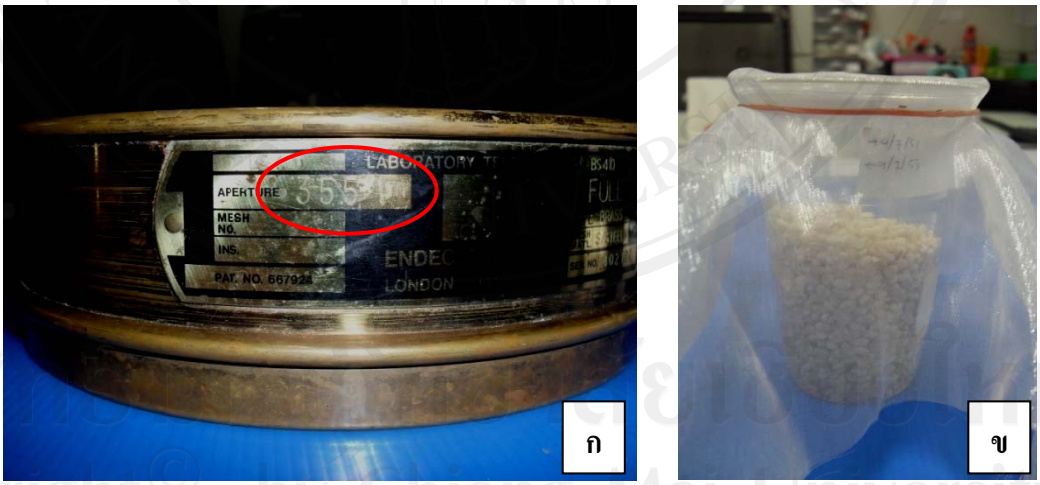
บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยง และเพิ่มปริมาณมอดฟันเลื่อย

นำเมล็ดข้าวบาร์เลย์เพื่อเป็นอาหารของมอดฟันเลื่อย มาแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 7 วัน เพื่อกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ ที่อาจติดมาในข้าวบาร์เลย์ จากนั้นนำข้าวบาร์เลย์ใส่ไว้ในถ้วยพลาสติกใส (ขนาด 29.57 มิลลิลิตร) ประมาณ 80 กรัม ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที จนกระทั่งข้าวบาร์เลย์มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องประมาณ 28 องศาเซลเซียส จึงใส่ตัวเต็มวัยของมอดฟันเลื่อย 100 ตัว นำผ้าไนลอนมาปิดปากถ้วยแล้วรัดด้วยยางรัดเพื่อป้องกันแมลงออก ให้แมลงวางไข่ในภาชนะ 5 วัน ร่อนแยกเฉพาะไข่ของมอดฟันเลื่อย ด้วยตะแกรงขนาด 335 µm ซึ่งจะทำให้ไข่ของมอดฟันเลื่อยผ่านตะแกรงลงมาบนถาดรอง นำไข่ของมอดฟันเลื่อยที่ได้จากการร่อนไปใส่ไว้ในถ้วยพลาสติกที่ภายในมีข้าวบาร์เลย์เพื่อเป็นอาหารของแมลงซึ่งไข่จะเจริญเป็นหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยต่อไป (ภาพ 3.1)



ภาพ 3.1 ตะแกรงร่อนแมลงขนาด 335 µm (ก) และแก้วพลาสติก (ขนาด 29.57 มิลลิลิตร) ใช้เลี้ยงมอดฟันเลื่อย *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus) ที่ภายในบรรจุข้าวบาร์เลย์ แล้วนำผ้าไนลอนมาปิดปากแก้วแล้วรัดด้วยยางรัดเพื่อป้องกันแมลงออก (ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องผลิตก๊าซโอโซน (ozone generator)

เครื่องผลิตก๊าซโอโซน (ozone generator) รุ่น WAO-2501 (Asiatech Industry IN) มีหัวปล่อยก๊าซ 1 หัว ใช้พลังงานกระแสไฟฟ้าสลับ 220 โวลต์ ความถี่ 50 Hz พลังงานไฟฟ้า 18 วัตต์ ซึ่งเครื่องนี้สามารถผลิตก๊าซโอโซนได้ 60 ppm (ภาพ 3.2)

ภาพ 3.2 เครื่องผลิตก๊าซโอโซนรุ่น WAO-2501 (Asiatech Industry IN)

ภาชนะรมก๊าซโอโซน (ozone chamber)

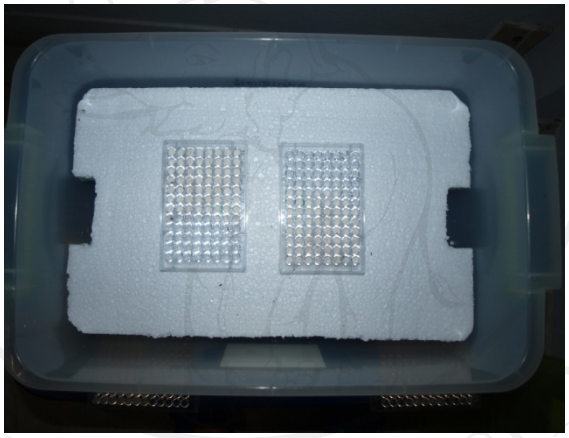
ภาชนะทำจากแก้วหรือกระจกใส แล้วเชื่อมรอยต่อด้วยซิลิโคน และกาวยาง มีขนาดกว้าง 12.5 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร (ภาพ 3.3) ซึ่งนำวัสดุที่ต้องการรมด้วยก๊าซโอโซนมาบรรจุบริเวณช่องว่างส่วนกลางของภาชนะรมก๊าซโอโซน

ภาพ 3.3 ภาชนะรมก๊าซโอโซนภายในบรรจุถุงข้าวสารน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ซึ่งมีดักแด้ของมอดฟันเลื่อย *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus) ปะปนอยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1 การศึกษาวงจรชีวิตของมอดฟันเลื่อยในข้าวสารพันธุ์ปทุมธานี 1

นำตัวเต็มวัยมอดฟันเลื่อยประมาณ 200 ตัว ใส่ลงในข้าวสารพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่ผสมด้วยข้าวบดหยาบ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปล่อยให้แมลงวางไข่เป็นเวลา 5 วัน ร่อนแยกไข่ออกด้วยตะแกรงขนาด 335 μm ใช้พู่กันเขี่ยไข่ใส่ลงไปในจานหลุม 96 หลุม (96-well plate) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ โดยแต่ละหลุมมีไข่มอดฟันเลื่อย 1 ฟอง จากนั้นใส่ข้าวสารพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่ผสมข้าวบดหยาบ 10 เปอร์เซ็นต์ลงในจานหลุม เก็บไว้ในถังพลาสติกที่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ที่ 75 เปอร์เซ็นต์ โดยมีสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคลอไรด์เป็นตัวควบคุมความชื้น (ภาพ 3.4) ทำการสังเกตและบันทึกข้อมูลทางชีววิทยาของมอดฟันเลื่อยในระยะไข่ หนอน และดักแด้ จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย



ภาพ 3.4 จานหลุม 96 หลุม (96-well plate) ที่ใช้ในการศึกษาวงจรชีวิตของแมลงบรรจุไว้ในถังควบคุมความชื้นสัมพัทธ์

3.2 การศึกษาการวางไข่ และการเจริญเติบโตของมอดฟันเลื่อยในอาหารชนิดต่าง ๆ

การศึกษาการวางไข่ และการเจริญเติบโตของมอดฟันเลื่อยในอาหารทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ ข้าวก่ำพันธุ์ 88061, ข้าวก่ำพันธุ์ดอยสะเก็ด, ข้าวสารพันธุ์ปทุมธานี 1, ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1, ข้าวบาร์เลย์ และข้าวบาร์เลย์ผสมยีสต์ 5 เปอร์เซ็นต์ นำอาหารชนิดต่าง ๆ มาแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อกำจัดแมลงอื่น ๆ ที่อาจติดมาในพืชอาหาร จากนั้นนำพืชอาหารแต่ละชนิดใส่ไว้ในถ้วยพลาสติกใส (ขนาด 12 ออนซ์) จำนวน 80 กรัม ทิ้งไว้ 20 นาที จนกระทั่งพืชอาหารมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องประมาณ 28 องศาเซลเซียส และใส่ตัวเต็มวัยของมอดฟันเลื่อย 100 ตัว นำผ้าไนลอนปิดปากถ้วยรัดด้วยยางรัดเพื่อป้องกันแมลงออก ปล่อยให้แมลงวางไข่ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาชนะ 5 วัน ร่อนแยกเฉพาะไข่ของมอดฟันเลื่อย ด้วยตะแกรงขนาด 335 μm ตรวจนับจำนวนไข่ของมอดฟันเลื่อย ทำการทดลองเช่นเดียวกัน โดยเลี้ยงแมลงในพืชอาหารทั้ง 6 ชนิด ชนิดละ 4 ซ้ำ ทำการตรวจนับจำนวนตัวเต็มวัยที่เจริญในอาหารชนิดต่าง ๆ เมื่อระยะเวลาครบ 4 สัปดาห์

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของก๊าซโอโซนในการควบคุมมอดฟันเลื่อย

นำไข่ของมอดฟันเลื่อยจำนวน 30 ฟอง ใส่ในถุงตาข่ายขนาด 5×7 เซนติเมตร (ภาพ 3.5) นำไปรมด้วยก๊าซโอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ตามวิธีการของ Kells *et al.* (2001) จากนั้นนำไข่ไปเลี้ยงในข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 น้ำหนัก 80 กรัม ที่บรรจุอยู่ในถ้วยพลาสติกในสภาพห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 30 วัน จำนวน 4 ซ้ำ ทำการนับแมลงที่รอดชีวิตที่พัฒนาเป็นตัวเต็มวัย ดำเนินการเช่นเดียวกันกับการทดลองในระยะไข่ โดยใช้หนอน (อายุประมาณ 5-6 วัน) ดักแด้ (อายุประมาณ 2-3 วัน) และตัวเต็มวัย (อายุ 4-5 วัน) มารมด้วยก๊าซโอโซนในอัตราเดียวกัน ทำการตรวจนับจำนวนหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยที่รอดตาย เป็นเวลา 14, 10 และ 2 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รมก๊าซโอโซน คำนวณเปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริง (corrected mortality) ของแมลงในระยะต่าง ๆ ด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925) ในกรณีที่พบจำนวนแมลงตายในชุดควบคุม (ไม่ผ่านก๊าซโอโซน) จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

เปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริง (corrected mortality)

$$\text{corrected mortality} = \frac{\%\text{tested mortality} - \%\text{control mortality}}{100 - \%\text{control mortality}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.5 ถุงตาข่ายขนาด 5×7 เซนติเมตรใช้สำหรับบรรจุไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ของมอดฟันเลื่อย *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus)

3.4 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ก๊าซโอโซนกำจัดมอดฟันเลื่อย

นำมอดฟันเลื่อยในระยะที่ทนทานที่สุด จำนวน 30 ตัว ใส่ลงในถุงตาข่ายขนาด 25×27 เซนติเมตร ซึ่งภายในบรรจุข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 น้ำหนัก 1 กิโลกรัม (ภาพ 3.6) นำไปรมด้วยก๊าซโอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 ชั่วโมง ทุกกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านก๊าซโอโซน ทำการนับจำนวนแมลงระยะทนทานที่สุดจากระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยที่รอดชีวิต สามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยหลังจากรมด้วยก๊าซโอโซน 6, 4, 2, และ 1 สัปดาห์ ตามลำดับ นำแมลงที่รอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยมาเลี้ยงในข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 นาน 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาจำนวนรุ่นลูก (F1) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยในแต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์แมลงที่ตาย และจำนวนแมลงรุ่นลูก (F1) ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.6 ถุงตาข่ายขนาด 25×27 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 น้ำหนัก 1 กิโลกรัม และดักแด้ของมอดฟันเลื่อย *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus) จำนวน 30 ตัว

3.5 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติทางกายภาพของข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หลังจากการใช้ก๊าซโอโซนในการกำจัดแมลง

จุดประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเมล็ดข้าว หลังจากผ่านโอโซนในระดับความเข้มข้นที่สามารถใช้ควบคุมมอดฟันเลื่อยได้ (จากระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ก๊าซโอโซนกำจัดมอดฟันเลื่อย) โดยเปรียบเทียบคุณภาพกับข้าวที่ไม่ได้ผ่านโอโซน โดยศึกษาคุณสมบัติของข้าวที่อาจเปลี่ยนแปลงได้แก่

3.5.1. การวิเคราะห์กลิ่นเมล็ดข้าว (2-acetyl-1-pyrroline; 2AP)

การวิเคราะห์ปริมาณกลิ่นในข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการรมด้วยก๊าซโอโซนเทียบกับข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ไม่ผ่านการรมด้วยก๊าซโอโซน โดยใช้เครื่อง Headspace Gas Chromatography ณ ห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ตามมาตรฐาน มอก.17025 : 2548 ผลที่ได้เป็นปริมาณสาร (2-acetyl-1-pyrroline; 2AP) (Tinakorn *et al.,* 2006)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.2. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นก่อน และหลังนำข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไปผ่านก๊าซโอโซน (ISTA, 2006)

วิเคราะห์ความชื้นข้าวโดยนำตัวอย่างข้าวมาบดให้ละเอียด นำไปชั่งแล้วทำการอบตัวอย่างข้าว พร้อมกล่องอลูมิเนียม (can) ด้วยความร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

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

เมื่อ A = น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝา

B = น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝา และข้าวก่อนอบ

C = น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝา และข้าวหลังอบ

3.5.3. การวัดความขาวของข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

การวัดสีของข้าวสารโดยใช้เครื่องมือวัดสี Hunter Lab รุ่น Color Quest XE โดยใช้ข้าวสารประมาณ 50 กรัม ใส่ในภาชนะแก้วใส ซึ่งหลักการทำงานของเครื่อง Color Quest XE ใช้หลักการตกกระเจิงของแสง ค่าที่ได้จากเครื่องมือเป็นค่า L*, a*, b* และนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับไดอะแกรมแสดงการจำแนกสเกลของตัวแปรในระบบสีของ Hunter color system (สุคนธ์ชื่น และวรรณวิบูลย์, 2543)

ค่า L* เป็นค่าที่แสดงถึงความสว่าง (lightness) ที่มีค่าเท่ากับ 0 แสดงถึงวัตถุเข้าใกล้สีดำหรือมีสีมืดที่สุด หาก L* มีค่าเท่ากับ 100 วัตถุมีสีขาว หรือสว่างที่สุด

ค่า a* เป็นค่าที่แสดงความเป็นสีแดง หรือความเป็นสีเขียว โดยค่า a* เป็นบวกแสดงถึงวัตถุมีสีแดง หากมีค่าเป็นลบ แสดงถึงวัตถุมีสีเขียว

ค่า b* เป็นค่าที่แสดงถึงความเป็นสีเหลือง หรือน้ำเงิน โดยที่ค่า b* เป็นบวก แสดงถึงวัตถุมีสีเหลือง หากมีค่าเป็นลบ หมายถึงวัตถุมีสีน้ำเงิน

โดยค่า a* และb* มีค่าอยู่ระหว่าง -60 ถึง +60

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved