บทที่ 3

วิธีการศึกษา

1. แพลงก์ตอนพืชที่ใช้ในการทดลอง

แพลงก์ตอนพืชที่ใช้ในการทดลอง คือ *G. catenatum* ที่แยกเซลล์ได้จากน้ำทะเลธรรมชาติ ที่เก็บจากบริเวณ แหลมแท่น อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เลี้ยงและทดลองในห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอนพืช ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเตรียมการทดลองต่าง ๆ ตามวิธีการต่อไปนี้

2. การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หรือเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงจะผ่านการทำความสะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาด (detergent) แช่ในกรดเกลือที่เข้มข้น 10%, ล้างด้วยน้ำประปา ล้างด้วยน้ำกลั่น และผ่านการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในตู้อบความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันประมาณ 1.25 บรรยากาศ เป็นเวลา 20 นาที

3. การเตรียมน้ำทะเลสังเคราะห์

น้ำทะเลสังเคราะห์ที่ใช้ตลอดการทดลองเตรียมจากสูตรของ Harrison และคณะ (1980) สารประกอบที่ใช้เตรียมน้ำทะเลสังเคราะห์มีองค์ประกอบดังนี้ คือ

Solution I-Anhydrous salts (g/L)	NaCl	20.758
	Na_2SO_4	3.477
	KCL	0.587
	$NaHCO_3$	0.17
	KBr	0.0845
	H_3BO_3	0.0225
	NaF	0.0027
Solution II-Hydrated salts (g/L)	$MgCl_2.6H_2O$	9.395
	$CaCl_2.2H_2O$	1.316
	$SrCl_2.6H_2O$	0.0214

โดยสารละลาย Solution I-Anhydrous salts และ Solution II-Hydrated salts เตรียมแยกกันแต่ละชุดเตรียมในน้ำกลั่น 0.5 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อแบคทีเรียในตู้อบความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันประมาณ 1.25 บรรยากาศ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาผสมรวมกัน เมื่อผสมรวมกันน้ำทะเลสังเคราะห์ 1 ลิตร จะมีความเค็มประมาณ 30.5 psu ถ้าต้องการความเค็มที่สูงขึ้น ให้เพิ่มปริมาณของสารเคมีที่ใช้เตรียม Solution I-Anhydrous salts และ Solution II-Hydrated salts เป็นสองเท่า ในการทดลองเตรียมน้ำทะเลสังเคราะห์ที่ความเค็มต่างๆ กันโดยใช้น้ำกลั่นที่นำไปฆ่าเชื้อแบคทีเรียแล้วมาเจือจางให้ได้ความเค็มที่ต้องการ

4. สารอาหาร

สารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *G. catenatum* เตรียมจากสูตรอาหาร T1 (ปรับปรุงจากสูตรอาหารของ Ogata และคณะ, 1987) ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบชนิดต่างๆ หลายชนิด โดยเตรียมสารประกอบแต่ละตัวแยกเป็นสารละลายเริ่มต้น แล้วทำเป็นสารละลายผสมชนิดเข้มข้น (stock solution) หลังจากนั้นนำมาผ่านกระดาษกรอง Milipore ขนาดตา 0.22 ไมครอน เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียก่อนเก็บเป็น stock solution ไว้ใช้ในการทดลอง (เก็บไว้ในที่เย็น)

องค์ประกอบของสารอาหารสำหรับเลี้ยง *G. catenatum* ในน้ำทะเลเทียม 1 ลิตร มีดังนี้

สารประกอบ	mg/L	
$NaNO_3$	42.50	
NaH_2PO_3	7.80	
Fe-EDTA	9.18	
H_2SeO_3	6.45	
Na_2-EDTA	37.22	
$Na_2SiO_3.5H_2O$	3.00	
Tris-HCl buffer	148.88	
Biotin	1.00	
Vitamin B_{12}	1.00	
Vitamin B_1	0.20	
*Trace metal solution	0.50	(ml/L)

* เตรียมเป็น stock solution มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

สารประกอบ	mg/L
$ZnSO_4$	287.54
$MnCl_2$	1385.34
$NaMoO_4$	120.98
CoCl	47.59
$CuSO_4$	2.49
Na_2EDTA	8934.00

(ปรับความเป็นกรด-เบส (pH) ประมาณ 10)

5. สภาพแวดล้อมของตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่ใช้ในการทดลองปรับไว้ดังนี้

5.1 อุณหภูมิปรับเป็น 4 ระดับ คือ 20 , 25, 28 และ 31 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับขั้นตอนการทดลอง

5.2 ความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์เท่ากับ 76 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$

5.3 แสง ช่วงเวลาสว่าง : ช่วงเวลามืด เท่ากับ 12 : 12 ชั่วโมง

6. การเตรียม *G. catenatum* สำหรับใช้ในการทดลอง

เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยง *G. catenatum* โดยนำน้ำทะเลสังเคราะห์ที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้วตามข้อ 3 ปรับความเค็ม 28 psu ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแล้ว เติมสารอาหารตามสูตรเลี้ยงเชื้อ T1 จากนั้นเทอาหารใส่ขวดกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปปรับสภาพในตู้บ่มเชื้อก่อนนำมาเติมแพลงก์ตอนลงไป แล้วนำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อเพื่อเป็น stock ของเซลล์เริ่มต้นของการทดลอง

7. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า in vivo fluorescence ที่วัดด้วยเครื่อง fluorometer กับจำนวนเซลล์ที่นับใต้กล้องจุลทรรศน์

การศึกษาการเติบโตของ *G. catenatum* ค่าการเติบโตของแพลงก์ตอนมาจากการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในเซลล์ด้วยเครื่อง fluorometer โดยสุ่มเซลล์ *G. catenatum* ที่เลี้ยงไว้ในระยะ exponential phase (8 วัน) ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร โดยแบ่งความหนาแน่นเป็น 5 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ มีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 มิลลิลิตร เท่ากันทุกหลอด แล้ววัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในเซลล์ของตัวอย่างในแต่ละหลอดด้วยเครื่อง fluorometer ค่าที่ได้คือ in vivo fluorescence (Yamamoto และคณะ, 2002) หลังจากนั้นนำตัวอย่างในแต่ละหลอดไปนับจำนวนเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope นำข้อมูลทั้งสองมาหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า in vivo fluorescence ที่ได้จาก Fluorometer กับจำนวนเซลล์ที่นับได้จริง ซึ่งจะใช้ค่า in vivo fluorescence เป็นข้อมูลแสดงถึงการเติบโตของ *G. catenatum*

8. การทดลองเพื่อศึกษาระดับของปัจจัยอุณหภูมิ ความเค็ม ไนเตรต และ ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *G. catenatum*

การทดลองผลของปัจจัยอุณหภูมิ ความเค็ม ไนเตรต และ ฟอสเฟต ทั้งหมด 4 ปัจจัย โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

8.1 การทดลองเพื่อศึกษาระดับของอุณหภูมิ และความเค็มที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ *G. catenatum*

การทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิ และความเค็ม ช่วงของอุณหภูมิที่เลือกมาศึกษา 4 ระดับ คือ 20, 25 , 28 และ 31 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิบริเวณที่พบตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงตลอดทั้งปีอยู่ในช่วงแคบ (ประมาณ 24-33 องศาเซลเซียส)

ความเค็ม 6 ระดับ คือ 10, 15, 20, 28, 35 และ 40 psu ตามการเปลี่ยนแปลงของความในธรรมชาติแต่ละฤดูกาล ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงกว้างเนื่องจากอิทธิพลของลมมรสุมในฤดูกาลที่แตกต่างกัน

โดยในแต่ละอุณหภูมิจะทำการทดสอบกับความเค็มทุกระดับ โดยทำการทดลองครั้งละระดับอุณหภูมิ ดังนี้ (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 **แผนการทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิ ต่อความเค็ม ที่เหมาะสมต่อการเติบโต และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ** *G. catenatum*

ความเค็ม (psu)						
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	10	15	20	28	35	40
20	20 :10	20 :15	20 : 20	20 : 28	20 : 35	20 : 40
25	25 :10	25 :15	25 : 20	25 : 28	25 : 35	25 : 40
28	28 :10	28 :15	28 : 20	28 : 28	28 : 35	28 : 40
31	31 :10	31 :15	31 : 20	31 : 28	31 : 35	31 : 40

8.2 การทดลองเพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของ ไนเตรต และฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการเติบโต และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ *G. catenatum*

การทดลองเพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของไนเตรต และฟอสเฟต สามารถกำหนดระดับความเข้มข้นไนเตรต และฟอสเฟตที่ใช้ในการทดลอง โดยพิจารณาจากข้อมูลปริมาณสารอาหารที่เคยมีการรายงานในบริเวณจุดที่เก็บตัวอย่าง (แหลมแท่น จังหวัดชลบุรี) รวมถึงในแหล่งน้ำที่มีสารอาหารสูง สามารถกำหนดได้ดังนี้ (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 **แผนการทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยของไนเตรต ต่อฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการเติบโต และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ** *G. catenatum*

PO4--P (µg-at P L-1)					
NO3--N (µg-at N L-1)	0.33	1.26	3.25	6.50	32.50
0.5	0.50 : 0.33	0.50 : 1.26	0.50 : 3.25	0.50 : 6.50	0.50 : 32.50
5	5.00 : 0.33	5.00 : 1.26	5.00 : 3.25	5.00 : 6.50	5.00 : 32.50
10	10.00 : 0.33	10.00 : 1.26	10.00 : 3.25	10.00 : 6.50	10.00 : 32.50
15	15.00 : 0.33	15.00 : 1.26	15.00 : 3.25	15.00 : 6.50	15.00 : 32.50
25	25.00 : 0.33	25.00 : 1.26	25.00 : 3.25	25.00 : 6.50	25.00 : 32.50
50	50.00 : 0.33	50.00 : 1.26	50.00 : 3.25	50.00 : 6.50	50.00 : 32.50
75	75.00 : 0.33	75.00 : 1.26	75.00 : 3.25	75.00 : 6.50	75.00 : 32.50

NO_3^--N เตรียมให้มีความเข้มข้น 7 ระดับ 0.5, 5 , 10 , 15, 25, 50 และ 75 µg-at N L^{-1}

PO_4^--P เตรียมให้มีความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.33, 1.62, 3.25, 6.50 และ 32.50 µg-at P L^{-1} โดยทุกระดับความเข้มข้นของไนเตรตจะทดสอบกับฟอสเฟตทุกระดับ ทำการศึกษาพร้อมกันทั้งหมดที่อุณหภูมิ และความเค็มที่ *G. catenatum* โตได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นผลมาจากการทดลองเบื้องต้น

การทดลองทั้งสองชุดเบื้องต้นเลี้ยง *G. catenatum* ในน้ำทะเลสังเคราะห์ที่เติมอาหารสูตร T1 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในหลอดฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร เซลล์เริ่มต้นการทดลองประมาณ 100 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยการศึกษาแบ่งเป็น 2 ช่วง

ช่วงที่ 1 ปรับสภาพอุณหภูมิก่อนเลี้ยง โดยปรับสภาพให้เซลล์เคยชินกับสภาพการทดลองก่อน 2 generation ในปัจจัยที่ต้องการทดสอบก่อนการทดลองจนมีการเติบโตคงที่ จึงนำมาทดลองเพื่อศึกษาการเติบโต ในช่วงที่มีการปรับสภาพจะมีการนับจำนวนเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope เพื่อดูความคงที่ของการเติบโต

ช่วงที่ 2 การทดลองเพื่อศึกษาระดับของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเติบโต หลังจากที่เซลล์มีการปรับสภาพจนการเติบโตคงที่แล้ว ทำการศึกษาทั้งสองชุดโดยเลี้ยงในหลอดฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร และมีอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 มิลลิลิตร เซลล์เริ่มต้นการทดลองประมาณ 100 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละชุดตามแต่ละปัจจัยที่กำหนด วัดการเติบโตของตัวอย่างทุก 2 วัน เริ่มต้นวัดค่า in vivo fluorescence ที่เวลา 10.00 น. โดยวัดด้วยเครื่อง fluorometer

8.3 ชุดควบคุม ในการทดลองเป็นชุดที่เลี้ยง *G. catenatum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับความเค็มเท่ากับ 28 psu ความเข้มข้นของ $NaNo_3$ เท่ากับ 1 โมล (500 µg-at N L^{-1}) ความเข้มข้นของ NaH_2PO_4 เท่ากับ 0.1 โมล (65 µg-at P L^{-1}) ปรับค่าความเป็นกรดเบส เท่ากับ 8 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 76 µmol.m^{-2}.s^{-1} ช่วงเวลาสว่างต่อช่วงเวลามืดเท่ากับ 12 : 12 ชั่วโมง

โดยชุดควบคุมจะกำหนด ความเค็ม และอุณหภูมิ ตามปัจจัยสิ่งแวดล้อมเดิมของตัวอย่าง (บริเวณแหลมแท่น)

9. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *G. catenatum*

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาในปัจจัยแต่ละระดับ โดยดูการเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน และการเปลี่ยนแปลงในระยะยาว

9.1 การเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานในช่วงที่เซลล์มีการปรับสภาพก่อนทดลอง

9.2 การเปลี่ยนแปลงในระยะยาวทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายหลังจากเซลล์มีการปรับสภาพในปัจจัยที่ต้องการศึกษาจนอัตราการเติบโตคงที่แล้ว (นั้นก็คือช่วงที่มีการทดลองเพื่อศึกษาระดับปัจจัยต่อการเติบโต)

โดยสุ่มตัวอย่างในระยะที่มีการเติบโต (exponential phase) ครั้งละ 0.2 มิลลิลิตร แต่ละชุดทำ 3 ซ้ำ นำตัวอย่างมาดูใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา

10. การวิเคราะห์ข้อมูล

การหาค่าสัมประสิทธิ์การเติบโตตามวิธีของ Yamamoto และคณะ (2002) ดังนี้

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

เมื่อ μ = สัมประสิทธิ์การเติบโต (ต่อวัน)

N_0, N_1 = ค่า in vivo fluorescence ที่วัดด้วยเครื่อง fluorometer ในช่วงเริ่มต้น และสุดท้ายในระยะที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ (exponential phase)

t_0, t_1 = เวลาเริ่มต้น และสุดท้ายในระยะที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์

11. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าสัมประสิทธิ์การเติบโตของ *G. catenatum* ระหว่างปัจจัยอุณหภูมิกับความเค็ม และ ไนเตรตกับฟอสเฟต โดยการหาค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) โดยมีสมมุติฐาน คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์การเติบโตของ *G. catenatum* ที่เลี้ยงในระดับอุณหภูมิ ความเค็ม ไนเตรต และฟอสเฟตต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์