

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ศึกษาการย่อยสลายของใบโกงกางใบเล็กและใบถั่วขาวในป่าชายเลน
 - 1.1 ถุง (litter bag) ทำจากตาข่ายไนลอนขนาดช่อง 2.0 มิลลิเมตร เย็บเป็นถุงขนาด 10x20 เซนติเมตร (ภาพประกอบ 4)
 - 1.2 เชือกไนลอน
 - 1.3 ถ้วยกระเบื้อง
 - 1.4 เตาอบ
 - 1.5 เครื่องชั่งละเอียด (ความแม่นยำ 0.01 มิลลิกรัม)
 - 1.6 กล้องสเตอริโอซูม (stereo zoom)

2. อุปกรณ์ศึกษาคุณภาพน้ำ
 - 2.1 เทอร์โมมิเตอร์
 - 2.2 เครื่องวัดดัชนีหักเหแสง (refractometer)

3. อุปกรณ์ศึกษาความหลากหลายของราที่พบในการย่อยสลายใบไม้ในป่าชายเลน
 - 3.1 ถุง (litter bag) ขนาดเดียวกับข้อ 1.1
 - 3.2 เชือกไนลอน
 - 3.3 อาหาร glucose-yeast extract agar (Johnson and Sparrow, 1961, quoted in Kohlmeyer and Kohlmeyer, 1979 : 20) (ส่วนประกอบแสดงในภาคผนวก ก)
 - 3.4 เหล็กเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร
 - 3.5 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
 - 3.6 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
 - 3.7 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
 - 3.8 กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope



ภาพประกอบ 4 ถุงใส่ใบไม้เพื่อศึกษาการย่อยสลายใบไม้ในป่าชายเลน



(ก)



(ข)

ภาพประกอบ 5 สภาพป่าชายเลน พื้นที่ศึกษา

(ก) ภาพรวมของป่า

(ข) สภาพภายในป่า

4. อุปกรณ์ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของราที่พบในการย่อยสลายใบไม้ในป่าชายเลน

- 4.1 อาหาร cellulolysis basal medium agar ที่มี carboxymethylcellulose ผสมอยู่ 2% (w/v) (Pointing, 1999 : 17-33) (ส่วนประกอบแสดงในภาคผนวก ก)
- 4.2 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- 4.3 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 4.4 สารละลาย Congo red ที่มีความเข้มข้น 2% (w/v)
- 4.5 สารละลาย NaCl ที่มีความเข้มข้น 1 M

5. อุปกรณ์ศึกษาอัตราการย่อยสลายใบโกงกางใบเล็กและใบถั่วขาวในห้องปฏิบัติการโดยราที่มีบทบาทในการย่อยเซลลูโลสได้ดี

- 5.1 หลอดดูดตราไวโอเล็ต
- 5.2 น้ำในป่าชายเลนซึ่งเก็บจากพื้นที่ศึกษา
- 5.3 ปีเปตขนาด 10 มิลลิลิตร
- 5.4 ชุดกรองของเหลว
- 5.5 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- 5.6 ถ้วยกระเบื้อง
- 5.7 เตาอบ
- 5.8 เครื่องชั่งละเอียด (ความแม่นยำ 0.01 มิลลิกรัม)

วิธีดำเนินการ

1. พื้นที่ศึกษาและจุดเก็บตัวอย่าง

พื้นที่ที่เลือกในการศึกษาคือป่าชายเลนในอำเภอยะหริ่ง จังหวัดปัตตานี โดยเลือกบริเวณปากแม่น้ำซึ่งอยู่ติดกับก้นอ่าวปัตตานี (ภาพประกอบ 5) ป่าชายเลนในบริเวณนี้พบต้นโกงกางใบเล็กเป็นพืชเด่น ซึ่งเติบโตเต็มที่กระจายทั่วพื้นที่ศึกษา ดินเลนในบริเวณนี้มีความอ่อนมากกว่าบริเวณอื่นๆของป่าชายเลนที่อยู่รอบๆ และยังเป็นพื้นที่ที่อยู่ห่างไกลจากชุมชน จึงมีความอุดมสมบูรณ์สูง

จุดที่ทำกรวางและเก็บตัวอย่างเป็นจุดที่อยู่บนแนวที่ขนานกับพื้นที่ป่าด้านยาวซึ่งติดกับก้นอ่าวปัตตานี โดยอยู่ห่างจากขอบป่าเข้ามา 40 เมตร โดยวางและเก็บตัวอย่าง 2 ช่วงคือ

ช่วงฤดูฝน เริ่มตั้งแต่เดือนธันวาคม 2542 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2543 และช่วงฤดูร้อน เริ่มตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม 2543

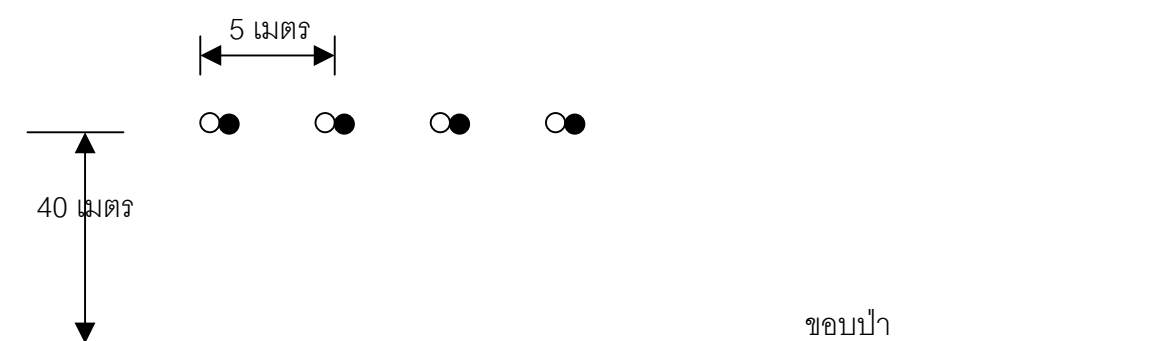
2. การย่อยสลายของใบโกงกางใบเล็กและใบถั่วขาวในป่าชายเลน

2.1 เก็บใบโกงกางใบเล็กและใบถั่วขาวซึ่งมีสีเหลืองและกำลังจะร่วงจากต้น นำใบไม้แต่ละชนิดแบ่งออกเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 10 กรัม บรรจุในถุง (litter bag) ใช้เชือกไนลอนมัดปิดปากถุงให้แน่น

2.2 นำถุงตัวอย่างใบไม้ผูกกับรากหรือลำต้นของต้นไม้ในป่าชายเลน 1 จุด โดยผูกถุงตัวอย่างใบไม้แต่ละชนิดจุดละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 9 ถุงในบริเวณที่ห่างจากขอบป่าประมาณ 40 เมตร แต่ละซ้ำห่างกันประมาณ 5 เมตร ดังแสดงในภาพประกอบ 6

○ ถุงตัวอย่างใบโกงกางใบเล็ก

● ถุงตัวอย่างใบถั่วขาว



ภาพประกอบ 6 การวางถุงตัวอย่างใบไม้ในพื้นที่ศึกษา

2.3 เก็บถุงตัวอย่างใบไม้ทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยเก็บถุงตัวอย่างใบไม้แต่ละชนิดครั้งละ 1 ถุง ในแต่ละซ้ำที่วาง นำใบไม้ออกจากถุงเพื่อแยกสัตว์ขนาดเล็กที่ติดมากับใบ โดยแยกเก็บสัตว์ดังกล่าวจากแต่ละถุงบรรจุลงในขวดที่มีแอลกอฮอล์ 70% เพื่อนำไปศึกษาชนิดและจำนวน หลังจากนั้นนำใบไม้ไปล้างดินเลนที่ติดมากับผิวใบก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักแห้งที่ได้เพื่อหาร้อยละของน้ำหนักที่หายไปจากการย่อยสลายในแต่ละช่วงเวลา โดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งของใบที่ยังไม่ผ่านการย่อยสลาย

2.4 บันทึกผลร้อยละของน้ำหนักใบที่หายไปจากการย่อยสลายในแต่ละช่วงเวลาเพื่อหาอัตราการย่อยสลายที่เกิดขึ้นตลอดช่วงเวลาที่ศึกษา

3. คุณภาพน้ำ

ในการเก็บตัวอย่างไปไม้แต่ละครั้ง ทำการเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำบางประการควบคู่ไปด้วย ได้แก่ คุณภูมิของน้ำในป่าชายเลนโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ และค่าความเค็มของน้ำในป่าชายเลนโดยใช้เครื่องวัดดัชนีหักเหแสง โดยวัดที่ริมขอบป่า ห่างจากจุดวางตัวอย่าง 40 เมตร ซึ่งเป็นบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึงอยู่เสมอ

4. ความหลากหลายของราที่พบในการย่อยสลายไปไม้ในป่าชายเลน

การศึกษาความหลากหลายของราที่พบในการย่อยสลายไปไม้ในป่าชายเลนจะทำความเข้าใจกับการศึกษาการย่อยสลายของใบโกงกางใบเล็กและใบถั่วขาว โดยมีขั้นตอนดังนี้

4.1 เก็บใบโกงกางใบเล็กและใบถั่วขาวซึ่งมีสีเหลืองและกำลังจะร่วงจากต้น แยกไปไม้แต่ละชนิดบรรจุลงในถุง (litter bag) โดยบรรจุถุงละ 10 กรัม ใช้เชือกไนลอนมัดปิดปากถุงให้แน่น

4.2 นำถุงตัวอย่างไปไม้แต่ละชนิดผูกกับรากหรือลำต้นของต้นไม้ในป่าชายเลนเช่นเดียวกับการศึกษาอัตราการย่อยสลายในภาพประกอบ 6 โดยผูกถุงตัวอย่างไปไม้แต่ละชนิดซ้ำละ 9 ถุง

4.3 เก็บถุงตัวอย่างไปไม้ทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยเก็บถุงตัวอย่างไปไม้แต่ละชนิดครั้งละ 1 ถุง ในแต่ละซ้ำ บรรจุลงในภาชนะปลอดเชื้อ นำกลับไปห้องปฏิบัติการเพื่อหาจำนวนและชนิดของราที่แยกได้

4.4 นำตัวอย่างไปไม้แต่ละชนิดที่เก็บได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อล้างสิ่งที่ดีติดมากับผิวใบ

4.5 เจาะไปไม้ด้วยเหล็กเจาะที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร โดยเจาะ 10 ชิ้นในตัวอย่างไปไม้แต่ละถุง นำไปไม้ที่เจาะแต่ละชิ้นวางบนอาหาร glucose-yeast extract agar ซึ่งเตรียมจากน้ำทะเลที่มีความเข้มข้น 15 พีเอสยู โดยใช้อาหาร 1 จานต่อไปไม้ที่เจาะ 1 ชิ้น นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 7 - 30 วัน

4.6 จำแนกสกุลราที่ขึ้นบนอาหารและความถี่ที่พบ โดยรายงานผลความถี่เป็นร้อยละของจำนวนขึ้นไปไม้ที่พบราแต่ละสกุลต่อจำนวนขึ้นไปไม้ทั้งหมดที่ศึกษา

5. ความสามารถในการย่อยเซลลูโลสของราที่แยกได้

การทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสของราทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่นิยมใช้ได้แก่ การใช้กระดาษกรอง (Whatman No.1) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลสในธรรมชาติ (Pointing, 1999 : 17-33) และการใช้ carboxymethylcellulose (CMC) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลสในธรรมชาติ (Booth, 1971 a : 39-41 ; Carder, 1986 : 75-79 ;

Griffin, 1994 : 160 ; Moustafa and Sharkas, 1982 : 185-190 ; Pointing, 1999 : 17-33 ; Saddler, 1982 : 414-418) แต่ในการศึกษาค้างนี้เลือกใช้วิธี dye staining of carboxymethylcellulose agar (CMC agar) ของ Pointing (1999 : 17-33) โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.1 นำราที่แยกได้จากการศึกษาในข้อ 4 มาเลี้ยงในอาหาร cellulolysis basal medium agar ที่มี carboxymethylcellulose ผสมอยู่ 2% (w/v) ซึ่งเตรียมจากน้ำทะเลที่มีความเค็ม 15 พีเอสยู นำไปบ่มในที่มืดที่ 25 องศาเซลเซียสจนนิคมราที่มีความกว้างประมาณ 30 มิลลิเมตร

5.2 นำราที่ได้มาย้อม โดยเทสารละลาย Congo red ที่มีความเข้มข้น 2%(w/v) ให้ท่วมอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 นาที เทสารละลาย Congo red ที่ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเทสารละลาย NaCl 1 M ให้ท่วมอาหารเลี้ยงเชื้ออีก 15 นาที แล้วจึงเทสารละลาย NaCl ที่

5.3 อ่านผลที่ได้จากการศึกษา โดยราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้จะทำให้เกิดวงใส (clear zone) รอบนิคมรา โดยขนาดของวงใสที่ปรากฏแสดงถึงความสามารถในการย่อยเซลลูโลสของราที่ทดสอบ

6. การย่อยสลายไบโโกลังไบเล็กและไบถั่วขาวในห้องปฏิบัติการโดยราที่มีบทบาทในการย่อยเซลลูโลสได้ดี

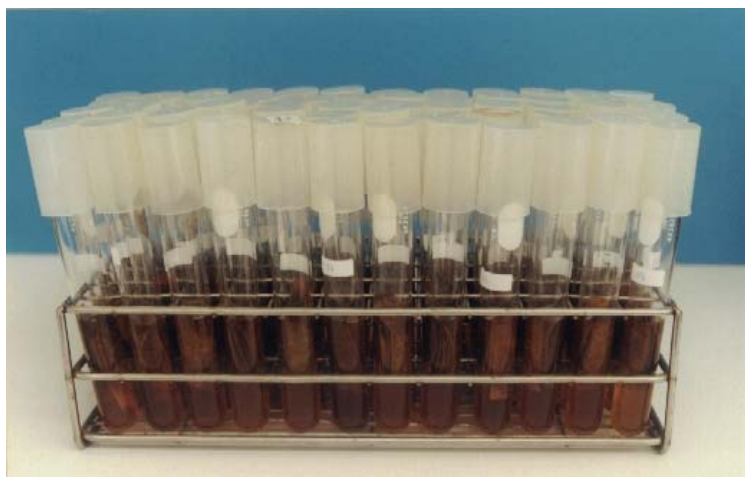
ศึกษาอัตราการย่อยสลายไบโโกลังไบเล็กและไบถั่วขาวในห้องปฏิบัติการโดยดัดแปลงจากวิธีของ Chale (1993 :177-183) และ Fell และ Master (1980 : 257-263) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

6.1 เก็บไบโโกลังไบเล็กและไบถั่วขาวซึ่งมีสีเหลืองและกำลังจะร่วงจากต้น นำมาทำให้ปลอดเชื้อโดยการใส่แสงอัลตราไวโอเล็ตส่องที่ผิวไบด้านละ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีขนาด 1X4 เซนติเมตร

6.2 นำไบไม้ที่ได้จากข้อ 6.1 ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งบรรจุน้ำจากป่าชายเลนที่ผ่านการกรองและทำให้ปลอดเชื้อ โดยใส่ไบไม้หนักประมาณ 1 กรัม (ไบโโกลังไบเล็ก 3 ชิ้น และไบถั่วขาว 5 ชิ้น) ลงในหลอดที่มีน้ำจากป่าชายเลนบรรจุอยู่ 10 มิลลิลิตร (ภาพประกอบ 7)

6.3 ใช้เหล็กเจาะที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตรเจาะบริเวณขอบของนิคมราที่ขึ้นบนอาหารแข็ง ใส่ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ในข้อ 6.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปลี่ยนน้ำจากป่าชายเลนซึ่งทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำทุกวัน วันละ 5 มิลลิลิตรในแต่ละหลอด

6.4 เก็บตัวอย่างใบโกงกางใบเล็กและใบถั่วขาวที่ผ่านการย่อยสลายในห้องปฏิบัติการทุกสัปดาห์ จนครบ 3 เดือน นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปหาอัตราการย่อยสลายที่เกิดขึ้น โดยการศึกษาอัตราการย่อยสลายใบโกงกางใบเล็กและใบถั่วขาวในห้องปฏิบัติการโดยวิธีที่คัดเลือกจะทำ 4 ซ้ำในการเก็บตัวอย่างแต่ละชุด



ภาพประกอบ 7 หลอดทดลองที่ใส่ใบไม้และน้ำจากป่าชายเลนเพื่อศึกษาอัตราการย่อยสลายในห้องปฏิบัติการโดยวิธีที่มีบทบาทในการย่อยเซลลูโลสได้ดี

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

7.1 การวิเคราะห์การย่อยสลายของใบโกงกางใบเล็กและใบถั่วขาวในป่าชายเลน

ใช้ t-test แบบสองหาง (Two-tailed) เพื่อ

- เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดใบไม้ต่ออัตราการย่อยสลายในทุก 2 สัปดาห์
- เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างฤดูต่ออัตราการย่อยสลายของใบไม้แต่ละชนิดในทุก 2 สัปดาห์

7.2 การวิเคราะห์การย่อยสลายใบโกงกางใบเล็กและใบถั่วขาวในห้องปฏิบัติการโดยวิธีที่มีบทบาทในการย่อยเซลลูโลสได้ดี

ใช้ One-way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสกุลราต่ออัตราการย่อยสลายในทุกสัปดาห์

