บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำต่อการเกิดโรคของปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในแม่น้ำชี เขตจังหวัดมหาสารคาม เป็นการศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดโรคในปลานิลซึ่งการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ การศึกษาคุณภาพน้ำในพื้นที่เลี้ยงปลานิล และศึกษาโรคที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงปลานิล เพื่อหาความสัมพันธ์โดยการศึกษาดำเนินการวิจัย ดังนี้

การสำรวจพื้นที่ดำเนินงานวิจัย

ออกสำรวจดูลักษณะสภาพพื้นที่การเลี้ยงปลานิลในกระชังในแม่น้ำชี เขตจังหวัดมหาสารคาม และติดต่อสอบถามข้อมูลทั่วไป เช่น ปัญหาการเลี้ยง การเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ และโรคที่พบโดยทั่วไป เป็นต้น เลือกเกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลในกระชัง เข้าร่วมการทำวิจัยจำนวน 8 ราย เมื่อได้รับการตอบรับจากเกษตรกร ดำเนินการเข้าสำรวจพื้นที่การเลี้ยงปลานิลในแต่ละจุด เพื่อระบุจุดเก็บตัวอย่างให้ชัดเจน (ภาพที่ 10) และ (ตารางที่ 5)

1. หลักเกณฑ์ในการกำหนดจุดเก็บตัวอย่าง

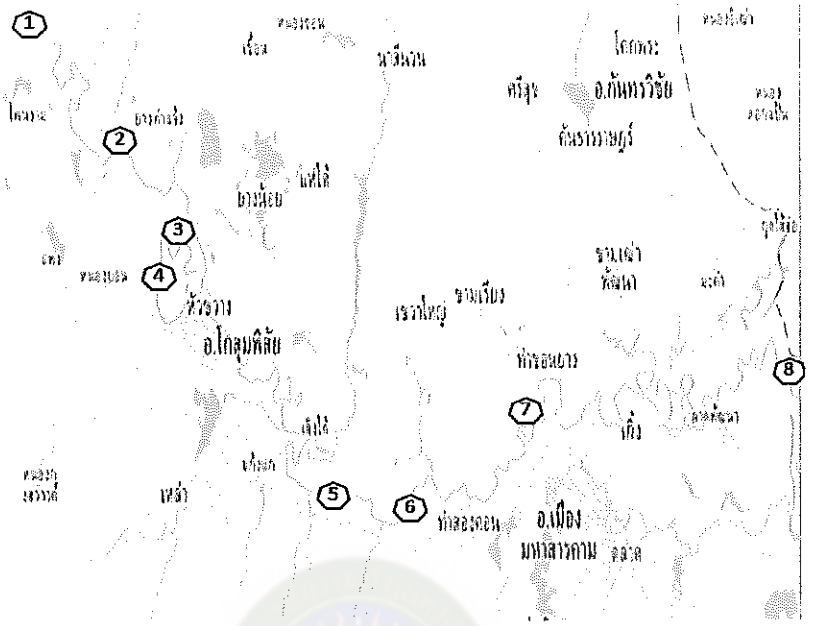
1.1 จุดเก็บตัวอย่างต้องเป็นฟาร์มปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในแม่น้ำชี

1.2 ลักษณะเส้นทางคมนาคมของจุดเก็บตัวอย่างต้องมีความเหมาะสม เอื้อต่อการทำวิจัย และการเข้าถึงพื้นที่ทำงานวิจัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2. สถานที่เก็บตัวอย่างงานวิจัยสามารถแสดงข้อมูล ได้ดังนี้

จุดที่ 1 ฟาร์มปลานิลบ้านผือ ต. ยางท่าแจ้ง อ. โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม
จุดที่ 2 ฟาร์มปลานิลบ้านท่าเดื่อ ต. หัวขวาง อ. โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม
จุดที่ 3 ฟาร์มปลานิลบ้านศรีสุข ต. หัวขวาง อ. โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม
จุดที่ 4 ฟาร์มปลานิลบ้านศรีสุข ต. หัวขวาง อ. โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม
จุดที่ 5 ฟาร์มปลานิลบ้านหนองโนน ต. เขวาใหญ่ อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม
จุดที่ 6 ฟาร์มปลานิลบ้านขี้เหล็ก ต. เขวาใหญ่ อ. กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม
จุดที่ 7 ฟาร์มปลานิลบ้านดินดำ ต. เกิ้ง อ. เมือง จ.มหาสารคาม
จุดที่ 8 ฟาร์มปลานิลบ้านม่วง ต.ท่าม่วง อ. เมือง จ.มหาสารคาม



ภาพที่ 10 แผนที่จุดเก็บตัวอย่างงานวิจัย

ที่มา: (Google Map, 2014)

ตารางที่ 5 จุดเก็บตัวอย่างงานวิจัยด้านพิกัดทางภูมิศาสตร์

จุด	พิกัดทางภูมิศาสตร์	
	Latitude	**Longitude**
1	16.3480103	102.9665522
2	16.30383947	103.0218057
3	16.27764116	103.0625753
4	16.26899	103.0678109
5	16.19556344	103.1583623
6	16.19263735	103.1872873
7	16.22354458	103.2678823
8	16.23409314	103.4298877

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

แผนการเก็บตัวอย่างงานวิจัย

ดำเนินการวิจัยบริเวณพื้นที่การเลี้ยงปลานิลในกระชังในแม่น้ำชี เขตจังหวัดมหาสารคาม รวมทั้งหมดจำนวน 8 ราย ระหว่างเดือนมิถุนายน 2552 ไปจนถึงพฤษภาคม 2553 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 สัปดาห์ ช่วงเวลา 06.00-18.00 น. เป็นเวลา 12 เดือน รวม 24 ครั้ง ตัวอย่างที่ดำเนินศึกษามี ดังนี้

1. ตัวอย่างน้ำ เพื่อศึกษาคุณภาพน้ำในแม่น้ำชี
2. ตัวอย่างปลานิลที่มีอาการป่วย เพื่อศึกษาด้านโรคที่เกิดขึ้นในระหว่างเลี้ยง

วิธีการวิจัย

การทดลองเป็นการตรวจคุณภาพน้ำชีบริเวณที่มีการเลี้ยงปลานิลในกระชังในแม่น้ำชี และตรวจโรคที่เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงปลานิลในกระชังในแม่น้ำชี เพื่อนำข้อมูลมาหาความสำพันธ์ โดยทำการหาความสัมพันธ์ของ 2 ปัจจัยโดยมีวิธีการทดลอง ดังนี้

1. การตรวจคุณภาพน้ำบริเวณฟาร์มปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในแม่น้ำชี

1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ ดำเนินการเก็บตัวอย่างน้ำ ตามจุดที่กำหนดไว้ บริเวณฟาร์มปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในแม่น้ำชี เขตจังหวัดมหาสารคาม ดำเนินการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ โดยการเก็บตัวอย่างน้ำแบบจ้วง (Grab Sample) ณ บริเวณในกระชังที่เลี้ยงปลานิล ความลึกประมาณ 10 เซนติเมตร โดยใช้ขวดพลาสติกขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการวัดคุณภาพน้ำ ณ จุดเก็บตัวอย่างได้แก่ อุณหภูมิ ความโปร่งแสง และนำตัวอย่างน้ำกลับมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเป็นกรด-ด่าง สภาพด่าง แอมโมเนีย ไนเตรท ความกระด้าง และสังกะสี และบันทึกข้อมูล

1.2 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1.2.1 การตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม โดยวิเคราะห์ดัชนีคุณภาพน้ำทางเคมีตามวิธี Standard Method of the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WPCF, 1998) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำพารามิเตอร์ต่างๆ

Water Quality Parameter	Sample analysis method	
	Field[1]	Laboratory[2]
1. Temperature (°C)	Thermometer	Thermometer
2. Transparency (cm)	Secchi disc	Secchi disc
3. Dissolved Oxygen (mg/l)	-	DO meter
4. pH	-	pH meter
5. Hardness (mg/l) $CaCO_3$	-	APHA, AWWA and WPCF (1998)
6. Alkalinity (mg/l) $CaCO_3$	-	APHA, AWWA and WPCF (1998)
7. Ammonia (NH_3) - mg/l	-	APHA, AWWA and WPCF (1998)
8. Nitrate (NO_3^-)- mg/l	-	APHA, AWWA and WPCF (1998)
9. Zinc (Zn) - mg/l	-	APHA, AWWA and WPCF (1998)

หมายเหตุ Field[1] คือ การตรวจคุณภาพน้ำในสถานที่จริง,
Laboratory[2] คือ การตรวจในห้องปฏิบัติการ

1.2.1 การวิเคราะห์ผล การศึกษาคุณภาพน้ำทางด้านกายภาพ และเคมี

นำผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ มาทำการเปรียบเทียบกับ คุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงประมง (มั่นสิน ยะราไสย์, 2540 ; ไมตรี ดวงสวัสดิ์, 2526)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2. การศึกษาโรคปลานิลกระชังที่เลี้ยงในแม่น้ำชี เขตจังหวัดมหาสารคาม

การเก็บตัวอย่างปลานิลที่มีอาการป่วย ยังฟาร์มปลานิลกระชังที่เลี้ยงในแม่น้ำชีเขตจังหวัดมหาสารคาม ซึ่งเข้าร่วมงานวิจัยจำนวน 8 ฟาร์ม เก็บตัวอย่างปลานิลทุก ๆ 2 สัปดาห์ จุดละ 10 ตัว เป็นเวลา 1 ปี รวม 24 ครั้ง นำปลานิลที่มีอาการป่วยมาทำการตรวจวินิจฉัยอาการหาสาเหตุการเกิดโรค ได้แก่ ปรสิต แบคทีเรีย และเชื้อรา โดยการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ดังนี้

2.1 การศึกษาโรคปรสิตในปลานิล

การศึกษาโรคปรสิต โดยเฉพาะโรคปรสิตภายนอก ควรดำเนินการยังภาคสนาม เพราะหากมีการขนส่งปลาอาจทำให้ปรสิตหลุดจากตัวปลาได้ โดยการตรวจปรสิตภายนอก ดำเนินการตรวจปรสิตภายนอกโดยใช้แผ่นสไลด์ (Cover Slip) ขูดตามลำตัว จากนั้น

ทำการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจหาชนิดของปรสิต หากต้องการตรวจแยกชนิดโดยละเอียดควรนำสไลด์ไปทำให้แห้งก่อน แล้วจึงย้อมสีต่าง ๆ เช่น Haematoxylin, Carmine, lugol Solution, Norland' s Solution, Iodine-eosin และ Klein's Silver Impregnation ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปรสิตที่ต้องการแยกชนิด การจำแนกชนิดปรสิตทำโดยการศึกษาโครงสร้างและรูปร่างของเซลล์ (Morphologically) ของเชื้อแต่ละชนิด โดยใช้เอกสารของ ประไพศิริ (2546) ; และ Woo (2006)

2.2 การศึกษาโรคแบคทีเรียในปลานิล

การแยกเชื้อแบคทีเรีย สามารถแยกได้จากแผล เหงือก หรืออวัยวะภายในของปลา เช่น ตับ ไต หรือม้าม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) สำหรับแยกเชื้อทั่วไป Brain Heart Infusion Agar (BHI) เหมาะสำหรับแยกเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการปริมาณสารอาหารสูง Ogawa Media สำหรับแยกเชื้อ *Mycobacterium* และ Cytophaga Agar สำหรับแยกเชื้อ *Flavobactacterium* การแยกเชื้อแบคทีเรียจากอวัยวะภายใน ทำได้โดยการผ่าตัดเปิดช่องท้องด้วยวิธีปลอดเชื้อ โดยใช้อุปกรณ์เครื่องมือผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วสังเกตลักษณะอาการของอวัยวะภายใน เช่น ขนาด สี อาการต่าง ๆ เช่น อาการตกเลือด หรือมีจุดขาวที่เกิดขึ้นบนอวัยวะภายใน หรือการสร้างของเหลว (Acites) ในลำไส้ การเพิ่มขนาดของม้าม (Spleen) หรือ ไต (Kidney) และการตกเลือดบริเวณตับ สิ่งเหล่านี้จะเป็นตัวบ่งชี้ของการติดเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ส่วนการเกิดจุดหรือแผ่นสีขาว (White Patch) ที่บริเวณตับหรือไตอาจเกิดจากเชื้อ *Edwardsiella* หรือ *Mycobacterium*

จากนั้นเมื่อทำการแยกเชื้อแล้ว จะต้องทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Pure culture) ก่อนเพื่อหาชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเกิดโรค โดยจากนั้นนำมาจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี (Austin and Austin, 1999 และ Buller, 2004) และใช้ API 20 NE และAPI 20 Strep (BIO Merieux) ตามคู่มือจากบริษัทผู้ผลิต เป็นต้น

2.3 การศึกษาเชื้อราในปลานิล

นำตัวอย่างปลานิล และน้ำมาทำการแยกเชื้อโดยนำไข่ปลา และชิ้นเนื้อบริเวณที่ติดเชื้อรามาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GY agar (Glucose – Yeast Extract Agar) ประกอบด้วย Glucose 1% (APS Ajex Tinechem), Yeast Extract 0.25% (Difco) และ Agar 1.5% ตามสูตรของ Hatai and Egusa (1979) และใช้ยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน (Sigma) กับสเตรปโตมัยซิน (Sigma) ความเข้มข้น 250 mg/l ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งการเจริญของ

แบคทีเรียบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C ส่วนการแยกเชื้อราจากน้ำ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำมาใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อแล้วใส่เมล็ด Hemp ลงไปล่อให้ Zoospores มาเกาะพร้อมทั้งเติมยาปฏิชีวนะ ลงไปเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย เมื่อโคโลนีของเชื้อราเจริญขึ้นมา จึงทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Purification) ด้วยวิธี Single Spore Culture ตามวิธีของ Seymour (1970) แล้วจึงทำการเก็บรักษาเชื้อต่อไป โดยการต่อเชื้อ (Subculture) ทุก ๆ 1 เดือนขึ้นกับชนิดของเชื้อรา เพื่อเก็บไว้ทำการจำแนกชนิดของเชื้อรา จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics) ได้แก่ ลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น การสร้าง Zoospores และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เช่น เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Antheridia) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Oogonia และ Oospore) เป็นต้น แล้วทำการจำแนกชนิดตามวิธีของ Seymour (1970), Scott (1961) และ Johnson (1956)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำต่อการเกิดโรคของปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในแม่น้ำชี

การวิเคราะห์ทางสถิติหาความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำต่อการเกิดโรคปลานิลกระชังที่เลี้ยงในแม่น้ำชีเขตจังหวัดมหาสารคาม วิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของชุดข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2007 นำชุดข้อมูลเข้าสู่การหาค่า Correlation เมื่อได้ค่า (r) นำค่าที่ได้ไปหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์โดยใช้วิธีของ เพียร์สัน (Pearson, 2007) (Pearson Product Moment Correlation) (r)

สมการของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ คือ

$$\text{Correlation (X,Y)}\ r=\frac{n\sum XY-\sum X\sum Y}{\sqrt{\left[n\sum X^2-\left(\sum X\right)^2\right]\left[n\sum Y^2-\left(\sum Y\right)^2\right]}}$$

หมายเหตุ x และ y เป็นค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง Average (Array1) และ Average (Aarray2) เมื่อได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของชุดข้อมูล นำค่าที่ได้ไปตรวจในช่วงระดับความสัมพันธ์ของชุดข้อมูล

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY