รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : **วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์**

2. โครงการวิจัย : **วิจัยสำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร**

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : **การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำของคะน้า**

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : **Selection of antagonistic bacteria for control bacterial black rot of Chinese kale**

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : กาญจนา ศรีไม้ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ดารุณี ปุญญพิทักษ์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ทิพวรรณ กันหาญาติ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รุ่งนภา ทองเครั่ง สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ : เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 193 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินและใบคะน้าที่ไม่แสดงอาการของโรคจากแปลงปลูกคะน้าในจังหวัดราชบุรี และกาญจนบุรี จำนวน 129 ไอโซเลท และจากคลังเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์จำนวน 64 ไอโซเลท ทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี disc diffusion method ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ B9 B10 BS-2 BS-14 และ 2G11 พร้อมจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี ร่วมกับการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป

api® 50 CHB (BioMerieux, France) พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท คือ *Bacillus subtilis* หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท สารคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 77% WP และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พ่นทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าดำในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่า กรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท B10 BS-2 BS-14 และกรรมวิธีพ่นสารคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 77% WP มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับไอโซเลท B9 และ 2G11 และมีกรรมวิธีควบคุม

: The total bacteria of 193 isolates - 129 collected from healthy leaves and rhizosphere soil of chinese kale in Ratchaburi and Kanchanaburi province and 64 derived from culture collections were screened for antagonistic bacteria against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using disc diffusion method. Among the studied isolates, 5 isolates consisting of B9, B10, BS-2, BS-14, and 2G11 demonstrated antagonistic ability. All strains were identified to be *Bacillus subtilis* based on morphological and biochemical characterization and test kit analysis api® 50 CHB (BioMerieux, France). Control efficiency to chinese kale black rot was conducted in greenhouse by spraying obtained antagonistic bacteria copper hydroxide 77% WP. The disease severity in bacterial isolates B10, BS-2, BS-14 and copper hydroxide 77% WP treatments were significantly lower than B9, 2G11 and untreated control.

6. คำนำ **:** คะน้า จัดอยู่ในผักตระกูลกะหล่ำ (Brassicaceae) เป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง ที่มีการปลูกตลอดทั้งปี เพราะเป็นพืชที่มีอายุการเก็บเกี่ยวสั้น และนิยมบริโภคเป็นจำนวนมากทุกภูมิภาคของประเทศไทย รวมถึงส่งออกไปขายยังต่างประเทศ นอกจากนี้คะน้ายังเป็นผักที่มีคนปลูกน้อย เนื่องจากเป็นโรคง่ายและมีแมลงศัตรูมาก (ชุมชนคนออนไลน์, 2552) ด้วยเหตุนี้เองที่ทำให้ผักคะน้าในตลาดมักมีราคาสูงกว่าผักชนิดอื่น ๆ ซึ่งโรคที่ทำความเสียหาย และเป็นปัญหาหลักของคะน้า คือ โรคขอบใบทอง หรือเน่าดำที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* พบได้ทุกระยะของพืช โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝน และช่วงที่มีความชื้นสูงจะเป็นโรครุนแรงมาก ทำให้ผลผลิตเสียหายถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (ศักดิ์, 2537) เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถแพร่กระจายจากต้นที่เป็นโรคไปยังต้นข้างเคียง โดยไปกับน้ำฝน น้ำที่ใช้รดต้นพืช ติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตร และบาดแผลจากแมลงกัดกิน (ศศิธร, 2545) การควบคุมโรคเน่าดำของคะน้านั้น เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชประเภทคอปเปอร์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมักจะได้ผลเร็วในระยะแรก ๆ (Humaydan *et al*., 1980) การใช้สารเคมีจำพวกคอปเปอร์ในการ

ควบคุมโรคเน่าดำ โดยส่วนใหญ่เกษตรกรจะใช้เกินอัตราที่กำหนด และใช้พ่นในจำนวนครั้งที่มากเกินไป ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อพืช (Phytotoxicity) ซึ่งเป็นสาเหตุให้ผลผลิตคะน้าเสียหาย นอกจากนั้นยังอาจเกิดสารพิษตกค้างในผลผลิต และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ถ้าเกษตรกรพ่นสารเคมีช่วงก่อนเก็บเกี่ยวผลผลิต และในปัจจุบันรัฐบาลมีการรณรงค์ให้เกษตรกรใช้สารเคมีน้อยลง ปลูกพืชอินทรีย์มากขึ้น เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลผลิต ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และสามารถส่งออกไปขายยังต่างประเทศได้

การควบคุมโดยชีววิธีเป็นวิธีที่นำเอาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากธรรมชาติ มาใช้ในการควบคุมโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมี โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ มีการปรับตัวและเจริญได้อย่างรวดเร็ว สำหรับเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ สามารถเจริญได้ในทุกสภาพแวดล้อม และพบว่าเชื้อแบคทีเรียสกุลนี้ยังสามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ได้แก่ bacitracin, subpeptin และ polymyxin เป็นต้น สารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้ง หรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค (Katz and Demain, 1977) ดังนั้นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี จึงถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรที่ช่วยลดการใช้สารเคมี เกษตรกรได้ผลผลิตที่ดี ปราศจากสารเคมีตกค้าง เพิ่มทางเลือกให้ผู้บริโภคที่ต้องการบริโภคอาหารปลอดภัย และสามารถส่งออกไปขายยังต่างประเทศได้ และที่สำคัญไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาการดื้อต่อสารเคมีด้วย ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นเพื่อคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้าในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. คะน้า
2. เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์
3. เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
4. อาหารที่ใช้ในการทดสอบและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น PSA NA TSA เป็นต้น
5. สารคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 77% WP

- วิธีการ

1. การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินและตัวอย่างคะน้า

1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินแปลงปลูกและดินรอบรากพืช : ชั่งดินจำนวน 10 กรัม ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจางโดย วิธี ten fold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-6} จากนั้นดูดสารละลายที่ได้มา 0.1 มิลลิลิตร ของความเข้มข้นที่ 10^{-1}-10^{-6} มากระจายบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็น

เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อมีเชื้อแบคทีเรียเจริญที่บริเวณผิวหน้าอาหาร ทำการบันทึกลักษณะและเลือกเก็บเชื้อแบคทีเรีย ที่มีลักษณะแตกต่างกันลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และเก็บเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากใบคะน้า : นำใบคะน้า จากแปลงปลูกของเกษตรกร มาแยกหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธี leaf wash technique โดยนำใบคะน้า ประมาณ 5-10 ใบ ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 50-150 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำสารแขวนลอยในแต่ละส่วนมาทำให้เจือจางโดยวิธี ten fold serial dilution และดูดสารแขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-4} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มากระจายบนอาหาร TSA ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อมีเชื้อแบคทีเรียเจริญที่บริเวณผิวหน้าอาหาร ทำการบันทึกลักษณะ และเลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และเก็บเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการผลิตสาร secondary metabolites ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) ด้วยวิธี disc diffusion method โดยเลี้ยงเชื้อ Xcc ในอาหารแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ค่าดูดซับคลื่นแสง optical density (O.D.) เท่ากับ 0.2 ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร และเตรียม cell suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ให้มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูด cell suspension ของเชื้อ Xcc ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมลงในหลอดอาหาร NA ที่หลอมไว้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เททับลงในจานอาหาร NA บาง ๆ แล้วทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรอง เบอร์ 1 (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใช้ปากคีบลนไฟฆ่าเชื้อแล้วคีบกระดาษกรองวางลงบนจานอาหารทดสอบที่เตรียมไว้ โดยวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร วางจานละ 5 จุด จำนวน 4 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทน บ่มที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการวัดความกว้างของบริเวณใส (clear inhibition zone) ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจและบันทึกผลการทดลองคำนวณหาค่าเฉลี่ย พร้อมคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Xcc จำนวน 5 ไอโซเลท เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำของคะน้าในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลองต่อไป

3. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ทำการศึกษาลักษณะรูปร่างทางสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย ทดสอบแกรม การสร้างสปอร์และการย้อมติดสี Malachite green และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิด และตรวจด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป api® 50 CHB (BioMerieux, France)

4. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าดำของคะน้าในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

4.1 การเตรียม cell suspension ของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)

โดยเลี้ยงเชื้อ Xcc บนอาหาร Nutrient Agar (NA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร โดยปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบต่อไป

4.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เลี้ยงลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) นำไปเขย่าเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้ไปผสมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปพ่นให้ทั่วต้นคะน้าด้วยเครื่องมือพ่น

4.3 <u>การดำเนินการทดลอง</u> : วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น จำนวน 7 กรรมวิธี โดยมีกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ B9

กรรมวิธีที่ 2 พ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ B10

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ BS-2

กรรมวิธีที่ 4 พ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ BS-14

กรรมวิธีที่ 5 พ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 2G11

กรรมวิธีที่ 6 พ่นสารคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 77% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (สารเปรียบเทียบ)

กรรมวิธีที่ 7 พ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (control)

ทำการพ่นเชื้อ Xcc ลงใบคะน้าให้ทั่วต้น จากนั้นนำถุงพลาสติกคลุมต้นคะน้า เพื่อเพิ่มความชื้น โดยคลุมไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำถุงพลาสติกดังกล่าวออก แล้วทำการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สารคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 77% WP น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ตามกรรมวิธีดังกล่าว ทำการพ่นทุก ๆ 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง สังเกตอาการแล้วประเมินความรุนแรงของการเกิดโรค โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการใช้สารคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 77% WP และกรรมวิธีใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

สังเกตอาการแล้วประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคโดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคเป็น 5 ระดับ (นลินา, 2554) ดังนี้

ระดับ 0 = ใบพืชไม่แสดงอาการผิดปกติใด ๆ

ระดับ 1 = ลักษณะอาการโรคบนใบเหลือง/เป็นจุดรุนแรงเท่ากับ 1-25 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด

ระดับ 2 = ลักษณะอาการโรคบนใบเหลือง/เป็นจุดรุนแรงเท่ากับ 26-50 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด

ระดับ 3 = ลักษณะอาการโรคบนใบเหลือง/เป็นจุดรุนแรงเท่ากับ 51-75 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด

ระดับ 4 = ลักษณะอาการโรคบนใบเหลือง/เป็นจุดรุนแรงเท่ากับ 76-100 เปอร์เซ็นต์หรือใบแห้งร่วหล่น

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่าการประเมินความรุนแรงของโรคที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีทางสถิติ

- เวลาและสถานที่ - เริ่มต้น ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2562

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยาและโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ : จากผลการทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินและใบคะน้าที่ไม่แสดงอาการของโรค ได้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 129 ไอโซเลท และจากคลังเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์จำนวน 64 ไอโซเลท รวมทั้งหมดจำนวน 193 ไอโซเลท นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 193 ไอโซเลทมาทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้าในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี disc diffusion method ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ B9 B10 BS-2 BS-14 และ 2G11 ที่แยกได้จากดินรอบรากของคะน้า และจากคลังเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่. No. 684 No. 1595 และ No 2814 ซึ่งมีการยับยั้งที่แตกต่างกัน โดยมีความกว้างของบริเวณใสตั้งแต่ 4.41-7.41 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1) เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยของ Monteiro *et. al.* (2005) ทำการแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ได้ 8 ไอโซเลท ทำการทดสอบกับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำจำนวน 9 ไอโซเลท โดยประเมินผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ พบว่า มี *Bacillus* spp. เพียง 4 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (clear inhibition zone) ประมาณ 2-12.7 มิลลิเมตร

จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท มาจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี ร่วมกับการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป api® 50 CHB (BioMerieux, France) แสดงผลว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท คือเชื้อ *Bacillus subtilis* (ตารางที่ 2) หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลทดังกล่าว และสารคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 77% WP ไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าดำในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง โดยพ่นทุก ๆ 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง พบว่า หลังการพ่นครั้งที่ 2 กรรมวิธีพ่นสารคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 77% WP กับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท B10 และ BS-14 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 17.88 18.13 และ 18.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว (กรรมวิธีควบคุม) แสดงเปอร์เซ็นต์เกิดโรคเท่ากับ 21.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) หลังการพ่นครั้งที่ 3 และหลังพ่นครั้งที่ 4 พบว่า กรรมวิธีพ่นสารคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 77% WP มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 35.13 และ 55.88 เปอร์เซ็นต์ กรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท B10 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 35.63 และ 56.00 เปอร์เซ็นต์ และกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BS-2 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 37.88 และ 57.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับเสมอใจและคณะ (2551) ได้ศึกษาหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (Xad) สาเหตุโรคใบไหม้ของหน้าวัว จากการแยกเชื้อแบคทีเรียของวัสดุปลูกหน้าวัว พบว่า เมื่อผสมเชื้อ *Bacillus subtilis* 3 ชนิด คือ B1228 B1317 และ B1348 ควบคู่กับการพ่น Xad ในโรงเรือนทดลอง สามารถลดการเกิดโรคได้ 81-89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำ ระหว่างการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช พบว่า กรรมวิธีที่มีการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท B10 และ BS-2 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำได้เช่นเดียวกับการใช้สารคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 77% WP และยังพบว่า กรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ใบคะน้าที่แตกใบใหม่พบอาการของโรคเน่าดำบนใบน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกรรมวิธีพ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) โดยชุดควบคุมต้นคะน้าแสดงอาการของโรคเน่าดำมากที่สุด และบางต้นเป็นโรคเยอะจนต้นตาย อีกทั้งเชื้อสาเหตุโรคแพร่กระจายไปยังใบอื่นเร็วกว่ากรรมวิธีใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำของคะน้าในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลองได้ และให้ผลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ : จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย 193 ไอโซเลท ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

ในสภาพห้องปฏิบัติการจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ B9 B10 BS-2 BS-14 และ 2G11 นำมาจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี ร่วมกับการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป api® 50 CHB (BioMerieux, France) แสดงผลว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท คือเชื้อ *Bacillus subtilis* หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท ไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าดำในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่า ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำของคะน้าในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง จำนวน 3 ไอโซเลท คือ B10 BS-2 และ BS-14

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

1. ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า

2. ได้วิธีการควบคุมและการป้องกันกำจัดโรคเน่าดำของคะน้าที่มีประสิทธิภาพ เพื่อนำไปใช้ในแปลงเกษตรกรต่อไป

11. เอกสารอ้างอิง :

ชุมชนคนออนไลน์. 2552. *การปลูกคะน้านอกฤดู*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.plapak.net/?p=293 (28 มีนาคม 2559)

นลินา เหมสนิท. 2554. *การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ Pseudomonas fluoreacens SP007s ชักนำให้คะน้าเกิดความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. *โรคของผักและการป้องกันกำจัด*. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ. 198 หน้า.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2545. *โรคของผักและการควบคุมโรค*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 173 หน้า.

เสมอใจ ชื่นจิตต์ วสันณ์ เพชรรัตน์ และ พรศิลป์ จันทวีเมือง. 2551. การประเมินการควบคุมโรคใบไหม้ของหน้าวัวด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์. *วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร*. 39(3): 195-198.

Humaydan, H.S., G.E. Harman., B.L. Nedrow. and L.v. Dinitto. 1980. Eradication of *Xanthomonas campestris* the causal agent of black rot from Brassica seeds with antibiotic and sodium hypochlorite. *Phytopathology*. 70: 127-131.

Katz, E. and A.L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry biogenesis and possible functions. *Bacteriological Reviews*. 41: 449-74.

Monteiro, L., R.D.L.R. Mariano. and A.M. Souto-Maior. 2005. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48(1): 23-29.

12. ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ขนาดความกว้างของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* บนอาหาร Nutrient Agar (NA) เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	**ความกว้างของบริเวณใส (มิลลิเมตร)**		
	X. campestris pv. *campestris* No. 684	*X. campestris* pv. *campestris* No. 1595	*X. campestris* pv. *campestris* No. 2814
1. B9	4.41	7.41	5.71
2. B10	5.29	5.75	6.75
3. BS-2	5.50	5.37	6.12
4. BS-14	6.25	6.0	6.0
5. 2G11	5.33	5.46	5.33

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท ร่วมกับชุดตรวจสำเร็จรูป api 50 CHB

ไอโซเลท	**การทดสอบแกรม**	**รูปร่างสปอร์**	**ตำแหน่งสปอร์**	**api 50 CHB**
B9	บวก	ท่อน	สปอร์อยู่กลางเซลล์	*Bacillus subtilis*
B10	บวก	ท่อน	สปอร์อยู่กลางเซลล์	*Bacillus subtilis*
BS-2	บวก	ท่อน	สปอร์อยู่กลางเซลล์	*Bacillus subtilis*
BS-14	บวก	ท่อน	สปอร์อยู่กลางเซลล์	*Bacillus subtilis*
2G11	บวก	ท่อน	สปอร์อยู่กลางเซลล์	*Bacillus subtilis*

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าดำของคะน้าในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง (พ่นทุก ๆ 7 วัน)

กรรมวิธี	ดัชนีการเกิดโรค (%)			
	หลังพ่นครั้งที่ 1	หลังพ่นครั้งที่ 2	หลังพ่นครั้งที่ 3	หลังพ่นครั้งที่ 4
กรรมวิธีที่ 1 พ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ B9	0.00	19.13bc[1/]	38.75b	59.75b
กรรมวิธีที่ 2 พ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ B10	0.00	18.13d	35.63cd	56.00c
กรรมวิธีที่ 3 พ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ BS-2	0.00	19.38b	37.88bc	57.25bc
กรรมวิธีที่ 4 พ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ BS-14	0.00	18.50cd	38.63b	59.38b
กรรมวิธีที่ 5 พ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 2G11	0.00	19.38b	39.50b	58.88b
กรรมวิธีที่ 6 copper hydroxide 77% WP (20 กรัม/ น้ำ 20 ลิตร)	0.00	17.88d	35.13d	55.88c
กรรมวิธีที่ 7 พ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)	0.00	21.25a	44.75a	76.50a
CV (%)	-	2.68	5.23	3.64

[1/] ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ