

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

การสำรวจไลเคนบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติน้ำตกพลี๊ว จังหวัดจันทบุรี มีการดำเนินงานวิจัยทั้งในส่วนของ การเก็บตัวอย่างในภาคสนามและดำเนินการจำแนกชนิดของไลเคนในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินงานวิจัย ดังนี้

1. อุปกรณ์การวิจัย

การสำรวจไลเคนบริเวณป่าพรุในพื้นที่ปกปักรักษาธรรมพีชา มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี มีอุปกรณ์การวิจัย ในภาคสนามและในภาคห้องปฏิบัติการดังนี้

1.1 ภาคสนาม

- (1) มีดคัตเตอร์และกรรไกร
- (2) ตลับเมตร
- (3) เชือกฟาง ขนาด 2x2 เมตร
- (4) กล้องดิจิตอล
- (5) สายวัดตัว
- (6) แวนขยาย
- (7) ทิชชู
- (8) ซองกระดาษใส่ตัวอย่าง
- (9) Tag ติดต้นไม้เพื่อระบุตำแหน่ง
- (10) แบบฟอร์มการบันทึกผล
- (11) เครื่องเขียนต่าง ๆ เช่น ปากกา ดินสอ ยางลบ ไม้บรรทัด ฯลฯ
- (12) เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น ยี่ห้อ STANDARD รุ่น ST-8820
- (13) เครื่องวัดความเข้มแสง ยี่ห้อ Delta OHM รุ่น HD 9021

1.2 ภาคห้องปฏิบัติการ

- (1) ตัวอย่างไลเคน
- (2) กล้องจุลทรรศน์รุ่น CH30 ยี่ห้อ Olympus
- (3) กล้องดิจิตอล ยี่ห้อ Olympus
- (4) Slide และ Cover Slide
- (5) ปากคีบ
- (6) ไขมีดโกน
- (7) หนังสือไลเคน เช่น หนังสือความหลากหลายของไลเคนป่ากุดจับ จังหวัดอุดรธานี และความหลากหลายของไลเคน ป่าดงภู จังหวัดศรีสะเกษ (สุรางค์ เขียรศิริธัญ และคนอื่น ๆ, 2554ก) ความหลากหลายของไลเคนป่าเขากระยาง จังหวัดพิษณุโลก (สุรางค์ เขียรศิริธัญ และคนอื่น ๆ, 2554ข) ความหลากหลายของไลเคนป่าภูค้ำบก จังหวัดร้อยเอ็ด (สุรางค์ เขียรศิริธัญ และคนอื่น ๆ, 2554ค)

ไลเคนแห่งเกาะแสมสารจากยอดเขาถึงชายทะเล (กัณฐรีย์ บุญประกอบ และกวินนาถ บัวเรือง, 2550) และคู่มือนักสืบสายลม (สรณรัชฎ์ กาญจนะวณิช, 2553) เป็นต้น

2. สารเคมี

- 2.1 Sodium Hypochlorite (NaOCl)
- 2.2 Potassium Hydroxide (KOH)
- 2.3 Paraphenylenediamine (Pd)
- 2.4 Ethanol 95%
- 2.5 Iodine (I)
- 2.6 Potassium Iodide (KI)

3. การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบสี (Spot test)

- 3.1 สาร C ได้แก่ สาร Sodium Hypochlorite (NaOCl)
- 3.2 สาร K ได้แก่ การนำ Potassium (K) 10 กรัม ไปละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลาย Potassium Hydroxide (KOH)
- 3.3 สาร Pd ได้แก่ การนำผลึก Paraphenylenediamine (Pd) 2-3 เกล็ด ละลายใน Ethyl Alcohol 95% ปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร โดยต้องเตรียมทุกวันที่ใช้ (เป็นสารก่อกัมเริง)
- 3.4 สาร I ได้แก่ สารละลายไอโอดีน (I) เตรียมโดยชั่งเกล็ดไอโอดีน (I) 0.5 กรัม ในสารละลาย โปแตสเซียมไอโอดด์ (Potassium Iodine) ซึ่งเตรียมได้จากการละลาย KI 1.5 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร สารละลายนี้ใช้ทดสอบผนังแอสคัส (Ascus) และบริเวณตอนปลายของแอสคัสที่เรียกว่า ธอลัส (Tholus) ซึ่งเกิดสีน้ำเงินกับสารอะไมโลส (พวกแป้ง) (กัณฐรีย์ บุญประกอบ และกวินนาถ บัวเรือง, 2550 : 17-18)

4. วิธีการดำเนินการวิจัย

4.1 การศึกษาภาคสนาม

ดำเนินการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไลเคนเฉพาะกลุ่มครัสโตสไลเคนบริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติ ในอุทยานแห่งชาติน้ำตกพลิว จังหวัดจันทบุรี ในช่วงเดือนมกราคมถึงเมษายน พ.ศ. 2566 โดยมีวิธีการศึกษา ดังนี้

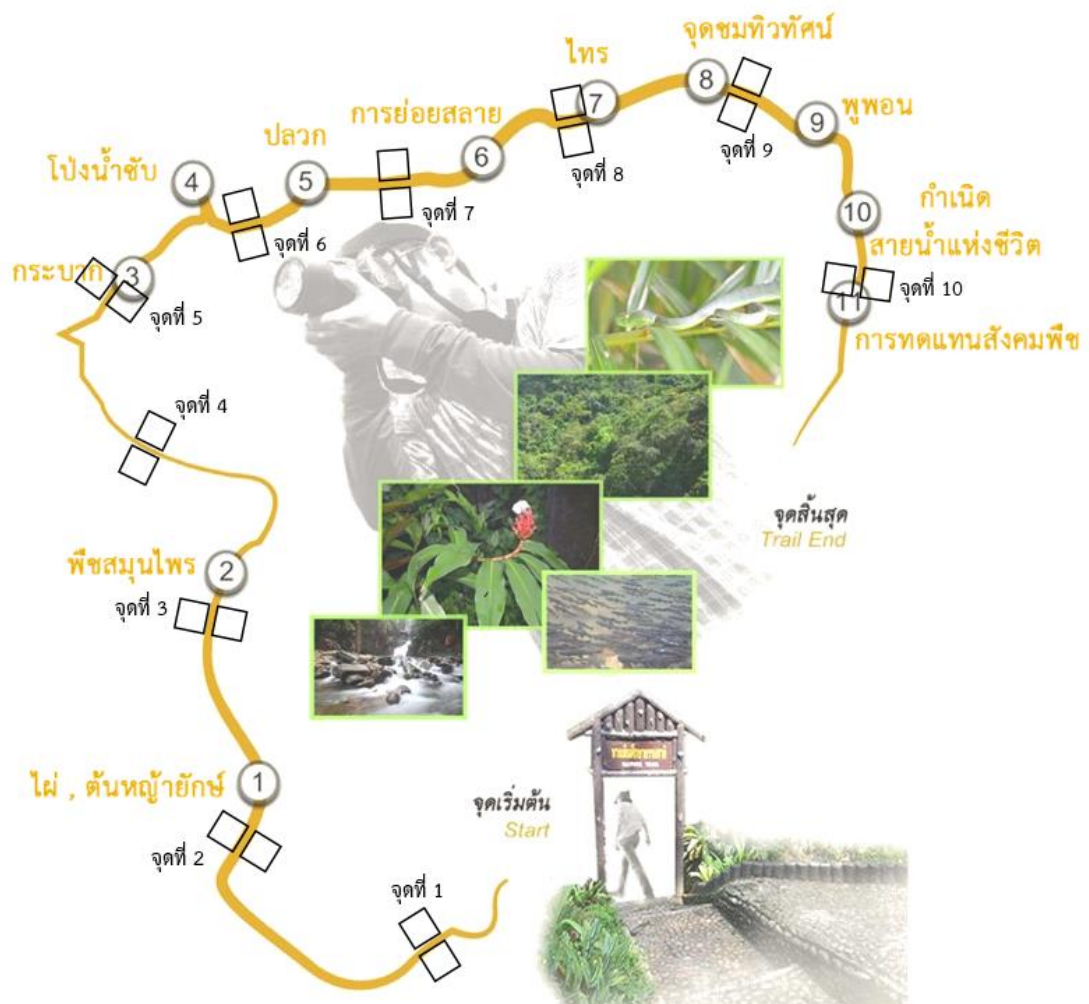
4.1.1 สำรวจพื้นที่เส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติ โดยทำการวางแปลงขนาด 2x2 เมตร ทั้งด้านซ้ายและขวาในแนวที่ติดกับเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติ ในทุก 100-120 เมตร ตามความเหมาะสมของพื้นที่ รวมระยะทาง 1.2 กิโลเมตร (ภาพที่ 3.1) โดยการวางแปลงเก็บตัวอย่างจะปฏิบัติตามคำแนะนำของเจ้าหน้าที่อุทยานฯ

4.1.2 เก็บตัวอย่างไลเคนจากเปลือกไม้ของต้นไม้ที่มีเส้นรอบวงตั้งแต่ 20 เซนติเมตร ขึ้นไป ตั้งแต่ความสูงจากระดับพื้นดินถึงระดับความสูง 2 เมตร บันทึกข้อมูลสภาพพื้นที่ ได้แก่ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่างไลเคน ชื่อต้นไม้ ขนาดเส้นรอบวง จำนวนไลเคน (จุด) อุณหภูมิ ความชื้น

และความเข้มแสง จากนั้นเมื่อเก็บตัวอย่างในจุดเก็บตัวอย่างหนึ่งแล้ว จะเคลื่อนย้ายอุปกรณ์การวางแปลงไปวางในจุดเก็บตัวอย่างถัดไป

4.1.3 เก็บตัวอย่างใช้มีดลอกแทลล์ของไลเคนรวมถึงวัสดุที่ไลเคนเกาะติดอยู่ ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 นิ้ว (ขึ้นอยู่กับขนาดของแทลล์ของไลเคนที่พบ) โดยเหลือบางส่วนของแทลล์ไว้เพื่อให้ไลเคนสามารถเจริญเติบโตได้ต่อไป และหากพบไลเคนที่มีลักษณะเดิมจะเลี่ยงการเก็บตัวอย่างซ้ำ

4.1.4 ใช้กระดาษนุ่มห่อตัวอย่างเพื่อซับความชื้นและป้องกันการกระแทก จากนั้นนำไลเคนมาผึ่งให้แห้งเพื่อป้องกันเชื้อรา ก่อนเก็บใส่ซองกระดาษเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีววิทยาในการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี และมหาวิทยาลัยรามคำแหง



ภาพที่ 3.1 การวางจุดเก็บตัวอย่างบริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติในพื้นที่อุทยานฯ

4.2 การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

4.2.1 จำแนกวงศ์และสกุล โดยการสังเกตสี และรูปร่างจากลักษณะของแทลลัสของไลเคน จากนั้นนำตัวอย่างไลเคนมาส่องภายใต้กล้องสเตอริโอ สังเกตโครงสร้างสีบัพนิจจากลักษณะของ อะโพทีเซีย (Apothecia) หรือเพอริทีเซีย (Perithecia) และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกต โครงสร้างภายในของแทลลัสตามลักษณะการเรียงตัวของราและสาหร่าย และสปอร์ (Spore) พร้อมบันทึกภาพ

4.2.2 ทำการตรวจสอบสารเคมีในไลเคนด้วยวิธีการทดสอบสี (Spot test) โดยนำชิ้นส่วนของไลเคนมาวางบนกระดาษสีขาว จากนั้นหยดสารเคมีแต่ละชนิดเพื่อทดสอบสารสีในไลเคนบริเวณ ชั้นคอร์เท็กซ์บนหรือเมดัลลา โดยมีการทดสอบสารสีแต่ละชนิด และทำการจดบันทึกชนิดของไลเคน ดังนี้

4.2.2.1 C-Test (สำหรับการทดสอบ Hypothamnolic Acid) โดยการหยดสาร Sodium Hypochlorite จำนวน 1 หยด ลงบนไลเคน สังเกตการเปลี่ยนสี (สีชมพู – สีแดง)

4.2.2.2 K-Test (สำหรับการทดสอบสาร Anthraquinones) โดยการหยดสาร Potassium hydroxide จำนวน 1 หยด ลงบนไลเคน สังเกตการเปลี่ยนสี (สีแดงเข้ม – สีม่วง)

4.2.2.3 Pd-Test (สำหรับการทดสอบ Norstictic Acid) โดยการหยดสารละลาย Paraphenylenediamine จำนวน 1 หยด ลงบนไลเคน สังเกตการเปลี่ยนสี (สีเหลือง - สีแดง)

4.2.2.4 KC-Test (สำหรับการทดสอบ Usnic Acid) โดยการหยดสาร Potassium Hydroxide จำนวน 1 หยด และ Sodium Hypochlorite จำนวน 1 หยด ลงบนไลเคน สังเกต การเปลี่ยนสี (สีส้ม – สีแดง)

4.2.2.5 I-Test (สำหรับทดสอบ Ascus และ Tholus) โดยการหยดสาร Potassium Iodide จำนวน 1 หยด ลงบนไลเคน สังเกตการเปลี่ยนสีของทอลัส (Thollus) (สีน้ำเงิน)

4.2.3 ทำการวิเคราะห์สารเคมีในไลเคนด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) โดยการตัดหรือขูดแทลลัสของไลเคนและส่วนของอะโพทีเซียประมาณ 2-3 เซนติเมตร แล้วหยด ด้วยอะซิโตนเพื่อสกัดสารเคมีจากแทลลัสของไลเคน จากนั้นนำมาหยดบนแผ่นที่แอลซีตามจุดที่ กำหนด พร้อมกับหยดสารมาตรฐานเพื่อใช้เป็นตำแหน่งค่า Rf อ้างอิง วางแผ่นที่แอลซีที่หยดสาร เรียบร้อยแล้ว วางลงบนแท่นรองรับให้ตัวทำละลายแบบเอ (Solvent A, Toluene : dioxane : acetic acid, 180 : 45 : 5) และตัวทำละลายแบบซี (Solvent C, Toluene : acetic acid, 170 : 30) เคลื่อนที่ไปบนแผ่นที่แอลซีจนถึงขีดกำหนดด้านบนของแผ่น ยกชิลิกาเจลออกและปล่อยให้แห้ง ฉาบด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 10 แล้วอบที่ 110 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหาค่า Rf ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร (จะเห็นจุดสีดำปรากฏบนแผ่นที่แอลซี และที่ ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร (จะเห็นเป็นสีต่าง ๆ บนแผ่นที่แอลซี) และเปรียบเทียบกับ สารมาตรฐานที่ทราบค่า Rf ของสารไลเคนแต่ละชนิดที่รวบรวมไว้ในฐานข้อมูล ตามวิธีการของ Nakswankul (2015) และ Elix (2014) พร้อมบันทึกภาพ

4.2.4 จำแนกวงศ์และสกุลตามหลักอนุกรมวิธานของไลเคน ตามหนังสือหรือคู่มือ การจัดจำแนกไลเคนหน้า 25 ข้อ 1.2 (7)

4.2.5 ตัวอย่างไลเคนที่เหลือจากการทดสอบจะจัดเก็บจำแนกตามสกุลและชนิด แฉ่งส่งมอบบัญชีรายชื่อให้กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิจารณา และขออนุญาตจัดเก็บรักษา ตัวอย่างต่อกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช เมื่อโครงการวิจัยแล้วเสร็จ



ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี