หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

แพลงตอนพืชที่ใช้ในการทดลองมี 2 ชนิด คือ Protogonyaulax tamarensis (Lebour) Taylor, 1979 และ Protogonyulax cohorticula (Balech) Taylor, 1979 ซึ่งแยกได้จากธรรมชาติ และเลี้ยงในลักษณะของ unialgal culture โดย P. tamarensis แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณปากแม่น้ำปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2527 จำนวน 3 isolation คือ Chula 1, Chula 2 และ Chula 3 ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ Chula 2 ส่วน P. cohorticula แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2528 จำนวน 2 isolation คือ Chula 5 และ Chula 6 ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ Chula 5

แพลงตอนพืชทะเลทั้งสองชนิดนี้เดิมเลี้ยงไว้ใน T.1 medium (Dr. Takashi Ishimaru) ที่ความเค็ม 30‰ โดยทำการเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ซึ่งปรับสภาพแวดล้อมไว้ที่อุณหภูมิ 28° ± 2 ° C ความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซน ประมาณ 3,000 ลักซ์ แพลงตอนพืชที่ศึกษานี้ทำการทดลองในห้องทดลองเลี้ยงแพลงตอนของภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้เตรียมการทดลองต่าง ๆตามวิธีการดังต่อไปนี้

1. <u>การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงแพลงตอนพืช</u>

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงหรือเกี่ยวข้องกับการเลี้ยงจะผ่านการทำความสะอาดด้วยผงซักฟอก (detergent), การแช่ในกรดเกลือที่ความเข้มข้น 10 % ล้างด้วยน้ำประปา, ล้างด้วยน้ำกลั่น และผ่านการฆ่าเชื้อด้วยตู้อบความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121° C ภายใต้ความกดดันประมาณ 1.25 บรรยากาศเป็นเวลา 20 นาที

2. <u>การเตรียมน้ำทะเลเทียมและสารอาหาร</u>

2.1 การเตรียมน้ำทะเลเทียม (artificial seawater) สำหรับเลี้ยงแพลงตอนพืชทั้งสองชนิดได้ดัดแปลงส่วนประกอบของน้ำทะเลเทียม สูตร ASP (Provasoli, 1963) โดยนำมาใช้เฉพาะเกลือของธาตุที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำทะเล (major

elements) ดังนี้

1	NaCl	25	g.
2	$MgSO_4 .7 H_2O$	9	g.
3	KCl	0.7	g.
4	Ca (as Chloride)	0.831	g.
	Distilled water	1,000	ml.

น้ำทะเลเทียมที่ได้จะมีความเค็มประมาณ 30 ‰ ซึ่งวัดโดยใช้เครื่องมือ salinity refractometer สำหรับน้ำทะเลที่ระดับความเค็มต่าง ๆ เตรียมโดยเพิ่ม หรือลดน้ำกลั่นที่เติมลงไป

2.2 สารอาหาร เตรียมตามสูตร T1 (Dr.Takashi Ishimaru , ติดต่อส่วนตัว) ดังนี้

T1 medium :

1	$NaNO_3$	1	M
2	$NaH_2 PO_4$	100	mM
3	Fe-EDTA	5	mM
4	*Vitamin Mix I		
5	**Trace metal solution		
6	Tris-HCl buffer (pH 8.0)	5	M

เติม 1 มิลลิลิตร ของ stock solution แต่ละชนิดดังกล่าวข้างบนลงในน้ำทะเลเทียม 1,000 มิลลิลิตร

*Vitamin Mix I

1	Thiamine . HCl	200	mg/l
2	Biotin	1	mg/l
3	Cyanocobalamin (B 12)	1	mg/l

* ปรับ pH เป็น 4 โดยใช้กรดเกลือ

**Trace metal solution

1	$ZnSO_4$	1	mM
2	$MnCl_2$	10	mM
3	$NaMoO_4$	0.5	mM
4	$CaCl_2$	0.2	mM
5	$CuSO_4$	0.01	mM
6	EDTA (as disodium salt)	24	mM

วิธีเตรียม Trace metal solution

1. นำ primary stock ของ trace metals แต่ละตัว (ตั้งแต่ 1 - 5) ให้มีความเข้มข้นมากเป็น 100 เท่าของความเข้มข้นที่เขียนไว้ข้างต้น
2. นำ primary stock ของ Na EDTA ให้มีความเข้มข้นเป็น 48 mM
3. นำ 50 มิลลิลิตร ของ primary stock ของ Na EDTA ใส่ลงใน volumetric flask เติม 1 มิลลิลิตร ของ primary stock ของ trace metals แต่ละตัว แล้วทำปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
4. ปรับ pH เป็น 10
5. ต้มสารละลายที่ได้เป็นเวลา 30 นาที

2.3 น้ำทะเลเทียมที่ใช้เลี้ยงจะผ่านการฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยตู้อบความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121° C ภายใต้ความกดดันอากาศ 1.25 บรรยากาศ เป็นเวลา 20 นาที ส่วนสารอาหารแต่ละชนิดผ่านการกรองแบคทีเรียด้วยวิธีการกรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ ขนาด 0.22 μm. ซึ่งได้ทำการฆ่าเชื้อแล้ว (filter sterile) สารอาหารนี้จะเติมลงในน้ำทะเลเทียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยตู้อบความดันไอน้ำแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

3. <u>สภาพแวดล้อมของตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่ใช้ทดลองได้ทำการปรับไว้ดังนี้</u>

3.1 อุณหภูมิ 28 ± 2° C

3.2 ความเข้มของแสงจากหลอด fluorescent ประมาณ 3,000 ลักซ์

3.3 ช่วงเวลาสว่างและช่วงเวลามืด (Light : Dark cycle) L : D = 14 : 10 ชั่วโมง

4. การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาช่วงความเค็มที่เหมาะสม

4.1 การทำ culture stock นำน้ำทะเลความเค็ม 30 ‰ ที่เตรียมไว้ปริมาณ 250 มิลลิลิตร บรรจุลงในขวดกลม (flat bottom flask ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด เติม Tris - HCl 5 M ขวดละ 0.25 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี หุ้ม foil แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยตู้อบความดันไอน้ำตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ต่อจากนั้นจึงนำมาเติมสารอาหารตามสูตร T1 ยกเว้น Tris -HCl) อย่างละ 0.25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงทำการถ่ายเชื้อ Protogonyaulax ลงในขวดชนิดละ 2 ขวด นำ sub culture นี้ไปเลี้ยงต่อในตู้ควบคุม เป็นเวลาประมาณ 10 วัน จะได้ผลผลิตของเซลล์ทั้งสองชนิดประมาณ 7,000 - 10,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

การเติมสารอาหารและการถ่ายเชื้อ Protogonyaulax ทั้งสองชนิดทุกครั้งที่ทดลองจะทำในตู้ถ่ายเชื้อฆ่าเชื้อแล้วด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

4.2 เตรียมน้ำทะเลเทียมระดับความเค็มแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 20, 25, 30, 35 และ 45‰ บรรจุในขวดกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ในปริมาณ 115 มิลลิลิตร จำนวน 2 ชุด ทำการฆ่าเชื้อและเติมสารอาหารตามสูตร T.1 ตามวิธีที่กล่าวในข้อ 4.1 แล้วจึงนำไปใส่ในตู้บ่มเชื้อที่มี culture stock ในข้อ 4.1 เลี้ยงอยู่เป็นเวลาประมาณ 2 - 4 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพของน้ำที่จะใช้ทดลองให้ใกล้เคียงกับ culture stock

4.3 นำ culture stock และน้ำทะเลเทียมความเค็มระดับต่าง ๆ ที่เตรียมไว้มายังตู้ถ่ายเชื้อ ทำการสุ่ม Protogonyaulax จาก culture stock เติมลงในน้ำทะเลเทียมความเค็มระดับต่าง ๆ ชนิดละ 1 ชุด ในปริมาณ 5 มิลลิลิตร จะได้เซลล์เริ่มต้นการทดลองประมาณ 200 - 500 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำกลับไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อเช่นเดิม

4.4 ทำการสุ่มตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงไว้ทั้งสองชนิดภายในตู้ถ่ายเชื้อมาวัดการเจริญทุกวันในเวลาเดียวกัน โดยใช้เครื่อง fluorometer ซึ่งเป็นการวัด in vivo fluoresence ตามวิธีของ Strickland and Parson (1968) และ Brand et al. (1980) หลังจากนั้นจึงดองเซลล์ด้วยฟอร์มาลิน 5 ‰ แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย Sedgwick - Rafter โดยใช้กำลังขยาย 4 x 10 เท่า เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่อ่านได้จาก fluorometer (fluoresence number) กับจำนวนเซลล์ (cell

number)

4.5 ทำการทดลอง ซ้ำ 3 ครั้ง

4.6 จากผลการทดลองนำมาหาค่าอัตราการเจริญเฉลี่ยเพื่อเลือกระดับความเค็มที่เหมาะสม 3 ระดับ สำหรับการทดลองต่อไปและเลือกความเค็มที่ดีสุด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองหาช่วงความเข้มข้นของกรดฮิวมิคที่เหมาะสมแก่การเจริญ

5. การทดสอบหาช่วงระดับความเข้มข้นของกรดฮิวมิกที่เหมาะสม

5.1 ในการทดลองนี้ใช้กรดฮิวมิกชนิด laboratory grade Fluka AG, CH - 94 70 Buchs ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 600 - 1,000 และทำ stock solution ของกรดฮิวมิกให้มีความเข้มข้น 100 ppm. เพื่อใช้ในการเตรียมน้ำทะเลให้มีระดับความเข้มข้นของกรดฮิวมิกต่าง ๆ กันตามที่ต้องการ กรดฮิวมิกที่ใช้จะผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการกรองเช่นเดียวกับสารอาหาร และจะเติมลงในน้ำทะเลเทียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน

5.2 จากผลการทดลองในข้อ 4 ทำการเลี้ยง Protogonyaulax ที่ระดับความเค็มที่ให้การเจริญดีที่สุดของแต่ละชนิด ในขวดกลมขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำทะเลที่เติมสารอาหารแล้วบรรจุอยู่ 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น culture stock สำหรับการทดลองต่อไป

5.3 เตรียมน้ำทะเลที่ระดับความเค็มต่าง ๆ โดยคำนวณว่าเมื่อเติมสารอาหารและกรดฮิวมิกให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันแล้ว จะได้ค่าความเค็มที่ให้การเจริญดีที่สุดของแต่ละชนิด ความเข้มข้นของกรดฮิวมิกที่ใช้ คือ 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 และ 30.0 ppm. น้ำทะเลที่มีระดับความเข้มข้นของกรดฮิวมิกต่าง ๆ กันนี้จะบรรจุในขวดกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ในปริมาณ 115 มิลลิลิตร ทำการปรับสภาพของน้ำก่อนการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 4.2

5.4 ทำการถ่ายเชื้อ Protogonyaulax ทั้งสองชนิดในตู้ถ่ายเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 4.3

5.5 ทำการสุ่มเซลล์วัดการเจริญทุกวันในเวลาเดียวกัน โดยวิธีเดียวกับข้อ 4.4

5.6 ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

5.7 จากผลการทดลองที่ได้ นำมาคำนวณหาค่าอัตราการเจริญ แล้วเลือกระดับความเข้มข้นของกรดฮิวมิคที่เหมาะสม 3 ระดับ เพื่อนำไปทดลองหาอิทธิพลร่วมกับความเค็ม 3 ระดับ ที่เลือกไว้จากการทดลองในข้อ 4

6. การทดลองผลของความเค็มและกรดฮิวมิก

6.1 ใช้ความเค็ม 3 ระดับ และความเข้มข้นของกรดฮิวมิก 3 ระดับ ที่ได้จาก

การทดลองในข้อ 4 และ 5 ขั้นตอนการเตรียมน้ำและการถ่ายเชื้อ Protogonyaulax จะทำตามวิธีเดียวกันกับการทดลองตอนแรก ๆ แต่จะใช้ความเค็มที่ให้การเจริญดีที่สุดเป็น culture stock

6.2 แต่ละระดับความเค็มจะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด และ ทำซ้ำ 3 ครั้ง ดังนี้

6.2.1 ชุดที่ 1 เป็นน้ำทะเลเทียม (ASP) เติมกรดฮิวมิค (HA) 3 ระดับ โดยมีน้ำทะเลเทียมไม่เติมกรดฮิวมิคเป็นตัวเปรียบเทียบ

6.2.2 ชุดที่ 2 เป็นน้ำทะเลเทียมเติมสารอาหาร T1 และเติมกรดฮิวมิค 3 ระดับ โดยมีน้ำทะเลเทียม เติมสารอาหาร T1 แต่ไม่เติมกรดฮิวมิคเป็นตัวเปรียบเทียบ

6.3 ทำการวัดการเจริญทุกวันในเวลาเดียวกัน ตามวิธีในข้อ 4.4

6.4 จากข้อมูลการเจริญที่ได้นำมาคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเพื่อทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบทางสถิติ

7. <u>การศึกษาการแพร่กระจายขนาดของเซลล์</u>

7.1 จากตัวอย่างที่สุ่มได้ในการทดลองข้อ 6 นำมาหาการแพร่กระจายขนาดของเซลล์โดยการกรองผ่าน ผ้ากรอง ขนาดต่าง ๆ กัน คือ 38 ,20 และ 10 μm

7.2 ทำการนับจำนวนเซลล์ที่ได้จากการกรองในข้อ 7.1 แล้วนำมาคำนวณเป็นร้อยละของเซลล์ขนาดต่าง ๆ จากผลรวมของเซลล์ทั้งหมดเพื่อแสดงกราฟแท่งแสดงการแพร่กระจายขนาดของเซลล์ตามระยะของการเจริญ

8. <u>การศึกษาขั้นตอนต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์</u>

จากผลการทดลองในข้อ 6 เลือกระดับความเค็มและระดับกรดฮิวมิคที่ให้การเจริญดีที่สุด มาทำการเลี้ยงด้วยวิธีการเช่นเดิม แต่ปล่อยให้มีการเจริญจนถึงระยะที่เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว (log phase) แล้วจึงทำการสุ่มเซลล์ทุกชั่วโมง ครั้งละ 3 มิลลิลิตร ตลอด 24 ชั่วโมง โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วน คือ

8.1 การศึกษาเซลล์ที่มีชีวิต โดยการสังเกต และ บันทึกภาพการแบ่งเซลล์

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

8.2 การศึกษาเซลล์ที่ไม่มีชีวิต โดยการดองตัวอย่างที่สุ่มมาได้ด้วย acetic acids และ ethanol ในอัตราส่วน 1 : 4 แล้วนำไป centrifuge ที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นรินส่วนที่เป็นน้ำเก็บไว้ แล้วเติมน้ำยา acetocarmine (Gabb and Latchum, 1969) ลงในส่วนที่เซลล์ตกตะกอนอยู่เพื่อย้อมสีนิวเคลียส จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 80° C เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมน้ำที่เก็บไว้ในตอนแรกทำให้ได้ปริมาตรประมาณ 5 มิลลิลิตร ทำการสุ่มเซลล์ขึ้นมาศึกษาขั้นตอนการแบ่งเซลล์ระยะต่าง ๆ และบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

9. <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

9.1 การหาอัตราการเจริญ คำนวณจากความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของ fluorescence number กับเวลาเป็นวัน โดยเลือกจุดที่เริ่มระยะ log phase จุดสุดท้ายที่เลือกจะเป็นจุดที่ปริมาณเซลล์เริ่มลดลง หาค่า slope จากสมการ โดยวิธี least square regression ค่า slope ที่ได้จะเป็นค่าอัตราการเจริญหรือ growth constant ของแพลงตอนพืช (Brand et al., 1980 และ Watras et al., 1982) ส่วนเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้เป็นสองเท่า คำนวณจากสูตรดังนี้

$$K = \frac{\log (Fl_t / Fl_o)}{t_t - t_o}$$

$$= \frac{\log (2Fl_t / Fl_o)}{t_t - t_o}$$

$$= \frac{\log 2}{t_t - t_o}$$

$$\text{Doubling Time (D. T.)} = \frac{\log 2}{K}$$

เมื่อ K คือ อัตราการเจริญของเซลล์

9.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการเจริญการทดลองนี้ได้ออกแบบไว้สำหรับการทดลองแบบแฟกตอเรียลที่มี 3 แฟกเตอร์ ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการเจริญได้จากตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์ (เจริญ จันทลักขณา, 2523) ดังนี้

ตารางที่ 3. ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ factorial ที่มี 3 factors

Source of Variation SOV	df	SS	MS	F
Replication	(r-1)			
Humic acids,A	(a-1)	$\Sigma \frac{(t.a_j)^2}{bcr} - C.T.$	$\frac{SS(A)}{(a-1)}$	$\frac{MS(A)}{MS(Error)}$
Salinity,B	(b-1)	$\Sigma \frac{(t.b_j)^2}{acr} - C.T.$	$\frac{SS(B)}{(b-1)}$	$\frac{MS(B)}{MS(Error)}$
Nutrient - Enrichment,C	(c-1)	$\Sigma \frac{(t.c_j)^2}{abr} - C.T.$	$\frac{SS(C)}{(c-1)}$	$\frac{MS(C)}{MS(Error)}$
AB	(a-1)(b-1)	SS(I)-SS(A)-SS(B)	$\frac{SS(AB)}{(a-1)(b-1)}$	$\frac{MS(AB)}{MS(Error)}$
AC	(a-1)(c-1)	SS(III)-SS(A)-SS(C)	$\frac{SS(AC)}{(a-1)(c-1)}$	$\frac{MS(AC)}{MS(Error)}$
BC	(b-1)(c-1)	SS(II)-SS(B)-SS(C)	$\frac{SS(BC)}{(b-1)(c-1)}$	$\frac{MS(BC)}{MS(Error)}$
ABC	(a-1)(b-1)	T_rSS-(A+B+C+AB+BC++AC)SS	$\frac{SS(ABC)}{(a-1)(b-1)(c-1)}$	$\frac{MS(ABC)}{MS(Error)}$
Error	abc(r-1)	TSS-T_rSS-BSS	$\frac{SS(Error)}{abc(r-1)}$	

เมื่อ a_i = ระดับความเข้มข้นของกรดฮิวมิก

b_i = ระดับของความเค็ม

c_i = ระดับความเข้มข้นของสารอาหาร

total a_j (ta_j) = ผลรวมของ a_i เมื่อได้รับอิทธิพลร่วมระหว่างความเค็มและกรดฮิวมิก (1)

total b_j (tb_j) = ผลรวมของ b_i เมื่อได้รับอิทธิพลร่วมระหว่างความเค็มและสารอาหาร (2)

total c_j (tc_j) = ผลรวมของ c_i เมื่อได้รับอิทธิพลร่วมระหว่างสารอาหารและกรดฮิวมิก

x = ค่าอัตราการเจริญของเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

C.T = correction term

TSS = total SS

TrSS = treatment SS

BSS = block SS

SS(1) = total SS in 1

SS(2) = total SS in 2

SS(3) = total SS in 3

โดยตั้งสมมติฐาน (null hypothesis) ไว้ว่าไม่มีความแตกต่างกันของอัตราการเจริญ เมื่อได้รับอิทธิพลจากความเค็มต่างระดับ กรดฮิวมิกระดับต่างๆและสารอาหารที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย