

อ  
597  
ส473ส  
2547

132730

บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การกำหนดประชากรและตัวอย่าง

ดำเนินการรวบรวมปลามัดจากต้นน้ำคลองปลายอน ตำบลพรหมโลก อำเภอพรหมคีรี จังหวัดนครราชสีมา ทุกเดือน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2545 ถึงเดือนธันวาคม 2546 โดยรวบรวมจากการทำประมงพื้นบ้านของสมาชิกในชุมชน บริเวณพื้นที่ที่มีความสูงตั้งแต่ 60-400 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง เป็นระยะทางของต้นน้ำคลองปลายอน 2 กิโลเมตร ซึ่งได้กำหนดจุดรวบรวมตัวอย่างปลามัดตามแหล่งที่อยู่อาศัยของปลามัดที่มีชื่อเรียกโดยชุมชน 5 สถานี คือ ห้วยตาเข ห้วยน้ำดำ ห้วยเมียบ ห้วยคลองปลายอน และห้วยเขาสมภาร ในแต่ละจุดมีการระบุพิกัด(global positioning system หรือ GPS) วิธีรวบรวมปลามัดโดยใช้ลอบขนาด กว้าง x ยาว x สูง (30 x 30 x 45 เซนติเมตร) หุ้มด้วยตาอวนในลอนขนาด 2 เซนติเมตร จำนวน 5 อัน และ อวนในลอนตาถี่จำนวน 5 อัน ภายในลอบมีเหยื่อปลามัดตามสูตรของชาวประมงในพื้นที่ คือ กะปิผสมกับปลากระป๋องในอัตราส่วนปลากระป๋องครึ่งกระป๋องต่อกะปิ 100 กรัม ต่อ ลอบ 1 อัน หุ้มด้วยอวนตาถี่ป้องกันไม่ให้ปลากินเหยื่อ ลอบถูกวางบริเวณโพรงปลามัดโดยหันปากงาไปตามกระแสน้ำแล้วใช้ใบไม้และวัชพืชพรางลอบ การวางลอบแต่ละครั้งกำหนดระยะเวลา ตั้งแต่ 18.00 น. – 21.00 น. เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงเก็บรวบรวมตัวอย่างปลามัดที่จับได้ในแต่ละครั้งมาศึกษาภายในห้องปฏิบัติการ

### การกำหนดตัวแปรที่ศึกษา

1. การวัดระยะจากจุดถึงจุดบนลำตัวปลามัดตามวิธีของ Teugels(1986) อ้างถึงใน Ng(2003, p. 393), Lim & Ng(1999, p. 158) และ Ng(1999, p. 18)
2. การนับจำนวนที่นับได้ของก้านครีบหลัง ครีบกัน ครีบท้อง ครีบหาง และ ซีกรองเหงือก(gill racker)
3. การบอกลักษณะภายนอกของปลามัดด้วยสายตา

4. ความแตกต่างระหว่างเพศและอัตราส่วนเพศ
5. น้ำหนักตัวปลาแยกเพศผู้และเพศเมีย
6. ค่าโกนาโดโซมาติกอินเด็กซ์ของปลามัดเพศผู้และเพศเมีย
7. ความตกและขนาดของไข่ปลามัดเพศเมีย
8. การศึกษาระยะการเจริญของไข่และอัตราระดับด้วยเนื้อเยื่อ
9. คุณภาพน้ำบริเวณแหล่งที่อยู่อาศัยของปลามัด

### การรวบรวมข้อมูล

1. ใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ขนาด 30 เซนติเมตร โดยวัดความยาวมาตรฐาน(standard length หรือ SL), ความยาวเหยียด(Total length หรือ TL), ความกว้างของลำตัว(maximal body depth หรือ MBD), ความยาวระหว่างปลายปากถึงจุดเริ่มต้นของครีบหลัง(predorsal length หรือ PDL), ความยาวระหว่างปลายปากถึงจุดเริ่มต้นของครีบท้อง(prepelvic length หรือ PPL), ความยาวระหว่างปากถึงจุดเริ่มต้นของครีบอก(prepectoral length หรือ PPEL), ความยาวของครีบหลัง(dorsal fin length หรือ DFL), ความยาวของครีบก้น(anal fin length หรือ AFL), ความยาวครีบท้อง(pelvic fin length หรือ PFL), ความยาวครีบอก(pectoral fin length หรือ PEFL), ความยาวก้านครีบแข็ง(pectoral spine length หรือ PESL), ระยะห่างระหว่างปลายกะโหลกท้ายทอยถึงจุดเริ่มต้นของครีบหลัง(length between occipital process and dorsal fin base หรือ OPDF), ความกว้างของคอดหาง(caudal peduncle depth หรือ CPD), ความยาวของหาง(caudal fin length หรือ CFL), ความยาวหัว(head length หรือ HL), ความกว้างหัว(head width หรือ HW), ความลึกหัว(head depth หรือ HD), ความกว้างของปลายกะโหลกท้ายทอย(occipital process width หรือ OPW), ความยาวของปลายกะโหลกท้ายทอย(occipital process length หรือ OPL), ความยาวหนวดทั้ง 4 เส้นคือ(nasal barbel length หรือ NBL, Maxillary barbel length หรือ MBL, inner mandibular barbel length หรือ IMB และ outer mandibular barbel length หรือ OMBL), ความยาวปาก(snout length หรือSNL), ระยะห่างระหว่างตา(interorbital width หรือ IOW), ขนาดตา(eye diameter หรือ ED), ความยาวของรอยนูนบนแผ่นกะโหลกหน้า(frontal fontanelle length หรือ FFL), ความกว้างของรอยนูนบนแผ่นกะโหลกหน้า(frontal fontanelle width หรือ FFW), ความยาวของรอยนูนบนแผ่นกะโหลกหลัง(occipital fontanelle length หรือ OFL), ความกว้างของรอยนูนบนแผ่นกะโหลกหลัง(occipital fontanelle width หรือ

OFW), ความยาวของแผ่นกระดูกฟันหน้า(premaxillary toothplate length หรือ PML) ความกว้างของแผ่นกระดูกฟันหน้า(premaxillary toothplate width หรือ PMW), ความยาวของแผ่นกระดูกฟันโวเมอริน(vomerine toothplate length หรือ VML) และ ความกว้างของแผ่นกระดูกฟันโวเมอริน(vomerine toothplate width หรือ VMW)

2. นับจำนวนก้านครีบท้อง, ครีบก้น, ครีบท้อง, ครีบทาง และ ซี่กรองเหงือก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิดกำลังขยายต่ำ(stereomicroscope)
3. บันทึกลักษณะจุด ลาย และสี บนลำตัว
4. บันทึกลักษณะแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่บอกได้จากลักษณะภายนอกและนับจำนวนเพศผู้กับเพศเมียที่รวบรวมได้ในแต่ละเดือน
5. ชั่งน้ำหนักปลาสดแต่ละตัวด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง บันทึกหน่วยเป็นกรัม
6. ศึกษาโกนาโดโซมาติกอินเด็กซ์ของปลาสดเพศผู้และเพศเมีย โดยการนำปลาสดที่รวบรวมได้มาผ่าเอาอวัยวะสืบพันธุ์ ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียดหน่วยเป็นกรัม นำมาหาค่าโกนาโดโซมาติกอินเด็กซ์ ตามวิธีของ Nikolsky(1963)

$$\text{โกนาโดโซมาติกอินเด็กซ์} = \frac{\text{น้ำหนักของรังไข่หรืออัณฑะ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวปลา}}$$

7. ศึกษาความตกและขนาดของไข่ปลาสดเพศเมีย โดยนำรังไข่ของปลาแต่ละตัวที่ผ่านการชั่งน้ำหนัก มานับจำนวนไข่โดยตรง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ หน่วยเป็นมิลลิเมตร
8. ศึกษาการพัฒนารังไข่และอัณฑะด้วยเนื้อเยื่อ โดยนำตัวอย่างรังไข่และถุงน้ำเชื้อที่ได้จากการผ่าตัดของท้องคองในน้ำยารักษาสภาพ(bouin' fixative solution) นาน 24-48 ชั่วโมง จึงนำไปเก็บไว้ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 % จากนั้นนำรังไข่และถุงน้ำเชื้อตัดเป็นชิ้นเล็กๆ มาผ่านกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) โดยใช้เครื่องเตรียมเนื้อเยื่อ(automatic tissue processor) โดยเริ่มจากขั้นตอนที่ผ่านแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% จนถึงแอลกอฮอล์เข้มข้น 100% จากนั้นผ่านคลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง นำตัวอย่างรังไข่และถุงน้ำเชื้อฝังในซีพัส(paraplast) แล้วนำมาตัดด้วยเครื่องมือโครโตม ให้มีความหนา 5 - 6 ไมครอน นำตัวอย่างที่ได้ไปลอยน้ำ ที่อุณหภูมิ 40 °C ใช้แผ่นสไลด์ซ็อน ตัวอย่างที่สมบูรณ์ นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ ที่ตั้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปย้อมสีฮีมาทอกซิลิน(haematoxylin) และ อีโอซิน(eosin) แล้วทำเป็นสไลด์ถาวร จึงนำมาตรวจหาไข่และเชื้อเพศผู้ระยะพัฒนาการต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามแนวทางการจำแนก

ของ ชลอ ลิมสุวรรณ, ปวีณา กิจสวัสดิ์ และ สุปราณี ชินบุตร(2530, หน้า 79) และ สุปราณี ชินบุตร, กัลยา จำเริญรัตน์ และ ชลอ ลิมสุวรรณ(2536, หน้า 86)

9. ศึกษาคุณภาพน้ำและลักษณะบริเวณแหล่งที่อยู่อาศัยของปลาหมัด โดยเก็บตัวอย่างน้ำตามจุดที่กำหนดไว้ 5 สถานี คือ ห้วยตาเซ่ ห้วยน้ำดำ ห้วยเมียบ ห้วยคลองปลายอวน และ ห้วยเขาสมภาร สถานีละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างน้ำทุก 4 เดือน ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2545 ถึงเดือนธันวาคม 2546 เวลาในการเก็บตัวอย่างน้ำ 8.00 น. ถึง 12.00 น. นำตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ดังนี้

9.1 อุณหภูมิอากาศและอุณหภูมิน้ำ โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์

9.2 ความเป็นกรดต่าง (pH) วัดโดยใช้ pH meter

9.3 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำโดยใช้วิธี Azidemodification Winkler method

9.4 แอมโมเนีย โดยใช้วิธี Indophenol Blue method

9.5 ไนไตรท์ (Nitrite) โดยใช้วิธี Colorimetric method

9.6 ไนเตรท (Nitrate) โดยใช้วิธี Cadmium Reduction method

9.7 ความเป็นด่างของน้ำ (Alkalinity) โดยใช้วิธี Titration method

9.8 ความกระด้างของน้ำ (Hardness) โดยใช้วิธี Titration method

9.9 ความเป็นกรด (Acidity) โดยใช้วิธี Titration method

9.10 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์อิสระ (Free CO<sub>2</sub>) โดยใช้วิธี Titration method

ระหว่างการศึกษาค้นคว้ามีการสังเกตลักษณะบริเวณแหล่งที่อยู่อาศัยของปลาหมัด มีการบันทึกลักษณะโพรงปลาหมัด ตรวจสอบลักษณะโพรงทั้งขนาดและรูปร่างปากโพรง ความลึกของโพรง ชนิดของดินและทรายภายในโพรง

### การวิเคราะห์ข้อมูล

1. นำข้อมูลการวัดระยะจากจุดถึงจุดบนลำตัวปลาหมัด และจำนวนที่นับได้ของก้าน ครีบหลัง, ครีบกัน, ครีบท้อง, ครีบหาง และ ซี่กรองเหงือก มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย(mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน(standard deviation หรือ SD) ค่าสูงสุด(maximum หรือ Max) และค่าต่ำสุด(minimum หรือ Min) และ นำข้อมูลการวัดจากจุดถึงจุดบริเวณลำตัว ความยาว ความกว้าง และความลึกของหัว คำนวณเทียบอัตราส่วนร้อยละกับความยาวมาตรฐาน ส่วนข้อมูลการวัดจากจุดถึงจุดบริเวณส่วนหัว คำนวณเทียบอัตราส่วนร้อยละกับความยาวหัว พร้อมนำข้อมูลและตัวอย่าง

ปลาหมัด วิเคราะห์ชนิดโดยผู้เชี่ยวชาญด้านอนุกรมวิธานของปลาน้ำจืดเอเชียเขตร้อน ดร. ปรัชญา มุสิกสินธร และอาจารย์สมหมาย เจริญกิจการ อาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การวิเคราะห์อัตราส่วนเพศของปลาหมัดที่รวบรวมได้ในแต่ละเดือน ซึ่งเป็นข้อมูลที่นำมาใช้ในการคาดคะเนความสามารถในการสืบพันธุ์ของปลาหมัด โดยตั้งสมมติฐานให้เพศผู้เท่ากับเพศเมีย หรือมีเพศผู้ต่อเพศเมียในอัตราส่วน 1:1 วิเคราะห์ทดสอบโดยใช้ไคสแควร์ (Chi-square test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งข้อมูลสถิติทดสอบค่าไคสแควร์อัตราส่วนเพศของปลาหมัดในแต่ละเดือนหาได้จากสูตรดังนี้ (สกุล สุพงษ์พันธุ์, ทศพล กระจ่างดารา และ พนิดา ชาลี, 2546, หน้า 227-240)

$$\text{ค่าไคสแควร์อัตราส่วนเพศปลาหมัดรายเดือน (Cs)} = \frac{(\text{จำนวนเพศผู้} - \text{จำนวนเพศเมีย})^2}{\text{จำนวนปลาทั้งหมดรายเดือน}}$$

$$\text{ค่าไคสแควร์อัตราส่วนเพศปลาหมัดรวมทั้งปี (Cst)} = \frac{(\text{จำนวนเพศผู้} - \text{จำนวนเพศเมีย})^2}{\text{จำนวนปลาทั้งหมดตลอดปี}}$$

3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักและความยาวของปลาหมัดเพศผู้ เพศเมีย และรวมทั้งสองเพศ โดยวิธีปรับค่าน้ำหนักและความยาว เป็นค่าลอการิทึม (natural logarithm) เพื่อนำไปวิเคราะห์สมการสหสัมพันธ์เส้นตรง (linear regression analysis) ได้สมการความสัมพันธ์ คือ

$$\log W = \log a + b \log TL \quad (\text{Pauly, 1984, p. 5})$$

เมื่อ  $W$  = น้ำหนักตัวมีหน่วยเป็นกรัม

$TL$  = ความยาวทั้งหมดมีหน่วยเป็นเซนติเมตร

$a$  และ  $b$  = ค่าคงที่

และนำสมการที่ได้มาแปลงให้อยู่ในรูปของฟังก์ชันยกกำลังดังสมการ  $W = a TL^b$  และใช้สถิติ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทดสอบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of determination หรือ  $r^2$ ) เพื่อทดสอบความเชื่อมั่นของสมการที่ได้ พร้อมคำนวณค่า t เพื่อทดสอบสมมติฐานรูปแบบการเติบโตแบบไฮโปเมตริกค่ายกกำลังของความยาวเท่ากับ 3 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $t_{0.05, n-2}$ ) (Pauly, 1984, p. 6) ดังนี้

$$t = \frac{\text{s.d.}(x)}{\text{s.d.}(y)} \cdot \frac{|b-3|}{\sqrt{1-r^2}} \cdot \sqrt{n-2}$$

$t = t\text{-test}$  จากการคำนวณ

$s.d._{(x)}$  = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ  $\log TL$

$s.d._{(y)}$  = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ  $\log W$

$b$  = ค่ายกกำลังของความยาวที่คำนวณได้

$n$  = จำนวนตัวอย่างปลาที่ใช้คำนวณ

4. นำค่าโกนาโตโซมาติกอินเด็กซ์ของปลามัดเพศผู้และเพศเมียแต่ละตัวมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของปลาแต่ละเพศในแต่ละเดือน และสร้างเส้นแนวโน้มในรอบปีเพื่อวิเคราะห์หาเดือนที่ปรากฏค่าโกนาโตโซมาติกอินเด็กซ์สูงสุด

5. การวิเคราะห์ความตกของไข่ปลามัดเพศเมีย โดยวิธีหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักและความยาวต่อความตกไข่ (length-weight & fecundity relationship) โดยวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (method of least square) ตามวิธีการของ Siddiqui, Chatterjee & Khan (1976, pp. 181-199) ซึ่งอธิบายความสัมพันธ์ในรูปของสมการยกกำลังคือ

$$F = aL^b \quad \text{หรือ} \quad \log F = \log a + b \log L$$

$$F = aW^b \quad \text{หรือ} \quad \log F = \log a + b \log W$$

เมื่อ  $F =$  จำนวนไข่

$W =$  น้ำหนักตัว หน่วยเป็นกรัม

$L =$  ความยาวทั้งหมด หน่วยเป็นเซนติเมตร

$a$  และ  $b =$  ค่าคงที่

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความตกไข่กับน้ำหนักและความยาวปลา โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์เป็นตัวกำหนด และทดสอบความเชื่อมั่นของสมการที่ได้โดยสถิติ  $t\text{-test}$  ที่คำนวณได้กับค่าในตาราง  $t$  ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

6. การวิเคราะห์ลักษณะทางเนื้อเยื่อรังไข่และอันตะ โดยการวิเคราะห์ระยะการเจริญของไข่ภายในรังไข่ และสเปิร์ม เพื่ออธิบายความสัมพันธ์กับการจำแนกพัฒนาการอวัยวะสืบพันธุ์ตามสภาพการมองเห็นด้วยตา โดยวิธีของ Kesteven (1960, pp. 44-56)

7. ค่าคุณภาพน้ำและลักษณะบริเวณแหล่งที่อยู่อาศัยของปลามัด นำมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยในรอบเดือน และค่าเฉลี่ยตลอดปี เพื่อเปรียบเทียบเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ (ไมตรี ดวงสวัสดิ์, 2530, หน้า 15)