

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์การเก็บตัวอ่อน

- 1.1 สวิงน้ำ (pond net)
- 1.2 ปากคีบ (forceps)
- 1.3 ถาด (trays)
- 1.4 ถุงพลาสติกและยางรัด
- 1.5 ขวดเก็บตัวอย่าง (vials)

2. สารเคมีที่ใช้ในการเก็บรักษาตัวอ่อน

- 2.1 แอลกอฮอล์ 80 %
- 2.2 Kahle's Solution

ส่วนประกอบ ของ Kahle's Solution (Wiggins, 1996)

Ethyl alcohol	95 %	15 part by volum	(25%)
Formalin	40 %	6 part by volum	(11%)
Glacial acetic acid		1 part by volum	(2%)
Distilled water		30 part by volum	(59%)

3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวินิจฉัยตัวอ่อน

3.1 การวินิจฉัยตัวอ่อนระดับวงศ์

- แอลกอฮอล์ 70 %
- อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ปากคีบ ปีกเกอร์ เข็มเย็บ ไคโมไฟ, ฟูกันปลายเล็ก
- กล้อง stereo microscope ที่มี drawing tube ประกอบ
- อุปกรณ์การวาดภาพ เช่น ดินสอ ขนาด 0.3 - 0.5 mm

และปากกาเขียนแบบขนาด 0.1-0.5 mm และกระดาษไขเขียนแบบ

- หนังสือช่วยในการวินิจฉัยตัวอย่างเช่น Stehr(1978) Wiggins(1996) และ

McCafferty (1981)

3.2 การวินิจฉัยตัวอย่างระดับสกุลและระดับชนิด

- KOH 10 %

- Dimethyl Hydantoin Formaldehyde Resin : DMHF-Resin ซึ่งเป็น resin กึ่งสำเร็จรูป เตรียมให้เป็น resin สำเร็จรูปโดยการบด resin ให้เป็นผงแล้วชั่ง 70 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 30 มล. จะได้ 70% resin หรือชั่ง 80 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มล. จะได้ 80% resin (Steedman, 1958)

- แอลกอฮอล์ 70 %

- Hot plate ชนิดควบคุมอุณหภูมิและมีระบบตัดไฟอัตโนมัติ

- อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ปากคีบ บีกเกอร์ ถ้วยต้ม (stenterdish) เข็มเขี่ย สไลด์ แผ่นปิดสไลด์ โคมไฟ ฟู่กันปลายเล็ก

- กล้อง stereo microscope

- กล้อง compound microscope ที่มี drawing tube ประกอบ

- อุปกรณ์การวาดภาพ เช่น ดินสอ ขนาด 0.3 - 0.5 mm ปากกาเขียนแบบ

ขนาด 0.1-0.5 mm และกระดาษไขเขียนแบบ

- หนังสือช่วยในการวินิจฉัยตัวอย่าง เช่น Cartwright (1991) และ Wiggins (1996)

วิธีการวิจัย

1. กำหนดสถานที่เก็บตัวอย่าง บนอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ ($18^{\circ}47'-18^{\circ}55' \text{ N}$, $98^{\circ}47'-98^{\circ}56' \text{ E}$) (รูปที่ 3) แบ่งจุดเก็บตัวอย่างเป็น 6 จุด จาก 3 ลำธารโดย

จุดที่ 1 ลำธารห้วยแก้วบริเวณหลังทำการอุทยานฯ (รูปที่ 4) ที่ระดับความสูง 950 เมตรจากระดับน้ำทะเล พิกัด $18^{\circ}49' \text{ N}$ $98^{\circ}54' \text{ E}$ ลักษณะลำธารจะค่อนข้างแคบ พื้นท้องน้ำเป็นทราย กรวด และหินขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ พื้นที่ส่วนใหญ่ของลำธารจะมีน้ำไหลเข้าตลอดปี ทำให้มีซากพืชและตะกอนสะสมตามพื้นท้องน้ำมาก ข้างลำธารจะมีพืชขึ้นตลอดแนว มีไม้ยืนต้นปกคลุม มีแสงส่องถึงบ้างรำไร

จุดที่ 2 ลำธารห้วยแก้วบริเวณเหนือน้ำตกมณฑาธาร (รูปที่ 5) ที่ระดับความสูง 800 เมตรจากระดับน้ำทะเล พิกัด $18^{\circ}47' \text{ N}$ $98^{\circ}56' \text{ E}$ ลำธารจะกว้างขึ้น พื้นท้องน้ำเป็นทราย กรวด และหินขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ มีน้ำไหลตลอดปี มีซากพืชและตะกอนสะสมตามพื้นท้องน้ำบ้าง ข้างลำธารจะมีพืชขึ้นตลอดแนว มีไม้ยืนต้นปกคลุม มีแสงส่องถึงบ้างรำไรคล้ายกับจุดที่ 1

จุดที่ 3 ลำธารห้วยแก้วบริเวณน้ำตกมณฑาธาร (รูปที่ 6) ที่ระดับความสูง 700 เมตรจากระดับน้ำทะเล พิกัด $18^{\circ}49'N$ $98^{\circ}55'E$ แบ่งเป็น 2 ส่วนคือ บริเวณน้ำตก และบริเวณลำธาร ซึ่งลำธารดังกล่าวจะกว้างกว่าจุดที่ 1 และ 2 พื้นท้องน้ำเป็นทราย กรวด และหินขนาดเล็ก จนถึงขนาดใหญ่ มีน้ำไหลตลอดปี มีซากพืชและตะกอนสะสมตามพื้นท้องน้ำ ข้างลำธารจะมีพืชขึ้นตลอดแนว มีไม้ยืนต้นปกคลุมน้อยกว่า 2 จุดแรก ทำให้มีแสงส่องถึงลำธารมากขึ้น

จุดที่ 4 ลำธารห้วยแก้วบริเวณท้ายน้ำตกมณฑาธาร (รูปที่ 7) ที่ระดับความสูง 650 เมตรจากระดับน้ำทะเล พิกัด $18^{\circ}48'N$ $98^{\circ}55'E$ ลำธารจะกว้างขึ้น พื้นท้องน้ำเป็นทราย กรวดและหินขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ มีน้ำไหลตลอดปี มีซากพืชและตะกอนสะสมตามพื้นท้องน้ำบ้าง ข้างลำธารจะมีพืชขึ้นตลอดแนว มีไม้ยืนต้นปกคลุมมาก ทำให้มีแสงส่องถึงบ้างรำไร

จุดที่ 5 ลำธารห้วยผาลาด (รูปที่ 8) ที่ระดับความสูง 700 เมตรจากระดับน้ำทะเล พิกัด $18^{\circ}47'N$ $98^{\circ}55'E$ ลักษณะลำธารจะค่อนข้างแคบ พื้นท้องน้ำเป็นหินขนาดใหญ่ (bed rock) น้ำไหลเชี่ยวในฤดูน้ำหลาก ทำให้มีซากพืชและตะกอนสะสมตามพื้นท้องน้ำน้อย ในบางเดือนของฤดูร้อนน้ำจะไม่มี ข้างลำธารจะมีพืชขึ้นตลอดแนว มีไม้ยืนต้นปกคลุมบ้าง จึงมีแสงส่องลงถึงลำธารได้มาก

จุดที่ 6 ลำธารห้วยกู่ขาว (รูปที่ 9) ที่ระดับความสูง 550 เมตรจากระดับน้ำทะเล พิกัด $18^{\circ}48'N$ $98^{\circ}56'E$ ลักษณะลำธารจะค่อนข้างแคบ พื้นท้องน้ำเป็นทราย กรวด และหินขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ น้ำไหลช้ามาก ทำให้มีการสะสมของตะกอนและซากพืชตามพื้นท้องน้ำมาก ในบางเดือนของฤดูร้อนน้ำจะไม่มี ข้างลำธารจะมีพืชขึ้นตลอดแนว มีไม้ยืนต้นปกคลุม มีแสงส่องถึงบ้างรำไร

จุดเก็บตัวอย่างลำธารห้วยแก้วจะให้เป็นตัวแทนของ permanent habitat เพราะมีน้ำไหลตลอดทั้งปี ส่วนลำธารห้วยผาลาดและลำธารห้วยกู่ขาวจะให้เป็นตัวแทนของ temporary habitat เพราะน้ำจะไม่มีตลอดทั้งปี กล่าวคือ ในบางเดือนของฤดูร้อนจะไม่มีน้ำเลย

2. การเก็บตัวอย่างตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำซึ่งจะเก็บให้ครอบคลุมทุกชนิด ทุกระยะ ด้วยวิธีการเตะตัวอย่าง (Kick Sampling) และเก็บด้วยการเลือกคืบเก็บ (Pick Sampling) โดยแบ่งตามลักษณะที่อยู่อาศัย (habitat) และระยะเวลาในการเก็บ ดังนี้

2.1 การเก็บด้วยวิธีการเตะตัวอย่าง (รูปที่ 10) แบ่งเป็น 2 บริเวณที่อยู่อาศัย ๗

ละ 3 นาที คือ

2.1.1 บริเวณน้ำไหล (running) (รูปที่ 11)

2.1.2 บริเวณน้ำนิ่ง (pool) (รูปที่ 12)

2.2 การเก็บด้วยการเลือกเก็บ แบ่งเป็น 3 บริเวณที่อยู่อาศัย ๗ ละ 10 นาที

คือ

2.2.1 ก่อนหินบริเวณน้ำเชี่ยว (fast flowing) (รูปที่ 13)

2.2.2 ก่อนหินบริเวณน้ำไหลช้า (slow flowing) (รูปที่ 14)

2.2.3 บริเวณที่มีซากพืชสะสม (leaf litter zone) (รูปที่ 15)

เก็บตัวอย่างทุกเดือนๆละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 16 เดือน เก็บรักษาตัวอย่างด้วย Kahle's solution เพื่อนำมาทำการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ เมื่อครบ 3 สัปดาห์เปลี่ยนถ่ายสาร เก็บตัวอย่างเป็นแอลกอฮอล์ 80 % เพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง

สังเกตบริเวณ habitat ที่เก็บตัวอย่างในระยะตัวอ่อน ดักด้ว พร้อมทั้งศึกษาลักษณะต่างๆทางด้านกายภาพและชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับตัวอ่อน เช่น ความเร็วกระแสน้ำ ความกว้างของแหล่งน้ำ ลักษณะของพื้นที่ท้องน้ำ ลักษณะของพืชพันธุ์ และเศษซากพืชในบริเวณลำธาร การเกิดร่มเงา ถ่ายภาพของตัวอ่อนและบริเวณที่พบตัวอ่อนในแต่ละ habitats และลักษณะต่างๆที่เกี่ยวข้อง

3. ตรวจวินิจฉัย จัดจำแนก ในห้องปฏิบัติการ

3.1 ตรวจวินิจฉัย จัดจำแนกในระดับวงศ์

- นำตัวอย่าง (รวมทั้งตัวอ่อนและดักด้ว) ที่ได้ มาคัดแยกออกจากเศษวัสดุที่ไม่ต้องการ แล้วแยกตัวอ่อนออกเป็นกลุ่ม ๆ ด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้อง stereo microscope โดยพิจารณาจากลักษณะต่างๆ ที่ปรากฏบริเวณลำตัวของตัวอ่อน ตามวิธีของ Stehr (1978) Wiggins (1996) และ McCafferty (1981).

- วัดการเจริญเติบโตของตัวอ่อน โดยวัดความกว้างของส่วนหัว (head capsule) ด้วย micrometer

- วาดรูปประกอบ และ นับจำนวน

3.2 ตรวจวินิจฉัย จัดจำแนกในระดับสกุล (genus) และระดับชนิด (species)

- วัดการเจริญเติบโตของตัวอ่อน โดยวัดความกว้างของส่วนหัว ด้วย micrometer ภายใต้ Stereo microscope

- นำตัวอย่าง (รวมทั้งตัวอ่อนและดักด้ว) ต้มด้วย สาร KOH 10 % โดยใช้ถ้วยต้ม การต้มจะต้มจนกว่าตัวอย่างจะใส (ถ้าตัวอย่างมีขนาดเล็กจะใช้เวลาประมาณ 1-3 ชั่วโมง แต่ถ้าตัวอย่างมีขนาดใหญ่จะใช้เวลาประมาณ 3-6 ชั่วโมง) เมื่อตัวอย่างใสแล้ว นำทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ โดยใช้ภูกันปลายเล็กทำความสะอาด

- นำตัวอย่างที่สะอาดแล้วมาทำให้เป็นสไลด์ถาวรโดยใช้ DMHF-Resin ภายใต้กล้อง stereo microscope (ข้อควรระวัง: ในขณะที่ทำสไลด์มักมีปัญหาเรื่องฟองอากาศที่เกิดขึ้นในสไลด์ ดังนั้นในขณะที่จะวางแผ่นปิดสไลด์ลงบน DMHF-Resin ควรวางให้ขนานกับพื้นสไลด์ ไม่ควรให้ส่วนใดส่วนหนึ่งของแผ่นปิดสไลด์แตะ DMHF-Resin ก่อนวางเพราะจะทำให้ตัวอย่างเคลื่อนย้ายจากตำแหน่งเดิมที่จัดวางไว้)

- นำสไลด์ตัวอย่างไปตรวจวินิจฉัยภายใต้กล้อง compound microscope ที่มี drawing tube การวินิจฉัยจะพิจารณาจากลักษณะต่างๆ ที่ปรากฏ ตามวิธีของ Cartwright(1991) และ Wiggins(1996)

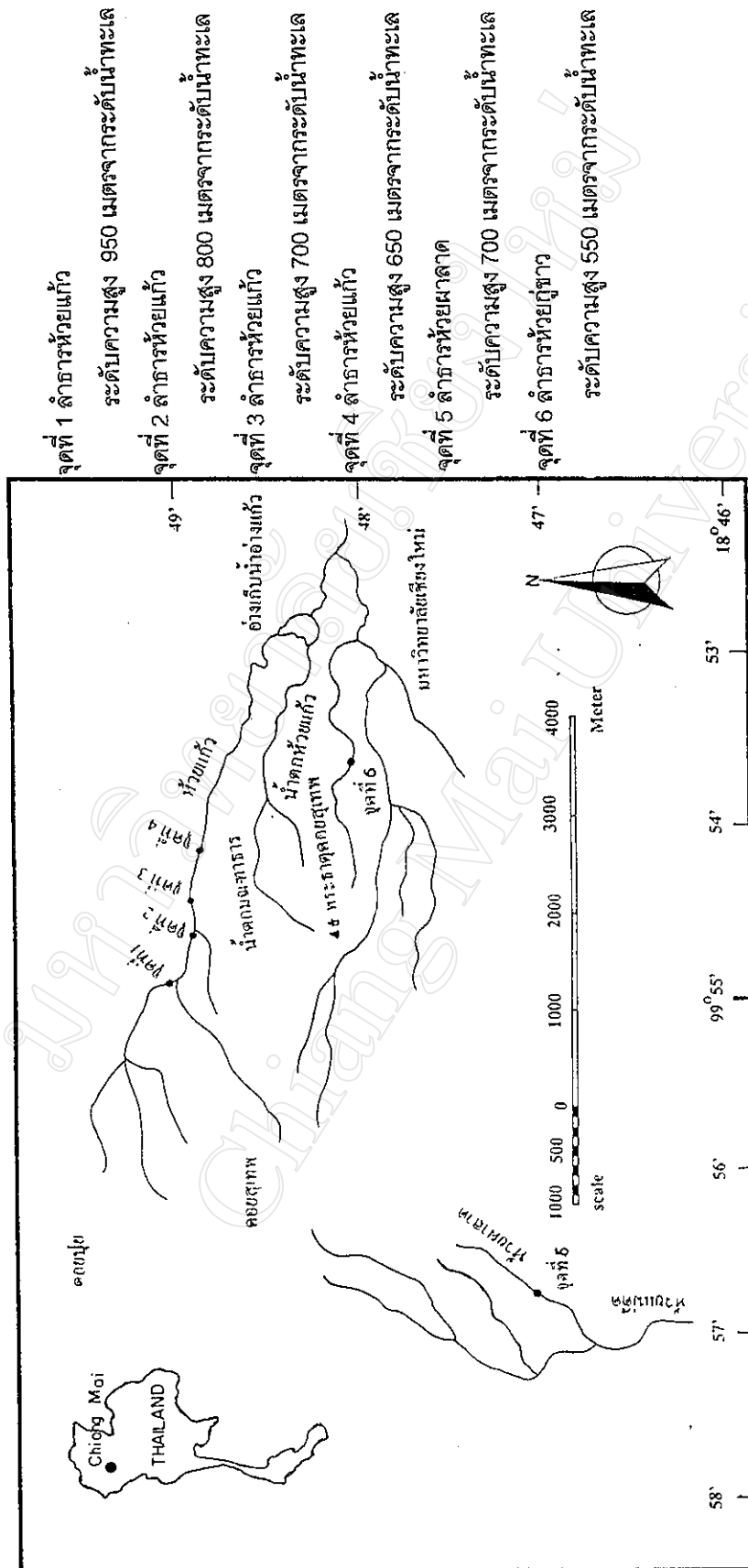
- วาดรูปประกอบ และ นับจำนวน

4. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำ (ใช้ข้อมูลร่วมกับ แต่ง
อ่อน(2542) เรื่อง ความหลากหลายและการกระจายของแมลงหนอนปลอกน้ำตัวเต็มวัยจากลำ
ธารที่ระดับความสูงต่างกัน บนอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่)

5. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

5.1 วิเคราะห์ข้อมูลแบบกลุ่ม โดยใช้ข้อมูลจำนวนตัวของตัวอ่อนแมลงหนอน
ปลอกน้ำในแต่ละวงศ์ เพื่อแบ่งกลุ่มการกระจายของตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำในลำธารตาม
ระดับความสูงที่ต่างกัน

5.2 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlation) เพื่อหาความ
สัมพันธ์กับคุณภาพน้ำของวงศ์ Philopotamidae



รูปที่ 3 แผนที่จุดเก็บตัวอย่าง บนอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ (18°47'-18°55' N, 98°47'-98°56' E)



รูปที่ 4 จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 ลำธารห้วยแก้วบริเวณหลังที่ทำการอุทยานฯ
ที่ระดับความสูง 950 เมตรจากระดับน้ำทะเล พิกัด 18°49'N 98°54'E



รูปที่ 5 จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 ลำธารห้วยแก้วบริเวณเหนือน้ำตกมณฑาทาร
ที่ระดับความสูง 800 เมตรจากระดับน้ำทะเล พิกัด $18^{\circ}47'N$ $98^{\circ}56'E$

A



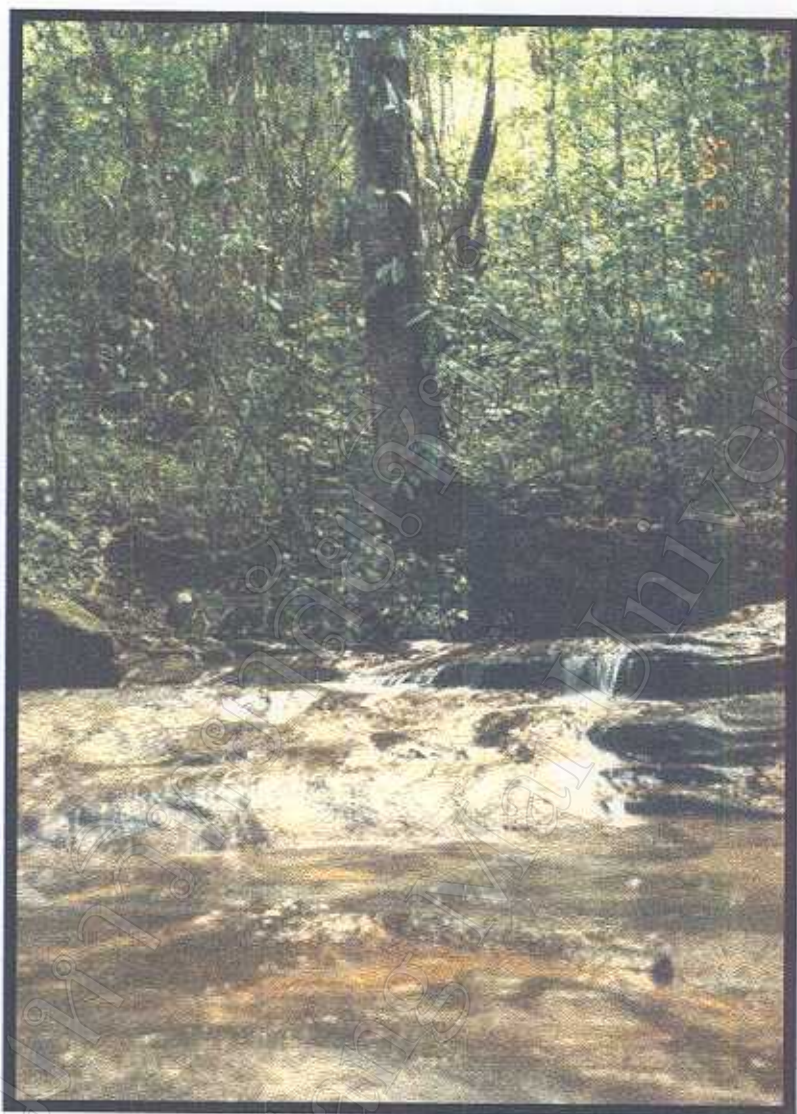
B



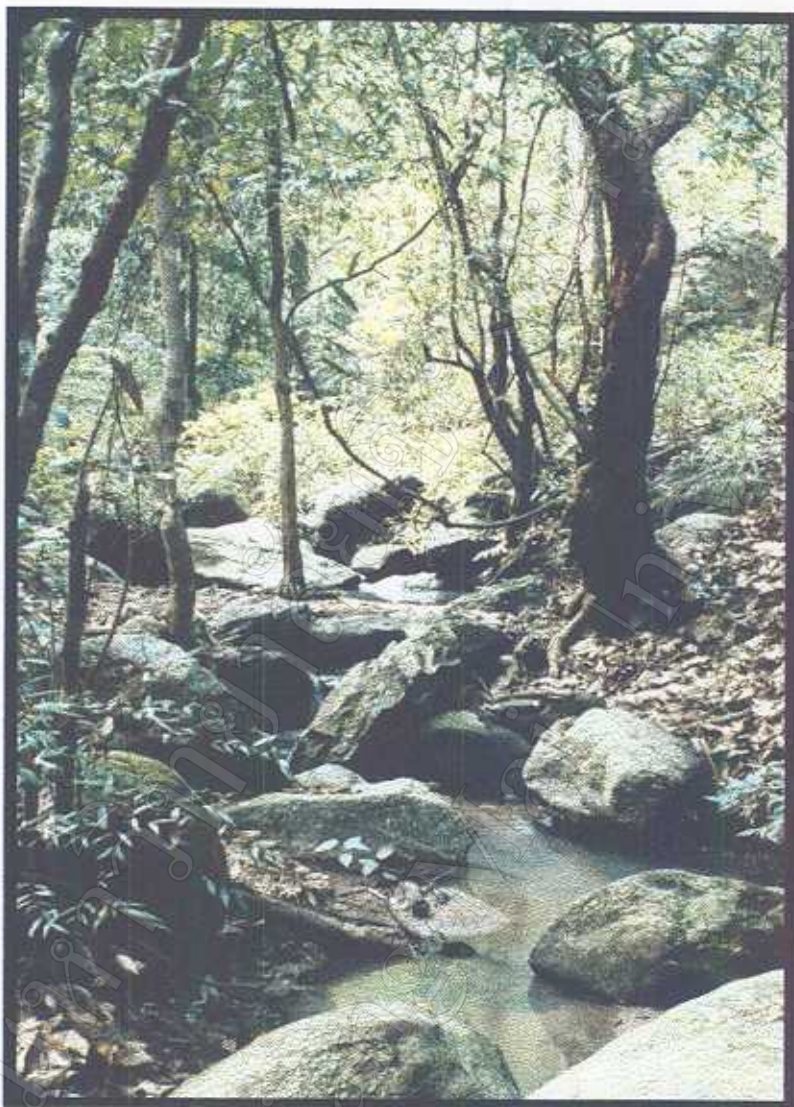
รูปที่ 6 จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 ลำธารห้วยแก้วบริเวณน้ำตกมณฑาธาร ที่ระดับความสูง 700 เมตรจากระดับน้ำทะเล พิกัด $18^{\circ}49'N$ $98^{\circ}55'E$ แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ บริเวณน้ำตก (A) และ บริเวณลำธาร (B)



รูปที่ 7 จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 ลำธารห้วยแก้วบริเวณท้ายน้ำตมณฑลธาร
ที่ระดับความสูง 650 เมตรจากระดับน้ำทะเล พิกัด $18^{\circ}48'N$ $98^{\circ}55'E$



รูปที่ 8 จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 ลำธารห้วยผาลาด ที่ระดับความสูง 700 เมตรจากระดับน้ำทะเล
พิกัด $18^{\circ}47'N$ $98^{\circ}55'E$



รูปที่ 9 จุดเก็บตัวอย่างที่ 6 ลำธารห้วยกุซาว ที่ระดับความสูง 550 เมตรจากระดับน้ำทะเล
พิกัด $18^{\circ}48'N$ $98^{\circ}56'E$



รูปที่ 10 การเก็บตัวอย่างด้วยวิธีการเตะตัวอย่าง (Kick sampling)



รูปที่ 11 ตัวอย่าง habitat บริเวณน้ำไหล (running)



รูปที่ 12 ตัวอย่าง habitat บริเวณน้ำนิ่ง (pool)



รูปที่ 13 การเก็บตัวอย่างแบบ Pick Sampling ตามบริเวณ habitat น้ำไหลเชี่ยว
(fast flowing)



รูปที่ 14 การเก็บตัวอย่างแบบ Pick Sampling ตามบริเวณ habitat น้ำไหลช้า
(slow flowing)



รูปที่ 15 การเก็บตัวอย่างแบบ Pick Sampling ตามบริเวณ habitat ที่มีซากพืชสะสม
(leaf litter zone)