บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์

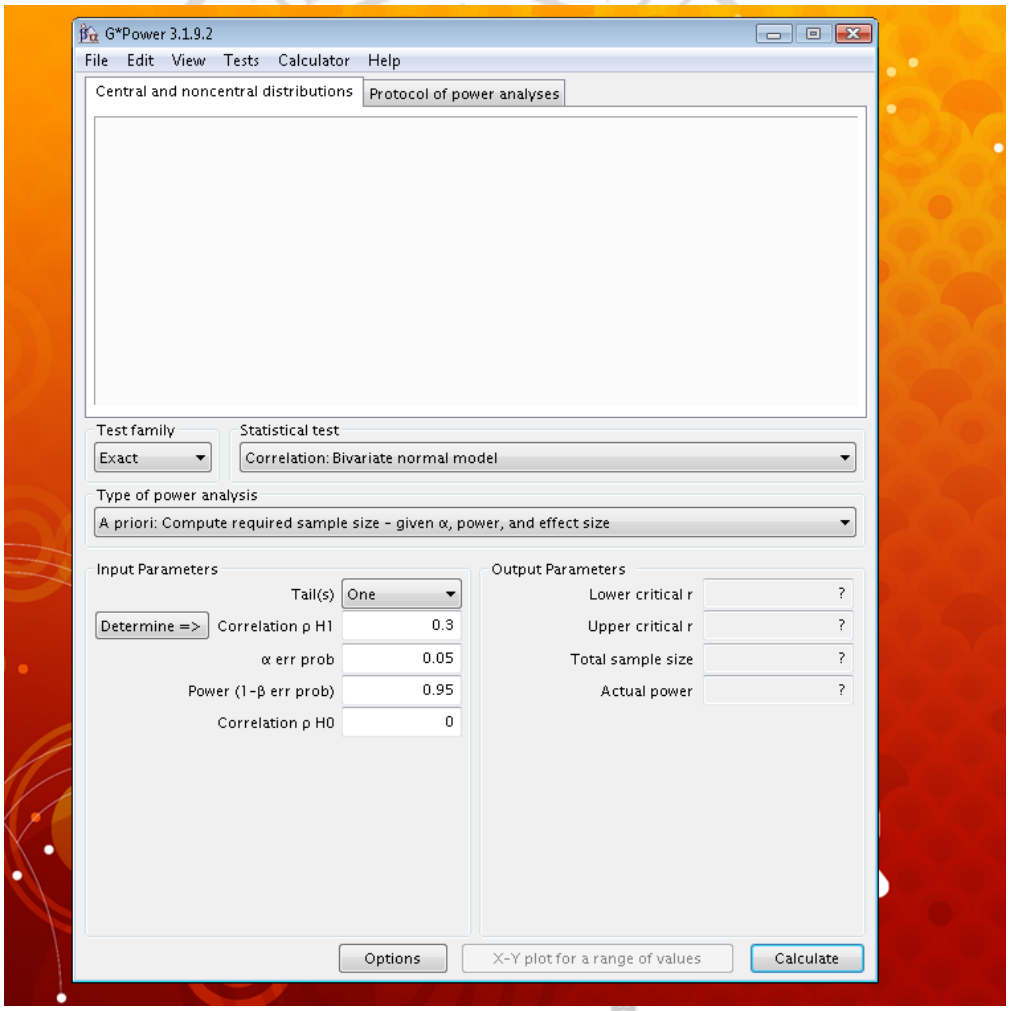
1.1 โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับคำนวณขนาดตัวอย่าง G*power รุ่น 3.1.9.2
1.2 ชุดเครื่องมือผ่าตัด
1.3 อุปกรณ์สำหรับวัดขนาดความยาวลำตัวปลา
1.4 เครื่องชั่งน้ำหนักปลาแบบดิจิทัล
1.5 หลอดพลาสติกเก็บตัวอย่างกระดูกหูปลา
1.6 กระดาษบันทึกข้อมูล (Data-sheet)
1.7 เรซิ่น
1.8 อุปกรณ์สำหรับใช้หล่อกระดูกหูปลาลงเรซิ่น
1.9 เครื่องตัดกระดูกหู low speed wheel saw ยี่ห้อ South bay technology รุ่น 650
1.10 กระดาษทรายที่มีความละเอียดสูง (เบอร์ 2000 ขึ้นไป)
1.11 กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
1.12 โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ภาพ imageJ
1.13 โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับการวิเคราะห์พลวัตประชากรสัตว์น้ำ FISAT II
1.14 วัสดุสำนักงาน
1.15 วัสดุคอมพิวเตอร์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2. วิธีการ

2.1 การหาขนาดตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างปลาลัง

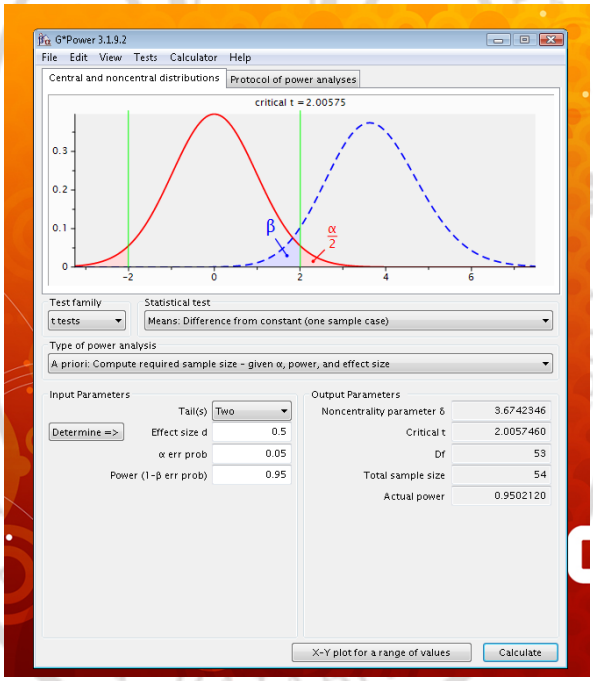
ดำเนินการรวบรวมตัวอย่างปลาลัง ที่จับได้โดยชาวประมงในพื้นที่แหล่งประมงชายฝั่งจังหวัดตราด (แบบคละขนาด) ตัวอย่างปลาลังที่ดำเนินการรวบรวมในครั้งนี้จะใช้จำนวนตัวอย่างตามหลักการคำนวณเพื่อหาขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม G*Power รุ่น 3.1.9.2 (นงลักษณ์, 2555) (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ลักษณะหน้าจอแสดงผลของโปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับการคำนวนขนาดตัวอย่าง G*power รุ่น 3.1.9.2

จากการคำนวณเพื่อหาขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม G*Power รุ่น 3.1.9.2 (นงลักษณ์, 2555) โดยกำหนด ค่าขนาดอิทธิพล (effect size) ให้ผันแปรตั้งแต่ขนาดปานกลาง (0.5) และขนาดใหญ่ (0.8) (Cohen, 1977) (เนื่องจากคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการทำ pilot study และนำค่าเฉลี่ยลำตัวปลามาคำนวณขนาดอิทธิพลแล้วพบว่าค่าขนาดอิทธิพลอยู่ในระหว่างช่วงดังกล่าวคือ

0.56) และจากนั้นได้กำหนดความน่าจะเป็นของความคลาดเคลื่อนในการทดสอบประเภทที่หนึ่ง (α) เท่ากับ 0.05 อำนาจการทดสอบ (Power, 1-β, β คือความน่าจะเป็นของความคลาดเคลื่อนในการทดสอบประเภทที่สอง) เท่ากับ 0.95 ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมของปลาลังในภาคตะวันออกได้แก่ 23-54 ตัวอย่าง ขึ้นอยู่กับขนาดอิทธิพล (effect size) (ภาพที่ 14, ตารางที่ 1) และเพื่อป้องกันการสูญเสียตัวอย่างระหว่างเตรียมตัวอย่างกระดูกหูเพื่อใช้ตรวจสอบอายุปลาลัง คณะผู้วิจัยจึงตัดสินใจดำเนินการรวบรวมตัวอย่างปลาลังจากชาวประมงพื้นบ้านซึ่งทำการประมงอวนติดตาในพื้นที่ชายฝั่งจังหวัดตราดตามจุดเก็บตัวอย่างภาพที่ 15 จำนวน 170 ตัวอย่าง และเมื่อได้ตัวอย่างมาแล้วทำการชั่งน้ำหนัก (หน่วยเป็นกรัม) วัดความยาวรายตัว (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) และจำแนกเพศ (ภาพที่ 16) ซึ่งสามารถแสดงรายละเอียดของข้อมูลความยาว น้ำหนัก และเพศ ของปลาลังได้ดังตารางที่ 2



ภาพที่ 14 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมโดยโปรแกรมสำเร็จรูป G*Power รุ่น 3.1.9.2 เมื่อกำหนดขนาดอิทธิพล (effect size) เท่ากับ 0.5

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่างที่คำนวณได้จากโปรแกรม G*Power รุ่น 3.1.9.2

ค่าขนาดอิทธิพล (effect size)	จำนวนตัวอย่าง
ขนาดปานกลาง (0.5)	54
ขนาดใหญ่ (0.8)	23

ภาพที่ 15 จุดเก็บตัวอย่างปลาลังในพื้นที่แหล่งประมงชายฝั่งจังหวัดตราด (1=แหลมงอบ, 2=บ้านไม้รูด, 3= บ้านตาหนึก, 4= เกาะกูด)

ที่มา: ดัดแปลงจาก google map (2016)

เมื่อเก็บข้อมูลจากตัวอย่างโดยการชั่งน้ำหนัก (หน่วยเป็นกรัม) และวัดความยาวรายตัว (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) จำแนกเพศแล้ว (ภาพที่ 16) หลังจากนั้นดำเนินการรวบรวมกระดูกหูของปลาลังแต่ละตัว (ภาพที่ 16) เก็บใส่หลอดพลาสติก (Plastic centrifuge tubes) (ภาพที่ 17, 18) เพื่อนำไปดำเนินการในห้องปฏิบัติการต่อไป

ตารางที่ 2 รายละเอียดข้อมูลตัวอย่างปลาลังที่เก็บตัวอย่างได้จากชายฝั่งจังหวัดตราด

จุดเก็บตัวอย่าง	จำนวนตัว	ความยาวลำตัวเฉลี่ย (มม.) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	น้ำหนักเฉลี่ย (ก.) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1. แหลมงอบ	13	192.54±6.97	74.23±7.99
2. บ้านไม้รูด	12	203.92±10.68	83.92±12.14
3. บ้านตาหนึก	32	189.06±6.68	71.28±6.91
4. เกาะกูด	113	208.33±13.29	97.99±15.55

รวมทั้งหมด	**170**	**203.18±14.15**	**90.15±17.72**

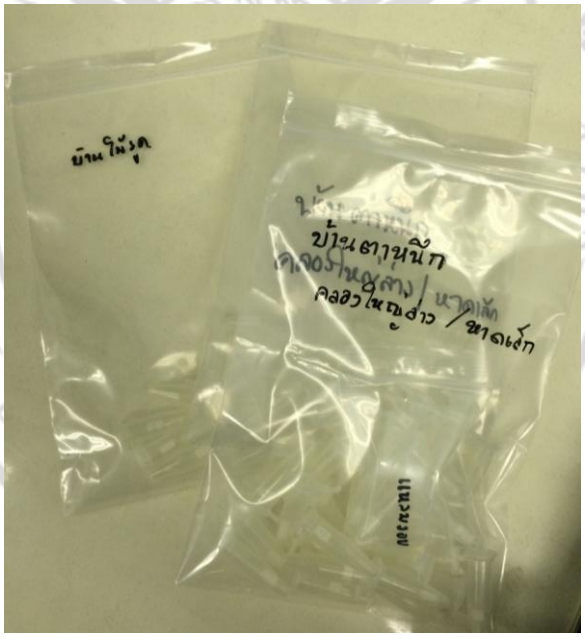
ภาพที่ 16 การชั่งน้ำหนัก วัดความยาว จำแนกเพศ และเก็บกระดูกหูปลาลัง

2.2 การเก็บและเตรียมตัวอย่างกระดูกหูเพื่อการวิเคราะห์อายุ

ดำเนินการเก็บตัวอย่างกระดูกหูจากกะโหลกปลาลังแต่ละตัว (ภาพที่ 16) จากนั้นเตรียมตัวอย่างกระดูกหูโดยการล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง และเก็บรักษาไว้ในหลอดพลาสติก (Centrifuge tubes) (ภาพที่ 17) เพื่อที่จะได้ทำการฝังกระดูกหูลงในเรซินและตัดกระดูกหูด้วยเครื่องตัดความเร็วต่ำ (Low speed diamond wheel saw, South Bay Technology, Inc., model 650) ต่อไป โดยตัวอย่างที่ทำการตัดแล้วจะนำมาวางลงและติดปะบนแผ่นสไลด์ และจะดำเนินการขัดแผ่นกระดูกหูที่ตัดแล้วจนแผ่นกระดูกหูมีความหนาอยู่ในระดับประมาณ 250 - 450 ไมครอน เพื่อที่จะดำเนินการเก็บข้อมูลอายุจากกระดูกหูต่อไป

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาพที่ 17 กระดูกหูปลาลังที่เก็บไว้ในหลอดพลาสติก

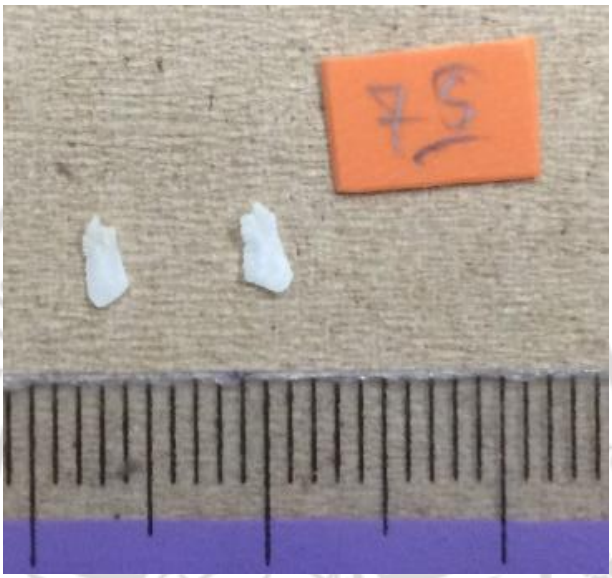


ภาพที่ 18 การเก็บตัวอย่างกระดูกหูปลาลังที่รวมรวมจากตัวอย่างปลาในแหล่งประมงชายฝั่งตราด

2.3 การเตรียมตัวอย่างกระดูกหู

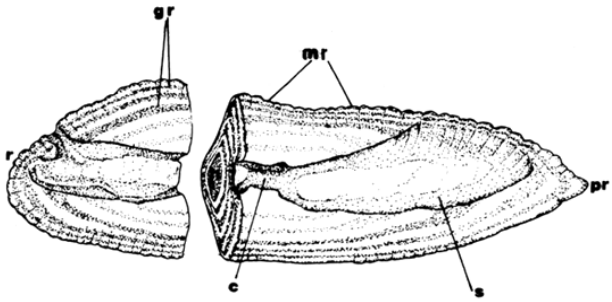
เตรียมตัวอย่างกระดูกหูโดยการล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง (ภาพที่ 19) แล้วทำการฝังกระดูกหูลงในเรซิน (ภาพที่ 20) หลังจากนั้นตัดกระดูกหูในแนวขวางด้วยเครื่องตัดความเร็วต่ำ (Low speed diamond wheel saw, South Bay Technology, Inc., model 650) (ภาพที่ 21 และ

22) ตัวอย่างที่ตัดแล้วทำการวางลงและติดปะบนแผ่นสไลด์ (ภาพที่ 23) ขัดแผ่นกระดูกหูที่ตัดแล้วจนแผ่นกระดูกหูมีความหนาอยู่ในระดับประมาณ 250 - 450 ไมครอน

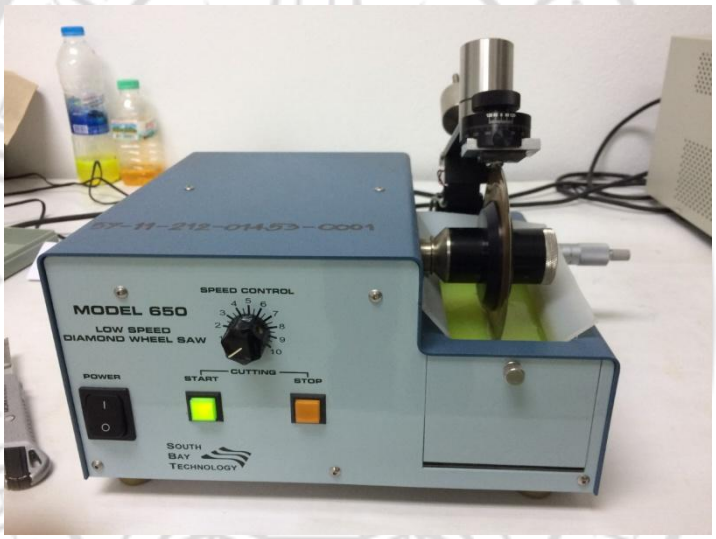


ภาพที่ 19 กระดูกหูปลาลังที่ทำความสะอาดแล้ว

ภาพที่ 20 การฝังกระดูกหูลงในเรซิ่น



ภาพที่ 21 การตัดกระดูกหูในแนวขวาง (Transverse section)
ที่มา: Morales-Nin (1992: 1-52)

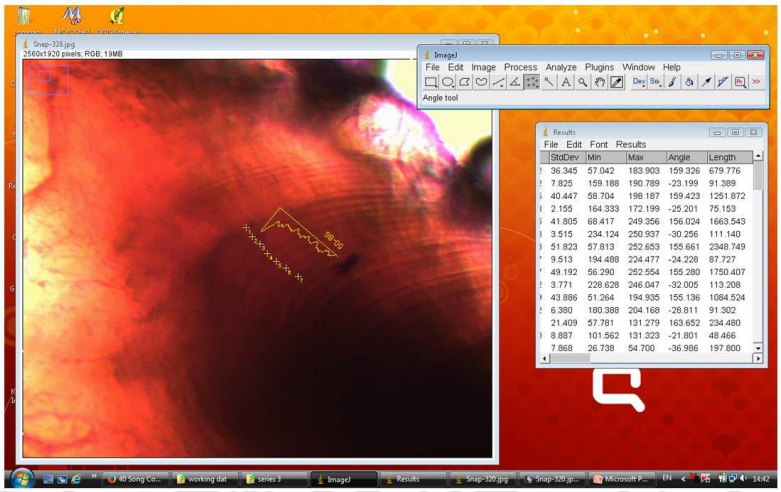


ภาพที่ 22 การตัดกระดูกหูในแนวขวาง (Transverse section) โดยใช้เครื่องตัดความเร็วต่ำ

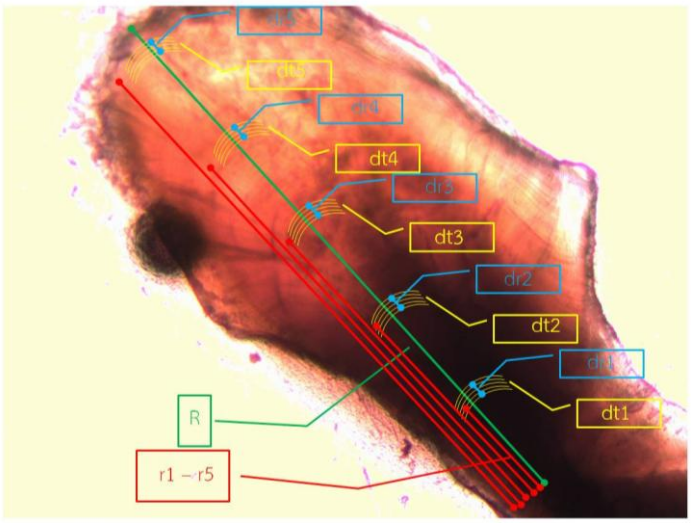
ภาพที่ 23 ตัวอย่างที่ตัดแล้วทำการวางลงและติดปะบนแผ่นสไลด์

2.4 การเก็บข้อมูลอายุ

ชิ้นกระดูกหูดังกล่าว นำมาถ่ายรูปกระดูกหูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบกำลังขยาย 10 เท่า แล้วอ่านอายุ (ค่าวงวัน) ในกระดูกหูด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (โปรแกรม ImageJ) (Rasband, 1997) (ภาพที่ 24) โดยคำนวณจำนวนวงวันทั้งหมดตามวิธี Ageing based on increment thickness (Ralston and Miyamoto, 1981, 1983; Ralston, 1976, 1985) (ภาพที่ 25) ข้อมูลค่าวงวันดังกล่าว เปลี่ยนหน่วยให้เป็นสัดส่วนของปี เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์การเติบโต ค่าพารามิเตอร์การตาย และระดับการทำประมงที่เหมาะสมของปลาลังในพื้นที่ประมงในพื้นที่แหล่งประมงชายฝั่งจังหวัดตราดต่อไป



ภาพที่ 24 การนับวงวันโดยโปรแกรม ImageJ



ภาพที่ 25 การคำนวณหาอายุของปลาโดยวิธี The ageing method based on increment thickness

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลอายุของปลาในแต่ละขนาดความยาวนำมาประมาณค่าพารามิเตอร์การเติบโตต่าง ๆ (ได้แก่ ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญเติบโต และความยาวสูงสุดของปลา) โดยใช้วิธีการ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบไม่เป็นเส้นตรงโดยเมนู Analysis of length-at-age data ในโปรแกรม Fisat II หลังจากนั้นดำเนินการสร้างสมการการเติบโตโดยใช้แบบจำลองการเติบโตของ von Bertalanffy (Bertalanffy, 1938) ซึ่งเป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายการเจริญเติบโตของปลาในรูปฟังก์ชันของอายุ โดยมีสมมติฐานว่ากลุ่มประชากรปลาที่ศึกษามีการเจริญเติบโตแบบไอโซเมตริก ซึ่งจะได้แบบจำลองการเติบโตในรูปความยาวและอายุ (สมการที่ 1) (Bertalanffy, 1938)

$$L_t = L_\infty [1 - e^{-k(t-t_0)}] \text{ ---------- (1)}$$

เมื่อ L_t คือความยาวของปลาที่อายุใดๆ, L_∞ คือความยาวอนันต์ (กล่าวคือ ความยาวมากที่สุดของปลาส่วนใหญ่ในสต๊อคตามทฤษฎี), K คือค่าสัมประสิทธิ์การเติบโต, t คือค่าอายุใดๆ และ t_0 คือค่าอายุสมมติเมื่อความยาวตัวปลาเป็นศูนย์

จากนั้น ประเมินอัตราการตายรวม (Z) ของปลาลังใช้วิธีการของ Hoenig (1982) (สมการที่ 2) ประเมินอัตราการตายโดยธรรมชาติ (M) ของปลาลังตามวิธีการของ Pauly (1980) (สมการที่ 3) จากนั้นประเมินอัตราการตายจากการทำประมง (F) ด้วยการลบอัตราการตายรวมด้วยอัตราการตายโดยธรรมชาติ

$$Z = 1/(c_1*(t_{max} - t_c)) \text{ ---------- (2)}$$

เมื่อ Z = อัตราการตายรวม t_{max} = อายุสูงสุดของสัตว์น้ำ t_c = อายุแรกจับของสัตว์น้ำ c_1 = ค่าคำนวณจากฟังก์ชั่นของขนาดตัวอย่าง

$$\ln(M) = -0.0152 - 0.279\ln(L_\infty) + 0.6543\ln(K) + 0.463\ln(T) \text{ ---------- (3)}$$

เมื่อ M คืออัตราการตายโดยธรรมชาติ, L_∞ คือความยาวอนันต์ (กล่าวคือ ความยาวมากที่สุดของปลาส่วนใหญ่ในสต๊อคตามทฤษฎี), K คือค่าสัมประสิทธิ์การเติบโต, T คือค่าอุณหภูมิน้ำซึ่งปลาอาศัยอยู่

หลังจากนั้นศึกษาขนาด และปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการทำการประมงปลาลัง ในพื้นที่แหล่งประมงชายฝั่งตราด โดยนำค่าพารามิเตอร์การเติบโต และการตายเป็นข้อมูลนำเข้า เพื่อประเมินผลจับต่อหน่วยทดแทนที่ และมวลชีวภาพต่อหน่วยทดแทนที่ โดยใช้แบบจำลองของ Beverton and Holt (1957) การตรวจสอบความน่าเชื่อถือของแบบจำลองในการประเมินค่าในขั้นตอนต่าง ๆ จะดำเนินการเปรียบเทียบผลการศึกษาที่ได้ครั้งนี้ กับผลการศึกษาในปลาลังในพื้นที่อื่น ๆ ทั้งจากเอกสารวิชาการ วารสาร และฐานข้อมูลที่มีมาตรฐานต่าง ๆ โดยการดำเนินการต่าง ๆ ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับการประเมินสภาวะทรัพยากรที่ชื่อว่า FiSAT II (Gayanilo *et al*. 2005)