

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดทองถั่งห่านที่มีศักยภาพร่วมกับชุมชน

3.1 การศึกษาและทดสอบวิธีการลดต้นทุนและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก้อนวัสดุเพาะ

1 ศึกษาและทดสอบวิธีการลดต้นทุนด้านพลังงานและเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตก้อนวัสดุเพาะโดยการเพิ่มอุณหภูมิ

พื้นที่ดำเนินงาน: โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงปางมะโอ

1.1) การทดสอบการลดต้นทุนด้านพลังงานและเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตก้อนวัสดุเพาะเห็ดร่วมกับวิสาหกิจชุมชนกลุ่มเพาะเห็ดทองถั่งห่านและเห็ดเศรษฐกิจบนพื้นที่สูง

1.1.1) เปรียบเทียบระหว่างการใช้น้ำปกติกับน้ำร้อน ใน 3 ฤดูกาล จำนวน 3 ซ้ำ โดยวัดอุณหภูมิ น้ำที่ใช้ก่อนการต้มเพื่อนึ่งฆ่าเชื้อก้อนวัสดุเพาะจากแหล่งกำเนิดทั้ง 2 แหล่ง (1) น้ำประปาภูเขา (2) น้ำจากเครื่องทำน้ำร้อนพลังแสงอาทิตย์ที่มีความจุไม่น้อยกว่า 150 ลิตร ที่สามารถเพิ่มอุณหภูมิได้ไม่ต่ำกว่า 65 องศาเซลเซียส และบันทึกอุณหภูมิ (3) น้ำที่ได้จากการหมุนเวียนผ่านความร้อนจากการต้มน้ำของหม้อต้มไอน้ำ

1.1.2) บันทึกน้ำหนักถังเชื้อเพลิงก๊าซหุงต้มก่อนใช้และหลังใช้

1.1.3) บันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิในฝาครอบจนถึง 90 °C

1.1.4) จับเวลาที่ใช้ในการนึ่งฆ่าเชื้อหลังจากอุณหภูมิถึง 90 °C (2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง)

1.1.5) ตรวจสอบผลการฆ่าเชื้อโดยการสุ่มก้อนวัสดุเพาะเห็ด จำนวน 60 ก้อน มาบ่มไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงและบันทึกผล

1.1.6) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

1.1.7) วิเคราะห์ต้นทุน และการยอมรับของเกษตรกร

1.2) การศึกษาต้นทุนการผลิตเห็ดบนพื้นที่สูงทั้งระบบ โดยอาศัยแนวทางจากการศึกษาการลงทุนเพาะเห็ดนางฟ้า (ชลธิชา, 2559) ดังนี้

1.2.1) หาต้นทุนในการเพาะเห็ด

1.2.2) สำรวจตลาดและช่องทางในการจัดจำหน่ายเห็ดและความต้องการของตลาด

1.2.3) วิเคราะห์การลงทุนการเพาะเห็ด

1.2.4) วิเคราะห์ความเป็นไปได้ในผลกำไร ขาดทุน เพื่อหาความเสี่ยงต่อการลงทุน

3.2 การศึกษาวิธีการเพาะเห็ดพื้นบ้านที่สำคัญในสภาพป่าธรรมชาติและครัวเรือนเกษตรกร

1. ศึกษาวิธีการเพาะเห็ดพื้นบ้านที่สำคัญในสภาพป่าธรรมชาติและครัวเรือนเกษตรกร

1.1) ศึกษาวิธีการเพาะเห็ดพื้นบ้านที่สำคัญในสภาพป่าธรรมชาติและครัวเรือนเกษตรกร โดยอาศัยแนวทางของวิธีการอยู่กับธรรมชาติอย่างยั่งยืน (permaculture)

พื้นที่ดำเนินงาน: ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะเรียง (หน่วยย่อยป่าแป๋) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงแม่ละลอง และโครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงโป่งคำ

1.1.1) กำหนดชนิดเห็ดร่วมกับชุมชน

1.1.2) ประเมินวัสดุเหลือใช้ทางเกษตร/ธรรมชาติ

1.1.3) กำหนดรูปแบบการเพาะเห็ดร่วมกับชุมชนจัดทำแผนผังและออกแบบพื้นที่โดยกำหนดขอบเขตพื้นที่ใช้สอย พื้นที่แนวกันชน และเส้นทาง ให้ความสำคัญเชื่อมโยงกันและสอดคล้องกับแนวทางมาตรฐานสินค้าเกษตร

1.1.4) เตรียมแปลงขนาด 1x2 เมตร จำนวน 4 แปลง และเตรียมวัสดุเพาะ ได้แก่ กิ่งไม้ ก้อนเห็ดเก่า และดิน

1.1.5) ทดลองเพาะเห็ดท้องถิ่น ได้แก่ เห็ดขาง เห็ดขอนขาว เห็ดลม และเห็ดหูหนู โดยอาศัยแนวทางของวิธีการอยู่กับธรรมชาติอย่างยั่งยืน (permaculture)

1.1.6) สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงและบันทึกผล ทุกๆ 2 สัปดาห์

1.1.7) บันทึกน้ำหนักผลผลิต ระยะเวลาและจำนวนรอบการเก็บผลผลิต

3.3 ศึกษาและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดท้องถิ่นบนพื้นที่สูงกลุ่มชมไบโอซิสที่มีศักยภาพ

1. ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการสร้างดอกเห็ดในห้องปฏิบัติการและแปลงทดสอบ (แสง อุณหภูมิ ความชื้น)

1.1) การศึกษาและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดเผาะและเห็ดหล่ม

พื้นที่ดำเนินงาน: โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงแม่ละลอง ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะเรียง (หน่วยย่อยป่าแป๋) และ พื้นที่ของสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง

1.1.1) ศึกษาชนิดและอายุของพืชอาศัย และความเข้มข้นของหัวเชื้อเห็ด ที่มีผลต่อการชักนำเชื้อเห็ดเข้าสู่รากพืชอาศัย ในแปลงทดสอบบริเวณพื้นที่ของสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง บันทึกข้อมูลรายละเอียดการเข้าสู่รากพืชอาหารภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการเจริญเติบโตของพืชอาศัย ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก และความสูง

1.1.2) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายของเห็ดท้องถิ่นและการสร้างดอกเห็ดในพื้นที่ป่าเต็งรัง บ้านแม่ละลอง โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงแม่ละลอง อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะเรียง อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน

1.1.2.1 สำรวจชนิดและปริมาณเห็ดเผาะและเห็ดท้องถิ่นอื่นๆ ในแปลงทดสอบขนาด 10 เมตร x 10 เมตร จำนวน 18 แปลง โดยแบ่งเป็นพื้นที่ป่าเต็งรังที่ถูกไฟไหม้ทุกปี จำนวน 6 แปลง และพื้นที่ป่าเต็งรังที่ไม่ถูกไฟไหม้อย่างน้อย 2 ปี จำนวน 12 แปลง และบันทึกข้อมูลปัจจัยแวดล้อม เช่น แสง ความเป็นกรดต่างในดิน ความชื้นในดิน ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ เป็นต้น โดยทำการเก็บข้อมูลทุก 2 เดือน จนครบ 1 ปี

1.1.2.2) วิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลาย โดยวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการตรวจหาลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม Phylogeny เช่น Bioedit, MEGA, PAUP เป็นต้น และ คำนวณ ค่าดัชนีความหลากหลาย (diversity index) ตามวิธีของ Shanon-Weiner ดังนี้

$$H = - \sum_{i=1}^n (P_i * \ln P_i)$$

และ

$$J = \frac{H}{\ln(n)}$$

เมื่อ

H = ดัชนีความหลากหลายของชนิด (Richness index)

J = ดัชนีความสม่ำเสมอ (Evenness index)

Pi = สัดส่วนของจำนวนสิ่งมีชีวิตชนิดที่ i ต่อจำนวนสิ่งมีชีวิตทั้งหมดในประชากร

n = จำนวนชนิดของสิ่งมีชีวิตที่พบทั้งหมดในประชากร

และวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

1.1.2.3) สรุปความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยแวดล้อมกับการเกิดของเห็ดในพื้นที่

1.2) นำร่องการทำแปลงเพาะเห็ดถอบเชิงพาณิชย์และการจัดการร่วมกับเกษตรกร

พื้นที่ดำเนินงาน: พื้นที่ของสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงแม่ละลอง และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะเรียง (หน่วยย่อยป่าแป๋)

1.2.1) ทดลองเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดโคนและกระตุ้นการสร้างดอกเห็ดในห้องปฏิบัติการ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) และสังเกตความเปลี่ยนแปลงและบันทึกผลทุกๆ 2 วัน เช่น การเจริญของเส้นใย การสร้างตุ่มดอก

1.2.2) ทดสอบการเพาะเห็ดโคนในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะเรียง อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน และโครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงแม่ละลอง อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่

1.2.2.1) เตรียมหัวเชื้อเห็ดโคนแบบสปอร์ผสมเส้นใย และแบบสปอร์เพียงอย่างเดียว เพื่อใช้สำหรับทดสอบการเพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ โดยให้ความเข้มข้น อยู่ที่ 1×10^8 สปอร์/มิลลิลิตร

1.2.2.2) เตรียมแปลงขนาด $1.5 \times 1.5 \times 0.2$ เมตร และเติมเศษใบไม้และกิ่งไม้ลงไปจำนวน 9 แปลง โดยเป็นแปลงควบคุม 3 แปลง เติมเชื้อรูปแบบสปอร์ผสมเส้นใย 3 แปลง และเติมเชื้อรูปแบบสปอร์เพียงอย่างเดียว 3 แปลง

1.2.2.3) สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงและบันทึกผลทุกๆ 1 เดือน เช่น การเข้าอาศัยและทำรังของปลวก การเจริญของเส้นใยและเกิดดอกเห็ด จำนวนดอกเห็ดและน้ำหนัก ระยะเวลาในการเก็บผลผลิต

3.4 ทดสอบการเพาะและการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากเห็ดกลุ่มผู้ย่อยสลายและเห็ดกลุ่มปรสิตร่วมกับชุมชน

1. ศึกษาวิธีการเพาะเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา และปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสำคัญของเห็ด (หัวลิงหลินจือ กระถินพิมาน)

พื้นที่ดำเนินงาน: ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง (เห็ดหลินจืด) สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) และโครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงปางมะโอ (เห็ดหัวลิง เห็ดหลินจือ และเห็ดกระถินพิมาน)

1.1) ศึกษาวิธีการเพาะเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา และปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสำคัญของเห็ด (หัวลิงหลินจือ กระถินพิมาน) ในห้องปฏิบัติการ

1.1.1) เตรียมเส้นใยเห็ดทั้ง 3 ชนิด บนอาหารวุ้นพีดีเอ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยบริสุทธิ์แต่ละชนิดที่เจริญบนอาหารวุ้นพีดีเออายุ 7 วัน นำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร modified preculture medium (Hu, et al, 2017) 100 มิลลิลิตร (g/L: glucose 35, peptone 5, yeast extract 2.5, KH_2PO_4 0.883, Vitamin B1 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 5.5) แล้วเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญและบันทึกผล

1.1.2) นำหัวเชื้อจากข้อ (1) มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร modified fermentation medium (Hu, et al, 2017) 100 มิลลิลิตร (g/L: glucose 35, peptone 5, yeast extract 2.5, KH_2PO_4 0.883, Vitamin B1 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 5.5) แล้วเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

1.1.3) เติมน้ำ Microcrystalline cellulose 1.5% และ D-Galactose 0.5% เมื่ออายุครบ 72 ชั่วโมง

1.1.4) วิธีการวัดผล

นำอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเส้นใย แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สกัดสารโดยใช้เส้นใยบดละเอียด 0.1 กรัม แล้วเติม 50% (v/v) ethanol ลงไป 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วน โดยเก็บตัวอย่างส่วนบนมาอบแห้งโดยใช้เครื่องอบแห้งสุญญากาศ และเก็บไว้สำหรับส่งวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ สารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ และสารกลุ่มไทรเทอปินอยด์

2) ศึกษาวิธีการเพาะเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา และปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสำคัญของเห็ด (หัวลิง หลินจือ กระถินพิมาน) ในสภาพโรงเรือน

2.1) เตรียมเส้นใยเห็ดทั้ง 3 ชนิด ในอาหารเพาะหัวเชื้อขยาย โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยเห็ดแต่ละชนิดที่ได้จากข้อ (2) ที่เจริญได้ 5 วัน นำไปใส่ในอาหารข้าวฟ่าง แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญและบันทึกผล

2.2) ศึกษาและคัดเลือกวิธีการเพาะเห็ดเพื่อเพิ่มปริมาณสารที่มีฤทธิ์ทางยา โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ (1 ซ้ำ = 100 ก้อนเชื้อเห็ด) โดยทดสอบการเพาะเห็ดหัวลิง หลินจือ กระถินพิมานในถุงพลาสติกร่วมกับเกษตรกร ในสูตรอาหารเพาะ 5 สูตร ประกอบด้วย สูตรอาหารขี้เลื่อยพื้นฐาน 1 สูตร และสูตรดัดแปลงจำนวน 4 สูตร (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สูตรอาหารขี้เลื่อยทดสอบ

ชนิดของส่วนผสม	ปริมาณส่วนผสม					หน่วยนับ
	สูตร1 (พื้นฐาน)	สูตร2	สูตร3	สูตร4	สูตร5	
1. ขี้เลื่อย	100	100	100	100	100	กิโลกรัม
2. รำข้าวละเอียด (กก.)	8	8	8	8	8	กิโลกรัม
3. D-Galactose (กก.)	-	-	1	0.5	0.5	กิโลกรัม
4. Microcrystalline cellulose (กก.)	-	1.5	-	-	1.5	กิโลกรัม
5. ยิปซัม (แคลเซียมซัลเฟต) (กก.)	1	1	1	1	1	กิโลกรัม
6. ดีเกลือ (แมกนีเซียมซัลเฟต) (กก.)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	กิโลกรัม
7. น้ำ (ความชื้นประมาณ 65-70%)	50-60	50-60	50-60	50-60	50-60	ลิตร

หมายเหตุ : ส่วนผสมอาจมีการปรับเพื่อให้เหมาะกับชนิดเห็ดและฤดูกาลได้

2.3) การบันทึกข้อมูล

2.3.1) อุณหภูมิ ความชื้นแสง และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศทุกวัน โดยใช้ data logger

2.3.2) การเจริญของเส้นใยทุกๆ 5 วัน นับจากวันที่ใส่เชื้อ จนกระทั่งเต็มถุง และบันทึกวันที่

เริ่มออกดอก

2.3.3) น้ำหนักผลผลิตดอกเห็ดต่อก้อน และน้ำหนักรวมของดอกเห็ด

2.4) ส่งตัวอย่างดอกเห็ดวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

3.5 การสร้างเครือข่ายการอนุรักษ์ พันธุ์ และใช้ประโยชน์เห็ดท้องถิ่น โดยกระบวนการมีส่วนร่วมของชุมชน

1. พัฒนาศูนย์การเรียนรู้และวิทยากรในชุมชนหรือหลักสูตรเพื่อเผยแพร่ความรู้เกี่ยวกับเห็ดท้องถิ่นและการจัดการ โดยอาศัยชุมชนเป็นหลักในการถ่ายทอด

พื้นที่ดำเนินงาน: (1) บ้านปางก๊าด โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงปางมะโอ จ.เชียงใหม่ (2) บ้านแม่มะลอ โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงแม่มะลอ จ.เชียงใหม่ (3) บ้านแม่พริก โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงวาวี จ.เชียงราย (4) บ้านศรีบุญเรือง โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงโป่งคำ จ.น่าน (5) บ้านแห่น โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงน้ำแบ่ง จ.น่าน (6) โรงเรียนบ้านแม่ระเมิง โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงแม่สอง จ.ตาก

1.1) ประเมินและจัดกลุ่มชุมชนตามศักยภาพของพื้นที่ ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ชุมชนที่เป็นแหล่งเรียนรู้ด้านการเพาะเลี้ยงเห็ดเชิงพาณิชย์ และ ชุมชนที่เป็นแหล่งเรียนรู้ด้านการเพาะเห็ดร่วมกับป้าธรรมชาติ

1.2) ศึกษาและพัฒนาชุดองค์ความรู้ที่เหมาะสมกับบริบทของชุมชนแต่ละกลุ่ม เช่น การเพาะเห็ดเชิงพาณิชย์ การเพาะเห็ดร่วมกับป้าธรรมชาติ และการแปรรูปเห็ด

1.3) พัฒนาศูนย์การเรียนรู้และสื่อการเรียนรู้ร่วมกับชุมชน

1.4) พัฒนาศักยภาพของวิทยากรท้องถิ่นให้สามารถถ่ายทอดความรู้สู่ชุมชน

1.5) ทดสอบกระบวนการถ่ายทอดความรู้โดยชุมชนให้กับผู้สนใจทั้งภายใน และภายนอกชุมชน

1.6) สรุป ประเมินผล และถอดบทเรียนร่วมกับชุมชน

พื้นที่ดำเนินการวิจัย/เก็บข้อมูล

1. พื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง 2 แห่ง ได้แก่

- 1) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
- 2) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะเรียง อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน

2. สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) อ.เมือง จ.เชียงใหม่

3. พื้นที่โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวง 6 แห่ง ได้แก่

- 1) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
- 2) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงแม่มะลอ อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่
- 3) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงวาวี อ.แม่สรวย จ.เชียงราย

- 4) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงโป่งคำ อ.สันติสุข จ.น่าน
- 5) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงน้ำแ่ง อ.ท่าวังผา จ.น่าน
- 6) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงแม่สลอง อ.ท่าสองยาง จ.ตาก

ระยะเวลาการดำเนินงาน

ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2562 ถึง 30 กันยายน 2563

