บทที่ 2

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

แพลงตอนพืชทะเลที่ใช้ในการทดลองมี 5 species Chaetoceros calcitrans f. pumilus Takano, 1968, Chlamydomonas sp. Ehrenberg, 1833 ;Chlorella 2 species และ Platymonas sp. West, 1961 ทั้งหมดนี้ถูกแยกออกไว้ในลักษณะของ unispecies culture โดยได้รับ stock culture จากคุณสุนีย์ สุวภีพันธ์ สถานวิจัยประมงทะเล, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

แพลงตอนพืชทะเลที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ เดิมเลี้ยงไว้ใน Miquel-Allen Nelson solution (1910) เก็บอยู่ในห้องปรับอากาศ อุณหภูมิประมาณ 27 °ซ ความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซน 800 ลักส์ และความเค็ม 30 ‰ ซึ่งแต่ละชนิดมีสถานที่มาแตกต่างกัน คือ Chaetoceros calcitrans (ภาพที่ 1) ขนาด 3–8 ไมครอน เดิมเลี้ยงไว้ที่มหาวิทยาลัยโคโกชิมา ประเทศญี่ปุ่น ได้นำมาเลี้ยงที่สถานวิจัยประมงทะเลตั้งแต่วันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2514

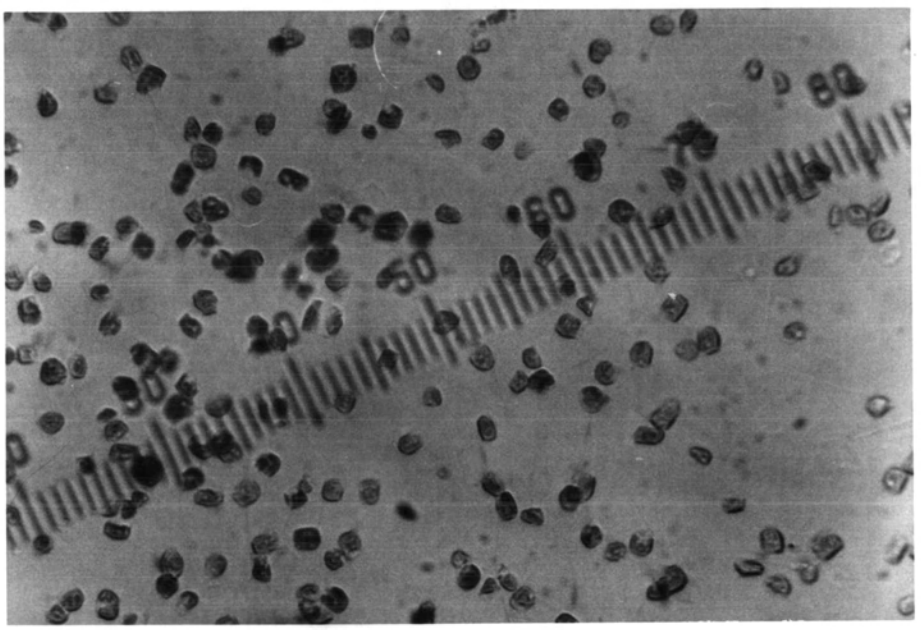
Chlamydomonas sp. (ภาพที่ 2) ขนาด 8–10 ไมครอน ได้มาจาก ดร.คิรายามา แห่งมหาวิทยาลัยนางาซากิ ประเทศญี่ปุ่น ตั้งแต่วันที่ 18 มีนาคม 2519

Chlorella sp.1 (ภาพที่ 3) ขนาด 3 ไมครอน ได้มาจากมหาวิทยาลัยโคโกชิมา ประเทศญี่ปุ่น ตั้งแต่วันที่ 3 ตุลาคม 2515

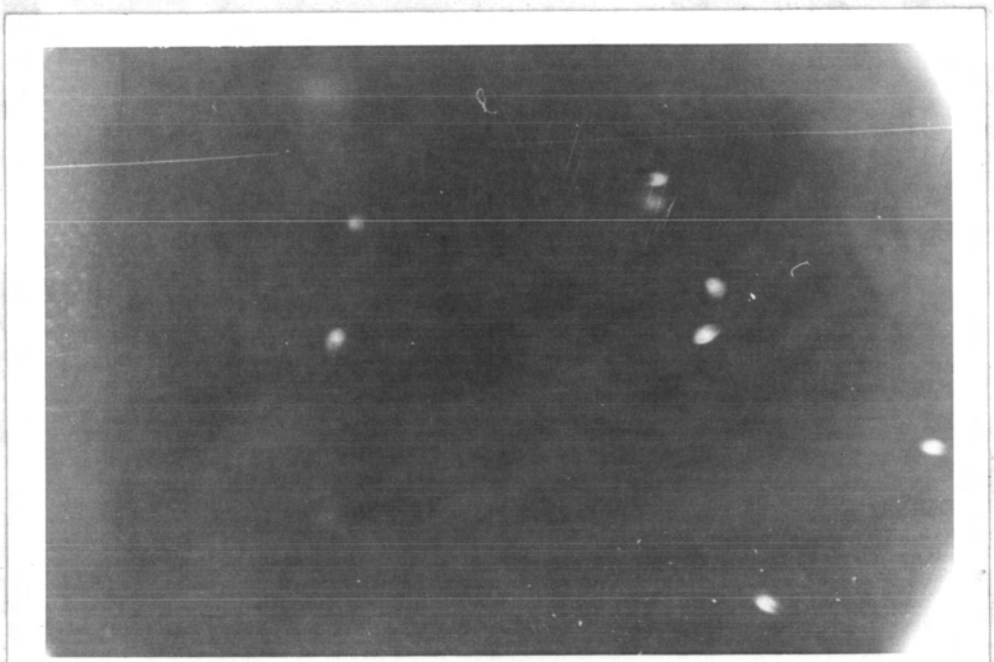
Chlorella sp.2 (ภาพที่ 4) ขนาด 7–9 ไมครอน ทำการแยกออกมาเป็น unispecies culture จากน้ำในอ่าวไทย โดยคุณสุนีย์ สุวภีพันธ์ ตั้งแต่วันที่ 3 พฤษภาคม 2517

Platymonas sp. (ภาพที่ 5) ขนาด 10–16 ไมครอน เป็น unispecies culture ซึ่งได้มาจาก ดร.คิรายามา แห่งมหาวิทยาลัยนางาซากิ ประเทศญี่ปุ่น ตั้งแต่วันที่ 18 มีนาคม 2519

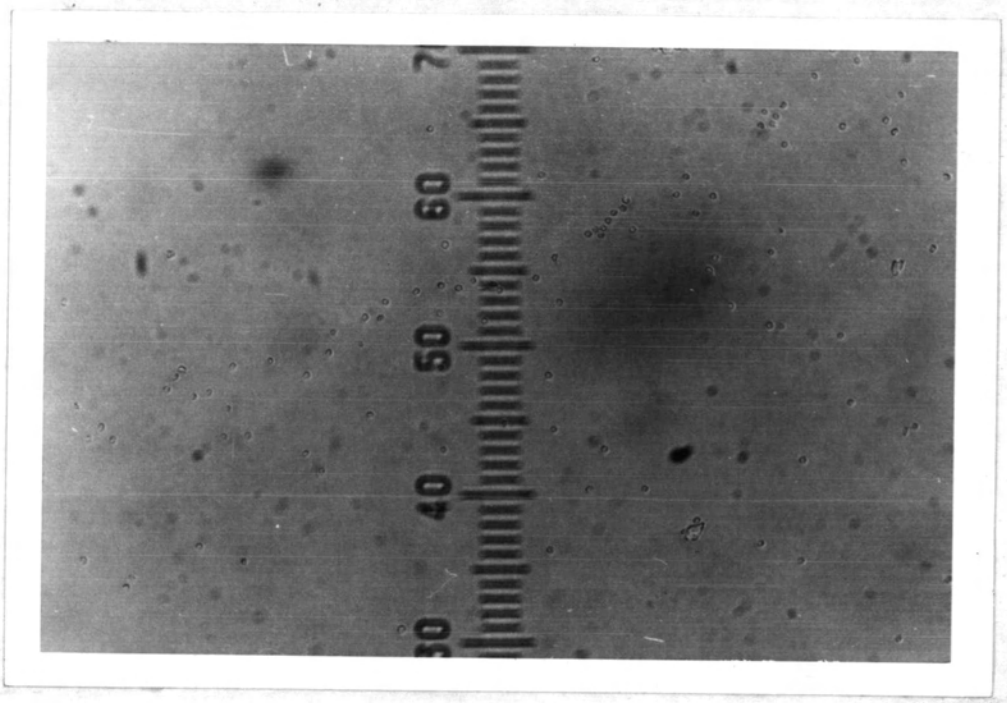
งานวิจัยนี้ ทำการทดลองโดยเลี้ยงแพลงตอนพืชทะเลไว้ในตู้ขนาดกว้าง 0.5 เมตร ยาว 2.0 เมตร มีผ้าม่านสองชั้นเพื่อกันแสงมารบกวนจากภายนอก (ภาพที่ 6) ที่เพดานตู้ทดลองติดหลอดฟลูออเรสเซน (phillips TL) ขนาด 40 วัตต์ 2 หลอด ซึ่งให้ความเข้มของแสงหลัง



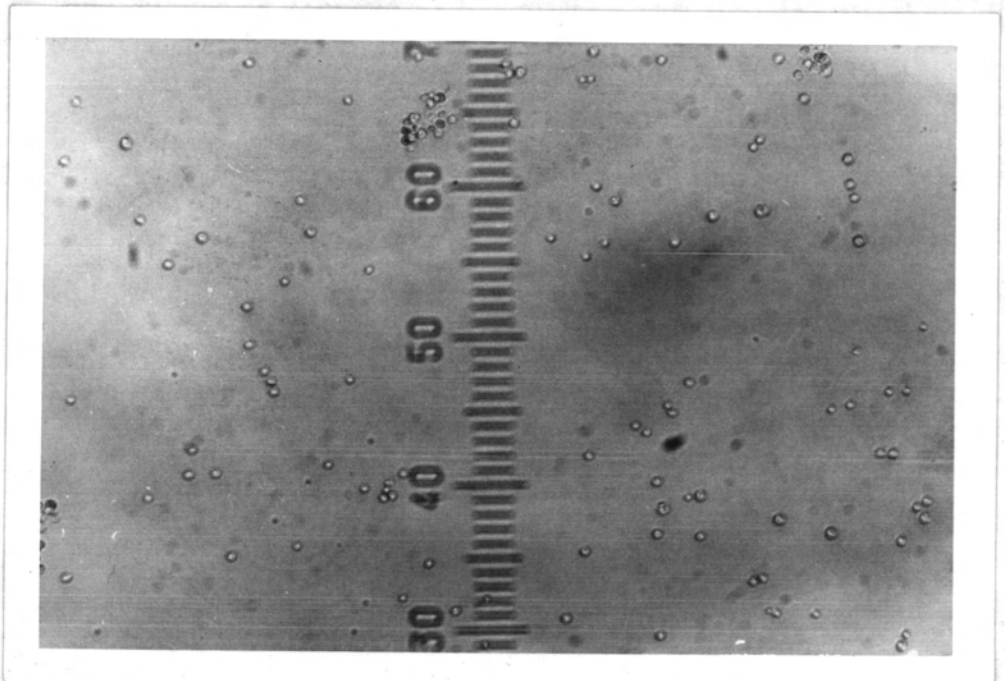
ภาพที่ 1 Chaetoceros calcitrans ขยาย 400 เท่า



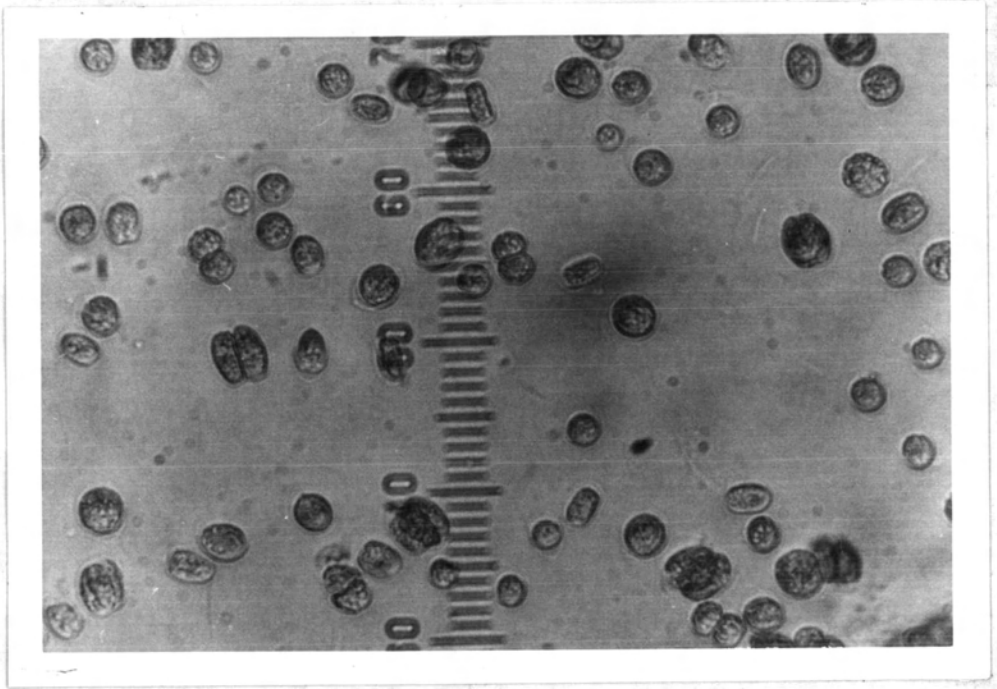
ภาพที่ 2 Chlamydomonas sp. ขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 3 Chlorella sp.1 ขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 4 Chlorella sp. 2 ขยาย 400 เท่า



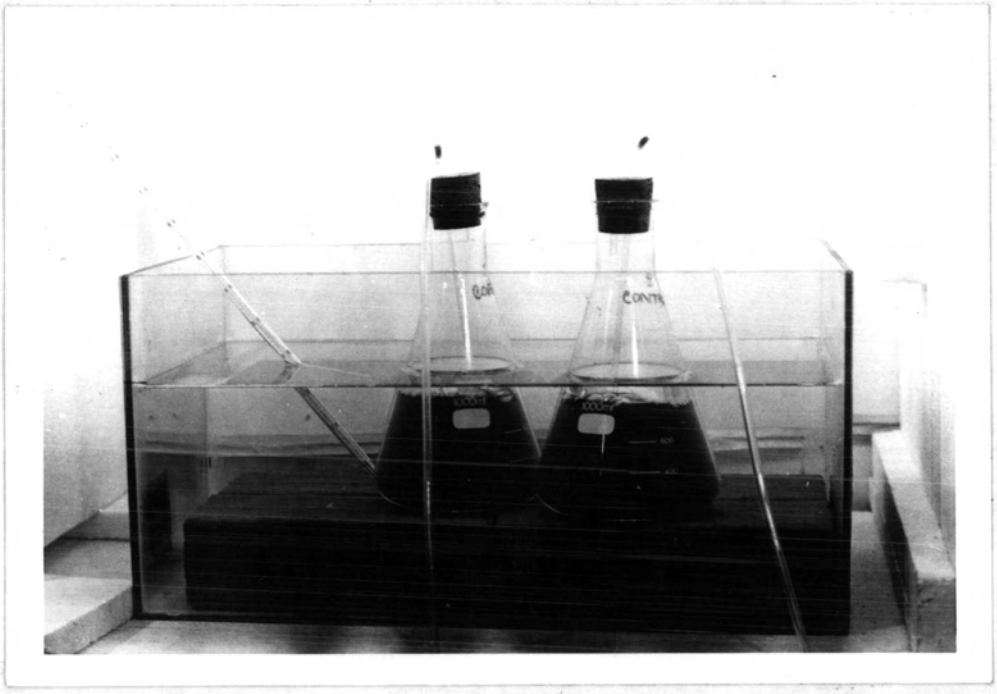
ภาพที่ 5 Platymonas sp. ขยาย 400 เท่า

ภาพที่ 6 ตู้ทดลองพร้อมด้วยอ่างแก้ว, เครื่องปรับอุณหภูมิ, เครื่องปั๊มอากาศ, และสวิสต์เปิดปิดไฟอัตโนมัติ

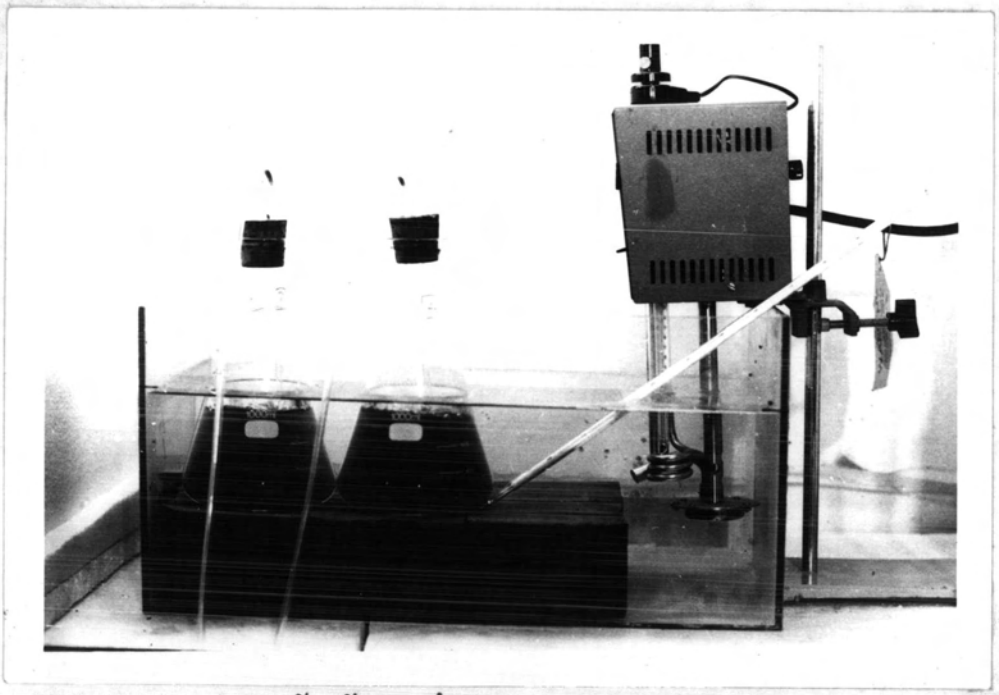
จากที่ผ่านน้ำกรองใน erlenmeyer flask ซึ่งตั้งอยู่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ใช้เก็บแพลงตอนพืช แล้วเท่ากับ 2,200 ลักส์ ทั้งนี้โดยการใช้ lux meter วัด การควบคุมอุณหภูมิของแพลงตอนพืชที่เลี้ยงไว้นั้น ใช้ลักษณะ water bath คือใช้น้ำประปาซึ่งกรองแล้ว ใส่ในอ่างแก้วสูง 25 เซนติเมตร กว้าง 25 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร ขณะทำการทดลอง จะต้องหมั่นเติมน้ำให้อยู่ในระดับที่กำหนดไว้เสมอเพื่อกันการแปรปรวน ภายในอ่างใส่เครื่องปรับระดับอุณหภูมิอัตโนมัติแบบ Polytemp (ของ Polyscience Corporation Illinoids U.S.A.) ซึ่งเป็นแบบที่ทำให้น้ำในอ่างมีการหมุนเวียนและมีระดับอุณหภูมิเท่ากันทั้งอ่าง (ภาพที่ 7) การควบคุมช่วงสว่างและมืดของตู้ทดลองใช้สวิทช์เปิดปิดอัตโนมัติ (ของ Venner) โดยควบคุมให้เปิดไฟ 14 ชั่วโมง และดับไฟ 10 ชั่วโมง โดยยึดหลักของ Castenholz (1964) ; Eppley (1971); Jensen, et al. (1972) ; Maddux & Jones (1964) และ Paasche (1967)

แพลงตอนพืชที่ใช้ในการทดลองจะเลี้ยงใน erlenmeyer flask (pyrex) ขนาด 1000 มิลลิลิตร อากาศที่ใช้เลี้ยงแพลงตอนพืชใน flask นี้ มาจากเครื่องปั๊มอากาศ แต่ได้ผ่านการกรองโดยใยแก้วแล้ว เพื่อป้องกันแบคทีเรีย

media ที่ใช้สำหรับการวิจัยนี้ แตกต่างจากที่ใช้ที่สถานวิจัยประมงทะเลคือ ใช้ media แบบ Robert Guillard Medium f/2-1 (Guillard,1962) น้ำทะเลที่ใช้สำหรับทำ media ในงานวิจัยทั้งหมดนี้ มาจากอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยเก็บน้ำที่ถนนไปเกาะลอยห่างจากฝั่งประมาณ 300 เมตร ในเดือนเมษายน 2519 และเก็บพักไว้ 1 เดือน ก่อนใช้จะกรองด้วยใยแก้ว แล้วใช้วิธีการของ Allen-Nelson (1910) ในการฆ่าสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ยกเว้นแบคทีเรีย โดยการนำไปต้มถึง 70° ซ นาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วต้มอีกครั้งให้ได้ 70° ซ 30 นาที ปรับระดับความเค็มให้ได้ 30 ‰ โดยการเติมน้ำกลั่น หรือโดยการเติมน้ำทะเลที่เค็มจัดลงไป แล้วตรวจวัดดูด้วย salinometer จนได้ความเค็มที่ต้องการ แล้วจึงเติม stock solution ตามส่วนผสมของ Robert Guillard Medium f/2-1 media ที่เตรียมนี้จะต้องนำไปใช้ทันที



ภาพที่ 7 ก. แสดงลักษณะของ water bath และการให้อากาศแก่แพลงตอนพืชที่เลี้ยงไว้ โดยใช้สายยางและแท่งแก้ว



ภาพที่ 7 ข. water bath พร้อมด้วยเครื่องปรับระดับอุณหภูมิอัตโนมัติ

ส่วนผสมของ Robert Guillard Medium f/2-1 เมื่อใช้เติมลงไปในน้ำทะเล 1,000 มิลลิลิตร มีดังนี้

1) Major elements

$NaNO_3$ (Sodium nitrate)	75 มิลลิกรัม (883 µM)
NaH_2PO_4 (Sodium dihydrogenphosphate)	5 มิลลิกรัม (36.3 µM)
$Na_2SiO_3.9H_2O$ (Sodium silicate)	15–20 มิลลิกรัม (54–107 µM)

2) Trace metals

Na_2EDTA (Sodium ethylenediamine tetraacetic acid)
4.36 มิลลิกรัม (11.7 µM)

$FeCl_3.6H_2O$ (Feric chloride	3.15 มิลลิกรัม (11.7 µM)
$CuSO_4.5H_2O$ (Copper sulfate)	0.01 มิลลิกรัม (0.04 µM)
$ZnSO_4.4H_2O$ (Zinc sulfate)	0.022 มิลลิกรัม (0.08 µM)
$CoCl_2$ (Cobolt chloride)	0.01 มิลลิกรัม (0.05 µM)
$MnCl_2$ (Manganese chloride)	0.18 มิลลิกรัม (0.9 µM)
$NaMoO_4.2H_2O$ (Sodium molybdate)	0.06 มิลลิกรัม (0.03 µM)

3) Vitamin

Thiamine hydrochloride	0.1 มิลลิกรัม
Biotin	0.5 ไมโครกรัม
B_{12}	0.5 ไมโครกรัม

4) Tris-pH buffering ซึ่งจะเตรียมได้โดยใช้ Tris-hydroxymethyl amino-methane 50 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 2,000 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือเข้มข้น 29.3 มิลลิลิตร ปรับระดับความเป็นกรดด่าง (pH) 7.1–7.3 ใช้สารละลายนี้ 2 มิลลิลิตร ต่อน้ำทะเล 1,000 มิลลิลิตร เครื่องแก้วทุกชิ้นที่ใช้ในการทดลองอบด้วยความร้อนแบบแห้ง (hot air oven) อุณหภูมิ 100° ซ นาน 1-½ ชั่วโมง

การวิจัยทั้งหมดนี้ทำในห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งงานวิจัยออกเป็นสองส่วนคือ

1) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของ unispecies culture

2) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลกระทบต่อ polyspecies culture

1) <u>ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของ unispecies culture ของแพลงตอนพืชทะเล</u>

ใช้อุณหภูมิ 23°ซ เป็นอุณหภูมิปกติ (control) โดยใช้อุณหภูมิห้องปรับอากาศ, 28°ซ, 31°ซ, 34°ซ, 37°ซ, 40°ซ, 43°ซ และ 45°ซ เพื่อศึกษาว่าอุณหภูมิจะมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของแพลงตอนพืชนี้หรือไม่ ซึ่งตรวจสอบโดยวิธีการนับจำนวนเซลล์และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอควบคู่กันไป การทดลองทุกครั้งใช้ culture media 400 มิลลิลิตร และ unispecies culture ที่เลี้ยงไว้ใน Robert Guillard medium f/2-1 ซึ่งอายุประมาณ 10 วันที่อุณหภูมิ 27°ซ ความเค็ม 30 ‰ ใช้ความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักส์ ซึ่งจะได้ inoculum ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรในค่าใกล้เคียงกันทุกครั้ง คือ <u>Chaetoceros calcitrans</u> ≃ 3.21×10^6, <u>Chlamydomonas</u> sp. ≃ 1.0×10^6, <u>Chlorella</u> sp.1 ≃ 13.0×10^6, <u>Chlorella</u> sp.2 ≃ 10.0×10^6 และ <u>Platymonas</u> sp. ≃ 1.40×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ใช้ inoculum 400 มิลลิลิตร ใส่ลงไปใน erlenmeyer flask ที่ใส่ media ไว้ 400 มิลลิลิตร ทำเครื่องหมายระดับน้ำไว้เป็นสำคัญ แล้วนับปริมาณเซลล์เริ่มต้นโดยใช้ haemacytometer เอาตั้งใน water bath ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงใน flask ทุกวัน โดยทุกครั้งจะตรวจดูระดับของ culture ให้อยู่คงเดิม โดยการปรับให้ตรงตามระดับโดยการเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ทั้งนี้เนื่องจากน้ำจะระเหยไป แล้วทำการวัดผลของการทดลอง

1.1 นับจำนวนเซลล์ การนับจำนวนเซลล์ทุกวันกระทำในเวลาเดียวกันของวันคือเวลา 10.00 น. ก่อนสุ่มตัวอย่างจะต้องเขย่า flask ให้ผสมกันทั่ว ใช้ pipette ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างใส่ใน haemacytometer ทำให้เซลล์หยุดนิ่ง (fixed) โดย heat ผ่านตะเกียงแอลกอฮอล จนเซลล์นิ่ง แต่ไม่แตก แล้วนับจำนวนเซลล์ ทำการสุ่มตัวอย่างสี่ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้น คำนวณให้เป็นค่ามาตรฐาน คิดเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสำหรับอัตราการเจริญเติบโตใน exponential phase นั้น คิดจากสูตร ดังนี้

$N_t = N_o e^{kt}$ (Fogg, 1966) หรือ $k = \frac{\ln N_t - \ln N_o}{t}$ 005022

1.2 วัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอ โดยใช้วิธีของ Strickland & Parson (1968) และ UNESCO (1966) เขย่า flask ให้ culture ผสมกันดี สุ่มตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตรทุก 2 วัน แล้วกรองโดยใช้ millipore AA paper ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร โดยใช้เครื่อง millipore suction ทิ้งไว้จนแห้งสนิท เติม 90 % acetone ลงไป 10 มิลลิลิตร ปิดฝา vial ให้สนิท เขย่าแรง ๆ หลายครั้งจน millipore paper ละลายหมด นำไปเก็บในตู้เย็นมืดเป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำมาเหวี่ยงด้วย centrifuger ความเร็ว 1,500 รอบ-ต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เอาเฉพาะสารละลายใสข้างบน (supernatant) มาวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ทันที โดยใช้ 1 cm. cell วัดที่ช่วงคลื่น 6,300, 6,450, 6630 และ 7,500 องศาแองสตรอม แล้วคูณค่าที่วัดได้ที่ช่วงคลื่นต่าง ๆ ด้วย 10 แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณของคลอโรฟิลล์เอ ตามสูตร อนึ่ง ทุกครั้งที่วัดคลอโรฟิลล์ จะมี blank ซึ่งประกอบด้วย 90 % acetone 10 มิลลิลิตร กับ millipore AA paper เทียบด้วยทุกครั้ง

สูตรคำนวณของ U.S. (UNESCO SCOR) หน่วยเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร

$$\text{Chlorophyll a} = 11.64 e_{6630} - 2.16 e_{6450} + 0.1 e_{6300}$$

เมื่อ e_{6630} = extinction at 6630°A - extinction at 7500°A

e_{6450} = extinction at 6450°A - extinction at 7500°A

e_{6300} = extinction at 6300°A - extinction at 7500°A

2) <u>การศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิที่มีผลกระทบต่อ polyspecies culture</u>

ใช้ culture media 400 มิลลิลิตร และ unispecies culture ของ C. calcitrans; Chlamydomonas sp., Chlorella 2 species และ Platymonas sp. รวม 5 species ซึ่ง culture มีอายุประมาณ 10 วัน นำ unispecies culture มาอย่างละ 80 มิลลิลิตร แล้วใส่รวมกันใน erlenmeyer flask ที่เตรียมไว้ นับปริมาณเซลล์เริ่มต้น และดำเนินการแบบเดียวกับการทดลองกับ unispecies culture

i 17471503

ในการทดลองขั้นนี้ วัดผลการเปลี่ยนแปลงโดยใช้เฉพาะวิธีนับเซลล์ (cell count method) เท่านั้น โดยวัดผลทุกวันในเวลาเดิม เขย่าแพลงตอนพืชให้ผสมกันให้ดี แล้วสุ่มตัวอย่างมานับโดยใช้ haemacytometer เช่นเดียวกัน ทำให้แพลงตอนพืชหยุดนิ่ง (fixed) แล้วหาค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ครั้ง ทุก ๆ วัน นำไปคำนวณเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บผลการทดลองทุกวันเป็นเวลา 11 วัน เปลี่ยนอุณหภูมิไปให้ครบทั้ง 8 อุณหภูมิที่ต้องการ

การวิเคราะห์ทางสถิติ ใช้การวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance) แบบแจงทางเดียว (one-way classification) เมื่อมีจำนวนค่าสังเกตเท่ากัน (จรัญ, 2519) โดยตั้ง null hypothesis ไว้ว่า การเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลต่อการเจริญเติบโตดังนี้

Source of Variation	df	definition	Working	Mean Square
Treatment	t-1	$r\sum_i(\bar{X}_i-\bar{X}..)^2$	$\sum \frac{X_i^2.}{r}-\frac{X_{..}^2}{rt}$	T = SS/df F = T/E
Error	t(r-1)	$\sum_i\left[\sum_j X_{ij}^2-X_i^2./r\right]$	by subtraction	E = SS/df
Total	r(t-1)	$\sum_{ij}(X_{ij}-\bar{X}_{ij})^2$	$\sum_{ij}X_{ij}^2-\frac{X_{..}^2}{rt}$	

และเพื่อจะทดสอบว่าแต่ละระดับอุณหภูมิมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างซึ่งกันและกัน หรือไม่ ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ "Duncan's New Multiple Range test" ดังนี้

$$S_{\bar{x}} = \frac{(\text{error mean square})}{r}$$

และ $LSR = SSR\ (S_{\bar{x}})$

โดยมีความคลาดเคลื่อน degree of freedom เท่ากับ 72 เปิดค่า Significant Studentized Ranges (SSR) สำหรับค่า 5 เปอร์เซนต์ แล้วคูณค่าของ SSR ด้วย $S_{\bar{x}}$ เพื่อให้ได้ค่า Least Significant Ranges (LSR)