ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *SCLEROTIUM ROLFSII* BY ANTAGONISTIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM SOIL AND *DENDROBIUM* ORCHID

CHUTIMA KUEKULVONG

A THESIS SUBMITTED IN PERTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(APPROPRIATE TECHNOLOGY FOR RESOURCES
AND ENVIRONMENTAL DEVELOPMENT)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

การต่อต้านเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดแยกจากดินและกล้วยไม้สกุลหวาย
(ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *SCLEROTIUM ROLFSII* BY ANTAGONISTIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM SOIL AND *DENDROBIUM* ORCHID)

ชุติมา เกื้อกูลวงศ์ 4837324 ENAT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : เบญจภรณ์ ประภักดี D.Tech.Sc (ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY, TECHNOLOGY AND MANAGEMENT), อัจฉราพร ขำโสภา Ph.D. (BIOLOGY), กรรณิการ์ ดวงมาลย์ Ph.D. (MICROBIOLOGY)

บทคัดย่อ

Sclerotium rolfsii เป็นราที่พบในดินและเป็นสาเหตุของโรคเน่าแห้งในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะต้นกล้วยไม้ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *S. rolfsii* จากกล้วยไม้และดิน โดยการศึกษาเริ่มจากการแยกแบคทีเรียจากส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ และแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณสวนกล้วยไม้ รวมถึงดินบริเวณรอบรากข้าว ต่อจากนั้นนำทุกไอโซเลทที่แยกได้มาทดสอบการปฏิปักษ์ต่อรา *S. rolfsii* โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (dual culture) คัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งรา *S. rolfsii* มาตรวจวัดการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและกลูคาเนส สุดท้ายประเมินศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกต่อการเจริญเติบโตของรา *S. rolfsii*

จากการศึกษา พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ 201 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 146 ไอโซเลท จากการทดสอบการปฏิปักษ์ต่อรา *S. rolfsii* โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกัน พบว่าสายพันธุ์ NBR41 ซึ่งระบุเชื้อว่าเป็น *Pseudomonas* sp. และสายพันธุ์ SRA14 ซึ่งระบุเชื้อว่าเป็น *Streptomyces* sp. มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งรา *S. rolfsii* จากการตรวจวัดการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและกลูคาเนส พบว่าทั้งสองสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสและกลูคาเนสในระยะ exponential น้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์ NBR41 และ SRA14 ในระยะ exponential และ stationary สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตในอาหารเหลวของรา *S. rolfsii* น้ำเลี้ยงเชื้อจากทั้งสองสายพันธุ์ในระยะ stationary มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *S. rolfsii* สูงกว่าในระยะ exponential อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของรา *S. rolfsii* ประกอบด้วย การบวม และรูปร่างเปลี่ยนไป อย่างไรก็ตาม เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อในระยะ exponential ของทั้งสองสายพันธุ์ไปต้มเป็นเวลา 45 นาที กับการเติมเอนไซม์โปรติเนส เค พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งรา *S. rolfsii* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในทางกลับกัน น้ำเลี้ยงเชื้อของทั้งสองสายพันธุ์ในระยะ stationary พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษา แสดงให้เห็นว่า น้ำเลี้ยงเชื้อในระยะ exponential ประกอบด้วยเอนไซม์ไคติเนสและกลูคาเนส ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อของทั้งสองสายพันธุ์ในระยะ stationary มีองค์ประกอบของสารที่ทนความร้อนและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *S. rolfsii*

118 หน้า.

Copyright by Mahidol University

ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *SCLEROTIUM ROLFSII* BY ANTAGONISTIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM SOIL AND *DENDROBIUM* ORCHID

CHUTIMA KUEKULVONG 4837324 ENAT/M

M.Sc. (APPROPRIATE TECHNOLOGY FOR RESOURCES AND ENVIRONMENTAL DEVELOPMENT)

THESIS ADVISORS: BENJAPHORN PRAPAGDEE, D.Tech.Sc (ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY, TECHNOLOGY AND MANAGEMENT), ACHARAPHORN KUMSOPA, Ph.D. (BIOLOGY), KANNIKA DUANGMAL, Ph.D. (MICROBIOLOGY)

ABSTRACT

Sclerotium rolfsii, a soil-borne fungal pathogen, causes Sclerotium wilt disease on a wide range of agricultural crops, particularly *Dendrobium* orchid, resulting in yield loss. The *Dendrobium* orchid is an important economic plant in Thailand. To reduce or substitute agricultural chemical fungicides, the aim of this study was isolation and screening of the antagonistic microorganisms from soil and the *Dendrobium* orchid with a high potential for inhibiting the growth of *S. rolfsii*. Firstly, bacteria were isolated from parts of *Dendrobium* orchid. Actinomycetes were isolated from the soil in orchid gardens and rhizosphere soil in paddy fields. Then, all of the isolated microorganisms were tested for antagonistic activity toward *S. rolfsii* by the dual culture technique. Potent antagonists were determined by the levels of chitinolytic and β-1,3-glucanolytic activities. Finally, extracellular antifungal metabolites produced by selected antagonists were evaluated for antifungal potential toward *S. rolfsii*.

The 201 bacterial and 146 actinomycete strains were isolated. The potent antagonists against *S. rolfsii*, designated strain NBR41 and SRA14, were selected and identified as *Pseudomonas* sp. and *Streptomyces* sp., respectively. *Pseudomonas* sp. NBR41 and *Streptomyces* sp. SRA14 produced both extracellular chitinase and β-1,3-glucanase enzymes during the exponential phase. Cell-free culture filtrates collected from the exponential and stationary phases of both *Pseudomonas* sp. NBR41 and *Streptomyces* sp. SRA14 inhibited the growth of *S. rolfsii*, indicating that growth suppression was due to extracellular antifungal metabolites present in the culture filtrates. The percentages of fungal growth inhibition by the stationary-culture filtrates of both antagonist strains were significantly higher than those of exponential-culture filtrates. Additionally, morphological changes such as hyphal swelling and abnormal shapes of *S. rolfsii* were observed in potato dextrose agar that contained the culture filtrates. However, the antifungal activity of exponential-culture filtrate of *Pseudomonas* sp. NBR41 and *Streptomyces* sp. SRA14 toward *S. rolfsii* were significantly reduced after boiling for 45 min or after treatment with 10 μg/ml proteinase K. There were no significant decreases in the percentages of fungal growth inhibition by the stationary-culture filtrates of strain NBR41 and SRA14 after treatment as above. These data indicate that the antifungal potential of the exponential-culture filtrates was related to the activities of both extracellular chitinase and β-1,3-glucanase enzymes, whereas the antifungal activity of the stationary-culture filtrate was involved in the action of unknown thermostable antifungal compound(s).

KEY WORDS : *SCLEROTIUM ROLFSII* / ANTAGONISM / *DENDROBIUM* / CHITINASE / β-1,3 GLUCANASE

118 pp.

Copyright by Mahidol University