บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุพันธุ์พืชที่นำมาใช้ในการทดลอง

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองเก็บเกี่ยวที่ระยะทางการค้า สำหรับการส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่นน้ำหนัก 300-400 กรัม/ผล จากชมรมผู้ส่งออกมะม่วง จังหวัดฉะเชิงเทรา

เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

1. เครื่องวัดสี Hunter's colorimeter รุ่น CR-200 ของ Minolta
2. เครื่องวัดความแน่นเนื้อ Fruit Hardness Tester 'NOW' รุ่น FHR-5
3. เครื่องชั่ง (ทศนิยม 2 ตำแหน่ง) รุ่น P1210 ของ Mettler
4. เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer) รุ่น N1-B
5. กล้องจุลทรรศน์รุ่น CX31RBSF ของบริษัท OLYMPUS
6. เครื่องชั่ง digital (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) รุ่น AB204-S ของบริษัท METTLER-TOLEDO (Thailand) LTD.
7. เครื่องไทเทรตชนิดอัตโนมัติ รุ่น TZ 3680 ของบริษัท SCHOTT
8. เครื่องวัด pH (pH meter) รุ่น PP-20E ของบริษัท SCIENTIFIC PROMOTION CO., LTD.
9. ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar Air Flow) รุ่น HF safe 900/C+ ของบริษัท SCIENTIFIC PROMOTION CO., LTD.
10. ตู้บ่มเชื้อ (Incubater) รุ่น MIR-553 ของบริษัท SANYO ELECTRICAL BIOMEDICAL CO., LTD.
11. ตู้อบอุณหภูมิสูง (Hot Air Oven) รุ่น UM500 ของบริษัท MEMMERT
12. หม้อนึ่งความดันไอ (Speedy Autoclave: Vertical Type) รุ่น HL-341 ของบริษัท GEMMY INDUSTRIAL CORP.
13. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
14. ตะเกียงแอลกอฮอลล์
15. มีดผ่าตัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16. เข็มเขี่ยเชื้อ
17. เข็มหมุดปลูกเชื้อ (inoculater) เบอร์ 4
18. เครื่องแก้ว
19. Cork borer
20. Micro pipette รุ่น T52647L ของบริษัท GILSON S.A.S.
21. Haemacytometer ของบริษัท CLAY - ADAMS

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ดังต่อไปนี้

1. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของบริษัท APS FINECHEM
2. สารละลายกรดเปอร์ออกซีแอซิติก (CH_3COOOH) ของบริษัท ECOLAB
3. สารการค้า Oxysan® zs ของบริษัท ECOLAB
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท APS FINECHEM
5. Phenolphthalein ของบริษัท APS FINECHEM
6. แอลกอฮอลล์ ของบริษัท MERCK
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท APS FINECHEM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการดำเนินงานการวิจัย

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ กรดเปอร์ออกซีแอซีติก (PAA) และ Oxysan® zs ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก และ Oxysan® zs ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการควบคุมโรคของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองโดยการปลูกเชื้อสาเหตุ การทดลองที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก และ Oxysan® zs ร่วมกับอุณหภูมิต่ำต่ออายุการเก็บรักษาของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดเปอร์ออกซีแอซีติก (PAA) และ Oxysan® zs ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 ผลต่อการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides*

ทำการเพาะเชื้อ *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA จนกระทั่งมีอายุ 5 วัน หลังจากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้ cork borer เบอร์ 2 เจาะขอบโคโลนีเชื้อรานำไปวางบนอาหาร PDA ที่ผสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดเปอร์ออกซีแอซีติก และ Oxysan® zs ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 เปอร์เซ็นต์ ชุดที่ไม่ผสมสารในอาหารเป็นชุดควบคุม โดยวิธี Poisoned Food Technique แต่ละชุดมี 5 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อเจริญ บันทึกการเจริญของเชื้อโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกๆ 3 วันเป็นเวลา 9 วัน

1.2 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสปอร์

โดยเลือกชุดการทดลองที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจากการทดลองที่ 1.1 มาศึกษาต่อ วิธีการศึกษาคือ โดยการเตรียมสารละลายแขวนลอยสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงเชื้อดังกล่าวเป็นเวลา 5 วัน โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อบนผิวหน้าจานอาหารแล้วเขี่ยสปอร์ของเชื้อราให้หลุดออกมา นำมากรองเศษวุ้นออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เขย่าสารแขวนลอยที่กรองได้ให้เข้ากัน ตรวจนับสปอร์ของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ counting chamber slide (haemacytometer) แล้วปรับความเข้มข้นสารแขวนลอยสปอร์ให้ได้จำนวน 2×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร นำสารละลายแขวนลอยสปอร์ที่เตรียมได้มาผสมกับกรดเปอร์ออกซีแอซีติก และ Oxysan® zs ความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 เปอร์เซ็นต์ที่ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบที่ 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสปอร์เชื้อราแล้วทำการบันทึกภาพ

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก และ Oxysan® zs ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการควบคุมโรคของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองโดยการปลูกเชื้อสาเหตุ *C. gloeosporioides*

จากการทดลองที่ 1 ได้คัดเลือกชุดการทดลองที่ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีมาทำการศึกษาต่อโดยนำมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่แก่เต็มที่มาทำความสะอาด โดยการล้างน้ำและผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นทำการทดลองโดยการสเปรย์เชื้อสาเหตุ *C. gloeosporioides* ให้เปียกชุ่มทั้งผล วางไว้ในตะกร้า 24 ชั่วโมงแล้วนำมาล้างด้วยสารกลุ่ม active oxygen ใช้ความเข้มข้นของสารดังต่อไปนี้คือ 0.1 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์

แบ่งการทดลองได้ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (สเปรย์เชื้อสาเหตุไว้ 24 ชั่วโมง) แล้วสเปรย์น้ำกลั่น

กรรมวิธีที่ 2 สเปรย์เชื้อสาเหตุไว้ 24 ชั่วโมงแล้วสเปรย์ peroxyacetic acid 0.1 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 3 สเปรย์เชื้อสาเหตุไว้ 24 ชั่วโมงแล้วสเปรย์ peroxyacetic acid 0.25 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 4 สเปรย์เชื้อสาเหตุไว้ 24 ชั่วโมงแล้วสเปรย์ Oxysan® zs 0.1 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 5 สเปรย์เชื้อสาเหตุไว้ 24 ชั่วโมงแล้วสเปรย์ Oxysan® zs 0.25 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นนำมะม่วงไปเก็บไว้ในตะกร้าวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ ได้แก่ ประเมินความรุนแรงของโรคเป็นคะแนน การเกิดโรค ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกและเนื้อ ความแน่นเนื้อ และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกผลการทดลอง

1. คะแนนการเกิดโรค

โดยให้คะแนนตามวิธีของสุขุมและคณะ (ไม่ระบุปีที่พิมพ์) ดังนี้

0 = ไม่เป็นโรค

1 = เกิดอาการโรค เป็นแผลเล็กขนาดเท่าหัวเข็มหมุดจำนวน 2-3 แผลและมองเห็นไม่ชัดเจน

2 = แผลค่อนข้างใหญ่ขนาด 3-4 มิลลิเมตร จำนวน 3-4 แผล และมีเนื้อที่ของแผลต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อที่ผล

3 = เป็นโรค 5-12 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อที่ผล

4 = เป็นโรค 13-25 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อที่ผล

5 = เป็นโรค 26-50 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อที่ผล

6 = เป็นโรค มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อที่ผล

2. การวัดปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Titratable acidity, TA)

โดยนำน้ำคั้นมะม่วงปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาไทเทรตด้วย NaOH (0.1N) โดยใช้ phenolpthaline 1 เปอร์เซ็นต์เป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อน้ำคั้นเปลี่ยนเป็นสีชมพูถือว่าถึงจุดยุติ (end point) นำปริมาตรของ NaOH ที่ใช้มาคำนวณหาปริมาณกรด โดยเทียบกับกรดซิตริกได้จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ TA} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH (0.1) x ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (มิลลิลิตร) x 0.064* x 100}}{\text{ปริมาณน้ำคั้นมะม่วง (มิลลิลิตร)}}$$

*milliequivalent of citric acid (anhydrous) = 0.064

วัดปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ตั้งแต่วันแรกที่เก็บผลมะม่วงจากต้น (วันที่ 0) จากนั้นตรวจวัดทุกๆ 3 วันจนครบ 6 วัน

3. การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solids, TSS)

วัดจากน้ำคั้นมะม่วง ด้วยเครื่อง hand refractometer (ATAGO) ของมะม่วงแต่ละกรรมวิธีๆ ละ 4 ผล ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 6 วัน อ่านค่าที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกและเนื้อ

วัดสีด้วยเครื่อง chroma meter (Minolta CR-200) ของผลมะม่วงแต่ละกรรมวิธีๆ ละ 10 ผล แต่ละผลวัดสี 3 จุดคือ บริเวณขั้ว กลาง และด้านล่างของผลมะม่วง รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย โดยค่าที่ได้จะแสดงออกมาเป็นค่า ค่าความสว่างของสี (L) ค่าสีเขียว (a) ค่าสีเหลือง (b) การวัดค่าต่างๆ เริ่มวัดจากวันแรกของการทดลอง (วันที่ 0) จากนั้นตรวจวัดทุกๆ 3 วันจนครบ 6 วัน มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ค่าความสว่างของสี (the lightness value) (L*) เมื่อค่า L* มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง ผลมะม่วงมีสีคล้ำ ถ้าเข้าใกล้ 100 แสดงว่าผลมะม่วงมีสีสว่าง

ค่าสีเขียว (a*) มีค่าอยู่ระหว่าง -60 ถึง +60 เมื่อมีค่าเป็นลบแสดงว่าผลมะม่วงมีสีเขียว หากเป็นบวกแสดงว่าวัตถุมีสีแดง ถ้าค่า a ต่ำมากแสดงว่าผลมะม่วงมีสีเขียวมาก

ค่าสีเหลือง (b*) มีค่าอยู่ระหว่าง -60 ถึง +60 เมื่อมีค่าเป็นลบแสดงว่าผลมะม่วงมีสีน้ำเงิน หากเป็นบวกแสดงว่าเป็นสีเหลือง หากมีค่าสูงมากแสดงว่าผลมะม่วงมีสีเหลืองมาก

จากนั้นคำนวณค่า L*, a* และ b* เป็นดัชนีการเกิดสีเหลือง (Yellow index) โดย

$$\text{ดัชนีการเกิดสีเหลือง} = \frac{L^* \times b^*}{|a^*|}$$

5. การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ

วัดความแน่นเนื้อโดยใช้เครื่อง หัวเจาะขนาด 0.6 cm กรรมวิธีละ 4 ผล ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 6 วัน โดยกดหัวเจาะลงในเนื้อผลบริเวณกลางผลมะม่วง จะได้ค่าความแน่นเนื้อเป็นกิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร

6. เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

ทำการชั่งน้ำหนักทุกๆ 3 วัน แล้วนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{การสูญเสียน้ำหนัก (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา} - \text{น้ำหนักหลังการเก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก และ Oxysan® zs ร่วมกับอุณหภูมิต่ำต่ออายุการเก็บรักษาของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง

จากการทดลองที่ 2 ได้คัดเลือกชุดการทดลองที่ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีมาทำการศึกษาต่อโดยนำมะม่วงน้ำดอกไม้ที่แก่เต็มที่มาทำความสะอาดโดยการล้างน้ำและผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นทำการทดลองโดยการสเปรย์เชื้อสาเหตุ *C. gloeosporioides* ให้เปียกชุ่มทั้งผล วางไว้ในตะกร้า 24 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วยสารกลุ่ม active oxygen ใช้ความเข้มข้นของสาร 0.25 เปอร์เซ็นต์

แบ่งการทดลองได้ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (สเปรย์เชื้อสาเหตุไว้ 24 ชั่วโมง) แล้วสเปรย์น้ำกลั่น

กรรมวิธีที่ 2 สเปรย์เชื้อสาเหตุไว้ 24 ชั่วโมงแล้วสเปรย์ peroxyacetic acid 0.25 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 3 สเปรย์เชื้อสาเหตุไว้ 24 ชั่วโมงแล้วสเปรย์ Oxysan® zs 0.25 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นนำมะม่วงไปเก็บไว้ในตะกร้าวางไว้ที่อุณหภูมิ 8 และ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ ได้แก่ ประเมินความรุนแรงของโรคเป็นคะแนน การเกิดโรค ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ดัชนีการเกิดสีเหลือง (Yellow index) ความแน่นเนื้อ และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก (วิธีการดังเช่นการทดลองที่ 2)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SX8 และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปัจจัยด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) พร้อมทั้งทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วย Least Significant Difference (LSD) โดยทดสอบระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและห้องปฏิบัติการวิจัยสรีรวิทยาหลังการเก็บเกี่ยว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

มีนาคม พ.ศ. 2549 – ธันวาคม พ.ศ. 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved