บทที่ 3
วิธีการวิจัย

การดำเนินการสำหรับงานวิจัย นวัตกรรมใหม่ในการใช้นาโนเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าว แบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน คือ การดำเนินการในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการตรวจสอบชนิดและปริมาณของเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในเมล็ดข้าว และการดำเนินการในภาคสนาม เป็นการตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโต และผลผลิตข้าวเพื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้อนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินกับสารเคมีทางการเกษตรอื่นๆ

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Model DG2002-S, Mettler Toledo, Switzerland)
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Model AG204, Mettler Toledo, Switzerland)
3. กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Eclipse E400, Hollywood International Ltd., Japan)
4. Vortex (Model VTX-3000L, Mixer Uzusio, Tokyo, Japan)
5. Hot plate (HC 502, Bibby Sterilin Ltd., The United States of America)
6. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Martiniany)
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Mammert, Germany)
8. ตู้อบความร้อนสูง (Hot Air Oven) (model ULE 500, Memmert, Germany)
9. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Fisher Scienctific)
10. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) (Ta Chang, Taichang, Taiwan)
11. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) (Model B T123, Issco)
12. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
13. กระดาษเพาะเมล็ดที่ปราศจากสารฆ่าเชื้อรา
14. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
15. ปากคีบ (Forcep)
16. หลอดทดลอง (Tube)
17. ตู้เพาะ (Growth Chamber)
18. เครื่องบดตัวอย่าง (Sample mill)

19. ตลับอลูมิเนียมสำหรับใส่ตัวอย่างตัวอย่างอบหาความชื้นของเมล็ดพันธุ์ข้าว
20. ไมโครปิเปต (micropipette)
21. ตะเกียงแอลกอฮอล์
22. สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์
23. บีกเกอร์ (beaker)
24. ขวดรูปชมพู่ (flask)
25. ขวดสีชา
26. กระบอกตวง (cylinder)
27. แท่งแก้วคนสาร

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (รายละเอียดดังภาคผนวก)

1. Potato Dextrose Agar (PDA)
2. Malt Extract Agar (MEA)
3. King's medium B (KMB)
4. Nutrient agar (NA)
5. Peptone Sucrose Agar (PSA)
6. Tryptic Soy Agar (TSA)
7. Hugh and Leifson's oxidation-fermentation medium (O-F)
8. Potassium Nitrate Agar
9. 2 –Ketoglucinate Borth
10. Arginine Medium (Thoenley' s Medium 2A)
11. Strach Medium
12. Ayers et al mineral salts medium
13. Aqueous Lugol's iodine
14. Arginine medium (Thornley's Medium 2A)
15. Ayers et al mineral salts medium
16. Gluconate peptone broth
17. Hugh and Leifson's oxidation-fermentation medium (O -F)
18. King's medium B (KMB)
19. Kligler's iron agar
20. Modified Wakimoto 's medium

21. Nutrient agar (NA)
22. Peptone sucrose agar (PSA)
23. Peptone sucrose broth (PSB)
24. Potassium nitrate agar
25. Selective medium for *P. fuscovaginae*
26. Selective medium for *P. glumae* PPGA + 0.1% CaCl
27. Selective medium for *P. glumae* S-PG
28. Starch medium
29. Tryptic soy agar (TSA)
30. Acetone-alcohol decolorizer
31. Crystal violet
32. Iodine solution
33. Safranin counterstain
34. Phosphate -buffered saline (PBS)
35. Kovacs'reagent 1% solution
36. Ethanol 95%
37. Nano silver solution

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของ อนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์ และการควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าว

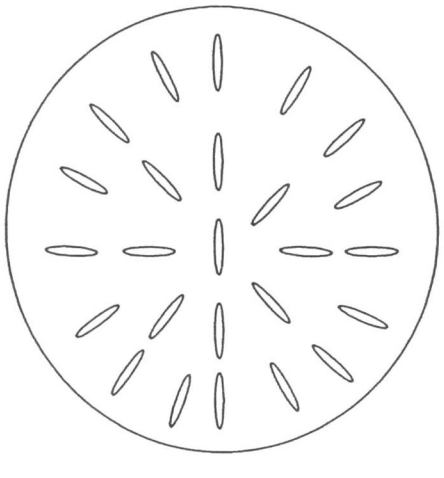
เป็นการทดสอบเพื่อหาประสิทธิภาพและความเข้มข้นของอนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินที่เหมาะสมสำหรับแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวก่อนการเพาะปลูก โดยนำเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ทั้งจากเกษตรกร และจากศูนย์เมล็ดพันธุ์), ปกาอำปึล และ กข 6 จำนวนชนิดพันธุ์ละ 40 ชุดการทดลอง (10 ความเข้มข้น x 4 ระยะเวลา) แช่ลงในสารละลายพร้อมใช้ของอนุภาคระดับนาโนเมตรของเงิน ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, และ 5000 ppm โดยทำการเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) และทำการแช่เมล็ดพันธุ์ในระยะเวลา 6, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการประเมินผลของอนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินทั้งต่อเชื้อรา และแบคทีเรียก่อโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าว และผลของอนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ได้แก่

ความงอกของเมล็ดพันธุ์ (Germination test) อัตราเร็วในการงอก (Speed of germination) อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Seedling growth rate test; SGR) โดยมีรายละเอียดของการดำเนินการดังนี้

3.3.1.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในเมล็ดพันธุ์

1. ปริมาณและจำนวนเชื้อราก่อโรคในเมล็ดพันธุ์

นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวในทุกชุดการทดลอง มาตรวจหาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราในเมล็ดพันธุ์ข้าว ตามมาตรฐานสากลของ International Testing Association (ISTA, 1999) โดยวิธีเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น (blotter method) ซึ่งมีวิธีการอย่างคร่าวๆ คือ นำเมล็ดพันธุ์ข้าวจากทุกชุดการทดลองเพาะบนกระดาษชื้น โดยใช้กระดาษเพาะชื้นที่ปราศจากสารกำจัดเชื้อรา จำนวน 3 แผ่น นำไปจุ่มน้ำกลั่นให้ให้ชุ่ม แล้ววางบนจานเลี้ยงเชื้อ (Petri-dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร นำเมล็ดข้าววางในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จำนวน 25 เมล็ดต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 4 ซ้ำๆละ 100 เมล็ด (ดังภาพที่ 3.1) หลังจากนั้นนำจานเมล็ดที่เพาะนี้ไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28° C เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำจานเมล็ดพันธุ์ไปไว้ ในช่องแช่เข็งของตู้เย็นนาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำออกมาบ่ม ภายใต้แสง near ultraviolet ในการวิจัยนี้ใช้ Cool – white fluorescent สลับกับความมืดอย่างละ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 28° C นาน 5 – 7 วัน โดยวิธีนี้เมล็ดจะไม่งอก ทำให้สามารถตรวจสอบเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพทุกเมล็ด จากนั้นนำมาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดภายใต้กล้อง Stereo microscope หากไม่สามารถระบุชนิดได้นำเชื้อรามาแยกบนอาหารแข็ง PDA และทำ slide culture เพื่อทำการจำแนกชนิดเชื้อราแต่ละชนิดภายใต้กล้อง Compound microscope อีกครั้ง สำหรับการระบุชนิดของเชื้อราทำการจำแนกตามคู่มือของ Watanabe (2002) และตามคู่มือของ Mew และ Misra (1994)



ภาพที่ 3.1 แสดงการตรวจสอบเชื้อราก่อโรคในเมล็ดพันธุ์

สำหรับเชื้อราก่อโรคทางเมล็ดพันธุ์ทำการวิเคราะห์สัดส่วนและร้อยละของเชื้อราในแต่ละชนิดที่พบแต่ละตัวอย่างมาหาค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อราในเมล็ดพันธุ์แต่ละความเข้มข้น และระยะเวลาในการแช่สารพร้อมใช้อนุภาคระดับนาโนเมตรของเงิน พร้อมทั้งทำการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การการยั้บยั้งการเจริญของเชื้อราในเมล็ดพันธุ์ จากสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Contamination} = \frac{(\text{จำนวนของเมล็ดที่ติดเชื้อ}) \times 100}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}}$$

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\% \text{ Infection of control treatment} - \% \text{ Infection of sample treatment} \times 100}{\% \text{ Infection of control treatment}}$$

2. การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในเมล็ดพันธุ์

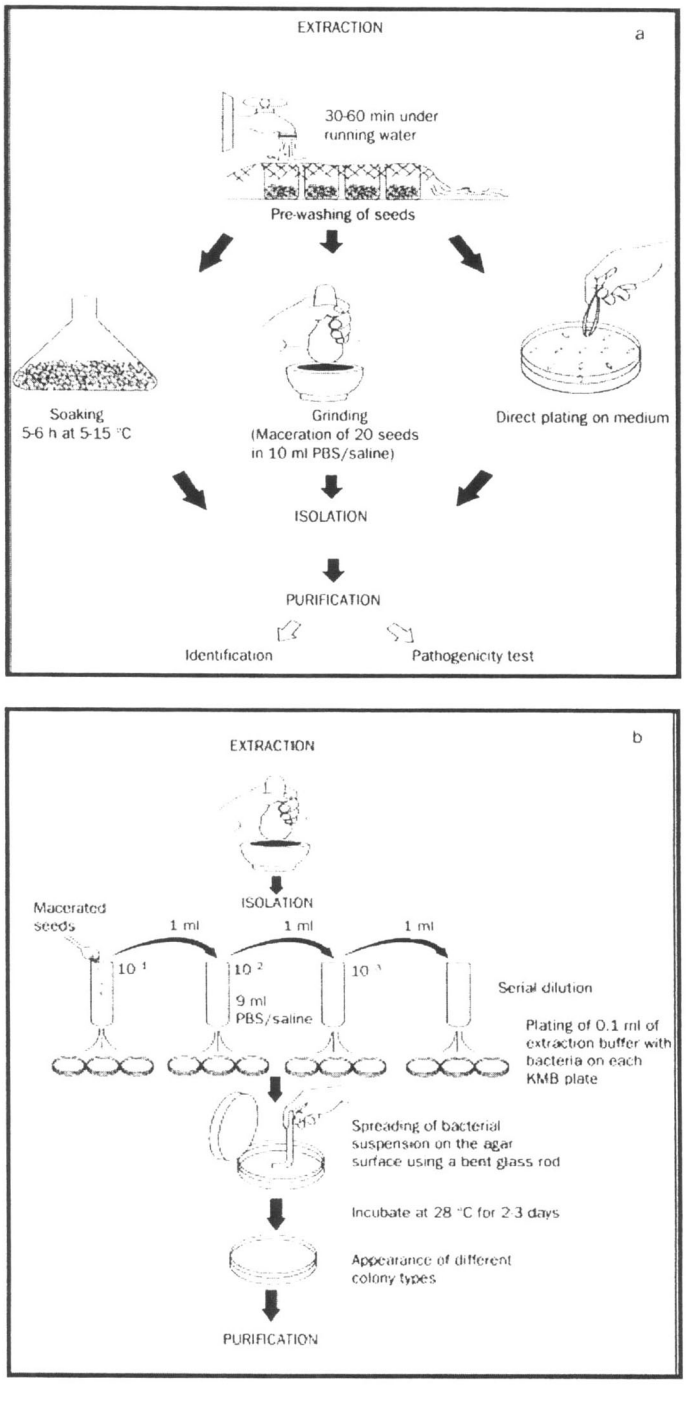
นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวในทุกชุดการทดลอง มาตรวจหาตรวจหาปริมาณของ Pseudomonads และ Xanthomonads ที่ก่อโรคสำคัญในข้าว ได้แก่ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas avenae*, *Pseudomonas glumae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ตามคู่มือของ Mew และ Misra (1994) โดยวิธีการดังนี้

2.1 นำเมล็ดพันธุ์ข้าวล้างน้ำประมาณ 30-60 นาทีเพื่อขจัดวัสดุอื่นๆ และเชื้อราที่อยู่บนผิวของเมล็ดพันธุ์ และทำการแช่สารพร้อมใช้อนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินดังข้อที่ 3.3.1 หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวมาบดและนำไปเจือจางใน PBS ตามลำดับ (ดังภาพที่ 3.2-3.3)

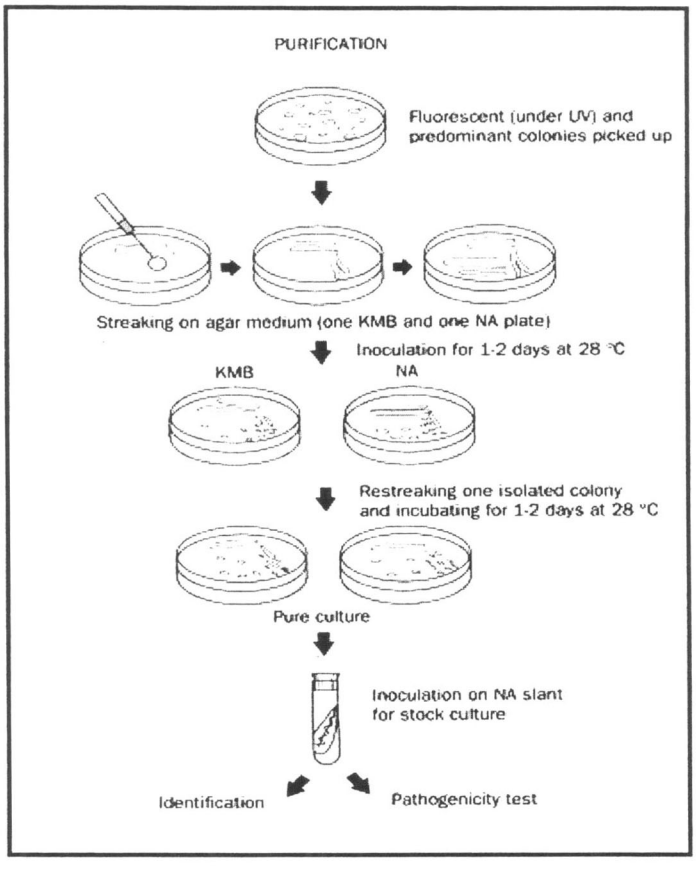
2.2 นำตัวอย่างข้าวที่ได้จากการเจือจางที่ระดับ 10^3 - 10^6 มาทำการ spread บนอาหาร KMB และ NA เพื่อตรวจสอบหาการปนเปื้อนของ Pseudomonads ส่วน Xanthomonads ใช้อาหาร PSA ในการเลี้ยงเชื้อดังกล่าว

2.3 ทำการบ่มจานเลี้ยงเชื้อต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นระยะเวลา 2-3 วันสำหรับแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ส่วน Xanthomonads ใช้ระยะเวลา 3-5 วัน ณ อุณหภูมิดังกล่าว

2.4 ทำการตรวจสอบ Pseudomonads ภายใต้แสง UV และนำมาทำการแยกเชื้อและทดสอบทางด้าน Morphological และ Biochemical characteristics (รายละเอียดดังตารางที่ 3.1 และ 3.2) ตามคู่มือของ Bergey"s manual of Determinative Bacteriology ต่อไป (J. G. Holt, Bergey, & Breed, 1994)



ภาพที่ 3.2 แสดงวิธีการในการเตรียมตัวอย่าง (a) และการแยกเชื้อแบคทีเรียจากเมล็ดพันธุ์ข้าว (b)



ภาพที่ 3.3 Purification of bacterial culture

ตารางที่ 3.1 Morphological and biochemical characteristics that differentiate pathogenic pseudomonads.

	P. syringae pv. *syringae*	*P. fuscovaginae*	*P. avenae*	*P. glumae*
Size	2.0-3.5	0.5-0.8	0.4-0.8	0.5-0.7
	x	x	x	x
	0.8-1.0 μm	2.0-3.5 μm	1.8-4.4 μm	1.5-2.5 μm
Fluorescence	+	+	-	-
Oxidase	-	+	+/-	-
Oxldation- fermentation	0	0	0	0
(O-F) test				
Nitrate reduction	-	-	+	+/-
2-ketogluconate	-	-	-	-
production				

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

	P. syringae pv. *syringae*	*P. fuscovaginae*	*P. avenae*	*P. glumae*
ADH	-	+	-	-
Starch hydrolysis	-	+	+/-	+/-
Growth on				
Inositol	+	-	-	+
Trehalose		+	-	

+ = positive, – = negative, 0 = oxidative.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (J. G. Holt, et al., 1994)

ตารางที่ 3.2 Morphological and biochemical characteristics that differentiate *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

	X. pv. *oryzae*	*X. oryzae* pv. *Oryzicola*
Size	0.5-0.8 x 1.3-2.2 μm	0.4-0.6 x 1.0-2.5 μm
Oxidase test	-	-
Oxidation -fermentation (O-F) test	0	0
Nitrate reduction	-	-
2 -ketogluconate production	-	-
Starch hydrolysis	±	+
Carbon source utilization		
Trehalose	+	+
Inositol	-	-
Alanine	-	+
0.001% $CuNO_3$	+	-

+ = positive, – = negative, 0 = oxidative.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (J. G. Holt, et al., 1994)

3.1.1.2 การทดสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

เพื่อศึกษาผลของอนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ ความงอกของเมล็ดพันธุ์ (germination test) อัตราเร็วในการงอก (speed of germination) อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (seedling growth rate test; SGR) โดยมีวิธีการดังนี้

1. การทดสอบความงอกมาตรฐาน

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวทุกชุดการทดลองเพาะทดสอบความงอกโดยวิธีมาตรฐาน (Standard Germination test) ตามสากลของการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ (ISTA, 1999) ใช้กระดาษเป็นวัสดุเพาะ โดยเพาะแบบวางเมล็ดไว้ระหว่างกระดาษเพาะ (Between Paper) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด นำม้วนกระดาษที่เพาะเมล็ดพันธุ์แล้วใส่ถุงพลาสติก เก็บในตู้เพาะความงอกควบคุมอุณหภูมิ 30 ºC แล้วประเมินผลความงอกครั้งแรกในวันที่ 5 และครั้งสุดท้ายในวันที่ 14 ของการเพาะ บันทึกค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย

2. ความเร็วในการงอก (speed of germination)

ทำเช่นเดียวกับการทดสอบความงอกมาตรฐาน โดยทำการตรวจสอบผลความเร็วในการงอกทุกวัน เป็นเวลา 12 วันหลังเพาะ นำผลตรวจนับมาคำนวณหาความเร็วในการงอก ดังนี้

$$\text{Speed of germination} = \frac{\text{no. of normal seedling} + \ldots\ldots\ldots\ldots + \text{no. of normal seedling}}{\text{Days of first count} \qquad\qquad \text{days of final count}}$$

3. การวัดอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (seedling growth rate test, SRG)

ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ในทุกชุดการทดลอง มาวางเพาะบนกระดาษเพาะชื้น 2 ชั้น ขนาด ประมาณ 14 x 24.8 นิ้ว โดยจัดวางเมล็ดพันธุ์แถวละ 25 เมล็ด เป็นแนวตามความยาวของกระดาษ ให้ส่วนปลายของรากอ่อนอยู่ด้านล่างของกระดาษ เพื่อให้ส่วนของรากแก้วงอกลงสู่ขอบล่างของกระดาษ จากนั้นปิดทับด้วยกระดาษเพาะอีกชั้นหนึ่ง แล้วม้วนกระดาษให้เป็นม้วนกลมใส่ไว้ในถุงพลาสติก นำไปไว้ในตู้เพาะมืดอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนด 7 วัน นำเมล็ดออกมาตรวจนับความงอก นำต้นกล้าที่งอกปกติ มาตัดเฉพาะส่วนของยอดอ่อนและรากอ่อน โดยตัดส่วนของ mesocotyl ทิ้ง จากนั้นบรรจุใส่ถุงกระดาษ นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน แล้วคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าจากสูตรต่อไปนี้

อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (SGR) = น้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน (กรัม) / จำนวนต้นกล้าปกติ (ต้น)

3.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตข้าว

ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของอนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินและสารเคมีทางการเกษตรอื่นๆ ต่อการเจริญเติบโต และองค์ประกอบของผลผลิตข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 36 Treatment ประกอบด้วย 12 ความเข้มข้น x 3 ซ้ำ (แช่ด้วยสารพร้อมใช้อนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 5000 ppm, สารเคมีกลุ่ม Carbendasim และเกษตรเคมี) ทำการปลูกข้าวในกระถางตามแผนการทดลองดังกล่าว และทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของต้นข้าว ดังนี้

1. การวิเคราะห์การเจริญเติบโต (growth analysis)

1.1 ความสูง (height) โดยวัดจากส่วนที่อยู่เหนือดินจนถึงส่วนปลายของใบข้าว บันทึกความยาวเป็นเซนติเมตร(cm)

1.2 ดัชนีพื้นที่ใบ (Leaf Area Index : LAI) เป็นดัชนีที่บอกถึงปริมาณพื้นที่ใบต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ดิน สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$LAI = \frac{\text{พื้นที่ใบ}}{\text{พื้นที่ดินที่พืชนั้นขึ้นอยู่}}$$

การหาพื้นที่ใบทั้งหมดใช้การสุ่มต้นข้าว 1 ต้นในแต่ละซ้ำของแต่ละทรีตเมนต์นำใบข้าวทาบบนกระดาษกราฟ จากนั้นลากเส้นขอบใบลงบนกระดาษกราฟ ซึ่งพื้นที่ใบทั้งหมดหาได้จากการนับช่องบนกระดาษกราฟ มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร (cm^2)

1.3 จำนวนต้นต่อกอ ทำการนับจำนวนต้นต่อกอ โดยสุ่มนับจาก 10 กอ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

1.4 จำนวนรวงต่อกอ การสุ่มนับจำนวนรวงต่อกอ สุ่มนับจาก 10 กอ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

1.5 จำนวนเมล็ดดีต่อรวง นับจำนวนเมล็ดดีต่อรวง โดยการนำข้าวในข้อที่ 1.5 มาคละรวมกัน แล้วแบ่งออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กัน กระทำเช่นนี้เรื่อยไปจนเหลือครึ่งสุดท้ายประมาณ 10 รวงจึงหยุด จากนั้นให้นับจำนวนเมล็ดทั้งหมดต่อรวง แล้วจึงนับเมล็ดดีเต็มเมล็ดทุกรวง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยเมล็ดดีต่อรวง

1.6 จำนวนเมล็ดลีบต่อรวง นับจำนวนเมล็ดลีบต่อรวง โดยทำการคำนวณได้จากจำนวนเมล็ดข้าวทั้งหมดลบด้วยจำนวนเมล็ดดีทั้งหมดแล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดลีบต่อรวง

3.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคในเมล็ดพันธุ์

1. การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารพร้อมใช้อนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินต่อการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา (mycelium growth inhibition) ด้วยวิธี agar diffusion โดยทำการผสมสารพร้อมใช้อนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในแต่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 และ 5000 ppm และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ไม่เติมสารพร้อมใช้ของอนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินเป็นตัวเปรียบเทียบ (control) นำมาทำให้ปราศจากเชื้อ (Autoclaving) จากนั้นวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราก่อโรคที่ตรวจพบในเมล็ดพันธุ์แต่ละชนิดที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร วางทดสอบบนอาหารดังกล่าว ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 5-7 วัน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยโดยทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control)

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Diameters of control treatment (cm)} - \text{Diameters of experiment treatment (cm)} \times 100}{\text{Diameters of control treatment (cm)}}$$

2. การทดสอบการยับยั้งของแบคทีเรียก่อโรค

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารพร้อมใช้อนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในข้าว ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ส่วน Xanthomonads ด้วยวิธี Filter paper disc method โดยทำการเตรียมสารพร้อมใช้อนุภาคระดับนาโนเมตรของเงินในระดับความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, และ 5000 ppm และนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas avenae*, *Pseudomonas glumae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยทำการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดขนาดของ clear zone และหาค่าดัชนีการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยทำการเปรียบเทียบกับแอลกอฮอล์

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

การทดลองในแต่ละขั้นตอนดำเนินการจำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$) และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สำหรับการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธี Analysis of Varience (ANOVA) โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการงอก ความเร็วในการงอก อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า ผลต่อความผิดปกติของต้นกล้าในแต่ละความเข้มข้นของสารพร้อมใช้อนุภาคระดับนาโนเมตรของเงิน และระยะเวลาในการแช่สารพร้อมใช้ด้วยวิธีการของ Tukey's Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Package 11.5 ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์