บทที่ 4

ผลการทดลอง

แพลงก์ตอนพืชที่ใช้ในการทดลองคือ ไดโนเฟลกเจลเลตชนิด Prorocentrum micans หลังจากแยกเซลล์จากน้ำทะเลธรรมชาติและเพาะเลี้ยงให้เพิ่มปริมาณได้ในห้องปฏิบัติการแล้ว ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ P. micans ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติ โดยเพิ่มสารอาหารตามสูตรอาหาร modified T1 ที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ที่สภาวะควบคุมในตู้บ่มเชื้อ ปรากฏว่าเซลล์ P. micans มีการเจริญ และเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดี โดยเริ่มจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง (initial concentration) ประมาณ 480-560 เซลล์ต่อน้ำเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลักษณะการเจริญของเซลล์ โดยเซลล์จะมีระยะการปรับตัวเพื่อการเจริญเติบโตหรือเรียกว่าระยะพักตัว (lag phase) ใช้เวลาประมาณ 2 วันหลังจากการถ่ายเชื้อ จากนั้นเซลล์จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมาก และมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์คงที่ (log phase) ประมาณช่วงวันที่ 2-8 ของการเจริญหลังจากการถ่ายเชื้อ ต่อจากระยะนี้ในระหว่างวันที่ 8-17 อัตราการเจริญของเซลล์ค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งเข้าสู่ระยะที่ปริมาณเซลล์คงที่ (Stationary phase) จะได้จำนวนเซลล์สูงสุดเฉลี่ยประมาณ 90,282 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในช่วงประมาณวันที่ 17-18 จากการเพาะเลี้ยงดังกล่าวนี้ จะใช้ในการเตรียม Stock culture เพื่อใช้ในการทดลองครั้งต่อ ๆ ไป

ลักษณะรูปร่างของเซลล์ P. micans ที่สังเกตได้เมื่อเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ลักษณะของเซลล์ P. micans มีลักษณะโดยทั่ว ๆ ไปเหมือนกับลักษณะที่ได้บรรยายไว้แล้วในข้างต้น เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้นประมาณระยะหลังวันที่ 8 ของการเจริญ ภายในเซลล์จะปรากฏให้เห็น vaccuole ขนาดใหญ่ พอเข้าสู่ระยะที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลงอันเนื่องมาจากมีการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้น เมื่อเซลล์ตายไปจะพบเปลือกของเซลล์คงอยู่ เปลือกหุ้มเซลล์จะโปร่งใสจะมองเห็นลักษณะเป็นแอ่งคล้ายรูกระจายอยู่ทั่วไป และขนาดของเซลล์มีความยาวและความกว้างดังนี้

ความยาวของลำตัวอยู่ในพิกัด 35-48 ไมครอน

ความกว้างของลำตัวอยู่ในพิกัด 15-28 ไมครอน

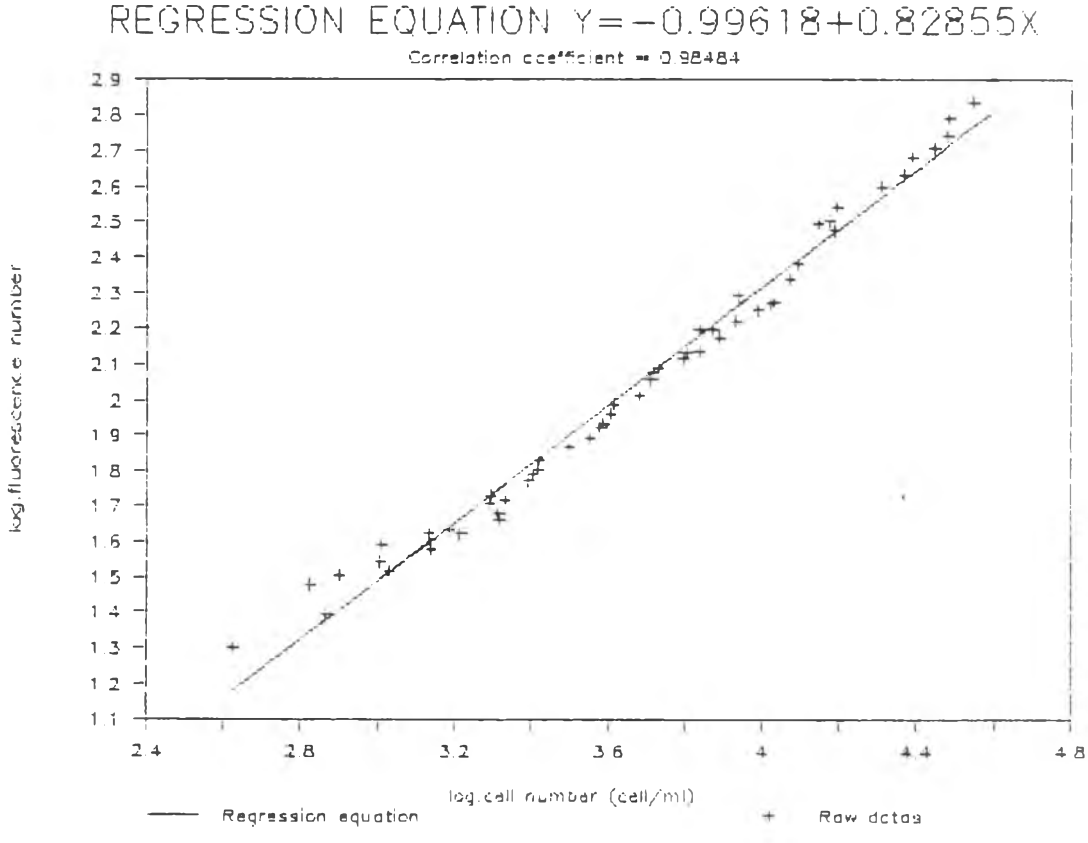
1. การวัดการเจริญของเซลล์ P. micans

การวัดอัตราการเจริญของเซลล์ตรวจวัดด้วยเครื่อง fluorometer เพื่อตรวจหาปริมาณของคลอโรฟิลด์ เอ. ที่มีอยู่ภายในเซลล์ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วในบทที่ 3 ในการวิจัยครั้งนี้ จึงได้ยึดถือการวัดการเจริญของเซลล์ด้วยเครื่อง flourometer แทนวิธีการสุ่มนับจำนวนเซลล์โดยตรง ซึ่งจะมีวิธีการปรับค่าและหาความสัมพันธ์ โดยใช้เส้นกราฟมาตรฐาน (Standardized calibration curve) ของเซลล์ P.micans โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า fluorescence number (fluo. no) กับค่าจำนวนเซลล์ที่ได้จากการสุ่มนับจำนวนเซลล์ เมื่อวิเคราะห์ผลโดยวิธีสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) พบว่าทั้งสองค่ามีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรง ตามสมการจำลองเชิงเส้นตรง (Regression equation) $y = - 0.99618 + 0.82855 x$ (รูปที่ 1) และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient,r) = 0.98484 นอกจากนี้แล้ว ยังได้มีการตรวจสอบความสัมพันธ์ดังกล่าวในการทดลอง โดยการสุ่มตัวอย่างออกมานับเซลล์ แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้จากการนับกับผลที่ได้จากการคำนวณ ซึ่งพบว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นจริงตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง

2. ผลของสารอาหารสูตร modified T1 ที่มีต่อการเจริญของ P. micans

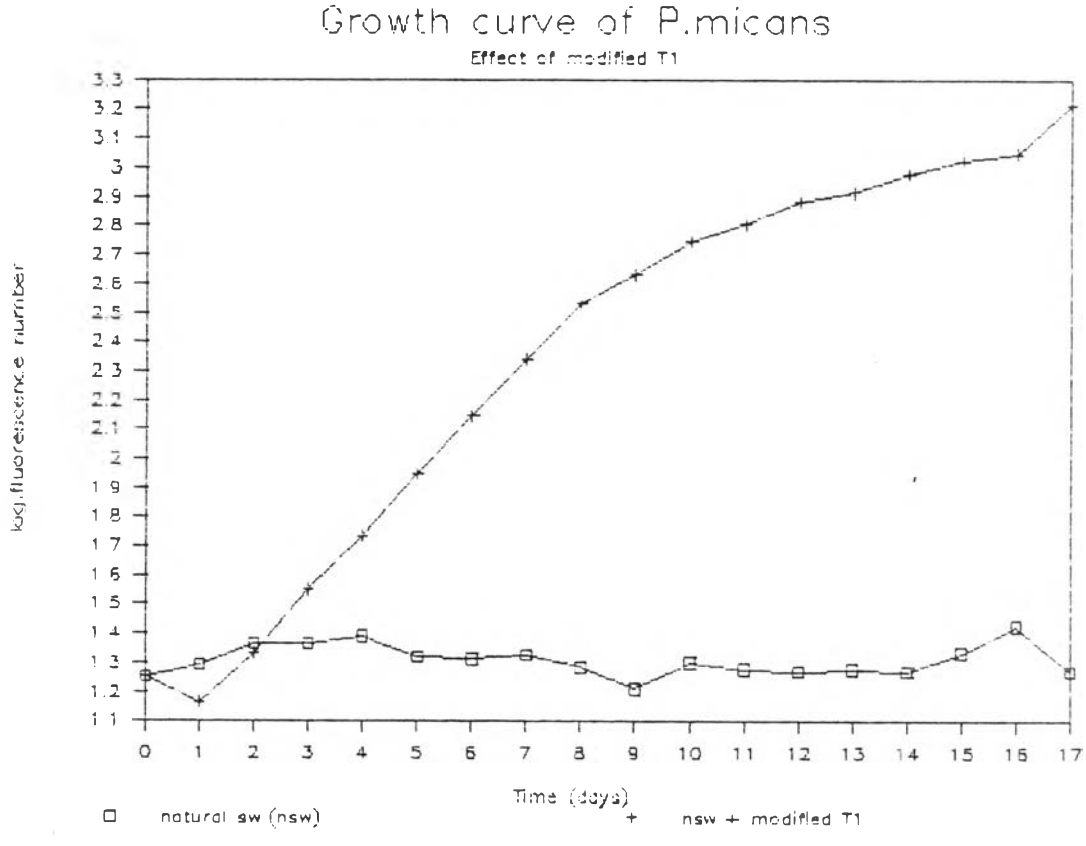
ทดลองเปรียบเทียบอัตราการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ P. micans ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติที่ไม่ได้เพิ่มสารอาหาร (nsw) กับเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติที่เพิ่มสารอาหาร modified T1 (nsw + T1) จากผลการเจริญของเซลล์ตามกราฟการเจริญ (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่าการเจริญของเซลล์ P. micans เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีการเพิ่มสารอาหารลงไปจะให้ผลการเจริญดีกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติเพียงอย่างเดียว อย่างเห็นได้ชัดเจน โดยมีอัตราการเจริญเฉลี่ยของเซลล์ เท่ากับ 0.1989 และ -0.0143 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ผลจากการวิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการเจริญของเซลล์ในน้ำเลี้ยงเซลล์ทั้งสอง



รูปที่ 1. เส้นกราฟมาตรฐานของ Prorocentrum micans จากความสัมพันธ์ระหว่างค่า fluorescence number กับค่าจำนวนเซลล์ ; ___ : ค่าที่ได้จากการทำนายตามสมการเชิงเส้นตรง ; + : ค่าที่ได้จากการนับจำนวนเซลล์

I 17513315



รูปที่ 2. การเจริญของ P. micans แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญเทียบกับเวลา (วัน) เมื่อได้รับอิทธิพลของสารอาหารสูตร modified T1 ; □ : น้ำเลี้ยงเชลล์ที่ไม่ได้เพิ่มสารอาหาร ; + : น้ำเลี้ยงเชลล์ที่เพิ่มสารอาหาร

ตารางที่ 2. อัตราการเจริญเฉลี่ย (growth constant) และเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (doubling time) ของ P. micans เมื่อได้รับอิทธิพลของการเพิ่มสารอาหาร modified T1 (nsw+T1) และน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เพิ่มสารอาหาร (nsw)

media	growth constant ($K_{10} \pm$ S.D.)	doubling time (D.T. (day))
nsw	-0.0143 + 0.002	-
nsw+T1	0.1989 + 0.001	1.51

ชนิด พบว่าอัตราการเจริญเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามตารางการวิเคราะห์ โควาเรียนซ์ (ตารางที่ 3)

3. ผลของอัตราส่วนระหว่าง EDTA กับผลรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อยที่มีต่อการเจริญของ P. micans

เพื่อทดลองเปรียบเทียบหาระดับอัตราส่วนของ EDTA ต่อผลรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด อันได้แก่ สังกะสี มังกานีส โมลิบดินัม โคบอลต์ และทองแดง ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ P. micans ดังนั้นจึงได้ทำการแปรผันอัตราส่วนระหว่าง EDTA กับธาตุโลหะปริมาณน้อย โดยกำหนดให้คีเลเตอร์มีปริมาณมากเป็น 2 เท่า 3 เท่า 5 เท่า 10 เท่า 15 เท่า และ 20 เท่าของปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อย ตามลำดับ โดยการเตรียมสารละลาย Mixed trace metal solution ที่มีอัตราส่วนของ mole ratio แตกต่างกันดังนี้ คือ EDTA ความเข้มข้น 24 มิลลิโมลาร์ ต่อ ความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อย 12 มิลลิโมลาร์ (Chelate-metal mole ratio = 2:1); EDTA ความเข้มข้น 36 มิลลิโมลาร์ ต่อความเข้มข้นรวมของ ธาตุโลหะปริมาณน้อย 12 มิลลิโมลาร์ (Chelate-metal mole ratio = 3:1); EDTA ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ต่อความเข้มข้นรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อย 12 มิลลิโมลาร์ (Chelate - metal mole ratio = 5:1) ; EDTA ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ ต่อความเข้มข้นรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อย 12 มิลลิโมลาร์ (Chelate-metal mole ratio = 10:1) ; EDTA ความเข้มข้น 180 มิลลิโมลาร์ ต่อความเข้มข้นรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อย 12 มิลลิโมลาร์ (Chelate - metal mole ratio = 15:1) ; EDTA ความเข้มข้น 240 มิลลิโมลาร์ ต่อความเข้มข้นรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อย 12 มิลลิโมลาร์ (Chelate-metal mole ratio = 20:1) ตามลำดับ

โดยทำการแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 6 ชุดการทดลองตามความแตกต่างของน้ำเลี้ยงเซลล์ ดังนี้ คือ

3.1 น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติ เพิ่มสารอาหาร modified T1 ที่มีอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมธาตุโลหะปริมาณน้อย = 3:1 (nsw + T1 (3:1))

3.2 น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติ เพิ่มสารอาหาร modified T1 ที่มีอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมธาตุโลหะปริมาณน้อย = 3:1 (nsw + T1 (3:1))

3.3 น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติ เพิ่มสารอาหาร modified T1 ที่มีอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมธาตุโลหะปริมาณน้อย = 5:1 (nsw + T1 (5:1))

3.4 น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติ เพิ่มสารอาหาร modified T1 ที่มีอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมธาตุโลหะปริมาณน้อย = 10:1 (nsw + T1(10:1))

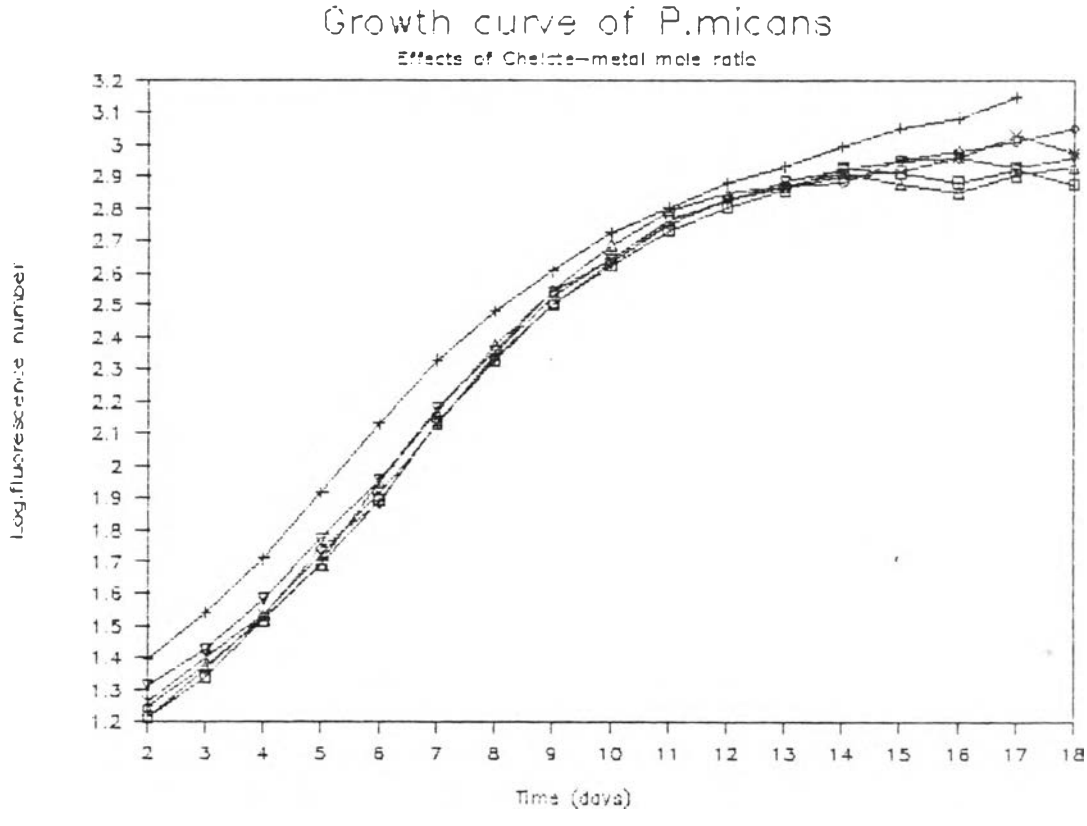
3.5 น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติ เพิ่มสารอาหาร modified T1 ที่มีอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมธาตุโลหะปริมาณน้อย = 15:1 (nsw + T1(15:1))

3.6 น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติ เพิ่มสารอาหาร modified T1 ที่มีอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมธาตุโลหะปริมาณน้อย = 20:1 (nsw + T1(20:1))

ผลการทดลองจากกราฟการเจริญ (รูปที่ 3) แสดงให้เห็นแนวโน้มของการเจริญของ P. micans มีลักษณะใกล้เคียงกัน มีการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดี โดยจะพบว่าระยะที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างมากและคงที่ในประมาณช่วงวันที่ 2 - 10 ของการเจริญหลังจากการถ่ายเชื้อ หลังจากวันที่ 10 ของการเจริญไปแล้ว อัตราการเจริญของเซลล์จะลดลง

เมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญของเซลล์ เมื่อได้รับอิทธิพลของการแปรผันอัตราส่วนระหว่าง EDTA กับปริมาณรวมของธาตุโลหะในสารอาหารตามสูตร modified T1 (ตารางที่ 4, รูปที่ 4) จะพบว่าเซลล์ P. micans ที่เพาะเลี้ยงในชุดการทดลองที่น้ำเลี้ยงเซลล์เตรียมโดยการเพิ่มสารอาหาร modified T1 ที่ระดับอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะ =10:1 มีค่าอัตราการเจริญสูงสุด = 0.1929 และอัตราการเจริญสูงรองลงมา ได้แก่ ชุดการทดลองที่น้ำเลี้ยงเซลล์เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติ เพิ่มสารอาหาร modified T1 ที่อัตราส่วนของ EDTA ต่อธาตุโลหะปริมาณน้อย = 2:1 มีอัตราการเจริญเฉลี่ย = 0.1890, 5:1 มีอัตราการเจริญเฉลี่ย = 0.1816, และ 20.1 มีอัตราการเจริญเฉลี่ย = 0.1785 ตามลำดับ

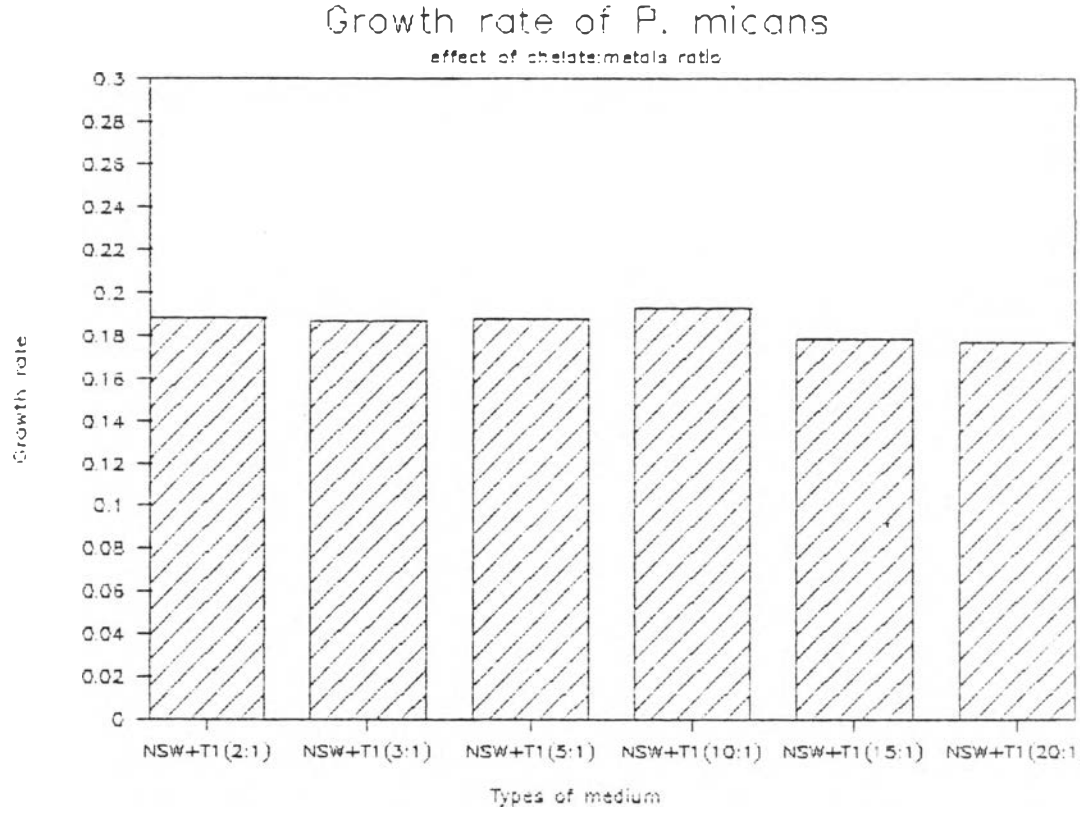
เมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการเจริญของเซลล์ ในระหว่างชุดการทดลองตามวิธีการวิเคราะห์โควาเรียนซ์ (ตารางที่ 5) เพื่อทดสอบว่าเซลล์ P. micans จะมีอัตราการเจริญแตกต่างกันหรือไม่เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมให้อัตราส่วนของ EDTA ต่อธาตุโลหะปริมาณน้อยแตกต่างกัน จากผลการวิเคราะห์โควาเรียนซ์ สรุปได้ว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างค่าอัตราการเจริญของเซลล์ ในทุกระดับอัตราส่วนของ EDTA ต่อ



รูปที่ 3. การเจริญของ P. micans แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญเทียบกับเวลา (วัน) เมื่อได้รับอิทธิพลของสารอาหารที่มีระดับอัตราส่วน Chelate-metal mole ratio 2:1 (□), 3:1 (+), 5:1 (◇), 10:1 (△), 15:1 (X) และ 20:1 (▽) ตามลำดับ

ตารางที่ 4. อัตราการเจริญเฉลี่ยและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่าของ P. micans เมื่อได้รับอิทธิพลของสารอาหารสูตร modified T1 โดยแปรผันระดับอัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio 2:1 [nsw + T1 (2:1)], 3:1 [nsw+T1(3:1)], 5:1 [nsw+T1(5:1)], 10:1 nsw+T1(10:1)], 15:1 [nsw+T1(15:1)] และ 20:1 [nsw+T1 (20:1)]

media	growth constant ($K_{10} \pm$ S.D.)	doubling time (D.T. (day))
nsw+T1(2:1)	0.1890 + 0.007	1.59
nsw+T1(3:1)	0.1873 + 0.006	1.61
nsw+T1(5:1)	0.1878 + 0.008	1.60
nsw+T1(10:1)	0.1929 + 0.014	1.56
nsw+T1(15:1)	0.1816 + 0.021	1.66
nsw+T1(20:1)	0.1785 + 0.012	1.69



รูปที่ 4. อัตราการเจริญเฉลี่ยของ P. micans เมื่อได้รับอิทธิพลของสารอาหารที่แปรผันระดับอัตราส่วน Chelate-metal mole ratio 2:1 [nsw+T1(2:1)], 3:1 [nsw+T1(3:1)], 5:1 [nsw+T1(5:1)], 10:1 [nsw+T1(10:1)], 15:1 [nsw+T1(15:1)] และ 20:1 [nsw+T1(20:1)]

ปริมาณรวมธาตุโลหะปริมาณน้อยในทั้ง 6 ชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ

4. ผลความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยที่มีต่อการเจริญของ P. micans

เพื่อทดลองเปรียบเทียบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของธาตุโลหะปริมาณน้อย ได้แก่ สังกะสี แมงกานีส โมลิบดินัม โคบอลต์ และทองแดง ต่อการเจริญของ P. micans อันเป็นการทดลองต่อเนื่องจากผลการทดลองในข้อ 3 เมื่อทราบอัตราส่วนของคีเลเตอร์ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะที่เหมาะสม ในการที่คีเลเตอร์จะไปเปลี่ยนรูปแบบของธาตุโลหะปริมาณน้อยทุกชนิดให้อยู่ในรูปแบบที่แพลงค์ตอนพืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ และให้ผลการเจริญดีที่สุด คือ ที่ระดับอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมธาตุโลหะปริมาณน้อย = 2:1 ในการทดลองขั้นต่อไปนี้เพื่อต้องการทราบระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิดร่วมกันที่เหมาะสมต่อการเจริญของ P. micans โดยทดลองเลี้ยงเซลล์ P. micans ในน้ำเลี้ยงที่มีการแปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อย คือ น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติที่เติมสารอาหารสูตร modified T1 ที่ระดับอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อย = 2:1 คงที่ตลอดการทดลอง แล้วทำการแปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด ตามสารอาหารสูตร modified T1 และแปรผันโดยเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยขึ้นเป็น 2 เท่า 4 เท่า 6 เท่า 8 เท่า และ 10 เท่า ตามลำดับ ดังต่อไปนี้

4.1 น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติที่เติมสารอาหารสูตร modified T1 ที่ระดับอัตราส่วน EDTA ต่อธาตุโลหะปริมาณน้อย = 2:1 ที่ระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะประมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด ตามสูตรอาหาร modified T1 (nsw + T1 (2:1)x1) โดยเตรียมสารละลาย Mixed trace metals ที่ความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ $ZnSO_4$ 1 ไมโครโมลาร์ $MnCl_2$ 10 ไมโครโมลาร์ Na_2MoO_4 0.5 ไมโครโมลาร์ $CoCl_2$ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ $CuSO_4$ 0.01 ไมโครโมลาร์

4.2 ในทำนองเดียวกันกับการทดลองในข้อ 4.1 แต่แปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของระดับความเข้มข้นเดิมในสารอาหารสูตร modified T1 (nsw+T1(2:1)x2) โดยเตรียมสารละลาย Mixed trace metals ที่ความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ $ZnSO_4$ 2 ไมโครโมลาร์ $MnCl_2$ 20

ไมโครโมลาร์ Na_2MoO_4 1 ไมโครโมลาร์ $CoCl_2$ 0.4 ไมโครโมลาร์ และ $CuSO_4$ 0.02 ไมโครโมลาร์

4.3 ในทำนองเดียวกันกับการทดลองในข้อ 4.1 แต่แปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด เพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่าของระดับความเข้มข้นเดิมในสารอาหารสูตร modified T1 (nsw+T1 (2:1)x4) โดยเตรียมสารละลาย Mixed trace metals ที่ความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ $ZnSO_4$ 4 ไมโครโมลาร์ $MnCl_2$ 40 ไมโครโมลาร์ Na_2MoO_4 2 ไมโครโมลาร์ $CoCl_2$ 0.8 ไมโครโมลาร์ และ $CuSO_4$ 0.04 ไมโครโมลาร์

4.4 ในทำนองเดียวกันกับการทดลองในข้อ 4.1 แต่แปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด เพิ่มขึ้นเป็น 6 เท่าของระดับความเข้มข้นเดิมในสารอาหารสูตร modified T1 (nsw+T1 (2:1)x6) โดยเตรียมสารละลาย Mixed trace metals ที่ความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ $ZnSO_4$ 6 ไมโครโมลาร์ $MnCl_2$ 60 ไมโครโมลาร์ Na_2MoO_4 3 ไมโครโมลาร์ $CoCl_2$ 1.2 ไมโครโมลาร์ และ $CuSO_4$ 0.06 ไมโครโมลาร์

4.5 ในทำนองเดียวกันกับการทดลองในข้อ 4.1 แต่แปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด เพิ่มขึ้นเป็น 8 เท่าของระดับความเข้มข้นเดิมในสารอาหารสูตร modified T1 (nsw+T1 (2:1)x8) โดยเตรียมสารละลาย Mixed trace metals ที่ความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ $ZnSO_4$ 8 ไมโครโมลาร์ $MnCl_2$ 80 ไมโครโมลาร์ Na_2MoO_4 4 ไมโครโมลาร์ $CoCl_2$ 1.6 ไมโครโมลาร์ และ $CuSO_4$ 0.08 ไมโครโมลาร์

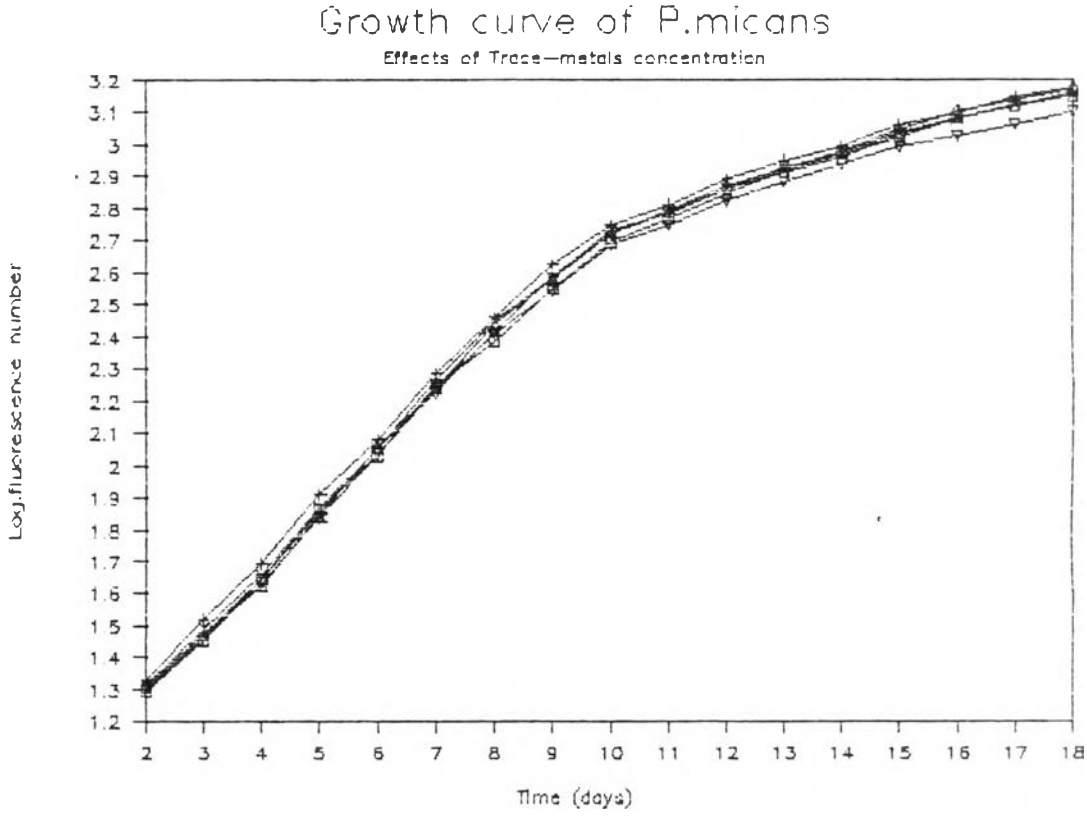
4.6 ในทำนองเดียวกันกับการทดลองในข้อ 4.1 แต่แปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิดเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่าของระดับความเข้มข้นเดิมในสารอาหารสูตร modified T1 (nsw+T1(2:1)x10) โดยเตรียมสารละลาย Mixed trace metals ที่ความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ $ZnSO_4$ 10 ไมโครโมลาร์ $MnCl_2$ 100

ไมโครโมลาร์ Na_2MoO_4 5 ไมโครโมลาร์ $CoCl_2$ 2 ไมโครโมลาร์ และ $CuSO_4$ 0.1 ไมโครโมลาร์

ผลการเจริญของ P. micans ที่ตอบสนองต่อการแปรผันปริมาณความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นในระดับต่าง ๆ ทั้ง 6 ระดับ ของธาตุโลหะปริมาณน้อยในสารอาหารสูตร modified T1 นั้น จากกราฟการเจริญ (รูปที่ 5) จะแสดงการเจริญในระยะเวลา 18 วันหลังจากการถ่ายเชื้อ ลักษณะของการเจริญของเซลล์ในแต่ละชุดการทดลองแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยทั้ง 6 ชุด การทดลองที่ทำการแปรผันปริมาณความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยในสูตรอาหาร modified T1 นั้น มีแนวโน้มการเจริญไปในลักษณะใกล้เคียงกันมาก โดยที่อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดจะพบในช่วงประมาณวันที่ 2-8 ของการเจริญ

หลังจากนั้นนำค่าการเจริญของเซลล์ P. micans ตั้งแต่วันที่ 2-8 ของการเจริญ (exponential phase) ไปคำนวณหาค่าอัตราการเจริญ (Growth constant, K_{10}) และระยะเวลาที่เซลล์มีการเจริญเพิ่มเป็นสองเท่า (doubling time, D.T.) (ตารางที่ 6, รูปที่ 6) ค่าอัตราการเจริญของชุดการทดลองที่แปรผันโดยเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยเป็น 6 เท่าของระดับความเข้มข้นเดิมในสูตรอาหาร modified T1 จะมีค่าอัตราการเจริญสูงที่สุด คือ เท่ากับ 0.1915 และมีค่า D.T. สั้นที่สุดเท่ากับ 1.57 วัน และค่าอัตราการเจริญเฉลี่ยของธาตุการทอลองที่แปรผันโดยเพิ่มความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยเป็น 4 เท่าของความเข้มข้นเดิมในสูตรอาหาร modified T1 จะมีอัตราการเจริญเฉลี่ยต่ำสุด คือ เท่ากับ 0.1871 และมีค่า DT = 1.61 วัน

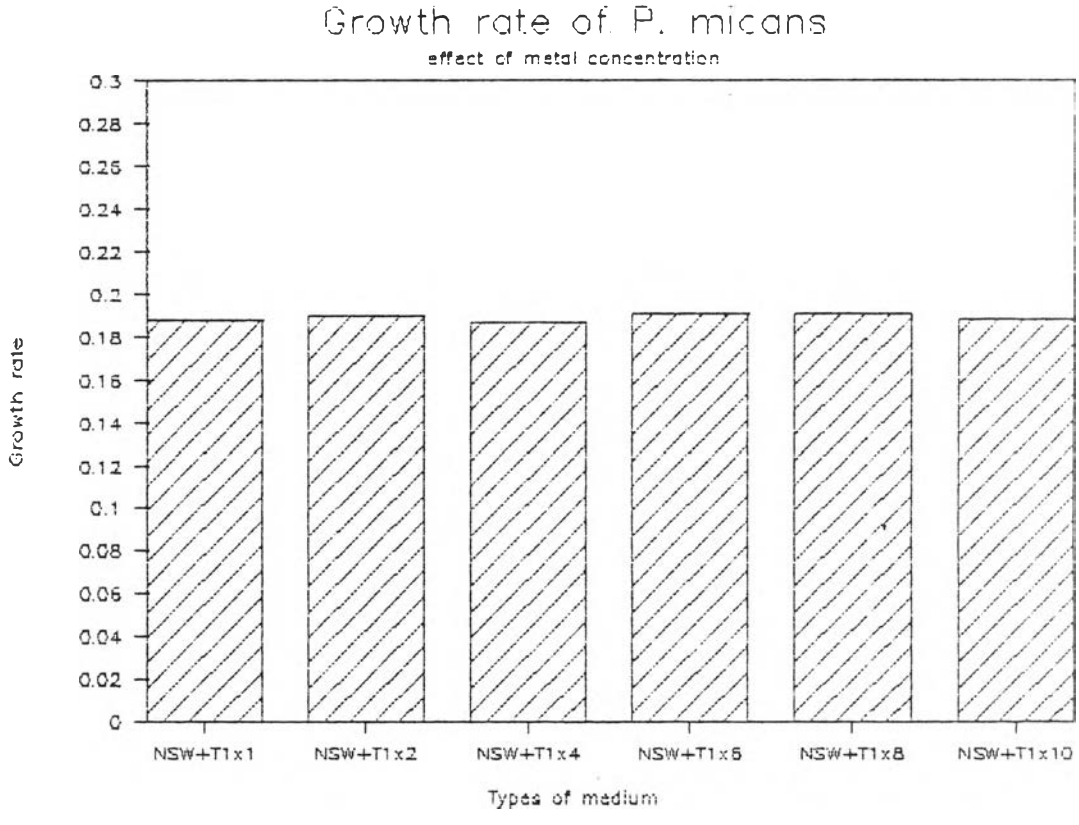
เมื่อทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างของอัตราการเจริญว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ ในระหว่างชุดการทดลองตามวิธีการวิเคราะห์โควาเรียนซ์ (ตารางที่ 7) จากผลการวิเคราะห์จะพบว่าค่าอัตราการเจริญของเซลล์ P. micans ที่มีการแปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า 4 เท่า 6 เท่า 8 เท่าและ 10 เท่า ของระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยเดิมที่เตรียมตามสารอาหารสูตร modified T1 ทุกชุดการทดลองได้ค่าอัตราการเจริญไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 5. การเจริญของ P. micans แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญเทียบกับเวลา (วัน) เมื่อได้รับอิทธิพลของสารอาหารที่มีการแปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยเพิ่มขึ้นเป็น 1 เท่า (□), 2 เท่า (+), 4 เท่า (◇), 6 เท่า (△), 8 เท่า (×) และ 10 เท่า (▽) ของระดับความเข้มข้นธาตุโลหะปริมาณน้อยตามสูตรอาหาร modified T1

ตารางที่ 6. อัตราการเจริญเฉลี่ยและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่าของ P. micans เมื่อได้รับอิทธิพลของสารอาหารที่แปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยเพิ่มขึ้นเป็น 1 เท่า (nsw+T1x1), 2 เท่า (nsw+T1x2), 4 เท่า (nsw+T1x4), 6 เท่า (nsw+T1x6), 8 เท่า (nsw+T1x8) และ 10 เท่า (nsw+T1x10), จากระดับความเข้มข้นธาตุโลหะปริมาณน้อยตามสูตรอาหาร modified T1

media	growth constant ($K_{10} \pm$ S.D.)	doubling time (D.T. (day))
nsw+T1x1	0.1877 + 0.002	1.60
nsw+T1x2	0.1897 + 0.010	1.59
nsw+T1x4	0.1871 + 0.007	1.61
nsw+T1x6	0.1915 + 0.005	1.57
nsw+T1x8	0.1908 + 0.002	1.58
nsw+T1x10	0.1885 + 0.007	1.60



รูปที่ 6. อัตราการเจริญเฉลี่ยของ P. micans เมื่อได้รับอิทธิพลของสารอาหารที่แปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยเพิ่มขึ้นเป็น 1 เท่า (nsw+T1x1), 2 เท่า (nsw+T1x2), 4 เท่า (nsw+T1x4), 6 เท่า (nsw+T1x6), 8 เท่า (nsw+T1x8) และ 10 เท่า (nsw+T1 x10) ของระดับความเข้มข้นธาตุโลหะปริมาณน้อยตามสูตรอาหาร modified T1

จากการสังเกตรูปร่างลักษณะของเซลล์ P. micans ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในขณะที่ได้รับอิทธิพลของการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยให้เพิ่มมากขึ้นตามลำดับนั้น พบว่าเซลล์ P. micans จะมีรูปร่างของเซลล์ปกติ ไม่พบลักษณะความผิดปกติของรูปร่างและขนาดของเซลล์ไปจากชุดการทดลองควบคุม

5. ผลของซีลิเนียม (Selenium) ที่มีผลต่อการเจริญของ P. micans

ทดลองเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ P. micans เมื่อได้รับอิทธิพลของธาตุโลหะซีลิเนียม ร่วมกับสารอาหาร modified T1 โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมต่างกันดังนี้ คือ

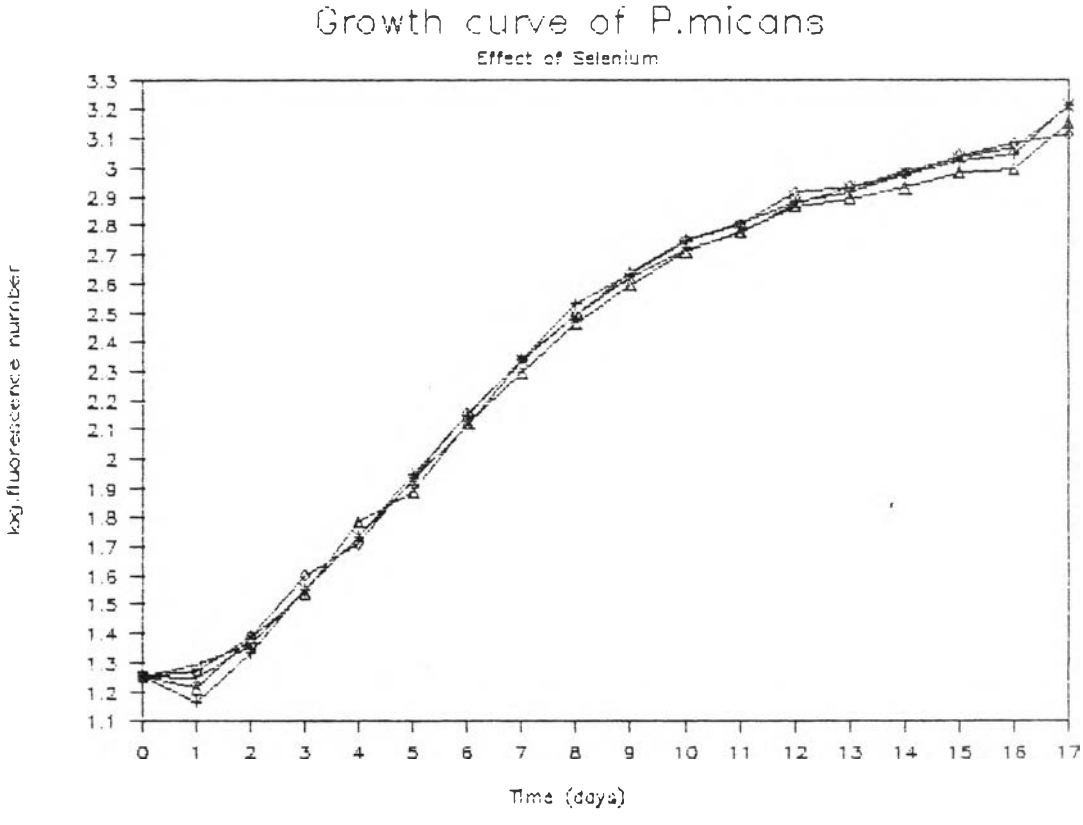
5.1 น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติเพิ่มสารอาหารสูตร modified T1 โดยองค์ประกอบในสูตร modified T1 ส่วนที่เป็น Trace metal solution นั้นจะเตรียมให้มีอัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio = 2:1 (nsw + T1 (2:1)) ใช้เป็นชุดทดลองควบคุม

5.2 น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมในทำนองเดียวกันกับข้อ 5.1 เพื่อดูผลของธาตุซีลิเนียมโดยเพิ่มสารละลาย H_2SeO_3 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ต่อน้ำเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 1 ลิตร (nsw+T1(2:1)+Se)

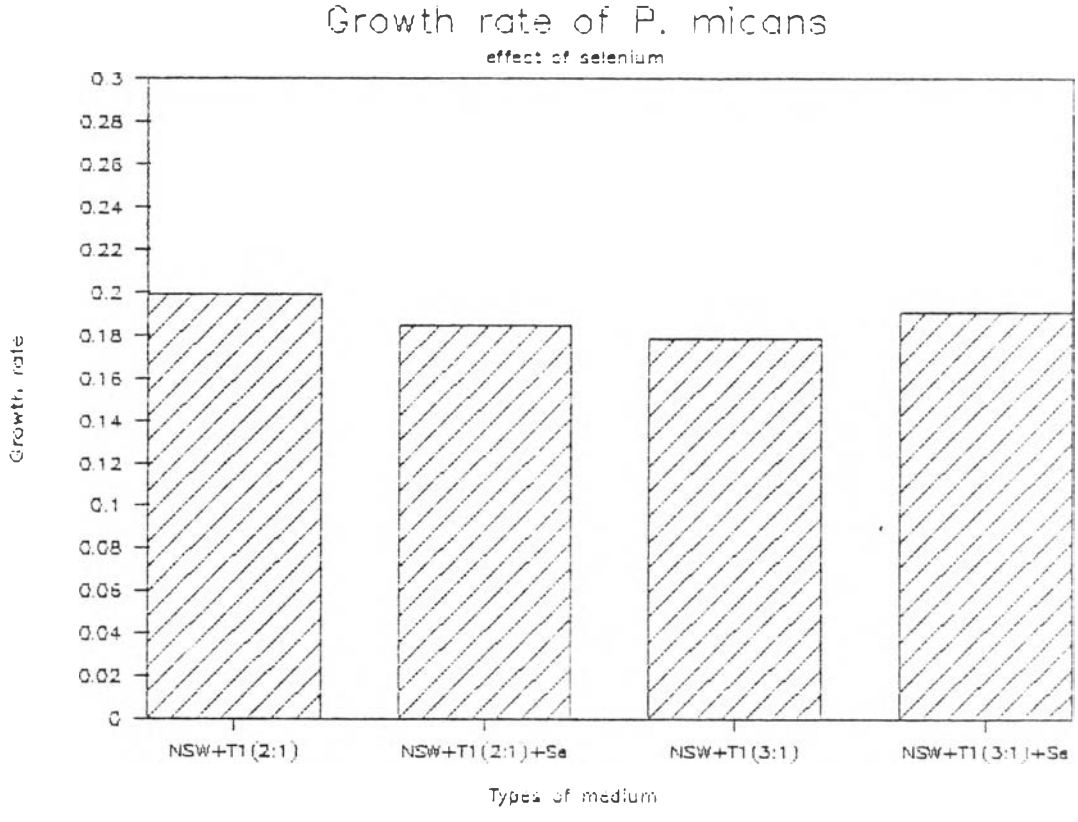
5.3 น้ำเลี้ยงเซลล์เซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติ เพิ่มสารอาหารสูตร modified T1 โดยในส่วนของ Trace metal solution นั้น เตรียมให้มีอัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio = 3:1 (nsw+T1(3:1))

5.4 น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมในทำนองเดียวกันกับข้อ 5.3 โดยเพิ่มสารละลาย H_2SeO_3 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ต่อน้ำเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 ลิตร

จากกราฟการเจริญ (รูปที่ 7) แสดงให้เห็นแนวโน้มของการเจริญของเซลล์อยู่ในระดับใกล้เคียงกันทั้งชุดการทดลองที่เตรียม Trace metal solution โดยเตรียมให้มีอัตราส่วนคีเลเตอร์ต่อปริมาณของธาตุโลหะเป็น 2:1 หรือ 3:1 และไม่ว่าจะเพิ่มหรือไม่เพิ่มสารละลายH_2SeO_3 ก็ตามจะมีอัตราการเจริญเฉลี่ยใกล้เคียงกัน (รูปที่ 8) โดยชุดการทดลองที่น้ำ



รูปที่ 7. การเจริญของ P. micans แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญเทียบกับเวลา (วัน) เมื่อได้รับอิทธิพลของธาตุซิลิเนียมร่วมกับสารอาหารสูตร modified T1 ; + : น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มสารอาหารโดยมีอัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio = 2:1 ; ◇ : น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มสารอาหารโดยมีอัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio = 2:1 และเพิ่มสารละลาย H_2SeO_3 ; △ : น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มสารอาหารโดยมีอัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio = 3:1 ; x : น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มสารอาหารโดยมีอัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio = 3:1 และเพิ่มสารละลาย H_2SeO_3



รูปที่ 8. อัตราการเจริญเฉลี่ยของ P. micans เมื่อได้รับอิทธิพลของธาตุซิลิเนียมร่วมกับสารอาหารสูตร modified T1 ที่ระดับอัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio = 2:1 และ 3:1 โดยแปรผันการใส่และไม่ใส่สารละลาย H_2SeO_3 ; nsw+T1(2:1) : น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มสารอาหารโดยมีอัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio = 2:1 ; nsw+T1(2:1) Se : น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มสารอาหารโดยมีอัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio = 2:1 และเพิ่มสารละลาย H_2SeO_3; nsw+T1(3:1) : น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มสารอาหารโดยที่อัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio = 3:1 ; nsw+T1(3:1)+Se : น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มสารอาหารโดยที่อัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio = 3:1 และเพิ่มสารละลาย H_2SeO_3

เลี้ยงเซลล์เตรียมโดยการเพิ่มสารอาหารที่ระดับอัตราส่วนดีเลเตอร์ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะเท่ากับ0.1989 และชุดการทดลองที่น้ำเลี้ยงเตรียมให้มีอัตราส่วนดีเลเตอร์ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะเท่ากับ 3:1 และไม่ใส่สารละลาย H_2SeO_3 จะมีอัตราการเจริญเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 0.1815(ตารางที่ 8)

เมื่อทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างของอัตราการเจริญในระหว่างแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธีวิเคราะห์โควาเรียนซ์ (ตารางที่ 9) จะพบว่าชุดการทดลองที่น้ำเลี้ยงเซลล์เตรียมโดยเพิ่มสารอาหารตามสูตร modidied T1 นั้น ผลที่ได้คือระดับอัตราส่วนของดีเลเตอร์ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อย 2:1 และ 3:1 ทั้งที่ใส่และไม่ใส่สารละลาย H_2SeO_3 นั้น ค่าอัตราการเจริญจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 8. อัตราการเจริญเฉลี่ยและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่าของ P. micans เมื่อได้รับอิทธิพลของธาตุซิลิเนียมร่วมกับสารอาหาร modified T1

nsw+T1(2:1) : น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มสารอาหาร โดยที่อัตราส่วนของ Chelate-metal ratio = 2:1

nsw+T1(2:1)+Se : น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มสารอาหารโดยที่อัตราส่วนของ Chelate-metal ratio = 2:1 และเพิ่มสารละลาย H_2SeO_3

nsw+T1(3:1) : น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มสารอาหาร โดยที่อัตราส่วนของ Chelate-metal ratio = 3:1

nsw+T1(3:1)+Se : น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มสารอาหารโดยที่อัตราส่วนของ Chelate-metal ratio = 3:1 และเพิ่มสารละลาย H_2SeO_3

media	growth constant ($K_{10} \pm$ S.D.)	doubling time (D.T. (day))
nsw+T1(2:1)	0.1989 + 0.001	1.51
nsw+T1(2:1)+se	0.1862 + 0.014	1.62
nsw+T1(3:1)	0.1815 + 0.026	1.66
nsw+T1(3:1)+se	0.1904 + 0.012	1.58