บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง

1. เครื่องมือวัดปริมาณออกซิเจน (DO Meter)
2. เครื่องมือวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter)
3. เครื่องมือวัดความเค็ม (Refractometer)
4. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
5. กระดาษจดบันทึก ปากกา
6. ถุงพลาสติก

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow)
2. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
3. เครื่องเขย่า (Incubator Shaker)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge)
5. เครื่องอบแห้งทำความเย็น (Freeze Dryer)
6. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography)
7. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
8. หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave)
9. อ่างปรับอุณหภูมิ (Water bath)
10. ตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Deep Freezer)
11. กล้องจุลทรรศน์ (Inverted Microscope)
12. จานเพาะเชื้อ บีกเกอร์ ปิเปต เข็มเขี่ยเชื้อ ขวดรูปชมพู่
13. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-Decimal Balance)
14. โกร่ง (Mortar and Pestle)
15. กระดาษกรอง (Fillter Paper)
16. โถดูดความชื้น (Desiccater)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

17. แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar)

18. เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography)

19. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer)

สารเคมี

1. กลูโคส (Glucose)

2. ยีสต์สกัด (Yeast Extract)

3. เปปโตน (Peptone)

4. วุ้น (Agar)

5. น้ำทะเล (Sea Water)

6. ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic)

6.1 คานามัยซิน (Kanamycin)

6.2 สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin Sulfate)

7. สารละลายพีบีเอส (Phosphate Buffered Saline)

7.1 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)

7.2 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium dihydrogen phosphate)

7.3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate)

8. เมทานอล (Methanol)

9. เฮกเซน (Hexanes)

10. อะซีโตน (Acetone)

11. กรดซัลฟิวริก (Sulphuric acid)

12. โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulphate)

13. กรดไขมันมาตรฐาน 19:0 Nonadecanoic acid (Internal Standard)

14. แอสตาแซนธินมาตรฐาน (Chlorophyll Pink)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการเก็บตัวอย่าง

1. เก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนที่ร่วงหล่นบริเวณสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 5 จังหวัดสมุทรสาคร โดยเก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนแต่ละชนิด ชนิดละ 20 ใบ และวัดค่าปัจจัยสิ่งแวดล้อม ดังตารางที่ 3-1

ตารางที่3-1 เครื่องมือที่ใช้ในการวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อม

ปัจจัยสิ่งแวดล้อม	เครื่องมือ
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ	DO Meter
ความเป็นกรด-เบส	pH Meter
อุณหภูมิ	Thermometer
ความเค็ม	Refractometer

บริเวณที่ทำการศึกษา

ภาพที่ 3-1 ป่าชายเลนบริเวณสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 5 จังหวัดสมุทรสาคร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 3-2 พันธุ์ไม้ป่าชายเลนบริเวณสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 5 จังหวัดสมุทรสาคร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การคัดแยกเชื้อทรอสโทไคตริดส์

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

2.2 นำใบไม้มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 9 ชิ้น จากนั้นนำตัวอย่างใส่ในจานเพาะเชื้อ ที่มีน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมยาปฏิชีวนะ (คานามัยซิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 300 มิลลิกรัมต่อลิตร) (ภาคผนวก ข) ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง

2.3 นำตัวอย่างจากข้อ 2.2 มาปักลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP (ภาคผนวก ก) ที่เติมยาปฏิชีวนะ โดยปักใบไม้ทั้งหมด 3 เพลท เพลทละ 3 ชิ้น จากนั้นเติมน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน

2.4 ตรวจหาเชื้อทรอสโทไคตริดส์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และแยกเชื้อทรอสโทไคตริดส์ จนกระทั่งได้เชื้อที่บริสุทธิ์

2.5 เก็บตัวอย่างเชื้อที่บริสุทธิ์ลงในอาหารผิวเอียง (GYP Agar Slants) และเติมน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อความเค็ม 15 พีเอสยู ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 2 เดือน

2.6 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การพบจุลินทรีย์ทะเลกลุ่มทรอสโทไคตริดส์ (Frequency of Occurrence (%)) ของตัวอย่างใบไม้ทุกชนิดที่พบ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การพบ} = \frac{\text{จำนวนใบไม้ที่พบทรอสโทไคตริดส์ (แต่ละชนิด)}}{\text{จำนวนใบไม้ทั้งหมดของตัวอย่าง (แต่ละชนิด)}} \times 100$$

3. การจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์กลุ่มทรอสโทไคตริดส์

จัดจำแนกชนิดทรอสโทไคตริดส์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะโคโลนี ขนาด การแบ่งเซลล์ การสร้างซูโอสปอร์ ลักษณะของซูโอสปอร์แรงเงียม การปล่อยซูโอสปอร์ รูปร่างของเซลล์ปกติ วงจรชีวิต (Life Cycle) ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน และแอสตาแซนธิน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การเตรียมเชื้อสำหรับการวิเคราะห์กรดไขมัน

4.1 นำทรอสโทไคตริดส์แต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหารเหลว GYP ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน

4.2 เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายพีบีเอสปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4.3 นำตัวอย่างไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และทำแห้งโดยเครื่อง Freeze dryer จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียสเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันต่อไป

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

5.1 ชั่งตัวอย่างเซลล์ของทรอสโทไคตริดส์ที่บดละเอียดแล้วประมาณ 0.10-0.15 กรัม ใส่ในขวดที่มีฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร

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

5.3 ทิ้งให้เย็นเติม Hexane (ผสม 10 ppm BHT) 1.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้จนแยกชั้น

5.4 นำของเหลวที่อยู่ชั้นบนสุด มากรองผ่าน Na_2SO_4 จากนั้นดูดของเหลวลงในขวดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด แล้วนำไปผ่านด้วยแก๊สไนโตรเจนจนแห้ง เก็บใส่ตู้เย็น ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

6. การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

6.1 นำตัวอย่างจากข้อ 6.4 เติมเฮกเซน (ผสม 10 ppm BHT) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สภาวะเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

ใช้ Flame Ionization Detector เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณและคอลัมน์ใช้ Capillary Column HP-INNOWAX Polyethylene Glycol (30m x 250μm x 0.25 μm) โดยใช้ฮีเลียมเป็นตัวพา อุณหภูมิของ Injector และ Detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้น 175 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 1 นาที และค่อยๆเพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส/นาที จนถึงอุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส คงไว้ 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส/นาที จนถึงอุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส คงไว้ 1 นาที

7. การสกัดแอสตาแซนธิน (Oclarit and Belarmino, 2009)

7.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 0.5-1 g ใส่ในโก่งและบดให้ละเอียด

7.2 เติม acetone ลงในโก่ง 5 ml คนให้เข้ากัน จากนั้นดูดตัวอย่างและสารละลายใส่ในขวดที่มีฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร ห่อด้วยกระดาษฟรอยด์ แล้วเก็บให้พ้นแสง ทิ้งไว้ 24 ชม.

7.3 นำของเหลวที่อยู่ชั้นบนสุด มากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.23 μm จากนั้นดูดของเหลวลงในขวดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด แล้วนำไปผ่านด้วยแก๊สไนโตรเจนจนแห้ง ห่อด้วยกระดาษฟรอยด์ และเก็บใส่ตู้เย็น

8. การวิเคราะห์แอสตาแซนธิน ด้วยเครื่อง HPLC (Water 600)

8.1 นำตัวอย่างจากข้อ 3 เติม methanol ผสมให้เข้ากันก่อนนำฉีดเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดย flow methanol 100% run ที่ 1 ml/min และคอลัมน์ใช้ C_{18} 10 μm ขนาด 3.9x300 mm. ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 468 nm

8.2 เปรียบเทียบ retention time ของตัวอย่างกับแอสตาแซนธินมาตรฐาน

9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทไคตริดส์จากตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนแต่ละชนิดในแต่ละเดือน โดยใช้ Two-way ANOVA และเมื่อพบว่ามีความแตกต่างเกิดขึ้น ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดของพันธุ์ไม้และระยะเวลาที่เก็บในแต่ละเดือน โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกทรอสโทไคตริดส์

เมื่อนำทรอสโทไคตริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ในป่าชายเลนมาจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Yokoyama et al., 2007) ดังนี้

1. เซลล์ปกติรูปร่างยาวรีคล้ายกระสวย และคืบคลานอยู่ภายในเส้นใยเอคโตพลาสมิคเนท	Family Labyrinthulaceae Single genus: *Labyrinthura*
1.เซลล์ปกติรูปร่างกลม และไม่คืบคลานอยู่ภายในเส้นใยเอคโตพลาสมิคเนท	Family Thraustochytriaceae
2. เซลล์ปกติจะเคลื่อนที่ และสร้างสปอร์ที่ไม่มีแฟลกเจลลา (aplanospores)	*Aplanochytrium*
2. เซลล์ปกติจะเคลื่อนที่ตั้งแต่แรก	3
3. ไม่มีเส้นใยเอคโตพลาสมิคเนท	*Althonia*
3. มีเส้นใยเอคโตพลาสมิคเนท	4
4. เอคโตพลาสมิคเนทมีลักษณะบวมพอง	*Japonochytrium*
4. เอคโตพลาสมิคเนทมีลักษณะไม่บวมพอง	5
5. เซลล์มีการแบ่งเซลล์แบบ Binary Division	6
5. เซลล์มีการพัฒนาไปเป็นซูโอสปอร์แรงเจียมหรืออะมีบอยด์เซลล์	8
6. โคโลนีมีขนาดเล็ก เอคโตพลาสมิคเนทไม่มีการพัฒนา	*Aurantiochytrium*
6. โคโลนีมีขนาดใหญ่ เอคโตพลาสมิคเนทมีการพัฒนา	7
7. ซูโอสปอร์มีลักษณะยาวรี และมีการผลิตแคนตาแซนธิน และเบ-ตาแคโรทีน	*Oblongichytrium*
7. ซูโอสปอร์มีลักษณะคล้ายรูปไข่	*Schizochytrium*
8. เซลล์มีการพัฒนาไปเป็นซูโอสปอร์แรงเจียม	*Thraustochytrium*
8. เซลล์มีการพัฒนาไปเป็นอะมีบอยด์เซลล์	9
9. โคโลนีมีขนาดเล็ก เอคโตพลาสมิคเนทไม่มีการพัฒนา	10
9. โคโลนีมีขนาดใหญ่ เอคโตพลาสมิคเนทมีการพัฒนา	11
10. ซูโอสปอร์สร้างด้วยวิธีการบิดตัว (pinching) และดึงตัว (pulling)	*Sicyoidochytrium*
10. ซูโอสปอร์ไม่ได้สร้างด้วยวิธีการบิดตัว (pinching) และดึงตัว (pulling)	*Ulkenia*
11. ผนังเซลล์ยังคงเหลือ หลังจากปล่อยอะมีบอยด์เซลล์	*Parietichytrium*
11. ผนังเซลล์สลาย หลังจากปล่อยอะมีบอยด์เซลล์	*Botryochytrium*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University