

ชื่อวิทยานิพนธ์	สมบัติการยับยั้งของสายพันธุ์ <i>Bacillus subtilis</i> และสารเมทาบอลิไทต์ด้านการเจริญของเชื้อราเขียว ( <i>Penicillium digitatum</i> Sacc.) ของส้ม
ผู้เขียน	นางสาวพรรณเพ็ญ เหมมณี
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2549

### บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 23 จาก 205 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน แสดงปฏิกิริยาปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Penicillium digitatum* ก่อโรคผลเน่าของส้ม น้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* จำนวน 9 สายพันธุ์ เมื่อเจือจางอย่างมีลำดับ (1:32) ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* (80-100 %) และสารระเหยที่แบคทีเรียผลิตขึ้นยับยั้งได้ 30-70% การทดสอบเมื่อใช้สารออกฤทธิ์ที่สกัดด้วยเอธานอล 80% จากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus* spp. ทั้ง 9 สายพันธุ์ พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ 155 แสดงประสิทธิภาพได้สูงสุดมีค่า  $EC_{50}$  ต่อการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์เชื้อรา *P. digitatum* เท่ากับ 77.26 และ 81.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารปฏิชีวนะที่แยกออกจากสารสกัดหยาบ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบางแบบเตรียมโดยใช้  $CHCl_3/MeOH/H_2O$  (65:25:4, ปริมาตร/ปริมาตร) สารในแถบที่มี  $R_f$  เท่ากับ 0.14, 0.19, 0.28, 0.49 และ 0.58 ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ชัดเจน โดยมี  $EC_{50}$  คือ 95.73, 14.07, 15.19, 108.59 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สารออกฤทธิ์โปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* 155 หลังจากตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80% มีค่า  $EC_{50}$  เป็น 288 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารออกฤทธิ์โปรตีนที่แยกได้จากแถบเจล เมื่อทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ เฉพาะจากแถบที่ 15 ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ได้ชัดเจน ความรุนแรงของโรคที่เกิดจากปลุกเชื้อรา *P. digitatum* ( $10^4$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร) บนผลผิวส้ม พบได้จากอาการของโรคแสดงในวันที่ 3 และเน่าทั้งผลในวันที่ 5 การทดสอบการควบคุมโรคของเอนโดสปอร์ *B. subtilis* 155 และสารสกัดหยาบบนผลส้มด้วยกรรมวิธีต่างๆบ่งชี้ชัดเจนว่า เอนโดสปอร์แบคทีเรียที่ใส่ก่อนปลุกเชื้อรา 24 ชั่วโมงสามารถยับยั้งการแสดงอาการของโรคได้ดี (99.70%) ในวันที่ 8 ส่วนสารสกัดหยาบ (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดเมื่อใส่พร้อมเชื้อราโดยยับยั้งอาการแสดงของโรคใน 5 วัน เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแผลที่พบบนผลส้มที่ปลุกเชื้อรา ร่วมกับเอนโดสปอร์แบคทีเรีย สารสกัดหยาบ หรือสารกำจัดเชื้อราอิมาซาลิล แตกต่างจากขนาดแผลที่พบในชุดควบคุมที่เกิดโรคอย่างมีนัยสำคัญ

**Thesis Title** Growth Inhibitory Properties of *Bacillus subtilis* Strains and Their Metabolites Against the Green Mold Pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of Citrus

**Author** Miss Panpen Hemmanee

**Major Program** Biochemistry

**Academic Year** 2006

### ABSTRACT

Twenty three strains of *Bacillus* spp. screened from 205 isolated of soil bacteria showed antagonistic activities towards *Penicillium digitatum* pathogen, a cause fruit rot disease of citrus. Culture supernatants obtained from 9 strains of *Bacillus* spp. caused 80-100 % inhibition of *P. digitatum* growth when they were serially diluted to 1:32. Volatile compounds produced by these strains also caused 30-70% inhibition of fungal growth. An ethanol extract from *B. subtilis* 155 culture supernatant produced the biggest inhibitory effect on mycelial growth and spore germination of the fungus with EC<sub>50</sub> at 77.26 and 83.35 µg/ml, respectively. Inhibitory compounds obtained from preparative thin layer chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O: 65/25/4, v/v) of the ethanol extract had R<sub>f</sub> values of 0.14, 0.19, 0.28, 0.49, and 0.58 with EC<sub>50</sub> value 95.73, 14.07, 15.19, 108.59 and 100 µg/ml, respectively. Protein precipitated with 80 % saturated ammonium sulfate, from the culture supernatant, had an EC<sub>50</sub> of 288 µg/ml. The antifungal protein activity was detected in bands 15 after native-polyacrylamide gel electrophoresis. Inoculation of a *P. digitatum* spore suspension (10<sup>4</sup> spores/ml) onto wounded citrus fruit induced disease symptoms at day 3 and decayed at day 5. To study the efficacy of *B. subtilis* 155 in controlling citrus fruit rot, various treatments, including inoculation with endospores and treatment with ethanol extracts were carried out. Inoculation with *B. subtilis* endospores 24 h prior to fungal spores inoculation decreased disease incidences by 99.70%, while addition of 10 mg/ml of the ethanol extract, together with the fungus, produced complete disease suppression within 5 days after inoculation. Average lesion diameters observed from those treatments with bacterial endospores, crude extract and imazalil were significant different from the size of wounds in the control set treated only with fungal spores.