รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแช่แข็งหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กสำหรับฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเชิงพาณิชย์

Microalgae stock cryopreservation for hatchery

ชลี ไพบูลย์กิจกุล มะลิวัลย์ คุตะโค รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ
และ เบ็ญจมาศ ไพบูลย์กิจกุล

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10803003
สัญญาเลขที่ 40/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแช่แข็งหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กสำหรับฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเชิงพาณิชย์

Microalgae stock cryopreservation for hatchery

หัวหน้าโครงการวิจัย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชลี ไพบูลย์กิจกุล

ผู้ร่วมโครงการวิจัย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะลิวัลย์ คุตะโค
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบ็ญจมาศ ไพบูลย์กิจกุล

คณะเทคโนโลยีทางทะเล
มหาวิทยาบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี
ตุลาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 40/2559

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนและช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากคณะเทคโนโลยีทางทะเล ทำให้การวิจัยดำเนินไปได้อย่างราบรื่น คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ คุณศศิษา ฉิมพลี เจ้าหน้าที่คณะเทคโนโลยีทางทะเล ที่ให้ความสะดวกด้านอุปกรณ์เครื่องมือ และสารเคมีในการทำวิจัย ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา จนทำให้งานวิจัยสำเร็จอย่างดี ขอขอบคุณ คุณชุภาดา ธนาพาณิชย์ ผู้ช่วยวิจัย ที่ช่วยให้โครงการวิจัยดำเนินการจนสำเร็จ

ชลี ไพบูลย์กิจกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย ฯ
พฤษภาคม 2560

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชนิดสาหร่ายขนาดเล็ก ชนิดสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลา คีโตเซอรอส และเตตราเซลมิส ที่ความเค็ม 30 ppt ด้วยอาหารสูตร Guillard's medium จากนั้นเก็บรวบรวมเซลล์และเติมสารละลายป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง 2 ชนิด ได้แก่ กลีเซอรอล และ DMSO ที่ความเข้มข้น 5% นำไปลดอุณหภูมิแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายทำการละลาย ล้างเซลล์แล้วนำไปเพาะเลี้ยง ทำการคำนวณอัตราการรอดของสาหร่าย

ผลการศึกษาพบว่ามีปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างชนิดสาหร่าย และชนิดสารละลายป้องกันการแช่แข็ง คลอเรลลามีอัตรารอดสูงที่สุดเมื่อทำการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO เมื่อพิจารณาการเก็บสาหร่ายแช่แข็งด้วยสารละลายกลีเซอรอลพบว่า คลอเรลลามีอัตรารอดมากที่สุด รองลงมาได้แก่ เตตราเซลมิส และ คีโตเซอรอส ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการเก็บรักษาสาหร่ายแช่แข็งตามชนิดของสาหร่ายพบว่า คลอเรลลาที่เก็บรักษาด้วยสารละลาย DMSO มีอัตรารอดสูงกว่าคลอเรลลาที่เก็บรักษาด้วยสารละลายกลีเซอรอล อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เตตราเซลมิสที่เก็บรักษาด้วยสารละลายกลีเซอรอล มีอัตรารอดสูงกว่าเตตราเซลมิสที่เก็บรักษาด้วยสารละลาย DMSO อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่คีโตเซอรอสมีอัตรารอดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง ทำการเลือกชนิดสารละลายป้องกันการแช่แข็งที่สาหร่ายแต่ละชนิดมีอัตรารอดสูง เลือกสารละลาย DMSO สำหรับสาหร่ายคลอเรลลา และเลือกสารละลายกลีเซอรอลสำหรับเตตราเซลมิส และ คีโตเซอรอส ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่เหมาะสม ทำการเปลี่ยนระดับความเข้มข้นของสารละลายป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง 2 ระดับ คือ 5 และ 10% ทำการทดลอง เก็บข้อมูล และวิเคราะห์ผลการทดลองเหมือนการทดลองที่ 1

ผลการศึกษาพบว่าคลอเรลลาที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลาย DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5% มีอัตรารอดของเซลล์สาหร่ายสูงกว่าการเก็บรักษาเซลล์ที่ระดับ 10% อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เตตราเซลมิสที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 5% มีอัตรารอดของเซลล์สาหร่ายมากกว่าการเก็บรักษาเซลล์ที่ระดับ 10% อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คีโตเซอรอสที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10% มีอัตรารอดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

คำสำคัญ: ความเข้มข้น, สารละลายแช่แข็ง, คลอเรลลา, การเก็บรักษาสายพันธุ์ด้วยการแช่แข็ง

Abstract

This study had two experiments. The first experiment was to investigate the effect of algal species and cryoprotectant on the viability of cryopreservation. Three microalgae including *Chlorella* sp., *Chaetoceros* sp. and *Tetraselmis* sp. were cultured with 30 ppt Guillard's medium. The microalgal cell was collected, and 5% of two cryoprotectants consisting of dimethyl sulfoxide (DMSO), and glycerol was added. Then, the temperature of the sample was reduced and freeze at 20 degree Celsius for three days. The microalgae were thawed and washed the cells when due to storage time. The recovery microalgae were cultured and calculated the viability of the cell.

The result showed the interaction between algal species and cryoprotectant. *Chlorella* preserved with DMSO was the highest viability rate. *Chlorella* was the greatest viability rate and the next was *Tetraselmis* and *Chaetoceros* when preserved microalgae with glycerol. When considering as species of microalgae, *Chlorella* preserved with DMSO had significantly higher viability rate ($P<0.05$) than those preserved with glycerol. *Tetraselmis* preserved with glycerol had significantly greater viability rate ($P<0.05$) than those preserved with DMSO. The viability rate of *Chaetoceros* was not significantly different when preserved in both solutions.

The second experiment examined the concentration of cryoprotectant on viability rate of cryopreservation. The cryoprotectant type in each microalga that had the highest viability rate was select. DMSO was used for *Chlorella* and glycerol was adopted for *Tetraselmis* and *Chaetoceros*. Two levels of cryoprotectant, 5 and 10 percent had applied. The experiment operation, data collection, and data analysis followed by the first experiment.

The result illustrated that *Chlorella* and *Tetraselmis* that preserved with 5 percent DMSO and glycerol, respectively, had significantly larger viability rate ($P<0.05$) than those preserved with 10 percent cryoprotectants. *Chaetoceros* preserved with 5 and 10 percent glycerol were not significantly different ($P>0.05$).

Key words: concentration, cryoprotectant, chlorella, cryopreservation

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ ก

บทคัดย่อภาษาไทย ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ค

สารบัญ ง

สารบัญภาพ ฉ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย 8

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 9

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย 10

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของชนิดสาหร่ายขนาดเล็ก ชนิดสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง 10

การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง 12

บทที่ 3 ผลการวิจัย 14

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของชนิดสาหร่ายขนาดเล็ก ชนิดสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง 14

การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง 19

บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย 23

สรุปผลการทดลอง 25

ข้อเสนอแนะ 25

คุณค่าและประโยชน์ของผลผลิตการวิจัย 25

แนวทางการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ และ/หรือพัฒนาต่อยอด 25

ผลผลิต (Output) 26

บทความวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ 26

รายงานการเงิน 33

บรรณานุกรม 34

ภาคผนวก 35

ภาคผนวก ก 37

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติการทดลองที่1 37

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติการทดลองที่2 42

ประวัติผู้วิจัย 45

สารบัญภาพ

1-1	ระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก	4
3-1	อัตรารอดของสาหร่าย 3 ชนิดที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลาย DMSO	15
3-2	อัตรารอดของสาหร่าย 3 ชนิดที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอล	16
3-3	อัตรารอดของคลอเรลลาที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วย DMSO และ Glycerol	17
3-4	อัตรารอดของคีโตเซอรอสที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วย DMSO และ Glycerol	18
3-5	อัตรารอดของเตตราเซลมิสที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วย DMSO และ Glycerol	19
3-6	อัตรารอดของคลอเรลลาที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์	20
3-7	อัตรารอดของคีโตเซอรอสที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์	21
3-8	อัตรารอดของเตตราเซลมิสที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์	22

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ประสบความสำเร็จ สามารถผลิตผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำส่งออกได้ปริมาณมากในแต่ละปีนั้น เกิดจากการประสบความสำเร็จในการจัดการพ่อแม่พันธุ์สัตว์น้ำ และการเพาะเลี้ยงลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน ในการเพาะเลี้ยงอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยเฉพาะกุ้งขาว การจัดการด้านอาหารที่มีชีวิตในช่วงลูกกุ้งอยู่ในระยะวัยอ่อนเป็นสิ่งที่สำคัญ อาหารที่ลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนกินส่วนใหญ่ได้แก่ สาหร่ายขนาดเล็ก และแพลงก์ตอนสัตว์ ในการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจำเป็นต้องใช้หัวเชื้อที่มีคุณภาพดี ปราศจากสิ่งมีชีวิตปนเปื้อน

การเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายด้วยวิธีการแช่แข็ง สามารถทำได้ และประสบความสำเร็จหลายสายพันธุ์ (Bodas et al., 1995; Day et al., 2005) แต่มีหลายปัจจัยที่ทำให้การแช่แข็งสาหร่ายขนาดเล็กประสบความสำเร็จ ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของสารช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant) ชนิดของสายพันธุ์สาหร่ายที่นำมาแช่แข็ง (Canavate and Lubian, 1995; Taylor and Fletcher, 1999) เทคนิคในการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็ง เทคนิคในการเพิ่มอุณหภูมิในการละลายอุณหภูมิในการแช่แข็ง และระยะเวลาในการแช่แข็ง เป็นต้น (Day et al., 1997; Day and Brand, 2005) ปัจจัยต่าง ๆ ควรได้รับการศึกษากับสาหร่ายขนาดเล็กที่มีการเพาะเลี้ยงในประเทศไทย เพื่อให้ฟาร์มเอกชน เกษตรกร หรือหน่วยงานรัฐบาลที่เกี่ยวข้องสามารถพัฒนาเทคนิค นำไปประยุกต์ในการจัดการรักษาสายพันธุ์สาหร่ายของตนเอง เพื่อเพิ่มศักยภาพในการแข่งขัน เพิ่มศักยภาพในการผลิต ลดต้นทุน และภาระต่าง ๆ ในการจัดการสายพันธุ์สาหร่าย

ตามปกติการเก็บรักษาพันธุ์สาหร่ายด้วยการแช่แข็งย่อมส่งผลกระทบต่อความแข็งแรง และอัตรารอดของสาหร่ายโดยตรง การเก็บรักษาเซลล์ด้วยการแช่แข็งอาจทำให้เซลล์ได้รับบาดเจ็บหรือเสียชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาเซลล์ การเก็บรักษาเซลล์บางชนิดจะต้องมีช่วงเวลาที่ต้องนำเซลล์สาหร่ายมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

ข้อดี-ข้อเสียของการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายด้วยการแช่แข็ง

ข้อดี

1. สามารถช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรมของสาหร่าย ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ระยะยาว
2. ช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตอื่น โดยเฉพาะแบคทีเรีย รวมถึงป้องกันการผิดพลาดจากการจัดการ และการเพาะเลี้ยง
3. ใช้พื้นที่ในการเก็บรักษาสายพันธุ์น้อย
4. ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาสายพันธุ์ระยะยาว วิธีการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายจำนวนมาก

ข้อเสีย

1. ต้องมีการลงทุนเบื้องต้น ถ้าต้องการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายด้วยการแช่แข็ง ทั้งวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และการฝึกอบรม

2. ต้องมีระบบสำรองที่น่าเชื่อถือ สำหรับกรณีไฟฟ้าดับ

3. ถ้ามีการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -150 องศาเซลเซียส ต้องมีไนโตรเจนเหลวตลอดเวลา

4. ต้องมีการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายอย่างสม่ำเสมอ

การเก็บรักษาเซลล์

โดยทั่วไปมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เซลล์สาหร่ายมีชีวิตรอด สามารถนำไปใช้เป็นหัวเชื้อต่อสายพันธุ์ได้ สามารถเก็บรักษาสายพันธุ์ได้นาน มีคุณภาพดี ไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตอยู่ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การศึกษาเซลล์สามารถทำได้ดังนี้

1. การต่อหัวเชื้อ (subculture)

เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสม ในอุณหภูมิที่กำหนดไว้ เพื่อให้เซลล์สาหร่ายเจริญเติบโต เมื่อเซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตถึงระยะ late log phase ถึงระยะ stationary phase ต้องทำการ subculture เซลล์สาหร่ายลงในอาหารใหม่ที่เตรียมไว้เพื่อไม่ให้เซลล์สาหร่ายตายหมด ระยะเวลาในการต่อหัวเชื้อใหม่ ขึ้นกับสภาวะในการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย และ life cycle ของสาหร่ายแต่ละชนิด ข้อดีของวิธีการต่อหัวเชื้อ ได้แก่ สามารถทำได้ง่าย อุปกรณ์ที่ใช้ราคาถูก ใช้เครื่องมือไม่ซับซ้อน ส่วนข้อเสีย ได้แก่ ใช้แรงงานมาก สิ้นเปลืองเวลา เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของสิ่งมีชีวิตอื่น อาจมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมเมื่อมีการ subculture บ่อย

2. การทำแห้ง (drying)

เป็นวิธีการเก็บรักษาเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยการนำน้ำออกจากเซลล์ นิยมใช้ในการเก็บรักษาเชื้อราสาหร่ายที่สามารถสร้างสปอร์ได้ การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้สิ่งมีชีวิตจะต้องสามารถทนทานต่อความแห้งได้ขึ้นข้างสูง

3. การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying)

วิธีการนี้จะทำการระเหยน้ำออกจากเซลล์สาหร่ายที่ทำการแช่เยือกแข็ง โดยระบบสุญญากาศ น้ำในเซลล์จะถูกดึงออกโดยการระเหิด ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายได้ในปริมาณมากให้อยู่ในสภาพแห้งและแข็ง สามารถเก็บเซลล์สาหร่ายไว้ใช้ได้นาน ส่วนข้อเสียคือ ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง มีค่าใช้จ่ายสูง

4. การแช่แข็ง (freezing)

เป็นการทำให้ตัวอย่างเซลล์สาหร่ายกลายเป็นน้ำแข็ง โดยของเหลวภายในเซลล์จะกลายเป็นน้ำแข็ง อุณหภูมิที่ใช้สามารถใช้ได้หลายระดับตั้งแต่คุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียสถึงอุณหภูมิลบ -196 องศาเซลเซียส (ยุวดี และฉมาภรณ์, 2546) การแช่แข็งสาหร่ายจะมีการเติมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง เช่น DMSO หรือ กลีเซอรอล เพิ่มเพื่อช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์ได้รับอันตรายเมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำ จนน้ำภายในเซลล์กลายเป็นน้ำแข็ง ทำให้เซลล์สาหร่ายมีโอกาสรอดมากขึ้น

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการนำสาหร่ายในใช้ประโยชน์

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการนำสาหร่ายในใช้ประโยชน์หรือทำการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่าย ควรทำการเก็บรักษาสายพันธุ์ในช่วงระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อเข้าสู่ระยะ late log phase โดยระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายมีระยะต่าง ๆ (ภาพที่ 1-1) ดังนี้

1. ระยะ lag phase

ระยะนี้สาหร่ายขนาดเล็กกำลังปรับตัวทางสรีรวิทยาเพื่อการเจริญเติบโต ปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ อาหารใหม่ การเจริญเติบโตยังช้า

2. ระยะ log phase

ระยะนี้สาหร่ายขนาดเล็กปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมได้แล้ว มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนอย่างทวีคูณ ระยะนี้อาจเรียกว่า exponential phase ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กต่อเวลาจะมีค่าสูงสุด (Vonshak, 1986)

3. ระยะ late log phase หรือ diminishing growth phase

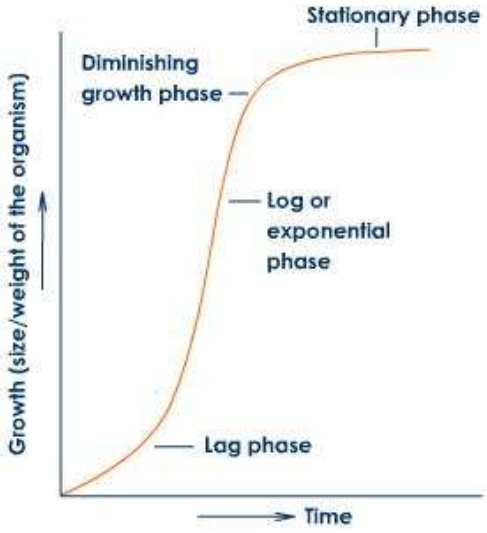
ระยะนี้เป็นช่วงปลายระยะ log phase เรียกอีกอย่างว่าระยะ declining phase อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กจะลดลง เนื่องจากปัจจัยบางปัจจัยมีผลในการจำกัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก เช่น แสง pH สารอาหาร ปริมาณกาซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือปัจจัยอื่น ๆ

4. ระยะ stationary phase

ระยะนี้เป็นระยะที่สาหร่ายขนาดเล็กมีจำนวนคงที่อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ใหม่เท่ากับอัตราการตาย อาหารที่อยู่ในระบบมีจำนวนลดลง มีการสะสมของเสียในระบบมากขึ้น

5. ระยะ death phase

ระยะนี้จำนวนสาหร่ายขนาดเล็กลดลง อัตราการเพิ่มขึ้นของเซลล์ใหม่น้อยกว่าอัตราการตาย เนื่องจากปัจจัยบางอย่างที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กมีผลต่อการจำกัดการเจริญเติบโต เช่น การขาดสารอาหาร คุณภาพน้ำไม่เหมาะสม



[1]

ภาพที่ 1-1 ระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก

การเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายโดยทั่วไป จะทำการเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเหลว หรืออาหารแข็ง ซึ่งวิธีการดังกล่าวต้องสิ้นเปลืองแรงงาน พื้นที่ พลังงาน ตลอดจนสารเคมีต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้มีการพัฒนาการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายด้วยวิธีการแช่แข็ง เพื่อให้สามารถเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายได้นานยิ่งขึ้น ลดปัญหาด้านพื้นที่ แรงงาน การสิ้นเปลืองพลังงานและสารเคมีต่างๆ สะดวกในการจัดการสายพันธุ์สาหร่าย

การเก็บรักษาพันธุ์สาหร่ายด้วยวิธีการแช่แข็งเป็นการนำสาหร่ายขนาดเล็กที่มีชีวิตมาทำการแช่แข็งเซลล์ให้อยู่ในสภาพเป็นน้ำแข็ง เมื่อต้องการใช้สาหร่ายเหล่านั้นก็จะทำการละลายเซลล์และนำเซลล์สาหร่ายมาเลี้ยงเพื่อขยายจำนวน ในการแช่แข็งสิ่งมีชีวิตทั่วไป สิ่งมีชีวิตจะตายเนื่องจาก cell membrane เกิดการฉีกขาด เพราะน้ำในเซลล์เกิดการขยายตัวจากการเกิดภาวะแข็งตัวของน้ำในเซลล์ แต่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กบางชนิดสามารถรอดจากการเกิดภาวะฉีกขาดของ cell membrane ได้ด้วยการใช้สารที่ช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant) และเทคนิคต่าง ๆ ในการลดอุณหภูมิก่อนเกิดการแข็งตัวของน้ำภายในเซลล์ รวมถึงชนิดและความเข้มข้นของสารที่ช่วยป้องกันการเกิดน้ำแข็ง ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้มีผลต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กเมื่อมีการเก็บรักษาเซลล์ด้วยการแช่แข็ง

การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาสาหร่ายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีการแช่แข็ง จะช่วยให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงลูกพันธุ์สัตว์น้ำสามารถนำไปประยุกต์ใช้เก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายที่เป็นอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนได้โดยตรง ลดภาระค่าใช้จ่ายในการจัดการอาหารสัตว์น้ำ ลดค่าใช้จ่ายในการจัดการพันธุ์สาหร่าย เพิ่มศักยภาพการแข่งขันในการประกอบธุรกิจ ลดการพึ่งพาองค์กรภายนอกทำให้สามารถจัดการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การแช่แข็งสาหร่ายขนาดเล็ก (algal cryopreservation) มีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการดำเนินการ เช่น ชนิดของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant) (Tzovenis et al., 2004; Gwo et al., 2005; Iwamoto et al., 2012) ความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง

[1] http://images.tutorvista.com/content/plant-growth-movements/growth-curve.jpeg

(Tanniou et al., 2012) ชนิดหรือสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กเทคนิคการลดอุณหภูมิในระหว่างการแช่แข็ง (Morris, 1978; Guermazi et al., 2010) ระยะเวลาหรือความยาวนานในการแช่แข็งสาหร่ายขนาดเล็ก และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายแช่แข็ง

ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์สาหร่าย

การเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายสามารถทำได้หลายวิธีแตกต่างกันตามชนิดของสาหร่าย และระยะเวลาการเก็บรักษารวมถึงปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการรอดของเซลล์สาหร่าย ได้แก่

1. อายุของเซลล์สาหร่าย (age of culture)

เซลล์สาหร่ายที่อยู่ในระยะ log phase มีการแบ่งเซลล์แบบเพิ่มจำนวนทวีคูณ จะมีความไวต่อการถูกทำลายด้วยผลึกน้ำแข็งในการแช่เยือกแข็งมากกว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะ stationary phase หรือเซลล์ที่อยู่ในระยะคงที่ เนื่องจากการเจริญเติบโตของเซลล์ระยะคงที่ถูกจำกัดด้วยอาหารและปัจจัยทางกายภาพ ทำไมเซลล์มีการสะสมไขมันในปริมาณที่สูงกว่าเซลล์สาหร่ายที่อยู่ในระยะ log phase

2. อุณหภูมิในการเจริญเติบโต (growth temperature)

สาหร่ายทั้งสาหร่ายน้ำจืดและสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก สามารถทนทานต่อการแช่เยือกแข็งในเพิ่มขึ้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายที่อุณหภูมิต่ำก่อนนำไปเก็บรักษาสายพันธุ์โดยการแช่แข็ง

3. ปัจจัยจำกัดด้านอาหาร (nutritinal limitation)

การลดการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย โดยการจำกัดอาหารในการเพาะเลี้ยง จะทำให้เซลล์สาหร่ายมีความทนทานต่อการแช่แข็งมากขึ้น การลดปริมาณไนเตรทและไบคาร์บอเนตจะช่วยกระตุ้นให้เซลล์สาหร่ายมีความต้านทานต่อการแช่เยือกแข็งสูงขึ้น

4. สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotective agents)

สารกลุ่มนี้จะช่วยลดอัตราการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์สาหร่าย ลดอัตราการทำลายเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษาเซลล์ด้วยการแช่เยือกแข็ง สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่นิยมใช้มีหลายชนิด ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO) และ กลีเซอรอล (glycerol) เป็นต้น

5. การช็อคด้วยความเย็น (cold shock)

การลดความเย็นอย่างรวดเร็วมีผลทำให้เซลล์สาหร่ายหลายชนิดถูกทำลาย ถ้าต้องการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายในเซลล์สาหร่ายที่มีความไวต่อการถูกทำลายโดยการลดความเย็นอย่างรวดเร็ว ควรทำการลดอุณหภูมิให้เย็นลงอย่างช้า ๆ เพื่อป้องกันเซลล์สาหร่ายถูกทำลาย และควรเลือกใช้เซลล์สาหร่ายในระยะ stationary phase

6. อัตราการลดอุณหภูมิ (cooling rate)

อัตราการลดอุณหภูมิมีผลโดยตรงต่ออัตรารอดของเซลล์สาหร่าย การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในเซลล์สาหร่ายบางชนิดจะทำให้อัตราการรอดลดลง เซลล์สาหร่ายโดยทั่วไปจะมีอัตราการรอดสูงขึ้นเมื่อใช้ความเย็นอยู่ในช่วง 0.25 ถึง 16 องศาเซลเซียสต่อนาที

7. อัตราการละลายน้ำแข็ง (thawing rate)

อัตราการละลายน้ำแข็งมีผลโดยตรงต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่าย การละลายน้ำแข็งอย่างรวดเร็วอาจทำให้ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในระหว่างการแช่แข็งละลายลง มีผลทำให้ผนังเซลล์สาหร่ายเกิดความ

เสียหาย ทำให้เซลล์สาหร่ายมีอัตรารอดต่ำลง

สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotective agents)

ลักษณะการเกิดผลึกน้ำแข็งในสารละลายที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอัตราการให้ความเย็น และมีผลต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายภายหลังจากการแช่แข็ง การแช่แข็งส่งผลกระทบต่อไลโปโซม เนื่องจากในระหว่างการแช่แข็งมีการก่อตัวของน้ำแข็งขึ้นอาจส่งผลกระทบทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อไลโปโซม (Nakhla et al., 2002) โดยสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งช่วยกดจุดเยือกแข็งของของเหลวให้การเก็บรักษาเซลล์โดยการแช่แข็ง ทำให้อัตราการเกิดน้ำแข็งช้าลง และเกิดผลึกน้ำแข็งที่อุณหภูมิต่ำลง อัตราการให้ความเย็นและการเกิดผลึกน้ำแข็งในระหว่างการแช่แข็งส่งผลทำให้เซลล์สาหร่ายได้รับความเสียหาย โดยกลไกของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง จะสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของสารนั้น โดยทั่วไปสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ดีจะต้องมีหมู่ไฮโดรคาร์บอนอยู่ในโมเลกุลด้วยมากกว่าหรือเท่ากับสามหมู่ สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งมีหลายกลุ่มสามารถแบ่งกลุ่มของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งได้จากการลดจุดเยือกแข็ง หรือสารที่เคลือบเซลล์ตามคุณสมบัติความเป็นกรดเป็นเบส การเป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) และสามารถแบ่งได้จากขนาดโมเลกุลของสาร (สมบูรณ์, 2553)

1. สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกกรด (acidic monomers) เช่น glutamte, asparagine, malate และ aspartate
2. สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกเป็นกลาง (neutral monomers) เช่น glycerol, glucose, lactose, sucrose, raffinose, sorbitol, xylitol, inosital และ DL-threonine
3. สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกเบส(basic monomers) เช่น lysine และ arginine
4. สารประกอบจำพวกโพลิเมอร์และอนุพันธ์ เช่น albummin, gelatin, mucin, peptone, dextrin, pectin, dextran, polyvinylpyrrolidone, carboxymethylœllulose และ phecol
5. สารประกอบธรรมชาติ (natural substances) เช่น หางนม และซีรัม
6. สารประกอบจำพวกรีดิวซ์ (reducting agents) เช่น ascorbate, cysteine, hydroxylamine และ semicarbazide

สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่นิยมใช้ในการเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย

สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่นิยมใช้ในการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายได้แก่ กลีเซอรอล (glycerol), dimethyl sulfoxide (DMSO) และ methanol (Hubalek, 2003)

1. กลีเซอรอล (glycerol)

กลีเซอรอลมีชื่อทางเคมีว่า 1,2,3 Propanetriol หรือเรียกอีกอย่างว่ากลีเซอรีน (glycerine) กลีเซอรอลมีความหวานตามธรรมชาติ แต่มีคุณสมบัติแตกต่างจากน้ำตาล กลีเซอรอลสามารถสกัดน้ำมันพืชและไขมันจากสัตว์ในรูปของ esther โดยกลีเซอรอลบริสุทธิ์มีสูตรโครงสร้าง CH_2OH-CHOH-CH_2OH ลักษณะภายนอกเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีความข้น มีจุดหลอมเหลว (melting point) ที่อุณหภูมิ 17.18 องศาเซลเซียส มีจุดเดือด (boiling point) ที่อุณหภูมิ 290 องศาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.261 และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 92.09 กลีเซอรอลเป็นสารประเภท trihydric alcohol เนื่องจาก

โครงสร้างมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ทำให้สามารถละลายได้ในน้ำและ alcohol คุณสมบัติที่สำคัญของกลีเซอรอล ได้แก่

- กลีเซอรอลไม่สามารถถูกออกซิไดซ์ได้จึงมีความคงตัวสูง (high stability)
- ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสีรส และกลิ่น เมื่อถูกเก็บเป็นเวลานาน
- สามารถเกิดสภาวะ supercool ได้และทนต่อสภาวะการการแช่เยือกแข็ง และการละลาย
- มีความดันไอต่ำ และไม่ระเหยที่อุณหภูมิปกติ เป็นสารที่ไม่มีพิษต่อระบบการย่อยอาหาร ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน
- ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

ความเป็นพิษของกลีเซอรอลค่อนข้างต่ำ แต่มีแรงงานในสัตว์ทดลอง พบว่าการสูดดมกลีเซอรอลเข้าไป อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองระบบทางเดินหายใจ หรือทำให้ผิวหนังเสียความชุ่มชื้นได้ กระทบทางสิ่งแวดล้อม พบว่ากลีเซอรอลสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่าย มีผลกระทบต่อสัตว์น้ำในระดับต่ำ ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศ หากมีการใช้และการจัดการอย่างเหมาะสม

2. dimethyl sulfoxide (DMSO) มีสูตรทางเคมีคือ $(CH_3)_2SO$ ลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลว ไม่มีสี สามารถสลายตัวเมื่อได้รับความร้อนหรือการเผาไหม้ ทำให้เกิดควันพิษ มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 18.5 องศาเซลเซียส มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 189 องศาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.1 และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 78.1 ถ้ามีการสัมผัสสารในระยะยาวหรือได้รับสารซ้ำ บริเวณผิวหนังอาจก่อให้เกิดอาการอักเสบที่ผิวหนังได้ มีผลต่อตับและเลือด ทำให้การทำงานบกพร่อง ทำลายเม็ดเลือดแดง

3. methanol หรือเมทิลแอลกอฮอล์ มีสูตรโครงสร้างคือ CH_4O ลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวใสไม่มีสี มีกลิ่นเฉพาะตัว มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ -97.8 องศาเซลเซียส มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 64.6 องศาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.79 และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 32 หากมีการสัมผัสสารบ่อยหรือเป็นเวลานานจะทำให้ผิวหนังอักเสบ methanol สามารถดูดซึมผ่านผิวหนังได้มีผลทำให้ระบบประสาทส่วนกลางถูกกด ทำให้ปวดศีรษะ ง่วงนอน เวียนศีรษะ คลื่นไส้อาเจียน ปวดท้อง หากมีการสัมผัสสารปริมาณมากหากเกิดอาการโคม่าและเสียชีวิตได้ methanol ยังมีผลกระทบต่อการมองเห็น โดยอาการจะรุนแรงมากขึ้นเมื่อมีการสัมผัสสารถึงฉลา 12 ถึง 18 ชั่วโมง

4. ethylene glycol มีชื่อทางเคมีว่า 1,2-Ethanediol สูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $C_2H_6O_2$ ลักษณะทางกายภาพเป็นของของเหลวใส คล้ายน้ำมัน ไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ -13 องศาเซลเซียส จุดเดือดที่อุณหภูมิ 197.6 องศาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.1 และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 62.07 หากมีการสัมผัสสารเป็นระยะฉลานานหรือได้รับสารซ้ำ ๆ อาจก่อปัญหารุนแรงต่อตับ ไต เกิดอันตรายต่อสมองและทารกในครรภ์

5. propylene glycol มีชื่อทางเคมีว่า 1,2 -Propanediol สูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $CH_3CHOHCH_2OH$ ลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวหนืด ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ -59 องศาเซลเซียส มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 188.2 องศาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.04 และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 76.09 สารนี้สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้จากการสูดดมไอของสาร หรือการกิน

Tzovenis et al. (2004) ทำการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายด้วยการแช่แข็งพบว่า methanol ให้ผลดี

ต่อการเก็บรักษาสาหร่ายชนิด *Chlorella stigmatophora* และ *Dunaliella tertiolecta* ส่วน DMSO ช่วยให้สาหร่าย *Chlorella minutissima*, *Chlorella stigmatophora* รอดตายจากการแช่แข็งสาหร่ายได้ ขณะที่ *Dunaliella tertiolecta* มีอัตราการรอดได้ดีในสารละลาย 8% propylene glycol ส่วน *Nannochloropsis oculata* ควรเก็บรักษาเซลล์ใน glycerol (Gwo et al., 2005)

สาหร่ายขนาดเล็กที่ใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อนแต่ละชนิด หรือสายพันธุ์มีความสามารถในการทนต่อการเก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็งไม่เท่ากัน (Canavate and lubinn, 1995) *Chaetoceros gracilis, Tetraselmis chuii, Nannochloris atomus* และ *Nannochloropsis gaditana* ค่อนข้างทนต่อการแช่แข็ง ในขณะที่ *Rhodomonas baltica* และ *Isochrysis galbana* ไม่ค่อยทนทานต่อการแช่แข็ง

การเก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็งยังช่วยลดภาระการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งในสัตว์น้ำเศรษฐกิจและสัตว์น้ำสวยงามในระยะวัยอ่อนต้องพึ่งพาอาหารขนาดเล็ก ได้แก่ สาหร่ายขนาดเล็ก และแพลงก์ตอนสัตว์ ในปัจจุบันเกษตรกรที่ต้องการใช้สาหร่ายขนาดเล็ก เพื่อผลิตอาหารสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อน หรือแพลงก์ตอนสัตว์ไม่มีการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายเอง ต้องขอรับบริการจากหน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีการเก็บรักษาสายพันธุ์แบบเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง หรืออาหารเหลวต้องใช้ค่าใช้จ่ายในการจัดการค่อนข้างสูง ทั้งด้านสถานที่ แรงงาน พลังงาน สารเคมี และเวลาในการจัดการ

การลดภาระการจัดการการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายจะช่วยเพิ่มศักยภาพในการผลิตให้กับฟาร์มเอกชน ช่วยลดภาระงาน และงบประมาณให้กับหน่วยงานของรัฐบาลที่ต้องให้บริการจัดหาสายพันธุ์สาหร่ายให้กับเอกชน และเกษตรกรที่มาขอรับบริการ แนวทางในการลดภาระการจัดการการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายโดยทั่วไปคือ การยืดระยะเวลาในการเจริญเติบโตของสาหร่าย ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่ช้าลง เพื่อลดระยะเวลาในการ subculture ในกรณีที่มีการเก็บรักษาสายพันธุ์ด้วยการเลี้ยงในอาหารแข็งหรืออาหารเหลว หรือทำให้สาหร่ายหยุดการเจริญเติบโตโดยที่สาหร่ายไม่ตาย และเมื่อต้องการใช้สาหร่ายขนาดเล็กก็นำสาหร่ายกลับมาทำการเพาะเลี้ยงอีกครั้ง ซึ่งแนวทางในการหยุดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายได้แก่ การเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายด้วยวิธีการแช่แข็ง (Rhodes et al., 2006) การเกิดการปนเปื้อนของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้แก่ โปรโตซัว หรือแบคทีเรีย (Tanniou et al., 2012) ป้องกันปัญหาสัณฐานของเซลล์สาหร่ายมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเก็บรักษาเซลล์เป็นระยะเวลานาน และสามารถรักษาลักษณะทางพันธุกรรมของสาหร่ายขนาดเล็กได้เป็นระยะเวลายาวนาน (Tanniou et al., 2012) และจากการศึกษาของ Guermazi et al. (2010) พบว่าการแช่แข็งสาหร่ายด้วยเทคนิคการลดอุณหภูมิที่ต่างกันมีผลต่อปริมาณกรดไขมันที่อยู่ในเซลล์สาหร่าย

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีการแช่งแข็ง
2. เพื่อศึกษาผลของชนิดของสาหร่ายต่ออัตรารอดของสาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง
3. เพื่อศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตรารอดของสาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง

4. เพื่อศึกษาผลระยะเวลาในการเก็บรักษาสาหร่ายขนาดเล็กแช่แข็งต่ออัตรารอดของสาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบเทคนิค และวิธีการในการเก็บรักษาหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีการแช่แข็ง

2. ทราบชนิดและความเข้มข้นของสารละลายป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กชนิดต่างๆ

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของชนิดสาหร่ายขนาดเล็กชนิดสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง

การออกแบบการทดลอง

ออกแบบการทดลองแบบสุ่มตลอดที่มี 3*2 Factorial ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ชนิดของสาหร่ายทำการเปลี่ยนแปลงชนิดสาหร่ายขนาดเล็ก 2 ชนิด ได้แก่ คลอเรลลา (*Chlorella* sp.) คีโตเซอรอส (*Chaetoceros* sp.) และเตตราเซลมิส (*Tetraselmis* sp.) เปลี่ยนแปลงชนิดของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง 2 ชนิด ได้แก่ glycerol และ dimethyl sulfoxide (DMSO) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ จัดชุดทดลองและซ้ำโดยการสุ่ม

สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษา

การทดลองใช้อาหารทดลองสูตร Guillard's medium (ลัดดา, 2540) ประกอบสารเคมีดังนี้

ส่วนประกอบที่ 1

$NaNO_3$	42.074 g
$Na_2HPO_4.H_2O$	3.0 g
$FeCl_3$	1.45 g
Na_2EDTA	5.0 g
Thiamine	0.2 g
Cyanocobalamin	0.001 mg
Biotin	0.05 mg

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 ml

ส่วนประกอบที่ 2	g
$CuSO_4.5H_2O$	1.96
$ZnSO_4$	4.40
$Na_2MoO_4.2H_2O$	1.26
$MnCl_2.4H_2O$	36.0
$CoCl_2.6H_2O$	2.0

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 ml

ส่วนประกอบที่ 3	g
$Na_2SiO_3.9H_2O$	16.50
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 ml	

ปิเปตส่วนประกอบที่ 1 และ 3 ปริมาตร 2 ml และส่วนประกอบที่ 2 ปริมาตร 1 ml เติมในน้ำทะเลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 1 ลิตร ทำการผสมอาหารเก็บไว้หนึ่งวันก่อนนำมาทดลอง

การทำความสะอาดอุปกรณ์และน้ำทะเล

เครื่องแก้ว ขวดรูปชมพู และอุปกรณ์ประกอบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทำการล้างให้สะอาด และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที และน้ำทะเลที่ใช้ในการทดลองทำการเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลา คีโตเซอรอส และเตตราเซลมิส ด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรกิลลาร์ด (Guillard medium, F/2) ความเค็ม 30 ppt ทำการเติมอาหารเลี้ยงสาหร่ายปริมาตร 150 ml ลงในขวดรูปชมพูขนาด 250 ml เติมหัวเชื้อสาหร่าย 5 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปวางไว้บนชั้นเลี้ยงสาหร่าย ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 3500 lux ระยะเวลาการให้แสง 24:0 (L/D period) ให้อากาศตลอดเวลา นับจำนวนเซลล์สาหร่ายทุกวันด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer)

การรวบรวมเซลล์สาหร่าย

เมื่อคลอเรลลา คีโตเซอรอส และเตตราเซลมิสเจริญเติบโตถึงระยะ late log phase ทำการนับจำนวนเซลล์สาหร่ายก่อนทำการแช่แข็ง ทำการรวบรวมเซลล์โดยนำคลอเรลลา คีโตเซอรอส และเตตราเซลมิส ปริมาตร 5 ml ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm นาน 5 นาที เก็บเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในหลอด cryo tube ทำการเติมสารละลาย glycerol และ DMSO ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 ml ทำการผสมสาหร่ายและสารละลายแช่แข็งให้เข้ากัน นำไปลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องถึง 0 °C ในเวลา 30 นาที จากนั้นนำสาหร่ายไปเข้าตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำสาหร่ายที่ผ่านการแช่แข็งมาละลายโดยเพิ่มอุณหภูมิจาก -20 °C ถึงอุณหภูมิห้อง ในเวลา 15 นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์สาหร่ายโดยการเติมอาหารเลี้ยงสาหร่ายในหลอด cryo tube ผสมให้เข้ากันแล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm นาน 5 นาที จำนวน 10 ครั้ง นำสาหร่ายที่ผ่านการล้างเซลล์ไปเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรกิลลาร์ด ในขวดรูปชมพูปริมาตร 250 ml ทำการนับเซลล์สาหร่ายทุกวันเพื่อตรวจสอบการรอดชีวิตของสาหร่าย และคิดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สาหร่าย

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทำการตรวจสอบอิทธิพลของชนิดสาหร่ายขนาดเล็กและชนิดสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยอัตราการรอดของสาหร่ายด้วยวิธีDuncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (Crawley, 2012)

การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง

การออกแบบการทดลอง

ออกแบบการทดลองแบบสุ่มตลอด ทำการทดลองกับสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ คลอเรลลา (*Chlorella* sp.) คีโตเซอรอส (*Chaetoceros* sp.) และเตตราเซลมิส (*Tetraselmis* sp.) ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ทำการเลือกชนิดสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ได้จากการการทดลองที่ 1 ที่เหมาะสมกับสาหร่ายแต่ละชนิด ทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง 2 ระดับ ได้แก่ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 10 ซ้ำ จัดชุดทดลองและซ้ำโดยการสุ่ม

สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษา

การทดลองใช้อาหารทดลองสูตร Guillard's medium (ลัดดา, 2540) รายละเอียดดังการทดลองที่ 1

การทำความสะอาดอุปกรณ์และน้ำทะเล

เหมือนการทดลองที่ 1

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

เหมือนการทดลองที่ 1

การรวบรวมเซลล์สาหร่าย

เมื่อคลอเรลลา คีโตเซอรอส และเตตราเซลมิสเจริญเติบโตถึงระยะ late log phase ทำการนับจำนวนเซลล์สาหร่ายก่อนทำการแช่แข็ง ทำการรวบรวมเซลล์โดยนำคลอเรลลา คีโตเซอรอส และเตตราเซลมิสปริมาตร 5 ml ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm นาน 5 นาที เก็บเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในหลอด cryo tube ทำการเติมสารละลายป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่เหมาะสมกับสาหร่ายแต่ละชนิดที่ได้จากการทดลองที่ 1 ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 ml ทำการผสมสาหร่ายและสารละลายแช่แข็งให้เข้ากัน นำไปลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องถึง 0 °C ในเวลา 30 นาที จากนั้นนำสาหร่าย

ไปเข้าตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำสาหร่ายที่ผ่านการแช่แข็งมาละลายโดยเพิ่มอุณหภูมิจาก -20 °C ถึงอุณหภูมิห้อง ในเวลา 15 นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์สาหร่ายโดยการเติมอาหารเลี้ยงสาหร่ายในหลอด cryo tube ผสมให้เข้ากันแล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm นาน 5 นาที จำนวน 10 ครั้ง นำสาหร่ายที่ผ่านการล้างเซลล์ไปเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรกิลลาร์ด ในขวดรูปชมพูปริมาตร 250 ml ทำการนับเซลล์สาหร่ายทุกวันเพื่อตรวจสอบการรอดชีวิตของสาหร่าย และคิดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สาหร่าย

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทำการตรวจสอบอิทธิพลของความข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายแต่ละชนิดด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยอัตราการรอดของสาหร่ายด้วยวิธี Duncan’s new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (Crawley, 2012)

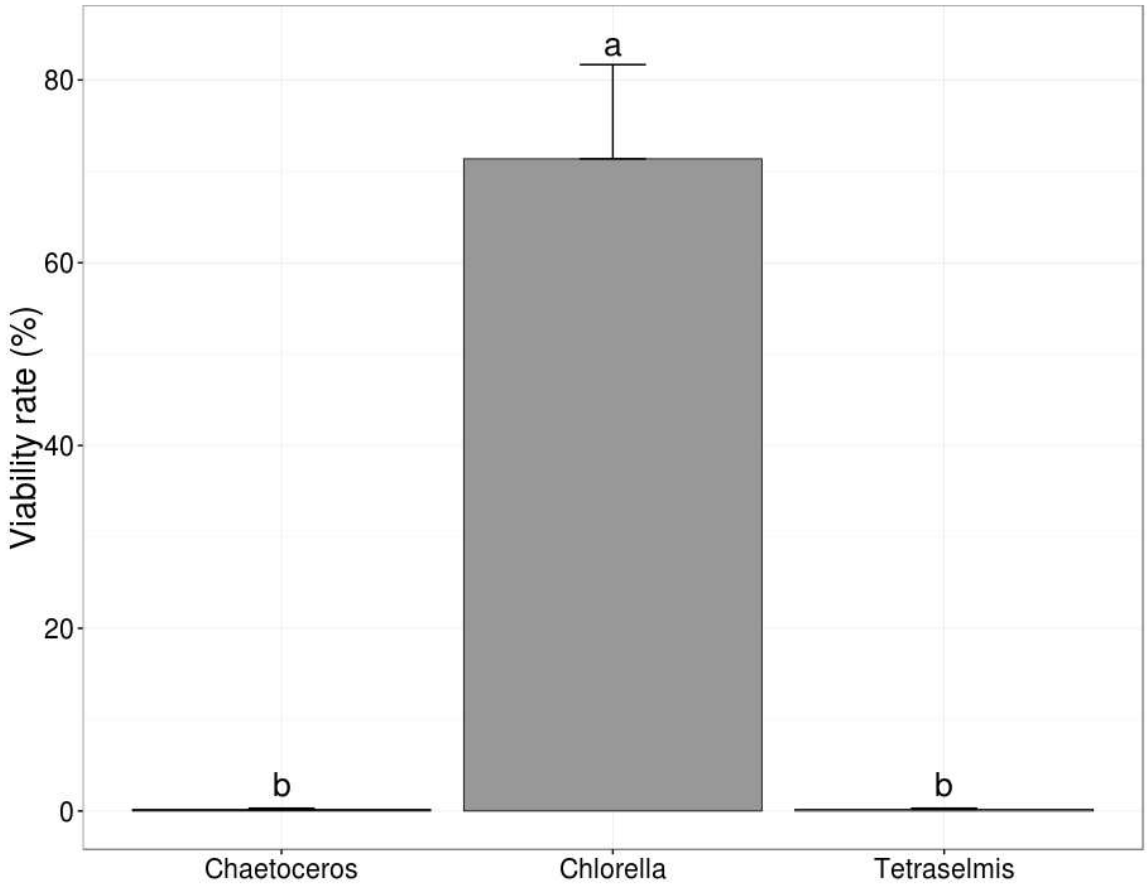
บทที่ 3

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของชนิดสาหร่ายขนาดเล็กชนิดสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง

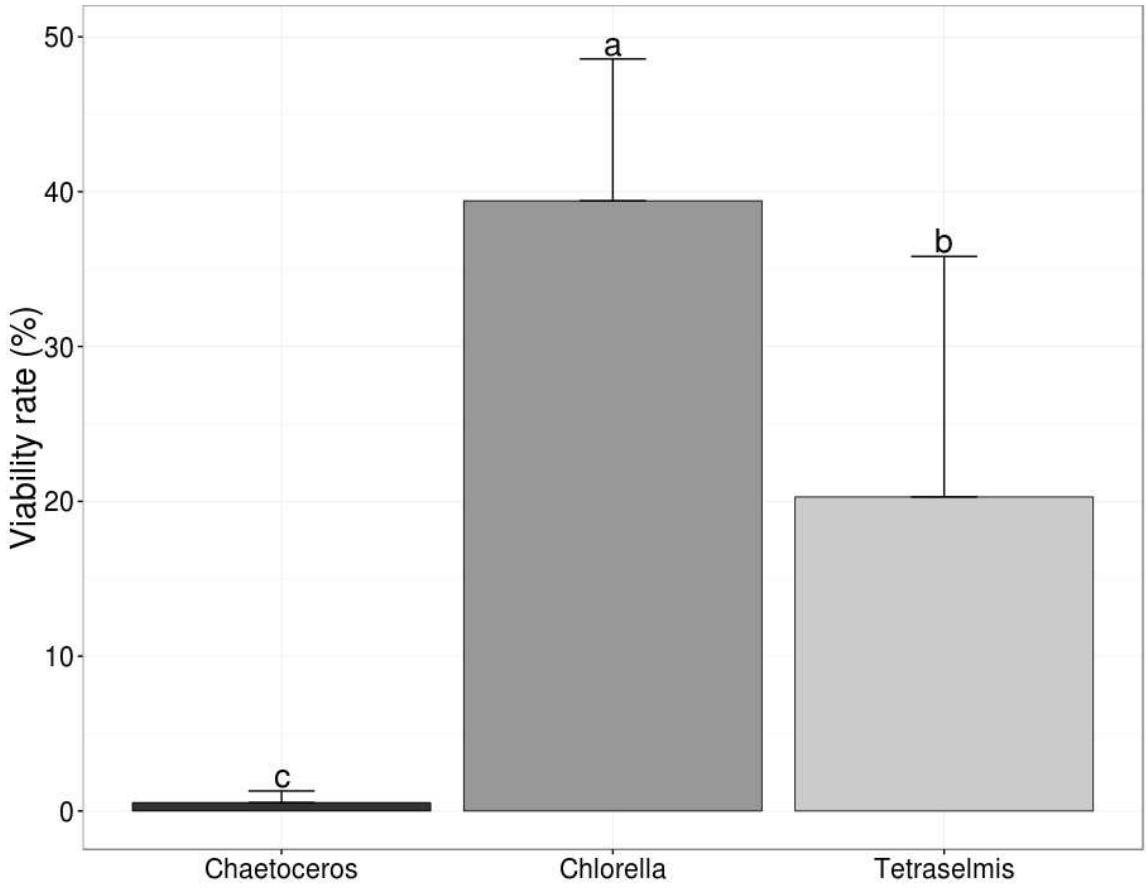
จากการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างชนิดสาหร่าย และชนิดของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งกับอัตราการรอดของสาหร่ายภายหลังการแช่แข็ง พบว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดสาหร่าย และชนิดของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ดังนั้นการวิเคราะห์ข้อมูลจะทำการวิเคราะห์ข้อมูลแยกตามระดับในแต่ละปัจจัย

อัตรารอดของสาหร่ายที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO แสดงดังภาพที่ 3-1 พบว่าสาหร่ายคลอเรลลามีอัตรารอดสูงสุดเท่ากับ 71.37±10.31 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกับอัตรารอดของสาหร่ายคีโตเซอรอส และเตตราเซลมิส อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่สาหร่ายคีโตเซอรอส และเตตราเซลมิสมีอัตรารอดเท่ากับ 0.18±0.12 และ 0.18±0.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



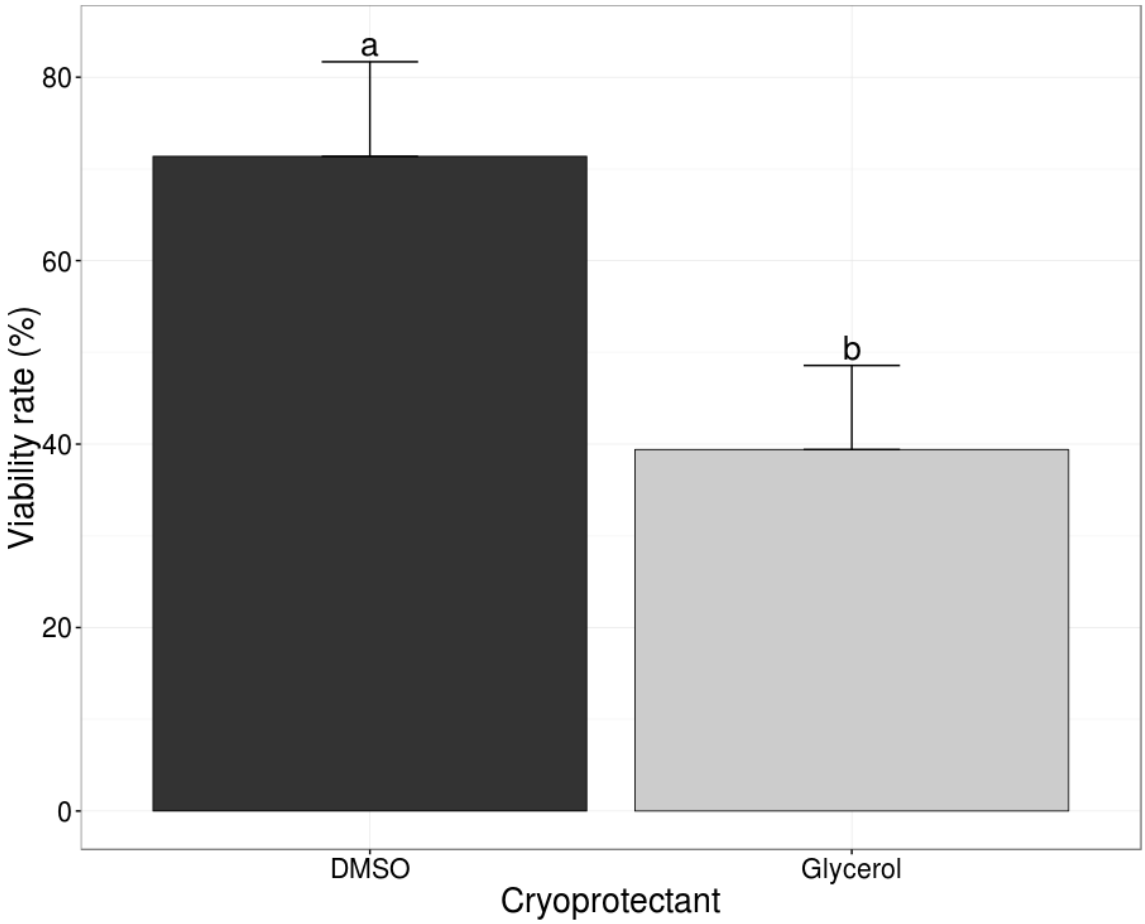
ภาพที่ 3-1 อัตรารอดของสาหร่าย 3 ชนิดที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลาย DMSO

อัตรารอดของสาหร่ายที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลายกลีเซอรอล แสดงดังภาพที่ 3-2 พบว่าสาหร่ายคลอเรลลามีอัตรารอดสูงสุดเท่ากับ 39.41±9.17 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกับอัตรารอดของสาหร่ายคีโตเซอรอส และเตตราเซลมิส อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่สาหร่ายเตตราเซลมิสมีอัตรารอดรองลงมาเท่ากับ 20.28±15.54 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าอัตราการรอดของสาหร่ายคีโตเซอรอสอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) อัตราการรอดของสาหร่ายคีโตเซอรอสเท่ากับ 0.55±0.75 เปอร์เซ็นต์



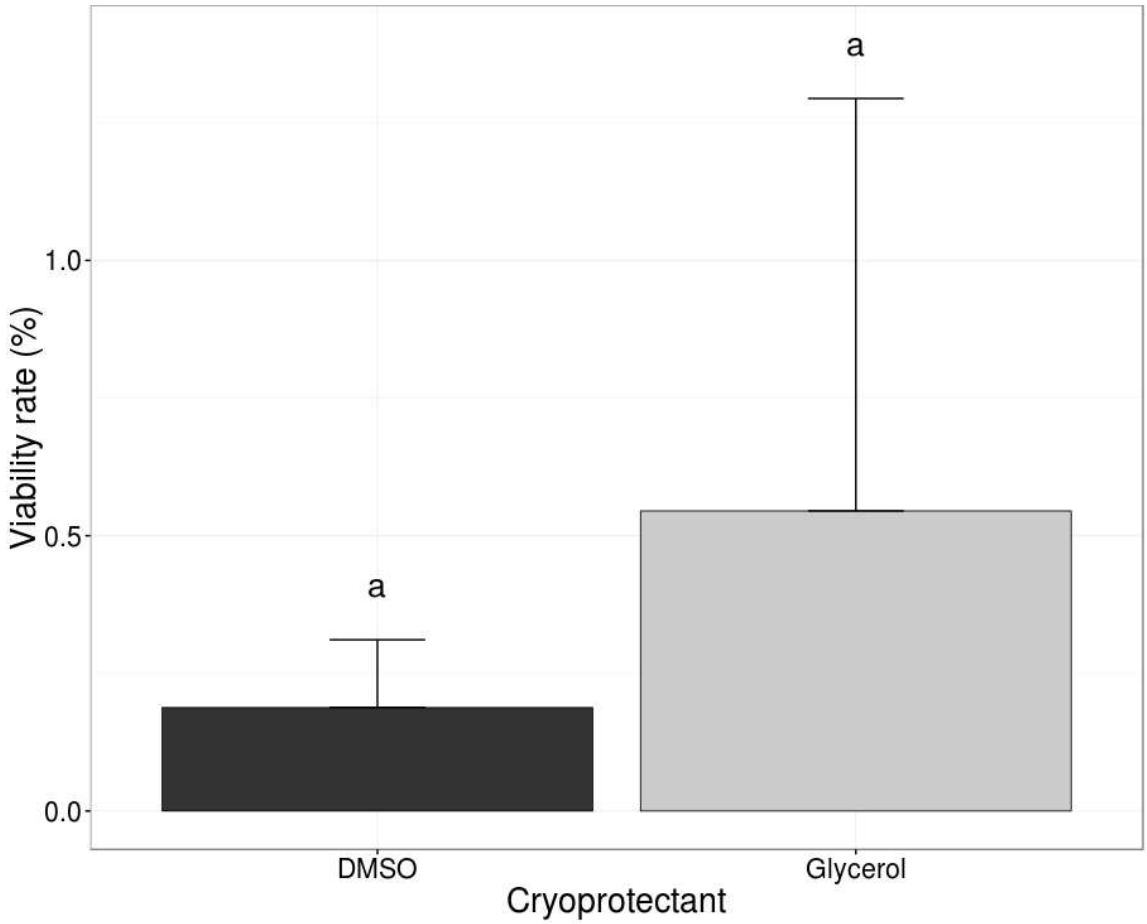
ภาพที่ 3-2 อัตรารอดของสาหร่าย 3 ชนิดที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอล

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบอัตรารอดของสาหร่ายคลอเรลลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO และกลีเซอรอล พบว่าอัตราการรอดของสาหร่ายที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO เท่ากับ 71.37±10.31 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอัตรารอดของสาหร่ายคลอเรลลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลายกลีเซอรอล (39.41±9.17 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ดังภาพที่ 3-3



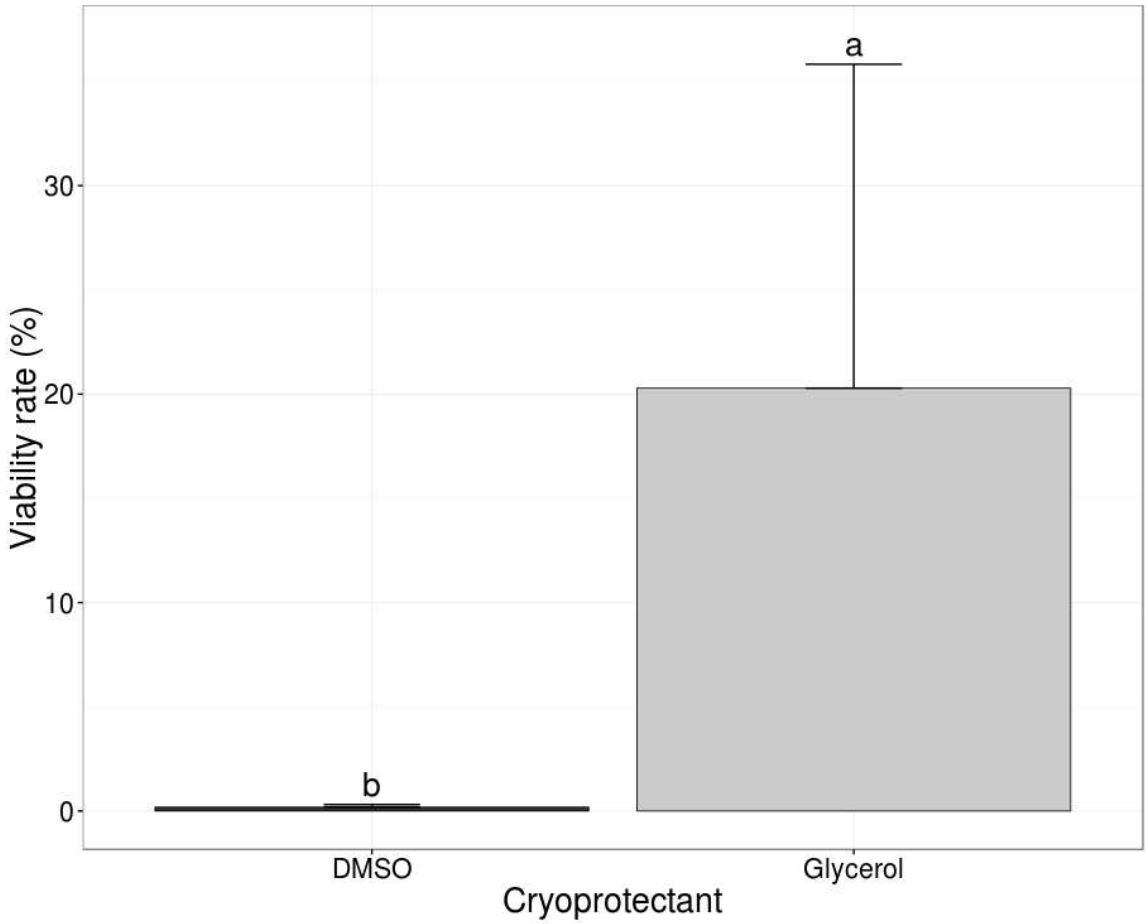
ภาพที่ 3-3 อัตรารอดของคลอเรลลาที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วย DMSO และ Glycerol

อัตรารอดของสาหร่ายคีโตเซอรอสที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO และกลีเซอรอล มีอัตรารอดเท่ากับ 0.18±0.12 และ 0.55±0.75 เปอร์เซ็นต์ อัตรารอดของสาหร่ายคีโตเซอรอสที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลายทั้งสองชนิดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ($P>0.05$) แสดงดังภาพที่ 3-4



ภาพที่ 3-4 อัตรารอดของคีโตเซอรอสที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วย DMSO และ Glycerol

อัตรารอดของสาหร่ายเตตราเซลมิสที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO และกลีเซอรอล เท่ากับ 20.28±15.54 และ 0.18±0.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 3-5 เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตรารอดของสาหร่ายระหว่างชุดทดลองพบว่าอัตราการรอดของสาหร่ายที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลายกลีเซอรอลสูงกว่าอัตรารอดของสาหร่ายคลอเรลลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)



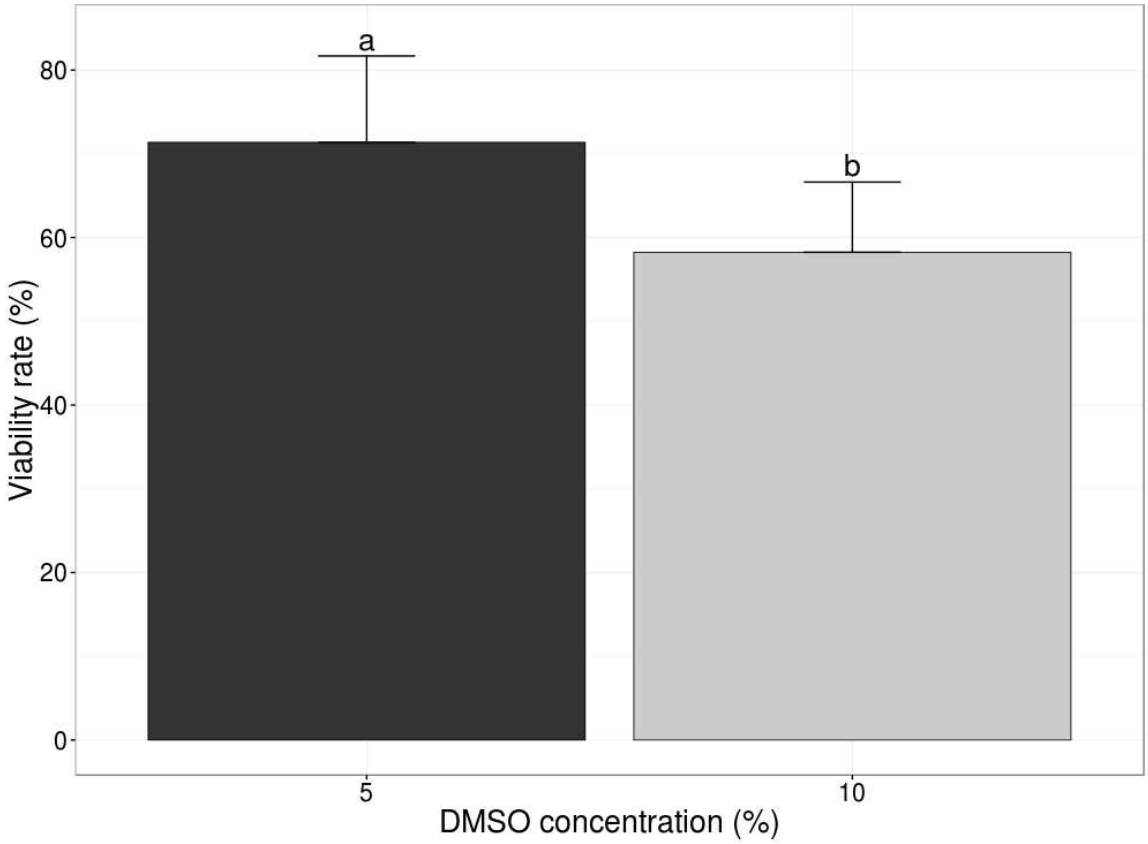
ภาพที่ 3-5 อัตรารอดของเตตราซลมิสที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วย DMSO และ Glycerol

การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง

จากผลการทดลองที่ 1 พบว่าอัตราการรอดของคลอเรลลาที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลาย DMSO มีอัตราการรอดสูงกว่าเซลล์ที่เก็บรักษาด้วยสารละลายกลีเซอรอล ในขณะที่คีโตเซอรอส และเตตราเซลมิส พบว่าการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอล มีอัตราการรอดสูงกว่าเซลล์ที่เก็บรักษาด้วยสารละลาย DMSO ดังนั้นในการทดลองที่ 2 จึงทำการเลือกการเก็บรักษาเซลล์คลอเรลลาด้วยสารละลาย DMSO และการเก็บรักษาเซลล์คีโตเซอรอส และเตตราเซลมิสด้วยสารละลายกลีเซอรอล มาทำการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

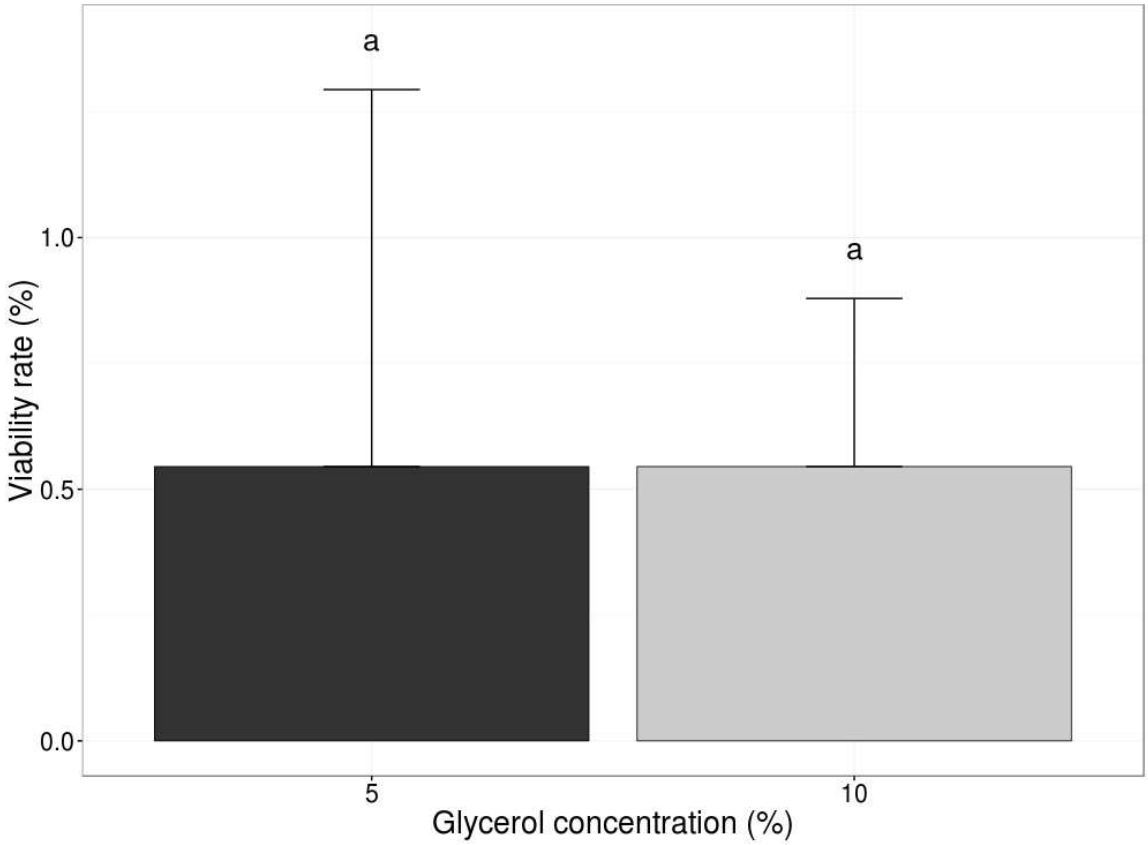
ผลการทดลองเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายคลอเรลลาแช่แข็ง ด้วยสารละลายป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง DMSO ที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอัตรารอดของสาหร่ายคลอเรลลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 71.37±10.31 และ 58.24±8.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 3-6 เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตรารอดของสาหร่ายระหว่างชุดทดลอง พบว่าอัตราการรอดของสาหร่ายคลอเรลลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลายความเข้มข้น

5 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอัตรารอดของสาหร่ายคลอเรลลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลายความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)



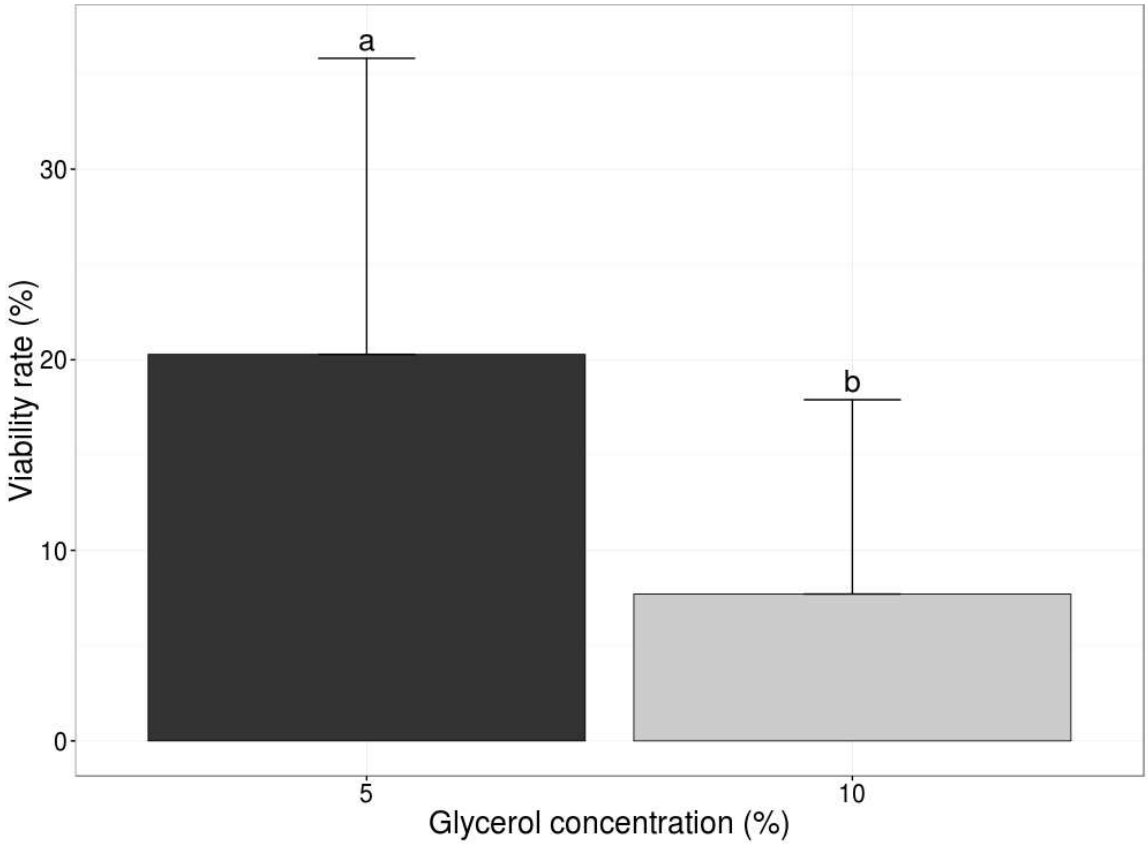
ภาพที่ 3-6 อัตรารอดของคลอเรลลาที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

อัตราการรอดของสาหร่ายคีโตเซอรอสแช่แข็งด้วยสารละลายป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งกลีเซอรอล ที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 0.55±0.75 และ 0.55±0.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 3-7 อัตราการรอดของสาหร่ายทั้งสองระดับความเข้มข้นแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ (P>0.05)



ภาพที่ 3-7 อัตรารอดของคีโตเซอรอสที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

อัตราการรอดของสาหร่ายเตตราซลมิสแช่แข็งด้วยสารละลายป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอัตรารอดของสาหร่ายเตตราซลมิสที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 20.28±15.54 และ 7.71±10.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 3-8 เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตรารอดของสาหร่ายเตตราเซลมิสระหว่างชุดทดลอง พบว่าอัตราการรอดของสาหร่ายคลอเรลลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลายความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอัตรารอดของสาหร่ายเตตราซลมิสที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลายความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)



ภาพที่ 3-8 อัตรารอดของเตตราเซลมิสที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของชนิดสาหร่ายขนาดเล็กชนิดสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง

จากการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างชนิดสาหร่าย และชนิดของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งกับอัตราการรอดของสาหร่ายภายหลังการแช่แข็ง พบว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดสาหร่าย และชนิดของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แสดงว่าอัตรารอดของสาหร่ายแต่ละชนิดเหมาะกับชนิดสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งแตกต่างกัน

จากผลการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบชนิดการป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งกับสาหร่ายคลอเรลลา สาหร่ายคลอเรลลามีอัตรารอดสูงเมื่อเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งทั้งสองชนิด โดยที่สาหร่ายคลอเรลลาที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งด้วยสารละลาย DMSO มีอัตราการรอดสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอล แสดงว่าสาหร่ายคลอเรลลาเหมาะในการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลาย DMSO สอดคล้องกับการศึกษาของ Tzovenis et al. (2004) ที่รายงานว่าสารละลาย DMSO สามารถเก็บรักษาเซลล์คลอเรลลาได้ สารละลาย DMSO เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่สามารถแทรกซึมเยื่อหุ้มเซลล์ได้ สารละลาย DMSO จะทำให้อัตราการเกิดน้ำแข็งหรืออัตราการแข็งตัวของ cytoplasm ช้าลง โดยเมื่อสารละลาย DMSO ซึมเข้าไปในเซลล์จะทำให้จุดเยือกแข็งของของเหลวภายในเซลล์ลดต่ำลง ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดสูงขึ้น (McLellan, 1989; Steponkus, et al., 1992; Hubalek, 2003; Tanniou et al., 2012) และสารละลาย DMSO ที่ซึมเข้าไปในเซลล์ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่าย ในขณะที่สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ไม่แทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น polyvinylpyrrolidone (PVP) และ polyethylene glycol (PEG) จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า แต่ประสิทธิภาพในการป้องกันเซลล์จากผลึกน้ำแข็งจะต่ำกว่าด้วย (Tzovenis et al., 2004; Tanniou et al., 2012)

เมื่อมีการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายคีโตเซอรอส ด้วยสารละลาย DMSO และกลีเซอรอล อัตราการรอดต่ำมาก แสดงว่าทั้งสารละลาย DMSO และกลีเซอรอลยังไม่เหมาะสมในการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายคีโตเซอรอส ในขณะนี้สาหร่ายเตตราเซลมิสที่ทำการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลาย DMSO มีอัตราการรอดค่อนข้างต่ำ ส่วนสาหร่ายเตตราเซลมิสที่ทำการเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอล มีอัตราการรอดค่อนข้างสูง แสดงให้เห็นว่าโดยสารละลายกลีเซอรอลมีความเหมาะสมในการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายเตตราเซลมิส เช่นเดียวกับการศึกษาของ มานิตา (2552) พบว่าการเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย *Spirulina platensis* ด้วยสารละลายกลีเซอรอล ทำให้สาหร่าย *S. platensis* มีอัตรารอดสูงที่สุด ในขณะที่ Tayler and Fletcher (1999) รายงานว่าเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการป้องกันเซลล์สาหร่ายระหว่างสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งชนิดที่แทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลาย DMSO กลีเซอรอล และเมทานอล พบว่าสารละลายกลีเซอรอลมีประสิทธิภาพต่ำที่สุด

ขนิดของสาหร่ายที่แช่แข็งมีผลต่ออัตราการรรอดเนื่องจากโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของสาหร่ายแต่ละชนิดแตกต่างกัน การยอมให้สารป้องกันการแช่แข็งผ่านเข้าสู่เซลล์ได้แตกต่างกัน และความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ของสาหร่ายแต่ละชนิดแตกต่างกันจึงทำให้อัตราการรอดของสาหร่ายแต่ละชนิดแตกต่างกันเมื่อทำการเก็บรักษาเซลล์ด้วยการแช่แข็ง (Hubalek, 2003)

ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารละลาย DMSO มีความเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายคลอเรลลา ในขณะที่สารละลายกลีเซอรอล เหมาะสมสำหรับสำหรับการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายเตตราเซลมิส

การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็ง

เมื่อทำการเลือกสารละลาย DMSO สำหรับการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายคลอเรลลา และเลือกสารละลายกลีเซอรอลสำหรับการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายคีโตเซอรอส และเตตราเซลมิส แล้วทำการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ระดับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

สาหร่ายคลอเรลลาที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดสูงกว่าสาหร่ายที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ สาหร่ายคีโตเซอรอสที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอลทั้งสองระดับ มีอัตราการรอดไม่แตกต่างกัน ในขณะที่สาหร่ายเตตราเซลมิสที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลายกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดสูงกว่าสาหร่ายที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการศึกษาของ มานิตา (2552) ที่พบว่าสาหร่าย *Spirulina platensis* มีอัตราการรอดดีที่สุด เมื่อเก็บรักษาเซลล์ด้วยกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 5% โดยมีอัตราการรอดสูงสุดเท่ากับ 30.63% สูงกว่าการเก็บรักษาเซลล์ด้วยกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 10 และ 15% และ Tanniou et al. (2012) พบว่าสาหร่าย *Haslea ostrearia* ที่แช่แข็งด้วยกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 5% มีอัตราการรอดสูงกว่าสาหร่ายที่แช่แข็งด้วยกลีเซอรอล 10% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลมากขึ้นอัตราการรอดของสาหร่ายจะลดลง (มานิตา, 2552; Tanniou et al., 2012) ซึ่งความเข้มข้นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายทั่วไป จะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 5-10% (Taylor and Fletcher, 1999) ความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่สูงขึ้นจะทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่ายมากขึ้นตามระดับความเข้มข้น (Joseph et al., 2000; Tanniou et al., 2012) ซึ่งมีผลทำให้อัตราการรอดลดต่ำลง การใช้สารละลาย DMSO ความเข้มข้นสูงในการแช่แข็งเซลล์ทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่ายสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้น (Joseph et al., 2000; Tanniou et al., 2012) ซึ่งอาจสาเหตุที่ทำให้สาหร่ายทั้งคลอเรลลา คีโตเซอรอส และเตตราเซลมิส ที่เก็บรักษาเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 10% มีอัตรารอดต่ำกว่าสาหร่ายที่เก็บรักษาเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 5%

การใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งต่าง ๆ มีผลต่ออัตราการรอดของสาหร่ายโดยตรง เนื่องจากสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งส่วนใหญ่รวมทั้งกลีเซอรอล ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสาหร่ายที่นำไปแช่ (Hubalek, 2003) การใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ระดับความเข้มข้นสูงความเป็นพิษต่อเซลล์

สาหร่ายจะสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้น Joseph et al. (2000) พบว่าการแช่เซลล์สาหร่าย *Chlorella marina* ด้วยสารละลายกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 0-40% จะทำให้เซลล์มีอัตราการรอดสูงสุดอัตราการรอดของสาหร่ายลดลงตามความเข้มข้นของสารละลายกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้น เซลล์สาหร่ายที่ตายในกระบวนการเก็บรักษาเซลล์แบบแช่แข็งอาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของระดับสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์สาหร่าย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกในระหว่างการแข็งตัวของเซลล์สาหร่าย (McLellan, 1989) รวมถึงการฉีกขาดของเยื่อหุ้มเซลล์สาหร่ายระหว่างของเหลวภายในเซลล์สาหร่ายแข็งตัว การแข็งตัวของของเหลวภายในเซลล์สาหร่าย ทำให้ปริมาตรของเหลวภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นอาจทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาดเป็นเหตุให้อัตราการรอดของสาหร่ายต่ำลง (Steponkus, et al., 1992; Day and Brand, 2005)

สรุปผลการทดลอง

1. สารละลาย DMSO เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นสารป้องกันการแช่แข็งในการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายคลอเรลลา แต่ไม่เหมาะสมในการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายคีโตเซอรอส และเตตราเซลมิส
2. สารละลายกลีเซอรอล เหมาะสำหรับการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายเตตราเซลมิส
3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้เก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่าย ควรใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายโดยวิธีการแช่แข็ง
2. ควรมีการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในสาหร่ายชนิดอื่นที่ยังมีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

คุณค่าและประโยชน์ของผลผลิตการวิจัย

การศึกษานี้มุ่งเน้นพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายด้วยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาสายพันธุ์ประกอบด้วย ชนิดของสาหร่าย ชนิดของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง และระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่าย ซึ่งผลการศึกษาสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในหน่วยงานที่มีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้โดยตรง

แนวทางการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ และ/หรือพัฒนาต่อยอด

ผลงานวิจัยในปีแรก จะเป็นข้อมูลประกอบสำหรับการพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้สามารถเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กได้

ผลผลิต (Output)

บทความวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่

ชลี ไพบูลย์กิจกุล, มะลิวัลย์ คุตะโค, รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, ศศิพา ฉิมพลี และ เบ็ญจมาศ ไพบูลย์กิจกุล. (2560). ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่ออัตราการรอดของสาหร่าย Chlorella sp. โดยวิธีแช่แข็ง. *แก่นเกษตร* 45 ฉบับพิเศษ 1: 859-864.

แก่นเกษตร 45 ฉบับพิเศษ 1 : (2560). KHON KAEN AGR. J. 45 SUPPL. 1 : (2017).

ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่ออัตราการรอดของสาหร่าย *Chlorella* sp. โดยวิธีแช่แข็ง

Effects of glycerol concentration and storage durationon the viability of cryopreservation *Chlorella* sp.

ชลี ไพบูลย์กิจกุล[1*], มะลิวัลย์ คุตะโค[1], รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ[1], ศศิพา ฉิมพลี[1] และ เบ็ญจมาศ ไพบูลย์กิจกุล[1]

Chalee Paibulkichakul[1*], Maliwan Kutako[1], Rachanimuk Hiransuchalert[1], Sasila Chemplee[1] and Benjamas Paibulkichakul[1]

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่ออัตราการรอดของสาหร่าย Chlorella sp. โดยวิธีแช่แข็ง โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ความเค็ม 30 ppt ด้วยอาหารสูตร Guillard medium จากนั้นเก็บรวบรวมเซลล์และเติมกลีเซอรอล 2 ระดับ ที่ 5 และ 10% นำไปลดอุณหภูมิแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 3, 30, 60 และ 90 วัน เมื่อครบกำหนดการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายทำการละลาย ล้างเซลล์แล้วนำไปเพาะเลี้ยง ทำการคำนวณอัตราการรอดของสาหร่าย ผลการศึกษาพบว่าสาหร่ายที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 5% มีอัตราการรอดสูงกว่าสาหร่ายที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 10% อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ที่วันที่ 3 และ 30 ของการทดลอง เมื่อเก็บรักษาเซลล์ครบ 60 และ 90 วัน อัตราการรอดของสาหร่ายที่เก็บรักษาเซลล์ด้วยกลีเซอรอลทั้งสองความเข้มข้นมีอัตราการรอดแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ส่วนระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายพบว่าการเก็บรักษาเซลล์ 3 วัน มีอัตราการรอดสูงสุดแตกต่างจากระยะเวลาการเก็บรักษาเซลล์อื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ทั้งสองระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอล ส่วนอัตราการรอดของเซลล์ที่เก็บ 30, 60 และ 90 วัน มีอัตราการรอดลดลงตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถเก็บรักษาสายพันธุ์ Chlorella sp. โดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C ด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 5% ได้นาน 30 วัน

คำสำคัญ: ความเข้มข้นของสารละลายแช่แข็ง, ระยะเก็บรักษา, คลอเรลลา, การเก็บรักษาสายพันธุ์ด้วยการแช่แข็ง

ABSTRACT: This study was aimed to investigate the effects of glycerol concentration and storage duration on the viability of cryopreservation *Chlorella* sp. The microalgae were cultured with Guillard medium at 30 ppt. Microalgal cells were collected and added with 5 and 10% glycerol. The temperature of the cells was cooled down to -20 °C and stored the cell for 3, 30, 60 and 90 days. The microalgae were thawed and washed the cells when due to storage time. The recovery microalgae were cultured and calculated the viability of the cell. Results showed that microalgae cultured with 5% glycerol had significantly higher viability ($P<0.05$) than the other which cultured on 10% glycerol at 3 and 30 days of the experiment. The viability of microalgae cultured in both concentrations of glycerol was not significantly different ($P>0.05$) at 60 and 90 days of the experiment. At both glycerol concentration, the viability at 3 days of cell storage was significantly greater ($P<0.05$) than the other period of cell storage. The viabilities of cell storage at 30, 60 and 90 days decreased, respectively with significantly difference ($P<0.05$). The consequence of this study demonstrated that the seed of *Chlorella* sp. could maintain with 5% glycerol for 30 days.
Keywords: concentration of cryoprotectant, storage duration, chlorella, cryopreservation

[1] คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี
Faculty of Marine Technology, Burapha University, Chanthaburi Campus

[*] Corresponding author: pchalee@buu.ac.th

บทนำ

คลอเรลลา (*Chlorella* sp.) เป็นสาหร่ายที่มีประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สามารถใช้เป็นอาหารเพื่อเลี้ยงแพลงก์ตอนสัตว์ชนิดอื่น เช่น ไรแดง หรือนำมาใช้อนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนโดยตรง คลอเรลลาสามารถขยายพันธุ์ได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว มีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยง การเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายเพื่อเป็นหัวเชื้อสำหรับขยายพันธุ์ให้ปราศจากการปนเปื้อนจึงเป็นสิ่งจำเป็น การปนเปื้อนส่วนใหญ่เกิดจากโปรโตซัวส่งผลต่อการเจริญเติบโตของคลอเรลลาที่เพาะเลี้ยง ทำให้ประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงลดลง การเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ดีจึงจะต้องไม่ให้มีการปนเปื้อนกับสิ่งมีชีวิตอื่น ป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Genetic drift) ลดค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาหัวเชื้อ และหัวเชื้อที่เก็บรักษานั้นสามารถนำมาขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้ (Gwo et al., 2005)

การเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายด้วยการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อตามวิธีปกติมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างมาก ใช้เวลาและแรงงานมาก การเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายทางเลือกที่นิยมในปัจจุบัน คือการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายหรือเซลล์ สาหร่ายด้วยการแช่แข็ง (cryopreservation) ใช้อุณหภูมิในการแช่แข็งในช่วง -20 ถึง -196 °C (Mazur, 1984; Day et al., 1997; Day and Brand, 2005; Rhodes et al., 2006) การเก็บรักษาสายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ช่วยลดค่าใช้จ่าย แรงงาน และเวลาในการดูแลสาหร่ายได้มาก และการเก็บรักษาสาหร่ายด้วยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C มีข้อดีที่สามารถเก็บรักษาสาหร่ายได้ด้วยตู้เย็น -20 °C ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาเซลล์ให้ประสบความสำเร็จมีหลายประการ ได้แก่ ชนิดของสาหร่าย สายพันธุ์ ขนาดเซลล์และรูปร่าง ระยะในการเจริญเติบโต อัตราการเจริญเติบโต อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย pH ปริมาณน้ำในเซลล์ ปริมาณไขมันและส่วนประกอบของเซลล์ ความหนาแน่นของเซลล์ในการแช่แข็ง ชนิดและความเข้มข้นของสารแช่แข็ง อัตราการลดอุณหภูมิ อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาเซลล์ ระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ และอาหารที่ใช้ในเพาะเลี้ยงภายหลังการแช่แข็ง (Hubalek, 2003) กลีเซอรอลเป็นสารแช่แข็งชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการแช่แข็งสาหร่าย (Tanniou et al., 2012) เนื่องจากกลีเซอรอลสามารถซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ทำให้จุดเยือกแข็งของของเหลวภายในเซลล์ลดต่ำลง ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดสูงขึ้น (McLellan, 1989; Steponkus, et al., 1992; Tanniou et al., 2012) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่ออัตราการรอดของสาหร่าย *Chlorella* sp. ด้วยวิธีแช่แข็งเซลล์สาหร่ายที่อุณหภูมิ -20 °C

วิธีการศึกษา

ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายแช่แข็งกลีเซอรอล (Glycerol) ที่ระดับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์ เปลี่ยนแปลงระยะเวลา 4 ช่วงเวลา ได้แก่ 3, 30, 60 และ 90 วัน ทำการทดลอง 10 ซ้ำ จัดชุดทดลองและซ้ำโดยการสุ่ม

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella* sp.) ด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรกิลลาร์ด (Guillard medium) ความเค็ม 30 ppt เมื่อเซลล์เจริญเติบโตถึงระยะ late log phase ทำการนับจำนวนเซลล์สาหร่ายก่อนการแช่แข็งด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) จากนั้นนำสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. มาในปริมาตร 5 มิลลิลิตร รวบรวมเซลล์สาหร่ายด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เก็บเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในหลอด cryo tube ทำการเติมสารละลายที่ใช้แช่แข็งตามความเข้มข้นที่กำหนดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมให้สาหร่ายและสารละลายแช่แข็งผสมเข้ากัน นำไปลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องถึง 0 °C ในเวลา 30 นาที จากนั้นนำสาหร่ายไปเข้าตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C ตามเวลาที่กำหนด เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำสาหร่ายที่ผ่านการแช่แข็งมาละลายโดยเพิ่มอุณหภูมิจาก -20 °C ถึง

อุณหภูมิห้อง ในเวลา 15 นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์สาหร่ายโดยการเติมอาหารเลี้ยงสาหร่ายในหลอด cryo tube ผสมให้เข้ากันแล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จำนวน 10 ครั้ง นำสาหร่ายที่ผ่านการล้างเซลล์ไปเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรกิลลาร์ด ในขวดรูปชมพูปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการนับเซลล์สาหร่ายทุกวันเพื่อตรวจสอบการรอดชีวิตของสาหร่าย และคิดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สาหร่าย

การวิเคราะห์ข้อมูลทำการตรวจสอบอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายแช่แข็ง และระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์ต่ออัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยอัตราการรอดของสาหร่ายด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (Cody and Smith, 1997)

ผลการศึกษา

เมื่อนำเซลล์สาหร่ายที่ครบกำหนดแช่แข็งมาละลายและนำมาเพาะเลี้ยง อัตราการรอดของสาหร่ายแสดงดัง Figure 1 สาหร่ายที่แช่แข็งด้วยกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 5% มีอัตราการรอดที่วันที่ 3, 30, 60 และ 90 วัน เท่ากับ 39.41±9.17, 14.79±9.95, 1.66±0.68 และ 0.09±0.04 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายที่แช่แข็งด้วยกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 10% มีอัตราการรอดที่วันที่ 3, 30, 60 และ 90 วัน เท่ากับ 13.89 ±3.29, 1.97±0.95, 1.32±0.54 และ 0.09±0.05 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการรอดของสาหร่ายแยกตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลพบว่าสาหร่ายทั้งสองความเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยการแช่แข็งนาน 3 วัน มีอัตราการรอดสูงสุดแตกต่างจากการเก็บรักษาเซลล์ที่ระยะเวลาอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนสาหร่ายทั้งสองความเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยการแช่แข็งนาน 30 วัน มีอัตราการรอดรองลงมาแตกต่างจากสาหร่ายที่เก็บรักษาเซลล์นาน 60 และ 90 วัน อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่สาหร่ายทั้งสองความเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยการแช่แข็งนาน 60 และ 90 วัน มีอัตราการรอดแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

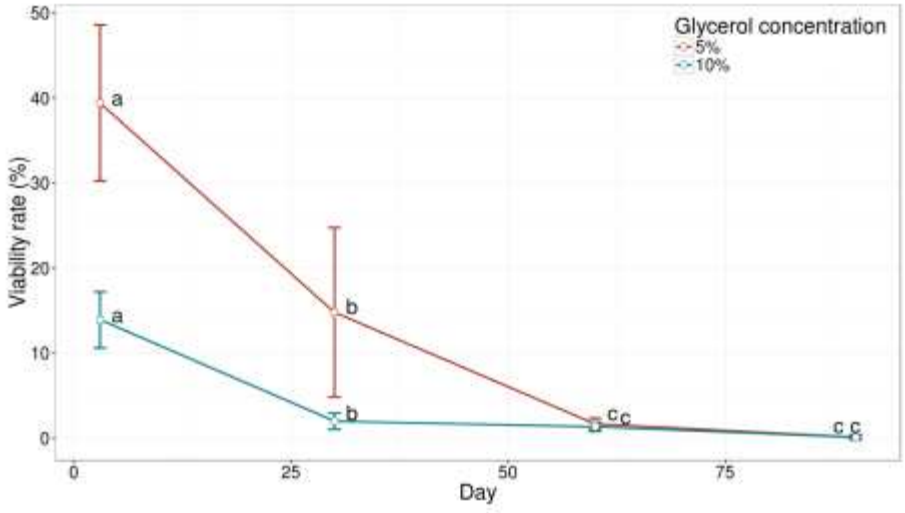


Figure 1 Viability rate of *Chlorella* sp. preserved with 5 and 10% of glycerol. The different letter of over the point on the same line indicated significantly difference at 95% confident level.

เมื่อพิจารณาอัตราการรอดในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการเก็บรักษาเซลล์พบว่า ในการเก็บรักษาเซลล์ 3 และ 30 วัน (Figure 2a, 2b) สาหร่ายที่แช่แข็งด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 5% มีอัตราการรอดสูงกว่าสาหร่ายที่แช่แข็งด้วย กลีเซอรอลความเข้มข้น 10% อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่สาหร่ายที่แช่แข็งด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 5% นาน 60 และ 90 วัน (Figure 2c, 2d) มีอัตราการรอดแตกต่างจากสาหร่ายที่แช่แข็งด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

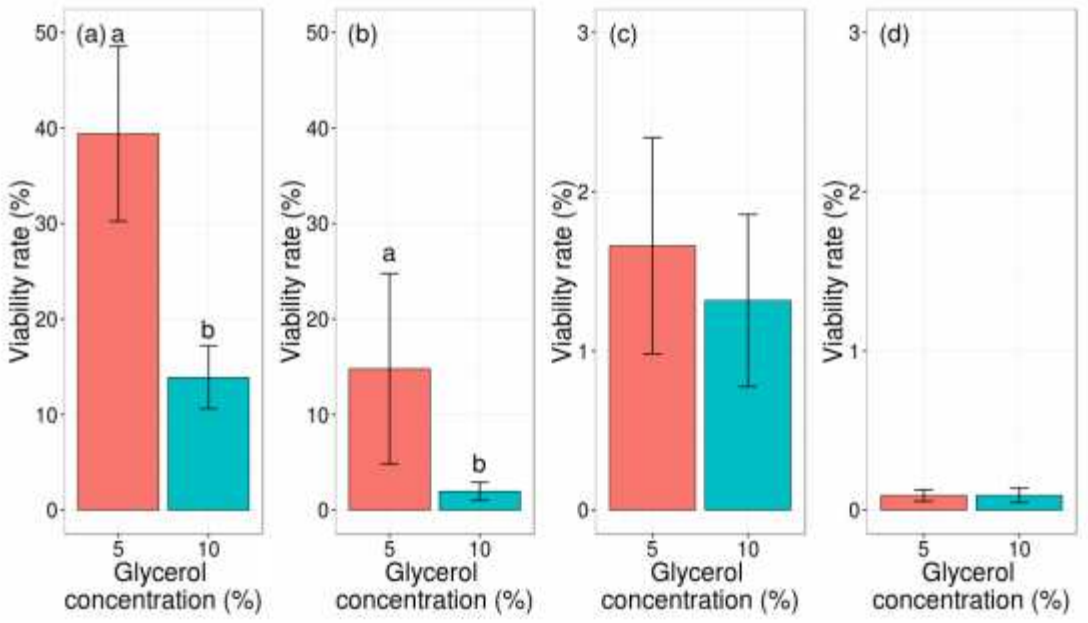


Figure 2 Viability rate of *Chlorella* sp. preserved with 5 and 10% glycerol at (a) 3 days, (b) 30 days, (c) 60 days and (d) 90 days. The different letter over the bar in each time indicated significantly difference at 95% confident level.

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้พบว่าการเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. ด้วยกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 5% สามารถเก็บรักษาเซลล์ได้ดีกว่าการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 10% ในช่วง 3 ถึง 30 วันแรกของการเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย สอดคล้องกับการศึกษาของ มานิตา (2552) ที่พบว่าสาหร่าย *Spirulina platensis* มีอัตราการรอดดีที่สุด เมื่อเก็บรักษาเซลล์ด้วยกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 5% โดยมีอัตราการรอดสูงสุดเท่ากับ 30.63% สูงกว่าการเก็บรักษาเซลล์ด้วยกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 10 และ 15% และ Tanniou et al. (2012) พบว่าสาหร่าย *Haslea ostrearia* ที่แช่แข็งด้วยกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 5% มีอัตราการรอดสูงกว่าสาหร่ายที่แช่แข็งด้วยกลีเซอรอล 10% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลมากขึ้นอัตราการรอดของสาหร่ายจะลดลง (มานิตา, 2552; Tanniou et al., 2012) ซึ่งความเข้มข้นสารละลายแช่แข็งที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายทั่วไป จะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 5-10% (Taylor and Fletcher, 1999) ความเข้มข้นของสารละลายแช่แข็งที่สูงขึ้นจะทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่ายมากขึ้นตามระดับความ

เข้มข้น (Joseph et al., 2000; Tanniou et al., 2012) ซึ่งมีผลทำให้อัตราการรอดลดต่ำลง

การใช้สารละลายแช่แข็งชนิดต่างๆ มีผลต่ออัตราการรอดของสาหร่ายโดยตรง เนื่องจากสารละลายแช่แข็งส่วนใหญ่รวมทั้งกลีเซอรอล ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสาหร่ายที่นำไปแช่ (Hubalek, 2003) การใช้สารละลายที่ระดับความเข้มข้นสูงความเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่ายจะสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้น Joseph et al. (2000) พบว่าการแช่เซลล์สาหร่าย *Chlorella marina* ด้วยกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 0-40% จะทำให้เซลล์มีอัตราการรอดสูงสุดอัตราการรอดของสาหร่ายลดลงตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้น เซลล์สาหร่ายที่ตายในกระบวนการเก็บรักษาเซลล์แบบแช่แข็งอาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของระดับสารละลายแช่แข็งในเซลล์สาหร่าย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกในระหว่างการแข็งตัวของเซลล์สาหร่าย (McLellan, 1989) รวมถึงการฉีกขาดของเยื่อหุ้มเซลล์สาหร่ายระหว่างของเหลวภายในเซลล์สาหร่ายแข็งตัว การแข็งตัวของของเหลวภายในเซลล์สาหร่ายทำให้ปริมาตรของเหลวภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นอาจทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาดเป็นเหตุให้สาหร่ายตาย (Steponkus, et al., 1992; Day and Brand, 2005)

ในการศึกษานี้ ระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ 3 และ 30 วัน อัตราการรอดของสาหร่ายอยู่ในช่วง 39.41-14.79% การเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายที่นานขึ้นที่ระยะเวลา 60 และ 90 วัน อัตราการรอดของสาหร่ายต่ำมากอยู่ในช่วง 1.32-0.09% การเก็บรักษาเซลล์ที่นานขึ้นทำให้อัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายต่ำลง สอดคล้องกับรายงานของ มานิตา (2552) ที่พบว่าสามารถเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย *S. platensis* ด้วยอุณหภูมิ -80 °C ได้นาน 3 เดือน เมื่อเพิ่มเวลาเก็บรักษาเซลล์ให้นานขึ้นอัตราการรอดของเซลล์สาหร่ายจะต่ำลง

สรุป

การเก็บรักษาเซลล์หรือรักษาสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. โดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C ควรเก็บเซลล์ด้วยกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นาน 30 วัน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 40/2559

เอกสารอ้างอิง

มานิตา โมธรรม. 2552. การเก็บรักษาสาหร่าย *Spirulina platensis* ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 3: 104-114.

Cody, R.P. and Smith, J.K. 1997. Applied statistics and the SAS programming language. New Jersey: Simon and Schuster / A Viacom Company.

Day, J.G., and J.J. Brand. 2005. Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures. In Andersen, R.A. (Ed.), Algal culturing techniques. California: Elsevier Academic Press.

Day, J.G., M.M. Watanabe, G.J. Morris, R.A. Fleck, and R. Mark. 1997. Long-term viability of preserved eukaryotic algae. J. Appl. Phycol. 9: 121-127.

Guermazi, W., A. Sellami-Kammoun, J. Elloumi, Z. Drira, L. Aleya, R. Marangoni, H. Ayadi, and S. Maalej. 2010. Microalgal cryo-preservation using dimethyl sulfoxide (Me_2SO) coupled with two freezing protocols: Influence on the fatty acid profile. Journal of Thermal Biology. 35: 175-181.

Gwo, J.-C., Chiu, J.-Y., Chou, C.-C. and H.-Y. Cheng. 2005. Cryopreservation of a marine MicroAge, *Nannochloropsis ovulate* (Eustigmatophyceae). Cryobiology. 50: 338-343.

Hubalek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 46: 205-229.

Joseph, I., A. Panigrahi, and P.K. Chandra. 2000. Tolerance of three marine microalgae to cryoprotectants dimethyl sulfoxide, methanol and glycerol. Indian Journal of Marine Sciences. 29: 243–247.

Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am. J. Physiol. 247: 125-142.

McLellan, M.R. 1989. Cryopreservation of diatoms. Diatom Res. 4: 301-318.

Rhodes, L., J. Smith, R. Tervit, R. Roberts, J. Adamson, S. Adams, and M. Decker. 2006. Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae. Cryobiology. 52: 152-156.

Steponkus, P.L., R. Langis, and S. Fujikawa. 1992. Cryopreservation of plant tissuues by vitrification. In Steponkus, P.L. (Ed.), Advances in low temperature biology, Vol. 1. JAI Press, London.

Tanniou, A., V. Turpin, and T. Lebeau. 2012. Comparison of cryopreservation methods for the long term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia* (simonsen). Cryobiology. 65: 45-50.

Taylor, R., and R.L. Fletcher. 1999. Cryopreservation of eukaryotic algae a review of methodologies. Applied Phycology. 10: 481-501.

Tzovenis, I., G. Triantaphyllidis, X. Naihong, E. Chatzinikolaou, K. Papadopoulou, G. Xouri, and T. Tafas, 2004. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. Aquaculture. 230: 457-473.

รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (2559A10803003) สัญญาเลขที่ 40/2559

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การแช่แข็งหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กสำหรับฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเชิงพาณิชย์

ชื่อหัวหน้าโครงการผู้รับทุน / ผู้วิจัย ผศ. ดร. ชลี ไพบูลย์กิจกุล

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2560

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2560

รายจ่าย

หมวด	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	คงเหลือ (หรือเกิน)
1. ค่าตอบแทน	42,450	42,450	-
2. ค่าจ้าง	180,000	180,000	-
3. ค่าวัสดุ	70,000	70,000	-
4. ค่าใช้สอย	158,000	158,000	-
5. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ			
ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน	50,050	50,050	-
รวม	500,500		

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ	500,500 บาท	
งวดที่ 1	200,200 บาท	เมื่อ 5 มกราคม 2559
งวดที่ 2	180,180 บาท	เมื่อ 24 กุมภาพันธ์ 2560
รวม	380,380 บาท	

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

วันที่ 30 พฤษภาคม 2560

บรรณานุกรม

มานิตา โมธรรม. (2552). การเก็บรักษาสาหร่าย *Spirulina platensis* ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง*, 3. 104-114.

ยุวดี พีรพรพิศาล และฉมาภรณ์ นิวาศะบุตร. (2546). *คู่มือปฏิบัติการสาหร่ายวิทยา*. ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ลัดดา วงศ์รัตน์. (2540). *คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. (2553). เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Bodas, K., Brenning, C., Diller, K.R. and Brand, J.J. (1995). Cryopreservation of blue-green and eukaryotic algae in the culture collection at the University of Texas at Austin. *CryoLetters*, 16, 267-274.

Canavate, J.P. and lubian, L.M. (1995). Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species. *Aquaculture*, 136, 277-290.

Crawley, M.J. (2012). *The R book*. New Jersey: John Wiley & Sons.

Day, J.G., Benson, E.E., Harding, K., Knowles, B., Idowu, M., Bremner, D., Santos, L., Santos, F., Friedl, T., Lorenz, M., Lukesova, A., Elster, J., Lukavsky, Herdman, M., Rippka, R. and Hall, T. (2005). Cryopreservation conservation of microalgae: the development of a pan-european scientific biotechnological resource (the COBRA project). *CryoLetters*, 26, 231-238.

Day, J.G. and Brand, J.J. (2005). Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures. pp. 165-187. in Andersen, R. (ed.). *Algal culturing techniques*. New York: Academic Press.

Day, J.G., Watanabe, M.M., Morris, G.J., Fleck, R.A. and McLellan, M.R. (1997). Long-term viability of preserved eukaryotic algae. *J. Appl. Phycol.*, 9, 121-127.

Guermazi, W., Sellami-Kammoun, A., Elloumi, J., Drira, Z., Aleya, L., Marangoni, R., Ayadi, H. and Maalej, S. (2010). Microalgal cryo-preservation using dimethyl sulfoxide (Me_2SO) coupled with two freezing protocols: Influence on the fatty acid profile. *Journal of Thermal Biology*, 35, 175-180.

Gwo, J., Chiu, J., Chou, C. and Cheng, H. (2005). Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Cryobiology,* 50, 338-343.

Hubalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46, 205-229.

Iwamoto, K., Fukuyo, S., Okuda, M., Kobayashi, M. and Shiraiwa, Y. (2012). Cryopreservation of the Chlorophyll d-Containing Cyanobacterium *Acaryochloris Marina*. *Procedia Environmental Sciences*, 15, 118-125.

Joseph, I., Panigrahi, A., Chandra, P.K. (2000). Tolerance of three marine microalgae to cryoprotectants dimethyl sulfoxide, methanol and glycerol. *Indian Journal of Marine Sciences,* 29, 243–247.

McLellan, M.R. (1989). Cryopreservation of diatoms. *Diatom Res.*, 4, 301-318.

Morris, G.J. (1978). Cryopreservation of 250 strains of Chlorococcales by the method of two-step cooling. *Brit. Phycol. J.*, 13, 15-24.

Nakhla, T., Marek, M. and Kovalcik, T. (2002). Issues associated with large-scale production of liposomal formulations. *Drug Delivery Technology*, 2, 1-6.

Steponkus, P.L., Langis, R. Fujikawa, S. (1992). Cryopreservation of plant tissues by vitrification. In Steponkus, P.L. (Ed.), *Advances in low temperature biology, Vol. 1*. London: JAI Press.

Tanniou, A., Turpin, V. and Lebeau, T. (2012). Comparison of cryopreservation methods for the long term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia* (simonsen). *Cryobiology*, 65, 45-50.

Tayler, R. and Fletcher, R. (1999). Cryopreservation of eukaryotic algae a review of methodologies. *J. Appl. Phycol.*, 10, 481-501.

Tzovenisa, I., Triantaphyllidis, G., Naihong, X., Chatzinikolaou, E., Papadopoulou, K., Xouri, G. and Tafas, T. (2004). Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. *Aquaculture*, 230, 457-473.

Vonshak, A. (1986). Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. p. 117-146. In: Richmond, A. (Ed.). *CRC handbook of microalgal mass culture*.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติการทดลองที่1

```
> ex1.fac <- ex1[,c(1,2,7)]
>
> aov.ea2.ex1 <- ea2(ex1.fac, design=1)
> aov.ea2.ex1
$`Analysis of variance`
                  df type III SS mean square  F value    p>F
factor_1           2  34426.5098  17213.2549 238.9421 <0.001
factor_2           1    220.8769    220.8769   3.0661 0.0856
factor_1:factor_2  2   6907.8125   3453.9063  47.9446 <0.001
Residuals         54   3890.1304     72.0395        -      -

$`Adjusted means (factor 1)`
     factor_1 adjusted.mean standard.error tukey snk duncan t scott_knott
1   Chlorella       55.3905         1.8979     a   a      a a           a
2 Tetraselmis       10.2360         1.8979     b   b      b b           b
3 Chaetoceros        0.3665         1.8979     c   c      c c           c

$`Multiple comparison test (factor 1)`
                     pair contrast p(tukey) p(snk) p(duncan)  p(t)
1   Chlorella - Tetraselmis  45.1545   0.0000  0e+00     0e+00 0e+00
2   Chlorella - Chaetoceros  55.0240   0.0000  0e+00     0e+00 0e+00
3 Tetraselmis - Chaetoceros   9.8695   0.0016  5e-04     5e-04 5e-04

$`Adjusted means (factor 2)`
  factor_2 adjusted.mean standard.error tukey snk duncan t scott_knott
1     DMSO       23.9163         1.5496     a   a      a a           a
2 Glycerol       20.0790         1.5496     a   a      a a           a

$`Multiple comparison test (factor 2)`
            pair contrast p(tukey) p(snk) p(duncan)   p(t)
1 DMSO - Glycerol   3.8373   0.0856 0.0856    0.0856 0.0856

$`Adjusted means (factor 1 in levels of factor 2)`
$`Adjusted means (factor 1 in levels of factor 2)`$`factor_1 in  DMSO`
         treatment adjusted.mean standard.error tukey snk duncan t scott_knott
2   Chlorella.DMSO        71.373          2.684     a   a      a a           a
1 Chaetoceros.DMSO         0.188          2.684     b   b      b b           b
3 Tetraselmis.DMSO         0.188          2.684     b   b      b b           b

$`Adjusted means (factor 1 in levels of factor 2)`$`factor_1 in  Glycerol`
            treatment adjusted.mean standard.error tukey snk duncan t scott_knott
5   Chlorella.Glycerol        39.408          2.684     a   a      a a           a
6 Tetraselmis.Glycerol        20.284          2.684     b   b      b b           b
4 Chaetoceros.Glycerol         0.545          2.684     c   c      c c           c


$`Multiple comparison test (factor 1 in levels of factor 2)`
$`Multiple comparison test (factor 1 in levels of factor 2)`$`factor_1 in  DMSO`
                              pair contrast p(tukey) p(snk) p(duncan) p(t)
1   Chlorella.DMSO - Chaetoceros.DMSO   71.185        0      0         0    0
2   Chlorella.DMSO - Tetraselmis.DMSO   71.185        0      0         0    0
3 Chaetoceros.DMSO - Tetraselmis.DMSO    0.000        1      1         1    1

$`Multiple comparison test (factor 1 in levels of factor 2)`$`factor_1 in  Glycerol`
                                    pair contrast p(tukey) p(snk) p(duncan) p(t)
1   Chlorella.Glycerol - Tetraselmis.Glycerol   19.124        0      0         0    0
2   Chlorella.Glycerol - Chaetoceros.Glycerol   38.863        0      0         0    0
3 Tetraselmis.Glycerol - Chaetoceros.Glycerol   19.739        0      0         0    0
```

```
$`Adjusted means (factor 2 in levels of factor 1)`
$`Adjusted means (factor 2 in levels of factor 1)`$`factor_2 in  Chaetoceros`
             treatment adjusted.mean standard.error tukey snk duncan t scott_knott
4 Chaetoceros.Glycerol         0.545          2.684     a   a      a a           a
1     Chaetoceros.DMSO         0.188          2.684     a   a      a a           a

$`Adjusted means (factor 2 in levels of factor 1)`$`factor_2 in  Chlorella`
           treatment adjusted.mean standard.error tukey snk duncan t scott_knott
2     Chlorella.DMSO        71.373          2.684     a   a      a a           a
5 Chlorella.Glycerol        39.408          2.684     b   b      b b           b

$`Adjusted means (factor 2 in levels of factor 1)`$`factor_2 in  Tetraselmis`
             treatment adjusted.mean standard.error tukey snk duncan t scott_knott
6 Tetraselmis.Glycerol        20.284          2.684     a   a      a a           a
3     Tetraselmis.DMSO         0.188          2.684     b   b      b b           b


$`Multiple comparison test (factor 2 in levels of factor 1)`
$`Multiple comparison test (factor 2 in levels of factor 1)`$`factor_2 in  Chaetoceros`
                                    pair contrast p(tukey) p(snk) p(duncan)   p(t)
1 Chaetoceros.Glycerol - Chaetoceros.DMSO    0.357   0.9254 0.9254    0.9254 0.9254

$`Multiple comparison test (factor 2 in levels of factor 1)`$`factor_2 in  Chlorella`
                                pair contrast p(tukey) p(snk) p(duncan) p(t)
1 Chlorella.DMSO - Chlorella.Glycerol   31.965        0      0         0    0

$`Multiple comparison test (factor 2 in levels of factor 1)`$`factor_2 in  Tetraselmis`
                                    pair contrast p(tukey) p(snk) p(duncan) p(t)
1 Tetraselmis.Glycerol - Tetraselmis.DMSO   20.096        0      0         0    0


$`Residual analysis`
                                  values
p.value Shapiro-Wilk test          0.0002
p.value Bartlett test (factor_1)   0.0000
p.value Bartlett test (factor_2)   0.0035
p.value Bartlett test (treatments) 0.0000
coefficient of variation (%)      38.5800
first value most discrepant        4.0000
second value most discrepant      53.0000
third value most discrepant        7.0000

> tapply(ex1$psurv, ex1$algae, mean)
Chaetoceros   Chlorella Tetraselmis
     0.3665     55.3905     10.2360
> tapply(ex1$psurv, ex1$algae, sd)
Chaetoceros   Chlorella Tetraselmis
  0.5539549  18.9477507  14.8530725
>
> tapply(ex1$psurv, ex1$cryoagent, mean)
    DMSO Glycerol
 23.91633 20.07900
> tapply(ex1$psurv, ex1$cryoagent, sd)
    DMSO Glycerol
 34.61039 19.01538
>
> ex1.dmso <- ex1[ex1$cryoagent=="DMSO",c(1,7)]
> aov.ex1.dmso <- ea1(ex1.dmso, design=1)
> aov.ex1.dmso
$`Analysis of variance`
           df  type I SS mean square  F value    p>F
treatments  2 33782.0282  16891.0141 476.8156 <0.001
Residuals  27   956.4649     35.4246        -      -

$Means
    treatment   mean standard.error tukey snk duncan t scott_knott
```

```
1   Chlorella 71.373         1.8821     a   a      a a           a
2 Chaetoceros  0.188         1.8821     b   b      b b           b
3 Tetraselmis  0.188         1.8821     b   b      b b           b

$`Multiple comparison test`
                      pair contrast p(tukey) p(snk) p(duncan) p(t)
1   Chlorella - Chaetoceros   71.185        0      0         0    0
2   Chlorella - Tetraselmis   71.185        0      0         0    0
3 Chaetoceros - Tetraselmis    0.000        1      1         1    1

$`Residual analysis`
                           values
p.value Shapiro-Wilk test      0.00
p.value Bartlett test          0.00
coefficient of variation (%)  24.89
first value most discrepant   23.00
second value most discrepant  26.00
third value most discrepant   30.00

> tapply(ex1.dmso$psurv, ex1.dmso$algae, mean)
Chaetoceros   Chlorella Tetraselmis
      0.188      71.373       0.188
> tapply(ex1.dmso$psurv, ex1.dmso$algae, sd)
Chaetoceros   Chlorella Tetraselmis
  0.1233604  10.3074461   0.1233604
>
> ex1.glycerol <- ex1[ex1$cryoagent=="Glycerol",c(1,7)]
> aov.ex1.glycerol <- ea1(ex1.glycerol, design=1)
> aov.ex1.glycerol
$`Analysis of variance`
           df type I SS mean square F value    p>F
treatments  2  7552.294   3776.1471 34.7538 <0.001
Residuals  27  2933.665    108.6543       -      -

$Means
    treatment   mean standard.error tukey snk duncan t scott_knott
1   Chlorella 39.408         3.2963     a   a      a a           a
2 Tetraselmis 20.284         3.2963     b   b      b b           b
3 Chaetoceros  0.545         3.2963     c   c      c c           c

$`Multiple comparison test`
                      pair contrast p(tukey) p(snk) p(duncan)  p(t)
1   Chlorella - Tetraselmis   19.124    1e-03  3e-04     3e-04 3e-04
2   Chlorella - Chaetoceros   38.863    0e+00  0e+00     0e+00 0e+00
3 Tetraselmis - Chaetoceros   19.739    7e-04  2e-04     2e-04 2e-04

$`Residual analysis`
                           values
p.value Shapiro-Wilk test     0.4431
p.value Bartlett test         0.0000
coefficient of variation (%) 51.9100
first value most discrepant   4.0000
second value most discrepant  7.0000
third value most discrepant   2.0000

> tapply(ex1.glycerol$psurv, ex1.glycerol$algae, mean)
Chaetoceros   Chlorella Tetraselmis
      0.545      39.408      20.284
> tapply(ex1.glycerol$psurv, ex1.glycerol$algae, sd)
Chaetoceros   Chlorella Tetraselmis
  0.7495369   9.1671561  15.5359026
>
> ex1.chlo <- ex1[ex1$algae=="Chlorella",c(2,7)]
> var.test(ex1.chlo[ex1.chlo$cryoagent=="DMSO",2],
ex1.chlo[ex1.chlo$cryoagent=="Glycerol",2])
```

```
       F test to compare two variances

data:  ex1.chlo[ex1.chlo$cryoagent == "DMSO", 2] and ex1.chlo[ex1.chlo$cryoagent ==
"Glycerol", 2]
F = 1.2642, num df = 9, denom df = 9, p-value = 0.7326
alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1
95 percent confidence interval:
 0.3140218 5.0898623
sample estimates:
ratio of variances
           1.26425

> ttest.chlo <- t.test(ex1.chlo[ex1.chlo$cryoagent=="DMSO",2],
ex1.chlo[ex1.chlo$cryoagent=="Glycerol",2], var.equal=TRUE)
> ttest.chlo

       Two Sample t-test

data:  ex1.chlo[ex1.chlo$cryoagent == "DMSO", 2] and ex1.chlo[ex1.chlo$cryoagent ==
"Glycerol", 2]
t = 7.3279, df = 18, p-value = 8.355e-07
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 22.80054 41.12946
sample estimates:
mean of x mean of y
   71.373    39.408

> tapply(ex1.chlo$psurv, ex1.chlo$cryoagent, mean)
    DMSO Glycerol
  71.373   39.408
> tapply(ex1.chlo$psurv, ex1.chlo$cryoagent, sd)
     DMSO  Glycerol
 10.307446  9.167156
>
> ex1.tetra <- ex1[ex1$algae=="Tetraselmis",c(2,7)]
> var.test(ex1.tetra[ex1.tetra$cryoagent=="DMSO",2],
ex1.tetra[ex1.tetra$cryoagent=="Glycerol",2])

       F test to compare two variances

data:  ex1.tetra[ex1.tetra$cryoagent == "DMSO", 2] and ex1.tetra[ex1.tetra$cryoagent ==
"Glycerol", 2]
F = 6.3049e-05, num df = 9, denom df = 9, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1
95 percent confidence interval:
 1.566048e-05 2.538349e-04
sample estimates:
ratio of variances
      6.304901e-05

> ttest.tetra <- t.test(ex1.tetra[ex1.tetra$cryoagent=="DMSO",2],
ex1.tetra[ex1.tetra$cryoagent=="Glycerol",2], var.equal=FALSE)
> ttest.tetra

       Welch Two Sample t-test

data:  ex1.tetra[ex1.tetra$cryoagent == "DMSO", 2] and ex1.tetra[ex1.tetra$cryoagent ==
"Glycerol", 2]
t = -4.0903, df = 9.0011, p-value = 0.002715
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -31.209852  -8.982148
sample estimates:
mean of x mean of y
    0.188    20.284
```

```
> tapply(ex1.tetra$psurv, ex1.tetra$cryoagent, mean)
    DMSO Glycerol
   0.188   20.284
> tapply(ex1.tetra$psurv, ex1.tetra$cryoagent, sd)
      DMSO   Glycerol
 0.1233604 15.5359026
>
> ex1.chaeto <- ex1[ex1$algae=="Chaetoceros",c(2,7)]
> var.test(ex1.chaeto[ex1.chaeto$cryoagent=="DMSO",2],
ex1.chaeto[ex1.chaeto$cryoagent=="Glycerol",2])

       F test to compare two variances

data:  ex1.chaeto[ex1.chaeto$cryoagent == "DMSO", 2] and ex1.chaeto[ex1.chaeto$cryoagent
== "Glycerol", 2]
F = 0.027087, num df = 9, denom df = 9, p-value = 9.641e-06
alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1
95 percent confidence interval:
 0.006728094 0.109053184
sample estimates:
ratio of variances
        0.02708727

 > ttest.chaeto <- t.test(ex1.chaeto[ex1.chaeto$cryoagent=="DMSO",2],
ex1.chaeto[ex1.chaeto$cryoagent=="Glycerol",2], var.equal=FALSE)
> ttest.chaeto

       Welch Two Sample t-test

data:  ex1.chaeto[ex1.chaeto$cryoagent == "DMSO", 2] and ex1.chaeto[ex1.chaeto$cryoagent
== "Glycerol", 2]
t = -1.4862, df = 9.4872, p-value = 0.1697
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.8961755  0.1821755
sample estimates:
mean of x mean of y
    0.188     0.545

> tapply(ex1.chaeto$psurv, ex1.chaeto$cryoagent, mean)
    DMSO Glycerol
   0.188    0.545
> tapply(ex1.chaeto$psurv, ex1.chaeto$cryoagent, sd)
     DMSO  Glycerol
 0.1233604 0.7495369
```

2. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติการทดลองที่2

```
> ex2.chlo$conc <- as.factor(ex2.chlo$conc)
> var.test(ex2.chlo[ex2.chlo$conc=="5",2],
ex2.chlo[ex2.chlo$conc=="10",2])

      F test to compare two variances

data:  ex2.chlo[ex2.chlo$conc == "5", 2] and ex2.chlo[ex2.chlo$conc ==
"10", 2]
F = 1.5115, num df = 9, denom df = 9, p-value = 0.5481
alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1
95 percent confidence interval:
 0.3754417 6.0853945
sample estimates:
ratio of variances
          1.511526

> t.test(ex2.chlo[ex2.chlo$conc=="5",2],ex2.chlo[ex2.chlo$conc=="10",2],
var.equal = TRUE)

      Two Sample t-test

data:  ex2.chlo[ex2.chlo$conc == "5", 2] and ex2.chlo[ex2.chlo$conc ==
"10", 2]
t = 3.125, df = 18, p-value = 0.00585
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
  4.302819 21.957181
sample estimates:
mean of x mean of y
   71.373    58.243

> tapply(ex2.chlo$psurv, ex2.chlo$conc, mean)
     5     10
71.373 58.243
> tapply(ex2.chlo$psurv, ex2.chlo$conc, sd)
        5        10
10.307446  8.383846
> ex2.chaeto <- ex2[ex2$algae=="Chaetoceros",c(4,7)]
> ex2.chaeto$conc <- as.factor(ex2.chaeto$conc)
> var.test(ex2.chaeto[ex2.chaeto$conc=="5",2],
ex2.chaeto[ex2.chaeto$conc=="10",2])

      F test to compare two variances

data:  ex2.chaeto[ex2.chaeto$conc == "5", 2] and
ex2.chaeto[ex2.chaeto$conc == "10", 2]
F = 5.0399, num df = 9, denom df = 9, p-value = 0.02442
alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1
95 percent confidence interval:
  1.251833 20.290489
sample estimates:
ratio of variances
           5.03987
```

```
> t.test(ex2.chaeto[ex2.chaeto$conc=="5",2],
ex2.chaeto[ex2.chaeto$conc=="10",2],var.equal = FALSE)

      Welch Two Sample t-test

data:  ex2.chaeto[ex2.chaeto$conc == "5", 2] and
ex2.chaeto[ex2.chaeto$conc == "10", 2]
t = -4.2787e-16, df = 12.436, p-value = 1
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.5631579  0.5631579
sample estimates:
mean of x mean of y
    0.545     0.545

> tapply(ex2.chaeto$psurv, ex2.chaeto$conc, mean)
    5    10
0.545 0.545
> tapply(ex2.chaeto$psurv, ex2.chaeto$conc, sd)
        5        10
0.7495369 0.3338746
> ex2.tetra <- ex2[ex2$algae=="Tetraselmis",c(4,7)]
> ex2.tetra$conc <- as.factor(ex2.tetra$conc)
> var.test(ex2.tetra[ex2.tetra$conc=="5",2],
ex2.tetra[ex2.tetra$conc=="10",2])

      F test to compare two variances

data:  ex2.tetra[ex2.tetra$conc == "5", 2] and ex2.tetra[ex2.tetra$conc ==
"10", 2]
F = 2.3217, num df = 9, denom df = 9, p-value = 0.2255
alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1
95 percent confidence interval:
 0.5766784 9.3471657
sample estimates:
ratio of variances
          2.321704

> t.test(ex2.tetra[ex2.tetra$conc=="5",2],
ex2.tetra[ex2.tetra$conc=="10",2],var.equal = TRUE)

      Two Sample t-test

data:  ex2.tetra[ex2.tetra$conc == "5", 2] and ex2.tetra[ex2.tetra$conc ==
"10", 2]
t = 2.1402, df = 18, p-value = 0.04628
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
  0.2310795 24.9229205
sample estimates:
mean of x mean of y
   20.284     7.707

> tapply(ex2.tetra$psurv, ex2.tetra$conc, mean)
     5     10
20.284  7.707
```

```
> tapply(ex2.tetra$psurv, ex2.tetra$conc, sd)
       5       10
15.53590 10.19608
```

ประวัติผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชลี ไพบูลย์กิจกุล

หน่วยงาน คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.โขมง อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22170
โทรศัพท์ 039-310000 โทรสาร 039-310128

2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะลิวัลย์ คุตะโค

หน่วยงาน คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.โขมง อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22170
โทรศัพท์ 039-310000 โทรสาร 039-310128

3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ

หน่วยงาน คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.โขมง อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22170
โทรศัพท์ 039-310000 โทรสาร 039-310128

4. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบ็ญจมาศ ไพบูลย์กิจกุล

หน่วยงาน คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.โขมง อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22170
โทรศัพท์ 039-310000 โทรสาร 039-310128