ผลยับยั้งของสารต้าน *Penicillium digitatum* จาก *Bacillus subtilis* PP10

Inhibitory Effect of Anti-*Penicilluim digitatum* substances from *Bacillus subtilis* PP10

พันธ์ทิพย์ โอฬารรัตน์มณี [1]สิริพร บุญทิวา [2]นพกาญจน์ รัตนกิจ [3]และ อภิญญา ผลิโกมล [1]

Phanthip Olanratmanee[1], Siriporn Boontiwa[1], Thida Sripuan[2], Nopakarn Rattanakit[3] and Abhinya Plikomol[1]

Abstract

This research was conducted to increase the value of shrimp shell waste and cope with the environmental problem through production of anti- *Penicillium digitatum* substances. Infection by *P.digitatum* is the main problem of orange postharvest. A total seventy microbial isolates were screened from Japanese natto, Thai fermented soybean and stock cultures.Those isolates were maintained on an agar medium containing shrimp shell waste and examined by spot test and cylinder plate methods for the inhibitory effect on *P.digitatum*. Bacterial isolates PP10 from dried Thai fermented soybean, showed the highest inhibitory effect in chitin broth . Its morphological, biochemical and 16S rRNA analysis indicated that this organism is *Bacillus subtilis* and thermotolerant. The most suitable condition was cultured in chitin broth, pH 7.0 in 125 ml Erlenmeyer flask supplemented with 10 % glucose. The medium was inoculated with 0.5 ml of the starter inoculum, which had a concentration equal to McFarland No. 3, and was inoculated at 37 °C for 2 days. It was found that the filtrate from this condition could inhibit *P.digitatum* 83 %. The exochitinase was 0.0031 U/ml; specific activity was 0.016 U/mg protein. The inhibitory effect for the germination of *P.digitatum* spores was 63 % after incubation at 25 °C for 24 hours.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการเพิ่มมูลค่าของเปลือกกุ้งวัสดุเหลือทิ้งและยังเป็นการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมโดยใช้เปลือกกุ้งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อนำไปผลิตสารยับยั้ง *Penicillium digitatum* ซึ่งเป็นปัญหาการติดเชื้อราของส้มหลังเก็บเกี่ยว จากการคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ จำนวน 70 ไอโซเลท โดยวิธี spot test และ cylinder plate พบว่าไอโซเลต PP10 ที่แยกจากถั่วเน่าแผ่นสามารถยับยั้ง *P.digitatum* ได้ดีที่สุด เมื่อเจริญใน chitin broth และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และการทดสอบโดย 16S rRNA พบว่าไอโซเลต PP10 เป็น *Bacillus subtilis* ที่ทนอุณหภูมิสูง และจากการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งพบว่า *B.subtilis* PP10 สามารถผลิตสารยับยั้งได้ดีที่สุดเมื่อใช้ความขุ่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland หมายเลข 3 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพาะลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร chitin broth, pH 7.0 เติมน้ำตาลกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2 วัน ให้ค่าการยับยั้ง 83 % จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อพบว่า น้ำกรองเลี้ยงเชื้อมีค่า exochitinase 0.0031 U/ml, specific activity 0.016 U/mg protein เมื่อนำน้ำกรองมาทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ พบว่า น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* PP10 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *P.digitatum* ได้ 63 % เมื่อนำไปบ่มที่ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

คำนำ

ความเสียหายหลังการเก็บเกี่ยวของส้มซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศมักเกิดจากเชื้อรา เช่น *Penicilium digitatum* เป็นส่วนใหญ่ เกษตรกรมักแก้ปัญหาโดยใช้ยาฆ่าเชื้อรา ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพต่อผู้ใช้และผู้บริโภค ตลอดจนปัญหาสิ่งแวดล้อม การควบคุมเชื้อราก่อโรค โดยชีววิธีจึงเป็นทางเลือกที่ดีกว่า

เปลือกกุ้งซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอาหารทะเลและภัตราคารร้านอาหาร อาจนำมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างสารยับยั้งการเติบโตของเชื้อราก่อโรคได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถเติบโตในอาหารที่มีเปลือกกุ้งเป็นองค์ประกอบ และผลิตสารยับยั้งการเติบโตของ *P. digitatum*

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถเติบโตบนอาหารที่มีไคตินจากเปลือกกุ้ง และยับยั้งการเติบโตของ *Penicilium digitatum* ได้ จากแหล่งต่างๆ เช่น ผลไม้ ถั่วเน่าสด ถั่วเน่าแห้ง ถั่วเน่าญี่ปุ่น (นัตโต๊ะ) และเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ที่สามารถเติบโตในอาหารที่มีเปลือกกุ้งเป็นส่วนประกอบ [chitin agar : $(NH_4)_2SO_4$ 0.5, KH_2PO_4 0.5, $MgSO_4$. $7H_2O$ 0.5, Na_2HPO_4 0.5, $NaNO_3$ 3.0, Yeast extract 1.0, agar 20 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมแล้วเติมเปลือกกุ้ง 10 กรัม ปรับ pH เท่ากับ 7 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที]

1.1 ทดสอบการยับยั้งการเติบโตของ *P.digitatum* โดยวิธี spot test

1.2 ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อในอาหาร chitin broth โดยวิธี cylinder plate

นำแบคทีเรียไอโซเลต PP10 และ PP11 ที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดจากข้อ 1.1 มาเลี้ยงใน chitin broth แล้วทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของ *P.digitatum* โดยวิธี cylinder plate

2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้ง *P.digitatum* ของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย PP10 และ PP11 ที่เพาะใน chitin broth และอาหารเปลือกกุ้ง

นำเชื้อแบคทีเรีย PP10 และ PP11 มาเพาะในอาหารเปลือกกุ้งบดหนัก 5 กรัม เติม chitin broth 15 มิลลิลิตร เพาะเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ cell suspension ที่มีความขุ่นของเซลล์เท่ากับ Mc Farland No. 0.5 ปริมตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 °C ทดสอบการยับยั้งการเติบโตของ *P.digitatum* โดยวิธี poisonous food (Wannissorn. *et. al*.,1996) โดยใช้อาหารเปลือกกุ้งที่เติม 0.1 M phosphase buffer pH 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นชุดควบคุม

เปอร์เซนต์การยับยั้ง = [(C-E)/C] x 100

C = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของชุดควบคุม

E = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของชุดทดสอบ

3. หาค่า exochitinase activity ของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อใน chitin broth และเลี้ยงในอาหารเปลือกกุ้ง

โดยวิธีของ Bernfeld, (1955) โดยใช้ colloidal chitin เป็นซับสเตรท ใช้ 0.1 M acetate buffer, pH 5.0

4. การศึกษาลักษณะบางประการ และการบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียไอโซเลต PP-10

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียไอโซเลต PP10 รวมทั้งการเปรียบเทียบ 16S rRNA ที่ได้รับการอนุเคราะห์จากนางสาวศิริลักษณ์ สันพา ในห้องปฏิบัติการของ Professor Motoki Kubo มหาวิทยาลัย Ritsumeikan ประเทศญี่ปุ่น

5. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง

5.1 หาชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบอาหารเหลว 4 ชนิด ได้แก่ nutrient broth, chitin broth, basal medium ที่มีเปลือกกุ้ง 1 % และ enzyme production medium (EPM) ที่มีเปลือกกุ้ง 1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับ pH ของอาหารเท่ากับ7

5.2 หาปริมาณเชื้อตั้งต้น (inoculum) ที่เหมาะสมทำ cell suspension โดยใช้ที่ความเข้มข้นเทียบกับ McFarland หมายเลข0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใน chitin broth, pH 7 (ที่คัดเลือกได้จากข้อ1)

5.3 หาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต โดยใช้เชื้อตั้งต้นที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No 3 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใน chitin broth, pH 7 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 25 °C 30 ,°C 37 ,°C และ 45 °C เป็นเวลา 4 วัน

4.5 หา pH ที่เหมาะสม โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ4 , 5, 6, 7 และ8

5.5 หาระยะเวลาที่เหมาะสม โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา0 , 2, 3, 4 และ 5 วัน

5.6 หาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Plackett and Berman designs แหล่งไนโตรเจนที่ทดสอบได้แก่ peptone, $(NH_4)_2SO_4$, Urea, corn steep liquor, yeast extract และ $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)

6. หาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Plackett and Berman designs แหล่งคาร์บอนที่ทดสอบได้แก่ glucose, maltose, sorbitol, sucrose, fructose และ soluble starch ความเข้มข้น 1 %

7. ทดสอบผลของสารยับยั้งจากไอโซเลต PP10 ที่มีต่อลักษณะทางกายภาพของ *P.digitatum* โดยการดูผลของสารยับยั้งต่อการงอกของสปอร์ โดยนำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต PP10 ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง มาผสมกับสปอร์ของ *P.digitatum* บ่มที่ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้อาหารที่ไม่ได้เพาะเชื้อเป็นชุดควบคุม และนำมานับจำนวนสปอร์ที่สามารถงอกได้ โดยใช้ Hemacytometer นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์

ผลการทดลอง

1. จากการคัดเลือกและการทดสอบคุณสมบัติของสารยับยั้งการเติบโตของ *P.digitatum* โดยวิธี spot test พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PP10 และ PP11 ที่แยกได้จากถั่วเน่าแผ่นให้เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสกว้างที่สุดเท่ากับ 3.2 และ 2.8 เซนติเมตร ตามลำดับ

2. การทดสอบผลการยับยั้งโดยวิธี cylinder plate พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PP10 และ PP11สามารถยับยั้ง *P.digitatum* โดยให้เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส 3.3 และ 3.0 เซนติเมตร ตามลำดับ

3. ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงใน chitin broth และอาหารที่มีเปลือกกุ้ง โดยวิธี poisonous food พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PP10 และ PP11 ที่เลี้ยงใน chitin broth เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °c ไอโซเลต PP10 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 43 % แต่เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 5 วัน ผลการยับยั้งลดลงเป็น 11 % และให้ผลดีกว่าการเลี้ยงในอาหารเปลือกกุ้ง

4. ผลการศึกษาสัณฐาน และคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PP10 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง สร้างเอนโดสปอร์ จากการเปรียบเทียบ16 S rRNA พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต PP10 มีความเหมือนกับ *B.subtilis*

5. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งของ *B. subtilis* PP10 จากการทดสอบการเติบโตและสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลว 4 ชนิด พบว่าให้ผลการยับยั้ง *P.digitatum* ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงใน chitin broth โดยยับยั้งได้ 60 % เมื่อทดสอบด้วยวิธี poisonous food ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งคือ ความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 3 อุณหภูมิที่เหมาะสมได้แก่ที่ 37 °C pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7 ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 2 วัน ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด คือ 46%ไม่ต้องมีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารก็สามารถสร้างสารยับยั้งการเติบโตของ *P.digitatum* ได้ และแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตได้แก่ glucose จากรายของ Wang *et. al* (2002) พบว่า *Monascus purpureus* CCRC 31499 สามารถผลิตสารยับยั้ง *Fusarium oxysporum* ได้ดีที่สุดเมื่อบ่มในอาหาร pH 7 เป็นเวลา 2 วันเช่นกัน และจากการศึกษาของ Yuksekdag *et. al* (2004) พบว่าการเติม glucose 2 % จะทำให้ *B.subtilis* 25 และ *B.megaterium* 12 เติบโตได้ดีด้วยการเติม sucrose, arabinose และ mannitol

6. การทดสอบผลของสารยับยั้งของ *B.subtilis* PP10 ต่อลักษณะทางกายภาพของ *P.digitatum* พบว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *B.subtilis* PP10 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *P.digitatum* ได้ 63 %

สรุป

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เติบโตในอาหารที่มีเปลือกกุ้งและสามารถสร้างสารยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *Penicilium digitatum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคส้มหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* PP10 สามารถเติบโตใน chitin broth ที่มีเปลือกกุ้ง 1 % เป็นส่วนผสม โดยให้ผลการยับยั้งการเติบโตของ *P.digitatum* 43 % และเมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งพบว่า *B.subtilis* PP10 สามารถผลิตสารยับยั้งได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงใน chitin broth, pH 7, ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่เติม 10 % glucose (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นเท่ากับ McFarland No. 3 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 °c เป็นเวลา 2 วัน โดยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้ง *P.digitatum* ได้ 60% ค่า exochitinase activity 0.0031 U/ml specific activity 0.016 U/ml

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อพบว่า น้ำกรองเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* PP10 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *P.digitatum* ได้ 63 %

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Bernfeld,1955. Amylase alpha and beta, Method in Enzymology 1, S., Colowick and N., Kaplan, Academic Press, New York, 149.

Nopakarn R., Abhinya P.; Shigekazu Y., Mamoru W., And Takashi T., Utilization of Shrimp Shellfish Waste as a Substrate for Solid-State Cultivation of *Aspergillus* sp. S 1 - 13 :Evaluation of a Culture Based on Chitinase Formation Which Is Necessary for Chitin-Assimilation. Journal of Bioscience and Bioengineering vol. 93, no. 6, 550-556.2002.

Wang. S.L., Yen, H.Y., Tsiao, W.J., Chang, W.T. and Wang, C.L. 2002. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. Enzyme and Microbial Technology 31: 312-328.

Wannison, B., P., Suyananda, P. Somchai, O. Shida and K. Komageta. 1996. Antifungal activity of Bacillus. P.9. Thailand Institute of Science and Technology Research.

Yaksekdag, Z.N., Aslim, B., Beyatli, Y. and Mercan, N. 2004. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. African Journal of Biotechnology 3: 63-66.