บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เตรียมสารอาหารสูตร T-1 (Ogata et al, 1987) ดังแสดงไว้ในภาคผนวก นำไปใช้ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร (มล.) ต่อน้ำทะเล 1 ลิตร

2. เตรียมน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอน (Enriched medium) โดยใช้น้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน (ppt) สำหรับเลี้ยง *A. cohorticula* ส่วน *A. minutum* ใช้น้ำจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำที่พบการเกิด *A. minutum* ที่ความเค็ม 15 ppt แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (μm) เติม Tris-HCl ตามสัดส่วนนำไปผ่านการฆ่าเชื้อในตู้ฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^2 นาน 30 นาที วางที่อุณหภูมิห้องนานไม่น้อยกว่า 2 - 3 วัน เพื่อให้เกิดสมดุลย์ของออกซิเจนในอากาศและน้ำ แล้วจึงนำไปเติมสารอาหารสูตร T-1 ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

3. คัดแยกเซลล์แพลงก์ตอนด้วยวิธี Capillary technique แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยง (incubator) ที่ควบคุมความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ช่วงเวลาแสงสว่างและช่วงเวลามืด เท่ากับ 14 และ 10 ชั่วโมง ในรอบวันและอุณหภูมิ 28 - 30° ซ

4. เพาะเลี้ยงเซลล์แพลงก์ตอนพืชให้ได้ปริมาณมาก (Mass culture) โดยใช้ขวดลูกชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 2 ลิตรและ 5 ลิตร เลี้ยงแพลงก์ตอนที่ปริมาตร 1.5 และ 3 ลิตร ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ตามลำดับ แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเช่นเดิม

การวัดการเติบโตของแพลงก์ตอนพืช

โดยการตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบหัวกลับ (inverted microscope) ทุกวันเพื่อดูการเปลี่ยนแปลง ศึกษารูปร่าง ลักษณะของเซลล์ ศึกษาระยะเวลากับการเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อดูรูปแบบการเติบโต ดังต่อไปนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เพาะเลี้ยง *A.minutum* และ *A.cohorticula* ในขวดกลมก้นแบน(flat bottom flask) ขนาด 250 มล. ปริมาตร 100 มล. ชนิดละ 3 ขวด

2. เลี้ยงที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นประมาณ 500 เซลล์/มล.

3. ทำการสุ่มนับ 3 ซ้ำด้วย Sedgwick Rafter Cell ขนาดความจุ 1 มล.

4. คำนวณความหนาแน่นแพลงก์ตอนเป็นจำนวนเซลล์/มล.

5. หาค่าเฉลี่ยนำมาวาดกราฟแสดงการเติบโตของ *A. minutum* และ *A. cohorticula* โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า ln y เมื่อ y เป็นความหนาแน่นของเซลล์ (เซลล์/มล.) และระยะเวลา (วัน)

6. การหาคงที่ของการเติบโต คำนวณจากความสัมพันธ์ระหว่างค่า ln y เมื่อ yเป็นความหนาแน่นของแพลงก์ตอน(เซลล์/มล.)กับเวลา(วัน) โดยใช้จุดเริ่มต้นที่จุดเริ่มระยะ log phase และจุดสุดท้ายเป็นจุดที่จำนวนเซลล์เริ่มลดลง ค่าความชัน(slope)ของกราฟที่ได้จากสมการเส้นตรง(regression)นี้ จะเป็นค่าคงที่ของการเติบโต (growth constant) ของแพลงก์ตอน (Brand et al, 1980 และ Watras et al, 1982 อ้างตามไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ, 2530)

ส่วนเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้เป็น 2 เท่า คำนวณจากสูตร

$$\text{Doubling Time (D.T.)} = \ln 2/K$$

เมื่อ K = ค่าคงที่ของการเติบโตของเซลล์

การเตรียมการทดลอง

1. เตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลานิล และกุ้งกุลาดำมาปรับสภาพให้คุ้นเคย (acclimate) กับความเค็มที่ต้องการเป็นเวลาอย่างน้อย 14 วัน (APHA, 1980) ก่อนนำมาใช้ทดลองทำการคัดขนาดให้ใกล้เคียงกัน โดยปลานิลที่ความเค็ม 15 ppt มีความยาวอยู่ในช่วง 2.5 - 3.5 ซม. และน้ำหนัก 0.38 - 0.62 กรัม และที่ความเค็ม 30 ppt จะมีขนาด 4.4 - 5.8 ซม. และ 1.60 - 2.60 กรัม ส่วนกุ้งกุลาดำจะมีขนาด 4.2 -5.6 ซม. และ 0.54 - 0.72 กรัม ที่ความเค็ม 15 และ 30 ppt ตามลำดับ เลี้ยงโดยให้อาหารเม็ดและงดอาหารก่อนการทดลอง 1 วัน และไม่มีการให้อาหารระหว่างทำการทดลอง

2. เตรียมน้ำทดลอง

ใช้น้ำทะเลจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำเดิมหรือแหล่งน้ำใกล้เคียงปรับระดับความเค็มให้ได้เท่ากับ 15 ppt ซึ่งเท่ากับ น้ำที่ใช้เลี้ยงแพลงก์ตอน *A. minutum* สำหรับ *A. cohorticula* ใช้น้ำทะเลที่มีความเค็มเท่ากับ 30 ppt หรือสูงกว่าเล็กน้อย แล้วนำมาปรับความเค็มในการทดลอง นำน้ำทะเลไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 5 และ 0.45 ไมโครเมตร ตามลำดับ แล้วเติม 2.5 M Tris-HCl ในปริมาตร 2 มล.ต่อน้ำทะเล 1 ลิตร เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลง pH และการตกตะกอนแร่ธาตุของน้ำทะเล แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยตู้ฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 127 ^{0}ซ ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^{2} เวลา 30 นาที วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 2 -3 วัน ให้เกิดสมดุลย์ของออกซิเจนในสารละลาย

3. เตรียมความเข้มข้นระดับต่างๆ ของ *A. minutum* และ *A. cohorticula*

นำเซลล์ที่มีชีวิตของ *A. minutum* และ *A. cohorticula* ในระยะ log phase ซึ่งจัดเป็นแพลงก์ตอนเข้มข้น เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยน้ำทดลองที่เตรียมไว้ ใช้หน่วยวัดความเข้มข้นเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร(เซลล์/มล.)ของสารละลายทดลอง

การทดลองผลของ *A. minutum* และ *A. cohorticula* ต่อปลานิลและกุ้งกุลาดำ

ใช้วิธีวิเคราะห์แบบหมุนเวียน (Recirculation Bioassay Test) ภายใต้อุณหภูมิห้อง โดยไม่เปลี่ยนสารละลายทดลอง และให้อากาศตลอดเวลาการทดลอง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็นการทดลอง ดังนี้

<u>การทดลองที่ 1 ผลของ *A. minutum* ต่อปลานิล</u>

<u>การทดลองที่ 1.1 ผลของความหนาแน่นของ *A. minutum* ต่อการตายของปลานิล</u>

ขั้นตอนการทดลอง

1. ใช้ความหนาแน่น *A. minutum.* ระยะ log phase เป็นระดับความหนาแน่นสูงสุด นำมาเจือจางด้วยน้ำทะเลทดลองที่เตรียมไว้ ให้ได้ความหนาแน่น 5 ระดับ ตามอนุกรมเรขาคณิต (คือ 1 : 1, 1 : 2 , 1 : 4 , 1 : 8 , 1 : 16 และ 1 : 32 ตามลำดับ) พร้อมกลุ่มควบคุม(ที่ไม่มีแพลงก์ตอน) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ รวม 7 ชุดการทดลอง โดยจัดให้ชุดควบคุมเป็นชุดการทดลองที่ 1 และ ชุดการทดลองที่มากขึ้นเป็นไปตามความหนาแน่นของแพลงก์ตอนที่มากขึ้น ชุด

การทดลองที่ 7 จึงเป็นชุดทดลองที่มีแพลงก์ตอนหนาแน่นที่สุด จัดชุดการทดลอง ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำใช้ปลานิล 10 ตัว ต่อปริมาตรสารละลายทดลอง 2500 มล. ในโหลทดลองขนาดประมาณ 9.5 ลิตร ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้วและสูง 12 นิ้ว

2. สังเกต และบันทึกอาการของปลานิลทดลอง และจำนวนปลานิลที่ตายในแต่ละภาชนะทดลอง เมื่อครบเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยการตัดสินการตายของปลานิลจะถือตามเกณฑ์ ดังนี้ ระยางค์ทั้งหมดหยุดการเคลื่อนไหว ไม่มีการบิดหรืองอตัว และไม่แสดงอาการตอบสนอง เมื่อใช้ของแหลมถูกตัว ตัวที่ตายจะนำออกจากภาชนะทดลองทันทีในทุกครั้งที่ตรวจพบ แล้วหาเปอร์เซนต์การตายเฉลี่ยสะสมในแต่ละชุดการทดลอง เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

3. ตรวจวัดคุณภาพน้ำ

ทำการวัดคุณภาพน้ำ 3 ช่วงเวลา คือ เมื่อเริ่มการทดลองที่ 0 ชั่วโมง, เมื่อสัตว์ทดลองเริ่มตายตัวแรก ณ เวลาใด ๆ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ที่ 96 ชั่วโมง โดยคุณภาพน้ำที่ตรวจวัดมีดังนี้ :-

- อุณหภูมิ วัดโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์
- pH วัดโดยใช้ Suntex digtal pH - meter 57
- ความเค็ม วัดโดยใช้ Refractometer model Stago-s-10
- แอมโมเนีย (NH_3-N) วัดโดยวิธี Phenate-hypochlorite method*
- ไนไตรท์ (NO^-_2-N) วัดโดยวิธี Coupling diazotized Sulfanilic*
- ไนเตรท (NO^-_3-N) วัดโดยการใช้เครื่องวัดไนเตรท ORION ion-selective eletrode specifications Model No. 9307 Type Liquid Membrane ในช่วงความเข้มข้น(M)เป็น ppm เท่ากับ ($1.0 - 7 \times 10^{-6}$) 14,000 - 0.1 ของ N
- ฟอสเฟตที่ละลายในน้ำ (Soluble - phosphate) วัดโดยวิธี Ascorbic acid method phosphate*
- ความเป็นด่างทั้งหมด (Total Alkalinity) วัดโดยวิธี Sulphuric acid method*
- ไบคาร์บอเนต (HCO^-_3) วัดโดยวิธี Sulphuric acid method*

*วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำแสดงในภาคผนวก ค

4. วิเคราะห์พยาธิวิทยา

โดยนำสัตว์ทดลองที่ใกล้ตาย 1-2 ตัวแรกเมื่อเริ่มการทดลอง ในแต่ละชุดการทดลอง เก็บรักษาไว้ตามวิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยาและศึกษาตามวิธีของ Humason (1979) ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ง แล้วนำมาเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองปกติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การทดลองที่ 1.2 ผลของสารสกัดจากเซลล์ *A. minutum* ต่อการตายปลานิล</u>

ขั้นตอนการทดลอง

1. การสกัดสารออกจากเซลล์แพลงก์ตอนพืช

1.1 เพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนให้ได้ปริมาณเซลล์ที่ต้องการ และอายุเซลล์อยู่ในช่วง log phase

1.2 ปั่น ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกตัวเซลล์แพลงก์ตอนออกจากน้ำเลี้ยง และกรองส่วนที่มีตัวเซลล์แพลงก์ตอนหนาแน่นที่ได้จากการปั่นอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง GFC

1.3 เก็บส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์แพลงก์ตอนที่ได้รวมกันไว้

1.4 บดกระดาษกรอง GFC ในข้อ 1.2 ด้วยแท่งแก้ว (tissue girder) และหยด 0.03 N กรดอะซิติก 1 มล. เพื่อช่วยสกัดสารในตัวเซลล์แพลงก์ตอนให้ออกมากับสารละลาย

1.5 กรองและเก็บสารละลายที่บดได้จากข้อ 1.4 ด้วยกระดาษกรอง

1.6 นำส่วนต่าง ๆ ที่เก็บไว้จากข้อ 1.3 และข้อ 1.5 ไปใช้ในการทดลอง

2. จัดชุดการทดลองชุดละ 3 ซ้ำในแต่ละซ้ำใช้ปลานิล 10 ตัว ในสารละลายทดลอง 2500 มล. ในโหลทดลองขนาดประมาณ 9.5 ลิตร ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้วและสูง 12 นิ้ว

ชุดที่ 1 ไม่เติมสารใดๆ (ชุดควบคุมที่ 1)

ชุดที่ 2 เติม 0.03 N กรดอะซิติก 1 มล. (ชุดควบคุมที่ 2)

ชุดที่ 3 เติมสารที่สกัดจากเซลล์ *A. minutum* ที่ได้จากข้อ 1.5 ทั้งหมด

ชุดที่ 4 เติมน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์ *A. minutum* ที่ได้จากข้อ 1.3 ทั้งหมด 2500 มล.

ชุดที่ 5 มีเซลล์และน้ำเลี้ยง *A. minutum* ตามความหนาแน่นที่เลี้ยงได้ในช่วง log phase ปริมาตร 2500 มล.

หมายเหตุ : ชุดที่ 3 และ 4 ได้จากการแยกเซลล์และน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนในปริมาณที่เท่ากันกับชุดที่ 5

3. บันทึกผลการทดลอง และวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยาเช่นเดียวกับข้อ 2 และข้อ 4 ในการทดลองที่ 1.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 2 ผลของ *A. minutum* ต่อกุ้งกุลาดำ

การทดลองที่ 2.1 ผลของความหนาแน่นของ *A. minutum* ต่อการตายของกุ้งกุลาดำ

ขั้นตอนการทดลอง

เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1 แต่เปลี่ยนชนิดสัตว์ทดลองจากปลานิลเป็นกุ้งกุลาดำ จำนวน 7 ตัวต่อ 1 ซ้ำ

การทดลองที่ 2.2 ผลของสารสกัดจากเซลล์ *A. minutum* ต่อการตายของกุ้งกุลาดำ

ขั้นตอนการทดลอง

เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 แต่เปลี่ยนชนิดสัตว์ทดลองจากปลานิลเป็นกุ้งกุลาดำ จำนวน 7 ตัวต่อ 1 ซ้ำ และจัดชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดที่ 1 ไม่เติมสารใดๆ (ชุดควบคุมที่ 1)

ชุดที่ 2 เติม 0.03 N กรดอะซิติก 1 มล. (ชุดควบคุมที่ 2)

ชุดที่ 3 เติมสารที่สกัดจากเซลล์ *A. minutum*

ชุดที่ 4 เติมน้ำเลี้ยงที่ปราศจากเซลล์ *A. minutum*

ชุดที่ 5 มีเซลล์และน้ำเลี้ยง *A. minutum* อยู่ในช่วงความหนาแน่นที่ได้จากการทดลองที่ 2.1

การทดลองที่ 3 ผลของ *A. cohorticula* ต่อปลานิล

การทดลองที่ 3.1 ผลของความหนาแน่นของ *A. cohorticula* ต่อการตายของปลานิล

ขั้นตอนการทดลอง

เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1 แต่เปลี่ยนชนิดแพลงก์ตอนพืชจาก *A. minutum* เป็น *A. cohorticula*

การทดลองที่ 3.2 ผลของสารสกัดจากเซลล์ *A. cohorticula* ต่อการตายของปลานิล

ขั้นตอนการทดลอง

เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 แต่เปลี่ยนชนิดแพลงก์ตอนพืชจาก *A. minutum* เป็น *A. cohorticula*

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การทดลองที่ 4 ผลของ *A. cohorticula* ต่อกุ้งกุลาดำ</u>

<u>การทดลองที่ 4.1 ผลของความหนาแน่นของ *A. cohorticula* ต่อการตายของกุ้งกุลาดำ</u>

ขั้นตอนการทดลอง

เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 แต่เปลี่ยนชนิดแพลงก์ตอนพืชจาก *A. minutum* เป็น *A. cohorticula*

<u>การทดลองที่ 4.2 ผลของสารสกัดจากเซลล์ *A. cohorticula* ต่อการตายของกุ้งกุลาดำ</u>

ขั้นตอนการทดลอง

เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 แต่เปลี่ยนชนิดแพลงก์ตอนพืชจาก *A. minutum* เป็น *A. cohorticula* และในชุดที่ 5 ให้มีเซลล์และน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอน *A. cohorticula* อยู่ในช่วงความหนาแน่นในการทดลองที่ 4.1

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์วาเรียนซ์ (ANOVA) แบบแจกแจงทางเดียว และเปรียบเทียบระหว่างค่าเฉลี่ยของการทดลองแบบ DUNCAN'S NEW MULTIPLE RANGE TEST ตามโปรแกรม STAT GRAPHIC VERSION 5.0 และวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ของแพลงก์ตอนต่อสัตว์ทดลอง ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938) ดังแสดงในวิธีคำนวณไว้ในภาคผนวก จ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย