ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การควบคุมเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี

ชื่อผู้เขียน นางสาวกาญจนา นิรภัย

หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกชัย ชูเกียรติโรจน์ ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุราภรณ์ สอาดสุด กรรมการ

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยได้ทำการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* จากแหล่งธรรมชาติสามแหล่งคือ ถั่วเน่า ดินบริเวณรากพืชสมุนไพร และ ผิวของผลลำไย ทั้งหมด 284 ไอโซเลท จากการทดสอบขั้นต้นโดยใช้เทคนิค dual culture test พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 43 ไอโซเลท โดยมีร้อยละของการยับยั้งอยู่ระหว่าง 25.0 - 67.5 และเมื่อนำมาทดสอบซ้ำโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหาร nutrient broth (37°C, pH 7) แล้วทำการปั่นแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ที่แยกมาจากผลลำไย พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญลดลงและบางไอโซเลทไม่เกิดการยับยั้งโดยมีร้อยละของการยับยั้งอยู่ระหว่าง 0.0 - 52.4 จากการสังเกตพบว่าการยับยั้งของเชื้อปฏิปักษ์เกิดขึ้นจากเซลล์ของแบคทีเรียที่ยังเหลืออยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองพบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งเกิดขึ้นได้จากการสร้างสาร antifungal compounds ของเซลล์แบคทีเรียบนอาหารแข็ง คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสูงที่สุด คือ TN79, RS5 และ CMU2 มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ ค่า pH 7

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ตัวแทนจากสามแหล่งจำนวน 3 ไอโซเลทคือ RS5, TN79 และ CMU2 บนอาหารแข็งเป็นเวลาอย่างน้อยสองอาทิตย์ จากนั้นสกัดสาร secondary

metabolite ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อราโดยใช้สารสกัดหยาบดังกล่าว พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 31.82 - 37.60 และยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 50.85 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า มีความเสถียรต่อ proteinase K (1 mg/ml) แสงอัลตราไวโอเลต (254 นาโนเมตร) อุณหภูมิในช่วงกว้าง (37 - 80 องศาเซลเซียส) แต่ไม่สามารถรักษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เมื่อนำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclaving) นอกจากนี้แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสามไอโซเลท และสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์อื่นได้อีกสี่สายพันธุ์ คือ LP1, LP2, LG2 และ Type strain1120 และจากการวิเคราะห์สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทด้วยเครื่องมือ GC-MS สามารถแยกสารประกอบออกได้มากกว่าห้าสิบชนิด โดยสามารถยืนยันชนิดและระบุชื่อสารได้แน่นอนถึงร้อยละ 99 สองชนิดคือ Octadec-9-enoic acid และ trans-Oleic acid ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทกรดไขมันไม่อิ่มตัว อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกสารบริสุทธิ์มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้

จากการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 ด้วยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี ทดสอบด้วยชุดทดสอบแบคทีเรีย API 50 CHB/E kits (bioMérieux) และ BLAST search โดยใช้ลำดับของ 16S rRNA gene พบว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีความใกล้เคียงกับ *B. amyloliquefaciens* มากที่สุดที่ร้อยละ 99.9 ส่วนแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 และ CMU2 นั้น เมื่อดูจากผลการ BLAST จะเห็นได้ว่ามีความใกล้เคียงกับ *B. subtilis* มากถึงร้อยละ 96.17 และ 99.6 ตามลำดับ

คำสำคัญ : *Lasiodiplodia* spp./ แบคทีเรียปฏิปักษ์/ การควบคุมโดยชีววิธี/ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

Thesis Title Biocontrol of *Lasiodiplodia* spp., the Fungal Causative Agents of Postharvest Diseases

Author Miss Kanjana Niraphai

Degree Master of Science (Biotechnology)

Supervisory Committee Asst. Prof. Dr. Ekachai Chukeatirote Chairperson

Asst. Prof. Dr. Uraporn Sardsud Member

ABSTRACT

A total of 284 bacterial isolates were screened from *thua nao*, rhizosphere soil and surface of Longan fruit to test for their antagonistic ability against *Lasiodiplodia theobromae*. Of these, 43 strains of bacteria were capable of inhibiting mycelium growth (25 - 67.5%) by using dual culture plate test. The antagonistic activity of 43 strains was further tested by using supernatant collected from nutrient broth culture of bacteria (pH 7, 37°C). Interestingly, only the culture supernatants that still had bacterial cells were able to inhibit mycelial growth of the fungal strain (0 - 52.4%) In addition, it was showed that the filter-sterilized culture supernatants could not inhibit the fungal mycelium. Due to superior inhibitory activity, the bacteria strains TN79, RS5 and CMU2 were selected for further study. For optimal condition, it was found that pH 7 and 37°C were the most effective condition.

Subsequently, the antifungal compounds of TN79, RS5 and CMU2 were extracted from the 2-week nutrient agar culture using phosphate buffer pH 7.0. The extracts could inhibit mycelial growth of *L. theobromae* CMUL (31.82 - 37.60%) and other strains including LP1, LP2, LG2 and type strain No.1120 (17.39 - 33.33%). Besides, the extracts also affected conidial germination of *L. theobromae* CMUL up to 50.85% (RS5). The extracts remained active when exposed to UV light (254 nm) up to 1 hour and to proteinase K (1mg/ml). In addition, the extracts

were active over a wide range of pH (6 - 9) and temperature (37 - 80°C). However, autoclaving treatment (121°C, 15 min) completely destroyed the antifungal activity. When analyzed by GC-MS, total ion chromatogram showed more than 50 compounds for each strain and only two unsaturated fatty acids, octadec-9-enoic acid and trans-oleic acid, from 9 compounds were in agreement based on the level of acceptation quality value at 99%.

For bacterial identification, based on bacterial morphological characteristic, biochemical characteristic and API 50 CH kit, TN79, RS5 and CMU2 were identified as *Bacillus subtilis* / *B. amyloliquefaciens*. Based on BLAST search of 16S rRNA genes sequencing, TN79 was closely related to *B. amyloliquefaciens* (99.90%). RS5 and CMU2 were most closely related to *B. subtilis* (96. 17 and 99.6%)

Keywords : *Lasiodiplodia* spp./ antagonistic bacteria/ biocontrol/ antifungal compounds.