GROWTH SUPPRESSION OF PHYTOPATOGENIC FUNGI BY ANTIFUNGAL METABOLITES FROM ANTAGONISTIC BACTERIA

ANYARAT KAEWCHAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL MANAGEMENT)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยสารเมแทบอไลท์ต่อต้านราที่สร้างจากแบคทีเรียปฏิปักษ์

(GROWTH SUPPRESSION OF PHYTOPATOGENIC FUNGI BY ANTIFUNGAL METABOLITES FROM ANTAGONISTIC BACTERIA)

อัญรัตน์ แก้วชัย 4837298 ENTM/M

วท. ม. (เทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เบญจภรณ์ ประภักดี D.Tech.Sc. (ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY TECHNOLOGY AND MANAGEMENT),
อัจฉราพร ขำโสภา Ph.D. (BIOLOGY),
พัชราภรณ์ ศิวายพราหมณ์ Ph.D. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCE)

บทคัดย่อ

เชื้อราที่ก่อโรคในพืชเป็นศัตรูพืชตัวสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อพืชเศรษฐกิจทั่วโลก ดังนั้นวิธีที่ใช้ในการควบคุมโรคจึงมีหลายวิธี แต่วิธีที่มีประสิทธิภาพ ปลอดภัย ควบคุมโรคได้ระยะเวลานาน และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม คือการนำวิถีทางธรรมชาติเข้ามาควบคุม ซึ่งหนึ่งในวิถีทางธรรมชาติที่ใช้ คือ การนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านศัตรูพืชมาใช้ในการควบคุม ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Collectotrichum gloeosporioides* และ *Sclerotium rolfsii* โดยคัดแยกจากน้ำหมักชีวภาพและของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล และนอกจากนั้นยังศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารเคมีที่แบคทีเรียผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา แบคทีเรีย 143 สายพันธุ์ ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำหมักชีวภาพและของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล ได้นำไปทดสอบเพื่อหาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Collectotrichum gloeosporioides* และ *Sclerotium rolfsii* ด้วยวิธีการปลูกเลี้ยงเชื้อคู่ พบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ จำนวน 3 สายพันธุ์ จากนั้นจึงนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ SSCHC4, EMC4 และ SSE4 ไปวิเคราะห์เพื่อระบุสายพันธุ์ด้วยวิธีการจับคู่ลำดับเบส จากการวิเคราะห์พบว่า แบคทีเรียรหัส SSCHC4 มีความคล้ายคลึงกับ *Aeromonas salmonicida* ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในตระกูลปลาแซลมอนจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการใช้ในการควบคุมโรคพืชจึงไม่ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพต่อไป แต่ในส่วนของแบคทีเรียรหัส EMC4 และ SSE4 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* จึงได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารซึ่งแบคทีเรียผลิตขึ้นตามธรรมชาติเพื่อใช้ในยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ณ ช่วงระยะที่มีอัตราการเพิ่มของจำนวนประชากรของแบคทีเรีย และช่วงระยะที่อัตราการเจริญเติบโตของประชากรคงที่ ด้วยวิธีเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่า สารที่ผลิตขึ้นในช่วงอัตราการเพิ่มของประชากรคงที่ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของราได้ทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการเจริญเติบโตของเชื้อราโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (PDA) ซึ่งมีส่วนผสมของสารที่แบคทีเรียผลิตขึ้นต่อเชื้อราทั้ง 2 ชนิด พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไปคือ เกิดการบวม การบิดเบี้ยวของเส้นใย การรวมตัวของไซโต พลาสซึมในเส้นใย และการแตกหักบริเวณรอยแยกของแขนง จากนั้นจึงได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงกระบวนการที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยการนำสารที่แบคทีเรียผลิตขึ้นทั้ง 2 ช่วงเวลา ไปทำลายประสิทธิภาพด้วยความร้อน โดยการต้มด้วยน้ำเดือดเป็นเวลา 45 นาที และเอนไซม์โปรตีนเนส พบว่าเมื่อนำสารเคมีที่ผ่านกระบวนข้างต้นไปทดสอบแล้วไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด จึงสรุปได้ว่า *B. subtilis* SSE4 และ *B. subtilis* EMC4 ใช้กลไกในการสร้างสารเคมีขึ้นเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรา จากการทดลองข้างต้นจึงสามารถนำแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. subtilis* SSE4 and *B. subtilis* EMC4 ไปใช้ในการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางธรรมชาติได้

142 หน้า

Copyright by Mahidol University

GROWTH SUPPRESSION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI BY ANTIFUNGAL METABOLITES FROM ANTAGONISTIC BACTERIA

ANYARAT KAEWCHAI 4837298 ENTM/M

M.Sc. (TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL MANAGEMENT)

THESIS ADVISORS: BENJAPHORN PRAPAGDEE, D.Tech.Sc. (ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY TECHNOLOGY AND MANAGEMENT), ACHARAPORN KUMSOPA, Ph.D. (BIOLOGY), PATCHARAPORN SIVAYAPHARM, Ph.D. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCE)

ABSTRACT

Phytopathogenic fungi are important problems in agricultural cultivation worldwide. The use of bacterial antagonists for biological control is an important environmentally friendly strategy for controlling phytopathogens. Thus, this study was focused on the isolation and screening of the potential bacterial antagonists from fermented bioextract (FBE) and shrimp shells. Antagonism of isolated bacteria to inhibit the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Sclerotium rolfsii* were investigated. Moreover, the efficiency of extracellular antifungal metabolites produced by the selected bacterial antagonists on the fungal growth inhibition and mycelial morphology was also investigated.

A total of 143 bacteria isolated from FBE and shrimp shells were screened for *in vitro* antagonism toward *C. gloeosporioides* and *S. rolfsii* by dual culture technique. The results found that 3 potent antagonistic bacteria, designated SSCHC4, EMC4 and SSE4, showed the high levels of mycelial growth inhibition to both fungi. These 3 bacterial strains were selected and identified by partial 16S rDNA sequence analysis. The strain SSCHC4 showed a high similarity to *Aeromonas salmonicida* while strain SSE4 and EMC4 showed a high similarity to *Bacillus subtilis*. Unfortunately, *A. salmonicida* causes disease in fish, thus it was unsafe to use as biocontrol agent. Cell-free culture filtrates collected from both the exponential and stationary phases of *B. subtilis* SSE4 and *B. subtilis* EMC4 inhibited the growth of both fungi, indicating that growth suppression was associated with the presence of antifungal metabolites in the culture filtrates. Stationary culture filtrate of both antagonists inhibited the submerged growth of *C. gloeosporioides* and *S. rolfsii* better than exponential culture filtrate. Additionally, morphological changes such as hyphal swelling, cytoplasm aggregation and distortion were observed in fungi grown on PDA that contained the culture filtrates. There was no significant decrease in the percentage of fungal growth inhibition by exponential and stationary culture filtrates after boiling for 45 min or treatment with proteinase K. It could be concluded that thermostable antifungal compounds in the culture filtrate of *B. subtilis* SSE4 and *B. subtilis* EMC4 play an important role in the growth suppression of *C. gloeosporioides* and *S. rolfsii*. This finding might lead to the use of both bacterial antagonists for biological control of fungal plant pathogens.

KEY WORDS: ANTIFUNGAL METABOLITES/ ANTAGONICTIC BACTERIA PHYTOPATHOGENIC FUNGI

142 pp.

Copyright by Mahidol University