

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วงเต่าลายหยัก

1.1 เตรียมแปลงปลูกผักคะน้า และปลูกถั่วฝักยาวในกระถางพลาสติก ในโรงเรือนทดลอง และแปลงทดลองสาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช เพื่อสำหรับเพาะเลี้ยงเพลี้ยอ่อน เพื่อเป็นอาหารของด้วงเต่าลายหยักที่จะเลี้ยงเป็นพ่อแม่พันธุ์ เพื่อให้ได้ไข่ของด้วงเต่าลายหยักเพียงพอสำหรับการทดลอง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แปลงปลูกผักคะน้า และกระถางปลูกถั่วฝักยาว สำหรับเพาะเลี้ยงเพลี้ยอ่อน เพื่อเป็นอาหารของพ่อแม่พันธุ์ด้วงเต่าลายหยัก

1.2 ทำการเก็บรวบรวมด้วงเต่าลายหยักทุกระยะการเจริญเติบโต ทั้งระยะไข่ ระยะตัวอ่อน ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัย ในสภาพแปลงปลูกพืชทั้งบริเวณพื้นที่ราบ เช่น แปลงเพาะปลูกพืชผักของเกษตรกร และบริเวณพื้นที่สูงในแปลงปลูกพืชของมูลนิธิโครงการหลวง ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ (ภาพที่ 2 และ 3) จากนั้นนำมาเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ 26.21 ± 3.39 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 66.72 ± 12.41 เปอร์เซ็นต์ ในกรงตาข่ายขนาด $40 \times 40 \times 60$ เซนติเมตร และในกล่องเลี้ยงแมลงขนาด $18 \times 25 \times 9$ เซนติเมตร ให้เพลี้ยอ่อนเป็นอาหาร พร้อมกับให้วุ้นน้ำหวานและน้ำผึ้งผสมยีสต์เพิ่มเติม เพื่อให้ตัวเต็มวัยวางไข่ ทำการเปลี่ยนอาหารและวุ้นน้ำหวานทุกวัน ร่วมกับการเช็ดทำความสะอาดกรง และกล่องเลี้ยงด้วงเต่าลายหยัก เพื่อป้องกันมิให้เกิดเชื้อราปนเปื้อน

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชเพิ่มเติมทุกสองสัปดาห์ เพื่อไม่ให้เกิดการผสมพันธุ์ใน
ประชากรรุ่นเดียวกัน และลดปัญหาในการวางไข่ไม่สมบูรณ์



ภาพที่ 2 สภาพแปลงปลูกพืชบริเวณพื้นที่ราบในการเก็บรวบรวมตัวอย่างพืช



ภาพที่ 3 บริเวณพื้นที่สูงในแปลงปลูกพืชของมูลนิธิโครงการหลวง ในเขตจังหวัดเชียงใหม่

2. การเตรียมอาหารเทียม

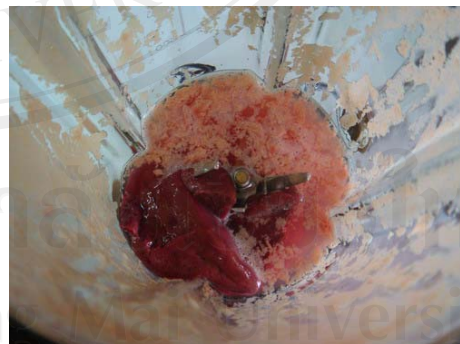
เตรียมอาหารเทียมโดยดัดแปลงสูตรอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงด้วงเต่าตัวห้ำจากการตรวจเอกสาร โดยใช้แหล่งโปรตีนหลายชนิดซึ่งรวบรวมจากเอกสารงานวิจัยในต่างประเทศ ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาง่าย และมีต้นทุนในการผลิตไม่สูงมากนัก เช่น ผงตัวอ่อนผึ้ง ไข่ไก่ (ทั้งฟอง) ไข่แดง ตับหมู ตับไก่ และเพ็ลลี่ยอ่อน นำมาเพิ่มเติมด้วยส่วนผสมอื่น ๆ เพื่อเพิ่มแหล่งพลังงานและกระตุ้นการกินของด้วงเต่า เช่น อาหารเสริมและวิตามินสำหรับเด็ก วิตามินซี ยีสต์ จมูกข้าวสาลี น้ำตาล และนมผง ตามที่สุกัญญา (2540), DeBach (1964), Attallah and Newsom (1966), Matsuka *et al.* (1972), Nijijima *et al.* (1986, 1997) และ Thompson (1999) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 วัตถุดิบในการผลิตอาหารเทียม และต้นทุน

วัตถุดิบ	บริษัท/แหล่งที่มา	ราคา (บาทต่อหน่วย)
ผงตัวอ่อนผึ้ง	ผลิตในห้องปฏิบัติการ	2,000 บาท/1 กิโลกรัม
ผงไข่ไก่	ผลิตในห้องปฏิบัติการ	1,650 บาท/1 กิโลกรัม
ผงไข่แดง (ไข่ไก่)	ผลิตในห้องปฏิบัติการ	1,650 บาท/1 กิโลกรัม
ผงตับไก่	ผลิตในห้องปฏิบัติการ	1,800 บาท/1 กิโลกรัม
ผงตับหมู	ผลิตในห้องปฏิบัติการ	1,800 บาท/1 กิโลกรัม
อาหารเสริมเด็ก	เนสท์เล่ แมนิวแฟลเชอริง (มาเลเซีย)	39 บาท/120 กรัม
วิตามินรวมสำหรับเด็ก	OLIC (Thailand) Limited	58 บาท/ 120 มิลลิลิตร
ยีสต์ (Yeast extract)	Lab Scan Analytical Science	1,490 บาท/ 500 กรัม
น้ำตาล glucose	Baolingbao Biology Co.,LTD.	600 บาท/ 500 กรัม
น้ำตาล sucrose	Ajax Finechem Pty Ltd.	377 บาท/ 500 กรัม
Ascorbic acid	Northeast General Pharmaceutical Factory	450 บาท/ 500 กรัม
จมูกข้าวสาลี	เจ เอ็ม รัชฎพีช เชียงใหม่	40 บาท/ 150 กรัม
นมผง	เชียงใหม่	1,500 บาท/ 1 กิโลกรัม
ผงวุ้น	ห้างหุ้นส่วนจำกัด ศรีอิสรา	600 บาท/ 500 กรัม
ฟอร์มาลีน (40% HCHO)	บริษัท แกมมาโก้	75 บาท/ 450 กรัม

2.1 อาหารเทียมผง

นำวัตถุดิบหลัก คือ ตัวอ่อนผึ้ง ไข่ไก่ (ทั้งฟอง) ไข่แดง ตับหมู ตับไก่ ล้างทำความสะอาด พักไว้ให้พอหมาด จากนั้นปั่นให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพที่ 4) แล้วเทใส่ในภาชนะที่สามารถทนต่อแรงดันได้ หรือใส่ถุงพลาสติก มัดปากถุงให้แน่น นำไปแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าสู่กระบวนการอบแห้งแบบระเหิดหรือการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying หรือ lyophilization) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ทำให้สารที่มีลักษณะเปียกหรือสารละลายในน้ำแห้ง โดยการทำให้สารนั้นเย็นจนแข็งตัวในบรรยากาศที่มีความชื้นต่ำ และดูดบรรยากาศให้เป็นสุญญากาศ เกิดการเปลี่ยนสถานะจากของแข็งเป็นก๊าซ โดยไม่เกิดการละลาย หลีกเลียงการเปลี่ยนแปลงทางเคมี กายภาพ และเอนไซม์ ผลลัพธ์ที่ได้จากกระบวนการนี้จะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับวัตถุดิบมาก คงคุณค่าทางด้านประสาทสัมผัส และคุณค่าทางโภชนาการสูงมาก สามารถคงตัวอยู่ได้นาน ณ อุณหภูมิห้อง มีอายุการเก็บรักษายาวนานกว่า 12 เดือนหรือหลายปี หากเก็บรักษาในสภาพปิดมิดชิด และสามารถนำกลับมาละลายน้ำได้ง่ายและรวดเร็ว ซึ่งถือเป็นข้อดีที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการนี้ (Wikipedia, 2009; วนิดา, 2552; วิไล, 2543 และ สุคนธ์ ชื่น, 2546) ในการทำแห้งอาหารเทียมครั้งนี้ได้ใช้เครื่อง Lyophilizer รุ่น Flexi-Dry MP และ Dura-Stop™ Stopping Tray Dryer (ภาพที่ 5) อาหารเทียมที่ได้มีลักษณะเป็นผงแห้ง (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 4 ตัวอย่างการเตรียมวัตถุดิบหลัก ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการ freeze drying



ภาพที่ 5 เครื่อง Lyophilizer รุ่น Flexi-Dry MP (A) ของศูนย์นวัตกรรมและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเครื่อง Dura-Stop™ Stopping Tray Dryer (B) ของห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ใช้ในการทำอาหารเทียมผง

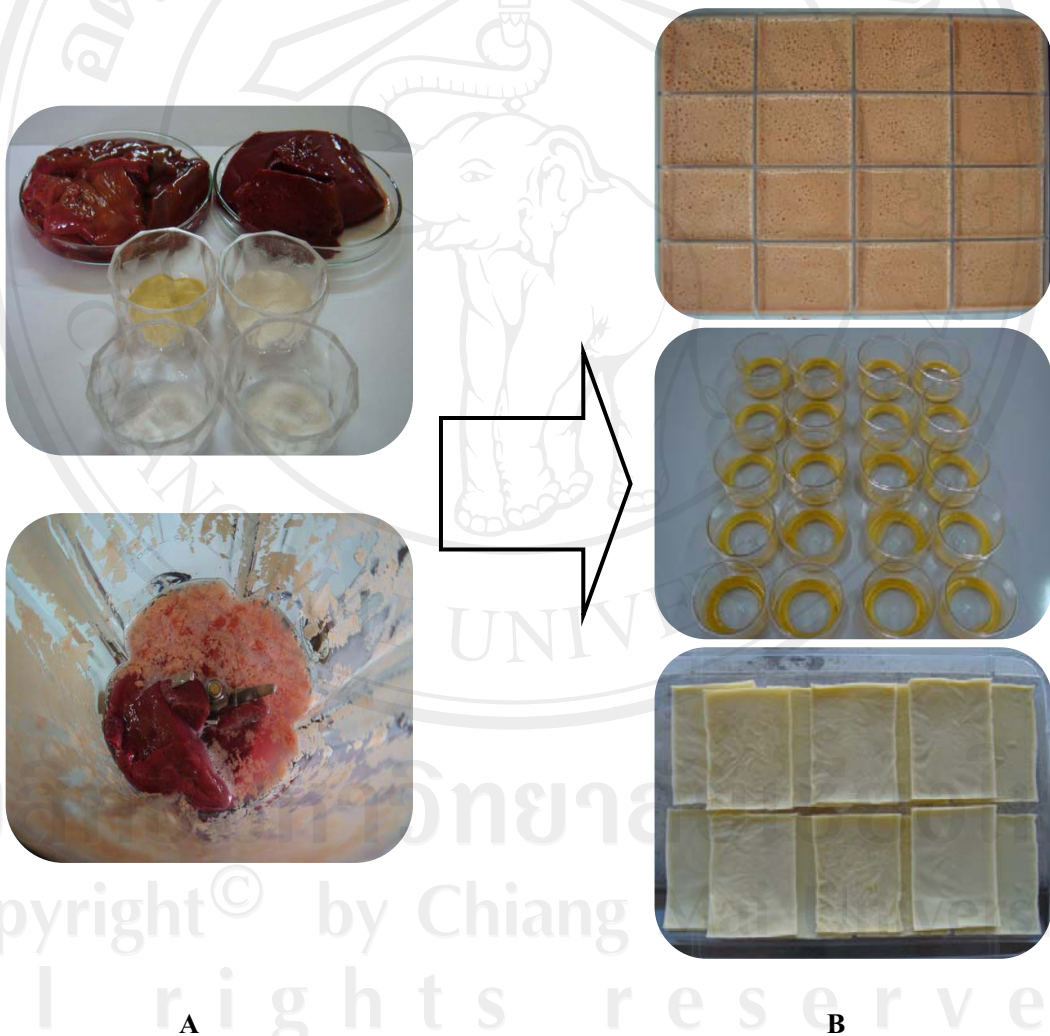


ภาพที่ 6 ลักษณะอาหารเทียมผงที่ได้จากกระบวนการอบแห้งแบบระเหิดหรือการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying หรือ lyophilization)

2.2 อาหารเทียมวุ้น

2.2.1 อาหารเทียมวุ้นที่เตรียมจากวัตถุดิบหลักสด

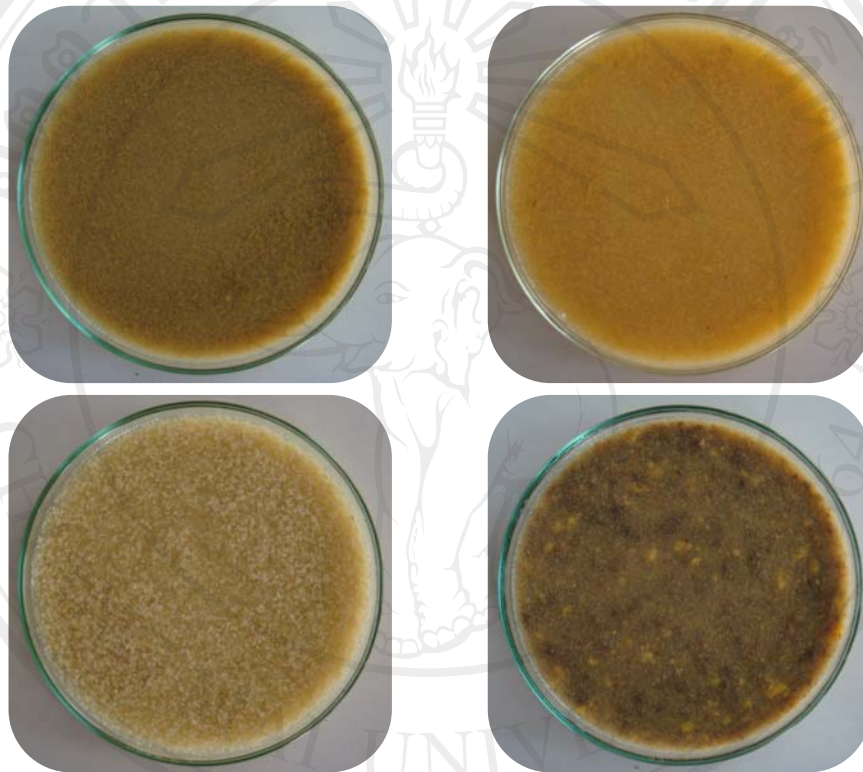
นำวัตถุดิบหลักที่ผ่านการล้างทำความสะอาดแล้วมาปั่นให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำตาลอาหารอื่น ๆ ลงไป แล้วปั่นให้เข้ากันอีกครั้ง เทใส่ภาชนะแล้วนำน้ำต้มวุ้นที่เตรียมไว้เทผสมลงไป คนให้เข้ากัน และเติมฟอรัมาลิน 40 เปอร์เซ็นต์ เทใส่ภาชนะหรือจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว พักไว้สักครู่ รอให้วุ้นแข็งตัว ได้อาหารเทียมสำหรับนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การเตรียมอาหารเทียมจากวัตถุดิบสด (A) และลักษณะอาหารเทียมวุ้น (B) ที่เตรียมจากวัตถุดิบสด

2.2.2 อาหารเทียมวุ้นที่เตรียมจากผงอาหารเทียม

นำผงอาหารเทียมที่ได้จากวิธีการข้อ 2.1 ตามสัดส่วนที่ต้องการ ร่วมกับสารอาหารตัวเติมอื่น ๆ มาผสมให้เข้ากัน แล้วนำน้ำต้มวุ้นที่เตรียมไว้เทผสมลงไปอีกครั้ง คนให้เข้ากัน และเติมฟอร์มาลิน 40 เปอร์เซ็นต์ เทใส่ภาชนะหรือจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว พักไว้สักครู่ รอให้วุ้นแข็งตัว ได้อาหารเทียมสำหรับนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 อาหารเทียมวุ้นที่เตรียมจากผงอาหารเทียมชนิดต่าง ๆ

3. การเลี้ยงด้วงเต่าตัวทำด้วยอาหารเทียมเปรียบเทียบกับอาหารธรรมชาติ

เมื่อตัวเต็มวัยของด้วงเต่าลายหยักวางไข่แล้ว ทำการแยกไข่ออกมาจากกรงพ่อแม่พันธุ์ทันที เพื่อป้องกันไม่ให้ด้วงเต่ากิน ไข่ที่วางไว้ นำไข่ของด้วงเต่าวางบนกระดาษกรองที่ให้ความชื้นในกล่องเลี้ยงแมลงทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร ที่ฝาปิดมีการเจาะรูติดตามข้างเพื่อให้มีการระบายอากาศภายในกล่อง เมื่อตัวอ่อนฟักออกมาจากไข่ ทำการแช่ตัวอ่อนไว้ในกล่องเลี้ยงแมลงทรงกลมข้างต้น ที่บุด้านล่างกล่องด้วยกระดาษกรอง กล่องละ 1 ตัว จำนวน 20 กล่อง พร้อมให้อาหารเทียมที่เตรียมไว้ เปรียบเทียบกับอาหารเทียมที่ผลิตเป็นการค้าจากต่างประเทศ และอีกชุดหนึ่งให้อาหารธรรมชาติคือเพี้ยอ่อนเป็นอาหาร เลี้ยงจนครบวงจรชีวิต ใน

สภาพห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิเฉลี่ย 26.21 ± 3.39 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 66.72 ± 12.41 เปอร์เซ็นต์ บันทึกการเจริญเติบโตในแต่ละระยะ การผสมพันธุ์ และการวางไข่ของด้วงเต่า วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) นำข้อมูลชีววิทยาของด้วงเต่าลายหยักที่ได้เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเทียมและอาหารตามธรรมชาติ มาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ โดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ด้วยโปรแกรม SX 8.0 (Statistic for window version 8)

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารเทียม

นำอาหารเทียมสูตรที่สามารถเพาะเลี้ยงด้วงเต่าลายหยักได้จนครบวงจรชีวิต อาหารสำเร็จรูปที่ผลิตเป็นการค้า และเปลือกอ่อนอบแห้ง มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารอาหาร 4 ประเภท คือ ความชื้น (moister) โปรตีนรวม (Crude protein) และไขมัน (Ether extract) โดยใช้วิธีการของ Windham (1998) สำหรับพลังงานรวม (Gross energy) วิเคราะห์โดยใช้วิธี Ballastic bomb calorimeter เพื่อเปรียบเทียบคุณค่าทางอาหาร และเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาสูตรอาหารเทียมที่มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงและเพิ่มขยายปริมาณด้วงเต่าลายหยักต่อไป