

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. กลูโคส (Glucose) HIMEDIA
2. ยีสต์สกัด (Yeast Extract) HIMEDIA
3. เปปโตน (Peptone) HIMEDIA
4. ฐัน (Agar) CHEMIKIT

สารเคมี

1. สารละลาย ฟิซีเอส (PBS)
 - 1.1 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) UNIVAR
 - 1.2 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) UNIVAR
 - 1.3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) UNIVAR
2. เมทานอล (Methanol) UNIVAR
3. เฮกเซน (Hexanes) FISHER SCIENTIFICRCK
4. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) MARCK
5. โซเดียมซัลเฟต (NaSO_4) UNIVAR
6. กรดไขมันมาตรฐาน 19: 0 Nonadecanoic Acid (Internal Standard) FLUKA

ยาปฏิชีวนะ

1. เพนนิซิลิน จี (Penicillin G) (M & H Manufacturing Co., Ltd.)
2. สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin Sulfate) (M & H Manufacturing Co., Ltd.)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องมือวัดปริมาณออกซิเจน (DO Meter) JANWAY
2. เครื่องมือในการวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter) HORIBA
3. เครื่องมือวัดความเค็ม (Refractometer) ATAGO S/ MILL-E
4. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
5. ตู้ฟุ้งเชื้อ (Laminar Flow) UNIFLOW UVUB 1200 BIOHAZARA
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) PUFFER HUBBARD IRI 1930 A14

7. เครื่องเขย่า (Incubator Shaker) GALLENKAMP
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge) SANYO HARRIER 18/ 80
9. เครื่องอบแห้งทำความเย็น (Freeze Dryer) FALEXI-DRY™ MP
10. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) HEWLETT PACKARD/ HP

6890 SERIES

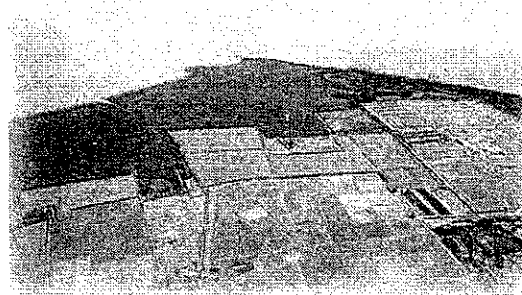
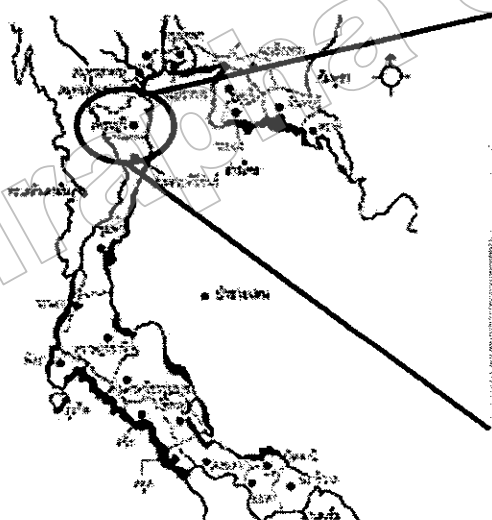
11. เครื่องให้ความร้อน (Hot Plate) FRAMO-GERATETECHNIK M21/ 1
12. หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave) TOMY SS-325
13. อ่างปรับอุณหภูมิ (Water Bath) HETRO SBD 50
14. ตู้ทำความเย็นอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส (Deep Freezer) SANYO
15. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

สถานที่เก็บตัวอย่าง

ป่าชายเลนแหลมผักเบี้ย ตำบลแหลมผักเบี้ย อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี

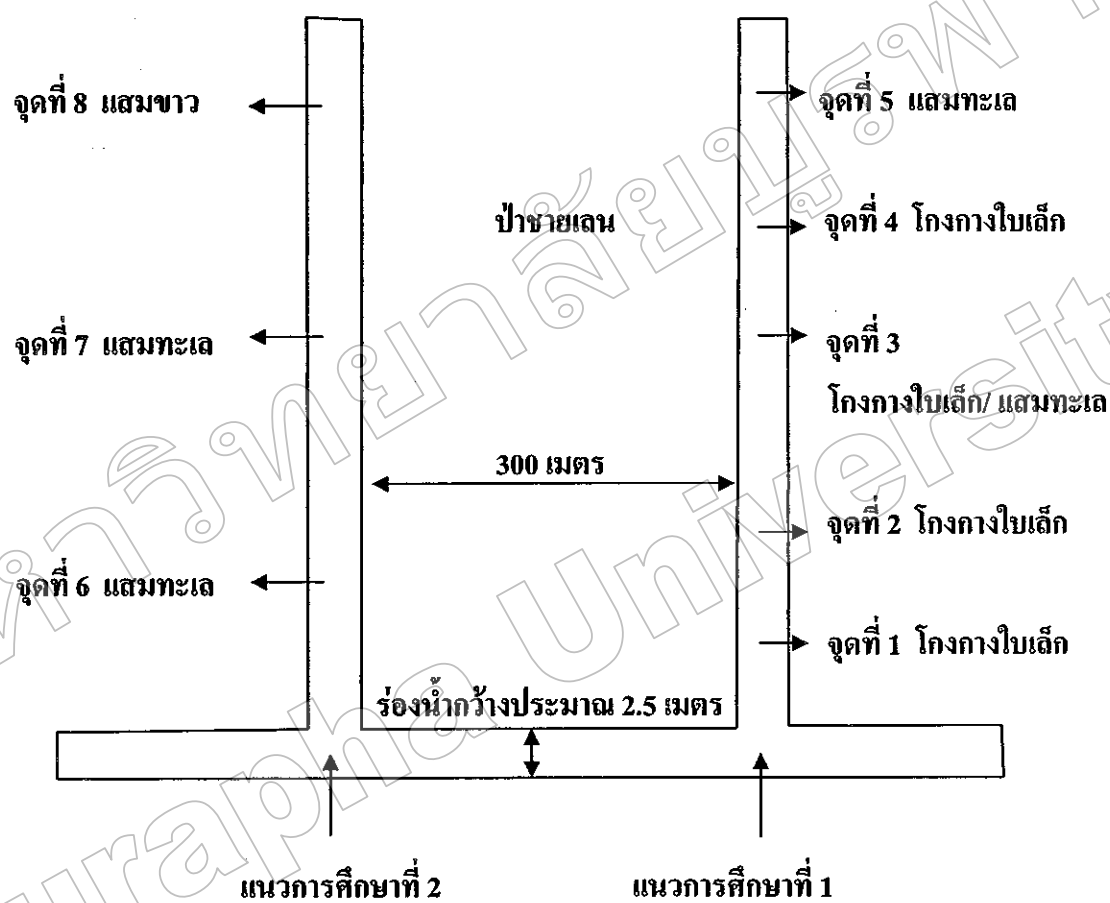


ภาพที่ 4 ป่าชายเลนแหลมผักเบี้ย ตำบลแหลมผักเบี้ย อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี

บริเวณที่ทำการศึกษ แบ่งเป็น 2 แนวการเก็บตัวอย่าง โดยแนวที่ 1 แบ่งเป็น 5 จุดเก็บตัวอย่าง และแนวที่ 2 แบ่งเป็น 3 จุดเก็บตัวอย่าง แสดงดังภาพที่ 5



ชายฝั่งทะเล



แผ่นดิน

ภาพที่ 5 แนวการเก็บตัวอย่างและพันธุ์ไม้หลักบริเวณป่าชายเลนแหลมผักเบี้ย ตำบลแหลมผักเบี้ย อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี

วิธีการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง ในต้นเดือนพฤษภาคม 2549 เป็นตัวแทนฤดูแล้ง และเดือนกันยายน 2549 เป็นตัวแทนฤดูฝน โดยเก็บใบไม้ป่าชายเลนที่พบทุกชนิด ทำการเก็บใบสีน้ำตาล ลักษณะใบไม่ยุ่ย ไม่เปื่อย ชนิดละ 20 ใบ และวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมน้ำทะเล ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อม

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

การคัดแยกเชื้อทรอสโทโคตริคัส

1. นำตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนแต่ละใบล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ (ความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน) ประมาณ 2-3 ครั้ง
2. นำใบไม้ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนำตัวอย่างใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีน้ำทะเลปราศจากเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ก) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะเท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง
3. นำตัวอย่างจากข้อ 2 มาปอกลงในอาหารแข็ง GYP (ภาคผนวก ข) เติมน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะเท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 27-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน
4. ตรวจสอบเชื้อทรอสโทโคตริคัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยพิจารณาจากลักษณะของเซลล์ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลมและมีเอด โทพลาสติกเน็ท จากนั้นแยกเชื้อทรอสโทโคตริคัสจนได้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure Culture)
5. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทโคตริคัส (Frequency of Occurrence (%)) ของตัวอย่าง ใบไม้ทุกชนิดที่ทำการศึกษา

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

การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร GYP ผิดแข็ง ที่เติมน้ำทะเลปราศจากเชื้อ (ความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน) ประมาณ 10 มิลลิลิตร และเก็บในตู้บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 2 เดือน

การจัดจำแนกทรอสโทโคตริคัส

จำแนกทรอสโทโคตริคัสโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะโคโลนี ขนาด และรูปร่างของเซลล์ปกติ ลักษณะการแบ่งเซลล์ ช่วงการสร้างหรือลักษณะการปล่อยซูโอสปอร์ จากซูโอสปอร์แรงเจียม รูปร่างของซูโอสปอร์ และวงจรชีวิต (Life Cycle)

การวิเคราะห์กรดไขมัน

1. การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมการวิเคราะห์กรดไขมัน

1.1 นำทรอสโทโคตริคัสแต่ละไอโซเลตเลี้ยงในอาหารเหลว GYP ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 4 วัน

1.2 เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/ นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยสารละลายฟิเบสปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/ นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.3 นำตัวอย่างไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และทำแห้งโดยเครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันต่อไป

2. การสกัดกรดไขมัน (ดัดแปลงจาก Shimizu et al., 1988)

2.1 ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วประมาณ 0.10-0.15 กรัม ใส่ในขวดที่มีฝาเกลียว ขนาด 20 มิลลิลิตร

2.2 เติม 2% H_2SO_4 ในเมทานอล ปริมาณ 3 มิลลิลิตร เติม Internal Standard 0.2 มิลลิลิตร ผ่านด้วยแก๊สไนโตรเจน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.3 ทิ้งให้เย็น เติมเฮกเซน (ผสม 10 ppt BHT) 1.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้จนแยกชั้น

2.4 ทำการดูดชั้นของเหลวที่อยู่บนสุด นำมากรองผ่านหลอดปลายแหลมที่อุดด้วยสำลีเติม Na_2SO_4 ลงไปเล็กน้อย จากนั้นดูดของเหลวใส่ในขวดทดลองที่มีฝาเกลียวปิดแล้วนำไปผ่านด้วยแก๊สไนโตรเจนจนแห้ง เก็บใส่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

3.1 นำตัวอย่างจาก 2.4 เดิมเฮกเซน (ผสม 10 ppt BHT) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำฉีดเข้าเครื่องโครมาโตกราฟฟี

สถานะเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี

ใช้ Flame Ionization Detector เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณและคอลัมน์ใช้ Capillary Column HP-INNOWAX Polyethylene Glycol (30 m×250 μ m×0.25 μ 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 จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส/ นาที จนอุณหภูมิถึง 230 องศาเซลเซียส คงไว้ 1 นาที

3.2 คำนวณหาปริมาณกรดไขมัน โดยเปรียบเทียบกับกรดไขมันมาตรฐาน (Standard Fatty Acid) (ภาคผนวก ก)