บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Yeast Agar (MYA)
4. Tween 20
5. สารละลายกรดแลคติก
6. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
7. ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer)
8. เทอร์โมมิเตอร์
9. Haemacytometer
10. Micropipette
11. เครื่องไตเตรท (Brinkman digital burette)
12. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (digital hand refractometer) ของ ATAGO รุ่น PR 101
13. เครื่องวัดสี (Hunter's colorimeter model CR-200 ของ Minolta)
14. เครื่องชั่งไฟฟ้า ของ Oertling รุ่น 21 TD
15. เครื่องบดเนื้อเยื่อ ของ Janke and Kunkel รุ่น T25
16. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ ของ Olympus รุ่น CO 1
17. เครื่องเขย่า (rotary shaker) ของ Kika Labortechnik รุ่น KS501 digital
18. เครื่องวัดความแน่นเนื้อ ของ Stable Micro Systems Texture Analyser รุ่น TA-XT2i
19. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath ของ Gel รุ่น 1083)
20. Inoculator (ภาคผนวก ก)
21. ภาชนะควบคุมความชื้น (ภาคผนวก ก)

การเตรียมผลมะม่วงที่ใช้ในการทดลอง

ผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกที่ใช้ในการทดลอง นำมาจากสวนบ้านทราย อ. เมือง จ. ลำปาง โดยใช้มะม่วงที่มีอายุการเก็บเกี่ยว 150 วันหลังดอกบานเต็มที่ เลือกผลที่ไม่มีบาดแผล ไม่เป็นโรคในการเก็บเกี่ยว ตัดก้านให้เหลือความยาวประมาณ 2 นิ้ว เพื่อป้องกันยางไหลโดนผิวมะม่วง ขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ โรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย เด็ดก้านออกเพื่อให้ยางไหลนำผลมะม่วงไปวางบนกระดาษหนังสือพิมพ์โดยคว่ำขั้วผลลงเพื่อซับยางออกให้หมด ทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ผึ่งไว้ให้แห้ง เช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ รอให้แห้งก่อนนำไปทดลองต่อไป

วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองเป็น 5 ตอน คือ ตอนที่ 1 การรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารและการคัดเลือกเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนส ตอนที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ตอนที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสเมื่อใช้ร่วมกับการแช่น้ำร้อน ตอนที่ 4 ศึกษาผลของการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับการแช่น้ำร้อน ต่อคุณภาพของผลมะม่วง ตอนที่ 5 การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ตอนที่ 1 การรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์จากอาหาร และการคัดเลือกเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนส

1.1 การรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์จากอาหาร

แยกเชื้อจุลินทรีย์จาก แหนมหมู ปลาส้ม ถั่วเน่า และวุ้นมะพร้าวซึ่งนำมาจากตลาดต้นพยอม อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ โยเกิร์ตยี่ห้อดัชท์มิลล์ น้ำส้มสายชูหมักจากน้ำตาลโตนด อำเภอสทิงพระ จังหวัดสงขลา และลูกแป้งจากอำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ โดยชั่งตัวอย่างอาหาร 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้เข้ากัน ใช้ปิเปตที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (spreader) จุ่มในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟรอจนเย็น นำมาเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานอาหาร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน จนเชื้อเจริญเต็มที่ นำไป streak บน PDA จนได้โคโลนีเดี่ยว เลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำให้บริสุทธิ์ ให้ชื่อและหมายเลขไอโซเลท แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป สำหรับเชื้อที่ปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการแยกโดยวิธี streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จนได้โคโลนีเดี่ยว เลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำให้บริสุทธิ์ ให้ชื่อและหมายเลขไอโซเลท

1.2 การคัดเลือกเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสไอโซเลทต่างๆ จากผลมะม่วง

1.2.1 แยกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* จากมะม่วงที่เป็นโรคแอนแทรคโนส โดยแยกจากผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้จากจังหวัดชัยนาท จังหวัดลำปาง และจากภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และมะม่วงพันธุ์มหาชนกจากจังหวัดลำปางและลำพูน โดยวิธี Tissue transplanting ตัดชิ้นส่วนของมะม่วงบริเวณที่เป็นโรคซึ่งเป็นส่วนรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่เป็นโรคและเนื้อเยื่อปกติขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อด้วย 1 % sodium hypochlorite เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้แห้ง นำมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3-7 วัน แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYA เพื่อกระตุ้นให้เชื้อสร้างสปอร์ บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 7-10 วัน เชื้อ *C. gloeosporioides* จะสร้างสปอร์จำนวนมาก เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารที่มีการสร้างสปอร์ ใช้ loop เขี่ยเบาๆ บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สปอร์หลุดออกมา นำไปกรองเอาเส้นใยเชื้อราออกด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วพับ 4 ชั้น นับจำนวนสปอร์ด้วย haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปรับปริมาณสปอร์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจนได้ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เติมสารละลาย Tween 20 ในอัตราส่วน 0.04 มิลลิลิตรต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร (อภิญญา, 2544) เพื่อให้สปอร์กระจายตัวได้ดีขึ้นเนื่องจาก Tween 20 มีคุณสมบัติช่วยลดแรงตึงผิวของสาร

1.2.2 การทดสอบเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสไอโซเลทต่างๆ เตรียมมะม่วงตามวิธีเตรียมพืชทดลอง ใช้ปากกาเคมีกันน้ำวาดวงกลมบนผิวมะม่วงด้านเดียวกับบริเวณที่จะปลูกเชื้อ ผลละ 3 วง ทำแผลโดยใช้ inoculator (ภาคผนวก ก) จิ้มลงในวงกลมที่เขียนไว้บนผิวมะม่วง 1 ครั้ง วางกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บนแผลที่ทำไว้ หยด spore suspention ของเชื้อ *C. gloeosporioides* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากการทดลองที่ 1.2.1 ซึ่งมีปริมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษกรองโดยใช้ ไมโครปิเปต แผลละ 20 ไมโครลิตร วางมะม่วงในภาชนะควบคุมความชื้น (ภาคผนวก ก) นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28±2 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดึงถุงพลาสติกออกแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องอีก 7 วัน ประเมินความสามารถทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสของเชื้อ *C. gloeosporioides* แต่ละไอโซเลทโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผล วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล

ตอนที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากการทดสอบร่วมกับเชื้อสาเหตุในจานเพาะเชื้อ (dual culture)

เตรียมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท MI1 โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จนมีอายุ 5–7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ตัดบริเวณขอบของโคโลนีเชื้อรา นำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจานทดสอบโดยห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 2 เซนติเมตร ใช้ loop แตะเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ จากอาหารแต่ละชนิด ลากเป็นเส้นตรงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้านตรงข้ามกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ห่างกัน 5 เซนติเมตร ส่วนชุดควบคุมได้วางเฉพาะโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บ่มที่อุณหภูมิห้อง วัดรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้านที่เจริญเข้าหาเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารทุกๆ 3 วัน นำค่าไปคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้ง โดยสูตรต่อไปนี้

$$\text{ประสิทธิภาพการยับยั้ง (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A = รัศมีโคโลนีของเชื้อราในจานควบคุม

B = รัศมีโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์จากอาหาร

วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละกรรมวิธีมี 7 ซ้ำ ซ้ำละ 1 plate

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากการทดสอบร่วมกับเชื้อสาเหตุบนผลมะม่วง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomized design) มี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ชนิดของจุลินทรีย์ 11 ชนิด ได้แก่ CM-NM-1, CM-NM-2 CM-NM-3, CM-PF-1, CM-PF-2, CM-LP, CM-YK, CM-NA, SK-AV, CM-TN และ CON-1 ปัจจัยที่ 2 คือ กรรมวิธี มี 2 กรรมวิธี ได้แก่ การจุ่มมะม่วงในสารละลายแขวนลอยของจุลินทรีย์จากอาหารก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ และการจุ่มมะม่วงในสารละลายแขวนลอยของจุลินทรีย์จากอาหารหลังการปลูกเชื้อสาเหตุ

เตรียมสารละลายแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารแต่ละชนิดที่แยกได้จากการทดลองตอนที่ 1 โดยใช้ loop แตะเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ นำไปเขย่าด้วยเครื่อง

เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 2-3 วัน นับจำนวนเชื้อโดยใช้ haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้ได้ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร

เตรียมมะม่วงตามวิธีเตรียมพืชทดลอง ใช้ปากกาเคมีกันน้ำวาดวงกลมบนผิวของผลมะม่วงด้านเดียวกับบริเวณที่จะปลูกเชื้อ ผลละ3 วง ทำแผลโดยใช้ inoculator จิ้มลงในวงกลมวงละ 1 ครั้ง สำหรับกรรมวิธีแรกนำผลมะม่วงจุ่มใน cell suspension ของจุลินทรีย์ปริมาณ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ให้ทั่วผล แล้วนำไปวางในภาชนะควบคุมความชื้น นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28±2 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปลูกเชื้อสาเหตุโดยวางกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บนแผลที่ทำไว้ หยด spore suspension ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ปริมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ลงบนกระดาษกรองโดยใช้ไมโครปิเปต แผลละ 20 ไมโครลิตร ส่วนกรรมวิธีที่ 2 ได้ปลูกเชื้อสาเหตุบนผลมะม่วงและบ่มในที่ชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมะม่วงจุ่ม cell suspension ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปริมาณ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร สำหรับชุดควบคุมได้ปลูกเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว (ดัดแปลงจากวิธีของ จินันทนา (2543)) เก็บมะม่วงที่อุณหภูมิห้อง (28±2 °C)

แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล ประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแอน-แทรคโนสโดยวัดขนาดของแผลที่เกิดในวันที่ 3, 5 และ 7

ตอนที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสเมื่อใช้ร่วมกับการแช่น้ำร้อน

คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแอน-แทรคโนส จากการทดลองตอนที่ 2 มาใช้ ซึ่งได้แก่เชื้อจุลินทรีย์ CM-NA

3.1 การทดสอบบนผลมะม่วงที่ผ่านการทำแผลก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ

เตรียมมะม่วงตามวิธีเตรียมพืชทดลอง ใช้ปากกาเคมีกันน้ำวาดวงกลมบนผิวมะม่วงด้านเดียวกับบริเวณที่จะปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* ผลละ 3 วง ทำแผลโดยใช้ inoculator จิ้มลงในวงกลมแต่ละวงบนผลมะม่วง 1 ครั้ง จากนั้นนำไปทดสอบ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุ่มน้ำกลั่นโดยไม่ปลูกเชื้อสาเหตุ (ชุดควบคุม 1)

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA โดยไม่ปลูกเชื้อสาเหตุ (ชุดควบคุม 2)

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อสาเหตุ (ชุดควบคุม 3)

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อสาเหตุ+จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อสาเหตุ+แช่น้ำร้อน 50 °C 5 นาที

กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อสาเหตุ+แช่น้ำร้อน 54 °C 5 นาที

กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อสาเหตุ+แช่น้ำร้อน 50 °C 5 นาที+จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA

กรรมวิธีที่ 8 ปลูกเชื้อสาเหตุ+แช่น้ำร้อน 54 °C 5 นาที+จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA

กรรมวิธีที่ 3-8 จะปลูกเชื้อสาเหตุด้วยวิธีเดียวกับการทดลองที่ 2.2 ควบคุมอุณหภูมิของน้ำโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์และเริ่มจับเวลาเมื่อน้ำมีอุณหภูมิถึงระดับที่กำหนด มะม่วงที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ ข้างต้น จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง (28±2 °C) แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล ประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสโดยวัดขนาดของแผลที่เกิดในวันที่ 3, 5 และ 7 ของการเก็บรักษา (Sangchote and Saoha, 1997)

3.2 การทดสอบบนผลมะม่วงที่ไม่ทำแผลก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ

เตรียมมะม่วงตามวิธีเตรียมพืชทดลอง ใช้ปากกาเคมีกันน้ำวาดวงกลมบนผิวของผลมะม่วงด้านเดียวกับบริเวณที่จะปลูกเชื้อ ผลละ 3 วง จากนั้นนำไปทดสอบโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุ่มน้ำกลั่นโดยไม่ปลูกเชื้อสาเหตุ (ชุดควบคุม 1)

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA โดยไม่ปลูกเชื้อสาเหตุ (ชุดควบคุม 2)

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อสาเหตุ (ชุดควบคุม 3)

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อสาเหตุ+จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อสาเหตุ+แช่น้ำร้อน 50 °C 5 นาที

กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อสาเหตุ+แช่น้ำร้อน 54 °C 5 นาที

กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อสาเหตุ+แช่น้ำร้อน 50 °C 5 นาที+จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA

กรรมวิธีที่ 8 ปลูกเชื้อสาเหตุ+แช่น้ำร้อน 54 °C 5 นาที+จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA

กรรมวิธีที่ 3-8 จะปลูกเชื้อสาเหตุด้วยวิธีเดียวกับการทดลองที่ 2.2 แต่ไม่ต้องทำแผล มะม่วงที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ ข้างต้น จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง (28±2 °C) แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล ประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสโดยวัดขนาดของแผลที่เกิดในวันที่ 3, 5 และ 7 ของการเก็บรักษา (Sangchote and Saoha, 1997)

3.3 การทดสอบบนผลมะม่วงที่ไม่ผ่านการปลูกเชื้อสาเหตุ

เตรียมมะม่วงตามวิธีเตรียมพืชทดลองโดยไม่มีการปลูกเชื้อสาเหตุ นำไปผ่านกรรมวิธีต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุ่มน้ำกลั่น (ชุดควบคุม 1)

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA (ชุดควบคุม 2)

กรรมวิธีที่ 3 แช่น้ำร้อน 50 °C 5 นาที

กรรมวิธีที่ 4 แช่น้ำร้อน 54 °C 5 นาที

กรรมวิธีที่ 5 แช่น้ำร้อน 50 °C 5 นาที+จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA

กรรมวิธีที่ 6 แช่น้ำร้อน 54 °C 5 นาที+จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA

มะม่วงที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ ข้างต้น จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง (28±2 °C) แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล ประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในวันที่ 3,5 และ 7 ของการเก็บรักษาโดยให้คะแนนตามวิธีของ สุขุมและคณะ (ไม่ระบุปีที่พิมพ์) ดังนี้

0 = ไม่เป็นโรค

1 = เกิดอาการโรค เป็นแผลเล็กขนาดเท่าหัวเข็มหมุดจำนวน 2-3 แผลและมองเห็นไม่ชัดเจน

2 = แผลค่อนข้างใหญ่ขนาด 3-4 มิลลิเมตร จำนวน 3-4 แผล และมีเนื้อที่ของแผลต่ำกว่า 5% ของเนื้อที่ผล

3 = เป็นโรค 5-12% ของเนื้อที่ผล

4 = เป็นโรค 13-25% ของเนื้อที่ผล

5 = เป็นโรค 26-50% ของเนื้อที่ผล

6 = เป็นโรคมากกว่า 50% ของเนื้อที่ผล

ตอนที่ 4 ศึกษาผลของการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับการแช่น้ำร้อน ต่อคุณภาพของผลมะม่วง

เตรียมมะม่วงตามวิธีเตรียมพืชทดลอง นำไปผ่านกรรมวิธีต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุ่มน้ำกลั่น

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA

กรรมวิธีที่ 3 แช่น้ำร้อน 54 °C 5 นาที

กรรมวิธีที่ 4 แช่น้ำร้อน 54 °C 5 นาที+จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ CM-NA

เก็บมะม่วงที่อุณหภูมิห้อง (28±2 °C) แต่ละกรรมวิธีมีมะม่วง 25 ผล แบ่งเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 จำนวน 5 ผล ใช้สำหรับวิเคราะห์ การสูญเสียน้ำหนัก การเปลี่ยนแปลงสีเปลือก ตลอดการทดลอง ชุดที่ 2 จำนวน 20 ผล ใช้สำหรับวิเคราะห์ การเปลี่ยนแปลงสีเนื้อ ความแน่นเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (TA) และการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยวิเคราะห์ในวันที่ 3, 5 และ 7 ของการทดลอง วันละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล ยกเว้นการประเมิน

คุณภาพทางประสาทสัมผัส ได้ทำการทดลองในวันที่ 7 เนื่องจากมะม่วงมหาชนกเป็นมะม่วงรับประทานสุก

4.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

4.1.1 การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกและสีเนื้อ

วัดสีเปลือกด้วยเครื่องวัดสี Hunter's colorimeter model CR-200 ของ Minolta วัดผลละ 2 จุดโดยทำเครื่องหมายวงกลมทั้ง 2 ข้างของผลมะม่วง และวัดบริเวณนั้นทุกครั้งของการตรวจผล การวัดสีเนื้อใช้มะม่วงจากชุดที่ 2 โดยหั่นมะม่วงให้เรียบและใกล้เมล็ดที่สุด วัดสีเนื้อมะม่วงชิ้นที่ไม่ติดเมล็ด ค่าที่ได้จะแสดงเป็นค่า L*, a* ,b* และ h°

โดยค่า L* = The lightness factor (value)

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

h° = hue angle (h° = arctangent b*/ a*)

เมื่อ L* มีค่าเข้าใกล้ศูนย์หมายถึงวัตถุมีสีคล้ำ ถ้าเข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีความสว่าง

a* มีค่าเป็นบวกหมายถึง วัตถุมีสีแดง หากเป็นลบหมายถึงวัตถุมีสีเขียว

b* มีค่าเป็นบวกหมายถึง วัตถุมีสีเหลือง หากมีค่าเป็นลบหมายถึงวัตถุมีสีน้ำเงิน

ทั้ง a* และ b* มีค่าอยู่ในช่วง –60 ถึง +60 หากมีค่าเป็น 0 หมายถึงวัตถุมีสีเทา

h° มีค่าเข้าใกล้มุม 90 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเหลือง (+b) หากมีค่าเข้าใกล้ 180 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเขียว (-a)

4.1.2 เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

ชั่งน้ำหนักผลมะม่วงในวันเริ่มต้นการทดลองและวันที่ตรวจผล (วันที่ 3, 5 และ7) นำค่าที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักจากสูตร

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

4.1.3 การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ

โดยใช้ Texture analyser รุ่น TA-XT2I กำหนดสถานะของเครื่องดังนี้

ความเร็วเริ่มต้น	: 1 mm/s
ความเร็วขณะกดผ่านตัวอย่าง	: 1 mm/s
ความเร็วหลังทดลอง	: 10 mm/s
ระยะที่กด	: 5 mm/s
ชนิดหัวกด	: P6 6 mm DAI Cylinder stainless

การเตรียมตัวอย่างให้หั่นเนื้อมะม่วงแยกออกจากเมล็ด ปอกผิวให้เรียบสม่ำเสมอ วัดความแน่นเนื้อชิ้นละ 3 จุด มะม่วง 1 ผล วัด 6 จุด

4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

4.2.1 การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids, TSS)

โดยใช้ hand refractometer (ATAGO) หยดน้ำคั้นที่ได้จากมะม่วงแต่ละกรรมวิธีลงไป อ่านค่าที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์

4.2.2 การวัดปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (titratable acidity, TA) ตามวิธีของ Pearson (1971)

โดยนำน้ำคั้นของมะม่วงปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาไตเตรทด้วยสารละลายด่างมาตรฐาน NaOH (0.1 N) โดยใช้สารละลาย phenolphthalein 1% เป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อสารละลายมีสีชมพูเกิดขึ้นถือว่าถึงจุดยุติ (end point) นำปริมาตรของสารละลายด่างมาตรฐาน NaOH (0.1 N) ที่ใช้มาคำนวณหาปริมาตรกรด โดยเทียบกับกรดซิตริกได้จากสูตร

$$\%TA = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH (0.1 N) x ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ (ml) x 0.064* x 100}}{\text{ปริมาตรน้ำคั้นมะม่วง (ml)}}$$

* milliequivalent of citric acid (anhydrous) = 0.064

4.3 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ประเมินจำนวน 5 คน ตลอดการทดลอง เพื่อประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ได้แก่ สีเปลือก สีเนื้อ กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส การยอมรับ โดยมีระดับคะแนนดังนี้

4.3.1 สีเปลือก (วิทวัส, 2545)

1 = สีเขียว
2 = สีเขียวอมเหลืองเล็กน้อย
3 = สีเขียวอมเหลือง
4 = สีเหลืองอ่อน
5 = สีเหลืองเข้ม

4.3.2 สีเนื้อ (ธีราพร, 2536)

1 = สีขาว
2 = สีขาวอมเหลือง
3 = สีเหลืองอ่อน
4 = สีเหลืองเข้ม
5 = สีเหลืองอมส้ม
6 = สีส้ม
7 = สีส้มแดง

4.3.3 คุณภาพด้านกลิ่น (ณรงค์ศักดิ์, 2537)

0 = กลิ่นผิดปกติ (กลิ่นหมัก)
1 = กลิ่นดิบ
2 = ไม่มีกลิ่นดิบ
3 = กลิ่นสุกเล็กน้อย
4 = กลิ่นสุกมาก

4.3.4 คุณภาพด้านรสชาติ (ณรงค์ศักดิ์, 2537)

0 = รสผิดปกติ
1 = รสจืด
2 = รสเปรี้ยว
3 = รสหวานอมเปรี้ยว
4 = รสหวานน้อย
5 = รสหวานปานกลาง
6 = รสหวานที่สุด

4.3.5 คุณภาพด้านเนื้อสัมผัส (วิทวัส, 2545)

1 = กรอบมาก
2 = กรอบปานกลาง
3 = กรอบเล็กน้อย
4 = นิ่มเล็กน้อย
5 = นิ่มปานกลาง
6 = นิ่มมาก

4.3.6 คุณภาพการยอมรับโดยรวม (ธีราพร, 2536)

1 = ไม่ชอบมากที่สุด
2 = ไม่ชอบมาก
3 = ไม่ชอบปานกลาง
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
5 = เฉยๆ
6 = ชอบเล็กน้อย
7 = ชอบปานกลาง
8 = ชอบมาก
9 = ชอบมากที่สุด

ตอนที่ 5 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ตรวจสอบเบื้องต้นโดยสังเกตลักษณะโคโลนี ย้อมสีกรัมดูรูปร่างเซลล์ และเพื่อความถูกต้องแม่นยำในการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จึงส่งตัวอย่างที่ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ไปตรวจสอบที่ ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย 196 ถ.พหลโยธิน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900