

บทความวิจัย (Research Article)

การแยกและระบุชนิดแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืช
จากดินรอบรากตะไคร้

Isolation and Identification of Actinomycetes Producing
Plant Growth-Promoting Substances from the Rhizosphere of the
Cymbopogon citratus

นีลวรรณ พงศ์ศิลป์¹, จินตนาถ วงศ์ขวาลิต², รัชณี มิ่งมา², พงศ์ระวี นิ่มน้อย^{2*}

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

² สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Neelawan Pongsilp¹, Jintanart Wongchawalit², Ratchanee Mingma²,
Pongrawee Nimnoi^{2*}

¹ Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, 73000, Thailand

² Division of Microbiology, Department of Science and Bioinnovation, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand

* Corresponding author

E-mail address: pongrawee.n@ku.th

Received: 17/10/2025; Revised: 24/11/2025; Accepted: 25/11/2025

คำสำคัญ

แอคติโนมัยซีท
กรดอินโดล-3-แอซิดิก
แอมโมเนีย
ERIC-PCR
RAPD

บทคัดย่อ

แอคติโนมัยซีทเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อพืช เพราะสามารถส่งเสริมการเจริญ
ป้องกันการเกิดโรคในพืช และช่วยหมุนเวียนธาตุอาหารในดิน จุดประสงค์ในการวิจัยนี้
เพื่อแยกและระบุชนิดแอคติโนมัยซีทจากดินรอบรากตะไคร้ และประเมินคุณสมบัติในการ
ผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก (IAA) และแอมโมเนีย (NH₃) จากการทดลองสามารถแยกเชื้อ
แอคติโนมัยซีทได้จำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งทุกสายพันธุ์สามารถผลิต IAA และ NH₃ ได้มีค่า
ระหว่าง 11.71±0.96 ถึง 43.41±0.80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 7.02±1.16 ถึง
33.77±1.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สายพันธุ์ A16 ผลิต IAA และ NH₃ ได้สูงที่สุด
อย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค Enterobacterial
repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) และ
Random amplified polymorphic DNA (RAPD) พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะลาย
พิมพ์ DNA ที่จำเพาะต่อแต่ละสายพันธุ์ จากการระบุสกุลของสายพันธุ์ A16 ด้วยการ
วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าเป็นสมาชิกของสกุล *Streptomyces*

โดยแอคติโนมัยซีท์ที่แยกได้เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช และทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชในแปลงปลูกจริงต่อไป

KEYWORDS

Actinomycetes
Indole-3-acetic acid
Ammonia
ERIC-PCR
RAPD

ABSTRACT

Actinomycetes are a group of bacteria crucial for plants as they enhance growth, protect against diseases, and contribute to nutrient cycling in soil. This study aimed to isolate and identify actinomycetes from the rhizosphere of lemongrass and to evaluate their ability to produce indole-3-acetic acid (IAA) and ammonia (NH₃). Five actinomycete strains were successfully obtained, all capable of producing IAA and NH₃, with concentrations ranging from 11.71±0.96 to 43.41±0.80 µg/ml and 7.02±1.16 to 33.77±1.00 mg/ml, respectively. Strain A16 produced significantly higher amounts of IAA and NH₃. The DNA fingerprints of these actinomycetes were assessed using Enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) and Random amplified polymorphic DNA (RAPD). Both methods generated distinct DNA fingerprints specific to individual strains. Analysis of 16S rDNA sequencing identified strain A16 as a member of the genus *Streptomyces*. These actinomycete strains warrant further investigation for their potential to suppress plant pathogens and promote plant growth under field conditions.

1. บทนำ

ความสัมพันธ์ระหว่างพืชและแบคทีเรียในดินเกี่ยวข้องโดยตรงกับความอุดมสมบูรณ์ของดินและความสมบูรณ์ของพืช พบว่าหากในดินมีปริมาณแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์มาก จะส่งผลให้ดินมีการหมุนเวียนของสารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ ในปริมาณสูง ทำให้พืชได้รับประโยชน์มากตามไปด้วย เป็นที่ทราบกันว่าแอคติโนมัยซีท์เป็นแบคทีเรียที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ โดยส่งเสริมการหมุนเวียนของธาตุต่าง ๆ ในดิน เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม เหล็ก สังกะสี และทองแดง ทั้งยังสามารถสร้างฮอร์โมนพืชที่สำคัญต่าง ๆ เช่น กรดอินโดล-3-แอซิดิก (Indole-3-acetic acid; IAA) และกรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid) ได้อีกด้วย (Silva et al., 2022) ปกติแล้วในดินจะมีปริมาณของไนโตรเจนอย่างจำกัดและมักไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช อนึ่งจากรายงานพบว่าแอคติโนมัยซีท์มีความสัมพันธ์แบบซิมไบโอซิสกับพืชคล้ายแบคทีเรียในสกุล (genus) *Rhizobium* และมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ทั้งยังเกิดปมกับรากพืชได้ (Boukhatem et al., 2022) แอคติโนมัยซีท์สกุล *Nocardia*, *Pseudonocardia* และ *Streptomyces* สามารถสร้างแอมโมเนีย (Ammonia; NH₃) และปลดปล่อยสู่ดินซึ่งพืชสามารถดูดซับได้โดยตรง เพราะโดยปกติพืชจะเปลี่ยนรูปของสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียก่อนนำไปใช้สร้างกรดอะมิโนและสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ (Nimnoi et al., 2014)

นอกจากนั้นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของแอคติโนมัยซีท์คือความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช ทั้งนี้ IAA เป็นหนึ่งในฮอร์โมนพืชสำคัญ มีฤทธิ์ควบคุมการเจริญและควบคุมกลไกหลายชนิดในการพัฒนาของเซลล์พืช จากการศึกษาพบว่าการเติมแอคติโนมัยซีท์ที่สร้าง IAA และ NH₃ อาทิ *Streptomyces* sp. ลงในดินปลูกแตงกวา (*Cucumis sativus*) สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้อย่างมีนัยสำคัญ (Omar et al., 2022) Nimnoi et al. (2014) รายงานการค้นพบแอคติโนมัยซีท์จำนวน 8 สายพันธุ์ ซึ่งทุกสายพันธุ์สามารถสร้าง IAA, NH₃ และไซเดอร์โอโรฟอรั (siderophore) ได้ โดยเมื่อผสมเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่แยกได้ร่วมกับ

Bradyrhizobium และปลูกเชื้อกับถั่วเหลือง (*Glycine max*) และทดสอบการส่งเสริมการเจริญ การสร้างปมรากถั่วและธาตุอาหารในต้นถั่ว พบว่าการใช้แอกติโนมัยซีทเป็นกล้ำเชื้อร่วมกับ *Bradyrhizobium* สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองและส่งเสริมการเกิดปมได้ดีกว่าการใช้ *Bradyrhizobium* เป็นกล้ำเชื้อเพียงชนิดเดียว อีกทั้งจากการวิเคราะห์ธาตุอาหารในพืชยังพบว่าการปลูกเชื้อทั้ง 2 ชนิดร่วมกันยังส่งเสริมให้ถั่วเหลืองดูดซับแร่ธาตุต่าง ๆ ได้ดียิ่งขึ้นด้วย El-Tarabily et al. (2008; 2010) รายงานว่าแอกติโนมัยซีทสกุล *Actinoplanes*, *Micromonospora* และ *Streptomyces* สามารถส่งเสริมการเจริญของแตงกวา (*C. sativus*) ได้ และเมื่อทดลองใช้แอกติโนมัยซีทดังกล่าวในการปลูกต้นถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris*) ก็สามารถช่วยเพิ่มการดูดซับธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม เหล็ก แมงกานีสและแมกนีเซียมให้แก่ต้นถั่วแดงหลวงได้

จากข้อมูลความสำเร็จดังกล่าวข้างต้นจะพบได้ว่าแอกติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์สำคัญที่สามารถประยุกต์ใช้เพื่อบำรุงดินและส่งเสริมการเจริญของพืชได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้แยกและคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถผลิต IAA และ NH_3 ได้ในปริมาณมากจากดินรอบรากตะไคร้ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีรายงานการแยกเชื้อจุลินทรีย์ศักยภาพสูงสำหรับส่งเสริมการเจริญของพืชและยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชได้หลายชนิด (Akponah and Ubogu 2023; Wongsariya et al., 2025) และใช้เทคนิค Enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) และ Random amplified polymorphic DNA (RAPD) เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ DNA และระบุสกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เพื่อที่จะได้เชื้อแอกติโนมัยซีทศักยภาพสูงพร้อมสำหรับนำไปผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชเศรษฐกิจและควบคุมโรคพืชที่สำคัญต่าง ๆ ต่อไปในอนาคต

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) จำนวน 1 จุดภายในบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยขุดลึกไปประมาณ 5-10 เซนติเมตร และนำตัวอย่างดินผึ่งแดดให้แห้งเป็นเวลา 7 วัน เจือจางตัวอย่างดินโดยนำดิน 10 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลาย Phenol ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 125 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 15 นาที และนำไปเจือจางด้วยเทคนิค Ten-fold dilution และเกลี่ยลงบนอาหาร Humic Vitamin agar (HV) (Hayakawa et al., 2004) ที่ผสม nystatin และ cycloheximide ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ nalidixic acid ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีแอกติโนมัยซีทที่มีลักษณะแตกต่างกันมาแยกบริสุทธิ์ในอาหาร International Streptomyces Project-2 (ISP-2) (Shirling and Gottlieb, 1966) และทำการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การทดสอบการสร้าง IAA

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้ในอาหาร ISP-2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติม tryptophan ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบ/นาที่ ในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดปริมาณ IAA โดยใช้ส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Salkowski's reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (Gordon and Weber, 1951) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ/ไอโซเลตและนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA

2.3 การทดสอบการสร้าง NH_3

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้ในอาหาร Peptone water (Hi-Media, India) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับ Nessler reagent ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 395 นาโนเมตร (Liotenberg et al., 1996) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ/ไอโซเลตและนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน NH_4Cl

2.4 การสกัด DNA

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีฟที่คัดเลือกได้ในอาหาร ISP-2 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นเติม glass beads (Sigma-Aldrich, Singapore) 0.5 กรัม และสกัด DNA ด้วยเครื่อง Bead mill homogenizer (Bead Ruptor Elite, Omni International, GA, USA)

2.5 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค ERIC-PCR

สกัด DNA จากเชื้อแอคติโนมัยซีฟที่คัดเลือกได้และนำ DNA มาใช้เป็น DNA แม่แบบในการสร้างลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค ERIC-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGG G-3') และ ERICR (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TAC-3') (Nimnoi et al., 2010) สร้าง Dendrogram จากรูปแบบลายพิมพ์ DNA ที่ได้โดยวิธี unweighted pair groups using mathematical averages algorithm (UPGMA) ด้วยโปรแกรม Phoretix 1D Pro software (Total Lab Ltd., UK)

2.6 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค RAPD

นำ DNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีฟที่คัดเลือกได้มาใช้เป็น DNA แม่แบบในการสร้างลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD3 (5'-GTA GAC CCG T-3') (Nimnoi et al., 2010) สร้าง Dendrogram จากรูปแบบลายพิมพ์ DNA ที่ได้โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม Phoretix 1D Pro software (Total Lab Ltd., UK)

2.7 การระบุสกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีฟที่ผลิต IAA และ NH_3 ได้ปริมาณสูงที่สุดมาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP-2 และลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA โดยนำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Quick Taq® HS DyeMix (Toyobo, Japan) และไพรเมอร์ 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') และ 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') ดังอธิบายใน Mahdi et al. (2022) สกัดแยกและทำบริสุทธิ์ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ด้วยชุด GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR) (Vivantis, Malaysia) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1st Base Inc. Malaysia จากนั้นเปรียบเทียบและระบุสกุลของเชื้อแอคติโนมัยซีฟกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ด้วยโปรแกรม BLASTN และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar et al., 2018) โดยวิเคราะห์ด้วย ClustalW กำหนดค่า bootstrap ที่ 1,000 ครั้ง และวิธี Neighbor-joining แบบ Maximum Composite Likelihood

2.8 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS software version 19.0 (IBM Corp., IL, USA) โดยเลือกการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Analysis of variance (ANOVA) และใช้รูปแบบการวิเคราะห์แบบ Tukey's กำหนดระดับนัยสำคัญ (p) ที่ 0.05

3. ผลการทดลอง

3.1 การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีฟและการทดสอบคุณสมบัติการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช

จากการทดลองสามารถแยกบริสุทธิ์เชื้อแอคติโนมัยซีฟจากดินรอบรากตะไคร้ได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต ดังตารางที่ 1 โดยเชื้อทุกไอโซเลตที่แยกได้สามารถผลิต IAA และ NH_3 ได้มีค่าระหว่าง 11.71 ± 0.96 ถึง 43.41 ± 0.80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 7.02 ± 1.16 ถึง 33.77 ± 1.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยแอคติโนมัยซีฟทุกไอโซเลตผลิต IAA ได้ปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ไอโซเลต A16 สามารถผลิต IAA ได้ปริมาณสูงที่สุดรองลงมาคือ A11, A7, A18 และ A2 ตามลำดับ นอกจากนั้นไอโซเลต A16 ยังสามารถผลิต NH_3 ได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น ๆ รองลงมาคือ A7, A2, A11 และ A18 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 การสร้าง IAA และ NH_3 ของเชื้อแอคติโนมัยซีท

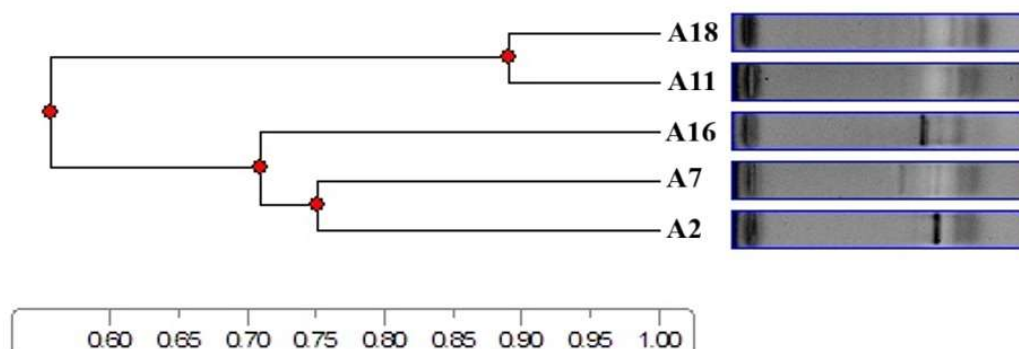
ไอโซเลต	ปริมาณสารส่งเสริมการเจริญของพืช*	
	IAA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	NH_3 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
A2	11.71±0.96a**	21.64±1.36c
A7	23.57±1.69c	22.49±0.93c
A11	31.09±1.03d	16.32±0.44b
A16	43.41±0.80e	33.77±1.00d
A18	17.67±0.37b	7.02 ±1.16a

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**ตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ ANOVA ด้วยวิธีของ Tukey's กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค ERIC-PCR

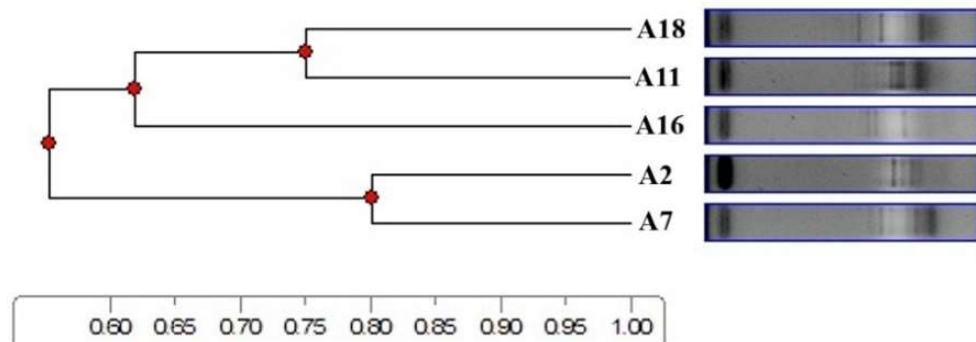
จากการทดลองพบว่าเชื้อทุกไอโซเลตที่แยกได้ปรากฏลายพิมพ์ DNA จากเทคนิค ERIC-PCR (ภาพที่ 1) ซึ่งมีรูปแบบลายพิมพ์ DNA ที่แตกต่างกัน โดยมีขนาดของแถบ DNA ระหว่าง 300-2,500 คู่เบส และเมื่อเปรียบเทียบความคล้ายของลายพิมพ์ DNA ด้วยวิธี UPGMA เพื่อประเมินความหลากหลายของสายพันธุ์ พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีลายพิมพ์ DNA ที่แตกต่างกันจัดเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์กัน Dendrogram จากเทคนิค ERIC-PCR สามารถแบ่งลายพิมพ์ DNA ของเชื้อได้เป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ A11 และ A18 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ A2, A7 และ A16 ทั้งนี้สายพันธุ์ A11 และ A18 มีลายพิมพ์ DNA คล้ายมากที่สุด (ค่า similarity coefficient = 0.90) รองลงมาคือสายพันธุ์ A2 และ A7 (ค่า similarity coefficient = 0.75)



ภาพที่ 1 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ด้วยเทคนิค ERIC-PCR

3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค RAPD

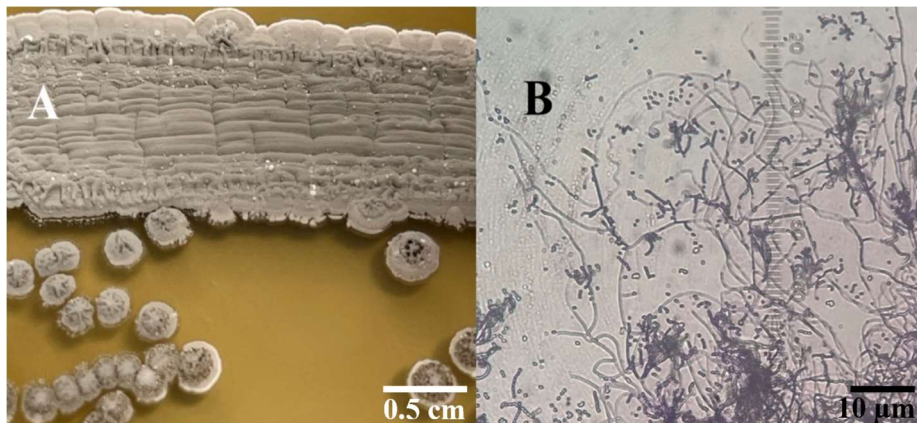
จากการทดลองพบว่าเชื้อทุกไอโซเลตที่แยกได้ปรากฏลายพิมพ์ DNA จากเทคนิค RAPD (ภาพที่ 2) ซึ่งมีรูปแบบลายพิมพ์ DNA ที่แตกต่างกัน โดยมีขนาดของแถบ DNA ระหว่าง 200-3,500 คู่เบส และเมื่อเปรียบเทียบความคล้ายของลายพิมพ์ DNA ด้วยวิธี UPGMA เพื่อประเมินความหลากหลายของสายพันธุ์ พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีลายพิมพ์ DNA ที่แตกต่างกันจัดเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์กัน Dendrogram จากเทคนิค RAPD สามารถแบ่งลายพิมพ์ DNA ของเชื้อได้เป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ A11, A16 และ A18 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ A2 และ A7 ทั้งนี้สายพันธุ์ A2 และ A7 มีลายพิมพ์ DNA คล้ายกันมากที่สุด (ค่า similarity coefficient = 0.80) รองลงมาคือไอโซเลต A11 และ A18 (ค่า similarity coefficient = 0.75)



ภาพที่ 2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่แยกได้ด้วยเทคนิค RAPD

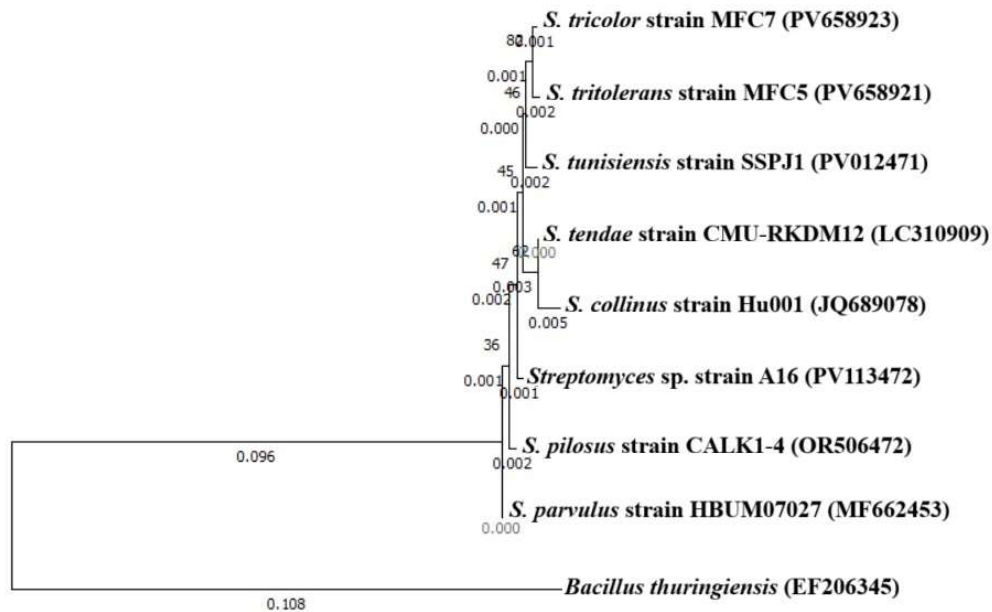
3.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการระบุสกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

จากการทดลองได้คัดเลือกแอคติโนมัยซีท์สายพันธุ์ A16 ที่สามารถผลิต IAA และ NH_3 ได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญมาศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระบุสกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าจากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ A16 บนอาหาร ISP-2 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เชื้อมีลักษณะสีของเส้นใยอากาศเป็นสีเทา สีของเส้นใยสับสเตรทเป็นสีขาวถึงน้ำตาล มีการสร้าง เม็ดสีน้ำตาลถึงดำพบได้บนผิวหน้าโคโลนีและในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 3) และเมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อสร้าง สปอร์แบบกลมเรียงตัวเป็นสายยาว



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีท์สายพันธุ์ A16 ที่เจริญบนอาหาร ISP-2 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (A) และ ลักษณะการเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000X (B)

จากการเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLASTN พบว่าสายพันธุ์ A16 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA กับ *Streptomyces parvulus* และ *Streptomyces tendae* ที่ร้อยละ 99.46 และมีความเหมือนกับ *Streptomyces tricolor* และ *Streptomyces tritolerans* ที่ร้อยละ 99.34 และจาก Phylogenetic tree (ภาพที่ 4) สามารถยืนยันได้ว่าสายพันธุ์ A16 เป็นสมาชิกในสกุล *Streptomyces* และมีความใกล้เคียงสูงกับ *S. parvulus* อนึ่งได้นำเข้าข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ A16 ในฐานข้อมูล NCBI โดยมีรหัส PV113472



ภาพที่ 4 Phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อสายพันธุ์ A16 และเชื้อใกล้เคียงโดยใช้วิธี Neighbor-joining

4. วิเคราะห์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชคือ IAA และ NH_3 จากดินรอบรากตะไคร้ เพราะจากรายงานพบว่าดินรอบรากตะไคร้มีแอคติโนมัยซีท์ที่มีประสิทธิภาพ เช่น มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชและส่งเสริมการเจริญของพืชได้ เช่น พบแอคติโนมัยซีท์สกุล *Micromonospora*, *Nocardia* และ *Streptomyces* ในดินรอบรากตะไคร้ที่ผลิตสารในกลุ่ม carboxylic acid, benzaldehyde และ polyketide ที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช (*Alternaria alternate*, *Aspergillus flavus* และ *Fusarium solani*) และแบคทีเรีย (*Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis*) ได้ (Akponah and Ubogu, 2023; Wongsariya et al., 2025) ทั้งนี้ IAA จัดเป็นฮอร์โมนออกซินธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดีที่สุด แอคติโนมัยซีท์หลายสกุลเช่น *Actinopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* และ *Streptomyces* สามารถผลิต IAA ได้ และใช้เป็นเชื้อปลูกเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชหลายชนิด เช่น พริก พริกไทย ข้าวโพด และมะเขือเทศ (Chaurasia et al., 2018; Djebaili et al., 2020; Boukhatem et al., 2022) มีรายงานว่าแอคติโนมัยซีท์ในสกุล *Actinomadura*, *Nocardia* และ *Streptomyces* สามารถผลิต NH_3 ได้ และเมื่อใช้เป็นเชื้อปลูกก็สามารถช่วยเพิ่มธาตุไนโตรเจนให้แก่พืชได้ เพราะ NH_3 จัดเป็นสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ และเมแทโบไลต์อื่น ๆ (Silva et al., 2022) Nimnoi et al. (2014) ประสบความสำเร็จในการแยก *Nocardia alba* ที่ผลิต IAA และ NH_3 โดยสามารถใช้เป็นเชื้อปลูกเพื่อส่งเสริมการเจริญของต้นกล้วยได้ ซึ่งสามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของรากและลำต้นกล้วยได้ดี แอคติโนมัยซีท์สกุล *Streptomyces* หลายชนิด เช่น *S. albolongus*, *S. cavourensis* และ *S. anulatus* พบรายงานความสามารถในการเพิ่มไนโตรเจนให้กับพืชได้ (Sari et al., 2014)

อนึ่งจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค ERIC-PCR และ RAPD พบว่าลายพิมพ์ DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลตที่ได้จากทั้ง 2 เทคนิคมีความแตกต่างกันอย่างจำเพาะต่อแต่ละไอโซเลต จึงจัดได้ว่าเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์กัน ทั้งนี้เทคนิค ERIC-PCR และ RAPD จัดเป็นเครื่องมือทางอนุพันธุศาสตร์ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างระดับสายพันธุ์ของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบเช่น *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Salmonella* และ *Streptomyces* (Hulton et al., 1991; Nimnoi et al., 2010) และจากการทดลองนี้พบว่าเทคนิคดังกล่าวยังมีความเหมาะสม และสามารถนำมาใช้เปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีท์ได้อย่างดี อนึ่งเมื่อระบุสกุลของเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อสายพันธุ์ A16 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ทั้งนี้จากรายงานพบว่า *Streptomyces* สามารถสร้างสปอร์ที่ไม่ละลายน้ำ แพร่กระจายได้ดีใน

สิ่งแวดล้อม และสร้างเส้นใยในการเจริญในธรรมชาติได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนั้นยังสร้างสารปฏิชีวนะต้านจุลชีพก่อโรคพืช เอนไซม์ และสารส่งเสริมการเจริญของพืชได้หลายชนิด ดังนั้นจึงนิยมใช้เป็นเชื้อปลูกเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืช (Ruanpanun and Nimnoi, 2020) Nonthakaew et al. (2022) ได้ใช้ *Streptomyces* sp. SNN289 ที่มีคุณสมบัติสร้าง siderophores, IAA และ NH_3 และละลายฟอสเฟตได้ในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ซึ่ง *Streptomyces* sp. SNN289 สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้โดยเพิ่มความยาวราก ความสูงต้น และน้ำหนักแห้งอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองไม่ใส่เชื้อ

5. บทสรุป

จากการศึกษาสามารถแยกแอสโตโมยซีทจากดินรอบรากตะไคร้ได้จำนวน 5 สายพันธุ์ โดยทุกสายพันธุ์สามารถผลิต IAA และ NH_3 ได้ ซึ่งมีค่าระหว่าง 11.71 ± 0.96 ถึง 43.41 ± 0.80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 7.02 ± 1.16 ถึง 33.77 ± 1.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สายพันธุ์ A16 สามารถผลิต IAA และ NH_3 ได้ปริมาณสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA พบว่าแอสโตโมยซีทที่แยกได้เป็นเชื้อต่างสายพันธุ์ โดยเทคนิค ERIC-PCR และ RAPD มีความเหมาะสมสำหรับใช้จำแนกลายพิมพ์ DNA ของเชื้อในกลุ่มแอสโตโมยซีท และจากการระบุสกุลของเชื้อสายพันธุ์ A16 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าเป็นสมาชิกของสกุล *Streptomyces* มีความคล้ายกับ *S. parvulus* มากที่สุด ทั้งนี้ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ A16 ที่แยกได้เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาต่อในอนาคตด้านคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช และเหมาะสมที่จะนำไปทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชเศรษฐกิจสำคัญอื่น ๆ เพื่อพัฒนาเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ศัลยกรรมสูงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากสาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2568

เอกสารอ้างอิง

- Akponah, E., & Ubogu, M. (2023). Phytopathogenic fungal growth inhibition by actinomycetes isolated from the rhizosphere of *Cymbopogon citratus* (Lemongrass). *Acta Microbiologica Bulgarica*, 39(3), 308-316. <https://doi.org/10.59393/amb23390312>
- Boukhatem, Z. F., Merabet, C., & Tsaki, H. (2022). Plant growth promoting actinobacteria, the most promising candidates as bioinoculants?. *Frontiers in Agronomy*, 4, 849911. <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.849911>
- Chaurasia, A., Meena, B. R., Tripathi, A. N., Pandey, K. K., Rai, A. B., & Singh, B. (2018). Actinomycetes: an unexplored microorganisms for plant growth promotion and biocontrol in vegetable crops. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 132. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2517-5>
- Djebaili, R., Pellegrini, M., Smati, M., Del Gallo, M., & Kitouni, M. (2020). Actinomycete strains isolated from saline soils: plant-growth-promoting traits and inoculation effects on *Solanum lycopersicum*. *Sustainability*, 12(11), 4617. <https://doi.org/10.3390/su12114617>
- El-Tarabily, K. A., St. J. Hardy, G. E., & Sivasithamparam, K. (2010). Performance of three endophytic actinomycetes in relation to plant growth and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber under commercial field production conditions in the United Arab Emirates. *European Journal of Plant Pathology*, 128, 527-539. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9689-7>

- El-Tarabily, K. A., Nassar, A. H., & Sivasithamparam, K. (2008). Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Applied Soil Ecology*, 39(2), 161-171. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.12.005>
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26(1), 192-195. <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>
- Hayakawa, M., Yoshida, Y., & Imura, Y. (2004). Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 973-981. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02230.x>
- Hulton, C. S., Higgins, C. F., & Sharp, P. M. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*, 5(4), 825-834. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Liotenberg, S., Campbell, D., Castets, A. M., Houmard, J., & de Marsac, N. T. (1996). Modification of the pII protein in response to carbon and nitrogen availability in filamentous heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 144(2-3), 185-190. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(96\)00360-6](https://doi.org/10.1016/0378-1097(96)00360-6)
- Mahdi, R. A., Bahrami, Y., & Kakaie, E. (2022). Identification and antibacterial evaluation of endophytic actinobacteria from *Luffa cylindrica*. *Scientific Reports*, 12(1), 18236. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23073-4>
- Nimnoi, P., Pongsilp, N., & Lumyong, S. (2010). Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 193-203. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0159-3>
- Nimnoi, P., Pongsilp, N., & Lumyong, S. (2014). Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with actinomycetes and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 37(3), 432-446. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.864308>
- Nonthakaew, N., Panbangred, W., Songnuan, W., & Intra, B. (2022). Plant growth-promoting properties of *Streptomyces* spp. isolates and their impact on mung bean plantlets' rhizosphere microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 13, 967415. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.967415>
- Omar, A. F., Abdelmageed, A. H. A., Al-Turki, A., Abdelhameid, N. M., Sayyed, R. Z., & Rehan, M. (2022). Exploring the plant growth-promotion of four *Streptomyces* strains from rhizosphere soil to enhance cucumber growth and yield. *Plants*, 11(23), 3316. <https://doi.org/10.3390/plants11233316>
- Ruanpanun, P., & Nimnoi, P. (2020). Evaluation on the efficiency and persistence of *Streptomyces jietaisiensis* strain A034 in controlling root knot disease and promoting plant growth in the plant-parasitic nematode infested soils. *Biological Control*, 144, 104221. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104221>

- Sari, W. E., Solihin, D. D., & Lestari, Y. (2014). Identification of endophytic actinomycetes from Indonesian rice plant based on 16S rRNA and *nifH* genes analyses. *Advances in Environmental Biology*, 8(7), 2357-2365.
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
- Silva, G. C., Kitano, I. T., Ribeiro, I. A. F., & Lacava, P. T. (2022). The potential use of actinomycetes as microbial inoculants and biopesticides in agriculture. *Frontiers in Soil Science*, 2, 833181. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.833181>
- Wongsariya, K., Duangupama, T., Pansomsuay, R., Thanaboripat, D., & Thawai, C. (2025). Genome characterization for the antimicrobial potential of *Streptomyces samsunensis* SA31, a rhizospheric actinomycete of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Current Applied Science and Technology*, 25(1), e0260305. <https://doi.org/10.55003/cast.2024.260305>