บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การวัดการเจริญของ P. micans

ในการศึกษาการเจริญของ P. micans ใช้วิธีการวัดหาปริมาณคลอโรฟิลด์ เอ โดยการวัด in vivo fluorescence ด้วยเครื่อง fluorometer แล้วนำค่าที่ได้ไปประมาณค่าจำนวนเซลล์ตามสมการจำลองเชิงเส้นตรง $y = -0.99618 + 0.82855\ x$ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะควบคุมที่ระดับอุณหภูมิ 30±1 °C ปริมาณความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ ในช่วงเวลาสว่างต่อช่วงเวลามืดเท่ากับ 14:10 ชั่วโมง วิธีการวัดแบบนี้จัดว่าเป็นการประมาณความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ได้ค่อนข้างถูกต้องและรวดเร็ว สิ้นเปลืองเวลาน้อย เหมาะกับงานเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวที่ต้องติดตามผลการเจริญในระยะยาวอย่างต่อเนื่อง ซึ่งวิธีการประมินความหนาแน่นของเซลล์แบบอื่น เช่นการวัดปริมาณอนุภาคแขวนลอย (particle counter) นั้นจะมีข้อจำกัดคือไม่เหมาะสมกับแพลงก์ตอนพืชชนิดที่มีขนาดของเซลล์แตกต่างกันมาก และเมื่อมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยการแบ่งเซลล์มากขึ้นเซลล์ที่ได้จากการแบ่งเซลล์จะต่อกันเป็นสายยาว (chains) ไม่แยกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือเซลล์บางชนิดจะมีระยางค์ยื่นยาวออกมาจากตัวเซลล์ (long appendages) และในบางชนิดของเซลล์ที่เมื่อตายแล้วแต่ยังคงพบเปลือกเซลล์ที่ว่างเปล่าเอาไว้ (empty thecae) ซึ่งข้อจำกัดเหล่านี้ค่อนข้างจะพบได้มากใน พวกไดโนแฟลกเจลเลต ส่วนความถูกต้องของค่าที่วัดได้จากการวัดด้วยวิธี in vivo fluorescence นี้จะขึ้นอยู่กับการควบคุมให้สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงให้คงที่สม่ำเสมอ เพราะว่าค่าปริมาณคลอโรฟิลด์ที่พบต่อเซลล์จะแปรผันไป โดยขึ้นอยู่กับขบวนการทางสรีรวิทยาของเซลล์ ซึ่งจะถูกควบคุมให้เกิดขึ้นอย่างคงที่สม่ำเสมอ (physiological steady state) ด้วยสภาวะแวดล้อมในการเจริญของเซลล์อีกทีหนึ่ง (Kiefer, 1973a, 1973b; Loftus & Seliger, 1975; Slovacek & Hannan, 1977 อ้างตาม Brand et al., 1981) จากรายงานการศึกษาของ Brand et al. (1981) ได้สรุปว่าการวัดการเจริญแบบ in vivo fluorescence เหมาะสมที่จะใช้ใน

การวัดอัตราการเจริญของไดโนแฟลตเจลเลตและนาก coccolithophores โดยค่าที่วัดได้จะมีความคลาดเคลื่อนร้อยละ 3 - 4 เมื่อควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเจริญให้คงที่ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีนี้ในการศึกษาการเจริญของ P. micans

2. ผลของสารอาหารสูตร modified T1 ที่มีต่อการเจริญของ P. micans

การศึกษาเบื้องต้นเพื่อทดสอบว่าสารอาหารสูตร modified T1 มีผลต่อการเจริญของ P. micans โดยเปรียบเทียบจากอัตราการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติเพียงอย่างเดียว กับเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลที่มีการเพิ่มสารอาหารสูตร modified T1 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า P. micans สามารถจะเจริญได้ดีในน้ำเลี้ยงที่มีการเพิ่มสารอาหารสูตร modified T1 ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติ P. micans ไม่สามารถจะเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ ดังนั้นความแตกต่างนี้จึงชี้ให้เห็นว่าเป็นผลมาจากอิทธิพลของสารอาหารสูตร modified T1 ที่เพิ่มเข้าไป

จากงานการศึกษาการเพาะเลี้ยง P. micans ได้มีรายงานว่า Barker เป็นคนแรกที่ทำการแยกเซลล์และเพาะเลี้ยง P. micans ได้ในปี ค.ศ. 1935 โดยทำการเพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลที่มีการเติมสารอาหาร คือสูตรอาหาร Erdschreiber (1934) (Braarud & Rossavik, 1951 ; Guillard & Keller, 1984) สูตรอาหาร Erdschreiber นี้จัดว่าเป็นน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน โดยจะประกอบด้วยน้ำทะเล และมีการเพิ่มสารประกอบ ไนเตรท ฟอสเฟต และสารละลายที่สกัดจากดิน (Soil extract) ซึ่งจะเป็นแหล่งของธาตุโลหะปริมาณน้อยและสารประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญ ซึ่งสูตรอาหารนี้รู้จักกันดีในชื่อของ Erdschreiber solution (ตารางที่ 10) Braarud และ Rossavik (1951) ได้เตรียมน้ำเลี้ยง Allen sea - water ใช้ในการเพาะเลี้ยง P. micans ซึ่งจะมีส่วนประกอบของสารละลายที่สกัดจากดินในปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อ Allen sea-water 1.0 ลิตร ซึ่ง Allen sea-water นี้ Allen และ Nelson ได้ดัดแปลงมาจาก Miquel-sea-water ในปี ค.ศ. 1910 (ตารางที่ 11)

ข้อเสียของธาตุอาหารสูตร Erdschreiber ที่พบได้เสมอ ๆ คือ สารละลายที่ได้จะมีการตกตะกอนหลังจากการฆ่าเชื้อด้วยการอบความดันไอน้ำ คุณภาพของสารละลายที่สกัดจากดินในแต่ละครั้งที่เตรียมขึ้นมาใช้จะมีองค์ประกอบแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ชนิดของดิน ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (Provasoli , Mclaughlin และ Droop, 1957)

สารอาหารสูตร modified T1 ได้รับการปรับปรุงมาจากสูตรอาหาร T1 Medium สูตรอาหาร T1 Medium จัดเป็นสูตรอาหารประเภท Enriched seawater media ซึ่งได้พัฒนามาจากสูตรอาหารยุคแรก ๆ โดยการปรับปรุงแก้ไขคุณสมบัติให้ดีขึ้น เช่น ปัญหาการตกตะกอนอันเนื่องมาจากวิธีการฆ่าเชื้อด้วยการอบความดันไอน้ำ ระบบควบคุมสมดุลย์ของความเป็นกรด-ด่าง และการเพิ่มสารประกอบที่ทำหน้าที่เป็นตัวจับธาตุโลหะ ทั้งนี้เพื่อเป็นการส่งเสริมการเจริญของแพลงก์ตอนพืชให้ดีขึ้น องค์ประกอบหลัก ของสูตรอาหาร T1 Medium ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้ (ตารางที่ 12)

- ธาตุอาหารหลัก (major nutrients and elements) ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และธาตุเหล็ก
- ธาตุโลหะปริมาณน้อย และ ตัวจับธาตุโลหะ (metals, minor elements, chelators) ได้แก่ สังกะสี แมงกานีส โมลิบดินัม โคบอลต์ ทองแดง EDTA และ Nitrilotriacetic acid (NTA)
- วิตามิน ได้แก่ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และไบโอติน

นอกจากนี้ยังมี Tris-HCl เพื่อทำหน้าที่เป็นระบบควบคุมความสมดุลย์ความเป็นกรด-ด่าง และป้องกันการตกตะกอนของน้ำทะเลด้วย

ส่วนสารอาหารสูตร modified T1 นั้น ได้มีการปรับปรุงในส่วนของสารประกอบที่ทำหน้าที่เป็นตัวจับธาตุโลหะ คือ คีเลเตอร์ โดยในสูตรอาหาร T1 จะประกอบไปด้วยสารประกอบ 2 ชนิด คือ EDTA และ NTA แต่ในสารอาหารสูตร modified T1 จะมีเฉพาะ EDTA (ตารางที่ 10) จากคุณสมบัติของสารประกอบ EDTA จัดว่าเป็นคีเลเตอร์ที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการเตรียมสูตรอาหารเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยมีคุณสมบัติพิเศษคือจุลินทรีย์

ตารางที่ 12 ตารางเปรียบเทียบองค์ประกอบและความเข้มข้นของสารประกอบในสูตรอาหาร T1 Medium และ modified T1 (จาก Ogata et al., 1987)

สารประกอบ	ความเข้มข้น (โมลาร์)	
	T1 medium	modified T1
Tris-HCl buffer (pH 8.0)	5.0	5.0
$NaNO_3$	1.0	1.0
NaH_2PO_4	1×10^{-1}	1×10^{-1}
Fe-EDTA	5×10^{-3}	5×10^{-3}
Thiamine HCl	5.93×10^{-4}	5.93×10^{-4}
Biotin	4.1×10^{-6}	4.1×10^{-6}
Cyanocobalamin	7.38×10^{-7}	7.38×10^{-7}
$ZnSO_4$	1×10^{-3}	1×10^{-3}
$MnCl_2$	1×10^{-2}	1×10^{-2}
$NaMoO_4$	5×10^{-4}	5×10^{-4}
$CoCl_2$	2×10^{-4}	2×10^{-4}
$CuSO_4$	1×10^{-5}	1×10^{-5}
EDTA (as Na_2 salt)	1.2×10^{-2}	2.4×10^{-2}
Nitrilotriacetic acid (as Na_2 salt)	2×10^{-2}	-

ไม่สามารถย่อยสลายสารนี้ได้ ละลายได้ดีในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่าง เมื่ออยู่ในรูปของเกลือโซเดียมจะสามารถละลายน้ำได้ดี (Na_2-EDTA.$2H_2O$) และมีความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4.5 - 5.0 ส่วน NTA เป็นคีเลเตอร์ที่มีประสิทธิภาพด้อยกว่า EDTA และมักจะใช้ร่วมกับสารประกอบ glycerophosphate (McLachlan, 1973) ส่วนความ สามารถในการรวมตัวกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสารประกอบคีเลเตอร์กับธาตุโลหะระหว่าง EDTA กับ NTA พบว่าสารประกอบ EDTA มีค่าคงที่ของความเสถียร (stability constant) มากกว่าสารประกอบ NTA (ตารางที่ 13) (Johnhton, 1964) จากผลการทดลองของ Huntsman ซึ่งศึกษาอัตราของ relative effectiveness ของ NTA และ EDTA ในการกระตุ้นการเจริญของแพลงก์ตอนพืช ผลจากการเติมคีเลเตอร์ลงไปในน้ำทะเลที่นำมาจากทะเลลึก ซึ่งจะมีสารอินทรีย์ต่ำ จะมีผลต่ออัตราการเจริญโดยเรียงลำดับของ effectiveness มีค่าลดลงตามลำดับ ดังนี้ 10^{-8} M EDTA > 10^{-7} M EDTA > 10^{-8} M NTA > 10^{-7} M NTA (Jackson and Morgan, 1978)

3. ผลของอัตราส่วนระหว่าง EDTA กับผลรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อยที่มีต่อการเจริญของ P. mcans

เพื่อทดสอบผลของอัตราส่วนระหว่าง EDTA ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อย 5 ชนิดคือ Zn, Mn, Mo, Co และ Cu โดยเปรียบเทียบอัตราการเจริญของ P. micans เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารอาหารสูตร modified T1 โดยทำการแปรผันอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อยในส่วนของสารละลาย Mixed trace metals ให้มีปริมาณของ EDTA มากขึ้นเป็น 2 เท่า, 3 เท่า, 5 เท่า, 10 เท่า, 15 เท่า และ 20 เท่า ของปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิด โดยมีชุดการทดลองที่น้ำเลี้ยงเซลล์เติมสารอาหารตามสูตร modifies T1เป็นชุดการทดลองควบคุม จากผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่น้ำเลี้ยงที่มีการเติมสารอาหารและมีการแปรผันอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อยในระดับต่าง ๆ นั้น P. micans มีผลการเจริญดีและมีแนวโน้มในการเจริญใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาจากค่าอัตราการเจริญจะพบว่าที่ทุกระดับของ Chelate-metal mole ratio อัตราการเจริญเฉลี่ยมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อดูแนวโน้มของการเจริญจะพบว่าเมื่อระดับ Chelate-metal mole ratio มีค่ามากขึ้นจะเป็นผลให้อัตรา

ตารางที่ 13 ค่าคงที่ความเสถียรภาพของสารประกอบคีเลเตอร์และธาตุโลหะเมื่อรวมกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (ดัดแปลงจาก Johnston, 1964)

อิออนของโลหะชนิดต่าง ๆ	สารประกอบคีเลเตอร์	
	NTA	EDTA
Fe^{3+}	8.9	14.4
Mn^{2+}	15.8	24.8
Cu^{2+}	7.4	14.0
Zn^{2+}	12.7	18.3
Cu^{2+}	10.4	16.3
Co^{2+}	10.6	-
Ca^{2+}	6.4	10.6

NTA : Nitrilotriacetic acid

EDTA : Ethylenediamine tetra-acetic acid

การเจริญของเซลล์มีแนวโน้มลดลง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกเอาอัตราส่วนระหว่าง EDTA ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อยเท่ากับ 2:1 ว่าเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ P. micans เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีการเติมสารอาหารสูตร modified T1 ซึ่งจะสอดคล้องกับรายงานการศึกษาดังต่อไปนี้

ตามหลักทฤษฎีในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี สารประกอบคีเลเตอร์จะทำปฏิกิริยาพอดีกับธาตุโลหะเพื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex compound) นั้นควรจะมีอัตราส่วนของสารประกอบคีเลเตอร์ 1 โมลาร์ ต่อสารประกอบของธาตุโลหะ 1 โมลาร์ (chelate: metal ratio เท่ากับ 1 : 1 Molar ratio) แต่ในทางปฏิบัติแล้วมีความจำเป็นจะต้องเพิ่มปริมาณของคีเลเตอร์ให้มากเกินพอ ประมาณร้อยละ 10 ถึงร้อยละ100 เพื่อที่จะให้เกิดความพอดีและมั่นใจว่าเกิดปฏิกิริยากันโดยสมบูรณ์โดยปกติอัตราส่วนของคีเลเตอร์ต่อธาตุโลหะ (chelate: metal ratio) ที่พอเหมาะจะอยู่ในช่วง 1.5-3 ต่อ 1 ซึ่งอัตราส่วนในเกณฑ์นี้จะเป็นอัตราส่วนที่พอดีสำหรับเผื่อให้ธาตุโลหะที่ปนเปื้อนอยู่ในสารเคมี (impurity) (McLachlan, 1973) และจากรายงานของ Harrison et al.(1980; อ้างตาม Guillard and Keller, 1984) พบว่าที่ระดับอัตราส่วนคีเลเตอร์ต่อธาตุโลหะ 2.3 : 1 จะส่งผลให้การเจริญของเซลล์ดีกว่าที่ระดับอัตราส่วน 1 : 1

แต่อัตราส่วนของคีเลเตอร์ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะที่พบในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงแพลงค์ตอนพืช สูตรอาหารหลาย ๆ สูตรจะมีอัตราส่วนแตกต่างกัน ได้แก่ 0.8:1, 0.9:1, 1.3:1, 2:1, 2.7:1 และ 92.6:1 (ตารางที่ 14) (Maclachlan, 1973; Keller และ Guillard, 1985)

และจากผลการทดลองพบว่าเมื่อระดับอัตราส่วนของ Chelate-metal mole ratio มีค่าเพิ่มมากขึ้น อัตราการเจริญของเซลล์มีแนวโน้มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาการปรับปรุงและพัฒนาสูตรอาหารสังเคราะห์สำหรับสาหร่ายทะเลของ Provasoli et al. (1957) งานปรับปรุงและพัฒนาสูตรอาหารที่สำคัญอีกด้านหนึ่งก็คือ การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ EDTA ให้มากกว่าระดับปกติ คือ อัตราส่วน 1:1 ของธาตุโลหะเป็นจำนวนประมาณ 2-3 เท่า อัตราส่วนระหว่างคีเลเตอร์ต่อธาตุโลหะในระดับต่าง ๆ จะมีผลกระทบต่อสูตรอาหาร เช่น ในระดับ

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อยใน Trace Metal-I (ดัดแปลงจาก McLachlan, 1973)

Element	Concentration (uM/l of medium)						
	P-II	P-8	TM-2	"f/2"	M-1	TMS-1	"K"
Zinc	0.8	7.7	35.2	0.08	14	35	0.08
Manganese	7.3	18	11.8	0.9	3.8	10	0.9
Molypdenum		5.2	2.1	0.03	0.83	5	0.03
Cobalt	0.17	0.17	0.11	0.05	0.04	0.3	0.05
Copper		0.32	0.02	0.04	0.008	0.3	0.01
Iron	1.8	35.8	1.8	11.7	1.2	2	11.7 (Fe-EDTA)
EDTA	26.9		53.7	11.7	53.7	48	100
Chelate:metal	2.7:1	1.3:1	0.8:1	0.9:1	2.7:1	2:1	92.6:1
Boron	185	185			32	400	
Selenium							0.01

อัตราส่วนของคีเลเตอร์ต่อธาตุโลหะเท่ากับ 1:1 จะเป็นผลให้น้ำเลี้ยงเซลล์เกิดการตกตะกอน และที่ระดับอัตราส่วนมากกว่า 3 : 1 จะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการขาดธาตุโลหะ (metal deficiency) ในน้ำเลี้ยง ระดับอัตราส่วนของคีเลเตอร์ที่เหมาะสมน่าจะอยู่ในช่วง 2:1 และ 3:1 ในกรณีที่อัตราส่วนของคีเลเตอร์สูงจะเป็นปรากฏการณ์ over chelation ซึ่งจะส่งผลให้เกิดสภาวะขาดธาตุโลหะในน้ำเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่อัตราส่วนของคีเลเตอร์ต่ำ ๆ ก็จะเป็นสาเหตุของการตกตะกอนของ cation ชนิดต่าง ๆ ในน้ำเลี้ยงเซลล์ เช่นเดียวกับงานของ Barber (1973) และ Huntsman (อ้างตาม Jackson and Morgan, 1978) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของคีเลเตอร์ต่อแพลงก์ตอนพืชพบว่า ถ้ามีการเพิ่มความเข้มข้นของคีเลเตอร์ในปริมาณมาก เช่น ที่ระดับ 10^{-4} โมลาร์ EDTA จะส่งผลให้อัตราการเจริญของเซลล์ลดลง อันเป็นสาเหตุมาจากการที่ระดับของอิออนอิสระของโลหะมีปริมาณลดลง

4. ผลของความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อย

เมื่อทดสอบผลของความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิดร่วมกัน ได้แก่ Zn, Mn, Mo, Co และ Cu ที่ระดับอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อยเท่ากับ 2:1 โดยเปรียบเทียบอัตราการเจริญของ P. micans เมื่อแปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิดไปพร้อม ๆ กัน โดยเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า, 4 เท่า, 6 เท่า, 8 เท่า และ 10 เท่า ของปริมาณความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยเดิมตามสูตรอาหาร modified T1 โดยมีชุดการทดลองที่น้ำเลี้ยงเซลล์เพิ่มสารอาหารตามสูตร modified T1 เป็นชุดทดลองควบคุม จากผลการทดลองพบว่าการทดลองที่น้ำเลี้ยงเซลล์มีการเพิ่มสารอาหาร และแปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 6 ระดับนั้น P. micans มีการเจริญดีและมีแนวโน้มของการเจริญใกล้เคียงกันมาก เมื่อพิจารณาจากค่าอัตราการเจริญของเซลล์ จะพบว่าจากผลการทดลองเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของธาตุปริมาณน้อยทั้ง 6 ระดับ ค่าอัตราการเจริญไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาจากแนวโน้มของการเจริญ จะพบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้อัตราการเจริญของเซลล์มีแนวโน้มลดลง จากผลการทดลองที่ได้นี้พอจะกล่าวได้ว่าการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยทั้ง 5 ชนิดไปพร้อม ๆ กันโดยเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า, 4 เท่า, 6 เท่า, 8 เท่าและ 10 เท่า จากปริมาณความเข้มข้นที่เตรียม

ตามสูตรอาหาร modified T1 ที่ระดับอัตราส่วน EDTA ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อย เท่ากับ 2:1 นั้น P. micans จะให้ผลการเจริญไม่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นในการทดลองนี้จึงพอจะสรุปได้ว่า ปริมาณความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อย ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ P. micans เท่ากับปริมาณความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อยที่เตรียมตามสูตรอาหาร modified T1 เมื่อระดับอัตราส่วนของ EDTA ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อยเท่ากับ 2:1

จากผลการทดลองในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการแปรผันระดับความเข้มข้นของธาตุโลหะทุก ๆ ตัวไปพร้อม ๆ กันนั้น ในช่วงระดับความเข้มข้นมากขึ้นจาก 2 เท่าจนถึง 10 เท่านั้น P. micans แสดงการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน จากวิธีในการเตรียมสารละลายในส่วนขององค์ประกอบ Mixed trace metal solution เพื่อทำการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของธาตุโลหะปริมาณน้อย ปริมาณความเข้มข้นของ EDTA ที่ใส่ลงไปก็จะมากขึ้นตามไปด้วย แต่ก็ยังคงเป็นอัตราส่วนคคีเลเตอร์ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะเท่ากับ 2:1 และธาตุโลหะปริมาณน้อยทุกตัวที่เพิ่มขึ้นในลักษณะปริมาณความเข้มข้นเป็นอัตราส่วนเดิม การแปรผันปริมาณความเข้มข้นของธาตุโลหะในการทดลองนี้จึงเป็นการเพิ่มธาตุอาหารให้มากขึ้นแต่รักษาอัตราส่วนเดิมของธาตุต่าง ๆ ไว้ การที่ปริมาณธาตุอาหารในส่วน Mixed trace metal solution มีปริมาณความเข้มข้นมากขึ้นแต่อัตราส่วนต่าง ๆ ของธาตุยังคงเดิม อาจจะไปมีผลในการเร่งปฏิกิริยาได้รวดเร็วขึ้นแต่สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากปฏิกิริยาก็ยังคงเกิดขึ้นได้ในอัตราส่วนเดิม เสมือนว่าในส่วนประกอบของน้ำเลี้ยงจะมีปริมาณของรูปแบบของธาตุโลหะที่ P. micans สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ (chelate-metal) เพิ่มมากขึ้นซึ่งก็ควรจะส่งผลให้การเจริญของ P. micans มีอัตราการเจริญมากขึ้น แต่จากผลการทดลองแสดงออกมาให้เห็นว่า P. micans ให้ผลการเจริญไม่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากเหตุผลที่ว่า ในการทดลองครั้งนี้ P. micans ถูกเลี้ยงอยู่ในสภาพที่ธาตุอาหารที่ใช้ในการเจริญมีมากเกินพอ (overnutrition) เซลล์ P. micans จึงไม่ได้แสดงความแตกต่างในการเจริญให้เห็น จากหลักการในการสร้างสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เพิ่มลงในน้ำทะเลสังเคราะห์ในการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างธาตุโลหะปริมาณน้อยกับแพลงก์ตอนพืช เช่น สูตร Aquil และ Fraquil จะประกอบไปด้วย major sea water salts, วิตามิน (องค์ประกอบเช่นเดียวกับที่เตรียมตามสูตรอาหาร medium f/2) ธาตุอาหารหลัก และธาตุโลหะปริมาณน้อยของสูตรอาหารมาตรฐานทั่วไป โดยการเจือจางระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารและธาตุโลหะปริมาณน้อยให้ต่ำกว่าระดับปกติ เช่น f/40 การเตรียมความเข้มข้นของธาตุโลหะและ

ธาตุอาหารหลักให้มีปริมาณความเข้มข้นต่ำ ๆ มีวัตถุประสงค์คือ เพื่อลดโอกาสในการเกิดการตกตะกอนของสารประกอบในน้ำทะเล และเพื่อเป็นการเลียนแบบระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารและธาตุโลหะต่าง ๆ ที่พบในน้ำทะเลธรรมชาติ (Morel, Westall, Rueter และ Chaplick, 1975)

อีประการหนึ่ง ในสภาพที่น้ำทะเลมีความเค็มสูง ธาตุโลหะปริมาณน้อยเมื่อละลายน้ำจะอยู่ในสภาพของอิออน อิออนของธาตุโลหะปริมาณน้อยสามารถเกิด ion-pairs กับ major anion ในน้ำทะเลเช่น hydroxide, carbonate, chloride หรือ sulfate เป็นต้น (Morel และ Morel-Leurens, 1983) เป็นผลให้อิออนอิสระของธาตุโลหะเหลือจำนวนน้อยในการที่จะรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับคีเลเตอร์เพื่อที่แพลงตอนพืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญ หรือแสดงความเป็นพิษต่อแพลงตอนพืช เมื่อธาตุโลหะเหล่านั้นอยู่ในรูปแบบของอิออนอิสระ จึงเป็นปรากฏการณ์ที่จะไปมีอิทธิพลส่งผลให้การทดลองครั้งนี้ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน ประการสุดท้ายที่ควรพิจารณาคือธาตุโลหะปริมาณน้อยอาจเกิดปรากฏการณ์ synergistic และ antagonistic ระหว่างธาตุโลหะด้วยกันเองเมื่อเกิดปฏิกริยาพร้อมกัน (Morell และ Morell-Laurens, 1983) จะส่งผลต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารประกอบคีเลเตอร์ ซึ่งจะเกิดเหตุการณ์ที่ว่าธาตุโลหะทั้งสองชนิดจึงเกิดเป็น synergism ในกรณีที่ธาตุโลหะนั้นแสดงความเป็นพิษต่อแพลงก์ตอนพืชทั้งคู่ และจะเกิด antagonism ในกรณีที่ธาตุโลหะตัวใดตัวหนึ่งเป็นพิษเท่านั้น เช่น การศึกษาของ Rueter และ Morell (1981) พบว่าจะเกิดปรากฏการณ์ antagonistic effect ระหว่างธาตุสังกะสีและทองแดง และส่งผลกระทบต่อการดูดซึมกรดซิลิอิคของไดอะตอมชนิด Thalassiosira pseudonana โดยทำให้ดูดซึมได้น้อยลง

5. ผลของซิลิเนียม

เพื่อทดสอบผลของธาตุเซเลเนียมต่อการเจริญของ P. micans โดยเปรียบเทียบอัตราการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารละลาย H_2SeO_3 ความเข้มข้น 10 นาโนโมลาร์ ร่วมกับสารอาหาร modified T1 ทั้งที่ระดับอัตราส่วนของคีเลเตอร์ต่อปริมาณรวมของธาตุโลหะปริมาณน้อย 2:1 และ 3:1 จากผลการทดลองจะพบว่าชุดการทดลองที่น้ำเลี้ยงเซลล์เพิ่มสารอาหารสูตร modified T1 ทั้งที่ระดับอัตราส่วนของ chelate metal

mole ratio เท่ากับ 2:1 และ 3:1 โดยแปรผันการใส่และไม่ใส่สารละลาย H_2SeO_3 นั้น จะพบว่า P. micans มีการเจริญดีและมีแนวโน้มของการเจริญอยู่ในระดับใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาจากค่าอัตราการเจริญพบว่า P. micans มีค่าอัตราการเจริญเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงพอสรุปได้ว่าสารละลาย H_2SeO_3 ความเข้มข้น 10 นาโนโมลาร์ ที่ใส่เพิ่มลงไปร่วมกับสารอาหารสูตร modified T1 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากน้ำทะเลธรรมชาติที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการอบความดันไอน้ำนั้นไม่มีผลต่อการเจริญของ P. micans ซึ่งการศึกษาของ Linstrom และ Rodhe (1978; อ้างตาม Taylor และ Pollingber,1987) พบว่าธาตุซิลิเนียมที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 50 นาโนกรัมต่อลิตรจะเป็นปัจจัยในการจำกัดการเจริญของ Peridinium cinctum และสอดคล้องกับการศึกษาของ Patrica et al. (1975; อ้างตาม Taylor และ Poolingber,1983) พบว่า Selenite ทั้งที่ระดับความเข้มข้น 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีผลทำให้ชุมชนของ ไดอะตอมประกอบไปด้วยความหลากหลายของชนิดและมีมวลชีวภาพสูง แต่ที่ความเข้มข้น 20-40 มิลลิกรัมต่อลิตรจะส่งผลให้ชุมชนของไดอะตอมมีจำนวนชนิดน้อยลงและในขณะเดียวกันที่ระดับความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตรนี้จะมีผลทำให้อัตราการเจริญของเซลล์ลดลงด้วย และธาตุซิลิเนียมในรูปแบบของ selenate ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีความเป็นพิษต่อไดอะตอม แต่ Ishimaru et al. (1987) ได้พบว่าสารละลาย H_2SeO_3 ที่ระดับครึ่งความเข้มข้นอิ่มตัวคงที่เท่ากับ 0.075 นาโนโมล่าร์จะกระตุ้นการเจริญของ Gymnodinium nagasakiense ให้มีปริมาณความหนาแน่นและอัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

ผลจากการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าธาตุซิลิเนียมในรูปของสารละลาย H_2SeO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 10 นาโนโมลาร์ที่ใส่ลงไปร่วมกับสารอาหารสูตร modified T1 โดยที่ระดับความเข้มข้น 10 นาโนโมลาร์นี้เป็นระดับความเข้มข้นที่ใช้ในสูตรอาหาร "K" medium (ตารางที่ 15) และแปรผันโดยการใส่และไม่ใส่สารละลาย H_2SeO_3 P. micans ให้ผลการเจริญไม่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าระดับความเข้มข้น H_2SeO_3 10 นาโนโมล่าร์เป็นระดับความเข้มข้นที่เพิ่มลงไปน้อยมากในสภาพที่น้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีสารอาหารสูตร modified T1 อยู่แล้ว (riched medium) เป็นผลให้บทบาทของซิลิเนียมไม่แสดงความแตกต่างออกมาให้เห็น

สารละลาย H_2SeO_3 เมื่อละลายอยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์แล้วอาจจะอยู่ในรูปแบบที่

แพลงตอนพืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญ (selenite)น้อยกว่ารูปแบบที่แพลงตอนพืชไม่สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ (selenate) ซึ่งจากการรายงานของ Bruland (1983) พบว่าธาตุซิลิเนียม เป็นธาตุโลหะปริมาณน้อยชนิดเดียวที่มีพฤติกรรมที่แปลก คือ มีรายงานว่าพบรูปแบบของ oxidation stage ทั้งรูปแบบ selenite และ selenate ในปริมาณความเข้มข้นเท่า ๆ กัน ซึ่ง Lindstrom (1985; อ้างตาม Ishimaru et al., 1987) ได้รายงานไว้ว่า selenate จะเป็นสาเหตุให้ Peridinium cinctum ใช้เวลาในการเจริญในระยะ lag period นานถึง 15-20 วัน

ถึงแม้ว่าธาตุซิลิเนียมจะมีรายงานว่า เป็นธาตุที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของแพลงตอนพืชหลาย ๆ ชนิด เช่น Peridinium cinctum , Chrysochromulina breviturrita และ Thalassiosira pseudonana แต่บทบาทของซิลิเนียมที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์จะมีลักษณะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของแพลงตอนพืช (Wheeler et al., 1982; อ้างตาม Ishimaru, T., T. Takeuchi, Y. Fukuyo, and M. Kodama ยังไม่ได้ตีพิมพ์) และยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับบทบาทของซิลิเนียมต่อการเจริญของ P. micans จึงอาจจะเป็นไปได้ว่า P. micans ไม่ต้องการธาตุซิลิเนียมในการเจริญ