บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์การทำ single cell isolation

- หลอดแก้วขนาดเล็ก (capillary tube)
- ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
- สไลด์ (slide)
- หลอดทดลองจุกเกลียว (screw cap test tube)
- กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (high power microscope)
- อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Zarrouk (ภาคผนวก ก.)

3.1.2 วัสดุการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์สาหร่าย

- ขวดเออร์เลนเมเยอร์ (erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร
- เครื่องกวนชนิดใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrir)
- เครื่องเขย่า (orbital incubator) ซึ่งสามารถควบคุมแสง อุณหภูมิ และอัตราการเขย่า
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) แบบ Titrigraph Mode PHA 943B ของ Hack Simson Limited
- ตู้อบแห้ง (hot air oven)
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
- สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 D ของ Bausch & Lomb พร้อมเซลล์แก้วขนาด 1 เซนติเมตร
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องบดกระดาษกรอง (tissue grinder)
- ชุดเครื่องกรองชนิดมีปั๊มช่วยดูดอากาศ
- กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง
- อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Zarrouk

- น้ำเค็มจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 แห่ง

3.1.3 วัสดุอุปกรณ์การตรวจและวิเคราะห์คุณภาพน้ำตัวอย่าง

- เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาดต่างๆ ปิเปต กระบอกตวง บีกเกอร์ และอื่นๆ
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำตาม Standard Methods (APHA-AWWA-WPCF, 1981) ดังนี้

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ความเป็นด่างรวม (total alkalinity)
สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ความกระด้างจากแคลเซียม (calcium hardness)
สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ความกระด้างรวม (total hardness)
สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์คลอรินิตี้ (chlorinity)
สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ซัลเฟต (sulfate)
สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ฟอสเฟต (phosphate)
สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ไนเตรท (nitrate)
สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์โพแทสเซียม (potassium)
สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์โซเดียม (sodium)
สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์เหล็ก (iron)

- atomic absorption Perkin Elmer 400
- สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 D ของ Bausch & Lomb พร้อมเซลล์แก้วขนาด 1 เซนติเมตร

3.1.4 วัสดุอุปกรณ์การลดเหล็ก

- เครื่องพ่นอากาศพร้อมอุปกรณ์
- ชุดเครื่องกรองชนิดมีปั๊มช่วยดูดอากาศ

3.1.5 วัสดุอุปกรณ์การลดความกระด้าง

- สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำตาม Standard Methods ดังนี้

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ความเป็นด่างรวม
สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ความกระด้างจากแคลเซียม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ความกระด้างรวม

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์คาร์บอนไดออกไซด์อิสระ

สารเคมีที่ใช้ลดความกระด้างได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$) และ โซดียมคาร์บอเนต ($Na_2(CO_3)$)

- เครื่องกวนผสมแบบมาตรฐาน (Phipp & Bird) ประกอบด้วยใบพัดสำหรับกวนผสมขนาด 2.5 x 7.5 เซนติเมตร จำนวน 6 ใบ สามารถปรับอัตราความเร็วได้ตั้งแต่ 0 ถึง 100 รอบต่อนาที
- ถ้วยทดลอง ใช้โถพลาสติกทรงกระบอก ซึ่งมีท่อแยกสำหรับเก็บตัวอย่าง
- ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และอุปกรณ์การเติมก๊าซ
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง

3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ มีขั้นตอนการดำเนินงานแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนหลักดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 วางแผนการทดลองและเตรียมการทดลอง

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเกลียวทอง

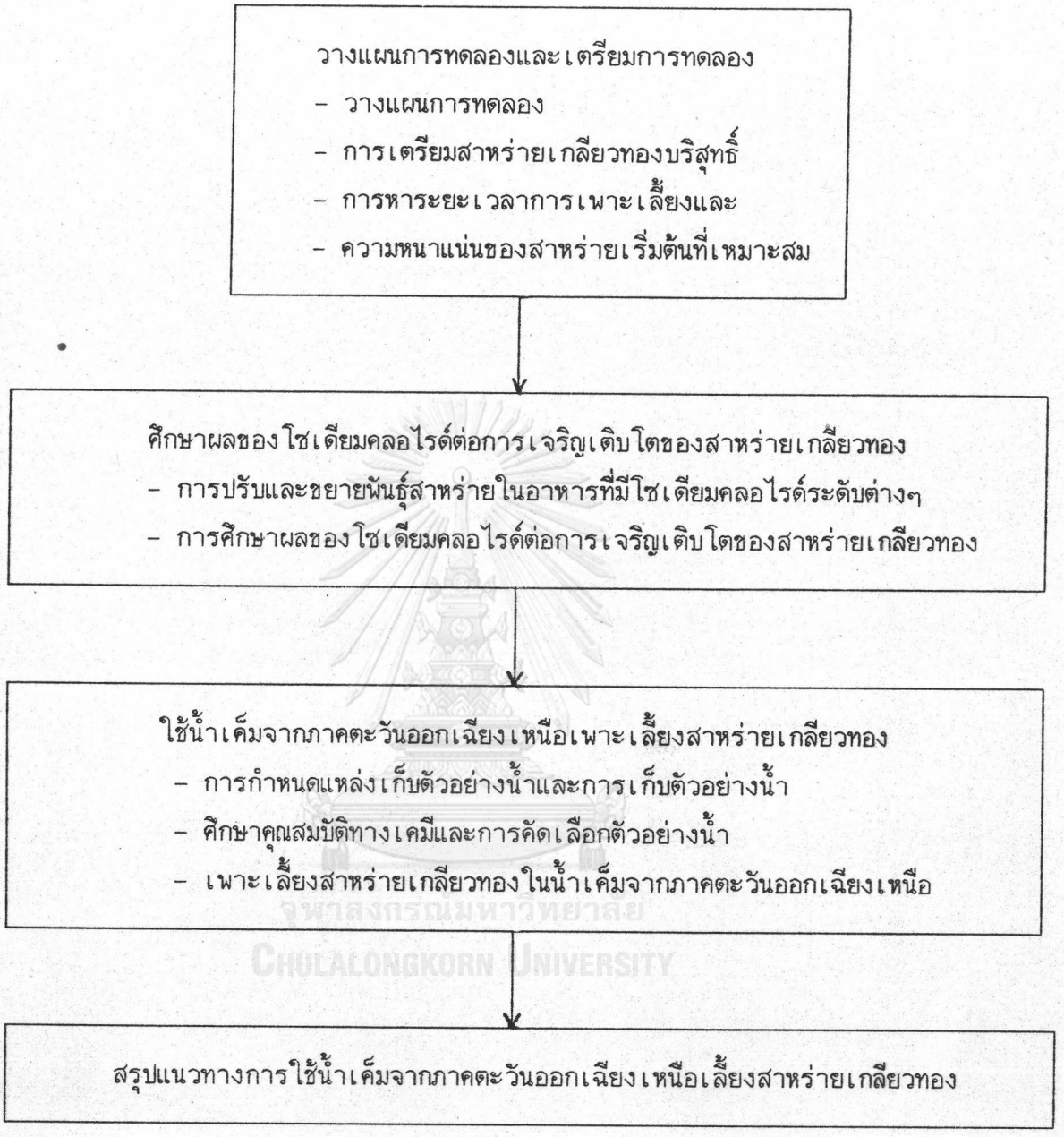
ขั้นตอนที่ 3 ใช้น้ำเค็มจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง

แต่ละขั้นตอนหลักทั้ง 3 ขั้นตอน ยังแบ่งออกเป็นขั้นตอนย่อย ๆ ดังแสดงในภาพที่ 3.1

3.2.1 วางแผนการทดลองและเตรียมการทดลอง

3.2.1.1 วางแผนการทดลอง

ทำการทดลองเป็นรอบ (batch culture) และ วางแผนการทดลองแบบ complete randomize design โดยแต่ละ treatment มี 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ทางสถิติ วิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างค่าที่ต้องการเปรียบเทียบด้วย analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วย Duncan New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 90 และเพื่อลดความแปรปรวนจากปัจจัยภายนอก ที่อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย จึงเลือกทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ ในเครื่องเขย่าที่สามารถควบคุมให้มีอุณหภูมิ ความเข้มแสง และอัตราการเขย่า เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของสาหร่ายเกลียวทอง โดยปรับให้มีอุณหภูมิ 30 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ และอัตราการเขย่า 140 รอบต่อนาที



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.2.1.2 <u>การติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายเกลียวทอง</u>

การติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายเกลียวทองในการศึกษาครั้งนี้ใช้ 3 วิธี คือ

1. การวัด O.D. เพื่อบอกถึงความหนาแน่นของสาหร่ายที่อยู่ในอาหาร โดยวัดการดูดกลืนแสงของสาหร่าย เป็นวิธีที่สะดวกในทางปฏิบัติเนื่องจากทำได้ง่ายทราบผลในเวลาอันรวดเร็ว และใช้ปริมาณสาหร่ายน้อยจึงเหมาะสมกับการทดลองในห้องปฏิบัติการและการทดลองกลางแจ้ง อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อควรระวังคือการจับตัวเป็นก้อน และการจมตัวของสาหร่ายขณะวัด ตลอดจนความขุ่นใสของอาหารเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งจะทำให้ค่าที่วัดได้คลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง และเพื่อให้ทราบถึงการเจริญเติบโตของสาหร่าย จึงนำค่า O.D. มาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของสาหร่าย โดยมีวิธีคำนวณดังสมการที่ 1 และเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดต่อวัน ซึ่งเป็นค่าที่คำนวณได้จากช่วงที่สาหร่ายมีการเจริญเติบโตในระยะ exponential การที่เลือกเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตต่อวันในช่วงนี้ เนื่องจากเป็นระยะที่สภาพแวดล้อมอื่นๆ ในการเลี้ยงไม่เป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญเติบโต ดังนั้นการเจริญเติบโตในระยะนี้ จึงเป็นผลมาจากปัจจัยที่กำหนดให้เท่านั้น

$$U = \frac{\ln O.D._{t} - \ln O.D._{(t-1)}}{time} \qquad \text{สมการที่ 1}$$

U = อัตราการเจริญเติบโตต่อวันของสาหร่าย (O.D. ต่อวัน)

$O.D._{t}$ = ค่า O.D.(O.D.unit) ที่แสดงความหนาแน่นของสาหร่ายในวันที่ t

$O.D._{t-1}$ = ค่า O.D.(O.D.unit) ที่แสดงความหนาแน่นของสาหร่ายในวันที่ t-1

time = จำนวนวันที่สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโต(time = 1 วัน)

2. การหาน้ำหนักแห้ง เป็นวิธีที่บอกถึงผลผลิตของสาหร่ายโดยตรง มีขั้นตอนการหาหลายขั้น และต้องใช้ปริมาณตัวอย่างที่มากพอจึงจะให้ผลน่าเชื่อถือ นอกจากนี้คุณสมบัติของน้ำที่ใช้เตรียมอาหาร เช่น ความกระด้าง ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่อาจทำให้ค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้อีกด้วย ผลผลิตของสาหร่ายคำนวณจากค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายในช่วงเวลาการเพาะเลี้ยง ดังสมการที่ 2

$$\text{Production} = D.W._{f} - D.W._{i} \qquad \text{สมการที่ 2}$$

Production = ผลผลิตของสาหร่าย (มิลลิกรัม/ลิตร)

$D.W._f$ = น้ำหนักแห้งของสาหร่ายในวันสุดท้ายของการเลี้ยงสาหร่ายแต่ละรอบ (มิลลิกรัม/ลิตร)

$D.W._i$ = น้ำหนักแห้งของสาหร่ายในวันแรกของการเลี้ยงสาหร่ายแต่ละรอบ (มิลลิกรัม/ลิตร)

3. การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เป็นวิธีหนึ่งในการแสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของสาหร่าย การเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ สามารถใช้เป็นตัวบอกถึงผลของปัจจัยต่างๆที่มีต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ เช่น ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ หรือคุณสมบัติของน้ำเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อย่างไรก็ตามแม้จะเป็นวิธีทางเคมีที่ได้ผลน่าเชื่อถือ แต่ต้องใช้เวลาเนื่องจากมีหลายขั้นตอน และแต่ละขั้นตอนต้องใช้ความระมัดระวังมาก นอกจากนี้การวิเคราะห์แต่ละครั้งต้องใช้ปริมาณตัวอย่างไปส่วนหนึ่ง จึงเป็นข้อจำกัดสำหรับการทดลองในห้องปฏิบัติการที่มีปริมาณตัวอย่างน้อย ในการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะนำไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (relative chlorophyll a) ซึ่งหมายถึงอัตราส่วนคลอโรฟิลล์ เอ ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อวัน ดังสมการที่ 3

$$\text{Rel.Chl.a} = \frac{\text{Chl.a}_f}{\text{Chl.a}_i \times t} \qquad \text{สมการที่ 3}$$

Rel.Chl.a = ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (มิลลิกรัม/ลิตร)

$Chl.a_f$ = ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในวันสุดท้ายของการเลี้ยงสาหร่ายแต่ละรอบ (มิลลิกรัม/ลิตร)

$Chl.a_i$ = ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในวันแรกของการเลี้ยงสาหร่ายแต่ละรอบ (มิลลิกรัม/ลิตร)

t = เวลาที่ใช้ในการทดลอง (t = f-i, วัน)

i = วันแรกของการทดลอง

f = วันสุดท้ายของการทดลอง

3.2.1.3 <u>การเตรียมสาหร่ายเกลียวทองบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลอง</u>

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองนี้คือ สาหร่ายเกลียวทองสายพันธุ์ TH-S-02 ของสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ ซึ่งเก็บและคัดแยกจากบ่อเลี้ยงปลาในจังหวัดปทุมธานี

โดยสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ ตามโครงการเก็บรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายเกลียวทองในประเทศไทย สาหร่ายเกลียวทองสายพันธุ์นี้ เป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการได้ดี การเตรียมสาหร่ายเกลียวทองเพื่อใช้ในการทดลองครั้งนี้ ต้องการให้สาหร่ายเกลียวทองที่ใช้ในการทดลองเป็นสาหร่ายที่เจริญเติบโตจาก trichome เดียว ดังนั้นจึงทำ single cell isolation โดยใช้หลอดแก้วขนาดเล็กปลายแหลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางกว้างกว่าเซลล์สาหร่ายเล็กน้อย เลือกดูดสาหร่ายออกมาเพียง trichome ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำไปเลี้ยงในหลอดทดลองจุกเกลียวซึ่งมีอาหารสูตรของ Zarrouk ประมาณ 10 มิลลิลิตร วางบนชั้นใกล้แสงสว่างให้สาหร่ายได้รับความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ตลอด 24 ชั่วโมงจะขยายจำนวนสาหร่ายหนาแน่นขึ้นจนเห็นเป็นสีเขียว เขย่าหลอดทุกวัน เมื่อเข้มข้นมากขึ้นจึงทำการขยายจำนวนสาหร่าย โดยเติมอาหารให้มากขึ้นทีละน้อยและเปลี่ยนภาชนะบรรจุให้ใหญ่ขึ้น เพาะเลี้ยงต่อไปอีกประมาณ 4 สัปดาห์ สาหร่ายจะเจริญเติบโตหนาแน่นพอที่จะใช้ในการทดลองขั้นต่อไปได้

3.2.1.4 <u>การหาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้น ที่เหมาะสม</u>

ความหนาแน่นของสาหร่ายในอาหารเริ่มต้น มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเกลียวทอง โดยพบว่าถ้าเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นน้อยเกินไป สาหร่ายจะเจริญเติบโตช้าในช่วงแรกของการเลี้ยง หรืออาจจะตายเมื่อได้รับความเข้มของแสงที่สูงกว่าระดับที่เหมาะสม และอาจปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ง่าย (Chiu et al.,1980b) ส่วนความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นถ้ามากเกินไป การเจริญเติบโตจะเข้าสู่ระยะ stationary phase เร็วขึ้น เนื่องจากสาหร่ายมีความหนาแน่นมาก ทำให้เกิดปัจจัยที่จำกัดการเจริญเติบโต เช่น แสง ความเป็นกรด-ด่าง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการทดลองครั้งนี้ โดยเลือกความหนาแน่นของสาหร่ายในรูปของ O.D. ในช่วงต้นของระยะ exponential จากกราฟการเจริญเติบโตเป็นความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นที่เหมาะสม โดยมีวิธีการทดลองเพื่อสร้างกราฟการเจริญเติบโตเติบโตดังนี้

เริ่มต้นเลี้ยงสาหร่ายที่ O.D. เท่ากับ 0.1 จำนวน 3 ซ้ำโดยเลี้ยงด้วยอาหารสูตรของ Zarrouk ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ในขวดเออร์เลนเมเยอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปไว้ในเครื่องเขย่าโดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 30 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ และอัตราการเขย่า 140 รอบต่อนาที ตลอดการทดลอง วัดความเป็นกรด-ด่าง และความหนาแน่นของสาหร่ายที่เปลี่ยนแปลงไปในรูป O.D.ทุกวัน นำข้อมูลการวัด O.D. มาสร้างกราฟแสดงการเจริญเติบโต

3.2.2 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเกลียวทอง

3.2.2.1 การปรับและขยายพันธุ์สาหร่ายในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆ

ในการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเกลียวทองนั้น เพื่อไม่ให้มีการเปลี่ยนระดับโซเดียมคลอไรด์อย่างกระทันหันมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย จึงต้องมีการปรับสาหร่ายให้สามารถเจริญเติบโตอยู่ในอาหารสูตรที่ 1 2 3 และ 4 อย่างค่อยเป็นค่อยไป โดยขยายพันธุ์สาหร่ายที่เดิมเจริญเติบโตอยู่ในอาหารสูตรที่ 1 (สูตรควบคุม) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรของ Zarrouk มีโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัมต่อลิตร ให้สามารถเจริญเติบโตอยู่ในอาหารสูตรของ Zarrouk ดัดแปลง คือสูตรที่ 2 3 และสูตรที่ 4 ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยมีลำดับการขยายพันธุ์สาหร่ายดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 นำสาหร่ายหลังจากทำ Single cell isolation และขยายพันธุ์ให้มีจำนวนมากพอมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 เลี้ยงในอาหารสูตรนี้เป็นเวลา 4 วัน (ดูภาพที่ 3.2)

ขั้นตอนที่ 2 ขยายพันธุ์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 ในขั้นตอนที่ 1 เป็นเวลา 4 วัน ให้ไปอยู่ในอาหารสูตรที่ 1 และ 2 เลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 2 สูตรนี้เป็นเวลา 4 วัน (ดูภาพที่ 3.2)

ขั้นตอนที่ 3 ขยายพันธุ์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 ในขั้นตอนที่ 2 เป็นเวลา 4 วัน ให้ไปอยู่ในอาหารสูตรที่ 1 และ 2 และ

ขยายพันธุ์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 ในขั้นตอนที่ 2 เป็นเวลา 4 วัน ให้ไปอยู่ในอาหารสูตรที่ 3 เลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 3 สูตรนี้เป็นเวลา 4 วัน (ดูภาพที่ 3.2)

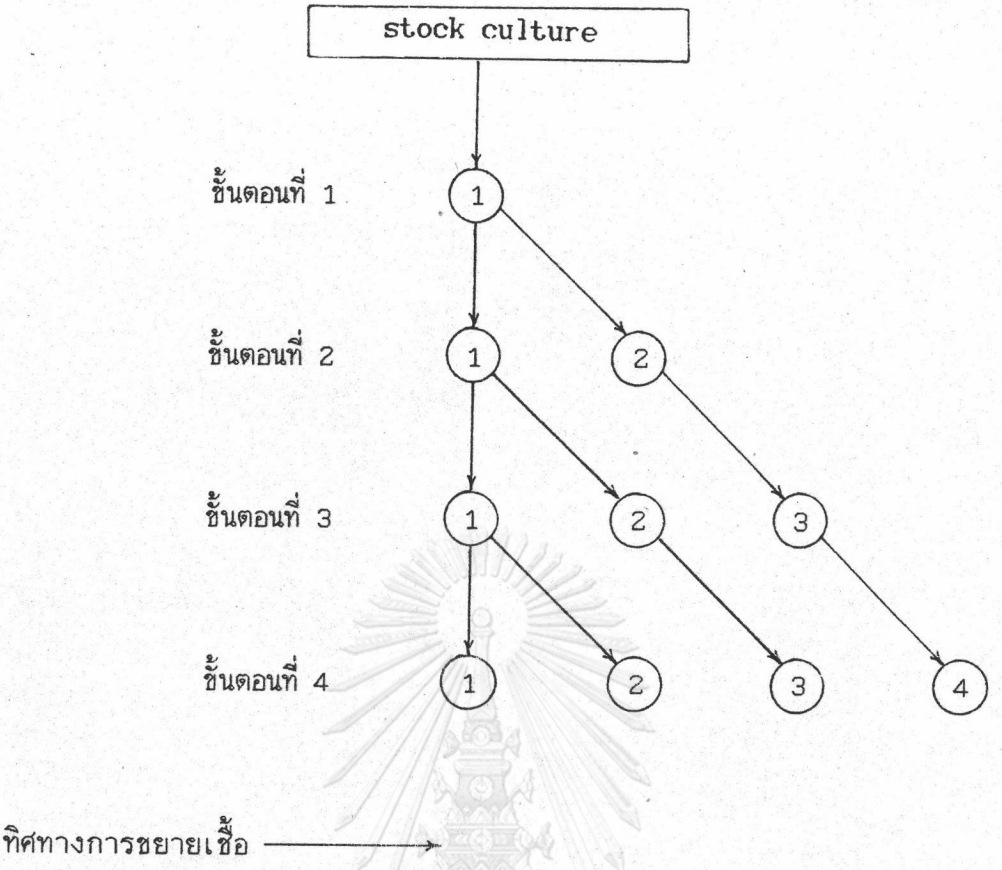
ขั้นตอนที่ 4 ขยายพันธุ์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 ในขั้นตอนที่ 3 เป็นเวลา 4 วัน ให้ไปอยู่ในอาหารสูตรที่ 1 และ 2

ขยายพันธุ์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 ในขั้นตอนที่ 3 เป็นเวลา 4 วัน ให้ไปอยู่ในอาหารสูตรที่ 3 และ

ขยายพันธุ์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 3 ในขั้นตอนที่ 3 เป็นเวลา 4 วัน ให้ไปอยู่ในอาหารสูตรที่ 4 และเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 4 สูตรนี้เป็นเวลา 4 วัน (ดูภาพที่ 3.2)

รายละเอียดการปรับและขยายพันธุ์สาหร่ายแสดงในภาพที่ 3.2

CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการปรับและขยายพันธุ์สาหร่ายในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆ

หมายเหตุ : 1 2 3 4 หมายถึง อาหารสูตรที่ 1 อาหารสูตรที่ 2 อาหารสูตรที่ 3 อาหารสูตรที่ 4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การเก็บข้อมูล

รายละเอียดวิธีการเก็บข้อมูลแสดงในภาคผนวก ข.

ข้อมูลที่เก็บทุกวันตลอดการทดลอง ได้แก่

- ความหนาแน่นของสาหร่ายซึ่งวัดในรูป O.D ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
- บันทึกลักษณะรูปร่าง และสภาพทั่วไปของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่า D.O. มาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของสาหร่าย

- เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดต่อวันระหว่างสาหร่ายที่

เจริญเติบโตในอาหารสูตรที่ 1 และ 2 ในการปรับสาหร่ายขั้นตอนที่ 2

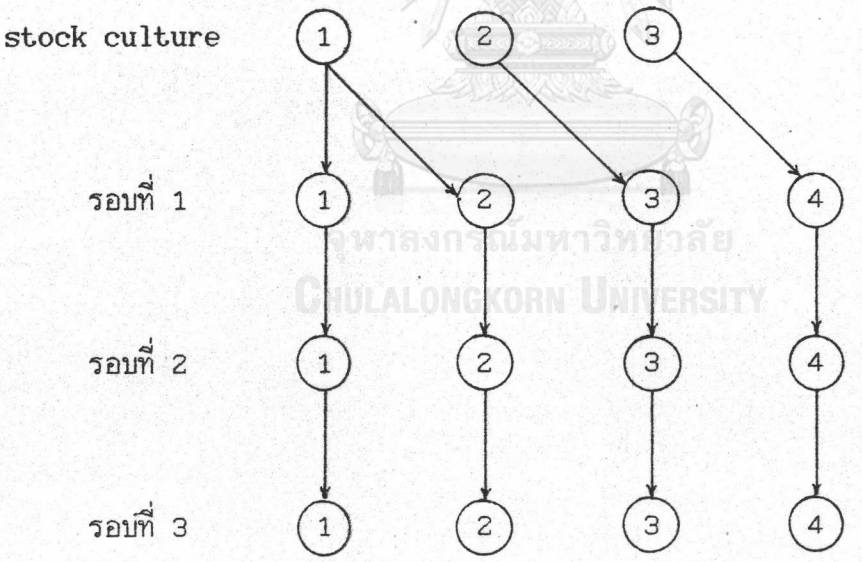
- เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดต่อวันระหว่างสาหร่ายที่เจริญเติบโตในอาหารสูตรที่ 1 2 และ 3 ในการปรับสาหร่ายขั้นตอนที่ 3

- เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดต่อวันระหว่างสาหร่ายที่เจริญเติบโตในอาหารสูตรที่ 1 2 3 และ 4 ในการปรับสาหร่ายขั้นตอนที่ 4

3.2.2.2 <u>การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย</u>

ในการทดลองขั้นนี้ เพื่อให้สาหร่ายผ่านการเลี้ยงในอาหารแต่ละสูตรเป็นเวลาเท่ากัน จึงขยายพันธุ์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 2 และ 3 ให้ไปอยู่ในอาหารสูตรที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น 1 ขั้น ยกเว้นสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งเป็นสูตรควบคุมที่ขยายสาหร่ายไปยังอาหารสูตรเดิมดังนี้ (ภาพที่ 3.3)

นำสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 มาขยายพันธุ์ให้เจริญเติบโตอยู่ในอาหารสูตรที่ 2
นำสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 มาขยายพันธุ์ให้เจริญเติบโตอยู่ในอาหารสูตรที่ 3
นำสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 3 มาขยายพันธุ์ให้เจริญเติบโตอยู่ในอาหารสูตรที่ 4



<u>ภาพที่ 3.3</u> ขั้นตอนการขยายพันธุ์สาหร่ายเกลียวทองในการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

หมายเหตุ : 1 2 3 4 หมายถึง อาหารสูตรที่ 1 อาหารสูตรที่ 2 อาหารสูตรที่ 3 อาหารสูตรที่ 4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ทำการทดลอง 3 รอบ(batch)เป็นเวลา 15 วัน โดยขยายพันธุ์สาหร่ายไปยังอาหารสูตรเดิมทุก 5 วันรวม 3 ครั้ง อาหารแต่ละสูตรมี 3 ซ้ำ รวมทั้งหมด 12 ตัวอย่าง และสุ่มย้ายตำแหน่งขวดเลี้ยงสาหร่ายในเครื่องเขย่าทุกครั้งที่มีการขยายพันธุ์สาหร่าย

การเก็บข้อมูล

รายละเอียดวิธีการเก็บข้อมูลแสดงในภาคผนวก ข.

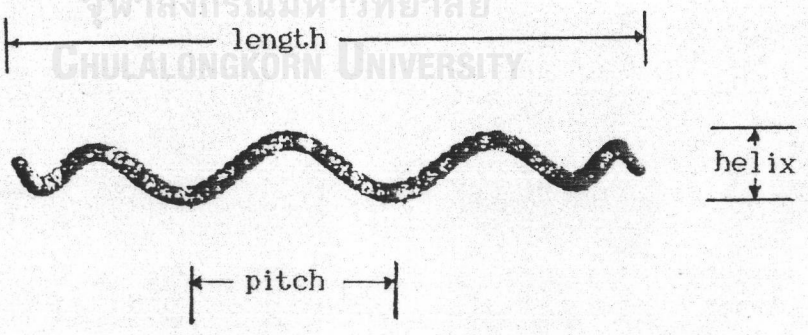
ข้อมูลที่เก็บทุกวันตลอดการทดลอง ได้แก่

- ความหนาแน่นสาหร่ายในอาหาร ซึ่งวัดในรูป O.D. ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
- บันทึกลักษณะรูปร่างและสภาพทั่วไปของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ข้อมูลที่เก็บวันแรกของการเลี้ยงสาหร่ายในแต่ละรอบ และวันสุดท้ายก่อนการขยายพันธุ์สาหร่ายไปยังอาหารสูตรเดิมในการทดลองรอบใหม่ ได้แก่

- น้ำหนักแห้ง
- ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ตาม Standard Methods
- ขนาดและรูปร่างของสาหร่าย สุ่มวัดขนาดของสาหร่าย 30 trichome โดยวัดความยาว (length) ระยะห่างระหว่างเกลียว (pitch) และเส้นผ่าศูนย์กลางเกลียว (helix) ของสาหร่าย (ภาพที่ 3.4) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย
- ความเป็นกรด-ด่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 3.4 รูปร่างสาหร่ายเกลียวทองแสดงลักษณะต่างๆ ที่จะทำการวัด

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่า O.D. น้ำหนักแห้งและปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่ายมาคำนวณหา อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน ผลผลิตคิดของสาหร่าย และปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ที่เพิ่มขึ้นต่อวันตามลำดับ

- เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดต่อวัน ผลผลิตของสาหร่าย และปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ที่เพิ่มขึ้นต่อวัน ระหว่างสาหร่ายที่เจริญเติบโตในอาหารสูตรที่ 1 2 3 และ 4 ในการทดลองรอบที่ 1 2 และ 3
- เปรียบเทียบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดต่อวัน ผลผลิตของสาหร่าย และปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ที่เพิ่มขึ้นต่อวัน ในการทดลองรอบที่ 1 2 และ 3 ของสาหร่ายที่เจริญเติบโตในอาหารสูตรที่ 1 2 3 และ 4
- เปรียบเทียบขนาดและรูปร่างของสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 2 3 และ 4 ในการทดลองขั้นตอนที่ 1 2 และ 3
- เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นและสุดท้าย ของอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรที่ 1 2 3 และ 4

เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองในขั้นตอนนี้ สาหร่ายที่เจริญเติบโตในอาหารสูตรที่ 1 2 3 และ 4 ก็จะถูกเลี้ยงไว้ในอาหารสูตรเดิมตลอดไป และเก็บไว้บนชั้นใกล้แสงสว่างให้สาหร่ายได้รับความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ เพื่อเป็นเชื้อ stock สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 การใช้น้ำเค็มจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง

3.2.3.1 การกำหนดแหล่งเก็บตัวอย่างน้ำและการเก็บตัวอย่างน้ำ

ศึกษาข้อมูลด้านคุณสมบัติทางเคมี ตลอดจนสถานที่ขุดเจาะน้ำบาดาลจากบัญชีบ่อน้ำบาดาลที่ขุดเจาะโดยกรมทรัพยากรธรณี ตั้งแต่ ปี 2501 ถึง 2527 ซึ่งจัดทำโดยงานซ่อมบำรุงรักษา กองน้ำบาดาล กรมทรัพยากรธรณี กระทรวงอุตสาหกรรม (2528) และศึกษาคุณสมบัติน้ำในอ่างเก็บน้ำที่อยู่ในความดูแลของกรมชลประทาน จากรายงานผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำชลประทานในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (2528) ตลอดจนเอกสารเรื่องการพิจารณาคุณภาพน้ำชลประทานและน้ำอุปโภค บริโภค(บุญธรรม วงศ์ไศลย์,2530) จากข้อมูลดังกล่าว กำหนดแหล่งเก็บตัวอย่างน้ำที่มีค่าคลอรินีตี้มากกว่า 1 กรัมต่อลิตร จำนวนทั้งสิ้น 11 แห่ง โดยเป็นน้ำบาดาล

ที่ 7496666

10 แห่ง และอ่างเก็บน้ำ 1 แห่ง เนื่องจากเป็นน้ำที่ไม่สามารถใช้เป็นประโยชน์ในการอุปโภคบริโภค เพาะปลูก ตลอดจนด้านอุตสาหกรรม

แหล่งเก็บตัวอย่างน้ำทั้ง 11 แห่งได้แก่

1. บ่อน้ำบาดาล บ้านบวร ตำบลแดงใหญ่ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น
2. บ่อน้ำบาดาล ที่สาธารณะ บ้านโนนสูง หมู่ 10 ตำบลดอนเงิน อำเภอเชียงยืน จังหวัดมหาสารคาม
3. บ่อน้ำบาดาล วัดบ้านหนองดู หมู่ 7 ตำบลหนองซอน อำเภอเชียงยืน จังหวัดมหาสารคาม
4. บ่อน้ำบาดาล วัดโนนคร้อ หมู่ 6 ตำบลโคกพระ อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม
5. บ่อน้ำบาดาล ที่สาธารณะ บ้านลุมพุก หมู่ 5 ตำบลโคกพระ อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม
6. บ่อน้ำบาดาล วัดท่าเลียบวังบัว หมู่ 9 ตำบลท่าขอนยาง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม
7. บ่อน้ำบาดาล วัดพิไชยาราม บ้านใคร่นุ่น หมู่ 10 ตำบลท่าขอนยาง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม
8. บ่อน้ำบาดาล อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา
9. บ่อน้ำบาดาล โรงเรียนแกเปะ ตำบลเชียงเครือ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์
10. บ่อน้ำบาดาล ที่สาธารณะบ้านดอนดู่ หมู่ 9 ตำบลคันธราษฎร์ อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม
11. อ่างเก็บน้ำหนองบ่อ ตำบลบรบือ อำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม

3.2.3.2 <u>การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและการคัดเลือกตัวอย่างน้ำ</u>

วิเคราะห์คุณสมบัติเบื้องต้นของตัวอย่างน้ำทุกแห่งที่เดินทางไปเก็บได้แก่

- ความเป็นกรด-ด่าง
- ความเป็นด่างรวม
- ความกระด้างรวม
- คลอรินิตี้

จากคุณสมบัติดังกล่าว คัดเลือกตัวอย่างน้ำสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง จำนวน 3 แห่ง โดยพิจารณาจากค่าคลอรินิตี้และความกระด้าง เป็นหลัก แล้ว

เลือกตัวอย่างน้ำซึ่งมีคลอรินิตี้ แตกต่างกัน 3 ระดับ และมีความกระด้างไม่สูงนัก

3.2.3.3 <u>การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทองในน้ำเค็มจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ</u>

อาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ใช้ในการทดลองขั้นนี้ เตรียมโดยใช้ตัวอย่างน้ำเป็นตัวทำละลายสารอาหารแทนการใช้น้ำกลั่น แต่เนื่องจากตัวอย่างน้ำที่นำมาใช้มีความกระด้างสูง ก่อให้เกิดการตกตะกอนกับสารอาหารที่ใส่ในอาหารเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ดังนั้นจึงแบ่งตัวอย่างน้ำเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 คงสภาพเดิมไว้ อีกชุดหนึ่งนำไปลดความกระด้างด้วยปูน-โซดาเย็นที่มากเกินพอ (excess cold lime-soda solftening) รายละเอียดการลดความกระด้างแสดงในภาคผนวก ค. นำน้ำตัวอย่างทั้ง 2 ชุดมาเติม โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4) โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) เฟอรัสซัลเฟต และอีดีทีเอ ($FeSO_4$-EDTA) ในปริมาณเท่ากับที่มีอยู่ในสูตรของ Zarrouk

ขยายพันธุ์สาหร่ายเชื้อที่ 1 (เชื้อควบคุม) 2 3 และ 4 ซึ่งเป็นสาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรของ Zarrouk ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จาก stock culture ที่ได้จากการทดลองข้อ3.2.2.3 (การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย) มาเลี้ยงในอาหารที่เตรียมจากตัวอย่างน้ำ ทำการทดลอง 3 รอบ (batch) เป็นเวลา 15 วัน โดยขยายพันธุ์สาหร่ายไปยังอาหารสูตรเดิมทุก 5 วัน รวม 3 ครั้ง อาหารแต่ละสูตรมี 3 ซ้ำ รวมทั้งหมด 12 ตัวอย่าง และเพื่อแสดงให้เห็นถึงปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆที่อาจจะมีผลต่อสาหร่ายขณะทดลอง ซึ่งมิใช่ผลจากตัวอย่างน้ำ จึงขยายพันธุ์สาหร่ายที่อยู่ในอาหารสูตรที่ 1 จาก stock culture มาเลี้ยงในอาหารสูตรของ Zarrouk ที่เตรียมจากน้ำกลั่น (สาหร่ายชุดควบคุม) และเลี้ยงไปพร้อมๆกับสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำตัวอย่าง

<u>การเก็บข้อมูล</u>

ข้อมูลที่เก็บทุกวัน ตลอดการทดลอง ได้แก่

- ความหนาแน่นของสาหร่ายซึ่งวัดในรูป O.D. ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
- บันทึกลักษณะรูปร่าง และสภาพทั่วไปของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ข้อมูลที่เก็บวันแรกของการเลี้ยงสาหร่ายในแต่ละรอบ และวันสุดท้ายก่อนการขยายพันธุ์สาหร่าย ไปยังอาหารสูตรเดิมในการทดลองรอบใหม่ ได้แก่

- น้ำหนักแห้งของสาหร่าย
- ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ
- ความเป็นกรด-ด่าง

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่า O.D. น้ำหนักแห้ง และปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่ายมาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน ผลผลิตของสาหร่าย และปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ที่เพิ่มขึ้นต่อวัน ตามลำดับ

- เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดต่อวัน ผลผลิตของสาหร่าย และปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ที่เพิ่มขึ้นต่อวัน ระหว่างสาหร่ายเชื้อที่ 1 2 3 และ 4 ในการทดลองรอบที่ 1 2 และ 3 เมื่อเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 4 เชื้อในอาหารที่เตรียมจากตัวอย่างน้ำ
- เปรียบเทียบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดต่อวัน ผลผลิตของสาหร่าย และปริมาณคลอฟิลล์ เอ ที่เพิ่มขึ้นต่อวัน ในการการทดลองรอบที่ 1 2 และ 3 ของสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรของ Zarrouk ที่เตรียมจากน้ำกลั่น (สาหร่ายชุดควบคุม) และสาหร่ายเชื้อที่ 1 2 3 4 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เตรียมจากตัวอย่างน้ำ
- เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นและสุดท้ายของอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เตรียมจากตัวอย่างน้ำ 1 2 และ 3 ทั้งก่อนลดความกระด้างและหลังลดความกระด้าง

3.3 สถานที่และระยะเวลาทดลอง

การทดลองในห้องปฏิบัติการ ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ โดยใช้สถานที่ และอุปกรณ์ของห้องปฏิบัติการ งานนิเวศวิทยา กลุ่มวิจัยสิ่งแวดล้อมสัตว์น้ำ ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2529 ถึง มกราคม 2530 และสำหรับการเก็บตัวอย่างน้ำกระทำโดยได้ติดตามคณะสำรวจสาหร่ายเกลียวทอง ตามโครงการเก็บและรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายเกลียวทองในประเทศไทยของสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY