บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. สวิงจับแมลง
2. กรรไกรตัดกิ่ง
3. กล้องถ่ายภาพดิจิตอล DSLR ยี่ห้อ Canon
4. ขาตั้งกล้อง
5. เครื่องวัดหลายปัจจัย ยี่ห้อ Extech
6. เครื่องวัดคุณภาพน้ำหลายปัจจัย ยี่ห้อ Lutron
7. เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิดินแบบไบเมทัล
8. เครื่องวัดความเค็มของน้ำ
9. ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ
10. เครื่องระบุพิกัด GPS ยี่ห้อ Garmin
11. ไคลโนมิเตอร์วัดความสูง
12. สายวัดความยาว
13. กรอบสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 100×100 เซนติเมตร
14. อะลูมิเนียมฟรอยด์
15. ถุงซิปล็อค
16. กล้องจุลทรรศน์
17. กล้องสเตอริโอ
18. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
19. ตู้อบลมร้อน
20. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
21. แท่นถ่ายรูป
22. Vernier caliper
23. Safanin-O

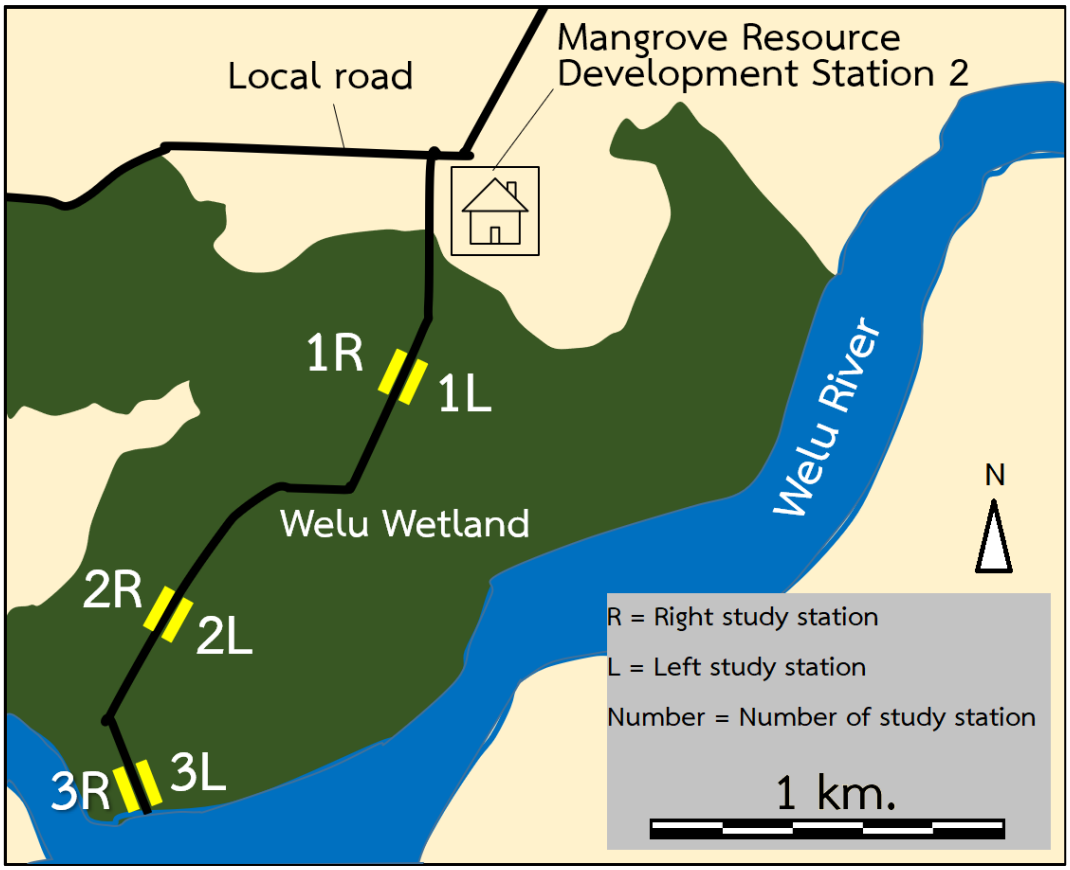
วิธีการศึกษา

1. การกำหนดพื้นที่ศึกษา

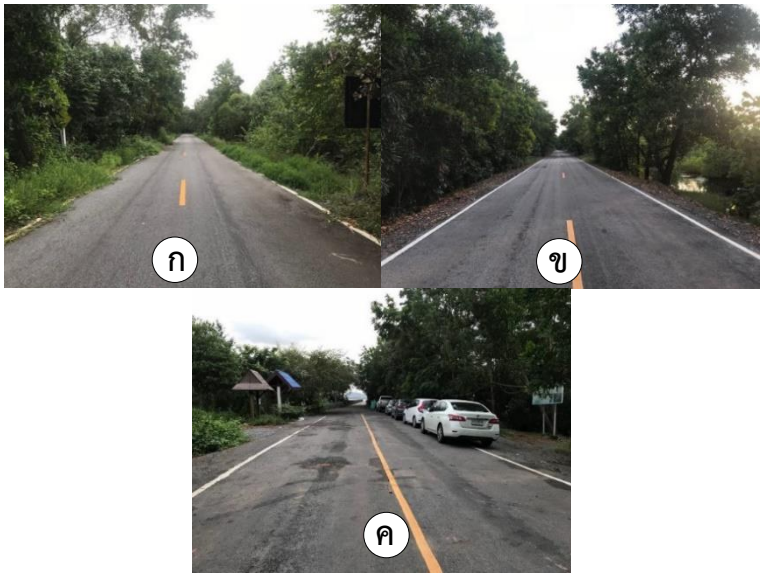
กำหนดพื้นที่ศึกษาบริเวณเส้นทางสัญจรภายในสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) ซึ่งเป็นถนนลาดยาง มีระยะทางจากสถานีฯ ถึงสะพานท่าเทียบเรือประมาณ 2.2 กิโลเมตร มีพิกัดอยู่ระหว่าง 12°23'01.7" N, 102°20'57.7" E ถึง 12°22'06.0" N, 102°20'30.0" E จากการสำรวจเบื้องต้น พบประชากรของหิ่งห้อยอาศัยอยู่ 3 บริเวณ จึงแบ่งพื้นที่ศึกษาออกเป็น 3 สถานี (ภาพที่ 3.1) คือ สถานีที่ 1 อยู่บริเวณใกล้ต้นทางจากที่ตั้งสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) ประมาณ 400 เมตร (ภาพที่ 3.2 ก) สถานีที่ 2 ตั้งอยู่บริเวณระหว่างกลางเส้นทางเป็นพื้นที่ปลูกต้นโกงกางของสถานีฯ ห่างจากต้นทางประมาณ 1,550 เมตร (ภาพที่ 3.2 ข) และสถานีที่ 3 ตั้งอยู่บริเวณปลายเส้นทางสัญจร ซึ่งเชื่อมต่อกับสะพานท่าเทียบเรือ ห่างจากต้นทางประมาณ 2,200 เมตร (ภาพที่ 3.2 ค) โดยแต่ละสถานีเก็บข้อมูลมีความยาว 100 เมตร ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ที่พบประชากรหิ่งห้อยในเส้นทางทั้งหมด โดยได้แบ่งเก็บข้อมูลในแต่ละสถานีออกเป็น 2 ฝั่งของถนน คือ ฝั่งซ้ายและฝั่งขวา เนื่องจากทั้ง 2 ฝั่งได้รับน้ำจากต่างแหล่งกัน จึงต้องเก็บข้อมูลต่าง ๆ แยกกัน

2. การศึกษาข้อมูลเพื่อกำหนดวันเก็บข้อมูลภาคสนาม

กำหนดวันเก็บข้อมูลภาคสนามในพื้นที่สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2563 สำรวจเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง รวมถึงการตรวจสอบมาตราน้ำจากกรมอุทกศาสตร์กองทัพเรือ เพื่อตรวจสอบผลกระทบของน้ำขึ้นน้ำลงของน้ำในแม่น้ำ และตรวจสอบเวลาดวงอาทิตย์ตก และดวงจันทร์ขึ้น-ตกจากสมาคมดาราศาสตร์ไทย โดยเลือกออกเก็บข้อมูลในช่วงคืนเดือนมืด ประมาณแรม 15 ค่ำ หรือก่อนหลังไม่เกิน 3 วัน เพื่อลดการรบกวนจากแสงดวงจันทร์ในการมองเห็นและการถ่ายภาพแสงของหิ่งห้อยให้น้อยที่สุด และง่ายต่อการสำรวจแสงจากหิ่งห้อย



ภาพที่ 3.1 แผนที่แสดงพื้นที่ศึกษา บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี)

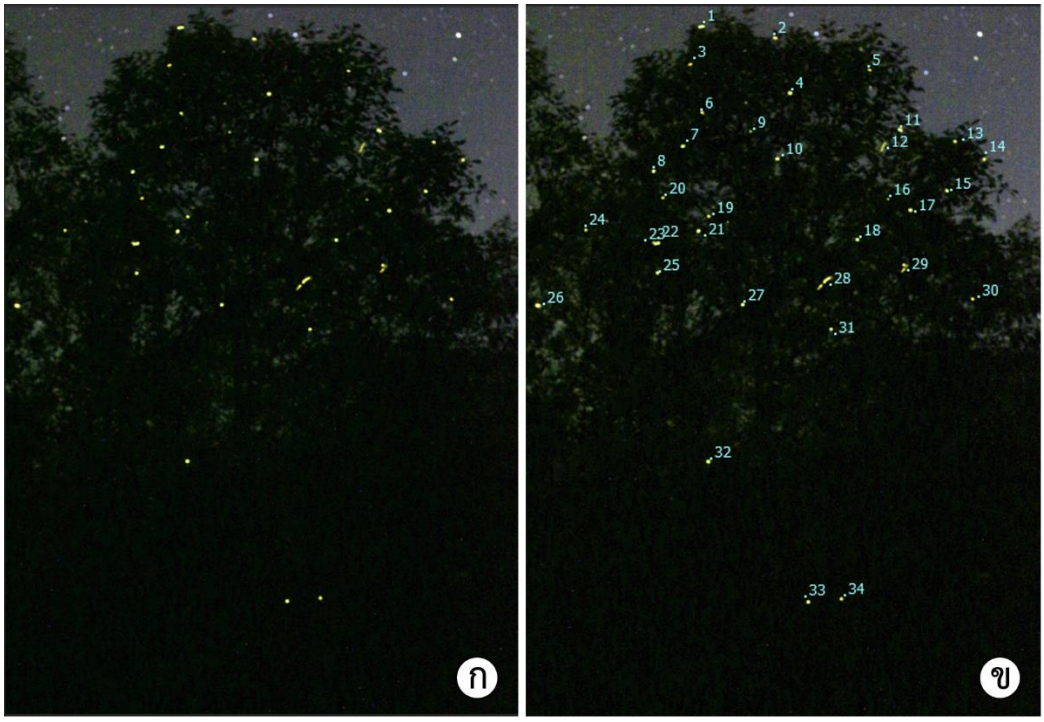


ภาพที่ 3.2 ลักษณะสภาพแวดล้อมของสถานีศึกษา สถานีที่ 1 (ก), สถานีที่ 2 (ข), สถานีที่ 3 (ค)

3. การศึกษาภาคสนาม

3.1 การศึกษาความชุกชุมของหิ่งห้อย

ผู้วิจัยได้ออกเก็บข้อมูลภาคสนามทุกเดือน เดือนละ 1 ครั้ง ครั้งละ 1 คืน เป็นเวลา 1 ปี ตั้งแต่ เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2563 โดยเลือกออกเก็บข้อมูลในช่วงคืนเดือนมืด ประมาณแรม 15 ค่ำ หรือก่อนหลังไม่เกิน 3 วัน เพื่อลดการรบกวนการมองเห็นและการถ่ายภาพแสงของหิ่งห้อย ในแต่ละเดือนได้สำรวจประชากรหิ่งห้อยที่เกาะรวมกลุ่มกันอยู่บนต้นไม้ที่พบได้ในแต่ละสถานีศึกษา โดยเริ่มสำรวจตั้งแต่เวลาพระอาทิตย์ตกดิน ต้นไม้ที่พบว่ามีการเกาะรวมกลุ่มกันของหิ่งห้อยอยู่นั้น จะถูกถ่ายภาพโดยใช้กล้องถ่ายภาพดิจิตอล DSLR ยี่ห้อ Canon รุ่น 650D ติดกับเลนส์ถ่ายภาพยี่ห้อ Canon รุ่น EF 50mm f/1.4 USM ตั้งบนขาตั้งกล้องถ่ายภาพ ต้นไม้ที่มีหิ่งห้อยเกาะทุกต้นในสถานีเก็บข้อมูลอย่างน้อยต้นละ 3 ภาพ แล้วนำภาพที่ได้มานับจำนวนประชากรจากจำนวนจุดแสงของหิ่งห้อยที่ปรากฏในภาพ ด้วยฟังก์ชัน Count ในโปรแกรม Photoshop CS6 (ภาพที่ 3.3) ภาพที่นับได้มากที่สุดจะเป็นตัวแทนของจำนวนในแต่ละต้น แล้วหาค่าเฉลี่ยของประชากรหิ่งห้อยในแต่ละสถานีศึกษา ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Kirton et al. (2012 : 245) และ นพรัตน์ พงศ์จันทร์ (2556 : 25-26)



ภาพที่ 3.3 จุดแสงของหิ่งห้อยที่ปรากฏในภาพถ่าย (ก) นับจำนวนประชากรด้วยฟังก์ชัน Count (ข)

3.2 การระบุชนิดของหิ่งห้อย

สุ่มเก็บตัวอย่างหิ่งห้อยที่พบในสถานีศึกษาโดยใช้สวิงจับแมลงเก็บตัวอย่างหิ่งห้อยบนต้นไม้ทุกต้นที่มีหิ่งห้อยเกาะ ระบุชนิดของหิ่งห้อยในภาคสนามด้วยการเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยากับคีย์จำแนกชนิดของ Jusoh et al. (2018 : 18-19) เมื่อจำแนกชนิดได้แล้วจึงปล่อยหิ่งห้อยไป

3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชอาศัย

จำแนกชนิดของต้นไม้ที่พบการเกาะอาศัยของหิ่งห้อยทุกต้นในภาคสนาม ด้วยการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยากับหนังสืออ้างอิงชนิดพรรณไม้ป่าชายเลนของ สรายุทธ บุณยะเวชชีวิน และรุ่งสุริยา บัวสาลี (2554 : 1-690) และเก็บตัวอย่างพืชที่ไม่ทราบชนิดไปจำแนกในห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา ต้นไม้ที่พบหิ่งห้อยเกาะถูกติดป้ายรหัสประจำต้นแต่ละต้น เก็บตัวอย่างใบที่สมบูรณ์จำนวนไม่ต่ำกว่า 30 ใบ วัดความสูงด้วยไคลโนมิเตอร์วัดความสูง วัดเส้นรอบวงระดับอกด้วยสายวัด วัดทรงพุ่มโดยวัดระยะห่างจากจุดศูนย์กลางลำต้นไปยังปลายกิ่ง 3 ทิศทางรอบลำต้น ระบุพิกัด GPS ของต้นไม้ และทำเช่นเดียวกันนี้กับต้นไม้ที่หิ่งห้อยไม่เกาะอาศัยที่มีขนาดเส้นรอบวงมากกว่า 4.5 เซนติเมตร ที่อยู่ภายในรัศมีประมาณ 10 เมตร จากต้นไม้ที่มีหิ่งห้อยเกาะอาศัย

3.4 การศึกษาปัจจัยทางกายภาพของแหล่งอาศัย

ในแต่ละสถานีศึกษาได้รับการเก็บข้อมูลปัจจัยทางกายภาพที่คาดว่าจะมีผลต่อประชากรหิ่งห้อย อันประกอบด้วย ข้อมูลสภาพอากาศ และข้อมูลปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำซึ่งเป็นแหล่งอาศัยของหิ่งห้อยในระยะไข่จนกระทั่งถึงระยะดักแด้ โดยข้อมูลปัจจัยทางกายภาพแต่ละปัจจัย มีวิธีการศึกษาดังนี้

3.4.1 การศึกษาสภาพอากาศ

การเก็บข้อมูลสภาพอากาศของพื้นที่ศึกษาประกอบด้วย การบันทึกปริมาณน้ำฝนจาก รายงานปริมาณน้ำฝนรายวันประจำเดือน ของสำนักพัฒนาอุตุนิยมวิทยา ซึ่งแสดงผลในเว็บไซต์ http://hydromet.tmd.go.th/Reports/report-rf-province-month.aspx โดยเลือกข้อมูลจากสถานี อบต.ทุ่งนนทรี อำเภอเขาสมิง จังหวัดตราด ซึ่งเป็นสถานีที่อยู่ใกล้เคียงพื้นที่ศึกษามากที่สุด มีระยะห่างออกไปเพียงประมาณ 10.5 กิโลเมตร

ข้อมูลอุณหภูมิ ความชื้นสัมพันธ์ของอากาศ และความเข้มแสงในแต่ละสถานีศึกษา ได้รับการบันทึกทุกครั้งที่ออกสำรวจประชากรหิ่งห้อย โดยใช้เครื่องวัดหลายปัจจัย ยี่ห้อ Extech รุ่น 5-in-1 Environmental Meter (ภาพที่ 3.3)

กำหนดช่วงการเปลี่ยนแปลงฤดูกาลตามประกาศของกรมอุตุนิยมวิทยา สามารถแบ่งฤดูกาล ออกเป็น 3 ฤดู ประกอบด้วย ฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว ซึ่งฤดูร้อนเริ่มตั้งแต่วันที่ 21 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562 (ภูเวียง ประคำมินทร์, 2562ก : 1) เริ่มเข้าสู่ฤดูฝนตั้งแต่วันที่ 20

พฤษภาคม พ.ศ. 2562 (กรรวี สิทธิชีวภาค, 2562 : 1) และเริ่มเข้าสู่ฤดูหนาวตั้งแต่วันที่ 17 ตุลาคม พ.ศ. 2562 (ภูเวียง ประคำมินทร์, 2562ข : 1)

ภาพที่ 3.4 เครื่องวัดหลายปัจจัย ยี่ห้อ Extech รุ่น 5-in-1 Environmental Meter

3.4.2 การศึกษาปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำ

การศึกษาปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำในบริเวณสถานีศึกษาทุกสถานี ได้ตรวจวัดคุณภาพน้ำบริเวณกึ่งกลางสถานีศึกษาแต่ละสถานี โดยวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (DO) และวัดอุณหภูมิของน้ำด้วยเครื่องวัดคุณภาพน้ำหลายปัจจัย ยี่ห้อ Lutron รุ่น WA-2017SD (ภาพที่ 3.4) วัดค่าความเค็มของน้ำด้วยเครื่องวัดความเค็ม (Salinity Refractometer) และเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการ สำหรับใช้ในการศึกษาหาปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (BOD) และปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (COD) ซึ่งบ่งบอกถึงปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำได้ (สราวุธ ศรีทองอุทัย, 2561 : 79) โดยเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณผิวน้ำใส่ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ และเก็บรักษาขวดเก็บตัวอย่างน้ำไว้ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง เพื่อรักษาอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงห้องปฏิบัติการแล้วจึงย้ายขวดเก็บตัวอย่างน้ำออกไปเก็บไว้ในตู้เย็นต่อไป

ภาพที่ 3.5 เครื่องวัดคุณภาพน้ำหลายปัจจัย ยี่ห้อ Lutron รุ่น WA-2017SD

4. การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบพืช

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบพืชทุกชนิดที่เก็บมาจากภาคสนาม โดยบันทึกลักษณะภายนอกของใบพืช ประกอบด้วยชนิดของใบ การเรียงตัวของใบ การเรียงตัวของเส้นใบ รูปร่างแผ่นใบ ลักษณะของโคนใบ ขอบใบ และปลายใบ วัดความกว้างและความยาวของใบ หาพื้นที่ใบโดยใช้กระดาษกราฟ นำใบพืชมาทำสไลด์สด ย้อมด้วยสี Safanin-O แล้วนำไปศึกษารายละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ศึกษาความหนาของชั้นคิวติเคลทั้งด้านหลังและด้านท้องใบ วัดความหนาของใบ และศึกษาลักษณะพิเศษอื่น ๆ ของใบ

4.2 การวิเคราะห์ BOD

ค่า BOD ทำการหาจากปริมาณออกซิเจนละลายน้ำวันแรก (DO_0) ลบด้วยปริมาณออกซิเจนละลายน้ำวันที่ 5 (DO_5) มีขั้นตอนดังนี้

1) นำตัวอย่างน้ำของแต่ละสถานีใส่ขวด BOD ให้เต็มขวดอย่างระมัดระวัง เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศภายในขวดแล้วปิดจุกแก้วให้สนิท

2) เติมสารละลาย $MnSO_4$ 1 มิลลิลิตร ลงในขวดบีโอดีและสารละลาย Allkali-iodide-azide 1 มิลลิลิตร ปิดจุกพลิกคว่ำไปมา ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน

3) เติม Conc H_2SO_4 1 มิลลิลิตร ปิดจุกพลิกคว่ำไปมาจนตะกอนละลายหมด (ควรปฏิบัติด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากสารละลายที่ใช้มีความเข้มข้นของกรดสูง)

4) ตวงสารละลายจากขวดบีโอดี 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร หยดน้ำแป้งใช้เป็นอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

5) ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน $Na_2S_2O_3$ 0.025 N จนกระทั่งสีน้ำเงินหมดไป บันทึกปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไป เพื่อหาปริมาณ DO ที่ละลายน้ำ บันทึกค่าเป็น DO_0 เพื่อใช้วิเคราะห์ค่า BOD

6) การหาปริมาณออกซิเจนละลายน้ำวันที่ 5 (DO_5) โดยนำน้ำตัวอย่างใส่ขวดบีโอดีโดย ระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศภายในขวด แล้วปิดขวดด้วยจุก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเติมสารละลายและไทเทรตเหมือนกับ DO_0 ทุกประการ (ข้อ 1-5)

วิเคราะห์ค่า BOD โดยใช้สมการดังต่อไปนี้

$$\text{ออกซิเจนละลาย มิลลิกรัม/ลิตร} = \frac{\text{ปริมาณ } Na_2S_2O_3 \text{ (มิลลิลิตร) x 200}}{\text{ปริมาณน้ำตัวอย่างที่ใช้ไทเทรต}}$$

$$\text{BOD (มิลลิกรัม/ลิตร)} = DO_0 - DO_5$$

4.3 การวิเคราะห์ COD

1) ใส่น้ำตัวอย่างปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 10 มิลลิลิตร และอีกหลอดใช้น้ำกลั่นปริมาตรเดียวกันสำหรับเป็น Blank

2) เติมสารละลาย $K_2Cr_2O_7$ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย H_2SO_4 ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ปิดฝาพลิกหลอดไปมา

3) นำไปต้มในฮีทบล็อก ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4) นำหลอดทดลองออกจากฮีทบล็อก ทิ้งให้เย็นในอุณหภูมิห้อง จากนั้นถ่ายตัวอย่างน้ำใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร หยดเฟอร์โรอีนอินดิเคเตอร์ 1-2 หยด สารละลายจะเปลี่ยนสีฟ้าหรือเขียว

5) ไทเทรตด้วยสารละลาย FAS จนน้ำตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนเป็นสีแดงอิฐ บันทึกปริมาณ FAS ที่ใช้เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่า COD

วิเคราะห์ค่า COD โดยใช้สมการดังนี้

$$\text{COD (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{[\,(A-B) \times N \times 8{,}000]}{\text{ปริมาณน้ำตัวอย่าง}}$$

โดย A = สารละลาย FAS ที่ใช้ไทเทรต Blank

B = สารละลาย FAS ที่ใช้ไทเทรตน้ำตัวอย่าง

N = Normality ของสารละลาย FAS

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรหิ่งห้อยที่นับได้และค่าปัจจัยทางกายภาพในแต่ละสถานีและแต่ละเดือน ถูกนำมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ one-way ANOVA แล้วทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรแบบ Multiple comparison ด้วยวิธี Tukey Method และ LSD Method ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ ของพืชเกาะอาศัยและพืชที่หิ่งห้อยไม่เลือกอาศัย โดยใช้สถิติ One-Way ANOVA แล้วทดสอบความแตกต่างระหว่างชนิดของพืชอาศัยแบบ Multiple comparison ด้วยวิธี Tukey Method และ LSD Method ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความชุกชุมของหิ่งห้อยตัวเต็มวัยกับปัจจัยทางกายภาพของแหล่งที่อยู่อาศัย โดยเปรียบเทียบความชุกชุมของหิ่งห้อยในแต่ละสถานี และแต่ละเดือนกับสภาพอากาศ และค่าปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำในสถานีศึกษา โดยใช้สถิติ Spearman's rank correlation coefficient ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรม SPSS Statistics version 16.0