รายงานวิจัย

เรื่อง

ผลกระทบเนื่องจากการผันแปรไนโตรเจนในสูตรน้ำเลี้ยงต่ออัตราการดูดซึมฟอสฟอรัสในแพลงก์ตอนพืช

Effect of Changes in Media Nitrogen Source on Phosphorus Uptake Rates in Phytoplanktons

ผู้วิจัย

พิกุล วณิชาภิชาติ* และ ชิดา เพชรมณี**

*ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา

**หน่วยอาหารมีชีวิต สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา

แหล่งทุนอุดหนุนวิจัย :

งบประมาณแผ่นดิน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ปี 2538-2539

Order Key 18722

BIB Key 156406

250 เลขหมู่ QK938 Y16P 25

- 8 เม.ย. 2542

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ใช้สารละลายเกลือรังสี $NH_4H_2{}^{32}PO_4$ เพื่อศึกษาการดูดซึมฟอสฟอรัสในแพลงก์ตอนพืชน้ำเค็ม 4 ชนิดคือกลุ่มสาหร่ายสีเขียว 2 ชนิด *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis* sp. และกลุ่มไดอะตอม 2 ชนิด *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. งานในขั้นตอนแรก ศึกษาความเหมาะสมในการใช้ $NH_4H_2{}^{32}PO_4$ เพื่อติดตามการดูดซึมฟอสฟอรัส โดยเปรียบเทียบระหว่างอัตรานับรังสีกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ในสูตรอาหารมาตรฐาน 3 สูตรคือ Sato&Serikawa Conway และ Guillard ในขั้นตอนที่สอง ศึกษาอัตรานับรังสีในเซลล์เมื่อผันแปรปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำทะเลเทียม โดยให้เกลือ NH_4Cl และ K_2HPO_4 เป็นแหล่งให้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสตามลำดับ ขั้นตอนที่สามศึกษาการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนที่อัตราส่วนระหว่างไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในระดับต่างๆ ทุกการทดลองกระทำภายใต้แสง 3000 ลักซ์และอุณหภูมิ 28^{o} เซลเซียส

เมื่อศึกษาการดูดซึมของ $NH_4H_2{}^{32}PO_4$ ในแพลงก์ตอนทั้ง 4 ชนิด พบว่าตลอดช่วงเวลา 1-5 ชั่วโมง *Chlorella* sp และ *Tetraselmis* sp. มีอัตรานับรังสีในน้ำเลี้ยงสูตร Sato&Serikawa สูงกว่าในน้ำเลี้ยงสูตร Conway ขณะที่ *Chaetoceros* sp. มีอัตรานับรังสีในน้ำเลี้ยงสูตร Conway สูงกว่า ส่วน *Skeletonema* sp. มีอัตรานับรังสีในน้ำเลี้ยงสูตร Guillard สูงกว่าในน้ำเลี้ยงสูตร Sato&Serikawa เล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงสูตรดังกล่าว พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์สอดคล้องกับอัตรานับรังสี แสดงว่าฟอสฟอรัสเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ และสามารถใช้สารละลายเกลือรังสี $NH_4H_2{}^{32}PO_4$ แทนการรับฟอสฟอรัสจากน้ำเลี้ยง เพื่อศึกษาการเจิญเติบโตในแพลงก์ตอนเหล่านี้ได้

การศึกษาในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว ได้ใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 2 ระดับคือ 1 μM และ 10 μM และสำหรับกลุ่มไดอะตอมใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 3 ระดับคือ 1 μM 20μM และ 40 μM ขณะที่การผันแปรความเข้มข้นของฟอสเฟต 5 ระดับคือ 1μM 2μM 5μM 10 μM และ 20 μM เมื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงได้ใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมและฟอสเฟตเดียวกันกับที่ใช้ในกลุ่มไดอะตอม พบว่าเมื่อให้ระดับฟอสเฟตคงที่ การเพิ่มระดับแอมโมเนียมในน้ำทะเลเทียม ทำให้อัตรานับรังสีเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อให้แอมโมเนียมคงที่อัตรานับรังสีในเซลล์ *Chlorella* sp. และ *Skeletonema* sp. ไม่ขึ้นกับการเพิ่มปริมาณฟอสเฟตในน้ำทะเลเทียม และกลับทำให้อัตรานับรังสีในเซลล์ *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. ลดลง อย่างไรก็ดีผลอัตรานับรังสีในเซลล์ *Skeletonema* sp. ค่อนข้างแปรปรวน เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลเทียมที่มีระดับแอมโมเนียมและฟอสเฟตต่างๆ พบว่า *Chlorella* sp. *Tetraselmis* sp.และ *Chaetoceros* sp. มีการเติบโตดีที่สุดที่อัตราส่วนเดียวกันกับที่พบด้วยการศึกษาอัตรานับรังสี จึงสรุปว่าอัตราส่วน N:P ในหน่วยโมลที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ทั้ง 3 ชนิดนี้คือ 1:1 20:1 และ 40:1 ตามลำดับ ส่วนการศึกษาในเซลล์ *Skeletonema* sp. แม้ว่าผลจากการศึกษาด้วยรังสีซึ่งวิเคราะห์ผลเชิงสถิติด้วยวิธี ANOVA จะสรุปว่าอัตราส่วน N:P ที่เหมาะสมน่าจะเป็น 40:1 และ 40:20 แต่

ผลจากการเพาะเลี้ยงพบว่า แม้อัตราส่วน 40:20 ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าแต่เซลล์รอดตายน้อย จึงสรุปว่าอัตราส่วน 40:1 น่าจะเหมาะสมสำหรับเซลล์ชนิดนี้เนื่องจากเซลล์มีอัตรารอดตายสูงกว่า

ในงานวิจัยนี้พบว่าอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมและฟอสเฟตที่ผันแปรในน้ำทะเลเทียมค่อนข้างสูง และการสุ่มตัวอย่างที่สิ้นสุดเวลา 1 ชั่วโมงอาจนานเกินไป ทำให้ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการนับในเซลล์และปริมาณฟอสเฟตที่ผันแปรไม่เป็นไปตามสมการ Michaelis-Menten

---

Key Words: **Radioisotope Technique, Phytoplankton, Phosphorus Uptake, N:P Ratios, Specific Growth Rate**

Abstract

This work used a radioisotope salt, $NH_4H_2\ ^{32}PO_4$ to study the uptake of phosphorus in 4 marine phytoplanktons. These were two green algae *Chlorella* sp. and *Tetraselmis* sp. and two diatom *Chaetoceros* sp. and *Skeletonema* sp. The first part was to determine whether the salt was a suitable tracer for phophorus uptake. This was done by comparing cell count rate with cell growth. Standard media used for cell culturing were Sato&Serikawa, Conway and Guillard. The second part was to determine the count rates of phophorus in the cells under variation of nitrogen and phosphorus in an artificial sea water (ASW). NH_4Cl and K_2HPO_4 salts were used as sources for nitrogen (N) and phosphorus (P), respectively. The third part was the study of cell growth under various N:P ratios in the ASW. All experiments were carried out under 3,000 lux light intensity at about 28^0 Celcius.

When the uptake of $NH_4H_2\ ^{32}PO_4$ was followed from 1 hour to 5 hours in *Chlorella* sp. and *Tetraselmis* sp., both cell species showed greater P-32 count rates in Sato&Serikawa than in Conway medium. In contrast, *Chaetoceros* sp. showed a greater count rate in Conway medium. Comparing the count rates in *Skeletonema* sp. growth in Sato&Serikawa and Guillard, it was found that the count rates for cells grown in the former were slightly smaller than in the latter. Similar results were found when the cells were grown in the media and the cell density was compared. The consistency between the count rates and the cell growth implied that cells utilized phosphorus partially for growth and the radioactive salt could represent P uptake into these cells.

The concentration of ammonium in the ASW was varied as 1μM and 10μM for the study in green agae, and as 1μM 20μM and 40 μM for diatom. That of phosphate was varied as 1μM, 2μM, 5μM, 10μM and 20μM. There appeared that at constant phosphate concentration, an increase in ammonium concentration increased the P-32 count rates significantly. When ammonium concentration was kept constant, P-32 count rates in *Chlorella* sp. and *Skeletonema* sp. did not depend on the increase in phosphate concentration of the ASW. In contrast, the increased phosphate reduced the count rates in *Tetraselmis* sp.and *Chaetoceros* sp. It was observed that radioisotope counts in *Skeletonema* sp. was fairly variable. After culturing these cell species in an ASW under several ammonium and phosphate ratios, it was observed that *Chlorella* sp. *Tetraselmis* sp. and *Chaetoceros* sp. provided better cell growth under the same N:P ratios as found in the uptake studies. It was therefore concluded that suitable N:P ratios for the above three plankton species were 1:1, 20:1 and 40:1, respectively. The statistical analysis for block design using ANOVA method indicated that possible N:P ratios for *Skeletonema* sp. were both 40:1 and 40:20. In growth studies, cells reached the maximum density sooner for 40:20 ratio and less cell survival was observed. It was thus concluded that the 40:1 ratio was more suitable for *Skeletonema* sp., due to the greater survival rate.

In this study, the phosphate concentrations used was rather high and 1 hour for P-32 uptake might be too long that the count rates and the varied phosphate concentrations in the ASW did not obey Michaelis-Menten relation.

Key Words: **Radioisotope Technique, Phytoplankton, Phosphorus Uptake, N:P Ratios, Specific Growth Rate**

สารบาญ

กิตติกรรมประกาศ A-1

บทคัดย่อ A-2

สารบาญ B-1

สารบาญรูป B-3

สารบาญตาราง B-4

1 บทนำ 1-1

ที่มาของปัญหาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 1-1

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 1-3

2 วิธีการ 2-1

การเพาะเลี้ยงเซลล์ 2-1

การเตรียมภาชนะเพื่อศึกษาการดูดซึม P-32 2-1

การเตรียมเซลล์เพื่อศึกษาการดูดซึม P-32 2-2

การติดฉลากรังสี 2-2

การ::าอัตรานับรังสี P-32 2-3

3 ผลการทดลอง 3-1

3.1 *ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดซึมรังสีกับการเพิ่มจำนวนเซลล์* 3-1

การศึกษาในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis* sp. 3-1

การศึกษาในไดอะตอม *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. 3-2

3.2 *การดูดซึมฟอสฟอรัสในแพลงก์ตอนกลุ่มสาหร่ายสีเขียว Chlorella sp. และ Teraselmis sp. เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมและฟอสเฟต* 3-7

ทดสอบการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลเทียมที่ไม่มีแอมโมเนียมและฟอสเฟต 3-7

อัตรานับของ P-32 ในน้ำทะเลเทียมที่ไม่มีแอมโมเนียมโดยเปลี่ยนระดับความเข้มข้นของฟอสเฟต 3-7

อัตรานับของ P-32 ในน้ำทะเลเทียมเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียม 2 ระดับ 3-8

3.3 *การดูดซึมฟอสฟอรัสในแพลงก์ตอนกลุ่มไดอะตอม Chaetoceros sp. และ Skeletonema sp. เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมและฟอสเฟต* 3-16

อัตรานับของ P-32 ในน้ำทะเลเทียมที่ผันแปรระดับแอมโมเนียมและฟอสเฟต 3-16

ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ในน้ำทะเลเทียมที่มีระดับแอมโมเนียมและฟอสเฟตต่างๆกัน 3-18

3.4 *การศึกษาเชิงจลนพลศาสตร์* **3-25**

อัตรานับรังสีภายในเซลล์เทียบกับความเข้มข้นของสับสเตรดที่ผันแปร 3-25

อัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์เทียบกับความเข้มข้นของสับสเตรดที่ผันแปร 3-26

4 สรุปผลและวิจารณ์ **4-1**

ความเหมาะสมของการใช้สารละลายเกลือรังสี $NH_4H_2{}^{32}PO_4$ 4-1

อัตราส่วนระหว่างไนโตรเจน (N) และฟอสฟอรัส (P) ที่เหมาะสม 4-1

การวิเคราะห์เชิงสถิติโดยวิธี ANOVA 4-4

การศึกษาเชิงจลนพลศาสตร์ 4-4

5 เอกสารอ้างอิง **5-1**

ภาคผนวก ก 5-3

ภาคผนวก ข 5-5

ภาคผนวก ค 5-9

สารบาญรูป

Fig. 1 Showing P-32 uptake into *Chlorella* sp (C) and *Tetraselmis* sp. (T) grown in Conway (C) and Sato&Serikawa (S) 3-3
Fig. 2 Growth of *Chlorella* sp. (C) and *Tetraselmis* sp. (T) in Sato&Serikawa (S) and Conway (C) from two experiments. 3-4
Fig. 3 Count rates of P-32 (a) in *Chlorella* sp. (C) and *Tetraselmis* sp.(T) and (b)in *Chaetoceros* sp.(Chae) and *Skeletonema* sp. (Skel) under different culture media: 3-5
Fig. 4 Cell density of *Chaetoceros* sp. (a) and *Skeletonema* sp. (b) cultured in Sato&Serikawa (S), Conway (C) and Guillard (G); averaged from 3 batches. 3-6
Fig. 5 P-32 in *Chlorella* sp. in ASW solution without nitrogen source. Data was averaged from 3 experiments at pH=7.4 and 161 cpm in 10μl blank solution.. 3-10
Fig. 6 P-32 in *Tetraselmis* sp. in ASW solution without nitrogen source. Data was averaged from 3 experiments at pH=7.4, 161 cpm in 10μl blank solution. 3-12
Fig. 7 Comparing P-32 count rates in *Chlorella* sp. at constant N level, 1 μM, and varied PO_4^{3-} levels. 3-13
Fig. 8 P-32 count rates for 60 minute uptake in *Chlorella* sp., comparing between N=1 and 10 μM. Data was averaged from 2 experiments. 3-13
Fig. 9 Growth of *Chlorella* sp. for 7 days in an artificial sea water under 4 ammonium levels 3-14
Fig. 10 The uptake of P-32 into *Tetraselmis* sp. under various N:P ratios. 3-14
Fig. 11 Comparing the growth of *Tetraselmis* sp. in an artificial sea water under various N:P ratios 3-15
Fig. 12 Comparing count rate in *Chaetoceros* sp. under various N:P ratios at the end of 1 hour (a), 2 hours (b) and 3 hours (c). 3-19
Fig. 13 Comparing count rates in *Skeletonema* sp. under various N:P ratios at the end of 1 hour (a), 2 hours (b) and 3 hours (c). 3-20
Fig. 14 Count rate (cpm) in 4 plankton species under different ammonium (N) and phosphate (P) concentration in the ASW. 3-26
Fig. 15 Specific growth rate for 4 plankton species under variation of PO_4^{3-} concentration in ASW. 3-27
Fig. 16 Growth of *Tetraselmis* sp. in the artificial sea water for constant phosphate level at 2 μM, under variation of 3 ammonium levels. 4-2

สารบาญตาราง

Table 1 Four standard media for cell culturing 2-1
Table 2 Amount of solutions added (in μl) into the 30 ml prepared cells for P-32 uptake studies. 2-3
Table 3 Cell density of *Chlorella* sp. and *Tetraselmis* sp. after being suspended in an artificial sea water (ASW), averaged from 3 experiments. 3-7
Table 4 Cell density for *Chaetoceros* in ASW, averaged from 3 replicates 3-21
Table 5 Cell density of *Sketonema* sp in ASW, averaged from 3 replicates. 3-23
Table 6 Comparing maximum specific growth rates for 4 plankton species under suitable nitrate concentration in the ASW. 3-28
Table 7 Comparing N:P mole ratios suitable for cell growth in the ASW for four phytoplankton species in this study and in the standard culture media. 4-3
Table 8 Nutrient composition of culture media for phytoplankton growth in laboratory. 5-3
Table 9 Nutrient composition in the artificial sea water used in this study. 5-4
Table 10 Comparing P-32 count rates in 15 treatments of *Chaetoceros* sp. and *Skeletonema* sp. under different ammonium and phosphate concentration in ASW. 5-10

---

1 บทนำ

กุ้งกุลาดำเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ และเป็นธุรกิจที่มีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่เพาะเลี้ยงกุ้งประมาณ 450,000 ไร่ ทำให้ไทยกลายเป็นผู้นำในการส่งออกกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์ไปยังตลาดโลก นำรายได้สู่ประเทศปีละกว่า 50,000 ล้านบาท (สิริ, 2541) ส่วนการเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดอื่น เช่นปลากะพงขาวและปลากะรังก็ทำรายได้ให้กับเกษตรกรไม่น้อย เพราะเป็นปลาเนื้อนุ่ม มีรสชาติดี เป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย (สุพจน์และคณะ, 2527) พันธ์สัตว์น้ำเกือบทั้งหมดที่นำมาเลี้ยงให้ได้ขนาดตามตลาดต้องการได้มาจากการเพาะและอนุบาลในโรงเพาะฟัก

เมื่อจัดลำดับห่วงโซ่อาหารในแหล่งน้ำธรรมชาติ จะพบว่าห่วงโซ่เริ่มต้น ที่แพลงก์ตอนพืชและสิ้นสุดลงที่สัตว์น้ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหารของสัตว์น้ำไม่ทางตรงก็ทางอ้อม ในการเพาะและอนุบาลลูกสัตว์น้ำ แพลงก์ตอนพืชจึงมีบทบาทสำคัญ โดยเฉพาะในประเทศไทยซึ่งมีอากาศร้อนชื้น แม้จะใช้อาหารไม่มีชีวิตได้ก็ต้องประสบกับปัญหาคุณภาพน้ำเสื่อมลงเร็วกว่าการใช้อาหารมีชีวิต เช่นแพลงก์ตอนพืช นักเพาะเลี้ยงนิยมใช้แพลงก์ตอนพืชในกลุ่มไดอะตอมคือ *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* costatum หรือแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวคือ *Chlorella* sp. และ *Tetrtaselmis* sp. ถูกใช้เป็นอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์คือ โรติเฟอร์ *Brachionus plicatilis* ซึ่งเป็นอาหารของลูกกุ้งต่อจากแพลงก์ตอนพืช และเป็นอาหารเริ่มแรกของลูกปลากะพงขาวและลูกปลาอื่นๆ (ธิดา, 2541)

การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชจึงเป็นกิจกรรมหนึ่ง ในขบวนการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีค่าทางเศรษฐกิจเช่นกุ้งกุลาดำและปลากะพงขาว การเพาะเลี้ยงและการจัดการให้มีผลผลิตของแพลงก์ตอนพืชเพียงพอแก่ความต้องการของลูกสัตว์น้ำอย่างต่อเนื่องยังเป็นปัญหาที่ต้องศึกษาวิจัยเพื่อหาทางแก้ไข (Jones et. al., 1993) ในประเทศไทยได้มีการศึกษาหลายแง่มุมเช่น การศึกษาพิษเฉียบพลันของแคดเมียมต่อแพลงก์ตอนพืชพวก *Chaetoceros* sp. และ *Chlorella* sp. (ปรอง, 2530) การใช้สารประกอบคลอรีนควบคุมโปรโตซัวในการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. (ธิดาและมาวิทย์, 2532) และปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ *Chlorella* sp. และ *Chaetoceros* sp. (ธิดา และประกิต, 2527; มาวิทย์และธิดา, 2534) อย่างไรก็ตามสารอาหารหรือปุ๋ยที่แพลงก์ตอนพืชต้องการเพื่อการเจริญเติบโต เป็นปัจจัยสำคัญซึ่งเซลล์แต่ละชนิดมีความต้องการแตกต่างกันในบรรดาสารอาหารหลายชนิด ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็นอาหารหลักที่แพลงก์ตอนต้องการในปริมาณมาก การรู้ปริมาณสารต่ำที่สุด ที่จะทำให้แพลงก์ตอนพืชเจริญเติบโตได้ดีที่สุด จะช่วยลดต้นทุนได้มาก การใส่สารอาหารมากเกินจำเป็นนอกจากจะสิ้นเปลืองแล้ว การเกิดตะกอนทำให้แพลงก์ตอนนำไปใช้ไม่ได้ (Richmond, 1986) และยังจะมีผลกระทบต่อลูกสัตว์น้ำอีกด้วย

มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาการดูดซึมธาตุอาหารของแพลงก์ตอนหลายชนิดในแหล่งน้ำธรรมชาติภายใต้สภาพแวดล้อมต่างๆกัน เช่น ศึกษาผลกระทบเนื่องจากความเข้มแสงและอุณหภูมิ (Viner 1984) ผลกระทบจากความเค็ม (Hirataet.al.1981) และผลจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของธาตุอาหาร (Dortch et.al.1991, Bentzen and Taylor 1992 และ Cotner,Jr.1992) ในการเปรียบเทียบการดูดซึมธาตุอาหารและการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนชนิดต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน วิธีการที่นิยมคือ การใช้สาร

กัมมันตรังสีติดฉลากสารอาหารที่ศึกษา (Radioisotope fracer Technique) และหาอัตราการดูดซึมธาตุอาหารสูงสุดภายใต้การเปลี่ยนแปลงความเข้มแสง (Reshkin and Knauer, 1979) หรือศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารในสารละลายระหว่าง N:P (Suttle และ Harison, 1985) และ N:C (Davies และ Sleep, 1989) ศึกษาความเข้มข้นของสารประกอบที่เป็นแหล่งให้ P ซึ่งแสดงความสามารถในการแย่งชิงธาตุฟอสฟอรัสของแพลงก์ตอน (Healey and Hendzel, 1988 , Cotner, J.1992, Bentzon และ Taylor 1992) และการหาปริมาณแอมโมเนียมหรือไนเตรทในสูตรอาหาร (Dortch et.al.1991)

จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ การเพาะเลี้ยงแพลงตอนของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง พบว่า แพลงตอนแต่ละชนิดเติบโตได้ในสูตรน้ำเลี้ยง อุณหภูมิ แสง และความเค็มที่เหมาะสมต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *Skeletonema* โดยใช้สูตรอาหาร Sato&Serikawa และสูตรอาหาร Conway พบว่า เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าได้เร็วกว่าในสูตรอาหารแรก (มาวิทย์ และธิดา, 2534) ขณะที่เลี้ยง *Chlorella* และ *Tetraselmis* เปรียบเทียบกันโดยใช้สูตรอาหารที่ต่างจากสูตรอาหาร 2 ชนิดข้างต้น เฉพาะ *Tetraselmis* เจริญเติบโตได้ดี (ธิดา และนิเวศน์, 2527) ส่วน *Chlorella* มีการเจริญเติบโตที่หยุดชะงักเป็นบางช่วง ปัญหาผลกระทบเนื่องจากอุณหภูมิได้เคยมีการรายงานจากประเทศญี่ปุ่น (Hirata et.al.1981. Okanchi และ Fukusho 1954) ทำให้ในหน้าร้อนต้องใช้ *Tetraselmis* แทน *Chlorella* เพื่อเลี้ยงโรติเฟอร์ เนื่องจาก *Tetraselmis* ทนต่อสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงถึง 35 C° ได้

โครงการวิจัยนี้ต้องการหาข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับอัตราส่วนระหว่างไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน 4 ชนิดในน้ำทะเลเทียม โดยศึกษาในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว 2 ชนิดคือ *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis* sp. และกลุ่มไดอะตอมอีก 2 ชนิดคือ *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. เพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงการผลิตแพลงก์ตอน งานวิจัยนี้จะใช้วิธีติดฉลากเกลือรังสีเพื่อหาอัตรานับรังสีของฟอสฟอรัส (P-32) และใช้วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเปรียบเทียบผล คาดว่าจะสามารถประมาณอัตราส่วนระหว่างไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เหมาะสม สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดได้ การผันแปรอัตราส่วนแอมโมเนียมและฟอสเฟตในน้ำเลี้ยงจะใช้สัดส่วนใกล้เคียงกับ Suttle และ Harrison (1988) โดยให้ NH_4Cl และ K_2HPO_4 เป็นแหล่งให้แอมโมเนียม (N) และฟอสเฟต (P) และมีรายงานว่าแพลงก์ตอนบางชนิดใช้ N ที่มาจากแหล่ง NH_4Cl ได้ดีกว่าที่ได้จากแหล่ง NO_3^- (Thompson et. al. , 1989) ข้อได้เปรียบของการใช้เทคนิคนี้คือใช้ได้กับเซลล์เล็กๆ ที่มีวงจรชีวิตสั้น และสามารถทราบผลได้ในเวลาอันสั้น การศึกษาเชิงพื้นฐานทำนองนี้ในวงการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนในประเทศไทยนับว่าเป็นสิ่งใหม่ การทราบปริมาณปุ๋ยที่เพียงพอต่อการเพาะเลี้ยง อาจเป็นอีกวิธีหนึ่งโดยทางอ้อมที่จะช่วยลดความเสื่อมของคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง หรือในการเพาะเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1 ต้องการตรวจสอบว่าสารละลายเกลือรังสี $NH_4H_2{}^{32}PO_4$ เหมาะสมที่จะใช้ศึกษาอัตราการดูดซึมฟอสฟอรัส (P) ในรูปของอัตรานับรังสีของ P-32 ในแพลงตอนพืชทั้ง 4 ชนิดนี้ได้หรือไม่

2 ต้องการเปรียบเทียบอัตราการดูดซึมฟอสฟอรัส (P) ในรูปของอัตรานับรังสีของ P-32 ในแพลงตอนพืชทั้ง 4 ชนิดเมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียม (N) และฟอสเฟต (P)

3 ต้องการศึกษาการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนในสภาพแวดล้อมที่มีอัตราส่วน N:P ที่เหมาะสมในน้ำทะเลเทียม ซึ่งผันแปรระดับ N:P ตามที่ศึกษาได้จากข้อ 2

นอกจากนี้จะตรวจสอบเชิงจลนพลศาสตร์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ที่จะใช้ สมการ Michaelis Menten อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัตรานับ P-32 กับปริมาณฟอสเฟตที่แปรผัน

---

2 วิธีการ

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

แพลงก์ตอนทั้ง 4 ชนิดได้รับจากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา เป็นสาหร่ายสีเขียว 2 ชนิดคือ *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis* sp. และเป็นไดอะตอม 2 ชนิดคือ *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. การเตรียมเซลล์เพื่อการทดลองแต่ละตอนทำโดยการแบ่งหัวเชื้อไปขยายเลี้ยงในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 1000 ml ใช้ในอัตราส่วนหัวเชื้อต่อน้ำเลี้ยง 1:5 สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง แสดงใน **Table1** ซึ่งบางครั้งจะเรียกสูตรอาหารเหล่านี้ว่า "สารละลายมาตรฐาน" (ดูองค์ประกอบของสูตรอาหารในภาคผนวก ก) ในการศึกษาการเพิ่มผลผลิตและความหนาแน่นของเซลล์ ใช้วิธีนับโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ชนิดประกอบที่มีกำลังขยาย 400 เท่า การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนทุกครั้งถูกควบคุมภายใต้แสงประมาณ 3000 ลักซ์ อุณหภูมิเฉลี่ย 28^0 C และความเค็มของสูตรอาหารในวันเริ่มทดลอง 25 ppt ใส่ฟองอากาศในขวดทดลองตลอดเวลาในระหว่างการเพาะเลี้ยง เพื่อให้เซลล์มีโอกาสสัมผัสธาตุอาหารและแสงอย่างสม่ำเสมอ pH ของสารละลายเปลี่ยนแปลงจาก 8.2 ในวันเริ่มต้นเป็น 9.5 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง

Table 1 Four standard media for cell culturing

Cell Type	Culture Media
Chlorella sp.	Sato&Serikawa
Tetraselmis sp.	Sato&Serikawa
Chaetoceros sp.	Conway
Skeletonema sp.	Guillard

2.2 การเตรียมภาชนะเพื่อศึกษาการดูดซึม P-32

เนื่องจากอนุมูลฟอสเฟตเกาะติดผิวภาชนะทุกชนิดได้ง่าย ทำให้อาจเป็นปัญหาต่อการศึกษาการดูดซึม P-32 เข้าสู่เซลล์ จึงล้างภาชนะแก้ว Pyrex ที่จะใช้ทดลองด้วยน้ำยาล้างภาชนะที่ปลอดฟอสเฟต แล้วแช่ภาชนะลงในกรด HNO_3 เข้มข้น 0.1 N เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนคว่ำให้แห้งเพื่อคอยการใช้งาน ในเบื้องต้นได้ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบผลของการใช้ภาชนะชนิดแก้ว Pyrex ซึ่งเตรียมโดยวิธีข้างต้น กับภาชนะชนิดโพลีคาร์บอเนต (Suttle and Harrison, 1988) ไม่ปรากฏว่าผลการศึกษาแตกต่างกัน การทดลองในระยะต่อมาจึงใช้ภาชนะแก้วไพเร็กซ์เท่านั้น

2.3 การเตรียมเซลล์เพื่อศึกษาการดูดซึม P-32

เซลล์เพื่อการทดลองในสารละลายที่ต่างจากสารละลายมาตรฐาน ทำโดยการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงในวันที่เซลล์อยู่ในช่วง log-phase (อายุ 3 วัน) ด้วยการเซนทริฟิวจ์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำทะเลเทียมปริมาตร 500 ml (ดูภาคผนวก ก) ที่ไม่มี N และ P ให้เซลล์ปรับตัวในน้ำทะเลเทียม อีก 1 วันก่อนทำการทดลองเพื่อจัดให้เซลล์อยู่ในภาวะการขาดแคลนอาหาร ก่อนการทดลองได้เซนทริฟิวจ์เซลล์อีกครั้ง เพื่อทิ้งน้ำที่อาจมีธาตุอาหารหรือของเสียจากเซลล์ปนอยู่ แขวนลอยแพลงก์ตอนอีกครั้งในน้ำทะเลเทียมจำนวน 500 ml เซลล์อยู่ในสภาพที่พร้อมใช้งาน

สำหรับการทดลองในแพลงก์ตอนกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (ข้อ 3.2.2) ไม่ได้ใส่แอมโมเนียมในขวดทดลองเนื่องจากต้องการประมาณช่วงความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ต้องการผันแปร จึงแบ่งเซลล์ออก 5 ชุดๆละ 30 มล เพื่อใส่ K_2HPO_4 ซึ่งเป็นแหล่งให้ P ตามความเข้มข้นที่ต้องการ ส่วนขั้นตอนที่ต้องการศึกษาผลของไนโตรเจน ได้แบ่งเซลล์ที่เตรียมไว้ออกตามจำนวนชุดความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่ต้องการ โดยใช้ NH_4Cl เป็นแหล่ง N ส่วนการทดลองในแพลงก์ตอนกลุ่มไดอะตอม จะแบ่งเซลล์ที่เตรียมไว้ออกเป็น 3 ชุด และเติม NH_4Cl ให้แต่ละขวดมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 μM 20 μM และ 40 μM ปล่อยให้เซลล์ปรับตัวครึ่งชั่วโมงก่อนแบ่งแพลงก์ตอนออกเป็น 5 ขวดๆละ 30 ml (ลงในขวด Pyrex รูปชมพู่ ขนาด 50 ml) เติม K_2HPO_4 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 μM 2 μM 5 μM 10 μM และ 20 μM แล้วเติม KCl เพื่อปรับความเข้มข้นของ K^+ ที่หายไปเนื่องจากการลดปริมาณ K_2HPO_4 (Suttle and Harrison, 1988) พร้อมทั้งเติมน้ำกลั่นเพื่อแก้ไขให้แพลงก์ตอนเจือจางลงเท่ากันทั้ง 5 ขวดทดลอง ปริมาณสารแต่ละชนิดที่เติมในขวดแพลงก์ตอนได้แสดงใน **Table 2** จะให้เซลล์ปรับตัวอีกประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนใส่สารรังสีในขวดทดลอง

จะเห็นว่า งานวิจัยนี้ผันแปรอัตราส่วนระหว่างปริมาณแอมโมเนียมและฟอสเฟตที่อยู่ในสารละลาย NH_4Cl และ K_2HPO_4 เมื่อได้ความเข้มข้นของ NH_4^+ และ PO_4^{3-} ที่เหมาะสมแล้ว จึงจะคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในภายหลัง (ดูข้อ4)

2.4 การติดฉลากรังสี

หลังจากปรับให้มีความหนาแน่นเท่ากันในสารละลายที่มีอัตราส่วน N:P ตามต้องการแล้ว ให้เซลล์ปรับตัวประมาณ 30 นาทีก่อนใส่สารละลายเกลือ $NH_4H_2{}^{32}PO_4$ ที่ผลิตจากสำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติบางเขน ก่อนนำไปใช้งานได้ทำให้เจือจางลงด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณที่ต้องการโดยให้ความแรงรังสีสุดท้ายของอนุมูล ออร์โธฟอสเฟต ($^{32}PO_4^{3-}$) ในเซลล์แพลงก์ตอนที่กำลังจะศึกษาเป็น 0.013 μ Ci/ml (Suttle et. al. 1988) โดยปริมาตรของสารละลายเกลือรังสีที่เติมในขวดทดลองเท่ากับ 50 μl ทุกชุด แต่ละช่วงเวลาที่ศึกษาจะสุ่มตัวอย่าง 3 ครั้ง ครั้งละ 500 ไมโครลิตร กรองด้วยกระดาษกรองแบบ Fibreglass GF/C (1.2 μm) ซึ่งวางบนเครื่องกรองสุญญากาศ (Sartorious) ซึ่งปั๊มด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ (Gast G21DX) ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปหาอัตรานับเฉลี่ย ในการวิเคราะห์หาความแรงรังสีจำเพาะของสารละลายนอกเซลล์ (S_o) ทำโดยเตรียมชุดควบคุมแบบเดียวกันแต่ไม่มีแพลงก์ตอนแขวนลอย และสุ่มตัวอย่างสารละลายรังสี

ในชุดควบคุมจำนวน 3 ครั้งๆละ 10 µl ทุกตัวอย่างที่สุ่มมาซึ่งอยู่บนกระดาษกรองจะถูกวางบนฝาขวดน้ำอัดลม ทำให้แห้งเพื่อลดการดูดกลืนตัวเองโดยการวางบนแผ่นทำความร้อน (Hot Plate) ประมาณ 5 นาที แล้วนำไปหาอัตรานับด้วยหัววัดแบบไกเกอร์ (*Nucleus* Model 575)

Table 2 Amount of solutions added (in µl) into the 30 ml prepared cells for P-32 uptake studies.

Solution	Stock Concentration	Concentration of (PO_4^{3-}) required in the medium				
		1µM	2µM	5µM	10µM	20µM
K_2HPO_4	1.0 mM 10.0 mM	30µl ----	60µl ----	150µl ----	--- 30µl	--- 60µl
KCl	10.0 mM	114µl	108µl	90µl	60µl	----
Distilled water	----	96µl	72µl	----	150µl	180µl
Total added volume		240µl	240µl	240µl	240µl	240µl

บางการทดลองในระยะแรก ได้เติม MOP (3-[N-Morpholino]propane-sulphonic acid) ลงในขวดทดลองก่อนเติมสารรังสีเพื่อควบคุม pH เนื่องจากพบว่า pH ของน้ำเลี้ยงเปลี่ยนแปลงจาก 8.2 เป็น 9.5 จากวันแรกถึงวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่พบความแตกต่างของการดูดกลืนรังสีอย่างมีนัยสำคัญ การทดลองครั้งต่อมา จึงไม่ได้ควบคุม pH อีกต่อไป และได้ติดตามการเพิ่มผลผลิตของแพลงก์ตอนชนิด *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis* sp. ในน้ำทะเลเทียม พบว่าเซลล์เพิ่มผลผลิตต่อไปถึงวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง หากการเพิ่มผลผลิตนี้เกิดจากการใช้ N และ P ภายในเซลล์ แสดงว่าเซลล์เริ่มขาดแคลน N และ P ในวันที่ 3 การทดลองอื่นๆจึงให้แพลงก์ตอนปรับตัวในน้ำทะเลเทียมในวันที่ 2 เพื่อหลีกเลี่ยงความไม่แน่นอนของสภาวะแวดล้อมของเซลล์อันจะมีผลต่อการศึกษา

2.5 การหาอัตรานับรังสี P-32

เนื่องจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเพื่อทดลองในแต่ละชุด จะมีความหนาแน่นแตกต่างกัน การปรับให้เซลล์มีความหนาแน่นเท่ากันทุกครั้งก่อนการทดลองจึงเป็นสิ่งจำเป็น นอกจากนี้ได้วิเคราะห์หาความแรงรังสีจำเพาะของสารละลายทุกชุดที่ทดลอง เพื่อการปรับเทียบอัตรานับรังสีระหว่างชุดการทดลองที่ทำในวันต่างกัน นอกจากนี้เนื่องจากครึ่งชีวิตของ P-32 คือ 14.3 วัน การหาอัตรานับรังสีจึงทำให้เสร็จภายในวันเดียวกัน โดยแต่ละชุดจะใช้เวลาไม่เกิน 3 ชั่วโมงภายหลังการสุ่มตัวอย่างเสร็จสิ้น และหากจำเป็นต้องหาอัตรานับในวันถัดไปจะคำนวณอัตรานับของรังสีที่สลายไปในช่วงเวลาก่อนการนับเสมอ

---

3 ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดซึมรังสีกับการเพิ่มจำนวนเซลล์

เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์แพลงก์ตอนดูดกลืนฟอสเฟตเพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มผลผลิตโดยตรงหรือไม่ การทดลองนี้จึงต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตรานับรังสีของ P-32 ที่อยู่ในสารละลายเกลือรังสี $NH_4H_2{}^{32}PO_4$ กับการเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอนทั้ง 4 ชนิด การทดลองแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ ส่วนที่ศึกษาโดยใช้สารกัมมันตรังสี ซึ่งวัดเป็นอัตรานับต่อนาที (cpm) และส่วนที่เพาะเลี้ยงเซลล์แล้วนับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ การทดลองทั้งสองส่วนใช้อาหารที่เป็นสูตรน้ำเลี้ยง 3 ชนิด คือ สูตร Sato&Serikawa สูตร Conway และ สูตร Guillard เฉพาะสูตร Guillard ใช้กับเซลล์ *Skeletonema* sp.

3.1.1 การศึกษาในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis* sp.

การศึกษาในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis* sp. โดยทดสอบอัตรานับรังสีระหว่างสูตรอาหารชนิด Sato&Serikawa และ Conway สุ่มตัวอย่างในช่วงต่างๆเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 2.2 ใน **Fig. 1 (a และ b)** แสดงค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง จะเห็นว่าอัตรานับที่พบในเซลล์ทั้งสองชนิดซึ่งเลี้ยงในสูตรอาหาร Sato&Serikawa สูงกว่าในสูตร Conway อัตรานับเพิ่มขึ้นค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ในชั่วโมงแรกจนถึงชั่วโมงที่ 5 ของการดูดกลืน P-32 เมื่อทดสอบด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำเลี้ยงดังกล่าว ด้วยการเอาเซลล์อายุ 3-4 วันไปขยายในสูตรน้ำเลี้ยงทั้งสองชนิด ในอัตราส่วนหัวเชื้อต่อน้ำเลี้ยง 1:3 ทุกชุด พบว่าน้ำเลี้ยงสูตร Sato&Serikawa ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้ดีกว่าน้ำเลี้ยงสูตร Conway ในทุกชุดการทดลอง ดังแสดงผลใน **Fig. 2 (a และ b)**

เนื่องจากอัตรานับของเซลล์ทั้งสองชนิดค่อนข้างคงที่หลังการดูดกลืนรังสี 1 ชั่วโมง จึงต้องการศึกษาการดูดกลืนรังสีในช่วงที่สั้นกว่า 1 ชั่วโมง และศึกษาอัตรานับของเซลล์ทั้งสองชนิดพร้อมกันในวันเดียวกัน การทดลองนี้ไม่ได้ควบคุมความหนาแน่นเซลล์ แต่เซลล์แต่ละชนิดถูกแบ่งออกเป็น 2 ชุด ซึ่งเตรียมตามวิธีในข้อ 2.2 โดยใช้สูตรอาหารที่ต้องการศึกษาแทนการใช้น้ำทะเลเทียม ชุดหนึ่งใส่สารรังสี อีกชุดหนึ่งไม่ใส่สารรังสี สำหรับใช้นับจำนวนเซลล์ที่ช่วงเวลาต่างๆ ผลอัตรานับได้แสดงใน **Fig. 3 a** จะเห็นว่า อัตรานับในเซลล์ *Chlorella* sp. ที่อยู่ในสูตรอาหาร Conway น้อยกว่าอัตรานับในเซลล์ที่อยู่ในอาหาร Sato&Serikawa อย่างชัดเจน และพบว่าระหว่างการเพาะเลี้ยงใน Conway ที่เวลา 125 นาที ถึง 245 นาที เซลล์เพิ่มความหนาแน่นจาก 237.5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร เป็น 347.5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร หรือเทียบต่อหน่วยนาทีพบว่า *Chlorella* sp. เพิ่มผลผลิตในสูตร Conway ด้วยอัตรา 0.9×10^4 เซลล์/นาที ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร Sato&Serikawa พบว่าการเพิ่มจำนวนเซลล์มีความชัดเจนภายหลังจาก 125 นาทีของการเพาะเลี้ยงทั้งๆที่อัตรานับภายในเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณที่เวลา 35 นาทีของการเพาะเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ช่วงเวลาเดียวกัน พบว่า *Cholrella* sp. เพิ่มจำนวนในสูตรอาหาร Sato&Serikawa ในอัตรา 1.5×10^4 เซลล์/นาที

เป็นที่สังเกตว่าในช่วงเวลาประมาณ 4-5 วันของการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp.และ *Chaetoceros* sp. ค่า pH ของสารละลายจะเพิ่มประมาณ 1 หน่วยโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 8.2-9.4 ขณะที่ pH ของ *Skeletonema* sp. เปลี่ยนแปลงน้อยกว่า คือมีค่าระหว่าง 8.4-8.7 เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในวันที่ 4

3.1.2 การศึกษาในไดอะตอม *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp.

การทดลองในเซลล์ *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. ทำนองเดียวกันกับการทดลองในเซลล์ 2 ชนิดแรก โดยเปรียบเทียบอัตรานับ P-32 ในสูตรอาหาร Conway, Sato&Serikawa และ Guillard ผลการทดลองได้แสดงใน **Fig.3(b)** จะเห็นว่าความหนาแน่นของเซลล์ *Chaetoceros* sp. ที่เลี้ยงใน Sato&Serikawa น้อยกว่าใน Conway เล็กน้อย โดยมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเวลา 125 นาทีคือ $0.2x10^4$ เซลล์ต่อนาที ขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงใน Conway มีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ $0.6x10^4$ เซลล์ต่อนาที ในการทดลองเพื่อศึกษาความเหมาะสมของสูตรน้ำเลี้ยง โดยการนับจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงระหว่าง 1-4 วัน และ 1-3 วัน **Fig. 4 (a และ b)** แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มจำนวนของ *Chaetoceros* sp. ในน้ำเลี้ยงสูตร Conway ดีกว่าในน้ำเลี้ยงสูตร Sato&Serikawa ส่วน *Skeletonema* sp. มีจำนวนเซลล์ในน้ำเลี้ยงสูตร Guillard หนาแน่นกว่าในน้ำเลี้ยงสูตร Sato&Serikawa

สรุปผลตอนที่ 3.1

จากความสอดคล้องกัน ระหว่างผลของอัตรานับของ P-32 และความหนาแน่นเซลล์ที่นับผ่านกล้องจุลทรรศน์ จึงอาจกล่าวโดยสรุปได้ว่าสารละลายเกลือรังสี $NH_4H_2{}^{32}PO_4$ สามารถนำมาใช้ทดสอบการดูดซึมฟอสฟอรัสของแพลงก์ตอนทั้ง 4 ชนิดได้ สูตรน้ำเลี้ยงที่ใช้อยู่ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการนี้ (ดังแสดงในตารางที่ 1) เหมาะสมดีแล้ว อย่างไรก็ดีพบว่ามีความไม่แน่นอนของการเพิ่มจำนวนเซลล์ใน *Skeletonema* sp. เข้าใจว่าเซลล์ชนิดนี้มีความไวสูงต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม ผลการทดลองแสดงแนวโน้มว่า น้ำเลี้ยงสูตร Guillard จะเหมาะสมกว่า Sato&Serikawa แต่เนื่องจากการเพิ่มผลผลิตไม่ต่างกันชัดเจน จึงเป็นไปได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้สามารถใช้สูตรอาหาร Sato&Serikawa ก็ได้ ทั้งนี้เพื่อลดความยุ่งยากในการจัดการ

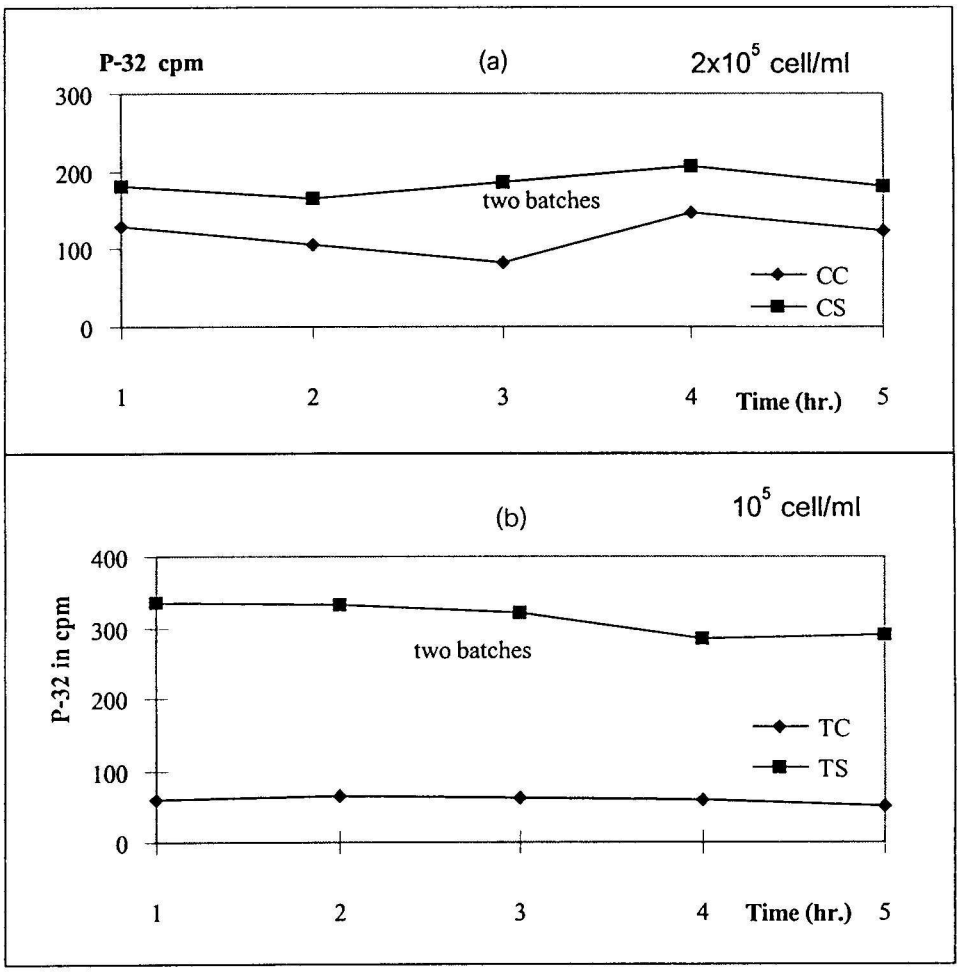


Fig. 1 Showing P-32 uptake into *Chlorella* sp (C) and *Tetraselmis* sp. (T) grown in Conway (C) and Sato&Serikawa (S)

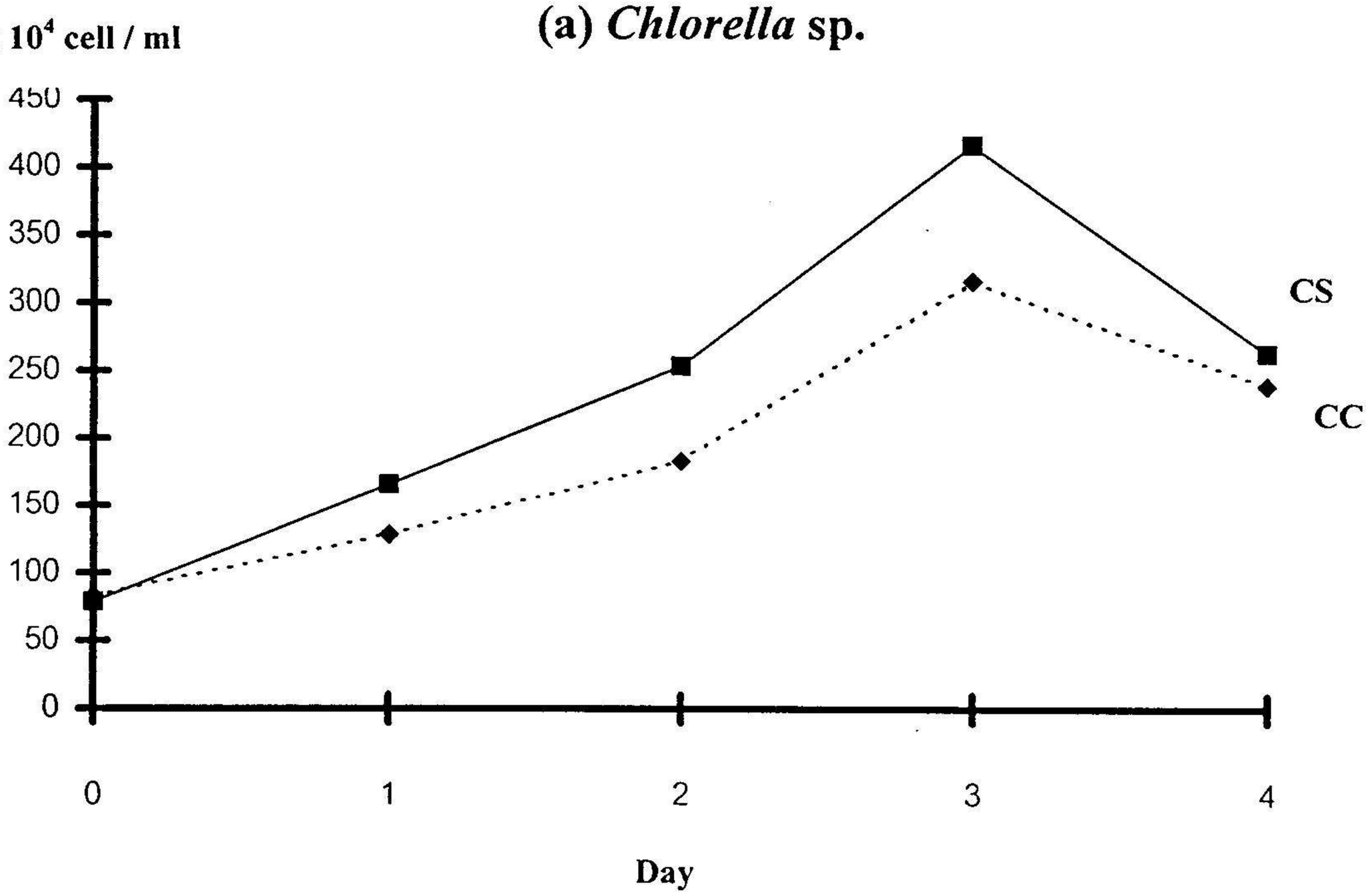
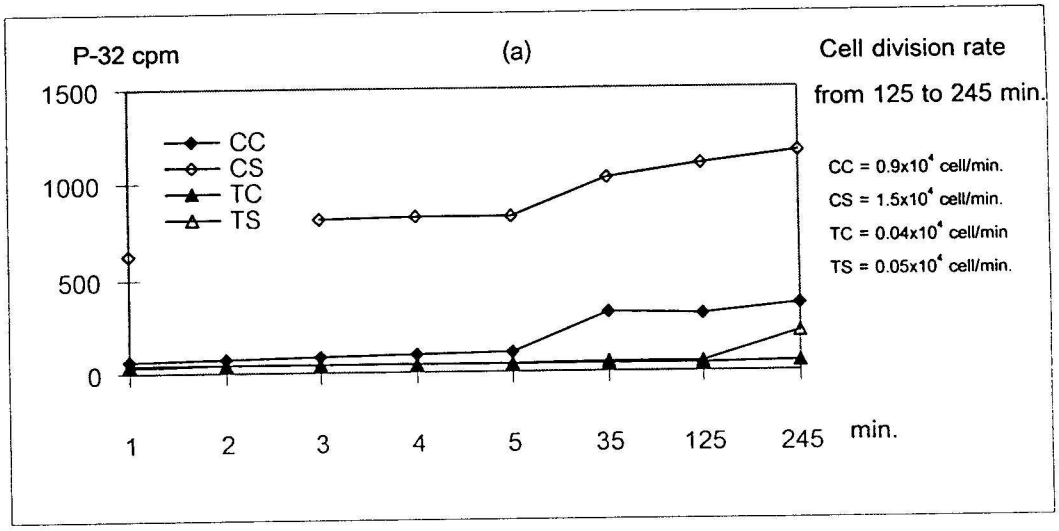


Fig. 2 Growth of *Chlorella* sp. (C) and *Tetraselmis* sp. (T) in Sato&Serikawa (S) and Conway (C) from two experiments.



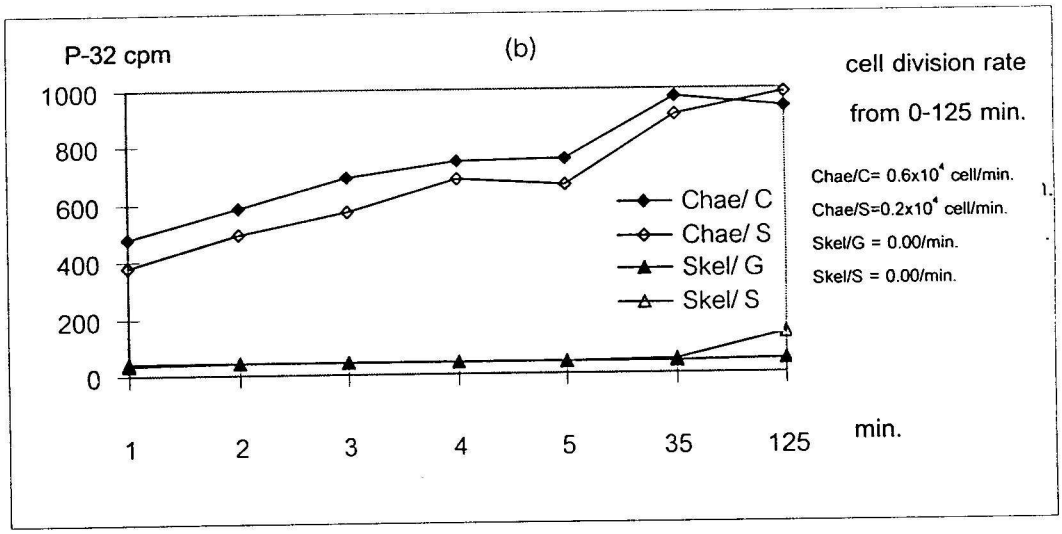


Fig. 3 Count rates of P-32 (a) in *Chlorella* sp. (C) and *Tetraselmis* sp.(T) and (b) in *Chaetoceros* sp.(Chae) and *Skeletonema* sp. (Skel) under different culture media:

C=Conway.
S=Sato&Serikawa. and
G=Guillard.

Note that rate of cell division in ***Fig. 3a*** *was between 125-145 min. when the cell density was recorded.*

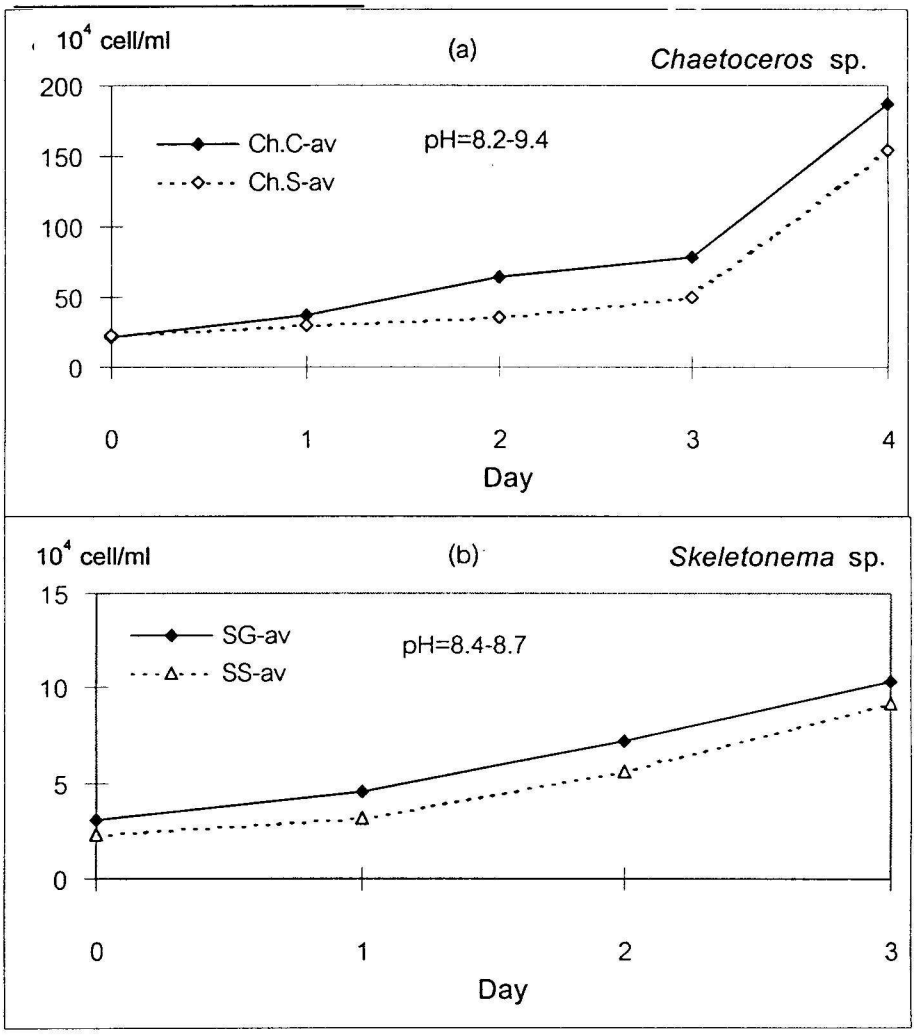


Fig. 4 Cell density of *Chaetoceros* sp. (a) and *Skeletonema* sp. (b) cultured in Sato&Serikawa (S), Conway (C) and Guillard (G); averaged from 3 batches.

3.2 การดูดซึมฟอสฟอรัสในแพลงก์ตอนกลุ่มสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis* sp. เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง แอมโมเนียม และ ฟอสเฟต

เนื่องจากการศึกษาการผันแปรปริมาณ แอมโมเนียม และ ฟอสเฟต ส่วนใหญ่ใช้เซลล์ที่เก็บจากธรรมชาติซึ่งมีปุ๋ยอาหารน้อย เซลล์จึงอยู่ในสภาพที่มีสารอาหารจำกัด งานวิจัยนี้จึงใช้น้ำทะเลเทียมซึ่งไม่มีองค์ประกอบของ แอมโมเนียม และ ฟอสเฟต (ดูภาคผนวก ก) ในขั้นต้นนี้จึงต้องการทราบข้อมูลเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเซลล์ในน้ำทะเลเทียม เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์สภาพของเซลล์ที่ต้องการทดลอง การทดลองนี้จึงแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ

3.2.1 ทดสอบการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลเทียมที่ไม่มีแอมโมเนียม และ ฟอสเฟต

นำเซลล์อายุ 3-5 วันที่เลี้ยงในสูตรอาหารเดิม ไปหมุนเหวี่ยงแล้วแขวนลอยในน้ำทะเลเทียม ภายหลังการติดตามนับจำนวนเซลล์พบว่า เซลล์มีความหนาแน่นลดลงอย่างชัดเจนภายหลังการเพาะเลี้ยงได้ 3 วัน **(Table 3)** แสดงว่าเซลล์เริ่มมีสภาพการขาดแคลนอาหารระหว่างวันที่ 2-3 ของการเพาะเลี้ยง การทดลองต่อไปนี้ใช้เวลาในการศึกษาไม่เกิน 10 ชั่วโมง จึงเลือกใช้เซลล์ที่เลี้ยงในน้ำทะเลเทียมเป็นเวลา 2 วัน มาทำการทดลอง

Table 3 Cell density of *Chlorella* sp. and *Tetraselmis* sp. after being suspended in an artificial sea water (ASW), averaged from 3 experiments.

Day	*Chlorella* sp. ($x10^4$ cell/ml)	*Tetraselmis* sp. ($x10^4$ cell/ml)	*Chaetoceros* sp. ($x10^4$ cell/ml)	*Skeletonema* sp. ($x10^4$ cell/ml)
1	16.8	132.2	9.5	86.0
2	19.4	151.0	12.5	108.2
3	19.1	146.9	11.2	103.2
4	16.0	124.1	8.0	83.0
pH	9.72	8.52	9.49	8.34

3.2.2 อัตรานับของ P-32 ในน้ำทะเลเทียมที่ไม่มีแอมโมเนียมโดยเปลี่ยนระดับความเข้มข้นฟอสเฟต

ในการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาระดับฟอสเฟตที่ต้องการผันแปรในสูตรน้ำทะเลเทียมที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน สำหรับเซลล์ *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis* sp. ในเบื้องต้นได้ทดลองเปลี่ยนระดับฟอสเฟตตั้งแต่ 0.8 μM ถึง 100 μM **Fig. 5(a)** แสดงให้เห็นว่า อัตรานับใน *Chlorella* sp. ค่อนข้างคงที่ภายหลังการดูดซึม P-32 นานประมาณ 1 ชั่วโมง จึงคาดว่าการผันแปรระดับฟอสเฟตในการทดลองกับเซลล์ *Chlorella* ไม่จำเป็นต้องใช้ฟอสเฟตสูงมาก จึงลดระดับฟอสเฟตลงให้อยู่ระหว่างช่วง 1 μM ถึง 20 μM

ผลใน **Fig. 5(b)** แสดงให้เห็นว่าปริมาณฟอสเฟตในสารละลายที่แปรผันระหว่าง 1μM ถึง 20μM ไม่มีผลต่อการดูดซึมฟอสฟอรัสของเซลล์ พึงสังเกตว่าอัตรานับในการทดลองทั้งสองใกล้เคียงกัน โดยเซลล์ในชุดแรกมีความหนาแน่นประมาณ $3x10^6$ เซลล์/มล ขณะที่เซลล์ในชุดที่สองมีความหนาแน่น $2.5x10^6$ เซลล์/มล

สำหรับการศึกษาใน *Tetraselmis* sp. ได้แสดงผลใน **Fig. 6(a)** ซึ่งแสดงแนวโน้มว่า ที่ระดับฟอสเฟต มากกว่า 10 μM อัตรานับรังสีลดลง แสดงว่าการมีฟอสเฟตมากไม่ได้ช่วยการดูดซึมฟอสฟอรัสจากน้ำเลี้ยง แต่กลับทำให้การดูดซึมลดลง จึงได้ลดระดับฟอสเฟต ลงไม่เกิน 20 μM ผลใน **Fig. 6(b)** แสดงให้เห็นว่า อัตรานับของ P-32 ที่ระดับฟอสเฟตระหว่าง 1μM ถึง 20 μM ในเซลล์ชนิดนี้ค่อนข้างไม่แน่นอน เมื่อเปรียบเทียบอัตรานับระหว่างผลการทดลองในรูป **Fig. 6a และ 6b** ซึ่งเป็นการทดลองคนละครั้ง พบว่าเซลล์ที่ใช้ใน **Fig. 6(a)** มีอัตรานับต่ำกว่า ทั้งๆที่มีความหนาแน่น ($48x10^4$ เซลล์/มล) สูงกว่าเซลล์ที่ใช้ในผลการทดลอง**Fig. 6(b)** ($22x10^4$ เซลล์/มล) ประมาณ 2 เท่า จึงมีเป็นไปได้ว่าเซลล์ที่มีความหนาแน่นมากกว่า เมื่อกรองโดยจำกัดให้เซลล์รวมกันอยู่กลางกระดาษกรอง ทำให้เกิดความหนาระดับหนึ่ง การปลดปล่อยรังสีของเซลล์ที่อยู่ด้านล่างจึงถูกดูดกลืนหายไปบางส่วน ซึ่งเรียกว่า **การดูดกลืนตัวเอง (Self absorption)** เฉพาะรังสีที่ถูกปลดปล่อยจากเซลล์บริเวณผิวด้านบนเท่านั้นที่เข้าหัววัด ทำให้เกิดอัตรานับดังกล่าว แสดงว่าความหนาแน่นเซลล์จะเป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่ง หากจะนำค่าอัตรานับในเซลล์เหล่านี้ ไปประมาณหาค่าฟลักซ์ไอออน จึงควรระวังไม่ให้เซลล์มีความหนาแน่นสูงเกินไป มิฉะนั้นค่าฟลักซ์ที่ประมาณได้จะต่ำกว่าความเป็นจริง

ในการศึกษาเพื่อหาอัตราส่วนแอมโมเนียม:ฟอสเฟต ในตอนต่อไปนี้จึงกำหนดให้ระดับของฟอสเฟต ไม่เกิน 20 μM และจะใช้ค่าฟอสเฟตระหว่าง 1μM ถึง 20μM ในการศึกษากับเซลล์ทั้ง 4 ชนิด

3.2.3 อัตรานับของ P-32 ในน้ำทะเลเทียมเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียม 2 ระดับ

<u>การศึกษาใน *Chlorella* sp.</u>

การทดลองนี้คงระดับของ ฟอสเฟต ตามที่ใช้ในการทดลองข้างต้น (ข้อ 3.2.2) แต่เปลี่ยนแปลง N เป็น 1 μM และ 10 μM **Fig. 7** แสดงอัตรานับใน *Chlorella* sp. เมื่อให้ระดับ แอมโมเนียม คงที่ที่ 1 μM โดยเปรียบเทียบเวลาที่ให้เซลล์ดูดซึมรังสีเป็นเวลา 30 นาที 60 นาทีและ 120 นาที พบว่าอัตรานับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ให้เซลล์รับรังสี เมื่อพิจารณาที่แต่ละช่วงเวลา อัตรานับรังสีค่อนข้างคงที่ไม่ขึ้นกับปริมาณฟอสเฟตที่ผันแปรระหว่าง 1 μM ถึง 20 μM พึงสังเกตว่าการใส่ ฟอสเฟต และ แอมโมเนียม ในอัตราส่วนที่ต้องการนี้ เซลล์ได้ปรับตัวในสภาพแวดล้อมใหม่ก่อนใส่สารรังสีประมาณ 1 ชั่วโมง ดังนั้นการเพิ่มอัตรานับตามเวลานี้จึงน่าจะขึ้นกับสะสมฟอสฟอรัสของเซลล์ มากกว่าการปรับตัวของเซลล์ต่อสภาพแวดล้อมใหม่ นอกจากนี้เมื่อหาอัตรานับของ *Chlorella* sp. ที่เวลา 60 นาที โดยเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียม จาก 1μM เป็น 10μM **Fig. 8** แสดงให้เห็นว่าอัตรานับในน้ำทะเลเทียมที่มี แอมโมเนียม:

ฟอสเฟต เป็น 1:1 และ 10:1 จะใกล้เคียงกัน แต่ที่ปริมาณแอมโมเนียมคงที่ ที่ 1μM การเพิ่มฟอสเฟตในน้ำเลี้ยงให้สูงทำให้เซลล์มีแนวโน้มรับฟอสฟอรัสได้น้อยลง ส่วนการเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมเป็น 10μM จะทำให้อัตรานับในเซลล์มากขึ้นกว่าเดิม

เพื่อตรวจสอบผล จึงเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารละลายที่มีแอมโมเนียม 4 ระดับคือ 1μM 10μM 20μM และ 40μM ขณะที่ให้ระดับของฟอสเฟตในสารละลายคงที่ที่ 1μM โดยแต่ละชุดมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากัน **Fig. 9** แสดงให้เห็นว่า ความหนาแน่นเซลล์ *Chlorella* sp. เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันแรกถึงวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และชุดที่มีระดับแอมโมเนียมสูงกว่าไม่ได้ทำให้เซลล์หนาแน่นมากกว่า อย่างไรก็ดีความหนาแน่นเซลล์เริ่มลดลงในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง เข้าใจว่าเกิดจากการเริ่มขาดแคลนอาหาร ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าปริมาณแอมโมเนียมที่มากขึ้นไม่ได้ช่วยให้เซลล์เจริญเติบโตได้เร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาด้วยรังสีใน **Fig. 8** ที่แสดงว่าการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนียมขณะที่ระดับฟอสเฟตคงที่ที่ 1μM ไม่ได้ช่วยให้เซลล์ดูดซึมฟอสฟอรัสได้ดีขึ้น

<u>การศึกษาใน *Tetraselmis* sp.</u>

การทดลองนี้ใช้ ฟอสเฟต 3 ระดับ คือ 1μM 10 μM และ 20 μM และเปลี่ยนแปลง แอมโมเนียม 3 ระดับคือ 1 μM 20 μM และ 40 μM อัตรานับใน *Tetraselmis* sp. และผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลเทียมตามอัตราส่วน ที่เปลี่ยนแปลง แอมโมเนียม และ ฟอสเฟต ดังกล่าว ได้แสดงไว้ใน **Fig. 10** ผลการนับรังสีชี้ให้เห็นว่า เมื่อให้ปริมาณ แอมโมเนียมคงที่ที่ 1 μM การเพิ่มระดับฟอสเฟตจาก 1 μM เป็น 10 μM ไม่ได้ช่วยให้เซลล์มีอัตรานับรังสีเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มระดับ แอมโมเนียม จาก 1 μM ถึง 40 μM ทำให้อัตรานับ P-32 ในเซลล์สูงขึ้น นอกจากนี้เมื่อฟอสเฟตคงที่ อัตราการดูดซึม P-32 จะเพิ่มตามการเพิ่มของแอมโมเนียม ยกเว้นที่ฟอสเฟตเป็น 10μM ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากความไม่สม่ำเสมอของกระบวนการเตรียมตัวอย่าง พึงสังเกตว่าอัตรานับสูงสุดเกิดขึ้นที่ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียม 40 μM และที่ระดับความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ 20 μM พบอัตรานับสูงสุดที่ แอมโมเนียม 40 μM เช่นเดียวกัน

เมื่อได้ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ *Tetraselmis* sp. ในน้ำทะเลเทียมที่มีอัตราส่วนแอมโมเนียม: ฟอสเฟต 3 ระดับ คือ 1:1 20:1 และ 40:1 เป็นเวลา 6 วัน จากการหาความหนาแน่นเซลล์โดยวิธีนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีความหนาแน่นสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลการเพาะเลี้ยงได้แสดงไว้ใน **Fig. 11(a)** จะเห็นว่าเซลล์ *Tetraselmis* sp. มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเมื่ออัตราส่วนแอมโมเนียม: ฟอสเฟต เป็น 20:1 อย่างไรก็ดี ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลเทียมอีกหนึ่งชุด โดยให้คงระดับแอมโมเนียม ที่ 40 μM และเปลี่ยนระดับ ฟอสเฟต 5 ระดับคือ 1μM 2μM 5μM 10μM และ 20μM **Fig. 11 (b)** แสดงให้เห็นว่าที่ทุกค่าของอัตราส่วนแอมโมเนียม:ฟอสเฟต เซลล์มีความหนาแน่นสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน และพบว่าอัตราส่วน แอมโมเนียม:ฟอสเฟต เป็น 40:2 และ 40:20

ให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีกว่าที่ระดับฟอสเฟตอื่นๆ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่า อัตราส่วนแอมโมเนียม: ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อเซลล์ *Tetraselmis* sp. น่าจะเป็นคือ 40:2 หรือ 2:1 นั่นเอง

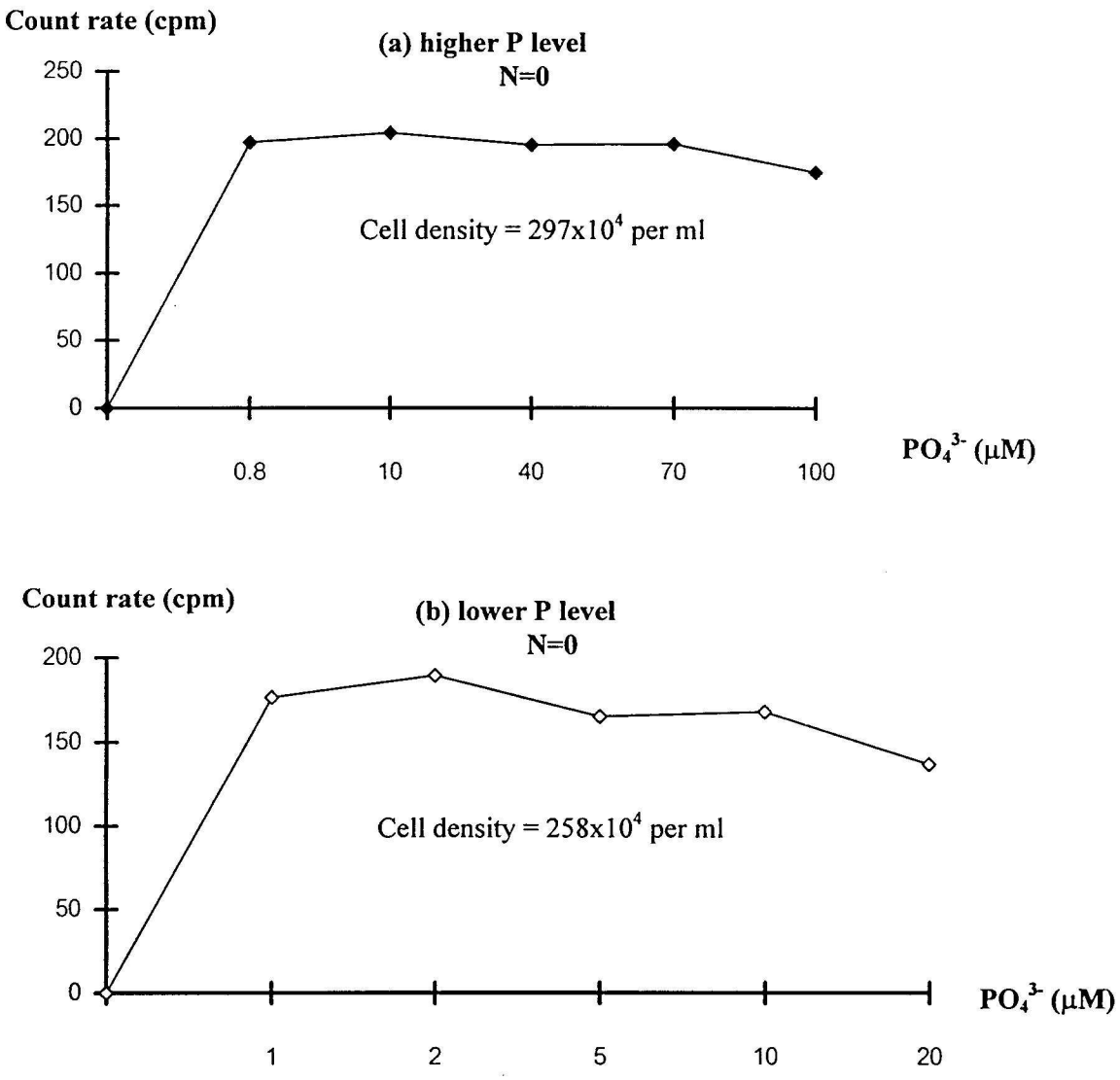


Fig. 5 P-32 in *Chlorella* sp. in ASW solution without nitrogen source. Data was averaged from 3 experiments at pH=7.4 and 161 cpm in 10μl blank solution.

สรุปการศึกษาในแพลงก์ตอนกลุ่มสาหร่ายสีเขียว

จากการศึกษาอัตรานับรังสี P-32 และเปรียบเทียบผลกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1 การมีแอมโมเนียมมากขึ้นช่วยกระตุ้นการดูดซึมฟอสฟอสฟอรัสของ *Chlorella* sp. **(Fig.8)** จากอัตรานับรังสีพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างของความเข้มข้นแอมโมเนียมและฟอสเฟตที่เป็นไปได้คือ 1:1 10:1 และ 40:1 ซึ่งผลจากการเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลเทียมพบว่าอัตราส่วน 1:1 ให้เซลล์เพิ่มจำนวนดีกว่าอัตราส่วนอื่น **(Fig. 9)**

2 การมี P เพิ่มขึ้นไม่ได้ช่วยให้การดูดซึม P-32 ของ *Tetraselmis* sp. ดีขึ้น คาดว่าระดับ PO_4^{3-} ที่เหมาะสมไม่น่าจะเกิน 2-5 μM อัตราส่วนแอมโมเนียม:ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Tetraselmis* sp. น่าจะเป็น 20:1 หรือ 2:1 (หน่วย μM)

3 ความไม่แน่นอนของอัตรานับในเซลล์ *Tetraselmis* sp. **(Fig. 6b)** น่าจะเกิดจากการสุ่มตัวอย่างและการกรองเซลล์ก่อนนำไปหาอัตรานับ เนื่องจากไม่สามารถควบคุมการกระจายของเซลล์บนเยื่อกรองได้ ความต่างกันของรูปแบบการกระจาย อาจมีผลต่อความหนา-บางของเซลล์ ซึ่งมีผลต่ออัตรานับ การทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเซลล์ที่นำมาทดลองไม่ควรหนาแน่นจนเกินไปและเซลล์ควรอยู่กลางหัววัดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการวัดรังสี

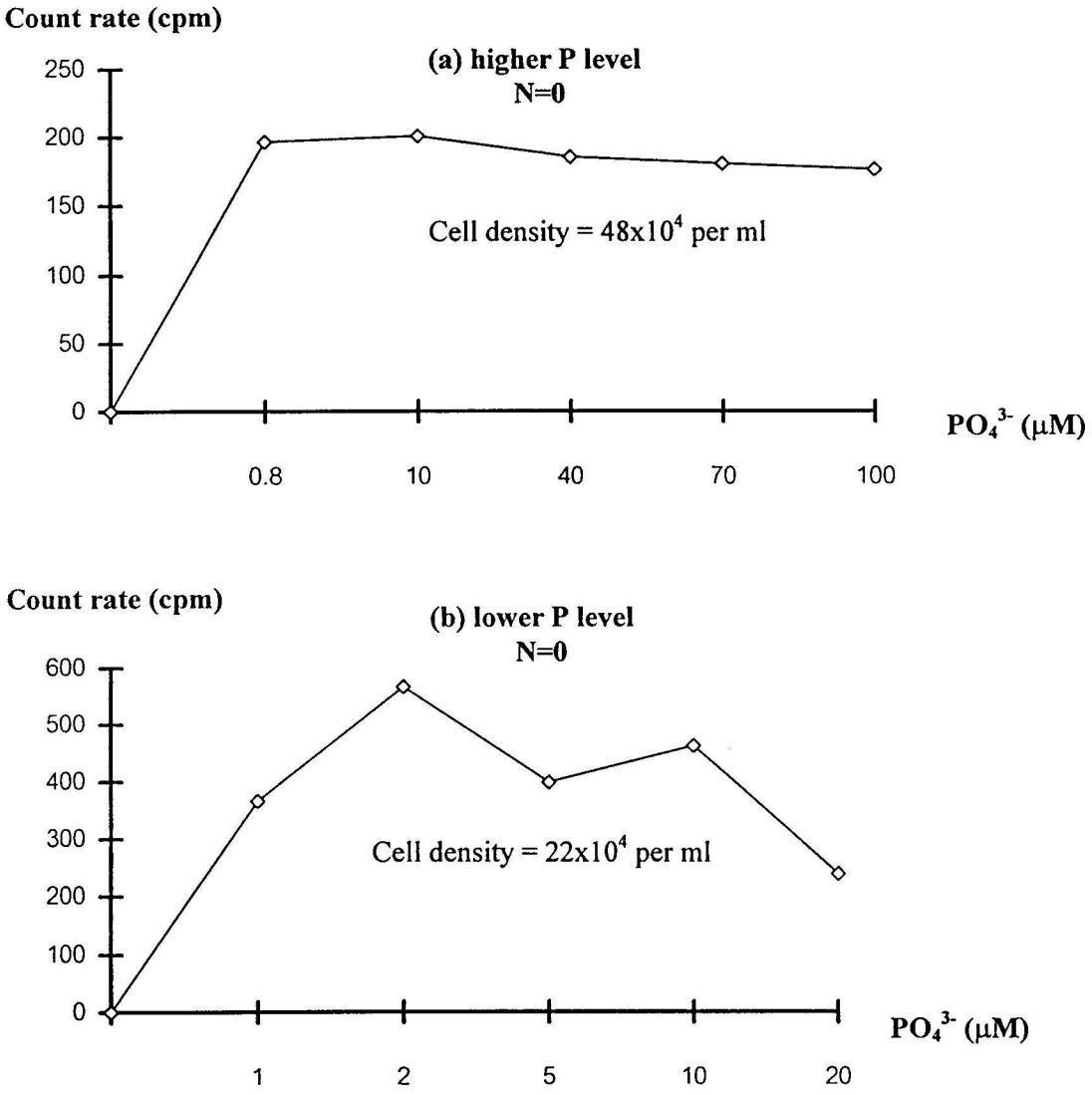


Fig. 6 P-32 in *Tetraselmis* sp. in ASW solution without nitrogen source. Data was averaged from 3 experiments at pH=7.4, 161 cpm in 10μl blank solution.

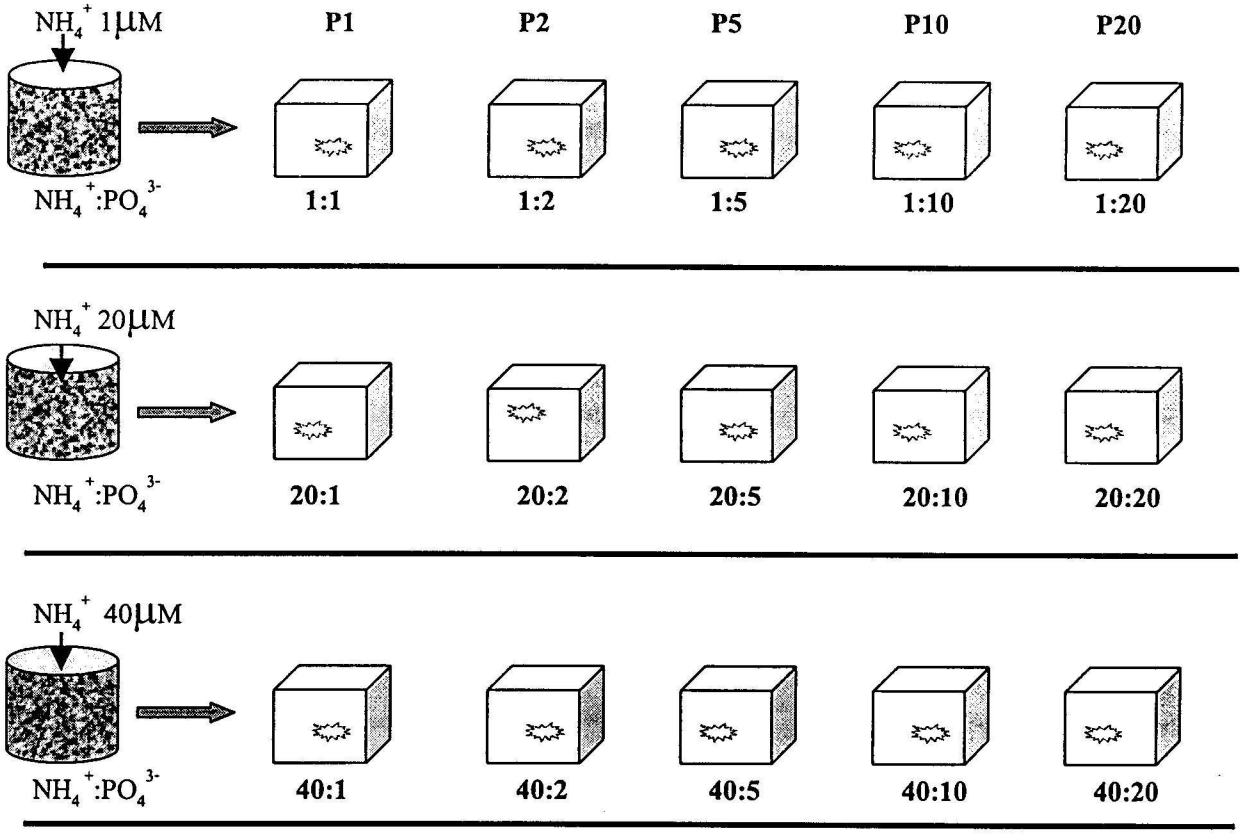
3.3 การดูดซึมฟอสฟอรัสในแพลงก์ตอนกลุ่มไดอะตอม *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง แอมโมเนียม และ ฟอสเฟต ในน้ำทะเลเทียม

การเลือกเซลล์เพื่อทดลอง ใช้วิธีเดียวกับหัวข้อ 3.2 กล่าวคือให้เซลล์อยู่ในสภาพขาดสารอาหาร โดยสังเกตจากการความหนาแน่นที่ลดลง **(Table 3)** ส่วนระดับฟอสเฟตและแอมโมเนียมที่จะผันแปร ได้ใช้ระดับเดียวกับที่ศึกษาในแพลงก์ตอนกลุ่มสาหร่ายสีเขียว

3.3.1 อัตรานับของ P-32 ในน้ำทะเลเทียมที่ผันแปรระดับ แอมโมเนียม และฟอสเฟต

<u>การศึกษาในเซลล์ *Chaetoceros* sp.</u>

ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองในน้ำทะเลเทียมที่ไม่มี แอมโมเนียม และ ฟอสเฟต เป็นเวลา 2 วันแล้ว นำเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงและแขวนลอยในน้ำทะเลเทียมใหม่อีกครั้งหนึ่ง การทดลองแต่ละชุดได้แบ่งเซลล์ที่เตรียมไว้ออกเป็น 3 ส่วน โดยใส่ NH_4Cl (N) ในปริมาณต่างกัน 3 ระดับ ดังนี้ 1 μM 20 μM และ 40 μM แบ่งเซลล์แต่ละส่วนออกเป็น 5 ชุดเพื่อใส่ K_2HPO_4 (P) ที่ระดับต่างกัน 5 ระดับ แล้วปล่อยไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนใส่สารรังสี ดังแสดงในแผนภาพ ข้างล่างนี้ (หมายเลขตามหลัง P คือความเข้มข้นในหน่วย μM)



= **Radioisotope**

Blank solution = ASW without plankton cells + Radioisotope $NH_4H_2{}^{32}PO_4$

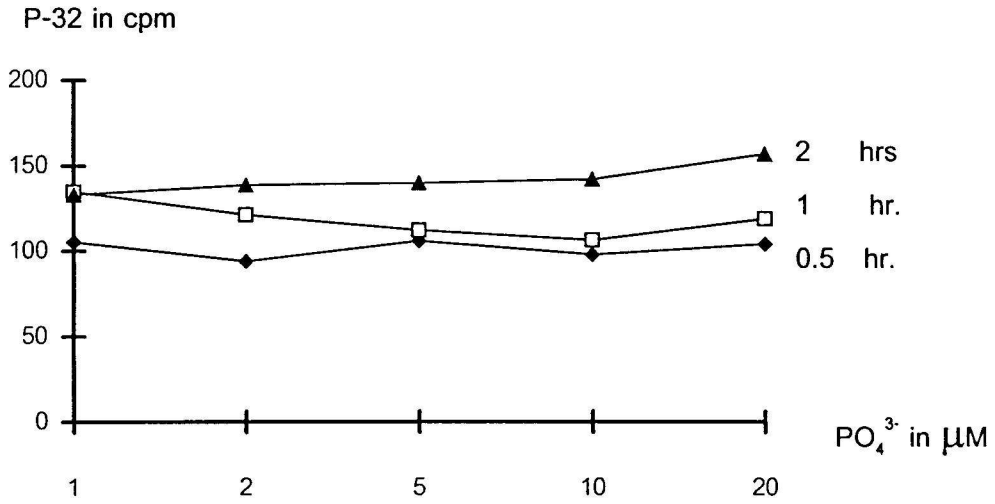


Fig. 7 Comparing P-32 count rates in *Chlorella* sp. at constant N level, 1 μM, and varied PO_4^{3-} levels.

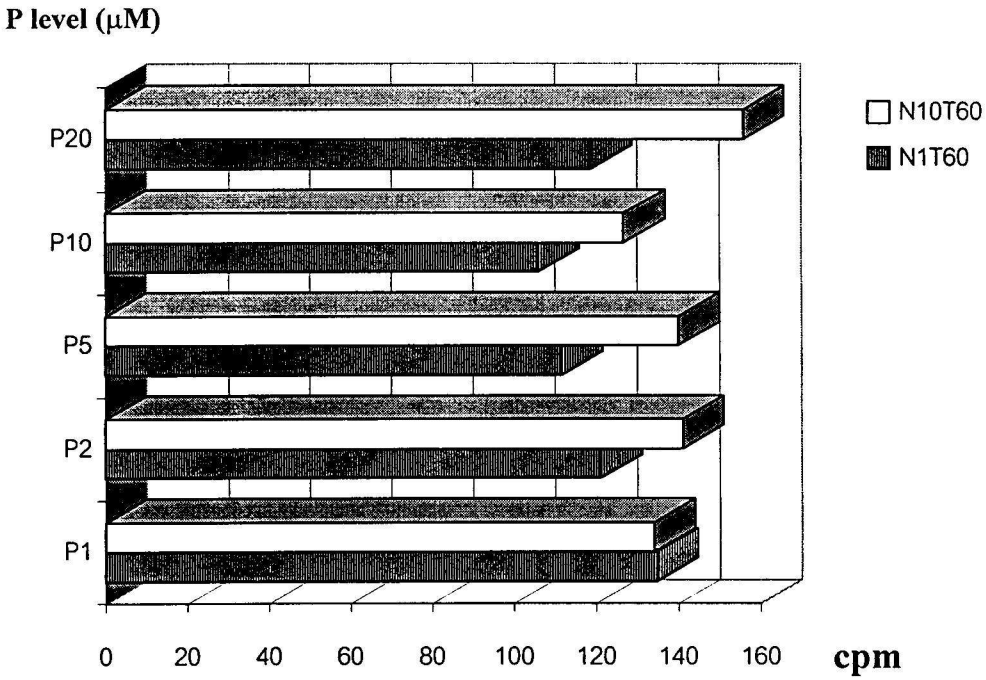


Fig. 8 P-32 count rates for 60 minute uptake in *Chlorella* sp., comparing between N=1 and 10 μM. Data was averaged from 2 experiments.

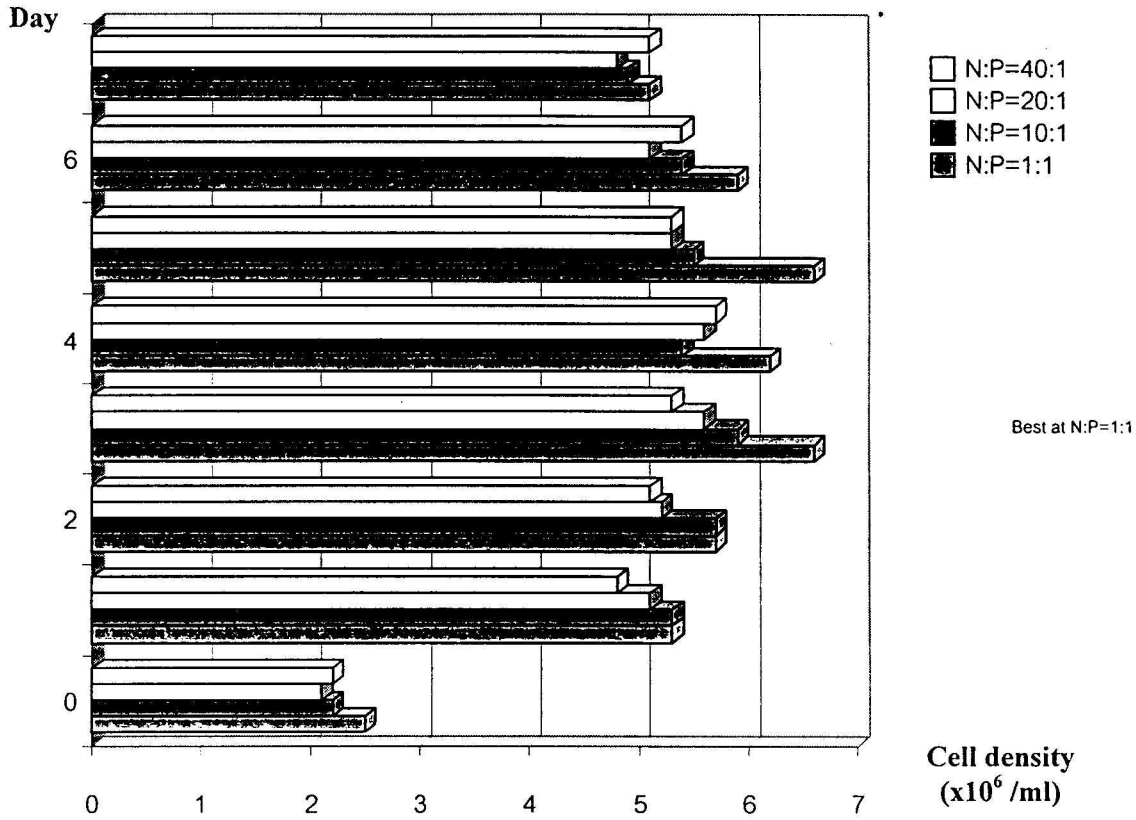


Fig. 9 Growth of *Chlorella* sp. for 7 days in an artificial sea water under 4 ammonium levels

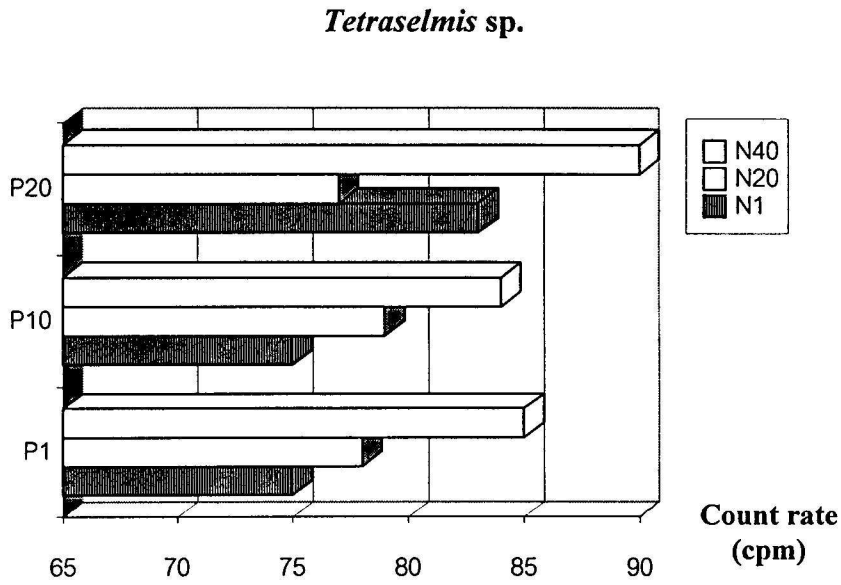


Fig. 10 The uptake of P-32 into *Tetraselmis* sp. under various N:P ratios.

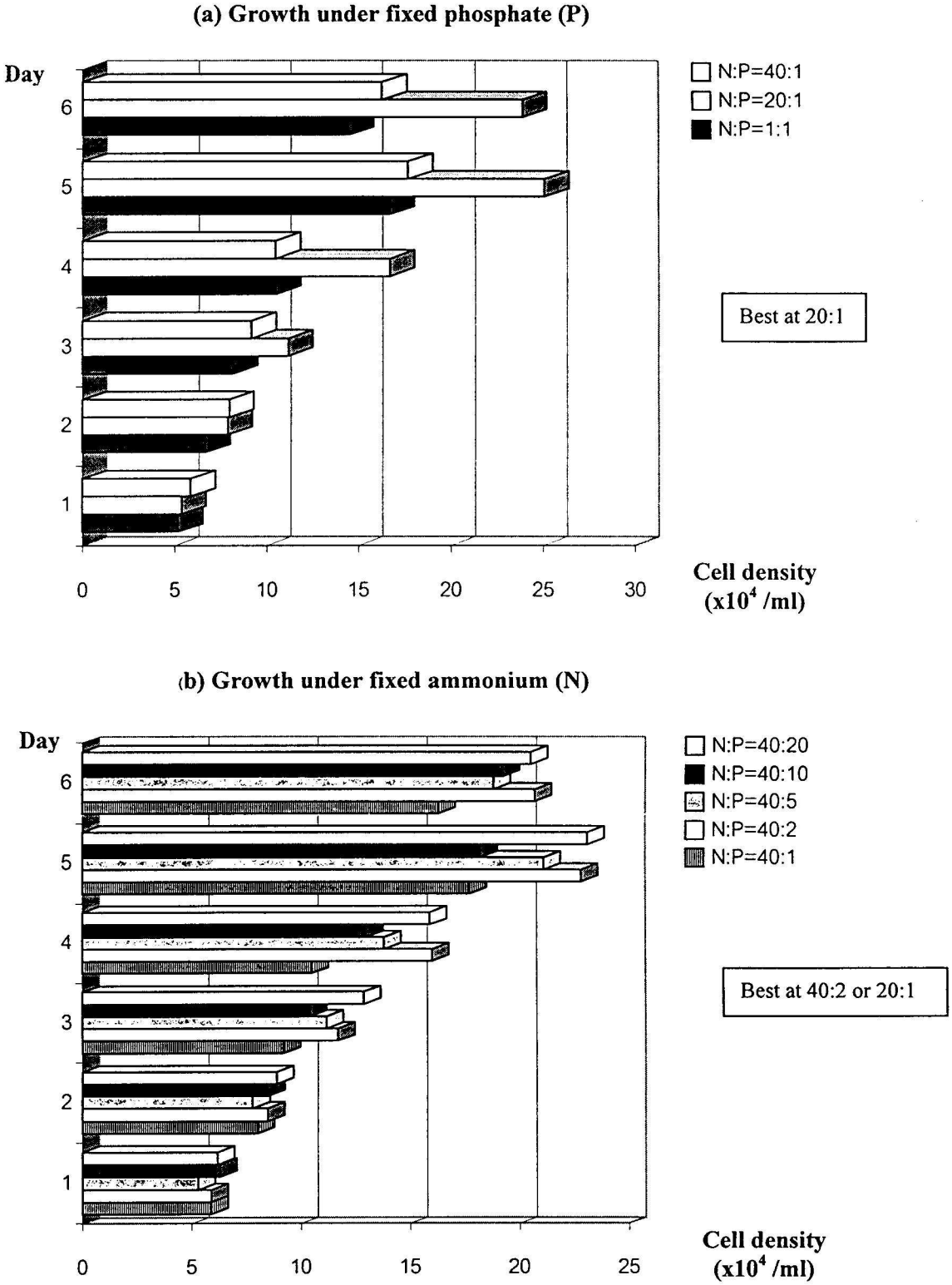


Fig. 11 Comparing the growth of *Tetraselmis* sp. in an artificial sea water under various N:P ratios
(a) when P level was fixed as 1 μM K_2HPO_4 and
(b) when N level was fixed as 40 μM NH_4Cl.

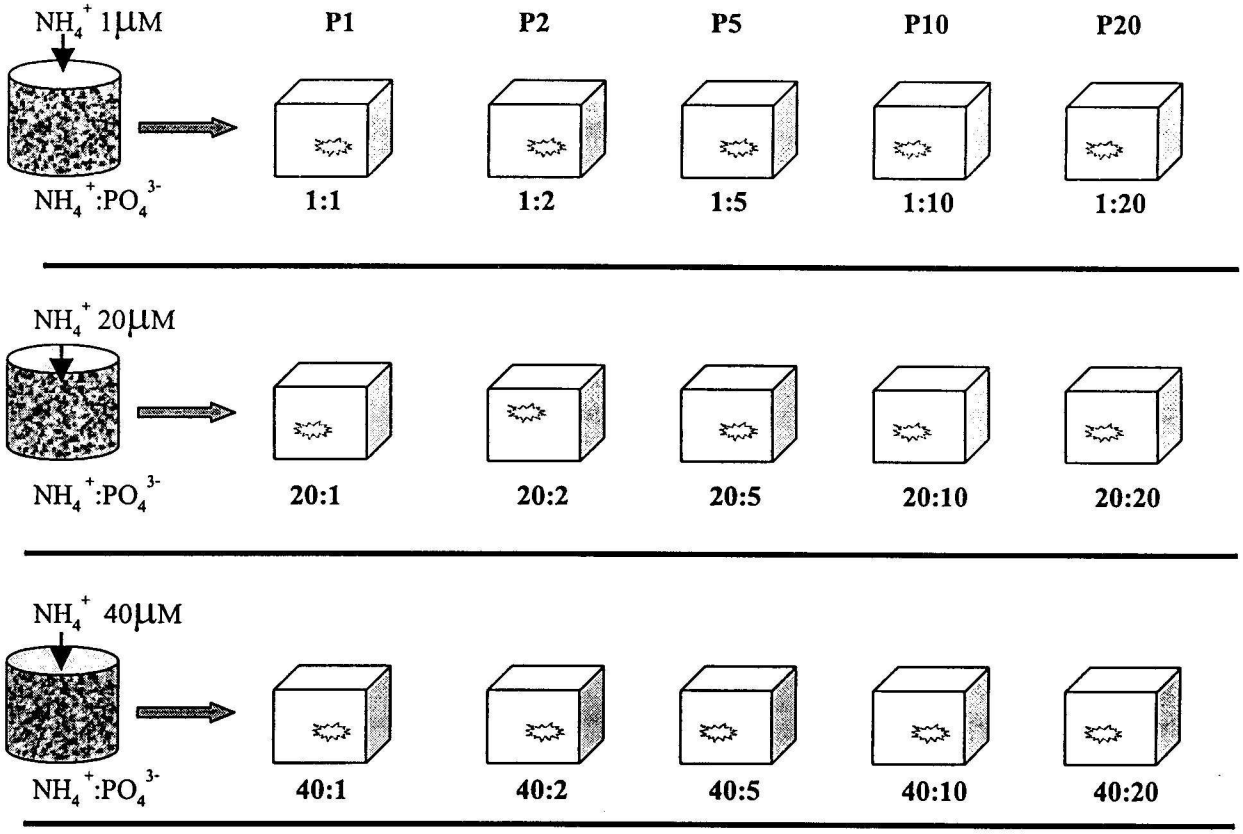
3.3 การดูดซึมฟอสฟอรัสในแพลงก์ตอนกลุ่มไดอะตอม *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง แอมโมเนียม และ ฟอสเฟต ในน้ำทะเลเทียม

การเลือกเซลล์เพื่อทดลอง ใช้วิธีเดียวกับหัวข้อ 3.2 กล่าวคือให้เซลล์อยู่ในสภาพขาดสารอาหาร โดยสังเกตจากการความหนาแน่นที่ลดลง **(Table 3)** ส่วนระดับฟอสเฟตและแอมโมเนียมที่จะผันแปร ได้ใช้ระดับเดียวกับที่ศึกษาในแพลงก์ตอนกลุ่มสาหร่ายสีเขียว

3.3.1 อัตรานับของ P-32 ในน้ำทะเลเทียมที่ผันแปรระดับ แอมโมเนียม และฟอสเฟต

<u>การศึกษาในเซลล์ *Chaetoceros* sp.</u>

ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองในน้ำทะเลเทียมที่ไม่มี แอมโมเนียม และ ฟอสเฟต เป็นเวลา 2 วันแล้ว นำเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงและแขวนลอยในน้ำทะเลเทียมใหม่อีกครั้งหนึ่ง การทดลองแต่ละชุดได้แบ่งเซลล์ที่เตรียมไว้ออกเป็น 3 ส่วน โดยใส่ NH_4Cl (N) ในปริมาณต่างกัน 3 ระดับ ดังนี้ 1 μM 20 μM และ 40 μM แบ่งเซลล์แต่ละส่วนออกเป็น 5 ชุดเพื่อใส่ K_2HPO_4 (P) ที่ระดับต่างกัน 5 ระดับ แล้วปล่อยไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนใส่สารรังสี ดังแสดงในแผนภาพ ข้างล่างนี้ (หมายเลขตามหลัง P คือความเข้มข้นในหน่วย μM)



= **Radioisotope**

Blank solution = ASW without plankton cells + Radioisotope $NH_4H_2{}^{32}PO_4$

ผลการสุ่มตัวอย่างที่สิ้นสุดเวลา 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง ได้แสดงไว้ใน **Fig. 12 (a,b,c)** พิจารณาอัตรานับรังสีจะเห็นว่า การดูดซึมสารรังสีของเซลล์ *Chaetoceros* sp. ค่อยๆเพิ่มจากชั่วโมงแรกถึงชั่วโมงที่ 3 และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเมื่อให้ปริมาณแอมโมเนียมเป็น40 μM มีแนวโน้มให้อัตรานับรังสีสูงสุดเกือบทุกค่าของฟอสเฟตที่ปรากฏอยู่ร่วมกัน เมื่อสิ้นสุดการดูดซึมรังสีที่ 3 ชั่วโมงจะเห็นว่าที่ปริมาณฟอสเฟต ตั้งแต่ 5 μM เป็นต้นไป แอมโมเนียมขนาด 40 μM ทำให้อัตรานับรังสีในเซลล์มากกว่าชุดที่มีแอมโมเนียมต่ำกว่าอย่างชัดเจน และหากเปรียบเทียบระหว่างช่วงเวลาทั้งสาม (a,b,c) แอมโมเนียมขนาดเดียวกันนี้ที่ ฟอสเฟต 5 μM ให้อัตรานับสูงกว่าชุดอื่นด้วย อย่างไรก็ดีเมื่อพิจารณาระหว่างเวลา 2-3 ชั่วโมง การให้ปริมาณฟอสเฟต คงที่ที่ 1 μM และปริมาณแอมโมเนียม ที่ 1 μM ให้อัตรานับรังสีในเซลล์ไม่ต่างจากกรณีที่มีแอมโมเนียมเข้มข้น 40μM มากนัก คาดว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียม อาจทำให้ความเร็วของการดูดซึมฟอสฟอรัสของเซลล์ไม่เท่ากัน กล่าวคือในชั่วโมงแรกอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียม:ฟอสเฟต 40:1 ทำให้เซลล์รับฟอสฟอรัสได้ดีกว่าที่อัตราส่วน 1:1 เมื่อเวลาผ่านไปมากพอ การรับฟอสฟอรัสอาจใกล้จุดอิ่มตัวเนื่องจากเซลล์มีปริมาตรจำกัด ทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่เซลล์รับจากน้ำทะเลเทียมชุด 1:1 ใกล้เคียงชุด 40:1 ยิ่งขึ้น ขณะเดียวกันหากพิจารณาที่เวลา 3 ชั่วโมงจะพบว่า เซลล์รับฟอสเฟตได้ดีที่อัตราส่วนระหว่าง แอมโมเนียม:ฟอสเฟต ที่ 40:5 ด้วยเช่นกัน โดยที่หากเวลาน้อยกว่า 3 ชั่วโมง ผลอัตรานับของเซลล์ในชุดดังกล่าวกลับไม่ได้แสดงออก

เป็นที่น่าสังเกตว่าหากเปรียบเทียบผลเมื่อให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคงที่ที่ 1μM ตั้งแต่ชั่วโมงแรกถึงชั่วโมงที่ 3 จะเห็นว่าการเพิ่มขึ้นของฟอสเฟต กลับปิดกั้นการดูดซึมฟอสฟอรัสของแพลงก์ตอนชนิดนี้ และผลดังกล่าวลดความชัดเจนลงเมื่อเพิ่มแอมโมเนียมให้มากขึ้น

จากการทดลองนี้ทำให้สามารถประมาณได้ว่า อัตราส่วนแอมโมเนียม:ฟอสเฟต ที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงแพลงก์ตอนชนิด *Chaetoceros* sp. ในน้ำทะเลเทียม น่าจะอยู่ระหว่าง 40:1 ถึง 40:5 (หรือ 8:1) โดยคงปริมาณ แอมโมเนียมที่ 40 μM

<u>การศึกษาในเซลล์ *Skeletonema* sp.</u>

การเตรียมเซลล์เป็นทำนองเดียวกับการเตรียมเซลล์ *Chaetoceros* sp. ผลการทดลองได้แสดงไว้ใน **Fig. 13 (a,b,c)** จะเห็นว่าการเพิ่มเวลาของการดูดซึมรังสีจาก 1 ชั่วโมงเป็น 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง อัตรานับรังสีเพิ่มขึ้นไม่มากนัก เมื่อพิจารณาที่เวลา 1 ชั่วโมง **(Fig. 13a)** และให้ฟอสเฟตคงที่ที่ 1 μM ปริมาณแอมโมเนียม ที่ 1 μM และ 40 μM มีผลอัตรานับใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเวลาผ่านไปเป็นชั่วโมงที่ 2 อัตรานับกรณีที่มีแอมโมเนียม 40 μM จะสูงกว่า และในชั่วโมงที่ 3 อัตรานับรังสีไม่แตกต่างกันมากนัก ขณะที่ระดับแอมโมเนียม ที่ 20μM กลับแสดงผลอัตรานับในเซลล์สูงสุด จึงทำให้เกิดความคลางแคลงใจเกี่ยวกับอัตรานับของเซลล์ชุด 40:1 ที่เวลา 3 ชั่วโมง เนื่องจากอัตรานับไม่น่าจะลดลงเมื่อเทียบกับผลเมื่อสิ้นสุดเวลา 2 ชั่วโมง **(เปรียบเทียบกับ Fig. 13b และ c)** ทำนองเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเวลา 1 และ 2 ชั่ว

โมง จะเห็นว่าความไม่แน่นอนเกิดขึ้นที่อัตรานับของเซลล์ในชุด 1:1 เช่นกัน กล่าวคืออัตรานับลดลงจาก 60 ต่อนาที เป็น 50 ต่อนาที ทั้งๆที่เวลาที่เซลล์ดูดซึมรังสีนานกว่า นอกจากนี้เซลล์ในชุดที่มี ฟอสเฟต 5 μM ระหว่างเวลา 2-3 ชั่วโมง แสดงอัตรานับรังสีลดลงเช่นกัน เนื่องจากข้อมูลที่ได้ทั้งหมดของกราฟทั้งสามนี้ ได้จากการเฉลี่ยของการทดลอง 6 ครั้ง จึงคาดว่าอัตรานับรังสีน่าจะเชื่อถือได้ แต่จากการสังเกตว่าเซลล์เติบโตช้าและมักมีปัญหาในการเพาะเลี้ยง ความแปรปรวนของข้อมูลเซลล์ชนิดนี้ คาดว่าเกิดจากสภาพของเซลล์ที่อ่อนแอ ปกติแล้วเซลล์ชนิดนี้ไวต่อแสง การเจริญเติบโตอาจเป็นไปอย่างรวดเร็วในสภาวะที่เหมาะสม เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่เซลล์จะตายในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เสมือนว่าเซลล์ไม่ดูดซึมสารรังสีเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาของการให้สารรังสี

นอกจากนี้จะสังเกตได้ว่า อัตรานับรังสีในเซลล์ชนิดนี้ต่ำกว่าที่พบในเซลล์อีก 3 ชนิดข้างต้น เนื่องจากข้อมูลที่ได้เป็นการเฉลี่ยจาก 6 การทดลอง จึงเข้าใจว่าสภาพของเซลล์ที่ใช้ศึกษาอาจไม่แข็งแรงนัก ทำให้การดูดซึมฟอสฟอรัสต่ำ

3.3.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ในน้ำทะเลเทียมที่มีระดับแอมโมเนียมและฟอสเฟตต่างๆกัน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp.ในน้ำทะเลเทียมที่มีอัตราส่วนของ แอมโมเนียม:ฟอสเฟต เป็น 1:1 10:1 20:1 และ 40:1 โดยทดลองจำนวน 4 ครั้งสำหรับเซลล์แต่ละชนิด แม้ว่าเซลล์แต่ละชุดทดลองที่เงื่อนไขอุณหภูมิและแสงเดียวกัน แต่ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ที่นำมาคำนวณความหนาแน่นมีค่อนข้างสูง จึงได้เสนอข้อมูลแยกแต่ละชุด เพื่อเปรียบเทียบในชุดทดลองวันเดียวกัน

Table 4 (a-d) แสดงการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *Chaetoceros* sp. พบว่าเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในวันที่ 5 เซลล์ทั้ง 4 ชุดแสดงความหนาแน่นสูงสุดที่ อัตราส่วนแอมโมเนียม:ฟอสเฟตที่ 40:1 ดังนั้นการศึกษาด้วยสารรังสี ที่ทำให้ทราบว่า อัตราส่วน แอมโมเนียม:ฟอสเฟต ที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงแพลงก์ตอนชนิด *Chaetoceros* sp. ในน้ำทะเลเทียม น่าจะอยู่ระหว่าง 40:1 ถึง 40:5 นั้น น่าเชื่อถือได้ แต่การทดสอบเลี้ยงเซลล์ได้เลือกเฉพาะอัตราส่วน 40:1 เท่านั้น พึงสังเกตว่า ที่อัตราส่วน 40:5 หรือเทียบเป็นสัดส่วนระหว่างปริมาณแอมโมเนียมและฟอสเฟตคือ 8:1 น่าจะให้ผลใกล้เคียงกับอัตราส่วน 10:1 ซึ่งมีผลการเพาะเลี้ยงแสดงไว้ในตารางเดียวกัน

Table 5(a-d) แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ *Skeletonema* sp. ในน้ำทะเลเทียมที่มีอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมและฟอสเฟต ต่างๆกัน สังเกตว่าในการเพาะเลี้ยงนี้ เซลล์เจริญเติบโตได้ดีเพียง 2 วันที่ทุกอัตราส่วน เมื่อพิจารณาอัตรารอดจะเห็นว่า สิ้นสุดวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เซลล์มีชีวิตรอดอยู่ได้มากที่สุดในน้ำทะเลเทียมที่มีแอมโมเนียม 40 μM และฟอสเฟต 1μM จึงสรุปว่าอัตราส่วน 40:1 (หน่วย μM) เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้เช่นเดียวกับเซลล์ *Chaetoceros* sp.

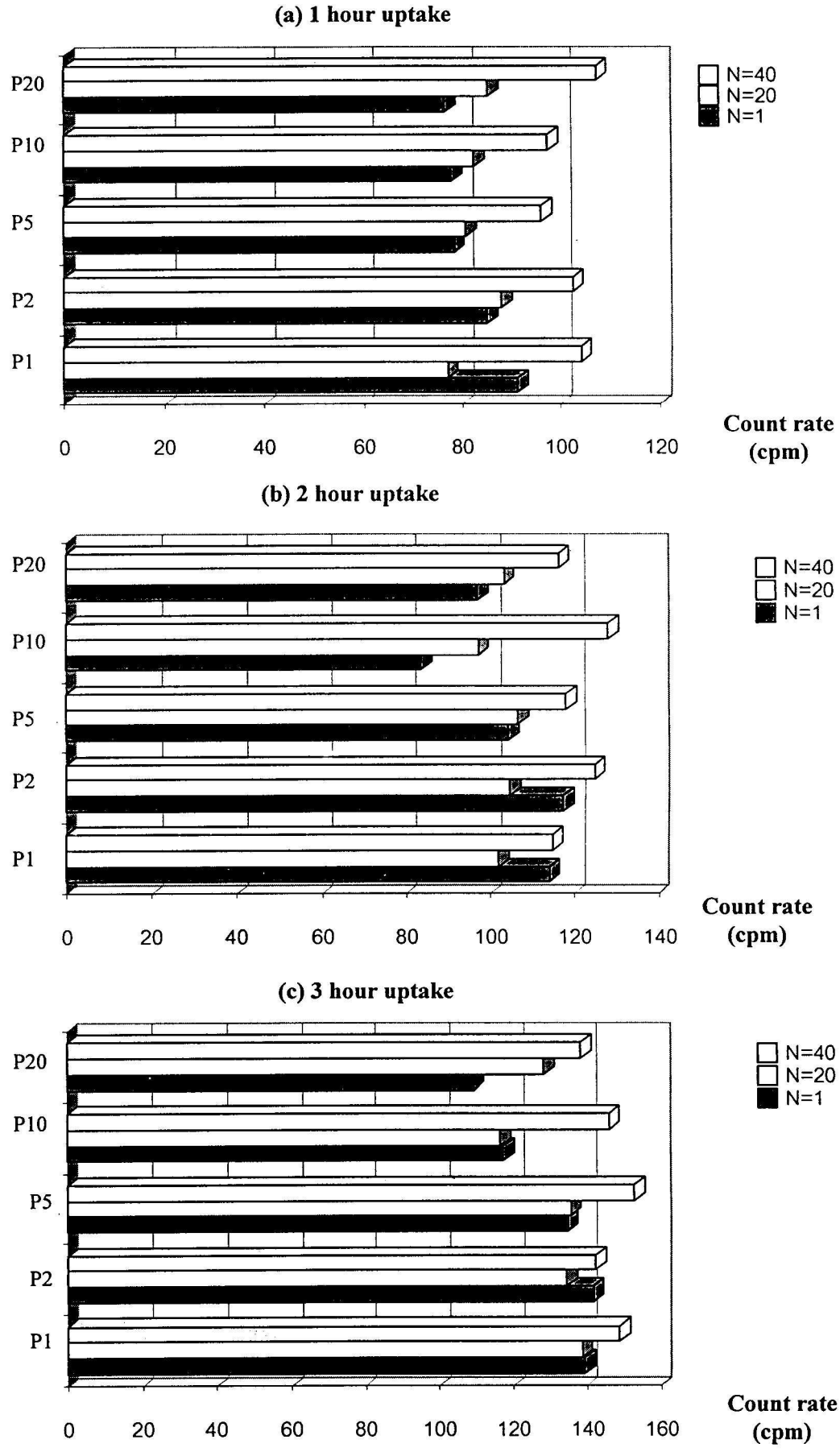
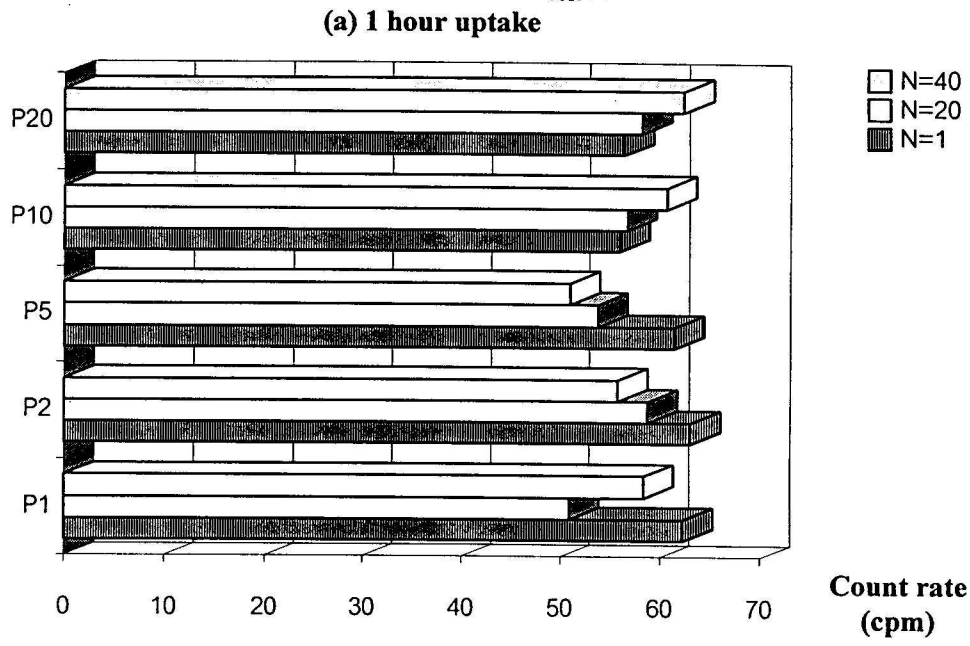
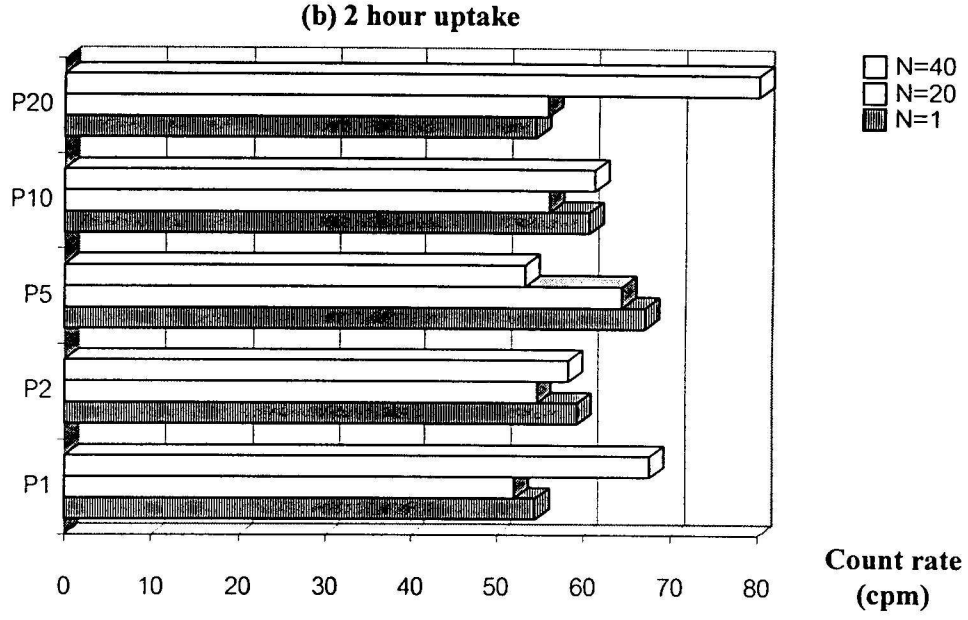


Fig. 12 Comparing count rate in *Chaetoceros* sp. under various N:P ratios at the end of 1 hour (a), 2 hours (b) and 3 hours (c).

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF A UNIVERSITY





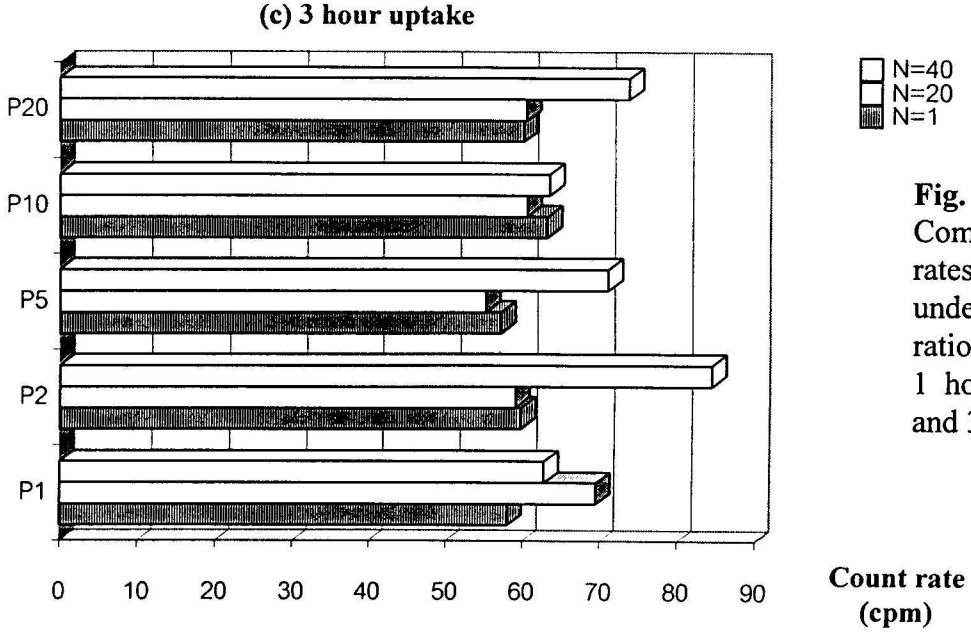


Fig. 13
Comparing count rates in *Skeletonema* sp. under various N:P ratios at the end of 1 hour (a), 2 hours (b) and 3 hours (c).

Table 4 Cell density for *Chaetoceros* sp. in ASW, averaged from 3 replicates.

(a) Experiment 1 in. ($x10^4$ cell/ml)

d-m-y	Treatment			
	N1 P1	N10 P1	N20 P1	N40 P1
4-11-40	51	58	62	52
5-11-40	116	111	122	112
6-11-40	105	103	121	120
7-11-40	115	94	127	113
8-11-40	96	99	110	123
9-11-40	82	101	111	125

(b) Experiment 2 in. ($x10^4$ cell/ml)

d-m-y	Treatment			
	N1 P1	N10 P1	N20 P1	N40 P1
4-11-40	54	52	53	58
5-11-40	110	112	119	136
6-11-40	104	121	123	140
7-11-40	117	125	132	147
8-11-40	118	120	116	114
9-11-40	90	115	111	129

Table 4 Cell density for *Chaetoceros* sp. in ASW, averaged from 3 replicates.

(c) Experiment 3 in. ($x10^4$ cell/ml)

d-m-y	Treatment			
	N1 P1	N10 P1	N20 P1	N40 P1
4-11-40	57	56	59	50
5-11-40	101	102	113	125
6-11-40	104	111	127	154
7-11-40	104	120	105	152
8-11-40	118	112	117	113
9-11-40	91	111	114	128

(d) Experiment 4 in. ($x10^4$ cell/ml)

d-m-y	Treatment			
	N1 P1	N10 P1	N20 P1	N40 P1
4-11-40	54	55	58	53
5-11-40	109	108	118	124
6-11-40	104	112	124	138
7-11-40	112	113	121	137
8-11-40	111	110	114	117
9-11-40	88	109	112	127

Table 5 Cell density of *Skeletonema* sp. in ASW, averaged from 3 replicates.

(a) Experiment 1 in ($x10^4$ cell/ml)

d-m-y	Treatment			
	N1 P1	N10 P1	N20 P1	N40 P1
4-11-41	8.20	9.44	10.88	5.11
5-11-41	23.16	16.22	16.72	15.55
6-11-41	19.44	13.77	12.05	12.22
7-11-41	17.61	10.22	12.44	11.88
8-11-41	3.22	4.50	5.70	11.27
9-11-41	0.22	0.38	0.27	3.50

(b) Experiment 2 in ($x10^4$ cell/ml)

d-m-y	Treatment			
	N1 P1	N10 P1	N20 P1	N40 P1
4-11-41	10.33	8.94	7.55	5.94
5-11-41	21.55	17.11	13.22	14.11
6-11-41	19.27	10.94	12.72	11.88
7-11-41	10.50	8.22	12.00	10.94
8-11-41	7.50	10.22	8.72	11.66
9-11-41	1.27	4.00	1.61	4.33

Table 5 Cell density for *Skeletonema* sp. in ASW, averaged from 3 replicates.

(c) Experiment 3 in ($x10^4$ cell/ml)

d-m-y	Treatment			
	N1 P1	N10 P1	N20 P1	N40 P1
4-11-41	9.88	9.88	9.77	3.61
5-11-41	25.22	24.72	13.38	19.61
6-11-41	17.38	15.33	11.11	13.88
7-11-41	14.27	11.61	13.50	13.61
8-11-41	8.00	6.92	12.00	14.05
9-11-41	3.88	5.05	6.61	8.22

(d) Experiment 4 in ($x10^4$ cell/ml)

d-m-y	Treatment			
	N1 P1	N10 P1	N20 P1	N40 P1
4-11-41	9.47	9.24	9.40	4.88
5-11-41	23.31	19.35	14.44	16.42
6-11-41	18.69	13.34	11.96	12.64
7-11-41	14.12	10.01	12.64	11.99
8-11-41	6.24	7.22	8.08	12.32
9-11-41	1.79	3.14	2.83	5.35

3.4 การศึกษาเชิงจลนพลศาสตร์

โดยทั่วไป เป็นที่ยอมรับว่าการเคลื่อนที่ของไอออนเข้าสู่เซลล์เกิดจากการแพร่และตัวช่วยขนส่ง (Carier) ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของโปรตีนหรือเอ็นไซม์ที่เยื่อเซลล์ ต่อไอออน (หรือเรียกว่าสับสเตรด) ชนิดนั้นๆ และบางครั้งตัวขนส่งที่เป็นโปรตีนอาจไม่ได้ช่วยขนส่งเสมอไป ทั้งนี้ขึ้นกับการปรากฏของสับสเตรดและสับสเตรดนี้อาจเป็นธาตุอาหารที่เซลล์ต้องการ หรือเป็นไอออนอื่นที่ไปเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นให้โปรตีนทำงาน ความเป็นไปได้เกี่ยวกับปฏิกิริยาเหล่านี้มีหลายรูปแบบ ซึ่งดูได้จาก Hofer (1936) หากสับสเตรดเคลื่อนที่โดยอาศัยโปรตีนหรือเอ็นไซม์ช่วย อัตราการรับสับสเตรดเข้าสู่เซลล์เทียบกับปริมาณสับสเตรดในสารละลายจะสัมพันธ์กันแบบสมการไฮเพอร์โบลา ตามที่ Michaelis-Menten เสนอ การศึกษาทำนองนี้จึงนิยมหาอัตรารับสับสเตรดสูงสุด (V_{max}) และหาปริมาณสับสเตรดต่ำสุดที่เป็นไปได้สำหรับการอยู่รอดของเซลล์ (K_S) ซึ่ง K_S พิจารณาจากปริมาณสับสเตรดที่ทำให้อัตรารับสับสเตรดเป็น $(1/2)V_{max}$ เรียกค่า V_{max} และ K_S ว่าเป็น**ค่าคงที่ Michaelis-Menten** ซึ่งเป็นค่าจำเพาะสำหรับเซลล์แต่ละชนิด ในบางกรณีใช้อัตราการเติบโตของเซลล์แทนอัตรารับสับสเตรด หากสับสเตรดนั้นๆ สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต

ข้างล่างนี้จึงอาศัยข้อมูลจากการทดลองข้างต้นเพื่อศึกษาค่าคงที่ทั้งสอง โดยใช้อัตราการดูดซึมฟอสฟอรัส (สับสเตรด) ของเซลล์ในรูปอัตรานับของ P-32 และใช้อัตราการเติบโตของเซลล์ ภายใต้การผันแปรปริมาณฟอสฟอรัส (สับสเตรด) ในสารละลาย และมีปริมาณไนโตรเจน (N) เป็นตัวแปรของปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวด้วย

3.4.1 อัตรานับรังสีภายในเซลล์เทียบกับความเข้มข้นของสับสเตรดที่ผันแปร

เนื่องจากการทดลองข้างต้นได้เลือกปริมาณแอมโมเนียมที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ *Chlorella* sp. คือ 1μM **(Fig. 9)** และสำหรับเซลล์ *Tetraselmis* sp. คือ 20 μM **(Fig. 11)** ส่วนการศึกษาในอะตอมทั้งสองชนิดคือ *Chaetoceros* sp. และ *Tetraselmis* sp. ในข้อ 3.3 พบว่าปริมาณแอมโมเนียมที่เหมาะสมอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 40μM **(Fig. 12 และ Fig. 13)** จึงเขียนกราฟระหว่างอัตรานับรังสีในเซลล์ทั้ง 4 ชนิดเทียบกับการผันแปร PO_4^{3-} ในสารละลาย ในที่นี้ PO_4^{3} คือปริมาณซับสเตรดในสารละลาย เฉพาะเซลล์กลุ่มสาหร่ายสีเขียวจะผันแปรสับสเตรดที่ 1μM 20μM และ 40μM **Fig. 14** แสดงอัตรานับของเซลล์ทั้ง 4 ชนิดในกราฟเดียวกัน โดยปรับความแรงรังสีในสารละลายให้เท่ากันที่ 161 cpm/10μl จะเห็นว่าเซลล์ทุกชุดแสดงอัตรานับรังสีที่ค่อนข้างอิ่มตัว แสดงว่าการให้เซลล์ดูดซึม P-32 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงนั้น นานเกินไปสำหรับการศึกษาค่าคงที่ Michaelis-Menten และเนื่องจากการทดลองไม่ได้ลดความเข้มข้นของ NH_4Cl ให้ต่ำกว่า 1μM จึงไม่สามารถประมาณค่าคงที่ Michaeis-Menten ได้ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตรารับสับสเตรดกับปริมาณสับสเตรดที่ผันแปรในสารละลายสำหรับงานวิจัยนี้ไม่เป็นไปตามสมการ Michaelis-Menten

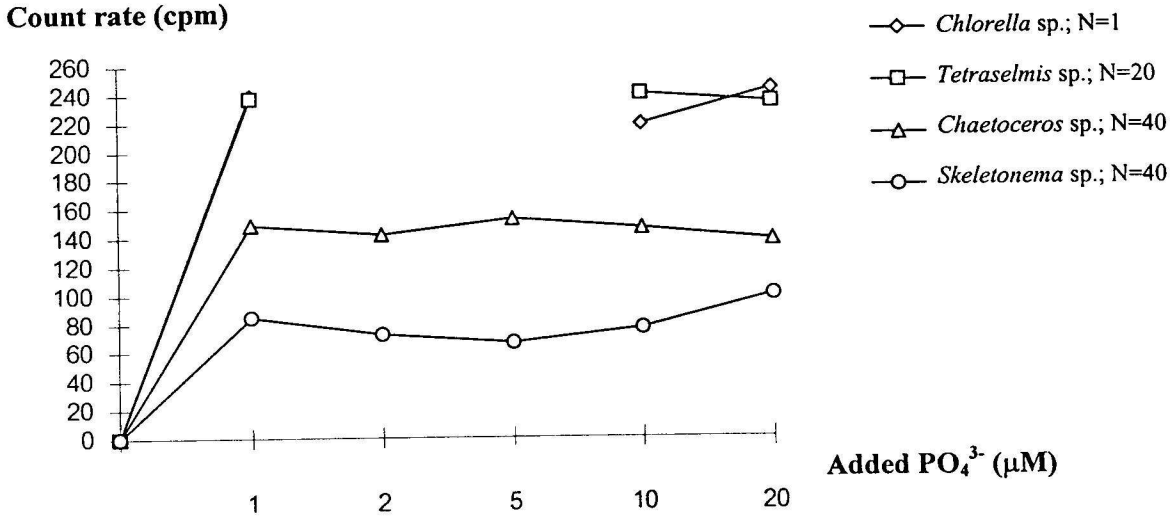


Fig. 14 Count rate (cpm) in 4 plankton species under different ammonium (N) and phosphate (P) concentration in the ASW.

Noted that cell density for each plankton was different, although the activity in 10 μl blank solution was the same (161 cpm).

3.4.2 อัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ของเซลล์ เทียบกับความเข้มข้นของซับเตรดที่ผันแปร

เนื่องจากการทดลองเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดซึม P-32 ในข้อ 3.1 พบว่าเซลล์ดูดซึมฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ ส่วนการศึกษาโดยวิธีเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลเทียมในข้อ 3.2 **(Fig.9 และ Fig.11)** และข้อ 3.3 **(Fig. 12 และ Fig. 13)** ได้ให้ข้อมูลเพื่อสามารถนำไปหาอัตราการเติบโตจำเพาะได้

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยประเภทจุลินทรีย์หรือแพลงก์ตอน สามารถหาอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ได้จากการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์เทียบกับเวลา $dx = \mu\, dt$ เมื่อ x คือจำนวนเซลล์ที่เวลา t ใดๆ เนื่องจากการเติบโตเป็นแบบเอ็กโปเนนเชียล ในช่วงล็อกเฟสของการเจริญเติบโต อัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์สามารถคำนวณได้จากจำนวนเซลล์ที่ 2 ช่วงเวลา ดังนี้

$$\mu = \frac{\ln(x_2 - x_1)}{t_2 - t_1}$$

Fig. 15(a-d) แสดงอัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์แต่ละชนิด จะเห็นว่าการเพิ่มปริมาณฟอสเฟตจาก 1μM ถึง 20μM ไม่มีผลต่อ μ แต่การผันแปรปริมาณไนเตรดจาก 1μM ถึง 40μM ทำให้ μ เปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนเตรดที่เพิ่มในน้ำทะเลเทียม จะเห็นว่าที่ระดับความเข้มข้น 1μM 20μM

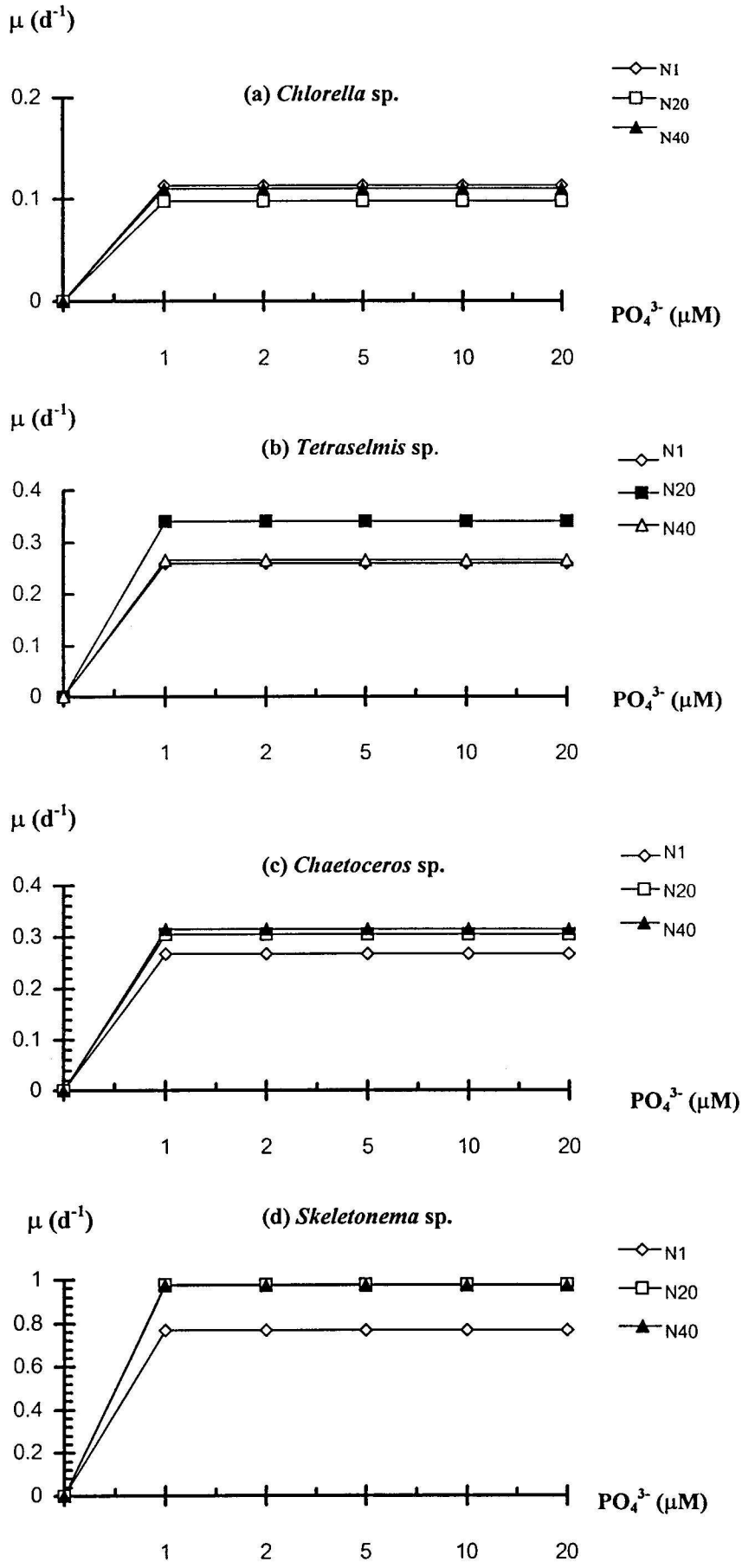


Fig. 15

Specific growth rate for 4 plankton species under variation of PO_4^{3-} concentration in ASW.

N1= 1μM NH_4Cl
N20=20μM NH_4Cl
N40=40μM NH_4Cl

และ 40μM ให้ μ สูงสุดใน *Chlorella* sp. *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. ตามลำดับ ส่วนใน *Skeletonema* sp. นั้นจะเห็นว่าไนเตรดที่ระดับความเข้มข้น 20 μM และ 40 μM ให้ μ เท่ากัน

Table 6 Comparing maximum specific growth rates for 4 plankton species under suitable nitrate concentration in the ASW.

Cell species	Maximum specific growth rate (d^{-1})	Amount of NO_3^- : PO_4^{3-} (μM)
***Chlorella* sp.**	0.11	1:1
***Tetraselmis* sp.**	0.34	20:1
***Chaetoceros* sp.**	0.32	40:1
***Skeletonema* sp.**	0.98	20:1 and 40:1

Table 6 จึงเปรียบเทียบ μ ของเซลล์แต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรดดังกล่าว จะเห็นว่าเซลล์ที่มีค่า μ สูงสุดคือ *Skeletonema* sp. ในการทดลองนี้พบว่า *Skeletonema* sp. มีอัตรารอดต่ำในน้ำทะเลเทียม กล่าวคือเซลล์เพิ่มจำนวนถึงจุดสูงสุดภายใน 2 วัน ขณะที่เซลล์ที่ มีค่า μ ต่ำที่สุดคือ *Chlorella* sp. แต่การเพิ่มจำนวนเซลล์ค่อยเป็นค่อยไป คือจำนวนเซลล์เพิ่มได้ถึงวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกัน การที่อัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์ทั้ง 4 ชนิดคงที่ตลอดทุกความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ผันแปร จึงอาจกล่าวได้ว่าค่า μ ที่คำนวณได้นี้คือการเติบโตจำเพาะสูงสุดของเซลล์ (μ_{max})

ทำนองเดียวกันกับการศึกษาโดยใช้อัตรานับรังสี งานวิจัยนี้สามารถหาได้เฉพาะอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด เนื่องจากทดลองการผันแปร PO_4^{3-} ไม่ได้ทำที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1μM การจะหาค่าคงที่ K_s ที่ให้ (1/2) μ_{max} จึงทำไม่ได้ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่า อัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์และสับสเตรดไม่ได้สัมพันธ์ตามสมการ Michaelis-Menten ถ้าผันแปรความเข้มข้นของฟอสเฟตในน้ำทะเลเทียมระหว่าง 1μM ถึง 20μM

---

4 สรุปผลและวิจารณ์

4.1 ความเหมาะสมของการใช้สารละลายเกลือรังสี $NH_4H_2{}^{32}PO_4$

ความสอดคล้องกันระหว่างอัตรานับรังสี กับการเจริญเติบโตของเซลล์ (ข้อ 3.1) ทำให้สรุปได้ว่าสามารถใช้สารละลายเกลือรังสี $NH_4H_2{}^{32}PO_4$ ศึกษาการดูดซึมฟอสฟอรัสในแพลงก์ตอนทั้ง 4 ชนิด คือ *Chlorella* sp. *Tetraselmis* sp. *Chaetoceros* sp..และ *Skeletonema* sp. ได้ แม้ว่าเกลือรังสีที่ผลิตจากสำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ ไม่เป็นชนิด Carier Free กล่าวคือมีปริมาณ NH_4^+ ติดมาด้วยจำนวนหนึ่ง ซึ่งอาจเป็นสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ เนื่องจากแหล่งให้ไนโตรเจนของเซลล์ในสูตรอาหารมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) คือ NO_3^- อย่างไรก็ดีการศึกษานี้ได้ใช้เกลือในปริมาณ 50 µl ใส่ลงในแพลงก์ตอนปริมาตร 30 ml ทุกครั้งที่ทดลอง ส่วนสารรังสีปริมาตร 50µl นั้นได้จากการเจือจางสารละลายเกลือรังสีที่ซื้อมาประมาณ 25 เท่าก่อนทดลอง รวมสัดส่วนที่ NH_4^+ ถูกเจือจางลงเป็น $[50x10^{-3}$ ml/(30 mlx25)] ซึ่งคิดเป็น 15,000 เท่า จึงสรุปว่า NH_4^+ ที่ปนมาไม่มีผลต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

4.2 อัตราส่วนระหว่างไนโตรเจน (N) และฟอสฟอรัส (P) ที่เหมาะสม

จากการผันแปรอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียมและฟอสเฟตในน้ำทะเลเทียมและจากการติดตามผลการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนทั้ง 4 ชนิดในน้ำทะเลเทียม ที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นตามที่ใช้ในการศึกษาด้วยรังสีในข้อ 3.2 และข้อ 3.3 นั้น ทำให้ทราบว่าปริมาณแอมโมเนียมที่เพิ่มขึ้นจะช่วยให้เซลล์ดูดซึมฟอสเฟตได้ดีขึ้นในเซลล์ทั้ง 4 ชนิด โดยระดับแอมโมเนียมสูงสุดที่ทดลองใช้ในเซลล์กลุ่มสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis* sp. คือ 10µM และที่ใช้ในเซลล์กลุ่มไดอะตอมคือ 40µM และพบว่าการเพิ่มปริมาณฟอสเฟตในน้ำทะเลเทียมจาก 1µM ถึง 20µM ในเซลล์ทั้ง 4 ชนิดไม่ได้ช่วยให้เซลล์ *Chlorella* sp. *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. รับรังสีได้มากขึ้น เนื่องจากฟอสเฟตไม่มีผลต่อการดูดซึม P-32 จากน้ำทะเลเทียมในเซลล์ทั้ง 3 ชนิดนี้ จึงให้ระดับฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ คือ 1µM

ส่วนเซลล์ *Tetraselmis* sp. ซึ่งแสดงผลทั้งในรูปของอัตรานับรังสี **(Fig. 10)** และการเจริญเติบโต **(Fig. 11b)** พบว่าการเพิ่มแอมโมเนียมพบว่าเซลล์มีอัตรานับสูงขึ้น และเซลล์อาจชอบให้น้ำทะเลเทียมมีฟอสเฟตที่เข้มข้นมากกว่า 1µM กล่าวคือผลจากการศึกษาด้วยวิธีนับรังสีพบว่าเซลล์ให้อัตรานับสูงสุดที่ระดับฟอสเฟต 20µM ขณะที่ระดับฟอสเฟต 10µM ให้ผลในรูปของอัตรานับเท่ากับที่ระดับฟอสเฟต 1µM เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์พบว่า ระดับฟอสเฟต 2µM และ 20µM ให้ผลใกล้เคียง เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลเทียมที่มีฟอสเฟตเข้มข้น 2µM โดยผันแปรระดับแอมโมเนียมไว้ 3 ระดับเช่นเดิม พบว่าอัตราส่วนแอมโมเนียม:ฟอสเฟตที่ 40:2 ให้ความหนาแน่นเซลล์มากที่สุด ดังแสดงใน **Fig. 16** โดยให้ผลชัดเจนในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง พึงสังเกตว่าผลการเพาะเลี้ยงที่ระดับ N:P=1:2 ให้ผลน้อยกว่าเพียงเล็กน้อย จึงสรุปว่าอัตราส่วนแอมโมเนียม:ฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ *Tetraselmis* sp. คือ 20:1 **(ดู Fig. 11a,b และ Fig. 16)** หรืออีกนัยหนึ่งก็คือ แอมโมเนียมควรมีความเข้มข้นเป็น 20 เท่าของ

ฟอสเฟต เนื่องจากการศึกษาวิจัยนี้ต้องการหาปริมาณธาตุอาหารต่ำสุดที่เป็นไปได้สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ จึงไม่ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ *Tetraselmis* sp. ในอัตราส่วน 40:20 ตามที่แสดงไว้ในผล **Fig. 10**

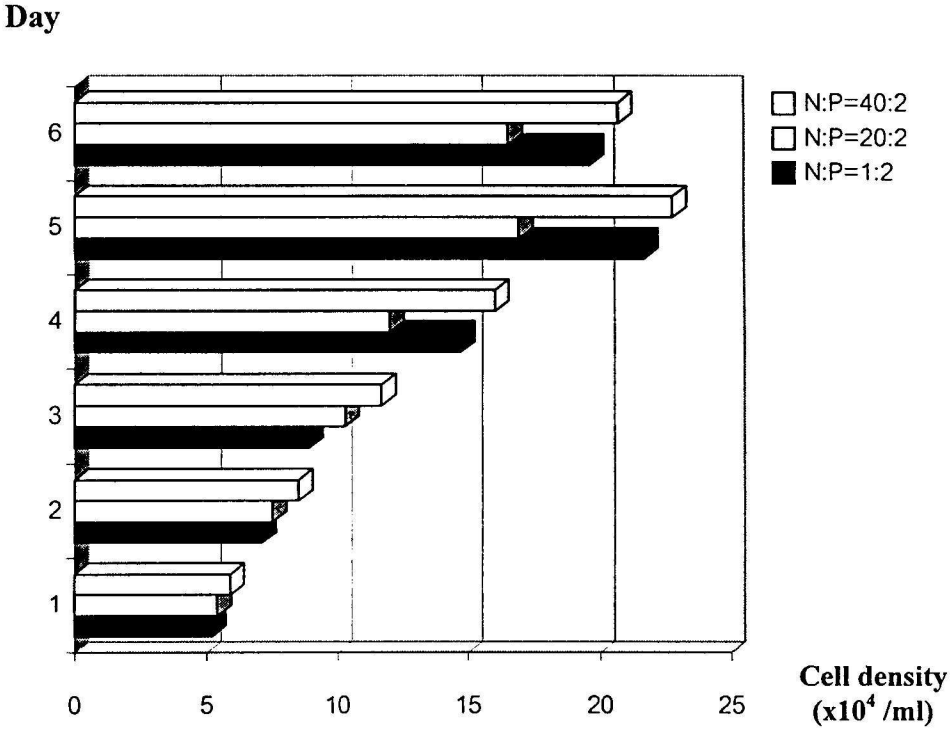


Fig. 16 Growth of *Tetraselmis* sp. in the artificial sea water for constant phosphate level at 2 μM, under variation of 3 ammonium levels.

Table 7 ได้สรุปอัตราส่วนระหว่าง N:P ในหน่วยโมลที่เหมาะสมสำหรับแพลงก์ตอนแต่ละชนิดที่ศึกษาได้ในงานวิจัยนี้ และได้เปรียบเทียบให้เห็นว่าอัตราส่วนดังกล่าวต่างจากอัตราส่วนที่ใช้ในสูตรอาหารมาตรฐานมาก ได้ทดลองหาอัตรานับของเซลล์โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้ในน้ำทะเลเทียมที่อัตราส่วนเหมาะสมดังกล่าวกับสูตรอาหารมาตรฐาน พบว่าอัตรานับของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารมาตรฐานมีปริมาณสูงกว่ามาก ความต่างกันนี้อาจเนื่องมาจาก 2 สาเหตุคือ

1 หากพิจารณาว่าปริมาณไนโตรเจนที่ผันแปรในงานวิจัยนี้ยังไม่มากพอ เนื่องจากพบว่าปริมาณไนโตรเจนสูงกว่ามีแนวโน้มจะช่วยการดูดซึมฟอสฟอรัสได้มากกว่า แต่หากพิจารณาอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด **(Fig. 15)** จะเห็นว่า การเพิ่มไนโตรเจนให้มากกว่า 20 μM ในไดอะตอมทั้งสองไม่ได้ช่วยให้อัตราการเติบโตจำเพาะเปลี่ยนแปลง ขณะที่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว ไนโตรเจนปริมาณ 1μM และ 40μM ให้ผลเท่ากัน จึงเป็นไปได้ว่าธาตุอาหารในน้ำทะเลเทียมไม่เพียงพอที่จะทำให้เซลล์เติบโตได้เท่ากับที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารมาตรฐาน

2 เป็นที่ทราบว่าอันตรกิริยาระหว่างไอออนแต่ละชนิด อาจมีผลในการชะลอ หรือเร่งการดูดซึมธาตุอาหารที่จำเป็น ดังนั้นการมีองค์ประกอบของธาตุอาหารต่างกัน อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สัดส่วน N:P ที่เหมาะสมในน้ำทะเลเทียมต่างจากที่ปรากฏในสูตรอาหารมาตรฐาน จึงน่าจะทดลองโดยศึกษาทำนองเดียวกันโดยใช้สูตรอาหารมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบผลด้วย

อย่างไรก็ดี ถึงแม้ว่าการดูดซึมฟอสฟอรัสในน้ำทะเลเทียมไม่ได้ให้อัตรานับสูงเท่าที่เลี้ยงในสูตรอาหารมาตรฐาน แต่การศึกษาในน้ำทะเลเทียมยังเป็นสิ่งจำเป็นในการทำความเข้าใจกระบวนการใช้ฟอสฟอรัสและการอันตรกิริยาระหว่างไนโตรเจนกับฟอสฟอรัส ข้อมูลนี้น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาเชิงจลนพลศาสตร์และเพื่อปรับปรุงสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงต่อไป

Table 7 Comparing N:P mole ratios suitable for cell growth in the ASW for four phytoplankton species in this study and in the standard culture media.

Cell Species	N:P in Artificial Sea Water (mole ratio)	Standard medium (mole ratio)
Chlorella sp.	1:1	in Sato&Serikawa 80:1
Tetraselmis sp.	20:1	in Sato&Serikawa 80:1
Chaetoceros sp.	40:1	in Conway 10:1
Skeletonema sp.	40:1	in Guillard 24:1

(การคำนวณจำนวนโมลในสูตรอาหารมาตรฐานดูได้จากภาคผนวก ข)

สำหรับความเหมาะสมเกี่ยวกับการใช้สารรังสีเพื่อศึกษาความต้องการธาตุอาหารนั้น หากมีอุปกรณ์ที่พร้อม อาจทำได้รวดเร็วกว่าวิธีทางชีววิทยา วิธีการนี้จะเหมาะกับการหาอัตราส่วน N:P ในสูตรอาหารที่ต้องแปรผันปริมาณธาตุอาหารหลายค่าในเวลาเดียวกัน ซึ่งหากใช้วิธีการนับเซลล์จะต้องใช้เวลานานกว่ามาก วิธีนี้อาจจะเป็นวิธีที่เหมาะสม หากจะศึกษาการดูดซึมอาหารที่ต้องหลีกเลี่ยงปัญหาการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ อย่างไรก็ดีการศึกษาด้วยวิธีรังสีนี้มีข้อด้อยตรงที่ต้องอาศัยความชำนาญเฉพาะทางและห้องปฏิบัติการต้องพร้อมเพื่อป้องกันอันตรายจากรังสี

4.3 การวิเคราะห์เชิงสถิติโดยวิธี ANOVA

จากการศึกษาในไดอะตอมทั้งสองชนิด ผลจากการผันแปรระดับแอมโมเนียมและฟอสเฟตในน้ำทะเลเทียมได้ถูกนำไปวิเคราะห์เชิงสถิติแบบบล็อก ด้วยวิธี ANOVA การวิเคราะห์ผลใน *Chaetoceros* sp. พบว่าที่ฟอสเฟตคงที่ การเพิ่มแอมโมเนียมมีผลทำให้อัตรานับรังสีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.01$) และเมื่อให้แอมโมเนียมคงที่ การเพิ่มฟอสเฟตมีผลทำให้อัตรานับรังสีลดลง นอกจากนี้ ยังพบอันตรกิริยาระหว่างแอมโมเนียมและฟอสเฟต ($P \geq 0.05$) กล่าวคือที่ระดับแอมโมเนียมต่ำ การเพิ่มฟอสเฟตจะทำให้อัตรานับลดลง แต่หากเพิ่มแอมโมเนียมให้สูงขึ้น (ที่ 20μM และ 40μM) การเพิ่มฟอสเฟตจะทำให้อัตรานับสูงขึ้นด้วย (ดูผลการวิเคราะห์จากภาคผนวก ค) อย่างไรก็ดีการใช้แอมโมเนียมที่ 40μM และฟอสเฟต 20μM แม้จะทำให้อัตรานับดีที่สุด แต่ผลเชิงสถิติไม่ต่างจากกรณีที่มีฟอสเฟต 1μM และ 2μM ดังนั้นการเลือกเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลเทียมที่ระดับแอมโมเนียมต่อฟอสเฟตเป็น 40:1 (โมล) จึงสมเหตุสมผลแล้ว

ส่วนการวิเคราะห์ผลในเซลล์ *Skeletonema* sp. พบว่า ที่ฟอสเฟตคงที่ การเพิ่มแอมโมเนียมจะทำให้อัตรานับรังสีลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่ระดับแอมโมเนียมคงที่การเพิ่มฟอสเฟตจะไม่มีผลต่ออัตรานับรังสีภายในเซลล์ และพบว่าอันตรกิริยาระหว่างแอมโมเนียมและฟอสเฟตมีผลต่ออัตรานับอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ กล่าวคือ ถ้าระดับแอมโมเนียมต่ำ (1μM) การเพิ่มฟอสเฟตจะมีผลทำให้อัตรานับลดลง แต่ถ้าระดับแอมโมเนียมสูงขึ้นที่ 20μM และ 40μM การเพิ่มฟอสเฟตจาก 1μM จนกระทั่งถึง 20μM จะทำให้อัตรานับรังสีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปว่าหากใช้แอมโมเนียมที่ระดับต่ำ (1μM) ควรใช้ฟอสเฟตที่ระดับต่ำ (1μM) ด้วยจึงจะให้ผลอัตรานับดีที่สุด แต่หากใช้แอมโมเนียมที่ระดับสูงสุด 40μM ก็ควรใช้ฟอสเฟตที่ระดับ 20μM จึงจะให้ผลดีที่สุด จากผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทั้ง 4 ซ้ำใน **Table 5 (a-d)** (หน้า 3-23) แม้จะพบว่าเซลล์เพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าในอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อฟอสเฟตที่ 1:1 แต่เมื่อเปรียบเทียบอัตรารอดตาย จะเห็นว่าอัตราส่วน 40:1 จะเหมาะสมกว่า ซึ่งเป็นอัตราส่วนเดียวกันกับเซลล์ *Chaetoceros* sp.

4.4 การศึกษาเชิงจลนพลศาสตร์

เนื่องจากวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้คือการหาอัตราส่วนไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนโดยอาศัยวิธีการติดฉลากรังสี จึงได้อาศัยข้อมูลที่มีอยู่มาวิเคราะห์ผลเชิงจลนพลศาสตร์ และพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตรารับสับสเตรดในรูปของ P-32 ค่อนข้างคงที่ ไม่ได้เป็นแบบไฮเพอร์โบลา ดังสมการ Michaelis-Menten แสดงว่าระยะเวลาที่ให้เซลล์รับรังสีในข้อ 3.2 และ 3.3 นานเกินไปที่จะนำไปใช้กับงานในข้อ 3.4 เนื่องจากเซลล์อาจ "อิ่ม" จึงทำให้อัตรานับที่ได้เป็นค่าสูงสุด (V_{max}) ที่ความเข้มข้นนั้นๆ งานวิจัยนี้จึงประมาณได้เฉพาะค่า V_{max} เท่านั้น นอกจากนี้ความเข้มข้นขนาด 1 μM ของสับสเตรดที่ผันแปรในน้ำเลี้ยงอาจมากเกินไปที่จะหาค่า K_S ได้ งานต่อไปจึงน่าจะลองลด

เวลาให้น้อยกว่า 30 นาที **(Fig. 7)** เช่นอาจสุ่มตัวอย่างทุกๆ 4 นาที เหมือนที่ Cotner และคณะ (1992) ทำ เพื่อให้เห็นรายละเอียดของการเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ดี V_{max} ที่ได้จากงานวิจัยนี้จึงน่าจะจัดให้เป็นค่าคงที่ของกระบวนการดูดซึมที่ Low affinity System ได้ (ดู Jansson 1993) ส่วนอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด μ_{max} ในน้ำทะเลเทียมที่ประมาณได้จากอัตราส่วนไนโตรเจนและฟอสฟอรัสตาม **Table 7** สำหรับเซลล์ *Chlorella* sp. *Tetraselmis* sp. *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. คือ $0.11 d^{-1}$ $0.34 d^{-1}$ $0.32 d^{-1}$ และ $0.98 d^{-1}$ ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่า เซลล์ที่มี μ_{max} ต่ำจะค่อยๆเจริญเติบโตและให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดช้ากว่าเซลล์ที่มี μ_{max} สูง

เอกสารอ้างอิง

ธรรมนูญ ง่านวิสุทธิพันธ์ 2531. การทดลองปรับปรุงช่วงระยะการให้อาหารและผลของการใช้อาร์ทีเมียที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อน วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 70 หน้า

ธิดา เพชรมณี และ ประกิต ไกรสิงห์เดชา 2527. อิทธิพลของอุณหภูมิ แสงและความเค็มของน้ำต่อการเจริญเติบโตของ *Chaetoceros* sp. รายงานการวิจัยอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน ปี 2527 เอกสารวิชาการฉบับที่ 19/2527. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา 8 หน้า

ธิดา เพชรมณี และมาวิทย์ อัศวอารีย์ 2532. การใส่สารประกอบคลอรีนเพื่อควบคุมโปรโตซัวในการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2532. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมงจังหวัดสงขลา 16 หน้า

ธิดา เพชรมณี. 2541. การอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำและลูกปลากะพงขาวโดยไม่ใช้อาร์ทีเมีย เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตรกลยุทธ์การอนุบาลสัตว์น้ำในยุคอาร์ทีเมียขาดแคลน วันที่ 23 มกราคม 2541 ห้องประชุมสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ. สงขลา หน้า 5-8.

ปรอง เกิดมีสุข 2530 พิษเฉียบพลันของแคดเมียมต่อแพลงก์ตอนพืชพวกดีโตเซอรอส (*Chaetoceros* sp.) และคลอเรลลา (*Chlorella* sp.) ปัญหาพิเศษ เสนอต่อภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สงขลา 29 หน้า

มาวิทย์ อัศวอารีย์ และธิดา เพชรมณี 2534. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ คลอเรลลาในห้องปฏิบัติการ เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2534 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง 13 หน้า

สวัสดิ์ วงศ์สมนึก และ สุจินต์ มณีวงศ์ 2516. ผลการทดลองเพาะพันธุ์ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) โดยวิธีผสมเทียม เอกสารวิชาการ สถานีประมงทะเลสงขลา กองสำรวจและค้นคว้า กรมประมง 22 หน้า.

สิริ ทุกข์วินาศ 2541.แนวทางและนโยบายการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำไทย เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการเรื่องกุ้งกุลาดำช่วยฟื้นฟูเศรษฐกิจไทย วันที่ 14 กันยายน 2541. โรงแรมหาดแก้วรีสอร์ท สงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 4-7.

สุพจน์ จึงแย้มปิ่น บุญส่ง สิริกุล ไชยยุทธ์ จันทนชูกลิ่น สุชาติ เตชนราวงศ์ และวิชัย วัฒนกุล 2527. การอนุบาลลูกปลากะพงขาวในกระชัง จากขนาดความยาว 1.5 เซนติเมตร จนถึงขนาดความยาว 5 เซนติเมตร (2 นิ้ว) ในอัตราความหนาแน่นต่างๆกัน รายงานผลงานทางวิชาการ ปี 2526 เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2527 หน้า 54-71.

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน

สูตรอาหารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนในห้องปฏิบัติการที่สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา

Table 8 Nutrient composition of culture media for phytoplankton growth in laboratory.

Components	Conway mg/L	Sato&Serikawa mg/L	Guillard mg/L
$NaNO_3$	100	100	150
$Na_2H_2PO_4.H_2O$	-	-	10
$Na_2HPO_4.2H_2O$	20	-	-
$Na_2HPO_4.12H_2O$	-	10	-
$NaHCO_3$	-	168	-
$Na_2SiO_3.9H_2O$	0.015	4	5
Na_2.EDTA	45	3	8.72
$FeCl_3.6H_2O$	1.3	0.24	6.30
$CuSO_4.5H_2O$	0.020	0.40	0.02
$ZnSO_4.7H_2O$	-	-	0.044
$CoCl_2.6H_2O$	0.020	0.80	0.02
$MnCl_2.4H_2O$	0.36	0.27	0.36
$Na_2MoO_4.2H_2O$	-	-	0.013
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.009	-	-
$ZnCl_2$	0.021	0.03	-
H_3BO_3	33.6	3.44	-
Thiamine HCl (B_1)	0.01	-	0.2
Biotin	-	-	0.001
Cyanocobalamin (B_{12})	0.005	-	0.001
Sea Water	1 L	**1 L**	1 L

(จากมาวิทย์ และ ธิดา 2534)

น้ำทะเลเทียม

(Artificial Sea Water)

In 1 L of an artificial sea water containing the following nutrients (see Limnol. Oceano. 1967, 12:176)

Table 9 Nutrient composition in the artificial sea water used in this study.

Components	mg/L
NaF	3
$SrCl_2.6H_2O$	20
H_3BO_3	30
KBr	100
KCl	700
$CaCl_2.2H_2O$	1,470
Na_2SO_4	4,000
$MgCl_2.6H_2O$	10,780
NaCl	**23,500**
$Na_2SiO_3.9H_2O$	20
Na_4EDTA	1
$NaHCO_3$	200

ภาคผนวก ข

การคำนวณจำนวนโมลของสารในสารละลายที่ศึกษา

1 **สูตรอาหาร Sato&Serikawa**

มี PO_4^{3-} ในรูปของเกลือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ จำนวน 10 mg/L

มวลโมเลกุลของ $Na_2HPO_4.12H_2O$ คือ (23x2)+(1x1)+[(31x1)]+(16x4)+12[(2x1)+(16x1)] = 358

ดังนั้น $Na_2HPO_4.12H_2O$ 10 mg/L คิดเป็น $(10x10^{-3}$ g/L) / (358 g/L) = $27.9x10^{-6}$ โมล/ลิตร

Mole/L = Molar $\therefore$ $27.9x10^{-6}$ mole/L = 27.9 μM

ใน $Na_2HPO_4.12H_2O$ จำนวน 358 โมล มี P อยู่จำนวน 31 โมล

ถ้า $Na_2HPO_4.12H_2O$ จำนวน $27.9x10^{-6}$ โมล/ลิตร จะมี P อยู่ = $(31)(27.9x10^{-6})/358$

= $2.42x10^{-6}$ โมล =**2.42 μmole**

ส่วน N มีอยู่ในรูป $NaNO_3$ จำนวน 100 mg/L

$NaNO_3$ มีมวลโมเลกุล = (23x1)+(14x1)+(16x3) = 85

$NaNO_3$ จำนวน 100 mg/L คิดเป็น $(100x10^{-3}$ g)/(85 g) = $1176.5x10^{-6}$ mole/L = 1176 μM

<u>หาจำนวนโมลของไนโตรเจน</u>

$NaNO_3$ 85 โมล มี N อยู่ = 14 โมล

ถ้า $NaNO_3$ $1176.5x10^{-6}$ โมล/ลิตร มี N อยู่ = $(14)(1176.5x10^{-6})/85$ = $193.8x10^{-6}$ โมล/ลิตร

= 193.8μmole

<u>สรุป</u> ในสูตร Sato&Serikawa มี N ใน $NaNO_3$ อยู่ **193.8 μmole** และ

มี P ในเกลือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ จำนวน 2.42 μmole

$\therefore$ ในสูตรอาหาร Sato&Serikawa

อัตราส่วนระหว่าง N:P =80:1 (จาก193.8/2.42)

2 **สูตรอาหาร Conway**

มี PO_4^{3-} ในรูปของเกลือ $Na_2HPO_4.2H_2O$ จำนวน 20 mg/L

มวลโมเลกุลของ $Na_2HPO_4.2H_2O$ คือ (23x2)+(1x1)+[(31x1)+(16x4)]+2[(2x1)+(16x1)] = 178

ดังนั้น $Na_2HPO_4.2H_2O$ 20 mg/L คิดเป็น $(20x10^{-3}$ g/L) / (178 g/L) = $112.3x10^{-6}$ โมล/ลิตร

Mole/L = Molar $\therefore$ $112.3x10^{-6}$ mole/L = 112.3 μM

<u>หาโมลของ PO_4^{3-}</u>

ใน $Na_2HPO_4.2H_2O$ จำนวน 178 โมล มี PO_4^{3-} อยู่จำนวน 95 โมล (แต่มี P 31 โมล)

ถ้า $Na_2HPO_4.2H_2O$ จำนวน $112.3x10^{-6}$ โมล/ลิตร จะมี PO_4^{3-} อยู่ = $(95)(112.3x10^{-6})/178$

= $59.9x10^{-6}$ โมล = 59.9 μmole

หรือ มี P =$31x112.3x10^{-6}/178 = 19.5x10^{-6}$ mole = 19.5 μmole

N มี 2 รูปแบบคือ $NaNO_3$ จำนวน 100 mg/L และ $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ จำนวน 0.009 mg/L

<u>ส่วนที่ 1</u> N มีอยู่ในรูป $NaNO_3$ จำนวน 100 mg/L

ซึ่งเป็นจำนวนเดียวกับที่มีในสูตร Sato&Serikawa **$\therefore$ มี N = 193.8μmole**

<u>ส่วนที่ 2</u> N จาก $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$

<u>หาโมลของ N</u>

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ จำนวน 6(14+4)+2(96)+(24x16)+4(18) = 516 โมล มี N อยู่ = 84 โมล

ในทุกๆ 1 ลิตร ถ้า $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 0.009mg/L (=$0.009x10^{-3}$g/516g= $0.02x10^{-6}$ mole/L)

มี N จำนวน = $84x0.02x10^{-6}/516$ = $0.003x10^{-6}$ mole/L = **0.003 μmole (น้อยมาก)**

<u>สรุป</u> **ในสูตร Conway**

มี N ใน $NaNO_3$ อยู่ 193.8 μmole และ ใน $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ อยู่ 0.003 μmole

รวม N = 193.8 μmole

มี P ในเกลือ $Na_2HPO_4.2H_2O$ จำนวน 19.5 μmole

อัตราส่วน N:P ใน Conway = 10:1

3 **สูตรอาหาร Guillard**

มี PO_4^{3-} ในรูปของเกลือ $Na_2H_2PO_4.H_2O$ จำนวน 10 mg/L

มวลโมเลกุลของ $Na_2H_2PO_4.H_2O$ คือ (23x2)+(2x1)+[(31x1)]+(16x4)+(2x1)+(16x1) = 161

ดังนั้น $Na_2H_2PO_4.H_2O$ 10 mg/L คิดเป็น $(10x10^{-3}$ g/L) / (161 g/L) = $62.1x10^{-6}$ โมล/ลิตร

Mole/L = Molar ∴ $62.1x10^{-6}$ mole/L = 62.1 μM

ใน $Na_2H_2PO_4.H_2O$ จำนวน 161 โมล มี P อยู่จำนวน 31 โมล

ถ้า มี $Na_2H_2PO_4.H_2O$ จำนวน $62.1x10^{-6}$ โมล/ลิตร จะมี P อยู่ = $(31)(62.1x10^{-6})/161$

= $12.0x10^{-6}$ โมล =**12.0 μmole**

ส่วน N มีอยู่ในรูป $NaNO_3$ จำนวน 150 mg/L

$NaNO_3$ มีมวลโมเลกุล = (23x1)+(14x1)+(16x3) = 85

$NaNO_3$ จำนวน 150 mg/L คิดเป็น $(150x10^{-3}$ g)/(85 g) = $1764.7x10^{-6}$ mole/L = 1764 μM

<u>หาโมลของ N</u>

$NaNO_3$ 85 โมล มี N อยู่ = 14 โมล

ถ้า $NaNO_3$ $1764.7x10^{-6}$ โมล/ลิตร มี N อยู่ = $(14)(1764.7x10^{-6})/85$ = $290.6x10^{-6}$ โมล/ลิตร

= 290.6 μmole

<u>สรุป</u> ในสูตร Guillardมี N ใน $NaNO_3$ อยู่ **290.6 μmole** และ

มี P ในเกลือ $Na_2H_2PO_4H_2O$ จำนวน **12.0 μmole**

∴ในสูตรอาหาร Guillard

อัตราส่วนระหว่าง N:P =24:1 (จาก290.6/12.0)

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์เชิงสถิติโดยวิธี ANOVA

ผลการศึกษาการเติบโตของแพลงก์ตอนกลุ่มไดอะตอมพบว่า การทดลองทั้ง 4 ซ้ำไม่สามารถนำมาหาค่าเฉลี่ยได้เนื่องจากแต่ละการเพาะเลี้ยงมีความแปรปรวนของข้อมูล จึงต้องการวิเคราะห์ผลแบบบล็อก ด้วยวิธีการเชิงสถิติ ANOVA โดยใช้ข้อมูลของอัตรานับที่ 1 ชั่วโมงและผันแปรระดับแอมโมเนียมและฟอสเฟตในหน่วย μM (ดู Fig. 12 และ Fig. 13 หน้า 3-19 และ 3-20) ดังนี้

Chaetoceros sp.

Analysis of Variance for Rate at 1 hr.

SV	DF	SS	MS	F
Block (B)	5	13886.83965	2777.36793	48.03**
Treatment	14	9126.04950	651.86068	11.27**
Factor B (N) (N)	2	7288.49851	3644.24925	63.02**
Factor A (P) (P)	4	630.21946	157.55487	2.72*
NxP	8	1207.33152	150.91644	2.61*
ERROR	70	4047.71012	57.82443	
Total	89	27060.59926		

cv =8.6%

** = significant at 1% level; * = significant at 5% level

NxP Table of Means for Rate at 1 hr. (cpm) (averaged over 6 reps)

	Factor B (N) (N)			
Factor A (P) (P)	1% N	20% N	40% N	P-Mean
1% P	91.083 a	76.993 b	103.468 ab	90.515
2% P	84.892 ab	87.908 a	102.372 ab	91.724
5% P	78.338 b	80.738 ab	95.972 b	85.016
10% P	77.815 b	82.393 ab	97.292 b	85.833
20% P	76.547 b	85.188 ab	107.213 a	89.649
N-Mean	81.735	82.644	101.263	88.548

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Comparison	S.E.D.	LSD (5%)	LSD (1%)
2-N*P means	4.390	8.756	11.624

Skeletonema sp.

Analysis of Variance for Rate at 1 hr.

SV	DF	SS	MS	F
Block (B)	4	11580.40471	2895.10118	130.91**
Treatment	14	1059.39878	75.67134	3.42**
Factor A (N) (A)	2	218.45981	109.22991	4.94*
Factor C (P) (C)	4	142.79194	35.69798	1.61 ns
AxC	8	698.14703	87.26838	3.95**
ERROR	56	1238.46061	22.11537	
Total	74	13878.26410		

cv =8.1%

** = significant at 1% level; * = significant at 5% level

ns = not significant

AxC Table of Means for Rate at 1 hr. (cpm) (averaged over 5 reps)

	Factor A (N) (A)			
Factor C (P) (C)	1% N	20% N	40% N	C-Mean
1% P	62.348 ab	50.914 b	58.390 ab	57.217
2% P	63.134 a	58.792 a	55.796 bc	59.241
5% P	61.366 ab	53.842 ab	50.998 c	55.402
10% P	56.000 b	56.678 ab	60.666 ab	57.781
20% P	56.424 b	58.156 a	62.348 a	58.976
A-Mean	59.854	55.676	57.640	57.723

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Comparison	S.E.D.	LSD (5%)	LSD (1%)
2-A* C means	2.974	5.958	7.930

Table 10 Comparing P-32 count rates in 15 treatments of *Chaetoceros* sp. and *Skeletonema* sp. under different ammonium and phosphate concentration in ASW.

Treatment	Ammonium μM	Phosphate μM	Count rate cpm	
			Chaetoceros sp.	*Skeletonema* sp.
1	1	1	91.08^{cde}	62.35^{ab}
2	1	2	84.89^{efg}	63.13^{a}
3	1	5	78.34^{g}	61.37^{abc}
4	1	10	77.82^{g}	56.00^{cdef}
5	1	20	76.55^{g}	56.42^{bcdef}
6	20	1	76.99^{g}	50.91^{f}
7	20	2	87.91^{def}	58.79^{abcde}
8	20	5	80.74^{fg}	53.84^{ef}
9	20	10	82.40^{efg}	56.68^{bcdef}
10	20	20	85.19^{efg}	58.16^{abcde}
11	40	1	103.47^{gb}	58.39^{abcde}
12	40	2	102.37^{a}	55.80^{cdef}
13	40	5	95.97^{bcd}	51.00^{f}
14	40	10	97.29^{bc}	60.67^{abcd}
15	40	20	107.21^{a}	62.35^{ab}

The superscript letters appearing in common between each count rate implies no significant difference in count rates.