# Final report

# การผลิตสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียปฏิปักษ์แบซิลลัส ซับทิลิส และการเหนี่ยวนำเอนไซม์ในผลส้มที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเขียวสาเหตุโรคผลเน่าของส้ม

# Antibiotic Production of Antagonistic *Bacillus subtilis* and Enzyme Induction in Citrus Fruit Involving Growth Inhibition of Green Mold Causing Fruit Rot Disease of Citrus


ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิจิตรา ลีละศุภกุล

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**Assistant Professor Wichitra Leelasuphakul**

**Department of Biochemistry,**

**Faculty of Science,**

**Prince of Songkla University**



.ับการสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี ๒๕๕๑-๒๕๕๒ สัญญาเลขที่ SCI5111990009S)

# บทคัดย่อ

การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธีโดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* ได้รับการนำไปใช้ในเชิงการค้าอย่างกว้างขวาง งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาและประเมินศักยภาพของเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการยับยั้งเชื้อราโรคผลเน่าในส้ม (*Penicillium digitatum*) และยังประเมินถึงคุณสมบัติในการกระตุ้นการต้านทานโรคต่อผลส้มด้วย จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์คือ ABS-S14 และ 155 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคในระบบจานอาหารทดลองได้ดี รวมทั้งสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อวิเคราะห์สารสกัดหยาบด้วยเทคนิค TLC, HPLC และ MALDI-TOF พบว่าเชื้อ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ผลิตสารกลุ่ม lipopeptides ซึ่งประกอบด้วย fengycin, iturin และ surfactin เมื่อนำไปแยกกึ่งบริสุทธิ์โดยการขูดออกจากแผ่น PLC แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งพบว่าสารกลุ่ม iturin และ fengycin แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ชัดเจน แต่ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งจากสารปฏิชีวนะกลุ่ม surfactin นอกจากนี้ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์นี้ยังสามารถผลิตสารระเหยอินทรีย์ (Volatile organic compounds, VOCs) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยการกระตุ้นให้โครงสร้างของเส้นใยเกิดความผิดปรกติและยังยับยั้งการสร้างสปอร์ และสมบัติการยับยั้งของสารระเหยขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อโดยอาหาร TSA ให้ผลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้สูงสุด รองลงมาคือ LA, PDA และ NA ตามลำดับ การทดสอบในระดับ *in vivo* แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สามารถดำรงชีวิตอยู่บนผลส้มโดยไม่มีการเพิ่มจำนวนประชากรนาน 20 วัน และสารสกัดหยาบจากเชื้อ *B. subtilis* สามารถกระตุ้นแอคติวิตี้ของเอนไซม์ peroxidase (POX) และ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) ในเปลือกส้มได้อย่างชัดเจน ความรุนแรงของโรคจากเชื้อรา *P. digitatum* ($10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) บนแผลผิวส้ม อาการของโรคแสดงในวันที่ 3 และเน่าทั้งผลในวันที่ 5 การควบคุมการเกิดโรคพบได้สูงสุดเมื่อใส่เซลล์แบคทีเรียก่อนปลูกเชื้อรา 24 ชั่วโมง สารสกัดหยาบ (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ใส่พร้อมกับเชื้อราควบคุมการเกิดโรคได้สูงและใกล้เคียงกับเมื่อใช้อิมาซาลิล (100 และ 500 พีพีเอ็ม) หรือใช้สารแขวนลอยเอนโดสปอร์ *B. subtilis* ABS-S14 ($10^7$-$10^8$ CFU/มิลลิลิตร) ก่อนปลูกเชื้อรา 24 ชั่วโมงควบคุมการเกิดโรคเน่าราเขียวบนผลส้มได้สูงขึ้น โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 5 %

คำสำคัญของเรื่องที่ทำวิจัย: แบซิลลัส ซับทิลลิส; ส้ม; โรคผลเน่าราเขียว; สารระเหยอินทรีย์; สารปฏิชีวนะ, สารสกัดหยาบ; เอนไซม์ Peroxidase; PAL

## ABSTRACT

Biological control by antagonistic *Bacillus subtilis* 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. The efficiency of *B. subtilis* in controlling citrus fruit rot was shown when inoculation with *B. subtilis* cells 24 hours prior to fungal spore inoculation. An ethanol extract (10 mg/ml) added with the fungus produced the same control of disease as did imazalil 100 and 500 ppm. *B. subtilis* endospores at $10^7$ -$10^8$ CFU/mL in controlling citrus fruit rot was shown when *B. subtilis* endospores were inoculated 24 hours prior to fungal spore inoculation. The best fungal growth inhibition on citrus fruits was demonstrated when a mixture of crude extracts and endospores of *B. subtilis* ABS-S14 were applied before pathogen challenge with 5.0 % disease incidence.



Keywords: *B. subtilis*; *P. digitatum*; VOCs ; crude extracts; antibiotics; peroxidase; phenylalanine ammonia-lyase