ว.วิทย. มข. 45(4) 782-792 (2560) KKU Sci. J. 45(4) 782-792 (2017)

ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาด้วยการแช่เย็นต่ออัตรารอดการเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของไดอะตอม *Chaetoceros gracilis*

Effects of cold storage duration on survival rate, growth, and biochemical compositions of diatom *Chaetoceros gracilis*

พรพิมล พิมลรัตน์[1*] พัชราวลัย ศรียะศักดิ์[2] สถาพร ดิเรกบุษราคม[3] สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี[3]
และ ปิยะพงค์ โชติพันธุ์[3]

[1]สาขาวิชาการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร ตำบลละแม อำเภอละแม จังหวัดชุมพร 86170

[2]ภาควิชาประมงคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน
วิทยาเขตสกลนครอำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร 47160

[3]ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161

[*]Corresponding Author, Email: paqua50@gmail.com

บทคัดย่อ

Chaetoceros gracilis (*C. gracilis*) เป็นไดอะตอมที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายสำหรับอนุบาลลูกกุ้งในประเทศไทยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่เย็น (อุณหภูมิ 4 - 5 องศาเซลเซียส) ต่อการมีชีวิตรอด การเติบโตเมื่อนำกลับมาเลี้ยงใหม่ การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรีย และองค์ประกอบทางชีวเคมีของ *C. gracilis* ผลการศึกษาพบว่าจำนวนเซลล์ของ *C. gracilis* มีค่าลดลง ($P<0.05$) ตลอดระยะเวลาการแช่เย็น โดยในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาความหนาแน่นเซลล์ของ *C. gracilis* ลดลงเหลือ 2.29×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (เริ่มต้นที่ 6.67×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และมีอัตรารอดของเซลล์ 5.08 เปอร์เซ็นต์ การเติบโตของ *C. gracilis* ที่นำเพาะเลี้ยงใหม่มีความแตกต่างกัน ($P<0.05$) โดยเซลล์ที่แช่เย็นเป็นระยะเวลา 3–14 วัน สามารถนำกลับมาเลี้ยงใหม่ได้แต่เซลล์ที่ผ่านการแช่เย็นเกิน 21 วัน มีการเติบโตช้าไม่เหมาะสมที่จะนำกลับไปเพาะเลี้ยงใหม่ ปริมาณจุลินทรีย์รวมและวิบริโอโคโลนีสีเขียวที่พบในตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง 5.64×10^4–2.88×10^7และ 5.67×10^3–1.53×10^7 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษาในครั้งนี้พบว่า *C. gracilis* ที่ไม่ผ่านการแช่เย็นและผ่านการแช่เย็นไม่เกิน 7 วัน มีปริมาณโปรตีนและไขมันสูงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดที่ผ่านการแช่เย็นเกิน 7 วัน ขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องตลอด

ระยะเวลาการแช่เย็นซึ่งผลการศึกษาที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดการอาหารมีชีวิตสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

ABSTRACT

The unicellular marine diatom, *Chaetoceros gracilis*, has been commonly used as an important live food for crustacean larvae in Thailand. The purpose of this study was to investigate the suitable cold storage duration (chilled temperature at 4-5 degrees Celsius) on viability, growth rate when revived in fresh medium, bacterial variation and biochemical composition of *C. gracilis*. The results showed that *C. gracilis* cells were significantly decreased ($P<0.05$) during chilled storage. After 28 days, cell density and survival rate were shown at 2.29×10^6 cell/milliliter (initial cell 6.67×10^6 cells/milliliter) and 5.08 percentages respectively. The growth rate of *C. gracilis*, after they were revived in fresh medium, was significantly different ($P<0.05$) which the cells ,storage for more than three weeks, were unsuitable used for revived in fresh medium since this will affect the quality of samples. The total plate counts and green colony of *Vibrio* spp. of samples were in the range of 5.64×10^4 – 2.88×10^7 and 5.67×10^3–1.53×10^7 CFU/milliliter, respectively. Results from this study found that proteins and total lipid ofthe fresh and chilled storage for not more than 7 days of *C. gracilis* was significantly highest ($P<0.05$) from that the other groups while the amount of carbohydrate was continuously decreased during chilled storage. These results can be applied for microalgae live feed management for animal larvae cultures.

คำสำคัญ: *Chaetoceros gracilis* การเก็บรักษา การแช่เย็นการเจริญเติบโต องค์ประกอบทางชีวเคมี

Keywords: *Chaetoceros gracilis*, Preservation, Frozen storage, Growth, Biochemical composition

บทนำ

อาหารมีชีวิตเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลวัยอ่อนซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องเลือกอาหารอนุบาลให้เหมาะสมกับชนิดขนาด และมีปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการของกุ้งในแต่ละวัยการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนด้วยอาหารมีชีวิต ได้แก่ สาหร่ายขนาดเล็กพวกแพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนสัตว์ จะทำให้ลูกสัตว์น้ำมีสุขภาพดี แข็งแรง ต้านทานโรคได้ดี และมีอัตรารอดตายสูง*Chaetoceros gracilis* เป็นสาหร่ายขนาดเล็กเซลล์เดียวกลุ่มไดอะตอมที่นิยมเพาะเลี้ยง เพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับการอนุบาลสัตว์น้ำกร่อยและน้ำเค็มขนาดเล็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่งลูกกุ้ง ลูกปู และหอยสองฝา เช่น หอยนางรม หอยเชลล์ และหอยแมลงภู่ (ลัดดา, 2540; Heasman et al., 2001; Rivero – Rodriguez et al., 2007; Pimolrat et al., 2010) เนื่องจากไดอะตอมชนิดนี้มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ย่อยง่าย และมีขนาดเหมาะสมต่อการเป็นอาหารของลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน อีกทั้งยังมีกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids: PUFA) เช่น EPA (eicosapentaenoic acid, C20:5n-3), ARA (arachidonic acid, C20:4n-6) และ

DHA (docosahexaenoic acid, C22:6n-3) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาการ และอัตราการรอดตายของลูกสัตว์น้ำ (Belay, 1997; Pimolrat et al., 2010) เพราะสัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันเหล่านี้ได้เอง จำเป็นต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น สัตว์น้ำที่ไม่ได้รับกรดไขมันเหล่านี้จากอาหาร จะมีการเติบโตช้า และเบื่ออาหาร (วีรพงศ์, 2536) การอนุบาลลูกกุ้งในระยะซูเอียนิยมใช้สาหร่ายในกลุ่มไดอะตอม เช่น *C. calcitrans* *C. gracilis* และ *Skeletonema costatum* โดยพบว่าลูกกุ้งที่อนุบาลด้วย *C. calcitrans* และ *C. gracilis* มีพัฒนาการดีกว่า *S. costatum* เนื่องจากไดอะตอมทั้งสองชนิดนี้มีคุณค่าทางอาหารเช่นปริมาณกรดไขมันชนิด ARA สูงกว่า (Rivero – Rodriguez et al., 2007)

ปัญหาที่มักประสบในโรงเพาะฟักกุ้งทะเลสำหรับการอนุบาลลูกกุ้งทะเลตั้งแต่ระยะนอเพลียสจนถึงระยะโพสลาวา 15 - 20 คือ การขาดแคลนไดอะตอม ซึ่งเป็นอาหารที่สำคัญที่สุดของลูกกุ้งระยะซูเอียและระยะไมซีสจะมีผลทำให้ลูกกุ้งมีอัตรารอดตายน้อย จึงมีการศึกษาวิธีการผลิตคีโตเซอรอสให้ได้ปริมาณมากเพื่อให้เพียงพอต่อการอนุบาลลูกสัตว์น้ำ (พรพิมล, 2552) แต่ในกรณีที่ผลผลิตคีโตเซอรอสมีมากเกินความต้องการของผู้เพาะเลี้ยงลูกกุ้งจะมีปัญหาเกี่ยวกับการจัดการและการเก็บรักษาเกิดขึ้น จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาถึงวิธีการเก็บรักษาคีโตเซอรอสด้วยวิธีและกระบวนการต่างๆ เช่น การกรอง การตกตะกอนด้วยสารเคมี การเก็บรักษาโดยใช้อุณหภูมิต่ำ การแช่แข็งและการทำให้แห้ง เป็นต้น (Heasman et al., 2001; ธิดาและมาวิทย์, 2538; เฉลิมชัยและปรเมษฐ์, 2546; อัชฌาและคณะ, 2554) เพื่อรักษาคุณภาพให้มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายสด มีอัตรารอดสูงและองค์ประกอบทางเคมีมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด การแช่เย็นในตู้เย็นหรือห้องเย็นเป็นกระบวนการเก็บรักษาอาหารโดยควบคุมอุณหภูมิให้สูงกว่า -1 องศาเซลเซียสและต่ำกว่า 8 องศาเซลเซียสเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา ชะลอวิถีเมตาบอลิซึมลดการสูญเสียวิตามินที่จำเป็นและกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (อรพิน, 2548) นับเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ง่าย สะดวกและสามารถใช้ประโยชน์จากเซลล์มีชีวิตได้จึงนิยมนำมาใช้เก็บคีโตเซอรอสที่เหลือใช้ในช่วงเวลาที่มีผลผลิตมากพอและนำมาใช้ได้ในช่วงเวลาที่ขาดแคลน แต่ข้อมูลเกี่ยวกับระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสมในการแช่เย็น *C. gracilis* ยังมีรายงานค่อนข้างน้อย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเก็บรักษาด้วยวิธีการการแช่เย็นต่อการมีชีวิตรอด ลักษณะของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรีย องค์ประกอบทางเคมี และการเติบโตเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงใหม่ของไดอะตอม *C. gracilis*

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมหัวเชื้อ *C. gracilis* ที่ใช้ในการทดลอง

นำหัวเชื้อไดอะตอม *C. gracilis* ที่ปราศจากแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอาหารเพาะสาหร่ายสูตร Guillard f/2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์แสงสีขาวที่ระดับความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ต่อเนื่องตลอด 24 ชั่วโมง เมื่อ *C. gracilis* มีการเติบโตเข้าสู่ระยะเอกซ์โพแนนเชียล ทำการขยายปริมาตรการเพาะเลี้ยงเพื่อนำไปใช้เป็นเซลล์เริ่มต้น (starter) ในการทดลอง โดยทำการย้าย *C. gracilis* ลงเพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเพาะสาหร่ายสูตร

Guillard f/2 ปริมาตร 1 ลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับการเลี้ยงหัวเชื้อ *C. gracilis* ให้อากาศตลอดเวลา

2. การเก็บรักษา *C. gracilis*

ทำการเพาะเลี้ยง *C. gracilis* แบบแบตช์ (batch) ในขวดพลาสติกขนาด 5 ลิตร ใส่อาหารเพาะเลี้ยง f/2 สูตรปรับปรุง โดยใช้เซลล์ความหนาแน่นเริ่มต้นที่ 5 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้น้ำทะเลความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์แสงสีขาวที่ระดับความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ต่อเนื่องตลอด 24 ชั่วโมง ตรวจวัดการเติบโตของสาหร่ายด้วยวิธีการนับเซลล์โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด เก็บตัวอย่างเซลล์ในช่วงปลายของระยะเอกซ์โพแนนเชียลของการเลี้ยงโดยนำคีโตเซอรอสมาแบ่งใส่ถุงพลาสติกขนาดกว้าง 18 นิ้ว ยาว 22 นิ้ว ปริมาตรถุงละ 1 ลิตร แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

3. การติดตามผลตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา *C. gracilis*

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ องค์ประกอบทางเคมี การเติบโตของคีโตเซอรอสเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงใหม่ และปริมาณเชื้อแบคทีเรียทุกๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 28 วันการหาอัตรารอดของเซลล์โดยการนับเซลล์โดยตรงตามวิธีการของ Harith et al. (2010) ด้วยกล้องจุลทรรศน์และใช้ Evan's blue ในการย้อมสีเซลล์ แล้วคำนวณอัตรารอดของเซลล์เป็นเปอร์เซ็นต์ ตรวจวัดการเติบโตของสาหร่ายด้วยวิธีการนับเซลล์โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือดโดยทำการสุ่มนับเซลล์จำนวน 5 ช่อง ของสไลด์นับเม็ดเลือด นับตัวอย่างละ 2 ซ้ำคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate: μ) ตามวิธีการของ Guillardand Ryther (1962) ดังสมการ

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$$

เมื่อ μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

x_1 = ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

x_2 = ความหนาแน่นเซลล์วันที่เก็บเกี่ยว (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

t_1 = ระยะเวลาที่เริ่มเพาะเลี้ยงสาหร่าย (ชั่วโมง)

t_2 = ระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย (ชั่วโมง)

ในการศึกษาองค์ประกอบในเซลล์โดยเก็บตัวอย่างเซลล์ด้วยวิธีการหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ (5,000 g, 3 นาที) ที่อุณหภูมิเดียวกับการเพาะเลี้ยง ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยแอมโมเนียมฟอร์เมต 0.5 M (0.5 M ammonium formate) เพื่อกำจัดเกลือและอาหารเพาะเลี้ยงที่เหลือก่อนนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีดังนี้ คือ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตวิธี Phenol-sulfuric acid spectrophotometric (Dubois et al.,1956) วิเคราะห์ปริมาณไขมันสกัดด้วย Chloroform: methanol (2:1) ตามวิธีของ Bligh and Dyer (1959) การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์รวม (Total Plate Count) และเชื้อวิบริโอโดยการกระจายเชื้อบนอาหารสูตร Nutrient agar (NA) และอาหารสูตร Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS) ตามลำดับ

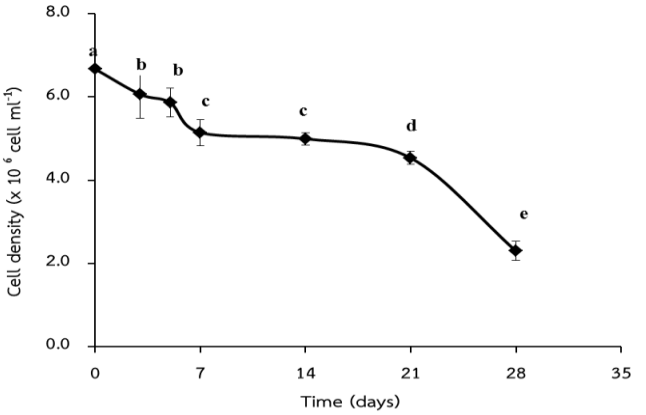
4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของของอัตรารอด จำนวนเซลล์ ปริมาณจุลินทรีย์รวม และองค์ประกอบทางชีวเคมีของแพลงก์ตอนพืชที่เก็บรักษาที่ระยะเวลาแตกต่างกันโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. จำนวนเซลล์ อัตรารอดและลักษณะเซลล์ของ *C. gracilis* แช่เย็นที่ระยะเวลาต่างๆ

จำนวนเซลล์*ของ C. gracilis* มีความหนาแน่นลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) โดยในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาเซลล์ของ *C. gracilis* จากจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 6.67×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรลดลงเหลือ 2.29×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ *Chaetoceros gracilis* แช่เย็นที่ระยะเวลาต่างๆ

จากการศึกษาอัตราการรอดของเซลล์ *C. gracilis* ที่เก็บรักษาโดยวิธีการแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4.36±1.52 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน พบว่า ระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่ออัตรารอดโดยเมื่อแช่เย็นเซลล์ *C. gracilis* เป็นระยะเวลา 28 วัน อัตรารอดของเซลล์จะลดลงอย่างต่อเนื่องและเหลือเซลล์มีชีวิตเพียง 5.08 % เท่านั้น (ตารางที่ 1) ซึ่งอัตรารอดในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Harith et al. (2010) *C. calcitrans* ที่เก็บเกี่ยวด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง การกรอง และการใช้สารเคมี แล้วนำไปเก็บรักษาด้วยการแช่เย็น (4°C) สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นาน 4 สัปดาห์แต่มีค่าน้อยกว่ารายงานของ อัชฌาและคณะ (2554) ที่ศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษา *Thalassiosira sp.* เข้มข้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด ซึ่งได้จากการกรองแบบแบ่งส่วนและการตกตะกอนด้วยสารส้ม โดยตรวจสอบดูจากสัปดาห์ที่ 4 มีอัตราการรอดที่ 29.20 – 43.23 % ตามลำดับ อาจเป็นเพราะในระหว่างการแช่เย็น *C. gracilis* ตลอดระยะเวลา 28 วัน พบว่าอุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 2-6 องศาเซลเซียส โดยจะเห็นว่าในบางช่วงของการแช่เย็นอุณหภูมิในตู้เย็นนั้นลดต่ำลงถึง 2 องศาเซลเซียส (จำนวน 6 วัน คือช่วงวันที่ 19, 20, 25, 26, 27, 28) ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าวอาจจะเป็นสาเหตุทำให้อัตรารอด

ของ *C. gracilis* มีค่าน้อยกว่า *Thalassiosira* sp. ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาโดยจะสังเกตว่าช่วงที่อุณหภูมิลดลงไปต่ำจะสอดคล้องกับระยะเวลาที่จำนวนเซลล์มีชีวิตลดลงอย่างชัดเจน (ช่วงวันที่ 21 และ 28) นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่าปริมาณไซโทพลาสซึมของเซลล์ *C. gracilis* ที่เก็บรักษาโดยวิธีการแช่เย็นระยะเวลาต่างกันจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยจะมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการแช่เย็นซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลต่อการนำไปเลี้ยงใหม่ของ *C. gracilis* โดยพบว่า *C. gracilis* จะใช้ระยะเวลาปรับตัว (Lag phase) นานกว่า *C. gracilis* ที่ไม่ผ่านการแช่เย็นซึ่งการพักตัวดังกล่าวน่าจะเกี่ยวข้องกับการลดลงของสารสีคลอโรฟิลล์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นโมเลกุลรับพลังงานจากแสง และนำพลังงานดังกล่าวไปใช้ในการสร้างพลังงานเคมีโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อสร้างสารอินทรีย์ เช่น น้ำตาล และนำไปใช้เพื่อการดำรงชีวิต โดยสารคลอโรฟิลล์ อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า เยื่อหุ้มไทลาคอยล์ ซึ่งเป็นเยื่อหุ้มที่อยู่ภายในโครงสร้างของคลอโรพลาสต์ (Chloroplast) (วงษ์จันทร์,2535)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตจำนวนเซลล์สูงสุดและอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดของของ *Chaetoceros gracilis* (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่นำมาเพาะขยายใหม่หลังจากเก็บรักษาโดยวิธีการแช่เย็นในระยะเวลาต่างกัน

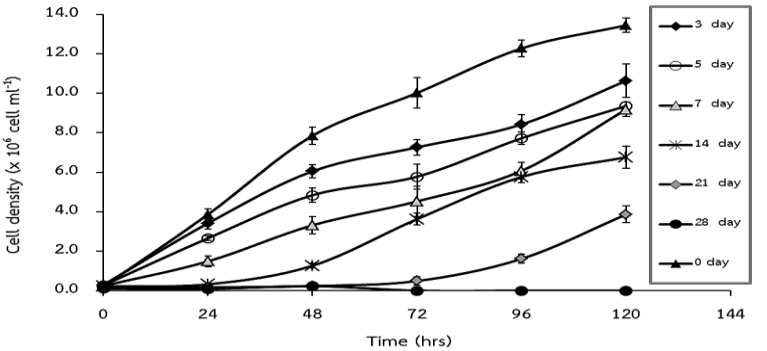
ระยะเวลา (วัน)	เซลล์ที่มีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนเซลล์สูงสุด ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (/ชั่วโมง)	ระยะเวลาของช่วง Lag phase (ชั่วโมง)
0	100.00	13.45 ± 0.34	0.11 ± 0.00	ไม่พบระยะนี้
3	90.00	10.64 ± 0.84	0.10 ± 0.00	0-12
5	87.86	9.36 ± 0.18	0.09 ± 0.00	0-12
7	77.06	9.19 ± 0.36	0.07 ± 0.01	0-12
14	74.81	6.76 ± 0.55	0.00 ± 0.00	0-36
21	67.92	3.86 ± 0.43	-0.02 ± 0.01	0-72
28	34.33	0.23 ± 0.02	-0.05 ± 0.00	ไม่เติบโตหลัง 48 ชั่วโมง

2. การศึกษาการเติบโตของ *C. gracilis* ที่นำมาเพาะเลี้ยงต่อหลังการแช่เย็นที่ระยะเวลาต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบผลการนำ *C. gracilis* ที่เก็บรักษาโดยการแช่เย็นที่ระยะเวลาต่างๆ มาเป็นหัวเชื้อสำหรับเพาะขยายใหม่อีกครั้งจากความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นที่ควบคุมให้เท่ากันคือ 0.29×10^6 cell/มิลลิลิตร พบว่า ชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการแช่เย็นสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้สูงสุด (13.45×10^6 cell/มิลลิลิตร) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 120 ชั่วโมง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่นๆ การเติบโตของ *C. gracilis* ที่นำมาเพาะเลี้ยงใหม่มีความแตกต่างกันโดยเซลล์ที่แช่เย็นเป็นระยะเวลา 3 – 14 วัน สามารถนำกลับมาเลี้ยงใหม่ได้ *C. gracilis* ที่ผ่านการแช่เย็นเป็นระยะเวลา 21 วัน ไม่เหมาะสมที่จะนำกลับไปเพาะเลี้ยงใหม่ เนื่องจากมีการเติบโตช้าและเมื่อแช่เย็นเป็นเวลา 28 วัน เซลล์ของ *C. gracilis* ไม่สามารถเติบโตได้เมื่อนำกลับมาเลี้ยงใหม่ (รูปที่ 2)

นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาการปรับตัว (Lag phase) ของ *C. gracilis* ทุกชุดที่ผ่านการแช่เย็นจะมีค่านานกว่า ชุดที่ไม่ผ่านการแช่เย็นโดยสามารถพิจารณาได้จากอัตราการเติบโตจำเพาะที่มีค่าลดลง

ตามระยะเวลาในการแช่เย็นที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1) ทั้งนี้อาจเนื่องจากอุณหภูมิต่ำไปลดกิจกรรมเมตาบอลิซึมและการเปลี่ยนปฏิกิริยาทางเคมีและเอนไซม์ ภายในเซลล์ *C. gracilis.* จึงมีผลต่ออัตราเร็วในการเพิ่มจำนวน โดยทำให้ช่วงพักตัวก่อนการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่ายาวนานขึ้น และลดการเจริญในช่วงทวีคูน (Log phase) (อรพิน, 2546) ปกติแพลงก์ตอนพืชมีอัตราการเจริญสูงสุดในช่วงระยะปรับตัวเมื่อถึงระยะคงที่ (Stationary phase) อัตราการเจริญเติบโตจะลดลงแต่ยังมีการเพิ่มจำนวนอยู่ แต่อัตราการเจริญในระยะเวลานี้จะมีความใกล้เคียงกับอัตราการตาย จึงทำให้เซลล์แพลงก์ตอนมีจำนวนใกล้เคียงกัน รวมถึงระยะเวลาจากความหนาแน่นเริ่มต้นจนถึงความหนาแน่นสูงสุดก็สามารถชี้วัดได้ว่าในระยะคงที่มีอัตราการเจริญสูงกว่าการตายและสามารถคงอยู่ในระยะนี้ได้นาน พบว่ายังมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น แม้ว่าไม่ได้อยู่ในช่วงระยะปรับตัว (อัชฌาและคณะ, 2554)



รูปที่ 2 การเจริญเติบโตของ *Chaetoceros gracilis* ที่นำมาเพาะขยายใหม่หลังจากเก็บรักษาโดยวิธีการแช่เย็นที่ระยะเวลาต่างกัน

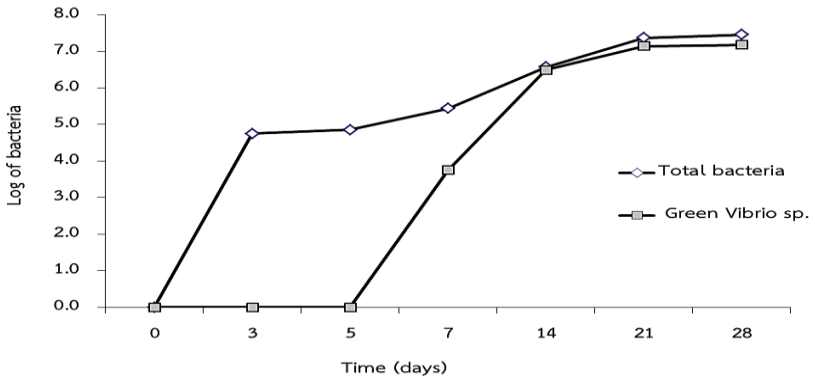
3. การเปลี่ยนแปลงของจำนวนเชื้อแบคทีเรียใน *C. gracilis* แช่เย็นที่ระยะเวลาต่างๆ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์รวม พบว่า *C. gracilis* ที่เก็บรักษาโดยการแช่เย็นที่ระยะเวลาต่างกันมีปริมาณจุลินทรีย์รวมอยู่ในช่วง 5.64×10^4 – 2.88×10^7 CFU/มิลลิลิตร โดยปริมาณจุลินทรีย์รวมจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการแช่เย็นและมีปริมาณสูงสุดในชุดที่แช่เย็นเป็นระยะเวลา 28 วัน (รูปที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบแล้วมีค่าสูงกว่าจำนวนจุลินทรีย์รวมใน *Thalassiosira sp.* ที่เก็บเกี่ยวโดยวิธีการกรองและตกตะกอนและนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในที่มืดที่ศึกษาโดย อัชฌาและคณะ (2554) พบว่าปริมาณจุลินทรีย์รวมที่พบในตัวอย่างจากการกรองและการตกตะกอนมีค่าอยู่ในช่วง 1.6×10^5 – 2.0×10^6 CFU/มิลลิลิตร และ 2.8×10^4 - 7.0×10^6 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณจุลินทรีย์รวมนี้

สอดคล้องกับการลดลงของปริมาณคาร์โบไฮเดรตของเซลล์ (ตารางที่ 2) และการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเซลล์ *C. gracilis* จึงอาจจะเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นมีการใช้สารอาหารโดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรตจากเซลล์ที่มีการแตกหรือเสียหายไปบางส่วนในระหว่างการเก็บรักษาโดยการแช่เย็นสำหรับการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์เพราะจุลินทรีย์

ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งนอกจากสารอาหารแล้ว ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น อุณหภูมิ aw (water activity) pH ปริมาณออกซิเจน ชนิดและปริมาณและสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นต้น (อรพิน, 2548)

แบคทีเรียสกุล *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่พบบ่อยสามารถก่อให้เกิดโรคและส่งผลให้กุ้งบางส่วนหรือทั้งหมดตาย ซึ่งพบได้ทั้งในโรงเพาะฟักและในบ่อเลี้ยง เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำที่สำคัญได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum* และ *V. harveyi* ซึ่งส่วนใหญ่จะเจริญให้โคโลนีสีเขียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS (สลิลภร, 2550) จากการศึกษาครั้งนี้พบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอโดยเฉพาะโคโลนีสีเขียวใน *C. gracilis* หลังจากแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส ผ่านไปเป็นระยะเวลา 7 วัน และพบตลอดจนกระทั่งระยะเวลา 28 วัน มีปริมาณที่พบอยู่ในช่วง 5.67×10^{3} – 1.53×10^{7} CFU/มิลลิลิตร (รูปที่ 3) ซึ่งปริมาณที่พบถือว่ามีค่าสูงและมีโอกาสที่จะทำให้เกิดโรคในกุ้งได้ เพราะจากรายงานของ Ruangpan (1995) ได้ตั้งข้อสังเกตว่าเมื่อปริมาณ *Vibrio* sp. เพิ่มสูงเป็น 10^{4}-10^{5} CFU/มิลลิลิตร และคงตัวอยู่ 1-2 สัปดาห์ กุ้งจะแสดงอาการของโรคและเกิดการตายขึ้น



รูปที่ 3 ปริมาณจุลินทรีย์รวมและเชื้อวิบริโอโคโลนีสีเขียวใน *Chaetoceros gracilis* แช่เย็นที่ระยะเวลาต่างๆ

4. องค์ประกอบทางชีวเคมีของของ *C. gracilis* แช่เย็นที่ระยะเวลาต่างๆ

การจัดการทางด้านอาหารของลูกกุ้งมีความสำคัญมาก เพราะถ้าลูกกุ้งได้รับอาหารไม่เพียงพอหรือไม่เหมาะสมจะทำให้ลูกกุ้งมีอัตรารอดต่ำ เนื่องจากลูกกุ้งวัยอ่อนแต่ละระยะกินอาหารแตกต่างกัน อาหารที่ดีและเหมาะสมสำหรับใช้ในการอนุบาลลูกกุ้งวัยอ่อนจึงควรมีคุณสมบัติที่ลูกกุ้งสามารถจับกินและนำเข้าปากได้ สามารถย่อยและเป็นสารอาหารที่ลูกกุ้งดูดซึมได้ง่ายเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ดังนั้น ขนาด รูปร่าง และคุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่ใช้จึงควรมีความเหมาะสม และมีปริมาณเพียงพอต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้ง *C. gracilis* นิยมใช้เป็นอาหารสำหรับอนุบาลลูกกุ้งตั้งแต่ระยะซูเอีย เนื่องจากไดอะตอมชนิดนี้มีองค์ประกอบทางชีวเคมี เช่น คาร์โบไฮเดรต (11.4%) โปรตีน (40.5%) และไขมันรวม (11.4%) (Rivero - Rodriguez et al., 2007) โดยเฉพาะองค์ประกอบในส่วนของโปรตีนและ

ไขมันที่ค่อนข้างสูงโดยโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักที่ช่วยในการเจริญเติบโต ขณะที่ไขมันในอาหารลูกกุ้งมีความจำเป็นสำหรับเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ แต่ยังส่งผลต่อการเติบโตและการดูดซึมสารอาหารที่ละลายได้ในไขมัน เช่น วิตามิน แร่ธาตุ และสเตอรอล (sterol) นอกจากนี้ไขมันยังช่วยป้องกันการถูกทำลายของเนื้อเยื่อได้อีกทางหนึ่ง (Brittino et al., 1980) จากการศึกษาในครั้งนี้องค์ประกอบทางชีวเคมี (เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง) ของ *C. gracilis* ที่เก็บรักษาโดยวิธีการแช่เย็นที่เวลาต่างกัน (ตารางที่ 2) พบว่า *C. gracilis* ที่ไม่ผ่านการแช่เย็นและผ่านการแช่เย็นไม่เกิน 7 วัน มีปริมาณโปรตีน และไขมันสูงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดที่ผ่านการแช่เย็นเกิน 7 วันขึ้นไป ขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด (14.81 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง) พบในชุดที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาโดยการแช่เย็น และมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการแช่เย็นที่นานขึ้นตามลำดับเมื่อพิจารณาข้อมูลโดยรวมทั้งในส่วนของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ จำนวนเซลล์ และองค์ประกอบทางชีวเคมีที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการแช่เย็นแล้ว ควรพิจารณาเลือก *C. gracilis* ที่แช่เย็นเป็นระยะเวลาไม่เกิน 5 วัน ไปอนุบาลลูกสัตว์น้ำเนื่องจากมีความเหมาะสมทั้งจำนวนเซลล์ ($9.36 \pm 0.18 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียวิบริโอโคโลนีสีเขียวซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคในลูกสัตว์น้ำ อีกทั้งยังมีคุณค่าทางอาหารทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันที่สูงเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของลูกสัตว์น้ำ

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางชีวเคมี (เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แห้ง) ของ *Chaetoceros gracilis* (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) เก็บรักษาโดยวิธีการแช่เย็นที่เวลาต่างกัน

ระยะเวลา (วัน)	โปรตีน	คาร์โบไฮเดรต	ไขมัน
เริ่มต้น	53.95 ± 0.40^{a}	14.81 ± 0.92^{a}	11.56 ± 0.25^{a}
3 วัน	53.96 ± 0.88^{a}	10.72 ± 0.67^{b}	11.55 ± 0.89^{a}
5 วัน	53.79 ± 0.15^{a}	4.24 ± 0.43^{cd}	11.66 ± 0.85^{a}
7 วัน	53.50 ± 1.39^{a}	4.72 ± 0.30^{c}	11.57 ± 0.24^{a}
14 วัน	50.67 ± 0.71^{b}	4.29 ± 1.01^{cd}	8.40 ± 0.48^{b}
21 วัน	50.11 ± 0.49^{b}	3.62 ± 0.07^{cd}	5.06 ± 0.99^{c}
28 วัน	45.85 ± 0.24^{c}	3.32 ± 0.02^{d}	5.03 ± 0.52^{c}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทดสอบโดยวิธี Duncan's multiple range test

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเก็บรักษาด้วยวิธีการการแช่เย็นต่อการมีชีวิตรอด ลักษณะของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรีย องค์ประกอบทางเคมี และการเติบโตเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงใหม่ของไดอะตอม *C. gracilis* สามารถสรุปได้ดังนี้ ระยะเวลาการแช่เย็นมีผลต่อจำนวนเซลล์การเติบโตเมื่อนำกลับไปเลี้ยงใหม่ ปริมาณจุลินทรีย์และคุณค่าทางอาหารของ *C. gracilis* โดยเซลล์ที่แช่เย็นเป็นระยะเวลา 3 – 14 วัน สามารถนำกลับมาเลี้ยงใหม่ได้ การแช่เย็นเกิน 21 วัน ไม่เหมาะสมที่จะนำกลับไปเพาะเลี้ยงใหม่การเก็บรักษาโดยวิธีการแช่เย็น *C. gracilis* เพื่อนำไปใช้อนุบาลลูกสัตว์น้ำไม่ควรเกิน 5 วัน เนื่องจากไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียวิบริโอโคโลนี

สีเขียวซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคในลูกสัตว์น้ำ อีกทั้งยังมีคุณค่าทางอาหารทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันที่สูงเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของลูกสัตว์น้ำ ดังนั้นการพิจารณาระยะเวลาการเก็บรักษาดังกล่าวจึงน่าจะมีประโยชน์กับการจัดการทางด้านอาหารของลูกกุ้งสำหรับโรงเพาะฟักต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยบางส่วนจากงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์สำหรับสถานที่และเครื่องมือสำหรับการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

เฉลิมชัย อยู่สำราญ และปรเมษฐ์ พลอยประดับ. (2546). การศึกษาผลของสารตกตะกอนต่อคีโตเซอรอส. ในเรื่องเต็ม การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41: สาขาประมง, กรุงเทพ-มหานคร.

ธิดาเพชรมณี และมาวิทย์ อัศวรักษ์. (2538). การตกตะกอนคลอเรลลาน้ำเค็มเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.เอกสารวิชาการฉบับที่ 10/2538 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งกรมประมงกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 7 หน้า.

พรพิมล พิมลรัตน์. (2552). การผลิต *Chaetoceros gracilis* ความหนาแน่นสูงในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับอนุบาลลูกกุ้งทะเล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหา-บัณฑิต, มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์. นครศรีธรรมราช.

ลัดดา วงศ์รัตน์. (2540). คู่มือการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วงษ์จันทร์ วงษ์แก้ว.(2535). หลักสรีรวิทยาของพืช. กรุงเทพมหานคร: ฟันนี่พับบลิชชิ่ง.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2536). อาหารปลา. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา: ชลบุรี.

สลิลภร สืบสาววงษ์. (2550). ผลของ *Chlorella* sp. ต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*Penaeusmonodon* Fabricius). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

อรพิน คงภักดี. (2546). ผลของสารภายนอกเซลล์และสารภายในเซลล์จากสเกลีโตนีมา (*Skeletonema-costatum*) ต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus) ในกุ้งกุลาดำ *(Penaeus monodon*). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต,มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์. นครศรีธรรมราช.

อรพิน ชัยประสพ. (2548). การถนอมอาหาร.กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

อัชฌา ป่านแก้ว สรวิศ เผ่าทองศุข วรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์ และจินตนา สและน้อย. (2554). การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษา *Thalassiosira* sp. สำหรับการอนุบาลลูกกุ้ง. แก่นเกษตร 39: 369-378.

Belay, A. (1997). Mass cultivation of *Spirulina* outdoors the earthrise farms experience. *In*: Vonshakm, A. (ed.), *Spirulinaplatensis* (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnology. London: Taylor and Francis.

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Journal of Biochemical Physiology 37: 911–917.

Brittino, N.R., Gennity, J., Lilly, M.L., Simons, E. and Finne, G. (1980). Seasonal and nutritional effects on the fatty acids of three species of shrimp *Penaeussetiferus*, *Penaeusazatecus* and *Penaeusduorarum*. Aquaculture 19: 139-148.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956).Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Journal of Chemistry 18: 350–356.

Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms I. Cyclotella nana Hustedt and Detonulaconfervacea (Clev) Gran. Canadian Journal of Microbiology 8: 229-239.

Harith, Z. T., Yosoff, F. M., Shariff, M., and Ariff, A. B. (2010). Effect of different seperation techniques and storage temperature on the viability of marine microalgae, *Chaetoceros-calcitrans*, during storage. Biotechnology 9(3): 387-391.

Heasman, M.P., Sushames, T.M., Diemar, J.A., O'Connor, W.A. and Foulkes.L.A. (2001). Production of Micro-algal Concentrates for Aquaculture Part 2: Development and Evaluation of Harvesting, Preservation, Storage and Feeding Technology. *In* NSW Fisheries Final Report Series No. 34 ISSN 1440-3544. NSW Fisheries Port Stephens Fisheries Centre, Australia.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265–275.

Pimolrat, P., Direkbusarakom, S., Chinajariyawong, C. and Powtongsook, S. (2010). The effect of sodium bicarbonate concentrations on growth and biochemical composition of *Chaetocerosgracilis* Schutt. Kasetsart University Fisheries Research Bulletin 34(2): 40-47.

Rivero-Rodriguez, S., Beaumont, A.R. and Lora-Vilchis, M.C. (2007). The effect of microalgae diets on growth, biochemical composition and fatty acid profile of *Crassostreacorteziensis* (Herlein) juveniles. Aquaculture 263: 199-210.

Ruangpan, L. (1995). Study on marine Vibrio isolation from culture shrimp (*Penaeusmonodon*) in Thailand. Ph.D. Thesis, Kagoshima University. Japan.

❑❑❑❑❑