

การทดสอบอาหารเพื่อผลิตและขยายแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สำหรับควบคุมโรคแอนแทรกซ์ในสของพริก

Testing of media for cultivation of *Bacillus subtilis* to control anthracnose disease in chilli

รัตติกาล ยุทธสินธุ์^{1*}, นฤทัย วรสาทิ¹, กุศล ถมมา¹, วิมลรัตน์ คำขำ¹ และ ปัทมสร สีลารักษ์¹
Rattikan Yutthasin^{1*}, Naruatai Worasatit¹, Kuson Thomma¹, Wimolrat Dumkhum¹
and Papatsorn Seelarak¹

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบวิธีการผลิตและขยายแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* แบบง่าย ต้นทุนต่ำ และเชื่อยั้งคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรกซ์ในสของพริก จากการทดสอบเตรียมหัวเชื้อชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลต 19w6 ในรูปของเหลว พบว่า การเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น (5-10 °ซ) สามารถเก็บรักษาหัวเชื้อได้นาน 6 เดือน โดยมีปริมาณแบคทีเรียมากกว่าเชื้อเริ่มต้น และเชื่อยั้งคงมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum acutatum* *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* ได้ดีเช่นเดียวกับเชื้อเริ่มต้น และเมื่อนำหัวเชื้อมาขยายในอาหาร 5 สูตร ได้แก่ สูตร 1 อาหารที่เตรียมจากน้ำมะพร้าวอ่อน สูตร 2 อาหารที่เตรียมจากนมสดอโรไรซ์ สูตร 3 อาหารที่เตรียมจากน้ำตาลทรายแดง (น้ำตาลทรายแดง 5 กรัม นมข้นหวาน 1 กรัม) สูตร 4 อาหารที่เตรียมจากกากน้ำตาล (กากน้ำตาล 5 กรัม นมข้นหวาน 1 กรัม) และสูตร 5 อาหาร NB (ชุดควบคุม) พบว่า สูตร 2 และ 3 สามารถเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* ไอโซเลต 19w6 ได้ภายใน 24 ชั่วโมง และมีปริมาณของแบคทีเรียมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (สูตร 5) และเชื้อที่เพิ่มปริมาณได้ยั้งคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 ชนิด ได้ดีหลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-12 วัน แต่สูตร 2 เป็นสูตรอาหารที่มีขั้นตอนการเตรียมไม่ยุ่งยาก ราคาไม่แพง และมีสารอาหารสม่ำเสมอที่เหมาะสมกับการนำมาใช้เป็นอาหารผลิตขยายชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลต 19w6 สำหรับนำไปทดสอบการควบคุมโรคแอนแทรกซ์ในสของพริกในสภาพแปลงปลูกต่อไป

คำสำคัญ: ชีวภัณฑ์, การควบคุมโรคโดยชีววิธี, อาหารเลี้ยงเชื้อ, โรคพริก

ABSTRACT: The objective of this study is testing of culture media for *Bacillus subtilis* in order to establish simple, low cost of production and stability on the growth inhibition of *Colletotrichum* spp., causal agent anthracnose disease of chilli. This study found that the nutrient broth (NB) medium could be used to prepare the starter of *B. subtilis* isolate 19w6. It was cultured in NB medium on shaker at 150 rpm for 5 days at room temperature and storage in refrigerator for 6 months. Five different media including coconut water, sterilized milk, granulated brown sugar, molasses and NB medium were tested for growth of *B. subtilis* isolate 19w6 starter. Higher concentration of bacterial cells was found in sterilized milk after inoculate *B. subtilis* isolate 19w6 for 24 hr and it strongly inhibited the growth of *Colletotrichum* spp. mycelium after cultured from 1-12 days. The sterilized milk is simple preparation, cheap and stable ingredients. These results suggested that the sterilized milk could be used as low cost medium for multiplication of *B. subtilis* isolate 19w6 bioproduct to control anthracnose disease in chilli.

Keywords: bioproduct, biocontrol, culture media, chilli disease

¹ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 กรมวิชาการเกษตร

Agricultural Research and Development Region 3 Department of Agricultural

* Corresponding author: rattikan3107@gmail.com

บทนำ

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive) รูปร่างเป็นท่อนสั้น ทรงกระบอก (rod-shape) ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ มีขนาดความกว้าง 0.5-2.5 ไมโครเมตร ความยาว 1.2-10 ไมโครเมตร สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ พืช หรือเศษซากพืช หรือแหล่งอาหารที่มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตสูง สามารถเจริญได้รวดเร็วในบริเวณรากพืช (Baker and Cook, 1974) แบคทีเรียชนิดนี้มีเมตาโบลิซึมเป็นทั้งแบบการหายใจ (respiration) การหมัก (fermentation) หรือเป็นทั้งสองแบบ มีความทนต่ออุณหภูมิช่วงกว้าง ตั้งแต่ -5 ถึง 75 °C เจริญได้ที่ pH 2-8 ทนเค็มได้ 25 % ของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แบคทีเรียหลายชนิดในสกุลนี้เจริญได้ในที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงประมาณ 55 °C เช่น *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. brevis* และ *B. acidocaldarius* เป็นต้น (El-Hassan and Gowen, 2006) มีกลไกสำคัญในการควบคุมโรคพืช คือ การแย่งแย่งอาหารและครอบครองพื้นที่อาศัย ผลผลิตสารปฏิชีวนะ และเอ็นไซม์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช และช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืชให้กับต้นพืช (Cawoy et al., 2011) สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้ทำการศึกษาวิจัยการควบคุมโรคพืชด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* มาอย่างต่อเนื่อง พบว่าแบคทีเรีย *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ช่วยลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเชอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า (ปฏิมาพร และคณะ, 2551) ในปี 2557 ได้นำแบคทีเรีย *B. subtilis* จำนวน 100 ไอโซเลต มาทดสอบยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกที่เกิดจากเชื้อ *C. capsici* โดยวิธี dual culture บนอาหาร PDA พบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราดังกล่าวได้ดีมีจำนวน 4 ไอโซเลต คือ B23 20W15 20W19 และ 19W6 โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 58.8 51.03 50.69 และ 51.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ฐารทิพย์ และคณะ, 2557) แตกต่างจากผลการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในสภาพแปลงทดลอง ที่พบว่า *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งดีที่สุดได้แก่ 20W33 20W16 และ 22W8 สามารถควบคุมให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค อยู่ในช่วง 43.89-53.95, 46.36-47.76 และ 46.85-64.50 ตามลำดับ โดยมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืชแมนโคเซบ (80% WP) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 45.33-54.61

(บุษราคัมและคณะ, 2557) การปลูกพริกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน มักประสบปัญหาการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum* อย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ *C. acutatum* *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* (รัตติกาล, 2558) จากการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* จำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ *B. subtilis* B23/2 19w6 20w15 20w16 20w19 และ 20w33 *B. siamensis* (DL7) *B. amyloliquefaciens* (DL9) *Bacillus* sp. 1324 1833 T4 CL และ CS พบว่า *Bacillus* ไอโซเลต DL7, DL9, B23/2, 19w6, 20w16 และ 20w33 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 ชนิด ได้มากกว่า 60 % สามารถปลดปล่อยสารปฏิชีวนะทำให้เส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* ผิดปกติ (รัตติกาล, 2561) และพบว่า *Bacillus* ทุก ไอโซเลตสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ดี โดยเฉพาะไอโซเลต 19W6 งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบวิธีการผลิตและขยายชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* แบบง่าย ต้นทุนต่ำ และเชื่อว่าจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก

วิธีการศึกษา

การทดสอบเตรียมหัวเชื้อ *Bacillus subtilis* ไอโซเลต 19W6 ในรูปของเหลว

นำเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลต 19W6 ที่เก็บไว้ใน 25 % Glycerol อุณหภูมิ -20 °C มาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 ซม. ปลอດดูเชื้อเจาะบริเวณของโคโลนี แล้วย้ายเชื้อจำนวน 1 ซีนมาเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 100 มล. ที่เตรียมไว้ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. จำนวน 6 ขวด แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน นำเชื้อที่เลี้ยงได้ 100 มล. ใส่ในขวด Duran ขนาด 250 มล. แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 จำนวน 3 ขวด เก็บที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °C) และส่วนที่ 2 อีก 3 ขวด เก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (5-10 °C) วางแผนการทดลองแบบ Split plot in RCBD จำนวน 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี โดย Main plot ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาหัวเชื้อ และ Subplot ได้แก่ ระยะเวลาเก็บรักษาหัวเชื้อนาน 6 เดือน โดยนำเชื้อที่เก็บไว้มาตรวจดูลักษณะของโคโลนี และนับจำนวนแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลต 19W6 ทุก 14 วัน ด้วยวิธี Dilution plating technique บนอาหาร NA จำนวน 3 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 10^{-1} 10^{-3} 10^{-5} 10^{-7} บ่มที่อุณหภูมิห้อง 48

ข้าวโม่ง และคัดเลือกโคโลนีตัวแทนจากแต่ละกรรมวิธี มาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *C. acutatum* *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี Dual culture technique โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มม. เจาะปลายเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายมาวางบนอาหาร PDA จากนั้นใช้ลูปปลอดเชื้อแตะโคโลนีเดียวของ *Bacillus* ที่เตรียมไว้ขีดเป็นเส้นตรงยาว 4 ซม. ด้านตรงข้ามกับชิ้นเชื้อราในระยะห่าง 5 ซม. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน สำหรับเชื้อรา *C. gloeosporioides* 14 วัน สำหรับเชื้อรา *C. capsici* และ 20 วัน สำหรับเชื้อรา *C. acutatum* เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ที่วางเฉพาะชิ้นเชื้อรา *Colletotrichum* บันทึกผลโดยวัดขนาดของรัศมีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบแล้วนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG) (Tronsmo, 1992) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistic Analysis System (SAS)

$$\%PIRG = [(Rc-RT)/Rc] \times 100$$

โดย Rc คือ รัศมีโคโลนีเชื้อรา *Colletotrichum* ในชุดควบคุม

RT คือ รัศมีโคโลนีเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus*

การทดสอบสูตรอาหารสำหรับขยายเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลต 19W6

นำหัวเชื้อมาทดสอบขยายในอาหารจำนวน 5 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 น้ำมะพร้าวอ่อน สูตรที่ 2 นมสเตอริไลซ์ สูตรที่ 3 น้ำตาลทรายแดง 5 กรัม ผสมนมข้นหวาน 1 กรัม สูตรที่ 4 กากน้ำตาล 5 กรัม ผสมนมข้นหวาน 1 กรัม และสูตรที่ 5 อาหาร NB โดยใช้ ไมโครปิเปต ดูดหัวเชื้อปริมาตร 1 มล. มาเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ปริมาตร 100 มล. ที่เตรียมไว้ในขวด Duran ขนาด 250 มล. วางแผนการทดลองแบบ Split plot in RCBD จำนวน 4 ซ้ำต่อกรรมวิธี โดย Main plot ได้แก่ สูตรอาหาร และ Subplot ได้แก่ ระยะเวลาที่เชื้อเจริญในอาหารแต่ละสูตร คือ 1, 2, 3, 6, 9, 12 และ 15 วัน นำเชื้อที่เลี้ยงในระยะเวลาต่างๆ มาตรวจจุลลักษณะของโคโลนี และนับจำนวนแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลต 19W6 ด้วยวิธี Dilution plating technique บนอาหาร NA จำนวน 4 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 10^{-2} 10^{-4} 10^{-6} บ่มที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง และเลือกเก็บโคโลนีตัวแทน มาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *C. acutatum* *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี Dual culture technique บนอาหาร PDA วัดเปอร์เซ็นต์การ

ยับยั้งการเจริญหลังจากเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 21 14 และ 10 วัน ตามลำดับ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดสอบเตรียมหัวเชื้อ *Bacillus subtilis* ไอโซเลต 19W6 ในรูปของเหลว

หัวเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลต 19W6 ในรูปของเหลวที่เลี้ยงในอาหาร NB มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.25×10^7 โคโลนี/มล. และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* แตกต่างกันไปตามชนิด โดยมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งประมาณ 50 % เมื่อนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °ซ) เปรียบเทียบกับอุณหภูมิของตู้เย็น (5-10 °ซ) เป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ พบว่า อุณหภูมิการเก็บรักษา และระยะเวลาในการเก็บรักษาหัวเชื้อไม่มีอิทธิพลร่วมกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ต่อปริมาณของแบคทีเรียที่มีชีวิตในหัวเชื้อ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ปริมาณของแบคทีเรียที่มีชีวิตในหัวเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้องไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการเก็บรักษาหัวเชื้อไว้ในอุณหภูมิตู้เย็น โดยมีปริมาณแบคทีเรีย $9.82 \times 10^9 - 1.11 \times 10^{10}$ โคโลนี/มล. และพบว่าปริมาณแบคทีเรียในหัวเชื้อที่เก็บรักษาเป็นเวลา 24 สัปดาห์ มีปริมาณมากกว่าเชื้อเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1) แต่หัวเชื้อที่เก็บในอุณหภูมิห้องมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียชนิดอื่น ขณะที่อุณหภูมิตู้เย็นไม่พบการปนเปื้อน และหัวเชื้อที่เก็บไว้ในตู้เย็น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้ดีกว่าที่เก็บในอุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ย 50.8 % ส่วนการเก็บรักษาหัวเชื้อไว้ในอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 ชนิด ไม่แตกต่างจากเชื้อเริ่มต้น (Table 1) (Figure 1)

การทดสอบสูตรอาหารสำหรับขยายเชื้อ *Bacillus subtilis* ไอโซเลต 19W6

จากการทดสอบขยายหัวเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลต 19W6 ในรูปของเหลวอาหาร NB ในอาหาร 5 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 น้ำมะพร้าวอ่อน สูตรที่ 2 นมสเตอริไลซ์ สูตรที่ 3 น้ำตาลทรายแดง 5 กรัม ผสมนมข้นหวาน 1 กรัม สูตรที่ 4 กากน้ำตาล 5 กรัม ผสมนมข้นหวาน 1 กรัม และสูตรที่ 5 อาหาร NB พบว่า สูตรอาหาร และระยะเวลาการขยายเชื้อไม่มีอิทธิพลร่วมกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ต่อปริมาณของแบคทีเรียที่มีชีวิตในสูตรอาหารต่างๆ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการ

Table1 Number of *Bacillus subtilis* 19W6 colonies and the percentage of mycelial growth inhibition of 3 species *Colletotrichum* spp. after stored in room temperature and in refrigerator for 6 months.

Treatment (Storage temperature)	Number of bacterial colonies (cfu/ml.) ¹	mycelial growth inhibition (%) ^{1,2}			
		Ca	Cc	Cg	mean
Room temp.	9.82 x 10 ⁹	50.5	50.3	42.8	47.9
Refrigerator temp.	1.11 x 10 ¹⁰	53.8	52.7	45.9	50.8
F-test	ns	*	ns	**	*
CV (%)	11.72	14.45	18.15	15.42	17.73
Storage time (week)					
0	1.25 x 10 ⁷ f	59.5a	57.1abc	39.6bc	52.1a
2	7.62 x 10 ⁶ e	37.3d	49.2bc	48.9a	45.1bc
4	2.07 x 10 ⁹ de	54.8abc	54.1abc	45.2abc	51.4ab
6	1.56 x 10 ¹⁰ ab	56.1ab	53.3abc	42.6abc	50.7ab
8	1.06 x 10 ¹⁰ bc	54.5abc	44.8c	48.3ab	49.2ab
10	2.37 x 10 ⁹ de	47.7bc	62.8a	50.7a	53.7a
12	3.08 x 10 ¹⁰ a	49.3abc	31.7g	38.4c	39.8c
14	1.77 x 10 ¹⁰ ab	56.1ab	55.4abc	45.7abc	52.4a
16	1.77 x 10 ¹⁰ ab	45.6cd	58.0ab	41.6abc	48.4ab
18	1.08 x 10 ¹⁰ cd	53.6abc	53.4abc	49.0a	52.0a
20	1.68 x 10 ¹⁰ bc	53.0abc	49.4bc	42.2abc	48.2ab
22	3.98 x 10 ⁹ cd	53.7abc	53.7abc	39.5bc	49.0ab
24	6.73x 10 ⁹ cd	57.0ab	46.6bc	45.0abc	49.5ab
F-test	**	**	**	*	**
CV (%)	11.72	14.45	18.15	15.42	17.73

¹Means within the same column with a common letter are not significantly different by DMRT (P < 0.05)

²Ca = *C. acutatum* Cc = *C. capsici* และ Cg = *C. gloeosporioides*

Table 2 Number of *Bacillus subtilis* 19W6 colonies and the percentage of mycelial growth inhibition of 3 species *Colletotrichum* spp. of *B. subtilis* 19w6 culture in media for 15 days.

Treatment (Media)	Number of bacterial colonies (cfu/ml.) ¹	mycelial growth inhibition (%) ^{1,2}			
		Ca	Cc	Cg	mean
1	3.14x10 ⁷ ab	52.0ab	49.0ab	54.8a	51.9a
2	3.46x10 ⁷ a	54.8ab	50.4a	54.6a	53.3a
3	4.11x10 ⁷ a	55.4a	49.9a	53.7a	53.0a
4	2.08x10 ⁷ b	52.7ab	50.3a	53.5a	52.2a
5	2.53x10 ⁷ b	51.7b	46.9b	51.3b	50.0b
F-test	*	*	*	*	**
CV (%)	25.84	10.11	15.91	8.19	16.4
Time (days)					
0	1.25x10 ⁵ f	59.5a	57.1a	39.6d	52.0c
1	3.00x10 ⁷ cd	56.1a	58.8a	50.6c	55.1b
2	4.83x10 ⁶ e	59.3a	57.8a	70.4a	62.4a
3	1.52x10 ⁷ d	58.0a	56.7a	70.6a	61.8a
6	2.31x10 ⁷ cd	46.9c	44.9b	50.4c	47.4d
9	3.30x10 ⁷ bc	51.4b	47.4b	51.7c	50.1cd
12	4.99x10 ⁷ b	50.4b	46.7b	55.5b	50.9c
15	8.90x10 ⁷ a	45.2c	24.9c	39.9d	36.7e
F-test	**	**	**	**	**
CV (%)	25.84	10.11	15.91	8.19	16.4

¹Means within the same column with a common letter are not significantly different by DMRT (P < 0.05)

²Ca = *C. acutatum* Cc = *C. capsici* และ Cg = *C. gloeosporioides*

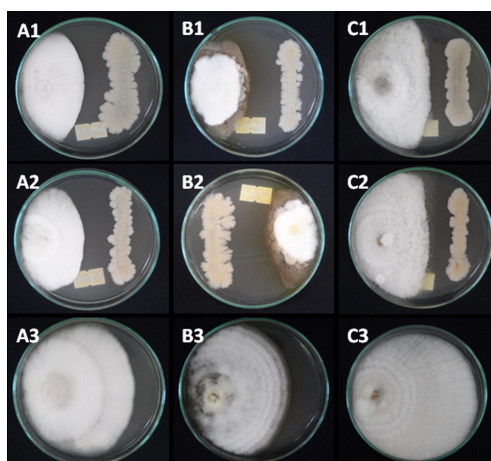


Figure1 The antagonistic *Bacillus subtilis* 19W6 from (1) room temperature and (2) refrigerator for 24 weeks inhibited mycelial growth of (A) *C. acutatum*, (B) *C. capsici*, (C) *C. gloeosporioides* compared with mycelium growth of 3 species of *Colletotrichum* without *B. subtilis* after dual cultured on PDA (A3-C3) media.

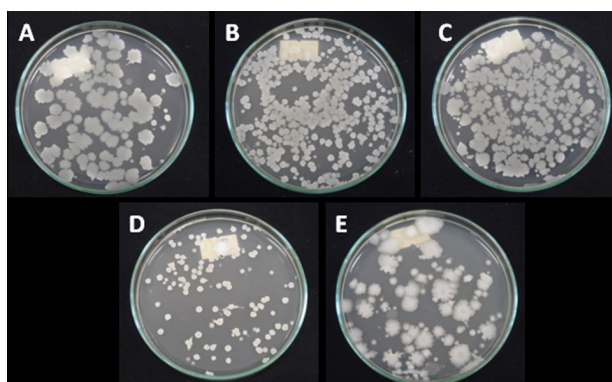


Figure 2 Colonies of *Bacillus subtilis* 19W6 on NA after cultured in each medium formulation for 15 days by dilution plating technique. (A) coconut water (B) sterilized milk (C) granulated brown sugar mixed sweetened condensed milk (D) molasses mixed sweetened condensed milk and (E) NB medium.

เจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยพบว่าปริมาณเชื้อที่ขยายได้ในสูตร 2 และ 3 มีปริมาณที่มากกว่าสูตร 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสูตร 1 และ 4 สามารถเพิ่มปริมาณแบคทีเรียได้ดีเช่นเดียวกับสูตร 5 และการขยายเชื้อเป็นระยะเวลา 15 วัน ทำให้มีปริมาณแบคทีเรียมากกว่าเชื้อเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าเฉลี่ยสูงสุดถึง 8.90×10^7 โคโลนี/มล. (Table 2) (Figure 2) แสดงว่าสูตรอาหาร 2 และ 3 เป็นอาหารที่มีปริมาณของโปรตีนและน้ำตาลเหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของเซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลต 19W6 ต่างจากเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ พลายแก้ว ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในสูตรอาหารที่เตรียมจากกากน้ำตาล และสูตรอาหารไข่

ผสมกับน้ำมะพร้าว (Ngampanya et al., 2006) ดังนั้นสูตรอาหารสำหรับขยายแบคทีเรีย *B. subtilis* น่าจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับไอโซเลตหรือสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ขณะที่ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* 3 ชนิดพบว่า *B. subtilis* ไอโซเลต 19W6 ที่ได้จากอาหารสูตร 1-4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 50 % มากกว่าสูตร 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2) และแบคทีเรียที่ขยายได้ในอาหารทุกสูตร เป็นเวลา 2-3 วันพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรามากที่สุดคือ 62.5 และ 61.8 % ตามลำดับ มากกว่าแบคทีเรียเริ่มต้น (52.0%) แต่หากขยายไว้นาน 15 วัน มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยที่สุดคือ 34.1% (Table 2)

