บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 การศึกษาสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการสืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis*

2.1.1 การศึกษารูปแบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่จากแหล่งอาศัยแตกต่างกัน

การเก็บต้นพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่จากแหล่งต่าง ๆ 4 แหล่ง ได้แก่ อ่าวปัตตานี บ่อดิน บ่อซิเมนต์ และห้องปฏิบัติการจาก 3 จุด ในช่วงเดือนกันยายน 2556 ถึงเดือนตุลาคม 2556 นำต้นพันธุ์สาหร่ายที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์แล้วมาตรวจสอบขนาดของเซลล์ การปรากฏของเซลล์สืบพันธุ์ และชนิดของเซลล์สืบพันธุ์ที่สร้าง นำไปตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำสาหร่ายที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์แล้ว แหล่งละ 30 แทลลัส ไปตรวจสอบลักษณะภายนอกได้แก่ ความกว้าง และความยาวของแทลลัส ลักษณะสี และมีการตรวจสอบคุณสมบัติบางประการของสภาวะแวดล้อมในบริเวณนั้น ได้แก่ ความเข้มแสง อุณหภูมิอากาศ อุณหภูมิน้ำ ความเค็ม พีเอช ไนเตรท-ไนโตรเจน ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส ความเป็นด่าง ความกระด้างตามคู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่ มั่นสิน (2540) เรียบเรียงไว้

2.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารบางชนิด

นำตัวอย่างสาหร่าย และน้ำจากแหล่งเดียวกันที่เก็บมาตรวจสอบ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารบางประการได้แก่ แคลเซียม (Ca), แมงกานิส (Mn), โครเมียม (Cr), คอปเปอร์ (Cu), เหล็ก (Fe) และสังกะสี (Zn) โดยนำสาหร่ายไส้ไก่ที่เก็บจากสถานที่ต่าง ๆ มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไปอบด้วยเครื่องอบแบบเป่าลมร้อน ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ชม.) จนสาหร่ายแห้ง จากนั้นนำไปย่อยตามขั้นตอนเพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารในสาหร่าย แล้วนำไปวิเคราะห์โลหะด้วยเครื่อง AAS (100) โดยวิธี AOAC (2000)

เปรียบเทียบปริมาณธาตุอาหารในสาหร่าย และในน้ำซึ่งสามารถหาค่า Concentration factor ได้จากการคำนวณ (Lobban and Harrison, 1994) ดังนี้

$$\text{Concentration factor} = \frac{\text{ปริมาณโลหะหนักในสาหร่าย (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย)}}{\text{ปริมาณโลหะหนักในน้ำ (มิลลิลิตร)}}$$

2.2 การศึกษาสภาวะแวดล้อมต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ในห้องปฏิบัติการ

นำต้นพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่จากบ่อซิเมนต์ นำไปตรวจการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ และเลือกท่อนพันธุ์ที่ยังไม่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำที่มีความเค็ม 20 ppt นำมาเหนี่ยวนำด้วยวิธีต่าง ๆ โดยเริ่มจากปัจจัยที่คาดว่ามีผลต่อการเหนี่ยวนำให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์มากที่สุด ได้แก่

2.2.1 ความเค็มที่ระดับ 10, 15, 20, 25 และ 30 ppt นำมาเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร (mL) ซึ่งมีขาต่อพิเศษเพื่อให้อากาศ ทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 30 ท่อนพันธุ์ ที่ระดับความเข้มแสง 60 μmol m^{-2} s^{-1} การให้แสง:มืด 12:12 ชั่วโมง ใช้สูตรอาหาร MGM (Guillard, 1975) ทำการตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก ๆ 2 วัน

2.2.2 การผึ่งแห้ง โดยนำแทลลัสที่ยังไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ มาตัดแทลลัสเป็นชิ้นเล็ก นำมาเหนี่ยวนำที่ระดับการผึ่งแห้งที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เลี้ยงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขาต่อพิเศษเพื่อให้อากาศ ทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 30 ท่อนพันธุ์ ระดับความเค็มที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาจากข้อ 2.2.1 ที่ระดับความเข้มแสง 60 μmol m^{-2} s^{-1} การให้แสง:มืด 12:12 ชั่วโมง ใช้สูตรอาหาร MGM (Guillard, 1975) ทำการตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก ๆ 2 วัน

2.2.3 ขนาดของท่อนพันธุ์ ตัดท่อนพันธุ์สาหร่ายที่ความยาวแตกต่างกัน 5 ขนาด ได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 เซนติเมตร (cm) ทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 30 ท่อนพันธุ์ มาเลี้ยงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขาต่อพิเศษเพื่อให้อากาศ โดยใช้เงื่อนไขของความเค็ม และการผึ่งแห้งที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาจากข้อ 2.2.1 และ 2.2.2 ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเข้มแสง 60 μmol m^{-2} s^{-1} การให้แสง:มืด 12:12 ชั่วโมง ใช้สูตรอาหาร MGM (Guillard, 1975) ตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก ๆ 2 วัน

2.2.4 อุณหภูมิ โดยนำแทลลัสที่ยังไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาตัดแทลลัสเป็นชิ้นเล็ก โดยใช้เงื่อนไขของความเค็ม การผึ่งแห้ง และขนาดท่อนพันธุ์ที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาจากข้อ 2.2.1, 2.2.2 และ 2.2.3 เลี้ยงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขาต่อพิเศษเพื่อให้อากาศ นำมาเหนี่ยวนำที่ระดับอุณหภูมิต่างกัน 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 30 ท่อนพันธุ์ การให้แสง: มืด 12:12 ชั่วโมง ใช้สูตรอาหาร MGM (Guillard, 1975) ทำการนับตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก ๆ 2 วัน

2.2.5 แคลเซียม การเติมสารละลายของแคลเซียมไอออนโดยการเติมสารละลายของ $CaCl_2$ 0, 6, 12 และ 18 มิลลิกรัม/ลิตร (mg/L) ในน้ำเลี้ยงโดยนำแทลลัสที่ยังไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาตัดเป็นชิ้นเล็กที่เงื่อนไขความเค็ม การผึ่งแห้ง ขนาดท่อนพันธุ์ และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาจากข้อ 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3 และ 2.2.4 เลี้ยงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขาต่อพิเศษเพื่อให้อากาศ ทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 30 ท่อนพันธุ์ เลี้ยงที่ความเข้มแสง 60 μmol m^{-2} s^{-1} การให้แสง:มืด 12:12 ชั่วโมง ใช้สูตรอาหาร MGM (Guillard, 1975) ทำการตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก ๆ 2 วัน

2.3 การศึกษาวิธีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ด้วยปัจจัยต่าง ๆ

โดยนำต้นพันธุ์ที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แล้ว ขนาดท่อนพันธุ์ 3 เซนติเมตร การเลี้ยงที่ระดับความเค็ม 25 ppt อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} การให้แสง:มืด 12:12 ชั่วโมง มากระตุ้นให้ปล่อยสปอร์ โดยเลี้ยงในจานพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ต้นพันธุ์จานละ 1 ต้น ตัวอย่างละ 10 ซ้ำ ใส่อาหาร MGM (Guillard, 1975) ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยเริ่มจากปัจจัยที่คาดว่ามีผลต่อการกระตุ้นการปล่อยสปอร์มากที่สุด ด้วยปัจจัยต่าง ๆ 3 ด้าน ปัจจัยความเค็ม การให้แสงที่ระดับแตกต่างกัน และการผึ่งแห้งดังต่อไปนี้

2.3.1 ความเค็ม

นำสาหร่ายมากระตุ้นที่ระดับความเค็ม 5, 10, 15, 20 และ 25 ppt โดยนำแทลลัสที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาตัดแทลลัสเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยใช้ความยาว 3 เซนติเมตร ภายใต้การเลี้ยงอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} การให้แสง:มืด 12:12 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนสปอร์ด้วยสไลด์ Haemacytometer ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก ๆ 2 วัน จนกว่าจะมีการปล่อยสปอร์จนหมดต้นพันธุ์

2.3.2 ระดับการให้แสง

นำสาหร่ายมากระตุ้นที่ระดับแสงสูงที่ 20, 80, 100 และ 150 µmol m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยนำแทลลัสที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แล้วมาตัดแทลลัสเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยใช้ท่อนพันธุ์ความยาว 3 เซนติเมตร ที่ระดับความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} การให้แสง:มืด 12:12 ชั่วโมง ทดลองในห้องปฏิบัติการ เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการนับจำนวนสปอร์ด้วยสไลด์ Haemacytometer ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก ๆ 2 วัน จนกระทั่งมีการปล่อยสปอร์จนหมดต้นพันธุ์

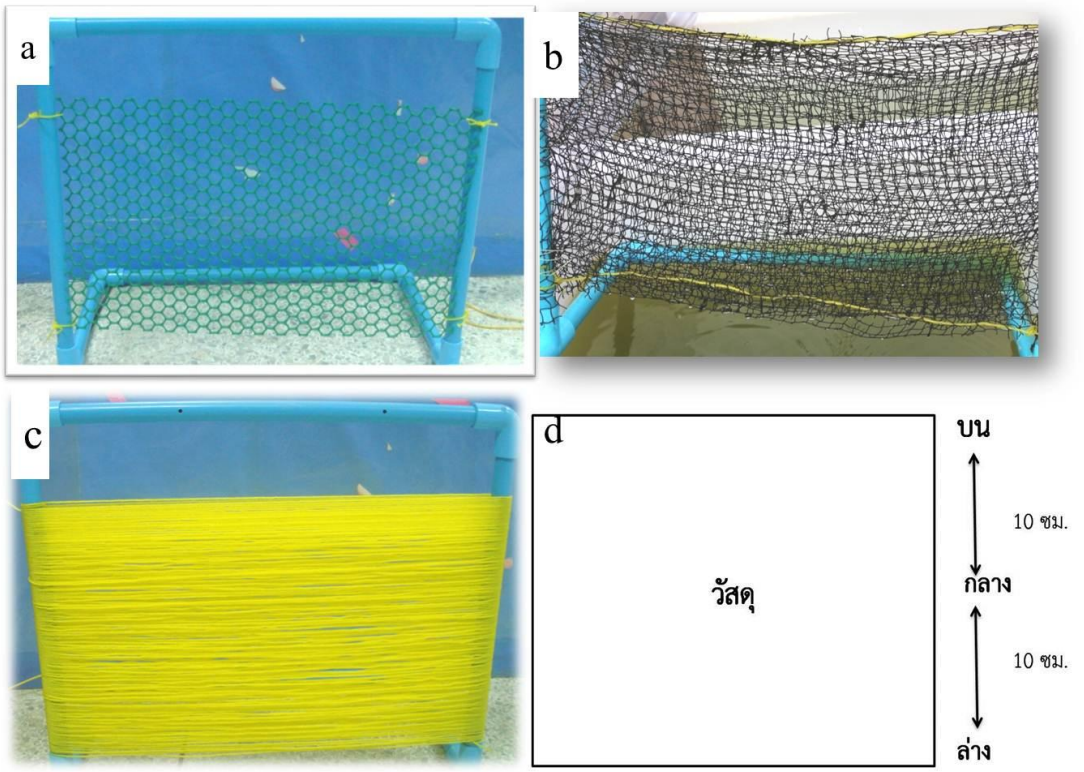
2.3.3 เวลาการผึ่งแห้ง

นำมากระตุ้นที่การผึ่งแห้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ได้แก่ 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง โดยนำแทลลัสที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แล้วมาตัดแทลลัสเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยใช้ความยาว 3 เซนติเมตร เลี้ยงที่ระดับความเค็มที่ได้ศึกษาจากข้อ 2.3.1 วางทดลองในห้องปฏิบัติการ ที่ระดับอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ระดับความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} การให้แสง:มืด 12:12 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนสปอร์ด้วยสไลด์ Haemacytometer ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก ๆ 2 วัน จนกระทั่งมีการปล่อยสปอร์จนหมดต้นพันธุ์

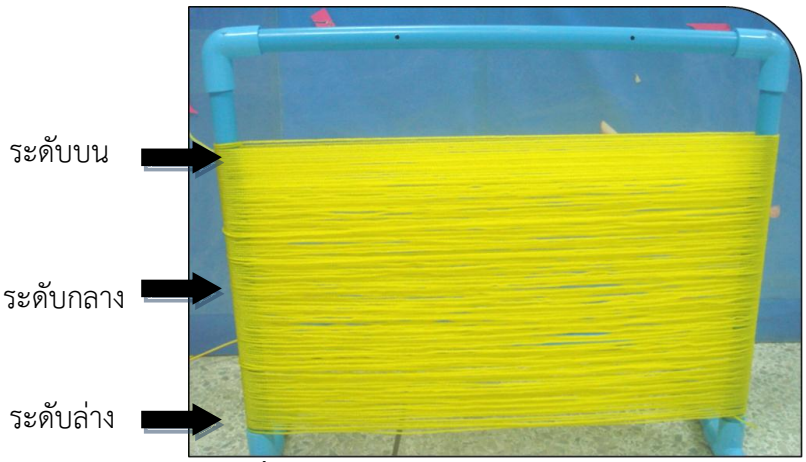
Prince of Songkla University Pattani Campus

2.4 การศึกษาพฤติกรรมการลงเกาะของสปอร์สาหร่ายไส้ไก่

โดยใช้วัสดุเกาะแตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ แผ่นพลาสติกรังผึ้งขนาดตา 1 เซนติเมตร อวนเส้นด้าย ขนาดตา 2 เซนติเมตร (Critchley and Ohno, 1998) และเชือกโพลีเอทธีลีนเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร (mm) ซึ่งพันกรอบสี่เหลี่ยมโดยมีขนาด 30x50 ตารางเซนติเมตร (ภาพที่ 4) ใช้ดักสปอร์ในถังพลาสติกสี่เหลี่ยมปริมาตรน้ำ 150 ลิตร ที่สภาวะกลางแจ้ง มีสปอร์ว่ายอยู่ในมวลน้ำที่ระดับความหนาแน่น $3.3x10^{7}$ สปอร์/มิลลิลิตร ทำการสุ่มตัวอย่างสปอร์ในนั้น 1 ตารางเซนติเมตร ที่ระดับความสูงทุก 10 เซนติเมตร คือ ระดับบน กลาง และล่างของกรอบสี่เหลี่ยม (ภาพที่ 5) โดยตัดชิ้นส่วนเชือกยาว 3 เซนติเมตร พลาสติกรังผึ้ง 1 ตา และอวนเส้นด้าย 1 ตารางเซนติเมตร นำมาตรวจนับสปอร์ทุกวัน โดยการปัดออกจากวัสดุ ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ เลี้ยงระยะเวลา 14 วัน ทิ้งสปอร์ส่วนที่เหลือทิ้งไว้ให้เกิดการเกาะกันเองเป็นกลุ่มก้อน (germling cluster) ตามวิธีของ Hiraoka and Oka (2008)



ภาพที่ 4 วัสดุเกาะชนิดต่าง ๆ แผ่นพลาสติกรังผึ้ง (a), อวนเส้นด้าย (b), เชือกโพลีเอทธีลีน (c), ระดับต่าง ๆ ที่เก็บวัสดุ (d)



ภาพที่ 5 ระดับการเก็บวัสดุเกาะของสปอร์สาหร่าย *U. intestinalis*

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

2.5.1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสภาพแวดล้อม และธาตุอาหารในแหล่งน้ำ และในสาหร่ายกับรูปแบบการสืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ ใช้สถิติ t-test และสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) ตามวิธีการของ Steel and Torrie (1980) เรียบเรียงไว้

2.5.2 การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ จำนวนสปอร์ที่ปล่อย และปริมาณสปอร์ที่เกาะวัสดุชนิดต่าง ๆ ใช้วิธีวิเคราะห์ความผันแปร (Analysis of Variance) แบบแจกแจงทางเดียว และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นคู่แบบ Tukey HSD[a] (Steel and Torrie, 1980)

2.6 วัสดุ และอุปกรณ์

2.6.1 วัสดุ

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

- Sulfuric acid (H_2SO_4)
- Ascorbic acid
- Ammonium molybdate ($(NH_4)\ 6Mo7O_2.H_2O$)
- Potassium antimonyl tartrate ($K(SbO)\ C4H_4O6.1/2H_2O$)
- Ammonium chloride (NH_4Cl)
- Mercuric chloride ($HgCl_2$)

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ธาตุอาหารในสาหร่าย และในน้ำ

- Hydrochloric acid (HCl)
- Nitric acid (HNO_3)
- Hipercloric ($HClO_4$)

สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหาร และเตรียมน้ำ เลี้ยงสาหร่าย

- Sodium Nitrate ($NaNO_3$)

Prince of Songkla University Pattani Campus

- Disodium Hydrogen Phosphate (Na_2HPO_4)
- Ferrous sulfate ($FeSO_4$)
- Disodium EDTA (Na_2 EDTA)

สไลด์นับตัวอย่าง Haemacytometer (BOECO)
ขวดแก้ว vial 20-50 mL
เครื่องแก้วในการเลี้ยงสาหร่าย และวิเคราะห์น้ำ
ถุงกรองน้ำใยละเอียด
อุปกรณ์ให้อากาศ ได้แก่ เครื่องปั๊มลม หัวทรายและสายยาง
กระดาษกรองใยแก้ว
ถังพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาด 200 ลิตร
ขวดโหลเลี้ยงสาหร่ายในห้องปฏิบัติการขนาด 6 ลิตร
หลอดไฟขนาด 220 วัตต์ (Phillip)

2.6.2 อุปกรณ์

1) ตู้อบแบบเป่าลมร้อน (BINDER)
2) หม้อนึ่งความดันไอ (HIRAYAMA)
3) เครื่อง AAS รุ่น (Perkins Elmer Analyst 100)
4) กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (OLYMPUS)
5) เครื่องวัดความเค็ม ชนิดหักเหของแสง (ATAGO)
6) pH meter (DELTA 320, TOLEDO)
7) Water bath (MEDICO)
8) เทอร์มอมิเตอร์ (SHENG ZHAN)
9) เครื่องเขย่า (VORTEX GENIE 2)
10) เครื่องวัดแสง (DL-204, TENMARS)

2.7 สถานที่ทำการวิจัย

อาคาร 26 อาคารปฏิบัติการเทคโนโลยีการประมง แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

Prince of Songkla University Pattani Campus