บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. กล่องพลาสติกสำหรับผลิตน้ำ EO (ภาพ 5)
2. เครื่องวัดความเข้มข้นของโอโซน (ozone detector) ยี่ห้อ GASTEC
3. เครื่องกำเนิดโอโซน (OZONIZER รุ่น SO 5 AE บริษัท SKY ZONE)
4. เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้า ยี่ห้อ Super 10 รุ่น S12A10
5. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer ยี่ห้อ ATAGO)
6. เครื่องวัดสีผิวเปลือก (chromameter) ยี่ห้อ MINOLTA รุ่น CR - 200
7. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น XT 920M บริษัท PRECISA
8. ตู้เย็นที่ปรับอุณหภูมิ 5°C ยี่ห้อ Refrigertor ITALY รุ่น PT 203
9. เครื่องกวนสารละลาย บริษัท Clifton CERASTIR
10. กล่องพลาสติกขนาด 15 x 11 x 5 ซม.
11. pH meter (รุ่น Metrohm 744)
12. เครื่องวัด ion exchange (ยี่ห้อ INOLAB)
13. เครื่องวัดปริมาณคลอรีน (ION SPECIFIC METERS รุ่น HI 93701)
14. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Olympus Bx – 51)
15. micro pipette
16. กระดาษกรอง
17. ถุงพลาสติกขนาด 18x30 นิ้ว
18. ตะกร้าพลาสติก
19. เข็มหมุดขนาดเล็ก
20. อุปกรณ์ด้านจุลชีววิทยา
    - autoclave
    - lamina air flow
    - petri dish
    -เข็มเขี่ยเชื้อและห่วงถ่ายเชื้อ
    - ตะเกียงแอลกอฮอล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- คีมคีบ

สารเคมี

1. แอลกอฮอล์ 70%
2. น้ำกลั่น
3. อาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA (potato dextrose agar)
4. เกลือบริสุทธิ์ (NaCl)
5. สารละลายเกลืออิ่มตัว (น้ำ 1 l : NaCl 400 g)
6. phenolphthalein
7. NaOH
8. sodium thiosulfate
9. เชื้อ *Penicillium digitatum*

พืชทดลอง

ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง จากอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการวิจัยสรีรวิทยาหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการทดลอง

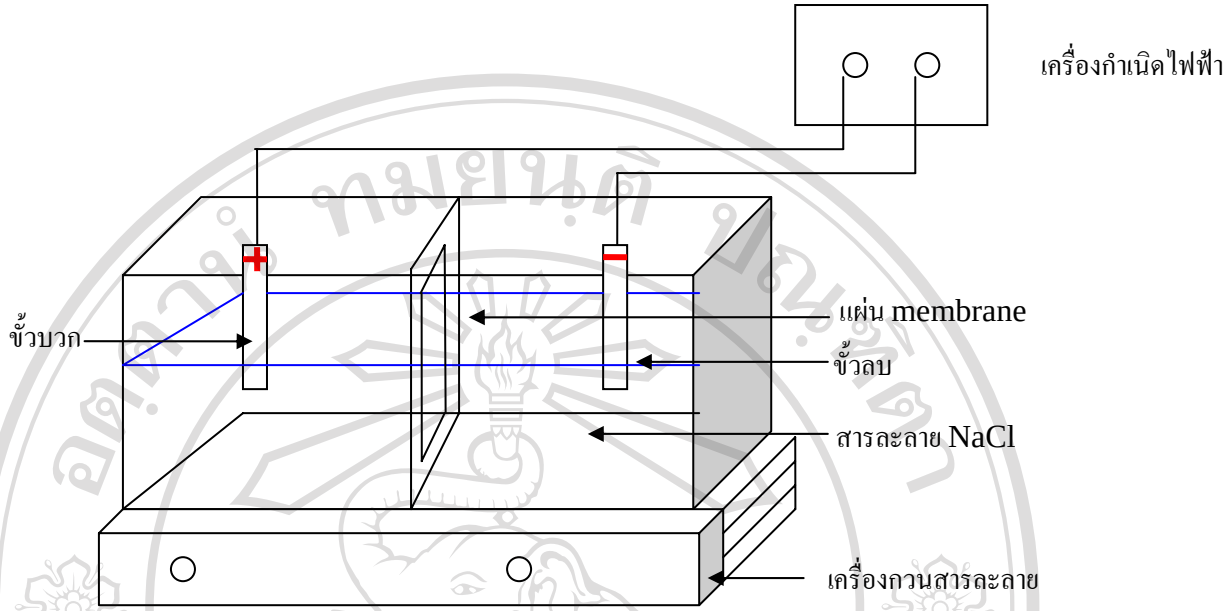
การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของน้ำอิเล็กโทรไลต์ (EO) ในการยับยั้งเชื้อ *Penicillium digitatum* ในหลอดทดลอง

แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย

1.1 การผลิตน้ำ EO

น้ำอิเล็กโทรไลต์ผลิตโดยใช้หลักการ electrolysis โดยใช้ขั้วบวกและลบที่ทำด้วย titanium และใช้สารละลายเกลือ (NaCl) ใส่ใน chamber (ภาพ 5) โดยใช้ความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน (0, 5, 25, 50% และสารละลายเกลืออิ่มตัว) โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 8 แอมแปร์ และ 8 โวลต์ เป็นเวลานาน 20, 40 และ 60 นาที หลังจากได้น้ำ EO แล้วนำไปวิเคราะห์ค่า pH , electrolyte conductivity (EC), และความเข้มข้นของคลอรีนอิสระ (available free chlorine) ทันทีโดยวิธี DPD (N,N-diethyl-p-phynylene) (Pailin, 1967)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 5 อุปกรณ์ผลิตน้ำอิเล็กโทรไลต์

1.2 ศึกษาผลของน้ำอิเล็กโทรไลต์ (EO) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Penicillium digitatum*

1. เตรียม spore suspention ของ *P. digitatum* จำนวน 1 ml ผสมกับ น้ำ EO ซึ่งผลิตจากการทดลอง 1.1 โดยใช้ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (0, 5, 25, 50% และสารละลายเกลืออิ่มตัว) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 27 °C เป็นเวลา 1, 2, 4, 8, 16, 32 นาที

2. ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสะลายในข้อ 1 มา 0.1 ml ผสมกับ 0.1N sodium thiosulfate ปริมาตร 0.9 ml

3. ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสะลายในข้อ 2 มา 0.1 ml แล้วทำการ spread plate บน PDA แล้วนำไปบ่มที่ 27 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทั้งหมด (CFU/ml)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 ผลของน้ำ EO ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเชื้อ *Penicillium digitatum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (light compound microscopy)

ทำการแยกเชื้อราที่มีอายุ 4–5 วัน มาใส่ในแผ่นสไลด์ที่ทำความสะอาดแล้ว จากนั้นหยดน้ำ EO ที่ผลิตได้ แล้วใช้แผ่น cover ปิดทับลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลา 32 นาที จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไป

ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (light compound microscope) Olympus Bx – 51

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของน้ำอิเล็กโทรไลต์ (EO) ต่อการควบคุมโรคและคุณภาพของส้มสายน้ำผึ้งหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

1. การเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ *Penicillium digitatum*

2. การปลูกเชื้อลงผลส้ม โดยการนำผลส้มมาทำความสะอาดและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ จากนั้นนำผลส้มมาทำบาดแผลด้วยการใช้เข็มหมุดขนาดเล็กแทงลงไปที่ผิวส้มลึกประมาณ 0.5 mm จากนั้นหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Penicillium digitat*um ปริมาณ 1.67 X 10^5 spore/ml ปริมาณ 20 µl บ่มเชื้อทิ้งไว้ 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 27°C แล้วจึงนำส้มไปล้างด้วยน้ำ EO โดยใช้ระยะเวลาการผ่านกระแสไฟและความเข้มข้นของ NaCl ที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2 โดยกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปลูกเชื้อแบบทำบาดแผลและล้างผลส้มในน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อแบบทำบาดแผลและล้างผลส้มในน้ำ EO นาน 4 นาที
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อแบบทำบาดแผลและล้างผลส้มในน้ำ EO นาน 8 นาที
กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อแบบทำบาดแผลและล้างผลส้มในน้ำ EO นาน 16 นาที

หลังจากนั้นนำผลส้มใส่ตะกร้าพลาสติกห่อด้วยถุงพลาสติกใสเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5°C นานเป็นเวลา 21 วัน โดยทำการวัดผลทุกๆ 3 วัน โดยมีแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD)

3. บันทึกผล โดยทำการสุ่มตัวอย่าง 3 ซ้ำๆ ละ 10 ผล โดยวัดค่าน้ำหนักการสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และสีเปลือกด้านนอกของผลดังนี้

1. เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก โดยวัดค่าน้ำหนักสดในวันเริ่มต้นและวันที่วัดผลโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ดังนี้

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

2. เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยพิจารณาจากการเกิดขึ้นของเส้นใยเชื้อราที่สามารถสังเกตได้ด้วย ตาเปล่า โดยที่มีเส้นใยขึ้นนับเป็นผลที่เกิดโรค แล้วจึงนำผลที่ได้ไปคำนวณดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

3. ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids ;TSS) วัดโดยใช้เครื่อง hand refractometer โดยก่อนวัดปรับสเกลให้เป็นศูนย์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงหยดน้ำคั้นจากผลส้มของแต่ละกรรมวิธีลงบนเครื่องวัดแล้วอ่านค่าที่ได้

4. ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TA) โดยการนำน้ำคั้นจากผลส้มมา 5ml หยดสาร phenolphthaline 2 หยดซึ่งใช้เป็นอินดิเคเตอร์แล้วจึงทำการไทเทรตด้วย sodium hydroxide (NaOH) จนกระทั่งสารละลายเป็นสีชมพูอ่อน แล้วนำค่าที่อ่านได้ไปคำนวณตามสูตรนี้

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

Normality of NaOH = 0.1 นอร์มัล

Titer = ปริมาณของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)

milliequivalent weight of citric acid = น้ำหนักกรัมสมมูลย์ของกรดที่มีมากในส้มคือกรดซิตริก = 0.064

Volume of sample use = น้ำคั้นผลิตผลที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

5. สีเปลือกด้านนอก โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของสีเปลือกด้านนอกของผลส้ม โดยใช้เครื่องวัดสีของวัตถุ (chromameter) วัดที่บริเวณกึ่งกลางผลทั้ง 2 ด้านค่าที่ได้จากการวัดแสดงเป็นค่า L*, a*, b* โดยค่า L* = The lightness factor (value)

a*, b* = The chromaticity coordinates (hue, chroma)

เมื่อค่า L* เป็นค่าความสว่าง มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีคล้ำ หากเข้าใกล้ 100 หมายถึง วัตถุมีสีสว่าง

a* เป็นค่าที่แสดงถึงสีแดงและสีเขียว ถ้าค่า a* เป็นบวก (+) วัตถุจะมีสีแดง แต่ถ้าค่า a* เป็นลบ (-) วัตถุจะมีสีเขียว โดยมีค่า -60 ถึง + 60

b* เป็นค่าที่แสดงถึงสีเหลืองและสีน้ำเงิน ถ้าค่า b* เป็นบวก (+) วัตถุจะมีสีเหลือง แต่ถ้าค่า b* เป็นลบ (-) วัตถุจะมีน้ำเงิน โดยมีค่า -60 ถึง + 60

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของก๊าซโอโซนในการควบคุมโรคของส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

3.1 ศึกษาผลของก๊าซโอโซนต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Penicillium digitatum*

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium digitatum* ไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ แล้วนำ จานอาหารเลี้ยงเชื้อไปรมด้วยก๊าซโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 200 ppm ที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง บันทึกผลและวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด

3.2 ผลของก๊าซโอโซนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเชื้อ *Penicillium digitatum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (light compound microscopy)

ทำการแยกเชื้อราอายุ 4 – 5 วันที่ผ่านการรมก๊าซโอโซนด้วยระยะเวลาที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 3.1 มาใส่ในแผ่นสไลด์ที่ทำความสะอาดแล้ว แล้วใช้ แผ่น cover ปิดทับลงไป จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศ์แบบเลนส์ประกอบ (Olympus Bx – 51)

3.3 ศึกษาผลของโอโซนต่อการควบคุมการเกิดโรคและคุณภาพของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

1. นำส้มมาทำบาดแผลโดยใช้เข็มหมุดขนาดเล็กแทงลงไปในผิวส้มลึก 0.5 mm จากนั้นนำส้มไปปลูกด้วยสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium digitatum* ปริมาณ 1.31 X 10^5 spore/ml หยด spore suspension 20 µl ใช้กระดาษกรองปิดปากแผลไว้ และบ่มเชื้อทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 27°C โดยแบ่งชุดการทดลองดังนี้

1) ปลูกเชื้อแบบทำบาดแผล (ชุดควบคุม)

2) ปลูกเชื้อแบบทำบาดแผล และรมก๊าซโอโซน

3) ปลูกเชื้อแบบไม่ทำบาดแผล

4) ปลูกเชื้อแบบไม่ทำบาดแผล และรมก๊าซโอโซน

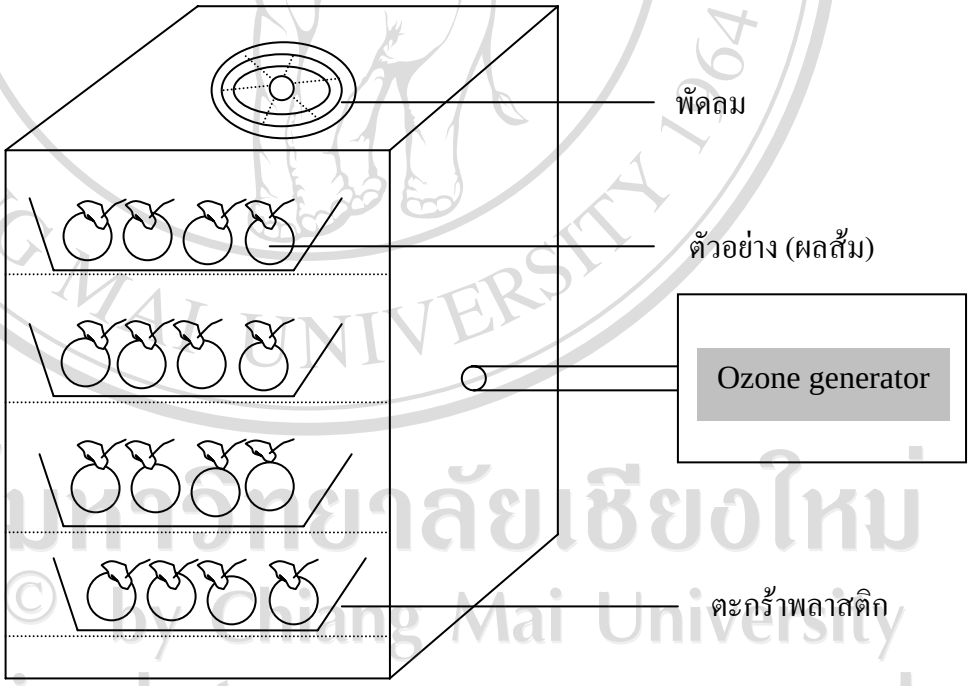
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. นำส้มมาผ่านกรรมวิธีโดยการรมด้วยก๊าซโอโซนที่ระดับความเข้มข้น ที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 3.1 วันละ 2 ชั่วโมงแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 21 วัน ทำ 3 ซ้ำโดยใช้ตัวอย่าง 10 ผล/ซ้ำ แล้วนำผลส้มใส่ในตะกร้าและบรรจุถุงพลาสติก แยกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C โดยทำการวัดผลทุกๆ 3 วัน โดยมีแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD)

3. การบันทึกผล โดยทำการสุ่มตัวอย่าง 3 ซ้ำๆ ละ 1 ผล ทำการตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และสังเกตการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของส้มสายน้ำผึ้ง โดยทำการวัด น้ำหนักสด เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายน้ำ (TSS) ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TA) การเปลี่ยนแปลงสีผิวตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้างต้น

การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของน้ำ EO ร่วมกับโอโซนต่อการควบคุมการเกิดโรคและคุณภาพของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

นำผลส้มมาทำการปลูกเชื้อ และมาล้างด้วยน้ำ EO เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 5°C ที่ต่อท่อเข้ากับเครื่องผลิตโอโซนทำการวัดความเข้มข้นของโอโซนโดยใช้ ozone detector (ภาพ 6) โดยรมผลส้มด้วยโอโซนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทุกวันแบบต่อเนื่องระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 28 วัน บันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2



ภาพ 6 แสดงการทดสอบผลของโอโซนแบบต่อเนื่องต่อการควบคุมการเกิดโรคและคุณภาพของผลส้มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved