2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

1. การเก็บเชื้อราจากผลส้ม คัดแยกสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า

1.1. เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของส้ม ได้จาก 2 แหล่งคือ

- ผลส้มเน่าจากสวนส้มใน จ. เชียงใหม่
- ผลส้มเน่าจากตลาด

1.2. เขี่ยเส้นใยเชื้อราจากส้มผลเน่าที่มีลักษณะสีเขียว เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ จนกระทั่งได้เส้นใยสีขาว แล้วถ่ายเชื้อลงบนจานอาหาร PDA ใหม่จนได้เชื้อราที่บริสุทธิ์และสปอร์สีเขียว ตรวจลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยราและรูปร่างของ conidia และ conidiospores (โดยความอนุเคราะห์ของ รศ. ดร. วสันณ์ เพชรรัตน์) ว่าเป็นเชื้อราเขียวสาเหตุโรคผลเน่าในส้ม คือ *P. digitatum*

2. การเก็บตัวอย่างของ *Bacillus* spp. จากดินในสวนผลไม้และจากโครงการวิจัย"การพัฒนาการใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* สำหรับการควบคุมโรคไม้ผล"

2.1. ทำการเก็บตัวอย่างดินจากสวนเกษตรจำพวกผลไม้และพืชอื่น ๆ ในจังหวัดนครศรีธรรมราชโดยสุ่มเก็บตัวอย่างหน้าดิน จำนวน 7 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างละ 300 กรัม ได้แก่

1. ตัวอย่างจากหน้าดินใต้ต้นสะตอบนเนินสูงสุดของเขาทับช้าง
2. ตัวอย่างหน้าดินบนจุดสูงสุดของเข้าทับช้างใต้ต้นมังคุด อายุรุ่นคุณปู่
3. ตัวอย่างหน้าดินกลางเนินเขาทับช้างใต้ต้นทุเรียนพื้นเมือง
4. ตัวอย่างหน้าดินต้นมังคุดที่ราบของเขาทับช้าง อายุประมาณ 180 ปี
5. ตัวอย่างหน้าดินล่างสุดของเนินใต้ต้นมังคุด บริเวณเขาทับช้าง
6. ตัวอย่างหน้าดินกลางเนินใต้ต้นมังคุด บริเวณเขาทับช้าง
7. ตัวอย่างหน้าดินที่ราบใต้ต้นลางสาด อายุประมาณ 30 ปี บริเวณเขาทับช้าง

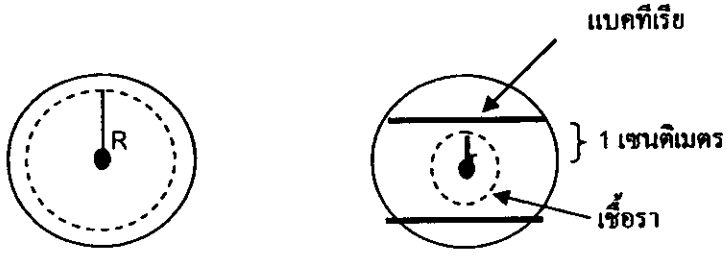
2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

ใช้วิธี dilution plate count บนอาหาร Nutrient Agar (NA) โดยการชั่งดินจำนวน 1 กรัม ใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 99 มล. เขย่าที่อุณหภูมิ 80 °ซ นาน 30 นาที เพื่อกำจัดเชื้ออื่น ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในดินแล้วจึงนำมาเจือจาง และแยกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่ติดสีแกรมบวก ย้ายเชื้อไปเขี่ยแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่อีกครั้ง

2.3 เชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้บริสุทธิ์จากโครงการวิจัย "การพัฒนาการใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* สำหรับการควบคุมโรคไม้ผล" ที่มีผลดีต่อการควบคุมเชื้อราที่ทดสอบจำนวน 20 สายพันธุ์ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราเขียวครั้งนี้ด้วย

3. การทดสอบปฏิกิริยาปฏิปักษ์ของ *Bacillus* spp. ต่อเชื้อราเขียว *P. digitatum* บนจานอาหาร

ทำการทดสอบโดยวิธี dual culture technique โดยเพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. digitatum* บนอาหาร PDA (จานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม.) บ่มเชื้อราจนได้ประมาณครึ่งจานอาหารก่อน แล้วใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะแบคทีเรียที่จะทดสอบซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหาร Luria Bertini (LA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาแตะเป็นจุดหรือขีดเป็นแนวยาวให้ห่างจากขอบโคโลนีเชื้อรา 1 ซม.ทั้งสองด้าน (รูปที่ 2) ทดสอบชุดละ 2 ซ้ำ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน สังเกตผลทุกวัน โดยวัดรัศมีของราเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ถ้าแบคทีเรียสามารถยับยั้งเชื้อราได้จะพบ inhibition zone หรือบริเวณเชื้อราเจริญมาชนแนวแบคทีเรีย แต่ไม่สามารถเจริญข้ามแบคทีเรียไปได้



รูปที่ 2 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี Dual culture plate

วัดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) คือ บริเวณช่องว่างระหว่างเชื้อราและแบคทีเรีย และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราสองแนวตั้งฉากกันในแต่ละตัวอย่างหาค่าเฉลี่ย นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับจานอาหารควบคุม และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราจากสูตร (Gamliel *et al.*, 1989)

เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้ง = $100-[(R^2/r^2)100]$

R = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารทดสอบ

r = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารควบคุม

4. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp.

4.1. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

นำแบคทีเรียที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวแล้วเขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหาร LB 1 มิลลิลิตรในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2. การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

ดูดกล้าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. 1 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตรที่มี LB 100 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที 30°ซ นาน 3 วัน จากนั้น

นำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 g นาน 20 นาที เก็บส่วนใส นำมาเจือจางแบบลำดับสอง (1:2) ได้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32

4.3. การเตรียมเชื้อรา *P. digitatum*

นำสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราเขียว 0.1 มิลลิลิตรเกลี่ยบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่ 24°ซ นาน 24 ชั่วโมง แยกโคโลนีเดี่ยวไปเพาะเลี้ยงบนจานอาหารใหม่

4.4. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

เตรียมอาหาร PDA เข้มข้น 2 เท่าของความเข้มข้นปกติผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2 ในอัตราส่วน 1:1 ได้ความเข้มข้นที่ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เทใส่จานอาหารขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้น เมื่อวุ้นแข็งนำก้อนเชื้อราที่ใช้ microhaematocrit tube (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 เซนติเมตร) เจาะจากบริเวณขอบโคโลนีมาวางกลางจานอาหารที่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 24 °ซ จนกระทั่งขนาดของโคโลนีราบนจานอาหารโตเกือบเต็มจานอาหาร ชุดควบคุมใช้ LB ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแทนน้ำเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราสองแนวตั้งฉากกันในแต่ละตัวอย่างและนำค่าเฉลี่ยมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตร (Gamliel *et.al.*, 1989)

5. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* โดยสารระเหย (Volatile organic compounds) ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* spp.

5.1. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. (ดังข้อ 4.1)

5.2. การเตรียมเชื้อ *P. Digitatum* (เช่นเดียวกับข้อ 4.3 แต่เลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน)

5.3. การทดสอบการยับยั้งบนจานอาหาร

ใส่อาหาร PDB 1 มิลลิลิตรในตะกอนเซลล์ผสมให้เข้ากัน ใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อเกลี่ยเชื้อบนอาหาร PDA ตั้งไว้ให้แห้ง นำไปประกบกับจานอาหารที่มีเชื้อรา *P. digitatum* อายุ 1 วันใช้พาราฟิล์มพันรอบขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองจานเข้าด้วยกันโดยให้เชื้อราอยู่ด้านบน ส่วนชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันโดยไม่มีการเกลี่ยตะกอนแบคทีเรียบนจานอาหาร PDA นำไปบ่มที่ 24 °ซ นาน 4 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อราและใช้ microhaematocrit tube เจาะขอบรอบนอกของโคโลนีเชื้อรา วางบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 24 °ซ สังเกตการเจริญของเชื้อราและคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราจากสูตรในข้อ 3

6. การสกัดสารปฏิชีวนะจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอาหารเหลว LB สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาปั่นแยกตัวเซลล์แบคทีเรียและน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกันที่ความเร็ว 8,000 rpm เวลา 20 นาที นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาตกตะกอนโดยเติม 6 N HCl จนกระทั่งวัดค่า pH ได้ประมาณ 2.0-2.5 ปั่นแยกตะกอนที่

ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เวลา 20 นาที นำส่วนตะกอนที่ได้มาสกัดสารปฏิชีวนะด้วยสารละลายเอทธานอล 80% โดยดัดแปลงจากวิธีของ McKeen และคณะ (1986) เก็บสารสกัดส่วนใสที่ได้มาทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotatory evaporator ชั่งน้ำหนักแห้งของสารสกัดที่ได้แล้วละลายกลับด้วยสารละลาย 80% ethanol ให้มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 50 mg/ml เก็บไว้ที่ 4 °ซ

7. การหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50})

7.1 การเจือจางสารปฏิชีวนะ

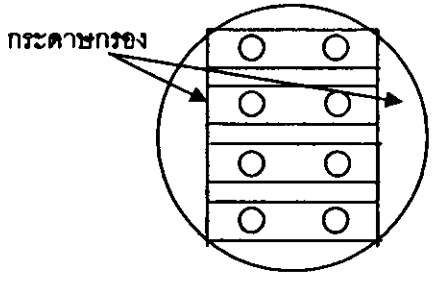
นำสารปฏิชีวนะที่สกัดได้มาเตรียมเป็น stock solution โดยละลายในเอทธานอล 80% แล้วนำมาเจือจางอย่างมีลำดับแบบ 1:2 ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 10,000-156.2 µg/ml

7.2. การเตรียมเชื้อรา *P. digitatum*

ใช้เชื้อราอายุ 2-3 วันที่เจริญบนจานอาหาร PDA ใช้ microhaematocrit tube เจาะก้อนเชื้อรารอบขอบนอกของโคโลนีเชื้อรา

7.3. การเตรียมสไลด์หลุม

ใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร วางแผ่นสไลด์หลุมซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม 1.5 เซนติเมตร โดยวางกระดาษกรองไว้ 2 ข้างดังรูปที่ 3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 30 นาที



รูปที่ 3 การเตรียมสไลด์หลุม

7.4. วิธีการทดสอบ

ทำในสไลด์หลุมตามวิธีการของ Picman และคณะ (1990) หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนกระดาษกรองในจานที่วางสไลด์หลุมพอชื้น ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลอมเหลวปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร กับสารปฏิชีวนะ 0.1 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นต่างๆกันคนให้เข้ากัน ดูดใส่ในสไลด์หลุม หลุมละ 0.1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 8 หลุม สำหรับชุดควบคุมใช้เอทธานอล 80% แทนสารปฏิชีวนะ จากนั้นวางก้อนเชื้อราขนาด 1 มิลลิเมตร ลงกลางหลุมแต่ละหลุมเลี้ยงเชื้อรา *P. digitatum* นาน 48 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราในแต่ละหลุม 2 ค่าที่ตั้งฉากกัน ด้วยออคคูลาร์ไมโครมิเตอร์ภายใต้กล้องสเตอริโอซูม คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ

รา ดังข้อ 3. และค่า EC_{50} (Effective Concentration 50) หรือ ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา*P. digitatum* ได้ 50% และสามารถคำนวณหาค่า EC_{50} ของสารจากสมการ linear regression $y = ax+b$

โดย y = เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรามีค่าเป็น 50

a = ค่าความชันกราฟ

b = จุดตัดบนแกน x

x = ค่าความเข้มข้นของสาร

8. การจำแนกเชื้อ *Bacillus* spp.

จำแนกชนิดของ *Bacillus* spp. ด้วยวิธีทดสอบทางชีวเคมีและสรีรวิทยาดังใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol 1. (Krieg and Holt, 1984) ได้แก่ Gram staining, Capsule Staiong, 7.5% NaCl, Oxidation – Fermentation glucose test (O – F glucose test), Gelatin liquefaction test, Simmons' Citrate test, Voges-Proskauer test (VP test), Urease test, Indole test, Starch hydrolysis test และ การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น glucose, mannitol, arabinose และ xylose

9. การแยกสารปฏิชีวนะจากสารสกัดหยาบ (crude extract) ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา *P. digitatum*

9.1. การเตรียมแผ่น Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) และ แท็งค์ TLC

นำแผ่น TLC ชนิด glass sheet Kieselgel $60F_{254}$ 20 × 20, 1 mm บริษัท Merck ไปอบที่ 80 °ซ นาน 2 ชั่วโมง ในขณะเดียวกันใส่กระดาษกรองลงในแท็งค์ที่มีใส่สารละลายเคลื่อนที่ $CHCl_3$:MeOH:H_2O ในอัตราส่วน 65:25:4 อยู่ก้นแทงค์ปล่อยให้สารละลายเคลื่อนที่จนอิ่มตัวนาน 30 นาที

9.2. การแยกสารสกัดหยาบโดย PTLC

นำแผ่น PTLC ที่เตรียมไว้หยดสารปฏิชีวนะเป็นจุดติดๆกันเป็นแถบยาวตลอดความกว้างของแผ่น TLC จากนั้นจึงนำใส่แท็งค์ที่เตรียมไว้ ปล่อยให้สารละลายเคลื่อนที่ 18 เซนติเมตร ดูแถบสารสกัดที่แยกได้ ใช้วิธีฉีดพ่นด้วยน้ำ และส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ใช้ดินสอวงกลมรอบบริเวณสารสกัดที่มองเห็น คำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพันธ์ (Relative mobility, R_f) ของสารจากสมการ

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพันธ์ } (R_f) = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ไป}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไป}}$$

9.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง

9.3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบที่แยกจากแผ่น PTLC

แบ่งแผ่น PTLC ที่ได้จากข้อ 10.2 เป็นแถบตามแนวยาวที่สารเคลื่อนที่แถบละ 1 เซนติเมตร ขูดซิลิกาเจลแต่ละแถบแล้วนำมาสกัดด้วยเอทธานอล 80% ปั่นที่ 20,000 g นาน 30 นาที เก็บส่วนใสมาทำให้แห้งด้วยการอบที่ 60 °ซ จากนั้นชั่งน้ำหนัก และนำสารที่ได้มาละลายด้วยเอทธานอล 80%

9.3.2. การเตรียมเชื้อรา *P. digitatum*

ใช้เชื้อราอายุ 2-3 วันที่เจริญบนจานอาหาร PDA ใช้ microhaematocrit tube เจาะก้อนเชื้อราขอบรอบนอกของโคโลนีเชื้อราวางกลางจานอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 24 °ซ นาน 2 วัน

9.3.3 การทดสอบการยับยั้ง

นำสารจากข้อ 9.3.1 ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* โดยใช้แผ่นกระดาษกรองสำหรับหยดสารปฏิชีวนะ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางบนจานอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ในข้อ 9.3.2. จานละ 4 แผ่น ระยะห่างจากเส้นใยรา 0.5 เซนติเมตร หยอดสารที่ได้จากแต่ละแถบของ TLC 20 ไมโครลิตร บ่มเชื้อที่ 24°ซ นาน 2 วัน บันทึกผลการทดลองโดยดูการเกิดบริเวณยับยั้งรอบแผ่นที่หยอดสาร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้สารที่ได้จากแถบซิลิกาเจล ที่ไม่ได้หยดสารใดๆ ชะด้วยเอทธานอล 80 %

10. การตรวจสอบความรุนแรงของเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม

10.1 วิธีการปลูกเชื้อราเบื้องต้นครั้งที่ 1

ทำการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *P .digitatum* สายพันธุ์ที่ใช้กับผลส้มแบ่งเป็น 3 ชุดทดสอบชุดละ 4 ผล

ชุดทดสอบที่ 1: ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยรา

นำผลส้มมาเจาะรูด้วยเข็มขนาดเล็กบริเวณเปลือก โดยผลส้มชุดควบคุมหยดน้ำลงในรู ส่วนผลส้มชุดทดสอบเขี่ยเชื้อเส้นใยรา *P.digitatum* ที่เพาะเลี้ยงไว้บนจานอาหาร PDA ใส่ลงไปในรูที่เจาะไว้ สังเกตผลที่เกิดกับส้มทั้ง 2 ชุดและบันทึกภาพไว้

ชุดทดสอบที่ 2: ปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีดสารแขวนลอยสปอร์รา

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ราในน้ำกลั่นจากเชื้อที่เลี้ยงไว้บนจานอาหาร PDA แล้วใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดที่เตรียมไว้มาฉีดเข้าไปในผลส้ม ลูกละ 0.1 มิลลิลิตร ผลส้มที่ใช้เป็นชุดควบคุมฉีดน้ำกลั่นเข้าไปแทนลูกละ 0.1มิลลิลิตรสังเกตผล และบันทึกภาพไว้

ชุดทดสอบที่ 3: ปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์รา

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ในน้ำกลั่นเชื้อ *P digitatum* แล้วนำมาฉีดพ่นบนเปลือกของผลส้ม ส่วนชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น สังเกตผลที่เกิดขึ้น และบันทึกภาพไว้

10.2 วิธีการปลูกเชื้อราเบื้องต้นครั้งที่ 2

นำเชื้อ *P digitatum* ที่เพาะเลี้ยงไว้มาทดสอบความรุนแรงบนผลส้มในวิธีการต่างๆ ต่อไปนี้

แบบที่ 1 เจาะผิวส้ม 1 แผล ลึกประมาณ 3 มิลลิเมตร และหยดสารแขวนลอยสปอร์ในน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น $6x10^6$ สปอร์ต่อไมโครลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตร

แบบที่ 2 เจาะผิวส้ม 3 แผล ลึกประมาณ 3 มิลลิเมตร และหยดสารแขวนลอยสปอร์ในน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น $6x10^6$ สปอร์ต่อไมโครลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตร

แบบที่ 3 ยัดสายราลงไปในผลส้มโดยตรง

แบบที่4 ฉีดสารแขวนลอยสปอร์ในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น $6x10^6$ สปอร์ต่อไมโครลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตร

แบบที่ 5 กลั้วสารแขวนลอยสปอร์ในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น $6x10^6$ สปอร์ต่อไมโครลิตร จำนวน 500 ไมโครลิตรในถุงพลาสติก

หมายเหตุ แต่ละรูปแบบของการทดลองให้ทำทั้งส้มโชกุนและส้มเขียวหวาน อย่างละ 4 ผล พร้อมชุดควบคุม

10.3. วิธีการตรวจสอบความรุนแรงเชื้อรา *Penicillium digitatum* บนผลส้ม

10.3.1. การเตรียมสปอร์เชื้อรา *P. digitatum*

ใช้เชื้อรา *P. digitatum* ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA นาน 2 สัปดาห์ ใส่น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆเพื่อให้สปอร์หลุดออกมา นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemacytometer และปรับให้ได้ความเข้มข้น 10^3- 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

10.3.2. การเตรียมผลส้ม

นำผลส้มที่มีผลเขียวเพิ่งเก็บจากต้น ขนาดใกล้เคียงกันมากที่สุดและปราศจากการเคลือบผิวมาล้างน้ำ จากนั้นแช่ผลส้มด้วย 0.1 % sodium hypochlorite นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง ก่อนใช้แอลกอฮอล์ 70 % เช็ดผิวส้ม

10.3.3. การทดสอบการเกิดโรค

ทำแผลบนผลส้มบริเวณกลางผล โดยอยู่ระนาบเดียวกันกับด้านขั้วและก้นของผลส้มใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร เจาะลึกประมาณ 0.3 มิลลิเมตร 5 แผล แผลห่างกันแผลละ 2 มิลลิเมตร หยอดสปอร์ราปริมาตร 20 ไมโครลิตร วางบ่มไว้ในภาชนะที่มีถ้วยพลาสติกใส่น้ำ 6 ถ้วยวางกระจายทั่วภาชนะ ที่อุณหภูมิ 24 °ซ นาน 7-10 วัน ตรวจดูการเจริญของเชื้อราเปรียบเทียบกับ ชุดควบคุมที่มีการทำแผล และฉีดน้ำกลั่น ทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ เขี่ยเชื้อรามาย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue ดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์

11. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม

11.1. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้มเบื้องต้น

11.1.1. การเตรียมเชื้อรา *P. digitatum*

เพาะเลี้ยงเชื้อราในจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 24 °ซ นาน 2 สัปดาห์ หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อและห่วงเขี่ยเชื้อขูดกระจายสปอร์ นำสารแขวนลอยสปอร์ไปนับจำนวนโดยใช้ haemocytometer และปรับให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

11.1.2. การเตรียมตัวเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตรที่มี PDB 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที 30 °ซ นาน 3 วันจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 10,000 g

นาน 20 นาที เก็บส่วนใสนำมากรองผ่านกระดาษกรอง (Millipore) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ส่วนตัวเซลล์เจือจางด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยเทียบกับความเข้มข้น 1 McFarland (3×10^8 CFU/ml โดยประมาณ)

11.1.3 การเตรียมสารปฏิชีวนะ

เตรียมสารปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น 50 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทธานอล 80% จากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

11.1.4. การเตรียมผลส้ม (ดังข้อ 10.3.2.)

11.1.5. การทดสอบเบื้องต้นการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม

ทำแผลบนผลส้มบริเวณกลางผลให้อยู่ระนาบเดียวกันกับด้านขั้วและก้นของผลส้มโดยใช้เข็มเจาะลึกประมาณ 0.3 มิลลิเมตร 4 แผลห่างกันแผลละ 2 มิลลิเมตรเป็นสี่เหลี่ยมจตุรัส และเจาะตรงกลางอีก 1 แผล จากนั้นจึงทำแผลด้านตรงกันข้ามบนผลส้มอีก 1 แผล (เจาะ 5 แผล) ทดสอบดังกรรมวิธีดังตารางที่ 1 โดยแต่ละกรรมวิธีใช้ผลส้ม 5 ผล หยอดสารแผลละ 20 ไมโครลิตร วางบ่มไว้ในภาชนะที่มีถ้วยพลาสติกใส่น้ำ 6 ถ้วยวางกระจายทั่วภาชนะที่อุณหภูมิ 24 °ซ นาน 7-10 วัน ตรวจดูการเจริญของเชื้อราเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการทำแผล และฉีดน้ำกลั่น

ตารางที่ 1 กรรมวิธีการทดสอบเบื้องต้นการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม

Treatments	*P. digitatum*	*B. subtilis*	Supernatant	Ethanol extracts	
				10 mg/ml	1 mg/ml
1	ก่อน 24 ชั่วโมง	✓			
2			✓		
3				✓	
4					✓
5	ก่อน 0 ชั่วโมง (พร้อมกัน)	✓			
6			✓		
7				✓	
8					✓
9	หลัง 24 ชั่วโมง	✓			
10			✓		
11				✓	
12					✓
13 (Control)	✓				

11.2. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม

11.2.1. การเตรียมเชื้อรา *P. digitatum* (ดังข้อ 11.1.1)

11.2.2. การเตรียมตัวเซลล์

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตรที่มี PDB 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที 30 °ซ นาน 3 วันจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 10,000 g นาน 20 นาที นำตัวเซลล์มาละลายในน้ำเกลือ 0.85 % นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาทีที่ 80 °ซ นาน 30 นาที เพื่อฆ่าเซลล์ปกติคงเหลือแต่เอนโดสปอร์ แล้วจึงแยกเอนโดสปอร์ด้วยการปั่นที่ 10,000 g นาน 20 นาที นำเอนโดสปอร์มาละลายในน้ำเกลือ 0.85 % แล้วจึงนำไปเจือจางเป็นลำดับ 1:10 นำไปเกลี่ยบนอาหาร NA บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย และทำการเจือจางให้ได้ 10^8 CFU/ ml

11.2.3. การเตรียมสารปฏิชีวนะ

เตรียมสารปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น 50 mg/ml ในเอทธานอล 80% จากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/ml

11.2.4. การเตรียมผลส้ม (ดังข้อ 10.3.2.)

11.2.5. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม

(ดังข้อ 11.1.5) โดยกรรมวิธีที่ใช้ในการทดสอบแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 กรรมวิธีการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม

Treatments	*P. digitatum*	*B. subtilis*	Ethanol extract 10 mg/ml	Imazalil 500 ppm
1	ก่อน 0 ชั่วโมง (พร้อมกัน)	✓		
2			✓	
3				✓
4	หลัง 24 ชั่วโมง	✓		
5			✓	
6				✓
7 (Control)	✓			

วางบ่มไว้ในภาชนะที่มีถ้วยพลาสติกใส่น้ำ 6 ถ้วยวางกระจายทั่วภาชนะ เพื่อให้มีความชื้นเต็มที่ที่อุณหภูมิ 24 °ซ นาน 9 วัน สังเกตและบันทึกการเกิดโรคทุกวัน และทำการทดสอบแบบเดียวกันซ้ำสองครั้ง

11.2.6. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ด้วยโปรแกรม SAS System for Window Version 6.12 โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (Peterson, 1985)