



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	ผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของ <i>Vigna radiata</i> The effect of the extracts from the interaction of bacteria on the growth of <i>Vigna radiata</i>
ชื่อนิสิต	นางสาวณัฐชา สวัสดิ์มงคล
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของ

Vigna radiata

The effect of the extracts from the interaction of bacteria on the
growth of *Vigna radiata*

โดย

นางสาวณัฐชา สวัสดิ์มงคล

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

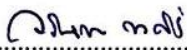
ปีการศึกษา 2560

โครงการ ผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของ *Vigna radiata*

โดย นางสาวณัฐชา สวัสดิ์มงคล

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....  ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร์ ชวศิริ)


.....  อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวพร วินยเวทิน)

.....  กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญฟ้า อุ่นอบ)

รายงานนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....  หัวหน้าภาควิชาเคมี

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ ผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของ *Vigna radiata*
ชื่อนิติในโครงการ นางสาวณัฐชา สวัสดิ์มงคล เลขประจำตัว 5733086523
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวพร วินยเวคิน
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Bacteria : PGPB) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยและเจริญเติบโตร่วมกับพืช โดยมีกลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น การตรึงไนโตรเจน การสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การสร้างสารที่ยับยั้งสารที่เป็นอันตรายต่อพืช เป็นต้น ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่รากพืช (Rhizosphere bacteria) ในกลุ่ม PGPB ต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยเลือกใช้แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ซึ่งมีสมบัติในการย่อยสลายสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ไตรโคลคาร์บอนและไตรโคลซาน การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral-salt medium พบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ เริ่มเข้าสู่ระยะแบ่งตัวทวีคูณที่เวลา 6 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ที่เวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาปริมาณในส่วนของอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MC46 ที่เหมาะสมต่อการนำมาเตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วเขียว *Vigna radiata* พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลวจากการเลี้ยงเชื้อ MC46 20 mL สามารถทำให้ลำต้นพืชโตมากกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่มีสารสกัด เป็น 1.2 เท่า แต่ไม่ส่งผลต่อรากพืชอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สุดท้ายผู้วิจัยนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ โดยมีปริมาตรรวมเป็น 20 mL ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเลี้ยงร่วมกันต่อไปเป็นเวลาอีก 6 ชั่วโมง จนเริ่มเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ และนำสารสกัดเอทิลอะซิเตตของส่วนอาหารเหลวจากปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวมาศึกษาการเจริญเติบโตของรากและลำต้นถั่วเขียว พบว่า สารสกัดเหล่านี้ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรากและลำต้นถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสารสกัดจากอาหารเหลวของแบคทีเรียในอัตราส่วนเดียวกันที่ไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน


คำสำคัญ : แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช, ปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรีย, *Vigna radiata*,
แบคทีเรียรอบรากพืช

Project title The effect of the extracts from the interaction of bacteria on the growth of *Vigna radiata*

Student Name Miss Natcha Sawatmongkol Student ID 5733086523

Advisor Name Assistant Professor Nawaporn Vinayavekhin, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017



Abstract

Plant growth promoting bacteria (PGPB) is a plant-living and growth-promoting bacteria by mechanisms of action of plant growth promoting, such as nitrogen fixation, production of phytohormones and production of chemicals that inhibit the growth of plant, etc. In this research, researchers studied the interaction of rhizosphere PGPB on plant growth. The three bacterial strains: *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 and *Pseudomonas* sp. MS45 were selected for this study, as they can degrade triclocarban and triclosan in the environment. The growth curves of three bacterial strains in Mineral-salt medium (MSM) broth were determined, and it was found that bacterial growth reaches early exponential phase after 6 h of incubation and early stationary phase at 12 h. After that, we evaluated the optimal volume of culture supernatant of MC46 strain for preparation of extracts for studying the growth of mung bean (*Vigna radiata*). It was found that 20 mL of broth from MC46 culture allowed the shoot to grow 1.2-fold more than that from the no-extract control, but it did not statistically significantly affect the growth of plant root. Finally, the three strains of bacteria were mixed together in various ratios for the total volume of 20 mL at 6 h and further incubated for another 6 h until they reached early stationary phase. The culture supernatant was then extracted with ethyl acetate to study its effects on the growth of root and shoot of *Vigna radiata*. The study showed that these extracts did not alter the growth of both root and shoot statistically significantly, compared to the extracts of bacterial supernatant mixed at the same ratio but without interaction.

Keywords: Plant growth promoting bacteria, Interaction of bacteria, *Vigna radiata*,

Rhizosphere bacteria

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากความอนุเคราะห์ของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวพร วินยเวคิน อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ ต่อการดำเนินงานวิจัยนี้ ตลอดจนตรวจทาน แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความใส่ใจตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ อีกทั้งยังได้ให้ข้อคิดและกำลังใจยามท้อแท้ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร์ ขวศิริ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เฟื่องฟ้า อุ่นอบ ที่สละเวลาให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบการวิจัยและตรวจสอบแก้ไขรายงานให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังใน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมี ห้องปฏิบัติการ 604/1 ภาควิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นางสาวปณยา คชพาย นักวิจัยหลังปริญญาเอก และนางสาวภัทราวรรณ ธิ่มม นิสิตปริญญาเอก ในกลุ่มวิจัยของรองศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังใน นางสาววิมลสิริ กองไชย นิสิตปริญญาโท ในกลุ่มวิจัยของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวพร วินยเวคิน ที่ให้ความรู้ คำปรึกษาขณะทำงานวิจัยและช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ ประสบการณ์ และเทคนิคปฏิบัติการอันเป็นพื้นฐานในการทำงานวิจัยตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา และขอระลึกถึงกำลังใจและความช่วยเหลือจากครอบครัวและเพื่อน ๆ รวมถึงบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามมา ณ ที่นี้ จนสามารถดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป	ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.2.1 แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Bacteria or PGPB)	3
1.2.2 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยไรโซแบคทีเรีย	3
1.2.3 กลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช	4
1.2.4 <i>Ochrobactrum</i> sp. MC22	8
1.2.5 <i>Pseudomonas fluorescens</i> MC46	10
1.2.6 <i>Pseudomonas</i> sp. MS45	12
1.2.7 ไตรโคลคาร์บาน	13
1.2.8 ไตรโคลซาน	14

1.2.9 ผลของปฏิสัมพันธ์ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตของพืช	15
1.2.10 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย	18
1.3 วัตถุประสงค์	19
1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับ	19
บทที่ 2 การทดลอง	20
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	20
2.1.1 วัสดุอุปกรณ์พื้นฐานภายใน	20
2.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	21
2.2 สายพันธุ์แบคทีเรียและสารเคมี	21
2.2.1 สายพันธุ์แบคทีเรีย	21
2.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral-salt medium (MSM)	21
2.2.3 อาหารเลี้ยงพืช Hoagland's medium	22
2.2.4 สารเคมี	22
2.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral-salt medium (MSM)	23
2.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (Solid medium)	23
2.3.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (Broth medium)	24
2.3.3 การเตรียม 60% กลีเซอรอล	24
2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงพืช Hoagland's medium	24
2.4.1 การเตรียม Hoagland's stock solution	25
2.4.2 การเตรียม Hoagland's medium	26



2.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM	26
2.6 การเตรียมสต็อกเชื้อแบคทีเรีย (Stock culture)	26
2.7 การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย	26
2.8 การเพาะปลูกพืชในอาหารเลี้ยงพืช Hoagland's medium	27
2.8.1 การงอกเมล็ด (Seed germination)	27
2.8.2 การปลูกพืชในอาหารเลี้ยงพืช Hoagland's medium	27
2.9 การศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย <i>Pseudomonas fluorescens</i> MC46 ที่เหมาะสมต่อการนำมาเตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วเขียว <i>Vigna radiata</i>	28
2.10 การศึกษาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว <i>Vigna radiata</i>	29
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	32
3.1 การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย	32
3.2 การศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย <i>Pseudomonas fluorescens</i> MC46 ที่เหมาะสมต่อการนำมาเตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (<i>Vigna radiata</i>)	35
3.3 การศึกษาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (<i>Vigna radiata</i>)	41
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและการศึกษาในอนาคต	54
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	61
ประวัติผู้วิจัย	74

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารสกัดในสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) และ DMSO ที่ปีเปดต์ลงในอาหารเลี้ยงพืช	29
ตารางที่ 2.2 การผสมอัตราส่วนต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MC46, MC22 และ MS45 เพื่อใช้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (<i>Vigna radiata</i>)	30
ตารางที่ 2.3 การผสมอัตราส่วนต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์ MC22, MC46 และ MS45 เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมการทดลอง	31
ตารางที่ 3.1 Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรีย <i>Ochrobactrum</i> sp	34
ตารางที่ 3.2 ความยาวของรากและลำต้นถั่วเขียว (<i>Vigna radiata</i>) ที่มีปริมาณสารสกัดของเชื้อแบคทีเรีย <i>Pseudomonas fluorescens</i> MC46 ในสารละลาย DMSO หรือ DMSO ที่แตกต่างกัน	37
ตารางที่ 3.3 ค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD ₆₀₀) ของแบคทีเรีย <i>Ochrobactrum</i> sp. MC22, <i>Pseudomonas fluorescens</i> MC46 และ <i>Pseudomonas</i> sp. MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง	42
ตารางที่ 3.4 ค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD ₆₀₀) ของการผสมอัตราส่วนต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MC46, MC22 และ MS45 และชุดควบคุม เพื่อใช้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (<i>Vigna radiata</i>)	44
ตารางที่ 3.5 ค่าเฉลี่ยความยาวของรากถั่วเขียว <i>Vigna radiata</i> ที่มีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่ต่างกัน เทียบกับชุดควบคุม	46
ตารางที่ 3.6 ค่าเฉลี่ยความยาวของรากถั่วเขียว <i>Vigna radiata</i> ที่มีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่ต่างกัน เทียบกับชุดควบคุม	50

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 ไโรโซสเฟียร์ (Rhizosphere) หรือ บริเวณดินรอบรากพืชที่ประกอบไปด้วยกลุ่มของ saprophytic และ symbiotic bacteria และ Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF)	3
รูปที่ 1.2 <i>Ochrobactrum</i> sp. MC22 บริเวณรอบราก <i>Vigna radiata</i> ที่เลี้ยงในอาหาร Hoagland's medium จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	8
รูปที่ 1.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสร้างจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของ <i>Ochrobactrum</i> sp. MC22	9
รูปที่ 1.4 (ก) <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ³⁴ (ข) <i>Pseudomonas fluorescens</i> จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	10
รูปที่ 1.5 สูตรโครงสร้างของ 2,4-Diacetylphloroglucinol	11
รูปที่ 1.6 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสร้างจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของ <i>Pseudomonas fluorescens</i> MC46	12
รูปที่ 1.7 แบคทีเรียสกุล <i>Pseudomonas</i> สายพันธุ์ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	13
รูปที่ 1.8 สูตรโครงสร้างไตรโคลคาร์บาน	14
รูปที่ 1.9 สูตรโครงสร้างไตรโคลซาน	14
รูปที่ 1.10 สูตรโครงสร้าง luteoride D	16
รูปที่ 1.11 สูตรโครงสร้าง pseurotin G	16
รูปที่ 1.12 สูตรโครงสร้างอนุพันธ์ terezine D	17
รูปที่ 1.13 สูตรโครงสร้างอนุพันธ์ 11-O-Methyl pseurotin A	17
รูปที่ 1.14 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย	18

- รูปที่ 3.1 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral-salt medium (MSM) 33
- รูปที่ 3.2 ค่าเฉลี่ยความยาวของรากถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ในแต่ละซ้ำของการปลูกต้นถั่วเขียวที่มีปริมาณของสารสกัดที่แตกต่างกันและชุดควบคุม 39
- รูปที่ 3.3 ค่าเฉลี่ยความยาวของลำต้นถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ในแต่ละซ้ำของการปลูกต้นถั่วเขียวที่มีปริมาณของสารสกัดที่แตกต่างกันและชุดควบคุม 39
- รูปที่ 3.4 ค่าเฉลี่ยความยาวของรากถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ที่มีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่ต่างกัน (สีดำ) เทียบกับชุดควบคุม (สีขาว) 48
- รูปที่ 3.5 ค่าเฉลี่ยความยาวของลำต้นถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ที่มีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่ต่างกัน (สีดำ) เทียบกับชุดควบคุม (สีขาว) 52



สัญลักษณ์และคำย่อ

PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
MSM	Mineral-salt medium
OD ₆₀₀	Optical density at 600 nm



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

แบคทีเรียในดินหลายชนิดอาศัยและเจริญเติบโตร่วมกับพืช แบคทีเรียกลุ่มนี้บางสายพันธุ์มีประโยชน์ต่อพืชเป็นอย่างมาก เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Bacteria : PGPB) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีลักษณะสำคัญและมีกลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลายรูปแบบ อาทิเช่น การตรึงไนโตรเจน การละลายธาตุอาหารในดิน เพื่อเพิ่มการดูดซึมที่ดีขึ้น การสร้างซีเดอรูโรฟอรัส การสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงการสร้างสารยับยั้งสารที่เป็นอันตรายต่อพืช จากคุณสมบัติดังกล่าว จึงอาจนำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาประยุกต์ใช้เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยเลือกใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ (1) *Ochrobactrum* sp. MC22, (2) *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ (3) *Pseudomonas* sp. MS45 แบคทีเรียเหล่านี้เป็น PGPB และอาศัยบริเวณรอบ ๆ รากพืช หรือที่เรียกว่า Rhizobacteria¹ การเจริญของรากจึงได้รับอิทธิพลจากแบคทีเรียเป็นอย่างมาก ทั้งในส่วนของกระบวนการแบ่งเซลล์ รูปแบบการเจริญและลักษณะโครงสร้างของรากพืช รวมทั้งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของลำต้นพืชอีกด้วย² จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Ochrobactrum* sp. MC22³ และ *Pseudomonas fluorescens* MC46⁴ มีความสามารถในการช่วยย่อยสลายสารไตรโคลคาร์บาน ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. MS45⁵ นั้นมีความสามารถในการย่อยสลายสารไตรโคลซาน ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้เป็นสารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในดินและสิ่งแวดล้อม

ไตรโคลคาร์บานและไตรโคลซาน เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมเครื่องอุปโภค และเป็นส่วนประกอบในกลุ่มผลิตภัณฑ์ยาและผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพ สารสองชนิดนี้มีคุณสมบัติคล้ายกันมาก แม้ว่าจะให้ประสิทธิภาพที่แตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์ ไตรโคลคาร์บานถูกใช้อย่างแพร่หลายในสบู่อ่อน ในขณะที่ไตรโคลซานถูกพบได้บ่อยในผลิตภัณฑ์ที่เป็นสบู่เหลว และเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ประเภทน้ำยาบ้วนปากและยาสีฟัน อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารไตรโคลคาร์บานและไตรโคลซานเป็นพิษต่อระบบอวัยวะ ระบบการทำงานของต่อมไร้ท่อในมนุษย์⁶ เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำและก่อให้เกิดการสะสมทางชีวภาพในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ รายงานยังระบุถึงผลกระทบของ

การปนเปื้อนของสารไตรโคลคาร์บอนในกากชีวภาพที่ได้รับการบำบัด ที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดและการเติบโตของพืชบางชนิดอีกด้วย⁷

พืชในวงศ์ *Leguminosae* หรือพืชตระกูลถั่ว เป็นพืชที่ใช้แพร่หลายในพื้นที่เกษตรกรรมหลายแห่งเพื่อใช้บำบัดดินจากมลพิษต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยเลือกใช้ถั่วเขียว (*Vigna Radiata*) ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากพืชตระกูลถั่วมีคุณสมบัติพิเศษคือใช้ระยะเวลาในการเพาะปลูกไม่นาน ช่วยบำรุงความอุดมสมบูรณ์ของดิน ช่วยตรึงไนโตรเจนได้ดี รวมทั้งมีระบบรากที่ลึก มีอัตราของชีวมวลที่สูง และยังมีความสัมพันธ์แบบอยู่ร่วมกันกับแบคทีเรียในดิน⁸

สำหรับการใช้เชื้อหลายสายพันธุ์ในการบำบัดดินร่วมกันนั้น งานวิจัยที่ผ่านมาโดย Chatterjee และคณะ⁹ ได้ศึกษาผลของการใช้แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ร่วมกัน ได้แก่ *Bacillus firmus* KUCr1, *Cellulosimicrobium cellulans* KUCr3 และ *Pseudomonas aeruginosa* KUCd1 ต่อการเจริญเติบโตของ *Amaranthus caudatus* L. พบว่าการใช้เชื้อสายพันธุ์ KUCd1 และ KUCr3 ร่วมกันทำให้เกิดการสร้าง indole acetic acid (IAA)¹⁰ เพิ่มมากขึ้น ซึ่งช่วยให้เกิดการขยายตัวของเซลล์พืช และกระตุ้นให้เซลล์พืชสร้างผนังเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการขยายตัวของใบและการยืดยาวของราก¹¹ นอกจากนี้ การใช้เชื้อร่วมกัน 3 สายพันธุ์ ยังทำให้เกิดการผลิตซิเตอร์โรฟอร์¹² ซึ่งเป็นสารแย่งจับเหล็กจากเชื้อที่ก่อโรคเพิ่มมากขึ้นจากการใช้เชื้อแบบเดี่ยวอีกด้วย⁹

ในงานวิจัยนี้ ทีมวิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในกลุ่ม PGPB ที่มีความสามารถในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และมีความสามารถในการย่อยสลายสารไตรโคลคาร์บอนและสารไตรโคลซานได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ochrobactrum* sp. MC22³, *Pseudomonas fluorescens* MC46⁴ และ *Pseudomonas* sp. MS45⁵ ถึงแม้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้จะเป็น PGPB แต่ยังไม่มีการรายงานว่า หากใช้แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์นี้ร่วมกัน จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชอย่างไร หรือควรผสมแบคทีเรียเหล่านี้ในสัดส่วนเท่าไร หากสำเร็จ การใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้ในการบำบัดดินและในการเกษตรจะช่วยยกระดับคุณภาพการเพาะปลูกพืชทางการเกษตร โดยเฉพาะระดับรากและลำต้นพืช ช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรและช่วยลดการใช้สารเคมี ส่งผลให้กระบวนการผลิตเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม รวมถึงเป็นการพัฒนาเกษตรกรรมควบคู่ไปกับการพัฒนาคุณภาพชีวิตของเกษตรกรและผู้บริโภคอย่างยั่งยืน

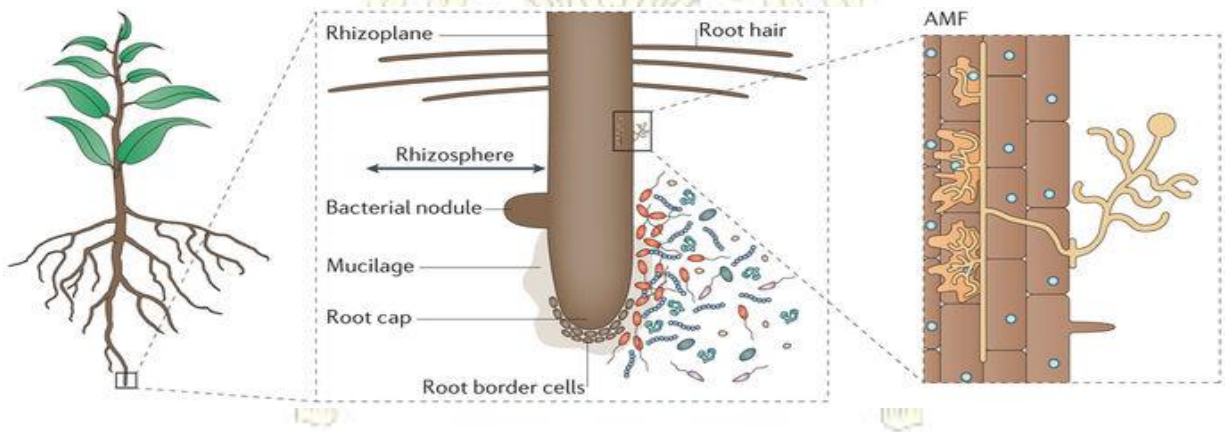
1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Bacteria or PGPB)

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช มีลักษณะสำคัญต่อพืชหลายรูปแบบ เช่น การครอบครองรากพืช การอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย เพิ่มจำนวนรากพืช และสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ เป็นต้น ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้พัฒนากลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลากหลายรูปแบบ เช่น การตรึงไนโตรเจน การละลายธาตุอาหารพืช การสร้างซีเดอโรฟออร์ (siderophore) การสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การสร้างสารปฏิชีวนะ และการสร้างสารยับยั้งเชื้อราที่เป็นอันตรายต่อพืช¹³

1.2.2 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยไรโซแบคทีเรีย

ไรโซสเฟียร์ (Rhizosphere) หมายถึง ดินบริเวณรอบรากพืชที่มีสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพที่ได้รับอิทธิพลจากพืช โดยพืชปลดปล่อยสารเมแทบอลิต์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมออกจากรากไปสู่ดินบริเวณโดยรอบ สารเมแทบอลิต์เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล คาร์โบไฮเดรต วิตามิน โปรตีน และกรดอินทรีย์ แบคทีเรียที่อาศัยบริเวณไรโซสเฟียร์หรือไรโซแบคทีเรียสามารถนำสารต่างๆที่หลั่งออกจากรากพืชนี้ ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตได้¹⁴



รูปที่ 1.1 ไรโซสเฟียร์ (Rhizosphere) หรือ บริเวณดินรอบรากพืชที่ประกอบไปด้วยกลุ่มของ saprophytic และ symbiotic bacteria และ Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF)¹⁵

ในทางกลับกัน กลุ่มแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณไรโซสเฟียร์หรือไรโซแบคทีเรียสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นกัน โดยไรโซสเฟียร์จะช่วยเพิ่มปริมาณธาตุอาหารหรือเพิ่มการละลายของธาตุอาหารในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์มากขึ้น ช่วยดูดซับธาตุอาหาร หรือช่วยสร้างสารประกอบบางชนิดที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เพราะเหตุนี้ เราจึงอาจเรียกไรโซแบคทีเรียเหล่านี้ว่า Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ได้เช่นกัน เราสามารถแบ่งไรโซแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) ได้เป็น 2 ประเภท คือ ไรโซแบคทีเรียที่สามารถเข้าสู่รากพืชได้และไรโซแบคทีเรียที่อาศัยแบบอิสระในดิน (free-live form) ซึ่งจะพบอยู่ใกล้ๆ บริเวณรอบรากพืช¹⁶

1.2.3 กลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

กลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมีทั้งทางตรงและทางอ้อม ดังนี้^{17,18}

1.2.3.1 กลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางตรง

1) การเพิ่มธาตุไนโตรเจน

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixing organism) สามารถเพิ่มปริมาณธาตุไนโตรเจนให้แก่พืชได้ โดยการเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นแอมโมเนียที่พืชสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต ตัวอย่างของแบคทีเรียประเภทนี้ ได้แก่ ไรโซเบียม ในปมรากของพืชตระกูลถั่ว¹⁹

2) การเพิ่มธาตุฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยฟอสฟอรัสจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแป้ง การถ่ายทอดพันธุกรรม การตรึงไนโตรเจน การออกดอก การออกผล การออกเมล็ด และการสุกของผล

พืชที่ขาดธาตุฟอสฟอรัสจะหยุดการเจริญเติบโต มีลำต้นแคระแกรน มีใบขนาดเล็ก และมีจำนวนใบลดลง²⁰ ธาตุฟอสฟอรัสที่อยู่ในดินทั่วไปจะอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้น้อย โดยในสภาพดินที่เป็นกรด ฟอสฟอรัสจะถูกตรึงกับธาตุอะลูมิเนียมและธาตุเหล็กในรูปของ ferric phosphate (FePO_4) และ aluminum phosphate (AlPO_4) ในขณะที่ในสภาพดินที่เป็นด่าง ฟอสฟอรัสจะถูกตรึงกับธาตุแคลเซียม ในรูปของ calcium orthophosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย

ในปี ค.ศ.1986 Goldstein และคณะ²¹ พบว่า แบคทีเรียหลายชนิดสามารถผลิตกรดอินทรีย์ โมเลกุลเล็กๆ (organic acid metabolites) หรือ เอนไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatases) เพื่อใช้ในการย่อยสลายฟอสเฟตในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้และยังสามารถผลิตฮอร์โมนที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งการเจริญเติบโตของพืชมีผลโดยตรงมาจากปริมาณของฮอร์โมนโดยเฉพาะ indole3-acetic-acid (IAA) ภายในต้นพืชโดยส่งผลให้เซลล์พืชยืดยาวและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับธาตุอาหารจากดินของพืช²²

3) การผลิตฮอร์โมนพืช (Phytohormones)

แบคทีเรียทั้งที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในดินและพวกที่ทำอันตรกิริยากับพืชหลากหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช ทั้งที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในดินหรือพวกที่ทำอันตรกิริยากับพืช โดยฮอร์โมนพืชที่แบคทีเรียผลิตขึ้น ได้แก่ ออกซิน (auxin) จิบเบอเรลลิน (Gibberillin) ไซโตไคนิน (cytokinin) เอทิลีน (ethylene) และกรดแอบไซซิก (abscisic acid) การผลิตฮอร์โมนพืชของแบคทีเรียมีส่วนในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในด้านต่างๆ เช่น การเจริญเติบโตของต้นพืช การติดดอก การออกผล และการหลุดร่วงของใบพืช เป็นต้น ซึ่งออกซิน เป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มที่ได้มีการศึกษาและนำไปใช้ในทางการเกษตรมากที่สุด

ออกซินเป็นฮอร์โมนพืชที่อยู่ในรูปสารเคมีที่เรียกว่า Indole-3-acetic acid หรือ IAA ซึ่งถูกสร้างขึ้นบริเวณปลายยอด ใบอ่อน และเมล็ด²³ ออกซินมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ดังนี้²⁴

(1) กระตุ้นการแบ่งเซลล์ ออกซินช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์แคมเบียม (cambium) ทำให้พืชมีเนื้อไม้มากขึ้น และเกิดการเจริญเติบโตด้านข้างเพิ่มขึ้น

(2) เร่งการขยายตัวของเซลล์ ออกซินช่วยให้เซลล์ในส่วนต่างๆ ของพืชยืดยาว และกระตุ้นให้เซลล์สร้างผนังเซลล์มากขึ้น

(3) ควบคุมการแตกของราก ออกซินสามารถกระตุ้นให้เกิดรากพิเศษ (adventitious root) และเนื้อเยื่อเจริญของรากได้

(4) ควบคุมการร่วงของใบ ดอก และผล เมื่ออวัยวะดังกล่าวแก่ตัวลง จากการลดการสร้างออกซินในส่วนดังกล่าว

4) การผลิตซิเดอโรฟออร์ (siderophores)

ซิเดอโรฟออร์ เป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กที่มีสมบัติเป็นคีเลต และเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรีย ในภาวะที่มีการละลายของเหล็กในดินต่ำ²⁵ ในธรรมชาติ เหล็กส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของแข็ง ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ หรือไม่ละลายน้ำเลย²⁶ การเกิดสารประกอบคีเลตระหว่างเหล็กกับซิเดอโรฟออร์ที่ถูกสร้างขึ้นจะทำให้เหล็กอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ พืชและแบคทีเรียจึงสามารถนำเหล็กไปใช้ประโยชน์ได้

ซิเดอโรฟออร์มีโครงสร้างหลายลักษณะ ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ผลิต ในปัจจุบันพบโครงสร้างทางเคมีของซิเดอโรฟออร์มากกว่า 500 ชนิด²⁷ เราสามารถจำแนกซิเดอโรฟออร์ได้ตามหมู่ฟังก์ชันและประเภทของลิแกนด์ที่ล้อมรอบ ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 ประเภท ได้แก่ Phenol Catecholate Hydroxamate Carboxylate และ Pyoverdine²⁸ ทั้งนี้ในแต่ละประเภทจะมีออกซิเจนอย่างน้อย 2 อะตอม หรือไนโตรเจนที่ทำหน้าที่สร้างพันธะกับเหล็ก

กลไกการขนส่งเหล็กจากภายนอกเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียแตกต่างไปจากกลไกที่ใช้ในการขนส่งกรดอะมิโน น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและสารอื่นๆ ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำที่มีการขนส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane pore) โดยกลไกการขนส่งเหล็กของซิเดอโรฟออร์จะอาศัยโปรตีนชนิดพิเศษที่มีความสามารถจำเพาะต่อสารประกอบเหล็กซิเดอโรฟออร์ ซึ่งจะอยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (cytoplasmic membrane) หรือไซโตพลาสซึม (cytoplasm)²⁹ กลไกการนำเหล็กเข้าสู่เซลล์โดยโมเลกุลของซิเดอโรฟออร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

- (1) การสังเคราะห์โมเลกุลของซิเดอโรฟออร์และแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกไปสู่สิ่งแวดล้อม
- (2) โมเลกุลของซิเดอโรฟออร์เข้าจับกับเฟอริกไอออนเกิดเป็นสารประกอบคีเลตเหล็กซิเดอโรฟออร์ และถูกดึงกลับเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการลำเลียงแบบใช้พลังงาน
- (3) ปลดปล่อยโมเลกุลของซิเดอโรฟออร์ออกสู่ภายนอกเซลล์

เมื่อโมเลกุลของซิเดอโรฟออร์เข้าจับกับเฟอริกไอออนแล้ว โมเลกุลของซิเดอโรฟออร์จะจับกับโปรตีนที่ผนังเซลล์ จากนั้นจะถูกขนย้ายผ่านผนังเซลล์ โดยกระบวนการลำเลียงแบบใช้พลังงาน โดยซิเดอโรฟออร์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนที่ผนังเซลล์แตกต่างกันออกไป เมื่อโมเลกุลของสารประกอบเหล็กซิเดอโรฟออร์ถูกเคลื่อนย้ายผ่านผนังเซลล์เข้ามายังไซโตพลาสซึม เฟอริกไอออนก็จะถูกปลดปล่อยออกจากโมเลกุลของซิเดอโรฟออร์โดยบริเวณโมเลกุลที่เป็นลิแกนด์ที่เชื่อมกับเฟอริกไอออนจะถูกสลายด้วยเอนไซม์

เช่น เอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) จะเข้าทำปฏิกิริยากับซิติเตอร์โรฟอร์กลุ่ม เอสเทอเรสหรือเอ็นเทอโรแบคติน (enterobactin) หรือเพอริกโอออนอาจจะถูกปลดปล่อยโดยเกิดปฏิกิริยารีดักชัน เมื่อเพอริกโอออนถูกปลดปล่อยออกจากโมเลกุลของซิติเตอร์โรฟอร์แล้ว ส่วนที่เป็นโมเลกุลของซิติเตอร์โรฟอร์ก็อาจถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปจากเดิมหรือไม่ก็ได้ แล้วจึงถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์ไปสู่สิ่งแวดล้อมเพื่อจับกับเพอริกโอออนต่อไป³⁰

1.2.3.2 กลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางอ้อม

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางอ้อม คือ การควบคุมแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช หรือแบคทีเรียที่มีส่วนยับยั้งการเจริญเติบโต หรือทำให้รากพืชผิดปกติ โดยการใช้แบคทีเรียต่างสายพันธุ์ซึ่งมีกลไกในการควบคุม ลดปริมาณ ยับยั้ง หรือกำจัดแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อพืช²⁷

1) การผลิตสารปฏิชีวนะ (Antibiotic)

หนึ่งในกลไกที่สำคัญที่ PGPR ใช้ป้องกันการแพร่พันธุ์ หรือขยายจำนวนของเชื้อโรคพืชคือความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย PGPR ได้แก่ agrocin 84, 2,4-diacetylphloroglucinol, herbicolin, phenazines, pyoluteorin, pyrrolnitrin เป็นต้น

2) การผลิตสารต้านเชื้อรา (Antifungal metabolites)

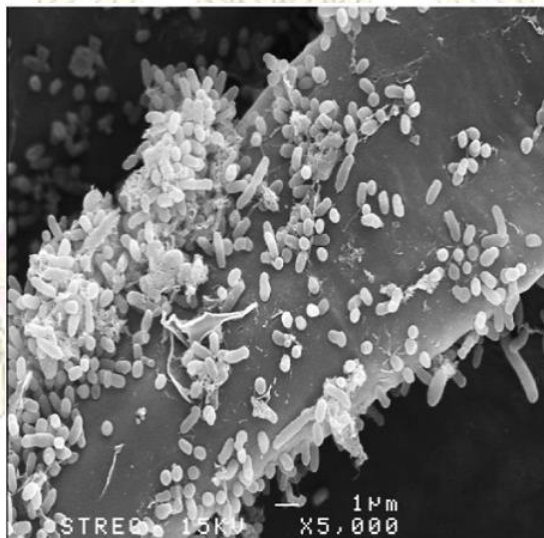
สารต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ชะลอการเจริญเติบโตหรือทำลายจุลินทรีย์ จึงช่วยลดการเน่าเสียของรากพืชที่เกิดจากจุลินทรีย์ กลไกในการทำงานของสารต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ประกอบด้วย การทำให้สมบัติของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ หรือประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เสียหาย ทำให้จุลินทรีย์ชะงักการเจริญเติบโตและตายในที่สุด หรือการเปลี่ยนกลไกทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์นั้นหยุดชะงักการแบ่งเซลล์ จุลินทรีย์จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ และทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์ลดลง

สำหรับ PGPR นอกจากจะสามารถผลิตซิติเตอร์โรฟอร์ และสารปฏิชีวนะซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการต้านทานเชื้อโรคพืชแล้ว PGPR บางชนิดยังสามารถผลิตสารต้านทานเชื้อราสาเหตุของโรคพืชได้ด้วย เช่น *Pseudomonas fluorescens* สามารถสังเคราะห์ไฮโดรเจนไซยาไนด์ ซึ่งทำให้ *P. fluorescens* สายพันธุ์นี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Thielabiopsis basicola* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าในเมล็ดยาสูบได้³¹

ในปี ค.ศ. 2001 Ramamoorthy และคณะ³² พบว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์รวมทั้ง *Cladosporium werneckii*, *Pseudomonas cepacia* และ *P. solanacearum* สามารถย่อยสลายสารประกอบ fusaric acid ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความเสียหายในพืชหลังจากที่พืชถูกเข้าทำลายโดยเชื้อรา *Fusarium* ได้

1.2.4 *Ochrobactrum* sp. MC22

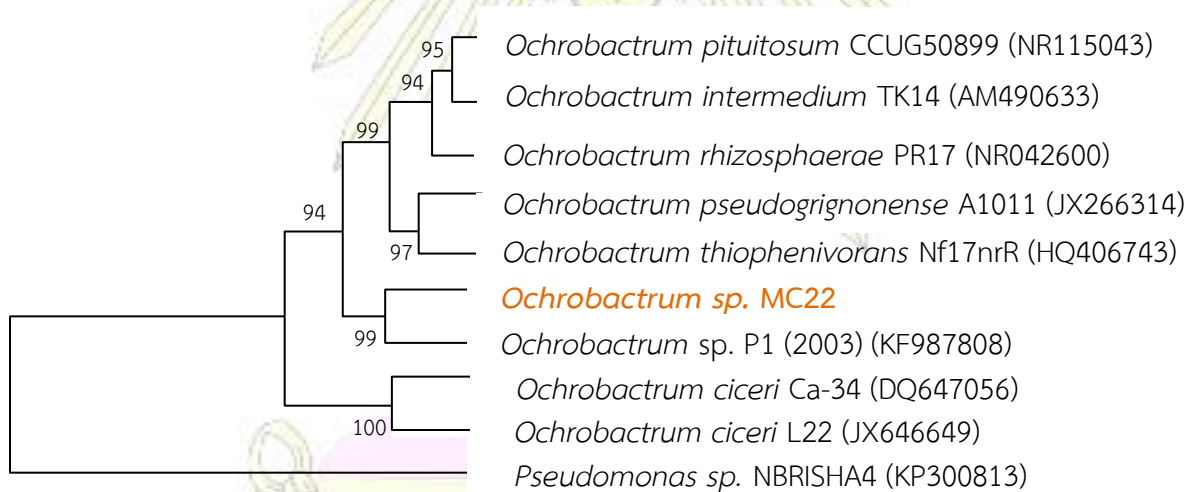
Ochrobactrum sp. อยู่ในวงศ์ Brucellaceae มีลักษณะเป็นท่อน (rod-shape) หรือโค้งเล็กน้อย ปลายมน ติดสีแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้เพอริทริคัสแฟล็กเจลลา (peritrichous flagella) ซึ่งเป็นแฟล็กเจลลายื่นออกมารอบๆ เซลล์ เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (strictly aerobes) ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) ในกระบวนการเมแทบอลิซึม อุณหภูมิที่แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือช่วงตั้งแต่ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส มีค่าโมลเปอร์เซ็นต์ G + C ของ DNA เท่ากับ 56-59 เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถใช้สารอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ และคาร์โบไฮเดรต เป็นทั้งแหล่งพลังงานและแหล่งอิเล็กตรอน (chemoorganotrophs) ได้ สร้างพลังงานแบบออกซิเดทีฟ ฟอสโฟริเลชัน (oxidative phosphorylation) จึงให้ผลบวกกับการทดสอบเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (cytochrome oxidase test) และในภาวะที่ไม่มีอากาศจะไม่มีกรหมัก (fermentation) น้ำตาลกลูโคสขึ้น



รูปที่ 1.2 *Ochrobactrum* sp. MC22 บริเวณรอบราก *Vigna radiata* ที่เลี้ยงในอาหาร Hoagland's medium จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด³

ในปี ค.ศ. 2017 Sipahutar, M. K. และคณะ³ ได้ศึกษาและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไตรโคลคาร์บานได้จากตัวอย่างดินในแปลงปลูกฝรั่ง (*Psidium guajava*) คณะได้จำแนกชนิดของแบคทีเรียจากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA และระบุว่าแบคทีเรียที่แยกได้ เป็นสมาชิกหนึ่งในสกุล *Ochrobactrum* (KT808621) และให้ชื่อสายพันธุ์ว่า MC22 สำหรับการวิเคราะห์ทางอนุกรมวิธานพบว่าเชื้อแบคทีเรีย MC22 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Ochrobactrum* ที่อาศัยอยู่ในดินสำหรับการย่อยสลายสารที่เป็นพิษ (รูปที่ 1.3)

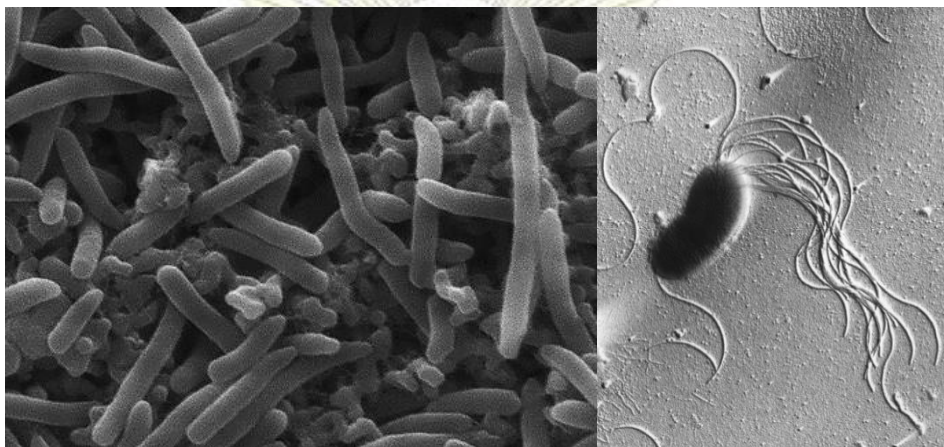
ตัวอย่างเช่น *Ochrobactrum* sp. P1 (2013) (KF987808) มีความสามารถในการย่อยสลายสารเฮกซะเดคเคน (hexadecane-degrading bacterium)³ เฮกซะเดคเคนเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำเมื่อปนเปื้อนในดิน จึงทำให้เกิดการสะสมเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ส่วนแบคทีเรียอีกชนิดคือ *Ochrobactrum pituitosum* CCUG50899 (NR115043) เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไนเตรท (nitrate-reducing bacterium) ที่อาศัยในบริเวณเขตอุตสาหกรรม³³



รูปที่ 1.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสร้างจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของ *Ochrobactrum* sp. MC22³

1.2.5 *Pseudomonas fluorescens* MC46

แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* อยู่ในวงศ์ Pseudomonadaceae มีรูปร่างลักษณะเป็นท่อนตรง (rod-shaped) หรือโคงค์เล็กน้อย (ไม่มีลักษณะเป็นเกลียว) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ (polar flagella) (รูปที่ 1.4) ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ (non – spore forming) เจริญเติบโตได้ในภาวะที่มีออกซิเจนและเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส พบได้ทั่วไปในดินและแหล่งน้ำธรรมชาติ



(ก)

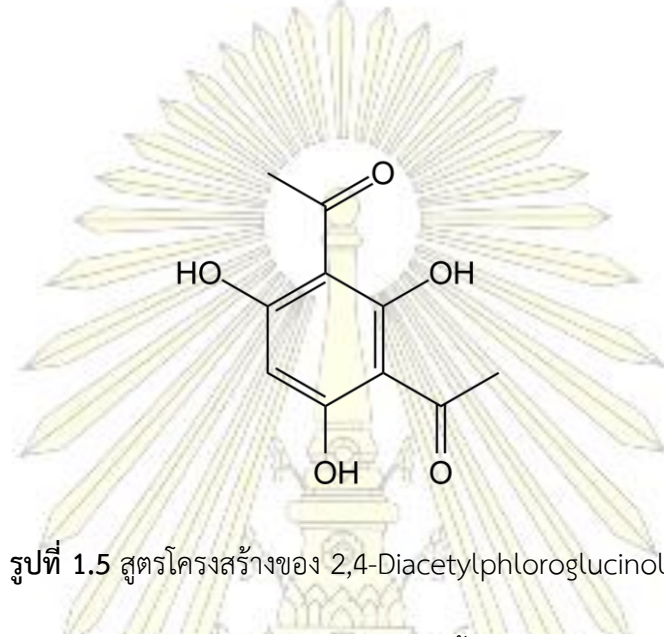
(ข)

รูปที่ 1.4 (ก) *Pseudomonas fluorescens* CHAO จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด³⁴

(ข) *Pseudomonas fluorescens* จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน³⁵

เชื้อ *Pseudomonas* หลายชนิดเป็นไรโซแบคทีเรีย (rhizobacteria) ที่อาศัยในดินบริเวณรากพืช เป็นเชื้อที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในดิน โดยกลไกต่างๆที่เชื้อ *Pseudomonas* ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ การผลิตยาปฏิชีวนะ แบคทีริโอซิน (bacteriocin) ซิเตอร์โรฟออร์ และเอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic enzyme) เช่น β -1,3-glucanase และไคตินเนส (chitinases) เป็นต้น นอกจากการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแล้ว ในปี ค.ศ.1996 Pierson และคณะ³⁶ ยังรายงานว่า *Pseudomonas aureofaciens* สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วรอบรากข้าวสาลี ซึ่งช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้

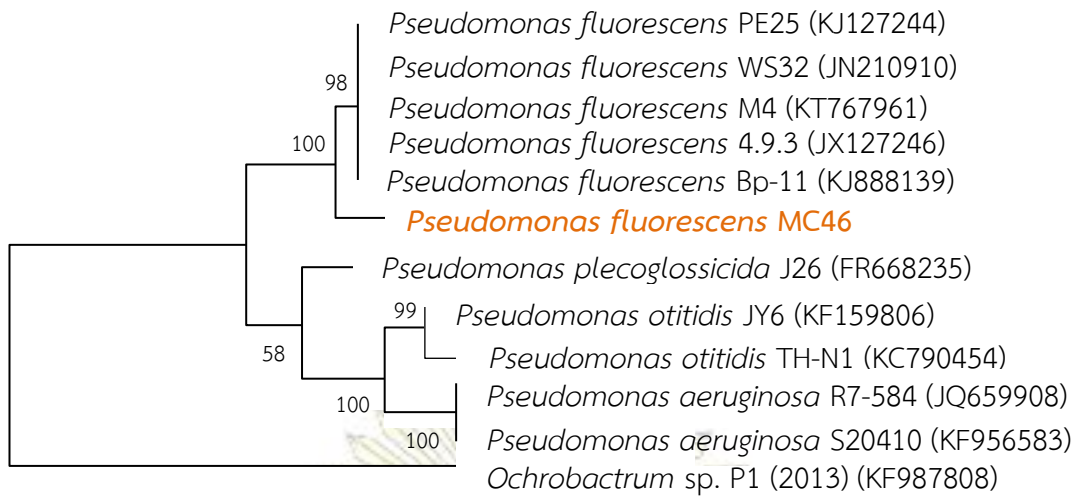
ในปี ค.ศ. 2002 Kumar, R. และคณะ³⁷ รายงานว่า *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR สามารถสร้างสาร 2,4-diacetyl phloroglucinol (รูปที่ 1.5) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ โดยสารเหล่านี้จะไปสลาย fusaric acid ที่ผลิตโดยเชื้อ *Fusarium* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพืชหลายชนิด ทำให้ป้องกันกระบวนการพยาธิกำเนิด (pathogenesis) ได้ นอกจากนี้ PGPR บางชนิด เช่น *Pseudomonas stutzeri* ยังสามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) และเอนไซม์ลามินารินเนส (laminarinase) ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อทำลายเส้นใยของ *Fusarium solani* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้



รูปที่ 1.5 สูตรโครงสร้างของ 2,4-Diacetylphloroglucinol

ในปี ค.ศ. 2018 Sipahutar, M. K. และคณะ⁴ แยกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ MC46 ที่มีสมบัติในการย่อยสลายสารไตรโคลคาร์บอน จากดินบริเวณรอบรากของถั่วฝักยาว *Vigna unguiculata* subsp. *Sesquipedalis* ในภาคกลางของประเทศไทย คณะได้จำแนกชนิดของแบคทีเรียจากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA และระบุว่าแบคทีเรียที่แยกได้ เป็นสมาชิกหนึ่งในสกุล *Pseudomonas* (MF164046) และให้ชื่อสายพันธุ์ว่า MC46 สำหรับการวิเคราะห์ทางอนุกรมวิธานพบว่าเชื้อแบคทีเรีย MC46 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* ที่อาศัยอยู่ในดินที่ยับยั้งการก่อโรคในพืชได้และย่อยสลายสารที่เป็นพิษได้ (รูปที่ 1.6)

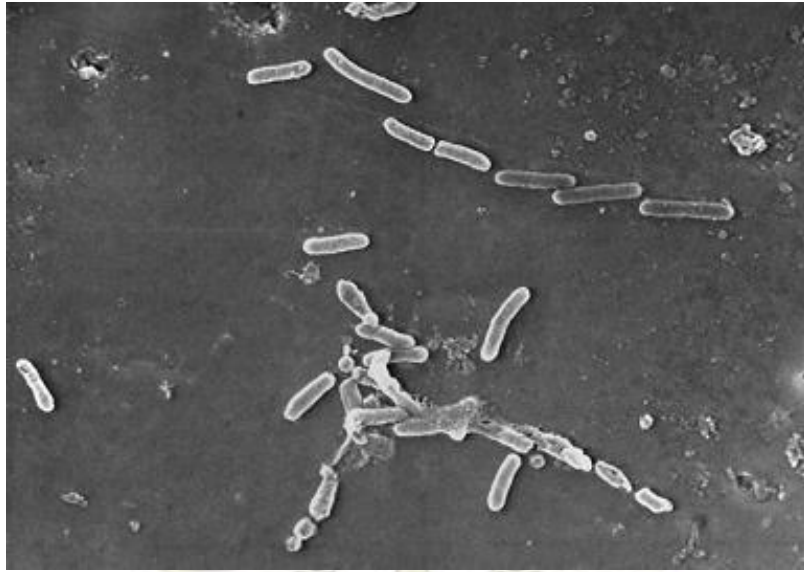
ตัวอย่างเช่น *P. fluorescens* สายพันธุ์ CHA0 สามารถยับยั้งโรค damping-off ของต้นแคสที่เกิดจาก *Pythium ultimum* ได้³⁸ นอกจากนี้ มีการรายงานการควบคุมโรคเหี่ยวของถั่วเขียว โดยสารปฏิชีวนะที่ *P. fluorescens* สร้างขึ้น ได้แก่ pyoluteorin, phenazines, herbicolin และ 2,4-diacetyl phloroglucinol³⁹ (รูปที่ 1.5)



รูปที่ 1.6 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสร้างจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของ *Pseudomonas fluorescens* MC46⁴

1.2.6 *Pseudomonas* sp. MS45

เชื้อ *Pseudomonas* พบอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ทั้งในดิน น้ำ พืช และสัตว์ รวมทั้งสามารถพบได้ในอาหาร และของใช้ต่างๆ หลายสปีชีส์พบเป็นเชื้อก่อโรคในพืชและสัตว์ เชื้อ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างตรง หรือโค้งเล็กน้อย มักพบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นเซลล์คู่ ไม่สร้างสปอร์ บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลได้ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่ส่วนปลายเซลล์ 1 เส้น บางสปีชีส์อาจมีมากกว่า 1 เส้น จัดอยู่ในกลุ่ม Obligate Aerobe จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต ซึ่งทำให้มีการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase-positive) และเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase-positive) มีปริมาณ G+C ของแบคทีเรียเท่ากับ 50-70 โมลเปอร์เซ็นต์ แต่บางสายพันธุ์เจริญได้ในบรรยากาศที่ไม่มีแก๊สออกซิเจน หากมีสารไนเตรทหรืออาร์จินีนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจนในกระบวนการหายใจ แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า⁴⁰



รูปที่ 1.7 แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* สายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* จากกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องกราด⁴⁰

จากการทดลองที่ผ่านมา ทีมวิจัยจากห้องปฏิบัติการของ รองศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังใน
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ศึกษาและแยกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas*
sp. สายพันธุ์ MS45 เนื่องจากคุณสมบัติของมันในการย่อยสลายสารไตรโคลซาน (triclosan-degrading
bacterium) ที่ปนเปื้อนในดินและสิ่งแวดล้อม⁵

1.2.7 ไตรโคลคาร์บาน

ไตรโคลคาร์บาน (Triclocarban) หรือ 3,4,4'-trichlorocarbanilide (รูปที่ 1.8) เป็นสารที่มี
คุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* ไตรโคลคาร์บานมี
ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ enoyl-(acyl-carrier protein) (ACP) reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบได้
มากในแบคทีเรีย รา และพืช โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะใช้เอนไซม์ ACP reductase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอน
สุดท้ายของ Fatty acid synthase type II ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ในสิ่งมีชีวิตและ
นำไปสู่การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย⁴¹ เนื่องจากไตรโคลคาร์บานเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียจึงพบ
ได้มากในผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อแบคทีเรียประเภทสบู่และผลิตภัณฑ์สำหรับดูแลสุขภาพ

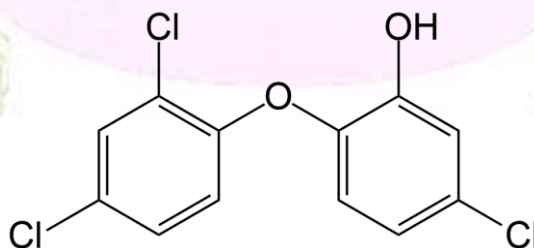
อย่างไรก็ดี ในปี ค.ศ. 2016 องค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา สั่งระงับการผลิตและจำหน่ายผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของไตรโคลคาร์บาน เนื่องจากพบว่า มีผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ เช่น ความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียและความผิดปกติของฮอร์โมนได้⁴²



รูปที่ 1.8 สูตรโครงสร้างไตรโคลคาร์บาน

1.2.8 ไตรโคลซาน

ไตรโคลซาน (Triclosan) หรือ 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol (รูปที่ 1.9) เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยพบว่าไตรโคลซานเป็นสารที่มีคุณสมบัติคล้ายกันมากกับสารไตรโคลคาร์บาน แม้ว่าจะให้ประสิทธิภาพที่แตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์ ไตรโคลซานถูกพบได้บ่อยได้ในผลิตภัณฑ์ที่เป็นสบู่เหลว รวมทั้งถูกใช้อย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อแบคทีเรียประเภทน้ำยาล้างปากและยาสีฟัน อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าสารไตรโคลซานเป็นพิษต่อระบบอวัยวะและรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในมนุษย์⁴³ เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ และก่อให้เกิดการสะสมทางชีวภาพในสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้ องค์การอาหารและยา ในประเทศสหรัฐอเมริกา จึงสั่งระงับการผลิตและจำหน่ายผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของไตรโคลซานเช่นเดียวกับสารไตรโคลคาร์บาน



รูปที่ 1.9 สูตรโครงสร้างไตรโคลซาน

1.2.9 ผลของปฏิสัมพันธ์ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตของพืช

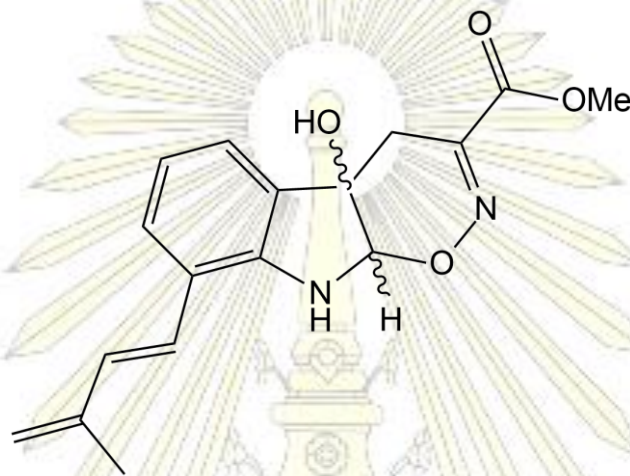
ถั่วเขียว ชื่อวิทยาศาสตร์ *Vigna radiata* (L.) Wilczek เป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ และเป็นที่ยึดกันอย่างแพร่หลาย ส่วนมากปลูกในแถบเอเชียช่วงฤดูร้อน มีระยะการเจริญเติบโตสั้น มีคุณค่าทางโภชนาการที่ดี เนื่องจากให้โปรตีนสูง นอกจากนี้ ถั่วเขียวยังช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินด้วยการตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศจากการมีปฏิสัมพันธ์กับแบคทีเรียในดิน โดยแบคทีเรียที่ถูกรับพบมากในปมรากถั่ว ได้แก่ ไโรโซเปียม, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* และ *Azorhizobium* โดยทั่วไปแบคทีเรียที่ไม่เป็นโรโซเปียม (non-Rhizobial bacteria) จะทำงานร่วมกับโรโซเปียม ทำให้มีการเพิ่มปมรากถั่วที่มากยิ่งขึ้น ทำให้สามารถผลิตสาร indole acetic acid (IAA) ซิเตอร์โรฟออร์ ละลายธาตุฟอสเฟต และตรึงไนโตรเจนในดินได้มากขึ้นอีกด้วย^{44,45}

ในปี ค.ศ. 2009 Mishra และคณะ⁴⁵ คัดแยกเชื้อ PGPB สายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis*-KR1 จากปมรากของต้น *Pueraria thunbergiana* เนื่องจากสายพันธุ์ KR1 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วลันเตาและถั่วเลนทิลได้เป็นอย่างดี จากนั้นเมื่อคณะวิจัยใช้เชื้อ *Bacillus thuringiensis*-KR1 นี้ร่วมกับแบคทีเรียโรโซเปียม *Rhizobium leguminosarum*-PR1 ในการปลูกถั่วลันเตาและถั่วเลนทิล คณะวิจัยพบจำนวนของปมรากที่เพิ่มขึ้นในถั่วทั้ง 2 ชนิด บ่งชี้ถึงความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศมากขึ้น นอกจากนี้ถั่วเหล่านี้ยังมีน้ำหนักราก น้ำหนักลำต้น และมวลชีวภาพที่มากขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้ *Rhizobium leguminosarum*-PR1 เพียงชนิดเดียว

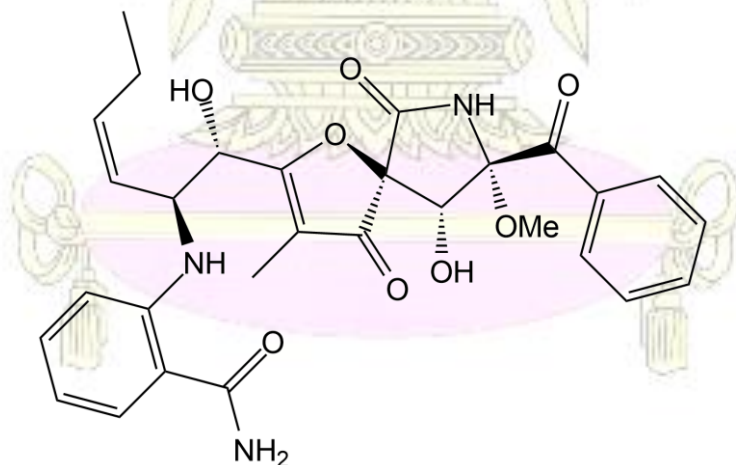
ในปี ค.ศ. 2012 Thi Thi Aung และคณะ⁴⁶ ตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ในดินที่สามารถใช้ร่วมกับแบคทีเรียที่สร้างปมในรากถั่วเหลือง *Bradyrhizobium japonicum* เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองพบว่าสปิซิสที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนปมในรากถั่วเหลือง คือ *Azospirillum* sp. เมื่อเพาะถั่วเหลืองร่วมกับเชื้อ *Azospirillum* sp. และเชื้อ *Bradyrhizobium japonicum* สายพันธุ์ CB1809 หรือ USDA 110 พบว่า ถั่วเหลืองมีจำนวนและน้ำหนักปมเพิ่มขึ้น และให้เมล็ดถั่วปริมาณมากขึ้น เมื่อเทียบกับการใช้เชื้อ *Bradyrhizobium japonicum* สายพันธุ์ CB1809 หรือ USDA 110 เพียงชนิดเดียว

ในปี ค.ศ. 2017 Wakefield, J. และคณะ⁴⁷ ศึกษาการเกิดสารเมแทบอลิโตนใหม่จากการเพาะเชื้อร่วมกันระหว่าง *Aspergillus fumigatus* MR2012 ที่แยกได้จากทะเลและแบคทีเรีย *Streptomyces leeuwenhoekii* จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ C34 และ C58 ซึ่งแยกได้จากทะเลทรายที่แห้งแล้ง พบว่าการเพาะเชื้อร่วมกันระหว่าง MR2012 และแบคทีเรียสายพันธุ์ C34 ทำให้เกิดการผลิตสาร luteoride D

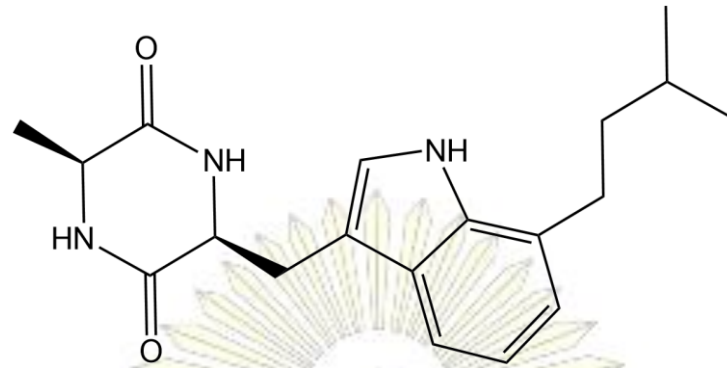
(รูปที่ 1.10) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ luteoride และสาร pseurotin G (รูปที่ 1.11) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ pseurotin และสาร Chaxapeptin ซึ่งไม่มีการรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการผลิตสารเหล่านี้ เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์ MR2012 และ C34 แยกกัน นอกจากนี้ยังพบว่า MR2012 ผลิตสาร terezine D (รูปที่ 1.12) และ 11-O-methylpseurotin (รูปที่ 1.13) ซึ่งเป็นสารที่ไม่ถูกตรวจพบเมื่อเลี้ยง MR2012 เท่านั้นอีกด้วย สำหรับการเพาะเชื้อ *Aspergillus fumigatus* MR2012 ร่วมกับแบคทีเรีย *Streptomyces leeuwenhoekii* สายพันธุ์ C58 พบว่า สายพันธุ์ MR2012 ส่งผลให้สายพันธุ์ C58 ผลิตสาร Chaxapeptin เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า



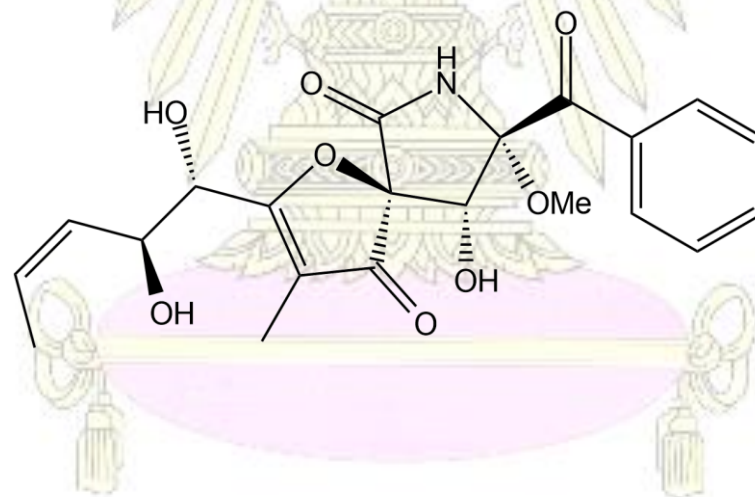
รูปที่ 1.10 สูตรโครงสร้าง luteoride D



รูปที่ 1.11 สูตรโครงสร้าง pseurotin G



รูปที่ 1.12 สูตรโครงสร้างอนุพันธ์ tereazine D

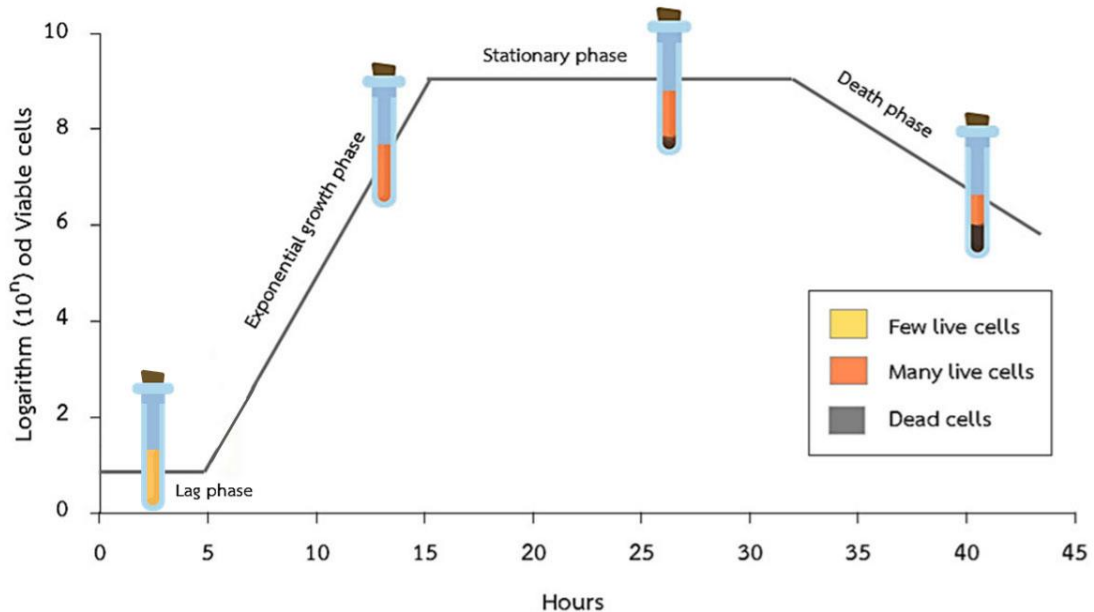


รูปที่ 1.13 สูตรโครงสร้างอนุพันธ์ 11-O-Methyl pseurotin A

1.2.10 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

1.2.10.1 กราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Bacterial Growth Curve)

เมื่อนำแบคทีเรียจำนวนหนึ่งใส่ลงไปในการเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลว จากนั้นจัดสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน ให้เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรีย จะพบว่าแบคทีเรียมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น รูปแบบของการเจริญของแบคทีเรียจะเป็นไป ดังรูปที่ 1.14 ซึ่งสามารถแบ่งเป็นระยะต่างๆ ได้ 4 ระยะ ดังนี้



รูปที่ 1.14 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

1) ระยะพัก (lag phase) เป็นระยะที่เพิ่งใส่แบคทีเรียในการเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะที่แบคทีเรียมีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ ถ้าเชื่อนั้นผิดปกติหรือเป็นเชื้อที่เก็บไว้นาน อาจต้องใช้เวลาในขั้นนี้มากขึ้น ช่วงนี้แบคทีเรียยังไม่เพิ่มจำนวน ไม่แบ่งเซลล์ แต่เซลล์จะเตรียมพร้อมสำหรับการเจริญโดยสังเคราะห์โปรโทพลาสซึม (protoplasm) ใหม่ รวมทั้งเอนไซม์ ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอเพื่อใช้ในกระบวนการทางชีวเคมี

2) ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (exponential or log phase) เป็นระยะที่แบคทีเรียแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ในอัตราคงที่ การแบ่งเซลล์แต่ละครั้งใช้เวลาเท่ากัน ระยะนี้แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนมากที่สุด สารอาหารจะถูกใช้ไปอย่างมากและรวดเร็ว

3) ระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) เป็นระยะที่แบคทีเรียมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และมีการขับของเสียที่เป็นพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism)

4) ระยะเซลล์ตาย (death or decline phase) แบคทีเรียจะมีการตายอย่างรวดเร็ว ซึ่งเกิดจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์หมดไปและเกิดการสะสมของของเสียและสารพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึม

1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 ศึกษาระยะเวลาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral-salt medium (MSM)

1.3.2 ศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas fluorescens* MC46 ที่เหมาะสมต่อการนำมาเตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*)

1.3.3 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของรากและลำต้นของถั่วเขียว (*Vigna radiata*)

1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับ

ทราบอัตราส่วนในการผสมแบคทีเรียสายพันธุ์ *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ที่เหมาะสมในการนำมาเตรียมสารสกัดที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปศึกษาสารเมทาบอลิไตในสารสกัดนี้ที่ยับยั้งหรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 วัสดุอุปกรณ์พื้นฐานภายใน

- 1) ปีกเกอร์
 - 2) หลอดหยด
 - 3) กระจกบอกดวง
 - 4) กรวยแยก ขนาด 500 mL
 - 5) ไมโครปิเปตต์
 - 6) ไมโครปิเปตต์ทีป
 - 7) ขวดสารตัวอย่างขนาด 4 mL 22 mL และ 60 mL พร้อมฝาปิดเทฟลอน
 - 8) จานเพาะเชื้อ
 - 9) ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 450 mL
 - 10) หลอดเซนต์ปีฟิวจ์พลาสติก ขนาด 50 mL
 - 11) หลอดไมโครเซนต์ปีฟิวจ์
 - 12) ขวดเลี้ยงพีช ขนาด 300 mL
 - 13) ขวดก้านกลม ขนาด 250 mL
 - 14) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
 - 15) หลอดทดลอง
 - 16) หลอดทดลองฝาเกลียว
 - 17) คิวเวทท์
 - 18) กระจกเพาะเมล็ด (กระจกทึบ)
 - 19) แท่งแก้วคนสาร
 - 20) ห่วงเชี่ยเชื้อ (Inoculating Loop)
 - 21) อลูมิเนียมฟอยล์
- 

2.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 1) เครื่องชั่งสารทศนิยม 3 ตำแหน่ง
- 2) เครื่องอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer)
- 3) ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)
- 4) เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)
- 5) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator)
- 6) ตู้ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth chamber)
- 7) เครื่องระเหยสารด้วยแก๊สไนโตรเจน (Nitrogen evaporator)
- 8) เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)
- 9) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- 10) ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven)
- 11) เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)
- 12) เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hotplate stirrer)
- 13) ตู้ทำความเย็น (Refrigerator) อุณหภูมิ -80, -20 และ 4 องศาเซลเซียส
- 14) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow clean bench)

2.2 สายพันธุ์แบคทีเรียและสารเคมี

2.2.1 สายพันธุ์แบคทีเรีย

- 1) *Ochrobactrum* sp. สายพันธุ์ MC22
- 2) *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ MC46
- 3) *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ MS45

2.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral-salt medium (MSM)

- 1) $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (AJAX, AR Grade)
- 2) KH_2PO_4 (AJAX, AR Grade)
- 3) $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (AJAX, AR Grade)

- 4) NH_4Cl (M&B, AR)
- 5) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (AJAX, AR Grade)
- 6) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (AJAX, AR Grade)
- 7) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MERCK, ACS, Reag. Ph Eur)
- 8) D-Glucose (AJAX, AR Grade)
- 9) Conc. HCl (MERCK, ACS, ISO, Reag. Ph Eur)
- 10) Agar

2.2.3 อาหารเลี้ยงพืช Hoagland's medium

- 1) KNO_3 (AJAX, AR Grade)
- 2) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (CARLO ERBA, ACS)
- 3) KH_2PO_4 (AJAX, AR Grade)
- 4) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (AJAX, AR Grade)
- 5) Fe-EDTA (Sigma-Aldrich, BioReagent)
- 6) Agar
- 7) Micronutrient stock solution
 - H_3BO_3 (AJAX, AR Grade)
 - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (FLUKA, puriss. p.a. ACS Reagent)
 - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (FLUKA, puriss. p.a. ACS Reagent)
 - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (FLUKA, puriss. p.a. USP Reagent)
 - MoO_3 (ANALAR, AR grade)
- 8) 1 M KOH (AJAX, AR grade)

2.2.4 สารเคมี

- 1) Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 2) Ethyl acetate (EtOAc) (Rci-Labscan, AR grade)
- 3) Acetone (J.T.Baker, ACS Reagent)
- 4) Ethyl alcohol

- 5) Hydrogen peroxide 30% (Merck, ISO)
- 6) Glycerol (AJAX, Univar)
- 7) น้ำปราศจากไอออน (Deionized Water)

2.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral-salt medium (MSM)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium ปริมาตร 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	4.5648	g
KH_2PO_4	3.4023	g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	5.3721	g
NH_4Cl	0.8024	g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.0368	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1232	g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.0014	g
D-Glucose	1	g
ผงวุ้น (Agar)	15	g

ปรับ pH ของสารละลายด้วยสารละลาย HCl เข้มข้นจน pH เท่ากับ 7.0 ± 0.1

2.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (Solid medium)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 200 mL โดยชั่งน้ำหนักตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 mL ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 200 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) จากนั้นปรับ pH ของสารละลายด้วยสารละลาย HCl เข้มข้นให้มี pH เท่ากับ 7.0 ± 0.1 ชั่งผงวุ้น 3 g ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและความดันไอน้ำ (Autoclave)

หลังจากฆ่าเชื้อเสร็จเรียบร้อยแล้ว นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเทลงจานเลี้ยงเชื้อ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 mL สามารถเทลงจานเลี้ยงเชื้อได้ประมาณ 10 จาน

ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมผงวุ้นแข็งตัว (ระวังอย่าให้มีไอน้ำเกาะอยู่ที่ฝาเพราะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้) เก็บในตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (Broth medium)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 800 mL โดยชั่งน้ำหนักตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในบีกเกอร์ขนาด 1,000 mL ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 800 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) จากนั้นปรับ pH ของสารละลายด้วยสารละลาย HCl เข้มข้นให้มี pH เท่ากับ 7.0 ± 0.1 ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวใส่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 450 mL ทั้งหมด 3 ขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและความดันไอน้ำ (Autoclave)

2.3.3 การเตรียม 60% กลีเซอรอล

เตรียม 60% กลีเซอรอล ปริมาตร 20 mL โดยนำกลีเซอรอล ปริมาตร 12 mL ปรับให้มีปริมาตรเป็น 20 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ถ่ายสารละลายที่ได้ลงในหลอดเซนต์ปีทิวส์พลาสติก ขนาด 50 mL นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและความดันไอน้ำ (Autoclave)

2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงพืช Hoagland's medium

อาหารเลี้ยงพืช Hoagland's medium ปริมาตร 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

KNO ₃	0.5055	g
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1.1808	g
KH ₂ PO ₄	0.1361	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4929	g
Fe-EDTA	2 mL ของ 2.5 g / L	
ผงวุ้น (Agar)	0.5 %	
Micronutrient stock solution	1 mL ของ Stock solution	
(ดูด้านล่าง)		

ปรับ pH ของสารละลายด้วย 1 M KOH จน pH เท่ากับ 7.2 ± 0.1

การเตรียม Fe-EDTA ปริมาตร 20 mL ที่ความเข้มข้น 2.5 g/L เตรียมได้โดยชั่ง Fe-EDTA 0.05 g ปรับปริมาตรเป็น 20 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและความดันไอน้ำ (Autoclave)

สำหรับการเตรียม Micronutrient stock solution ปริมาตร 50 mL เตรียมความเข้มข้นของสารละลายใน stock solution ให้มีความเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 20 mL (ยกเว้น stock solution ของ H_3BO_3 ซึ่งไม่ละลายเมื่อเตรียมในความเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 20 mL จึงเตรียมที่ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 200 mL) ดังนี้

สารละลาย	ความเข้มข้น
H_3BO_3	5.72 g / 0.2 L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	3.62 g / 0.02 L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.44 g / 0.02 L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.16 g / 0.02 L
MoO_3	0.04 g / 0.02 L

(เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

ปิเปตต์สายละลาย H_3BO_3 ใส่หลอดเซนติพิวจขนาด 50 mL ปริมาตร 5 mL และสารละลายที่เหลือ ได้แก่ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ และ MoO_3 อย่างละ 0.5 mL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและความดันไอน้ำ (Autoclave)

2.4.1 การเตรียม Hoagland's stock solution

การเตรียม Hoagland's stock solution ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 300 mL ชั่ง KNO_3 0.1517 g, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 0.3542 g, KH_2PO_4 0.0408 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1479 g และ ปิเปตต์ Fe-EDTA ความเข้มข้น 2.5 g/L ปริมาตร 0.6 mL และ Micronutrient stock solution ปริมาตร 0.3 mL ใส่ในขวด ปริมาตร 450 mL ปรับ pH ของสารละลายด้วย 1 M KOH ให้มี pH เท่ากับ 7.2 ± 0.1 ปรับปริมาตรให้เป็น 300 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและความดันไอน้ำ (Autoclave)

2.4.2 การเตรียม Hoagland's medium

การทดลองนี้ใช้ Hoagland's solution ความเข้มข้น 0.1 เท่า เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ซึ่งเตรียมได้โดยนำ Hoagland's stock solution ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 80 mL มาปรับปริมาตรให้เป็น 800 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM

ขีดเชื้อในงานเพาะเชื้อ (MSM solid) ด้วยแบคทีเรีย *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 หรือ *Pseudomonas* sp. MS45 นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังบ่ม จะเห็นการกระจายของเซลล์แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ในแต่ละสายพันธุ์ นำโคโลนีเดี่ยวแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (MSM broth) ปริมาตร 5 mL ในหลอดทดลองฝาเกลียว บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง

2.6 การเตรียมสต็อกเชื้อแบคทีเรีย (Stock culture)

ปิเปตต์เชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงตามหัวข้อ 2.5 แล้ว สายพันธุ์ละ 800 μ L ลงในหลอดไมโครเซนติพิวล์ที่มี 60% glycerol ปริมาตร 400 μ L เก็บในตู้ทำความเย็น -80 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเป็นเชื้อใช้งาน (working stock cultures) ต่อไป

2.7 การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อดังหัวข้อ 2.5 จากนั้นปิเปตต์เชื้อแต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 400 μ L ลงในขวดขนาด 60 mL ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (MSM broth) ปริมาตร 20 mL (สายพันธุ์ละ 3 ขวด) นำไปบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ระหว่างบ่มนำตัวอย่างมาวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ที่เวลา 3, 6, 9, 12 และ 14 ชั่วโมง นำผลที่ได้ทั้ง 3 ขวดมาหาค่าเฉลี่ยและสร้างกราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์

2.8 การเพาะปลูกพืชในอาหารเลี้ยงพืช Hoagland's medium

2.8.1 การงอกเมล็ด (Seed germination)

ทำให้เมล็ดถั่วเขียวปราศจากเชื้อโดยการนำเมล็ดถั่วเขียวใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ 95% เอทานอล ปริมาตร 50 mL เขย่าเป็นเวลา 2 นาที เทเอทานอลทิ้ง จากนั้นใส่น้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไป 50 mL และเขย่าเป็นเวลา 1 นาที เพื่อล้าง 95% เอทานอลออก เทน้ำทิ้ง และใส่ 30% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ปริมาตร 50 mL เขย่าเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้น ล้างเมล็ดถั่วเขียวให้สะอาดด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 50 mL อีก 3 ครั้ง (ครั้งละ 2 นาที)

ใช้ปากคีบ (forceps) คีบกระดาษเพาะเมล็ด วางในจานเลี้ยงเชื้อ (ไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ) ที่มีน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 20 mL จากนั้นคีบเมล็ดถั่วเขียววางลงบนกระดาษเพาะเมล็ดที่ชุ่มด้วยน้ำ ควรมีเมล็ดถั่วเขียว 30-40 เมล็ดต่อจาน หุ้มจานด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นเก็บไว้ในที่ปราศจากแสงเป็นระยะเวลา 3-4 วัน จนรากของถั่วเขียวงอก (ภาชนะที่ใช้ทั้งหมดต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและความดันไอน้ำ)

2.8.2 การปลูกพืชในอาหารเลี้ยงพืช Hoagland's medium

นำอาหารเลี้ยงพืช Hoagland's solution ความเข้มข้น 0.1 เท่า ใส่ในขวดเลี้ยงพืชขนาด 300 mL ขวดละ 50 mL ใส่ผงวุ้นลงไปขวดละ 0.25 g (0.5% Agar) จากนั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและความดันไอน้ำ เมื่อฆ่าเชื้อเสร็จแล้ว ทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงพืชมีอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ปิดเตีตราสสกัดแบคทีเรียที่ละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ใส่ลงไปในการเลี้ยงพืชที่ยังเหลว ทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงพืชแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

นำเมล็ดที่ทำการงอกเมล็ด (Seed germination) แล้วเป็นเวลา 3-4 วัน จนรากถั่วเขียวงอก มาลงในวุ้นอาหารเลี้ยงพืช Hoagland's medium ที่มีสารสกัดแบคทีเรียที่แข็งตัว โดยลงต้นถั่วเขียวขวดละ 3 ต้น และหุ้มบริเวณวุ้นอาหารส่วนรากของต้นถั่วเขียวด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้น นำขวดเลี้ยงพืชไปบ่มในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต (Plant growth chamber) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และวัดความยาวของรากและลำต้นของต้นถั่วเขียว

2.9 การศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* MC46 ที่เหมาะสมต่อการนำมาเตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วเขียว *Vigna radiata*

ในการศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการนำมาเตรียมสารสกัด ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาปริมาณกับแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ MC46 โดยได้เลือกศึกษาปริมาณของเชื้อ 3 ปริมาตร ได้แก่ 5 mL, 20 mL และ 35 mL

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* MC46 ดังหัวข้อ 2.5 โดยทำในหลอดทดลองฝาเกลียวทั้งหมด 3 หลอด ปิเปตต์เชื้อ MC46 จำนวน 400 μL ใส่ในขวดขนาด 60 mL ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (MSM broth) ปริมาตร 20 mL ทำทั้งหมด 12 ขวด จะมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งสิ้น 240 mL จากนั้นนำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี MC46 ทั้งหมด 12 ขวด ไปบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างจากทุกขวดมารวมกันและเก็บตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตร 500 μL เพื่อนำมาวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600})

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือมาแบ่งใส่หลอดเซนติฟิวจ์ขนาด 50 mL จำนวน 5 หลอด ตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 4500 g เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายส่วนที่เป็นสารละลายใส่หลอดเซนติฟิวจ์และเก็บในตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สกัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อสายพันธุ์ MC46 ปริมาตร 240 mL ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ปริมาตร 120 mL โดยใช้กรวยแยก (Separatory funnel) ขนาด 500 mL ถ่ายส่วนชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ใส่ขวดก้นกลม ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotatory evaporator) ชะขวดก้นกลมด้วยเอทิลอะซิเตท และถ่ายใส่ขวดเก็บสารขนาด 4 mL จากนั้น ระเหยตัวทำละลายโดยเครื่องระเหยสารด้วยแก๊สไนโตรเจน (Nitrogen evaporator) และเก็บในตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ละลายสารสกัดในขวดเก็บสารด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 500 μL

เตรียมอาหารเลี้ยงพืช Hoagland's medium ในขวดเลี้ยงพืชทั้งหมด 12 ขวด (ทำปริมาตรละ 3 ข้วรวมทั้งชุดควบคุม) ดังหัวข้อ 2.8.2 เพื่อศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสม ปิเปตต์สารสกัดในสารละลาย DMSO หรือ DMSO ลงอาหารเลี้ยงพืชตามปริมาตร ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาตรสารสกัดในสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) และ DMSO ที่ปิเปตต์ลงในอาหารเลี้ยงพืช

ปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย MC46 (mL)	ปริมาตรสารสกัด (μL)	ปริมาตร DMSO (μL)
5	10.4	62.5
20	41.7	31.3
35	72.9	0.0
ชุดควบคุม	0.0	72.9

2.10 การศึกษาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว *Vigna radiata*

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ดังหัวข้อ 2.5 โดยทำในหลอดทดลองฝาเกลียวสายพันธุ์ละ 3 หลอด รวมเป็น 9 หลอด ปิเปตต์เชื้อที่มีลักษณะขุ่นหรือการเจริญเติบโตดีที่สุดของ MC22 จำนวน $400 \mu\text{L}$ ใส่ในขวดขนาด 60 mL ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (MSM broth) ปริมาตร 20 mL ทำทั้งหมด 10 ขวด นำตัวอย่างของ starter ที่เหลือมาวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ทำซ้ำกับสายพันธุ์ MC46 และ MS45 เพราะฉะนั้นมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อรวมสายพันธุ์ละ 200 mL จากนั้นนำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี MC22, MC46 และ MS45 ทั้งหมด 30 ขวด ไปบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เวลา 6 ชั่วโมง มาวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600})

เนื่องจากปริมาตรของเชื้อ (culture) ที่เหมาะสม คือ 20 mL จึงนำเชื้อสายพันธุ์เดียวกันในขวดจำนวน 5 ขวด ที่เวลา 6 ชั่วโมง มารวมกันและแบ่งผสมอัตราส่วนต่างๆในขวดขนาด 60 mL ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การผสมอัตราส่วนต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MC46, MC22 และ MS45 เพื่อใช้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*)

ขวดที่	ปริมาณ culture (mL)			ขวดที่	ปริมาณ culture (mL)		
	MC22	MC46	MS45		MC22	MC46	MS45
1	20	-	-	8	-	10	10
2	-	20	-	9	10	-	10
3	-	-	20	10	5	15	-
4	15	5	-	11	-	15	5
5	-	5	15	12	15	-	5
6	5	-	15	13	6.67	6.67	6.67
7	10	10	-				

จากนั้น นำขวดที่ผสมแบคทีเรียในอัตราส่วนต่างๆ ทั้งหมด 13 ขวด และขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี MC22, MC46 และ MS45 ที่เหลืออีกสายพันธุ์ละ 5 ขวด ไปบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ต่อเป็นระยะเวลาอีก 6 ชั่วโมง (ระยะเวลารวมทั้งหมด 12 ชั่วโมง)

เมื่อครบ 12 ชั่วโมง นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดมาทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี MC22, MC46 และ MS45 (สายพันธุ์ละ 5 ขวด) มาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมการทดลอง ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การผสมอัตราส่วนต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์ MC22, MC46 และ MS45 เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมการทดลอง

ขวดที่	ปริมาณ culture (mL)			ขวดที่	ปริมาณ culture (mL)		
	MC22	MC46	MS45		MC22	MC46	MS45
14	15	5	-	19	10	-	10
15	-	5	15	20	5	15	-
16	5	-	15	21	-	15	5
17	10	10	-	22	15	-	5
18	-	10	10	23	6.67	6.67	6.67

จากนั้น เก็บตัวอย่างจากทุกขวด (ขวด 1-23) ปริมาตร 400 μL เพื่อนำมาวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) สำหรับตัวอย่างที่เหลือตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 4500 g เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสใส่หลอดเซนติฟิวจ์และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สกัดสารโดยแบ่งตัวอย่างแต่ละตัวอย่างจากขวด 1-23 พร้อมทั้ง MSM 20 mL (ชุดควบคุม; ขวด 24) ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนละเท่าๆกัน (ส่วนละ 10 mL) ในขวดขนาด 22 mL เพราะฉะนั้นมีทั้งหมด 48 ขวด ใส่เอทิลอะซิเตท (EtOAc) ปริมาตร 5 mL ลงในแต่ละขวดพร้อมทั้งเขย่า ถ่ายส่วนที่เป็นชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวอย่างเดียวกัน (เช่น ตัวอย่างจากขวด 1 ที่เหมือนกัน) ใส่ขวดเก็บสารขนาด 4 mL นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารด้วยแก๊สไนโตรเจน (Nitrogen evaporator) ทำซ้ำจนระเหยตัวทำละลายออกหมด จากนั้นเก็บขวดสารสกัดที่ได้ในตู้ทำความเย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนละลายสารสกัดในขวดเก็บสาร 4 mL แต่ละขวดด้วย DMSO ปริมาตร 100 μL

เตรียมอาหารเลี้ยงพืช Hoagland's medium ในขวดเลี้ยงพืชทั้งหมด 24 ขวด ดังหัวข้อ 2.8.2 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว โดยปิเปตต์สารสกัดในสารละลาย DMSO ทั้งหมด (100 μL ต่อตัวอย่าง) ลงในอาหารเลี้ยงพืช ทำการทดลองทั้งหมดในหัวข้อนี้ (หัวข้อ 2.10) ซ้ำอีก 3 ครั้ง

บทที่ 3

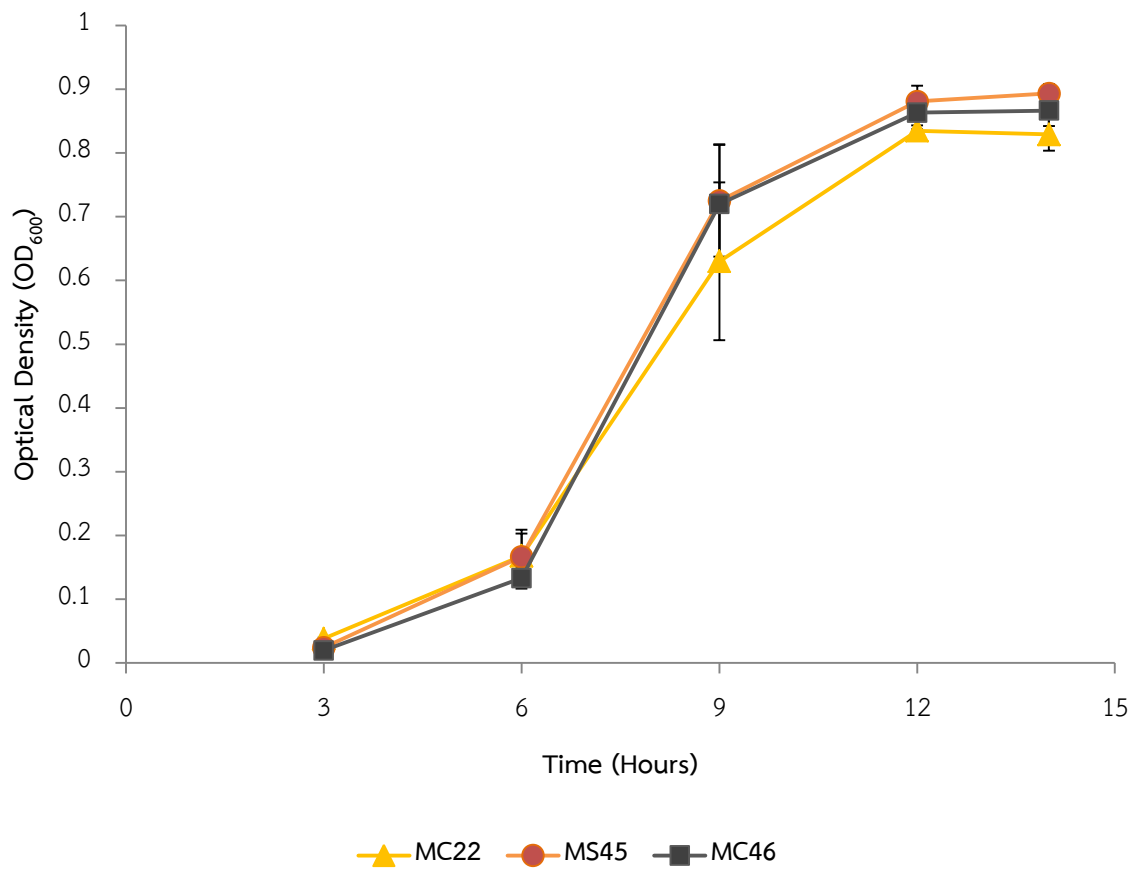
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral-salt medium (MSM) ศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas fluorescens* MC46 ที่เหมาะสมต่อการนำมาเตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*) และศึกษาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอัตราส่วนที่แตกต่างต่อการเจริญเติบโตในส่วนรากและลำต้นของถั่วเขียว (*Vigna radiata*)

3.1 การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ (1) *Ochrobactrum* sp. MC22 (2) *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ (3) *Pseudomonas* sp. MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral-salt medium (MSM) บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยติดตามผลของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ณ ชั่วโมงที่ 3, 6, 9, 12 และ 14 ชั่วโมง ด้วยการวัดความขุ่น (optical density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.1

เมื่อพิจารณา รูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.1 พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไปค่าความขุ่น OD_{600} จะมีค่าเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM โดยพบว่าในช่วง 3 ถึง 6 ชั่วโมงแรกของการนำตัวอย่างมาศึกษาการเจริญ เชื้อแบคทีเรียจะอยู่ในระยะพัก (lag phase) โดยสายพันธุ์ MC22 มีค่า OD_{600} สูงที่สุด และแบคทีเรียจะเข้าสู่ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (exponential phase) ในชั่วโมงที่ 6 ถึง 9 ซึ่งในระยะนี้เชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว และเริ่มเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) ในชั่วโมงที่ 12



รูปที่ 3.1 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral-salt medium (MSM)



ตารางที่ 3.1 Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรีย *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ที่เวลา 3, 6, 9, 12 และ 14 ชั่วโมง

ชนิดแบคทีเรีย	เวลา (ชั่วโมง)	ค่า Optical Density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
<i>Ochrobactrum</i> sp. MC22	3	0.035	0.039	0.041	0.038
	6	0.099	0.192	0.213	0.168
	9	0.400	0.665	0.825	0.630
	12	0.838	0.838	0.830	0.835
	14	0.878	0.790	0.820	0.830
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MC46	3	0.020	0.015	0.024	0.020
	6	0.102	0.140	0.158	0.133
	9	0.560	0.715	0.885	0.720
	12	0.850	0.838	0.903	0.863
	14	0.830	0.858	0.913	0.867
<i>Pseudomonas</i> sp. MS45	3	0.012	0.032	0.029	0.024
	6	0.086	0.188	0.227	0.167
	9	0.550	0.815	0.810	0.725
	12	0.833	0.895	0.915	0.881
	14	0.873	0.885	0.923	0.893

ในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้เชื้อแบคทีเรีย *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral-salt medium เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง และนำมาผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกันของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ เนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียใน 6 ชั่วโมงแรก แบคทีเรียจะเข้าสู่ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (exponential phase) ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นสูงที่สุด และคงที่ ซึ่งเซลล์แบคทีเรียในระยะนี้จะมีกระบวนการเมแทบอลิซึม และมีคุณสมบัติทางสรีรวิทยาเหมือนกันทุกประการ ดังนั้น ที่เวลา 6 ชั่วโมง ทางผู้วิจัยจึงนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาผสมอัตราส่วนของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*) และเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MC22, MC46 และ MS45 เริ่มเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ (early stationary phase) โดยพบว่ามีค่า OD₆₀₀ สูงถึง 0.835, 0.863 และ 0.881 ตามลำดับ บ่งชี้ถึงการมีจำนวนแบคทีเรียสูงสุด ในระยะนี้แบคทีเรียจะมีการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) สูงที่สุดเช่นเดียวกัน ดังนั้น ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมในการนำแบคทีเรียมาศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*)

3.2 การศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* MC46 ที่เหมาะสมต่อการนำมาเตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*)

สำหรับการทดลองนี้ ผู้วิจัยสนใจศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว *Vigna radiata* เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม PGPB ซึ่งมีความสามารถในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นเดียวกัน และมีลักษณะการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการนำมาเตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วเขียวจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* MC46 เพียงสายพันธุ์เดียว โดยศึกษา 3 ปริมาตร ได้แก่ 5 mL 20 mL และ 35 mL

ผู้วิจัยได้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* MC46 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับที่จะนำมาทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรีย จากนั้นเก็บตัวอย่างมาวัด OD₆₀₀ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยพบว่ามีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.838 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า OD₆₀₀ ในกราฟลักษณะ

การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MC46 ในรูปที่ 3.1 ข้างต้น และอยู่ในช่วงเริ่มเข้าสู่ระยะคงจำนวน เซลล์ (early stationary phase) ดังคาด

จากนั้น ผู้วิจัยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย MC46 มาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต และละลายสารสกัดที่ได้ด้วย DMSO ปิเปตต์สารสกัดในสารละลาย DMSO หรือ DMSO ลงอาหารเลี้ยงพืช (Hoagland's medium) ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในตารางที่ 2.1 การที่มีปริมาณของสารสกัดจากอาหารเหลวจากการเลี้ยงเชื้อ MC46 ในสารละลาย DMSO หรือ DMSO แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงพืช จะทำให้ผู้วิจัยสามารถศึกษาผลของปริมาณที่แตกต่างกัน ได้แก่ 5 mL 20 mL และ 35 mL ต่อการเจริญเติบโตของรากและลำต้นแก้วเขียวได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.2

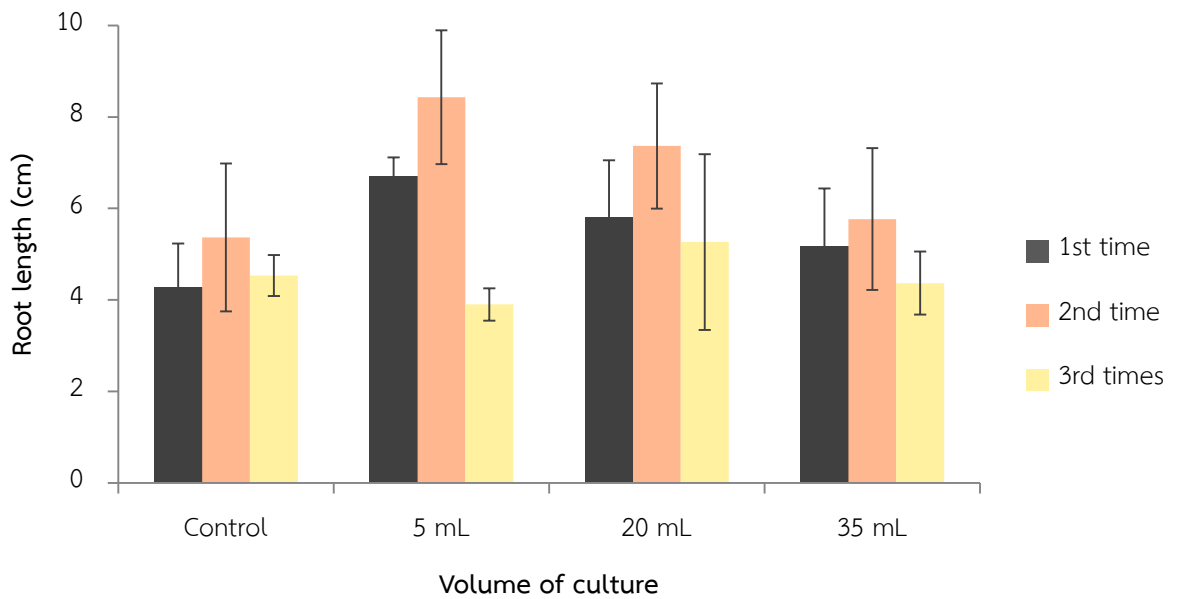


ตารางที่ 3.2 ความยาวของรากและลำต้นถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ในสถานะที่มีปริมาณสารสกัดของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* MC46 ในสารละลาย DMSO หรือ DMSO ที่แตกต่างกัน

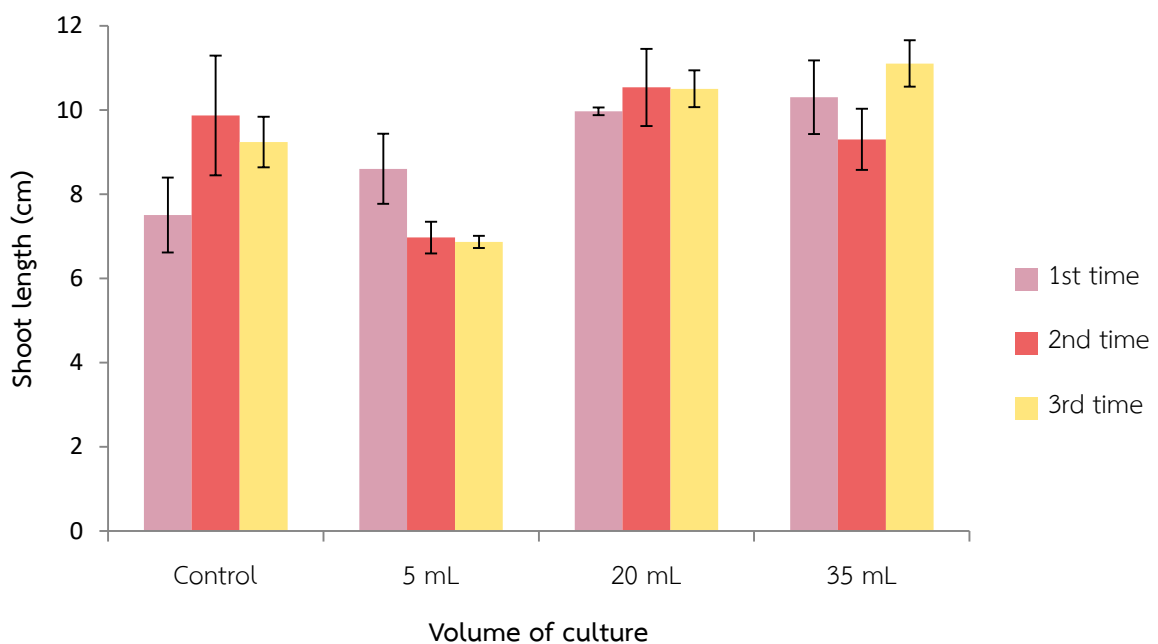
ปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย MC46 (mL)	ทำซ้ำ	ต้นที่	ความยาว (เซนติเมตร)			
			ราก	ค่าเฉลี่ย (ราก)	ลำต้น	ค่าเฉลี่ย (ลำต้น)
Control	1	1	6.2	4.3 ± 1.0	9.2	7.5 ± 0.9
		2	3.4		6.2	
		3	3.2		7.1	
	2	1	2.3	5.4 ± 1.6	12.2	9.9 ± 1.4
		2	7.8		10.1	
		3	6.0		7.3	
	3	1	5.4	4.5 ± 0.5	8.9	9.2 ± 0.6
		2	4.3		10.4	
		3	3.9		8.4	
5	1	1	6.1	6.7 ± 0.4	9.8	8.6 ± 0.8
		2	6.5		9.0	
		3	7.5		7.0	
	2	1	7.5	8.4 ± 1.5	7.0	7.0 ± 0.4
		2	11.3		7.6	
		3	6.5		6.3	
	3	1	3.5	3.9 ± 0.4	7.1	6.9 ± 0.2
		2	4.6		6.9	
		3	3.6		6.6	

ปริมาตรของเชื้อแบคทีเรีย MC46 (mL)	ทำซ้ำ	ต้นที่	ความยาว (เซนติเมตร)			
			ราก	ค่าเฉลี่ย (ราก)	ลำต้น	ค่าเฉลี่ย (ลำต้น)
20	1	1	8.3	5.8 ± 1.3	10.1	10.0 ± 0.1
		2	4.7		9.8	
		3	4.4		10.0	
	2	1	5.9	7.4 ± 1.4	11.4	10.5 ± 0.9
		2	6.1		11.5	
		3	10.1		8.7	
	3	1	9.1	5.3 ± 1.9	11.2	10.5 ± 0.4
		2	3.1		10.6	
		3	3.6		9.7	
35	1	1	3.3	5.2 ± 1.3	10.8	10.3 ± 0.9
		2	4.6		11.5	
		3	7.6		8.6	
	2	1	3.7	5.8 ± 1.6	9.2	9.3 ± 0.7
		2	8.8		10.6	
		3	4.8		8.1	
	3	1	3.4	4.4 ± 0.7	12.2	11.1 ± 0.6
		2	5.7		10.6	
		3	4.0		10.5	





รูปที่ 3.2 ค่าเฉลี่ยความยาวของรากถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ในแต่ละซ้ำของการปลูกต้นถั่วเขียวที่มีปริมาตรของสารสกัดที่แตกต่างกันและชุดควบคุม



รูปที่ 3.3 ค่าเฉลี่ยความยาวของลำต้นถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ในแต่ละซ้ำของการปลูกต้นถั่วเขียวที่มีปริมาตรของสารสกัดที่แตกต่างกันและชุดควบคุม

จากผลการทดลอง ค่าเฉลี่ยของความยาวรากในแต่ละซ้ำของการปลูกถั่วเขียวที่มีปริมาตรของสารสกัดแบคทีเรีย 5 mL, 20 mL และ 35 mL ในวุ้นอาหาร Hoagland's medium เทียบกับชุดควบคุม (DMSO) ซึ่งไม่มีสารสกัด พบว่าสารสกัดอาหารเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* MC46 ในทุกปริมาตร เมื่อทดสอบด้วย t-test เทียบกับชุดควบคุมนั้น ปริมาตรของสารสกัดแบคทีเรียทั้ง 3 ปริมาตร จะไม่ส่งผลต่อรากพืชอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจะสังเกตได้ว่าความยาวรากมีลักษณะที่แตกต่างกันสำหรับแต่ละซ้ำอย่างสิ้นเชิง (รูปที่ 3.2) เมื่อพิจารณาปริมาตรสารสกัดอาหารเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MC46 ที่สามารถทำให้ลำต้นถั่วเขียวโต (รูปที่ 3.3) พบว่าปริมาตรสารสกัดอาหารเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MC46 เท่ากับ 20 mL มีค่าความยาวเฉลี่ยของลำต้นถั่วเขียวสำหรับแต่ละซ้ำ เท่ากับ 10.0, 10.5 และ 10.5 เซนติเมตร ตามลำดับ และปริมาตร 35 mL มีค่าความยาวเฉลี่ยของลำต้นถั่วเขียวสำหรับแต่ละซ้ำ เท่ากับ 10.3, 9.3 และ 11.1 เซนติเมตร ตามลำดับ จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความแตกต่างด้วย t-test ของทั้ง 2 ปริมาตร เทียบกับชุดควบคุม (DMSO) ที่ไม่มีสารสกัด พบว่าปริมาตรสารสกัดอาหารเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MC46 เท่ากับ 20 mL และ 35 mL สามารถส่งผลทำให้ลำต้นถั่วเขียวโต เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (DMSO) ที่ไม่มีสารสกัด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาปริมาตรสารสกัดอาหารเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MC46 ปริมาตร เท่ากับ 5 mL พบว่าลำต้นถั่วเขียวโตได้ไม่เต็มที่เท่าที่ควร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (DMSO) ที่ไม่มีสารสกัด และเมื่อทดสอบความแตกต่างด้วย t-test พบว่าที่ปริมาตรสารสกัดอาหารเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MC46 เท่ากับ 5 mL จะไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของลำต้นถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เนื่องจากที่ปริมาตรสารสกัดอาหารเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MC46 เท่ากับ 20 mL และ 35 mL สามารถส่งผลทำให้ลำต้นถั่วเขียวโตได้ทั้ง 2 ปริมาตร ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ปริมาตรอาหารเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MC46 เท่ากับ 20 mL ซึ่งมีปริมาตรของสารสกัดที่น้อยกว่า และสามารถทำให้ลำต้นพืชโตมากกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่มีสารสกัด เป็น 1.2 เท่า เมื่อพิจารณาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of the mean) พบว่ามีค่าความคลาดเคลื่อนที่น้อยกว่าปริมาตรสารสกัดอาหารเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MC46 เท่ากับ 35 mL

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ ทางผู้วิจัยได้เลือกใช้ปริมาตรของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* MC46 เท่ากับ 20 mL เป็นปริมาตรที่เหมาะสมในการนำมาเตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*) และใช้ปริมาตรของสารสกัดนี้กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Ochrobactrum* sp. MC22 และ *Pseudomonas* sp. MS45 เช่นเดียวกัน ในการทดลองต่อไป

3.3 การศึกษาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*)

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral-salt medium (MSM) ผู้วิจัยผสมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.2 และ ตารางที่ 2.3 เพื่อศึกษาผลปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการเจริญรากและลำต้นของถั่วเขียว *Vigna radiata*

ผู้วิจัยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MC46, MC22 และ MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งตามรูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.1 พบว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะเริ่มเข้าสู่ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (exponential phase) จากนั้นนำแบคทีเรียมาผสมกันตามอัตราส่วน ในตารางที่ 2.2 ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 12 ชั่วโมง ซึ่งตามรูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.1 เป็นเวลาที่แบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) โดยมีชุดควบคุม (control) คือ การนำเอาแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (MC22, MC46, MS45 ที่เพาะเลี้ยงในลักษณะเดียวกัน) มาผสมกันดังอัตราส่วนในตารางที่ 2.3 ณ ชั่วโมงที่ 12 แล้วเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทันที เพื่อนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ก่อนละลายสารสกัดที่ได้ด้วย DMSO ปริมาตร 100 μL ปิเปตต์สารสกัดในสารละลาย DMSO ทั้งหมด (100 μL ต่อตัวอย่าง) ลงในอาหารเลี้ยงพืช (Hoagland's medium) ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ ใช้ถั่วเขียวซ้าละ 3 ต้น

สำหรับการวัดค่า OD_{600} ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MC46, MC22 และ MS45 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ที่เวลา 6 ชั่วโมง พบว่าค่า OD_{600} มีค่าใกล้เคียงกับค่า OD_{600} ที่ได้ในรูปที่ 3.1 แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ เข้าสู่ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (exponential phase) ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ของแบคทีเรีย *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่า Optical Density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร					
	ข้อมูลจากตารางที่ 3.1 ที่เวลา 6 ชั่วโมง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย
MC22	0.168	0.220	0.358	0.265	0.210	0.263 ± 0.034
MC46	0.133	0.175	0.318	0.308	0.188	0.247 ± 0.038
MS45	0.167	0.243	0.303	0.280	0.225	0.263 ± 0.035

สำหรับการนำแบคทีเรียมาผสมกันตามอัตราส่วน ในตารางที่ 2.2 ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 12 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่า OD_{600} ณ ชั่วโมงที่ 12 (ขวดที่ 4-13) และชุดควบคุม (control) ซึ่งเป็นการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (MC22, MC46, MS45 ที่เพาะเลี้ยงในลักษณะเดียวกัน) มาผสมกันตั้งอัตราส่วนในตารางที่ 2.3 ณ ชั่วโมงที่ 12 (ขวดที่ 14-23) ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.4

เมื่อพิจารณาค่า OD_{600} ของขวดที่ 1-23 พบว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM มีค่า OD_{600} ใกล้เคียงกับค่า OD_{600} ที่ได้ในตารางที่ 3.1 แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ และที่ทำการผสมในอัตราส่วนต่างๆ เริ่มเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) ตามที่ได้คาดไว้ และเมื่อผู้วิจัยพิจารณาค่า OD_{600} ของขวดที่ 1-3 ซึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย MC22, MC46 และ MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตได้ดี โดยมีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.790, 0.824 และ 0.765 แต่เมื่อพิจารณาค่า OD_{600} ขวดที่ 4-13 เทียบกับชุดควบคุมในอัตราส่วนของแบคทีเรีนั้นๆ (ขวดที่ 14-23) พบว่าส่วนมากการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (co-inoculation) โดยการนำแบคทีเรียมาผสมกันที่เวลา 6 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 12 ชั่วโมง จะมีการเจริญของเชื้อได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเป็นการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (MC22, MC46, MS45 ที่เพาะเลี้ยงในลักษณะเดียวกัน) มาผสมอัตราส่วน ณ ชั่วโมงที่ 12 (ขวดที่ 14-23) แต่เมื่อทดสอบความแตกต่างด้วย t-test พบว่าการเจริญของแบคทีเรียที่ผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง (ขวดที่ 4-13) นั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ขวดที่ 14-23) ที่ทำการผสมแบคทีเรียที่ผ่านการ

เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MSM เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาค่า OD_{600} ของขวดที่ 7 ซึ่งมีอัตราส่วนของแบคทีเรียสายพันธุ์ MC22 ต่อ MC46 เท่ากับ 10 mL ต่อ 10 mL และมีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.716 เทียบกับชุดควบคุม (ขวดที่ 17) ซึ่งมีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.841 จะสังเกตได้ว่าการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาผสมกันที่เวลา 6 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 12 ชั่วโมง นั้นเจริญไม่ดีเท่าที่ควรเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ผสมอัตราส่วนที่เวลา 12 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MC22 และ MC46 ที่ปริมาตร 10 mL ต่อ 10 mL ร่วมกัน (co-inoculation) สามารถส่งผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อใดเชื้อหนึ่งได้



ตารางที่ 3.4 ค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ของการผสมอัตราส่วนต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MC46, MC22 และ MS45 และชุดควบคุม เพื่อใช้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*)

ขวด ที่	ชุด ควบคุม	ปริมาตร culture (mL)			OD_{600}				
		MC22	MC46	MS45	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย
1	-	20		-	0.798	0.913	0.718	0.730	0.790 ± 0.045
2	-	-	20	-	0.908	0.745	0.825	0.818	0.824 ± 0.033
3	-	-	-	20	0.790	0.823	0.723	0.723	0.765 ± 0.025
4	-	15	5	-	0.893	0.740	0.900	0.893	0.857 ± 0.039
14	✓	15	5	-	0.943	0.735	0.780	0.775	0.808 ± 0.046
5	-	-	5	15	0.833	0.855	0.930	0.913	0.883 ± 0.023
15	✓	-	5	15	0.888	0.787	0.733	0.738	0.787 ± 0.036
6	-	5	-	15	0.828	0.690	0.828	0.828	0.794 ± 0.035
16	✓	5	-	15	0.943	0.708	0.715	0.720	0.772 ± 0.057
7	-	10	10	-	0.960	0.718	0.558	0.628	0.716 ± 0.088
17	✓	10	10	-	0.873	0.718	0.885	0.888	0.841 ± 0.041
8	-	-	10	10	0.845	0.753	0.743	0.743	0.771 ± 0.025
18	✓	-	10	10	0.978	0.758	0.633	0.643	0.753 ± 0.080
9	-	10	-	10	0.900	0.820	0.718	0.720	0.790 ± 0.044
19	✓	10	-	10	0.843	0.755	0.770	0.780	0.787 ± 0.019
10	-	5	15	-	0.888	0.728	0.860	0.858	0.834 ± 0.036
20	✓	5	15	-	0.958	0.755	0.653	0.693	0.765 ± 0.068
11	-	-	15	5	0.940	0.668	0.820	0.819	0.812 ± 0.056
21	✓	-	15	5	0.723	0.725	0.768	0.753	0.742 ± 0.011
12	-	15	-	5	0.928	0.733	0.745	0.750	0.789 ± 0.046
22	✓	15	-	5	0.930	0.745	0.680	0.680	0.759 ± 0.059
13	-	6.67	6.67	6.67	0.865	0.685	0.933	0.938	0.855 ± 0.059
23	✓	6.67	6.67	6.67	0.953	0.698	0.693	0.713	0.764 ± 0.063

หมายเหตุ: ขวดที่ 24 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ปริมาตร 20 mL

ผู้วิจัยเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทุกอัตราส่วนและชุดควบคุม (ขวดที่ 1-24) ที่เพาะเลี้ยงจนครบ 12 ชั่วโมง มาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ก่อนละลายสารสกัดที่ได้ด้วย DMSO ปริมาตร 100 μL บีเบดต์สารสกัดในสารละลาย DMSO ทั้งหมด (100 μL ต่อตัวอย่าง) ลงในอาหารเลี้ยงพืช (Hoagland's medium) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างกันและชุดควบคุม (ขวดที่ 1-23) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral-salt medium (ขวดที่ 24) ในการส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรากและลำต้นถั่วเขียว *Vigna radiata*

เมื่อพิจารณาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างกันและชุดควบคุม ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรากถั่วเขียว ผู้วิจัยได้ทดสอบความแตกต่างของการนำแบคทีเรียมาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการนำแบคทีเรียมาผสมในอัตราส่วนเดียวกัน ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ชุดควบคุม) ด้วยการทดสอบ t-test พบว่าสารสกัดในอัตราส่วนที่แตกต่างกันนี้ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรากถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระดับ 0.05 ดังแสดงในตารางที่ 3.5, A1 และรูปที่ 3.4 ซึ่งแสดงค่าเฉลี่ยความยาวของรากถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ที่ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซึ่งมีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างกันเทียบกับชุดควบคุม

จากนั้นผู้วิจัยจึงพิจารณาผลของการนำแบคทีเรียมาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 12 ชั่วโมง (ขวดที่ 4-13) เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรีย MC22 (ขวดที่ 1) MC46 (ขวดที่ 2) และ MS45 (ขวดที่ 3) พบว่าสารสกัดของแบคทีเรีย ในขวดที่ 4-13 ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรากถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อขวดที่ 1-3 ดังแสดงในตารางที่ 3.5, A1, A3 และรูปที่ 3.4

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดของเชื้อแบคทีเรีย MC22 MC46 และ MS45 ในขวดที่ 1-3 กับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ปริมาตร 20 mL ที่ไม่มีสารสกัด พบว่าสารสกัดของเชื้อแบคทีเรีย (ขวดที่ 1-3) ไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของรากถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระดับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 3.4 และตารางที่ 3.5, A1 นอกจากนี้ ผู้วิจัยคาดว่าสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย MC46 5 mL และ MS45 15 mL (ขวดที่ 5) อาจพบความแตกต่างของความยาวรากถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในอัตราส่วนเดียวกัน (ขวดที่ 15) หากทำการทดลองที่

มากกว่า 4 ซ้ำ เช่นเดียวกับสารสกัดจากปฏิกิริยาของแบคทีเรียในอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย MC22 10 mL และ MS45 10 mL (ขวดที่ 9) และขวดที่ 19 ซึ่งเป็นชุดควบคุมในอัตราส่วนเดียวกัน

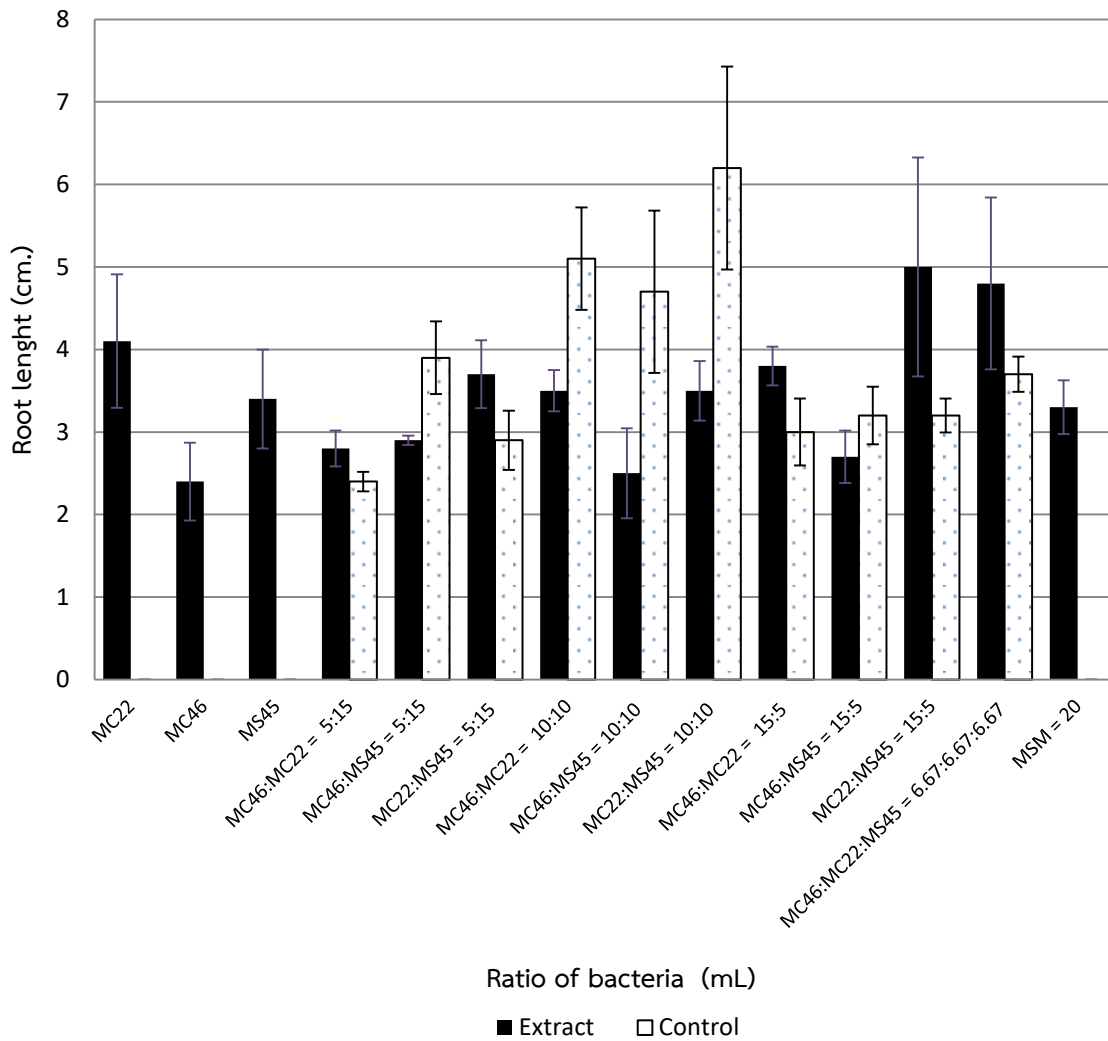


ตารางที่ 3.5 ค่าเฉลี่ยความยาวของรากถั่วเขียว *Vigna radiata* ที่มีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่ต่างกัน เทียบกับชุดควบคุม

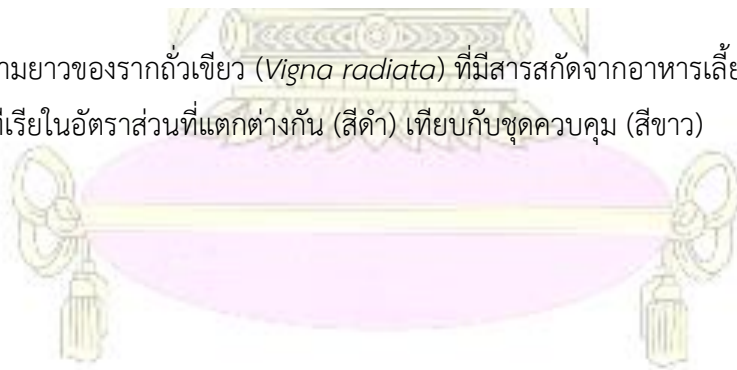
ขวดที่	ชุดควบคุม	ปริมาตร culture (mL)			ความยาวราก (เซนติเมตร)					p-value
		MC22	MC46	MS45	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
1	-	20		-	6.5	3.2	3.6	3.1	4.1 ± 0.8	0.173*
2	-	-	20	-	1.0	2.5	2.8	3.2	2.4 ± 0.5	0.415*
3	-	-	-	20	3.5	1.8	3.7	4.7	3.4 ± 0.6	0.880*
4	-	15	5	-	2.7	2.3	2.8	3.3	2.8 ± 0.2	0.181
14	✓	15	5	-	2.1	2.3	2.5	2.6	2.4 ± 0.1	
5	-	-	5	15	3.1	2.9	3.0	2.8	2.9 ± 0.1	0.064
15	✓	-	5	15	4.1	5.1	3.3	3.2	3.9 ± 0.4	
6	-	5	-	15	2.9	4.8	3.6	3.3	3.7 ± 0.4	0.205
16	✓	5	-	15	1.8	3.0	3.2	3.4	2.9 ± 0.4	
7	-	10	10	-	3.2	2.9	4.1	3.6	3.5 ± 0.2	0.073
17	✓	10	10	-	6.3	5.6	3.4	5.0	5.1 ± 0.6	
8	-	-	10	10	2.3	1.1	3.0	3.6	2.5 ± 0.5	0.103
18	✓	-	10	10	6.5	6.3	3.6	2.5	4.7 ± 1.0	
9	-	10	-	10	4.1	4.1	2.9	2.8	3.5 ± 0.4	0.076
19	✓	10	-	10	8.2	8.4	3.5	4.8	6.2 ± 1.2	

* p-value เทียบกับ MSM (ขวดที่ 24)

ขวดที่	ชุดควบคุม	ปริมาตร culture (mL)			ความยาวราก (เซนติเมตร)					p-value
		MC22	MC46	MS45	ซ้่าที่ 1	ซ้่าที่ 2	ซ้่าที่ 3	ซ้่าที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
10	-	5	15	-	3.3	4.4	3.5	3.9	3.8 ± 0.2	0.178
20	✓	5	15	-	2.3	4.1	3.2	2.5	3.0 ± 0.4	
11	-	-	15	5	2.5	2.0	3.1	3.4	2.7 ± 0.3	0.353
21	✓	-	15	5	2.4	4.0	3.5	2.9	3.2 ± 0.3	
12	-	15	-	5	8.6	5.4	3.2	2.9	5.0 ± 1.3	0.271
22	✓	15	-	5	3.0	3.4	2.8	3.7	3.2 ± 0.2	
13	-	6.67	6.67	6.67	7.5	5.5	3.4	2.9	4.8 ± 1.0	0.358
23	✓	6.67	6.67	6.67	4.0	4.0	3.3	3.3	3.7 ± 0.2	
24	MSM 20 mL	-	-	-	2.4	3.8	3.2	3.8	3.3 ± 0.3	-



รูปที่ 3.4 ค่าเฉลี่ยความยาวของรากถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ที่มีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน (สีดำ) เทียบกับชุดควบคุม (สีขาว)



เมื่อพิจารณาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างกันและชุดควบคุมต่อการเจริญเติบโตของลำต้นถั่วเขียว ในลักษณะเดียวกับรากถั่วเขียว พบว่าสารสกัดในอัตราส่วนที่แตกต่างกันไม่ส่งผลต่อความยาวลำต้นถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.6 และ A2

จากนั้นผู้วิจัยจึงพิจารณาผลของการนำแบคทีเรียมาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 12 (ขวดที่ 4-13) เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรีย MC22 (ขวดที่ 1) MC46 (ขวดที่ 2) และ MS45 (ขวดที่ 3) พบว่าสารสกัดของแบคทีเรีย ในขวดที่ 4-13 นั้นไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของลำต้นถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อขวดที่ 1-3 ดังแสดงในรูปที่ 3.5 ตารางที่ 3.6, A2 และ A4

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดของเชื้อแบคทีเรีย MC22 MC46 และ MS45 ในขวดที่ 1-3 กับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ปริมาตร 20 mL ที่ไม่มีสารสกัด พบว่าสารสกัดของเชื้อแบคทีเรีย (ขวดที่ 1-3) ไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของลำต้นถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระดับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 3.5 ตารางที่ 3.6, A2 และ A4

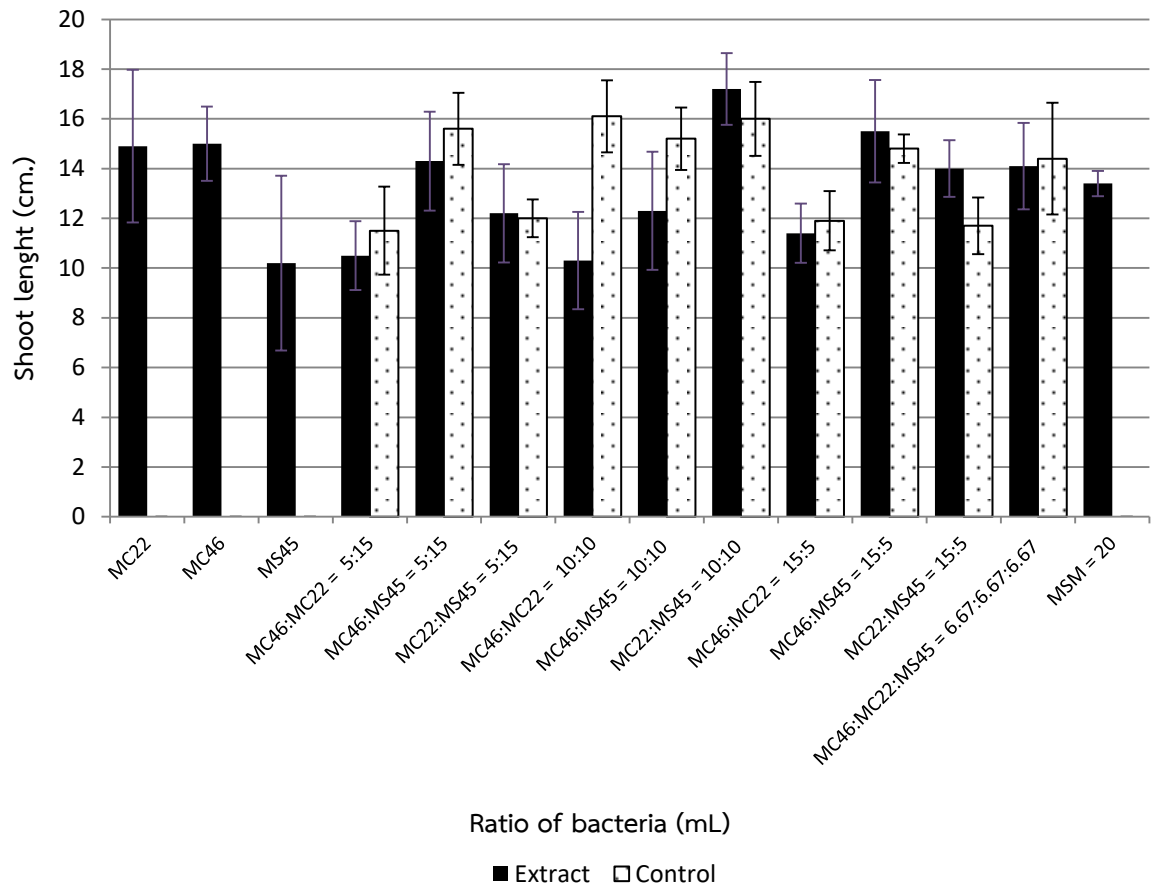


ตารางที่ 3.6 ค่าเฉลี่ยความยาวของรากถั่วเขียว *Vigna radiata* ที่มีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่ต่างกัน เทียบกับชุดควบคุม

ขวดที่	ชุดควบคุม	ปริมาตร culture (mL)			ความยาวลำต้น (เซนติเมตร)					p-value
		MC22	MC46	MS45	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
1	-	20	-	-	18.5	5.8	17.4	18.2	15.0 ± 1.5	0.644*
2	-	-	20	-	18.2	14.9	15.9	11.0	14.9 ± 3.1	0.338*
3	-	-	-	20	15.7	11.5	13.7	0.0	10.2 ± 3.5	0.442*
4	-	15	5	-	7.0	10.3	10.8	13.8	10.5 ± 1.4	0.795
14	✓	15	5	-	13.4	7.8	15.5	9.4	11.5 ± 1.8	
5	-	-	5	15	16.4	8.4	16.5	16.0	14.3 ± 2.0	0.751
15	✓	-	5	15	18.4	12.7	17.8	13.5	15.6 ± 1.5	
6	-	5	-	15	10.4	12.2	8.6	17.7	12.2 ± 2.0	0.813
16	✓	5	-	15	11.5	14.2	10.7	11.5	12.0 ± 0.8	
7	-	10	10	-	10.1	7.8	7.3	15.9	10.3 ± 2.0	0.090
17	✓	10	10	-	12.7	18.3	18.6	14.5	16.1 ± 1.4	
8	-	-	10	10	16.3	6.2	15.7	10.7	12.3 ± 2.4	0.251
18	✓	-	10	10	14.9	18.8	14.0	13.0	15.2 ± 1.3	
9	-	10	-	10	19.7	13.1	18.3	17.6	17.2 ± 1.4	0.633
19	✓	10	-	10	18.6	15.2	18.0	12.1	16.0 ± 1.5	

* p-value เทียบกับ MSM (ขวดที่ 24)

ขวดที่	ชุดควบคุม	ปริมาณ culture (mL)			ความยาวราก (เซนติเมตร)					p-value
		MC22	MC46	MS45	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
10	-	5	15	-	9.9	14.9	10.0	10.7	11.4 ± 1.2	0.730
20	✓	5	15	-	9.8	13.8	10.4	13.6	11.9 ± 1.0	
11	-	-	15	5	18.9	11.0	19.0	13.0	15.5 ± 2.1	0.713
21	✓	-	15	5	13.2	15.9	15.0	15.2	14.8 ± 0.6	
12	-	15	-	5	16.7	13.0	18.6	7.7	14.0 ± 2.4	0.910
22	✓	15	-	5	8.7	12.2	14.2	11.6	11.7 ± 1.1	
13	-	6.67	6.67	6.67	15.9	12.2	18.0	10.3	14.1 ± 1.7	0.844
23	✓	6.67	6.67	6.67	14.5	8.0	17.1	17.8	14.4 ± 2.2	
24	MSM 20 mL	-	-	-	14.8	12.7	13.2	12.7	13.4 ± 0.5	-



รูปที่ 3.5 ค่าเฉลี่ยความยาวของลำต้นถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ที่มีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน (สีดำ) เทียบกับชุดควบคุม (สีขาว)



ในงานวิจัยนี้ ทีมวิจัยมุ่งเน้นศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรีย *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ที่มีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co-inoculation) แต่จากผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ร่วมกันในอัตราส่วนที่ต่างกัน นั้นจะไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรากและลำต้นของถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียในกลุ่ม PGPB แต่ละชนิดสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ต่างชนิดกัน เช่น *Pseudomonas fluorescens* กับ Canola (*Brassica napus* L.)⁴⁸ และ *Pseudomonas stutzeri* กับ มะเขือเทศ⁴⁹ เป็นต้น ความจำเพาะของแบคทีเรียและพืชที่ต่างกันนี้ อาจเนื่องมาจากสมบัติเฉพาะของแบคทีเรียแต่ละชนิด เช่น การสร้างสารออกซิน Indole-3-acetic acid (IAA) ความสามารถในการละลายฟอสฟอรัส และการตรึงไนโตรเจนที่ต่างกัน

นอกจากนี้อาจเกิดจากข้อจำกัดของแบคทีเรียกลุ่ม PGPB ที่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบด้านลบต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น การสร้างไฮโดรเจนไซยาไนด์ในปริมาณที่มากเกินไป จะส่งผลในการทำลายเมแทบอลิซึมและการเจริญเติบโตของรากพืช โดยพบว่าแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* และ *Bacillus* สร้างไฮโดรเจนไซยาไนด์ได้ถึงร้อยละ 88.89 และ 50 ตามลำดับ⁵⁰ ในทำนองเดียวกัน การสร้างสารออกซิน ถ้าอยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต แต่หากในระดับความเข้มข้นสูงๆ จะมีผลยับยั้งการยืดยาวของรากแทน

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและการศึกษาในอนาคต

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในกลุ่มที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือ PGPB ที่มีความสามารถในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*) และมีความสามารถในการย่อยสลายสารไตรโคลคาร์บานและสารไตรโคลซานได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ถึงแม้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้จะเป็น PGPB แต่ยังไม่มีการรายงานว่า หากใช้แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์นี้ร่วมกัน จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชอย่างไร หรือควรผสมแบคทีเรียเหล่านี้ในสัดส่วนเท่าไร

การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดย 6 ชั่วโมงแรก เชื้อแบคทีเรียอยู่ในระยะพัก (lag phase) และชั่วโมงที่ 6 ถึง 9 แบคทีเรียจะเข้าสู่ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (exponential phase) และเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) ในชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมักเป็นระยะที่แบคทีเรียมีการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) มากที่สุด โดยเป็นระยะที่ผู้วิจัยนำแบคทีเรียมาใช้ในการศึกษาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเขียว *Vigna radiata*

นอกจากนี้ ผู้วิจัยศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* MC46 ที่เหมาะสมต่อการนำมาเตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MC46 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM และนำสารสกัดมาศึกษาผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยการวัดความยาวของรากและลำต้นของถั่วเขียว (*Vigna radiata*) พบว่าการใช้สารสกัดจาก culture ของ *Pseudomonas fluorescens* MC46 ปริมาตร 20 mL ช่วยให้ถั่วเขียวเจริญเติบโตได้ดี โดยทำให้ลำต้นของถั่วเขียวยาวมากขึ้นแต่ไม่มีผลต่อรากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สุดท้าย ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของสารสกัดจากปฏิสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MC46 MC22 และ MS45 ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata*) โดยทดสอบความแตกต่างของการนำแบคทีเรียมาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการนำแบคทีเรียมาผสมในอัตราส่วนเดียวกัน ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ชุดควบคุม) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดในอัตราส่วนที่แตกต่างกันนั้นจะไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรากและลำต้นถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM และนำมาผสมในอัตราส่วนต่างๆ หรือเพาะเลี้ยงร่วมกัน โดยมีปริมาตรรวมเป็น 20 mL ที่เวลา 6 ชั่วโมงและเลี้ยงร่วมกันจนครบ 12 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดในอัตราส่วนต่างๆนี้ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรากและลำต้นถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



การศึกษาในอนาคต

ศึกษาปฏิสัมพันธ์การทำงานร่วมกันระหว่างแบคทีเรียในกลุ่ม PGPB ได้แก่ *Ochrobactrum* sp. MC22, *Pseudomonas fluorescens* MC46 และ *Pseudomonas* sp. MS45 กับจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา เป็นต้น ต่อการเจริญเติบโตของพืช หรือการเลือกศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะอื่น โดยการเริ่มผสมแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในเวลาที่แตกต่างออกไป อย่างเช่น ที่เวลา 3 ชั่วโมง นอกจากนี้สามารถเลือกศึกษาในปริมาตรของสารสกัดจากอาหารเหลว MSM จากการเลี้ยงเชื้อต่างๆ ที่แตกต่างจากปริมาตร 5 mL, 20 mL และ 35 mL ที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาไว้ รวมไปถึงการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสูตรอื่นนอกเหนือจากสูตร Mineral-salt medium (MSM) และการเลือกใช้ตัวทำละลายอื่นที่นอกเหนือจากเอทิลอะซิเตท และอาจทำการแยกสารเมแทบอไลต์จากปฏิสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียก่อน โดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) และเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อระบุสารเมแทบอไลต์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมีฤทธิ์ยับยั้งหรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอย่างไร แล้วจึงนำสารสกัดมาทดสอบผลการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

หากสำเร็จในการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากและลำต้นพืชทางผู้วิจัยคาดว่าอาจเป็นประโยชน์ในการนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้บำบัดดินและสามารถช่วยยกระดับคุณภาพการเพาะปลูกทางการเกษตรได้ดียิ่งขึ้น รวมไปถึงช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรและช่วยลดการใช้สารเคมีลงได้

เอกสารอ้างอิง

1. Walker, T. S.; Bais, H. P.; Grotewold, E.; Vivanco, J. M. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 44–51.
2. Ahemad, M.; Kibret, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University.* **2014**, *26*, 1-20.
3. Sipahutar, M. K.; Vangnai, A. S. Role of plant growth-promoting *Ochrobactrum* sp. MC22 on triclocarban degradation and toxicity mitigation to legume plants. *Journal of Hazardous Materials.* **2017**, *329*, 38-48.
4. Sipahutar, M. K.; Vangnai, A. S.; Piapukiew, J. Efficiency of the formulated plant-growth promoting *Pseudomonas fluorescens* MC46 inoculant on triclocarban treatment in soil and its effect on *Vigna radiata* growth and soil enzyme activities. *Journal of Hazardous Materials.* **2017**, *344*, 883-892.
5. อ้างอิงจากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการของ รองศาสตราจารย์อลิสา วั่งใน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. Ahn, K. C.; Zhao, B.; Chen J.; Cherednichenko, G.; Sanmarti, E.; Denison, M. S.; Lasley, B.; Pessah, I. N.; Kultz, D.; Chang, D. P. Y.; Gee, S. J.; Hammock, B. D. In Vitro Biologic Activities of the Antimicrobials Triclocarban, Its Analogs, and Triclosan in Bioassay Screens: Receptor-Based Bioassay Screens. *Environ Health Perspect.* **2008**, *116*, 1203-1210.
7. Prosser, R. S.; Lissemore, L.; Solomon, K. R.; Sibley, P. K. Toxicity of biosolids-derived triclosan and triclocarban to six crop species. *Environ Toxicol Chem.* **2014**, *33*, 1840-1848.
8. Gómez-Sagasti, M. T.; Marino D. PGPRs and nitrogen-fixing legumes: a perfect team for efficient Cd phytoremediation?. *Front Plant Sci.* **2015**, *81*, 3389-3398.
9. Chatterjee, S.; Sau, G. B.; Sinha, S.; Mukherjee, S. K. Effect of co-inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of amaranth plants. *Archives of Agronomy and Soil Science.* **2012**, *58*, 1387-1397.

10. Rajkumar, M.; Nagendran, R.; Lee, K.J.; Lee, W.H. Characterization of a novel Cr⁶⁺ reducing *Pseudomonas* sp. with plant growth-promoting potential. *Curr Microbiol.* **2005**, *50*, 266–271.
11. Bianco, C.; Imperlini, E.; Calogero, R. Indole 3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. *Arch Microbiol.* **2006**, *185*, 373-382.
12. Sinha, S.; Mukherjee, S.K. Cadmium-induced siderophore production by a high Cd resistant bacterial strain relieved Cd-toxicity in plants through root colonization. *Curr Microbiol.* **2008**, *56*, 55–60.
13. Glick, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Hindawi Publishing Corporation.* **2012**, 12-20.
14. Whipps, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the Rhizosphere. *Journal of Experimental Botany.* **2001**, *52*, 487-511.
15. https://www.researchgate.net/figure/The-rhizosphereThe-rhizosphere-is-a-narrow-zone-of-soil-a-few-millimetres-wide-that_fig1_256930702. (accessed Feb 10, 2018)
16. Siddiqui, Z. A. Biocontrol and Biofertilization. Springer, Netherlands
17. Bashan, Y.; de-Bashan, L. E. BACTERIA | Plant Growth-Promoting. *Encyclopedia of Soils in the Environment.* **2005**, 103-115.
18. Somers, E. Rhizosphere Bacterial Signalling: A Love Parade Beneath Our Feet. *Critical Reviews in Microbiology.* **2004**, *26*, 91-110.
19. Lakha, S. S.; Glick, B. R. Plant growth promoting bacteria. *Modern Microbiology.* **2007**, 503-516.
20. Brady, R. H.; Kurtz, L. T. Determination of Total Organic and Available Forms of Phosphorus in Soils. *Soil Science.* **1945**, *59*, 36-45.
21. Goldstein, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspective and future prospects. *Am J Altern Agri.* **1986**, *1*, 51–57.
22. Buensanteai, N.; Yuen, G. Y.; Prathuangwong, S. The biocontrol bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 produces auxin, surfactin and extracellular proteins for enhanced growth of cucumber plant, *Thai J. Agric. Sci.* **2008**, *41*, 101-116.

23. Ribinky, D.; Cohn, J.; Hu, W. S.; Cooke, T. An extraordinary auxin surge following fertilization in carrot: its significance for plant totipotency. *Plant*. **2002**, *214*, 505-509.
24. Hedden, P.; Thomas, S. G. Plant hormone signaling. *Blackwell publ. Ltd, Oxford*
25. Pinton, R. Z.; Nannipieri, P. Biochemistry and organic substances at the soil plant interface. *Taylor and Francis Group*. **2007**, New York.
26. Crowley, E. Iron nutrition in plants and Rhizosphere microorganisms. *Microbial siderophore in the plant Rhizosphere*. **2006**, 169-198.
27. Boukhafa, H.; Crumbliss, A. L. Chemical aspects of siderophore mediated transport. *BioMetals*. **2002**, *15*, 325-339.
28. Winkelmann, G.; Drechsel, H. Iron chelation and siderophore. *Transition metals in microbial metabolism*. **1997**, 1-40.
29. Leong, J.; Neilands, J. B. Mechanisms of siderophore iron transport in enteric bacteria. *J.Bacteriol*. **1976**, *126*, 823-30.
30. Tamas, M. J.; Martinoia, E. Molecular biology of metal homeostasis and detoxification: from microbes to man. *Springer berlin heidelberg*. **2006**, New York.
31. Ramette, A.; Looco, Y. M.; Defago, G. Prevalence of fluorescent *Pseudomonas* producing antifungal phloroglucenols and/or hydrogen cyanide in soil naturally suppressive or condition to tobacco black root rot. *FEMS Microbiol. Eco*. **2003**, *44*, 35-43.
32. Ramamoorthy, V.; Viswanathan, R.; Raguchandar, J.; Prakasham, T.; Samiyappan, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and diseases. *Crop Protection*. **2001**, *20*, 1-11.
33. Woo, S. G.; Ten, L. N.; Park, J.; Lee, M. *Ochrobactrum daejeonense* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from sludge of a leachate treatment plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2011**, *61*, 2690-2696.
34. Sun, X.; Lu, Q.; Boluk, Y.; Liu, Y. The impact of cellulose nanocrystals on the aggregation and initial adhesion of *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *Royal society of chemistry*. **2014**, *10*, 8923-8931
35. https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/gallery/Low_Angle_Rotary_Shadowed_TEM.aspx. (accessed Mar 24, 2018)

36. Pierson, L. S.; Pierson, E. A. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *Microbiology Letters*. **1996**, *136*, 101–108.
37. Kumar, R.; Arasu, T.; Gunasekaran, P. Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. *Current Science*. **2002**, *82*, 1463-1466.
38. Maurhofer, M.; Keel, C.; Haas, D.; Defago, G. Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress but not cucumber. *EJPP*. **1994**, *100*, 221-232.
39. Georgakopoulos, D.; Hendson, M.; Ponopoulos, N.; Schroth, M. Cloning of a phenazines biosynthetic locus of *P. aureofaciens* PGS 12 and analysis of its expression in vitro with the ice nucleator receptor gene. *Appl Environ Microbiol*. **1994**, *49*, 28-32.
40. David, B. V.; Chandrasehar, G.; Selvam, P. N. *Pseudomonas fluorescens*: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops. *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*. **2018**, 221–243.
41. <http://www.alamy.com/stock-photo-scanning-electron-micrograph-sem-of-pseudomonas-aeruginosa-bacteria-155847852.html>. (accessed Mar 24, 2018)
42. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triclocarban> (accessed Mar 24, 2018)
43. Stoker, T. E.; Kavlock, R. J. Pesticides as Endocrine-Disrupting Chemicalsa. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)*, **2010**, 551–569
44. Mishra, P.K.; Mishra, S.; Selvakumar, G.; Bisht, J.K.; Kundu, S.; Gupta, H.S. Co-inoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol*. **2009**, *25*, 753-761.
45. Rajendran, G.; Sing, F.; Desai, A.J.; Archana, G. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* sp. *Bioresour. Technol*. **2008**, *99*, 4544-4550.
46. *Bradyrhizobium japonicum* on soybean nodulation, growth and rhizosphere soil microbial community structures. *School of Biotechnology*. **2012**.

47. Wakefield, J.; Hassan, H. M.; Jaspars, M.; Ebel, R.; Rateb, M. E. Dual Induction of New Microbial Secondary Metabolites by Fungal Bacterial Co-cultivation. *Frontiers in Microbiology*. **2017**, *8*, 1284.
48. Jalili, F.; Khavazi, K.; Pazira, E.; Nejati, A.; Rahmani, H. A.; Sadaghiani, H. R.; Miransari, M. Isolation and characterization of ACC deaminase-producing Fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *J. Plant Physiol.* **2009**, *166*, 667-674.
49. Tank, N.; Saraf, M. Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants. *J. Plant Interact.* **2010**, *5*, 51-58.
50. Saharan, B. S.; Nehra, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci. Med. Res.* **2011**, *21*, 1-30.





ภาคผนวก

ตารางที่ A1 ค่าความยาวของรากถั่วเขียว *Vigna radiata* ที่มีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่ต่างกัน เทียบกับชุดควบคุม

ขวดที่	ชุดควบคุม	ปริมาณ culture (mL)			วันที่	ความยาวราก (เซนติเมตร)					p-value
		MC22	MC46	MS45		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
1	-	20	-	-	1	6.4	2.1	3.9	2.3	15.0 ± 1.5	0.173*
					2	5.8	2.3	2.7	4.1		
					3	7.3	5.1	4.1	3.0		
2	-	-	20	-	1	3.1	2.7	2.0	3.4	14.9 ± 3.1	0.415*
					2	10.7	2.4	3.5	2.9		
					3	8.2	2.5	3.0	3.2		
3	-	-	-	20	1	3.8	10.5	4.5	6.3	10.2 ± 3.5	0.880*
					2	3.0	2.2	3.6	3.1		
					3	3.6	3.2	2.9	4.7		
4	-	15	5	-	1	3.0	3.3	2.5	3.8	10.5 ± 1.4	0.181
					2	2.3	4.7	3.0	3.4		
					3	2.9	3.5	2.8	2.8		
14	✓	15	5	-	1	10.4	6.3	1.8	2.4	11.5 ± 1.8	
					2	2.8	3.3	2.4	2.5		
					3	3.5	3.7	3.4	3.0		

* p-value เทียบกับ MSM (ขวดที่ 24)

ชนิดที่	ชุดควบคุม	ปริมาณ culture (mL)			ต้นที่	ความยาวราก (เซนติเมตร)					p-value
		MC22	MC46	MS45		ซ้ที่ 1	ซ้ที่ 2	ซ้ที่ 3	ซ้ที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
5	-	-	5	15	1	7.1	3.2	3.8	2.5	14.3 ± 2.0	0.064
					2	5.4	2.6	2.7	3.6		
					3	3.8	3.0	2.4	2.3		
15	✓	-	5	15	1	4.5	5.4	4.0	3.2	15.6 ± 1.5	
					2	9.7	6.3	2.9	3.1		
					3	7.7	3.7	3.1	3.4		
6	-	5	-	15	1	7.2	3.3	3.2	2.9	12.2 ± 2.0	0.205
					2	4.3	6.0	3.6	4.0		
					3	4.4	5.1	4.1	2.9		
16	✓	5	-	15	1	2.9	6.5	3.7	3.2	12.0 ± 0.8	
					2	7.9	3.7	2.9	3.6		
					3	2.6	5.3	3.1	3.5		
7	-	10	10	-	1	4.1	2.3	4.1	4.0	10.3 ± 2.0	0.073
					2	5.6	3.4	3.2	3.7		
					3	9.6	3.1	5.0	3.0		

वादती	खुद कवकुम	पररुडर culture (mL)			तुडती	कवरडरररर (सेनतीडरर)					p-value
		MC22	MC46	MS45		खुडी 1	खुडी 2	खुडी 3	खुडी 4	कडरररर	
17	✓	10	10	-	1	7.5	6.3	3.5	4.3	16.1 ± 1.4	
					2	6.1	5.1	4.1	3.2		
					3	5.4	5.3	2.6	7.5		
8	-	-	10	10	1	8.8	2.0	3.4	3.6	12.3 ± 2.4	0.103
					2	3.4	3.3	2.5	3.2		
					3	3.4	6.3	3.1	4.1		
18	✓	-	10	10	1	8.2	6.4	4.7	3.1	15.2 ± 1.3	
					2	4.6	6.7	2.9	2.0		
					3	6.6	5.9	3.3	2.5		
9	-	10	-	10	1	4.1	5.5	2.4	3.2	17.2 ± 1.4	0.076
					2	4.2	2.6	2.8	2.4		
					3	4.0	4.1	3.4	2.8		
19	✓	10	-	10	1	9.5	7.4	3.8	3.9	16.0 ± 1.5	
					2	9.9	8.7	3.7	5.1		
					3	5.1	9.1	2.9	5.4		

ขวดที่	ชุดควบคุม	ปริมาตร culture (mL)			ชั้นที่	ความยาวลำต้น (เซนติเมตร)					p-value
		MC22	MC46	MS45		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
10	-	5	15	-	1	10.6	6.1	3.9	4.1	11.4 ± 1.2	0.178
					2	5.1	4.3	3.6	3.7		
					3	4.9	2.7	2.9	4.0		
20	✓	5	15	-	1	3.6	3.2	3.7	3.1	11.9 ± 1.0	
					2	3.3	2.9	3.2	8.7		
					3	7.6	6.2	2.8	4.5		
11	-	-	15	5	1	3.8	3.9	3.8	3.8	15.5 ± 2.1	
					2	3.6	2.1	2.5	2.9		
					3	7.2	5.5	2.9	3.6		
21	✓	-	15	5	1	3.9	3.9	3.5	2.8	14.8 ± 0.6	
					2	9.7	4.3	3.7	3.3		
					3	3.3	3.8	3.4	2.7		
12	-	15	-	5	1	10.6	6.7	2.9	2.0	14.0 ± 2.4	
					2	7.2	5.3	3.1	3.1		
					3	8.1	4.1	3.6	3.5		

หมวดที่	ชุดควบคุม	ปริมาณ culture (mL)			ต้นที่	ความยาวลำต้น (เซนติเมตร)					p-value
		MC22	MC46	MS45		ซ้ที่ 1	ซ้ที่ 2	ซ้ที่ 3	ซ้ที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
22	✓	15	-	5	1	2.4	4.3	3.0	3.9	11.7 ± 1.1	
					2	2.1	2.7	2.9	4.5		
					3	4.5	3.1	2.4	2.7		
13	-	6.67	6.67	6.67	1	11.6	4.8	3.9	3.0	14.1 ± 1.7	0.358
					2	10.8	6.1	3.5	2.4		
					3	15.3	5.5	2.8	3.4		
23	✓	6.67	6.67	6.67	1	5.1	3.5	3.9	1.4	14.4 ± 2.2	
					2	8.1	3.6	2.8	4.0		
					3	7.0	5.0	3.1	4.6		
24	MSM 20 mL	-	-	-	1	7.3	3.5	3.7	4.5	13.4 ± 0.5	-
					2	11.2	4.9	3.1	3.0		
					3	12.3	3.1	2.7	3.8		

ตารางที่ A2 ค่าความยาวของลำต้นถั่วเขียว *Vigna radiata* ที่มีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เทียบกับชุดควบคุม

ขวดที่	ชุดควบคุม	ปริมาณ culture (mL)			ต้นที่	ความยาวลำต้น (เซนติเมตร)					p-value
		MC22	MC46	MS45		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
1	-	20	-	-	1	18.5	8.4	17.3	19.3	15.0 ± 1.5	0.644*
					2	19.6	6.2	16.7	16.1		
					3	17.3	8.9	18.1	19.1		
2	-	-	20	-	1	15.7	14.4	15.3	11.9	14.9 ± 3.1	0.338*
					2	19.8	16.8	16.0	10.2		
					3	19.0	13.6	16.3	10.9		
3	-	-	-	20	1	18.0	12.6	12.6	21.0	10.2 ± 3.5	0.442*
					2	10.4	10.3	13.0	19.9		
					3	18.6	11.6	15.5	19.8		
4	-	15	5	-	1	9.4	12.2	10.8	13.2	10.5 ± 1.4	0.795
					2	5.1	9.2	10.0	13.6		
					3	6.6	9.5	11.5	14.6		
14	✓	15	5		1	8.6	6.9	15.8	7.0	11.5 ± 1.8	
					2	15.2	8.3	14.1	10.1		
					3	16.5	8.2	16.5	11.1		

* p-value เทียบกับ MSM (ขวดที่ 24)

หมวดที่	ชุดควบคุม	ปริมาณ culture (mL)			ต้นที่	ความยาวลำต้น (เซนติเมตร)					p-value
		MC22	MC46	MS45		ซ้าที่ 1	ซ้าที่ 2	ซ้าที่ 3	ซ้าที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
5	-	-	5	15	1	14.8	11.9	16.9	16.0	14.3 ± 2.0	0.751
					2	17.5	13.2	15.9	16.3		
					3	16.9	10.1	16.7	15.8		
15	✓	-	5	15	1	21.2	14.2	18.6	16.9	15.6 ± 1.5	
					2	16.8	12.3	18.1	13.5		
					3	17.2	11.7	16.7	10.1		
6	-	5	-	15	1	12.7	13.4	8.8	17.4	12.2 ± 2.0	
					2	8.8	11.3	8.9	17.5		
					3	9.7	11.9	8.1	18.3		
16	✓	5	-	15	1	9.0	15.4	9.6	11.6	12.0 ± 0.8	
					2	11.3	13.4	14.5	11.9		
					3	14.1	13.7	8.0	11.0		
7	-	10	10	-	1	10.1	10.3	7.2	17.1	10.3 ± 2.0	0.090
					2	10.3	7.6	7.3	15.8		
					3	9.8	5.6	7.5	14.7		

वादकी	खुद कवकुम	पररुडर culture (mL)			तुडकी	कवरुडरलरतुडन (खनतुडडर)					p-value
		MC22	MC46	MS45		खरती 1	खरती 2	खरती 3	खरती 4	कुररुडुडर	
17	✓	10	10	-	1	7.2	20.6	18.1	15.1	16.1 ± 1.4	
					2	18.3	19.2	18.3	14.2		
					3	19.9	15.2	19.4	14.3		
8	-	-	10	10	1	17.5	8.6	16.2	16.0	12.3 ± 2.4	0.251
					2	16.6	9.0	15.7	16.2		
					3	14.9	18.6	15.3	19.5		
18	✓	-	10	10	1	15.3	19.5	11.4	13.2	15.2 ± 1.3	
					2	15.7	19.1	16.1	14.9		
					3	13.7	17.7	14.6	11.0		
9	-	10	-	10	1	21.6	13.2	17.3	19.3	17.2 ± 1.4	0.633
					2	18.3	13.3	18.1	17.0		
					3	19.3	12.7	19.5	16.6		
19	✓	10	-	10	1	19.0	15.6	19.1	12.2	16.0 ± 1.5	
					2	20.1	15.4	18.7	11.1		
					3	16.7	14.7	16.2	13.0		

ขวดที่	ชุดควบคุม	ปริมาตร culture (mL)			ต้นไม้	ความยาวลำต้น (เซนติเมตร)					p-value
		MC22	MC46	MS45		ซ้าที่ 1	ซ้าที่ 2	ซ้าที่ 3	ซ้าที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
10	-	5	15	-	1	14.8	15.4	13.4	17.3	3.8 ± 0.2	0.730
					2	10.2	14.6	15.1	15.6		
					3	15.0	14.8	14.9	16.5		
20	✓	5	15	-	1	8.1	13.3	8.7	12.8	3.0 ± 0.4	
					2	12.5	13.1	11.8	14.7		
					3	8.7	14.9	10.7	13.2		
11	-	-	15	5	1	18.6	12.6	20.1	13.3	2.7 ± 0.3	
					2	19.1	6.8	18.3	12.4		
					3	19.0	13.5	18.7	13.2		
21	✓	-	15	5	1	12.5	16.2	14.2	16.2	3.2 ± 0.3	
					2	12.1	16.9	15.6	13.3		
					3	15.0	14.6	15.1	16.1		
12	-	15	-	5	1	18.3	9.3	19.7	8.7	5.0 ± 1.3	0.910
					2	16.3	14.6	18.9	7.0		
					3	15.4	15.0	17.1	7.3		

ขวดที่	ชุดควบคุม	ปริมาตร culture (mL)			ชั้นที่	ความยาวลำต้น (เซนติเมตร)					p-value
		MC22	MC46	MS45		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
22	✓	15	-	5	1	8.3	13.0	14.3	7.9	11.7 ± 1.1	
					2	8.6	10.6	13.1	12.9		
					3	9.2	12.9	15.3	14.1		
13	-	6.67	6.67	6.67	1	13.0	18.2	18.4	11.3	14.1 ± 1.7	0.844
					2	16.1	9.3	17.2	10.6		
					3	18.6	9.2	18.3	8.9		
23	✓	6.67	6.67	6.67	1	15.6	5.4	16.7	16.7	14.4 ± 2.2	
					2	14.1	12.7	18.1	18.5		
					3	13.9	11.2	16.6	18.3		
24	MSM 20 mL	-	-	-	1	15.4	12.6	14.2	14.3	13.4 ± 0.5	-
					2	16.2	13.0	13.9	10.1		
					3	12.9	12.5	11.5	13.6		



ตารางที่ A3 แสดงค่าความยาวของรากถั่วเขียว *Vigna radiata* ที่มีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่แตกต่างกันเป็นจำนวนเท่า เทียบกับขวดที่ 1-3 และค่า p-value

ขวดที่	MC22 (ขวดที่ 1)		MC46 (ขวดที่ 2)		MS45 (ขวดที่ 3)	
	Fold ^a	p-value	Fold ^b	p-value	Fold ^c	p-value
4	1.2	0.488	0.7	0.167	0.8	0.378
5	1.2	0.330	0.7	0.206	0.9	0.468
6	1.5	0.290	0.9	0.652	1.1	0.753
7	1.4	0.091	0.8	0.483	1.0	0.942
8	1.0	0.885	0.6	0.163	0.7	0.305
9	1.4	0.102	0.8	0.514	1.0	0.946
10	1.6	0.337	0.9	0.720	1.1	0.600
11	1.1	0.280	0.6	0.195	0.8	0.371
12	2.1	0.136	1.2	0.231	1.5	0.331
13	2.0	0.078	1.2	0.345	1.4	0.294

Fold ^{a, b, c} คือ การเปรียบเทียบค่าความยาวรากของถั่วเขียวขวดที่ 4-13 เทียบกับขวดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ A4 แสดงค่าความยาวของลำต้นถั่วเขียว *Vigna radiata* ที่มีสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียในอัตราส่วนที่ต่างกันเป็นจำนวนเท่า เทียบกับขวดที่ 1-3 และค่า p-value

ขวดที่	MC22 (ขวดที่ 1)		MC46 (ขวดที่ 2)		MS45 (ขวดที่ 3)	
	Fold ^a	p-value	Fold ^b	p-value	Fold ^c	p-value
4	0.701	0.873	0.699	0.255	1.025	0.949
5	0.959	0.873	0.956	0.798	1.402	0.355
6	0.819	0.491	0.816	0.308	1.197	0.638
7	0.688	0.251	0.685	0.104	1.006	0.989
8	0.820	0.514	0.817	0.373	1.199	0.652
9	1.150	0.544	1.146	0.332	1.682	0.140
10	0.762	0.341	0.760	0.109	1.115	0.767
11	1.035	0.892	1.032	0.859	1.514	0.254
12	0.935	0.811	0.932	0.732	1.367	0.418
13	0.943	0.819	0.940	0.708	1.379	0.379

Fold^{a, b, c} คือ การเปรียบเทียบค่าความยาวลำต้นของถั่วเขียว ขวดที่ 4-13 เทียบกับขวดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวณัฐชา สวัสดิ์มงคล เกิดเมื่อวันที่ 22 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2538 ที่จังหวัดราชบุรี สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเบญจมราชูทิศ ราชบุรี จังหวัดราชบุรี เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 107/1 หมู่ 1 ตำบลเขาสามสืบบาบ อำเภอกำมะกา จังหวัดกาญจนบุรี รหัสไปรษณีย์ 71120 อีเมล natcha.sawa@gmail.com

