ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตและคุณค่าทางอาหารของคีโตเซอรอส

Effect of media on growth and nutritional composition of *Chaetoceros gracilis*

สุพัตรา ขุนเสนาะ, นพวรรณ ฉิ้มสังข์*, สถาพร ดิเรกบุษราคม และสุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี

Supattra Khoonsanoh, Noppawan Chimsung, Sataporn Direkbusarakom and Suwit Wuthisuthimethavee

ศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80160

โทร/โทรสาร 0-7567-2390/0-7567-2302 อีเมลล์ sru@wu.ac.th

Research Center of Excellence in Shrimp, Walailak University, Nakhon Si Thammarat 80160, Thailand

Tel/Fax: 0-7567-2390/0-7567-2302 E -mail: sru@wu.ac.th

*Corresponding author: bee_rie@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบทางโภชนาการคีโตเซอรอส (*Chaetoceros gracilis*) โดยใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสูตร F/2 ของ Guillard and Ryther (1962), ชุดการทดลองที่ 2 อาหารสูตรปรับปรุง F/2 ของ Guillard and Ryther (1962) และชุดการทดลองที่ 3 อาหารสำเร็จรูปพร้อมใช้ผลิตโดยศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จากนั้นนำหัวเชื้อ *C.gracilis* จากห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมสภาวะต่างๆ ได้แก่ ความเค็ม (25 ส่วนในพันส่วน) อุณหภูมิ (25 องศาเซลเซียส) และความเข้มแสง (5,000 ลักซ์) ทำการเก็บตัวอย่าง *C. gracilis* เมื่อเลี้ยงครบ 24, 48 และ 60 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างเพื่อนับจำนวนเซลล์ และวิเคราะห์เถ้า โปรตีน ไขมันและสังกะสี ผลการทดลองพบว่า อาหารสูตรที่ 2 มีค่าความหนาแน่นของเซลล์เฉลี่ยอยู่ที่ 6.08×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณไขมันในเซลล์เฉลี่ยมีค่า 8.82 ± 0.41 เปอร์เซ็นต์ของ *C.gracilis* ซึ่งมีค่ามากกว่าอาหารสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ปริมาณเถ้า โปรตีน และสังกะสี ของ *C.gracilis* ทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สรุปได้ว่า อาหารสูตรที่ 2 อาหารสูตรปรับปรุง F/2 ของ Guillard and Ryther (1962) ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณไขมันในเซลล์ของ *C.gracilis* มีค่ามากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ

คำสำคัญ: *Chaetoceros gracilis* สูตรอาหาร องค์ประกอบทางโภชนาการ

Abstract

This study aimed to investigate the effects of three different mediums on growth and cellular nutritional composition of *Chaetoceros gracilis. C.gracilis* from laboratory of Research Center of Excellence in Shrimp, Walailak University was cultured under control laboratory conditions; salinity (25 ppt), temperature (25 ^{o}C) and light intensity (5,000 lux). Three treatments were performed as treatment 1; F/2 of Guillard and Ryther (1962), treatment 2; modified F/2 of Guillard and Ryther (1962) and treatment 3; media from Research Center of Excellence in Shrimp, Walailak university. Algal cells were collected and counted at 24, 48 and 60 hr after culture using a hemacytometer. Ash, protein content, lipid content and zinc content were analyzed in each treatment. The result showed that treatment 2 has highly average cell density and lipid content (6.08 x10^6 cell/ml, 8.82 ± 0.41% lipid per cell, respectively) and it has significantly different ($p<0.05$) comparing with the others. However, the specific growth rate, ash, protein content and zinc content of *C.gracilis* were not significant difference in all treatments. Finally, treatment 2 modified F/2 of Guillard and Ryther (1962) can be increased cell density and lipid content than other treatments.

Keyworde: *Chaetoceros gracilis*, media, nutritional composition

คำนำ

คีโตเซอรอส (*Chaetoceros gracilis*) เป็นไดอะตอมที่มีคุณค่าทางอาหารสูงซึ่งประกอบไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA) (Tokushima *et al*., 2016) วิตามิน (Brown *et al*., 1997; Brown *et al*., 1989) และสารสี เช่น Fucoxanthin, β-carotein, Chlorophyll (Foo *et al*., 2015; Tokushima *et al*., 2016) ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้ *C.gracilis* เป็นอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างแพร่หลาย มีรายงานการเลี้ยงเป็นอาหารสำหรับแพลงก์ตอนสัตว์ เช่น โรติเฟอร์ (Ortega-Salas and Reyes-Bustamante, 2013) อาร์ทีเมีย (Ahmadi *et al.,* 2017) ก่อนจะใช้อนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน หรือใช้อนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนโดยตรง (Khojasteh *et al.,* 2013) รวมทั้งเสริมในอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งวัยรุ่น (Ekawati *et al.,* 2013) ซึ่งส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ (Ekawati *et al.,* 2013) อย่างไรก็ตาม การเจริญเติบโตและคุณค่าทางโภชนาการของ *C.gracilis* ขึ้นอยู่กับสภาวะการเลี้ยง โดยมีรายงานว่า อุณหภูมิสูงสุดที่เลี้ยง *C.gracilis* ไม่ควรเกิน 37 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญควรอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 17-25 ส่วนในพันส่วน ความเข้มแสง 500-10,000 ลักซ์ (Wongrat and Wongrat, 2003) อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลผลิตและคุณค่าทางโภชนาการของ *C.gracilis* ซึ่งอาหารที่นิยมใช้เลี้ยง *C.gracilis* มีหลายสูตร สูตรที่นิยมคือ อาหาร F/2 ของ Guillard and Ryther (1962) (Kutako *et al*., 2014) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการวิจัยที่ปรับปรุงสูตรอาหารดังกล่าว เพื่อให้เหมาะสมกับสภาวะการเลี้ยงของประเทศไทย ในงานวิจัยของ Pimolrat (2009) ได้ศึกษาการผลิต *C.gracilis* โดยใช้อาหาร 4 สูตรด้วยกัน คือ อาหารสูตรมาตรฐาน Guillard and Ryther (1962) F/2 , สูตร F/2 m (เป็นสูตรจากศูนย์วิจัย

ความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์), อาหารทางการค้าชนิด A และ อาหารทางการค้าชนิด B โดยเซลล์ เริ่มต้นที่ $5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่า *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหาร F/2 m มีความหนาแน่นเซลล์ 1.2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรสูงสุด อีกทั้งยังมีองค์ประกอบทางชีวเคมีในส่วนของโปนตีน 62.21 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง และไขมันรวม 14.76 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง รวมทั้งมีอาหารสำเร็จพร้อมใช้ของศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อความสะดวกสำหรับการใช้งาน ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบอาหารเลี้ยง *C.gracilis* ที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการสะสมของไขมัน ใน *C.gracilis* โดยเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสม และศึกษาปริมาณของสังกะสีใน *C.gracilis* ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต โดยเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเอมไซม์ของกุ้งขาว รวมทั้งพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของกุ้งขาว ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการใช้ประโยชน์ *C. gracilis* เป็นแหล่งอาหารเสริมสำหรับกุ้งขาวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design, CRD) โดยมีสูตรอาหาร 3 สูตร ได้แก่ อาหารสูตรที่ 1 อาหาร F/2 ของ Guillard and Ryther (1962) อาหารสูตรที่ 2 อาหารสูตรปรับปรุง F/2 ของ Guillard and Ryther (1962) และ อาหารสูตรที่ 3 สูตรอาหารพร้อมใช้จากศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ทำการเลี้ยงในโหลแก้วขนาด 5 ลิตร จำนวน 3 ซ้ำต่อสูตรอาหาร ภายในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงแพลค์ตอนที่มีการควบคุมสภาวะ

การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารสูตรที่ 1 ตาม Guillard and Ryther (1962) และอาหารสูตรที่ 2 (ส่วนประกอบดังแสดงใน Table 1) ทำการเตรียมสูตรอาหารทั้ง 2 สูตร ให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อโดยใส่ในขวดดูแรน (สีชา) ขนาด 500 มิลลิลิตร นำปุ๋ยไป autoclave เพื่อฆ่าเชื้อและทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณภูมิห้อง เพื่อรอการใช้งาน ส่วนสูตรอาหารที่ 3 เป็นสูตรอาหารเหลวพร้อมใช้สำหรับงานทดลอง

Table1 Composition of madia (g/L)

Formula	media 1 of Guillard and Ryther (1962)	media F/2 of Guillard and Ryther (1962) modified
$NaNO_3$	0.075	-
Urea	-	84.15
$Na_2HPO_4.H_2O$	0.005	6.00
$FeCl_3.6H_2O$	3.15	2.90
$Na_2EDTA.2H_2O$	4.36	10.00
Vitamin B1	0.1	0.40
Vitamin B12	0.0005	0.002
Biotin	0.0005	0.10
$CuSO_4.5H_2O$	0.01	1.96
$ZnSO_4.7H_2O$	0.022	4.40
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.006	1.26
$MnCl_2.4H_2O$	0.18	36.00
$CoCl_2.6H_2O$	0.01	2.00
$Na_2SiO_3.9H_2O$	0.03	33.00

นำข้อมูลที่ได้จากตารางข้างต้นคำนวณอัตราส่วน N:P (Rasdi and Qin, 2002)

ดังสมการ หามวลโมเลกุลของสาร = มวลอะตอมของธาตุในโมเลกุลรวมกัน

ไนโตรเจน = (ปริมาณสารที่ใช้ x มวลโมเลกุลของไนโตรเจน) / มวลอะตอมของธาตุในโมเลกุลรวมกัน

ฟอสเฟอรัส = (ปริมาณสารที่ใช้ x มวลโมเลกุลของฟอสเฟอรัส) / มวลอะตอมของธาตุในโมเลกุลรวมกัน

หาอัตราส่วน ของ N:P

การเลี้ยง *C.gracilis*

หัวเชื้อ *C.gracilis* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นำมาเลี้ยงในขวดโหลแก้วขนาด 5 ลิตร เติมสูตรอาหาร โดยกำหนดความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นอยู่ที่ $5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Pimolrat, 2009) มีการควบคุมสภาวะการเลี้ยง ได้แก่ น้ำทะเลฆ่าเชื้อความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ ที่ระดับความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ และให้อากาศต่อเนื่องตลอด 24 ชั่วโมง เติมอาหารทุก ๆ 12 ชั่วโมง (Pimolrat, 2009)

การเจริญเติบโตของ *C.gracilis*

ทำการเก็บตัวอย่าง *C.gracilis* เมื่อเลี้ยงครบ 24, 48 และ 60 ชั่วโมง และนับจำนวนเซลล์ *C.gracilis* โดยใช้ hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ที่มีกำลังขยาย 40x (Wongrat and Wongrat, 2003) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate: μ) ตามวิธีการของ Guillard and Ryther (1962) อ้างโดย Wongrat and Wongrat (2003)

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 = เวลาที่เริ่มเพาะเลี้ยงสาหร่าย (ชั่วโมง)

t_2 = ระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย(ชั่วโมง)

การเตรียมตัวอย่าง *C.gracilis* สำหรับการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร

นำ *C.gracilis* ที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารในแต่ละสูตร มาใส่ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เพื่อทำการตกตะกอนเซลล์ โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (Thermo Scientific รุ่น Sorvall Legend XTR Centrifuge) ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ของสาหร่ายมาใส่ในขวดก้นกลม เพื่อให้เซลล์เคลือบอยู่ที่ผิวด้านในของขวดก้นกลมแล้วนำไปกลิ้งในอ่างเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส (EYELA รุ่น FDU-1100) และนำไปแช่ที่ตู้แช่ –80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) (EYELA รุ่น PFR-1000)ได้เซลล์แห้งของไดอะตอมเพื่อการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของ *C.gracilis*

เซลล์แห้งของ *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารแต่ละสูตร นำมาวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ เถ้า ตามวิธี AOAC (1990) โปรตีน โดยเครื่อง C/N combustion รุ่น TRU SPAC®Combusion ไขมัน ดัดแปลงจากวิธีการของ Bligh and Dyer (1959) และวิเคราะห์แร่ธาตุสังกะสี (ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยแบบทางเดียว (One way analysis of variance : ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan' s New Multiple Rang Test : DMRT)

ผลการวิจัย

1. จำนวนเซลล์ของ *C.gracilis*

ผลการเลี้ยง *C.gracilis* โดยใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 2 อาหารสูตรปรับปรุง F/2 ของ Guillard and Ryther (1962) และสูตรอาหารที่ 3 มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) แต่มีความหนาแน่นของเซลล์ *C.gracilis* เมื่อเลี้ยงไป 48 และ 60 ชั่วโมง สูงกว่าการเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Table 2)

Table 2 Density of *C.gracilis*

Treatment	Density of *C.gracilis* (10^6 cells/mL)			
	1st sampling (24 hour)	2nd sampling (48 hour)	3rd sampling (60 hour)	3 timer Arerage
T1	2.10 ± 0.12^a	4.36 ± 0.14^a	6.84 ± 0.32^a	4.43 ± 2.4^a
T2	3.02 ± 0.08^a	6.07 ± 0.13^b	9.14 ± 0.15^b	6.08 ± 2.5^a
T3	2.52 ± 0.08^a	5.44 ± 0.2^b	8.35 ± 0.3^b	5.44 ± 2.4^a

Values with different superscript (a-b) differ significantly ($p>0.05$)

[1] Values are means ± SD (n=3)

T 1 = media F/2 of Guillard and Ryther (1962)

T 2 = mediaF/2 of Guillard and Ryther (1962) modified

T 3 = media from the Center of Excellence in Shrimp Research Walailak University

2. อัตราการเจริญเติบโตของ *C.gracilis*

ผลการเลี้ยง *C.gracilis* โดยใช้สูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 3 ชุดการทดลอง พบว่า *C. gracilis* ที่ได้รับสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) (Table 3)

Table 3 Specific growth rate fo *C.gracilis*

Treatment	Specific growth rate of *C.gracilis* (10^{-2} /hour)			
	1st sampling (24 hour)	2nd sampling (48 hour)	3rd sampling (60 hour)	3 timer Arerage
T1	0.59 ± 0.02^a	0.46 ± 0.01^a	0.44 ± 0.01^a	0.49 ± 0.01^a
T2	0.78 ± 0.01^a	0.51 ± 0.01^a	0.49 ± 0.01^a	0.59 ± 0.01^a
T3	0.68 ± 0.02^a	0.50 ± 0.01^a	0.47 ± 0.01^a	0.55 ± 0.01^a

Values with different superscript (a-b) differ significantly ($p>0.05$)

1 Values are means ± SD (n=3)

T 1 = media F/2 of Guillard and Ryther (1962)

T 2 = mediaF/2 of Guillard and Ryther (1962) modified

T 3 = media from the Center of Excellence in Shrimp Research Walailak University

3. คุณค่าทางโภชนาการของ *C. gracilis*

สูตรอาหารที่แตกต่างกันส่งผลต่อคุณค่าทางอาหาร โดยพบว่า *C.gracilis* ที่ได้รับสูตรอาหารที่ 2 มีปริมาณไขมัน (8.82 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 1 และ 3 ในขณะที่ปริมาณโปรตีนของ *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 2 และ 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีค่าสูงกว่า *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ส่วนปริมาณเถ้าและสังกะสีของ *C.gracilis* ในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ($p<0.05$) (Table 4)

Table 4 Nutritional composition of *C.gracilis*

Treatment	Protein[1] (%)	Lipid[1] (%)	Ash[1] (%)	Zinc[1] (mg/kg)
T1	14.53 ± 0.15^{a}	5.04 ± 0.51^{a}	57.86 ± 0.29^{a}	1074 ± 18.12^{a}
T2	17.23 ± 0.05^{b}	8.82 ± 0.41^{b}	58.61 ± 0.17^{a}	1053.8 ± 18.64^{a}
T3	16.01 ± 0.22^{b}	5.65 ± 0.24^{a}	57.74 ± 0.18^{a}	995.84 ± 16.27^{a}

Values with different superscript (a-b) differ significantly ($p>0.05$)

[1] Values are means ± SD (n=3)

T 1 = media F/2 of Guillard and Ryther (1962)

T 2 = mediaF/2 of Guillard and Ryther (1962) modified

T 3 = media from the Center of Excellence in Shrimp Research Walailak University

สรุปและวิจารณ์ผล

แหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *C.gracilis* โดยสูตรอาหารที่ 1 มีแหล่งของไนโตรเจนแตกต่างกับสูตรอาหาร 2 และ 3 (Table 1) โดยสูตรอาหารที่ 1 ใช้ โซเดียมไนไตรท ($NaNO_3$) เป็นแหล่งไนโตรเจน (N=14) ในขณะที่สูตรอาหารที่ 2 และ 3 ใช้ ยูเรีย (NH_2CONH_2) เป็นแหล่งไนโตรเจน (N=28) ส่งผลให้ *C.gracilis* ที่ได้รับสูตรอาหารที่ 2 และ 3 มีปริมาณเซลล์สูงสุด สอดคล้องกับรายงานของ Pimolrat (2009) ที่ได้ทำการทดลองเลี้ยง *C.gracilis* โดยเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจน พบว่า *C. gracilis* ที่ใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน มีจำนวนเซลล์สูงสุด เมื่อเทียบกับ *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วย โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ เช่นเดียวกับรายงานของ Tokushima *et al*. (2016) ที่สรุปผลการศึกษาว่าการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนจะส่งผลให้จำนวนเซลล์ของ *C.gracilis* เพิ่มจำนวนมากกว่า การเลี้ยงโดยใช้โซเดียมไนไตรท ($NaNO_3$) เป็นแหล่งไนโตรเจน ทั้งนี้เนื่องจาก *C.gracilis* สามารถนำยูเรียไปใช้ได้เลยทันทีเมื่อเทียบกับไนเตรทที่ต้องอาศัยกระบวนการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ใช้งานได้ ทั้งนี้ Wongrat and Wongrat (2003) ได้อธิบายกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนในเซลล์แพลงก์ตอนไว้ว่า การใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน แพลงก์ตอนไม่สามารถนำไปใช้ได้ทันที จำเป็นต้องนำไปผ่านกระบวนการรีดักชั่นให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียก่อนจึงจะสามารถนำไปใช้ได้ แต่ไนโตรเจนเป็นแร่ธาตุที่มี

ความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ นอกจากนี้ในสูตรอาหารที่ 2 และ 3 มีปริมาณของซิลิเกตสูงกว่าสูตรอาหารที่ 1 ถึง 2 เท่า ด้วยเหตุที่ซิลิกาเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเปลือกหรือ ฟรัสทูล ของไดอะตอม (Taguchi *et al.,*1987) จึงส่งผลให้ *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 2 และ 3 มีความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่า *C. gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามปัจจัยข้างต้นไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *C.gracilis* เมื่อพิจารณาจากค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณของซิลิกาซิลิเกตที่มีในสูตรอาหารที่ 2 ไม่ส่งผลต่อเปลี่ยนแปลงขนาดและรูปร่างของเซลล์ *C.gracilis*

นอกจากนี้ อัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (N:P ratio) ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแพลงก์ตอน ซึ่งอัตราส่วนของ N:P ที่เหมาะสมสำหรับแพลงก์ตอนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน (Qingtian and Guikun, 2011) มีรายงานว่าอัตราส่วน N:P ที่เหมาะสมควรอยู่ที่16:1 (Downing and Mccauley, 1992) อย่างไรก็ตาม Qingtian and Guikun (2011) สรุปผลจากการทดลองเลี้ยง *C. gracilis* ในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารสูตร F/2 พบว่าอัตราส่วนของ N:P ขึ้นอยู่กับแหล่งของไนโตรเจน โดยเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ยูเรีย ($CO(NH_2)_2$) และแหล่งของฟอสฟอรัสจาก NaH_2PO_4 ควรมีอัตราส่วนของของ N:P เป็น 40:1 และ 60:1 ตามลำดับ ซึ่งในการทดลองนี้อาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรมีอัตราส่วนของ N:P แตกต่างกัน โดยสูตรอาหารที่ 2 มีอัตราส่วนของ N:P สูงสุด (17:1) ในขณะที่สูตรที่ 1 และ 3 มีค่า 12:1 และ 15:1 ตามลำดับ ทั้งนี้ในการศึกษาครั้งนี้สัดส่วนของ N:P ของสูตรอาหารที่ 2 แม้จะมีค่าสูงใกล้เคียงกับค่าที่แนะนำ แต่ยังไม่ถึงระดับที่เหมาะสม จึงส่งผลที่ไม่ชัดเจนต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของไดอะตอม

สภาวะการเลี้ยงและสูตรอาหารมีผลต่อคุณค่าทางอาหารของเซลล์ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาคุณค่าทางโภชนาการพบว่า *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 2 มีค่าไขมันที่สูงกว่าไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารอื่น เพราะอัตราส่วนของ N:P ในอาหารสูตร 2 ที่สูงกว่าสูตรอื่นส่งผลต่อการสะสมไขมันภายในเซลล์ของ *C. gracilis* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rasdi and Qin (2002) ที่ทำการศึกษาในแพลงก์ตอนชนิด *Nannochloropsis oculata* และ *Isochrysis lutea* พบว่า อัตราส่วน N:P ในอาหารมีผลต่อปริมาณสารอาหารภายในเซลล์ โดยปริมาณของไขมันในเซลล์เพิ่มสูงสุดเมื่อระดับของ N:P อยู่ที่ 120:1 ทั้งนี้เนื่องจากฟอสฟอรัสที่มีน้อยเป็นปัจจัยจำกัดต่อการเจริญเติบโตทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ไขมันมากขึ้น (Rasdi and Qin, 2002) ซึ่งปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์แพลงก์ตอนพืช มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของกุ้ง เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นในการสร้างฮอร์โมนโพรสตาแกลนดิน (Niu *et al.,* 2012)

สังกะสีเป็นแร่ธาตุที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของแพลงค์ตอน สังกะสีจะถูกใช้ในกระบวนการตรึงและส่งผ่านคาร์บอนไดออกไซด์โดยเอมไซม์คาร์บอนิค นอกจากนี้สังกะสียังมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการทำงานของระบบเอมไซม์ต่างๆ อีกทั้งเป็นองค์ประกอบของเปลือกหรือโครงสร้างภายนอกของ *C. gracilis* (Morel *et al.,* 1994) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าปริมาณ *C.gracilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร 2 มีจำนวนเซลล์สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เพราะสูตรอาหาร 2 มีปริมาณสังกะสีมากกว่าสูตรอาหาร 1 ถึง 200 เท่า (Table 1) อย่างไรก็ตามปริมาณสังกะสีของ *C.gracilis* ในทุก

ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ($p<0.05$) (Table 4) จากผลการทดลองนี้แสดงว่าการเพิ่มสังกะสีในสูตรอาหารจะช่วยให้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการสะสมของสังกะสีภายในเซลล์ ทั้งนี้เพราะปริมาณสังกะสีที่สะสมในเซลล์มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Shimei *et al.,* 2013) อีกทั้งสังกะสียังส่งผลในกระบวนการย่อยของเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการใช้ประโยชน์จากสารอาหาร และเป็นองค์ประกอบของฮอร์โมนอินซูลินและเอนไซม์หลายชนิด เป็นโคเฟคเตอร์ในการสร้างกรดนิวคลีอิกและการสร้างโปรตีนกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนเพศผู้ และดึงวิตามินเอ ออกจากแหล่งเก็บคืนสู่กระแสเลือด (Jean *et al.,* 2002)

เมื่อพิจารณาถึงราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรอาหาร โดยคำนวณจากปริมาณของอาหารที่ใช้ต่อปริมาตรน้ำสำหรับเพาะเลี้ยงไดอะตอม พบว่า สูตรอาหารที่ 3 มีราคาสูงสุด (0.35 บาท/ลิตร) ตามด้วย อาหารสูตร 2 (0.25 บาท/ลิตร) และอาหารสูตร 1 มีราคาถูกสุด (0.2 บาท/ลิตร)

สรุปผลการทดลอง

การเลี้ยงไดอะตอม *C. gracilis* ด้วยสูตรอาหารที่ 2 (สูตรอาหารอาหารปรับปรุง F/2 ของ Guillard and Ryther, 1962) ซึ่งใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เพิ่มอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสและเพิ่มซิลิเกต ส่งผลให้เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นและมีปริมาณโปรตีนและไขมันภายในเซลล์มากขึ้นด้วย เหมาะสมในการนำไปใช้อนุบาลลูกกุ้ง

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ และทุนอุดหนุนจากศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

อ้างอิง

Adams, C. and Bugbee, B. 2013. Enhancing lipid production of the marine diatom *Chaetoceros gracilis*: synergistic interactions of sodium chloride and silicon. Journal of Applied Phycology. 26(3): 1351-1357.

AOAC (Association of official Analytical I Chemists). 1990. Official Methods of Analysis the Association of official Analytical Chemists (15th ed.). VA: Chemists.

Ahmadi, A., Mozanzadeh, M.T., Agh, N. and Bahabadi, M.B. 2017. Effects of enriched Artemia with *Saccharomyces cerevisiae* and *Chaetoceros gracilis* on growth performance International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 5(2): 669-673.

Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canada Journal of Biochemistry and Physiology. 37: 911-917.

Brown, M.R., Jeffrew, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A., Wilson, R.P. and Wee, K.L. 1997. Nutritional properties of microalgae for urine culture. Aquaculture .151: 315-331.

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. 29-44.

Downing, J.A. and Mccauley, E. 1992. The nitrogen: phosphorus relationship in lakes. Limnol. Oceanography. 37: 936–945.

Ekawati, A.W., Nursyam, P., Widjayanto, E. and Marsoedi. 2013. *Chaetoceros ceratosporum* Diatomae in feed formula to Increase growth and Postlarvae Immunity of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fed) to *Vibrio harveyi* Infection. Indonesia: Brawijaya University. 3: 33-36.

Foo, S.C., Yusoff, F.M., Ismail, M., Basri, M., Chan, K.W., Khons, N.M.H. and Yau, S.K. 2015. Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968. Algal Research. 12: 26-30.

Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic Diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Canadian Journal of Microbiology. 8: 229-239.

Jean, J., Blais, B., Darveav, A. and Fliss, I. 2002. Rapid detection of human rotavirus Using colorimetric nucleis and sequence based amplification (NASBA)-enzyme-linked immunosorbent assay in sewage treatment effluent.FEMS Microbiology Letters. 210: 143-147.

Kutako, M., Khamtongdee, S., Setthamongkol, P., Jamkratoke M. and Yuvanatemiya, V. 2014. The effect of nutrients on growth of a marine diatom *Chaetocero*s sp. in Recycled diatom cultured water. Journal of Fisheries Technology Research. 74-83. [in Thai]

Khojasteh, Z., Davoodi, R., Vaghei, R.G. and Nooryazdan, H. 2013. Department survival Development and Growth of Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Zoea Fed with Monoalgae (*Chaetoceros* and *Tetraselmis*) Diets. World Journal of Fish and Marine Sciences. 5(5): 553-55.

Morel, F.M.M., Reinfelder, J.R., Roberts, S.B., Chamberlain, C.P., Lee, J.G. and Yee, D. 1994. Zinc and carbon co-limitation of marine phytoplankton. Nature. 369: 740-42.

Niu, J. P. F., Chen, L. X., Tian, Y. J., Liu, H. Z., Lin, H. J., Yang and G. Y., Liang. 2012. Excess dietary cholesterol may have an adverse effect on growth performance of early postlarval *Litopenaeus vannamei*. Journal of Animal Science and Biotechnology 3:19.

Ortega-Salas, A.A. and Reyes-Bustamante, H. 2013. Cultivation of the microalgae *Chaetoceros gracilis* to feed the rotifer *Brachionus plicatilis*. Journal of the Costa Rican Distance Education University. 5(2): 553-555.

Pimolrat, P. 2009. Production of high cell density *Chaetoceros gracilis* in laboratory for nursing marine shrimp larvae. Master degree. Agricultural Science. Walailak University, Nakhon Si Thammarat. 40-47. [in Thai].

Qingtian, Z. and Guikun, H.U. 2011. Effect of nitrogen to phosphorus ratios on cell proliferation in marine micro algae. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 29(4): 739-745.

Rasdi, N.W. and Qin, J.G. 2002. Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis lutea*. Journal of Applied Phycology. 27: 2221–2230.

Shimei, L., Xin, L., Yang, Y., Fajian, L. and Li, L. 2013. Comparison of chelated zinc and zinc sulfate as zinc sources for growth and immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture. 406–407: 79–84

Taguchi, S., Hirata, J.A. and Laws, E.A., 1987. Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms. Journal of Phycology. 23: 260–267.

Tokushima, H., Inoue-Kashino, N., Nakazato, Y., Masuda, A.,Ifuku, K. and Kashino, Y. 2016. Advantageous characteristics of the diatom *Chaetoceros gracilis* as a sustainable biofuel producer. Biotechnology for Biofuels. 9: 235.

Wongrat, L., and Wongrat, P. 2003. Phytoplankton. Kasetsart University: Bangkok. 35:11-21[in Thai].