บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินของงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 6 เรื่อง ดังนี้

3.1 การประเมินสถานภาพของทรัพยากรปูม้า ภายหลังการปรับปรุงมาตรการการทำประมงปูม้า บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน

3.1.1 ทบทวน วรรณกรรมปริทัศน์ บริเวณอ่าวคุ้งกระเบนที่เกี่ยวข้องกับสถานภาพของประชากรปูม้า (Stock) ก่อนมีมาตรการ (ชุตาภา คุณสุข , 2549 : หน้า 19; กุศล เรืองประเทืองสุข , 2553 : หน้า 34; Bhatrasataponkul et al., 2007 : p. 5; Kunsook Paphavasit, & Gajaseni, 2014b : p. 46) และหลังการมีมาตรการ (ชุติมากรณ์ ชำนาญชล เปรมใจ คำจันทร์ และวาสนา เพชรเรือง , 2557: หน้า 45) ปริชมน พยัคโยธี สุดาพร ทองเติม และสุประภา นาเรือง , 2558 : หน้า 40); นิธิ คำพันธ์ และสรรัตน์ เลิศธัญญา , 2559 : หน้า 35)

3.1.2 การศึกษาในภาคสนามโดยการ ออกเก็บตัวอย่างประชากรปูม้า บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี ตั้งแต่เดือนมกราคม -ธันวาคม 2561 เป็นจำนวน 12 ครั้ง ใน 10 สถานี ได้แก่

สถานี A, B, C คือ บริเวณป่าชายเลน (Reforested mangrove)

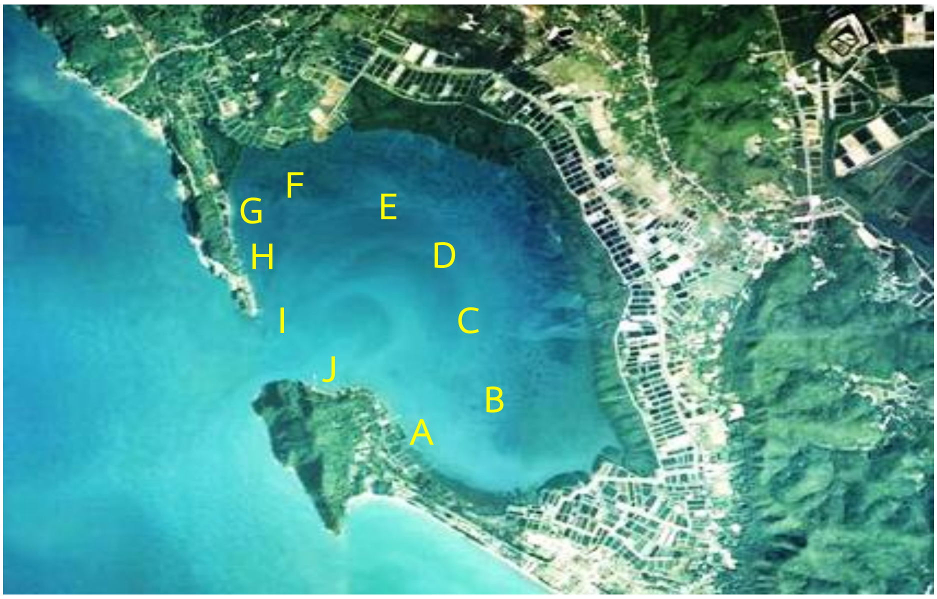
สถานี D, E คือ บริเวณหญ้าทะเลชะเงาใบยาว *(E. acoroides)*

สถานี F, G คือ บริเวณหญ้าทะเลผมนาง (*H. pinifolia)*

สถานี H คือ บริเวณหญ้าทะเลชะเงาใบยาว *(E. acoroides)*

สถานี I, J คือ บริเวณปากอ่าว (Pelagic area)

ในแต่ละสถานีทำการวางลอบปูแบบพับได้จำนวน 10 ลูก รวม ทั้งหมด 100 ลูก ดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 สถานีเก็บตัวอย่างปูม้า บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

การวางลอบเก็บตัวอย่างปูม้าจะใช้ลอบปูแบบพับได้ขนาดตาด้านข้างและด้านบนมีขนาด 1.5 นิ้ว และด้านล่างมีขนาด 2 นิ้ว ทั้งหมด 100 ลูก โดยวางสถานีละ 10 ลูก โดยใช้เวลาในการวางลอบประมาณ 2 ชั่วโมง ในการวางลอบจะใช้เหยื่อ คือ ปลาข้างเหลือง และวางทิ้งไว้ประมาณ 4 – 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการกู้ลอบขึ้นมาและปลดปูม้าและสัตว์น้ำพลอยจับได้ออกจากลอบ นำสัตว์ที่ได้ใส่ถุงและแยกสถานี ตัวอย่างปูม้าและสัตว์น้ำพลอยจับได้ที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง จะนำไปรักษาสภาพด้วยน้ำแข็ง เพื่อป้องกันการสลัดรยางค์ และป้องกันตัวอย่างเสียหายแล้วนำกลับไปศึกษาในห้องปฏิบัติการต่อไป การศึกษาปัจจัยทางกายภาพ โดยใช้เครื่องมือต่าง ๆ ดังมีรายละเอียด ดังนี้

1) ค่าความลึก วัดโดยใช้ลูกตุ้มวัดความลึก (m)

2) ค่าความขุ่น วัดโดยใช้ Secchi disc (m)

3) ค่าความเค็ม วัดโดยใช้เครื่อง Refractometer (ppt)

4) ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) และอุณหภูมิ (°C) วัดโดยใช้เครื่องวัดปัจจัยหลายตัวแปร (Multimeter) ยี่ห้อ Lutron รุ่น WA-2017SD

3.1.3 จากนั้นนำตัวอย่างปูม้าในแต่ละสถานีมาจำแนกเพศวัดความกว้างกระดอง (CW) และความยาวของกระดอง (CL) ด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์แบบดิจิทัลหน่วยเป็นมิลลิเมตร และชั่งน้ำหนัก (W) ด้วยเครื่องชั่งสองตำแหน่ง มีหน่วยเป็นกรัม บันทึกผลการศึกษา

3.1.4 การวิเคราะห์ค่าพลวัตประชากรศึกษาโดยการนำข้อมูลการกระจายขนาดความกว้างกระดองของปูม้าในแต่ละเดือนมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป FiSAT (FAO-ICLARM Stock Assessment Tools) (Gayanilo, Sparre & Pauly, 1994 : p. 29) เพื่อประมาณค่าพารามิเตอร์การเติบโต ค่าสัมประสิทธิ์การตาย รูปแบบการเข้าทดแทนที่ และอัตราการนำมา ประโยชน์ ดังนี้

3.1.4.1 ค่าพารามิเตอร์การเติบโต (growth parameter)

Von Bertalanffy (1938) ได้สร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่ออธิบายการเจริญเติบโตของสัตว์ โดยมีข้อกำหนดว่าสิ่งมีชีวิตนั้นจะต้องมีการเจริญแบบไอโซเมตริก คือ การเจริญเติบโตที่ทุกส่วนของร่างกายต้องเป็นสัดส่วนกัน โดยมีสมการการเติบโตในรูปของความยาว ดังนี้

$$L_t = L_\infty[1 - e^{-K(t-t_0)}]$$

L_t = ความยาวปูม้าเมื่ออายุ t (เซนติเมตร)

L_∞ = ความยาวสูงสุดที่สามารถเติบโตได้

K = ค่าพารามิเตอร์การเติบโตต่อปี

t_0 = อายุแรกเกิดที่ปูม้ามีความยาวเท่ากับศูนย์ (ปี)

3.1.4.2 ค่าสัมประสิทธิ์การตายรวม (Total mortality)

ค่าการตาย แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การตายตามธรรมชาติ (Natural mortality; M) และการตายจากการทำประมง (Fishing mortality; F) สัตว์น้ำมีโอกาสตายจากสาเหตุใดสาเหตุหนึ่ง คือ อาจจะตายจากการประมง หรืออาจตายจากธรรมชาติก็ได้ สามารถหาได้จากสมการดังนี้

$$Z = F + M$$

เมื่อ Z = ค่าการตายรวม

F = ค่าการตายจากการทำประมง

M = ค่าการตายจากธรรมชาติ

3.1.4.3 รูปแบบการเข้าทดแทนที่ (Recruitment pattern)

การเข้าทดแทนที่ของสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีรูปแบบการทดแทนที่แตกต่างกัน สัตว์น้ำบางชนิดมีการเข้าทดแทนที่ตลอดทั้งปี บางชนิดมีการเข้าทดแทนที่น้อยมาก การวิเคราะห์รูปแบบการเข้าทดแทนที่นั้นจะใช้ค่าสัมประสิทธิ์ คือ L_∞ และค่า K โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป FiSAT (FAO-ICLARM Stock Assessment Tools) (Gayanilo, Sparre & Pauly, 1994 : pp. 12-19)

3.1.4.4 อัตราการนำมา ใช้ประโยชน์ (Exploitation rate)

การทำประมงปูม้าเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทั้งบริโภคและจำหน่ายสามารถหาได้จากสมการ ดังนี้

$$E = F / Z$$

เมื่อ E = ค่าอัตราการนำมาใช้ประโยชน์

F = ค่าการตายจากการทำประมง

Z = ค่าการตายรวม

3.1.5 การวิเคราะห์ค่าโครงสร้างประชากร มีดังนี้

3.1.5.1 อัตราส่วนเพศ

การศึกษาอัตราส่วนเพศหาอัตราส่วนเพศระหว่างเพศผู้ต่อเพศเมีย โดยใช้สถิติทดสอบไคสแควร์ (Zar, 1984 : p. 45)

$$x^2 = \sum (O_i - E_i)^2 / E_i$$

เมื่อ x^2 = ค่าไคสแควร์ จากการคำนวณ

O_i = จำนวนตัวของแต่ละเพศ

E_i = จำนวนตัวที่คาดหวังในแต่ละเพศ

3.1.5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างกระดอง และน้ำหนักของปูม้า โดยใช้สมการเส้นตรง Y= ax+b จากนั้นทำการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์ b โดยใช้ สถิติทดสอบ t-test

3.1.5.3 การหาค่าการกระจายความกว้างของกระดองปูม้า
โดยหาค่าความถี่ของกระดองปูม้าตามช่วงอันตรภาคชั้น ตามวิธีการของ นิธิ คำพันธ์ และสรรัตน์ เลิศธัญญา (2559)

3.1.6 การวิเคราะห์ความแตกต่างของความชุกชุมของปูม้าในแต่ละสถานี ช่วงเวลา และฤดูกาล ทดสอบสถิติด้วย One-way ANOVA จากโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Statistics 16.0 โดยถ้าค่า F มีค่า > 0.05 หมายความว่าความชุกชุมของปูม้าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) แต่ถ้ามีค่า F มีค่า < 0.05 หมายความว่า ความชุกชุมของปูม้ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

3.1.7 ความสัมพันธ์ระหว่างความชุกชุมของปูม้าและปัจจัยทางกายภาพบางประการโดยใช้ค่าสหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson’s correlation)

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความชุกชุมของปูม้าและปัจจัยทางกายภาพบางประการเช่น ค่าความลึก (m) ค่าความขุ่น (m) ค่าความเค็ม (ppt) ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) และอุณหภูมิ (°C) โดยใช้ค่าสหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson’s correlation) จากโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Statistics 16.0

3.1.8 การเปรียบเทียบพลวัตประชากรปูม้ารวมไปถึงตัวชี้วัดทางชีววิทยาประชากรปูม้าก่อนและหลังการปรับปรุงมาตรการการทำประมงปูม้า บริเวณอ่าวคุ้งกระเบนจังหวัดจันทบุรี

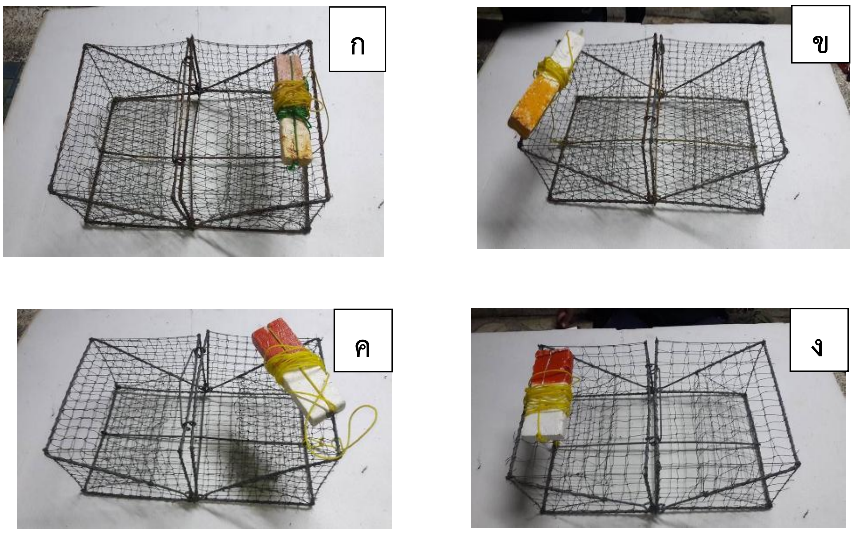
ทำการเปรียบเทียบค่าพลวัตประชากรปูม้า และโครงสร้างประชากรปูม้า รวมไปถึงตัวชี้วัดทางชีววิทยาประชากรปูม้าบางประการ ก่อนและหลังการปรับปรุงมาตรการการทำประมงปูม้าบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี ซึ่งก่อนการปรับปรุงมาตรการการทำประมงปูม้าจะศึกษาจากรายงานการวิจัยของ ชุตาภา คุณสุข (2549 : หน้า 30-50) กุศล เรืองประเทืองสุข (2552 : หน้า 17-52) และชุติมากรณ์ ชำนาญชล เปรมใจ คำจันทร์ และวาสนา เพชรเรือง (2557: หน้า 40-55) และหลัง การปรับปรุงมาตรการการทำประมงปูม้า จะศึกษาจากรายงานการวิจัย ของปริชมน พยัคโยธี สุดาพร ทองเติม และสุประภา นาเรือง (2558 : หน้า 30-45) นิธิ คำพันธ์ และสรรัตน์ เลิศธัญญา (2559 : หน้า 40-46) และสาธิต ฉันผ่อง (2560 : หน้า 32-45)

3.2 การศึกษาประสิทธิภาพของมาตรการการปรับปรุงการทำประมงปูม้าเพิ่มเติมบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

3.2.1 การศึกษาประสิทธิภาพลอบของแต่ละขนาด โดยการเก็บตัวอย่าง ภาคสนาม ในเดือนมีนาคม เดือนมิถุนายน เดือนกันยายน และเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 ส่วนการศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูม้าเพศเมีย จะเก็บตัวอย่างตลอดทั้งปีตั้งแต่เดือน มกราคม ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 จำนวน 30 ตัวต่อเดือนด้วยลอบขนาดตาอวน 2, 2.5, 3 และ 2.5 นิ้วทุกด้าน และการศึกษาขนาดความกว้างปูม้า ที่นำมาใช้ประโยชน์ ของชาวประมง จะทำการเก็บตัวอย่างตลอดทั้งปีตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561

3.2.2 ลักษณะของลอบปูแบบพับได้ที่นำมาทดลอง คือ ด้านข้างและด้านบนหุ้มด้วยอวนขนาด 1 นิ้ว แต่ด้านท้องลอบหุ้มด้วยอวนขนาดตาที่ต่างกัน3 ขนาด คือ 2, 2.5, 3 นิ้ว และลอบที่มีขนาดตาอวน2.5 นิ้วทุกด้าน ขนาดละ 30 ลูก โดยแต่ละลูกจะมีสีของทุ่นที่แตกต่างกันดังนี้

สีชมพูใช้แทนขนาดตาอวน 3 นิ้ว สีเหลืองใช้แทนขนาดตาอวน 2.5 นิ้ว
สีส้มใช้แทนขนาดตาอวน 2 นิ้ว สีแดงใช้แทนขนาดตาอวน 2.5 นิ้วทุกด้าน



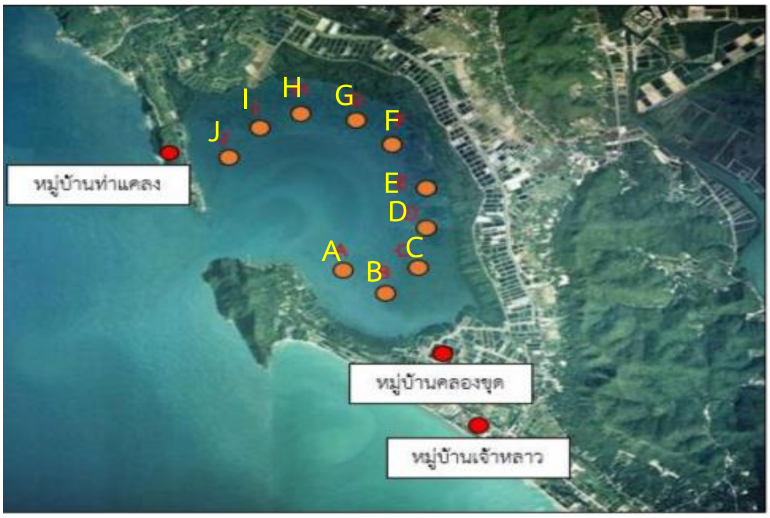
ภาพที่ 3.2 ลักษณะของลอบปูแบบพับขนาดตาต่าง ๆ (Collapsible crab trap)
ก. ขนาดตาอวน 3.00 นิ้ว ข. ขนาดตาอวน 2.50 นิ้ว
ค. ขนาดตาอวน 2.00 นิ้ว ง. ขนาดตาอวน 2.50 นิ้วทุกด้าน

3.2.3 นำลอบแต่ละขนาดใส่เหยื่อคือปลาข้างเหลืองหรือปลาสด ไปวางบริเวณปากอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี โดยวางลอบแต่ละขนาดละ 1 แถว แถวละ 30 ลูก โดยลอบแต่ละขนาดจะมี ระยะห่างกันระหว่างลูกประมาณ 4-5 เมตร จากนั้นทิ้งระยะเวลาในการวางลอบประมาณ 4-6 ชั่วโมง

ภาพที่ 3.3 เหยื่อที่ใช้ในลอบปูม้าแต่ละขนาด

ภาพที่ 3.4 แนวการวางลอบขนาดตา 2.00 นิ้ว, 2.50 นิ้ว, 3.00 นิ้ว และ 2.50 นิ้วทุกด้าน บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

3.2.4 ศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูม้า โดยการสุ่มตัวอย่างปูม้าเพศเมียในแต่ละเดือนจำนวน 30 ตัวจากสถานีเก็บตัวอย่างทั้งหมด 10 สถานี ดังภาพที่ 3.5 มาวัดความกว้างกระดอง ชั่งน้ำหนัก ศึกษาระยะการพัฒนาของรังไข่ในแต่ละเดือนเป็นระยะเวลา 1 ปี ตามวิธีการของ Kunsook (2011)



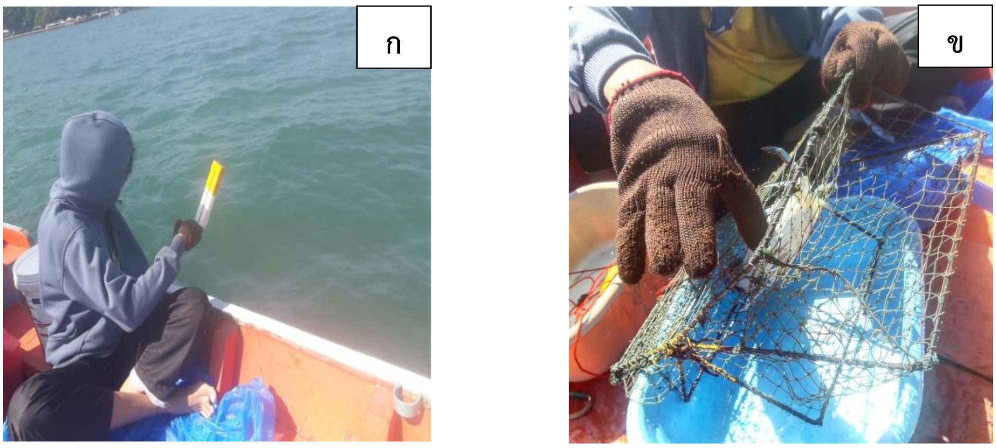
ภาพที่ 3. 5 สถานที่เก็บตัวอย่างการศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูม้าเพศเมีย บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี โดยแต่ละสถานีมีรายละเอียดดังนี้

สถานี A และ B คือ สถานีป่าชายเลนปลูก
สถานี C, D และ E คือ สถานีหญ้าทะเลชะเงาใบยาว
สถานี F และ G คือ สถานีหญ้าทะเลผมนาง
สถานี H, I และ J คือ สถานีปากอ่าวคุ้งกระเบน

3.2.5 ทำการวัดค่าปัจจัยทางกายภาพของน้ำทะเลโดยการวัดค่าความเค็มโดยใช้ refractometer ค่าปริมาณออกซิเจนละลาย (Dissolved oxygen หรือ DO) ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ค่าอุณหภูมิ โดยใช้เครื่องวัดปัจจัยหลายตัวแปร (Multimeter) ยี่ห้อ Lutron รุ่น WA-2017SD การวัดค่าความลึกโดยใช้ลูกตุ้มวัดระดับความลึกและค่าความขุ่นวัดโดยใช้ secchi disc เพื่อศึกษาค่าปัจจัยทางกายภาพที่มีความสัมพันธ์กับความชุกชุมของปูม้าเพศเมียในแต่ละสถานีและฤดูกาล ดังภาพที่ 3.6

ภาพที่ 3.6 การวัดค่าปัจจัยทางกายภาพต่าง ๆ บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี
ก. การวัดค่าความเค็ม
ข. การวัดอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ
ค. การวัดค่าความลึกและความขุ่นของน้ำทะเล

3.2.6 เมื่อกู้ลอบขึ้นมาแล้วนำตัวอย่างปูม้าและสัตว์น้ำพลอยจับได้ออกจากลอบนำมาใส่ถุงที่มีแผ่นป้ายสีที่ระบุสถานี โดยที่แผ่นป้ายแต่ละสีจะใช้แทนขนาดของตาลอบ จากนั้นรักษาสภาพตัวอย่างด้วยน้ำแข็ง ดังภาพที่3.7 และนำกลับไปศึกษาต่อยังห้องปฏิบัติการชีววิทยาต่อไป

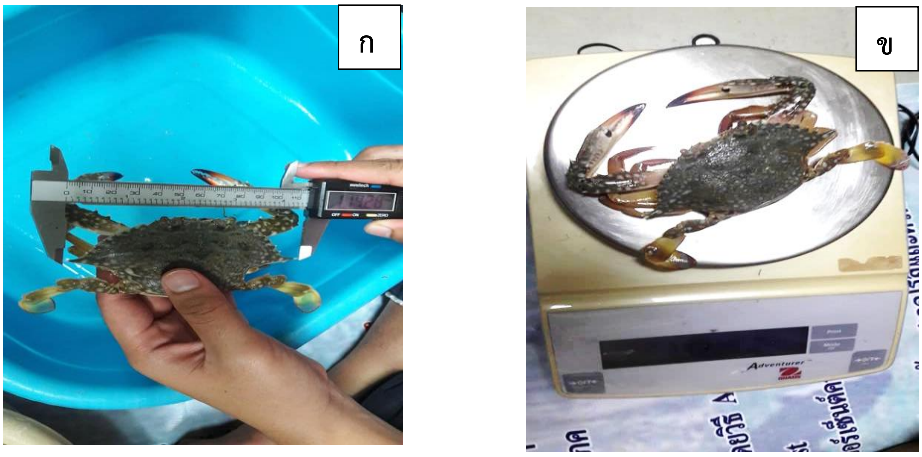


ภาพที่ 3.7 การกู้ลอบปูม้า บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

ก. การนำลอบขึ้นมาจากทะเล

ข. นำตัวอย่างปูม้า และสัตว์น้ำพลอยได้ออกจากลอบ

3.2.7 นำตัวอย่างปูม้ามาแยกเพศ วัดความกว้างกระดอง (CW) และความยาวกระดอง (CL) ด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์แบบดิจิทัล มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร และชั่งน้ำหนัก (W) ด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง มีหน่วยเป็นกรัม ดังภาพที่ 3.8 นับจำนวนปูม้าที่จับมาได้แต่ละสถานีในลอบปูม้าแต่ละขนาด เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าอัตราการจับปูม้าต่อไป



ภาพที่ 3.8 การศึกษาปูม้าในห้องปฏิบัติการ

ก. การวัดความกว้างกระดองของปูม้า (CW)

ข. การชั่งน้ำหนักของปูม้า (BW)

3.2.8 สัตว์น้ำพลอย จับได้ที่จับมาจะนำมาถ่ายรูปทั้งด้านหน้าและด้านหลัง ดังภาพที่ 3.9 แล้วนำไป จัดจำแนกอย่างน้อยในระดับสกุลโดยใช้เอกสารอ้างอิง เช่น หนังสือคู่มืออันดามันปูทะเลไทยของ ธรณ์ ธำรงนาวาสวัสดิ์ และพันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์ (2550) หนังสือหอยในเมืองไทย (Shells of Thailand) ของพงษ์รัตน์ ดำรงโรจน์วัฒนา (2554) และหนังสือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง 2 แอนเนลิดา ถึง โพรโทคอร์ดาตาของ บพิธ จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์ (2546) เป็นต้น

ภาพที่ 3.9 การถ่ายรูปสัตว์น้ำพลอยจับได้
ก. ภาพด้านหน้า
ข. ภาพด้านหลัง

3.2.9 สำหรับการศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูม้าเพศเมีย ทำโดยการแยกปูม้าเพศเมียออกมา 30 ตัว เพื่อศึกษาระยะการพัฒนาของรังไข่ในกระดองด้วยการผ่าตัดเปิดกระดองแล้วสังเกตระยะการพัฒนาของรังไข่ (Ovary) ตามวิธีการของ Kunsook (2011)

3.2.10 การวิเคราะห์ข้อมูลอัตราส่วนเพศของปูม้าเพศผู้ต่อเพศเมียในลอบแต่ละขนาดโดยใช้สถิติทดสอบไคสแควร์ (χ^2) มีสูตรดังนี้

$$x^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

เมื่อ χ^2 คือ ค่าไคสแควร์จากการคำนวณ
O คือ จำนวนตัวของแต่ละเพศ
E คือ จำนวนตัวที่คาดหวังในแต่ละเพศ

3.2.11 ศึกษาการกระจายความกว้างของขนาดกระดองปูม้าในลอบแต่ละขนาดโดยการจัดเรียงความถี่ตามลำดับอันตรภาคชั้น ชั้นละ 1.0 เซนติเมตร เพื่อหาความถี่ของปูแต่ละขนาด

3.2.12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของตาลอบปูม้าขนาดต่าง ๆ เช่น อัตราการจับทั้งหมดปริมาณปูม้าต่อลอบ (Catch Per Unit and Effort, CPUE) การกระจายขนาดความกว้างกระดองของปูม้า ในลอบแต่ละขนาด ปริมาณ และชนิด ของสัตว์น้ำพลอย จับได้แต่ละขนาดในลอบ โดยใช้สถิติทดสอบ (One-Way ANOVA) ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2.13 ศึกษาร้อยละของการพัฒนารังไข่ ของปูม้าเพศเมีย ในระยะต่าง ๆ (ชุตาภา คุณสุข, 2549 : หน้า 19; Svane and Hooper, 2004 : p. 10-13) ด้วยวิธีการแยกตัวอย่างปูม้าเพศเมียจากลอบในภาคสนาม และจากอวนจมปูม้าของชาวบ้าน

3.2.14 ศึกษาค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (Gonado somatic index: GSI) คำนวณโดยใช้สมการของ Sukumaran และ Neelakantan (1996) โดยสมการดังนี้

$$GSI = (OW/W) \times 100$$

เมื่อ GSI คือ ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ

OW คือ น้ำหนักรังไข่ (g)

W คือ น้ำหนักตัวปูม้าเพศเมีย (g)

3.2.15 ศึกษาขนาดแรกเริ่มสืบพันธุ์ (First size at maturity) คำนวณโดยคิด จากสัดส่วนปูม้าเพศเมียที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ (ระยะที่ 3-6) ต่อจำนวนปูม้าเพศเมียทั้งหมด (ระยะที่ 1-6) และเนื่องจาก อายุขัยของปูม้าที่อยู่ได้โดยประมาณ 1 ปี แต่อัตราการอยู่รอดถึงอายุ 1 ปี เป็นไปได้น้อยเพราะถูกจับมาใช้ประโยชน์ก่อนจึงคิดขนาดแรกเริ่มสืบพันธุ์จากค่าครึ่งชีวิตคือ 0.5 ต่อขนาดความกว้างกระดองของปูม้าเพศเมีย

3.2.16 ศึกษาขนาดของความกว้างกระดองของปูม้าที่นำมาใช้ประโยชน์โดยการสุ่มวัดกระดองจำนวน 50 ตัวต่อเดือน หลังจากนั้นนำมาหาความถี่การกระจายของความกว้างกระดอง

3.2.17 ศึกษาความแตกต่างของความชุกชุมของปูม้าเพศเมียในแต่ละสถานีและฤดูกาล โดยใช้สถิติทดสอบตามวิธีการของ สุมาลัย ปิดตาทะสา และอังค์วรา รื่นรมย์ (2560)

3.2.18 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความชุกชุมของปูม้าเพศเมียกับปัจจัยทางกายภาพที่เกี่ยวข้องโดยใช้ค่าสหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson’s Correlation)

3.2.19 เปรียบเทียบสถานภาพของทรัพยากรปูม้าจากขนาดตาลอบต่าง ๆ และชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูม้า ภายหลังการจัดตั้งธนาคารปูม้า

3.3 การศึกษาข้อมูลพันธุกรรมของปูม้าและปูน้ำเค็ม ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

3.3.1 การรวบรวมตัวอย่างปูน้ำเค็ม

ตัวอย่างปูน้ำเค็ม บริเวณอ่าวคุ้งกระเบนจังหวัดจันทบุรี ที่ใช้ในการศึกษา ดีเอ็นเอบาร์โค้ด มีจำนวน 49 ตัวอย่าง รหัสตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 3.1 โดยรวบรวมจากการใช้เครื่องมือลอบแบบพับ ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2561 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ.2562ตัวอย่างปูที่ได้มาถูกรักษาสภาพโดยการแช่น้ำแข็ง และนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.3.2 วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
2. เครื่องอุ่นสารในหลอดทดลอง (Heating block incubator)
3. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler)
4. ชุดแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้าแบบแนวนอน (Electrophoresis set)
5. ตู้แสงสีขาวและแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet-visible transilluminator)
6. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์(Microcentrifuge tube) ขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
7. เครื่องปั่นตกตะกอนชนิดตั้งโต๊ะ (Spin down centrifuge)
8. เครื่องดูด- จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Auto pipette)
9. ถุงมือแพทย์ (Latex disposable gloves)
10. ปากคีบ (Forcep)
11. บีกเกอร์ (Beaker)
12. ขวดรูปชมพู่ (Flask)
13. หลอดเอพเพนดอฟ (Eppendorf tube)
14. ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette tip)
15. กรรไกรผ่าตัด (Operating scissor)
16. นาฬิกาจับเวลา (Stopwatch)
17. กล้องถ่ายภาพ (Camera)
18. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
19. เครื่องชั่งสาร (Balance)
20. กระดาษชำระ (Tissue paper)
21. เครื่องไมโครเวฟ (Microwave)
22. ที่ตั้งหลอดทดลอง (Rack)
23. กล่องใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก (Rack of microtube)
24. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.3.3 สารเคมีในการทดลอง

1. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA extraction Mini Kit (Flavogen,Taiwan) สำหรับสกัดดีเอ็นเอ
2. น้ำกลั่น (Distilled water)
3. น้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ (Deionized distilled water)

4. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid,Taiwan) สำหรับทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

5. เอนไซม์ Proteinase K

6. เอนไซม์ Hot Start PCR Master Mix,2X (Apsalagen, Germany)

7. สารละลายดีเอ็นเอ (DNA template)

8. ผงวุ้นอะกาโรส(Agarose powder)

9. เอทานอลบริสุทธิ์99.5 % (Absoluteethanol)

10. TAE (Tris-acetate EDTA) Buffer

11. 10 pmol Forward primer

12. 10 pmol Reverse primer

13. RedSafe™Nucleic Acid Staining Solution

14. Loading dye

15. 1 Kb DNA Ladder (Kapa Biosystems, USA)

16. 100 bp DNA Ladder (BiotechrabbitGmbh, Germany)

3.3.4 วิธีการวิจัย

3.3.4.1 การเก็บเนื้อเยื่อตัวอย่างใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์

นำตัวอย่างไปล้างทำความสะอาด และเช็ดให้แห้ง จากนั้นเก็บเนื้อเยื่อตัวอย่างปูจากส่วนขาเดินและก้ามปูด้วยปากคีบและ กรรไกรใส่ในหลอดเอพเพนดอฟ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3.3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอจาก เนื้อเยื่อ ปูตัวอย่าง

สกัดดีเอ็นเอ จากเนื้อเยื่อปูตัวอย่าง ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ TissueGenomic DNA Extraction Mini Kit (Flavogen, Taiwan) โดยใช้เนื้อเยื่อปูปริมาณ 0.07 กรัม และดำเนินการสกัดตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

ตารางที่ 3.1 รหัสตัวอย่างและผลการจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน

รหัสตัวอย่าง	**ชื่อวงศ์**	**ชื่อสามัญ**	**ชื่อวิทยาศาสตร์**
Kb_C01	Portunidae	ปูขาว	*Scyllaparamamosain*
Kb_C02	Portunidae	ปูขาว	*Scylla paramamosain*
Kb_C03	Portunidae	ปูขาว	*Scylla paramamosain*
Kb_C04	Portunidae	ปูม่วง	*Scylla tranquebarica*
Kb_C05	Portunidae	ปูดำ	*Scylla olivacea*
Kb_C06	Portunidae	ปูหินก้ามฟ้า	*Thalamita crenata*
Kb_C07	Ocypodidae	ปูก้ามหัก	*Macrophthalmus vietnamensis*
Kb_C08	Portunidae	ปูกะตอยแดง	*Charybdis affinis*
Kb_C09	Portunidae	ปูขาว	*Scylla paramamosain*
Kb_C10	Portunidae	ปูขาว	*Scylla paramamosain*
Kb_C11	Portunidae	ปูม้า	*Portunus pelagicus*
Kb_C12	Portunidae	ปูม้าลาย	*Charybdis feriatus*
Kb_C13	Portunidae	ปูม้า	*Portunus pelagicus*
Kb_C14	Portunidae	ปูหินก้ามฟ้า	*Thalamita crenata*
Kb_C15	Portunidae	ปูม้า	*Portunus pelagicus*
Kb_C16	Portunidae	ปูหินก้ามฟ้า	*Thalamita crenata*
Kb_C17	Portunidae	ปูหินก้ามฟ้า	*Thalamita crenata*
Kb_C18	Portunidae	ปูหินก้ามฟ้า	*Thalamita crenata*
Kb_C19	Portunidae	ปูหินก้ามฟ้า	*Thalamita crenata*
Kb_C20	Ocypodidae	ปูก้ามหัก	*Macrophthalmus vietnamusis*
Kb_C21	Portunidae	ปูกะตอยแดง	*Charybdis affinis*
Kb_C22	Portunidae	ปูกะตอยแดง	*Charybdis affinis*
Kb_C23	Portunidae	ปูกะตอยแดง	*Charybdis affinis*
Kb_C24	Portunidae	ปูกะตอยแดง	*Charybdis affinis*

ตารางที่ 3.1 รหัสตัวอย่างและผลการจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน(ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ชื่อวงศ์	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์
Kb_C25	Portunidae	ปูกะตอยแดง	*Charybdis affinis*
Kb_C26	Portunidae	ปูม้า	*Portunus pelagicus*
Kb_C27	Portunidae	ปูม่วง	*Scylla tranquebarica*
Kb_C28	Portunidae	ปูม่วง	*Scylla tranquebarica*
Kb_C29	Portunidae	ปูม้า	*Portunus pelagicus*
Kb_C30	Portunidae	ปูม้า	*Portunus pelagicus*
Kb_C32	Portunidae	ปูขาว	*Scylla paramamosain*
Kb_C33	Portunidae	ปูขาว	*Scylla paramamosain*
Kb_C34	Portunidae	ปูหินก้ามฟ้า	*Thalamita crenata*
Kb_C35	Portunidae	ปูหินก้ามฟ้า	*Thalamita crenata*
Kb_C36	Portunidae	ปูกะตอยแดง	*Charybdis affinis*
Kb_C37	Portunidae	ปูม่วง	*Scylla tranquebarica*
Kb_C38	Portunidae	ปูขาว	*Scylla paramamosain*
Kb_C39	Calappidae	ปูหนุมานหกตุ่ม	*Ashtoret lunaris*
Kb_C40	Grapsidae	ปูแป้น	*Varuna yui*
Kb_C41	Diogenidae	ปูเสฉวนขาส้ม	*Clibanarius infraspinatus*
Kb_C42	Portunidae	ปูกะตอยแดง	*Charybdis affinis*
Kb_C43	Portunidae	ปูกะตอยแดง	*Charybdis affinis*
Kb_C44	Diogenidae	ปูเสฉวนขาฟ้า	*Clibanarius longitarsus*
Kb_C45	Portunidae	ปูดาวสามจุด	*Portunus sanguinolentus*
Kb_C46	Portunidae	ปูหินอินโดแปซิฟิก	*Charybdis hellerii*
Kb_C47	Portunidae	ปูหินก้ามสัน	*Charybdis natator*
Kb_C48	Majidae	ปูแมงมุม	*Hyastenus diacanthus*
Kb_C49	Portunidae	ปูขาว	*Scylla paramamosain*

หมายเหตุ: Kb หมายถึง อ่าวคุ้งกระเบน C หมายถึง ปูน้ำเค็ม

3.3.4.3 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมเจลอะกาโรส ความเข้มข้น1% โดยชั่งผงวุ้นอะกาโรส 0.30 กรัม ต้มในสารละลาย0.5X TAE Buffer ที่ 60 องศาเซลเซียส จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 30 มิลลิลิตร

2) แล้วเติมสารละลายRed Safeลงไปปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร จากนั้นเทใส่พิมพ์ เสียบหวีไว้ให้เกิดหลุมแล้วทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

3) เตรียมเครื่อ งElectrophoresis ปรับการทำงานที่ 100โวลต์นาน 25นาที

4) วางถาดที่เตรียมไว้ลงในเครื่อง แล้วเติม 0.5XTAE Buffer ให้พอท่วมเจล

5) นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 4 ไมโครลิตรผสมกับ Loading dye 1 ไมโครลิตรจากนั้นโหลดลงหลุมเจลจนครบทุกตัวอย่าง โดยโหลดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Kapa Biosystems, USA) 4 ไมโครลิตร ลงในหลุมเจลช่องแรก

6) นำแผ่นเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องUltraviolet-visible Transilluminator เพื่อตรวจสอบผลการ สกัดดีเอ็นเอ และถ่ายภาพเจล

3.3.4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือการพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR)

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของยีนไซโตโครมออกซิเดสวัน (Cytochrome oxidase I:COI)ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยปฏิกิริยาประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ (PCR mixture) ซึ่งมีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ดังนี้

น้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่	17.4	ไมโครลิตร
Forward primer (10 µM)	0.8	ไมโครลิตร
Reverse primer (10 µM)	0.8	ไมโครลิตร
Hot Start PCR Master Mix	25	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)	6.0	ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ที่ใช้เป็น Universal primer ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน COIคือ ไพรเมอร์ LCO1490 และ HCO2198 (Folmer et al., 1994) โดยมีลำดับเบสดังนี้

LCO1490: 5’–GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG -3’ (Forward primer)

HCO2198: 5’–TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA -3’ (Reverse primer)

โปรแกรมปรับเปลี่ยนอุณหภูมิสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C นาน 5 นาที 1 รอบ จากนั้น	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C นาน 30 วินาที	35 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ	45 °C นาน 30 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72	°C นาน 1 นาที	
Final extention	ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 10 นาที		

3.3.4.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในส่วนของยีน COI ด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้วทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCRproduct) ที่ได้ด้วยวิธี Agarosegelelectrophoresis ตามขั้นตอนดังที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3.3.4.3 และทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ (Purified) โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GenepHlow^{TM} Gel/PCR Kit จากนั้นทำการส่งผลผลิตพีซีอาร์ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (Automated sequencer) ที่บริษัท Macrogenประเทศเกาหลีใต้

3.3.4.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างชิ้นส่วนที่สมบูรณ์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอทั้งเส้น Forward และ Reverse ของแต่ละตัวอย่างที่ได้นำมาทำ Pairwise DNA alignment เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างดีเอ็นเอเป้าหมายที่สมบูรณ์ โดยใช้โปรแกรม MEGA v.7.0

3.3.4.7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับฐานข้อมูลพันธุกรรมสาก ล GenBankและฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด Barcode of Data System (BOLD) เพื่อระบุชนิดปูตัวอย่าง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างจากข้อ 3.5.1 นำไปทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม Blast (Basic Local Aligment Search Tool) และฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดBOLD (http://www.boldsystems.org) เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ได้ว่ามีความคล้ายคลึงกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดใด

3.3.4.8 การสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูทุกตัวอย่าง นำมาทำการเปรียบเทียบ(Multiple sequence alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่นำมาจากฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank และ BOLD ที่มีความคล้ายคลึงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมากที่สุด (ตารางที่ 3.2) นำผลจากการทำ Multiple sequence alignment มาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) โดยใช้โปรแกรม MEGAv.7.0 ทดสอบความเชื่อมั่นของ Tree ด้วยการทดสอบ Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำแล้วสร้างConsensus tree ด้วยวิธี 50% majority rule ซึ่งจะแสดง Branch ใด ๆ ใน Consensus tree ก็ต่อเมื่อBranch นั้นปรากฏ Tree ที่ได้จากการทดสอบBootstrap มากกว่าครึ่งหนึ่ง (50%) ของ Treeทั้งหมด

ตารางที่ 3.2 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูน้ำเค็มที่นำมาจากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank และBOLD

ชนิดปู	**Accession No. ใน GenBank**	**Accession No. ใน BOLD**
S. paramamosain	JX457150 และ MG197997	GBCMD12359-13
S. olivacea	FJ827760	GBCMD12359-13และ SLCRB004-14
S. tranquebarica	FJ827759	GBMTG1485-16
T. crenata	MH425338	GBCMD14135-13
M. latreillei	LC097126	GBCM11545-17
C. variegata	EU284142 และKT365723	GBCMD1864-08 และGBCM5763-17
P. sanguinolentus	EU284144	GBCMA6747-14
C. hellerii	KX060324	MDECA118-10
Majoidea sp.	GQ260908	GBCMD11209-13
P. pelagicus	KT382858	GBCMD14133-13
C. feriatus	EU284140	GBCMD1866-08
A. lunaris	LK391941	GBMTG3678-16
V. litterata	KX372552	GBCMD0177-06
C. infraspinatus	LN626968	GBMTG3682-16

3.4 การจัดทำฐานข้อมูลชีววิทยาประชากรปูม้า เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการปรับปรุงมาตรการการทำประมงปูม้า ในบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน

3.4.1 การรวบรวมข้อมูล ได้แก่ การนำข้อมูลประชากรปูม้ารายปี มาจัดทำเป็นฐานข้อมูลการทำประมงปูม้า บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี โดยจัดเรียงเป็น Timeline ซึ่งเริ่มตั้งแต่การประเมินประชากรปูม้าก่อนเกิดมาตรการการทำประมงปูม้า ในปี 2556 และหลังเกิดมาตรการการทำประมงปูม้าในปี 2557 จนถึงการปรับปรุงมาตรการการทำประมงปูม้า โดยมีเนื้อหาและรายละเอียด ดังนี้

- ข้อมูลพลวัตประชากร ได้แก่ ค่าพารามิเตอร์การเติบโต การตาย การเข้าทดแทนที่ อัตราการนำไปใช้ประโยชน์
- ข้อมูลโครงสร้างประชากร ได้แก่ อัตราส่วนเพศ ความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างกระดอง และน้ำหนักของปูม้า การกระจายความกว้างกระดองของปูม้า ความชุกชุมแต่ละพื้นที่ ฤดูกาล สัดส่วนของปูม้าวัยอ่อน และตัวเต็มวัย
- ข้อมูลชีววิทยาการสืบพันธุ์ และมิญชวิทยา ได้แก่ การเจริญของรังไข่ ความดกไข่ ขนาดแรกเริ่มสมบูรณ์เพศ ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ และฤดูการวางไข่
- ข้อมูลชนิดความชุกชุมและการปรากฏของสัตว์น้ำพลอยได้ จากการทำประมงปูม้า
- ข้อมูลพันธุกรรมของปูม้า และปูน้ำเค็ม จากการทำประมงปูม้า
- ข้อมูลมาตรการการทำประมงปูม้า ของประเทศ และบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน
- ข้อมูลการปรับปรุงการทำประมงปูม้าบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน
- ข้อมูลผู้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำประมงปูม้า
- ข้อมูลกิจกรรมการรณรงค์การทำประมงปูม้าอย่างยั่งยืน ของอ่าวคุ้งกระเบน
- ข้อมูลงานวิจัยปูม้าในประเทศ ประเทศอาเซียน และต่างประเทศ

โดยงานวิจัยนี้จะจัดข้อมูลตามลำดับเวลา เริ่มต้นตั้งแต่ปี 2555 สิ้นสุดที่ปี 2562 ซึ่งมีฐานข้อมูลหลัก ได้แก่ 1) สถานภาพและโครงสร้างของประชากรปูม้าในแต่ละปี 2) มาตรการปรับปรุงการทำประมง ได้แก่ การเปรียบเทียบประสิทธิภาพตาลอบ 3) ข้อมูลพันธุกรรมของปูม้า และสัตว์น้ำบางชนิด 4) จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในปูม้า และปูชนิดต่าง ๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ที่มีการสร้างสารชีวภาพเพื่อยับยั้งเชื้อที่มีความสำคัญทางการเกษตรและการแพทย์ด้วย 5) แบบจำลองทางนิเวศวิทยา และ 6) กิจกรรมเกี่ยวกับการอนุรักษ์และจัดการทรัพยากรปูม้าร่วมหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง โดยนำข้อมูลดังกล่าวไปไว้ใน Google drive ที่สามารถแชร์ข้อมูลให้ผู้ที่เกี่ยวข้องและสนใจเข้าไปศึกษาได้ รวมทั้งมีการจัดสร้างเป็น QR Code เพื่อให้สะดวกต่อการเข้าถึงด้วย

3.5 การวิจัยต่อยอด การสำรวจจุลินทรีย์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปูม้าและปูน้ำเค็มในบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน

3.5.1 การคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากปูม้าและปูน้ำเค็มในบริเวณอ่าวคุ้งกระเบนและการเก็บรักษา

(ก) ชนิดของปูน้ำเค็มและการเตรียมตัวอย่าง

ชนิดของปูน้ำเค็ม

1) ปูกะตอย (*Charybdis affinis*)

2) ปูดำ (*Scylla serrata*)

3) ปูม้า (*Portunus pelagicus)*

4) ปูหินก้ามฟ้า (*Thalamita crenata*)

การเตรียมตัวอย่าง

1) นำตัวอย่างปูที่เก็บรักษาด้วยความเย็นมาล้างด้วยน้ำประปา โดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านตัวปูเพื่อให้ปูคืนสภาพ

2) นำตัวอย่างปูแช่ใน 70% alcohol นาน 1 นาที และ 3% sodium hypochlorite นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที ตามลำดับ ทำในตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อที่ไม่ต้องการ

3) แกะตัวอย่างปูที่ผ่านการ ล้างแล้ว ทำการแยกอวัยวะภายในและเหงือกออกจากตัวปูด้วยปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำออกมาใส่ในโกร่งบดสาร โดยแยกเป็นเหงือกและอวัยวะภายใน จากนั้นบดให้ละเอียด

4) นำอวัยวะภายในและเหงือกของตัวอย่างปูที่บดละเอียดแล้วมาใส่หลอดทดลองขนาด 13×150 mm แล้วเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลาย 3% yeast extract ที่ผสมกับ 0.05% SDS buffer กำหนดให้มีความเข้มข้น 1:10 เท่า (ชั่งเหงือกและอวัยวะภายในของตัวอย่างปู 1 g แล้วเติม buffer 9 ml) จากนั้นเจือจางต่อให้มีความเข้มข้นเป็น 1:100 เท่า และ 1:1000 เท่า ตามลำดับ

5) นำสารละลายของตัวอย่างปูที่ผ่านการเจือจางแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 20 นาที

(ข) อาหารเลี้ยงเชื้อ การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างปูน้ำเค็ม การทำบริสุทธิ์และการเก็บรักษาเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

1) Humic acid vitamin agar (HVA) ดัดแปลงโดยใช้น้ำทะเลเป็นตัวทำละลาย

2) International Streptomycyces Project-2 agar (ISP-2 agar) ดัดแปลงโดยใช้น้ำทะเล

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างปูน้ำเค็ม

1) ดูดสารละลายตัวอย่างของปูปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ humic acid vitamin agar (HV agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project-2 agar (ISP-2 agar) ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล จากนั้นเกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหาร

2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์

3) สังเกต การเจริญของเชื้อแอคติโนมัย ซีทบนอาหารดังกล่าวซึ่งจะปรากฏเป็นโคโลนีมีลักษณะคล้ายผง แป้ง และมีลักษณะแห้งคล้ายหนังสัตว์ ทำการ แยก เชื้อแอคติโนมัยซีท ที่เจริญ บนอาหาร ISP-2 agar (เตรียมจากน้ำกลั่น)

การทำบริสุทธิ์และการเก็บรักษาเชื้อแอคติโนมัยซีท

1) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท ต่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้อาหาร ISP-2 agar (เตรียมจากน้ำกลั่น)

2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ หากยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำการแยกต่อด้วยอาหาร ISP-2 agar (เตรียมจากน้ำกลั่น)

3) ทำการเก็บรักษาเชื้อที่แยกได้โดยการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ให้เจริญและสร้างสปอร์บน อาหาร ISP-2 agar (เตรียมจากน้ำกลั่น) แบบเอียง (ประมาณ 7-14 วัน)

4) ใช้ 20% glycerol ชะสปอร์ และเก็บเชื้อในรูปของสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 1.0 ml ในหลอด cryotube แล้วเก็บในตู้ -70 °C

(ค) การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยวิธี slide culture

1) ทำการตัดอาหารเลี้ยงเชื้อISP-2 agar เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณด้านละ 1 เซนติเมตร

2) นำอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสวางลงบนสไลด์ นำเชื้อที่ต้องการศึกษาแตะที่ด้านข้างทั้ง 4 ด้านของอาหาร ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปราศจากเชื้อ

3) เติมน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 3 ml เพื่อให้เกิดความชื้น แล้วนำไปเก็บในที่มืด สังเกตการเจริญของเชื้อเกือบถึงขอบของกระจกปิดสไลด์ (ประมาณ 7 วัน)

4) เมื่อเชื้อเจริญ เต็มที่แล้ว ถอดกระจกปิดสไลด์ออก นำมาเตรียมสไลด์โดยย้อมเชื้อด้วยสีย้อม lactophenal cotton blue 1 หยด ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ นำไป ศึกษาลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมบันทึกภาพ

5) สไลด์ที่มีวุ้นอาหารวางอยู่ด้านบนให้เขี่ยวุ้นที่มีเชื้อเจริญทิ้งไป แล้วนำสีย้อม lactophenal cotton blue มาหยดลงบริเวณที่เคยวางวุ้นอาหารแล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปลอดเชื้อ

6) นำสไลด์ไป ศึกษาลักษณะของเชื้อ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ชนิดใช้แสง พร้อมบันทึกภาพ และใส่ scale bar ในภาพ

3.5.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท

ก) การคัดเลือกสายพันธุ์แอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ทดสอบ

1) *Bacillus cereus* TISTR 2372

2) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753

4) *Escherichia coli* ATCC 25922

5) *Candida albicans* ATCC 90028

การทดสอบความสามารถของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี cross streak

1) เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยก ได้บนอาหาร ISP-2 agar โดยใช้พื้นที่ 1 ใน 4 ส่วนของเพลท

2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน หรือบ่มจนเชื้อสร้างสปอร์

3) เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 5 ชนิด โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar (NA) เมื่อเชื้อเจริญถ่ายเชื้อดังกล่าวลงในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ส่วนเชื้อยีสต์ *C.*

albicans เพาะเลี้ยงบนอาหาร yeast extract malt extract agar (YM) เมื่อเชื้อเจริญถ่ายเชื้อดังกล่าวลงในอาหาร yeast extract malt extract broth (YMB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สำหรับแบคทีเรีย) และ 48 ชั่วโมง (สำหรับยีสต์)

5) ทำการปรับปริมาณเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland standards No. 0.5 (สำหรับแบคทีเรีย) และ No. 1.0 (สำหรับยีสต์) จะได้เซลล์ประมาณ 1.5 × 10^8 CFU/ml

6) ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อชุบเชื้อทดสอบที่ปรับปริมาณแล้ว ขีดตั้งฉากและห่างจากรอยขีดของเชื้อแอคติโนมัยซีทประมาณ 0.5 เซนติเมตร

7) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สำหรับแบคทีเรีย) และ 48 ชั่วโมง (สำหรับยีสต์)

8) สังเกตการเจริญและการถูกยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ บันทึกระยะยับยั้งเป็นมิลลิเมตร (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ)

ข) การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่การคัดเลือก

1) ทำการ streak เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกให้เต็มผิวหน้าอาหาร ISP-2 agar จำนวน 200 เพลท

2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ หรือสังเกตการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3) ตัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยใบมีดที่ปลอดเชื้อให้เป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ ขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร ใส่ลงในขวดโหลแก้ว ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ให้ได้ประมาณ 1 ใน 3 ส่วนของขวดโหลแก้ว

4) เติมตัวทำละลาย ethyl acetate ให้ท่วมชิ้นวุ้นสูงประมาณ 2 เซนติเมตร ปิดฝาให้แน่นโดยแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) นำสารสกัดที่ได้มากรองผ่านสำลีและกระดาษกรอง จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ให้เหลือแต่สารสกัดหยาบที่ต้องการ

6) ชั่งน้ำหนัก บันทึกลักษณะของสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บไว้ในตู้เย็นและให้พ้นจากแสง

ค) การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่คัดเลือก

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (minimal inhibitory concentration; MIC) ด้วยวิธี broth microdilution (National Committee for Clinical Laboratory Standards)

การเตรียมสารสกัดหยาบสำหรับการทดสอบ

1) เตรียมสาร สกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทโดยการละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นเป็น 10,240 µg/ml

2) ทำการเจือจางสารสกัดหยาบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB โดย วิธี 2-fold serial dilutions ใน 96 well microplate ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบอยู่ในช่วง 1- 2,048 µg/ml และมีปริมาตรเป็น 100 µl

การเตรียมสารสำหรับชุดควบคุม

เตรียมสารละลาย 1% DMSO ใช้เป็น negative control และเตรียมยาปฏิชีวนะ gentamicin ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 0.3125-40.0 µg/ml เป็น positive control

การเตรียมเชื้อทดสอบ

1) เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อnutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญทำการตรวจสอบลักษณะของเชื้อและความบริสุทธิ์ของเชื้อ

2) นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่มีลักษณะปกติและมีความบริสุทธิ์เลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 1 ml บ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3) ทำการปรับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ทดสอบด้วย 0.85% NaCl ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland standards No. 0.5 จะมีความเข้มข้นของ เชื้อประมาณ 1.5×10^{8} CFU/ml และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 2×10^{5} CFU/ml ด้วยอาหาร NB

การทดสอบ หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ แบคทีเรียทดสอบ

1) เติมสารแขวนลายของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่ปรับปริมาณเชื้อแล้วปริมาตร 100 µl ลงใน 96 well microplate ที่สารสกัดหยาบ จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเป็น 1,024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 และ 0.5 µg/ml ตามลำดับ และความเข้มข้นของยา gentamicin เป็น 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 และ 0.15625 µg/ml ตามลำดับ

2) บ่ม 96 well microplate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การอ่านผลการทดลอง

เมื่อครบเวลาทำการอ่านผลการทดลองโดยสังเกตความขุ่นของแต่ละหลุม โดยหลุมที่มีลักษณะใส (ไม่ขุ่น) อยู่ที่ความเข้มข้นต่ำสุดใด ให้รายงานเป็นค่า MIC

การ หาความเข้มขันต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (minimum bactericidal concentration; MBC)

1) ทำการดูดสารแขวนลายผสมของสารสกัดหยาบและ จุลินทรีย์ทดสอบจากทุกหลุมที่ไม่ขุ่น ปริมาตรหลุมละ 10 µl มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA)

2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) ตรวจสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งโดยหากไม่มีการเจริญของเชื้ออยู่ที่ความเข้มข้นต่ำสุดใด ให้รายงานความเข้มข้นเป็นค่า MBC

3.5.3 การจัดจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีทด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

ก) การสกัด DNA โดยวิธีของ Cook และ Meyers (2003)

1) เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 broth ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 150 rpm รอให้เชื้อเจริญ

2) ดูดเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหาร ISP-2 broth ปริมาตร 4 ml ใส่ในหลอด centrifuge tube ขนาด 15 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง

3) เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 ml จากนั้นถ่ายใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง

4) เติม TE buffer ปริมาตร 500 µl จากนั้นนำไป vortex และนำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง

5) เติม TE buffer ใหม่ ปริมาตร 500 µl จากนั้นนำไป vortex แล้วนำตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที และพักตัวอย่างให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 7000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

6) ถ่ายส่วนที่เป็น supernatant ปริมาตร 300 µl ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้สำหรับการทำ PCR

ข) การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction

primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA

Name	Primer sequences (5’ --> 3’)	Gene	PCR product size (bp)
m27F	5’- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3’	16S rRNA	1500
m1525R	5’- AAGGAGGTGATCCAGCC -3’		

การเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA และการทำให้ผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

1) เตรียม PCR mixture ลงใน microcentrifuge tube โดยผสมสารต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1.1) ddH_2O	34.5	µl
1.2) 10X PCR buffer	5.0	µl
1.3) 10 mM dNTPs	1.0	µl
1.4) Primer m27F (10 µM)	1.0	µl
1.5) Primer m1525R (10 µM)	1.0	µl
1.6) 5X Band Helper^{TM}	5.0	µl
1.7) *Taq* DNA polymerase	0.5	µl

2) เติม DNA template ที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 2 µl ลงใน PCR tube ผสมให้เข้ากัน และนำไปเข้าเครื่อง themocycler โดยมีสภาวะของ PCR ดังนี้

2.1) ขั้นตอน pre denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที

2.2) ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที

2.3) ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 40 วินาที

2.4) ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 90 วินาที

2.5) ขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

3) ตรวจสอบผลผลิตPCR ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยการใช้ 1% agarose gel เตรียมด้วย 1X TAE buffer ที่ผสมตัวติดตาม DNA red saft นำผลผลิต PCR ปริมาตร 5 µl ผสมกับ loading dye ปริมาตร 1 µl แล้วนำเข้าเครื่อง electrophoresis พร้อมด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder) 1 kb (+) DNA Ladder ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ 1X TAE buffer เป็น running buffer แล้วสังเกตการเกิดแถบของDNA ด้วยเครื่อง UV transilluminator

การทำให้ผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

การทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ทำโดยการนำผลผลิต PCR มาทำ gel electrophoresis อีกครั้ง โดยใช้ 1% agarose gel เตรียมด้วย 1X TAE buffer ที่ผสมตัวติดตาม DNA red saft จากนั้นนำผลผลิต PCR ตัวอย่างปริมาตร 45 µl ผสมกับ loading dye ปริมาตร 5 µl แล้วนำเข้าเครื่อง electrophoresis ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ 1 X TAE buffer จากนั้นทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR Clean-UP & Extraction Kit ของบริษัท PureDirex ตามขั้นตอนดังนี้

1) Gel Extraction

1) ตัด agarose gel ออกให้เหลือแต่ส่วนของ DNA ให้มีน้ำหนักประมาณ 300 มิลลิกรัม 2) ย้าย DNA ใน agarose gel ที่ตัดแล้วใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

3) เติม buffer B ปริมาตร 500 µl จากนั้นนำไป vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 ˚C เป็นเวลา 10 นาที

4) ในระหว่างการบ่ม ทำการ vortex หลอดตัวอย่างทุก ๆ 2 นาที

5) พักตัวอย่างให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2) Binding

1) ย้ายส่วน supernatant ปริมาตรประมาณ 600-800 µl ใส่ลงใน PG column ที่สวมอยู่ใน collection tube

2) นำไปเข้าเครื่อง centrifuge ที่ 13,500 rpm เป็นเวลา 30 วินาที

3) ทิ้งส่วนที่ไหลผ่าน PG column และนำ PG column สวมลงใน collection tube เดิม

3) Wash

1) เติม buffer W1 ปริมาตร 400 µl ลงใน PG column

2) นำไปเข้าเครื่อง centrifuge ที่ 13,500 rpm เป็นเวลา 30 วินาที

3) ทิ้งส่วนที่ไหลผ่าน PG column และนำ PG column ใส่ลงใน collection tube เดิม4) เติม buffer W2 ปริมาตร 600 µl ลงใน PG column

5) นำไปเข้าเครื่อง centrifuge ที่ 13,500 rpm เป็นเวลา 30 วินาที

6) ทิ้งส่วนที่ไหลผ่าน PG column และนำ PG column ใส่ลงใน collection tube เดิม

7) นำไปเข้าเครื่อง centrifuge ที่ 13,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อล้าง buffer W2 ที่เหลืออยู่ออกให้หมด

4) Elution

1) เติม buffer E ปริมาตร 50 µl (แบ่งเป็น 2 x (25 µl)) ลงตรงกลางของ PG column ที่สวมด้วย microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ (ตัดฝาออก) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

2) นำไปเข้าเครื่อง centrifuge ที่ 13,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที

3) ถ่าย purified PCR product ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่

4) ตรวจสอบผลผลิตpurified PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis อีกครั้งแล้วเก็บที่ -20 ˚C

ค) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

primer ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

Name	Primer sequences (5’ --> 3’)	Gene	product size (bp)
m27F	5’- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3’	16S rRNA	~600
800R	5’- GGATTAGATACCCTGGTA -3’		
1492R	5’- TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3’		

1) นำ purified PCR product ที่มีความบริสุทธิ์แล้วส่งไป sequence ยังบริษัท 1^{st} Base ประเทศมาเลเซีย

2) นำผล sequence ที่ได้มาประกอบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ให้ครบโดยให้ได้ใกล้เคียงขนาดของยีน 16S rRNA ประมาณ 1500 bp ด้วยโปรแกรม MEGA version 7

3) นำ ผลการ ประกอบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นทำการ BLAST ในเว็บไซต์ https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi และสร้างตารางเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้กับเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใกล้เคียง

ง) การสร้าง phylogenetic tree

1) นำข้อมูลที่ได้จากการ BLAST ของเว็บไซต์ https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi และข้อมูลชื่อเชื้อจากการสร้างตารางเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีทมาหาชื่อสายพันธุ์ต้นแบบ (Type strain) โดยใช้ข้อมูลจากเว็บไซต์ https://lpsn.dsmz.de/genus/streptomyces

2) ทำการสร้าง file ในรูปแบบ Fasta ที่ประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ผู้วิจัยแยกได้ และของสายพันธุ์ต้นแบบ (Type strain) ที่ใกล้เคียงจากผลการ BLAST และของสายพันธุ์ต้นแบบ (Type strain) ที่เป็น out group คือเชื้อ *Catenulispora graminis* BR-34^{T} (HM748599)

3) นำ file ในรูปแบบ Fasta ไป จัดทำ phylogenetic tree เพื่อศึกษาลักษณะทางวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining และใช้ค่า Bootstrap เท่ากับ 1000 ด้วยโปรแกรม MEGA version 7

3.6 การจัดการความรู้ เพื่อเผยแพร่องค์ความรู้งานวิจัย ผ่านการใช้แบบจำลองทางนิเวศวิทยา

นำฐานข้อมูลทางชีววิทยา นิเวศวิทยา ข้อมูลพันธุกรรม และจากการสัมภาษณ์เชิงลึกในชุมชุนทั้ง 2 บริเวณ คือ อ่าวคุ้งกระเบน และหาดเจ้าหลาว มาวิเคราะห์ เพื่อปรับปรุงมาตรการการทำประมง จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมด มาสร้างเป็นเกมแสดงบทบาทสมมุติ และสร้างเป็นแบบจำลองทางนิเวศวิทยา แล้วนำไปจัดประชุมเผยแพร่องค์ความรู้ และความเข้าใจ สู่ชุมชนและผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ตามวิธีการของ Barreteau et al. (2003), Dumrongrojwatthana et al. (2011) และ Leteurtre, Kunsook & Dumrongrojwatthana (2011)