

การพัฒนาเทคนิควัดการเจริญเติบโตของ *Skeletonema costatum* โดยการวัดพื้นที่ภาพถ่าย
Developmental technique for growth rate measurement of *Skeletonema costatum* by
photographic area method

ชลี ไพบูลย์กิจกุล ณัฐพล แชมป์เพชร และ เบญจมาศ ไพบูลย์กิจกุล

Chalee Paibulkichakul, Natthaphon Champetch, and Benjamas Paibulkichakul

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการวัดการเจริญเติบโตของ *Skeletonema costatum* ที่แตกต่างกัน 4 วิธี ได้แก่ การนับจำนวนเซลล์ การวัดคลอโรฟิลล์เอ การวัดน้ำหนักแห้ง และการวัดพื้นที่ภาพถ่าย ข้อมูลที่ได้จำนวน 202 ชุด นำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการวัดการเจริญเติบโตต่าง ๆ ด้วยสมการวิเคราะห์ความถดถอย ผลการศึกษาพบว่า สมการวิเคราะห์ความถดถอยระหว่างวิธีการนับจำนวนเซลล์กับการวัดพื้นที่ภาพถ่ายเท่ากับ $y = 20.701x + 7.3844$ ($R^2 = 0.6199$) สมการวิเคราะห์ความถดถอยระหว่างการวัดน้ำหนักแห้งกับการวัดพื้นที่ภาพถ่ายมีค่า $y = 0.2401x + 0.4523$ ($R^2 = 0.5363$) และสมการวิเคราะห์ความถดถอยระหว่างการวัดคลอโรฟิลล์เอกับการวัดพื้นที่ภาพถ่ายเท่ากับ $y = 1.6741x + 0.4614$ ($R^2 = 0.7272$) สมการที่ได้สามารถนำไปประยุกต์เพื่อวัดการเจริญเติบโตของ *S. costatum* ด้วยการใช้การวัดพื้นที่จากภาพถ่ายได้

ABSTRACT

This study was compared 4 techniques for growth measurement of *Skeletonema costatum* including cell count, dry weight measurement, chlorophyll a determination and photographic area methods. Two hundred and two datasets were used to determine relationship among method by regression analysis. The consequence demonstrated equation of regression analysis between cell count determination and photographic area methods was $y = 20.701x + 7.3844$ ($R^2 = 0.6199$). Equation of regression analysis between dry weight measurement determination and photographic area methods was $y = 0.2401x + 0.4523$ ($R^2 = 0.5363$). Finally, equation of regression analysis between chlorophyll a determination and photographic area methods was $y = 1.6741x + 0.4614$ ($R^2 = 0.7272$). This study illustrated that photographic area method could apply for growth rate measurement of *S. costatum*.

คำสำคัญ: การวัดอัตราการเจริญเติบโต, สำหรับขนาดเล็ก, วิธีการวัดพื้นที่ภาพถ่าย, *Skeletonema costatum*

Key word: growth rate measurement, microalgae, photographic area method, *Skeletonema costatum*

Corresponding email: pchalee@buu.ac.th

คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

Faculty of Marine Technology, Burapha University, Chanthaburi Campus

คำนำ

สาหร่ายจัดเป็นผู้ผลิตในระบบนิเวศ สามารถสร้างอาหารเองได้ด้วยการสังเคราะห์แสง ประมาณร้อยละ 90 ของกระบวนการสังเคราะห์แสงที่เกิดขึ้นบนโลกส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากสาหร่าย กล่าวได้ว่าสาหร่ายเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นที่มีความสำคัญที่สุดในห่วงโซ่อาหาร สาหร่ายยังมีประโยชน์อีกมากมาย เช่น นำมาทำเป็นอาหาร นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรม ใช้เป็นยารักษาโรค ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย (Chuntapa et al., 2003) ใช้เป็นอาหารสัตว์ และใช้สาหร่ายในการตรวจสอบคุณภาพน้ำ เป็นต้น

Skeletonema costatum เป็นแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอม เซลล์เรียงต่อกันเป็นเส้นสาย นำมาใช้ขยายพันธุ์เพื่อเป็นอาหารของลูกกุ้งทะเลตั้งแต่ ระยะเวลาชุกวัยถึงไม่ซีด ชนิดพันธุ์ของ *Skeletonema* ที่นิยมเลี้ยง คือ *S. costatum* สาหร่ายชนิดนี้นิยมเลี้ยงกันมากเนื่องจากเลี้ยงง่ายและลูกกุ้งสามารถกินได้ง่าย มีความสำคัญมากต่ออัตราการรอดระยะแรกของลูกกุ้ง (ลัดดา, 2540)

การเพาะเลี้ยง *S. costatum* จะต้องมีการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายเพื่อที่จะติดตามผลการเลี้ยง ซึ่งการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการนับจำนวนเซลล์ การวัดน้ำหนักแห้ง การวัดคลอโรฟิลล์เอ และการวัดการกระจายแสงหรือความขุ่น ซึ่งแต่ละวิธีนั้นมีข้อดีข้อเสียที่ต่างกันไป วิธีที่นำมาเชื่อถือสำหรับการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั่วไปมี 3 วิธีคือ การนับเซลล์ การวัดคลอโรฟิลล์เอ และการวัดน้ำหนักแห้งซึ่งทั้ง 3 วิธีต้องใช้เวลาในการตรวจสอบ และเสียค่าใช้จ่ายพอสมควร ในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. costatum* โดยการถ่ายภาพเปรียบเทียบกับวิธีการนับเซลล์ วัดมวลชีวภาพและการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอ วิธีนี้น่าจะเป็นทางเลือกที่ช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายได้

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการเพิ่มปริมาณเซลล์ของสาหร่าย *S. costatum* เพื่อใช้ในการทดลอง โดยเตรียมน้ำความเค็ม 28 ppt ใส่ในขวดน้ำเกลือปริมาตร 1000 ml เติมหาละลายอาหารตามสูตรของ Guillard medium or F/2 (ลัดดา, 2540) แล้วเติมสาหร่าย *S. costatum* ประมาณ 200 ml เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิห้องประมาณ 28 °C ให้อากาศโดยใช้ปั๊มตลอดเวลา ให้ความเข้มข้นของแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ประมาณ 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ให้แสงสว่างตลอดทั้งวัน ทิ้งไว้ประมาณ 4-5 วันจึงนำไปทดลอง

การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายทำการวัดด้วยวิธีการนับเซลล์, การวัดน้ำหนักแห้ง (ลัดดา, 2540) การวัดคลอโรฟิลล์เอ (นิคม และยงยุทธ, 2546) และการวัดการเจริญเติบโตด้วยภาพถ่าย โดยทำการถ่ายภาพสาหร่าย *S. costatum* จากกล้องจุลทรรศน์ (Leica model DME) ทำการปรับมาตรฐานระยะภาพจริงกับขนาดภาพในเครื่องคอมพิวเตอร์โดยเปรียบเทียบกับภาพถ่าย microscale นำภาพสาหร่าย *S. costatum* ที่ถ่ายไว้ไปคำนวณหาสัดส่วนพื้นที่ของเซลล์สาหร่าย *S. costatum* ต่อพื้นที่ทั้งหมด ด้วยโปรแกรม Image J

การวิเคราะห์ข้อมูล หาสมการความสัมพันธ์ระหว่างการวัดเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. costatum* ด้วยวิธีการวัดพื้นที่ภาพถ่ายกับการนับจำนวนเซลล์ การวัดน้ำหนักแห้ง และการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอด้วยวิธีวิเคราะห์ความถดถอย (regression analysis) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และวัดความสามารถในการพยากรณ์ของสมการวิเคราะห์ความถดถอยโดยโปรแกรม R ตามวิธีของ Crawley (2005)

ผลการศึกษา

การเจริญเติบโตของ *Skeletonema costatum*

จากการวัด growth curve ของสาหร่าย *S. costatum* ที่เพาะเลี้ยงในห้องทดลองที่ความเค็ม 28 ppt ความเข้มแสง $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ภายใต้อุณหภูมิที่ 28°C พบว่าสาหร่าย *S. costatum* มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ) เท่ากับ 0.147 ดัง Figure 1

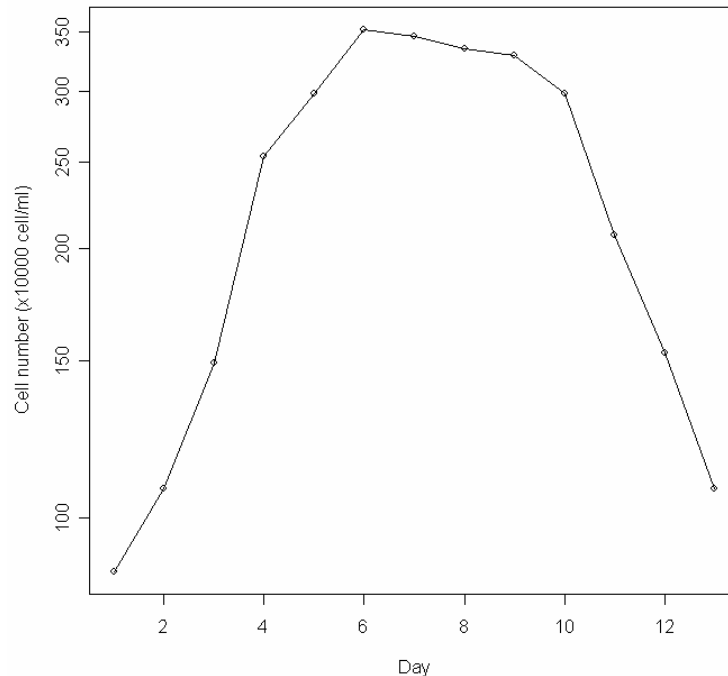


Figure 1 Growth rate of *S. costatum*

การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. costatum* ด้วยการนับจำนวนเซลล์และวัดพื้นที่ภาพถ่าย

ความสัมพันธ์ระหว่างการวัดการเจริญเติบโตของ *S. costatum* ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์และการวัดพื้นที่ภาพถ่าย ดัง Figure 2 โดยค่าพื้นที่ภาพถ่ายแสดงในแนวแกน X กับจำนวนเซลล์แสดงในแนวแกน Y การวัดการเจริญเติบโตทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์ในทางบวก ค่าทั้งสองแปรผันตรงต่อกัน และสมการวิเคราะห์ความถดถอยเท่ากับ $y = 20.701x + 7.3844$ ($R^2 = 0.6199$, $n = 202$) การวัดความสามารถในการพยากรณ์ของสมการวิเคราะห์ความถดถอยระหว่างการวัดการเจริญเติบโตของ *S. costatum* ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์และการวัดพื้นที่ภาพถ่ายแสดงดัง Figure 3

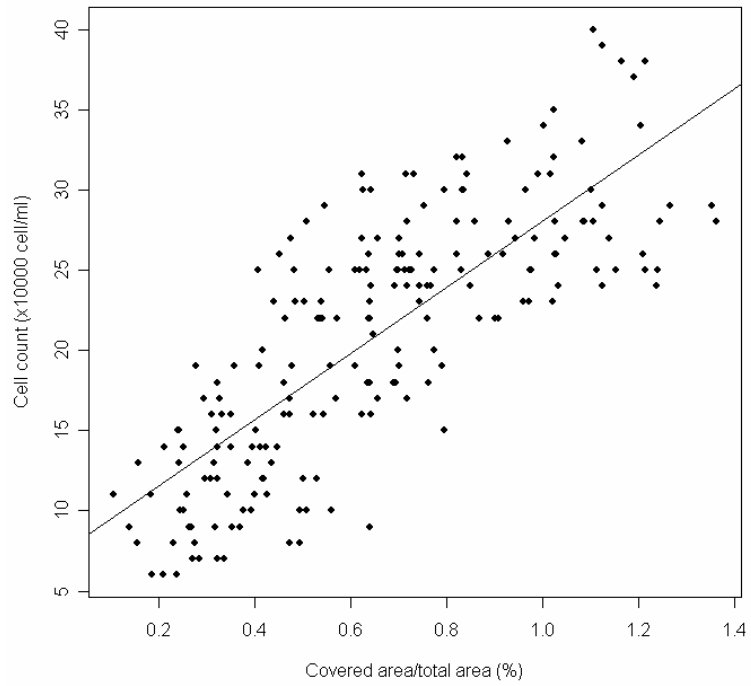


Figure 2 Relationship of growth rate measurement of *S. costatum* between cell count method and photographic area method.

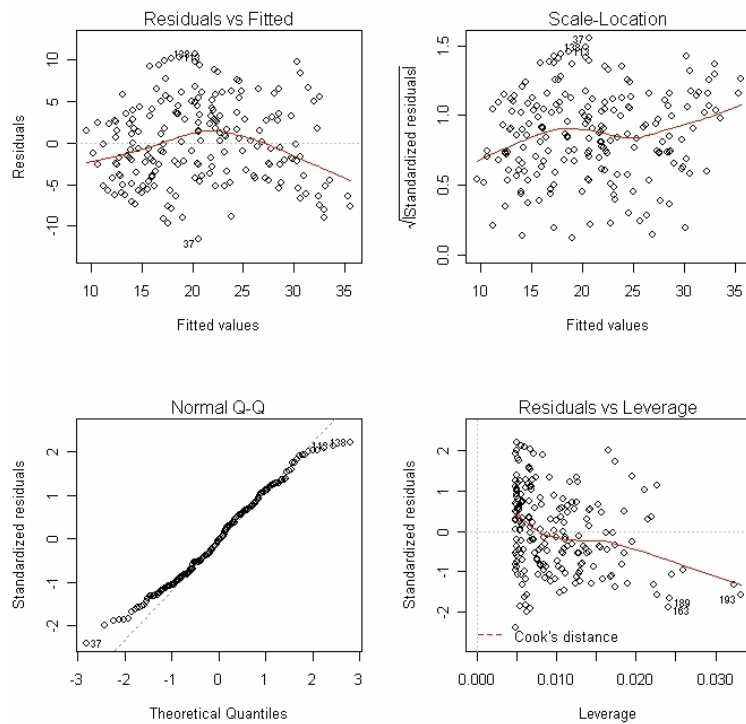


Figure 3 Regression model checking of growth rate measurement of *S. costatum* between cell count method and photographic area method.

การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. costatum* ด้วยการวัดน้ำหนักรวมและวัดพื้นที่ภาพถ่าย
ความสัมพันธ์ระหว่างการวัดการเจริญเติบโตของ *S. costatum* ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์และการวัด

พื้นที่ภาพถ่าย ดัง Figure 4 โดยค่าพื้นที่ภาพถ่ายแสดงในแนวแกน X กับน้ำหนักแห้งแสดงในแนวแกน Y การวัดการเจริญเติบโตทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์ในทางบวก ค่าทั้งสองแปรผันตรงต่อกัน และสมการวิเคราะห์ความถดถอยเท่ากับ $y = 0.2401x + 0.4523$ ($R^2 = 0.5363$, $n = 202$) การวัดความสามารถในการพยากรณ์ของสมการวิเคราะห์ความถดถอยระหว่างการวัดการเจริญเติบโตของ *S. costatum* ด้วยวิธีการวัดน้ำหนักแห้งและการวัดพื้นที่ภาพถ่ายแสดงดัง Figure 5

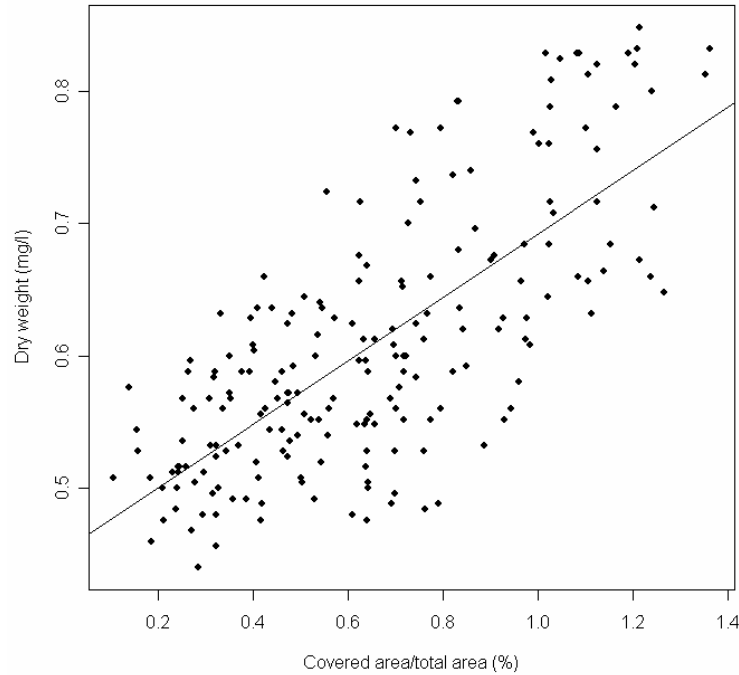


Figure 4 Relationship of growth rate measurement of *S. costatum* between dry weight method and photographic area method.

การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. costatum* ด้วยการวัดคลอโรฟิลล์เอและวัดพื้นที่ภาพถ่าย

ความสัมพันธ์ระหว่างการวัดการเจริญเติบโตของ *S. costatum* ด้วยวิธีการวัดคลอโรฟิลล์เอและการวัดพื้นที่ภาพถ่าย ดัง Figure 6 โดยค่าพื้นที่ภาพถ่ายแสดงในแนวแกน X กับปริมาณคลอโรฟิลล์เอแสดงในแนวแกน Y การวัดการเจริญเติบโตทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์ในทางบวก ค่าทั้งสองแปรผันตรงต่อกัน และสมการวิเคราะห์ความถดถอยเท่ากับ $y = 1.6741x + 0.4614$ ($R^2 = 0.7272$, $n = 202$) การวัดความสามารถในการพยากรณ์ของสมการวิเคราะห์ความถดถอยระหว่างการวัดการเจริญเติบโตของ *S. costatum* ด้วยวิธีการวัดคลอโรฟิลล์เอและการวัดพื้นที่ภาพถ่ายแสดงดัง Figure 7 ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการวัดการเจริญเติบโตทั้ง 4 วิธีแสดงใน Figure 8

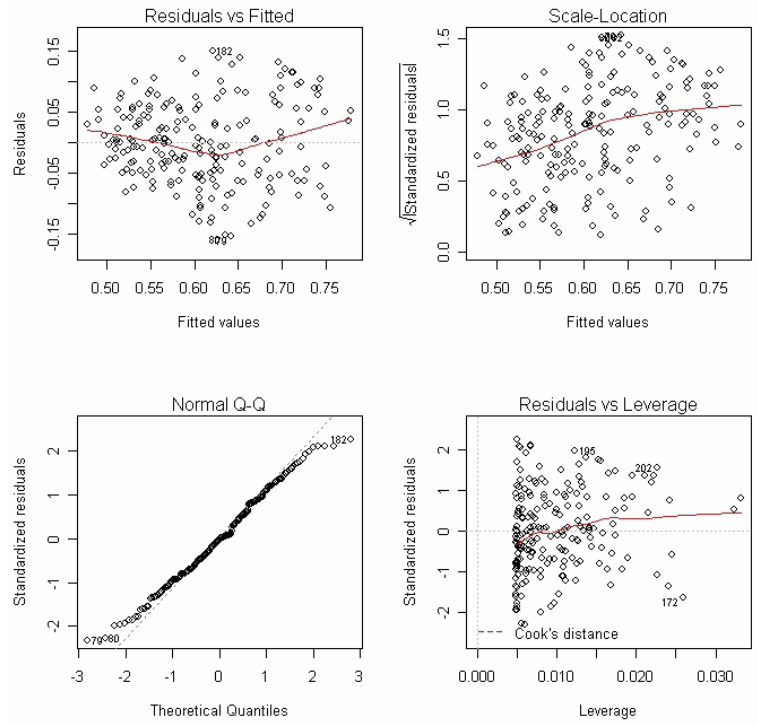


Figure 5 Regression model checking of growth rate measurement of *S. costatum* between dry weight method and photographic area method.

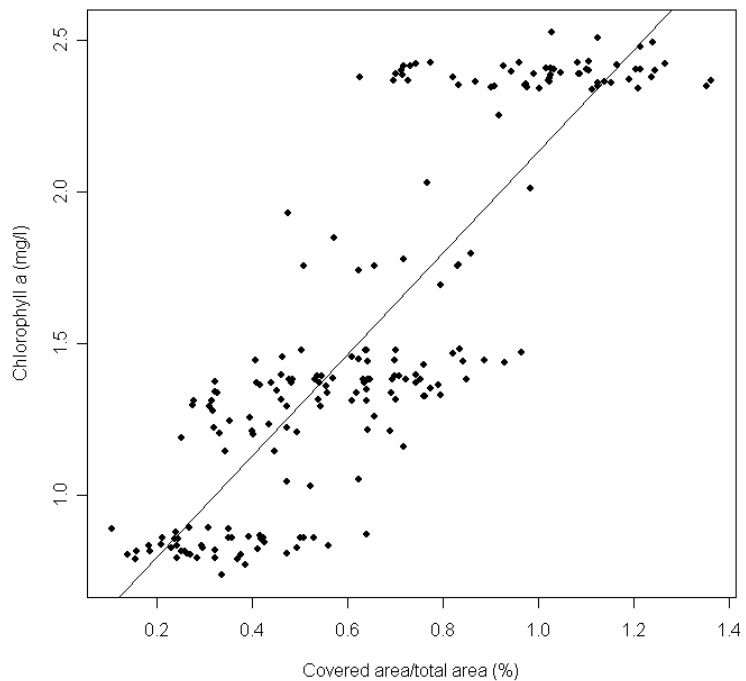


Figure 6 Relationship of growth rate measurement of *S. costatum* between chlorophyll-a determination method and photographic area method.

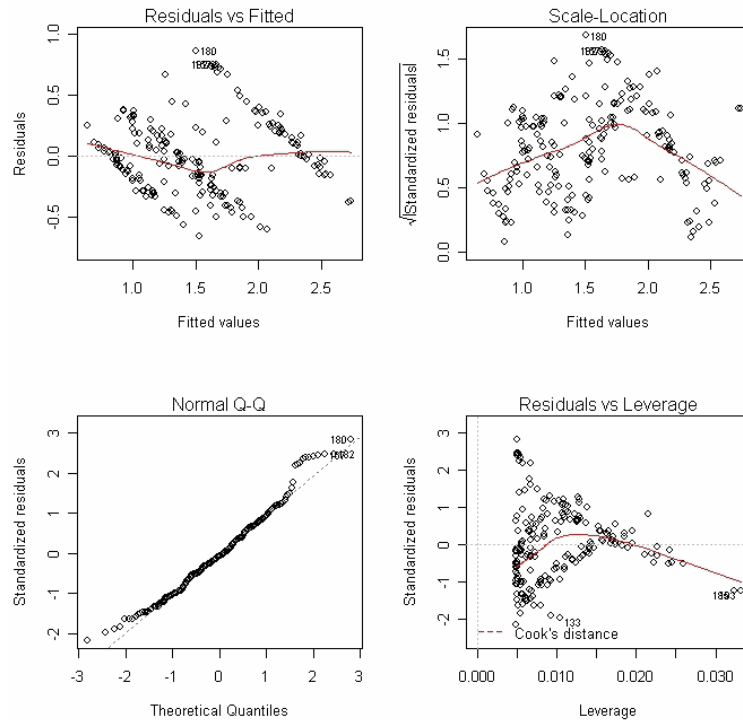


Figure 7 Regression model checking of growth rate measurement of *S. costatum* between chlorophyll-a determination method and photographic area method.

วิจารณ์

เทคนิคการใช้ถ่ายภาพในการเก็บข้อมูลและตรวจสอบการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตมีการศึกษากันในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Zehm et al., 2003; Shinn, 2006 และ Dumas et al., 2009) การนำเทคนิคภาพถ่ายมาประยุกต์ใช้กับการวัดการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แพลงก์ตอน จะช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการเก็บตัวอย่างจำนวนมาก และต้องทำการวิเคราะห์ให้หมดภายในช่วงเวลาอันสั้น เทคนิคนี้สามารถช่วยให้การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผลสามารถทำได้ง่ายขึ้น ยืดระยะเวลาการเก็บข้อมูล โดยที่ข้อมูลยังคงอยู่ในสภาพเดิมที่มีความถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือ ยังช่วยประหยัดเวลา และลดค่าใช้จ่ายในการเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล แต่การใช้เทคนิคการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้การวัดพื้นที่ภาพถ่ายจำเป็นต้องมีข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการวัดการเจริญเติบโตโดยวิธีวัดพื้นที่ภาพถ่ายกับการวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีอื่น

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของ *S. costatum* ด้วยวิธีการวัดพื้นที่จากภาพถ่าย โดยทำการเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานคือ การนับเซลล์ วัดน้ำหนักแห้ง วัดคลอโรฟิลล์ พบว่าวิธีการวัดพื้นที่ภาพถ่ายมีความสัมพันธ์กับวิธีการวัดการเจริญเติบโตที่ได้รับการยอมรับ ซึ่งแสดงให้เห็นโดยความสัมพันธ์ของการวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีวัดพื้นที่ภาพถ่ายกับการวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีอื่น พบว่าข้อมูลมีการกระจายในเชิงเส้นตรง ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ข้อมูลปริมาณมากถึง 202 ข้อมูล

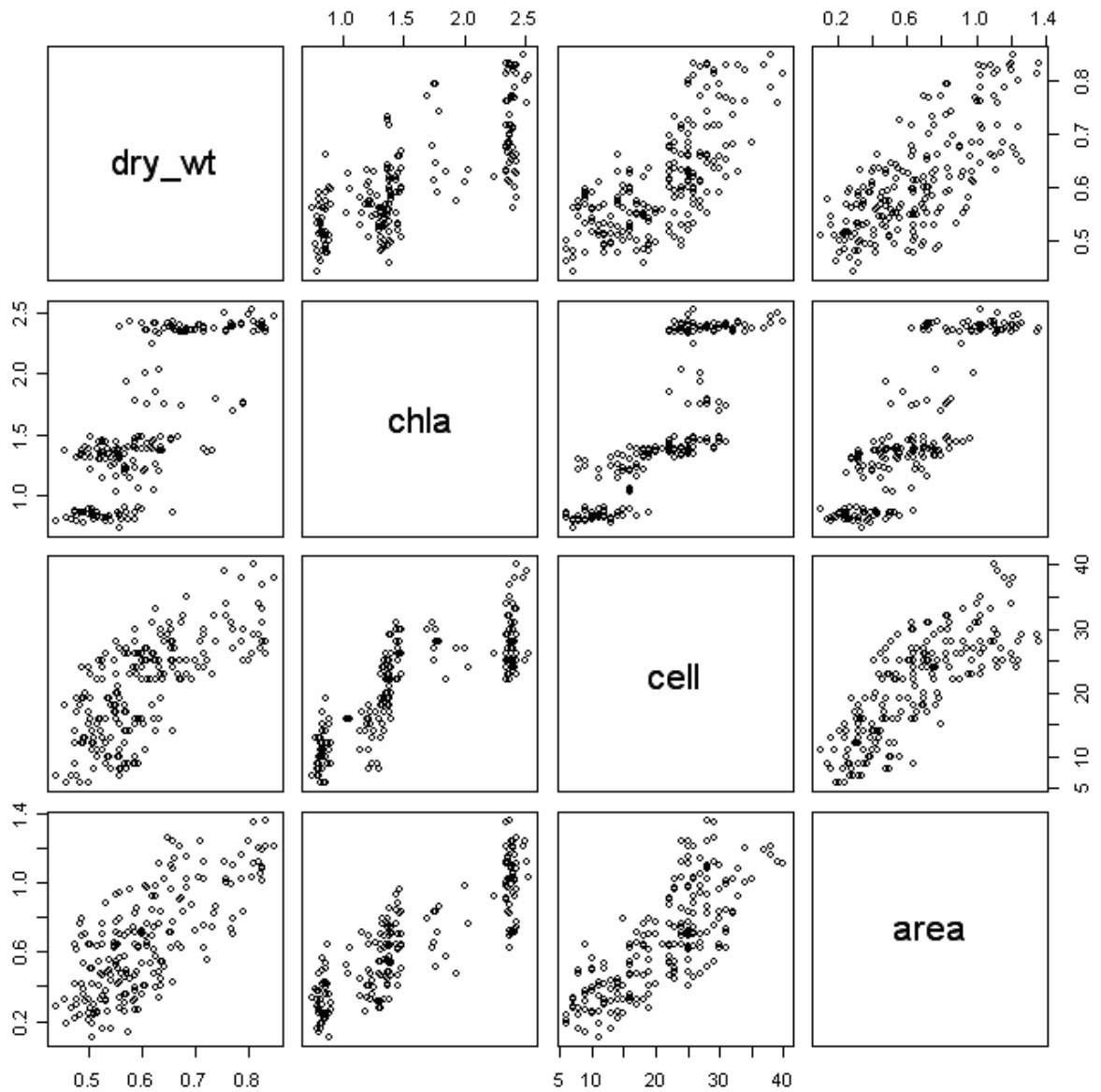


Figure 8 Relationship of growth rate measurement of *S. costatum* among 4 methods including cell count, dry weight, chlorophyll a determination and photographic area method.

การใช้เทคนิคการถ่ายภาพสามารถนำมาใช้ในการนับจำนวนและวัดการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ การใช้เทคนิคการถ่ายภาพเพื่อวัดการเจริญเติบโตจะช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ ประหยัดค่าใช้จ่าย และยังช่วยเพิ่มความแม่นยำในการเก็บข้อมูล ซึ่ง Chatain et al. (1996) ได้ทำการศึกษาการนับจำนวนลูกปลา *Dicentrarchus labrax* ด้วยวิธีการถ่ายภาพโดยเปรียบเทียบกับวิธีการชั่งน้ำหนักและการนับด้วยมือ พบว่ามีความถูกต้องและแม่นยำมากกว่าการชั่งน้ำหนักและการนับด้วยมือ เทคนิคการถ่ายภาพนี้ยังสามารถใช้ในการประเมินและตรวจสอบความสมบูรณ์ของเซลล์ *S. costatum* โดยดูลักษณะของเซลล์จากภาพถ่ายโดยตรง ก่อนนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำได้

สรุป

การวัดพื้นที่ภาพถ่ายสามารถประยุกต์ใช้วัดการเจริญเติบโตของ *S. costatum* ได้ สมการวิเคราะห์ความถดถอยที่แสดงความสัมพันธ์ของการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. costatum* ระหว่างการวัดคลอโรฟิลล์เอ การนับเซลล์ และวัดน้ำหนักแห้ง กับการวัดพื้นที่ภาพถ่ายแสดงดัง Table 1

Table 1 Relationship equations of cell count, dry weight, chlorophyll-a determination and photographic area method (n=202).

Method	Regression equation	R ²
Chlorophyll a determination - photographic area method	$y = 1.6741x + 0.4614$	0.7272
dry weight - photographic area method	$y = 0.2401x + 0.4523$	0.5363
cell count - photographic area method	$y = 20.701x + 7.3844$	0.6199

เอกสารอ้างอิง

- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. **คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
นิคม ละอองศิริวงศ์ และ ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร. 2546. **วิธีวิเคราะห์น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง**. พิมพ์ครั้งที่ 1, สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา.
- Chuntapa, B., S. Powtongsook, and P. Menasveta. 2003. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture* 220: 355-366.
- Chatain, B., L. Debas, and A. Bourdillon. 1996. A Photographic larval fish counting technique: comparison with other methods, statistical appraisal of the procedure and practical use. *Aquaculture* 141, 83-96.
- Crawley, M.J. 2005. **Statistics an introduction using R**. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- Dumas, P., A. Bertaud, C. Peignon, M. Leopold, and D. Pelletier. 2009. A "quick and clean" photographic method for the description of coral reef habitats. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 368: 161-168.
- Shinn, E.A. 2006. Coral reef recovery in Florida and the Persian Gulf. *Environmental Geology* 1: 241-254.
- Zehm, A., M. Nobis, and A. Schwabe. 2003. Multiparameter analysis of vertical vegetation structure based on digital image processing. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 198: 142-160.