

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

วัสดุและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและ การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย

- 1.1 ถุงซิปใส่ตัวอย่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง
- 1.2 กล้องถ่ายภาพไดน้ำ และอุปกรณ์ดำน้ำ
- 1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า
- 1.4 ครกและที่บดขนาดเล็ก
- 1.5 กระจกทรงปราคาจากเชื้อ
- 1.6 กรรไกร มีด ปากคีบ
- 1.7 เครื่องดูดปล่อยสารละลายอัตโนมัติ (auto-micropipette)
- 1.8 ตู้กรองอากาศ (laminar flow)
- 1.9 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 1.10 จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- 1.11 เข็มเขี่ยเชื้อ

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างเพรียงหิน เพื่อแยกไข่เพาะเลี้ยง

- 2.1 มีด และไขควง
- 2.2 เครื่องวัดความเค็ม (refractometer)
- 2.3 เทอร์โมมิเตอร์
- 2.4 บีกเกอร์ ขนาด 1,000, 500 และ 250 มิลลิลิตร
- 2.5 โคมไฟ
- 2.6 ชุดกรองน้ำ
- 2.7 กระจกทรง GF/C (ขนาดช่อง 1.2 ไมครอน)
- 2.8 กระจกทรง ไนโตรเซลลูโลส ขนาดช่อง 0.22 ไมครอน

- 2.9 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 300 มิลลิลิตร
- 2.10 สไลด์นับเซลล์ (haemocytometer)
- 2.11 กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)
- 2.12 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อเพิ่มความดัน (autoclave)
- 2.13 ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร
3. อุปกรณ์ทดสอบการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงหินกับแบคทีเรียทดสอบ
 - 3.1 หลอดเพาะเชื้อ (culture tube)
 - 3.2 จานเพาะเชื้อขนาด 6 หลุม (polystyrene dishes falcon)
 - 3.3 ตู้บ่มที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่าง (bio-shaker)
 - 3.4 กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope)
4. สารเคมี
 - 4.1 ฟอรัมาลีน
 - 4.2 อาครีดีนออเรนจ์ (Acridine Orange)
 - 4.3 N, N-Dimethyl-p-phenylenediamine (p-Aminodimethylaniline Grade II)
 - 4.4 สีย้อมแกรม (ภาคผนวก)
 - 4.5 สีย้อมแฟลกเจลลา (ภาคผนวก)
 - 4.6 sodium penicillin G
 - 4.7 streptomycin sulfate
5. อาหารทดลอง (ภาคผนวก)
 - 5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อโออาไอ (ORI)
 - 5.2 อาหารเหลวเลี้ยงไดอะตอมสูตรกิลลาร์ด F/2
 - 5.3 อาหารทดสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อ (O-F Basal medium)
 - 5.4 อาหารทดสอบการทนเค็มของเชื้อ (halophism medium)
 - 5.5 อาหารทดสอบเอ็นไซด์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (DNase)
 - 5.6 อาหารทดสอบการย่อยสลายเจลาติน (gelatin hydrolysis)
6. สัตว์ทดลอง
 - 6.1 *Chaetoceros calcitrans*
 - 6.2 *Balanus amphitrite*
 - 6.3 *Artemia* sp.

วิธีดำเนินการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่างฟองน้ำและปะการังอ่อน เพื่อคัดแยกแบคทีเรีย

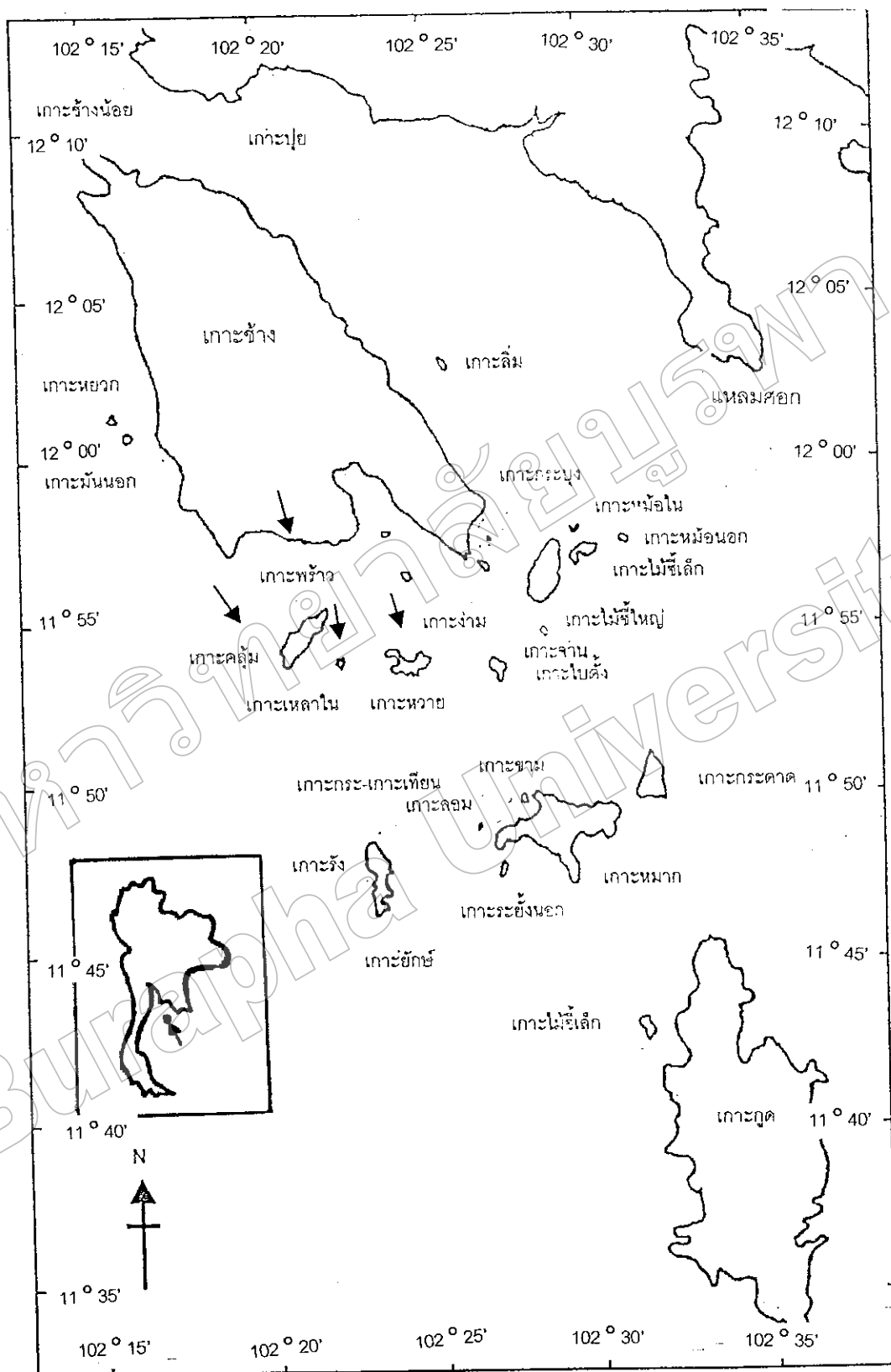
1.1 เก็บตัวอย่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง กลุ่มฟองน้ำ (sponges), ปะการังอ่อน (soft coral) จากแนวปะการัง หมู่เกาะช้าง จังหวัดตราด บริเวณที่เก็บตัวอย่างคือ เกาะคลุ้ม 11 54' 20.8" N 102 20' 62.4" E ทิศตะวันออกของหมู่เกาะช้าง กองหินแหลมโป่ง 11 57' 67.0" N 102 22' 75" E หน้าอ่าวสลักเพชร เกาะหวายด้านนอก 11 54' 20.2" N 102 23' 23.9" E ทิศใต้ของหมู่เกาะช้าง เกาะหวายด้านใน 11 53' 77.9" N 102 24' 35.0" E ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของหมู่เกาะช้าง เกาะเหลายา 11 56' 11.3" N 102 24' 34.3" E ทิศตะวันออกเฉียงใต้ของหมู่เกาะช้าง และเกาะพร้าวนอก 11 58' 13.4" N 102 23' 56.4" E ทิศใต้อ่าวสลักเพชร โดยวิธี SCUBA DIVING เก็บตัวอย่างใส่ในถุงซิปล็อคพร้อมทั้งติดกระดาษบันทึกข้อมูล แสดงภาพแผนที่และจุดเก็บตัวอย่างดังแสดงในภาพที่ 10

1.2 นำตัวอย่างสัตว์ดังกล่าวมาตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ น้ำหนักประมาณ 5 กรัม ล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อเพื่อกำจัดสิ่งเจือปน แล้วนำมาบดกับน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้จากการบดมาเจือจาง และดูมาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI สูตรที่ดัดแปลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อไซเบล (ภาคผนวก) เพื่อแยกกระจายบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

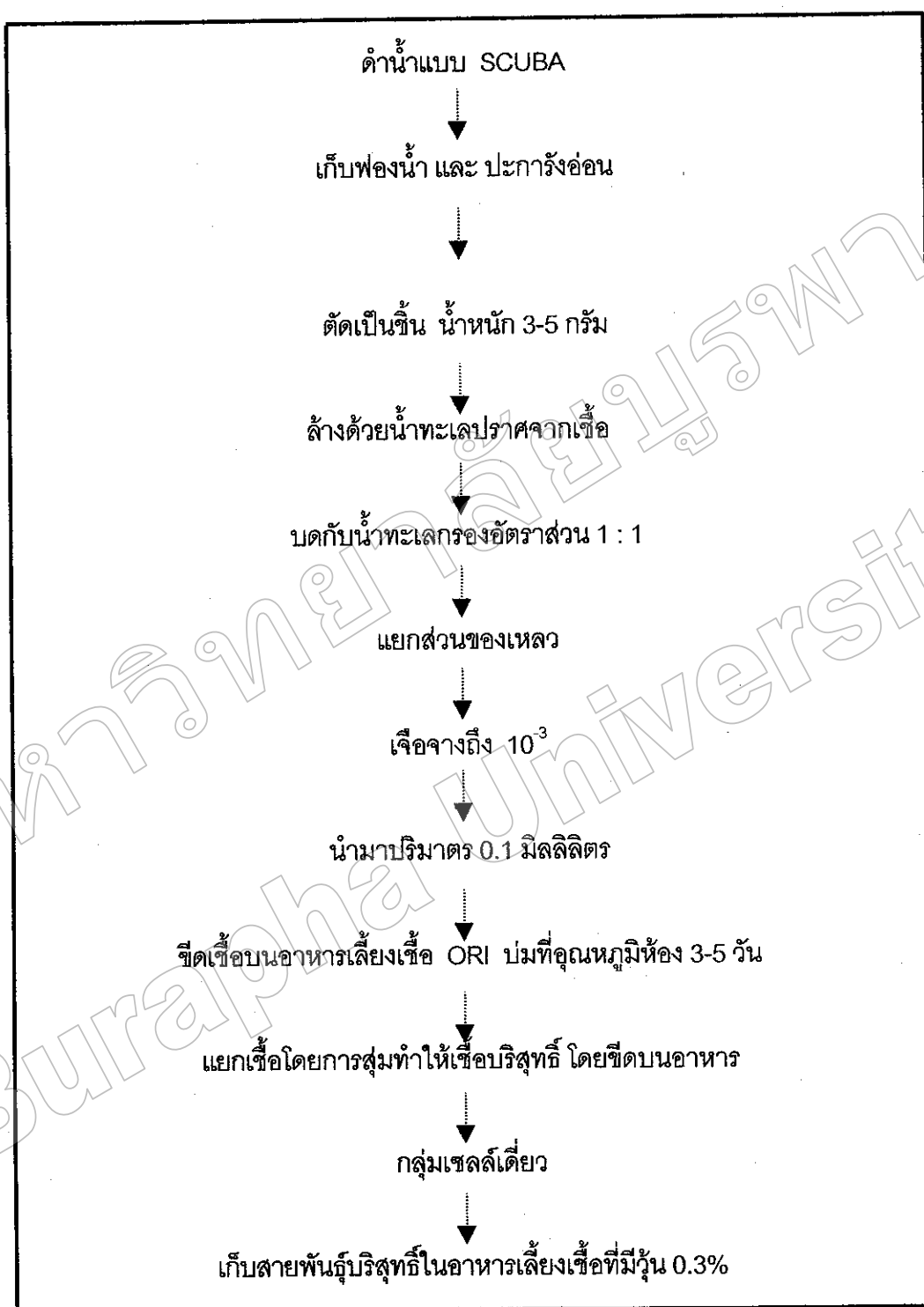
1.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน และเก็บเชื้อที่เจริญบนอาหารโดยคัดแยกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน นำมาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI จนกระทั่งได้เป็นเชื้อชนิดเดียว จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้เก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI ที่มีวุ้น 0.3% เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปโดยทำการคัดแยกและสุมเชื้อทดสอบจำนวน 30 ชนิด เพื่อใช้ในการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 3 และ ภาพที่ 11 แสดงแผนภูมิขั้นตอนการแยกแบคทีเรียจากฟองน้ำหรือปะการังอ่อน

160886

๑
๕๗๙. 3
๗๕๓๓๐
๓๐



ภาพที่ 10 แสดงจุดเก็บตัวอย่างบริเวณหมู่เกาะช้าง จังหวัดตรัง



ภาพที่ 11 แผนภาพแสดงการแยกตัวอย่างแบคทีเรียจากฟองน้ำและปะการังอ่อน

ตารางที่ 3 แสดงชนิดแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำ และปะการังอ่อน ที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ชื่อสามัญ	ไฟล์	ชื่อวิทยาศาสตร์
1)	IMS 278-1	ฟองกระชาย	ฟอริเฟอร่า	<i>Biemna</i> sp.
	IMS 278-2			
	IMS 278-3			
	IMS 278-4			
	IMS 278-7			
	IMS 278-8			
	IMS 278-10			
	IMS 278-11			
2)	IMS 279-4	ฟองน้ำท่อพุ่มสีม่วงแดง	ฟอริเฟอร่า	<i>Oceanapia sagittaria</i>
	IMS 279-5			
	IMS 279-7			
	IMS 279-10			
	IMS 279-11			
3)	IMS 284-1	ปะการังอ่อนจานเหลือง	ไนดาเรีย	<i>Sinularia</i> sp3.
	IMS 284-5			
4)	IMS 289-6	ฟองน้ำเคลือบหินสีส้ม	ฟอริเฟอร่า	
5)	IMS 296-3	ฟองน้ำต้นไม้ขาวนวล	ฟอริเฟอร่า	<i>Dysidea</i> cf. sp.
	IMS 296-5			
6)	IMS 306-2	ปะการังอ่อนเล็กดอกขาว	ไนดาเรีย	<i>Xenia</i> sp.
	IMS 306-5			
7)	IMS 307-1	ฟองน้ำสีน้ำเงิน	ฟอริเฟอร่า	<i>Haliclona</i> sp.
	IMS 307-6			
	IMS 307-7			
	IMS 307-9			
8)	IMS 314-3	ฟองน้ำหนังม่วงน้ำตาล	ฟอริเฟอร่า	<i>Chondrilla</i> sp.
9)	IMS 315-2	ฟองน้ำแผ่นตั้งน้ำตาลเขียว	ฟอริเฟอร่า	
	IMS 315-3			
10)	IMS 317-2	ฟองน้ำปล่องภูเขาไฟ	ฟอริเฟอร่า	<i>Spirastrella</i> sp.
11)	IMS 329-1	ฟองน้ำเคลือบสีม่วงเข้ม	ฟอริเฟอร่า	
	IMS 329-4			

2. การเก็บตัวอย่างเพรียงหินชนิด *Balanus amphitrite* และการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนเพรียงหิน

2.1 การเก็บตัวอย่างเพรียงหินชนิด *B. amphitrite*

2.1.1 เก็บตัวอย่างเพรียงหินชนิด *B. amphitrite* บริเวณหาดหิน และหลักไม้ไผ่จากแนวชายฝั่งทะเล จังหวัดชลบุรี (ภาพ 12) โดยจำแนกชนิดของเพรียงหินตามวิธีของ Darwin (1854)

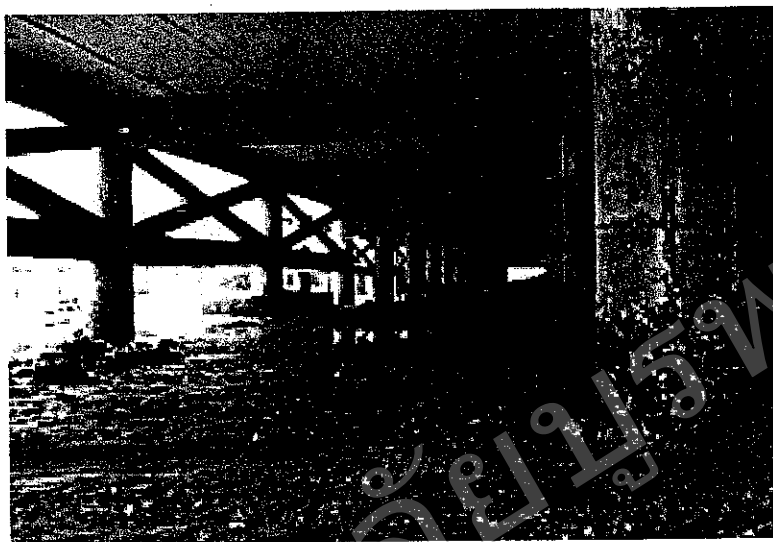
2.1.2 นำเพรียงหินมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด $30 \times 50 \times 50$ เซนติเมตร ที่ความเค็ม 30 ± 1 ส่วนในพันส่วน (ppt) และเพาะ *Artemia* sp. อายุ 1 – 2 วัน เป็นอาหาร

2.2 การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนเพรียงหิน

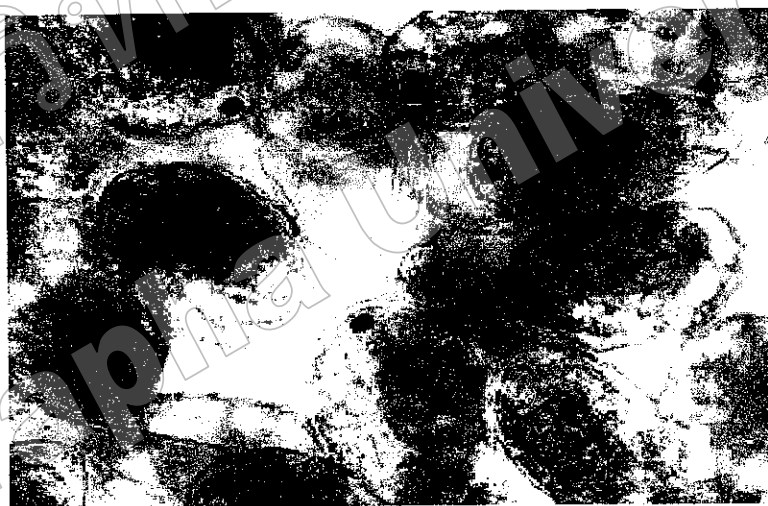
2.2.1 นำเพรียงหินที่เก็บได้มาแยกไข่ ซึ่งไข่จะอยู่บริเวณส่วนฐานของตัวเพรียงหินคัดเลือกไข่ดี มีลักษณะเป็นฟูลีนน้ำตาลเข้ม ซึ่งเป็นไข่ที่พร้อมฟักเป็นตัวอ่อน ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไข่ที่พร้อมฟักมีลักษณะเป็นจุดสีดำซึ่งเป็นตาของตัวอ่อนในไข่แต่ละฟอง (Anil, et al., 1995) (ภาพ 13)

2.2.2 แยกฟูลไข่ (ภาพ 14) ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำทะเลที่ผ่านการกรองและฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความเค็ม 30 ± 1 ส่วนในพันส่วน ซึ่งเป็นความเค็มที่ใช้ตลอดทุกการทดลองและให้อากาศเบา ๆ ปิดบีกเกอร์ด้วยแผ่นฟิล์มพลาสติกบาง ปล่อยให้ประมาณ 2 – 4 ชั่วโมง ตัวอ่อนจะฟักออกจากไข่อยู่ในระยะนอพลีซิส ระยะที่ 1 – 2 (Qiu, Gosselin & Qian, 1997)

2.2.3 แยกนอพลีซิสออกจากไข่ที่ยังไม่ฟัก ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ความเค็มเดียวกัน โดยควบคุมการให้แสงสว่างเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และมีมืด 12 ชั่วโมง พร้อมกันนี้ได้เพาะเลี้ยงไดอะตอมชนิด *Chaetoceros calcitrans* ในอาหารเลี้ยง ไดอะตอมสูตรกิลลาร์ด F/2 (ภาคผนวก) เพื่อใช้เป็นอาหารของตัวอ่อนเพรียงหินในระยะนอพลีซิสที่ 1 – 6 ด้วย โดยให้อาหารตัวอ่อนที่ความเข้มข้น $10^5 - 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง (เช้า - บ่าย) ความหนาแน่นของตัวอ่อนเพรียงหินที่ 800 – 1,800 ตัว/บีกเกอร์ ปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร กำจัดของเสียและคราบตัวอ่อนทิ้ง ก่อนให้อาหารใหม่ทุกครั้ง และเปลี่ยนน้ำใหม่จนกระทั่งตัวอ่อนเปลี่ยนเป็นระยะไซพริด (ภาพ 15) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 4 – 5 วัน ย้ายไซพริดมาไว้ในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำทะเลกรองปราศจากเชื้อ ปิดด้วยแผ่นฟิล์มและนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Rittschof et al., 1984) เพื่อให้ไซพริดหยุดกิจกรรมต่าง ๆ ภายในร่างกาย บันทึกวันที่เก็บเพื่อเตรียมไว้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

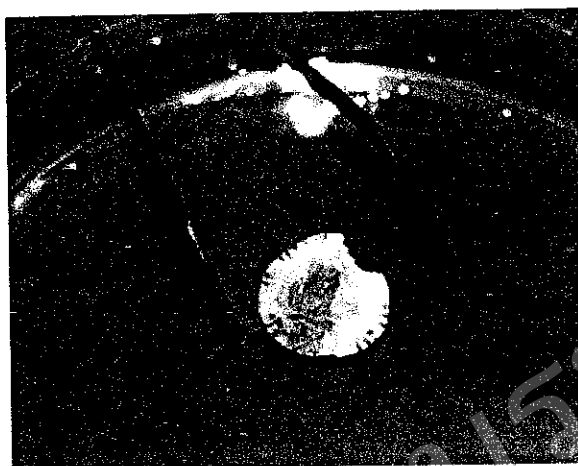


ภาพที่ 12 สถานที่เก็บเพรียงหิน บริเวณเสาหินปูนสะพานแหลมแท่น จ.ชลบุรี

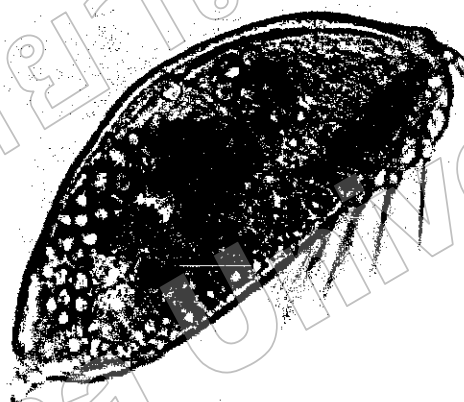


ภาพที่ 13 แสดงไขเพรียงหิน ระยะพร้อมฟักตัว โดยมีจุดตาอยู่ภายในไข่แต่ละฟองที่กำลังขยาย

1125 เท่า



ภาพที่ 14 แสดงพูใบที่ส่วนฐานของเพรียงหินตัวเต็มวัย



ภาพที่ 15 แสดงตัวอ่อนเพรียงหิน *Balanus amphitrite* ระยะไซพริด (กำลังขยาย 750 เท่า)

3. การเตรียมแบคทีเรียเพื่อการทดลอง เนื่องจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำและปะการังอ่อน ที่เก็บไว้ระยะเวลาหนึ่งบางส่วนตายไป ดังนั้นก่อนที่จะทดลอง นำเชื้อที่เก็บไว้มาซัดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโออาไอ (ORI) ได้เชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี และมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันจำนวน 30 ชนิด (ตาราง 3) สำหรับใช้ในการทดลอง โดยนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดใส่ในหลอดทดลอง (เพื่อเตรียมหัวเชื้อ) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) จนกระทั่งเชื้อเจริญทั่วหลอด ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จึงถ่ายเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI เป็น 10 เท่าของอาหารจากหลอดหัวเชื้อที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิเดียวกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

4. แผนการทดสอบการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงหินระยะไซพริต แบ่งออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

4.1 การทดสอบผลของเซลล์แบคทีเรียต่อการลงเกาะของไซพริต

4.1.1 นำแบคทีเรียแต่ละชนิดที่บ่มไว้ในขวดรูปชมพู่ใช้ปิเปตดูดใส่จานหลุมทดสอบขนาด 6 หลุม เชื้อละ 6 ข้ำ (ที่ระยะเวลาเดียวกัน) โดย 3 ข้ำนำไปบ่มเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะนำไปใช้ในการทดสอบการลงเกาะของไซพริต ส่วนที่เหลือนำไปตรึงด้วยฟอร์มาลีน และย้อมเซลล์แบคทีเรียด้วยสีอะครีดินออร์เรนจ์ เพื่อนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย ดังภาพ 16 แสดงแบคทีเรียที่ย้อมด้วยสีอะครีดินออร์เรนจ์ ภายใต้กล้องอีพิฟลูออเรสเซนส์

4.1.2 นำไซพริตที่เตรียมไว้ออกจากตู้เย็น (ไซพริตถูกนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 วัน ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง) วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง สังเกตว่าไซพริตมีการเคลื่อนที่ และมีความสมบูรณ์ ก่อนนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

4.1.3 ภายหลังจากบ่มแบคทีเรียแต่ละชนิดเป็นระยะเวลา 2 และ 24 ชั่วโมง ดูดส่วนของเหลวในแต่ละหลุมออกให้หมด และใส่น้ำทะเลกรองที่ปราศจากเชื้อลงไปหลุมละ 5 มิลลิลิตร นับไซพริตใส่ลงไปหลุมละ 10 ตัว นำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ควบคุมการให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และมีมืด 12 ชั่วโมง และเตรียมไซพริตใส่ลงในจานหลุมที่มีน้ำทะเลกรองปราศจากเชื้อจำนวน 3 ข้ำ ใช้เป็นกลุ่มทดลองควบคุมในแต่ละชุดการทดลอง

4.1.4 การตรวจสอบและการลงเกาะและไม่ลงเกาะของไซพริต ภายใน 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)

4.2 การทดสอบการลงเกาะของไซพริต ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่นำมาเจือจางเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.2.1. นำแบคทีเรียที่บ่มในขวดรูปชมพู่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ละชนิด แบ่งใส่หลอดเพื่อนำไปปั่นเหวี่ยง ให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยแผ่นกรองเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน (ปราศจากเชื้อ) เก็บเฉพาะส่วนของเหลวนำมาเจือจางกับน้ำทะเลกรองที่ปราศจากเชื้อ (FSW) ภายในจานหลุมทดสอบขนาด 6 หลุม ในอัตราส่วน 1 : 1 และ 1 : 9 (ภาพ 17) อย่างละ 3 ข้ำและในการทดลองชุดควบคุมเพื่อเปรียบเทียบ ให้อาหารเลี้ยงเชื้อ ORI เจือจางกับน้ำทะเลกรองที่ปราศจากเชื้อ ในอัตราส่วน 1 : 1

และ 1 : 9 อย่างละ 3 ซ้ำเช่นเดียวกัน นับไซพริตใส่ในแต่ละหลุมทดสอบ 10 ตัวต่อหลุม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ควบคุมการให้แสงและตรวจสอบการนับจำนวนการลงเกาะของไซพริตทำเช่นเดียวกับการทดสอบในข้อ 4.1 ขั้นตอนการทดสอบทั้งหมดสรุปได้ในภาพที่ 18

5. การจำแนกชนิดแบคทีเรีย นำแบคทีเรียที่ทดสอบมาจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะทาง ชีวเคมีดังนี้

5.1 การย้อมแกรม (Gram's stain) โดยวิธีของฮักเกอร์ (Hucker) เพื่อจำแนกกลุ่มแบคทีเรีย (แกรมบวก / แกรมลบ)

5.2 การทดสอบเพื่อตรวจหาเอนไซม์ cytochrome oxidase (oxidase test)

5.3 การทดสอบการใช้น้ำตาล glucose ของแบคทีเรีย (O – F test)

5.4 ทดสอบการทนความเค็มของเชื้อแบคทีเรีย (halophilism)

5.5 ทดสอบการย่อยสลายดีเอ็นเอ(DNA) และเจลาติน (DNA, gelatin decomposition)นอกจากวิธีดังกล่าว มีการศึกษาลักษณะโคโลนี(colony) การสร้างสารสี (pigmentation) การเคลื่อนที่ภายใต้กล้อง(motility) การเรืองแสง (luminescence) การย่อยสลายวุ้น(agar decomposition) และการย้อมแฟลกเจลลาโดยวิธีลีฟสัน (Leifson method) ทั้งนี้จำแนกชนิดตามวิธีการของ ซิมิดู และอิซุรา (Simidu & Ezura,1988; Dechsakulwatana, 1994) ดังแสดงในภาพ 19

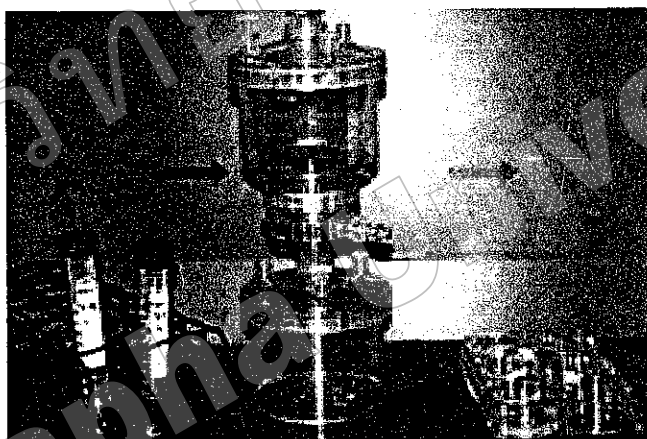
6. การวางแผนการทดลอง ทำการทดสอบการลงเกาะของไซพริตกับแบคทีเรียจำนวน 30 ชนิดโดยแบ่งการทดลองดังนี้

6.1 ทำการทดสอบผลของตัวเซลล์แบคทีเรียต่อการลงเกาะของไซพริตเปรียบเทียบแบคทีเรีย 2 ชนิด ร่วมกับกลุ่มควบคุมที่บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 15 การทดลอง โดยแต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ ดังแสดงในภาพ 20

6.2 ทำการทดสอบผลของตัวเซลล์แบคทีเรียต่อการลงเกาะของไซพริตเปรียบเทียบแบคทีเรีย 2 ชนิด ร่วมกับกลุ่มควบคุมที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 15 การทดลอง โดยแต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ ดังแสดงในภาพ 20

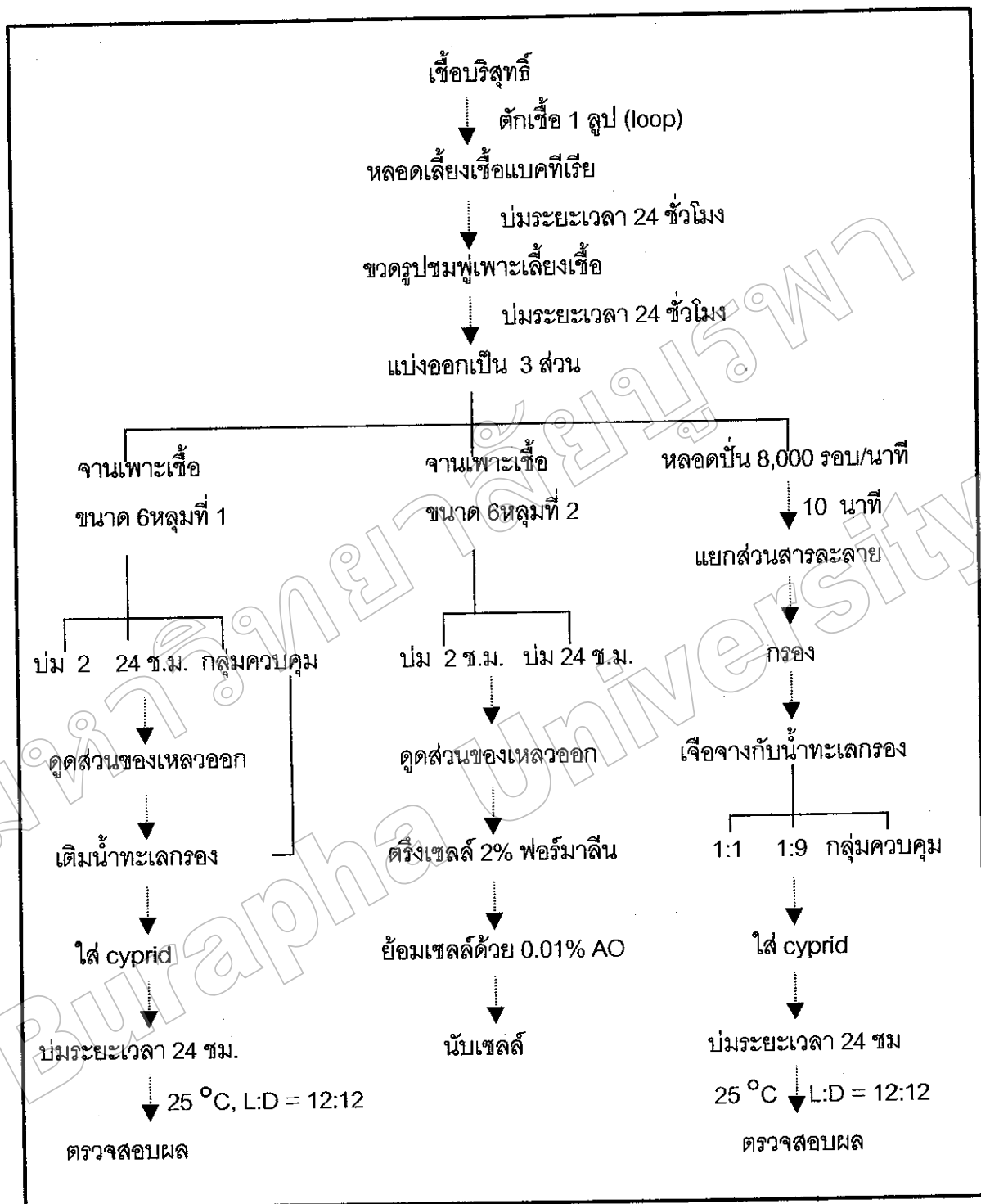


ภาพที่ 16 แสดงแบคทีเรีย IMS 289 - 6 ย้อมสีอาร์คตินอร์เรนจ์ภายใต้กล้องอีฟฟลูออเรสเซนซ์
ที่กำลังขยาย 6250 เท่า

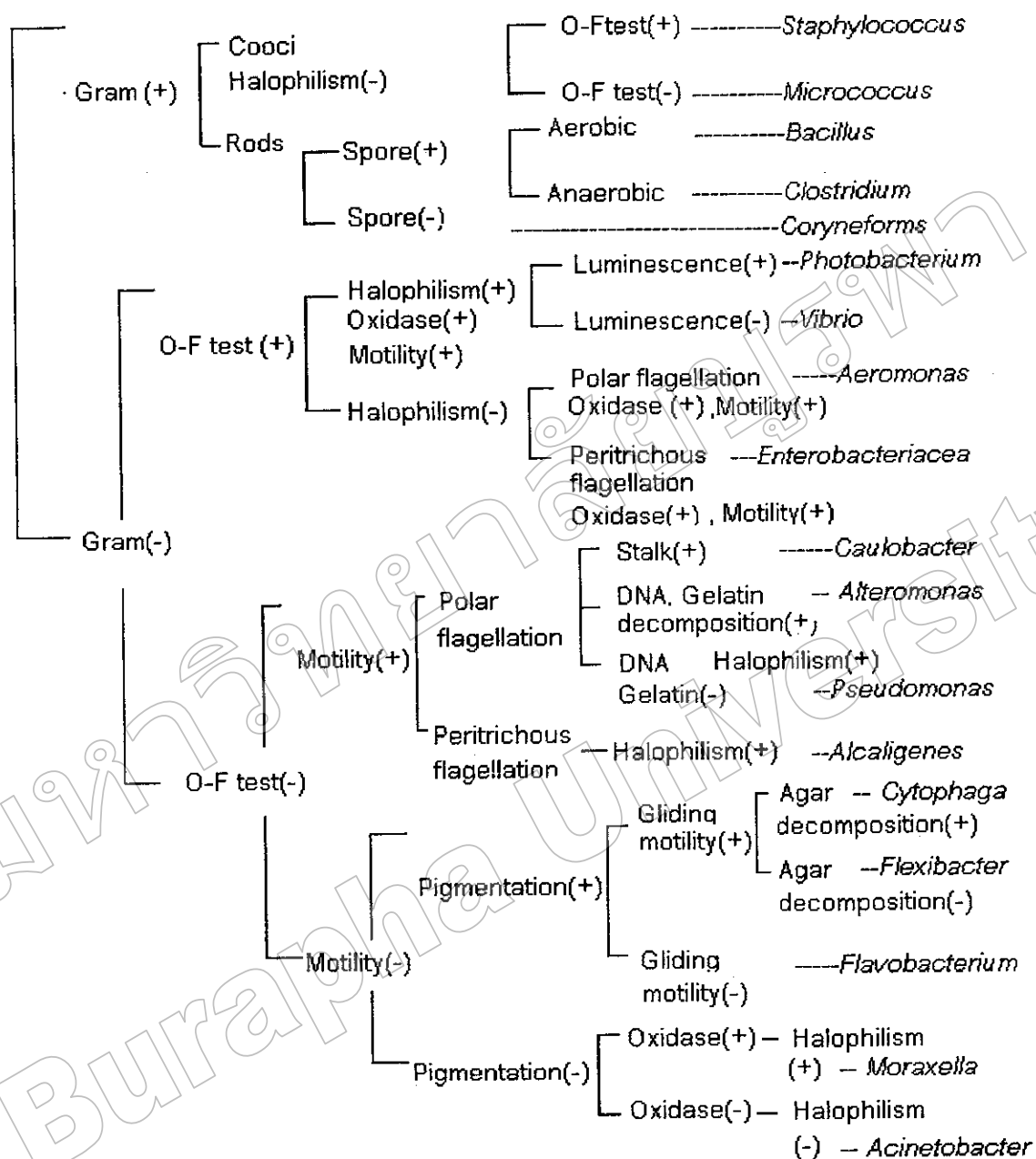


ภาพที่ 17 แสดงขั้นตอนการเตรียมน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย ทดสอบการลงเกาะของไซพริด

6.3 การทดสอบการลงเกาะของไซพริดกับน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย (supernatant)
นำน้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อจากกับน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1 : 1 และ 1 : 9 และในกลุ่ม
ควบคุม ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ORI เชื้อจากกับน้ำทะเลกรองปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1 : 1 และ
1 : 9 ในแต่ละกลุ่มทำ 3 ซ้ำ (กลุ่มควบคุมและการทดสอบในน้ำเลี้ยงเซลล์ทุกการทดลองที่กล่าว
มาข้างต้นใส่ยาปฏิชีวนะหลุมละ 5 ไมโครลิตร (μl)) ดังแสดงในภาพ 21



ภาพที่ 18 แผนผังการทดสอบการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงหินระยะไซพริดกับแบคทีเรีย



ภาพที่ 19 แผนภาพแสดงปฏิกิริยาทางชีวเคมี ในการจัดจำแนกแบคทีเรียทะเล (Simidu & Ezura, 1988; Dechsakulwatana, 1994)

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

7.1 ทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยจำนวนการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงหิน ระยะไซพริต ในแต่ละชุดการทดลอง (การทดสอบการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงหินระยะไซพริตกับฟิล์มแบคทีเรียที่บ่ม 2 ชั่วโมง , 24 ชั่วโมง) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน แบบมี 1 ตัวประกอบ (one-way-analysis of variance) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ .01 ก่อนทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน ได้ทดสอบคุณสมบัติของข้อมูลว่าเป็นไปตามนอร์มอลลิตี (normality) หรือไม่ ถ้าไม่เป็นจะแปลงข้อมูล และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของสตีวเดนท์นิวแมน -คูลส์ (Student – Newman –Keuls : SNK) ด้วยคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS/PC for Window 97

7.2 ทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ย จำนวนการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงหินระยะไซพริตในแต่ละชุดการทดลอง (การทดสอบการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงหินระยะไซพริตกับน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียตามข้อ 6.3) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมี 2 ตัวประกอบ (two-way- analysis of variance) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ .01 ก่อนทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนได้ทดสอบคุณสมบัติของข้อมูลว่าเป็นไปตามนอร์มอลลิตี (normality) หรือไม่ ถ้าไม่เป็นจะแปลงข้อมูล และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของสตีวเดนท์นิวแมน - คูลส์ (Student – Newman –Keuls : SNK) ด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS/PC for Window 97

7.3 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของจำนวนแบคทีเรียในแต่ละชุดทดลองที่ระยะเวลา 2 และ 24 ชั่วโมง โดยการทดสอบไค – สแควร์ (chi – square test) โดยมีสมมุติฐานการทดลองดังนี้

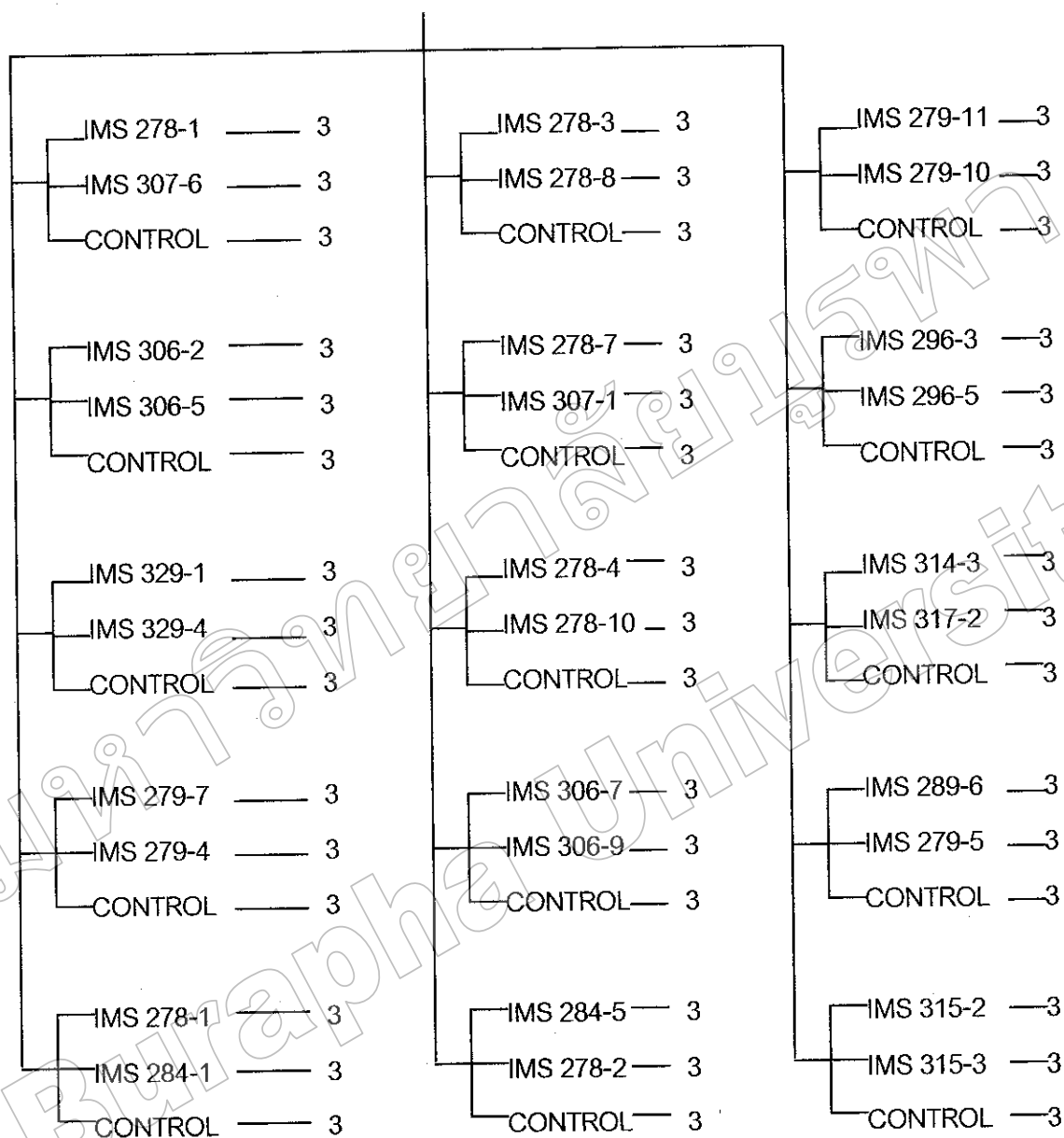
H_0 : แบคทีเรียที่บ่มไว้ที่ระยะเวลา 2 และ 24 ชั่วโมงแตกต่างกัน

H_1 : แบคทีเรียที่บ่มไว้ที่ระยะเวลา 2 และ 24 ชั่วโมงไม่แตกต่างกัน

ที่ระดับความมีนัยสำคัญ α .005 , df = k-1

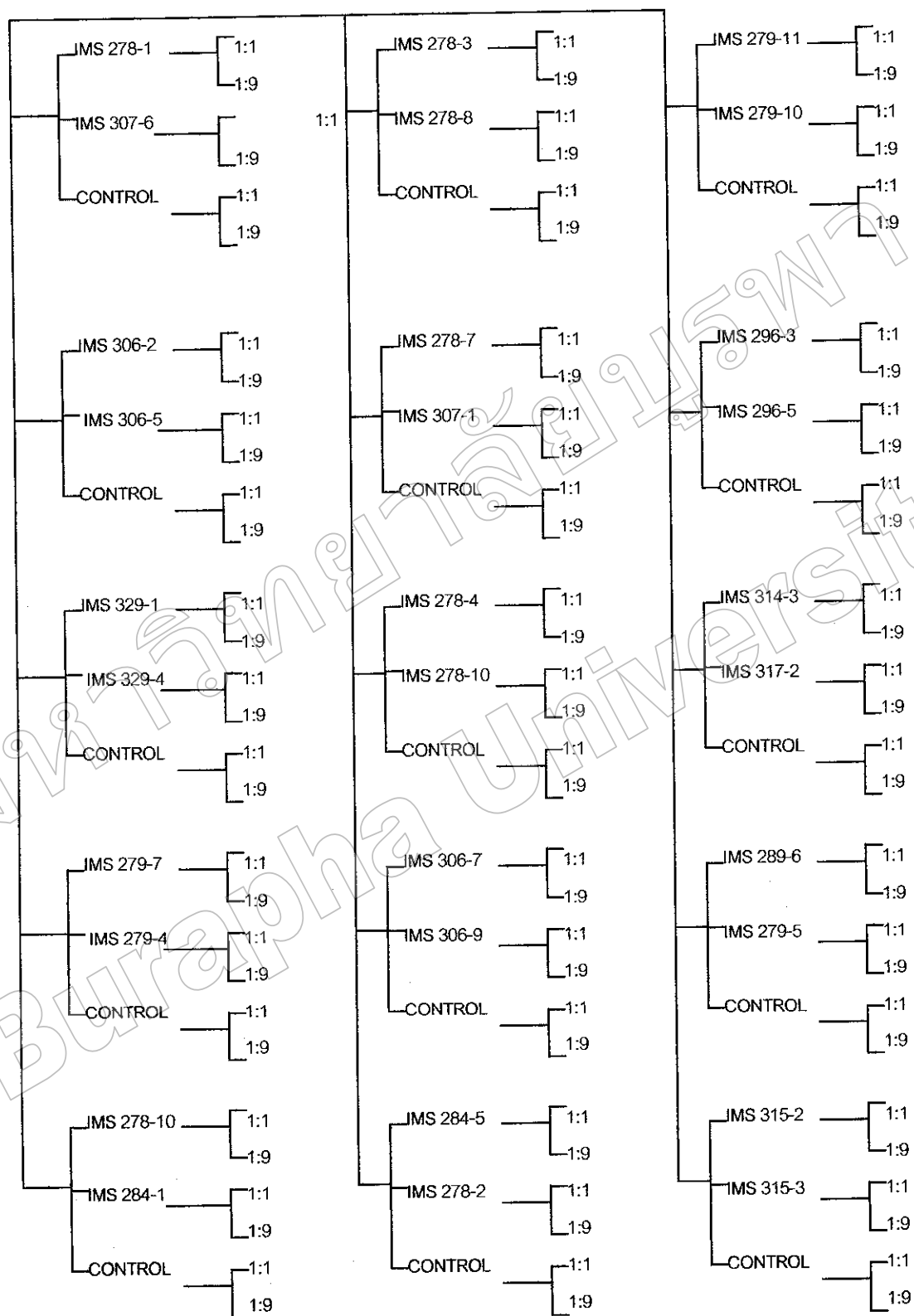
$$\text{สูตร } \chi^2 = \frac{\sum (fi - \hat{fi})^2}{\hat{fi}}$$

ระยะเวลา 2 ,24 ชั่วโมง



ภาพที่ 20 แผนโครงสร้างการทดสอบการลงเกาะของไซพริต กับเซลล์แบบที่เรียวที่ป่ม

ระยะเวลา 2 และ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 21 แผนโครงสร้างการทดสอบการลงเกาะของไซพริต กับน้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อจาก