บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีการ

1. <u>ศึกษาการเติบโตของ *N. scintillans* ในอาหารแพลงก์ตอนพืชต่างชนิด</u>

1.1 อุปกรณ์และสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

1.1.1 การเตรียมอุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ในการเลี้ยงแพลงก์ตอน

ขวดแก้วที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและอุปกรณ์เครื่องแก้วอื่นๆ ผ่านการทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างเครื่องแก้วแช่ค้างคืนในกรดเกลือ 1 เปอร์เซนต์ ล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นอย่างน้อย 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยการอบความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 127 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 1.5 Kgf/cm^2 เป็นเวลา 20 นาที และนำไปอบแห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.1.2 การเตรียมน้ำทะเล

น้ำทะเลที่ใช้ในการเตรียมน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนเป็นน้ำทะเลที่เก็บมาคราวเดียวกันและใช้ตลอดการทดลองโดยนำมาเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลานาน นำมากรองผ่านกระดาษกรอง GF/C และเก็บไว้ในภาชนะ เมื่อต้องการเตรียมน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนจึงนำน้ำทะเลมาปรับความเค็มตามที่ต้องการใช้ในการทดลองด้วยน้ำกลั่นหรือเกลือแกง (NaCl) แล้วกรองกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตรอีกครั้ง

1.1.3 สารอาหาร

สารอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงแพลงก์ตอนเตรียมจากสูตรอาหาร ESM (ปรับปรุงจากสูตรอาหารของ Okaichi และคณะ, 1991) ซึ่งประกอบไปด้วยสารอาหารต่างๆหลายชนิด โดยมีความเข้มข้นขององค์ประกอบดังนี้

1.	Seawater	1000	มิลลิลิตร
2.	$NaNO_3$	1.41	มิลลิโมล
3.	Tris-buffer	1	กรัม
4.	K_2HPO_4*	0.029	มิลลิโมล
5.	EDTA-Fe*	0.71	ไมโครโมล
6.	EDTA-Mn*	0.74	ไมโครโมล
7.	$Na_2SiO_3.9H_2O$**	16.5	กรัม
8.	Vitamin mixed***	200	ไมโครลิตร
9.	Trace metal****	200	ไมโครลิตร

10. ปรับ pH เป็น 8

1.1.4 การเตรียมน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช

* เตรียมเป็น stock solution ก่อนเพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้

** เตรียมเป็น stock solution และใช้เฉพาะแพลงก์ตอนพืชที่เป็นไดอะตอมเท่านั้น (*Skeletonema* sp.)

*** การเตรียม Vitamin mixed

1. B12 + Biotin stock solution

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
B12	0.1	กรัม
Biotin	0.01	กรัม

2. เตรียม Vitamin mixed

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
B1-HCl	0.1	กรัม
B12 + Biotin	5	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 4

**** การเตรียม Trace metal

1. น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
2. $ZnSO_4 . 7H_2O$	0.144	กรัม
3. $MnCl_2 . 4H_2O$	0.990	กรัม
4. $Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0.061	กรัม
5. $CoCl_2 . 6H_2O$	0.024	กรัม
6. $CuSO_4 . 5H_2O$	0.001	กรัม
7. EDTA (as Na_2 salt)	4.467	กรัม

8. ปรับ pH เป็น 10 และนำไปตั้งไฟเพื่อให้ สารละลายดีขึ้น

1.1.5 การเตรียมตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมสำหรับการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน

- ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 28±2 องศาเซลเซียส
- ปริมาณความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ประมาณ 3,000 ลักซ์
- ปรับช่วงเวลาที่แพลงก์ตอนใช้ในการสังเคราะห์แสง ช่วงเวลาสว่างต่อช่วงเวลามืด (L:D cycle) เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง

1.2 การเตรียมแพลงก์ตอนสำหรับใช้ในการทดลอง

1.2.1 การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชสำหรับใช้เป็นอาหาร *N. scintillans*

แพลงก์ตอนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงคือ *Dunaliella* sp., *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp. และ *Skeletonema* sp. ซึ่งได้รับจากสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล อ่างศิลา จ.ชลบุรี นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอนพืช ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยโดยทำการคัดเลือกเซลล์ (isolation) ด้วยเทคนิคหลอดแก้วปลายแหลม (capillary technique) เพื่อให้ได้เป็น clonal culture และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตร ESM ความเค็ม 20, 30 และ 40 ส่วนในพัน ตามลำดับ

1.2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ *N. scintillans*

แพลงก์ตอนที่นำมาเพาะเลี้ยงคือไดโนแฟลเจลเลต *N. scintillans* ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเลธรรมชาติ ความเค็ม 30 ส่วนในพัน บริเวณปลายสะพานปลาใกล้สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล อ่างศิลา จ.ชลบุรี นำมาคัดเลือกเซลล์และเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อ 1.2.1 โดยเริ่มให้แพลงก์ตอนพืช *Dunaliella* sp. (ที่เลี้ยงไว้ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์) เป็นอาหารในครั้งแรกเมื่อเซลล์เติบโตดีแล้วจึงคัดเลือกเซลล์ที่เลี้ยงอีกครั้งและปรับให้คุ้นเคยกับอาหารแพลงก์ตอนพืช *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp. และ *Skeletonema* sp. จนกระทั่งเซลล์เติบโตดีจึงทำการปรับความเค็ม *N. scintillans* ในอาหารแพลงก์ตอนพืชทั้ง 4 ชนิดเป็น 20, 30 และ 40 ส่วนในพัน ตามลำดับ

1.3 ผลของความเข้มแสงและความเค็มต่อการเติบโต

นำ *N. scintillans* ที่สามารถเติบโตได้ในอาหารแพลงก์ตอนพืชในข้อ 1.2.2 มาปรับสภาพให้เคยชินกับสภาพการทดลองอย่างน้อย 2 generations จากนั้นจึงนำมาศึกษาการเติบโตที่ระดับความเข้มแสง 3,000 และ 6,000 ลักซ์ โดยเตรียมน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงในแต่ละระดับความเข้มแสงให้มีความเค็ม 20, 30 และ 40 ส่วนในพัน การทดลองทั้งหมดจะทำในขวด culture flask ขนาด 500 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนบรรจุอยู่ 300 มิลลิลิตร โดยทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 หน่วยทดลอง (รูปที่5)

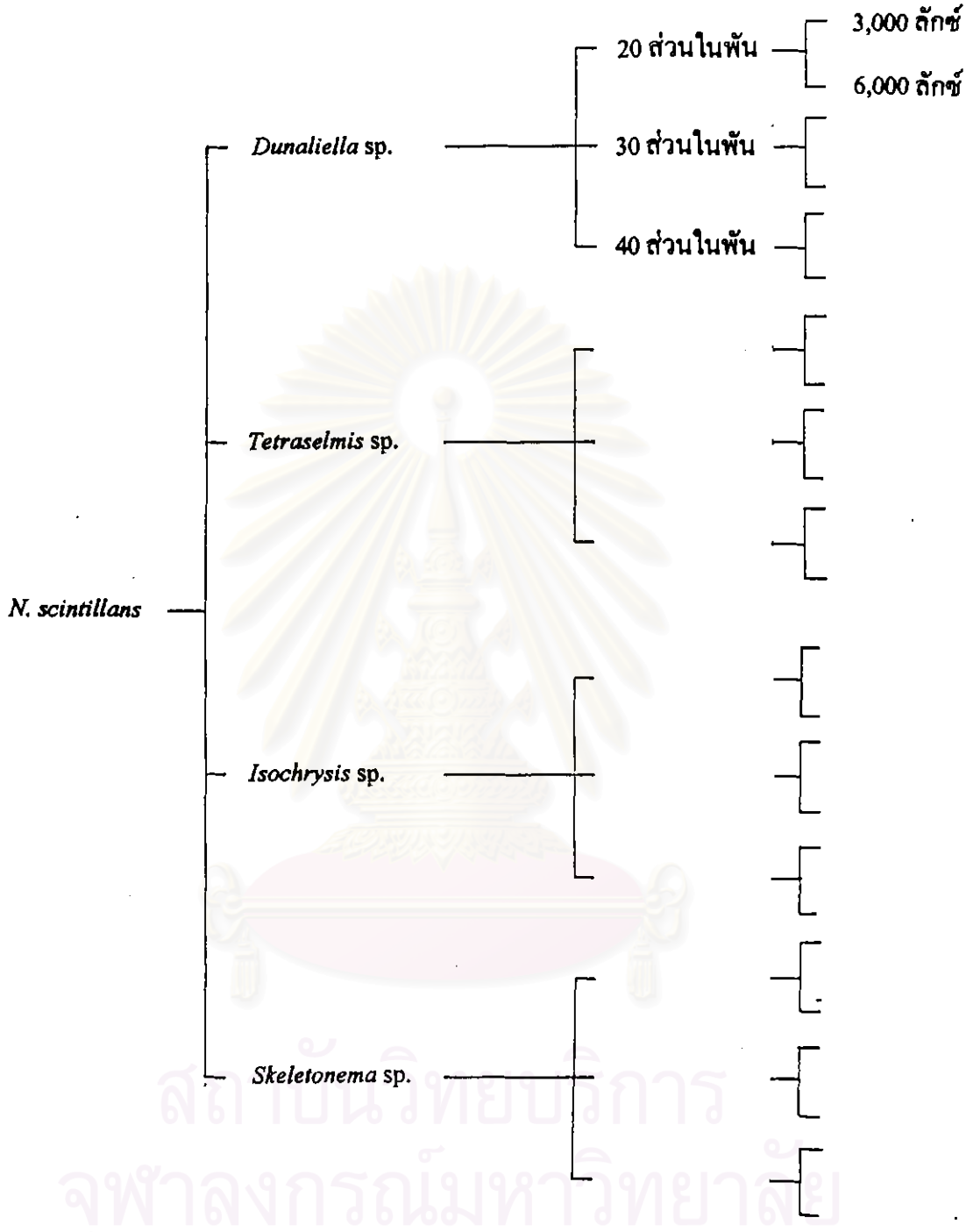
นับจำนวนเซลล์ *N. scintillans* ทุกวันและหาค่าสัมประสิทธิ์การเติบโต (specific growth rate, μ) ตามวิธีการของ Fogg และThake (1987) ดังนี้

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0)/t$$

เมื่อ μ = สัมประสิทธิ์การเติบโต (ต่อวัน)

N_0, N_t = จำนวนเซลล์เริ่มต้นและจำนวนเซลล์ที่เวลา t

t = เวลาระหว่าง N_0 และ N_t (วัน)



รูปที่ 5 การทดลองศึกษาการเติบโตของ *N. scintillans* ในอาหารแพลงก์ตอนพืชต่างชนิดที่ระดับความเข้มแสงและความเค็มต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ศึกษาผลของความหนาแน่นเซลล์และสารสกัดจากเซลล์ *N. scintillans* ต่ออัตราการตายของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนและปลากะพงขาววัยรุ่น

2.1 อุปกรณ์และสภาวะที่ใช้การทดลอง

2.1.1 การเตรียมตู้ทดลอง

ตู้สำหรับใช้ในการทดลองมีความกว้าง 1.50 เมตรและยาว 2.00 เมตร ปิดทึบทั้ง 4 ด้านโดยด้านหน้าของตู้ทดลองสามารถเปิด-ปิดได้ ควบคุมระดับความเข้มแสงภายในตู้ทดลองไว้ที่ 3,000 ลักซ์ ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 28±2 องศาเซลเซียส และมีช่วงเวลามืดต่อช่วงเวลาสว่าง 12:12 ชั่วโมง

2.1.2 ถังสำหรับใช้ทดลอง

ภาชนะที่ใช้ในการทดลองเป็นถังพลาสติกรูปทรงสี่เหลี่ยมมีความจุ 5 ลิตร มีปริมาณของสารละลายที่ใช้ในการทดลอง 3 ลิตรโดยให้เหลือเนื้อที่ส่วนบนที่อยู่เหนือน้ำไว้ให้สูงพอที่จะป้องกันไม่ให้ลูกกุ้งและลูกปลากระโดดหนีออกจากภาชนะขณะทดลอง

2.1.3 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำลูกกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ระยะ P15 ที่มีขนาดความยาวเฉลี่ย 1.50±0.15 เซ็นติเมตรและลูกปลากะพงขาว (*L. calcarifer* Bloch) อายุ 30 วัน ที่มีขนาดความยาวเฉลี่ย 0.90±0.10 เซ็นติเมตร จากฟาร์มเพาะเลี้ยงจังหวัดฉะเชิงเทราและชลบุรี นำไปใส่ในถัง polyethylene ความจุ 50 ลิตร ในห้องซึ่งควบคุมอุณหภูมิเพื่อให้สัตว์ทดลองดังกล่าวปรับสภาพของร่างกายให้เคยชินต่อสภาพแวดล้อมของห้องทดลอง (acclimation) เป็นเวลา 2 วัน

หยุดการให้อาหารลูกกุ้งและลูกปลาก่อนการทดลองประมาณ 12 ชั่วโมง เนื่องจากลูกกุ้งและลูกปลามีขนาดเล็กจะมีผลกระทบและอ่อนแอมากถ้าหยุดการให้อาหารก่อนการทดลองจริง 1-2 วัน (สิริ ทุกข์วินาศ, 2527)

2.1.4 การเตรียมเซลล์ *N. scintillans*

เซลล์ของ *N. scintillans* ที่ใช้สำหรับการทดลองนี้เตรียมจากผลการทดลองในข้อ 1.3 ที่ระดับความเข้มแสง ความเค็มและชนิดของอาหารแพลงก์ตอนพืชที่เหมาะสมและให้การเติบโตสูงสุดต่อ *N. scintillans* โดยนำเซลล์ของ *N. scintillans* ที่รวบรวมได้จากการเลี้ยงมาล้างให้เซลล์สะอาดปราศจากอาหารแพลงก์ตอนพืชที่ใช้เลี้ยงเซลล์ก่อนนำไปใช้ทดลอง ส่วนเซลล์ของ *N. scintillans* จากธรรมชาติเตรียมโดยรวบรวมเซลล์จากบริเวณที่เกิดปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสีในธรรมชาติและผ่านการล้างเซลล์ก่อนการทดลองเช่นเดียวกัน

2.2 ศึกษาผลของความหนาแน่นเซลล์ *N. scintillans* ต่ออัตราการตายของลูกกุ้งและลูกปลา

2.2.1 ความหนาแน่นเซลล์ของ *N. scintillans* ที่ได้จากการเลี้ยงต่ออัตราการตายของลูกกุ้งและลูกปลา

- ทดลองเบื้องต้นโดยกำหนดความหนาแน่นเซลล์ของ *N. scintillans* จากการเลี้ยงเพื่อหาระดับความหนาแน่นเซลล์โดยประมาณที่ทำให้ลูกกุ้งกุลาดำตาย 0 และ 100 เปอร์เซนต์ การทดลองนี้ใช้ความหนาแน่นเซลล์ 5 ระดับ แต่ละระดับมี 2 ซ้ำ และมีชุดควบคุม ความหนาแน่นของลูกกุ้งกุลาดำในถังทดลอง 10 ตัว/3ลิตร และไม่ให้อากาศ จากนั้นทดลองอีกครั้งหนึ่งโดยเลือกใช้ความหนาแน่นเซลล์จากการเลี้ยงซึ่งได้จากการทดลองครั้งแรกมาแบ่งเป็นช่วงๆให้ได้ระดับเพื่อให้ทราบความหนาแน่นเซลล์จากการเลี้ยงที่ทำให้ลูกกุ้งกุลาดำตาย 50 เปอร์เซนต์ในระยะเวลาที่กำหนด (median lethel concentration, LC_{50}) การทดลองนี้มี 5 ระดับ 2 ซ้ำและมีชุดควบคุมซึ่งไม่มีการให้อากาศเช่นเดียวกัน

- ทดลองเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้นแต่เปลี่ยนสัตว์ทดลองเป็นลูกปลากะพงขาว

2.2.2 ความหนาแน่นเซลล์ของ *N. scintillans* ที่ได้จากธรรมชาติต่ออัตราการตายของลูกกุ้งและลูกปลา

- ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 แต่เปลี่ยนเป็นเซลล์ของ *N. scintillans* ที่รวบรวมได้จากธรรมชาติบริเวณที่เกิดน้ำเปลี่ยนสี

2.3 สารสกัดจากเซลล์ของ *N. scintillans* ต่ออัตราการตายของลูกกุ้งและลูกปลา

2.3.1 อิทธิพลของสารสกัดจากเซลล์ *N. scintillans* ที่ได้จากการเลี้ยงต่ออัตราการตายของลูกกุ้งและลูกปลา

- ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 แต่เปลี่ยนเป็นสารสกัดจากเซลล์ซึ่งเตรียมโดยนำเซลล์ของ *N. scintillans* จากการเลี้ยงที่ทราบความหนาแน่นแล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร การทดลองนี้มี 3 ระดับและมีชุดควบคุม

2.3.2 อิทธิพลของสารสกัดจากเซลล์ *N. scintillans* ที่ได้จากธรรมชาติต่ออัตราการตายของลูกกุ้งและลูกปลา

- ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 แต่เปลี่ยนเป็นเซลล์ *N. scintillans* จากธรรมชาติที่รวบรวมได้จากบริเวณที่เกิดน้ำเปลี่ยนสี

2.4 อัตราการตายของลูกกุ้งและลูกปลาในสารละลายแอมโมเนีย

ทดสอบอัตราการตายของลูกกุ้งกุลาดำและลูกปลากะพงขาวในสารละลายแอมโมเนียโดยทดลองที่ความเข้มข้นของแอมโมเนีย 4 ระดับและมีชุดควบคุม ซึ่งสารละลายแอมโมเนียที่ใช้จะเตรียมเป็น stock solution โดยการชั่ง $(NH_4)_2SO_4$ 13.2 กรัม (ก่อนชั่งควรอบที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเก็บไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน)ในน้ำกลั่นและทำให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดย 1 มิลลิลิตรมี NH_4-N 5.28×10^3 มิลลิกรัม/ลิตร

2.5 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ

- อุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำตรวจวัดโดยใช้เครื่อง DO meter (Handy MK III)
- ความเป็นกรด-เบสตรวจวัดโดยใช้โดย pH meter model HM-101
- ปริมาณแอมโมเนียตรวจวัดโดยใช้วิธีการของ Strickland และParsons (1972) ในขณะเริ่มการทดลอง สัตว์ทดลองเริ่มตายและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

2.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

2.6.1 วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการเติบโตทางสถิติแบบแฟกตอเรียลที่มี 3 แฟกเตอร์และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการเติบโตโดยวิธี Least Significant Different (LSD) โดยมีสมมุติฐานว่าอัตราการเติบโตของเซลล์ *N. scintillans* ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

2.6.2 วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ทำให้กุ้งกุลาดำวัยอ่อนและปลากะพงขาววัยรุ่นตาย 50 เปอร์เซนต์ในเวลา 72 ชั่วโมง (72-hr LC_{50}) ตามวิธีการของ Finney (1971) สำหรับข้อมูลคุณภาพน้ำนำมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติตามระยะเวลาการทดลองที่ 72 ชั่วโมงโดยการทดสอบความแปรปรวนของกลุ่มข้อมูลด้วยวิธี T-test ที่ $P<0.05$ หากข้อมูลชุดใดค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะนำเอาค่าเฉลี่ยของข้อมูลชุดนั้นมาเปรียบเทียบความแตกต่างกันโดยวิธี Least Significant Different (LSD) ที่ $P<0.05$ อีกครั้งหนึ่ง

2.7 สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8 ระยะเวลาการทดลอง

เริ่มทำการทดลองในเดือนตุลาคม 2539 สิ้นสุดการทดลองในเดือนมิถุนายน 2541