

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วงงวงข้าว

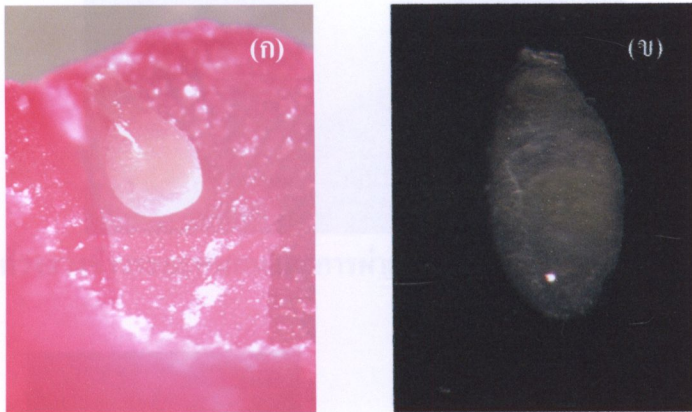
การเพาะเลี้ยงด้วงงวงข้าวในเมล็ดข้าว เพื่อใช้ในการทดลองแยกแมลงแต่ละระยะการเจริญเติบโต ได้แก่ ระยะไข่ หนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย ทำการเลี้ยงด้วงงวงข้าวที่อุณหภูมิห้อง 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 70% โดยใช้เมล็ดข้าวสารที่เป็นพืชอาหาร ซึ่งเมล็ดข้าวที่จะนำมาเลี้ยงต้องผ่านการแช่แข็ง 2-3 วัน เพื่อป้องกันไม่ให้มีแมลงชนิดอื่นติดมากับเมล็ด แล้วทำการปรับความชื้นของเมล็ดข้าวเป็น 18% เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของแมลง ก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วงงวงข้าว เพาะเลี้ยงด้วงงวงข้าวในกล่องพลาสติกทรงกระบอกฝาปิดตาข่ายถี่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร (ภาพ 3.1) โดยใส่ตัวเต็มวัยของด้วงงวงข้าวลงไปประมาณ 300 ตัวต่อกล่อง ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 5 วัน เพื่อให้แมลงมีการผสมพันธุ์และวางไข่ จากนั้นทำการร่อนแมลง โดยนำตัวเต็มวัยใส่ลงในกระป๋องพลาสติกที่ใส่ข้าวใหม่ ส่วนข้าวสารที่ร่อนนำกลับมาใส่กระป๋องพลาสติกเดิม เพื่อให้ได้ไข่ของด้วงงวงข้าวเจริญพร้อมเพรียงกัน และมีอายุใกล้เคียงกันในแต่ละระยะการเจริญเติบโต



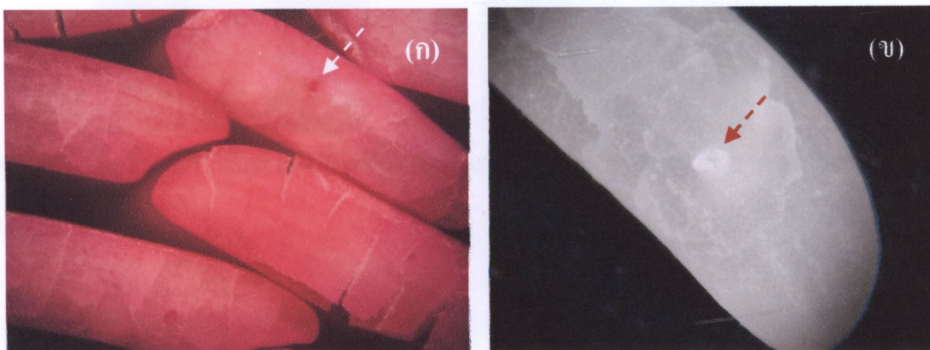
ภาพ 3.1 กล่องพลาสติกทรงกระบอกฝาปิดตาข่ายถี่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ใช้สำหรับเลี้ยงด้วงงวงข้าว

วิธีการเตรียมแมลงในแต่ละระยะการเจริญเติบโตเพื่อใช้ในการทดลอง

ระยะไข่ (ภาพ 3.2) นำด้วงงวงข้าวตัวเต็มวัยจำนวน 100 ตัวใส่ลงในกล่องพลาสติกฝาปิดตาข่ายถี่ ขนาดบรรจุเมล็ดได้ 500 กรัม ที่บรรจุข้าวสารที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้วและปล่อยให้อยู่ในสภาพอุณหภูมิห้อง แมลงจะมีการผสมพันธุ์และวางไข่เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นร่อนโดยใช้ตะแกรง คัดแยกเมล็ดข้าวและตัวเต็มวัยของด้วงงวงข้าวออกจากกัน นำเมล็ดข้าวมาข้อมสีเพื่อจำแนกเมล็ดข้าวปกติออกจากเมล็ดข้าวที่มีไข่ด้วงงวงข้าว ด้วยการแช่เมล็ดข้าวในน้ำยา acid fuchsin 0.05% ซึ่งถูกทำให้เจือจาง โดยการเติม glacial acetic acid 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ประมาณ 3 นาที (Frankenfeld, 1950) ซึ่งเมล็ดข้าวที่มีด้วงงวงข้าวมาวางไข่จะเห็น egg plug (ภาพ 3.3) ปรากฏอยู่ ทั้งนี้การข้อมจะใช้ความเข้มข้นของสีข้อมและเวลาน้อยที่สุดที่ทำให้เห็นไข่ และทำให้ไข่สามารถฟักเป็นตัวหนอนได้ตามปกติ คัดแยกเมล็ดข้าวสารที่มีไข่โดยแยกจากเมล็ดที่เห็น egg plug นำไข่ของด้วงงวงข้าวที่ได้ไปใช้ในการทดลอง



ภาพ 3.2 ไข่ของด้วงงวงข้าว (*Sitophilus oryzae* Linnaeus) ที่ตรวจพบจากการข้อมสีด้วย acid fuchsin (ก) และไข่ของด้วงงวงข้าวที่ไม่ผ่านการข้อมสี (ข)

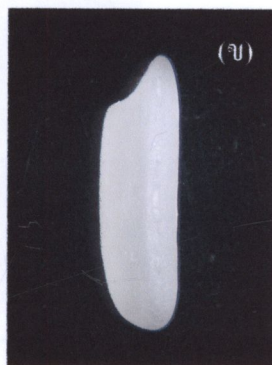
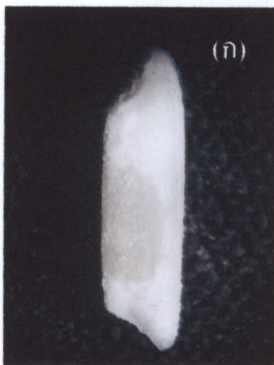


ภาพ 3.3 ลักษณะ egg plug ของด้วงงวงข้าวที่ปรากฏบนเมล็ดข้าวสารที่ผ่านการข้อมสีด้วยน้ำยา acid fuchsin 0.05% (ก) และ egg plug บนข้าวสารปกติซึ่งจะสังเกตได้ยาก (ข)

ระยะหนอน (ภาพ 3.4) นำด้วงงวงข้าวตัวเต็มวัยจำนวน 100 ตัวใส่ลงในกล่องพลาสติกฝาปิดตาข่ายถี่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่บรรจุข้าวสารที่ผ่านการแช่เย็นมาแล้ว จากนั้นทิ้งไว้ 7 วัน เพื่อให้มีการผสมพันธุ์และวางไข่ แล้วทำการร่อนโดยใช้ตะแกรง คัดแยกเมล็ดข้าวและตัวเต็มวัยของด้วงงวงข้าวออกจากกัน จากนั้นจึงปล่อยให้ไข่ฟักออกมาเป็นตัวหนอน ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 20-25 วัน คัดแยกเมล็ดที่มีตัวหนอนซึ่งจะมีลักษณะสีขาว สังเกตเห็นผงสีขาวคล้ายผงแป้ง (ภาพ 3.5 (ก)) เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวปกติที่มีสีขาวเรียบสม่ำเสมอ (ภาพ 3.5 (ข)) เมล็ดข้าวสารที่มีหนอนของด้วงงวงข้าวจะถูกคัดเลือกจากการสังเกตและนำไปใช้ในการทดลอง

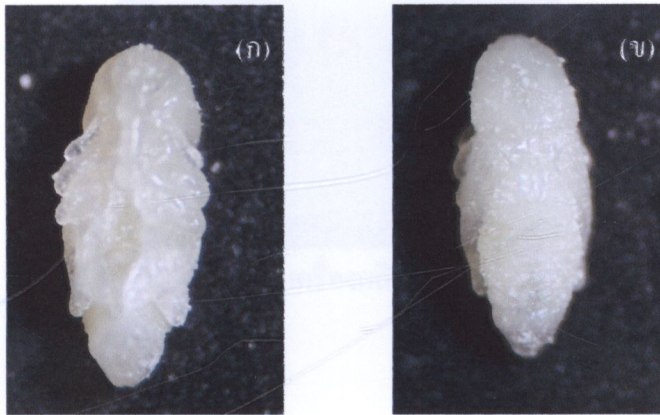


ภาพ 3.4 ด้วงงวงข้าวระยะหนอนโดยการผ่าเมล็ดข้าวสาร และนำตัวหนอนออกมา



ภาพ 3.5 เมล็ดข้าวสารที่มีตัวหนอน (ก) และเมล็ดข้าวสารปกติ (ข) ของด้วงงวงข้าว

ระยะดักแด้ (ภาพ 3.6) ใช้การเตรียมเช่นเดียวกับระยะหนอนเพียงแต่ทิ้งไว้ประมาณ 25-30 วัน เพื่อให้หนอนเข้าดักแด้



ภาพที่ 3.6 ค้างคาวงว่งเข้าระยะดักแด้ด้านหน้า (ventral view) (ก)
ค้างคาวงว่งเข้าระยะดักแด้ด้านหลัง (dorsal view) (ข)

ระยะตัวเต็มวัย (ภาพ 3.7) ใช้การเตรียมเช่นเดียวกับระยะหนอน จนกระทั่งแมลงพัฒนาไปเป็นดักแด้ และกลายเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30-35 วัน



ภาพ 3.7 ค้างคาวงว่งเข้าตัวเต็มวัย

เครื่องผลิตโอโซน (ozone generator)

เครื่องผลิตโอโซน (ozone generator) รุ่น WAO-2501 (Asia Industry IN) มีหัวปล่อยก๊าซ 1 หัว ใช้พลังงานกระแสไฟฟ้าสลับ 220 โวลต์ ความถี่ 50 Hz พลังงานไฟฟ้า 18 วัตต์ ซึ่งเครื่องนี้สามารถผลิตโอโซนได้ความเข้มข้น 60 ppm (ภาพ 3.8)



ภาพ 3.8 เครื่องผลิตโอโซน

ozone chamber

ภาชนะทำจากแก้วหรือวัสดุที่ทำจากพลาสติกอื่น ๆ มีขนาดกว้าง 12.5 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร สูง 21 เซนติเมตร เชื่อมต่อกับเครื่องผลิตโอโซน (ภาพ 3.9)

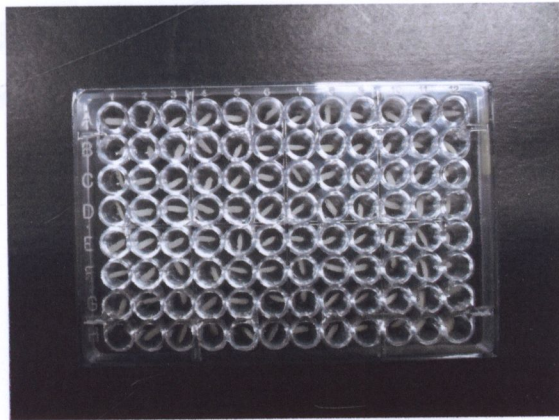


ภาพ 3.9 ภาชนะทรงสี่เหลี่ยมขนาด 12.5x25x21 เซนติเมตร ที่ใช้ในการทดสอบหาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดด้วงงวงข้าวในข้าวสาร

3.1 การศึกษาหาอัตราการฟักไข่ของด้วงงวงข้าวที่ย้อมสีด้วย acid fuchsin 0.05%

นำด้วงงวงข้าวตัวเต็มวัยประมาณ 300 ตัวใส่ลงในกล่องพลาสติกฝาปิดตายถึ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่บรรจุข้าวสารที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว และปล่อยทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง จากนั้นทิ้งไว้ 5 วันเพื่อให้มีการผสมพันธุ์และวางไข่ แล้วทำการร่อนโดยใช้ตะแกรง คัดแยกเมล็ดข้าวและตัวเต็มวัยของด้วงงวงข้าวออกจากกัน นำเมล็ดข้าวมาย้อมสีเพื่อจำแนกเมล็ดข้าวปกติออกจากเมล็ดข้าวที่มีไข่ด้วงงวงข้าว ด้วยการแช่เมล็ดข้าวในน้ำยา acid fuchsin

0.05% ซึ่งถูกทำให้เจือจาง โดยการเติม glacial acetic acid 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ประมาณ 3 นาที (Frankenfeld, 1950) ซึ่งเมล็ดข้าวที่มีด้วงงวงข้าวมาวางไข่จะเห็นร่องรอยการวางไข่ฝังอยู่ที่ผิวของเมล็ดข้าวหรือเรียกว่า egg plug ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์สเตอริโอแยกเมล็ดที่เห็น egg plug ซึ่งในข้าวสาร 1 เมล็ดจะมีไข่ของแมลง 1 ฟอง จากนั้นคัดแยกเมล็ดข้าวสารที่มีไข่ไปเลี้ยงเดี่ยว โดยบรรจุเมล็ดที่มีไข่ลงในจานหลุมขนาดเล็ก 96 หลุม (96 well plate) หลุมละ 1 เมล็ด (ภาพ 3.10) เลี้ยงไข่ของด้วงงวงข้าวในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิระหว่าง 28-32°C ในกล่องปรับความชื้นสัมพัทธ์ที่ 75% (ภาพ 3.11) จนกระทั่งแมลงเจริญเป็นตัวเต็มวัย จึงตรวจนับแมลงที่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้ นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับไข่ของด้วงงวงข้าวที่ไม่ผ่านการย้อมสี ซึ่งทุกกรรมวิธีทำการทดลอง 4 ซ้ำ



ภาพ 3.10 จานหลุมขนาดเล็ก 96 หลุม (96 well plate) บรรจุข้าวสารที่ใช้ในการแยกไข่ของ ด้วงงวงข้าวเลี้ยงเดี่ยว โดยข้าวสาร 1 เมล็ดมีไข่ 1 ฟอง



ภาพ 3.11 กล่องปรับความชื้นสัมพัทธ์ 75% ด้วยสารละลายอิมมิดัวของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ใช้ในการเลี้ยงด้วงงวงข้าว



3.2 การศึกษาประสิทธิภาพก๊าซไอโซนในการกำจัดด้วงงวงข้าวในแต่ละระยะการเจริญเติบโต

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาระยะการเจริญเติบโตของด้วงงวงข้าวที่มีการคายน้อยที่สุดหลังจากการผ่านก๊าซไอโซนโดยตรง ซึ่งมีวิธีการดังนี้

ระยะไข่ เตรียมด้วงงวงข้าวระยะไข่โดยการปล่อยให้ด้วงงวงข้าว ประมาณ 300 ตัววางไข่ในข้าวสารประมาณ 500 กรัม เป็นเวลา 3 วัน ร่อนแยกตัวเต็มวัยออก คัดแยกเมล็ดที่มีไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ซึ่งเมล็ดข้าวสารที่มีไข่จะเห็น egg plug อยู่ที่ผิวของเมล็ดข้าวสารเป็นจุดสีขาวขุ่น นำเมล็ดที่มี egg plug จำนวน 30 เมล็ดใส่ในถ้วยพลาสติกทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ปากถ้วย 5 เซนติเมตร สูง 2.5 เซนติเมตร (ภาพ 3.12) นำไปผ่านก๊าซไอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการอุณหภูมิระหว่าง 28-32°C ในกล่องปรับความชื้นสัมพัทธ์ที่ 75% ตรวจสอบจำนวนตัวเต็มวัยที่รอดชีวิต หรือไข่ของด้วงงวงข้าวที่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้ หลังจากการไข่ประมาณ 34 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยที่แมลงไม่ได้รับก๊าซไอโซน



ภาพ 3.12 ถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 2.5 เซนติเมตร ที่ใช้บรรจุ

ด้วงงวงข้าวในระยะไข่ หนอน และคักแด่ ซึ่งอยู่ภายในเมล็ดข้าวสารเพื่อใช้ทดลองปล่อยก๊าซไอโซนเป็นระยะเวลาต่างๆ

ระยะหนอน เตรียมแมลง โดยคัดเลือกเมล็ดที่มีตัวหนอนที่มีอายุประมาณ 20-25 วัน หลังจากแมลงวางไข่ เมล็ดที่มีตัวหนอนเข้าทำลายสังเกตได้จาก เมล็ดที่มีสีขาวขุ่น มีผงของข้าวสารหรือมูลของหนอนติดอยู่ เนื่องจากตัวหนอนกักกินภายใน ใช้เมล็ดข้าวที่มีหนอนจำนวน 30 ตัว ใส่ลงในถ้วยพลาสติกทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 2.5 เซนติเมตร นำไปทดลองผ่านก๊าซไอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการอุณหภูมิระหว่าง 28-32°C ในกล่องปรับความชื้นสัมพัทธ์ 75% ตรวจสอบจำนวนตัว

เต็มวัยที่รอดชีวิต หรือหนอนของด้วงวงงช้างที่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้ หลังจากระยะหนอนประมาณ 22 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ระยะดักแด้ เตรียมดักแด้เช่นเดียวกับวิธีการเตรียมแมลงในระยะหนอน โดยใช้เวลา 26-33 วัน หลังจากแมลงวางไข่ ไข่เมื่อดักแด้ที่มีดักแด้จำนวน 30 ตัว ใส่ลงในภาชนะ แล้วนำไปทดสอบทดลองผ่านก๊าซไอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการอุณหภูมิระหว่าง 28-32°C ในกล่องปรับความชื้นสัมพัทธ์ 75% ตรวจสอบจำนวนตัวเต็มวัยที่ตายหรือดักแด้ที่ไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้ หลังจากการทดลอง 10 วัน

ระยะตัวเต็มวัย เตรียมแมลงตัวเต็มวัย ที่มีอายุไม่เกิน 2 สัปดาห์จำนวน 30 ตัว ใส่ลงในภาชนะ แล้วนำไปทดสอบเช่นเดียวกับระยะหนอนและระยะดักแด้ แล้วตรวจสอบจำนวนแมลงตัวเต็มวัยของด้วงวงงช้างที่ตายหลังการทดสอบด้วยก๊าซไอโซนหลังจากเวลาผ่านไป 3 วัน

ทุกระยะการเจริญเติบโตของด้วงวงงช้างทำการทดลอง 4 ซ้ำ และนำจำนวนแมลงที่รอดคำนวณหาจำนวนแมลงตาย นำผลที่ได้วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย โดยวิธี Least Significant Difference (LSD)

3.3 การศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ก๊าซไอโซนกำจัดด้วงวงงช้างที่มีความทนทานต่อก๊าซไอโซนมากที่สุด

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดด้วงวงงช้างที่มีความทนทานต่อก๊าซไอโซนมากที่สุดจากการทดลอง 3.2 หลังจากการผ่านก๊าซไอโซนเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง โดยการนำด้วงวงงช้างที่มีระยะทนทานที่สุด นำไปทดลองผ่านก๊าซไอโซนโดยตรงที่ความเข้มข้น 60 ppm เป็นเวลา 6, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบแมลงที่ตายหลังการผ่านไอโซนแล้วนำไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ทุกระยะวิธีทำ 4 ซ้ำ และนำผลที่ได้วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย โดยวิธี Tukey HSD

3.4 ประสิทธิภาพการใช้ก๊าซไอโซนในการกำจัดด้วงวงงช้างเพื่อหาการตายอย่างสมบูรณ์ในภาชนะบรรจุข้าวสาร

หลังจากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ก๊าซไอโซนกำจัดด้วงวงงช้างที่มีการตายน้อยที่สุดจากการทดลองที่ 3.3 ในการทดลองนี้จึงเป็นการศึกษาหาการตายอย่างสมบูรณ์หลังจากผ่านก๊าซไอโซนในการใช้กำจัดด้วงวงงช้างในภาชนะที่บรรจุข้าวสาร มีวิธีการดังนี้

นำด้วงวงข้าวที่มีระยะทนทานที่สุดหลังจากการผ่านก๊าซโอโซนโดยตรง นำไปทดลองผ่านก๊าซโอโซนพร้อมกับข้าวสารปริมาณ 200 กรัม บรรจุอยู่ในถุงผ้าไนลอน ขนาด 6x6 นิ้ว โดยใช้ก๊าซโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 60 ppm โดยนำถุงบรรจุข้าวสารพร้อมกับแมลงผ่านก๊าซโอโซนเป็นเวลาที่ทำให้แมลงมีการตายอย่างสมบูรณ์ 100% ทำการตรวจนับแมลงที่ตายหลังการผ่านโอโซนแล้วนำไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทุกกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ

3.5 การศึกษาคุณภาพทางกายภาพและคุณภาพทางเคมีของข้าวหลังจากการใช้โอโซนกำจัด

ด้วงวงข้าวในเมล็ดข้าวสาร

การทดลองศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเมล็ดข้าว หลังจากการผ่านโอโซนในระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่สามารถกำจัดด้วงวงข้าวได้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยทำการศึกษาคูณภาพของข้าวดังนี้

3.5.1 การวัดคุณภาพข้าวทางกายภาพ

3.5.1.1 การวัดสีของข้าว

การวัดสีของข้าวโดยใช้เครื่องวัดสี Colorimeter (Color Quest XE, USA) ซึ่งหลักการของเครื่อง Color Quest XE ใช้หลักตกกระเจิงของแสง ค่าที่ได้จากเครื่องมือเป็นค่า L^* , a^* , b^*

ค่า L^* เป็นค่าที่แสดงถึงความสว่าง (lightness) ที่มีค่าเท่ากับ 0 แสดง ถึง วัตถุเข้าใกล้สีดำ หรือมีสีมืดที่สุด หาก L^* มีค่าเท่ากับ 100 วัตถุมีสีขาว หรือสว่างที่สุด

ค่า a^* เป็นค่าที่แสดงความเป็นสีแดง หรือความเป็นสีเขียว โดยที่ค่า a^* เป็นบวก แสดงถึง วัตถุมีสีแดง หากมีค่าเป็นลบ แสดงถึง วัตถุมีสีเขียว

ค่า b^* เป็นค่าที่แสดงความเป็นสีเหลือง หรือสีน้ำเงิน โดยที่ค่า b^* เป็นบวก แสดงถึงวัตถุ มีสีเหลือง หากมีค่าเป็นลบ หมายถึงวัตถุมีสีน้ำเงิน

โดยค่า a^* และ b^* มีค่าอยู่ระหว่าง -60 ถึง +60

ค่าดัชนีความขาว (whiteness index) = $100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$

3.5.1.2 การวิเคราะห์ความชื้น (ISTA, 1999)

วิเคราะห์ความชื้นข้าวโดยนำตัวอย่างข้าวมาบดให้กลายเป็นแป้ง นำไปชั่งน้ำหนัก 5 กรัม แล้วทำการอบตัวอย่างข้าว พร้อมกล่องอลูมิเนียม (can) ด้วยความร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 130°C เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

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

เมื่อ	A	=	น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝา
	B	=	น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝา และข้าวก่อนอบ
	C	=	น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝา และข้าวหลังอบ

3.5.2 การวัดคุณภาพข้าวทางเคมี

การวิเคราะห์ปริมาณสารหอม (2-acetyl-1-pyrroline, 2AP)

การวิเคราะห์ปริมาณในข้าวสารขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการกึ่งไอโซนเปรียบเทียบกับข้าวสารที่ไม่ผ่านกึ่งไอโซน โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยเคมีของข้าว ภายใต้การดำเนินงานของศูนย์บริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (สวท.-มช.) ผลที่ได้เป็นปริมาณของสาร 2-acetyl-1-pyrroline (Tinakorn *et al.*, 2006)