บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์และสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

1.1 การเตรียมอุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ในการเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช

ขวดแก้วที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและอุปกรณ์เครื่องแก้วอื่น ๆ ต้องผ่านการทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างแก้ว (liquid detergent) แช่ในกรดเกลือ (HCl) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ ล้างให้สะอาดด้วยน้ำ และตามด้วยน้ำกลั่นอย่างน้อย 2 ครั้ง อุปกรณ์ทุกอย่างต้องปลอดเชื้อด้วยการอบความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 1.25 บรรยากาศ เป็นเวลา 30 นาที แล้วอบให้แห้งด้วยไอร้อน (heat dry)

1.2 การเตรียมน้ำทะเล

น้ำทะเลสำหรับที่จะใช้เป็นน้ำเลี้ยงนั้น ใช้น้ำทะเลธรรมชาติที่นำมาเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลานาน แล้วกรองน้ำทะเลผ่านแผ่นกรอง GF/C ปรับความเค็มให้เท่ากับ 30 ส่วนในพันส่วน ด้วยน้ำกลั่น แล้วเก็บไว้ในภาชนะพลาสติกที่มีฝาปิดมิดชิด น้ำทะเลที่ใช้ในการเตรียมน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนจะเป็นน้ำทะเลที่เก็บมาในคราวเดียวกันใช้ตลอดการทดลอง

1.3 สารอาหาร

สารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน เตรียมจากสูตรอาหาร modified T1 (Dr. Takashi Ishimaru, ติดต่อส่วนตัว, 1987) ซึ่งประกอบไปด้วยสารประกอบต่าง ๆ หลายชนิด โดยการเตรียมสารประกอบแต่ละตัวแยกเป็นสารละลายเริ่มต้นแล้วทำเป็นสารละลายผสมชนิดเข้มข้น (stock solution) ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบดังนี้

modified T1

1.	Tris-HCl buffer (pH 8.0)	5.0	โมลาร์
2.	$NaNO_3$	1.0	โมลาร์
3.	NaH_2PO_4	0.1	โมลาร์
4.	Fe-EDTA	0.005	โมลาร์
5.	Mixed Vitamin Solution *		
6.	Mixed Trace-metals Solution **		

เติมสารละลายผสมชนิดเข้มข้นนี้ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในน้ำทะเล 1 ลิตร

หมายเหตุ * Mixed Vitamin Solution

1.	Thiamine HCl	200	มิลลิกรัมต่อลิตร
2.	Biotin	1	มิลลิกรัมต่อลิตร
3.	Cyanocobalamin	1	มิลลิกรัมต่อลิตร

** Mixed Trace-metal Solution

1.	$ZnSO_4$	0.001	โมลาร์
2.	$MnCl_2$	0.01	โมลาร์
3.	$NaMoO_4$	0.0005	โมลาร์
4.	$CoCl_2$	0.0002	โมลาร์
5.	$CuSO_4$	0.00001	โมลาร์
6.	EDTA (as Na_2 salt)	0.024	โมลาร์

ปรับ pH เป็น 10.0 แล้วต้มสารละลายที่ได้เป็นเวลา 30 นาที

ตามหลักการ การสร้างสูตรอาหาร modified T1 ในส่วนของ Mixed Trace-metal Solution นั้นอัตราส่วนของ EDTA ต่อธาตุโลหะปริมาณน้อย (Chelate-metal mole ratio) เตรียมให้มีอัตราส่วนเท่ากับ 2:1

1.4 การเตรียมตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมสำหรับการเพาะเลี้ยงในการทดลอง

ได้จัดสภาพแวดล้อมภายในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ให้คงที่ตลอดการทดลองไว้ดังนี้

- ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 30±1 องศาเซลเซียส
- ปริมาณความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ที่ให้แสงสีขาวเย็น (cool white fluorescent) โดยปรับระยะให้ชวดเพาะเลี้ยงเซลล์ได้รับแสงที่มีความเข้มแสงประมาณ 4,000 ลักซ์
- ปรับช่วงเวลาที่แพลงก์ตอนพืชใช้ในการสังเคราะห์แสง ช่างเวลาสว่างต่อช่วงเวลามืด (Light : Dark cycle; L : D) เท่ากับ 14 : 10 ชั่วโมง

1.5 การเตรียมแพลงก์ตอนพืชสำหรับใช้ในการทดลอง

แพลงก์ตอนพืชที่ใช้ในการทดลองคือไดโนแฟลกเจลเลตชนิด Prorocentrum mican ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเลธรรมชาติ บริเวณชายฝั่งแหลมแท่น จังหวัดชลบุรี ในเดือนมิถุนายน พ.ศ.2530 นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการแยกเซลล์เดี่ยว ๆ แล้วเริ่มต้นเพาะเลี้ยงจากเซลล์เดี่ยวแบบปลอดเชื้อ (clonal axenic culture) ตามวิธีการ Isolation and Purification for microflagellate and nannoplankton (Guillard, 1973a) การปฏิบัติทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic technique)

1.6 การเตรียม stock culture และวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในการทดลอง

การเตรียม stock culture เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สำหรับใช้ในการทดลองเริ่มจากการเตรียมน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนนำน้ำทะเลที่เตรียมไว้ตามข้อ 1.2 เติมสารละลาย

Tris-HCl buffer ในอัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตร ในน้ำทะเล 1 ลิตร เพื่อป้องกันการตกตะกอนของเกลือในน้ำทะเล และสารอาหารที่เตรียมแยกไว้แต่ละชนิด บรรจุลงในขวดแก้ว (vial) นำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการอบความดันไอน้ำตามสภาวะดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลา 20 นาที แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลายตามสูตรอาหาร modified T1 ลงในน้ำทะเล โดยกระทำภายใต้ตู้ถ่ายเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลลินทรีย์แล้วด้วยแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อป้องกันการปนเปื้อน (contamination)

สารละลายที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร modified T1 โดยเฉพาะ Mixed Vitamin Solution สามารถทำให้ปลอดเชื้อได้ด้วยวิธีการอบความดันไอน้ำ (autoclave) (Brand, Sunda และ Guilland, 1983) โดยที่ไวตามินทั้ง 3 ชนิดจะไม่ถูกทำให้สูญเสียสภาพ (decompose) คือจะคงสภาพอยู่ได้ในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด (Mclachlan, 1973)

หลังจากเตรียมน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนตามขบวนการข้างต้นนี้แล้วทำการถ่ายเชื้อ P. micans ที่เตรียมไว้ตามข้อ 1.5 ลงในน้ำเลี้ยงให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น (initial concentration) ที่ใช้ในการทดลองประมาณ 480-560 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากการศึกษาเบื้องต้นได้พบว่าเป็นความหนาแน่นที่เหมาะสมในการแสดงแบบแผนการเจริญเติบโต (groth pattern) ของ P. micans โดยทำในตู้ถ่ายเชื้อแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่จัดเตรียมสภาพแวดล้อมตามที่กล่าวแล้วข้างต้น

ทำการสุ่มตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาวัดการเจริญทุกวัน ที่เวลาเดียวกันด้วยเครื่อง fluorometer ซึ่งจัดเป็นอีกวิธีหนึ่งในการประเมินผลผลิต (biomass) ของแพลงก์ตอนพืชโดยวิธีวิเคราะห์หาปริมาณรงควัตถุ (pigment) ภายในเซลล์คือ คลอโรฟิลล์ เอ ซึ่งอาศัยหลักการของ fluorescence effect ที่ว่า คลอโรฟิลล์ เอ สามารถที่จะปลดปล่อยแสงสีแดงออกมาได้หลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแสงสีน้ำเงิน (Breemen, 1982) ในการทดลองนี้จะเป็นการวัดแบบ in vivo fluorescence ตามวิธีการของ Brand, Guillard และ Murphy (1981) หลังจากนั้นดองเซลล์ด้วยฟอร์มาลีนที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ แล้วนำไปวัดการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ (cell counting measurement) ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ Sedgwick-Rafter counting chamber เพื่อเปรียบเทียบและหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการ

เจริญที่อ่านได้จาก fluorometer (ซึ่งเป็นเครื่องตรวจวัดที่ดัดแปลงและสร้างขึ้นโดย Dr. Ishimaru) กับค่าจำนวนเซลล์ที่ได้จากการนับเซลล์เพื่อใช้เป็นข้อมูลมาตรฐาน (Standardized calibration curve) เมื่อต้องการทราบค่าจำนวนเซลล์โดยการประมาณจากค่าที่วัดได้ด้วยเครื่อง fluorometer (fluorescence number)

2. วิธีการทดลอง

2.1 การทดลองเบื้องต้นเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ P. micans เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลธรรมชาติที่ถูกนำไปฆ่าเชื้อและไม่ได้เติมสารอาหารกับเมื่อเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เติม สารอาหารตามสูตรอาหาร modified T1

2.2 ทดลองหาระดับอัตราส่วนของ EDTA ต่อผลรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อย (chelate-metal mole ratio) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ P. micans โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยสูตรอาหาร modified T1 โดยในส่วนของ Mixed Trace-metals solution ทำการแปรผันอัตราส่วนของ EDTA กับผลรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อยเป็น 3:1, 5:1, 10:1, 15:1 และ 20:1 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับหน่วยทดลองที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในสูตรอาหาร modified T1 เป็นหน่วยทดลองควบคุม (control unit)

2.3 ทดลองหาระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อย ได้แก่ สังกะสี แมงกานีส โมลิบดินัม โคบอลต์ และทองแดงที่เหมาะสมต่อการเจริญของ P. micans โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยสูตรอาหาร modified T1 โดยในส่วนของ Mixed Trace-metals solution ทำการแปรผันความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด ให้เพิ่มขึ้นไปพร้อม ๆ กัน ในระดับ 2 เท่า 4 เท่า 6 เท่า 8 เท่า และ 10 เท่าตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนของ EDTA ต่อ ธาตุโลหะปริมาณน้อย คงที่ ตามผลการทดลองที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.2 เปรียบเทียบกับหน่วยทดลองที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในสูตรอาหาร modified T1 เป็นหน่วยทดลองควบคุม

2.4 ศึกษาผลของ Selenium ต่อการเจริญของเซลล์ P. micans โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยสูตรอาหาร modified T1 ทำการเปรียบเทียบระหว่างการใส่ Selenic

acid และไม่ใส่ Selenic acid

ทุกขั้นตอนทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยสุ่มตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาวัดการเจริญทุกวันที่เวลาเดียวกัน ด้วยเครื่อง Fluorometer นำผลการเจริญที่วัดได้ไปคำนวณหาค่าอัตราการเจริญ และทำการวิเคราะห์ เปรียบเทียบทางสถิติต่อไป

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การคำนวนหาอัตราการเจริญ (Growth rate)

จากข้อมูลการเจริญนำมาเขียนกราฟการเจริญ (growth curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของ fluorescence number กับเวลาเป็นวัน แล้วคำนวณหาอัตราการเจริญจากความสัมพันธ์ดังกล่าวโดยเลือกช่วงของการเจริญที่อยู่ในระยะ exponential phase โดยวิธีสมการถดถอยกำลังสอง (By least-square fit of a straight line to the data, logarithmically transformed) (Guillard, 1973) ตามสมการดังนี้

$N = No\ e^{Ke.t}$

$\log N = \log No + K_e.t \log(e)$

จาก $\log(e) = 0.4343$

$\log N = \log No + 0.4343\ K_e.t$

จาก $K_e = (0.6931)\ k$

$\log N = \log No + (0.4343)(0.6931)\ k.t$

$\log N = \log No + 0.3010\ k.t$

จาก $k = 3.322\ K_{10}$

$\log N = \log No + (0.3010)(3.322)\ K_{10}.t$

$\log N = \log No + 0.999922\ K_{10}.t$

$\log N = \log No + K_{10}.t$

แทนค่า N ด้วย Fl

$$\log Fl = \log Flo + K_{10}.t$$

เมื่อ Fl = ค่าการเจริญที่อ่านได้จาก fluorometer (fluorescence number)

K_{10} = อัตราการเจริญ

t = เวลา

ส่วนเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้เป็นสองเท่า (Doubling Time) คำนวณได้จากสมการ

$$D.T. = \log 2 / K_{10} \text{ วัน}$$

3.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการเจริญ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญของเซลล์โดยใช้สถิติการวิเคราะห์โควาเรียนซ์ (Analysis of covariance) ตามวิธีของ Zar (1974) ตามตารางวิเคราะห์โควาเรียนซ์ ดังนี้

ตารางวิเคราะห์โควาเรียนซ์แบบเปรียบเทียบรีเกรซชันมากกว่า 2 ค่า

source	Σx^2	Σxy	Σy^2	Residual SS	Residual DF
Regression 1	A_1	B_1	C_1	$SS_1 = C_1-(B_1^2/A_1)$	$DF_1 = n_1-2$
Regression 2	A_2	B_2	C_2	$SS_2 = C_2-(B_2^2/A_2)$	$DF_2 = n_2-2$
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
Regression k	A_k	B_k	C_k	$SS_k = C_k-(B_k^2/A_k)$	$DF_k = n_k-2$
"Pooled"regression				$SS_p = \sum_{i=1}^{k} SS_i$	$DF_p = \sum_{i=1}^{k}(n_i-2)$
"Common"regression	$A_c = \sum_{i=1}^{k} A_i$	$B_c = \sum_{i=1}^{k} B_i$	$C_c = \sum_{i=1}^{k} C_i$	$SS_c = C_c-(B_c^2/A_c)$	$DF_c = \sum_{i=1}^{k} n_i-k-1$

To test for differences between slope

Ho : $B_1 = B_2 = \ldots = B_k$

Ha : All k B's are not equal

$F = [(SS_c-SS_p)/k-1] / [SS_p/DF_p]$

Since F 0.05(2), k-1, DF_p

โดยตั้งสมมติฐาน (null hypothesis) ว่าอัตราการเจริญเฉลี่ยของเซลล์ไม่มีความแตกต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์