บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องผลิตก๊าซโอโซน ยี่ห้อ OZONIZER รุ่น S05AE
2. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer ยี่ห้อ ATAGO)
3. เครื่องไตเตรท ยี่ห้อ Brinkman Digital Buret
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า (Mettler BB2400)
5. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (visible spectrophotometer) ยี่ห้อ Thermo Spectronic รุ่น Helios Etsilon
7. กล้องจุลทรรศน์
8. ตู้ดูดควัน
9. เครื่องบดปั่นตัวอย่าง ยี่ห้อ National
10. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์อื่น ๆ

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณโอโซน (American Public Health Association, 1998)
   - phosphoric acid
   - potassium indigo trisulfonate
   - sodium dihydrogen phosphate
2. สารเคมีที่ใช้ในการปรับ pH ของน้ำ
   - hydrochloric acid
   - sodium hydroxide
3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้
   - sodium hydroxide
   - phenolphthalein

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างด้วยวิธี GT Pesticide Test Kit (Thoophom, 1998) ประกอบด้วย
   - น้ำยาสกัด-1
   - น้ำยาสกัด-2
   - น้ำยาจีที-1
   - น้ำยาจีที-2
   - สารจีที-2.1
   - น้ำยาจีที-3
   - สารจีที-3.1
   - น้ำยาจีที-4
   - น้ำยาจีที-5
5. สารฆ่าแมลง
   - methomyl 40% SP ผลิตโดยบริษัท ดูปองท์ (ประเทศไทย) จำกัด
   - dimethoate 40%EC ผลิตโดยบริษัท เอราวัณเคมีเกษตร จำกัด
6. sodium chloride ผลิตโดยบริษัท Merck
7. silica gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ผล โดยนำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมาจากสวนเกษตรกรที่อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ทำการคัดคุณภาพเบื้องต้นโดยการคัดแยกผลที่ไม่ดี (มีตำหนิเนื่องจากเกิดบาดแผล เสียหายเนื่องจากเชื้อโรค และแมลง) ออกไป จากนั้นแบ่งผลส้มเป็นกลุ่ม เพื่อแยกปฏิบัติตามแต่ละกรรมวิธี ซึ่งได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาระยะเวลาการปล่อยก๊าซโอโซนและการคงตัวของโอโซนในน้ำ

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองย่อย ดังนี้

1.1 ศึกษาระยะเวลาการปล่อยก๊าซโอโซนผ่านน้ำ โดยในเบื้องต้นจะทำการปล่อยก๊าซโอโซนจากเครื่องผลิตโอโซน ยี่ห้อ OZONIZER รุ่น S05AE ซึ่งมีความสามารถในการผลิตโอโซนได้ 1,500 มิลลิกรัม/ชั่วโมง ลงไปในน้ำกรอง (pH 7.15) ด้วยอัตราการไหลของก๊าซเท่ากับ 3.35 ลิตร/นาที เป็นระยะเวลา 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณโอโซนในน้ำโดยใช้วิธี Indigo Colorimetric (Clesceri *et al.*, 1998) เพื่อทดสอบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการปล่อยก๊าซโอโซนลงในน้ำนานขึ้นจะมีปริมาณโอโซนในน้ำเพิ่มขึ้นด้วยหรือไม่ สำหรับวิธีการตรวจวัดปริมาณโอโซนในน้ำนั้นได้อธิบายไว้ในภาคผนวก ก

1.2 ศึกษาการคงตัวของโอโซนในน้ำที่มีค่า pH ต่าง ๆ โดยปล่อยก๊าซโอโซนลงไปในน้ำกลั่น (pH 5.52) น้ำกรอง (pH 7.15) และน้ำกรองซึ่งใช้สาร HCl และ NaCl ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.50, 5.50, 4.50 และ 3.50 เป็นเวลาตามผลที่ดีที่สุดของการทดลองที่ 1.1 จากนั้นจึงทำการตรวจวัดปริมาณโอโซนในน้ำ เพื่อทดสอบว่าค่า pH ของน้ำมีผลต่อสภาพการคงตัวของโอโซนหรือไม่

1.3 ศึกษาผลของ NaCl ต่อการคงตัวของโอโซนในน้ำ โดยนำสาร NaCl 2, 4, 6, 8, 10 และ 20 กรัม มาละลายในน้ำกรอง (pH 7.15) จากนั้นปล่อยก๊าซโอโซนลงไปในน้ำเป็นเวลาตามผลที่ดีที่สุดของการทดลองที่ 1.1 และทำการตรวจวัดปริมาณโอโซนในน้ำ เพื่อทดสอบสภาพการคงตัวของโอโซนในสารละลาย NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการใช้โอโซนกับผลส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้ง

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

2.1 ศึกษาผลของการใช้โอโซนในรูปที่ปล่อยก๊าซผ่านน้ำกับผลส้ม โดยแบ่งผลส้มออกเป็น 2 กลุ่ม ผลส้มกลุ่มแรกจะนำไปจุ่มสาร methomyl (สารกลุ่ม carbamate) ความเข้มข้น 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และสาร dimethoate (สารกลุ่ม organophosphorus) ความเข้มข้น 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร นาน 1 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ จากนั้นนำไปตรวจวัดปริมาณสารตกค้างที่เปลือกผล ส่วนผลส้มกลุ่มที่ 2 นำมาผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ ทันที โดยกรรมวิธีที่เลือกใช้กับผลส้มทั้ง 2 กลุ่ม คือ กรรมวิธีที่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจจากการทดลองที่ 1 จึงนำมาศึกษาต่อ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่ในน้ำกรอง pH 7.05 (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 2 แช่ในน้ำกรอง pH 7.05 ที่ผ่านก๊าซโอโซน 10 นาที
กรรมวิธีที่ 3 แช่ในน้ำกรอง pH 7.05 ที่ผสมสาร NaCl 8 กรัม/ลิตร
กรรมวิธีที่ 4 แช่ในน้ำกรอง pH 7.05 ที่ผสมสาร NaCl 8 กรัม/ลิตรและผ่านก๊าซโอโซน 10 นาที
กรรมวิธีที่ 5 แช่ในน้ำกรอง pH 3.5 ที่ผ่านก๊าซโอโซน 10 นาที
กรรมวิธีที่ 6 แช่ในน้ำกรอง pH 6.5 ที่ผ่านก๊าซโอโซน 10 นาที

หลังจากผ่านกรรมวิธีข้างต้นแล้ว นำผลส้มมาผึ่งให้แห้งและนำไปเก็บรักษาในห้องเย็น อุณหภูมิ 5°C ความชื้นสัมพัทธ์ 80-85 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการตรวจวัดข้อมูลทุก ๆ 10 วัน ได้แก่

1. ปริมาณสารตกค้างที่เปลือกผลโดยใช้วิธี GT Pesticide Test Kit (Thoophom, 1998) ซึ่งอธิบายรายละเอียดของวิธีการไว้ในภาคผนวก ก

2. การเปลี่ยนแปลงสีผิวของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ทำการประเมินสีผิวของผลส้มโดยแบ่งออกเป็น 4 ระดับ ดังภาพ 3

ภาพ 3 ภาพประกอบการให้คะแนนสีผิวของผลส้มเขียวหวาน

4 = สีเขียวเข้ม
3 = สีเขียวออกเหลือง
2 = สีเหลืองออกเขียว
1 = สีเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค การเกิดโรคของผลส้มเขียวหวานพิจารณาจากการปรากฏของเส้นใยของเชื้อราที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า (ภาพ 4) โดยผลที่ปรากฏเส้นใยในระดับ 1 จะนับเป็นผลที่เป็นโรค จากนั้นนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนผลที่เกิดโรค}}{\text{จำนวนผลทั้งหมด}} \times 100$$

ภาพ 4 ผลส้มเขียวหวานที่เป็นโรคและมีเส้นใยของเชื้อราเกิดขึ้น

4. เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก โดยการชั่งน้ำหนักเริ่มต้นและน้ำหนักในวันที่ตรวจวัดผลของผลส้มแต่ละผล แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักในวันที่วัดผล}) \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$$

5. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ วัดโดยใช้เครื่อง hand refractometer โดยก่อนที่จะทำการวัดให้ใช้น้ำกลั่นปรับสเกลให้เป็นศูนย์ แล้วเช็ดน้ำกลั่นออก จากนั้นหยดน้ำคั้นที่ได้จากผลส้มในแต่ละกรรมวิธีลงบนเครื่อง hand refractometer อ่านค่าเป็นเปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ นำน้ำคั้นจากผลส้มมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้ฟีนอล์ฟธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ จนกระทั่งได้จุดยุติเป็นสีชมพูแล้ว นำไปคำนวณหาปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดซิตริก ดังนี้

$$\%TA = \frac{\text{Normality of NaOH} \times \text{Titer} \times \text{milliequivalent weight of citric acid} \times 100}{\text{Volume of sample used}}$$

โดยที่ Normality of NaOH = 0.1 นอร์มัล

Titer = ปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

Milliequivalent weight of citric acid = น้ำหนักกรัมสมมูลย์ของกรดที่มีมากในส้ม คือ กรดซิตริก = 0.064

Volume of sample used = น้ำคั้นผลิตผลที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)

7. การยอมรับของผู้บริโภค โดยใช้หลักการให้คะแนนการยอมรับแบบ 1-9 ที่เรียกว่า Hedonic scale (Peacock *et al.*, 1986) โดยพิจารณาทั้งทางด้านสีเนื้อ (flesh colour) กลิ่น (odor) รสชาติ (flavor) เนื้อสัมผัส (texture) และการยอมรับคุณภาพโดยรวม (acceptability) ดังนี้

1 = ไม่ชอบมากที่สุด (dislike extremely)
2 = ไม่ชอบมาก (dislike very much)
3 = ไม่ชอบปานกลาง (dislike moderately)
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย (dislike slightly)
5 = เฉยๆ (like nor dislike)
6 = ชอบเล็กน้อย (like slightly)
7 = ชอบปานกลาง (like moderately)
8 = ชอบมาก (like very much)
9 = ชอบมากที่สุด (like extremely)

2.2 ศึกษาผลของการใช้โอโซนในรูปของก๊าซกับผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง โดยแบ่งผลส้มออกเป็น 2 กลุ่ม ผลส้มกลุ่มแรกจะนำไปจุ่มสาร methomyl (สารกลุ่ม carbamate) ความเข้มข้น 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และสาร dimethoate (สารกลุ่ม organophosphorus) ความเข้มข้น 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร นาน 1 นาที แล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ จากนั้นนำไปตรวจวัดปริมาณสารตกค้างที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปลือกผล ส่วนผลส้มกลุ่มที่ 2 นำมาผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ ทันที โดยกรรมวิธีที่เลือกใช้กับผลส้มทั้ง 2 กลุ่ม คือ การรมด้วยก๊าซโอโซนที่ผลิตจากเครื่องผลิตโอโซน ยี่ห้อ OZONIZER รุ่น S05AE ด้วยอัตราการไหลของก๊าซเท่ากับ 3.35 ลิตร/นาที โดยทำการปล่อยก๊าซโอโซนรมผลส้มเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ผ่านการรมด้วยก๊าซโอโซน (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 2 รมด้วยก๊าซโอโซน 15 นาที
กรรมวิธีที่ 3 รมด้วยก๊าซโอโซน 30 นาที
กรรมวิธีที่ 4 รมด้วยก๊าซโอโซน 45 นาที
กรรมวิธีที่ 5 รมด้วยก๊าซโอโซน 60 นาที

หลังจากผ่านกรรมวิธีข้างต้นแล้ว นำผลส้มไปเก็บรักษาในห้องเย็นอุณหภูมิ 5°C ความชื้นสัมพัทธ์ 80-85 เปอร์เซ็นต์ และทำการตรวจวัดข้อมูลเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 2.1

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของโอโซนต่อการเกิดโรคเนื่องจากเชื้อ *Penicillium digitatum* และการลดปริมาณสารตกค้างในผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

3.1 ศึกษาถึงผลของโอโซนต่อการเกิดโรคเนื่องจากเชื้อ *P. digitatum* โดยนำผลส้มมาทำบาดแผลด้วยการใช้เข็มหมุดขนาดเล็กแทงลงไปที่ผิวของผลส้มลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร จากนั้นจึงนำผลส้มไปปลูกเชื้อด้วยสปอร์ของเชื้อ *P. digitatum* ปริมาณ 7.3×10^5 สปอร์/มิลลิลิตร และบ่มเชื้อทิ้งไว้จนครบ 3 ชั่วโมง จึงนำไปผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ทำบาดแผลและไม่ปลูกเชื้อ *P. digitatum* (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 2 ทำบาดแผลและไม่ปลูกเชื้อ *P. digitatum*
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อ *P. digitatum*
กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อ *P. digitatum* และแช่ในน้ำกรอง pH 7.05 ที่ผสมสาร NaCl 8 กรัม/ลิตร
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อ *P. digitatum* และแช่ในน้ำกรอง pH 3.50 ที่ผ่านก๊าซโอโซน 10 นาที
กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อ *P. digitatum* และรมด้วยก๊าซโอโซน 30 นาที
กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อ *P. digitatum* และรมด้วยก๊าซโอโซน 60 นาที

หลังจากนั้นนำผลส้มใส่ตะกร้าและบรรจุลงในถุงพลาสติกที่มีกระดาษชื้น เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ทำการตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคทุกวันจนสิ้นสุดการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 ศึกษาผลของโอโซนต่อการลดปริมาณสารตกค้างในเปลือกผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

3.2.1 ศึกษาถึงผลของโอโซนต่อการลดปริมาณสาร methomyl ในผลส้ม โดยนำผลส้มมาจุ่มลงในสาร methomyl (สารกลุ่ม carbamate) ความเข้มข้น 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร นาน 1 นาที แล้วผึ่งให้แห้งก่อน จากนั้นจึงนำไปผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุ่มสาร methomyl

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มสาร methomyl และแช่ในน้ำกรอง pH 7.05 ที่ผสมสาร NaCl 8 กรัม/ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 จุ่มสาร methomyl และแช่ในน้ำกรอง pH 3.50 ที่ผ่านก๊าซโอโซน 10 นาที

กรรมวิธีที่ 4 จุ่มสาร methomyl และรมด้วยก๊าซโอโซน 30 นาที

กรรมวิธีที่ 5 จุ่มสาร methomyl และรมด้วยก๊าซโอโซน 60 นาที

ทำการตรวจวัดปริมาณสารตกค้างที่เปลือกผลโดยใช้วิธี GT Pesticide Test Kit (Thoophom,1998)

3.2.2 ศึกษาถึงผลของโอโซนต่อการลดปริมาณสาร dimethoate ในผลส้ม โดยนำผลส้มมาจุ่มลงในสาร dimethoate (สารกลุ่ม organophosphorus) ความเข้มข้น 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร นาน 1 นาที แล้วผึ่งให้แห้งก่อน จากนั้นจึงนำไปผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุ่มสาร dimethoate

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มสาร dimethoate และแช่ในน้ำกรอง pH 7.05 ที่ผสมสาร NaCl 8 กรัม/ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 จุ่มสาร dimethoate และแช่ในน้ำกรอง pH 3.50 ที่ผ่านก๊าซโอโซน 10 นาที

กรรมวิธีที่ 4 จุ่มสาร dimethoate และรมด้วยก๊าซโอโซน 60 นาที

ทำการตรวจวัดปริมาณสารตกค้างที่เปลือกผลโดยใช้วิธี GT Pesticide Test Kit (Thoophom,1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved