

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus velezensis* B49 และการยับยั้งราก่อโรคพืช



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF BIOSURFACTANT FROM *Bacillus velezensis* B49 AND INHIBITION OF
FUNGAL PLANT PATHOGENS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology and Microbial Technology

Department of Microbiology

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก <i>Bacillus velezensis</i> B49 และการยับยั้งราก่อโรคพืช
โดย	นายสิรภพ ภูมิภูติกุล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)	
.....	กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)	

สิริภาพ ภูมิภูติกุล : การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus velezensis* B49 และการยับยั้งราก่อโรคพืช. (PRODUCTION OF BIOSURFACTANT FROM *Bacillus velezensis* B49 AND INHIBITION OF FUNGAL PLANT PATHOGENS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ

ราก่อโรคพืชสามารถทำลายผลผลิตทางการเกษตรได้ทั่วโลก การใช้วิธีทางชีวภาพสามารถลดการใช้สารเคมีในการกำจัดราก่อโรคพืชได้ ราก่อโรคพืชที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ *Acremonium furcatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora palmivora* และ *Pyricularia oryzae* การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า *Bacillus velezensis* B49 สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช และสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. velezensis* B49 และทดสอบการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยใช้เทคนิคการขีดเชื้อและเทคนิคผสมน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. velezensis* B49 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชทั้ง 7 ชนิด ทดสอบสมบัติการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. velezensis* B49 โดยใช้ 4 วิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ การทดสอบการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเชื้อบนฟิล์มน้ำมัน, การทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดง, การทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน และการทดสอบการเกิดอิมัลชัน พบว่า *B. velezensis* B49 ให้ผลบวกกับทั้ง 4 วิธี ซึ่งยืนยันได้ว่า *B. velezensis* B49 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ การทดสอบผลของความเป็นกรดเบสที่มีต่อสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าที่ความเป็นกรดเบสระหว่าง pH 2 – 10 ทำให้เกิดอิมัลชันไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อความเป็นกรดเบสสูงขึ้น ส่งผลทำให้การเกิดอิมัลชันลดลงจนกระทั่งไม่เกิดอิมัลชันเลย ส่วนการทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. velezensis* B49 พบว่า อุณหภูมิไม่มีผลต่อสมบัติการเกิดอิมัลชัน การทดสอบผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหาร Mineral salt solution พบว่า *B. velezensis* B49 สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส, ฟรุกโทส และซูโครส ส่วนแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต อย่างไรก็ตาม อาหารสูตรสมบูรณ์ให้ผลการเกิดอิมัลชันสูงกว่า ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการเกิดอิมัลชันต่อเวลา พบว่า *B. velezensis* B49 มีการเจริญสูงสุดที่ประมาณ 24 ชั่วโมง และเกิดอิมัลชันที่มากที่สุดที่เวลา 18 – 24 ชั่วโมง จากการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ 2 วิธีที่แตกต่างกัน โดยวิธีแรกตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกแล้วสกัดด้วยเมทานอล และวิธีที่สองสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ละลายตะกอนที่ได้จากทั้งสองวิธีด้วยสารละลาย 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ หรือ 100% เอทานอล พบว่าผลการยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดหยาบจากเมทานอลที่ละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ และสารสกัดหยาบจากเมทานอลที่ละลายตะกอนในเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตต การวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้วิธีไฮเพอร์ฟอรัมซึลควิดโครมาโทกราฟี พบว่ารูปแบบโครมาโทแกรมของตัวอย่างสารสกัดหยาบทั้ง 4 ชนิด ในช่วงเวลาคงอยู่ที่ 5 ถึง 10 นาที มีความคล้ายคลึงกับสารมาตรฐานเซอร์แฟกทีน และสามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ ผลงานวิจัยนี้เสนอแนะได้ว่าสามารถใช้ *B. velezensis* B49 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียนี้ในการยับยั้งราก่อโรคพืชแทนการใช้สารเคมี เพื่อลดผลกระทบต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2562	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6072114423 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORD: Bacillus velezensis, Biocontrol, Biosurfactant, Fungal plant pathogen

Siraphop Pumiputikul : PRODUCTION OF BIOSURFACTANT FROM *Bacillus velezensis* B49 AND INHIBITION OF FUNGAL PLANT PATHOGENS. Advisor: Assoc. Prof. PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D. Co-advisor: Chompoonik Kanchanabanca, Ph.D.

Fungal plant pathogens can destroy agricultural products worldwide. Biological control is an alternative way to reduce the usage of chemical fungicides. The most common fungal plant pathogens include *Acrimonium furcatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora palmivora*, and *Pyricularia oryzae*. Previous study found that *Bacillus velezensis* B49 was able to inhibit the growth of fungal plant pathogens, and produce biosurfactant. The aims of this study were to optimize biosurfactant production by *B. velezensis* B49 and to test the inhibition of fungal plant pathogens by the biosurfactant. The results revealed that bacterial cells and cell-free supernatant were able to inhibit all seven species of plant pathogenic fungi. Biosurfactant production properties were tested using four different methods including drop collapse test, hemolytic activity test, oil displacement test, and emulsifier test. *B. velezensis* B49 gave positive results for all tested method confirming its ability to produce biosurfactant. The effects of pH and temperature on biosurfactant stability were tested. The result showed that, at pH 2 – 10, there was no effect on the emulsifier activity. However, at pH more than 10 the reduction or completely loss of emulsifier activity were observed. The effect of temperature on the emulsifier activity was also not detectable. The effect of carbon and nitrogen sources on biosurfactant production in Mineral salt solution medium revealed that *B. velezensis* B49 was able to grow in carbon sources such as glucose, fructose, and sucrose, and in nitrogen sources such as ammonium nitrate and ammonium sulfate. However, the complete medium gave a higher emulsifier activity. The study of time-course relationship between bacterial growth and emulsifier activity indicated that *B. velezensis* B49 produced the highest growth at around 24 hours, and the highest emulsion index at 18 – 24 hours culture. Biosurfactant was extracted by two different methods, acid precipitation followed by methanol extraction and ethyl acetate extraction. Crude extracts from both methods were each redissolved with 1 M Tris-HCl or absolute ethanol. The results showed that the methanol crude extracts both dissolved in 1 M Tris-HCl and absolute ethanol show higher fungal inhibition than those ethyl acetate crudes. High-performance liquid chromatography analysis of the four crude extracts at retention time between 5 to 10 minutes revealed similar chromatogram patterns to the surfactin standard. These fractions also retained antifungal activity. This study suggests the potential of using *B. velezensis* B49 and its biosurfactant in biological control against fungal plant pathogen alternative to the use of chemical fungicides with the aim to decrease the negative impact on users, consumers, and environment.

Field of Study:	Microbiology and Microbial Technology	Student's Signature
Academic Year:	2019	Advisor's Signature
		Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถบรรลุวัตถุประสงค์และสำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสาราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพิงคะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความรู้ และข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ตลอดการทำวิจัย อีกทั้งให้การช่วยเหลือในทุกอุปสรรคปัญหาในระหว่างการทำวิจัย และยังกรุณาแก้ไขตรวจทานและปรับปรุงเพิ่มเติมให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยจึง ขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชูลี ยมภักดี ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน และอาจารย์ ดร. ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและช่วยกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณทุนวิทยบัณฑิต จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนค่าเล่าเรียนในระหว่างการศึกษา ทุน ๙๐ ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่ให้การสนับสนุนเงินอุดหนุนในการทำวิจัย และขอบคุณโครงการแลกเปลี่ยนนักศึกษาระยะสั้น SSSV Program ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายและเปิดโอกาสให้ไปเรียนรู้ประสบการณ์การทำวิจัย ณ ประเทศญี่ปุ่น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความรู้ คำแนะนำและอำนวยความสะดวกให้การวิจัยราบรื่นและเป็นไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชกร ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ภายในห้องวิจัยของอาจารย์ ขอขอบคุณ ดร. สินีนาถ กันธิพรธรม นางสาวพัชราภรณ์ หุ่นดี และนายตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ สถานที่ และการให้คำปรึกษาแนะนำต่าง ๆ ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. รพีวรรณ โสวรรณปรีชา และนางสาวจุฑากาญจน์ นามสง่า ที่สอน ให้คำแนะนำ ให้กำลังใจ และเป็นพี่ปรึกษา ขอขอบคุณนางสาวสิริตา เสียมไหม ที่ให้คำปรึกษา ฝ่าฟันอุปสรรค และแก้ไขปัญหาลดตลอดการทำวิจัย รวมถึงทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวและเพื่อน ๆ ที่คอยสนับสนุน ช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาตลอดการศึกษา จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

สิรภพ ภูมิภูติกุล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ปิทธิรศน์วรรณกรรม	5
โรคพืช (plant pathology).....	5
ลักษณะอาการของโรคพืช (symptom).....	5
ราโรคพืชเศรษฐกิจ	6
การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ.....	10
กลไกการยับยั้งราโรคพืชของแบคทีเรีย.....	13
สารลดแรงตึงผิว.....	16
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	18
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการควบคุมโรคพืช.....	23
ปัจจัยด้านองค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	24
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	27
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	27
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จรูป.....	28
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	30

3.3.1	แบคทีเรีย	30
3.3.2	ราก่อโรคพืช	30
3.4	การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช	31
3.4.1	การทดสอบโดยใช้เทคนิคการขีดเชื้อ	31
3.4.2	การทดสอบโดยใช้เทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร	31
3.5	การทดสอบสมบัติการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>B. velezensis</i> B49	32
3.5.1	การทดสอบการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเชื้อบนหยดน้ำมัน (drop collapse test)	32
3.5.2	การทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดง (blood agar test)	32
3.5.3	การทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement test)	32
3.5.4	การทดสอบการเกิดอิมัลชัน (emulsification index)	33
3.6	การทดสอบผลของปัจจัยทางกายภาพที่มีต่อสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการยับยั้งราก่อโรคพืช	33
3.6.1	ผลของความเป็นกรดเบส	33
3.6.2	ผลของอุณหภูมิ	33
3.7	การทดสอบผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการยับยั้งราก่อโรคพืช	34
3.8	การแปรผันเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	35
3.9	การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	35
3.10	การวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	36
3.11	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย	36
3.11.1	การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจาก <i>B. velezensis</i> B49	36
3.11.2	การเพิ่มปริมาณเฮาส์คิปปิงยีน (housekeeping gene)	37
3.12	การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	40
บทที่ 4	ผลการทดลอง	41

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช	41
4.1.1 การทดสอบโดยใช้เทคนิคการฉีดเชื้อ	41
4.1.2 การทดสอบโดยใช้เทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร	41
4.2 การทดสอบสมบัติการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ <i>B. velezensis</i> B49	45
4.3 การทดสอบผลของปัจจัยทางกายภาพที่มีต่อสมบัติสารลดแรงดึงผิวชีวภาพและการยับยั้ง ราก่อโรคพืช	46
4.3.1 ผลของความเป็นกรดเบส	46
4.3.2 ผลของอุณหภูมิ	51
4.4 การทดสอบผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ	55
4.5 การแปรผันเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพและการยับยั้ง ราก่อโรคพืช	56
4.6 การสกัดสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ	62
4.7 การวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ	65
4.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย	69
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	71
บรรณานุกรม	79
ภาคผนวก	92
ภาคผนวก ก	93
ภาคผนวก ข	95
ภาคผนวก ค	97
ประวัติผู้เขียน	107

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 การควบคุมโรคพิษด้วยวิธีทางชีวภาพของแบคทีเรียในสกุล <i>Bacillus</i>	12
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ	14
ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สไพรมเมอร์ของเฮาส์คิปปิงยีน.....	38
ตารางที่ 4.1 การยับยั้งการเจริญของราโรคพิษโดยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร.....	42
ตารางที่ 4.2 สรุปการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพิษโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบส.....	50
ตารางที่ 4.3 สรุปการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพิษโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิ.....	55
ตารางที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของราโรคพิษจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดและละลายด้วยวิธีแตกต่างกัน.....	63

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 ลักษณะอาการของโรคพืช	5
รูปที่ 2.2 โรคเหี่ยวแห้งในพืชจำพวกอ้อย.....	7
รูปที่ 2.3 โรคแอนแทรคโนสในอะโวคาโดและสตรอเบอร์รี่.....	7
รูปที่ 2.4 โรคฝักเน่าในข้าวโพด.....	8
รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของพิวโมนิซินปี 1 และพิวโมนิซินปี 2	8
รูปที่ 2.6 โรครากเน่าในต้นถั่วชิกพี	9
รูปที่ 2.7 โรคใบไหม้ในข้าว	9
รูปที่ 2.8 โรคผลเน่าดำในโกโก้.....	10
รูปที่ 2.9 ภาพรวมของกลไกการยับยั้งราโรคพืชของแบคทีเรีย.....	15
รูปที่ 2.10 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวและการเกิดไมเซลล์ของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว	16
รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของอีเทอร์แพตตี้แอลกอฮอล์.....	17
รูปที่ 2.12 โครงสร้างทางเคมีของแอลคิลซิลเฟตแบบเส้นตรงกับแบบแตกกิ่ง	17
รูปที่ 2.13 โครงสร้างทางเคมีของเอสเทอร์ควอท	18
รูปที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของแอลคิลบีเทน	18
รูปที่ 2.15 โครงสร้างทางเคมีของแรมโนลิพิด.....	19
รูปที่ 2.16 โครงสร้างทางเคมีของทรีฮาลิลิพิด	20
รูปที่ 2.17 โครงสร้างทางเคมีของโซโฟโรลิพิด	20
รูปที่ 2.18 โครงสร้างทางเคมีของเซอร์แฟกทิน	21
รูปที่ 2.19 โครงสร้างทางเคมีของฟอสโฟลิพิด.....	22
รูปที่ 2.20 โครงสร้างทางเคมีของอิมัลชัน.....	22
รูปที่ 4.1 การทดสอบการยับยั้งราโดย <i>B. velezensis</i> B49 ด้วยเทคนิคการขีดเชื้อ.....	41

รูปที่ 4.2 การทดสอบการยับยั้ง <i>A. furcatum</i> โดย <i>B. velezensis</i> B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ.....	42
รูปที่ 4.3 การทดสอบการยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> โดย <i>B. velezensis</i> B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ.....	43
รูปที่ 4.4 การทดสอบการยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> โดย <i>B. velezensis</i> B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ	43
รูปที่ 4.5 การทดสอบการยับยั้ง <i>F. proliferatum</i> โดย <i>B. velezensis</i> B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ	43
รูปที่ 4.6 การทดสอบการยับยั้ง <i>F. solani</i> โดย <i>B. velezensis</i> B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ	44
รูปที่ 4.7 การทดสอบการยับยั้ง <i>P. palmivola</i> โดย <i>B. velezensis</i> B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ	44
รูปที่ 4.8 การทดสอบการยับยั้ง <i>P. oryzae</i> โดย <i>B. velezensis</i> B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ.....	44
รูปที่ 4.9 การทดสอบสมบัติการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>B. velezensis</i> B49	45
รูปที่ 4.10 การเกิดอิมัลชัน (E ₂₄) ที่ความเป็นกรดเบสตั้งแต่ 2 ถึง 14	46
รูปที่ 4.11 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 2	47
รูปที่ 4.12 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 4	47
รูปที่ 4.13 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 6	48
รูปที่ 4.14 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 8	48
รูปที่ 4.15 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 10	49

รูปที่ 4.16 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 12	12
.....	49
รูปที่ 4.17 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 14	14
.....	50
รูปที่ 4.18 การเกิดอิมัลชัน (E ₂₄) ของ <i>B. velezensis</i> B49 ที่อุณหภูมิ 20 ถึง 121 องศาเซลเซียส.	51
รูปที่ 4.19 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิ ที่ 20 องศาเซลเซียส	52
รูปที่ 4.20 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิ ที่ 40 องศาเซลเซียส	52
รูปที่ 4.21 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิ ที่ 60 องศาเซลเซียส	53
รูปที่ 4.22 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิ ที่ 80 องศาเซลเซียส	53
รูปที่ 4.23 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิ ที่ 100 องศาเซลเซียส	54
รูปที่ 4.24 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิ ที่ 121 องศาเซลเซียส	54
รูปที่ 4.25 การเกิดอิมัลชัน (E ₂₄) ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงของ <i>B. velezensis</i> B49 ในอาหารสูตรต่าง ๆ	56
รูปที่ 4.26 การเจริญและการเกิดอิมัลชัน (E ₂₄) ของ <i>B. velezensis</i> B49 เมื่อเลี้ยงในอาหาร LB ต่อเวลา	57
รูปที่ 4.27 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช <i>A. furcatum</i> ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง	58
รูปที่ 4.28 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช <i>C. gloeosporioides</i> ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง	58
รูปที่ 4.29 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช <i>F. moniliforme</i> ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง	59
รูปที่ 4.30 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช <i>F. proliferatum</i> ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง	60

รูปที่ 4.31 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *F. solani* ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง 60

รูปที่ 4.32 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *P. palmivora* ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง 61

รูปที่ 4.33 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *P. oryzae* ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง..... 61

รูปที่ 4.34 การเกิดอิมัลชันของสารสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์ที่มาจากวิธีการสกัด และการ
ละลายที่แตกต่างกัน 62

รูปที่ 4.35 โครมาโตแกรม HPLC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการสกัดและละลายด้วยวิธีต่าง ๆ
..... 65

รูปที่ 4.36 การยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum* ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC 66

รูปที่ 4.37 การยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC 66

รูปที่ 4.38 การยับยั้งการเจริญของ *F. moniliforme* ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC..... 67

รูปที่ 4.39 การยับยั้งการเจริญของ *F. proliferatum* ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC 67

รูปที่ 4.40 การยับยั้งการเจริญของ *F. solani* ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC 68

รูปที่ 4.41 การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC 68

รูปที่ 4.42 การยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC..... 69

รูปที่ 4.43 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของ
เฮาส์คิปปิงอิน 69

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันเกษตรกรมีการสูญเสียผลผลิตทางการเกษตรจากการระบาดของและการเข้าทำลายของราก่อโรคพืช ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรเสียหาย ส่งผลกระทบต่อรายได้ของเกษตรกร และส่งผลกระทบต่อขาดแคลนอาหารของประชากรโลก ซึ่งราก่อโรคพืชที่พบส่วนใหญ่ได้แก่ *Acremonium furcatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora palmivora* และ *Pyricularia grisea* โดย *A. furcatum* ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพืชทำให้พืชมีอาการเหี่ยวเฉาเห็นได้ชัดที่ใบหรือยอด โดยมีรายงานการก่อโรคของ *A. furcatum* ในพืชจำพวกอ้อยทำให้ผลผลิตของอ้อยลดลง (Viswanathan และคณะ, 2012) *C. gloeosporioides* เป็นราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส โดยเกิดอาการที่ใบ ลำต้น และผล มีลักษณะของอาการเป็นจุดทำให้เกิดแผลยุบตัว โดยมีรายงานการก่อโรคของ *C. gloeosporioides* ในพืชหลายชนิด เช่น มะละกอ มะม่วง และกล้วย โดยทำให้ผลไม้เหล่านี้เกิดความเสียหายระหว่างการเพาะปลูก หลังการเก็บเกี่ยว และในระหว่างเก็บรักษา (Zhou และคณะ, 2018) *F. moniliforme* และ *F. proliferatum* เป็นราที่ก่อให้เกิดโรคฝักเน่าในข้าวโพด ซึ่งราทั้งสองสายพันธุ์สามารถผลิตสารพิษจำพวกไมโคทอกซินชนิดฟูโมนิซินบี 1 (Velluti และคณะ, 2000) ซึ่งสารพิษชนิดนี้สามารถทำให้เกิดเนื้องอกในตับของหนู (Wang และคณะ, 1991) และยังเป็นพิษและสารก่อมะเร็งในน้ำและสุกรด้วย (Ross และคณะ, 1990) *F. solani* เป็นราที่ทำให้เกิดโรครากเน่าในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ถั่วลิสง ถั่วเหลือง และมะเขือเทศ เป็นต้น (Benhamou และ Thériault, 1992; Rojo และคณะ, 2007) *P. palmivora* ทำให้เกิดโรคผลเน่าดำในโกโก้ทำให้การผลิตฝักของโกโก้ลดลงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Hanada และคณะ, 2009) และ *P. grisea* เป็นราที่ก่อโรคใบไหม้ในพืชตระกูลข้าวทำให้เกิดความเสียหายทางการเกษตรและส่งผลกระทบต่ออาหารของประชากรโลก (Chen และคณะ, 2003) การใช้สารเคมีควบคุมราก่อโรคพืชมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น แมนโคเซบ, เมตาแลซิล และเทบูโคนาโซล เป็นต้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของคน ดังเช่นมีการรายงานว่า 1 μM แมนโคเซบ สามารถยับยั้งการสังเคราะห์สเตียรอยด์ที่เกี่ยวข้องกับการตกไข่ของเพศหญิงได้ 33 เปอร์เซ็นต์, 100 μM เทบูโคนาโซล ยับยั้งได้ 65 เปอร์เซ็นต์ และ 500 μM เมตาแลซิล ยับยั้งได้ 31 เปอร์เซ็นต์ (Atmaca และคณะ, 2018) ทั้งนี้สารเคมีควบคุมราก่อโรคพืชยังทำให้เกิดการดื้อยาของราก่อโรคพืชและเกิดการตกค้างของสารพิษในอาหารและสิ่งแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและผู้สัมผัสด้วย (Choi และคณะ, 2017)

โรคพืชที่เป็นปัญหาส่วนใหญ่เกิดจากการเข้าทำลายของราทำให้พืชผลทางการเกษตรเสียหาย และถูกทำลาย ทางเลือกหนึ่งเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีคือ การใช้การควบคุมทางชีวภาพโดยใช้ จุลินทรีย์ในสกุลต่าง ๆ เช่น *Pseudomonas* sp., *Lactobacillus* sp., *Trichoderma* sp. และ *Bacillus* sp. เพื่อควบคุมเชื้อก่อโรค ซึ่งจุลินทรีย์ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ *Bacillus* spp. ดังเช่นมีการ รายงานการใช้แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่แยกได้จากบริเวณรอบรากของมะเขือเทศในการยับยั้ง *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในต้นมะเขือเทศ ซึ่งแบคทีเรีย สามารถลดการระบาดได้ 36 เปอร์เซ็นต์ (Jangir และคณะ, 2018) มีงานวิจัยที่ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus velezensis* AR1 ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและโรคผลเน่าที่เข้าทำลายพืช สตรอเบอรี่ และมะม่วงที่เกิดจาก *Glomerella cingulate* หรืออีกชื่อคือ *C. gloeosporioides* ได้ 64 เปอร์เซ็นต์ (Regassa และคณะ, 2018) *B. velezensis* CC09 สามารถควบคุม *Blumeria graminis* ที่ทำให้เกิดโรคราแป้งในข้าวสาลีได้ 86 เปอร์เซ็นต์ (Cai และคณะ, 2017) ทั้งนี้ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ยังสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชได้อีกด้วย จากการรายงานของ Asari และคณะ (2016) ได้รายงานว่า *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5033 ผลิตสารอินทรีย์ระเหยง่ายจำพวกเมธิลไพราซีนและ 2,5-ไดเมธิลไพราซีนที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria brassicae* และ *Sclerotinia sclerotiorum* ได้

สารลดแรงตึงผิว (surfactant) เป็นของเหลวที่มีความสามารถลดแรงตึงผิวของของเหลว ช่วยให้การกระจายตัวได้ง่ายขึ้น และยังสามารถลดแรงยึดระหว่างผิวของของเหลวกับผิวของสารอื่นที่อาจ เป็นของแข็ง, ของเหลว และแก๊ส ซึ่งสารลดแรงตึงผิวมักเป็นสารอินทรีย์ที่มีสารประกอบที่เป็น แอมฟิพาธิค (amphipathic) (Mishra และคณะ, 2009) ที่ประกอบด้วยโมเลกุล 2 ส่วนคือ ส่วนที่มี ขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้ว (Pereira และคณะ, 2013) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารที่ผลิตได้จาก สิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ พืช และสัตว์ (Al-Wahaibi และคณะ, 2014) สามารถใช้ประโยชน์ได้หลาย อย่าง เช่น ใช้ในการแยกน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมออกได้และยังสามารถช่วยในกระบวนการ ย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ (Sharma และคณะ, 2018) นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิว ภายยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคพืช เช่น *Bacillus subtilis* RC 218 สามารถผลิตสารลดแรงตึง ผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Fusarium graminearum* ที่เป็นสาเหตุของโรครวงแห้งในข้าวสาลี (Palazzini และคณะ, 2016) มีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *B. amyloliquefaciens* และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสีย ไปใช้เพื่อ ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจำพวก *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Candida albicans* ได้ 90, 100 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Ndlovu และคณะ, 2017) ทั้งนี้ในการผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียให้ได้ผลผลิตสูง ต้องมีการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพื่อให้ได้ผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปริมาณที่มาก โดยมีการรายงานการปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของ *B. subtilis* 309 ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมอะซิเตต, โซเดียมซิติเรต, โซเดียมไนเตรต, ฟรุกโทส, กลีเซอรอล, กลูโคส, แลคโทส, สารสกัดจากเนื้อ, พาราฟฟิน, ซูโครส, ยูเรีย, ทริปโตน และสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งพบว่าแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ทำให้เกิดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงคือ สารสกัดจากยีสต์, ทริปโตน และสารสกัดจากเนื้อ โดยมีดัชนีการเกิดอิมัลชัน 52.7, 49.6 และ 47.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทั้งนี้ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Pereira และคณะ, 2013) มีการศึกษาภาวะความเป็นกรดเบสและอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น Tabatabaee และคณะ (2007) ได้ศึกษาภาวะความเป็นกรดเบสที่ 4.2 ถึง 9.2 ที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว โดย *Bacillus* sp. 3 สายพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดในการความเป็นกรดเบสต่างกัน คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 4 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดที่ความเป็นกรดเบสที่ 9.2, *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 5 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดที่ความเป็นกรดเบสที่ 4.2 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 30 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดที่ความเป็นกรดเบสที่ 5.2 และ 8.2 ทั้งนี้ Tabatabaee และคณะ (2005) ได้ศึกษาอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ 25 ถึง 50 องศาเซลเซียส โดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 4, 5 และ 30 ผลการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 4 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดที่ 25 องศาเซลเซียส และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 5 และ 30 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดที่ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ เวลาในการเลี้ยงเชื้อยังมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย เช่น Abushady และคณะ (2005) ได้ศึกษาเวลาในการเลี้ยง *B. subtilis* ที่ส่งผลต่อการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เวลา 24 ชั่วโมง ถึง 144 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ AB01335-1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และคงตัวไปจนถึงเวลา 144 ชั่วโมง เป็นต้น

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *B. velezensis* B49 สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้ 10 – 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าแบคทีเรียนี้สามารถก่อให้เกิดอิมัลชันในน้ำมันไซลิโนได้ 53 เปอร์เซ็นต์ (ขวัญธิดา โพพิฑูล, 2560) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. velezensis* B49 และทดสอบการยับยั้งราที่ก่อโรคพืชด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

ขั้นตอนการวิจัย

1. การเตรียมจุลินทรีย์
2. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรากล่อโรคพืช
3. การทดสอบการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ *B. velezensis* B49
4. การทดสอบผลของปัจจัยทางกายภาพที่มีต่อสมบัติของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพและการยับยั้งรากล่อโรคพืช
5. การทดสอบผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพและการยับยั้งรากล่อโรคพืช
6. การแปรผันเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ
7. การสกัดสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ
8. การวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ
9. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

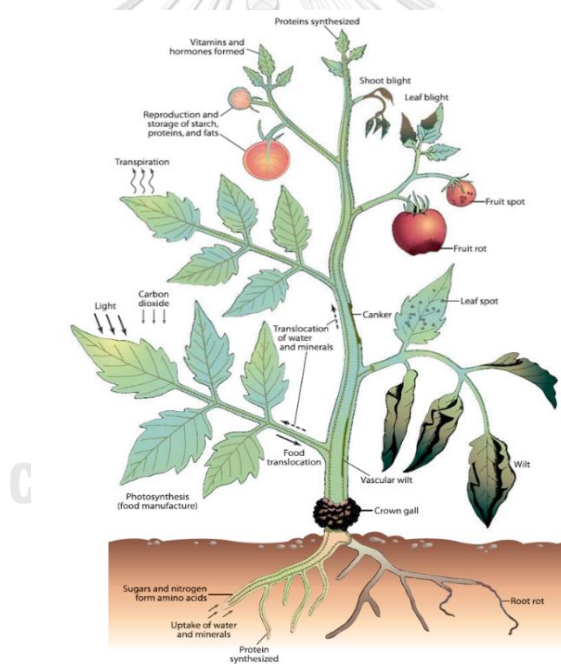


บทที่ 2

ปรีทรศน์วรรณกรรม

โรคพืช (plant pathology)

โรคพืช หมายถึง พืชที่มีลักษณะอาการเจริญเติบโตผิดปกติ และผลผลิตของพืชลดลง ซึ่งอาการเหล่านี้อาจเกิดขึ้นบนส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นพืชหรือเกิดขึ้นทั้งต้นของพืช ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืชแบ่งได้ 2 สาเหตุ โดยสาเหตุแรกมาจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ไวรัส, แบคทีเรีย, รา, สัตว์เซลล์เดียว และไส้เดือนฝอย เป็นต้น ที่สามารถแพร่ระบาดจาก ดิน เศษซากพืชที่เป็นโรค หรือสปอร์ของราในอากาศไปยังพืชปกติได้ ส่วนอีกสาเหตุหนึ่งมาจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย ได้แก่ การขาดหรือได้รับมากเกินไปของสารอาหาร ความชื้น แสง และเกิดจากสารพิษในอากาศหรือดิน เป็นต้น (Agrios, 2005) ลักษณะอาการต่าง ๆ ของโรคพืชแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ลักษณะอาการของโรคพืช

ที่มา : (Agrios, 2005)

ลักษณะอาการของโรคพืช (symptom)

ลักษณะอาการของโรคพืช หมายถึง อาการผิดปกติทางสรีรวิทยาของพืชเมื่อเกิดโรค ตัวอย่างเช่น อาการเน่า (rot) ที่สามารถเกิดได้ทั้งราก ลำต้น และผลของพืช การติดเชื้อของราก

อาจทำให้เกิดรากเน่าและทำให้ไม่สามารถดูดซับน้ำและสารอาหารจากดิน การติดเชื้อที่ท่อน้ำเลี้ยง (xylem vessel) ทำให้เกิดการเหี่ยวของท่อน้ำเลี้ยง (vascular wilt) ซึ่งทำให้กระบวนการขนย้ายน้ำ และแร่ธาตุอาหารของพืชไม่สามารถเกิดขึ้นได้จนทำให้เกิดอาการเหี่ยว (wilt) อาการแคงเกอร์ (canker) ที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียโดยบริเวณที่เป็นโรคมะจะมีลักษณะเป็นจุดแผล สะเก็ดสีน้ำตาลนูน ขึ้นมาบนผิวใบทั้งสองด้าน ซึ่งนอกจากเกิดที่ใบแล้วอาจเกิดที่กิ่งและผลได้ด้วย อาการจุด (spot) ที่ จะพบว่าเนื้อเยื่อใบและผลของพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีเทา จุดแผลที่ใบอาจเกิดกระจายกันทั่วทั้งใบจนทำให้ใบแห้งได้ อาการแห้งหรือไหม้ (blight) ซึ่งเป็นลักษณะอาการตายอย่างรวดเร็วของ ใบทั้งใบหรือยอดอ่อนของพืช มีขนาดของแผลใหญ่กว่าอาการจุด และมีขอบเขตของแผลกว้างกว่า โดยบริเวณเซลล์ที่ตายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและลูกกลามออกไปไม่มีขอบเขต แอนแทรคโนส (antracnose) ซึ่งมีอาการเป็นแผลแห้งสีน้ำตาล โดยส่วนมากจะเห็นส่วนของรากที่มีลักษณะเรียงเป็น วงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ ค่อนข้างชัดเจน โดยสามารถเกิดได้ทั้งบนใบ กิ่ง และผล และอาการปุ่มปม (gall) ซึ่งจะเกิดปุ่มปมที่มีลักษณะกลมบริเวณลำต้น และราก โดยมีสาเหตุจากการที่แบคทีเรียเข้าไป เจริญอยู่ในเซลล์พืช แล้วสร้างสารบางชนิดออกมากระตุ้นให้เซลล์บริเวณนั้นมีการแบ่งตัวมากขึ้น (Agrios, 2005)

ราโรคพืชเศรษฐกิจ

Acremonium

ราในสกุลนี้เป็นราที่เจริญช้า และสามารถก่อโรคในพืชได้หลากหลายเช่น โรคใบจุด (leaf spot) ในดอกปทุมมา, กระจับปวย, ขมิ้นโคก หรือทิวลิปสยาม ลักษณะอาการของโรคใบจุดที่เกิด จาก *Acremonium* sp. จะเป็นแผลจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กที่ก้านใบ ใบ ก้านดอก กลีบรองดอก และ กลีบดอก เนื้อเยื่อส่วนที่เป็นแผลจะยุบตัวลงเล็กน้อย จุดแผลอาจเกิดกระจายกันทั่วจนทำให้เกิด อาการแห้งได้ (Thongwai และ Kunopakarn, 2007) ในปัจจุบันการท่องเที่ยวแห่งประเทศไทยได้ มีการส่งเสริมการปลูกดอกปทุมมาเพื่อการท่องเที่ยว ซึ่งโรคใบจุดในดอกปทุมมาอาจส่งผลกระทบต่อ การท่องเที่ยวได้ ทั้งนี้ราในสกุล *Acremonium* ยังทำให้เกิดโรค *Acremonium* collapse ในพืช จำพวกแตง แตงโม และเมลอน ซึ่งมีลักษณะอาการทำให้รากของต้นกล้ามีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล เหลืองอ่อน จากนั้นจะเกิดเนื้อเยื่อตาย (Garcia-Jimenez และคณะ, 1994; Armengol และคณะ, 1998) และนอกจากนี้ยังสามารถทำให้เกิดโรคเหี่ยวแห้งในพืชจำพวกอ้อย โดยราที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยว คือ *A. furcatum* (Ricaud และคณะ, 2012; Viswanathan และคณะ, 2012) ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โรคเหี่ยวแห้งในพืชจำพวกอ้อย
ที่มา : (Viswanathan และคณะ, 2012)

Colletotrichum

ราในสกุลนี้เป็นราที่สำคัญที่ก่อให้เกิดโรครากับพืชเศรษฐกิจมากมาย ซึ่งราสกุลนี้มักก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสเป็นส่วนใหญ่ โดยเกิดอาการที่ใบ ลำต้น และผล มีลักษณะของอาการเป็นจุดทำให้เกิดแผลยุบตัว โรคที่เกิดจะมีได้สองแบบคือ โรคที่เกิดความเสียหายที่เกิดก่อนการเก็บเกี่ยว (preharvest) และโรคที่เกิดความเสียหายระหว่างการเก็บรักษา (postharvest) (Freeman และคณะ, 1998) โดยมีรายงานการก่อโรคของราในสกุล *Colletotrichum* เช่น *Colletotrichum acutatum* สามารถก่อโรคแอนแทรคโนสในสตรอเบอรี่, แอปเปิ้ล, อะโวคาโด, อัลมอนต์, พืช, มะม่วง และพริก เป็นต้น (Adaskaveg และ Hartin, 1997; Freeman และคณะ, 2001), *Colletotrichum lindemuthianum* สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของถั่วทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนส (Wijesundera และคณะ, 1989) *Colletotrichum gloeosporioides* สามารถเกิดโรคในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น มะละกอ มะม่วง และกล้วย โดยทำให้ผลไม้เหล่านี้เกิดความเสียหายระหว่างการเพาะปลูก หลังการเก็บเกี่ยว และในระหว่างเก็บรักษา (Baños และคณะ, 2002; Bautista-Baños และคณะ, 2003; Zakaria และคณะ, 2009; Zhou และคณะ, 2018) ลักษณะอาการโรคแอนแทรคโนสแสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โรคแอนแทรคโนสในอะโวคาโดและสตรอเบอรี่
ที่มา : (Freeman และคณะ, 1998)

ราสกุล *Fusarium* ยังสามารถก่อให้เกิดโรครากเน่า เช่น *Fusarium solani* ที่เป็นราที่ทำให้เกิดโรครากเน่าในและผลเน่าในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ถั่วลิสง ถั่วเหลือง มะเขือเทศ และเมลอน เป็นต้น (Champaco และคณะ, 1993; Rojo และคณะ, 2007) โดยลักษณะอาการโรครากเน่าแสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โรครากเน่าในต้นถั่วซิคพี

ที่มา : (Egamberdieva และคณะ, 2017)

Pyricularia

ราในสกุลนี้เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในการก่อโรคใบไหม้ในข้าว (rice blast disease) ซึ่งเป็นโรคที่ก่อความเสียหายรุนแรงและมีการระบาดอย่างมากในประเทศไทย ทำให้ผลผลิตของข้าวลดลง และยังทำให้เกิดผลกระทบต่อภาวะขาดแคลนอาหารและเศรษฐกิจการส่งออกของข้าว ซึ่งเป็นสินค้าส่งออกอันดับต้น ๆ ของประเทศไทย (Chutrakul และคณะ, 2009) โรคใบไหม้ในข้าวเกิดจากการเข้าทำลายของ *P. oryzae* และสามารถสร้างความเสียหายในต้นข้าวได้ทุกส่วน ทั้งในระยะต้นกล้า จนถึงระยะที่ข้าวออกรวง โรคนี้จะทำให้ใบของต้นข้าวเกิดเป็นแผลรูปกลมหรือคล้ายรูปเพชร มีขอบของแผลเป็นสีน้ำตาลและทำให้ใบข้าวแห้งตาย แผลสามารถขยายลุกลามและกระจายทั่วทั้งใบ ดังรูปที่ 2.7 อีกทั้งยังสามารถทำให้กล้าข้าวแห้งตายได้ หากเกิดโรคในระยะข้าวแตกกออาจพบการเกิดโรคได้ที่ใบ ข้อต่อของใบ และข้อต่อของลำต้น (Arazoe และคณะ, 2014)



รูปที่ 2.7 โรคใบไหม้ในข้าว

ที่มา : (<http://duniaticom.blogspot.com/2015/04/jenis-penyakit-blas-potong-leher-dan.html>)

Phytophthora

สกุล *Phytophthora* จัดเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตคล้ายรา (fungal-like organism) หรือเรียกอีกอย่างว่าราน้ำ (water mold) ที่สามารถทำให้เกิดโรคพืชได้ *Phytophthora palmivora* สามารถก่อโรคได้ทั้งกับระบบราก ลำต้น และผล ในพืชมากกว่า 100 สายพันธุ์ โดยพืชเศรษฐกิจส่วนใหญ่ที่เกิดโรคคือสับปะรด, มะละกอ, ส้ม, มะเขือเทศ, ยาสูบ, ยางพารา และโกโก้ เป็นต้น (Churngchow และ Rattarasarn, 2000; Hanada และคณะ, 2009) ตัวอย่างการเกิดโรคในโกโก้แสดงดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 โรคผลเน่าดำในโกโก้

ที่มา : (<http://shawinieelaeis.blogspot.com/2016/01/disease-and-methods-control-of-cocoa.html>)

การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ

ในปัจจุบันการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืชทำให้เกิดสารพิษตกค้างในผลผลิตและสิ่งแวดล้อม จนทำให้เกิดอันตรายต่อชาวไร่ ชาวนา และผู้บริโภค (Choi และคณะ, 2017) มีการใช้สารเคมีควบคุมราก่อโรคพืชมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น แมนโคเซบ (mancozeb), เมตาแลซิล (metalaxyl) และเทบูโคนาโซล (tebuconazole) เป็นต้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของคน ดังเช่นมีการรายงานว่า 1 μM แมนโคเซบ สามารถยับยั้งการสังเคราะห์สเตียรอยด์ที่เกี่ยวข้องกับการตกไข่ของเพศหญิงได้ 33 เปอร์เซ็นต์, 100 μM เทบูโคนาโซล ยับยั้งได้ 65 เปอร์เซ็นต์ และ 500 μM เมตาแลซิล ยับยั้งได้ 31 เปอร์เซ็นต์ (Atmaca และคณะ, 2018) จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์คิดค้นวิธีเพื่อลดการใช้สารเคมีในการกำจัดโรคพืช โดยคิดค้นการใช้วิธีทางชีวภาพ (biocontrol) ซึ่งเป็นวิธีทางเลือกในการกำจัดสิ่งมีชีวิตที่เป็นสาเหตุของโรคพืช เช่น รา แบคทีเรีย หรือหนอนแมลงที่ทำให้เกิดโรคพืช (Pal และ Gardener, 2006) วิธีทางชีวภาพสามารถใช้ได้ทั้งแบคทีเรียและราในการควบคุมโรคพืช (Droby และคณะ, 2009) การใช้แบคทีเรียในการควบคุมโรคพืชสามารถใช้ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรายงานว่าสามารถใช้เพื่อการควบคุม

ทางชีวภาพได้ ได้แก่ *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp. และ *Lactococcus* sp. เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Serratia* sp. และ *Acetobacter* sp. (Deketelaere และคณะ, 2017; Hossain และคณะ, 2017) แบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่นิยมใช้มากที่สุดในวิธีควบคุมทางชีวภาพคือ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ซึ่งมีมากมายหลากหลายสายพันธุ์เช่น *Bacillus amyloliquefaciens* (Priest และคณะ, 1987), *B. cereus* (Granum, 1994), *B. pumilus* (Munimbazi และ Bullerman, 1998), *B. subtilis* (Dubnau, 1991) และ *B. velezensis* (Ruiz-Garcia และคณะ, 2005) เป็นต้น *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) อยู่ในวงศ์ Bacillaceae เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศหรือออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) แต่บางชนิดสามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) นอกจากนี้ *Bacillus* sp. ยังเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore forming bacteria) ซึ่งสปอร์ของ *Bacillus* sp. สามารถทนความร้อน ความแห้งแล้ง สารเคมี และภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ดี (Emmert และ Handelsman, 1999) อีกทั้ง *Bacillus* sp. ยังเป็นแบคทีเรียประเภทแบคทีเรียในดินที่อาศัยอยู่บริเวณรากของต้นพืชและมีความสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant-growth promoting rhizobacterium หรือ PGPR) (Li และคณะ, 1992), สามารถละลายฟอสเฟตในดินให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ (phosphate solubilization) (Hashem และคณะ, 2019), สามารถผลิตสารไซเดอร์โรฟออร์ (siderophore) ที่ช่วยดึงดูดเหล็กมาให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถใช้ได้, และนอกจากนี้ *Bacillus* sp. ยังสามารถผลิตฮอร์โมนหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยฮอร์โมนมีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของพืช โดยควบคุมและส่งผลต่อการพัฒนาขึ้นส่วนของพืชทั้งหมด และดังนั้นจึงถือเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตสำหรับพืช ฮอร์โมนสำหรับพืชมี 5 กลุ่มใหญ่คือ ออกซิน (auxin), จิบเบอเรลลิน (gibberellin), กรดแอบไซซิก (abscisic acid), ไซโตไคนิน (cytokinin) และเอทิลีน (ethylene) ซึ่งจุลินทรีย์ PGPR สามารถผลิตฮอร์โมนหลายชนิดเหล่านี้ได้ และนอกจากนี้ จุลินทรีย์ PGPR ยังสามารถผลิตสารที่มีส่วนในการควบคุมศัตรูพืชด้วยกระบวนการชีวภาพ (biological control) และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืช (induce systemic resistance) ได้อีกด้วย (Nguyen และคณะ, 2017; Hashem และคณะ, 2019) มีการศึกษาและงานวิจัยมากมายเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ในการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพดังสรุปไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ชนิดของพืช	สายพันธุ์ราก่อโรคพืช	เอกสารอ้างอิง
<i>B. pumilus</i> SE34	ยาสูบ	<i>Peronospora tabacina</i>	(Zhang และคณะ, 2002)
<i>Bacillus</i> spp.	แตงกวา	<i>Pythium</i> spp.	(Zhang และคณะ, 1996)
<i>Bacillus</i> spp.	ถั่วลิสง	<i>Cercosporidium personatum</i>	(Zhang และคณะ, 2001)
<i>B. subtilis</i> AF1	ถั่วลิสง	<i>Aspergillus niger</i>	(Sailaja และคณะ, 1998)
<i>B. pumilus</i> SE34	มะเขือเทศ	<i>Phytophthora infestans</i>	(Yan และคณะ, 2003)
<i>B. pumilus</i> INR7	แตงกวา	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	(Wei และคณะ, 1996)
<i>Bacillus</i> spp.	พริกชี้ฟ้า ยาว	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	(Yan และคณะ, 2003)
<i>Bacillus</i> spp.	ผักกาดเขียว กวาดตั้ง	<i>Rhizoctonia solani</i>	(Yan และคณะ, 2003)
<i>B. velezensis</i> AR1	พืช	<i>Glomerella cingulata</i>	(Regassa และคณะ, 2018)
<i>B. velezensis</i> CC09	ข้าวสาลี	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	(Cai และคณะ, 2017)
<i>B. velezensis</i> BS87 และ RK1	สตรอเบอร์รี่	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	(Nam และคณะ, 2009)
<i>B. subtilis</i> RB14	มะเขือเทศ	<i>Rhizoctonia solani</i>	(Asaka และ Shoda, 1996)
<i>B. amyloliquefaciens</i> B9601-Y2	ข้าวโพด	<i>Bipolaris maydis</i>	(Cui และคณะ, 2019)
<i>B. velezensis</i> OEE1	โอลีฟ	<i>Verticillium dahliae</i>	(Azabou และคณะ, 2020)
<i>B. velezensis</i> 5YN8 และ DSN01	พริกไทย	<i>Botrytis cinerea</i>	(Jiang และคณะ, 2018)

กลไกการยับยั้งราโรคพืชของแบคทีเรีย

กลไกในการยับยั้งราที่ก่อโรคพืชของแบคทีเรียมีทั้งหมด 4 อย่าง ดังนี้

1) ภาวะการแข่งขัน (competition) ซึ่งเป็นการแข่งขันระหว่างแบคทีเรียและราก่อโรคพืช ซึ่งสามารถส่งผลในการควบคุมหรือยับยั้งของราก่อโรคพืช โดยการแข่งขันนี้จะแข่งขันกันในด้านอาหารและองค์ประกอบที่จำเป็นในการเจริญเติบโตในดินและรอบ ๆ รากของพืช เนื่องจากแบคทีเรียมีการเจริญเร็วกว่าราก่อโรคพืช จึงทำให้แบคทีเรียใช้สารอาหารบางชนิดไปอย่างรวดเร็ว ส่งผลทำให้ราก่อโรคพืชถูกจำกัดการใช้สารอาหาร และถูกยับยั้งการเจริญ อีกทั้งแบคทีเรียยังมีการแย่งใช้ องค์ประกอบสำคัญบางอย่างภายในดิน เช่น ธาตุเหล็ก ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญอย่างหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในดิน แต่ส่วนใหญ่มักพบในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งแบคทีเรียจะผลิตสารไซโตเรโอฟอร์ ที่สามารถจับกับไอออนของธาตุเหล็กที่มีอิเล็กตรอนคู่อิสระอยู่ทำให้สามารถดูดซึมไซโตเรโอฟอร์เข้าสู่เซลล์และพืชยังสามารถรับธาตุเหล็กได้ด้วย การแข่งขันนี้จะทำให้ราก่อโรคพืชขาดธาตุเหล็กที่ใช้ในการเจริญเติบโตทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชในที่สุด (Chet และคณะ, 1990; Handelsman และ Stabb, 1996)

2) ภาวะปรสิตและการย่อยสลาย (parasitism and lysis) เนื่องจากผนังเซลล์ของรามมีไคตินเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์บางชนิดที่มีสมบัติในการย่อยสลายผนังเซลล์ของรา (cell wall digesting enzyme) หรือเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์ซัสเตรตที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของรา (hydrolytic enzyme) ซึ่งนำไปสู่การสลายตัวของโครงสร้างของรา เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ ไคตินเนส (chitinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์สลายพันธะ β -1,4 ไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ระหว่างโมเลกุลของชีวโพลิเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิด N-อะซีติลกลูโคซามีน, กลูแคนเนส (glucanase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์กลูแคนให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และโปรตีเอส (protease) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยโปรตีน เป็นต้น (Chet และคณะ, 1990; Ab Rahman และคณะ, 2018)

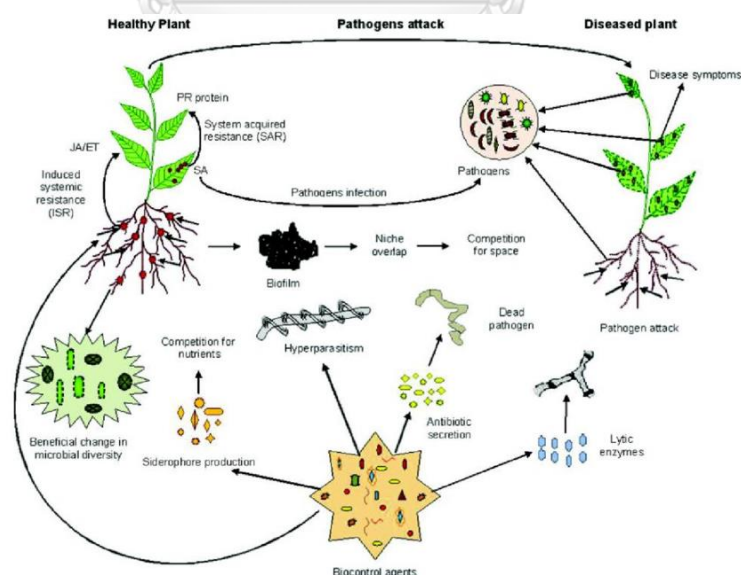
3) การผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic production) การควบคุมราก่อโรคพืชทางชีวภาพส่วนใหญ่มักเกิดจากสารปฏิชีวนะหลายชนิด โดยสารปฏิชีวนะสามารถทำลายหรือเป็นพิษต่อจุลินทรีย์อื่น ทั้งนี้แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตและหลั่งสารปฏิชีวนะได้อย่างน้อย 1 ชนิด (Handelsman และ Stabb, 1996; Ab Rahman และคณะ, 2018) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแสดงดังตารางที่ 2.2 เช่น บาซิลโลมัยซิน (bacillomycin) ซึ่งเป็นพอลิเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา, คาโนซามีน

(kanosamine) ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มอะมิโนซูการ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งราแท้และราน้ำ และอิทูริน A (iturin A) ซึ่งเป็นลิโปเปปไทด์ที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและมีฤทธิ์ยับยั้งรา เป็นต้น (Pal และ Gardener, 2006)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Pal และ Gardener (2006))

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ชนิดของสารปฏิชีวนะ	สายพันธุ์ราก่อโรครพืช
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	bacillomycin และ fengycin	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Bacillus cereus</i> UW85	zwittermicin a และ kanosamine	<i>Phytophthora medicaginis</i> และ <i>Pythium aphanidermatum</i>
<i>Bacillus subtilis</i> AU195	bacillomycin d	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>B. subtilis</i> BBG100	mycosubtilin	<i>P. aphanidermatum</i>
<i>B. subtilis</i> QST713	iturin A	<i>Botrytis cinerea</i> และ <i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	pyrrolnitrin, pseudane	<i>R. solani</i> และ <i>Pyricularia oryzae</i>
<i>Lysobacter</i> sp. SB-K88	xanthobaccin a	<i>Aphanomyces cochlioides</i>
<i>P. fluorescens</i> 2-79 และ 30-84	phenazine	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	2, 4-diacetylphloroglucinol	<i>Pythium</i> spp.
<i>P. fluorescens</i> Pf-5	pyoluteorin และ pyrrolnitrin	<i>Pythium ultimum</i> และ <i>R. solani</i>
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>geldonus</i> .	geldanomycin	<i>R. solani</i>

4) การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืช (induced systemic resistance) ซึ่งเป็นการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานทางสรีรวิทยา เพื่อเพิ่มความสามารถในการป้องกันโรคพืชได้มากขึ้น ซึ่งการกระตุ้นภูมิคุ้มกันนี้พืชจะได้รับการกระตุ้นหรือได้รับสิ่งเร้าจากสิ่งแวดล้อม โดยที่สารหรือเชื้อควบคุมทางชีวภาพบางชนิดทำให้เกิดการกระตุ้นเพื่อเพิ่มความทนทานต่อการติดโรคพืชทางอ้อมได้ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันมี 2 ประเภทที่แตกต่างกันคือ systemic acquired resistance (SAR) และ induced systemic resistance (ISR) ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว SAR จะถูกกระตุ้นโดยเชื้อก่อโรคในขณะที่ ISR จะถูกกระตุ้นด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค การกระตุ้นผ่าน SAR จะเกิดจากการผลิตกรดซาลิไซลิกที่ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางที่ส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (pathogenesis related protein) เช่น PR-1, PR-2, ไคตินเนส และเพอร็อกซิเดสบางชนิด ซึ่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเหล่านี้สามารถทำให้เกิดการสลายของเซลล์ที่ถูกบุกรุกได้ และช่วยในการเสริมความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อต่อต้านการติดเชื้อหรือชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อด้วย ส่วนการกระตุ้นผ่าน ISR จะถูกกระตุ้นด้วยสารสื่อกลางซึ่งคือ กรดจัสโมนิก (jasmonic acid) หรือ เอธิลีน (ethylene) ซึ่งอาจผลิตขึ้นจากแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคที่อาศัยอยู่บริเวณรากของต้นพืช โดยการตอบสนองของ ISR จะทำให้เกิดการเสริมความแข็งแรงของผนังเซลล์ของพืชและเกิดการเปลี่ยนแปลงของสรีรวิทยาของพืช (Singh, 2014) ภาพรวมของกลไกการยับยั้งโรคพืชของแบคทีเรีย แสดงดังรูปที่ 2.9

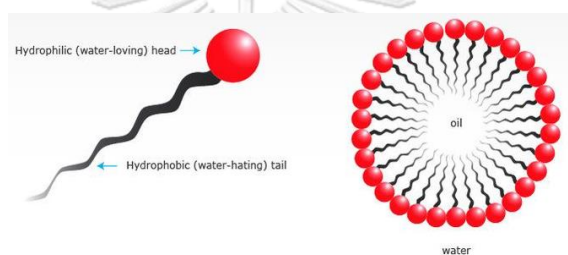


รูปที่ 2.9 ภาพรวมของกลไกการยับยั้งโรคพืชของแบคทีเรีย

ที่มา : (Singh, 2014)

สารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิว (surfactant) เป็นสารที่มีความสามารถลดแรงตึงผิวของของเหลว ช่วยให้กระจายตัวได้ง่ายขึ้น และยังสามารถลดแรงยึดระหว่างผิวของของเหลวกับผิวของสารอื่นที่อาจเป็นของแข็ง, ของเหลว และแก๊ส สารลดแรงตึงผิวมักเป็นสารอินทรีย์ที่มีสารประกอบที่เป็นแอมฟิพาธิค (amphipathic) ที่หมายถึง สารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนหัวที่ชอบน้ำ ซึ่งเรียกว่า ไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) และส่วนหางที่ชอบไขมัน ซึ่งเรียกว่า ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ดังนั้นจึงสามารถละลายได้ทั้งในตัวทำละลายสารอินทรีย์และน้ำ สารลดแรงตึงผิวจึงมีส่วนที่มีขั้ว (polar) และไม่มีขั้ว (non-polar) ซึ่งเมื่อโมเลกุลเหล่านี้อยู่บริเวณที่เชื่อมต่อระหว่างน้ำกับอากาศหรือระหว่างน้ำกับน้ำมันแล้ว จะมีโครงสร้างเป็นไมเซลล์ (micelle) โดยหันหัวที่ชอบน้ำออกและหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้ามารวมกัน (Mishra และคณะ, 2009) ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวและการเกิดไมเซลล์ของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว
ที่มา : (<https://alchetron.com/Surfactant>)

สารลดแรงตึงผิวสามารถจัดจำแนกได้ตามประจุของส่วนที่ชอบน้ำได้เป็น 4 ประเภท ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุที่ส่วนหัวจะเรียกว่า nonionic, สารลดแรงตึงผิวที่ส่วนหัวมีไอออนประจุลบจะเรียกว่า anionic, ส่วนสารลดแรงตึงผิวที่ส่วนหัวมีไอออนประจุบวกจะเรียกว่า cationic, และสารลดแรงตึงผิวที่ส่วนหัวมีทั้งประจุบวกและประจุลบเรียกว่า amphoteric หรือ zwitterionic (Mishra และคณะ, 2009) ซึ่งแต่ละประเภทมีรายละเอียดดังนี้

1. สารลดแรงตึงผิวกลุ่มนอนไอออนิก (non-ionic surfactant) สารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้ไม่มีประจุไฟฟ้า ซึ่งทำให้ทนต่อความกระด้างของน้ำ สารลดแรงตึงผิวในกลุ่มนี้จะมีความระคายเคืองน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวประจุลบและสารลดแรงตึงผิวประจุบวก ส่วนที่ชอบน้ำประกอบด้วยอนุพันธ์ของพอลิออกซีเอธิลีน, พอลิออกซีโพรไพลีน หรือพอลิอล ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะมีกรดไขมันอิ่มตัว, กรดไขมันไม่อิ่มตัว หรือฟอสโฟลิกออล ซึ่งทำให้สารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้ถูกใช้เป็นน้ำยาขจัดคราบไขมันและทำให้เกิดอิมัลชันที่ตีมาก สารลดแรงตึงผิวกลุ่มนอนไอออนิกสามารถเป็นพอลิอล

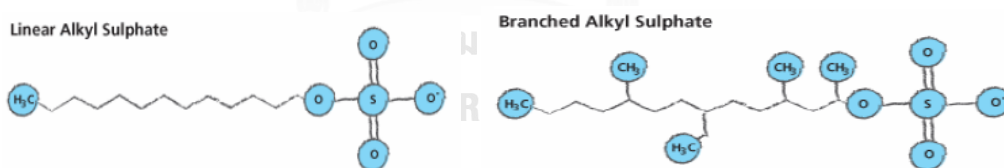
เอสเทอร์, พอลิออกซีเอธิลีนเอสเทอร์ และพอล็อกซามเมอร์ (poloxamer) ซึ่งพอลิออลเอสเทอร์ ประกอบด้วยไกลคอล, กลีเซอรอลเอสเทอร์ และอนุพันธ์ซอร์บิแทน ส่วนพอลิออกซีเอธิลีนเอสเทอร์ประกอบด้วยพอลิเอธิลีนไกลคอล (PEG-40, PEG-50, PEG-55) สารลดแรงตึงผิวกลุ่มนอนไอออนิกที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ อีเทอร์ของแพตตีแอลกอฮอล์ ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.11 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีสารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ผงซักฟอก และสารขจัดคราบฝังแน่น เป็นต้น (Mishra และคณะ, 2009; Vijayakumar และ Saravanan, 2015)



รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของอีเทอร์แพตตีแอลกอฮอล์

ที่มา : (Mishra และคณะ, 2009)

2. สารลดแรงตึงผิวแอนไอออนิก (anionic surfactant) สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการผลิตแชมพูเพราะมีสมบัติในการทำความสะอาดที่ดีมาก และทำหน้าที่ให้ความนุ่มลื่นกับเส้นผม สารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้ยังมีประสิทธิภาพในการทำความสะอาดน้ำมัน จึงนิยมนำไปผลิตน้ำยาล้างจานและผงซักฟอก สารลดแรงตึงผิวแบบแอนไอออนิกที่ใช้กันมากที่สุดคือ แอลคิลซัลเฟต, แอลคิลเอเธกซีเลต, ซัลเฟต และสบู่ (Mishra และคณะ, 2009; Vijayakumar และ Saravanan, 2015) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.12

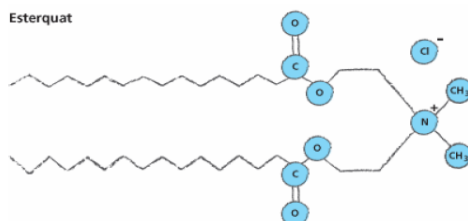


รูปที่ 2.12 โครงสร้างทางเคมีของแอลคิลซัลเฟตแบบเส้นตรงกับแบบแตกกิ่ง

ที่มา : (Mishra และคณะ, 2009)

3. สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวก (cationic surfactant) เป็นสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม และส่วนใหญ่จะมีสมบัติในการฆ่าเชื้อโรคและใช้เป็นสารถนอม (preservative) สารลดแรงตึงผิวแคทไอออนิกสามารถใช้กับผิวหนังเพื่อทำความสะอาดบาดแผลหรือแผลไหม้ และเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวประเภทนี้สามารถเกาะกับพื้นผิวได้ดี จึงนิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ครีมนวดผม และน้ำยาปรับผ้านุ่ม เป็นต้น (Mishra และคณะ, 2009; Vijayakumar และ

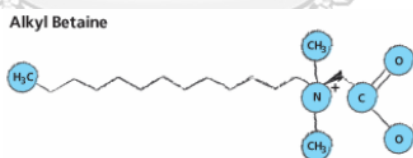
Saravanan, 2015) ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้คือ เอสเทอร์ควอท (esterquat) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 โครงสร้างทางเคมีของเอสเทอร์ควอท

ที่มา : (Mishra และคณะ, 2009)

4. สารลดแรงตึงผิวแอมโฟเทอริก (amphoteric surfactant) หรือสารลดแรงตึงผิวสวิตเทอร์ไอออน (zwitterionic surfactant) สารลดแรงตึงผิวประเภทนี้มีทั้งประจุบวกและประจุลบในโมเลกุลเดียวกัน โดยประจุบวกจะเกิดจากแอมโมเนียมเสมอ แต่ประจุลบอาจแตกต่างกันไปเช่น คาร์บอกซิเลต ซัลเฟต หรือซัลโฟเนต สามารถทนน้ำกระด้างได้ มีความอ่อนละมุนต่อผิว จึงนิยมใช้ในผลิตภัณฑ์จำพวกสบู่และครีมอาบน้ำ เป็นต้น (Mishra และคณะ, 2009; Vijayakumar และ Saravanan, 2015) ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้คือ แอลคิลบีเทน (alkyl betaine) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของแอลคิลบีเทน

ที่มา : (Mishra และคณะ, 2009)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

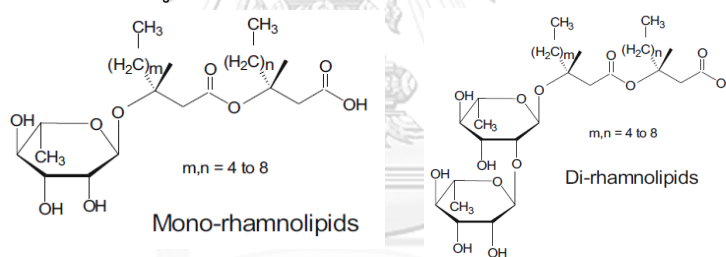
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ ด้วยสมบัติที่มีประโยชน์ที่หลากหลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงทำให้มีการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในด้านต่าง ๆ นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีความจำเพาะ มีความเป็นพิษต่ำ และง่ายต่อการประยุกต์ใช้ จึงถูกนำมาใช้ในหลายอุตสาหกรรม เช่น สารเคมีอินทรีย์, ปิโตรเลียม, ปิโตรเคมีเหมืองแร่, โลหะวิทยา, เคมีเกษตร, ปุ๋ย, อาหาร, เครื่องดื่ม, เครื่องสำอาง, ยา และอื่น ๆ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์, ตัวยาละลาย, สารที่ทำให้เกิด

ฟอง, ตัวแพร่กระจาย, ส่วนผสมอาหาร, และผงซักฟอก นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเก็บและกำจัดน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ (Volkering และคณะ, 1997)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลที่ซับซ้อนที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่แตกต่างกันซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 5 ประเภท ดังนี้ (Mercade และ Manresa, 1994)

1. ไกลโคลิพิด ซึ่งเป็นโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตที่เชื่อมพันธะกับกรดอะลิฟาติกสายยาวหรือกรดไฮดรอกซีอะลิฟาติก สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ได้แก่ แรมโนลิพิด (rhamnolipid), ทรีฮาโลลิพิด (trehalolipid) และโซโฟโรลิพิด (sophorolipid) (Vijayakumar และ Saravanan, 2015)

1.1. แรมโนลิพิด (rhamnolipid) ซึ่งเป็นไกลโคลิพิดที่มีหนึ่งหรือสองโมเลกุลของน้ำตาลแรมโนสเชื่อมพันธะกับหนึ่งหรือสองโมเลกุลของกรดไฮดรอกซีเคโคโนอิก มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีตามรูปที่ 2.15



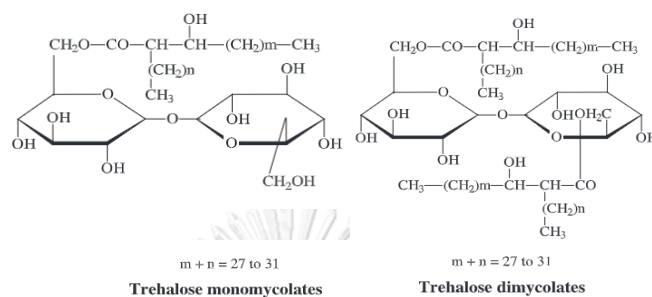
รูปที่ 2.15 โครงสร้างทางเคมีของแรมโนลิพิด

ที่มา : (Soberón-Chávez และคณะ, 2005)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแรมโนลิพิดส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* เช่น *P. aeruginosa* PAO1 ซึ่งสามารถผลิตแรมโนลิพิดได้ (Davey และคณะ, 2003) นอกจากนี้แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* แล้ว ยังมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่สามารถผลิตแรมโนลิพิดได้ เช่น *Thermus thermophilus* HB8 ซึ่งสามารถผลิตได้ทั้งโมโนแรมโนลิพิดและไดแรมโนลิพิด (Pantazaki และคณะ, 2011)

1.2 ทรีฮาโลลิพิด (trehalolipid) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นไดแซ็กคาไรด์ทรีฮาโลส (disaccharide trehalose) เชื่อมพันธะกับ C-6 และ C-6' กับกรดมัคโคลิก (mycolic acid) โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตได้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Mycobacterium*, *Nocardia* และ

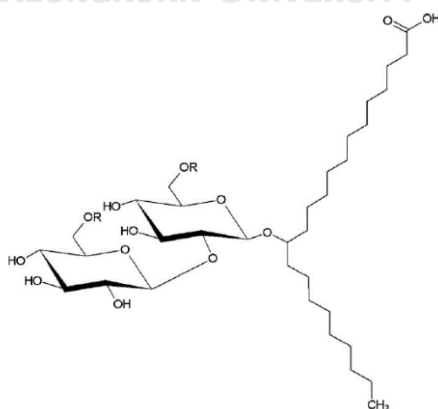
Corynebacterium นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Rhodococcus* สามารถผลิตทรีฮาโลลิพิดได้ (White และคณะ, 2013) ทรีฮาโลลิพิดที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันจะมีขนาดและโครงสร้างของกรดมัคคอลลิก และจำนวนอะตอมของคาร์บอนที่แตกต่างกัน (Gautam และ Tyagi, 2006; White และคณะ, 2013) มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีตามรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.16 โครงสร้างทางเคมีของทรีฮาโลลิพิด

ที่มา : (Kuyukina และคณะ, 2015)

1.3 โซโฟโรลิพิด (sophorolipid) ซึ่งส่วนใหญ่สามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์พวกยีสต์ โดยโซโฟโรลิพิดประกอบด้วยโมเลกุลคู่ของคาร์โบไฮเดรตโซโฟโรสที่เชื่อมพันธะกับกรดไขมันไฮดรอกซิล โดยการเชื่อมพันธะนั้นจะใช้พันธะไกลโคซิดิก ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีตามรูปที่ 2.17 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้จะมีส่วนโมเลกุลที่แตกต่างกัน 6 ถึง 9 โมเลกุลที่ขอบน้ำของโซโฟโรลิพิด (Gautam และ Tyagi, 2006) ซึ่งมีรายงานว่า *Candida bombicola* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดโซโฟโรลิพิดได้ (Daverey และ Pakshirajan, 2010)

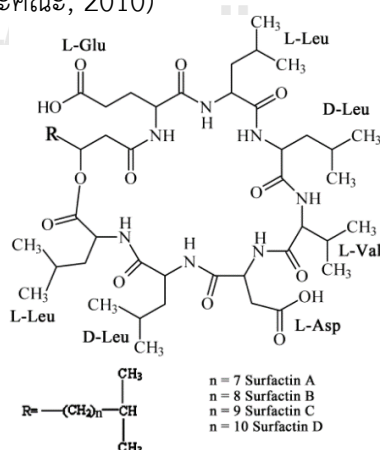


รูปที่ 2.17 โครงสร้างทางเคมีของโซโฟโรลิพิด

ที่มา : (Van Bogaert และคณะ, 2011)

2. ลิโปเปปไทด์ (lipopeptide) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยไขมันติดอยู่กับสายพอลิเปปไทด์ในลักษณะเป็นวงขนาดใหญ่ โดยไฮโดรคาร์บอนหนึ่งหรือสองตัวจะทำงานหน้าที่เป็นหางที่ไม่ชอบน้ำ ในขณะที่สายของเปปไทด์จะทำหน้าที่เป็นหัวที่ชอบน้ำ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพหลายชนิดในกลุ่มนี้มีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย สาหร่าย รา และไวรัส สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ที่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย ได้แก่ อิทูริน (iturin), เซอร์แฟกติน (surfactin) และเฟนจีซิน (fengycin) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ (Vijayakumar และ Saravanan, 2015)

เซอร์แฟกตินเป็นสารลดแรงตึงผิวแบบไซคลิกลิโปเปปไทด์ ซึ่งเป็นหนึ่งในสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด โครงสร้างของเซอร์แฟกตินจะเป็นวงแหวนของกรดอะมิโนทั้งเจ็ดเชื่อมพันธะกับกรดไขมันผ่านพันธะที่เรียกว่า lactone ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีตามรูปที่ 2.18 การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานสมบัติการยับยั้งเชื้อก่อโรคต่าง ๆ โดยเซอร์แฟกติน เช่น *B. subtilis* 6051 มีความสามารถในการผลิตเซอร์แฟกตินที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas syringae* ที่ก่อให้เกิดโรคในต้นอะราบิโดพซิส โดยสามารถลดการเกิดโรคได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Bais และคณะ, 2004), *Bacillus mojavensis* RRC 101 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดเซอร์แฟกตินที่มีฤทธิ์ยับยั้งราโรคพืช *Fusarium verticillioides* ที่ก่อให้เกิดโรคในข้าวโพด (Snook และคณะ, 2009) และ *B. amyloliquefaciens* KPS46 ที่ผลิตเซอร์แฟกตินซึ่งมีสมบัติในการยับยั้ง *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในต้นถั่วเหลือง เป็นต้น (Preecha และคณะ, 2010)



รูปที่ 2.18 โครงสร้างทางเคมีของเซอร์แฟกติน

ที่มา : (Chen และคณะ, 2015)

5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactant) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทนี้จะเป็ยื่อหุ้มเซลล์ส่วนนอกของเวซิเคิล (extracellular membrane vesicle) ที่สามารถรวมตัวเป็นไมโครอิมัลชันได้ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการดูดซับแอลเคนเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ (Vijayakumar และ Saravanan, 2015)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการควบคุมโรคพืช

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น สามารถใช้ในการแยกน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมออกได้และยังสามารถช่วยในกระบวนการย่อยสลายน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย (Sharma และคณะ, 2018) นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวภาพยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคพืช เช่น *Bacillus velezensis* RC 218 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Fusarium graminearum* ที่เป็นสาเหตุของโรครวงแห้งในข้าวสาลีได้ 42 และ 76 เปอร์เซ็นต์ (Palazzini และคณะ, 2016) Plaza และคณะ (2013) ได้ศึกษาเซอร์แฟกทินที่ผลิตจาก *B. subtilis* เพื่อยับยั้งราโรคพืช 4 ชนิด ได้แก่ *Botrytis cinerea* ที่สามารถยับยั้งได้ 51 เปอร์เซ็นต์, *Sclerotinia sclerotiorum* ที่สามารถยับยั้งได้ 52 เปอร์เซ็นต์, *Colletotrichum gloeosporioides* ที่สามารถยับยั้งได้ 45 เปอร์เซ็นต์ และ *Phoma complanate* ที่สามารถยับยั้งได้ 38 เปอร์เซ็นต์ Singh และคณะ (2014) รายงานว่า *B. amylofaciens* สายพันธุ์ AR2 สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทลิโปเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Scopulariopsis acremonium*, *Microsporium gypseum* และ *Fusarium oxysporum* ได้ 80, 78 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Kim และคณะ (2004) ได้ศึกษา *B. thuringiensis* สายพันธุ์ CMB26 พบว่าสามารถผลิตลิโปเปปไทด์ที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับเพนนิซิลินและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากการศึกษาของ Debode และคณะ (2007) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ CMR12a, PNA1, 7NSK2 และ PCL1391 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Verticillium longisporum* ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ Wu และคณะ (2019) ได้ศึกษา *Bacillus* sp. CS30 ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟกทินที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Magnaporthe grisea* ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และ Stanghellini และ Miller (1997) ได้ศึกษา *Pseudomonas aeruginosa* R4 ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทแรมโนลิพิดที่สามารถย่อยสลายซูโอสปอร์และผนังเซลล์ของ *Plasmopara lactucea-radidis*,

Phytophthora capsici และ *Pythium aphanidermatum* ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดเท่ากับ 5, 15 และ 25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

ปัจจัยด้านองค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนคือ แหล่งพลังงานหลักของจุลินทรีย์ที่ได้จากสารอินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต มีการศึกษามากมายที่มีการปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนของสูตรอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น Pereira และคณะ (2013) ได้ศึกษาการปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 309, 311 และ 573 โดยมีแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 12 ชนิดคือ โซเดียมอะซิเตต, โซเดียมซิเตรต, ฟรุกโทส, กลูโคส, กลีเซอรอล, แลคโทส, สารสกัดจากเนื้อ, พาราฟฟิน, ซูโครส, n-เฮกซะดีเคน, ทริปโตน, และสารสกัดจากยีสต์ ผลการศึกษาพบว่า *B. subtilis* ทั้งสามสายพันธุ์เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครสสามารถผลิตเซอร์แฟกทินได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน เช่น Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ได้ศึกษาปริมาณของกลูโคสต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* SPB1 โดยใช้กลูโคส 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 กรัมต่อลิตร ผลการศึกษาพบว่า *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดเมื่อใช้กลูโคสที่ 40 กรัมต่อลิตร โดยสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 720 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญของการสังเคราะห์กรดอะมิโน ซึ่งกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบของโปรตีนทุกชนิดในสิ่งมีชีวิต มีการศึกษามากมายที่มีการปรับเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนของสูตรอาหาร เช่น Pereira และคณะ (2013) ได้ศึกษาการปรับเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 309, 311 และ 573 โดยมีแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด 8 ชนิดคือ แอมโมเนียมซิเตรต, แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต, สารสกัดจากเนื้อ, โซเดียมไนเตรต, ทริปโตน, ยูเรีย, และสารสกัดจากยีสต์ ผลการศึกษาพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ 309 และ 311 สามารถผลิตเซอร์แฟกทินได้มากที่สุดเมื่อมี

แหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดจากยีสต์ แต่ *B. subtilis* สายพันธุ์ 573 สามารถผลิตเซอร์แฟกทินได้มากที่สุดเมื่อมีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ได้ศึกษาการปรับเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ คือ เคซีน, สารสกัดจากเนื้อ, ยูเรีย, เคซีนที่ย่อยจากตับอ่อน และสารสกัดจากยีสต์ โดยพบว่า *B. subtilis* SPB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถทำให้ *B. subtilis* SPB1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด โดยสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 720 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. ภาวะความเป็นกรดและเบส

ภาวะความเป็นกรดเบสเป็นอีกภาวะหนึ่งที่สำคัญในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และยังส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีการศึกษาภาวะความเป็นกรดเบสที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนี้ Tabatabaei และคณะ (2005) ได้ศึกษาภาวะความเป็นกรดเบสที่ pH 4.2 ถึง 9.2 ที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 4, 5 และ 30 ผลการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 4 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดที่ pH 9.2, *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 5 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดที่ pH 4.2 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 30 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดที่ความเป็นกรดเบสที่ 5.2 และ 8.2 Apama และคณะ (2012) ได้ศึกษาความคงตัวของ การเกิดอิมัลชันต่อภาวะความเป็นกรดเบสของ *Pseudomonas* sp. 2B ในช่วงความเป็นกรดเบสที่ pH 2 ถึง 12 ผลการทดลองพบว่า ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมีค่าความเป็นกรดเบสที่สูงเกินไปจะทำให้การเกิดอิมัลชันลดลง เมื่อภาวะความเป็นกรดที่ 2 การเกิดอิมัลชันจาก 85 เปอร์เซ็นต์ ลดลงเหลือเพียง 58 เปอร์เซ็นต์ และภาวะความเป็นเบสที่ 12 การเกิดอิมัลชันจาก 85 เปอร์เซ็นต์ ลดลงเหลือเพียง 70 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาของ Cooper และ Goldenberg (1987) ได้ศึกษาความคงตัวของ การเกิดอิมัลชันต่อความเป็นกรดเบสของ *Bacillus* sp. IAF343 และ *B. cereus* IAF346 ในช่วง pH 2 ถึง 14 พบว่า *Bacillus* sp. IAF343 และ *B. cereus* IAF346 เมื่อความเป็นเบสเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลทำให้เกิดอิมัลชันลดลง โดยภาวะความเป็นเบสที่ pH 14 การเกิดอิมัลชันลดลงจาก 70 เปอร์เซ็นต์ จนทำให้ไม่เกิดอิมัลชันเลย

4. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีความสำคัญต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีการศึกษาของ Tabatabaei และคณะ (2005) ได้ศึกษาอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ 25 ถึง

50 องศาเซลเซียส โดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 4, 5 และ 30 ผลการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 4 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดที่ 25 องศาเซลเซียส และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 5 และ 30 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดที่ 50 องศาเซลเซียส Aparna และคณะ (2012) ได้ศึกษาความคงตัวของการเกิดอิมัลชันของ *Pseudomonas* sp. 2B ที่ช่วงอุณหภูมิ 4 ถึง 121 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถคงการเกิดอิมัลชันได้แม้แต่ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้การเกิดอิมัลชันลดลง การศึกษาของ Cooper และ Goldenberg (1987) ได้ศึกษาความคงตัวของการเกิดอิมัลชันของ *Bacillus* sp. IAF343 และ *B. cereus* IAF346 ที่ช่วงอุณหภูมิ 0 ถึง 80 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่า เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงถึง 20 องศาเซลเซียส จะทำให้การเกิดอิมัลชันลดลง แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจนถึง 80 องศาเซลเซียส ยังทำให้สามารถเกิดอิมัลชันได้



บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
2. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (microscope) รุ่น UNILUX-12 ของบริษัท Kyowa, Tokyo, Japan
3. คอร์กบอเรีย (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
4. เครื่องแก้วของบริษัท Pyrex, USA
5. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
6. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-G ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Forma Scientific, USA
8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hettich Zentrifugen, Germany
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Allegra 25R ของบริษัท Beckman, Germany
12. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G506E ของบริษัท Scientific Industries instruments, USA
13. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น MyCycler Thermal Cycler ของ บริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
14. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 ของบริษัท Eyela, Japan
15. เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 ของบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore
16. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Scientific, USA
17. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Scientific, USA

18. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโนรูน 2000 C (Nanodrop 2000 C spectrophotometer) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
19. เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) รุ่น 1100 series ของบริษัท Agilent Technologies, USA
20. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 60X15 มิลลิเมตร ของบริษัท Bio Spectrum, India
21. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 90X15 มิลลิเมตร ของบริษัท Hycon plastic, USA
22. จานไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม (microtiter plate) ของบริษัท Sorfa Life Science Research, China
23. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore, USA
24. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 ของบริษัท ISSCO, USA
25. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan
26. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
27. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany
28. แผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ขนาด 6 มิลลิเมตร ของบริษัท Whatman, United Kingdom
29. ไมโครปิเปตต์และทีปรุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson, USA
30. หลอดควิวเวตต์ (cuvette) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA
31. หลอดไวแอล (clear snap cap vial) ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Thermo Scientific, USA

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จรูป

1. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท Merck, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
3. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Merck, Germany
4. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Sigma, USA

5. คลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamylalcohol) ของบริษัท Bio Basic, Canada
6. แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ของบริษัท Carlo Erba Reagents, Spain
7. ชุดสำหรับทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจลสำเร็จรูป GeneJet Gel extraction kit ของบริษัท Thermo Scientific, USA
8. ซูโครส (sucrose) ของบริษัท Sigma, USA
9. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
10. โซเดียมซิเตรต ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) ของบริษัท LOBA Chemie, India
11. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3$) ของบริษัท Nacalai Tesque, Japan
12. โซเดียมไนเตรต (NaNO_3) ของบริษัท Merck, Germany
13. โซเดียมอะซิเตต ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
14. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
15. เซอร์แฟกทีน (surfactin) จาก *Bacillus subtilis* ของบริษัท Sigma, USA
16. ไดโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท Kemaus, Australia
17. ทริปโตเนน (tryptone) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
18. น้ำมันไซลีน (xylene) ของบริษัท Carlo Erba Reagents, Spain
19. เปปโทน (peptone) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
20. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
21. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
22. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
23. ฟรุคโทส (fructose) ของบริษัท Kemaus, Australia
24. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Bio Basic, Canada
25. เมทานอล (methanol) ของบริษัท Merck, Germany
26. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
27. ยูเรีย ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
28. ไลโซไซม์ (lysozyme) ของบริษัท Thermo Scientific, USA

29. สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ของบริษัท Siberian Enzyme, Russia
30. สีย้อมดีเอ็นเอความเข้มข้น 6 เท่า (6X loading dye) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
31. อาหารสำเร็จรูป NB (Nutrient Broth) ของบริษัท Difco™, USA
32. อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
33. อาหารสำเร็จรูป TSB (Tryptic Soy Broth) ของบริษัท Difco™, USA
34. เอทานอล (ethanol) ของบริษัท Merck, Germany
35. เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) ของบริษัท Merck, Germany
36. เอนไซม์ DNase ของบริษัท Thermo Scientific, USA
37. เอนไซม์ Proteinase K ของบริษัท Thermo Scientific, USA
38. แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) ของบริษัท Merck, Germany
39. แอมโมเนียมไนเตรต (NH₄NO₃) ของบริษัท Merck, Germany
40. Bacterial cell lysis buffer ของบริษัท Gold Biotechnology, USA
41. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ของบริษัท Thermo Scientific, USA
42. SeaKem® LE Agarose ของบริษัท Bio Science Rockland, USA
43. SERVA DNA stain G ของบริษัท Serva Electrophoresis GmbH, Germany
44. Tris base (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) (C₄H₁₁NO₃) ของบริษัท Research Organics, USA

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 แบคทีเรีย

นำ *Bacillus velezensis* B49 ที่คัดแยกได้จากดินโดยขวัญธิดา โพพิบูล (2560) มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) agar (ภาคผนวก ก1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Xu และคณะ, 2016)

3.3.2 ราก่อโรคพืช

เลี้ยงราก่อโรคพืช ได้แก่ *Acremonium furcatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora*

palmivora และ *Pyricularia oryzae* ซึ่งมาจากคลังจุลินทรีย์ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลี้ยง *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก2) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน (Kim และคณะ, 2010) และเลี้ยง *P. palmivora* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 (ภาคผนวก ก3) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน (Timmusk และคณะ, 2009)

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช

3.4.1 การทดสอบโดยใช้เทคนิคการขีดเชื้อ

การทดสอบโดยใช้เทคนิคการขีดเชื้อ ปฏิบัติโดยในชุดทดสอบนำ *B. velezensis* B49 ในข้อที่ 3.3.1 ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ V8 ให้เป็นเส้นตรง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ปราศจากเชื้อ เจาะบริเวณขอบเส้นใยของราก่อโรคพืชในข้อที่ 3.3.2 แล้วนำชิ้นวุ้นที่มีรามาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ V8 ที่ขีด *B. velezensis* B49 ไว้ โดยแบคทีเรียและราก่อโรคพืชมีระยะห่างกัน 2 เซนติเมตร สำหรับชุดควบคุมปฏิบัติเช่นเดียวกับชุดทดสอบแต่ไม่ขีดแบคทีเรีย บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 วัน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของราก่อโรคพืชของชุดทดสอบและชุดควบคุม แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Suganthi และคณะ, 2018) ดังนี้

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

โดย C คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของชุดควบคุม

T คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของชุดทดสอบ

3.4.2 การทดสอบโดยใช้เทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร

การทดสอบโดยใช้เทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร ปฏิบัติโดยในชุดทดสอบนำ *B. velezensis* B49 ในข้อที่ 3.3.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก4) โดยลงเชื้อ 1 ลูบ ในอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.5 จากนั้นลงเชื้อ

1% ในอาหารเหลว LB 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เพื่อเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส นำส่วนใสกรองไปด้วยตัวกรองปลอดเชื้อ (sterile syringe filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หรือ V8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:10 ซึ่งเตรียมอาหารเป็น 2X และ 1.2X ตามลำดับ เมื่ออาหารแข็งแล้ว วางชิ้นวุ้นของราก่อโรคพืชที่กึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนชุดควบคุมปฏิบัติเช่นเดียวกับชุดทดสอบแต่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรีย บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 วัน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อก่อโรคพืชของชุดทดสอบและชุดควบคุม แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดังสูตรในข้อที่ 3.4.1 (Sowanpreecha และ Rerngsamran, 2018)

3.5 การทดสอบสมบัติการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. velezensis* B49

3.5.1 การทดสอบการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเชื้อบนหยดน้ำมัน (drop collapse test)

หยดน้ำมันไซลีน 20 ไมโครลิตร ลงบนด้านในของฝาไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไขมันไซลีนเสถียรที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยดน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. velezensis* B49 ตามข้อที่ 3.4.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สังเกตการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจาก 1 นาที สำหรับชุดควบคุมผลบวกใช้ 1% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) และชุดควบคุมผลลบใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่ปราศจากเชื้อ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (Ibrahim, 2016)

3.5.2 การทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดง (blood agar test)

ขีด *B. velezensis* B49 เป็นเส้นตรงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar ที่มีความเข้มข้นของเลือด 5% v/v (ภาคผนวก ก5) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วดูผลการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (Vigneshwaran และคณะ, 2018)

3.5.3 การทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement test)

ใส่น้ำปลอดประจุปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเติมน้ำมันดิบ 20 ไมโครลิตร ให้น้ำมันดิบเคลือบเป็นฟิล์มลอยบนน้ำทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหยดน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. velezensis* B49 ตามข้อที่ 3.4.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สังเกตลักษณะการกระจายตัว

ของน้ำมันดิบ สำหรับชุดควบคุมผลบวกใช้ SDS และชุดควบคุมผลลบใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่ปราศจากเชื้อ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (Ibrahim, 2016)

3.5.4 การทดสอบการเกิดอิมัลชัน (emulsification index)

ใส่น้ำมันไซลีนปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในหลอดไวแอล (clear snap cap vial) และเติมน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. velezensis* B49 ตามข้อที่ 3.4.2 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) เป็นเวลา 5 นาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูผลการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และคำนวณการเกิดอิมัลชันตามสูตร (Suganthi และคณะ, 2018) ดังนี้

$$E_{24} = \frac{\text{ความสูงของการเกิดอิมัลชัน}}{\text{ความสูงของปริมาตรสารทั้งหมด}} \times 100$$

3.6 การทดสอบผลของปัจจัยทางกายภาพที่มีต่อสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการยับยั้งราก่อโรคพืช

3.6.1 ผลของความเป็นกรดเบส

นำน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. velezensis* B49 ตามข้อที่ 3.4.2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาปรับความเป็นกรดเบสที่ pH 2, 4, 6, 8 หรือ 10 โดยใช้ 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาให้ปรับความเป็นกรดเบสให้เท่ากับ pH 7 ทดสอบการเกิดอิมัลชันตามข้อที่ 3.5.4 และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยใช้วิธีผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อที่ 3.4.2 ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมปฏิบัติเช่นเดียวกับชุดทดสอบแต่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรีย (Sowanpreecha และคณะ, 2018)

3.6.2 ผลของอุณหภูมิ

นำน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. velezensis* B49 ตามข้อที่ 3.4.2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปบ่มที่อุณหภูมิ 20, 40, 60, 80, 100 หรือ 121 (autoclave) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตั้งไว้เพื่อให้อุณหภูมิของน้ำเลี้ยงเชื้อเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นทดสอบการเกิดอิมัลชันตามข้อที่ 3.5.4 และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยใช้วิธีผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อที่ 3.4.2

ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมปฏิบัติเช่นเดียวกับชุดทดสอบแต่ไม่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรีย (Sowanpreecha และคณะ, 2018)

3.7 การทดสอบผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการยับยั้งราก่อโรคพืช

เลี้ยง *B. velezensis* B49 ในอาหาร LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำเลี้ยงเชื้อออกให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ปราศจากเชื้อ และปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ 2 รอบ แล้วนำเซลล์ที่ผ่านการล้างมาแขวนลอยในน้ำปราศจากไอออนที่ปราศจากเชื้อ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.5 จากนั้นลงเชื้อ 1% ในอาหาร Mineral salt solution (MSS) ที่องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ 10.0 กรัม, ไตโซเดียมฟอสเฟต 5.0 กรัม, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.0 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัม จากนั้นแปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ โซเดียมอะซิเตต, โซเดียมซิเตรต, ฟรุกโทส, กลูโคส, กลีเซอรอล หรือซูโครส 10.0 กรัม และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมไนเตรต หรือยูเรีย 2.0 กรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการเจริญโดยสังเกตจากความขุ่นที่เกิดขึ้นสำหรับคู่แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้ จะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบการเกิดอิมัลชันตามข้อที่ 3.5.4 และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยใช้วิธีผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อที่ 3.4.2 นอกจากอาหารกำหนดสูตร (synthetic medium) ข้างต้นแล้ว ยังทดสอบโดยใช้อาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (complete medium) ซึ่งได้แก่ LB, Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก6) และ Tryptic Soy Broth (TBS) (ภาคผนวก ก7) โดยเก็บตัวอย่างที่ 24 และ 48 ชั่วโมง และนำไปทดสอบการเกิดอิมัลชันตามข้อที่ 3.5.4 และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยใช้วิธีผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อที่ 3.4.2 เช่นกัน ทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ (Pereira และคณะ, 2013)

3.8 การแปรผันเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยง *B. velezensis* B49 ในอาหารตามข้อที่ 3.7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟการเจริญ และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยใช้วิธีผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อที่ 3.4.2 (Moshafi และคณะ, 2011)

3.9 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

วิธีที่ 1 นำน้ำเลี้ยงแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่ให้ผลดีที่สุดมาเติม 6 M กรดไฮโดรคลอริก เพื่อปรับความเป็นกรดเบสให้เป็น 2 ตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที เพื่อเก็บตะกอนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แล้วล้างด้วยน้ำปลอดประจุที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นสกัดด้วยเมทานอล 100 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองตะกอนออกเก็บส่วนใสของเมทานอล และกำจัดตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ รุ่น N-100 ละลายตะกอนที่ได้ในสารละลาย 2 ชนิด ซึ่งคือ 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ ที่ pH 7.5 หรือ 100% เอทานอล (Ndlovu และคณะ, 2017) แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยใช้วิธี disc diffusion assay โดยหยดสารสกัดที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ขนาด 6 มิลลิเมตร ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยประมาณ 20 นาที จากนั้นนำแผ่นกระดาษกรองไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชั้นวุ้นของราก่อโรคพืชที่กึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยให้มีระยะห่างระหว่างแผ่นกระดาษกรองและราก่อโรคพืช 1.5 เซนติเมตร ส่วนชุดควบคุมหยดตัวทำละลาย 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ ที่ pH 7.5 (ภาคผนวก ข1) หรือ 100% เอทานอล บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 วัน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

วิธีที่ 2 นำน้ำเลี้ยงแบคทีเรียมาสกัดด้วยปริมาตรที่เท่ากันของเอทิลอะซิเตต โดยเขย่าให้เข้ากันด้วยกรวยแยกสาร แล้วตั้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนตัวทำละลายของเอทิลอะซิเตต นำไปกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุน โดยสกัดซ้ำ 2 รอบ จากน้ำเลี้ยงแบคทีเรียเดิม ละลายตะกอนด้วย 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ ที่ pH 7.5 (Carrillo และคณะ,

1996) หรือเอทานอล แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งรากล่อโรคพืชโดยใช้วิธี disc diffusion assay

3.10 การวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ส่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากข้อที่ 3.9 ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิดโครมาโทกราฟี (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) เพื่อหาโครงสร้างเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. velezensis* B49 (Anjum และคณะ, 2016) โดยใช้คอลัมน์ Cosmosil 5C18-AR (4.6×150 mm, Nacalai tesque, Kyoto, Japan) ที่มีอะซีโตนไนไตรล์กับกรดไตรฟลูออโรอะซิติกเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยสารละลาย A (อะซีโตนไนไตรล์ 10% + กรดไตรฟลูออโรอะซิติก 0.1%) และสารละลาย B (อะซีโตนไนไตรล์ 100% + กรดไตรฟลูออโรอะซิติก 0.1%) เป็นสารละลายผสมที่มีการปรับอัตราส่วนตามเวลาที่เปลี่ยนไป (gradient elution) ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีภาวะดังนี้ ณ เวลาที่ 0 นาที อัตราของสารละลาย B เท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ 5 นาที อัตราของสารละลาย B เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ 20 นาที อัตราของสารละลาย B เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ 21 นาที อัตราของสารละลาย B เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ 30 นาที อัตราของสารละลาย B เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ 30.10 นาที อัตราของสารละลาย B เท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ และเวลาที่ 35 นาที อัตราของสารละลาย B เท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 220 นาโนเมตร และเก็บตัวอย่างจากโครมาโทแกรมในแต่ละช่วงเวลา (retention time) ทุก ๆ 5 นาที โดยสารมาตรฐานเซอร์แฟกทินมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องอบแห้งสุญญากาศและทดสอบการยับยั้งรากล่อโรคพืชโดยใช้วิธี disc diffusion assay

3.11 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

3.11.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจาก *B. velezensis* B49

สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียโดยวิธีของ LMU-Munich Team (Wecke, 2010) ดังนี้ เลี้ยง *B. velezensis* B49 บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.8 – 1.0 จึงปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และกระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย TEN (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมไลโซไซม์ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) (ภาคผนวก ข3) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร, proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลาย TEN* (ภาคผนวก ข4) ปริมาตร 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติมสารละลายฟีนอล ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บส่วนใสที่อยู่ด้านบนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอลอีกครั้ง แล้วนำส่วนใสที่อยู่ด้านบนมาเติมสารละลายผสมของคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเก็บส่วนใสที่อยู่ด้านบน ย้ายไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ที่เย็น ปริมาตรสองเท่า แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายออก แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายออก และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TEN* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.11.2 การเพิ่มปริมาณเฮาส์คิปปิงยีน (housekeeping gene)

งานวิจัยก่อนหน้านี้โดยขวัญธิดา โพพิทูล (2560) ได้ระบุเอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ว่าเป็น *Bacillus velezensis* แต่เนื่องจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีความคล้ายคลึงกันมากที่ระดับของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16 rDNA ดังที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นเพื่อให้สามารถระบุเอกลักษณ์ของแบคทีเรียได้แม่นยำมากขึ้น จึงจำเป็นต้องเปรียบเทียบลำดับของเฮาส์คิปปิงยีน ดังนั้นเพิ่มปริมาณเฮาส์คิปปิงยีน ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในทุกเซลล์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *B. velezensis* B49 เป็นแม่แบบ ซึ่งมีเฮาส์คิปปิงยีนที่ตรวจสอบทั้งหมด 5 ยีน คือ

groEL, gyrA, polC, purH, และ rpoB ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 3.1 (Rooney และคณะ, 2009) ซึ่งยีน groEL มีหน้าที่ในการตรวจสอบการม้วนพับ (folding) ที่ถูกต้องของโปรตีนต่าง ๆ, ยีน gyrA มีหน้าที่สังเคราะห์ DNA gyrase subunit A, ยีน polC มีหน้าที่สังเคราะห์ DNA polymerase III, ยีน purH มีหน้าที่ในการสังเคราะห์พิวรีน และยีน rpoB มีหน้าที่สังเคราะห์ RNA polymerase subunit beta (UniProt, 2020)

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สไพรเมอร์ของเฮาส์คิปปิงยีน

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (5'-3')	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีเวิร์สไพรเมอร์ (5'-3')
groEL	GAGCTTGAAGTKGTTGAAGG	TGAGCGTGTWACTTTTTGTWG
gyrA	CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT	CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT
polC	TTGTCGCTCAYAATGCAAGC	YTCAAGCATTTCRTCTGTGCG
purH	ACAGAGCTTGGCGTTGAAGT	GCTTCTTGGCTGAATGAAGG
rpoB	GACGTGGGATGGCTACAAC	ATTGTCGCCTTTAACGATGG

โดยเตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา ดังนี้

5X Phusion HF Buffer	10	ไมโครลิตร
50 μ M ของฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	1	ไมโครลิตร
50 μ M ของรีเวิร์สไพรเมอร์	1	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้ (50 ng/ μ l)	1	ไมโครลิตร
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	0.5	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออนและปลอดเชื้อ	35.5	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงเบา ๆ โดยหลอดสารละลายต้องอยู่ในสถานะน้ำแข็งตลอดเวลา จากนั้นนำหลอดสารละลายผสมที่ได้ใส่ลงเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งค่าอุณหภูมิและเวลาดังนี้

ภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันสำหรับยีน *groEL*, *gyrA*, *purH* และ *rpoB*

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	

ภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันสำหรับยีน *polC*

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 0.8% ที่ห่อมละลายใน 1X TAE (ภาคผนวก ข5) ที่เติมสารละลายสำหรับย้อมดีเอ็นเอ SERVA DNA stain G ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ในสารละลายอะกาโรส 100 มิลลิกรัม และผสม 6X loading dye กับสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 แล้วใส่ลงในหลุมของเจลที่เตรียมไว้ และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder ในการเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้ชุดสำหรับทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจลสำเร็จรูป GeneJet Gel extraction kit โดยตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการมาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม binding buffer ปริมาตรเท่ากับเจล แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 – 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ประกอบคอลัมน์สำหรับทำบริสุทธิ์เข้ากับหลอดเก็บสารละลาย จากนั้นใส่สารละลายเจลลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วเติม wash buffer ปริมาตร 700

ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงต่ออีก 1 นาที เทสารละลายในหลอดเก็บสารละลายทิ้ง แล้วนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่มาประกอบเข้ากับคอลัมน์แทนหลอดเก็บสารละลาย ใส่ elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงตรงกลางเมมเบรนในคอลัมน์ และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเก็บสารละลายดีเอ็นเอ จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้บริการจากบริษัท Integrated DNA Technologies ประเทศสิงคโปร์ จากนั้นวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลใน NCBI โดยใช้วิธี BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.12 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองมีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวแปรโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple comparison test โดยใช้โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics เวอร์ชัน 22

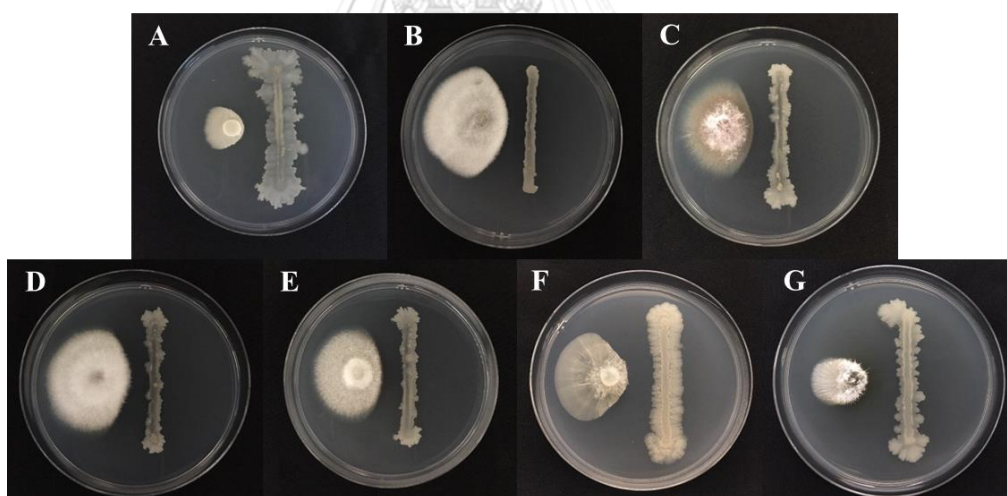
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช

4.1.1 การทดสอบโดยใช้เทคนิคการขีดเชื้อ

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยใช้เทคนิคการขีดเชื้อของ *Bacillus velezensis* B49 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หรือ V8 พร้อมกับราก่อโรคพืชทั้ง 7 ชนิด พบว่า *B. velezensis* B49 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชทั้ง 7 ชนิด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ *Acremonium furcatum* เท่ากับ 30.22 ± 5.39 เปอร์เซ็นต์, *Colletotrichum gloeosporioides* เท่ากับ 28.34 ± 2.14 เปอร์เซ็นต์, *Fusarium moniliforme* เท่ากับ 24.79 ± 1.73 เปอร์เซ็นต์, *Fusarium proliferatum* เท่ากับ 27.16 ± 3.75 เปอร์เซ็นต์, *Fusarium solani* เท่ากับ 24.20 ± 2.40 เปอร์เซ็นต์, *Phytophthora palmivora* เท่ากับ 32.86 ± 0.82 เปอร์เซ็นต์ และ *Pyricularia oryzae* เท่ากับ 31.60 ± 3.01 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 การทดสอบการยับยั้งราโดย *B. velezensis* B49 ด้วยเทคนิคการขีดเชื้อ
A) *A. furcatum*, B) *C. gloeosporioides*, C) *F. moniliforme*, D) *F. proliferatum*,
E) *F. solani*, F) *P. palmivora* และ G) *P. oryzae*

4.1.2 การทดสอบโดยใช้เทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร

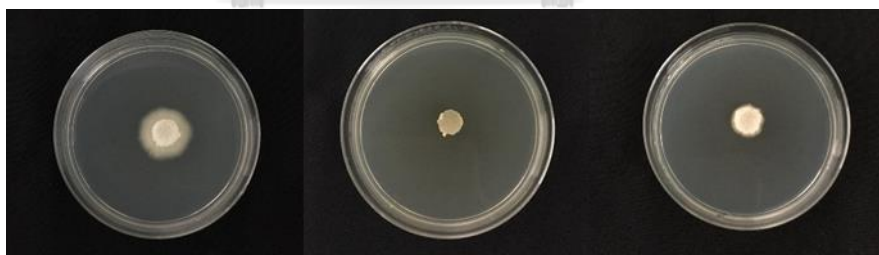
การทดสอบการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยใช้เทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. velezensis* B49 ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หรือ V8 ที่อุณหอมเหลวไว้ ในอัตราส่วน 1:1 และ

1:10 โดยทดสอบกับราก่อโรคพืชทั้ง 7 ชนิด พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. velezensis* B49 สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้ทุกชนิด ยกเว้นที่อัตราส่วน 1:10 ของ *P. palmivora* ที่ไม่พบการยับยั้งการเจริญ โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของราก่อโรคพืชเป็นดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร

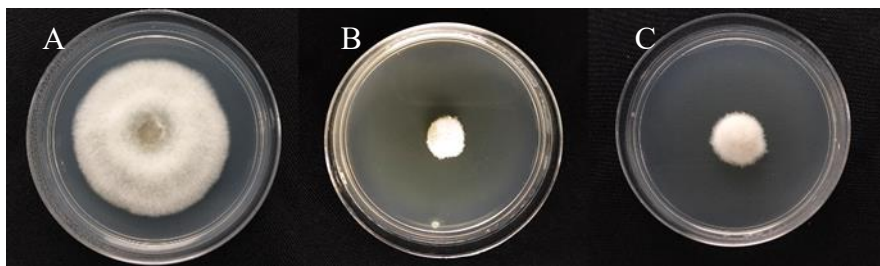
ราโรคพืช	การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชที่อัตราส่วนแตกต่างกัน	
	อัตราส่วน 1:1	อัตราส่วน 1:10
<i>A. furcatum</i>	96.08 ± 6.79 %	33.85 ± 3.92 %
<i>C. gloeosporioides</i>	71.23 ± 1.38 %	59.20 ± 1.80 %
<i>F. moniliforme</i>	68.49 ± 1.62 %	17.31 ± 1.12 %
<i>F. proliferatum</i>	64.08 ± 2.24 %	18.75 ± 0.26 %
<i>F. solani</i>	53.84 ± 0.61 %	33.07 ± 2.49 %
<i>P. palmivora</i>	67.14 ± 3.76 %	0.00 ± 0.00 %
<i>P. oryzae</i>	100.00 ± 0.00 %	68.34 ± 2.35 %

A. furcatum ในอัตราส่วน 1:1 สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 96.08 ± 6.79 เปอร์เซ็นต์ และในอัตราส่วน 1:10 สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 33.85 ± 3.92 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.2



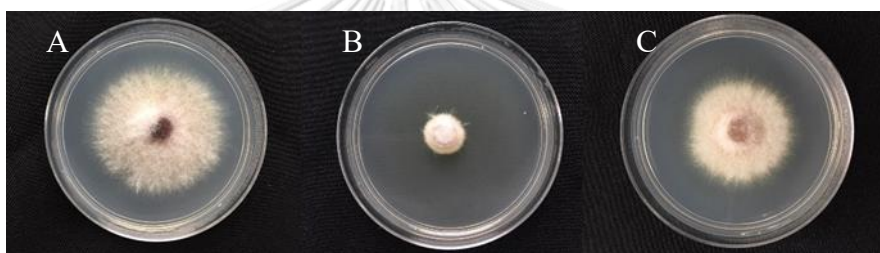
รูปที่ 4.2 การทดสอบการยับยั้ง *A. furcatum* โดย *B. velezensis* B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยภาพ A เป็นชุดควบคุม ภาพ B เป็นที่อัตราส่วน 1:1 และภาพ C เป็นที่อัตราส่วน 1:10

C. gloeosporioides สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 71.23 ± 1.38 เปอร์เซ็นต์ และในอัตราส่วน 1:10 สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 59.20 ± 1.80 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.3



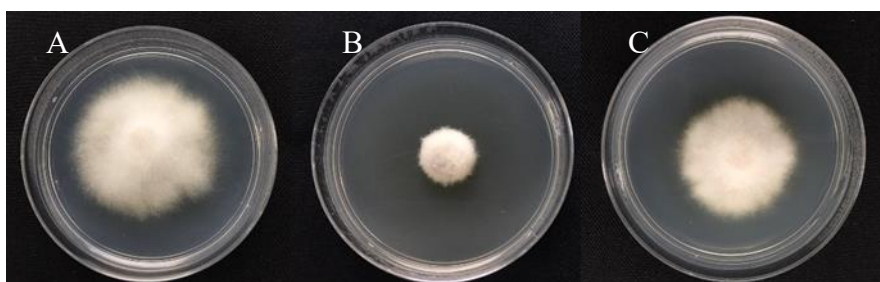
รูปที่ 4.3 การทดสอบการยับยั้ง *C. gloeosporioides* โดย *B. velezensis* B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยภาพ A เป็นชุดควบคุม ภาพ B เป็นที่อัตราส่วน 1:1 และภาพ C เป็นที่อัตราส่วน 1:10

F. moniliforme สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 68.49 ± 1.62 เปอร์เซ็นต์ และในอัตราส่วน 1:10 สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 17.31 ± 1.12 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.4



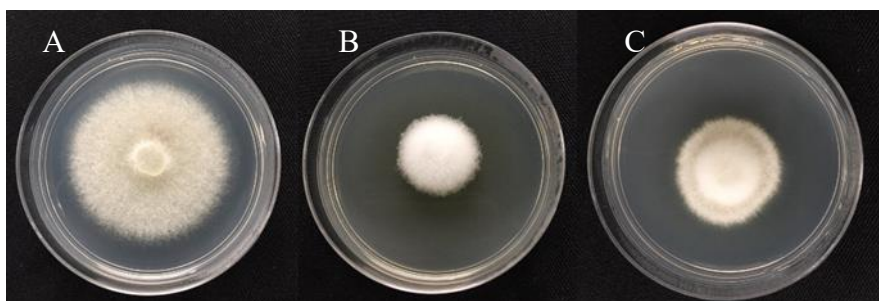
รูปที่ 4.4 การทดสอบการยับยั้ง *F. moniliforme* โดย *B. velezensis* B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยภาพ A เป็นชุดควบคุม ภาพ B เป็นที่อัตราส่วน 1:1 และภาพ C เป็นที่อัตราส่วน 1:10

F. proliferatum สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 64.08 ± 2.24 เปอร์เซ็นต์ และในอัตราส่วน 1:10 สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 18.75 ± 0.26 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.5



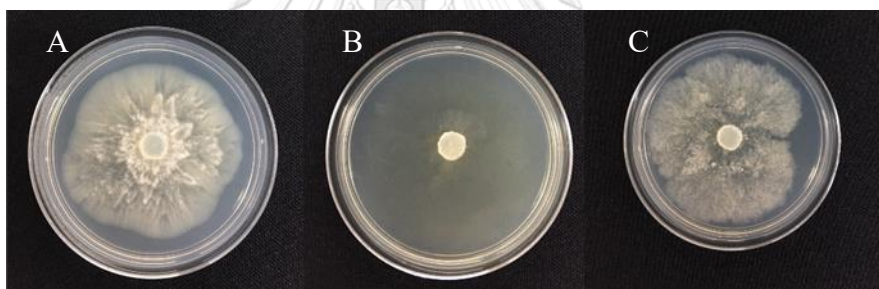
รูปที่ 4.5 การทดสอบการยับยั้ง *F. proliferatum* โดย *B. velezensis* B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยภาพ A เป็นชุดควบคุม ภาพ B เป็นที่อัตราส่วน 1:1 และภาพ C เป็นที่อัตราส่วน 1:10

F. solani สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 53.84 ± 0.61 เปอร์เซ็นต์ และในอัตราส่วน 1:10 สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 33.07 ± 2.49 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.6



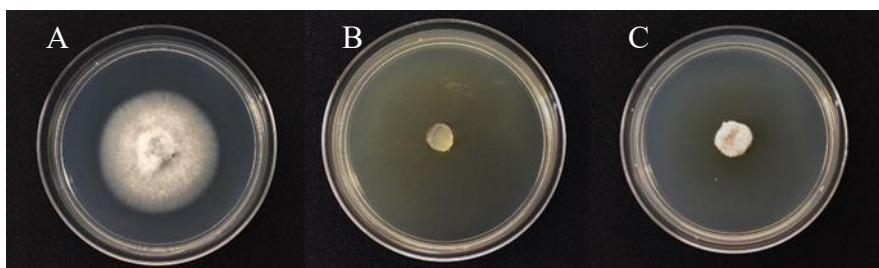
รูปที่ 4.6 การทดสอบการยับยั้ง *F. solani* โดย *B. velezensis* B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยภาพ A เป็นชุดควบคุม ภาพ B เป็นที่อัตราส่วน 1:1 และภาพ C เป็นที่อัตราส่วน 1:10

P. palmivora สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 67.14 ± 3.76 เปอร์เซ็นต์ และในอัตราส่วน 1:10 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ ดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 การทดสอบการยับยั้ง *P. palmivora* โดย *B. velezensis* B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยภาพ A เป็นชุดควบคุม ภาพ B เป็นที่อัตราส่วน 1:1 และภาพ C เป็นที่อัตราส่วน 1:10

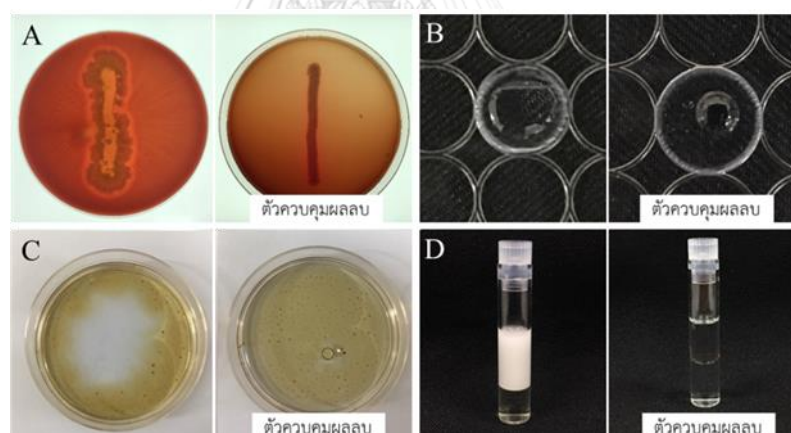
P. oryzae สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ และในอัตราส่วน 1:10 สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 68.34 ± 2.35 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 การทดสอบการยับยั้ง *P. oryzae* โดย *B. velezensis* B49 ด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยภาพ A เป็นชุดควบคุม ภาพ B เป็นที่อัตราส่วน 1:1 และภาพ C เป็นที่อัตราส่วน 1:10

4.2 การทดสอบสมบัติการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. velezensis* B49

การทดสอบสมบัติการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. velezensis* B49 โดยใช้ 4 วิธีที่แตกต่างกัน พบว่า *B. velezensis* B49 ให้ผลบวกกับทั้ง 4 วิธี ดังนี้ การทดสอบการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงแสดงให้เห็นความสามารถในการแตกสลายเม็ดเลือดแดงของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้น โดยจะเห็นบริเวณที่เม็ดเลือดแดงเกิดการแตกสลายเป็นโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรีย ดังรูปที่ 4.9A การทดสอบการยุบตัวของหยดน้ำเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดสอบจะเห็นว่าเกิดผลบวก โดยมีการกระจายตัวของหยดน้ำเลี้ยงเชื้อบนคราบน้ำมันไซลีน ดังรูปที่ 4.9B การทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. velezensis* B49 สามารถทำให้เกิดการกระจายตัวของฟิล์มน้ำมันดิบ ดังรูปที่ 4.9C การทดสอบการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. velezensis* B49 สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดอิมัลชัน และสามารถคำนวณการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) ได้ 62.5 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.9D จากการให้ผลบวกกับการทดสอบทั้ง 4 วิธี จึงเป็นไปได้สูงว่า *B. velezensis* B49 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ



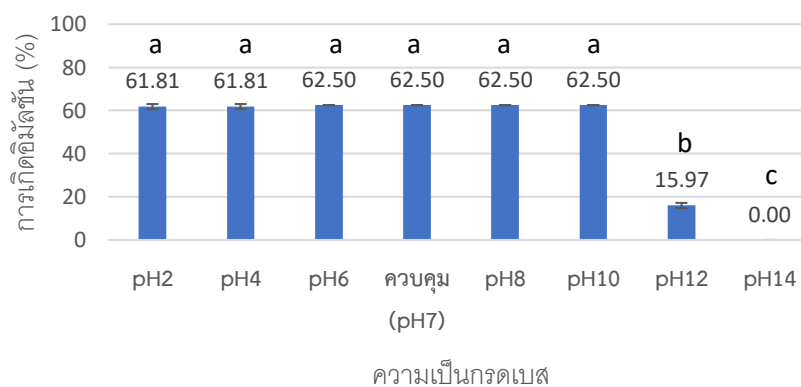
รูปที่ 4.9 การทดสอบสมบัติการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. velezensis* B49

- A) การทดสอบการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง, B) การทดสอบการยุบตัวของหยดน้ำเลี้ยงเชื้อ, C) การทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน และ D) การทดสอบการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง

4.3 การทดสอบผลของปัจจัยทางกายภาพที่มีต่อสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการยับยั้งราก่อโรคพืช

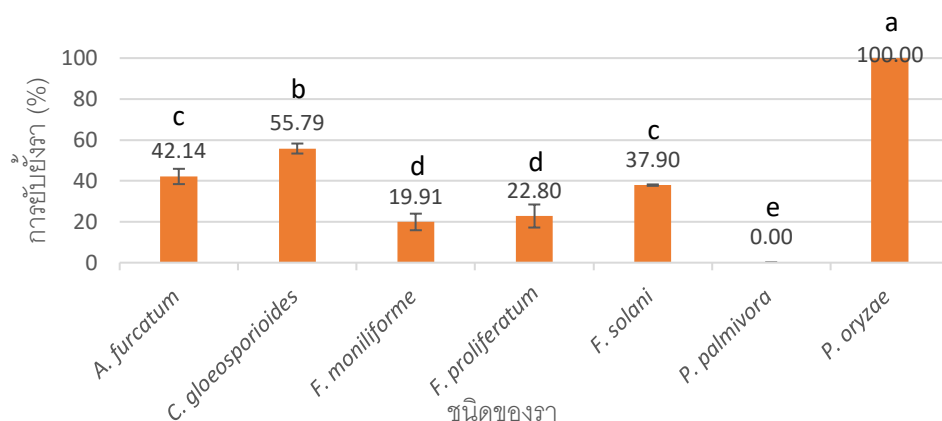
4.3.1 ผลของความเป็นกรดเบส

การทดสอบผลของความเป็นกรดเบสที่มีต่อสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ใช้สมบัติการเกิดอิมัลชัน (E_{24}) ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. velezensis* B49 เป็นเกณฑ์ติดตามผล โดยแปรผันความเป็นกรดเบสตั้งแต่ 2 ถึง 14 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับความเป็นกรดเบสให้เท่ากับ 7 แล้วจึงทดสอบค่า E_{24} พบว่าเมื่อความเป็นกรดเบสอยู่ระหว่าง 2 – 10 จะเกิดอิมัลชันไม่แตกต่างกันโดยอยู่ที่ประมาณ 61.81 ± 1.20 ถึง 62.50 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นเป็น 12 การเกิดอิมัลชันเหลือเพียง 15.97 ± 1.20 เปอร์เซ็นต์ และไม่เกิดอิมัลชันเลยที่ความเป็นกรดเบสเท่ากับ 14 สำหรับชุดควบคุมซึ่งมีความเป็นกรดเบสที่ 7 เกิดอิมัลชันเท่ากับ 62.5 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามรูปที่ 4.10



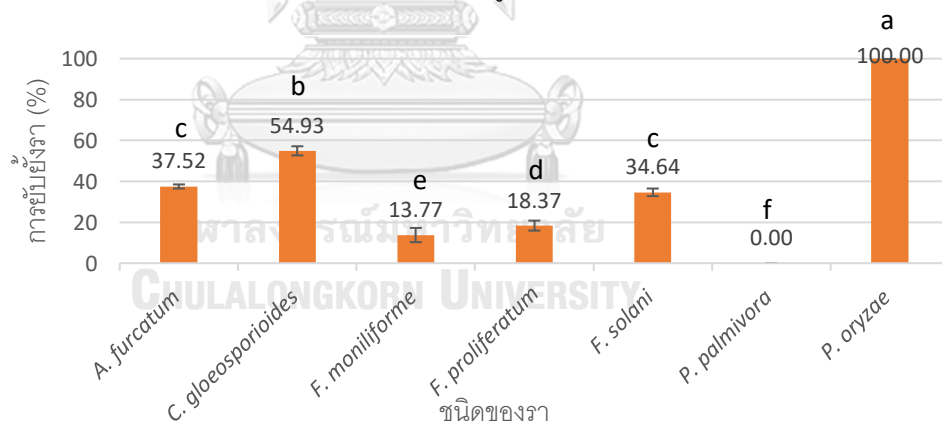
รูปที่ 4.10 การเกิดอิมัลชัน (E_{24}) ที่ความเป็นกรดเบสตั้งแต่ 2 ถึง 14 และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแปรผันความเป็นกรดเบสและปรับความเป็นกรดเบสให้เท่ากับ 7 แล้ว ไปทดสอบการยับยั้งราก่อโรคพืช โดยใช้วิธีผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วน 1:10 พบว่าที่ความเป็นกรดเบสที่ 2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้เท่ากับ 42.14 ± 3.73 , 55.79 ± 2.44 , 19.91 ± 4.05 , 22.80 ± 5.63 , 37.90 ± 0.34 , และ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ ดังรูปที่ 4.11



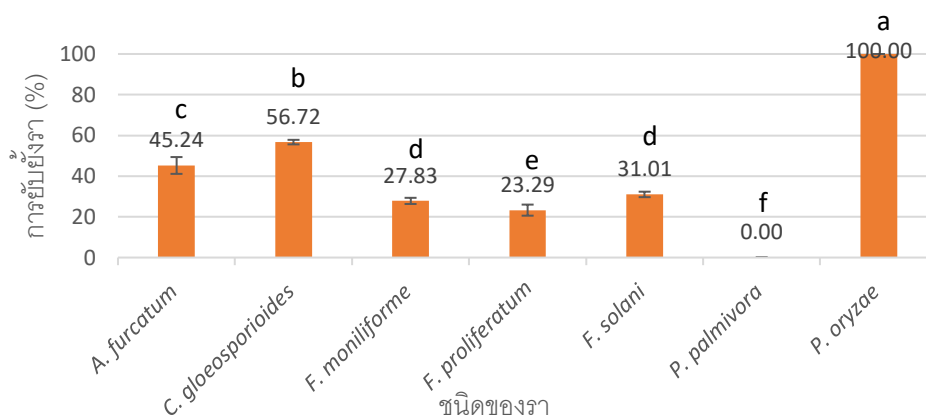
รูปที่ 4.11 การยับยั้งการเจริญของรากล่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 2 และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ความเป็นกรดเบสที่ 4 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้เท่ากับ 37.52 ± 1.00 , 54.93 ± 2.23 , 13.77 ± 3.47 , 18.37 ± 2.45 , 34.64 ± 1.86 , และ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ ดังรูปที่ 4.12



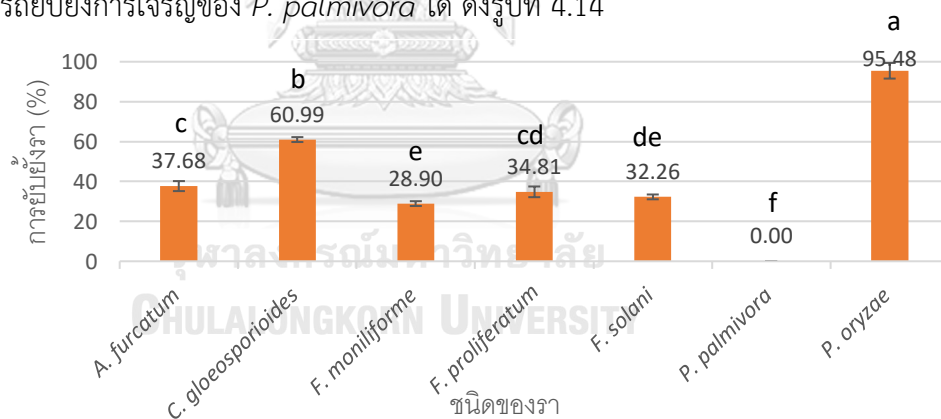
รูปที่ 4.12 การยับยั้งการเจริญของรากล่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 4 และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ความเป็นกรดเบสที่ 6 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้เท่ากับ 45.24 ± 4.12 , 56.72 ± 1.11 , 27.83 ± 1.52 , 23.29 ± 2.72 , 31.01 ± 1.34 , และ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ ดังรูปที่ 4.13



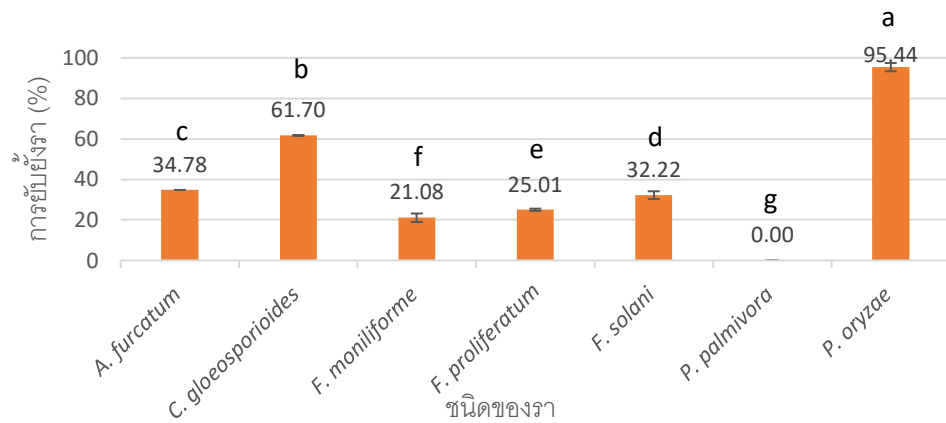
รูปที่ 4.13 การยับยั้งการเจริญของรากล่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 6 และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ความเป็นกรดเบสที่ 8 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้เท่ากับ 37.68 ± 2.51 , 60.99 ± 1.23 , 28.90 ± 1.20 , 34.81 ± 2.68 , 32.26 ± 1.21 , และ 95.48 ± 3.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ ดังรูปที่ 4.14



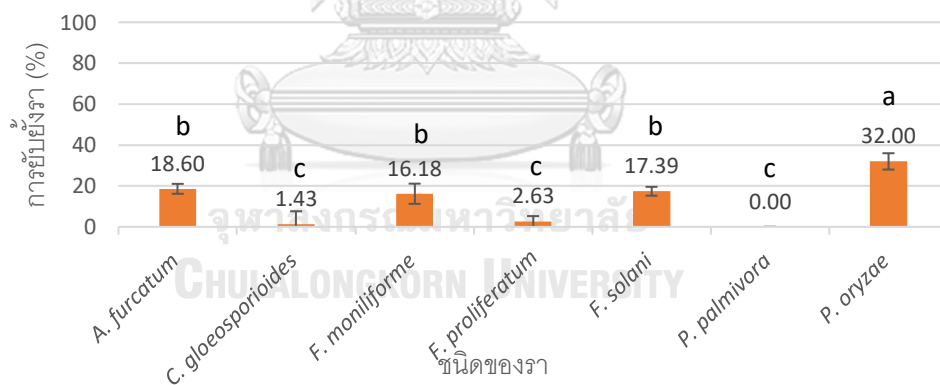
รูปที่ 4.14 การยับยั้งการเจริญของรากล่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 8 และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ความเป็นกรดเบสที่ 10 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้เท่ากับ 34.78 ± 0.00 , 61.70 ± 0.00 , 21.08 ± 2.11 , 25.01 ± 0.57 , 32.22 ± 1.92 , และ 95.44 ± 2.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ ดังรูปที่ 4.15



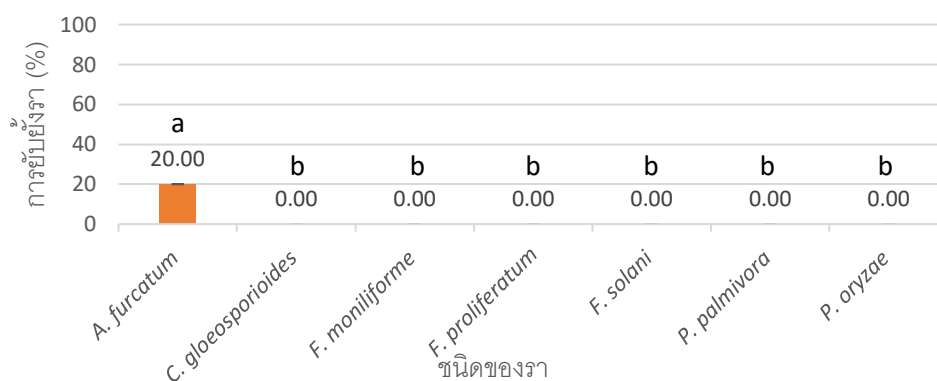
รูปที่ 4.15 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 10 และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ความเป็นกรดเบสที่ 12 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้เท่ากับ 18.60 ± 2.43 , 1.43 ± 6.20 , 16.18 ± 4.93 , 2.63 ± 2.63 , 17.39 ± 2.17 , และ 32.00 ± 4.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ ดังรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 12 และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ความเป็นกรดเบสที่ 14 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum* ได้เพียงชนิดเดียว โดยยับยั้งได้เท่ากับ 20.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนราอีก 6 ชนิดที่เหลือไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ ดังรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 14 และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

โดยสรุป การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสพบว่า สำหรับ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum* และ *F. solani* นั้น ความเป็นกรดเบสระหว่าง pH 2 ถึง 10 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่เมื่อความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นเป็น pH 12 พบว่าทำให้สมบัติการยับยั้งราลดลงอย่างมาก นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบสที่ 14 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชส่วนใหญ่ได้ ยกเว้น *A. furcatum* เพียงชนิดเดียวที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญได้เพียงเล็กน้อย ทั้งนี้การยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ในช่วงความเป็นกรดเบสที่ 2 ถึง 10 สามารถยับยั้งการเจริญได้สูงกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 สรุปการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับความเป็นกรดเบส

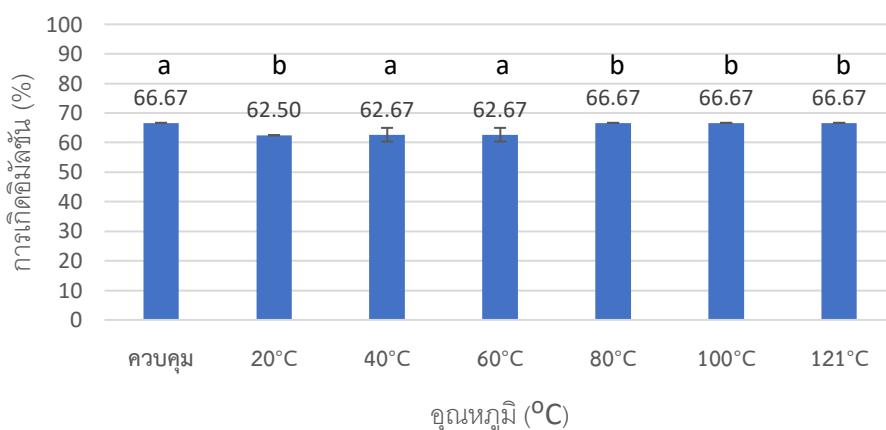
ราก่อโรคพืช	ความเป็นกรดเบสที่ pH ต่าง ๆ *							
	2	4	6	7 (ควบคุม)	8	10	12	14
<i>A. furcatum</i>	42.14 ± 3.73	37.52 ± 1.00	45.24 ± 4.12	33.85 ± 3.92	37.68 ± 2.51	34.78 ± 0.00	18.60 ± 2.43	20.00 ± 0.00
<i>C. gloeosporioides</i>	55.79 ± 2.44	54.93 ± 2.23	56.72 ± 1.11	59.20 ± 1.80	60.99 ± 1.23	61.70 ± 0.00	1.43 ± 6.20	0.00 ± 0.00
<i>F. moniliforme</i>	19.91 ± 4.05	13.77 ± 3.47	27.83 ± 1.52	17.31 ± 1.12	28.90 ± 1.20	21.08 ± 2.11	16.18 ± 4.93	0.00 ± 0.00
<i>F. proliferatum</i>	22.80 ± 5.63	18.37 ± 2.45	23.29 ± 2.72	18.75 ± 0.26	34.81 ± 2.68	25.01 ± 0.57	2.63 ± 2.63	0.00 ± 0.00
<i>F. solani</i>	37.90 ± 0.34	34.64 ± 1.86	31.01 ± 1.34	33.07 ± 2.49	32.26 ± 1.21	32.22 ± 1.92	17.39 ± 2.17	0.00 ± 0.00
<i>P. palmivora</i>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>P. oryzae</i>	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	68.34 ± 2.35	95.48 ± 3.92	95.44 ± 2.02	32.00 ± 4.00	0.00 ± 0.00

*สีเขียวแทนความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) จากชุดควบคุม

*สีส้มแทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) จากชุดควบคุม

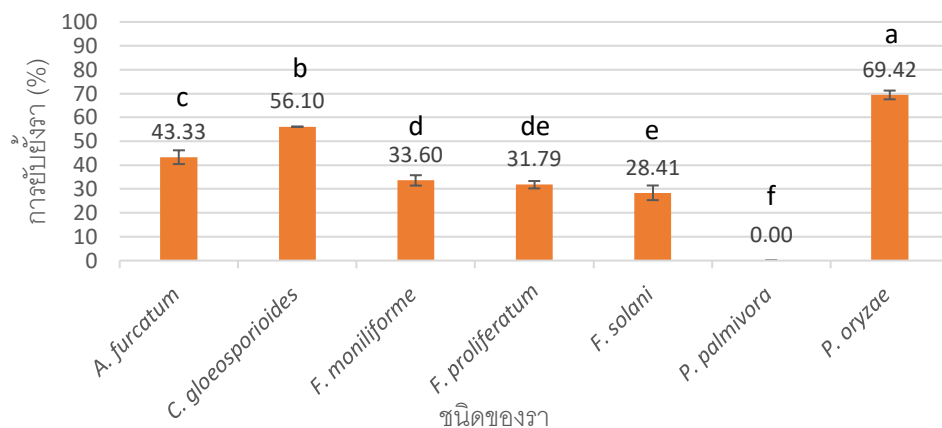
4.3.2 ผลของอุณหภูมิ

การทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ใช้สมบัติการเกิดอิมัลชัน (E_{24}) ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. velezensis* B49 เป็นเกณฑ์ติดตามผลเช่นกัน โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 20, 40, 60, 80, 100 หรือ 121 (autoclave) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตั้งไว้ให้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วจึงทดสอบค่า E_{24} พบว่าการแปรผันอุณหภูมิในช่วง 20 – 121 องศาเซลเซียส ไม่กระทบต่อการเกิดอิมัลชัน โดยมีค่า E_{24} ระหว่าง 62.50 ± 0.00 ถึง 66.67 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ผ่านการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีค่า E_{24} เท่ากับ 66.67 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามรูปที่ 4.18



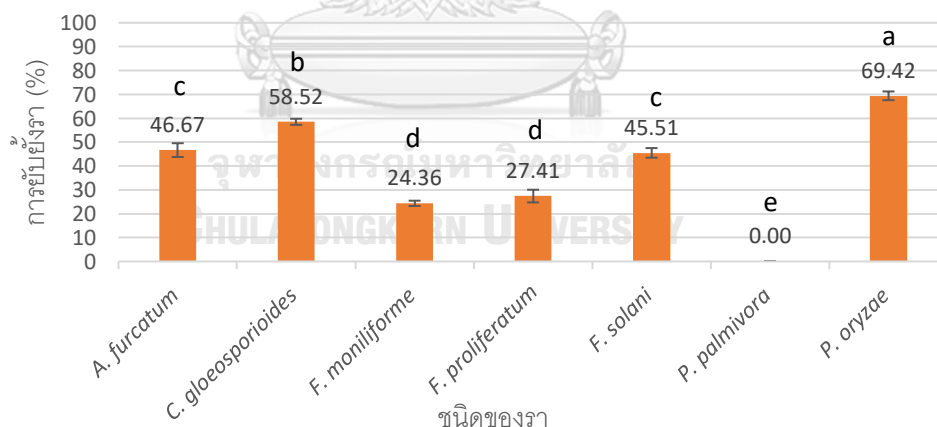
รูปที่ 4.18 การเกิดอิมัลชัน (E_{24}) ของ *B. velezensis* B49 ที่อุณหภูมิ 20 ถึง 121 องศาเซลเซียส และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิและตั้งไว้ให้เท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปทดสอบการยับยั้งราก่อโรคพืช โดยใช้วิธีผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วน 1:10 พบว่า ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้เท่ากับ 43.33 ± 2.89 , 56.10 ± 0.00 , 33.60 ± 2.17 , 31.79 ± 1.55 , 28.41 ± 3.07 และ 69.42 ± 1.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ ดังรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

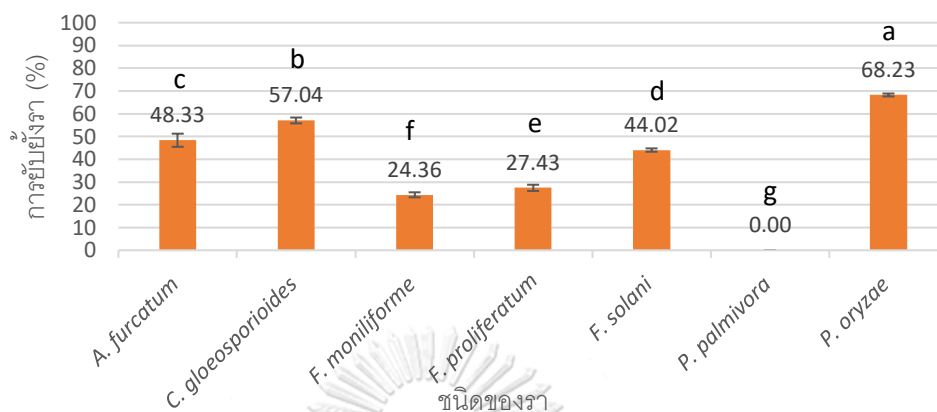
อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้เท่ากับ 46.67 ± 2.89 , 58.52 ± 1.28 , 24.36 ± 1.11 , 27.41 ± 2.67 , 45.51 ± 2.01 และ 69.42 ± 1.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ ดังรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.20 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

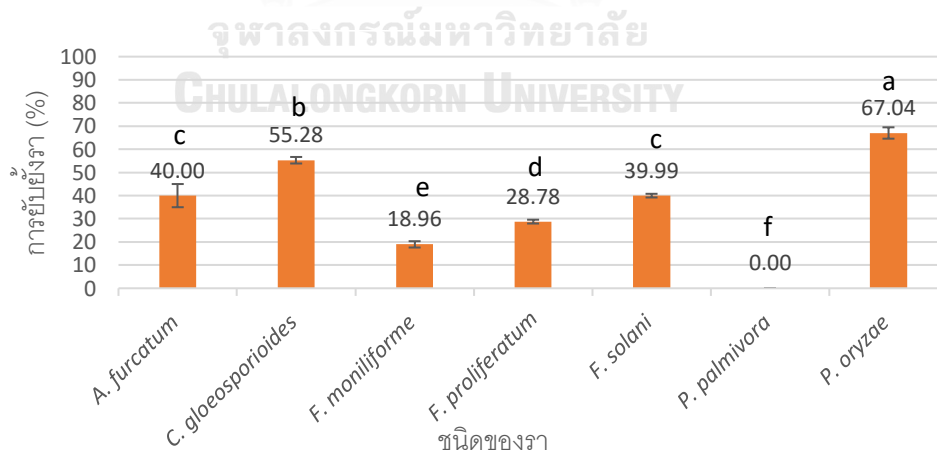
อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้เท่ากับ

48.33 ± 2.89, 57.04 ± 1.28, 24.36 ± 1.11, 27.43 ± 1.36, 44.02 ± 0.73 และ 68.23 ± 0.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ ดังรูปที่ 4.21



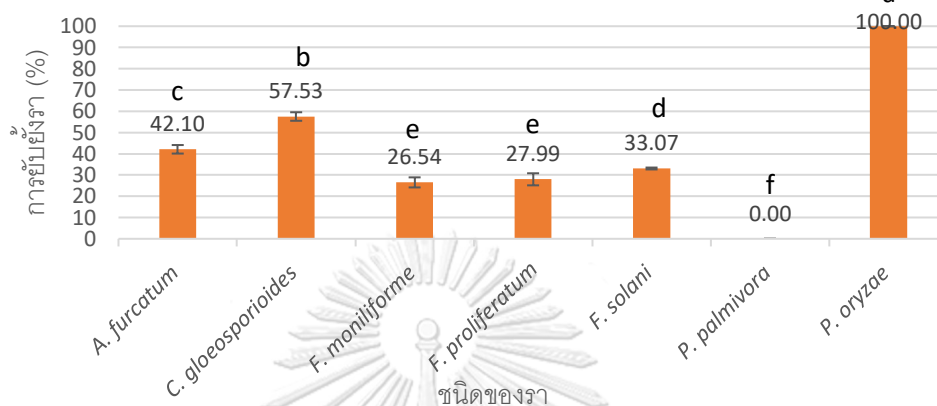
รูปที่ 4.21 การยับยั้งการเจริญของรากล่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้เท่ากับ 40.00 ± 5.00, 55.28 ± 1.41, 18.96 ± 1.36, 28.78 ± 0.82, 39.99 ± 0.79 และ 67.04 ± 2.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ ดังรูปที่ 4.22



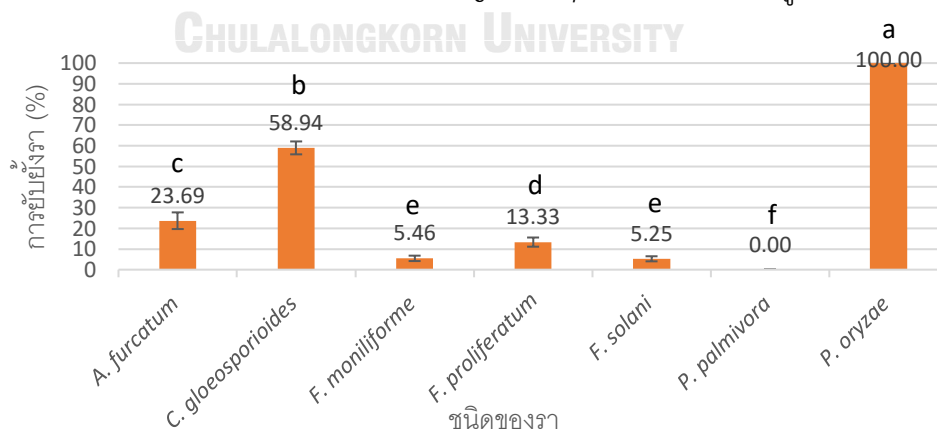
รูปที่ 4.22 การยับยั้งการเจริญของรากล่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้เท่ากับ 42.10 ± 2.01 , 57.53 ± 2.01 , 26.54 ± 2.37 , 27.99 ± 2.83 , 33.07 ± 0.45 และ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ ดังรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.23 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani* และ *P. oryzae* ได้เท่ากับ 23.69 ± 4.04 , 58.94 ± 3.12 , 5.46 ± 1.31 , 13.33 ± 2.22 , 5.25 ± 1.23 และ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ ดังรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.24 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

โดยสรุปแล้ว การยับยั้งการเจริญของรากล่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิ พบว่า สำหรับ *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum* และ *F. solani* นั้น อุณหภูมิระหว่าง 20 ถึง 100 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งรา เนื่องจากยังแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่เมื่อน้ำเลี้ยงเชื้อผ่านการปรับอุณหภูมิให้เพิ่มขึ้นเป็น 121 องศาเซลเซียส พบว่าทำให้สมบัติในการยับยั้งรา ส่วนใหญ่ลดลงอย่างชัดเจน ยกเว้นสำหรับ *C. gloeosporioides* ที่แม้แต่เมื่อผ่านการปรับอุณหภูมิเป็น 121 องศาเซลเซียส ก็ยังคงแสดงความสามารถในการยับยั้งราใกล้เคียงกับชุดควบคุม สำหรับการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* นั้น เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อผ่านการปรับอุณหภูมิให้เป็น 100 และ 121 องศาเซลเซียสแล้ว สามารถยับยั้งการเจริญได้สูงกว่าชุดควบคุม ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 สรุปการยับยั้งการเจริญของรากล่อโรคพืชโดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับอุณหภูมิ

รากล่อโรคพืช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) *						
	20	37 (ควบคุม)	40	60	80	100	121 (autoclave)
<i>A. furcatum</i>	43.33 ± 2.89	33.85 ± 3.92	46.67 ± 2.89	48.33 ± 2.89	40.00 ± 5.00	42.10 ± 2.01	23.69 ± 4.04
<i>C. gloeosporioides</i>	56.10 ± 0.00	59.20 ± 1.80	58.52 ± 1.28	57.04 ± 1.28	55.28 ± 1.41	57.53 ± 2.01	58.94 ± 3.12
<i>F. moniliforme</i>	33.60 ± 2.17	17.31 ± 1.12	24.36 ± 1.11	24.36 ± 1.11	18.96 ± 1.36	26.54 ± 2.01	5.46 ± 1.31
<i>F. proliferatum</i>	31.79 ± 1.55	18.75 ± 0.26	27.41 ± 2.67	27.43 ± 1.36	28.78 ± 0.82	27.99 ± 2.37	13.33 ± 2.22
<i>F. solani</i>	28.41 ± 3.07	33.07 ± 2.49	45.51 ± 2.01	44.02 ± 0.73	39.99 ± 0.79	33.07 ± 0.45	5.25 ± 1.23
<i>P. palmivora</i>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>P. oryzae</i>	69.42 ± 1.83	68.34 ± 2.35	69.42 ± 1.83	68.23 ± 0.64	67.04 ± 2.45	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00

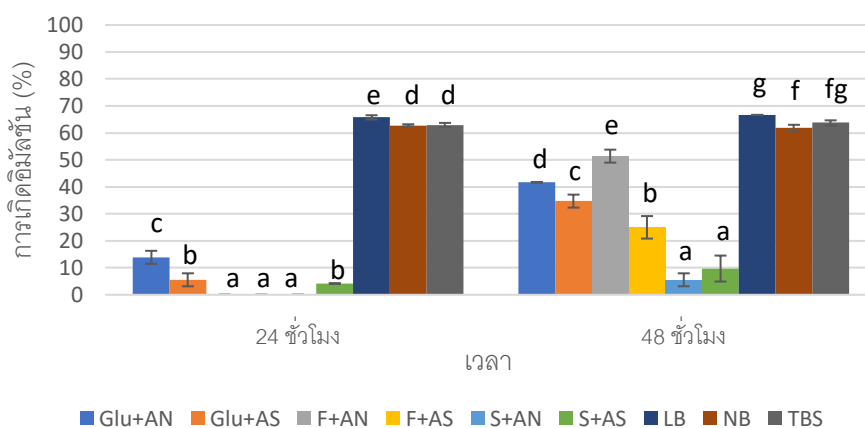
*สีเขียวแทนความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) จากชุดควบคุม

*สีส้มแทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) จากชุดควบคุม

4.4 การทดสอบผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สำหรับอาหารกำหนดสูตร (defined medium) เมื่อจับคู่แหล่งคาร์บอน ได้แก่ โซเดียมอะซิเตต, โซเดียมซิเตรต, ฟรุกโทส, กลูโคส, กลิเซอรอล หรือซูโครส และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมไนเตรต หรือยูเรีย ลงในอาหาร Mineral salt solution ที่จำกัดทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน สามารถจับคู่อาหารได้ทั้งหมด 24 คู่ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า *B. velezensis* B49 สามารถเจริญได้ในอาหารเพียงแค่ 6 คู่ ได้แก่ กลูโคสกับแอมโมเนียมไนเตรต (Glu+AN), กลูโคสกับแอมโมเนียมซัลเฟต (Glu+AS), ฟรุกโทสกับแอมโมเนียมไนเตรต (F+AN), ฟรุกโทสกับแอมโมเนียมซัลเฟต (F+AS), ซูโครสกับแอมโมเนียมไนเตรต (S+AN) และซูโครสกับแอมโมเนียมซัลเฟต (S+AS) เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อจากคู่ของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนทั้ง 6 คู่เหล่านี้ มาทดสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้สมบัติการเกิดอิมัลชัน (E_{24})

ของน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นเกณฑ์ติดตามผล โดยทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ได้ผลดังรูปที่ 4.25 ซึ่งพบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงให้ผลการเกิดอิมัลชันสูงกว่าที่ 24 ชั่วโมง อาหารที่มีฟรุกโทสกับแอมโมเนียมไนเตรตเป็นคู่ที่ทำให้เกิดอิมัลชันได้มากที่สุดได้เท่ากับ 51.39 ± 2.41 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากอาหารกำหนดสูตรข้างต้นแล้ว สำหรับอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (complete medium) ได้ทดสอบกับอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ LB, NB และ TSB และพบว่าผลการเกิดอิมัลชันเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร LB, NB และ TSB มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 66.67 ± 0.00 , 62.76 ± 0.44 และ 63.89 ± 1.20 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน โดยสามารถเกิดอิมัลชันได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร LB ดังรูปที่ 4.25



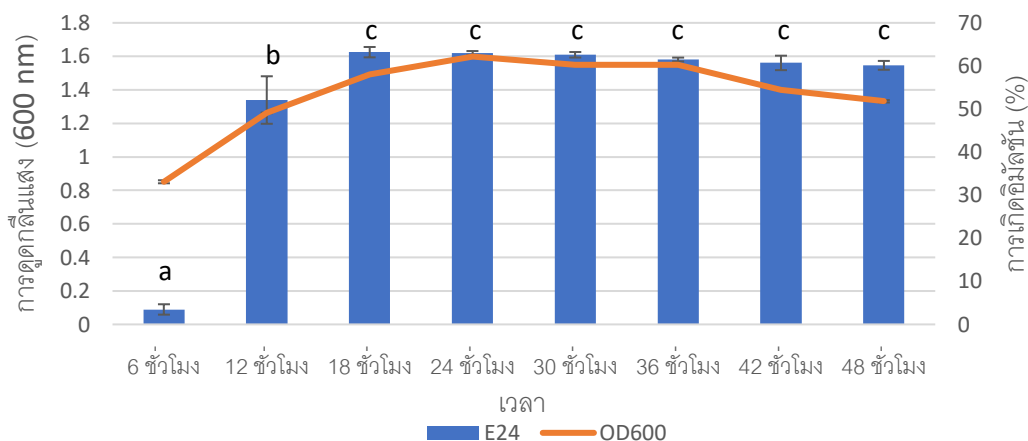
รูปที่ 4.25 การเกิดอิมัลชัน (E_{24}) ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงของ

B. velezensis B49 ในอาหารสูตรต่าง ๆ และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

4.5 การแปรผันเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการยับยั้งราก่อโรคพืช

จากผลการทดสอบข้างต้นพบว่าอาหาร LB สามารถทำให้เกิดอิมัลชันได้มากที่สุด จึงเลือกอาหาร LB มาแปรผันหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยง *B. velezensis* B49 ในอาหาร LB จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร, การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวัดการเกิดอิมัลชัน (E_{24}), และการยับยั้งราก่อโรคพืช ได้ผลดังรูปที่ 4.26 ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียมีการเจริญสูงสุดที่ประมาณ 24 ชั่วโมง ซึ่งหลังจากนั้นเข้าสู่ระยะ stationary phase และ

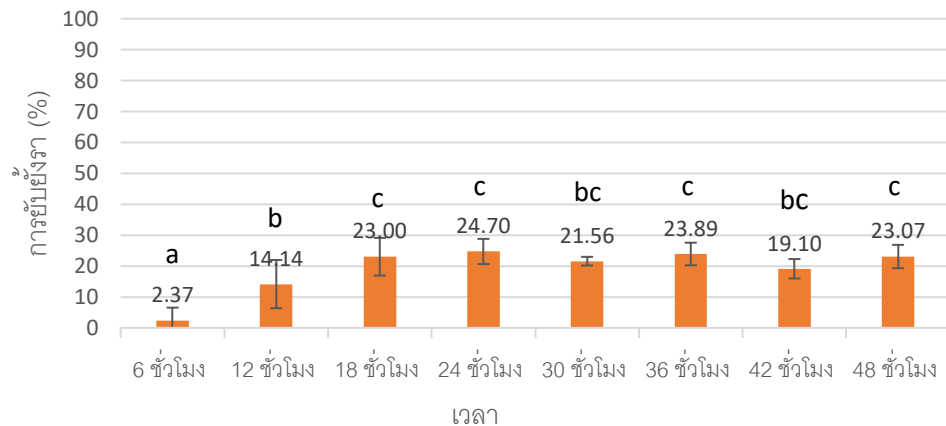
decline phase ส่วนการเกิดอิมัลชันเกิดสูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมง โดยสามารถเกิดอิมัลชันเท่ากับ 63.19 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.26 การเจริญและการเกิดอิมัลชัน (E_{24}) ของ *B. velezensis* B49

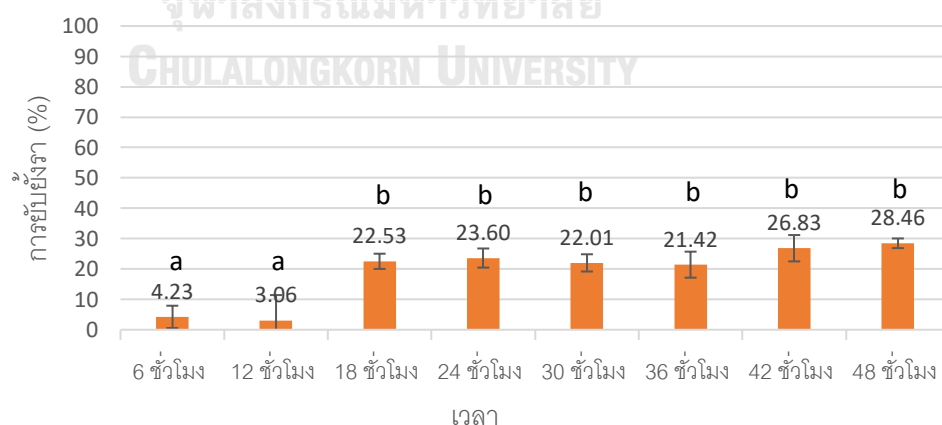
เมื่อเลี้ยงในอาหาร LB ต่อเวลา (ชั่วโมง) และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ผลการทดสอบการยับยั้งรากอโรครพืชทั้ง 7 ชนิดต่อเวลา โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วน 1:10 พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum* ได้เท่ากับ 2.37 ± 4.17 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 12 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 14.14 ± 7.80 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 18 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 23.00 ± 6.09 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 24.70 ± 4.08 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 30 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 21.56 ± 1.41 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 36 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 23.89 ± 3.66 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 42 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 19.10 ± 3.15 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 23.07 ± 3.76 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.27



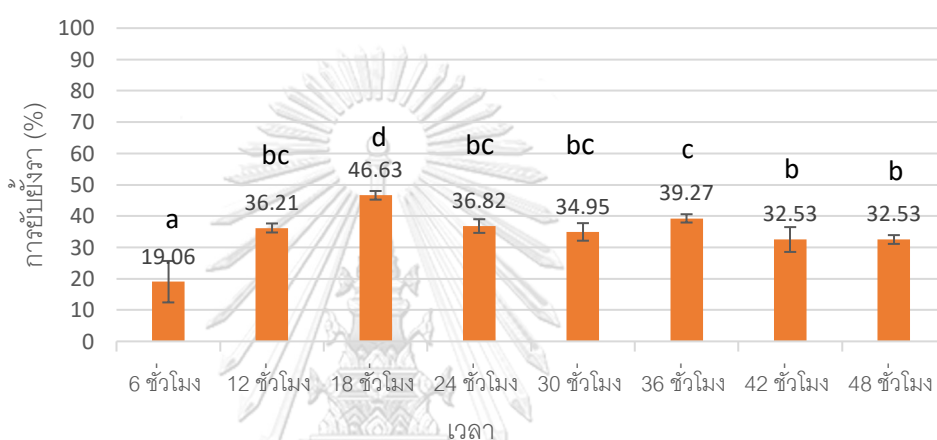
รูปที่ 4.27 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *A. furcatum* ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ที่เวลา 6 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* ได้เท่ากับ 4.23 ± 3.67 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 12 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 3.06 ± 8.35 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 18 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 22.53 ± 2.50 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 23.60 ± 3.15 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 30 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 22.01 ± 2.84 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 36 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 21.42 ± 4.29 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 42 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 26.83 ± 4.34 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 28.46 ± 1.59 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.28



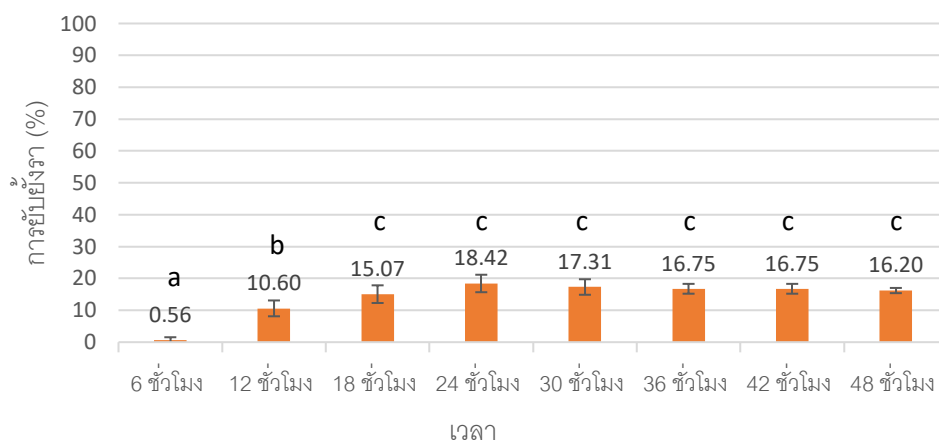
รูปที่ 4.28 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *C. gloeosporioides* ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ที่เวลา 6 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. moniliforme* ได้เท่ากับ 19.06 ± 6.62 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 12 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 36.21 ± 1.44 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 18 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 46.63 ± 1.38 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 36.82 ± 2.18 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 30 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 34.95 ± 2.80 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 36 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 39.27 ± 1.32 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 42 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 32.53 ± 3.96 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 32.53 ± 1.40 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.29



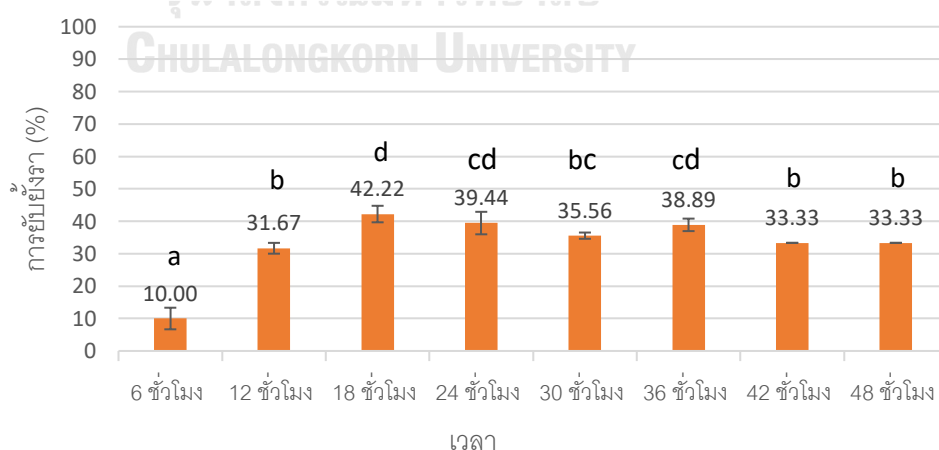
รูปที่ 4.29 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *F. moniliforme* ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ที่เวลา 6 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. proliferatum* ได้เท่ากับ 0.56 ± 0.98 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 12 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 10.60 ± 2.48 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 18 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 15.07 ± 2.77 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 18.42 ± 2.74 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 30 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 17.31 ± 2.44 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 36 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 16.75 ± 1.54 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 42 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 16.75 ± 1.54 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 16.20 ± 0.82 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.30



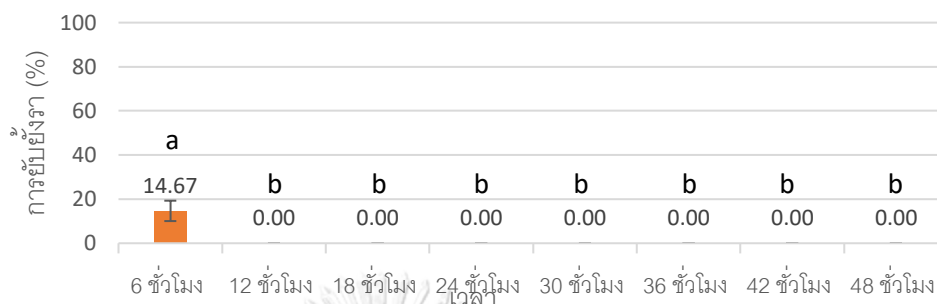
รูปที่ 4.30 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *F. proliferatum* ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ที่เวลา 6 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. solani* ได้เท่ากับ 10.00 ± 3.33 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 12 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 31.67 ± 1.67 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 18 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 42.22 ± 2.55 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 39.44 ± 3.47 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 30 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 35.56 ± 0.96 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 36 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 38.89 ± 1.92 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 42 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 33.33 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 33.33 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.31



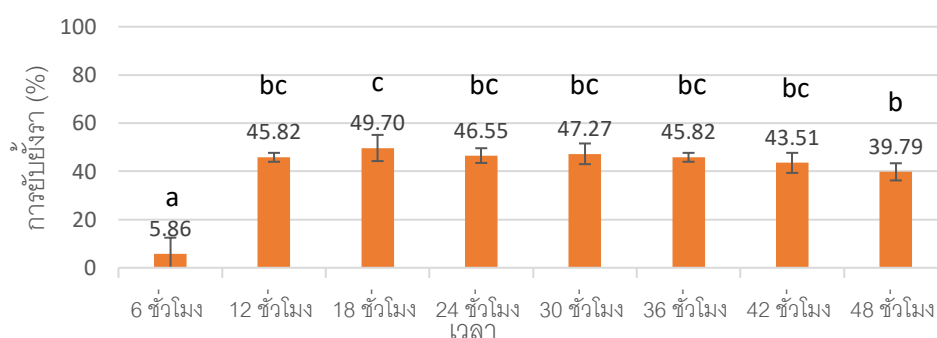
รูปที่ 4.31 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *F. solani* ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ที่เวลา 6 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้เท่ากับ 14.67 ± 4.62 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่เวลา 12 ชั่วโมง, 18 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง, 30 ชั่วโมง, 36 ชั่วโมง, 42 และ 48 ชั่วโมง ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ ดังรูปที่ 4.32



รูปที่ 4.32 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *P. palmivora* ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

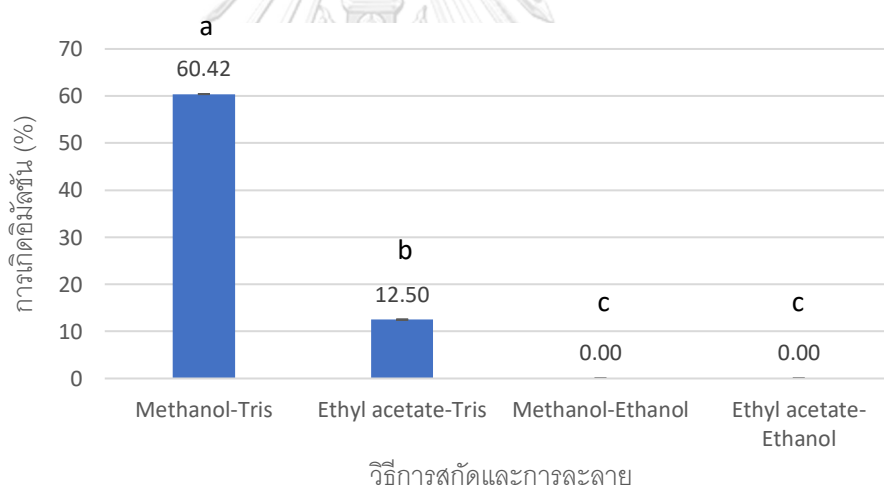
ที่เวลา 6 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ได้เท่ากับ 5.86 ± 6.62 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 12 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 45.82 ± 1.85 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 18 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 49.70 ± 5.43 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 46.55 ± 3.06 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 30 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 47.27 ± 4.29 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 36 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 45.82 ± 1.85 เปอร์เซ็นต์, ที่เวลา 42 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 43.51 ± 4.16 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 39.79 ± 3.56 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.33



รูปที่ 4.33 การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *P. oryzae* ในระยะเวลา 6 ถึง 48 ชั่วโมง และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

4.6 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใช้ 2 วิธี แตกต่างกัน คือ การตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกแล้วสกัดด้วยเมทานอล กับ การสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ซึ่งเมื่อสกัดและขจัดตัวทำละลายแล้ว ทั้ง 2 วิธีละลายตะกอนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยสารละลาย 2 ชนิด ซึ่งคือ 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ หรือ 100% เอทานอล จากนั้นนำไปทดสอบการเกิดอิมัลชัน (E_{24}) และการยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช สำหรับผลการเกิดอิมัลชันได้ผลดังรูปที่ 4.34 ซึ่งพบว่าการสกัดด้วยเมทานอลแล้วละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Methanol-Tris) สามารถเกิดอิมัลชันได้ 60.42 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์, การสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Ethyl acetate-Tris) สามารถเกิดอิมัลชันได้ 12.50 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์, การสกัดด้วยเมทานอลแล้วละลายตะกอนใน 100% เอทานอล (Methanol-Ethanol) ไม่สามารถทำให้เกิดอิมัลชันได้ และการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วละลายตะกอนใน 100% เอทานอล (Ethyl acetate-Ethanol) ไม่สามารถทำให้เกิดอิมัลชันได้เช่นกัน

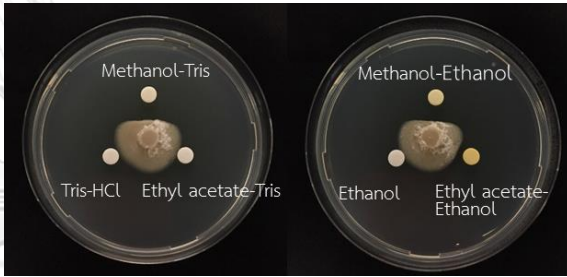
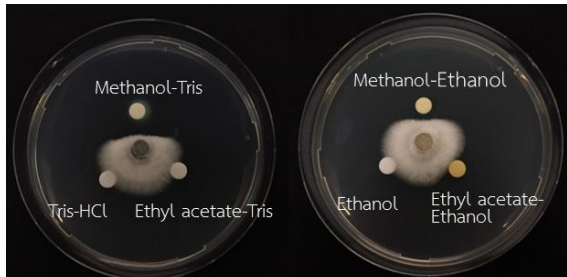


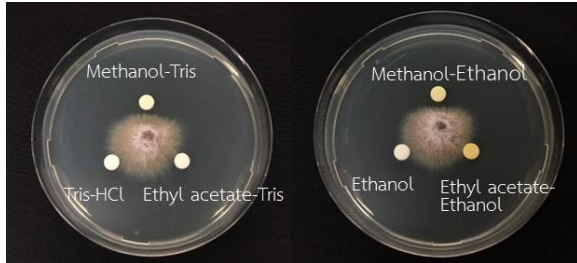
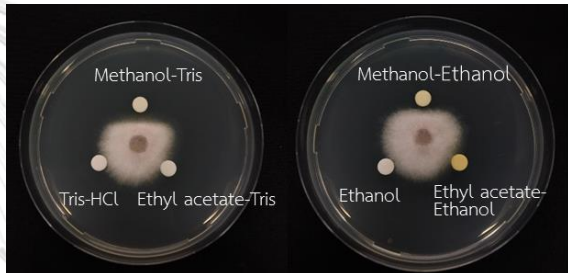
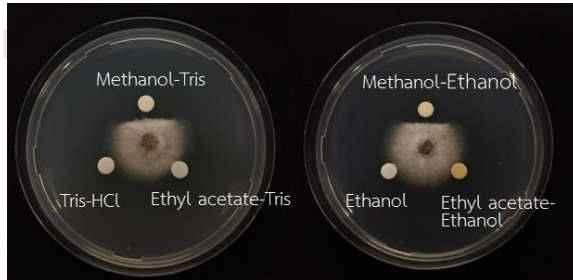
รูปที่ 4.34 การเกิดอิมัลชันของสารสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์ที่มาจากวิธีการสกัดและการละลายที่แตกต่างกัน และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)


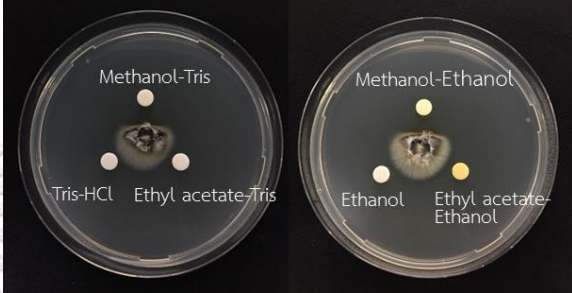
สำหรับการยับยั้งราก่อโรคพืชทั้ง 7 ชนิด ได้ผลดังตารางที่ 4.4 ซึ่งพบว่าราก่อโรคพืช *A. furcatum*, *C. gloeosporioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *P. palmivora* และ *P. oryzae* ถูกยับยั้งได้ดีด้วยทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอลแล้วละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอล แล้วละลายตะกอนใน 100% เอทานอล ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จาก

การสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ และเอทิลอะซิเตตแล้วละลายตะกอนใน 100% เอทานอล สามารถยับยั้งได้เล็กน้อย แต่ทั้งนี้การสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ ไม่สามารถยับยั้ง *P. palmivora* ได้ เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชด้วยสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้กับก่อนการสกัด พบว่าสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้สามารถยับยั้งการเจริญของราได้มากกว่าก่อนการสกัด ยกเว้นผลการยับยั้ง *F. moniliforme* ที่พบวก่อนและหลังการสกัดให้ผลการยับยั้งที่ใกล้เคียงกัน และนอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวหลังการสกัดพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้

ตารางที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของราโรคพืชจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดและละลายด้วยวิธีแตกต่างกัน

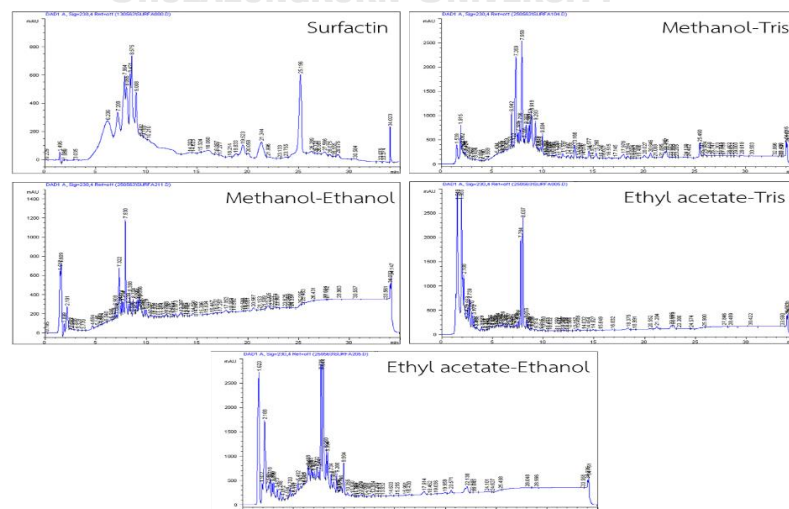
ชนิดของราก่อโรคพืช	วิธีการสกัดและการละลาย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	การยับยั้งการเจริญของราด้วยสารสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิด
<i>A. furcatum</i>	ชุดควบคุม (ก่อนการสกัด)	24.70	
	Methanol-Tris	48.46	
	Ethyl acetate-Tris	2.31	
	Methanol-Ethanol	48.91	
	Ethyl acetate-Ethanol	12.41	
<i>C. gloeosporioides</i>	ชุดควบคุม (ก่อนการสกัด)	23.60	
	Methanol-Tris	56.28	
	Ethyl acetate-Tris	8.74	
	Methanol-Ethanol	45.20	
	Ethyl acetate-Ethanol	28.25	

<i>F. moniliforme</i>	ชุดควบคุม (ก่อนการสกัด)	46.63	
	Methanol-Tris	35.00	
	Ethyl acetate-Tris	3.89	
	Methanol-Ethanol	43.22	
	Ethyl acetate-Ethanol	18.03	
<i>F. proliferatum</i>	ชุดควบคุม (ก่อนการสกัด)	18.42	
	Methanol-Tris	33.16	
	Ethyl acetate-Tris	5.26	
	Methanol-Ethanol	34.22	
	Ethyl acetate-Ethanol	9.09	
<i>F. solani</i>	ชุดควบคุม (ก่อนการสกัด)	42.22	
	Methanol-Tris	43.50	
	Ethyl acetate-Tris	3.95	
	Methanol-Ethanol	41.18	
	Ethyl acetate-Ethanol	7.65	
<i>P. palmivora</i>	ชุดควบคุม (ก่อนการสกัด)	0.00	
	Methanol-Tris	27.07	
	Ethyl acetate-Tris	0.00	

	Methanol-Ethanol	27.01	
	Ethyl acetate-Ethanol	29.20	
<i>P. oryzae</i>	ชุดควบคุม (ก่อนการสกัด)	49.70	
	Methanol-Tris	59.23	
	Ethyl acetate-Tris	13.08	
	Methanol-Ethanol	60.63	
	Ethyl acetate-Ethanol	18.90	

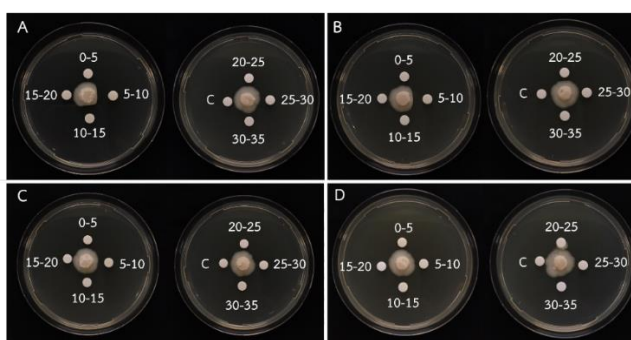
4.7 การวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) จากตัวอย่างสารสกัดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 4 ในข้อ 4.6 พบว่าโครมาโทแกรมของตัวอย่างสารสกัดทั้ง 4 ในช่วงเวลาคงอยู่ (retention time) 5 ถึง 10 นาที มีการชะออกมามากที่ช่วงเวลาเดียวกันกับโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเซอร์แฟกทิน จาก *Bacillus subtilis* ดังแสดงในรูปที่ 4.35



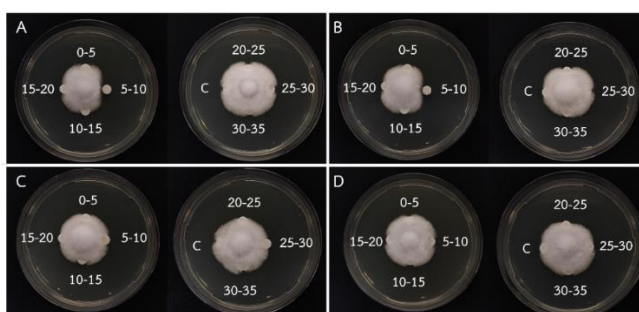
รูปที่ 4.35 โครมาโทแกรม HPLC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการสกัดและละลายด้วยวิธีต่าง ๆ

สำหรับการยับยั้งราก่อโรคพืชทั้ง 7 ชนิด ของตัวอย่างจากโครมาโทแกรมในแต่ละช่วงเวลาคง อยู่ ทุก ๆ 5 นาที พบว่า *A. furcatum* สามารถถูกยับยั้งได้โดยสารละลายจากช่วงเวลา 5 ถึง 10 นาที ของสารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่าง และช่วงเวลา 10 ถึง 15 สามารถยับยั้งการเจริญได้เพียงสารสกัด ด้วยเมทานอลแล้วละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ และช่วงเวลา 0 ถึง 5, 15 ถึง 20, 20 ถึง 25, 25 ถึง 30 และ 30 ถึง 35 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum* ดังรูปที่ 4.36



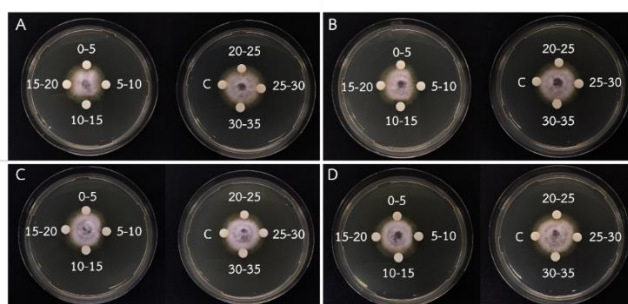
รูปที่ 4.36 การยับยั้งการเจริญของ *A. furcatum* โดยภาพ A คือ Methanol-Tris ภาพ B คือ Methanol-Ethanol ภาพ C คือ Ethyl acetate-Tris ภาพ D คือ Ethyl acetate-Ethanol ตัวเลขคือ ช่วงเวลา (นาที) ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC

C. gloeosporioides สามารถถูกยับยั้งได้โดยช่วงเวลา 5 ถึง 10 นาที ของสารสกัดด้วย เมทานอลแล้วละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ และสารสกัดด้วยเมทานอลแล้วละลาย ตะกอนใน 100% เอทานอล ส่วนสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ และสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วละลายตะกอนใน 100% เอทานอลไม่สามารถ ยับยั้งการเจริญได้ และช่วงเวลา 0 ถึง 5, 10 ถึง 15, 15 ถึง 20, 20 ถึง 25, 25 ถึง 30 และ 30 ถึง 35 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* ดังรูปที่ 4.37



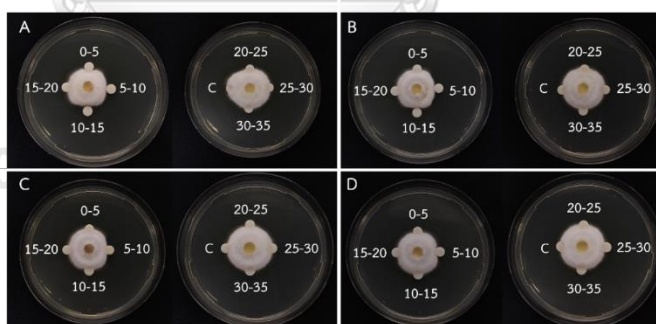
รูปที่ 4.37 การยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* โดยภาพ A คือ Methanol-Tris ภาพ B คือ Methanol-Ethanol ภาพ C คือ Ethyl acetate-Tris ภาพ D คือ Ethyl acetate-Ethanol ตัวเลขคือ ช่วงเวลา (นาที) ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC

F. moniliforme สามารถถูกยับยั้งได้โดยช่วงเวลา 5 ถึง 10 นาที ของสารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่าง และช่วงเวลา 10 ถึง 15 สามารถยับยั้งการเจริญได้ ยกเว้นสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทแล้วละลายตะกอนใน 100% เอทานอลไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ และช่วงเวลา 0 ถึง 5, 15 ถึง 20, 20 ถึง 25, 25 ถึง 30 และ 30 ถึง 35 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. moniliforme* ดังรูปที่ 4.38



รูปที่ 4.38 การยับยั้งการเจริญของ *F. moniliforme* โดยภาพ A คือ Methanol-Tris ภาพ B คือ Methanol-Ethanol ภาพ C คือ Ethyl acetate-Tris ภาพ D คือ Ethyl acetate-Ethanol ตัวเลขคือ ช่วงเวลา (นาที) ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC

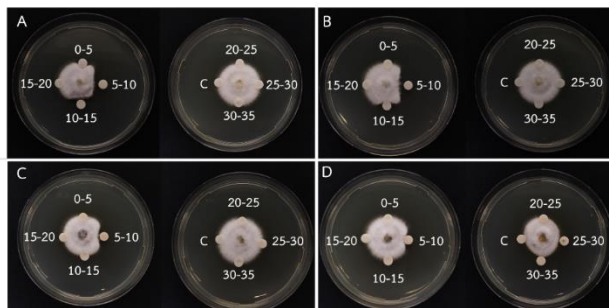
F. proliferatum สามารถถูกยับยั้งได้โดยช่วงเวลา 5 ถึง 10 นาที และช่วงเวลา 10 ถึง 15 ของสารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่าง สามารถยับยั้งการเจริญได้ และช่วงเวลา 0 ถึง 5, 15 ถึง 20, 20 ถึง 25, 25 ถึง 30 และ 30 ถึง 35 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. proliferatum* ดังรูปที่ 4.39



รูปที่ 4.39 การยับยั้งการเจริญของ *F. proliferatum* โดยภาพ A คือ Methanol-Tris ภาพ B คือ Methanol-Ethanol ภาพ C คือ Ethyl acetate-Tris ภาพ D คือ Ethyl acetate-Ethanol ตัวเลขคือ ช่วงเวลา (นาที) ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC

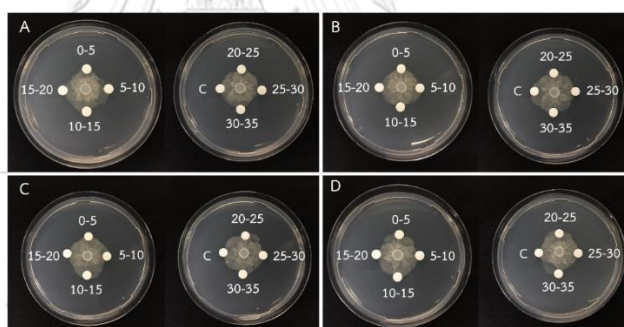
F. solani สามารถถูกยับยั้งได้โดยช่วงเวลา 5 ถึง 10 นาที ของสารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่าง และช่วงเวลา 10 ถึง 15 สามารถยับยั้งการเจริญได้ ยกเว้นสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทแล้วละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ และสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทแล้วละลายตะกอนใน 100%

เอทานอลไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ และช่วงเวลาที่ 0 ถึง 5, 15 ถึง 20, 20 ถึง 25, 25 ถึง 30 และ 30 ถึง 35 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. solani* ดังรูปที่ 4.40



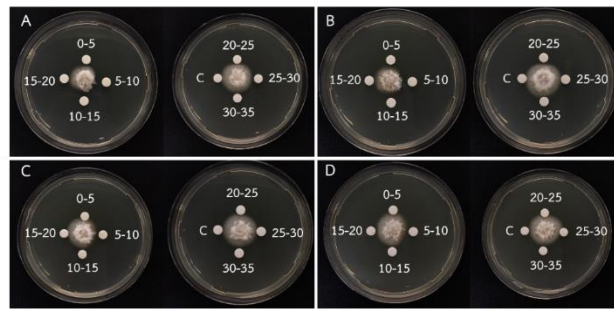
รูปที่ 4.40 การยับยั้งการเจริญของ *F. solani* โดยภาพ A คือ Methanol-Tris ภาพ B คือ Methanol-Ethanol ภาพ C คือ Ethyl acetate-Tris ภาพ D คือ Ethyl acetate- Ethanol ตัวเลขคือ ช่วงเวลา (นาที่) ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC

P. palmivora ไม่สามารถถูกยับยั้งการเจริญได้โดยทุกช่วงเวลาของสารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่าง ดังรูปที่ 4.41



รูปที่ 4.41 การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* โดยภาพ A คือ Methanol-Tris ภาพ B คือ Methanol-Ethanol ภาพ C คือ Ethyl acetate-Tris ภาพ D คือ Ethyl acetate- Ethanol ตัวเลขคือ ช่วงเวลา (นาที่) ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC

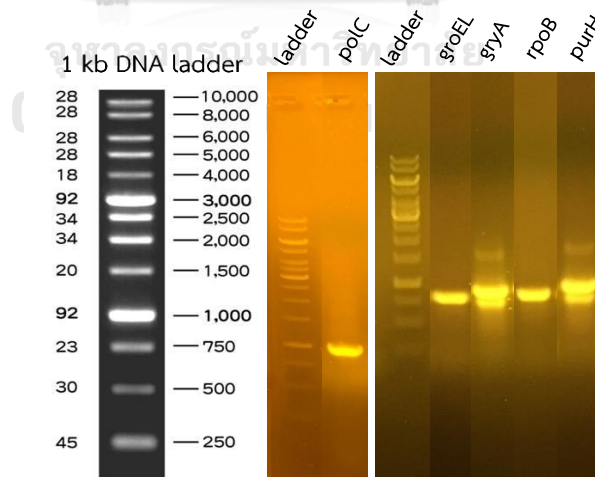
P. oryzae สามารถถูกยับยั้งได้โดยช่วงเวลาที่ 5 ถึง 10 นาที ของสารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่าง และช่วงเวลาที่ 10 ถึง 15 สามารถยับยั้งการเจริญได้ ยกเว้นสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ และสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วละลายตะกอนใน 100% เอทานอลไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ และช่วงเวลาที่ 0 ถึง 5, 15 ถึง 20, 20 ถึง 25, 25 ถึง 30 และ 30 ถึง 35 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ดังรูปที่ 4.42



รูปที่ 4.42 การยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* โดยภาพ A คือ Methanol-Tris ภาพ B คือ Methanol-Ethanol ภาพ C คือ Ethyl acetate-Tris ภาพ D คือ Ethyl acetate- Ethanol ตัวเลขคือ ช่วงเวลา (นาที) ที่เก็บตัวอย่างจาก HPLC

4.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

ระบุเอกลักษณ์ของแบคทีเรียโดยการนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มปริมาณแฮสคิปปีงยีน ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในทุกเซลล์ โดยตรวจสอบกับแฮสคิปปีงยีนทั้งหมด 5 ยีน คือ *groEL*, *gyrA*, *polC*, *purH* และ *rpoB* โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ซึ่งผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสพบว่า *groEL* ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 835 คู่เบส, *gyrA* ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 928 คู่เบส, *polC* ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 777 คู่เบส, *purH* ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 875 คู่เบส และ *rpoB* ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 964 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.43



รูปที่ 4.43 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสของแฮสคิปปีงยีน ได้แก่ *groEL*, *gyrA*, *polC*, *purH* และ *rpoB* ของ *B. velezensis* B49

เมื่อนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาบลูโชนโพลีเมอร์สไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับในฐานข้อมูล NCBI ด้วยอัลกอริธึม BLASTn เพื่อระบุเอกลักษณ์ของแบคทีเรีย พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน groEL มีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis* สายพันธุ์ GFP-2 มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค1), ยีน gyrA มีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis* สายพันธุ์ GFP-2 มากถึง 99.79 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค2), ยีน polC มีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis* สายพันธุ์ BvL03 มากถึง 99.75 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค3), ยีน purH มีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis* สายพันธุ์ BvL03 มากถึง 99.52 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค4) และ ยีน rpoB มีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis* สายพันธุ์ GH1-13 มากถึง 99.58 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค5) จึงสามารถยืนยันได้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้ คือ *B. velezensis* B49



บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษานี้เกี่ยวข้องกับการทดสอบการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยใช้ *Bacillus velezensis* B49 ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ (ขวัญธิดา โภพิบูล, 2560) โดยใช้เทคนิคการฉีดแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หรือ V8 พร้อมกับราก่อโรคพืช ซึ่งพบว่า *B. velezensis* B49 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชทั้ง 7 ชนิดที่ทดสอบ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora palmivora* และ *Pyricularia oryzae* ได้มากที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้เท่ากับ 32.86 ± 0.82 และ 31.60 ± 3.01 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบการยับยั้งด้วยเทคนิคการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร พบว่าที่อัตราส่วน 1:1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* และ *Acremonium furcatum* ได้มากที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้เท่ากับ 100 ± 0.00 และ 96.08 ± 6.79 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อัตราส่วน 1:10 สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้มากที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้เท่ากับ 68.34 ± 2.35 และ 59.20 ± 1.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของราผสมกับอาหาร พบว่าส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้มากกว่าการใช้เซลล์สดโดยตรง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในน้ำเลี้ยงเชื้อมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รวมทั้งสารอื่นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา เช่น เอนไซม์ สารปฏิชีวนะ ที่ *B. velezensis* B49 สร้างออกมาอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อแล้ว จึงทำให้สามารถยับยั้งการเจริญได้ทันที แต่การฉีดแบคทีเรียลงบนอาหารโดยตรง อาจต้องใช้เวลาในการเจริญเติบโตและสร้างสารออกฤทธิ์เหล่านั้น จึงให้ผลการยับยั้งที่ช้ากว่า นอกจากนี้ อาจเกิดจากการที่แบคทีเรียสร้างสารต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชได้แตกต่างกัน เมื่อเจริญในอาหารแข็งและอาหารเหลว (Li และคณะ, 2016) หรืออาจเกิดจากสารออกฤทธิ์บางชนิดจะถูกเก็บไว้ในเซลล์ไม่สามารถหลั่งออกนอกเซลล์ได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Price และคณะ, 2007) อย่างไรก็ตาม สำหรับการทดสอบกับ *P. palmivora* ให้ผลที่ตรงข้ามกัน นั่นคือ ผลการทดลองด้วยการฉีดเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้มากกว่าการทดลองด้วยการผสมน้ำเลี้ยงเชื้อกับอาหาร ทั้งนี้อาจเกิดจากสารบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* มีสมบัติที่ไม่สามารถทนต่อความร้อนได้ (heat labile) จึงทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้เมื่อนำมาผสมกับอาหารที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Sumayo และคณะ, 2013)

การทดสอบสมบัติการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. velezensis* B49 โดยใช้เทคนิคเบื้องต้นในการพิสูจน์การสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งหมด 4 เทคนิคคือ การทดสอบการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเชื้อบนฟิล์มน้ำมัน, การทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดง, การทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน และการทดสอบการเกิดอิมัลชัน พบว่า *B. velezensis* B49 มีสมบัติในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยสามารถทำให้เกิดการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเชื้อบนฟิล์มน้ำมัน ซึ่งผลการทดลองในลักษณะเดียวกันยังพบได้ในงานวิจัยของ Ibrahim (2016) ซึ่งศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Ochrobactrum anthropi* สายพันธุ์ HM-1 และ *Citrobacter freundii* สายพันธุ์ HM-2 และพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ทำให้เกิดการยุบตัวของน้ำเลี้ยงเชื้อบนฟิล์มน้ำมันดิบ การทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดงพบว่า *B. velezensis* B49 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร blood agar ที่มีความเข้มข้นของเลือด 5% v/v ทำให้เกิดโคโซนใสรอบ ๆ โคโลนี ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงในอาหารเมื่อสัมผัสกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แบคทีเรียผลิตออกมา Mulligan และคณะ (1984) กล่าวไว้ว่าการทดสอบการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงเป็นวิธีการเบื้องต้นที่นิยมในการศึกษาการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะใช้ส่วนหางจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แยกออกจากกันจนทำให้เกิดการแตกสลายขึ้น (Zaragoza และคณะ, 2010) การทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. velezensis* B49 สามารถทำให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมันได้ เช่นเดียวกับที่พบใน *O. anthropi* สายพันธุ์ HM-1 และ *C. freundii* สายพันธุ์ HM-2 (Ibrahim, 2016) การทดสอบการเกิดอิมัลชันของ *B. velezensis* B49 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถทำให้เกิดอิมัลชันได้เท่ากับ 62.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการเกิดอิมัลชันเป็นอีกหนึ่งสมบัติในการพิสูจน์การสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบเป็นน้ำจะไม่สามารถรวมตัวกับน้ำมันโซลินได้ทำให้เกิดการแยกชั้น แต่การเกิดอิมัลชันแสดงว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอยู่จึงทำให้เกิดการรวมตัวของน้ำและน้ำมัน จึงเกิดเป็นชั้นที่มีความเป็นเนื้อเดียวกันและไม่แยกชั้น (Amodu และคณะ, 2014)

การทดสอบผลของปัจจัยทางกายภาพที่มีต่อสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการยับยั้งราก่อโรคพืช ซึ่งสมบัติแรกทดสอบคือ ผลของความเป็นกรดเบสที่มีต่อสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้สมบัติการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. velezensis* B49 เป็นเกณฑ์ติดตามผล และแปรผันความเป็นกรดเบสตั้งแต่ 2 ถึง 14 ผลการทดสอบพบว่าเมื่อความเป็นกรดเบสอยู่ระหว่าง 2 ถึง 10 จะเกิดอิมัลชันไม่แตกต่างกันโดยอยู่ที่ประมาณ 61.81 ± 1.20 ถึง 62.50 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นเป็น 12 การเกิดอิมัลชันเหลือเพียง 15.97 ± 1.20 เปอร์เซ็นต์

และไม่เกิดอิมัลชันเลยที่ความเป็นกรดเบสเท่ากับ 14 ผลการทดสอบเช่นนี้แสดงว่าเมื่อมีภาวะเป็นเบสมากขึ้นจะทำให้สมบัติการเกิดอิมัลชันของ *B. velezensis* B49 ลดลง จนกระทั่งสูญเสียสมบัติการเกิดอิมัลชันไป เนื่องจากเมื่อความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดการสูญเสียของประจุบวกที่ส่วนหัวทำให้มีผลต่อสภาพขั้วของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และสมบัติการเป็นอิมัลซีไฟเออร์หายไป อีกทั้งเมื่อสูญเสียประจุไปจะทำให้พันธะเอสเทอร์ถูกทำลายด้วย (Cooper และ Goldenberg, 1987) ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Cooper และ Goldenberg (1987) ที่ศึกษาความคงตัวของการเกิดอิมัลชันต่อความเป็นกรดเบสของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus* sp. IAF343 และ *Bacillus cereus* IAF346 ในช่วงความเป็นกรดเบสที่ 2 ถึง 14 และพบว่าเมื่อความเป็นเบสเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลทำให้เกิดอิมัลชันลดลง โดยภาวะความเป็นเบสที่ pH 14 พบว่าการเกิดอิมัลชันลดลงจาก 70 เปอร์เซ็นต์ จนทำให้ไม่เกิดอิมัลชันเลย การยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคพืชทั้ง 6 ชนิดพบว่าสอดคล้องกับการเกิดอิมัลชันคือ เมื่อความเป็นกรดเบสอยู่ระหว่าง 2 ถึง 10 นั้น เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่แตกต่างกันมากนัก แต่เมื่อความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นเป็น 12 ทำให้สมบัติในการยับยั้งลดลง และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชทั้ง 5 ชนิด ยกเว้น *A. furcatum* เพียงชนิดเดียวที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญได้เพียงเล็กน้อยที่ความเป็นกรดเบสเท่ากับ 14

สำหรับการทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้สมบัติการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. velezensis* B49 เป็นเกณฑ์ติดตามผล โดยบ่มน้ำเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20 ถึง 121 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อสมบัติการเกิดอิมัลชัน ซึ่งมีค่าการเกิดอิมัลชันอยู่ในช่วง 62.50 ± 0.00 ถึง 66.67 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ และมีความใกล้เคียงกับการศึกษาของ Aparna และคณะ (2012) ที่ศึกษาความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก *Pseudomonas* sp. 2B ที่ช่วงอุณหภูมิ 4 ถึง 121 องศาเซลเซียส และผลการทดลองพบว่า ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่เวลา 24 ชั่วโมง ยังสามารถทำให้เกิดอิมัลชันได้แม้แต่ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้การเกิดอิมัลชันลดลง เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตและไขมันซึ่งมีถึง 30% และ 40% ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนเล็กน้อยเพียง 1% ส่วนที่เหลืออีก 29% ส่วนใหญ่เป็นเกลืออนินทรีย์ จึงเป็นเหตุผลทำให้สมบัติการเกิดอิมัลชันไม่เปลี่ยนแปลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Pruthi และ Cameotra, 1997) ส่วนผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชทั้ง 6 ชนิด พบว่าเมื่ออุณหภูมิผันแปรในช่วง 20 ถึง 100 องศาเซลเซียสนั้น เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากแต่ละอุณหภูมิให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส พบว่าการยับยั้งราก่อโรคพืชลดลงถึง 4 ชนิด ได้แก่

A. furcatum, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* และ *Fusarium solani* ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการยับยั้งราก่อโรคพืชนอกจากจะเกิดจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้เกิดอิมัลชัน แล้ว ยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่นที่มีส่วนประกอบของโปรตีนที่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้เช่นกัน เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้เกิดการแข็งตัวและตกตะกอนของสารจำพวกโปรตีน ทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มนี้เสื่อมสภาพจึงทำให้ความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคลดลง แต่สำหรับ *C. gloeosporioides* และ *P. oryzae* พบว่าแม้ผ่านการบ่มที่ 100 หรือ 121 องศาเซลเซียส และยังสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้สูง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นชนิดที่ไม่เสื่อมสภาพที่อุณหภูมินี้ จึงไม่มีผลต่อการยับยั้งรา (Abdel-Mawgoud และคณะ, 2008) โดยเฉพาะความสามารถในการยับยั้ง *Pyricularia oryzae* นั้น การนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปผ่านอุณหภูมิสูงที่ 100 และ 121 องศาเซลเซียส ทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งราสูงกว่าชุดควบคุม ขณะที่งานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความสามารถในการยับยั้งมักจะลดลง (Li และคณะ, 2018; Dong และคณะ, 2019; Chen และคณะ, 2020)

การทดสอบผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสำหรับอาหารกำหนดสูตร เมื่อจับคู่แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนลงในอาหาร Mineral salt solution ที่จำกัดทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนนั้น สามารถจับคู่อาหารได้ทั้งหมด 24 คู่ ซึ่งพบว่า *B. velezensis* B49 สามารถเจริญได้ในเพียงแค่ 6 คู่ ได้แก่ กลูโคสกับแอมโมเนียมไนเตรต, กลูโคสกับแอมโมเนียมซัลเฟต, ฟรุกโทสกับแอมโมเนียมไนเตรต, ฟรุกโทสกับแอมโมเนียมซัลเฟต, ซูโครสกับแอมโมเนียมไนเตรต และซูโครสกับแอมโมเนียมซัลเฟต จากการทดสอบการเกิดอิมัลชันด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารคู่ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงนั้น พบว่าการเกิดอิมัลชันมีค่าสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงแบบที่เรียเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยฟรุกโทสกับแอมโมเนียมไนเตรตเป็นคู่ที่ทำให้เกิดอิมัลชันได้มากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 51.39 ± 2.41 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Pereira และคณะ (2013) ที่ได้ศึกษาการปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารกำหนดสูตรเพื่อเพิ่มผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 309, 311 และ 573 โดยมีแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 12 ชนิดคือ โซเดียมอะซิเตต, โซเดียมซิเตรต, ฟรุกโทส, กลูโคส, กลีเซอรอล, แลคโทส, สารสกัดจากเนื้อ, พาราฟีน, ซูโครส, n-เฮกซะดีเคน, ทริปโตน, และสารสกัดจากยีสต์ และมีแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด 8 ชนิดคือ แอมโมเนียมซิเตรต, แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต, สารสกัดจากเนื้อ, โซเดียมไนเตรต, ทริปโตน, ยูเรีย, และสารสกัดจากยีสต์ ผลการศึกษาพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ 309 และ 311

สามารถใช้ซูโครสและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนที่ทำให้สามารถผลิตเซอร์แฟกทินได้มากที่สุด ขณะที่ *B. subtilis* สายพันธุ์ 573 ใช้ซูโครสและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ทำให้สามารถผลิตเซอร์แฟกทินได้มากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ก็มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชันเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารกำหนดสูตรที่มีฟรุกโทสกับแอมโมเนียมไนเตรตซึ่งเป็นคู่ที่ทำให้เกิดอิมัลชันได้มากที่สุดเท่ากับ 51.39 ± 2.41 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าระดับการเกิดอิมัลชันยังต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ที่ทำให้เกิดอิมัลชันเท่ากับ เท่ากับ 66.67 ± 0.00 , 62.76 ± 0.44 และ 63.89 ± 1.20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร LB, NB และ TSB ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นเพราะอาหารสูตรสมบูรณ์นั้นมีองค์ประกอบของสารอาหารที่ไม่ทราบชนิดและปริมาณที่มีผลต่อการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น สารสกัดจากยีสต์, สารสกัดจากเนื้อ, ทริปโตน หรือ เปปโตน เป็นต้น จึงทำให้อาหารสมบูรณ์นั้นสามารถเกิดอิมัลชันได้ดีกว่าอาหารที่ทราบองค์ประกอบที่แน่ชัด (Zhang และ Greasham, 1999) ซึ่งผลการทดลองยังสอดคล้องกับที่พบจากการศึกษาของ Dastgheib และคณะ (2008) ที่ศึกษาองค์ประกอบของสารอาหารที่ส่งผลต่อการเกิดอิมัลชัน และพบว่าสารสกัดจากยีสต์สามารถทำให้เกิดอิมัลชันได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับกลูโคสและฟรุกโทส นอกจากนี้ จากการทดลองยังพบว่าเมื่อเลี้ยง *B. velezensis* B49 ในอาหารสูตรสมบูรณ์ทั้ง 3 ชนิดนี้แล้ว การเกิดอิมัลชันที่ 24 และ 48 ชั่วโมงมีระดับที่ไม่แตกต่างกัน ลักษณะนี้อาจเกิดเนื่องจากเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ stationary phase ไประยะหนึ่งแล้ว สารอาหารจะหมดไปจึงทำให้การสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ 24 และ 48 ชั่วโมงไม่แตกต่างกัน (Barros และคณะ, 2008)

การแปรผันเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการยับยั้งราก่อโรคพืช พบว่า *B. velezensis* B49 มีการเจริญสูงสุดที่ประมาณ 24 ชั่วโมง ซึ่งหลังจากนั้นเข้าสู่ระยะ stationary phase ส่วนการเกิดอิมัลชันที่มากที่สุดเกิดขึ้นที่เวลา 18 ชั่วโมง โดยสามารถเกิดอิมัลชันได้ 63.01 เปอร์เซ็นต์ และค่อนข้างคงที่ไปจนถึง 24 ชั่วโมง การทดลองในลักษณะเดียวกันมีการศึกษาโดย Abushady และคณะ (2005) ซึ่งศึกษาเวลาในการเลี้ยง *B. subtilis* ที่ส่งผลต่อการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เวลา 24 – 144 ชั่วโมง และผลการศึกษาพบว่า *B. subtilis* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และคงที่ไปจนถึง 144 ชั่วโมง ส่วนการยับยั้งราก่อโรคพืชพบว่า *B. velezensis* B49 สามารถยับยั้งรา 6 ชนิดได้ โดยสามารถยับยั้ง

ได้ดีที่สุดที่เวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากผลการทดลองนี้สามารถบอกได้ว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งผลิตขึ้นในช่วงท้ายของ log phase จนถึงช่วง stationary phase ซึ่งสารจำพวกนี้เป็นสารที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ (Chakraborty และคณะ, 2015) สำหรับ *P. palmivora* ผลการทดลองซึ่งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและการยับยั้งรา พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียสามารถยับยั้งราชนิดนี้ได้เพียงเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 6 ชั่วโมงเท่านั้น และไม่พบว่าสามารถยับยั้งราได้หลังจากนั้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองทุกการทดลองที่ผ่านมาที่ไม่แสดงผลการยับยั้งรานี้เนื่องจากการทดลองเหล่านั้นใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ 18 ชั่วโมง สารซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง *P. palmivora* ถูกผลิตในช่วงเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงการเจริญที่ log phase ของแบคทีเรีย ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง *P. palmivora* เป็นสารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite)

สำหรับการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในงานวิจัยนี้ใช้ 2 วิธีที่แตกต่างกัน เนื่องจากตัวทำละลายแต่ละชนิดมีสภาพขั้วที่ต่างกัน จึงทำให้สกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ต่างชนิดกันออกมาได้ วิธีดังกล่าวคือ การตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกแล้วสกัดด้วยเมทานอล กับการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ซึ่งเมื่อสกัดและกำจัดตัวทำละลายแล้ว ทั้ง 2 วิธีละลายตะกอนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยสารละลาย 2 ชนิด คือ 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ หรือ 100% เอทานอล พบว่าการละลายตะกอนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ทำให้เกิดอิมัลชันขึ้น แต่เมื่อละลายตะกอนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน 100% เอทานอล ทำให้สมบัติการเกิดอิมัลชันหายไป ทั้งนี้อาจเกิดจากความคงตัวในการเกิดอิมัลชันไม่สามารถรักษาสภาพไว้ได้เมื่อเติมเอทานอล (Xu และคณะ, 2001) ทั้งเอทิลอะซิเตตและเมทานอลสามารถสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยการสกัดด้วยเมทานอลที่ละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ สามารถสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดโดยให้ระดับการเกิดอิมัลชันที่ 60.42 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่ละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ ให้ระดับการเกิดอิมัลชันที่ 12.50 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากเมทานอลเป็นสารที่มีขั้วมากกว่าเอทิลอะซิเตตจึงทำให้เมทานอลสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นสารที่มีขั้วได้มากกว่า (Reichardt, 1982) ส่วนการยับยั้งร่าก่อโรคพืชส่วนใหญ่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดจากเมทานอลที่ละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ และสารสกัดจากเมทานอลที่ละลายตะกอนในเอทานอล ส่วนสารสกัดจากเอทิลอะซิเตตที่ละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ และเอทิลอะซิเตตที่ละลายตะกอนในเอทานอลสามารถยับยั้งได้

เล็กน้อย และสารสกัดเอทิลอะซิเตตที่ละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ไม่สามารถยับยั้ง *P. palmivora* ได้ ผลการยับยั้งของสารสกัดจากเมทานอลที่ละลายตะกอนใน 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ สอดคล้องกับการเกิดอิมัลชัน ส่วนสารสกัดจากเมทานอลที่ละลายตะกอนในเอทานอล ถึงแม้ว่าสมบัติในการเกิดอิมัลชันจะหายไป แต่สมบัติในการยับยั้งการเจริญยังคงอยู่ ทั้งนี้อาจเกิดจากเอทานอลทำให้การเกิดอิมัลชันไม่คงตัวดังกล่าวข้างต้น (Xu และคณะ, 2001) แต่ไม่ได้เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารจึงทำให้ยังสามารถยับยั้งได้ หรืออาจเกิดจากการมีสารชนิดอื่นที่มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืช

การวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) จากตัวอย่างสารสกัดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามีการชะสารออกมาและใกล้เคียงกับโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเซอร์แฟกทีนในช่วงเวลาคงอยู่ (retention time) ที่ 5 ถึง 10 นาที จึงคาดว่าน่าจะมีเซอร์แฟกทีนอยู่ในตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ และผลการยับยั้งราก่อโรคพืชในช่วงเวลาที่ 5 ถึง 10 นาที ที่คาดว่าป็นเซอร์แฟกทีนนั้น สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้ทั้งหมด ยกเว้น *P. palmivora* และช่วงเวลา 5 ถึง 10 นาที ของสารสกัด Methanol-Tris สามารถยับยั้งได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดอีก 3 ชนิด

เนื่องจากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีความใกล้เคียงกับ *B. subtilis* ดังนั้นการระบุสายพันธุ์ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์หรือชีวเคมี และด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA จะให้ผลของความคล้ายคลึงกันถึง 99 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า จึงทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ถูกต้องได้ ดังนั้นจึงต้องใช้วิธี multilocus sequence analysis (MSA) ในการจัดจำแนกเพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกันมากแทน (Rooney และคณะ, 2009) วิธี MSA ใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากหลายยีนที่มีความอนุรักษ์สูง เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับในฐานข้อมูล NCBI ด้วยอัลกอริธึม BLASTn เพื่อระบุเอกลักษณ์ของแบคทีเรียแล้ว พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 5 ยีน ที่เป็นเฮาส์คีปปีงยีน ได้แก่ *groEL*, *gyrA*, *polC*, *purH* และ *rpoB* ของ *B. velezensis* B49 มีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis* สายพันธุ์อื่นในฐานข้อมูล 99.52 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จึงยืนยันได้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้คือ *B. velezensis*

จากผลงานวิจัยนี้เสนอแนะได้ว่าสามารถใช้ *B. velezensis* B49 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียนี้ในการกำจัดราที่ก่อโรคในพืชแทนการใช้สารเคมี เพื่อลดผลกระทบต่อผู้ใช้

ผู้บริโภคร และสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ยังต้องการทดสอบประสิทธิภาพเพิ่มเติมกับพืชทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ, ในระดับเรือนกระจก และในแปลงปลูกจริง รวมทั้งต้องทดสอบผลการตกค้างและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมร่วมด้วย



บรรณานุกรม

- ขวัญธิดา โฟพิบูล. 2560. การคัดกรองจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ยับยั้งราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช. ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Ab Rahman SFS, Singh E, Pieterse CM, Schenk PM. 2018. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science* **267**: 102-111.
- Abdel-Mawgoud AM, Aboulwafa MM, Hassouna NA-H. 2008. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **150**: 289-303.
- Abushady H, Bashandy A, Aziz N, Ibrahim H. 2005. Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production. *International Journal of Agriculture and Biology* **3**: 337-344.
- Adaskaveg J, Hartin R. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* **87**: 979-987.
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- Al-Wahaibi Y, Joshi S, Al-Bahry S, Elshafie A, Al-Bemani A, Shibulal B. 2014. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **114**: 324-333.
- Amodu OS, Ntwampe SK, Ojumu TV. 2014. Emulsification of hydrocarbons by biosurfactant: exclusive use of agrowaste. *BioResources* **9**: 3508-3525.
- Anjum F, Gautam G, Edgard G, Negi S. 2016. Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresource Technology* **213**: 262-269.
- Aparna A, Srinikethan G, Smitha H. 2012. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **95**: 23-29.
- Arazoe T, Younomaru T, Ohsato S, Kimura M, Arie T, Kuwata S. 2014. Site-specific DNA double-strand break generated by I-SceI endonuclease enhances ectopic homologous recombination in *Pyricularia oryzae*. *FEMS Microbiology Letters*

352: 221-229.

- Armengol J, Sanz E, Martínez-Ferrer G, Sales R, Bruton B, García-Jiménez J. 1998. Host range of *Acremonium cucurbitacearum*, cause of *Acremonium* collapse of muskmelon. *Plant Pathology* **47**: 29-35.
- Asaka O, Shoda M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied Environmental Microbiology* **62**: 4081-4085.
- Asari S, Matzén S, Petersen MA, Bejai S, Meijer J. 2016. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology* **92**: fiw070.
- Atmaca N, Arikan S, Essiz D, Kalender H, Simsek O, Bilmen FS, Kabakci R. 2018. Effects of mancozeb, metalaxyl and tebuconazole on steroid production by bovine luteal cells *in vitro*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **59**: 114-118.
- Azabou MC, Gharbi Y, Medhioub I, Ennouri K, Barham H, Tounsi S, Triki MA. 2020. The endophytic strain *Bacillus velezensis* OEE1: An efficient biocontrol agent against *Verticillium* wilt of olive and a potential plant growth promoting bacteria. *Biological Control* **142**: 104168.
- Bacon CW, Nelson PE. 1994. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *Journal of Food Protection* **57**: 514-521.
- Bais HP, Fall R, Vivanco JM. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology* **134**: 307-319.
- Baños SB, Necha LLB, Luna LB, Torres KB. 2002. Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruit after storage. *Revista Mexicana de Fitopatología* **20**: 8-12.
- Barros FFC, Ponezi AN, Pastore GM. 2008. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **35**: 1071-1078.
- Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E, Wilson C. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*,

- anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* **22**: 1087-1092.
- Beebe JL, Umbreit W. 1971. Extracellular lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal of Bacteriology* **108**: 612.
- Benhamou N, Thériault G. 1992. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **41**: 33-52.
- Cai XC, Liu CH, Wang BT, Xue YR. 2017. Genomic and metabolic traits endow *Bacillus velezensis* CC09 with a potential biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease. *Microbiological Research* **196**: 89-94.
- Carrillo P, Mardaraz C, Pitta-Alvarez S, Giulietti A. 1996. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**: 82-84.
- Castro GR, Panilaitis B, Kaplan DL. 2008. Emulsan, a tailorable biopolymer for controlled release. *Bioresource Technology* **99**: 4566-4571.
- Chakraborty S, Ghosh M, Chakraborti S, Jana S, Sen KK, Kokare C, Zhang L. 2015. Biosurfactant produced from *Actinomyces nocardiformis* A17: characterization and its biological evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules* **79**: 405-412.
- Champaco E, Martyn R, Miller M. 1993. Comparison of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* as causal agents of fruit rot and root rot of muskmelon. *HortScience* **28**: 1174-1177.
- Chen H, Wang S, Xing Y, Xu C, Hayes PM, Zhang Q. 2003. Comparative analyses of genomic locations and race specificities of loci for quantitative resistance to *Pyricularia grisea* in rice and barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 2544-2549.
- Chen W-C, Juang R-S, Wei Y-H. 2015. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* **103**: 158-169.
- Chen Z, Zhao L, Chen W, Dong Y, Yang C, Li C, Xu H, Gao X, Chen R, Li L. 2020. Isolation and evaluation of *Bacillus velezensis* ZW-10 as a potential biological control agent against *Magnaporthe oryzae*. *Biotechnology & Biotechnological*

Equipment **34**: 714-724.

- Chet I, Ordentlich A, Shapira R, Oppenheim A. 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and Soil* **129**: 85-92.
- Choi NH, Jang JY, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Nguyen VT, Min BS, Le Dang Q, Kim JC. 2017. Antifungal activity of sterols and dipsacus saponins isolated from *Dipsacus asper* roots against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **141**: 103-108.
- Chungchow N, Rattarasarn M. 2000. The elicitin secreted by *Phytophthora palmivora*, a rubber tree pathogen. *Phytochemistry* **54**: 33-38.
- Chutrakul C, Boonruangprapa T, Suvannakad R, Isaka M, Sirithunya P, Toojinda T, Kirtikara K. 2009. Ascherxanthone B from *Aschersonia luteola*, a new antifungal compound active against rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 1624-1631.
- Cooper DG, Goldenberg BG. 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 224-229.
- Cui W, He P, Munir S, He P, Li X, Li Y, Wu J, Wu Y, Yang L, He P. 2019. Efficacy of plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 for biocontrol of southern corn leaf blight. *Biological Control* **139**: 104080.
- Dastgheib S, Amoozegar M, Elahi E, Asad S, Banat I. 2008. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. *Biotechnology Letters* **30**: 263-270.
- Daverey A, Pakshirajan K. 2010. Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **160**: 2090-2101.
- Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* **185**: 1027-1036.
- Debode J, Maeyer KD, Perneel M, Pannecoucq J, Backer GD, Höfte M. 2007. Biosurfactants are involved in the biological control of *Verticillium microsclerotia* by *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 1184-1196.

- Deketelaere S, Tyvaert L, França SC, Höfte M. 2017. Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. *Frontiers in Microbiology* **8**: 1186.
- Dong Y, Li H, Rong S, Xu H, Guan Y, Zhao L, Chen W, He X, Gao X, Chen R. 2019. Isolation and evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* Rdx5 as a potential biocontrol agent against *Magnaporthe oryzae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **33**: 408-418.
- Droby S, Wisniewski M, Macarasin D, Wilson C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* **52**: 137-145.
- Dubnau D. 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **55**: 395-424.
- Egamberdieva D, Wirth SJ, Shurigin VV, Hashem A, Abd_Allah EF. 2017. Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress. *Frontiers in Microbiology* **8**: 1887.
- Emmert EA, Handelsman J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* **171**: 1-9.
- Freeman S, Horowitz S, Sharon A. 2001. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology* **91**: 986-992.
- Freeman S, Katan T, Shabi E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* **82**: 596-605.
- Garcia-Jimenez J, Velázquez M, Jorda C, Alfaro-Garcia A. 1994. *Acremonium* species as the causal agent of muskmelon collapse in Spain. *Plant Disease* **78**: 416-419.
- Gautam K, Tyagi V. 2006. Microbial surfactants: a review. *Journal of Oleo Science* **55**: 155-166.
- Gelderblom W, Jaskiewicz K, Marasas W, Thiel P, Horak R, Vlegaar R, Kriek N. 1988. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 1806-1811.
- Ghribi D, Ellouze-Chaabouni S. 2011. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and

- adequate control of aeration. *Biotechnology Research International* **2011**.
- Granum P. 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology* **76**: 61S-66S.
- Hanada RE, Pomella AW, Soberanis W, Loguercio LL, Pereira JO. 2009. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Biological Control* **50**: 143-149.
- Handelsman J, Stabb EV. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* **8**: 1855.
- Hashem A, Tabassum B, Abd_Allah EF. 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Hossain MI, Sadekuzzaman M, Ha S-D. 2017. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Research International* **100**: 63-73.
- Ibrahim HM. 2016. Characterization of biosurfactants produced by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 from used engine oil-contaminated soil. *Egyptian Journal of Petroleum* **27**: 21-29.
- Jangir M, Pathak R, Sharma S, Sharma S. 2018. Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biological Control* **123**: 60-70.
- Jiang C-H, Liao M-J, Wang H-K, Zheng M-Z, Xu J-J, Guo J-H. 2018. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control* **126**: 147-157.
- Kim P-I, Ryu J, Kim YH, Chi Y-T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**: 138-145.
- Kim P, Bai H, Bai D, Chae H, Chung S, Kim Y, Park R, Chi YT. 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 942-949.
- Kuyukina MS, Ivshina IB, Baeva TA, Kochina OA, Gein SV, Chereshev VA. 2015.

- Trehalolipid biosurfactants from nonpathogenic *Rhodococcus* actinobacteria with diverse immunomodulatory activities. *New Biotechnology* **32**: 559-568.
- Li C, Massicote H, Moore L. 1992. Nitrogen-fixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. *Plant and Soil* **140**: 35-40.
- Li H, Guan Y, Dong Y, Zhao L, Rong S, Chen W, Lv M, Xu H, Gao X, Chen R. 2018. Isolation and evaluation of endophytic *Bacillus tequilensis* GYLH001 with potential application for biological control of *Magnaporthe oryzae*. *PLOS One* **13**: e0203505.
- Li X, Zhang Y, Wei Z, Guan Z, Cai Y, Liao X. 2016. Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis. *PLOS One* **11**: e0162125.
- Mercade M, Manresa M. 1994. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **71**: 61-64.
- Mishra M, Muthuprasanna P, Prabha KS, Rani PS, Satish IA, Ch IS, Arunachalam G, Shalini S. 2009. Basics and potential applications of surfactants-a review. *International Journal of PharmTech Research* **1**: 1354-1365.
- Moshafi MH, Forootanfar H, Ameri A, Shakibaie M, Dehghan-Noudeh G, Razavi M. 2011. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. strain FAS 1 isolated from soil. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **24**: 269-275.
- Mulligan CN, Cooper DG, Neufeld RJ. 1984. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal of Fermentation Technology* **62**: 311-314.
- Munimbazi C, Bullerman L. 1998. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 959-968.
- Nam MH, Park MS, Kim HG, Yoo SJ. 2009. Biological control of strawberry Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**: 520-524.
- Ndlovu T, Rautenbach M, Vosloo JA, Khan S, Khan W. 2017. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express* **7**: 108, DOI 110.1186/s13568-13017-10363-13568.

- Nguyen P-A, Strub C, Fontana A, Schorr-Galindo S. 2017. Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biological Control* **104**: 10-27.
- Pal KK, Gardener BM. 2006. Biological control of plant pathogens. *Plant Health Instructor*: 1-25.
- Palazzini JM, Dunlap CA, Bowman MJ, Chulze SN. 2016. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiological Research* **192**: 30-36.
- Pantazaki AA, Papanephytou CP, Lambropoulou DA. 2011. Simultaneous polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids production by *Thermus thermophilus* HB8. *AMB Express* **1**: 17.
- Pereira JF, Gudiña EJ, Costa R, Vitorino R, Teixeira JA, Coutinho JA, Rodrigues LR. 2013. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* **111**: 259-268.
- Płaza G, Turek A, Król E, Szczygłowska R. 2013. Antifungal and antibacterial properties of surfactin isolated from *Bacillus subtilis* growing on molasses. *African Journal of Microbiology Research* **7**: 3165-3170.
- Preecha C, Sadowsky MJ, Prathuangwong S. 2010. Lipopeptide surfactin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 is required for biocontrol efficacy against *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines*. *Kasetsart Journal (Natural Science)* **44**: 84-99.
- Price NP, Rooney AP, Swezey JL, Perry E, Cohan FM. 2007. Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. *FEMS Microbiology Letters* **271**: 83-89.
- Priest F, Goodfellow M, Shute L, Berkeley R. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **37**: 69-71.
- Pruthi V, Cameotra SS. 1997. Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**: 133-135.

- Regassa AB, Taegy C, Lee YS. 2018. Supplementing biocontrol efficacy of *Bacillus velezensis* against *Glomerella cingulata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **102**: 173-179.
- Reichardt C. 1982. Empirical parameters of solvent polarity and chemical reactivity. *Molecular Interactions* **3**: 241-282.
- Ricaud C, Egan B, Gillaspie A, Hughes C. 2012. *Diseases of Sugarcane: Major Diseases*. Elsevier.
- Rajo FG, Reynoso MM, Ferez M, Chulze SN, Torres AM. 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection* **26**: 549-555.
- Rooney AP, Price NP, Ehrhardt C, Swezey JL, Bannan JD. 2009. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**: 2429-2436.
- Ross P, Nelson P, Richard J, Osweiler G, Rice L, Plattner R, Wilson T. 1990. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 3225-3226.
- Ruiz-Garcia C, Bejar V, Martinez-Checa F, Llamas I, Quesada E. 2005. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 191-195.
- Sailaja P, Podile A, Reddanna P. 1998. Biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1 rapidly induces lipooxygenase in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared to crown rot pathogen *Aspergillus niger*. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 125-132.
- Sharma R, Singh J, Verma N. 2018. Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **16**: 132-139.
- Singh AK, Rautela R, Cameotra SS. 2014. Substrate dependent *in vitro* antifungal activity of *Bacillus* sp. strain AR2. *Microbial Cell Factories* **13**: 67.

- Singh H. 2014. Management of plant pathogens with microorganisms. *Proceedings of the Indian National Science Academy* **2**: 443-454.
- Snook ME, Mitchell T, Hinton DM, Bacon CW. 2009. Isolation and characterization of Leu7-surfactin from the endophytic bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a biocontrol agent for *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 4287-4292.
- Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E. 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**: 718-725.
- Sowanpreecha R, Kanchanabanca C, Sangvanich P, Panan R. 2018. *Bacillus subtilis* N3 as a biocontrol agent for *Curvularia lunata* and its antifungal protein properties. *International Journal of Agriculture and Biology* **20**: 531-538.
- Sowanpreecha R, Rerngsamran P. 2018. Biocontrol of orchid-pathogenic mold, *Phytophthora palmivora*, by antifungal proteins from *Pseudomonas aeruginosa* RS1. *Mycobiology* **46**: 129-137.
- Stanghellini ME, Miller RM. 1997. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Disease* **81**: 4-12.
- Suganthi SH, Murshid S, Sriram S, Ramani K. 2018. Enhanced biodegradation of hydrocarbons in petroleum tank bottom oil sludge and characterization of biocatalysts and biosurfactants. *Journal of Environmental Management* **220**: 87-95.
- Sumayo M, Hahm M-S, Ghim S-Y. 2013. Determinants of plant growth-promoting *Ochrobactrum lupini* KUDC1013 involved in induction of systemic resistance against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in tobacco leaves. *Plant Pathology Journal* **29**: 174.
- Tabatabaei A, Nouhi AA, Sajadian V, Mazaheri AM. 2005. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* **2**: 6-12.
- Thongwai N, Kunopakarn J. 2007. Growth inhibition of *Ralstonia solanacearum* PT1J by antagonistic bacteria isolated from soils in the northern part of Thailand. *Chiang Mai Journal of Science* **34**: 345-354.
- Timmusk S, Van West P, Gow N, Paul Huffstutler R. 2009. *Paenibacillus polymyxa*

- antagonizes oomycete plant pathogens *Phytophthora palmivora* and *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Applied Microbiology* **106**: 1473-1481.
- UniProt. UniProtKB results. <https://www.uniprot.org/uniprot/>. 15 September 2020.
- Van Bogaert IN, Zhang J, Soetaert W. 2011. Microbial synthesis of sphorolipids. *Process Biochemistry* **46**: 821-833.
- Velluti A, Marin S, Bettucci L, Ramos A, Sanchis V. 2000. The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology* **59**: 59-66.
- Vigneshwaran C, Sivasubramanian V, Vasantharaj K, Krishnanand N, Jerold M. 2018. Potential of *Brevibacillus* sp. AVN 13 isolated from crude oil contaminated soil for biosurfactant production and its optimization studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **6**: 4347-4356.
- Vijayakumar S, Saravanan V. 2015. Biosurfactants-types, sources and applications. *Research Journal of Microbiology* **10**: 181.
- Viswanathan R, Poongothai M, Malathi P, Ramesh Sundar A. 2012. Sugarcane wilt: New insights into the pathogen identity, variability and pathogenicity. *Functional Plant Science and Biotechnology* **6**: 30-39.
- Volkering F, Breure A, Rulkens W. 1997. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* **8**: 401-417.
- Wang E, Norred W, Bacon C, Riley R, Merrill AH. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 14486-14490.
- Wecke T. Isolation of genomic DNA from *Bacillus* (for PCR...). http://2012.igem.org/Team:LMU-Munich/Lab_Notebook/Protocols. 12 March 2020.
- Wei G, Kloepper J, Tuzun S. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* **86**: 221-224.
- White D, Hird L, Ali S. 2013. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain

- PML026. *Journal of Applied Microbiology* **115**: 744-755.
- Wijesundera R, Bailey J, Byrde R, Fielding A. 1989. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **34**: 403-413.
- Wu S, Liu G, Zhou S, Sha Z, Sun C. 2019. Characterization of antifungal lipopeptide biosurfactants produced by marine bacterium *Bacillus* sp. CS30. *Marine Drugs* **17**: 199.
- Xu Q, Nakajima M, Nabetani H, Iwamoto S, Liu X. 2001. The effects of ethanol content and emulsifying agent concentration on the stability of vegetable oil-ethanol emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **78**: 1185-1190.
- Xu T, Zhu T, Li S. 2016. β -1, 3-1, 4-glucanase gene from *Bacillus velezensis* ZJ20 exerts antifungal effect on plant pathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **32**: 26.
- Yan Z, Reddy M, Kloepper JW. 2003. Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato transplant system. *Canadian Journal of Microbiology* **49**: 383-389.
- Zakaria L, Sahak S, Zakaria M, Salleh B. 2009. Characterisation of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana. *Tropical Life Sciences Research* **20**: 119.
- Zaragoza A, Aranda FJ, Espuny MaJ, Teruel JA, Marqués A, Manresa A, Ortiz A. 2010. Hemolytic activity of a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp.: evidence for a colloid-osmotic mechanism. *Langmuir* **26**: 8567-8572.
- Zhang J, Greasham R. 1999. Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 407-421.
- Zhang S, Moyne A-L, Reddy M, Kloepper JW. 2002. The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control* **25**: 288-296.
- Zhang S, Reddy M, Kokalis-Burelle N, Wells LW, Nightengale SP, Kloepper JW. 2001. Lack of induced systemic resistance in peanut to late leaf spot disease by plant growth-promoting rhizobacteria and chemical elicitors. *Plant Disease* **85**: 879-884.

- Zhang W, Dick W, Hoitink H. 1996. Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. *Phytopathology* **86**: 1066-1070.
- Zhou Y, Li W, Zeng J, Shao Y. 2018. Mechanisms of action of the yeast *Debaryomyces nepalensis* for control of the pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mango fruit. *Biological Control* **123**: 111-119.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

1. อาหารแข็ง Luria-Bertani (LB)

ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็ง Potato Dextrose (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDB	24	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารแข็ง V8

น้ำผัก 100 เปอร์เซนต์ V8 + แคลเซียมคาร์บอเนต	50	มิลลิลิตร
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 950 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลว Luria-Bertani (LB)

ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม

โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
----------------	---	------

ผสมส่วนผสมทั้งหมดตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Blood Agar

เปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
NaCl	5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมสารตามลำดับรวมกับผงวุ้นในน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอจนอาหารมีอุณหภูมิเย็นลงประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่เลือดลงไป 50 มิลลิลิตร

6. อาหารเหลว Nutrient Broth (NB)

อาหารสำเร็จรูป NB	8	กรัม
-------------------	---	------

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปราศจากไอออน 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB)

อาหารสำเร็จรูป TSB	30	กรัม
--------------------	----	------

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปราศจากไอออน 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

1. สารละลาย 1 โมลาร์ Tris-HCl, pH 7.5

Tris(hydroxymethyl)aminomethane	121	กรัม
---------------------------------	-----	------

ละลายสารเคมีในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย TEN

สารละลาย 1 โมลาร์ Tris-HCl, pH 8.0	100	ไมโครลิตร
สารละลาย 1 โมลาร์ EDTA	100	ไมโครลิตร
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	1.5	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายตามลำดับ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลาย 10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10	กรัม
----------------------	----	------

ค่อย ๆ ละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 80 มิลลิลิตร โดยทำในตู้ดูดควัน และต้องใส่มาส์กปิดจมูกเพื่อป้องกันฝุ่นของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต อาจต้องอุ่นด้วยความร้อนเพื่อช่วยการละลาย เมื่อละลายหมดเติมน้ำปราศจากไอออนให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. สารละลาย TEN*

สารละลาย 1 โมลาร์ Tris-HCl, pH 8.0	100	ไมโครลิตร
สารละลาย 1 โมลาร์ EDTA	10	ไมโครลิตร
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	500	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายตามลำดับ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. บัฟเฟอร์ 50X TAE

Tris(hydroxymethyl)aminomethane	242	กรัม
EDTA	18.61	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	กรัม

ละลาย Tris(hydroxymethyl)aminomethane และ EDTA ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 800 มิลลิลิตร และเติมกรดอะซีติกผสมให้เข้ากัน และเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

เตรียมบัฟเฟอร์ 1X TAE โดยเจือจางบัฟเฟอร์ 50X TAE ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำ ปริมาตร 990 มิลลิลิตร



ภาคผนวก ค

1. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน groEL เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank
Bacillus velezensis strain GFP-2 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP021011.1](#) Length: 3975220 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1685 bits(912)	0.0	912/912(100%)	0/912(0%)	Plus/Plus
Query 2	GAAGGTATGCAATTCGACCGGGATATGCGTCTCCTTACATGGTGACTGACTCTGATAAG	61		
Sbjct 2560053	GAAGGTATGCAATTCGACCGGGATATGCGTCTCCTTACATGGTGACTGACTCTGATAAG	2560112		
Query 62	ATGGAAGCGGTTCTTGACAATCCTTACATCTTAATCACAGACaaaaaaaaTCACAAACATT	121		
Sbjct 2560113	ATGGAAGCGGTTCTTGACAATCCTTACATCTTAATCACAGACAAAAAAAAATCACAAACATT	2560172		
Query 122	CAAGAAATCCTTCCTGTGCTTGAGCAAGTTGTACAGCAAGGCAAACCATTGCTTCTGATC	181		
Sbjct 2560173	CAAGAAATCCTTCCTGTGCTTGAGCAAGTTGTACAGCAAGGCAAACCATTGCTTCTGATC	2560232		
Query 182	GCTGAAGATGTTGAAGGGGAAGCTCTTGCTACACTCGTTGTCAACAAACTTCGCGGCACA	241		
Sbjct 2560233	GCTGAAGATGTTGAAGGGGAAGCTCTTGCTACACTCGTTGTCAACAAACTTCGCGGCACA	2560292		
Query 242	TTCAACGCTGTTGCCGTTAAAGCTCCTGGCTTCGGTGACCGCCGTAAAGCAATGCTTGAA	301		
Sbjct 2560293	TTCAACGCTGTTGCCGTTAAAGCTCCTGGCTTCGGTGACCGCCGTAAAGCAATGCTTGAA	2560352		
Query 302	GACATCTCTGTTCTTACAGGCGGAGAAGTGATCACAGAAGATTTAGGCCTTGACCTGAAA	361		
Sbjct 2560353	GACATCTCTGTTCTTACAGGCGGAGAAGTGATCACAGAAGATTTAGGCCTTGACCTGAAA	2560412		
Query 362	TCTACTGAAATCGGACAATTGGGACGCGCTTCTAAAGTTGTGGTAACGAAAGAAAACACA	421		
Sbjct 2560413	TCTACTGAAATCGGACAATTGGGACGCGCTTCTAAAGTTGTGGTAACGAAAGAAAACACA	2560472		
Query 422	ACAATCGTAGAAGGCGCCGGCGACACTGAAAAAATCGCTGCACGCGTCAACCAATCCGC	481		
Sbjct 2560473	ACAATCGTAGAAGGCGCCGGCGACACTGAAAAAATCGCTGCACGCGTCAACCAATCCGC	2560532		

```

Query 482      GCTCAAGTGAAGAAACAACCTTCTGAATTCGACAGAGAAAATTACAAGAGCGTCTTGCG 541
                |||
Sbjct 2560533 GCTCAAGTGAAGAAACAACCTTCTGAATTCGACAGAGAAAATTACAAGAGCGTCTTGCG 2560592

Query 542      AAACTTGCCGGCGGCGTAGCAGTCATCAAAGTCGGCGCTGCGACTGAAACTGAGCTGAAA 601
                |||
Sbjct 2560593 AAACTTGCCGGCGGCGTAGCAGTCATCAAAGTCGGCGCTGCGACTGAAACTGAGCTGAAA 2560652

Query 602      GAGCGTAAACTTCGCATCGAAGACGCCCTCAACTCAACTCGCGCAGCTGTTGAAGAAGGC 661
                |||
Sbjct 2560653 GAGCGTAAACTTCGCATCGAAGACGCCCTCAACTCAACTCGCGCAGCTGTTGAAGAAGGC 2560712

Query 662      ATCGTATCCGGCGGTGGTACAGCGCTTGTCAACGTATAACAACAAGTTGCTGCAGTTGAA 721
                |||
Sbjct 2560713 ATCGTATCCGGCGGTGGTACAGCGCTTGTCAACGTATAACAACAAGTTGCTGCAGTTGAA 2560772

Query 722      GCTGAAGGCGATGCGCAAACAGGTATCAACATCGTGCTTCGCGCGCTTGAAGAGCCGATC 781
                |||
Sbjct 2560773 GCTGAAGGCGATGCGCAAACAGGTATCAACATCGTGCTTCGCGCGCTTGAAGAGCCGATC 2560832

Query 782      CGTCAAATCGCGCACAATGCAGGTCTTGAAGGATCTGTTCATCGTTGAGCGCCTGaaaaac 841
                |||
Sbjct 2560833 CGTCAAATCGCGCACAATGCAGGTCTTGAAGGATCTGTTCATCGTTGAGCGCCTGAAAAAC 2560892

Query 842      gaaaaaaTCGGCGTAGGCTTCAACGCTGCAACCGGCGAATGGGTAAACATGATCGAAAAA 901
                |||
Sbjct 2560893 GAAAAAATCGGCGTAGGCTTCAACGCTGCAACCGGCGAATGGGTAAACATGATCGAAAAA 2560952

Query 902      GGTATCGTTGAC 913
                |||
Sbjct 2560953 GGTATCGTTGAC 2560964

```


2. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gyrA* เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank
Bacillus velezensis strain GFP-2 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP021011.1](#) Length: 3975220 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1790 bits(969)	0.0	973/975(99%)	0/975(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGACTATGCAATGAGCGTTATCGTATCCCGGGCGCTTCCGGATGTGCGTGACGGTCTGAA	60		
Sbjct 1938307	GGACTATGCAATGAGCGTTATCGTATCCCGGGCGCTTCCGGATGTGCGTGACGGTCTGAA	1938366		
Query 61	GCCGGTTCACAGACGGATTTGTACGCAATGAATGATTTAGGCATGACCAGTGACAAACC	120		
Sbjct 1938367	GCCGGTTCACAGACGGATTTGTACGCAATGAATGATTTAGGCATGACCAGTGACAAACC	1938426		
Query 121	ATATAAAAAATCTGCCCGTATCGTCGGTGAAGTTATCGGTAAGTACCACCCGCACGGTGA	180		
Sbjct 1938427	ATATAAAAAATCTGCCCGTATCGTCGGTGAAGTTATCGGTAAGTACCACCCGCACGGTGA	1938486		
Query 181	CTCAGCGGTTTACGAATCAATGGTCAGAATGGCGCAGGATTTTAACTACCGCTACATGCT	240		
Sbjct 1938487	CTCAGCGGTTTACGAATCAATGGTCAGAATGGCGCAGGATTTTAACTACCGCTACATGCT	1938546		
Query 241	TGTTGACGGACACGGCAACTTCGGTTCGGTTGACGGCGACTCAGCGGCCGCGATGCGTTA	300		
Sbjct 1938547	TGTTGACGGACACGGCAACTTCGGTTCGGTTGACGGCGACTCAGCGGCCGCGATGCGTTA	1938606		
Query 301	CACAGAAGCGAGAATGTCAAAAATCGCAATGGAAATTTCTGCGTGACATTACGAAAGACAC	360		
Sbjct 1938607	CACAGAAGCGAGAATGTCAAAAATCGCAATGGAAATTTCTGCGTGACATTACGAAAGACAC	1938666		
Query 361	GATTGACTATCAAGATAACTATGACGGTTCAGAAAGAGAGCCTGCCGTCATGCCTTCGAG	420		
Sbjct 1938667	GATTGACTATCAAGATAACTATGACGGTTCAGAAAGAGAGCCTGCCGTCATGCCTTCGAG	1938726		
Query 421	ATTTCCGAATCTGCTCGTAAACGGGGCTGCCGGTATTGCGGTTCGGAATGGCGACAAACAT	480		
Sbjct 1938727	ATTTCCGAATCTGCTCGTAAACGGGGCTGCCGGTATTGCGGTTCGGAATGGCGACAAACAT	1938786		
Query 481	TCCCCGCATCAGCTTGGAGAAGTCATTGAAGGCGTGCTTGCCGTAAGTGAGAATCCTGA	540		
Sbjct 1938787	TCCCCGCATCAGCTTGGAGAAGTCATTGAAGGCGTGCTTGCCGTAAGTGAGAATCCTGA	1938846		

```
Query 541      GATTACAAACCAGGAGCTGATGGAGTACATCCCGGGCCCGGATTTCCGACTGCAGGTCA 600
                |||
Sbjct 1938847  GATTACAAACCAGGAGCTGATGGAGTACATCCCGGGCCCGGATTTCCGACTGCAGGTCA 1938906

Query 601      GATTTTGGGCCGGAGCGGCATCCGCAAGGCGTATGAATCCGGACGGGGATCAATCACAAT 660
                |||
Sbjct 1938907  GATTTTGGGCCGGAGCGGCATCCGCAAGGCGTATGAATCCGGACGGGGATCAATCACAAT 1938966

Query 661      CCGGGCTAAGGCTGAAATCGAAGAGACTTCATCGGGAAAAGAAAGAATTATTGTACGGGA 720
                |||
Sbjct 1938967  CCGGGCTAAGGCTGAAATCGAAGAGACTTCATCGGGAAAAGAAAGAATTATTGTACGGGA 1939026

Query 721      ACTTCCTTATCAGGTGAACAAAGCGAGATTAATTGAAAAAATCGCGGATCTTGTCGGGA 780
                |||
Sbjct 1939027  ACTTCCTTATCAGGTGAACAAAGCGAGATTAATTGAAAAAATCGCGGATCTTGTCGGGA 1939086

Query 781      CaaaaaaaTCGAAGGAATTACCGATCTGCGAGACGAATCCGACCGTAACGGAATGAGAAT 840
                |||
Sbjct 1939087  CAAAAAATCGAAGGAATTACCGATCTGCGAGACGAATCCGACCGTAACGGAATGAGAAT 1939146

Query 841      CGTCATTGAGATCCGCCGTGACGCCAATGCTCACGTCATTTTGAATAACCTGTACAAACA 900
                |||
Sbjct 1939147  CGTCATTGAGATCCGCCGTGACGCCAATGCTCACGTCATTTTGAATAACCTGTACAAACA 1939206

Query 901      AACGGCCCTGCAGACGTCTTTCGGAAATCAATCTGCTGGCGCTCGTTGACGGACAGCCGAA 960
                |||
Sbjct 1939207  AACGGCCCTGCAGACGTCTTTCGGGATCAACCTGCTGGCGCTCGTTGACGGACAGCCGAA 1939266

Query 961      GGTACTAAGCCTGAA 975
                |||
Sbjct 1939267  GGTACTAAGCCTGAA 1939281
```

3. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *polC* เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank
Bacillus velezensis strain BvL03 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP041192.1](#) Length: 3984544 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1465 bits(793)	0.0	797/799(99%)	0/799(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCTTTGATATGGGATTTTTAAATGTGGCGTACAAGCGTCTTTTGAAAACGGAAAAAGCGA	60		
Sbjct 1629808	GCTTTGATATGGGATTTTTAAATGTGGCGTACAAGCGTCTTTTGAAAACGGAAAAAGCGA	1629867		
Query 61	AAAATCCGGTTATTGATACGCTGGAACGCGCGTTTCCTGTATCCTGAGTTTAAAAATC	120		
Sbjct 1629868	AAAATCCGGTCATTGATACGCTGGAACGCGCGTTTCCTGTATCCTGAGTTTAAAAATC	1629927		
Query 121	ACCGCTTAAATACGTTATGTAAGAAGTTTGATATCGAATTAACCCAGCATCACCGAGCGG	180		
Sbjct 1629928	ACCGCTTAAATACGTTATGTAAGAAGTTTGATATCGAATTAACCCAGCATCACCGAGCGG	1629987		
Query 181	TCTTTGACGCTGAAGCAACGGGCTACCTGCTGTTGAAAATGCTCAAAGATGCCGCTGAAA	240		
Sbjct 1629988	TCTTTGACGCTGAAGCAACGGGCTACCTGCTGTTGAAAATGCTCAAAGATGCCGCTGAAA	1630047		
Query 241	AAGACATTTTTTATCATGATCAGCTGAATGAGAATATGGGACAATCCAATGCTTATCAAA	300		
Sbjct 1630048	AAGACATTTTTTATCATGATCAGCTGAATGAGAATATGGGACAATCCAATGCTTATCAAA	1630107		
Query 301	GATCAAGGCCTTATCACGCTACATTGCTCGCCGTAAATGAGACCGGCCTTAAAAATCTGT	360		
Sbjct 1630108	GATCAAGGCCTTATCACGCTACATTGCTCGCCGTAAATGAGACCGGCCTTAAAAATCTGT	1630167		
Query 361	TTAAGCTTGTGTCCATTTCTCATATTCAATATTTCTACAGAGTGCCGCGCATCCGAGGT	420		
Sbjct 1630168	TTAAGCTTGTGTCCATTTCTCATATTCAATATTTCTACAGAGTGCCGCGCATCCGAGGT	1630227		
Query 421	CGCAGCTTAATAAATACAGAGAAGGTCTGTTAATCGGCTCTGCCTGTGACAGGGGAGAGG	480		
Sbjct 1630228	CGCAGCTTAATAAATACAGAGAAGGTCTGTTAATCGGCTCTGCCTGTGACAGGGGAGAGG	1630287		
Query 481	TCTTTGAAGGCATGATGCAAAAATCACCTGAAGAGGTTGAAGATATCGCATCCTTCTATG	540		
Sbjct 1630288	TCTTTGAAGGCATGATGCAAAAATCACCTGAAGAGGTTGAAGATATCGCATCCTTCTATG	1630347		

Query 541 ATTATCTTGAAGTGCAGCCGCCGGAAGTATACAGACACCTTCTGCAGCTTGAGCTCGTCC 600
|||||
Sbjct 1630348 ATTATCTTGAAGTGCAGCCGCCGGAAGTATACAGACACCTTCTGCAGCTTGAGCTCGTCC 1630407

Query 601 GGGATGAAAAAGCGCTGAAAGAAATCATCGCCAACATCACGAAGCTCGGGGAAAAATTGA 660
|||||
Sbjct 1630408 GGGATGAAAAAGCGCTGAAAGAAATCATCGCCAACATCACGAAGCTCGGGGAAAAATTGA 1630467

Query 661 ATAAGCCGGTCGTTGCCACCGGAAATGTCCACTACTTAAACGATGAGGATAAAATTTACC 720
|||||
Sbjct 1630468 ATAAGCCGGTCGTTGCCACCGGAAATGTCCACTATTTAAACGATGAGGATAAAATTTACC 1630527

Query 721 GGAAGATCTTAATATCTTCCCAAGGCGCGCCAACCCGTTAAACCGGCACGAACTGCCTA 780
|||||
Sbjct 1630528 GGAAGATCTTAATATCTTCCCAAGGCGCGCCAACCCGTTAAACCGGCACGAACTGCCTA 1630587

Query 781 AAGTGCCTTCAGAACGAC 799
|||||
Sbjct 1630588 AAGTGCCTTCAGAACGAC 1630606



4. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *purH* เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank
Bacillus velezensis strain SCGB 1 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP023320.1](#) Length: 4085488 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1504 bits(814)	0.0	822/826(99%)	0/826(0%)	Plus/Plus
Query 1	GATGTCATCGGCATTTTCAGAAGTACTGGATTTCTGAAATTATGGACGGACGGTTAAAA	60		
Sbjct 2649950	GATGTCATCGGCATTTTCGGAAGTACCGGATTTCTGAAATTATGGACGGACGGTTAAAA	2650009		
Query 61	ACGCTCCATCCTAATATTCACGGCGGACTGCTTGCCGTAAGAGACAATGAAGAGCATATG	120		
Sbjct 2650010	ACGCTCCATCCTAATATTCACGGCGGCTGCTTGCCGTAAGAGACAATGAAGAGCATATG	2650069		
Query 121	GCGCAGATCAATGAGCACGGCATTGCACCGATTGACCTTGTGGTCGTCAACCTTTATCCG	180		
Sbjct 2650070	GCGCAGATCAATGAACACGGCATTGCACCGATTGACCTTGTGGTCGTCAACCTTTATCCG	2650129		
Query 181	TTTAAAGAAACGATTTCAAAGAAGACGTAACATACGATGAAGCGATAAAAAACATTGAT	240		
Sbjct 2650130	TTTAAAGAAACGATTTCAAAGAAGACGTAACATACGATGAAGCGATAAAAAACATTGAT	2650189		
Query 241	ATCGGGGCCCCGGCATGCTGCGCGCCGATCGAAAAACCATCAGGATGTGACGGTCATC	300		
Sbjct 2650190	ATCGGGGCCCCGGCATGCTGCGCGCCGATCGAAAAACCATCAGGATGTGACGGTCATC	2650249		
Query 301	ACAGATCCGGCCGATTACAGCTCCGTGCTCAATGAGATGAAAGAACACGGCGGCGTTTCA	360		
Sbjct 2650250	ACAGATCCGGCCGATTACAGCTCCGTGCTCAATGAGATGAAAGAACACGGCGGCGTTTCA	2650309		
Query 361	CTCAAAGAAAACGCGAGCTTGCGGCCAAAGTATTCGCCATACCGGGCGTACGACGCA	420		
Sbjct 2650310	CTCAAAGAAAACGCGAGCTTGCGGCCAAAGTATTCGCCATACCGGGCGTACGACGCA	2650369		
Query 421	TTAATCGCTGATTACTTAACACGCGAGGCCGGTGAGAAAGACCCTGAGCAATTCACCGTT	480		
Sbjct 2650370	TTAATCGCTGATTACTTAACACGCGAGGCCGGTGAGAAAGACCCTGAGCAATTCACCGTT	2650429		
Query 481	ACTTTTGAGAAAAACAGTCGCTCCGCTACGGTGAAAATCCTCACCAAGAGGGCGTTTTTC	540		
Sbjct 2650430	ACTTTTGAGAAAAACAGTCGCTCCGCTACGGTGAAAATCCTCACCAAGAGGGCGTTTTTC	2650489		

Query 541 TACCAAAGCGCACTTCCTGTCTCCGGTTCATCGCGGCGGCAAAACAGCTTCACGGCAA 600
 |||
 Sbjct 2650490 TACCAAAGCGCACTTCCTGTCTCCGGTTCATCGCGGCGGCAAAACAGCTTCACGGCAA 2650549

Query 601 GAGCTTTCTTACAACAACATTAAGGACGCGGATGCGGCCGTTCAAATCGTCCGGGAATTT 660
 |||
 Sbjct 2650550 GAGCTTTCTTACAACAACATTAAGGACGCGGATGCGGCCGTTCAAATCGTCCGGGAATTT 2650609

Query 661 ACAGAACCCGCAGCTGTTGCCGTTAAACATATGAATCCGTGCGGAGTCGGTACGGGAGCT 720
 |||
 Sbjct 2650610 ACAGAACCCGCAGCTGTTGCCGTTAAACATATGAATCCGTGCGGAGTCGGTACGGGAGCT 2650669

Query 721 TCAATTGAGGAAGCATTCAATAAAGCGTATGAAGCTGATAAACTTCCATTTTCGGCGGC 780
 |||
 Sbjct 2650670 TCAATTGAGGAAGCATTCAATAAAGCGTATGAAGCTGATAAACTTCCATTTTCGGCGGC 2650729

Query 781 ATCATCGCGCTGAACCGTGAAGTTGATCAGGCTACGGCTGAAGCCC 826
 |||
 Sbjct 2650730 ATCATCGCGCTGAACCGTGAAGTTGATCAGGCTACGGCTGAAGCCC 2650775



5. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rpoB เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank
Bacillus velezensis strain GH1-13, complete genome

Sequence ID: [CP019040.1](#) Length: 4071980 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1757 bits(951)	0.0	959/963(99%)	0/963(0%)	Plus/Plus
Query 1	GATGATGTTTATACATCTATTCACATTGAAGAATATGAATCAGAAGCACGTGATACAAAG	60		
Sbjct 124960	GATGATGTATACACATCTATTCACATTGAAGAATATGAATCAGAAGCACGTGATACAAAG	125019		
Query 61	CTTGACCGGAAGAGATCACCCGCGATATCCAAACGTAGGGGAAGATGCGCTTCGCAAC	120		
Sbjct 125020	CTTGACCGGAAGAGATCACCCGCGATATCCAAACGTAGGGGAAGACGCGCTTCGCAAC	125079		
Query 121	CTTGATGACCGGGAATTATCCGTATCGGCGCGGAAGTCAACGACGGAGACCTTCTCGTA	180		
Sbjct 125080	CTTGATGACCGGGAATTATCCGTATCGGTGCGGAAGTCAACGACGGAGACCTTCTCGTA	125139		
Query 181	GGTAAAGTAACGCCTAAAGGTGTAAGTACTGAGCTTACGGCTGAAGAACGCCTTCTTCATGCG	240		
Sbjct 125140	GGTAAAGTAACGCCTAAAGGTGTAAGTACTGAGCTTACGGCTGAAGAACGCCTTCTTCATGCG	125199		
Query 241	ATCTTTGGAGAAAAAGCGCGTGAGGTCCGTGATACTTCTCTCCGTGTGCCTCACGGCGGC	300		
Sbjct 125200	ATCTTTGGAGAAAAAGCGCGTGAGGTCCGTGATACTTCTCTCCGTGTGCCTCACGGCGGC	125259		
Query 301	GGCGGAATTATCCACGACGTAAAAGTCTTCAACCGTGAAGACGGCGACGAACTTCCTCCG	360		
Sbjct 125260	GGCGGAATTATCCACGACGTAAAAGTCTTCAACCGTGAAGACGGCGACGAACTTCCTCCG	125319		
Query 361	GGAGTGAACCAGCTTGTACGCGTATATATCGTTTCAGAAACGTAAGATTTCTGAAGGTGAT	420		
Sbjct 125320	GGAGTGAACCAGCTTGTACGCGTATATATCGTTTCAGAAACGTAAGATTTCTGAAGGTGAT	125379		
Query 421	AAAATGGCCGGACGTCACGAAACAAAGGGTTATCTCGAAGATTCCTCCTGAAGAAGAT	480		
Sbjct 125380	AAAATGGCCGGACGTCACGAAACAAAGGGTTATCTCGAAGATTCCTCCTGAAGAAGAT	125439		
Query 481	ATGCCTTACCTTCCTGACGGCACGCCGATCGATATCATGCTTAACCCGCTGGGTGTACCA	540		
Sbjct 125440	ATGCCTTACCTTCCTGACGGCACGCCGATCGATATCATGCTTAACCCGCTGGGTGTACCA	125499		

```
Query 541 TCACGTATGAATATCGGTCAGGTATTAGAACTTCACATGGGTATGGCTGCCCGCTACCTC 600
          |||
Sbjct 125500 TCACGTATGAATATCGGTCAGGTATTAGAACTTCACATGGGTATGGCTGCCCGCTACCTC 125559

Query 601 GGCATTCACATCGCGTCACCTGTATTTGACGGCGCGCGTGAAGAAGATGTGTGGGAAACA 660
          |||
Sbjct 125560 GGCATTCACATCGCGTCACCTGTATTTGACGGCGCGCGTGAAGAAGATGTGTGGGAAACA 125619

Query 661 CTTGAAGAAGCAGGCATGTCAAGAGACGCTAAAACAGTTCTTTATGACGGCCGTACGGGA 720
          |||
Sbjct 125620 CTTGAAGAAGCAGGCATGTCAAGAGACGCTAAAACAGTTCTTTATGACGGCCGTACGGGA 125679

Query 721 GAACCGTTCGACAACCGTGTATCAGTCGGAATCATGTACATGATCAAACCTGGCGCACATG 780
          |||
Sbjct 125680 GAACCGTTCGACAACCGTGTATCAGTCGGAATCATGTACATGATCAAACCTGGCGCACATG 125739

Query 781 GTTGATGATAAACTTCATGCCCGTTCTACAGGTCCTTACTCACTGTTACGCAGCAGCCT 840
          |||
Sbjct 125740 GTTGATGATAAACTTCATGCCCGTTCTACAGGTCCTTACTCACTGTTACGCAGCAGCCT 125799

Query 841 CTCGGCGGTAAAGCCCAATTCGGCGGACAGCGTTTCGGTGAGATGGAGGTTTGGGCGCTT 900
          |||
Sbjct 125800 CTCGGCGGTAAAGCCCAATTCGGCGGACAGCGTTTCGGTGAGATGGAGGTTTGGGCGCTT 125859

Query 901 GAAGCTTACGGCGCAGCTTACACGCTTCAAGAAATCCTGACTGTGAAGTCCGATGACGTG 960
          |||
Sbjct 125860 GAAGCTTACGGCGCAGCTTACACGCTTCAAGAAATCCTGACTGTGAAGTCCGATGACGTG 125919

Query 961 GTC 963
          |||
Sbjct 125920 GTC 125922
```


ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายสิรภพ ภูมิภูติกุล
วัน เดือน ปี เกิด	3 สิงหาคม 2537
สถานที่เกิด	พิษณุโลก
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในปี การศึกษา 2559 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทบัณฑิต สาขาจุล ชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2560
ผลงานตีพิมพ์	ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The 5th EnvironmentAsia International Conference ระหว่างวันที่ 13 – 15 มิถุนายน 2562 ณ The Empress Hotel เชียงใหม่ ในหัวข้อเรื่อง “Biosurfactant from <i>Bacillus velezensis</i> B49 as an alternative to chemical fungicide to inhibit the growth of fungal plant pathogen”