บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1 ภาคสนาม

1) ขวดเก็บตัวอย่างน้ำขนาด 1.5 ลิตร

2) ขวดพลาสติกเก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาด 200 มิลลิลิตร

3) ขวด BOD ใส

4) คีมคีบสาหร่าย

5) เครื่องหาพิกัดตำแหน่งและนำร่องด้วยดาวเทียม (GPS)

6) เชือก

อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1) อุปกรณ์วัดความเร็วกระแสน้ำ

2) อุปกรณ์วัด pH

3) อุปกรณ์วัดอุณหภูมิของน้ำ

4) อุปกรณ์วัดอุณหภูมิของอากาศ

5) อุปกรณ์วัดการนำไฟฟ้า

6) ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

อุปกรณ์ศึกษาลักษณะพื้นท้องน้ำ

1) ไม้เมตร

2) สายวัด

1.2 อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

1) อุปกรณ์วัดค่าความขุ่น

2) ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์ความเป็นด่างในน้ำ

3) ชุดอุปกรณ์ศึกษาสาหร่าย *Cladophora* spp. และ *Microspora* spp.

2. แผนการดำเนินงานและวิธีการวิจัย

2.1 จุดเก็บตัวอย่าง

สำรวจจุดเก็บตัวอย่างของลุ่มนำน่านตอนบนโดยแบ่งออกเป็น 5 จุด ครอบคลุมพื้นที่ที่พบสาหร่ายในปริมาณมากในลำน้ำน่าน และลำน้ำสาขาจากการศึกษาของ สุรเชษฐ์ (2548) โดยจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมดมีดังนี้

1) แม่น้ำน่านบริเวณบ้านศาลา ต.เจดีย์ชัย อ.ปัว

2) น้ำยาวบริเวณบ้านนาหนุน ต.แสนทอง อ.ท่าวังผา

3) แม่น้ำน่านบริเวณบ้านท่าค้ำ ต.ริม อ.ท่าวังผา

4) แม่น้ำน่านบริเวณบ้านม่วง ต.ศรีภูมิ อ.ท่าวังผา

5) น้ำยาวบริเวณบ้านน้ำยาว ต.อวน อ.ปัว

2.2 วิธีการวิจัย

2.2.1. การเก็บตัวอย่างสาหร่าย

เก็บตัวอย่างสาหร่ายไกสกุล *Cladophora* และ *Microspora* โดยใช้วิธี line transect (Atkinson, 1975)โดยกำหนดระยะตามความกว้างของลำน้ำ กำหนด subtransect ห่างกัน 2.5, 5.0 หรือ 10.0 เมตรขึ้นอยู่กับความกว้างของลำน้ำ แต่ละ subtransect ยาวออกไปกลางแม่น้ำเป็นระยะ 10 เมตรสลับกันซ้ายและขวาของ line transect แล้วกำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่างวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เมตร ในแต่ละ subtransect แล้วเก็บสาหร่ายที่พบไว้ในขวดพลาสติกขนาด 200 มิลลิลิตรแล้วแช่ในกล่องน้ำแข็ง ทำการเก็บตัวอย่างเดือนละสองครั้งตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม 2551

2.2.3. การศึกษาสาหร่ายไกสกุล *Cladophora* และ *Microspora*

2.2.3.1. จำแนกสาหร่ายเบื้องต้นจากลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นสายที่พบในธรรมชาติจากการสัมผัส และสังเกตด้วยตาเปล่า (Prescott, 1976; Smith, 1950; Tiffany and Birtton, 1971)

2.2.3.2. ทำการถ่ายรูปโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope เพื่อยืนยันลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันของสาหร่าย และเก็บไว้เป็นหลักฐานต่อไป

2.2.3.3. ดองตัวอย่างด้วยน้ำยา Lugol และอัดแห้งสาหร่ายบนกระดาษ

2.2.3.4. ประเมินการการกระจายตัวของสาหร่ายในลำน้ำโดยการวิเคราะห์ร้อยละการปกคลุมพื้นท้องน้ำจากภาพถ่ายโดยใช้โปรแกรม Image J

2.2.2 การศึกษาลักษณะสภาพแวดล้อม

2.2.2.1 วัดพิกัด และความสูงจากระดับน้ำทะเลด้วยเครื่องหาพิกัดตำแหน่งและนำร่องด้วยดาวเทียม (เครื่อง GPS)

2.2.2.2 ศึกษาความลึกของแหล่งน้ำบริเวณจุดเก็บตัวอย่างแต่ละจุดโดยใช้สายวัด

2.2.2.3 ศึกษาลักษณะของพื้นท้องน้ำโดยวัดความกว้างของลำน้ำและความลึกของลำน้ำโดยแบ่งระยะความลึกออกเป็น 3, 5, หรือ 7 จุดตามความกว้างของลำน้ำ ในแต่ละจุดที่วัดความลึกนั้นจะทำการสุ่มศึกษาลักษณะของพื้นท้องน้ำเพื่อนำมาเป็นข้อมูลพื้นท้องน้ำนำมาวาดเป็นแผนที่ภาพประกอบกับแผนที่ของจุดเก็บตัวอย่าง

2.2.3 การเก็บตัวอย่างน้ำและการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทุกจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายโดยวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางด้านกายภาพและเคมีบางประการดังนี้ (APHA, 1992; ศิริเพ็ญ, 2543)

2.2.3.1 วัดอุณหภูมิของน้ำและอากาศโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์

2.2.3.2 วัดค่าการนำไฟฟ้าโดยใช้ Conductivity meter

2.2.3.3 วัดค่าพีเอชของน้ำโดยใช้ pH meter

2.2.3.4 วัดค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำโดยใช้วิธี Azide modification (ภาคผนวก ค)

2.2.3.5 เก็บตัวอย่างน้ำใส่ขวดโพลีเอทธีลีนมาไตเตรทหาค่าความเป็นด่างโดยใช้วิธี Phenolpthalein methyl orange indicator (ภาคผนวก ค)

2.2.3.6 วิเคราะห์ปริมาณสารอาหารซึ่งประกอบด้วย

- แอมโมเนียไนโตรเจน ด้วยวิธี Direct Nesslerization (ภาคผนวก ค)
- ไนเตรทไนโตรเจน ด้วยวิธี Phenoldisulphonic Acid (ภาคผนวก ค)
- ออร์โธฟอสเฟต ด้วยวิธี Stannous Chloride (ภาคผนวก ค)

2.2.4 การหาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลด้วยเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ของสาหร่ายสกุล *Cladophora* และ *Microspora*

นำตัวอย่างสาหร่ายไกสกุล *Cladophora* และ *Microspora* ที่จำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยามาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer OPV-14, OPV-06, OPV-15, OPO-15, OPO-16, OPAJ-11, OPZ-11, OPV-06, OPM-01, OPN-03, OPA-09, OPN-09 และ OPX-13 (ตาราง 1) โดยการดัดแปลงวิธีการของ ลภัสรดา (2549) ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปแยกใน agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจสอบด้วย UV Transluminator แล้วถ่ายรูปนำมาวิเคราะห์ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของสาหร่ายไกต่อไป

เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

(1) Initial denaturation	94°C	4	นาที
(2) PCR cycle - denature	94°C	0.30	นาที
- Annealing	45 - 50°C	0.45	นาที
- Extension	72°C	0.45	นาที
(3) Final extension	72°C	5	นาที

ตาราง 1 Primer ที่ใช้ในเทคนิค RAPD

รหัส primer	ลำดับเบส 5' ------> 3'
OPV-14	AGATCCCGCC
OPV-06	ACGCCCAGGT
OPV-15	CAGTGCCGGT
OPO-15	TGGCCTCCTT
OPO-16	TCGGCGGTTC
OPAJ-11	GAACGCTGCC
OPZ-11	CTCAGTCGCA
OPV-06	ACGCCCAGGT
OPM-01	GTTGGTGGCT
OPN-03	GGTACTCCCC
OPA-09	GGGTAACGCC
OPN-09	TGCCGGCTTG
OPX-13	ACGGGAGCAA

3. สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

3.1 จุดเก็บตัวอย่าง

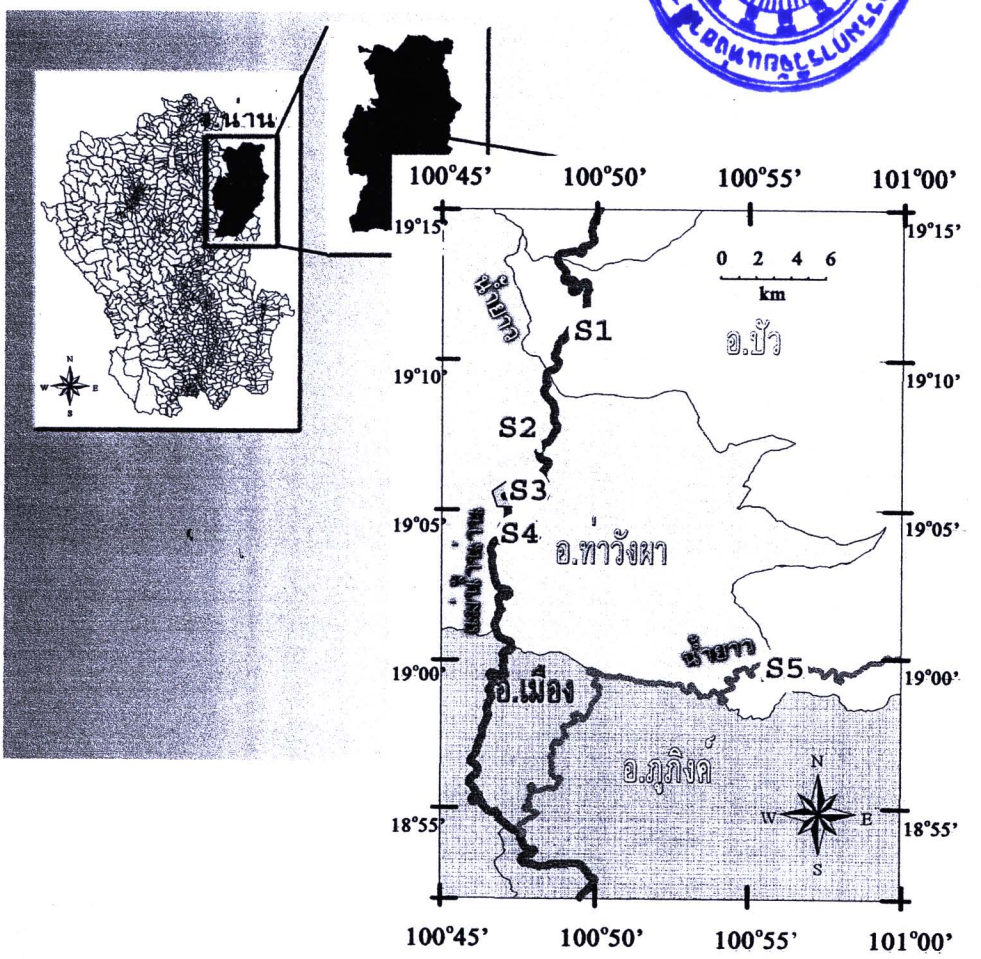
สำรวจจุดเก็บตัวอย่างของลุ่มนำน่านตอนบนโดยแบ่งออกเป็น 5 จุด ในเขตอำเภอปัว และอำเภอท่าวังผาครอบคลุมพื้นที่ที่พบสาหร่ายในปริมาณที่สูงในจังหวัดน่านจากการศึกษาของ รุ่งนภา (2546) และ สุรเชษฐ์ (2548)

3.2 สถานที่ดำเนินการวิจัยในห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างน้ำและสาหร่ายจะนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยสาหร่ายและคุณภาพน้ำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ส่วนตัวอย่างสาหร่ายที่ทำการจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา แล้วจะนำไปศึกษาในระดับอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยและบริการจีโนมพืชเศรษฐกิจ

4. ระยะเวลาทำการวิจัย

12 เดือน โดยเก็บตัวอย่าง 5 ครั้ง เริ่มจากเดือนมกราคม 2551 ถึงเดือนมีนาคม 2551 และศึกษาในห้องปฏิบัติการอีก 8 เดือน



ภาพ 1 จุดเก็บตัวอย่างในเขตอำเภอท่าวังผา และอำเภอปัว จังหวัดน่าน

S1 คือ จุดสำรวจที่ 1 บริเวณบ้านศาลา ต.เจดีย์ชัย อ.ปัว จ.น่าน

S2 คือ จุดสำรวจที่ 2 บริเวณบ้านนาหนุน ต.แสนทอง อ.ท่าวังผา จ.น่าน

S3 คือ จุดสำรวจที่ 3 บริเวณบ้านท่าค้ำ ต.ริม อ.ท่าวังผา จ.น่าน

S4 คือ จุดสำรวจที่ 4 บริเวณบ้านม่วง ต.ศรีภูมิ อ.ท่าวังผา จ.น่าน

S5 คือ จุดสำรวจที่ 5 บริเวณบ้านน้ำยาว ต.อวน อ.ปัว จ.น่าน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 14 ก.ย. 2554
242437