

### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

#### เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. ชุดกับดักแสงไฟล่อ (light traps)
  - 1.1 หลอดไฟ black light 6 วัตต์ 12 โวลท์ บัลบาส และ สตาร์ทเตอร์
  - 1.2 แบตเตอรี่ 12 โวลท์
  - 1.3 กะละมังพลาสติก
  - 1.4 น้ำยาล้างจาน (detergent)
2. ชุดกับดักอีเมอร์เจนซ์ (emergence traps)
3. สารเคมีที่ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่างและการทำใส
  - 3.1 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
  - 3.2 เอทิลีนไกลคอล 50 เปอร์เซ็นต์
  - 3.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์
  - 3.4 สารละลายน้ำยาล้างจาน
4. อุปกรณ์ที่ใช้วินิจฉัยตัวอย่าง
  - 4.1 กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope
  - 4.2 Hot plate ชนิดควบคุมอุณหภูมิและมีระบบตัด ไฟอัตโนมัติ
  - 4.3 อุปกรณ์อื่นๆเช่น petri dish, beaker, คีมคีบ, เข็มเขี่ย, โคมไฟ, แวนชยาย
  - 4.4 หนังสือช่วยในการวินิจฉัยตัวอย่าง Malicky (1997)
5. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางด้านกายภาพและเคมี
  - 5.1 เทอร์โมมิเตอร์
  - 5.2 ตลับเมตร
  - 5.3 pH meter รุ่น Scan 2
  - 5.4 conductivity/TDS meter รุ่น Cyber Scan 300
  - 5.5 velocity meter รุ่น Swoffer 2100
  - 5.6 เครื่อง spectrophotometer รุ่น DR 2000 บริษัท HACH สหรัฐอเมริกา
  - 5.7 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

- 5.7.1 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen) วิเคราะห์ด้วยวิธี Azide modification และปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Biochemical Oxygen Demand) ด้วยวิธี Azide modification
- manganous sulfate solution
  - alkaline-iodide azide
  - conc. sulfuric acid
  - strach solution
  - standard sodium thiosulfate (0.02N)
- 5.7.2 ความเป็นด่างของน้ำ (alkalinity)
- phenolphthalein indicator
  - methyl orange indicator
  - sulfuric acid (0.02N)
- 5.7.3 วิเคราะห์ปริมาณสารอาหาร
- Mineral stabilizer
  - Nessler reagent
  - Polyvinyl alcohol
  - Nitrate reagent Nitra Ver 5
  - Phosphate reagent Phos Ver 3

### วิธีการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้แยกเป็น 3 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 การศึกษาตัวเต็มวัยของแมลงหนอนปลอกน้ำเปรียบเทียบกับ light traps และ การใช้ emergence traps พร้อมทั้งตรวจวัดคุณภาพน้ำทั้งทางด้านกายภาพและด้านเคมี โดยการเก็บตัวอย่างโดยใช้กับดักแสงไฟล่อทุกๆเดือน เดือนละ 1 ครั้ง ส่วนการใช้ emergence traps ได้กระทำอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาของการวิจัยคือช่วงเดือน สิงหาคม 2542 ถึง เดือน ตุลาคม 2543 และเก็บตัวอย่างออกเดือนละ 1 ครั้ง ส่วนการตรวจวัดคุณภาพน้ำได้กระทำเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมกับการวางกับดักโดยใช้แสงไฟล่อ

ส่วนที่ 2 คือการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของแมลงหนอนปลอกน้ำกับถิ่นที่อยู่ย่อยแบบต่างๆ คือ บริเวณน้ำไหลเร็วความเร็วกระแสน้ำมากกว่า 0.50 เมตร ต่อ วินาที บริเวณน้ำไหลเอื่อยความเร็วกระแสน้ำต่ำกว่า 0.50 เมตร ต่อ วินาที และ บริเวณเศษใบไม้ทับถมซึ่งมีพืช ใบไม้จำนวนมาก

มากทับถมกันอยู่

ส่วนที่ 3 คือการหาความสัมพันธ์และเชื่อมโยงชนิดตัวเต็มวัยกับตัวอ่อนที่ยังไม่ทราบชนิด โดยการเก็บตัวอย่างด้วยความต่อเนื่องจนตัวอ่อนลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย

### 1. สถานที่เก็บตัวอย่าง

สถานที่เก็บตัวอย่างคือลำธารน้ำบนอุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย รูป 3 ตั้งอยู่ทางทิศตะวันตกของจังหวัดเชียงใหม่พิกัดระหว่าง  $98^{\circ}47' - 98^{\circ}56' E$ ,  $18^{\circ}47' - 18^{\circ}55' N$  โดยเลือกลำธารห้วยแก้วตั้งแผนที่บริเวณน้ำตกมณฑลธารที่ระดับความสูง 650 เมตรจากระดับน้ำทะเล รูป 4 และลักษณะบริเวณที่เก็บตัวอย่าง รูป 5

### 2. การเก็บตัวอย่างแมลงหนอนปลอกน้ำตัวเต็มวัย

การเก็บตัวอย่างตัวเต็มวัย 2 วิธีคือ

วิธีที่ 1 การใช้ light traps รูป 6 โดยใช้หลอดไฟ black light 6 วัตต์ ต่อเข้ากับแบตเตอรี่ 12 โวลท์วางบนภาชนะใส่น้ำผสมกับน้ำยา detergent ในบริเวณใกล้ๆกับลำน้ำจำนวน 2 จุด โดยแบตเตอรี่สามารถให้กำลังไฟไม่น้อยกว่า 12 ชั่วโมง ตั้งวางไว้ตลอดทั้งคืน จากนั้นเก็บตัวเต็มวัยในตอนเช้าโดยเก็บลงในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำมาจัดจำแนกในห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีที่ 2 การใช้ emergence traps รูป 7 ขนาดพื้นที่ 0.125 ตารางเมตร ขนาดตาข่าย 500 ไมครอน ซึ่งข้างบนเป็นกรวยบรรจุเอทิลีนไกลคอลล์ ผสมน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ตั้งวางไว้อย่างต่อเนื่อง แล้วจึงเก็บตัวอย่างออกเดือนละ 1 ครั้ง นำตัวอย่างที่ได้ลงในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการต่อไป สังเกตลักษณะต่างๆ ทางด้านกายภาพและชีวภาพ เช่น ความเร็วของกระแส น้ำ พร้อมทั้งบันทึกภาพจุดเก็บตัวอย่างและลักษณะต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง

### 3. การศึกษาความสัมพันธ์ของแมลงหนอนปลอกน้ำกับถิ่นที่อยู่แบบต่างๆ

โดยการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนทุกระยะ คือตัวอ่อน ตัวดักแด้ และ ตัวเต็มวัย เพื่อยืนยันว่าตัวอ่อนที่ศึกษาเป็นแมลงชนิดใด และการเก็บข้อมูลจาก emergence traps ทำให้ทราบถึงการกระจายของแมลงหนอนปลอกกับถิ่นที่อยู่แบบต่างๆ และมีการวางวัสดุต่อ (artificial substrates) รูป 8 ให้ตัวอ่อนแมลงน้ำมาเกาะอยู่

การเชื่อมโยงชนิดจะเก็บตัวอย่างที่คาดว่าจะป็นชนิดเดียวกันกับตัวเต็มวัยเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และอีกส่วนหนึ่งจะแยกมาเลี้ยงในกระชังลอยน้ำ รูป 9 และให้อาหารจนเข้าตู้ระยะดักแด้จะนำ emergence traps ครอบไว้เมื่อเป็นตัวเต็มวัยก็สามารถทราบถึงชนิดตัวอ่อนได้

#### 4. ศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี

ศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีโดยศึกษาคุณสมบัติดังต่อไปนี้

ความกว้างของลำธารน้ำ วัดโดยใช้ตลับเมตร

ความเร็วของกระแส น้ำ วัดโดยใช้เครื่องมือ velocity meter

อุณหภูมิ น้ำและอากาศใช้ hand thermometer

ความสามารถในการนำไฟฟ้าของน้ำ (conductivity) และปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำ (Total Dissolved Solid) วัดโดยใช้ conductivity meter

pH ของน้ำ วัดโดยใช้ pH meter

#### 5. เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อนำมาศึกษาคุณภาพน้ำทางเคมีและชีวภาพในห้องปฏิบัติการ

5.1 วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen) โดยเก็บตัวอย่างด้วยขวด BOD<sub>5</sub> และรักษาสภาพของตัวอย่างด้วยการเติม 1 มิลลิลิตร manganus sulfate และ 1 มิลลิลิตร alkaline - iodide - azide และนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Azide modification โดยการเติมกรด HCl เข้มข้น 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาไตเตรทด้วย standard sodium thiosulfate (0.02N) จนใส

5.2 วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลาย (Biochemical Oxygen Demand) โดยเก็บตัวอย่างน้ำด้วยขวด BOD<sub>5</sub> เอทิลีนไกลคอลล์ นำมา incubate ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน วัดค่า DO ด้วยวิธี Azide modification

5.3 วิเคราะห์ความเป็นด่างของน้ำ (alkalinity) โดยใช้วิธี Phenolphthalein methyl orange indicator (APHA, 1992)

5.4 วิเคราะห์ปริมาณสารอาหาร โดยเก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 1 ลิตร วิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารโดยใช้ Spectrophotometer DR 2000 ของบริษัท HACH และใช้การวิเคราะห์สารอาหารตามคู่มือ HACH DR2000

แอมโมเนีย ไนโตรเจน (Ammonia Nitrogen) ด้วยวิธี Nessler Method โดยใช้ร่วมกับสารละลาย Nessler reagent, Mineral stabilizer และ Polyvinyl alcohol

ไนเตรท ไนโตรเจน (Nitrate Nitrogen) ด้วยวิธี Cadmium Reduction Method โดยใช้ร่วมกับสารละลาย Nitrate reagent Nitra Ver5

ออร์โธฟอสเฟต (Orthophosphate) ด้วยวิธี Ascorbic Acid Method ร่วมกับสารละลาย Phosphate reagent Phos Ver3

5.5 วิเคราะห์ความขุ่นใสของน้ำ โดยใช้ Spectrophotometer DR 2000 ของบริษัท HACH

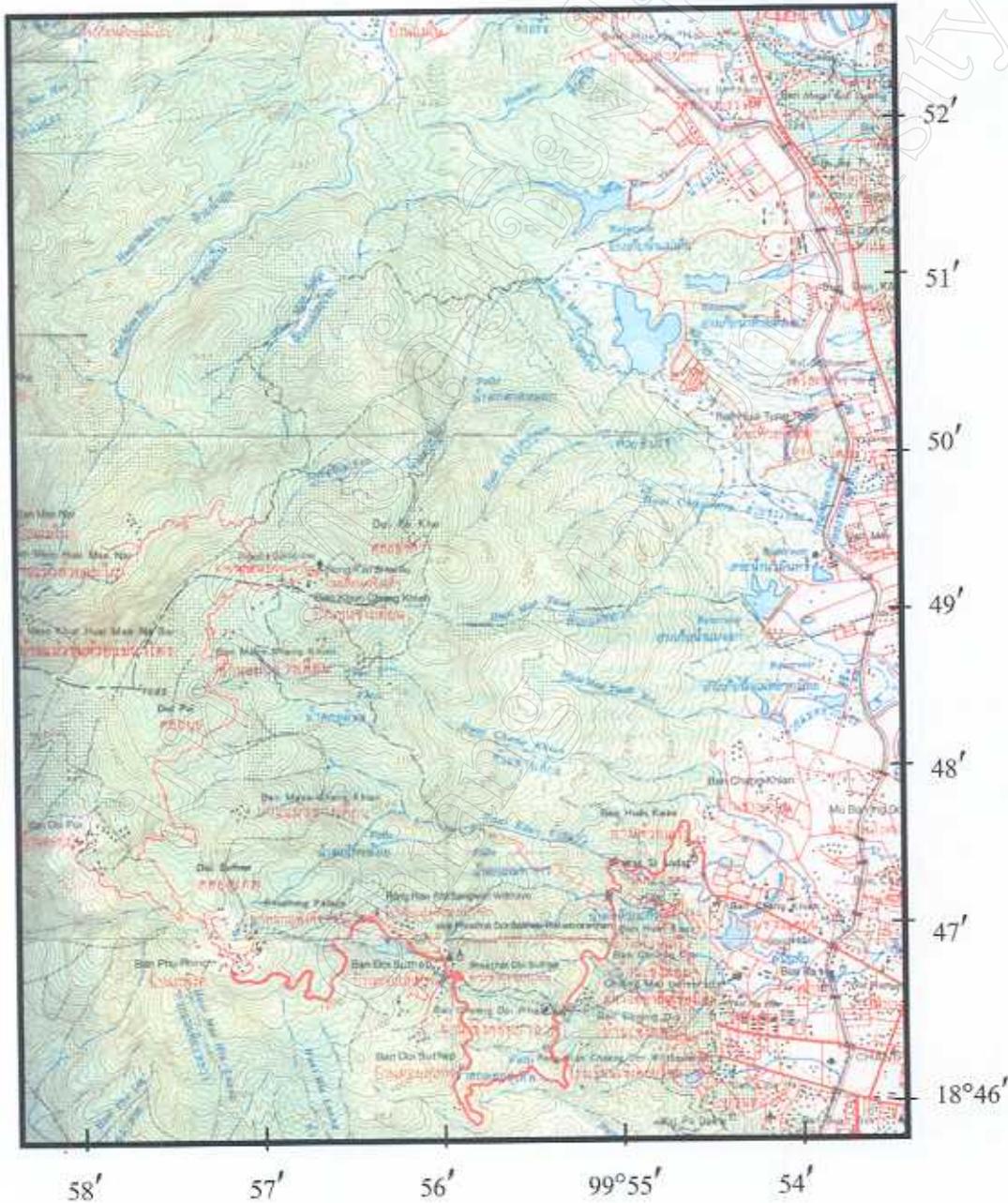
## 6.การวินิจฉัยและการจัดจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ

นำตัวอย่างที่ได้มาคัดแยกเอาเฉพาะแมลงหนอนปลอกน้ำจากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาตรวจด้วยกล้อง Stereo microscope และจัดจำแนกระดับวงศ์ได้โดยดูลักษณะ spurs formula การปรากฏหรือไม่ปรากฏของ ocelli ลักษณะของเส้นปีก (wing venation) หนวด (antenna) จำนวน segment ของ maxillary pulp การจัดจำแนกระดับชนิดใช้ลักษณะของ male genitalia ส่วนเพศเมียไม่สามารถจัดจำแนกได้จากส่วนของ genitalia ดังนั้นจึงคัดเลือกเอาเฉพาะเพศผู้เท่านั้น การจัดจำแนกถึงระดับชนิดทำได้โดยการตัดส่วนท้ายของ abdomen นำไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส นำมาล้างด้วยสารละลาย detergent จากนั้นตรวจสอบด้วยกล้อง stereo microscope โดยใช้ diagnostic character จากหนังสือวินิจฉัยชนิดที่เป็นหลักสำคัญคือ Malicky (1997) ส่วนเอกสารอื่นๆ ที่ใช้คือ พรทิพย์ และ Malicky 2543 ; Chantaramongkol and Malicky, 1989 ; 1997 , Malicky, 1987 ; 1989 ; 1994 ; 1997 , Malicky and Chantaramonkol, 1989 ; 1989a ; 1991 ; 1991b ; 1992 ; 1993 ; 1994 ; 1996 ; and 1999 )

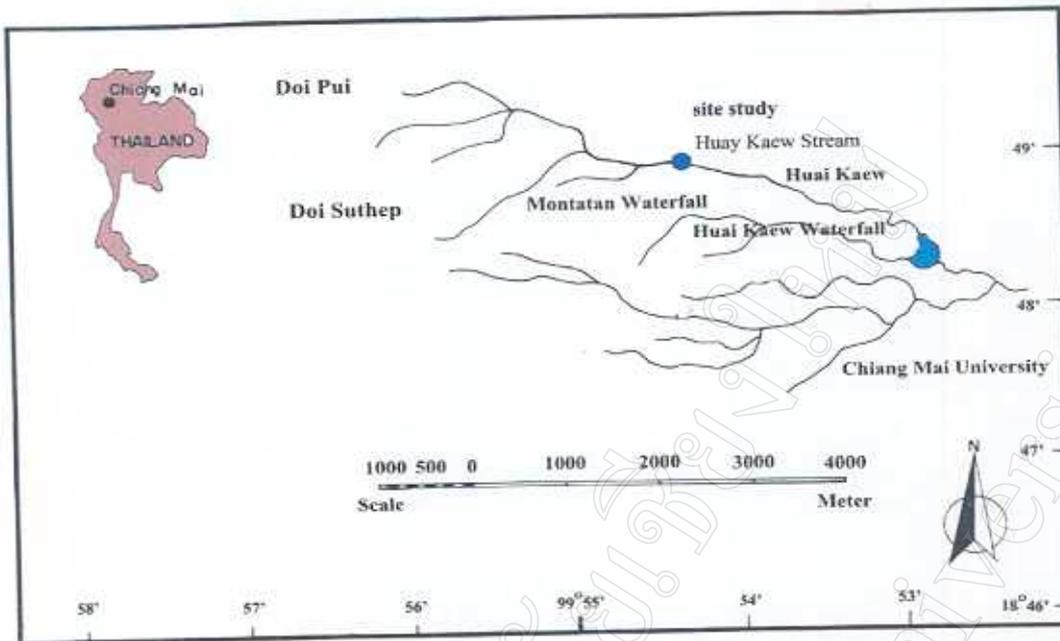
## 7.การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลตัวเต็มวัยที่จับโดยใช้ light traps และ emergence traps โดย emergence traps คัดแปลงจากวิธีการของ Hauer and Lamberti (1996) นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับถิ่นที่อยู่แบบต่างๆกับแมลงหนอนปลอกน้ำที่พบ ความเหมือนและความแตกต่างของแมลงหนอนปลอกน้ำที่พบในแต่ละถิ่นที่อยู่ จำนวนและชนิดของแมลงหนอนปลอกน้ำ ความสัมพันธ์กับฤดูกาล และปัจจัยด้านคุณภาพน้ำโดยใช้โปรแกรม SPSS/PC (Statistical Package for Social Science) จากข้อมูลหากมีการกระจายแบบ normal curve จะใช้การวิเคราะห์แบบ parametric F-test one-way analysis of variances (ANOVA) and least significant design (LSD) หากข้อมูลมีการกระจายไม่เป็น normal

curve จะใช้การวิเคราะห์แบบ non parametric (Kruskal-Walis one-way ANOVA และ Mann-Whitney U test) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ปัจจัยคุณภาพน้ำแต่ละ parameter ใช้ correlation coefficient การจัดกลุ่มความเหมือนโดย hierarchical cluster analysis กัลยา (2544) วิธีอื่น ๆ เช่น similarity index (Abel , 1989)



รูป 3 แสดงบริเวณพื้นที่อุทยานแห่งชาติคอกสุเทพ-ปุย ในส่วนที่แสดงลำธารห้วยแก้ว (ที่มา : กรมแผนที่ทหาร, 2537)



รูป 4 แสดงสายลำธารห้วยแก้วและพิกัดทางภูมิศาสตร์และจุดเก็บตัวอย่าง



รูป 5 จุดเก็บตัวอย่างบริเวณลำธารห้วยแก้วที่ระดับความสูง 650 เมตรจากระดับน้ำทะเล



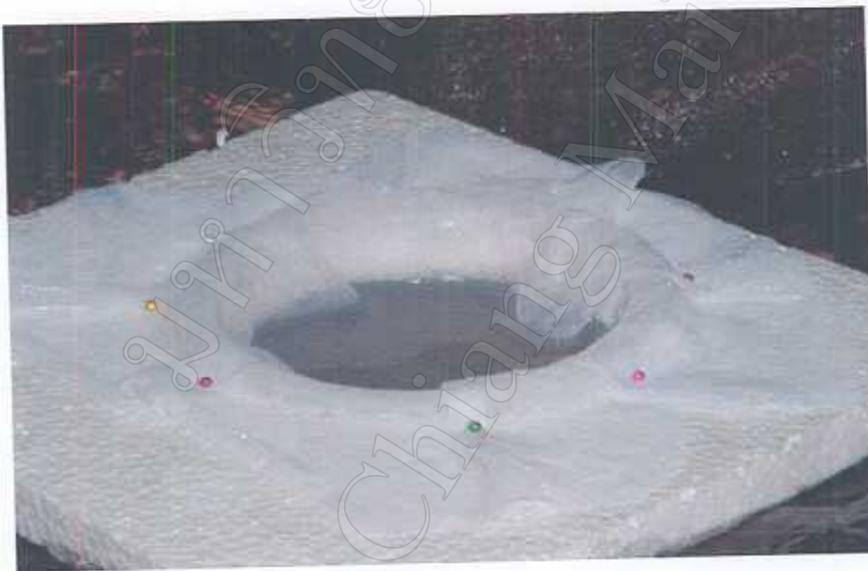
รูป 6 อุปกรณ์ light trap ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างแมลงหนอนปลอกน้ำตัวเต็มวัย



รูป 7 อุปกรณ์ emergence trap



รูป 8 Artificial substrate เพื่อใช้เป็นวัสดุถ่อให้แมลงหนอนปลอกน้ำมาเกาะ



รูป 9 กระจังลอยน้ำเพื่อคัดเลือกตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำมาเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัย