บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีการ

แพลงก์ตอนพืชที่ใช้ในการทดลอง คือ *Pedinomonas noctilucae* ซึ่งแยกได้จากเซลล์ *Noctiluca scintillans* ที่เก็บจากบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยา จ.สมุทรปราการ และทำการทดลองในห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอนพืช ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเตรียมการทดลองต่างๆ ตามวิธีการต่อไปนี้

1. การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหรือเกี่ยวข้องกับการเลี้ยงจะผ่านการทำความสะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาด (detergen), การแช่ในกรดเกลือที่ความเข้มข้น 1%, ล้างด้วยน้ำประปา, ล้างด้วยน้ำกลั่นและผ่านการฆ่าเชื้อ ด้วยตู้อบความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความกดดันประมาณ 1.25 บรรยากาศเป็นเวลา 20 นาที

2. การเตรียมน้ำทะเล

น้ำทะเลที่ใช้ศึกษาตลอดการทดลอง ใช้น้ำทะเลธรรมชาติที่เก็บมาคราวเดียวกับที่เก็บตัวอย่างของ *N. scintillans* ซึ่งความเค็มของน้ำทะเลในขณะเก็บตัวอย่างเท่ากับ 20 ส่วนในพันแล้วกรองน้ำทะเลผ่านกระดาษกรอง GF/C เก็บน้ำไว้ในถังปิดฝาให้สนิท เมื่อจะใช้น้ำในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Milipore ขนาดตา 0.45 ไมครอน อีกครั้ง

3. สารอาหาร

สารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนเตรียมจากสูตรอาหาร modified ESM (Okaichi และคณะ, 1991) ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบต่าง ๆ หลายชนิด โดยการเตรียมสารประกอบแต่ละตัวแยกเป็นสารละลายเริ่มต้นแล้วทำเป็นสารละลายผสมชนิดเข้มข้น (stock solution) องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีดังนี้ คือ

น้ำทะเล	1,000	มิลลิลิตร
NH_4Cl	1	มิลลิโมล
K_2HPO_4	0.1	มิลลิโมล
EDTA-Fe	4.6	ไมโครโมล
EDTA-Mn	6	ไมโครโมล
Biotin	1	ไมโครโมล
Vitamin B_1	1	มิลลิกรัม
Vitamin B_{12}	10	มิลลิกรัม

ปรับให้มี pH เท่ากับ 4.5

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารอาหารและปรับความเป็นกรด-เบส (pH) แล้วนำไปฆ่าเชื้อแบคทีเรียในตู้อบความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันประมาณ 1.25 บรรยากาศ เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง ก่อนใช้ในการเพาะเลี้ยง

4. สภาพแวดล้อมของตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่ใช้ในการทดลองได้ปรับไว้ ดังนี้

4.1 อุณหภูมิปรับเป็น 3 ระดับ คือ 10±2 องศาเซลเซียส 20±2 องศาเซลเซียส และ 28±2 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่ กับขั้นตอนการทดลอง

4.2 ความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์เท่ากับ 5,000 ลักซ์

4.3 ช่วงเวลาสว่าง : ช่วงเวลามืด เท่ากับ 12 : 12 ชั่วโมง

5. การเตรียมแพลงก์ตอนพืชสำหรับใช้ในการทดลอง

5.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. noctilucae* โดยนำน้ำทะเลที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้วตามข้อ 2 ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร มาเติมสารอาหารตามสูตร modifile ESM ปรับความเป็นกรด-เบสให้ได้ 4.5 จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ขวดกลมขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด ปริมาณ 100 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือเก็บไว้ในขวดกลมเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์เดี่ยว จากนั้นทำการฆ่าเชื้อในตู้อบความดันไอน้ำ

5.2 แยกเซลล์ *P. noctilucae* จากเซลล์ *N. scintillans*

แยกเซลล์เดี่ยวๆ เพื่อเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง (monoclonal culture) แบบปลอดเชื้อ (axenic) ในตู้บ่มเชื้อ(incubator) ที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 28±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 5,000 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่าง : ช่วงเวลามืดเท่ากับ 12 : 12 ชั่วโมง การปฏิบัติทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ

6. การเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. noctilucae* ให้มีปริมาณมาก

ถ่ายเซลล์ *P. noctilucae* ที่เลี้ยงไว้ในข้อ 5.2 จนมีจำนวนมากลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในข้อ 5.1 จำนวน 10 ขวดและนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อให้มีปริมาณมากขึ้น ทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ (bacteria free)

7. ศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของ *P. noctilucae*

ศึกษาลักษณะเซลล์ของ *P. noctilucae* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ electron microscope (SEM)

ศึกษาการแบ่งเซลล์ของ *P. noctilucae* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope เลือกระดับของความเค็ม สารอาหาร ความเป็นกรด-เบส (pH) และอุณหภูมิที่ให้การเติบโตดีที่สุดมาทำการเลี้ยงด้วยวิธีการเช่นเดิมให้เซลล์ของ *P. noctilucae* เติบโตจนถึงระยะที่เซลล์มีอัตราการเติบโตสูงสุด (exponential phase) แล้วสุ่มเซลล์ทุกชั่วโมง ครั้งละ 3 มิลลิลิตร ตลอด 24 ชั่วโมง ศึกษาเซลล์ที่มีชีวิตโดยการสังเกตและบันทึกภาพการแบ่งเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope

8. การเตรียม stock culture ที่ระดับความเค็มต่างๆ

8.1 ปรับระดับความเค็มน้ำทะเลเป็น 3 ระดับ คือ 20 30 และ 40 ส่วนในพัน จากนั้นเติมสูตรอาหาร modified ESM ปรับความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4.5 จากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเชื้อลงในขวดกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ความเค็มละ 3 ขวด นำไปฆ่าเชื้อแบคทีเรียในตู้อบความดันไอน้ำ หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง

8.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละความเค็มที่เตรียมในข้อ 8.1 ใส่ในตู้บ่มเชื้อเดียวกันกับที่เลี้ยง stock culture ในข้อ 6 เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพแวดล้อมของอาหารเลี้ยงเชื้อและ stock culture ให้ใกล้เคียงกันที่สุด

8.3 จากการเตรียมการไว้ในข้อ 8.2 นำ stock culture *P. noctilucae* เติมลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ระดับความเค็มที่ได้เตรียมไว้ในตู้บ่มเดียวกัน ขวดละ 2 มิลลิลิตร จะทำให้ได้เซลล์เริ่มต้นการทดลอง (initial concentration) ประมาณ 1,500 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อเพื่อให้เพิ่มปริมาณเซลล์สำหรับการทดลองต่อไป

9. การทดลองเพื่อศึกษาผลของความเค็ม สารอาหาร ความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิต่อการเติบโตของ *P. noctilucae*

9.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง มีดังนี้คือ

<u>สารอาหาร</u>

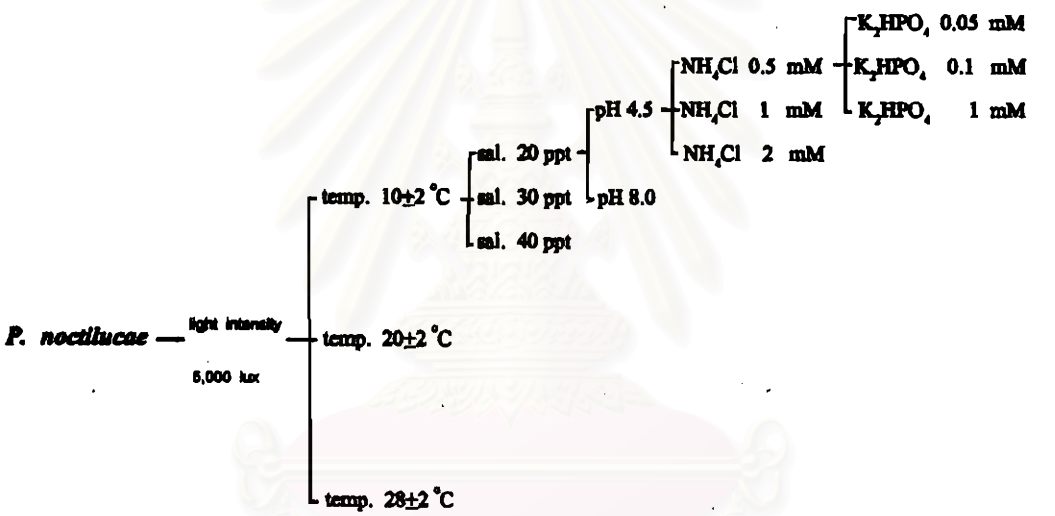
K_2HPO_4 เตรียมให้มีความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยง 3 ระดับ คือ 0.05 mM, 0.1 mM และ 1 mM

NH_4Cl เตรียมให้มีความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยง 3 ระดับ คือ 0.5 mM, 1 mM และ 2 mM

9.12 ปรับระดับความเป็นกรด-เบส เป็น 2 ระดับ คือ 4.5 และ 8.0

9.13 ปรับอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเป็น 3 ระดับ คือ 10±2 องศาเซลเซียส 20±2 องศาเซลเซียส และ 28±2 องศาเซลเซียส

9.2 ทำการทดลองตามแผนผังที่แสดงไว้ ดังนี้คือ



รูปที่ 2-1 แผนผังการทดลองผลร่วมของความเค็ม สารอาหาร ความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิต่อการเติบโตของ *P. noctilucae*

9.3 ทุกชุดการทดลองใช้ขวดกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยง *P. noctilucae* ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร เซลล์เริ่มต้นการทดลองประมาณ 1,500 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละชุดตามแต่ละปัจจัยที่กำหนด

9.4 ชุดควบคุมในการทดลองทั้งหมด คือ ชุดที่เลี้ยง *P. noctilucae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับความเค็มเท่ากับ 20 ส่วนในพัน ความเข้มข้นของ NH_4Cl เท่ากับ 1 มิลลิโมล ความเข้มข้นของ K_2HPO_4 เท่ากับ 0.1 มิลลิโมล ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 4.5 และเลี้ยง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อุณหภูมิ 20±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ช่วงเวลาสว่าง : ช่วงเวลามืดเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง

10. ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ทุกวันเพื่อนำไปคำนวณหาอัตราการเติบโตแล้วทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติต่อไป

11. การวิเคราะห์ข้อมูล

11.1 การหาอัตราการเติบโต คำนวณจากความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์กับเวลาเป็นวัน โดยเลือกจุดที่เริ่มระยะ exponential phase และจุดสุดท้ายที่เลือกจะเป็นจุดที่ปริมาณเซลล์เริ่มลดลง หาค่า slope จากสมการโดยวิธี least square regression ค่า slope ที่ได้จะเป็นค่าอัตราการเติบโตหรือ growth constant ของแพลงก์ตอนพืช (Brand และคณะ, 1982)

$$\mu\ (day^{-1}) = [\ln (N_1/N_0)] / (t_1-t_0)$$

เมื่อ μ คือ สัมประสิทธิ์การเติบโตของเซลล์, N_0และN_1 คือ จำนวนเซลล์เริ่มต้นและสุดท้ายในระยะที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์, t_0และt_1 คือ เวลาเริ่มต้นและสุดท้ายในระยะที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์

11.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการเติบโตของเซลล์ใช้วิธีทางสถิติแบบแฟกตอเรียลที่มี 4 แฟกเตอร์ โดยตั้งสมมติฐาน (null hypothesis) ว่าอัตราการเติบโตของเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย