รายงานการวิจัย

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชบางชนิดที่เป็นสาเหตุของปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี

โดย

พรศิลป์ ผลพันธิน

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Order Key 27646
BIB Key 174622

สงขลา
เลขหมู่ QK569.D56 พ45 2541
เลขทะเบียน ค.1
19 เม.ย. 2543

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการผลิตจากคณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชบางชนิดที่เป็นสาเหตุของปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี

บทคัดย่อ

จากการแยกและการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะแพลงก์ตอนในกลุ่มที่อาจเป็นสาเหตุของปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี สามารถเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนได้ 2 กลุ่ม 11 ชนิด คือแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มไดอะตอม 3 ชนิด ได้แก่ *Chaetoceros* sp., *Pleurosigma* sp. และ *Thalassiosira* sp. โดยใช้อาหารสูตร f/2 และเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดโน-แฟลกเจลเลตได้ 8 ชนิด ได้แก่ *Alexandrium* sp., *Chattonella* sp., *Gonyaulax polyedra*, *Gymnodinium sanguineum*, *Gymnodinium striatum*, *Gyrodinium* sp., *Prorocentrum lima* และ *Prorocentrum micans* โดยใช้อาหารสูตร T1

จากการทดลองศึกษาปัจจัยของความเค็มต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลต 2 ชนิด คือ *Chattonella* sp. และ *Gymnodinium sanguineum* ในความเค็มต่างๆ กัน 5 ระดับคือ 15, 20, 25, 30 และ 35 ppt พบว่า *Chattonella* sp. มีการเจริญสูงสุดที่ระดับความเค็ม 25 ppt โดยมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 26,177 เซลล์/1 มิลลิลิตร มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.24 เซลล์ต่อวัน มีระยะเวลาของการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า เท่ากับ 1.25 วัน และมีการเจริญต่ำสุดที่ความเค็ม 15 ppt ในขณะที่ *Gymnodinium sanguineum* มีการเจริญสูงสุดที่ระดับความเค็ม 20 ppt โดยมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 5,952 เซลล์/1 มิลลิลิตร มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.14 เซลล์ต่อวัน มีระยะเวลาของการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า เท่ากับ 2.15 วัน และมีการเจริญต่ำสุดที่ระดับความเค็ม 35 ppt

จากการทดลองศึกษาผลของซิลิกอนต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลต 2 ชนิดคือ *Gyrodinium* sp. และ *Prorocentrum micans* ในความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ระดับได้แก่ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 µmol/L พบว่า ซิลิกอนจะไม่ส่งผลต่อการเจริญของ *Prorocentrum micans* แต่จะช่วยให้การเจริญของ *Gyrodinium* sp. เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 µmol/L

จากการทดลองศึกษาผลของสารเคมี 2 ชนิดคือ ทองแดง และ Benzolkonium chloride (Bkc) ต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลต *Prorocentrum micans* โดยใช้ความเข้มข้นของทองแดง 5 ระดับที่ไม่เกินค่ามาตรฐานน้ำทิ้ง คือ 0, 0.001, 0.005, 0.01 และ 0.05 mg/L พบว่าความเข้มข้นของทองแดงในระดับต่างๆ ไม่มีผลต่อการเจริญของ *Prorocentrum micans* แต่จากการศึกษาโดยใช้ Bkc ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5 และ 2.0 ppm พบว่า Bkc จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Prorocentrum micans* ได้ในทุกระดับความเข้มข้น โดยจะทำให้เซลล์ของ *Prorocentrum micans* ตายลงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชบางชนิดที่เป็นสาเหตุของปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี

บทคัดย่อ

จากการแยกและการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะแพลงก์ตอนในกลุ่มที่อาจเป็นสาเหตุของปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี สามารถเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนได้ 2 กลุ่ม 11 ชนิด คือแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มไดอะตอม 3 ชนิด ได้แก่ *Chaetoceros* sp., *Pleurosigma* sp. และ *Thalassiosira* sp. โดยใช้อาหารสูตร f/2 และเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดโน-แฟลกเจลเลตได้ 8 ชนิด ได้แก่ *Alexandrium* sp., *Chattonella* sp., *Gonyaulax polyedra*, *Gymnodinium sanguineum*, *Gymnodinium striatum*, *Gyrodinium* sp., *Prorocentrum lima* และ *Prorocentrum micans* โดยใช้อาหารสูตร T1

จากการทดลองศึกษาปัจจัยของความเค็มต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลต 2 ชนิด คือ *Chattonella* sp. และ *Gymnodinium sanguineum* ในความเค็มต่างๆ กัน 5 ระดับคือ 15, 20, 25, 30 และ 35 ppt พบว่า *Chattonella* sp. มีการเจริญสูงสุดที่ระดับความเค็ม 25 ppt โดยมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 26,177 เซลล์/1 มิลลิลิตร มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.24 เซลล์ต่อวัน มีระยะเวลาของการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า เท่ากับ 1.25 วัน และมีการเจริญต่ำสุดที่ความเค็ม 15 ppt ในขณะที่ *Gymnodinium sanguineum* มีการเจริญสูงสุดที่ระดับความเค็ม 20 ppt โดยมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 5,952 เซลล์/1 มิลลิลิตร มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.14 เซลล์ต่อวัน มีระยะเวลาของการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า เท่ากับ 2.15 วัน และมีการเจริญต่ำสุดที่ระดับความเค็ม 35 ppt

จากการทดลองศึกษาผลของซิลิกอนต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลต 2 ชนิดคือ *Gyrodinium* sp. และ *Prorocentrum micans* ในความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ระดับได้แก่ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 µmol/L พบว่า ซิลิกอนจะไม่ส่งผลต่อการเจริญของ *Prorocentrum micans* แต่จะช่วยให้การเจริญของ *Gyrodinium* sp. เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 µmol/L

จากการทดลองศึกษาผลของสารเคมี 2 ชนิดคือ ทองแดง และ Benzolkonium chloride (Bkc) ต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลต *Prorocentrum micans* โดยใช้ความเข้มข้นของทองแดง 5 ระดับที่ไม่เกินค่ามาตรฐานน้ำทิ้ง คือ 0, 0.001, 0.005, 0.01 และ 0.05 mg/L พบว่าความเข้มข้นของทองแดงในระดับต่างๆ ไม่มีผลต่อการเจริญของ *Prorocentrum micans* แต่จากการศึกษาโดยใช้ Bkc ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5 และ 2.0 ppm พบว่า Bkc จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Prorocentrum micans* ได้ในทุกระดับความเข้มข้น โดยจะทำให้เซลล์ของ *Prorocentrum micans* ตายลงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชบางชนิดที่เป็นสาเหตุของปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี

บทนำ

ปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี หรือปรากฏการณ์ขี้ปลาวาพ หรือ Red Tide เป็นปรากฏการณ์ธรรมชาติที่สามารถพบได้ทั่วไปทั้งในเขตชายฝั่งทะเล และนอกฝั่งทะเล ปรากฏการณ์นี้จะทำให้น้ำทะเลเปลี่ยนเป็นสีต่างๆ เช่น สีเขียว สีเหลือง สีน้ำตาล หรือสีแดง ปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสีเกิดขึ้นเนื่องจากในน้ำนั้นมีการเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอนขึ้นอย่างมากมาย ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ทำให้ในน้ำนั้นมีความหนาแน่นของแพลงก์ตอนอยู่มากจนทำให้สามารถเห็นสีของน้ำนั้นแตกต่างไปจากบริเวณอื่น ซึ่งสีที่ปรากฏจะขึ้นอยู่กับชนิดของแพลงก์ตอนที่มีอยู่มากในขณะนั้น เช่นถ้าเป็นพวกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ก็จะทำให้เห็นน้ำเป็นสีเขียว ถ้าเป็นพวกไดโนแฟลกเจลเลต ก็จะทำให้เห็นน้ำเป็นสีแดง เป็นต้น

ในประเทศไทย ปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสีได้มีผู้สังเกตุพบมานานแล้ว (สว่าง เจริญผล, 2495) และได้เกิดเพิ่มมากขึ้นเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน แพลงก์ตอนที่เกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสีในประเทศไทยมีอยู่หลายชนิด ทั้งในกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ไดอะตอม และไดโนแฟลกเจลเลต (ตารางที่ 1) ซึ่งเมื่อมีปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นในบริเวณที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้สัตว์น้ำเหล่านั้นตายได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม กล่าวคือเมื่อมีแพลงก์ตอนเหล่านี้เพิ่มจำนวนขึ้นมาอย่างมากมาย จะทำให้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายน้ำลดต่ำลง หรือแพลงก์ตอนเหล่านั้นอาจไปเกาะติดกับอวัยวะที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนก๊าซของสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอ และตายได้ในที่สุด นอกจากนี้แพลงก์ตอนบางชนิดอาจสร้างสารพิษที่มีผลต่อสัตว์น้ำโดยทันที หรืออาจไปสะสมอยู่ในสัตว์น้ำ ซึ่งจะแสดงความเป็นพิษต่อเมื่อมีผู้นำสัตว์น้ำเหล่านั้นไปบริโภค อันอาจทำให้เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมการส่งออกสัตว์น้ำได้ ดังเช่นที่เกิดในประเทศทางแถบทวีปยุโรป หรือประเทศญี่ปุ่น เป็นต้น ดังนั้นการที่จะศึกษาถึงสาเหตุที่ทำให้แพลงก์ตอนเหล่านั้นมีการเจริญขึ้นอย่างรวดเร็วในธรรมชาติ จนทำให้เกิดปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสีได้ จึงจำเป็นที่จะต้องเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนเหล่านั้นในห้องปฏิบัติการให้ได้เสียก่อน จึงจะสามารถทดลองหาปัจจัยสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของแพลงก์ตอนเหล่านั้น ซึ่งจะทำให้สามารถทราบสาเหตุของการเกิดปรากฏการณ์นี้ในธรรมชาติ เพื่อที่จะได้ทำการระวังป้องกัน หรือหาวิธีที่จะใช้ในการควบคุมแพลงก์ตอนเหล่านั้นต่อไป

ตารางที่ 1 รายชื่อของแพลงก์ตอนที่เคยมีรายงานว่าเป็นสาเหตุของปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสีในประเทศไทย

รายชื่อ	เอกสารอ้างอิง
Blue-green algae	
Trichodesmium erythraeum	สุนีย์ สุวภีพันธ์, 2536
Diatom	
Coscinodiscus jomesianus	สุนีย์ สุวภีพันธ์, 2536
Rhizosolenia styliformis	สุนีย์ สุวภีพันธ์, 2536
Skeletonema costatum	สุนีย์ สุวภีพันธ์, 2536
Dinoflagellate	
Ceratium furca	สุวรรณี เฉินบำรุง และชลัญญา ธารบุปผา, 2524
Gonyaulax polyedra	สุนีย์ สุวภีพันธ์, 2525
Gymnodinium sanguineum	สุนีย์ สุวภีพันธ์, 2525
Noctiluca scintillans	สุวรรณี เฉินบำรุง และชลัญญา ธารบุปผา, 2524
Prorocentrum micans	สุนีย์ สุวภีพันธ์, 2525

ความพยายามในการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนในห้องปฏิบัติการได้เกิดขึ้นมานานแล้ว ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1890-93 โดยในระยะแรกสามารถเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มของไดอะตอมได้เพียงบางชนิดเท่านั้น ซึ่งแพลงก์ตอนพืชที่เพาะเลี้ยงได้นี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาทางด้านนิเวศวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และพันธุศาสตร์ ซึ่งการศึกษาทางด้านต่างๆ เหล่านี้ไม่อาจทำได้จากตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่มีอยู่ในธรรมชาติ และการใช้น้ำที่เก็บมาจากบริเวณที่แพลงก์ตอนเหล่านั้นอาศัยอยู่ ก็ไม่สามารถช่วยให้แพลงก์ตอนเจริญอยู่ได้ตลอดไปในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้อาจเกิดจากการขาดธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของแพลงก์ตอนบางชนิดไป หลังจากนั้นจึงได้มีผู้คิดค้นพัฒนาสูตรอาหารต่างๆ เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของแพลงก์ตอนพืช ดังที่ Provasoli *et al.* (1957) ได้ตรวจสอบเอกสารไว้ในเรื่องของการพัฒนาสูตรอาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว จากความรู้ที่ได้รับทำให้มีผู้พัฒนาสูตรอาหารต่างๆ ขึ้นมาอีกมากมาย และทำให้สามารถเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชได้หลายชนิด ซึ่งแพลงก์ตอนที่เพาะเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการเหล่านี้ ได้ก่อให้เกิดองค์ความรู้ต่างๆ เพิ่มขึ้นอีกมากมาย อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านเศรษฐกิจได้อีกทางหนึ่งด้วย

การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชในประเทศไทยยังไม่เป็นที่แพร่หลายนัก ส่วนใหญ่จะเพาะเลี้ยงไว้เพื่อใช้เป็นอาหารแก่สัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเท่านั้น โดยพยายามเพาะเลี้ยงให้ได้ผลผลิตที่สม่ำเสมอ (สุนีย์ สุวภีพันธ์, 2519) หรือให้ได้ปริมาณมาก (ผุสดี ศรีพยัตต์, 2521) เหตุที่การศึกษาทางด้านการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนในประเทศไทยยังไม่เป็นที่แพร่หลาย อาจมีสาเหตุมาจากค่าใช้จ่ายในการที่จะเก็บรักษาพันธุ์ของแพลงก์ตอนพืชไว้นั้นค่อนข้างสูง และการแยกเชลล์ของแพลงก์ตอนพืชจนไม่มีสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเจือปน ทำได้ค่อนข้างยาก ทำให้แพลงก์ตอนพืชกลุ่มอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำไม่ได้รับความสนใจ ในปัจจุบันความสำคัญของแพลงก์ตอนในกลุ่มอื่นๆ เริ่มมีบทบาทสำคัญ ทั้งนี้เพราะมีแพลงก์ตอนบางชนิดสามารถสร้างสารพิษได้ และสารพิษนั้นอาจไปสะสมอยู่ในสัตว์น้ำอื่นๆ ซึ่งจะส่งผลต่อผู้บริโภค ดังการเกิดพิษอัมพาตในหอยขึ้นที่จังหวัดปราณบุรี ในปี พ.ศ. 2526 (เกรียงศักดิ์ สายธนู และสุทธิชัย เดมียวณิชย์, 2527) ดังนั้นการที่จะพิสูจน์ทราบถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอนในกลุ่มดังกล่าว จำเป็นที่จะต้องเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนเหล่านั้นในห้องปฏิบัติการให้ได้เสียก่อน

จากความสำคัญของแพลงก์ตอนมีอยู่มากดังกล่าว การวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะเพาะเลี้ยง และเก็บรวบรวมพันธุ์ของแพลงก์ตอนชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อที่จะได้นำมาศึกษาหาทางระวัง ป้องกัน หรือหาวิธีที่จะใช้ในการกำจัดต่อไป

วิธีการศึกษา

สถานที่ศึกษา

ออกสำรวจและเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนจากบริเวณชายฝั่งทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณทะเลสาบสงขลาตอนล่าง และบริเวณอื่นๆ เพื่อใช้ในการแยกเซลล์ของแพลงก์ตอนในห้องปฏิบัติการต่อไป

การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนจะใช้ถุงแพลงก์ตอนที่มีขนาดตา 20 ไมครอน ลากในแนวเฉียงหลายๆ ครั้ง แล้วนำมากรองผ่านตะแกรงที่มีขนาดตา 120 ไมครอน เพื่อกรองเอาแพลงก์ตอนสัตว์ที่อาจติดมาออกไป นำตัวอย่างที่ได้ใส่ในกระบอกพลาสติกที่มีขนาดความจุประมาณ 1 ลิตร แล้วเติมน้ำทะเลลงไปเพื่อไม่ให้แพลงก์ตอนที่เก็บมามีความหนาแน่นมากจนเกินไป นำตัวอย่างไปเก็บไว้ในที่มืด และเย็น เพื่อนำมาแยกเซลล์แพลงก์ตอนที่มีความสำคัญในห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การแยกตัวอย่างแพลงก์ตอนเพื่อการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

สุ่มตัวอย่างแพลงก์ตอนที่เก็บมาใส่ใน Sedgewick-Rafter Slide ที่มีขนาดความจุ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40-100 เท่า เพื่อตรวจหาแพลงก์ตอนที่ต้องการ ดูดตัวอย่างแพลงก์ตอนเหล่านั้นด้วย micropipette วางลงบนสไลด์ซึ่งมีน้ำทะเลกรอง 1-2 หยด ล้างเซลล์ที่แยกได้ด้วยน้ำทะเลกรองนี้ 2-3 ครั้ง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอื่นๆ นำเซลล์ที่ล้างเสร็จเรียบร้อยแล้วใส่ใน Plate สำหรับการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Multiwell Tissue Culture Plate) ซึ่งใน 1 Plate จะมี 24 หลุม และในแต่ละหลุมจะใส่อาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนไว้ 1 มิลลิลิตร สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนในครั้งนี้ได้เลือกใช้สูตรอาหาร 3 ชนิด คือ สูตร BG11 (Rippka *et al.*, 1979) สูตร f/2 (Guillard and Ryther, 1962) และสูตร T1 (Ogata *et al.*, 1987) ตรวจดูการเจริญของแพลงก์ตอนทุกวันโดยใช้ Inverted microscope เมื่อแพลงก์ตอนมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น ก็ขยายลงในภาชนะที่ใหญ่ขึ้นตามลำดับ เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาผลของปัจจัยสภาวะแวดล้อมบางประการต่อการเจริญของแพลงก์ตอน

นำตัวอย่างแพลงก์ตอนที่เพาะเลี้ยงได้จนเป็นเซลล์บริสุทธิ์ไม่มีแพลงก์ตอนชนิดอื่นเจือปน (Unialgal culture) บางชนิด มาขยายให้มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นในขวดที่มีความจุประมาณ 1 ลิตร เมื่อเซลล์เจริญจนถึงใกล้ช่วงปลายของระยะ log phase จึงนำเซลล์เหล่านั้นไปทดลองหาผลของสภาวะแวดล้อมบางประการที่มีต่อแพลงก์ตอนเหล่านั้น ซึ่งได้เลือกศึกษาผลของความ

เค็ม และปริมาณสารอาหาร (ซิลิกอน) ต่อการเจริญของแพลงก์ตอนในกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลตบางชนิดที่เพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลตบางชนิด – ไดโนแฟลกเจลเลตที่ใช้ในการศึกษามี 2 ชนิดคือ *Chattonella* sp. และ *Gymnodinium sanguineum* โดยแบ่งความเค็มที่ศึกษาออกเป็น 5 ระดับคือ 15, 20, 25, 30 และ 35 ppt โดยการค่อยๆ เพิ่มและลดระดับความเค็มจากที่เลี้ยงแพลงก์ตอนเหล่านี้ไว้ที่ระดับความเค็ม 30 ppt จนได้ความเค็มระดับต่างๆ ตามที่แบ่งไว้ (15, 20, 25 และ 35 ppt) และเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนเหล่านั้นไว้ที่แต่ละระดับความเค็มจนได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงสุดจึงนำมาใช้ในการทดลอง โดยทดลองเลี้ยงที่ระดับความเค็มต่างๆ กัน 5 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ แพลงก์ตอนเหล่านี้จะเลี้ยงไว้ในขวดกลมกันแบนที่มีความจุ 250 มิลลิลิตร และมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่แพลงก์ตอนเหล่านั้นเจริญอยู่ 120 มิลลิลิตร ปรับให้เซลล์เริ่มต้นในแต่ละขวดมีความหนาแน่นประมาณ 100 เซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร นำขวดไปวางบนชั้นเลี้ยงแพลงก์ตอนในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 27 องศาเซลเซียส และให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนแพลงก์ตอนที่เพิ่มขึ้นทุกวัน และคำนวณหาค่าอัตราการเจริญ (K) จาก

$$K = (\log N_t - \log N_0) / t$$

เมื่อ K = อัตราการเจริญ

N_t = ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่เพาะเลี้ยงได้

N_0 = ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น

t = ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

และหาระยะเวลาของการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (D) จาก

$$D = \log 2 / K$$

นำผลที่ได้ไปทดสอบทางสถิติโดยใช้ ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การศึกษาผลของซิลิกอนต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลตบางชนิด – ไดโนแฟลกเจลเลตที่ใช้ในการศึกษามี 2 ชนิดคือ *Prorocentrum micans* และ *Gyrodinium* sp. โดยแบ่งความเข้มข้นของซิลิกอนที่ใช้ในการศึกษาออกเป็น 5 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 µmol/L ระดับละ 3 ซ้ำ สำหรับเซลล์ของไดโนแฟลกเจลเลตที่ใช้ในการทดลองจะเพาะเลี้ยงไว้ในน้ำทะเลสังเคราะห์ตามสูตรของ ASP (Provasoli, 1963) และเติมสารอาหารตามสูตร T1 (Ogata *et al.*, 1987) โดยลดความเข้มข้นของสูตรอาหารลงเหลือ 1/5 เท่า เก็บรักษาแพลงก์ตอนไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่าง โดยให้มีอุณหภูมิเท่ากับ 28 ± 1 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง โดยมีความเข้มแสงประมาณ 30 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ ทำการ

ทดลองในขวดกลมกันแบนที่มีความจุ 250 มิลลิลิตร โดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 100 เซลล์/1 มิลลิลิตร สุ่มแพลงก์ตอนมานับจำนวนทุกวัน นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าอัตราการเจริญ และการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า พร้อมทั้งนำไปทดสอบทางสถิติด้วย ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การศึกษาผลของสารเคมีบางชนิดที่มีต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลต

สารเคมีที่นำมาศึกษาเพื่อตรวจดูผลต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลตในครั้งนี้มี 2 ชนิดคือ ทองแดง และ Benzolkonium chloride (Bkc) โดยทดลองกับไดโนแฟลกเจลเลตที่พบได้เสมอๆ และอาจเป็นสาเหตุของปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี คือ *Prorocentrum micans* โดยใช้ทองแดงที่ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0, 0.001, 0.005, 0.01 และ 0.05 mg/L สำหรับ Bkc แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ครั้งคือ ครั้งแรกทดลองใช้ที่ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ppm และในครั้งที่สองได้ใช้ความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ระดับเช่นเดียวกันคือที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ppm ทำการทดลองระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สำหรับเซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลองเพาะเลี้ยงไว้ในน้ำทะเลสังเคราะห์สูตร ASP (Provasoli, 1963) ที่เติมสูตรอาหาร T1 (Ogata *et al.*, 1987) โดยลดความเข้มข้นของสูตรอาหารลงเหลือ 1/5 เท่า เก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่าง โดยมีอุณหภูมิเท่ากับ 28 ± 1 องศาเซลเซียส และแสงสว่างต่อความมืดเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง โดยมีความเข้มแสงประมาณ 30 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ ทำการทดลองในขวดกลมกันแบนที่มีความจุ 250 มิลลิลิตร โดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 100 เซลล์/1 มิลลิลิตร สุ่มแพลงก์ตอนมานับจำนวนทุกวัน นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าอัตราการเจริญ และการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า พร้อมทั้งนำไปทดสอบทางสถิติด้วย ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษา

การแยกและการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนในห้องปฏิบัติการ

จากการแยกแพลงก์ตอนที่มีความสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่อาจเป็นสาเหตุของปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสีจากน้ำทะเลธรรมชาติ เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารสูตรต่างๆ จนสามารถเลี้ยงเป็น Unialgal culture ได้สำเร็จ มีทั้งสิ้น 11 ชนิด เป็นแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มไดอะตอม 3 ชนิดคือ *Chaetoceros* sp., *Pleurosigma* sp. และ *Thalassiosira* sp. โดยสามารถเจริญได้ดีด้วยสูตรอาหาร f/2 (Guillard and Ryther, 1962) และเป็นแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลต 8 ชนิดคือ *Alexandrium* sp., *Chattonella* sp., *Gonyaulax polyedra*, *Gymnodinium sanguineum*, *Gymnodinium striatum*, *Gyrodinium* sp., *Prorocentrum lima* และ *Prorocentrum micans* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสูตรอาหาร T1 (Ogata *et al.*, 1987) สำหรับอาหารสูตร BG11 (Rippka *et al.*, 1979) ไม่สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนชนิดใดได้ในการศึกษาครั้งนี้

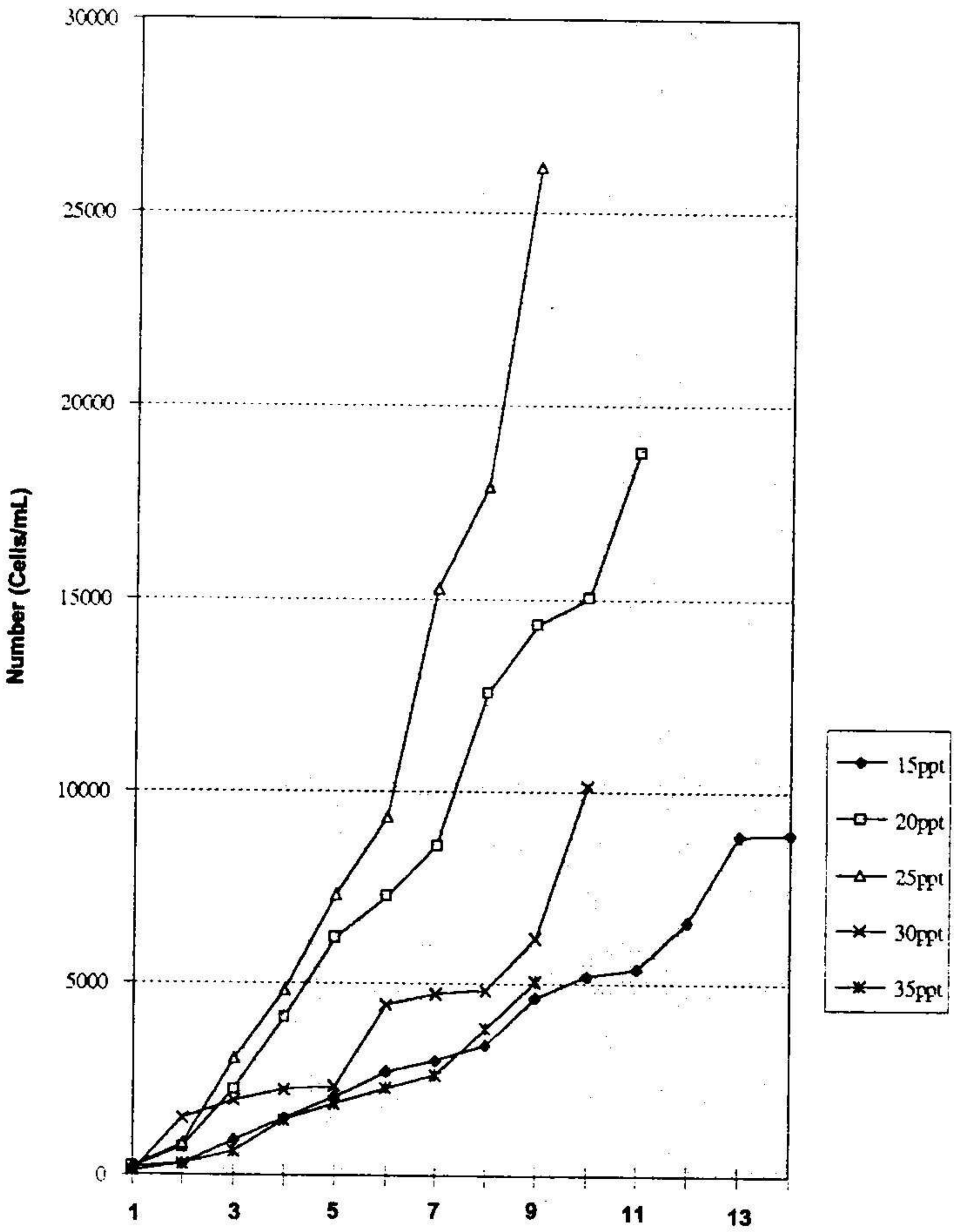
ผลของความเค็มต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลตบางชนิด

การเจริญของ *Chattonella* sp.

จากการทดลองเลี้ยง *Chattonella* sp. ที่แยกได้จากท่าเทียบเรือน้ำลึก จังหวัดสงขลา ที่ระดับความเค็มต่างๆ กัน 5 ระดับ พบว่า *Chattonella* sp. มีการเจริญสูงสุดที่ระดับความเค็ม 25 ppt โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 26177 เซลล์/1 มิลลิลิตร รองลงมาคือที่ระดับความเค็ม 20, 30 และ 15 ppt โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 18797, 10148 และ 8899 เซลล์/1 มิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ระดับความเค็ม 35 ppt *Chattonella* sp. มีการเจริญต่ำที่สุดโดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 5052 เซลล์/1 มิลลิลิตร (ภาพที่ 1)

เมื่อนำความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ระดับความเค็ม 15, 20, 25, 30 และ 35 ppt มาคำนวณหาค่าอัตราการเจริญ (Growth rate) และการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time) พบว่าที่ระดับความเค็ม 25 ppt มีอัตราการเจริญมากที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 0.24 เซลล์/วัน และการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า เท่ากับ 1.25 วัน ในช่วงระยะเวลา 9 วัน หลังเริ่มการทดลอง รองลงมาได้แก่ในระดับความเค็มที่ 30, 35 และ 20 ppt ตามลำดับ และที่ระดับความเค็ม 15 ppt จะมีอัตราการเจริญของ *Chattonella* sp. ต่ำที่สุด โดยมีค่าอัตราการเจริญเท่ากับ 0.12 เซลล์/วัน และการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า เท่ากับ 2.5 วัน (ตารางที่ 1)

เมื่อนำค่าความหนาแน่นของ *Chattonella* sp. ที่ระดับความเค็ม 15, 20, 25, 30 และ 35 ppt. ไปทดสอบทางสถิติด้วย ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าความเค็มมีผลต่อการเจริญของ *Chattonella* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 1 กราฟแสดงการเจริญของ *Chattonella* sp. ที่ระดับความเค็ม 15, 20, 25, 30 และ 35 ppt

ตารางที่ 1 แสดงอัตราการเจริญ (K) และการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (D) ของ *Chattonella* sp. ที่เลี้ยงในระดับความเค็มต่างๆ

ระดับความเค็ม (ppt.)	อัตราการเจริญ (K) (เซลล์/วัน)	การเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (D) (วัน)
15	0.12	2.5
20	0.18	1.67
25	0.24	1.25
30	0.21	1.43
35	0.20	1.5

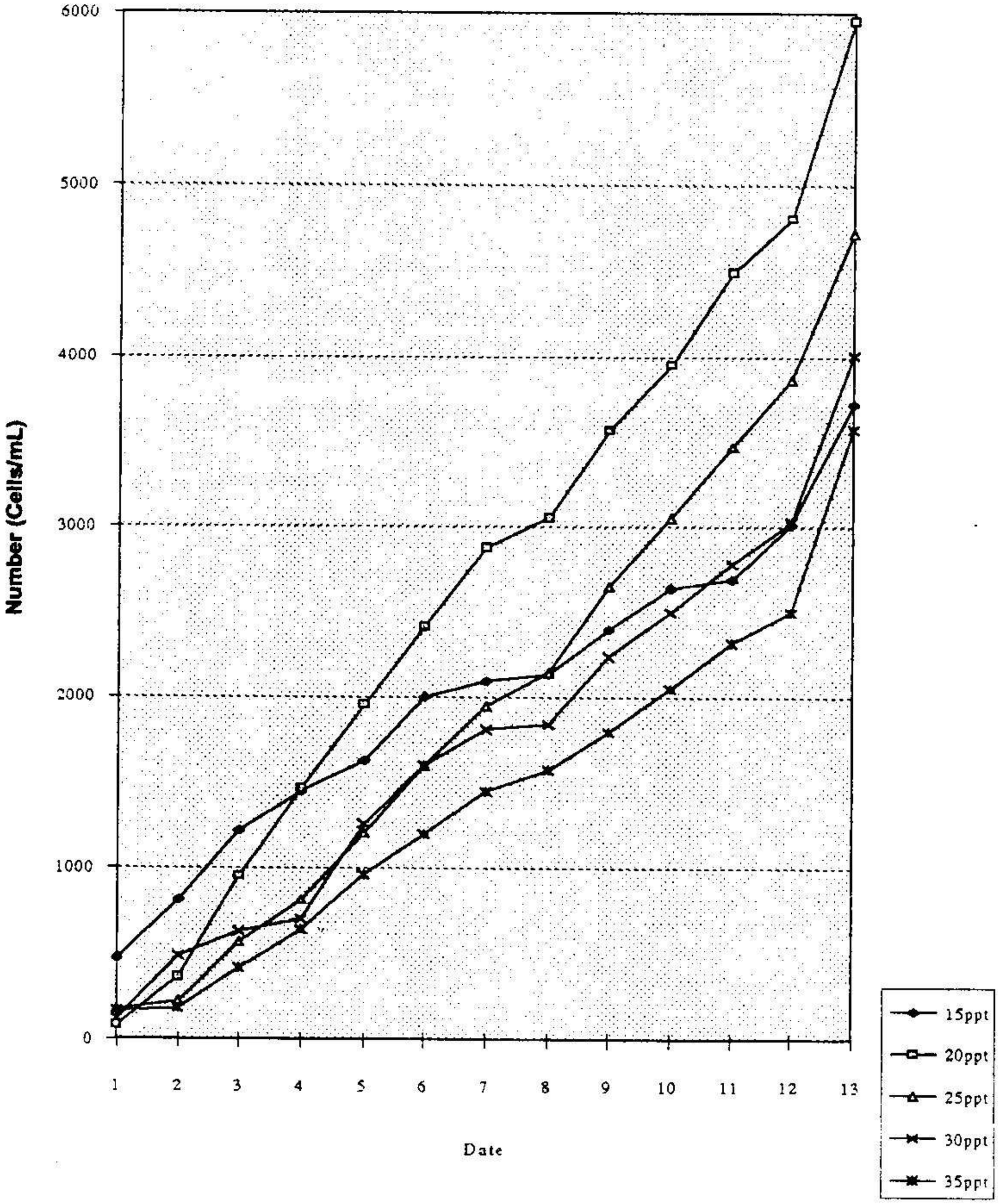
การเจริญของ *Gymnodinium sanguineum*

จากการทดลองเลี้ยง *Gymnodinium sanguineum* ที่ระดับความเค็มต่างๆ กัน 5 ระดับ พบว่า *Gymnodinium sanguineum* มีการเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับความเค็ม 20 ppt โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 5952 เซลล์/1 มิลลิลิตร รองลงมาคือที่ระดับความเค็ม 25, 30 และ 15 ppt โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 4717, 4002 และ 3722 เซลล์/1 มิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ระดับความเค็ม 35 ppt *Gymnodinium sanguineum* มีความสามารถในการเจริญต่ำที่สุด โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3569 เซลล์/1 มิลลิลิตร (ภาพที่ 2)

เมื่อนำความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด มาคำนวณหาค่าอัตราการเจริญ และการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า พบว่าที่ระดับความเค็ม 20 ppt มีอัตราการเจริญของเซลล์สูงสุดโดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.14 เซลล์/วัน และการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า เท่ากับ 2.15 วัน ในช่วงระยะเวลา 13 วัน หลังเริ่มการทดลอง รองลงมาได้แก่ความเค็มที่ระดับ 30, 25 และ 35 ppt ตามลำดับ ส่วนที่ความเค็มระดับ 15 ppt จะมีอัตราการเจริญต่ำที่สุดคือ 0.07 เซลล์/วัน และมีการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า เท่ากับ 4.30 วัน (ตารางที่ 2)

ผลของปริมาณสารอาหาร (ซิลิกอน) ต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลตบางชนิด

จากการศึกษาผลของซิลิกอนต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลต 2 ชนิด คือ *Prorocentrum micans* และ *Gyrodinium* sp. ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 µmol/L ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 โดยพบว่า *Prorocentrum micans* มีจำนวนเซลล์สูงสุดอยู่ระหว่าง 7479 – 8884 เซลล์/1 มิลลิลิตร และ *Gyrodinium* sp. มีจำนวนเซลล์สูงสุดอยู่ระหว่าง 1303 – 2516 เซลล์/1 มิลลิลิตร ซึ่งจำนวนเซลล์สูงสุดของ *Prorocentrum micans* ที่ความเข้มข้นของซิลิกอนต่างๆ กันจะมีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วย ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในขณะที่จำนวนเซลล์สูงสุดของ *Gyrodinium* sp. จะมีความแตกต่างกันในแต่ละระดับความเข้มข้นของซิลิกอน โดยในขวดที่เติมซิลิกอนจะมีจำนวนเซลล์สงสดมากกว่าขวดที่ไม่เติมซิลิกอน นอกจากนี้ขอบเขตของอัตราการเจริญ ค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญ (K) การเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (D) ของไดโนแฟลกเจลเลตทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกัน โดย *Prorocentrum micans* มีค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญอยู่ระหว่าง 0.0512 – 0.0528 เซลล์ต่อวัน และระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าอยู่ระหว่าง 5.7 – 5.9 วัน ในขณะที่ *Gyrodinium* sp. มีค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญอยู่ระหว่าง 0.0367 – 0.0440 เซลล์ต่อวัน และระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าอยู่ระหว่าง 6.3 – 8.2 วัน



ภาพที่ 2 กราฟแสดงการเจริญของ *Gymnodinium sanguineum* ที่ระดับความเค็ม 15, 20, 25, 30 และ 35 ppt

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการเจริญ (K) และการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (D) ของ *Gymnodinium sanguineum* ที่เลี้ยงในระดับความเค็มต่างๆ

ระดับความเค็ม (ppt.)	อัตราการเจริญ (K) (เซลล์/วัน)	การเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (D) (วัน)
15	0.07	4.30
20	0.14	2.15
25	0.11	2.74
30	0.12	2.51
35	0.10	3.01

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนเซลล์สูงสุด (Max. Yield) ขอบเขตของอัตราการเจริญ (Range k) อัตราการเจริญเฉลี่ย (Mean k) ค่า Standard error และการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (D) ของ *Prorocentrum micans* และ *Gyrodinium* sp. ที่ความเข้มข้นของซิลิกอนเท่ากับ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 µmol/L

ความเข้มข้นของซิลิกอน (µmol/l)		0	0.1	0.5	1.0	2.0
P. micans	Max.yield (cells/ml.)	8,884.15	7,479.15	7,503.33	7,706.65	8,231.10
	Range k (divisions/day)	0.0507 - 0.0524	0.0492 - 0.0532	0.0498 - 0.0527	0.0517 - 0.0532	0.0522 - 0.0531
	Mean k (divisions/day)	0.0515	0.0512	0.0516	0.0525	0.0528
	std.error mean	0.0009	0.002	0.0009	0.0008	0.0003
	D (day)	5.8452	5.8795	5.8339	5.7339	5.7013
Gyrodinium sp.	Max.yield (cells/ml.)	1,303.35	2,470.85	2,516.10	2,316.10	1,906.70
	Range k (divisions/day)	0.0339 - 0.0395	0.0428 - 0.0441	0.0425 - 0.0444	0.0418 - 0.0464	0.0399 - 0.0417
	Mean k (divisions/day)	0.0367	0.0435	0.0433	0.0440	0.0408
	std.error mean	0.003	0.0007	0.0006	0.001	0.0009
	D (day)	8.2025	6.2902	6.9522	6.8416	7.3782

ผลของซิลิกอนต่อการเจริญของ *Prorocentrum micans*

จากผลการศึกษาการเจริญของ *Prorocentrum micans* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีซิลิกอนในระดับความเข้มข้นต่างๆ กันในห้องปฏิบัติการ พบว่าความหนาแน่นของเซลล์จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงในทุกระดับความเข้มข้นของซิลิกอน (ภาพที่ 3) และเมื่อนำความหนาแน่นของเซลล์ในแต่ละระดับความเข้มข้นของซิลิกอนไปทดสอบทางสถิติด้วย ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ *Prorocentrum micans* ที่ซิลิกอนระดับความเข้มข้นต่างๆ จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อพิจารณาถึงค่าของอัตราการเจริญในแต่ละวันของ *Prorocentrum micans* (ภาพที่ 4) พบว่าอัตราการเจริญในแต่ละวันของ *Prorocentrum micans* ที่เติมซิลิกอนเข้มข้น 0.5 μ mol/L จะมีอัตราการเจริญลดลงในช่วงแรกของการทดลอง (วันที่ 1-4) แต่หลังจากนั้นอัตราการเจริญก็จะเพิ่มขึ้นจนมาอยู่ในระดับเดียวกับค่าอัตราการเจริญในแต่ละวันของ *Prorocentrum micans* ที่เลี้ยงในซิลิกอนที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ

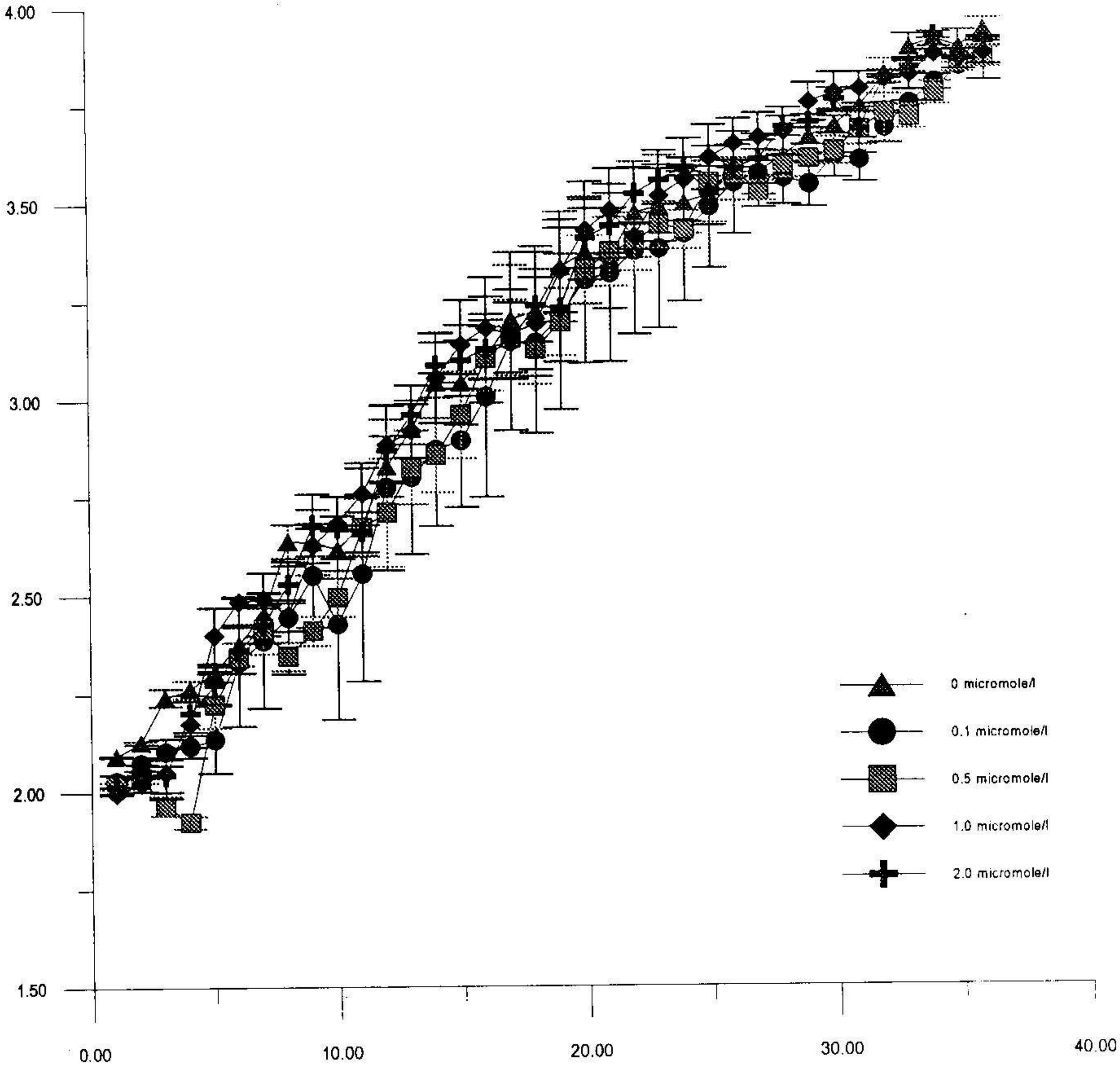
เมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (ภาพที่ 5) พบว่าในซิลิกอนที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ คือ 0, 0.1 และ 0.5 μmol/L *Prorocentrum micans* จะใช้ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าอยู่ระหว่าง 5.8 – 5.9 วัน ซึ่งใช้เวลามากกว่าในขวดที่เติมซิลิกอนที่มีระดับความเข้มข้นสูง คือ 1.0 และ 2.0 μmol/L เล็กน้อย โดยในความเข้มข้นหลังนี้จะมีระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าประมาณ 5.7 วัน

ผลของซิลิกอนต่อการเจริญของ *Gyrodinium* sp.

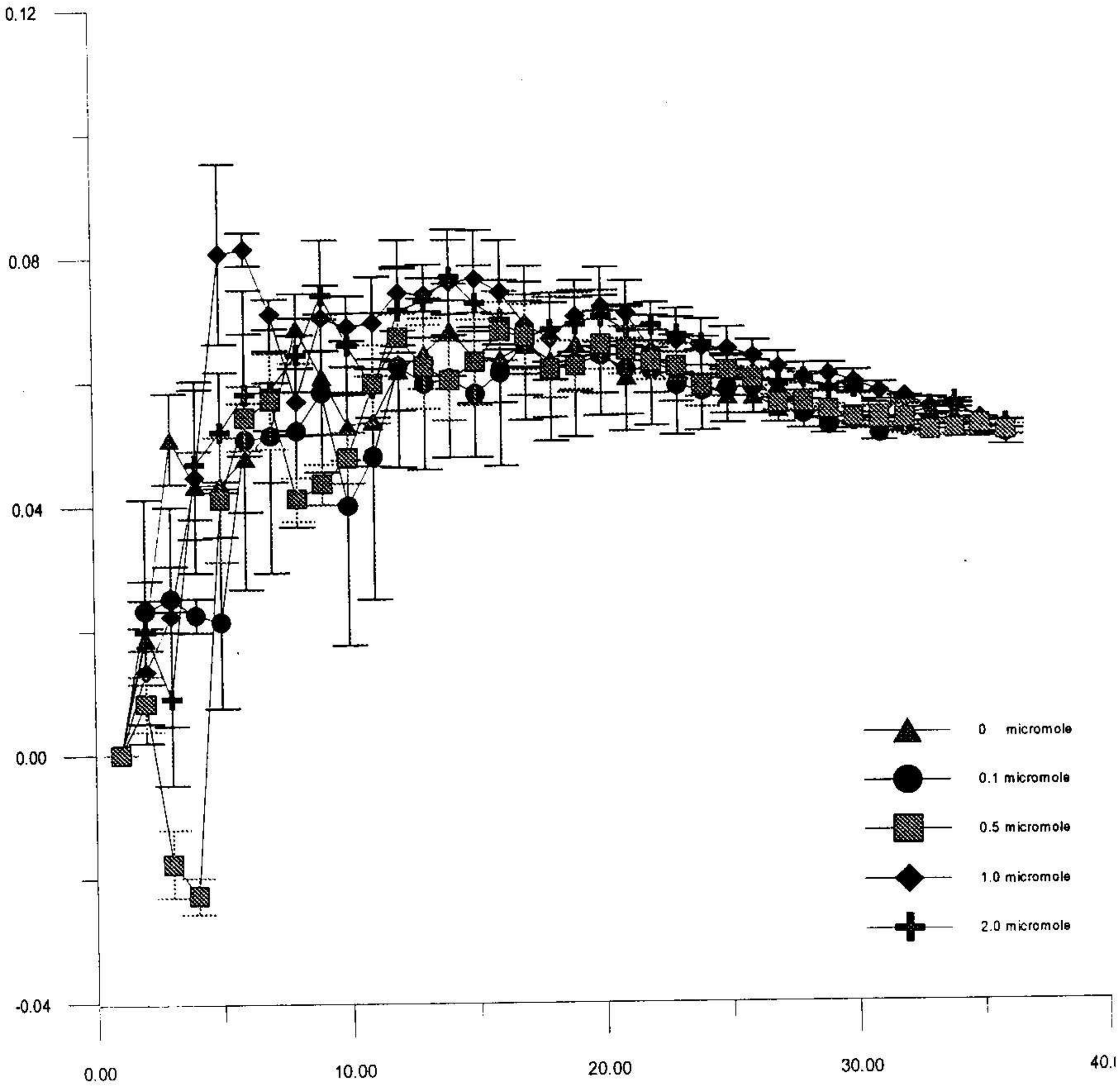
จากการเพาะเลี้ยง *Gyrodinium* sp. ในอาหารที่มีซิลิกอนในระดับความเข้มข้นต่างๆ กันในห้องปฏิบัติการ พบว่า *Gyrodinium* sp. มีการเจริญเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (ภาพที่ 6) เมื่อนำความหนาแน่นของเซลล์ไปทดสอบทางสถิติด้วย ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า การเจริญของ *Gyrodinium* sp. ที่เลี้ยงในแต่ละระดับความเข้มข้นของซิลิกอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อใช้ Duncan's new multiple range test (DMRT) มาทดสอบ พบว่าการเจริญของ *Gyrodinium* sp. ที่ไม่เติมซิลิกอน (0 μmol/L) จะแตกต่างไปจากความเข้มข้นอื่นๆ สำหรับการเจริญของ *Gyrodinium* sp. ที่เลี้ยงโดยการเติมซิลิกอนในระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 μmol/L ไม่มีความแตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญของแต่ละวันของ *Gyrodinium* sp. (ภาพที่ 7) พบว่าอัตราการเจริญในแต่ละวันของ *Gyrodinium* sp. จะลดลงในช่วงแรกของทุกระดับความเข้มข้นของซิลิกอน (วันที่ 1-3 ของการทดลอง) หลังจากนั้นอัตราการเจริญจะเพิ่มสูงขึ้น และขวดที่มีการเติมซิลิกอนในระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 μmol/L จะมีค่าอัตราการเจริญในแต่ละวันสูงกว่าในขวดที่มีการเติมซิลิกอนในระดับความเข้มข้น 0 และ 2.0 μmol/L

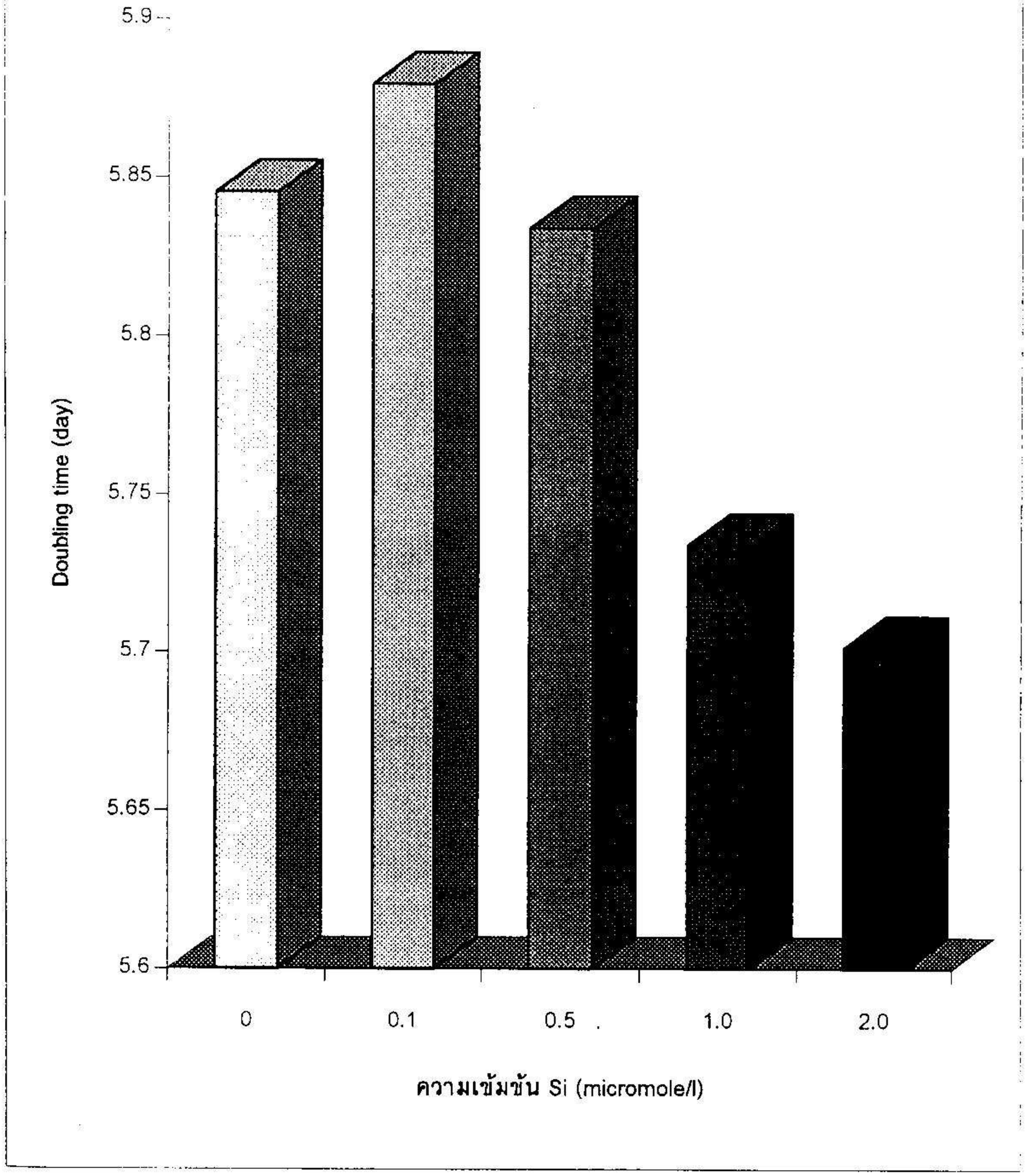
เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (ภาพที่ 8) พบว่าในขวดที่มีซิลิกอนระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 μmol/L จะมีระยะเวลาของการเพิ่มจำนวนเป็น



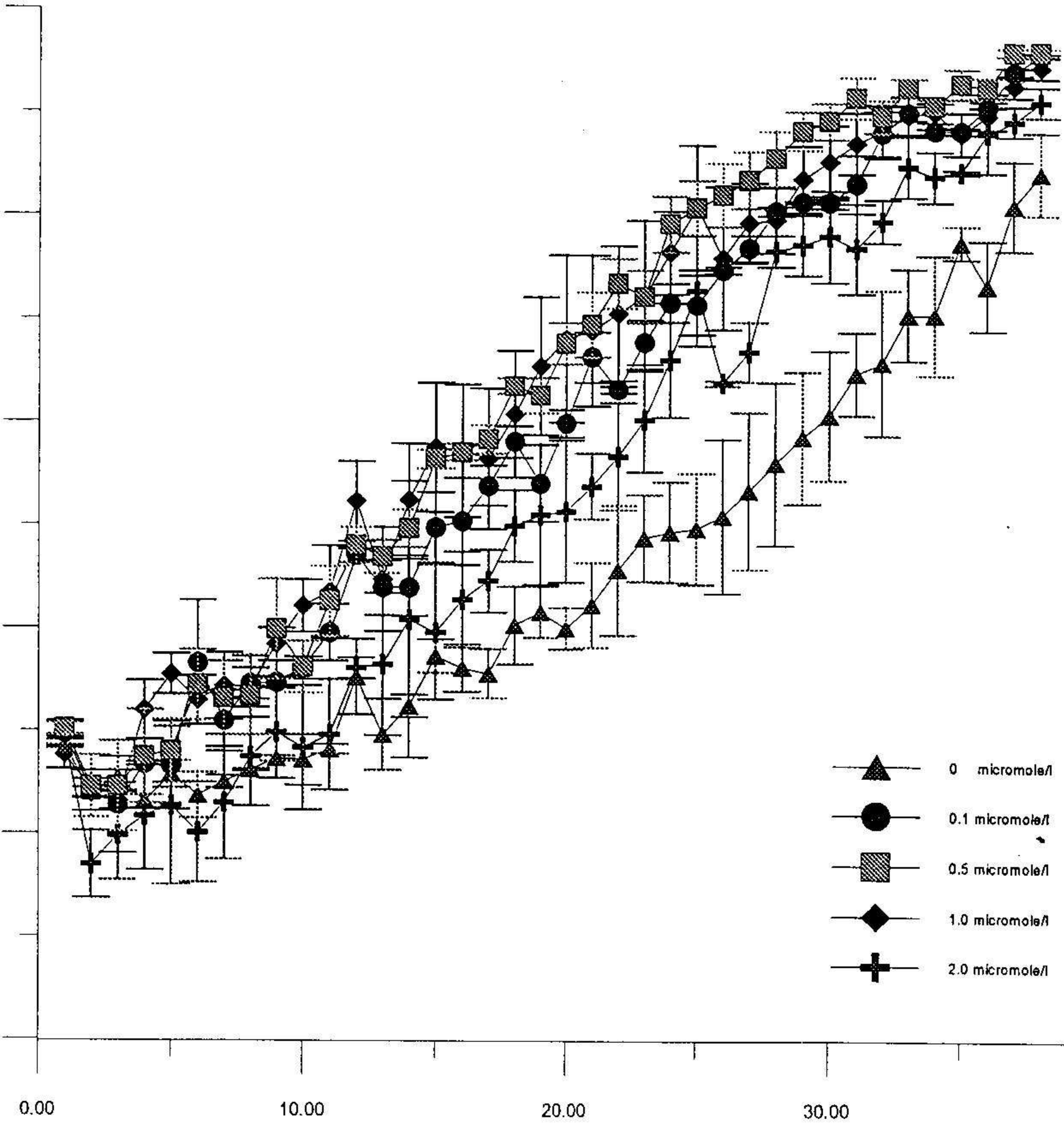
ภาพที่ 3 กราฟแสดงผลของซิลิกอนที่ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ ต่อการเจริญของ *Prorocentrum micans* เส้นในแนวตั้งคือค่า Standard error



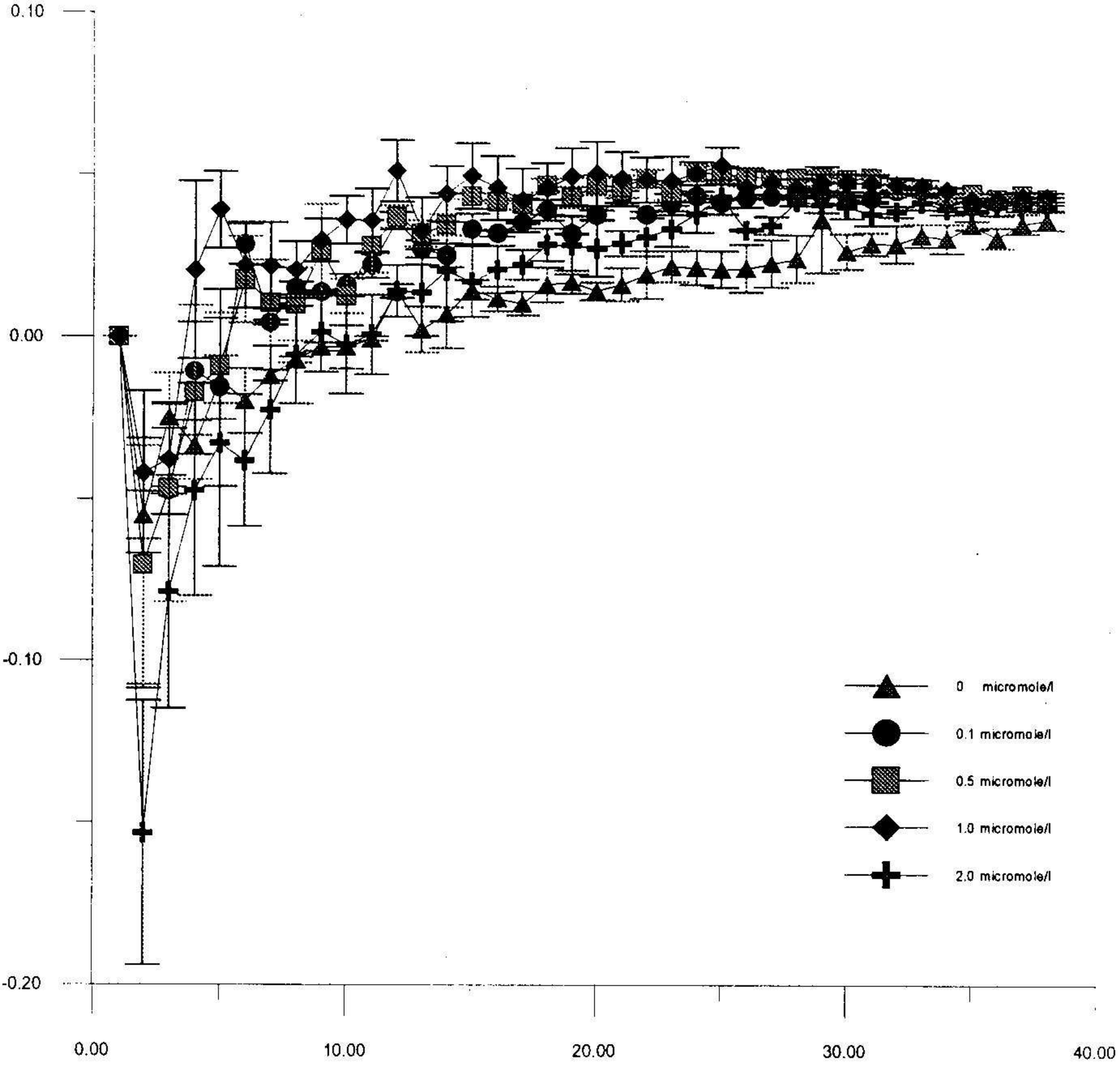
ภาพที่ 4 กราฟแสดงผลของซิลิกอนที่ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ ต่ออัตราการเจริญในแต่ละวัน ของ *Prorocentrum micans* เส้นในแนวตั้งคือค่า Standard error



ภาพที่ 5 กราฟแสดงผลของซิลิกอนที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ ต่อระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของ *Prorocentrum micans*

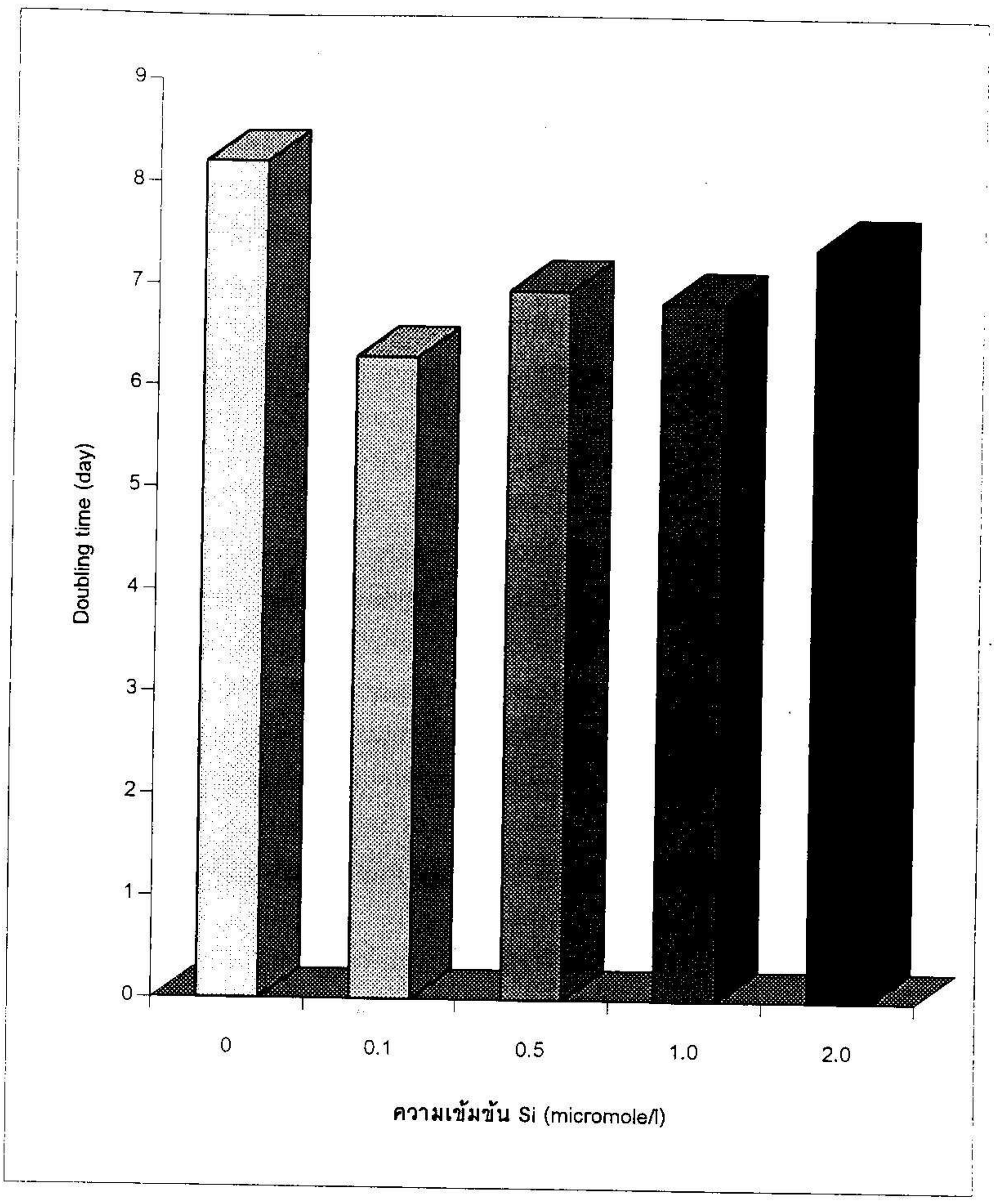


ภาพที่ 6 กราฟแสดงผลของซิลิกอนที่ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ ต่อการเจริญของ *Gyrodinium* sp. เส้นในแนวตั้งคือค่า Standard error



ภาพที่ 7 กราฟแสดงผลของซิลิกอนที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ ต่ออัตราการเจริญในแต่ละวัน ของ *Gyrodinium* sp. เส้นในแนวตั้งคือค่า Standard error

Central Library
Prince of Songkla U.



ภาพที่ 8 กราฟแสดงผลของซิลิกอนที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ ต่อระยะเวลาของการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของ *Gyrodinium* sp.

สองเท่าอยู่ระหว่าง 6.3-7.0 วัน ในขณะที่ในขวดที่มีซิลิกอนในระดับความเข้มข้น 0 และ 2.0 µ mol/L จะมีระยะเวลาของการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าอยู่ระหว่าง 7.4-8.2 วัน

ผลของสารเคมีบางชนิดที่มีต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลต *Prorocentrum micans*

ผลของทองแดง

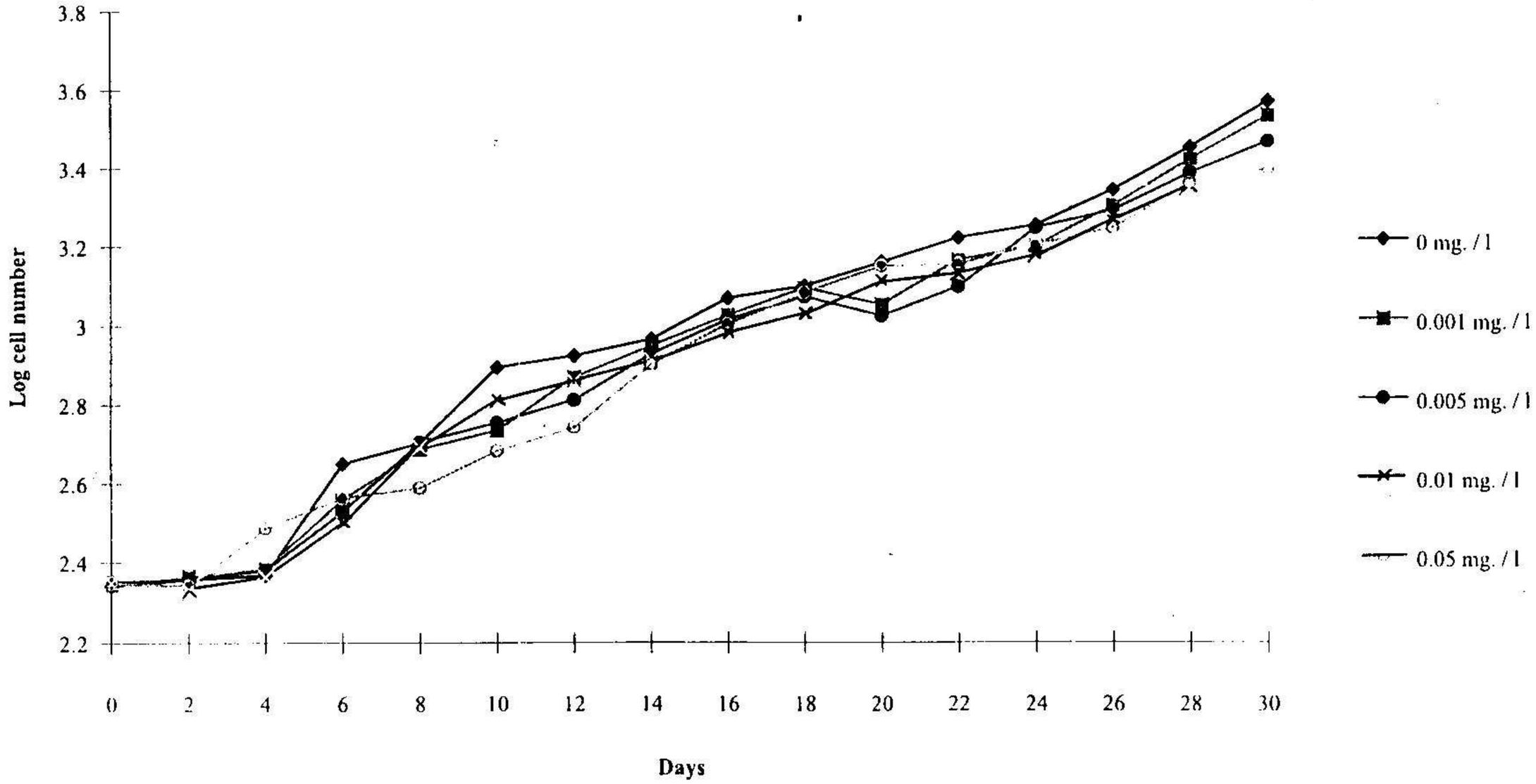
จากการทดลองเติมทองแดงในระดับความเข้มข้น 0, 0.001, 0.005, 0.01 และ 0.05 mg/L ลงในอาหารเลี้ยงไดโนแฟลกเจลเลต *Prorocentrum micans* พบว่าการเจริญของ *Prorocentrum micans* ในแต่ละระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *Prorocentrum micans* ยังคงสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 9) อย่างไรก็ตามในอาหารที่มีความเข้มข้นของทองแดงเท่ากับ 0 mg/L จะมีจำนวนเซลล์สูงสุดมากกว่าในอาหารที่มีความเข้มข้นของทองแดงเท่ากับ 0.001, 0.005, 0.01 และ 0.05 mg/L (ตารางที่ 4)

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญของ *Prorocentrum micans* พบว่า ในอาหารที่มีความเข้มข้นของทองแดง 0.01 mg/L จะให้ค่าอัตราการเจริญเฉลี่ยสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.0325 divisions/day รองลงมาได้แก่อาหารที่มีระดับความเข้มข้นของทองแดงเท่ากับ 0.005, 0.001 และ 0.05 mg/L ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญในทุกๆ 2 วัน พบว่าลักษณะของการเจริญของ *Prorocentrum micans* ในแต่ละความเข้มข้นของทองแดงมีลักษณะคล้ายๆ กัน กล่าวคือ ในช่วง 4 วันแรกของการทดลองจะมีอัตราการเจริญที่ค่อนข้างคงที่ หลังจากนั้น อัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 4-8 วัน และจะลดลงในวันที่ 10-12 หลังจากนั้นอัตราการเจริญจะคงที่ (ภาพที่ 10)

เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของทองแดงเท่ากับ 0.01 mg/L จะมีระยะเวลาของการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าน้อยที่สุด โดยใช้เวลา 9.3 วัน รองลงมาได้แก่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.001 และ 0.05 mg/L ตามลำดับ (ภาพที่ 11)

ผลของ Benzolkonium chloride (Bkc)

จากการศึกษาผลของ Bkc ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 ppm ต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลต *Prorocentrum micans* พบว่า *Prorocentrum micans* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีการเติม Bkc ในทุกระดับความเข้มข้น ยกเว้นที่ระดับ 0 ppm (ตารางที่ 5 ภาพที่ 12) และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การตายของ *Prorocentrum micans* พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ Bkc 2.0 ppm จะมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด และเปอร์เซ็นต์การตายนี้จะลดลงตามระดับของความเข้มข้นของ Bkc คือ 1.5, 1.0 และ 0.5 ppm ตามลำดับ (ภาพที่ 13) สำหรับในขวดที่มีความเข้มข้นของ Bkc เป็น 0 ppm จะมีเปอร์เซ็นต์การตายในช่วง 4 วันแรกของการทดลอง หลังจากนั้นไม่ปรากฏว่ามีการตายเกิดขึ้นอีกเลย จึงได้ทดลองเปลี่ยนความเข้มข้นของ Bkc โดยการลดความเข้มข้นลง และทดลองใน 5 ระดับความเข้มข้นคือ 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ppm

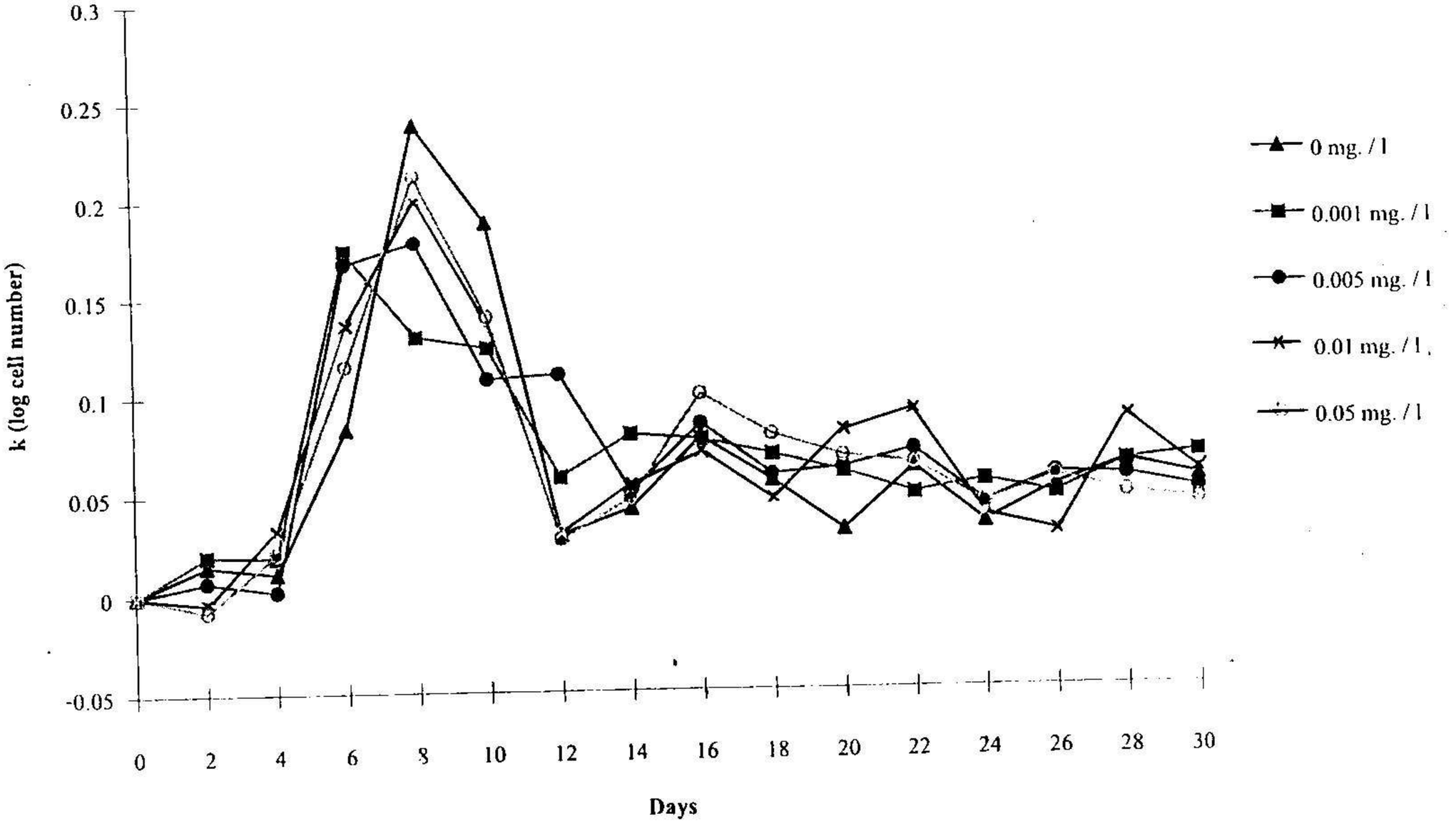


ภาพที่ 9 กราฟแสดงผลของทองแดงที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ ต่อการเจริญของ *Prorocentrum micans*

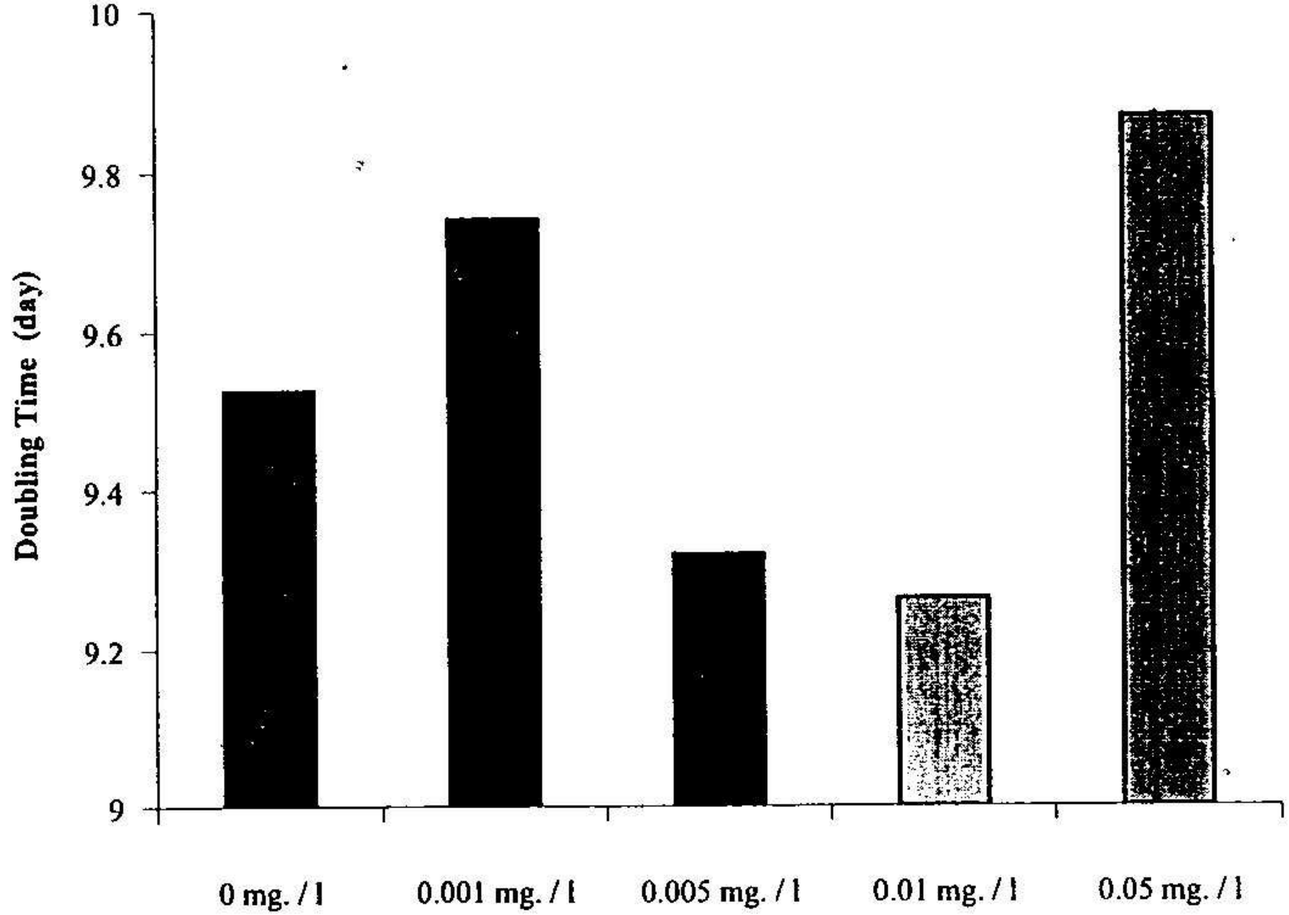
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเซลล์สูงสุด (Max. Yield) ขอบเขตของอัตราการเจริญ (Range k) อัตราการเจริญเฉลี่ย (Mean k) ค่า Standard error และการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (D) ของ *Prorocentrum micans* และ *Gyrodinium* sp. ที่ความเข้มข้นของทองแดงเท่ากับ 0, 0.001, 0.005, 0.01 และ 005 mg/L

ความเข้มข้นของทองแดง (mg/L)	0	0.001	0.005	0.01	0.05
Max.Yield (cell/ml.)	2,633.3	2,605.5	2,557.2	2,527.7	2,503.8
Range k (divisions/day)	0.0334-0.0364	0.0287-0.0331	0.0289-0.0357	0.0297-0.0353	0.0287-0.0323
Mean k (divisions/day)	0.0316	0.0309	0.0323	0.0325	0.0305
std.error mean k	0.0015	0.0022	0.0034	0.0028	0.0018
D (day)	9.525	9.742	9.319	9.264	9.869

*หมายเหตุ ค่า Max.Yield คิดจากค่าเฉลี่ยความหนาแน่นเซลล์ในวันที่ 30



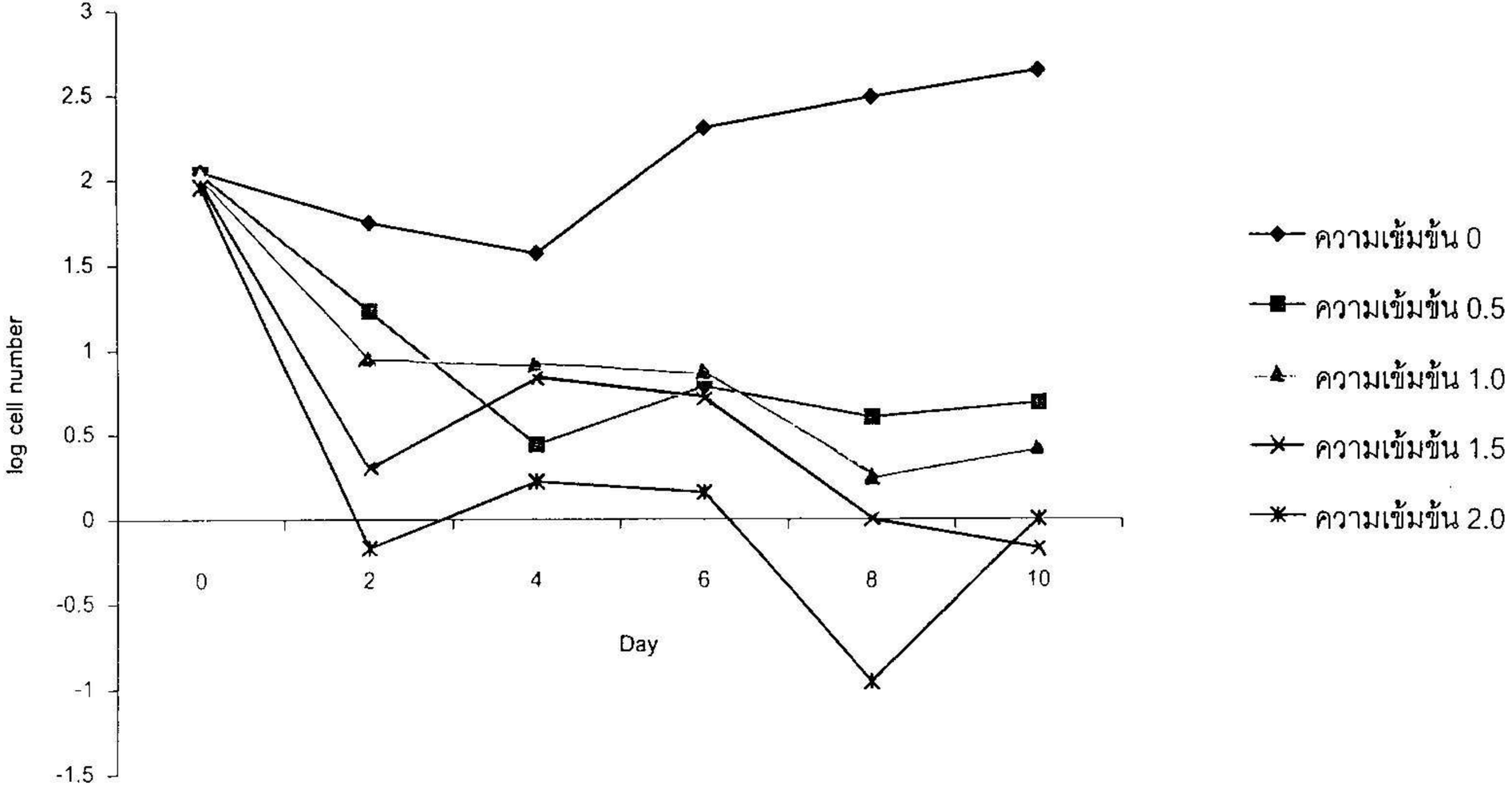
ภาพที่ 10 กราฟแสดงผลของทองแดงที่ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ ต่ออัตราการเจริญของ *Prorocentrum micans*



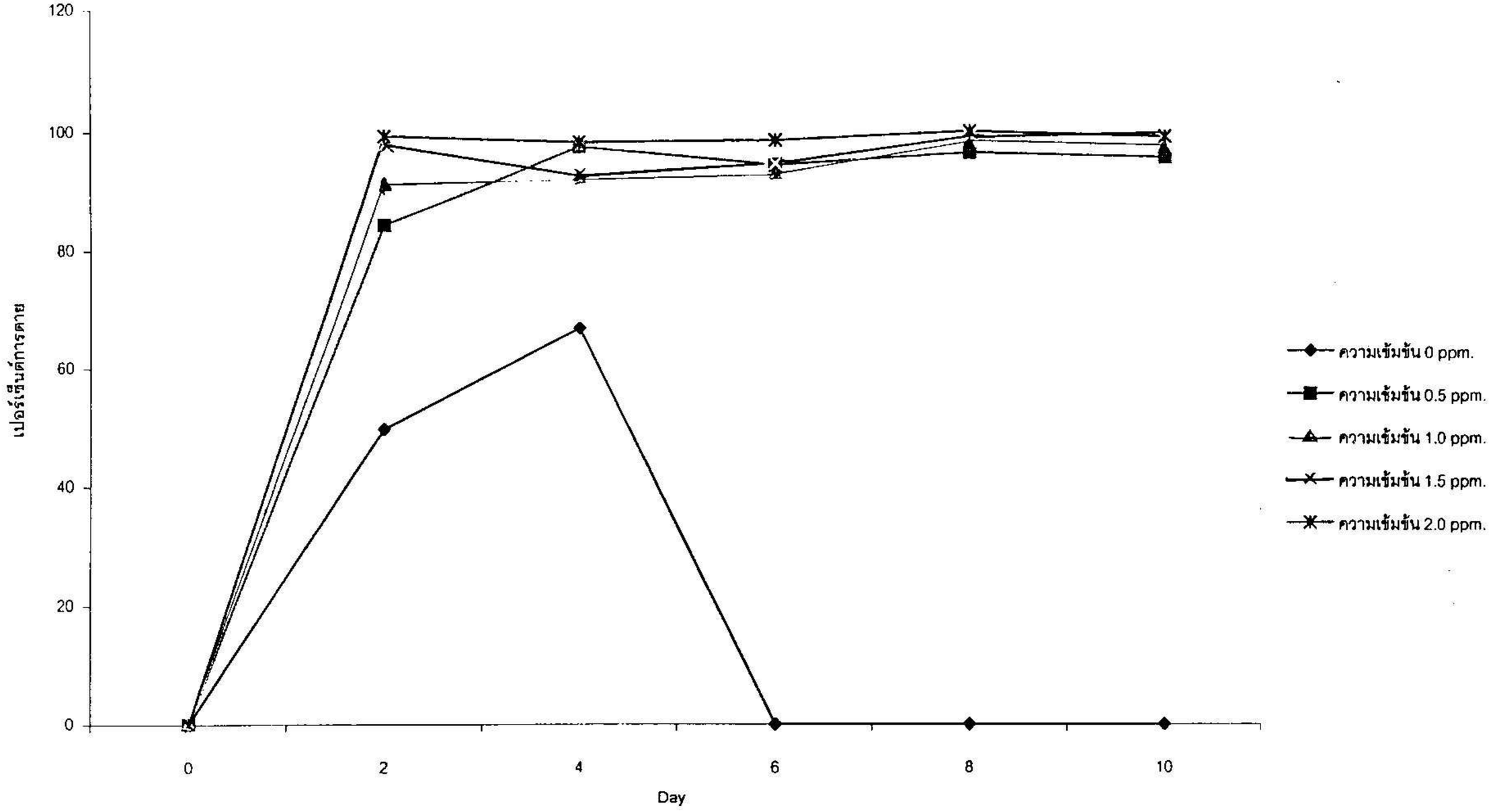
ภาพที่ 11 กราฟแสดงผลของทองแดงที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ ต่อระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของ *Prorocentrum micans*

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ *Prorocentrum micans* (เซลล์/1 มิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของ Bkc 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ppm

วันที่	ความเข้มข้นของ Bkc (ppm.)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
0	112.22 ± 16.68	108.11 ± 2.77	102.78 ± 13.35	95.67 ± 9.49	90.56 ± 3.86
2	56 ± 23.15	16.89 ± 4.66	8.89 ± 7.955	2 ± 1.19	0.67 ± 0.57
4	37 ± 4.08	2.78 ± 0.95	8.22 ± 2.26	6.89 ± 0.96	1.67 ± 0.33
6	201.11 ± 62.11	6.11 ± 1.83	7.44 ± 0.50	5.22 ± 1.92	1.44 ± 0.19
8	304.22 ± 227.96	4 ± 1.19	1.78 ± 1.01	1 ± 0.88	0.11 ± 0.19
10	434.22 ± 209.33	4.89 ± 0.50	2.67 ± 2.18	0.67 ± 0.57	1.0 ± 0.57



ภาพที่ 12 กราฟแสดงการเจริญของ *Prorocentrum micans* ที่ระดับความเข้มข้นของ Bkc 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ppm

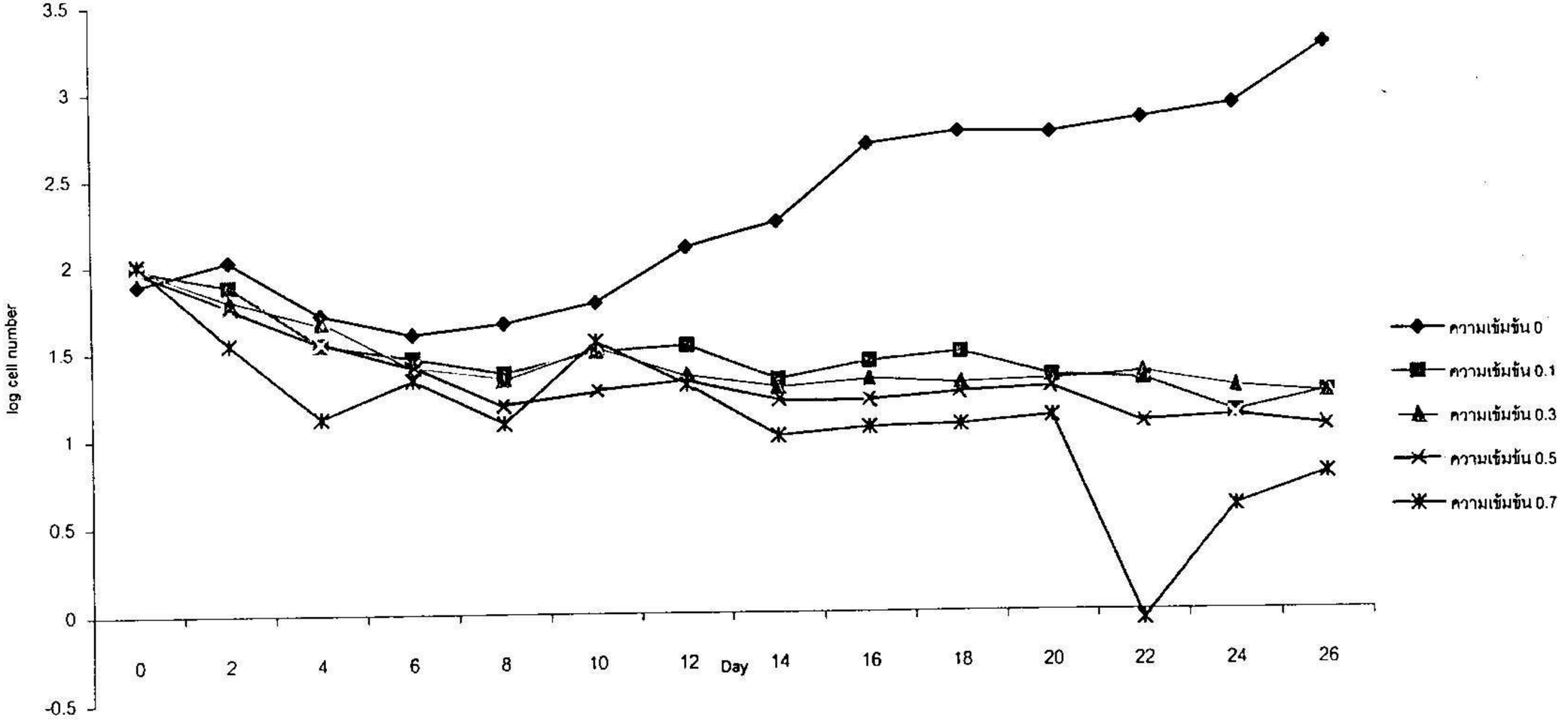


ภาพที่ 13 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การตายของ *Prorocentrum micans* ที่ระดับความเข้มข้นของ Bkc 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ppm

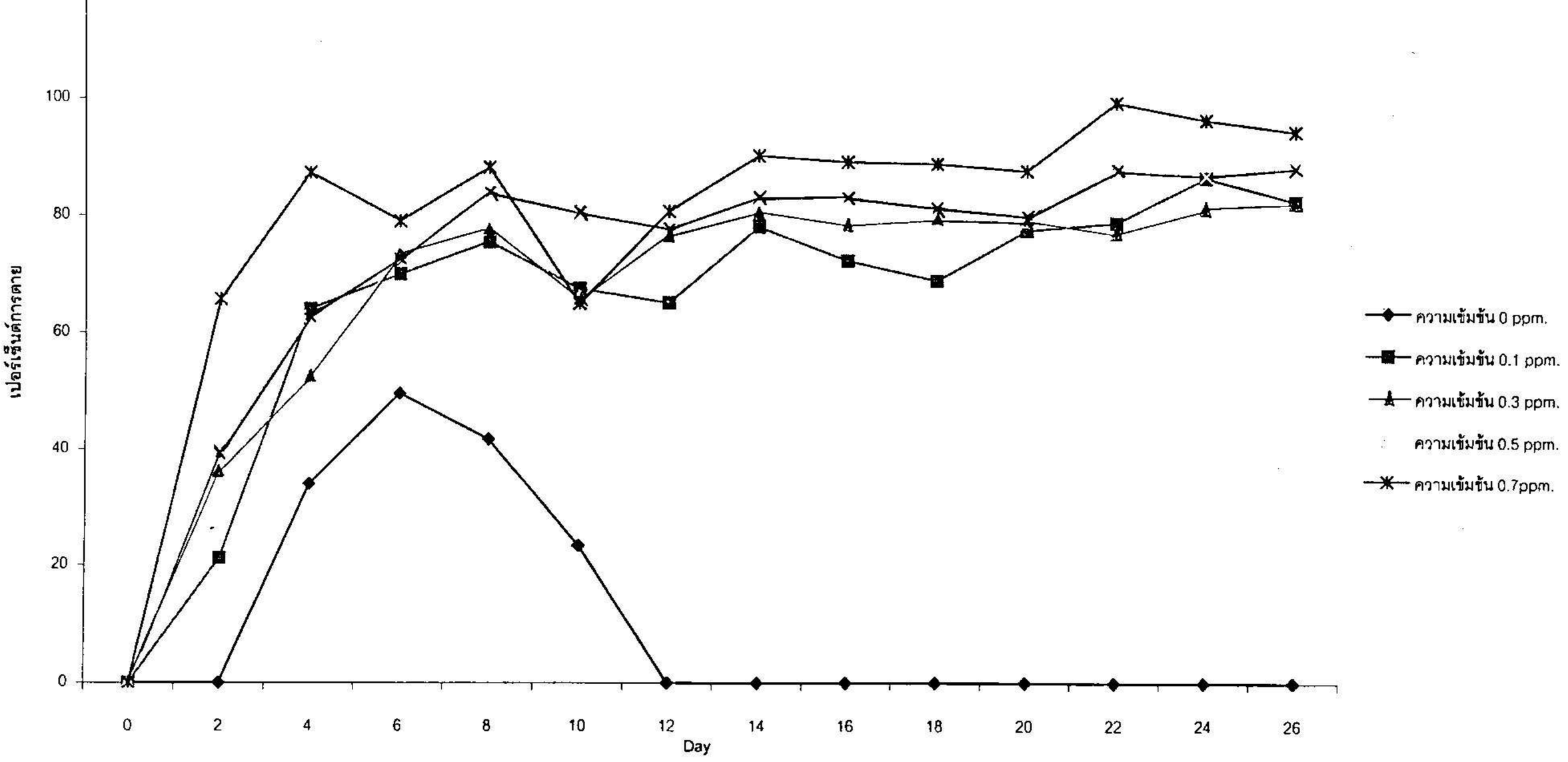
พบว่าได้ผลในทำนองเดียวกับการทดลองแรก กล่าวคือในขวดที่มีความเข้มข้นของ Bkc เท่ากับ 0 ppm *Prorocentrum micans* จะมีความหนาแน่นของเซลล์ลดลงเล็กน้อยในช่วงแรกของการทดลอง หลังจากนั้นจะเพิ่มจำนวนขึ้น ในขณะที่ในขวดที่มีความเข้มข้นของ Bkc เท่ากับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ppm ความหนาแน่นของเซลล์จะค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง และไม่มีการเพิ่มจำนวนขึ้นมาเลย (ตารางที่ 6 ภาพที่ 14) และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การตายพบว่ามีการตายเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ Bkc เช่นกัน (ภาพที่ 15)

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ *Prorocentrum micans* (เซลล์/1 มิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของ Bkc 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ppm

วันที่	ความเข้มข้นของ Bkc (ppm.)				
	0	0.1	0.3	0.5	0.7
0	77.11 ±20.36	95.67 ± 11.5	96.789 ± 9.34	93.78 ± 6.73	101.34 ±4.93
2	104.78 ± 23.51	75.45 ± 13.36	61.99 ± 3.05	56.89 ± 4.62	34.77 ± 3.50
4	51 ± 19.67	34.44 ±28.66	46.22 ±8.17	35.11 ± 12.44	13 ± 2.9
6	39.33 ± 7.84	28.78 ± 1.50	25.56 ± 1.92	25.89 ± 6.88	21.44 ± 1.83
8	45.22 ±3.27	23.56 ± 3.67	21.67 ± 0.01	15.27 ± 2.31	12.11 ± 1.89
10	59.22 ± 20.99	31.11 ± 2.16	32.89 ± 5.50	18.56 ± 1.50	35.50 ±12.93
12	122.67 ± 11.84	33.45 ± 12.60	22.78 ± 3.07	21.11 ± 1.35	19.76 ± 1.73
14	169.67 ± 71.905	21.11 ± 4.85	18.89 ± 0.76	15.99 ± 1.15	10 ± 0.33
16	471.67 ± 350.59	26.55 ± 1.57	21.11 ± 4.00	16 ± 1.85	11.11 ± 2.85
18	553.33 ± 362.31	29.78 ± 2.21	20.11 ± 2.49	17.67 ± 1.20	11.42 ± 0.38
20	544.67 ± 337.06	21.67 ± 3.46	20.44 ± 2.52	19 ± 0.67	12.66 ± 3.51
22	652 ±407.46	20.45 ± 4.67	22.45 ± 1.07	11.67 ±1.45	0.89 ± 0.19
24	780.44 ± 980.92	13.11 ± 1.70	18.33 ± 0.33	12.56 ± 0.51	53.88 ± 1.07



ภาพที่ 14 กราฟแสดงการเจริญของ *Prorocentrum micans* ที่ระดับความเข้มข้นของ Bkc 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ppm



ภาพที่ 15 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การตายของ *Prorocentrum micans* ที่ระดับความเข้มข้นของ Bkc 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ppm

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนโดยเฉพาะในกลุ่มที่อาจก่อให้เกิดปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี สามารถเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนได้ 2 กลุ่ม 11 ชนิด โดยเป็นกลุ่มไดอะตอม 3 ชนิด ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารสูตร f/2 (Guillard and Ryther, 1962) และอาหารสูตรนี้สามารถใช้ได้ดีกับการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนในกลุ่มไดอะตอม สำหรับที่เหลืออีก 8 ชนิด เป็นแพลงก์ตอนในกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลต ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้ด้วยอาหารสูตร T1 (Ogata *et al.*, 1987) แต่การใช้อาหารสูตรนี้สำหรับการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนในกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการแยกแพลงก์ตอนจากบริเวณชายฝั่ง จำเป็นจะต้องมีการลดความเข้มข้นของสูตรอาหารลง มิฉะนั้นอาจทำให้การเพาะเลี้ยงเซลล์ของแพลงก์ตอนไม่ประสบผลสำเร็จได้

จากการศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญของ *Chattonella* sp. และ *Gymnodinium sanguineum* ที่ระดับความเค็ม 15, 20, 25, 30 และ 35 ppt พบว่า *Chattonella* sp. สามารถเจริญได้ดีที่สุดในระดับความเค็ม 25 ppt และเจริญต่ำสุดที่ระดับความเค็ม 35 ppt ส่วน *Gymnodinium sanguineum* สามารถเจริญได้ดีที่สุดในระดับความเค็ม 20 ppt และเจริญต่ำสุดที่ระดับความเค็ม 30 ppt แสดงให้เห็นว่าความเค็มเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลต และระดับความเค็มที่สูงหรือต่ำเกินไป จะทำให้การเจริญของเซลล์ลดลง (โสภณา บุญญาภิวัฒน์, 2521) และผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ทำโดย Takayama และคณะ (1991) และ Kennish (1990)

จากการทดลองเติมซิลิกอนในระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 µmol/L ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงไดโนแฟลกเจลเลต 2 ชนิดคือ *Gyrodinium* sp. และ *Prorocentrum micans* เพื่อทดลองหาสาเหตุที่แพลงก์ตอนในกลุ่มของไดโนแฟลกเจลเลต ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารสูตร f/2 ซึ่งมีความแตกต่างกันในเรื่องของซิลิกอนเป็นหลัก และซิลิกอนนี้เป็นสารที่มีความจำเป็นต่อแพลงก์ตอนในกลุ่มของไดอะตอม เนื่องจากจะต้องใช้ในการสร้างผนังเซลล์ (Vonshak, 1986) แต่ไม่จำเป็นและอาจเป็นอันตรายต่อแพลงก์ตอนในกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลต จึงไม่นิยมเติมซิลิกอนลงในอาหารเลี้ยงไดโนแฟลกเจลเลตแม้จะใช้สูตรอาหาร f/2 แต่จากผลการศึกษาพบว่าซิลิกอนมีผลต่อการเจริญของ *Gyrodinium* sp. โดยจะช่วยให้ *Gyrodinium* sp. มีการเจริญที่ดีขึ้นกว่าอาหารที่ไม่ได้เติมซิลิกอน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Iizuka และคณะ (1989) แต่ในขณะเดียวกันการเติมซิลิกอนลงในอาหารเลี้ยงไดโนแฟลกเจลเลต *Prorocentrum micans* ไม่ส่งผลใด ๆ ต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลตชนิดนี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าซิลิกอนจะส่งผลต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลตบางชนิดเท่านั้น เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของเซลล์ไดโนแฟลกเจลเลตทั้งสองชนิดจะพบว่า *Gyrodinium* sp. เป็นไดโนแฟลกเจลเลตที่ไม่มีเปลือกแข็งหุ้มลำตัว (unarmoured dinoflagellate) ส่วน *Prorocentrum micans* เป็นไดโนแฟลก-เจลเลตที่มีแผ่นเปลือกที่เป็นสารเซลลูโลสหุ้มลำตัว (armoured dinoflagellate) ซึ่งอาจเป็นไปได้

ว่าซิลิกอนจะส่งผลต่อการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลตที่ไม่มีเปลือกแข็งหุ้มลำตัวเท่านั้น เพราะผลในทำนองเดียวกันนี้สามารถพบได้ในไดโนแฟลกเจลเลตอีกชนิดหนึ่งคือ *Gymnodinium nagasakiense* ด้วยเช่นกัน (Iizuka *et al.*, 1989)

จากการทดลองใช้สารเคมีบางชนิด (ทองแดง และ Bkc) ในการควบคุมการเจริญของไดโนแฟลกเจลเลตที่มีความสำคัญ โดยอาจเป็นสาเหตุของปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ (*Prorocentrum micans*) โดยใช้ทองแดงในระดับความเข้มข้น 0.001, 0.005, 0.01 และ 0.05 mg/L ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เกินค่ามาตรฐานของคุณภาพน้ำชายฝั่งทะเล ซึ่งกำหนดไว้ไม่เกิน 0.05 mg/L (กรมควบคุมมลพิษ, 2537) พบว่าการใช้ความเข้มข้นของทองแดงในระดับต่างๆ เหล่านี้ไม่ส่งผลต่อการเจริญของ *Prorocentrum micans* หมายความว่าถ้าต้องการใช้ทองแดงในการกำจัด *Prorocentrum micans* โดยให้มีความเข้มข้นที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำอื่นๆ หรือไม่ให้มีสารตกค้างอยู่ในแหล่งน้ำแล้วไม่อาจใช้ทองแดงในการควบคุม หรือกำจัด *Prorocentrum micans* ได้ และถ้าต้องการกำจัดแพลงก์ตอนชนิดนี้ด้วยทองแดงแล้ว จะต้องใช้ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นมากกว่านี้ (Lage *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง *Prorocentrum micans* (สูตร T1) แล้วพบว่ามี EDTA ที่อยู่ในรูปของ NaEDTA และ FeEDTA ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้เป็นตัวจับประจุทองแดง ทำให้ลดความเป็นพิษของทองแดงลงได้ (Gledhill *et al.*, 1977) ดังนั้นสารที่เป็นตัวจับประจุโลหะหนัก (Chelator) จึงอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อความเป็นพิษของโลหะหนัก โดยถ้าในน้ำนั้นมีสารที่เป็น chelator อยู่มากก็จำเป็นจะต้องเพิ่มความเข้มข้นของโลหะหนักที่ใช้ในการควบคุมเพิ่มมากขึ้นด้วย และจากการทดลองใช้ Bkc ซึ่งเป็นยาฆ่าเชื้อโรคภายนอก แต่มีความปลอดภัยทั้งต่อผู้ใช้ และสัตว์น้ำสูงกว่าฟอร์มาลิน (วิชัย ลาภจตุพร, 2535) ในระดับความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 2.0 ppm พบว่า Bkc สามารถยับยั้งการเจริญของ *Prorocentrum micans* ได้ดีในทุกระดับความเข้มข้น และจากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเราอาจสามารถใช้ความเข้มข้นของ Bkc ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้ได้อีก ซึ่งอาจเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่าย และลดปริมาณของสารปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้อีกทางหนึ่งด้วย อย่างไรก็ตามก็ควรมีการศึกษาผลของ Bkc ต่อแพลงก์ตอนในกลุ่มอื่นๆ อีกด้วยรวมทั้งระยะเวลาของการส่งผลของสาร Bkc ทั้งนี้เพื่อป้องกันผลเสียที่อาจเกิดขึ้นตามมา

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2540-2541

เอกสารอ้างอิง

1. กรมควบคุมมลพิษ. 2537. มาตราฐานคุณภาพแหล่งน้ำ. กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ 8 หน้า.
2. เกรียงศักดิ์ สายธนู และสุทธิชัย เตมียวณิชย์. 2527. พิษอัมพาตในหอยบริเวณปราณบุรีและชายฝั่งทะเลตะวันตกของอ่าวไทย. การสัมมนาครั้งที่ 3 การวิจัยคุณภาพน้ำและคุณภาพทรัพยากรมีชีวิตในน่านน้ำไทย. 26-28 มีนาคม 2527. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 39-44.
3. วิชัย ลาภจตุพร. 2535. หมวดยาฆ่าเชื้อ คู่มือการใช้ผลิตภัณฑ์โรคกุ้งที่สำคัญ. แลปอินเตอร์. ไลฟ์สต๊อกอกรีคัลเจอรัล บิซิเนส กรุงเทพฯ.
4. ผุสดี ศรีพยัตต์. 2521. การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชแบบปริมาณมาก. รายงานวิชาการที่ สจ/21/8 สถานวิจัยประมงทะเล กรมประมง. 6 หน้า.
5. สว่าง เจริญผล. 2495. ขี้ปลาวาพ. ข่าวการประมง 5(4) : 307-314.
6. สุวรรณี เฉินบำรุง และชลัญญา ธารบุปผา. 2524. การสำรวจสภาวะน้ำเสียบริเวณปากแม่น้ำท่าจีน และแม่กลอง. รายงานวิชาการที่ สจ/24/1 สถานวิจัยประมงทะเล กรมประมง. 23 หน้า.
7. สุนีย์ สุวภีพันธ์. 2519. การเพาะเลี้ยงคลอเรลลาทะเล (*Chlorella*) ที่ให้ผลผลิตสม่ำเสมอ. รายงานวิชาการที่ สจ/19/7 สถานวิจัยประมงทะเล กรมประมง. 8 หน้า.
8. สุนีย์ สุวภีพันธ์. 2525. น้ำเปลี่ยนสีในบริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทย. วารสารการประมง 35(6) : 581-593.
9. สุนีย์ สุวภีพันธ์. 2536. การเกิดน้ำเปลี่ยนสีและการวิจัยน้ำเปลี่ยนสีในน่านน้ำไทย. การประชุมสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องน้ำเปลี่ยนสี. วันที่ 31 พฤษภาคม ถึง 3 มิถุนายน 2536 ณ. ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก จ.ระยอง. 10 หน้า.
10. โสภณา บุญญาภิวัฒน์. 2521. การศึกษาดัชนีความชุกชุมของไมโครงแพลงก์ตอนในบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยา. กองสำรวจแหล่งประมง กรมประมง. 68 หน้า.
11. Gledhill, M., Nimmo, M. and Hill, S.J. 1977. The toxicity of copper (II) species to marine algae, with particular reference to macroalgae. J. Phycol., 33:2-11.
12. Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. 1962. Cultivation of Plants. In, Marine ecology, Volume 3, Part 1, Kinne, O. (ed.), John Wiley & Sons, Toronto. pp. 420-441.
13. Iizuka, S., Sagiyama, H. and Hirayama, K. 1989. Population growth of *Gymnodinium nagasakiense* red tide in Omura Bay. In, Red tide : Biology, Environmental science, and Toxicology, Okaichi, T., Anderson, D.M. and Nemoto, T. (eds.). pp. 269-272.
14. Kennish, M.J. 1990. Marine Science. CRC Press. Boca Ratoon, Florida. pp. 227-254.

15. Lage, O.M., Parente, A.M., Soares, H.M.V.M., Vasconcelos, M.T.S.D. and Salema, R. 1994. Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture. Eur. J. Phycol., 29:253-260.

16. Ogata, T., Ishimaru, T. and Kodama, M. 1987. Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarensis.* Mar. Biol., 95:217-220.

17. Provasoli, L. 1963. Growing marine seaweeds. In, Proc. 4th Intern. Seaweed Sym., Pergamon Press, pp. 9-17.

18. Provasoli, L., McLaughlin, J.J.A. and Droop, M.R. 1957. The development of artificial media for marine algae. Archiv. Fur Mikrobiologie, 25:392-428.

19. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stanier, R.Y. 1979. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. J. Gen. Microbiol., 111:1-61.

20. Takayama, N., Hosaka, M., Hirai, S. and Hara, Y. 1991. The occurrence of raphidophycean alga *Chattonella* sp. (Globular type) in Tokyo Bay, Japan. Bull. Plankton Soc. Japan, 38:1-8.

21. Vonshak, A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In, Handbook of microalgal mass culture. Richmond, A. (ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 125-134.