รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ธิดา เพชรมณี. 2542. *คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน*. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ. สงขลา.49 หน้า.

ธิดา เพชรมณีและมาวิทย์ อัศวอารีย์. 2538. *การตกตะกอนคลอเรลลาน้ำเค็มเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ*. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 10/2538, สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 7 หน้า.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2545. *เคมีอาหาร*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 487 หน้า.

ประยูร สุรตระกูล. 2540. การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชทะเล *Chaetoceros calcitrans* เพื่อเป็นอาชีพเสริมของเกษตรกร. *วารสารการประมง*. 50(6): 488-492.

เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต 2534. อาหารสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. *วารสารการประมง*. 44(4): 329-342.

ผุสดี ศรีพยัตต์. 2525. *การตกตะกอนแพลงก์ตอนพืช*. รายงานวิชาการ. สถานีวิจัยประมงทะเล, กองประมงทะเล, กรมประมง. 10 หน้า.

พัชรา วีระกะลัส. 2544. พลังงานและเมแทบอลิซึม. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 438 หน้า.

พิชาญ สว่างวงศ์ และคณะ. 2540. การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เคมี และชีววิทยาในบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง 2537-2540. ใน *โครงการความร่วมมือไทย-ญี่ปุ่น ประจำปี 2537-2540*.

พูนสิน พานิชสุข มาวิทย์ อัศวอารีย์ และนพรัตน์ มะเห. 2538. *การเพาะเลี้ยงสเกลีโตนีมาแบบมหมวล*. เอกสารวิชาการฉบับที่ 13/2538, สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 16 หน้า.

เพ็ญแข อนันต์คูศรี. *การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไขมันโอเมกา-3 จากสาหร่ายน้ำเค็มขนาดเล็ก*. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2539), 151 หน้า.

มาวิทย์ อัศวอารีย์ และธิดา เพชรมณี. 2534. *ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของคลอเรลลาในห้องปฏิบัติการ*. เอกสารวิชาการ. ฉบับที่ 5. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 11 หน้า.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอนใ กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์เกษตรศาสตร์. 117 หน้า.

วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2534. *กุ้งกุลาดำ*. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. กรุงเทพฯ: เพรสโปรดักส์. 136 หน้า.

วินัย ดะห์ลันและคณะ. 2545. *อาหารและโภชนาการและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร*. ฝ่ายเอกสารและ

ตำรา. คณะสหเวชศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 478 หน้า.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. *อาหารปลา*. ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา. 213 หน้า.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2542. *โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์น้ำ*. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 255 หน้า.

วุฒิ คุปตะวาทิน. *การทดลองเก็บรักษาสเกเลโตนีมาเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อน*. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2535), 60 หน้า.

สุนีย์ สุวภีพันธ์. 2532. *การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว*. เอกสารเผยแพร่ ฉบับที่ 11. สถานีวิจัยประมงทะเล, กองประมงทะเล, กรมประมง. กรุงเทพ ฯ. 21 หน้า.

โสภณา บุญญาภิวัฒน์. 2526. การเตรียมตัวอย่างไดอะตอมเพื่อการวิเคราะห์ชนิด. *วารสารการประมง*. 38(1): 67-71.

หมั่น โพธิ์วิจิตร และอัจฉรา มโนเวชพันธ์. 2527. แพลงก์ตอนพืชบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย. ใน *การสัมมนาครั้งที่ 3 การวิจัยคุณภาพน้ำและคุณภาพทรัพยากรมีชีวิตในน่านน้ำไทย*, หน้า 229-246. สถาบันทรัพยากรทางน้ำ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

AOAC. 1990. *Official method of analysis of the association of official analytical chemistry 15 th ed.* Washington: Association of Official Analytical Chemists.

Akiyama, D. M., Dominy, W. G. and Lawrence, A. L. 1992. Penaeid shrimp nutrition. In A. W. Fast and Lester, L. J. (eds.), *Marine Shrimp Culture: Prnciples and practices*, pp. 535-568. NewYork: Elsevier.

Bailey-Brock, J. H. and Moss, S. M. 1992. Penaeid Taxonomy, Biology and zoogeography. In A.W. Fast and L. J. Lester (eds.), *Marine Shrimp Culture: Prnciples and practices*, pp. 9-27. NewYork: Elsevier.

Becker, E. W. 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. U.S.A.: Cambrige University Press.

Becker, E. W. 1986. Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints. In A. Richmond (ed.), *CRC Handbook of microalgae mass culture*, pp. 421-454. Florida: CRC Press.

Ben-Amotz, A., Fishler, R. and Schneller, A. 1987. Chemical composition of dietary species of

Marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Mar. Bio.* 95:31-36.

Ben-Amotz, A., Tornabene, T. G. and Thomas, W. H. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21:72-81.

Bligh, E. G. and Dyer, W. 1959. Arapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physio.* 37: 911-917.

Borowitzka, M. A. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constrains. *J. App. Phycol.* 9: 393-401.

Brown, M. R., Jeffrey, S. W. and Garland, C. D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: *a literature review. CSIRO Marine Laboratories Report 205.*

Brown, M. R. 1991. The amino acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in Mariculture. *J. Exp.Mar.Biol. Ecol.* 145: 79-99.

Brown, M. R. and Jeffrey, S. W. 1992a. Biochemical composition of microalgae from the green algae classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acid, sugar and pigments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161: 91-113.

Brown, M. R. and Jeffrey, S. W. 1992b. Biochemical composition of microalgae from the green algae classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty acids. *J. Exp.Mar.Biol. Ecol.* 161: 115-134.

Brown, M. R., Dunstan, G. A., Norwood, S. J. and Miller, K. A. 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana. J. Phycology.* 32(1): 64-73.

Brown, M. R. and Jeffrey, S. W. 1995. The amino acid and gross composition of marine diatoms potentially useful for mariculture. *J. App. Phycol.* 7: 521-527.

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. and Dunstan, G.A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture.* 151: 315-331.

Cohen, Z. 1986. Products from microalgae. In A. Richmond (ed.), *CRC Handbook of microalgae mass culture*, pp. 421-454. Florida: CRC Press.

Cupp, E. E. 1943. *Marine plankton diatoms of the west coast of notrth America.* Los Angeles: University of California Press.

Dall, W. and Smith, D. M. 1987. Change in protein-bound and free amino acids in the muscle of the tiger prawn *Penaeus esculentus* during starvation. *Mar. Biol.* 95: 509-520.

Darley, W. M. 1977. Chapter 7: Biochemical composition. In D. Werner (ed.) *The Biology of diatom*, pp. 198-223. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

De Silva, S. S. and Anderson, A. 1995. *Fish Nutrition in Aquaculture*. UK: Chapman & Hall.

D' Souza, F. M. L. and Loneragan, N. R. 1999. Effecct of monospecific and mixed-algae diets on survival development and fatty acid composition of penaeid prawn (*Penaeus* spp.) larvae. *Marine Biology*. 133: 621-633.

Duerr, E. O., Molnar, A. and Sato, V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *J. Marine Biotechnology*. 7: 65-70.

Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M., Leroi, J. M. and Jeffrey. S. W. 1994. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry*. 35(1): 155-161.

Dy-Penaflorida, V. D. 1989. An Evaluation of indigenous protein source as potential component in the diet formulation for tiger prawn, *Penaeus monodon*, using Essential Amino Acid Index (EAAI). *Aquaculture*. 83: 319-330.

Enright, C. T., Newkirk, G. F. Craigie, J. S. and Castell, J. D. 1986a. Evaluation of Phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. . *J. Exp. Mar.Biol. Ecol.* 96: 1-13.

Enright, C. T., Newkirk, G. F. Craigie, J. S. and Castell, J. D. 1986b. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schutt of varied chemical composition. *J. Exp. Mar.Biol. Ecol.* 96: 15-26.

Fernandez-Reiriz, M. J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M. J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J. and Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (Total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*. 83: 17-37.

Fogg, G. E. and Thake, B. 1987. *Algal culture and Phytoplankton Ecology*. England: Wisconsin Press.

French, F. W. III and Hargraves, P. E. 1985. Spore formation in the life cycle of the diatoms *Chaetoceros diadema* and *Leptocylindrus danicus*. *J. Phycol.* 21: 477-483.

Fryxell, G. A. 1976. The position of Labiate procell in the diatom genus *Skeletonema*. *Br. Phycol. J.* 11: 93-99.

Gallardo, P. P., Alfunso, E. Gaxiola, G., Soto, L. A. and Rosas, C. 1995. feeding schedule for *Penaeus setiferus* larvae based on diatoms (*Chaetoceros ceratosporum*), flagellates (*Tetraselmis chuii*) and *Artemia nauplii*. *Aquaculture*. 131: 239-252.

Garrison, D. L. 1984. Planktonic Diatoms. In K. A. Steidinger and L. M. Walker (eds.), *Marine Plankton Life Cycle Strategies*, pp. 1-17. U.S.A.: CRC Press.

Goluek, C. G. and Oswald, W. J. 1965. Harvesting and Processing Sewage Grown Planktonic Algae. *Journal of Water Pollution Control Federation*. 37(4): 471-498.

Guillard, R. R. L. 1973. Division rate. In J. R. Stein (ed.), *Handbook of phycological methods culture methods and growth measurements*, pp. 289-312. U.S.A.: Cambridge University Press.

Guckert, J. B. and Cooksey, K. E. 1990. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induceed cell cycle inhibition. *J. Phycol.* 26: 72-79.

Harrison, P. J., Conway, H. L., Holmes, R. W. and Davis, C. O. 1977. Marine Diatoms Grown in Chemostats under Silicate or Ammonium Limitation. III, Cellular Chemical Composition and Morphology of *Chaetoceros debilis*, *Skeletonema costatum*, and *Thalassiosira gravida*. *Marine Biology*. 43: 19-31.

Harrison, P. J., Thompson, P. A. and Calderwood, G. S. 1990. Effect of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *J. App. Phycology.* 2: 45-56.

Harwood, J. L. and Russell, N. J. 1984. *Lipids in Plants and Microbe*. London: George Allen Urwin.

Haryanti, S. K., Ismi, S., Khalik, A. and Takano, M. 1994. Survival and development of *Penaeus monodon* larvae reared on different species of phytoplankton. In *The Third Asian Fisheries Forum*, pp. 1021-1024. Asia Fisheries Society, Manila, Philippines.

Hasle, G. R. and Syvertsen, E. E. 1997. Marine diatom. In C. R., Tomas (ed.), *Identifying Marine Phytoplankton*, pp. 5-385. San Diego: Academic Press.

Hiromu, K. 1993. Life history of *Skeletonema costatum*. In T, Hori (ed.), *An Illustrated Atlas of the Life History of Algae*, *Volume 3: Unicellular and Flagellated Algae*, pp. 232. Tokyo: Uchida Rokakuho Publishing.

Hoshow, R. W. and Rosowski, J. R. 1973. Methods of microscopic algae. In J. R. Stein (ed.), *Handbook of phycological methods culture methods and growth measurements*, pp.53-68. U. S. A.: Cambridge University Press.

Johansen, J. R., Barclay, W. R. and Nagle, N. 1990. Physiological variability within ten strains of *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 26: 271-278.

Johansen, J. R. and Rushforth, S. R. 1985. A contribution to the taxonomy of *Chaetoceros muelleri* Lemmermann (Bacillariophyceae) and relate taxa. *Phycologia*. 24:437-447.

Kanazawa, A. 1984. Nutrition of Penaeid Prawn and Shrimp. In Y. Taki, J. H. Primavera and J. A. Liobrera (eds.), *Proceeding of the first International Conference on the Culture of Penaeid Prawn/Shrimp*, pp. 123-130. Iloilo City, Philippines.

Kanazawa, A. 1994. Nutritional Requirements of shrimps. In *The Third Asian Fisheries Forum*, pp. 987-990. Asia Fisheries Society, Manila, Philippines.

Kanazawa, A. K. and Teshima, S. 1981. Essential Amino acids of the prawn. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 47(10):1375-1377.

Kanazawa, A. K. and Teshima, S. and Ono, K. 1979. Relationship between essential fatty acid Requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B: 295-298.

Kanazawa, A., Teshima, S. and Sakamoto, M. 1985. Effect of dietary lipids, fatty acids and Phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) Larvae. *Aquaculture*. 50: 39-49.

Kaplan, D., Richmond, A. E., Dubinsky, Z. and Aaronson, S. 1986. Algal nutrition. In A. R. Richmond (ed.). *Handbook of Microalgae Mass culture*, pp. 147-198. Florida: CRC Press.

Klausmeier, W. H. 1991. Applications for algal culture in aquaculture. In *Proceedings Research Seminar and Workshop on Mass Culture of Microalgae*, pp. 33-49. Faculty of science Silpakorn University, Nakorn Pathom, Thailand.

Kochert, G. 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. In J. A. Hellebust and J. S. Craigie (eds.), *Hand book of Phycological Methods*: Physiological *and biochemical methods*, pp. 95-97. London: Cambridge University Press.

Kuban, F. D., Lawrence, A. L. and Wilkenfeld, J. S. 1985. Survival, metamorphosis and growth of larvae from penaeid species fed six food combination. *Aquaculture*. 47: 151-162.

Kurmaly, K., Jones. D. A., Yule, A. B. and East, J. 1989. Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae from protozoea 1 to postlarva, on live feeds artificial diets and on combination of both. *Aquaculture*. 81:27-45.

Kungvankij, P. and Other. 1989. *Shrimp hatchery design operation and management aquaculture*. Extension Manual No. 14 SEAFDEC Aquaculture Department Iloilo, Philippines.

Lim, C. E. 1998. Feeding penaeid shrimp. In Lovell, T. (ed.) *Nutrition and feeding of fish*, pp. 227-248. U.S.A.: Kluwer academic publishers.

Lovell, T. 1998. *Nutrition and feeding of fish*. U.S.A.: Kluwer academic publishers.

McGinnis, K. M., Dempster, T. A. and Sommerfeld, M. R. 1997. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *J. App. Phycol.* 9: 19-24.

Medlin, L. K., Elwood, H. J., Stickel, S. and Sogin, M. L. 1991. Morphological and genetic Variation within the diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta): evidence for new species, *Skeletonema pseudocostatum*. *J. Phycol.* 27: 514-524.

Morrison, W. R. and Smith, L. M. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid. Res.* 5: 600-608.

Mortensen, S. H., Bosheim, K. Y., Rainuzzo, J. R. and Kuntsen, G. 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schutt. effects of silscate deprivation, temperature and light intensity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 122: 173-185.

Motoh, H. 1981. Studies on the fisheries biology of giant tiger prawn, *Penaeus monodon* in the Philippines. Techical Paper No. 7/1981. SEAFDEC Aquaculture Department. Iloilo, Philippines.

Motoh, H. 1984. Biology and Ecology of *Penaeus monodon*. *In* Y. Taki, J. H. Primavera and J. A. Liobrera (eds.), *Proceeding of the first International Conference on the Culture of Penaeid Prawn/Shrimp*, pp. 27-36. Iloilo City, Philippines.

Mourente, G., Medina, A., Gonzalez, S. and Rodriguez, A. 1995. Variation in lipid content and Nutritional status during larval development of the marine shrimp *Penaeus kerathurus*. *Aquaculture*. 130: 187-199.

Myklestad, S. 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatom. I. comparison of nine different species in culture. . *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 15: 261-274.

Napolitano, G. E., Ackman, R. G. and Ratnayake, W. M. N. 1990. Fatty acid composition of three Cultured algal species (*Isochrysis galbana, Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. *J. World. Aqua. Soc.* 21: 122-130.

Opute, F. 1974. Lipids and fatty acid composition of diatoms. *J. Exp. Bot.* 25: 823-835.

Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R. and Olsen, Y. 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.* 30: 972-979.

Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Qie, G. and Olsen, Y. 1997. A review of the nutritional effects of lagae in marine fish larvae. *Aquaculture*. 155: 207-221.

Renaud. S. M., Parry. D. L. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of

marine microalgae. *J. App. Phycol.* 6: 347-356.

Renaud. S. M., Parry, D. L. and Thinh, L. V. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *J. App. Phycol.* 6: 337-345.

Renaud, S. M., Thinh, L. V., Lambrinidis, G. and Parry, D. L. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch culture. *Aquaculture*. 211: 195-214.

Renaud, S. M., Thinh, L. V. and Parry, D. L. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*. 170: 147-159.

Renaud, S. M., Zhou, H. C., Parry, D. L., Thinh, L. V. and Woo, K. C. 1995. Effect of Temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently Isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T. ISO). J. *App. Phycol.* 7595-602.

Rines, J. E. B. and Hargraves, P. E. 1986. Considerations of the taxonomy and biogeography of *Chaetoceros ceratosporus* Ostf. And Chaetoceros rigidus Ostf. In M. Richard (ed.), *Proceeding 8th Diatom Symposium*., 1984, pp. 97-112.

Rines, J. E. B. and Hargraves, P. E. 1988. The *Chaetoceros* Ehrenberg (Bacillariophyceae) flora of Narragansett Bay, Rhode Island, U.S.A. *Bibliotheca Phycologia*. 79: 1-196.

Rodgers, L. J. and Barlow, C. G. 1987. Better nutrition enhance survival of barramundi larvae. *Aus. Fish.* 46(7): 30-32.

Rogerson, A., DeFreitas, S. W. and McInnes, A. G. 1986. Growth rates and ultrastructure of siliceous setae of *Chaetoceros grcilis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 22: 56-62.

Sar, E. A., Hernandez-Becerril, D. U. and Sunesen, I. 2002. A morphological study of *Chaetoceros tenuissimus* Meunier, a little-known planktonic diatom, with a discussion of the section simplicia, Subgenus Hyalochaete. *Diatom Research*. 17(2): 327-335.

Sargent, J. R., Henderson, R. J., Tocher, D. R. 1989. The lipids. In H. Halver (ed.), *Fish Nutrition Vol. 2*, pp. 153-218. London: Academic Press.

Seto, A., Wong, W. L. and Hesseltine, C. W. 1984. Culture condition affect EPA content of *Chlorella minutissima*. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 61:892-894.

Shamsudin, L. 1994. Lipid fatty acid composition of selected diatom species used in Malaysia aquaculture as live food for penaeid larvae. In D. Marino and M. Montresor (eds.),

Proceeding at the thirteenth International Diatom Symposium. Biopress Limited Bristol.

Shamsudin, L. 1992. Lipid and fatty acid composition of microalgae used in Malaysian Aquaculture as live food for the early stage of penaeid larvae. *J. App. Phycol.* 4: 371-378.

Shifrin, N. S. and Chisholm. 1981. Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of Nitrate, silicate and light-dark cycles. *J. Phycol.* 17: 374-384.

Sicko-Goad, L. and Andersen, N. A. 1991. Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid content and composition. *J. Phycol.* 27: 710-718.

Simon, C. M. 1978. The culture of diatom *Chaetoceros gracilis* and its use as a food for penaeid protozoeal larvae. *Aquaculture*. 14: 105-113.

Sorgeloos, P. and Leger, P. 1992. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *J. World. Aqua. Soc.* 23(4): 251-264.

Strickland, J. D. H. and Parson, T. R. 1972. *A practical Handbook of seawater Analysis*. Ottawa: The Algar press.

Syrett, P. J. 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. *Can. Bull. Fish. Aqua. Sci.* 210: 182-210.

Tacon, A. G. J. 1990. *Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp Volume I: the essential nutrients*. Washington: Argent Laboratories Press. 117 pp.

Taguchi, S., Hirata, J. A. and Laws, E. A. 1987. Silicate deficiency and lipid synthesis of marine Diatoms. *J. Phycol.* 23: 260-267.

Teshima, S. and Kanazawa, A. 1984. Effect of protein, lipid and carbohydrate levels in purified diets on growth and survival rates of prawn larvae. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 50(10): 1709-1715.

Teshima, S. and Kanazawa, A. and Koshio, S. 1992. Ability for bioconversion of n-3 fatty acids in fish and crustaceans. *Oceanus*. 18: 67-75.

Teshima, S. I., Kanazawa, A. and Yamashita, M. 1986. Dietary value of several proteins and supplemental amino acids for larvae of the prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 51: 225-235.

Thinh, L. V. Renaud, S. M. and Parry, D. L. 1999. Evaluation of recently isolated Australian tropical microalgae for the enrichment of the dietary value of brine shrimp, Artemia nauplii. *Aquaculture*. 170: 161-173.

Thompson, P. A., Gue, M., Harrison, P. J. 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of the

Pacific Oyser (*Crassostrea gigas*). *Mar. Bio.* 117: 259-268.

Thompson, P. A., Gue, M., Harrison, P. J. and Whyte, J. N. C. 1992. Effects of variation in temperature II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 28: 488-497.

Thompson, P. A., Harrison, P. J. and Whyte, J. N. C. 1990. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. *J. Phycol.* 26: 278-288.

Timmermans, K. R., Gerringa, L. J. A., De Baar, H. J. W., De Wagt, B., Veldhuis, M. J. W., De Jong, J. T. M. and Croot, P. L. 2001. Growth rates of large and small Southern Ocean diatoms in relation to availability of iron in natural sea water. *Limnol. Oceanogr.* 46(2): 260-266.

Tobias- Quinitio, E. and Villegas, C. T. 1982. Growth, survival and macronutrient composition of *Penaeus Monodon* Fabricius larvae fed with *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis chuii*. *Aquaculture*. 29: 253-260.

Tocher, D. R. and Sargent, J. R. 1984. Analysis of lipids and fatty acids in ripe roes of some Northwest European marine fish. *Lipids*. 7: 492-499.

Tomas, C. 1997. *Identifying Marine Phytoplankton*. San Diego: Academic Press.

Treece, G. D. 1985. Larval rearing technology. In G. W. Chamberlain, M. G. Haby and R. J. Miget (eds.), *Texas Shrimp Farming Manual an Update on Current Technology*, pp. 43-64. Texas: Corpus Christi.

Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I. And Garland, C. D. 1989. Fatty acid and Lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp.Mar.Biol.Ecol.* 128: 219-240.

Walne, P. R. 1966. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *Fishery Invest.*, (London) Ser. 2. 25(4): 1-53.

Water AccQ-Tag Instruction Manual (Manual No. WAT052874, REVO April, 1993)

Whyte, J. N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*. 60: 231-241.

Werner, D. 1977. Chapter 4: Silicate metabolism. In D. Werner (ed.) *The Biology of diatom*, pp. 110-149. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Wouter, R., Lavens, P., Nieto, J. and Sorgeloos, P. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*. 202: 1-21.

Xu, X. L., Ji, W. J., Castell, J. D. and O' Dor, R. K. 1994. Influence of dietary lipid source on Fecundity, egg hatchability abd fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture*. 119: 359-370.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร Conway

$FeCl_3.6H_2O$	2.60	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.72	กรัม
H_3BO_3	67.20	กรัม
EDTA (sodium salt)	90.00	กรัม
$Na_2HPO_4.2H_2O$	40.00	กรัม
$NaNO_3$	200.00	กรัม
สารละลายสูตร A (สารประกอบโลหะปริมาณน้อย)	2	มิลลิลิตร
สารละลายสูตร B (สารประกอบซิลิเกต)	2	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 2 ลิตร

<u>วิธีใช้</u> เตรียมน้ำทะเลที่กรอง และอบฆ่าเชื้อ แล้วทิ้งไว้ให้เย็น 1 ลิตร ใส่สารละลายที่เตรียม 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายวิตามิน 0.1 มิลลิลิตร

สารละลายสูตร A ประกอบด้วย

$ZnCl_2$	2.10	กรัม
$CoCl_2.6H_2O$	2.00	กรัม
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.90	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	2.00	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

(ทำให้สารละลายมีฤทธิ์เป็นกรดด้วยการเติมกรดเกลือ (HCl) เพื่อให้ได้สารละลายใส)

สารละลายสูตร B ประกอบด้วย

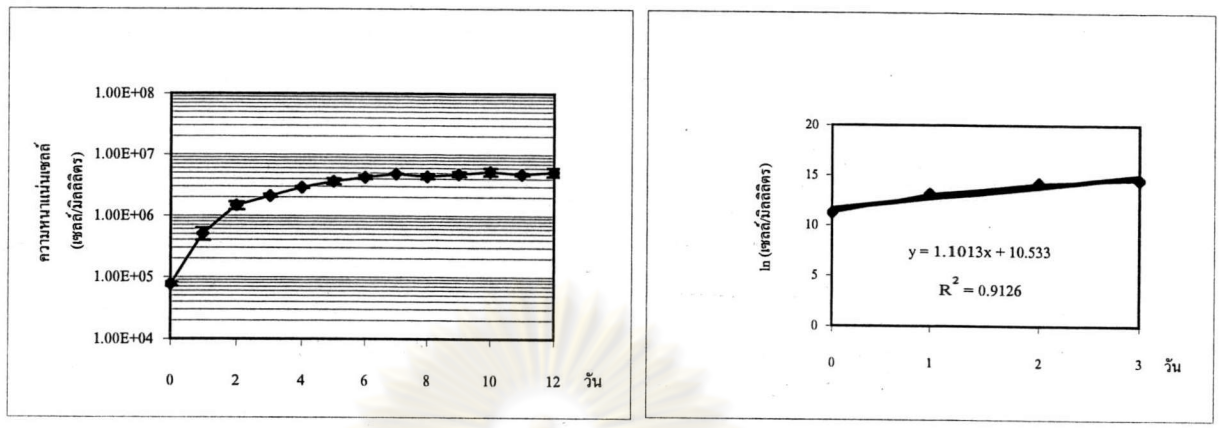
$Na_2SiO_3.9H_2O$	15.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

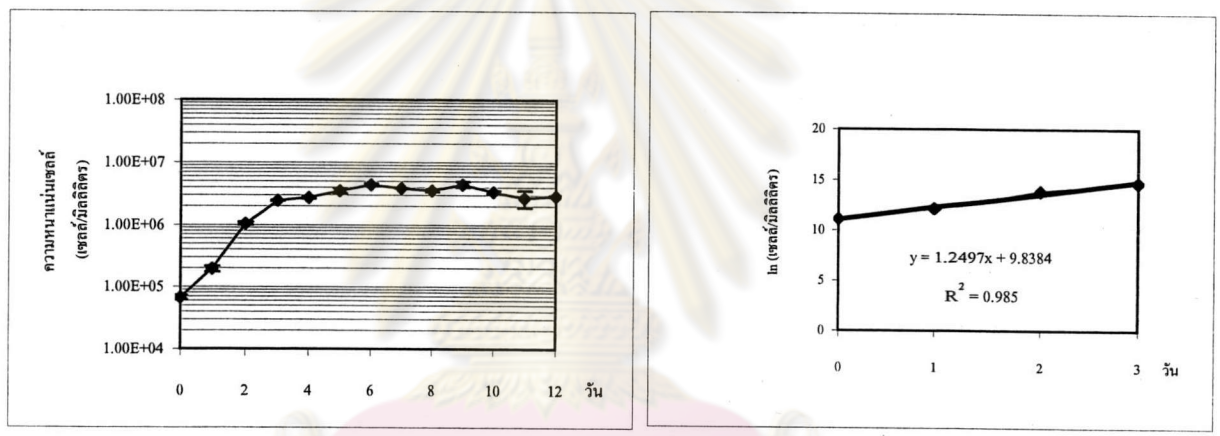
สารละลายวิตามิน (Vitamin stock solution) ประกอบด้วย

วิตามิน B_{12}	10	มิลลิกรัม
วิตามิน B_1(Thiamin HCl)	200	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

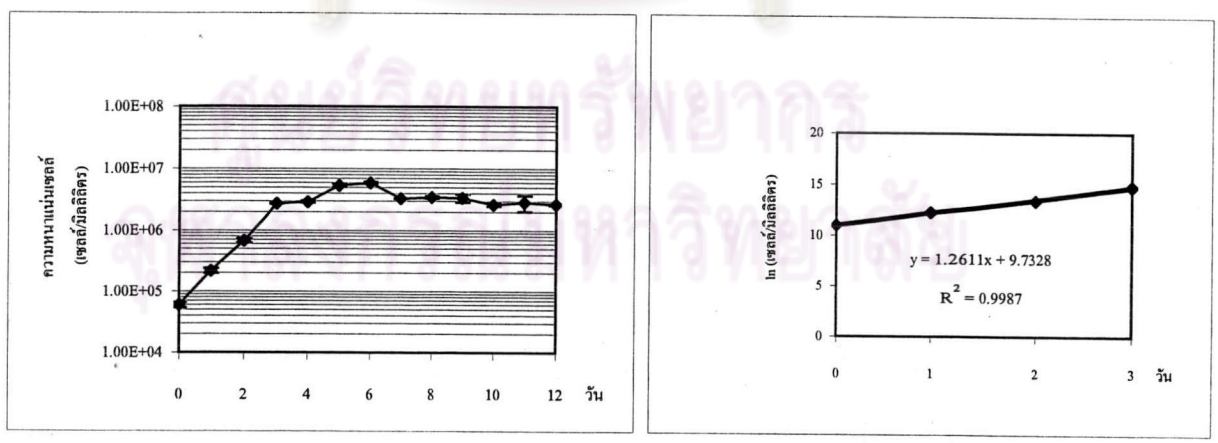
ภาคผนวก ข



1)



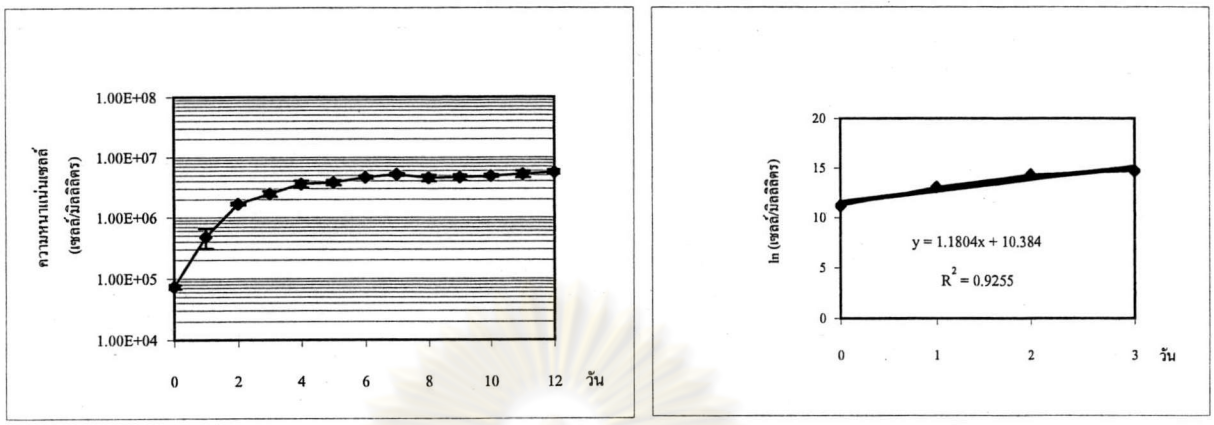
2)



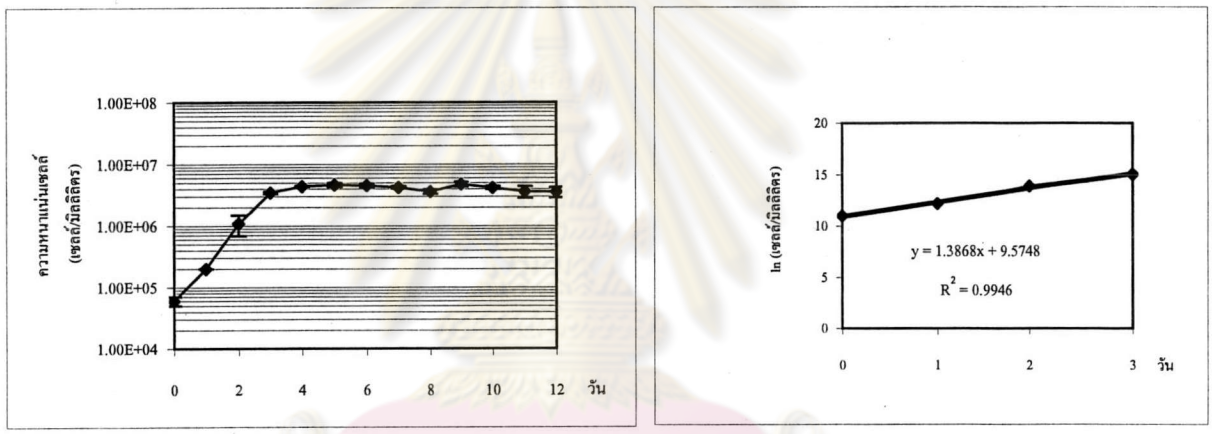
3)

รูปที่ ข1 การเติบโตของ *Chaetoceros* (AL)

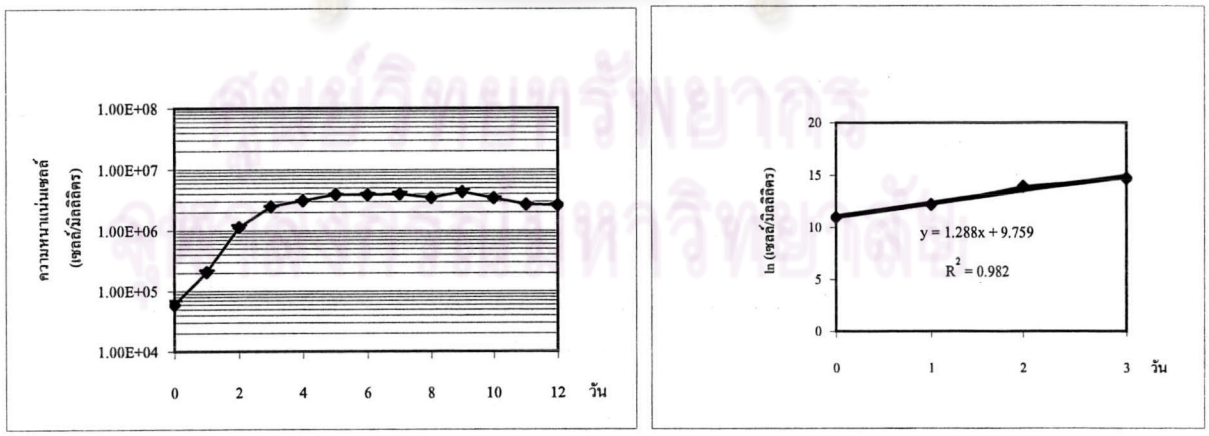
1) ชุดการทดลองที่ 1 2) ชุดการทดลองที่ 2 3) ชุดการทดลองที่ 3



1)



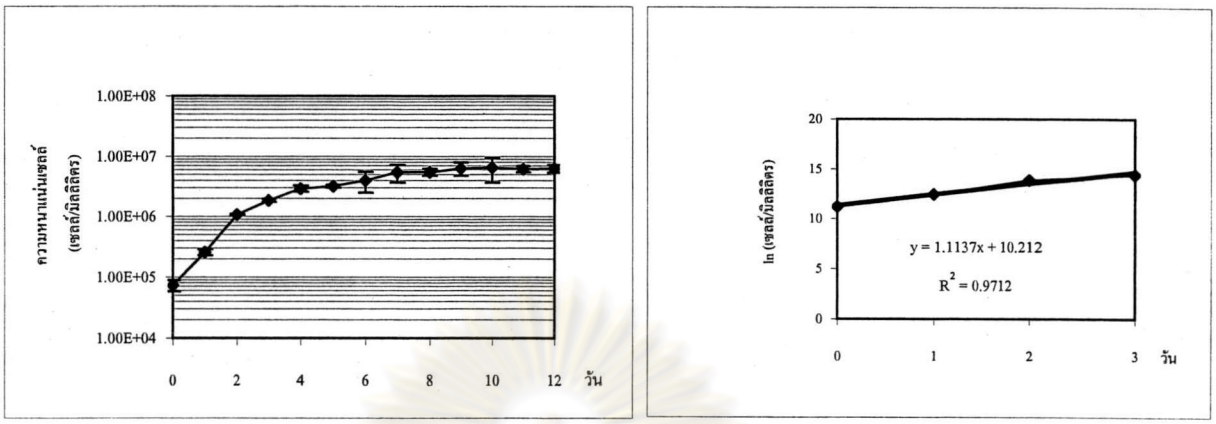
2)



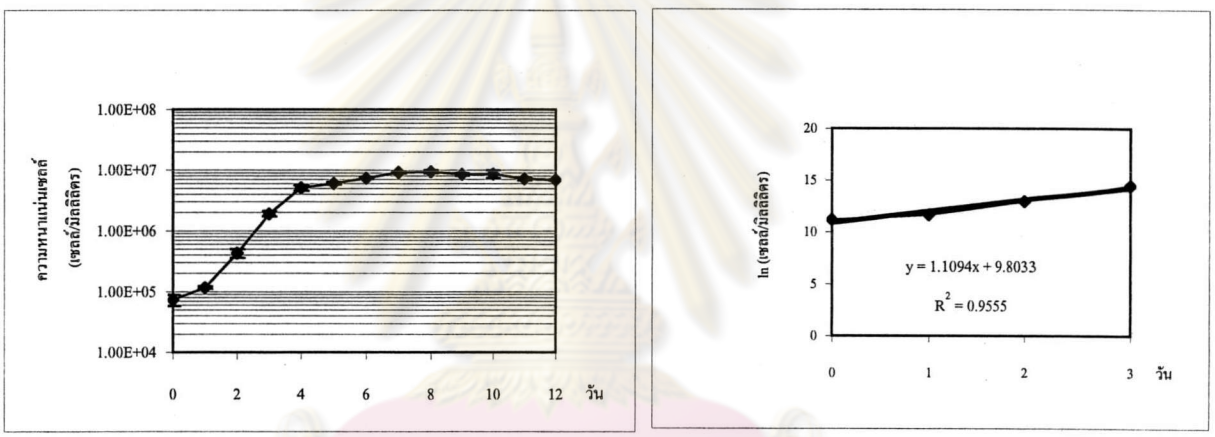
3)

รูปที่ ข2 การเติบโตของ *Chaetoceros* (BP)

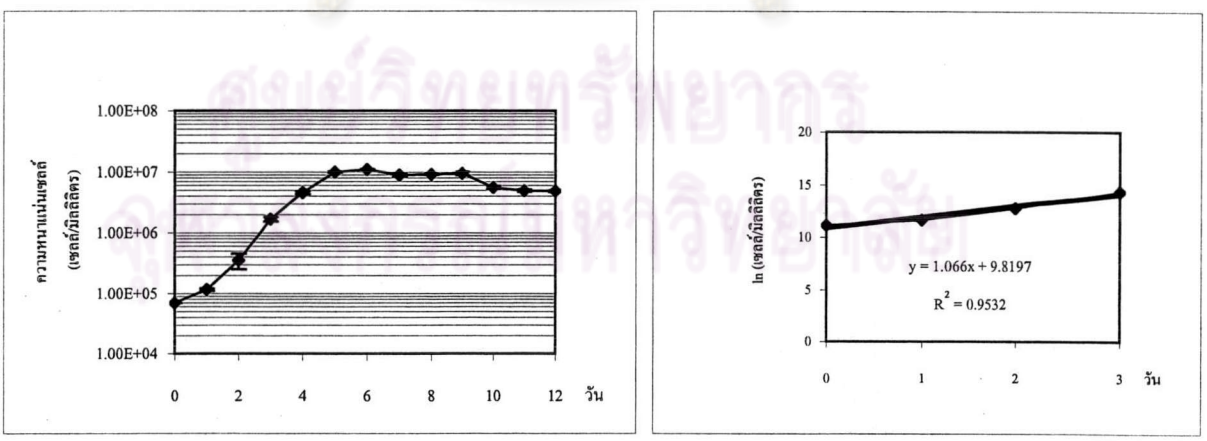
1) ชุดการทดลองที่ 1 2) ชุดการทดลองที่ 2 3) ชุดการทดลองที่ 3



1)



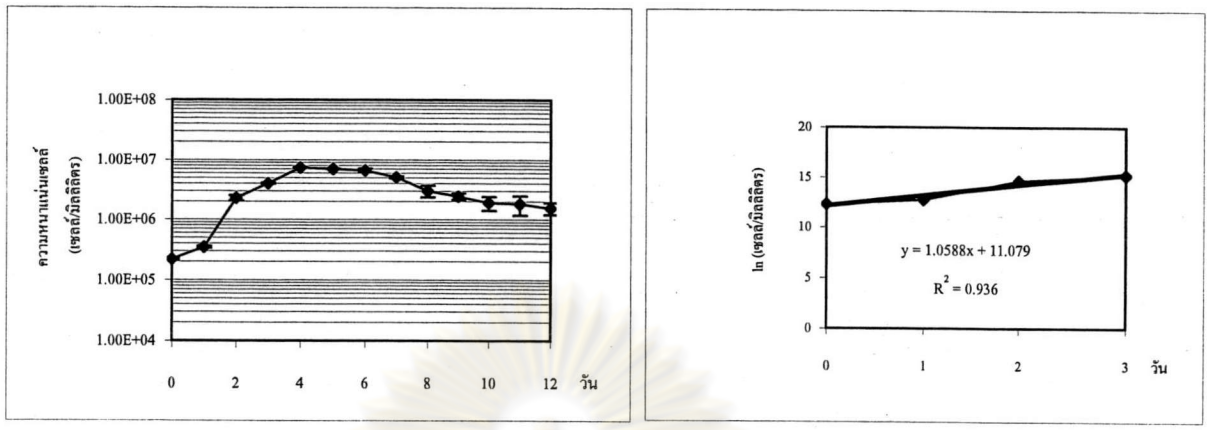
2)



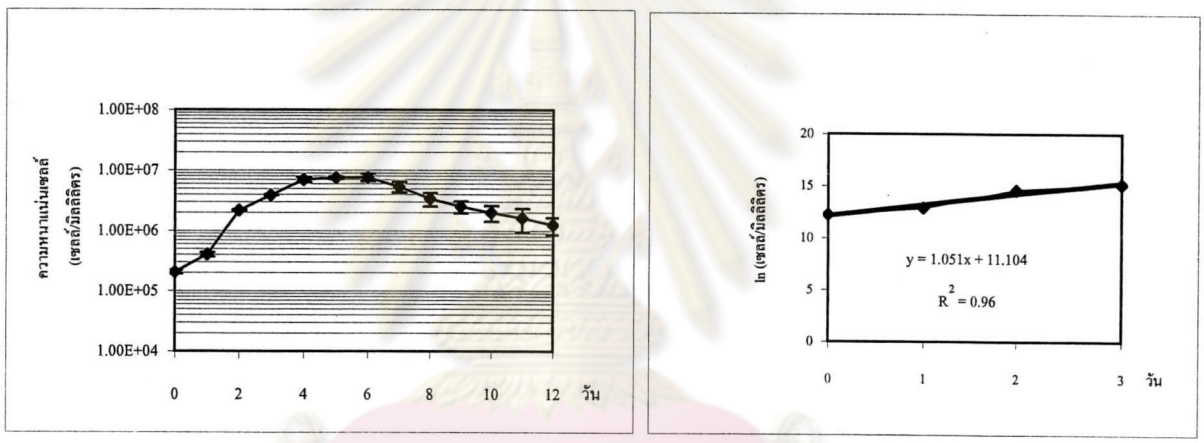
3)

รูปที่ ข3 การเติบโตของ *Chaetoceros* (BU)

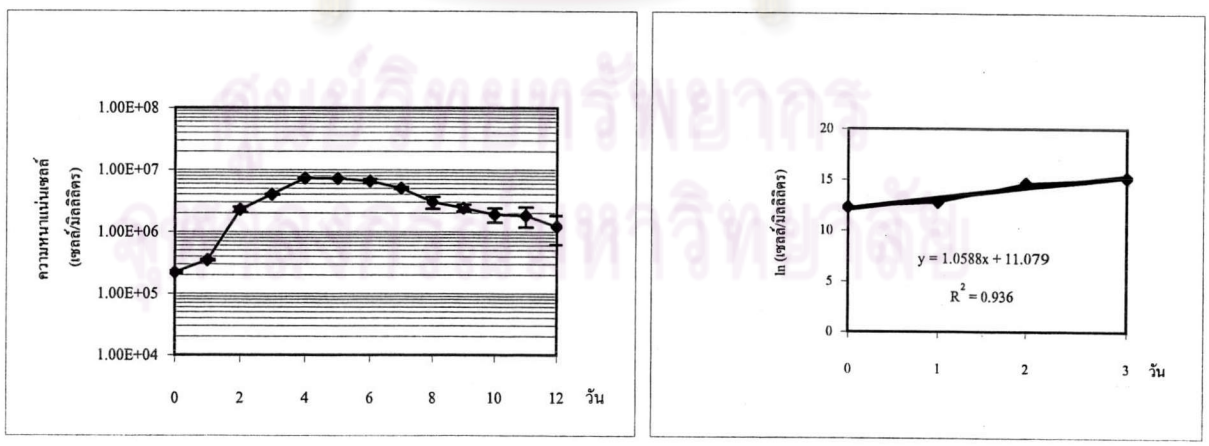
1) ชุดการทดลองที่ 1 2) ชุดการทดลองที่ 2 3) ชุดการทดลองที่ 3



1)



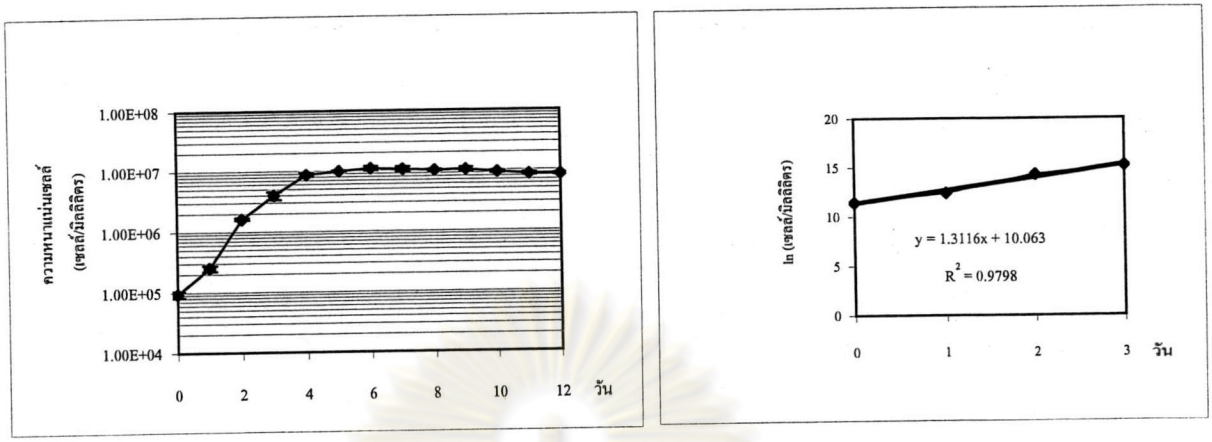
2)



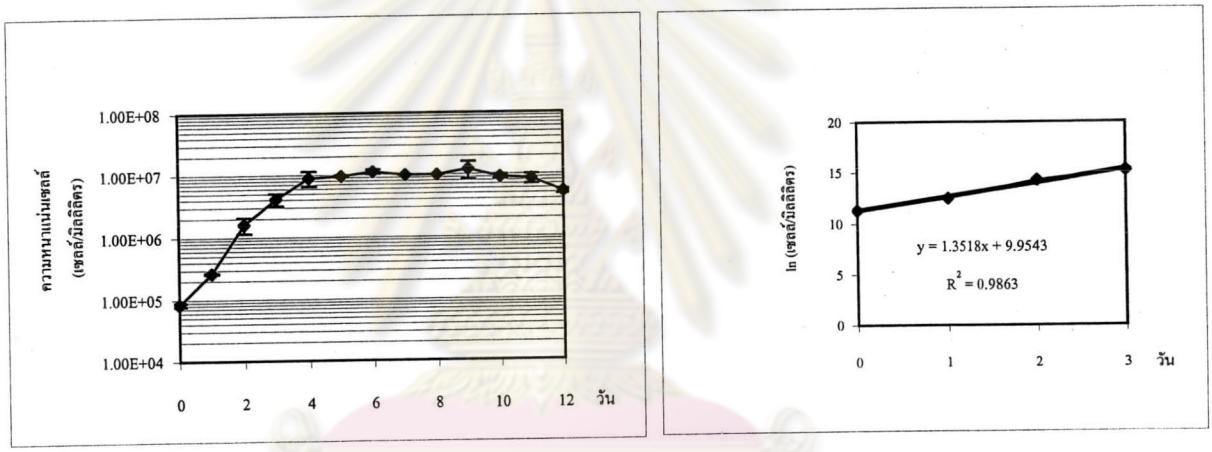
3)

รูปที่ ข4 การเติบโตของ *Chaetoceros* (NI)

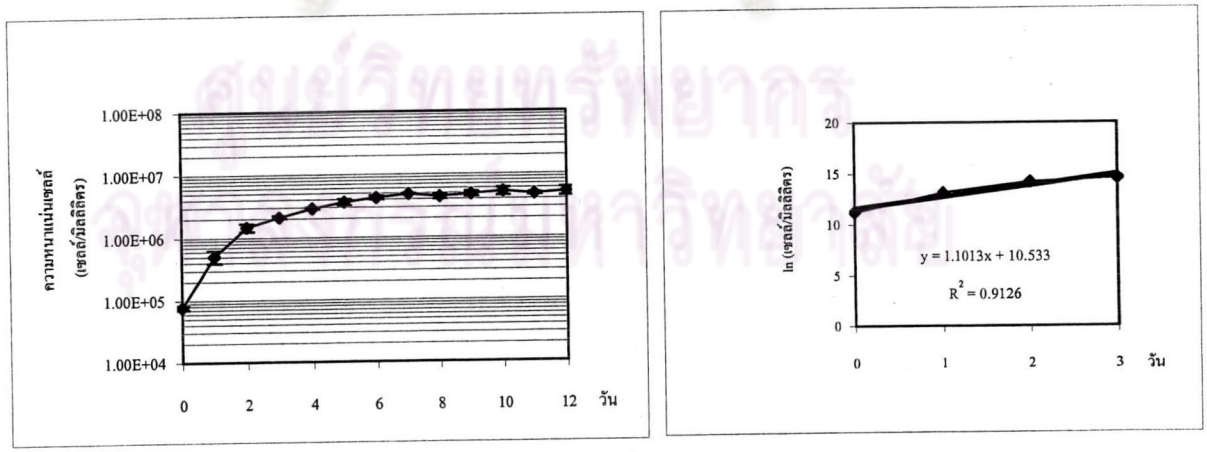
1) ชุดการทดลองที่ 1 2) ชุดการทดลองที่ 2 3) ชุดการทดลองที่ 3



1)



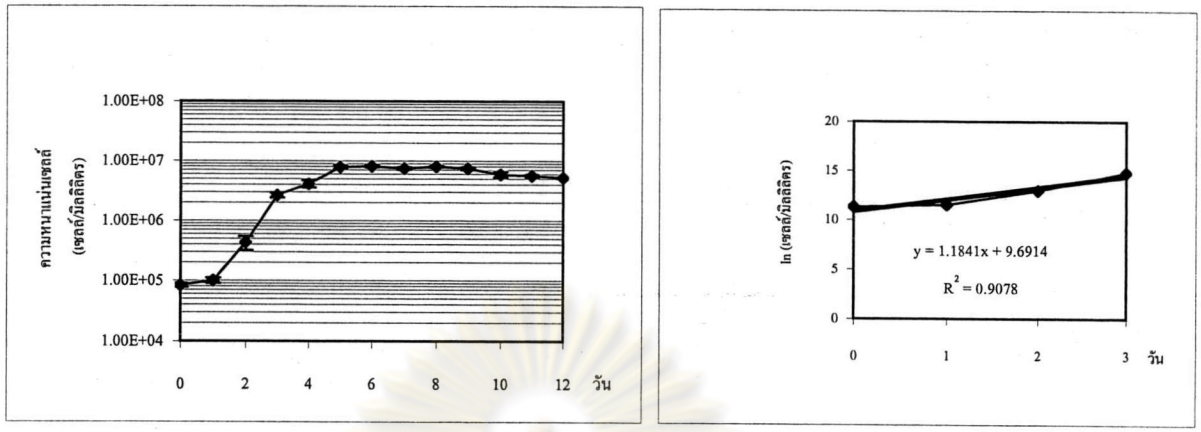
2)



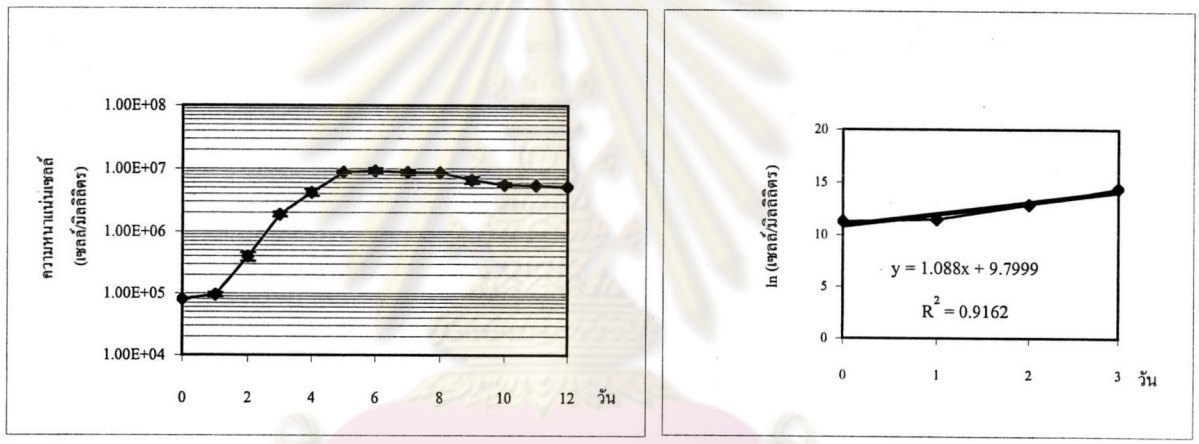
3)

รูปที่ ข5 การเติบโตของ *Chaetoceros* (LA)

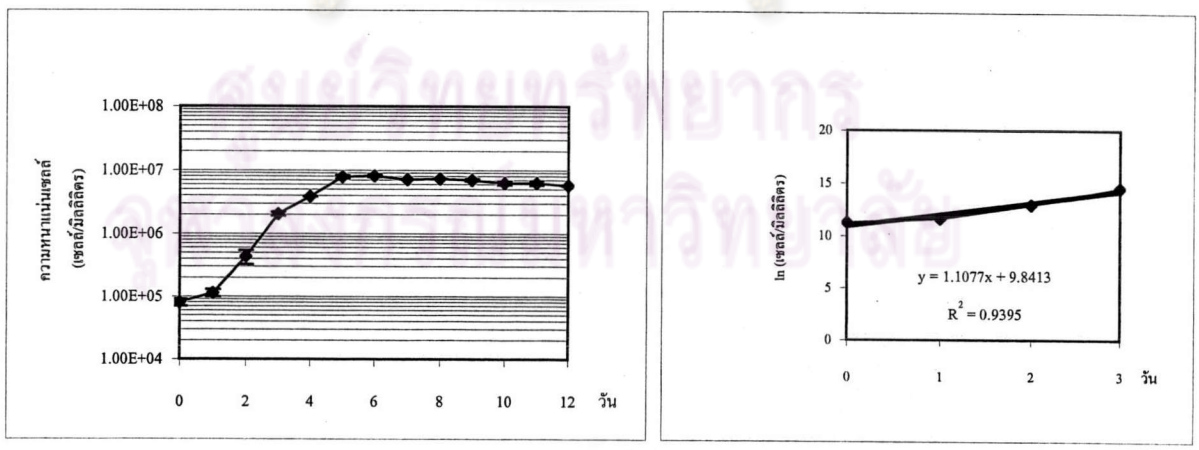
1) ชุดการทดลองที่ 1 2) ชุดการทดลองที่ 2 3) ชุดการทดลองที่ 3



1)



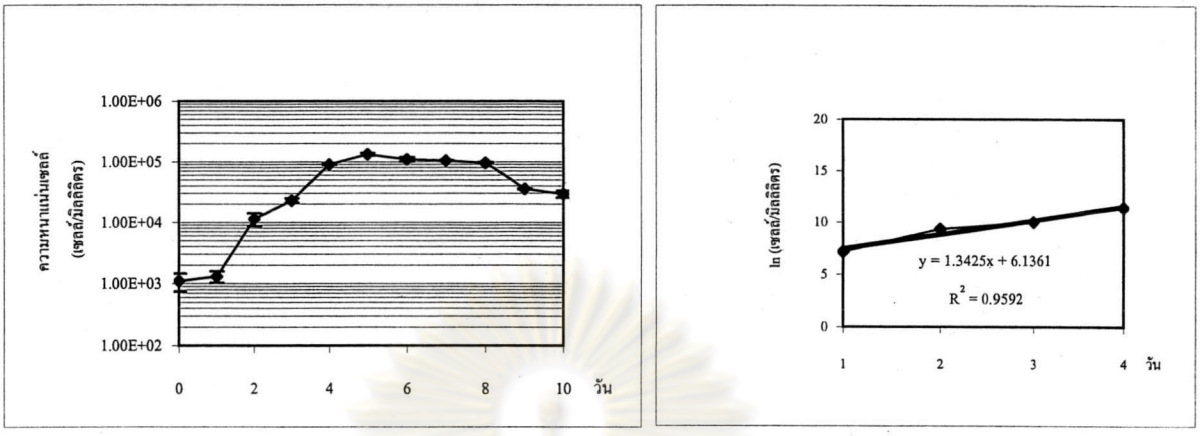
2)



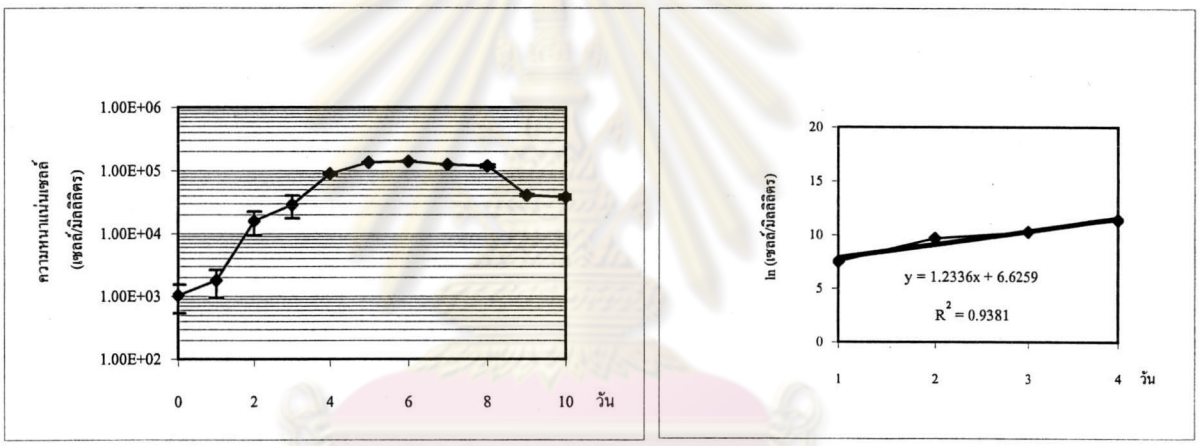
3)

รูปที่ ข6 การเติบโตของ *Chaetoceros* (PP)

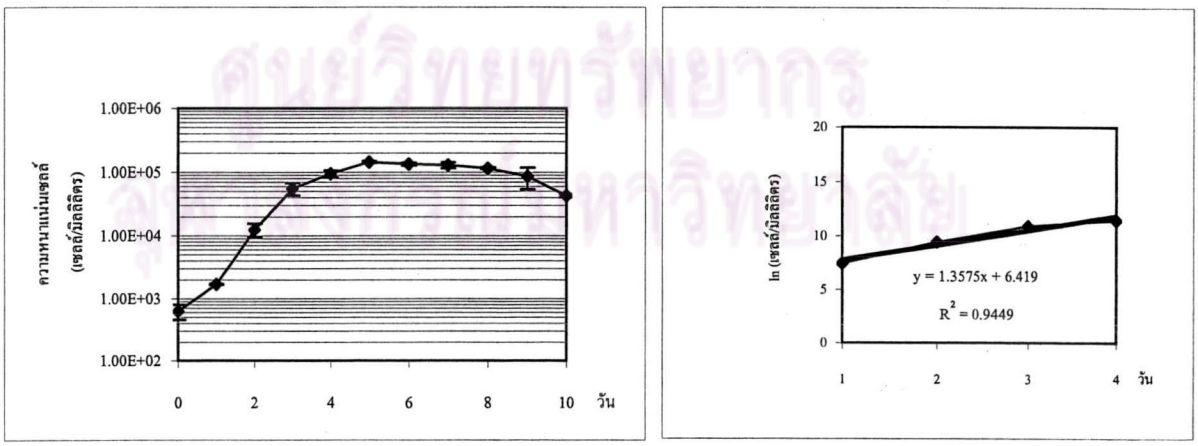
1) ชุดการทดลองที่ 1 2) ชุดการทดลองที่ 2 3) ชุดการทดลองที่ 3



1)



2)

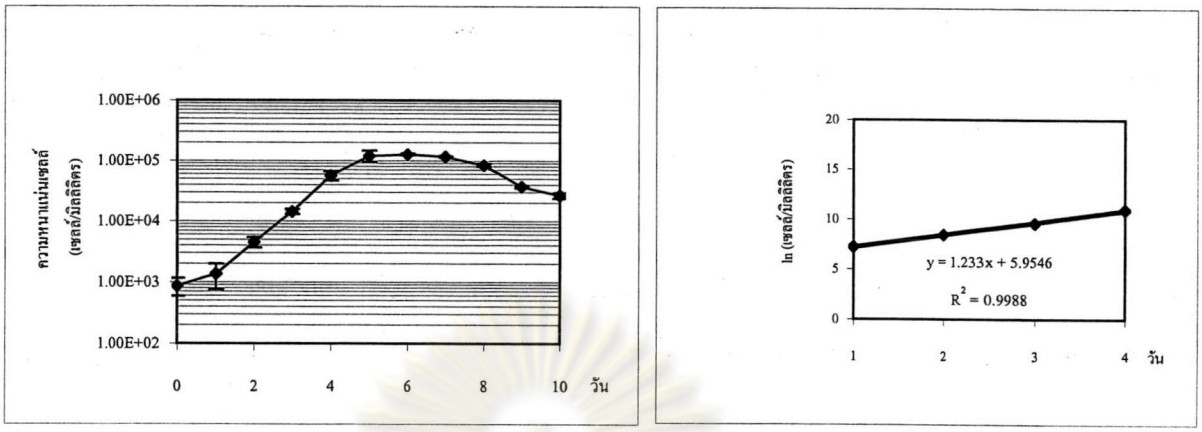


3)

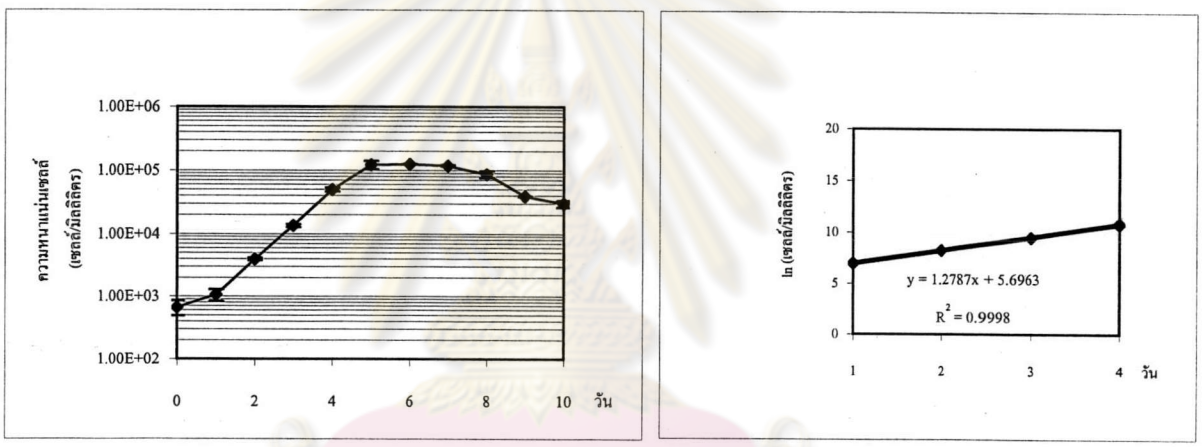
รูปที่ ข7 การเติบโตของ *Skeletonema costatum* (NI)

1) ชุดการทดลองที่ 1 2) ชุดการทดลองที่ 2 3) ชุดการทดลองที่ 3

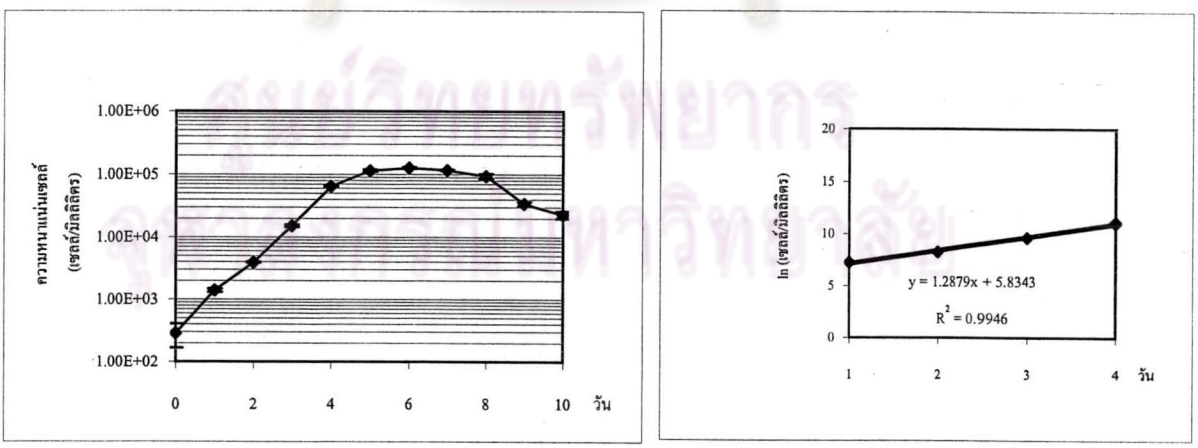
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



1)



2)



3)

รูปที่ ข8 การเติบโตของ *Skeletonema costatum* (BP)

1) ชุดการทดลองที่ 1 2) ชุดการทดลองที่ 2 3) ชุดการทดลองที่ 3

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียมตัวอย่างไดอะตอมเพื่อการวิเคราะห์ชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบลำแสงส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)

<u>การล้างตัวอย่าง</u> Simonsen (1974 อ้างโดย โสภณา บุญภิวัฒน์, 2526)

1. นำตัวอย่างไดอะตอม เติม $KmnO_4$ (Conc.) ปริมาตร 1:1 วางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
2. ค่อยๆเติมกรด HCl (Conc.) จนส่วนผสมเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม เนื่องจากการ reduction ของ permanganate เป็น manganese dioxide
3. นำไปต้มบนไฟอ่อนๆ จนเกือบเดือด จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีส่วนผสม จากสีน้ำตาลเข้มเป็นสีเขียวมะกอก สีเขียว และสีเหลือง ตามลำดับ
4. นำส่วนผสมที่มีสีเหลืองไปปั่นแยกเอาไดอะตอมออก เติมน้ำกลั่นลงในตัวอย่าง ปั่นและดูดส่วนน้ำใสออก ทำการล้างซ้ำ 6 ครั้ง
5. กรองตัวอย่างบนกระดาษกรองขนาดตา 0.45 ไมโครเมตร (Millipore type HTTP)

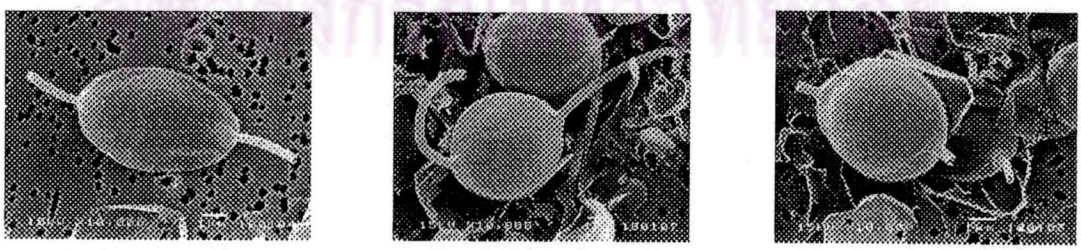
<u>Dehydrattion</u>

ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยเอธานอลที่มีความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูงคือ 25%, 50%, 75%, 90% และ absolute ethanol ในแต่ละขั้นจะใช้เวลาประมาณ 15 นาที และขั้นสุดท้ายทำ 2 ซ้ำ

<u>Critical point drying</u>

ดูดเซลล์ที่ผ่านการดึงน้ำออกแล้วใส่ลงในแคปซูลสำหรับทำให้แห้ง ณ จุด วิกฤติ (Critical point drying ; CPD) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 1100 psi เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง เพื่อให้เซลล์คงรูปร่างตามธรรมชาติ

ติดเซลล์ที่ทำแห้ง ณ จุดวิกฤติแล้วลงบนฐานยึด และฉาบผิวเซลล์ด้วยโมเลกุลทอง หลังจากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน (JEOL รุ่น JSM-5410 LV SCANNING MICROSCOPE) และถ่ายภาพไว้ใช้ประกอบการจัดจำแนกชนิด



Chaetoceros (PP) *Chaetoceros* (NI) *Chaetoceros* (BU)

รูปที่ ค1 ลักษณะเซลล์ทางด้านวาลว์ใน *Chaetoceros* 3 โคลนของการศึกษาครั้งนี้ (จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน)

ภาคผนวก ง

ภาคผนวก ง1 วิธีวิเคราะห์โปรตีน (AOAC, 1990)

สารเคมี 1. Conc. H_2SO_4 98% reagent grade (กรดซัลฟุริคเข้มข้น)

2. 40 % NaOH ชั่ง 400 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนเป็น 1 ลิตร

3. 4 % Boric acid (ชั่ง Boric acid 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนเป็น 1 ลิตร)

4. Na_2CO_3 0.1 N. (ชั่ง Na_2CO_3 5.3 กรัม อบที่ 100 °C 2 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้นออก ละลายในน้ำกลั่นอุ่นๆ ที่ต้มไล่ CO_2 ออกแล้ว ทำเป็น 1 ลิตร

5. Catalyst mixture (ตัวเร่งปฏิกิริยา) แบบเม็ด (5.0 g. K_2SO_4 + 0.005 g. Se)

6. Indicator = Methyl red : Methylene blue (3:2) ละลาย Methyl red 1 กรัม ใน NaOH 0.1 N 37 ml. และ น้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมรวมกับการละลาย Methylene blue 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

7. Methyl orange

8. 0.1 N H_2SO_4 (สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟุริค)

ปิเปต H_2SO_4 98% มา 3 ml. ใส่ในน้ำกลั่น 1 ลิตร หาความเข้มข้นที่แท้จริงโดยปิเปต Na_2CO_3 25 ml. หยด methyl orange 2-3 หยด นำไปไตเตรทกับกรดซัลฟุริคจนได้ end point จะมีสีชมพูเหลือง และคำนวณตามสูตร

$$\text{ความเข้มข้น } H_2SO_4 = (\text{ปริมาตร } Na_2CO_3 \times 25)/V_1$$

V_1= ปริมาตร H_2SO_4 ที่ใช้

วิธีการ

<u>การย่อยสลาย</u> (Digestion)

1. ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl tube
2. เติม catalyst mixture เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 1 เม็ด
3. เติม conc. H_2SO_4 25 ml. เพื่อเป็นตัวออกซิไดส์
4. นำ Kjeldahl tube ไปตั้งบนเครื่องย่อย ตั้งอุณหภูมิดังนี้ 120 °C 10 นาที
   250 °C 20 นาที
   380 °C 50 นาที
   420 °C 70 นาที
5. ตั้งหลอดตัวอย่างทิ้งไว้ให้เย็น

<u>การกลั่น</u> (Distillation)

1. ตั้งให้เครื่องเติม NaOH 90 ml., H_2O 30 ml., steam 9 นาที
2. ต่อสายยาง, สายน้ำ, สาย NaOH และน้ำกลั่น

3. นำ 4 % Boric acid 50 ml. ใส่ในฟลาสขนาด 500 ml. และหยดอินดิเคเตอร์ 6 หยด แล้วนำไปต่อกับปลายอีกด้านของเครื่องกลั่นเพื่อจับแอมโมเนีย กลั่นให้ได้สารละลายในฟลาสประมาณ 300 ml. (สารเป็นสีเขียว)

<u>การไตเตรท</u> (Titration)

นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นมาไตเตรทกับ standard 0.1 N H_2SO_4 จนถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพูม่วง

การคำนวณ

$$\% \text{ crude protein} = \{(S - B) \times 1.4 \times N \times 6.25\} / w$$

S = ปริมาณ (ml.) ของ H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B = ปริมาณ (ml.) ของ H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรท blank

N = ความเข้มข้นเป็น Normal ของ H_2SO_4 = 0.1 N

w = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง2 วิธีการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต (Kochert, 1978)

สารเคมี 1. Glucose Standard 5 mg/ml. (stock)

เตรียม dilution ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.25, .0125, .0100, .0.0625, 0.05, 0.03125, 0.025 mg/ml.

2. Phenol Solution 5 g/100 ml. (5% w/v)

3. Conc. H_2SO_4 (AR grade)

4. 2 M H_2SO_4 (AR grade)

วิธีการ

<u>hydrolyst</u> 1. ชั่งตัวอย่าง 0.05 กรัม

2. ใส่ 2 M H_2SO_4 6 ml. แล้วนำไป sonicate 5 นาที แล้วเติมอีก 1 ml.

3. นำไปใส่ใน water bath ที่ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4. centrifuge ที่ 3000 rpm. 5 นาที

5. ปิเปตตัวอย่างที่ hydrolyst แล้วมา 0.1-0.5 ml. แล้วทำให้เป็น 2 ml. ด้วย DDW.

<u>การเตรียม Standard</u>

1. เตรียม Stock Glucose ชั่งมา 0.5 g. ทำเป็น 100 ml. in DDW.
2. เตรียม Glucose ความเข้มข้นต่างๆ จาก Stock 0.25, .0125, .0100, .0.0625, 0.05, 0.03125, 0.025, 0.01 mg/ml.

0.25	mg/ml.	ใช้ Stock	5 ml.	in DDW	100	ml.
0.125	mg/ml.	ใช้ Stock	2.5 ml.	in DDW	100	ml.
0.100	mg/ml.	ใช้ Stock	2 ml.	in DDW	100	ml.
0.0625	mg/ml.	ใช้ Stock	1.25 ml.	in DDW	100	ml.
0.050	mg/ml.	ใช้ Stock	1 ml.	in DDW	100	ml.
0.03125	mg/ml.	ใช้ Stock	0.6 ml.	in DDW	100	ml.
0.025	mg/ml.	ใช้ Stock	0.5 ml.	in DDW	100	ml.
0.01	mg/ml.	ใช้ Stock	0.2 ml.	in DDW	100	ml.

<u>การหา % คาร์โบไฮเดรต</u>

1. ปิเปตตัวอย่างที่ปรับปริมาตรแล้วมาหลอดละ 2 ml. และ standard
2. เติม 1 ml. 5% phenol และ mix อย่างรวดเร็วด้วย Vorex Stirrer
3. เติม 5 ml. Conc. H_2SO_4 ทันที ตัวอย่างจะเปลี่ยนสีทันทีเป็นสีส้มเหลือง

4. ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 30 นาทีและนำไปวัดค่า absorbance ที่ 485 nm. และเปรียบเทียบกับ standard curve

<u>วิธีการคำนวณ</u>

ทำ standard curve ระหว่าง Absorbance (y) กับ ความเข้มข้นกลูโคส (mg/ml) (x)

ตัวอย่าง 2 ml. มีความเข้มข้น 0.05 mg/ml.

หาเนื้อคาร์โบไฮเดรต ใน 2 ml. $0.05 \times 2 = 0.1$ mg.

ตัวอย่าง 0.1 ml. มีคาร์โบไฮเดรต 0.1 mg.

"------- " 7 ml. "----------" $0.1 \times 7/0.1 = 7$ mg.

ดังนั้น ตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 0.05 g.(50 mg.) มีคาร์โบไฮเดรต 7 mg.

ถ้าตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 mg. มีคาร์โบไฮเดรต $7 \times 100/50 = 14$ mg.

∴ ตัวอย่างมีคาร์โบไฮเดรต 14% dw.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง3 วิธีการวิเคราะห์ไขมัน (ดัดแปลงวิธีของ Bligh and Dyer, 1959)

สารเคมี คลอโรฟอร์ม:เมธานอล (2:1)

วิธีการ

1. อบขวดสกัดไขมันของเครื่องสกัดไขมันกึ่งอัตโนมัติ (automatic soxtherm) ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 2 ชั่งโมง ทิ้งให้เย็นใน desicator แล้วชั่งน้ำหนักละเอียด
2. ชั่งน้ำหนักแห้งของตัวอย่างโดยละเอียดประมาณ 1 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1
3. ใส่ตัวอย่างลงใน thimble cellulose จากนั้นใส่ลงในขวดสกัดไขมัน เติมคลอโรฟอร์ม:เมธานอล (2:1) 50 มิลลิลิตร ลงในขวดสกัดไขมัน
4. เปิดสวิทซ์ oil bath แล้วตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 200 °C เปิดสวิตซ์ pressure control pump และเปิดเครื่องทำความเย็น ให้น้ำไหลเวียนเข้าสู่ condenser
5. นำขวดสกัดไขมันประกอบกับเครื่องสกัดไขมันกึ่งอัตโนมัติ
6. ใช้เวลาสกัดตัวอย่างประมาณ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นระเหย คลอโรฟอร์ม:เมธานอล (2:1) เก็บไว้ในถังเก็บ
7. นำขวดสกัดไขมันไปอบที่ 80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นใน desicator แล้วชั่งน้ำหนักขวดโดยละเอียด
8. คำนวณ % ไขมัน จาก

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักขวดสกัด} \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง}}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง4 วิธีการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชและเนื้อกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ทิมเบิล (Cellulose Extraction Thimble, Whatman, 30 × 123 mm. round bottom)
2. ขวดก้นกลม (Conical Flask)
3. ปาสเตอร์ปิเปต (Paster Pipette)
4. หลอดทดลองขนาดเล็ก (Vial Test Tube)
5. คลอโรฟอร์ม (Re-distilled Chloroform) AR grade ยี่ห้อ Lab Scan
6. เมธานอล (Re-distilled Chloroform) AR grad ยี่ห้อ Lab Scan
7. เฮกเซน (Re-distilled Hexane) AR grad ยี่ห้อ Lab Scan
8. 14% Borontrifluoride in Methanol AR grade (BF_3)
9. 0.5 N NaOH ใน Methanol (เตรียมโดยการชั่ง NaOH AR grade 1 กรัม. เติม Methanol AR grade 50 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer
10. aturated NaCl (เตรียมโดยละลาย NaCl 36 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)
11. ชุดสกัด thimble
12. เครื่องสกัดไขมันแบบกึ่งอัตโนมัติ (Soxthrem Extraction Unit) ยี่ห้อ Gerhard
13. เครื่องลดปริมาตร (Rotary evaporator)
14. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (Gas chromatograph) ยี่ห้อ Hewlett-Packard 6890
15. สารละลายมาตรฐานกรดไขมัน (Internal standard) Nonadecanoic acid Methyl Ester (C19 : 0) ยี่ห้อ SIGMA เตรียมความเข้มข้นประมาณ 1000 ppm. in Hexane
16. สารละลายมาตรฐานกรดไขมัน GLC-68D ยี่ห้อ Nu-check Prep, Minesota ซึ่งเป็นสารละลายแบบผสมประกอบด้วยกรดไขมัน 19 ชนิด ได้แก่

		% by weight
C14 : 0	Methyl Myristate	6.0
C14 : 1	Methyl Myristoleate	1.0
C16 : 0	Methyl Palmitate	16.0
C16 : 1	Methyl Palmitoleate	5.0
C18 : 0	Methyl Stearate	8.0
C18 : 1	Methyl Oleate	13.0
C18 : 1	Methyl Vaccenate	4.0

C18 : 2	Methyl Linoleate	2.0
C18 : 3	Methyl Linolenate	2.0
C20 : 0	Methyl Arachidate	1.0
C20 : 1	Methyl 11-Eicosenoate	9.0
C20 : 2	Methyl 11, 14 Eicosadienoate	1.0
C20 : 3	Methyl 11, 14, 17 Eicosatrienoate	1.0
C20 : 4	Methyl Arachidonate	3.0
C20 : 5	Methyl Eicosapentaenoate	10.0
C22 : 0	Methyl Behenate	1.0
C22 : 1	Methyl Erucate	3.0
C22 : 6	Methyl Docosahexaenoate	12.0
C24 : 0	Methyl Lignocerate	1.0

วิธีการ

ก. การสกัดกรดไขมัน

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักแห้งประมาณ 100-200 มิลลิกรัม ใส่ในกระดาษกรอง

2. เติม คลอโรฟอร์ม : เมธานอล (2 : 1) 30 ml. ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ทิ้งไว้ 1 คืน หมั่นเขย่าอยู่เรื่อย ๆ

3. นำสารละลายที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้ แล้วล้างตะกอนที่อยู่บนกระดาษกรองและฟลาสด้วยคลอโรฟอร์ม:เมธานอล (2 : 1) 20 ml. เพื่อสกัดไขมันที่อาจตกค้างอยู่

4. นำสารละลายไประเหยด้วยเครื่อง Evaporatory จนเกือบแห้งแล้วเก็บในหลอดทดลองฝาเกลียว

ข. การทำ Esterification (ดัดแปลงวิธีของ Morrison and Smith, 1964)

1. นำน้ำมันตัวอย่างทั้งหมด ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว

2. เติม 0.5 N NaOH in Methanol 2 มิลลิลิตร ไล่อากาศออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ปิดฝาเขย่า 30 วินาที

3. reflux ในน้ำเดือดจนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง

4. เติม 14 % BF_3 in methanol 4 มิลลิลิตร ไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน ปิดฝาเขย่า 30 วินาที แล้ว reflux ในน้ำเดือด 30 วินาที ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง

5. เติม Hexane 2 มิลลิลิตร ปิดฝา ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เติม Saturated NaCl 2 มิลลิลิตร ปิดฝา ทิ้งไว้ให้แยกชั้น

6. ดูดสารละลายผิวบนทั้งหมดใส่ใน vial ที่มีฝาชั้นในเป็นซิลิโคนปิดสนิท เป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนจนแห้ง แล้วจึงเติม Hexane 400 ไมโครลิตร และเติม internal standard 100ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ไล่อากาศออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ปิดให้สนิท ถ้ายังไม่ฉีดให้เก็บในที่เย็นและหุ้มขวดด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์

7. ฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ลงในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

ค. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชและกุ้งกุลาดำวัยอ่อนด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (Gas chromatograph) ยี่ห้อ Hewlett-Packard 6890

<u>ประกอบด้วย</u>

- ตัวตรวจแบบเฟลมไอโอไนเซชัน (FID)
- คอลัมน์แบบ fused silica capillary DB-WAX เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มม. ยาว 30 ม. ความ หนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร

<u>สภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ</u>

อุณหภูมิของช่องฉีดสาร	250	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของดีเทคเตอร์	260	องศาเซลเซียส

<u>โปรแกรมอุณหภูมิของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชและเนื้อกุ้ง</u>

อุณหภูมิเริ่มต้น 90 องศาเซลเซียส

ขั้นที่	อัตราของการเพิ่มอุณหภูมิ (°C/นาที)	อุณหภูมิ (°C)	hold (นาที)
1	20	169	0
2	0.25	172	0
3	1.00	188	2
4	5.00	200	10

อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจน สำหรับ FID	30	มิลลิลิตร/นาที
อัตราการไหลของอากาศ สำหรับ FID	300	มิลลิลิตร/นาที
อัตราการไหลของแก๊สพา	1-2	มิลลิลิตร/นาที
ปริมาตรสารละลายที่ฉีด	1	ไมโครลิตร

Split ratio 10:1 Split flow 10 มิลลิลิตร

ง. การคำนวณชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

1. การคำนวณปริมาณของกรดไขมัน

การคำนวณปริมาณสารโดยใช้การเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคเทียบกับสารมาตรฐาน ดังนี้

สมมติให้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเท่ากับ A ppm จะมีเนื้อสารเท่ากับ A นาโนกรัม

ขั้นที่ 1

สารละลายมาตรฐานมี peak area เท่ากับ **B** จะมีเนื้อสารเท่ากับ **A** นาโนกรัม

ดังนั้น ในตัวอย่างที่มี peak area เท่ากับ **C** จะมีเนื้อสารเท่ากับ $\frac{A \times C}{B}$ นาโนกรัม

สมมติให้ $\frac{A \times C}{B} = D$ นาโนกรัม

ในการฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จะฉีด 1 ไมโครลิตร

ดังนั้นแสดงว่าในการฉีด 1 ไมโครลิตร จะมีเนื้อสารเท่ากับ **D** นาโนกรัม

สมมติให้ปริมาตรสุดท้ายก่อนฉีดเท่ากับ **E** ไมโครลิตร ก็จะมีเนื้อสารเท่ากับ $D \times E$ นาโนกรัม

ขั้นที่ 2

สมมติให้น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์เท่ากับ **G** กรัม

หมายความว่าในตัวอย่าง **G** กรัม จะมีเนื้อสารอยู่เท่ากับ $D \times E$ นาโนกรัม

ดังนั้นถ้าตัวอย่าง 1 กรัม จะมีเนื้อสารอยู่เท่ากับ $\frac{D \times E}{G}$ นาโนกรัม

2. การวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมัน

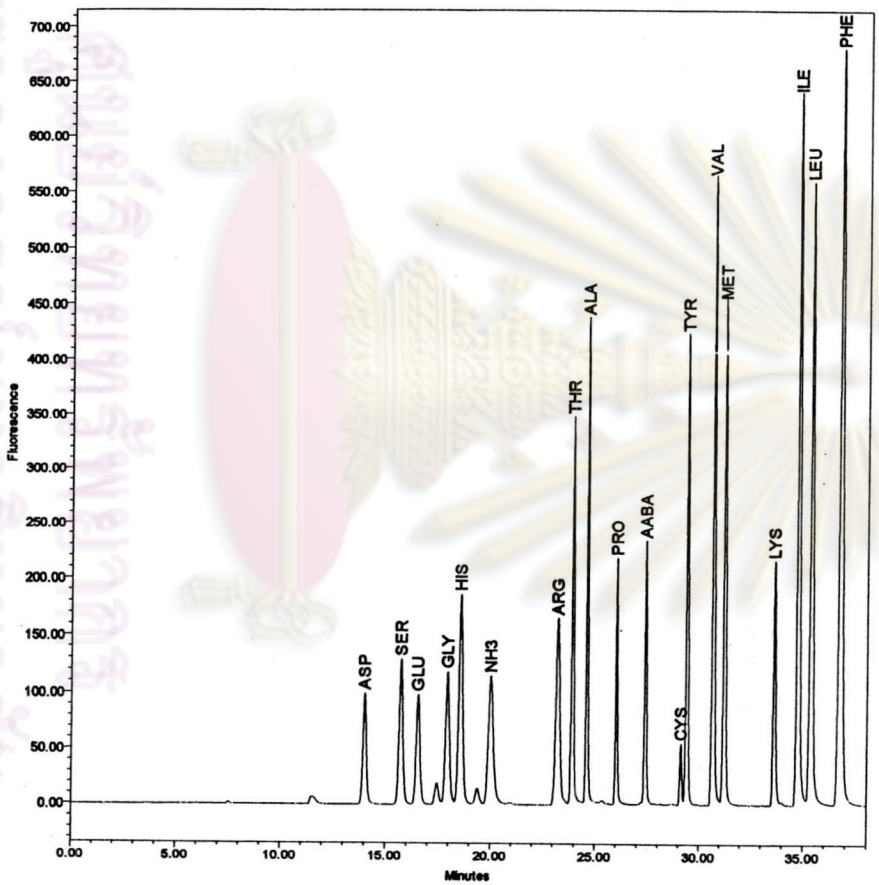
สำหรับกรดไขมันทั้งหมด 19 ตัว ที่มีในสารละลายมาตรฐานจะวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมัน โดยการเปรียบเทียบค่า retention time ของตัวอย่างกับ retention time ของสารละลายมาตรฐานกรดไขมัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

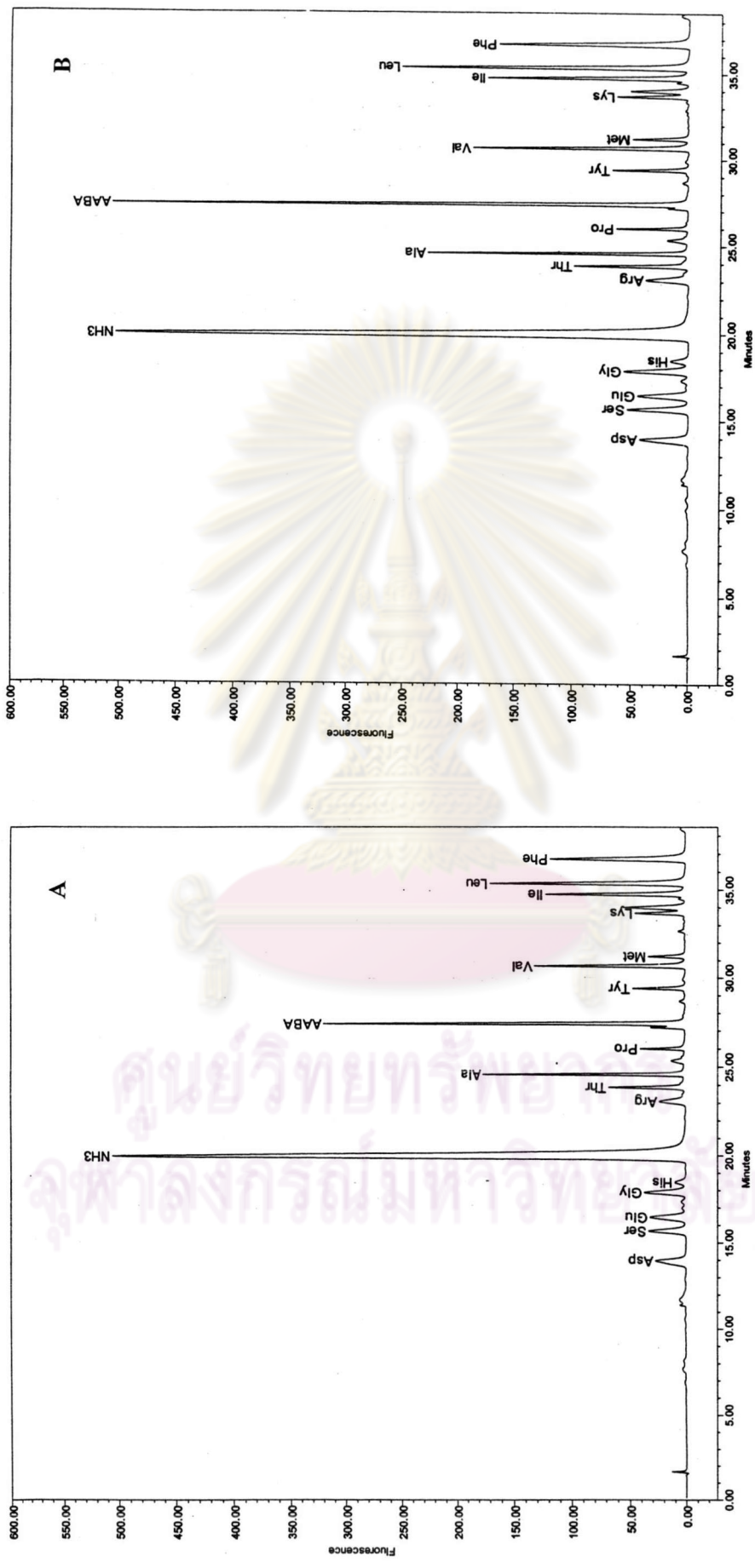
I20919827

ภาคผนวก จ

โครมาโทแกรมของกรดอะมิโน



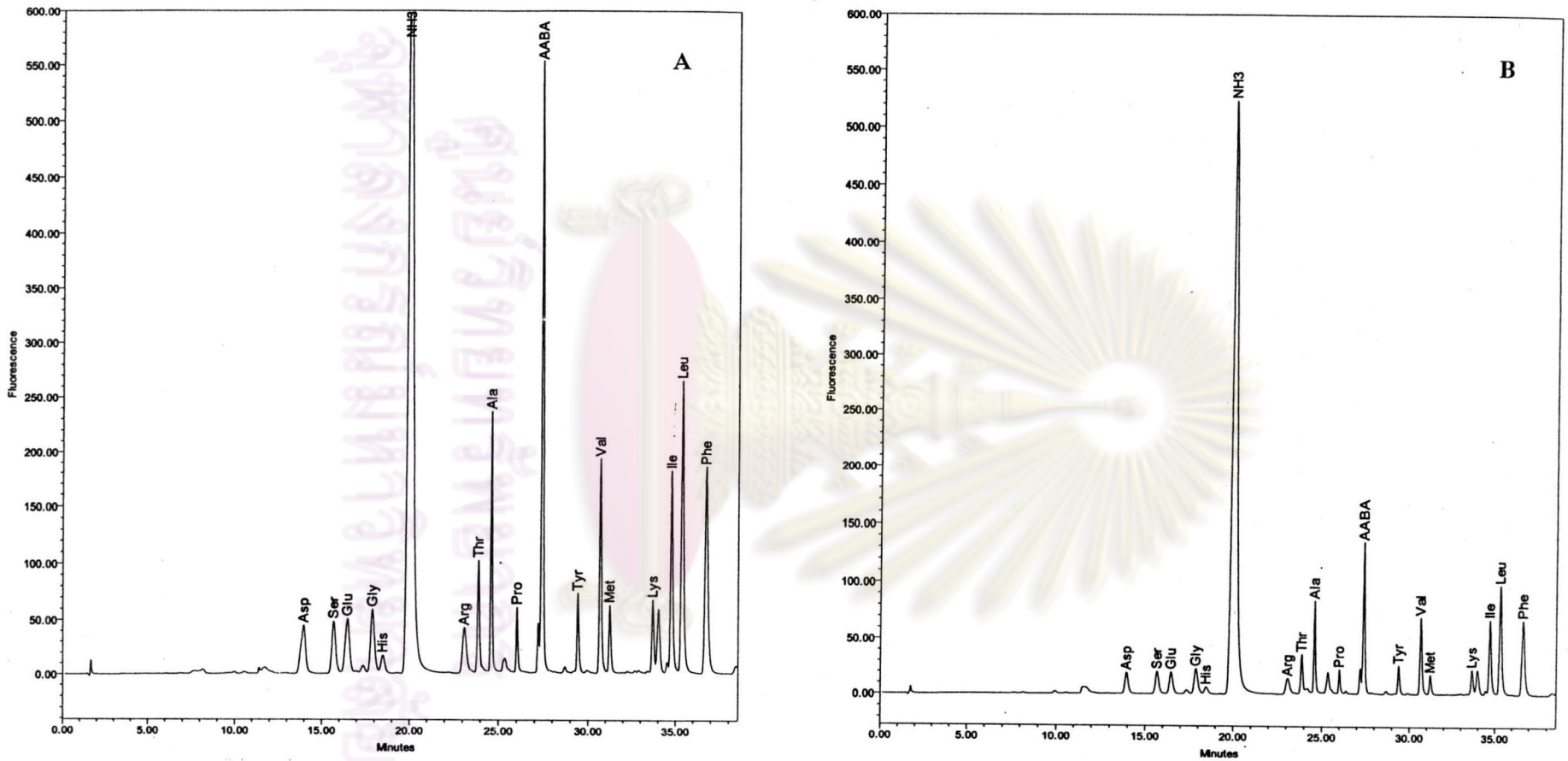
รูปที่ จ1 โครมาโทแกรมของกรดอะมิโนในสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน (ยี่ห้อ PIERCE)



รูปที่ 62 โครมาโทแกรมของกรดอะมิโนในไคอะตอม

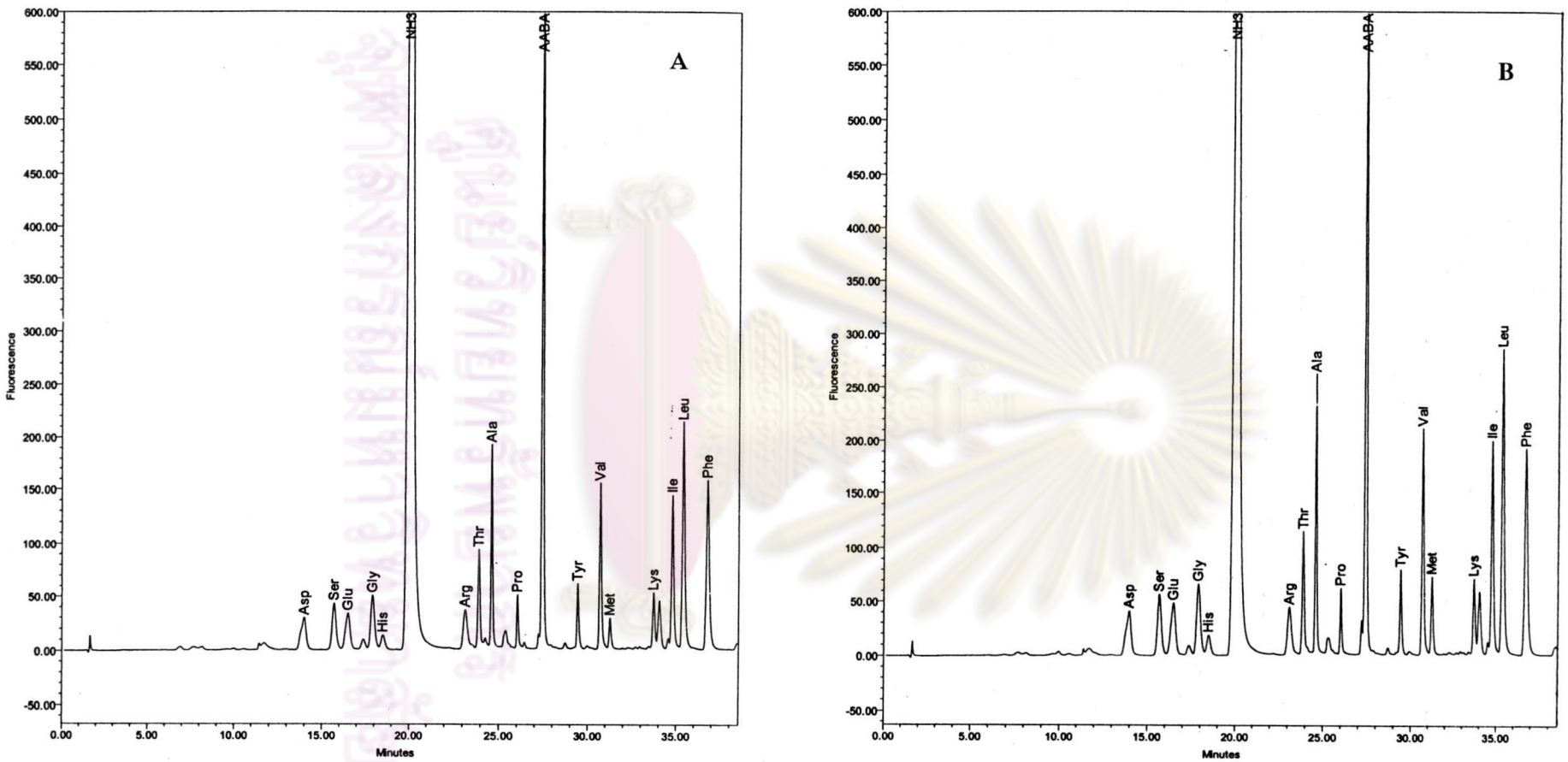
A. โคลน *Chaetoceros* (AL) B. โคลน *Chaetoceros* (BP)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



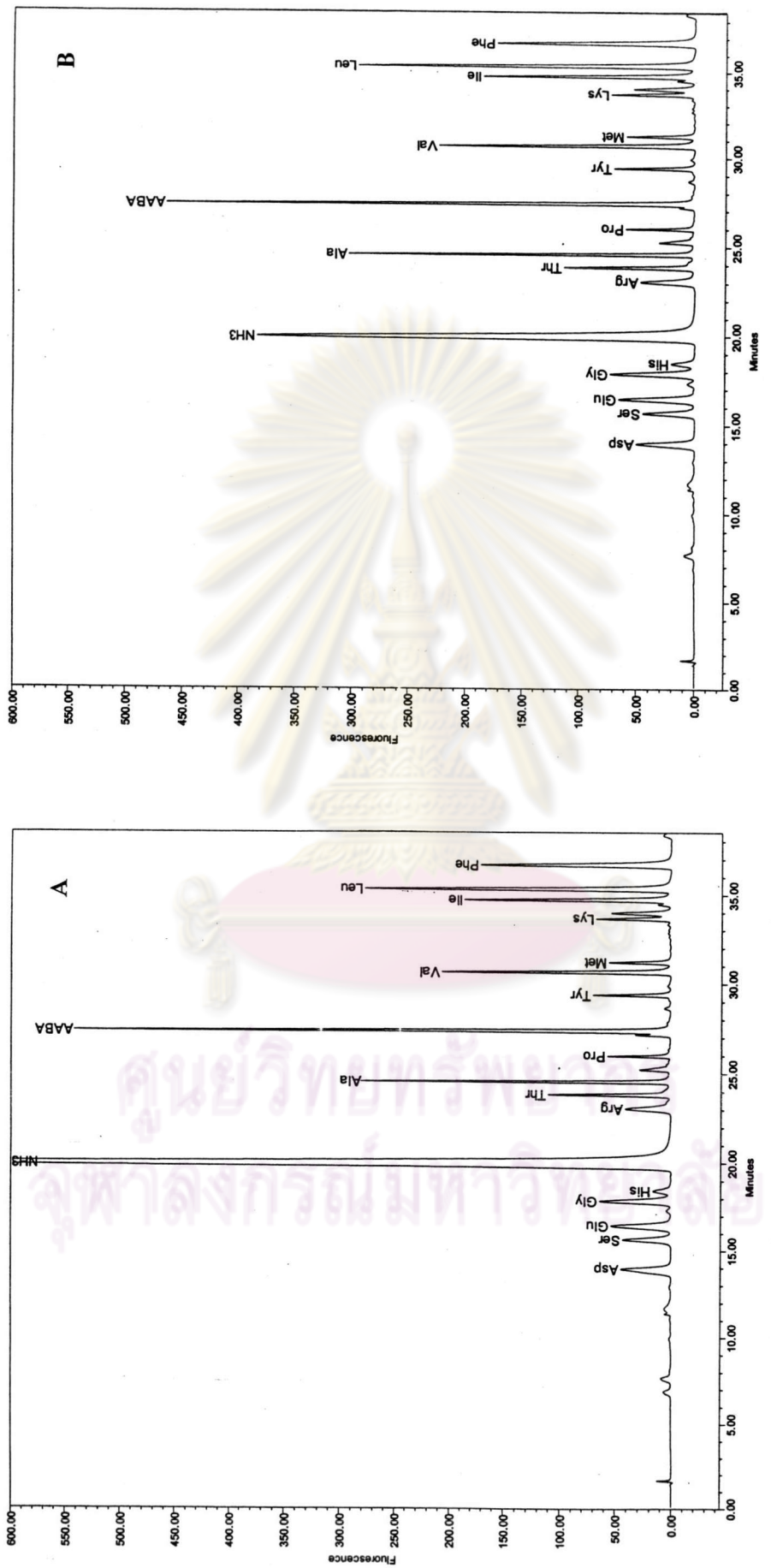
รูปที่ จ3 โครมาโทแกรมของกรดอะมิโนในไดอะตอม

A. โคลน *Chaetoceros* (BU) B. โคลน *Chaetoceros* (NI)



รูปที่ จ4 โครมาโทแกรมของกรดอะมิโนไดอะตอม

A. โคลน *Chaetoceros* (LA) B. โคลน *Chaetoceros* (PP)

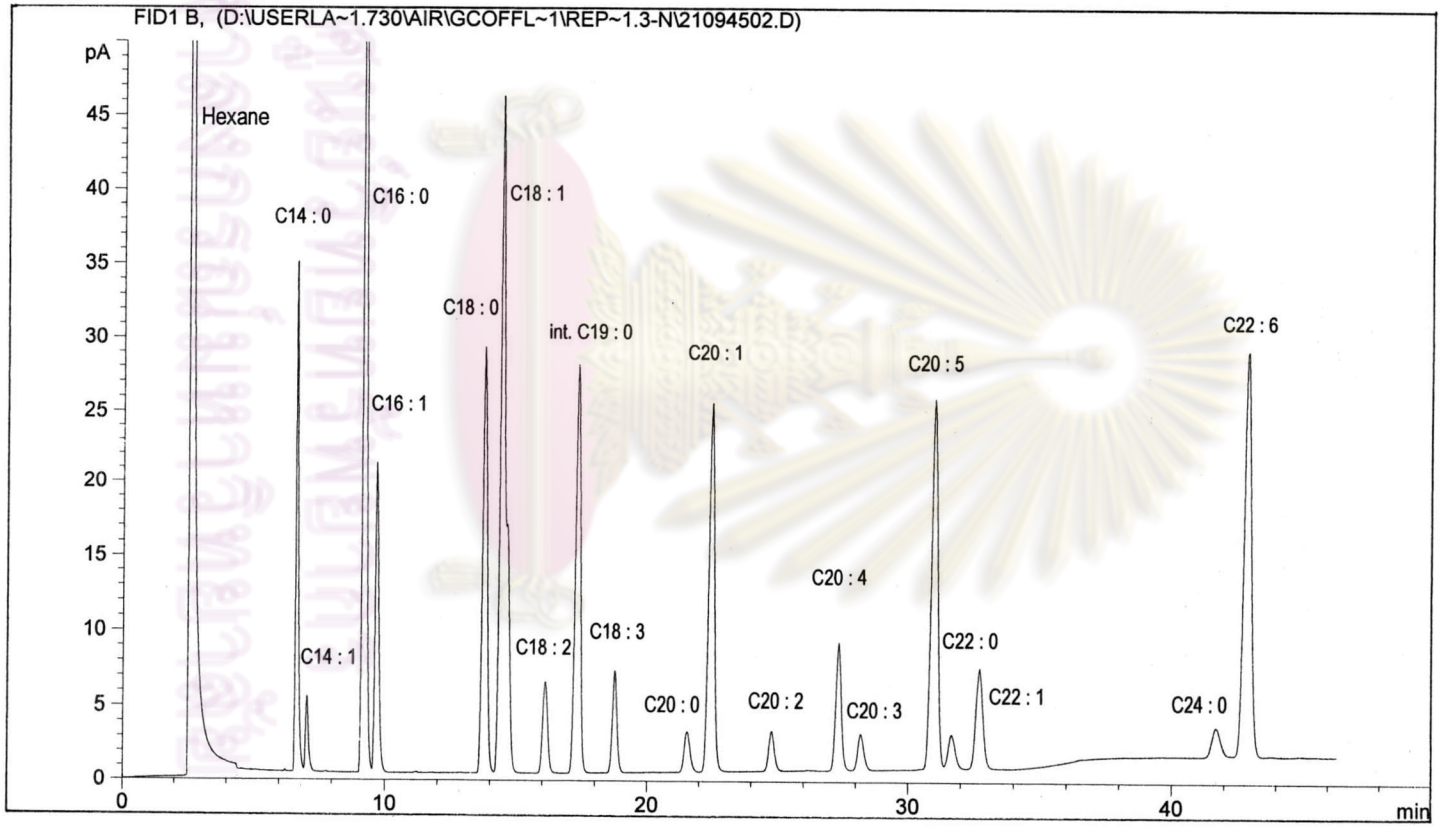


รูปที่ 15 โครมาโทแกรมของกรดอะมิโนในโคอะดอม

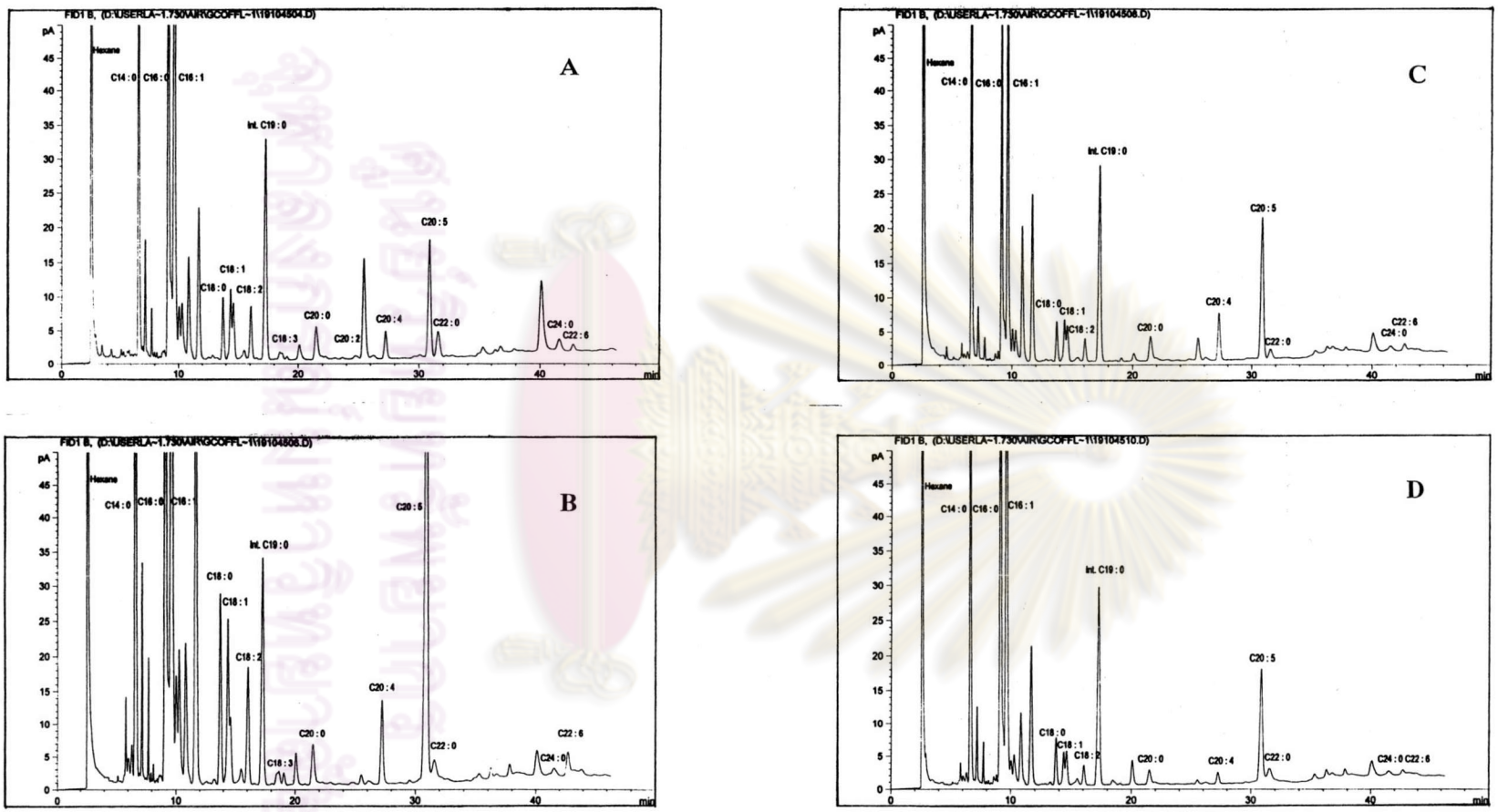
A. โคลน *Skeletonema costatum* (NI) B. โคลน *Skeletonema costatum* (BP)

ภาคผนวก ฉ

โครมาโทแกรมของกรดไขมัน

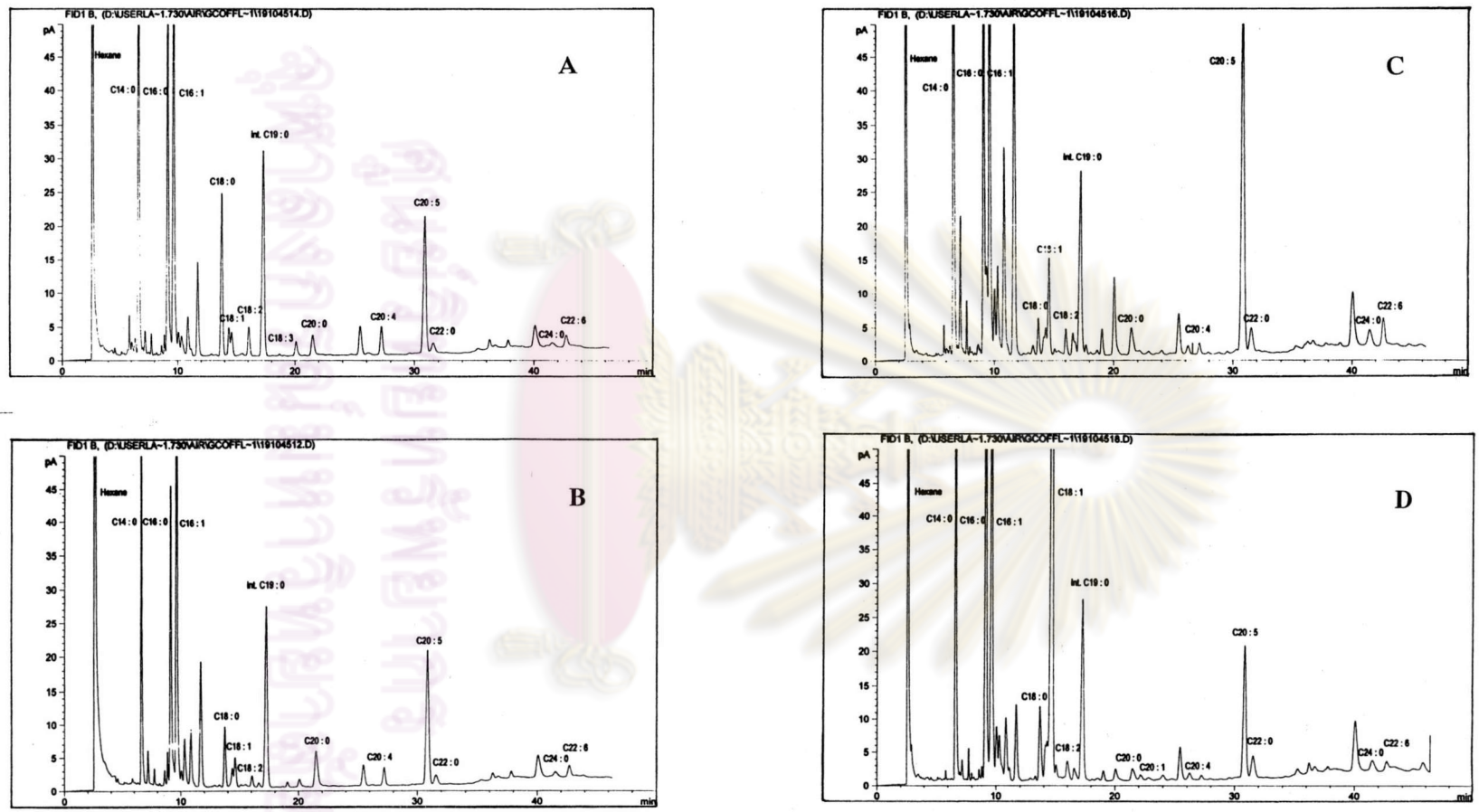


รูปที่ ฉ1 โครมาโทแกรมของกรดไขมันในสารละลายมาตรฐานกรดไขมัน GLC-68D (ยี่ห้อ Nu-check Prep, Minesota, U.S.A.)



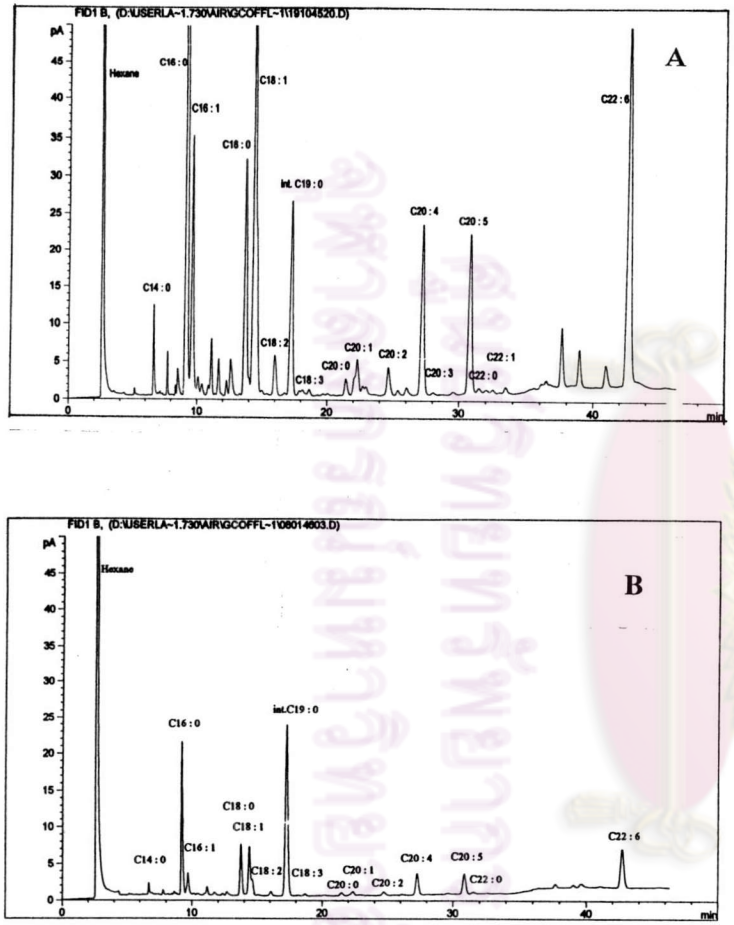
รูปที่ ฉ2 โครมาโทแกรมของกรดไขมันในไดอะตอม

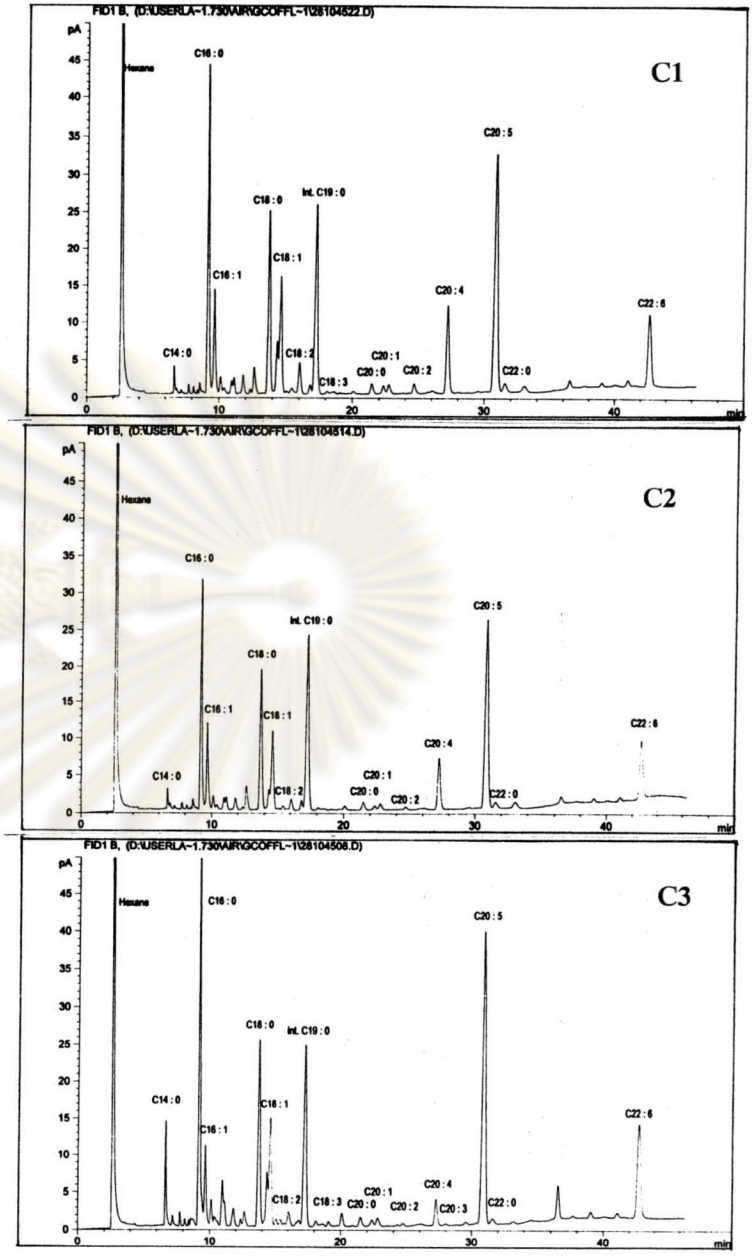
A. โคลน *Chaetoceros* (AL) B. โคลน *Chaetoceros* (BP) C. โคลน *Chaetoceros* (BU) D. โคลน *Chaetoceros* (NI)



รูปที่ ฉ3 โครมาโทแกรมของกรดไขมันในไดอะตอม

A. โคลน *Chaetoceros* (LA) B. โคลน *Chaetoceros* (PP) C. โคลน *Skeletonema costatum* (NI) D. โคลน *Skeletonema costatum* (BP)





รูปที่ ฉ4 โครมาโทแกรมของกรดไขมันเนื้อกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะต่าง ๆ

A. ระยะนอเพลียส IV B. ระยะโปรโตซูเอีย I (ไม่ได้รับอาหาร)

C. ระยะโพสลาร์วา I ที่ได้รับอาหารจาก C1. โคลน *Chaetoceros* (BP)

C2. โคลน *Chaetoceros* (NI)

C3. โคลน *Skeletonema costatum* (BP)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชัชฎาภรณ์ สรรคอนุรักษ์ เกิดเมื่อวันที่ 17 กรกฎาคม พ.ศ. 2519 ที่อำเภอเมือง จังหวัดชัยนาท สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2542

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย