รายงานการวิจัย

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านเชื้อราของ *Bacillus* spp. ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนสที่คัดแยกจากสภาวะแวดล้อมทางทะเลในจังหวัดสงขลาและปัตตานี

Antifungal Activity of Chitinolytic *Bacillus* spp. Isolated from Marine Environments in Songkhla and Pattani Provinces

สมรักษ์ พันธ์ผล

นิสา แซ่หลี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยวิทยาเขตปัตตานี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี
ประจำปีงบประมาณ 2553

บทคัดย่อ

คัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้จำนวน 98 ไอโซเลทจากตัวอย่างทางทะเลที่เก็บในบริเวณจังหวัดสงขลาและปัตตานี แบคทีเรียทุกไอโซเลท (100%) สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี NaCl ความเข้มข้น 0-3% และ 84 % ของแบคทีเรียทั้งหมดเจริญได้ในอาหารที่มี NaCl 6 % แบคทีเรียทุกไอโซเลทไม่สามารถเจริญที่ความเข้มข้นของ NaCl 18 % นำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราในขั้นต้น (primary screening) ในการยับยั้งเชื้อรา 6 ชนิดได้แก่ *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus fumigatus* TISTR 3463, *Fusarium solani* TISTR 3436, *Penicillium* sp. และ *Candida albicans* DMST 5815 โดยใช้เทคนิค dual culture พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *A. alternata* TISTR 3282, *A. flavus* TISTR 3041, *A. fumigatus* TISTR 3463, *F. solani* TISTR 3436 และ *Penicillium* sp. คิดเป็น 57, 65, 61, 33 และ 36% ตามลำดับ แบคทีเรียทั้งหมดไม่สามารถยับยั้ง *C. albicans* DMST 5815 จากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 98 ไอโซเลท คัดเลือกแบคทีเรีย จำนวน 24 ไอโซเลท (24.5%) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา $\geq$ 51 % มาทดสอบการยับยั้งเชื้อราในขั้นที่สอง (secondary screening) และสามารถคัดเลือก *Bacillus* sp. B29 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเพื่อนำมาศึกษาในขั้นต่อไป สภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. B29 ได้แก่การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร starch casein broth ที่เตรียมโดยใช้น้ำทะเล 10 ppt มีไคติน 1 % อุณหภูมิ 35 °C ระยะเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะดังกล่าว แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนส (0.87 U/mL) โปรติเอส (2.64 mU/mL) และ β-1, 3 glucanase (0.65 U/mL) และสารสกัดหยาบที่ได้ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* TISTR 3041, *A. fumigatus* TISTR 3463, *A.niger* และ *Penicillium* sp. โดยยับยั้ง *A. flavus* TISTR 3041 ได้ดีที่สุดให้ขนาดวงใส 5 มิลลิเมตรที่ความเข้มข้น 200 µg/mL ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสพบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเมื่อนำไปบ่มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที หรือการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) (อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที) แต่ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* TISTR 3041 เหลือ 85 % หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใส (10 % v/v) และสารสกัดหยาบ (100 µg/mL) ยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* TISTR 3041 ประมาณ 33.7 % และ 42 % ตามลำดับหลังจากบ่มร่วมสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ลักษณะของเส้นใยเชื้อราที่ผิดปกติสามารถสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คุณลักษณะของ *Bacillus* sp. B29 พบว่า เจริญได้ในช่วง NaCl 0 - 6 % ไม่เจริญที่ NaCl ความเข้มข้น 12 % อุณหภูมิ และพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 35°C และ 7 ตามลำดับ เชื้อ *Bacillus* sp. B29 สามารถย่อย

แป้ง ย่อยเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท และสร้างกรดจากการหมักกลูโคส ไม่สามารถหมักแลกโตส และแมนนิทอล ไม่สร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาล

Abstract

A total of 98 chitinolytic *Bacillus* isolates was isolated from marine samples collected from Songkhla and Pattani provinces. Effect of NaCl at different concentrations on growth of *Bacillus* spp. was tested. Results showed that 100 % of the bacterial isolates grew well at 0-3 % NaCl and 84 % could grow at 6 % NaCl . In addition, all isolates did not grow at 18 % NaCl. Antagonistic activity of isolated chitinolytic *Bacillus* spp. was tested against 6 fungal pathogens including *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus fumigatus* TISTR 3463, *Fusarium solani* TISTR 3436, *Penicillium* sp. and *Candida albicans* DMST 5815 by a dual culture method for a primary screening . Results revealed that 57, 65, 61, 33 and 36 % of isolated *Bacilllus* spp. inhibited the mycelium growth of *A. alternata* TISTR 3282, *A. flavus* TISTR 3041, *A. fumigatus* TISTR 3463, *F.* TISTR 3436 and *Penicillium* sp., respectively. By contrast, all *Bacillus* isolates failed to inhibit the growth of *C. albicans* DMST 5815. Out of 98 chitinolytic *Bacillus* isolates 24 isolates (24.5%) which exhibited $\geq$ 51 % fungal inhibition were selected for a secondary screening and the effective *Bacillus* sp. B29 was chosen for further studies. The optimal conditions for culturing the *Bacillus* sp. B29 to produce extracellular antifungal metabolites was found to be starch casein broth medium prepared by 10 ppt seawater amended with 1.0 % colloidal chitin at 35 °C for 5 days. Under these conditions, the chitinase (0.87 U/mL), protease (2.64 mU/mL) and β-1, 3 glucanase (0.65 U/mL) enzymes were produced by this strain. The crude extract obtained from the culture broth showed antifungal activity against *A. flavus* TISTR 3041, *A. fumigatus* TISTR 3463, *A.niger* and *Penicillium* sp. and it showed the most active against *A. flavus* TISTR 3041 which gave the inhibition zone size of 5 mm at a concentration of 200 μg/mL. Temperature was found to affect antifungal activity of the culture supernatant. It showed the loss of antifungal activity after incubating in boiling water for 15 min and autoclaving temperature (121°C, 15 min). In addition, the culture supernatant showed 85% antifungal activity against *A. flavus* TISTR 3041 after heating at 50 °C for 30 min. The effect of cell free culture supernatant and the crude extract on growth of *A. flavus* TISTR 3041 was examined. Results showed that the culture supernatant (10% v/v) and crude extract (100 μg/mL) were found to inhibit the growth of *A. flavus* TISTR 3041

by 33.7 % and 42 %, respectively, after incubating them with the spore suspension ($1x10^{6}$ spores /mL) for 72 hours. Abnormal appearance of the fungal mycelium could be observed by light microscopy. Characteristics of the *Bacillus* sp. B29 were tested. The strain grew well at 0-6 % NaCl but no growth was observed at 12% NaCl. Optimum temperature and pH for growth of *Bacillus* sp. B29 were 35°C and 7, respectively. The *Bacillus* sp. B29 gave positive results for starch hydrolysis, gelatin hydrolysis, and nitrate reduction. Acid was produced from glucose but not from lactose and mannitol. In addition, gas production was not observed.