บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยทำการแยกเส้นใยเห็ดป่าที่บริโภคได้จากพื้นที่ อ.แม่ริม-อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ เพื่อศึกษาการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแข็งวุ้น อาหารแข็งเมล็ดธัญพืช สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย การชักนำให้เกิดดอกเห็ดในห้องปฏิบัติการ และนำเชื้อเห็ดป่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง กลับคืนสู่ธรรมชาติ

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

1. ประชากร

เห็ดป่าที่บริโภคได้

2. กลุ่มตัวอย่าง

2.1 เห็ดป่าที่บริโภคได้

2.2 สูตรอาหารแข็งวุ้น 5 สูตร ได้แก่ Potato Dextose Agar; (PDA), Malt Extract Agar; (MEA), Modified Melin Norkans Agar; (MMN), Hagem medium; (Hagem) และ Gamborg medium; (Gamborg)

2.3 อาหารแข็งเมล็ดธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (ข้าวโพดไร่ชนิดหัวแข็ง) เมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว เมล็ดข้าวไร่ และเมล็ดข้าวบาเล่ย์

เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 มันฝรั่ง

1.2 เมล็ดก่อแป้น (*Castanopsis diversifolia* King.)

1.3 เมล็ดข้าวบาเล่ย์

1.4 เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (ข้าวโพดไร่ชนิดหัวแข็ง; Zea mays indurata)

1.5 เมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว (Zea mays ceratina)

1.6 เมล็ดข้าวฟ่าง

1.7 เมล็ดข้าวไร่

1.8 กระดาษขาว-ดำ

1.9 กระบอกฉีดน้ำ ขวดน้ำกลั่น

1.10 กระบอกตวง ขนาด 250 มล.

1.11 กระบอกตวง ขนาด 500 มล.

1.12 กระถางปลูกกล้าไม้

1.13 ขวดแก้ว ขนาด 8 ออน

1.14 ขวดเตรียมอาหาร ขนาด 250 มล.

1.15 ขวดเตรียมอาหาร ขนาด 500 มล.

1.16 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล.

1.17 เข็มเขี่ย

1.18 คีมคีบ

1.19 จานอาหารเพาะเชื้อ

1.20 ชั้นวางหลอดทดลอง

1.21 ช้อนตักสาร

1.22 ดินผสม

1.23 ด้ามมีดผ่าตัด เบอร์ 3

1.24 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.25 ตะแกรงร่อน

1.26 ถาดรองกระถาง

1.27 ถุงพลาสติก

1.28 ถุงพลาสติกดำ

1.29 แท่งแก้วคนสาร

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ CHIANG MAI RAJABHAT UNIVERSITY

1.30 แท่งแก้วรูปตัววี	
1.31 บีกเกอร์ ขนาด 50 มล.	
1.32 บีกเกอร์ ขนาด 250 มล.	
1.33 บีกเกอร์ ขนาด 500 มล.	
1.34 บีกเกอร์ ขนาด 1000 มล.	
1.35 ใบมีดผ่าตัด เบอร์ 11	
1.36 ปากคีบ	
1.37 ปิเปต ขนาด 1 มล.	
1.38 ปิเปต ขนาด 5 มล.	
1.39 ปิเปต ขนาด 10 มล.	
1.40 ยางรัด	
1.41 ลูกยางแดงสำหรับดูดปิเปต	
1.42 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์	
1.43 สำลี	
1.44 หลอดหยดสาร	
1.45 กล้องจุลทรรศน์	Nikon, Eclipse E600
1.46 กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ	Nikon, Eclipse SMZ-2T
1.47 กล้องถ่ายภาพ	Casio, EX-Z77
1.48 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง	Mettler, PG 203-S
1.49 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Mettler, AG 245
1.50 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler, MP 220
1.51 เตาแม่เหล็กไฟฟ้า	Schott, SLK 2
1.52 ตู้เขี่ยเชื้อ	Heal Force, HF safe-1200
1.53 ตู้บ่มเชื้อ	Contherm, P.O. Box 30605
1.54 ตู้อบลมร้อน	Memmert, DLE 500
1.55 เวอร์เนียร์	Mahco, 18-201
1.56 หม้อนึ่งความดันไอ	Tomy, SS-325

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ CHIANG MAI RAJABHAT UNIVERSITY

2. สารเคมี

2.1 กรดบอริก (H_3BO_3)	Ajax, AR grade
2.2 กลูโคส (Glucose)	Himedia, AR grade
2.3 คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	Ajax, AR grade
2.4 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2. 2H_2O$)	Ajax, AR grade
2.5 โคบอลด์คลอไรด์ ($CoCl_2. 6H_2O$)	Ajax, AR grade
2.6 ซิงก์ซัลเฟต ($ZnSO_4. 7H_2O$)	Rankem, Hi-pure
2.7 ซูโครส (Sucrose)	Fisher, AR grade
2.8 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Ajax, AR grade
2.9 โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	Fluka, AR grade
2.10 โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2Mo_4. 2H_2O$)	Fluka
2.11 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Merck, AR grade
2.12 เดกซ์โทส (Dextrose)	Himedia, AR grade
2.13 ไตร-แคลเซียมฟอสเฟต ($Ca_3(PO_4)_2$)	Ajax, AR grade
2.14 ไทมีนไฮโดรคลอไรด์ (Thaimine HCl)	Ajax
2.15 เปปโตน (Peptone)	Merck, AR grade
2.16 ผงวุ้น (Agar)	Himedia
2.17โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	Merck, AR grade
2.18 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Rankem, AR grade
2.19 โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)	Ajax, AR grade
2.20 โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)	Ajax, AR grade
2.21 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	Ajax, AR grade
2.22 เฟอร์ริคซัลเฟต ($FeSO_4. 7H_2O$)	Ajax, AR grade
2.23 เฟอร์ริค อีดีทีเอ (Fe EDTA)	Ajax
2.24 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4. 7H_2O$)	Ajax, AR grade
2.25 แมงกานิสซัลเฟต ($MnSO_4. 4H_2O$)	Merck, AR grade
2.26 มอลเอ็กแทร์ก (Malt Extract)	Himedia
2.27 ยีสต์เอ็กแทร์ก (Yeast Extract)	Lab scan

2.28 แลคโตฟีนอล คอทตอลบลู (Lactophenol cotton blue)

2.29 แอลกอฮอล์ 95% (Ethyl alcohol 95%) Merck

2.30 แอลกอฮอล์ 70% (Ethyl alcohol 70%) Merck

2.31 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) Rankem, AR grade

2.32 แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) Ajax, AR grade

2.33 ไฮโดรคลอริก (HCl) Merck, AR grade

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. การเพาะเลี้ยงเส้นใยของเชื้อราจากเห็ดป่าที่บริโภคได้

1.1 การแยกเส้นใยเชื้อราจากเห็ดป่าที่บริโภคได้

คัดเลือกเชื้อราจากเห็ดป่าที่บริโภคได้ ทำการแยกเชื้อจากส่วนของหมวกเห็ด (sporocarp) จากเห็ดป่าที่บริโภคได้ ที่เก็บได้จากการสำรวจพื้นที่ อ.แม่ริม-อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ โดยนำส่วนของหมวกเห็ดมาปัดเศษดิน-สิ่งสกปรกที่ติดบนหมวกเห็ดออก ฉีกแบ่งหมวกเห็ดออกเป็น 2 ส่วนตามแนวตั้ง จากนั้นตัดชิ้นเนื้อเยื่อด้านในของหมวกเห็ดออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้เข็มเขี่ยเชื้อย้ายชิ้นเนื้อเยื่อวางบนอาหารแข็งวุ้น PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่มเชื้อขึ้นอยู่กับ เชื้อราจากเห็ดป่าที่บริโภคได้แต่ละชนิด และเก็บรักษาเส้นใยบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

1.2 การศึกษาลักษณะโคโลนี

สะกิดเส้นใยบริสุทธิ์ของเชื้อราจากเห็ดป่าที่บริโภคได้ วางบนอาหารแข็งวุ้น PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นใช้ปลายหลอดหยดสาร (dropper) ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อราจากเห็ดป่า ที่บริโภคได้ วางบนอาหารแข็งวุ้น PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน บันทึกผลการเจริญเติบโตโดยใช้เวอร์เนียร์วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ทุก 2 วัน

1.3 การศึกษาลักษณะเส้นใย

นำแท่งแก้วรูปตัววี และแผ่นสไลด์ วางลงในจานเพาะเชื้ออบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เตรียมอาหารแข็งวุ้น PDA ในจานเพาะเชื้อโดยเทอาหารหนากว่าปกติเล็กน้อย จากนั้นใช้ปลายหลอดหยดสาร (dropper) ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะอาหารแข็งวุ้น PDA วางบนแผ่นสไลด์ที่วางอยู่บนแท่งแก้วรูปตัววี ใช้เข็มเขี่ยเชื้อสะกิดเส้นใยของเห็ดป่าที่

บริโภคได้วางบนอาหารแข็งวุ้นที่เจาะ 4 ด้าน ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางก้อนสำลีจุ่มน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน นำมาศึกษาลักษณะเส้นใยโดยย้อมสีเส้นใยด้วยสีย้อม lactophenol cotton blue ส่องดูโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ดป่าที่บริโภคได้

2.1. การศึกษาผลของสูตรอาหารแข็งวุ้นต่อการเจริญเติบโต

ศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อราจากเห็ดป่าที่บริโภคได้บนอาหารแข็งวุ้น 5 ชนิด ได้แก่ 1) Potato Dextose Agar (PDA), 2) Malt Extract Agar (MEA), 3) Modified Melin-Norkans Medium (MMN), 4) Hagem Medium (Hagem) และ 5) Modified Gamborg Medium (Gamborg) โดยใช้วุ้นที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นใช้ปลายหลอดหยดสาร (dropper) ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อราจากเห็ดป่าที่บริโภคได้ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน วางบนอาหารแข็งวุ้นทั้ง 5 สูตร บ่มที่อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน บันทึกผลการเจริญเติบโตโดยใช้เวอร์เนียร์ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ทุก 2 วัน

2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโต

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราจากเห็ดป่าที่บริโภคได้ โดยศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารแข็งวุ้น 5 สูตร ได้แก่ PDA, MEA, MMN, Hagem และ Gamborg โดยเจาะปลายเส้นใยของเชื้อราที่บ่มที่อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน ด้วย ปลายหลอดหยดสาร (dropper) ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางบนอาหารแข็งวุ้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน บันทึกผลการเจริญเติบโตโดยใช้เวอร์เนียร์วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ทุก 2 วัน

2.3 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการเจริญเติบโต

การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราจากเห็ดป่าที่บริโภคได้ โดยศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารแข็งวุ้น 5 สูตร ได้แก่ PDA, MEA, MMN, Hagem และ Gamborg ที่ความเป็นกรด-ด่าง 4 ระดับ คือ pH 5, 6, 7 และ 8 ด้วยใช้บัฟเฟอร์ NaOH 1 นอร์มอล และ HCl 1 นอร์มอล ในการปรับความเป็นกรด-ด่าง จากนั้นเจาะปลายเส้นใยของเชื้อราที่บ่มเป็นเวลา 20 วัน วางบนอาหารแข็งวุ้นทั้ง 5 สูตร บ่มที่อุณหภูมิ 27±2 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน บันทึกผลการเจริญเติบโตโดยใช้เวอร์เนียร์วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ทุก 2 วัน

2.4 การศึกษาการเจริญของเส้นใยเชื้อราจากเห็ดป่าที่บริโภคได้บนอาหารแข็งเมล็ดธัญพืช

การศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารแข็งเมล็ดธัญพืช 5 ชนิด คือ เมล็ดข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ เมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว เมล็ดข้าวไร่ และเมล็ดข้าวบาเล่ย์ ในการทดสอบโดยมีขั้นตอนการเตรียมอาหารแข็งเมล็ดธัญพืช ดังนี้

อาหารแข็งเมล็ดข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว มีวิธีการเตรียม ดังนี้ นำเมล็ดข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว มาล้างสิ่งเจือปนออกให้สะอาด แช่น้ำ ทิ้งไว้ประมาณ 12-18 ชั่วโมง หรือแช่ข้ามคืน ต้มให้เดือดจนเมล็ดเริ่มปริ-แตก จากนั้นนำมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำหรือพอหมาด ชั่งใส่หลอดทดลองขนาด 25x200 มิลลิเมตร ปริมาณ 10 กรัม ปิดทับด้วยจุกสำลี

อาหารแข็งเมล็ดข้าวไร่ และเมล็ดข้าวบาเล่ย์ มีวิธีการเตรียม ดังนี้ นำเมล็ดข้าวไร่ และเมล็ดข้าวบาเล่ย์ มาล้างน้ำให้สะอาดแล้วผึ่งให้สะเด็ดน้ำหรือพอหมาด จากนั้นชั่งเมล็ดปริมาณ 10 กรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 25x200 มิลลิเมตร เติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ปิดทับด้วยจุกสำลี

จากนั้นนำอาหารแข็งเมล็ดธัญพืชทั้งหมดนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ทำการเจาะปลายเส้นใยของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน จำนวน 4 ชิ้น วางลงด้านบนของอาหารแข็งเมล็ดธัญพืชที่ใช้ในการทดสอบ บ่มเชื้อในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเจริญจนเส้นใยเจริญเต็มหลอดทดลอง

3. การชักนำให้เกิดดอกเห็ด

เตรียมเมล็ดข้าวฟ่าง (ข้อ 2.4) จากนั้นเทเมล็ดข้าวฟ่างปริมาตร 15 กรัม ลงในจานเพาะเชื้อ เติมอาหารเหลว PDB ฆ่าเชื้อ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการเจาะปลายเส้นใยเชื้อราที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน วางลงบนจานเพาะเชื้อพันทับด้วย parafilm (Whatman) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงในที่มีแสง 12 ชั่วโมง และสลับเพาะเลี้ยงในที่มืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยและการสร้างดอกเห็ด

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราจากเห็ดป่าที่บริโภคได้ มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS โดยวิธี One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P = 0.05$)

นำข้อมูลการเพาะเห็ดป่ากินได้คืนสู่ชุมชน

ทำการส่งมอบรูปเล่มผลงานวิจัย และหัวเชื้อเห็ดป่ากินได้ที่เพาะได้ในระดับห้องปฏิบัติการ ให้กับผู้บริหารของ อบต.สะลวง อ.แม่ริม และอบต.สันป่ายาง อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ และจัดอบรมให้ความรู้เรื่องการเพาะเห็ดป่ากินได้ และขยายเส้นใยเพื่อคืนแหล่งอาหารให้กับชุมชนให้กับ ผู้นำชุมชน และเยาวชนในชุมชน บ้านพระพุทธบาทสี่รอย ต.สะลวง อ.แม่ริม และผู้นำชุมชน และเยาวชนในชุมชน บ้านเอียก ต.สันป่ายาง อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชสกุลไพล

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 พืชทดลอง

หน่ออ่อนของพืชในสกุลไพล 3 ชนิด ได้แก่

- ไพลเหลือง (*Zingiber montanum*)
- ไพลดำ (*Zingiber ottensii*)
- ขิง (*Zingiber officinale*)

3.1.2 เครื่องแก้ว

1) ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 8, 12 ออนซ์
2) ปิเปต ขนาด 1, 10 และ 20 มิลลิลิตร
3) แท่งแก้วคนสาร
4) บีกเกอร์ ขนาด 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
5) จานแก้วเพาะเชื้อ
6) กระบอกตวง ขนาด 10, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
7) ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
8) หลอดหยด
9) ขวดแก้วสีชา
10) หลอดทดลอง

3.1.3 สารเคมี

1) สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารโดยใช้สูตรของ Murashige and Skoog (MS, 1962)
2) สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ
    1. แอลกอฮอล์ 95% และ 70%
    2. น้ำยาล้างจาน
    3. เมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$)
    4. ทวีน 20 (Tween-20)
3) สารควบคุมการเจริญเติบโต
    1. BA (6-Benzylaminopurine)
    2. NAA (α-Napthaleneacetic acid)
4) สารเคมีปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)
    1. ไฮโดรคลอริก (HCl)
    2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
5) น้ำตาลทราย (Sucrose)
6) ผงวุ้น (Agar)

3.1.4 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารประกอบด้วย

1) เครื่องชั่งหยาบ 2 ตำแหน่ง บริษัท METTLER TOLEDO รุ่น PG 2002-S
2) เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง บริษัท METTLER TOLEDO รุ่น AG 204
3) หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) บริษัท HIRAYAMA รุ่น HVE - 50
4) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท METROHM SIAM รุ่น 837
5) เตาไฟฟ้า (Hot plate) บริษัท SCHOTT รุ่น D65319
6) ตู้เย็น

3.1.5 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการตัดเนื้อเยื่อ

1) มีดผ่าตัด เบอร์ 11
2) ด้ามมีด เบอร์ 3
3) ปากคีบ
4) ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ
5) ตะเกียงแอลกอฮอล์

6) กระบอกฉีด

3.1.6 อุปกรณ์เลี้ยงเนื้อเยื่อภายหลังการย้ายเนื้อเยื่อลงขวดอาหาร

1) ชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ ความสว่าง 2500-3000 ลักซ์
2) เครื่องควบคุมเวลา (Timer)
3) เครื่องปรับอากาศ (Air Condition)

3.1.7 เครื่องมือที่ใช้บันทึกและเก็บข้อมูล

1) กล้องถ่ายรูป
2) ไม้บรรทัด
3) เครื่องชั่ง
4) สมุด
5) ปากกา

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมอาหาร

การเตรียมสารละลายเข้มข้นในสูตรอาหารของ Murahige and Skoog (1962) ดังตาราง ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการเตรียมอาหาร

การเตรียมอาหาร ครั้งละ 1 ลิตร ใช้อาหารสูตร MS โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA ในอัตราส่วนความเข้มข้นที่ต่างกัน

ขั้นที่ 1 เทน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ประมาณ 300 มิลลิลิตร

ขั้นที่ 2 ดูดสารละลายเข้มข้นสูตร MS ลงในบีกเกอร์ตามลำดับ

- สต็อคที่ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- สต็อคที่ 2-5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- ใส่น้ำตาลซูโครส 30 กรัม

ขั้นที่ 3 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ตามความเข้มข้นที่กำหนด

ขั้นที่ 4 ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ขั้นที่ 5 นำไปปรับความเป็นกรด-เบส (pH) ด้วยกรดเกลือ (HCl) และ

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยให้ค่า pH ที่ได้อยู่ระหว่าง 5.6-5.8

ขั้นที่ 6 เติมผงวุ้น 7 กรัม คนให้วุ้นกระจายตัวดีแล้วยกไปวางบนเตาไฟฟ้าคนเบาๆตลอดเวลาจนวุ้นละลาย

ขั้นที่ 7 กรอกอาหารลงในขวดเพาะลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ ปิดฝาใส่ถุงพลาสติกแล้วรัดด้วยยางรัด

ขั้นที่ 8 นำอาหารที่ใส่ถุงเรียบร้อยแล้ว นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นที่ 9 นำขวดเพาะเลี้ยงออกจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอที่เย็นแล้วเก็บในตู้ที่สะอาดมิดชิดเพื่อนำไปใช้เพาะเลี้ยงต่อไป

3.2.2. ศึกษาผลของ BA ต่อการเจริญเติบโตของไพลเหลือง ไพลดำ และขิง

โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วนคือ ผลของ BA ต่อการเจริญเติบโตของไพลเหลือง ไพลดำและขิง มีขั้นตอนการดังนี้

1. นำเหง้าไพลเหลือง ไพลดำ และขิงมาล้างให้สะอาด นำไปปลูกลงในกระบะทรายเพื่อให้เกิดการงอกเป็นหน่ออ่อนออกมา โดยรดน้ำทุกๆ 5 วัน เนื่องจากหากรดน้ำบ่อยเกินไปจะ ทำให้เหง้าไพลเหลือง ไพลดำ และโดยเฉพาะขิงเกิดการเน่าได้

2. ตัดแยกหน่ออ่อนซึ่งมีตาอยู่ด้วย ที่มีขนาดยาวประมาณ 5 นิ้ว (ภาพที่ ข.1) ออกจากเหง้า นำมาล้างให้สะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 15 นาที

3 ล้างสารละลายฟอกฆ่าเชื้อออกด้วยน้ำกลั่น ที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

4 นำหน่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดแต่งบริเวณที่เนื้อเยื่อสัมผัสกับสารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ รวมทั้งตัดส่วนกาบใบทิ้ง

5 ตัดแบ่งโคนหน่ออ่อนออกเป็น 4 ชิ้น ตามแนวทแยงมุม (ภาพที่ ข.2)

6 นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต คือ BA ความเข้มข้น 0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปตั้งไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ ข.3) เพื่อทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตโดยทำการย้ายเนื้อเยื่อ เปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ บันทึกผลการเจริญเติบโตหลังการเพาะเลี้ยง

3.2.3. ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

นำขวดที่เพาะเลี้ยง มาตั้งไว้ในที่มีแสง และอุณหภูมิห้องนาน 10 วัน หลังจากนั้น จึงนำต้นอ่อนออกจากขวด ล้างน้ำให้ อาหารวุ้นที่ติดกับรากออกให้หมดนำมาปลูกในโรงเรือนเพาะชำ ในกระบะขนาด 2 x 2 นิ้ว วัสดุปลูก ทราย ดิน ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 2 : 2 : 1 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วบันทึกข้อมูล อัตราการรอดชีวิต

3.2.4 การบันทึกผลการทดลองและวิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

การบันทึกผลการทดลองได้แก่ ผลการเจริญเติบโตคือ จำนวนยอดและความสูงของยอด และการเปลี่ยนแปลงอื่นของชิ้นส่วนพืช โดยทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยวิธี Complete Randomized Design, CRD

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน

3.3 วัสดุอุปกรณ์

3.3.1 พืชทดลอง

1) ชิ้นส่วนของใบของหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

3.3.2 เครื่องแก้ว ใช้อุปกรณ์ เครื่องแก้ว และเครื่องมือ เหมือนกับในการทดลอง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไพล

3.3.3 สารเคมี ใช้เหมือนกับในการทดลอง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไพล โดยมีการเพิ่มเติม คือ สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

1. กลูโคส (glucose, $C_6H_{12}O_6$)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH)
3. ไดไนโตรซาลิไซลิก แอสิด (dinitrosalicylic acid, $C_7H_4N_2O_7$)
4. น้ำกลั่น

3.3.4 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ใช้เหมือนกับในการทดลอง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไพล

3.3.5 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

1) เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer)

2) เครื่องเขย่า (vortex mixer)

3) ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)

3.3.6 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการตัดเนื้อเยื่อ ใช้เหมือนกับในการทดลอง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไพล

3.3.7อุปกรณ์เลี้ยงเนื้อเยื่อภายหลังการย้ายเนื้อเยื่อลงขวดอาหาร

- ชั้นวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์
- เครื่องควบคุมเวลาปิด-เปิดไฟ

3.4 วิธีดำเนินงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน

3.4.1 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. วางแผนการทดลอง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลอง (Treatment) และทำการทดลองละ 10 ซ้ำ จำนวน 3 รอบ

2. เตรียมอาหารสูตร MS (1962) ซึ่งเติม NAA และ BA ในอัตราส่วนความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนความเข้มข้นของ NAA และ BA ในสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยง

สูตรอาหาร	ปริมาณ NAA (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	ปริมาณ BA (มิลลิกรัม ต่อลิตร)
T1	0	0
T2	1	0
T3	0	1
T4	1	1
T5	2	1
T6	1	2

T7	2	2

3.4.2 วิธีการทดลอง

ขั้นตอนการเตรียมสารที่ใช้ในการทดลอง

1. การเตรียมอาหาร

1.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้นในสูตรอาหารของ Murahige and Skoog (1962) ดังตารางภาคผนวก ก

1.2 ขั้นตอนการเตรียมอาหาร เตรียมครั้งละ 1 ลิตร ใช้อาหารสูตร MS โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAAและ BA ในอัตราส่วนความเข้มข้นที่ต่างกัน

ขั้นที่ 1 เทน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ประมาณ 300 มิลลิลิตร

ขั้นที่ 2 ดูดสารละลายเข้มข้นสูตร MS ลงในบีกเกอร์ตามลำดับ

- สต็อคที่ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 1
- สต็อคที่ 2-5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- ใส่น้ำตาลซูโครส 30 กรัม

ขั้นที่ 3 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ตามสูตร

ขั้นที่ 4 ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ขั้นที่ 5 นำไปปรับความเป็นกรด-เบส (pH) ด้วยกรดเกลือ (HCl) และโซเดียม ไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยให้ค่าที่ได้ประมาณ 5.6-5.7

ขั้นที่ 6 เติมผงวุ้น 7 กรัมคนให้วุ้นกระจายตัวดีแล้วยกไปวางบนเตาไฟฟ้าคนเบาๆ ตลอดเวลาจนวุ้นละลาย

ขั้นที่ 7 กรอกอาหารลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ ปิดฝาใส่ถุงพลาสติกแล้วรัดด้วยยางรัด

ขั้นที่ 8 นำขวดอาหารที่ทำการกรอกเรียบร้อยแล้ว มาใส่ในถุงพลาสติกทนร้อน รัดด้วยยางรัด นำเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ(Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นที่ 9 นำขวดเพาะเลี้ยงออกจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอที่เย็นแล้วเก็บในตู้ที่สะอาดมิดชิด

2. วิธีการตัดเนื้อเยื่อ

ทำความสะอาดภายในห้องตัดเนื้อเยื่อ และทำการเช็ดตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ด้วยแอลกอฮอล์ 70เปอร์เซ็นต์ เปิดหลอดรังสีอุลตราไวโอเลตเพื่อฆ่าเชื้อภายในตู้อย่างน้อย 30 นาที

เตรียมต้นหญ้าหวาน ตัดส่วนใบนำส่วนใบที่ได้มาทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำยาล้างจานเจือจางแล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด

นำส่วนใบของหญ้าหวนที่ผ่านการล้างนำเข้าตู้ตัดเนื้อเยื่อ นำไปฟอกฆ่าเชื้อ บริเวณผิวด้วยคลอร็อกซ์ (Clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ ที่หยด tween-20 จำนวน 1-2 หยด เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที ทำการฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยคลอร็กซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่หยด tween-20 จำนวน 1-2 หยด เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที คีบส่วนใบวางบนจานเพาะเชื้อ แล้วทำการตัดเนื้อเยื่อโดยใช้มีดที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดส่วนที่โดยคลอรอกซ์ออกทิ้งประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทำการตัดชิ้นส่วนของใบขนาดประมาณ 0.5 × 0.5 เซนติเมตร ไปวางบนอาหารที่เตรียมไว้ ตามสูตร 1-7 นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ตัดเนื้อเยื่อเสร็จแล้วไปวางบนชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ บันทึกข้อมูลทุกๆ 1 สัปดาห์ ตั้งแต่เริ่มเกิดแคลลัส เป็นเวลา 1 เดือน เมื่อครบ 1 เดือน ทำการตัดแบ่งเนื้อเยื่อแคลลัสไปยังอาหารชุดใหม่ บันทึกข้อมูลทุก ๆ สัปดาห์

3. ขั้นตอนการบันทึกข้อมูล

สังเกตและบันทึกผลการทดลอง นับจากวันที่เริ่มมีการเจริญ โดยสังเกตและบันทึกผลจาก ขนาดของแคลลัส โดยวัดด้านกว้าง ด้านยาว น้ำหนักของแคลลัส บันทึกภาพถ่ายด้วยกล้องถ่ายรูป

4. วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี การวิเคราะห์ข้อมูลโดยหาค่าเฉลี่ย การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยวิธีของ Least Significant Difference (LSD)

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างแมลงน้ำ

3.1.1 สวิงแบบ D-Frame net

3.1.2 ถุงพลาสติกและยางรัด

3.1.3 กะละมัง

3.1.4 เข็มเขี่ย

3.1.5 แว่นขยาย

3.1.6 ปากคีบ

3.1.7 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereomicroscope)

3.1.8 สมุดบันทึก

3.1.9 ปากกาเมจิก

3.1.10 กล้องถ่ายรูปดิจิตอล

3.2 วัสดุ อุปกรณ์ ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างแมลงบก

3.2.1 สวิงดักจับแมลง

3.2.2 ขวดสำหรับน็อคแมลง

3.2.3 สมุดจดบันทึก

3.2.4 ปากกา

3.2.5 ไม้บรรทัด

3.2.6 กล้องถ่ายรูปดิจิตอล

3.2.7 กล้องจุลทรรศน์ 3 มิติ (stereo microscope)

3.2.8 ตู้อบลมร้อน

3.2.9 เข็มหมุด

3.2.10 โฟม

3.2.11 ภาชนะใส่แมลง

3.2.12 ปากคีบ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ CHIANG MAI RAJABHAT UNIVERSITY

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสำรวจนก

3.3.1 กล้องส่องทางไกลแบบสองตา (binocular)

3.3.2 กล้องส่องทางไกลแบบตาเดียว (telescope)

3.3.3 กล้องถ่ายภาพนิ่ง

3.3.4 กล้องถ่ายภาพเคลื่อนไหว

3.3.5 หนังสือคู่มือดูนก

3.3.6 สมุดบันทึก ดินสอ

3.4 สารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลงบกและแมลงน้ำ

3.4.1 ฟอร์มาลีน 4%

3.4.2 แอลกอฮอล์ 95 %

3.4.3 แอลกอฮอล์ 70 %

3.4.4 น้ำกลั่น

3.4.5 ปูนปลาสเตอร์ หรือสำลี

3.4.6 เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate)

3.5 สถานที่ดำเนินการศึกษา

บริเวณพื้นที่ป่าบ้านเอียก ตำบลสันป่ายาง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ และวัดพระบาทสี่รอย ตำบลสะสวง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ CHIANG MAI RAJABHAT UNIVERSITY

ภาพที่ 3.1 แสดงแผนที่ที่ทำการสำรวจผีเสื้อและแมลงปอ

หมายเหตุ : เครื่องหมายคือ พื้นที่ที่ทำการสำรวจ

ที่มา : http://www. maetaeng-cm.com

พื้นที่เก็บตัวอย่างแมลงน้ำ จุดที่เลือกศึกษามีทั้งหมด 4 จุด ดังนี้

จุดที่ 1 BE 1 บริเวณเส้นทางเดินป่า

จุดที่ 2 BE 2 บริเวณต้นน้ำเหนือหมู่บ้าน

จุดที่ 3 BE 3 บริเวณท้ายหมู่บ้านเขตรอยต่อวัดพระบาทสี่รอย

จุดที่ 4 BE 4 บริเวณน้ำตกสายหมอก

จุดที่ 5 BE 5 บริเวณน้ำตกตาดหลวง

3.6 วิธีการดำเนินวิจัย

3.6.1 ศึกษาความหลากหลายของแมลงน้ำ

1) เก็บตัวอย่างแมลงน้ำโดยใช้วิธี Kick sampling และ วิธี Sweep sampling (Anon, 1994)

1.1) วิธี Kick sampling

ใช้สวิงน้ำที่มีความกว้างของปากสวิงประมาณ 50 เซนติเมตร

↓

วางปากสวิงน้ำลงบนพื้นท้องน้ำโดยวางทิศทางทวนกระแสน้ำ

↓

ใช้ไม้เขี่ยหรือใช้ก้อนหินโยนไปก้านหน้าของปากสวิงน้ำ เพื่อให้สัตว์ที่อาศัยอยู่พื้นท้องน้ำ

ถูกรบกวนและไหลตามกระแสน้ำเข้าสู่ปากสวิงน้ำ

↓

การทำแต่ละตำแหน่งใช้เวลา 3 นาที จะทำการย้ายตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง

โดยในแต่ละจุดที่เก็บตัวอย่างจะย้ายตำแหน่ง 3 ครั้ง ระยะห่างประมาณ 2 เมตร

1.2) วิธี Sweep sampling

ใช้สวิงน้ำกวาด แกว่ง บริเวณโคนกอหญ้า หรือพืชริมฝั่ง

↓

นำมาแยกเศษขยะ เศษไม้ เศษใบไม้ และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังออกจากกัน

2) ทำการแยกแมลงน้ำออกจาก กรวดหิน เศษขยะ เศษใบไม้ เทใส่ถุงพลาสติก เติมฟอร์มาลีน 4% , Alcohol 95 % รัดปากถุงให้แน่นด้วยยางรัด เพื่อมาทำการตรวจสอบและจำแนกแมลงน้ำในระดับวงศ์ (Family) ต่อไปในห้องปฏิบัติการ

3) ตรวจสอบเพื่อสำรวจชนิดโดยใช้หนังสือในการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างของ (McCafferty ,1981) และปริมาณของแมลงน้ำ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอโดยทำการตรวจสอบตัวอย่างที่พบแต่ละชนิดจนถึงระดับวงศ์ (Family) และถ่ายรูปตัวอย่างแมลงน้ำ

3.6.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

1) ใช้วิธีการคำนวณ BMWP score และ ASPT โดยนำแมลงน้ำวงศ์ต่าง ๆ ในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างซึ่งวินิจฉัยเรียบร้อยแล้วมาให้คะแนนตาม BMWP score ของแมลงน้ำทั่วไป ซึ่งมีค่าแตกต่างกันในสัตว์ที่อยู่ในน้ำที่มีคุณภาพน้ำต่างกันอย่างชัดเจน แมลงน้ำที่ทนทานต่อมลพิษน้อยมีคะแนนสูง ส่วนที่ทนทานต่อมลพิษมากมีคะแนนต่ำ เอาคะแนนของสัตว์แต่ละวงศ์มารวมกัน ค่าที่ได้เรียกว่า BMWP score นำค่าที่ได้นี้หาค่า ASPT โดย (Mustow, 2002)

$$\text{ASPT} = \frac{\text{BMWP score}}{\text{จำนวนวงศ์ของสัตว์ที่พบและสามารถให้คะแนนได้}}$$

2) ค่าดัชนีความหลากหลายโดยใช้สูตรของ shannon – weiner diversity index ที่ได้ดัดแปลงแล้ว (Washington, 1984; Ludwig & Reynolds , 1988 ; Clarke & Warwick , 2001) มีสูตร ดังนี้คือ

$$H = -\sum(P_i \log_2 P_i)$$

เมื่อ H = ดัชนีความหลากหลาย

Pi = สัดส่วนของจำนวนสิ่งมีชีวิตที่ i ต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมด

3.7 วิธีดำเนินการวิจัยในการเก็บตัวอย่างผีเสื้อและแมลงปอ

ผู้วิจัยได้ทำการเลือกศึกษาพื้นที่วิจัยบริเวณพื้นที่ป่าบ้านเอียก ตำบลสันป่ายาง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ โดย และได้เลือกทำการเก็บตัวอย่างเฉพาะแมลงปอ และผีเสื้อ เนื่องจากการเก็บข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้น แมลงชนิดอื่นมีการปรากฏจำนวนน้อย *

3.7.1 ภาคสนาม

1) ดำเนินการสำรวจเส้นทางศึกษา สภาพป่าไม้ ชนิดของดิน และต้นไม้ที่เป็นถิ่นที่อยู่อาศัยของผีเสื้อและแมลงปอ

2) กำหนดเขตพื้นที่ในการสำรวจใช้วิธีสำรวจโดยเลือกแบบสุ่ม ทั่วพื้นที่ป่าบ้านเอียก เมื่อเลือกเส้นทางในการสุ่มได้แล้ว ทำการเก็บตัวอย่าง 2 ช่วงเวลา ในตอนเช้า เริ่มตั้งแต่เวลา 8.30 น. ถึง 12.30 น. ในช่วงบ่าย เริ่มตั้งแต่ 13.30 น.-17.30 น.

3) ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างผีเสื้อและแมลงปอในพื้นที่ โดยใช้สวิงในการเก็บตัวอย่าง โดยใช้วิธีการเดินเข้าค้นหาบริเวณจุดสำรวจ แล้วใช้สวิงโฉบจับ หรือใช้การถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอล

4) เก็บผีเสื้อและแมลงปอ โดยใช้ขวดฆ่าแมลงที่มีสารเอทิลอะซิเตท (Ethyl aceted)

3.7.2. ห้องปฏิบัติการ

1) นำผีเสื้อและแมลงปอที่ได้จากการสำรวจมาสังเกตรูปร่างพร้อมทั้งถ่ายรูปประกอบเพื่อจะจัดจำแนกและต้องรักษาแมลงให้มีรูปร่างครบสมบูรณ์เช่น ขา หนวด เป็นต้น

2) การเก็บตัวอย่างผีเสื้อและแมลงปอเก็บใส่ในขวดเพื่อทำการจัดรูปร่างโดยนำผีเสื้อและแมลงปอที่จับได้มาจัดรูปร่างโดยใช้เข็มปักแมลง ให้อยู่ในท่าที่เป็นธรรมชาติ

3) การรักษาสภาพแมลงโดยการอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 50-60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4) เก็บรักษาในกล่องเก็บแมลง

5) นำตัวอย่างที่ได้ไปวินิจฉัยโดยจำแนกถึงลำดับจีนัส (genus) และสปีชีส์ (species)

3.8 การสำรวจชนิดของนก

3.8.1 ทำการศึกษาโดยใช้วิธีการวางเส้นสำรวจ (Line transect method) บนเส้นทางศึกษาระยะทางทั้งสิ้น5 กิโลเมตร ตามเส้นทางศึกษาทางเดินธรรมชาติ

3.8.2 เริ่มสำรวจตั้งแต่เวลา 08.00 – 10.00 น. และ 15.00 – 17.00 น. โดยบันทึกชนิดของนกที่พบทุกระยะ 50 เมตรของเส้นสำรวจ และระยะห่างไม่เกิน 25 เมตรตามแนวตั้งฉากจากเส้นสำรวจ

3.8.3 ทำการสำรวจเดือนละ 1-2 ครั้ง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2552 ถึง ธันวาคม 2552 รวมทั้งสิ้น 11 ครั้ง

การจำแนกชนิดของนก

อ้างอิงจากหนังสือคู่มือดูนก A Guide to the Birds of Thailand (Lekagul and Round, 1991) และ A Field Guide to the Birds of Thailand and South-East Asia (Robson, 2000)

3.9 การกำหนดพื้นที่ดำเนินงานการถ่ายทอดองค์ความรู้สู่ชุมชน

พื้นที่หมู่บ้านพระบาทสี่รอย ต.สันป่ายาง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ โดยในพื้นที่ ประชากรส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตในพื้นที่โดยตรง รวมถึงมีการดำเนินชีวิตตามวิถีการเกษตร เช่น หาของป่า การทำไร่ข้าวโพด และพืชสวน นอกจากนี้ยังมีการทำปศุสัตว์และโรงงานอุตสาหกรรมในครัวเรือนขนาดเล็กเช่น ท้อดอง และยาสมุนไพรเป็นต้น

3.6.1 กลุ่มเป้าหมาย

เยาวชนและผู้นำชุมชน และตัวแทนชุมชน ในเขตพื้นที่หมู่บ้านพระบาทสี่รอย ต.สันป่ายาง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ และสามารถเป็นตัวแทนในการขยายเครือข่ายได้เมื่อเสร็จสิ้นโครงการ

3.6.2 การเก็บข้อมูล

การเก็บข้อมูลจะเก็บในสองด้านหลักได้แก่ การประเมินคุณภาพน้ำจากชุมชน/เยาวชน/โรงเรียนโดยการใช้สิ่งมีชีวิตติดตามตรวจสอบสิ่งแวดล้อม โดยจะอยู่ในรูปของข้อมูลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ และเครือข่ายการเฝ้าระวังและติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำ การสร้างและจัดการระบบบำบัดน้ำเสีย อีกด้านจะเป็นการเก็บข้อมูลและสังเคราะห์ข้อมูลจากสถิติการเจ็บป่วยและการประเมินคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นในชุมชน

3.6.3 กิจกรรมในโครงการ

กิจกรรมที่ 1 การร่วมศึกษาองค์ความรู้ในพื้นที่

นักวิจัยร่วมเก็บตัวอย่างและศึกษาองค์ความรู้ชุมชน ร่วมกับเยาวชนและนักวิจัยท้องถิ่น และติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำโดยใช้ดัชนีชีวภาพอย่างง่ายร่วมกับการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางด้านกายภาพและเคมีอย่างง่ายบางประการในน้ำของเขตพื้นที่ศึกษา การติดตามตรวจสอบลักษณะองค์ประกอบพื้นที่ ความหลากหลาย ความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศ องค์ความรู้ภูมิปัญญาท้องถิ่น โดยมีการให้ผู้เข้าร่วมการอบรมมีความรู้ ความเข้าใจ ประเมินคุณภาพน้ำ เก็บตัวอย่าง วางแผนและสามารถปฏิบัติได้จริง

กิจกรรมที่ 2 การศึกษาวิจัยติดตามตรวจสอบและประเมินคุณภาพน้ำ

การติดตามตรวจสอบและประเมินคุณภาพน้ำ โดยจะมีการดำเนินการจากผู้เข้าร่วมโครงการที่ผ่านการอบรมและมีการประเมินคุณภาพน้ำ โดยกิจกรรมจะมีการศึกษาคุณภาพน้ำในหลายปัจจัยดังนี้

ทำการดำเนินการเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตโดยผู้เข้าร่วมการอบรม และควบคุมดูแลโดยคณะวิทยากร ข้อมูลดังกล่าวจะนำมาใช้ในการจัดทำดัชนีทางชีวภาพบ่งบอกคุณภาพน้ำ โดยสิ่งมีชีวิตที่เลือกมาทำการศึกษาประกอบด้วย แมลงน้ำ และนก และสามารถนำมาประเมินคุณภาพสิ่งแวดล้อมจากสิ่งมีชีวิตที่พบได้ นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างโดยเยาวชนและชุมชนท้องถิ่นจะทำควบคู่ไปกับการเก็บตัวอย่างและวินิจฉัยโดยนักวิจัยจากมหาวิทยาลัย

กิจกรรมที่ 3 การติดตามตรวจสอบลักษณะองค์ประกอบพื้นที่ และความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศ

การติดตามตรวจสอบลักษณะองค์ประกอบพื้นที่ที่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของแหล่งน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งองค์ประกอบของระบบนิเวศไม่ว่าจะเป็นผู้ผลิต ผู้บริโภค และการส่งต่อของพลังงานและสารอาหาร ที่สามารถนำมาประเมินความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศได้

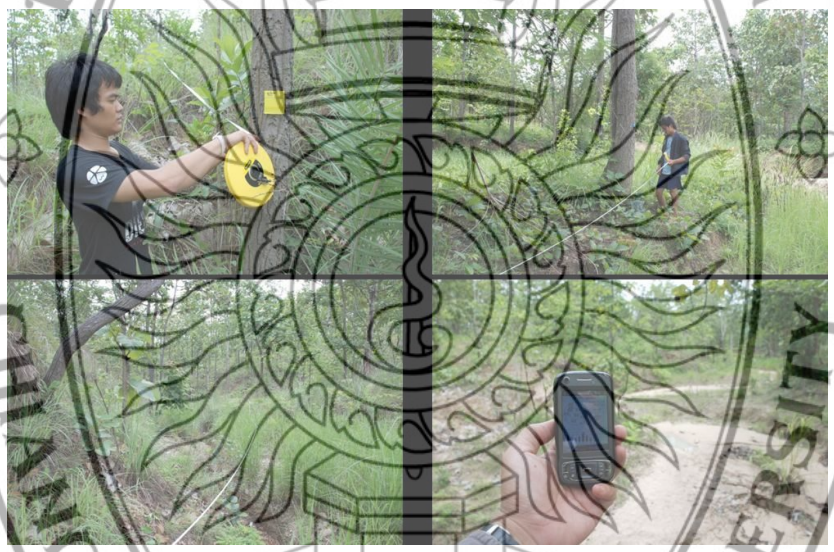
กิจกรรมที่ 4 การสรุปผลและการประเมินความเข้มแข็งของชุมชนและการมีได้รับผลสำเร็จจากการวิจัย

ข้อมูลจากการเก็บตัวอย่างของนักวิจัยและผู้เข้าร่วมโครงการรวมถึงกิจกรรมที่เกิดในชุนในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งในระยะเวลาที่กำหนด จะนำมาสรุป เปรียบเทียบ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าการวิเคราะห์โดยเยาวชนและชุมชนกับนักวิจัย เพื่อที่สามารถบ่งชี้และสร้างความเชื่อมั่นของการติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำและสภาพนิเวศโดยชุมชนรวมถึงสามารถดำเนินการตามกิจกรรมที่ได้เรียนรู้ได้อย่างต่อเนื่องและถูกต้อง ชุมชนมีความเข้มแข็งจากกิจกรรมต่างและ รวมถึงมีรายได้เสริมจากการท่องเที่ยวอีกด้วย

3.10 จัดทำเส้นทางเดินเพื่อศึกษานกในพื้นที่

1) การสำรวจ

ขั้นตอนปฏิบัติการสำรวจเส้นทางเริ่มต้นที่การแบ่งกลุ่มสำรวจออกเป็นสองทีม แต่ละทีมประกอบไปด้วยตัวแทนตัวแทนของผู้ที่มีความรู้และความเชี่ยวชาญทางด้านสภาพนิเวศ และความหลากหลายของนกในพื้นที่วิจัย แต่ละกลุ่มจะมีผู้ช่วยกลุ่มละ 5 คนที่จะทำหน้าที่ วัดพิกัด วัดระยะทาง จัดทำบันทึกระดับความสูง ถ่ายภาพ บันทึกข้อมูล และเขียนแผนที่ร่าง โดยทั้งสองทีมจะเดินสำรวจกันคนละด้านของเส้นทาง และจะกำหนดให้เส้นมาบรรจบกันกลางทาง



ภาพ การศึกษา วัด และกำหนดจุด พร้อมวิเคราะห์พื้นที่ และพิกัดภูมิศาสตร์เส้นทางศึกษาธรรมชาติ

2) การกำหนดลักษณะเพาะของเส้นทาง

เส้นทางศึกษาธรรมชาติและนกในพื้นที่สะลวง จะถูกดำเนินการศึกษาและวิจัยอย่างละเอียด เพื่อหาคุณลักษณะเฉพาะของเส้นทาง เช่น มีความหลากหลายทางชีวภาพของนก รวมถึงควรจะมีปริมาณของนกในพื้นที่สูง เพื่อจะสามารถพัฒนาและดำเนินการในเชิงการท่องเที่ยวเชิงนิเวศได้ ซึ่งในปัจจุบันความหลากหลายทางชีวภาพของนกในประเทศไทยได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในเชิงคุณค่าของทรัพยากร

ชีวภาพ นอกจากนี้ยังศึกษาถึงลักษณะของพื้นที่ที่เหมาะสมและไม่เหมาะสมกับการเจริญและการกระจายของนกในพื้นที่ เนื่องจากกิจกรรมต่างๆ และลักษณะของพื้นที่ทำให้นกอาจจะมีการกระจายตัวแตกต่างกันออกไปตามปัจจัยต่างๆ เช่น ความสูงของพื้นที่ ลักษณะภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และอาหาร ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ล้วนส่งผลต่อการอยู่รอดของนก โดยเฉพาะนกที่มีการกระจายตัวค่อนข้างน้อย นอกจากนี้ในนกในพื้นที่บางชนิดยังเป็นนกที่ยังมีคุณประโยชน์ แต่พบได้น้อย เนื่องจาก บางชนิดใกล้สูญพันธุ์ บางชนิดหายาก บางชนิดถูกคุกคามอย่างต่อเนื่อง ทำให้จำนวนประชากรในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็ว

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
CHIANG MAI RAJABHAT UNIVERSITY