สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

2.1 ชีววิทยาของสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว *Tetraselmis suecica* เป็นสาหร่ายที่จัดอยู่ในคลาส Prasinophyceae เป็นสาหร่ายที่มีหนวด มีขนาดเล็กมาก โดยมีลักษณะที่สำคัญประจำคลาสมีดังนี้ (Tomas, 1997)

1. **รูปร่างของเซลล์** มักเป็นรูปสี่เหลี่ยมหรือแบนข้าง เซลล์แบนจากบนลงล่าง (depressed) ตรงบริเวณจุดตั้งต้นของหนวด

2. ผนังเซลล์ เซลล์หุ้มด้วยเกล็ดประกอบด้วยสารอินทรีย์ ซึ่งบางครั้งอาจมีลักษณะเหมือนเปลือกหุ้มเซลล์ ดังเช่นที่พบใน *Tetraselmis* แต่มีหลายชนิดที่ไม่มีเกล็ดหุ้ม

3. **หนวด** มีหนวดจำนวน 1, 2, 4 หรือ 8 เส้น บนหนวดมีขนซึ่งแข็งและหนาบนแกนหนวด บนหนวดมีเกล็ดขนาดเล็กปกคลุม การเคลื่อนที่เป็นการเคลื่อนที่แบบขึ้นด้านบน

4. **คลอโรพลาสต์** รูปร่างมักเป็นแผ่นซึ่งมีจำนวน 1- 2 แผ่น หรือเป็นเม็ดกลมมีจำนวนมาก

5. **Eyespot** เซลล์ส่วนใหญ่มี eyespot และอยู่ในคลอโรพลาสต์

6. **Ejectosome** เป็นโครงสร้างที่มีหน้าที่ป้องกันตัว

7. **อาหารสะสม** ได้แก่ แป้ง มีลักษณะเป็นแผ่นหุ้มอยู่รอบไพรีนอยด์ ซึ่งอยู่ในคลอโรพลาสต์หรือเป็นเม็ดแป้งอยู่ในคลอโรพลาสต์

2.2 อนุกรมวิธานของสาหร่ายสีเขียว *Tetraselmis suecica*

Tetraselmis เป็นสาหร่ายที่เซลล์มีเปลือกหุ้มซึ่งเกิดจากเกล็ดหุ้มเซลล์ มีหนวด 4 เส้น ซึ่งสามารถจัดจำแนกชนิดของ *Tetraselmis suecica* ตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้คือ อยู่ในดิวิชั่น Chlorophyta คลาส Prasinophyceae อันดับ Chlorodendrales ครอบครัว Chlorodendraceae สกุล *Tetraselmis* และชนิด *Tetraselmis suecica* (Tomas, 1997)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกได้ 2 ประเภทคือ (ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542)

2.3.1 ปัจจัยทางฟิสิกส์

2.3.1.1 แสงสว่าง (illumination) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากต่อการเติบโตของสาหร่าย ถ้าปริมาณแสงน้อยเกินไปสาหร่ายจะเติบโตไม่ได้ และที่แสงระดับหนึ่งสาหร่ายจะเติบโตเร็วมาก แต่ถ้าแสงมากไปกว่านั้นสาหร่ายจะไม่สามารถเติบโตต่อไปได้

2.3.1.2 อุณหภูมิ (temperature) อุณหภูมิต่ำเกินไปสาหร่ายจะเติบโตไม่ได้ แต่ถ้าสูงเกินไปสาหร่ายก็เติบโตได้ไม่ดีเช่นกัน

2.3.1.3 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) โดยทั่วไปสาหร่ายในกลุ่มสาหร่ายเขียวสามารถเติบโตได้ดีในสภาวะที่ค่อนไปทางกรดเล็กน้อย ส่วนกลุ่มไดอะตอมสามารถเติบโตได้ดีในสภาพที่เป็นกลาง ส่วนกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างเล็กน้อย

2.3.1.4 ความเค็ม (salinity) สาหร่ายบางชนิดชอบอยู่ในน้ำที่มีความเค็มประมาณ 28-30 พีเอสยู บางชนิดสามารถทนต่อความเค็มสูงได้ดี

นอกจากปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีปัจจัยชนิดอื่นที่มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายอีก เช่น แก๊สออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ ความกระด้างของน้ำ เป็นต้น ซึ่งมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสาหร่าย

2.3.2 ปัจจัยทางเคมี

การเติบโตของสาหร่ายขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยงซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของสาหร่าย อาหารหรือธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มธาตุอาหารหลัก (macronutrient) และกลุ่มธาตุอาหารรอง (micronutrient) ธาตุอาหารหลักคือธาตุอาหารที่ประกอบเป็นโครงสร้างของสาหร่าย ดังนั้นจึงต้องใช้เป็นปริมาณค่อนข้างมาก ประกอบด้วยคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และโพแทสเซียม ส่วนธาตุอาหารรองได้แก่ธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการใช้น้อย ธาตุอาหารรองเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลที่จำเป็นเช่น เอนไซม์ เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตหรือเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลของเอนไซม์บางชนิด

2.3.2.1 ธาตุอาหารหลัก (macronutrients) ประกอบด้วยธาตุต่อไปนี้

คาร์บอน คาร์บอนที่พืชนำไปใช้แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คืออนินทรีย์คาร์บอนและอินทรีย์คาร์บอน สาหร่ายใช้คาร์บอนประเภทอนินทรีย์ในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งละลายได้ในน้ำหรืออยู่ในรูปของเกลือคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนต

ไนโตรเจน ไนโตรเจนมีความสำคัญรองจากคาร์บอน โดยปริมาณ

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขาดไนโตรเจนจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสงและปริมาณรงควัตถุของเซลล์รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดก็จะลดลงด้วย

ฟอสฟอรัส เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของพืช เพราะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายเทพลังงานและกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิค ฉะนั้นสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสจึงจัดว่าเป็นแหล่งเบื้องต้นของฟอสฟอรัสซึ่งจะแตกตัวเป็นสารอนินทรีย์ ถ้าสาหร่ายขาดฟอสฟอรัสจะมีผลเสียต่อการเติบโต คือปริมาณโปรตีน รงควัตถุชนิดคลอโรฟิลล์เอ RNA และ DNA จะลดลง แต่แป้งหรือคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

ซัลเฟอร์ เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายทุกชนิด ซัลเฟอร์ในเซลล์สาหร่ายมีหลายรูปแบบเช่น ในรูปของกรดอะมิโน วิตามินบี กรดแพนโทเธนิค กรดลิโพอิค ฯลฯ ซัลเฟอร์ที่สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ ได้แก่ เกลือของโลหะ คือซัลเฟต ซัลไฟท์ และซัลไฟด์

แคลเซียม เป็นธาตุอาหารที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเกล็ดของสาหร่ายบางชนิด และโครงสร้างของสาหร่ายโดยเฉพาะสาหร่ายน้ำเค็ม ปริมาณแคลเซียมที่พืชต้องการขึ้นอยู่กับปริมาณของธาตุอาหารชนิดอื่นด้วย

โซเดียม โพแทสเซียม และคลอรีน โซเดียมเป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายบางชนิดต้องการ เป็นธาตุอาหารที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด และพืชสามารถใช้โซเดียมทดแทนโพแทสเซียมในกรณีที่แหล่งน้ำขาดโลหะชนิดนี้ โพแทสเซียมเป็นธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์หลายชนิด อัตราส่วนของโซเดียมและโพแทสเซียมจะมีผลต่อการใช้คลอรีนของสาหร่าย

แมกนีเซียม เป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์

2.3.2.2 ธาตุอาหารรอง (micronutrients)

เป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการใช้ปริมาณน้อยมาก ปริมาณที่ใช้ในอาหารเพาะเชื้อในระดับมิลลิกรัมต่อลิตรอาหารได้แก่

เหล็ก เป็นธาตุอาหารที่ช่วยการดูดซึมไนโตรเจนและกระบวนการสังเคราะห์แสง คือช่วยการสร้างสารสีสีเขียวชนิด คลอโรฟิลล์ เอ และสารสีสีน้ำเงินชนิด ไฟโคไซยานิน ถ้าสาหร่ายขาดธาตุเหล็กจะมีผลต่อการเติบโตและสรีรวิทยาของเซลล์

โบรอน เป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายบางชนิดต้องการใช้ ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและไดอะตอม โดยเฉพาะไดอะตอมน้ำเค็ม

แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี เป็นธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย รวมทั้งเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเอนไซม์อีกหลาย

ชนิด ถ้าขาดจะทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงลดลงและการหายใจเพิ่มขึ้น ธาตุอาหารทั้งสามชนิดนี้ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้สาหร่ายไม่สามารถเติบโตได้

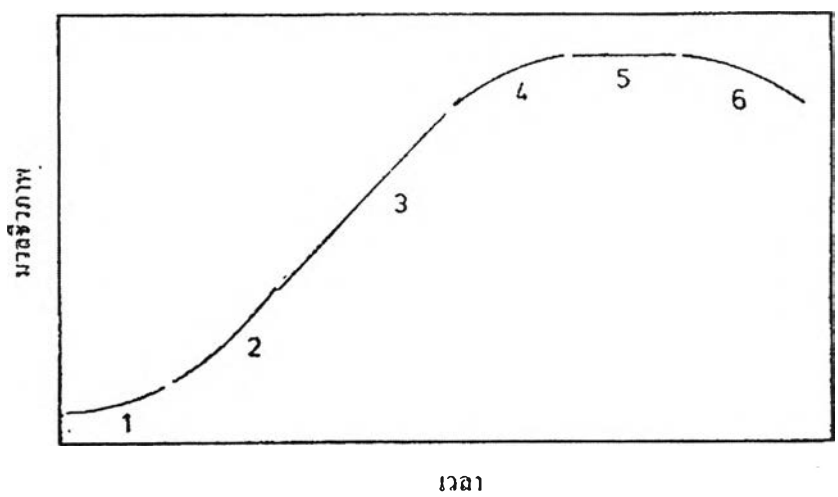
โมลิบดินัม วานาเดียม โคบอลท์ นิเกิล โมลิบดินัมมีบทบาทสำคัญในการตรึงไนโตรเจน นอกจากนั้นโมลิบดินัมยังเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ช่วยในการสังเคราะห์แสง วานาเดียมเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่ายบางชนิด และสามารถใช้ทดแทนโมลิบดินัมเพื่อการตรึงไนโตรเจน โคบอลท์เป็นส่วนประกอบของวิตามินบี 12 ซึ่งสำคัญมากต่อการเติบโตของสาหร่าย หลายชนิด นิเกิลเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ยูเรียของสาหร่ายบางชนิด เช่น ไดอะตอมและสาหร่ายสีเขียว

ซิลิกา เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นที่สุดสำหรับพวกไดอะตอมเพื่อสร้างผนังเซลล์

เซเลเนียม บทบาทของธาตุอาหารชนิดนี้ต่อการเลี้ยงสาหร่ายยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก แต่มีข้อสังเกตจากการทดลองว่าปริมาณของเซเลเนียมที่เติมในแหล่งน้ำจะสามารถเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบชนิดของสาหร่าย ถ้าปริมาณเซเลเนียมเพิ่มขึ้นจะมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพิ่มขึ้นและไดอะตอมจะลดปริมาณลง สาหร่ายบางชนิดต้องการเซเลเนียมเพื่อการเติบโต

2.4 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

2.4.1 การเลี้ยงแบบแบตช์ (batch culture) การเลี้ยงแบบแบตช์เป็นการเลี้ยงในระบบปิดซึ่งมีอาหารตั้งแต่เริ่มแรกที่จำกัด เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์มีอัตราการเติบโตค่อยๆ เพิ่มขึ้น หลังจากนั้นเซลล์จะมีอัตราการเติบโตคงที่และมีค่าสูงสุดในระบบการเลี้ยงแบบแบตช์ การเติบโตจะถูกจำกัดเมื่ออาหารหมดการเติบโตจะค่อยๆ ลดลงเข้าใกล้ศูนย์ (Stanbury, 1995) การเติบโตของสาหร่ายภายใต้การเลี้ยงแบบแบตช์โดยทั่วไปแสดงดังรูปที่ 2-1



ภาพที่ 2-1 การเติบโตของสาหร่ายในระบบการเลี้ยงแบบแบตช์ (Becker, 1994)

1 คือ ระยะพักเซลล์ (lag phase)

2 คือ ระยะเร่งการเติบโต (accelerating growth phase)

3 คือ ระยะทวีคูณ (exponential growth or log phase)

4 คือ ระยะทวีคูณลดลง (decreasing log growth phase)

5 คือ ระยะคงที่ (stationary phase)

6 คือ ระยะเร่งตาย (accelerated death phase)

จากกราฟสามารถอธิบายการเติบโตระยะที่สำคัญของสาหร่ายได้ดังนี้

ระยะพักเซลล์ (lag phase) การเติบโตระยะนี้เป็นระยะที่เซลล์มีการปรับตัวให้เข้ากับอาหาร เพาะเชื้อและสภาวะใหม่ ทำให้ไม่มีการเพิ่มจำนวนขึ้นแต่เซลล์สาหร่ายจะมีขนาดใหญ่ขึ้น ช่วงระยะพักเซลล์จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย สภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงและระยะของเซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยง

ระยะทวีคูณ (log phase) เป็นระยะที่สาหร่ายมีการเติบโตแบบทวีคูณ ระหว่างการเติบโตความเข้มข้นของสารอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากสาหร่ายนำไปใช้ในการเติบโต หลังจากนั้นสาหร่ายจะปลดปล่อยของเสียจากกระบวนการเมตาบอลิซึมออกมาทำให้การเติบโตของสาหร่ายลดลงการเติบโตในระยะนี้สามารถอธิบายได้ด้วยสมการนี้

$$dx/dt = \mu x \qquad (1.1)$$

โดย x คือ ความหนาแน่นเซลล์ของสาหร่าย

t คือ เวลา (ชั่วโมง)

μ คือ อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

เมื่อ อินทีเกรต สมการ 1.1 จะได้

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \qquad (1.2)$$

โดย x_0 คือ ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น

x_t คือ ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายเมื่อเวลาผ่านไป t

e คือ ค่า log ธรรมชาติ

หรือ $$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \qquad (1.3)$$

ระยะคงที่ (stationary phase) เป็นระยะที่ความหนาแน่นสูงสุดและคงที่ เกิดภาวะสมดุลระหว่างอัตราการแบ่งเซลล์กับอัตราการตาย

ระยะตาย (death phase) เป็นระยะสุดท้ายของการเติบโตของเซลล์สาหร่าย ซึ่งเซลล์จะตายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากขาดสารอาหารและของเสียที่มากขึ้น

2.4.2 การเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture) (Wang และคณะ, 1979)

สิ่งที่สำคัญในการเลี้ยงแบบต่อเนื่องคือการควบคุมปริมาตรของระบบเลี้ยงให้คงที่อยู่ตลอดเวลา มีการเติมอาหารเพาะเชื้อตลอดเวลาโดยใช้เครื่องสูบน้ำซึ่งทำให้สามารถควบคุมอัตราการเติมอาหารเพาะเชื้อให้คงที่ได้ และภาชนะเก็บอาหารเพาะเชื้อจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อน นอกจากนั้นยังต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรดเป็นด่าง อุณหภูมิและอัตราการให้อากาศให้คงที่อีกด้วย

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องมี 2 แบบ คือ

2.4.2.1 chemostat ระบบนี้จะมีการเติมสารอาหารเข้าสู่ระบบเลี้ยงที่มีปริมาตรในระบบคงที่ สารอาหารทุกตัวต้องมีปริมาณที่มากเกินพอต่อการเติบโตของเซลล์ การจำกัดความเข้มข้นของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของเซลล์เพียงชนิดเดียวจะมีผลต่อความหนาแน่นของเซลล์ในระยะคงที่ได้ chemostat หมายถึง ลักษณะสภาพแวดล้อมทางเคมีที่คงที่ ทำให้สามารถควบคุมสรีรวิทยาของเซลล์ที่เติบโตโดยการควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเติบโตของเซลล์ โดยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตจะเป็นตัวจำกัดอัตราการเติบโตของเซลล์

การอธิบายลักษณะการเติบโตในระยะคงที่ (steady stage) สำหรับการเลี้ยงแบบ chemostat ต้องอธิบายถึงความสัมพันธ์ของความหนาแน่นเซลล์และความเข้มข้นของปริมาณสารอาหารที่จำกัดที่มีกับอัตราการไหลของอาหารที่เติมลงสู่ระบบ (Wang และคณะ, 1979) โดยความสัมพันธ์ของความหนาแน่นเซลล์ (X) และปริมาณสารอาหารที่จำกัด (S) กับอัตราการเจือจาง สามารถอธิบายได้ดังสมการต่อไปนี้

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \qquad (2.1)$$

K_s คือ ค่าคงที่ (half-rate saturation)

S คือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

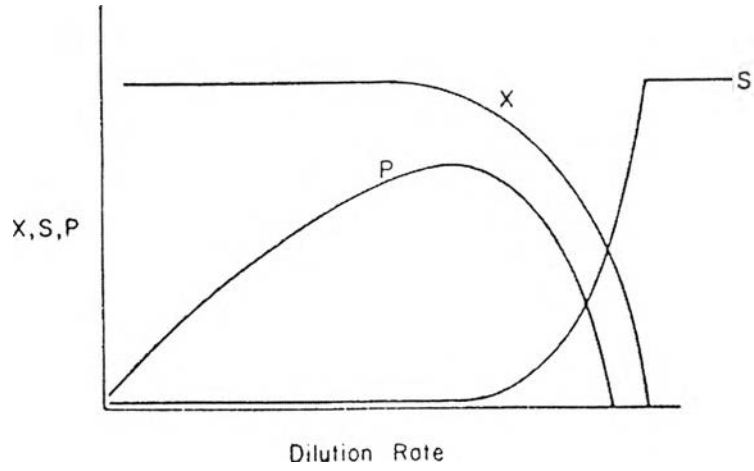
μ คือ อัตราการเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate)

μ_{max} คือ อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด

จากสมการ (2.1) เมื่อนำมาใช้ในการเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะกลายเป็น

$$D=D_c \frac{S}{(Ks + S)} \qquad (2.2)$$

D_c คือ ค่าอัตราการเจือจางสูงสุด



ภาพที่ 2-2 ความสัมพันธ์ของความหนาแน่นเซลล์ (X) ปริมาณสารอาหารที่จำกัด (S) และผลผลิต (P) กับอัตราการเจือจาง (D)

อย่างไรก็ตาม การเติบโตของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องที่เกิดขึ้นจริง จะมีลักษณะที่แตกต่างจากทฤษฎี ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้ยังไม่ถูกกล่าวถึงมากนักในตำราทั่วไป ปรากฏการณ์นี้ทำให้กราฟความสัมพันธ์ของความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจือจางเปลี่ยนไปจากภาพที่ 2-2 เป็นดังที่แสดงในภาพที่ 2-3 โดยสามารถอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้ดังนี้

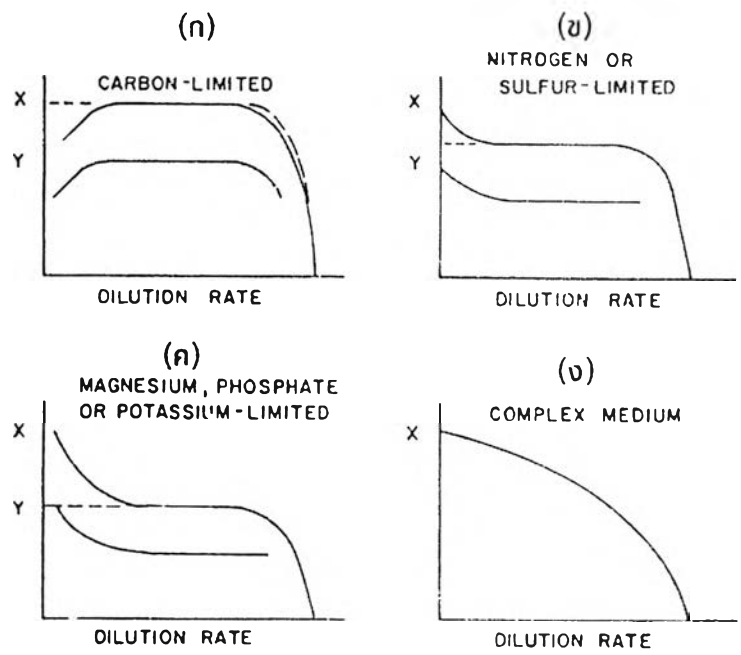
1. สภาวะคาร์บอนจำกัด (Carbon-limited Chemostat) เป็นการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในสภาวะที่เกิดการจำกัดความเข้มข้นของคาร์บอนในอาหารเพาะเชื้อ พบว่าในสภาวะที่อัตราการเจือจางต่ำ ประมาณร้อยละ 25 ของอัตราการเจือจางสูงสุด ความหนาแน่นเซลล์จะลดลงเมื่ออัตราการเจือจางลดลง เนื่องจากเซลล์ที่กำลังเติบโตมีความต้องการที่จะนำคาร์บอนไปใช้เป็นแหล่งพลังงานในการดำรงชีวิตของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กระบวนการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ เพื่อรักษาองค์ประกอบโครงสร้างและโปรตีน และเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ของเซลล์ ความต้องการปริมาณพลังงานจากคาร์บอนเพื่อการดำรงชีวิตของเซลล์จะอยู่ประมาณร้อยละ 5-10 ของความต้องการพลังงานรวมเมื่อเซลล์อยู่ในช่วงที่มีการเติบโตสูงสุด ซึ่งจะเป็นค่าคงที่และไม่ขึ้นกับอัตราการเติบโต อย่างไรก็ตามขณะที่อัตราการเติบโตลดลง ปริมาณพลังงานจากคาร์บอนที่ใช้ในการดำรงชีวิตจะเพิ่มขึ้น และเป็นส่วนหลักของพลังงานรวม ทำให้ปริมาณพลังงานจากคาร์บอนที่ใช้สร้างเซลล์ใหม่ลดลง ทำให้ผลผลิตเซลล์ลดลง โดยทั่วไปจะพบว่าผลผลิตเซลล์จะลดลงที่อัตราการเติบโตสูงขึ้น เนื่องจากผลผลิตและการสะสมของของเสียจากกระบวนการเมตาบอลิซึม ภาพที่ 2-3 (ก)

2. สภาวะไนโตรเจนหรือซัลเฟตจำกัด (Nitrogen or Sulfate-limited Chemostat) ในสภาวะที่ไนโตรเจนหรือซัลเฟตมีจำกัด เมื่ออัตราการเจือจางลดลงความหนาแน่นเซลล์ที่วัดจากน้ำหนักของเซลล์ในหน่วยกรัมต่อลิตรจะสูงขึ้น เซลล์เริ่มมีการสะสมพลังงานเช่น โพลีแซคคาไรด์

และไขมัน ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นและเพิ่มปริมาณมากขึ้น มีผลให้ผลผลิตเซลล์เพิ่มขึ้น ภาพที่ 2-3 (ข)

3. สภาวะโปแตสเซียม แมกนีเซียม และฟอสเฟตจำกัด (Potassium, Magnesium, or Phosphate-limited Chemostat) การที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียม แมกนีเซียม หรือฟอสเฟตมีจำกัดในอาหารเพาะเชื้อ จะทำให้การเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบต่อเนื่องมีลักษณะคล้ายกับที่พบในสภาวะไนโตรเจนหรือซัลเฟตจำกัด กล่าวคือความหนาแน่นเซลล์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการเจือจางลดลง แต่มีสาเหตุที่ต่างกันคือเซลล์ที่เติบโตในสภาวะที่มีสารอาหารที่จำกัดจะมีสารอาหารที่ใช้ในการเติบโตปริมาณน้อย โดยโพแทสเซียม แมกนีเซียม และฟอสเฟตมีความเกี่ยวข้องในกระบวนการสร้าง (anabolism) และเป็นส่วนประกอบสำคัญของกรดนิวคลีอิค เซลล์ที่โตช้าจะต้องการ RNA น้อยกว่าเซลล์ที่โตเร็ว ดังนั้นเมื่ออัตราการเจือจางลดลง ปริมาณโพแทสเซียม แมกนีเซียม หรือฟอสเฟตจะมีเพียงพอต่อความต้องการของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อนำความเข้มข้นของเซลล์ในรูปของปริมาณ RNA หรือ กรดนิวคลีอิกรวมต่อมิลลิลิตร มาเขียนกราฟจะได้รูปตามเส้นประในภาพที่ 2-3 (ค)

4. สภาวะการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องที่ไม่ใช่คีโมแสตท (Non-chemostat Continuous Culture) เป็นการเติบโตของเซลล์ในอาหารเพาะเชื้อที่มีความซับซ้อนเนื่องจากมีองค์ประกอบของสารอาหารหลายชนิดและมีความเข้มข้นเพียงพอไม่เกิดการจำกัด มีผลทำให้เซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น ภาพที่ 2-3 (ง)



ภาพที่ 2-3 ลักษณะการเติบโตของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่มีลักษณะแตกต่างจากแนวทฤษฎีทั่วไป (Wang และคณะ, 1979)

2.4.2.2 turbidostat (McNeil และ Harvey, 1990) การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องในระบบนี้จะมีการให้อาหารที่เป็นธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณที่มากเกินพอ ดังนั้นการเติบโตจะไม่มีสารอาหารที่เป็นตัวจำกัด สาหร่ายจะมีอัตราการเติบโตสูงสุดที่จำเพาะ (μ_{max}) ระบบจะควบคุมความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในปริมาณที่ต้องการ โดยทำการตรวจวัดความหนาแน่นของสาหร่ายด้วย Nephelometer หรือ Spectrophotometer เมื่อพบว่าความหนาแน่นของสาหร่ายมีค่าต่างจากที่ตั้งไว้ เครื่องจะส่งสัญญาณไปยังตัวควบคุมซึ่งจะทำการปรับโดยเติมอาหารลงสู่ภาชนะ

ข้อดีของวิธีการเลี้ยงแบบต่อเนื่องคือให้ผลผลิตเซลล์สาหร่ายที่มีคุณภาพและคงที่ สาหร่ายจะมีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณให้ผลผลิตสูงกว่าและเป็นระบบอัตโนมัติ แต่สิ่งที่สำคัญในการเลี้ยงแบบต่อเนื่องคือการปรับอัตราการเจือจางจนเกิดการชะล้างเซลล์ออกจากระบบ (wash out) ซึ่งอัตราการเจือจางที่ใช้ควรต่ำกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะเล็กน้อย (Fulks และ Main, 1991)

2.5 ชีววิทยาของโรติเฟอร์ (Pechenik, 1996)

2.5.1 รูปร่างลักษณะทั่วไป

ลำตัวโรติเฟอร์แบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ หัว (head) ลำตัว (trunk) และเท้า (foot) ส่วนหัวเป็นส่วนที่สั้นและแคบ ประกอบด้วยวงขนเรียกว่า corona เมื่อเคลื่อนไหวจะคล้ายวงล้อที่หมุน ซึ่งแตกต่างกันไปตามกลุ่มของโรติเฟอร์ ลำตัวของโรติเฟอร์หุ้มด้วยลอริกาซึ่งบางหรือหนาก็ได้ตามชนิด ลอริกาประกอบด้วยไคติน โรติเฟอร์ส่วนใหญ่มีหนวดที่ใช้รับความรู้สึกซึ่งอยู่ด้านหลังเรียกว่า dorsal antenna จำนวน 1 เส้น และอยู่ด้านหลังอีก 1 เส้น เรียกว่า lateral antennae เท้าของโรติเฟอร์เรียวยาวมีลักษณะต่อเป็นวงหรือแบ่งเป็นปล้องค่อนข้างแข็งสามารถยืดหดได้

2.5.2 การเคลื่อนที่

โรติเฟอร์เคลื่อนที่ด้วยการว่ายน้ำ การเคลื่อนที่ใช้ส่วนของ corona ช่วยให้เคลื่อนที่ไปข้างหน้าและใช้เท้าช่วยบังคับทิศทางเวลาเคลื่อนที่

2.5.3 การกินและการย่อยอาหาร

การกินอาหารของโรติเฟอร์ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของ corona และส่วนของ trophi ที่อยู่ใน mastax พวกที่กินอาหารที่อยู่ในน้ำจะมี corona ใหญ่และมี trophi ช่วยในการบด โรติเฟอร์ที่อยู่ในคลาส Monogononta จะกินอาหารโดยการฉีก เนื่องจากขนาดของ corona เล็กและสำหรับใช้ว่ายน้ำเพียงอย่างเดียว ฉะนั้นโรติเฟอร์จึงจับอาหารโดยการยืดส่วนของ trophi ออกมานอกช่องปาก อาหารอาจถูกย่อยหรือบดจนเล็กลง หรือใช้ปลาย trophi แทงและดูดของเหลวเข้าสู่ลำตัวก็ได้ โรติเฟอร์ในคลาส Monogononta บางชนิดมีการพัฒนาวิธีการกินอาหาร โดยวิธีการดักด้วยหนามหรือ setae ที่มีโครงสร้างคล้ายกับดัก เมื่ออาหารถูกจับได้แล้วจะถูกส่งเข้าทางช่องปาก ทางเดินอาหาร (digestive tract) ของโรติเฟอร์เป็นท่อที่ไม่สลับซับซ้อน

2.5.4 การหมุนเวียน แลกเปลี่ยนแก๊ส ขับถ่าย และออสโมเร็กกูเลชั่น

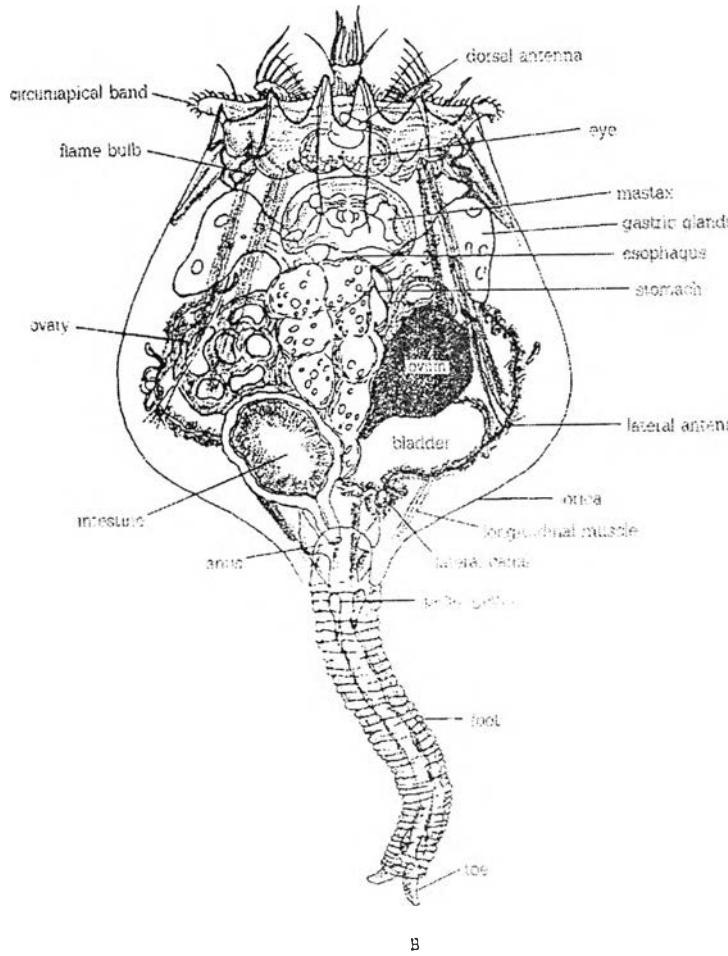
โรติเฟอร์ไม่มีอวัยวะพิเศษสำหรับการหมุนเวียนแก๊สภายในตัว หรือการแลกเปลี่ยนก๊าซระหว่างเนื้อเยื่อและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นของเหลวในช่องว่างจึงทำหน้าที่เป็นตัวหมุนเวียนก๊าซ โรติเฟอร์ส่วนใหญ่มีอวัยวะช่วยในการขับถ่ายที่เรียกว่า protonephridia 1 คู่ ระบบของ protonephridia ทำหน้าที่เป็นระบบออสโมเร็กกูเลชั่น

2.5.5 ระบบสืบพันธุ์

ระบบสืบพันธุ์ของโรติเฟอร์มี 2 แบบคือ

2.5.5.1 การสืบพันธุ์แบบมีเพศ โรติเฟอร์มีเพศเมียมากกว่าเพศผู้ เพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้มาก อวัยวะของเพศผู้ประกอบด้วย testis 1 อัน ท่อนำสเปิร์มและช่องเปิดสเปิร์ม ซึ่งผนังท่อจะม้วนงอเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ ตัวผู้มีช่วงชีวิตสั้น โรติเฟอร์เพศเมียจะมี gervitellarium เป็นคู่หรือมีเพียง 1 ข้าง เป็นถุงประกอบด้วยเซลล์ที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ 2-3 อัน เมื่อไข่แต่ละฟองใกล้โตเต็มที่จะเคลื่อนที่ลงสู่ด้านล่างเพื่อเตรียมออกสู่ท่อนำไข่ gervitellarium จะทำหน้าที่สร้างไข่แดง การผสมของไข่กับสเปิร์มจะเป็นแบบภายใน ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วจะถูกปล่อยออกหรือติดกับตัวแม่จนฟักเป็นตัว

2.5.5.1 การสืบพันธุ์แบบพาร์เธโนเจเนสิส (parthenogenesis reproduction) เพศเมียที่มีการสืบพันธุ์แบบพาร์เธโนเจเนสิสมีชื่อเรียกว่า อะมิคติคฟีเมล (amictic female) ตัวแม่และไข่ที่ถูกสร้างขึ้นจะมี diploid chromosome ซึ่งไข่จะแบ่งตัวโดยไม่ลดจำนวนโครโมโซมในระหว่างที่อยู่ในรังไข่



ภาพที่ 2-4 ลักษณะของโรติเฟอร์

ที่มา : Pechenik (1996)

2.5 อนุกรมวิธานของโรติเฟอร์ *Brachionus plicatilis*

สามารถจำแนกโรติเฟอร์ *Brachionus plicatilis* ได้ดังนี้คือ โรติเฟอร์อยู่ในไฟลัม Rotifera คลาส Monogononta อันดับ Ploima ครอบครัว Brachionidae สกุล *Brachionus* และชนิด *Brachionus plicatilis* (Pechenik, 1996)

2.6 การเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์

โรติเฟอร์เป็นสิ่งมีชีวิตที่ทนความเค็มได้ในช่วงกว้าง มีขนาดเล็ก ว่ายน้ำช้าและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง (Treece และ Davis, 2001) จึงเหมาะสมที่จะนำมาเป็นอาหารสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร โรติเฟอร์ถูกใช้เป็นอาหารสำหรับปลาและสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเซียมากกว่า 78 ชนิด ทำให้ความต้องการโรติเฟอร์เพิ่มมากขึ้น (Fu และคณะ, 1997) โรติเฟอร์ชนิด *Brachionus*

plicatilis ถูกนำมาใช้อนุบาลลูกปลาครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่นปี ค.ศ. 1990 และได้ถูกนำมาใช้ในโรงเพาะฟักทั่วโลกในเวลาต่อมา

การเลือกคัดสายพันธุ์ของโรติเฟอร์เป็นสิ่งที่สำคัญเนื่องจากโรติเฟอร์แต่ละชนิดจะมีอัตราการสืบพันธุ์ ขนาดและสภาวะที่ใช้ในการเติบโตที่แตกต่างกัน โรติเฟอร์น้ำเค็มแบ่งเป็นสองชนิดตามขนาด ได้แก่ *B. plicatilis* เป็นโรติเฟอร์ขนาดใหญ่หรือที่เรียกว่า large (L) type มีขนาดประมาณ 200-300 ไมครอน และ *B. rotundiformis* เป็นโรติเฟอร์ขนาดเล็กหรือ small (S) type มีขนาดประมาณ 100-200 ไมครอน (Treece และ Davis, 2001)

การเลี้ยงโรติเฟอร์มีด้วยกันหลายวิธีแต่วิธีที่เป็นที่นิยมได้แก่ (Lubzens และคณะ, 2001)

1. การเลี้ยงแบบแบตช์ (batch culture)

เป็นการเติมโรติเฟอร์ลงในถังที่มีสาหร่ายอยู่ หลังจากนั้นสาหร่ายจะถูกโรติเฟอร์ใช้เป็นอาหาร ส่วนโรติเฟอร์จะเพิ่มจำนวนมากขึ้นและนำไปใช้อนุบาลสัตว์ได้ ในแต่ละวันมีการเติมอาหารลงในถังโรติเฟอร์ การเลี้ยงด้วยวิธีนี้ให้ความหนาแน่นของโรติเฟอร์ได้ถึง 300-500 ตัวต่อมิลลิลิตร แต่การเลี้ยงด้วยความหนาแน่นก็ทำให้เกิดการสะสมของของเสียเช่นแอมโมเนียด้วยเช่นกัน

2. การเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous culture)

เป็นวิธีการเลี้ยงที่มีการเก็บเกี่ยวผลผลิตเป็นช่วงๆ โดยนำผลผลิตโรติเฟอร์ออก และเติมอาหารของโรติเฟอร์เช่น ใช้สาหร่ายหรือยีสต์ลงในถัง การเลี้ยงด้วยวิธีนี้สามารถเลี้ยงได้เป็นเวลานานหลายวันหรือหลายสัปดาห์ ดังนั้นอาจเกิดการสะสมของของเสียทั้งของแข็งและสารประกอบไนโตรเจน

3. การเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture)

เป็นวิธีการเลี้ยงที่โรติเฟอร์จะมีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณตลอดเวลาที่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้อย่างต่อเนื่อง รวมทั้งมีคุณค่าทางโภชนาการที่เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์น้ำอีกด้วย

2.7 ปัจจัยที่สำคัญต่อการเลี้ยงโรติเฟอร์ (Fulks และ Main, 1991)

2.7.1 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำในการเลี้ยงโรติเฟอร์จะขึ้นกับอุณหภูมิ ความหนาแน่นโรติเฟอร์ และชนิดของอาหาร ซึ่งในการใช้สาหร่ายเป็นอาหารอย่างเดียวจะมีความต้องการปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำกว่าการใช้อาหารจำพวกยีสต์ เพราะสาหร่ายสามารถสร้างออกซิเจนได้หากมีแสงที่เพียงพอ นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความต้องการออกซิเจนของโรติเฟอร์จะมากขึ้นเนื่องจากมีเมตาบอลิซึมสูงขึ้น

2.7.2 แสง แสงมีส่วนช่วยในการเติบโตของโรติเฟอร์โดยช่วยเพิ่มจำนวนสาหร่ายซึ่งเป็นอาหารของโรติเฟอร์

2.7.3 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) โรติเฟอร์สามารถทนต่อค่า pH ได้ในช่วงกว้าง แต่ช่วง pH ที่เหมาะสมประมาณ 5-9 แล้วแต่ชนิดของโรติเฟอร์ ค่า pH มีผลโดยตรงต่อจำนวนประชากรของโรติเฟอร์และส่งผลทางอ้อมต่อความเข้มข้นของแอมโมเนีย (NH_3)

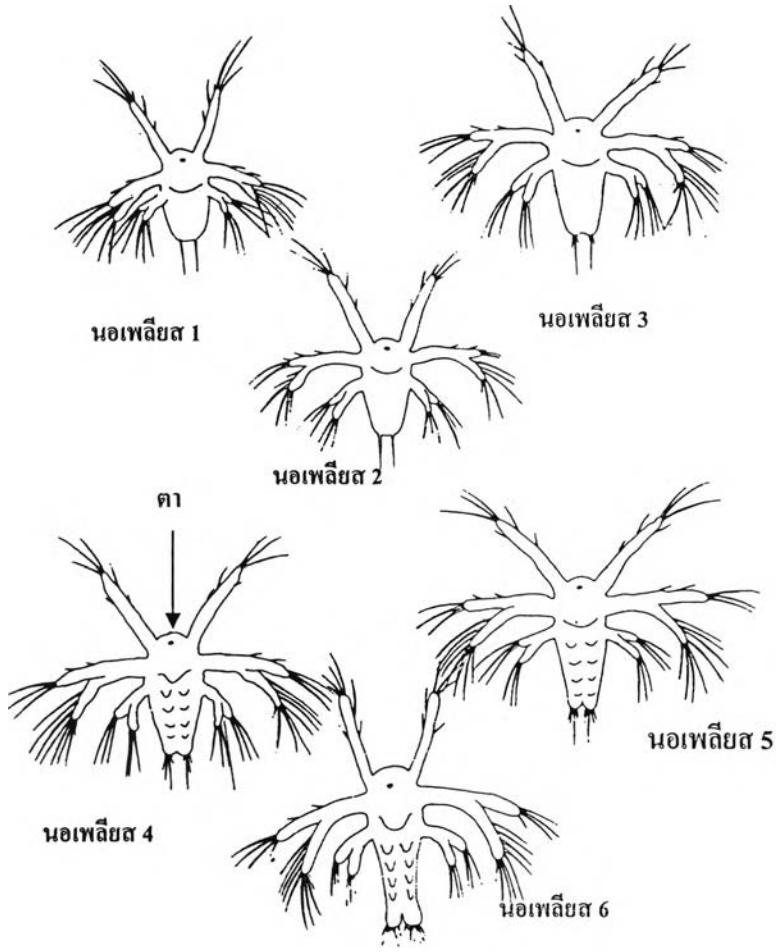
2.7.4 อุณหภูมิ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของโรติเฟอร์แตกต่างกันตามชนิด ช่วงที่ให้ผลผลิตสูงสุดประมาณ 30 ถึง 34 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อสาหร่ายที่ใช้เป็นอาหารของโรติเฟอร์อยู่ในช่วง 21 ถึง 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงจึงอยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส

2.7.5 ความเค็ม โรติเฟอร์เติบโตได้ในความเค็มช่วงกว้างตั้งแต่ 1 ถึง 60 พีเอสยู แต่ช่วงที่ให้การเติบโตดีที่สุดประมาณ 10 ถึง 20 พีเอสยู โดยความเค็มมีผลต่ออัตราการสืบพันธุ์

2.8 วิวัฒนาการของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อน (บรรจง เทียนส่งรัศมี, 2530)

สามารถแบ่งวิวัฒนาการของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนได้เป็น 4 ระยะใหญ่ได้ดังนี้

2.8.1 ลูกกุ้งระยะนอเพลียส (nauplius) เป็นลูกกุ้งระยะที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ มีขนาดเล็ก รูปร่างค่อนข้างกลมมีระยางค์สามคู่ระยางค์คู่แรกจะเจริญเป็นหนวดคู่สั้น (1^{st}antenna) อยู่ด้านหัวสุด ตอนปลายไม่แยกเป็นแฉก ระยางค์คู่ที่สองเจริญเป็นหนวดคู่ยาว (2^{nd}antenna) และคู่ที่สามจะเจริญเป็นขากรรไกรส่วนหางตรงปลายจะมีขนประมาณข้างละเจ็ดเส้น และทางด้านหน้ามีจุดสีดำซึ่งเจริญเป็นตาภายหลัง ระยะนี้ลูกกุ้งยังไม่กินอาหารแต่จะได้รับอาหารส่วนใหญ่จากถุงอาหาร (yolk sac) ที่ติดตัวมา ลูกกุ้งระยะนี้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งหมด 6 ครั้งภายในเวลา 40-50 ชั่วโมง



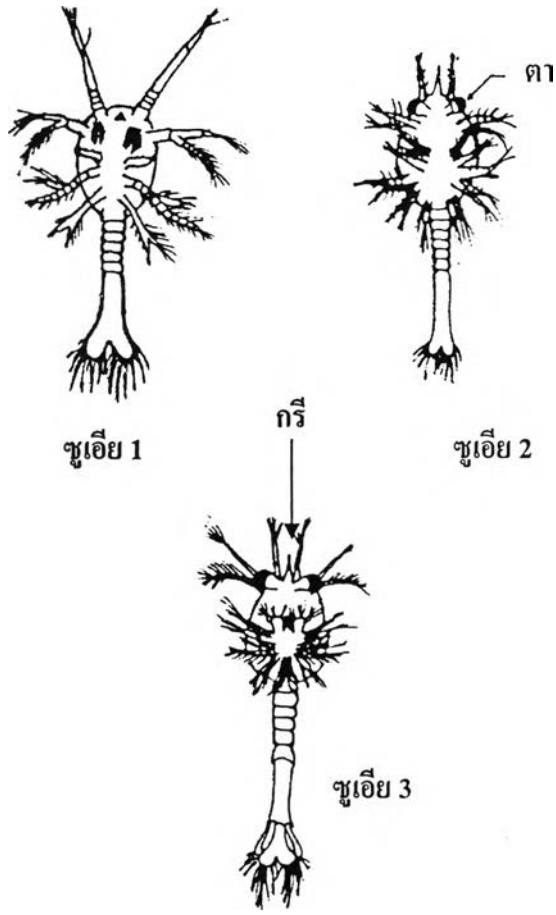
ภาพที่ 2-5 ลูกกุ้งระยะนอเพลียส
ที่มา: บรรจง เทียนส่งรัศมี (2530)

2.8.2 **ลูกกุ้งระยะซูเอีย** (zoea) ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวโตเห็นได้ชัด ลูกกุ้งจะค่อยๆ ลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำ และเริ่มกินอาหาร ส่วนใหญ่เป็นแพลงก์ตอนพืชขนาด 50-100 ไมครอน อยู่ในระยะนี้ประมาณ 3-4 วัน ลอกคราบสามครั้ง แต่ละครั้งจะมีรูปร่างแตกต่างไปจากเดิม

การลอกคราบครั้งที่ 1 (zoea 1) ตายังอยู่ภายในเปลือกมองเห็นเป็นจุดดำ เปลือกคลุมหัวเรียบ ไม่มีหนาม ด้านหน้าค่อนข้างกลม ระยางค์คู่แรกมีสามปล้องตรงปลายไม่มีแฉก ระยางค์คู่ที่สองตรงปลายมีแฉก ส่วนหางเป็นแฉกมีหนามข้างละเจ็ดอัน มีความยาวประมาณ 0.85 มิลลิเมตร

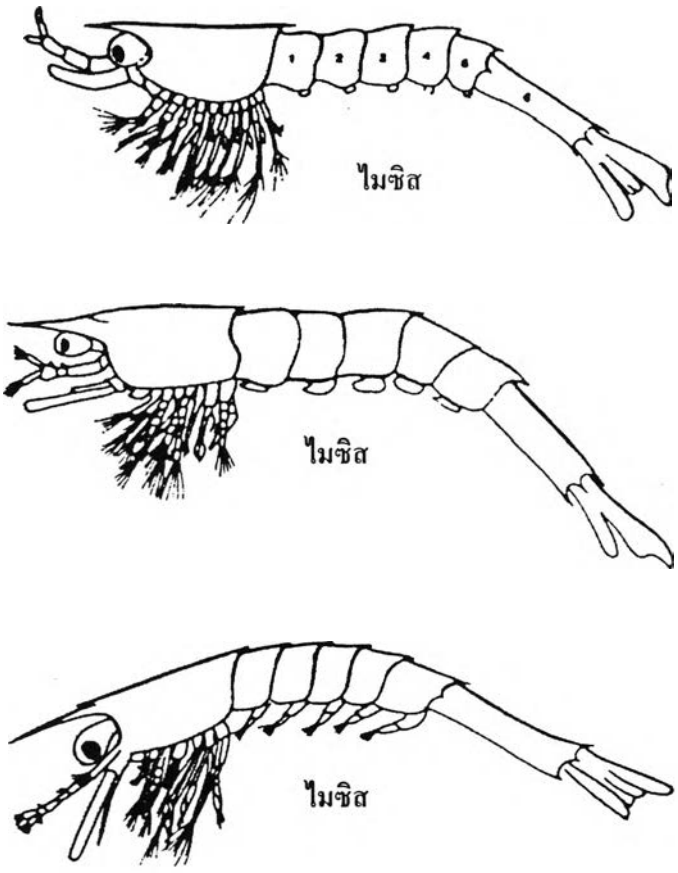
การลอกคราบครั้งที่ 2 (zoea 2) ตาโผล่พ้นเปลือกคลุมหัว มีก้านตายาว กรีบื่นแหลมไปข้างหน้าและงุ้มลงล่างเล็กน้อย ส่วนหัวมีเปลือกคลุม ความยาวประมาณ 1.77 มิลลิเมตร

การลอกคราบครั้งที่ 3 (zoea 3) maxillipedes อันที่สามเจริญจนมองเห็นได้ชัด ขาสำหรับเดินในระยะนี้ตอนปลายเป็นแฉกแต่ไม่มีขน ความยาวประมาณ 1.80 มิลลิเมตร



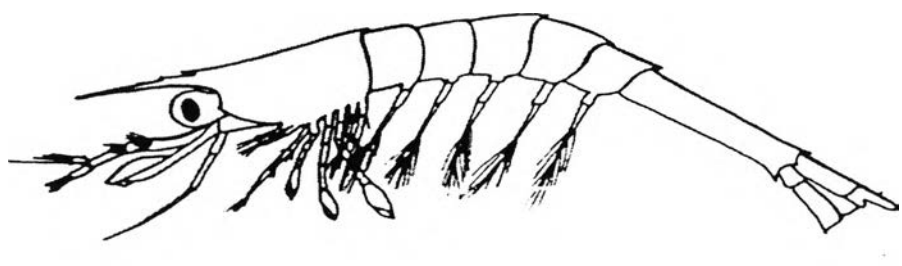
ภาพที่ 2-6 ลูกกุ้งระยะซูเอีย
ที่มา: บรรจง เทียนส่งรัศมี (2530)

2.8.3 **ลูกกุ้งระยะไมซิส** (mysis) ลูกกุ้งระยะนี้มีลักษณะคล้ายพ่อแม่มากขึ้นสามารถมองเห็นส่วนหัวและส่วนท้องได้ชัด ส่วนอกยังรวมอยู่กับส่วนหัวและมีเปลือกคลุม มีกรีเห็นได้ชัด ส่วนท้องมีหกปล้องและมีแพนหาง ลำตัวยาวประมาณ 2.56 มิลลิเมตร ขาสำหรับเดินเริ่มมีข้อปล้องเห็นชัดขึ้น สามคู่แรกจะมีลักษณะเป็นก้ามและค่อยๆ ยาวขึ้นเรื่อยๆ ขาว่ายน้ำระยางค์คู่ที่หก (uropod) เจริญมากขึ้น หางจะแคบเข้ามีขนข้างละเจ็ดเส้น ลอกคราบสามครั้งก็จะเจริญเข้าสู่ระยะโพสลาวา



ภาพที่ 2-7 ลูกกุ้งระยะไมซิส
ที่มา: บรรจง เทียนส่งรัศมี (2530)

2.8.4 ลูกกุ้งระยะโพสลาวา (postlarva) ระยะนี้ลูกกุ้งมีความยาวประมาณ 5.56 มิลลิเมตร สำหรับขาเดินคู่แรกมีลักษณะเป็นก้ามมองเห็นได้ชัด คู่แรกสั้นและคู่ที่สามยาวที่สุด หางจะแคบเข้าจนแหลม ลูกกุ้งระยะนี้มีระยางค์ครบเหมือนกุ้งเต็มวัย ลูกกุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 30 วัน มีความยาวประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร



ภาพที่ 2-8 ลูกกุ้งระยะโพสลาวา
ที่มา: บรรจง เทียนส่งรัศมี (2530)

2.9 การดูแลรักษาในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้ง (ประพันธ์ และคณะ, 2530)

2.9.1 อาหารที่ใช้เลี้ยงลูกกุ้งมีอยู่หลายชนิดด้วยกันขึ้นอยู่กับระยะของลูกกุ้ง การให้อาหารแต่ละชนิดในปริมาณที่เหมาะสมจะมีผลต่อผลผลิตของลูกกุ้ง เช่น ลูกกุ้งระยะซูเอียจะใช้อาหารจำพวกแพลงก์ตอนพืชในการอนุบาลเป็นหลักได้แก่ *Chaetoceros* และ *Skeletonema* ความหนาแน่นของไดอะตอมควรอยู่ระหว่าง 2×10^4 ถึง 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถ้ามากเกินไปแพลงก์ตอนพืชเหล่านั้นจะเพิ่มจำนวนมากเกินไปทำค่าความเป็นกรดเป็นด่างสูงขึ้นทำให้กุ้งตาย ในระยะไมซิสนิยมให้อาหารจำพวกไรน้ำเค็ม เช่น โรติเฟอร์ อาร์ทีเมีย ปริมาณไรน้ำเค็มที่ต้องการ 3-5 ตัวต่อมิลลิลิตรและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เป็น 8-10 ตัวต่อมิลลิลิตร เมื่อลูกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาวาที่ 5 ให้ลดการให้ไรน้ำเค็มลง (ประพันธ์ และคณะ, 2530)

2.9.2 คุณภาพน้ำที่ใช้ในการอนุบาลลูกกุ้ง (ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ, 2531)

2.9.2.1 อุณหภูมิ มีผลต่อการกินอาหารและการเติบโตของลูกกุ้งมาก อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำอยู่ในช่วง 25-32 องศาเซลเซียส หากอุณหภูมิสูงกว่านี้จะทำให้กุ้งร้อนเกินไป แต่ถ้าหากอุณหภูมิต่ำกว่า 18 องศาเซลเซียส กุ้งก็จะไม่กินอาหาร

2.9.2.2 ความเค็ม มีผลต่อการรักษาสมดุลย์ของแร่ธาตุในน้ำ กุ้งกุลาสามารถปรับตัวให้อยู่ได้ในความเค็มตั้งแต่ 5 ถึง 30 พีเอสยู

2.9.2.3 ความเป็นกรดเป็นด่าง มีผลต่อการเกิดสาหร่าย พืชน้ำ และการเกิดสารพิษต่างๆ ค่าของความเป็นกรดเป็นด่างควรอยู่ในช่วง 6.5 ถึง 9

2.9.2.4 ออกซิเจน โดยปกติค่าออกซิเจนละลายน้ำควรอยู่ในระดับ 5-8 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิและความเค็มยังมีผลต่อการการละลายของออกซิเจนในน้ำอีกด้วย

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากระบบการเลี้ยงแบบแบตช์ที่เกษตรกรนิยมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและโรติเฟอร์มาเป็นเวลานาน พบกับปัญหาของผลผลิตที่ไม่มีคุณภาพและปริมาณที่เพียงพอจึงก่อให้เกิดงานวิจัยที่พัฒนาระบบผลิตสาหร่ายและโรติเฟอร์เพื่อใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน ระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญ ในปีค.ศ. 1977 Fukami และคณะ ได้ทำการเลี้ยงไดอะตอม *Nitzchia* sp. แบบต่อเนื่อง โดยใช้น้ำจากทะเลสึกพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอที่ได้จากการเลี้ยงแบบต่อเนื่องสูงกว่าการเลี้ยงแบบแบตช์ แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงแบบต่อเนื่องสาหร่ายให้ผลผลิตที่ดีและมีความคงที่

นอกจากนั้นยังได้มีการศึกษาการเติบโตของสาหร่ายหลายชนิดในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ตัวอย่างเช่นการศึกษาของ Wen และ Chen (2001) ซึ่งทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Nitzschia laevis* ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าที่สภาวะสมดุลอัตราการเจือจางต่ำ

(0.1-0.3 ต่อวัน) ให้ผลผลิตเซลล์ที่สูง ในขณะที่อัตราการเจือจาง 1.0 ต่อวัน เกิดสภาวะการชะล้างเซลล์ออกจากระบบ และพบว่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงไดอะตอมเท่ากับ 0.6 ต่อวัน ส่วนการเพาะเลี้ยง *Chaetoceros ceratosporum* แบบต่อเนื่องในภาชนะปริมาตร 180 ลิตร โดย Shozen และคณะ (2001) ที่ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเป็นน้ำจากทะเลลึกซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารสูงกว่าที่ผิวน้ำ โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น $10x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรและมีการปรับเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นทีละระดับจาก 0.2-1.2 ต่อวัน พบว่าเซลล์มีความหนาแน่นสูงสุดที่อัตราการเจือจาง 0.2 ต่อวัน และต่ำสุดที่ 0.5 ต่อวัน แสดงให้เห็นว่าเมื่ออัตราการเจือจางสูงขึ้นความหนาแน่นเซลล์จะต่ำลง อัตราการเจือจางนอกจากจะส่งผลต่อสาหร่ายแล้วยังส่งผลต่อองค์ประกอบทางชีวเคมีของแพลงก์ตอนสัตว์ที่ใช้สาหร่ายเหล่านั้นเป็นอาหารอีกด้วย จากการศึกษาของ Fabregas และคณะ (2001) พบว่าปริมาณโปรตีนในอาร์ทีเมียเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย *Tetraselmis suecica* และการเพิ่มอัตราการเจือจางยังมีผลต่ออัตราการรอด การเติบโตและการสืบพันธุ์ของอาร์ทีเมียอีกด้วย

อาหารที่นิยมให้เป็นอาหารของโรติเฟอร์ได้แก่ สาหร่ายในกลุ่มสีเขียว *Nanochloropsis oculata*, *Tetraselmis tetrathele* และ *Chlorella vulgaris* และอาหารเสริมพวกยีสต์ (Maruyama และคณะ, 1997) แต่พบว่าโรติเฟอร์ที่เลี้ยงด้วยยีสต์ให้คุณค่าทางโภชนาการต่ำไม่เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์น้ำ อัตราการสืบพันธุ์ (reproduction rate) ของโรติเฟอร์ขึ้นอยู่กับอาหารที่เลี้ยง นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงต้องมีการดูแลในเรื่องการปนเปื้อนของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ด้วย เช่น แบคทีเรีย บางชนิด ซึ่งพบว่าแบคทีเรียมีผลต่อการสืบพันธุ์ของโรติเฟอร์และเมื่อนำไปใช้เลี้ยงสัตว์น้ำอาจก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำได้ (Lubzens และคณะ, 2001)

จากความเหมาะสมทางด้านคุณค่าทางอาหารและความต้องการของโรติเฟอร์ที่มากขึ้น ทำให้เกิดการพัฒนาระบบการเลี้ยงโรติเฟอร์หลายรูปแบบ เช่น การพัฒนาการเลี้ยงโรติเฟอร์ที่ความหนาแน่นสูง จากการศึกษาของ Yoshimura และคณะ (1997) ซึ่งได้ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาการเลี้ยงโรติเฟอร์ *B.rotundiformis* จากความหนาแน่น 10^3 ตัวต่อมิลลิลิตรเป็น 10^4 ตัวต่อมิลลิลิตร โดยใช้วัสดุกรองที่ทำจากไนลอนเพื่อช่วยกำจัดสารแขวนลอยและตะกอนต่างๆ ในน้ำ ทั้งนี้สารแขวนลอยและตะกอนยังมีส่วนทำให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำอีกด้วย จากการศึกษาของ Yoshimura และคณะ (1997) พบว่าเมื่อทำการเก็บโรติเฟอร์ไม่มีการอุดตันของตะกอนที่ถุงเก็บแพลงก์ตอน และระบบสามารถใช้เลี้ยงโรติเฟอร์ได้นานกว่าระบบที่ไม่มีตัวกรองรวมทั้งพบโปรโตซัวและแบคทีเรียในชุดที่ไม่มีตัวกรองอีกด้วย สารแขวนลอยถูกกำจัดได้มากถึง ร้อยละ 80 แต่ก็พบว่ามีโรติเฟอร์ที่ติดอยู่ที่ตัวกรองร้อยละ 0.5

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

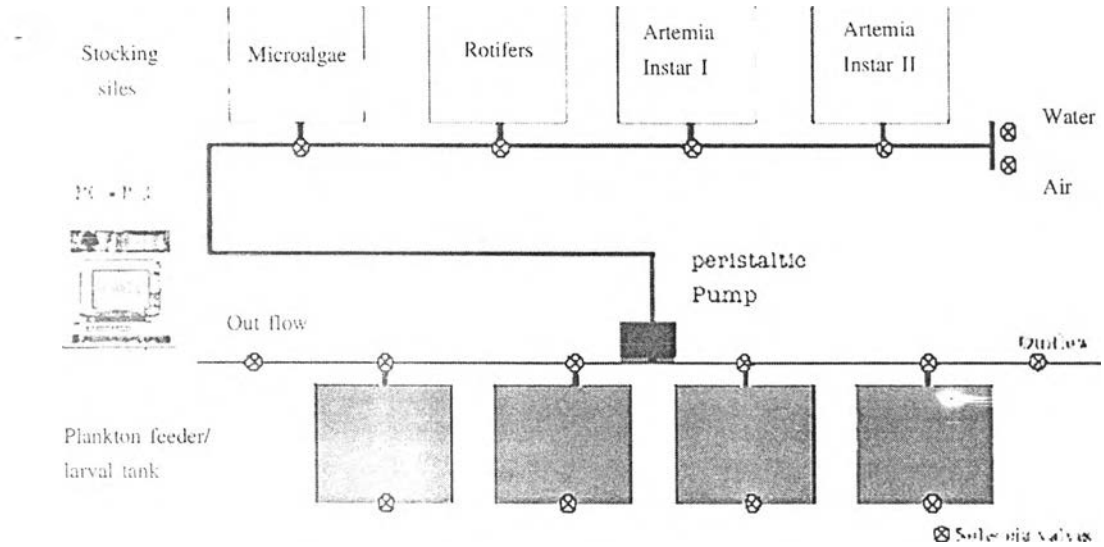
นอกจากการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์โดยการเพิ่มความหนาแน่นของโรติเฟอร์แล้ว ได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์แบบต่อเนื่อง โดยการศึกษาของ Fu และคณะ (1997)ซึ่งทำการศึกษาการเติบโตของโรติเฟอร์ *B. rotundiformis* (S-type) และ *B. plicatilis* (L-type) ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยใช้ *Chlorella vulgaris* เป็นอาหาร พบว่าการเลี้ยง *B. rotundiformis* ที่อัตราการเจือจาง 0.6-0.7 ต่อวัน ให้ความหนาแน่นประมาณ 3,000-6,000 ตัวต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 38 วันซึ่งระบบมีค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำและค่าความเป็นกรดเป็นด่างคงที่ตลอดการทดลองเป็นเวลารวม 110 วัน ส่วน *B. plicatilis* ทำการเลี้ยงที่อัตราการเจือจาง 0.25 ต่อวัน ให้ความหนาแน่นประมาณ 1,100-2,200 ตัวต่อมิลลิลิตร นอกจากผลผลิตสูงแล้วยังพบว่าน้ำที่เติมลงไปสู่ถังเพาะเลี้ยงตลอดเวลาจึงช่วยในการรักษาคุณภาพน้ำทำให้โรติเฟอร์ที่นำไปใช้ดี ลดการใช้แรงงานและพื้นที่ได้อีกด้วย การเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่มีความหนาแน่นของโรติเฟอร์เพิ่มมากขึ้นจึงเกิดของเสียโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบไนโตรเจนซึ่งมีผลต่อโรติเฟอร์ การศึกษาของ Schluter และ Groeneweg (1985) พบว่าที่ความเข้มข้นของแอมโมเนีย 3 mg NH_3-N/l ไม่มีผลต่ออัตราการสืบพันธุ์ของ *B. rubens* แต่ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนีย 3-5 mg NH_3-N/l จะทำให้อัตราการสืบพันธุ์ของโรติเฟอร์ลดลง และเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมากกว่า 5 mg NH_3-N/l *B. rubens* จะตายภายใน 2 วัน

การเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยวิธี chemostat ยังพบข้อเสียว่าจะมีความแปรปรวนของผลผลิตและองค์ประกอบทางชีวเคมีเนื่องจากการจำกัดในเรื่องของอาหารได้มากกว่าการเลี้ยงต่อเนื่องแบบ turbidostat ซึ่งจะใช้ระบบตรวจวัดควบคุมความเข้มข้นของสาหร่ายทั้งในระบบสาหร่ายและระบบโรติเฟอร์ แต่วิธีนี้ต้องทำการคัดเลือกสายพันธุ์โรติเฟอร์ที่มีอัตราการเติบโตสูง (Walz และคณะ, 1997)

จากการพัฒนาระบบการผลิตโรติเฟอร์แบบต่อเนื่องของ Suantika และคณะ (2003) พบว่าระบบผลิตอาหารอัตโนมัติ สามารถลดการใช้แรงงานและลดต้นทุนการผลิตถึง 46 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งการเลี้ยงแบบต่อเนื่องยังสามารถลดแบคทีเรียในระบบได้ดีกว่าการเลี้ยงแบบแบตช์ ซึ่งเมื่อนำไปใช้ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำจะทำให้โอกาสที่ลูกสัตว์น้ำจะติดโรคน้อยลง

การพัฒนาระบบการผลิตอาหารมีชีวิตแบบต่อเนื่องได้เริ่มมีการนำไปใช้ประโยชน์ในการอนุบาลสัตว์น้ำ โดยเริ่มศึกษาในการอนุบาลลูกปลา ตัวอย่างการศึกษาของ Papandroulakis และคณะ (2002) ที่ศึกษาการอนุบาลลูกปลา sea bream โดยใช้ระบบผลิตอาหารอัตโนมัติเปรียบเทียบกับการอนุบาลแบบดั้งเดิม (ภาพที่ 2-7) พบว่าลูกปลา sea bream ที่เลี้ยงด้วยระบบผลิตอาหารอัตโนมัติมีอัตราการเติบโตที่ดีขึ้นและมีอัตราการรอดประมาณร้อยละ 41-51 ระบบสามารถให้อาหารได้ทั้งในเวลากลางวันและกลางคืน รวมทั้งลดการใช้แรงงานได้ถึงร้อยละ 30-40 นอกจากนั้น Kolkovski และคณะ (2004) รายงานว่าระบบให้อาหารอัตโนมัติยังสามารถช่วยควบคุม

สภาพแวดล้อมในถังเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจนที่ละลายน้ำและค่าความเป็นกรดเป็นด่างอีกด้วย



ภาพที่ 2-7 ระบบให้อาหารอัตโนมัติในการอนุบาลลูกปลา sea bream
(Papandroulakis และคณะ, 2002)

ระบบให้อาหารอัตโนมัติสำหรับเลี้ยงลูกปลา red porgy ของ Papandroulakis และคณะ (2004) พบว่าให้อัตราการรอดประมาณ 61 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าในการอนุบาลลูกปลา sea bream ที่เลี้ยงในระบบเดียวกัน จากการศึกษาของ Rabe และ Brown (2000) ซึ่งศึกษาการเติบโตของลูกปลา yellow tail ในระบบการให้อาหารอัตโนมัติเปรียบเทียบกับการให้อาหารเป็นช่วงๆ พบว่าการให้อาหารวันละ 2, 4 ครั้ง และให้อาหารแบบต่อเนื่องจะให้อัตราการเติบโตไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการให้อาหารเพียงวันละ 2 ครั้ง เพียงพอต่อการเติบโตของลูกปลา yellow tail แต่จากรายงานดังกล่าวก็ยังคงสรุปว่าการให้อาหารแบบอัตโนมัติช่วยลดการใช้แรงงานได้เช่นกัน