

### บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

#### 3.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

3.1.1 เก็บสาหร่ายใส่ไก่อจากธรรมชาติ โดยตรวจวัดคุณภาพน้ำบางประการในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง เช่น อุณหภูมิ และความเค็ม เป็นต้น

3.1.2 นำสาหร่ายมาล้างทำความสะอาดเบื้องต้น โดยใช้น้ำที่มีความเค็มระดับเดียวกับน้ำบริเวณที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นจึงเลือกแทลลัสสาหร่ายที่สมบูรณ์ แข็งแรง มาบดล้างด้วยฟุ้งกันอีกครั้ง

3.1.3 นำแทลลัสสาหร่ายมาตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกส่วนที่มีเซลล์เริ่มแก่ โดยจะเห็นโปรโตพลาสต์แบ่งเป็นส่วน จากนั้นจึงตัดแบ่งส่วนของแทลลัสดังกล่าวเป็นท่อน ขนาด 2 ซม.

3.1.4 นำชิ้นส่วนมากระตุ้นเพื่อให้มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ด้วยวิธีต่างๆ 5 วิธี คือ การลดความเค็ม (10 ppt) การเพิ่มความเค็ม (40 ppt) การทำให้แห้งและมีด การเพิ่มอุณหภูมิ (40°C) และการลดอุณหภูมิ (4°C) การกระตุ้นด้วยวิธีลดและเพิ่มความเค็มทำโดยใส่ชิ้นส่วนสาหร่ายลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิเมตร ที่มีน้ำทะเล 10 และ 40 ppt สำหรับการทำให้แห้งและมีดทำการห่อด้วยกระดาษฟางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง และนำชิ้นส่วนลงในน้ำเลี้ยงที่มีความเค็มที่ใกล้เคียงกับน้ำขณะเก็บตัวอย่าง ส่วนการเพิ่มอุณหภูมิทำโดยนำสาหร่ายใส่ภาชนะที่มีน้ำทะเลความเค็มเท่ากับบริเวณที่เก็บตัวอย่าง และวางภาชนะในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 40 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงนำลงในน้ำที่มีความเค็มเท่าเดิม การลดอุณหภูมิ ทำโดยใส่ภาชนะที่มีน้ำทะเลและตัวอย่างในตู้เย็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำชิ้นส่วนสาหร่ายใส่เลี้ยงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิตร ฟลาสก์ ละ 3 ชิ้น และตรวจสอบการปล่อยสปอร์ทุกวัน ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ การเลี้ยงทำในตู้ที่มีอุณหภูมิ 25 °C ในฟลาสก์ ที่มีท่อให้อากาศต่อยาวบริเวณกัน เพื่อให้ให้น้ำหมุนเวียนเป็นวงกลม ใส่เชือกพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ยาว 5 ซม จำนวน 10 เส้น เพื่อให้สปอร์ลงเกาะ

3.1.5 ตรวจสอบการปล่อยสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุกวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หากพบการเกาะสปอร์ บนเส้นเชือกจะทำการเปลี่ยนเชือกชุดใหม่ เพื่อเก็บสปอร์

#### 3.2 การศึกษาปัจจัยในการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์

การจัดปัจจัยสภาพแวดล้อมต่างๆที่ละปัจจัยตามลำดับความสำคัญดังนี้ ความเค็ม อุณหภูมิ และ แสง

3.2.1 การเลี้ยงที่ความเค็มต่างๆ โดยใช้ระดับความเค็มที่ 0, 10, 20, 30 และ 40 ppt โดยนำเชือกที่มีสปอร์เกาะจากข้อ 2.1.5 หรือ ทำการเก็บสปอร์บนเชือกใหม่ นำมาเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 500-1000 มิลลิตร ที่อุณหภูมิ 25 °C แสง 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  และอาหารเลี้ยงสูตร MGM มีการให้อากาศเพื่อให้ให้น้ำหมุนเวียน วัดการเจริญเติบโตของแทลลัส จากที่ยาวที่สุด จำนวน 30

แทลลัส และตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ในทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 1-2 เดือน มีการเปลี่ยนภาชนะ และน้ำเลี้ยงหลังจากการตรวจวัด

3.2.2 การเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ ใช้อุณหภูมิที่ 20, 25 และ 30 °C โดยนำสปอร์จากการเก็บสปอร์บนเชือกใหม่ มาเลี้ยงในที่ระดับความเค็มที่เหมาะสมจากข้อ 2.2.2.1 และความเข้มแสง 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ระยะเวลาที่มีแสง:มืดเป็น 12:12 ชม.

3.2.3 การเลี้ยงที่ระดับความเข้มของแสงระดับต่างๆโดยใช้แสงระดับ 40, 80 และ 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  โดยนำสปอร์สาหร่ายที่เลี้ยงที่ระดับความเค็มที่เหมาะสมจากข้อ 2.2.2.1 และอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2.2.2 มีการศึกษาการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์เช่นเดียวกับ ข้อ 2.2.2.1

### 3.3 การเลี้ยงสาหร่ายใส่ไถ่ในบ่อดิน

3.3.1 ทำการเก็บสปอร์ในบ่อซิเมนต์หรือถังไฟเบอร์ โดยใช้ต้นพันธุ์จากการเลี้ยงมากระตุ้นให้ปล่อยสปอร์ลงบนเชือกในลอนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-5 มิลลิเมตร ยาว 6-10 เมตร พันรอบ โดยนำต้นพันธุ์สาหร่ายใส่ไถ่ ล้างทำความสะอาด และ ผึ่งให้หมาด จากนั้นจึง ใส่ในถุงผ้าตาถี่ ถุงละ 2 กรัม ปิดถุง และนำไปใส่ในถังไฟเบอร์ ละ 1 ถุง จำนวน 3 ถัง ในถังมีเชือกที่พันรอบกรอบท่อพีวีซี และวางเป็นแนวเฉียงโดยใช้ตุ้มถ่วงเพื่อเก็บสปอร์ในบ่อ

3.3.2 อนุบาลต้นอ่อนที่อยู่บนอวน ไว้ประมาณ 1 เดือน หรือให้ต้นอ่อน มีขนาด 0.5- 1.0 เซนติเมตร ทำการตรวจสอบ ตรวจวัดคุณภาพน้ำและเปลี่ยนถ่ายน้ำระหว่างเลี้ยง ทุกสัปดาห์

3.3.3 นำเชือกดังกล่าวไปขึงเลี้ยงในบ่อดินขนาด 2.5 x 10.0 ตารางเมตร ในเชือกอยู่ในระดับต่ำกว่าผิวน้ำ 5-10 เซนติเมตร ตรวจสอบการเจริญเติบโตของสาหร่ายทุก 2 สัปดาห์ คำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (relative growth rate ของสาหร่ายเป็นร้อยละต่อวัน) ซึ่งมีสูตรในการคำนวณ Lobban และ Harrison (1994) ดังนี้

	$\mu$	=	$100 \ln (N_t / N_0) \cdot t^{-1}$
เมื่อ	$\mu$	=	ร้อยละของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
	$N_0$	=	น้ำหนักผลผลิตเมื่อเริ่มเลี้ยง
	$N_t$	=	น้ำหนักผลผลิตสุดท้าย
	t	=	ระยะเวลาในการเลี้ยง

### 3.4 การเลี้ยงสาหร่ายใส่ไถ่ในถังพลาสติก

3.4.1 ใช้กลุ่มก้อนต้นอ่อนจากการเพาะในห้องปฏิบัติการ และขยายเลี้ยงในโหลแก้วจนมีขนาด ประมาณ 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงในถังพลาสติกความจุ 200 ลิตร ใส่สาหร่ายให้มีความหนาแน่น 10 กอ ต่อลิตร เลี้ยงที่ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน เติมสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ โซเดียมไนเตรด ( $\text{NaNO}_3$ ) 2กรัม ต่อตัน และ เติมสารอาหารที่เป็นแหล่งของฟอสฟอรัส ได้แก่ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ ) ให้ 0.2 กรัมต่อตัน ทุก 3วัน

3.4.2 อนุบาลต้นอ่อนที่อยู่บนอวน ไว้ประมาณ 1 เดือน หรือให้ต้นอ่อน มีขนาด 0.5- 1.0 เซนติเมตร ทำการตรวจสอบความยาวของแผลลัสจำนวน 30 ต้น ต่อถึงทุกสัปดาห์ และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ

3.4.3 คำนวณหา อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ ของสาหร่ายเป็นร้อยละต่อวัน ตาม Lobban และ Harrison (1994) เช่นเดียวกับการเลี้ยงในถัง