

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์ภาคสนาม

1. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
2. เครื่องมือวัดปริมาณออกซิเจน (DO meter)
3. เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
4. เครื่องมือวัดความเค็ม (Refractometer)
5. ถังพลาสติกใส่ตัวอย่าง
6. กระดาษ ปากกาจดบันทึก
7. ขวดน้ำกลั่น
8. กระบอกจืด

อุปกรณ์และสารเคมีในห้องปฏิบัติการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. เครื่องเขย่า (Incubator Shaker)
3. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow)
4. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
5. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
6. ตู้อบ (Oven)
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
8. แผ่นให้ความร้อน (Hot Plate)
9. จานเพาะเชื้อ เข็มเขี่ยเชื้อ
10. ปีกเกอร์ ขวดรูปหมฟู

สารเคมี

1. กลูโคส (Glucose)
2. ยีสต์สกัด (Yeast Extract)
3. เปปโตน (Peptone)

4. วุ้น (Agar)

5. ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic)

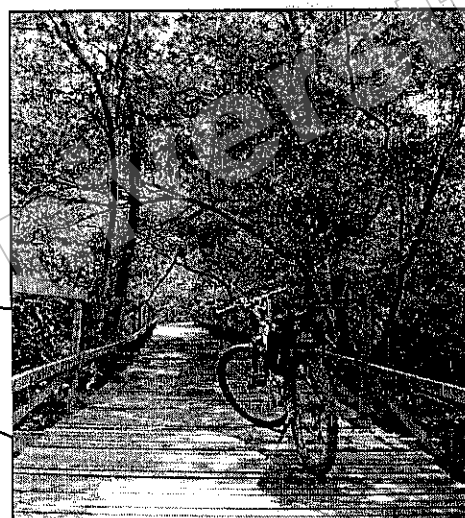
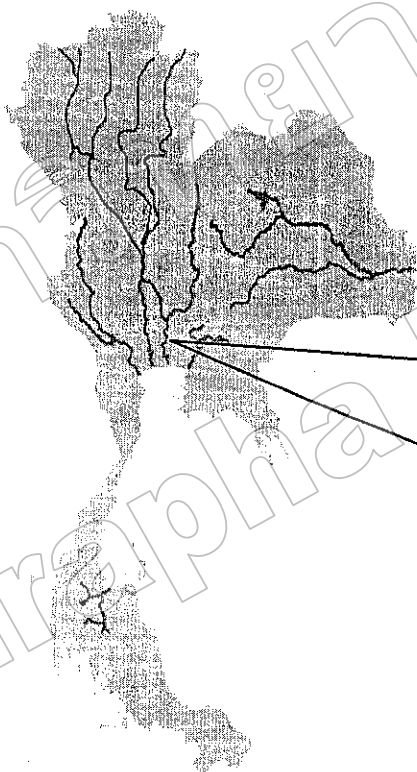
5.1 เพนนิซิลิน จี (Penicillin G)

5.2 สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin Sulfate)

วิธีดำเนินการ

สถานที่เก็บตัวอย่าง

ป่าชายเลนบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร



ภาพที่ 7 พื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณป่าชายเลนบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร

(http://wqm.thaigov.net/picture/map_lone.gif)

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง ในวันที่ 26 มีนาคม 2549 วันที่ 30 กรกฎาคม 2549 และวันที่ 15 พฤศจิกายน 2549 เก็บตัวอย่างใบไม้ที่มีสีเหลือง และสีน้ำตาลของพันธุ์ไม้ป่าชายเลน 4 ชนิด คือ

พักกาหัวผสมดอกแดง แสมขาว โพทะเล และแสมทะเล โดยใบไม้แต่ละสีเก็บอย่างละ 20 ใบ ส่วน
โก่งกางใบเล็กเก็บใบที่มีสีเหลือง สีเหลืองอมน้ำตาล และสีน้ำตาล อย่างละ 20 ใบ ส่วนในครั้งที่ 1
โพทะเลเก็บเฉพาะใบสีน้ำตาล 20 ใบ ลักษณะใบไม่ยุ่ย ไม่เปื่อย และวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมบาง
ประการ ได้แก่ อุณหภูมิของน้ำ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเป็นกรด-เบส และความ
เค็มของน้ำ

วิธีการทดลอง

1. การคัดแยกทรอสโทโคตริดส์จากใบไม้ป่าชายเลน

1.1 นำตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนแต่ละใบล้างด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพัน
ส่วน เพื่อเอาโคลนออก

1.2 นำตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนที่ล้างแล้วจากข้อ 1.1 มาล้างด้วยน้ำทะเลความเค็ม
15 ส่วนในพันส่วน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

1.3 นำใบไม้มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5 ตารางเซนติเมตร โดยใน 1 ใบ
ทำการสุ่มตัดแบบกระจายทั่วใบตัดทั้งหมด 9 ชิ้น จากนั้นนำไปแช่ในจานเพาะเชื้อที่มีน้ำทะเล
ความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเติมยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) (ภาคผนวก
ก) โดยเติมยาปฏิชีวนะ 1 มิลลิลิตรต่อลิตร แช่เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.4 นำตัวอย่างใบไม้จากข้อ 1.3 มาปักลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP agar (ภาคผนวก
ก) ปักโดยในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 จานเพาะเชื้อ ปัก 3 ชิ้น และทำการปักลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด
3 จานเพาะเชื้อ

1.5 เติมน้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเติม
ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) โดยเติมยาปฏิชีวนะ 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP agar
ที่มีใบไม้ปักอยู่ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน

1.6 ตรวจหาทรอสโทโคตริดส์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งลักษณะภายนอกที่เห็น
ชัดเจน คือ เซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลมและเจริญบนผิวของอาหาร จากนั้นทำการแยก
ทรอสโทโคตริดส์ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Cross Streak บนอาหาร GYP agar

1.7 เก็บตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารผิวเอียง (GYP agar slant) แล้วเติมน้ำทะเล
ความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

2. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทโคตริดส์ (Frequency of Occurrence (%))
ของตัวอย่างใบไม้ทุกชนิด

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

3. การจำแนกชนิดจุลินทรีย์ทะเลกลุ่มทอรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน

3.1 เพาะเลี้ยงทอรอสโทโคตริดส์แต่ละสายพันธุ์ลงบนอาหาร GYP agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน

3.2 เติมน้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง ตรวจสอบการปล่อยซูอิสปอร์

3.3 ดูดส่วนของน้ำทะเลลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

3.4 จำแนกชนิดทอรอสโทโคตริดส์โดยใช้ช่วงการสร้างหรือลักษณะการปล่อยซูอิสปอร์จากซูอิสปอร์แรงเจียมร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะโคโลนี ขนาด และรูปร่างของเซลล์ การแบ่งเซลล์ และวงจรชีวิต (Life Cycle)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาวิเคราะห์ความแปรปรวน (3 Fixed Factors ANOVA) เมื่อมีความแตกต่างจะเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระดับของปัจจัยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.0 for windows (เจริญ จันทลักษณ์, 2549; วิภูษิต มั่นทะจิตร, 2541)