

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชภายใต้สภาวะความเค็ม โดยแอคติโนมัยซีท์ที่คัดแยกจากมูลไส้เดือนดิน

Plant growth promoting activity under saline conditions by actinomycetes isolated from vermicast of earthworm

ทิวาภรณ์ กนกฉันท¹, จิราวรรณ สิทธิสวนจิก¹, เศรษฐวัชร จำปาสาตร์^{2*}, จันทรา อินทนันท³
Tiraporn Kanokchan¹, Jirawan Sitisuanjig¹, Saethawat Chamsart^{2*}, Chantira Indananda³

Received: 22 July 2020 ; Revised: 13 August 2020 ; Accepted: 21 September 2020

บทคัดย่อ

แอคติโนมัยซีท์ไอโซเลต BBUU157 ที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนดิน นำมาจัดจำแนกสกุลโดยใช้ยีน *16S rRNA* พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับแอคติโนมัยซีท์ในสกุล *Streptomyces* จากนั้นตรวจสอบการเจริญภายใต้การเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ตรวจสอบการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา พบว่า สามารถเจริญได้ดีที่สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 7% (w/v) และเจริญได้ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 61.20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 65.70 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ไม่มีการผลิตฮอร์โมนออกซิน ผลิตไซโตไคน์ได้ดีที่สุดในสภาวะที่ไม่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยวัดขนาดโซนสีส้มได้ 4.70 เซนติเมตร ผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้ดีที่ 72 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ และให้ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และเชื้อรา *Penicillium* sp. ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า สามารถนำแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท์ไอโซเลต BBUU157 ใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชภายใต้สภาวะความเค็มและป้องกันพืชจากเชื้อก่อโรคได้

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีท์ แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช มูลไส้เดือนดิน สภาวะความเค็ม

Abstract

Actinomycetes BBUU157 isolated from the vermicast of earthworms was identified to genus level using the *16S rRNA* gene. The results showed that the nucleotide sequence was very similar to that of the genus *Streptomyces*. Growth of the organism under NaCl addition, production of plant growth-promoting agents, antibacterial and antifungal activities were tested. It could grow with 7% (w/v) NaCl and grew well in 800 and 1,000 mM NaCl solutions with a dry cell weight of 61.20 mg/ml and 65.70 mg/ml, respectively. There was no production of auxin hormones but it did produce a maximum siderophore when grown without NaCl. The orange zone size measured was 4.70 cm. It produced a maximum ACC deaminase at 72 hours in the absence of NaCl. It showed the actinomycetes's antagonistic activities against *B. cereus*, *S. aureus* and *Penicillium* sp. It was concluded that the actinomycetes isolate BBUU157 can promote plant growth under saline conditions and protect plants from phyto-pathogenic microorganisms.

Keywords: Actinomycetes, Plant growth promoting bacteria, Vermicast of earthworms, Saline conditions

¹ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

³ อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

¹ Master's Degree, Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, Thailand 20131

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, Thailand 20131

³ Lecturer, Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, Thailand 20131

* Correspondent author: saethawa@buu.ac.th

บทนำ

ความเค็มส่งผลให้สภาวะแวดล้อมของดินไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้รากพืชไม่เจริญ และแร่ธาตุบางอย่างละลายออกมาจากดินจนเป็นพิษต่อพืช พืชแต่ละชนิดปรับตัวเข้ากับสภาพความเค็มได้ต่างกัน หากพืชปรับตัวไม่ได้พืชอาจจะตายได้ (วิชิตพล มีแก้ว และคณะ, 2553) มีการแก้ปัญหาโดยใช้ปุ๋ยชีวภาพในการปรับปรุงดิน การเพิ่มแร่ธาตุอาหารในดิน การดัดแปลงปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อสภาวะดินเค็มได้ดีขึ้น และการประยุกต์ใช้วิธีทางธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth Promoting Bacteria, PGPB) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมและป้องกันพืชจากสภาวะความเครียดต่างๆ เช่น ความเค็ม เชื้อก่อโรคพืช รวมทั้งการใช้ปุ๋ยเคมีเร่งการเจริญเติบโตของพืช

ไส้เดือนดินถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อย่อยสลายอินทรีย์วัตถุอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ รวมถึงการแก้ปัญหาของเสียจากอุตสาหกรรมและสารอินทรีย์ (Hickman and Reid, 2009) ไส้เดือนดินสามารถย่อยและเปลี่ยนแปลงอินทรีย์วัตถุคุณภาพต่ำให้เป็นปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่อุดมไปด้วยธาตุอาหาร โดยทำงานร่วมกับจุลินทรีย์ในดิน (Dominguez *et al.*, 2010 ; Goswami *et al.*, 2014 ; (Singh *et al.*, 2018) มูลไส้เดือนจะทำให้เกิดตะกอนอินทรีย์ที่บวมในดิน ตะกอนอินทรีย์เหล่านี้จะช่วยเพิ่มการหมุนเวียนของธาตุอาหารในดินและปรับปรุงโครงสร้างของดิน (Singh *et al.*, 2018) มูลไส้เดือนดินเป็นผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุต่างๆ ผ่านกระบวนการย่อยโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ของไส้เดือน (Huang *et al.*, 2013) ซึ่งจะประกอบไปด้วยสารอินทรีย์และสารอินทรีย์ เอนไซม์ จุลินทรีย์ และฮอร์โมนส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Singh *et al.*, 2018) พบการรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ในมูลไส้เดือนดิน เช่น จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต (Gopal *et al.*, 2009) แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Pathma and Sakthivel, 2012) แบคทีเรียต้านเชื้อรา (Yasir *et al.*, 2009 ; Pathma and Sakthivel, 2012) และแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ (Pathma and Sakthivel, 2012 ; Singh *et al.*, 2015) ความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่กล่าวมานี้ ช่วยปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดิน ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและต้านทานเชื้อก่อโรคในดิน (Chaoui *et al.*, 2003 ; Arancon *et al.*, 2005 ; Pathma and Sakthivel, 2012) มีการรายงานการพบแอคติโนมัยซิสในสกุล *Streptomyces* ในมูลไส้เดือนดิน (Parthasarathi *et al.*, 2007 ; Gopalakrishnan *et al.*, 2011 ; Pathma and Sakthivel, 2012 ; Singh *et al.*, 2015) ซึ่งเป็นสกุลที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง และพบมากที่สุด

ในดินทุกประเภท (Kämpfer, 2012) และมีบทบาทสำคัญใน

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช *Streptomyces* ที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนดิน สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยการผลิตไซโตไคน์ โดยสารกลุ่มนี้ช่วยพืชทนทานต่อโรค ผลิตฮอร์โมนออกซิน (auxin) ซึ่งเป็นฮอร์โมนส่งเสริมการเจริญเติบโต และการละลายฟอสเฟต (Gopalakrishnan *et al.*, 2011 ; Gopalakrishnan *et al.*, 2014 ; Singh *et al.*, 2015) ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การผลิตฮอร์โมนออกซิน ไซโตไคน์ และเอนไซม์ 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) ของแอคติโนมัยซิสไอโซเลต BBUU157 ที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนดิน

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างแบคทีเรีย

นำแอคติโนมัยซิสไอโซเลต BBUU157 ที่คัดแยกไว้แล้วจากมูลไส้เดือนดิน (จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดฉะเชิงเทรา) โดยเก็บรักษาไว้ในหน่วยวิจัยแอคติโนมัยซิสภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี มาตรวจสอบความบริสุทธิ์บนอาหารแข็งสูตร MS

การจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำแอคติโนมัยซิสไอโซเลต BBUU157 มาศึกษาลักษณะของเส้นใยใต้ผิวหนัง เส้นใยเหนือผิวหนัง สีสปอร์ และรงควัตถุ บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP) ได้แก่ Yeast Extract-Malt Extract Agar (ISP2), Oatmeal Agar (ISP3), Inorganic Salts-Starch Agar (ISP44) และ Glycerol-Asparagine Agar (ISP5) (Shirling and Gottlieb, 1966) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เปรียบเทียบสีกับ Color Harmony Manual (Jacobson *et al.*, 1958) และศึกษาลักษณะของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์

เพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซิสไอโซเลต BBUU157 ในอาหารเหลวสูตร YD (Yeast extract D-glucose) จนกระทั่งเจริญดี นำเซลล์ที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอใน lysozyme solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม 2% SDS ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และ Phenol-chloroform (25 phenol: 24 chloroform: 1 isomyl alcohol) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายที่ได้ จะถูกตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 3 โมลาร์ sodium acetate pH8 ปริมาตร 0.1 เท่าของดีเอ็นเอ และ Isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของดีเอ็นเอ จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH

และปล่อยดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย บัฟเฟอร์ 1X TE นำไปตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วตรวจสอบ ดีเอ็นเอภายใต้ UV illumination

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน 16S rRNA โดยวิธี PCR ใช้ไพรเมอร์ STR1F (5'-TCACGGAGAGTTT-GATCCTG-3') และ STR1530R (5'-AAGGAGATCCAGC-CGCA-3') (Kataoka *et al.*, 1997) ปฏิกริยา PCR ถูกทำที่: 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที 94 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 1 นาที 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และรอบสุดท้ายที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยทำ 35 รอบ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไป ทำให้บริสุทธิ์โดย QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) และส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First Base Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย จากนั้นนำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EZbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ ชาติพันธุ์ในโปรแกรม MEGA โดยใช้วิธี Neighbour-Joining Method (Saitou and Nei, 1987) 20Maximum likelihood และ Maximum parsimony วิเคราะห์ Bootstrap 1,000 ครั้ง คำนวณระยะห่างระหว่างลำดับเบสโดยใช้ Kimura two-parameter (K2P) (Kimura, 1980)

การเจริญเติบโตบนสารละลายเกลือโซเดียม คลอไรด์

นำแอคติโนมัยซีทไอโซเลต BBUU157 ที่เจริญบน อาหารแข็งสูตร MS มาศึกษาการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง สูตร YD agar ที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

การเจริญเติบโตในสารละลายเกลือโซเดียม คลอไรด์²²

เชื้อจากเซลล์แอคติโนมัยซีทไอโซเลต BBUU157 ให้อยู่ในช่วง 10^1 - 10^6 จุดเซลล์แขวนลอยแต่ละระดับการเจือจาง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนจานเพาะเชื้อที่มี อาหารแข็งสูตร YD แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นับจำนวนโคโลนี เพื่อเลือก ระดับการเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นนำเซลล์ที่ระดับการ เจือจางที่เหมาะสม มาล้างเซลล์ด้วย 0.9% normal saline solution จนสะอาด แล้วจึงจุดเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเกลือโซเดียม คลอไรด์ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) (Sadeghi *et al.*, 2012) นำหลอดทดลองไปเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นกรองเซลล์ด้วยกระดาษ กรอง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง

การผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตในสารละลายเกลือ โซเดียมคลอไรด์

การผลิตฮอร์โมนออกซิน

จุดเซลล์แขวนลอยของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต BBUU157 ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร YD ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YD ที่มีสารละลาย เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ และมี L-tryptophan (0.2 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มีด เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นตรวจสอบการผลิตฮอร์โมนออก ซิน (Patten and Glick, 2002) ด้วย Salkowski reagent และ วัดปริมาณการผลิตฮอร์โมนออกซินด้วย spectrophotometer สร้างกราฟมาตรฐานของ การผลิตฮอร์โมนออกซินเพื่อใช้ เปรียบเทียบ

การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase

นำแอคติโนมัยซีทไอโซเลต BBUU157 ที่เจริญใน อาหารแข็งสูตร MS มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Minimal Medium ที่ไม่มีสารเคมี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และไม่มี ACC อาหาร เหลวสูตร Minimal Medium ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และอาหารเหลว สูตร Minimal Medium ที่มี ACC บ่มในที่มีดบนเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นตรวจสอบการมีเอนไซม์ ACC deaminase (*acdS*) ซึ่งเป็นเอนไซม์ควบคุมการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ Degenerate Primer ATT082F และ ATT082R (Indanand 2013)²⁴ และตรวจสอบการผลิต เอนไซม์ ACC deaminase (Penrose and Glick, 2003) โดย เลี้ยงแอคติโนมัยซีทไอโซเลต BBUU157 ในอาหารเหลวสูตร YD บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ล้างเซลล์ด้วย 0.1 โมลาร์ Tris-HCl (pH 8.5) และเลี้ยงต่อ ในอาหารเหลวสูตร Minimal Medium ที่มี ACC ปริมาตร 0.3 มิลลิโมลาร์ และที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ (ทำการ ทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ ต่อนาที ในที่มีด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ดูดส่วนใส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม ACC ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารละลาย HCL ความเข้มข้น 0.56 โมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร และ 0.1%

(w/v) 2,4-dinitrophenylhydrazine (ที่ละลายใน HCl ความเข้มข้น 2 โมลาร์) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเติม NaOH ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน α -ketobutyrate

การผลิตสารไซโตโรฟอร

ตรวจสอบการผลิตสารไซโตโรฟอรในอาหารสูตร Chrome Azurol S (CAS) agar (Schwyn and Neillands, 1987) ตัดชิ้นวุ้นที่มีแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BBUU157 เจริญอยู่บนอาหารแข็งสูตร MS ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร แล้วนำชิ้นวุ้นไปวางบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร CAS ที่ผสมเกล็ดไฮโดรเจนคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หากมีการผลิตสารไซโตโรฟอร จะปรากฏฮาโลโซนรอบๆ โคลนเป็นสีส้ม

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *S. aureus* มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีลงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาเจือจางให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No.0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) โดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.08

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี

Agar Disc Diffusion

เตรียมอาหารแข็ง NA ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดที่ปรับความขุ่นไว้ เกลี่ยให้ทั่วบนผิวอาหาร NA จากนั้นตัดชิ้นวุ้นของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BBUU157 บริเวณที่เชื้อเจริญหนาแน่น (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) ไปวางในจานเพาะเชื้อที่เกลี่ยด้วยเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) นำจานเพาะเชื้อ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

นำเชื้อรา *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Fusarium* sp. เลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตัดชิ้นวุ้น บริเวณที่เชื้อราเจริญหนาแน่น (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5

มิลลิเมตร) นำไปวางตรงกลางในจานเพาะเชื้อ และนำชิ้นวุ้นของแอกติโนมัยซีท (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) วางด้านตรงข้าม 2 ชิ้นให้มีระยะห่างระหว่างเชื้อราและแอกติโนมัยซีท 3 เซนติเมตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แล้วนำจานเพาะเชื้อ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และวัดบริเวณยับยั้ง (%) โดยวัดได้จาก $C-T/C \times 100$ เมื่อ C คือ การเจริญของโคโลนีในชุดควบคุม และ T คือ การเจริญของโคโลนีในชุดทดสอบ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้ผลการวิเคราะห์ ANOVA และ Tukey's multiple ในโปรแกรม Minitab 17 และนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (คำนวณได้จากทดลอง 3 ซ้ำ) ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

การจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่ผลิตเส้นใย 2 ชนิด คือ เส้นใยใต้ผิวอาหารและเส้นใยเหนือผิวอาหาร หรืออาจผลิตเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหารอย่างเดียว เมื่อเส้นใยเกิดการรวมตัวทำให้เส้นใยมีความหนาแน่นเกิดเป็นโคโลนี จากนั้นเส้นใยจะเปลี่ยนรูปแบบไปเป็นสปอร์ (Barka *et al.*, 2016) โคลนของแอกติโนมัยซีทมีสีที่แตกต่างกันออกไป เช่น สีขาว สีเหลือง สีส้ม สีแดง สีม่วง สีเขียว สีน้ำเงิน สีน้ำตาล และสีดำ (รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2548) และจะผลิตรังควัตถุ ซึ่งอาจเป็นสีแดง สีเหลือง สีส้ม สีชมพู สีน้ำตาล สีน้ำเงิน หรือสีดำ ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย อาหารที่ใช้เลี้ยง และจำนวนวันเวลาที่เลี้ยง (Barka *et al.*, 2016) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BBUU157 โดยศึกษาเส้นใยใต้ผิวอาหาร เส้นใยเหนือผิวอาหาร สปอร์ และรังควัตถุ บนอาหาร ISP2, ISP3, ISP4 และ ISP5 ผลแสดงดัง Table 1 และสปอร์มีลักษณะเป็นรูปท่อนสั้นๆ เรียงตัวเป็นเส้นยาว (Rectifexibiles) ผิวสปอร์เรียบ ขนาดประมาณ 0.9-1 ไมโครเมตร (Figure 1)

Table 1. Morphological characteristics of the isolate BBUU157

ISP	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Spores	Soluble pigment
ISP2	white	apricot	grey	grey
ISP3	grey	thistle	grey	grey
ISP4	red-violet	purple	grey	grey
ISP5	heliotrope	purple	-	-

- indicates no production

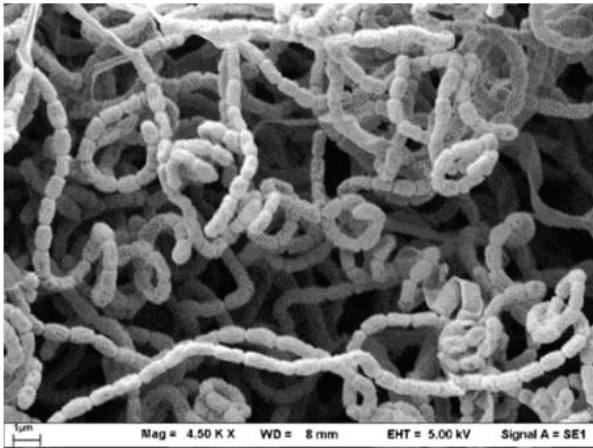


Figure 1. Scanning electron micrograph of BBUU157 cultured on ISP3 medium at 28 °C for 28 days

การจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ยีน *16S rRNA* และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์

จากการสกัด DNA และเพิ่มปริมาณยีน *16S rRNA* ของแอกติโนมัยซีท์ไอโซเลต BBUU157 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาด 780 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EZbiocloud พบว่า มีค่าความคล้ายคลึงมากกับแอกติโนมัยซีท์ในสกุล *Streptomyces* (Figure 2) ซึ่งเป็นสกุลที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง โดยพบมากที่สุด在地ในทุกประเภท (Kämpfer, 2012) และสามารถพบได้ในมูลไส้เดือน (Parthasarathi *et al.*, 2007 ; Pathma and Sakthivel, 2012 ; Singh *et al.*, 2015)

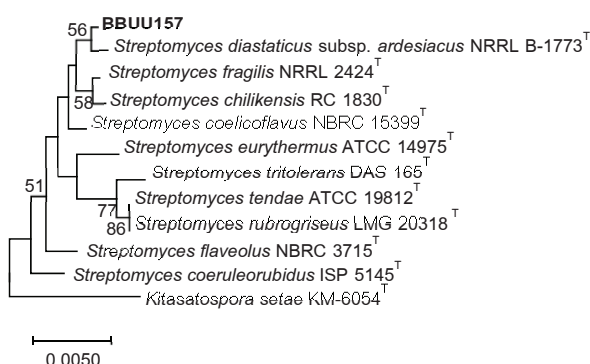


Figure 2. Neighbour-joining tree, based on *16S rRNA* gene sequencing, showing the position of BBUU157 and closely related species of the genus *Streptomyces*. *Kitasatospora setae* KM-6054^T was used as the outgroup.

การเจริญเติบโตบนอาหารที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์

จากการศึกษาการเจริญเติบโตในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแอกติโนมัยซีท์ไอโซเลต BBUU157 พบว่า สามารถเจริญได้สูงสุดที่สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 7% (w/v) (Figure 3) (Gopalakrishnan *et al.*, 2014) รายงานว่า *Streptomyces* สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 12% (w/v)

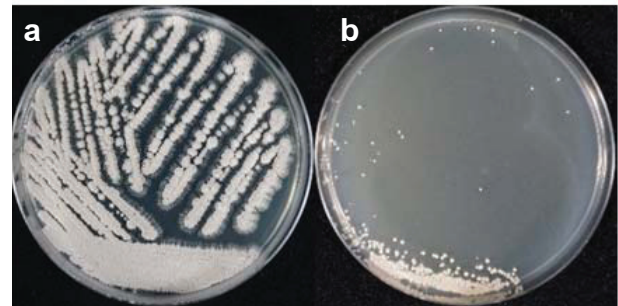


Figure 3. Growth in NaCl (a) no sodium chloride and (b) concentration of NaCl at 7% (w/v)

การเจริญเติบโตในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์

จากการศึกษาการเจริญของแอกติโนมัยซีท์ไอโซเลต BBUU157 ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เซลล์เริ่มต้นที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-3} (1.4×10^6 CFU/ml) พบว่า สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 65.70 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Figure 4) (Sadeghi *et al.*, 2012) รายงานว่า *Streptomyces* ไอโซเลต C เจริญเติบโตได้ดีในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ และจะลดลงเมื่อความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงเกิน 300 มิลลิโมลาร์

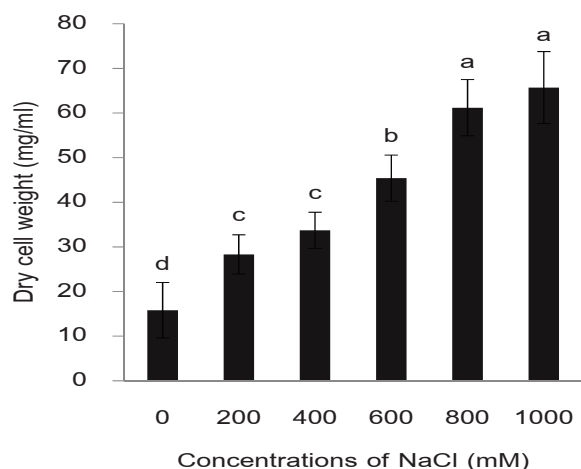


Figure 4. Growth in NaCl 0-1,000 mM of BBUU157

จากอักษร a, b, c และ d อักษรต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์

การผลิตฮอร์โมนออกซิน

จากการตรวจสอบการผลิตฮอร์โมนออกซินของแอคติโนมัยซีท์ไอโซเลต BBUU157 พบว่า ตรวจไม่พบการผลิตฮอร์โมนออกซิน

การผลิตสารไซโตไคน์

จากการตรวจสอบการผลิตสารไซโตไคน์ของแอคติโนมัยซีท์ไอโซเลต BBUU157 พบว่า สามารถผลิตสารไซโตไคน์ได้ดีที่สุดในสภาวะที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยวัดขนาดโซนสีส้มได้ 4.70 ± 0.10 เซนติเมตร (Figure 5) และจะผลิตสารไซโตไคน์ลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น (Figure 6) Argandona *et al.* (2010) รายงานว่า *Chromohalobacter salexigens* ผลิตสารไซโตไคน์ได้ดีที่สุดในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำสุด และจะผลิตได้ลดลงเมื่อความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น และ Gopalakrishnan *et al.* (2014) รายงานว่า *Streptomyces* ที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนดิน (*Eisenia foetida*) สามารถผลิตสารไซโตไคน์ และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในข้าวสาลีพันธุ์ Sampada ในประเทศอินเดีย โดยจะช่วยให้เพิ่มในส่วนของการขยายตัวของลำต้น จำนวนเมล็ดที่งอก น้ำหนักของเมล็ด จำนวนราก ความยาวรากและน้ำหนักแห้งราก เป็นต้น

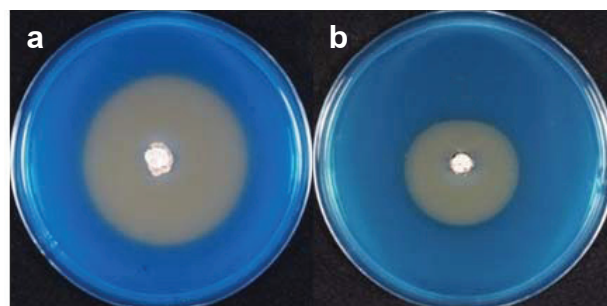


Figure 5. Siderophore production of BBUU157 on CAS agar (a) no NaCl and (b) concentration of NaCl 1,000 mM

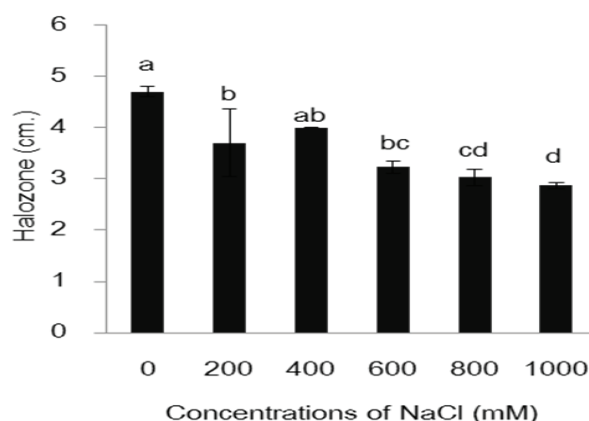


Figure 6. Siderophore production of BBUU157 in NaCl 0-1,000 mM

จากอักษร a, b, c และ d อักษรต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase

จากการตรวจสอบการมีเอนไซม์ *acdS* ของแอคติโนมัยซีท์ไอโซเลต BBUU157 พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณเอ็นเอ็น *acdS* ได้ และเป็นแถบเดี่ยว มีขนาดความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (Figure 7) และสามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้ดีที่สุด ที่เวลา 72 ชั่วโมง (Figure 8) ในความเข้มข้นที่ไม่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Figure 9) ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถผลิต ACC deaminase ได้ จะช่วยให้พืชทนทานต่อสภาวะเครียดต่างๆ เช่น ดินเค็ม และยังมีคุณสมบัติปลดปล่อยฮอร์โมน เอทิลีน (ethylene) ในพืช ทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโตได้ Gopalakrishnan *et al.* (2014) รายงานว่า *Streptomyces* ที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนดิน (*Eisenia foetida*) สามารถผลิตสารไซโตไคน์ และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในข้าวสาลีพันธุ์ Sampada ในประเทศอินเดีย โดยจะช่วยให้เพิ่มในส่วนของการขยายตัวของลำต้น จำนวนเมล็ดที่งอก น้ำหนักของเมล็ด จำนวนราก ความยาวรากและน้ำหนักแห้งราก เป็นต้น

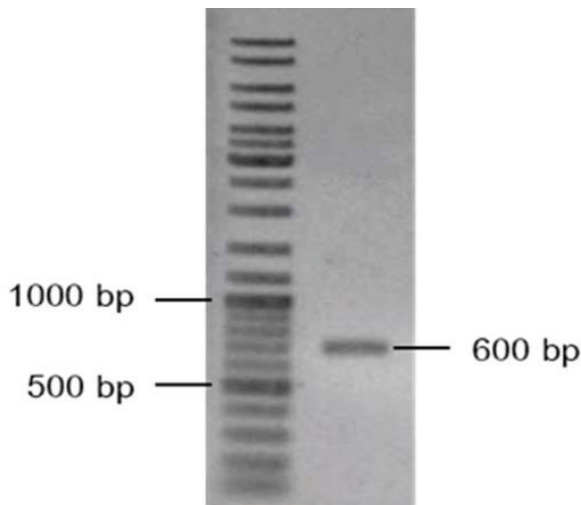


Figure 7. *acdS* gene fragments has a length of 600 nucleotides of BBUU157

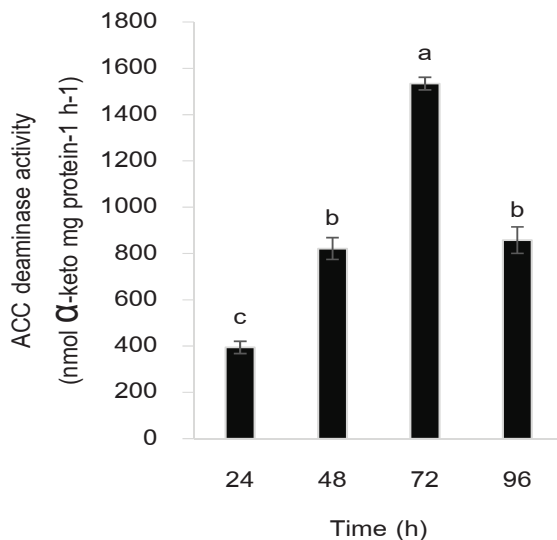


Figure 8. ACC deaminase production of BBUU157 at 24, 48, 72 and 96 h

จากอักษร a, b และ c อักษรต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

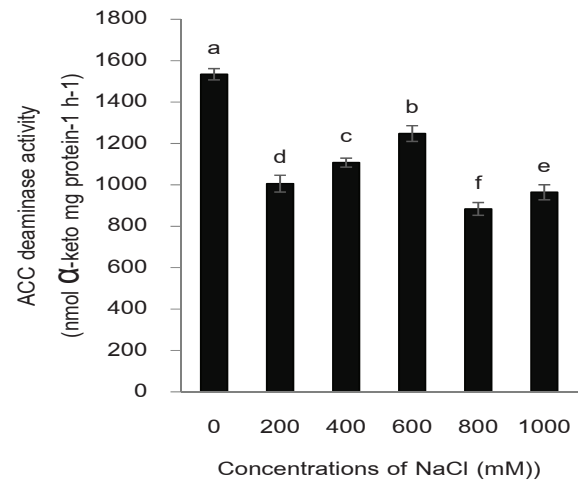


Figure 9. ACC deaminase production at 72 h in NaCl 0-1,000 mM of BBUU157

จากอักษร a, b, c, d, e และ f อักษรต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของแอคติโนไมซีตไฮโซเลต BBUU157 พบว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* (1.03 ± 0.12 เซนติเมตร) และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (0.53 ± 0.06 เซนติเมตร) (Figure 10) Kruasuwat and Thamchaipenat (2016) รายงานว่า *Streptomyces* มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC 1178, *E. coli* ATCC 8739 และ *S. aureus* เช่นเดียวกับ Shaik *et al.* (2017) รายงานว่า *Streptomyces* มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* NCIM-2063 และ *E. coli* NCIM-2065

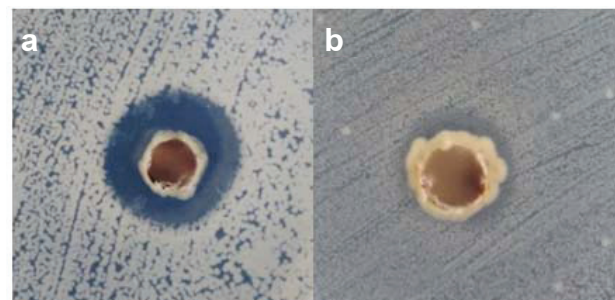


Figure 10. Antibacterial activity of BBUU157 (a) *B. cereus* and (b) *S. aureus*

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของแอคติโนมัยซีท ไอโซเลต BBUU157 พบว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อราเพียงชนิดเดียวคือ เชื้อรา *Penicillium* sp. (36.5 ± 0.5 %) (Figure 11) Kruasuwan and Thamchaipenat (2016) รายงานว่า *Streptomyces* มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Aspergillus niger* ATCC 6275 และเชื้อรา *Fusarium moniliforme* DOAC 1224 เช่นเดียวกับ Khamna et al. (2009) รายงานว่า *Streptomyces* มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Fusarium oxysporum* และเชื้อรา *Penicillium digitatu*

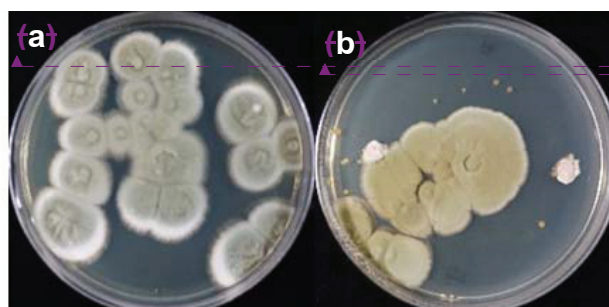


Figure 11. Antifungal activity of BBUU157 (a) control and (b) BBUU157+*Penicillium* sp.

สรุปผลการวิจัย

จากการนำแอคติโนมัยซีท ไอโซเลต BBUU157 ที่คัดแยกได้จากมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาไว้ในหน่วยวิจัยแอคติโนแบคทีเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา พบว่า มีความคล้ายคลึงกับแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* และสามารถเจริญได้มากที่สุดในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 7% (w/v) และเจริญเติบโตได้ดีในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 61.20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 65.70 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ไม่มีการผลิตฮอโมนออกซิน แต่มีการผลิตไซโตโรฟอรัส และผลิตเอนไซม์ ACC deaminase โดยผลิตไซโตโรฟอรัสได้ดีที่สุดในสภาวะที่ไม่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยวัดขนาดโซนส์สัมได้ 4.70 เซนติเมตร และผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้ดีที่สุดที่เวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ แอคติโนมัยซีท ไอโซเลต BBUU157 นี้ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* แบคทีเรีย *S. aureus* และมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Penicillium* sp. จากผลการศึกษานี้ สามารถนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในระบบการทำเกษตรอินทรีย์ให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพสูง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารเคมีสังเคราะห์หรือสารพิษตกค้างในพืชผล และยังปกป้องพืชจากเชื้อที่ก่อโรคได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนการศึกษากับผู้วิจัยแรก นางสาวทราภรณ์ กนกฉันท

เอกสารอ้างอิง

- วิจิตพล มีแก้ว ญัฐพล ชันชรปราบ และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2553). การปรับตัวของพืชภายใต้สภาวะที่มีความเค็ม. *ก้าวหน้าโลกวิทยาศาสตร์* 10(2), 28-37.
- รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์. (2548). แอคติโนมัยซีท (*Actinomycete*). ชลบุรี: สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Hickman, Z.A. and Reid, B.J. (2009). Earthworm assisted bioremediation of organic contaminant. *Environment International*, 34, 1072-1081.
- Domínguez, J., Aira, M. and Gómez-Brandón M. (2010). Vermicomposting: earthworms enhance the work of microbes. In: Insam, H., Franke-Whittle, I., Goberna, M. (Eds.), *Microbes at Work: From Wastes to Resources*. Berlin Heidelberg: Springer, 93-114.
- Goswami, L., Sarkar, S., Mukherjee, S., Das, S., Barman, S., Raul, P., Bhattacharyya, P., Mandal, N.C., Bhattacharya, S. and Bhattacharya, S.S. (2014). Vermicomposting of Tea Factory Coal Ash: Metal accumulation and metallothionein response in *Eisenia fetida* (Savigny) and *Lampito mauritii* (Kinberg). *Bioresource Technology* ; 166, 96-102.
- Singh, J., Singh, S., Vig, A.P., Bhat, S.A., Hundal, S.S., Yin, R. and Schädler, M. (2018). Conventional farming reduces the activity of earthworms: Assessment of genotoxicity test of soil and vermicast, *Agriculture and Natural Resources* ; 52(4), 366-370.
- Huang, K., Li, F., Wei, Y., Chen, X. an, Fu, X. (2013). Changes of bacterial and fungal community compositions during vermicomposting of vegetable wastes by *Eisenia foetida*, *Bioresource Technology*, 150, 235-241.
- Gopa, M., Gupta, A., Sunil, E. an, Thomas, G.V. (2009). Amplification of plant beneficial microbial communities during conversion of coconut leaf substrate to vermicompost by *Eudrilus* sp., *Current Microbiolog*, 59(1), 15-20.

- Pathma, J. an, Sakthivel, N. (2012). Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential, *SpringerPlus*, 1(26), 1-19.
- Yasir, M., Aslam, Z., Song, G.C., Bibi, F., Jeon, C.O, and Chung, Y.R. (2009). *Chitinophaga vermicomposti* sp. nov., with antifungal activity, isolated from vermicompost, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 268.
- Singh, S.P., Gupta, R., Gaur, R. an, Srivastava, A.K. (2015). Antagonistic actinomycetes mediated resistance in *Solanum lycopersicon* Mill. Against *Rhizoctonia solani* Kühn, Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: *Biological Sciences* 87(3): 789-798.
- Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Bierman, P., Metzger, J.D. an, Lucht, C. (2005). Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers in the field, *Pedobiologi* ; 49(4): 297-306.
- Chaoui, H.I., Zibilske, L.M. an, Ohno, T. (2003). Effects of earthworm casts and compost on soil microbial activity and plant nutrient availability, *Soil Biology and Biochemistry* ; 35, 295-302.
- Parthasarathi, K., Ranganathan, L.S., Anandi, V. and Zeyer, J. (2007). Diversity of microflora in the gut and casts of tropical composting earthworms reared on different substrates, *Journal of Environmental Biology*, 28(1), 87-97.
- Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B.K., Sandeep, D., Vidya, M.S., Deepthi, K. and Rupela, O. (2011). Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea, *Crop Protectio*, 30(8), 1070-1078.
- Kämpfer, P. (2012). *Genus Streptomyces*. In Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K.-i., Ludwig, W. and Whitman, W.B., (Eds.). New York: *Springer*2.
- Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., Bandikinda, P., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Rupela, O., Kudapa, H., Katta, K. and Varshney R.K. (2014). Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice, *Microbiological Research*, 169(1), 40-48.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species1. *International journal of systematic bacteriology*6, 16(3), 313-340.
- Jacobson, E., Granville. W.C. and Foss, C.E. (1958). Color Harmony Manual, 4th edn. Chicago: Container Corporation of Americ8.
- Kataoka, M., Ueda, K., Kudo, T., Seki, T. and Yoshida, T. (1997). Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*, *FEMS Microbiology Letters*, 151, 249-255.
- Saitou, N. an, Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Kimura, M.A. (1980). simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P.A., Javid, M.G., Dalvand, Y. and Askari, H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1503-1509.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3795-3801.
- Indananda, C. (2013). *Characterization and Identification of Novel Taxa, Plant Growth Promoting Properties and New Compound from Endophytic Actinomycetes*. Doctoral Dissertation, Doctor of Philosophy Genetics, Department of Genetics, Graduate School, Kasetsart University.

- Penrose, D.M. and Glick, B.R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria, *Physiologia Plantarum*, 118(1), 10-5.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore, *Analytical Biochemistry*, 160, 47-56.
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J.P., Clement, C., Ouhdouch, Y. and Van-Wezel, G.P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Argandona, M., Nieto, J.J., Iglesias-Guerra, F., Calderon, M.I., Garcia-Esteva, R. and Vargas, C. (2010). Interplay between iron homeostasis and the osmotic stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*, *Applied and environmental microbiology*, 76(11), 3575-3589.
- Kruasuwan, W. and Thamchaipenet, A. (2016). Diversity of culturable plant growth-promoting bacterial endophytes associated with sugarcane roots and their effect of growth by co-inoculation of Ddazotrophs and actinomycetes, *Journal of Plant Growth Regulation*, 6(3), 1074-1087.
- Shaik, M., Girija-Sankar, G., Iswarya, M. and Rajitha, P. (2017). Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnolog*, 15(1), 87-94.
- Khamna, S., Yokota, A. and Lumyong, S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production, *World Journal of Microbiology and Biotechnolog*, 2, 649-655.