

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง

1. เครื่องมือวัดปริมาณออกซิเจน (DO Meter) JANWAY
2. เครื่องมือในการวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter) HORIBA
3. เครื่องมือวัดความเค็ม (Refractometer) ATAGO S/ MILL-E
4. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
5. ถุงพลาสติก
6. กระดาษจดบันทึก ปากกา

อุปกรณ์และสารเคมีห้องปฏิบัติการ

1. สารเคมี
 - 1.1 กลูโคส (Glucose) HIMEDIA
 - 1.2 ยีสต์ สกัด (Yeast Extract) HIMEDIA
 - 1.3 วุ้น (Agar) CHEMIKIT
 - 1.4 น้ำทะเลเทียม (Artificial Seawater) (Q-SEA)
 - 1.5 ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic)
 - 1.5.1 เพนนิซิลลิน จี (Penicillin G) (m & h manufacturing co.,ltd.)
 - 1.5.2 สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin Sulfate) (m & h manufacturing co.,ltd.)
 - 1.6 สารละลาย ฟิซีเอส (PBS)
 - 1.6.1 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) UNIVAR
 - 1.6.2 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) UNIVAR
 - 1.6.3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) UNIVAR
 - 1.7 เมทานอล (Methanol) UNIVAR
 - 1.8 เฮกเซน (Hexanes) FISHER SCIENTIFICRCK
 - 1.9 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) MARCK
 - 1.10 โซเดียมซัลเฟต ($NaSO_4$) UNIVAR
 - 1.11 กรดไขมันมาตรฐาน 19 : 0 Nonadecanoic Acid (Internal Standard) FLUKA

2. อุปกรณ์

- 2.1 ตู้เปื้อยเชื้อ (Laminar Flow) UNIFLOW UVUB 1200 BIOHAZARA
- 2.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) PUFFER HUBBARD IRI 1930 A14
- 2.3 เครื่องเขย่า (Incubator Shaker) GALLENKAMP
- 2.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge) SANYO HARRIER 18/80
- 2.5 เครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น (Freeze Dryer) FALEXI-DRY™ MP
- 2.6 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) HEWLETT PACKARD/HP 6890 SERIES
- 2.7 เครื่องให้ความร้อน (Hot Plate) FRAMO-GERATETECHNIK M21/1
- 2.8 หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave) TOMY SS-325
- 2.9 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง METTELER TOLEDO AG-285
- 2.10 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) GENESYS 20
- 2.11 อ่างปรับอุณหภูมิ (Water Bath) HETRO SBD 50
- 2.12 ตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ-80 องศาเซลเซียส (Deep Freezer) SANYO
- 2.13 กล้องจุลทรรศน์ NIKON
- 2.14 เครื่องดูดความชื้น (Desiccator)
- 2.15 แท่งแม่เหล็ก (Magnetic Bar)
- 2.16 งานเพาะเชื้อ บีกเกอร์ ปิเปต แจ้มเจียเชื้อ ขวดรูปชมพู่

วิธีการวิจัย

เก็บตัวอย่าง วันที่ 27 สิงหาคม พ.ศ. 2546 ณ ป่าชายเลนวัดอโศการาม อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ โดยเก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนทุกชนิดที่พบ ชนิดละ 20 ใบ และวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการ

ปัจจัยสิ่งแวดล้อม	อุปกรณ์
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	เครื่องวัดออกซิเจน (DO Meter)
ความเป็นกรด-เบส	เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter)
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermometer)
ความเค็ม (ppt)	เครื่องวัดความเค็ม (Refractometer)

การทดลองในห้องปฏิบัติการ

1. เตรียมอาหารแข็งกฏูโคส: ยีสต์สกัด (GY) (ภาคผนวก ก)

2. การคัดแยกเชื้อทรอสโทคิทริดส์

2.1 นำตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนแต่ละใบล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ (ความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน) ประมาณ 2-3 ครั้ง

2.2 นำใบไม้ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 9 ชิ้น จากนั้นนำตัวอย่าง ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีน้ำทะเลปราศจากเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะเท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข) ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง

2.3 นำตัวอย่างจากข้อ 2.2 มาปักลงในอาหารแข็ง GY 3 ชิ้น ต่อ 1 จานเพาะเชื้อแล้วเติมน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะเท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 27-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน

2.4 ตรวจหาเชื้อทรอสโทคิทริดส์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จากลักษณะเซลล์ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลมประกอบด้วยเอดโดพลาสมีคเน็ท จากนั้นแยกทรอสโทคิทริดส์จนเชื้อบริสุทธิ์ (Pure Culture)

2.5 เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร GY ผิวน้ำที่เติมน้ำทะเลปราศจากเชื้อ (ความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน) ประมาณ 10 มิลลิลิตรและเก็บในตู้บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 2 เดือน

3. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทลิทริดส์ (Frequency of Occurrence (%))
ของตัวอย่างใบไม้ทุกชนิดที่ทำการศึกษา

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

รหัสเชื้อทรอสโทลิทริดส์ เพื่อความสะดวกในการศึกษาจึงได้กำหนดรหัส
ทรอสโทลิทริดส์ดังตัวอย่างต่อไปนี้

Schizochytrium mangrovei BUSPRA 013 ความหมายคือ

Schizochytrium mangrovei หมายถึง ชนิดของทรอสโทลิทริดส์

BU หมายถึง มหาวิทยาลัยบูรพา (Burapha University)

SP หมายถึง จังหวัดสมุทรปราการ (Samut Prakan Province)

RA หมายถึง ชนิดของพันธุ์ไม้ป่าชายเลน ในที่นี้หมายถึงต้นโกงกางใบเล็ก
(*Rhizophora apiculata*)

013 หมายถึง ใบตัวอย่างที่ 1 และซ้ำในการทดลองที่ 3

4. การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมการวิเคราะห์กรดไขมัน

4.1 นำทรอสโทลิทริดส์แต่ละไอโซเลตเลี้ยงในอาหารเหลว GY ที่อุณหภูมิ
25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 4 วัน

4.2 เก็บเซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟิสิเอส ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว
10,000 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4.3 นำตัวอย่างไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ-80 องศาเซลเซียส และทำแห้งโดยเครื่องอบแห้ง
ระบบทำความเย็น จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ-10 องศาเซลเซียสเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน
ต่อไป

5. การสกัดกรดไขมัน ทำตามขั้นตอนต่อไปนี้ (ดัดแปลงจาก Shimizu et al., 1988)

5.1 ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วประมาณ 0.10-0.15 กรัม ใส่ในขวดที่มีฝาเกลียว
ขนาด 20 มิลลิลิตร

5.2 เติม 2% H_2SO_4 ใน methanol ปริมาณ 3 มิลลิลิตร เติม Internal Standard (ภาคผนวก ก) 0.2 มิลลิลิตร ผ่านด้วยแก๊สไนโตรเจน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5.3 ทิ้งให้เย็น เติมเฮกเซน (ผสม 10 ppm BHT) 1.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้จนแยกชั้น

5.4 ทำการดูดชั้นของเหลวที่อยู่บนสุด นำมารองผ่านหลอดปลายแหลมที่อุดด้วยสำลีเติม Na_2SO_4 ลงไปเล็กน้อย จากนั้นดูดของเหลวใส่ในขวดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด แล้วนำไปผ่านด้วยก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง เก็บใส่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

5.5 นำตัวอย่างจาก 6.4 เติมเฮกเซน (ผสม 10 ppm BHT) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

5.6 คำนวณหาปริมาณกรดไขมัน โดยเปรียบเทียบกับกรดไขมันมาตรฐาน (Standard Fatty Acid) (ภาคผนวก ง)

6. ศึกษาการเจริญของทราสโททริคัส

6.1 เลือกทราสโททริคัส 3 ไอโซเลท คือ *Schizochytrium mangrovei* BUSPRA 161 *Schizochytrium limacinum* BUSPTP 143 และ *Schizochytrium* sp. 8 BUSPRA 122 มาศึกษาการเจริญ

6.2 นำเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท มาเลี้ยงเป็นหัวเชื้อในอาหารเหลว GY (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 4 วัน นำมาวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ 650 นาโนเมตร จากนั้นปรับหัวเชื้อโดยทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อปรับหัวเชื้อให้เข้มข้นมีค่าดูดกลืนแสงประมาณ 6

6.3 เตรียมอาหารเหลว GY ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร

6.4 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว 5 % V/V นำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที่ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างและวัดปริมาณความหวานของอาหารทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน

6.5 เก็บตัวอย่างเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟิฟิเอสปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6.6 นำตัวอย่างไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แล้วทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น (Freeze Dryer) จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวอย่าง

6.7 นำตัวอย่างแห้งเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียสเพื่อวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

สภาวะเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

ใช้ Flame Ionization Detector เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณ และคอลัมน์ใช้ Capillary Column HP- INNOWAX Polyethylene Glycol ($30\text{m} \times 250\text{ }\mu\text{m} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$) โดยใช้ฮีเลียมเป็นตัวพา อุณหภูมิของ Injector และ Detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้น 175 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 1 นาที และค่อย ๆ เพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส/ นาที จนถึงอุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส คงไว้ 1 นาที จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มทีละ 2 องศาเซลเซียส/ นาที จนกระทั่งอุณหภูมิสิ้นสุดที่ 230 องศาเซลเซียส คงไว้ 1 นาที