บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการปรับปรุงมาตรการการทำประมง เพื่อการจัดการทรัพยากรปูม้าและระบบนิเวศหญ้าทะเลอย่างยั่งยืน บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี ตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม 2560 มีขั้นตอนการดำเนินงาน**ใน**แต่ละขั้นตอนดังนี้

3.1 การศึกษาประสิทธิภาพของมาตรการการปรับปรุงการทำประมงปูม้า บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

<u>วิธีการศึกษา</u>

ศึกษาผลการดำเนินการจากการกำหนดใช้มาตรการปรับปรุงการทำประมงปูม้าอันเกิดจากความต้องการของชุมชน เมื่อปี พ.ศ. 2557 เช่น การห้ามจับปูม้าที่มีขนาดเล็กกว่า 6 เซนติเมตรไปใช้ประโยชน์ และ ศึกษาวิจัยโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างประชากรปูม้าในภาคสนาม โดยการกำหนดพื้นที่การเก็บตัวอย่างตามระบบนิเวศ ดังวิธีการของ Kunsook et al. (2014b) เป็นระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2562 จากนั้นเปรียบเทียบผลการศึกษากับการทำประมงปูม้าของชาวบ้านจำนวน 5 ราย สำหรับมาตรการการปรับปรุงขนาดตาลอบปูม้าให้มีขนาดที่ใหญ่ขึ้นตามกฎหมายนั้น ศึกษาโดยการวางลอบปูม้าที่มีขนาดต่าง ๆ 3 ขนาด ได้แก่ ขนาด 2 นิ้ว, 2.5 นิ้ว และ 3 นิ้ว ขนาดละ 30 ลูก ไปวางในพื้นที่การทำประมงปูม้า จากนั้นทำการกู้ลอบแต่ละขนาด เพื่อศึกษาผลผลิตต่อลอบ (CPUE) เปรียบเทียบผลผลิตต่อลอบของปูม้า ตลอดจนปริมาณของสัตว์น้ำพลอยได้ในลอบแต่ละขนาด โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ในช่วงเดือนพฤศจิกายน เมษายน และกรกฎาคม ซึ่งคลอบคลุมทุกฤดูกาล จากนั้นนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของลอบปูม้าแต่ละขนาดโดยใช้สถิติทดสอบ สำหรับการศึกษาการวางแนวทางเพื่อกำหนดมาตรการปรับปรุงการทำประมงปูม้าเพิ่มเติม ได้แก่ การศึกษาช่วงระยะเวลาการวางไข่ของปูม้าเพศเมีย เพื่อกำหนดมาตรการการห้ามจับปูม้าในช่วงระยะเวลาดังกล่าว โดยการศึกษาสัณฐานวิทยาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal morphology) ดัชนีความสมบูรณ์เพศ (Gonadosomatic index) ความดกไข่ (fecundity) และมิญชวิทยาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal histology) ด้วยวิธีมาตรฐานทางด้านวิทยาเนื้อเยื่อ (Standard histological techniques (Presnell and Schreibman, 1997; Suvarna et al., 2013) เพื่อใช้สำหรับยืนยันขนาดของปูม้าที่มีขนาดเล็กที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (First maturity) องค์ประกอบและการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal histology and development) รวมทั้งจุลกายพยาธิของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏราไพพรรณี

(Histopathology) นอกจากนี้ยังทำการศึกษาอัตราส่วนแม่ปูไข่นอกกระดองต่อปูม้าเพศเมียทั้งหมดอีกตัว ตามวิธีของ Miller (2001b)

3.2 การประเมินประชากรปูม้าภายหลังการเข้าสู่มาตรการการปรับปรุงการทำประมงบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

วิธีการศึกษา

3.2.1 ทบทวนวรรณกรรมปริทัศน์บริเวณอ่าวคุ้งกระเบนที่เกี่ยวข้องกับสถานภาพของประชากรปูม้า (stock) ก่อนมีมาตรการ (ชุตาภา คุณสุข, 2549; กุศล เรืองประเทืองสุข, 2553; Bhatrasataponkul et al., 2007; Kunsook et al, 2014b) และหลังการมีมาตรการ ของ ชุติมากรณ์ ชำนาญชล และคณะ (2557) และปริชมน พยัคโยธี และคณะ (2558)

3.2.2 ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างประชากรปูม้า บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี เป็นระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2562 ด้วยเครื่องมือประมงประจำที่ 2 ชนิด คือ ลอบปูม้าและอวนจมปูม้า โดยในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่างจะทำการเก็บข้อมูลปัจจัยทางกายภาพในบริเวณที่ปูม้าอาศัยอยู่ เช่น ค่าอุณหภูมิ ค่าความเค็ม ปริมาณออกซิเจนละลาย เป็นต้น

3.2.3 วิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์การเติบโต ค่าการตายรวม การเข้าทดแทนที่ ค่าขนาดแรกจับ และค่าอัตราการใช้ประโยชน์ ตามหลักเกณฑ์มาตรฐานของ Sparre and Venema (1998)

3.2.4 วิเคราะห์ตัวชี้วัดทางชีววิทยา เช่น อัตราส่วนเพศ การกระจายขนาดความกว้างกระดอง ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดและน้ำหนักของปูม้า สัดส่วนของปูม้าวัยอ่อนและตัวเต็มวัย ตามวิธีการของ Miller (2001b)

3.2.5 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความชุกชุมของปูม้าและค่าปัจจัยทางกายภาพในแต่ละแหล่งอาศัย ในพื้นที่ที่ทำการศึกษา

3.2.6 เปรียบเทียบผลการศึกษาในครั้งนี้กับงานวิจัยก่อนหน้าของชุตาภา คุณสุข (2559), Kunsook et al. (2014b), ทิพวัลย์ ป้องหมู่และคณะ (2556), จริญญา เกษมศรีและคณะ (2556), ชุติมากรณ์ ชำนาญชล และคณะ (2557), ปริชมน พยัคโยธี และคณะ (2558)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.3 การประเมินสถานภาพของระบบนิเวศหญ้าทะเล บริเวณอ่าวคุ้งกระเบนและบริเวณหาดเจ้าหลาว จังหวัดจันทบุรี

วิธีการศึกษา

3.3.1 ศึกษาการแพร่กระจายของหญ้าทะเลบริเวณอ่าวคุ้งกระเบนและบริเวณหาดเจ้าหลาว จังหวัดจันทบุรี โดยทำการระบุพิกัดทางภูมิศาสตร์ที่หญ้าทะเลแต่ละชนิดที่มีการแพร่กระจายในแต่ละฤดูกาล รวมทั้งทำการวัดค่าปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการแพร่กระจายของหญ้าทะเลด้วย เช่น ปริมาณแสง ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ ระดับน้ำ รวมไปถึงชนิดของดิน ตามวิธีการของ Roca et al.

(2016) จากนั้นนำพิกัดที่วัดได้มาสร้างเป็นแผนที่การกระจายของหญ้าทะเลแต่ละชนิด ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ArcView GIS

3.3.2 ศึกษา สถานภาพของแหล่งหญ้าทะเลโดยพิจารณาจากตัวชี้วัดต่าง ๆ เช่น การปรากฏและการหายไปของหญ้าทะเลในแต่ละฤดูกาล โดยวิเคราะห์จากแผนที่ทางอากาศ และการสำรวจภาคพื้นดิน มวลชีวภาพ ความหนาแน่น เปอร์เซ็นต์การปกคลุมพื้นที่ (Cover area) จาก 2 พื้นที่ตามระดับความลึก ได้แก่ อ่าวคุ้งกระเบน และหาดเจ้าหลาว ตามวิธีการของ Roca et al. (2016) และ Mejia et al. (2016) โดยจากผลการศึกษาจะนำไปเปรียบเทียบกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยใช้ตัวชี้วัดทางชีววิทยาและนิเวศวิทยา เพื่อประเมินผลเกี่ยวกับการรบกวน และสภาวะการฟื้นฟู

3.3.3 ศึกษาการแพร่กระจายของปูม้าวัยอ่อน และสัตว์ทะเลหน้าดินที่มีการแพร่กระจายในระบบนิเวศหญ้าทะเลในพื้นที่อ่าวคุ้งกระเบน และหาดเจ้าหลาว โดยกำหนดจุดเก็บตัวอย่างในพื้นที่หญ้าทะเลทั้ง 2 บริเวณภายหลังการสำรวจเบื้องต้น การกำหนดสถานีขึ้นอยู่กับการกระจายของแหล่งหญ้าทะเลในแต่ละบริเวณ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง 3 วิธี ได้แก่ 1) โดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างจากการวางตารางสุ่มสัตว์ (Quadrate) ขนาด 50x50 cm ทั้งหมด 3 ควอดแดรท ในแต่ละสถานี 2) เก็บตัวอย่างโดยการวางลอบแบบพับได้ ขนาดตา 2.5 นิ้ว (ขนาดที่เหมาะสมและเป็นขนาดที่กฎหมายกำหนดให้ใช้) ในพื้นที่ 2 บริเวณดังกล่าว พื้นที่ละ 200 ลูก พร้อมทั้งทำการวัดค่าปัจจัยทางกายภาพต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น ค่าความเค็ม ค่าความเป็นกรดเบส ค่าอุณหภูมิ เป็นต้น 3) เก็บตัวอย่างโดยการจับด้วยมือ และใช้สวิง ตัวอย่างสัตว์น้ำที่จับมาได้จะถูกรักษาสภาพ และนำกลับไปศึกษายังห้องปฏิบัติการ เพื่อจัดจำแนกชนิดตามลักษณะสัณฐาน และลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป

3.3.4 สัตว์น้ำที่จับมาได้ นำมาบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจัดจำแนกโดยใช้หนังสือดังนี้ พงษ์รัตน์ ดำรงโรจน์วัฒนา (2554); ศิรินันท์ ไชยวาที (2555); ศุภรักษ์ วิรัชพินทุ (2532); ชัย ดำรงค์ สิงหเจริญวัฒน์ และคณะ (2554); จริญญา เกษมศรี และคณะ (2556)

3.3.5 ตัวอย่างที่มีการจำแนกแล้ว นำมาบันทึกข้อมูลต่าง ๆ เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ สถานที่เก็บตัวอย่าง วันเวลาที่เก็บ เป็นต้น เพื่อเก็บไว้ใช้ในการเรียนการสอนของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ตลอดจนเป็นฐานข้อมูลของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณีต่อไป

3.3.6 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลการแพร่กระจายของสัตว์ทะเลหน้าดินแต่ละชนิด โดยเฉพาะกลุ่มปูม้าวัยอ่อน โดยใช้โปรแกรม Arc View GIS และทำรายงานสรุปพื้นที่แหล่งหญ้าทะเลที่เหมาะสมต่อการเป็นพื้นที่อนุรักษ์

3.37 นำเสนอแนวทางการจัดการอนุรักษ์แหล่งหญ้าทะเลต่อชุมชนและผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.4 การรวบรวมข้อมูลพันธุกรรมของปูม้าและสัตว์น้ำพลอยได้บางชนิด จากการทำประมงปูม้า บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

<u>วิธีการศึกษา</u>

3.4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.4.1 บีกเกอร์
3.4.2 ขวดรูปชมพู่
3.4.3 หลอดเอพเพนดอฟ
3.4.4 ไมโครปิเปตต์ทิป
3.4.5 ปากคีบ
3.4.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์
3.4.7 น้ำยาฆ่าเชื้อเดทตอล
3.4.8 กรรไกรผ่าตัด
3.4.9 ถุงมือ
3.4.10 นาฬิกาจับเวลา
3.4.11 กล้องถ่ายรูป
3.4.12 กระดาษทิชชู่
3.4.13 ที่ตั้งหลอดทดลอง
3.4.14 กล่องใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก
3.4.15 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ
3.4.16 เครื่องชั่งสาร
3.4.17 เครื่องไมโครเวฟ
3.4.18 ตู้แสงสีขาวและแสงอัลตร้าไวโอเลต
3.4.19 เครื่องแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้าแบบแนวนอน
3.4.20 เครื่องอุ่นสารในหลอดทดลอง
3.4.21 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
3.4.22 เครื่องผสมสารในหลอดทดลอง
3.4.23 ตู้อบลมร้อน
3.4.24 เครื่องแยกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยงเซนทริฟิวส์
3.4.25 เครื่องปั่นตกตะกอนชนิดตั้งโต๊ะ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.4.2 สารเคมี

3.4.2.1 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Flavoprep^{TM}Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Flavogen, Taiwan) สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

3.4.2..2 น้ำกลั่น

3.4.2.3 น้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่

3.4.2.4 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปGenepHlow^{TM}Gel/PCR Kit(Thermo Fisher Scientific Inc, USA) สำหรับทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

3.4.2.5 เอนไซม์ Proteinase K

3.4.2.6 สารละลาย 10x Reaction buffer

3.4.2.7 สารละลาย 50 mM $MgCl_2$

3.4.2.8 10 mM dNTP

3.4.2.9 5x PCR Enhancer

3.4.2.10 10 pmol Forward primer

3.4.2.11 10 pmol Reverse primer

3.4.2.12 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

3.4.2.13 สารละลาย DNA

3.4.2.14 ผงวุ้น Agarose

3.4.2.15 TAE (Tris-borate EDTA) Buffer

3.4.2.16 Red Safe

3.4.2.17 Tris base

3.4.2.18 100 bp Ladder (BiotechrabbitGmbh, Gemany)

3.4.2.19 Acetic Acid

3.4.2.20 Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)

3.4.2.21 1 Kb DNA Ladder (Kapa Biosystems, USA)

3.4.3 การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

3.4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ

เก็บเนื้อเยื่อตัวอย่างปูน้ำเค็ม (ศึกษาชนิดของปูน้ำเค็มเพิ่มเติมจากการทำประมงอวนจมปูม้า) จากขาเดินคู่ที่ 1 หรือ 2 น้ำหนักประมาณ 50-70 มิลลิกรัม ส่วนการศึกษาสัตว์น้ำพลอยได้ในกลุ่มปลา (Teleost) ทำการศึกษาโดยการเก็บเนื้อเยื่อตัวอย่างปลาบริเวณเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อที่อยู่ถัดลงมาจากครีบหลังน้ำหนักประมาณ 50-70 มิลลิกรัมเช่นเดียวกัน ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 ml เพื่อเตรียมสำหรับนำมาสกัดดีเอ็นเอสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Flavoprep^{TM}Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Flavogen, Taiwan) และดำเนินการสกัดตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏราไพพรรณี

3.4.3.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ภายหลังการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างจะทำการตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี 1% Agarose Gel Electrophoresis

3.4.3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน COI โดยเทคนิค PCR โดยปฏิกิริยาดังกล่าวจะประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ (PCR mixture) ซึ่งมีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร (µl) ดังนี้

น้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ 22.6 µl

10x Reaction buffer	5.0	µl
50mMMgCl2	3.0	µl
5x PCR Enhancer	10.0	µl
10mM dNTP	1.0	µl
Forword primer FishF1	1.0	µl
Reverse primer FishR1	1.0	µl
Hot start Taq DNA polymerase	0.4	µl
ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)	6.0	µl

ไพรเมอร์ที่ใช้เป็น Universal primer โดยไพรเมอร์ที่ใช้กับตัวอย่างกลุ่มปู คือ ไพรเมอร์ LCO1490 และ HCO2198(Folmer et al., 1994) และไพรเมอร์ที่ใช้กับตัวอย่างกลุ่มปลา คือ ไพรเมอร์ FishF1, FishR1 และ FishR2 (Ward et al., 2005)

3.4.3.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากผลิตผลที่ได้จากเทคนิค PCR

ภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนCOI ด้วยเทคนิค PCR ทำการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี 1 % Agarose gel electrophoresis โดย PCR product ที่ได้จะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ (Purified) โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปGenepHlow™ Gel/PCR Kit จากนั้นทำการส่ง PCR product เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (Automated sequencer) ที่บริษัท Macrogenประเทศเกาหลีใต้

3.4.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.4.4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่สมบูรณ์โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอทั้งสองสายของแต่ละตัวอย่างมาทำ Pairwise DNA alignmentโดยใช้โปรแกรม MEGA v.7 (Kumar, Stecher, and Tamura, 2016)

3.4.4.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank และฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด Barcode of Life Data System (BOLD)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.3.1 ไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล Genbank (http:///www.ncbi.nlm.nih.gov)โดยใช้โปรแกรม Blast (Basic Local Aligment Search Tool) และฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด BOLD (http://www.boldsystems.org) เพื่อตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดังกล่าวเป็นชิ้นส่วนของยีนCOI ที่ต้องการหรือไม่ และรหัสพันธุกรรมดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตชนิดใด

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.5 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากปูม้าและปูน้ำเค็ม บริเวณอ่าวคุ้งกระเบนจังหวัดจันทบุรี

วิธีการทดลอง

3.5.1 **ขั้นตอนการเตรียมปูและการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากอวัยวะภายในของปู**

เตรียมปูที่น็อคไว้ออกมาแช่น้ำทะเลประมาณ 10 นาทีเพื่อให้ปูคืนสภาพแล้วล้างปูด้วยน้ำทะเลให้สะอาดจากนั้นล้างด้วย 70 % alcohol เพื่อกาจัดเชื้อที่ไม่ต้องการออกจากตัวปูแล้วนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) จากนั้นแกะปูเพื่อเอาอวัยวะภายในของปูมาบดด้วยโกรกบดยา นำอวัยวะภายในปูที่บดแล้วใส่หลอดทดลองขนาดเพื่อเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลาย 6% yeast extractและ 0.05% SDS (buffer) ให้มีความเข้มข้น 1:10 เท่า (อวัยวะภายในปู 1 g เติม buffer 9 ml)ทำการเจือจางต่อให้มีความเข้มข้นเป็น 1:100 เท่าและ1:1000 เท่าบ่มที่ 40°C นาน 20 นาที จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 ml เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยง ISP-2 agar และ humic acid vitamin agar ที่มียา nystatin 60 μg/ml และ $K_2Cr_2O_7$ 75 μg/ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 – 4สัปดาห์เมื่อเชื้อมีการเจริญและปรากฏขึ้นเป็นโคโลนีนำโคโลนีที่คาดว่าเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีททำการแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 agar และเก็บเชื้อบ้างส่วนเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปใน 20% glycerol ที่อุณหภูมิ -70˚C

3.5.2 **ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี cross streak**

ทำการเพาะเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้บนอาหาร Muller- Hinton agar (MHA) โดยใช้พื้นที่ 1 ใน 4 ของจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วันหรือเมื่อมีการสร้างสปอร์ เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแบคทีเรียคือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 และเชื้อยีสต์คือ *Candida albicans* ATCC 90028เลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) (สำหรับแบคทีเรีย) และอาหาร potato dextrose broth (PDB) (สำหรับยีสต์)บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงนำเชื้อทดสอบมาปรับปริมาณเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ให้เท่ากับ McFarland standards No. 0.5 และ No.1 สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับซึ่งจะได้เซลล์ประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/ml ใช้ไม้พันสาลีขนาดมาตรฐานที่ปลอดเชื้อชุบเชื้อทดสอบแล้วขีดตั้งฉากให้ห่างจากรอยของเชื้อแอคติโนมัยซีทประมาณ 0.5 cm นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C หรืออุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง(สาหรับแบคทีเรีย) และ 48 ชั่วโมง (สาหรับยีสต์) สังเกตการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบบันทึกผลการทดลอง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.5.3. **การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* sp.** และ ***Fusarium* sp. ด้วยวิธี dual culture**

เตรียมเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้บนอาหาร ISP-2 agar โดยใช้สารละลายสปอร์หยดที่ขอบจานเพาะเชื้อทั้ง 4 ด้านหยดละ 10 µl บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วันจากนั้นทำการตัด

เอาโคโลนีเชื้อราบริเวณที่กำลังเจริญขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 cm นำไปวางตรงกลางจานเพาะเชื้อระหว่างโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท บ่มต่อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วันทำการวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราโดยเปรียบเทียบกับขนาดรัศมีโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุม แล้วคำนวณหาร้อยละของการยั้บยั้ง

3.5.4 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี slide culture

ตัดอาหาร ISP-2 agar เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณด้านละ 0.5 cm นำอาหาร ISP-2 agar ที่เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสวางลงบนสไลด์ถ่ายเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ต้องการศึกษาโดยแตะที่ด้านข้างทั้ง 4 ด้านของอาหารแข็ง 0.5 x 0.5 cm ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปราศจากเชื้อนำน้ำกลั่นปลอดเชื้อใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีสำลีประมาณ3 ml เพื่อรักษาความชื้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °Cเป็นเวลาอย่างน้อย 3 วันหรือจนกว่ามีการสร้างสปอร์เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วทำการถอดกระจกปิดสไลด์แล้ววางลงบนสไลด์ที่มีสีย้อม lactophenal cotton blue 1 หยด ระวังอย่าให้เกิดฟองส่วนสไลด์ที่มีชิ้นวุ้นอาหารให้เขี่ยวุ้นทิ้งไปแล้วหยด lactophenal cotton blue 1 หยดที่สไลด์ที่เคยมีวุ้นแล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ใหม่ทำเป็นสไลด์ถาวรนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พร้อมถ่ายภาพ

3.5.5 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแอคติโนมัยซีทและศึกษายีน 16S rRNA

เลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP-2 broth บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันจากนั้นทำการเก็บมวลเซลล์ใน microcentrifuge tube แล้วทำการสกัด DNA ด้วยวิธีของ Cook **และ** Meyers (2003) และ Harju **และคณะ** (2004) แล้วตรวจสอบ DNA ด้วยการทำ electrophoresis **ใน** 1% agarose gel ที่ผสม RedSafe solution (**ใน** 1X TAE bufferrun ที่ความต่างศักย์ 100 V **นาน** 25 นาที) จากนั้นนำมาทำ PCR ด้วยชุดน้ำยา BIOFACT™ S-*Taq* DNA Polymeraseโดยใช้ primer 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') ใช้สภาวะของ PCR คือ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 3 นาทีจากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบโดยใช้ denaturation อุณหภูมิ 95 °C นาน 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 56 °C นาน30วินาทีextension อุณหภูมิ 72 °C นาน 2 นาทีเมื่อปฏิกิริยาครบ 30 รอบให้ทำ final extension อุณหภูมิ 72 °C นาน 10 นาที แล้วตรวจสอบ PCR product ด้วยการทำ electrophoresis ใน 1% agarose gel และใช้ DNA marker ชนิด 1 kb Ladder

3.6 การสร้างแบบจำลองทางนิเวศวิทยา เพื่อการจัดการทรัพยากรปูม้า และระบบนิเวศหญ้าทะเล

นำข้อมูลภาคสนามที่ประกอบไปด้วยข้อมูลทางชีววิทยา นิเวศวิทยา และจากการสัมภาษณ์เชิงลึกในชุมชนทั้ง 2 บริเวณ คือ อ่าวคุ้งกระเบน และหาดเจ้าหลาว เกี่ยวกับสถานภาพของหญ้าทะเล และสัตว์น้ำที่มีการแพร่กระจายในแหล่งหญ้าทะเล มาสร้างเป็นเกมแสดงบทบาทสมมุติ และสร้างเป็นแบบจำลองทางนิเวศวิทยาขึ้นมา จากนั้นนำไปจัดประชุมเผยแพร่องค์ความรู้และความเข้าใจสู่ชุมชนและผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ตามวิธีการของ Barreteau et al. (2003), Dumrongrojwatthana et al. (2011) และ Leteurtre et al. (2011)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี