บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BGA (basal BGA Medium), BG-11 (Blue Green-11 Medium), Allen's Medium และ NS III Medium

3.1.2 ฟิล์มถ่ายรูป และวัสดุสิ้นเปลืองอื่นๆ

3.1.3 เครื่องแก้ว ได้แก่ จานเพาะเชื้อ หลอดเลี้ยงเชื้อ ขวดรูปชมพู่ ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์

3.1.4 เครื่องวัดพีเอช

3.1.5 กล้องจุลทรรศน์

3.1.6 หม้อนึ่งความดันไอ

3.1.7 เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง

3.1.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3.1.9 กล้องจุลทรรศน์พร้อมกล้องถ่ายรูป

3.1.10 ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับเก็บสาหร่าย

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างและการแยกสาหร่ายให้บริสุทธิ์

3.2.1 การกำหนดสถานีเก็บตัวอย่าง

กำหนดสถานีการเก็บตัวอย่างน้ำ ดิน ก้อนหิน ต้นไม้ บริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏ จำนวน 8 สถานี เก็บตัวอย่างจุดละ 3 ตัวอย่าง

1) สถานีที่ 1 บริเวณบ้านพักอาจารย์ริมเขารูปช้างใกล้หอสบันงา
2) สถานีที่ 2 บริเวณบ้านพัก ทางทิศตะวันออกติดถนนสงขลา-นาทวี
3) สถานีที่ 3 บริเวณหอพักราชพฤกษ์ หอพักหญิงปาริชาติ
4) สถานีที่ 4 บริเวณสระน้ำใกล้โรงเรียนสาธิต
5) สถานีที่ 5 บริเวณสระน้ำหอประชุม 1
6) สถานีที่ 6 บริเวณโรงแรมสงขลาพลาเลช
7) สถานีที่ 7 บริเวณรอบหอประชุมเฉลิมพระเกียรติ
8) สถานีที่ 8 บริเวณศูนย์วิทยาศาสตร์

3.2.2 การเก็บตัวอย่างสาหร่าย

1) เก็บตัวอย่างสาหร่ายจากสถานีเก็บตัวอย่างที่กำหนด ถ้าเป็นตัวอย่างจากดิน หิน ต้นไม้ จะใช้วิธีขูด แซะ บริเวณที่มีสีเขียว

2) ตัวอย่างน้ำ จะใช้วิธีตักน้ำบริเวณขอบสระ บริเวณผิวน้ำ และ ลึกลงไป 30 เซนติเมตร 3 ตำแหน่ง โดยใช้ภาชนะที่มีปริมาตร 1 ลิตร แห่งละ 50 มิลลิลิตร ของแต่ละสถานีเก็บตัวอย่าง

3.2.3 วิธีการแยกสาหร่ายให้บริสุทธิ์

1) การเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่าย

เตรียมอาหารเหลวสูตร BGA Medium , BG-11 Medium, Allen 's Medium และ NS III Medium (ภาคผนวก ก) ใส่ในขวดๆ ละ 500 มล. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2) การทำให้สาหร่ายบริสุทธิ์

2.1) นำตัวอย่างน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วใสขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นดูดอาหารเหลวทั้ง 4 ชนิด (BGA Medium , BG-11 Medium , Allen's Medium และ NS III Medium) เติมลงไปปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยแต่ละตัวอย่างน้ำจะแยกเลี้ยงในอาหาร 4 ชนิด

2.2) วางในตู้บ่ม (growth chamber) ภายใต้แสงสว่างฟลูออเรสเซน ความเข้มแสง 60 $\mu mol/m^2/s$ ที่อุณหภูมิ 29±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จนสังเกตเห็นน้ำมีสีเขียว และมีสาหร่ายเกาะข้างภาชนะ (ภาคผนวก ข (2))

2.3) นำสาหร่ายที่เกาะข้างภาชนะซึ่งมีสีที่มีความแตกต่างกันมาลากบนผิวอาหารแข็ง ด้วยวิธีขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Streak plate technique) จากนั้นนำมาวางในตู้บ่มเชื้อภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงข้อ 2.2 เป็นเวลา 7 วัน

2.4) เลือกกลุ่มสาหร่ายที่มีลักษณะโคโลนีที่มีความแตกต่าง (ข้อ 2.3) นำมาลากบนอาหารแข็งอีกครั้ง ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง จนได้สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีเขียวที่บริสุทธิ์

2.5) นำสาหร่ายที่บริสุทธิ์เก็บไว้ในรูปอาหารเหลว และอาหารแข็งเอียง (slant agar medium) ที่บรรจุในหลอดทดลองเพื่อเป็น stock culture ต่อไป

3.2.4 การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีเขียว

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำไปจำแนกชนิดและสายพันธุ์ตามหนังสือหรืองานวิจัยของ Smith (1950), Desikachary (1959), Komárek และ Anagnostidis (1998), กาญจนภาชน์ (2527), ลัดดา (2544) และมัณฑนา (2543)

3.3 สถานที่ดำเนินการวิจัย

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและเก็บรวบรวมตัวอย่างสาหร่าย ณ บริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา สถานที่วิเคราะห์ข้อมูลและรวบรวมสายพันธุ์สาหร่าย ณ ห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์ โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา

3.4 ระยะเวลาในการดำเนินการ

ใช้เวลา 9 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2552 โดยเก็บข้อมูลสาหร่าย จำนวน 4 ครั้ง

ครั้งที่ 1 พฤษภาคม พ.ศ. 2551
ครั้งที่ 2 กรกฎาคม พ.ศ. 2551
ครั้งที่ 3 กันยายน พ.ศ. 2551
ครั้งที่ 4 พฤศจิกายน พ.ศ. 2551

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY