การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืช

CONTROLLING OF PLANT PATHOGENIC FUNGI BY BIOACTIVE COMPOUNDS FROM BLUE-GREEN ALGAE

อภินันทนาการ
ห้องสมุดคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2540

วน
ส393ก
2540
ค.1

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืช
ผู้วิจัย	สวรส ดำริชอบ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	รุ่งจรัส ทุตะเจริญ วท.ม. อาภารัตน์ มหาขันธ์ Ph.D. เตือนใจ บุญ-หลง Ph.D. วิทยา ศรีมโนภาษ D. Sc.
วันที่สำเร็จการศึกษา	8 พฤษภาคม พ.ศ. 2540

บทคัดย่อ

นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 11 สกุล 61 สายพันธุ์มาแยกและคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านเชื้อราโรคพืช 5 สายพันธุ์ โดยนำสารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่นทดสอบ (paper disc) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาทดสอบกับเชื้อราด้วยวิธี paper disc plate พบว่าสาหร่ายที่สามารถยับยั้งเชื้อรามี 13 สายพันธุ์ โดยสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง รวมทั้งเชื้อรา *Bipolaris maydis* *Fusarium oxysporum* และ *Macrophomina phaseolina*

เมื่อนำสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 มาเลี้ยงในอาหาร BGA ที่ดัดแปลงโดยการเติมโซเดียมไนเตรต 1.5 กรัมต่อลิตร ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.03 กรัมต่อลิตร และ pH เริ่มต้น 7.0 ปริมาตร 10 ลิตร ที่บรรจุอยู่ในถังคาร์บอยขนาด 12 ลิตร พ่น 5% คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 60 $\mu E/m^2/s$ พบว่า สาหร่ายมีน้ำหนักสดของเซลล์ 2.05 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักสดของสารสกัด 1 กรัมเซลล์ต่อลิตร ให้ปริมาณสารสกัด 28 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดกับสารมาตรฐาน cycloheximide พบว่าสารสกัด 100 มิลลิกรัม มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 43.9 มิลลิกรัม

เมื่อนำสารสกัดจากสาหร่าย *Calothrix* sp. TISTR 8913 มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา

Copyright by Mahidol University

C. truncatum บนเมล็ดถั่วเหลืองในจานเลี้ยงเชื้อ พบว่าสารสกัดในรูปแบบที่ผสมสารลดแรงตึงผิว ความเข้มข้น 700 ไมโครกรัมต่อเมล็ดขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เทียบเท่าสารเคมีแมนโคเซบที่อัตราแนะนำคือ 400 ไมโครกรัมต่อเมล็ด และเมื่อนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *C. truncatum* ในระดับถุงเพาะกล้า พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนถั่วเหลืองที่มีการปลูกเชื้อราแบบหยดเชื้อลงบนเมล็ด (dipping method) ได้ดีเทียบเท่าสารเคมีแมนโคเซบ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีความคงตัวที่ pH 4 ถึง 9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีความคงตัวมากกว่า 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 และ 70 องศาเซลเซียส คงตัวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และคงตัวที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และจากการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปน โดยวิธีทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนคือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ อัตรา 7 : 3 : 1 โดยตำแหน่งของสารออกฤทธิ์อยู่ที่ค่า R_f 0.61 และ 0.65 และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับ ninhydrin reaction, biuret reaction, Molisch's test, anthrone test และ unsaturation test เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอาจเป็นสารโมเลกุลใหญ่ มีโครงสร้างที่ซับซ้อน ไม่สามารถทำลายพันธะด้วยวิธีการเหล่านี้ได้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Controlling of Plant Pathogenic Fungi by Bioactive Compounds from Blue-green Algae
Name	Swaros Dumrichob
Degree	Master of Science (Technology of Environmental Management)

Thesis Supervisory Committee

Rungjarat Hutacharoen M.Sc.

Aparat Mahakhant Ph.D.

Tuanchai Boon-Long Ph.D.

Vithya Srimanobhas D.Sc.

Date of Graduation 8 May B.E. 2540 (1997)

ABSTRACT

Each of 20 µl of 1,000 µg/disc of extract from 11 genera 161 isolates of nitrogen-fixing blue-green algae (BGA) was applied on paper disc to screen for the antifungal activities against 5 isolates of plant pathogenic fungi. The activities were shown in 13 isolates of BGA. *Calothrix* sp. TISTR 8913 was chosen for further study due to its highest inhibition activity against *Colletotrichum truncatum*, the soybean pathogen causing soybean anthracnose disease, *Bipolaris maydis*, *Fusarium oxysporum* and *Macrophomina phaseolina*.

Calothrix sp. TISTR 8913 incubated at 30 °C for 17 days in a 12-L carboy containing of 10-L modified BGA medium by the addition of $NaNO_3$ 1.5 g/l, and increase of K_2HPO_4 to 1.5 g/l, reduction of NaCl to 0.03 g/l with the initial pH of 7.0. The cultures were sparged with 5% CO_2 in air at flow rate of approximately 1,000 ml/min under the light intensity of 60 µE/m^2/s. The biomass obtained was 2.05 g/l and 1 g of fresh cells gave 28 mg of the extract. The specific activity of crude extract 100 mg was equivalent to 49.3 mg-cycloheximide.

Copyright by Mahidol University

The effect of algal extract on the infection of *C. truncatum* on soybean seeds (in petridish) by crude algal extract formulated with surfactant (0.1% Tween 20) at the concentration of 700 µg/seed could inhibit the growth of *C. truncatum* as that of the commercial fungicide, mancozeb at the dose of 400 µg/seed. In the pot experiment, the crude algal extract with this formulation and concentration could inhibit the fungal infection that inoculated by dipping method at the same level as mancozeb.

The bioactive compounds were stable when treated at 50 and 70 $^{\circ}$C for more than 2 h, stable at 100 $^{\circ}$C for 60 min, stable at 121 $^{\circ}$C for 45 min and stable at pH 4-9 at 4 $^{\circ}$C for 24 h. Purification of bioactive compounds by developing of silica gel thin layer chromatography in the solvent system of $CHCl_3$: CH_3OH : H_2O at the ratio of 7:3:1 showed the bioactive compounds by two spots with R_f value of 0.61 and 0.65. The negative result from ninhydrin reaction, biuret reaction, Molisch's test, anthrone test, unsaturation test and protease, amylase, lipase inhibition indicated that these bioactive compounds may be a big molecule with a complicate chemical structure.

Copyright by Mahidol University