ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง การเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอน Chaetoceros sp. และ Isochrysis sp. ที่อุณหภูมิต่ำ

Preservation of the Marine Microalgae Chaetoceros sp. and Isochrysis sp.

at Low Temperature

ชื่อนักศึกษา นายภาณุวัฒน์ ภูมิตินทรีย์

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา .....

(อาจารย์รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมชาย หวังวิบูลย์กิจ)

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

วันที่ 15 เดือน พ.ค. พ.ศ. 45

18767

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอน Chartoceros sp. และ Isochrysis sp. ที่อุณหภูมิต่ำ

Preservation of the Marine Microalgae Chaetoceros sp. and Isochrysis sp. at Low Temperature

T099265

โดย

นาย ภาณุวัฒน์ ภูมิตินทรีย์

ว/ท.
ส 4351
2545
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร 10520

พ.ศ. 2545

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอน Chaetoceros sp. และ Isochrysis sp. ที่อุณหภูมิต่ำ

Preservation of the Marine Microalgae Chaetoceros sp. and Isochrysis sp. at Low Temperature

การศึกษาการเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอน Chaetoceros sp. และ Isochrysis sp. ด้วยอุณหภูมิต่ำที่ระดับประมาณ 6 และ –10 องศาเซลเซียสรวมทั้งระดับที่เหมาะสมของสารป้องกันการแข็งตัว คือ Glycerol และ DMSO (dimethylsulfoxide) โดยทำการเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอนเป็นเวลา 30 วัน พบว่า การคงสภาพของกลุ่ม Chaetoceros มีค่ามากกว่ากลุ่ม Isochrysis (P> 0.05) ส่วนการเจริญเติบโต Chaetoceros ที่ใส่ DMSO และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส มีค่ามากกว่า Chaetoceros ที่ไม่ใส่สารป้องกันการแข็งตัวและเก็บที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส นอกนั้น Chaetoceros กลุ่มอื่นและ Isochrysis ไม่สามารถเก็บรักษาได้ (P>0.05)

วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอน Chaetoceros โดยเก็บที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส และใส่สาร DMSO ความเข้มข้น 5 % สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 15 วัน

คำนิยม

จุดมุ่งหมายของการทำปัญหาพิเศษนั้นจุดประสงค์หลักไม่ได้อยู่ที่ผลการทดลองที่สามารถเปลี่ยนให้เกิดนวัตกรรมใหม่ ๆ หรือแนวคิดที่เป็นประโยชน์แก่สาธารณะชน แต่กลับอยู่ที่ตัวบุคคลผู้ทำเอง ซึ่งทำให้เกิดมุมมองความรู้ การเรียบเรียง การนำเสนอ และความรับผิดชอบต่างๆ ซึ่งสิ่งเหล่านี้ผมได้ประจักษ์แก่ตนเองแล้วทั้งสิ้น

การทำปัญหาพิเศษนั้น หากขาดบุคคลที่ให้คำปรึกษาหรือบุคคลที่ให้ความช่วยเหลือ ก็คงจะสำเร็จลุล่วงได้อย่างลำบาก ข้าพเจ้าขอขอบคุณบุคคลทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำปัญหาพิเศษเล่มนี้ อาจารย์รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ อาจารย์ที่ปรึกษา พี่บุปผา จงรัตน์ เจ้าหน้าที่ห้องแพลงก์ตอน อาจารย์สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์ อาจารย์ผู้ให้คำแนะนำ และขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ที่คอยถามไถ่ น้องปี 2 ที่น่ารักและคอยให้กำลังใจเสมอมา ที่ลืมไม่ได้แหล่งหาข้อมูลความรู้ที่ดีที่สุด ห้องสมุด

นาย ภาณุวัฒน์ ภูมิตินทรีย์

เดือน มีนาคม พ.ศ. 2545

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลการทดลองและวิจารณ์	19
สรุปและข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	29

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณค่าทางอาหารของแพลงก์ตอนพืช	3
2	การ Cryopreservation ในสิ่งมีชีวิต	8
3	ชนิดของแพลงก์ตอนพืชและระยะเวลาที่เก็บไว้ได้นานที่ 3 °c	14
4	แผนการทดลอง	17

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	Chaetoceros sp.	3
2	Isochrysis sp.	4
3	กราฟการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอน	5
4	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในขณะลดอุณหภูมิในการแช่แข็ง	9
5	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant	11
6	แผนงานทดลอง	16
7	การคงสภาพของ Chaetoceros sp.	19
8	การคงสภาพของ Isochrysis sp.	20
9	การเจริญเติบโตหลังการแช่เย็นของ Chaetoceros ที่อุณหภูมิ 6 องศา	21
10	การเจริญเติบโตหลังการแช่แข็งของ Chaetoceros ที่อุณหภูมิช่องแช่แข็ง	21
11	การเจริญเติบโตหลังการแช่เย็นของ Isochrysis ที่อุณหภูมิ 6 องศา	23
12	การเจริญเติบโตหลังการแช่แข็งของ Chaetoceros ที่อุณหภูมิช่องแช่แข็ง	23
13	กราฟการเจริญเติบโตของ Chaetoceros	35
14	กราฟการเจริญเติบโตของ Isochrysis	36

คำนำ

แพลงก์ตอน Isochrysis และ Chaetoceros เป็นพืชในกลุ่มสาหร่ายเซลล์เดียว ที่มีประโยชน์มากในการใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ทะเลวัยอ่อนเช่น ลูกหอยฝาเดียว ลูกหอยสองฝา และสัตว์จำพวก Crustracean เนื่องจากมีขนาดเล็ก ซึ่งสัตว์ทะเลวัยอ่อนสามารถกินได้ การเลี้ยงแพลงก์ตอนจำเป็นต้องเพาะขยายปริมาณของแพลงก์ตอนให้มีปริมาณมากขึ้น เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการ บางครั้งผลผลิตที่ได้มากเกินความต้องการของผู้เลี้ยง ดังนั้นจึงมีวิธีการเก็บแพลงก์ตอนสดโดยวิธีการแช่เยือกแข็งหรือเก็บแห้งด้วยกรรมวิธีการแช่เยือกแข็งแห้ง (Freeze Dried) เพื่อเก็บไว้ใช้ในยามขาดแคลนแพลงก์ตอนสดบางฤดูกาลได้

การเก็บรักษาแพลงก์ตอน โดยใช้อุณหภูมิต่ำ (Cryopreservation) เป็นการหยุดขบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์โดยใช้ความเย็นและสารเคมี จะทำให้กรดไขมันหรือสารประกอบของเซลล์สูญเสียไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยสามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานานและสามารถนำมาเพาะขยายใหม่ได้ ดังนั้นถ้าสามารถหาอุณหภูมิและสารเคมีที่เหมาะสมกับชนิดของแพลงก์ตอนทำให้สามารถเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอนไว้ใช้ได้ตลอดเวลา

การเก็บรักษาแพลงก์ตอนโดยใช้อุณหภูมิต่ำ ได้มีการศึกษาทดลองถึงปัจจัยต่างๆ โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะให้มีอัตรารอดสูงที่สุดและสามารถเก็บไว้ได้ในระยะเวลาที่ต้องการ กระบวนการแช่แข็งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนมาก สิ่งที่สำคัญที่สุดก็คือ น้ำ(Water) เนื่องจากน้ำเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์และเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการทางเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยเมื่อทำการแช่เย็น น้ำจะก่อตัวเกิดเป็นผลึกขึ้นมา ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์เสียชีวิต

การเก็บรักษาแพลงก์ตอนโดยใช้อุณหภูมิต่ำในเมืองไทยนั้น มีการเก็บรักษากันในทางปฏิบัติมากกว่า โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยของต่างประเทศ การศึกษาอย่างจริงจังในเมืองไทยนั้น พบงานวิจัยอยู่น้อยมากเพียง 2-3 ชิ้นเท่านั้น ควรมีการใส่ใจศึกษาค้นคว้าทางด้านนี้ให้มากขึ้น เพื่อให้สอดคล้องกับสภาวะการทำประมงของประเทศที่เน้นทางด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเป็นการตรวจสอบการคงสภาพของแพลงก์ตอน 2 ชนิด โดยใช้อุณหภูมิที่ต่างกัน
2. เพื่อตรวจสอบ ชนิดของสารป้องกันการแข็งตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่ให้การคงสภาพและการเจริญเติบโตสูงที่สุด

การตรวจเอกสาร

การเลี้ยงแพลงก์ตอนเซลล์เดียว หรือ เป็นกลุ่มเซลล์ (Colony) หรือ ชนิดเป็นเส้น ที่เรียกว่า Filamentous เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ทะเลวัยอ่อนนั้น ปัจจุบันการเลี้ยงได้รับการพัฒนาจนเจริญก้าวหน้าไปมาก เนื่องจากปริมาณสัตว์น้ำที่จับได้ไม่เพียงพอสำหรับการบริโภค ทำให้ประชาชนหันมาสนใจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากขึ้น ปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีหลายประการ อาหาร (Food) นับว่าเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งในการเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะในระยะวัยอ่อน

1. การใช้ประโยชน์จากแพลงก์ตอน

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งนั้น กุ้งกุลาดำและหอยนางรม นับเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีการบริโภคภายในประเทศเป็นจำนวนมาก โดยมีปริมาณที่จับได้ในปี 2541 เป็นจำนวน 248,700 และ 22,500 ตัน ตามลำดับ (กรมประมง, 2544) ในช่วงที่อยู่ในระยะวัยอ่อน สัตว์น้ำเหล่านี้จะมีขนาดเล็ก ดังนั้นอาหารพวกแพลงก์ตอนที่เหมาะสมจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะนำมาเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนเหล่านี้

แพลงก์ตอนที่นำมาใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อนนั้น มีอยู่มากมายได้แก่ Chaetoceros sp., Chlorella sp., Isochrysis sp., Tetraselmis sp. แต่ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและหอยนางรมระยะวัยอ่อน นิยมใช้ Chaetoceros sp., Isochrysis sp. ตามลำดับ (ผุสดี ศรีพยัตต์, 2528) เนื่องจากแพลงก์ตอนสองชนิดนี้มีขนาดเล็กและมีหลายขนาด เช่น Chaetoceros calcitrans มีขนาดยาว 4-7 ไมครอน (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2529) และ Isochrysis galbana ที่พบว่ามีความเหมาะสมกับการอนุบาลลูกหอยนางรมวัยอ่อน (เสาวภา สวัสดิ์พีระ และคณะ, 2533) มีขนาดความยาว 5-6 ไมครอน

2. แพลงก์ตอน

แพลงก์ตอนที่นิยมนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อนนั้นมีอยู่ 2 ชนิด คือ Chaetoceros และ Isochrysis เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย มีขนาดเล็ก และมีคุณค่าทางโภชนาการที่เป็นประโยชน์ทั้ง Carbohydrate และ Protein ดังตารางที่ 1 ทำให้เหมาะสมที่จะใช้เป็นอาหารที่ใช้อนุบาลสัตว์ทะเลวัยอ่อน

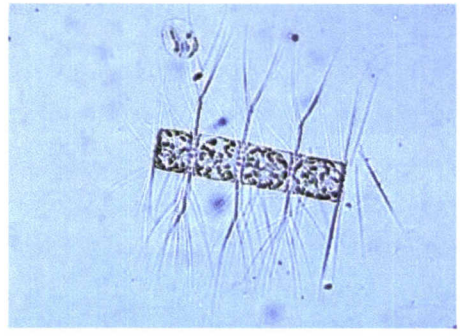
ตารางที่ 1 คุณค่าทางอาหารของแพลงก์ตอนพืช (% ของน้ำหนักแห้ง)

Family	Dry waight	Chlorophyll a	Protein	Carbohydrates	Lipids	Nucleis acid
Chlorophyceae						
Chlorella spp.	-	-	51-58	13-26	0-22	4.3
Dunaliella tertiolecta	-	-	49-57	0-32	7.2	-
Bacillariophyceae						
Chaetoceros calcitrans	11.3	3.01	3.8	0.68	1.8	-
Phaeodactylum triconutum	76.7	0.53	30	8.4	14	-
Skeletonema costatum	52.2	1.21	25	4.6	10	-
Thalassiosira pseudonana	28.4	0.95	34	8.8	19	-
Prasinophyceae						
Tetraselmis chuii	269	3.83	83.4	32.5	45.7	-
Tetraselmis suecica	168.2	1.63	52.1	20.2	16.8	-
Prymnesiophyceae						
Isochrysis galbana	30.5	0.98	29	12.9	23	-
Pavlova lutheri	102.3	0.84	29	9	12	-

ที่มา : ลัดดา วงศ์รัตน์ (2543)

โดยในเมืองไทยมีการเพาะเลี้ยงอย่างกว้างขวาง ซึ่งเหมาะกับสภาพอุณหภูมิในเมืองไทย

2.1 Chaetoceros sp.



ภาพที่ 1 Chaetoceros sp.

ที่มา : Tsukii (2002)

การจำแนก

Kingdom Plantae

Division Bacilariophyta

Class Bacillariophyceae

Order Centrales

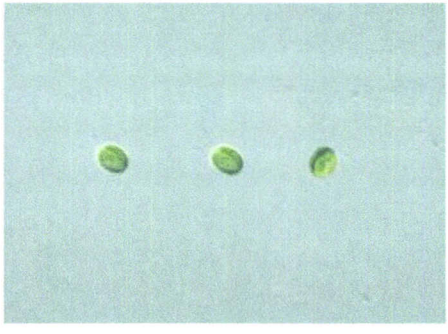
Family Chaetoceraceae

Genus Chaetoceros

ลักษณะ

Chaetoceros เป็นไดอะตอมที่มีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมมุมฉาก มีก้าน (Setae) ที่ยื่นยาวออกมาทั้งสี่มุมซึ่งใช้ในการแยกชนิด ส่วนใหญ่มีความยาวของก้านประมาณ 4-12 ไมครอน สาเหตุที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถหาหัวเชื้อได้สะดวกและเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว จะยังคงอยู่ได้อีกระยะหนึ่ง โดยที่จะไม่ตายและตกตะกอนทันทีเหมือนกันกับแพลงก์ตอนชนิดอื่น

2.2 Isochrysis sp.



ภาพที่ 2 Isochrysis sp.

ที่มา : Tsukii (2002)

การจำแนก

Kingdom Plantae

Division Bacillariophyceae

Class Prymnesiophyceae

Order Isochrysidales

Family Isochrysidaceae

Genus Isochrysis

ลักษณะ

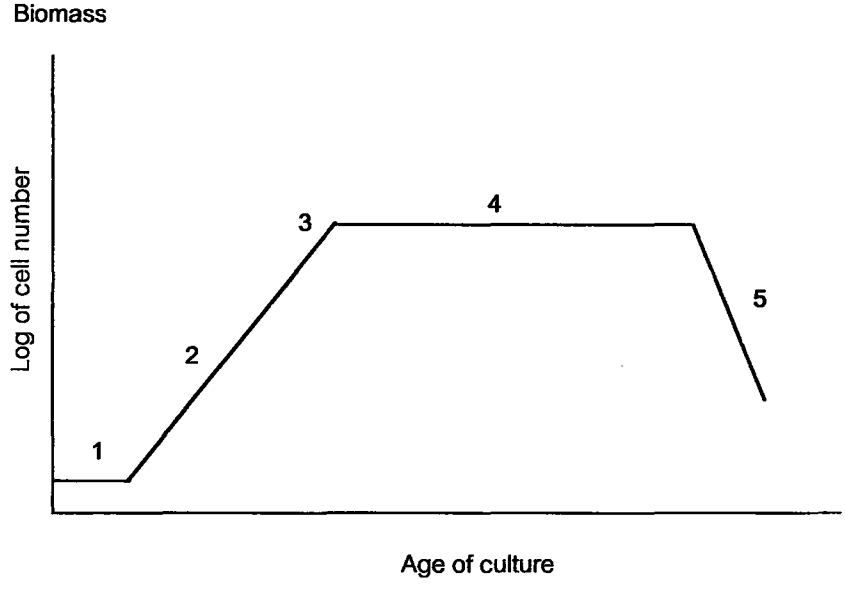
Isochrysis เป็นแพลงก์ตอนที่อยู่ในกลุ่ม Coccolithophorids คือมีเกล็ดที่มีส่วนประกอบของ calcium เรียกว่า Coccoliths ส่วนมากเซลล์มีรูปร่างยาวรี มีหนวดแบบแส้ 2 เส้น ยาวเท่ากัน ไม่มี Haptonema มีคลอโรพลาสต์ 1 แผ่น สีน้ำตาลแกมเหลือง ความยาวของเซลล์ 5-6 ไมครอน หนวดมีความยาว 7 ไมครอน (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

3. การเพาะเลี้ยง

ในการเพาะแพลงก์ตอน Chaetoceros sp. และ Isochrysis sp. ต้องทำการดูแลอยู่เสมอ และทำการเพาะเชื้อใหม่ (Subculture) เป็นระยะ เพื่อป้องกันการตกตะกอน (Drop) โดยเราสามารถศึกษา และทำนายได้จากกราฟการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอน ดังนี้

3.1 กราฟการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืช

มีประโยชน์ในการตรวจสอบประสิทธิภาพการเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช ในการนี้ผู้เลี้ยงควรเข้าใจลักษณะการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชในห้องปฏิบัติการแสดงการเจริญเติบโต ซึ่งแบ่งออกได้ 5 ระยะ คือ ระยะปรับตัว ระยะเอกซ์โพเนนเชียล ระยะเฉื่อย ระยะคงที่ และระยะตาย



ภาพที่ 3 กราฟการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอน

ที่มา : ลัดดา วงศ์รัตน์ (2543)

(1) ระยะปรับตัว (Lag phase) เป็นระยะที่เซลล์ปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ เช่น แสง อุณหภูมิ และ ธาตุอาหาร ฯลฯ ระยะนี้แพลงก์ตอนพืชไม่มีการแบ่งเซลล์ ฉะนั้น ถ้าเซลล์ไม่สามารถปรับตัวได้จะตายลง การที่แพลงก์ตอนพืชจะผ่านระยะปรับตัวนี้ เร็วมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของเซลล์และความอุดมสมบูรณ์ของอาหารที่เลี้ยง ถ้าสภาพทั้งสองอย่างเหมาะสม จะเข้าสู่ระยะที่สองเร็วขึ้น

(2) ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) เป็นระยะที่แพลงก์ตอนพืชเจริญเติบโตและแพร่ขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ระยะนี้จะนานเท่าใดขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารและคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เคมี ของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงแสงสว่าง รวมทั้งผลผลิตนอกเซลล์ของแพลงก์ตอนพืช สภาวะรวมของสิ่งแวดล้อม ลักษณะการเจริญเติบโต ในระยะนี้เป็นแบบที่รวดเร็วในระยะแรก และจะค่อย ๆ ช้าลงตามลำดับ

(3) ระยะเฉื่อย (Phase of Declining) เป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตช้าลง เพราะขาดแคลนอาหาร เช่น ไนโตรเจน เหล็ก คาร์บอน หรือ ออกซิเจน เพราะปริมาณเซลล์เกิดหนาแน่นเกินไป การเสียสมดุลของ pH เพราะเกิดแอมโมเนียขึ้นมาก หรือ แสงสว่างลดลงเนื่องจากเซลล์เกิดการบังกันเอง (Auto – shading) วิธีแก้ไขให้เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็นปกติ ทำได้โดยเติมธาตุอาหารที่ขาดแคลน ถ้ามีการตกตะกอนของ เฟอริคฟอสเฟต อาจแก้ไขโดยเติม สารคีเลเตอร์ เช่น โซเดียมอีดีทีเอ ลงไปละลายตะกอนเหล็ก ส่วนการป้องกันการขาดแคลนคาร์บอน และ ออกซิเจน นั้นอาจทำได้โดยการเขย่าภาชนะตลอดเวลา หรือ ใช้การพ่นอากาศ ซึ่งนอกจากจะเพิ่มคาร์บอน และ ออกซิเจนแล้ว ยังช่วยให้เกิดการผสมผสาน ของมวลน้ำในภาชนะเลี้ยงทำให้เซลล์แพลงก์ตอนพืชได้รับแสงสว่างโดยทั่วถึงกันอีกด้วย

(4) ระยะคงที่ (Stationary phase) เป็นระยะที่การเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชหยุดนิ่งเนื่องจากธาตุอาหารลดน้อยลงและเกิดสารพิษจากขบวนการเมตาบอลิซึม หรือ การสลายตัวของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

(5) ระยะตาย (Death phase) เป็นระยะที่เซลล์หยุดการเจริญเติบโตโดยสิ้นเชิงเนื่องจากธาตุอาหารหมดลง เซลล์จะเริ่มตายและการตายจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และรวดเร็วขึ้น ฉะนั้น ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชเพื่ออนุบาลลูกสัตว์น้ำจึงขึ้นอยู่กับความสามารถของผู้เลี้ยง ที่จะควบคุมการเลี้ยงให้มีกราฟการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล นานที่สุดเท่าที่จะทำได้

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอน

(1) ปัจจัยทางกายภาพ

<u>แสงสว่าง</u> การเปลี่ยนเชื้อแพลงก์ตอนจากสต๊อคสาหร่ายไปใส่อาหารที่เตรียมขึ้นมาใหม่ นั้นควรใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้นโดยใช้แสงฟลูออเรสเซนส์ประมาณ 400 แรงเทียน นาน 7–10 วัน เพื่อให้แพลงก์ตอนเจริญเติบโต

ควรใช้หลอดฟลูออเรสเซนส์ดีกว่าใช้หลอดไฟธรรมดา หรือ แสงแดด เนื่องจากมีอุณหภูมิต่ำกว่า ช่วงแสงสว่างที่เหมาะสมคือ 12 ชั่วโมงให้แสง 12 ชั่วโมงหยุดให้แสง

<u>อุณหภูมิ</u> แพลงก์ตอนน้ำเค็มเกือบทุกชนิดเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 5-15 องศาเซลเซียส และจะตายถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส

<u>ความเป็นกรด –ด่าง</u> เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งเพราะแต่ละชนิดมีความต้องการ pH ในระดับที่แตกต่างกัน

<u>ความเค็ม</u> มีความสำคัญมากต่อการเลี้ยงแพลงก์ตอนน้ำเค็ม แพลงก์ตอนบางชนิดชอบอยู่ในน้ำกร่อยที่มีความเค็มประมาณ 28 – 30 ppm

(2) ปัจจัยทางเคมี

การเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยง อาหารหรือธาตุอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม

<u>กลุ่มธาตุอาหารหลัก</u> ได้แก่ธาตุอาหารพวก คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์

<u>กลุ่มธาตุอาหารรอง</u> ได้แก่ธาตุอาหารพวก เหล็ก ซิลิกา

4. Cryopreservation

ปัจจุบันเทคนิคในการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนมีความก้าวหน้าไปมาก เพื่อการผลิตแพลงก์ตอนให้ได้ปริมาณตามความต้องการของผู้เพาะเลี้ยง มีรูปแบบของแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารมีหลายรูปแบบ เช่น อาหารเม็ดขนาดเล็ก อาหารเทียม อาหารแช่แข็ง แต่ในการเก็บรักษาแพลงก์ตอนนั้นมีหลายวิธีการ เช่น ให้ความเข้มแสงที่น้อยลงประมาณ 200 – 500 ลักซ์ ใช้น้ำเลี้ยงที่มีธาตุอาหารเจือจางกว่าปกติ ซึ่งจะเก็บรักษาไว้ได้ชั่วระยะเวลาไม่นานนัก วิธีที่ได้ผล และ เป็นที่นิยมมากที่สุดคือ การเก็บรักษาแพลงก์ตอนด้วยความเย็นหรือที่อุณหภูมิต่ำ (Cryopreservation)

เป็นวิธีที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) เนื้อเยื่อพืชและสัตว์ น้ำเชื้อของมนุษย์ แบคทีเรีย และ ไวรัส ตามตารางข้างล่าง

ตารางที่ 2 การ Cryopreservation ในสิ่งมีชีวิต

Cell Type	Number of Cells	Cryoprotective Agent	Minimun Stroge Temperature
Bacteria	10^7 /ml	Glycerol (10%)	-60
Fungi			
Hyphae	-	Glycerol (10%)	-150
Spore	10^6 /ml	Glycerol (10%)	-60
Yeast	10^7 /ml	Glycerol (10%)	-150
Protozoa	10^5 - 10^7 /ml	DMSO (5-10%) or Glycerol (10-20%)	-150
Algae	10^5 - 10^7 /ml	Methanol (5-10%) DMSO (5-10%)	-150
Plant Cells	-	DMSO (5-10%) and Glycerol (5-10%)	-150
Animal Cells	10^6 - 10^7 /ml	DMSO (5-10%) or Glycerol (5-10%)	-150
Plant Viruses	-	None	-60
Animal Viruses			
Cell Free	-	None	-60

ที่มา : Simione (1998)

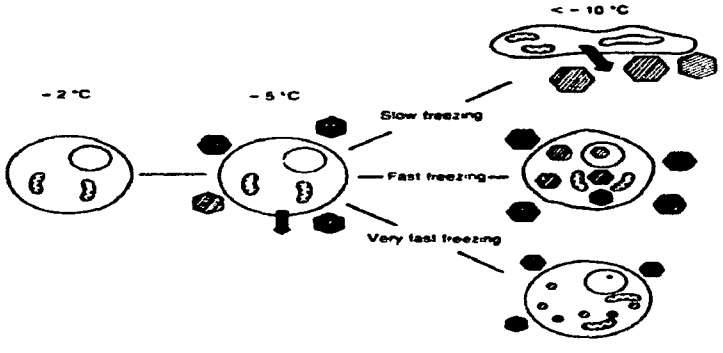
Cryopreservation หมายถึง การเก็บรักษาสิ่งมีชีวิตด้วยอุณหภูมิที่ต่ำมาก (Susanti,1998) โดยใช้อุณหภูมิในตู้เย็น (0 – 5 องศาเซลเซียส) และ ลดอุณหภูมิไปจนถึงอุณหภูมิภายในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) พบว่า ไนโตรเจนเหลวมีประสิทธิภาพในการทำความเย็นดีกว่าน้ำแข็ง 1.2 เท่า (มยุรี จัยวัฒน์, 2527)

4.1 ชีววิทยาการแช่แข็ง (Cyrobiology)

มีความสำคัญและมีประโยชน์สำหรับการรักษาเซลล์และน้ำเชื้อ ตัวอ่อน โดยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ และ ออร์แกนเนลล์

การแช่แข็ง คือ การลดอุณหภูมิลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำในสภาพที่เป็นของเหลวกลายเป็นเกล็ดน้ำแข็ง ส่วนการละลายเป็นวิธีการที่กลับกัน

เมื่อมีการลดอุณหภูมิลงต่ำถึง 0 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่าเพียงเล็กน้อย (ประมาณ -0.5 องศาเซลเซียส) ของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์จะยังไม่แข็งตัว ดังนั้นของเหลวรอบเซลล์ และ เซลล์จะอยู่ในสภาพที่เย็นจัด ตามปกติเซลล์จะคงอยู่ในสภาพเย็นจัดได้นานต่อไป ขณะที่ของเหลวรอบ ๆ เซลล์ เริ่มมีเกล็ดน้ำแข็ง หรือ อีกในหนึ่งก็คือการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์เกิดขึ้นช้ากว่าการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในของเหลวรอบ ๆ เซลล์



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในขณะลดอุณหภูมิในการแช่แข็ง
ที่มา : กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536)

ผลต่อเนื่องจากปรากฏการณ์นี้ก็คือ

(1) ตัวถูกละลายในของเหลวรอบ ๆ เซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามปริมาณการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในขณะที่ยังไม่เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงสูญเสียน้ำเพราะความไม่สมดุลของแรงดันออสโมติก

(2) ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างช้า ๆ เซลล์ก็จะสูญเสียน้ำ เพียงพอที่ทำให้แรงดันออสโมติกมีความสมดุลได้ และเซลล์จะมีขนาดเล็กลงได้ อย่างไรก็ตามถ้าการปรับตัวดังกล่าวนี้ต้องใช้เวลานานเกินพอดี โดย Sheeler and Bianchi (1987) กล่าวว่า จะเป็นอันตรายอย่างยิ่งต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ทั้งนี้เพราะการสูญเสียน้ำและเพราะความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงเกินควรอาจถึงขั้นตกผลึกในที่สุด วิธีหนึ่งที่จะช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำมากเกินไป อาจทำได้โดยการชัก

นำให้เกิดผลึกน้ำแข็งเร็วขึ้น (Seeding) เช่น เมื่อลดอุณหภูมิลงถึงประมาณ -5 หรือ -7 องศาเซลเซียส ให้ใช้ปากคีบที่เย็นจัด (-196 องศาเซลเซียส) มาคีบหลอดตัวอย่างนั้นเป็นต้น

(3) ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างรวดเร็ว ความสมดุลของแรงดันออสโมติกก็เกิดขึ้นได้ เพราะการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ ถูกทิ่มแทงโดยเกล็ดน้ำแข็ง

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่า เมื่อทำการแช่แข็งอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าหรือเร็วต่างก็ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ทั้งนั้น ดังนั้นอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมย่อมจะทำให้ตัวอย่างเซลล์แช่แข็งมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมดังกล่าวจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ หรืออาจต่างกันไปตามชนิดของแพลงก์ตอนแม้ว่าจะเป็นเซลล์แพลงก์ตอนชนิดเดียวกัน

ในการทำการลดอุณหภูมิเพื่อทำการแช่แข็งเซลล์ทั่ว ๆ ไป อันตรายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์เพราะการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และเพราะการสูญเสียน้ำนั้น สัณนิษฐานกันว่าน่าจะเกิดขึ้นเมื่อมีการลดอุณหภูมิจาก - 15 ถึง - 50 องศาเซลเซียส เพราะหลังจากนั้นเราสามารถจุ่มหลอดตัวอย่างเซลล์ลงสู่ถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ได้ทันที จะมีผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์ไม่มาก

ในทางเดียวกันการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อการละลาย (Thawing) เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ก็ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์เช่นเดียวกัน

4.2 กระบวนการ Cryopreservation

ปัจจัยที่มีผลต่อขบวนการ Cryopreservation เช่น สารป้องกันการแข็งตัว (Cryoprotectant) อัตราเย็น (Cooling rate) และการละลาย (Thawing) ซึ่งจะมีผลทำให้เซลล์ฟื้นคืนและกลับสภาพมาเป็นอย่างเดิม

สารป้องกันการแข็งตัว (Cryoprotectant)

สารป้องกันการแข็งตัว แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

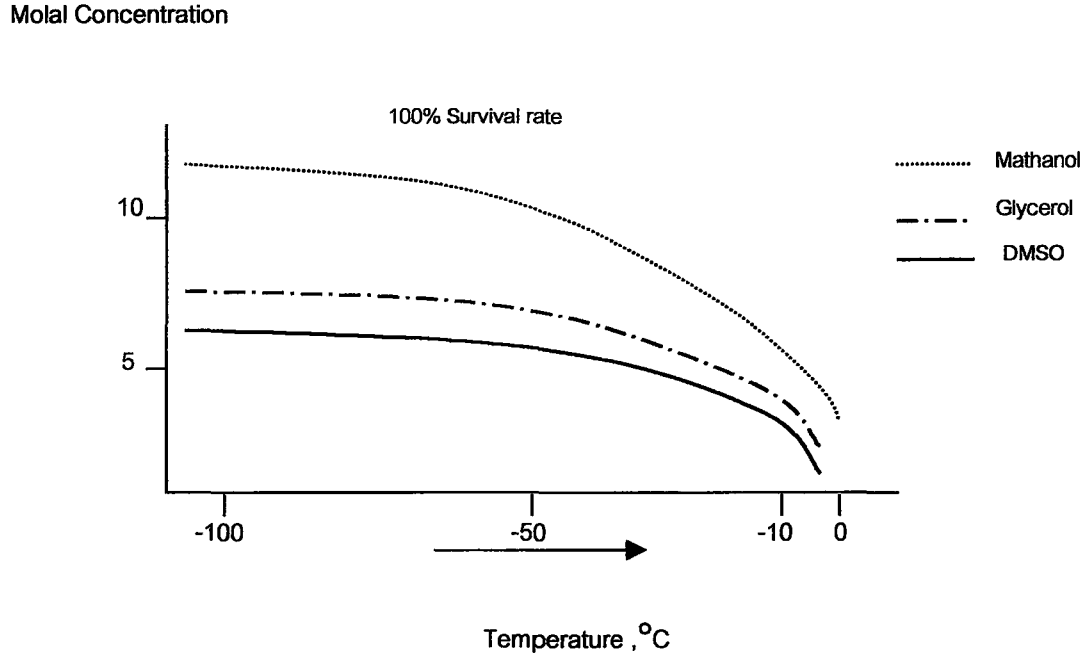
สารเคมีที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (Penetrating Agent) : สารเคมีเหล่านี้ จะต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ เพื่อทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ที่มีชีวิตและต่อต้านการบาดเจ็บของเซลล์ ตัวอย่างได้แก่ Glycerol, Dimethylsulfoxide DMSO และ Alcohol เช่น Methanol, Ethanal, Propanediol สารเคมีกลุ่มนี้ จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อใช้ในระดับที่มีความเข้มข้นสูง (1-4 M)

สารเคมีที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (Non – Penetrating Agent) : สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ ขณะที่อยู่นอกเซลล์ และสามารถใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าพวกแรก (0.01- 0.2 M) สารพวกนี้มีความเป็นพิษน้อยกว่า ตัวอย่างที่ได้แก่ Polyvinylpyrolidon, PVP และน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น Sucrose, Glucose, Mentinol

ในการเลือกใช้ Cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเซลล์นั้นมีหลักใหญ่ๆ คือ

ก. สารเคมีตัวนั้นต้องสามารถเข้าไปในเซลล์ได้ง่าย และรวดเร็ว

ข. สารเคมีตัวนั้นต้องไม่เป็นอันตราย (Toxin) ที่ความเข้มข้นสูง



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง อุณหภูมิกับความเข้มข้นของ สาร Cryoprotectant

ที่มา : Susanti (1998)

จากภาพแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของ Cryoprotectant กับอุณหภูมิ ที่มีผลต่ออัตราการรอด ที่เกิดจากการแช่แข็ง พบว่า ความเข้มข้นที่ต้องการเพื่อเพิ่มอัตราการรอด ซึ่งต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงมาก

4.3 การป้องกันการแข็งตัว

การป้องกันการแข็งตัว (Cryoprotection) คือการป้องกันการเกิดผลึกหรือเกล็ดน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ (Becker et al. 2000) โดย Cryoprotectant จะช่วยทำให้การแบ่งตัวของเซลล์ช้าลง (ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์, 2526) และช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ 2 วิธี คือ

ก. ทำให้ของเหลวแข็งตัวช้า

ข. ทำให้น้ำในเซลล์มีน้อยลง

สาร Cryoprotectant ที่นิยมใช้ได้แก่

Glycerol เป็นที่รู้กันอยู่ว่ามีผลในการป้องกัน การบาดเจ็บจากการละลายของน้ำแข็งในเซลล์ โดยทั่วไปมีคุณสมบัติป้องกันการแข็งตัวของเซลล์ ที่ส่วนประกอบที่เหมาะสม จะช่วยลดปริมาณของน้ำ ซึ่งเกิดจากการแช่เย็น

DMSO ใช้เป็นสาร Cryoprotectant ในช่วงความเข้มข้น ตั้งแต่ 5-15 % โดยจะทำให้การแพร่ของน้ำเกิดความสมดุลที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ มากกว่า Glycerol กลไกของ DMSO มีความสัมพันธ์กับเซลล์และองค์ประกอบของเซลล์ แต่ Prave et al. (1987) กล่าวว่า DMSO สามารถทำให้เกิดพิษ (Cytotoxin) แก่เซลล์ได้

4.4 การทำให้เย็น (Cooling)

เซลล์ที่ใส่สาร Cryoprotectant และใส่ในหลอด Vial หรือหลอดแก้ว หลังจากนั้นเป็นขั้นตอนการทำให้เย็น อัตราของการทำให้เย็น เป็นสิ่งที่สำคัญมาก พบว่ามีผลต่อการเกิดและขนาดของผลึกน้ำแข็ง ดังที่ อัธยา กังสุวรรณ (2543) กล่าวว่า ผลึกน้ำแข็งจะก่อตัวขึ้นจากน้ำบริสุทธิ์เท่านั้น โดยไม่ยอมให้มีสารอื่นมาเจือปนในโครงสร้าง ดังนั้น ในขณะที่ผลึกโตขึ้นมันจะขับสารละลายอื่นที่ละลายอยู่ออกไปสู่สารละลายรอบ ๆ ทำให้ความเข้มข้นของสารเหล่านั้นเพิ่มขึ้น ในการทำให้เย็นอย่างช้า ๆ การแช่แข็งจะเกิดขึ้นภายนอกของเซลล์ก่อน หลังจากนั้นจะเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ เนื่องจากน้ำจะแพร่ออกสู่ภายนอกเซลล์และทำให้การแพร่ของน้ำเกิดความไม่สมดุล การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายภายนอกเซลล์ เป็นอันตรายต่อการอยู่รอดของเซลล์ ถ้าน้ำที่อยู่ภายในเซลล์มีมากเกินไป ภายในเซลล์จะถูกทำลายโดยการเกิดของผลึกน้ำแข็ง

ในการแช่แข็งของเซลล์นั้น Molina-Grima et al. (1994) ได้ศึกษาปริมาณของกรดไขมันของ Isochrysis galbena พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดไขมัน ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Cordero and Voltolina (1997) พบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งก่อนและหลังการทดลอง การศึกษาของ Canavate and Lubinn (1995) พบว่า การเก็บรักษา Tetraselmis chuii, Nannochloris gaditana, Rhodomonas baltica และ Isochrysis galbenaที่ให้ผลน่าพอใจ โดยใช้ DMSO ที่ความเข้มข้น 15 % ที่อุณหภูมิ (-20 และ -80 องศาเซลเซียล)

ในการเลือกใช้ สาร Cryoprotectant นั้น ต้องดูที่ความเหมาะสม โดยที่สาร Cryoprotectant บางตัวมีราคาแพง ซึ่งอาจทำให้ต้นทุนการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสูงขึ้นตามไปด้วย (Day and Fenwich, 1993)

Meillamena et al. (1990) รายงานว่าการแช่เยือกแข็งแห้งของ Chaetoceros หรือ Tetraselmis สามารถใช้ทั้งหมด หรือ เฉพาะบางส่วน แทนที่แพลงก์ตอนที่มีชีวิต เพื่อให้เป็นอาหารตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำ

(1) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตราการมีชีวิตรอดหลังแช่แข็ง

ปัจจัยที่มีผลต่อการตายของเซลล์ เมื่อพิจารณาดูแล้ว พบว่ามีอยู่มากมาย เพราะทุกขั้นตอนมีผลที่จะทำให้เซลล์ตาย หรือบาดเจ็บได้ง่าย พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดเซลล์ภายหลังแช่แข็งและการละลายนั้นขึ้นอยู่กับ

- ขนาดของเซลล์
- อัตราการลดอุณหภูมิ
- อัตราการแพร่ของน้ำผ่านผนังเซลล์

ปัจจัยทั้งสามประการนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำภายในเซลล์ กล่าวคือ เราสามารถคำนวณหาปริมาณน้ำภายในเซลล์ได้ เพราะมีความผันแปรไปตามอุณหภูมิ ถ้าเราทราบพื้นที่ผิวของเซลล์, อัตราการแพร่ของน้ำผ่านผนังเซลล์, ความผันแปรของอัตราการแพร่ของน้ำที่อุณหภูมิต่างกัน (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) ดังนี้

ก. เซลล์ที่มีขนาดใหญ่หรืออัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตร เซลล์มีค่าน้อย เมื่อนำมาแช่แข็งจะต้องลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ เพื่อให้น้ำแพร่ออกนอกเซลล์ได้มากพอในขณะทำการแช่แข็ง ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้เซลล์ถูกทำลาย

ข. ถ้าธรรมชาติของผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์เป็นเหตุให้การแพร่ของน้ำ เข้าออกเซลล์ได้ยาก อัตราการลดอุณหภูมิจำเป็นต้องช้าลง เพื่อให้น้ำในเซลล์แพร่ออกนอกเซลล์มากพอ

สำหรับการทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอนที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 0-5 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการลดต้นทุนและไม่ต้องนำเซลล์แพลงก์ตอนไปเก็บไว้ใน Liquid Nitrogen แต่สามารถนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นแทน ทำให้เกิดความสะดวกและประหยัด สามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับเกษตรกรหรือผู้ประกอบการเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งผู้จัดทำพบว่าในเมืองไทยมีการศึกษาทางด้านนี้น้อยมาก ในการเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอนที่อุณหภูมิต่ำนี้ พบว่ามีแพลงก์ตอนพืชที่สามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานานอยู่หลายชนิดเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 3 ชนิดของแพลงก์ตอนพืชและระยะเวลาที่เก็บไว้ได้นานที่ 3° C

ชนิดแพลงก์ตอนพืช	ระยะเวลาที่เก็บ (เดือน)
Skeletonema costatum	9
Cyclotella nana	9
Chaetoceros calcitrans	13
Phaeodactylum tricornutum	24
Nitzschia closterium	36
Chlorella sp.	13
Platymonas sp.	11
Thalassiosira sp.	5
Isochrysis sp.	-
Tetraselmis sp.	-

ที่มา : ผุสดี ศรีพยัตต์ (2529)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. แพลงก์ตอน Chaetocereos sp., Isochrysis sp.
2. สารเคมีที่ใช้ Glycerol และ DMSO (Dimethylsulfoxide) ความเข้มข้นอย่างละ 5%
3. อุปกรณ์เก็บรักษา ตู้เย็น SHARP รุ่น SJ-K17V
4. อุปกรณ์อื่น
    - เครื่องวัดความเค็ม (Salinometer)
    - สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer)
    - เครื่องแก้ว (Glassware)
    - เครื่องปั่นให้ตกตะกอน (Centrifugal)

การวางแผนการทดลอง

การทำการทดลองใช้แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) ในแพลงก์ตอนแต่ละชนิด โดยให้อุณหภูมิเป็นบล็อก และให้สาร Cryoprotectant เป็นสิ่งทดลอง

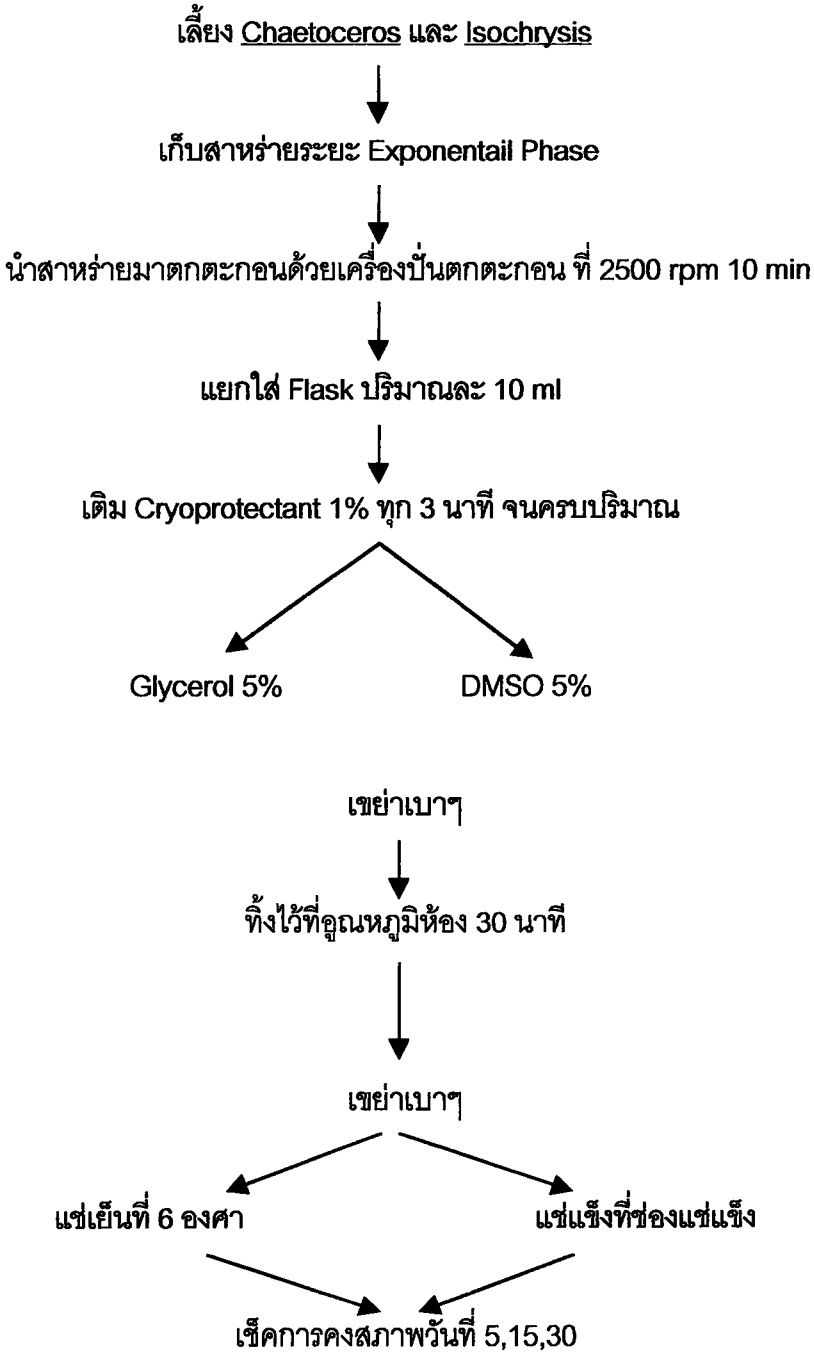
การเก็บรักษาแพลงก์ตอน

เก็บในตู้เย็น (ที่หมุนปุ่มปรับอุณหภูมิไปที่เลข 6) ที่อุณหภูมิประมาณ 6 องศา และซ่องแช่แข็ง ตามลำดับ เป็นเวลา 30 วัน

การบันทึกข้อมูล

สุ่มนับจำนวนเซลล์แพลงก์ตอนมีชีวิต หลังจากการแช่แข็ง โดยการใช้สไลด์นับเม็ดเลือดส่องนับ ในวันที่ 5, 15, 30 ของ การแช่แข็ง หลังจากนั้นทำเป็นอัตราส่วนและเปลี่ยนเป็นลอการิธึม ของการคงสภาพ รวมทั้งบันทึกจำนวนเซลล์แพลงก์ตอนที่เก็บรักษาไว้และกลุ่มควบคุม ในวันที่ 15 ของการแช่แข็ง

วิธีการทดลอง



ภาพที่ 6 แผนงานทดลอง

และนำสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงเพื่อทำกราฟการเจริญเติบโต ในวันที่ 15 ของการแช่แข็ง

ตารางที่ 4 แผนการทดลอง

ชนิด	วิธีเก็บ	สารเคมี		กลุ่มควบคุม
	อุณหภูมิตู้เย็น (a1)	Glycerol	a1.1	CA1
		DMSO	a1.2	
Chaetoceros (a)				
	อุณหภูมิช่องแช่แข็ง (a2)	Glycerol	a2.1	CA2
		DMSO	a2.2	
	อุณหภูมิตู้เย็น (b1)	Glycerol	b1.1	CB1
		DMSO	b1.2	
Isochrysis (b)				
	อุณหภูมิช่องแช่แข็ง (b2)	Glycerol	b2.1	CB2
		DMSO	b2.2	

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Systat version 5

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องแพลงก์ตอน (B 130) ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

99265

ระยะเวลาในการทำการทดลอง

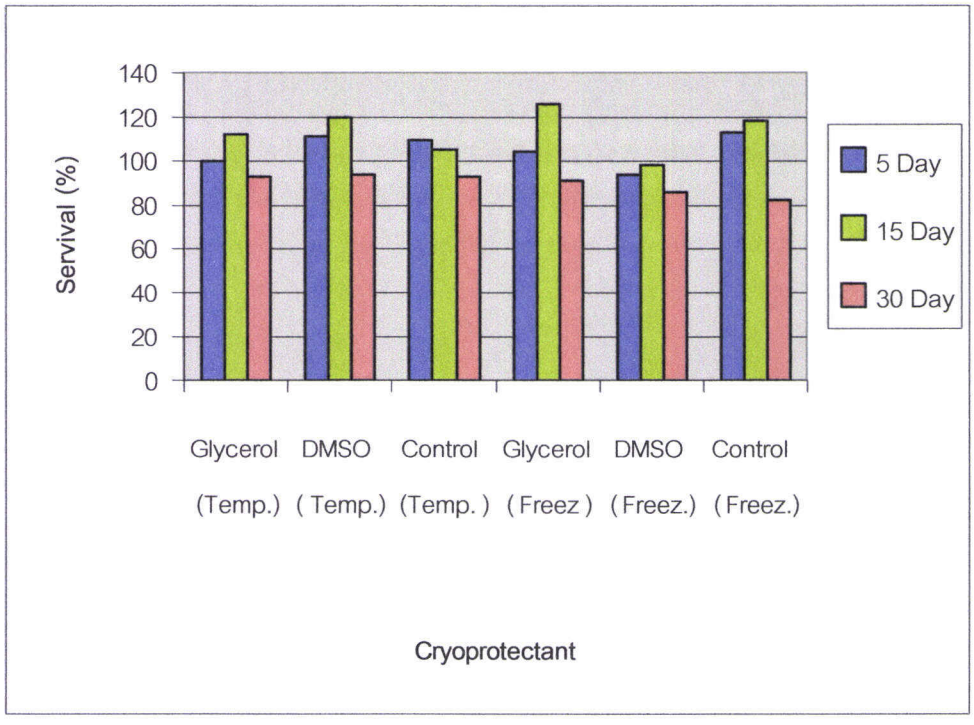
เริ่มทำการทดลอง ตั้งแต่วันที่ 29 ธันวาคม ถึง 26 มกราคม 2545

ผลการทดลองและวิเคราะห์

1. การคงสภาพ

การหาการคงสภาพทำโดยการนับเซลล์แพลงก์ตอนหลังจากการแช่เย็น ที่เวลา 5, 15, 30 วัน หลังจากนั้นทำเป็น % การคงสภาพ ลอการิธึม และนำมาสร้างกราฟ

1.1 Chaetoceros



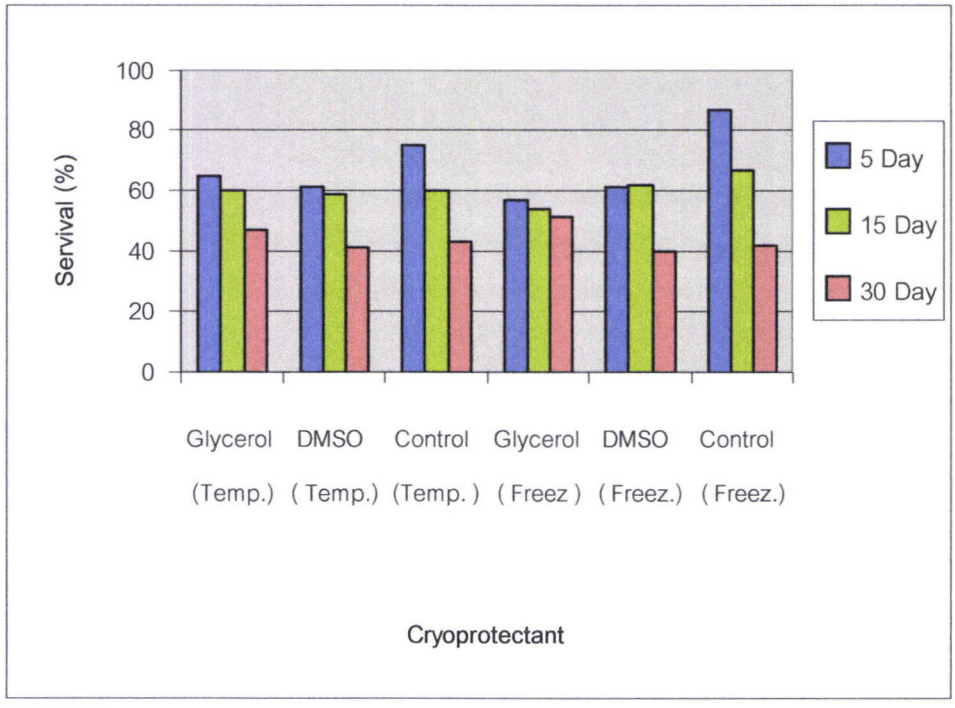
ภาพที่ 7 การคงสภาพของ Chaetoceros sp.

การคงสภาพของการเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอน ที่เก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิประมาณ 6 องศาเซลเซียสและที่เก็บในช่องแช่แข็ง โดยใช้ 5% ของ Glycerol และ DMSO

ที่ 15 วันหลังจากการเก็บรักษา พบว่าเกือบทุกตัวอย่างยังคงมีการเจริญเติบโตขึ้น โดยมีการเจริญเติบโตสูงสุด 0.25 เท่า ที่ glycerol (Freez) ยกเว้น DMSO (Freez) แทบไม่มีการเจริญเติบโตเลยและที่ 30 วัน หลังจากการเก็บรักษา การคงสภาพของทุกตัวอย่างมีค่าประมาณ 90% ยกเว้นกลุ่ม Control (Freez) ที่มีการคงสภาพ 80 % ดังภาพที่ 7

เมื่อนำการคงสภาพมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ พบว่าทั้งสารเคมี (Glycerol, DMSO) และอุณหภูมิ (Temp., Freez) การคงสภาพที่ 5, 15, 30 วัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังตารางผนวกที่ 12, 13 และ14

1.2 Isochrysis



ภาพที่ 8 การคงสภาพของ Isochrysis sp.

การคงสภาพของแพลงก์ตอน Isochrysis พบว่าไม่มีการเจริญเติบโตขึ้นเหมือน Chaetoceros ที่ 5 วัน หลังจากการเก็บรักษา แพลงก์ตอน Isochrysis ที่กลุ่ม Control แช่ช่องแช่แข็ง มีการคงสภาพสูงสุด 87 % และจะพบว่า การเก็บรักษาแพลงก์ตอน Isochrysis โดยไม่ใส่สาร Cryoprotectant จะมีการคงสภาพสูงมากกว่ากลุ่มที่ใส่สาร Cryoprotectant

ที่ 15 วัน หลังจากการเก็บรักษา พบว่า แพลงก์ตอนทุกกลุ่มมีการคงสภาพใกล้เคียงกันที่ 60 %และที่ 30 วัน หลังจากการเก็บรักษา แพลงก์ตอนเกือบทุกกลุ่มมีการคงสภาพประมาณ 40 % ยกเว้นกลุ่ม แพลงก์ตอนที่ใส่ Glycerol ที่อุณหภูมิตู้เย็น มีการคงสภาพสูงสุดที่ 5 %

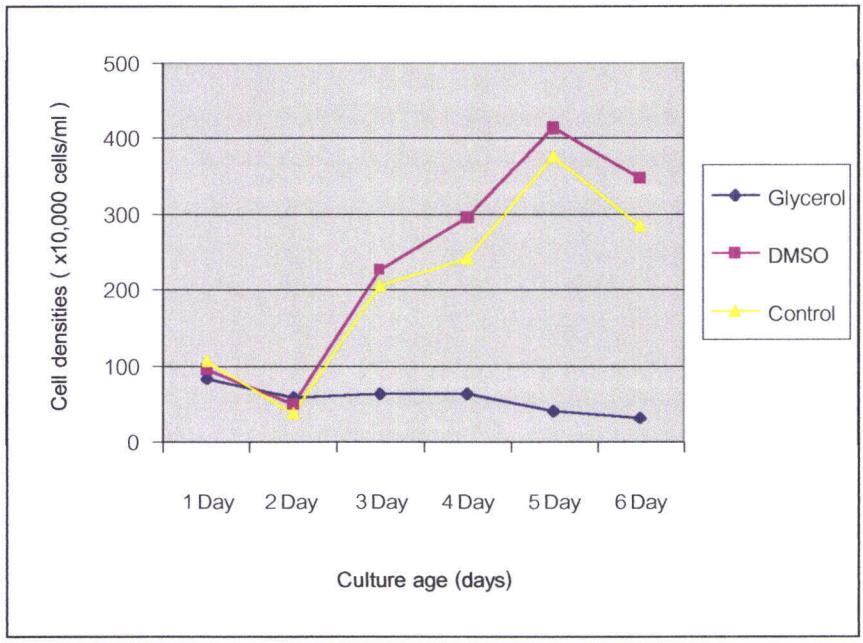
เมื่อนำการคงสภาพมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังตารางผนวกที่ 21, 22 และ23 ในกลุ่มของอุณหภูมิ แต่ในกลุ่มของสารเคมี พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P=0.00$) ตารางผนวกที่ 21 ในวันที่ 5 และวันที่ 30 ของการแช่แข็งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตารางผนวกที่ 23 โดย Glycerol ให้การคงสภาพของเซลล์แพลงก์ตอนสูงกว่า DMSO

18767

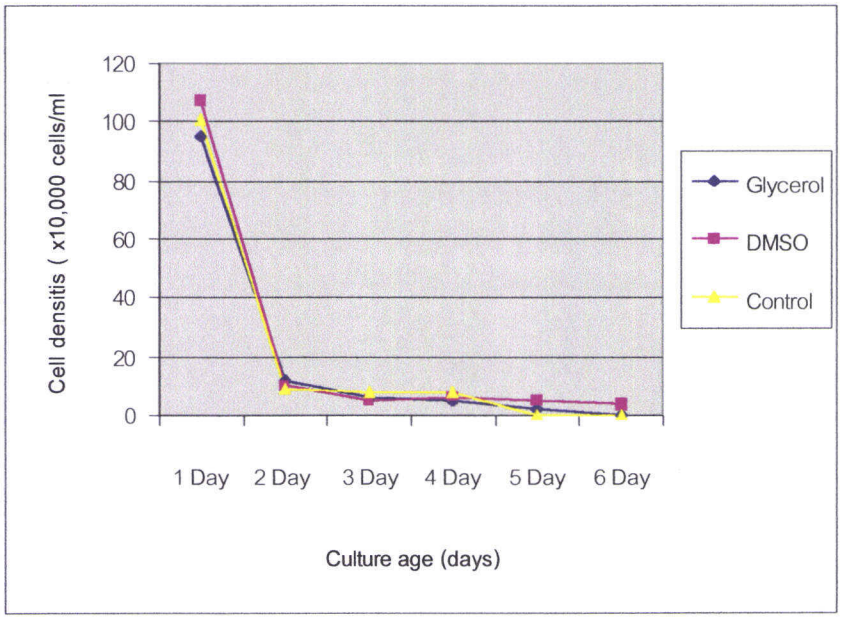
2. การเจริญเติบโตหลังการแช่เย็น

การหาการเจริญเติบโตหลังการแช่เย็น ทำได้โดยการ นำเซลล์แพลงก์ตอนที่แช่เย็นที่ 15 วัน มาใส่สารละลายอาหาร หลังจากนั้นทำการนับเซลล์ทุกวัน

2.1 Chaetoceros



ภาพที่ 9 การเจริญเติบโตหลังการแช่เย็น ของ Chaetoceros ที่อุณหภูมิ 6 องศา



ภาพที่ 10 การเจริญเติบโตหลังการแช่แข็งของ Chaetoceros ที่อุณหภูมิช่องแช่แข็ง

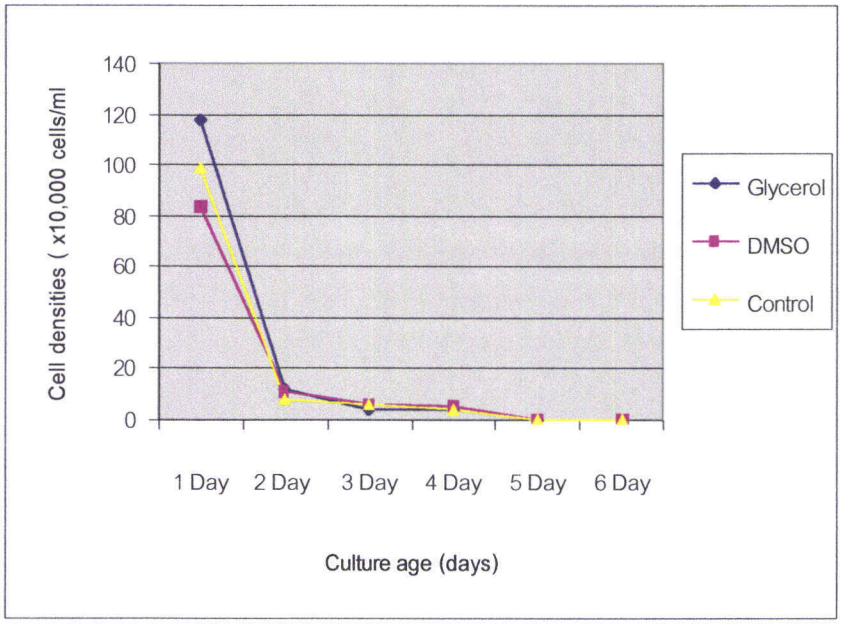
ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

จากภาพที่ 9 พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่มีการเจริญเติบโต มี 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม Control (กลุ่มที่ไม่ใส่สาร Cryoprotectant) และกลุ่มที่ใส่ DMSO 5% โดยที่ กลุ่มที่ใส่ DMSO 5% มีการเจริญเติบโตสูงกว่า กลุ่ม Control ประมาณ $25x10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร ทั้งสองกลุ่มมีการเจริญเติบโตเมื่อนำมาเทียบกับกราฟการเจริญเติบโตปกติช้ากว่า โดยที่กลุ่มตัวอย่างใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโต 5 วัน ในขณะที่กราฟการเจริญเติบโตปกติใช้ระยะเวลา เพียง 3 วัน และปริมาณเซลล์สูงสุดมีค่าต่ำกว่า กราฟการเจริญเติบโตปกติ ประมาณ $100x10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร ภาพที่ 10 กลุ่มตัวอย่างที่เก็บที่ อุณหภูมิ Freez มีการลดลงของเซลล์อย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง

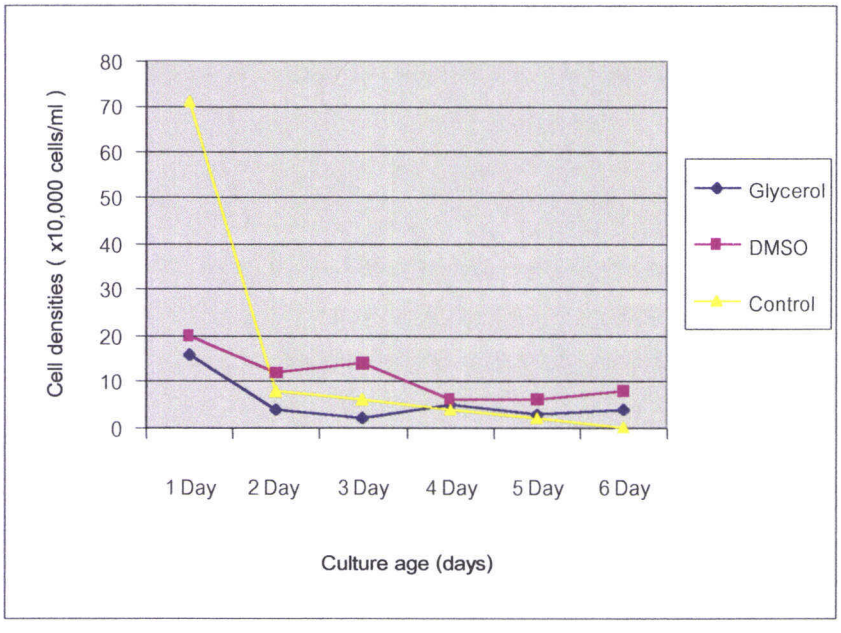
การเจริญเติบโตของเซลล์แพลงก์ตอน Chaetoceros หลังจาการแช่เย็น เมื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ พบว่า ในวันที่ 1 ของการแช่แข็งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังตารางผนวกที่ 6 วันที่ 2 ของการแช่แข็งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P=0.00$) ตารางผนวกที่ 7 ในกลุ่มของอุณหภูมิ

ส่วนในวันที่ 3, 4, 5และ6 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P=0.00$) ตารางผนวกที่ 8, 9, 10 และ11 ทั้งกลุ่มของอุณหภูมิและสารเคมี ดังนั้นแสดงว่า การเจริญเติบโตหลังจากการแช่แข็งในวันที่ 1, 2, 3, 4, 5และ6 ทั้งกลุ่มของอุณหภูมิและสารเคมีให้ผลแตกต่างกันในการเจริญเติบโต

2.2 Isochrysis



ภาพที่ 11 การเจริญเติบโตหลังการแช่เย็น ของ Isochrysis ที่อุณหภูมิ 6 องศา



ภาพที่ 12 การเจริญเติบโตหลังการแช่แข็งของ Isochrysis ที่อุณหภูมิช่องแช่แข็ง

เซลล์แพลงก์ตอน Isochrysis หลังจากการแช่เย็น พบว่า ปริมาณเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงและไม่มีการเจริญเติบโตของเซลล์จนตาย

เมื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ พบว่า ในวันที่ 1 ของการแช่แข็งพบพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P=0.05) ดังตารางผนวกที่ 15 ทั้งกลุ่มของอุณหภูมิและสารเคมี ในวันที่ 2 ของการแช่แข็ง พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ตารางผนวกที่ 16 ขณะที่วันที่ 3 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ตารางผนวกที่ 17 ทั้งกลุ่มอุณหภูมิและสารเคมี ส่วนในวันที่ 4 พบว่ากลุ่มของสารเคมีเท่านั้นที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ตารางผนวกที่ 18 วันที่ 5และ6 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P=0.00) ตารางผนวกที่ 19และ20 ในกลุ่มของอุณหภูมิ ส่วนในกลุ่มของสารเคมีไม่พบความแตกต่าง การวิเคราะห์การเจริญเติบโตหลังจากการแช่แข็งของ Isochrysis พบว่าค่าความหนาแน่นของเซลล์มีค่าน้อยมาก

เซลล์แพลงก์ตอน Isochrysis พบว่าไม่สามารถทำการเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิต่ำ (Molina-grima et al. 1994) และที่อุณหภูมิต่ำมาก (-50, -196) (Canavate and Lubinn , 1995)

แต่เซลล์แพลงก์ตอน Chaetoceros สามารถทำเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ ผุสดี ศรีพยัตต์ (2529) ที่ทำการเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอน Chaetoceros calcitrans ที่เก็บรักษาที่ 3 องศา ได้เป็นระยะเวลานาน 13 เดือน สาเหตุที่ความสามารถในการแช่เย็นแพลงก์ตอนทั้งสองชนิด ไม่เท่ากันนั้น อาจมีผลมาจากลักษณะของผนังเซลล์ของ Diatom ที่มีผนังเซลล์ 2 ชั้นซ้อนกันซึ่งอยู่ใน Class Bacillariophyceae มีสารประกอบพวกซิลิกา (Si) มีความสามารถในการป้องกันหรือลดแรงดันออสโมติกของน้ำภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ นอกจากนั้น

Susanti (1998) กล่าวว่า เซลล์ที่มีการบาดเจ็บจากการแช่เย็นและการละลายจากการแช่เย็น จะเกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์

ขณะที่เซลล์แพลงก์ตอน Isochrysis ซึ่งอยู่ใน Class Prymnesiophyceae ไม่มีผนังเซลล์ แต่จะพบเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า Coccolith ที่มีสารประกอบของแคลเซียมคาร์บอนเนต ($CaCo_3$) หุ้มอยู่ ทำให้มีการบาดเจ็บของเซลล์ได้ง่าย จึงสันนิษฐานได้ว่า Coccolith มีความแข็งแรงและคุณสมบัติความทนทานในการเคลื่อนที่ของสารละลายที่เกิดจากแรงดันออสโมติกภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ได้ไม่ดีพอเท่ากับผนังเซลล์ 2 ชั้นของ Diatom ก็เป็นได้โดย Tanaka et al. (2000) กล่าวว่า ปัจจัยที่ควบคุมแรงดันออสโมติกที่แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์มี ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ความสามารถในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของสารละลาย ค่าสัมประสิทธิ์ของการไหลย้อนกลับ

สำหรับความแตกต่างของ Cryoprotection พบว่า DMSO ให้ผลการเจริญเติบโตหลังการแช่เย็นสูงกว่า Glycerol คล้ายกับผลการทดลองของ Cordeo and Voltolina (1997) ที่พบอัตราการรอดของ Chaetoceros ที่เก็บด้วย DMSO (1, 5, 10 %) ให้ผลดีกว่า ที่เก็บรักษาด้วย Glycerol (1, 5,10 %) ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส อย่างเห็นได้ชัด

การละลายหลังการแช่เย็น ก็มีผลต่อการคงสภาพของเซลล์แพลงก์ตอน โดย Canavate and Lubinn (1997) กล่าวว่า เซลล์แพลงก์ตอน Chaetoceros ที่เก็บด้วย DMSO 15% ในการละลายต้องทำการละลายที่ 0.5 องศาเซลเซียส ต่อนาที จึงให้ผลการคงสภาพสูงสุด

การเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอนที่อุณหภูมิต่ำ พบว่ามีปัจจัยมากมายที่จะควบคุมการคงสภาพและการเจริญเติบโตหลังการแช่เย็น อาทิเช่น ชนิดของแพลงก์ตอน ชนิดและความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา อุณหภูมิการละลายหลังการแช่เย็น ดังนั้นในการเก็บรักษาควรจะเลือกวิธีและกระบวนการต่างๆ ให้เหมาะสมกับการใช้งาน ซึ่งจะทำให้ได้ผลตอบแทนสูงสุด

สรุป

1. การเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอน ที่อุณหภูมิต่ำ Chaetoceros สามารถเก็บได้ดีที่อุณหภูมิตู้เย็นปกติ (6-8 องศา) และหากใส่สารป้องกันการแข็งตัว (DMSO) ความเข้มข้น 5% อัตราการเจริญเติบโตหลังจากการแช่เย็นจะเพิ่มขึ้นประมาณ 10%
2. แพลงก์ตอน Isochrysis พบว่า ไม่สามารถเก็บรักษาได้ในทั้งสองอุณหภูมิ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัว (Cryoprotectant) ที่เหมาะสมกับอุณหภูมิตู้เย็น (6-8 องศา)
2. ควรมีการศึกษาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอน ว่ามีความสามารถในการเก็บได้ระยะเวลานานเท่าใด
3. การศึกษาถึงอัตรารอดควรหาวิธีการศึกษาที่เหมาะสมกว่านี้ เนื่องจากวิธีการใช้สไลด์นับเม็ดเลือด ในบางกรณีพบเซลล์แพลงก์ตอนอยู่แต่อาจไม่มีชีวิตก็เป็นได้ อาจทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน
4. ควรมีการศึกษาถึงปริมาณความเข้มข้นของเซลล์แพลงก์ตอน ที่เหมาะสมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ
5. ควรมีการศึกษาการเก็บรักษาเซลล์แพลงก์ตอนที่มีอุณหภูมิต่ำ ในแพลงก์ตอนพวก Diatom อื่นอีกเช่น Skeletonema, Bacteriastrum
6. ควรมีการศึกษาการเก็บรักษา Isochrysis โดยวิธีการทำแห้งโดยการแช่แข็ง (Freeze-Drying)

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. ๒๕๑๒. คู่มือการศึกษาแพลงก์ตอนเบื้องต้น. หน่วยสำรวจแหล่งประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. (..) หน้า

_____. ๒๕๔๔. สถานการณ์ตลาดสัตว์น้ำเค็ม. [Online]. Availiable: http:// www.fisheries.go.th

กฤษณ์ มงคลปัญญา. ๒๕๓๖. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. ๑๒๘ หน้า

ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์. ๒๕๒๖. สรีรวิทยาของเซลล์. ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. ๑๖๕ หน้า

ผุสดี ศรีพยัตต์. ๒๕๒๘. ศูนย์สะสมแพลงก์ตอนมีชีวิต. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ ๒๒. สถานวิจัย ประมงทะเล กองประมงทะเล กรมประมง. ๗ หน้า

_____. ๒๕๒๙. การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชเพื่อเป็นอาหารลูกสัตว์น้ำ. เอกสารเผยแพร่ ฉบับที่ ๒๙. ฝ่ายสถานวิจัยประมงทะเล กองประมงทะเล กรมประมง. ๘ หน้า

มยุรี จัยวัฒน์. ๒๕๒๗. การให้ความเย็นผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. ๑๖๔ หน้า

ลัดดา วงศ์รัตน์. ๒๕๔๓. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. ๑๒๗ หน้า

_____. ๒๕๔๒. แพลงก์ตอนพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ๘๕๑ หน้า

_____. ๒๕๒๙. แพลงก์ตอนวิทยาเบื้องต้น. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. ๓๒๙ หน้า

_____. ๒๕๓๑. แพลงก์ตอน. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. ๒๘๙ หน้า

เสาวภา สวัสดิ์พีระ จารุนันท์ ประทุมยศ ขวัญเรือน ปิ่นแก้ว อัมพร คอแก้ว และ อมรรัตน์ เกิดบ้านกอก. ๒๕๓๓. การเจริญเติบโตของหอยนางรมปากจีบวัยเกล็ด (Crassortrea commercialis) ที่เลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิด (Amphiphora sp., Tetraselmis helle และ Isochrysis galbana). สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี. ๑๖๗ หน้า

อัธยา กังสุวรรณ. ๒๕๔๓. ชีวิตในแบบเย็นและเยือกแข็ง. วารสารการประมง. ๔๓(๑) : ๗๕-๗๙ http:// www.fisheries.go.th

Becker, W.M. Kleinsmith, L.J. and Hardin, J. 2000. The World of cell. 4th The Benjamin/Cummings Publishing Company. 878 pp.

Canavate, J.P. and Lubinn, L.M. 1995. Some Aspects on the Cryopreservation of Microalgae Used as Food for Marine Species. Aquaculture. 136 : 277-290 pp.

_____. 1997. Cryobiology Academic Press. [Online]. Availiable: http.// www.academipress.com/cryo.

Cordero, B. and Voltolina, D. 1997. Viability of Mass Algal Culture Preserved by Freezing and Freeze-Dying. Aquacultural Engineering. 16 : 205-211

Day, J.G. and Fenwick, C. 1993. Cryopreservation of Member of the Genus Tetraselmis Used in Aquaculture. Aquaculture. 118 : 151-160 pp.

Donal, P.S. and Bianchi, D.E. 1987. Cell and Molecular Biology. 3rd John Wiley & Sons, INC. 704 pp.

Grima, E.M. Perez, J.A. Camacho, F.G. Fernandez, F.G. Alonso, D.P. and Castillo C.I. 1994. Preservation of the Marine MicroAlga, Isochrysis galbana : Influnce on the Fatty Acid Profile. Aquaculture. 123 : 377-385 pp.

Millamena, O.M. Aujero, E.J. and Borlongan, I.G. 1990. Techniqes on Algae Harvesting Preservation for Use in Culture and as Larval Food. Aquacultural Engineering. 9 : 95-304 pp.

Prave, P. Faust, U. Sittig, W. and Sukatsch, D.A. 1987. Fundamental of Biotechnology. Verlagsgesellschaft, Geramany. 792 pp.

Stickney, R.R. 1994. Priciples of Aquaculture. John Wiley & Sons, New york. 502 pp.

Susanti, B.H. 1998. Cryopreservation of Marine Microalgae Using Simple Prefreezing System. M.Sc. Thesis of Asian Institute of Technology. (..) pp.

Simione, F.P. 1998. Cryopreservation Manual. [Online]. Available: http:// www.nalgenunc.com/cryo.

Tanaka, J.Y. Walsh, J.R. Diller, K.R. Aggarwal, S.J. and Brand, J.J. 2000. Cryobiology Academic Press. [Online]. Available: http:// www.academicpress.com/cryo.

Tsukii, Y. 2002. Protist Information server. [Online]. Available: http:// protist.i.hosei.jp/PDB/images.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การคงสภาพของ Chaetoceros ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (x10,000 เซลล์/มิลลิลิตร)

Temp.	Cryo.	Rep.	Day 1	Day 5	Day 15	Day 30
(6')	Glycerol	1	157	148	150	151
		2	157	162	169	148
		3	157	168	189	151
		4	157	154	198	141
	DMSO	1	157	170	185	146
		2	157	171	205	146
		3	157	203	170	161
		4	157	159	199	140
	Control	1	157	169	165	179
		2	157	156	166	133
		3	157	185	164	152
		4	157	181	172	125
(-10')	Glycerol	1	157	183	223	153
		2	157	153	171	135
		3	157	159	203	166
		4	157	161	195	127
	DMSO	1	157	156	155	116
		2	157	122	157	135
		3	157	156	148	146
		4	157	158	159	150
	Control	1	157	173	182	120
		2	157	189	189	124
		3	157	168	192	132
		4	157	185	182	144

ตารางผนวกที่ 2 การคงสภาพของ Isochrysis ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (x10,000 เซลล์/มิลลิลิตร)

Temp.	Cryo.	Rep.	Day 1	Day 5	Day 15	Day 30
(6')	Glycerol	1	404	227	246	202
		2	404	260	235	200
		3	404	257	264	190
		4	404	265	240	170
	DMSO	1	404	268	247	159
		2	404	271	263	179
		3	404	235	203	157
		4	404	228	252	179
	Control	1	404	341	271	183
		2	404	310	214	210
		3	404	279	271	167
		4	404	294	213	140
(-10')	Glycerol	1	404	233	231	187
		2	404	267	190	253
		3	404	235	235	203
		4	404	194	228	194
	DMSO	1	404	228	277	158
		2	404	246	326	146
		3	404	273	220	167
		4	404	253	196	188
	Control	1	404	363	273	169
		2	404	331	309	188
		3	404	381	245	159
		4	404	340	267	175

ตารางผนวกที่ 3 การเจริญเติบโตของ Chetocecos หลังจากการแช่เย็น

(x10,000 เซลล์/มิลลิลิตร)

Temp.	Cryo.	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
(6')	Glycerol	81	57	62	23	36	30
		96	68	74	20	47	27
		69	68	53	25	35	28
		93	42	59	17	43	45
	DMSO	104	44	250	286	414	316
		88	45	218	305	336	352
		80	51	234	290	407	418
		108	61	198	296	506	302
	Control	122	49	220	242	357	466
		107	37	189	263	394	374
		94	38	196	227	389	342
		102	33	202	235	370	351
(-10')	Glycerol	93	11	187	7	2	0
		100	8	232	6	3	0
		115	21	218	4	1	0
		74	8	183	3	2	0
	DMSO	124	12	9	4	3	4
		102	15	4	9	6	2
		111	7	6	7	4	5
		91	6	5	4	7	5
	Control	107	13	6	5	0	0
		103	14	9	6	0	0
		87	9	5	4	0	0
		110	16	8	6	0	0

ตารางผนวกที่ 4 การเจริญเติบโตของ Isochrysis หลังจากการแช่เย็น

(x10,000 เซลล์/มิลลิลิตร)

Temp.	Cryo.	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
(6')	Glycerol	130	10	4	5	0	0
		120	9	2	4	0	0
		104	9	6	5	0	0
		118	20	4	2	0	0
	DMSO	76	14	6	3	0	0
		84	12	5	4	0	0
		85	8	4	7	0	0
		94	10	5	6	0	0
	Control	77	10	6	4	2	0
		116	12	5	3	0	2
		91	9	8	3	4	0
		114	6	3	4	0	0
(-10')	Glycerol	29	4	5	7	4	2
		10	5	7	6	4	4
		14	3	4	4	2	4
		13	4	4	3	2	2
	DMSO	28	9	7	4	4	4
		24	15	9	4	9	7
		17	15	6	9	4	9
		29	9	2	7	7	4
	Control	75	12	5	4	3	0
		70	16	6	2	3	0
		77	10	9	4	0	0
		64	5	6	2	2	2

ตารางผนวกที่ 5 การเจริญเติบโตของ Chaetoceros (x10,000 เซลล์/มิลลิลิตร)

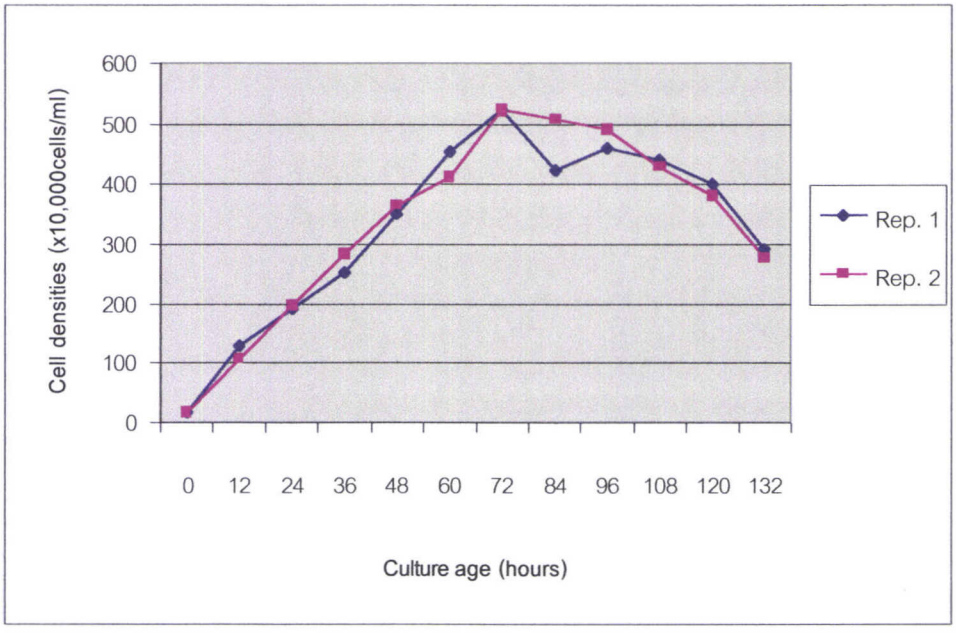
Time	Rep. 1	Rep. 2
0	17	16
12	130	106
24	191	195
36	251	282
48	350	364
60	454	411
72	524	525
84	422	507
96	461	491
108	441	428
120	401	382
132	292	278

ตารางผนวกที่ 6 การเจริญเติบโตของ Isochrysis (x10,000 เซลล์/มิลลิลิตร)

Time	Rep. 1	Rep. 2
0	20	22
12	164	163
24	271	271
36	362	335
48	445	442
60	613	626
72	756	726
84	964	917
96	1011	1005
108	1089	1141
120	1139	1112
132	1000	969
144	882	731

กราฟการเจริญเติบโตของการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน 2 ชนิด

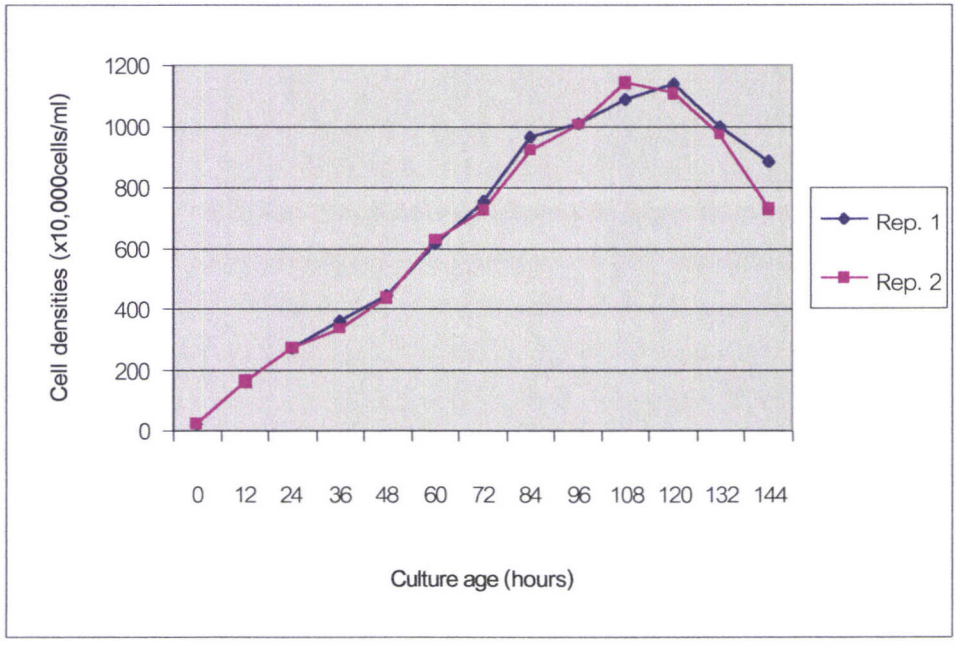
การเจริญเติบโตของ Chaetoceros sp.



ภาพที่ 13 กราฟการเจริญเติบโตของ Chaetoceros

Chaetoceros ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตจนตายทั้งหมดประมาณ 132 ชั่วโมง ช่วง 0-6 ชั่วโมงแรก อยู่ใน Lag phase ซึ่งคล้ายกันในทั้ง 2 ซ้ำ และในช่วง 12-60 ชั่วโมง เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ใน Exponential phase ช่วง 72-84 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ประมาณ 5.2×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ช่วง 86-120 ชั่วโมง เซลล์เริ่มมีการลดลงใน Stationary phase และมีการลดลงเรื่อยๆ

การเจริญเติบโตของ Isochrysis sp.



ภาพที่ 14 กราฟการเจริญเติบโตของ Isochrysis sp.

การเจริญเติบโตของ Isochrysis มีปริมาณเซลล์และใช้เวลามากกว่า Chaetoceros มีระยะเวลาทั้งหมด ประมาณ 144 ชั่วโมง ในการเจริญเติบโต Lag phase 0-12 ชั่วโมง เท่ากันทั้ง 2 ซ้ำ ช่วง 24-96 ชั่วโมง อยู่ใน Exponential phase ที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ช่วง 120-132 ในทั้ง 2 ซ้ำเป็นช่วง Stationary phase ซึ่งมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นเซลล์จะค่อยๆ ลดลงใน Death phase พบว่า เซลล์มีปริมาณสูงสุด $1.14x10^{7}$ เซลล์/มิลลิลิตร ในซ้ำที่ 1 และ $1.11x10^{7}$ เซลล์/มิลลิลิตร ในซ้ำที่ 2

ตารางผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง

Chaetoceros การวัดการเจริญเติบโตวันที่ 1

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	0.025	1	0.025	1.268	0.275
TREATMENT	0.100	2	0.050	2.574	0.104
ERROR	0.351	18	0.019		

ตารางผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง

Chaetoceros การวัดการเจริญเติบโตวันที่ 2

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	13.179	1	13.179	141.723	0.000
TREATMENT	0.111	2	0.056	0.597	0.561
ERROR	1.674	18	0.093		

ตารางผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง
Chaetoceros การวัดการเจริญเติบโตวันที่ 3

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	22.844	1	22.844	579.217	0.000
TREATMENT	6.727	2	3.364	85.287	0.000
ERROR	0.710	18	0.039		

ตารางผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง
Chaetoceros การวัดการเจริญเติบโตวันที่ 4

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	57.493	1	57.493	894.550	0.000
TREATMENT	9.589	2	4.795	74.602	0.000
ERROR	1.157	18	0.064		

ตารางผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง

Chaetoceros การวัดการเจริญเติบโตวันที่ 5

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	342.733	1	342.733	5056.063	0.000
TREATMENT	123.996	2	61.998	914.608	0.000
ERROR	1.220	18	0.068		

ตารางผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง

Chaetoceros การวัดการเจริญเติบโตวันที่ 6

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	697.153	1	697.153	14682.086	0.000
TREATMENT	187.940	2	93.970	1979.014	0.000
ERROR	0.855	18	0.047		

ตารางผนวกที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง
Chaetoceros การวัดการคงสภาพวันที่ 5

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	0.007	1	0.007	0.929	0.348
TREATMENT	0.042	2	0.021	2.795	0.088
ERROR	0.134	18	0.007		

ตารางผนวกที่ 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง
Chaetoceros การวัดการคงสภาพวันที่ 15

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	0.000	1	0.000	0.069	0.795
TREATMENT	0.029	2	0.014	2.340	0.125
ERROR	0.110	18	0.006		

ตารางผนวกที่ 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง

Chaetoceros การวัดการคงสภาพวันที่ 30

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	0.033	1	0.033	3.108	0.095
TREATMENT	0.015	2	0.007	0.678	0.520
ERROR	0.193	18	0.011		

ตารางผนวกที่ 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง

Isochrysis การวัดการเจริญเติบโตวันที่ 1

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	8.771	1	8.771	159.986	0.000
TREATMENT	2.280	2	1.140	20.792	0.000
ERROR	0.987	18	0.055		

ตารางผนวกที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง

Isochrysis การวัดการเจริญเติบโตวันที่ 2

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	0.515	1	0.515	4.627	0.045
TREATMENT	1.113	2	0.556	5.003	0.019
ERROR	2.002	18	0.111		

ตารางผนวกที่ 17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง
Isochrysis การวัดการเจริญเติบโตวันที่ 3

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	0.186	1	0.186	1.140	0.300
TREATMENT	0.360	2	0.180	1.105	0.353
ERROR	2.936	18	0.163		

ตารางผนวกที่ 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง
Isochrysis การวัดการเจริญเติบโตวันที่ 4

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	0.027	1	0.027	0.193	0.665
TREATMENT	1.017	2	0.509	3.631	0.047
ERROR	2.522	18	0.140		

ตารางผนวกที่ 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง

Isochrysis การวัดการเจริญเติบโตวันที่ 5

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	374.294	1	374.294	36.611	0.000
TREATMEN	6.699	2	3.350	0.328	0.725
ERROR	184.023	18	10.224		

ตารางผนวกที่ 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง

Isochrysis การวัดการเจริญเติบโตวันที่ 6

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	299.330	1	299.330	36.384	0.000
TREATMENT	42.937	2	21.469	2.610	0.101
ERROR	148.087	18	8.227		

ตารางผนวกที่ 21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง

Isochrysis การวัดการคงสภาพวันที่ 5

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	0.002	1	0.002	0.289	0.598
TREATMENT	0.458	2	0.229	29.232	0.000
ERROR	0.141	18	0.008		

ตารางผนวกที่ 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง

Isochrysis การวัดการคงสภาพวันที่ 15

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	0.002	1	0.002	0.110	0.744
TREATMENT	0.036	2	0.018	1.033	0.376
ERROR	0.317	18	0.018		

ตารางผนวกที่ 23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหน่วยทดลอง Isochrysis การวัดการคงสภาพวันที่ 30

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
BLOCK	0.002	1	0.002	0.197	0.662
TREATMENT	0.142	2	0.071	5.678	0.012
ERROR	0.225	18	0.012		