



Antibiotic Production and Growth Inhibiting Activities on Fruit Rot Fungus of
Antagonistic *Bacillus subtilis* in Citrus

Thanong Narawitseree

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry

Prince of Songkla University

2009

Copyright of Prince of Songkla University

Thesis Title Antibiotic Production and Growth Inhibiting Activities on Fruit
Rot Fungus of Antagonistic *Bacillus subtilis* in Citrus

Author Mr.Thanong Narawitseree

Major Program Biochemistry

Major Advisor:

.....
(Asst.Prof.Dr.Wichitra Leelasuphakul)

Co-advisor:

.....
(Dr.Ausa Chandumpai)

Examining Committee

.....
(Dr.Rapiporn Sotthibandhu)

.....
(Asst.Prof.Dr.Wichitra Leelasuphakul)

.....
(Dr.Ausa Chandumpai)
.....
(Dr.Wipapan Pongcharoen)

The Graduate School, Prince of Songkla University, has approved this thesis as partial fulfillment of the requirements for the Master of Science Degree in Biochemistry.

.....
(Assoc.Prof.Dr.Krekchai Thongnoo)

Dean of Graduate School

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตสารปฏิชีวนะและการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคผลเน่าของส้มโดย
จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบซิลลัส ซับทิลิส

ผู้เขียน นายทณง นราวิทย์เสรี

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธีโดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* ได้รับการยืนยันและพิสูจน์อย่าง
ต่อเนื่อง ทั้งยังมีการนำไปใช้ในเชิงการค้าอย่างกว้างขวาง งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาและประเมิน
ศักยภาพของเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการยับยั้งเชื้อราโรคผลเน่าในส้ม (*Penicillium digitatum*) และยัง
ประเมินถึงคุณสมบัติในการกระตุ้นการต้านทานโรคต่อผลส้มด้วย จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. subtilis* ทั้งสอง
สายพันธุ์คือ ABS-S14 และ 155 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคในระบบจานอาหารทดลอง
ได้ดี รวมทั้งสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อวิเคราะห์สารสกัดหยาบด้วยเทคนิค TLC, HPLC และ
MALDI-TOF พบว่าเชื้อ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ผลิตสารกลุ่ม lipopeptides ซึ่งประกอบด้วย fengycin,
iturin และ surfactin เมื่อนำไปแยกกึ่งบริสุทธิ์โดยการชูดออกจากแผ่น PLC แล้วนำมาทดสอบการยับยั้ง
พบว่าสารกลุ่ม iturin และ fengycin แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ชัดเจน แต่ไม่พบฤทธิ์การยับยั้ง
จากสารปฏิชีวนะกลุ่ม surfactin นอกจากนี้ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์นี้ยังสามารถผลิตสารระเหยอินทรีย์
(Volatile organic compounds, VOCs) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยการกระตุ้นให้โครงสร้างของ
เส้นใยเกิดความผิดปกติและยังยับยั้งการสร้างสปอร์ และสมบัติการยับยั้งของสารระเหยขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้
เลี้ยงเชื้อโดยอาหาร TSA ให้ผลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้สูงสุด รองลงมาคือ LA, PDA และ NA ตามลำดับ การ
ทดสอบในระดับ *in vivo* แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สามารถดำรงชีวิตอยู่บนผลส้มโดยไม่มีการเพิ่มจำนวน
ประชากรนาน 20 วัน และ สารสกัดหยาบจากเชื้อ *B. subtilis* สามารถกระตุ้นแอกติวิตี้ของเอนไซม์
peroxidase (POX) และ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) ในเปลือกส้มได้อย่างชัดเจน

Thesis Title Antibiotic Production and Growth Inhibiting Activities on Fruit Rot Fungus of Antagonistic *Bacillus subtilis* in Citrus

Author Mr. Thanong Narawitseree

Major Program Biochemistry

Academic Year 2009

ABSTRACT

Biological control by antagonistic *Bacillus subtilis* is a subject that is receiving considerable attention and has now moved from a laboratory scale to patents and evaluations of commercial applications. This study focuses on the determination and interpretation of the potential of *B. subtilis* ABS-S14 and 155 strains to suppress citrus fruit rot disease caused by *Penicillium digitatum*. In addition, the ability of these pathogen antagonists to induce resistance mechanisms in citrus fruit was also examined. Both strains of *B. subtilis* showed strong antagonistic activity to the fungus pathogen *in vitro*. The crude extracts from cell-free cultured broth also showed significant antifungal activities. Upon TLC, HPLC and MALDI-TOF analysis, both strains produced antifungal lipopeptides belonging to the families of fengycin, iturin and surfactin. Partially purified fractions of crude extracts revealed potent antifungal activity related to iturins and fengycins, but not from surfactins. Volatile organic compounds (VOCs) emitted by these two antagonists induced mycelial morphological abnormalities and inhibited the formation of spores. Moreover, fungal inhibition property varied with culture media. Bacterial culture in TSA medium showed the highest level of mycelial inhibition, followed by LA, PDA and NA, respectively. *In vivo* experiment, antagonistic *B. subtilis* survived on the surface of citrus fruit over 20 days and their crude extracts were clearly induced activity of peroxidase (POX) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzymes in the citrus rind.