ผลการยับยั้งของจุลินทรีย์ที่ผลิตไคตินเนสต่อเชื้อราสาเหตุของโรคในมะม่วงและลำไย

อภิญญา ผลิโกมล ศิริลาภา สมานมิตร และเครือวัลย์ ทองเล่ม
สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

Collectotrichum gloeosporioides ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคในมะม่วง และ *Fusarium solani* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคในลำไย เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดปัญหากับผลผลิตของสวนมะม่วงและลำไยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางภาคเหนือของประเทศไทย จากจุลินทรีย์จำนวน 242 ไอโซเลท ซึ่งแยกจากตัวอย่างดิน ตัวอย่างอาหารและจากหน่วยเก็บเชื้อจุลินทรีย์, สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เจริญบนอาหารที่มีไคตินจากเปลือกกุ้ง พบว่ามี 48 ไอโซเลท เป็นเชื้อราและแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง เมื่อนำมาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับเชื้อราทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท และแอคติโนมัยซีส 2 ไอโซเลท ที่แสดงการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อ *C. gloeosporioides* และมีเชื้อรา 4 ไอโซเลท แบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ที่แสดงการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อ *F. solani* จากนั้นนำมาทดสอบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคด้วย paper disc method โดยเลี้ยงใน enzyme production medium ซึ่งมีเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($28\pm2^{\circ}C$) พบว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียไอโซเลท H11 สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *F. solani* โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้นได้ 23.2 มิลลิเมตรและ 15.7 มิลลิเมตร ตามลำดับ การบ่งบอกชนิดจากคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของไอโซเลท H11 พบว่าเป็น *Bacillus cereus*

เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งโรคบนผลมะม่วงพบว่าน้ำกรองของ *B. cereus* H11 ที่จุ่มผลมะม่วงก่อนทำการปลูกเชื้อก่อโรคมีความสามารถในการยับยั้งโรคได้ไม่แตกต่างจากการใช้สารฆ่าเชื้อรา Octave® ก่อนปลูกเชื้อแต่ดีกว่าการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ $55^{\circ}C$ ก่อนปลูกเชื้อและการใช้ cell suspension ของ *B. cereus* H11 ก่อนปลูกเชื้อ แต่ถ้าใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *B. cereus* H11 หลังจากปลูกเชื้อไปแล้วจะมีความสามารถในการยับยั้งโรคน้อยกว่าการใช้สารฆ่าเชื้อรา คะแนนทางด้านการเปลี่ยนแปลงสีผิวนั้นชุดที่จุ่มมะม่วงในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *B. cereus* H11 ก่อนปลูกเชื้อจะมีคะแนนแตกต่างจากชุดควบคุม 1 ซึ่งเป็นชุดที่ไม่มีการทำให้เกิดแผลและจุ่มในสารยับยั้งใด ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แต่จะเท่ากับชุดควบคุม 2 ซึ่งเป็นชุดที่ทำให้เกิดแผลแต่ไม่มีการจุ่มในสารยับยั้ง ในทุก ๆ ครั้งที่วัดผล

ทางด้านสีเนื้อนั้น ชุดที่จุ่มมะม่วงในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *B. cereus* H11 ทั้งก่อนและหลังปลูกเชื้อจะมีสีเนื้อต่างจากชุดควบคุม 1 แต่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม 2 และชุดที่จุ่มมะม่วงในสารต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังปลูกเชื้อ ส่วนกลิ่นนั้นทุกชุดการทดลองจะไม่มีความแตกต่างกัน! ทางด้านรสชาติ ชุดที่จุ่มมะม่วงในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *B. cereus* H11 ทั้งก่อนและหลังปลูกเชื้อจะมีรสชาติไม่ต่างจากชุดควบคุม 2 แต่มีรสชาติแตกต่างจากชุดควบคุม 1 ส่วนเนื้อสัมผัสของชุดที่จุ่มมะม่วงในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *B. cereus* H11 ทั้งก่อนและหลังปลูกเชื้อจะไม่แตกต่างกับชุดควบคุมทั้ง 1 และ 2 ในแง่ของการยอมรับของชุดที่จุ่มมะม่วงในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *B. cereus* H11 ทั้งก่อนและหลังปลูกเชื้อ มีการยอมรับไม่แตกต่างจากชุดควบคุม 2 แต่การยอมรับจะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม 1 ทางด้านปริมาณ total soluble solid ของทุกชุดการทดลองจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเหมือนกับชุดควบคุมทั้ง 2 และปริมาณกรดก็มีแนวโน้มลดลงเหมือนกับชุดควบคุมเช่นกัน

สำหรับการทดสอบการยับยั้งราก่อโรคของลำไย พบว่าคะแนนเฉลี่ยของการเกิดโรคโดยวัดพื้นที่ของโรคที่เกิดขึ้นบนผลลำไยของชุดที่จุ่มด้วยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อทั้งก่อนและหลังปลูกเชื้อในวันที่ 4 จะลดการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้น้ำกลั่นและมีพื้นที่การเกิดโรคน้อยกว่าชุดควบคุม ส่วนแนวโน้ม total soluble solid ของทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มลดต่ำลงเหมือนกับในชุดควบคุม ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างจากการหาปริมาณกรดในน้ำคั้นซึ่งทุกชุดการทดลองมีปริมาณกรดลดต่ำลงเหมือนกับในชุดควบคุม

จากการทดสอบผลของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* H11 ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *C. gloeosporioides* และ *F. solani* พบว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* H11 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *F. solani* ได้ดีกว่า *C. gloeosporioides*

เมื่อนำน้ำกรอง *B. cereus* H11 มาหาค่า chitinase activity และ specific activity พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ chitinase activity 51.97 mU/ml และมี specific activity 227.5 mU/mg protein เมื่อทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* H11 ตกตะกอนได้ในช่วงความเข้มข้น 40-80% โดยที่ส่วนของตะกอนที่เกิดจากแอมโมเนียมซัลเฟต 80% ยังคงมีคุณสมบัติในการยับยั้งราก่อโรคทั้ง 2 ชนิดภายหลังการให้ความร้อนเป็นเวลา 3 และ 5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Inhibitory Effect of Chitinase Producing Microorganisms on Mango's and Longan's Pathogenic Molds

Abhinya Plikomol, Sirilapa Samarnmit and Kreuawan Thonglem

Microbiology Section, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

Abstract

Collectotrichum gloeosporioides, a pathogenic mold of mango and *Fusarium solani*, a pathogenic mold of longan cause a lot of damage on the products of mango and longan orchards, especially in the northern part of Thailand. From 242 isolates of microorganisms obtained from soil samples, fermented food and Microbiology Section, Culture Collection, Faculty of Science, Chiang Mai University growning on shrimp shell-chitin containing medium, 48 isolates were thermotolerant molds and bacteria. They were tested for antagonistic effect against the growth of the two pathogenic molds by spot test method . Two bacterial isolates and two isolates of actinomycetes inhibited *C. gloeosporioides*. Four isolates of molds and two isolates of bacteria inhibited *F. solani*. The selected isolates were cultivated in enzyme production medium (EPM) containing chitin from shrimp shells as carbon source with shaking at room temperature (28±2°C) for 7 days. The culture filtrates were then tested for growth inhibition against the pathogenic molds by using paper disc method. Bacterial isolate H11 was found to inhibit *C. gloeosporioide* and *F. solani* giving clear zones of 23.2 and 15.7 millimeters, respectively. Morphological and some biochemical properties of the isolate H11 indicated that it was *Bacillus cereus*.

The culture filtrate of H11 was tested on the prevention of molds infection on post-harvested mangoes before inoculation of the pathogen in comparison with dipping in commercial fungicide Octave®, dipping in 55°C water and the cell suspension of H11. Efficacy on protection was not different from that of the fungicide, but better than using 55°C water and cell suspension. However, dipping in culture filtrate after inoculation of the pathogen, the protection was less effective than using the fungicide. Score of skin color change of mango was different from the untreated control 1 but was equal to that of control 2 which wound on the peel was made.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Pulp color of mango dipped in the culture filtrate both before and after inoculation of the pathogenic mold was different from control 1, but not from control 2 and the other treatments. There was no difference in the odor in all the treated groups. The taste of mango dipped in culture filtrate before and after inoculation did not differ from control 2 but differed from control 1. The texture of those dipped in the culture filtrate, both before and after inoculations was not different from both control. Acceptability of mango treated with culture filtrate was significantly different from control 1 but not from control 2. The total soluble solid content of every treatment tended to increase, but the titratable acidity tended to decrease similar to both control groups.

As for the prevention of pathogenic mold on longan, it was found that on day 4 of both treatments before and after inoculations of *F. solani* , the culture filtrate was able to decrease the infection on the longan peel. Total soluble solid and titratable acidity tended to decrease in all treatments.

The culture filtrate of H11 was also tested for its inhibitory effect on spore germination of *F. solani* and *C. gloeosporioides.* It was found that the filtrate of H11 was more effective inhibiting the spore germination of *F. solani* than that of *C. gloeosporioides*. The chitinase activity and specific activity of the filtrate were 51.97 mU/ml and 227.5 mU/mg protein, respectively. When the filtrate was concentrated by precipitation with ammonium sulfate, it was found that precipitation occurred at 40-80% ammonium sulfate. The precipitate at 80% concentration was still able to inhibit the growth of both pathogens after boiling for 3 and 5 minutes.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved