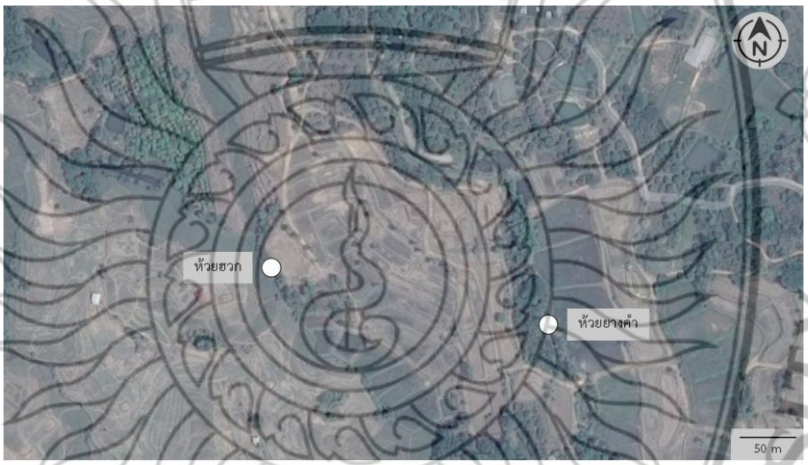
บทที่ 3
วิธีดำเนินการ

3.1 การกำหนดจุดเก็บตัวอย่าง

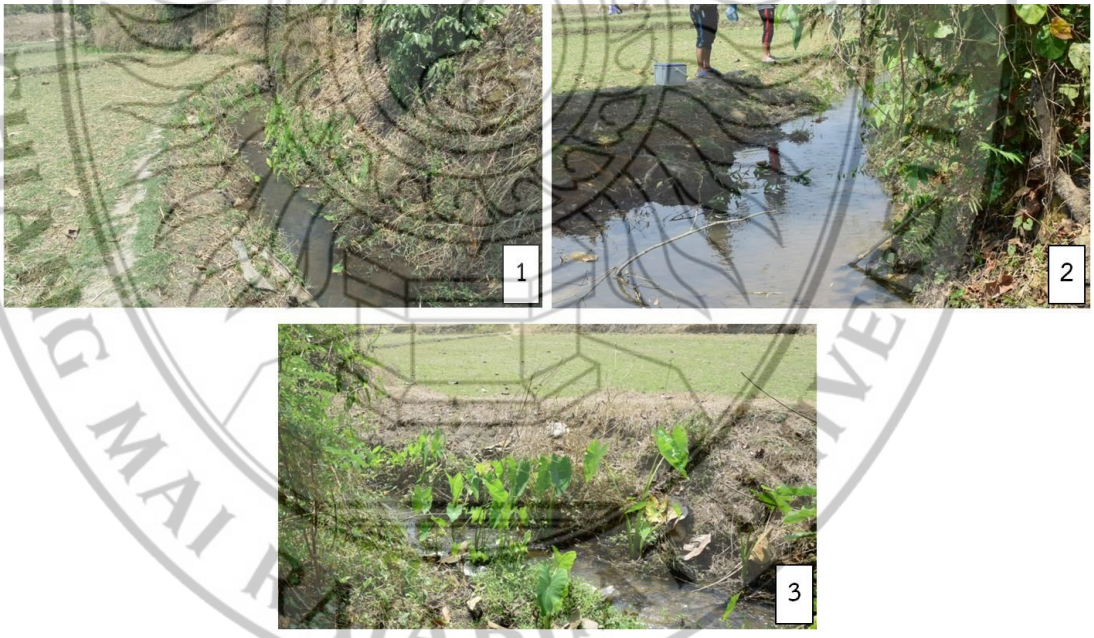
กำหนดจุดเก็บตัวอย่างระบบนิเวศน้ำไหลในบริเวณพื้นที่นาข้าวอินทรีย์และนาข้าวแบบเคมี 2 อำเภอในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ จุดที่ 1 อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเก็บตัวอย่างในห้วยยางคำเป็นตัวแทนพื้นที่นาข้าวอินทรีย์และห้วยฮวกเป็นตัวแทนพื้นที่นาข้าวแบบเคมี จุดที่ 2 อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเก็บตัวอย่างในลำน้ำขุนแจ่โดยเป็นลำน้ำที่ไหลผ่านทั้งนาข้าวอินทรีย์และนาข้าวแบบเคมี โดยในแต่ละลำน้ำจะทำการกำหนดจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 จุด มีระยะห่างในแต่ละจุดประมาณ 50 เมตร โดยเก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคม 2561 รายละเอียดเกี่ยวกับจุดเก็บตัวอย่าง แสดงในภาพที่ 3.1-3.6 และตารางที่ 1



ภาพที่ 3.1 ภาพถ่ายทางอากาศจุดเก็บตัวอย่างพื้นที่นาข้าวอินทรีย์บริเวณห้วยยางคำและนาข้าวเคมีบริเวณห้วยฮวก อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

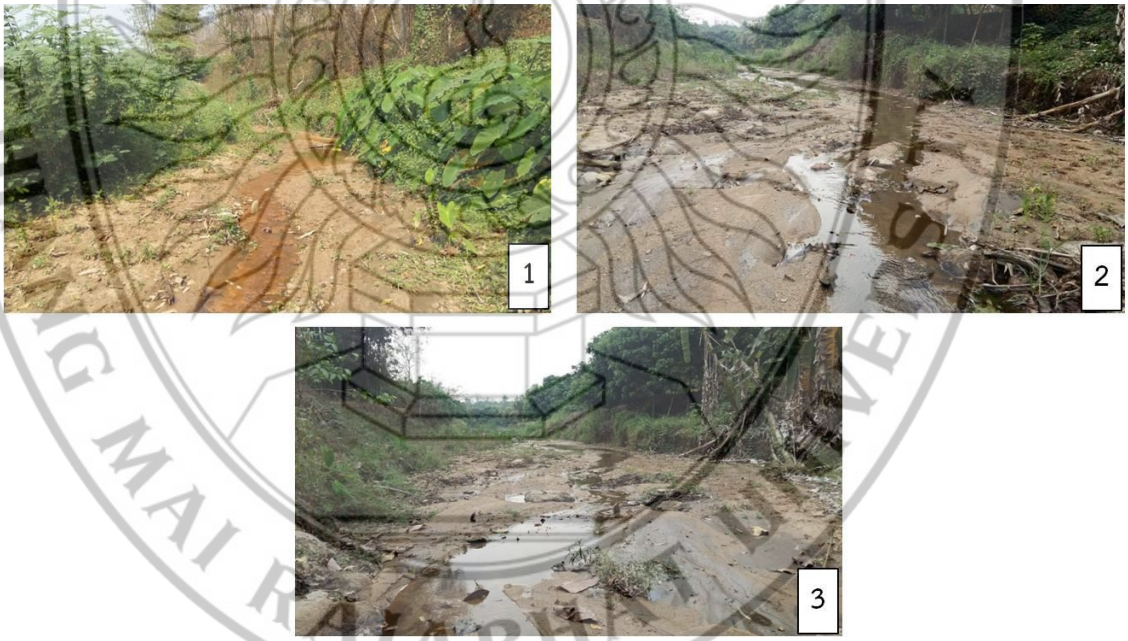
ภาพที่ 3.2 ภาพถ่ายทางอากาศจุดเก็บตัวอย่างพื้นที่นาข้าวอินทรีย์และนาข้าวเคมีบริเวณลำน้ำขุนแจ่ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่

ภาพที่ 3.3 จุดเก็บตัวอย่างพื้นที่นาข้าวอินทรีย์ 3 จุด บริเวณห้วยยางคำ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 3.4 จุดเก็บตัวอย่างพื้นที่นาข้าวนาข้าวเคมี 3 จุด บริเวณห้วยฮวก อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

ภาพที่ 3.5 จุดเก็บตัวอย่างพื้นที่นาข้าวอินทรีย์ 3 จุด บริเวณลำน้ำขุนแจ่ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 3.6 จุดเก็บตัวอย่างพื้นที่นาข้าวเคมี 3 จุด บริเวณลำน้ำขุนแจ่ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่

ตารางที่ 3.1 พิกัดของจุดเก็บตัวอย่างในอำเภอจอมทองและอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่

จุดเก็บตัวอย่าง	ที่ตั้ง	พิกัด GPS	ความสูงจากระดับน้ำทะเล (เมตร)
1 นาข้าวอินทรีย์	ห้วยยางคำ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่	18.405423 N 98.643334 E	299
2 นาข้าวเคมี	ห้วยฮวก อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่	18.405399 N 98.641204 E	315
3 นาข้าวอินทรีย์	ลำน้ำขุนแจ๋ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่	19.329082 N 99.248302 E	501
4 นาข้าวเคมี	ลำน้ำขุนแจ๋ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่	19.323251 N 99.237759 E	469

3.2 การศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี

3.2.1) อุณหภูมิของน้ำและอากาศ (Water and Air temperature) ใช้เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิของน้ำและอากาศ หน่วยเป็นองศาเซลเซียส (°C)

3.2.2) อัตราความเร็วของกระแสน้ำ (Velocity) โดยใช้ Velocity meter

3.2.3) วัดค่าความขุ่นของน้ำ โดยใช้เครื่อง Colorimeter รุ่น DR890 หน่วยเป็น FAU (Formazin Attenuation Unit)

3.2.4) วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง Multi-parameter analyzer

3.2.5) ค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) โดยใช้เครื่อง Conductivity Meter มีหน่วยเป็นไมโครซีเมนต์ต่อเซนติเมตร (μS/cm)

3.2.6) วัดปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen: DO) และปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายอินทรีย์สารที่มีอยู่ในน้ำ (Biochemical Oxy gen Demand: BOD) โดยใช้วิธี Azide Modification of iodometric Method

3.2.7) วัดปริมาณสารอาหาร โดยเก็บตัวอย่างน้ำมาปริมาตร 1 ลิตร แล้วทำการวิเคราะห์สารอาหารในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ไนเตรท-ไนโตรเจน (Nitrate-Nitrogen) โดยวิธี Cadmium reduction แอมโมเนียม-ไนโตรเจน (Ammonium-Nitrogen) โดยวิธี Nesslerization และออร์โธ

ฟอสเฟต (Orthophosphate) โดยวิธี Ascorbic acid โดยใช้อุปกรณ์และสารเคมีเฉพาะกับเครื่อง Spectrophotometer (รุ่น DR 890 Colorimeter ของบริษัท HACH)

3.3 การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต

3.3.1 การเก็บตัวอย่างและการวินิจฉัยชนิดสาหร่าย

1) สาหร่ายขนาดใหญ่

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างสาหร่ายตามลักษณะพื้นท้องน้ำแบบต่างๆ เช่น ก้อนหิน กรวด รวมถึงพืชน้ำ ซึ่งสาหร่ายขนาดใหญ่เป็นสาหร่ายที่มองเห็นด้วยตาเปล่าที่มีลักษณะเป็นเมือก เส้นสาย ทัลลัส หรือเกาะตัวเป็นแพ ใช้คีมคีบและมีดขูดมาจากพื้นผิวที่เกาะติด บรรจุตัวอย่างสาหร่ายลงในกระป๋องพลาสติกแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 0-4 องศาเซลเซียส (Thiamdao et al., 2012) เพื่อนำไปวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ พร้อมกันนี้ได้ ประเมินความมากน้อยของสาหร่ายขนาดใหญ่ที่พบ โดยใช้ควอแดรทขนาด 1x1 เมตร วางแบบสุ่มทั้งหมด 6 ครั้ง ประยุกต์จาก Asmida et al. (2015) ซึ่งจัดระดับความมากน้อยโดยให้เป็นร้อยละของพื้นที่และแสดงเป็นเครื่องหมายดังนี้

1-20%	+	แทนปริมาณของสาหร่ายที่พบน้อยมาก
21-40%	++	แทนปริมาณของสาหร่ายที่พบน้อย
41-60%	+++	แทนปริมาณของสาหร่ายที่พบได้ปานกลาง
61-80%	++++	แทนปริมาณของสาหร่ายที่พบมาก
81-100%	+++++	แทนปริมาณของสาหร่ายที่พบมากที่สุด

2) ไดอะตอมพื้นท้องน้ำ (Renberg, 1990; Vilbaste, 1994; Kelly et al., 1998)

เก็บตัวอย่างไดอะตอมโดยเลือกเก็บตัวอย่างไดอะตอมชนิดที่เกาะอยู่บนสิ่งยึดเกาะ (substrate) ซึ่งอาจจะเป็นก้อนหิน กิ่งไม้หรือพืชน้ำที่มีเมือกลื่นสีน้ำตาลเข้มหรือมีสีดำ ใช้แผ่นพลาสติกเจาะรูเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 3x3 เซนติเมตรหรือประมาณ 10 ตารางเซนติเมตร วางทาบไปที่ผิวหน้าของตัวอย่าง ปัดตัวอย่างไดอะตอมที่ติดบนสิ่งยึดเกาะเหล่านั้นในช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสที่เจาะไว้ด้วยแปรงสีฟันใหม่ลงในขันจากนั้นเทตัวอย่างที่ปัดได้ใส่ลงในกระป๋องพลาสติก หลังจากปัดแล้วจะเห็นพื้นที่ที่ปัดตัวอย่างออกไป จากนั้นในห้องปฏิบัติการนำตัวอย่างมาปั่นเพื่อแยกเอาตะกอนหนักพวกกรวด ทราย และอนุภาคที่ปะปนมาออกด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วรอบ 2500 รอบ/นาทีเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นดูดเอาส่วนสีน้ำตาลที่อยู่ระหว่างส่วนใสด้านบน (supernatant) และตะกอนหนักออกมาซึ่งจะประกอบด้วยเซลล์ของ ไดอะตอมจำนวนมาก นำไปใส่บีกเกอร์ขนาด 50 ml. นำตัวอย่างที่ได้มาต้มกับ conc.Nitric acid หรือ conc.Hydrochloric acid บนเตาความร้อนเพื่อขจัดเอาสารอินทรีย์ออก ที่อุณหภูมิประมาณ 100 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15 นาที หรืออาจต้มกับ Hydrogenperoxide เข้มข้น 30 % หลังจากครบเวลาอาจเติม Potassiumpermanganate หรือ Potassiumdichromate ในปริมาณเล็กน้อยลงไปด้วย แล้วต้มต่อไปพอเดือดเป็นเวลาประมาณ 5

นาที หรือในกรณีที่เติม Potassiumdichromate ให้สังเกตสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองแสดงว่าสารอินทรีย์ถูกกำจัดออกหมดแล้ว จากนั้นนำตัวอย่างที่ทำการกำจัดสารอินทรีย์ออกหมดแล้วมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อแยกกรดและ oxidizing agent ออกโดยปั่นที่ 2500-3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างตัวอย่าง 3-5 ครั้ง จนตัวอย่างมี pH เป็นกลาง จากนั้นเตรียมสไลด์ถาวรโดยหยดตัวอย่างที่ได้จากการทำความสะอาดลงบนกระจกปิดสไลด์ ทำให้แห้งอย่างช้าๆ บนเตาความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 60 $^{\circ}$C ใช้ Naphrax เป็น mounting agent โดยหยดลงบนกระจกปิดสไลด์รอจน mounting agent เริ่มเดือดแล้วคว่ำกระจกปิดสไลด์ลงบนสไลด์ กดเบาๆ ด้วยคีมคีบเพื่อไล่ฟองอากาศ นำสไลด์ไปวางลงบนเตาความร้อนอีกครั้งจน mounting agent เดือดสัก 2-3 วินาทีเพื่อไล่ toluene ซึ่งเป็นตัวทำละลายออกให้หมดแล้วนำสไลด์ออกมาวางจนเย็นจากนั้นติดกระดาษ lable และนำไปนับจำนวนในแต่ละชนิดที่พบเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคำนวณหาค่าดัชนีความหลากหลายต่อไป

3) การวินิจฉัยชนิดสาหร่ายขนาดใหญ่และไดอะตอมพื้นท้องน้ำ

นำตัวอย่างสาหร่ายทั้งสาหร่ายขนาดใหญ่และไดอะตอม มาทำการวินิจฉัยชนิดจนถึงระดับจีนัสหรือ สปีชีส์ โดยใช้เอกสารที่เกี่ยวข้องในประเทศได้แก่ ยุวดี (2549; 2556) และเอกสารต่างประเทศ ได้แก่ Desikachary (1959), Krammer and Lange-Bertalot (1986, 1988, 1991a,b), Entwisle (1989), Lange-Bertalot (2001), John et al. (2002), Kelly and Haworth (2002), Kumano (2002), Taylor et al. (2007), Ahn (2012) และ Wehr et al. (2015) ถ่ายรูปตัวอย่างสาหร่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบในกำลังขยายต่างๆ

3.3.2 การเก็บตัวอย่างและการวินิจฉัยชนิดแมลงน้ำ

1) เก็บตัวอย่างแมลงน้ำ โดยใช้วิธี Sweep sampling ใช้สวิงน้ำที่มีความกว้างของปากสวิงประมาณ 50 เซนติเมตร นำสวิงกวาดแกว่งไปบริเวณโคนกอหญ้าใต้น้ำหรือภายใต้รากของพืชริมฝั่ง การทำในแต่ละตำแหน่งใช้เวลา 3 นาที โดยแต่ละจุดที่เก็บตัวอย่างจะทำการเก็บฝั่งซ้ายและฝั่งขวาของแม่น้ำ แต่ละฝั่งจะทำการเก็บตัวอย่างฝั่งอีกละ 3 จุด (3 ซ้ำ) ระยะห่างแต่ละจุด 3 เมตร รวมทั้งหมด 6 จุดต่อจุดเก็บตัวอย่างหนึ่งจุด

2) ทำการแยกแมลงน้ำออกจาก เศษใบไม้ เศษขยะ หรือเศษก้อนหินขนาดใหญ่ออก นำตัวอย่างจากสวิงใส่ลงในถุงพลาสติก และเติมสารละลาย Formaldehyde 10% ลงในถุงพลาสติกเพื่อใช้เป็นตัวรักษาสภาพของตัวอย่างแมลงน้ำที่จะนำไปศึกษาในห้องปฏิบัติการต่อไป

3) นำตัวอย่างแมลงน้ำที่ได้มาล้างด้วยน้ำสะอาด เพื่อเจือจางกลิ่นของฟอร์มาลินให้หมดแล้วทำการแยกแมลงน้ำออกจาก กรวด โคลน ใบไม้ เศษก้อนหินต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope) เพื่อความละเอียดในการแยกแมลงน้ำออกมา เพราะแมลงน้ำบางชนิด

อาจจะเล็กมากจนมองด้วยตาเปล่าได้ไม่ชัดเจน ทำให้ไม่สามารถแยกเอาตัวสัตว์ออกจากเศษกรวดหรือเศษอินทรีย์ต่างๆ ได้

4) นำแมลงน้ำที่แยกเศษใบไม้ สิ่งปฏิกูลต่างๆ มาทำการรักษาสภาพในขวดพลาสติกด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 80% โดยทำการแยกเป็นแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง

5) นำตัวอย่างแมลงน้ำมาจัดจำแนกถึงระดับวงศ์ (Family) โดยใช้การอ้างอิงจากเอกสารที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ McCafferty (1983), Merritt and Cummins (2009), Stehr (1991), Dudgeon (1992), Wiggins (1996) and Sangpradub and Boonsoong (2006) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope) และถ่ายรูปตัวอย่างแมลงน้ำที่ร่างกายครบสมบูรณ์เก็บไว้

6) นำตัวอย่างแมลงน้ำที่ได้รับการจัดจำแนกแล้วใส่ลงในขวดเก็บตัวอย่าง พร้อมทั้งระบุอันดับ (Order) ระดับวงศ์ (Family) สถานที่เก็บตัวอย่าง วันที่เก็บตัวอย่างนั้น และนับจำนวนตัวของแต่ละชนิด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคำนวณหาค่าดัชนีความหลากหลายต่อไป

3.3.3 วิธีการวิเคราะห์ผล

1) คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี

วิเคราะห์ค่าสถิติของค่าคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง ใช้การวิเคราะห์แบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยวิธี One-Way ANOVA โดยทดสอบความแตกต่างพหุคูณด้วยวิธี Duncan

2) ดัชนีความหลากหลายและค่าดัชนีความสม่ำเสมอ (Odum & Barrett, 2004)

โดยดัชนีความหลากหลายทางชีวภาพใช้สูตรของ Shannon - weiner diversity index โดยมีสูตรดังนี้

$$H = -\sum (P_i \ln(P_i))$$

เมื่อ H = ดัชนีความหลากหลาย

Pi = สัดส่วนของจำนวนสิ่งมีชีวิตที่ i ต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมด

$$E = \frac{H'}{ln\ S}$$

เมื่อ E = ความสม่ำเสมอ (evenness)

H' = ความหลากหลายของ Shannon - Wiener'sIndex

S = จำนวนชนิดของสิ่งมีชีวิต