บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์เครื่องมือ

1. หลอดไฟ UV (10 mW) 2 หลอด บริษัท Boyu Industries Co., Ltd.
2. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ บริษัท Olympus รุ่น CH30
3. ตู้อะคริลิกแบบทึบแสงขนาด 30x30x65 เซนติเมตร
4. Haemacytometer บริษัท Clay-Adams
5. เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (Firmness Tester)
6. ตู้ปรับอุณหภูมิ (Refrigerator) รุ่น PT203 ประเทศอิตาลี
7. เครื่องวัดสี (Chromameter)
8. เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง บริษัท Ohaus รุ่น ARC120
9. Autoclave
10. Laminar air flow
11. เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Refractometer) บริษัท ATAGO

อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

1. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
2. กรวยกรอง
3. หลอดทดลอง
4. Petri dish ขนาด 15 x 80 มิลลิเมตร
5. ผ้าขาวบาง
6. เข็มเขี่ยเชื้อ
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. Cover glass
9. คีมคีบ
10. Beaker
11. Flask
12. Cylinder
13. Parafilm M

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมี

1. Titanium dioxide บริษัท Ajax Finecham
2. Potato dextrose agar บริษัท Lab Scan
3. Alcohol 95%
4. NaOH 0.1 M บริษัท Merck
5. Phenolphthalein บริษัท APS Finechem
6. Tween 20 (Polysorbate 20)

พืชทดลอง

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง ซึ่งเก็บเกี่ยวจากแปลงของเกษตรกร อำเภอ พร้าว จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพ 12) ที่มีอายุ 105 หลังดอกบานคัดเลือกผลที่มีขนาด และน้ำหนักใกล้เคียงกัน ประมาณ 400 กรัม/ผล ซึ่งเป็นผลที่ไม่มีตำหนิหรือบาดแผล บรรจุผลมะม่วงในกล่องกระดาษแล้วขนส่งโดยสารรถยนต์ปรับอากาศ ใช้ระยะเวลาขนส่งประมาณ 4 ชั่วโมง เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการแล้วเริ่มทำการทดลองทันที

ภาพ 12 มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่

เชื้อทดลอง

เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้จากผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองโดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อสะกิดผิวเปลือกมะม่วงบริเวณที่มีจุดสีน้ำตาลที่เกิดจากโรคแอนแทรคโนส แล้วนำปลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข็มเขี่ยเชื้อสะกิดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อให้เชื้อ *C. gloeosporioides* ที่ติดตรงปลายเข็มเขี่ยเชื้อไปติดอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วปิดขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย Parafilm M เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ ที่อาจเข้าไป จากนั้นนำไปวางไว้ภายใต้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent lamp) เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตเป็นเวลา 5 วัน และนำมาทำเป็นสารแขวนลอยสปอร์เพื่อใช้ในการทดลอง โดยเติมน้ำกลั่นลงไป 5 ml จากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อขูดบริเวณผิวหน้าอาหาร PDA เพื่อให้สปอร์ของเชื้อหลุดออกมาเป็นสารแขวนลอยสปอร์ แล้วเทลงใน flask ที่มีผ้ากรองเพื่อให้ได้เฉพาะส่วนของสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* แล้วปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นให้เจือจางจนมีความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $2x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งความเข้มข้นของสปอร์จะทำโดยการนับจำนวนสปอร์บนแผ่น Haemacytometer ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการวิจัยสรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของ TiO_2 ร่วมกับระยะเวลาการให้แสง UV ที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides*

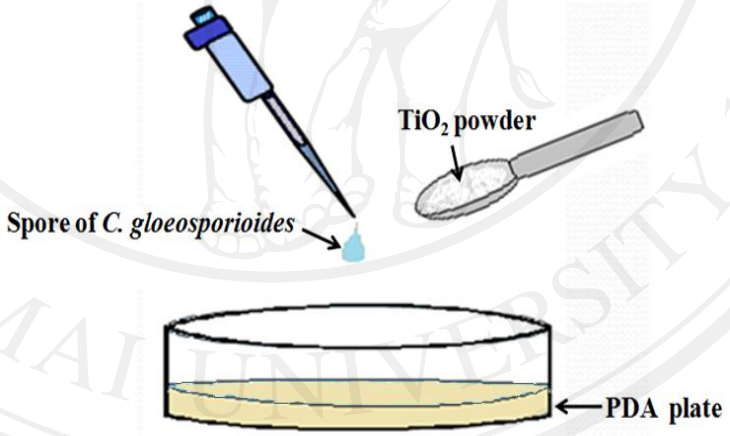
1.1 ผลต่อการงอกของสปอร์

นำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่ความเข้มข้น $2x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสมกับผง TiO_2 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 1 ,5 และ 10 mg/ml หยดลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 1 ml แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่วเพื่อให้เชื้อกระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นนำมาวางในตู้อะคริลิกแบบทึบแสงขนาด 30x30x65 เซนติเมตร และให้แสง UV 20 mW ที่ระยะเวลา 0, 15, 30 และ 60 นาที แล้วนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เชื้อเจริญเติบโต แล้วนับจำนวนสปอร์ของเชื้อในแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเติมน้ำกลั่น 5 ml ลงไปในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อบนผิวอาหารเพื่อให้สปอร์ของเชื้อหลุดออกมาเป็นสารแขวนลอย แล้วนำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้ไปนับจำนวนสปอร์โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ต่อจำนวนสปอร์ทั้งหมด ทำทุกวัน เป็นระยะเวลาทั้งหมด 3 วัน (ภาพ 13 และ ภาพ 14) โดยวางแผนการทดลองแบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

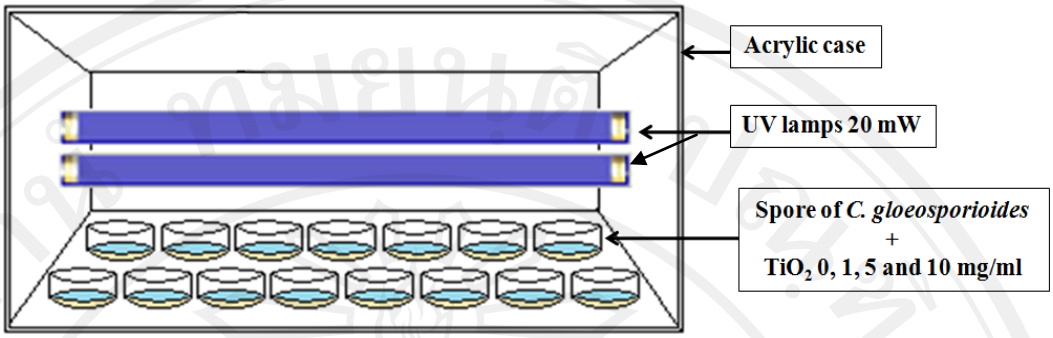
สุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) มี 10 กรรมวิธี และแต่ละกรรมวิธีจะมีจำนวน 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	ชุดควบคุม (TiO_2 0 mg/ml + UV 0 นาที)
กรรมวิธีที่ 2	TiO_2 1 mg/ml + UV 15 นาที
กรรมวิธีที่ 3	TiO_2 1 mg/ml + UV 30 นาที
กรรมวิธีที่ 4	TiO_2 1 mg/ml + UV 60 นาที
กรรมวิธีที่ 5	TiO_2 5 mg/ml + UV 15 นาที
กรรมวิธีที่ 6	TiO_2 5 mg/ml + UV 30 นาที
กรรมวิธีที่ 7	TiO_2 5 mg/ml + UV 60 นาที
กรรมวิธีที่ 8	TiO_2 10 mg/ml + UV 15 นาที
กรรมวิธีที่ 9	TiO_2 10 mg/ml + UV 30 นาที
กรรมวิธีที่ 10	TiO_2 10 mg/ml + UV 60 นาที



ภาพ 13 การเตรียมสารละลายที่มีส่วนผสมของสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* กับผงไทเทเนียมไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 14 การเร่งปฏิกิริยาด้วยแสงโดยไทเทเนียมไดออกไซด์ต่อการยับยั้งการเจริญสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides*

1.2 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสปอร์

นำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่ความเข้มข้น $2x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสมกับผง TiO_2 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 1, 5 และ 10 mg/ml แล้วหยดลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำมาวางในตู้อะคริลิกแบบทึบแสงขนาด 30x30x65 เซนติเมตร และให้แสง UV 20 mW ที่ระยะเวลา 0, 15, 30 และ 60 นาที จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 400 เท่า แล้วบันทึกภาพที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) และแต่ละชุดการทดลองจะมีจำนวน 5 ซ้ำ มีกรรมวิธีดังเช่นการทดลองที่ 1.1

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของปฏิกิริยาที่ใช้แสงเป็นตัวเร่งของ TiO_2 ต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของเชื้อ *C. gloeosporioides* ในผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง

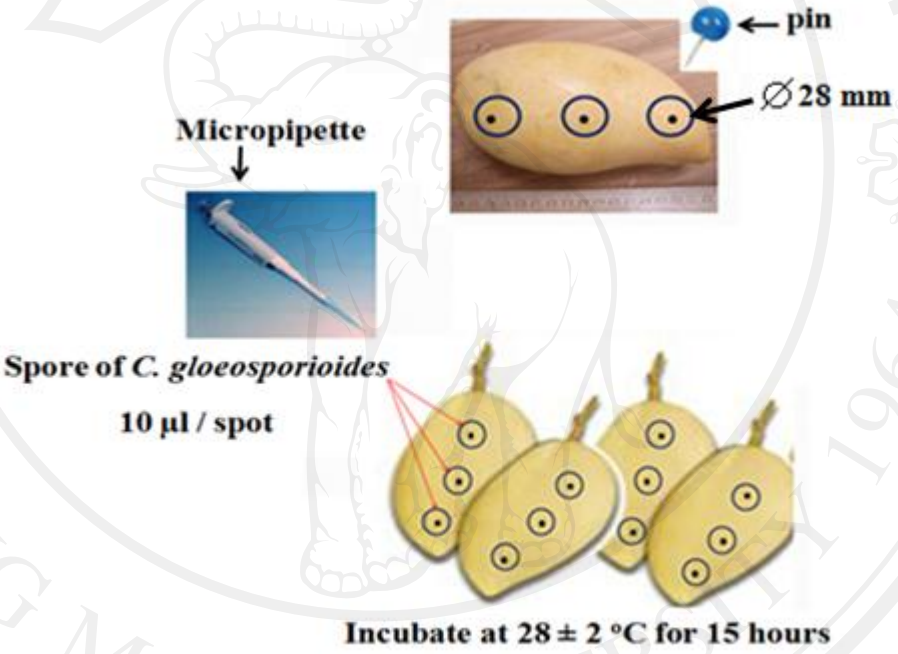
สะกิดผิวเปลือกมะม่วงให้เกิดบาดแผล ผลละ 3 แผล แล้วหยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น $2.0x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงไปแผลละ 10 µl แล้ววางทิ้งไว้เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 70±5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปไว้ในตู้อะคริลิกแบบทึบแสงขนาด 30x30x65 เซนติเมตร สำหรับแช่ด้วยน้ำที่มี TiO_2 ร่วมกับการให้แสง UV 20 mW ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ดีที่สุดจากผลการทดลองที่ 1 เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี (ภาพ 15 และ ภาพ 16) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำผลมะม่วงมาวางผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ 13°C ความชื้นสัมพัทธ์ 97 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำผลมะม่วงออกมาชุดละ 4 ผล วัดสมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางเคมี วัดผลทุก 5 วัน เป็นเวลาทั้งหมด 20 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) มี 2 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมีจำนวน 5 ซ้ำ ดังนี้

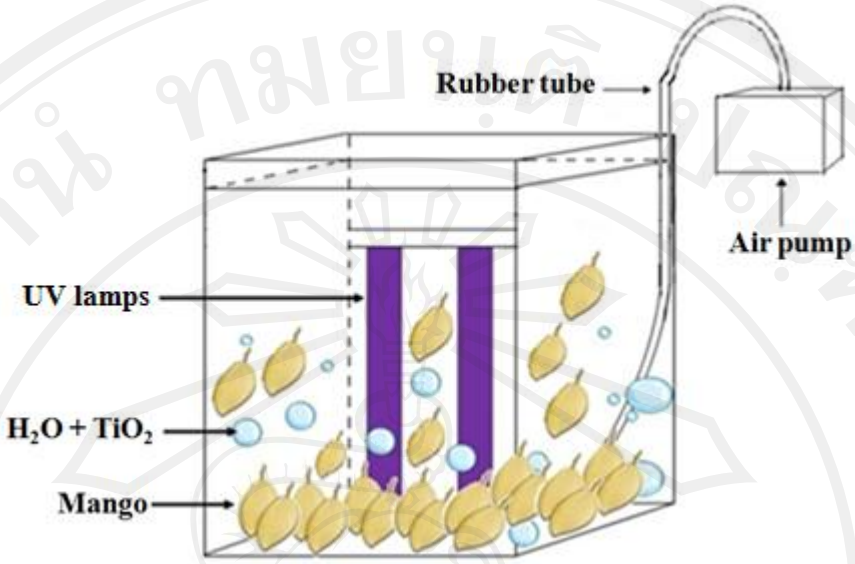
กรรมวิธีที่ 1 แช่มะม่วงในน้ำกลั่น 60 นาที (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 แช่มะม่วงในสารแขวนลอยของ TiO_2 ร่วมกับการให้แสง UV (เลือกกรรมวิธีที่ดีที่สุดจากผลการทดลองที่ 1)



ภาพ 15 การปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ลงบนผลมะม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 16 การเร่งปฏิกิริยาด้วยแสงโดยไทเทเนียมไดออกไซด์ของผลมะม่วงที่ปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides*

โดยการวัดผลการทดลองจะแบ่งออกเป็น 2 ประเด็นหลักๆ คือ

1. การวัดสมบัติทางกายภาพ ตรวจวัดในเรื่องต่างๆ ต่อไปนี้

1.1 ความรุนแรงของการเกิดโรค

วัดความรุนแรงของการเกิดโรคบนผิวเปลือกมะม่วงที่ผ่านการลงเชื้อด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของจุดสีดำ 3 จุด บนผิวเปลือกมะม่วงทุกๆ วัน นำมาคิดเป็นค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรคที่ได้โดยวัดทุกวัน เป็นเวลาทั้งหมด 20 วัน

1.2 เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

ชั่งน้ำหนักมะม่วงด้วยเครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง ทุกๆ 5 วัน เป็นเวลาทั้งหมด 20 วัน เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของผลมะม่วงแต่ละกรรมวิธี

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 การเปลี่ยนสีของเปลือก

วัดการเปลี่ยนสีของเปลือกมะม่วงด้วยเครื่องวัดสี colorimeter โดยวัดผลละ 3 จุด คือ บริเวณขั้ว กลาง และด้านล่างของผลมะม่วง รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย โดยค่าที่ได้จะออกมาเป็น ค่าความสว่างของสี (L*) ค่าสีเขียว (a*) ค่าสีเหลือง (b*) การวัดค่าต่างๆ เริ่มวัดจากวันก่อนทำการทดลอง จากนั้นวัดทุกๆ 5 วัน จนครบ 20 วัน มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

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

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

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

1.4 การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ

วัดความแน่นเนื้อในผลมะม่วงด้วยเครื่อง firmness tester กรรมวิธีละ4 ผล โดยกดหัวเจาะลงในเนื้อมะม่วงบริเวณกลางผลทั้ง 2 ด้าน แล้วนำไปคำนวณหาค่าความแน่นเนื้อมีหน่วยเป็น กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร ทุกๆ 5 วัน เป็นเวลาทั้งหมด 20 วัน ใช้หัวเจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 cm สำหรับวัดความแน่นเนื้อในมะม่วงวันที่ 0, 5, 10 และ 15 ของระยะเวลาการเก็บรักษา แล้วใช้หัวเจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 cm สำหรับวัดความแน่นเนื้อในมะม่วงวันที่ 20 ของระยะเวลาการเก็บรักษา

2. การวัดสมบัติทางเคมี โดยตรวจวัดข้อมูลต่อไปนี้

2.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids, TSS)

วัดน้ำคั้นมะม่วงด้วยเครื่อง digital refractometer ทุกๆ 5 วัน เป็นเวลาทั้งหมด 20 วัน เพื่อหาค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ มีหน่วยเป็น %Brix

2.2 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity, TA)

คั้นน้ำมะม่วงผลละ 5 มิลลิลิตร แล้วไทเทรตด้วย NaOH 0.1 นอร์มัล โดยหยด phenolphthalein 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อน้ำคั้นมะม่วงเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู ถือว่าถึงจุดยุติ (end point) และนำปริมาตรของ NaOH ที่ใช้มาคำนวณหาปริมาณกรดที่ไทเทรตได้โดยเทียบกับกรดซิตริกได้จากสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

*milliequivalent of citric acid (anhydrous) = 0.064 (Pearson, 1971)

วัดปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ตั้งแต่วันแรกก่อนทำการทดลองจากนั้นตรวจวัดทุกๆ 5 วันจนครบ 20 วัน

โดยแต่ละการทดลองใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved