

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

การศึกษาค้นคว้าหลาย คุณค่าทางโภชนาการ และพยาธิของแมลงน้ำที่กินได้ ได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน คือ การเก็บตัวอย่างภาคสนาม และการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยเริ่มเก็บตัวอย่างในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2547 จนถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2548 จากพื้นที่ใน 2 อำเภอ คือ อำเภอบ้านธิ และอำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน (ภาพ 1) สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการนั้นได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน คือ การศึกษาค้นคว้าหลายของแมลงน้ำที่กินได้ การสำรวจหาพยาธิในแมลงน้ำที่กินได้ และการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

3.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง

สถานที่เก็บตัวอย่างแมลงน้ำที่กินได้ และตัวอย่างน้ำมีทั้งหมด 6 จุด ดังนี้

จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 บ้านธิ ตำบลบ้านธิ อำเภอบ้านธิ จังหวัดลำพูน ลักษณะของจุดเก็บตัวอย่างเป็นทุ่งนามีการทำนาปีละ 1 ครั้ง ในช่วงเดือนกรกฎาคมของทุกปีจะเริ่มมีฝนตก และมีน้ำขังเป็นแอ่งบริเวณกว้าง พื้นที่โดยรอบมีต้นข้าวขึ้นอยู่เต็มพื้นที่ และเป็นแหล่งชุมชนมีบ้านเรือนอยู่ไม่ไกลจากทุ่งนามากนัก ลักษณะของพื้นที่ท้องนา และบริเวณที่มีน้ำขังมีลักษณะเป็นโคลน (ภาพ 2)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 บ้านเหมืองกวั๊ก ตำบลมะเขือแจ้ อำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน จุดเก็บตัวอย่างเป็นบริเวณทุ่งนามีการทำนาปีละ 1 ครั้ง ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน ในทุ่งนามีบ่อเก็บน้ำขนาดเล็ก และมีการเลี้ยงสัตว์ในทุ่งนา หรือตามที่โล่งที่ไม่มีการทำนา (ภาพ 3)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 บ้านสะแล้ง ตำบลมะเขือแจ้ อำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน จุดเก็บตัวอย่างเป็นบริเวณทุ่งนามีการทำนาปีละ 1 ครั้ง ติดกับบ้านเรือนชุมชน และสวนลำไย มีคลองชลประทานอยู่ใกล้กับทุ่งนา (ภาพ 4)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 บ้านแจ่ม ตำบลบ้านกลาง อำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน จุดเก็บตัวอย่างเป็นบริเวณทุ่งนามีการทำนาปีละ 1 ครั้ง อยู่ห่างจากชุมชนแต่ไม่ไกลมากนัก เป็นทุ่งนาติดต่อกันเป็นบริเวณกว้าง (ภาพ 5)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 บ้านทุ่ง ตำบลในเมือง อำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน จุดเก็บตัวอย่างเป็นบริเวณทุ่งนามีการทำนาปีละ 1 ถึง 2 ครั้ง ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำ หากมีน้ำน้อยก็จะทำการเกษตรอย่างอื่นแทน เช่น การปลูกถั่ว แตงโม หรือข้าวโพด เป็นต้น ซึ่งตั้งอยู่ห่างจากชุมชนพื้นที่ทั้งหมดบริเวณนี้เป็นทุ่งนาบริเวณกว้าง อยู่ใกล้กับคลองชลประทาน (ภาพ 6)



ภาพ 1 แผนที่จุดเก็บตัวอย่างทั้ง 6 จุด ในอำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน

จุดเก็บตัวอย่างที่ 6 บ้านสันริมปิง ตำบลริมปิง อำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน จุดเก็บตัวอย่างเป็นบริเวณทุ่งนามีการทำนาปีละ 1 ถึง 2 ครั้ง ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ และน้ำที่มีอยู่ในคลองชลประทาน บริเวณนี้อยู่ใกล้กับแม่น้ำปิงแต่มีทึบดินกันไว้ (ภาพ 7)



ภาพ 2 จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 บ้านธิ ตำบลบ้านธิ อำเภอบ้านธิ จังหวัดลำพูน



ภาพ 3 จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 บ้านเหมืองกวั๊ก ตำบลมะเขือแจ้ อำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน



ภาพ 4 จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 บ้านสะแล่ง ตำบลมะเขือแจ้ อำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน



ภาพ 5 จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 บ้านแจ่ม ตำบลบ้านกลาง อำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน



ภาพ 6 จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 บ้านทุ่ง ตำบลในเมือง อำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน



ภาพ 7 จุดเก็บตัวอย่างที่ 6 บ้านริมปิง ตำบลริมปิง อำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน

3.2 การศึกษาทางด้านชีวภาพ

3.2.1 การเก็บตัวอย่างแมลงน้ำที่กินได้

เก็บตัวอย่างแมลงน้ำที่กินได้โดยใช้สวิงช้อนในแอ่งน้ำในทุ่งนา ซึ่งแอ่งน้ำที่เก็บตัวอย่างนั้นต้องเป็นแอ่งน้ำที่มีความกว้างพอสมควร ลึกประมาณ 10 – 30 เซนติเมตร เพราะหากปริมาณน้ำน้อย หรือมากเกินไปก็มักจะไม่นพบแมลงน้ำ สำหรับการเลือกจุดเก็บตัวอย่างจะกำหนดโดยสำรวจดูว่าหมู่บ้านใดที่มีการบริโภคแมลงน้ำบ้าง จากนั้นก็สำรวจตลาดในหมู่บ้านที่มีแมลงน้ำวางขายในตลาด และสอบถามแหล่งที่แม่ค้าไปหาแมลงน้ำ เมื่อได้ข้อมูลเบื้องต้นแล้วจึงกำหนดจุดเก็บตัวอย่าง ส่วนวิธีการเก็บตัวอย่างแมลงน้ำที่กินได้โดยใช้มือทั้งสองข้างจับปากสวิง กดปากสวิงและถุงของตาข่ายจมลงในน้ำจนหมด จากนั้นยกสวิงแล้วแกว่งไปมาซ้ายขวาในพื้นที่ 2 ตารางเมตร เป็นเวลา 5 นาที ทำทั้งหมด 3 ชั่วโมง (ภาพ 8) จากนั้นเทลงในกะละมังเพื่อแยกเศษใบไม้ ก้อนหิน ขยะต่าง ๆ ที่ไม่ต้องการออก ล้างเศษต่าง ๆ ที่จะหยิบออกก่อนทุกครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีแมลงน้ำติดมาด้วย แล้วกรองด้วยสวิง เทใส่ถุงพลาสติกใสที่เตรียมไว้และใส่น้ำลงไปพอประมาณเพื่อไม่ให้แมลงน้ำตาย รัดปากถุงให้สนิท เขียนสถานที่ วันที่ ชื่อผู้เก็บตัวอย่างให้ชัดเจน



ภาพ 8 วิธีการเก็บตัวอย่างแมลงน้ำโดยใช้สวิง

3.2.2 การสำรวจแมลงน้ำที่กินได้ในตลาด

สำรวจตลาดที่อยู่ใกล้กับจุดเก็บตัวอย่าง และอยู่หมู่บ้านเดียวกับจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่ในเขตอำเภอบ้านธิ และอำเภอเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน โดยสำรวจทั้งหมด 6 จุด เป็นเวลา 6 เดือน ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างเป็นที่น่าแปลงเดียวกัน พร้อมกับการเก็บตัวอย่างแมลงน้ำที่กินได้ในทุ่งนา เพื่อหาแมลงน้ำที่กินได้ที่นำมาวางขายในตลาด สอบถามข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งที่เก็บแมลงน้ำที่กินได้ วิธีการ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บ และซื้อแมลงน้ำที่กินได้ที่วางขายในตลาดเพื่อนำไปจำแนกในห้องปฏิบัติการ บันทึกผลชนิดแมลงน้ำที่พบ

3.2.3 การศึกษาความหลากหลาย

นำตัวอย่างไปจำแนกถึงระดับสกุล (genus) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอในห้องปฏิบัติการ โดยใช้หนังสือของ MaCafferty (1981), Merritt and Cummins (1988), Borror and DeLong (1954) และ Waterhouse *et. al.*, (1991) นำตัวอย่างที่จำแนกเสร็จแล้วแบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกเก็บในขวดเก็บตัวอย่างที่มีแอลกอฮอล์ 70% เขียนอันดับ และวงศ์ที่พบ สถานที่เก็บตัวอย่าง วันที่ และชื่อผู้ทำการวิเคราะห์ ใส่ลงในขวดเก็บตัวอย่างแต่ละขวด บันทึกข้อมูลที่ได้ในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำไปคำนวณหาค่าความหลากหลายทางชีวภาพ (Species Diversity Index) โดยใช้สูตร Shannon – Wiener Index (H') ด้วยคอมพิวเตอร์โปรแกรม ECOSTAT ส่วนที่สองนำไปตรวจหาพยาธิ และส่วนสุดท้ายนำไปหาคุณค่าทางโภชนาการ

3.2.4 การตรวจหาพยาธิ

นำแมลงน้ำที่กินได้ที่จำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วมาตรวจหาพยาธิโดยตัดลำตัวของตัวอย่างแมลงน้ำเพื่อตรวจหาพยาธิในทางเดินอาหาร อวัยวะภายในต่าง ๆ ของแมลงน้ำ และช่องว่างภายในลำตัวของแมลงน้ำ หากพบพยาธิทำการรักษาสภาพโดยการแช่ใน formaline 10% และนำมาทำ permanent slide และจำแนกพยาธิที่ได้จำแนกพยาธิจนถึงระดับสกุล หรือชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope)

3.2.5 การตรวจหาคุณค่าทางอาหาร

การเตรียมตัวอย่างแมลงน้ำที่กินได้เพื่อการตรวจวิเคราะห์

ตัวอย่างแมลงน้ำที่กินได้ที่จะนำมาตรวจหาสารอาหารโดยทั่วไปแล้วมีลักษณะเป็น heterogeneous จึงมีความจำเป็นต้องทำให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อน (homogeneous) ที่จะทำการวิเคราะห์สารอาหารต่าง ๆ ด้วยการนำแมลงน้ำที่กินได้ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า การเตรียมเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ทุกชิ้นต้องล้างให้สะอาด เพื่อป้องกันการปนเปื้อน สำหรับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอาหารมีดังนี้

- ชั่งน้ำหนักขวดพลาสติก หรือบีกเกอร์เปล่าที่จะใช้บรรจุอาหารด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียดบันทึกน้ำหนัก นับจำนวนแมลงน้ำที่กินได้ที้นำไปหาปริมาณสารอาหารแยกเอาเฉพาะส่วนของแมลงน้ำที่กินได้ คือ ส่วนลำตัว และส่วนหัว ใส่ลงในภาชนะที่เตรียมไว้ ชั่งน้ำหนักแมลงน้ำที่กินได้ที่เตรียมไว้ แล้วห้กลับน้ำหนักของภาชนะออก
- นำแมลงน้ำที่กินได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 - 60 °C ประมาณ 48 ชั่วโมง หรือจนกว่าแมลงน้ำที่กินได้จะแห้งซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงน้ำ และอุณหภูมิจะต้องไม่เกิน 70 °C เพราะจะทำให้คุณค่าทางอาหารของแมลงน้ำหายไป
- ชั่งน้ำหนักแห้งของแมลงน้ำที่กินได้ บันทึกน้ำหนักไว้
- ปั่นแมลงน้ำที่กินได้ด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน

ตรวจวิเคราะห์คุณค่าสารอาหารในตัวอย่างแมลงน้ำดังนี้ (ภาคผนวก จ)

- โปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl (A.O.A.C.,1995)
- ไขมัน (Crude fat) ด้วยวิธีการสกัดไขมันออกจากตัวอย่างด้วย chloroform และ methanol ในอัตราส่วน 2 : 1 (A.O.A.C.,1995)
- เส้นใย (Total Crude Fiber Analysis) ด้วยวิธีการย่อยแมลงน้ำที่กินได้ทั้งหมดด้วย 1.25% H₂SO₄ และ NaOH 1.25% เพื่อย่อยเอาสารอินทรีย์ที่ถูกย่อยออก ส่วนที่ไม่ถูกย่อย คือเส้นใย (A.O.A.C.,1995)
- เถ้าด้วยการเผาในเตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle furnace) (Dry Ashing) (A.O.A.C.,1995)
- คาร์โบไฮเดรต ด้วยวิธีการคำนวณ

3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมี

3.3.1 ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ (dissolved oxygen; DO)

(APHA, AWWA and WEF, 1992)

ใช้วิธี Azide Modification ล้างขวด BOD ไส้ที่มีปริมาตร 300 มิลลิลิตร 2 – 3 ครั้งก่อนเก็บตัวอย่างน้ำ จุ่มขวดใต้ผิวน้ำลึกประมาณ 30 เซนติเมตร อย่าให้มีฟองอากาศปิดฝาขวดขณะอยู่ใต้น้ำ เติมสารละลาย MnSO₄ 1 มิลลิลิตร แล้วตามด้วย Alkaline-Iodide-Azide reagent (AIA) 1 มิลลิลิตร ปิดจุกขวดเขย่าโดยกลับขวดไปมา ตั้งทิ้งไว้รอให้ตะกอนนอนก้นประมาณ 2 ใน 3 ของขวด เติม conc.H₂SO₄ 1 มิลลิลิตร ปิดจุกขวดเขย่าโดยกลับขวดไปมาจนกระทั่งตะกอนละลายหมด ตวงสารละลายที่ได้ลงใน Erlenmeyer flask 100 มิลลิลิตร ไตเตรทด้วย

0.025 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ จนได้สีเหลืองอ่อนเดิม น้ำแข็ง 3 หยด เขย่าให้เข้ากันสารละลายจะมีสีน้ำเงิน ไตเตรตต่อจนสีน้ำเงินจางหายไป บันทึกปริมาตร $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ที่ใช้ และนำไปคำนวณหาปริมาณ DO มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

$$\text{DO (mg/l)} = \text{ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน 0.025 M Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \text{ ที่ใช้} \times 2$$

3.3.2 ปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (biochemical oxygen demand; BOD) (APHA, AWWA and WEF, 1992)

ล้างขวด BOD ใส่ 2 – 3 ครั้งก่อนเก็บตัวอย่างน้ำ จุ่มขวดใต้ผิวน้ำลึกประมาณ 30 เซนติเมตร อย่าให้มีฟองอากาศปิดฝาขวดขณะอยู่ใต้น้ำ วิเคราะห์ DO ทันทีโดยวิธี Azide Modification ให้เป็น DO_{ini} เก็บน้ำตัวอย่างด้วยขวด BOD สีดำจนเต็มอย่าให้มีฟองอากาศปิดจุกให้สนิท จากนั้นนำไป incubate ในที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำน้ำมาหาปริมาณออกซิเจน โดยใช้วิธีเดียวกันกับการหา DO ให้เป็น DO_{final} มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร คำนวณค่า BOD_5 โดยมีสูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\text{BOD}_5 \text{ (mg/l)} = \text{DO}_{\text{ini}} - \text{DO}_{\text{final}}$$

เมื่อ DO_{ini} คือ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่ไตเตรตได้ในวันแรก
 DO_{final} คือ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่ไตเตรตได้ในวันที่ห้า

3.3.3 ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH)

วัดโดยใช้ Multi – Parameter Analyzer รุ่น Consort C533 จากประเทศเบลเยียม ที่ระดับความลึก 10 - 30 เซนติเมตร จากระดับผิวน้ำ

3.3.4 ค่าการนำไฟฟ้า (conductivity)

วัดโดยใช้เครื่อง Multi – Parameter Analyzer รุ่น Consort C533 จากประเทศเบลเยียม ที่ระดับความลึก 10 - 30 เซนติเมตร จากระดับผิวน้ำ มีหน่วยเป็นไมโครซีเมนต่อเซนติเมตร ($\mu\text{S/cm}$)

3.3.5 ปริมาณสารอาหาร (nutrients)

เก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 1 ลิตร ด้วยขวด Polyethylene ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารด้วยเครื่อง Spectrophotometer DR 2400 ของบริษัท HACH ประเทศสหรัฐอเมริกา มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร สารอาหารที่ทำการวิเคราะห์ ได้แก่

- ไนเตรทไนโตรเจน ($\text{NO}_3^- - \text{N}$) ใช้วิธี Cadmium Reduction Method
- แอมโมเนียมไนโตรเจน ($\text{NH}_4^+ - \text{N}$) ใช้วิธี Nessler Method
- ออร์โธฟอสเฟต ($\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$) ใช้วิธี Ascorbic Acid Method

3.4 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

3.4.1 อุณหภูมิน้ำ (water temperature)

วัดโดยใช้ hand thermometer ได้ระดับผิวน้ำที่ระดับความลึกประมาณ 10-30 เซนติเมตร มีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส

3.4.2 อุณหภูมิอากาศ (air temperature)

วัดโดยใช้ hand thermometer แวนไว้เหนือพื้นดินบริเวณได้ร่มไม้ มีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส

3.4.3 ความขุ่น (turbidity)

วัดโดยใช้เครื่อง turbidimeter รุ่น 6035 ของบริษัท Jenway ประเทศอังกฤษ มีหน่วยเป็น NTU (Nephelo Turbidity Units)

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทางกายภาพ เคมี และชีวภาพวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MVSP (Multi Variate Statistic Package) โดยใช้การวิเคราะห์แบบ ordination ซึ่งเป็นเทคนิคการจัดกลุ่มที่อาศัยความเหมือนโดยวัดระยะความสัมพันธ์ของข้อมูล และจัดกลุ่มความเหมือนแบบสัมพัทธ์ (relative homogeneity) ของสิ่งๆที่เหมือนกันให้อยู่กลุ่มเดียวกันโดยใช้ UPGMA clustering method และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ (correlation) โดยใช้โปรแกรม SPSS (statistical package for social science) ทำให้สามารถจัดกลุ่มคุณภาพน้ำของแต่ละจุดศึกษา และยังสามารถบอกได้ว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการจัดกลุ่มการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญ