บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

ทำการดำเนินการศึกษาที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชและห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีทางอาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยวิธีดำเนินการศึกษาแบ่งเป็น 5 ส่วน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การคัดเลือกแพลงก์ตอนพืช

1.1 การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจะผ่านการทำความสะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาด (detergent) ก่อนแช่ในกรดไฮโดรคลอริก 1% ล้างด้วยน้ำประปา ล้างด้วยน้ำกลั่น และผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการอบนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 1 บรรยากาศ เป็นเวลา 20 นาที

1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช

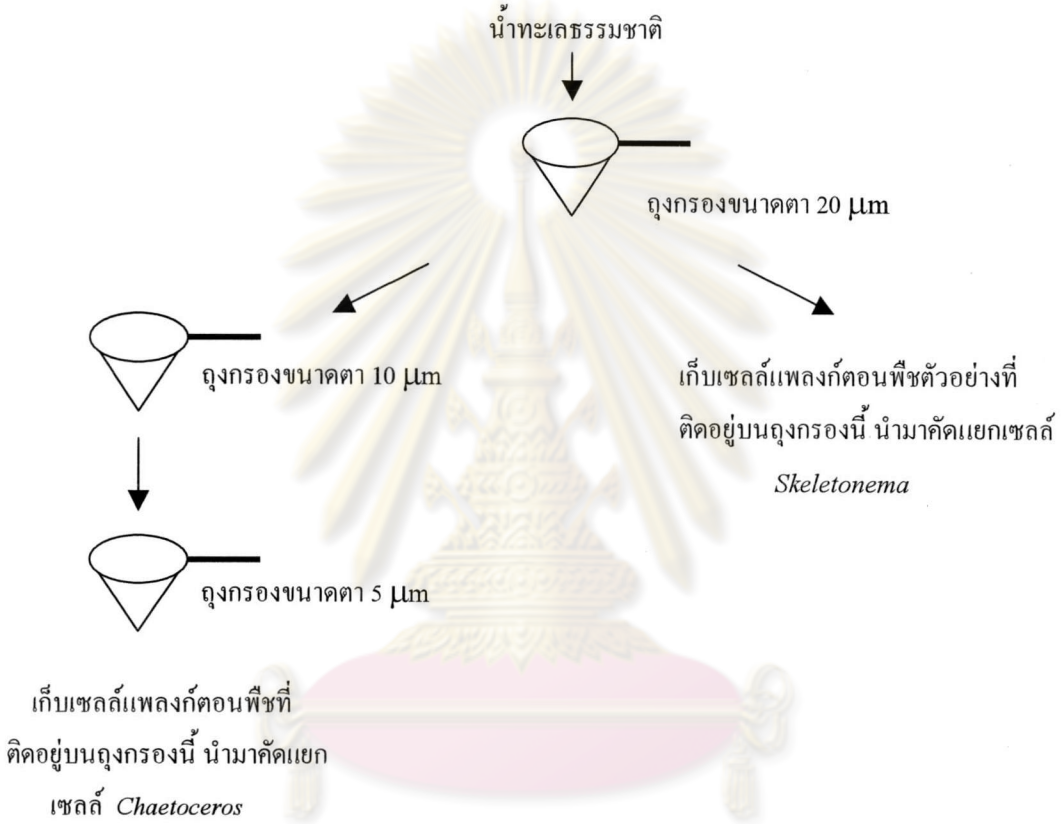
น้ำทะเลที่ใช้ในการทดลอง ใช้น้ำทะเลธรรมชาติที่เก็บจากบริเวณชายฝั่งทะเลบางพระ จังหวัดชลบุรี นำน้ำทะเลมาปรับความเค็มเป็น 30 psu ด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองน้ำทะเลผ่านกระดาษกรอง GF/C จากนั้นนำไปอบนึ่งที่อุณหภูมิ 121 ° C ภายใต้ความดัน 1 บรรยากาศ เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลาอย่างน้อย 1 วัน ก่อนนำไปใช้งาน จากนั้นเตรียมอาหารสูตร Conway (Walne, 1966) (ภาคผนวก ก) แล้วกำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาดตา 0.22 ไมโครเมตร แล้วหยดสารอาหารลงในน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้วดังข้างต้นโดยทำในตู้ปลอดเชื้อ และปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย pH-Meter model IQ 150

การเตรียมอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชจะมี 2 รูปแบบคือ อาหารเหลวและอาหารแข็ง (อาหารวุ้น) ทั้งสองรูปแบบ มีวิธีการเตรียมเหมือนกัน แต่อาหารแข็งได้เติมวุ้นผง 0.9 % w/v แล้วนำไปต้มจนละลาย เทลงบนจานแก้ว (petri dish) ทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัว แล้วจึงนำไปใช้งาน

1.3 การเก็บตัวอย่าง การคัดแยกไดอะตอมสกุล *Chaetoceros* และ *Skeletonema* เพื่อเป็นหัวเชื้อ (stock culture)

ก. การเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างจาก 3 แหล่ง ดังนี้

แหล่งที่ 1 เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากน้ำทะเลธรรมชาติ บริเวณชายฝั่งทะเลอ่างศิลา บางแสน และบางพระ จังหวัดชลบุรี โดยการใช้ถังตักน้ำในระดับต่ำกว่าผิวหน้าน้ำประมาณ 50 เซนติเมตร แล้วนำมากรองผ่านถุงกรองแพลงก์ตอนพืชที่มีขนาดตา 20 ไมโครเมตร ซึ่งวิธีการคัดแยก *Chaetoceros* และ *Skeletonema* จะแตกต่างกัน โดยทำการเลือก *Chaetoceros* ชนิดที่เป็นเซลล์เดี่ยวและมีขนาดเล็กกว่า *Skeletonema* ซึ่งเป็นสายโซ่ (chain)ตามวิธีการดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ขั้นตอนการคัดแยกแพลงก์ตอนพืชจากน้ำทะเลธรรมชาติ

แหล่งที่ 2 *Chaetoceros* และ *Skeletonema* ที่ได้จากหน่วยงานของรัฐ ได้แก่ หน่วยงานของกรมประมง และมหาวิทยาลัย เป็นต้น

แหล่งที่ 3 *Chaetoceros* และ *Skeletonema* ที่ได้จากภาคเอกชนซึ่งเพาะเลี้ยงขายแถบจังหวัดฉะเชิงเทราและชลบุรี

ข. การคัดแยกชนิด

นำตัวอย่างจากข้อ ก. มาแยกเลี้ยงเพื่อให้ได้เป็น monoclonal culture ด้วยเทคนิคหลอดแก้วปลายแหลมและการเพาะเชื้อบนอาหารวุ้นตามวิธีของ Hoshow and Rosowski (1973) โดย *Chaetoceros* จะคัดแยกด้วยการเขี่ยเชื้อลงบนอาหารวุ้น (รูปที่ 7) ส่วน

Skeletonema จะคัดแยกด้วยการใช้เทคนิคหลอดแก้วปลายแหลมดูดเซลล์ขึ้นมาเลี้ยงใน multiwell plate ที่มีอาหารเหลว แล้วนำทั้งหมดไปเลี้ยงในห้องเพาะบ่ม (incubation room) โดยมีสภาวะห้องดังนี้ อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 3000 ลักซ์ และช่วงเวลาได้รับแสง: ไม่ได้รับแสงคือ 12 : 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นประมาณ 2-3 สัปดาห์ จะมีโคโลนีเซลล์สีน้ำตาลขึ้นบนอาหารวุ้นและอาหารเหลว ให้เขี่ยโคโลนีแต่ละกลุ่มมาตรวจสอบว่าเป็นเซลล์ *Chaetoceros* และ *Skeletonema* หรือไม่ โดยดูจากลักษณะโครงสร้างเซลล์ดังบทที่ 2 จากนั้นแยกเซลล์นั้นมาเลี้ยงในหลอดแก้วที่มีอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช โดยเรียกเซลล์ *Chaetoceros* และ *Skeletonema* ที่แยกได้และคาดว่าจะต่างชนิดกันว่า "โคลน" แล้วนำไปขยายลงในขวดทดลองก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวน ซึ่งแต่ละโคลนจะใช้เป็นหัวเชื้อในขั้นตอนต่าง ๆ ต่อไป

รูปที่ 7 การเพาะเชื้อแพลงก์ตอนพืชบนอาหารวุ้นและอาหารเหลว

1.4 การศึกษาอัตราการเติบโต (growth rate)

นำอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช ใส่ขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร ซึ่งในแต่ละโคลนจะทำการทดลอง 3 ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ซ้ำ (แต่ละชุดการทดลองจะทำต่างช่วงเวลากันแต่สภาวะการทดลองเหมือนกันทุกประการ) จากนั้นถ่ายเซลล์แต่ละโคลนจากหัวเชื้อ มาใส่ลงในขวดให้มีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นประมาณ 8–10 $\times$ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับโคลนที่เป็น *Chaetoceros* และ 600-800 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับโคลนที่เป็น *Skeletonema* ทำการสุ่มเก็บเซลล์ทุกวัน ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ใส่ไว้ในขวด เพื่อนำมาตรวจนับจำนวนเซลล์ โดยจะสุ่มเซลล์ใส่ใน Haemacytometer เพื่อทำการตรวจนับ *Chaetoceros* และสุ่มเซลล์ใส่ใน Sedgewick Rafter Slide ที่มีความจุ 1 มิลลิลิตร เพื่อทำการตรวจนับ *Skeletonema* นำขวดทุกชุดการทดลองเข้าห้องเพาะบ่ม สภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับการทำหัวเชื้อ โดยในการเลี้ยง *Chaetoceros* จะให้อากาศตลอดเวลา (เพื่อช่วยในการกวนน้ำ ป้องกันการตกตะกอนของเซลล์แพลงก์ตอนพืช แต่ในการเลี้ยง *Skeletonema* จะไม่ให้อากาศ แต่ใช้วิธีเขย่าขวดวันละ 3 ครั้ง ดังรูปที่ 8 ทำการสุ่มเซลล์ในเวลาเดียวกันทุกวันเพื่อนับจำนวนเซลล์ แล้วคำนวณหาความหนาแน่นของเซลล์ จากนั้นเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า ln ของ จำนวนเซลล์ (cell count number) กับระยะเวลา (วัน) โดยเลือกจุดที่เริ่ม

ระยะ exponential phase กับจุดสุดท้ายที่เลือกจะเป็นจุดที่ปริมาณเซลล์เริ่มจะไม่เพิ่มจำนวน (ก่อนระยะเฉื่อย) หาค่า slope จากสมการโดยวิธี least square regression ค่า slope ที่ได้จะเป็น ค่าสัมประสิทธิ์การเติบโต (Growth Constant: μ) ของแพลงก์ตอนพืชดังสูตรที่ 1 (Guillard, 1973) สำหรับระยะเวลาที่แพลงก์ตอนพืชใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (Generation Time: G) คำนวณได้จากสูตรที่ 2

จาก $N_t = N_0 e^{\mu t}$

$\ln N_t = \ln N_0 + \mu t$

$y = c + \mu t$

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t} \qquad \text{——————} \quad \mathbf{1}$$

$$G = \frac{\ln 2}{\mu} \qquad \text{——————} \quad \mathbf{2}$$

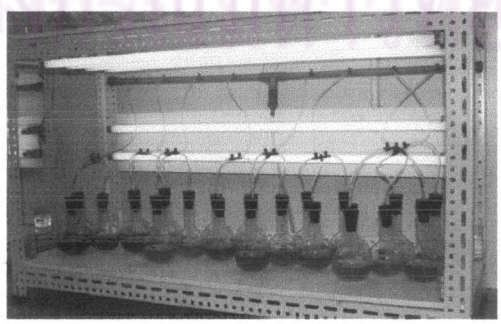
โดย N_0 = จำนวนเซลล์เริ่มต้น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

N_t = จำนวนเซลล์สุดท้าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

μ = ค่าสัมประสิทธิ์การเติบโต (ต่อวัน)

t = เวลาระหว่าง N_0 กับ N_t (วัน)

G = เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (วัน)



รูปที่ 8 การศึกษาอัตราการเติบโตของแพลงก์ตอนพืช

I20919827

1.5 การศึกษาขนาดเซลล์ *Chaetoceros* และ *Skeletonema* แต่ละโคลน

สุ่มเซลล์ *Chaetoceros* และ *Skeletonema* ที่เพาะเลี้ยงในระยะ middle log phase โคลนละ 50 เซลล์ นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและวัดขนาดเซลล์โดยวัดความยาวของเซลล์จากด้านเกอเดิล ได้แก่ ด้านแกนอะพิคัล (Apical Axis: AA), ด้านแกนเพอร์วาลวาร์ (Pervalvar Axis: PA) (รูปที่ 1) โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ภาพด้วยโปรแกรม Image-Pro Plus version 3.00 (บริษัท มีเดีย ไซเบอร์เนติค)

1.6 การจำแนกชนิด *Chaetoceros* และ *Skeletonema*

นำตัวอย่าง *Chaetoceros* และ *Skeletonema* แต่ละโคลนมาทำความสะอาดเพื่อขจัดตะกอนแคลเซียมและสารอินทรีย์ต่าง ๆ ให้หมดไปเพื่อให้เห็นรายละเอียดต่าง ๆ บนผนังเซลล์โดยใช้วิธีการของ Simonsen (1974 อ้างโดย โสภณา บุญญาภิวัฒน์ 2526) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ค จากนั้นนำตัวอย่างมาหยดลงบนสไลด์ นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (compound microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) จำแนกชนิดโดยเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง

2. องค์ประกอบทางชีวเคมีในแพลงก์ตอนพืช

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบทางชีวเคมีชนิดต่าง ๆ ในแพลงก์ตอนพืชโดยมีวิธีการดังนี้

2.1 การเตรียมตัวอย่างแห้ง *Chaetoceros* และ *Skeletonema* โคลนต่าง ๆ

ก. นำหัวเชื้อ *Chaetoceros* และ *Skeletonema* แต่ละโคลน มาขยายเพิ่มปริมาณในโหลแก้วโคลนละ 50 ลิตร โดยเลี้ยงในสภาวะการเลี้ยงข้างต้น และให้อากาศตลอดเวลา

ข. เก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะ late log phase โดย *Chaetoceros* เก็บเซลล์ในวันที่ 3 และ *Skeletonema* เก็บเซลล์ในวันที่ 4 ตามวิธีการดังนี้

1. นำมาตกตะกอนด้วยสารส้ม ความเข้มข้น 0.02 % w/v ใช้ 2 มิลลิลิตรต่อปริมาตรแพลงก์ตอนพืช 1 ลิตร ประมาณ 60 นาที เซลล์จะจับกันแล้วตกลงสู่ก้นโหล จากนั้นดูดน้ำข้างบนทิ้งให้มากที่สุด

2. นำเซลล์ที่ตกตะกอนมาเซนตริฟิวจ์ ที่ 3000 r.p.m. เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์แพลงก์ตอนพืชด้วย 0.5 M แอมโมเนียมฟอร์เมท ($CH_2O_2.NH_3$) (เพื่อล้างเกลือและสารอาหารออก)

3. ทำให้แห้งโดยการนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry)

4. เก็บเซลล์แห้งใส่ในภาชนะที่ปิดสนิทและใส่ซิลิกาเจล เพื่อดูดความชื้น แล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่าง ๆ ต่อไป

2.2 การหาน้ำหนักแห้ง (dry weight) น้ำหนักต่อเซลล์ (mass/cell) และจำนวนเซลล์ขณะเก็บเกี่ยว (cell/ml.)

น้ำหนักเซลล์แห้ง แบ่ง *Chaetoceros* และ *Skeletonema* ที่เพาะเลี้ยงจากข้อ 2.1 โคลนละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ มากรองผ่านกระดาษกรอง millipore ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ขนาดตา 0.45 ไมโครเมตร (ก่อนใช้อบกระดาษกรอง ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ให้แห้ง แล้วนำไปใส่โถดูดความชื้น เพื่อให้น้ำหนักคงที่ปราศจากความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง) จากนั้นล้างเซลล์แพลงก์ตอนพืชด้วย 0.5 แอมโมเนียมฟอร์เมท 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง เพื่อล้างเกลือและสารอาหารที่ติดอยู่กับเซลล์ออก นำกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่โถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักกระดาษสุดท้าย คำนวณค่าน้ำหนักแห้งของแพลงก์ตอนพืช ในหน่วย มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l)

นับจำนวนเซลล์ขณะเก็บเกี่ยว สุ่มเก็บเซลล์ *Chaetoceros* และ *Skeletonema* จากข้อ 2.1 โคลนละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ นับจำนวนเซลล์ หน่วยเป็น เซลล์ต่อมิลลิลิตร (cell/ml.)

น้ำหนักต่อเซลล์ นำผลจากการหาน้ำหนักแห้ง และการนับจำนวนเซลล์ มาคิดคำนวณน้ำหนักต่อเซลล์ หน่วยเป็น พิโคกรัมต่อเซลล์ (pg/cell)

2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบทางชีวเคมีชนิดต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ (ภาคผนวก ง)

โปรตีน	โดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method) (AOAC, 1990)
คาร์โบไฮเดรต	โดยใช้ Phenol-sulphuric acid method ตามวิธีของ Kochert (1978)
ไขมัน	สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม:เมธานอล (2:1) โดยดัดแปลงวิธีของ Bligh and Dyer (1959)
กรดไขมัน	โดยดัดแปลงวิธีของ Morrison และ Smith (1964)
กรดอะมิโน	โดยวิธี Water AccQ-Tag Instruction Manual (1993)
เถ้า	โดยการนำตัวอย่างแห้ง *Chaetoceros* และ *Skeletonema* นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่งโมง (AOAC, 1990)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยอ่อนด้วย *Chaetoceros* และ *Skeletonema*

3.1 คัดเลือกโคลน *Chaetoceros* และ *Skeletonema* เพื่อเป็นอาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน โดยพิจารณาจากปริมาณกรดไขมันชนิดจำเป็น (EFAs) และอัตราการเติบโตของ *Chaetoceros* และ *Skeletonema*

3.2 วิธีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

การศึกษาครั้งนี้ใช้กุ้งกุลาดำระยะนอเพลียส ที่มาจากพ่อแม่พันธุ์เดียวกัน นำมาเลี้ยงในถังพลาสติกก้นเรียบขนาด 12 ลิตร วางบนชั้นเลี้ยงที่มืดสนิทโดยการบุโฟมที่หุ้มด้วยถุงดำทุกด้าน เพื่อช่วยควบคุมอุณหภูมิน้ำเลี้ยงให้อยู่ระหว่าง 29.5–30.5 °C ในแต่ละถังบรรจุน้ำทะเลกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรค ปริมาตร 6 ลิตร ที่ความเค็ม 30 psu ความหนาแน่นของกุ้งประมาณ 100 ตัว/ลิตร ให้อากาศตลอดเวลา ให้อาหารวันละ 6 มื้อ (02.00, 6.00, 10.00, 14.00, 18.00 และ 22.00 น.) ดังตารางที่ 6 เมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะโปรโตซูเอีย I เริ่มเติมน้ำทะเลใหม่ ทุกวัน ๆ ละ 500 มิลลิลิตรต่อถัง

ตารางที่ 6 ตารางการให้อาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะต่าง ๆ (ปริมาณต่อ 1 มื้อ)

ระยะของกุ้ง	*Chaetoceros*		*Skeletonema*	
	ปริมาณ (ml.)	ความหนาแน่นเซลล์*	ปริมาณ (ml.)	ความหนาแน่นเซลล์*
นอเพลียส	-	-	-	-
โปรโตซูเอีย I	20	250-300	40	6-7
โปรโตซูเอีย II	30	250-300	60	6-7
โปรโตซูเอีย III	50	250-300	100	6-7
ไมซิส I	80	250-300	160	6-7
ไมซิส II	80	250-300	160	6-7
ไมซิส III	80	250-300	160	6-7

- คือ กุ้งระยะนี้ยังไม่ต้องให้อาหารเนื่องจากยังมีอาหารจาก yolk

* ความหนาแน่นเซลล์ หน่วยคือ $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดละ 4 ซ้ำ

บันทึกระยะเวลาการเข้าระยะโปรโตซูเอีย I, II, III, ไมซิส I, II, III ระยะโพสลาร์วา I สุ่มตักด้วยบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยสังเกตขั้นแรกจากการว่ายน้ำของลูกกุ้ง หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ โดยกำหนดให้ ลูกกุ้งมีจำนวน 70 %

ขึ้นไป ต่อการสุ่มแต่ละครั้งจึงถือว่ามีการเปลี่ยนเข้าสู่ระยะ และนับจำนวนเพื่อหาอัตรารอดของลูกกุ้งทุกชุดการทดลอง เมื่อลูกกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาร์วา I

3.3 ตรวจสอบคุณภาพของน้ำทะเลที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ความเค็ม, อุณหภูมิ, pH, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO) โดยเครื่อง DO meter YSI model 550-12 และ แอมโมเนีย (Strickland และ Parsons, 1972) โดยทำการตรวจสอบในวันเริ่มต้นการทดลอง และวันสิ้นสุดการทดลอง เมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาร์วา I เนื่องจากไม่สามารถทำได้ทุกวันเพราะกุ้งวัยอ่อนค่อนข้างอ่อนแอ

4. องค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

เก็บกุ้งระยะนอเพลียส, ระยะโปรโตซูเอีย I (เข้าระยะนี้โดยไม่ได้รับอาหาร) และระยะโพสลาร์วา I ทั้ง 3 ชุดการทดลอง มาวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบกรดไขมันในเนื้อกุ้งกุลาดำ ดังรายละเอียดในภาคผนวก ง4

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

5.1 ศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบทางชีวเคมีใน *Chaetoceros* และ *Skeletonema* แต่ละโคลน โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างระหว่างโคลน โดยวิธี Duncan's Multiple Rank Test

5.2 ศึกษาความแตกต่างของอัตราการรอดของลูกกุ้งที่เลี้ยงด้วยไดอะตอม *Chaetoceros* และ *Skeletonema* 3 โคลน โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง โดยวิธี Duncan's Multiple Rank Test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย