รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2555

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การคัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจากระบบนิเวศทางทะเล ของหมู่เกาะแสมสารและเกาะสีชัง

Isolation and Culture of Microalgae from Marine Ecosystems of Samaesarn Islands and Sichang Island

รศ. ดร. อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์
ทัชชา โชคปมิตต์กานนท์
สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การคัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจากระบบนิเวศทางทะเลของหมู่เกาะแสมสารและเกาะสีชัง: การศึกษาการเติบโต

Isolation and Culture of Microalgae from Marine Ecosystems of Samaesarn Islands and Sichang Island: Study of Microalgal Growth

อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์

สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ของสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่และห้องปฏิบัติการ รวมทั้งนิสิตและผู้ช่วยวิจัยจากห้องปฏิบัติการนิเวศวิทยาทางทะเลภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล และตร. สมภพ รุ่งสุภา ที่ช่วยเหลือในการออกภาคสนามทุกครั้ง

เฉพาะหมู่
เลขทะเบียน 016462
วัน, เดือน, ปี 23 มี.ค. 58

การคัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจากระบบนิเวศทางทะเลของหมู่เกาะแสมสารและเกาะสีชัง: การศึกษาการเติบโต

Isolation and Culture of Microalgae from Marine Ecosystems of Samaesarn Islands and Sichang Island: Study of Microalgal Growth

อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์

Ajcharaporn Piumsomboon

สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 และ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330 and

Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำ

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตจากทะเลไทยส่วนใหญ่มุ่งเน้นในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ที่มองเห็นด้วยตาเปล่า แต่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น จุลินทรีย์และสาหร่ายขนาดเล็กยังมีน้อยมาก ทั้งที่สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเหล่านี้มีความหลากหลายทั้งในระดับอาณาจักรลงไปจนถึงระดับชนิดที่แตกต่างกันและอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันอย่างมาก การศึกษาสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในทะเลไทยที่ผ่านมาส่วนใหญ่เน้นในเรื่องของความหลากหลายในระดับสกุลและการกระจายในบริเวณต่างๆ ปัญหาการขาดแคลนอาหารและพลังงานในปัจจุบันทำให้สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กโดยเฉพาะสาหร่ายขนาดเล็กเริ่มมีความสำคัญในการใช้ประโยชน์ในด้านโภชนาการ เภสัชกรรมและพลังงานทดแทน แต่การศึกษาเพื่อนำสาหร่ายขนาดเล็กไปใช้ประโยชน์นั้นจำเป็นต้องเข้าใจถึงสภาพทางชีววิทยา นิเวศวิทยาและสรีระวิทยาของสาหร่าย จนสามารถเพาะเลี้ยงให้สาหร่ายเติบโตและสร้างสารที่มีประโยชน์ตามต้องการได้ ดังนั้นการเก็บรวบรวมสายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจึงเป็นสิ่งจำเป็นเบื้องต้นที่จะขาดไม่ได้ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเก็บสายพันธุ์ก็เป็นแนวทางหนึ่งในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของทรัพยากรจากทะเลไทยโดยเฉพาะจากเกาะแสมสารและหมู่เกาะใกล้เคียงซึ่งอยู่ในพื้นที่เป้าหมายของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ในพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตน์ฯ ส่วนเกาะสีชังก็เป็นเกาะที่มีความสำคัญมาแต่อดีตทั้งในด้านภูมิศาสตร์ ประวัติศาสตร์ และพาณิชยนาวี และมีพื้นที่บางส่วนอยู่ในความรับผิดชอบของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงเหมาะสมต่อการเป็นพื้นที่ศึกษาเพื่อการคัดแยกสายพันธุ์สำหรับการเพาะเลี้ยงและเก็บรวบรวมสายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์และการอ้างอิง รวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดแยกพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากระบบนิเวศทางทะเลของเกาะแสมสารและเกาะสีชัง

เพื่อทำการเพาะเลี้ยงและเก็บรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายทะเลขนาดเล็กสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ต่อไป

เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายของสาหร่ายทะเลขนาดเล็กในระบบนิเวศชายฝั่งของไทย

ขอบเขตของการศึกษา

1. ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น สารอาหาร อุณหภูมิ ฯลฯ ต่อการเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ที่แยกได้จากกลุ่มเกาะแสมสารและ/หรือเกาะสีชังในปีงบประมาณ 2555

2. เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กเพิ่มเติมจากบริเวณชายฝั่งของเกาะบริวารของแสมสารและเกาะสีชังโดยในปีงบประมาณ 2556 นี้ทำการเก็บตัวอย่างที่เกาะขามในกลุ่มเกาะแสมสารและเกาะขามน้อยในกลุ่มเกาะสีชัง และคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อการเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ใช้ศึกษาต่อไป

วิธีการดำเนินการศึกษา

I. การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก

1. อิทธิพลของของสารอาหารต่อการเติบโตของ *Amphora* sp.

ศึกษาการเติบโตและมวลชีวภาพในรูปของคลอโรฟิลล์ *เอ* ของไดอะตอมรวม 4 ชนิด ได้แก่ ชนิด *Amphora* sp1., *Amphora* sp2., *Skeletonema costatum* และ *Actinocyclus* sp. ที่แยกได้จากชายฝั่งเกาะสีชังและเกาะแสมสาร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร f/20 ที่มีการปรับปริมาณสารอาหารหลักคือไนเตรทและฟอสเฟตให้ได้ตามอัตราส่วนโดยโมล (DIN:DIP molar ratio) ที่แตกต่างกัน 5 ค่า 2:1, 6:1, 12:1, 24:1 (อัตราส่วนใน f/20 เป็นชุดควบคุม) และ 36:1 ที่ความเค็ม 31 psu ทำการทดลองอัตราส่วนละ 3 ซ้ำ โดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์ไดอะตอมเริ่มต้นไม่เกิน 1000 เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงไดอะตอมไว้ในอ่างน้ำที่ช่วยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 29.7±1.93 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แบบ cool daylight ความเข้มแสง 32.00 ไมโครโมล/ตร.ม./วินาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมงและช่วงมืด 12 ชั่วโมง (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 หน่วยทดลองอิทธิพลของอัตราส่วน DIN:DIP ต่อการเติบโตของไดอะตอม

สุ่มตัวอย่างสาหร่ายมา 10 มิลลิลิตรจากแต่ละขวด ตั้งแต่วันที่เริ่มต้นการศึกษาเป็นช่วง ๆ ตามช่วงเวลาของการเติบโต ดังตารางที่ 1 แบ่งตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร เพื่อตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วย Sedgewick-Rafter counting slide คำนวนความหนาแน่นและคำนวนสัมประสิทธิ์การเติบโต (specific growth rate, μ) ตามวิธีของ Guillard (1973) ตรวจวัดการเรืองแสงของคล โรฟิลล์ *เอ* ในเซลล์ที่ยังมีชีวิต (*in vivo* fluorescence) ด้วยเครื่อง AquaFluor (Turner Designs) สุ่มตัวอย่างไดอะตอมอายุ 12 วัน ที่เลี้ยงในความเข้มข้นของสารอาหาร DIN:DIP อัตราส่วนต่าง ๆ มาย้อมด้วยสีเรืองแสง Nile red เพื่อตรวจสอบการสะสมของไขมันที่เป็นกลาง (neutral lipids) ตามวิธีของ McGinnis *et al.* (1997)

สำหรับไดอะตอมชนิด *Amphora* sp.1 นำตัวอย่างอย่างน้อย 30 มิลลิลิตรมากรองลงบนกระดาษกรอง GF/F นำตัวอย่างสาหร่ายที่ค้างอยู่บนกระดาษกรองไปสกัดด้วยสารละลาย 90% อะซีโตน ตรวจวัดการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ *เอ* ในสารละลายด้วยเครื่อง AquaFluor (Turner Designs) ที่ปรับเทียบความเข้มข้นกับสารมาตรฐานคลอโรฟิลล์ *เอ* (Chlorophyll *a* standard, Sigma) แสดงผลในหน่วยของไมโครกรัมต่อลิตร ส่วนน้ำที่ผ่านการกรองนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปของไนเตรทและแอมโมเนียม ตามวิธีการมาตรฐานของ Parsons *et al.*, (1984) ในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 1 การแบ่งช่วงการเติบโตเพื่อการเก็บตัวอย่างมาศึกษาอัตราการเติบโตในสารอาหาร DIN:DIP ต่าง ๆ

ช่วงการเติบโต	วันที่เก็บตัวอย่าง
ช่วงการปรับตัว (เริ่มต้นการศึกษา)	วันที่ 1
Early exponential growth	วันที่ 3
Late exponential growth	วันที่ 6
Stationary growth	วันที่ 9
Senescent phase	วันที่ 12 และวันที่ 15

II. การคัดแยก เพาะเลี้ยงและเก็บสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากระบบนิเวศชายฝั่งของเกาะขาม (หมู่เกาะแสมสาร)และเกาะขามน้อย (เกาะสีชัง)

1. การเก็บตัวอย่างภาคสนาม

เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กในระบบนิเวศทางทะเล 2 บริเวณ คือ ชายฝั่งเกาะขามน้อยในกลุ่มเกาะสีชังและชายฝั่งเกาะขามในหมู่เกาะแสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี แนวปะการังของเกาะแสมสารหรือเกาะอื่น ๆ บริเวณช่องแสมสาร โดยใช้ถุงเก็บแพลงก์ตอนขนาดตาถุง 20 ไมโครเมตร ลากในมวลน้ำหรือรอบ ๆ ก้อนปะการังเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่หนาแน่นพอสมควร เก็บตัวอย่างที่ได้ในขวดพลาสติกขนาดความจุ 1-5 ลิตร ที่สะอาด เติมน้ำทะเลที่เก็บในบริเวณเดียวกับตัวอย่างและกรองผ่านผ้ากรองขนาดตา 10 ไมโครเมตร ลงไปให้มีปริมาตรน้ำประมาณ 2/3 ของความจุของขวด เก็บตัวอย่างไว้ที่ร่มไม่ให้ถูกแสงโดยตรงจนถึงห้องปฏิบัติการและเก็บตัวอย่างดินโดยใช้พลั่วมือตักดินจากแนวปะการังและแช่เย็นไว้จนถึงห้องปฏิบัติการ ก่อนการเก็บตัวอย่างทำการบันทึกพิกัดที่เก็บตัวอย่างและตรวจวัดปัจจัยสภาพแวดล้อมคือ อุณหภูมิ ความเค็ม ออกซิเจนละลาย และ pH ของน้ำทะเล เก็บน้ำทะเลปริมาตร 1 ลิตร เพื่อนำไป

วิเคราะห์ปริมาณสารอาหารอนินทรีย์ไนโตรเจน สารอาหารอนินทรย์ฟอสฟอรัส และซิลิเคต ตามวิธีการมาตรฐานของ Parsons *et al.*, (1984) ในห้องปฏิบัติการ

2. การคัดแยกตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อการพาะเลี้ยง

นำน้ำตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บจากน้ำทะเลมาลดปริมาตรในห้องปฏิบัติการแล้วคัดแยกเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กมาเป็นหัวเชื้อโดยใช้เทคนิคหลอดแก้วปลายแหลม (micro-pipette isolation) และการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) เลี้ยงเซลล์สาหร่ายที่แยกได้ใส่ในถาดหลุมเลี้ยงเชื้อ (multi-well plate) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร f/20 ซึ่งเจือจางจากอาหารสูตร Guillard's f/2 (Anderson *et al.*, 2005) ลงสิบเท่า เก็บถาดหลุมไว้ในตู้บ่มเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิและแสงไว้ที่ 25±1 องศาเซลเซียส และ 32 ไมโครโมล/ตร.ม./วินาที โดยให้ช่วงมีแสง : ช่วงมืด เท่ากับ 12ชั่วโมง : 12 ชั่วโมง ส่วนตัวอย่างดินตะกอนนำมาแบ่งให้ได้ปริมาตรประมาณเท่าหัวไม้ขีดไฟ ใส่ลงในถาดหลุมเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร f/20 ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร บ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อที่สภาวะเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำ ทั้งนี้ภาชนะและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อตามที่ระบุไว้ใน Guillard (1973) และ Guillard and Morton (2003) สังเกตการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับทุกวันหรือเมื่อเห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อในถาดหลุมเริ่มมีสีเขียวหรือน้ำตาล

3. การขยายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

เมื่อสาหร่ายที่เลี้ยงไว้ในถาดหลุมเพิ่มจำนวนขึ้นโดยมีสีชัดเจน ทำการแยกเซลล์สาหร่ายมาล้างให้สะอาดโดยแยกเซลล์จากถาดหลุมด้วยเทคนิคหลอดแก้วปลายแหลม ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง ร่วมกับการปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอน จนได้เซลล์ที่ปราศจากสิ่งเจือปน เช่น ขยะ หรือซากเซลล์ที่ตายหรือโปรโตซัว จากนั้นถ่ายเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่ได้ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ f/20 บ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อ จนสังเกตเห็นสีของสาหร่ายชัดเจน ถ่ายหัวเชื้อสาหร่ายลงอาหารใหม่ทุก ๆ 2-3 สัปดาห์ เพื่อให้ได้หัวเชื้อสาหร่ายแบบ mono-species จากนั้นทำการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาตรการเลี้ยงสาหร่ายจากหลอดทดลองเป็นขวดรูปชมพู่ปริมาตร 125 มิลลิลิตร และ 250 มิลลิลิตร ตามลำดับ

4. การตรวจวัดอัตราการเติบโต

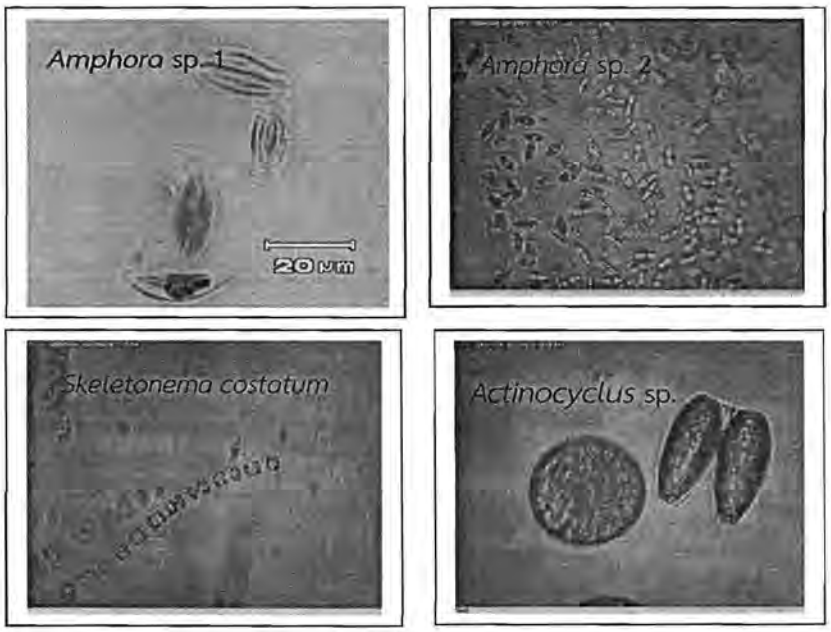
นำหัวเชื้อสาหร่ายมาถ่ายลงในอาหารใหม่ จำนวน 3 ซ้ำ เลี้ยงสาหร่ายโดยควบคุมแสงและอุณหภูมิเป็นเวลาอย่างน้อย 10 วัน สุ่มตัวอย่างสาหร่ายทุกวันเพื่อวัดการเรืองแสงและตรวจนับความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายและ/หรือวิเคราะห์ปริมาณของคลอโรฟิลล์ *เอ* นำค่าความหนาแน่นเซลล์ที่ได้มาใช้คำนวณสัมประสิทธิ์การเติบโต (specific growth rate, μ) ตามวิธีของ Guillard (1973)

ผลการศึกษา

I. การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก

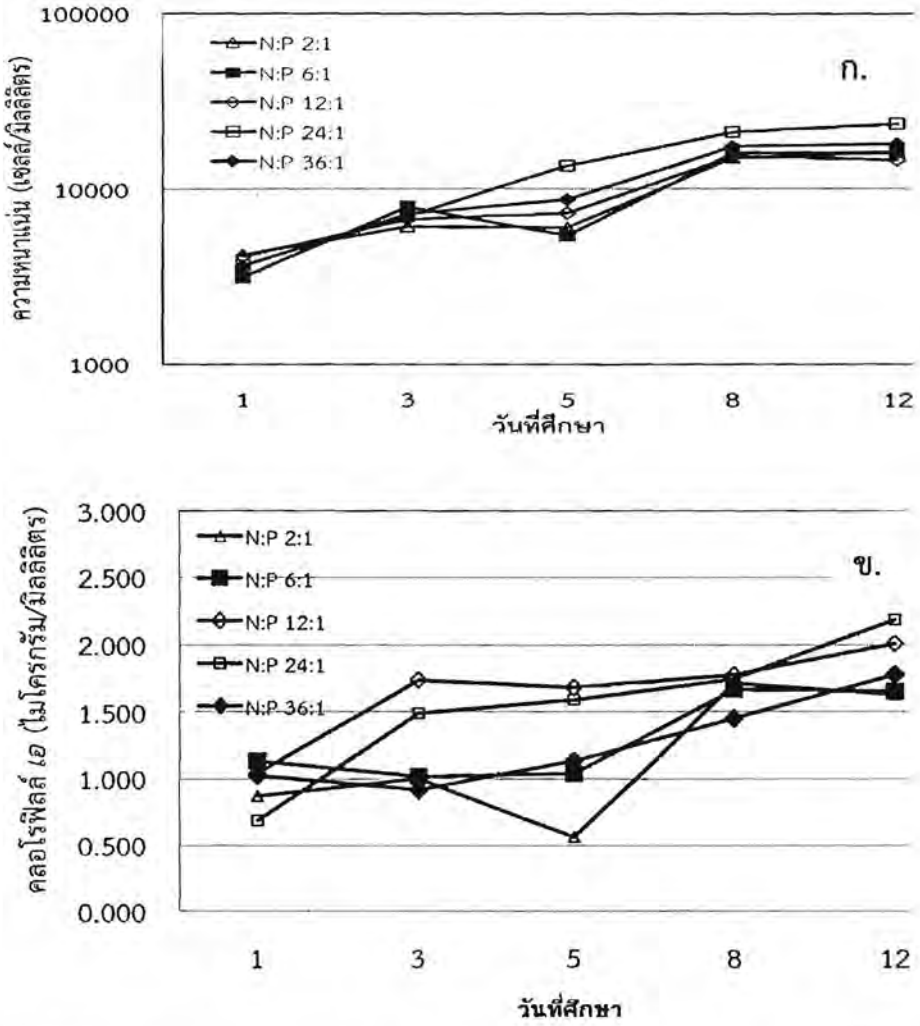
1. อิทธิพลของของสารอาหารต่อการเติบโตของไดอะตอม

ไดอะตอมที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย ไดอะตอม *Amphora* sp. 1 *Amphora* sp. 2 *Skeletonema costatum* และ *Actinocyclus* sp. (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ไดอะตอม ที่ใช้ในการศึกษา

ไดอะตอม *Amphora* sp. 1 ที่เลี้ยงในอาหารที่ปรับอัตราส่วน DIN:DIP ตั้งแต่ 2:1 ถึง 36:1 มีการเติบโตดีและมีสัมประสิทธิ์การเติบโต (specific growth rate, μ) สูงกว่า 1.00 ต่อวัน แต่ในระยะแรกการเพิ่มจำนวนไดอะตอมมีระยะปรับตัวหรือระยะ Lag phase ประมาณ 2 วัน ยกเว้นไดอะตอมที่เลี้ยงในอาหารที่มี DIN:DIP เท่ากับ 24:1 ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนเร็วกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และมีความหนาแน่นเซลล์สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ (รูปที่ 3 ก.) โดยไดอะตอมในอาหารที่มี DIN:DIP เท่ากับ 24:1 มีอัตราการเติบโตเท่ากับ 4.39 ต่อวัน สูงกว่าไดอะตอมในอาหารที่มี DIN:DIP ต่ำกว่า (2:1 6:1 และ 12:1) หรือสูงเกินไป (36:1) รวมทั้งความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (maximum cell density) ก็มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ คือ 2.3×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ในวันที่สุดท้ายของการทดลอง (ตารางที่ 2) แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ* ในชุดทดลองที่มี DIN:DIP 12:1 มีค่าสูงกว่าชุดการทดลอง 24:1 ในช่วงแรกของการศึกษา (รูปที่ 3 ข.)

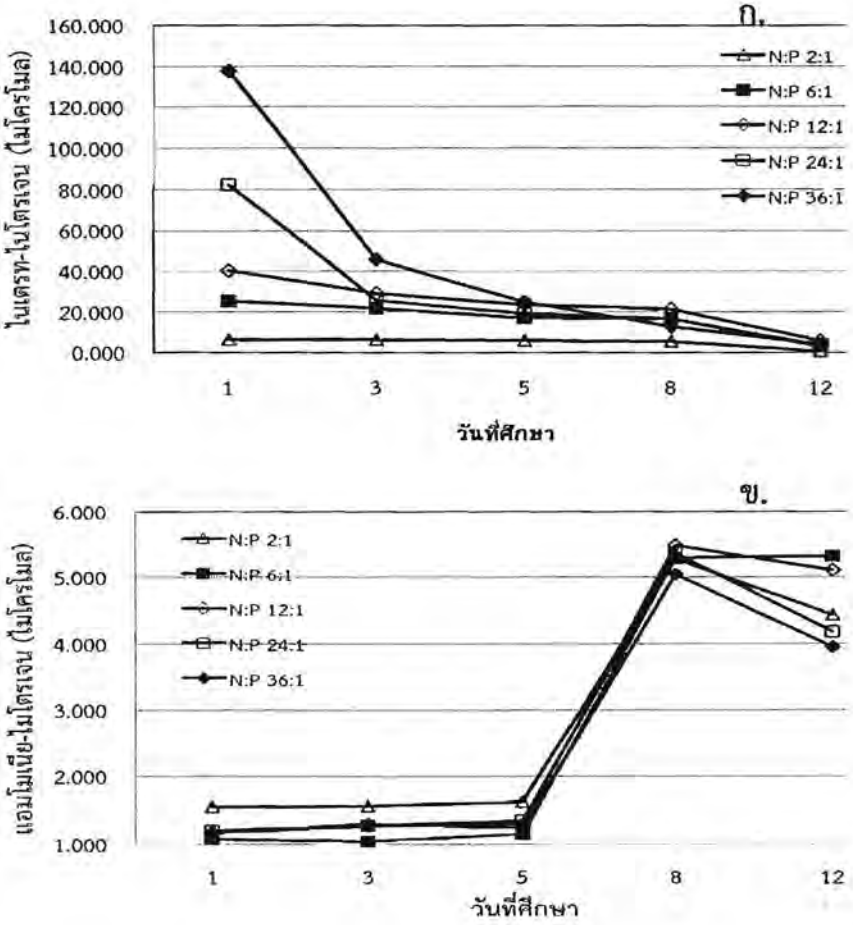


รูปที่ 3 การเติบโตของไดอะตอม *Amphora* sp.1 ในอาหารเลี้ยงที่มีอัตราส่วน DIN:DIP ต่าง ๆ
ก. ความหนาแน่น ข. ปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ*

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์การเติบโตของไดอะตอม *Amphora* sp. 1 ที่เลี้ยงในอาหารที่มี DIN:DIP ต่างกัน

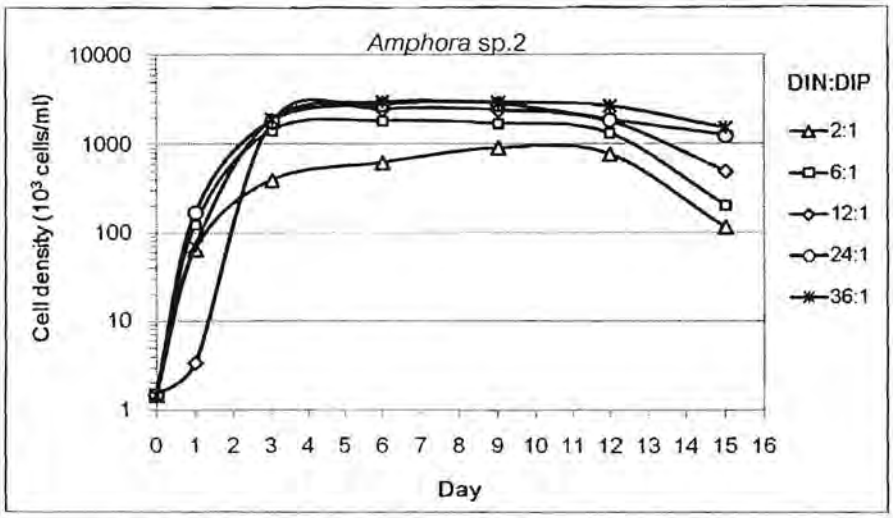
อัตราส่วน DIN:DIP ในอาหารเลี้ยง	สัมประสิทธิ์การเติบโต (ต่อวัน)	ความหนาแน่นสูงสุด (เซลล์/มิลลิลิตร)	คลอโรฟิลล์ *เอ* (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในวันที่ 5 ของการศึกษา
2:1	3.04	1.60×10^4	1.714
6:1	3.09	1.62×10^4	1.669
12:1	3.00	1.54×10^4	1.775
24:1	4.39	2.34×10^4	1.745
36:1	3.03	1.81×10^4	1.453

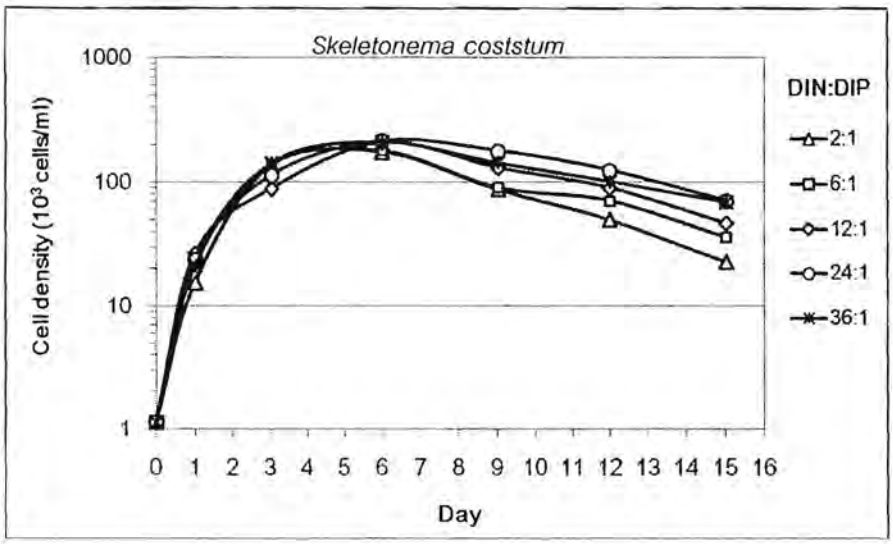
ปริมาณสารอาหารไนเตรทในอาหารเลี้ยงไดอะตอมลดลงตลอดเวลาที่มำการศึกษาโดยลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3-5 วันแรก ขณะเดียวกันก็มีการสะสมของแอมโมเนีย-ไนโตรเจนที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ของไดอะตอมหลังจากวันที่ 5 ของการศึกษา (รูปที่ 4)

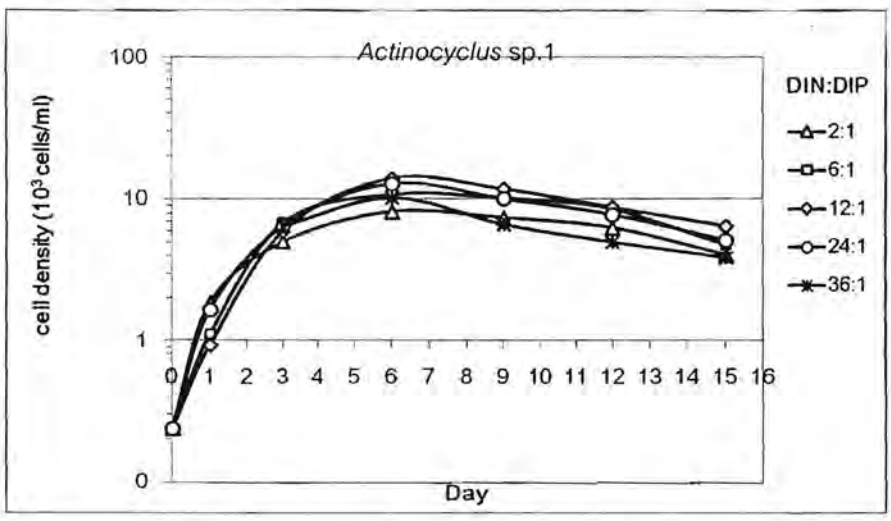


รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอาหารไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงไดอะตอม *Amphora* sp. 1 ที่มีอัตราส่วน DIN:DIP แตกต่างกัน ก. ไนเตรท-ไนโตรเจน ข. แอมโมเนีย-ไนโตรเจน

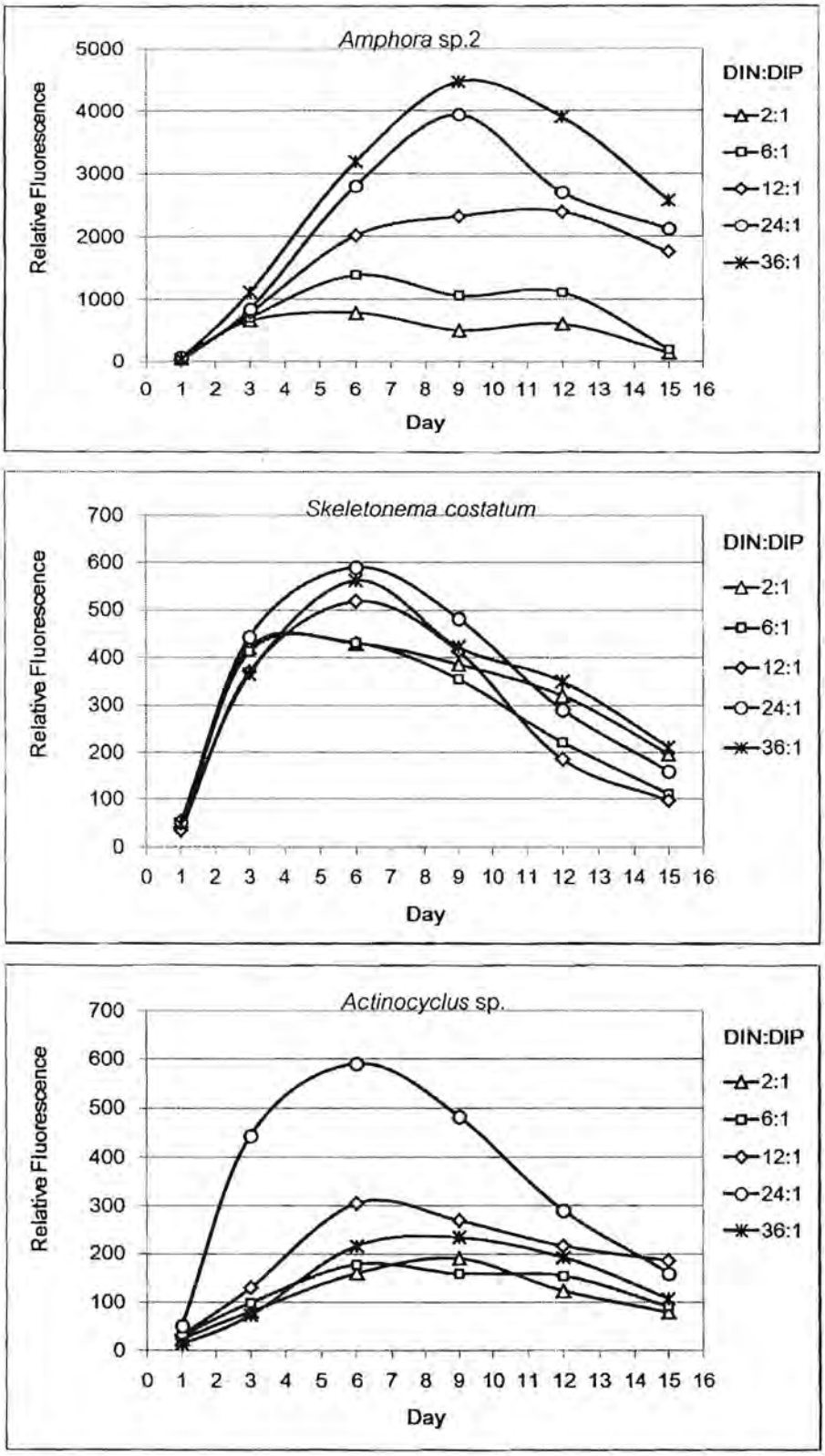
การศึกษาในไดอะตอมอีกสามชนิด คือ *Amphora* sp. 2, *Skeletonema costatum* และ *Actinocyclus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารที่ปรับอัตราส่วน DIN:DIP ตั้งแต่ 2:1 ถึง 36:1 โดยปริมาณเซลล์ตั้งต้นระหว่าง 2.00 – 15.00 x 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร นั้น สามารถเติบโตได้ทุกระดับความเข้มข้นของสารอาหาร DIN:DIP ที่ใช้ทดลอง กราฟการเติบโตจากการเพิ่มจำนวนเซลล์และค่า Fluorescence แสดงว่าไดอะตอมทั้งสามชนิดมีรูปแบบการเติบโตคล้ายคลึงกัน คือ มีระยะปรับตัวหรือระยะ Lag phase 1 วัน ไดอะตอมทุกชนิดมีการเพิ่มจำนวนแบบ exponential รวม 6 วัน โดยระยะที่มีการเติบโตสูงสุด (กราฟการเติบโตมีความชันสูงสุด) จะอยู่ในระหว่างวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 ของการศึกษา จากนั้นอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์จะลดลง (ความชันของกราฟการเติบโตของไดอะตอมลดลง) และเข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 6-9 ของการศึกษา ดังรูปที่ 5 และรูปที่ 6







รูปที่ 5 การเพิ่มจำนวนเซลล์ของไดอะตอมสามชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนความเข้มข้น DIN:DIP ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 6 การผันแปรของ Relative Fluorescence ของไดอะตอมสามชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนความเข้มข้น DIN:DIP ที่แตกต่างกัน

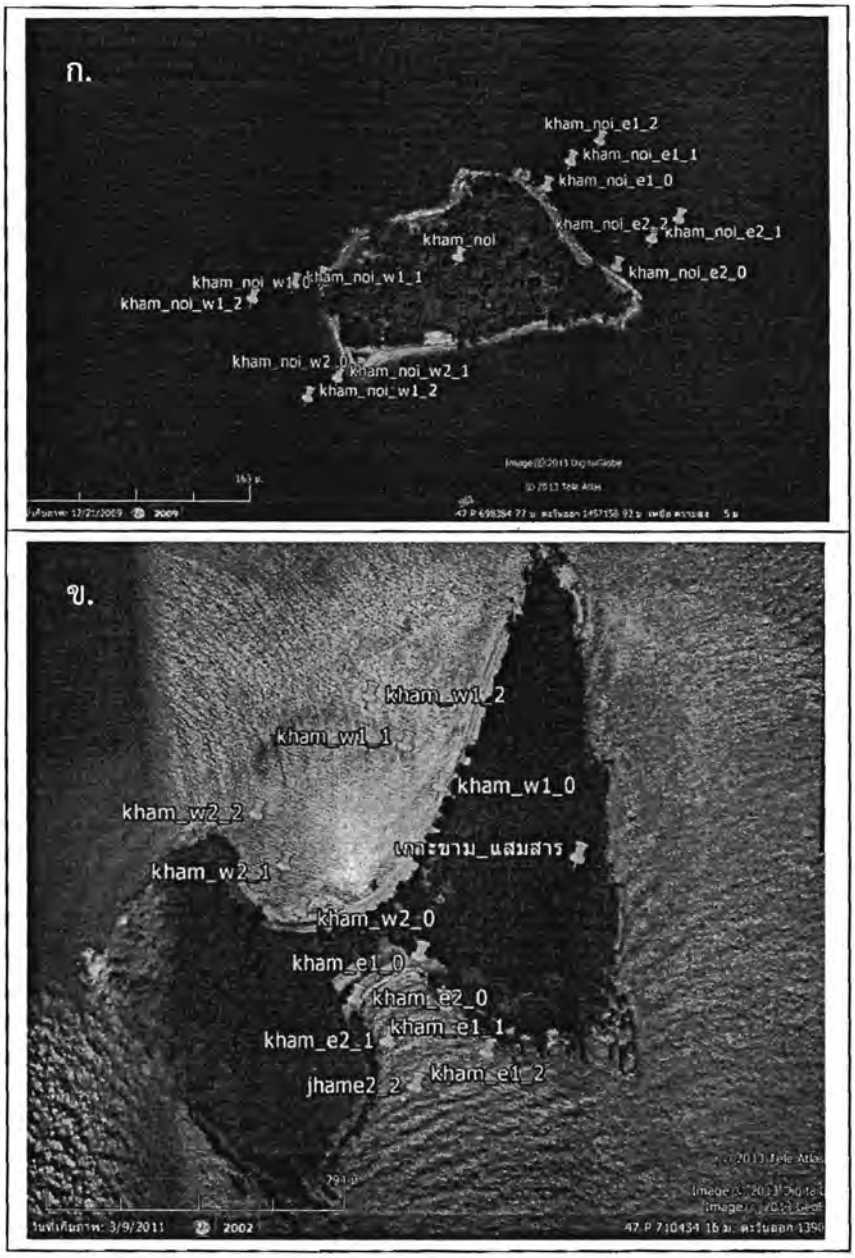
การเปรียบเทียบพารามิเตอร์การเติบโตของเอะตอมทั้งสามชนิด แสดงว่า ไดอะตอมชนิด Amphora sp. 2 และ *Actinocyclus* sp.เติบโตได้ดีเมื่ออัตราส่วน DIN:DIP มีค่าประมาณ 12:1 และมีค่าสัมประสอทธิ์การเติบโต หรือ specific growth rate สูงถึง 3.13 ต่อวัน และ 0.93 ต่อวัน ตามลำดับ ส่วนไดอะตอม Skeletonema costatum นั้นมีสัมประสิทธิ์การเติบโตสูงสุด 1.09 ต่อวัน ไดอะตอมที่เติบโตในสภาพที่มีอัตราส่วนของ DIN:DIP สูง 24:1 และ 36:1 มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ช้า ๆ ในระยะแรกของการเติบโตจึงมีสัมประสิทธิ์การเติบโตต่ำแต่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์จนมีความหนาแน่นสูงสุดได้ดีกว่าในสภาพที่มีอัตราส่วนของ DIN:DIP ต่ำ (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับรายงานที่ว่าอัตราส่วน N:P โดยโมลที่ทำให้แพลงก์ตอนพืชรวมทั้งไดอะตอมส่วนใหญ่เติบโตได้ดีมีค่าอยู่ในพิสัยตั้งแต่ 8.2 ถึง 45.0 (Klausmeier *et al.*, 2004)

ตารางที่ 3 พารามิเตอร์การเติบโตของไดอะตอมสามชนิดที่เลี้ยงในอาหารที่มี DIN:DIP ต่างกัน

ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็ก	อัตราส่วน DIN:DIP ในอาหารเลี้ยง	สัมประสิทธิ์การเติบโต (ต่อวัน)	ความหนาแน่นสูงสุด (เซลล์/มิลลิลิตร)
Amphora sp. 2	2:1	0.90	9.09×10^2
	6:1	1.23	1.85×10^3
	12:1	**3.13**	2.51×10^3
	24:1	1.20	**2.85×10^3**
	36:1	1.65	3.03×10^3
Skeletonema costatum	2:1	**1.09**	1.76×10^2
	6:1	0.91	1.80×10^2
	12:1	0.60	2.08×10^2
	24:1	0.78	**2.15×10^2**
	36:1	0.95	2.12×10^2
Actinocyclus sp.	2:1	0.50	8.00
	6:1	0.91	1.10×10^1
	12:1	**0.93**	1.40×10^1
	24:1	0.68	1.30×10^1
	36:1	1.43	1.00×10^1

II. การคัดแยก เพาะเลี้ยงและเก็บสายพันธุ์สาหร่าขนาดเล็กจากระบบนิเวศชายฝั่ง

เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กในน้ำทะเลโดยใช้ถุงลากแพลงก์ตอนขนาดตา 20 ไมโครเมตร ลากเป็นวงหรือตามแนวตั้งฉากกับหาดเหนือแนวปะการังในด้านทิศตะวันออกและทิศตะวันตกของเกาะขามน้อยในกลุ่มเกาะสีชัง และในแนวปะการังด้านเหนือและด้านใต้ของเกาะขามในหมู่เกาะแสมสาร (รูปที่ 7) ในระหว่างวันที่ 16-17 มีนาคม 2556



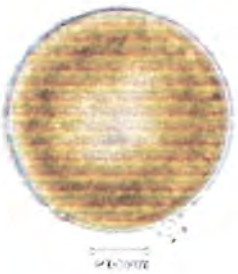
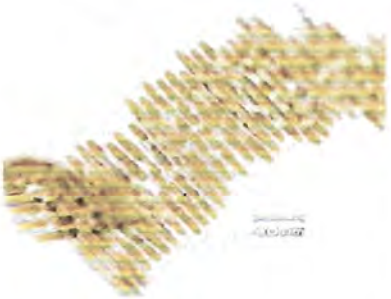
รูปที่ 7 บริเวณเก็บตัวอย่างในแนวปะการัง
(ก) เกาะขามน้อยในกลุ่มเกาะสีชัง และ (ข) เกาะขามในหมู่เกาะแสมสา

ในช่วงเวลาที่ศึกษาสภาพแวดล้อมชายฝั่งของเกาะขามน้อย (บริเวณใกล้เคียงเกาะสีชัง) และเกาะขาม ในกลุ่มเกาะแสมสาร มีลักษณะใกล้เคียงกันโดยบริเวณเกาะขามของหมู่เกาะแสมสารมีความเค้มและอุณหภูมิของน้ำทะเลสูงกว่าเกาะขามน้อย (ในกลุ่มเกาะสีชัง)เล็กน้อย (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 คุณภาพน้ำบริเวณเกาะขามน้อยและเกาะขามในขณะเก็บตัวอย่าง

วันที่ศึกษา	พารามิเตอร์	เกาะขามน้อย	เกาะขาม
17-18 มี.ค. 56	อุณหภูมิ (^{o}C)	29.8 ± 0.3	30.6 ± 0.5
	ความเค็ม (psu)	29.5 ± 0.1	29.7 ± 0.2
	ออกซิเจนละลาย (มก./ล)	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.4
	pH	8.0 ± 0.0	8.1 ± 0.1
	แอมโมเนียม (ไมโครโมล)	1.195 ± 1.263	1.156
	ไนเตรท (ไมโครโมล)	0.164 ± 0.106	0.222
	ไนไตรต์ (ไมโครโมล)	0.058 ± 0.013	0.097
	ฟอสเฟต (ไมโครโมล)	0.430 ± 0.119	0.372
	ซิลิเคต (ไมโครโมล)	2.532 ± 0.430	6.630
	อัลคาลินิตี้ (มก. $CaCO_3$/ล)	176.3 ± 1.443	179.4
5-6 มิ.ย. 56	อุณหภูมิ (^{o}C)	30.1 ± 1.1	30.2 ± 0.1
	ความเค็ม (psu)	30.8 ± 0.1	30.9 ± 0.4
	ออกซิเจนละลาย (มก./ล)	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.1
	pH	8.1 ± 0.0	8.1 ± 0.0
	แอมโมเนียม (ไมโครโมล)	1.138 ± 1.265	1.100
	ไนเตรท (ไมโครโมล)	0.148 ± 0.033	0.100
	ไนไตรต์ (ไมโครโมล)	0.110 ± 0.063	0.155
	ฟอสเฟต (ไมโครโมล)	0.645 ± 0.164	0.530
	ซิลิเคต (ไมโครโมล)	25.41 ± 4.300	17.04
	อัลคาลินิตี้ (มก. $CaCO_3$/ล)	187.5 ± 9.574	189.0

ตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กที่แยกได้จากตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่เก็บในบริเวณเกาะขามน้อยและกาะขามส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มไดอะตอม 15 ชนิด และไซยาโนแบคทีเรีย 1 ชนิด ดังรูปที่ 8 และรูปที่ 9

บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	
เกาะขาม แสมสาร	 *Thalassiosira* sp.	*Coscinodiscus* sp. (girdle view)
	Hemiaulus sp.	*Odontella* sp. 1
	Odontella sp. 2	 *Bacillaria* sp.
	Pluerosugma sp.	*Amphora* sp.

รูปที่ 8 สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมที่แยกได้จากเกาะขาม ในหมู่เกาะแสมสาร

บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง
เกาะขามน้อย สีชัง	*Actinocyclus* sp.	*Thalassiosira* sp.
	Ditylum sp.	*Heliotheca* sp.
	Biddulphia sp.	*Cylindrotheca* sp.
	Amphora sp.	***Oscillatoria* sp.**

รูปที่ 9 สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมและไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากเกาะขามน้อย ใกล้เกาะสีชัง

เอกสารอ้างอิง

โสภณา บุญญาภิวัฒน์ 2526 การเตรียมตัวอย่างไดอะตอมเพื่อการวิเคราะห์ชนิด วารสารการประมง ปีที่ 38 ฉบับที่ 1 หน้า 67-71.

Anderson, R. A., Berges, J. A., Harrison, P. J. and Watanabe, M. M. 2005. Recipes for freshwater and seawater media. In: Anderson, R. A. (ed.), Algal Culturing Techniques. Elsevier, Amsterdam, pp. 429-538.

Guillard, R. R. L. 1973. Division rates. In, J. R. Stein (ed.) Handbook of Phycological Mathods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp. 289-311.

Guillard, R. R. L. and Morton, S. 2003. Culture method. In: G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson and A. D. Cembella, (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on Oceanographic Methodology 11, UNESCO, Paris, pp: 77-97.

Klausmeier, C. A, Litchman, E., Daufresne, T. and Levin S. A. 2004. Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. Nature 429: 171-174.

McGinnis, K. M., Dempster, T. A. and Sommerfeld, M. R. 1997. Characterization of growth and lipid contents of the diatom *Chaetoceros mulleri*. J. Appl. Phycol. 9: 19-24.

Thomas, C. R. 1996. Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates. Academic Press, London.