บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

สารเคมี

1. อาหารที่ใช้คัดแยกและเลี้ยงเชื้อทรอสโทรคิทริด

   กลูโคส (glucose)

   ยีสต์สกัด (yeast extractX

   เปปโตน (peptone)

   สเต็ปโตไมซิน (streptomycin)

   เพนนิซิลิน (penicilin)

   พีบีเอส (phosphate buffered saline, PBS)

   1.1 0.34 g/l KH_2PO_4

   1.2 1.21 g/l K_2HPO_4

   1.3 8 g/l NaCl

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารสำหรับแยกเชื้อยีสต์

   Yeast Extract-Malt Extract Agar

   Sabourand Dextrose Broth

   Potato Dextrose Broth

   Czapek Dox Liquid Medium

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบทางชีวเคมี และการทดสอบทางสัณฐานวิทยา

   Malt Extract Broth

   Sodium acetate Agar

   Corn Meal Agar

   Glucose/Yeast Extract Broth

   Glucose/Nitrate Agar

   Wickerham's Yeast Carbon Base

4. สารเคมี

   Sodium acetate

   Glucose

   Yeast Extract

Bromcresol purple

KNO_3

แอลกอฮอล์ 70%

5. วัสดุสิ้นเปลืองอื่น ๆ

Aluminium Foil

Sealing Film

Plastic wrap

สำลี

กระดาษกรอง whatman No.1

Membrane filter (Cellulose Nitrate) ขนาด 0.2 um.

Slide และ Cover glass

กระดาษเช็ดเลนส์

กระดาษชั่งสาร

กระดาษวัด pH

6. อุปกรณ์เครื่องแก้ว

กระบอกฉีดยา

Petri dish

Test tube ขนาดเล็ก

บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250, 1000 ml.

Conical Flasks ขนาด 300 ml.

Pipette

Autopipette

7. เครื่องมือ

ตู้บ่มเชื้อ / ตู้บ่มเชื้อ Incubator shaker

ตู้อบเครื่องแก้ว

Autoclave

ตู้เย็น

Ultra Centrifuge

Freeze dry

เครื่องชั่ง 2, 4 ตำแหน่ง

กล้องจุลทรรศน์

กล้อง Electron Microscope ZSEM)

เครื่องกรองแบคทีเรีย

8. สารเคมีในการวิเคราะห์กรดไขมัน

กรดซัลฟูริค (H_2SO_4)

เมทานอล (methanol)

เฮกเซน (hexanes)

บีเอชที (butylated hydroxy-toluene)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณแนวปะการัง

บริเวณแนวปะการังที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ ได้แก่

1. เกาะมันใน จังหวัดระยอง เก็บทั้งสิ้น 2 ครั้ง โดยการเก็บตัวอย่างครั้งแรก ได้เก็บเฉพาะตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณปะการังจำนวน 5 สถานีๆ ละ 3 ซ้ำ แต่ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่สอง ได้เก็บตัวอย่างเพิ่มขึ้น โดยแยกเป็น 2 ส่วน คือน้ำทะเลบริเวณปะการังจำนวน 5 สถานีๆ ละ 3 ซ้ำ และการขูดเมือกที่ก้อนปะการังอีก 5 ชนิดๆ 3 ซ้ำ คือ *Acropora* sp. (เขากวางแบบโต๊ะ), *Favia* sp. (วงแหวน), *Porites* sp. (โขด), *Symphylia* sp. (สมองร่องใหญ่) และ *Diploastrea* sp. (ดาวใหญ่)

2. เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี เก็บตัวอย่างรวม 2 ครั้ง โดยเก็บตัวอย่างแยกเป็น 2 ส่วน คือน้ำทะเลบริเวณปะการังจำนวน 5 สถานีๆ ละ 3 ซ้ำ และขูดเมือกที่ก้อนปะการัง 5 ชนิดๆ 3 ซ้ำ คือ *Acropora* sp., *Favia* sp., *Porites* sp., *Symphylia* sp. และ *Diploastrea* sp. และวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการเช่นอุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-เบส และปริมาณออกซิเจนในน้ำ เป็นต้น

3. บริเวณเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี เก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณปะการังจำนวน 5 สถานีๆ ละ 3 ซ้ำ

1.2 การเก็บตัวอย่างหญ้าทะเล

เก็บตัวอย่างหญ้าทะเลจากบริเวณต่างๆ และวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการ เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-เบส และปริมาณออกซิเจนในน้ำ เป็นต้น บริเวณที่เก็บตัวอย่างได้แก่

1. อ่าวคุ้งกระเบนจำนวน 2 ครั้ง ได้ตัวอย่างหญ้าทะเล 2 ชนิด คือกุ๊ยช่ายเข็ม (*Halodule pinifolia*) และหญ้าชะเงา (*Enhalus acoroides*) โดยเก็บใบหญ้าทะเลที่มีสีเขียว สีเทา-เขียว และสีน้ำตาล

2. อ่าวมะขามป้อม จังหวัดระยอง ได้ตัวอย่างหญ้าทะเล 1 ชนิด คือ กุ๋ยช่ายเข็ม โดยเก็บตัวอย่างใบหญ้าทะเลที่มีสีแตกต่างกัน 6 สีๆ ละ 10 ใบ คือ เขียวอ่อน เขียวแก่ น้ำตาลปนเขียว น้ำตาลอ่อน น้ำตาลแข้ม และดำเริ่มเน่า

2. สัตหีบ จังหวัดชลบุรี ได้ตัวอย่างหญ้าทะเล 1 ชนิด คือกุ๋ยช่ายเข็มโดยเก็บตัวอย่างใบหญ้าทะเลที่มีสีแตกต่างกันสีๆ ละ 15 ใบ คือเทาตลอดใบ และ เทาปนเขียว

3. เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยมีตัวอย่าง 2 ชนิด กุ๋ยช่ายเข็ม (*Halodule pinifolia*) และหญ้าชะเงา (*Enhalus acoroides*) โดยเก็บตัวอย่างใบหญ้าทะเลที่มีสีแตกต่างกัน 6 สีๆ ละ 10 ใบ คือ เขียวปนเทา เทาอ่อน เทาแก่ เขียวปนน้ำตาล น้ำตาลอ่อน และ น้ำตาลแก่

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ทะเล

2.1 การแยกและเลี้ยงเชื้อยีสต์

2.1.1 นำตัวอย่างน้ำทะเลที่เก็บมาใหม่ ๆ มาแยกเชื้อยีสต์โดยใช้ปริมาณ 0.1 ml ของตัวอย่างน้ำใส่ลงในอาหาร Yeast Extract-Malt Extract Agar และปริมาณ 5 ml โดยวิธีกรองผ่าน Cellulose Nitrate membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้ววางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

2.1.2 นำเชื้อที่เจริญบนจานเพาะเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ โดย steak ลงบนอาหาร Yeast Extract-Malt Extract Agar หลาย ๆ ครั้ง จนได้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นจึงเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง เพื่อใช้ในการทดสอบทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมีต่อไป

2.1.3 นำเชื้อยีสต์บริสุทธิ์มาเลี้ยงใน 0.5 % Sodium Nitrate Agar บ่มเชื้อที่ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อนำมาตรวจดูลักษณะรูปร่างของสปอร์ โดยวิธี Wet mount

2.1.4 เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่บริสุทธิ์ลงในอาหาร Corn Meal Agar โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อนำมาตรวจดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ pseudomycelium หรือ true mycelium ถ้ามี รวมทั้งตรวจดู arthospores

2.1.5 นำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงบน Glucose/Nitrate agar (Wickerham's Yeast Carbon Base + 0.5 % KNO_3 หรือ $NaKNO_3$) โดยบ่มเชื้อที่ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นตรวจสอบดูว่าเชื้อมีการเจริญหรือไม่

2.1.6 นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร Sabouraud Dextrose Broth, Potato Dextrose Broth, Czapek Dox Liquid Medium เพื่อให้ได้ปริมาณมาก ๆ โดยเลี้ยงใน Conical flask ขนาด 30 ml แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อพร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงเก็บเซล โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Ultra Centrifuge ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเซลล์ยีสต์ไปทำให้แห้งเพื่อนำไปตรวจหาปริมาณและชนิดกรดไขมัน

2.1.7 นำยีสต์ที่บริสุทธิ์แล้วมาจัดจำแนกชนิด ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kuger-van Rij (1984)

2.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ทะเลกลุ่ม Thraustochytrids

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาแยกหาเชื้อจุลินทรีย์ทันทีเมื่อนำกลับมาห้องปฏิบัติการ โดยตัวอย่างน้ำจากบริเวณปะการัง นำมากรองแล้วจึงดูดตัวอย่างน้ำที่กรองได้ใส่ลงบนอาหารวุ้น GYP (กลูโคส : ยีสต์สกัด : เปปโตน = 5 : 1 : 1) ส่วนตัวอย่างเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง ทำการดูดเมือกและน้ำใส่บนอาหารวุ้น GYP

ส่วน ตัวอย่างหญ้าทะเลแต่ละใบ นำมาล้างในน้ำทะเลสะอาด แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใบละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปปักลงบนอาหารวุ้น GYP แล้วเทน้ำทะเลสะอาดลงไปเล็กน้อย

3. การวิเคราะห์กรดไขมัน

ทำการวิเคราะห์กรดไขมันที่มีอยู่ในเซลของจุลินทรีย์ที่แยกได้ โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Shimizu *et al.* (1988) และ Christie (1989) ดังนี้

3.1 ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.1-0.2 กรัม เติมกรดซัลฟูริค (ในเมทานอล) 2 % ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และ internal standard 0.2 มิลลิลิตร (19:0) ผ่านด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วนำไปใส่ใน water bath ให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.2 เติม hexanes (ใส่ BHT 10 ppm) 2 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งให้แยกชั้น

3.3 ดูดของเหลวชั้นบนใส่ในหลอดทดลอง แล้วกรองผ่าน Na_2SO_4 จากนั้นผ่านด้วย ก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง เก็บในตู้เย็น เพื่อรอการวัดด้วยเครื่อง Gas Chromatography

3.4 นำตัวอย่างฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography อ่านค่าโครมาโตแกรม โดยเทียบกับ standard fatty acids