญเติบโต

ตารางที่ 6 การย้อมแกรม

แบคทีเรีย	แกรมบวก (สีม่วง)	แกรมลบ (สีแดง)
<i>E. coli</i>		
<i>B. subtilis</i>		
แอกติโนมัยสีท 35 ไอโซเลต		
<i>P. putida</i> ATCC 17484		

2. คัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตไซเดอโรฟอร์ได้ในอาหาร CAS

แอคติโนมัยสีทและ *P. putida* ATCC 17484 มีความสามารถในการผลิตไซเดอโรฟอร์ ซึ่งไซเดอโรฟอร์ จะไปช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และควบคุมเชื้อก่อโรคพืชได้ จากการศึกษากาการผลิตไซเดอโรฟอร์บนอาหารแข็ง CAS พบว่า หากมีการผลิตไซเดอโรฟอร์ บริเวณรอบ ๆ โคลินี เพลตอาหารจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีส้ม แอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากมูลไส้เดือน และจากผักบุงทะเลทั้ง 35 ไอโซเลต สามารถผลิตไซเดอโรฟอร์ได้ทั้ง 35 ไอโซเลต โดยมี 2 ไอโซเลต ผลิตไซเดอโรฟอร์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสีส้มมากกว่า 3 เซนติเมตร กำหนดสัญลักษณ์เป็น (+++) คือ ไอโซเลต BBUU157 และไอโซเลต BBUU500 มี 15 ไอโซเลต ผลิตไซเดอโรฟอร์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสีส้ม 2-3 เซนติเมตร กำหนดสัญลักษณ์เป็น (++) คือ ไอโซเลต BBUU105, BBUU118, BBUU134, BBUU151, BBUU160, BBUU161, BBUU164, BBUU165/1, BBUU165/2, BBUU166, BBUU168, BBUU180, BBUU187, BBUU906 และ BBUU907 และ 21 ไอโซเลตที่เหลือ ผลิตไซเดอโรฟอร์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสีส้มน้อยกว่า 2 เซนติเมตร กำหนดสัญลักษณ์เป็น (+) คือ ไอโซเลต BBUU112, BBUU114, BBUU118, BBUU134, BBUU144, BBUU145, BBUU146, BBUU149, BBUU150, BBUU155/1, BBUU155/2, BBUU157, BBUU162, BBUU163, BBUU 179, BBUU186, BBUU190, BBUU192, BBUU195, BBUU903 และ BBUU904 (ตารางที่ 7) (ภาพที่ 10) ดังนั้น แอคติโนมัยสีทที่ผลิตไซเดอโรฟอร์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสีส้มได้มากที่สุด คือ ไอโซเลต BBUU157 และไอโซเลต BBUU500 ($P>0.05$) ดังนั้น ไอโซเลต BBUU157 และไอโซเลต BBUU500 จึงถูกนำไปศึกษาในสภาวะความเค็มเป็นลำดับต่อไป

ตารางที่ 7 การผลิตไซเดอโรฟอร์ภายใต้สภาวะปกติ

แอคติโนมัยสีท	การผลิตไซเดอโรฟอร์	สัญลักษณ์
BBUU105	2.4±0.14	++
BBUU112	1.7±0.28	+
BBUU114	2.00±0.14	+
BBUU118	2.65±0.07	++
BBUU134	3.00±0.14	++
BBUU144	2.20±0.14	++

ตารางที่ 7 (ต่อ)

แอดคิโนมายส์	การผลิตไซเตอร็พอร์	สัญลักษณ์
BBUU145	1.40±0.14	+
BBUU146	0.70±0.14	+
BBUU149	0.85±0.07	+
BBUU150	1.50±0.00	+
BBUU151	2.60±0.00	++
BBUU155/1	1.15±0.07	+
BBUU155/2	1.25±0.07	+
BBUU157	4.70±0.14	+++
BBUU160	2.25±0.07	++
BBUU161	2.20±0.28	++
BBUU162	1.60±0.28	+
BBUU163	1.90±0.14	+
BBUU164	2.05±0.21	++
BBUU165/1	2.75±0.07	++
BBUU165/2	2.45±0.07	++
BBUU166	2.40±0.14	++
BBUU168	1.00±0.00	++
BBUU179	1.50±0.14	+
BBUU180	2.00±0.42	++
BBUU186	1.20±0.14	+
BBUU187	0.75±0.07	++
BBUU190	1.05±0.21	+
BBUU192	0.60±0.14	+
BBUU195	0.95±0.07	+
BBUU500	4.40±0.10	+++
BBUU903	1.00±0.00	+

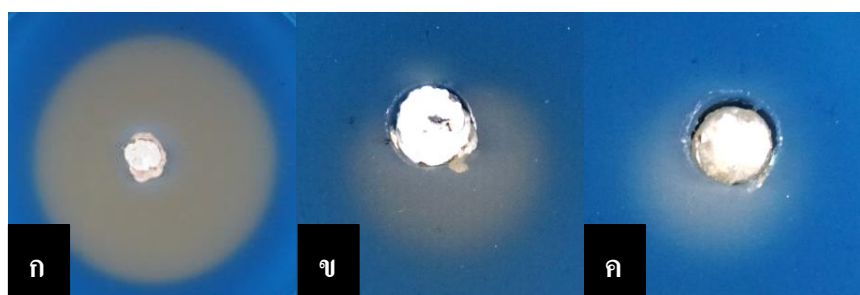


369644678

BUU_1Thesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

ตารางที่ 7 (ต่อ)

แอสโคสปอร์	การผลิตไซเคอโรฟอร	สัญลักษณ์
BBUU904	2.60±0.00	+
BBUU906	1.70±0.14	++
BBUU907	2.60±0.00	+



ภาพที่ 10 การผลิตไซเคอโรฟอรของแอสโคสปอร์ (ก) เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสีส้มมากกว่า 3 เซนติเมตร (ข) เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสีส้ม 2-3 เซนติเมตร (ค) เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสีส้มน้อยกว่า 2 เซนติเมตร

3. ตรวจสอบการทนเค็มของแอสโคสปอร์และ *P. putida* ATCC 17484

3.1 คัดเลือกอาหาร

จากการคัดเลือกแอสโคสปอร์ที่ผลิตไซเคอโรฟอรได้มากที่สุด คือ ไอโซเลต BBUU157 คัดแยกได้จากมูลไส้เดือน และไอโซเลต BBUU500 คัดแยกได้จากผักนึ่งทะเล มาศึกษาในสภาวะความเค็มและตรวจสอบการทนเค็มของ *P. putida* ATCC 17484 เริ่มจากคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งมีสูตรอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ YD, ISP2, ISP3, ISP4 และ ISP5 พบว่า ไอโซเลต BBUU157 ไอโซเลต BBUU500 และ *P. putida* ATCC 17484 สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารสูตรที่เหมือนกัน คือ อาหารสูตร YD, ISP2 และ ISP3 (ตารางที่ 8) (ภาพที่ 11, 12) แต่เนื่องจาก อาหารสูตร ISP2 และ ISP3 มีราคาค่อนข้างสูง และเป็นอาหารที่ใช้สำหรับศึกษาแอสโคสปอร์ ในสกุล *Streptomyces* (Shirling & Gottlieb, 1966)

ดังนั้นอาหารสูตร YD จึงถูกเลือกมาศึกษาการทนเค็ม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบส่วนประกอบในสูตรอาหาร พบว่า อาหารสูตร YD และ ISP2 มีส่วนประกอบที่ใกล้เคียงกัน (ภาคผนวก ข)

ตารางที่ 8 การเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์บนอาหารสูตรต่าง ๆ

แบคทีเรีย	การเจริญเติบโตบนอาหาร					การสร้างสปอร์				
	YD	ISP2	ISP3	ISP4	ISP5	YD	ISP2	ISP3	ISP4	ISP5
BBUU157	VG	VG	VG	G	G	VG	VG	VG	-	G
BBUU500	VG	VG	VG	G	G	VG	VG	VG	-	VP
<i>P. putida</i> ATCC 17484	VG	VG	VG	G	G	-	-	-	-	-

“หมายเหตุ” - หมายถึง ไม่สร้างสปอร์; VG, Very good, G, Good, VP, Very poor



ภาพที่ 11 การเจริญบนอาหารแข็งสูตร YD (ก) ไอโซเลต BBUU157, (ข) ไอโซเลต BBUU500 และ (ค) *P. putida* ATCC 17484



ภาพที่ 12 การเจริญบนอาหารแข็งสูตร ISP2 (ก) ไอโซเลต BBUU157, (ข) ไอโซเลต BBUU500 และ (ค) *P. putida* ATCC 17484

3.2 ตรวจสอบความทนต่อความเค็ม

จากการทดสอบการทนเค็มของแอกคิโนมัยซีทไอโซเลต BBUU157, ไอโซเลต BBUU500 และ *P. putida* ATCC 17484 บนอาหารแข็งสูตร YD ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7% พบว่า ไอโซเลต BBUU157 สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 7% เกลือโซเดียมคลอไรด์ ส่วนไอโซเลต BBUU500 และ *P. putida* ATCC 17484 สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 6% เกลือโซเดียมคลอไรด์ (ตารางที่ 9) (ภาพภาคผนวก จ) ซึ่ง Kumar et al. (2015) รายงานว่า *P. putida* (ECL5) สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 6% เกลือโซเดียมคลอไรด์ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าแอกคิโนมัยซีทไอโซเลต BBUU157 สามารถทนต่อความเค็มได้มากกว่า *P. putida* ATCC 17484 ในขณะที่ไอโซเลต BBUU500 กับ *P. putida* ATCC 17484 สามารถทนต่อความเค็มได้เท่ากัน

ตารางที่ 9 การทนเค็มในเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0-7%)

แบคทีเรีย	% เกลือโซเดียมคลอไรด์							
	0	1	2	3	4	5	6	7
BBUU157	+	+	+	+	+	+	+	+
BBUU500	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. putida</i> ATCC 17484	+	+	+	+	+	+	+	-

“หมายเหตุ” + หมายถึง มีการเจริญเติบโต, - หมายถึง ไม่มีการเจริญเติบโต

4. การศึกษาการเจริญเติบโตในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์และหาน้ำหนักแห้ง

จากการศึกษาการเจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตร YD ที่มีสารเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1000 มิลลิโมลาร์ ในการศึกษาจะใช้เซลล์ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม ซึ่งอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี ไอโซเลต BBUU157 ใช้เซลล์ที่ในระดับการเจือจางที่ 10^{-3} (1.4×10^6 CFU/ มิลลิลิตร) ไอโซเลต BBUU500 ใช้เซลล์ที่ในระดับการเจือจางที่ 10^{-2} (1.6×10^5 CFU/ มิลลิลิตร) และ *P. putida* ATCC 17484 ใช้เซลล์ที่ในระดับการเจือจางที่ 10^{-5} (1.2×10^8 CFU/ มิลลิลิตร) (ตารางที่ 10) จากการการศึกษาการเจริญในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1000 มิลลิโมลาร์ พบว่า ไอโซเลต BBUU157

สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1000 มิลลิโมลาร์ มีค่าน้ำหนักแห้ง 61.20 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีค่าน้ำหนักแห้ง 15.80 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร (ตารางที่ 11) (ภาพที่ 13) ไอโซเลต BBUU500 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1000 มิลลิโมลาร์ มีค่าน้ำหนักแห้ง 41.30 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีค่าน้ำหนักแห้ง 6.90 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร (ตารางที่ 11) (ภาพที่ 14) Sadeghi et al. (2012) รายงานไว้ว่า *Streptomyces* ไอโซเลต C สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 300 มิลลิโมลาร์ และจะลดลงเมื่อความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงเกิน 300 มิลลิโมลาร์ ส่วน *P. putida* ATCC 17484 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 600 มิลลิโมลาร์ มีค่าน้ำหนักแห้ง 50.80 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีค่าน้ำหนักแห้ง 11.70 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร (ตารางที่ 11) (ภาพที่ 15) จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น ไอโซเลต BBUU157 และ ไอโซเลต BBUU500 สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นจนถึง 1000 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ *P. putida* ATCC 17484 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 600 มิลลิโมลาร์ และจะลดลงเมื่อความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงเกิน 600 มิลลิโมลาร์ ดังนั้น ไอโซเลต BBUU157 และ ไอโซเลต BBUU500 สามารถเจริญเติบโตได้ดีและมีค่าน้ำหนักแห้งมากกว่า *P. putida* ATCC 17484 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 16)

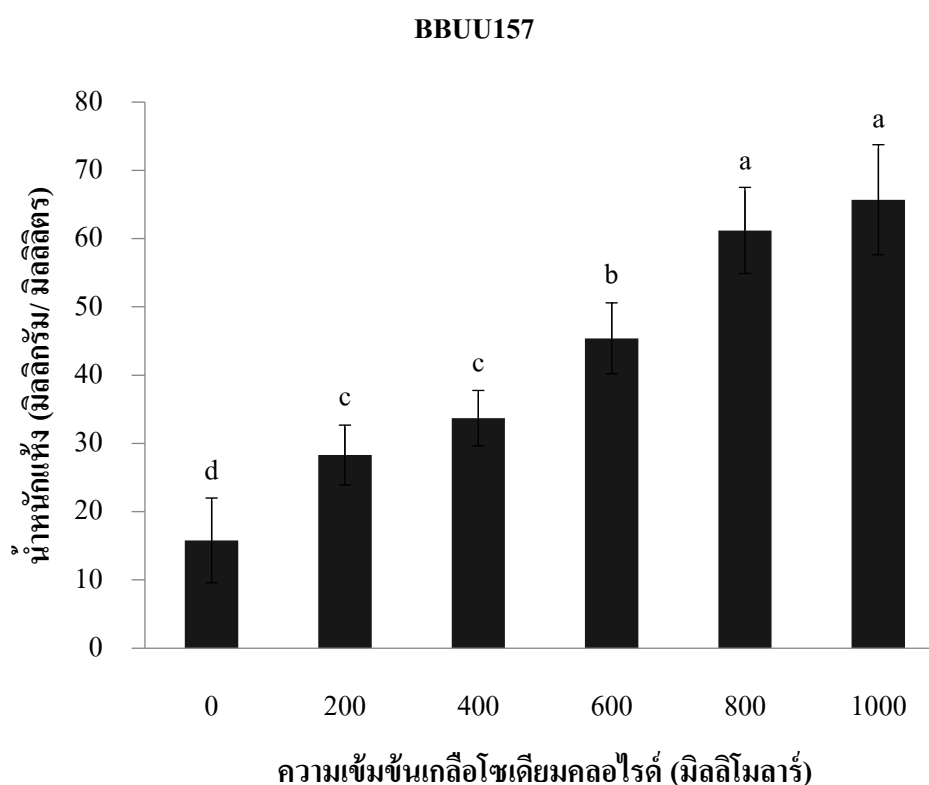
ตารางที่ 10 ระดับการเจือจางที่เหมาะสม

ระดับการเจือจาง	จำนวนโคโลนี (CFU/ มิลลิลิตร)		
	BBUU157	BBUU500	<i>P. putida</i> ATCC 17484
10^{-1}	นับไม่ได้ (>300)	นับไม่ได้ (>300)	นับไม่ได้ (>300)
10^{-2}	นับไม่ได้ (>300)	1.6×10^5	นับไม่ได้ (>300)
10^{-3}	1.4×10^6	3.2×10^5	นับไม่ได้ (>300)
10^{-4}	6.0×10^6	2.6×10^5	นับไม่ได้ (>300)
10^{-5}	2.1×10^7	ไม่เจริญเติบโต	1.2×10^8
10^{-6}	1.4×10^8	ไม่เจริญเติบโต	3.8×10^8

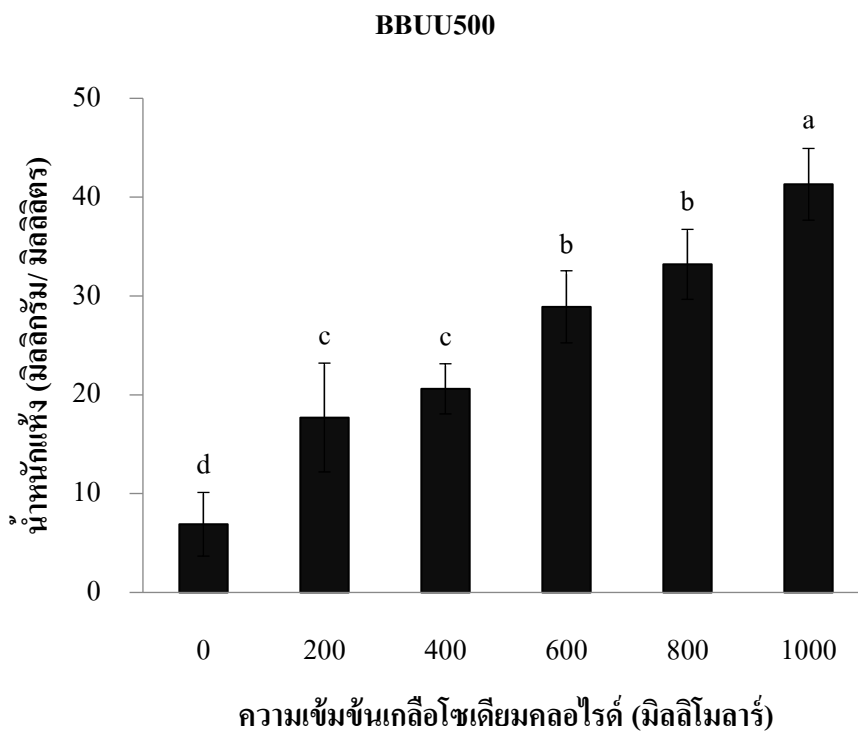
ตารางที่ 11 การเจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)		
	BBUU157	BBUU500	<i>P. putida</i> ATCC 17484
0	15.80±6.21 ^d	6.90±3.22 ^d	11.70±5.42 ^e
200	28.30±4.39 ^c	17.70±5.51 ^c	20.60±5.96 ^d
400	33.70±4.06 ^c	20.60±2.54 ^c	36.80±5.36 ^{bc}
600	45.40±5.19 ^b	28.90±3.65 ^b	50.80±4.36 ^a
800	61.20±6.31 ^a	33.40±3.54 ^b	40.80±3.03 ^b
1000	65.70±8.06 ^a	41.30±3.63 ^a	32.20±3.01 ^c

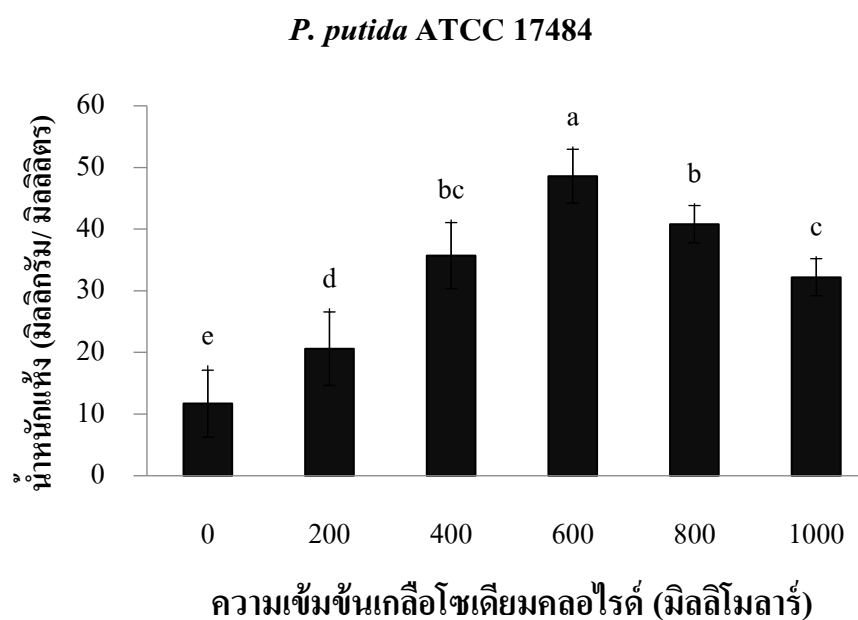
“หมายเหตุ” ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษร แสดงผลการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Tukey Method



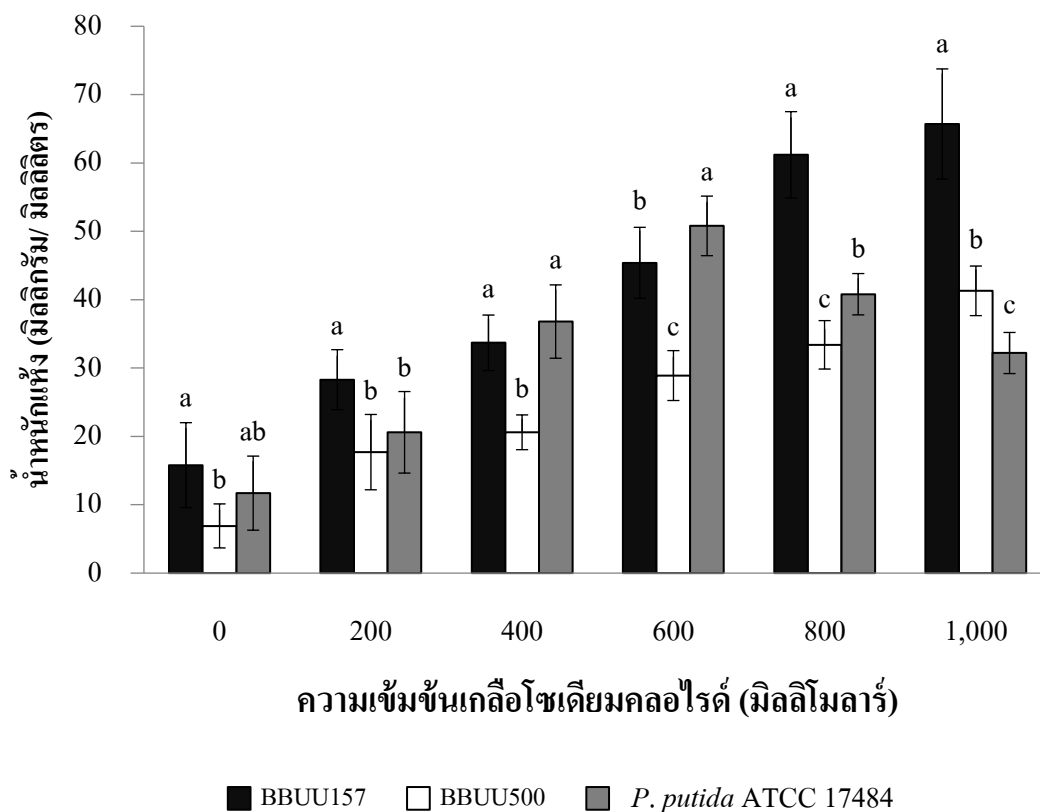
ภาพที่ 13 การเจริญเติบโตในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ของไอโซเลต BBUU157



ภาพที่ 14 การเจริญเติบโตในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ของไอโซเลต BBU500



ภาพที่ 15 การเจริญเติบโตในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ของ *P. putida* ATCC 17484



ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในสถานะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ของไอโซเลต BBUU157 และ ไอโซเลต BBUU500 กับ *P. putida* ATCC 17484

5. การผลิตไซเดอโรฟอรัในสถานะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์

จากการศึกษาการผลิตไซเดอโรฟอรัที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ โดยเปรียบเทียบในแนวดิ่ง พบว่า ไอโซเลต BBUU157 สามารถผลิตไซเดอโรฟอรัได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 มิลลิโมลาร์ วัดขนาดโซนสีส้ม มีขนาด 4.70 เซนติเมตร ในขณะที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1000 มิลลิโมลาร์ วัดขนาดโซนสีส้ม มีขนาด 2.87 เซนติเมตร (ตารางที่ 12) (ภาพที่ 17) ไอโซเลต BBUU500 สามารถผลิตไซเดอโรฟอรัได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 400 มิลลิโมลาร์ วัดขนาดโซนสีส้ม มีขนาด 4.40 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1000 มิลลิโมลาร์ วัดขนาดโซนสีส้ม มีขนาด 3.30 เซนติเมตร (ตารางที่ 12) (ภาพที่ 18) และ *P. putida* ATCC 17484 สามารถผลิตไซเดอโรฟอรัได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น

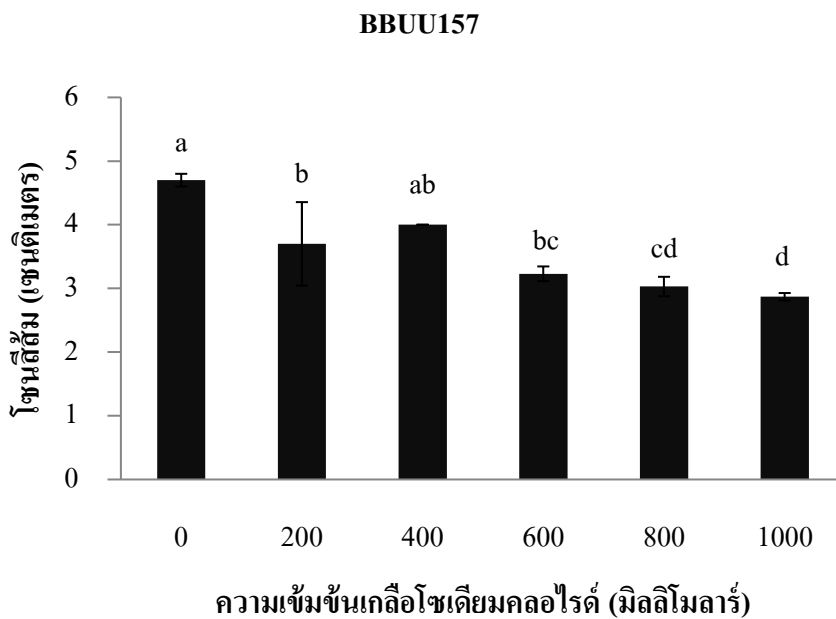
เกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 มิลลิโมลาร์ วัดขนาดโคนสี่เหลี่ยม มีขนาด 2.20 เซนติเมตร ในขณะที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1000 มิลลิโมลาร์ วัดขนาดโคนสี่เหลี่ยม มีขนาด 0.33 เซนติเมตร (ตารางที่ 12) (ภาพที่ 19) (ตารางภาคผนวก ๗) จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต BBUU157 มีการผลิตไซเคอโรฟอรัลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ซึ่ง Argandona et al. (2010) รายงานว่า *C. salexigens* จะผลิตไซเคอโรฟอรัได้มากที่สุดเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ำสุด และจะผลิตได้ลดลงเมื่อความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น ส่วนไอโซเลต BBUU500 มีการผลิตไซเคอโรฟอรัได้เพิ่มขึ้น ซึ่ง Sadeghi et al. (2012) รายงานว่า *Streptomyces* ไอโซเลต C มีประสิทธิภาพในการผลิตไซเคอโรฟอรัเพิ่มขึ้น เมื่อมีระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น และเมื่อนำไอโซเลต BBUU157 และไอโซเลต BBUU500 เปรียบเทียบกับ *P. putida* ATCC 17484 จะเห็นได้ว่า ไอโซเลต BBUU157 และไอโซเลต BBUU500 สามารถผลิตไซเคอโรฟอรัได้ดีกว่า *P. putida* ATCC 17484 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 20)

ตารางที่ 12 การผลิตไซเคอโรฟอรัในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์

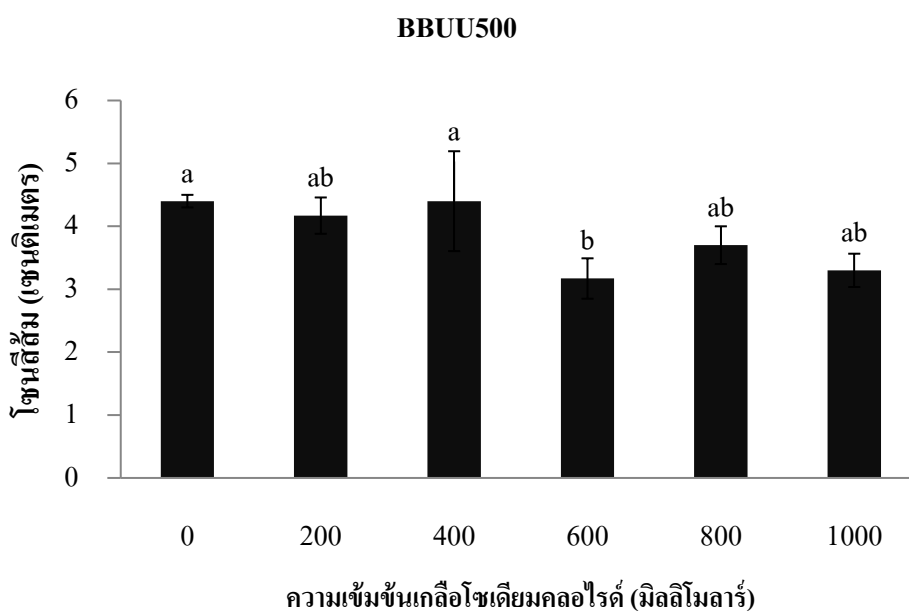
ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	ขนาดโคนสี่เหลี่ยม (เซนติเมตร)		
	BBUU157	BBUU500	<i>P. putida</i> ATCC 17484
0	4.70±0.10 ^a	4.40±0.10 ^a	2.20±0.20 ^a
200	3.70±0.65 ^b	4.17±0.29 ^{ab}	1.33±0.15 ^b
400	4.00±0.00 ^{ab}	4.40±0.79 ^a	1.20±0.10 ^{bc}
600	3.23±0.11 ^{bc}	3.17±0.32 ^b	0.77±0.06 ^c
800	3.03±0.15 ^{cd}	3.70±0.30 ^{ab}	0.47±0.06 ^{cd}
1,000	2.87±0.06 ^d	3.30±0.26 ^{ab}	0.33±0.06 ^d

“หมายเหตุ” ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษร แสดงผลการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย

ใช้วิธี Tukey Method



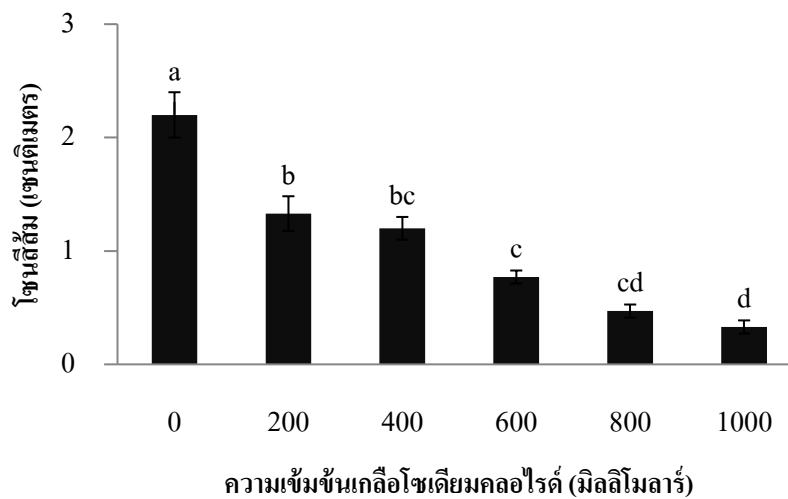
ภาพที่ 17 การผลิตไซเคอโรฟอรัในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ของไอโซเลต BBUU157



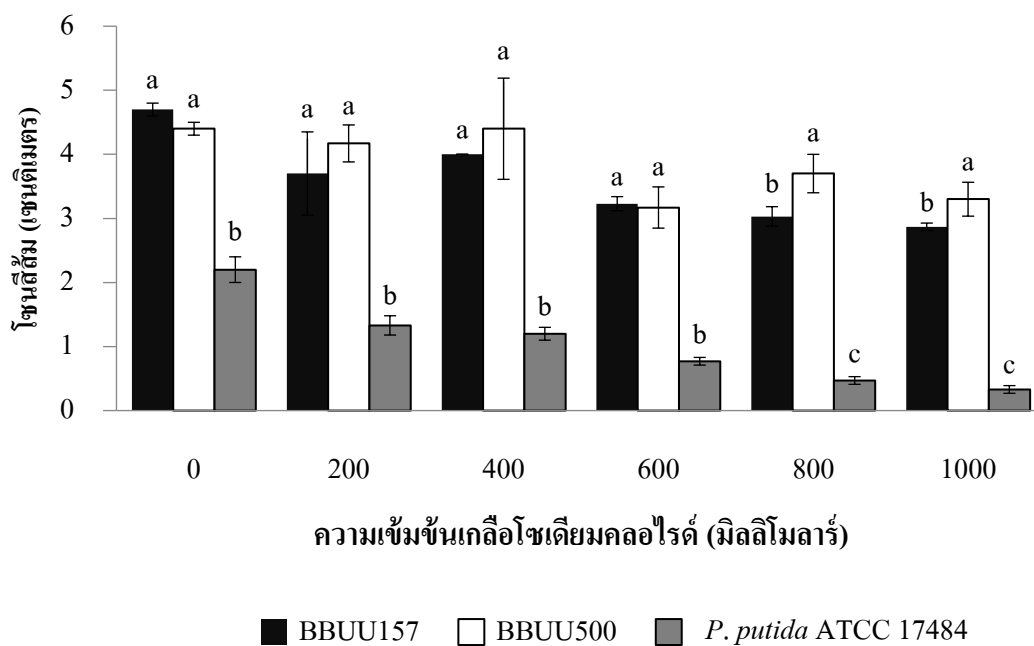
ภาพที่ 18 การผลิตไซเคอโรฟอรัในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ของไอโซเลต BBUU500



369644678

P. putida ATCC 17484

ภาพที่ 19 การผลิตไซโตโรพอร์ในสภาวะที่มีกลีโกลิโคเจนของ *P. putida* ATCC 17484



ภาพที่ 20 การเปรียบเทียบการผลิตไซโตโรพอร์ในสภาวะที่มีกลีโกลิโคเจนของไอโซเลต BBUU157 และไอโซเลต BBUU500 กับ *P. putida* ATCC 17484

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ของแอคติโนไมซีตทั้ง 35 ไอโซเลต พบว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* จำนวน 23 ไอโซเลต มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 4 ไอโซเลต มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* จำนวน 2 ไอโซเลต และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จำนวน 15 ไอโซเลต (ตารางที่ 13) Kruasuwan and Thamchaipenet (2016) รายงานว่า *Streptomyces* มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC 1178, *E. coli* ATCC 8739 และ *S. aureus* และ Shaik et al. (2017) รายงานว่า *Streptomyces* มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* NCIM-2063 และ *E. coli* NCIM-2065

ตารางที่ 13 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ไอโซเลต	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
BBUU105	1.17±0.06	-	-	-
BBUU112	0.73±0.15	-	-	-
BBUU114	1.17±0.15	-	-	-
BBUU118	0.93±0.06	-	-	-
BBUU134	1.37±0.25	-	-	-
BBUU144	0.93±0.15	-	-	-
BBUU145	-	-	-	-
BBUU146	-	-	-	-
BBUU149	1.63±0.25	0.47±0.06	0.40±0.10	1.77±0.06
BBUU150	1.20±0.17	0.60±0.20	0.57±0.06	1.43±0.15
BBUU151	1.43±0.21	-	-	-
BBUU155/1	1.00±0.20	-	-	1.33±0.15
BBUU155/2	1.87±0.15	-	-	1.40±0.17
BBUU157	1.03±0.12	-	-	0.53±0.06
BBUU160	1.27±0.15	-	-	-
BBUU161	0.93±0.06	-	-	0.43±0.15

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ไอโซเลต	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
BBUU162	0.93±0.12	-	-	0.63±0.06
BBUU163	0.93±0.12	-	-	0.57±0.06
BBUU164	1.13±0.06	-	-	-
BBUU165/1	1.30±0.10	-	-	-
BBUU165/2	1.27±0.15	-	-	0.57±0.15
BBUU166	1.20±0.20	-	-	0.57±0.06
BBUU168	-	-	-	-
BBUU179	-	-	-	-
BBUU180	-	-	-	0.43±0.06
BBUU186	0.63±0.06	-	-	0.70±0.10
BBUU187	-	-	-	0.53±0.15
BBUU190	0.67±0.06	-	-	0.60±0.10
BBUU192	-	0.73±0.06	-	-
BBUU195	-	0.60±0.10	-	-
BBUU500	-	-	-	-
BBUU903	-	-	-	-
BBUU904	-	-	-	-
BBUU906	2.20±0.06	-	-	2.73±0.21
BBUU907	-	-	-	-

“หมายเหตุ” - หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

7. การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทในระดับสกุล

7.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการนำไอโซเลตที่ผลิตไซเคอโรฟอรัได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลต BBUU157 คัดแยกได้จากมูลไส้เดือน และ ไอโซเลต BBUU500 คัดแยกได้จากผักนึ่งทะเล มาศึกษาลักษณะทาง

ลัทธิฐานวิทยาบนอาหาร ISP สูตรต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับ Color Harmony Manual (Jacobson et al.,1958) พบว่า บนอาหารสูตร ISP2 ไอโซเลต BBUU157 สร้างเส้นใยได้ผิวอาหารสีเหลือง (Apricot) เส้นใยเนื้อผิวอาหารสีขาว สร้างสปอร์สีเทา (Grey) และไม่สร้างรงควัตถุ บนอาหารสูตร ISP3 สร้างเส้นใยได้ผิวอาหารสีม่วง (Thistle) เส้นใยเนื้อผิวอาหารสีเทา (Battleship grey) สร้างสปอร์สีเทา (Battleship grey) และไม่สร้างรงควัตถุ บนอาหารสูตร ISP4 สร้างเส้นใยได้ผิวอาหารสีม่วง (Purple) เส้นใยเนื้อผิวอาหารสีม่วง (Red-violet) สร้างสปอร์สีเทา (Battleship grey) และไม่สร้างรงควัตถุ และบนอาหารสูตร ISP5 สร้างเส้นใยได้ผิวอาหารสีม่วง (Purple) เส้นใยเนื้อผิวอาหารสีม่วง (Heliotrope) ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างรงควัตถุ (ตารางที่ 14) (ภาคผนวก จ) ไอโซเลต BBUU500 บนอาหารสูตร ISP2 สร้างเส้นใยได้ผิวอาหารสีน้ำตาล (Raw umber) เส้นใยเนื้อผิวอาหารสีขาว สร้างสปอร์สีขาว และไม่สร้างรงควัตถุ บนอาหารสูตร ISP3 สร้างเส้นใยได้ผิวอาหารสีน้ำตาล (Ecru) เส้นใยเนื้อผิวอาหารสีขาว สร้างสปอร์สีขาว และไม่สร้างรงควัตถุ บนอาหารสูตร ISP4 สร้างเส้นใยได้ผิวอาหารสีเหลือง (Blond) เส้นใยเนื้อผิวอาหารสีขาว สร้างสปอร์สีขาว และไม่สร้างรงควัตถุ และบนอาหารสูตร ISP5 สร้างเส้นใยได้ผิวอาหารและเส้นใยเนื้อผิวอาหารสีเหลือง (Lemon chiffon) ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างรงควัตถุ (ตารางที่ 15) (ภาคผนวก ฉ) และจากการตรวจสอบลักษณะของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) บนอาหารสูตร ISP2, ISP3 และ ISP4 พบว่า ไอโซเลต BBUU157 และไอโซเลต BBUU500 สปอร์มีลักษณะเป็นรูปท่อนสั้น ๆ เรียงตัวเป็นเส้นยาว ผิวสปอร์เรียบ ขนาดประมาณ 0.9-1 ไมโครเมตร (ภาพที่ 21, 22)

ตารางที่ 14 ลักษณะทางลัทธิฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP ของไอโซเลต BBUU157

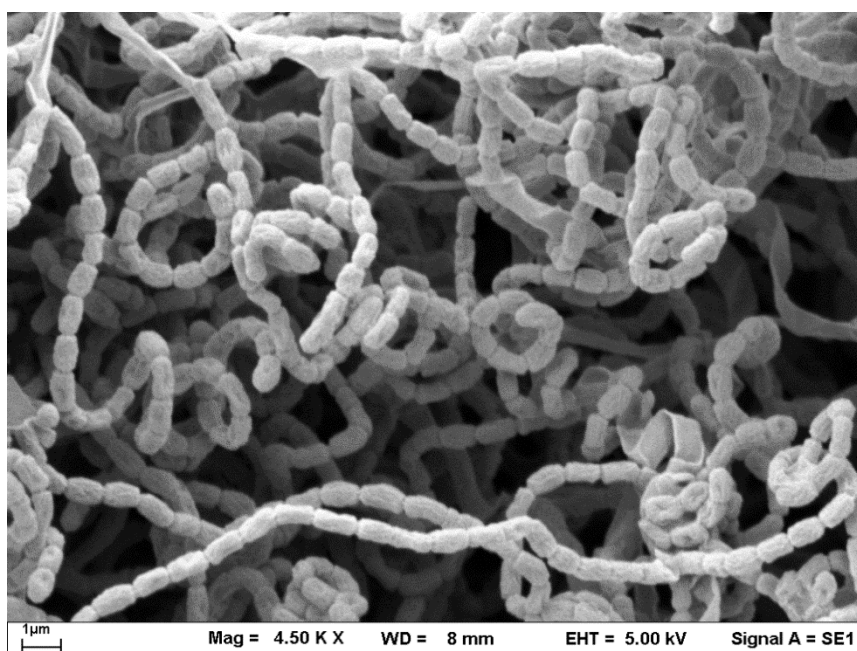
ISP	เส้นใยได้ผิวอาหาร	เส้นใยเนื้อผิวอาหาร	สปอร์	รงควัตถุ
ISP2	Apricot	White	Grey	-
ISP3	Thistle	Battleship grey	Battleship grey	-
ISP4	Purple	Red-violet	Taupe grey	-
ISP5	Purple	Heliotrope	-	-

“หมายเหตุ” - หมายถึง ไม่มีการสร้าง

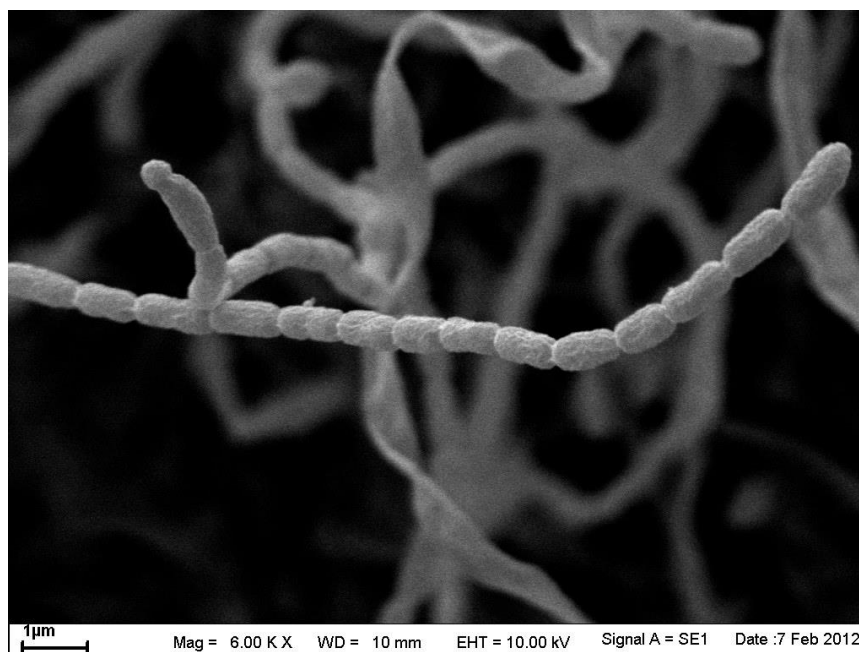
ตารางที่ 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร ISP ของไอโซเลต BBUU500

ISP	เส้นใยได้ผิวอาหาร	เส้นใยเหนือผิวอาหาร	สปอร์	รงควัตถุ
ISP2	Raw umber	White	White	-
ISP3	Ecru	White	White	-
ISP4	Blond	White	White	-
ISP5	Lemon chiffon	Lemon chiffon	-	-

“หมายเหตุ” - หมายถึง ไม่มีการสร้าง



ภาพที่ 21 ลักษณะของสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ไอโซเลต BBUU157 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP3 agar บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 22 ลักษณะของสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของไอโซเลต BBUU500 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP3 agar บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์

7.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์

พันธุ์

จากการนำนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA ของทั้ง 35 ไอโซเลต ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EZbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) พบว่า 33 ไอโซเลต จัดอยู่ในชั้นของแอคติโนมัยซีท ประกอบด้วย สกุล *Streptomyces* จำนวน 28 ไอโซเลต สกุล *Kitasatospora* จำนวน 3 ไอโซเลต และสกุล *Micromonospora* จำนวน 1 ไอโซเลต โดยค่าความคล้ายคลึงของแต่ละไอโซเลตแสดงไว้ในตารางที่ 16 และอีก 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต BBUU118 BBUU151 และ BBUU166 เกิดการปนเปื้อนไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ และจากตารางผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EZbiocloud พบว่า ไอโซเลต BBUU500 มีความคล้ายคลึงสูงสุดกับ *Streptomyces lannensis* TA4-8^T ที่ 97.99% ซึ่งไอโซเลตที่มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน 16S rRNA $\leq 98.7\%$ จะได้รับการพิจารณาให้เป็นตัวแทนสปีชีส์ใหม่ (Stackebrandt & Ebers, 2006; Ramasamy et al., 2014) และจากการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ไอโซเลต BBUU500 พบว่า มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *S. durhamensis* NRRL

B-3309^T (ภาพที่ 23) ดังนั้น ไอโซเลต BBUU500 จึงถูกนำมาศึกษาการเป็นสปอร์ใหม่ และใช้ *S. lannensis* TA4-8^T เป็นตัวเปรียบเทียบ เนื่องจาก จากตารางผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BBUU500 ในฐานข้อมูล EZbiocloud พบว่า มีค่าความคล้ายคลึงกับ *S. lannensis* TA4-8^T เป็นลำดับที่ 3 ในขณะที่ *S. durhamensis* NRRL B-3309^T มีค่าความคล้ายคลึงเป็นลำดับที่ 7 โดยมีค่าความคล้ายคลึงที่ 97.77% (ตารางที่ 17)



369644678

BUU-IThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

ตารางที่ 16 ค่าความเหมือนของแอสคิตินัมยีสกับแอสคิตินัมยีสที่สายพันธุ์ใกล้เคียง โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ในการวิเคราะห์

(<https://www.ezbiocloud.net>)

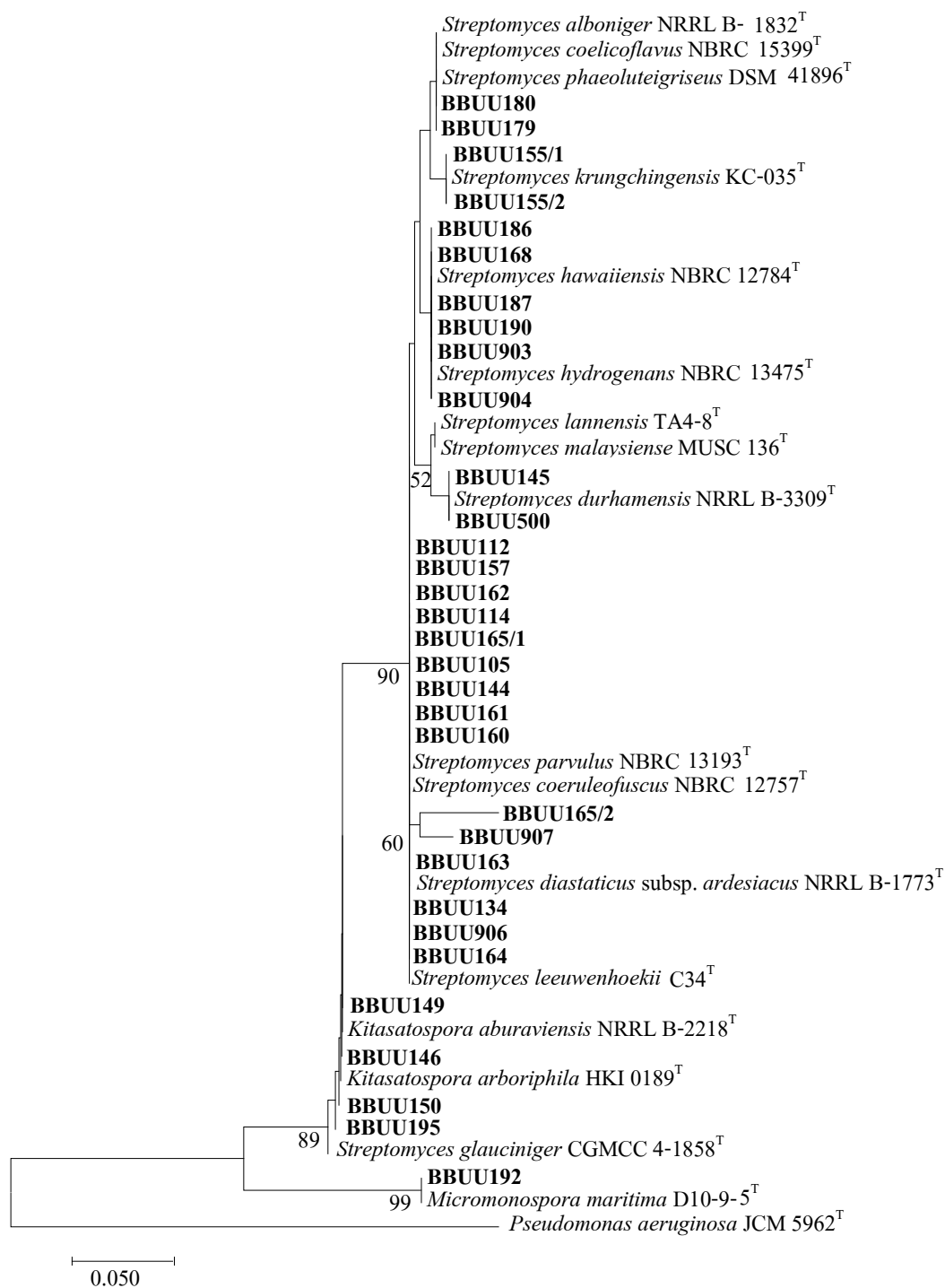
ไอซีเสด	แบคทีเรีย	ลำดับฐานข้อมูล	ค่าความเหมือน (%)	ค่าความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์
BBUU105 (488 bp)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	98.76	6/485
BBUU112 (582 bp)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	99.48	3/582
BBUU114 (1,039 bp)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	99.71	3/1,039
BBUU118	-	-	-	-
BBUU134 (737 bp)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	99.59	3/737
BBUU144 (944 bp)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	99.68	3/944
BBUU145 (609 bp)	<i>Streptomyces durhamensis</i> NRRL B-3309 ^T	AB184650	100.00	0/609
BBUU146 (437 bp)	<i>Kitasatospora arboriphila</i> HKI 0189 ^T	AY442267	99.77	1/437
BBUU149 (919 bp)	<i>Kitasatospora aburaviensis</i> NRRL B-2218 ^T	AY999779	100.00	0/919
BBUU150 (768 bp)	<i>Kitasatospora aburaviensis</i> NRRL B-2218 ^T	AY999779	100.00	0/768
BBUU151	-	-	-	-
BBUU155/1 (470 bp)	<i>Streptomyces krungchingensis</i> KC-035 ^T	LC008304	100.00	0/470
BBUU155/2 (864 bp)	<i>Streptomyces krungchingensis</i> KC-035 ^T	LC008304	100.00	0/864

ตารางที่ 16 (ต่อ)

ไอโซเลต	แบคทีเรีย	ลำดับฐานข้อมูล	ค่าความเหมือน (%)	ค่าความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์
BBUU157 (780 bp)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	99.74	2/780
BBUU160 (789 bp)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	99.62	3/789
BBUU161 (1,092 bp)	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i> NRRL B-1773 ^T	NBRC15399	99.63	4/1,092
BBUU162 (730 bp)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	99.59	3/730
BBUU163 (506 bp)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	99.41	3/506
BBUU164 (605 bp)	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 ^T	LN831790	100.00	0/605
BBUU165/1 (884 bp)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	99.66	3/884
BBUU165/2 (237 bp)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	97.47	6/237
BBUU166	-	-	-	-
BBUU168 (912 bp)	<i>Streptomyces hawaiiensis</i> NBRC 12784 ^T	AB184143	99.89	1/912
BBUU179 (926 bp)	<i>Streptomyces phaeoluteigriseus</i> DSM 41896 ^T	MPOH01000466	99.57	4/926
BBUU180 (856 bp)	<i>Streptomyces alboniger</i> NRRL B-1832 ^T	LIQN01000245	99.88	1/856
BBUU186 (1,037 bp)	<i>Streptomyces hawaiiensis</i> NBRC 12784 ^T	AB184143	99.71	3/1,037

ตารางที่ 16 (ต่อ)

ไอโซเลต	แบคทีเรีย	ลำดับฐานข้อมูล	ค่าความเหมือน (%)	ค่าความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์
BBUU187 (948 bp)	<i>Streptomyces hawaiiensis</i> NBRC 12784 ^T	AB184143	100.00	0/948
BBUU190 (1,123 bp)	<i>Streptomyces hawaiiensis</i> NBRC 12784 ^T	AB184143	100.00	0/1,123
BBUU192 (1,179 bp)	<i>Micromonospora maritima</i> D10-9-5 ^T	HQ704071	99.66	4/1,179
BBUU195 (990 bp)	<i>Streptomyces glauciniger</i> CGMCC 4.1858 ^T	jgi.1076272	99.90	1/990
BBUU500 (1,440 bp)	<i>Streptomyces lammensis</i> TA4-8 ^T	AB562508	97.99	28/1390
BBUU903 (1,005 bp)	<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475 ^T	AB184868	100.00	0/1005
BBUU904 (808 bp)	<i>Streptomyces malaysiense</i> MUSC 136 ^T	LBDA02000093	99.75	2/808
BBUU906 (925 bp)	<i>Streptomyces parvulus</i> NBRC 13193 ^T	AB184326	99.78	2/925
BBUU907 (706 bp)	<i>Streptomyces olivaceus</i> NRRL B-3009 ^T	AB184326	99.43	4/706



ภาพที่ 23 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ Neighbor-Joining method ของแอกติโนมัยซีท 35 ไอโซเลต กับแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ใกล้เคียง และใช้ *Pseudomonas aeruginosa* JCM 5962^T เป็น Outgroup ใช้ค่า Bootstrap (%) 1,000 ครั้ง ระยะห่างของการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.005

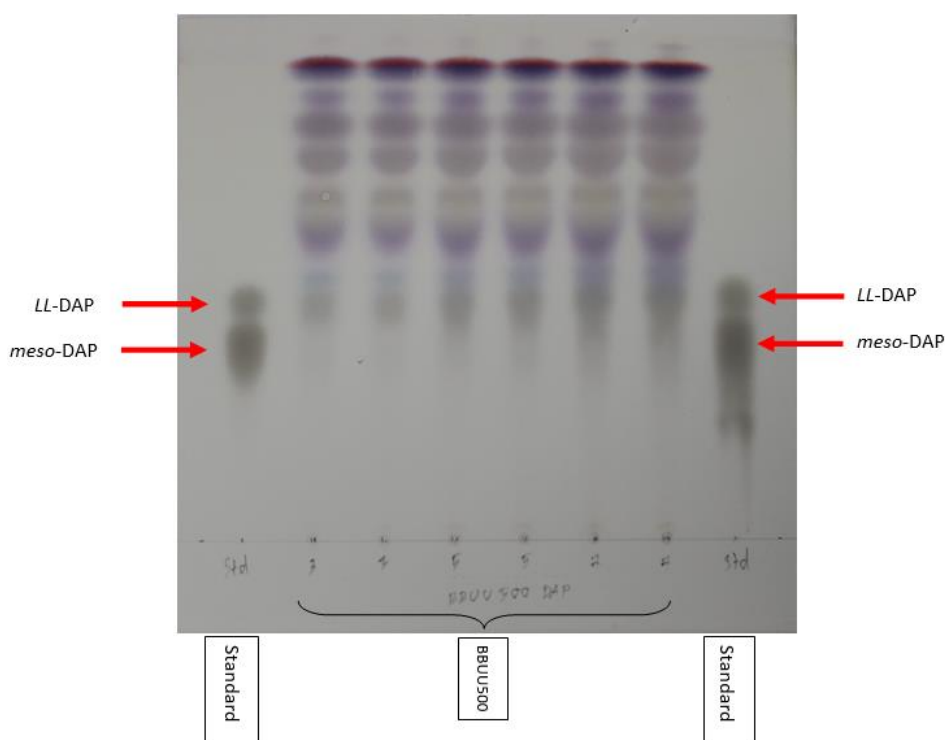
ตารางที่ 17 ค่าความเหมือนของ BBUU500 (1,440 bp) กับสมาชิกแอสเคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ในการวิเคราะห์ (<https://www.ezbiocloud.net>)

แบคทีเรีย	สายพันธุ์	ลำดับฐานข้อมูล	ค่าความเหมือน (%)	ค่าความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์	ความสมบูรณ์ (%)
CP006259_s	Tu 365	CP006259	98.20	25/1392	100.0
CM002285_s	DS 12.976	CM002285	98.13	26/1392	100.0
<i>Streptomyces lammensis</i>	TA4-8(T)	AB562508	97.99	28/1390	100.0
<i>Streptomyces lanatus</i>	NBRC 12787(T)	AB184845	97.92	29/1392	99.9
<i>Streptomyces filipinensis</i>	NBRC 12860(T)	AB184198	97.84	30/1392	99.8
<i>Streptomyces curacoi</i>	DSM 40107(T)	KQ948008	97.77	31/1392	100.0
<i>Streptomyces durhamensis</i>	NRRL B-3309(T)	JNXR01000068	97.77	31/1392	100.0
<i>Streptomyces panaciradicis</i>	1MR-8(T)	KF971876	97.77	31/1392	100.0
<i>Streptomyces yaanensis</i>	Z4(T)	JQ307192	97.70	32/1392	98.7
<i>Streptomyces actinomycinicus</i>	RCU-197(T)	LC069046	97.70	31/1348	96.3
<i>Streptomyces gilvifuscus</i>	T113(T)	KM229362	97.69	32/1383	99.4

7.3 ลักษณะทางเคมี

7.3.2 องค์ประกอบของผนังเซลล์ (Cell wall composition)

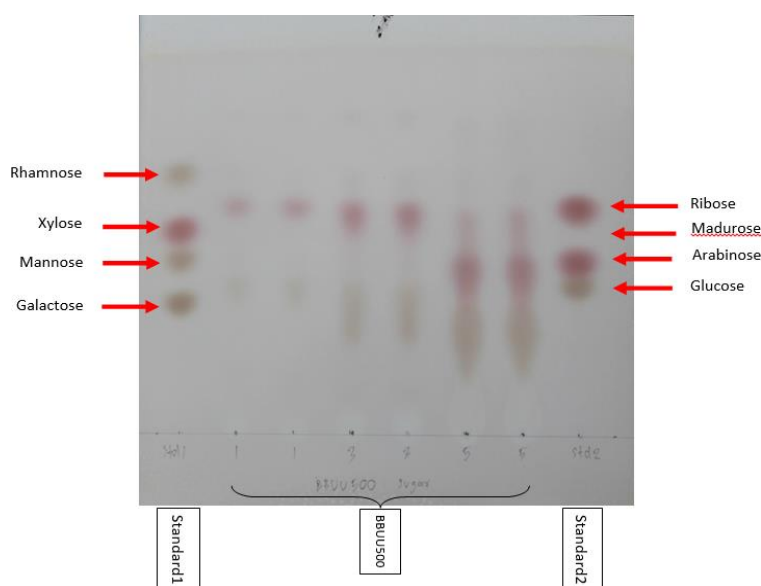
ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีเพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) หลากหลายประเภท และเรียงตัวเป็นแบบหลายชั้น (multilayered) ซึ่งอาจมีความจำเพาะต่อสกุลหรือสปีชีส์นั้น ๆ (Vandamme et al., 1996; Kämpfer, 2012) ในสกุล *Streptomyces* จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 4 ชนิด คือ Alanine, Glutamic acid, Glycine และ Diaminopimelic acid (DAP; A₂pm) (Kampfer, 2012) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ในส่วนของ Diaminopimelic acid (DAP; A₂pm) ของไอโซเลต BBUU500 พบว่า Diaminopimelic acid เป็นแบบ LL-DAP (ภาพที่ 24) และ *S. lannensis* TA4-8^T ก็มี Diaminopimelic acid เป็นแบบ LL-DAP เช่นกัน (Promnuan et al., 2013) Lechevalier and Lechevalier, 1970 รายงานว่า Diaminopimelic acid ของแอกติโนมัยซีตสกุล *Streptomyces* จะพบแบบ LL-DAP เท่านั้น



ภาพที่ 24 Diaminopimelic acid ของไอโซเลต BBUU500

7.3.3 น้ำตาลในผนังเซลล์ (Whole cell sugar)

น้ำตาลในผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีท จะประกอบด้วย Arabinose, Galactose, Xylose และ Madurose (Lechevalier & Lechevalier, 1970) จากการวิเคราะห์น้ำตาลในผนังเซลล์ของไอโซเลต BBU500 พบว่า น้ำตาลที่พบ คือ Ribose, Arabinose, Glucose, Xylose, Mannose และ Galactose (ภาพที่ 25) ซึ่งในสกุล *Streptomyces* มีการรายงานพบน้ำตาล Arabinose, Galactose และ Xylose และยังพบน้ำตาล Glucose, Mannose และ Ribose ในปริมาณเล็กน้อย (Kämpfer, 2012)



ภาพที่ 25 น้ำตาลในผนังเซลล์ของไอโซเลต BBU500

7.3.4 กรดไขมัน (Fatty acids)

ในเซลล์แบคทีเรียมีลิพิด (Lipids) อยู่หลากหลายชนิด ซึ่งองค์ประกอบหลักของลิพิด คือ ไขมันมีขั้ว (Polar lipids) โดยจะเรียงตัว 2 ชั้น (Lipid bilayer) ในเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย และมีการนำมาศึกษาเพื่อใช้ในการจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรีย (Vandamme et al., 1996) จากการวิเคราะห์กรดไขมันของไอโซเลต BBU500 พบว่า กรดไขมันที่ตรวจพบจำนวนมาก ได้แก่ iso-C_{15:0} (10.07%), anteiso-C_{15:0} (18.03%), iso-C_{16:0} (22.14%) และ anteiso-C_{17:0} (15.25%) (ตารางที่ 18) ส่วน *S. lannensis* TA4-8^T fatty acids ที่พบจำนวนมาก ได้แก่ iso-C_{14:0} (10.2%), anteiso-C_{15:0} (14.0%), C_{16:0} (18.3%) และ iso-C_{16:0} (28.3%) (Promnuan et al., 2013)

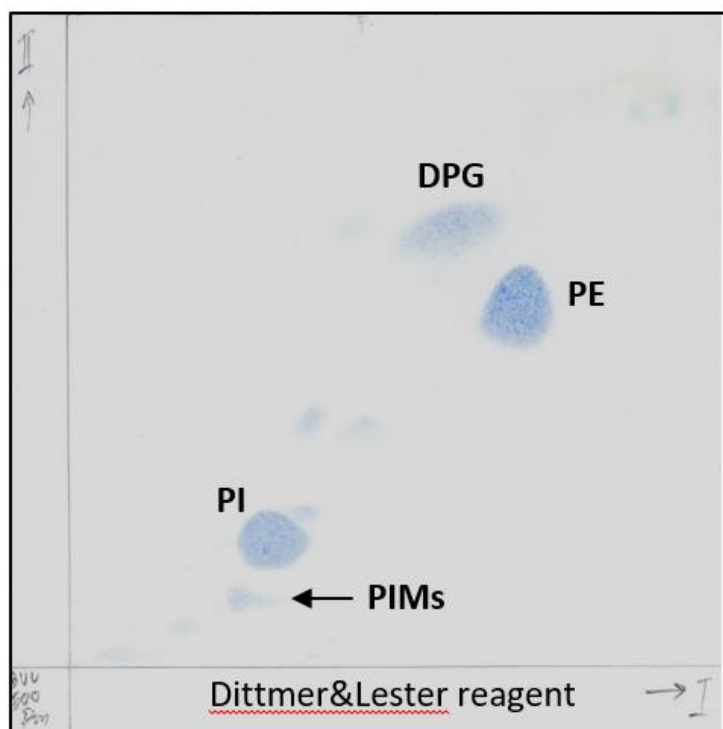
ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันของไอโซเลต BBUU500 เปรียบเทียบกับสารพันธุ์ใกล้เคียง *S. lannensis* TA4-8^T

กรดไขมัน (%)	BBUU500	<i>S. lannensis</i> TA4-8 ^T
Straight-chain saturated		
C _{14:0}	<1	3.2
C _{15:0}	-	4.2
C _{16:0}	2.97	18.3
C _{18:0}	-	-
Branched saturated		
iso-C _{13:0}	<1	-
anteiso-C _{13:0}	<1	-
iso-C _{14:0}	2.00	10.2
iso-C _{15:0}	10.07	8.4
anteiso-C _{15:0}	18.03	14.0
iso-C _{16:0}	22.14	28.2
iso-C _{16:1} H	2.79	-
iso-C _{17:0}	6.20	-
anteiso-C _{17:0}	15.25	3.0
Cyclo- C _{17:0}	1.10	-
Unsaturated		
anteiso-C _{17:1} Ω ₉ c	3.40	-
Summed feature*		
3	2.95	-
9	6.77	-

“หมายเหตุ” *Summed features คือ กลุ่มของกรดไขมันสองชนิดที่ไม่สามารถแยกออกได้ โดยวิธี GLC และ MIDI ซึ่ง Summed features 3 และ 9 ประกอบด้วย C_{16:1}Ω₇c/C_{16:1}Ω₆c และ iso-C_{17:1}Ω₉c/C_{16:0} 10-methyl ตามลำดับ

7.3.5 Phospholipid

ลิพิดของ *Streptomyces* จะประกอบด้วย Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylinositol และ Phosphatidylinositol mannosides (Kampfer, 2012) จากการวิเคราะห์ Phospholipid ของไอโซเลต BBUU500 พบว่า Phospholipid ที่พบ คือ Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylinositol (PI) และ Phosphatidylinositol mannosides (PIMs) (ภาพที่ 26) ส่วน *S. lannensis* TA4-8^T Phospholipid ที่พบ คือ Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylethanolamine (PE) และ Phosphatidylinositol mannosides (Promnuan et al., 2013)



ภาพที่ 26 Phospholipid ของไอโซเลต BBUU500

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการนำแอคติโนมัยซีทที่เก็บรักษาไว้ในหน่วยวิจัยแอคติโนมัยซีทที่เรีย ภาควิชา
ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนและผักนึ่งทะเล มาทำให้
บริสุทธิ์ พบว่า ได้แอคติโนมัยซีทที่มีความบริสุทธิ์ 35 ไอโซเลต และตรวจสอบการผลิตไซเคโอโร
ฟออร์ พบว่า สามารถผลิตไซเคโอโรฟออร์ได้ทั้ง 35 ไอโซเลต จากนั้นเลือกไอโซเลตที่ผลิตไซเคโอโร
ฟออร์ได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลต BBUU157 และ ไอโซเลต BBUU500 มาศึกษาภายใต้สภาวะความเค็ม
ผลพบว่า ไอโซเลต BBUU157 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ 7% เกลือโซเดียมคลอไรด์ และที่ระดับ
ความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1,000 มิลลิโมลาร์ มีค่าน้ำหนักแห้ง 65.70 mg/ml
ผลิตไซเคโอโรฟออร์ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 มิลลิโมลาร์ วัดขนาดโซนีสัม
ได้ 4.70 เซนติเมตร ไอโซเลต BBUU500 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ 6% เกลือโซเดียมคลอไรด์ และ
ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1,000 มิลลิโมลาร์ มีค่าน้ำหนักแห้ง 41.30
mg/ml ผลิตไซเคโอโรฟออร์ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 400 มิลลิโมลาร์ วัดขนาด
โซนีสัมได้ 4.40 เซนติเมตร ในขณะที่ *P. putida* ATCC 17484 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ 6% เกลือ
โซเดียมคลอไรด์ และที่ระดับความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1,000 มิลลิโมลาร์ มีค่า
น้ำหนักแห้ง 50.80 mg/ml ผลิตไซเคโอโรฟออร์ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 มิลลิ
โมลาร์ วัดขนาดโซนีสัมได้ 2.20 เซนติเมตร และผลจากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย
พบว่า แอคติโนมัยซีททั้ง 35 ไอโซเลต มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* จำนวน 23 ไอโซเลต มี
ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 4 ไอโซเลต มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* จำนวน 2
ไอโซเลต และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จำนวน 15 ไอโซเลต และจากผลการวิเคราะห์
ลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่า มีค่าความเหมือนแอคติโนมัยซีท สกุล *Streptomyces* (97-
100%) จำนวน 28 ไอโซเลต สกุล *Kitasatospora* (99-100%) จำนวน 3 ไอโซเลต สกุล
Micromonospora (99%) จำนวน 1 ไอโซเลต และอีก 3 ไอโซเลต เกิดการปนเปื้อนไม่สามารถ
วิเคราะห์ผลได้ ผลจากการตรวจสอบการเป็นสปอร์ใหม่ของไอโซเลต BBUU500 พบว่า ลักษณะ
ทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาของไอโซเลต BBUU500 เมื่อเทียบกับ *S. lannensis*
TA4-8^T พบว่า ไอโซเลต BBUU500 มีสปอร์บนอาหารสูตร ISP3 สีขาว พื้นผิวสปอร์เรียบ และ
สปอร์มีลักษณะเรียงตัวแบบเป็นเส้นยาว (*Rectiflexibiles*) และสามารถเจริญได้สูงสุดที่ 6% เกลือ



3636644678

โซเดียมคลอไรด์ ส่วน *S. lannensis* TA4-8^T มีสี่สปอร์บนอาหารสูตร ISP3 สีเทา พื้นผิวสปอร์เรียบ และสปอร์มีลักษณะหมุนเป็นเกลียว (*Spirales*) และสามารถเจริญได้สูงสุดที่ 3% เกลือ โซเดียมคลอไรด์ และผลจากการวิเคราะห์ลักษณะทางเคมี พบว่า ไอโซเลต BBUU500 และ *S. lannensis* TA4-8^T มี Diamonopimelic acid เป็นแบบ *LL-DAP* ส่วน Polar lipids จะแตกต่างกันที่ ไอโซเลต BBUU500 จะมี phosphatidylinositol แต่ *S. lannensis* TA4-8^T จะไม่มี phosphatidylinositol และผลการวิเคราะห์ fatty acids พบว่า ไอโซเลต BBUU500 มี fatty acids ที่พบจำนวนมาก ได้แก่ iso-C_{15:0} (10.07%), anteiso-C_{15:0} (18.03%), iso-C_{16:0} (22.14%) และ anteiso-C_{17:0} (15.25%) ส่วน *S. lannensis* TA4-8^T fatty acids ที่พบจำนวนมาก ได้แก่ iso-C_{14:0} (10.2%), anteiso-C_{15:0} (14.0%), C_{16:0} (18.3%) และ iso-C_{16:0} (28.3%) ผลที่ได้นี้ แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต BBUU500 มีความเป็นไปได้ว่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่ แต่ก็ต้องมีการตรวจสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันในลำดับต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ควรรักษาแอคติโนมัยซีทไอโซเลตที่เหลือไปตรวจสอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เพื่อเพิ่มศักยภาพการนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะดินเค็มในสภาพแปลงทดลองจริง ซึ่งนอกจากตรวจสอบภาวะความเค็มแล้ว ควรมีการตรวจสอบภาวะความเครียดต่าง ๆ เช่น ดินเปรี้ยว ดินแห้งแล้ง เป็นต้น เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีศักยภาพเพิ่มขึ้น

ภาคผนวก



369644678

BUU iThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

ภาคผนวก ก

สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย



369644678

BUU_iThesis 59910008 thesis / rcv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแอกติโนไมซีตา

1. Mannitol soybean Agar (MS)

Mannitol	20	กรัม
Soybean	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ: ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที

2. 1% Yeast extract D-glucose (YD)

Yeast extract	10	กรัม
D-glucose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ: ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ต้มจนละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที

3. Yeast extract D-glucose (YD)+2% Agar

Yeast extract	10	กรัม
D-glucose	10	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ: ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ต้มจนละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที

4. Nutrient Agar (NA)

Beef extract	1.5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Yeast extract	1.5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ: ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.8 ต้มจนละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5. Nutrient Broth (NB)

Peptic digest of animal tissue	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
extract	1.5	กรัม
Yeast extract	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

6. Yeast extract-malt extract agar (ISP2)

Dextrose	10	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptic digest of animal tissue	5	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	490	มิลลิลิตร

7. Oatmeal agar (ISP3)

Oat meal	20	กรัม
Trace salt solution (ml)	1	กรัม

Ferric sulphate heptahydrate	0.001	กรัม
Manganese chloride tetrahydrate	0.001	กรัม
Zinc sulphate heptahydrate	0.001	กรัม
Agar	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

8. *Inorganic salts-starch agar (ISP4)*

Soluble starch	10	กรัม
Calcium carbonate	2	กรัม
Ammonium sulphate	2	กรัม
Di-potassium phosphate	1	กรัม
Magnesium sulphate	1	กรัม
Ferrous sulphate	1	กรัม
Manganous chloride	0.001	กรัม
Zinc sulphate	0.001	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

9. *Glycerol-asparagine agar (ISP5)*

L-Asparagine	1	กรัม
Di-potassium phosphate	1	กรัม
Ferric sulphate heptahydrate	0.001	กรัม
Manganese chloride tetrahydrate	0.001	กรัม
Zinc sulphate heptahydrate	0.001	กรัม
Trace salt Soln (ml)	1	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

10. Chrom azurol S (CAS)

10.1 Preparation of CAS Indicator Solution

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

หมายเหตุ: ชั่งสาร Chrom azurol S 0.06 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีเหลือง เติม Fe III solution 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีม่วง เติม HDTMA ที่ละลายในน้ำ 40 มิลลิลิตร ในขณะที่เติม HDTMA ให้เติมอย่างช้าๆ ด้วย Volumetric Pipettes จะได้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม หลังจากนั้นนำ CAS Indicator Solution ที่ได้ใส่ในขวดคูเรนขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

10.2 Preparation of Basal Agar Medium

MOPS	3	กรัม
NaCl	0.05	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.03	กรัม
NH ₄ Cl	0.01	กรัม
L-asparagine	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	83	มิลลิลิตร
NaOH	5	มิลลิลิตร
Agar	1.5	กรัม

หมายเหตุ: ชั่งสาร MOPS 3 กรัม NaCl 0.05 กรัม KH₂PO₄ 0.03 กรัม NH₄Cl 0.01 กรัม และ L-asparagine 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 83 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย NaOH จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 88 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เติม Agar 1.5 กรัม ละลายด้วยความร้อน หลังจากนั้นนำไปใส่ในขวดคูเรนขนาด 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

10.3 Preparation of CAS Agar Plates

CAS Indicator Solution	10	มิลลิลิตร
Basal Agar Medium	88	มิลลิลิตร
Glucose	2	มิลลิลิตร

หมายเหตุ: นำ CAS Indicator Solution, Basal Agar Medium และ 50% Glucose ไปปรับอุณหภูมิใน water bath ที่ 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติม 50% Glucose 2 มิลลิลิตร ใน Basal Agar Medium และเติม CAS Indicator Solution 10 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ ด้วย Volumetric Pipettes โดยตะกั่วที่ข้างขวดพร้อมเขย่าอย่างช้า ๆ และไม่ให้เกิดฟอง จากนั้นเทลงบนเพลตปริมาณ 25 มิลลิลิตร จะได้อาหารที่เป็นสีฟ้า

ภาคผนวก ข
สารเคมีและการเตรียมสารเคมี



369644678

BUU_iThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

สารเคมี

1. การทำอาหาร CAS plate assay

1. Chrome azurol S
2. Fe III solution
 - 2.1 Ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
 - 2.2 Hydrogen chloride (HCl)
 - 2.3 double-distilled water (ddH_2O)
3. Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HDTMA)
4. 3-(N-morpholino) propane sulfonic acid (MOPS)
5. Sodium chloride (NaCl)
6. Potassium Dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)
7. Ammonium chloride (NH_4Cl)
8. L-asparagine
9. Sodium hydroxide (NaOH)
10. Agar
11. 50% glucose solution

2. การเก็บรักษาตัวอย่างแบคทีเรียแอกติโนมัยสิทธิ์

1. 20% Glycerol

การเตรียมสารเคมี

1. Stock Fe III Solution

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0027	กรัม
HCl	83.3	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ชั่ง $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 27 กรัม และ HCl 83.3 ไมโครลิตร ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

คนสารละลายให้เข้ากัน

2. Stock HDTMA Solution

Hexadecyltrimethyl ammonium bromide	0.0729	กรัม
น้ำกลั่น	40	มิลลิลิตร

ชั่ง Hexadecyltrimethyl ammonium bromide 0.0729 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจากนั้นนำไป Clave

3. Stock NaOH Solution

NaOH	12	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

ชั่ง NaOH 12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจากนั้นนำไป Clave

4. Stock Glucose Solution

Glucose	50	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ชั่ง Glucose 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยฟิวเตอร์

5. Stock ความเข้มข้นเกลือ 1,000 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น	1000	มิลลิโมลาร์
ปริมาตรที่ต้องการเตรียม	100	มิลลิลิตร
น้ำหนักโมลกุล (MW)	58.44	

$$\text{สูตรเคมีในการคำนวณ} \quad \frac{1000 \text{ mM} \times 58.44 \text{ g} \times 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 5.85 \text{ กรัม}$$

6. เตรียมความเข้มข้น NaCl 800 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น	800	มิลลิโมลาร์
ปริมาตรที่ต้องการเตรียม	100	มิลลิลิตร
น้ำหนักโมลกุล (MW)	58.44	
สูตรเคมีในการคำนวณ	$\frac{800 \text{ m M} \times 58.44 \text{ g} \times 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 4.68 \text{ กรัม}$	

7. Stock ความเข้มข้นเกลือ 600 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น	600	มิลลิโมลาร์
ปริมาตรที่ต้องการเตรียม	100	มิลลิลิตร
น้ำหนักโมลกุล (MW)	58.44	
สูตรเคมีในการคำนวณ	$\frac{600 \text{ mM} \times 58.44 \text{ g} \times 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 3.51 \text{ กรัม}$	

8. Stock ความเข้มข้นเกลือ 400 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น	400	มิลลิโมลาร์
ปริมาตรที่ต้องการเตรียม	100	มิลลิลิตร
น้ำหนักโมลกุล (MW)	58.44	
สูตรเคมีในการคำนวณ	$\frac{400 \text{ mM} \times 58.44 \text{ g} \times 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 2.34 \text{ กรัม}$	

9. Stock ความเข้มข้นเกลือ 200 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น	200	มิลลิโมลาร์
ปริมาตรที่ต้องการเตรียม	100	มิลลิลิตร
น้ำหนักโมลกุล (MW)	58.44	
สูตรเคมีในการคำนวณ	$\frac{200 \text{ mM} \times 58.44 \text{ g} \times 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 1.17 \text{ กรัม}$	

ภาคผนวก ค

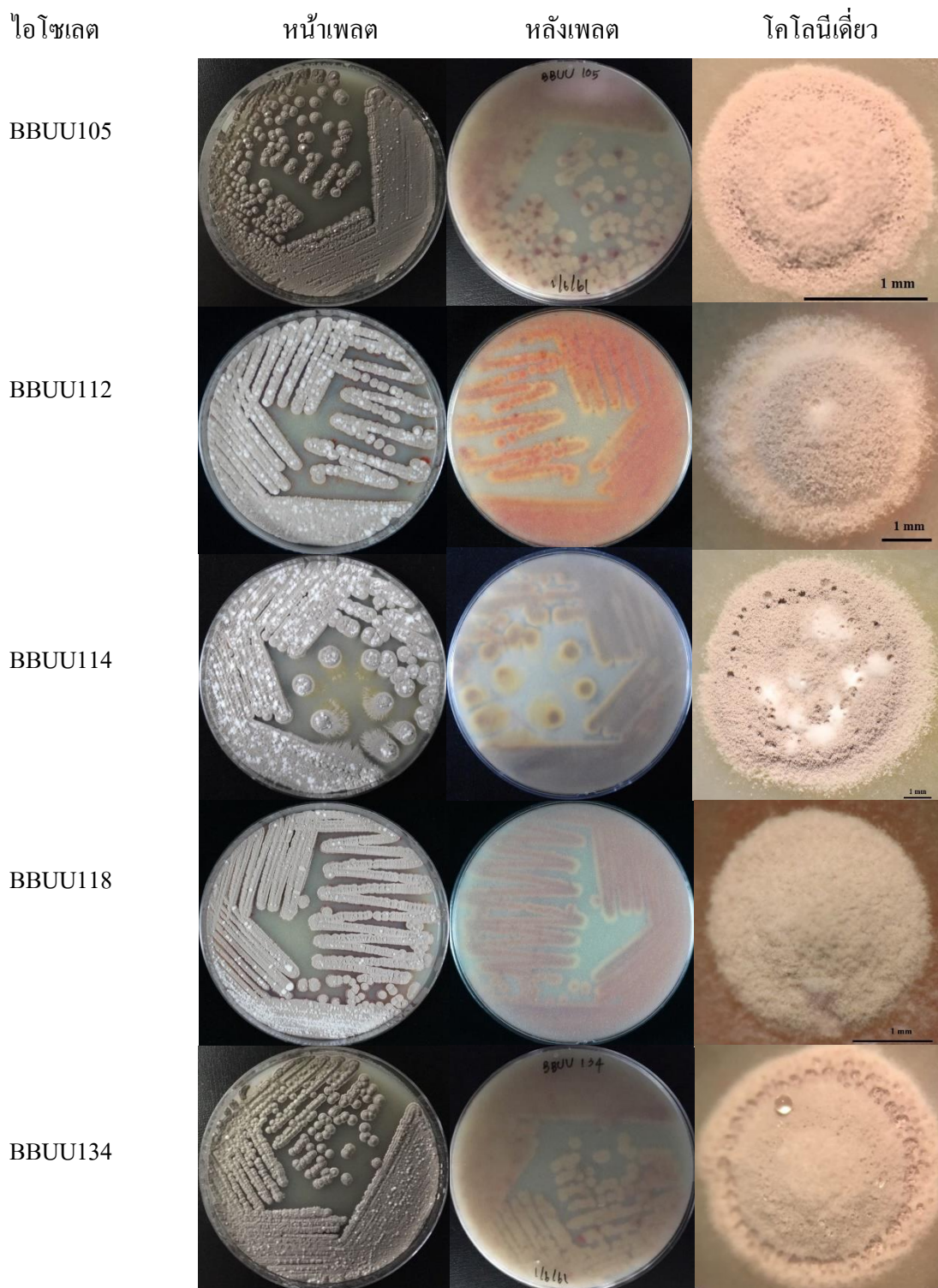
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร MS ของแอกติโนมัยซีท

และ *P. putida* ATCC 17484

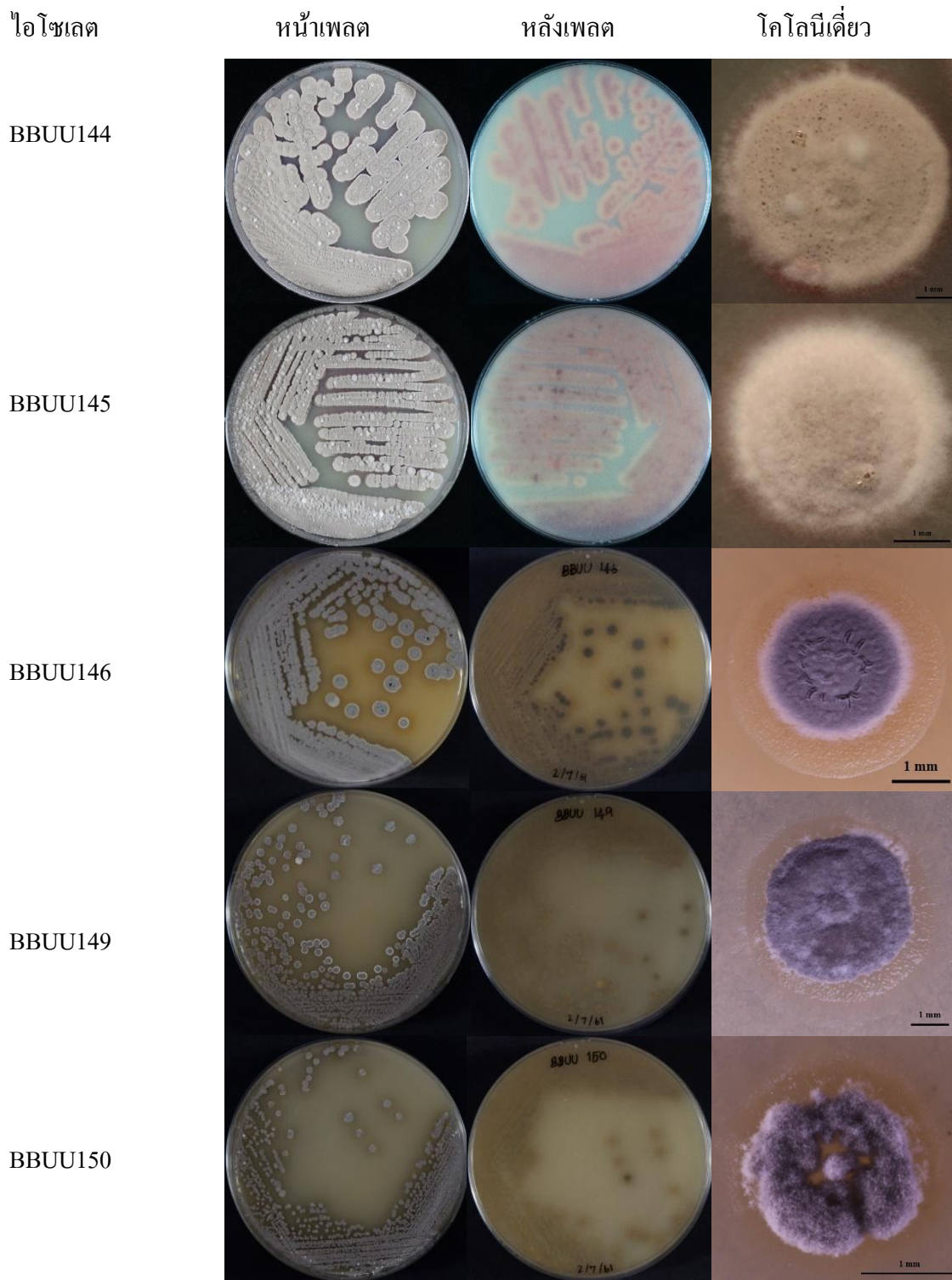


369644678

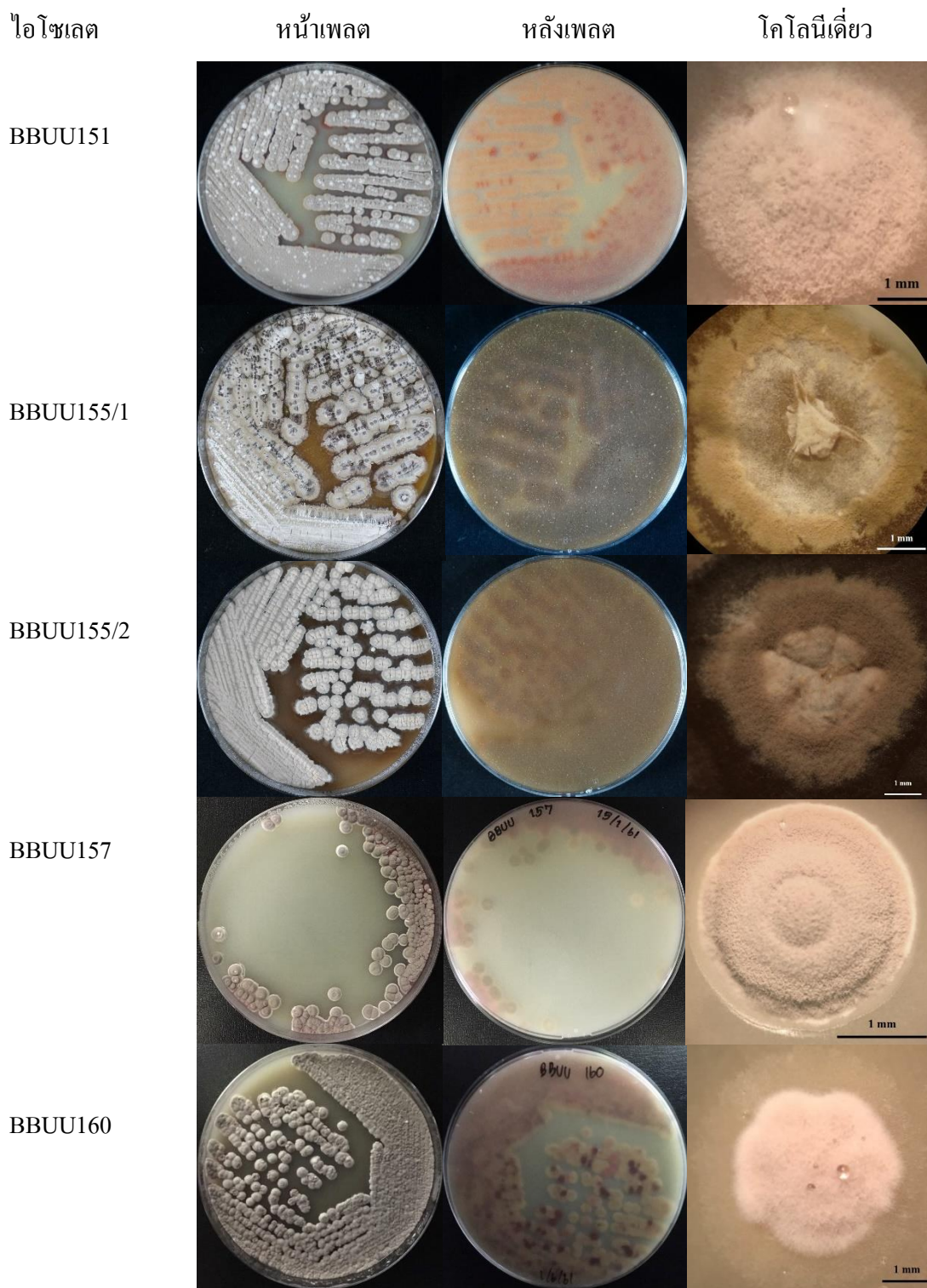
BUU iThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28



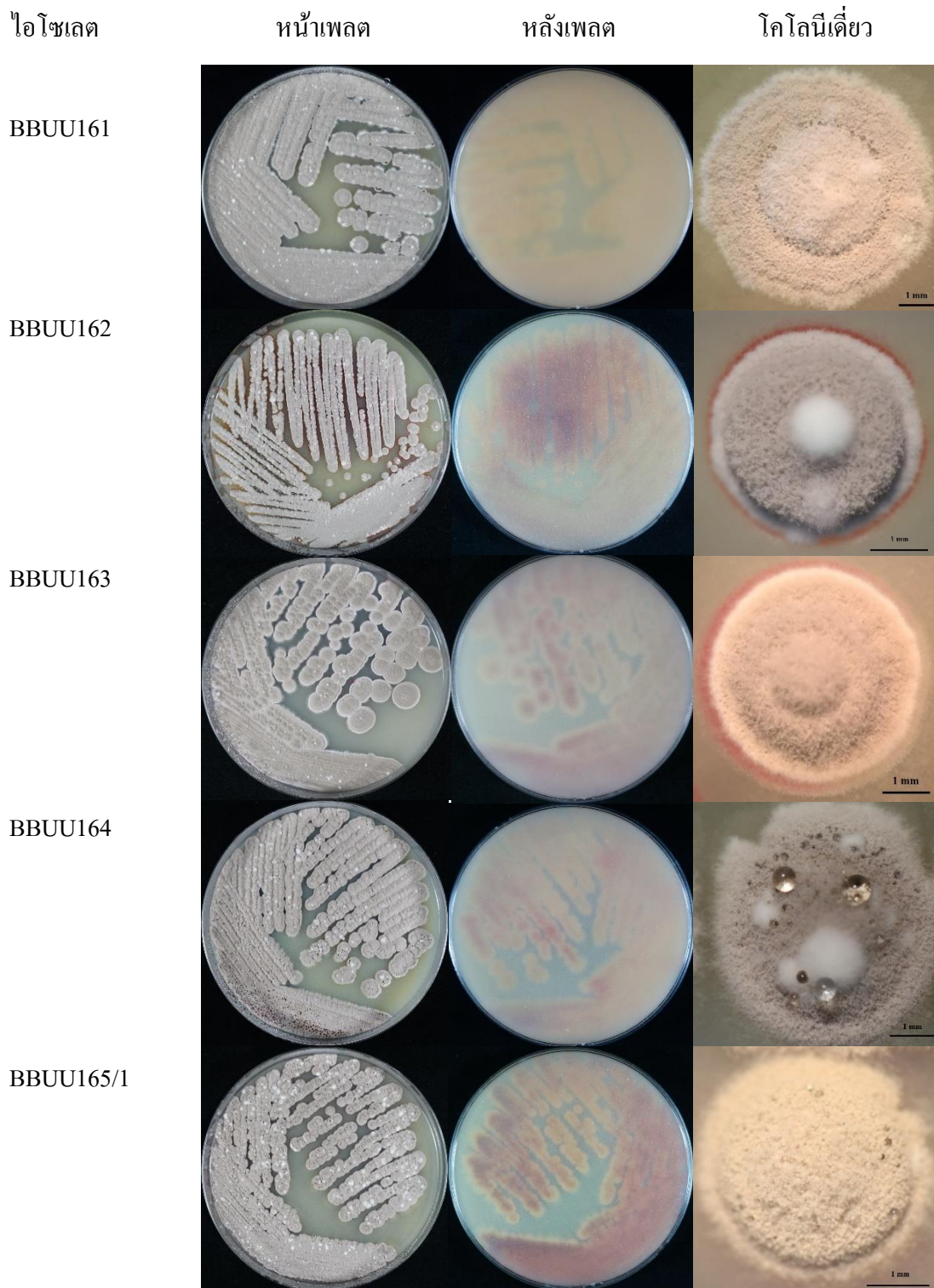
ภาพภาคผนวก 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร MS



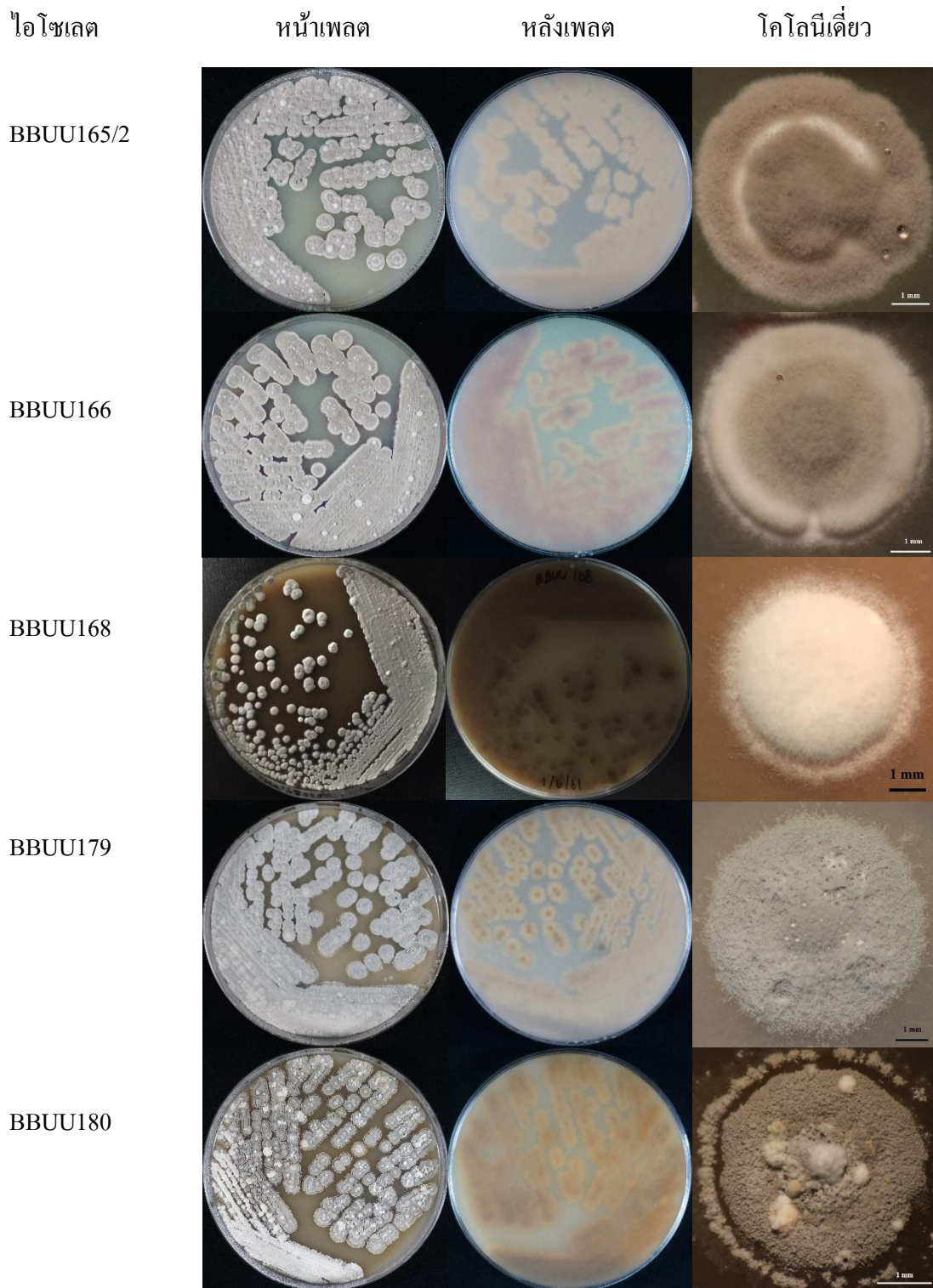
ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)



ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)



ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)



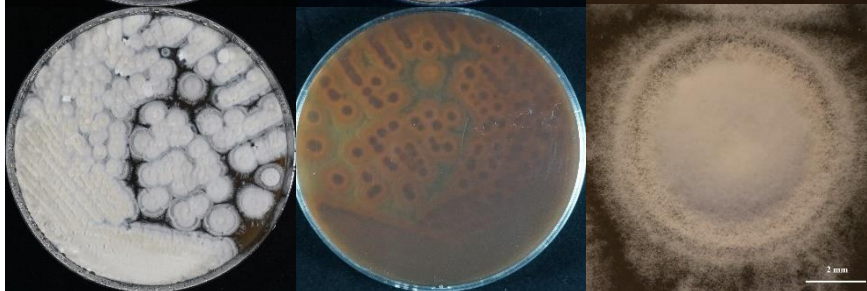
ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)

ไอโซเลต หน้าเพลต หลังเพลต โคลนเดี่ยว

BBUU186



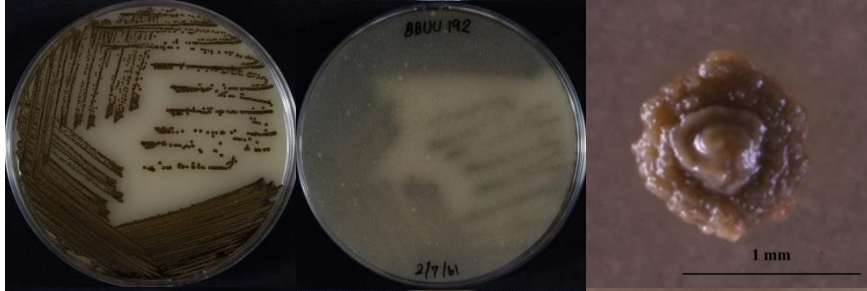
BBUU187



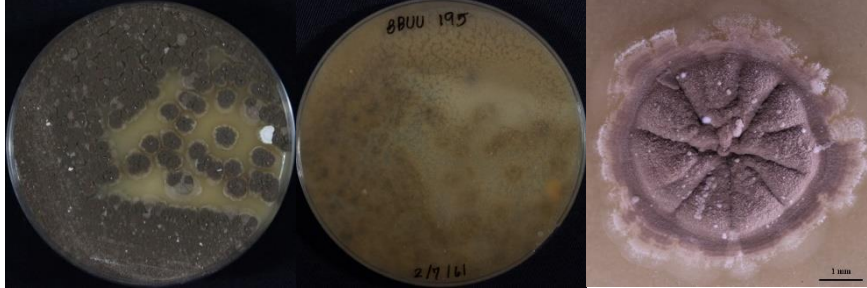
BBUU190



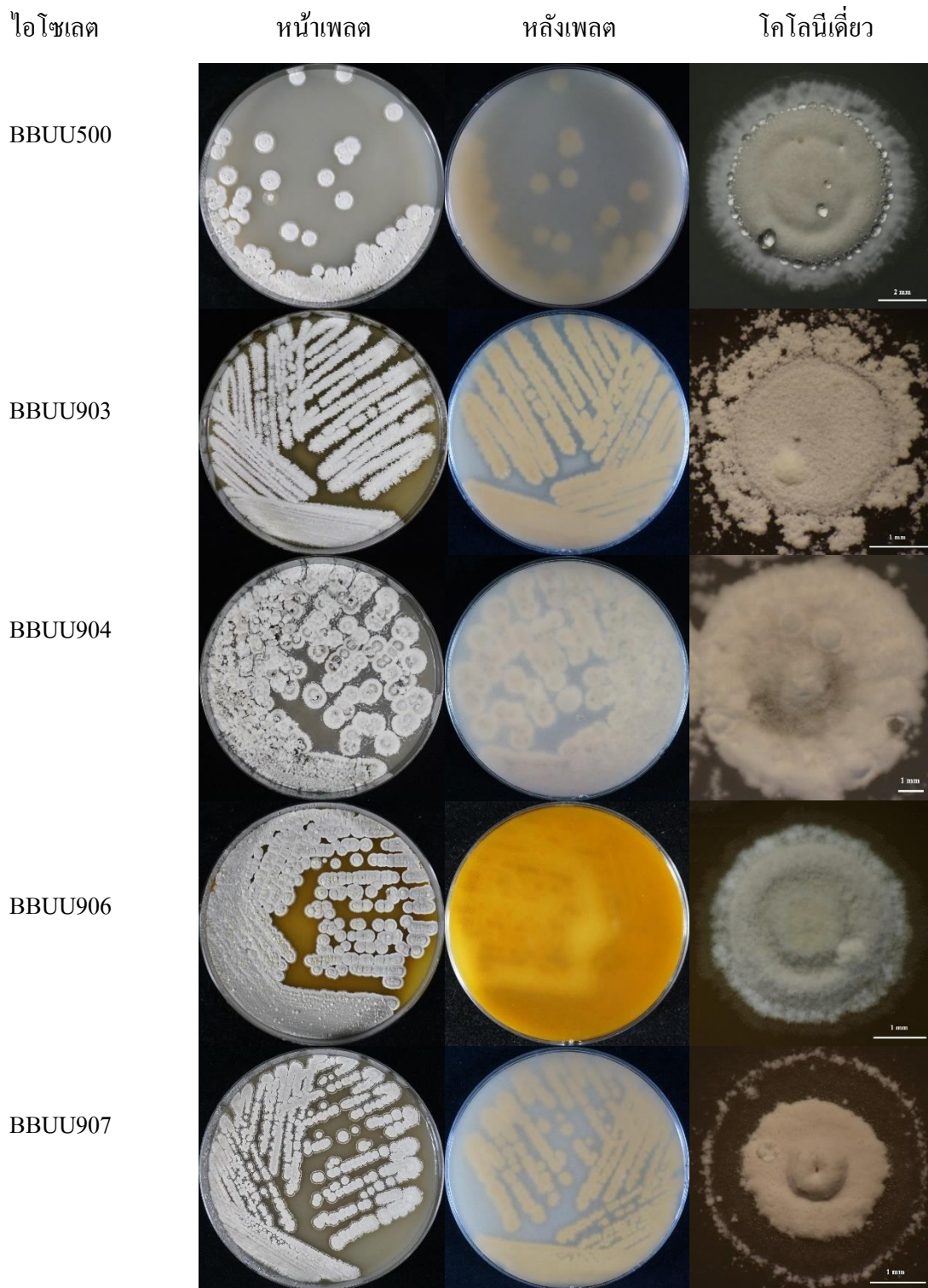
BBUU192



BBUU195



ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)



ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)



ภาพภาคผนวก 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร NA ของ *P. putida* ATCC 17484



369644678

BUU iThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

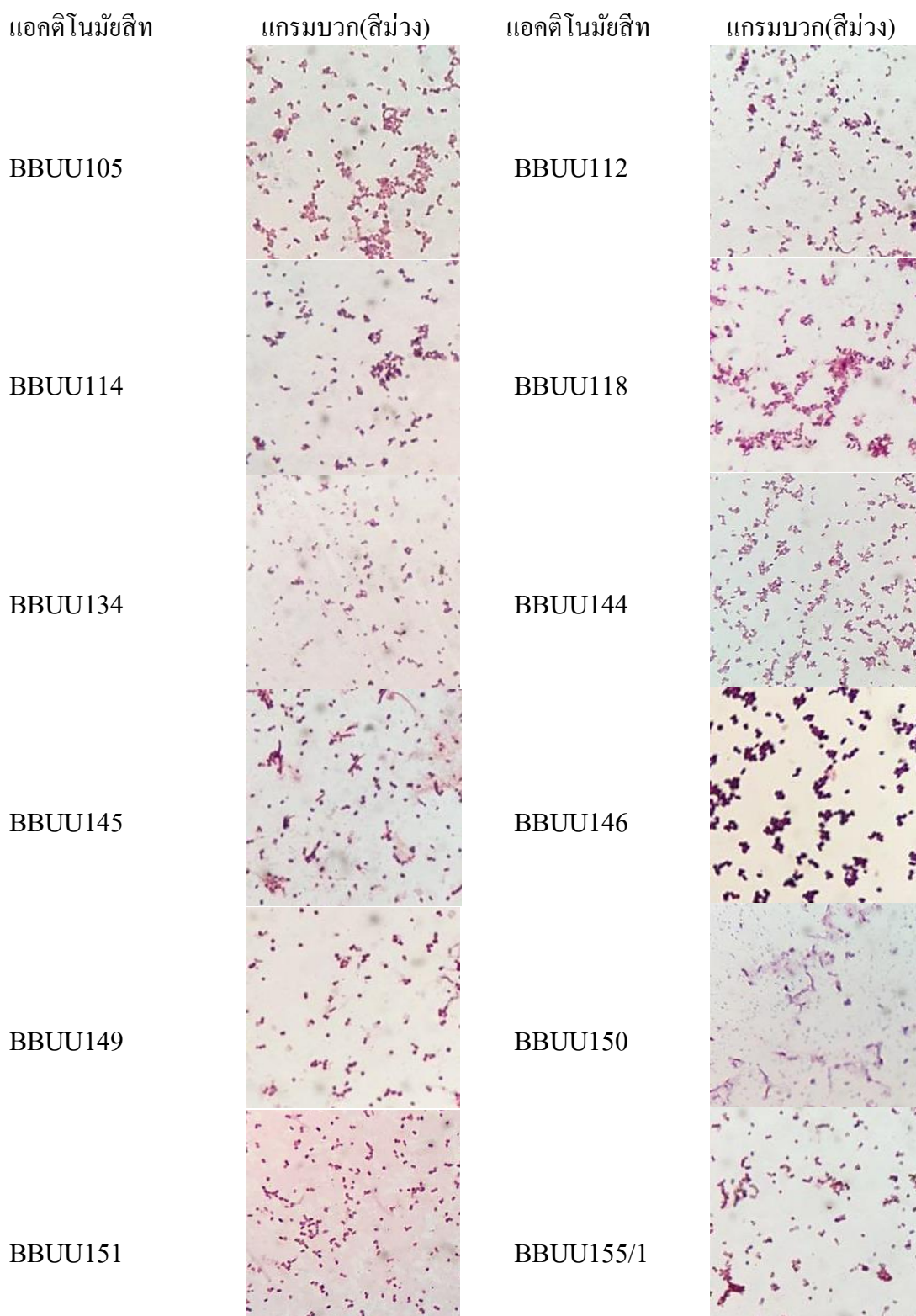
ภาคผนวก ง

การข้อมสิทธิ์กรรมของแอกติโนมัยสิทธิ์



369644678

BUU iThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

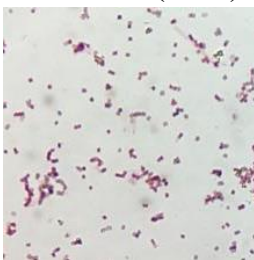


ภาพภาคผนวก 3 การย้อมสีแกรมของแอกติโนมัยสีท

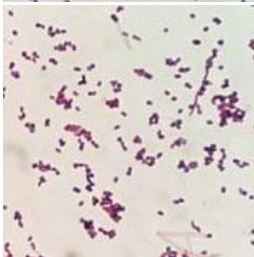
แอกติโนมัยสีท

แกรมบวก(สีม่วง)

BBUU155/2



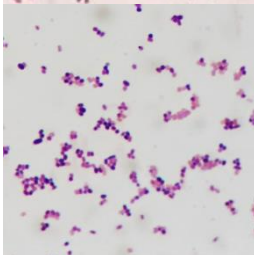
BBUU160



BBUU162



BBUU164



BBUU165/2



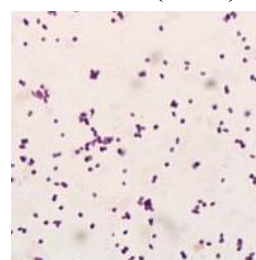
BBUU168



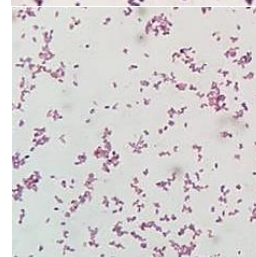
แอกติโนมัยสีท

แกรมบวก(สีม่วง)

BBUU157



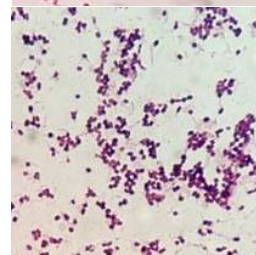
BBUU161



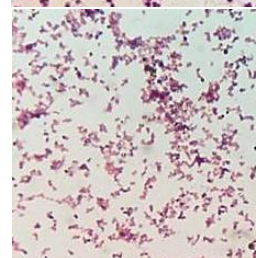
BBUU163



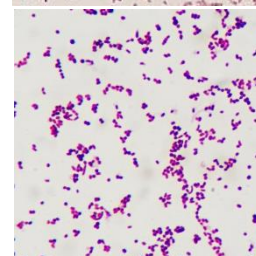
BBUU165/1



BBUU166



BBUU179



ภาพภาคผนวก 3 (ต่อ)



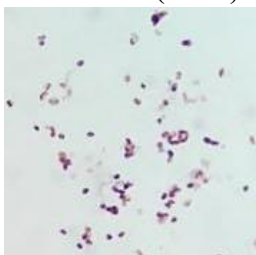
3639644678

BUU_1Thesis_59910008_thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

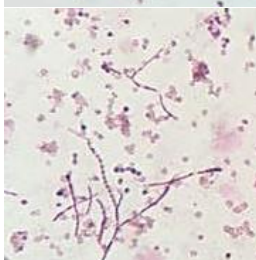
แอกติโนมัยสีท

แกรมบวก(สีม่วง)

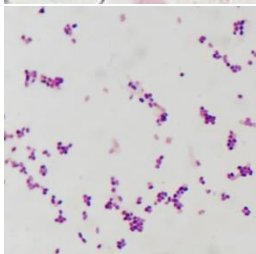
BBUU180



BBUU187



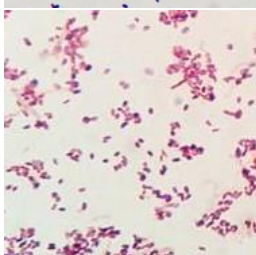
BBUU192



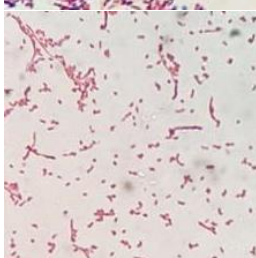
BBUU500



BBUU904



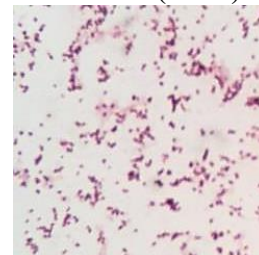
BBUU907



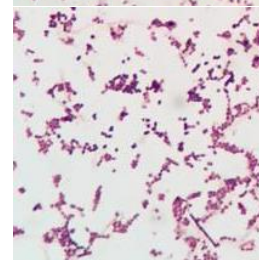
แอกติโนมัยสีท

แกรมบวก(สีม่วง)

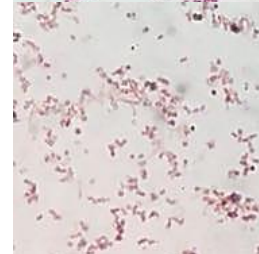
BBUU186



BBUU190



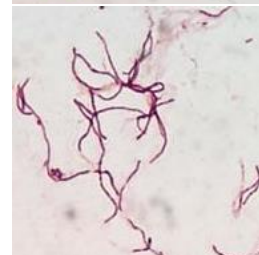
BBUU195



BBUU903



BBUU906



ภาพภาคผนวก 3 (ต่อ)

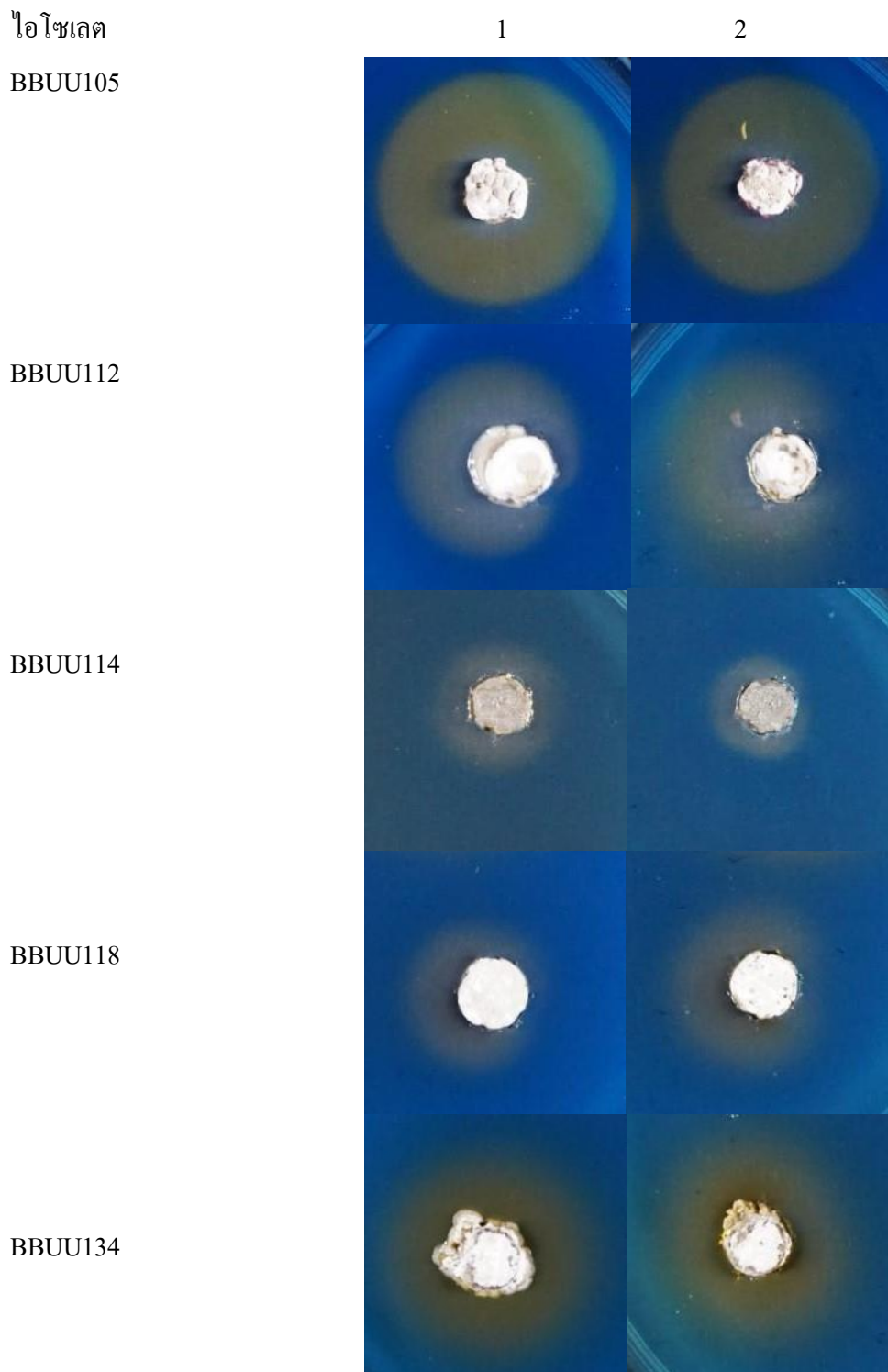
ภาคผนวก จ

การผลิตไซเคอโรพอร์ของแอกติโนมัลลีภายใต้สภาวะปกติ



369644678

BUU iThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

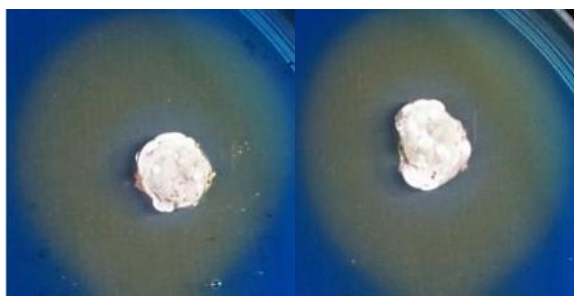


ภาพภาคผนวก 4 การผลิตไซเดอโรฟอร์ของแอคติโนมัยซีทภายใต้สภาวะปกติ

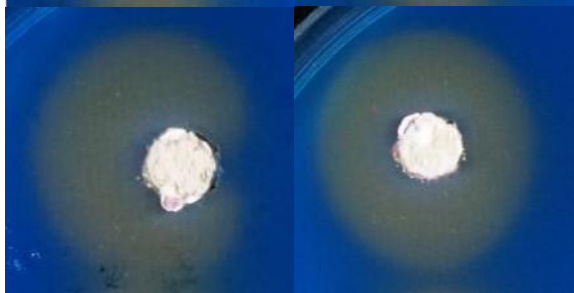
ไอโซเลต
BBUU144

1

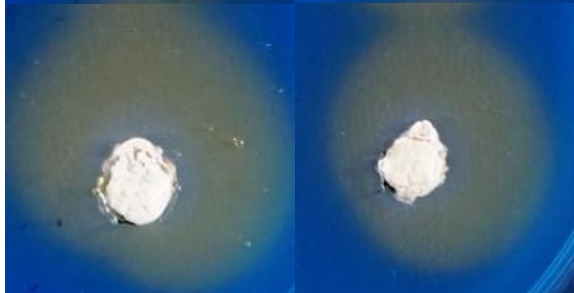
2



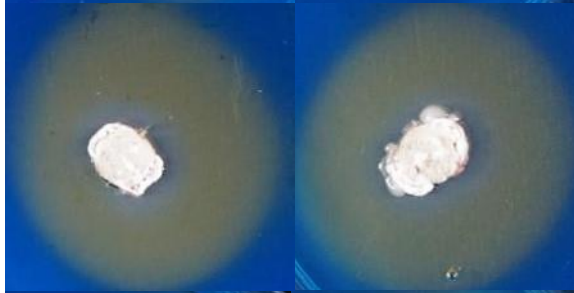
BBUU145



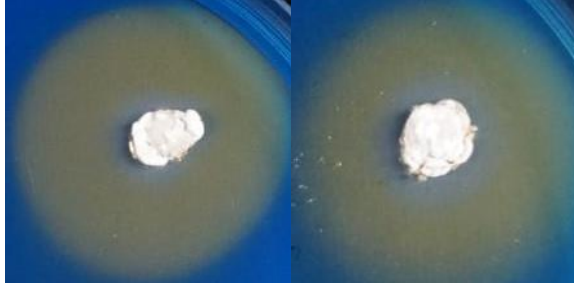
BBUU146



BBUU149



BBUU150



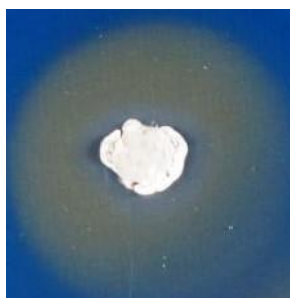
3639644678
BUU iThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

ภาพภาคผนวก 4 (ต่อ)

ไอโซเลต
BBUU151

1

2



เพลตอาหารมีการ
ปนเปื้อน

BBUU155/1



BBUU155/2



BBUU157



BBUU160



ภาพภาคผนวก 4 (ต่อ)

ไอโซเลต

BBUU161

1

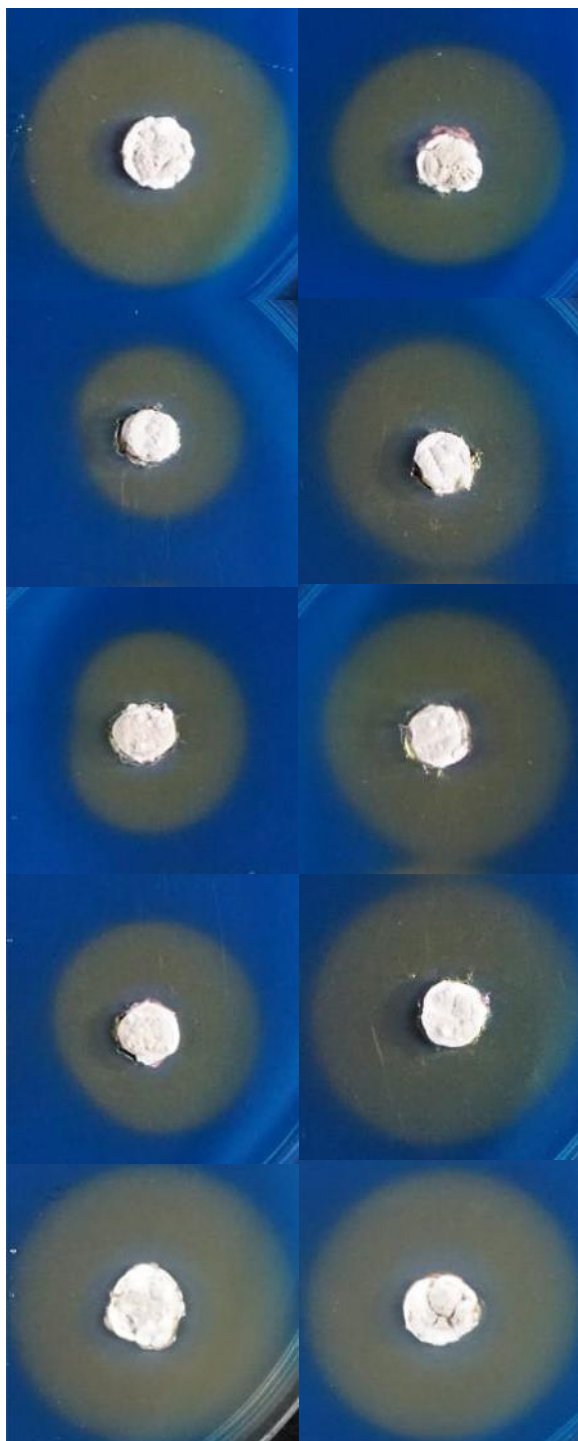
2

BBUU162

BBUU163

BBUU164

BBUU165/1



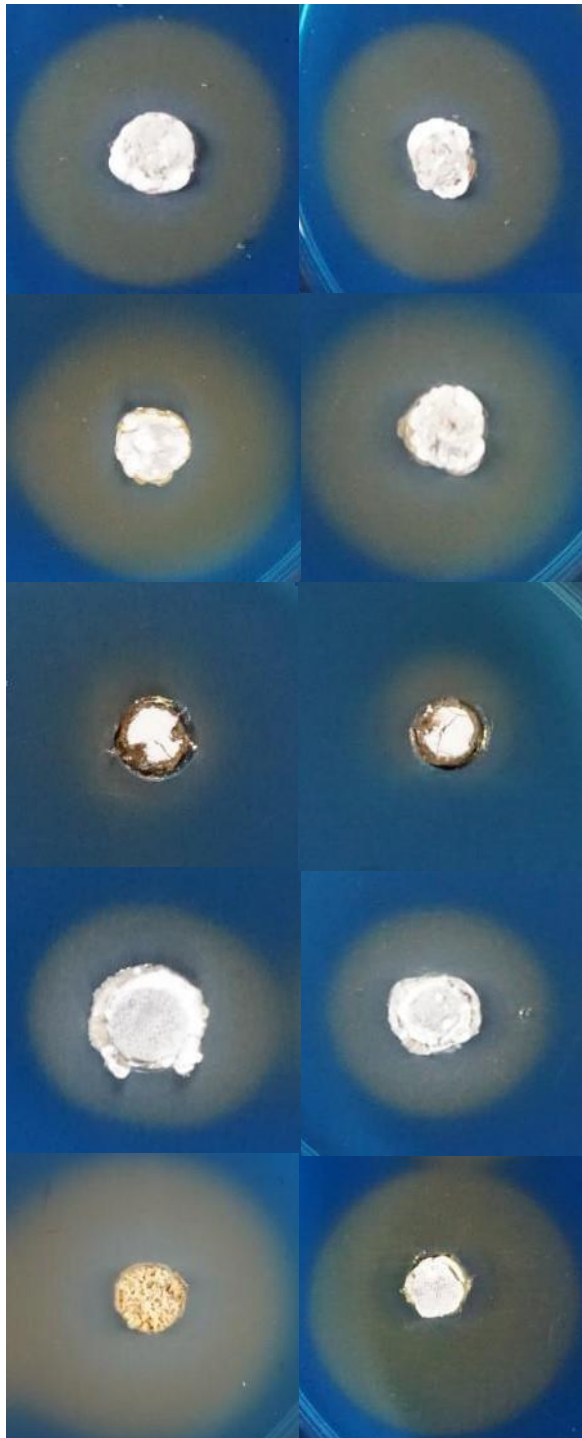
ภาพภาคผนวก 4 (ต่อ)

ไอโซเลต

BBUU165/2

1

2



BBUU166

BBUU168

BBUU179

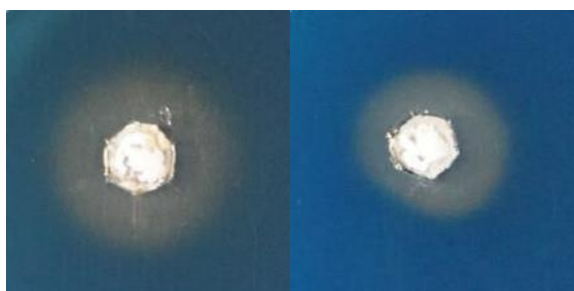
BBUU180

ไอโซเลต

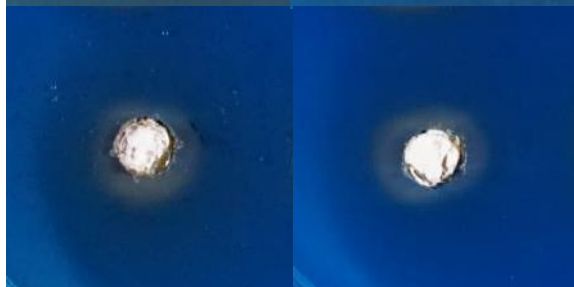
BBUU186

1

2



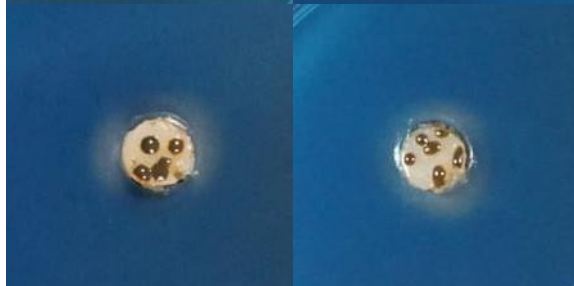
BBUU187



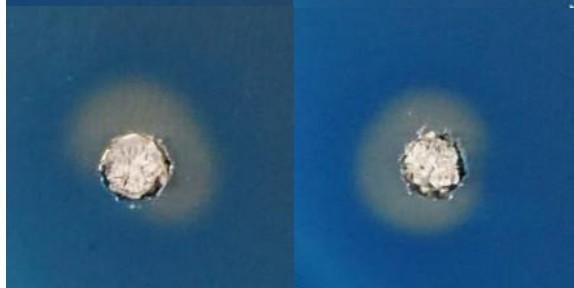
BBUU190



BBUU192



BBUU195

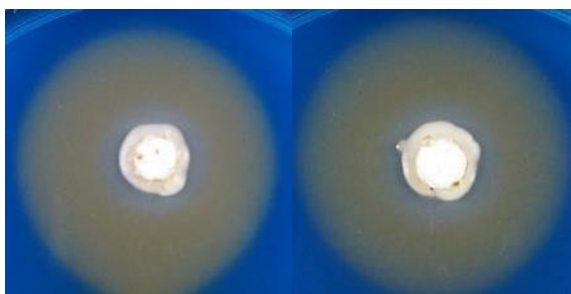


ภาพภาคผนวก 4 (ต่อ)

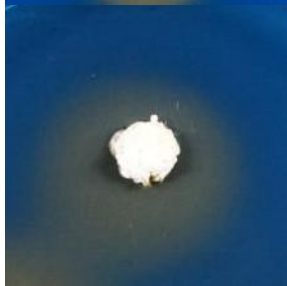
ไอโซเลต
BBUU500

1

2



BBUU903



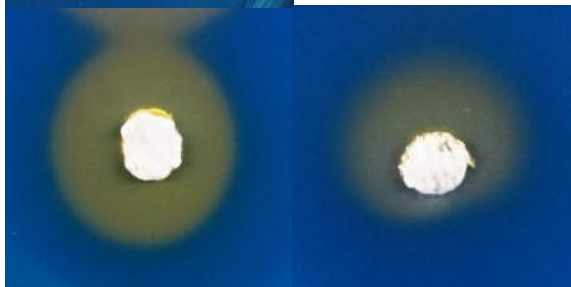
เพลตอาหารมีการ
ปนเปื้อน

BBUU904



เพลตอาหารมีการ
ปนเปื้อน

BBUU906



BBUU907



เพลตอาหารมีการ
ปนเปื้อน

ภาพภาคผนวก 4 (ต่อ)

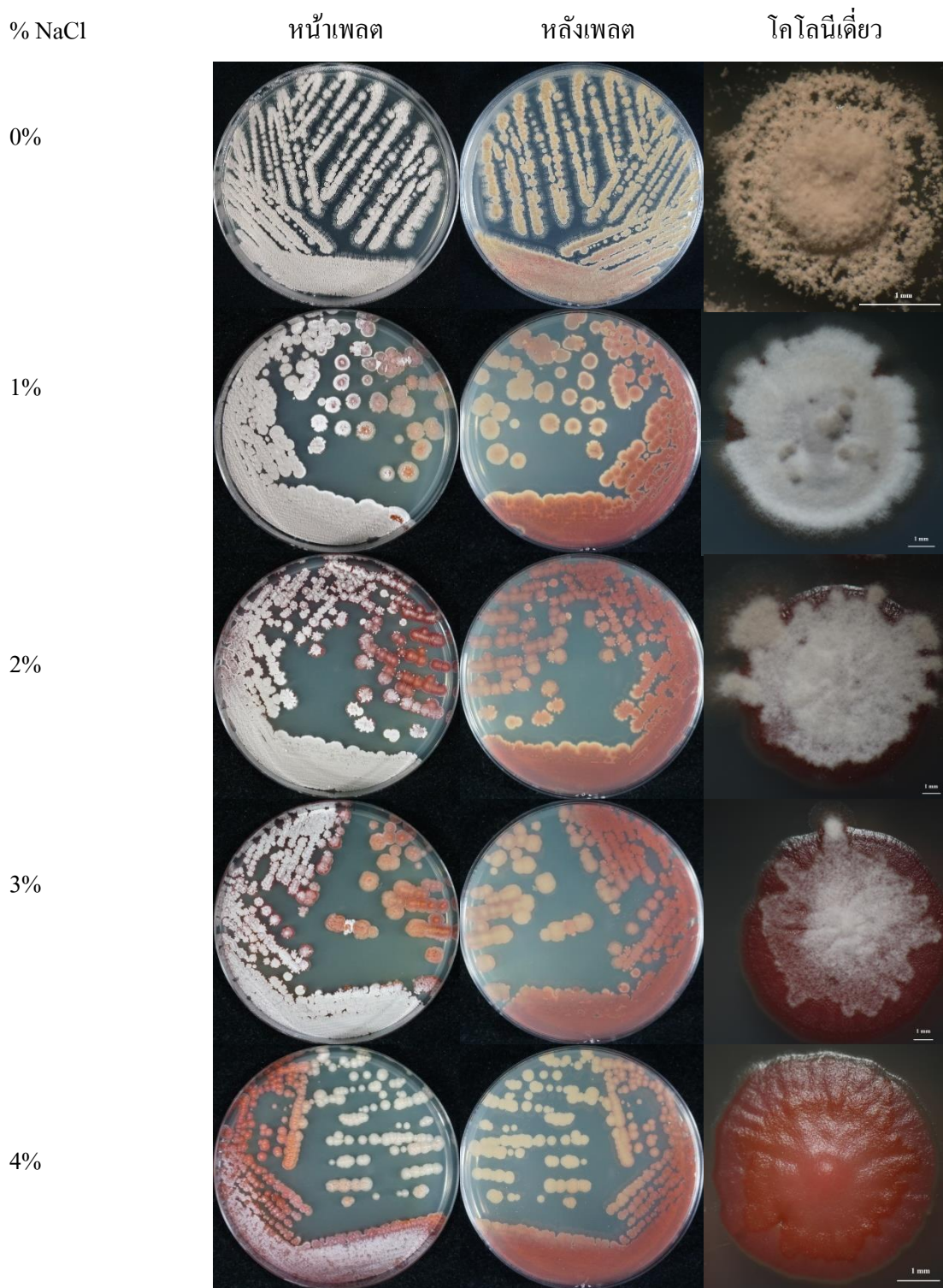
ภาคผนวก จ

การทนเค็มของแอกติโนมัยซีทและ *P. putida* ATCC 17484

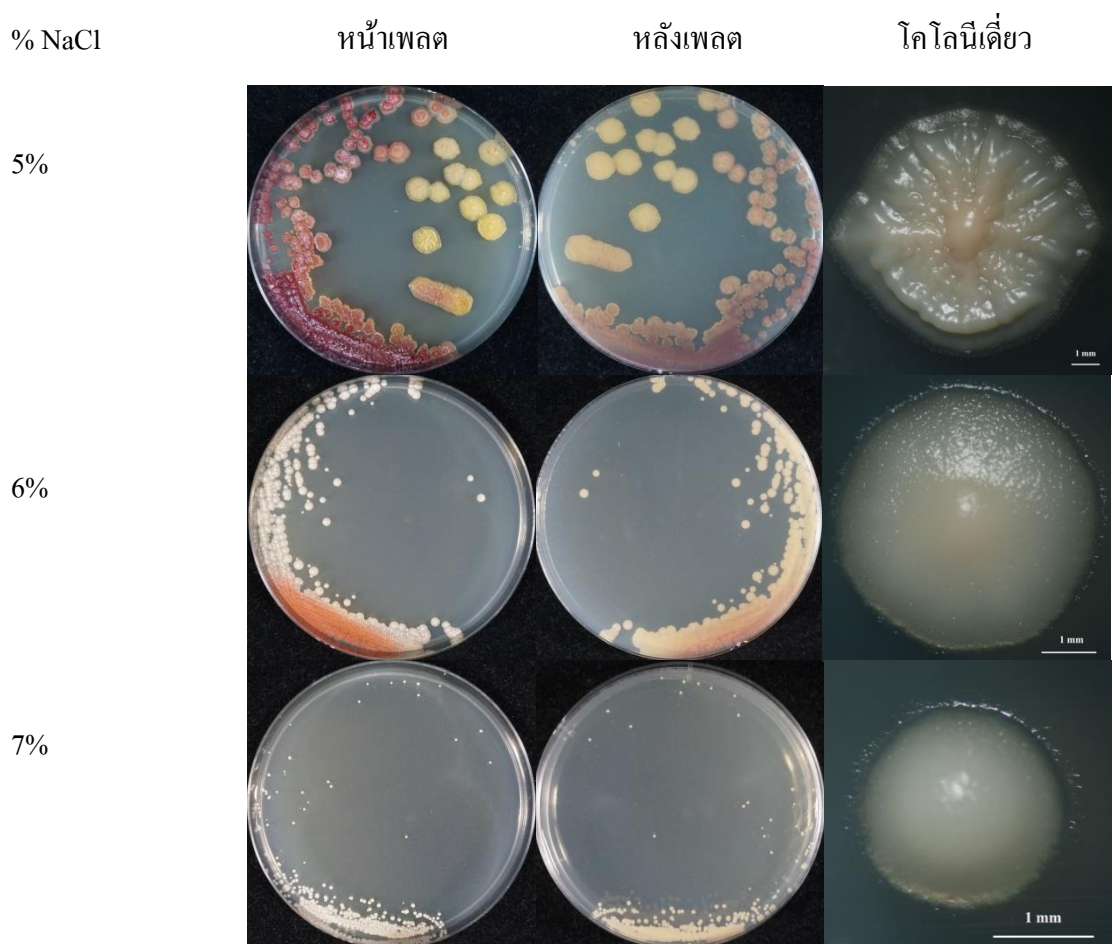


369644678

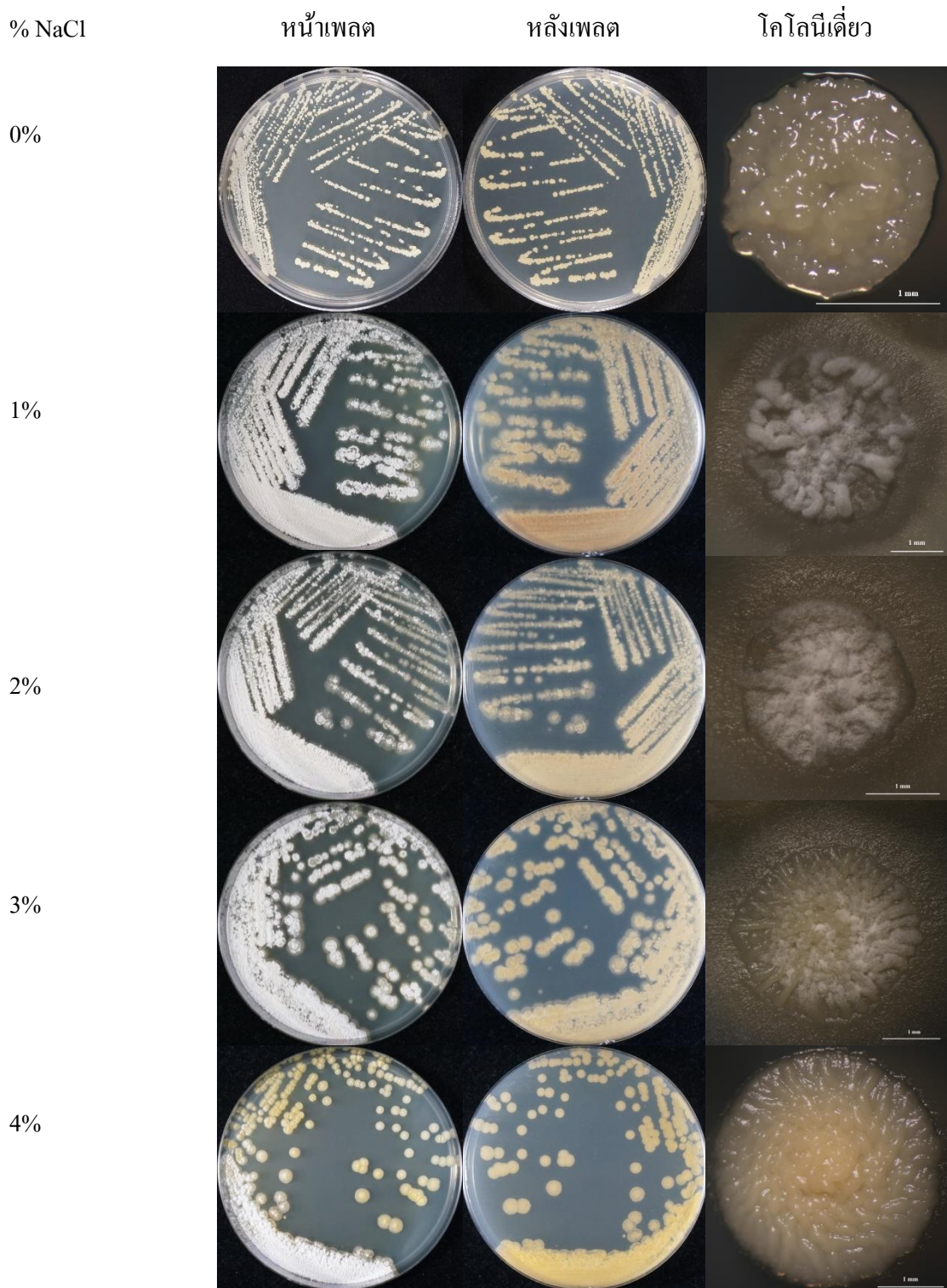
BUU .IThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28



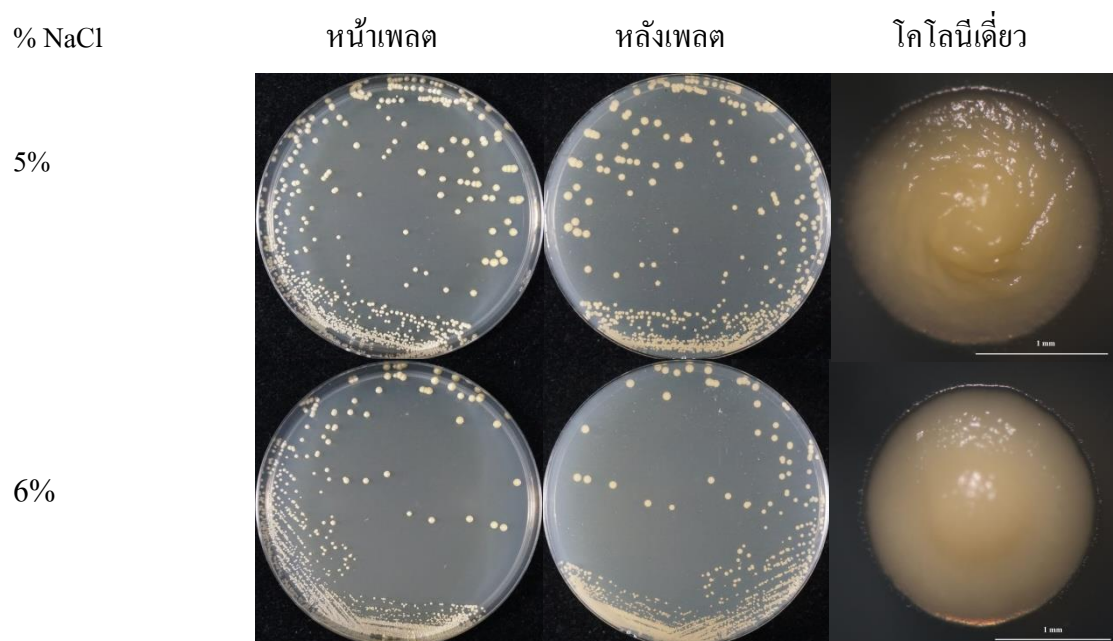
ภาพภาคผนวก 5 การทนเค็มของไอโซเลต BBUU157



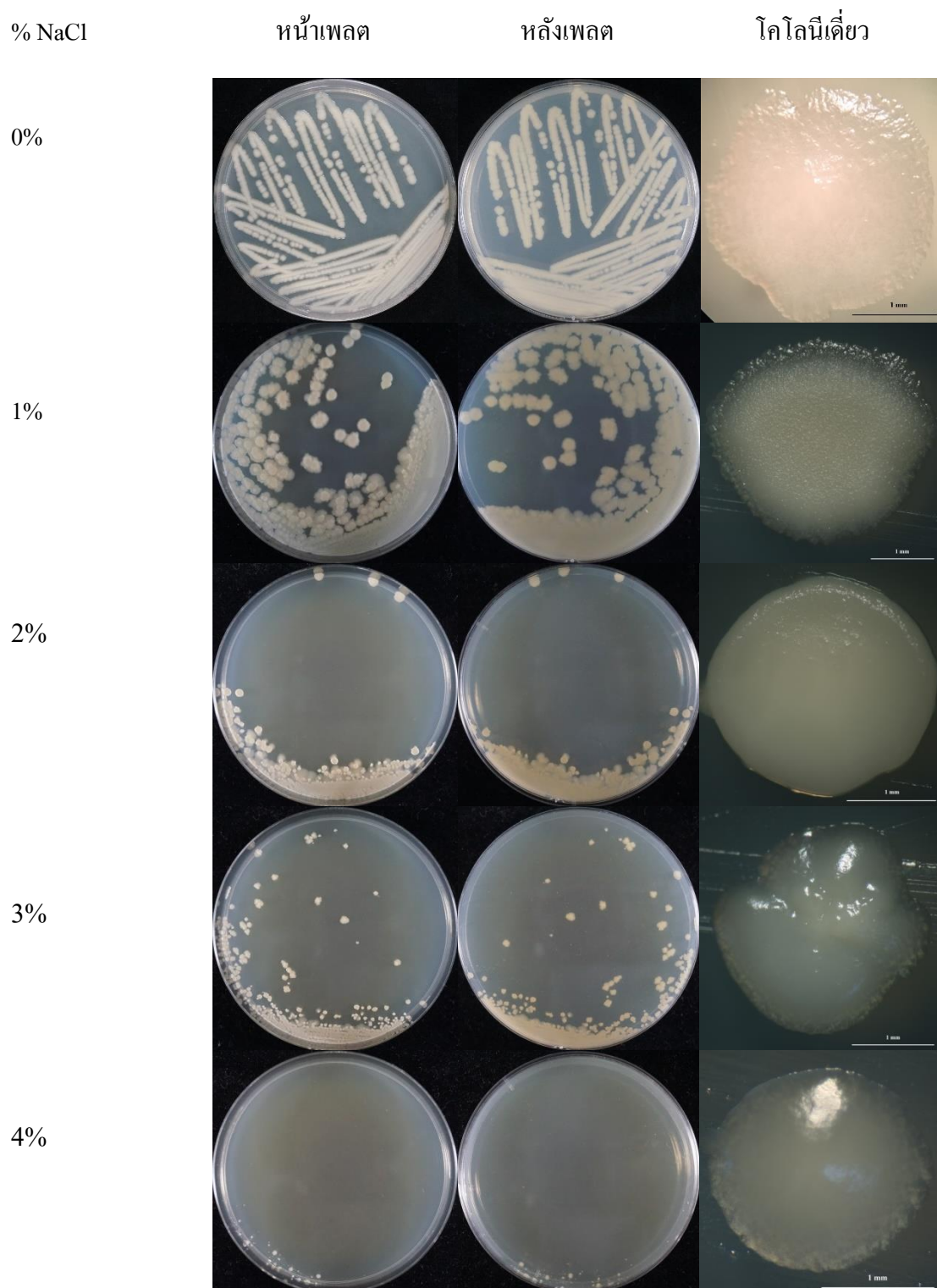
ภาพภาคผนวก 5 (ต่อ)



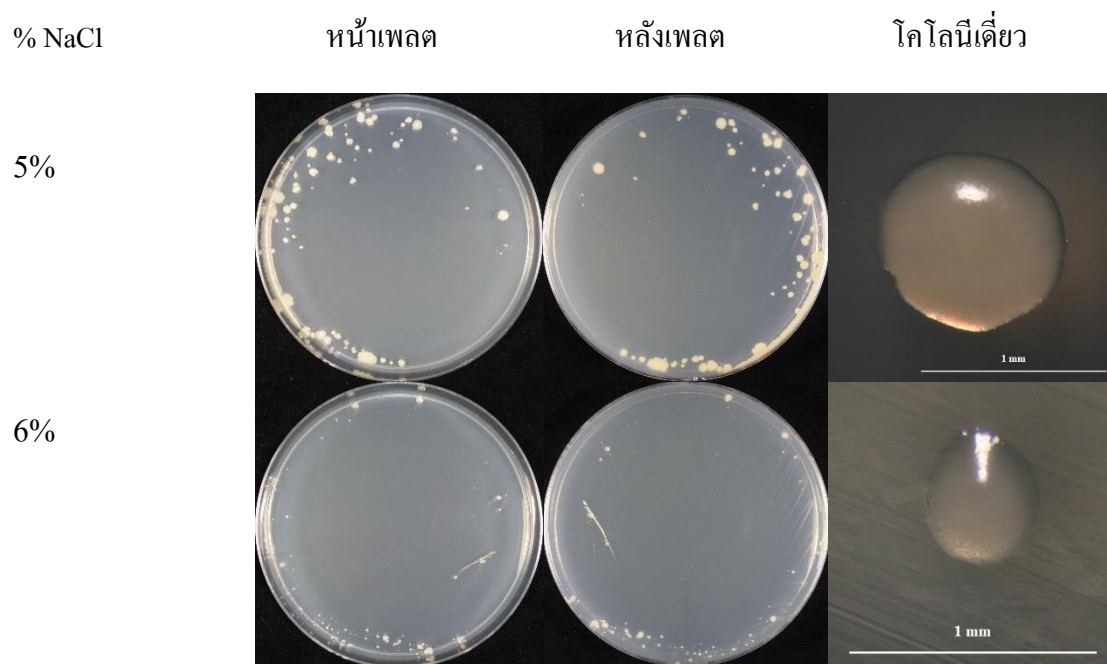
ภาพภาคผนวก 6 การทนเค็มของไอโซเลต BBU500



ภาพภาคผนวก 6 (ต่อ)



ภาพภาคผนวก 7 การทนเค็มของ *P. putida* ATCC 17484



ภาพภาคผนวก 7 (ต่อ)

ภาคผนวก ข

การเจริญภายใต้สภาวะความเค็มและการหาน้ำหนักแห้ง



369644678

BUU.ITthesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

ตารางภาคผนวก 8 ข้อมูลการเจริญของ BBUU157 ภายใต้สภาวะความเค็ม

ความเข้มข้น NaCl (mM)	ชุดการ ทดลอง	หลอด ที่	น้ำหนักแห้ง (g/ ml)				เฉลี่ยรวม
			ก่อนอบ	หลังอบ	น้ำหนักแห้ง เฉลี่ย	เฉลี่ย	
0	1	1	0.2266	0.2428	0.0162		
		2	0.2213	0.2447	0.0234	0.0198	
		3	0.2215	0.2412	0.0197		
	2	1	0.2274	0.2413	0.0139		
		2	0.2208	0.2471	0.0263	0.0179	0.0158
		3	0.2225	0.236	0.0135		
	3	1	0.1796	0.1857	0.0092		
		2	0.1781	0.1844	0.0094	0.0096	
		3	0.1736	0.1835	0.0102		
200	1	1	0.2231	0.2509	0.0278		
		2	0.2209	0.2435	0.0226	0.0268	
		3	0.218	0.2481	0.0301		
	2	1	0.2204	0.2505	0.0301		
		2	0.2257	0.2579	0.0322	0.0315	0.0283
		3	0.2254	0.2577	0.0323		
	3	1	0.2227	0.2556	0.0329		
		2	0.228	0.2486	0.0206	0.0267	
		3	0.2266	0.2531	0.0265		

ตารางภาคผนวก 8 (ต่อ)

ความเข้มข้น NaCl (mM)	ชุดการ ทดลอง	หลอด ที่	น้ำหนักแห้ง (g/ ml)				เฉลี่ยรวม
			ก่อนอบ	หลังอบ	น้ำหนักแห้ง เฉลี่ย		
400	1	1	0.224	0.2617	0.0377		
		2	0.2188	0.2577	0.0389	0.0356	
		3	0.2202	0.2503	0.0301		
	2	1	0.2237	0.2538	0.0301		
		2	0.222	0.2493	0.0373	0.0319	0.0337
		3	0.2191	0.2474	0.0283		
	3	1	0.2241	0.254	0.0299		
		2	0.2255	0.2576	0.0321	0.0326	
		3	0.227	0.2629	0.0359		
600	1	1	0.2271	0.2742	0.0471		
		2	0.2245	0.2659	0.0414	0.0443	
		3	0.2214	0.2657	0.0443		
	2	1	0.2232	0.2695	0.0463		
		2	0.2214	0.2608	0.0394	0.0457	0.0454
		3	0.2268	0.2782	0.0514		
	3	1	0.2222	0.2761	0.0539		
		2	0.223	0.2614	0.0384	0.0462	
		3	0.2268	0.2732	0.0464		

ตารางภาคผนวก 8 (ต่อ)

ความเข้มข้น NaCl (mM)	ชุดการ ทดลอง	หลอด ที่	น้ำหนักแห้ง (g/ ml)				เฉลี่ยรวม
			ก่อนอบ	หลังอบ	น้ำหนักแห้ง เฉลี่ย		
800	1	1	0.2245	0.2877	0.0632		
		2	0.2208	0.2875	0.0667	0.0615	
		3	0.2241	0.2786	0.0545		
	2	1	0.2214	0.2715	0.0501		
		2	0.2226	0.2891	0.0665	0.0598	0.0612
		3	0.2184	0.2811	0.0627		
	3	1	0.218	0.2847	0.0667		
		2	0.2218	0.2769	0.0551	0.0624	
		3	0.2313	0.2968	0.0655		
1000	1	1	0.2224	0.2884	0.066		
		2	0.2265	0.2761	0.0546	0.0587	
		3	0.2227	0.2782	0.0555		
	2	1	0.2234	0.2731	0.0597		
		2	0.2238	0.2991	0.0753	0.0685	0.0657
		3	0.2211	0.2916	0.0705		
	3	1	0.2241	0.2989	0.0748		
		2	0.2249	0.2974	0.0725	0.0698	
		3	0.222	0.2842	0.0622		

ตารางภาคผนวก 9 ข้อมูลการเจริญของ BBUU500 ภายใต้สภาวะความเค็ม

ความเข้มข้น NaCl (mM)	ชุดการ ทดลอง	หลอด ที่	น้ำหนักแห้ง (g/ ml)				เฉลี่ยรวม
			ก่อนอบ	หลังอบ	น้ำหนักแห้ง เฉลี่ย		
0	1	1	0.2305	0.2353	0.0048		
		2	0.2265	0.232	0.0055	0.0052	
		3	0.2308	0.2362	0.0054		
	2	1	0.2358	0.2453	0.0095		
		2	0.2292	0.2435	0.0143	0.0097	0.0069
		3	0.2406	0.2458	0.0052		
	3	1	0.2282	0.2362	0.008		
		2	0.2354	0.2401	0.0047	0.0059	
		3	0.2293	0.2342	0.0049		
200	1	1	0.2305	0.2526	0.0221		
		2	0.2383	0.2557	0.0174	0.0195	
		3	0.2336	0.2527	0.0191		
	2	1	0.2318	0.2592	0.0274		
		2	0.2336	0.2468	0.0132	0.0175	0.0177
		3	0.2331	0.245	0.0119		
	3	1	0.2252	0.2364	0.0112		
		2	0.2363	0.2509	0.0146	0.0161	
		3	0.2283	0.2507	0.0224		

ตารางภาคผนวก 9 (ต่อ)

ความเข้มข้น NaCl (mM)	ชุดการ ทดลอง	หลอด ที่	น้ำหนักแห้ง (g/ ml)				เฉลี่ยรวม	
			ก่อนอบ	หลังอบ	น้ำหนักแห้ง	เฉลี่ย		
400	1	1	0.2307	0.2571	0.0264			
		2	0.2363	0.2563	0.0200	0.0221		
		3	0.2337	0.2538	0.0201			
	2	1	0.2323	0.2517	0.0194			
		2	0.239	0.2572	0.0182	0.0197	0.0206	
		3	0.2317	0.2533	0.0216			
	3	1	0.2249	0.2454	0.0205			
		2	0.2293	0.247	0.0177	0.0199		
		3	0.232	0.2534	0.0214			
	600	1	1	0.2367	0.2615	0.0248		
			2	0.2279	0.2643	0.0364	0.0292	
			3	0.2267	0.2531	0.0264		
2		1	0.2374	0.2674	0.03			
		2	0.233	0.2615	0.0285	0.0303	0.0289	
		3	0.2334	0.2657	0.0323			
3		1	0.2352	0.261	0.0258			
		2	0.2378	0.2645	0.0267	0.0273		
		3	0.2338	0.2631	0.0293			

ตารางภาคผนวก 9 (ต่อ)

ความเข้มข้น NaCl (mM)	ชุดการ ทดลอง	หลอด ที่	น้ำหนักแห้ง (g/ ml)				เฉลี่ยรวม	
			ก่อนอบ	หลังอบ	น้ำหนักแห้ง เฉลี่ย			
800	1	1	0.2317	0.2648	0.0331			
		2	0.2284	0.2675	0.0391	0.036		
		3	0.2422	0.268	0.0358			
	2	1	0.2293	0.2611	0.0318			
		2	0.2286	0.266	0.0374	0.037	0.0334	
		3	0.2329	0.2647	0.0318			
	3	1	0.2334	0.2622	0.0288			
		2	0.2354	0.2691	0.0337	0.0305		
		3	0.229	0.258	0.029			
	1000	1	1	0.2302	0.2775	0.0473		
			2	0.2298	0.2681	0.0383	0.0409	
			3	0.2309	0.2679	0.037		
2		1	0.2291	0.2732	0.0441			
		2	0.2317	0.2763	0.0446	0.042	0.0413	
		3	0.2402	0.2776	0.0374			
3		1	0.2303	0.2728	0.0425			
		2	0.2365	0.2753	0.0388	0.041		
		3	0.2285	0.2702	0.0417			



369644678

BUU_1Thesis_59910008_thesis / rev: 02042563 18:44:30 / seq: 28

ตารางภาคผนวก 10 ข้อมูลการเจริญของ *P.putida* ATCC 17484 ภายใต้สภาวะความเค็ม

ความเข้มข้น NaCl (mM)	ชุดการ ทดลอง	หลอด ที่	น้ำหนักแห้ง (g/ ml)				เฉลี่ยรวม
			ก่อนอบ	หลังอบ	น้ำหนักแห้ง เฉลี่ย	เฉลี่ย	
0	1	1	0.2351	0.2428	0.0077		
		2	0.2351	0.2458	0.0107	0.0122	
		3	0.2378	0.256	0.0182		
	2	1	0.2336	0.2549	0.0213		
		2	0.2308	0.242	0.0112	0.0129	0.0117
		3	0.2313	0.2374	0.0061		
	3	1	0.232	0.2458	0.0138		
		2	0.2368	0.2483	0.0115	0.01	
		3	0.2331	0.2379	0.0048		
200	1	1	0.2304	0.2425	0.0121		
		2	0.2328	0.2516	0.0188	0.0215	
		3	0.2299	0.2636	0.0337		
	2	1	0.2337	0.2529	0.0192		
		2	0.2319	0.2558	0.0239	0.0197	0.0206
		3	0.2325	0.2484	0.0159		
	3	1	0.2303	0.2505	0.0202		
		2	0.236	0.2558	0.0198	0.0206	
		3	0.2286	0.3505	0.0219		

ตารางภาคผนวก 10 (ต่อ)

ความเข้มข้น NaCl (mM)	ชุดการ ทดลอง	หลอด ที่	น้ำหนักแห้ง (g/ ml)				เฉลี่ยรวม	
			ก่อนอบ	หลังอบ	น้ำหนักแห้ง	เฉลี่ย		
400	1	1	0.2333	0.2688	0.0355			
		2	0.2329	0.2758	0.0429	0.0396		
		3	0.2322	0.2727	0.0405			
	2	1	0.2279	0.2695	0.0416			
		2	0.2326	0.2654	0.0328	0.0356	0.0368	
		3	0.2309	0.2634	0.0325			
	3	1	0.235	0.279	0.044			
		2	0.2313	0.263	0.0317	0.0353		
		3	0.2301	0.2604	0.0303			
	600	1	1	0.2341	0.2787	0.0477		
			2	0.2366	0.2889	0.0523	0.0509	
			3	0.2336	0.2863	0.0527		
2		1	0.2331	0.2787	0.0456			
		2	0.2314	0.2825	0.0511	0.0503	0.0508	
		3	0.2344	0.2886	0.0542			
3		1	0.2327	0.2846	0.0519			
		2	0.2308	0.2887	0.0579	0.0513		
		3	0.2349	0.2789	0.044			

ตารางภาคผนวก 10 (ต่อ)

ความเข้มข้น NaCl (mM)	ชุดการ ทดลอง	หลอด ที่	น้ำหนักแห้ง (g/ ml)				เฉลี่ยรวม
			ก่อนอบ	หลังอบ	น้ำหนักแห้ง	เฉลี่ย	
800	1	1	0.2352	0.2737	0.0385		
		2	0.2293	0.2737	0.0444	0.0406	
		3	0.2315	0.274	0.0389		
	2	1	0.2358	0.282	0.0462		
		2	0.2331	0.273	0.0399	0.041	0.0408
		3	0.233	0.27	0.037		
	3	1	0.2277	0.2705	0.0428		
		2	0.2334	0.2739	0.0405	0.0408	
		3	0.2315	0.2742	0.0391		
1000	1	1	0.2337	0.2669	0.0332		
		2	0.2299	0.2599	0.03	0.0328	
		3	0.23	0.2653	0.0353		
	2	1	0.2307	0.2606	0.0299		
		2	0.2335	0.2683	0.0348	0.0340	0.03218
		3	0.2303	0.2676	0.0373		
	3	1	0.2337	0.2613	0.0296		
		2	0.2314	0.2609	0.0295	0.0297	
		3	0.2373	0.2675	0.03		

ภาคผนวก ซ

การผลิตไซเคอโรฟอรัภายใต้สภาวะความเค็ม



369644678

BUU .IThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

ตารางภาคผนวก 11 การผลิตไซเคอโรฟอรัภายใต้สภาวะความเค็มของไอโซเลต BBUU157

ความเข้มข้น NaCl (mM)	Halozone (cm.)			เฉลี่ย (cm.)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	4.7	4.8	4.6	4.70±0.10
200	3.6	3.1	4.4	3.70±0.65
400	4.0	4.0	4.0	4.00±0.00
600	3.1	3.3	3.3	3.23±0.11
800	2.9	3.0	3.2	3.03±0.15
1,000	2.9	2.8	2.9	2.87±0.06

ตารางภาคผนวก 12 การผลิตไซเคอโรฟอรัภายใต้สภาวะความเค็มของไอโซเลต BBUU500

ความเข้มข้น NaCl (mM)	Halozone (cm.)			เฉลี่ย (cm.)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	4.3	4.5	4.4	4.40±0.10
200	4.0	4.5	4.0	4.17±0.29
400	3.5	4.7	5.0	4.40±0.79
600	3.4	2.8	3.3	3.17±0.32
800	3.4	3.7	4.0	3.70±0.30
1,000	3.0	3.5	3.4	3.30±0.26

ตารางภาคผนวก 13 การผลิตไซโคโรฟอร်ภายใต้สภาวะความเค็มของ *P. putida* ATCC 17484

ความเข้มข้น NaCl (mM)	Halozone (cm.)			เฉลี่ย (cm.)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	2.4	2.0	2.2	2.20±0.20
200	1.2	1.3	1.5	1.33±0.15
400	1.3	1.2	1.1	1.20±0.10
600	0.8	0.7	0.8	0.77±0.06
800	0.5	0.5	0.4	0.47±0.06
1,000	0.3	0.3	0.4	0.33±0.06

ความเข้มข้น NaCl
(mM)

0

200

400

600

800

1

2

3



ภาพภาคผนวก 14 การผลิตไซโตโครฟอรภายใต้สภาวะความเค็มของไอโซเลต BBUU157

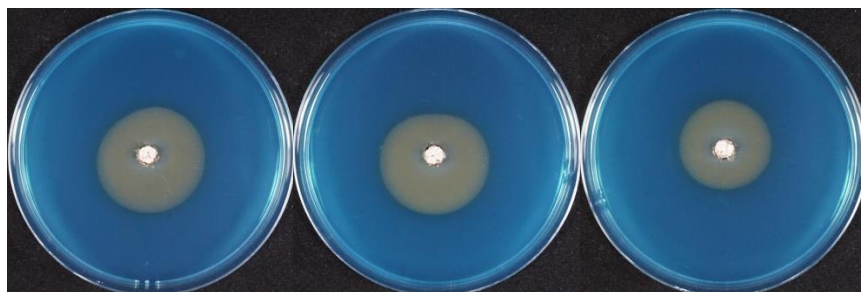
ความเข้มข้น NaCl
(mM)

1

2

3

1000



ภาพภาคผนวก 14 (ต่อ)



369644678

BUU_1Thesis_59910008_thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

ความเข้มข้น NaCl
(mM)

1

2

3

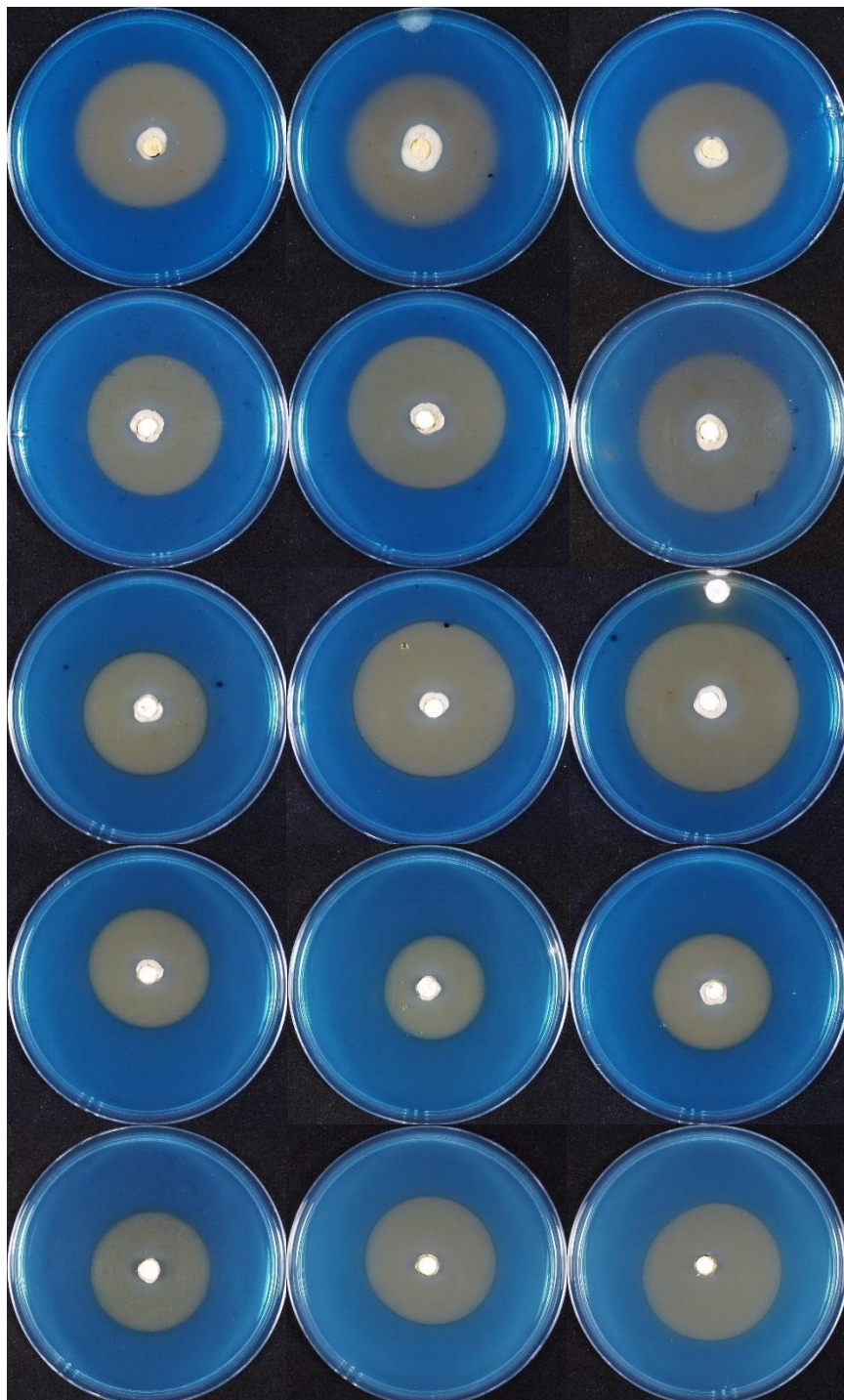
0

200

400

600

800



ภาพภาคผนวก 15 การผลิตไซเดอโรฟอรัภายใต้สภาวะความเค็มของไอโซเลต BBUU500

ความเข้มข้น NaCl
(mM)

1

2

3

1000



ภาพภาคผนวก 15 (ต่อ)

ความเข้มข้น NaCl
(mM)

0

1

2

3

0

200

400

600

800



เพลตอาหาร
มีการปนเปื้อน

ภาพภาคผนวก 16 การผลิตไซเดอโรฟอรัภายใต้สภาวะความเค็มของ *P. putida* ATCC 17484

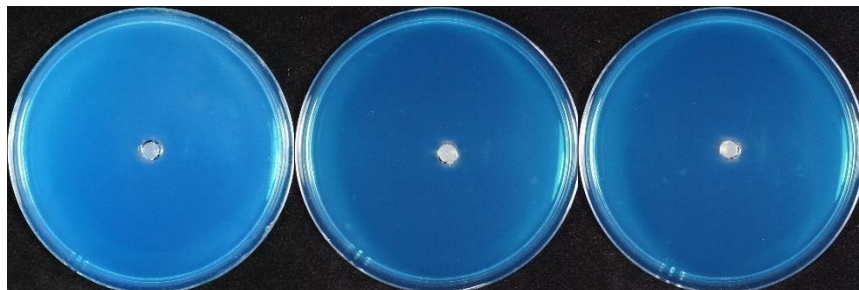
ความเข้มข้น NaCl
(mM)

1

2

3

1000



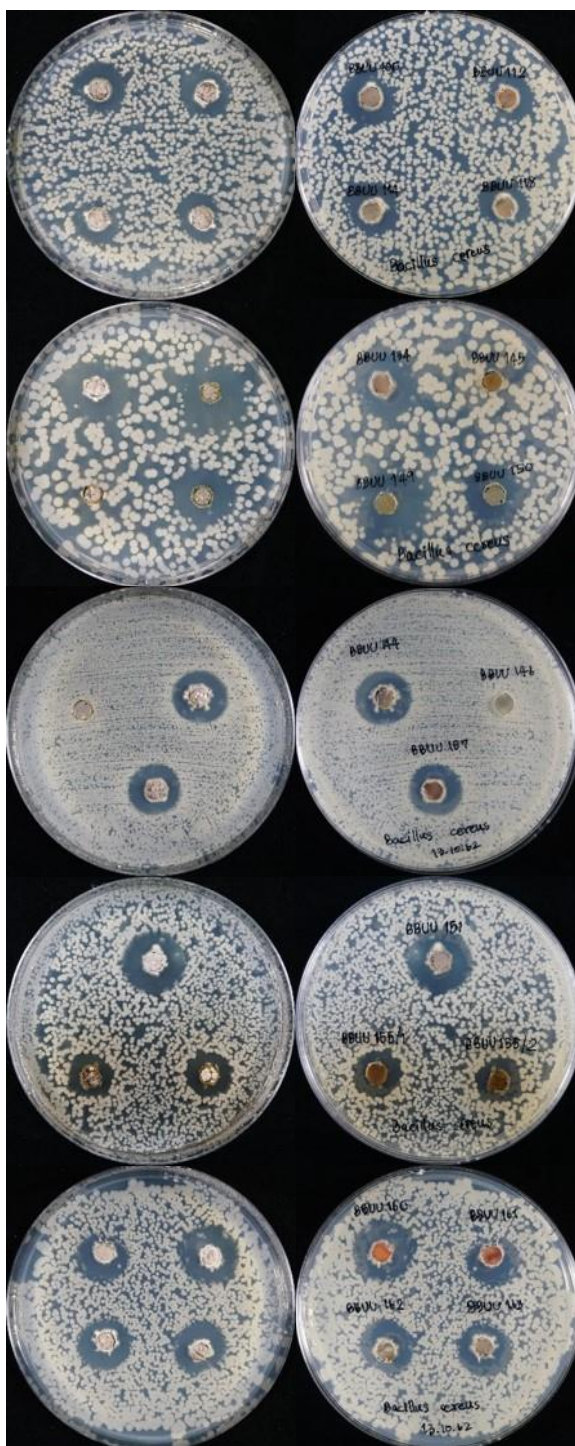
ภาพภาคผนวก 16 (ต่อ)

ภาคผนวก ฅ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

หน้าเพลต

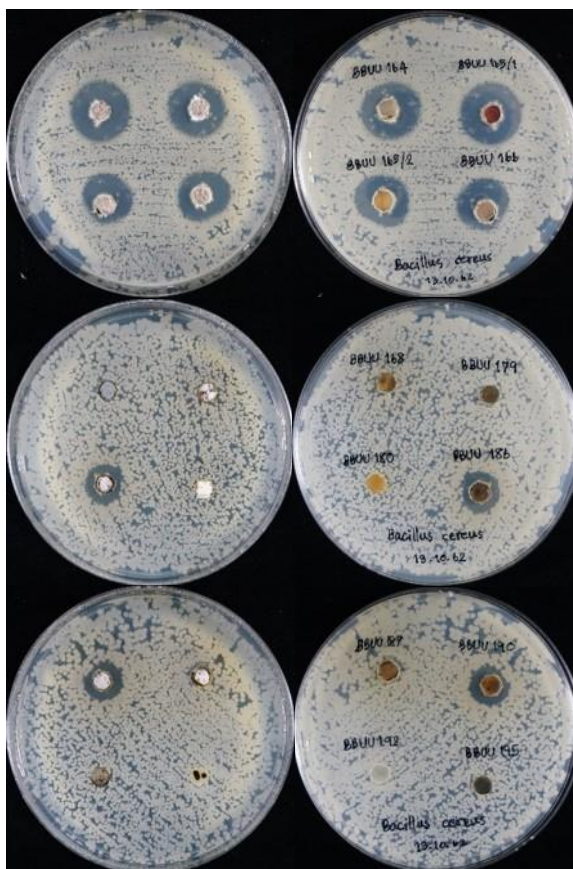
หลังเพลต



ภาพภาคผนวก 17 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B.cereus*

หน้าเพลต

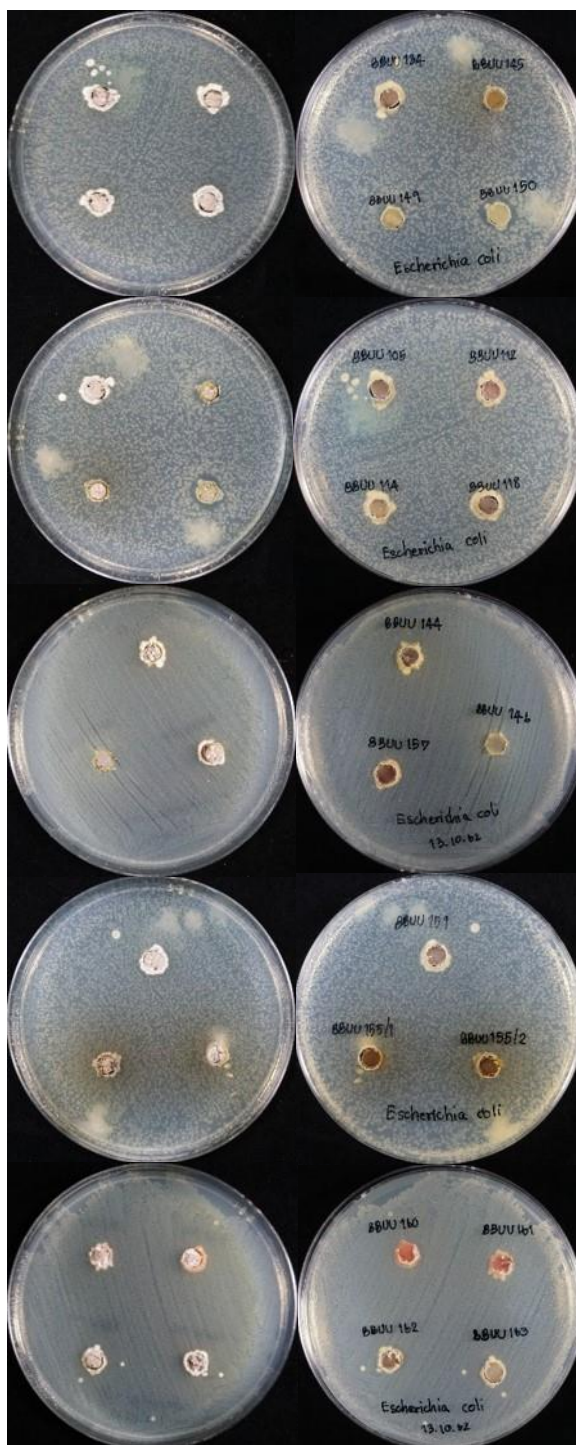
หลังเพลต



ภาพภาคผนวก 17 (ต่อ)

หน้าเพลต

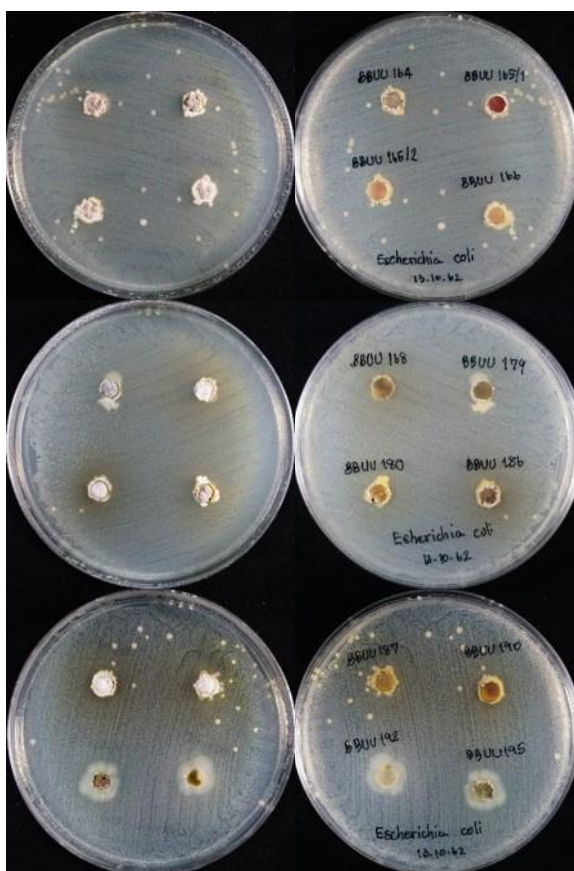
หลังเพลต



ภาพภาคผนวก 18 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

หน้าเพลต

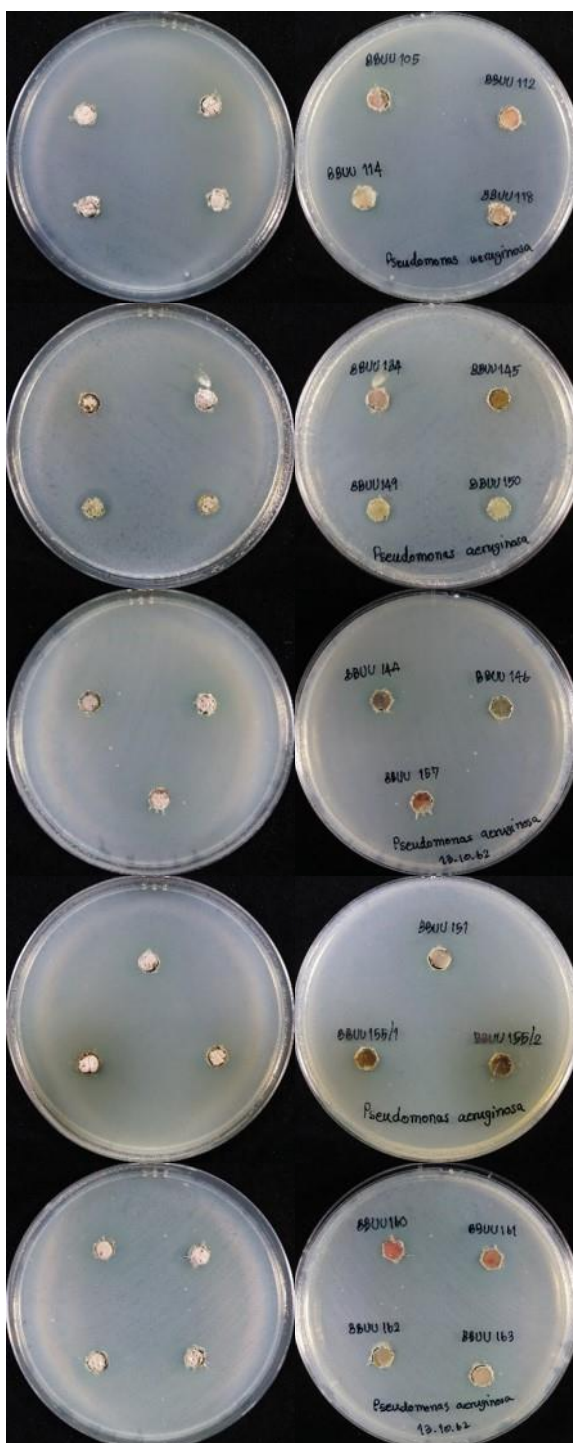
หลังเพลต



ภาพภาคผนวก 18 (ต่อ)

หน้าเพลต

หลังเพลต



ภาพภาคผนวก 19 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *P.aeruginosa*

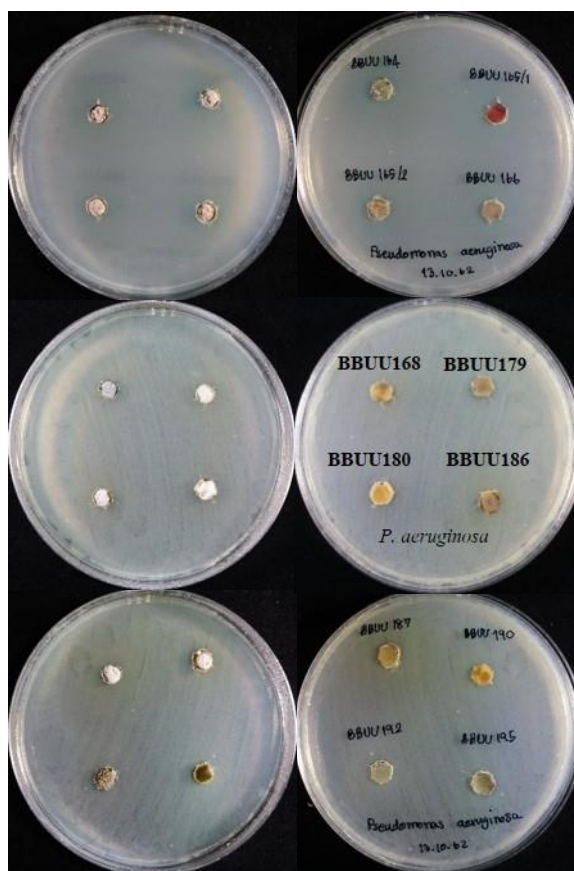


363644678

BUU iThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

หน้าเพลต

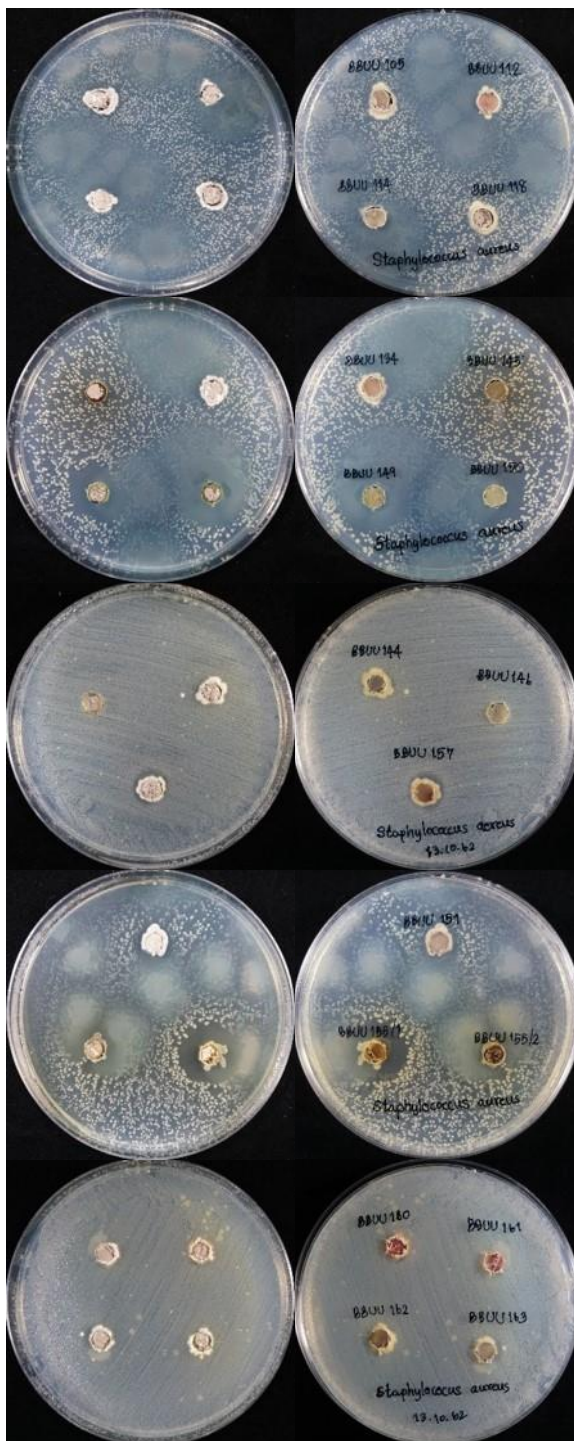
หลังเพลต



ภาพภาคผนวก 19 (ต่อ)

หน้าเพลต

หลังเพลต



ภาพภาคผนวก 20 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus*

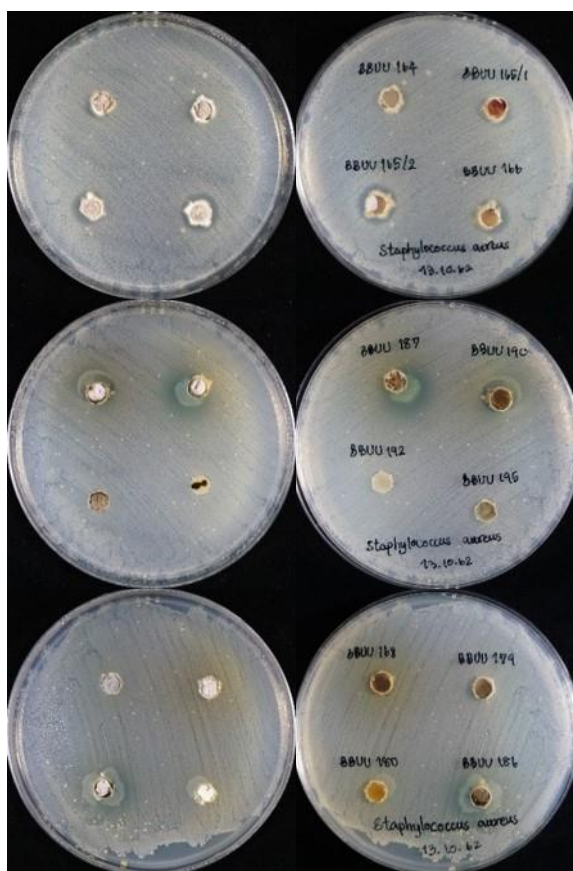


3639644678

BUU iThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

หน้าเพลต

หลังเพลต



ภาพภาคผนวก 20 (ต่อ)



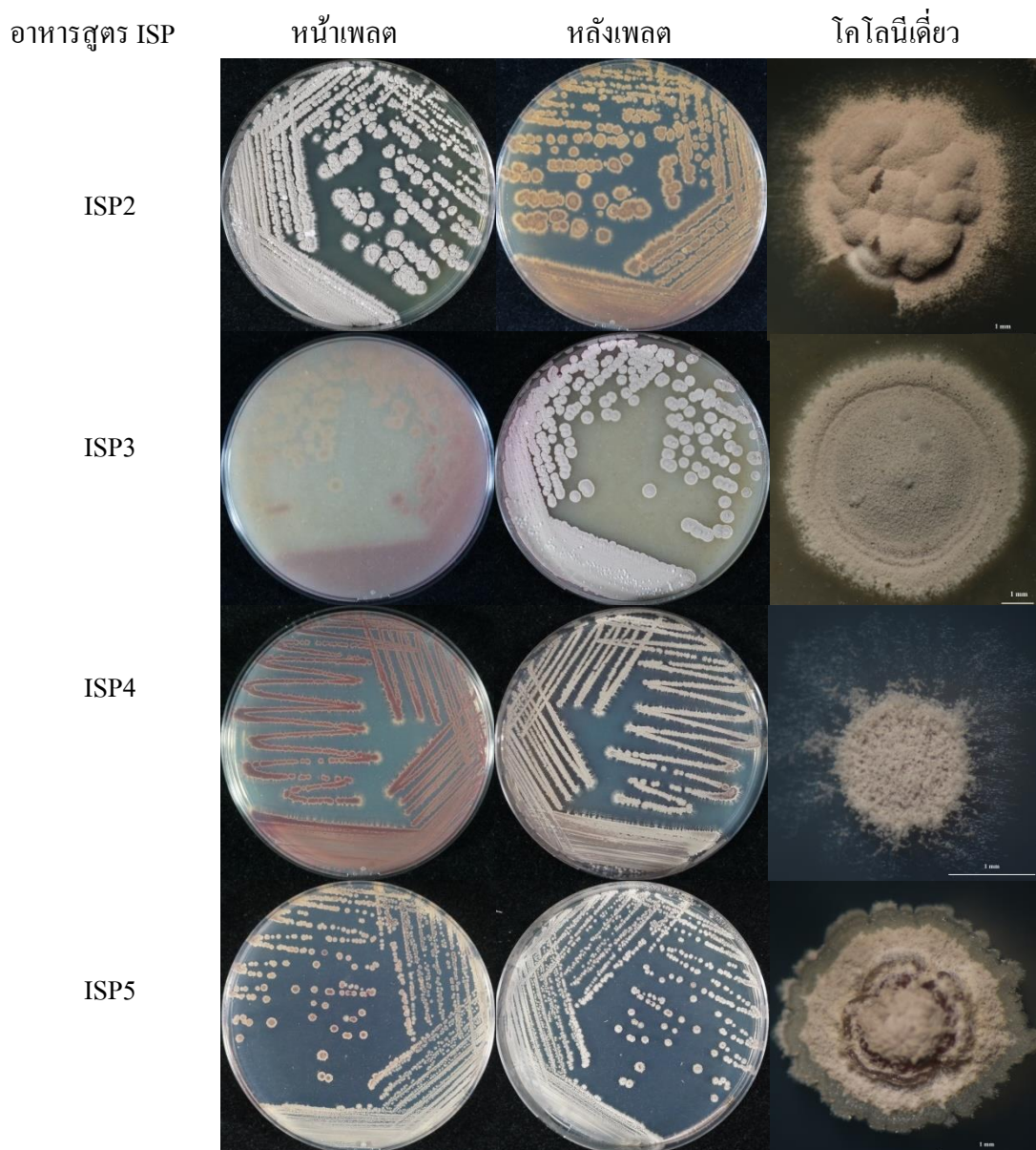
369644678

BUU iThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

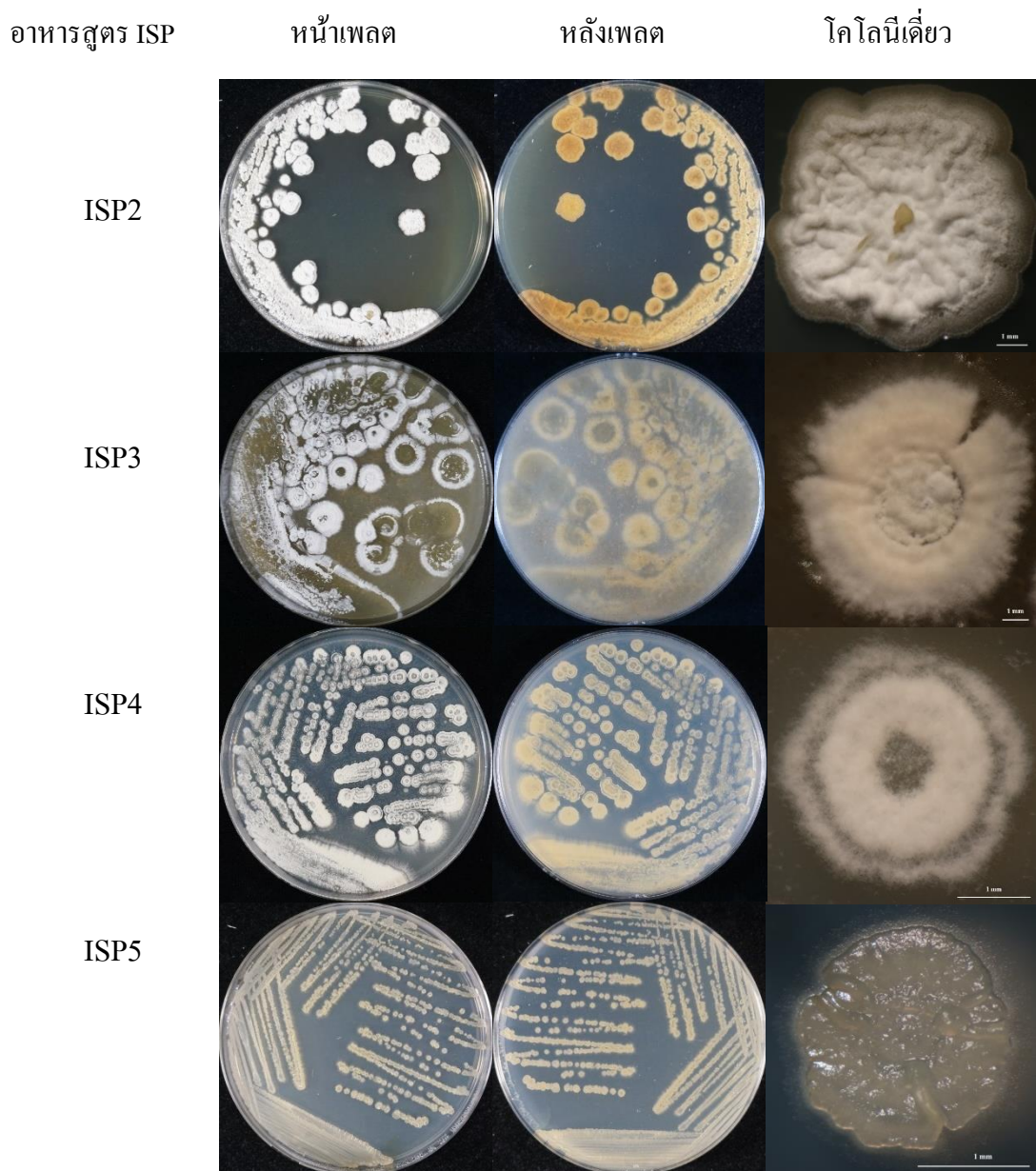
ภาคผนวก ญ

ลักษณะสัญญาณวิทยาไอโซเลต BBUU157 และ ไอโซเลต BBUU500

บนอาหาร ISP สูตรต่าง ๆ

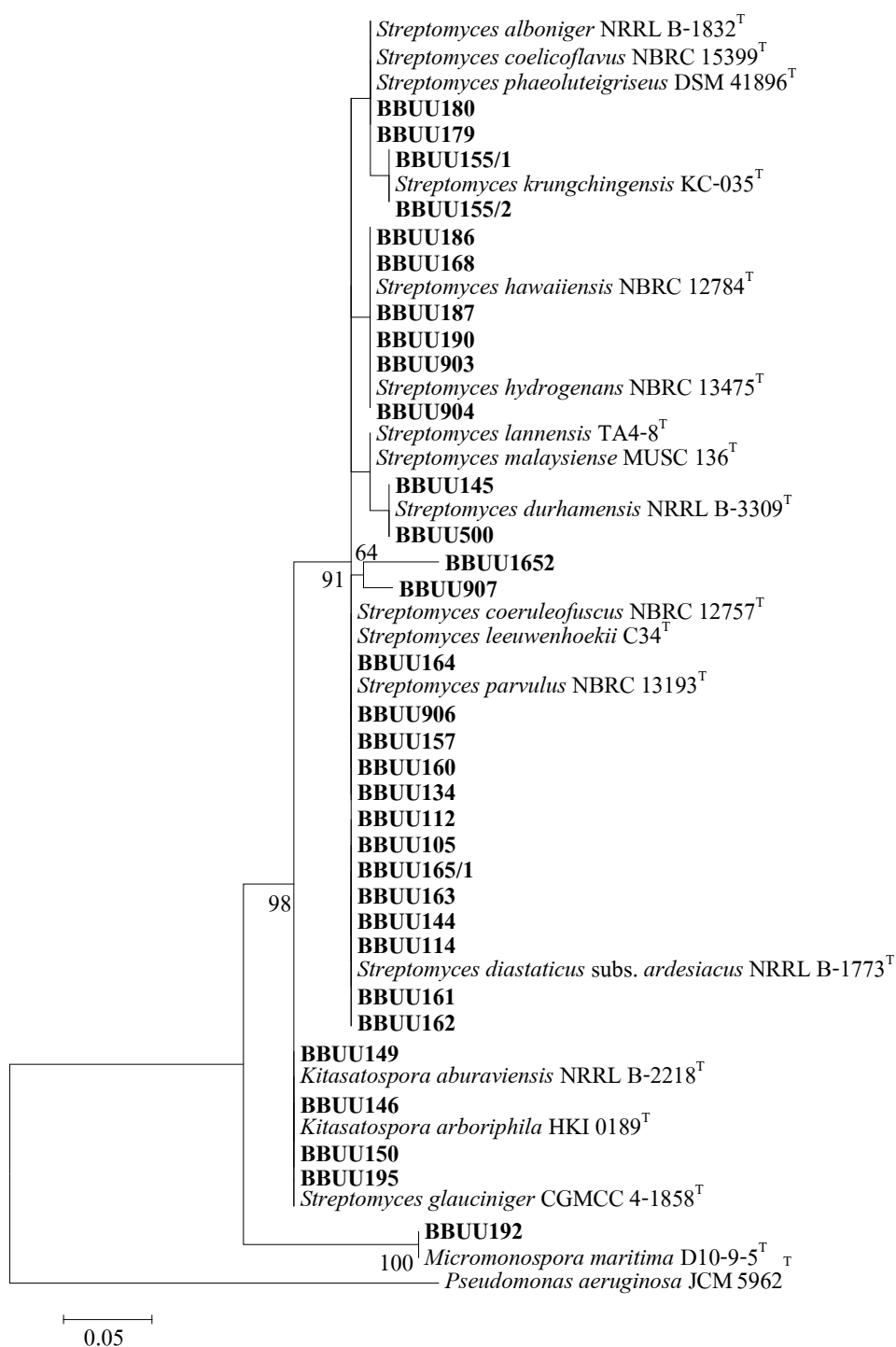


ภาพภาคผนวก 21 ลักษณะสัณฐานวิทยาไอโซเลต BBUU 157 บนอาหาร ISP

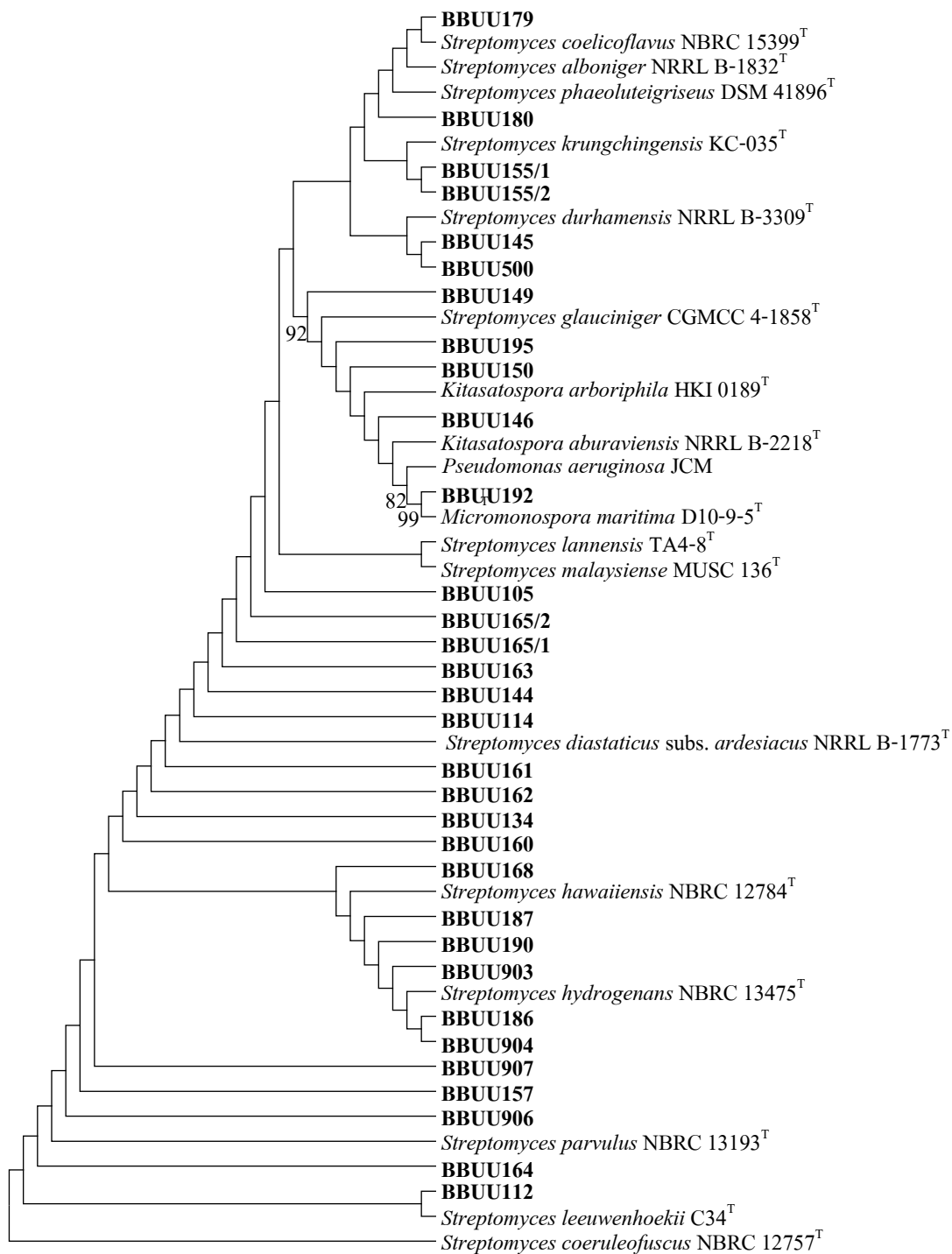


ภาพภาคผนวก 22 ลักษณะพื้นฐานวิทยาไอโซเลต BBUU 500 บนอาหาร ISP

ภาคผนวก ก
แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์



ภาพภาคผนวก 23 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ Maximum Likelihood method ของแอกติโนมัยซีท 35 ไอโซเลต และใช้ *P. aeruginosa* JCM 5962^T เป็น outgroup ใช้ค่า bootstrap (%) 1,000 ครั้ง ระยะห่างของการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.005



ภาพภาคผนวก 24 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ Maximum Parsimony method ของแอกติโนมัยซีท 32 ไอโซเลต และใช้ *P. aeruginosa* JCM 5962^T เป็น outgroup ใช้ค่า bootstrap (%) 1,000 ครั้ง

ภาคผนวก ฎ

การวิเคราะห์ลักษณะทางเคมี



369644678

BUU iThesis 59910008 thesis / recv: 02042563 18:44:30 / seq: 28

ตารางพัฒนาภ 25 ผลการวิเคราะห์ fatty acids ของ ไอโซเลต BBUU500

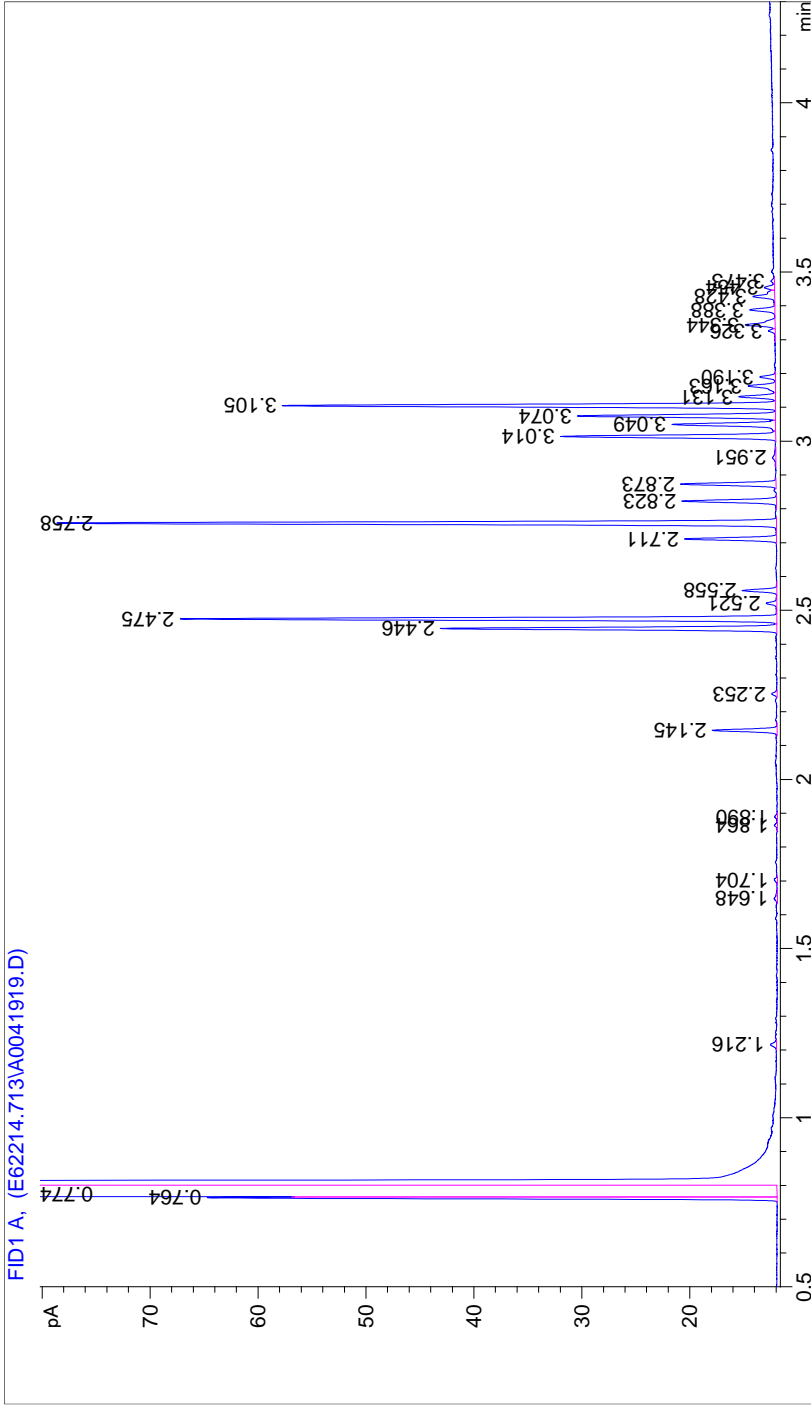
RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.7635	38056	0.006	----	6.5215		----	< min rt	
0.7738	1.09E+9	0.020	----	6.5899	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.2160	903	0.011	----	9.5545	Unknown 9.560	----	ECL deviates -0.006	
1.6476	770	0.016	----	11.7598		----		
1.7039	502	0.011	1.033	12.0048	12:0	0.15	ECL deviates 0.005	Reference 0.015
1.8643	445	0.011	1.025	12.6175	13:0 iso	0.13	ECL deviates -0.005	Reference 0.001
1.8899	433	0.010	1.024	12.7153	13:0 anteiso	0.13	ECL deviates 0.001	Reference 0.007
2.1449	6659	0.009	1.013	13.6250	14:0 iso	2.00	ECL deviates -0.003	Reference -0.003
2.2528	674	0.010	1.009	13.9986	14:0	0.20	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
2.4461	33954	0.009	1.002	14.6326	15:0 iso	10.07	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
2.4745	60862	0.009	1.001	14.7258	15:0 anteiso	18.03	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
2.5206	1278	0.010	1.000	14.8767	15:1 w6c	0.38	ECL deviates 0.002	
2.5583	3558	0.009	----	15.0003	15:0	----	ECL deviates 0.000	
2.7109	9487	0.009	0.993	15.4857	16:1 iso H	2.79	ECL deviates 0.004	

ตารางพัฒนาภ 25 (ต่อ)

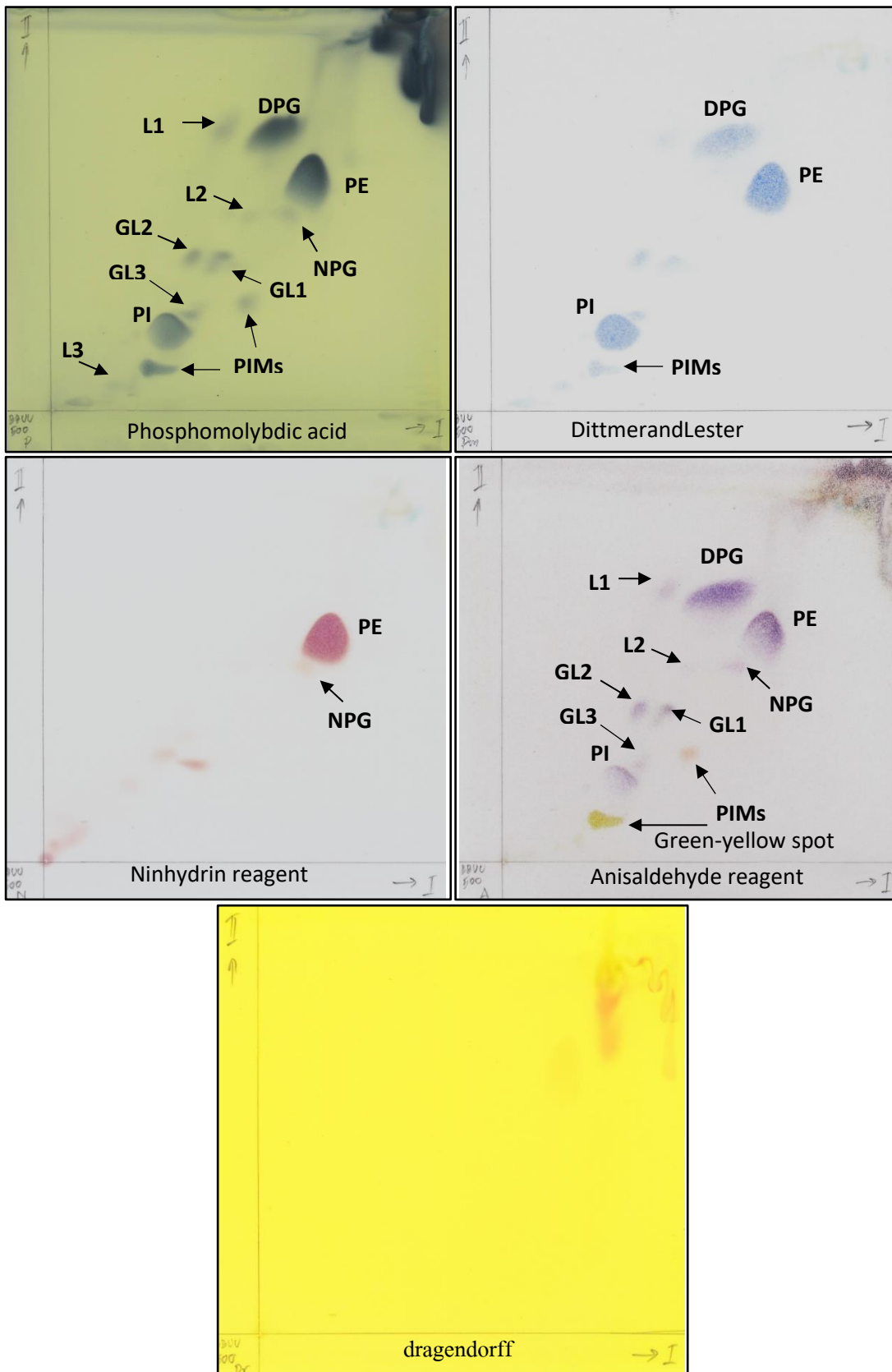
RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
2.7578	75466	0.009	0.992	15.6347	16:0 iso	22.14	ECL deviates 0.002	Reference -0.005
2.8226	10091	0.009	0.989	15.8406	Sum In Feature 3	2.95	ECL deviates 0.001	16:1 w7c/16:1 w6c
2.8729	10164	0.009	0.988	16.0007	16:0	2.97	ECL deviates 0.001	Reference -0.006
2.9512	755	0.015	0.985	16.2484	15:0 2OH	0.22	ECL deviates -0.007	
3.0138	23282	0.009	0.982	16.4464	Sum In Feature 9	6.77	ECL deviates -0.001	17:1 iso w9c
3.0493	11704	0.009	0.981	16.5584	17:1 anteiso w9c	3.40	ECL deviates 0.006	
3.0743	21391	0.009	0.980	16.6375	17:0 iso	6.20	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
3.1048	52652	0.009	0.979	16.7340	17:0 anteiso	15.25	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
3.1314	4018	0.009	0.978	16.8180	17:1 w8c	1.16	ECL deviates 0.003	
3.1629	3824	0.011	0.977	16.9174	17:0 cyclo	1.10	ECL deviates 0.002	
3.1897	1776	0.009	0.976	17.0022	17:0	0.51	ECL deviates 0.002	Reference -0.005
3.3259	816	0.010	----	17.4344		----		
3.3437	4157	0.011	0.969	17.4911	18:1 iso H	1.19	ECL deviates 0.001	
3.3882	2911	0.010	0.967	17.6323	18:0 iso	0.83	ECL deviates -0.004	Reference -0.011

ตารางพัฒนาภ 25 (ต่อ)

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
3.4277	3326	0.012	0.965	17.7576	Sum In Feature 5	0.95	ECL deviates 0.002	18:2 w6,9c/18:0 ante
3.4540	1204	0.010	0.964	17.8409	Sum In Feature 8	0.34	ECL deviates -0.007	18:1 w7c
3.4730	419	0.008	0.963	17.9013	Sum In Feature 8	0.12	ECL deviates -0.001	18:1 w6c
----	10091	---	----	----	Summed Feature 3	2.95	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	3326	---	----	----	Summed Feature 5	0.95	18:0 ante/18:2 w6,9c	18:2 w6,9c/18:0 ante
----	1622	---	----	----	Summed Feature 8	0.46	18:1 w7c	18:1 w6c
----	23282	---	----	----	Summed Feature 9	6.77	16:0 10-methyl	17:1 iso w9c



ภาพภาคผนวก 26 ผลการวิเคราะห์ fatty acids ของ ไอโซเลต BBUU500



ภาพภาคผนวก 27 Polar lipids ของไอโซเลต BBUU500 จากผลการวิเคราะห์ thin-layer chromatograms (TLC) ประกอบไปด้วย phosphomolybdic acid (a), Dittmer and Lester (b), ninhydrin (c), anisaldehyde (d) และ dragendorff (e) as spraying reagents.

กำหนดให้ : PE, phosphatidylethanolamine; DPG, diphosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PIMs, phosphatidylinositol manosides; GL1 และ GL2, unknown glycolipid; NPG, unknown ninhydrin positive glycolipid และ L1, L2 และ L3, unknown lipid

บรรณานุกรม

- มานิตา คำแจ่ม และวสุ ปฐมอารีย์. (2557). สารไซเคโอโรฟอรัจากจุลินทรีย์. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว*, 30(1), 229-247.
- รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์. (2548). แอคติโนมัยซีท (*Actinomycete*). ชลบุรี: สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- วิจิตพล มีแก้ว ญัฐพล ชันชปราบ และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2553). การปรับตัวของพืชภายใต้สภาวะที่มีความเค็ม. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์*, 10(2), 28-37.
- ศิริลักษณ์ นามวงษ์. (2553). สักยภาพของแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางทางเทคโนโลยีชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 15(2), 122-132.
- ศิริวรรณ รุ่งอินทร์. (2555). ผลการส่งเสริมการเจริญของพืชโดย *Streptomyces* เอนโคไฟต์ที่ผลิตไซเคโอโรฟอรัและสายพันธุ์กลาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาพันธุวิศวกรรม, บัณฑิตศึกษา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7, 196-208.
- Argandona, M., Nieto, J. J., Iglesias-Guerra, F., Calderon, M. I., Garcia-Esteba, R., & Vargas, C. (2010). Interplay between iron homeostasis and the osmotic stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Applied and environmental microbiology*, 76(11), 3575-3589.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Clement, C., Ouhdouch, Y., & Van-Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Barona-Go´mez , F., Wong, U., Giannakopoulos, A. E., Derrick, P. J., & Challis, G. L. (2004). Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *Journal of American Chemical Society*, 126, 16282-16283.
- Barona-Gomez, F., Lautru, S., Francou, F. X., Leblond, P., Pernodet, J. L., & Challis, G. L. (2006). Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. *Microbiology*, 152(11), 3355-3366.

- Barry, S. M., & Challis, G. L. (2009). Recent advances in siderophore biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(2), 205-215.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., & Zhou, S. (2005). Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *Federation of European Microbiological Societies*, 247, 147-152.
- Chaoui, H. I., Zibilske, L. M., & Ohno, T. (2003). Effects of earthworm casts and compost on soil microbial activity and plant nutrient availability. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 295-302.
- Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K., & Lim, Y. W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2259-2261.
- Collins, M. D., & Jones, D. (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiology reviews*, 45(2), 316-354.
- Coombs, J. T., & Franco, C. M. M. (2003). Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied and environmental microbiology*, 69(9), 5603-5608.
- Coombs, J. T., Michelsen, P. P., & Franco, C. M. M. (2004). Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological Control*, 29, 359-366.
- Dietz, A., & Mathews, J. (1972). Characterization of Hairy-Spored *Streptomyces*. *International journal of systematic bacteriology*, 22(3), 173-177.
- Dikin, A., Sijim, K., Kadir, J., & Seman, I. A. (2007). Mode of action of antimicrobial substances from *Burkholderia multivorans* and *Microbacterium testaceum* Against *Schizophyllum commune*. *Journal of Agriculture and Biology*, 9, 311-314.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 368-376.
- Fialho de Oliveira, M., Germano da Silva, M., & Germano da Sand, S. T. (2010). Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. *Research in Microbiology*, 161(7), 565-572.

- Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, 20, 406-416.
- Flardh, K., & Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces morphogenetics*: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 36-49.
- Flores, F. J., & Martín, J. F. (2004). Iron-regulatory proteins DmdR1 and DmdR2 of *Streptomyces coelicolor* form two different DNA-protein complexes with iron boxes. *Biochemical Journal*, 379, 1-7.
- Gopal, M., Gupta, A., Sunil, E., & Thomas, G. V. (2009). Amplification of plant beneficial microbial communities during conversion of coconut leaf substrate to vermicompost by *Eudrilus* sp. *Current Microbiology*, 59(1), 15-20.
- Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B. K., Sandeep, D., Vidya, M. S., Deepthi, K., & Rupela, O. (2011). Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. *Crop Protection*, 30(8), 1070-1078.
- Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., Bandikinda, P., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Rupela, O., Kudapa, H., Katta, K., & Varshney, R. K. (2014). Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research*, 169(1), 40-48.
- Gopalakrishnana, S., Humayuna, P., Vadlamudia, S., Vijayabharathia, R., Bhiminenia, R. K., & Rupelaa, O. (2012). Plant growth-promoting traits of *Streptomyces* with biocontrol potential isolated from herbal vermicompost. *Biocontrol Science and Technology*, 22(10), 1199-1210.
- Górska, A., Sloderbach, A., & Marszałł, M. P. (2014). Siderophore-drug complexes: potential medicinal applications of the 'Trojan horse' strategy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(9), 442-449.
- Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2012). Who's who in the plant root microbiome?. *Nature Biotechnology*, 30(10), 961-962.
- Huang, K., Li, F., Wei, Y., Chen, X., & Fu, X. (2013). Changes of bacterial and fungal community compositions during vermicomposting of vegetable wastes by *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology*, 150, 235-241.

- Kadi, N., Oves-Costales, D., Barona-Gomez, F., & Challis, G. L. (2007). A new family of ATP-dependent oligomerization-macrocyclization biocatalysts. *Nature Chemical Biology*, 3, 652-656.
- Kämpfer, P. (2012). *Genus Streptomyces*. In M., Goodfellow, P., Kämpfer, H-J., Busse, M.E., Trujillo, K-i., Suzuki, W. Ludwig and W.B., Whitman (Eds.) (Vol. 2). New York: Springer.
- Kaur, T., Sharma, D., Kaur, A., & Manhas, R. K. (2013). Antagonistic and plant growth promoting activities of endophytic and soil actinomycetes. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 1-13.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Kruasuwan, W., & Thamchaipenet, A. (2016). Diversity of culturable plant growth-promoting bacterial endophytes associated with sugarcane roots and their effect of growth by co-inoculation of Ddazotrophs and actinomycetes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35, 1074-1087.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kumar, V., Kumar, A., Pandey, K. D., & Roy, B. K. (2015). Isolation and characterization of bacterial endophytes from the roots of *Cassia tora* L. *Ann Microbiology*, 65, 1391–1139.
- Lautru, S., Oves-Costales, D., Pernodet, J.-L., & Challis, G. L. (2007). MbtH-like protein-mediated cross-talk between non-ribosomal peptide antibiotic and siderophore biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* M145. *Microbiology*, 153(5), 1405-1412.
- Lechevalier, M. P., Bievre, C. D., & Lechevalier, H. (1977). Chemotaxonomy of aerobic Actinomycetes: Phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5(4), 249-260.
- Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International journal of systematic bacteriology*, 20(4), 435-443.
- Loper, J. E., & Henkels, M. D. (1999). Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Applied and environmental microbiology*, 65(12), 5357-5363.

- Ludwig, W., Euzeby, J., Schumann, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Kämpfer, P., & Whitman, W. B. (2012). *Road map of the phylum Actinobacteria*. In Goodfellow, P., Kämpfer, H.-J., Busse, M.E., Trujillo, K.-i., Suzuki, W. Ludwig and W. B., Whitman (Vol. 2). New York: Springer.
- Matsuo, Y., Kanoh, K., Jang, J. H., Adachi, K., Matsuda, S., Miki, O., Kato, T., & Shizuri, Y. (2011). Streptobactin, a tricatchol-type siderophore from marine-derived *Streptomyces* sp. YM5-799. *Journal of Natural Products*, 74(11), 2371-2376.
- Misk, A., & Franco, C. (2011). Biocontrol of chickpea root rot using endophytic actinobacteria. *Biological Control*, 56, 811-822.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 26723-26726.
- Nimnoi, P., Pongsilp, N., & Lumyong, S. (2010). Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 26, 193-203.
- Parthasarathi, K., Ranganathan, L. S., Anandi, V., & Zeyer, J. (2007). Diversity of microflora in the gut and casts of tropical composting earthworms reared on different substrates. *Journal of Environmental Biology*, 28(1), 87-97.
- Pathma, J., & Sakthivel, N. (2012). Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential *SpringerPlus*, 1(26), 1-19.
- Pathma, J., & Sakthivel, N. (2013). Molecular and functional characterization of bacteria isolated from straw and goat manure based vermicompost. *Applied Soil Ecology*, 70, 33-47.
- Pridham, T. G., Hesseltine, C. W., & Benedict, R. G. (1958). A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups. Placement of strains in morphological sections'. *American Society for Microbiology*, 6, 52-79.
- Promnuan, Y., Kudo, T., Ohkuma, M., & Chantawannakul, P. (2013). *Streptomyces Chiangmaiensis* sp. nov. and *Streptomyces lannensis* sp. nov., isolated from the South-East Asian stingless bee (*Tetragonilla collina*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 1896-1901.
- Ramasamy, D., Mishra, A. K., Lagier, J. C., Padhmanabhan, R., Rossi, M., Sentausa, E., Raoult, D., & Fournier, P. E. (2014). A polyphasic strategy incorporating genomic data for the

- taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 384-391.
- Reiter, B., & Sessitsch, A. (2006). Bacterial endophytes of the wildflower *Crocus albiflorus* analyzed by characterization of isolates and by a cultivation-independent approach. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(2), 140-149.
- Rungin, S., Indananda, C., Suttiviriya, P., Kruasuwan, W., Jaemsaeng, R., & Thamchaipenet, A. (2012). Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). *Antonie van Leeuwenhoek*, 102, 463-472.
- Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P. A., Javid, M. G., Dalvand, Y., & Askari, H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1503-1509.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Schleifer, K. H., & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, 36(4), 407-477.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are Endophytes? *Microbial Root Endophytes*, 1-13.
- Shaik, M., Girija Sankar, G., Iswarya, M., & Rajitha, P. (2017). Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 87-94.
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species¹. *International journal of systematic bacteriology*, 16(3), 313-340.
- Shrivastava, U. P., & Kumar, A. (2011). Biochemical characterization of siderophore producing plant growth promoting rhizobacteria of rhizosphere. *Nepalese Journal of Integrated Sciences*, 1, 31-37.
- Singh, J., Singh, S., Vig, A. P., Bhat, S. A., Hundal, S. S., Yin, R., & Schädler, M. (2018). Conventional farming reduces the activity of earthworms: Assessment of genotoxicity test of soil and vermicast. *Agriculture and Natural Resources*, 52(4), 366-370.
- Singh, R., Sharma, R. R., Kumar, S., Gupta, R. K., & Patil, R. T. (2008). Vermicompost substitution

- influences growth, physiological disorders, fruit yield and quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Bioresource Technology*, 99(17), 8507-8511.
- Singh, S. P., Gupta, R., Gaur, R., & Srivastava, A. K. (2015). Antagonistic actinomycetes mediated resistance in *Solanum lycopersicon* Mill. Against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87(3), 789-798.
- Stackebrandt, E., & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33, 152-155.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International journal of systematic bacteriology*, 44(4), 846-849.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67, 257-268.
- Tan, H. M., Cao, L. X., He, Z. F., Su, G. J., Lin, B., & Zhou, S. N. (2006). Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* in vitro. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 22, 1275-1280.
- Teaumroong, N., Boonkerd, N., & Haselwandter, K. (1996). Effect of the iron sources on the siderophore produced from *Bacillus polymyxa*. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 3, 133-137
- Tunca, S., Barreiro, C., Sola-Landa, A., Coque, J. J., & Martin, J. F. (2007). Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the *desA* gene. *Federation of European Biochemical Societies*, 274(4), 1110-1122.
- Uchida, K., & Aida, K. (1979). Taxonomic significance of cell-wall type in *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia* group by a glycolate test. *Journal of General and Applied Microbiology*, 25, 169-183.
- Ulrich, K., Ulrich, A., & Ewald, D. (2008). Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(2), 169-180.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De-Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407-438.

- Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, *97*, 250-256.
- Yan, X., Li, Y., Wang, N., Chen, Y., & Huang, L.-l. (2018). *Streptomyces ginkgonis* sp. nov., an endophyte from *Ginkgo biloba*. *Antonie van Leeuwenhoek*, *111*, 891-896.
- Yasir, M., Aslam, Z., Song, G. C., Bibi, F., Jeon, C. O., & Chung, Y. R. (2009). Chitinophaga vermicomposti sp. nov., with antifungal activity, isolated from vermicompost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*(1), 268-268.
- Zhi, X. Y., Li, W. J., & Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*, 589-608.