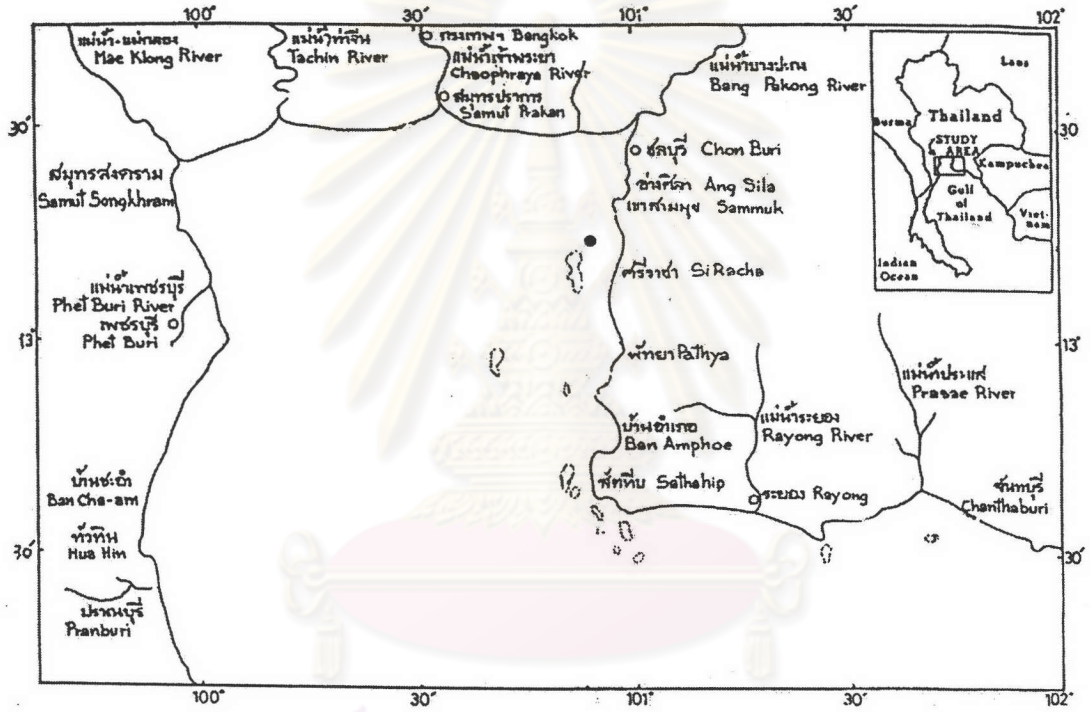
บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

สถานที่ศึกษา

สถานที่ศึกษาเป็นบริเวณชายฝั่งทะเล ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยจุดเก็บห่างจากฝั่งเป็นระยะทาง 10 กิโลเมตร ในจุดพิกัด N 13.22038^0 E100.89058^0 ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 จุดเก็บตัวอย่าง (●) บริเวณชายฝั่งทะเลตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

สภาพทั่วไปของตำบล มีลักษณะพื้นที่เต็มไปด้วยป่าเขาลำเนาไพรปกคลุมหนาแน่น ไม่มีแม่น้ำ มีแต่ลำห้วยสายยาว มีอ่างเก็บน้ำโป่งดินดำ (ความจุ 570,000 ล้านลูกบาศก์เมตร) อ่างเก็บน้ำบางพระ (ความจุ 117 ล้านลูกบาศก์เมตร) และมีโรงงาน 1 โรง อาณาเขตตำบล ทิศเหนือติดต่อกับเทศบาลเมืองแสนสุขและอบต.เหมือง อ.เมือง จ.ชลบุรี ทิศใต้ติดต่อกับเทศบาลเมืองศรีราชาและเทศบาลตำบลเจ้าพระยาสุรศักดิ์ ทิศตะวันออกติดต่อกับอบต.คลองกิ่ว อำเภอบ้านบึงและทิศตะวันตกติดต่อเทศบาลตำบลบางพระและอ่าวไทย จำนวนประชากรทั้งสิ้น 13,691 คน (ข้อมูล ณ 10 ก.พ. 2546) อาชีพหลัก ทำสวน/ทำไร่ /ประมง (ที่มา: http://www.thaitambon.com/tambon/ttambon.asp)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียและแพลงก์ตอนพืช

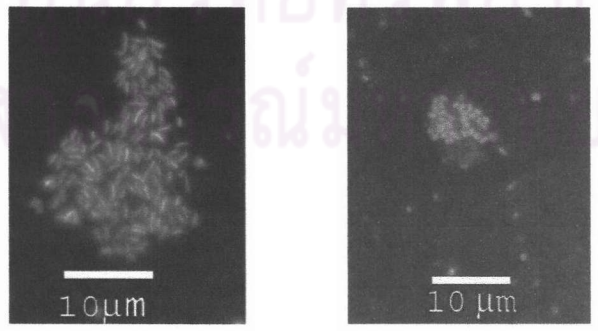
ทำการเก็บตัวอย่างทุกเดือน เริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2546 ถึงเดือนมิถุนายน 2547 โดยในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน 2546 ทำการเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียและแพลงก์ตอนพืชในรอบปีและช่วงที่มีการเกิดปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสีบ่อยครั้งในฤดูฝน

1.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียโดยใช้กระบอกเก็บน้ำ เก็บน้ำทะเลที่ระดับความลึก 0.5 และ 2 เมตรใต้ผิวน้ำ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ระดับความลึกละ 3 ซ้ำ รักษาสภาพตัวอย่างด้วยสารละลาย Glutaraldehyde ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายไม่เกิน 2 % เก็บตัวอย่างในที่มีอุณหภูมิต่ำ (Porter and Feig, 1980 และ Turley, 1993)

1.2 การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชโดยใช้กระบอกเก็บน้ำ เก็บน้ำทะเลที่ระดับความลึก 0.5 และ 2 เมตรใต้ผิวน้ำ ปริมาตรน้ำไม่ต่ำกว่า 10 ลิตร นำมากรองผ่านผ้ากรองขนาดตา 20 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างที่ค้างอยู่บนผ้ากรอง รักษาสภาพตัวอย่างด้วยสารละลาย Lugol's solution (Throndsen, 1995)

2. การศึกษาตัวอย่างแบคทีเรียและแพลงก์ตอนพืช

2.1 นำน้ำตัวอย่างที่ดองด้วยสารละลาย Glutaraldehyde กรองลงบนกระดาษกรอง Polycarbonate membrane (PC) สีดำ ขนาดตา 0.2 ไมโครเมตร ย้อมสีด้วย 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ทิ้งไว้ 5-7 นาที จึงล้างด้วยน้ำทะเลกรอง 3 ครั้ง แล้วนำไปนับหาความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียโดยนับแยกเป็นกลุ่มจากรูปร่างที่เห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Epifluorescence (Porter and Feig, 1980 และ Turley, 1993) โดยการใช้ช่วงแสงเหนือม่วง (< 390 นาโนเมตร) DAPI จะย้อมติด DNA ให้เซลล์สีฟ้าสว่าง (Bright blue) ดังรูปที่ 3.2a ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Heterotrophic bacteria และให้แสงสีส้มอิฐในแบคทีเรียกลุ่ม Autotrophic bacteria ดังรูปที่ 3.2b ส่วน Particulate matter อื่นที่ไม่มี DNA จะให้แสงสีเหลืองอ่อน



a b

รูปที่ 3.2 แบคทีเรียในทะเลเมื่อย้อมสีด้วย DAPI

a. Heterotrophic bacteria ให้แสงสีฟ้า

b. Autotrophic bacteria ให้แสงสีส้มอิฐ

2.2 นำตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชมาทำการจำแนกชนิดและนับความหนาแน่นของเซลล์โดยใช้สไลด์แบบ Sedwidge rafter counting slide ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Throndsen, 1995)

3. การศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียและแพลงก์ตอนพืช

3.1 การศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ได้จากการกรองน้ำทะเลและแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่น

เก็บตัวอย่างน้ำทะเลที่ระดับความลึก 2 เมตร แบ่งน้ำตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองชนิด PC ขนาดตา 0.8 ไมโครเมตร เพื่อแยกสารแขวนลอยและแพลงก์ตอนพืชออกให้เหลือแต่แบคทีเรีย (ขนาดเซลล์ประมาณ 0.2-0.8 ไมโครเมตร) ส่วนที่สองกรองผ่านกระดาษกรองชนิดเดียวกัน ขนาดตา 0.2 ไมโครเมตร เพื่อให้ได้น้ำทะเลปราศจากแบคทีเรีย เจือจางน้ำทะเลส่วนที่หนึ่งด้วยน้ำทะเลส่วนที่สองให้มีความเข้มข้นเป็น 10^{0} 10^{-1} 10^{-2} และ 10^{-3} เท่า (Fukami *et al.*, 1996) นำน้ำทะเลที่เจือจางแล้วแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในถาดหลุมเลี้ยงเชื้อที่มีแพลงก์ตอนพืชปราศจากแบคทีเรีย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 หลุม พร้อมทั้งชุดควบคุมที่มีแพลงก์ตอนพืชรวมกับน้ำที่ปราศจากแบคทีเรีย (แพลงก์ตอนพืชปราศจากแบคทีเรียได้รับความอนุเคราะห์ จาก คุณชลธยา ทรงรูป โดยทำการเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชในบริเวณที่ศึกษาและถูกเพาะเลี้ยงแบบ Axenic culture ที่ห้องปฏิบัติการสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล ศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) นำถาดหลุมไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างต่อมืดเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ภายใต้ความเข้มแสง 50 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ เป็นเวลา 7-14 วันสังเกตสีของตัวอย่างแพลงก์ตอนที่เลี้ยงไว้ ถ้าสีจางลงแสดงว่าปริมาณแพลงก์ตอนพืชลดลงเนื่องจากแบคทีเรียในน้ำทะเล เมื่อครบ 14 วัน สุ่มตัวอย่างมานับเซลล์แพลงก์ตอนพืชที่เหลืออยู่ในแต่ละหลุม เทียบกับการทดลองชุดควบคุม

3.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่แยกจากธรรมชาติและทำการเพาะเลี้ยงกับแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่น

เตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียซึ่งประกอบด้วย Beef extract 3 กรัม Peptone 5 กรัม ต่อน้ำทะเลกรอง 1 ลิตร ปรับความเค็มให้เป็น 30 psu และเติมวุ้น 15 กรัม เมื่อต้องการใช้เป็นอาหารแข็ง(Johnson and Case, 1989) นำน้ำทะเลกรองผ่านกระดาษกรองชนิด PC ขนาดตา 0.8 ไมโครเมตร Pour plate บนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะโคโลนีแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารแข็ง นำแบคทีเรียไปทำการ Steak plate เพื่อให้ได้โคโลนีที่บริสุทธิ์ นำแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวๆ เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 1 คืน โดยเขย่าตลอดเวลา จึงทำการตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง 2,000 รอบต่อนาที และทำการเจือจางด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียเป็น 10^{3} 10^{4} 10^{5} และ 10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำแบคทีเรียที่ความเข้มข้นระดับต่างๆใส่ในหลุม หลุมละ 0.5 มิลลิลิตรและแพลงก์ตอนพืชที่ใช้ในการทดลอง 0.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในสภาวะเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.1

4. การแยกกลุ่มของแบคทีเรียด้วยการใช้ลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ

4.1ทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวเป็นเวลา 1 คืน พร้อมทั้งเขย่าตลอดเวลา จากนั้นทำการสกัด DNA โดยดัดแปลงวิธีมาจาก Bruford *et al.* (1998) และทำเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส เพื่อตรวจสอบการมีดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

การสกัดดีเอ็นเอ

- เพิ่มจำนวนแบคทีเรียใน Nutrient broth โดยเขย่าทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน
- นำแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนแล้ว เติมลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ 1.5 มิลลิลิตร นำไปเซนติฟิวส์ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทของเหลวส่วนบนออก
- เติม TEN buffer+SDS 1 % ปริมาตร 390 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดกลับไปกลับมา
- เติม ProteinaseK เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- เติม NaCl (6M) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเซนติฟิวส์ 5 นาที
- เตรียมหลอดเซนติฟิวส์โดยเติม Absolute ethanol ลงในหลอด 1 มิลลิลิตร
- ดูด Supernatant ลงในหลอดที่เตรียมไว้
- นำหลอดไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง
- นำหลอดไปปั่น 15 นาที เทของเหลวส่วนบนออก
- ล้าง DNA ด้วย 700 ไมโครลิตรของ Ethanol 70 % ผสมให้เข้ากัน นำไปเซนติฟิวส์ 5 นาที แล้วเทของเหลวส่วนบนออก วางทิ้งไว้ให้ Ethanol ระเหยหมด (สังเกตดูต้องไม่เหลือผลึกเกลือค้างอยู่ หากมีผลึกเกลือให้ล้างด้วย Ethanol 70 % อีกครั้ง)
- เติม TE buffer 30 ไมโครลิตร เก็บระยะสั้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือเก็บไว้เป็นเวลานานที่อุณหภูมิ -20

การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

- เจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอโดย เติมน้ำ 6 ไมโครลิตรและ Loading buffer 2 ไมโครลิตร ลงบนพาราฟิล์มเติม ดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตรหรือมากกว่า นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เจือจางแล้ว load ลงใน 1%(W/V) อะกาโรสเจล และ run ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 V ปริมาณดีเอ็นเอจะถูกเปรียบเทียบกับ Series dilution λ DNA marker
- นำเจลไปดูด้วยเครื่อง Gel documentation (Biorad)

4.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยพอลิเมอเรสเชนรีแอกชั่น โดยใช้ 16SrRNA เป็น Primer (Muyzer *et.al*, 1995)

ฟอร์เวิดไพรเมอร์ (Forward primer) GM5F 5′-CCTACGGGAGGCAGCAG-3′

รีเวิร์สไพรเมอร์ (Reverse primer) 907R 5′-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3′

ในปฏิกิริยามีสารดังต่อไปนี้

DNA จากข้อ 4.1	1	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากเชื้อโรค	17.3	ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์	2.5	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์	2.5	ไมโครลิตร
ดีเอ็นทีพี	1	ไมโครลิตร
GM5F	0.25	ไมโครลิตร
907R	0.25	ไมโครลิตร
Tag polymer	0.2	ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	25	ไมโครลิตร

เขย่า และทำการหมุนเหวี่ยงเพียงเล็กน้อยเพื่อให้ส่วนผสมอยู่ที่ก้นหลอด วางลงในเครื่องพีซีอาร์ ตั้งโปรแกรมวงจรปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 34 รอบ ดังนี้

วงจรที่ 1 ขั้นที่ 1(Denaturation) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.0 นาที

วงจรที่ 2 ขั้นที่ 1(Denaturation) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.0 นาที

ขั้นที่ 2 (Annealing) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.0 นาที

ขั้นที่ 3(Extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.0 นาที

วงจรที่ 35 ขั้นที่ 1 (Polishing) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5.0 นาที

ขั้นที่ 2 (Cooling) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค้างไว้

4.3 นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 4.2 มาทำเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส จากนั้นจึงตัดเจลใส่หลอดและทำการ Purify ดีเอ็นเอ ด้วย SV wizard Gel and PCR purification (Promega)

4.4 วิเคราะห์หาลำดับเบส โดยส่งวิเคราะห์ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาลัยมหิดล

4.5 เทียบหาลำดับเบสกับฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) จาก เว็บไซต์ **http://www.ncbi.nlm.nih.gov/**

5. การวัดพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่

5.1 อุณหภูมิและความเค็มวัดด้วยเครื่องมือวัด SCT (YSI model 30)

5.2 ปริมาณออกซิเจนละลายวัดด้วยเครื่องวัด DO meter (YSI model 55)

5.3 ความเป็นกรด-เบส (pH) วัดด้วยเครื่อง pH meter แบบพกพา (HANNA)

5.4 ปริมาณสารอาหารจากข้อมูลทุติยภูมิที่ คุณสมภพ รุ่งสุภา ได้ทำการวิเคราะห์จากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากสถานที่และเวลาเดียวกับการศึกษานี้

6. การหาปริมาณคลอโรฟิลล์

เก็บตัวอย่างน้ำทะเลด้วยกระบอกเก็บน้ำ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่ระดับความลึก 0.5 และ 2 เมตร ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ 3 ซ้ำในแต่ละระดับความลึก นำน้ำตัวอย่างกรองผ่านกระดาษกรอง GF/F นำไปสกัดคลอโรฟิลล์โดยสารละลาย 90 % Acetone (Parsons *et al.*, 1984) และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยเครื่อง Fluorometer (Turner Design Model 10-AU-005)

7.การวิเคราะห์ข้อมูล

7.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณและมวลชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรีย รวมถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรียที่เป็นกลุ่มเด่นโดยพิจารณาจากปริมาณที่พบ (เซลล์ต่อลิตร) และการเปลี่ยนแปลงในแต่ละฤดูที่ทำการศึกษา

7.2 วิเคราะห์ความหลากหลายของสกุลแพลงก์ตอนพืชด้วยค่าดรรชนีความหลากหลายของ Shannon-Wiener Index; H' (จิรากรณ์ คชเสนี, 2537)

$$H' = -\sum[(n_i/N)\log(n_i/N)]$$

เมื่อ H' คือ ดรรชนีความหลากหลาย

n_i คือ จำนวนของแพลงก์ตอนพืชแต่ละสกุล/กลุ่ม

N คือ จำนวนแพลงก์ตอนพืชทั้งหมด

7.3 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อมและปริมาณสารอาหารกับความหนาแน่นของมวลชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรีย โดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Pearson Correlation)

7.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแบคทีเรียกับความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชกลุ่มเด่นและมวลชีวภาพของแพลงก์ตอนพืช โดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Pearson Correlation)

7.5 ศึกษาผลการทดลองเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่นที่เติมแบคทีเรียระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน ทั้งจากการกรองน้ำทะเลและจากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพิจารณาจากความหนาแน่นเซลล์และลักษณะเซลล์ของแพลงก์ตอนพืชที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม