ประสิทธิภาพผงชีวภัณฑ์ *Bacillus* sp. Ks5 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และควบคุมเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่เป็นสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว

Efficiency of Dry Formulation *Bacillus* sp. Ks5 to Plant Growth Promotion and Biological Control of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Caused Bacterial Leaf Blight Disease

สุวิชญา บัวชาติ[1*] ประภาพร พวงพี[1] และณัฐวรรณ แจ่มใส[1]
Suwichaya Buachard [1*], Praphaphorn Phuangphee [1] and Natthawan Jamsai [1]

[1]โปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร จังหวัดกำแพงเพชร 62000
[1]Biology Program, Faculty of Science and Technology, Kamphaeng Phet Rajabhat University, KamphaengPhet 62000
*Corresponding author, e-mail: suwichaya.gift@gmail.com
(Received: Feb 15, 2022; Revised: Jun 4, 2022; Accepted: Jun 15, 2022)

บทคัดย่อ

โรคโรคขอบใบแห้งในข้าวที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ได้กลายเป็นปัญหาที่รุนแรงในประเทศไทย การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ทดสอบประสิทธิภาพของผงชีวภัณฑ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และควบคุมเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากข้าว ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 23 ไอโซเลต พบ 6 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งในข้าวที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* โดย *Bacillus* sp. Ks5 สามารถยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ได้ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้งกว้าง 1.43 เซนติเมตร เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar diffusion *Bacillus* sp. Ks5 สามารถนำมาพัฒนาเป็นผงชีวภัณฑ์และรักษาเซลล์แบคทีเรียให้อยู่รอดที่ 6.37×10^{8} CFU/ml ผงชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. Ks5 ที่เก็บเป็นระยะเวลา 3 เดือน มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยมีบริเวณกว้าง 2.20 เซนติเมตร ตามลำดับ ผงชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. Ks5 สามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ แอมโมเนีย

คำสำคัญ : เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ผงชีวภัณฑ์

Abstract

Bacterial Leaf Blight Disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* has become a severe problem, mainly in Thailand. This research project aimed to test the efficacy of dry formulation for plant growth promotion and biological control of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Screening of antagonistic bacteria from the rhizosphere soil of rice. Antagonistic bacteria were isolated from 23 isolates. 6 isolates showed the efficiency to inhibit bacterial blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Bacillus* sp. Ks5 indicated a difference in higher inhibition of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with clear zone 1.43 cm, using agar diffusion technique. *Bacillus* sp. Ks5 was adapted to the development of dry formulation and remarkably, this was successful as a carrier to maintain bacterial survival with 6.37×10^{8} CFU/ml. The formulation from *Bacillus* sp. Ks5 was the most effective in inhibiting bacteria pathogens that had been stored for 3 months with 2.20 cm, respectively. The dry formulation of *Bacillus* sp. Ks5 was able to produce plant growth promoters such as ammonia.

Keywords: Antagonist bacteria, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae,* Plant growth promotion, Dry formulation antagonistic

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มรย.
YRUJST
YRU JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Print ISSN: 2539-5688, e-ISSN: 2672-9873

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นธัญพืชอาหารหลักที่มีการบริโภคทั่วโลก โดยเฉพาะในเอเชีย แอฟริกา และลาตินอเมริกา (Tariq *et al*., 2019) Thai Rice Exporters Association (2020) รายงานว่าในปี พ.ศ. 2562 ประเทศไทยมีการส่งออกข้าวจำนวน 7,580,505 ตัน คิดเป็นมูลค่า 130,545 ล้านบาท ปัญหาที่ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงเกิดจากโรคระบาดในนาข้าวที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย รา และไวรัส โรคขอบใบแห้งในข้าวที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงอย่างมากถึง 50% ในพื้นที่เพาะปลูกข้าว (Dossa *et al*., 2014) โดยธรรมชาติเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จะเข้าสู่ภายในใบข้าวโดยผ่านต่อมคายน้ำ (Hydathodes) ของขอบใบและเพิ่มจำนวนเข้าไปในช่องว่างระหว่างเยื่อบุผิว (Epithelial tissues) จากนั้นเข้าทำลายท่อลำเลียงน้ำ (Xylem vessel) เพื่อแพร่กระจายการติดเชื้อทั่วลำต้น (Tariq *et al*., 2019) มีความพยายามที่จะควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าวโดยใช้สารเคมีสังเคราะห์ผสมทองแดง แม้จะได้ผลดีแต่ก็มีผลกระทบด้านค่าใช้จ่ายและสุขภาพของเกษตรกร ด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การทำลายพืชขนาดเล็กที่เป็นประโยชน์ การตกค้างของสารเคมีในดินและน้ำ (Paslon *et al*., 2017) ดังนั้นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ คือ การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี (Biocontrol) ซึ่งเป็นการใช้สิ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์มายับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคเพื่อไม่ให้สร้างความเสียหายต่อพืช จุลินทรีย์เหล่านี้เรียกว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Antagonist) ปัจจุบันมีการขึ้นทะเบียนสารควบคุมทางชีวภาพและวางจำหน่ายในท้องตลาดเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า รวมถึงจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas*, *Streptomyces* และ *Bacillus* และเชื้อราสกุล *Trichoderma* และ *Gliocladium* กลไกของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืชได้แก่ การสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโต (Antibiosis) แข่งขัน (Competition) การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ทำให้เชื้อก่อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางสายพันธุ์ยังสามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น *Pseudomonas fluorescens* (Azman *et al*., 2017) สารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ การละลายสารประกอบฟอสเฟต การผลิตแอมโมเนีย และการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) เป็นต้น (Kittiwongwattana *et al*., 2016) ปัจจุบันเริ่มนำเชื้อ *Bacillus* spp. มาควบคุมหรือยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชต่าง ๆ โดยเก็บรักษาจุลินทรีย์ด้วยวิธีการทำแห้งแบบอบลมร้อนในรูปแบบผงชีวภัณฑ์ (Sirinunta & Akarapisan, 2015) ซึ่งผงชีวภัณฑ์นั้นสามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน จึงได้คัดแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินรอบรากข้าวในจังหวัดกำแพงเพชร ศึกษาประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง และการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาผลิตเป็นผงชีวภัณฑ์ที่มีความสามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและควบคุมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่เป็นสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินรอบรากข้าว ศึกษาประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง และการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช สำหรับเป็นแนวทางในการนำผงชีวภัณฑ์ไปใช้ในการควบคุมเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่เป็นสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากข้าว

นำดินบริเวณรอบรากข้าวที่ไม่เป็นโรคขอบใบแห้งในจังหวัดกำแพงเพชรทั้งหมด 11 อำเภอ ได้แก่ อำเภอเมือง อำเภอพรานกระต่าย อำเภอลานกระบือ อำเภอทรายทองวัฒนา อำเภอขาณุวรลักษบุรี อำเภอคลองขลุง อำเภอปางศิลาทอง อำเภอคลองลาน อำเภอโกสัมพี อำเภอไทรงาม และอำเภอบึงสามัคคี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินอำเภอละ จุด 1 โดยแต่ละจุดจะเก็บตัวอย่างดินลึกลงไปจากผิวหน้าดิน 5 เซนติเมตร (Yang *et al*., 2015) มาทำการแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธี Soil dilution plate โดยใช้ตัวอย่างดิน 10 กรัม ผสมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเจือจางด้วยวิธี Ten-fold serial dilution จากนั้นดูดดินแขวนลอย (Suspension) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) และเกลี่ย (Spread) ให้ทั่วอาหาร NGA ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มไว้อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวแยกเชื้อบริสุทธิ์

2. ประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จากศูนย์อารักขาพันธุ์พืช กรุงเทพฯ ด้วยวิธี Agar well diffusion (Beric *et al*, 2012) โดยเลี้ยงเชื้อแยกกันระหว่างแบคทีเรียสาเหตุโรคและแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหาร Nutrient glucose broth (NGB) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของ Suspension เชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.2 (ประมาณ 10^8 cfu/ml) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer นำเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* 100 ไมโครลิตร Spread บนอาหาร NGA ในจานเพาะเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร จากนั้นเจาะหลุมโดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บนอาหาร NGA ที่มีเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) บนผิวหน้าอาหารทดสอบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และหาบริเวณการยับยั้ง ดังนี้

$$\text{บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)} = \frac{\text{ความกว้างบริเวณยับยั้งทั้งหมด} - \text{ความกว้างของ Cork borer}}{2}$$

3. กิจกรรมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* มาศึกษากิจกรรมการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ดังต่อไปนี้

3.1 การผลิต Indole-3-acetic acid (IAA)

นำเชื้อปฏิปักษ์มาเลี้ยงในอาหาร Luria Bertani medium (LB) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ผสม L-tryptophan ร้อยละ 0.5 บ่มที่ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำส่วนใส 2 มิลลิลิตร ผสมกับ Orthophosphoric acid 2 หยด และ Salkowski 2 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่มืด 30 นาที และสังเกตถ้ามีการผลิต IAA จะมีสีชมพู ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 การผลิตแอมโมเนีย

เลี้ยงเชื้อปฏิปักษ์ใน Peptone 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 28 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 48 - 72 ชั่วโมงแล้วเติมตัวทำปฏิกิริยาน้ำยา Nessler's reagent 0.5 มิลลิลิตร ถ้าเป็นสีเหลืองจะเป็นผลบวก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3 การละลายฟอสเฟต

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหาร Pikovskaya's agar ที่มี Bromophenol blue 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วใช้กระดาษกรองที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร วางบน Pikovskaya's agar จากนั้นบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน สังเกตถ้ามีโซนสีเหลืองรอบโคโลนีจะเป็นผลบวก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Sirinunta & Akarapisan, 2015)

4. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* มาศึกษาสัณฐานวิทยาโดยดูลักษณะเซลล์ (Cell morphology) การย้อมสีแกรม (Gram reaction) และการสร้างเอนโดสปอร์ (Endospore forming) การผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Catalase production)

5. การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธี single 16s ribosomal DNA (rDNA) sequencing

สกัด Chromasomal DNA ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหาร Nutrient agar (NA) ทำการเพิ่ม จำนวนยีนเปาหมาย คือ 16s rDNA ดวยวิธีการ PCR โดยใช้ universal primers คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') ทำปฏิกิริยา PCR สภาวะดังต่อไปนี้

Initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
Denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
Annealing	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
Elongation	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
Final elongation	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มรย.
YRUJST
YRU JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Print ISSN: 2539-5688, e-ISSN: 2672-9873

ในขั้นตอน Denaturation - Final elongation ทำซ้ำ 30 รอบ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Germany) แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม CLUSTAL X (Version 1.83)

6. ประสิทธิภาพผงชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. Ks5

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. Ks5 มาเลี้ยงในอาหาร Nutrient glucose broth (NGB) ปริมาณ 120 มิลลิลิตร บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 28±2 องศาเซลเซียส 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปิเปตดูดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) ที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย NaCl 0.85 % (w/v) ดูดเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์เข้มข้นประมาณ 10^8 CFU/ml 20 มิลลิลิตร ผสมกับแป้งข้าวจ้าว 43.5 กรัม น้ำมันรำข้าว 1.5 มิลลิลิตร และซูโครส 5 กรัม นำส่วนผสมมาอบในตู้อบลมร้อน ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Sirinunta & Akarapisan, 2015) จากนั้นนำไปปั่นให้เป็นผงและใส่ถุงซิปล็อค ถุงละ 10 กรัม และเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้องปกติ ตรวจสอบอัตราการรอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในผงชีวภัณฑ์ โดยวิธีนับจุลินทรีย์มาตรฐาน (Total plate count; TPC) ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง และกิจกรรมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยนำผงชีวภัณฑ์มาตรวจสอบ 3 เดือน เดือนละ 1 ครั้ง

7. วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics (SPSS)

ผลการวิจัย

1. การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากข้าว

จากการคัดแยกแบคทีเรียในดินบริเวณรอบรากข้าวจังหวัดกำแพงเพชรทั้งหมด 11 อำเภอ พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 23 สายพันธุ์

2. ประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง

นำแบคทีเรียทั้ง 23 สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดแยก มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งในข้าว *X. oryzae* pv. *oryzae*. พบว่ามีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ 6 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ Ks5 มีความสามารถในการยับยั้งได้ดีที่สุดโดยบริเวณยับยั้งกว้าง 1.43 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p>0.05$) โดยมีประสิทธิภาพรองลงมา คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ Pt2 Ps2 M3 M2 และ St1 มีบริเวณยับยั้งกว้าง 1.33 1.33 1.33 1.20 และ 1.17 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

แบคทีเรียปฏิปักษ์	เส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้ง (เซนติเมตร)
Ks5	1.43±0.12
Pt2	1.33±0.15
Ps2	1.33±0.06
M3	1.33±0.06
M2	1.20±0.17
St1	1.17±0.15
C.V. (%)	0.07

3. กิจกรรมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ Ks5 ทดสอบกิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่าสามารถผลิตแอมโมเนียได้ แต่ไม่สามารถผลิต IAA และไม่สามารถละลายฟอสเฟตได้ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 กิจกรรมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

แบคทีเรียปฏิปักษ์	การสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช		
	การผลิต IAA	การผลิตแอมโมเนีย	การละลายฟอสเฟต
Ks5	-	+	-

(+) = แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถสร้างสารการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช, (–) = แบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่สามารถสร้างสารการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

4. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ Ks5 มาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีววิทยาบางประการ พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน แกรมบวก มีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส และสร้างสปอร์ ดังตารางที่ 3 ซึ่งตรงกับลักษณะเชื้อแบคทีเรียกลุ่มจีนัส Bacillus

ตารางที่ 3 ทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยาบางประการของแบคทีเรียปฏิปักษ์

แบคทีเรียปฏิปักษ์	สัณฐานวิทยา	การสร้างสปอร์	การผลิตเอนไซม์คะตะเลส
Ks5	เซลล์รูปท่อน แกรมบวก	สร้าง	+

5. การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธี single 16s ribosomal DNA (rDNA) sequencing

แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ Ks5 ถูกนำมาระบุสายพันธุ์โดยเทคนิค Single 16S ribosomal DNA (rDNA) sequencing และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ Ks5 เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน Bacillaceae มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* และ *Bacillus velezenis* โดยมีความเหมือนร้อยละ 99.92 และ *Bacillus subtitis* subsp. *subtitis* โดยมีความเหมือนร้อยละ 99.77 ดังตารางที่ 4 จึงระบุเบื้องต้นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ Ks5 จัดอยู่ในกลุ่ม *B. subtilis* Species Complex

ตารางที่ 4 สัณฐานวิทยาและชีววิทยาบางประการของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

แบคทีเรียปฏิปักษ์	ชื่อสายพันธุ์	ร้อยละความเหมือน
Ks5	*Bacillus siamensis*	99.92
	Bacillus velezenis	99.92
	Bacillus subtitis subsp. *subtitis*	99.77

6. ประสิทธิภาพผงชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. Ks5

จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นของผงเชื้อชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. Ks5 เท่ากับ 4.17×10^{8} CFU/ml ทำการเก็บรักษาในถุงซิปล็อคที่อุณหภูมิห้องปกติ ที่เวลา 3 เดือน มีจำนวนจุลินทรีย์ 6.37×10^{8} CFU/ml โดยเมื่อเทียบกับก่อนทำเป็นผงชีวภัณฑ์ จำนวนจุลินทรีย์ 3.73×10^{8} CFU/ml และยังคงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. oryzae เท่ากับ 2.20 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ดังตารางที่ 5 และพบว่าปริมาณจุลินทรีย์เมื่อทำการเก็บรักษาที่ 2 และ 3 เดือน มีปริมาณเพิ่มขึ้นกว่าการเก็บรักษาก่อนหน้านั้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p\leq0.05$) ส่วนประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. Ks5 กับผงเชื้อชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. Ks5 เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p>0.05$)

เมื่อทำการทดสอบกิจกรรมการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ของผงชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. Ks5 พบว่าสามารถผลิตแอมโมเนีย แต่ไม่สามารถผลิต IAA และการละลายฟอสเฟตได้ เช่นเดียวกับเชื้อสด *Bacillus* sp. Ks5 ดังตารางที่ 6

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มรย.
YRUJST
YRU JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Print ISSN: 2539-5688, e-ISSN: 2672-9873

ตารางที่ 5 จำนวนจุลินทรีย์และการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. Ks5 และผงชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. Ks5

แบคทีเรียปฏิปักษ์ / ผงชีวภัณฑ์	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFU/ml)	เส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้ง (เซนติเมตร)
Bacillus sp Ks5	3.73×10^{8}c	1.98±0.22
ผงชีวภัณฑ์ 0 วัน	4.17×10^{8}bc	1.95±0.10
ผงชีวภัณฑ์ 1 เดือน	4.83×10^{8}b	1.96±0.16
ผงชีวภัณฑ์ 2 เดือน	5.77×10^{8}a	2.08±0.07
ผงชีวภัณฑ์ 3 เดือน	6.37×10^{8}a	2.20±0.15
C.V. (%)	0.22	0.05

* อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 6 กิจกรรมการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชของผงชีวภัณฑ์ *Bacillus* sp. Ks5

แบคทีเรียปฏิปักษ์ / ผงชีวภัณฑ์	การสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช		
	การผลิต IAA	การผลิตแอมโมเนีย	การละลายฟอสเฟต
Bacillus sp Ks5	–	+	–
ผงชีวภัณฑ์ 0 วัน	–	+	–
ผงชีวภัณฑ์ 1 เดือน	–	+	–
ผงชีวภัณฑ์ 2 เดือน	–	+	–
ผงชีวภัณฑ์ 3 เดือน	–	+	–

(+) = แบคทีเรียปฏิปักษ์และผงชีวภัณฑ์สามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช, (–) = แบคทีเรียปฏิปักษ์และผงชีวภัณฑ์ไม่สามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช

อภิปรายผลการวิจัย

ดินตัวอย่างบริเวณรอบรากข้าวจังหวัดกำแพงเพชรทั้งหมด 11 อำเภอ เมื่อทำการคัดแยกพบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 23 สายพันธุ์ ซึ่ง Kantajan *et al*. (2018) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าวจากแปลงนาเกษตรกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน 11 จังหวัด พบแบคทีเรีย 207 สายพันธุ์ ดินบริเวณรอบรากพืชเป็นแหล่งของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา ซึ่งจุลินทรีย์บางสายพันธุ์มีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคพืช และสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

จากการทดลองนี้พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Ks5 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งในข้าว *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ดีที่สุดโดยมีบริเวณยับยั้งกว้าง 1.43 เซนติเมตร แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ผลิตสาร Secondary metabolites ออกมายับยั้งการเจริญเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว และจากประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae*. ที่ไม่แตกต่างอย่างมีมีนัยสำคัญทางสถิติกันของแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ มีความเป็นไปได้ว่าอาจเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน โดย Azman *et al*. (2017) ทำการแยกแบคทีเรีย 93 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 16 สายพันธุ์ที่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ *X. oryzae* pv. *oryzae* และพบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus licheniformis* มีบริเวณยับยั้งกว้างสูงที่สุด คือ 1.50 เซนติเมตร Paslon *et al*. (2017) กล่าวว่าเชื้อสายพันธุ์ FVP22 ที่แยกจากดินบริเวณรากข้าวสามารถยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีบริเวณยับยั้งกว้างสูงที่สุด คือ 4.91 เซนติเมตร มีการรายงานว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถผลิตสารทุติยภูมิยับยั้งเชื้อก่อโรค เช่น สารปฏิชีวนะ สารพิษ แบคทีเรียบริเวณรากพืชส่วนใหญ่ผลิตแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไลโปเปปไทด์ (Lipopeptides) ของอิทูริน (Iturin) และสารลดแรงตึงผิว (Surfactin) ซึ่งมียีน sfp รับผิดชอบในการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวที่มีศักยภาพควบคุม *X. oryzae* pv. *oryzae* (Beric *et al*., 2012)

แบคทีเรีย *Bacillus* sp. Ks5 นอกจากมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งในข้าวแล้ว ยังสามารถผลิตแอมโมเนียที่เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้อีกด้วย การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในทางตรงและทางอ้อม กลไกทางตรง เช่น การสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การเพิ่มการละลายของ

สารประกอบฟอสเฟตที่อยู่ในดิน การผลิตแอมโมเนีย การผลิต IAA เป็นต้น ส่วนทางอ้อม คือ การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กอโรคในพืชทั้งกลุ่มแบคทีเรีย และฟังไจ (Kittiwongwattana *et al*., 2016) จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) เร่งปฏิกิริยาตรึงแก๊สไนโตรเจน (N_2) เปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย (NH_3) เมื่อเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์จะเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน และเกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อด้วยพันธะเพปไทด์ระหว่างโมเลกุลของกรดอะมิโน กลายเป็นโปรตีนสะสมในเซลล์ของจุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์ตายจะเกิดการสลายองค์ประกอบในเซลล์ จากนั้นจุลินทรีย์ชนิดอื่นในดินจะทำการเปลี่ยนไนโตรเจนให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ต่อได้ โดยแอมโมเนียจะถูกออกซิไดซ์เป็นไนไตรท์และไนเตรทซึ่งพืชสามารถเอาไนเตรทไปใช้ประโยชน์ต่อได้ แต่ถ้าหากมีการสะสมของของแอมโมเนียสูงเกินไปก็อาจจะเป็นพิษต่อพืชได้เช่นกัน ซึ่งแอมโมเนียมีคุณสมบัติทำให้พืชเจริญเติบโต และตั้งตัวได้เร็ว โดยเฉพาะในระยะแรกของการงอก (Herrera *et al*., 2016)

แบคทีเรีย *Bacillus* sp. Ks5 จัดอยู่ในกลุ่มจีนัส Bacillus เนื่องจากสอดคล้องกับการรายงานของ Public Health England (2018) ที่ระบุว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp มีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก มีการสร้างสปอร์ และผลิตเอนไซม์คะตะเลส มีแหล่งที่อยู่อาศัยสามารถพบได้ทั่วไปในดิน เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ Ks5 มาระบุสายพันธุ์โดยเทคนิค Single 16S ribosomal DNA (rDNA) sequencing พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* และ *Bacillus velezenis* โดยมีความเหมือนร้อยละ 99.92 และ *Bacillus subtitis* subsp. *subtitis* โดยมีความเหมือนร้อยละ 99.77 จึงระบุเบื้องต้นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ Ks5 จัดอยู่ในกลุ่ม *B. subtilis* Species Complex Fan *et al*., (2017) รายงานว่า *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. amyloliquefaciens* subsp.*Plantarum*, *B. velezensis*, *Bacillus methylotrophicus* และ *B. Siamensis* มีความลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกัน เมื่อวิเคราะห์ Phylogenomic พบว่าอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกัน จัดอยู่ในกลุ่ม *B. subtilis* Species Complex นอกจากนี้ Wu *et al*. (2015) รายงานว่า Difficidin และ Bacilysin จาก *Bacillus* spp. สามารถยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* โดยจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และ Xie *et al*. (2018) พบว่า *Bacillus* strain D13 มีการผลิตสารระเหย (Volatile) ชนิด Decyl alcohol และ 3, 5, 5 - trimethylhexanol ยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* และสารระเหยที่ปล่อยออกมาจากเชื้อไรโซแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) ยังกระตุ้นให้พืชต้านทานต่อความเครียดจากเชื้อก่อโรค ภัยแล้ง เกลือและการขาดสารอาหาร Jin *et al*. (2020) รายงานว่า *B. velezensis* HN-2 ผลิตสารลดแรงตึงผิว C_{15} surfactin ยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยจะไปทำลายผนังเซลล์ของ *X. oryzae* pv. *oryzae* Chung *et al*. (2015) รายงานว่าเชื้อ *B. siamensis* YC7007 สามารถยับยั้งเชื้อ *Fusarium fujikuroi*, *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *Burkholderia glumae* โดยใช้วิธี Culture filtrate ได้สูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 60 โดยให้บริเวณการยับยั้งเท่ากับ 30, 24 และ 19.7 มิลลิเมตร ตามลำดับ Suliasih & Widawati (2020) พบว่า *B. siamensis* ที่แยกได้จากดินป่าพรุ ผลิต IAA ได้สูงที่สุด 9.89 µg/ml ในอาหาร YEMB medium ในชั่วโมงที่ 96 Varma *et al*. (2017) รายงานว่า *B. velezensis* SE15 ไม่สามารถละลายฟอสเฟตได้ สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไนโตรเจนได้ และสามารถผลิต IAA ได้ ส่วน *B. siamensis* SE16 และ *B. siamensis* SE4 สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไนโตรเจนได้ และไม่สามารถผลิต IAA ได้ โดย *B. siamensis* SE16 ไม่สามารถละลายฟอสเฟตได้ แต่ *B. siamensis* SE4 สามารถละลายฟอสเฟตได้

เมื่อนำเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. Ks5 มาพัฒนาผงชีวภัณฑ์ด้วยการใช้ตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่ายังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งให้ผลการยับยั้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p>0.05$) และสามารถผลิตแอมโมเนียได้เช่นเดียวกับเชื้อสดได้ สอดคล้องกับ Poralokanon (2017) พัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดผงเพื่อควบคุมโรคเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ในมะนาว ทำการทดสอบความมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เก็บรักษา 1, 3, 6 และ 12 เดือน ในสภาพอุณหภูมิห้อง พบว่าชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์มีอัตราการรอดชีวิต 2.8×10^{16}, 2.8×10^{15}, 1.9×10^{13} และ 2.8×10^{10} CFU/g ตามลำดับ โดยเชื้อปฏิปักษ์จะลดจำนวนลงหลังระยะการเก็บรักษาผงชีวภัณฑ์ 3 เดือนขึ้นไป โดยมีแป้งข้าวจ้าวเป็นสารพา เพื่อเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์ มีน้ำมันรำข้าวเป็นสารเหนียว ช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถยึดเกาะกับสารพารวมทั้งให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา และซูโครสเป็นสารเสริมประสิทธิภาพทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารและพลังงานให้แก่เซลล์ แสดงให้เห็นว่าผงชีวภัณฑ์ที่ผลิตด้วยการใช้ตู้อบลมร้อนยังคงคุณสมบัติการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นเดิม เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. มีการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ จึงทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สารเคมีและความร้อนได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (Wongchalee, 2015)

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มรย.
YRUJST
YRU JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Print ISSN: 2539-5688, e-ISSN: 2672-9873

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากข้าวที่ไม่เป็นโรคขอบใบแห้ง ในจังหวัดกำแพงเพชร พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Ks5 มีความสามารถในการยับยั้ง *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* แบคทีเรียก่อโรคขอบใบแห้งในข้าวได้สูงที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถผลิตแอมโมเนียซึ่งเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชได้อีกด้วย จึงนำแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Ks5 มาพัฒนาเป็นผงชีวภัณฑ์เพื่อใช้ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าวและส่งสริมการเจริญเติบโตในข้าว โดยศึกษาระยะเวลาในการเก็บรักษาผงชีวภัณฑ์เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าผงชีวภัณฑ์ *Bacillus* sp. Ks5 ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งในข้าว และสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ไม่แตกต่างจากการใช้เชื้อสด *Bacillus* sp. Ks5 แสดงให้เห็นว่าผงชีวภัณฑ์ *Bacillus* sp. Ks5 สามารถต่อยอดนำไปใช้ได้ในอนาคต จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการนำไปใช้ควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าวระดับแปลงทดลองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Azman, N.A., Sijam, K., Hata, E.M., Othman, R. & Saud, H.M. (2017). Screening of Bacteria as Antagonist against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the Causal Agent of Bacterial Leaf Blight of Paddy and as Plant Growth Promoter. *Journal of Experimental Agriculture International*, *16*(4), 1-15.

Beric, T., Koji, M., Stankovi, S., Topisirovi, L., Degrassi, G., Myers, M., *et al.* (2012). Antimicrobial activity of *Bacillus sp*. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technology and Biotechnology, 50* (1), 25-31.

Chung, E.J., Hossain, M.T., Khan, A., Kim, K.H., Jeon, C.O. & Chung, Y.R. (2015). *Bacillus oryzicola* sp. nov., an Endophytic Bacterium Isolated from the Roots of Rice with Antimicrobial, Plant Growth Promoting, and Systemic Resistance Inducing Activities in Rice. *The Plant Pathology Journal*. *31*(2), 152-164.

Dossa, C.S.G., Karlovsky, P. & Wydra, K. (2014). Biochemical Approach for Virulence Factors' Identification in *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, *5*(2), 1-7.

Fan, B., Blom, J., Klenk, H.P. & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* Species Complex. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1-15.

Herrera, J.M., Rubio, G., Levy, L., Delgado, J.A., Lucho-Constantino, C.A., Islas-Valdez, S., *et al.* (2016). Emerging and established technologies to increase nitrogen use efficiency of cereals. *Agronomy, 6*(25), 1-19.

Jin, P., Wang, Y., Tan, Z., Liu, W. & Miao, W. (2020). Antibacterial activity and rice-induced resistance, mediated by C_{15}surfactinA, in controlling rice disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. *169*, 1-9.

Kantajan, A., Klinmanee, C. & Dhitikiattipong, R. (2018). Using Antagonistic Bacteria to Control Bacterial Blight of Rice under Greenhouse Condition. *The 35th Winter Rice and Cereals Conference*, June 26 – 28, 2018. Chanthaburi: Sand Dunes Chaolao Beach Resort. (in Thai)

Kittiwongwattana, C., Thanaboripat, D., Laosinwattana, C., Koohakan, P., Parinthawong, N. & Thawa, T. (2016). Isolation of Plant-growth-promoting Bacteria from Rice (*Oryza sativa*). *Journal of Science Ladkrabang*, *25*(1), 59–74. (in Thai)

Paslon, F.V., Alovera, R.B., Amper, C.D. & Ballentes, M.G. (2017). Suppression of Bacterial Leaf Blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) using Local Isolates of Rhizobacteria. *CMU Journal of Science*, *21*, 2-8.

Poralokanon, P. (2017). *Biochar based bioformula development of antagonistic bacteria to induce systemic resistant of organic lime against canker disease*. Master's Thesis. Thammasat University. (In Thai)

Public Health England. (2018). *UK Standards for Microbiology Investigations: Identification of Bacillus species*. London: Standards Unit.

Sirinunta, A. & Akarapisan, A. (2015). Screening of antagonistic bacteria for controlling *Cercospora coffeicola* in Arabica coffee. *International Journal of Agricultural Technology, 11*(5), 1209-1218.

Suliasih & Widawati S. (2020). Isolation of Indole Acetic Acid (IAA) producing *Bacillus siamensis* from peat and optimization of the culture conditions for maximum IAA production. *The 9th International Symposium for Sustainable Humanosphere*. October 28 – 29, 2019. Indonesia: Grand Savero Hotel.

Tariq, R., Ji, Z., Wang, C., Tang, Y., Zou, L., Sun, H., *et al.* (2019). RNA-Seq analysis of gene expression changes triggered by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in a susceptible rice genotype. *Rice*, *12*(44), 1-14.

Varma, p.K., Kumar, K.V.K., Sekhar, V.C., Adilakshmi, D., Suresh, M., Kumar, N.R., *et al.* (2017). Evaluation of Endophytic Bacteria for Plant Growth Promotion and Pathogen Suppression Traits in *Saccharum officinarum*. *Journal of Agricultural Science and Technology A. 7*, 535-545.

Wongchalee, D. (2015). *Efficacy of an encapsulated antagonistic Bacillus in controlling chili anthracnose*. Master's Thesis. Suranaree University of Technology. (In Thai)

Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R. & Gao, X. (2015). Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports, 5*, 1 – 9.

Xie, S., Zang, H., Wu, H., Rajer, F.U. & Gao, X. (2018). Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant Pathology*. *19*(1), 49–58.

Yang, L., Quan, X., Xue, B., Goodwin, P.H., Lu, S., Wang, J., *et al.* (2015). Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biological Control*, *8*, 52-58.