บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาการเติบโตของ *A. minutum* และ *A. cohorticula*

การเพาะเลี้ยง *A. minutum* ด้วยอาหารสูตร T-1 ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสงสว่าง : มืด เท่ากับ 14 : 10 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28 ± 2 °ซ ความเค็ม 15 ppt จากความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 4.79 x 10^2 เซลล์/มล. ได้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 1.86 x 10^4 เซลล์/มล. มีอัตราการเติบโต 0.24 วัน$^{-1}$ และใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่าที่ 2.89 วัน (ตารางที่ 7 และรูปที่ 6) ซึ่งอยู่ในช่วงอัตราการเติบโต 2.2-3.3 วันของ *A. minutum* ที่ Cannon (1993) ได้ทำการศึกษาไว้ที่ออสเตรเลีย

A. minutum มีขนาดประมาณ 17-20 ไมโครเมตร ลักษณะรูปร่างเป็นวงรี แนวตั้ง มีสีน้ำตาลเหลือง (รูปที่ 4) แต่อาจพบเซลล์ขนาดเล็ก 15 ไมโครเมตร และไม่มีสีโดยเซลล์ขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเซลล์ขนาดใหญ่ เมื่อเริ่มเลี้ยง พบว่ามี thecal plate บริเวณก้นภาชนะ ซึ่งอาจเกิดจากความเครียดในการปรับสภาพให้เข้ากับสารอาหารใหม่ จากการสังเกตพบว่าจะมีการทิ้ง thecal plate โดยตัวเซลล์ จะเคลื่อนที่ออกจาก thecal plate แล้วตัวเซลล์จะเคลื่อนที่ต่อไป เมื่อเซลล์มีการเติบโตจะแบ่งเซลล์ต่อกันเพียง 2 เซลล์เท่านั้น แล้วแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวเช่นเดียวกับการศึกษาของ Chang (1995) ที่พบว่าโอกาสที่จะพบเซลล์คู่ของ *A. minutum* นั้นมีน้อยมาก จากการสังเกต พบว่าปริมาณเซลล์คู่ของ *A. minutum* จะพบในช่วง log phase ตอนต้นมากกว่าช่วงอื่นๆ และมีปริมาณเซลล์เดี่ยวมากกว่าเซลล์คู่ในทุกระยะการเติบโต ในช่วง log phase ตอนปลายจะเริ่มพบเซลล์เกาะกลุ่มตกตะกอนบริเวณก้นขวดและเซลล์มีการเคลื่อนที่ช้าอยู่ในตะกอน บางเซลล์มีลักษณะผิดปกติซึ่งมีผิวรอบนอกเซลล์ไม่เรียบ และจะพบจำนวนเซลล์ผิดปกติมากขึ้นในระยะ stationary phase รวมทั้งมีเซลล์ตายและ thecal plate ในกลุ่มตะกอน เนื่องจาก *A. minutum* จะสลัด thecal plate และ flagella ทิ้งเมื่อเข้าระยะ declining phase จำนวนเซลล์ *A. minutum* จะลดลงอย่างมาก เซลล์ที่ยังมีชีวิตจะมีการเคลื่อนที่ช้าลง และตายไปในที่สุด เซลล์ที่ตายจะมีสีของเซลล์จางลง

การเพาะเลี้ยง *A. cohorticula* ด้วยอาหารสูตร T-1 ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสงสว่าง : มืด เท่ากับ 14 : 10 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28 ± 2 ° ซ ความเค็ม 30 ppt จากความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 4.08 x 10^2 เซลล์/มล. ได้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดที่ 2.81 x 10^4 เซลล์/มล. มีอัตราการเติบโต 0.28 วัน$^{-1}$ และใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่าที่ 2.48 วัน(ตารางที่ 7 และรูปที่ 6)

A. cohorticula มีขนาดประมาณ 30-35 ไมโครเมตร ลักษณะรูปร่างเป็นห้าเหลี่ยมเกือบกลม มีสีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ 5) ในช่วงแรกของการเลี้ยง เมื่อเซลล์มีการเติบโตจะแบ่งเซลล์ต่อกันหลายเซลล์ใน 1 สาย แต่ละเซลล์ไม่ขาดออกจากกัน Wisessang และคณะ (1993) กล่าวว่าการต่อกันแต่ละเซลล์ในสายเป็นลักษณะเด่นของ *A. cohorticula* ที่ไม่เคยพบใน *Alexandrium* ชนิดอื่นเลย จากการสังเกตพบว่า ในแต่ละสายมักประกอบด้วย 4 เซลล์ในสาย (รูปที่ 5) พบได้มากในช่วงนี้และในช่วงกลาง log phase พบเซลล์มากกว่า 30 เซลล์ในสาย ใน log phase ตอนปลายเซลล์จะเริ่มเกาะตัวตกตะกอนบริเวณจุดที่ได้รับแสงมากที่สุด บางเซลล์มีการเคลื่อนที่รอบตัวเองอย่างช้าๆ บางเซลล์จะแสดงลักษณะผิดปกติ เนื่องจากเมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น ช่องว่างภายในเซลล์ (vacuole) จะมีขนาดใหญ่ขึ้นจึงไปเบียดเม็ดสีให้ไปอยู่ขอบเซลล์ข้างใดข้างหนึ่งของเซลล์ ทำให้สีของแพลงก์ตอนจางลง โดยเซลล์ลักษณะผิดปกติดังกล่าว มีจำนวนมากขึ้น ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเมื่อถึงระยะ stationary phase เซลล์มีการเคลื่อนที่ช้าลง จนกระทั่งเซลล์เกาะกลุ่มเกิดเป็นตะกอนสีน้ำตาลเข้มติดก้นภาชนะเห็นได้ชัดเมื่อมองจากภายนอกเนื่องจากเซลล์สลัด thecla plate และ flagella ทิ้งและจำนวนเซลล์ในสายจะลดจำนวนลง เพราะจุดเชื่อมต่อระหว่างเซลล์จะหายไปเมื่ออายุการเลี้ยงใน batch culture มีระยะเวลานานขึ้น ทำให้เซลล์แยกออกจากสายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ (Wisessang et al, 1993) จนถึงระยะ declining phase *A. cohorticula* จะมีลักษณะเซลล์เกือบกลมเคลื่อนที่ช้าอยู่ก้นภาชนะ จนกระทั่งหยุดนิ่งและแตกสลายไปในที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของ *A. minutum* และ *A. cohorticula* ต่อปลานิลและกุ้งกุลาดำ

ผลตรวจวัดคุณภาพน้ำในระหว่างการทดลอง ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ, ความเป็นกรด-ด่าง ความเป็นด่างทั้งหมด, ไบคาร์บอเนต , แอมโมเนีย, ไนไตรท์, ไนเตรท และออร์โธฟอสเฟต พบว่าไม่มีความแตกต่างกันมากนักในแต่ละการทดลอง ยกเว้นแอมโมเนีย ซึ่งมีค่าค่อนข้างสูง แต่ไม่น่าจะเป็นเหตุให้สัตว์ทดลองตาย เพราะสัตว์ทดลองสามารถมีชีวิตรอดได้ในชุดควบคุม และเมื่อนำค่าคุณภาพน้ำดังกล่าว(ตารางที่16)เปรียบเทียบกับค่าคุณภาพน้ำที่สัตว์น้ำสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างปกติ (ตารางที่ 17) แล้วพบว่า มีค่าอยู่ในช่วงเดียวกัน โดยอยู่ในระดับที่สัตว์น้ำสามารถดำรงชีวิตได้อย่างเป็นปกติ

ตารางที่ 16 แสดงค่าคุณภาพน้ำต่ำสุด-สูงสุดของหน่วยทดลองที่ศึกษาในแต่ละการทดลอง

Water quality (parameter)*	*A. minutum*[1]				*A. cohorticula*[2]			
	Fish		Shrimp		Fish		Shrimp	
	min.	max.	min.	max.	min.	max.	min.	max.
pH	8.18	8.99	7.58	8.79	8.06	8.54	7.94	8.82
Tot. Alk	328	411	287	352	147	231	290	462
HCO_3	83	276	98	287	76	143	100	294
NH_3-N	0.02	0.88	0.002	0.73	0.004	0.68	0.002	0.844
NO_2-N	0.01	0.30	0.04	0.27	0.04	0.82	0.024	0.95
NO_3-N	0.28	13.16	0.22	11.65	-	-	0.625	0.94
PO_4-P	0.01	1.21	0.00	1.15	0.52	1.42	0.018	1.584

หมายเหตุ * หน่วยวัดเป็น ppm ยกเว้นค่า pH และวัดที่อุณหภูมิ 25-27°ซ

[1] ความเค็ม 15 ppt

[2] ความเค็ม 30 ppt

- ไม่ได้ทำการตรวจวัด

ตารางที่ 17 คุณภาพน้ำที่สัตว์น้ำสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างปกติ

Parameter	Optimum value	Referances	Remark
Temperature	stable	ชิตชาติ ชิตมน (2538)	
pH	7.5 - 8.5	ชลอ ลิ้มสุวรรณ (2534)	for shrimp
	7.3 - 8.8	Chiang et al (1989)	fof shrimp
	6.5 - 9	มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ (2536)	for fish
HCO_3 (ppm)	> 80	แลป อินเตอร์ (2535)	
NH_3-N (ppm)	< 2.0	Boyd (1989)	
NO_2-N (ppm)	<3.8	Chen and Lei (1990)	for shrimp
	0.5 - 5	มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ (2536)	for fish
NO_3-N (ppm)	not toxic	Wetzel (1975)	0.01-0.5 ppm in natural water
PO_4-P (ppm)	not toxic	ยนต์ มุสิก (2530)	0.005-0.5 ppm in natural water

อย่างไรก็ตาม ค่าคุณภาพน้ำแต่ละตัว จะมีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา โดยเฉพาะค่าไนเตรท และค่าฟอสฟอรัสในน้ำทดลอง มีความแตกต่างกันมากเมื่อเริ่มต้นในแต่ละชุดการทดลอง ทั้งนี้เนื่องจาก มีสารอาหารจากน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนเหลืออยู่ และเมื่อทำการเจือจางความหนาแน่นของแพลงก์ตอนเพื่อการทดลอง สารอาหารที่อยู่ในน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนก็จะถูกเจือจางไปตามความหนาแน่นเซลล์แพลงก์ตอนด้วยเช่นกัน

ช่วงระหว่างการทดลอง ค่าไนโตรเจน อันประกอบด้วย แอมโมเนีย, ไนไตรท์ และไนเตรท ควรมีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่สัมพันธ์กัน กล่าวคือ ในสภาพการทดลองที่มีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอตลอดเวลานั้น จะทำให้ไม่มีแอมโมเนียหลงเหลืออยู่ในน้ำ โดยจะเปลี่ยนรูปไปเป็นไนไตรท์ และไนเตรท ตามลำดับ ดังสมการ

$$NH_4^+ + 1.5O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O$$

$$NO_2^- + 1.5O_2 \rightarrow NO_3^-$$ (Boyd, 1989)

แต่ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า ค่าแอมโมเนียในแต่ละชุดการทดลองไม่เท่ากัน และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แสดงว่า ออกซิเจนในน้ำไม่เพียงพอกับการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์ และไนเตรทได้ โดยสังเกตได้ชัดว่า ไม่มีการเพิ่มขึ้นของไนเตรท จึงน่าจะเกิดจากความผิดพลาดในการวัดแอมโมเนีย เนื่องจากแอมโมเนียมีความไวกับสภาพแวดล้อมอย่างยิ่ง จึงต้องทำการวิเคราะห์อย่างรวดเร็ว และระมัดระวังในการปนเปื้อนสูง ค่าที่ได้จึงจะถูกต้อง

ส่วนค่าไนไตรท์ มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เกิดจากการเปลี่ยนแอมโมเนียในช่วงแรกของการทดลองโดยอาศัยออกซิเจนเป็นตัวออกซิไดซ์ และเมื่อออกซิเจนไม่เพียงพอ ก็ไม่สามารถเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์และไนเตรทต่อไปได้ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง จึงเกิดมีแอมโมเนียที่ได้จากการขับถ่ายของของเสียจากสัตว์ทดลองสะสมมากขึ้นในทุกชุดการทดลอง, มีไนไตรท์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และส่งผลให้ไนเตรทเพิ่มขึ้นน้อยมาก แต่มีบางชุดการทดลอง ไนเตรทมีค่าลดลง เนื่องจากมีการนำไปใช้ในการเติบโตโดยแพลงก์ตอน ตรงข้ามกับค่าออร์โธฟอสเฟตที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ที่ได้จากการขับถ่ายและการย่อยสลายสารอินทรีย์ (เช่น ซากแพลงก์ตอน) แล้วได้ออร์โธฟอสเฟตในน้ำมากขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการศึกษาถึงผลกระทบของ *A. minutum* และ *A. cohorticula* ต่อการตายของปลานิล และกุ้งกุลาดำ สามารถแสดงผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 18 และ 19

ตารางที่ 18 ผลของความหนาแน่นของ *A. minutum* และ *A. cohorticula* ที่มีต่ออัตราการตายเฉลี่ยสะสมต่ำสุด และสูงสุดของปลานิล และกุ้งกุลาดำ ที่ 96 ชั่วโมง

	A. minutum				*A. cohorticula*			
	Fish		Shrimp		Fish		Shrimp	
	min.	max.	min.	max.	min.	max.	min.	max.
% Mortality	3.33	46.67	23.81	100.00	23.33	86.67	23.81	100.00
cells concentration (cells/ml)	$8.77x10^{2}$	$1.26x10^{4}$	$7.62x10^{2}$	$1.51x10^{4}$	$5.28x10^{2}$	$2.40x10^{3}$	$1.73x10^{2}$	$5.54x10^{3}$
96 h - LC_{50} (cells/ml)	6.59×10^{3}		1.09×10^{3}		1.39×10^{2}		4.17×10^{2}	

ตารางที่ 19 ผลของสารสกัดจากเซลล์ *A. minutum* และ *A. cohorticula* ต่ออัตราการตายของปลานิล และกุ้งกุลาดำ ที่ 96 ชั่วโมง

Source of toxin	*A. minutum*				*A. cohorticula*			
	Fish		Shrimp		Fish		Shrimp	
	Quantity	% Mor.	Quantity	% Mor.	Quantity	% Mor.	Quantity	% Mor.
cell extract (cells)	$4.25x10^{7}$	3.33	$4.45x10^{5}$	33.33	$1.38x10^{7}$	26.67	$6.90x10^{3}$	28.57
cell free medium (ml)	2500	0.00	285	23.81	2500	33.33	40	9.52
cell concentration (cells/ml)	$1.70x10^{4}$	13.33	$1.56x10^{3}$	42.86	$5.5x10^{3}$	66.67	$1.73x10^{2}$	23.81

จากตารางที่ 18 และ 19 รวมทั้งผลการทดลองข้างต้น สามารถวิจารณ์ผลการทดลองแยกเป็นหัวข้อได้ ดังต่อไปนี้

ผลของ *A. minutum* ต่อการตายของปลานิล และกุ้งกุลาดำ

จากตารางที่ 18 ในการศึกษาเรื่อง ผลของความหนาแน่นของ *A. minutum* ต่อการตายของปลานิลและกุ้งกุลาดำ พบว่า ค่า 96 h-LC_{50} ของ *A. minutum* ต่อปลานิลที่ 6.59 x 10^3 เซลล์/มล. มีค่ามากกว่า 1.09 x 10^3 เซลล์/มล. ซึ่งเป็นค่า 96 h-LC_{50} ของ *A. minutum* ต่อกุ้งกุลาดำ ซึ่งให้ผลตรงกับตารางที่ 19 ในการศึกษาผลของสารสกัดจากเซลล์ *A. minutum* ต่อการตายของสัตว์ทดลอง *A. minutum* ที่ความหนาแน่น 1.56 x 10^3 เซลล์/มล. ทำให้กุ้งกุลาดำตาย 42.86 % ขณะที่ *A. minutum* ที่ความหนาแน่นมากถึง 1.70 x 10^4 เซลล์/มล. แต่ทำให้ปลานิลตายเพียง 13.33% เท่านั้น แสดงว่า *A. minutum* มีผลต่อการตายของกุ้งกุลาดำมากกว่าปลานิล

ความหนาแน่น *A. minutum* ที่ 1.56 x 10^3 เซลล์/มล. ทำให้กุ้งกุลาดำตาย 42.86 % ในการทดลองที่ 2.2 นี้ มีค่าอัตราการตายแตกต่างกันเล็กน้อยกับการทดลองที่ 2.1 ที่มี *A. minutum* ความหนาแน่น 1.48 x 10^3 เซลล์/มล. แล้วทำให้กุ้งกุลาดำตาย 47.62 % (ตารางที่ 9 ในภาคผนวก) เนื่องจากกุ้งกุลาดำในการทดลองที่ 2.1 มีขนาดต่างกันเล็กน้อยกับการทดลองที่ 2.2 การตายของกุ้งกุลาดำ จึงเพิ่มขึ้นตามความหนาแน่นของแพลงก์ตอน *A. minutum* ที่เพิ่มมากขึ้น แต่การตายของปลานิลในการทดลองเรื่องนี้ ไม่สามารถสรุปรูปแบบที่ชัดเจนถึงผลความหนาแน่นของเซลล์ *A. minutum* ต่อการตายของปลานิลได้ แต่มีผลทำให้ปลานิลตาย (ดังรูปที่ 7)

และพบว่า *A. minutum* ที่มีชีวิตในน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนมีผลต่อปลานิลและกุ้งกุลาดำมากกว่าสารสกัดจากเซลล์ หรือน้ำเลี้ยงที่แยกเอาเซลล์ออก ทั้งนี้เนื่องจาก ในสภาพที่เซลล์มีชีวิตในน้ำเลี้ยง ทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์, เพิ่มสารที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ และความเป็นพิษร่วมกันทั้งตัวเซลล์และน้ำเลี้ยง จึงทำให้สัตว์ทดลองตายมากขึ้น ในตารางที่ 4 จากการวิเคราะห์ความเป็นพิษของน้ำเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียวของ *A. minutum* (Kodama, ติดต่อส่วนตัว) ค่าความเป็นพิษเท่ากับ 0.068 MU/มล. เมื่อนำมาเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษในน้ำเลี้ยง *A. minutum* ในการทดลองร่วมกับปลานิลและกุ้งกุลาดำนี้ พบว่า ที่ 0.068 MU/มล. ไม่มีผลต่อการตายของปลานิล แต่ในการทดลองกับกุ้งที่ระดับความเป็นพิษเพียง 0.008 MU/มล. ทำให้กุ้งกุลาดำตายสูงถึง 23.81% ส่วนผลของสารสกัดจากเซลล์เพียงอย่างเดียว พบว่า จากการวิเคราะห์ระดับความเป็นพิษในเซลล์ในตารางที่ 4 เท่ากับ 0.104 MU/10^4 เซลล์ (Kodama, ติดต่อส่วนตัว) เมื่อนำมาเปรียบเทียบความเป็นพิษในตัวเซลล์ *A. minutum* จากจำนวนต่าง ๆ ในการทดลองร่วมกับปลานิลและกุ้งกุลาดำ พบ

ว่า ที่ 0.177 MU/มล. ปลานิลตาย 3.33% แต่ในการทดลองกับกุ้งที่ระดับความเป็นพิษเพียง 0.002 MU/มล. ทำให้กุ้งกุลาดำตายสูงถึง 33.33% อย่างไรก็ตามผลของความหนาแน่น *A. minutum* จะทำให้เกิดการตายของกุ้งกุลาดำมากกว่าระดับความเป็นพิษดังกล่าว

ผลของ *A. cohorticula* ต่อการตายของปลานิลและกุ้งกุลาดำ

จากตารางที่ 18 พบว่า ค่า 96 h-LC_{50} ของ *A. cohorticula* ต่อปลานิล 1.39 x 10^2 เซลล์/มล. มีค่าน้อยกว่า 96 h-LC_{50} ของ *A. cohorticula* ต่อกุ้งกุลาดำที่ 4.17 x 10^2 เซลล์/มล. แสดงว่า *A. cohorticula* มีผลต่อการตายรุนแรงต่อปลานิลมากกว่ากุ้งกุลาดำ อย่างไรก็ตาม เมื่อค่อย ๆ ปรับความเค็มของปลานิลทีละน้อย เพื่อให้ปลาอยู่ได้ในน้ำความเค็มสูง 30 ppt เพื่อการทดลองนี้ ทำให้ปลานิลเกิดความเครียด ดังนั้น ในการทดลองทั้งชุดควบคุมและชุดการทดลองมีการตายสูง ส่งผลให้ค่า LC_{50} ใด ๆ ของ *A. cohorticula* ต่อปลานิลมีค่าต่ำ เพราะมีผลกระทบร่วมอันเนื่องจากความเค็มด้วย นอกจากนี้การตายของปลานิล เป็นไปในทำนองเดียวกับการทดลองผล *A. minutum* ต่อการตายของปลานิล คือไม่มีรูปแบบที่ชัดเจน แต่มีผลต่อการตายของปลานิล ดังตารางที่ 18 และ 19

ส่วนอัตราการตายของกุ้งกุลาดำ จะเป็นไปตามความหนาแน่นของ *A. cohorticula* ที่เพิ่มขึ้น(รูปที่16)และการทดลองที่4.1 และ 4.2 เป็นการทดลองที่เมื่อความหนาแน่น *A. cohorticula* เท่ากัน(1.73 x 10^2 เซลล์/มล.) มีผลให้อัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่มีขนาดเท่ากัน ให้ผลเท่ากันด้วย คือ 23.81% (ตารางที่ 23 และ25 ในภาคผนวก ก)

ในชุดการทดลองที่มีทั้งเซลล์และน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอน *A. cohorticula* ร่วมกัน ให้อัตราการตายของปลานิล 66.67% ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากเซลล์ และน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอน โดยสารสกัดจากเซลล์และน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนเพียงอย่างเดียวจะให้ผลอัตราการตายที่ไม่แตกต่างจากการตายในชุดควบคุมในทางสถิติ (รูปที่ 32) ทั้งนี้เพราะการตายมีผลเนื่องจากผลของความเค็มและความอ่อนแอของสัตว์ทดลองร่วมอยู่ด้วย สังเกตได้จากการตายของปลานิลในชุดควบคุมมีค่าสูง

ผลของสารสกัดจากเซลล์ *A. cohorticula* ซึ่งผสมกรดอะซิติกให้อัตราการตายของกุ้งกุลาดำสูงสุด 28.57% เมื่อเปรียบเทียบกับผลของส่วนที่มีทั้งเซลล์และน้ำเลี้ยงร่วมกัน (ไม่เติมกรดอะซิติก) มีค่าอัตราการตาย 23.81% นั้น มีค่าต่างกันประมาณ 5% ขณะที่น้ำเลี้ยงเซลล์ให้ผลต่ออัตราการตายเท่ากับชุดควบคุมที่ไม่เติมกรดอะซิติกิคือ 9.52% แต่ชุดควบคุมกรดอะซิติก ให้ผลการตายมากกว่าชุดควบคุมที่ 1 ประมาณ 5% ดังนั้นจึงสังเกตได้ว่า ผลของกรดอะซิติกมีส่วนร่วมในการตายของกุ้งกุลาดำ แต่ไม่พบผลความแตกต่างของกรดอะซิติกในการทดลองกับ *A. minutum*

แต่สิ่งที่แตกต่างกันในการจัดการทดลองทั้ง 2 มีเฉพาะความเค็มเท่านั้น จึงยังสรุปผลที่ชัดเจนของกรดอะซิติกกับความเค็มไม่ได้

เมื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากเซลล์ของ *A. cohorticula* ต่อการตายของปลานิลและกุ้งกุลาดำพบว่าสารสกัดจากเซลล์ของ *A. cohorticula* ให้ผลการตายของกุ้งกุลาดำมากกว่าปลานิล ขณะที่ใช้จำนวนเซลล์ในการสกัดน้อยกว่า และน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *A. cohorticula* มีแนวโน้มให้ผลการตายของกุ้งกุลาดำมากกว่าปลานิล (ดังตารางที่ 19)

ผลของ *A. minutum* และ *A. cohorticula* ต่อการตายของปลานิล

ผลของความหนาแน่นของ *A. minutum* และ *A. cohorticula* ต่อการตายของปลานิลไม่มีรูปแบบที่ชัดเจน แต่ *A. cohorticula* มีผลต่อการตายของปลานิลมากกว่า *A. minutum* จากการคำนวณระดับความเป็นพิษจากรายงานของสุชนา วิเศษสังข์ และเกรียงศักดิ์ สายธนู (2536) พบว่า *A. cohorticula* สายพันธุ์เดียวกันนี้ (CU 21) มีระดับความเป็นพิษ เท่ากับ 0.61 MU/10^4 เซลล์ และ Kodama (ติดต่อส่วนตัว) พบว่า *A. minutum* สายพันธุ์เดียวกันนี้ (จากประเทศไทย) มีความเป็นพิษเท่ากับ 0.104 MU/10^4 เซลล์ ดังนั้น *A. cohorticula* 2.40 x 10^3 เซลล์/มล. จะมีระดับความเป็นพิษ เท่ากับ 0.146 MU/ml ขณะที่ *A. minutum* 1.26 x 10^4 เซลล์/มล. มีระดับความเป็นพิษเท่ากับ 0.131 MU/ml ซึ่งเป็นระดับพิษที่ใกล้เคียงกัน แต่ *A. cohorticula* ให้อัตราการตายของปลานิลที่รุนแรงกว่า *A. minutum* (ตารางที่ 18)

จากรูปที่ 15 จะเห็นได้ว่า ทั้งเซลล์และน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอน *A. minutum* มีผลทำให้ปลานิลตายมากกว่าสารสกัดจากเซลล์และน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนเพียงอย่างเดียว และให้ผลทำนองเดียวกันกับการทดลองร่วมกับ *A. cohorticula* (รูปที่ 32) โดยน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอน *A. cohorticula* จะมีผลต่อการตายของปลานิลมากกว่าน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอน *A. minutum* ซึ่งไม่ส่งผลให้ปลานิลตายแต่อย่างใด (ตารางที่ 4) อาจเป็นไปได้ว่าในน้ำเลี้ยง *A. minutum* และ *A. cohorticula* นั้นมีผลส่งเสริมร่วมกับตัวเซลล์แพลงก์ตอน ทำให้ปลานิลตายมากขึ้น ซึ่ง Ogata และ Kodama (1986) พบว่าในน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอน *A. catanella* และ *A. tamarense* ไม่มีพิษ PSP แต่มี Ichthyotoxin ทำให้ปลาตาย โดยแสดงลักษณะเหงือกบวม จึงเป็นไปได้ว่า ในการทดลองครั้งนี้อาจมี Ichthyotoxin เกิดขึ้นได้เช่นเดียวกัน เนื่องจาก พบการเปลี่ยนแปลงที่เหงือกของปลานิลในตัวที่เริ่มตาย ดังในรูปที่ 43

นอกจากนี้ จากตารางที่ 19 จะเห็นได้ว่า เปอร์เซนต์การตายเฉลี่ยสะสมของปลานิล ที่เกิดจากสารสกัดจากเซลล์ *A. cohorticula* มากกว่าการตายที่เกิดจากสารสกัดจากเซลล์ *A.*

minutum ทั้งที่จำนวนเซลล์ในการสกัดของ *A. cohorticula* น้อยกว่า *A. minutum* แต่เมื่อคำนวณระดับความเป็นพิษในชุดการทดลองแล้วพบว่าในชุดการทดลองของ *A. cohorticula* มีระดับความเป็นพิษสูงกว่าชุดการทดลองของ *A. minutum* คือ ในชุดการทดลอง *A. cohorticula* มีจำนวน 1.38×10^7 เซลล์ มีระดับความเป็นพิษ 0.336 MU/มล. ขณะที่ *A. minutum* จำนวน 4.25×10^7 เซลล์ มีระดับความเป็นพิษน้อยกว่าที่ 0.177 MU/มล. ดังนั้น สารสกัดจากเซลล์แพลงก์ตอน น่าจะเป็นสาเหตุทำให้ปลานิลตาย และ แพลงก์ตอนในสภาพมีชีวิตที่อยู่ในน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนจะส่งผลให้ปลานิลตายมากขึ้น

อย่างไรก็ตาม การทดลองในสภาวะน้ำกร่อยหรือน้ำเค็มนั้น ความเค็มของน้ำจะมีผลกระทบต่อสภาพทางสรีระวิทยาของปลานิล ความทนทานของปลานิลต่อความเค็มของน้ำจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่มันอาศัยอยู่ และความสามารถในการควบคุมปริมาณน้ำและเกลือแร่ (osmotic and ionic regulation) โดยมีอวัยวะสำคัญต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ เหงือก และไต (Smith, 1982) ปลานิลที่นำมาทดลองนี้ ได้มาจากการเลี้ยงในน้ำจืด และถูกนำมาปรับสภาพให้เคยชินกับน้ำที่มีความเค็มทีละน้อย จนถึงระดับความเค็มที่ต้องการ ปลานิลจึงเกิดความเครียด เมื่อต้องอยู่ในสภาวะของน้ำที่มีความเค็มสูง ทำให้ปลานิลตายมากขึ้น (Suresh and Lin, 1993) เนื่องจากปลานิลจะมีการสูญเสียน้ำออกนอกร่างกาย ปลาจึงต้องกินน้ำเข้าไปเพื่อชดเชยน้ำที่สูญเสียไป น้ำเค็มจากนอกร่างกายจะมีเกลือแร่มากกว่าในร่างกาย ขณะเดียวกัน ไตมีความสามารถขับอิออนของแร่ธาตุ divalent ions ออกไปได้เพียงเล็กน้อย (Hwang and Wu, 1988) จึงเกิดการสะสมของแคลเซียมในท่อไต (ซึ่งแคลเซียมจัดอยู่ในพวก divalent ions) เรียกว่า nephrocalcinosis (Ferguson, 1989) ดังในรูปที่ 45 และเนื่องจากปลานิลต้องพยายามรักษาน้ำในร่างกายให้มากที่สุด ไตจึงต้องพยายามดูดน้ำกลับมากที่สุด จึงทำให้พบว่าเกิดมีน้ำในเซลล์ไต เรียกว่า tubullar hydropic change (รูปที่ 45) (Smith, 1982) ดังนั้น ความเค็มอาจทำให้ปลานิลที่ทดลองร่วมกับ *A. cohorticula* ที่ความเค็ม 30 ppt มีการตายจำนวนมากและมากกว่าปลานิลที่ใช้ทดลองร่วมกับ *A. minutum* ที่ความเค็ม 15 ppt

สรุปได้ว่า *A. cohorticula* มีผลต่อการตายของปลานิลมากกว่า *A. minutum* และพิษของ *A. cohorticula* และ *A. minutum* น่าจะมีผลต่อการตายของปลานิลมากกว่าความหนาแน่นเซลล์ เพราะปลานิลมีซี่เหงือก และช่องเหงือกที่ใหญ่ ทำให้โอกาสที่จะเกิดแพลงก์ตอนอุดตันในช่องเหงือกน้อย

ผลของ *A. minutum* และ *A. cohorticula* ต่อการตายของกุ้งกุลาดำ

การตายของกุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้นตามความหนาแน่นของเซลล์ *A. minutum* และ *A. cohorticula* ที่มากขึ้น และที่ความหนาแน่นสูงสุดของ *A. minutum* และ *A. cohorticula* ทำให้กุ้งกุลาดำตาย 100% ที่ 72 และ 48ชั่วโมง ตามลำดับ(รูปที่ 16 และ 33) เมื่อพิจารณาจากค่า 96 h-LC_{50} ของ *A. minutum* เท่ากับ 1.09×10^3 เซลล์/มล. และของ *A. cohorticula* เท่ากับ 4.17×10^2 เซลล์/มล. ซึ่งแสดงว่า *A. cohorticula* ให้ผลการตายของกุ้งกุลาดำรุนแรงกว่า *A. minutum*

จากรูปที่ 24 และ 41 จะเห็นได้ว่า ทั้งเซลล์และน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอน *A. minutum* และ *A. cohorticula* มีผลร่วมกันทำให้กุ้งกุลาดำตายมากใกล้เคียงกับสารสกัดจากเซลล์ และมากกว่าการตายจากน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอน แต่น้ำเลี้ยงแพลงก์ตอน *A. minutum* จะมีผลต่อการตายของกุ้งกุลาดำมากกว่าน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอน *A. cohorticula* ดังตารางที่ 19 ซึ่งจากตารางนี้ก็ยังพบว่าสารที่สกัดจากเซลล์ *A. minutum* ทำให้เกิดการตาย 33.33% ขณะที่ *A. cohorticula* ทำให้เกิดการตาย 28.57% จะเห็นได้ว่าอัตราการตายไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีทั้งเซลล์และน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนร่วมกันของ *A. minutum* และ *A. cohorticula* ให้อัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่แตกต่างกัน อาจเนื่องจากความหนาแน่นเซลล์แตกต่างกัน

ดังนั้น ความหนาแน่นเซลล์ของแพลงก์ตอนทั้ง 2 ชนิด จะมีผลต่อการตายของกุ้งกุลาดำชัดเจนมากกว่าสารสกัดจากเซลล์ เป็นไปได้ว่าช่องว่างระหว่างซี่เหงือกของกุ้งกุลาดำมีขนาดเล็ก ทำให้เซลล์มีโอกาสเข้าไปอุดช่องเหงือก และมีการอักเสบของเหงือก (inflammation) (รูปที่ 48,49) ซึ่งตรงกับรายงานของ Ferguson (1989) กล่าวว่า แพลงก์ตอนไดโนแฟลกเจลเลต อาจทำให้เกิดการอักเสบของเหงือก ซึ่งมีความรุนแรงมากพอที่จะเป็นสาเหตุของการตายของสัตว์ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย