บทที่ 4
การเก็บข้อมูล

การศึกษาได้ทำการเก็บตัวอย่างดิน ทุก 2 เดือนจำนวน 6 ครั้งคือ เดือนกรกฎาคม 2540 เดือนกันยายน 2540 เดือนพฤศจิกายน 2540 เดือนมกราคม 2541 เดือนมีนาคม 2541 และเดือนพฤษภาคม 2541 โดยใช้วิธีเก็บแบบ composite sample พร้อมทำการบันทึกข้อมูล อุณหภูมิดิน และอากาศ ณ จุดนั้น โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยการแบ่งตัวอย่างดินออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 วิเคราะห์หา pH, Organic matter, ปริมาณธาตุอาหารที่สำคัญคือ P ,K ,Ca และ Mg สำหรับดินส่วนที่ 2 นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ cyanobacteria

1. การศึกษาหาปริมาณของจุลินทรีย์ cyanobacteria โดยวิธี most probable number (MPN)

ใช้อาหาร BG_{11} ประกอบด้วย $MgSO_4$ 0.30 mM., Na_2CO_3 0.25 mM.,$CaCl_2$ 0.25 mM., Citric acid 0.03 mM., $FeNH_4$citrate 0.03 mM. , Na_2EDTA 0.003 mM., K_2HPO_4 0.18 mM. และ Arnon's A_5 minor element 1 ml (ลัดดา, 2540) เริ่มด้วยการชั่งดินหนักตัวอย่างละ 50 กรัม เขย่าใน flask ที่มีน้ำกลั่น 450 ml โดยใช้วิธีเจือจาง 10 เท่าจาก 10^{-1} ถึง 10^{-6} โดยดูดตัวอย่างจาก dilution ที่ 1 ใน flask จำนวน 1 ml ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออยู่ 9 ml เป็น dilution ที่ 2 หรือ 10^{-2} ทำเช่นเดียวกันจนถึง 10^{-6} ใส่สารละลายเลี้ยง cyanobacteria ที่เตรียมได้ในหลอดทดลองหลอดละ 9 ml ดูดสารละลายดินที่เตรียมไว้ใส่ลงไปหลอดละ 1 ml โดยทำ dilution ละ 3 ซ้ำ แล้วนำ test tube ทั้งหมดไป incubate ภายใต้แสงที่มีความเข้มประมาณ 400 μE.S^{-1} m^{-2} ที่อุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส นาน 25 ถึง 30 วัน แล้วนำจำนวนหลอดที่ปรากฏ cyanobacteria เจริญขึ้น นำไปเทียบจำนวนเซลของ cyanobacteria จากตาราง MPN (Grant *et al.*, 1985) แล้วนำมาคำนวณหาประมาณเซลต่อน้ำหนักดินแห้ง 1 กรัม

2. การเก็บรวบรวมและการจำแนก cyanobacteria

การแยก cyanobacteria เป็นชนิดเดี่ยวๆ ทำโดยวิธี dilution plating technique โดยทำการใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ BG_{11} agar medium ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 ml ทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัว แล้วนำตัวอย่างสารละลายดินใน dilution ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} จากตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 1 จำนวน dilution ละ 1 ml หยดลงบนอาหารวุ้นแล้วเกลี่ยด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอลให้ทั่วผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำ dilution ละ 3 ซ้ำ นำจานเพาะเชื้อไปวางไว้บนชั้นแสงที่สภาพแวดล้อมเหมือน

ข้อ 1 บ่มเชื้อไว้นาน 25 ถึง 30 วัน โดยสังเกตว่าไม่มี colony ใหม่ของ cyanobacteria เกิดขึ้นอีก แล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างจากจานเพาะเชื้อ ก่อนทำการเก็บตัวอย่าง cyanobacteria จาก colony เดี่ยว ไว้ ต้องทำการบันทึกภาพลักษณะของ colony แล้วจึงเก็บไว้ในหลอดทดลองที่มี slant agar medium

การจำแนกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินดูจากลักษณะเซลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่าและใช้หลักการตามแนววินิจฉัยของ Desikachary (1959) โดยจำแนกในระดับสกุลโดยตรวจดูจากลักษณะต่าง ๆ เช่น รูปร่าง ขนาด และตำแหน่งของเซล vegetetive รูปร่าง ขนาด และตำแหน่งของเซล heterocyst รูปร่าง ขนาด และตำแหน่งของเซล akinete และลักษณะของเส้นสาย (filament) เป็นองค์ประกอบในการจำแนก

3. การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากร cyanobacteria ในรอบปี

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติหาความสัมพันธ์ ระหว่างสมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพกับปริมาณ cyanobacteria ในระบบนิเวศที่ต่างกัน โดยใช้สมการการทดสอบ การถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) เพื่อใช้อธิบายผลของปัจจัยนั้น ๆ ที่มีต่อปริมาณ cyanobacteria ในระบบนิเวศที่ต่างกันและการเปลี่ยนแปลงประชากรในแต่ละพื้นที่ในรอบ 1 ปี

4. การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของตัวอย่าง cyanobacteria ที่เก็บรวบรวมได้ตลอดทั้งปี

4.1 การตรวจวัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) ตามวิธีของ Grant *et al.*(1985) นำ cyanobacteria มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG_{11} ดูดเอาก๊าซภายในขวดที่ใช้บ่มออก 10 % และใส่ acetylene ที่บริสุทธิ์เข้าไปแทนที่ โดยใช้ acetylene 10 % ของปริมาตรอากาศทั้งหมดในขวด นำไปบ่มในบริเวณที่มีแสงสว่าง 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องหลังครบกำหนดแล้วเก็บตัวอย่างก๊าซในภาชนะ 10 ml ไว้ใน vacutainer เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซ ethylene ซึ่งจะใช้ตัวอย่างก๊าซที่เก็บในหลอด vacutainer จำนวน 1 ml ฉีดเข้าเครื่อง gas chromatography

4.2 การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ ตามวิธีของ Wintermans and Demots (1965) ดูดสารละลาย 10 ml นำไปปั่นแยกด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบ/15 นาที นำตะกอนที่ได้เติมด้วย ethanol 95 % ปริมาณ 5 ml จากนั้นบดละเอียดโดยเครื่อง Homogenizer เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที วัดการดูดกลืนแสงของสารละลาย

ส่วนใสที่ความยาวคลื่น 665 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้ ethanol 95 % เป็น reference

4.3 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยใช้น้ำหนักแห้ง นำกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำกระดาษกรองใส่ในโถดูดความชื้น รอจนกระดาษกรองเย็น นำมาชั่งหาน้ำหนักกระดาษก่อนกรองสาหร่าย ที่เลี้ยงในอาหารปริมาตร 10 ml นำกระดาษกรองที่กรองสาหร่ายแล้วไปอบให้แห้งอีกครั้งที่อุณหภูมิ 80^0C นาน 48 ชั่วโมงจึงนำมาชั่งเพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (mg/ml) (ประกิต, 2535)

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Lowry *et al.*(1951) หลังจากการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์แล้วนำส่วนที่ตกตะกอนละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85 % 0.5 ml เติม 1 N NaOH 0.1 ml นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เมื่อต้มเสร็จแล้วปรับปริมาตรส่วนผสมให้ได้ 1 ml ด้วยน้ำกลั่น ใส่สารละลาย C (สารละลาย Na หรือ K Tartrate 2 เปอร์เซนต์ 1 ml ผสมกับ $CuSO_4$ 1 เปอร์เซนต์ 1 ml เข้าด้วยกันแล้วเอาส่วนผสมนี้ 1 ml ผสมกับสารละลาย $NaCO_3$ 2 เปอร์เซนต์ ใน 0.1 N NaOH 50 ml) ลงในหลอดตัวอย่าง หลอดละ 5 ml ทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้น ใส่สารละลาย Phenol 1 N ลงไป 0.5 ml ผสมกันทันทีให้ทั่วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงวัดความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยา ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Spectronic – 21 ใช้ความยาวคลื่นที่ 660 nm โดยใช้ NaoH 0.1 N เป็น Blank และเปรียบเทียบกับ Standard Curve ของปริมาณโปรตีน BSA (Bovine Serum Albumin) ละลายให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่ทราบค่าหน่วยเป็น (μg / ml)

4.5 วิธีการนับจำนวนเซล สาหร่ายที่จะนำมานับต้องทำให้อยู่ในสภาพการกระจายแบบสุ่ม (random distribution) โดยนำเข้าเครื่องปั่นให้เซลแยกจากกัน ถ้าเป็นสาหร่ายที่ขณะเจริญจะต้องไปเกาะติดผนังของภาชนะพวกนี้ต้องขูดออกเสียก่อนแล้ว จึงนำไปปั่นให้เซลหลุดออกจากกัน (จงจินต์, 2524) การนับจำนวนเซลใช้ Petroff – hausser counting chamber โดยการหยดตัวอย่างบนสไลด์ปิดกระจก (cover glass) รอให้เซลตกตะกอนประมาณ 4 – 5 นาที ทำการนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เลื่อนสไลด์ให้ตรงกับกริด