

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง

1. ถุงพลาสติก
2. กระดาษจดบันทึก ปากกา

สารเคมี

1. กลูโคส (Glucose)
2. ยีสต์สกัด (Yeast Extract)
3. เปปโตน (Peptone)
4. ฐัน (Agar)
5. ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic)
 - 5.1 เพนนิซิลลิน จี (Penicillin G)
 - 5.2 สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin Sulfate)

อุปกรณ์

1. ตู้เจ็บบี (Laminar Flow)
2. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
3. เครื่องเขย่า (Incubator Shaker)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
5. แท่งแม่เหล็ก (Magnetic Bar)
6. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
7. งานเพาะเชื้อ ปีกเกอร์ ปิเปต เข็มเจ็บบี ขวดรูปชมพู่

แหล่งตัวอย่าง และการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบไม้ที่ร่วงหล่นบริเวณป่าชายเลน บ้านเปร็ดใน จังหวัดตราด ในวันที่ 1 เมษายน 2548 เก็บตัวอย่างใบไม้ทั้งหมด 11 ชนิด โดยสุ่มเก็บใบไม้สีเหลืองน้ำตาลที่ร่วงหล่นบริเวณโคนต้นชนิดละ 15 ใบ ยกเว้นปรังทะเล หงอนไก่ทะเลและปอทะเลที่เก็บตัวอย่าง 3, 10 และ

7 ใบ เนื่องจากพบใบไม้ที่ร่วงหล่นแล้วมีสีเหลืองน้ำตาลน้อย

วิธีการทดลอง

1. การคัดแยกจุลินทรีย์ทะเลกลุ่มทรอสโทคิทริดส์จากใบไม้ป่าชายเลน

1.1 นำตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนแต่ละใบล้างด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ความเต็ม 15 ส่วนในพันส่วน

1.2 ใบไม้แต่ละใบตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 9 ชิ้น แล้วนำไปใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่เติมยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน จี 300 มิลลิกรัมต่อลิตรและสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.3 นำตัวอย่างใบไม้จากข้อ 1.2 จำนวน 9 ชิ้น มาปักลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP Agar ที่เติมเพนนิซิลิน จี 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก) โดยปักใบไม้ทั้งหมด 3 เฟลท เฟลทละ 3 ชิ้น แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน

1.4 ตรวจสอบทรอสโทคิทริดส์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งลักษณะภายนอกที่เห็นชัดเจนคือเซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลมและเจริญบนผิวของอาหาร แยกทรอสโทคิทริดส์โดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตอื่น หากพบการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นให้นำเชื้อมาทำการขีดเชื้อแบบตัดกัน (Cross Streak) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวจนกระทั่งได้เชื้อที่บริสุทธิ์

1.5 เก็บตัวอย่างเชื้อที่บริสุทธิ์ลงในอาหารผิวเอียง (GYP Agar Slants) และเติมน้ำทะเลความเต็ม 15 ส่วนในพันส่วน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยเติมเพนนิซิลิน จี 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

1.6 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การพบจุลินทรีย์ทะเลกลุ่มทรอสโทคิทริดส์ (Frequency of Occurrence (%)) ของตัวอย่างใบไม้ทุกชนิด

$$\text{เปอร์เซ็นต์การพบ} = \frac{\text{จำนวนใบที่พบทรอสโทคิทริดส์ (แต่ละชนิด)}}{\text{จำนวนใบทั้งหมดของตัวอย่าง (แต่ละชนิด)}} \times 100$$

2. จัดจำแนกชนิดทรอสโทคิทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน

จัดจำแนกชนิดทรอสโทคิทริดส์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การสร้างซูโอสปอร์ การแบ่งเซลล์ ลักษณะของซูโอสปอร์แรงเจียม การปล่อยซูโอสปอร์และลักษณะโคโลนี

3. คีย์ที่ใช้ในการจัดจำแนกระดับจันีส (Honda, 2001; Goldstein & Belsky, 1964; Hunt, 2000; Alderman & Jones, 1971; Porter, 1989; Leander & Porter, 2000; Watson & Raper, 1957)

- | | |
|--|-------------------------|
| 1. เซลล์รูปร่างยาวรีคล้ายกระสวย..... | <i>Labyrinthula</i> |
| 1. เซลล์รูปร่างกลม..... | คู่มือ 2 |
| 2. ไม่มีเส้นใยเอกโคพลาสติก..... | <i>Althonia</i> |
| 2. มีเส้นใยเอกโคพลาสติก..... | คู่มือ 3 |
| 3. สร้างสปอร์ที่ไม่มีแฟลกเจลลา..... | <i>Aplanochytrium</i> |
| 3. สร้างสปอร์ที่มีแฟลกเจลลา..... | คู่มือ 4 |
| 4. เส้นใยเอกโคพลาสติกมีลักษณะบวมพอง..... | <i>Japonochytrium</i> |
| 4. เส้นใยเอกโคพลาสติกไม่บวมพอง..... | คู่มือ 5 |
| 5. มีการแบ่งเซลล์แบบ Binary Division..... | <i>Schizochytrium</i> |
| 5. ไม่มีการแบ่งเซลล์แบบ Binary Division..... | คู่มือ 5 |
| 6. สร้างอะมิบอยด์เซลล์ก่อนสร้างซุโอสปอร์..... | <i>Ulkenia</i> |
| 6. ไม่สร้างอะมิบอยด์เซลล์ก่อนสร้างซุโอสปอร์..... | คู่มือ 7 |
| 7. มีพอลิเฟอร์รัส..... | <i>Thraustochytrium</i> |
| 7. ไม่มีพอลิเฟอร์รัส..... | <i>Labyrinthuloides</i> |