

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงและสังกะสีด้วยบาซิลลัส  
เพื่อควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว



ธัญชนก เอื้ออาจีน

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2566



การสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงและสังกะสีด้วยบาซิลลัส  
เพื่อควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว



ธัญชนก เอื้ออาจิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักบริหารและพัฒนาระบบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2566

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงและสังกะสีด้วยบาซิลลัส  
เพื่อควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว

ฉันทน์ชนก เอ้ออาจัน

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรียาญจนา คล้ายเรือง)  
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ แสงทอง)  
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)  
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิรัชชา เครือฟู)  
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร .....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)  
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว .....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)  
รองอธิการบดี  
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

ชื่อเรื่อง	การสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงและสังกะสีด้วยบาซิลลัส เพื่อควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว
ชื่อผู้เขียน	นางสาวธันย์ชนก เอื้ออาจีน
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรีกาญจนา คล้ายเรือง

### บทคัดย่อ

โรคขอบใบแห้ง และโรคใบไหม้ในข้าว ที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) และเชื้อรา *Pyricularia oryzae* เป็นปัญหาสำคัญของการผลิตข้าวในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีและทองแดง โดยใช้ *Bacillus* ในการควบคุมโรคข้าว โดยศึกษาการยับยั้ง Xoo และ *P. oryzae*. ของแบคทีเรีย *Bacillus* จำนวน 79 ไอโซเลต ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* และ *Oceanobacillus* การทดสอบเบื้องต้นพบว่า *Bacillus velezensis* ทั้งหมดที่ทดสอบแสดงฤทธิ์ต้าน Xoo และ *P. oryzae* pv. *oryzae* เมื่อทดสอบโดยวิธี spot on lawn assay, agar well assay และ dual cultures method เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารยับยั้งยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สำคัญที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* ดังนั้นจึงตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้ข้อบ่งชี้ได้แก่ความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง ความไม่ชอบน้ำของเซลล์ กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร cyclic lipopeptides (cLPs) ผลของการสลายเม็ดเลือดแดง การยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียกับเฮกซาเดเคน และการเกิดอิมัลชันของน้ำมันมะกอกยืนยันว่าแบคทีเรีย *B. velezensis* ทั้ง 7 ไอโซเลต สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ นอกจากนี้ยังตรวจพบ PCR product ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ cLPs หกชนิดซึ่งประกอบด้วย *SUR3*, *srfA*, *ituD*, *ituC*, *fenD* และ *bmyB* ที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ยับยั้งจุลินทรีย์ ได้แก่ surfactin, iturin, fengycin และ bacillomycin

เมื่อศึกษาการผลิตสารต้านแบคทีเรียของเชื้อ *B. velezensis* ไอโซเลต LC1, LC2, LC19, LC33, LC33.1, LC70 และ LC130 ที่ pH และอุณหภูมิคงที่โดยมีการแปรผันแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์จากแต่ละสภาวะที่ศึกษามาวัดฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Xoo โดยวิธี agar well diffusion assay พบว่ากลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดตามลำดับ สำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. velezensis* LC19 และ LC130 ซึ่ง *B. velezensis* LC130 เป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีศักยภาพมากที่สุด ถูกนำมาใช้

สำหรับการสร้างแบบจำลองพื้นผิวการตอบสนองทางสถิติตามการออกแบบของ Box-Behnken ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นการศึกษาปริมาณกลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์ รวมถึงค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ แบบจำลองสรุปได้ว่าค่า E24 สูงสุด (59.58 %) เมื่อ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ pH 7.65 และปริมาณเริ่มต้นของกลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 22.17 กรัม/ลิตร และ 2.55 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

เมื่อทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโน ZnO และ CuO โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *B. velezensis* LC19, LC70 และ LC130 ขั้นตอนการสังเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษานี้เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีมากกว่าการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดง เนื่องจากได้อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดง ริมานน้อยมาก ซึ่งวิธีการตกตะกอนร่วมเป็นกระบวนการหลักในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนชีวภาพ สำหรับสัณฐานวิทยา และโครงสร้างของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่สังเคราะห์ได้ ศึกษาโดยใช้ X-ray Diffraction (XRD) สเปกโทรสโกปีแบบกระจายพลังงาน (EDS) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) จากข้อมูลที่ได้ระบุว่า อนุภาคนาโน ZnO มี hexagonal phase รูปทรงกลมและรีรูปทรง มีเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4-107 นาโนเมตร การทดลองฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยเทคนิค spot on lawn และ agar dilution plate technique พบว่าอนุภาคนาโน ZnO มีผลยับยั้งแบคทีเรีย *Xoo* และเชื้อรา *P. oryzae*

จากการศึกษาผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่คัดเลือกแล้ว (SK6412-01) ต่อการงอกของเมล็ดข้าวและการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว พบว่าอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีไม่มีผลต่อการลดลงของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าว การเติมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี (500-1,000 ppm) ทำให้ความยาวต้นและความยาวรากของข้าวลดลง และยังศึกษาผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี (500-1,000 ppm ในดิน) ที่ระยะเวลา 30 วัน ต่อจุลินทรีย์ในดินและเอนไซม์ในดิน ด้วยการวัดจำนวนจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย ยีสต์และรา แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน และแบคทีเรียละลายฟอสเฟต) และกิจกรรมของเอนไซม์ (dehydrogenase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, cellulase และ protease) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใส่อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ไม่มีผลกระทบต่อประชากรจุลินทรีย์ในดิน สำหรับดินที่มีการใส่อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่ความเข้มข้น 1,000 ppm กิจกรรมของ dehydrogenase, alkaline phosphatase และ cellulase ถูกยับยั้ง ในขณะที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีนี้ทำให้กิจกรรมของ acid phosphatase และกิจกรรมของ protease เพิ่มขึ้น การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงวิธีการทางเลือกสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี และแสดง

ประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในข้าว

คำสำคัญ : ขอบใบแห้ง, ใบไหม้, บาซิลลัส เวเลเซนซิส, อนุภาคนาโน





<b>Title</b>	BACILLUS-BASED SYNTHESIS OF COPPER OXIDE AND ZINC OXIDE NANOPARTICLES FOR CONTROLLING OF RICE PATHOGENS
<b>Author</b>	Miss Thanchanok Auearchin
<b>Degree</b>	Master of Science in Biotechnology
<b>Advisory Committee Chairperson</b>	Assistant Professor Dr. Srikanjana Klayraung

## ABSTRACT

Rice bacterial leaf blight and rice blast caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Pyricularia oryzae* are the major problems for rice production in Thailand. The aims of this study were to study the *Bacillus*-based synthesis of ZnO and CuO nanoparticles for controlling rice diseases. Seventy-nine isolates of bacteria, including *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* and *Oceanobacillus* were investigated for antagonistic activities against *Xoo* and *P. oryzae*. Preliminary testing showed that all isolates of *B. velezensis* showed antimicrobial activities against *Xoo* and *P. oryzae* according to spot on lawn assay, agar well assay and dual cultures method. The biosurfactant production by *B. velezensis* was screened by selected criteria including hemolytic assay, cell hydrophobicity, emulsification activity (E24) and specific genes for cyclic lipopeptides (cLPs). The results showed that the seven isolates of *B. velezensis* were able to produce biosurfactant. Furthermore, the PCR products of six cLPs synthesis-related genes comprising of *SUR3*, *srfA*, *ituD*, *ituC*, *fenD* and *bmyB* that regulated antibiotic biosurfactants production including surfactin, iturin, fengycin and bacillomycin, were detected.

The production of antibacterial substances of *B. velezensis* isolates, LC1, LC2, LC19, LC33, LC33.1, LC70 and LC130, were investigated at constant pH and temperature with variations in carbon and nitrogen sources. Cell free supernatant from each condition was evaluated for antibacterial activity against *Xoo* according to agar well diffusion assay. It was found that glucose and ammonium chloride were the most suitable carbon source and nitrogen source, respectively, for antibiotic



substance production by *B. velezensis* LC19 and LC130. The most potent antagonist *B. velezensis* LC130 was used for construction of the statistical response surface model according to Box-Behnken design. To optimize the composition of culture medium in terms of glucose and ammonium chloride content including initial pH of culture medium were investigated. The model predicted that the maximum E24 (59.58 %) was reached at pH 7.65 as initial pH of medium when the initial content of glucose and ammonium chloride were 22.17 g/L and 2.55 g/L, respectively.

The supernatant of *B. velezensis* LC19, LC70 and LC130 were used for the synthesis of ZnO and CuO nanoparticles. Synthesis procedures that used in this study were more suitable for ZnO biosynthesis than CuO biosynthesis since small amount of CuO nanoparticles was obtained. Coprecipitation method was the main process for synthesis of ZnO nanoparticles. The morphology and structure of the biosynthesized ZnO nanoparticles were studied using X-ray Diffraction (XRD), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), and Transmission Electron Microscopy (TEM). The data indicated that ZnO nanoparticles were hexagonal phase, spherical and amorphous with average particle diameter in the range of 4-107 nm. Antimicrobial activity experiments indicated that ZnO nanoparticles were effective against *Xoo* and *P. oryzae* according to spot on lawn and agar dilution plate technique.

The effect of selected biogenic ZnO nanoparticle (SK6412-01) on rice seed germination and early seedling growth were investigated. The results showed that there was no reduction in the percentage of rice seed germination. ZnO nanoparticle at the ZnO NPs amendment (500-1,000 ppm) decreased shoot length and root length of rice. The effect of the ZnO nanoparticle (500-1,000 ppm in soil) and contact time for 30 days on soil microbes and soil enzyme was also carried out. Microbial population (bacteria, yeast and mold, nitrogen fixing bacteria and phosphate solubilizing bacteria) and enzyme activities (dehydrogenase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, cellulase and protease) were measured. Results showed that ZnO nanoparticle treatments had no negative impact on soil microbial population. The soil treated with 1,000 ppm ZnO nanoparticle, activities of

dehydrogenase, alkaline phosphatase and cellulase were inhibited, whereas this ZnO-NPs dose produced an increase in acid phosphatase activity and protease activity. This study distributes evidence for an alternative method for biogenic synthesis ZnO nanoparticles and exhibits their efficacy against rice pathogenic microbes.

Keywords : Bacterial leaf blight, Leaf blast, *Bacillus velezensis*, Nanoparticles



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบคุณบุคคลและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือทั้งด้านวิชาการ และในด้านการดำเนินงานให้งานวิจัยดำเนินการสำเร็จเป็นอย่างดี อันได้แก่

ขอขอบพระคุณการสนับสนุนจากทุนนักศึกษาเรียนดีประจำปีการศึกษา 2563 และได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรม จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2564

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ศรีกาญจนา คล้ายเรือง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความเมตตาอบรมสั่งสอน คอยให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการแก้ปัญหา คอยติดตามการทำงานอยู่เสมอ และตรวจสอบวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ แสงทอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และรองศาสตราจารย์ ดร. วิรัชชา เครือฟู อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้มอบโอกาสและประสบการณ์ในการทำงานพร้อมทั้งให้คำแนะนำ ความรู้ และการช่วยเหลือมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณท่านผู้ทรงคุณวุฒิและคณะกรรมการทั้งในการสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์และการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์ ตรวจสอบและให้คำแนะนำ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้เมตตาตอบวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้าเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณบุคลากรศูนย์บริการวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ญาติพี่น้อง และกัลยาณมิตร ที่คอยสนับสนุนให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจสำคัญให้แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

ธัญชนก เอื้ออาเงิน

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฌ
สารบัญ.....	ญ
สารบัญตาราง.....	ท
สารบัญภาพ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและการตรวจสอบเอกสาร.....	3
ปัญหาของโรคข้าว.....	3
การป้องกันและการควบคุมโรคข้าว.....	5
การควบคุมโรคข้าวโดยวิธีทางชีวภาพ.....	5
<i>Bacillus</i> .....	6
ความสำคัญของ <i>Bacillus</i> ในการเกษตร.....	9
อนุภาคนาโน.....	14
การใช้อนุภาคนาโนในเกษตร.....	14
การสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของโลหะด้วยวิธีทางชีวภาพ.....	15
ดัชนีบ่งชี้คุณภาพดินทางชีวภาพ.....	15
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....	17

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา.....	22
2. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคข้าว .....	22
2.1 การทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าวโดยวิธี Spot on lawn.....	22
2.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> ต่อเชื้อรา <i>Pyricularia oryzae</i> โดยวิธี Dual culture .....	23
3. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ.....	23
4. การศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (biosurfactants) ของเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> .....	24
4.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) .....	24
4.2 การวัด cell hydrophobicity ด้วย BATH assay.....	24
4.3 การทดสอบความสามารถในการเกิด E24 ของเชื้อแบคทีเรียด้วยการหาค่า emulsification index (E24).....	25
4.4 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ .....	25
5. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ <i>Bacillus velezensis</i> เพื่อผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .....	27
6. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีและทองแดงด้วยเชื้อ <i>Bacillus</i> .....	29
7. การทดสอบฤทธิ์ของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคข้าว ....	30
8. การทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อข้าว .....	31
9. ศึกษาผลกระทบของอนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงและสังกะสีต่อจุลินทรีย์ในดินและ เอนไซม์ในดิน.....	31
9.1 ผลกระทบของอนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงและสังกะสีต่อจุลินทรีย์ในดิน .....	31
9.2 ผลกระทบของอนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงและสังกะสีต่อเอนไซม์ในดิน.....	31
10. การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	32
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ .....	33

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> และ <i>Pyricularia oryzae</i> ของ <i>Bacillus</i> และ กลุ่มที่เกี่ยวข้องซึ่งแยกได้จากไลเคน .....	33
2. ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ .....	39
3. ผลการศึกษากิจกรรมของสารทุติยภูมิในกลุ่มสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ .....	40
3.1 ผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolysis activity) .....	40
3.2 ผลการทดสอบ cell hydrophobicity ด้วย BATH assay .....	41
3.3 ผลการทำให้เกิด E24 ของ <i>B. velezensis</i> .....	42
3.4 ผลการตรวจยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในกลุ่ม Cyclic lipopeptides.....	43
4. ผลการศึกษาแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนต่อฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ของเชื้อ <i>B. velezensis</i> .....	47
5. ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ <i>Bacillus velezensis</i> เพื่อผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .....	49
6. ลักษณะสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดง และ สังกะสีที่สังเคราะห์จาก <i>Bacillus</i> .....	57
7. ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคข้าว .....	64
8. ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อการงอกของเมล็ด.....	69
9. ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อจุลินทรีย์ในดิน และ เอนไซม์ในดิน .....	72
ผลการทดสอบอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อจุลินทรีย์ในดิน .....	72
ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อเอนไซม์ในดิน .....	75
วิจารณ์ผลการทดลอง .....	76
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	81
บรรณานุกรม.....	83
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์.....	94



ภาคผนวก ข รายชื่อเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา.....	96
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์เอนไซม์และกราฟมาตรฐาน.....	100
การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในดิน.....	100
การวิเคราะห์เอนไซม์ Dehydrogenase.....	101
การวิเคราะห์เอนไซม์ Phosphatase.....	104
การวิเคราะห์เอนไซม์ Cellulase.....	108
การวิเคราะห์เอนไซม์ Protease.....	111
ภาคผนวก ง ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติ.....	114
ประวัติผู้วิจัย.....	137

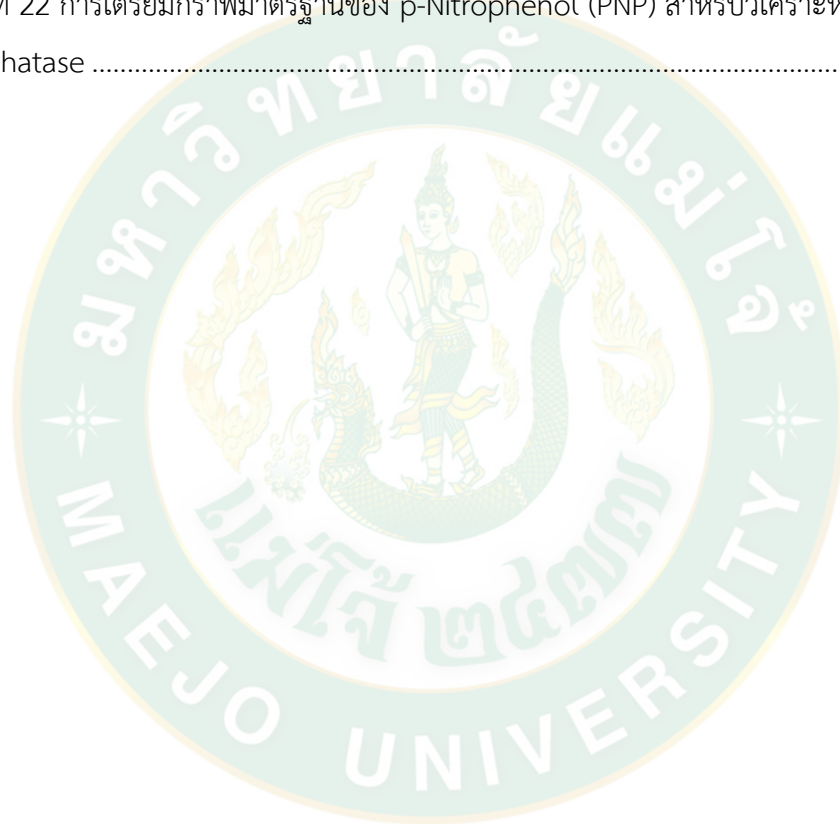




## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สมบัติที่แตกต่างกันของ <i>Bacillus</i> spp. (Castillo et al., 2013).....	8
ตารางที่ 2 การศึกษาจุลินทรีย์ปฏิกิริยาในการควบคุมโรคข้าว .....	11
ตารางที่ 3 Primers และสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR.....	26
ตารางที่ 4 ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลอง .....	27
ตารางที่ 5 การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken .....	28
ตารางที่ 6 ส่วนประกอบในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี .....	29
ตารางที่ 7 ส่วนประกอบในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดง .....	30
ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยดัชนีการยับยั้ง และจำนวนไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวก.....	34
ตารางที่ 9 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใย <i>P. oryzae</i> โดย <i>Bacillus</i> ที่แยกได้จากไลเคน .....	37
ตารางที่ 10 ความไวต่อยาปฏิชีวนะ ของ <i>B. velezensis</i> .....	40
ตารางที่ 11 ผลการตรวจยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในกลุ่ม Cyclic lipopeptides.....	47
ตารางที่ 12 E24 ของแต่ละหน่วยการทดลองในการศึกษาปัจจัยในการผลิต.....	50
ตารางที่ 13 รูปร่างและขนาดของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้.....	57
ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .....	69
ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวในสารละลายอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	69
ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ต่อการงอกของเมล็ดความยาวราก และความสูงของยอดของข้าว .....	72
ตารางที่ 17 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงในอาหาร PCA ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี SK3412-01 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	73

ตารางที่ 18 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ และรา Azotobacter และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระในดิน.....	74
ตารางที่ 19 ปริมาณเอนไซม์ในดินชุดควบคุม และดินชุดที่มีการเติมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี สูตร SK6412-01 หลังเติมนาน 30 วัน .....	75
ตารางที่ 20 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา.....	96
ตารางที่ 21 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ Triphenyl formazan (TPF).....	102
ตารางที่ 22 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol (PNP) สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Phosphatase .....	105



## สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 บริเวณยับยั้งของ <i>B. velezensis</i> LC130 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ด้วยวิธี spot on lawn บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient glucose agar.....	33
ภาพที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้ง <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ของ supernatant <i>B. velezensis</i> (LC1) จากการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion บนอาหาร Nutrient glucose agar.....	35
ภาพที่ 3 ความกว้างของบริเวณยับยั้งเชื้อ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Agar well diffusion โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.	35
ภาพที่ 4 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคไหม้ <i>P. oryzae</i> ของ <i>B. velezensis</i> LC1 เป็นเวลา 7 วัน ด้วยวิธี Dual culture บนอาหาร Modified potato dextrose agar.....	36
ภาพที่ 5 การยับยั้งของ supernatant แบคทีเรียของ <i>B. velezensis</i> LC19 ต่อเชื้อรา <i>P. oryzae</i> เป็นเวลา 7 วัน ด้วยวิธี Agar well diffusion บนอาหาร Modified potato dextrose agar.....	38
ภาพที่ 6 ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งการเจริญของ <i>P. oryzae</i> โดย supernatant จาก <i>Bacillus</i> (Bp คือ <i>B. pumilus</i> และ Bv คือ <i>B. velezensis</i> ) โดยตัวอักษรที่แสดงบนกราฟความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test.....	38
ภาพที่ 7 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ <i>B. velezensis</i> LC70 .....	39
ภาพที่ 8 ลักษณะการย่อยเม็ดเลือดแดงของ <i>B. velezensis</i> LC1 (gamma-hemolysis) (ก) และ <i>B. velezensis</i> LC19 (beta-hemolysis) (ข) .....	41
ภาพที่ 9 ความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (cell hydrophobicity) ของ <i>B. velezensis</i> เมื่อทดสอบโดย BATH assay ด้วย hexadecane โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	42
ภาพที่ 10 ค่ากิจกรรมการเกิด E24 น้ำมันมะกอกโดยเชื้อ <i>B. velezensis</i> ไอโซเลตต่างๆ (LC1, LC2, LC19, LC33, LC33.1, LC70 และ LC130) โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	43

ภาพที่ 11 ขนาด PCR product ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ <i>srfA</i> M: Molecular marker และ - ve control: DNase free water.....	44
ภาพที่ 12 ขนาด PCR product ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ <i>SUR3</i> M: Molecular marker และ - ve control: DNase free water.....	44
ภาพที่ 13 ขนาด PCR product ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ <i>ituD</i> M: Molecular marker และ - ve control: DNase free water.....	45
ภาพที่ 14 ขนาด PCR product ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ <i>ituC</i> M: Molecular marker และ - ve control: DNase free water.....	45
ภาพที่ 15 ขนาด PCR product ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ <i>fenD</i> M: Molecular marker และ - ve control: DNase free water.....	46
ภาพที่ 16 ขนาด PCR product ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ <i>bmyB</i> M: Molecular marker และ - ve control: DNase free water.....	46
ภาพที่ 17 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ของเชื้อ <i>B. velezensis</i> โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	48
ภาพที่ 18 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ของเชื้อ <i>B. velezensis</i> โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% .....	49
ภาพที่ 19 พื้นผิวตอบสนองของ E24 ระหว่างปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พล็อตโดยใช้โปรแกรม Design-Expert 13.0.5.0.....	51
ภาพที่ 20 กราฟโครงร่างความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พล็อตโดยใช้โปรแกรม Design-Expert 13.0.5.0.....	52
ภาพที่ 21 พื้นผิวตอบสนองของ E24 ระหว่างปริมาณแหล่งคาร์บอนและพีเอชเริ่มต้นของอาหาร พล็อตโดยใช้โปรแกรม Design-Expert 13.0.5.0.....	53
ภาพที่ 22 กราฟโครงร่างความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแหล่งคาร์บอนและพีเอชเริ่มต้นของอาหาร พล็อตโดยใช้โปรแกรม Design-Expert 13.0.5.0.....	54

ภาพที่ 23 พื้นผิวตอบสนองของ E24 ระหว่างปริมาณแหล่งไนโตรเจนและพีเอชเริ่มต้นของอาหาร  
พล็อตโดยใช้โปรแกรม Design-Expert 13.0.5.0 ..... 55

ภาพที่ 24 กราฟโครงร่างความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแหล่งไนโตรเจนและพีเอชเริ่มต้นของ  
อาหาร พล็อตโดยใช้โปรแกรม Design-Expert 13.0.5.0 ..... 56

ภาพที่ 25 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านโหมดโปรตีฟิลด์ของอนุภาคนาโน  
ออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร SK6412-01 (ก) SK6511-01 (ข) และSK6511-02 (ค) ..... 58

ภาพที่ 26 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านโหมดโปรตีฟิลด์ของอนุภาคนาโน  
ออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร Bv19-01 (ก) Bv130-01 (ข) และBv130MOLP (ค) ..... 59

ภาพที่ 27 ขนาดอนุภาคที่วิเคราะห์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านโหมดโปรตีฟิลด์ของ  
อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร SK6412-01 (ก) SK6511-01 (ข) SK6511-02 (ค) Bv19-  
01 (ง) Bv130-01 (จ) และBv130MOLP (ฉ) ..... 60

ภาพที่ 28 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคการกระจายพลังงานรังสีเอกซ์ของ  
อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร SK6412-01 (ก) SK6511-01 (ข) SK6511-02 (ค) Bv19-  
01 (ง) Bv130-01 (จ) และBv130MOLP (ฉ) ..... 61

ภาพที่ 29 รูปแบบการเลี้ยวเบนของอิเล็กตรอนในพื้นที่ที่เลือก (SAED) ของอนุภาคนาโนออกไซด์ของ  
สังกะสีแต่ละสูตร SK6412-01 (ก) SK6511-01 (ข) SK6511-02 (ค) Bv19-01 (ง) Bv130-01 (จ)  
และBv130MOLP (ฉ) ..... 62

ภาพที่ 30 รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (XRD) ของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร  
SK6412-01 (ก) SK6511-01 (ข) SK6511-02 (ค) Bv19-01 (ง) Bv130-01 (จ) และBv130MOLP  
(ฉ) ..... 63

ภาพที่ 31 บริเวณยับยั้งของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี สูตร SK11-02 และ Bv19-01 ที่ความ  
เข้มข้น 10,000 และ 20,000 ppm ต่อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (ก) บริเวณยับยั้งของอนุภาคนาโน  
ออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร และอนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดง ที่ความเข้มข้น 10,000 ต่อ  
*X. oryzae* pv. *oryzae* (ข) streptomycin 50 µg/ml (ค) และสารเคมีทางการค้าซึ่งมีส่วนผสมของ  
ทองแดงและสังกะสี (ง) ..... 65

ภาพที่ 32 ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตรต่อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ความ  
เข้มข้น 10,000 และ 20,000 ppm โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ  
ความเชื่อมั่น 95% ..... 66



ภาพที่ 33 แสดงการเจริญของเชื้อรา <i>P. oryzae</i> บนอาหารที่ผสมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี สูตร SK6511-02 ที่ความเข้มข้น 1,250 ppm (ก) 2,000 ppm (ข) และ 0 ppm (control) (ค).....	67
ภาพที่ 34 ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตรต่อ <i>P. oryzae</i> ที่ความเข้มข้น 1,250 และ 2,500 ppm ด้วยเทคนิค Agar dilution plate โดยตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	68
ภาพที่ 35 ผลของการแช่เมล็ดข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2 กข 6 กข 23 และ ขาวดอกมะลิ 105 ใน สารละลายอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ความเข้มข้น 0-1,000 ppm นาน 24 ชั่วโมง ต่อความสูงของยอด โดยตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% .....	70
ภาพที่ 36 ผลของการแช่เมล็ดข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2 กข 6 กข 23 และ ขาวดอกมะลิ 105 ใน สารละลายอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีความเข้มข้น 0-1,000 ppm นาน 24 ชั่วโมง ต่อความยาวราก โดยตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% .....	71
ภาพที่ 37 กราฟมาตรฐานของ Triphenyl formazan (TPF) สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Dehydrogenase และค่า $A_{485}$ .....	103
ภาพที่ 38 กราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol (PNP) สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Acid Phosphatase และค่า $A_{420}$ .....	106
ภาพที่ 39 กราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol (PNP) สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Alkaline Phosphatase และค่า $A_{420}$ .....	106
ภาพที่ 40 กราฟมาตรฐาน Glucose สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Cellulase และค่า $A_{690}$ .....	110
ภาพที่ 41 กราฟมาตรฐาน Tyrosine สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Protease และค่าการดูดกลืนแสงที่ $A_{700}$ .....	113

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นพืชในวงศ์หญ้า เป็นอาหารหลักของหลายประเทศในเอเชีย โดยประเทศจีนเป็นผู้ผลิตข้าวรายใหญ่ของโลก ในอนาคตประชากรจะเพิ่มขึ้นจาก 7.5 เป็น 9.5 พันล้านคนทั่วโลก ทำให้เกษตรกรต้องผลิตข้าวให้ได้ผลผลิตจำนวนมาก เพื่อให้เพียงพอต่อประชากรที่เพิ่มขึ้น (Ahmed et al., 2020) อุปสรรคสำคัญในการผลิตข้าวอย่างหนึ่ง คือ การเกิดโรคระบาดของข้าว และศัตรูพืชอื่น ๆ โดยสถิติของประเทศไทยจากทั้ง 4 ภาค มีโรคไหม้ข้าว โรคขอบใบแห้ง เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และโรคไหม้คอรวง (กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย, 2562)

โรคข้าวที่ทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงมากคือ โรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2560) โดยโรคไหม้ทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้า จนถึงระยะออกรวง มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* ซึ่งสามารถทำลายพืชตระกูลหญ้าได้หลายชนิด อาการของโรคไหม้จะเกิดแผลที่มีจุดสีน้ำตาลคล้ายรูปตา (พูนศักดิ์และวิวัฒนา, 2559) ส่วนโรคขอบใบแห้งเกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สามารถเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า จนถึงออกรวง ลักษณะอาการของขอบใบแห้ง จะมีสีซีดเหมือนสีฟางข้าวมีแผลตามความยาวของใบ มีลายหยักที่ขอบแผล (ชลิตา, 2554) ในการป้องกันการเกิดโรคข้าว เกษตรกรมักใช้สารเคมีในการควบคุมโรค ซึ่งหากใช้ในปริมาณที่มาก และระยะเวลาานาน จะเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและเกษตรกรผู้ใช้เอง ดังนั้นจึงได้มีการหาวิธีการใช้สารเคมีที่สามารถให้ผลในระยะยาวได้ โดยการนำแบคทีเรีย *Bacillus* มาควบคุมการเกิดโรคข้าว นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ รวมถึงจุลินทรีย์ก่อโรคข้าว (Shafi et al., 2017)

ในปัจจุบันได้มีการนำอนุภาคนาโนมาใช้ทั้งทางการแพทย์ เภสัชกรรม สิ่งแวดล้อม และทางการเกษตรซึ่งรวมถึงการจัดการศัตรูพืช โดยการสังเคราะห์อนุภาคนาโนส่วนใหญ่ใช้วิธีการทางเคมี ซึ่งใช้สารเคมีที่อาจเป็นพิษ และอาจมีของเสียอันตรายเกิดขึ้น จึงมีการพยายามนำเอาวิธีการทางชีวภาพหรือวิธีการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยเฉพาะอนุภาคนาโนออกไซด์ของโลหะที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายและมีประสิทธิภาพสูงในการจัดการจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อเป็นการลดปัญหาการใช้สารเคมี (Mittal et al., 2013) ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย และแมงทอปอไลท์จากแบคทีเรียถูกนำมาใช้เป็นตัวรีดิวส์ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของโลหะ ตัวอย่างเช่น การนำ *Bacillus amyloliquefaciens* RAB14R มาสังเคราะห์อนุภาคนาโนเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ



ราสาเหตุโรคใบไหม้ และยังมีการใช้อนุภาคนาโนเงิน (AgNPs) จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้ง โรคใบจุดสีน้ำตาล ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ *Acidovorax oryzae* ตามลำดับ อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช (Ibrahim et al., 2019) ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงและสังกะสี ซึ่งมีราคาสารตั้งต้นถูกกว่าการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินหรือทอง ด้วยการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ที่แยกได้จากไลเคน ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ เพื่อใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวโดยเฉพาะ *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งที่เป็นปัญหาสำคัญในการผลิตข้าวของไทย โดยอนุภาคนาโนออกไซด์ชีวภาพที่ได้จะสามารถเป็นทางเลือกสำหรับเกษตรกรเพื่อใช้ในการจัดการโรคข้าว นอกเหนือจากการใช้สารเคมีกำจัด และชีวภัณฑ์ที่มีขายตามท้องตลาดในปัจจุบัน

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว
2. เพื่อศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีและทองแดงด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* sp.
3. เพื่อศึกษาการใช้อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีและทองแดงเพื่อใช้ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว
4. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีและทองแดงต่อข้าว
5. เพื่อศึกษาผลกระทบของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีและทองแดงต่อจุลินทรีย์และเอนไซม์ในดิน

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมโรคข้าวที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์
2. สามารถช่วยเกษตรกรลดการใช้สารป้องกันเชื้อราหรือสารเคมี
3. ได้อนุภาคนาโนที่สังเคราะห์จากสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าว

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

#### ปัญหาของโรคข้าว

โรคข้าวเกิดจากความผิดปกติของข้าว มีผลทำให้ผลผลิตหรือคุณภาพลดลง อาจเกิดจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เชื้อสาเหตุของโรคและพืชอ่อนแอ โดยสาเหตุของโรค มีสาเหตุมาจากสิ่งมีชีวิตสาเหตุโรคพืช และสิ่งไม่มีชีวิต โดยสิ่งมีชีวิตสามารถเข้าไปทำลายต้นพืชให้เกิดการติดเชื้อและระบาดไปยังต้นอื่นได้ หากอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม สิ่งมีชีวิตนั้น ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย ราเมือก ไวรัส ไวรอยด์ ไฟโตพลาสมา ไส้เดือนฝอย และสิ่งไม่มีชีวิต หมายถึงสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของพืช เช่น สภาพดิน อากาศ น้ำไม่เพียงพอ ความเป็นกรดต่างในดิน

โรคข้าวที่สำคัญของประเทศไทยมี 5 อันดับ โดยอันดับที่หนึ่ง เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา เช่น โรคไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคกาบใบแห้ง โรคใบซีดสีน้ำตาล เป็นต้น รองลงมาคือโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น ขอบใบแห้ง ใบขีดโปร่งแสง โรคใบแถบแดง เป็นต้น ต่อมาคือโรคที่เกิดจากไวรัสและไฟโตพลาสมา เช่น โรคใบสีส้ม ใบหงิก ใบสีแสด เป็นต้น จากนั้นเป็นโรคที่เกิดจากไส้เดือนฝอย และโรคที่ไม่เกิดจากเชื้อ เช่น โรคเมตาตอซัง (ดาราและคณะ, 2550)

รายงานสรุปของกรมการข้าวพบว่า ในช่วงระยะเวลา ปี2555/56-ปี 2559/60 มีพื้นที่การปลูกข้าวโดยประมาณถึง 61 ล้านไร่ (กรมการข้าว, 2560) และจากรายงานสถานการณ์ศัตรูข้าวของกองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย กรมส่งเสริมการเกษตร ในปี 2562 พบว่าโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีระบาดได้แก่ (กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย, 2562)

#### โรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf blight disease) (ชลิตา, 2554)

โรคขอบใบแห้งมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* อาการโรคนี้เป็นได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า แตกกอ จนถึงออกรวง โดยขอบใบจะมีสีซีดแล้วเปลี่ยนเป็นสีฟางข้าว แผลจะขยายไปตามความยาวของใบ บางครั้งขยายเข้าไปข้างในตามความกว้างของใบ ขอบแผลมีลักษณะเป็นขอบลายหยัก หากเกิดโรครุนแรงต้นข้าวจะเหี่ยวเฉา และตายโดยเร็ว เรียกอาการของโรคแบบนี้ว่า ครีเสก (kresek)

#### โรคไหม้ (Rice blast disease) (ชลิตา, 2554)

โรคไหม้มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* หรือ *Pyricularia oryzae* โดยอาการของโรค คือ ใบมีแผลจุดสีน้ำตาลคล้ายรูปตา มีสีเทาตรงกลางแผล ความกว้างประมาณ 2-5 mm และยาวประมาณ 10-15 mm พบโรคได้ที่ใบ กาบใบ ข้อต่อของใบ และลำต้น ในระยะคอรวงเมล็ดจะลีบ ถ้ารวงข้าวแก่บริเวณคอรวงจะมีสีน้ำตาล ทำให้คอรวงเปราะง่าย

### โรคกาบใบแห้ง (Sheath blight Disease)

โรคกาบใบแห้งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* พบโรคในระยะแตกกอจนถึงระยะใกล้ เก็บเกี่ยว โดยพบแผลสีเขียวปนเทา บริเวณกาบใบใกล้ระดับน้ำ แผลจะลุกลามขยายใหญ่ขึ้นจนถึงใบข้าว ทำให้ใบและกาบใบเหี่ยวแห้ง ผลผลิตจะลดลง โรคจะระบาดรุนแรงในแปลงข้าวที่มีต้นข้าวหนาแน่น อากาศถ่ายเทไม่สะดวก การแพร่ระบาด เชื้อราสามารถสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่สามารถอยู่ได้นานและปนเปื้อนไปกับเมล็ดพันธุ์

### โรคกาบใบเน่า (Sheath rot disease)

โรคกาบใบเน่ามีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Sarocladium oryzae* พบโรคนี้ในระยะตั้งท้อง แผลเป็นสีน้ำตาลดำบนกาบที่อวบ ตรงกลางแผลมีกลุ่มเส้นใยสีขาวอมชมพู และแผลสามารถขยายติดต่อกันทำให้บริเวณกาบหุ้มรวงมีสีน้ำตาลดำและรวงข้าวส่วนใหญ่ไหลไม่พังกาบหุ้มรวงหรือไหลได้บางส่วน ทำให้เมล็ดลีบและมีสีดำ เชื้อรานี้ติดอยู่บนเมล็ดได้นาน และมีไรขาวเป็นพาหะช่วยให้โรคแพร่ระบาดได้รุนแรงมากยิ่งขึ้น

### โรคถอดฝักดาบ (Bakanae disease)

โรคถอดฝักดาบมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Fusarium fujikuroi* พบอาการในระยะกล้า ต้นกล้าจะแห้งตาย หลังจากปลูกได้ไม่เกิน 7 วัน ระยะเริ่มแตกกอ ข้าวเป็นโรคต้นจะพอมสูงมีสีเขียวอ่อนซีดหรือบางกรณีรากจะเน่าช้าเวลาถอนมักจะขาดตรงบริเวณโคนต้นถ้าอาการรุนแรงกล้าข้าวจะตาย การแพร่ระบาด เชื้อราจะติดไปกับเมล็ด และอาศัยในซากต้นข้าวและในดินได้เป็นเวลาหลายเดือนตลอดจนมีหญ้าชันกาดเป็นพืชอาศัย

### โรคเมล็ดต่าง (Dirty panicle disease)

โรคเมล็ดต่างมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Curvularia lunata*, *C. oryzae*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium semitectum*, *Alternaria padwickii* และ *Sarocladium oryzae* ลักษณะอาการระยะออกรวง พบแผลจุดสีน้ำตาลดำหรือสีเทาปนชมพู ที่เมล็ดบนรวงข้าว เพราะมีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถเข้าทำลายและ ก่อให้เกิดอาการต่างกันไป โรคนี้มักจะเกิดในช่วงดอกข้าวเริ่มโผล่จากกาบหุ้มรวง จนถึงระยะเมล็ดข้าวเริ่มเป็นน้ำนม และอาการเมล็ดต่างจะปรากฏเด่นชัดในระยะใกล้เก็บเกี่ยว เชื้อราสามารถแพร่กระจายไปกับลม ติดไปกับเมล็ด และอาจสามารถแพร่กระจายในยุ่งฉางได้

### โรคใบขีดโปรงแสง (Bacterial leaf streak disease)

โรคใบขีดโปรงแสงเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzicola* โรคนี้เป็นได้ตั้งแต่แตกกอจนถึงออกรวง ใบเป็นแผลขีดข้าวยาวไปตามเส้นใบ ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือส้ม แผลสามารถขยายรวมกันเป็นแผลใหญ่ แสงสามารถทะลุผ่านได้ ข้าวพันธุ์อ่อนแอแผลจะขยายจนใบไหม้ไปถึงกาบใบ การแพร่ระบาด ในสภาพที่มีฝนตก ลมพัดแรงจะช่วยให้โรคแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางรวดเร็ว (ดารารและคณะ, 2550)

### การป้องกันและการควบคุมโรคข้าว (กรมการข้าว, 2560)

ในการควบคุมโรคข้าวเหล่านี้ (กองวิจัยและพัฒนากรมการข้าว, 2559) แนะนำเกษตรกรให้ใช้พันธุ์ข้าวต้านทาน การใช้สารเคมีทางการเกษตรด้วยการฉีดพ่น การคลุมเมล็ดหรือแช่เมล็ด (สมคิด, 2554) ซึ่งการใช้สารเคมีส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตทุกชนิด แม้ว่าสารเคมีจะมีประสิทธิภาพสูง แต่เชื้อก่อโรคอาจเกิดการพัฒนาในการก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคที่มากขึ้น ทำให้ต้องใช้สารเคมีในปริมาณที่มากขึ้น ส่งผลให้สารเคมีมีการตกค้างและเป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้ นอกจากนี้ยังนำไปสู่การดื้อยาของเชื้อก่อโรคด้วย นอกจากนี้ยังมีการใช้ชีววิธีในการควบคุม โดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งเป็นทางเลือกในการควบคุมโรค โดยนำมาคลุมเมล็ดหรือพ่นด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* หรือ *Trichoderma* ซึ่งแบคทีเรีย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่ถูกนำมาใช้งานทางการเกษตรค่อนข้างมากมีชีวภัณฑ์ที่หลากหลายในท้องตลาด เช่น Serenade® ของบริษัท AgraQuest Inc., USA ซึ่งมีส่วนผสมของ *B. subtilis* มีงานวิจัยใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria solani* (METZ, 2017), FZB 24®WG ของบริษัท ABITEP GmbH, Germany มีส่วนผสมของ *B. subtilis* สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้งได้ โดยไปเหนี่ยวนำให้เกิดเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคข้าว (Nagendran et al., 2013) และยังมีผลิตภัณฑ์ที่มีชื่อทางการค้าว่า Flick ของบริษัท Prathibha Biotech :ซึ่งมีส่วนผสมของ *Pseudomonas fluorescens* ใช้ควบคุมโรคไหม้ในข้าวได้ (Khan, 2012)

การป้องกันโรคขอบใบแห้งมีการใช้พันธุ์ข้าวที่ต้านทาน เช่น พันธุ์สุพรรณบุรี 60 สุพรรณบุรี 90 สุพรรณบุรี 1 สุพรรณบุรี 2 กข7 และ กข23 ในดินที่อุดมสมบูรณ์ไม่ควรใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมาก และไม่ควรระบายน้ำจากแปลงที่เป็นโรคไปสู่แปลง สารที่ใช้ป้องกันกำจัดโรคขอบใบแห้ง ไอโซโทพรโทโอเลน คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ เช่น สเตร์พโตมัยซินซัลเฟต ออกซีเตตราไซคลินไฮโดรคลอไรด์ และไตรเบซิคคอปเปอร์ซัลเฟต (กรมการข้าว, 2560)

การป้องกันโรคไหม้มีการใช้พันธุ์ค่อนข้างต้านทานโรค สำหรับภาคกลาง เช่น สุพรรณบุรี 1 สุพรรณบุรี 60 ปราชินบุรี 1พลา漾าม ข้าวเจ้าหอมพิษณุโลก 1 ส่วนภาคเหนือ และตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น ข้าวเจ้าหอมพิษณุโลก 1 สุรินทร์ 1 เหนียวอุบล 2 สันป่าตอง 1 หางยี 71 กู้เมืองหลวง ขาวโป่งไคร้ น้ำรู่ เป็นต้น และกำจัดโรคไหม้ในข้าวด้วยสารเคมี ได้แก่ สารป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น ไตรไซคลาโซล (tricyclazole) คาซูกาไมซิน (kasugamycin) ไอโซโทพรโทโอเลน (isoprothiolane) และคาร์เบนดาซิม (carbendazim) (กรมการข้าว, 2560)

### การควบคุมโรคข้าวโดยวิธีทางชีวภาพ

การควบคุมโรคข้าวโดยวิธีทางชีวภาพเป็นการควบคุมโดยชีววิธีด้วยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ดีที่เป็นศัตรูของเชื้อสาเหตุโรคพืชมาลดจำนวนหรือควบคุมประชากรของเชื้อสาเหตุโรค ด้วยการยับยั้งกิจกรรมหรือกระบวนการเข้าทำลายพืชของเชื้อสาเหตุโรค เช่น



*Pseudomonas* spp. และ *Bacillus* spp. การควบคุมโรคข้าวโดยชีววิธีเป็นวิธีการทางเลือกในการควบคุมโรคที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้สารเคมี (Fira et al., 2018) เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นจุลินทรีย์กลุ่มดีที่ไม่สามารถทำความเสียหายกับพืชได้ มีความสามารถในการเจริญหรือเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว มีการสร้างสปอร์ช่วยให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรง มีกลไกสำคัญในการควบคุมโรคข้าวของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบ่งเป็น 2 ปฏิสัมพันธ์คือกลไกทางตรงและทางอ้อม (Olanrewaju et al., 2017) โดยกลไกทางตรงเป็นกลไกที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชโดยตรง ได้แก่ ความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินซึ่งมีบทบาทด้านการโค้งงอของยอดในการตอบสนองต่อแสง และการโค้งงอของยอดในการตอบสนองต่อแรงดึงดูดของโลก ความสามารถผลิต ACC deaminase จะช่วยให้ระดับเอทิลีนลดลงช่วยให้พืชเครียดน้อยลง การผลิตฮอร์โมนไซโคไนน์ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการสร้างเนื้อเยื่อส่วนของ meristematic มีผลต่อการแบ่งเซลล์ การยึดของราก การงอกของเมล็ด การพัฒนาของดอกและผล และไซโตไคนินยังช่วยชะลอความแก่ได้โดยการสะสมของคลอโรฟิลล์ การผลิตฮอร์โมน Gibberellin (GA) มีบทบาทกระตุ้นการเจริญเติบโต การพัฒนาของยอด การยึดตัวของลำต้น การงอกของเมล็ด การออกดอก การติดผล และยับยั้งการเจริญเติบโตของราก ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต และผลิตสารไซโตโรพอร์ สามารถป้องกันหรือลดการแพร่กระจายของเชื้อโรคเนื่องจากการขาดธาตุเหล็กทำให้สูญเสียความสามารถในการเป็นเชื้อก่อโรค นอกจากนี้ไซโตโรพอร์ยังจับกับธาตุเหล็กเพื่อเปลี่ยนไอออนของเหล็ก ทำให้อยู่ในรูปที่พืชดูดซึมง่าย ส่วนกลไกทางอ้อมเป็นกลไกที่แบคทีเรียไปยับยั้งการทำงานของเชื้อก่อโรค ในปัจจุบันได้ถูกนำไปใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพในเชิงพาณิชย์ ได้แก่ ยาปฏิชีวนะสามารถต่อต้านกับเชื้อก่อโรคได้ตั้งแต่ 1 ชนิดขึ้นไป แต่อาจไม่ได้ผลกับเชื้อโรคอื่นในพืชเดียวกัน ซึ่งยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ได้มาจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* เอนไซม์ที่ไปย่อยผนังเซลล์ ความสามารถในการแข่งขันในการแย่งสารอาหารหรือที่อยู่บนพืช ความสามารถสังเคราะห์ Hydrogen cyanide (HCN) โดยไปยับยั้ง Cytochrome c oxidase และกลไกทางอ้อมยังรวมไปถึงการเหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทาน (Induced systemic resistance; ISR)

## ***Bacillus***

### ลักษณะทั่วไปของ *Bacillus*

แบคทีเรียในجنัส *Bacillus* พบได้ทั่วไป ทั้งในดิน น้ำ อากาศ บนพื้นผิว บริเวณรอบรากพืช และในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง นอกจากนี้ยังพบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ โดยลักษณะโคโลนีของ *Bacillus* จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อมเช่น ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม เป็นต้น *Bacillus* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ มีรูปร่างเป็นท่อน เซลล์มีการเรียงตัวเป็นท่อนเดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย มีการสร้างเอนโดสปอร์ที่ตำแหน่งต่างๆ ของเซลล์แบ่งเป็น 3 ตำแหน่งได้แก่ บริเวณกลางเซลล์ บริเวณปลายเซลล์ และบริเวณค่อนข้างปลายหรือตรง

ปลายเซลล์ รูปร่างของสปอร์มีทั้งรูปร่างกลมรี หรือรูปทรงกระบอก ซึ่งการสร้างเอนโดสปอร์ช่วยให้ *Bacillus* สามารถทนร้อน และสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ (Castillo et al., 2013) ซึ่งการจำแนกแบคทีเรียวิธีดั้งเดิมสามารถทำได้ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เป็นการจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ โดย *Bacillus* แต่ละสปีชีส์มีสมบัติทางชีวเคมีที่ต่างกันดังแสดงในตารางที่ 1



ตารางที่ 1 สมบัติที่ต่างกันของ *Bacillus* spp. (Castillo et al., 2013)

คุณสมบัติ	Ba1	Bp	Bs	BL1	Bc	Bt	Bm1	Bf1	BL2	Bm2	Bb	Ba2
Anaerobic	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Voges Proskauer	+	-	+	+	d	+	+	NG	-	-	-	+
l-arabinose	d	+	+	+	-	-	-	NG	+	d	-	-
d-xylose D	d	+	+	+	-	-	-	NG	+	d	-	-
d-mannitol	+	+	+	+	-	-	-	NG	+	d	-	-
Starch	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Casein	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+
Nitrate reduction	+	-	+	+	+	+	-	d	d	d	-	+
Degradation of tyrosine	-	-	-	-	-	ND	ND	-	-	d	+	d
Growth in 7% NaCl	+	+	+	+	+	d	d	+	d	d	ND	+
Growth at												
10 °C	ND	+	d	-	d	d	d	+	ND	+	-	-
50 °C	d	d	d	+	-	-	-	-	-	-	+	-
55 °C	ND	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	d	+	+	+	+	+	d	-	-	+	-	d
propionate	ND	-	-	+	ND	ND	ND	-	-	ND	-	ND

หมายเหตุ : Ba1= *B. amyloliquefaciens*, Bp= *B. pumilus*, Bs= *B. subtilis*, BL1= *B. licheniformis*, Bc= *B. cereus*, Bt= *B. thuringiensis*, Bm1= *B. mycolides*, Bf1= *B. fastidiosus*, Bf2= *B. firmus*, BL2= *B. lentus*, Bm2= *B. megaterium*, Bb= *B. bodius* และ Ba2= *B. anthracis* d= substantial proportion of specie differ; ND= Not done; NG= no growth



## ความสำคัญของ *Bacillus* ในการเกษตร

บทบาทของแบคทีเรีย *Bacillus* ในกลุ่มของไรโซแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือจุลินทรีย์ในกลุ่ม Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) สามารถโดยช่วยให้พืชทนต่อความเครียดที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต ช่วยตรึงธาตุอาหารมาให้พืชได้ดูดซับและนำไปใช้ได้ง่าย สามารถผลิตสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชหรือฮอร์โมนสังเคราะห์ช่วยทำให้พืชเจริญได้ดีขึ้น ผลิตสารไซโตไคน์ ผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile Organic Compounds; VOCs) และสามารถผลิตเอนไซม์เพื่อช่วยป้องกันเชื้อก่อโรคพืช (Vejan et al., 2016)

*Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ทั้งกลไกทางตรง และทางอ้อม โดยการสร้างฮอร์โมนพืช เช่น cytokine, ZR, DHZR, IPA และกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA ABA สร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย Volatile organic compounds เช่น 2,3-butanediol, acetoin, 1-octen-3-ol, butyrolactone ซึ่งอาจมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช รวมทั้งสร้างสาร Lipopeptide เช่น bacillomycin, fengycin, iturin A ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารลดแรงตึงผิว และยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่น โดยสรุปได้จากงานวิจัยของ (Shafi et al., 2017) จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารสำคัญที่ *Bacillus* ผลิตและมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น คือ กลุ่มของสารลดแรงตึงผิว (biosurfactants) สารลดแรงตึงผิวประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic portion) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) (Santos et al., 2016) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่หลากหลายมีโครงสร้างทางเคมี คุณสมบัติและหน้าที่ที่ต่างกันไป มีความเป็นพิษน้อย ย่อยสลายได้ง่ายเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดย *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis* และ *B. methylotrophicus* เป็น กลุ่ม *Bacillus* จากพืชที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช (Mora et al., 2015; Nanjundan et al., 2019; Rani et al., 2020)

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* แต่ละชนิดมีกลไกในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืชได้ต่างกัน ซึ่งอาจเป็นสารสกัด ยีนหรือผลผลิตจากยีนและน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ (supernatant) ก็สามารถยับยั้งเชื้อโรคได้เนื่องจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ทำลายเชื้อก่อโรคได้ มีการศึกษากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับสารทุติยภูมิของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus velezensis* ที่สามารถสังเคราะห์อยู่ในกลุ่ม Cyclic lipopeptide เช่น surfactin, bacillomycin-D, fengycin และ bacillibactin และยังสามารถสังเคราะห์กลุ่ม polyketide เช่น marcrolactin, bacillaene และ difficidin และพบว่าสารทุติยภูมิที่ *B. velezensis* สังเคราะห์ไปกระตุ้นให้พืชเกิดการป้องกันตัวเองจากเชื้อโรค (Rabbee et al., 2019) นอกจากนี้ ยังมีรายงานเกี่ยวกับการเป็นสารควบคุมทางชีวภาพ โดยการสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่หลากหลายและยังสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ surfactins fengycins และ iturin โดย surfactin ช่วยทำให้พืชต่อสู้กับเชื้อก่อ

โรคได้ด้วยการที่ *Bacillus* ไปช่วยแย่งชิงพื้นที่และสารอาหารซึ่งเป็นกลไกในการป้องกันโรคจากแบคทีเรีย ส่วน fengycins และ iturin มีความสามารถในการต้านเชื้อราโรคพืช โดยไปรบกวนความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการรั่วไหลของไซโตพลาสซึม ทำให้เส้นใยของเชื้อราตาย และยับยั้งการงอกของสปอร์ด้วย (Andric et al., 2020) ในปัจจุบันจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่นิยมนำมาใช้และผลิตขายมีทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น *Bacillus thuringiensis* (BT) และ เชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยมีรายงานของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคข้าวได้ดังตารางที่ 2 ในปัจจุบันจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยังได้รับการยอมรับว่าเป็นเครื่องมือสำคัญในการควบคุมโรคพืช จากการศึกษาเหล่านี้สามารถนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และ supernatant มาใช้ในการควบคุมโรคข้าวและนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อใช้ในการควบคุมโรคข้าวทางการค้าได้



## ตารางที่ 2 การศึกษาจุลินทรีย์ป้องกันในการควบคุมโรคข้าว

จุลินทรีย์ป้องกัน	เชื้อสาเหตุโรค	กลไกการควบคุม	โรค	อ้างอิง
<i>Bacillus</i> spp. D3	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	สร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compound; VOC) ได้แก่ decyl alcohol และ 3,5,5-trimethylhexanol	ขอบใบแห้ง	(Xie et al., 2016)
<i>Acinetobacter</i> sp. ACMS25	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	สารปฏิชีวนะ surfactant ชนิด glycolipid	ขอบใบแห้ง	(Shalini et al., 2017)
<i>B. subtilis</i> ,	<i>Ralstonia solanacearum</i> ,	สารปฏิชีวนะ bacillomycin, fengycin, iturin และ surfactin	โรคเหี่ยว, โรคขอบ	(Sakthivel et al., 2023)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> , และ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	นอกจากนี้ยังส่งเสริมการเจริญของพืช ด้วยการสร้างสารเมแทบอไลต์ที่ติดยูมิได้แก่ ผลิตภัณฑ์เอโรโรเซอร์ และละลายธาตุอาหาร (phosphate, Zn และ K)	ใบแห้ง และโรครดใบ จุด	
<i>B. amyloliquefaciens</i> (VB2, และ VB7)	<i>Sclerotinia scerotiorum</i>	สารปฏิชีวนะ iturin, bacilysin, bacillomycin, surfactin, subtilin และ subtilosin นอกจากนี้ยังพบว่าในเมแทบอลิไทต์สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านคือฟิโนลและกรดไขมัน	โรคโคนเน่า	(Vinidkumar et al., 2017)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

จุลินทรีย์เป้าหมาย	เชื้อสาเหตุโรค	กลไกการควบคุม	โรค	อ้างอิง
<i>Bacillus subtilis</i> RH5	<i>Rhizoctonia solan</i>	สร้างสารเมแทบอไลต์ที่อุดมไปด้วย indole acetic acid, siderophore, ผลิต hydrogen cyanide และ ช่วยละลายฟอสเฟต ซิงค์ และโพแทสเซียม, สามารถผลิต hydrolytic enzymatic ได้แก่ chitinase, protease, cellulase และ xylanase และพบเป็นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ bacylisin, surfactin, และ fengycin	โรคกาบใบแห้ง	(Jamali et al., 2019)
<i>B. altitudinis</i>	<i>Pyricularia oryzae</i>	สารปฏิชีวนะ iturin และ fengycin พบว่า iturin และ fengycin ยับยั้งการเจริญของ mycelial ของเชื้อรา	โรคไหม้	(Lam et al., 2021)
<i>B. velezensis</i>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	สารปฏิชีวนะ bacillomycin, fengycin, itulin และ surfactin	ขอบใบแห้ง	(Elshakh et al., 2016)
<i>B. amyloliquefaciens</i> D29, <i>B. methylotrophicus</i> H8				
<i>B. velezensis</i> HN-2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	สารปฏิชีวนะ Bacillomycin D ทำให้ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเส้นใยและสปอร์ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> เสียหาย	โรคแอนแทรคโนส	(Jin et al., 2020)
<i>B. velezensis</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i>	สารปฏิชีวนะ surfactin, fengycin และ plantazolicin ลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ amino acid metabolism, sugar metabolism, oxidative phosphorylation และ autophagy	โรคไหม้	(Zhang et al., 2022)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

จุลินทรีย์เป้าหมาย	เชื้อสาเหตุโรค	กลไกการควบคุม	โรค	อ้างอิง
<i>B. amyloliquefaciens</i> B014	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> (XAD)	สารปฏิชีวนะ iturins และ surfactins	ใบไหม้	(Shu-Bin et al., 2012)
<i>B. siamensis</i> H30-3	<i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Colletotrichum higginsianum</i>	สารปฏิชีวนะ bacilysin, bacillomycin D, fengycin, iturin A, surfactin และ zwittrmicin	โรคใบจุด และแอนแทรกนิมส	(Lee et al., 2018)
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>X. oryzae</i> และ <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	สารปฏิชีวนะ Difficidin และ baclyysi	ขอบใบแห้ง	(Wu et al., 2015)
<i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> และ <i>B. pumilus</i>	<i>X. campestris</i> และ <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	สารลดแรงดึงผิวชีวภาพ (biosurfactant)	โรคใบเน่าดำและโรคเน่าและ	(Issazadeh et al., 2012)
<i>B. subtilis</i>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> และเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium verticilloides</i> และ <i>Sclerotium rolfsii</i>	โดยสารปฏิชีวนะ surfactin ยับยั้งแบคทีเรีย และ iturin D และ bacillomycin D ยับยั้งเชื้อรา	โรคกาบใบแห้ง, เชื้อราที่ทำให้เกิดสารพิษ และโรครากเน่าโคนเน่า	(Kumar et al., 2020)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BRp3	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	สังเคราะห์แบอไลด์ที่อุดมไปด้วยได้แก่ siderophores (1-hydroxy-phenazine, pyocyanin, และ pyochelin), rhamnolipids, 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs), 2,3,4-trihydroxy-2-alkylquinolines และ 1,2,3,4-tetrahydroxy-2-alkylquinolines	โรคขอบใบแห้ง	(Yasmin et al., 2017)



## อนุภาคนาโน

อนุภาคนาโนเป็นเทคโนโลยีที่เกิดขึ้นมาใหม่ที่สร้างจากนาโนเทคโนโลยี ที่เกี่ยวข้องกับวิทยาศาสตร์ เกิดจากการนำเทคโนโลยีมาสังเคราะห์ห่อหุ้มรวมของอะตอมหรือโมเลกุลให้เข้าด้วยกันมีขนาดเล็ก 1 ถึง 100 nm มีความแม่นยำและถูกต้องในระดับนาโนเมตร (สุเมธา, 2550) โดยการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทำได้โดยวิธีการทางเคมีฟิสิกส์และวิธีทางชีวภาพ ซึ่งการสังเคราะห์โดยวิธีเคมีฟิสิกส์ ได้รับความนิยมน้อยมาก แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถใช้งานทางการแพทย์ อันตราย ราคาแพง และวิธีทางชีวภาพ สามารถผลิตอนุภาคนาโนได้ในปริมาณที่มาก มีขนาดและรูปร่างแน่นอน เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สังเคราะห์จากจุลินทรีย์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางด้านทางการแพทย์ เกษตร สิ่งแวดล้อม อาหาร และอุตสาหกรรม เป็นต้น (Li et al., 2011) ต่อมา (Zhang et al., 2016) ได้รายงานว่ อนุภาคนาโนเงิน (AgNPs) สามารถนำไปใช้งานทางด้านทางการแพทย์ได้ในการวินิจฉัยและการบำบัดโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์จากสารสกัดจากพืช มีข้อดีคือสามารถปรับขนาดได้ง่ายและอาจมีราคาไม่แพง (Mittal et al., 2013)

สุเมธา (2550) ได้รายงานว่าการเตรียมอนุภาคนาโนออกไซด์ของโลหะมีการศึกษามากในปัจจุบัน เนื่องจากอนุภาคนาโนมีพื้นที่ผิวและความหนาแน่นต่อหน่วยปริมาตรสูง มีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีและโปร่งแสงสูง โดยวิธีการเตรียมอนุภาคนาโนออกไซด์ของโลหะสามารถจำแนกได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ

การเตรียมจากบนลงล่าง (top-down approach) เป็นการทำให้วัสดุที่มีขนาดใหญ่แตกออกเป็นชิ้นหรืออนุภาคเล็ก ๆ โดยจะใช้วิธีการบดทำให้เกิดการประสานกันของอนุภาค การแตกหักของอนุภาค การประสานเข้ากันใหม่ของอนุภาคเกิดขึ้นซ้ำ ๆ ซึ่งแบ่งเป็นการบดแบบธรรมดา และการบดด้วยพลังงานสูง ดังนั้นรูปร่างและขนาดของอนุภาคนาโนที่ต่างกัน เกิดจากการบดที่ต่างกัน โดยการบดด้วยพลังงานสูงจะทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่แตกออกเป็นอนุภาคเล็ก ขนาดที่ได้ขึ้นกับอัตราส่วนโดยน้ำหนักของลูกบดต่อน้ำหนักสารที่ถูกบด ความเร็วรอบและเวลาที่ใช้บด

การเตรียมจากล่างขึ้นบน (bottom-up approach) เป็นการสังเคราะห์อนุภาคที่มีขนาดเล็กจากระดับของอะตอมหรือโมเลกุลของสารตั้งต้น โดยใช้วิธีการทางเคมีสารละลาย เช่น วิธีโซล-เจล หรือการตกตะกอนจากสารละลาย โดยการตกตะกอนจะมีรูปร่างหลากหลาย ขึ้นกับองค์ประกอบของระบบ

## การใช้อนุภาคนาโนในเกษตร

ในปัจจุบันได้มีการนำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในทางการเกษตร ซึ่งถูกนำมาใช้ในรูปของอนุภาคนาโน เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ โลหะที่นำมาสังเคราะห์ เช่น โลหะเงิน โลหะทอง โลหะทองแดง อนุภาคนาโนเงิน มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระ (เนตรนภาและคณะ, 2562)



Concha-Guerrero et al. (2015) ได้รายงานผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดง (CuO) ต่อแบคทีเรียในดิน โดยประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าเซลล์เกิดการแตกตัวเนื่องจากสูญเสียความสมดุลของเยื่อหุ้ม

Wang et al. (2016) ได้รายงานว่า การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินสามารถสังเคราะห์ได้จาก จุลินทรีย์หลายชนิด จึงได้ทำการการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน ที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดยใช้ จุลินทรีย์ *Bacillus methylotrophicus* DC3 ได้อนุภาคที่มีรูปร่างกลม ขนาด 10-30 nm และยังมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ *Candida albicans*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* และ *Vibrio parahaemolyticus*

Pestovsky and Martínez-Antonio (2017) ได้รายงานว่ามีการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนในการเกษตร ได้แก่ การใช้ปุ๋ยอนุภาคนาโนเพื่อเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช การใช้อนุภาคนาโนเพื่อกำจัดศัตรูพืช พาหะของสารกำจัดศัตรูพืช และเป็นสารต้านแบคทีเรีย หากใช้อนุภาคนาโนในปริมาณมากจะช่วยให้เกษตรกรแม่นยำ เพิ่มผลผลิตทางการเกษตรได้ มีต้นทุนลดลง

Chhipa (2017) ได้รายงานว่า การใช้ปุ๋ยนาโนที่มาจากโลหะและสารกำจัดศัตรูพืชเพื่อการเกษตรมีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นทางเลือก โดยใช้แคลเซียม (Ca) และฟอสฟอรัส ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (P hydroxyapatite), เหล็ก (Fe), ออกไซด์ของสังกะสี (ZnO), ไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO<sub>2</sub>), อนุภาคนาโนเงิน (Ag nanoparticles) และท่อนาโนคาร์บอน (Carbon nanotubes; CNT) รูปแบบของอนุภาคนาโนโดยทั่วไป มีขนาดเฉพาะ ปล่อยสารออกฤทธิ์ที่สามารถรีดิวซ์ธาตุอาหารส่วนเกินออก และป้องกันปฏิกิริยายูโทรฟิเคชัน (Eutrophication)

### **การสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของโลหะด้วยวิธีทางชีวภาพ**

เนื่องจากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยทั่วไปใช้กระบวนการทางเคมี หรือฟิสิกส์ที่ค่อนข้างอันตราย และไม่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม การสังเคราะห์ทางชีวภาพจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการสังเคราะห์ โดยเป็นวิธีการที่ใช้สารจากพืช หรือจุลินทรีย์ หรือสารออกฤทธิ์จากจุลินทรีย์เป็นตัวรีดิวซ์ เพื่อให้เกิดอนุภาคนาโนออกไซด์ของโลหะ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารกลุ่มหนึ่งที่มีรายงานการนำมาใช้เพื่อสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยเฉพาะกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทั้งในกลุ่มของ lipopeptides และ glycolipid (Płaza et al., 2015) ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร โดยเฉพาะเพื่อการควบคุมโรคพืช

### **ดัชนีบ่งชี้คุณภาพดินทางชีวภาพ**

ดัชนีบ่งชี้ที่ใช้ในการบ่งบอกคุณภาพดินทางชีวภาพ ได้แก่ จุลินทรีย์ และเอนไซม์ในดิน โดยจุลินทรีย์ที่พบในดิน มีทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท ฟังไจ ไชยาโนแบคทีเรีย และโปรโตซัว โดยปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ประมาณ  $10^8$ - $10^9$  CFU ต่อ ดิน 1 g โดยเชื้อแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่พบมากที่สุด ในดิน บทบาทของจุลินทรีย์ในดินคือ เป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ และปลดปล่อยธาตุ

อาหารให้แก่พืช และสิ่งมีชีวิตอื่น จึงเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรของสารในดิน ทั้งวัฏจักรคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และธาตุอื่น ๆ (Sylvia et al., 2005) นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังมีบทบาทต่อคุณสมบัติทางกายภาพของดินด้วย การที่จุลินทรีย์สามารถบ่งชี้สุขภาพของดินได้ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้เร็วกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากมีอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงกว่าสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่น ๆ โดยที่การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และกายภาพบางอย่างที่ตรวจวัดไม่สามารถบอกสุขภาพของดินได้ (Das and Varma, 2010)

สำหรับเอนไซม์ในดิน (soil enzymes) คือกลุ่มของเอนไซม์ที่ปกติดูอยู่ในดิน และมีบทบาทสำคัญต่อการรักษาระบบนิเวศในดิน คุณสมบัติทางเคมี เอนไซม์ที่ใช้ในการบ่งชี้ความสมบูรณ์ และสุขภาพดินเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของจุลินทรีย์ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรของสารภายในดิน ได้แก่ วัฏจักรคาร์บอน คือ dehydrogenase,  $\beta$ -glucosidase และ cellulase วัฏจักรไนโตรเจน คือ urease และ protease ส่วนเอนไซม์ phosphatase จะเกี่ยวข้องกับวัฏจักรของฟอสฟอรัส โดยเอนไซม์เหล่านี้จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ในดิน ทำให้เกิดการปลดปล่อยธาตุอาหารออกมาในดิน โดยแหล่งของเอนไซม์ภายในดินอาจมาจากจุลินทรีย์ พืช หรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่อยู่ในดิน โดยดินที่ดีจะเกิดจากความสมดุลของคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพซึ่งรวมถึงเอนไซม์ (Das and Varma, 2010)

### บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ

#### 1. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1.1	Cuvette	(VWR, Germany)
1.2	Hot plate stirrer รุ่น MS300HS	(M Tops, Korea)
1.3	PCR รุ่น Mastercycler-25	(Major science, Taiwan)
1.4	Syringe filter ขนาดรู 0.22 $\mu$	(Nylon membrane, Labfil, China)
1.5	Vernia caliper	(BEC, ยูเนี่ยน ซายน์ จำกัด, ประเทศไทย)
1.6	เครื่อง Electrophoresis	(Labnet, USA)
1.7	เครื่องเขย่า	(Gallen Kamp, UK)
1.8	เครื่องฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ	(Wise Cave, China)
1.9	เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	(Mettler-Toledo, Switzerland)
1.10	เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	(Mettler-Toledo, Switzerland)
1.11	เครื่องปั๊ม DNA	(Major science, Taiwan)
1.12	เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Scanspeed mini	(Labogene, Denmark)
1.13	เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) รุ่น MPW-380R	(MPW MED.instruments, Poland)
1.14	เครื่องผสมสาร (vortex mixer)	(LMS, Japan)
1.15	เครื่องมองเจลแบบใช้แสง LED รุ่น UltraSlim LED illuminator	(Maestrogen, Taiwan)
1.16	เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง รุ่น pH100	(Ionix, India)
1.17	เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น SP-830	(Metertech, Taiwan)
1.18	เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์(Bruker D2 Phaser X-ray Diffractometer)	(Bruker AXS, Germany)
1.19	ชุดทำ PCR Product ให้บริสุทธิ์สำเร็จรูป TIANquick Midi Purification Kit	(Tiangen Biotech, China)

- 1.20 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป TIANamp Bacteria DNA Kit (Tiangen Biotech, China)
- 1.21 ตะแกรงร่อน (No.80) (Endecotts, England)
- 1.22 ตู้ดูดควัน (Electric service device, Thailand)
- 1.23 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Termaks, Norway)
- 1.24 ตู้ปลอดเชื้อ (AIRTECH, China)
- 1.25 ตู้บลมร้อน (Binder, Germany)
- 1.26 เตาเผา รุ่นYR05272 (Kalstein, France)
- 1.27 น้ำปราศจากอออน (DI) (RCL Labscan, Thailand)
- 1.28 พาสเจอร์ปีเปตแก้ว (glass pasture pipette) (Paul Marienfeld, Germany)
- 1.29 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, Germany)

## 2. สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- 2.1 Absolute ethanol (RCL Labscan, Thailand)
- 2.2 Absolute methanol (RCL Labscan, Thailand)
- 2.3 Agar (ยูเนียน ซายน์ จำกัด, ประเทศไทย)
- 2.4 Agarose gel (Invitrogen, Canada)
- 2.5 Ammonium chloride (Merck, Germany)
- 2.6 Ammonium nitrate (QRëc, New Zealand)
- 2.7 Ammonium sulfate (RCL Labscan, Thailand)
- 2.8 Anhydrous sodium carbonate (QRëc, New Zealand)
- 2.9 Boric acid (Fisher Scientific, UK)
- 2.10 Calcium chloride (Merck, Germany)
- 2.11 Carboxymethyl cellulose sodium salt solution (บริษัทกรุงเทพเคมี จำกัด, ประเทศไทย)
- 2.12 Casein (Fluka, Germany)
- 2.13 Citric acid (AnalaR, Ireland)
- 2.14 Copper (II) sulfate anhydrous (QRëc, New Zealand)



2.15	di-Potassium hydrogen orthophosphate	(Ajax Finechem, Australia)
2.16	Ferric ammonium sulfate	(Ajax Finechem, Australia)
2.17	Ferrous sulfate heptahydrate	(Carlo Erba, Germany)
2.18	Folin Ciocalteu's phenol reagent	(Merck, Germany)
2.19	Fructose	(Fluka, Japan)
2.20	Glucose	(ยูเนียนซายด์, ประเทศไทย)
2.21	Glucose anhydrous	(Fisher scientific, UK)
2.22	Glycerol	(QRęc, New Zealand)
2.23	Glacial acetic acid	(RCL Labscan, Thailand)
2.24	Hexadecane	(Sigma-aldrich, USA)
2.25	Hydrochloric acid	(RCL Labscan, Thailand)
2.26	L-Tyrosine	(Fluka, Switzerland)
2.28	Magnesium sulfate heptahydrate	(QRęc, New Zealand)
2.29	Maleic acid	(QRęc, New Zealand)
2.30	Manganese (II) sulfate 1-hydrate	(Kemaus, Australia)
2.31	p-Nitrophenol	(Sigma-aldrich, Japan)
2.32	p-Nitrophenyl phosphate	(Sigma-aldrich, Austria)
2.33	Potassium cyanide	(Honeywell Research Chemicals, Germany)
2.34	Potassium dihydrogen orthophosphate anhydrous	(RCL Labscan, Thailand)
2.35	Potassium ferric hexacyanide	(Fisher scientific, UK)
2.36	Streptomycin	(Sigma-aldrich, Germany)
2.37	Sodium acetate	(QRęc, New Zealand)
2.38	Sodium carbonate	(QRęc, New Zealand)
2.39	Sodium chloride	(RCL Labscan, Thailand)
2.40	Sodium dihydrogen phosphate anhydrous	(QRęc, New Zealand)
2.41	Sodium dodecyl sulfate	(Fisher scientific, Germany)
2.42	Sodium hydroxide	(Kemaus, Australia)
2.43	Sodium nitrate	(Merck, Germany)
2.44	Sucrose	(RCL Labscan, Thailand)



2.45	Sulfuric acid	(RCL Labscan, Thailand)
2.46	TAE buffer	(Invitrogen, Canada)
2.47	Trichloro acetic acid	(AnalaR, Ireland)
2.48	Triphenyl formazan	(Sigma-aldrich, Japan)
2.49	Triphenyl tetrazolium chloride	(Merck, Germany)
2.50	Tris (pH10-11.5)	(Vivantis Technologies, Malaysia)
2.51	Zinc nitrate hexahydrate	(LOBA chemie, India)
2.52	Zinc sulfate heptahydrate	(RCL Labscan, Thailand)
2.53	น้ำมันมะกอก	(Bertolli, USA)
2.54	สีย้อมเจล SYBR® Safe DNA gel stain	(Invitrogen, Canada)
<b>3. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)</b>		
3.1	Ashby's Mannitol Agar	(Himedia, India)
3.2	Blood agar	(Biomed, Thailand)
3.3	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)	(Himedia, India)
3.4	Medium optimal of lipopeptide production	ภาคผนวก ก
3.5	Modified Potato Dextrose Agar (MPDA)	ภาคผนวก ก
3.6	Nutrient Glucose Agar (NGA)	(Himedia, India)
3.7	Nutrient Glucose Broth (NGB)	(Himedia, India)
3.8	Pikovskaya's Agar	(Himedia, India)
3.9	Plate Count Agar	(Himedia, India)
3.10	Peptone	(Criterion, Canada)
3.11	Soyabean Casein Digest Medium หรือ Tryptone Soya Agar (TSA)	(Himedia, India)
3.12	Soyabean Casein Digest Medium หรือ Tryptone Soya broth (TSB)	(Himedia, India)
3.13	Tryptone Type-1 (Casitose Type-I)	(Himedia, India)
3.14	yeast extract	(Himedia, India)



#### 4. ยาปฏิชีวนะ (Susceptibility test discs) (Himedia, India)

- 4.1 Ciprofloxacin (5 µg/disc)
- 4.2 Penicilin (10 µg/disc)
- 4.3 Tetracyclin (30 µg/disc)
- 4.4 Tigecyclin (15 µg/disc)
- 4.5 Vancomycin (30 µg/disc)

#### 5. Primers (Integrated DNA Technologies PTE, Singapore)

- 5.1 *srfA*
- 5.2 *SUR3*
- 5.3 *fenD*
- 5.4 *ituD*
- 5.5 *ituC*
- 5.6 *bmyB*

#### 6. พันธุ์ข้าวที่ใช้ในงานวิจัย

(ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยความเป็นเลิศด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมหาวิทยาลัยแม่โจ้)

- 6.1 ข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2
- 6.2 ข้าวพันธุ์ กข 6
- 6.3 ข้าวพันธุ์ กข 23
- 6.4 ข้าวพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

1.1 แบคทีเรีย *Bacillus* sp. และกลุ่มที่เกี่ยวข้องจำนวน 79 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากไลเคน (ศรีกาญจนาและคณะ, 2560) แสดงดังภาคผนวก ข

1.2 จุลินทรีย์ก่อโรคข้าว ได้แก่ เชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ และ เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ไอโซเลต 13 สาเหตุโรคขอบใบแห้ง

### 2. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคข้าว

2.1 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าวโดยวิธี Spot on lawn

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในอาหารเหลว Nutrient Glucose Broth (NGB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 2-3 วัน นำมาปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.85% NaCl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้มีค่าความขุ่น 0.2 จากนั้นนำไป swab บนผิวหน้าอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptone Soya Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน ปริมาตร 2  $\mu$ l หยดลงบนผิวหน้าอาหาร รอให้ของเหลว ชิมลงผิวหน้าวันจนแห้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 วัน สังเกตการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากการเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบๆ โคลนินของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและโคลนิน นำมาหาอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและโคลนินเพื่อแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง ซึ่งแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวกในการทดสอบด้วยเทคนิค spot on lawn มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยสารทุติยภูมิด้วยวิธี agar well diffusion โดยนำสารแขวนลอยแบคทีเรีย *Bacillus* ที่เตรียมไว้เช่นเดียวกับข้างต้น นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เก็บส่วนใส ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนรูพรุน 0.2  $\mu$  ก่อนนำไปทดสอบ และเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคข้าว โดยเลี้ยงในอาหาร NGB นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 2-3 วัน นำมาปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.85% NaCl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ( $A_{600}$ ) ให้มีค่าความขุ่น 0.2 จากนั้นนำไป swab บนผิวหน้าอาหาร NGA ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที เจาะอาหารให้เป็นหลุมโดยใช้ glass pasteur pipette ด้านบน ให้ได้หลุม ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm จากนั้นนำ supernatant ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 25  $\mu$ l เติมลงไป ในหลุมที่เจาะไว้ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 วัน สังเกตการยับยั้งจากบริเวณใสแล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นโดยรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมด้วย นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบ

ฤทธิ์ยับยั้งของสารเคมีทางการเกษตรต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ streptomycin 50 µg/ml และสารเคมีทางการค้าซึ่งมีส่วนผสมของทองแดงและสังกะสี

## 2.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* โดยวิธี Dual culture

นำเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวกในการทดสอบด้วยเทคนิค spot on lawn มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NGB บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมไว้ หยดลงบนผิวหน้าอาหาร Modified Potato Dextrose Agar (MPDA) ให้มีระยะห่างระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ที่ศึกษากับเชื้อรา *P. oryzae* 3 cm รอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นนำ glass pasteur pipette ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ด้านบนซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm เจาะวงที่มีเชื้อรา *P. oryzae* และนำเข็มเขี่ยปลายตรง ย้ายเชื้อราไปวางบนอาหาร MPDA ด้านตรงข้ามกับที่หยด supernatant แบคทีเรีย *Bacillus* นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตการยับยั้งเชื้อราก่อโรคจากการเจริญของเส้นใยที่ไม่เข้าใกล้ *Bacillus* แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ วัดขนาดการเจริญของเส้นใย นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสมการ (1)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อรา} = \frac{(d_{\text{control}} - d_{\text{assay}})}{d_{\text{control}}} \times 100 \quad (1)$$

โดย  $d_{\text{control}}$  = ขนาดการเจริญของเส้นใยที่ไม่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus*

$d_{\text{assay}}$  = ขนาดการเจริญของเส้นใยที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus*

จากนั้นจึงนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. oryzae* โดยสารทุติยภูมิ ด้วยวิธี agar well diffusion ด้วยการเจาะอาหาร MPDA ด้วย glass pasteur pipette ที่ฆ่าเชื้อแล้วและนำ supernatant ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB นาน 3 วัน เช่นเดียวกับที่ทดสอบ *X. oryzae* pv. *oryzae* เมื่อใช้วิธี agar well diffusion โดยจุด supernatant ปริมาตร 25 µl เติมลงไปในกลุ่มที่เจาะไว้ รอให้ส่วนใสซึมลงไป ในอาหาร จากนั้นจึงทำการเจาะวงที่มีเชื้อรา *P. oryzae* มาวางไว้บนอาหารด้านตรงข้าม ให้มีระยะห่างระหว่างเชื้อรากับหลุม 3 cm จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตการยับยั้งเชื้อราก่อโรคจากการเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบๆหลุม และทำการวัดขนาดการเจริญของเส้นใยเพื่อนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสมการ (1)

## 3. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* ลงในอาหารเหลว NGB นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.85% NaCl วัดค่า  $A_{600}$  ให้มีค่าความขุ่น 0.1 จากนั้นนำไป swab บนผิวหน้าอาหาร Blood agar นำแผ่นยาแต่ละ

ชนิด ได้แก่ Penicillin (10 µg/disc), Ciprofloxacin (5 µg/disc), Tetracyclin (30 µg/disc), Tigecyclin (15 µg/disc), และ Vancomycin (30 µg/disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm วางบนผิวหน้าอาหารที่ได้ทำการ swab ไว้แล้ว ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง สังเกตบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส นำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4. การศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (biosurfactants) ของเชื้อแบคทีเรีย

##### *Bacillus*

##### 4.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity)

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ที่ต้องการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงมา streak บนอาหาร Blood agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญบนอาหารว่าเป็นกลุ่มที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ จะมีลักษณะวงใสสีเหลืองรอบโคโลนีของเชื้อ (beta-hemolysis) หรือกลุ่มที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้บางส่วน จะมีลักษณะวงใสสีเขียวรอบโคโลนี (alpha-hemolysis) หรือกลุ่มที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ลักษณะโคโลนีของเชื้อและอาหารจะไม่มี การเปลี่ยนแปลง (gamma-hemolysis) เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวสามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้ ดังนั้นถ้าเชื้อแบคทีเรียสามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้ ดังนั้นก็น่าจะมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ด้วย (Rengathavasi et al., 2011)

##### 4.2 การวัด cell hydrophobicity ด้วย BATH assay (Pruthi and Cameotra, 1997; Rengathavasi et al., 2011)

การทดสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (cell hydrophobicity) ด้วย Bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) assay โดยปรับความขุ่นของตะกอนเซลล์ด้วยการละลายสารแขวนลอยแบคทีเรียด้วยบัฟเฟอร์ และปรับความขุ่นโดยวัด  $A_{610}$  ให้ได้ประมาณ  $0.5 \pm 0.05$  และดูดใส่หลอดทดลองปริมาตร 1.2 ml เติม hydrocarbon โดยใช้ hexadecane ปริมาตร 2 ml ตั้งทิ้งไว้ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำที่อยู่ด้านล่างหลอดไปวัดค่า  $A_{610}$  ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ บันทึกผลความไม่ชอบน้ำของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับความสามารถของระดับการยึดเกาะของเซลล์กับไฮโดรคาร์บอน โดยเซลล์ที่ไม่ชอบน้ำจะจับกับไฮโดรคาร์บอน จึงต้องแยกส่วนน้ำไปวัดค่า  $A_{610}$  ถ้าความขุ่นในน้ำลดลง แสดงว่าเซลล์ไม่ชอบน้ำ และคำนวณเซลล์ที่ยึดเกาะกับไฮโดรคาร์บอนโดยใช้สูตร

$$\% \text{ การยึดเกาะของเซลล์} = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

โดย A = ค่า  $A_{610}$  ที่วัดได้หลังจากเติม hexadecane ,  $A_0$  = ค่า  $A_{610}$  เริ่มต้น

#### 4.3 การทดสอบความสามารถในการเกิด E24 ของเชื้อแบคทีเรียด้วยการหาค่า emulsification index (E24)

การหาค่า E24 ของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ 120 rpm นาน 3 วัน ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใสด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 5 นาที นำส่วนใส 2 ml ผสมน้ำมันมะกอก 2 ml โดยใช้ 0.5% sodium dodecyl sulfate เป็น positive control และใช้น้ำกลั่น และอาหารเหลว TSB เป็น negative control ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง คำนวณหาค่าดัชนี E24 โดยสูตรต่อไปนี้

$$E24 (\%) = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชัน}}{\text{ความสูงของของเหลว}} \times 100 \quad (3)$$

#### 4.4 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป TIANamp Bacteria DNA Kit ทำตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 1% TAE buffer ที่ย้อมด้วยสี SYBR® Safe DNA gel stain และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ทำการตรวจหายีนด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยคัดเลือกยีนที่กำหนดการสร้างสารปฏิชีวนะจำนวน 6 ยีน ได้แก่ *sfA*, *SUR3*, *fenD*, *ituD*, *ituC* และ *bmyB* โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนทั้ง 6 ยีน (ตารางที่ 3) เตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50  $\mu$ l จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR รุ่น Mastercycler-25 โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

- initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- ตามด้วยปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ
- denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นทำการตรวจผลผลิต PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น



ตารางที่ 3 Primers และสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

ยีน	สารยับยั้ง จุลินทรีย์	Primer	Sequence F (5' -> 3'), R (3' -> 5')	product size (bp)	Ta (°C)	Reference
						(Mora et al., 2015)
<i>urfA</i>	Surfactin	<i>urfAF</i>	TCGGGACAGGAAGACATCAT	201	58	และ (Plaza et al., 2015)
		<i>urfAR</i>	CCACTCAAACGGATAATCCTGA			
<i>SUR3</i>		<i>SUR3F</i>	ACAGTATGGAGGCATGGTC	441	57	(Nanjundan et al., 2019)
		<i>SUR3R</i>	TTCCGCCACTTTTTTCAGTTT			
						(Mora et al., 2015)
<i>fenD</i>	Fengycin	<i>fenDF</i>	GGCCCGTTCTCTAAATCCAT	269	58	และ (Zouari et al., 2016)
		<i>fenDR</i>	GTCATGCTGACGAGAGCAAA			
						(Mora et al., 2015)
<i>ituD</i>	Iturin	<i>ituDF</i>	GATGCGATCTCCTTGGATGT	647	60	(Nanjundan et al., 2019)
		<i>ituDR</i>	ATCGTCATGTGCTGCTTGAG			
						(Mora et al., 2015)
<i>ituC</i>		<i>ituCF</i>	GGCTGCTGCAGATGCTTTAT	423	58	และ (Plaza et al., 2015)
		<i>ituCR</i>	TCGCAGATAATCGCAGTGAG			
						(Mora et al., 2015)
<i>bmyB</i>	Bacillomycin	<i>bmyBF</i>	GAATCCCGTTGTTCTCCAAA	370	55	และ (Frikha-Gargouri et al., 2017)
		<i>bmyBR</i>	GCGGGTATTGAATGCTTGTT			

หมายเหตุ : Ta = annealing temperature



## 5. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ *Bacillus velezensis* เพื่อผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย

### *X. oryzae* pv. *oryzae*

นำแบคทีเรีย *B. velezensis* มาศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยทดสอบแหล่งคาร์บอน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุกโตส และกลีเซอรอล และใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ จากนั้นนำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ *B. velezensis* ที่จะผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* เนื่องจาก lipopeptide เป็นสารทุติยภูมิ ซึ่งเชื้อจะผลิตได้มากขึ้นเมื่อมี อุณหภูมิ ค่าพีเอช และแหล่งอาหารที่เหมาะสม ดังนั้นจึงต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน โดยใช้เทคนิค พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) ปัจจัยที่ใช้ในการทดลองเป็นปัจจัยที่มี ผลต่อการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 4 ออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ด้วยโปรแกรม Design-Expert version 13.05 (ดารีกาและคณะ, 2013) ซึ่งมี 3 ปัจจัย โดยแต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ มีการ ทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 ซ้ำ และมีทั้งหมด 17 หน่วยการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลอง

ปัจจัย	ระดับ		
	-1	0	1
ปริมาณแหล่งคาร์บอน (X1) (g/L)	10	25	40
ปริมาณแหล่งไนโตรเจน (X2) (g/L)	1	4	7
พีเอชของอาหารเริ่มต้น (X3)	5	7	9

ตารางที่ 5 การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

std	run	glucose	NH <sub>3</sub> Cl	pH	glucose	NH <sub>3</sub> Cl	pH
1	14	-1	-1	0	10	1	7
2	9	1	-1	0	40	1	7
3	16	-1	1	0	10	5	7
4	4	1	1	0	40	5	5
5	8	-1	0	-1	10	4	5
6	11	1	0	-1	40	4	5
7	13	-1	0	1	10	4	9
8	3	1	0	1	40	4	9
9	17	0	-1	-1	25	1	5
10	2	0	1	-1	25	5	5
11	6	0	-1	1	25	1	9
12	10	0	1	1	25	5	9
13	7	0	0	0	25	4	7
14	15	0	0	0	25	4	7
15	1	0	0	0	25	4	7
16	12	0	0	0	25	4	7
17	5	0	0	0	25	4	7

นำแบคทีเรีย *Bacillus* ที่คัดเลือกแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Medium Optimal of Lipopeptide Production (MOLP) (ดัดแปลงจาก Abouseoud et al. (2008) และ Gu et al. (2005)) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไปกรองด้วย filter ที่ฆ่าเชื้อแล้วที่มีขนาดรูพรุน 0.22  $\mu\text{m}$  จากนั้นนำส่วนใสมาวัดผลการทดลองโดยการหาค่า E24 และนำไปทดสอบ Agar well diffusion assay ต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* นำผลการทดลองที่ได้มาสร้างสมการทำนายค่า E24 จากการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความเหมาะสมของรูปแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กับผลการทดลองที่ได้ในรูปแบบของสมการต่อไปนี้ (สมการ (4))

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^n \beta_{ij} x_i x_j \quad (4)$$

โดยที่  $y$  คือตัวแปรผลตอบสนอง E24,  $X_1$  และ  $X_2$  คือตัวแปรอิสระ,  $\beta_0$ ,  $\beta_1$  และ  $\beta_2$  คือสัมประสิทธิ์การถดถอยของจุดตัดแกน  $y$  (Intercept) อิทธิพลเชิงเส้น (Linear) และอิทธิพลกำลังสอง (Quadratic) จากนั้นนำสมการที่ได้มาใช้ในการสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองและกราฟโครงร่างของ emulsification index เทียบกับปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

## 6. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีและทองแดงด้วยเชื้อ *Bacillus*

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* ที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลว นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วย Refrigerated Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,200 rpm เป็นเวลา 15-20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วน supernatant ไว้สังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี โดยดัดแปลงจาก Alayande et al. (2019) และ Selim et al. (2020) สำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีใช้ Zinc nitrate ความเข้มข้น 0.25 M, 0.50 M และ 1 M ในการสังเคราะห์ โดยใช้ส่วนของ supernatant เป็นตัวรีดิวซ์ ใช้วิธีการตกตะกอนด้วย NaOH ความเข้มข้น 0.33 M และกวนด้วยเครื่อง hotplate stirrer ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 6 ส่วนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงใช้วิธีการดัดแปลงจาก วชิรและคณะ. (2561) และ Kala et al. (2016) โดยใช้ copper sulfate ความเข้มข้น 0.01M กวนทิ้งไว้ด้วย hot plate stirrer ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี

ชื่อตัวอย่าง	เชื้อ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความเข้มข้นของ Zinc nitrate hexahydrate (Molar)	ความเข้มข้นของ NaOH (Molar)
SK6412-01	LC70	TSB	0.25	0.33
SK6511-01	LC33	NGB	0.50	0.33
SK6511-02	LC33	NGB	0.50	0.33
Bv19	LC19	TSB	1	0.33
Bv130	LC130	TSB	1	0.33
Bv130MOLP	LC130	MOLP	1	0.33

หมายเหตุ : TSB = Tryptone Soya Broth, MOLP = Medium Optimal of Lipopeptide Production

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดง

สูตร	เชื้อ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความเข้มข้นของ copper sulfate
Cu	LC70	1/2NGB	0.01 M
Cu-1	LC70	TSB	1 mM
Cu-2	LC70	TSB	0.01 M
Cu-3	LC70	TSB	1 mM
Cu-4	LC70	TSB	0.01M

หมายเหตุ : TSB = Tryptone Soya Broth, 1/2NGB = ครึ่งสูตรของ Nutrient Glucose Broth

หลังจากทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีและทองแดงสูตรต่างๆแล้ว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย Refrigerated Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4200 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และล้างตะกอนด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง ตามด้วย Ethanol 2 ครั้ง เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ที่หลุดกระจายอยู่ จากนั้นนำอนุภาคไปอบด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าตัวอย่างจะแห้ง จึงนำมาบดในโกร่งที่ปราศจากเชื้อให้ได้ผงละเอียด นำไปร่อนด้วยตะแกรง No.80 ขนาดอนุภาค 180  $\mu\text{m}$  แล้วนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงเพื่อกำจัดธาตุอื่นๆ และนำมาร่อนอีกครั้ง และเก็บไว้ในโถดูดความชื้น

นำอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ตรวจสอบการเกิดอนุภาคนาโนด้วยการวิเคราะห์ขนาดและรูปร่างโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) วิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของอิเล็กตรอนในบริเวณที่เลือก (Selected Area Electron Diffraction; SAED) ศึกษาการกระจายตัวของธาตุองค์ประกอบด้วยเทคนิคการกระจายพลังงานรังสีเอกซ์ของอนุภาคองค์ประกอบทางเคมี (EDS mapping) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (X-ray diffractometer; XRD) ด้วยเครื่อง Bruker D2 Phase X-ray Diffractometer เพื่อระบุชนิดและโครงสร้างผลึกของสารประกอบ

### 7. การทดสอบฤทธิ์ของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคข้าว

สำหรับเชื้อแบคทีเรียขอบใบแห้งใช้เทคนิค Spot on lawn โดย *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนที่นำมาทดสอบมี 2 ความเข้มข้นได้แก่ 10,000 และ 20,000 ppm โดย

เจือจางอนุภาคนาโนด้วยน้ำปราศจากอ็อกซิเจน และหยดลงบนผิวหน้าอาหาร NGA ที่ swab เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* แล้ว ปริมาตร 10  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน สังเกตลักษณะการยับยั้งจากการเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบๆ อนุภาคนาโนที่หยดลงไป และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส นำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สำหรับเชื้อรา *P. oryzae* ใช้เทคนิค Agar dilution plate ด้วยการผสมอนุภาคนาโนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนที่นำมาทดสอบได้แก่ 1,250 และ 2,500 ppm จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. oryzae* ลงบนอาหารที่ผสมอนุภาคนาโน สูตรต่างๆ โดยกลุ่มควบคุมจะเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่ผสมอนุภาคนาโน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน บันทึกผลโดยดูจากการเจริญของเชื้อราบนผิวหน้าอาหาร วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและนำมาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

#### 8. การทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อข้าว (Ndeh et al., 2017)

นำอนุภาคนาโนที่คัดเลือกมาทดสอบความเป็นพิษกับข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2 กข 6 กข 23 และข้าวดอกมะลิ 105 โดยนำเมล็ดข้าวมาแช่ในสารละลายอนุภาคนาโนสังกะสีที่เลือก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 500 และ 1,000 ppm และใช้น้ำปราศจากอ็อกซิเจนเป็นชุดควบคุม ใช้จำนวน 10 เมล็ดต่อซ้ำ นำเมล็ดข้าวที่แช่แต่ละพันธุ์เพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงที่ปราศจากเชื้อ โดยให้ความชื้นด้วยการให้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาณ 5 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน และบันทึกผลโดยดูจากเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวราก และความสูงของยอด

#### 9. ศึกษาผลกระทบของอนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงและสังกะสีต่อจุลินทรีย์ในดินและเอนไซม์ในดิน

##### 9.1 ผลกระทบของอนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงและสังกะสีต่อจุลินทรีย์ในดิน

เตรียมดิน 400 g/กระถาง ผสมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 500 และ 1,000 mg/ดิน 1 kg แบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง คือดินที่มีการปลูกข้าว และดินที่ไม่มีการปลูกข้าว ควบคุมความชื้นให้อยู่ประมาณ 70% หลังจาก 30 วัน (Sillen et al., 2015) เก็บตัวอย่างดิน นำมาตรวจนับปริมาณ *Azotobacter* และ Non-symbiotic microorganisms บนอาหาร Ashby's Mannitol Agar (Chai et al., 2015) ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดของตัวอย่างด้วยอาหาร Plate count agar ตรวจนับปริมาณเชื้อราด้วยอาหาร Potato dextrose agar ตรวจนับปริมาณยีสต์และราด้วยอาหาร Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) และตรวจนับแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วยอาหาร Pikovskaya's Agar (Nautiyal, 1999)

##### 9.2 ผลกระทบของอนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงและสังกะสีต่อเอนไซม์ในดิน

ตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ในดิน ได้แก่ dehydrogenase, protease, acid phosphatase, alkaline phosphatase และ cellulase (Pascual et al., 1998) แสดงดังภาคผนวก ค



## 10. การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) และ Tukey's HSD ( honestly significant difference) test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 29.0

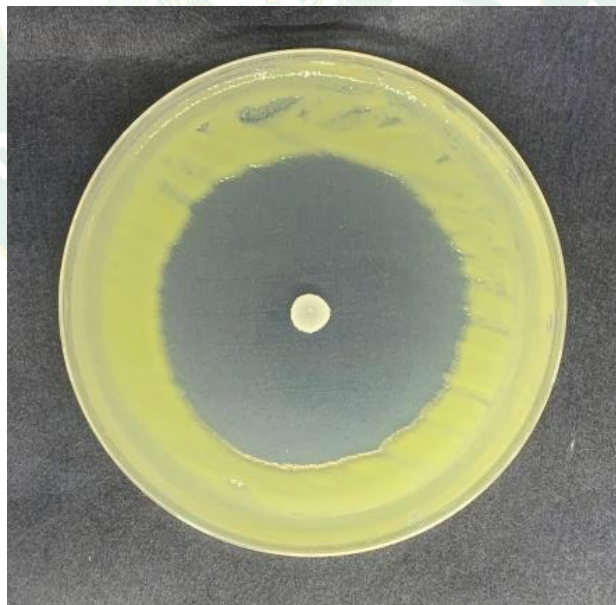




## บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์

### 1. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ *Pyricularia oryzae* ของ *Bacillus* และ กลุ่มที่เกี่ยวข้องซึ่งแยกได้จากไลเคน

จากการนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* และ กลุ่มที่เกี่ยวข้อง ซึ่งแยกได้จากไลเคน จำนวน 79 ไอโซเลตที่แยกได้จากไลเคน *Parmotrema* sp. ดังแสดงในรายละเอียดในภาคผนวก ข ซึ่งประกอบด้วย *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. aryabhattai*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. siamensis*, *B. velezensis*, *Lysinibacillus macrolides*, *Oceanobacillus sojae* และ *Paenibacillus favisporus* มาทดสอบความสามารถ ในการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* แบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี spot on lawn มีแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลต ที่ให้ผลบวก สังเกตจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 1) โดยมีดัชนีการยับยั้ง ตั้งแต่ 1.19-8.12 ดังแสดงในตารางที่ 8 ซึ่ง *Bacillus velezensis* LC130 สามารถยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ดีที่สุด โดยมีดัชนีการยับยั้งคือ 8.12

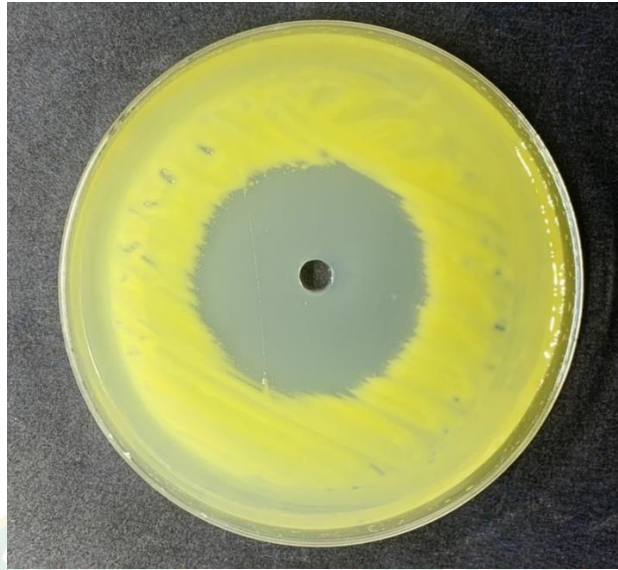


ภาพที่ 1 บริเวณยับยั้งของ *B. velezensis* LC130 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี spot on lawn บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient glucose agar

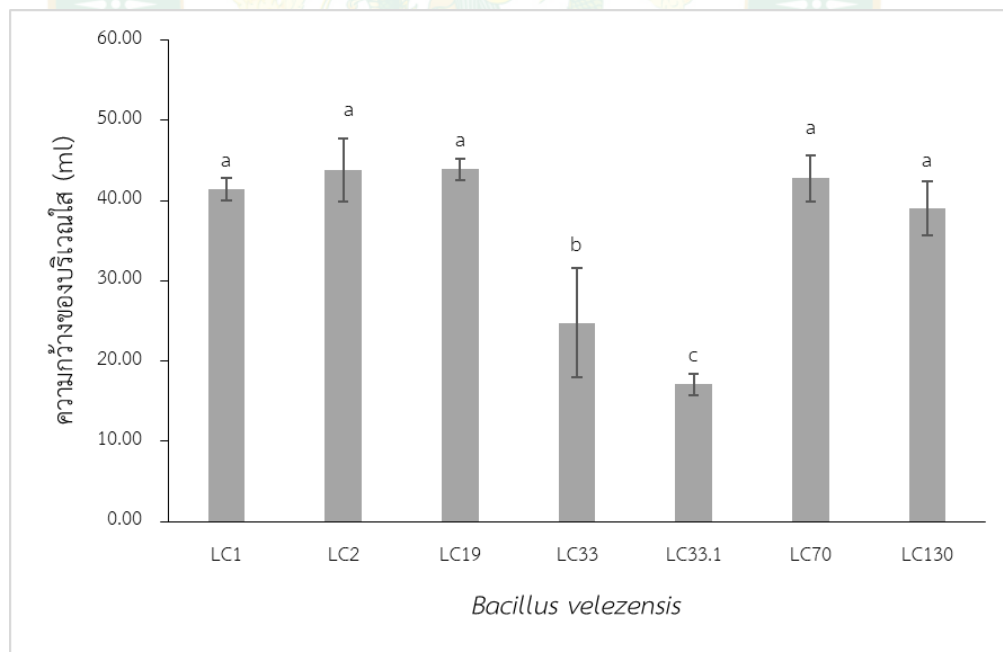
ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยดัชนีการยับยั้ง และจำนวนไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวก

ค่าเฉลี่ยดัชนีการยับยั้ง	จำนวนไอโซเลต	ไอโซเลต
>1.00-1.50	7	LC56, LC62, LC71, LC72, LC90, LC96, LC101
>1.50-2.00	14	LC11, LC12, LC13, LC70, LC78, LC93, LC98, LC99, LC43, LC122, LC126, LC132, LC142, LC153
>2.00-2.50	12	LC10, LC14, LC20, LC89, LC91, LC100, LC113, LC114, LC121, LC137, LC149
>2.50-3.00	12	LC19, LC29, LC46, LC92, LC107, LC128, LC129, LC146, LC147, LC148, LC150, LC152
>3.00-4.00	5	LC1, LC28, LC123, LC144, LC145
>4.00-5.00	1	LC67
>5.00-7.00	2	LC2, LC33
>7.00-8.00	1	LC33.1
>8.00	1	LC130

หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวกในการทดสอบเหล่านี้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยสารทุติยภูมิ โดยใช้ supernatant ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB นาน 3 วัน โดยวิธี agar well diffusion พบว่ามี supernatant เพียง 7 ไอโซเลต ซึ่งเป็น *B. velezensis* ทั้งหมด ได้แก่ LC1, LC2, LC19, LC33, LC33.1, LC70 และ LC130 ที่แสดงบริเวณยับยั้งเกิดขึ้นรอบหลุมที่เติม supernatant (ภาพที่ 2 - ภาพที่ 3) ที่ช่วงค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้ง 17.13-43.90 mm โดย LC1, LC2, LC19, LC70 และ LC130 มีค่าสูงกว่า LC33 และ LC33.1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ของ supernatant *B. velezensis* (LC1) จากการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion บนอาหาร Nutrient glucose agar



ภาพที่ 3 ความกว้างของบริเวณยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Agar well diffusion โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ในข้าว ใช้เชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวกในการทดสอบการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยเทคนิค spot on lawn ทั้ง 54 ไอโซเลต มาทดสอบด้วยวิธี dual culture พบว่าในจำนวนนี้มี 9 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. oryzae* (ภาพที่ 4) ประกอบด้วย *B. megaterium* จำนวน 1 ไอโซเลต (LC67) *B. pumilus* จำนวน 1 ไอโซเลต (LC28) ส่วนอีก 7 ไอโซเลต เป็น *B. velezensis* โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง 24.67-58.79% ดังแสดงในตารางที่ 9



ภาพที่ 4 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคไหม้ *P. oryzae* ของ *B. velezensis* LC1 เป็นเวลา 7 วัน ด้วยวิธี Dual culture บนอาหาร Modified potato dextrose agar

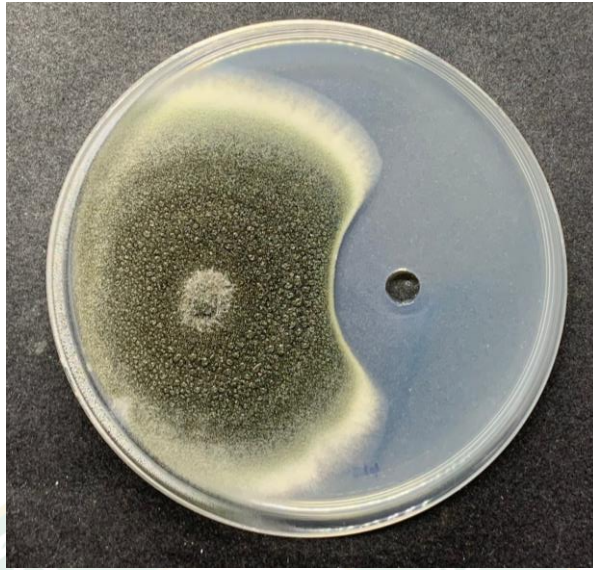
ตารางที่ 9 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. oryzae* โดย *Bacillus* ที่แยกได้จากไลเคน

สปีชีส์	ชื่อไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ <i>P. oryzae</i>
<i>B. megaterium</i>	LC67	51.61 <sup>ab</sup>
<i>B. pumilus</i>	LC28	51.71 <sup>bc</sup>
<i>B. velezensis</i>	LC1	58.79 <sup>a</sup>
	LC2	57.68 <sup>ab</sup>
	LC19	33.16 <sup>d</sup>
	LC33	56.19 <sup>ab</sup>
	LC33.1	49.38 <sup>c</sup>
	LC70	52.97 <sup>abc</sup>
	LC130	24.67 <sup>e</sup>

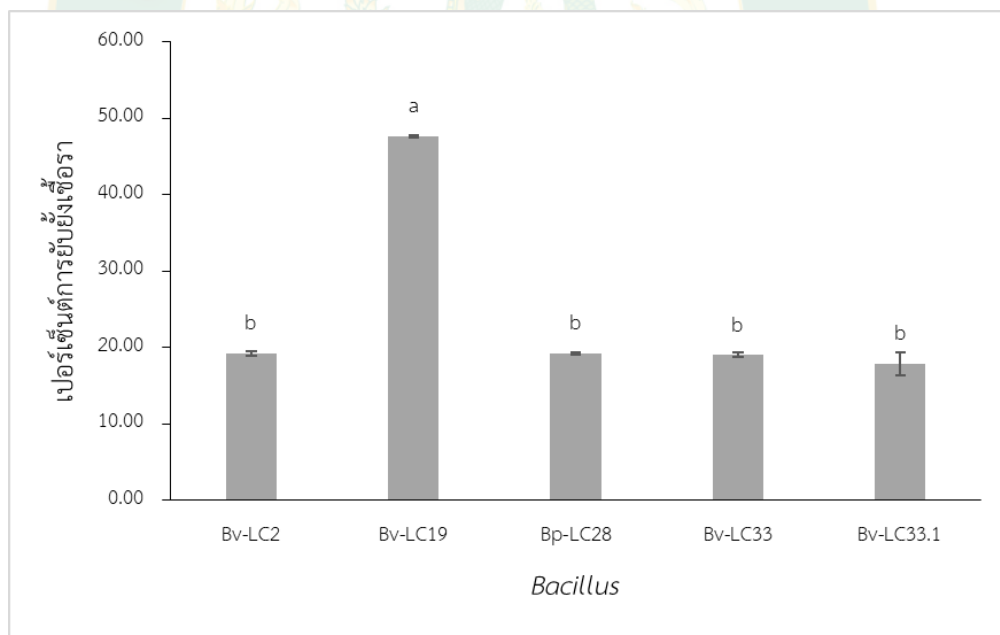
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แสดงในแต่ละแถวแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test

นอกจากนี้ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. oryzae* โดยสารทุติยภูมิ โดยใช้ supernatant ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB นาน 3 วัน เช่นเดียวกับที่ทดสอบ *X. oryzae* pv. *oryzae* เมื่อใช้วิธี agar well diffusion พบว่าจาก 9 ไอโซเลตที่ให้ผลบวกในขั้นตอนการทดสอบ Dual culture มีเพียง 5 ไอโซเลต ที่ supernatant ของ *Bacillus* สามารถยับยั้งได้ (ภาพที่ 5) คือ *B. pumilus* จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ LC28 และ *B. velezensis* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ LC2, LC19, LC33 และ LC33.1 โดยให้บริเวณยับยั้ง 17.85-47.67 mm ซึ่ง supernatant ของ *Bacillus* ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการทดสอบขั้นตอนนี้คือ *B. velezensis* LC19 โดยให้บริเวณยับยั้งถึง 47.67 mm ดังแสดงในภาพที่ 6





ภาพที่ 5 การยับยั้งของ supernatant แบคทีเรียของ *B. velezensis* LC19 ต่อเชื้อรา *P. oryzae* เป็นเวลา 7 วัน ด้วยวิธี Agar well diffusion บนอาหาร Modified potato dextrose agar



ภาพที่ 6 ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* โดย supernatant จาก *Bacillus* (Bp คือ *B. pumilus* และ Bv คือ *B. velezensis*) โดยตัวอักษรที่แสดงบนกราฟความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test



จากผลการทดลองการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคข้าวข้างต้น จะเห็นได้ว่า แบคทีเรีย *Bacillus* สปีชีส์ที่มีศักยภาพในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคข้าวได้ดี คือ *B. velezensis* ดังนั้นในการศึกษาขั้นตอนต่อไปในส่วนของการศึกษาสารทุติยภูมิที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเชื้อก่อโรคจะใช้ *B. velezensis* LC1, LC2, LC19, LC33, LC33.1, LC70 และ LC130 เป็นเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างในการศึกษา

## 2. ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ได้เปรียบเทียบเชื้อเชื้อแบคทีเรียกับประกาศกระทรวงสาธารณสุข พบว่าเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* ยกเว้น *B. cereus* ไม่ปรากฏในทะเบียนรายชื่อเชื้อก่อโรคในคนและสัตว์ และในการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ด้วย disc diffusion method ของ *Bacillus* ตามหลักการของ (Celandroni et al., 2016) ใช้สาร Penicillin (10 µg/disc), Ciprofloxacin (5 µg/disc), Tetracyclin (30 µg/disc), Tigecyclin (15 µg/disc), และ Vancomycin (30 µg/disc) (ภาพที่ 7) ดังแสดงในตารางที่ 10 ไม่พบว่าเชื้อ *B. velezensis* ที่ใช้ในการศึกษาต่อียดังกล่าว



ภาพที่ 7 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *B. velezensis* LC70

ตารางที่ 10 ความไวต่อยาปฏิชีวนะ ของ *B. velezensis*

ไอโซเลต	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง $\pm$ SD (S/I/R)				
	CIP5 ( $S \geq 21$ mm)	TGC15 ( $S \geq 19$ mm)	VA30 ( $S \geq 12$ mm)	TE30 ( $S \geq 15$ mm)	P10 ( $S \geq 15$ mm)
LC1	28.73 $\pm$ 1.46 (S)	19.97 $\pm$ 0.95 (S)	19.87 $\pm$ 0.59 (S)	27.33 $\pm$ 0.15 (S)	23.37 $\pm$ 1.10 (S)
LC2	31.87 $\pm$ 0.58 (S)	20.93 $\pm$ 0.61 (S)	19.93 $\pm$ 0.81 (S)	25.10 $\pm$ 0.35 (S)	23.07 $\pm$ 0.98 (S)
LC19	27.33 $\pm$ 0.12 (S)	21.17 $\pm$ 0.23 (S)	20.97 $\pm$ 0.51 (S)	20.30 $\pm$ 0.00 (S)	18.87 $\pm$ 0.98 (S)
LC33	26.13 $\pm$ 0.50 (S)	21.87 $\pm$ 0.92 (S)	19.70 $\pm$ 0.00 (S)	19.77 $\pm$ 0.50 (S)	22.80 $\pm$ 0.00 (S)
LC33.1	29.97 $\pm$ 0.40 (S)	22.30 $\pm$ 1.31 (S)	20.37 $\pm$ 2.75 (S)	24.70 $\pm$ 0.60 (S)	24.37 $\pm$ 0.40 (S)
LC70	26.70 $\pm$ 0.80 (S)	21.30 $\pm$ 0.26 (S)	20.00 $\pm$ 0.00 (S)	20.50 $\pm$ 0.52 (S)	18.03 $\pm$ 1.22 (S)
LC130	37.77 $\pm$ 1.27 (S)	25.80 $\pm$ 0.30 (S)	26.60 $\pm$ 0.66 (S)	31.43 $\pm$ 0.75 (S)	28.97 $\pm$ 0.61 (S)

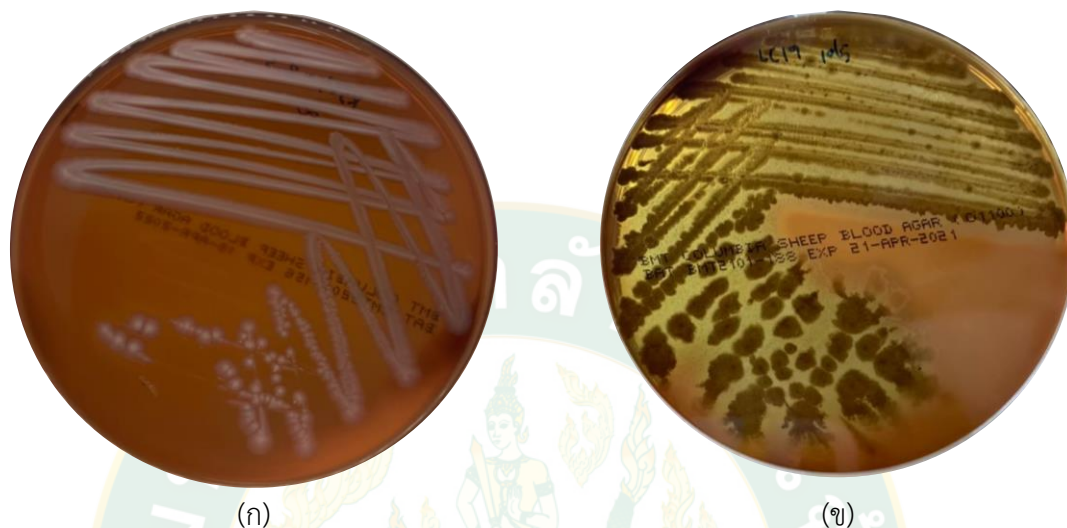
หมายเหตุ : SD หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, S หมายถึง Susceptible ; I หมายถึง intermediate; R หมายถึง Resistant

### 3. ผลการศึกษากิจกรรมของสารทุติยภูมิในกลุ่มสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

#### 3.1 ผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolysis activity)

เมื่อนำแบคทีเรีย *Bacillus* ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และเชื้อรา *P. oryzae* จำนวน 7 ไอโซเลตมาทำการศึกษากิจกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพโดยคัดเลือกจากความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง พบว่า *Bacillus* เกือบทั้งหมดให้ผลบวกต่อการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ (beta-hemolysis) ดูจากลักษณะการเกิดวงใสรอบโคโลนี ดังแสดงในภาพที่ 8 และมี *Bacillus* เพียง 1 ไอโซเลต ที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (gamma-hemolysis) ได้แก่ *B. velezensis* LC1 โดยในงานวิจัยของ Walter et al. (2010) ได้ทำการทดสอบเกี่ยวกับการคัดแยกสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นโดยทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงด้วยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหาร Blood agar พบว่าจุลินทรีย์ที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกจะมีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบๆโคโลนี ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงสามารถเกิดขึ้นได้ด้วยสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ นอกจากนี้ ในงานวิจัยของ Thavasi et al. (2011) ยังบอกว่าการทดสอบด้วยการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการคัดเลือกการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพและไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวทุกชนิดที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ สารประกอบอื่นอาจ

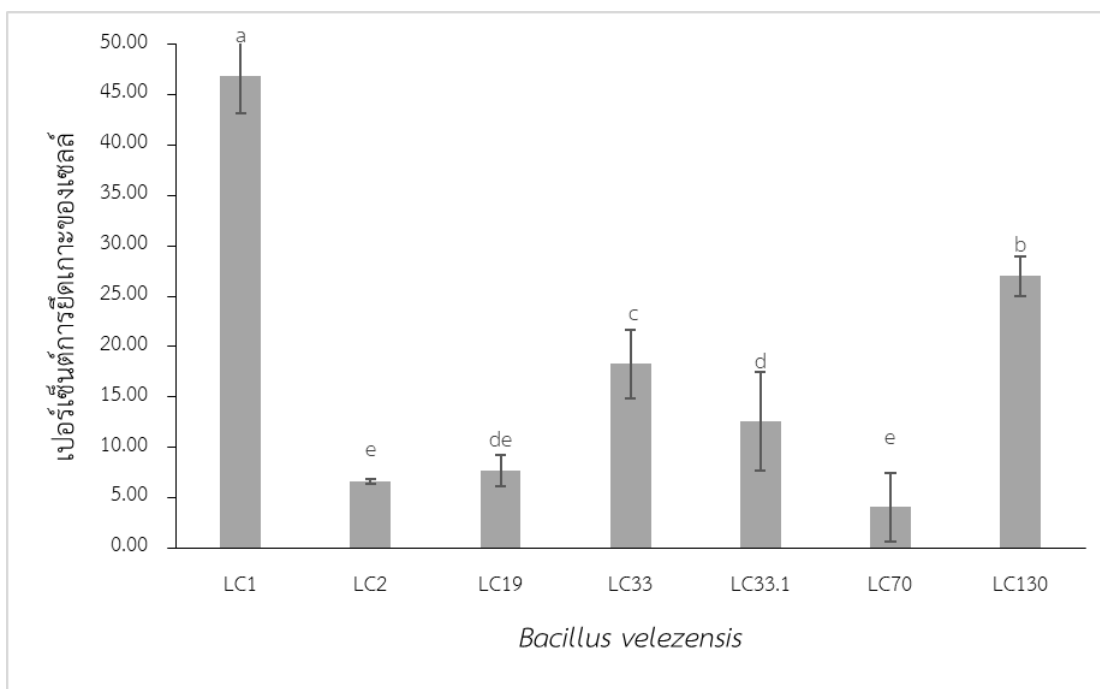
ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ จึงต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ เช่น ทดสอบ BATH ทดสอบการแพร่กระจายของน้ำมัน การวัดแรงตึงผิว และทดสอบ Emulsification เป็นต้น



ภาพที่ 8 ลักษณะการย่อยเม็ดเลือดแดงของ *B. velezensis* LC1 (gamma-hemolysis) (ก) และ *B. velezensis* LC19 (beta-hemolysis) (ข)

### 3.2 ผลการทดสอบ cell hydrophobicity ด้วย BATH assay

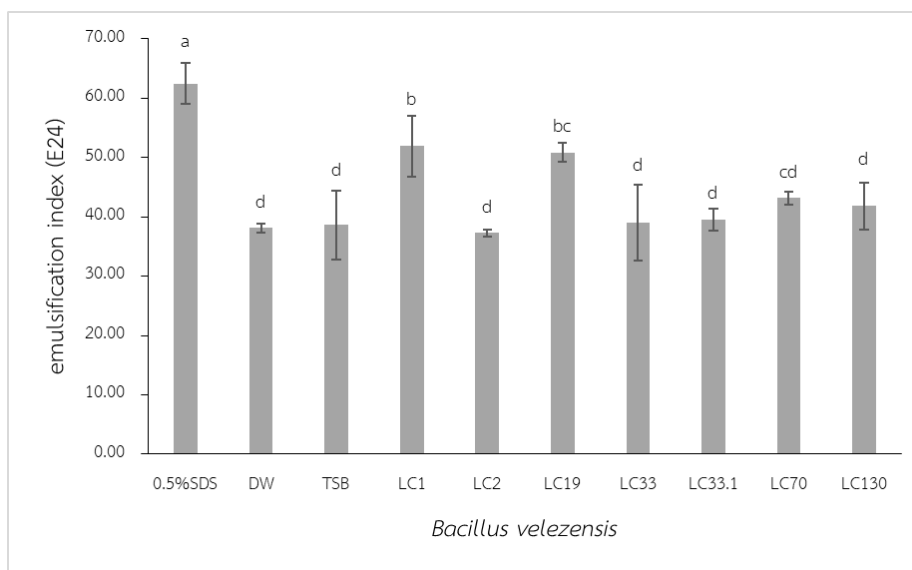
ผลการทดสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (cell hydrophobicity) ด้วย Bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) assay โดยใช้ hexadecane เพื่อยืนยันการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ พบว่า *B. velezensis* ให้เปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำของเซลล์ 4.10-46.86% (ภาพที่ 9) โดยไอโซเลตที่ให้ค่าความไม่ชอบน้ำของเซลล์สูงที่สุด คือ *B. velezensis* LC1 ซึ่งการไม่ชอบน้ำของเซลล์สามารถใช้เป็นข้อบ่งชี้การผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพของแบคทีเรียได้



ภาพที่ 9 ความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (cell hydrophobicity) ของ *B. velezensis* เมื่อทดสอบโดย BATH assay ด้วย hexadecane โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### 3.3 ผลการทำให้เกิด E24 ของ *B. velezensis*

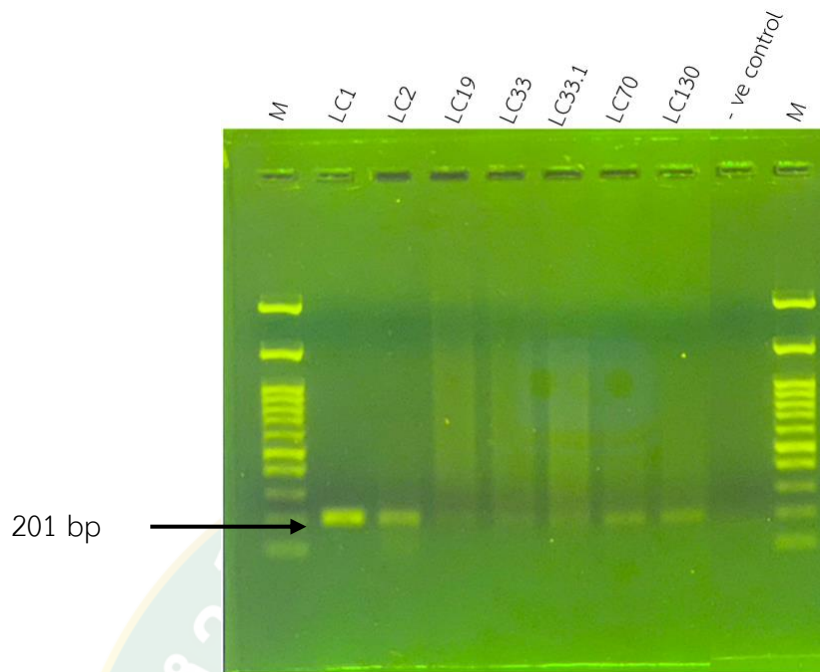
เมื่อนำเชื้อ *B. velezensis* ทั้ง 7 ไอโซเลต มาศึกษากิจกรรมการเกิด E24 (emulsification index, E24) โดยใช้น้ำมันมะกอก เพื่อตรวจสอบการปลดปล่อยสารในกลุ่ม cyclic lipopeptide โดย 0.5% sodium dodecyl sulfate เป็น positive control และใช้น้ำกลั่น และอาหาร TSB เป็น negative control พบว่า *B. velezensis* จำนวน 6 ไอโซเลต มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมการเกิด E24 สูงกว่า negative control ยกเว้น *B. velezensis* LC2 ที่มีค่าต่ำกว่า คือ 37.30% ในขณะที่อีก 6 ไอโซเลตนั้น มีค่าอยู่ในช่วง 38.97-51.92% ดังแสดงในภาพที่ 10 แต่อย่างไรก็ดี supernatant ของ *B. velezensis* ทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยกิจกรรมการเกิด E24 ต่ำกว่า positive control คือ 0.5% SDS ที่มีค่าถึง 62.42% จากผลการทดลองนี้ *B. velezensis* ไอโซเลตที่แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมการเกิด E24 สูงกว่าไอโซเลตอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ LC1, LC19 และ LC70 ซึ่งอาจระบุได้ว่าเชื้อ *B. velezensis* มีการปลดปล่อยสารในกลุ่ม cyclic lipopeptides ออกมา



ภาพที่ 10 ค่ากิจกรรมการเกิด E24 น้ำมันมะกอกโดยเชื้อ *B. velezensis* ไอโซเลตต่างๆ (LC1, LC2, LC19, LC33, LC33.1, LC70 และ LC130) โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

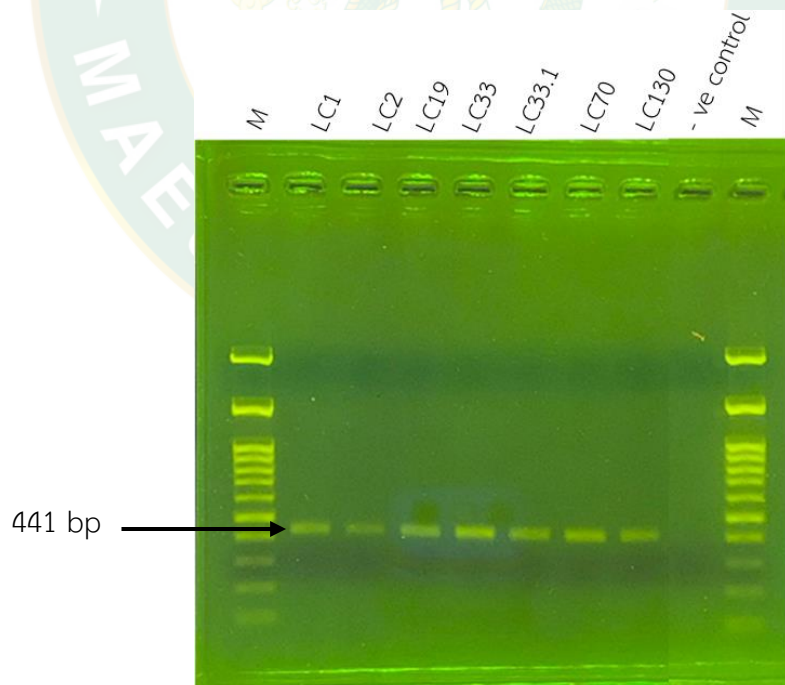
3.4 ผลการตรวจยืนยันที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในกลุ่ม Cyclic lipopeptides จากผลการทดสอบลักษณะเบื้องต้นในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ในขั้นตอนนี้จึงได้ทำการตรวจยืนยันที่เกี่ยวข้องที่ข้องกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีรายงานการตรวจพบในแบคทีเรีย *Bacillus* โดยเฉพาะกลุ่มของ cyclic lipopeptides ได้แก่ *urfA* และ *SUR3* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง surfactin ยีน *fenD* เกี่ยวข้องกับการสร้าง fengycin ยีน *ituD* และ *ituC* เกี่ยวข้องกับการสร้าง Iturin และ *bmyB* ที่สัมพันธ์กับการสร้าง Bacillomycin รวมเป็น 6 ยีน ที่ใช้ในการศึกษา พบว่า เชื้อ *B. velezensis* ทั้ง 7 ไอโซเลต ตรวจพบยีน 5 ยีน ได้แก่ *urfA* (ภาพที่ 11), *SUR3* (ภาพที่ 12), *ituD* (ภาพที่ 13), *fenD* (ภาพที่ 15) และ *bmyB* (ภาพที่ 16) โดยมีขนาดของ PCR products ที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 11 ส่วน ยีน *ituC* นั้นตรวจพบเพียง 3 ไอโซเลต ได้แก่ *B. velezensis* LC1, LC2 และ LC130 มีขนาดของ PCR product 423 bp (ภาพที่ 14)





ภาพที่ 11 ขนาด PCR product ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ *srfa*

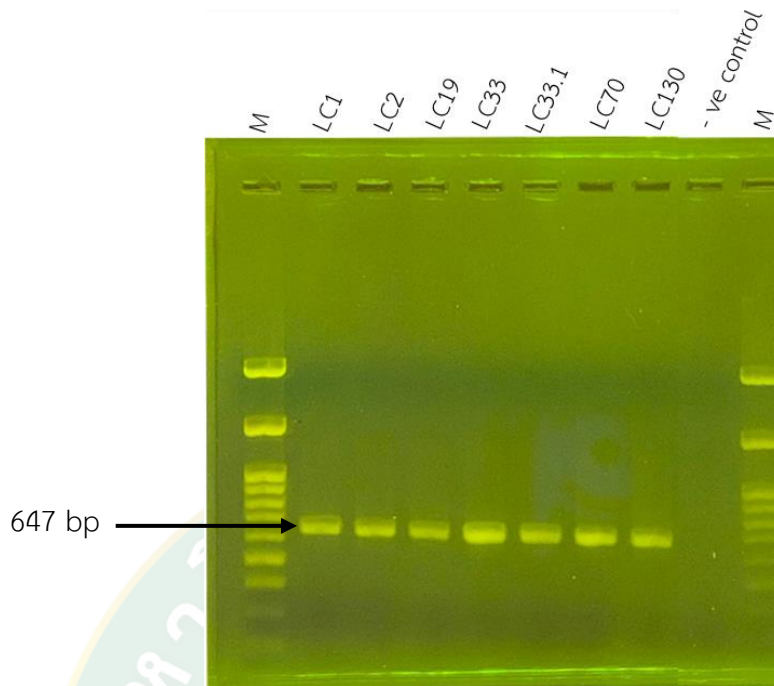
M: Molecular marker และ - ve control: DNase free water



ภาพที่ 12 ขนาด PCR product ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ *SUR3*

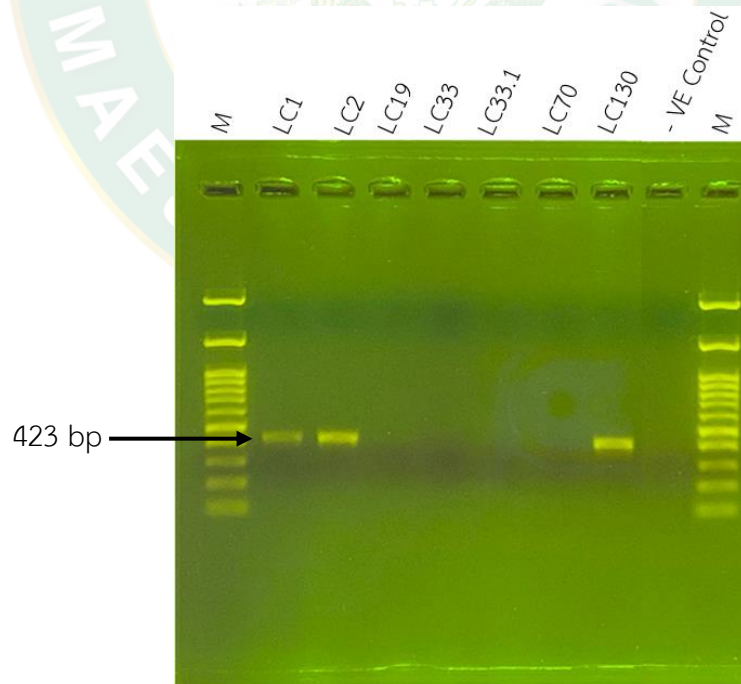
M: Molecular marker และ - ve control: DNase free water





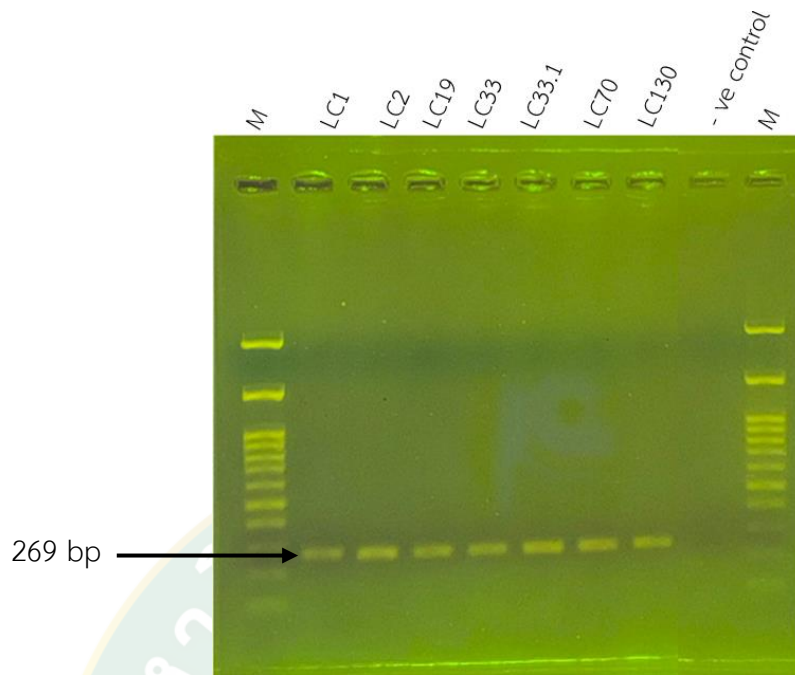
ภาพที่ 13 ขนาด PCR product ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ *ituD*

M: Molecular marker และ - ve control: DNase free water



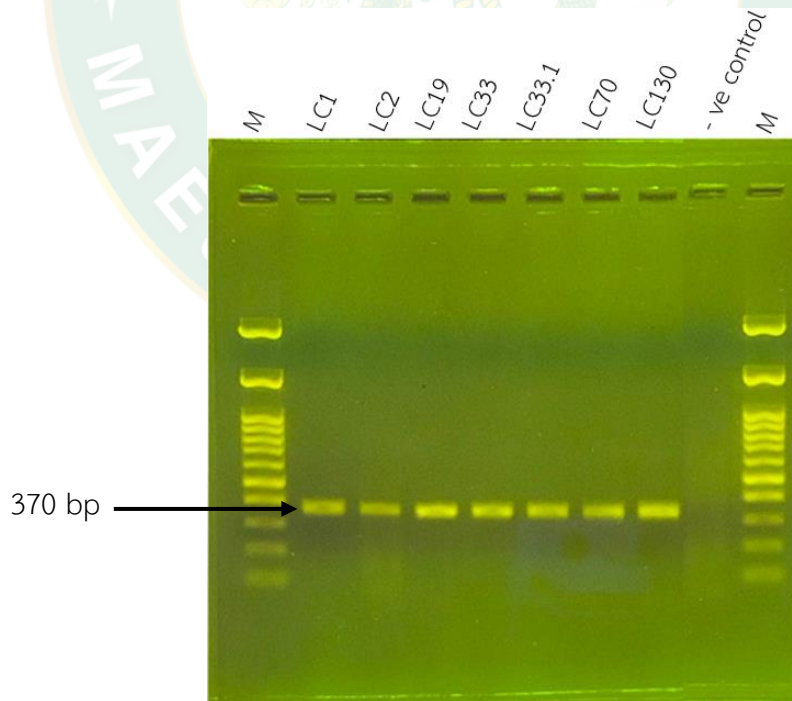
ภาพที่ 14 ขนาด PCR product ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ *ituC*

M: Molecular marker และ - ve control: DNase free water



ภาพที่ 15 ขนาด PCR product ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ *fenD*

M: Molecular marker และ - ve control: DNase free water



ภาพที่ 16 ขนาด PCR product ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ *bmyB*

M: Molecular marker และ - ve control: DNase free water

ตารางที่ 11 ผลการตรวจยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในกลุ่ม Cyclic lipopeptides

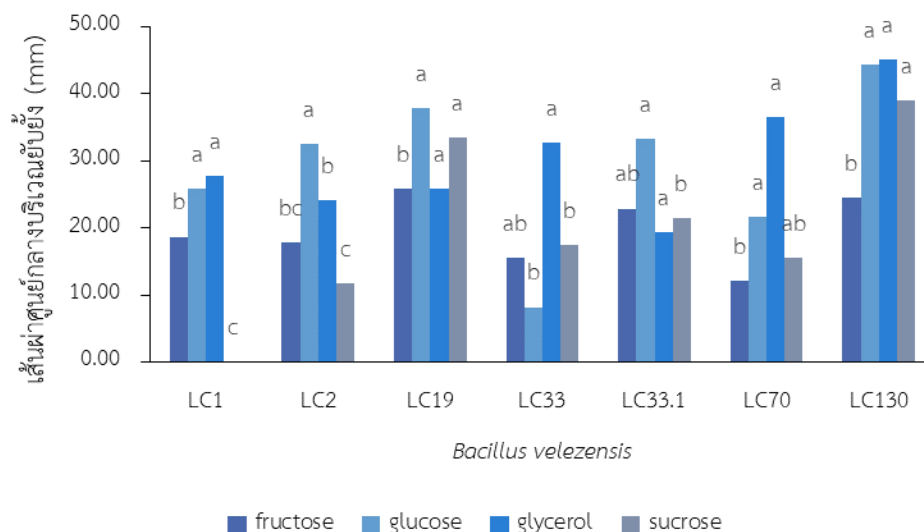
Cyclic lipopeptides	ยีน	ขนาด PCR product (bp)	<i>B. velezensis</i>						
			LC1	LC2	LC19	LC33	LC33.1	LC70	LC130
Surfactin	<i>srfA</i>	201	+	+	+	+	+	+	+
	<i>SUR3</i>	441	+	+	+	+	+	+	+
Fengycin	<i>fenD</i>	269	+	+	+	+	+	+	+
Iturin	<i>ituD</i>	647	+	+	+	+	+	+	+
	<i>ituC</i>	423	+	+	-	-	-	-	+
Bacillomycin	<i>bmyB</i>	370	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ : + หมายถึง ตรวจพบ PCR Product

#### 4. ผลการศึกษาแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนต่อฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

##### *X. oryzae* pv. *oryzae* ของเชื้อ *B. velezensis*

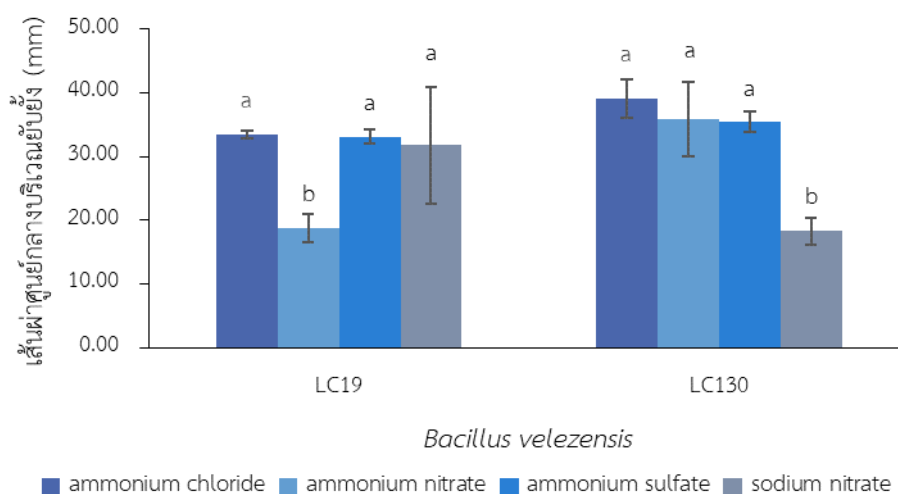
เมื่อนำแบคทีเรีย *B. velezensis* ทั้ง 7 ไอโซเลต มาศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยจากการทดสอบแหล่งคาร์บอน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุกโตส และกลีเซอรอล โดยใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่า *B. velezensis* LC19 และ LC130 ให้ผลการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* สูงสุดในทุกแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 17 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ของเชื้อ *B. velezensis* โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อพิจารณาเชื้อแบคทีเรียคือ *B. velezensis* LC19 และ LC130 เป็นหลัก พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ให้กิจกรรมการยับยั้งสูงสุดคือกลูโคส คือให้ค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 37.87 และ 44.33 mm ตามลำดับ ถึงแม้ว่าในการใช้กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนของ LC130 จะให้ความกว้างมากกว่ากลูโคส คือ 45.20 mm แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากการใช้กลูโคส ดังนั้นจึงใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับ *B. velezensis* LC19 และ LC130 ต่อไป

ในการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ประกอบด้วย แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียมไนเตรต จากกราฟในภาพที่ 18 จะเห็นได้ว่า แอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับ *B. velezensis* LC19 และ LC130 โดยให้ความกว้างของบริเวณยับยั้ง 33.50 และ 39.07 mm ตามลำดับ ในขณะที่ แอมโมเนียมซัลเฟต ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้ง 33.10 และ 35.40 mm ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้น กลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์ จะเป็นสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารทุติยภูมิต่อไป



ภาพที่ 18 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ของเชื้อ *B. velezensis* โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### 5. ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ *Bacillus velezensis* เพื่อผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae*

การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ *Bacillus velezensis* เพื่อผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และค่า pH เริ่มต้นของอาหาร เมื่อทดลองตามลำดับและตามสภาวะที่กำหนดไว้และวัดการตอบสนองเป็น E24 ต่อน้ำมันมะกอก เนื่องจากคุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) สัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ผลดังแสดงในตารางที่

ตารางที่ 12 E24 ของแต่ละหน่วยการทดลองในการศึกษาปัจจัยในการผลิต

การทดลอง	ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา			E24 ± SD*
	กลูโคส	แอมโมเนียมคลอไรด์	pH	
1	10	1	7	67.15±24.37
2	40	1	7	52.87±2.42
3	10	5	7	54.71±6.81
4	40	5	5	54.02±5.74
5	10	4	5	50.57±6.80
6	40	4	5	48.16±2.59
7	10	4	9	60.21±4.01
8	40	4	9	54.14±4.18
9	25	1	5	49.00±2.47
10	25	5	5	50.33±2.17
11	25	1	9	59.54±9.41
12	25	5	9	52.38±10.67
13	25	4	7	50.11±1.55
14	25	4	7	56.70±13.16
15	25	4	7	59.77±8.68
16	25	4	7	58.74±12.73
17	25	4	7	57.20±4.44

หมายเหตุ : \* ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



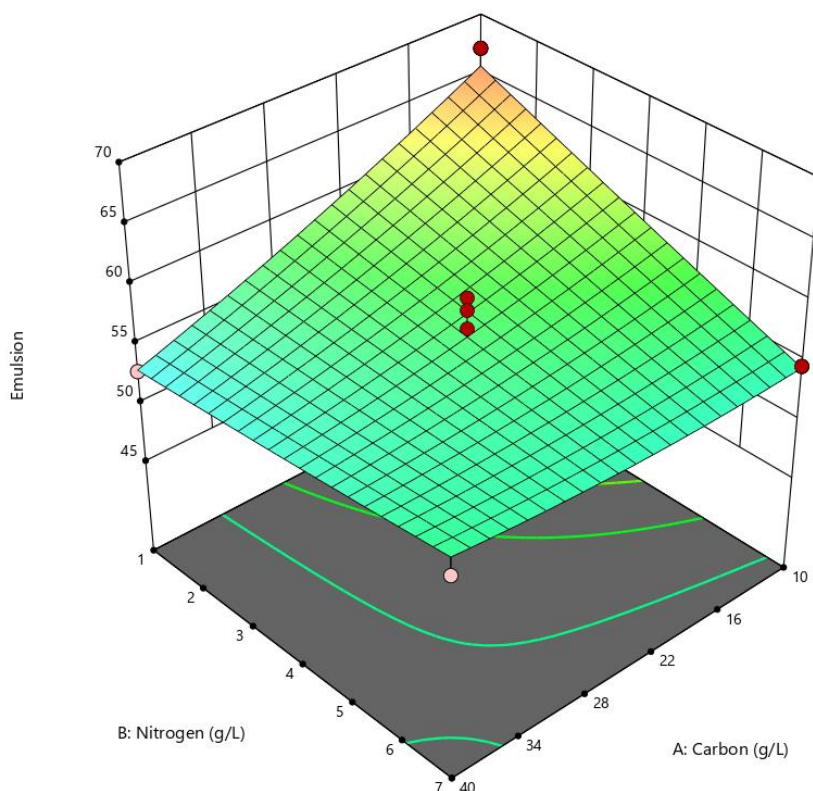
จากข้อมูลผลการทดสอบ E24 เท่ากับ  $48.16 \pm 2.59 - 67.15 \pm 24.37\%$  โดยมีค่า  $R^2 = 0.8327$  หมายความว่า พีเอช แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน สามารถอธิบายความผันแปรได้ 83.27% และ P-value เท่ากับ 0.0440 ซึ่งสามารถเขียนให้อยู่ในรูปของสมการดังต่อไปนี้ (สมการที่ 5)

$$\%emulsion = 56.50 - 2.93X_1 - 2.14X_2 + 3.53X_3 + 3.40X_1X_2 - 0.9143X_1X_3 - 2.12 X_2X_3 \quad (5)$$

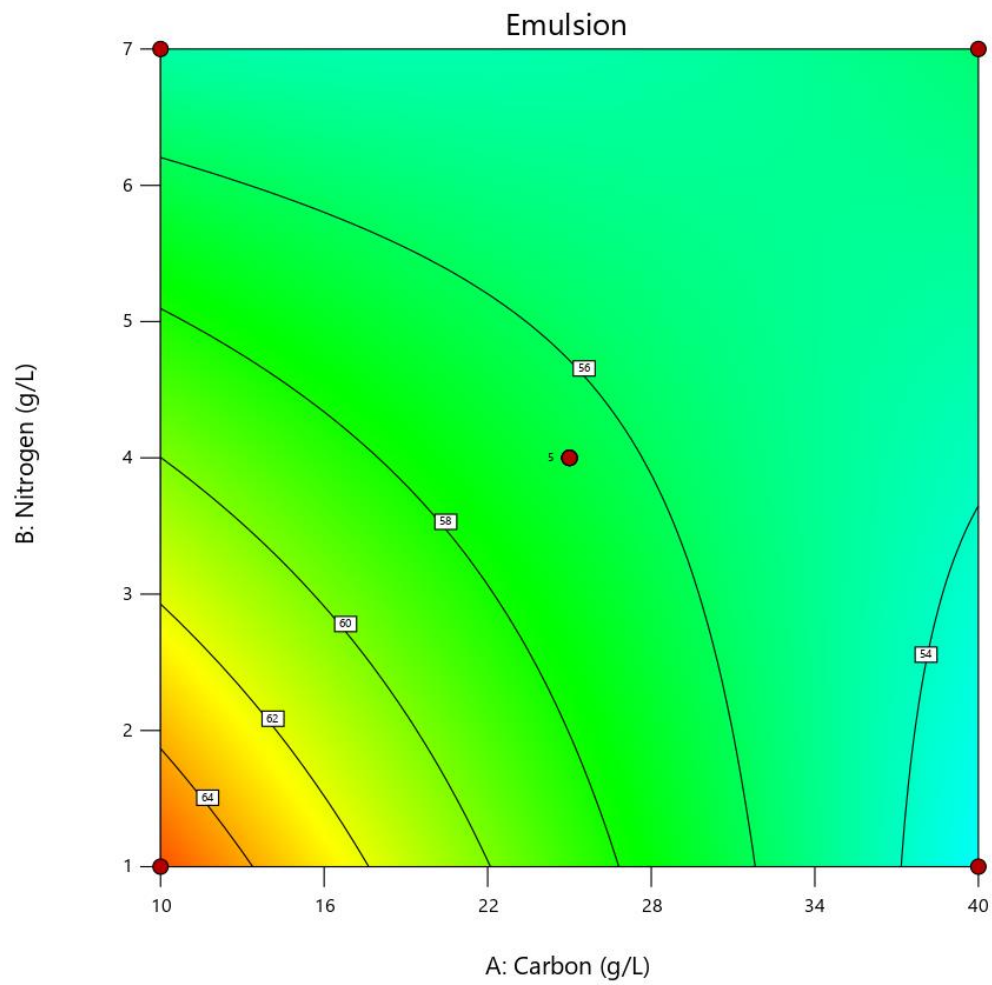
โดยที่  $X_1$  = ปริมาณกลูโคส ,  $X_2$  = แอมโมเนียมคลอไรด์ และ  $X_3$  = pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำสมการทางคณิตศาสตร์ที่ได้มาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองของ % emulsion และกราฟโครงร่าง (ภาพที่ 19-ภาพที่ 24) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง *B. velezensis* เพื่อให้ได้สารยับยั้งที่มีฤทธิ์สูงสุด พบว่า ปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมคือ 22.17 g/L ปริมาณแอมโมเนียมคลอไรด์ 2.55 g/L ที่ pH ของอาหารเริ่มต้น เท่ากับ 7.65 จะได้ E24 = 59.58%

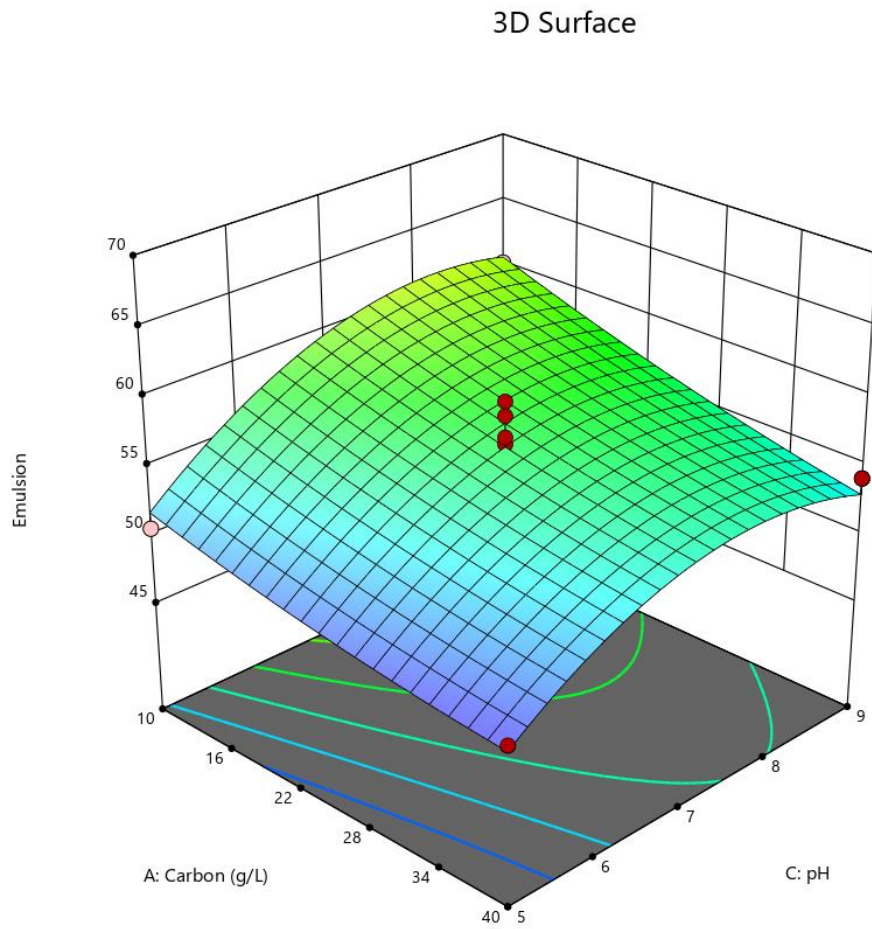
3D Surface



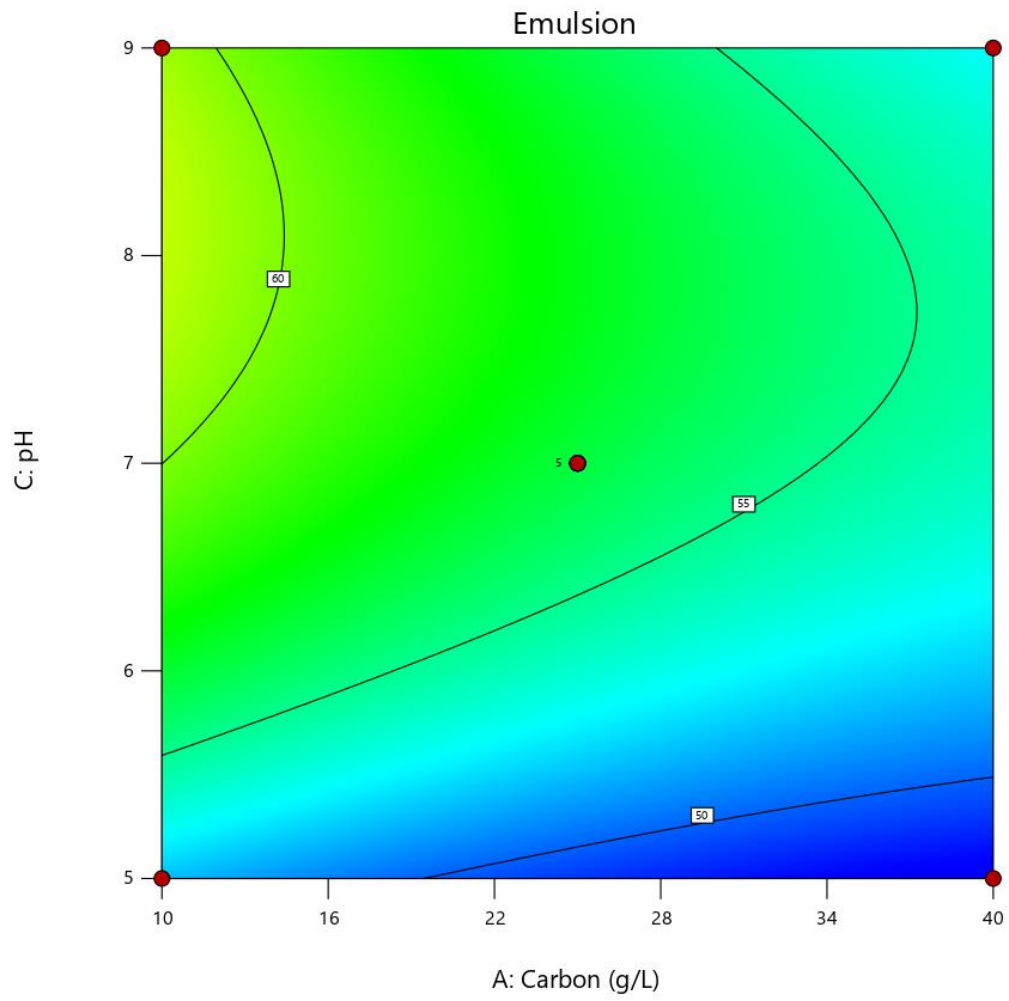
ภาพที่ 19 พื้นผิวตอบสนองของ E24 ระหว่างปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พล็อตโดยใช้โปรแกรม Design-Expert 13.0.5.0



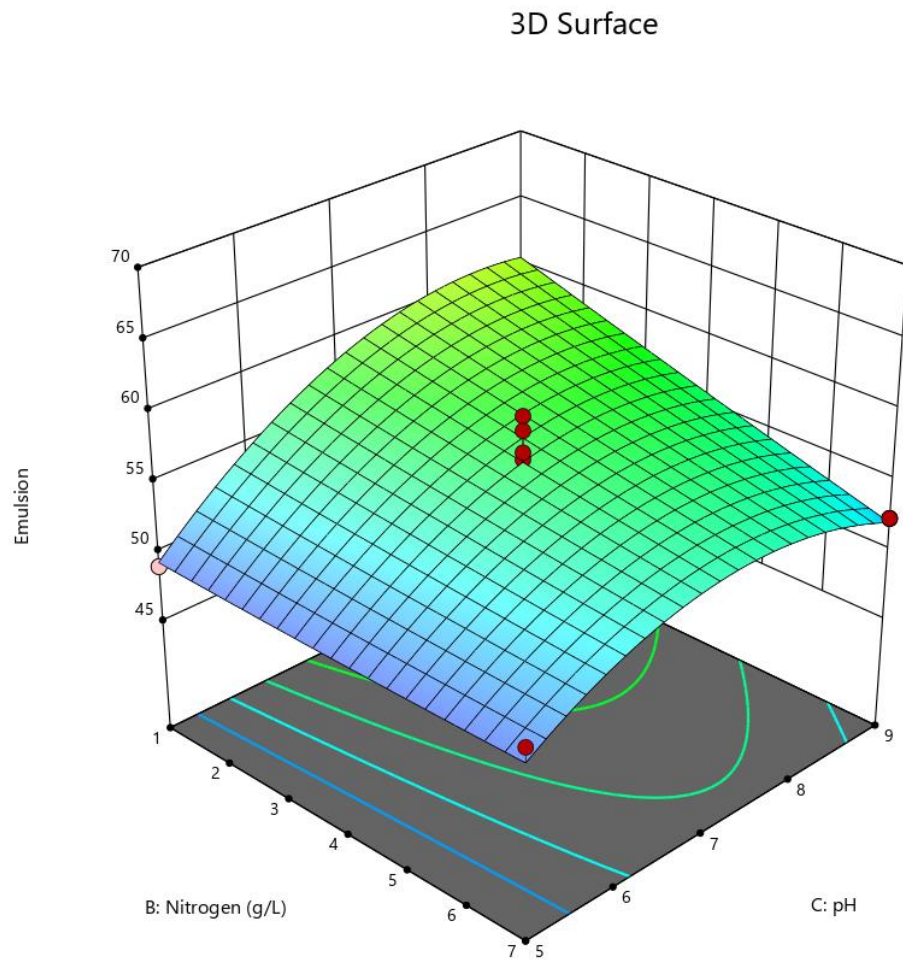
ภาพที่ 20 กราฟโครงสร้างความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พล็อตโดย  
ใช้โปรแกรม Design-Expert 13.0.5.0



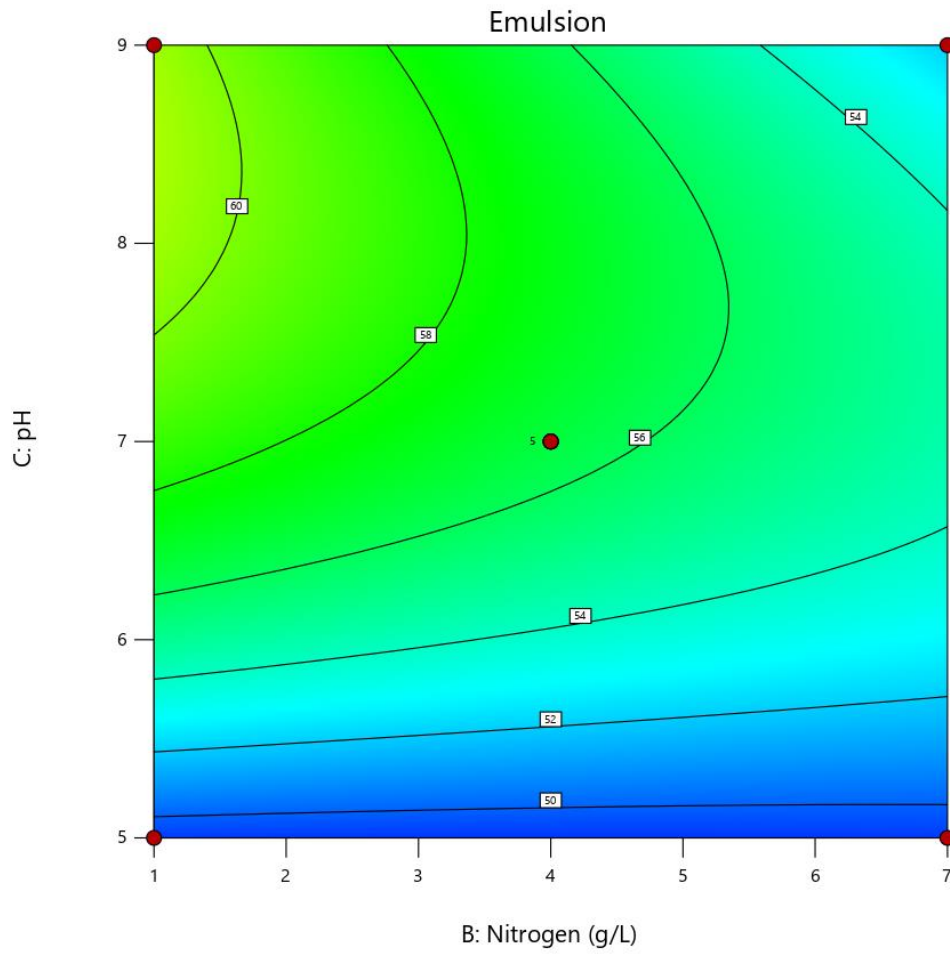
ภาพที่ 21 พื้นผิวตอบสนองของ E24 ระหว่างปริมาณแหล่งคาร์บอนและพีเอชเริ่มต้นของอาหาร  
พล็อตโดยใช้โปรแกรม Design-Expert 13.0.5.0



ภาพที่ 22 กราฟโครงร่างความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแหล่งคาร์บอนและและพีเอชเริ่มต้นของอาหาร  
พลีตโดยใช้โปรแกรม Design-Expert 13.0.5.0



ภาพที่ 23 พื้นผิวตอบสนองของ E24 ระหว่างปริมาณแหล่งไนโตรเจนและพีเอชเริ่มต้นของอาหาร  
พล็อตโดยใช้โปรแกรม Design-Expert 13.0.5.0



ภาพที่ 24 กราฟโครงร่างความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแหล่งไนโตรเจนและและพีเอชเริ่มต้นของอาหาร พล็อตโดยใช้โปรแกรม Design-Expert 13.0.5.0

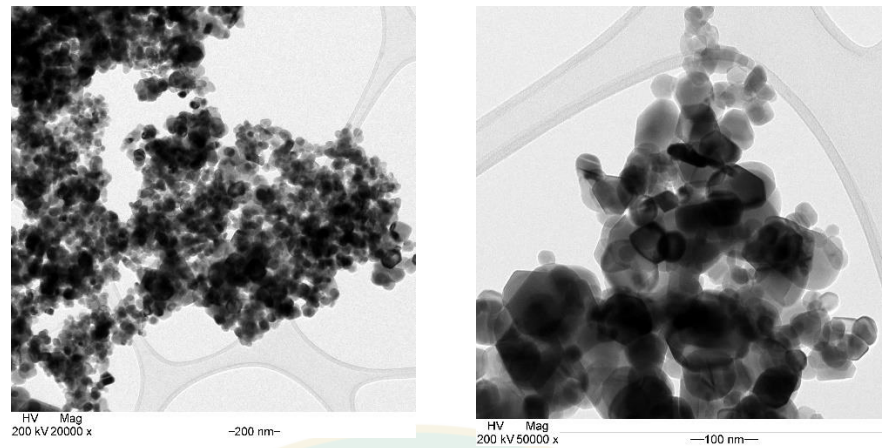


## 6. ลักษณะสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดง และ สังกะสีที่สังเคราะห์จาก *Bacillus*

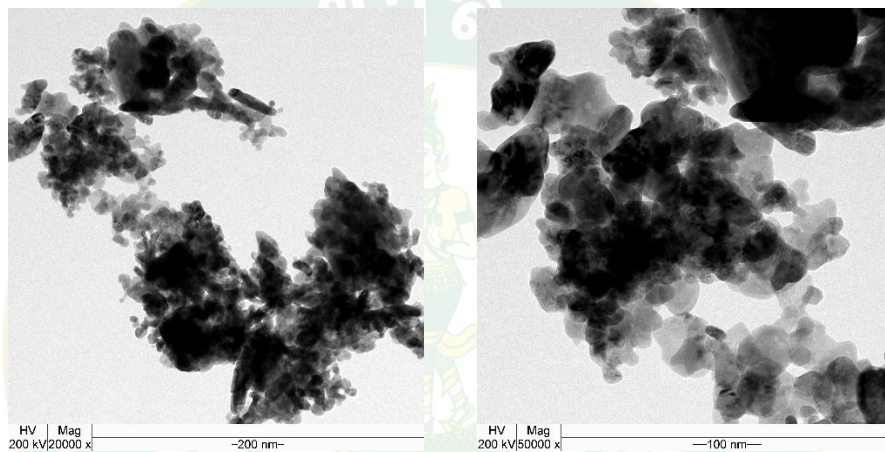
จากการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมี และโครงสร้างผลึกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านโหมดไบรท์ฟิลด์ (Bright Field Transmission Electron Microscope, BF-TEM) พบว่าอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้มีหลายรูปทรงดังแสดงในตารางที่ 13 (ภาพที่ 25 – ภาพที่ 28) เมื่อทำการวิเคราะห์รูปแบบการเลี้ยวเบนของอิเล็กตรอนในพื้นที่ที่เลือก (SAED) และวิเคราะห์รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (XRD) พบว่าอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้มีโครงสร้างผลึกเป็นเฮกซะโกนอลของอนุภาคออกไซด์ของสังกะสี โดยดูจากวงแหวนการเลี้ยวเบน มีระยะห่างระหว่างระนาบตรงกับตำแหน่งเดียวกันกับวงแหวนจากออกไซด์ของสังกะสี (JCPDS เลขที่ 36-1454) ดังแสดงในภาพที่ 29 – ภาพที่ 30 สำหรับอนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมี และโครงสร้างของผลึกเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์ด้วยวิธี Co-precipitation ได้

ตารางที่ 13 รูปร่างและขนาดของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้

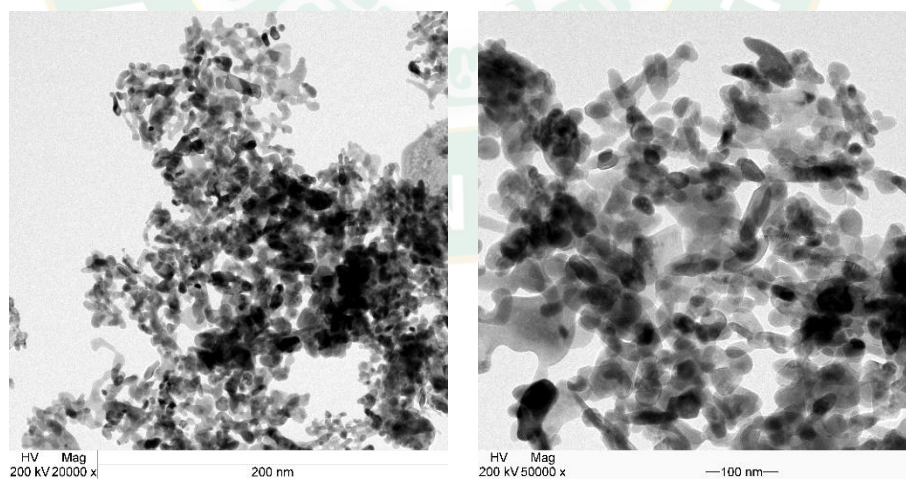
ชื่อสูตร	รูปร่าง	ขนาดจาก TEM (nm)	โครงสร้างผลึก (SAED)	XRD
SK6412-01	กลม, รี และไร้รูปทรง	20-60	Hexagonal	ZnO
SK6511-01	กลม, รี, และไร้รูปทรง	15-75	Hexagonal	ZnO
SK6511-02	กลม, รี, และไร้รูปทรง	11-60	Hexagonal	ZnO
Bv19-01	กลม และรี	5.7-78.3	Hexagonal	ZnO
Bv130-01	กลม	4-20	Hexagonal	ZnO
Bv130MOLP	กลม, รี, และไร้รูปทรง	4.8-107.1	Hexagonal	ZnO



(ก)

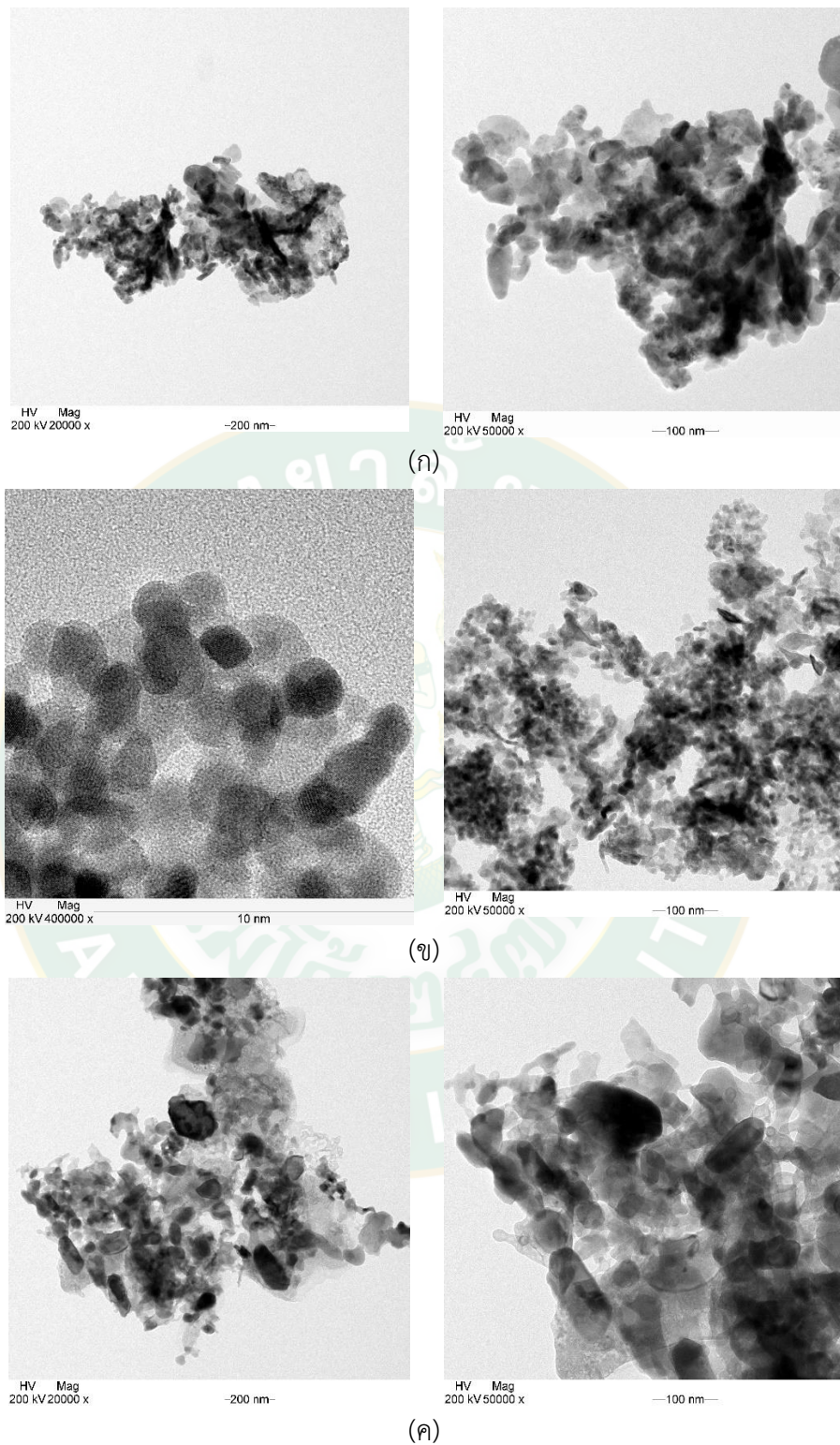


(ข)



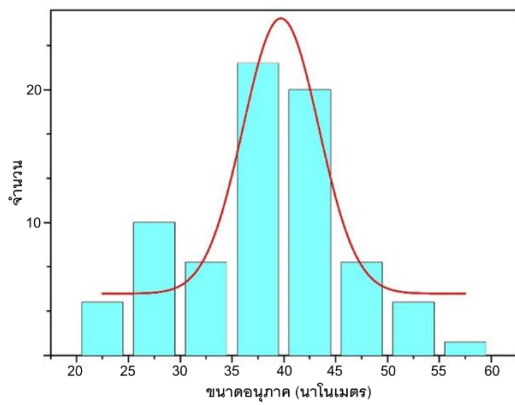
(ค)

ภาพที่ 25 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านโหมดที่ฟิลด์ของอนุภาคนาโน ออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร SK6412-01 (ก) SK6511-01 (ข) และSK6511-02 (ค)

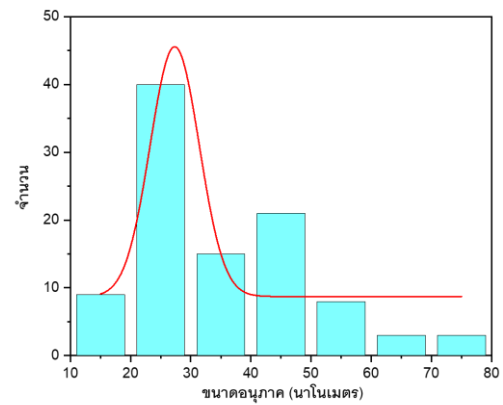


ภาพที่ 26 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านโหมดไบรท์ฟิลด์ของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร Bv19-01 (ก) Bv130-01 (ข) และ Bv130MOLP (ค)

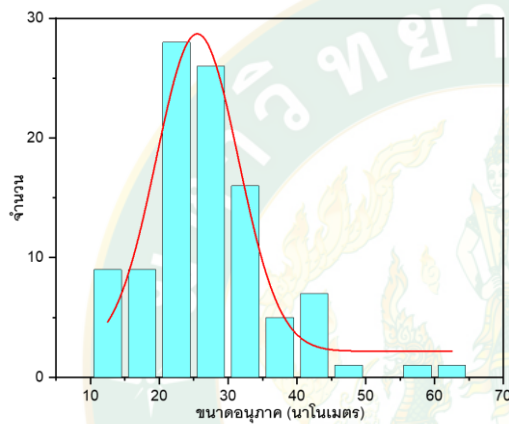




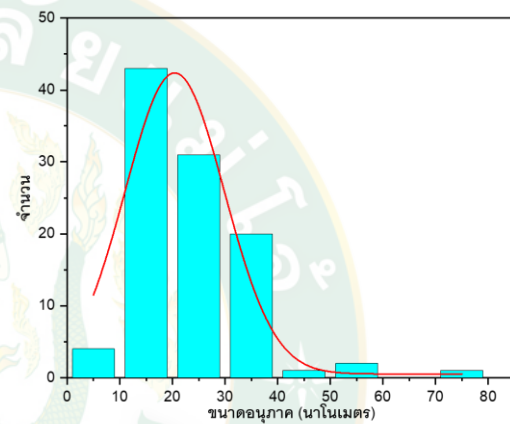
(ก)



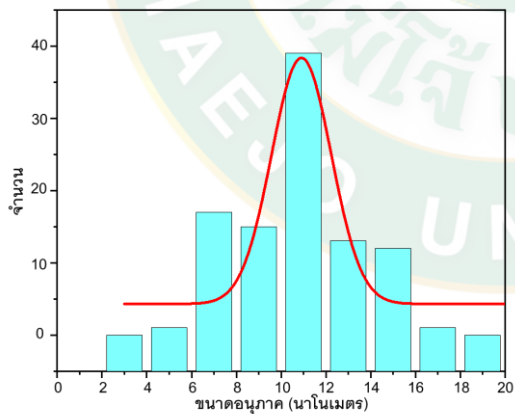
(ข)



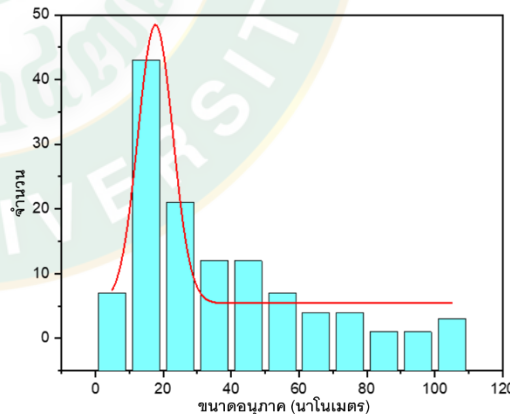
(ค)



(ง)



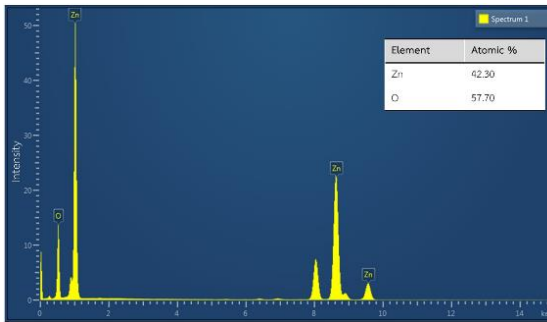
(จ)



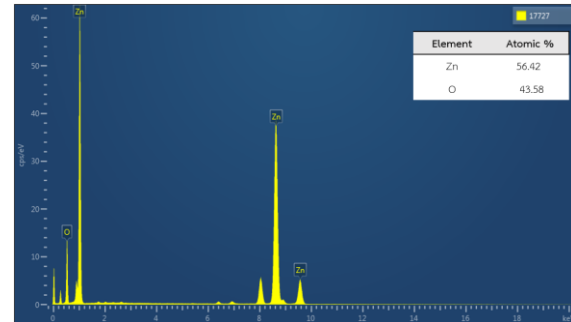
(ฉ)

ภาพที่ 27 ขนาดอนุภาคที่วิเคราะห์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านโหมดไบรท์ฟิลด์ของ  
อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร SK6412-01 (ก) SK6511-01 (ข) SK6511-02 (ค)

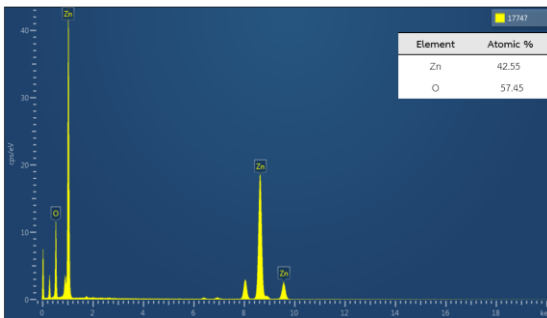
Bv19-01 (ง) Bv130-01 (จ) และ Bv130MOLP (ฉ)



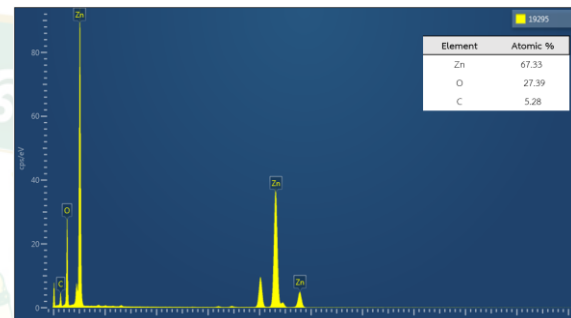
(ก)



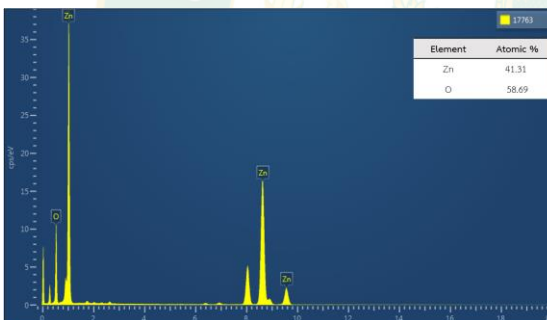
(ข)



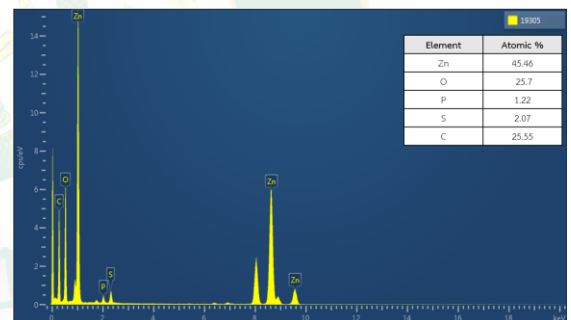
(ค)



(ง)



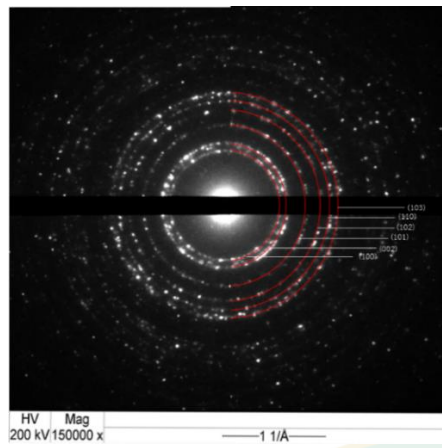
(จ)



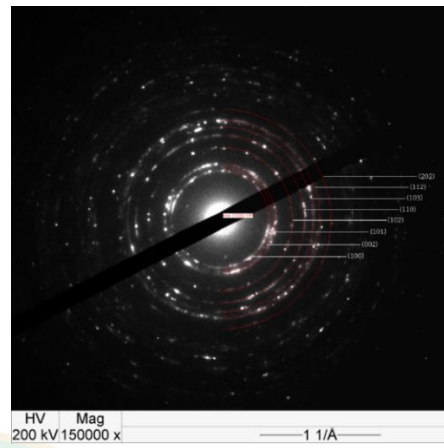
(ฉ)

ภาพที่ 28 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคการกระจายพลังงานรังสีเอกซ์ของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร SK6412-01 (ก) SK6511-01 (ข) SK6511-02 (ค) Bv19-01 (ง) Bv130-01 (จ) และ Bv130MOLP (ฉ)

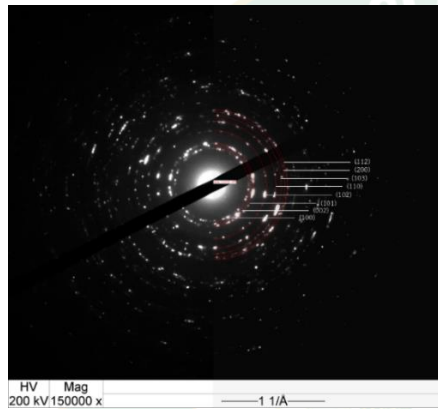




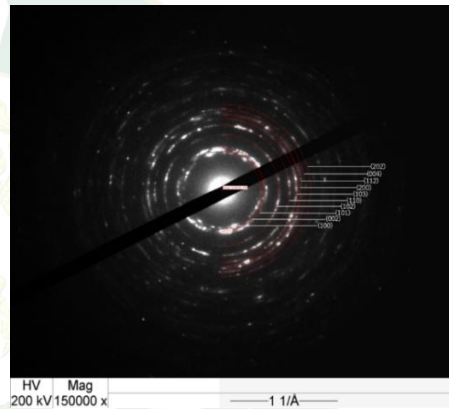
(ก)



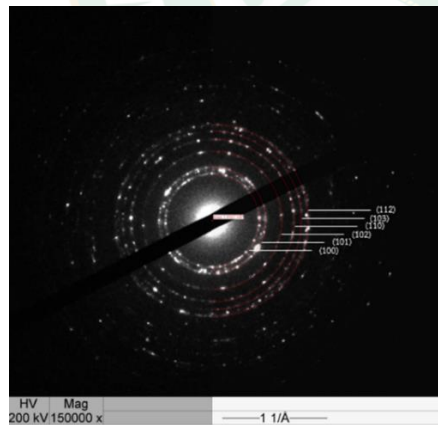
(ข)



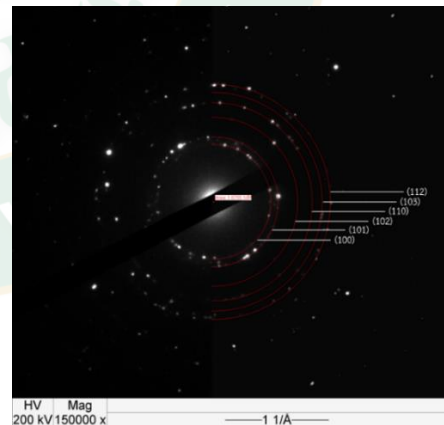
(ค)



(ง)

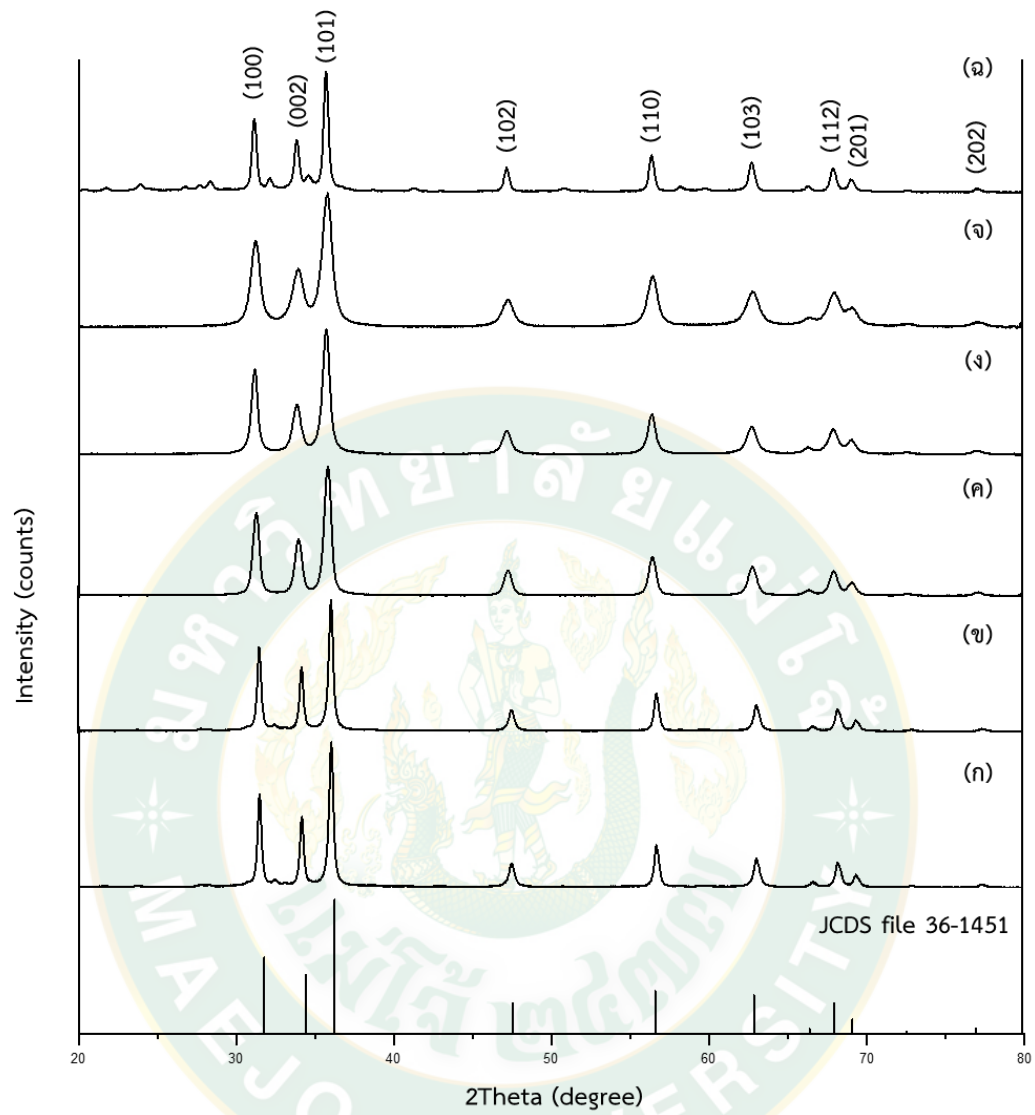


(จ)



(ฉ)

ภาพที่ 29 รูปแบบการเลี้ยวเบนของอิเล็กตรอนในพื้นที่ที่เลือก (SAED) ของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร SK6412-01 (ก) SK6511-01 (ข) SK6511-02 (ค) Bv19-01 (ง) Bv130-01 (จ) และ Bv130MOLP (ฉ)

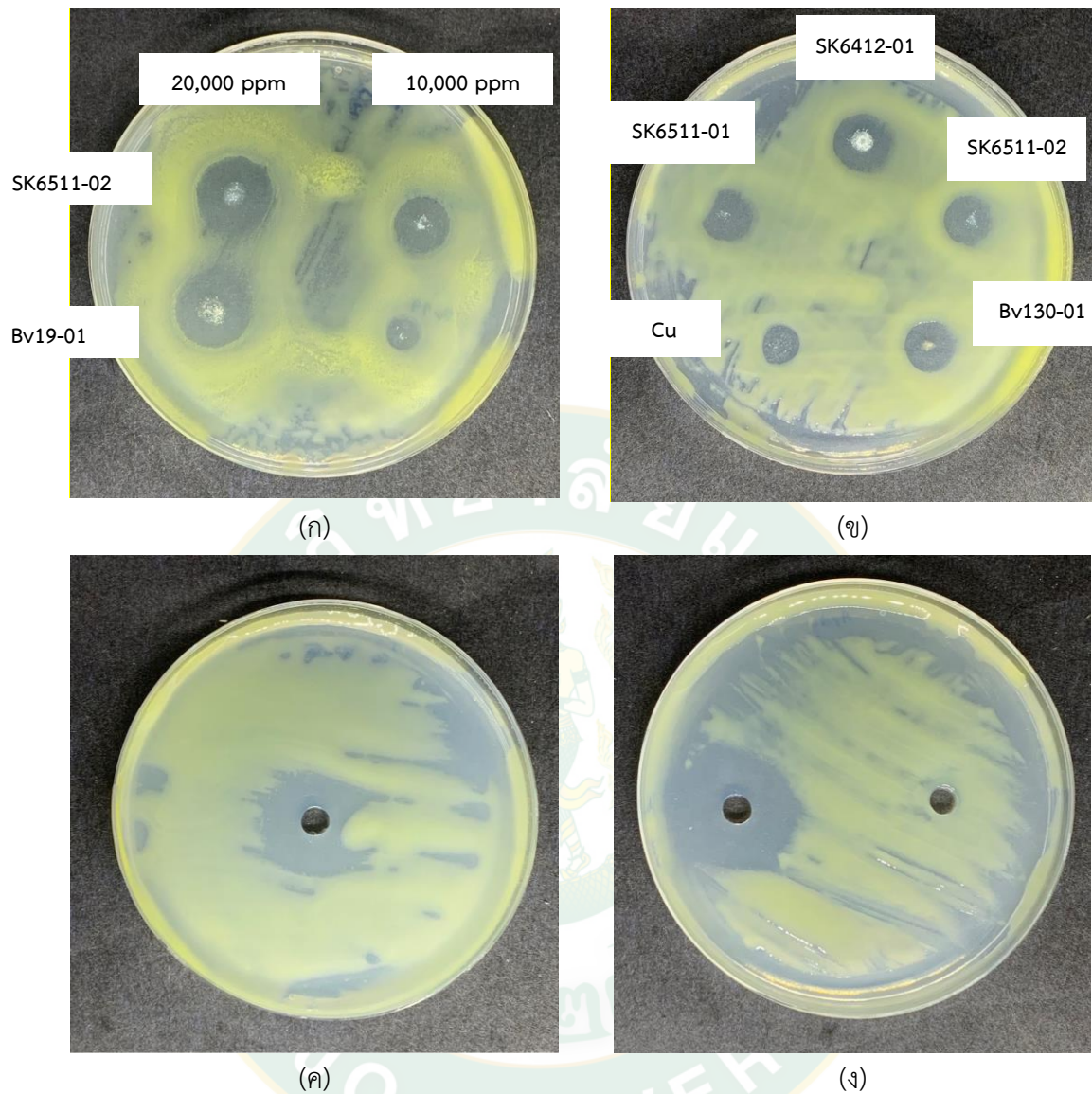


ภาพที่ 30 รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (XRD) ของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร SK6412-01 (ก) SK6511-01 (ข) SK6511-02 (ค) Bv19-01 (ง) Bv130-01 (จ) และ Bv130MOLP (ฉ)

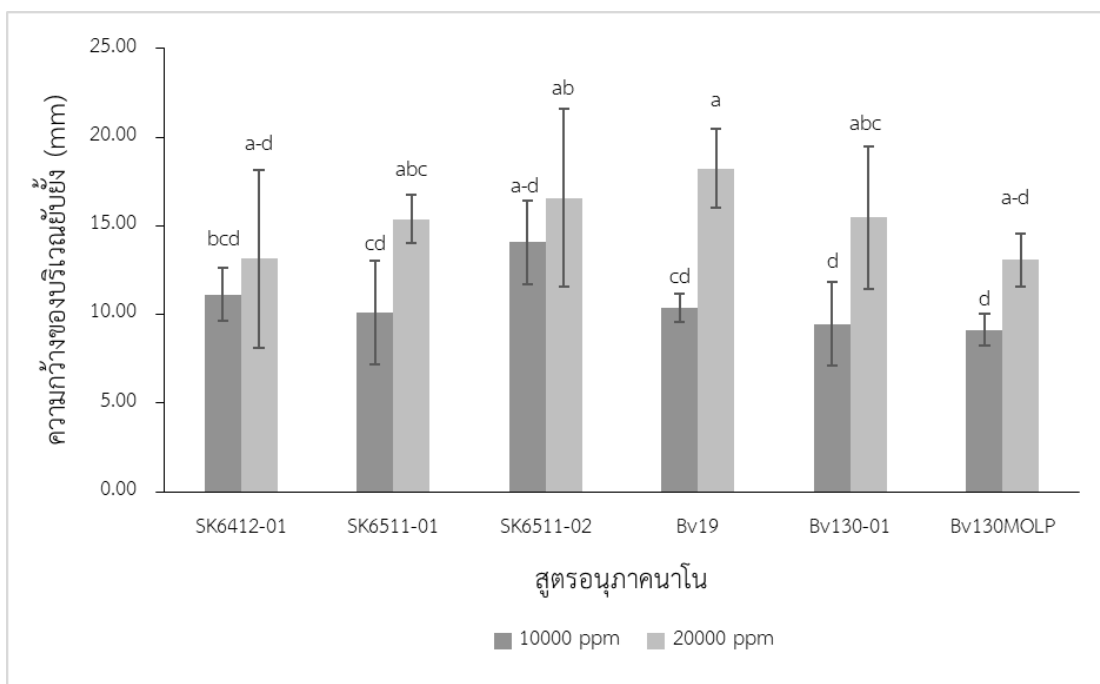
## 7. ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคข้าว

จากการทดสอบผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่สังเคราะห์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยใช้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนที่ทดสอบ 2 ความเข้มข้นได้แก่ 10,000 และ 20,000 ppm ด้วยวิธี Spot on lawn พบว่าอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* อนุภาคนาโนแต่ละสูตรสามารถยับยั้งได้ดังแสดงในภาพที่ 31 โดยที่ความเข้มข้น 10,000 ppm และที่ความเข้มข้น 20,000 ppm อนุภาคนาโนแต่ละสูตรสามารถยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.01 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ดังแสดงในภาพที่ 32

นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความฤทธิ์ยับยั้งของสารเคมีทางการเกษตรต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ streptomycin และสารเคมีทางการค้าซึ่งมีส่วนผสมของทองแดงและสังกะสี โดยใช้ความเข้มข้นตามที่คุณผลิตแนะนำในฉลากผลิตภัณฑ์ พบว่ามีเพียง streptomycin 50 µg/ml เท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้งนี้ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยใช้สารเคมีทางการค้าแบบไม่เจือจาง ซึ่งเกินกว่าที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำให้ใช้พบว่ามิฤทธิ์ในการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ดังแสดงในภาพที่ 31



ภาพที่ 31 บริเวณยับยั้งของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี สูตร SK11-02 และ Bv19-01 ที่ความเข้มข้น 10,000 และ 20,000 ppm ต่อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (ก) บริเวณยับยั้งของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตร และอนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดง ที่ความเข้มข้น 10,000 ต่อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (ข) streptomycin 50 µg/ml (ค) และสารเคมีทางการค้าซึ่งมีส่วนผสมของทองแดงและสังกะสี (ง)



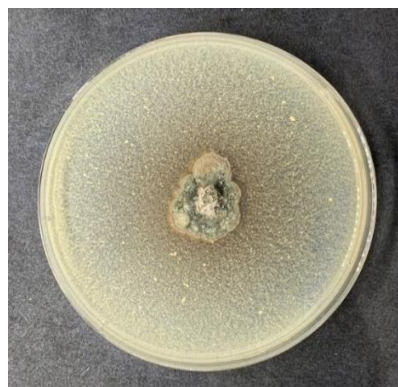
ภาพที่ 32 ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตรต่อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ความเข้มข้น 10,000 และ 20,000 ppm โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่สังเคราะห์ต่อการยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ข้าว *P. oryzae* โดยใช้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนที่ทดสอบ 2 ความเข้มข้น ได้แก่ 1,250 และ 2,500 ppm ด้วยเทคนิค agar dilution plate พบว่าอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีสูตร SK6511-02 ที่ความเข้มข้น 1,250 ppm มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้มากที่สุด  $58.56 \pm 2.27$  mm และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติพบว่า อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีสูตร SK6511-02 ความเข้มข้น 1,250 ppm สามารถยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ข้าว *P. oryzae* ได้ไม่แตกต่างจากสูตร Bv30-01 และสูตร Bv130-01 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.01 และที่ความเข้มข้น 2,500 ppm อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีสูตร SK6412-01 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ข้าวน้อยที่สุดและแตกต่างจากทุกสูตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.01 อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีสูตร SK6511-01, SK6511-02, Bv19, Bv130-01 และ Bv130MOLP สามารถยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ข้าวได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.01 ดังแสดงในภาพที่ 33 - ภาพที่ 34





(ก)

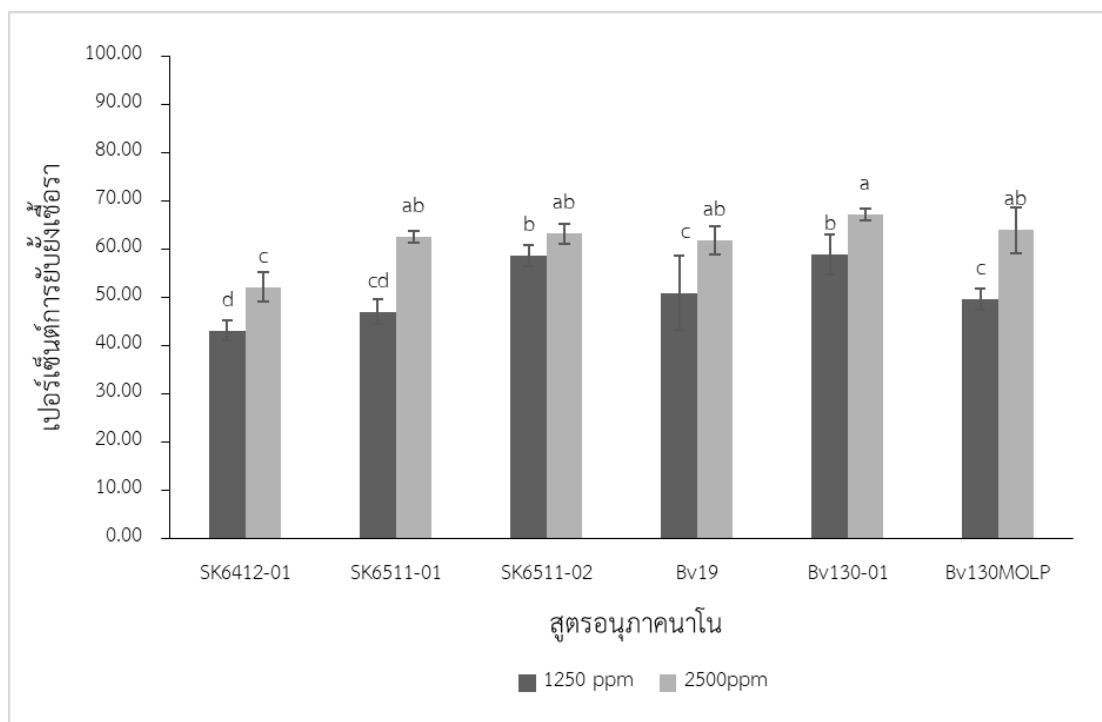


(ข)



(ค)

ภาพที่ 33 แสดงการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* บนอาหารที่ผสมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี สูตร SK6511-02 ที่ความเข้มข้น 1,250 ppm (ก) 2,000 ppm (ข) และ 0 ppm (control) (ค)



ภาพที่ 34 ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีแต่ละสูตรต่อ *P. oryzae* ที่ความเข้มข้น 1,250 และ 2,500 ppm ด้วยเทคนิค Agar dilution plate โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อนำข้อมูลความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี และค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS version 29.0 ในการวิเคราะห์ ได้ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี และบริเวณยับยั้ง ดังแสดงในตารางที่ 14 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี มีความสัมพันธ์กับบริเวณยับยั้ง ในทิศทางเดียวกัน 60.10 mm และมีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.37 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 หมายความว่าความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี มีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของบริเวณยับยั้ง 37 mm นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* ในทิศทางเดียวกัน 78.40% และมีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.61 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 หมายความว่า ความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี มีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 61%

ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae*

พารามิเตอร์ที่วัด	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation)
เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	0.601**
เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>P. oryzae</i>	0.784**

\*\* มีความสัมพันธ์กันที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

### 8. ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อการงอกของเมล็ด

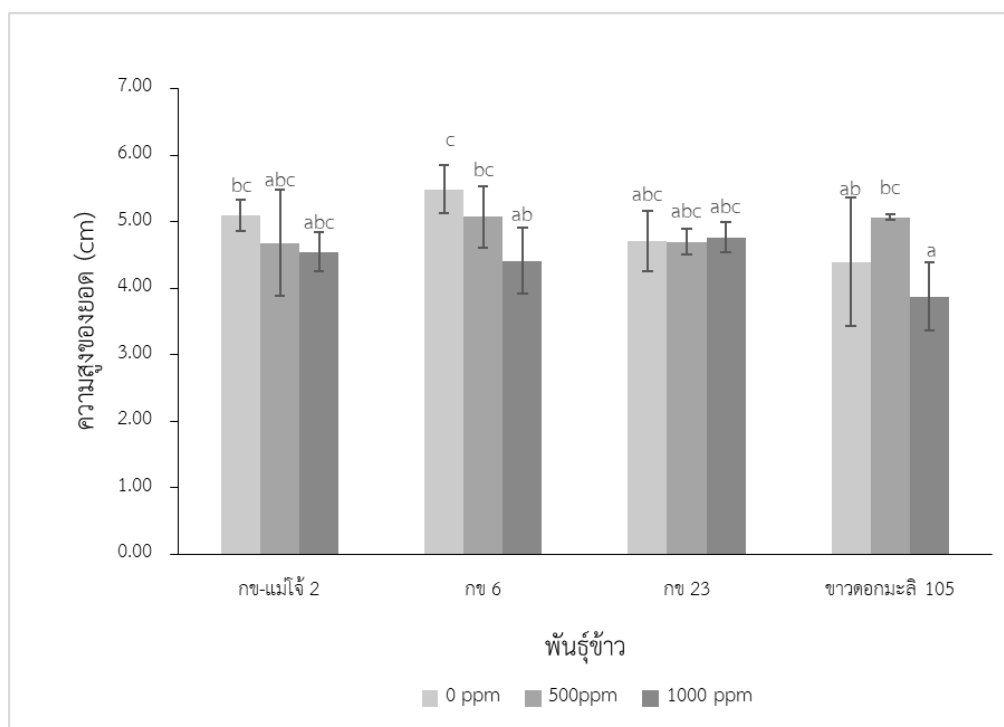
จากการทดสอบผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2 กข 6 กข 23 และข้าวดอกมะลิ 105 โดยการใช้ความเข้มข้น 0-1,000 ppm จากการใช้เมล็ดข้าว 10 เมล็ดต่อซ้ำ พบว่า ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีไม่มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าวที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การงอก ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวในสารละลายอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

พันธุ์ข้าว	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าว		
	0 ppm	500 ppm	1,000 ppm
กข-แม่โจ้ 2	96.67	100	96.67
กข 6	100	100	100
กข 23	96.67	100	93.33
ข้าวดอกมะลิ 105	100	93.33	100

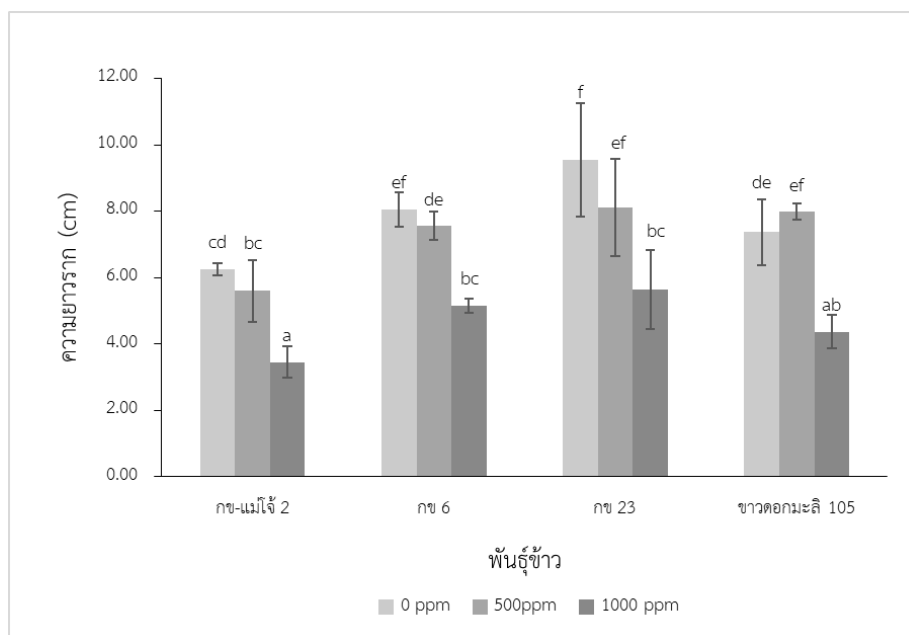
ในขณะที่เมื่อพิจารณาผลอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อความสูงของยอด ข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2 และ กข 6 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ส่งผลให้ความสูงของยอดลดลง ดังแสดงในภาพที่ 35 ในขณะที่พันธุ์ กข 23 พบว่า อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีไม่มีผลต่อความสูงของยอด โดยแต่ละความเข้มข้นให้ความสูงของยอดที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ สำหรับพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ในการทดลองที่มีการใช้ความเข้มข้น 500 ppm ให้ความสูงของยอด

มากกว่าที่ไม่มีอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี และที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่ 1,000 ppm



ภาพที่ 35 ผลของการแช่เมล็ดข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2 กข 6 กข 23 และ ขาวดอกมะลิ 105 ในสารละลายอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ความเข้มข้น 0-1,000 ppm นาน 24 ชั่วโมง ต่อความสูงของยอด โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สำหรับผลต่อความยาวราก พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ส่งผลให้ความยาวของรากของข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2 กข 6 และ กข 23 ลดลง ดังแสดงในภาพที่ 36 โดยการใช้ความเข้มข้น 1,000 ppm แตกต่างจากที่ความเข้มข้น 0 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งความเข้มข้น 1,000 ppm ให้ความยาวของรากของเมล็ดพันธุ์ข้าวทั้ง 3 พันธุ์ ลดลง 44.78, 35.92 และ 40.85% ตามลำดับ ส่วนในการทดสอบกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ จากภาพที่ 39 จะเห็นได้ว่าการใช้ความเข้มข้น 500 ppm มีผลทำให้ความยาวเฉลี่ยของรากเพิ่มขึ้น 7.61% แต่เมื่อใช้ความเข้มข้น 1,000 ppm กลับยับยั้งความยาวของรากไปถึง 40.75% จากการเทียบกับความเข้มข้น 0 ppm



ภาพที่ 36 ผลของการแช่เมล็ดข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2 กข 6 กข 23 และ ชาวดอกมะลิ 105 ในสารละลายอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีความเข้มข้น 0-1,000 ppm นาน 24 ชั่วโมง ต่อความยาวราก โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อนำข้อมูลความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี และค่าเฉลี่ยการงอกของเมล็ด ความยาวราก และความสูงของยอดของข้าวมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS version 29.0 ในการวิเคราะห์ ได้ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี และพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้วัดการเจริญเติบโตของต้นข้าว ดังแสดงในตารางที่ 16 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี มีความสัมพันธ์กับความยาวรากในทิศทางตรงกันข้าม 68.90% ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 และเมื่อคำนวณค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.47 นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กับความสูงของยอดของข้าวในทิศทางตรงกันข้าม 37.70% และมีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.14 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 หมายความว่า ความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี มีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของความยาวราก และความสูงของยอด 47 และ 14% ตามลำดับ



ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ต่อการงอกของเมล็ด ความยาวราก และความสูงของยอดของข้าว

พารามิเตอร์ที่วัด	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation)
การงอกของเมล็ด	-0.086
ความยาวราก	-0.689**
ความสูงของยอดของข้าว	-0.377*

\* มีความสัมพันธ์กันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

\*\* มีความสัมพันธ์กันที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

## 9. ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อจุลินทรีย์ในดิน และ เอนไซม์ในดิน

ผลการทดสอบอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อจุลินทรีย์ในดิน

เมื่อนำดินมาผสมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 500 และ 1,000 ppm หลังจาก 30 วัน เก็บตัวอย่างดิน นำมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียละลายฟอสเฟต ยีสต์และรา *Azotobacter* และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระในดิน จากการทดสอบพบว่าอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่ความเข้มข้นต่างๆ ส่งผลให้ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร PCA ลดลง (ตารางที่ 17) โดยที่ความเข้มข้น 0-1,000 ppm มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และที่ความเข้มข้น 0 และ 500 ppm มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดไม่แตกต่างกับดินเริ่มต้นซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุด  $2.37 \times 10^4$  CFU/g ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ส่วนในการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตพบว่าปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี โดยที่ความเข้มข้น 0-1,000 ppm มีปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเท่ากับ  $2.02 \times 10^3$ ,  $3.08 \times 10^3$  และ  $3.15 \times 10^3$  CFU/g ตามลำดับ และในดินเริ่มต้นมีปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตแตกต่างจากดินที่ผสมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่ความเข้มข้น 0-1,000 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

สำหรับการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *Azotobacter* ในอาหาร Ashby พบว่ามีปริมาณลดลง โดยที่ความเข้มข้น 0-1,000 ppm มีปริมาณ *Azotobacter* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยมีปริมาณ *Azotobacter*  $1.22 \times 10^3$ ,  $2.33 \times 10^3$  และ  $1.87 \times 10^3$  CFU/g ตามลำดับ และในดินเริ่มต้นมีปริมาณ *Azotobacter*  $4.77 \times 10^4$  CFU/g ซึ่งแตกต่างจากดิน

ที่ผสมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่ความเข้มข้น 0-1,000 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียตรงไนโตรเจนอิสระในดิน พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี โดยที่ความเข้มข้น 0-1,000 ppm มีปริมาณแบคทีเรียตรงไนโตรเจนอิสระเท่ากับ  $1.76 \times 10^4$ ,  $2.90 \times 10^4$  และ  $2.40 \times 10^4$  CFU/g และดินที่ผสมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่ความเข้มข้น 0 และ 1,000 ppm มีปริมาณแบคทีเรียตรงไนโตรเจนอิสระไม่แตกต่างจากดินเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียตรงไนโตรเจนอิสระ  $1.99 \times 10^4$  CFU/g

ส่วนการตรวจนับปริมาณยีสต์และรา ในอาหาร DRBC agar พบว่าดินเริ่มต้นและดินที่ผสมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่ความเข้มข้น 0 -1,000 ppm มีปริมาณยีสต์และราไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยดินเริ่มต้นมีปริมาณยีสต์และรา  $2.85 \times 10^3$  CFU/g และดินที่ผสมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่ความเข้มข้น 0 -1,000 ppm มีปริมาณยีสต์และรา  $1.63 \times 10^3$ ,  $2.97 \times 10^3$  และ  $2.30 \times 10^3$  CFU/g ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงในอาหาร PCA ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี SK3412-01 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น ของอนุภาคนาโน	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFU/g)				
	แบคทีเรียทั้งหมด	แบคทีเรีย ละลาย ฟอสเฟต	<i>Azotobacter</i>	แบคทีเรียตรง ไนโตรเจนอิสระ	ยีสต์และรา
1,000 ppm	$1.14 \times 10^4$ a	$3.15 \times 10^3$ a	$1.87 \times 10^3$ a	$2.40 \times 10^4$ ab	$2.30 \times 10^3$ a
500 ppm	$2.08 \times 10^4$ ab	$3.08 \times 10^3$ a	$2.33 \times 10^3$ a	$2.90 \times 10^4$ b	$2.97 \times 10^3$ a
0 ppm	$1.53 \times 10^4$ ab	$2.02 \times 10^3$ a	$1.22 \times 10^3$ a	$1.76 \times 10^4$ a	$1.63 \times 10^3$ a
Initial	$2.37 \times 10^4$ b	$1.57 \times 10^4$ b	$4.77 \times 10^4$ b	$1.99 \times 10^4$ a	$2.85 \times 10^3$ a

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)  $P < 0.05$

เมื่อนำข้อมูลปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียละลายฟอสเฟต ยีสต์และรา *Azotobacter* และแบคทีเรียตรงไนโตรเจนอิสระในดินมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลจากค่าสัมประสิทธิ์

สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS version 29.0 ในการวิเคราะห์ จะเห็นได้ว่าปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟต มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรีย *Azotobacter* ในทิศทางเดียวกัน 89.90% และเมื่อกำหนดค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.81 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 หมายความว่า ปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตมีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของ *Azotobacter* 81% ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ และรา *Azotobacter* และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระในดิน

พารามิเตอร์ที่วัด	แบคทีเรียทั้งหมด	แบคทีเรียละลายฟอสเฟต	<i>Azotobacter</i>	แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ	ยีสต์และรา	ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี
แบคทีเรียทั้งหมด	1	0.204	0.360	-0.27	0.386	-0.429
แบคทีเรียละลายฟอสเฟต	0.204	1	0.899**	-0.57	0.531	-0.318
<i>Azotobacter</i>	0.360	0.899**	1	0.159	0.579	-0.222
แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ	-0.27	-0.57	0.159	1	0.496	0.499
ยีสต์และรา	0.386	0.531	0.579	0.496	1	0.119
ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี	-0.429	-0.318	-0.222	0.499	0.119	1

หมายเหตุ : \*\* มีความสัมพันธ์กันที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อเอนไซม์ในดิน

เมื่อศึกษาผลของการเติม อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีสูตร SK6412-01 ปริมาณ 1,000 ppm ลงในดิน จากนั้น 30 วัน นำมาตรวจค่ากิจกรรมเอนไซม์ในดิน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 19 พบว่า Dehydrogenase, Alkaline phosphatase และ Cellulase มีแนวโน้มที่ลดลงในดินที่มีการเติมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี สำหรับ Acid phosphatase มีค่ากิจกรรมที่เพิ่มขึ้น แต่จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ในดิน 4 กลุ่มนี้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ Protease มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในดินที่มีการเติมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีมีปริมาณสูงกว่าชุดควบคุมถึง 4 เท่าดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ปริมาณเอนไซม์ในดินชุดควบคุม และดินชุดที่มีการเติมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีสูตร SK6412-01 หลังเติมนาน 30 วัน

เอนไซม์ในดิน	ดินชุดควบคุม	เติมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี
Dehydrogenase ( $\mu\text{gTPF/g/h}$ )	$54.75 \pm 13.62^a$	$51.77 \pm 11.32^a$
Alkaline phosphatase ( $\mu\text{gPNP/g/h}$ )	$101.11 \pm 1.21^a$	$98.93 \pm 2.55^a$
Acid phosphatase ( $\mu\text{gPNP/g/h}$ )	$120.11 \pm 3.24^a$	$121.35 \pm 4.93^a$
Cellulase ( $\mu\text{g glucose/g/h}$ )	$6.37 \pm 0.69^a$	$4.72 \pm 0.65^b$
Protease ( $\mu\text{mole tyrosine/g/h}$ )	$79.44 \pm 35.14^a$	$338.11 \pm 45.86^b$

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แสดงในแต่ละแถวแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการวิเคราะห์แบบ Tukey's HSD ( honestly significant difference) test

## วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์สำคัญในการใช้แบคทีเรียบาซิลลัสในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีและทองแดงเพื่อควบคุมโรคข้าวโดยเน้นไปที่โรคขอบใบแห้งซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) และ โรคไหม้ในข้าว ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* โดยเริ่มจากการคัดกรองแบคทีเรีย *Bacillus* ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Xoo และ *P. oryzae* ซึ่งใช้ *Bacillus* และ จีโนมที่มีความสัมพันธ์ ได้แก่ *Lysinibacillus*, *Oceanibacillus* และ *Paenibacillus* จากการทดสอบพบว่าแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชคือ *Bacillus velezensis* โดยในงานวิจัยนี้มี *B. velezensis* 7 ไอโซเลต ซึ่ง *B. velezensis* เป็นแบคทีเรียที่มีรายงานการใช้ประโยชน์ทางการเกษตรทั้งในส่วนของของการควบคุมโรคพืช และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชรวมถึงในข้าวด้วย โดย *B. velezensis* เป็นสปีชีส์ที่ถูกจัดจำแนกใหม่ของ *B. methylotrophicus*, *B. amyloliqueciens* subsp. *plantarum* และ *B. oryzicola* (Ye et al., 2018)

สำหรับฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชของ *B. velezensis* มีรายงานว่าเกิดจากการสร้างสารทุติยภูมิ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี่คือ supernatant ของ *B. velezensis* อายุ 72 ชั่วโมงที่มีฤทธิ์ยับยั้ง Xoo และ *P. oryzae* โดย Lim et al. (2017) ได้รายงานชนิดของสารละลายน้ำของแบคทีเรีย *B. velezensis* G341 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe oryzae*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotinia sclerotiorum* จากการวิเคราะห์พบว่ากลุ่มสารละลายน้ำได้ คือ bacillomycin L และ fengycin A ซึ่ง Chen et al. (2020) ได้รายงานว่ามีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* สาเหตุโรคไหม้ในข้าว โดยส่วน supernatant ของ *B. velezensis* ZW-10 สามารถยับยั้งเชื้อได้โดยเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์จากกราฟการเจริญและฤทธิ์การยับยั้งแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ยับยั้งนี้มีบทบาทจากสารทุติยภูมิ

โดยสารทุติยภูมิจาก *B. velezensis* ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชคือ กลุ่มของ cyclic lipopeptides เช่น surfactin, bacillomycin-D, fengycin, iturin และ bacillibactin และกลุ่มของ polyketides เช่น macrolactin, bacillaene และ difficidin ซึ่งสารเหล่านี้นอกจากมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์แล้วยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (Rabbee et al., 2019) อีกทั้งจากงานวิจัยของ Yu et al. (2022) ยังรายงานว่า *B. velezensis* YA215 ซึ่งแยกได้จากป่าชายเลนมีการสารชีวโมเลกุลในกลุ่มของ lipopeptides ทั้ง surfactin, Iturin และ fengycin ซึ่ง



สารในกลุ่มของ lipopeptides มีคุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพด้วยในงานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาความไม่ชอบน้ำ (BATH assay) และความสามารถในการเกิด E24 (emulsification index, E24) ซึ่งผลจาก BATH assay *B. velezensis* ให้เปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำของเซลล์ 4.10-46.86% ส่วน ค่า E24 มีค่าอยู่ในช่วง 38.97-51.92% ซึ่งจากงานวิจัยของ Syahriansyah and Hamzah (2016) และ Mouafi et al. (2016) ซึ่งตรวจสอบความสามารถในการเกิด E24 ของ *B. subtilis* และ *B. brevis* เพื่อระบุความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ พบว่ามีค่า E24 เพียง 17% และ 46.6% ตามลำดับ

นอกจากนี้จากการตรวจสอบยีนจำเพาะที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ cyclic lipopeptides ได้แก่ *SUR3*, *srfA*, *ituD*, *ituC*, *fenD* และ *bmyB* ที่ควบคุมการผลิต surfactin, iturin, fengycin และ bacillomycin พบว่า *B. velezensis* ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Xoo* และ *P. oryzae* ตรวจพบยีนทั้ง 6 นี้ เช่นเดียวกับงานวิจัย Zhou et al. (2022) ได้รายงานการศึกษาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว โดยเชื้อ *B. velezensis* ซึ่งแยกได้จากราก *Boldostemmatis* ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวที่สำคัญ *Magnaporthe oryzae* และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง lipopeptides ได้แก่ *ituA*, *ituD*, *bmyB*, *bmyC*, *srfAA*, *fenB*, *fenD*, *bacA* และ *bacD* ดังนั้น *B. velezensis* จึงอาจมีการสร้าง lipopeptides ทั้ง 3 กลุ่มคือ surfactin, iturin และ fengycin นอกจากนี้ Niemhom and Kittiwongwattana (2023) ได้รายงานการแสดงออกของยีนแบคทีเรีย *B. velezensis* 2211 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth มีการแสดงออกของยีน *bmyA*, *fenB* และ *dhbE* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีน Bacillomycin D synthetase A, Fengycin

ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ นั้นส่วนประกอบของอาหารมีส่วนสำคัญต่อปริมาณสารที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตได้ ซึ่ง Nurfarahin et al. (2018) ได้รายงานส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ซึ่งที่สำคัญได้แก่ธาตุอาหารหลัก คือ แหล่งของคาร์บอน และแหล่งของไนโตรเจน โดยแหล่งของคาร์บอนที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย และให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสูง คือ กลูโคส และซูโครส ส่วนของแหล่งไนโตรเจน ประเภทที่เป็นสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ yeast extract, urea และ peptone และประเภทที่เป็นสารประกอบไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ ammonium nitrate, sodium nitrate, ammonium sulfate และ potassium nitrate ซึ่งความเหมาะสมของส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ได้ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ด้วย สำหรับในงานวิจัยนี้ เมื่อศึกษาการผลิตสารต้านแบคทีเรียของเชื้อ *B. velezensis* ไอโซเลตที่ LC1, LC2, LC19, LC33, LC33.1, LC70 และ LC130 ที่ pH และอุณหภูมิคงที่โดยมีการแปรผันแหล่งคาร์บอน และแหล่งของไนโตรเจน โดยศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Xoo* พบว่ากลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่ง

ไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดตามลำดับ สำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. velezensis* LC19 และ LC130 ในขณะที่ Syahriansyah and Hamzah (2016) ระบุว่าแหล่งคาร์บอนคือ น้ำมันปาล์ม และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพของเชื้อ *B. subtilis* UKMP-4M5 คือ ammonium chloride และ yeast extract โดยการวัดจากแรงตึงผิว

จากนั้นนำ *B. velezensis* LC130 เป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีศักยภาพมากที่สุด ถูกนำมาใช้สำหรับการสร้างแบบจำลองพื้นผิวการตอบสนองทางสถิติตามการออกแบบของ Box-Behnken ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นการศึกษาปริมาณกลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์ รวมถึงค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ แบบจำลองสรุปได้ว่าค่า E24 สูงสุด (59.58 %) เมื่อ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ pH 7.65 และปริมาณเริ่มต้นของกลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 22.17 g/L และ 2.55 g/L ตามลำดับ โดย Mouafi et al. (2016) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ของ *B. brevis* โดยคัดเลือกจากค่า emulsification index (E24) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 46.6% สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจากการใช้วิธีพื้นที่ผิวตอบสนองคือ การใช้น้ำตาล glucose 8.5 g/L ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ pH8 ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส บ่มนาน 10 วัน ซึ่งได้ค่า E24 พยากรณ์จากสมการเท่ากับ 71.89% ได้สภาวะที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ แต่ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา ส่วนงานวิจัยของ Liu et al. (2012) ได้ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต surfactin ของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* โดยการใช้วิธีพื้นที่ผิวตอบสนองเช่นกันแต่แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ ซูโครส และแอมโมเนียมไนเตรต นอกจากนี้ยังมีการเติม  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  สภาวะของอาหารที่เหมาะสมคือ การใช้น้ำตาลซูโครส 21.17 g/L, แอมโมเนียมไนเตรต 2.5 g/L และ โมโนโซเดียมฟอสเฟต (โมโนไฮเดรต) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 11.56 g/L ได้ปริมาณ surfactin เท่ากับ 88.6 mg/L

ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีและทองแดง โดยใช้ supernatant ของ *B. velezensis* LC19, LC70 และ LC130 ด้วยวิธีการตกตะกอนร่วม พบว่าวิธีนี้เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี มากกว่าการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดง เนื่องจากได้อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดงปริมาณน้อยมาก สำหรับสัณฐานวิทยาและโครงสร้างของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่สังเคราะห์ได้ โดยศึกษา X-ray Diffraction (XRD) สเปกโทรสโกปีแบบกระจายพลังงาน (EDS) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) จากข้อมูลที่ได้ระบุว่าอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี มี hexagonal phase รูปทรงกลมและไร้รูปร่าง มีเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4-107 nm เมื่อนำอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่สังเคราะห์ได้ มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยเทคนิค spot on lawn และ agar dilution plate technique พบว่ามีผลยับยั้งกับแบคทีเรีย *Xoo* และเชื้อรา *P. oryzae* โดยให้บริเวณยับยั้งแบคทีเรีย *Xoo* 9.13-18.23 mm และอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีทุกสูตรที่ทดสอบสามารถยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae*

ได้มากกว่า 40% โดยสูตร SK6511-02 ที่ความเข้มข้น 1,250 ppm มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้มากที่สุด 58.56% โดยในรายงานการวิจัยที่มีมาก่อนหน้าเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนด้วยวิธีชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus* สปีชีส์ที่ไม่ก่อโรคในคนและสัตว์ และมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช เช่น U et al. (2022) ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี จาก supernatant ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ซึ่งได้อนุภาคนาโนทรงกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 32 nm และเมื่อใช้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนนี้ 0.125% สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืชได้แก่ *Collettrichum capsica*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria solani* และ *Fusarium oxysporum* ได้ 99% และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพืช คือ *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ด้วย และ Ogunyemi et al. (2020) ซึ่งสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี, ออกไซด์ของแมงกานีส และออกไซด์ของแมกนีเซียม โดยใช้ *Paenibacillus polymyxa* เป็น reducing agent ได้ขนาดของอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 62.8, 18.8 และ 10.9 nm โดยอนุภาคนาโนเหล่านี้ที่ความเข้มข้น 16 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้าง biofilm ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคขอบใบแห้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* และยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี จากสารสกัดจากพืช และสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชได้เช่นกัน ได้แก่ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี จากสารสกัดจากมะกอก (*Olea europus*) คาโมไมล์ (*Matricaria chamomilla*) และ มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) ได้ขนาดของอนุภาคนาโน 40.5-124.0 nm โดยอนุภาคนาโนเหล่านี้ที่ความเข้มข้น 4-16 µg/ml ซึ่งได้สรุปผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคขอบใบแห้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ว่าสามารถยับยั้งการเจริญ การสร้าง biofilm การเคลื่อนที่ และเยื่อหุ้มเซลล์ (Ogunyemi et al., 2019)

สำหรับผลกระทบของการใช้อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ต่อพืช หรือความเป็นพิษนั้นพบว่าอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี (SK6412-01) ไม่มีผลต่อการลดลงของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าว การเติมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี (500-1,000 ppm) ทำให้ความยาวต้นและความยาวรากของข้าวลดลง ซึ่ง Liu et al. (2022) ได้รวบรวมผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ต่อพืช และสภาพแวดล้อมรอบราก โดยมีทั้งผลในด้านดี และด้านที่เป็นพิษ และรายงานไว้ว่าอนุภาคนาโนสามารถเข้าสู่พืชโดยทางราก และทางใบ การใช้ความเข้มข้นระดับปานกลางสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และทำให้พืชทนต่อความเครียด ในขณะที่ความเข้มข้นสูงอาจทำให้เกิดความเป็นพิษกับพืชได้ แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วย โดยทำให้การงอกของเมล็ดลดลง ลดอัตราการสังเคราะห์แสง ลดกิจกรรมการเกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย หรืออาจกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์รากได้

ส่วนผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นักวิจัยได้มีการเผยแพร่และสรุปไว้ในเบื้องต้นว่า ผลของอนุภาคนาโนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในดิน มีความสัมพันธ์กับชนิดของเอนไซม์ และขึ้นกับขนาดของอนุภาคนาโน ความเข้มข้นของอนุภาคนาโน และระยะเวลาที่สัมผัสกับอนุภาคนาโนนั้น (Mishra et al., 2021) ซึ่งการศึกษาผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี (500-1,000 ppm ในดิน) ที่ระยะเวลา 30 วัน ต่อจุลินทรีย์ในดินและเอนไซม์ในดิน โดยการวัดจำนวนจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย ยีสต์ และรา แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน และแบคทีเรียละลายฟอสเฟต) และกิจกรรมของเอนไซม์ (dehydrogenase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, cellulase และ protease) ผลทดลองแสดงให้เห็นว่าการใส่อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ไม่มีผลกระทบต่อประชากรจุลินทรีย์ในดิน สำหรับดินที่มีการใส่อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มีผลยับยั้งกิจกรรมของ dehydrogenase, alkaline phosphatase และ cellulase ในขณะที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่ความเข้มข้นนี้ทำให้กิจกรรมของ acid phosphatase และกิจกรรมของ protease เพิ่มขึ้น โดยกิจกรรมของ acid phosphatase มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jiang et al. (2021) ได้รายงานว่าการเติมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ปริมาณ 500 ppm ในดิน ยับยั้งการหายใจของกลุ่ม heterotrophs ในดิน โดยกลุ่มของแบคทีเรียจะอ่อนไหวต่ออนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี มากกว่ากลุ่มของฟังไจ และที่ความเข้มข้นสูงยังยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase, cellulase และ cellobiohydrolase แต่ในงานวิจัยของ (Du et al., 2011) กลับพบว่าในดินที่มีการเติมอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ protease ลดลง และงานวิจัยของ Kwak et al. (2017) ได้ศึกษาผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี กิจกรรมของเอนไซม์ในดินที่มีการเพาะปลูก พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ acid phosphatase มีค่าลดลง แต่ dehydrogenase และ  $\beta$ -glucosidase มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งความไม่สอดคล้องอาจเกิดจากความแตกต่างทางกายภาพของตัวอย่างดินที่ใช้ในการศึกษา และสมบัติของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ที่ใช้ในการศึกษา



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

1. ในการศึกษาแบคทีเรีย *Bacillus* และจีโนมที่เกี่ยวข้อง จำนวน 79 ไอโซเลต การยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และเชื้อรา *Pyricularia oryzae* มี *B. velezensis* 7 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิด ได้ดี และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้จากการตรวจสอบความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง ความไม่ชอบน้ำของเซลล์ กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร cyclic lipopeptides ซึ่งประกอบด้วย *SUR3*, *srfA*, *ituD*, *ituC*, *fenD* และ *bmyB* ที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ยับยั้งจุลินทรีย์ ได้แก่ surfactin, iturin, fengycin และ bacillomycin และ *B. velezensis* มีความปลอดภัยทางชีวภาพจากการศึกษาไวต่อยาปฏิชีวนะ penicillin, ciprofloxacin, tetracyclin, tigecyclin และ vancomycin และการตรวจสอบทะเบียนรายชื่อเชื้อก่อโรคในคนและสัตว์พระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558

2. ศึกษาหาแหล่งของคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพซึ่งแบคทีเรียของเชื้อ *B. velezensis* LC1, LC2, LC19, LC33, LC33.1, LC70 และ LC130 พบว่ากลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด โดย *B. velezensis* LC19 และ LC130 ซึ่ง *B. velezensis* LC130 เป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีศักยภาพมากที่สุด

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพโดยการสร้างแบบจำลองพื้นผิวการตอบสนองทางสถิติตามการออกแบบของ Box-Behnken ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นการศึกษาปริมาณกลูโคส ( $X_1$ ) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $X_2$ ) รวมถึงค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ( $X_3$ ) แบบจำลองสรุปได้ว่าค่า E24 สูงสุด (59.58 %) เมื่อ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ pH 7.65 และปริมาณเริ่มต้นของกลูโคส และแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 22.17 g/L และ 2.55 g/L ตามลำดับ ซึ่งได้สมการ

$$\%emulsion = 56.50 - 2.93X_1 - 2.14X_2 + 3.53X_3 + 3.40X_1X_2 - 0.9143X_1X_3 - 2.12 X_2X_3$$

4. ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีและทองแดง โดยใช้ supernatant ของ *B. velezensis* LC19, LC70 และ LC130 ด้วยวิธีการตกตะกอนร่วม พบว่าวิธีนี้เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีมากกว่าการสังเคราะห์ทางออกไซด์ของทองแดง เนื่องจากได้อนุภาคนาโนออกไซด์ของทองแดง ปริมาณน้อยมาก จึงศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีเป็นหลัก โดยศึกษาโดยใช้ X-ray Diffraction (XRD) สเปกโทรสโกปีแบบกระจาย



พลังงาน (EDS) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่า อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีมี hexagonal phase รูปทรงกลมกลม รี เส้นใย และไร้รูปทรง มีเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4-107 nm และอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่สังเคราะห์ได้มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และเชื้อรา *P. oryzae*

5. ศึกษาผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีที่คัดเลือกแล้ว (SK6412-01) ต่อการงอกของเมล็ดข้าว และการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว จำนวนทั้งสิ้น 4 พันธุ์ พบว่าอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีไม่มีผลต่อการลดลงของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าว แต่มีผลทำให้ความยาวต้นและความยาวรากของข้าวลดลง

6 .ศึกษาผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีความเข้มข้น 0, 500 และ 1,000 ppm ในดิน ต่อจุลินทรีย์ในดิน ที่ระยะเวลาานาน 30 วัน ด้วยการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ และรา แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน และแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ว่าการใส่อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีไม่มีผลกระทบต่อประชากรจุลินทรีย์ในดิน ในขณะที่การทดสอบผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อ กิจกรรมของเอนไซม์ในดินใช้ความเข้มข้น 1,000 ppm เมื่อตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ dehydrogenase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, cellulase และ protease พบว่ากิจกรรมของ dehydrogenase, alkaline phosphatase และ cellulase ถูกยับยั้งโดยความเข้มข้นนี้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่ไม่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีนี้ทำให้กิจกรรมของ acid phosphatase และกิจกรรมของ protease เพิ่มขึ้น

## บรรณานุกรม

- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. & Nabi, A. 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, 223(1-3), 143-151.
- Ahmed, T., Shahid, M., Noman, M., Niazi, M. B. K., Mahmood, F., Manzoor, I., Zhang, Y., Li, B., Yang, Y. & Yan, C. 2020. Silver Nanoparticles Synthesized by Using *Bacillus cereus* SZT1 Ameliorated the Damage of Bacterial Leaf Blight Pathogen in Rice. **Pathogens**, 9(3), 160.
- Alayande, S., Adeselu, T., Odewumi, B., Torimiro, N., Daramola, O., Sodeinde, K., Ighodaro, O., Ofudje, E. & Ajao, J. 2019. Evaluation of microbial inhibition properties of green and chemically synthesized ZnO nanoparticles. **Bulletin of Materials Science**, 42(3), 101.
- Andric, S., Meyer, T. & Ongena, M. 2020. *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities. **Frontiers in Microbiology**, 11, 1350.
- Castillo, H. F. D., Reyes, C. F., Morales, G. G., Herrera, R. R. & Aguilar, C. 2013. Biological control of root pathogens by plant-growth promoting *Bacillus* spp. **Weed and Pest Control-Conventional and New Challenges**, 79-103.
- Celandroni, F., Salvetti, S., Gueye, S. A., Mazzantini, D., Lupetti, A., Senesi, S. & Ghelardi, E. 2016. Identification and Pathogenic Potential of Clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* Isolates. **PloS One**, 11(3), e0152831.
- Chai, H., Yao, J., Sun, J., Zhang, C., Liu, W., Zhu, M. & Ceccanti, B. 2015. The Effect of Metal Oxide Nanoparticles on Functional Bacteria and Metabolic Profiles in Agricultural Soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 94, 490-495.
- Chen, Z., Zhao, L., Chen, W., Dong, Y., Yang, C., Li, C., Xu, H., Gao, X., Chen, R., Li, L. & Xu, Z. 2020. Isolation and evaluation of *Bacillus velezensis* ZW-10 as a potential biological control agent against *Magnaporthe oryzae*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 34(1), 714-724.
- Chhipa, H. 2017. Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. **Environmental**

**Chemistry Letters**, 15(1), 15-22.

- Concha-Guerrero, S. I., Brito, E. M. S., Piñón-Castillo, H. A., Tarango-Rivero, S., Caretta, C. A., Luna-Velasco, A., Duran, R. & Orrantia-Borunda, E. 2015. Effect of CuO nanoparticles over isolated bacterial strains from agricultural soil. **Journal of Nanomaterials**, 2014, 206-206.
- Das, S. K. & Varma, A. (2010). Role of enzymes in maintaining soil health. In **Soil Enzymology** (pp. 25-42): Springer.
- Du, W., Sun, Y., Ji, R., Zhu, J., Wub, J. & Guo, H. 2011. TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. **Journal of Environmental Monitoring**, 13(4), 822-828.
- Elshakh, A. S. A., Anjum, S. I., Qiu, W., Almoneafy, A. A., Li, W., Yang, Z., Cui, Z.-Q., Li, B., Sun, G.-C. & Xie, G.-L. 2016. Controlling and defence-related mechanisms of *Bacillus* strains against bacterial leaf blight of rice. **Journal of Phytopathology**, 146(7-8), 534-546.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J. & Stanković, S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, 285, 44-55.
- Frikha-Gargouri, O., Abdallah, D. B., Bhar, I. & Tounsi, S. 2017. Antibiosis and bmyB Gene Presence As Prevalent Traits for the Selection of Efficient *Bacillus* Biocontrol Agents against Crown Gall Disease. **Frontiers in Plant Science**, 8, 1363.
- Gu, X.-B., Zheng, Z.-M., Yu, H.-Q., Wang, J., Liang, F.-L. & Liu, R.-L. 2005. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. **Process Biochemistry**, 40(10), 3196-3201.
- Ibrahim, E., Fouad, H., Zhang, M., Zhang, Y., Qiu, W., Yan, C., Li, B., Mo, J. & Chen, J. 2019. Biosynthesis of silver nanoparticles using endophytic bacteria and their role in inhibition of rice pathogenic bacteria and plant growth promotion. **RSC Advances**, 9(50), 29293-29299.
- Issazadeh, K., Rad, S. K., Zarrabi, S. & Rahimibashar, M. R. 2012. Antagonism of *Bacillus* species against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* **African Journal of Microbiology Research**, 6(7), 1615-1620.

- Jamali, H., Sharma, A., Roohi & Srivastava, A. K. 2019. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. **Journal of Basic Microbiology**, 60(3), 268-280.
- Jiang, H., Yang, B., Wang, H., Chen, Q., Cao, X., Gao, Y., Zhao, C. & Yin, K. 2021. Insights on the effects of ZnO nanoparticle exposure on soil heterotrophic respiration as revealed by soil microbial communities and activities. **Journal of Soils and Sediments**, 21, 2315-2326.
- Jin, P., Wang, H., Tan, Z., Xuan, Z., Dahar, G. Y., Li, Q. X., Miao, W. & a, W. L. 2020. Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 163, 102-107.
- Kala, A., Soosairaj, S., Mathiyazhagan, S. & Raja, P. 2016. Green synthesis of copper bionanoparticles to control the bacterial leaf blight disease of rice. **Current Science**, 2011-2014.
- Khan, M. R. 2012. Beneficial Bacteria for Biological Control of Fungal Pathogens of Cereals. In **Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management** 153-165.
- Kumar, V., Jain, L., Jain, S. K., Chaturvedi, S. & Kaushal, P. 2020. Bacterial endophytes of rice (*Oryza sativa* L.) and their potential for plant growth promotion and antagonistic activities. **South African Journal of Botany**, 134, 50-63.
- Kwak, J. I., Yoon, S.-J. & An, Y.-J. 2017. Long-term effects of ZnO nanoparticles on exoenzyme activities in planted soils. **Environmental Engineering Research**, 22(2), 224-229.
- Lam, V. B., Meyer, T., Arias, A. A., Ongena, M., Oni, F. E. & Hofte, M. 2021. *Bacillus* cyclic lipopeptides iturin and fengycin control rice blast caused by *Pyricularia oryzae* in potting and acid sulfate soils by direct antagonism and induced systemic resistance. **Microorganisms**, 7(9), 1441.
- Lee, Y. H., Jang, S. J., Han, J.-H., Bae, J. S., Shin, H., Park, H. J., Sang, M. K., Han, S. H., Kim, K. S., Han, S.-W. & Hong, J. K. 2018. Enhanced tolerance of Chinese cabbage seedlings mediated by *Bacillus aryabhattai* H26-2 and *B. siamensis* H30-3 against high temperature stress and fungal infections. **The Plant Pathology Journal**, 34(6), 555.

- Li, X., Xu, H., Chen, Z.-S. & Chen, G. 2011. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. **Journal of Nanomaterials**, 2011, 1-16.
- Lim, S. M., Yoon, M.-Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., Park, H. W., Yu, N. H., Kim, Y. H. & Kim, J.-C. 2017. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. **The Plant Pathology Journal**, 33(5), 488.
- Liu, L., Nian, H. & Lian, T. 2022. Plants and rhizospheric environment: Affected by zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs). A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, 185(91-100).
- Liu, X., Ren, B., Gao, H., Liu, M., Dai, H., Song, F., Yu, Z., Wang, S., Hu, J., Kokare, C. R. & Zhang, L. 2012. Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. **PLoS one**, 7(5), 34430.
- METZ, N. 2017. Biologicals for the control of *Alternaria solani* under greenhouse and field conditions. In **Sixteenth Euroblight Workshop, Aarhus, Denmark, Special Report** 18, 85-90.
- Mishra, P., Xue, Y., Eivazi, F. & Afrasiabi, Z. 2021. Size, concentration, coating, and exposure time effects of silver nanoparticles on the activities of selected soil enzymes. **Geoderma**, 381, 114682.
- Mittal, A. K., Chisti, Y. & Banerjee, U. C. 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, 31(2), 346-356.
- Mora, I., Cabrefiga, J. & Montesinos, E. 2015. Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. **PLoS One**, 10(5), e0127738.
- Mouafi, F. E., Elsoud, M. M. A. & Moharam, M. E. 2016. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. **Biotechnology Reports**, 9, 31-37.
- Nagendran, K., Karthikeyan, G., Peeran, M. F., Raveendran, M., Prabakar, K. & Raguchander, T. 2013. Management of Bacterial Leaf Blight Disease in Rice with Endophytic Bacteria. **World Appl Sci Journal**, 28(12), 2229-2241.
- Nanjundan, J., Ramasamy, R., Uthandi, S. & Ponnusamy, M. 2019. Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from



- Bacillus amyloliquefaciens* SR1. **Microbial Pathogenesis**, 128, 374-380.
- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, 170(1), 265-270.
- Ndeh, N. T., Maensiri, S. & Maensiri, D. 2017. The effect of green synthesized gold nanoparticles on rice germination and roots. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, 8(3), 035008.
- Niemhom, N. & Kittiwongwattana, C. 2023. Biocontrol Potential, Genome and Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Expression of *Bacillus velezensis* 2211. **Current Applied Science and Technology**, 10-55003.
- Nurfarahin, A. H., Mohamed, M. S. & Phang, L. Y. 2018. Culture medium development for microbial-derived surfactants production—an overview. **Molecules**, 23(5), 1049.
- Ogunyemi, S. O., Abdallah, Y., Zhang, M., Fouad, H., Hong, X., Ibrahim, E., Masum, M. M. I., Hossain, A., Mo, J. & Li, B. 2019. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using different plant extracts and their antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, 47(1), 341-352.
- Ogunyemi, S. O., Zhang, M., Abdallah, Y., Ahmed, T., Qiu, W., Ali, M. A., Yan, C., Yang, Y., Chen, J. & Li, B. 2020. The bio-synthesis of three metal oxide nanoparticles (ZnO, MnO<sub>2</sub>, and MgO) and their antibacterial activity against the bacterial leaf blight pathogen. **Frontiers in Microbiology**, 11, 588326.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. & Babalola, O. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33(11), 1-16.
- Pascual, J. A., Hernandez, T., Garcia, C. & Ayuso, M. 1998. Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: laboratory experiment. **Bioresource Technology**, 64(2), 131-138.
- Pestovsky, Y. S. & Martínez-Antonio, A. 2017. The use of nanoparticles and nanoformulations in agriculture. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 17(12), 8699-8730.

- Płaza, G., Chojniak, J., Rudnicka, K., Paraszkiwicz, K. & Bernat, P. 2015. Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. **Journal of Applied Microbiology**, 119(4), 1023-1034.
- Pruthi, V. & Cameotra, S. S. 1997. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, 11, 671-674.
- Rabbee, M. F., Ali, M. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C. & Baek, K.-h. 2019. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. **Molecules**, 24(6), 1046.
- Rani, M., Weadge, J. T. & Jabaji, S. 2020. Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from oil well batteries with antimicrobial activities against food-borne and plant pathogens. **Frontiers in Microbiology**, 11, 64.
- Rengathavasi, T., Sharma, S. & Jayalakshmi, S. 2011. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. **J Pet Environ Biotechnol S**, 1(2), 1-7.
- Sakthivel, K., Manigundan, K., Sharma, S. K., Singh, R., Das, M., Devi, V., Gautam, R. K., Nakkeeran, S. & Kumar, A. 2023. Diversity of Antimicrobial Peptide Genes in *Bacillus* from the Andaman and Nicobar Islands: Untapped Island Microbial Diversity for Disease Management in Crop Plants. **Current Microbiology**, 80(1), 45.
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A. & Sarubbo, L. A. 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, 17(3), 401.
- Selim, Y. A., Azb, M. A., Ragab, I. & Abd El-Azim, M. H. 2020. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Deverra tortuosa* and their Cytotoxic Activities. **Scientific Reports**, 10(1), 1-9.
- Shafi, J., Tian, H. & Ji, M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 31(3), 446-459.
- Shalini, D., Benson, A., Gomathi, R., Henry, A. J., Jerritta, S. & Joe, M. M. 2017. Isolation, characterization of glycolipid type biosurfactant from endophytic *Acinetobacter*

- sp. ACMS25 and evaluation of its biocontrol efficiency against *Xanthomonas oryzae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 11, 252-258.
- Shu-Bin, L., Mao, F., Ren-Chao, Z. & Juan, H. 2012. Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*-Induced blight of Anthurium. **Biological control**, 63(1), 9-16.
- Sillen, W. M., Thijs, S., Abbamondi, G. R., Janssen, J., Weyens, N., White, J. C. & Vangronsveld, J. 2015. Effects of silver nanoparticles on soil microorganisms and maize biomass are linked in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, 91, 14-22.
- Syahriansyah, U. K. M. & Hamzah, A. 2016. Determination of optimum conditions and stability study of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* UKMP-4M5. **Malaysian J. Anal. Sci**, 20(5), 986-1000.
- Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G. & Zuberer, D. A. 2005. **Principles and applications of soil microbiology**. Pearson.
- Thavasi, R., Sharma, S. & Jayalakshmi, S. 2011. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. **J Pet Environ Biotechnol S**, 1(2).
- U, V. J., Nargund, V. B., Patil, R. R. & Vanti, G. L. 2022. *Bacillus* sp. extract used to fabricate ZnO nanoparticles for their antagonist effect against phytopathogens. **BioMetals**, 35(6), 1255-1269.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S. & Boyce, A. N. 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A Review. **Molecules**, 21(5), 573.
- Vinidkumar, S., Nakkeeran, S., Renukadevi, P. & Malathi, V. G. 2017. Biocontrol potentials of antimicrobial peptide producing *Bacillus* species: multifaceted antagonists for the management of stem rot of carnation caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in microbiology**, 8, 446.
- Walter, V., Sylatk, C. & Hausmann, R. 2010. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganism. **Biosurfactant**, 1-13.
- Wang, C., Kim, Y. J., Singh, P., Mathiyalagan, R., Jin, Y. & Yang, D. C. 2016. Green synthesis

- of silver nanoparticles by *Bacillus methylotrophicus*, and their antimicrobial activity. **Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, 44(4), 1127-1132.
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R. & Gao, X. 2015. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. **Scientific reports**, 5(1), 12975.
- Xie, S., Zang, H., Wu, H., Rajer, F. U. & Gao, X. 2016. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular Plant Pathology**, 19(1), 49-58.
- Yasmin, S., Hafeez, F. Y., Mirza, M. S., Rasul, M., Arshad, H. M. I., Zubair, M. & Iqbal, M. 2017. Biocontrol of bacterial leaf blight of rice and profiling of secondary metabolites produced by rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* BRp3. **Frontiers in Microbiology**, 8, 1895.
- Ye, M., Tang, X., Yang, R., Zhang, H., Li, F., Tao, F., Li, F. & Wang, Z. 2018. Characteristics and application of a novel species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. **ACS Chemical Biology**, 13(3), 500-505.
- Yu, F., Shen, Y., Qin, Y., Pang, Y., Fan, H., Peng, J., Pei, X. & Liu, X. 2022. Isolation and purification of antibacterial lipopeptides from *Bacillus velezensis* YA215 isolated from sea mangroves. **Frontiers in Nutrition**, 9.
- Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W. & Gurunathan, S. 2016. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, 17(9), 1534.
- Zhang, Y., Zhao, M., Chen, W., Yu, H., Jia, W., Pan, H. & Zhang, X. 2022. Multi-Omics techniques for analysis antifungal mechanisms of lipopeptides produced by *Bacillus velezensis* GS-1 against *Magnaporthe oryzae* in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(7), 3762.
- Zhou, J., Xie, Y., Liao, Y., Li, X., Li, Y., Li, S., Ma, X., Lei, S., Lin, F., Jiang, W. & Yong-Qiang. 2022. Characterization of a *Bacillus velezensis* strain isolated from *Bolbostemmatis Rhizoma* displaying strong antagonistic activities against a variety of rice pathogens. **Frontiers in Microbiology**, 13.
- Zouari, I., Jlaiel, L., Tounsi, S. & Trigui, M. 2016. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and

- purification of its bioactive compounds. **Biological Control**, 100, 54-62.
- กรมการข้าว. 2560. รายงานประจำปี กรมการข้าว 2560. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.  
กองวิจัยและพัฒนากรมการข้าว. (2559). โรคข้าวและการป้องกันกำจัด.[ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา  
<http://www.ricethailand.go.th/rkb3 / title-index.php-file=content.php&id=1 1 2 - 1.htm>.
- กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย. (2562). สถานการณ์การระบาดของศัตรูข้าว. [ระบบ  
ออนไลน์]. แหล่งที่มา [http://www.ppsf.doae.go.th/wordpress/wp-content/uploads/2020/02/2562\\_12\\_11\\_SUMRice\\_pest.pdf](http://www.ppsf.doae.go.th/wordpress/wp-content/uploads/2020/02/2562_12_11_SUMRice_pest.pdf).
- ชลิตา เล็กสมบูรณ์. 2554. โรคพืชและการวินิจฉัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 269  
ดารา เจตนะจิตร, นงรัตน์ นิลพานิชย์, พากเพียร อรัญนารถ, วิชิต ศิริสันธนะ, วิชชุดา รัตนกาญจน์, รัศมี  
ฐิติเกียรติพงศ์, วันชัย โรจนหัสติน และธัญลักษณ์ อารยาพันธ์. 2550. โรคข้าวและการป้องกัน  
กำจัด. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตร แห่งประเทศไทย จำกัด.
- ดาริกา อวะภาค, นพรัตน์ มะเห และคลฤติ พิชัยรัตน์. 2013. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพอลิ  
แซ็กคาไรด์จากสารห่วยผมนาง โดยใช้วิธีฟื้นผิวตอบสนอง. *KKU Science Journal*, 41(2),  
414-430.
- เนตรนภา ชชนะ, เบญญา เทพชนะ, และเบญจมาศ, หนูแป้น. 2562. การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน  
จากเกสรบัวหลวงด้วยวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม. การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัย  
ทักษิณ ครั้งที่ 29, 1183-1190
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ และวิณา เมฆวัฒนากาญจน์. 2559. โรคไหม้ของข้าว. พิมพ์ครั้งที่ 2. วัน  
ไอ กราฟฟิก.
- วชิร ยอดทอง, ธนากร คำภีระ, ญัฐกานต์วดี คำภีระแปง และทะนงศักดิ์ สัสดีแพง. 2561. การ  
สังเคราะห์ทองแดงขนาดอนุภาคนาโนโดยใช้สารสกัดพืชเป็นตัวยึดเพื่อใช้กำจัดสีกองโกเรด.  
247-256.
- ศรียาญจนา คล้ายเรือง, นพมณี โทปุญญานนท์, ปิยะนุช เนียมทรัพย์, ฉัตรชฎา กันทะเรียน และ  
พูนพัฒน์ พูนน้อย 2560. การผลิตเอนไซม์แอล-แอสพาราจินิกเนสของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์  
จากข้าวที่เพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว. การประชุมวิชาการระดับชาติ "มศว  
วิจัย" ครั้งที่ 9, 567-573
- สมคิด ดิสถาพร. (2554). สารเคมีคลุกหรือแช่เมล็ดข้าวเพื่อการป้องกันกำจัดโรค. กองโรคพืชและจุล  
ชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- สุเมธา สุวรรณบูรณ์. 2550. การเตรียมอนุภาคนาโนของสังกะสีออกไซด์ด้วยวิธีการบดและการ



ตกตะกอน. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 35(4), 215-221.





ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**  
**สูตรอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์**

Ashby's Mannitol Agar

Ashby's Mannitol Agar	40.7	g/L
-----------------------	------	-----

Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)

Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar	31.63	g/L
--	-------	-----

Nutrient Glucose Agar (NGA)

Nutrient broth	13	g/L
----------------	----	-----

Glucose	5	g/L
---------	---	-----

Agar	15	g/L
------	----	-----

Nutrient Glucose Broth (NGB)

Nutrient broth	13	g/L
----------------	----	-----

Glucose	5	g/L
---------	---	-----

Plate Count Agar

Tryptone Type-1 (Casitose Type-I)	5	g/L
-----------------------------------	---	-----

yeast extract	2.5	g/L
---------------	-----	-----

Glucose	1	g/L
---------	---	-----

Agar	15	g/L
------	----	-----

Phosphate Agar

Pikovskaya's Broth	16.3	g/L
--------------------	------	-----

Agar	15	g/L
------	----	-----

## Soyabean Casein Digest Medium หรือ Tryptone Soya Agar (TSA)

Tryptone Soya broth	30	g/L
Agar	15	g/L

## Soyabean Casein Digest Medium/Tryptone Soya broth (TSB)

Tryptone Soya broth	30	g/L
---------------------	----	-----

## Medium optimal of lipopeptide production (MOLP)

glucose	20	g/L
NH <sub>4</sub> Cl	3	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.5	g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	g/L
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.5	μM/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.04	mM/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	mM/L
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02	mM/L
yeast extract	0.5	g/L

## Modified Potato Dextrose Agar (MPDA)

Peptone	5	g/L
Tryptone Type-1 (Casitose Type-I)	5	g/L
Potato Dextrose Broth	24	g/L
Agar	15	g/L

**ภาคผนวก ข**  
**รายชื่อเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา**

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* และ กลุ่มที่เกี่ยวข้อง ซึ่งแยกได้จากไลเคน จำนวน 79 ไอโซเลตที่แยกได้จากไลเคน *Parmotrema* sp. (ศรียาญญาและคณะ, 2560)

ตารางที่ 20 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อไอโซเลต	ชนิดของแบคทีเรียที่จำแนกได้	Accession no.	%homology
LC1	<i>Bacillus velezensis</i>	KY084550	100
LC2	<i>Bacillus velezensis</i>	KY084550	100
LC3	<i>Bacillus safensis</i>	KY174336	100
LC5	<i>Bacillus megaterium</i>	KX158859	100
LC6	<i>Bacillus aryabhatai</i>	KY098769	100
LC8	<i>Bacillus megaterium</i>	KX061100	100
LC9	<i>Bacillus megaterium</i>	KX061100	100
LC10	<i>Bacillus safensis</i>	KY174336	100
LC11	<i>Bacillus pumilus</i>	KY078801	100
LC12	<i>Bacillus safensis</i>	KY174336	100
LC13	<i>Bacillus pumilus</i>	KY078801	100
LC14	<i>Bacillus</i> sp.	KX021847	100
LC16	<i>Lysinibacillus</i> sp.	GU645030.1	99
LC18	<i>Paenibacillus</i> sp.	KR514535.1	99
LC19	<i>Bacillus velezensis</i>	CP014990	100
LC20	<i>Bacillus</i> sp.	KY203855	100
LC23	<i>Bacillus</i> sp.	AB243835	100
LC24	<i>Bacillus megaterium</i>	FJ174605	99
LC25	<i>Lysinibacillus macroides</i>	MF170826	100
LC27	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	KY435698	99
LC28	<i>Bacillus pumilus</i>	KU962124	100



ตารางที่ 20 (ต่อ)

ชื่อไอโซเลต	ชนิดของแบคทีเรียที่จำแนกได้	Accession no.	%homology
LC29	<i>Bacillus</i> sp.	KY203855	100
LC30	<i>Bacillus siamensis</i>	KY218896	100
LC33	<i>Bacillus velezensis</i>	CP014990	100
LC33.1	<i>Bacillus velezensis</i>	MT649755	100
LC40	<i>Lysinibacillus macroides</i>	MF170826	99
LC41	<i>Lysinibacillus macroides</i>	HG326429.1	99
LC43	<i>Bacillus</i> sp.	KP119610	99
LC46	<i>Lysinibacillus macroides</i>	MK942418	100
LC49	<i>Oceanobacillus sojae strain Y27</i>	NR_112845.1	99
LC56	<i>Bacillus megaterium</i>	KX061100	100
LC060	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX447652	99
LC62	<i>Bacillus pumilus</i>	KU962124	100
LC67	<i>Bacillus megaterium strain H2</i>	JQ579631.1	99
LC70	<i>Bacillus velezensis</i>	KX673635	99
LC71	<i>Bacillus pumilus</i>	CP012330	99
LC72	<i>Bacillus altitudinis</i>	KX023240	100
LC78	<i>Bacillus aryabhattai</i>	MT605509	100
LC89	<i>Bacillus pumilus</i>	KR010180	99
LC90	<i>Bacillus pumilus</i>	KT986126	99
LC91	<i>Bacillus pumilus</i>	CP012330	99
LC92	<i>Bacillus pumilus</i>	CP012330	100
LC93	<i>Bacillus safensis</i>	KX694275	98
LC96	<i>Bacillus pumilus</i>	KC355253	99

## ตารางที่ 20 (ต่อ)

ชื่อไอโซเลต	ชนิดของแบคทีเรียที่จำแนกได้	Accession no.	%homology
LC97	<i>Bacillus pumilus</i>	KC355253	99
LC98	<i>Bacillus safensis</i>	CP012330	99
LC99	<i>Bacillus safensis</i>	KY174336	100
LC100	<i>Bacillus pumilus</i>	KY078801	100
LC101	<i>Bacillus pumilus</i>	KX426046	100
LC107	<i>Bacillus invictae</i>	KT719707	100
LC110	<i>Bacillus megaterium</i>	KC414697	99
LC113	<i>Bacillus pumilus</i>	CP012330	100
LC114	<i>Bacillus megaterium</i>	KX350034	99.6
LC115	<i>Bacillus megaterium</i>	KX350034	99
LC116.1	<i>Bacillus flexus strain</i>	MT299668	100
LC120	<i>Bacillus megaterium</i>	KX061100	100
LC121	<i>Bacillus pumilus</i>	KJ870186	97
LC122	<i>Bacillus altitudinis</i>	KX023239	100
LC123	<i>Bacillus sp.</i>	KU866186	98
LC124	<i>Bacillus pumilus</i>	KU962124	100
LC125	<i>Bacillus sp.</i>	KY203855.1	100
LC126	<i>Bacillus safensis</i>	KU955620	100
LC128	<i>Bacillus safensis</i>	KY174336	100
LC129	<i>Bacillus sp.</i>	KX021854	100
LC130	<i>Bacillus velezensis</i>	KY084550	100
LC131	<i>Bacillus pumilus</i>	KY078813.1	100
LC132	<i>Bacillus sp.</i>	AM396932	100

ตารางที่ 20 (ต่อ)

ชื่อไอโซเลต	ชนิดของแบคทีเรียที่จำแนกได้	Accession no.	%homology
LC136	<i>Bacillus megaterium</i>	CP045272	100
LC137	<i>Bacillus subtilis</i>	KU551183	100
LC142	<i>Bacillus safensis</i>	KY174336	100
LC144	<i>Bacillus</i> sp.	KX021854	100
LC145	<i>Bacillus</i> sp.	AM396932	100
LC146	<i>Bacillus pumilus</i>	KY078801	100
LC147	<i>Bacillus</i> sp.	KX021854	100
LC148	<i>Bacillus safensis</i>	KY174336	100
LC149	<i>Bacillus</i> sp.	KX021849	100
LC150	<i>Bacillus</i> sp.	AM396932	100
LC152	<i>Bacillus</i> sp.	KP296490	99
LC153	<i>Paenibacillus favisporus</i>	LC127090.1	100

## ภาคผนวก ค

### การวิเคราะห์เอนไซม์และกราฟมาตรฐาน

#### การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในดิน

- 1) นำตัวอย่างดินชั้นไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 mm
- 2) นำ moisture can ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะอบให้เปิดฝา
- 3) นำ moisture can ที่อบแล้ว ปิดฝาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น
- 4) ชั่งน้ำหนัก moisture can ด้วยเครื่องชั่ง บันทึกน้ำหนัก (W1)
- 5) ชั่งน้ำหนักดินประมาณ 5 g ใส่ moisture can บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน(W2)
- 6) นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง หรือข้ามคืน
- 7) นำออกจากตู้อบ ใส่ในโถดูดความชื้นเพื่อให้เย็นลง หลังจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักและบันทึกผล (W3)
- 8) คำนวณหาความชื้น

นำ moisture can พร้อมฝาปิดมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (W1) และชั่งดินใส่ลงใน moisture can 5 g โดยทำการชั่งน้ำหนักของดินรวมกับ moisture can พร้อมฝาปิดด้วย (W2) จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน เมื่อครบเวลาแล้วนำออกมาใส่โถดูดความชื้น พักให้อุณหภูมิเย็นลงและชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน (W3) จากนั้นทำการบันทึกข้อมูลและคำนวณหาความชื้นดังสมการที่ 6

$$(6) \quad \text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{W2 - W3}{W3 - W1} \times 100$$

โดย W1 คือ น้ำหนัก moisture can พร้อมฝา (g)

W2 คือ น้ำหนัก moisture can พร้อมฝาและน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (g)

W3 คือ น้ำหนัก moisture can พร้อมฝาและน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (g)

## การวิเคราะห์เอนไซม์ Dehydrogenase

สารละลายสำหรับการวิเคราะห์

### 1. Tris buffer pH7.8

- 1) ชั่ง Tris (hydroxy methyl) aminomethane 3.0275 g
- 2) ละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 150 ml
- 3) ปรับ pH ให้ได้ 7.8 (acetic soil)
- 4) ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 250 ml

### 2. 1% Triphenyl tetrazolium chloride (TTC)

### 3. Triphenyl formazan (TPF)

- 1) ชั่ง TPF 100 mg ละลายใน Absolute-Methanol ปริมาตร 80 ml
- 2) ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml จะได้ความเข้มข้น 1 mg/ml
- 3) ตูตสารละลาย TPF ที่ละลายใน Absolute-Methanol ปริมาตร 10 ml
- 4) ปรับปริมาตรด้วย Absolute-Methanol ปริมาตร 100 ml จะได้ความเข้มข้น 0.1 mg/ml เป็น working solution



### การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Dehydrogenase

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของ Triphenyl formazan (TPF)

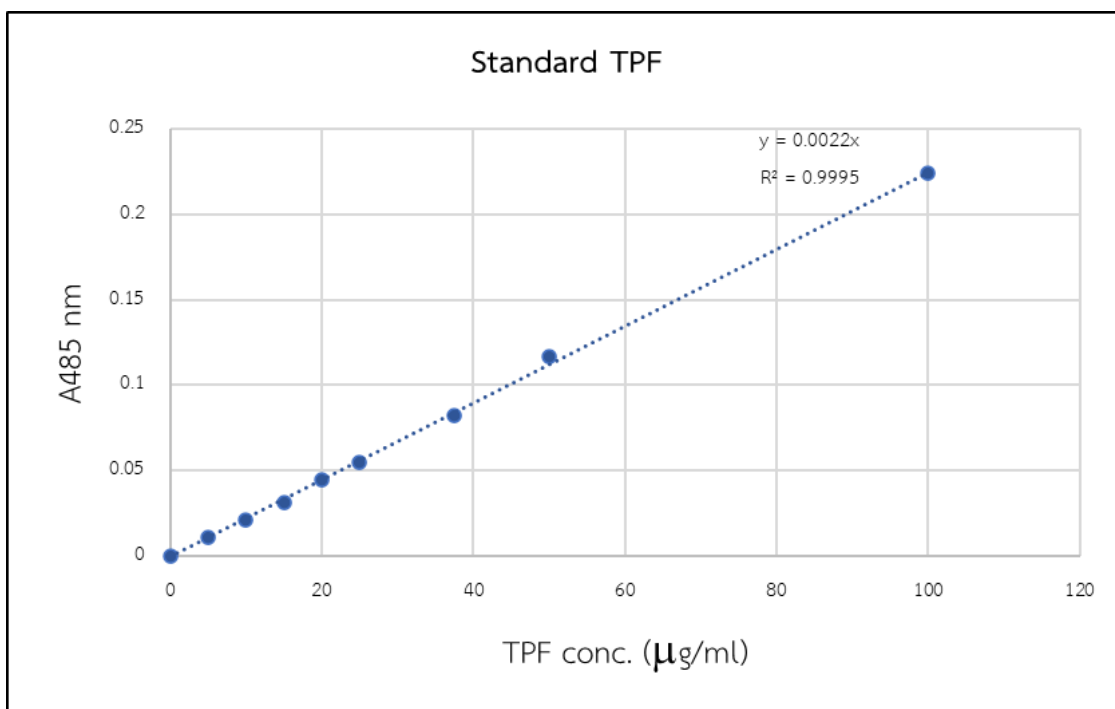
1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน TPF และ Absolute-Methanol ในปริมาณตามตาราง ลงในหลอดทดลองตามลำดับ

ตารางที่ 21 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ Triphenyl formazan (TPF)

TPF (ml)	MeOH (ml)	conc. TPF (mg/ml)
0.00	2	0
0.10	1	5
0.20	1.8	10
0.30	1.7	15
0.40	1.6	20
0.50	1.5	25
0.75	1.25	37.5
1.00	1	50
2.00	0	100
0.00	2	0
0.10	1	5
2.00	0	100

2. วัดค่า  $A_{485}$

3. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ TPF กับค่าการดูดกลืนแสง  $A_{485}$



ภาพที่ 37 กราฟมาตรฐานของ Triphenyl formazan (TPF) สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Dehydrogenase และค่า A<sub>485</sub>

#### วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Dehydrogenase

1. ชั่งตัวอย่างดินชั้น 2 g
2. เติมสารละลาย Substrate (1%TTC) ปริมาตร 2 ml โดย Blank จะเติม Tris buffer pH7.8 แทน Substrate ปริมาตร 2 ml
3. ผสมให้เข้ากันและบ่มในที่มืด 24 ชั่วโมง
4. เติม Absolute-Methanol ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากัน
5. ดูดส่วนใสมา Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm นาน 10 นาที
6. วัดค่า A<sub>485</sub>
7. เทียบหาความเข้มข้นของ TPF กับกราฟมาตรฐาน
8. คำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์

## การวิเคราะห์เอนไซม์ Phosphatase

สารละลายสำหรับการวิเคราะห์

### 1. Modified universal buffer (MUB) stock solution

Tris (pH10-11.5)	12.1 g
Maleic acid	11.6 g
Citric acid	14 g
Boric acid	6.3 g

ละลายส่วนผสมลงในสารละลาย 1M sodium hydroxide ปริมาตร 500 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 1 L เก็บไว้ในที่เย็น 4 องศาเซลเซียส

### 2. MUB pH6.5

นำ MUB stock solution ปริมาตร 200 ml มาปรับ pH ด้วยสารละลาย 0.1M hydrochloric acid ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 6.5 จากนั้นนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 1 L

### 3. MUB pH11

นำ MUB stock solution ปริมาตร 200 ml มาปรับ pH ด้วยสารละลาย 0.1M sodium hydroxide ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 11 จากนั้นนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 1 L

4. สารละลาย p-Nitrophenyl phosphate (PNPP) ความเข้มข้น 15 mM ใน MUB pH6.5 หรือ MUB pH11

5. สารละลาย 0.5M Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) ปริมาตร 250 ml

6. p-Nitrophenol (PNP)

### การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Phosphatase

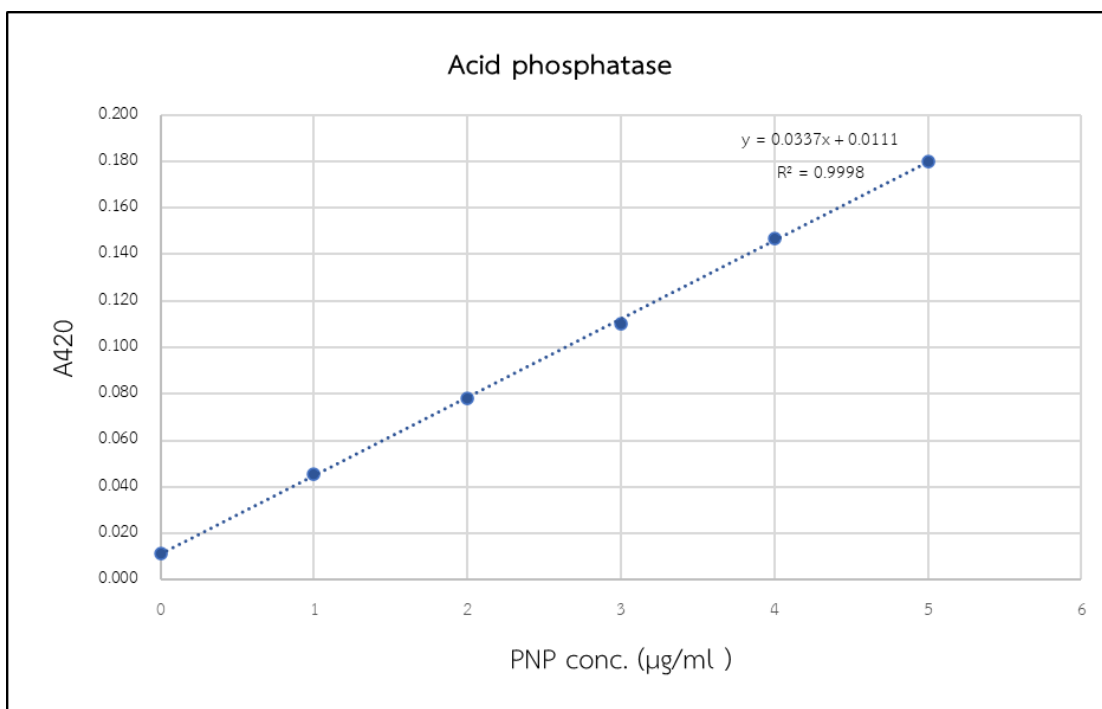
วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol (PNP)

1. เตรียมสารละลาย PNP ความเข้มข้น 1 mg/ml เป็น Stock solution จากนั้นนำมาเจือจางเป็น working solution ให้ได้ความเข้มข้น 10 µg/ml
2. นำ working solution ของ PNP ในปริมาณตามตาราง ลงในหลอดทดลองตามลำดับ

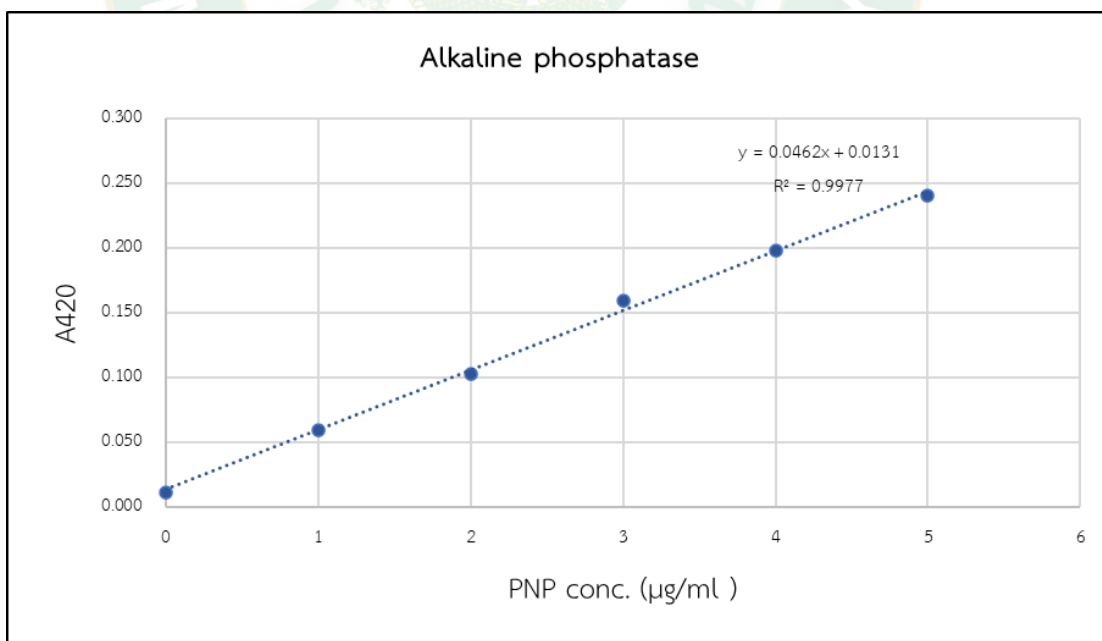
ตารางที่ 22 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol (PNP) สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Phosphatase

PNP (µl)	MUB pH6.5 (µl)	conc.(mg/ml)
0	2,500	0
250	2,250	1
500	2,000	2
750	1,750	3
1,000	1,500	4
1,250	1,250	5

3. นำมาเติมสารละลาย 0.5M CaCl<sub>2</sub> ปริมาตร 1 ml และสารละลาย 0.5M NaOH ปริมาตร 4 ml ผสมให้เข้ากัน
4. นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm นาน 5 นาที
5. นำส่วนใสไปวัดค่า A<sub>420</sub>



ภาพที่ 38 กราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol (PNP) สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Acid Phosphatase และค่า A<sub>420</sub>



ภาพที่ 39 กราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol (PNP) สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Alkaline Phosphatase และค่า A<sub>420</sub>



### วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Phosphatase

1. ชั่งตัวอย่างดินขึ้น 0.5 g ลงในหลอดทดลอง เติม Toluene 0.125 ml
2. เติมสารละลาย MUB pH6.5 หรือ MUB pH11 ปริมาตร 2 ml
3. เติมสารละลาย 15 mM PNPP ปริมาตร 0.5 ml
4. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
5. เติม 0.5M  $\text{CaCl}_2$  ปริมาตร 0.5 ml และ 0.5M NaOH ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน
6. นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm นาน 5 นาที
7. นำส่วนใสไปวัดค่า  $A_{420}$
8. นำค่าไปเทียบกราฟมาตรฐาน p-Nitrophenyl



## การวิเคราะห์เอนไซม์ Cellulase

สารละลายสำหรับการวิเคราะห์

1. 2M acetate buffer pH5.5
  - 1) ชั่ง Sodium acetate 164.08 g ละลายในน้ำปราศจากอ็อกซิเจน 700 ml
  - 2) ปรับ pH ให้ได้ 5.5 ด้วย glacial acetic acid และปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml
2. Carboxymethyl cellulose sodium salt solution (0.7%w/v)
  - 1) ชั่ง CMC 7 g ละลายในสารละลาย 2M acetate buffer pH5.5 ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml
  - 2) กวนโดยใช้ Hot plate stirrer ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
  - 3) สารละลายที่เตรียมได้ ใช้ได้ 1 สัปดาห์ โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. Reagent A
  - 1) ชั่ง anhydrous sodium carbonate ปริมาตร 16 g
  - 2) ชั่ง Potassium cyanide ปริมาตร 0.9 g
  - 3) ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากอ็อกซิเจนเป็น 1,000 ml
4. Reagent B
  - 1) ชั่ง Potassium ferric hexacyanide ปริมาตร 0.5 g
  - 2) ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 ml และเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา
5. Reagent C
  - 1) ชั่ง Ferric ammonium sulfate ปริมาตร 1.5 g
  - 2) ชั่ง Sodium dodecyl sulfate ปริมาตร 1 g
  - 3) เติม Sulfuric acid ปริมาตร 4.2 ml ที่ละลายในน้ำปราศจากอ็อกซิเจนและอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
  - 4) ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1,000 ml
6. สารละลายมาตรฐาน glucose
  - 1) ชั่ง glucose anhydrous 28 mg ละลายในน้ำปราศจากอ็อกซิเจน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml

## การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Cellulase

### วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐาน Glucose

- 1) ปิเปตสารละลาย glucose anhydrous ลงในหลอดทดลองปริมาตร ดังนี้ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 ml
- 2) ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ครบ 1 ml (ใส่น้ำก่อน glucose)
- 3) เติม Reagent A และ Reagent B ปริมาตร 1 ml ตามลำดับ
- 4) ผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 5) ย้ายมาตั้งทิ้งไว้ในน้ำอุณหภูมิห้องรอให้อุณหภูมิลงประมาณ 5 นาที
- 6) เติม Reagent C ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
- 7) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความเข้มข้นของแสงที่ 690 nm ( $A_{690}$ ) และนำไปทำกราฟมาตรฐาน Glucose

### การคำนวณ

Glucose equivalent ( $\mu\text{g/g dwf}_{24/\text{h}}$ )

แทนค่าในสูตร  $\frac{C \times V \times f}{S_w \times s_{w_f}}$

โดยที่

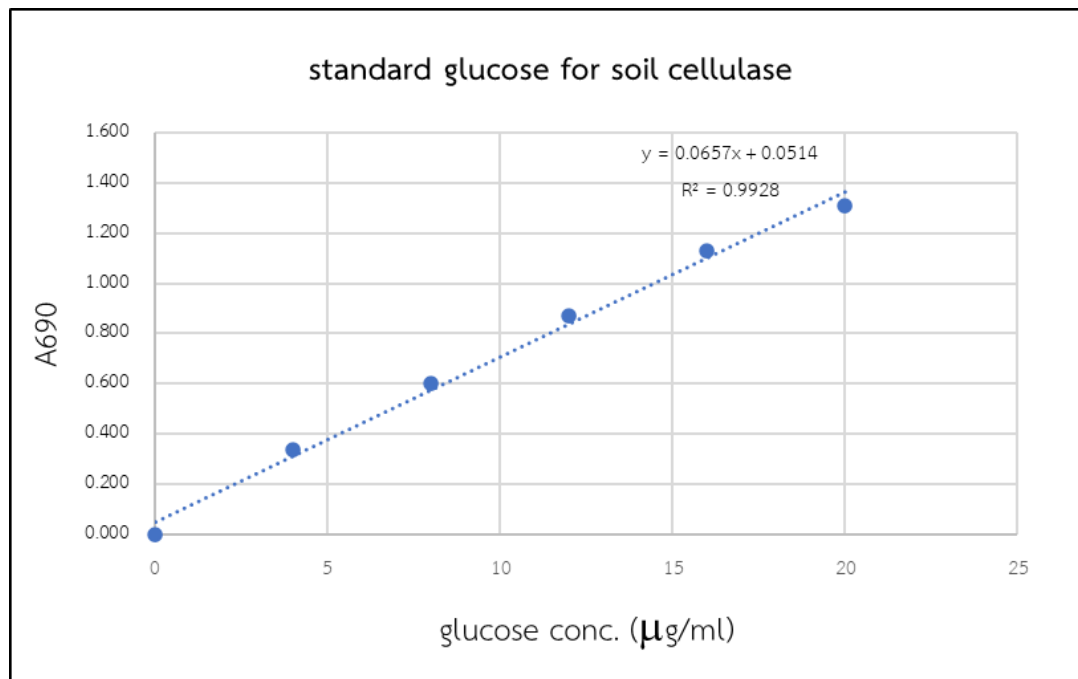
C คือ ความเข้มข้นของ Glucose ( $\mu\text{g/ml}$ )

V คือ ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ทดสอบ (15 ml)

f คือ dilution factor (20 ml)

$S_w$  คือ น้ำหนักดินชั้นที่ใช้ (5 g)

$s_{w_f}$  คือ น้ำหนักแห้งของตัวอย่างดิน 1 g



ภาพที่ 40 กราฟมาตรฐาน Glucose สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Cellulase และค่า A<sub>690</sub>

#### วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Cellulase

- 1) ชั่งตัวอย่างดินขึ้น 5 g ใส่ในขวดรูปชมพู่ 125 ml
- 2) เติมสารละลาย acetate buffer ปริมาตร 7.5 ml
- 3) เติมสารละลาย CMC ปริมาตร 7.5 ml
- 4) ปิด flask นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 5) กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 เพื่อแยกดินออกจากสารละลาย
- 6) ดูดสารละลายที่กรองแล้ว ปริมาตร 1 ml เจือจางด้วยน้ำปราศจากอิออน 20 ml
- 7) ปิเปตสารละลายที่เจือจางแล้ว 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง โดยที่ชุดควบคุมคือ ดินที่ไม่เติม CMC และ Blank ใช้ น้ำปราศจากอิออน
- 8) เติม Reagent A และ Reagent B ปริมาตร 1 ml ตามลำดับ ปิดฝาหลอด
- 9) ผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 10) ย้ายมาตั้งทิ้งไว้ในน้ำอุณหภูมิห้องรอให้อุณหภูมิลงประมาณ 5 นาที
- 11) เติม Reagent C ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
- 12) นำมาวัดค่า A<sub>690</sub> บันทึกผลเทียบกราฟมาตรฐาน Glucose

## การวิเคราะห์เอนไซม์ Protease

สารละลายสำหรับการวิเคราะห์

1) Tris buffer (0.2mM, pH8.1)

2) 2% sodium caseinate

ละลาย sodium caseinate 10 g ในสารละลาย 0.2 mM Tris buffer pH8.1 ปรับด้วยสารละลาย 1M NaOH ให้ได้ pH8.1 ปรับปริมาตรด้วย Tris buffer (0.2mM, pH8.1) เป็น 500 ml โดยขวดปรับปริมาตร

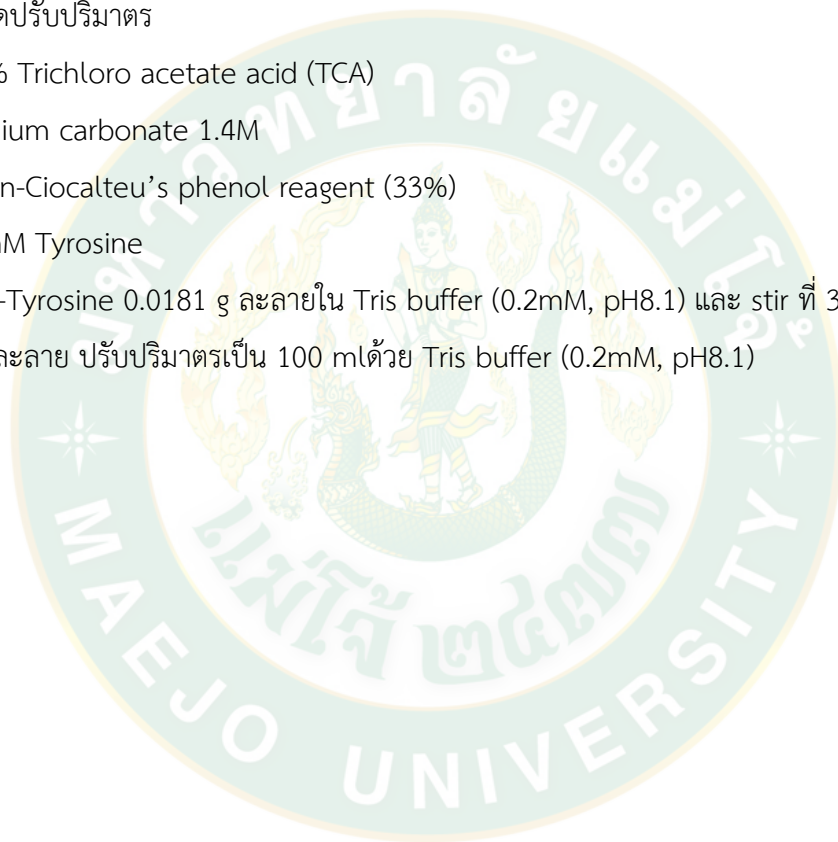
3) 10% Trichloro acetate acid (TCA)

4) Sodium carbonate 1.4M

5) Folin-Ciocalteu's phenol reagent (33%)

6) 1 mM Tyrosine

ชั่ง L-Tyrosine 0.0181 g ละลายใน Tris buffer (0.2mM, pH8.1) และ stir ที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้ละลาย ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย Tris buffer (0.2mM, pH8.1)





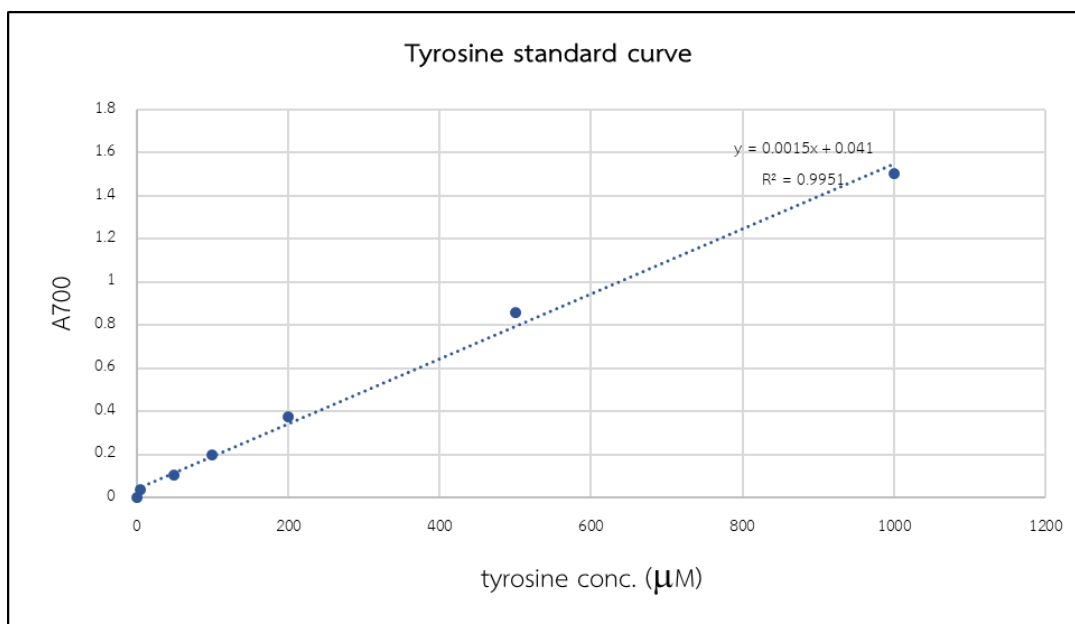
## การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Protease

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐาน Tyrosine

- 1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 1 mM Tyrosine และ 0.2 M Tris buffer ในปริมาณตามตาราง ลงในหลอดทดลองตามลำดับ
- 2) เตรียมสารละลาย 10% TCA ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน
- 3) นำไป Centrifuge ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 4) ดูดส่วนใสลงในหลอดทดลอง 0.5 ml
- 5) เติม 1.4M Sodium carbonate ปริมาตร 0.75 ml
- 6) Folin-Ciocalteu's phenol reagent (33%) ปริมาตร 0.25 ml ผสมให้เข้ากัน
- 7) ปั่นที่มีด 30 นาที
- 8) วัดการดูดกลืนแสงที่  $A_{700}$
- 9) สร้างกราฟสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น Tyrosine และ  $A_{700}$

ตารางการเตรียมกราฟมาตรฐาน Tyrosine

1 mM Tyrosine (ml)	0.2M Tris buffer (ml)
0	5
0.025	4.975
0.05	4.950
0.25	4.750
0.50	4.5
1	4
2.5	2.5
5	0



ภาพที่ 41 กราฟมาตรฐาน Tyrosine สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Protease และค่าการดูดกลืนแสง

ที่ A<sub>700</sub>

### วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Protease

- 1) ชั่งตัวอย่างดินชั้น 1 g
- 2) เติม Tris buffer (0.2 mM, pH 8.1) ปริมาตร 2.5 ml และสารละลาย 2% sodium caseinate ปริมาตร 2.5 ml ส่วนชุดควบคุมดิน เติม Tris buffer (0.2 mM, pH 8.1) ปริมาตร 5 ml และชุดควบคุมสารตั้งต้นไม่มีดิน เติม Tris buffer (0.2 mM, pH 8.1) ปริมาตร 2.5 ml และสารละลาย 2% sodium caseinate ปริมาตร 2.5 ml
- 3) เขย่าความเร็วรอบ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
- 4) เติม 10% TCA ปริมาตร 5 ml และผสมให้เข้ากัน
- 5) Centrifuge 12,000 rpm นาน 1 นาที
- 6) ดูดส่วนใสใส่ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 0.5 ml โดย Blank ใช้ Tris buffer (0.2 mM, pH 8.1)
- 7) เติม 1.4 M Sodium carbonate ปริมาตร 0.75 ml
- 8) Folin-Ciocalteu's phenol reagent reagent (33%) ปริมาตร 0.25 ml ผสมให้เข้ากัน
- 9) บ่มที่มืด 5 นาที
- 10) วัดการดูดกลืนแสงที่ A<sub>700</sub>



2. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติความกว้างของบริเวณยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี Agar well diffusion โดย Duncan's multiple range test

**clear\_zone\_diameter**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

LC	N	Subset			
		1	2	3	4
LC33.1	3	17.1333			
LC33	2		24.8000		
LC127	3			37.4333	
LC130	3			39.0333	39.0333
LC32	3			39.1333	39.1333
LC1	3			41.4000	41.4000
LC70	3			42.8000	42.8000
LC2	3				43.8667
LC19	3				43.9000
Sig.		1.000	1.000	.060	.090

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 8.325.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.842.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = 0.05.

3. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติความกว้างของเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia oryzae* โดย *Bacillus* จากวิธี Dual culture ด้วย Duncan's multiple range test

### ANOVA

percent\_inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3268.897	8	408.612	39.900	<.001
Within Groups	174.095	17	10.241		
Total	3442.991	25			

### percent\_inhibition

Duncan<sup>a,b</sup>

LC	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
LC130	3	24.6678				
LC19	3		33.1600			
LC33.1	3			49.3843		
LC67	3			51.6119	51.6119	
LC28	2			51.7110	51.7110	
LC70	3			52.9732	52.9732	52.9732
LC33	3				56.1908	56.1908
LC2	3				57.6759	57.6759
LC1	3					58.7897
Sig.		1.000	1.000	.236	.056	.061

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.842.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.



4. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia oryzae* โดย supernatant ของ *Bacillus* จากวิธี agar well assay ด้วย Duncan's multiple range test

### ANOVA

clear_zone					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1952.190	4	488.048	1056.295	<.001
Within Groups	4.158	9	.462		
Total	1956.349	13			

clear_zone			
Duncan <sup>a,b</sup>			
LC	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
LC33.1	2	17.8500	
LC33	3	19.0000	
LC28	3	19.2000	
LC2	3	19.2333	
LC19	3		47.6667
Sig.		.053	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.727.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

5. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติเปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำของเซลล์ ของ *B. velezensis* ด้วย Bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) assay ด้วย Duncan's multiple range test

### ANOVA

BATH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4114.682	6	685.780	71.093	<.001
Within Groups	135.048	14	9.646		
Total	4249.730	20			

### BATH

Duncan<sup>a</sup>

bacterial_strain	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
LC70	3	4.0967				
LC2	3	6.6400				
LC19	3	7.6833	7.6833			
LC33.1	3		12.5600			
LC33	3			18.2833		
LC130	3				27.0100	
LC1	3					46.8633
Sig.		.200	.075	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

6. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติเปอร์เซ็นต์กิจกรรมการเกิด E24 (Emulsification activity, E24) ของ *B. velezensis* โดยใช้ไขมันมะกอก ด้วย Duncan's multiple range test

### ANOVA

emulsion\_percent

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1213.851	9	134.872	9.883	<.001
Within Groups	136.466	10	13.647		
Total	1350.317	19			

### emulsion\_percent

Duncan<sup>a</sup>

LC	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
LC2	2	37.2950			
DW	2	38.1050			
TSB	2	38.6200			
LC33	2	38.9700			
LC33.1	2	39.5100			
LC130	2	41.7950			
LC70	2	43.1750	43.1750		
LC19	2		50.7900	50.7900	
LC1	2			51.9200	
0.5%SDS	2				62.4150
Sig.		.178	.066	.766	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

7. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติการทดสอบแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุกโตส และกลีเซอรอล โดยใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ ต่อ *B. velezensis* จำนวน 7 ไอโซเลต ด้วย Duncan's multiple range test

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
LC1_AW	Between Groups	1445.590	3	481.863	345.835	<.001
	Within Groups	11.147	8	1.393		
	Total	1456.737	11			
LC2_AW	Between Groups	709.247	3	236.416	20.095	<.001
	Within Groups	94.120	8	11.765		
	Total	803.367	11			
LC19_AW	Between Groups	259.857	3	86.619	15.678	.001
	Within Groups	44.200	8	5.525		
	Total	304.057	11			
LC33_AW	Between Groups	638.827	3	212.942	4.436	.048
	Within Groups	336.040	7	48.006		
	Total	974.867	10			
LC33.1_AW	Between Groups	361.323	3	120.441	4.136	.048
	Within Groups	232.947	8	29.118		
	Total	594.269	11			
LC70_AW	Between Groups	161.633	3	53.878	4.027	.051
	Within Groups	107.027	8	13.378		
	Total	268.660	11			
LC130_AW	Between Groups	827.867	3	275.956	25.381	<.001
	Within Groups	86.980	8	10.872		
	Total	914.847	11			

**LC1\_AW**

Duncan<sup>a</sup>

C_source	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
sucrose	3	.0000		
fructose	3		18.7000	
glucose	3			25.8333
glycerol	3			27.8000
Sig.		1.000	1.000	.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**LC2\_AW**

Duncan<sup>a</sup>

C_source	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
sucrose	3	11.7333		
fructose	3	17.8333	17.8333	
glycerol	3		24.0667	
glucose	3			32.5000
Sig.		.061	.057	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**LC19\_AW**Duncan<sup>a</sup>

C_source	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
fructose	3	25.8333	
sucrose	3		33.5000
glycerol	3		36.4667
glucose	3		37.8667
Sig.		1.000	.061

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**LC33\_AW**Duncan<sup>a,b</sup>

C_source	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
glucose	3	7.7667	
sucrose	3	11.6667	
fructose	2	15.5000	15.5000
glycerol	3		27.2667
Sig.		.255	.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.667.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

**LC33.1\_AW**Duncan<sup>a</sup>

C_source	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
sucrose	3	21.4000	
fructose	3	22.9000	22.9000
glycerol	3		32.8000
glucose	3		33.3333
Sig.		.742	.053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**LC70\_AW**Duncan<sup>a</sup>

C_source	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
fructose	3	12.1667	
sucrose	3	15.4667	15.4667
glycerol	3		19.4333
glucose	3		21.7333
Sig.		.301	.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**LC130\_AW**Duncan<sup>a</sup>

C_source	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
fructose	3	24.4667	
sucrose	3		39.0667
glucose	3		44.3333
glycerol	3		45.2000
Sig.		1.000	.060

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

8. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ของเชื้อ *B. velezensis* LC19 และ LC130 ด้วย Duncan's multiple range test

### ANOVA

inhibition\_zone\_LC19N

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	447.343	3	149.114	6.597	.015
Within Groups	180.813	8	22.602		
Total	628.157	11			

### inhibition\_zone\_LC19N

Duncan<sup>a</sup>

N_sources_LC19	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ammonium sulfate	3	18.7667	
sodium nitrate	3		31.7667
ammonium nitrate	3		33.1000
ammonium chloride	3		33.5000
Sig.		1.000	.679

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### ANOVA

inhibition\_zone\_AWN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	789.260	3	263.087	3.503	.069
Within Groups	600.867	8	75.108		
Total	1390.127	11			



**inhibition\_zone\_AWN**Duncan<sup>a</sup>

N_sources_LC130	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
sodium nitrate	3	18.3333	
ammonium sulfate	3		35.4333
ammonium nitrate	3		35.8333
ammonium chloride	3		39.0667
Sig.		1.000	.635

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



9. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีในการยับยั้ง แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วย Duncan's multiple range test และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี และค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง

### ANOVA

clear\_zone\_diameter

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	321.545	13	24.734	2.982	.007
Within Groups	232.267	28	8.295		
Total	553.811	41			

### clear\_zone\_diameter

Duncan<sup>a</sup>

ZnO_ppm	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Bv130MOLP_1000	3	9.1333				
Bv130_01_1000	3	9.4667				
SK6511_01_1000	3	10.1000	10.1000			
Bv19_1000	3	10.3667	10.3667	10.3667		
SK6412_01_1000	3	11.1333	11.1333	11.1333	11.1333	
Bv30_01_1000	3	12.9667	12.9667	12.9667	12.9667	12.9667
Bv130MOLP_2000	3	13.0667	13.0667	13.0667	13.0667	13.0667
SK6412_01_2000	3	13.1333	13.1333	13.1333	13.1333	13.1333
SK6511_02_1000	3	14.0667	14.0667	14.0667	14.0667	14.0667
SK6511_01_2000	3		15.3667	15.3667	15.3667	15.3667
Bv130_01_2000	3		15.4667	15.4667	15.4667	15.4667
Bv30_01_2000	3			15.9333	15.9333	15.9333
SK6511_02_2000	3				16.5667	16.5667
Bv19_2000	3					18.2333
Sig.		.082	.059	.050	.056	.064

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### Correlations

		ZnO_conc	clear_zone_diameter
ZnO_conc	Pearson Correlation	1	.601**
	Sig. (2-tailed)		<.001
	N	42	42
clear_zone_diameter	Pearson Correlation	.601**	1
	Sig. (2-tailed)	<.001	
	N	42	42

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



10. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา  
ก่อโรคไหม้ *Pyricularia oryzae* ด้วย Duncan's multiple range test และวิเคราะห์ความสัมพันธ์  
ของความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ

### ANOVA

percent\_inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11438.747	14	817.053	62.530	<.001
Within Groups	391.997	30	13.067		
Total	11830.744	44			

### percent\_inhibition

Duncan<sup>a</sup>

ZnO_ppm	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
ZnO_0ppm	3	.1133						
SK6412_01_1250	3		43.0767					
SK6511_01_1250	3		46.9467	46.9467				
Bv130MOLP_1250	3			49.5500				
Bv19_1250	3			50.8833	50.8833			
SK6412_01_2500	3			52.0833	52.0833			
Bv30_01_1250	3				56.7567	56.7567		
SK6511_02_1250	3					58.5600	58.5600	
Bv130_01_1250	3					58.8900	58.8900	
Bv19_2500	3					61.8267	61.8267	61.8267
SK6511_01_2500	3					62.4267	62.4267	62.4267
SK6511_02_2500	3					63.0967	63.0967	63.0967
Bv130MOLP_2500	3						63.8300	63.8300
Bv30_01_2500	3							67.1667
Bv130_01_2500	3							67.1700
Sig.		1.000	.200	.121	.068	.067	.126	.121

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### Correlations

		ZnO_conc	percent_inhibition
ZnO_conc	Pearson Correlation	1	.784**
	Sig. (2-tailed)		<.001
	N	45	45
percent_inhibition	Pearson Correlation	.784**	1
	Sig. (2-tailed)	<.001	
	N	45	45

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



11. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติผลของการแช่เมล็ดข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2 กข 6 กข 23 และ ขาวดอกมะลิ 105 ในสารละลายอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสี ด้วย Duncan's multiple range test และความสัมพันธ์ของความเข้มข้นอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อการงอกของเมล็ด ความยาวราก และความสูงของยอดของข้าว

### 11.1 การงอกของเมล็ด

#### ANOVA

seed\_germination

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	76.889	11	6.990	3.069	.010
Within Groups	54.667	24	2.278		
Total	131.556	35			

#### seed\_germination

Duncan<sup>a</sup>

ZnO_rice_trt	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
105-0ppm	3	5.0000			
105-500ppm	3	6.0000	6.0000		
KD23-500ppm	3	7.0000	7.0000	7.0000	
KD23-1000ppm	3	7.0000	7.0000	7.0000	
105-1000ppm	3	7.0000	7.0000	7.0000	
KD23-0ppm	3	7.6667	7.6667	7.6667	7.6667
MJU2-0ppm	3		8.6667	8.6667	8.6667
KD6-500ppm	3		8.6667	8.6667	8.6667
MJU2-1000ppm	3			9.0000	9.0000
KD6-0ppm	3			9.0000	9.0000
MJU-500ppm	3			9.6667	9.6667
KD6-1000ppm	3				10.0000
Sig.		.066	.069	.074	.110

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



## 11.2 ความยาวราก

**ANOVA**

root\_lenght

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	48.666	11	4.424	2.172	.054
Within Groups	48.888	24	2.037		
Total	97.554	35			

**root\_lenght**Duncan<sup>a</sup>

ZnO_rice_trt	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MJU2-1000ppm	3	3.2200		
105-1000ppm	3	4.5833	4.5833	
KD23-500ppm	3	4.9367	4.9367	
KD6-500ppm	3	5.4367	5.4367	5.4367
KD6-1000ppm	3	5.6233	5.6233	5.6233
105-500ppm	3	5.6500	5.6500	5.6500
KD23-1000ppm	3	5.7100	5.7100	5.7100
MJU-500ppm	3	5.8733	5.8733	5.8733
105-0ppm	3		6.1633	6.1633
KD23-0ppm	3		6.7333	6.7333
MJU2-0ppm	3		6.9067	6.9067
KD6-0ppm	3			8.0267
Sig.		.059	.100	.066

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## 11.3 ความสูงของยอดของข้าว

**ANOVA**

shoot\_lenght

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30.128	11	2.739	7.811	<.001
Within Groups	8.416	24	.351		
Total	38.544	35			

**shoot\_lenght**Duncan<sup>a</sup>

ZnO_rice_trt	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
105-500ppm	3	2.2733			
105-1000ppm	3	3.1033			
KD23-1000ppm	3		4.1267		
105-0ppm	3		4.3967	4.3967	
KD23-0ppm	3		4.4333	4.4333	
KD23-500ppm	3		4.5467	4.5467	
MJU2-1000ppm	3		4.5733	4.5733	
KD6-1000ppm	3		4.8833	4.8833	4.8833
MJU2-0ppm	3		4.9467	4.9467	4.9467
MJU-500ppm	3		5.1500	5.1500	5.1500
KD6-0ppm	3			5.3800	5.3800
KD6-500ppm	3				5.7033
Sig.		.099	.078	.090	.141

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### Correlations

		seed_germination	shoot_lenght	root_lenght	ZnO_conc	rice_variety
seed_germination	Pearson Correlation	1	.375*	.049	.142	-.663**
	Sig. (2-tailed)		.024	.778	.407	<.001
	N	36	36	36	36	36
shoot_lenght	Pearson Correlation	.375*	1	.290	-.244	-.632**
	Sig. (2-tailed)	.024		.087	.152	<.001
	N	36	36	36	36	36
root_lenght	Pearson Correlation	.049	.290	1	-.539**	-.012
	Sig. (2-tailed)	.778	.087		<.001	.946
	N	36	36	36	36	36
ZnO_conc	Pearson Correlation	.142	-.244	-.539**	1	.000
	Sig. (2-tailed)	.407	.152	<.001		1.000
	N	36	36	36	36	36
rice_variety	Pearson Correlation	-.663**	-.632**	-.012	.000	1
	Sig. (2-tailed)	<.001	<.001	.946	1.000	
	N	36	36	36	36	36

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



12. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติผลการทดสอบอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อจุลินทรีย์ในดินด้วย Duncan's multiple range test

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
total_bacteria	Between Groups	235872121.2	3	78624040.40	2.735	.123
	Within Groups	201233333.3	7	28747619.05		
	Total	437105454.5	10			
P_solubilize	Between Groups	279610671.2	3	93203557.07	4.867	.039
	Within Groups	134058783.3	7	19151254.76		
	Total	413669454.5	10			
Azotobacter	Between Groups	16316022.73	3	5438674.242	6.144	.023
	Within Groups	6196250.000	7	885178.571		
	Total	22512272.73	10			
nonsymbiotic_N_fixation	Between Groups	216101666.7	3	72033888.89	4.367	.049
	Within Groups	115458333.3	7	16494047.62		
	Total	331560000.0	10			
yeast_mold	Between Groups	3170707.576	3	1056902.525	.934	.473
	Within Groups	7919583.333	7	1131369.048		
	Total	11090290.91	10			

**total\_bacteria**

Duncan<sup>a,b</sup>

soil_treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1000ppm	3	1.1367E+004	
0ppm	3	1.5333E+004	1.5333E+004
500ppm	3	2.0800E+004	2.0800E+004
initial_soil	2		2.3700E+004
Sig.		.092	.127

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.667.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

**yeast\_mold**

Duncan<sup>a,b</sup>

soil_treatment	N	Subset for alpha = 0.05
		1
0ppm	3	1.6333E+003
1000ppm	3	2.3000E+003
initial_soil	2	2.8550E+003
500ppm	3	2.9667E+003
Sig.		.213

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.667.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

**P\_solubilize**Duncan<sup>a,b</sup>

soil_treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0ppm	3	2.0167E+003	
500ppm	3	3.0833E+003	
1000ppm	3	3.1500E+003	
initial_soil	2		1.5765E+004
Sig.		.781	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.667.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

**Azotobacter**Duncan<sup>a,b</sup>

soil_treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0ppm	3	1.2167E+003	
1000ppm	3	1.8667E+003	
500ppm	3	2.3333E+003	
initial_soil	2		4.7750E+003
Sig.		.229	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

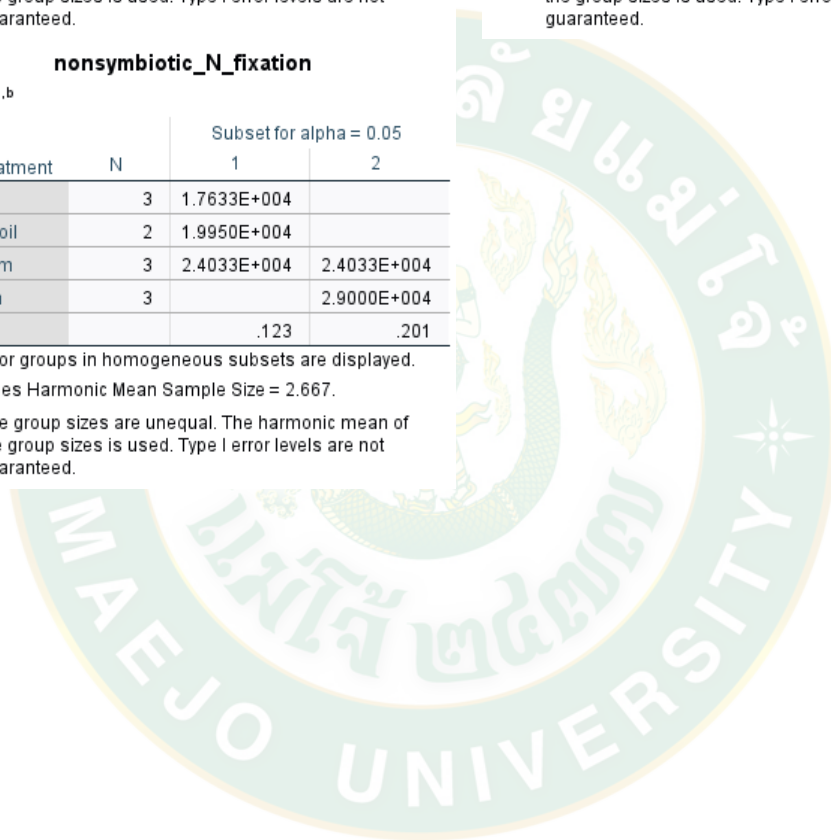
- Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.667.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

**nonsymbiotic\_N\_fixation**Duncan<sup>a,b</sup>

soil_treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0ppm	3	1.7633E+004	
initial_soil	2	1.9950E+004	
1000ppm	3	2.4033E+004	2.4033E+004
500ppm	3		2.9000E+004
Sig.		.123	.201

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.667.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.



13. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อรา และยีสต์ และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระในดินทั้ง Azotobacter และ Non-symbiotic Nitrogen fixation

		<b>Correlations</b>					
		total_bacteria	P_solubilize	Azotobacter	nonsymbiotic_N_fixation	yeast_mold	ZnO_concentration
total_bacteria	Pearson Correlation	1	.204	.360	-.027	.386	-.429
	Sig. (2-tailed)		.547	.277	.938	.240	.188
	N	11	11	11	11	11	11
P_solubilize	Pearson Correlation	.204	1	.899**	-.057	.531	-.318
	Sig. (2-tailed)	.547		<.001	.867	.093	.340
	N	11	11	11	11	11	11
Azotobacter	Pearson Correlation	.360	.899**	1	.159	.579	-.222
	Sig. (2-tailed)	.277	<.001		.641	.062	.512
	N	11	11	11	11	11	11
nonsymbiotic_N_fixation	Pearson Correlation	-.027	-.057	.159	1	.496	.499
	Sig. (2-tailed)	.938	.867	.641		.121	.118
	N	11	11	11	11	11	11
yeast_mold	Pearson Correlation	.386	.531	.579	.496	1	.119
	Sig. (2-tailed)	.240	.093	.062	.121		.728
	N	11	11	11	11	11	11
ZnO_concentration	Pearson Correlation	-.429	-.318	-.222	.499	.119	1
	Sig. (2-tailed)	.188	.340	.512	.118	.728	
	N	11	11	11	11	11	11

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).





14. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติผลของอนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีต่อเอนไซม์ในดิน  
ด้วยTukey's HSD ( honestly significant difference) test

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
dehydrogenase	Between Groups	1731.642	5	346.328	5.077	.010
	Within Groups	818.585	12	68.215		
	Total	2550.227	17			
alkaline_phosphatase	Between Groups	51.240	5	10.248	3.622	.031
	Within Groups	33.949	12	2.829		
	Total	85.189	17			
acid_phosphatase	Between Groups	137.321	5	27.464	2.219	.120
	Within Groups	148.512	12	12.376		
	Total	285.834	17			
cellulase	Between Groups	16.257	5	3.251	12.136	<.001
	Within Groups	3.215	12	.268		
	Total	19.472	17			
protease	Between Groups	203944.741	5	40788.948	18.170	.001
	Within Groups	13469.333	6	2244.889		
	Total	217414.074	11			

**dehydrogenase**

Tukey HSD<sup>a</sup>

ZnO_treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
CT3	3	44.0900	
TRT2	3	45.9067	
TRT1	3	46.3600	
CT1	3	50.0033	50.0033
TRT3	3	63.0300	63.0300
CT2	3		70.1533
Sig.		.123	.092

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**alkaline\_phosphatase**

Tukey HSD<sup>a</sup>

ZnO_treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
TRT2	3	96.4894	
TRT1	3	99.8083	99.8083
TRT3	3	100.4886	100.4886
CT1	3	100.5710	100.5710
CT2	3	100.9421	100.9421
CT3	3		101.8079
Sig.		.061	.696

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**acid\_phosphatase**Tukey HSD<sup>a</sup>

ZnO_treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
CT1	3	117.6120	
TRT3	3	118.0359	
TRT1	3	120.0424	
CT3	3	121.3141	
CT2	3	121.3989	
TRT2	3	125.9771	
Sig.			.104

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**cellulase**Tukey HSD<sup>a</sup>

ZnO_treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
TRT2	3	4.2510	
TRT1	3	4.6230	
TRT3	3	5.2741	
CT1	3	5.6394	5.6394
CT3	3		6.6947
CT2	3		6.7658
Sig.		.057	.154

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

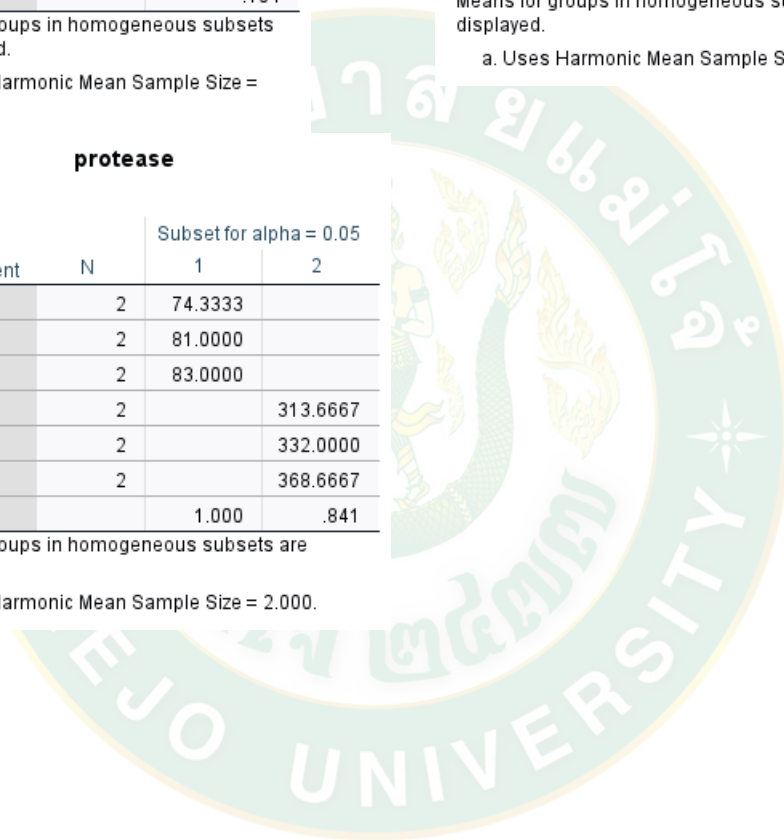
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**protease**Tukey HSD<sup>a</sup>

ZnO_treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
CT1	2	74.3333	
CT2	2	81.0000	
CT3	2	83.0000	
TRT1	2		313.6667
TRT2	2		332.0000
TRT3	2		368.6667
Sig.		1.000	.841

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.



## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวธัญชนก เอื้ออาจิน
เกิดเมื่อ	15 กุมภาพันธ์ 2542
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2556 – 2559 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสารภีพิทยาคม พ.ศ. 2560 - 2563 ปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการทำงาน	Gmail: aythanchanok@gmail.com

### ผลงานทางวิชาการและรางวัล

1. ธัญชนก เอื้ออาจิน วราภรณ์ แสงทอง ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และศรีกาญจนา คล้ายเรือง. 2564. ความสามารถด้านเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากลำต้นและเมล็ดข้าว. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏกลุ่มศรีอยุธยา ครั้งที่ 11 “งานวิจัยและนวัตกรรมเพื่อการพัฒนาชุมชนเชิงพื้นที่” วันที่ 15 กรกฎาคม 2564 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏราชชนครินทร์ อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา. หน้า 560-568.
2. ธัญชนก เอื้ออาจิน วราภรณ์ แสงทอง วิรันธชา เครือฟู ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และศรีกาญจนา คล้ายเรือง. 2564. กิจกรรมปฏิบัติการของแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes จากไลเคน *Parmotrema* และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. การประชุมวิชาการระดับชาติประจำปี 2564 “นวัตกรรมเกษตรอาหารและสุขภาพ” วันที่ 24-25 ธันวาคม 2564 ณ อาคารเรียนรวม 80 ปี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่. หน้า 1163-1173.
3. รางวัลการนำเสนอผลงานวิจัย ระดับชมเชย  
ธัญชนก เอื้ออาจิน ธัญวลัย อินปัญญา รังสิมา อัมพวัน ทิพย์สุดา ปุกมณี ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และ ศรีกาญจนา คล้ายเรือง. 2565. การปนเปื้อนแบคทีเรียในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะละกอและการยับยั้งการเจริญ

โดยสารฆ่าเชื้อและแบคทีเรียบราซิล. การประชุมวิชาการระดับชาติ  
วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและนวัตกรรม (มหาวิทยาลัยแม่โจ้) ครั้งที่ 3 วันที่  
17 มีนาคม 2565 รูปแบบการนำเสนองานออนไลน์ผ่านสื่ออิเล็กทรอนิกส์.  
หน้า 272-283.

