วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 42(3): 74-88

กิจกรรมต้านจุลินทรีย์ก่อโรคข้าวของ *Bacillus velezensis* และการสร้างสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

Antimicrobial Activities against Rice Pathogens of *Bacillus velezensis* and Their Biosurfactant Production

ธันย์ชนก เอื้ออาจิน[1] วราภรณ์ แสงทอง[2] วิรันธชา เครือฟู[3] ปิยะนุช เนียมทรัพย์[1] และศรีกาญจนา คล้ายเรือง[1,*]

Thanchanok Auearchin[1], Varaporn Saengtong[2], Viruntachar Kruefu[3]

Piyanuch Niamsup[1] and Srikanjana Klayraung[1,*]

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[2]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[3]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนาโน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[1]Division of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

[2]Division of Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

[3]Nanoscience and Nanotechnology Program, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

*Corresponding author: s.klayraung@gmail.com

Received: *September 25, 2023*
Revised: *March 03, 2025*
Accepted: *April 11, 2025*

Abstract

The aims of this study were to investigate antimicrobial activities against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* the bacterium responsible for rice bacterial leaf blight and *Pyricularia oryzae*, major rice pathogens, and biosurfactant production of *Bacillus velezensis*. *B. velezensis* isolated from lichen were used in this study. All isolates of *B. velezensis* showed antimicrobial activities against *Xoo* and *P. oryzae* according to spot on lawn assay, agar well assay and dual cultures method. The biosurfactant production of *B. velezensis* was screened by cell hydrophobicity, emulsification activity (E24) and specific genes for cyclic lipopeptides (cLPs). The results of bacterial cell adherence with hexadecane and emulsion by olive oil confirmed that the seven isolates of *B. velezensis* were able to produce biosurfactant. Furthermore, the PCR products of six cLPs synthesis-related genes comprising of *SUR3, srfA, ituD, ituC, fenD* and *bmyB* that regulated antibiotic biosurfactants production including surfactin, iturin, fengycin and bacillomycin, were detected. The safety of *B. velezensis* isolates were evaluated using antibiotic susceptibility test. It was found that all *B. velezensis* isolates were susceptible to

penicillin, ciprofloxacin, tetracyclin, Tigecyclin and vancomycin. *B. velezensis* are also not be listed in Pathogens and Animal Toxins Act 2015. These results can potentially make *B. velezensis* useful and safe as agricultural biocontrol agents.

Keywords: rice pathogen, *Bacillus velezensis*, antimicrobial activity, biosurfactant

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ *Bacillus velezensis* ในการยับยั้ง *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง และ *Pyricularia oryzae* เชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในข้าว และการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพของ *Bacillus velezensis* โดย *B. velezensis* ทั้ง 7 ไอโซเลต ที่ทดสอบแสดงฤทธิ์ต้าน *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *P. oryzae* เมื่อทดสอบโดยวิธี spot on lawn assay, agar well assay และ dual cultures การตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้ความไม่ชอบน้ำของเซลล์ กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร cyclic lipopeptides (cLPs) ผลการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียกับเฮกซาเดเคน และการเกิดอิมัลชันของน้ำมันมะกอกยืนยันว่าแบคทีเรีย *B. velezensis* ทั้ง 7 ไอโซเลต สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ นอกจากนี้ยังตรวจพบ PCR products ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ cLPs 6 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย *SUR3, srfA, ituD, ituC, fenD* และ *bmyB* ที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ยับยั้งจุลินทรีย์ ได้แก่ surfactin, iturin, fengycin และ bacillomycin ในการทดสอบความปลอดภัยของ *B. velezensis* ใช้การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่า *B. velezensis* ที่ใช้ในการศึกษาไวต่อยาปฏิชีวนะ penicillin, ciprofloxacin, tetracyclin, tigecyclin และ vancomycin อีกทั้ง *B. velezensis* ยังไม่อยู่ในทะเบียนรายชื่อเชื้อก่อโรคในคนและสัตว์ ตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 ผลการทดลองนี้สามารถบ่งชี้ว่า *B. velezensis* มีประโยชน์และปลอดภัยสำหรับเป็นสารควบคุมชีวภาพทางการเกษตร

คำสำคัญ: จุลินทรีย์ก่อโรคข้าว *Bacillus velezensis* ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

คำนำ

โรคข้าวที่ทำให้ผลผลิตของข้าวลดลดมาก คือ โรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง โดยโรคไหม้ทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงกว่า 50 เปอร์เซนต์ สามารถเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ส่วนโรคขอบใบแห้งเกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สามารถเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงออกรวง (Division of Rice Research and Development, 2016) ในการป้องกันการเกิดโรคข้าว เกษตรกรมักใช้สารเคมีในการควบคุมโรค ซึ่งหากใช้ในปริมาณที่มากและระยะเวลานาน จะเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและเกษตรกรผู้ใช้เอง ดังนั้นจึงได้มีการหาวิธีลดการใช้สารเคมีที่สามารถให้ผลในระยะยาวได้ โดยการนำแบคทีเรีย *Bacillus* มาควบคุมการเกิดโรคข้าวโดย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ทั้งกลไกทางตรงและทางอ้อม ได้แก่ 1) Phytostimulation โดยการสร้างฮอร์โมนพืช เช่น cytokine และ indole acetic acid 2) สร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหย volatile organic compounds เช่น 2,3-butanediol, acetoin, 1-octen-3-ol, butyrolactone ซึ่งอาจมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช 3) สร้างสาร

lipopeptide เช่น bacillomycin, fengycin, iturin A ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่น และ 4) Induced systemic resistant เช่น ในกรณีของโรคกาบใบแห้งของข้าวที่มีสาเหตุจาก *Rhizoctonia solani* เชื้อ *B. subtilis* สร้างสารที่กระตุ้นให้ต้านทาน คือ Jasmonic acid (JA), ethylene (ET), abscisic acid (ABA), auxin signaling, Peroxidase (PO), polyphenol oxidase (Shafi *et al*., 2017)

สำหรับฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชของ *B. velezensis* มีรายงานว่าเกิดจากการสร้างสารทุติยภูมิ เนื่องจาก Chen *et al*. (2020) ได้รายงานว่า *B. velezensis* ZW-10 มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* สาเหตุโรคไหม้ในข้าว ส่วน supernatant ของ *B. velezensis* ZW-10 สามารถยับยั้งเชื้อได้ โดยเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์จากกราฟการเจริญและฤทธิ์การยับยั้ง แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ยับยั้งมีบทบาทจากสารทุติยภูมิ โดยสารทุติยภูมิจาก *B. velezensis* ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช คือ กลุ่มของ cyclic lipopeptides ที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพด้วย เช่น surfactin, bacillomycin-D, fengycin, iturin และ bacillibactin และกลุ่มของ polyketides เช่น macrolactin, bacillaene และ difficidin ซึ่งสารเหล่านี้นอกจากมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์แล้วยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (Rabbee *et al*., 2019; Yu *et al*., 2022) ซึ่งคุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสามารถประเมินได้จากการศึกษาความไม่ชอบน้ำ และความสามารถในการทำให้เกิด emulsion ได้ (Syahriansyah and Hamzah, 2016; Mouafi *et al*., 2016) รวมถึงการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเหล่านี้ เช่น *ituA, ituD, bmyB, bmyC, srfAA, fenB, fenD, bacA* และ *bacD* (Zhou *et al*., 2022; Niemhom and Kittiwongwattana, 2023) ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของ *B.* velezensis ที่แยกได้จากไลเคน ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคข้าวที่จะสามารถเป็นทางเลือกสำหรับเกษตรกร เพื่อใช้ในการจัดการโรคข้าวนอกเหนือจากการใช้สารเคมีการเกษตร และชีวภัณฑ์ที่มีขายตามท้องตลาดในปัจจุบัน

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

ทดสอบด้วยเทคนิค spot on lawn โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ในอาหารเหลว Nutrient Glucose Broth (NGB) ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm นาน 2 วัน นำมาปรับความขุ่นให้ได้ค่าการดูดดลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.5 นำไปทาลงบนผิวหน้าอาหาร Nutrient Glucose Agar (NGA) ตั้งทิ้งไว้ 5–10 นาที นำเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (Klayraung *et al*., 2017) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptone Soya Broth (TSB) (Himedia, India) นาน 24 ชั่วโมง ปริมาตร 2 µl หยดลงผิวหน้าอาหาร รอให้ของเหลวซึมลงผิวหน้าวุ้นจนแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน บันทึกผลบวกเป็นค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial Index; ABI) ด้วยอัตราส่วนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส และโคโลนี

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยสารทุติยภูมิด้วยวิธี agar well diffusion โดยนำสารแขวนลอยแบคทีเรีย *B. velezensis* ที่เตรียมไว้เช่นเดียวกับข้างต้น นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เก็บส่วนใส ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนรูพรุน 0.2 µm ก่อนนำไปทดสอบ และเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* บนอาหาร NGA เจาะอาหารให้เป็นหลุมโดยใช้ glass pasteur pipette ด้านบน ให้ได้หลุมซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. จากนั้นนำ supernatant ที่เตรียมไว้ปริมาตร 25 µl เติมลงไปในหลุมที่เจาะไว้ บ่มที่

อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน สังเกตการยับยั้งจากบริเวณใส แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น

การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* ในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* ในการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* ด้วยวิธี dual culture นำเชื้อ *B. velezensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 5 µl หยดลงบนผิวหน้าอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) จากนั้นนำ glass pasteur pipette ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะวุ้นที่มีเชื้อรา *P. oryzae* ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. และวางบนอาหาร PDA อีกด้าน ให้มีระยะห่างระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* ที่ศึกษา กับเชื้อรา *P. oryzae* เป็นระยะ 3 ซม. บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน วัดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราทดสอบ (fungal growth) เทียบกับเชื้อราควบคุมที่เจริญบนจานอาหารที่ไม่ปลูกเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (fungal control growth) จากนั้นนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย พร้อมนำมาหาเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งจากสูตร

$$\text{Mycelium growth inhibition (\%)} = \frac{(\text{fungal control growth} - \text{fungal growth})}{\text{fungal control growth}} \times 100$$

จากนั้นจึงนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. oryzae* โดยสารทุติยภูมิ ด้วยวิธี agar well diffusion ด้วยการเจาะอาหาร MPDA ด้วย glass pasteur pipette ที่ฆ่าเชื้อแล้ว และนำ supernatant ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB นาน 3 วัน เช่นเดียวกับที่ทดสอบ *X. oryzae* pv. *oryzae* เมื่อใช้วิธี agar well diffusion โดยดูด supernatant ปริมาตร 25 µl เติมลงไปในหลุมที่เจาะไว้ วางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *P. oryzae* บนอาหารด้านตรงข้าม ให้มีระยะห่างระหว่างเชื้อรากับหลุม 3 ซม. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดขนาดการเจริญของเส้นใยเพื่อนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดังสูตรข้างต้น

การทดสอบกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

1) การทดสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (cell hydrophobicity) ด้วยวิธี Bacterial Adhesion to Hydrocarbons (BATH) assay

ปรับความขุ่นของตะกอนเซลล์ *B. velezensis* โดยการเจือจางด้วยสารละลาย 50 mM phosphate buffer pH7.4 วัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer (SP-830, Metertech, Taiwan) ที่ความยาวคลื่น A610 nm ให้ได้ประมาณ 0.5 ± 0.05 (A_0) และดูดใส่หลอดทดลองปริมาตร 1.2 ml เติม hydrocarbon โดยใช้ hexadecane (Sigma, Germany) ปริมาตร 2 ml ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer ปั่นเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำที่อยู่ด้านล่างหลอดไปวัดค่า A610 nm (A) บันทึกผลความไม่ชอบน้ำของแบคทีเรีย คำนวณโดยใช้สูตร

$$\%\ cell\ hydrophobicity = \left(1 + \frac{A}{Ao}\right) x\ 100$$

2) การทดสอบความสามารถในการเกิด emulsion ของเชื้อแบคทีเรียด้วยการหาค่า emulsification index (E24)

การหาค่า E24 ของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ 120 rpm นาน 3 วัน ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใสด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 5 นาที นำส่วนใส 2 ml ผสมน้ำมันมะกอกธรรมชาติ (Bertolli, Italy) 2 ml ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการปลดปล่อยสาร

ในกลุ่มcyclic lipopeptide โดย 0.5% Sodium Dodecyl sulfate (SDS) เป็น positive control และใช้น้ำกลั่นและอาหาร TSB เป็น negative control คำนวณหาค่าดัชนี E24 โดยสูตร

$$E24\ (\%) = \frac{\text{height of emulsion layer}}{\text{height of liquid column}} \times 100$$

3) ตรวจยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวของ *Bacillus* ได้แก่ surfactin, fengycin, iturin และ bacillomycin โดยอ้างอิง primers และสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) จากงานวิจัยของ Mora *et al*. (2015); Nanjundan *et al*. (2019); Plaza *et al*. (2015) โดยสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรีย *Bacillus* ที่ต้องการตรวจ โดยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป PureDirex Genomic DNA Isolation Kit (BIO-HELIX, Taiwan) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับ cyclic lipopeptide (**Table 1**) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยเครื่องพีซีอาร์ Major cycler (Major science, Taiwan) การตรวจผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis ใน 1.5% Agarose gel ซึ่งผสม SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, Canada) รันเจลโดยเครื่อง Electrophoresis (Majorscience, Taiwan) เติม 1xTAE buffer (Invitrogen, Canada) อ่านผลด้วยเครื่อง UltraSlim® LED illuminator (Mastrogen, Taiwan)

Table 1 Specific primers for cyclic lipopeptides (cLPs) production

cLPs	Genes	Primers	Base sequces (5′→3′)	Ta (°C)
Surfactin	*SUR3*	SUR3F	ACAGTATGGAGGCATGGTC	56.8
		SUR3R	TTCCGCCACTTTTTCAGTTT	
	srfAA	SRFAF	TCGGGACAGGAAGACATCAT	60.4
		SRFAR	CCACTCAAACGGATAATCCTGA	
Iturin	*ituD*	ITUD1F	GATGCGATCTCCTTGGATGT	58
		ITUD1R	ATCGTCATGTGCTGCTTGAG	
	ituC	ITUCF	GGCTGCTGCAGATGCTTTAT	60.1
		ITUCR	TCGCAGATAATCGCAGTGAG	
Bacillomycin	*bymB*	BMYBF	GAATCCCGTTGTTCTCCAAA	59.9
		BMYBR	GCGGGTATTGAATGCTTGTT	
Fengicin	*fenD*	FENDF	GGCCCGTTCTCTAAATCCAT	60.1
		FENDR	GTCATGCTGACGAGAGCAAA	

การทดสอบด้านความปลอดภัยของเชื้อ *B. velezensis*

ศึกษารูปแบบในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ด้วย disc diffusion method (CLSI, 2010) โดยกรณีของ *Bacillus* ใช้สาร Penicillin (10 μg/disc), Ciprofloxacin (5 μg/disc), Tetracyclin (30 μg/disc), Tigecyclin (15 μg/disc), และ Vancomycin (30 μg/disc) (Himedia, India) ทำการทดสอบบนอาหาร Blood agar (Biomedia, Thailand) นำแผ่นยาแต่ละชนิด วางบนผิวหน้าอาหารที่ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24–48 ชั่วโมง สังเกตบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส นำมาหาค่าเฉลี่ยและเทียบกับค่ามาตรฐาน เพื่อสรุปว่า Susceptible (S) คือ ไวต่อการยับยั้งของยา Intermediate (I) คือ ไวต่อการยับยั้งของยาบางส่วน และ Resistant (R) คือต้านทานต่อยา (Weber *et al*., 1988) นอกจากนี้ตรวจเทียบระดับความปลอดภัยทางชีวภาพจากระดับความเสี่ยง (1-4) ของเชื้อแบคทีเรีย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ. 2561 (Royal Thai Government Gazette, 2018)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics version 29.0

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis*

จากการทดสอบความสามารถของ *B. velezensis* ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว โดยเฉพาะกลุ่มที่แยกได้จากไลเคน (Klayraung *et al.*, 2017) พบว่าเชื้อ *B. velezensis* ที่ให้ผลบวกในการยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งจากการทดสอบโดยใช้วิธี spot on lawn และ agar well diffusion ซึ่งจากการทดสอบโดย spot on lawn มีดัชนีการยับยั้งตั้งแต่ 1.86–8.12 (**Table 2, Figure 1 A**) ซึ่งเชื้อ *B. velezensis* LC130 สามารถยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ดีที่สุด โดยมีดัชนีการยับยั้ง คือ 8.12

หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวกในการทดสอบเหล่านี้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยสารทุติยภูมิโดยใช้ supernatant ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB นาน 3 วัน โดยวิธี agar well diffusion พบว่า supernatant ของเชื้อ *B. velezensis* ทั้ง 7 ไอโซเลต แสดงบริเวณยับยั้งเกิดขึ้นรอบหลุม ที่เติม supernatant (**Figure 1B**) มีค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้ง 17.13–43.87 มม. โดยเชื้อ *B. velezensis* ไอโซเลต LC1, LC2, LC19, LC70 และ LC130 มีค่าสูงกว่า LC33 และ LC33.1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (**Table 2**)

Table 2 Antibacterial activity of *B. velezensis* against *X. oryzae* pv. *oryzae*

B. velezensis	Accession no.	Antibacterial activity against *Xoo*	
		Spot on lawn (ABI)*	Agar well assay (DCZ)**
LC1	KY084550	3.73[b]	41.40[a]
LC2	KY084550	6.65[a]	43.87[a]
LC19	CP014990	2.55[b]	43.87[a]
LC33	CP014990	6.93[a]	24.80[b]
LC33.1	MT649755	7.01[a]	17.13[c]
LC70	KX673635	1.86[b]	42.80[a]
LC130	KY084550	8.12[a]	39.03[a]

* ABI means antibacterial activity index. ** DCZ means diameter of clear zone in mm.

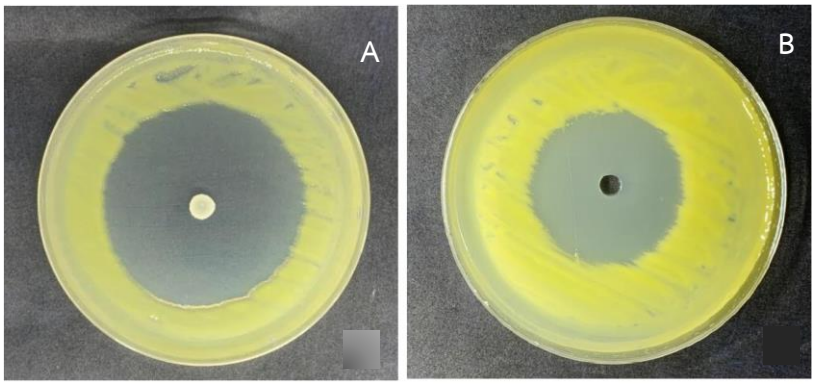


Figure 1 Clear zone of antibacterial activity against *X. oryzae* pv. *oryzae* of *B. velezensis* LC130 by spot on lawn (A) and agar well diffusion assays

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* ของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis*

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ในข้าว เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค dual cultures พบว่า เชื้อ *B. velezensis* ทั้ง 7 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* สามารถยับยั้ง *P. oryzae* ได้เช่นกัน โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ 24.67–58.79%

นอกจากนี้ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. oryzae* โดยสารทุติยภูมิ โดยใช้ supernatant ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB นาน 3 วัน เช่นเดียวกับที่ทดสอบ *X. oryzae* pv. *oryzae* เมื่อใช้วิธี agar well diffusion พบว่าจาก 7 ไอโซเลตที่ให้ผลบวกในขั้นตอนการทดสอบ dual culture มีเพียง 4 ไอโซเลต ที่ supernatant สามารถยับยั้ง *P. oryzae* ได้ (**Figure 2**) ได้แก่ LC2, LC19, LC33 และ LC33.1 โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเพียง 11.89–31.64% (**Table 3**) โดย supernatant ของ *B. velezensis* LC19 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทดสอบขั้นตอนนี้

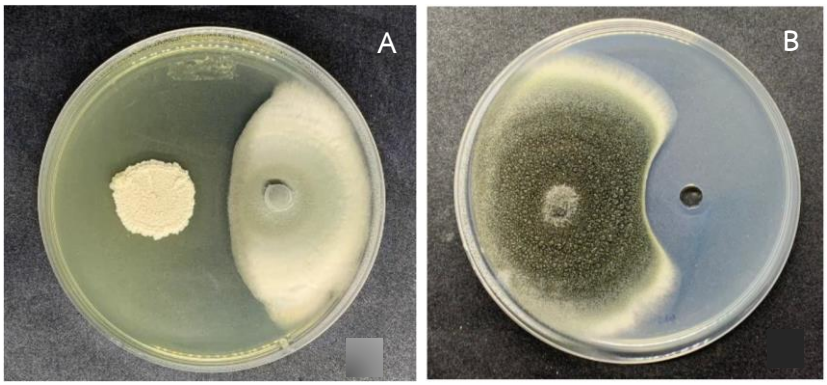


Figure 2 Mycelial growth inhibition on *P. oryzae* by *B. velezensis* LC1 (A) and supernatant of *B. velezensis* LC19 (B)

Table 3 Mycelial growth inhibition of *Pythium oryzae* by *Bacillus velezensis* using dual culture and agar well diffusion methods

B. velezensis	Percentage of mycelial growth inhibition	
	Dual culture	Agar well assay
LC1	58.79±4.5a	-
LC2	57.68±1.34a	11.89±1.47b
LC19	28.41±2.61c	31.64±0.22a
LC33	56.19±1.29ab	12.96±1.37b
LC33.1	49.38±6.39b	16.63±6.78b
LC70	52.97±0.93ab	-
LC130	19.31±1.56d	-

ผลการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพของเชื้อ *B. velezensis* ผลการทดสอบ cell hydrophobicity ด้วยวิธี BATH assay

ผลการทดสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (cell hydrophobicity) ด้วย BATH assay โดยใช้ hexadecane เพื่อยืนยันการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ พบว่า *B. velezensis* ให้เปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำของเซลล์ 4.10–46.86 (**Figure 4**) โดยไอโซเลตที่ให้ค่าความไม่ชอบน้ำของเซลล์สูงที่สุด คือ *B. velezensis* LC1 ซึ่งการไม่ชอบน้ำของเซลล์สามารถใช้เป็นข้อบ่งชี้การผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพของแบคทีเรียได้

ผลการทำให้เกิด emulsion ของเชื้อ *B. velezensis*

กิจกรรมการเกิด emulsion โดยใช้น้ำมันมะกอก ของ *B. velezensis* ทั้ง 7 ไอโซเลต แสดงด้วยค่า E24 พบว่า *B. velezensis* จำนวน 6 ไอโซเลต มีค่าเฉลี่ย E24 สูงกว่า negative control ยกเว้น *B. velezensis* LC2 ที่มีค่าต่ำกว่า คือ 37.30% ในขณะที่อีก 6 ไอโซเลตนั้น

มีค่าอยู่ในช่วง 38.97–51.92% ดังแสดงใน **Figure 5** แต่อย่างไรก็ดี supernatant ของ *B. velezensis* ทั้งหมดมีค่าเฉลี่ย E24 ต่ำกว่า positive control คือ 0.5% SDS ที่มีค่าถึง 62.42% จากผลการทดลองนี้ *B. velezensis* ไอโซเลตที่แสดงค่าเฉลี่ย E24 สูงกว่าไอโซเลตอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ LC1, LC19 และ LC70 ซึ่งอาจระบุได้ว่าเชื้อ *B. velezensis* มีการปลดปล่อยสารในกลุ่ม cyclic lipopeptides ออกมา

ผลการตรวจยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในกลุ่ม cyclic lipopeptide

จากผลการทดสอบลักษณะเบื้องต้นในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ในขั้นตอนนี้จึงได้ทำการตรวจยีนที่เกี่ยวข้องที่ข้องกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีรายงานการตรวจพบในแบคทีเรีย *Bacillus* โดยเฉพาะกลุ่มของ cyclic lipopeptides ได้แก่ *srfA* และ *SUR3* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง surfactin ยีน *fenD* เกี่ยวข้องกับการสร้าง fengycin ยีน *ituD* และ *ituC* เกี่ยวข้องกับการสร้าง iturin และ *bmyB* ที่สัมพันธ์กับการสร้าง bacillomycin รวมเป็น 6 ยีน ที่ใช้ในการศึกษา พบว่า เชื้อ *B. velenzensis* ทั้ง 7 ไอโซเลต ตรวจพบยีน 5 ยีน ได้แก่ *srfA*, *SUR3*, *ituD*, *fenD* และ *bmyB* (**Figure 5A-C, E-F**) โดยมีขนาดของ PCR product เท่ากับ 201, 441, 647, 201 และ 370 bp ตามลำดับ ส่วน ยีน *ituC* นั้นตรวจพบเพียง 3 ไอโซเลต ได้แก่ *B. velenzensis* LC1, LC2 และ LC130 มีขนาดของ PCR product 423 bp (**Figure 5D**)

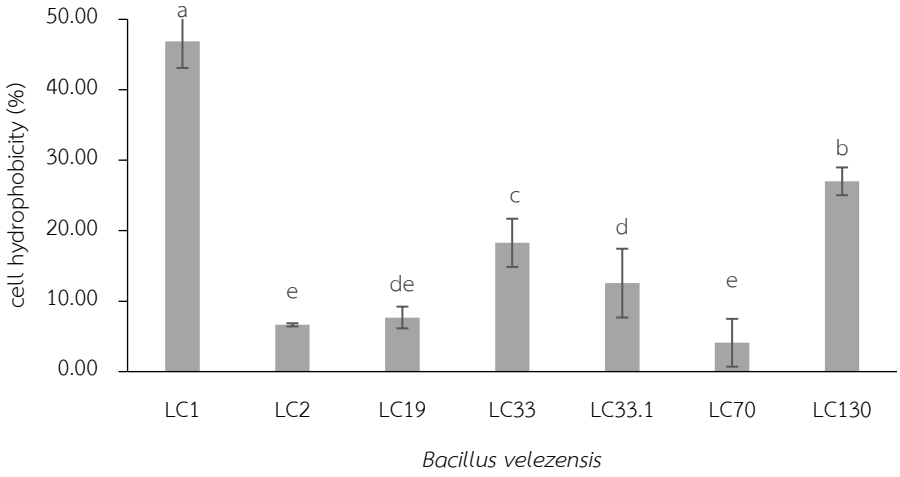


Figure 3 Cell hydrophobicity of *B. velezensis* by BATH assay

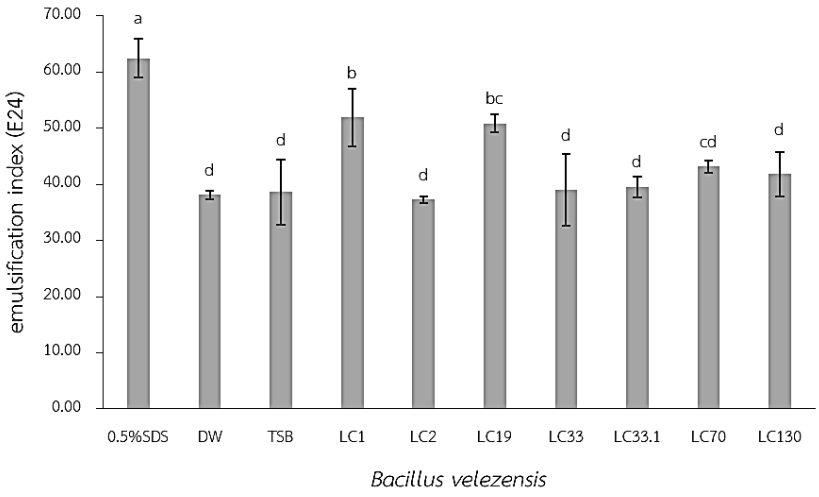


Figure 4 Emulsion index of *B. velezensis* supernatant

ผลการศึกษาความปลอดภัยของเชื้อ *B. velezensis*

ได้เปรียบเทียบชื่อเชื้อแบคทีเรียกับประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ. 2561 พบว่าเชื้อในกลุ่ม *B. velezensis* ไม่ปรากฏในทะเบียนรายชื่อเชื้อก่อโรคในคนและสัตว์ และในการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วย disc diffusion method ของ *Bacillus* ตามหลักการของ Celandroni *et al.* (2016) ใช้สาร Penicillin (10 µg/disc), Ciprofloxacin (5 µg/disc), Tetracyclin (30 µg/disc), Tigecyclin (15 µg/disc), และ Vancomycin (30 µg/disc) ไม่พบว่าเชื้อ *B. velezensis* ที่ใช้ในการศึกษาดื้อต่อยาดังกล่าว

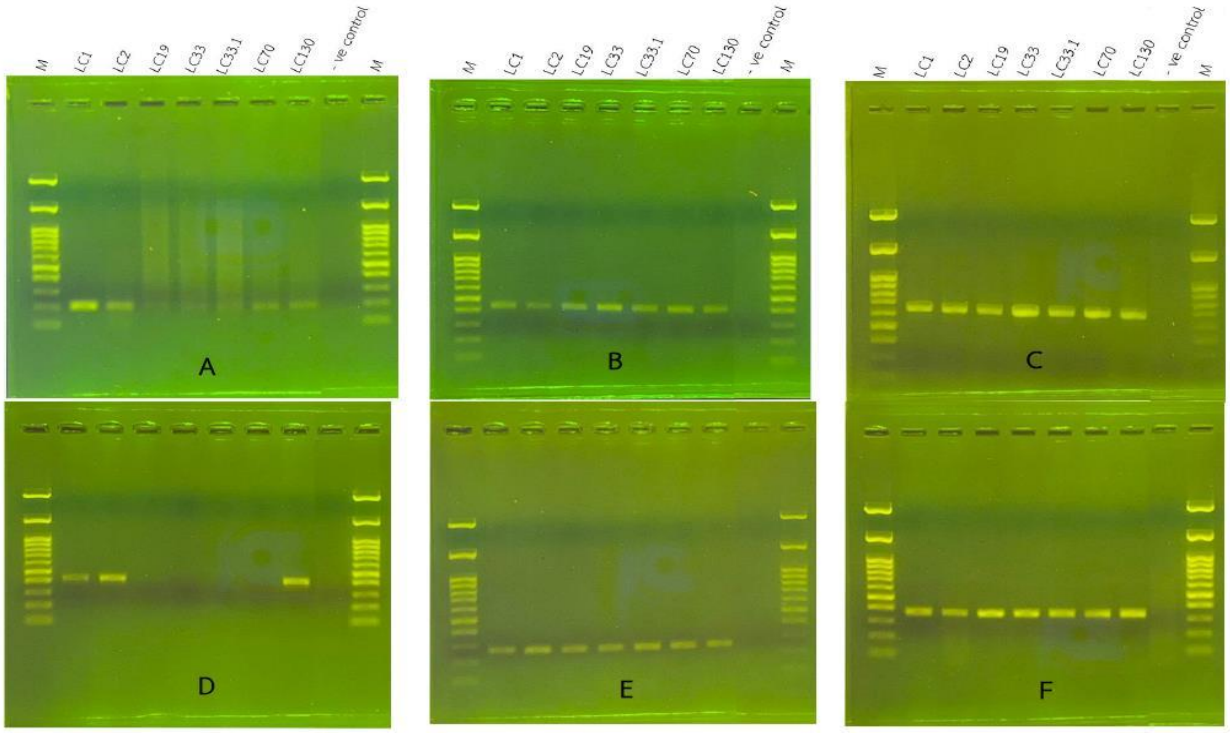


Figure 5 PCR products of specific primers for *srfA* (A), *SUR3* (B), *ituD* (C), *ituC* (D), *fenD* (E) and *bmyB* (F) genes

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์สำคัญในการใช้แบคทีเรีย *Bacillus velezensis* เพื่อควบคุมโรคขอบใบแห้งซึ่งมีสาเหตุจากชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ โรคไหม้ในข้าว ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* โดยในงานวิจัยนี้มี *B. velezensis* จำนวน 7 ไอโซเลต ซึ่ง *B. velezensis* เป็นแบคทีเรียที่มีรายงานการใช้ประโยชน์ทางการเกษตรทั้งในส่วนของของการควบคุมโรคพืช และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงในข้าวด้วย โดย *B. velezensis* เป็นสปีชีส์ที่ถูกจัดจำแนกใหม่ของ *B. methylotrophicus, B. amyloliqueciens* subsp. *plantarum* และ *B. oryzicola* (Ye *et al*., 2018)

สำหรับฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชของ *B. velezensis* มีรายงานว่าเกิดจากการสร้างสารทุติยภูมิ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ คือ supernatant ของ *B. velezensis* อายุ 72 ชั่วโมง ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *P. oryzae* โดย Lim *et al.* (2017) และ Chen *et al*. (2020) ได้รายงานว่า supernatant ของ *B. velezensis* สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชรวมทั้ง *Magnaporthe oryzae* สาเหตุโรคไหม้ในข้าว เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์จากกราฟการเจริญและฤทธิ์การยับยั้ง แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ยับยั้งนี้มีบทบาทจากสารทุติยภูมิ จากการวิเคราะห์พบว่ากลุ่มสารละลายน้ำได้ คือ bacillomycin L และ fengycin A อีกทั้งจากงานวิจัยของ Yu *et al*. (2022) ยังรายงานว่า *B. velezensis* YA215 ซึ่งแยกได้จากป่าชายเลนมีการผลิตสารชีวโมเลกุลในกลุ่มของ lipopeptides ทั้ง surfactin, iturin และ fengycin ซึ่งสารในกลุ่มของ lipopeptides มีคุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาความไม่ชอบน้ำ (BATH assay) และความสามารถในการเกิด E24 (emulsification index, E24) ซึ่งผลจาก BATH assay *B. velezensis* ให้เปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำของเซลล์ 4.10–46.86% ส่วนค่า E24 มีค่าอยู่ในช่วง 38.97–51.92% ซึ่งจากงานวิจัยของ Syahriansyah and Hamzah (2016) และ Mouafi *et al.* (2016) ซึ่งตรวจสอบความสามารถในการเกิด E24 ของ *B. subtilis* และ *B. brevis* เพื่อระบุความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ พบว่ามีค่า E24 เพียง 17 และ 46.60% ตามลำดับ

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

ในการนำแบคทีเรียมาประยุกต์ทางการเกษตร ไม่ว่าจะเป็นการผลิตพืชหรือสัตว์ก็ตาม สิ่งสำคัญที่จะต้องคำนึงถึง คือ สายพันธุ์เหล่านั้นจะต้องปราศจากยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งอาจแพร่กระจายไปยังเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสิ่งแวดล้อมได้ อาจก่อให้เกิดปัญหาในการรักษาในมนุษย์หรือสัตว์ด้วยยาปฏิชีวนะนั้น ดังนั้นจำเป็นต้องมีวิธีการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่ง

สามารถประเมินระดับการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่จะนำไปใช้งานได้ (Agersø *et al*., 2018) โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* โดยวิธี disc agar diffusion กับยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด คือ Penicillin, Ciprofloxacin, Tetracyclin, Tigecyclin และ Vancomycin พบว่าเชื้อ *B. velezensis* ทั้ง 7 ไอโซเลต ไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิดที่ทดสอบ เช่นเดียวกับงานวิจัย Celandroni *et al*. (2016) และ Luna *et al*. (2007) โดยในงานวิจัยทั้งสองนี้ได้ทำกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* หลายสปีชีส์ เช่น *B. anthracis, B. cereus, B. mycoides, B. pseudomycoides* และ *B. thuringiensis* จำนวนทั้งสิ้นมากกว่า 75 ไอโซเลต พบว่าเชื้อ *Bacillus* ที่ทดสอบส่วนใหญ่ดื้อต่อยา penicillin แต่ไวต่อ Ciprofloxacin, Tetracyclin, Tigecyclin และ Vancomycin ซึ่งการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ในโรงพยาบาลใช้ยา Tetracyclin และ Vancomycin ดังนั้นเชื้อ *B. velezensis* ในงานวิจัยครั้งนี้เบื้องต้นจึงมีความปลอดภัยในการนำไปใช้งาน อย่างไรก็ดีจะต้องมีการนำไปตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาการยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ของ *B. velezensis* จำนวน 7 ไอโซเลต พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวทั้ง 2 ชนิด ได้ดี มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ จากการตรวจสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์ กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร cyclic lipopeptides ซึ่งประกอบด้วย *SUR3, srfA, ituD, ituC, fenD* และ *bmyB* ที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ยับยั้งจุลินทรีย์ ได้แก่ surfactin, iturin, fengycin และ bacillomycin และ *B. velezensis* มีความปลอดภัยทางชีวภาพจากการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ penicillin, ciprofloxacin, tetracyclin, tigecyclin และ vancomycin และการตรวจสอบทะเบียนรายชื่อเชื้อก่อโรคในคนและสัตว์ เชื้อ *B. velezensis* ยังไม่อยู่ในบัญชีรายการเชื้อก่อโรคประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ. 2561 ตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณในการวิจัยจากทุนสนับสนุนงานมูลฐานของสถาบันอุดมศึกษา ด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 (มจ.1-65-012) และทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรม จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี พ.ศ. 2564 (ทุนพัฒนาบัณฑิตศึกษา ปี พ.ศ. 2564)

เอกสารอ้างอิง

Agersø, Y., B. Stuer-Lauridsen, K. Bjerre, M.G. Jensen, E. Johansen, M. Bennedsen, E. Brockmann and B. Nielsen. 2018. Antimicrobial susceptibility testing and tentative epidemiological cutoff values for five Bacillus species relevant for use as animal feed additives or for plant protection. **Applied and Environmental Microbiology** 84(19): e01108–18. https://doi.org/10.1128/AEM.01108-18

Celandroni, F., S. Salvetti, S.A. Gueye, D. Mazzantini, A. Lupetti, S. Senesi and E. Ghelardi. 2016. Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. **PloS one** 11(3): e0152831. https://doi.org/10.1371/journal.pone 0152831

Chen, L., Y.D. Wu, X.Y. Chong, Q.H. Xin, D.X. Wang and K. Bian. 2020. Seed-borne endophytic *Bacillus velezensis* LHSB1 mediate the biocontrol of peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii.* **Journal of Applied Microbiology** 128(3): 803–813. https://doi.org/10.1111/jam.14508

Division of Rice Research and Development. 2016. **Rice Knowledge Bank: rice diseases and control**. [Online]. Available http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=112-1.htm (July 31, 2022). [in Thai]

Klayraung, S., S. Jariangprasert, P. Niamsup and N. Wongkattiya. 2017. **Isolation and Screening for Biological Activities of Lichen- Associated Bacteria Collected from Agricultural Sites.** 97 p. *In* Research Report. Chiang Mai: Maejo University. [in Thai]

Lim, S.M., M.Y. Yoon, G.J. Choi, Y.H. Choi, K.S. Jang, T.S. Shin and J.C. Kim. 2017. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. **The Plant Pathology Journal** 33(5): 488. https://doi.org/10.5423%2FPPJ.OA.04.2017.0073

Luna, V.A., D.S. King, J. Gulledge, A.C. Cannons, P.T. Amuso and J. Cattani. 2007. Susceptibility of *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre® automated microbroth dilution and Etest® agar gradient diffusion methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 60(3): 555–567. https://doi.org/10.1093/jac/dkm213

Mora, I., J. Cabrefiga and E. Montesinos. 2015. Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. **PLoS One** 10(5): e0127738. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127738

Mouafi, F.E., M.M.A. Elsoud and M.E. Moharam. 2016. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. **Biotechnology Reports** 9: 31–37. https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.12.003

Nanjundan, J., R. Ramasamy, S. Uthandi and M. Ponnusamy. 2019. Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. **Microbial Pathogenesis** 128: 374–380. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.037

Niemhom, N., and C. Kittiwongwattana. 2023. Biocontrol potential, genome and nonribosomal peptide synthetase gene expression of *Bacillus velezensis* 2211. **Current Applied Science and Technology** 23(3): 1–17 https://doi.org/10.55003/cast.2022.03.23.005

Płaza, G., J. Chojniak, K. Rudnicka, K. Paraszkiewicz and P. Bernat. 2015. Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. **Journal of Applied Microbiology** 119(4): 1023–1034. https://doi.org/10.1111/jam.12893

Rabbee, M.F., M.S. Ali, J. Choi, B.S. Hwang, S.C. Jeong and K.H. Baek. 2019. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. **Molecules** 24(6): 1046. https://doi.org/10.3390/molecules24061046

Royal Thai Government Gazette. 2018. **List of disease that wish to be controlled section18 [2018]**. [Online]. Available https://ratchakitcha.soc.go.th/documents/17064620.pdf (July 31, 2022). [in Thai]

Shafi, J., H. Tian and M. Ji. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment** 31(3): 446–459. https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950

Syahriansyah, U.K.M. and A. Hamzah. 2016. Determination of optimum conditions and stability study of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* UKMP-4M5. **Malaysian Journal of Analytic Science** 20(5): 986–1000. http://dx.doi.org/10.17576/mjas-2016-2005-03

Weber, D.J., S.M. Saviteer, W.A. Rutala, C.A. Thomann. 1988. *In vitro* susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. **Antimicrob Agents Chemother** 32(5): 642–645

Ye, M., X. Tang, R. Yang, H. Zhang, F. Li, F. Tao, L. Fei and Z. Wang. 2018. Characteristics and application of a novel species of *Bacillus: Bacillus velezensis*. **ACS Chemical Biology** 13(3): 500–505. https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acschembio.7b00874

Yu, F., Y. Shen, Y. Qin, Y. Pang, H. Fan, J. Peng and X. Liu. 2022. Isolation and purification of antibacterial lipopeptides from *Bacillus velezensis* YA215 isolated from sea mangroves. **Frontiers in Nutrition** 9: 1064764. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1064764

Zhou, J., Y. Xie, Y. Liao, X. Li, Y. Li, S. Li and Y.Q. He. 2022. Characterization of a *Bacillus velezensis* strain isolated from *Bolbostemmatis Rhizoma* displaying strong antagonistic activities against a variety of rice pathogens. **Frontiers in Microbiology** 13: 983781. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.983781