

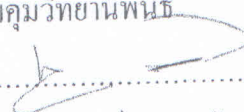
การตกตะกอนและการเก็บรักษาดีโตะเซอร์อส (*Chaetoceros gracilis*)  
แบบเข้มข้นสำหรับอนุบาลลูกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

กุลวดี ว่องวิไลรัตน์

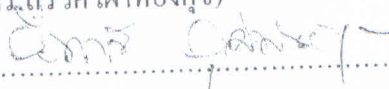
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวาริชศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
ธันวาคม 2558  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา  
วิทยานิพนธ์ของ กุลวดี ว่องวิไลรัตน์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์


  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญรัตน์ ประทุมชาติ)


  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ดร.สุรวิต เผ่าทองสุข)

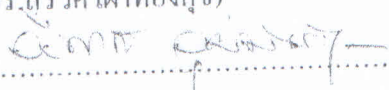
  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธาน  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรียัน รัชฎกิจจานุกิจ)

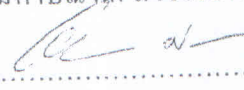
  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญรัตน์ ประทุมชาติ)

  
..... กรรมการ  
(ดร.สุรวิต เผ่าทองสุข)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

  
..... กรรมการ  
(ดร.นิตยา ไชยเนตร)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

  
..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัตน์ ศรีสุข)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2558

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์  
จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
ประจำภาคปลาย ปีการศึกษา 2555

และ

ทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม - พวอ.  
ระดับปริญญาโท ประจำปี 2556

และ

บริษัท เมฆา คอร์ปอเรชั่น จำกัด

ความเห็นในรายงานผลการวิจัยเป็นของผู้รับทุน  
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และบริษัท เมฆา คอร์ปอเรชั่น จำกัด  
ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญรัตน์ ประทุมชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และดร.สรวิศ เผ่าทองสุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุริยัน รัชฎกิจจานุกิจ ประธานกรรมการ และดร.นิตยา ไชยเนตร กรรมการสอบควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะเพิ่มเติมต่าง ๆ เพื่อปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น รวมถึงทางสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้คำปรึกษา ศึกษาดูงาน และสาหร่ายคิโอเซอโรสเพื่อใช้ในการทดลอง ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบ ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ได้รับการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีภาคปลาย ปีการศึกษา 2555 และทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม-พวอ. ระดับปริญญาโท ประจำปี 2556 และบริษัท เมฆา คอร์ปอเรชั่น จำกัด ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณบิดามารดา และพี่ ๆ ทุกคนที่ทำให้กำลังใจ และสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา รวมถึงรองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเดิว และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมสมร แก้วบริสุทธิ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาในการทำวิจัยในครั้งนี้

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบนานเท่านานนี้

กุลวดี ว่องวิไลรัตน์

53910950: สาขาวิชา: วาริชศาสตร์; วท.ม. (วาริชศาสตร์)

คำสำคัญ: คีโตเซอโรส/ ลูกกุ้งขาว/ โคลโตซาน/ การตกตะกอน/ การเก็บรักษา

กุลาวิ ว่องวิไลรัตน์: การตกตะกอนและการเก็บรักษาคีโตเซอโรส (*Chaetoceros gracilis*)

แบบเข้มข้นสำหรับอนุบาลลูกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (PRECIPITATION AND

PRESERVATION OF CONCENTRATED CHAETOCEROS (*Chaetoceros gracilis*) FOR

LARVICULTURE OF PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)) คณะกรรมการควบคุม

วิทยานิพนธ์: บุญรัตน์ ประทุมชาติ, Ph.D., สรวิศ เผ่าทองสุข, Ph.D., วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, Ph.D. 144  
หน้า. ปี พ.ศ. 2558.

การวิจัยนี้เพื่อศึกษาถึงวิธีการที่เหมาะสมต่อการนำ *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอนและเก็บรักษามาอนุบาล ลูกกุ้งขาว โดยนำ *Chaetoceros* ตกตะกอนด้วยสาร โคลโตซานโพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง (CPS) โคลโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง (COS) และจากเปลือกปู (COC) พบว่า ประสิทธิภาพการรวมตะกอนของ CPS สูงที่สุด (>90%) และค่อนข้างคงที่ ที่ความเข้มข้น 40 - 60 มก./ล. รองลงมา คือ COS และ COC ที่ความเข้มข้น 60 มก./ล.ตามลำดับ *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วย CPS สามารถฟื้นตัวได้ดี โดยจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) กับชุดควบคุม ขณะที่ *Chaetoceros* ที่ใช้ COS ในการตกตะกอนฟื้นตัวได้ช้ากว่าอย่างไรก็ตาม การใช้ COS ตกตะกอน *Chaetoceros* ที่ได้ เซลล์มีลักษณะการจับกันเป็นกลุ่มขนาดเล็กและไม่หนาแน่น ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการอนุบาลลูกกุ้งขาว จึงนำ *Chaetoceros* มาตกตะกอนด้วย COS และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ร่วมกับกลีเซอรอล (Gly) เข้มข้น 10 % (v/v) เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง พบว่า *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย COS ทั้งที่ผสมและไม่ผสม Gly มีอัตราการรอดของเซลล์ไม่แตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) จากการทดลองอนุบาลลูกกุ้งระยะซุเอียด้วย *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย COS และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ร่วมกับ Gly เข้มข้น 10 % (v/v) แล้วนำมาผ่านขั้นตอนก่อนให้อาหาร 3 วิธี ได้แก่ (1) ผ่านการละลาย (2) ผ่านการละลายร่วมกับการเขย่า และ (3) ผ่านการละลายร่วมกับปรับ pH ที่ 5.0 พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดตายและอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาวระยะซุเอียที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาและปรับการให้ทั้ง 3 แบบข้างต้น มีการพัฒนาการ เปรอร์เซ็นต์รอดตาย และอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่า ( $p < 0.05$ ) ลูกกุ้งที่อนุบาลด้วยเซลล์ *Chaetoceros* สด (ชุดควบคุม)

53910950: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; M.Sc. (AQUATIC SCIENCE)

KEYWORDS: *Chaetoceros*/ Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)/ Chitosan/  
Precipitation/ Preservation

KULWADEE WONGWIRAT: PRECIPITATION AND PRESERVATION OF  
CONCENTRATED CHAETOCEROS (*Chaetoceros gracilis*) FOR LARVICULTURE OF  
PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*). ADVISORY COMMITTEE:  
BOONYARATH PRATOOMCHAT, Ph.D., SORAWIT POWTONGSOOK, Ph.D. ,  
VERAPONG VUTHIPHANDCHAI, Ph.D. 144 P. 2015.

This research was to investigate the appropriated method for precipitation and preservation of concentrated *Chaetoceros* for larviculture of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chaetoceros* was precipitated by extracted chitosan from shrimp shell in polymer type (CPS), extracted chitosan in oligomer type of shrimp shell (COS) and crab shell (COC), respectively. The results found that the highest efficient of flocculation (> 90%) was using CPS and rather constant at 40-60 mg/l and followed by using COS and COC at 60 mg/l, respectively. *Chaetoceros* were precipitated with CPS can recovery well and not different in cell count ( $p > 0.05$ ) with control while it was slower recovery when using COS. However the characteristic of precipitated *Chaetoceros* using COS was loose and small form which was suitable for larviculture of *L. vannamei*. Thus *Chaetoceros* that precipitating with COS and preserved at -20 °C combinations with and without 10 % (v/v) glycerol (Gly) as cryoprotectant were further conducted. It found that survival rate of precipitated *Chaetoceros* using COS and preserved with or without Gly were not different ( $p > 0.05$ ). From the larviculture testing of *L. vannamei* at zoea stage using *Chaetoceros* that precipitating with COS and preserved at -20 °C combinations with 10 % (v/v) Gly including three processes prior to feeding as (1) thawing (2) thawing and shaking and (3) thawing and adjust pH at 5.0 found that metamorphosis, % survival and growth rate of zoea (*L. vannamei*) fed on preserved *Chaetoceros* with three processes prior to feeding above were lower than ( $p < 0.05$ ) that of zoea fed on fresh *Chaetoceros* (Control).

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
สมมุติฐานของการวิจัย.....	4
กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
ขอบเขตของการวิจัย.....	7
2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
บทบาทและความสำคัญของกุ้งขาว.....	10
ความหมายและความสำคัญของ <i>Chaetoceros</i> .....	13
วิธีการเก็บเกี่ยว.....	18
การเก็บรักษาเซลล์ <i>Chaetoceros</i> .....	31
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	49
วัสดุและอุปกรณ์.....	49
แผนการดำเนินการวิจัย.....	51
ขั้นตอนดำเนินการวิจัย.....	53
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	63

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	64
การทดลองที่ 1 ผลการตกตะกอน <i>Chaetoceros</i> ด้วยไลโคโตซานร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH.....	64
การทดลองที่ 2 ผลของการเก็บรักษาเซลล์ <i>Chaetoceros</i> แบบเข้มข้นด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส.....	77
การทดลองที่ 3 ผลการทดลองการใช้ <i>Chaetoceros</i> สดและ <i>Chaetoceros</i> เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาในการอนุบาลลูกกุ้งขาว ( <i>L. vannamei</i> ).....	86
5 อภิปรายและสรุปผล.....	94
ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ด้วยไลโคโตซาน.....	94
การฟื้นตัวของเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ภายหลังจากตกตะกอนด้วยไลโคโตซาน.....	95
การเก็บรักษาเซลล์ <i>Chaetoceros</i> แบบเข้มข้นด้วยวิธีการแช่แข็ง.....	96
การอนุบาลลูกกุ้งขาว ( <i>L. vannamei</i> ) ด้วย <i>Chaetoceros</i> เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษา.....	100
สรุปผลการทดลอง.....	103
ข้อเสนอแนะ.....	103
บรรณานุกรม.....	105
ภาคผนวก.....	114
ภาคผนวก ก.....	115
ภาคผนวก ข.....	141
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	144



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 การศึกษาที่เกี่ยวข้องต่อการใช้สารป้องกันความเย็นชนิดต่าง ๆ ในการเก็บรักษาเซลล์ สำหรับ.....	39
3-1 ลักษณะเฉพาะของไคโตซาน.....	54
4-1 ระยะการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเปอร์เซ็นต์การรอดตายของลูกกุ้งขาว ( <i>L. vannamei</i> ) ภายหลังการอนุบาลด้วย <i>Chaetoceros</i> สด และ <i>Chaetoceros</i> ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็น เวลา 5 วัน.....	87
4-2 คุณภาพน้ำระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งขาว ( <i>L. vannamei</i> ).....	93

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1-1 กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	6
2-1 กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโต.....	17
2-2 การจำแนกขนาดของสารต่าง ๆ ในน้ำ.....	20
2-3 กลไกการทำลายเสถียรภาพของคอลลอยด์ แบบต่อเชื่อมด้วย โพลีเมอร์.....	22
2-4 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน.....	25
3-1 แผนการทดลองในระยะที่ 1 ศึกษาผลการเก็บเกี่ยว <i>Chaetoceros</i> โดยใช้ไคโตซานเป็นสารตกตะกอน.....	57
3-2 แผนการทดลองในระยะที่ 2 ศึกษาผลของการเก็บรักษา <i>Chaetoceros</i> โดยใช้กลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร(v/v) เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง.....	60
4-1 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> เมื่อใช้สารไคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งเป็นสารตกตะกอนที่ 5 ระดับความเข้มข้น.....	64
4-2 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ในแต่ละช่วงระยะเวลาเมื่อใช้สารไคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งเป็นสารตกตะกอนที่ 5 ระดับความเข้มข้น.....	65
4-3 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> เมื่อใช้สารไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งเป็นสารตกตะกอนที่ 5 ระดับความเข้มข้น.....	66
4-4 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ในแต่ละช่วงระยะเวลาเมื่อใช้สารไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งเป็นสารตกตะกอนที่ 5 ระดับความเข้มข้น.....	67
4-5 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> เมื่อใช้สารไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปูเป็นสารตกตะกอนที่ 5 ระดับความเข้มข้น.....	68
4-6 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ในแต่ละช่วงระยะเวลาเมื่อใช้สารไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปูเป็นสารตกตะกอนที่ 5 ระดับความเข้มข้น.....	69
4-7 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> เมื่อใช้สารไคโตซาน 3 ชนิดเป็นสารตกตะกอนที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	70

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-8 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ในแต่ละช่วงระยะเวลาเมื่อใช้สารไคโตซาน 3 ชนิดเป็นสารตกตะกอนที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	71
4-9 ลักษณะตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่เกิดขึ้นหลังเติมสารไคโตซานโพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งแล้วปรับ pH เป็น 8.5 (ก) สภาพ <i>Chaetoceros</i> เมื่อตั้งทิ้งไว้ 0 นาที, (ข) สภาพ <i>Chaetoceros</i> เมื่อตั้งทิ้งไว้ 180 นาที, (ค) ลักษณะตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ .....	72
4-10 ลักษณะตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่เกิดขึ้นหลังเติมสารไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งแล้วปรับ pH เป็น 8.5 (ก) สภาพ <i>Chaetoceros</i> เมื่อตั้งทิ้งไว้ 180 นาที, (ข) ลักษณะตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ .....	73
4-11 ลักษณะตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่เกิดขึ้นหลังเติมสารไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปูแล้วปรับ pH เป็น 8.5 (ก) สภาพ <i>Chaetoceros</i> เมื่อตั้งทิ้งไว้ 180 นาที, (ข) ลักษณะตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ .....	74
4-12 สภาพ <i>Chaetoceros</i> เมื่อขยายด้วยหัวเชื้อ <i>Chaetoceros</i> แบบต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน (ก) <i>Chaetoceros</i> สด, (ข) <i>Chaetoceros</i> ที่ตะกอนด้วยสารไคโตซานโพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง, (ค) <i>Chaetoceros</i> ที่ตะกอนด้วยสารไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง.....	75
4-13 อัตราการฟื้นตัวของเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่ผ่านการตะกอนหลังขยายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	76
4-14 จำนวนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่ผ่านการตะกอนหลังขยายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8 วัน.....	76

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-15 เซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายหลังจากละลายที่อุณหภูมิห้อง (ก) สภาพ <i>Chaetoceros</i> ที่ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง, (ข) ลักษณะเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่ตกตะกอนด้วย ไคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์, (ค) สภาพ <i>Chaetoceros</i> ที่ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง, (ง) ลักษณะเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ .....	78
4-16 ลักษณะตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายหลังจากละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาแช่เป็นเวลา 60 วินาที ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์ (ก) ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง, (ข) ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง.....	79
4-17 ลักษณะตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายหลังจากละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาปรับ pH เป็น 7.0 ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์ (ก) ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง, (ข) ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง.....	81
4-18 ลักษณะตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายหลังจากละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาปรับ pH เป็น 6.0 ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์ (ก) ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง, (ข) ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง.....	82

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-19 ลักษณะตะกอนเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาปรับ pH เป็น 5.0 ภายใต้อากาศจุลทรรศน์ (ก) ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง, (ข) ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง.....	83
4-20 เปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อมีการผสมและไม่ผสมกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร(v/v) ในการเก็บรักษา (ก) เก็บรักษาเป็นเวลา 0 ชั่วโมง, (ข) เก็บรักษาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	84
4-21 เปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ <i>Chaetoceros</i> ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อมีการผสมและไม่ผสมกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร(v/v) เก็บรักษาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	85
4-22 ความยาวที่เพิ่มขึ้นของลูกกุ้งขาว ( <i>L. vannamei</i> ) ภายหลังจากอนุบาลด้วย <i>Chaetoceros</i> สด และ <i>Chaetoceros</i> ที่ผ่านการเก็บรักษา.....	89
4-23 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของลูกกุ้งขาว( <i>L. vannamei</i> ) ภายหลังจากอนุบาลด้วย <i>Chaetoceros</i> สด และ <i>Chaetoceros</i> ที่ผ่านการเก็บรักษา.....	91

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบัน ความต้องการของผู้บริโภคเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากกุ้งในตลาดโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ซึ่งความต้องการที่เพิ่มขึ้นนี้มีมากกว่าผลผลิตกุ้งจากทั่วโลกที่สามารถผลิตได้ แม้ว่าแต่ละประเทศจะมีการเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อส่งออกเพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกันกับประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศหนึ่งที่มีการส่งออกกุ้งและผลิตภัณฑ์จากกุ้งได้มากเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก โดยในปี พ.ศ. 2550 – 2554 มูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้งของประเทศไทยในตลาดโลก คือ 2,383.01, 2,546.59, 2,745.34, 3,209.89 และ 3,641.40 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ ตามลำดับ ทั้งนี้มูลค่าส่วนใหญ่นั้นมาจากผลผลิตกุ้งทะเลที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ถึง 85 – 90 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์กุ้งเพื่อการส่งออก ส่วนที่เหลือจะใช้บริโภคภายในประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555) ดังนั้น การเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อให้ได้กุ้งที่แข็งแรง ปลอดภัยจากสารพิษ และมีคุณภาพดี ตรงตามความต้องการของตลาดทั้งภายในและภายนอกประเทศ จึงมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจในประเทศเป็นอย่างมาก นอกจากนี้งานด้านการเพาะฟักและการอนุบาลลูกกุ้งก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน เพื่อให้ได้ลูกกุ้งที่แข็งแรง โตเร็ว และมีอัตราการรอดสูง ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นกุ้ง โตเต็มวัยสำหรับการจัดจำหน่ายหรือส่งเข้าโรงงานการแปรรูปต่อไป

เพื่อตอบสนองต่อการอนุบาลลูกกุ้งเชิงพาณิชย์ กลุ่มผู้ผลิตอาหารเลี้ยงลูกกุ้งจึงพยายามพัฒนาอาหารสำเร็จรูปในแบบต่าง ๆ ให้สะดวกและง่ายต่อการอนุบาลลูกกุ้งจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตาม ลูกกุ้งที่เพิ่งเกิดยังไม่มีความสามารถในการจับอาหารที่มีขนาดใหญ่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาหารสำเร็จรูปจึงเหลือทิ้งอยู่ที่ก้นบ่ออนุบาลส่งผลให้คุณภาพน้ำและสิ่งแวดล้อมในบ่อเน่าเสีย ลูกกุ้งจึงอ่อนแอ เติบโตช้า และมีอัตราการรอดต่ำ ด้วยสาเหตุนี้ หากในช่วงแรกหลังจากที่ลูกกุ้งใช้อาหารจากถุงไข่แดงหมดและเริ่มกินอาหาร ซึ่งระยะนี้เป็นระยะที่ลูกกุ้งมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม หากมีการอนุบาลที่ดีในระยะนี้จะส่งผลให้ลูกกุ้งมีอัตราการรอดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (ลีลา เรืองแป้น, 2542; บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2544) และเนื่องจากเซลล์แพลงก์ตอนพืชส่วนใหญ่จะมีการดำรงชีวิตแบบล่องลอยอยู่ในกระแสน้ำ เช่นเดียวกับลูกกุ้งทำให้ไม่ตกตะกอนได้ง่าย มีขนาดเหมาะสม สะดวกต่อการจับกินของลูกกุ้ง นอกจากนี้ยังมีคุณค่าทางอาหารครบถ้วน เมื่อยังไม่ถูกกินจะช่วยปรับคุณภาพน้ำให้ดีขึ้น ทำให้ระบบ

นิเวศน์สมดุลเหมาะสมแก่การเจริญเติบโต และช่วยให้ลูกกุ้งมีอัตราการรอดเพิ่มขึ้นได้ ดังนั้น แพลงก์ตอนพืชจึงมีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้เลี้ยงลูกกุ้งค่อนข้างมาก ทั้งนี้ สำหรับในประเทศไทยนั้น แพลงก์ตอนพืชที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้อุบลาลูกกุ้งมีอยู่หลายสกุล (Genus) อาทิเช่น *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. เป็นต้น แต่ที่นิยมใช้คือ สกุลของ *Chaetoceros* เพราะสามารถหาซื้อหัวเชื้อได้ทั่วไป เพราะเลี้ยงง่ายและใช้เวลาเพาะเลี้ยงน้อย สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส (ธิดา เพชรธณี, 2542) ซึ่งเหมาะสมกับสภาพอากาศของประเทศไทย

การให้ *Chaetoceros* เป็นอาหารลูกกุ้งในอดีต เกษตรกรจะให้โดยตรงด้วยการเติม *Chaetoceros* พร้อมกับน้ำเลี้ยงลงไปบ่ออนุบาล ทำให้เสี่ยงต่อการติดเชื้อจากน้ำเลี้ยงที่อาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ส่งผลให้คุณสมบัติของน้ำในบ่อเปลี่ยนแปลงไป เกิดเป็นน้ำเสียและอาจได้หัวเชื้อ *Chaetoceros* ใหม่ที่ไม่มีคุณภาพ นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายในการขนส่งสูง ปัจจุบันจึงนิยมใช้วิธีการตกตะกอนและรวมตะกอนเพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ *Chaetoceros* ก่อนนำไปใช้เป็นอาหารลูกกุ้ง เนื่องจากสะดวก ต้นทุนค่าใช้จ่ายน้อย วิธีการทำงานไม่ยุ่งยาก ใช้แรงงานน้อย (Golueke & Oswald, 1965) และช่วยให้เซลล์ *Chaetoceros* สามารถเก็บรักษาโดยใช้พื้นที่เก็บน้อยลงได้จึงสะดวกต่อการขนส่ง กล่าวคือวิธีการนี้จะเป็นการใส่สารเคมีลงไปในภาชนะที่ใช้เลี้ยง *Chaetoceros* เพื่อเร่งปฏิกิริยาการตกตะกอนของเซลล์ ได้แก่ อลูมิเนียมซัลเฟต ปูนขาว เฟอริกซัลเฟต เฟอริกคลอไรด์ สารส้ม และโคโคซาน เป็นต้น (มันสิน ต้นทูลเวศม์, 2537) แต่สารเคมีเหล่านี้ ส่วนใหญ่เมื่อใช้ในปริมาณมากจะทำให้ *Chaetoceros* เป็นพิษต่อลูกกุ้งที่กินเข้าไป ต่างจากสารโคโคซาน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของโคโคลินและเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติ สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ช่วยควบคุมปริมาณสาหร่ายในน้ำได้ดี ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และไม่ทำให้เซลล์ *Chaetoceros* มีความเป็นพิษ (Wang & Tang, 2001; Lertsutthiwong et al., 2009) อีกทั้งยังยังสามารถเปลี่ยนสภาพโคโคซานไปเป็นสารตั้งต้นในการสร้างเนื้อเยื่อและเปลือก กระตุ้นให้มีการลอกคราบที่ดี เพิ่มการไหลเวียนเลือดส่งผลให้การขับถ่ายของเสียดีขึ้น ทำให้โตเร็ว (สราวุธ เจริญพร, 2554 ก) อัตราการรอดเพิ่มขึ้น มีการเจริญเติบโตที่สม่ำเสมอ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกินอาหาร (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2546) แต่เนื่องจากสารโคโคซานที่ขายอยู่ทั่วไปนั้นมีราคาสูง การใช้สารในปริมาณที่มากเกินไป ย่อมสิ้นเปลืองทั้งปริมาณสารและงบประมาณในการซื้อสารมาใช้ ดังนั้น หากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งสามารถทราบถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารโคโคซานในการทำปฏิกิริยาการตกตะกอนเซลล์ของ *Chaetoceros* ย่อมสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการเก็บเกี่ยวได้

โดยทั่วไป หลังจากเก็บเกี่ยว *Chaetoceros* หากยังไม่นำไปใช้จะสามารถเก็บรักษาด้วยการแช่เย็น (Refrigerating) ในตู้เย็นทั่วไปที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จากการศึกษาของนิริวดี ทุมวัน (2543) พบว่า การเก็บรักษาเซลล์ *Chaetoceros* ด้วยการแช่เย็น จะพบปริมาณแบคทีเรียสูงสุด คือ  $9.58 \times 10^8$  โคโลนีต่อมิลลิเมตร ทำให้เกิดกลิ่นเน่าตามมาในสัปดาห์ที่ 10 ของการเก็บรักษา ในปัจจุบันจึงนิยมใช้การเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง (Freezing) ที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส ร่วมกับการป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง ในการเก็บรักษาเซลล์ เพื่อยืดอายุเซลล์ให้มีชีวิตรอดได้นานขึ้น อีกทั้งเป็นวิธีที่สะดวก ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน สามารถเก็บรักษาเซลล์ไว้ใช้เป็นหัวเชื้อเมื่อขาดแคลนในบางฤดูกาล และยังสามารถคงสายพันธุ์ที่มีคุณภาพดีเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงต่อไปได้ (สมบุญ ธนาสุวัฒน์, 2553) แต่จากการศึกษาสาขา 4 ชนิด ของ Tzovenis et al. (2004) พบว่า สาขาแต่ละชนิดมีความไวต่อชนิด และความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ในระดับที่ส่งผลเป็นพิษต่อเซลล์ได้แตกต่างกัน นอกจากนี้ ความไวต่อความเป็นพิษของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งของผู้บริโภ�ที่กินสาหร่ายเหล่านี้เป็นอาหารและผู้บริโภ�กระดับสูงขึ้นไปในห่วงโซ่อาหารนั้นก็มีความแตกต่างกัน จากการศึกษาของ Hubálek (2003) พบว่า ไคเมทิลซัลฟอกไซด์ เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง ที่ใช้กันมากและมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเก็บรักษาเซลล์ แต่ก็มีความเป็นพิษสูง แม้ว่าจะมีการใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ชนิดอื่นที่ให้ผลดีต่อการฟื้นตัวของเซลล์มากกว่า แต่ก็มีผลต่อชนิดของสิ่งมีชีวิต ชนิดของสารและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ พบว่า กลีเซอรอลค่อนข้างมีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง เนื่องจาก เป็นสารที่ไม่เป็นพิษต่อระบบย่อยอาหาร ผิวหนัง และเนื้อเยื่ออ่อน ๆ ของมนุษย์ มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และอุตสาหกรรมอื่น ๆ อย่างแพร่หลาย สามารถหาซื้อได้ง่ายปลอดภัยต่อผู้สูงวัยกว่าสารเคมีชนิดอื่น (วิภา สุโรจนะเมธากุล, 2546) ทั้งยังไม่เป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่าย เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำระดับต่ำ (ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตราย และเคมีภัณฑ์ กรมควบคุมมลพิษ, 2544) จากศึกษาของ Cordero and Voltolinah (1997) ถึงผลการเก็บรักษา *Chaetoceros* ด้วยการแช่แข็งอย่างช้าที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งในการเก็บรักษา พบว่า *Chaetoceros* มีการรอดชีวิตดีเป็นเวลา 7 วัน หากนานกว่านี้การเจริญเติบโตของเซลล์จะลดลงตามลำดับ และเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งเมื่อทำการเก็บรักษา จะช่วยให้การเก็บรักษาเกิดผลดีเพิ่มขึ้น เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในเกณฑ์ดีถึงปานกลาง สามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นานถึง 30 วัน ซึ่งให้ผลดีกว่าการใช้ไคเมทิลซัลฟอกไซด์เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ทั้งในด้านความเป็นพิษและระยะเวลาการ



เก็บรักษา จากสภาพปัญหาและความสำคัญดังกล่าว การเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษา *Chaetoceros* จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการนำไปใช้เป็นอาหารแก่ลูกกุ้ง หากกระบวนการเหล่านี้มีความเป็นพิษเกิดขึ้นย่อมส่งผลถึงความปลอดภัยของลูกกุ้งที่เลี้ยงไว้ แต่ทั้งนี้กลับพบว่ามีการศึกษาน้อยมากที่เกี่ยวข้องกับการใช้โคโคซานในการตกตะกอนเพื่อการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษา *Chaetoceros* ต่อแบบเข้มข้น เพื่อนำมาใช้อนุบาลลูกกุ้งด้วยเทคนิคหรือวิธีการที่เหมาะสม ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาถึงผลการเก็บเกี่ยว *Chaetoceros* ด้วยโคโคซานและผลการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งร่วมกับการใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษา *Chaetoceros* แบบเข้มข้น ซึ่งเป็นการช่วยให้การตกตะกอนเกิดผลสูงสุด ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้อสาร รวมถึงสามารถเก็บรักษา *Chaetoceros* ได้นานขึ้น มีคุณภาพดีเหมาะแก่การนำมาใช้เป็นอาหารอนุบาลลูกกุ้ง อันจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

### 2.1 วัตถุประสงค์ทั่วไป

เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการตกตะกอนและการเก็บรักษา *Chaetoceros* แบบเข้มข้นด้วยการแช่แข็งเพื่ออนุบาลลูกกุ้งขาว

### 2.2 วัตถุประสงค์เฉพาะ

2.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการตกตะกอนของ *Chaetoceros* ด้วยโคโคซานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH

2.2.2 เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษา *Chaetoceros* แบบเข้มข้น

2.2.3 เพื่อศึกษาเทคนิคหรือวิธีการที่เหมาะสมในการนำ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษามาใช้อนุบาลลูกกุ้งขาว

## 3. สมมุติฐานของการวิจัย

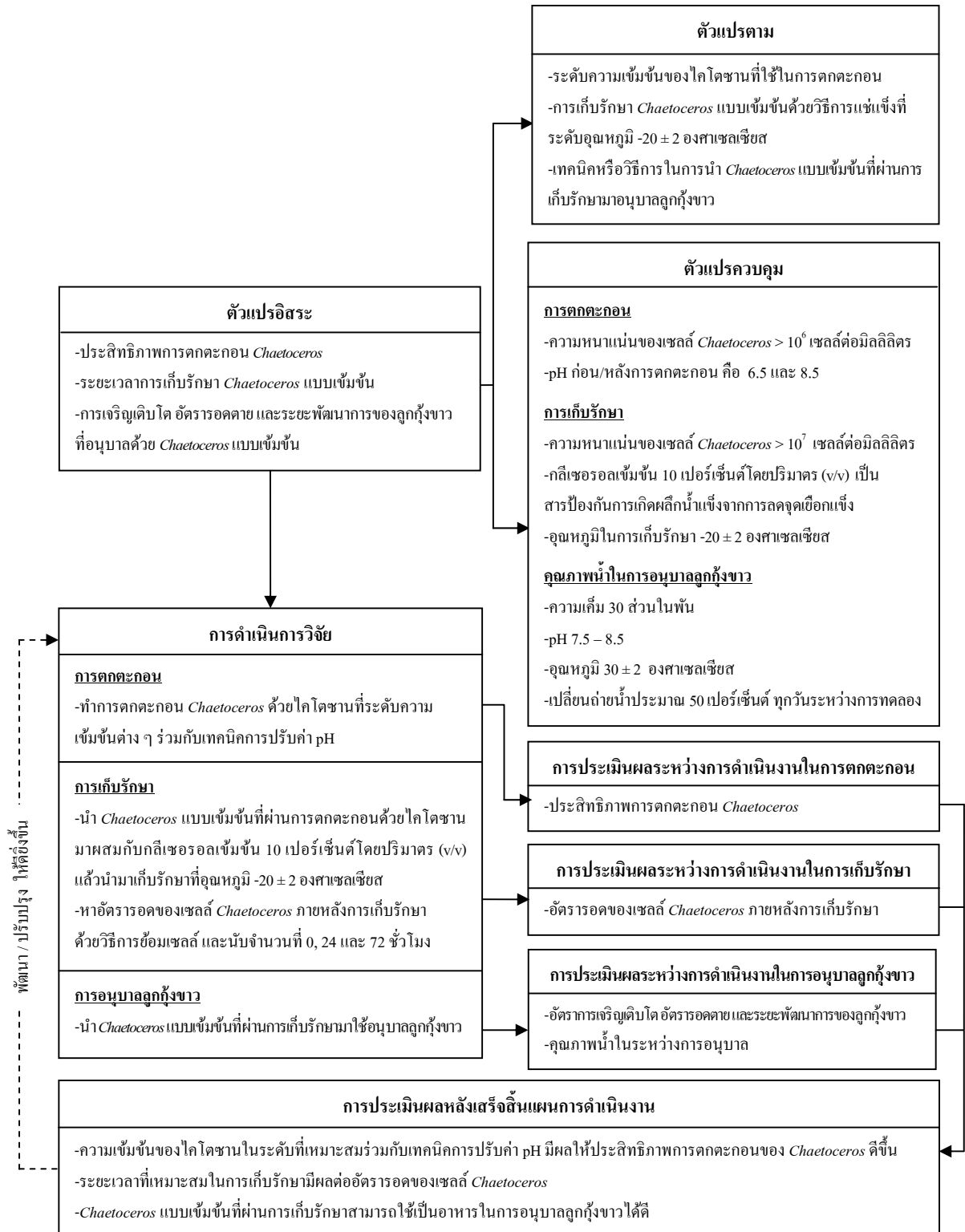
3.1 ความเข้มข้นของโคโคซานในระดับที่เหมาะสมร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH มีผลให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนของ *Chaetoceros* ดีขึ้น

3.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษามีผลต่ออัตราการรอดของเซลล์ *Chaetoceros*

3.3 *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาสามารถใช้เป็นอาหารในการอนุบาลลูกกุ้งขาว  
ได้ดี

#### 4. กรอบแนวคิดในการวิจัย

จากปัญหาและความสำคัญของปัญหาดังกล่าวนำไปสู่กรอบแนวคิดในการวิจัย ซึ่งประกอบด้วยกิจกรรมต่าง ๆ ที่มีแผนดำเนินการ ดังนี้



ภาพที่ 1-1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

## 5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

5.1 ทราบถึงความเข้มข้นของโคโคซานในระดับที่เหมาะสมในการใช้ *Chaetoceros* ทำให้ประหยัดปริมาณสาร และค่าใช้จ่ายในกระบวนการเก็บเกี่ยว

5.2 ทราบถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษา *Chaetoceros* แบบเข้มข้นด้วยวิธีการแช่แข็งภายใต้อุณหภูมิ  $-20 \pm 2$  องศาเซลเซียส ทำให้ประหยัดพื้นที่ในการจัดเก็บ และการขนส่ง ทั้งยังสะดวกต่อการวางแผนในการนำ *Chaetoceros* ที่เก็บรักษาไว้ออกมาใช้ เพื่อให้ได้คุณภาพ และปริมาณที่เพียงพอกับความต้องการในช่วงนั้น ๆ

5.3 ทราบถึงเทคนิคหรือวิธีการในการนำ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษามาใช้เป็นอาหารอนุบาลลูกกุ้งขาวได้อย่างเหมาะสม

5.4 เกษตรกรผู้ประกอบการ โรงเพาะฟักกุ้งขาว หน่วยงานภาครัฐ และเอกชนสามารถนำผลการวิจัยครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ได้จริงในการเก็บเกี่ยวหรือการเก็บรักษา *Chaetoceros* เพื่อใช้ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวภายในฟาร์ม ตลอดจนสามารถนำความรู้ที่ได้ไปขยายผลต่อเพื่อส่งเสริมและพัฒนาเกี่ยวกับกระบวนการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษา *Chaetoceros* ให้คงคุณภาพดีนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต อีกทั้งยังเป็นการรองรับการตลาดเชิงพาณิชย์ที่มีการขยายตัวเพิ่มขึ้นของกุ้งขาว และสัตว์น้ำอื่น ๆ

## 6. ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงการตกตะกอนและการเก็บรักษา *Chaetoceros* แบบเข้มข้นสำหรับอนุบาลลูกกุ้งขาว โดยนำหัวเชื้อ *Chaetoceros* มาเจือจางในน้ำทะเล ปรับระดับความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ให้ได้มากกว่า  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาตกตะกอน *Chaetoceros* ด้วยโคโคซานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH ในระหว่างการตกตะกอนดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lertsutthiwong et al. (2009) โดยเริ่มทำการตกตะกอนที่ pH 6.5 หลังจากผ่านไป 60 นาที ค่า pH จะถูกปรับให้เป็น 8.5 พิจารณาถึงประสิทธิภาพการตกตะกอนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในแต่ละช่วงเวลา จากนั้นเลือกความเข้มข้นที่ให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนดีที่สุดมาขยายลงอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบการฟื้นตัวของตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* และทำการเก็บรักษาต่อ โดยนำเซลล์ *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนได้มาเก็บรักษาต่อในระดับความหนาแน่นที่มากกว่า  $10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-20 \pm 2$  องศาเซลเซียส

ร่วมกับการใช้กลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งในการเก็บรักษา นำผลการเก็บรักษาที่ได้มาหาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ *Chaetoceros* ภายหลังจากการเก็บรักษาในช่วงเวลาต่าง ๆ จากการสุ่มเก็บตัวอย่างที่ 0, 24 และ 72 ชั่วโมง รวมทั้งหาความเหมาะสมของเทคนิคหรือวิธีการในการนำ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นมาใช้เป็นอาหารในการอนุบาลลูกกุ้งขาว พิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์รอดตาย และระยะเวลาพัฒนาการของลูกกุ้ง นำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

## บทที่ 2

### เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยครั้งนี้ เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึง การตกตะกอนและการเก็บรักษา *Chaetoceros* แบบเข้มข้นสำหรับอนุบาลลูกกุ้งขาว โดยศึกษาจากผล ของประสิทธิภาพการตกตะกอน *Chaetoceros* ด้วยโคโคซานร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH และผลการ เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่ระดับอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันการ เกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดยุติเยือกแข็งในการเก็บรักษา รวมถึงเทคนิคหรือวิธีการที่เหมาะสมในการนำ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษามาใช้ออนุบาลลูกกุ้งขาว ซึ่งผู้วิจัยได้ทบทวนวรรณกรรม จากเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องตามลำดับ ดังนี้

1. บทบาทและความสำคัญของกุ้งขาว
  - 1.1 บทบาทและความสำคัญของกุ้งขาวต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย
  - 1.2 ลักษณะทางชีววิทยาและการจำแนกทางอนุกรมวิธานของกุ้งขาว
  - 1.3 ระยะเวลาพัฒนาของลูกกุ้งขาววัยอ่อน
  - 1.4 การอนุบาลลูกกุ้งขาววัยอ่อน
2. ความหมายและความสำคัญของ *Chaetoceros*
  - 2.1 ลักษณะทางชีววิทยาและการจำแนกทางอนุกรมวิธานของ *Chaetoceros*
  - 2.2 ความสำคัญของ *Chaetoceros*
  - 2.3 ชนิดของ *Chaetoceros* ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย
  - 2.4 ระยะเวลาเจริญเติบโตของ *Chaetoceros* ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์
3. วิธีการเก็บเกี่ยว (Harvest)
  - 3.1 การสูบลไปใช้โดยตรง
  - 3.2 วิธีการกรองเพื่อคั่งน้ำเลี้ยงออก
  - 3.3 การปั่นแยก (Centrifugation)
  - 3.4 การตกตะกอน
  - 3.5 สารที่ใช้ในการตกตะกอน
4. การเก็บรักษาเซลล์ *Chaetoceros*

- 4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์
- 4.2 วิธีการเก็บรักษาเซลล์ (Preservation)
- 4.3 สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง (Cryoprotectant)
- 4.4 ผลของการเก็บรักษาเซลล์สำหรับในระยะเวลา

## 1. บทบาทและความสำคัญของกุ้งขาว

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลในกลุ่มกุ้งขาวแปซิฟิก (Pacific white shrimp) หรือที่นิยมเรียกสั้น ๆ ว่า “กุ้งขาว” เป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก ทางตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกจนถึงตอนเหนือของประเทศเปรู มีการเลี้ยงกันมากในประเทศเอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลัมเบีย และบราซิล กุ้งขาวเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่ายจึงมีการพัฒนาสายพันธุ์อย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลานาน ทำให้ปัจจุบันได้ลูกพันธุ์กุ้งขาวที่แข็งแรง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี และมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้เป็นที่สนใจและมีการนำเข้ามาเลี้ยงในหลายประเทศ (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2545 ก)

### 1.1 บทบาทและความสำคัญของกุ้งขาวต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย

(สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555)

กุ้งเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าและความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวมากขึ้น เนื่องจากมีความต้องการบริโภคที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในตลาดโลก ทำให้ราคากุ้งในตลาดโลกอยู่ในเกณฑ์ที่ดี ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศที่ทำการส่งออกกุ้งและผลิตภัณฑ์จากกุ้งได้มากเป็นอันดับหนึ่งของโลก คิดเป็น 24.05 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณการส่งออกโลกทั้งหมด รองลงมา ได้แก่ จีน เอกวาดอร์ และอินเดีย คิดเป็น 13.04, 7.85 และ 7.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยในประเทศไทยนั้นมีปริมาณผลผลิตกุ้งจากการเพาะเลี้ยงทั้งหมดในประเทศภายในปี 2550 - 2554 เพิ่มขึ้น 5.02 เปอร์เซ็นต์ต่อปี ซึ่งเป็นผลผลิตของกุ้งขาวจากการเพาะเลี้ยงมากถึง 99.00 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนผลิตภัณฑ์กุ้งทะเลจากการเพาะเลี้ยงทั้งหมด ที่เหลืออีก 1.00 เปอร์เซ็นต์เป็นผลผลิตของกุ้งกุลาดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยง อันเนื่องมาจากกุ้งขาวเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย มีโรคระบาดน้อย และให้ผลผลิตได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับกุ้งกุลาดำ ในปี 2555 คาดว่าผลผลิตกุ้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงของไทยนั้นจะมีปริมาณอยู่ที่ 55,000 ตัน เพิ่มขึ้น 7.84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปี 2554 ส่วนความต้องการในการบริโภคภายในประเทศนั้นคาดว่าจะ มีปริมาณความต้องการที่ใกล้เคียงกับปีที่ผ่านมา คือ ประมาณ 75,000 ตัน

## 1.2 ลักษณะทางชีววิทยาและการจำแนกทางอนุกรมวิธานของกุ้งขาว

กุ้งขาวมีลำตัวขาวใส ร่างกายมีทั้งหมด 8 ปล้อง โดยแบ่งออกเป็นส่วนหัว 1 ปล้อง มีกรียาวประมาณ 0.8 เท่า ของความยาวเปลือกหัว สันกรีสูง ปลายกรีแคบ มีลักษณะคล้ายสามเหลี่ยม มีสีแดงอมน้ำตาล โดยกรีด้านบนมีฟัน 8 ซี่ กรีด้านล่างมีฟัน 2 ซี่ ร่องบนกรีสามารถมองเห็นได้ชัดเจน หนวดสีแดง 1 คู่ เปลือกบริเวณหัวมีสีขาอมชมพูจนถึงแดง ส่วนลำตัว 6 ปล้อง มีขาสีขาวว่ายน้ำ 5 คู่ และส่วนหางอีก 1 ปล้อง มีแพนหาง 4 ใบ ปลายหางสีเข้ม และมี 1 กรีที่หาง (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2545 ก) เมื่อนำกุ้งขาว มาจำแนกตามอนุกรมวิธาน จะสามารถจัดจำแนกได้ ดังนี้ (Holthuis, 1980; Pérez Farfante & Kensley, 1997)

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Natantia

Family Penaeidae

*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931

## 1.3 ระยะการพัฒนากลูกกุ้งขาววัยอ่อน (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2545 ข)

การพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของตัวอ่อนจะเป็นไปตามช่วงของการลอกคราบ โดยเมื่อไข่ได้รับการปฏิสนธิ จะมีลักษณะกลม มีเมือกหุ้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.22 มิลลิเมตร ซึ่งไข่จะค่อย ๆ จมลงสู่พื้น ใช้เวลาประมาณ 12 - 14 ชั่วโมง ในการฟักเป็นตัวอ่อนในระยะนอเพเลียส (Nauplius) และจะมีการพัฒนาการเปลี่ยนแปลงไป โดยสามารถแบ่งออกเป็นระยะต่าง ๆ ได้ดังนี้

1.3.1 ตัวอ่อนระยะที่ 1 นอเพเลียส (Nauplius) เป็นลูกกุ้งที่ฟักออกจากไข่ มีขนาดเล็กมาก รูปร่างคล้ายแมงมุม ระยะนี้ลูกกุ้งยังไม่ต้องการอาหาร เนื่องจากจะใช้อาหารจากถุงไข่แดง (yolk sac) ที่ติดอยู่กับลำตัว ตัวอ่อนระยะนี้จะลอกคราบประมาณ 5 - 6 ครั้ง ภายในเวลา 36 - 48 ชั่วโมง ก่อนเข้าสู่ระยะที่ 2



1.3.2 ตัวอ่อนระยะที่ 2 ซูเอีย (Zoea) ตัวอ่อนระยะนี้จะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัว และลำตัว แยกออกจากกันอย่างชัดเจน ในระยะนี้ลูกกุ้งจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป 3 ขั้นตอน โดยจะใช้เวลา ประมาณ 4 - 7 วัน ก่อนเข้าสู่ระยะที่ 3

1.3.3 ตัวอ่อนระยะที่ 3 ไมซิส (Mysis) ลูกกุ้งในระยะนี้จะมีลักษณะคล้ายพ่อแม่มากขึ้น แต่การว่ายน้ำยังคงมีลักษณะเป็นแบบหัวที่มลง และติดตัวขึ้นลง ตัวอ่อนระยะนี้จะลอกคราบทั้งหมด 3 ครั้ง ใช้ระยะเวลา 5 - 7 วัน ก่อนเข้าสู่ระยะที่ 4

1.3.4 ตัวอ่อนระยะที่ 4 โปสลาวา (Post larva) ระยะนี้ลูกกุ้งจะมีลักษณะใกล้เคียงกับพ่อแม่มากขึ้น มีอวัยวะต่าง ๆ ครบทุกส่วน และพัฒนาไปเรื่อย ๆ จนเข้าสู่กุ้งวัยรุ่น ระยะนี้จะมีขาเดิน 3 คู่ โดยคู่แรกจะมองเห็นเป็นก้ามชัดเจน ขาวว่ายน้ำเจริญดี เป็นระยะที่มีรยางค์ครบ หางแคบเข้า มีขากรรไกร กริมมีลักษณะสั้นกว่าดวงตา และระยะห่างระหว่างตากางออกอย่างชัดเจน ลำตัวป้อม ใส มีเส้นสีน้ำตาล พาดยาวจากบริเวณหนวดถึงหาง โดยปล้องท้องปล้องที่ 6 จะยาวกว่าปล้องหัวเล็กน้อย

#### 1.4 การอนุบาลลูกกุ้งขาววัยอ่อน

หลังจากที่ไข่ได้รับการปฏิสนธิและฟักเป็นตัวแล้วจำเป็นต้องมีการย้ายตัวอ่อนลงบ่ออนุบาล เพื่อความสะดวกในการให้อาหาร และการจัดการต่อไป เนื่องจากลูกกุ้งจะมีความต้องการลักษณะอาหาร ที่แตกต่างกันตามช่วงอายุและการพัฒนาการ (ลิลา เรืองแป้น, 2542) ดังนี้

1.4.1 ลูกกุ้งระยะนอเพเลียส ระยะนี้รยางค์ต่าง ๆ ยังไม่มีการพัฒนา และยังไม่ได้รับอาหารจาก ถุงไข่แดงที่ติดอยู่ ลูกกุ้งจึงยังไม่กินอาหาร ควรทำการอนุบาลที่ความหนาแน่น 100 - 150 ตัวต่อลิตร น้ำ ทะเลที่ใช้ควรมีความเค็มระหว่าง 30 - 33 ส่วนในพัน (ppt) อุณหภูมิระหว่าง 28 - 30 องศาเซลเซียส ค่า pH อยู่ระหว่าง 7.7 - 8.5 และมีการให้อากาศตลอดเวลา

1.4.2 ลูกกุ้งระยะซูเอีย เป็นระยะที่ลูกกุ้งเริ่มกินอาหารแต่เนื่องจากขนาดปากยังมีขนาดเล็ก จึงต้องการอาหารที่มีความกว้างเหมาะกับขนาดปากของลูกกุ้ง ซึ่งได้แก่ แพลงก์ตอนพืช หรือโคอะดอม ขนาดเล็ก เช่น *Chaetoceros* sp. หรือ *Skeletonema* sp. และเริ่มมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันประมาณ 20 - 50 เปอร์เซ็นต์ (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2544) โดยลูกกุ้งจะต้องการโคอะดอมไม่น้อยกว่า 6,000 เซลล์ต่อมิลลิเมตร เพื่อนำสารอาหารที่ได้จากโคอะดอมไปสร้างเปลือก หากช่วงนี้มีการให้อาหาร ไม่เพียงพอจะมีผลต่อการสร้างอวัยวะส่วนต่าง ๆ เช่น กริมของกุ้งอาจมีลักษณะผิดปกติ หรือโค้งงอ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2541)

1.4.3 ลูกกุ้งระยะไมซิส ระยะนี้ช่องปากของลูกกุ้งจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและเริ่มมีรยางค์ เพิ่มขึ้นหลายคู่ ทำให้รับอาหารที่มีขนาดใหญ่ขึ้นได้ (ลิลา เรืองแป้น, 2542) เช่น โรติเฟอร์ หรือไรน้ำเค็ม

ที่เพิ่งฟักออกจากไข่ไม่เกิน 12 ชั่วโมง ควรมีการดูดตะกอนของเสียออกและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ประมาณ 20 - 50 เปอร์เซ็นต์ (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2544)

1.4.4 ลูกกุ้งระยะโพสลาวา ลักษณะจะเหมือนกุ้งโตเต็มวัย โดยในวัยช่วงแรกของระยะนี้ ยังคงให้ตัวอ่อนของไรน้ำเค็มที่เพิ่งฟักร่วมกับอาหารสำเร็จรูป เมื่อลูกกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาวาที่ 10 วัน ขึ้นไป อาจให้ไรน้ำเค็มร่วมกับตัวอ่อนไรน้ำเค็ม เพื่อฝึกให้ลูกกุ้งสามารถกินอาหารที่มีขนาดใหญ่ขึ้น การเริ่มหัดลูกกุ้งให้กินอาหารสำเร็จรูปนั้นในครั้งแรก ๆ ควรให้แต่น้อยแล้วจึงค่อย ๆ เพิ่มปริมาณในครั้งต่อไป ไม่ควรให้อาหารมากเกินไป เพราะจะเหลือเป็นเศษอาหารตกค้างภายในบ่อ (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2544)

จะเห็นได้ว่า จากปริมาณความต้องการบริโภคของตลาดโลกและมูลค่าการส่งออกที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นแรงจูงใจทำให้เกษตรกรพัฒนาการเพาะเลี้ยงให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพและปริมาณมากขึ้นเพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดที่มีการแข่งขันสูงในเรื่องราคา และคุณภาพของสินค้า โดยเฉพาะปริมาณสารตกค้างต่าง ๆ ในผลิตภัณฑ์ประเภทอาหาร ควรมีการตรวจสอบย้อนกลับได้ตลอดกระบวนการผลิต เพื่อเป็นการยืนยันความปลอดภัยของผู้บริโภค และหนึ่งในกระบวนการผลิตกุ้งขาวที่สำคัญ ได้แก่ การอนุบาลลูกกุ้งรวมถึงการจัดการดูแลให้อาหารลูกกุ้งในช่วงแรก คือ ระยะซูเอีย จึงนิยมให้โคอะตอม แพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนสัตว์ขนาดเล็กเป็นอาหารเนื่องจากมี คุณค่าทางอาหารสูง มีขนาดเหมาะสมกับขนาดปาก และการจับกินอาหารของลูกกุ้ง หากมีการจัดการดูแลในช่วงอนุบาลดีจะมีผลอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงระยะพัฒนาการของลูกกุ้ง และทำให้ลูกกุ้งมีอัตราการรอดสูง ได้ลูกกุ้งที่มีคุณภาพดี สมบูรณ์ แข็งแรง และโตเร็ว ก่อนนำไปปล่อยลงในบ่อเพาะเลี้ยงต่อไป

ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ลูกกุ้งขาวระยะซูเอียสำหรับการทดสอบความเป็นพิษของ *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอนเซลล์ด้วยสาร โคโคซานร่วมกับการใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งในการเก็บรักษา *Chaetoceros* เพื่อให้ทราบถึงความเป็นไปได้ และความปลอดภัยในการนำ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษามาปรับใช้ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวระยะซูเอีย ซึ่งมีความคาดหวังว่า *Chaetoceros* ที่ใช้เป็นอาหารอนุบาลนี้จะช่วยเพิ่มอัตราการรอดของลูกกุ้งได้

## 2. ความหมายและความสำคัญของ *Chaetoceros*

*Chaetoceros* เป็นสาหร่ายขนาดเล็กเซลล์เดียวในกลุ่มไดอะตอมชนิดหนึ่ง ซึ่งจัดเป็นแพลงก์ตอนถาวร กล่าวคือ มีการดำรงชีวิตแบบล่องลอยไปตามกระแสน้ำตลอดช่วงชีวิต ไม่สามารถว่ายน้ำได้

(วันเพ็ญ ภูติจันทร์, 2549) ซึ่งสามารถพบได้ในทะเลทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตชายฝั่งทะเลจะพบได้มากกว่าในทะเลลึก และในพื้นที่เขตอบอุ่นมากกว่าเขตหนาว (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

## 2.1 ลักษณะทางชีววิทยาและการจำแนกทางอนุกรมวิธานของ *Chaetoceros*

*Chaetoceros* จัดเป็นเซนตริกไดอะตอม (Centric diatom) มีโครงสร้างของผนังเซลล์ประกอบด้วยสารกลุ่มซิลิกาเป็นองค์ประกอบหลัก ที่เรียกว่า ฟรักทูล (Frustule) (Lee, 1995) ตัวเซลล์ประกอบด้วยฝา 2 ฝา ลักษณะเซลล์เป็นรูปทรงกระบอก มีวงเกอเดิล 1 - 2 วง (สมพงษ์ คุณจินดาชาภาพร, 2544) และมีหนามยาวที่เรียกว่า “ซีติ” (Setae) มุมละ 1 เส้น โดยทั่วไปมักอยู่เป็นสายโซ่เรียงต่อกัน ซึ่งสายโซ่นี้เกิดจากซีติที่มุมของแต่ละฝาของเซลล์เดี่ยว ๆ ที่อยู่ติดกัน มีการแตะกันที่บริเวณใกล้กันกับฐานทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ ที่เรียกว่า อะเพอร์เชอร์ หรือ ฟอรามินา (Apertures or Foramina) ทั้งนี้ความยาวของสาย *Chaetoceros* ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับการสร้างซีติปลายสุดของสาย (Terminal Setae) ซึ่งมักจะสั้นกว่าและหนากว่าซีติเส้นอื่น (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542) ดังนั้น จึงสามารถพบ *Chaetoceros* ได้ทั้งที่เป็นสายโซ่ตรง โซ่โค้ง โซ่บิด โซ่เกลียว บางชนิดอาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือสายสั้น ๆ (มาลินี ฉัตรมงคล และชัชชัย จันทร์ตั้งสี, 2548) นอกจากนี้ องค์ประกอบของคลอโรพลาสต์ในเซลล์ *Chaetoceros* มีรูปร่างขนาด และตำแหน่งไม่แน่นอน โดยประกอบไปด้วยคลอโรฟิลล์เอ ซี<sub>1</sub> และซี<sub>2</sub> กับแคโรทีนอยด์ที่มีมากที่สุด คือ ฟิวโคแซนทีน (Fucoxanthin) จึงทำให้มีสีน้ำตาลแกมทอง เมื่อจำแนกตามอนุกรมวิธาน จะสามารถจัดจำแนกได้ ดังนี้ (Lee, 1995)

Division Chrysophyta

Class Bacillariophyceae

Order Biddulphiales

Family Chaetocerotaceae

Genus *Chaetoceros*

## 2.2 ความสำคัญของ *Chaetoceros*

*Chaetoceros* เป็นไดอะตอมที่มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย ซึ่งผู้รู้หลายท่านได้จำแนกความสำคัญของ *Chaetoceros* ออกเป็นด้านต่าง ๆ ได้ดังนี้ วันเพ็ญ ภูติจันทร์ (2549) ได้จำแนกความสำคัญของ *Chaetoceros* ออกเป็น 3 ด้าน คือ

1. เป็นดัชนีพื้นฐานบ่งบอกถึงคุณภาพน้ำและปริมาณสารอาหารตามธรรมชาติ โดย  
 คีโตเซอรอสจะเพิ่มปริมาณขึ้นมากมายอย่างรวดเร็ว (Bloom) เมื่อมีแร่ธาตุไนเตรต ฟอสเฟต และซิลิกาสูง

2. เป็นผู้ผลิตเบื้องต้นในระดับห่วงโซ่อาหารของสัตว์น้ำ ช่วยให้เกิดการถ่ายทอดพลังงาน  
 และมีการหมุนเวียนของสารอาหารในธรรมชาติ

3. ด้านความสำคัญทางเศรษฐกิจ อาทิเช่น ดินไคอะตอมหรือดินซิลิกาที่เกิดจากผนังเซลล์  
 ของไคอะตอมที่ตายแล้วทับถมกันและตกตะกอน เมื่อนำส่วนที่ตกตะกอนมาใช้โดยตรง หรือเมื่อนำ  
 ตะกอนมาเผาให้เป็นเถ้าถ่าน สารอินทรีย์ที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ ดังนี้

1) อุตสาหกรรมการกรองให้เกิดความบริสุทธิ์ เช่น กรองน้ำเสีย กรองน้ำดื่ม กรองน้ำมัน  
 กรองน้ำเชื่อม กรองน้ำในสระว่ายน้ำแบบหมุนเวียนน้ำมาใช้อีก เป็นต้น

2) เป็นผงขัดสำหรับ เครื่องเงิน ทองเหลือง โลหะให้มันวาว ขัดเครื่องสุขภัณฑ์ ผสม  
 ในยาสีฟัน และผงขัดอื่น ๆ ช่วยให้สะอาด

3) เป็นฉนวน โดยใช้ผสมในกระดาศยให้สามารถทนความร้อนได้ ผสมในอิฐหรือ  
 ซีเมนต์ทนไฟ ฉนวนอุปกรณ์ไฟฟ้า ทำห้องเก็บเสียง และฉนวนอื่น ๆ อีกมากมาย

4) ใช้ผสมในสารต่าง ๆ เพื่อช่วยเพิ่มเสถียรภาพให้แก่สารนั้น ๆ เนื่องจาก *Chaetoceros*  
 ไม่มีปฏิกริยาตอบโต้กับสารใด ๆ จึงสามารถผสมกับสารได้หลายชนิด เช่น ผสมในสี ผสมในดินระเบิด  
 ทำปูนปลาสเตอร์ เป็นต้น

ธิดาเพชรมณี (2542) ได้จำแนกความสำคัญของ *Chaetoceros* ในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำไว้  
 ดังนี้

1. เป็นอาหารอนุบาลลูกกุ้ง แม้ว่าลูกกุ้งกุลาดำและลูกกุ้งชนิดอื่น ๆ จะสามารถกิน  
 อาหารผงหรืออาหารสำเร็จได้ตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นการกินอาหาร แต่จะหาอาหารผงที่มีคุณค่าทางโภชนาการ  
 ครบสมบูรณ์ได้ค่อนข้างยาก อีกทั้งอาหารผงยังมีขนาดเล็กมาก จมน้ำได้ง่าย ไม่สอดคล้องกับธรรมชาติ  
 ของลูกกุ้งในระยะแรกที่ใช้ชีวิตลอยอยู่ในมวลน้ำ อาหารสำเร็จจึงมีโอกาสน้อยได้มาก ทำให้เกิด  
 การเน่าเสียภายในบ่ออนุบาลขึ้นได้ ซึ่งของเสียเหล่านี้จะเป็นอาหารอย่างคิของพวก โปรโตซัว และ  
 จุลินทรีย์ อีกทั้งยังก่อให้เกิดสารพิษ เช่น แอมโมเนีย ไนไตรท์ สะสมในบ่ออนุบาลมีผลทำให้ปริมาณ  
 ออกซิเจนในบ่ออนุบาลลดลงได้ อาจก่อให้เกิดโรคกับลูกสัตว์น้ำ หรือส่งผลให้ลูกกุ้งอ่อนแอ เติบโตช้า  
 มีอัตราการรอดต่ำได้ จึงมักใช้ *Chaetoceros* แทนการให้อาหารผง

2. ช่วยลดการเน่าเสียของน้ำ โดย *Chaetoceros* จะช่วยเพิ่มออกซิเจน ลดแอมโมเนียในน้ำได้  
 โดยทำหน้าที่เป็นตัวกรองชีวภาพในการกำจัดพวกสารประกอบไนโตรเจนในระบบ

3. ช่วยก่อให้เกิดระบบนิเวศน์ภายในบ่อที่สมดุล
4. ช่วยลดความโปร่งใสของน้ำ ทำให้ลูกกุ้งเจริญเติบโตได้ดี มีอัตราการรอดตายสูง โดยไม่จำเป็นต้องพึ่งยาและสารเคมี เป็นการช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตและได้ลูกกุ้งที่แข็งแรง มีคุณภาพดี

Hargreaves (2006) ได้จำแนกความสำคัญของ *Chaetoceros* เพิ่มเติม คือ ในด้านการประมง เนื่องจาก *Chaetoceros* เป็นอาหารธรรมชาติที่มีคุณค่าทางโภชนาการ มีวิตามินและเกลือแร่ครบถ้วน มีขนาดเหมาะสมต่อสัตว์น้ำขนาดเล็ก และพบตลอดอยู่ทั่วไปในทะเล ซึ่งเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นในระดับห่วงโซ่อาหารของสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่จับได้ตามธรรมชาติ

### 2.3 ชนิดของ *Chaetoceros* ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย

ปัจจุบันมีการนิยมเลี้ยง *Chaetoceros* กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากหาหัวเชื้อได้สะดวกและเมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะยังคงอยู่ได้อีกระยะหนึ่ง โดยที่จะไม่ตายและตกตะกอนทันทีเหมือนกับสาหร่ายชนิดอื่น ๆ ไม่ไวต่อแสงและไม่ตายง่ายเหมือนสเกลีโตนีมา (ธิดา เพชรมณี, 2542) อีกทั้งยังสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง ๆ ของน้ำในบ่อเลี้ยงได้ดี ทั้งนี้ ชนิดของ *Chaetoceros* ที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเลี้ยงลูกกุ้งของประเทศไทยมีหลัก ๆ ด้วยกัน 2 ชนิด ได้แก่ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2541)

2.3.1 *Chaetoceros calcitrans* เป็นพันธุ์จากแหล่งน้ำของประเทศฟิลิปปินส์ เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ มีขนาดเล็กและหนามสั้น ซึ่งจะมีปริมาตรเซลล์ประมาณ 50 ลูกบาศก์ไมโครเมตร แต่ปริมาตรอาจน้อยกว่านี้ เช่น 30 ลูกบาศก์ไมโครเมตร ในบางครั้ง *C. calcitrans* อาจมีขนาดเล็กมาก คือ มีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ 4 - 5 ไมโครเมตร ก็ได้ เพราะขนาดจะเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ไดอะตอมชนิดนี้จะเป็นชนิดที่เหมาะสมกับการเป็นอาหารของลูกกุ้งแล้วยังเป็นอาหารที่ดีในการเลี้ยงหอยสองฝาด้วย

2.3.2 *Chaetoceros gracilis* เซลล์มีรูปร่างรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาดของเซลล์โดยไม่นับก้าน (setae) มีความยาว 8 - 12 ไมโครเมตร ความกว้าง 7 - 10 ไมโครเมตร ซึ่ง *C. gracilis* จะนิยมเลี้ยงกันในประเทศตาฮิติ มลรัฐฮาวาย และห้องปฏิบัติการทางทะเลตุงกวาง (tungkang) ในประเทศไต้หวัน เพื่อเป็นอาหารลูกกุ้งฟิเนียส ลูกหอยสองฝา โรติเฟอร์ และโคฟีพอด

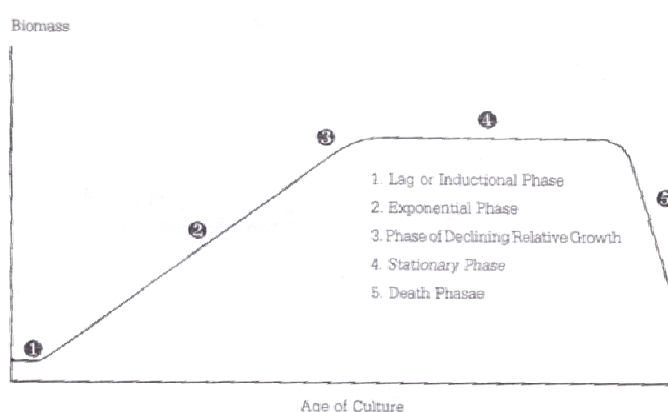
ส่วน *Chaetoceros* สายพันธุ์ของไทยส่วนใหญ่นั้นจะมีลักษณะเป็นเซลล์ที่ต่อกันเป็นสาย สำหรับในสายพันธุ์พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ มีบ้าง แต่มักจะมีหนามยาวมากหรือหนามโค้งไม่เหมาะที่จะใช้เป็นอาหารของลูกกุ้ง

สรุป *Chaetoceros* เป็นแพลงก์ตอนพืชที่มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับเป็นอาหารอนุบาลลูกสัตว์น้ำระยะต่าง ๆ หลายชนิด รวมถึงลูกกุ้งขาวระยะชูเอีย เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงและหาหัวเชื้อได้ง่าย รวมถึงมีสารอาหารครบถ้วนเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของลูกกุ้ง

ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ *C. gracilis* ในการศึกษาผลการตกตะกอนและการเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษา *Chaetoceros* แบบเข้มข้น ทำให้สามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นานขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเลี้ยงกุ้งต่อไป เนื่องจาก เซลล์ของ *C. gracilis* นั้นมีขนาดค่อนข้างใหญ่ จึงง่ายต่อตรวจสอบหาเซลล์ที่มีชีวิตรอดและนับจำนวนเซลล์มากกว่าการใช้ *C. calcitrans*

#### 2.4 ระยะการเจริญเติบโตของ *Chaetoceros* ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2541)

ในการเพาะเลี้ยง *Chaetoceros* เพื่อให้เป็นอาหารอนุบาลลูกกุ้งนั้น สามารถทำนายความหนาแน่นของเซลล์ที่จะเกิดขึ้นได้ล่วงหน้า รวมทั้งช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวผลผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณที่เพียงพอต่อลูกกุ้งที่ต้องการได้ โดยระยะการเจริญเติบโตโดยทั่วไปแบ่งออกได้ 5 ระยะ ดังแสดง ในภาพที่ 2-1



ภาพที่ 2-1 กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโต (Fox, 1983)

2.4.1 ระยะที่ 1 ระยะปรับตัว (Lag phase or inductional phase) เป็นระยะที่เซลล์ปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ เช่น แสง อุณหภูมิ และธาตุอาหาร ฯลฯ ระยะนี้จะไม่มีการแบ่งเซลล์ ถ้าปรับตัว

ไม่ได้จะตายลง โดยการที่เซลล์ของ *Chaetoceros* จะปรับตัวได้ช้าหรือเร็วขึ้น ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของเซลล์และความอุดมสมบูรณ์ของอาหารที่เลี้ยงถ้าสภาพทั้งสองเหมาะสมก็จะเข้าสู่ระยะที่ 2 ได้เร็วขึ้น

2.4.2 ระยะที่ 2 ระยะเพิ่มจำนวนทวีคูณ (Log phase or exponential phase) เป็นระยะที่เซลล์ *Chaetoceros* จะเพิ่มจำนวนทวีคูณอย่างรวดเร็ว ระยะนี้จะนานเท่าใดขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารและคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงแสงสว่าง รวมทั้งผลผลิตภายนอกเซลล์ สภาวะรวมของสิ่งแวดล้อม ลักษณะการเจริญเติบโตของระยะนี้จะรวดเร็วในระยะแรกและจะค่อย ๆ ช้าลงตามลำดับ

2.4.3 ระยะที่ 3 ระยะเฉื่อย (Retardation phase or phase of declining relative growth) เป็นช่วงที่เซลล์เจริญเติบโตช้าลงเพราะขาดแคลนอาหาร เช่น ไนโตรเจน เหล็ก คาร์บอน หรือออกซิเจน เนื่องจากปริมาณเซลล์หนาแน่นเกินไป มีการเสียดุลของ pH เนื่องจากมีแอมโมเนียเกิดขึ้นมาก หรือแสงสว่างลดลงเนื่องจากเซลล์เกิดการบังกันเอง

2.4.4 ระยะที่ 4 ระยะคงที่ (Stationary phase) เป็นระยะที่การเจริญเติบโตของเซลล์หยุดนิ่งเนื่องจากแร่ธาตุอาหารลดน้อยลง และเกิดสารพิษจากขบวนการเมตาบอลิซึมหรือการสลายตัวของเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น

2.4.5 ระยะที่ 5 ระยะตาย (Death phase) เป็นระยะที่เซลล์หยุดการเจริญเติบโตโดยสิ้นเชิงเนื่องจากธาตุอาหารหมดลง เซลล์จะเริ่มตายและจะตายเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และรวดเร็วขึ้น

ดังนั้น ระยะการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมจึงควรอยู่ในระยะที่เซลล์มีความสมบูรณ์และแข็งแรงมากที่สุด ได้แก่ ช่วงปลายของระยะที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนทวีคูณ (ระยะที่ 2) ไม่ควรเกินระยะคงที่ (ระยะที่ 4) ไปมาก เนื่องจากเซลล์จะหยุดชะงักจนเริ่มมีการตายและการสะสมสารพิษจากขบวนการเมตาบอลิซึมเกิดขึ้นบ้างแล้ว ไม่เหมาะแก่การนำไปอนุบาลลูกกุ้ง ในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้เซลล์ *Chaetoceros* ในระยะที่ 2 ของการเจริญเติบโตมาทำการตกตะกอนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เนื่องจาก เป็นระยะที่เหมาะสมที่สุดของการเจริญเติบโต เซลล์มีความสมบูรณ์ แข็งแรง สามารถเจริญเติบโตและนำไปขยายต่อได้ดีภายหลังจากการเก็บรักษา

### 3. การเก็บเกี่ยว (Harvest)

การเก็บเกี่ยวแพลงก์ต่อนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน ควรพิจารณาตามความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ ขนาดของเซลล์ที่จะเก็บเกี่ยว ชนิดของแพลงก์ตอนที่ทำการเก็บเกี่ยว รวมถึง

ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงาน โดยวิธีการเก็บเกี่ยวที่นิยมในการนำใช้ประโยชน์ทางด้านอนุบาลและเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบัน มีดังนี้ (ธิดา เพชรรมณี, 2542)

### 3.1 การสูบน้ำไปใช้โดยตรง

เป็นการสูบน้ำจากบ่อเลี้ยงแพลงก์ตอนไปใช้โดยตรง เมื่อแพลงก์ตอนมีขนาดเล็กมากไม่สามารถกรองแยกออกจากน้ำได้ด้วยวิธีธรรมดา มีข้อเสีย คือ เป็นการเพิ่มน้ำภายนอกที่มีทั้งเซลล์แพลงก์ตอนที่เป็นอาหารและแร่ธาตุอาหารในน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยง ควรต้องมีการถ่ายน้ำและการจัดการบ่ออนุบาลที่ดี

### 3.2 วิธีการกรองเพื่อคั่งน้ำเลี้ยงออก

เป็นการกรองโดยใช้ถุงกรองแพลงก์ตอน เหมาะสำหรับแพลงก์ตอนที่มีขนาดโตหรือเป็นสายยาว โดยเฉพาะใน *Skeletonema* ที่มีข้อเสีย คือ เซลล์ของ *Skeletonema* จะขาดหลุดออกจากกันเป็นสายสั้น ๆ ใต้ง่ายเมื่อโดนกระทบกระแทกทำให้หลุดลอยออกจากถุงกรองได้มาก นอกจากนี้ หากนำวิธีการนี้ไปใช้ในแพลงก์ตอนขนาดเล็กจะทำให้แพลงก์ต่อนั้นสามารถฟื้นตัวได้ยาก เช่น ใน *Chlorella* และ *Scenedesmus* (De Godos et al., 2011)

### 3.3 การปั่นแยก (Centrifugation)

เป็นการใช้เครื่องมือในการปั่นแยกเพื่อคั่งเอาน้ำออก วิธีการนี้เหมาะสมกับการทดลองในห้องปฏิบัติการมากกว่า เนื่องจากอุปกรณ์มีขนาดใหญ่และราคาสูงมาก นอกจากนี้ยังมีผลทำให้เซลล์แตกและเสียหายได้ง่าย ยากต่อการฟื้นตัวของเซลล์

### 3.4 การตกตะกอน

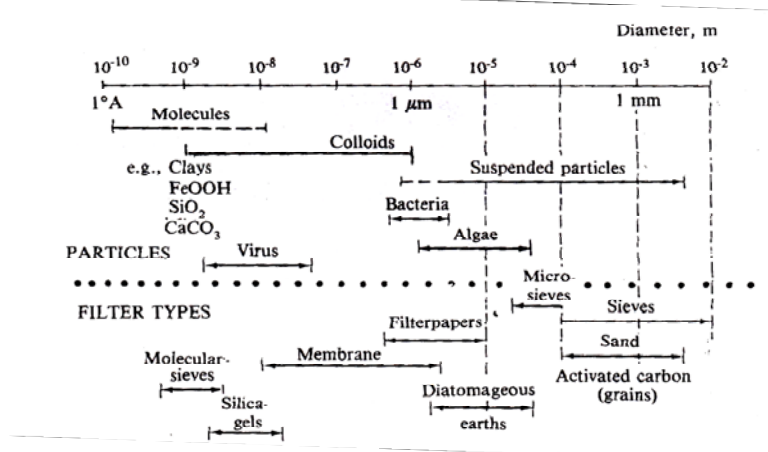
การตกตะกอนเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถทำให้แพลงก์ตอนพืชมีความหนาแน่นสูงขึ้นแต่มีปริมาณน้อยลงทำให้สะดวกต่อการขนส่งและเก็บรักษา จากการศึกษาของ Golueke and Oswald (1965) พบว่า วิธีการตกตะกอนเป็นที่นิยมมาก และเป็นวิธีการที่สะดวกที่สุด อีกทั้งอุปกรณ์ราคาไม่แพง ใช้แรงงานน้อย จึงช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้มาก โดยมักจะใช้สารเคมีเป็นตัวช่วยในการรวมตะกอน ทั้งนี้ จากการศึกษาของ Richmond and Becker (1986) พบว่า สารเคมีที่ช่วยในการรวมตะกอนที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป ได้แก่ อลูมิเนียมซัลเฟต ปูนขาว เฟอร์ริกซัลเฟต และเฟอร์ริกคลอไรด์ เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะทำให้แพลงก์ตอนเกิดการจับกลุ่มกัน เมื่อมีน้ำหนักรวมมากพอจะตกลงเป็นตะกอน นอกจากนี้ การศึกษาของ Franks (2005) พบว่า สารตกตะกอน ค่า pH และอุณหภูมิของน้ำ มีส่วนเป็นตัวกระตุ้นในการควบคุมปฏิสัมพันธ์ระหว่างอนุภาคจะช่วยให้เกิดตะกอนได้รวดเร็วมากขึ้น จากการศึกษาของ เฉลิมชัย อยู่สำราญ และปรเมษฐ์ พลอยประดับ (2546) พบว่า ค่า pH ที่เหมาะสมในการตกตะกอนเซลล์ของสาหร่ายพันธุ์



*Chaetoceros* คือ ช่วง pH ที่ 7 - 8 จะทำให้มีการตกตะกอนและการเจริญเติบโตภายหลังการตกตะกอนดีที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Millamena et al. (1977) ที่ศึกษาถึงวิธีการเก็บเกี่ยวไดอะตอม *C. calcitrans* พบว่า หากค่า pH ต่ำกว่า 6 จะมีผลทำให้เซลล์แพลงก์ตอนเสียหาย และมีผลต่อการเจริญเติบโตภายหลังการตกตะกอน และทั้งนี้ การศึกษาของ ยวดี อินสำราญ (2543) พบว่า ชนิดและสายพันธุ์ของแพลงก์ตอน มีผลต่อปริมาณของตะกอนที่ได้ รวมถึงชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการตกตะกอนที่แตกต่างกัน ก็มีผลต่อปริมาณการตกตะกอนและการตอบสนองต่อการเจริญเติบโตภายหลังการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน โดยการตกตะกอนจะเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยกระบวนการที่เรียกว่า โคลแอกกูเลชัน

#### 3.4.1 กระบวนการ โคลแอกกูเลชัน (Coagulation) (มันสิน ตัณฑุลเวศม์, 2537)

กระบวนการโคลแอกกูเลชัน คือ กระบวนการในการทำให้คอลลอยด์หลาย ๆ อนุภาคจับตัวกัน เป็นก้อนฟล็อก (Floc) หรือก้อนตะกอน โดยทั่วไปมีขนาดของอนุภาคคอลลอยด์ (Colloidal Particle) อยู่ในช่วง  $10^{-9}$  จนถึง  $10^{-6}$  เมตร (ภาพที่ 2-2) ซึ่งมีขนาดเล็กมากจึงไม่สามารถตกตะกอนได้ด้วยน้ำหนักของตัวเองในเวลาจำกัด อนุภาคคอลลอยด์จะสามารถแขวนลอยอยู่ในน้ำได้เป็นเวลานาน ๆ โดยไม่ตกตะกอน ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องทำให้เกิดการจับกลุ่มของอนุภาคคอลลอยด์ต่าง ๆ จนเป็นก้อนตะกอน โดยกระบวนการ โคลแอกกูเลชัน ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้



ภาพที่ 2-2 การจำแนกขนาดของสารต่าง ๆ ในน้ำ (มันสิน ตัณฑุลเวศม์, 2537)

ขั้นตอนที่ 1 การทำลายเสถียรภาพ (Destabilization) ของคอลลอยด์ขึ้นอยู่กับแรงผลัก และแรงดูดระหว่างอนุภาคคอลลอยด์ โดยแรงผลักเกิดจากศักย์ไฟฟ้าซึ่งชักนำโดยประจุไฟฟ้าของ

อนุภาคคอลลอยด์ ส่วนแรงคู่เป็นแรงแวนเดอร์วาลส์ซึ่งเป็นแรงที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติของอนุภาคขนาดเล็กและของโมเลกุล ถ้าแรงคู่สูงกว่าแรงผลักอนุภาคคอลลอยด์จะไม่สามารถแขวนลอยอยู่ในน้ำได้ การทำลายเสถียรภาพของคอลลอยด์สามารถกระทำได้โดยอาศัยกลไกการทำงาน 4 รูปแบบ ดังนี้

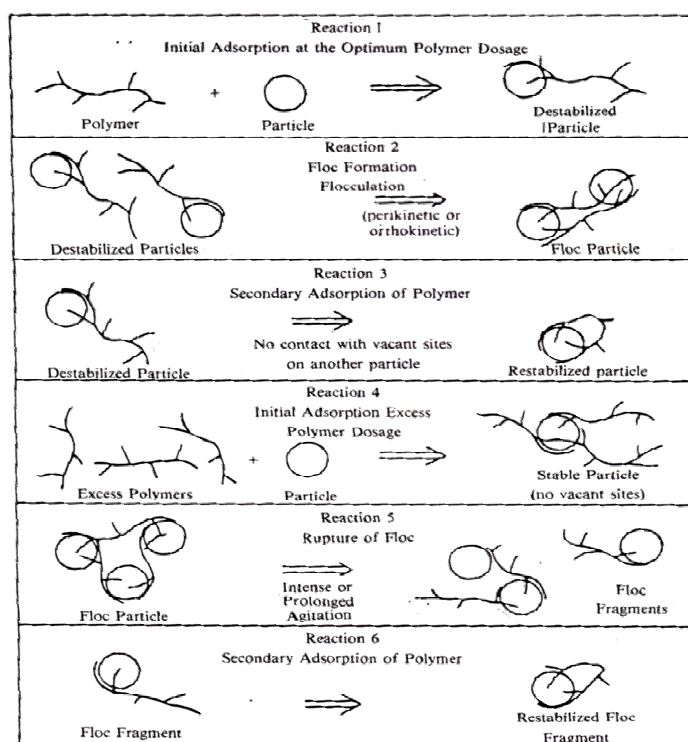
รูปแบบที่ 1 กลไกการลดความหนาของชั้นกระจาย (Diffuse Layer) โดยการเพิ่มจำนวนไอออนที่มีประจุตรงกันข้ามกับประจุของอนุภาค เป็นการเพิ่มประจุตรงกันข้าม (counter ion) ในชั้นกระจาย ผลที่เกิดขึ้น คือ ชั้นกระจายจะมีความหนาแน่นลดลงและทำให้ศักย์ซีต้า (Zeta Potential) หรือ ความแตกต่างของประจุไฟฟ้าที่อยู่รอบ ๆ อนุภาคนั้น ลดลงตามไปด้วย เนื่องจากมีประจุบวกไปออกันอยู่ใกล้ผิวของอนุภาคคอลลอยด์เพิ่มขึ้นทำให้อำนาจประจุลบของอนุภาคไม่สามารถส่งออกไปได้เท่าเดิม ไอออนต่าง ๆ จะมีอำนาจในการลดความหนาของชั้นกระจาย

รูปแบบที่ 2 กลไกการดูดซับและทำลายประจุของอนุภาคคอลลอยด์ (Adsorption and Charge Neutralization) สารเคมีบางหมู่สามารถดูดซับ (adsorbed) บนผิวของอนุภาคคอลลอยด์ได้ หากสารเหล่านั้นมีประจุไฟฟ้าตรงกันข้ามกับอนุภาคคอลลอยด์ การดูดซับจะมีผลต่อการลดอำนาจศักย์ไฟฟ้าและการทำลายเสถียรภาพของคอลลอยด์

รูปแบบที่ 3 กลไกการสร้างผลึกขึ้นมาเพื่อให้อนุภาคคอลลอยด์มาเกาะจับ (Sweep Coagulation) การเติมสารประกอบเกลือของโลหะบางชนิดลงไปในน้ำในปริมาณที่มากพอจะมีการตกผลึกเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว อนุภาคคอลลอยด์อาจเป็นแกนในของผลึกดังกล่าวเพื่อให้ผลึกมีขนาดใหญ่ หรืออาจจับตัวรวมกับผลึก ถือเป็น การเพิ่มขนาดหรือน้ำหนักให้กับอนุภาคคอลลอยด์ เป็นผลทำให้คอลลอยด์สูญเสียเสถียรภาพและสามารถตกตะกอนได้ สารประกอบที่เติมลงไป เช่น สารส้ม ( $Al_2(SO_4)_3$ ) เฟอริกคลอไรด์ แมกนีเซียมคาร์บอเนต และปูนขาว เป็นต้น

รูปแบบที่ 4 กลไกการใช้สารโพลีเมอร์เป็นสะพานเชื่อมอนุภาคคอลลอยด์ (Polymer Bridging) สารประกอบตามธรรมชาติหลายชนิด เช่น แป้ง เซลลูโลส น้ำตาลบางชนิด และโปรตีนบางชนิด รวมทั้งสารอินทรีย์โพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถใช้เป็น โคแอกกูแลนต์ ในการกำจัดคอลลอยด์ได้ สารเหล่านี้มักมีขนาดโมเลกุลใหญ่มาก ประจุไฟฟ้าประจำตัวอาจเป็นบวก ลบ หรือไม่มีประจุก็ได้ การทำลายเสถียรภาพของคอลลอยด์ด้วยสารอินทรีย์ต่าง ๆ สามารถอธิบายได้ด้วยโมเดล Polymer Bridging (ภาพที่ 2-3) ตามทฤษฎีนี้ โมเลกุลของสารโพลีเมอร์สามารถเกาะติดบนอนุภาคคอลลอยด์ได้หลายตำแหน่ง ดังแสดงในปฏิกิริยาที่ 1 ของภาพที่ 2-3 การเกาะติดอาจเป็นผลเนื่องมาจากประจุที่ต่างกันของโพลีเมอร์ และคอลลอยด์ อนุภาคที่มีโพลีเมอร์เกาะติดอยู่โดยมีปลายอิสระสำหรับเกาะบนอนุภาคอื่น ถือได้ว่าเป็นอนุภาคที่สูญเสียเสถียรภาพแล้ว (Destabilized Particle)

อนุภาคนี้อาจจะจับกับอนุภาคตัวอื่น ๆ โดยมีโพลีเมอร์เป็นสะพานเชื่อม ดังแสดงในปฏิกิริยาที่ 2 ของภาพที่ 2-3 การเชื่อมต่อด้วยโพลีเมอร์จะเกิดขึ้นได้เท่าที่มีโพลีเมอร์และตำแหน่งที่ว่างบนผิวอนุภาค ถ้าปลายที่อิสระของโพลีเมอร์ไม่มีที่จับเกาะกับอนุภาคอื่น ปลายอิสระนั้นก็ก็จะเกาะจับบนอนุภาคเดิม ดังแสดงในปฏิกิริยาที่ 3 ของภาพที่ 2-3 อนุภาคที่ถูกสารโพลีเมอร์ยึดเกาะหลายตำแหน่งจนไม่มีปลายอิสระและไม่มีที่ว่าง เรียกว่าอนุภาคที่มีเสถียรภาพกลับคืนมาใหม่ (Restabilized Particle) การใช้โพลีเมอร์มากเกินไปอาจก่อให้เกิดผลเสียได้ เพราะโพลีเมอร์หลายโมเลกุลจะไปเกาะอยู่บนอนุภาคคอลลอยด์ จนกระทั่งไม่มีที่ว่างบนอนุภาคสำหรับเป็นที่จับของปลายอิสระของโพลีเมอร์ที่อยู่บนอนุภาคอื่น ๆ ดังแสดงในปฏิกิริยาที่ 4 ของภาพที่ 2-3 อนุภาคคอลลอยด์ที่เกิดขึ้นจึงเป็นแบบที่มีเสถียรภาพ การกวนน้ำแรงเกินไปหรือนานเกินไปก็ก่อผลเสียได้ เนื่องจากก้อนตะกอนที่เกิดขึ้นแล้วนั้นแตกออกเป็นส่วน ๆ แสดงในปฏิกิริยาที่ 5 ของภาพที่ 2-3 และอาจทำให้ปลายอิสระของโพลีเมอร์เกาะจับอนุภาคอันเดิมดังแสดงในปฏิกิริยาที่ 6 ของภาพที่ 2-3 ความเสถียรภาพของคอลลอยด์ก็จะกลับคืนมาใหม่อีกครั้ง



ภาพที่ 2-3 กลไกการทำลายเสถียรภาพของคอลลอยด์ แบบต่อเชื่อมด้วยโพลีเมอร์ (Weber, 1972)

ขั้นตอนที่ 2 การทำให้อนุภาคคอลลอยด์ต่าง ๆ เคลื่อนที่มากระทบหรือสัมผัสกันให้มากที่สุด (Transport of Colloidal Partical) เมื่ออนุภาคถูกทำลายเสถียรภาพแล้ว การสร้างโอกาสสัมผัสระหว่างอนุภาค ย่อมเกิดขึ้นง่ายกว่าเดิม ขั้นตอนต่อไปคือ การทำให้เกิดฟล็อกคูเลชัน (Flocculation) ซึ่งเป็นการทำให้อนุภาคต่าง ๆ เคลื่อนที่มาสัมผัสหรือกระทบกัน แล้วจะต้องเกาะติดกันจนเป็นก้อนตะกอน วิธีการสร้างสัมผัสให้อนุภาคมีหลายวิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 การทำให้อนุภาคคอลลอยด์เคลื่อนที่ไปมาในน้ำจนกว่าจะมีการสร้างสัมผัสเกิดขึ้น วิธีปฏิบัตินี้เป็นที่นิยมมากที่สุด คือ กวนน้ำให้เคลื่อนที่ในลักษณะที่ส่วนต่าง ๆ ของน้ำมีอัตราเร็วในการไหลแตกต่างกัน เป็นเหตุให้อนุภาคต่าง ๆ มีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ไม่เท่ากันจึงมีการสัมผัสเกิดขึ้น การเคลื่อนที่ของน้ำต้องไม่รวดเร็วจนเกินไป มิฉะนั้นแล้วตะกอนที่เกิดขึ้นอาจแตกหรือหลุดออกจากกันได้

วิธีที่ 2 การสัมผัสของอนุภาคคอลลอยด์ อาจเกิดขึ้นได้เองโดยอาศัยการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน (Brownian Motion) ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากอนุภาคคอลลอยด์กระทบกันเองหรือถูกชนโดยโมเลกุลของน้ำ เนื่องจากการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของน้ำขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ การสัมผัสแบบนี้จึงขึ้นอยู่กับอุณหภูมิด้วย จึงอาจกล่าวได้ว่าการเคลื่อนที่แบบบราวเนียนเป็นการเคลื่อนที่แบบใช้ความร้อน (Thermal Motion) การสัมผัสระหว่างอนุภาคต่าง ๆ ที่เกิดจากการเคลื่อนที่แบบบราวเนียนหรืออาศัยความร้อนนี้ เรียกว่า Perikinetic Flocculation

วิธีที่ 3 การสัมผัสระหว่างอนุภาค เกิดขึ้นเนื่องจากการตกตะกอนที่มีอัตราไม่เท่ากันของอนุภาคต่าง ๆ ฟล็อกคูเลชันด้วยวิธีนี้เกิดขึ้นพร้อม ๆ กับการตกตะกอน ทำให้สามารถกำจัดอนุภาคคอลลอยด์ออกจากน้ำได้เลย อนุภาคที่สามารถสร้างฟล็อกคูเลชันแบบนี้ได้ต้องมีขนาดใหญ่กว่า 5.0 ไมโครเมตร และมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีที่ 4 ในกรณีที่อนุภาคคอลลอยด์มีขนาดใหญ่กว่า 0.1 – 1.0 ไมโครเมตร แต่เล็กกว่า 5.0 ไมโครเมตร และมีความเข้มข้นน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟล็อกคูเลชันอาจเกิดขึ้นโดยการสร้างสัมผัสแบบออร์โธไคเนติก (Orthokinetic Flocculation) แต่อาจเกิดขึ้นช้าเนื่องจากโอกาสสัมผัสน้อย

โดยสรุป หากจะทำการเก็บเกี่ยวรวบรวมเซลล์ *Chaetoceros* ให้ได้ปริมาณมากเพื่อใช้เป็นอาหารแก่ลูกกุ้งโดยตรง หรือเพื่อนำมาเก็บรักษาต่อสำหรับใช้เป็นสต็อกหัวเชื้อ หรือเก็บไว้ใช้ยามขาดแคลนนั้นสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน แต่ทั้งนี้วิธีการเก็บเกี่ยวด้วยการตกตะกอนจะดีที่สุด ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงสนใจศึกษาการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีการตกตะกอน เนื่องจากเป็นทำได้ง่าย ใช้แรงงาน และเครื่องมือน้อย สามารถตกตะกอนบ่อใหญ่ได้ ทำให้ได้ปริมาณเซลล์ที่หนาแน่นสมบูรณ์ แข็งแรง

เซลล์ *Chaetoceros* จะฟื้นตัวได้ง่ายเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อ หรือใช้เป็นอาหารสด นอกจากนี้ยังสะดวกและเหมาะสมต่อการเก็บรักษาต่อไปได้อีก

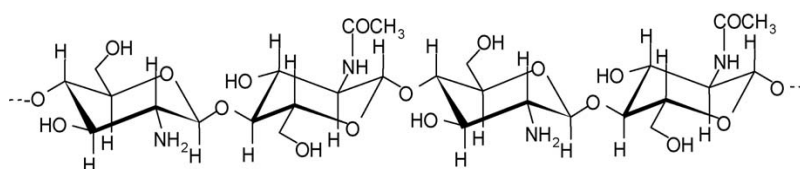
### 3.5 สารที่ใช้ในการตกตะกอน

#### 3.5.1 ไคโตซาน (Chitosan)

ไคโตซานเป็นสารธรรมชาติที่สกัดได้จากเปลือกกุ้ง กระจงปู แกนหมึก สาหร่าย จุลินทรีย์หลายชนิด ผงเซลล์ของเห็ดรา (ภาวดี เมธะคานนท์, อริศรา เฟื่องฟูชาติ และก้องเกียรติ คงสุวรรณ, 2543) หรือในเชื้อราบางชนิด และในโครงร่างแข็งภายนอก (exoskeleton) ของแมลง (Rabea et al., 2003) ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคติน (สราวุธ เกียรติพร, 2554 ข) ซึ่งเป็นโพลีแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่พบได้มากที่สุดเป็นอันดับสองของโลกรองจากเซลลูโลส (Kas, 1997) โดยสามารถสกัดไคโตซานได้จากปฏิกิริยากากกำจัดหมู่อะซีติล (deacetylation) ด้วยด่างเข้มข้นเป็นการเปลี่ยนน้ำตาลเอ็น-อะซีติล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) ไปเป็นกลูโคซามีนด้วยการย่อยไคตินในเปลือกของครัสเตเชีย (Illum, 1998; Jones & Mawhinney, 2006) ไคโตซานจึงเป็นวัสดุชีวภาพ (Biomaterials) ที่สามารถย่อยสลายตัวได้เองตามธรรมชาติจึงไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและไม่มีปัญหาเรื่องความเป็นพิษ (Wang & Tang, 2001) ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพหรือต่อสิ่งแวดล้อม (Chihpin et al., 2000) ในปัจจุบันจึงมีการนำไคโตซานไปประยุกต์ในงานด้านต่าง ๆ มากมาย ไม่ว่าจะเป็นด้านเภสัชกรรม ด้านอาหาร ด้านการแพทย์และเกษตรกรรม ด้านเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอและกระดาษ ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ และด้านการแยกทางชีวภาพ เป็นต้น (สุวลิ จันทรกระจ่าง, 2546) เนื่องจากไคโตซานเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ได้แก่ กลูโคซามีนที่เรียงต่อกันเป็นสายยาว การนำไปใช้จึงควรจะต้องพิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยากากกำจัดหมู่อะซีติล และน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานให้ เป็นไปตามจุดประสงค์ของการใช้งาน ซึ่งประสิทธิภาพการทำงานของไคโตซานจะขึ้นกับขนาดโมเลกุล (McGahren et al., 1984) โดยน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานจะบ่งบอกถึงความยาวของสายไคโตซานซึ่งมีผลต่อความหนืด เช่น ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จะมีสายยาวและสารละลายมีความหนืดมากกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ส่วนไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะมีสายสั้น เป็นต้น (สราวุธ เกียรติพร, 2554 ก) ในเชิงพาณิชย์การผลิตไคโตซานจะมาจากเปลือกกุ้งและกระจงปูเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีปริมาณมากและเป็นกากของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร (Franks, 2005)

### 3.5.1.1 โครงสร้างของไคโตซาน

ไคโตซานเกิดจากปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซีติลของไคตินด้วยด่างเข้มข้น ทำให้โครงสร้างของไคตินบางส่วนเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะหมู่ฟังก์ชันที่มีธาตุไนโตรเจนในรูปของหมู่อะซีตามิโด (-NHCOCH<sub>3</sub>) เปลี่ยนไปเป็นรูปของหมู่อะมิโน (-NH<sub>2</sub>) ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 ดังนั้นไคโตซาน คือ โพลีเมอร์ของ D-glucosamine (2-amino-2-deoxy-D-glucose) (ภาวดี เมธะกานนท์, อริศรา เฟื่องฟูชาติ และก้องเกียรติ คงสุวรรณ, 2543) ดังแสดงในภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2-4 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน (Lertsutthiwong et al., 2009)

ไคโตซานเป็นโพลีเมอร์แบบเส้นตรงของ  $\beta$ -1,4-glucosamine (Kas, 1997) สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดอินทรีย์เกือบทุกชนิดที่มี pH ต่ำกว่า 6 เมื่อไคโตซานละลายในสารละลายกรด หมู่อะมิโนในสายโซ่โมเลกุลจะรับประจุบวก (โปรตอน) แล้วอยู่ในรูปของแอมโมเนียม (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) การที่มีหมู่อะมิโนจำนวนมากทำให้สามารถแตกตัวเป็นประจุบวกและจับกับสารที่มีประจุลบได้ (สุวบุญ จิรชาญชัย, รังรอง ยกसान และโกสุม สมัครรัตน์, 2544) เนื่องจากไคโตซานเป็นสารที่มีคุณสมบัติทางไฟฟ้าคือ เป็นโพลีเมอร์ที่มีประจุบวกอย่างรุนแรง และมีน้ำหนักโมเลกุลสูงอยู่ในช่วง  $1.0 \times 10^5$  ถึง  $1.2 \times 10^6$  ประกอบกับสารประกอบในธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็นโพลีเมอร์ที่เป็นประจุลบ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก จุลินทรีย์ เซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น มีผลทำให้ไคโตซานเป็นตัวสร้างตะกอนและตัวตกตะกอนที่ดี เพราะสายโพลีเมอร์ของไคโตซานจะเข้าไปเป็นสะพานเชื่อมต่อระหว่างอนุภาคของสารแขวนลอยที่มีประจุลบนั่นแข็งแรงและทนทานต่อแรงผลัก โดยเฉพาะสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จนเกิดเป็นตะกอนขึ้น ซึ่งประสิทธิภาพการเกิดตะกอนโดยไคโตซานนั้นจะมีการรวมตัวเป็นตะกอนได้เร็วเมื่อมีความหนาแน่นของสารแขวนลอยสูง ทำให้ได้ก้อนตะกอนขนาดใหญ่และตกตะกอนเร็ว (สราวุธ เกียรติพร, 2555; Lalov et al., 2000; Divakaran & Pillai, 2001; Wibowo et al., 2007) ดังนั้น จึงมีการนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้เป็นสารช่วยตกตะกอนและใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

ในด้านต่าง ๆ โดยประสิทธิภาพการรวมตะกอนที่ดีที่สุดของไคโตซานอยู่ที่ช่วง pH 7.0 - 7.5 ซึ่งค่าอยู่ใกล้กับจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point) ของไคโตซานคือ ที่ pH 6.5 (Divakaran & Pillai, 2002 b)

### 3.5.1.2 ผลการศึกษาการใช้ไคโตซานในการตกตะกอน

ชาญวิทย์ ศรีแก้ว (2544) ทำการศึกษาถึงผลของการใช้ไคโตซานเป็นสารช่วยสร้างตะกอนในการกำจัดลิกนินจากน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษ โดยใช้ความเข้มข้นไคโตซานที่ 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ pH ของตัวอย่างน้ำตั้งแต่ 5.0 ถึง 9.0 พบว่าความเข้มข้นของไคโตซานและ pH ที่เหมาะสมในการกำจัดลิกนินจากถังตกตะกอนขั้นต้น คือ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 8.0 ตามลำดับ สามารถกำจัดลิกนินได้ 51 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของไคโตซานและ pH ที่เหมาะสมในการกำจัดลิกนินจากถังตกตะกอนขั้นที่สอง คือ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 8.0 ตามลำดับ โดยสามารถกำจัดลิกนินได้ 71 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าไคโตซานสามารถเป็นตัวสร้างตะกอนโดยไปจับกับลิกนิน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชที่สร้างมากจากกรดอะมิโนฟีนิลอะลานิน (phenylalanine) ได้

พรรณวรรณ อินทตติงห์ (2545) ศึกษาถึงการลดค่าความขุ่นและปริมาณสารแขวนลอยของน้ำเสียจากโรงงานถลุงมือยาง ด้วยการเกิดกระบวนการโคแอกกูเลชันโดยใช้ไคโตซานเป็นสารช่วยสร้างตะกอน พบว่า เมื่อใช้ไคโตซานเป็นตัวช่วยสร้างตะกอนทำให้น้ำที่ผ่านการบำบัดมีคุณภาพดีที่สุด กล่าวคือ สามารถลดค่าความขุ่นจาก  $50.06 \pm 0.03$  NTU ลงอยู่ระหว่าง  $22.30 \pm 0.02$  ถึง  $41.68 \pm 0.01$  NTU และลดสารแขวนลอยจาก  $141 \pm 1.53$  มิลลิกรัมต่อลิตร ลงอยู่ระหว่าง  $63 \pm 1.00$  ถึง  $118 \pm 0.58$  มิลลิกรัมต่อลิตร

Strand et al.(2002) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของไคโตซานที่ใช้รวมตะกอนเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน 8 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp.* และ *Rhodococcus sp.* โดยใช้ไคโตซานที่มีองค์ประกอบทางเคมีและน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 3 ระดับในการรวมตะกอน คือ  $F_A$  0.01 (180,000 กรัมต่อโมล),  $F_A$  0.13 (220,000 กรัมต่อโมล) และ  $F_A$  0.49 (290,000 กรัมต่อโมล) ตามลำดับ ซึ่ง ( $F_A$ ) แทนองค์ประกอบทางเคมีอธิบายโดยใช้เศษส่วน โมลของหน่วย (1-4)-linked 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose พบว่า ความเข้มข้นและชนิดของไคโตซานมีผลต่อการเกิดตะกอนของแบคทีเรียที่แขวนลอยมากกว่าสภาพทางประจุไฟฟ้า (electrostatic interaction) ของแบคทีเรีย

Franks (2005) ทำการศึกษาถึงการใช้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำในการตกตะกอนผงซิลิกาบริสุทธิ์ พบว่า โพลีแซ็กคาไรด์ของไคโตซานสามารถใช้ในการคัดแยกสารแขวนลอยซิลิกา

ออกจากของเหลวได้ เนื่องจากประจุบวกของไคโตซานจะไปจับกับซัลเฟต ประกอบกับผลของแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของไคโตซานกับอนุภาคซิลิกา นั้นใกล้เคียงกับการสร้างแรงดึงดูดระหว่างอนุภาค ทำให้อนุภาคเกิดการจับกลุ่มรวมตัวกันและจมลงอย่างรวดเร็ว

### 3.5.1.3 ผลการศึกษาการใช้ไคโตซานในการตกตะกอนเซลล์สาหร่าย

Divakaran and Pillai (2002 a) ได้ทำการศึกษาถึงการใช้ไคโตซานรวมตะกอนสาหร่ายน้ำจืด 3 ชนิด คือ *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Chlorella* และสาหร่ายน้ำกร่อย 1 ชนิด คือ *Synechocystis* พบว่า สามารถการรวมตะกอนสาหร่ายได้สูงสุดประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 7.0 เมื่อใช้ความเข้มข้นของไคโตซาน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสาหร่ายน้ำจืด แต่อาจต่ำกว่านี้ในสาหร่ายในทะเล เนื่องจากค่า pH ความเข้มข้นของไคโตซาน และความหนาแน่นของสาหร่ายมีผลต่อประสิทธิภาพการรวมตะกอน นับได้ว่าไคโตซานมีประสิทธิภาพมากในการรวมตะกอนสาหร่ายทุกชนิด สันนิษฐานว่าตะกอนเกิดขึ้นจากการทำลายอำนาจประจุของอนุภาคสาหร่ายที่แขวนลอยอยู่ และเกิดการเชื่อมโยงระหว่างเซลล์สาหร่ายโดยสายโซ่ของไคโตซานจนหนักมากพอและตกตะกอนลง ทำให้เซลล์สาหร่ายไม่ได้รับความเสียหายและยังคงมีชีวิตอยู่ สามารถฟื้นตัวเจริญได้ทันทีเมื่อนำไปเพาะเลี้ยง แตกต่างจากการเก็บเกี่ยวด้วยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง เซลล์สาหร่ายมักจะแตก ทำให้เซลล์ต้องใช้ระยะเวลาในการฟื้นตัว

Lertsutthiwong et al. (2009) ศึกษาถึงการกำจัดแพลงก์ตอนพืช (*C.gracillis*) ในบ่อกึ่งทะเล (*L.vannamei*) โดยการใช้ไคโตซานเป็นสารรวมตะกอน พบว่า ประสิทธิภาพการรวมตะกอนของไคโตซาน มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ และค่อนข้างคงที่ ที่ระดับความเข้มข้นไคโตซานที่ 40 - 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วง pH 7 - 9 และสามารถใช้ได้กับน้ำที่มีค่าอัลคาไลน์สูง ๆ ได้ถึง 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) แม้ว่าประสิทธิภาพการรวมตะกอนจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ การรวมตะกอนในน้ำที่มีค่าอัลคาไลน์ต่ำกว่านี้ แต่ยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ 90.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังพบว่าประสิทธิภาพการรวมตะกอนสามารถเพิ่มขึ้นสูงได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นไคโตซานที่ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเทคนิคในการปรับค่า pH แบบสองขั้นตอน (two-step) โดยเริ่มตกตะกอนที่ pH 6.5 ซึ่งจะมีค่าอยู่ใกล้กับจุดไอโซอิเล็กทริกของไคโตซาน และตามด้วยการปรับค่า pH สุดท้ายเป็น 8.5



Cheng et al. (2011) ศึกษาถึงผลกระทบจากองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในผนังเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* พบว่า เมื่อใช้โคโคซานในการรวมตะกอนสาหร่าย *Chlorella* การรวมตะกอนจะดีขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของโคโคซานเท่ากับ 69.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง pH ที่ 8.5 สำหรับสาหร่าย *Chlorella* ทุกสายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าแรงระหว่างโมเลกุล (intermolecular forces) ต่าง ๆ เช่น พันธะไฮโดรเจน และแรงแวนเดอร์วาลส์ อาจมีความสำคัญมากกว่าการทำลายประจุ (charge neutralization) ในการรวมตะกอนสาหร่าย *Chlorella* ในขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมทั้งหมดในผนังเซลล์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดต่อประสิทธิภาพการรวมตะกอน ซึ่งจะให้ผลดีในสาหร่าย *Chlorella variabilis* NC64A ซึ่งมีองค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกับสาหร่าย *Chlorella* สายพันธุ์อื่น ๆ อีก 3 สายพันธุ์ที่ได้นำมาทดสอบด้วย แสดงให้เห็นว่าการใช้โคโคซานรวมตะกอนสามารถเพิ่มขึ้นได้ โดยการเพิ่มประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เกิดปริมาณโพลีแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์ที่สูงขึ้น หรือการเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีปริมาณโพลีแซ็กคาไรด์ในเซลล์ผนังที่สูงกว่า เนื่องจากองค์ประกอบของโพลีแซ็กคาไรด์ทั้งหมดมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับประสิทธิภาพการรวมตะกอนสุทธิ นับได้ว่าปริมาณองค์ประกอบของโพลีแซ็กคาไรด์ทั้งหมดนั้นมีความสัมพันธ์อย่างสูงต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมทั้งหมด

#### 3.5.1.4 ประโยชน์ของโคโคซานต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง

โคโคซานเป็นสารตัวใหม่ที่นิยมและมีประโยชน์มากในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมาเนื่องจากเป็นสาร โพลีเมอร์ชีวภาพที่สกัดได้จากไคติน ประกอบไปด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเรียงต่อกันเป็นสายยาว จึงทำให้โคโคซานมีคุณสมบัติพิเศษเด่น ๆ เฉพาะตัว คือ ไม่มีความเป็นพิษ เป็นวัสดุทางชีวภาพ สามารถเข้ากับธรรมชาติได้ดีและสลายตัวได้เองตามธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม (สุวดี จันทร์กระจ่าง, 2546; นุจรินทร์ โชคบัณฑิต, 2553) จึงมีการประยุกต์ในโคโคซานกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในด้านต่าง ๆ เช่น เคลือบอาหารกุ้งหรือสัตว์น้ำอื่น ๆ เพื่อให้อาหารแตกตัวช้า ละลายน้ำช้าลง หรือใช้บำรุงสุขภาพกุ้งและเสริมสร้างเปลือกกุ้ง เป็นต้น ทำให้โคโคซานมีประโยชน์ที่หลากหลายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมากโดย

สรารุช เกียรพร (2554 ก) ได้จำแนกประโยชน์ของโคโคซานต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง ดังนี้

1. เป็นสารตั้งต้นในการสร้างเนื้อเยื่อและเปลือก กระตุ้นให้มีการลอกคราบได้ดี ช่วยให้โตเร็ว
2. เพิ่มการไหลเวียนเลือดของกุ้งทำให้มีการหมุนเวียนสารอาหารที่ดี และขับถ่ายของเสียดีขึ้น
3. เพิ่มภูมิคุ้มกันในทุกชนิด

4. ใช้เป็นสารเคลือบอาหารเพื่อให้อาหารคงทน ไม่ละลายสูญเสียไปกับน้ำ ลดค่าใช้จ่าย

5. ใช้จับตะกอนและควบคุมปริมาณสาหร่ายในน้ำ

6. ช่วยเพิ่มปริมาณของเม็ดสีในกุ้ง ทำให้กุ้งมีสีเข้มจัด

7. ช่วยป้องกันกุ้งไม่ให้ติดเชื้อไวรัสได้เมื่อมีการใช้โคลโตซานอย่างสม่ำเสมอ

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ (2546) ได้จำแนกประโยชน์ของโคลโตซานต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งไว้ดังนี้

1. ช่วยทำให้กุ้งมีอัตราการรอดเพิ่มขึ้น โตเร็ว เนื่องจากสามารถสร้างเปลือกได้สมบูรณ์ แข็งแรงมากขึ้น ทำให้กุ้งมีการลอกคราบบ่อย จึงสามารถเปลี่ยนระยะการเจริญเติบโตได้เร็วขึ้น
2. ช่วยให้กุ้งมีการเจริญเติบโตที่สม่ำเสมอ ไม่แตกไซส์
3. เพิ่มประสิทธิภาพของการใช้อาหาร ส่งผลให้กุ้งมีอัตราแลกเนื้อต่ำลง
4. ช่วยในการเสริมสร้างกล้ามเนื้อของกุ้ง
5. ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานโรค
6. ทำให้กุ้งมีสุขภาพแข็งแรง ตัวโต คืดตัวดี มีสีเข้ม
7. ลดปัญหาการป่วยของกุ้ง จากการติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไวรัสต่าง ๆ

เนื่องจากโคลดินและโคลโตซานมีส่วนช่วยทำให้พัฒนาการของกุ้งมีการสร้างระบบภูมิคุ้มกันโรคได้ดีขึ้น

### 3.5.2 สารส้ม (Aluminium Sulfate)

สารส้มเป็นสารประกอบของอะลูมิเนียม ซึ่งมีสูตรเคมี คือ  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 14.3H_2O$  (มันสิน ตันกุลเวศม์, 2537) ทั้งนี้ จากการศึกษาของชวดี อินสำราญ (2543) ที่ศึกษาถึงผลของการเก็บเกี่ยวและการเจริญหลังการเก็บเกี่ยวสาหร่าย 4 ชนิด ได้แก่ สาหร่าย *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus*, *Closterium acerorum* โดยใช้สารตกตะกอน 4 ชนิด คือ สารส้ม เฟอริคคลอไรด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 50, 100, 150, 200 และ 250 ส่วนในล้าน พบว่า สาหร่าย *Scenedesmus acutus* จะมีผลการเก็บเกี่ยวและการเจริญหลังการเก็บเกี่ยวดีที่สุดเมื่อใช้สารส้มที่ระดับความเข้มข้น 100 ส่วนในล้าน เป็นสารตกตะกอน ซึ่งความสามารถในการตกตะกอนของสาหร่ายแต่ละชนิดนั้นจะขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้เป็นสารตกตะกอน คือเมื่อมีการใช้ความเข้มข้นของสารตกตะกอนในระดับที่สูงขึ้นจะให้ผลในการเก็บเกี่ยวสาหร่ายได้ดีขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ เฉลิมชัย อยู่สำราญ และปรเมษฐ์ พลอยประดับ (2546) ที่ศึกษาถึงผลของสารตกตะกอนต่อ *Chaetoceros* โดยใช้สารส้ม เป็นสารตกตะกอน

ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 62.5, 125, 250 และ 500 ส่วนในล้าน พบว่า เมื่อมีใช้ความเข้มข้นของสารตกตะกอนที่สูงขึ้นจะส่งผลต่อการตกตะกอน *Chaetoceros* ได้มากขึ้น ซึ่งจะให้ผลในการเก็บเกี่ยวได้ดีที่สุดเมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้น 250 ส่วนในล้าน ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 125 ส่วนในล้าน จะให้ผลการเจริญภายหลังการตกตะกอนดีกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ทั้งนี้ ในการศึกษาของ อัชฌา ปานแก้ว, สรวิศ เผ่าทองสุข, วรณวิมล คล้ายประดิษฐ์ และจินตนา สและน้อย (2554) ถึงวิธีการเก็บเกี่ยวสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ด้วยวิธีการกรองแบบแบ่งส่วนและการตกตะกอนด้วยสารส้ม ระดับความเข้มข้น 100 ส่วนในล้าน เป็นเวลา 45 นาที พบว่า สาหร่าย *Thalassiosira* sp. ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวทั้ง 2 วิธี มีอัตราการรอดไม่แตกต่างกัน แต่วิธีการตกตะกอนด้วยสารส้มนั้นจะทำให้เกิดการบอบช้ำของเซลล์ ในระหว่างการเก็บเกี่ยวได้น้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตาม การใช้สารเพื่อช่วยในการตกตะกอนถือว่าเป็นการเพิ่มสารสังเคราะห์ลงในอาหาร ควรมีการตรวจสอบถึงปริมาณที่จะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และสุขภาพของผู้บริโภค

### 3.5.3 เฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric Chloride)

เฟอร์ริกคลอไรด์เป็นสารประกอบของเหล็ก ซึ่งมีสูตรเคมี คือ  $Fe_3Cl$  (มันสิน ตันฑุลเวศม์, 2537) จากการศึกษาของยูวดี อินสำราญ (2543) ถึงผลการเก็บเกี่ยวและการเจริญภายหลังการเก็บเกี่ยวสาหร่าย 4 ชนิด ได้แก่ *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus*, *Closterium acerorum* โดยใช้สารตกตะกอน 4 ชนิด คือ สารส้ม เฟอร์ริกคลอไรด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 50, 100, 150, 200 และ 250 ส่วนในล้าน พบว่า เฟอร์ริกคลอไรด์ จะให้ผลการเก็บเกี่ยวและการเจริญภายหลังการเก็บเกี่ยวได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 100 ส่วนในล้าน เมื่อใช้ตกตะกอนสาหร่าย *Spirulina platensis*

สรุป สารที่ใช้ในการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* โดยทั่วไปมีหลายชนิดที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งแต่ละชนิดต่างมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกับขึ้นกับสภาวะแวดล้อม ความเข้มข้นของสารความเป็นพิษ และชนิดของสาหร่าย ทั้งนี้ ไคโตซานเป็นหนึ่งในสารที่นิยมนำมาใช้ในการตกตะกอน เนื่องจากเป็นโพลีเมอร์ธรรมชาติ มีความปลอดภัยสูง และยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของลูกกุ้งได้ ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้สาร ไคโตซานในการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ระดับความเข้มข้นของสารต่าง ๆ กัน เพื่อให้ทราบถึงปริมาณสารที่เหมาะสมในการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ซึ่งจะช่วยในการประหยัดงบประมาณที่ใช้สารตกตะกอนได้

#### 4. การเก็บรักษาเซลล์ *Chaetoceros*

การเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายโดยทั่วไปแล้วมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เซลล์มีชีวิตรอด สามารถเก็บเป็นสต็อกได้นาน มีคุณภาพดี ไม่มีเชื้ออื่นปะปน และป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ทั้งนี้วิธีการเก็บรักษาเซลล์สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้ (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2553)

##### 4.1 วิธีการเก็บรักษาเซลล์ (Preservation)

วิธีการโดยทั่วไปที่นิยมใช้กันในการเก็บรักษาเซลล์ มีดังนี้

###### 4.1.1 การต่อเชื้อ (Subculture)

เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารที่เหมาะสมภายในหลอดหรือขวดแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อเจริญแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และต้องต่อเชื้อลงบนอาหารใหม่อีกครั้งก่อนที่เชื้อเก่าจะตาย โดยระยะเวลาของการต่อเชื้อที่ไม่เสี่ยงต่อการสูญเสียเชื้อนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ใช้อุปกรณ์ราคาถูก ทำได้ง่าย เครื่องมือไม่ซับซ้อน แต่ต้องใช้แรงงานมาก เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้ออื่นและการเปลี่ยนแปลงลักษณะเมื่อมีการต่อเชื้อบ่อย ๆ

###### 4.1.2 การทำแห้ง (Drying)

เป็นวิธีการเก็บรักษาโดยการนำน้ำออกและไม่ให้เกิดความชื้นอีก ส่วนใหญ่ใช้เก็บพวกเชื้อราหรือสาหร่ายที่สร้างสปอร์ ซึ่งจะมีความทนทานต่อความแห้งมากกว่ากลุ่มอื่น

###### 4.1.3 การทำแห้งจากของเหลว (Liquid Drying หรือ L-drying)

เป็นวิธีการทำแห้งภายใต้สุญญากาศเพื่อถนอมเชื้อที่ไว (Sensitive) ต่อการเยือกแข็งโดยไม่ต้องเยือกแข็งเชื้อ

###### 4.1.4 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying)

เป็นกระบวนการที่ทำให้น้ำระเหยไปจากสารแขวนลอยเชื้อที่เยือกแข็งแล้ว โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อ นำไปทำให้เยือกแข็งและนำเข้าสู่ระบบสุญญากาศ น้ำในเซลล์จะถูกดึงออกโดยการระเหิด และถูกจับไว้ที่เครื่องควบแน่นซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ (Refrigerated Condenser) ข้อดีของวิธีนี้คือเหมาะสมต่อการเก็บรักษาเชื้อจำนวนมาก โดยที่เชื้อจะอยู่ในสภาพแห้งและแข็ง แต่ยังมีชีวิตอยู่และสามารถเก็บเชื้อไว้ได้นาน ส่วนข้อเสียคือ มีค่าใช้จ่ายสูงในการซื้อเครื่องมือ และต้องใช้แรงงานมากหากเก็บเชื้อจำนวนมาก

###### 4.1.5 การเยือกแข็งหรือแช่แข็ง (Freezing)

เป็นการเก็บรักษาเชื้อโดยทำให้เยือกแข็ง มีหลายวิธี เช่น การเก็บบนเม็ดแก้ว (Glass bead) ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อในกลีเซอรอล หยอดสารแขวนลอยเชื้อลงบน

เม็ดแก้วภายในขวด (Vial) แล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส หรือ ไอไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -140 องศาเซลเซียส ซึ่งวิธีการนี้จะมีการรอดชีวิตและความคงที่ของเชื้อสูง แต่มีข้อเสียคือ ไนโตรเจนเหลวนั้นระเหยได้และต้องเติมใหม่อยู่เสมอ ค่าใช้จ่ายสูง เสี่ยงต่อการระเบิดหรือแตกของภาชนะที่เป็นแก้ว โดยไนโตรเจนเหลวอาจเข้าไปตามรูรั่วและขยายตัวอย่างรวดเร็ว

#### 4.1.5.1 หลักการแช่แข็ง

เป็นการทำให้ตัวอย่างเยือกแข็ง คือ น้ำที่มีอยู่กลายเป็นน้ำแข็ง โดยน้ำนี้จะมีผลต่อเซลล์เมื่อน้ำถูกดึงออก และกลายเป็นน้ำแข็ง การทำเยือกแข็งนั้นแบ่งตามอุณหภูมิที่ใช้ ได้แก่ อุณหภูมิ -20, -30, -40, -70, -140 และ -196 องศาเซลเซียส (ยูดี พีรพรพิศาล และฉมภรณ์ นิवासบุตร, 2546) นอกจากนี้ การทำให้ตัวอย่างเยือกแข็งจะเกิดผลต่อตัวอย่างสามประการ คือ ประการที่หนึ่ง ตัวอย่างจะถูกขจัดน้ำออกบางส่วน (Partial Dehydration) ของแข็งบางอย่างมีน้ำอยู่จะเข้มข้นมากขึ้นจึงต้องรักษาอุณหภูมิให้ต่ำพอเพื่อให้ตัวอย่างเยือกแข็งตลอดกระบวนการ ประการที่สอง ความแข็งตัวของโครงสร้างตัวอย่าง (Stiffening of structure) ขึ้นอยู่กับส่วนผสมในการแข็งของน้ำและส่วนที่ไม่เยือกแข็ง ประการสุดท้าย สันฐานวิทยาของตัวอย่าง โดยลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างมีผลต่อขนาดตำแหน่งและทิศทางของการเกิดผลึกน้ำแข็ง โดยที่ความเสียหายของเซลล์มักจะเกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการทำให้เย็นลง และการละลาย (Thawing) เมื่อต้องการนำเชื้อไปเพาะเลี้ยงใหม่ ความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์ จะเพิ่มขึ้นขณะน้ำถูกดึงออกไปหรือการเกิดผลึกน้ำแข็งจะทำลายเซลล์ ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่จะรอดชีวิตในกรณีที่ทำให้เยือกแข็งโดยการลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ เนื่องจากผลึกของน้ำแข็งที่เกิดขึ้นจะเรียงตัวกันอย่างมีทิศทาง และเซลล์ส่วนใหญ่จะตายในกรณีที่ทำให้เยือกแข็งโดยการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้ผลึกน้ำแข็งเรียงตัวกันอย่างไม่มีทิศทางและอาจเป็นผลเสียต่อเซลล์เพื่อที่จะลดความเสียหายต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นกับตัวเซลล์ กระบวนการแช่แข็งนี้สามารถทำได้โดยการปรับอัตราการทำความเย็น การเพิ่มอุณหภูมิและการเติมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง เช่น ไคเมทิลซัลฟอกไซด์ หรือกลีเซอรอล ลงในสารแขวนลอยเชื้อ เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำ ๆ อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้เซลล์รอดชีวิตมากขึ้น (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2553)

#### 4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์

การเก็บรักษาเซลล์สามารถทำได้หลายวิธีตามความแตกต่างของระยะเวลาการเก็บรักษาและลักษณะทางชีววิทยาหรือลักษณะทางสันฐานวิทยาของสายแต่ละชนิด โดยปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ มีดังนี้ (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2553)

#### 4.2.1 ปัจจัยภายใน (Intrinsic Factors)

การรอดชีวิตของเซลล์หลังจากเยือกแข็งสามารถตัดสินใจได้จากการเลือกชนิดของเซลล์และภาวะการเลี้ยงก่อน และหลังเยือกแข็ง เซลล์สาหร่ายที่อยู่ในระยะพักตัวจะมีน้ำอยู่น้อยและทนต่อการทำลายมากกว่าเซลล์ที่มีน้ำมาก และการเลือกไซโทคหรือซีสต์จะเก็บรักษาได้ดีกว่า ภาวะการเจริญที่ควรตรวจสอบมีดังนี้

4.2.1.1 อุณหภูมิของการเจริญ (Growth Temperature) ความต้านทานต่อการเยือกแข็งของสาหร่ายน้ำจืดและสาหร่ายทะเลชนิดเซลล์เดี่ยว รวมทั้ง ciliated protozoa จะเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำก่อนนำไปทำการเก็บรักษาด้วยความเย็น

4.2.1.2 อายุของเชื้อ (Age of Culture) เซลล์ของสาหร่ายขณะที่กำลังแบ่งตัวในระยะเพิ่มจำนวนทวีคูณ (ระยะที่ 2) จะมีความไวต่อการทำลายด้วยการเยือกแข็งมากกว่าเซลล์ในระยะคงที่ (ระยะที่ 4) เนื่องจาก ในช่วงปลายของระยะคงที่ การเจริญของเซลล์ถูกจำกัดอาหารและปัจจัยทางกายภาพ ทำให้เกิดการสะสมไขมัน แวกิวโอลมีขนาดลดลงและกรดไขมันที่เมมเบรนเปลี่ยนแปลงไป

4.2.1.3 การจำกัดอาหาร (Nutrient Limitation) การลดอัตราการเจริญของสาหร่ายโดยการจำกัดอาหารจะทำให้เชื้อทนทานต่อการเยือกแข็งการลดไนเตรต และไปคาร์บอนเนต จะเป็นตัวกระตุ้นให้มีความต้านทานสูงขึ้นต่อความเยือกแข็ง

#### 4.2.2 ปัจจัยภายนอก (Extrinsic Factors)

ปฏิกิริยาภายนอกระหว่างกระบวนการเยือกแข็งและการละลาย รวมทั้งการเติมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ ได้แก่

4.2.2.1 การช็อคด้วยความเย็น (Cold Shock) เซลล์หลายชนิดถูกทำลายเมื่อลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเรียกว่า cold shock protists การลดการทำลายของเซลล์ที่ไวต่อความเย็นทำได้โดยลดอัตราการลดของอุณหภูมิเซลล์บางชนิดขณะที่กำลังแบ่งตัวอย่างรวดเร็วซึ่งจะไวต่อความเย็นจึงควรเลือกเซลล์ที่อยู่ในระยะคงที่ (ระยะที่ 4)

4.2.2.2 อัตราของความเย็น (Rate of Cooling) เซลล์บางชนิดมีความต้านทานภายในต่อการทำลายเมื่อเยือกแข็งและการละลายจากอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส การรอดชีวิตจึงขึ้นอยู่กับอัตราของความเย็น

4.2.2.3 การเติมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง (Cryoprotective Additive) เพื่อลดการทำลายเซลล์ระหว่างการละลายและการเยือกแข็ง

สรุป การเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายในปัจจุบันมีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีที่แตกต่างกัน แต่การจะเลือกวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาได้ดีมากหรือน้อยนั้น ย่อมขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายในของการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของเซลล์ที่ทำการเก็บรักษา ทั้งนี้ การแช่แข็งเป็นวิธีการที่ง่าย และให้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการอื่น ๆ นอกจากนี้ยังช่วยประหยัดงบประมาณของอุปกรณ์ที่ใช้ได้ ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้จึงเลือกวิธีการเก็บรักษาเซลล์ *Chaetoceros* ด้วยการแช่แข็ง เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย สามารถนำไปขยายผลและปรับใช้แก่เกษตรกรต่อไปได้

### 4.3 สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง (Cryoprotectant)

สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง เป็นสารที่เติมลงไปในกระบวนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ๆ เพื่อปกป้องเซลล์จากความเย็นและการแข็งตัวของน้ำภายในเซลล์ มีรายละเอียดดังนี้

#### 4.3.1 บทบาทและหน้าที่ของสารป้องกันความเย็น

จากการศึกษาของ Franks (1982) ที่ศึกษาถึงคุณสมบัติของสารละลายในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส พบว่า ลักษณะการเจริญของผลึกน้ำแข็งนั้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอัตราการทำความเย็น และอาจมีผลต่อการฟื้นตัวของเซลล์หลังจากการเก็บรักษาขึ้นอยู่กับอัตราความร้อนที่ใช้ในการละลาย หลังจากนิวเคลียสเกิดการเกาะรวมตัวเป็นน้ำแข็งอีกด้วย อย่างไรก็ตามเซลล์ส่วนใหญ่มีชีวิตรอดหลังการละลายดีขึ้นเมื่อใช้อัตราการทำความเย็นในช่วง 0.25 - 16 องศาเซลเซียสต่อวินาที และจากการศึกษาของ Nakhla et al. (2002) พบว่า การแช่แข็งอาจจะส่งผลกระทบต่อความเสถียรของไลโปโซม เนื่องจากมีความเครียดทางกลที่เกิดจากการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งในระหว่างการแช่แข็ง สามารถทำให้เกิดความเสียหายของเยื่อไลโปโซมได้ ในระหว่างการแช่แข็งทำให้เกิดภาวะขาดน้ำเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของสารละลายภายในสูง ทำให้เกิดความเป็นพิษในไลโปโซม สอดคล้องกับจากการศึกษาของ Stark et al. (2010) ที่ศึกษาถึงผลกระทบของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งในการเก็บรักษาต่อโครงสร้างของไลโปโซมในเซลล์สิ่งมีชีวิต พบว่า สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งมีส่วนช่วยในการยับยั้งการหลอมละลายของไลโปโซมจากการเสื่อมสภาพระหว่างการแช่แข็งและการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งในระหว่างการแช่แข็ง ทั้งนี้ Acker and McGann (2003) ทำการศึกษาถึงผลของการป้องกันการเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์ในระหว่างการแช่แข็ง พบว่า ความเย็นและการแช่แข็งส่งผลกระทบต่อได้รับบาดเจ็บของเซลล์ในระหว่างแช่แข็งเมื่อมีการสัมผัสกับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารละลาย โดยการ ก่อตัวของน้ำแข็งภายในเซลล์ และจากการทบทวนวรรณกรรมของ Muchlisin (2005) ถึงสภาพ

ปัจจุบันของสารละลายน้ำแข็งและสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง ในการเก็บรักษาอสุจิปลา พบว่า สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง มีความจำเป็นมากต่อการปกป้องเซลล์จากผลกระทบของความเสียหายที่เกิดจากการก่อตัวของน้ำแข็งภายในเซลล์ ในช่วงก่อนกระบวนการแช่แข็ง ในระหว่างการแช่แข็งและหลังการละลาย สอดคล้องกับจากการศึกษาของ Yu and Quinn (2000) ที่พบว่า ประสิทธิภาพของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ช่วยจำกัดการเกิดผลึกน้ำแข็งอย่างสมบูรณ์ หลีกเลี่ยงเกิดผลึกน้ำแข็งหรือช่วยลดขนาดผลึกน้ำแข็งซึ่งมักจะเกิดได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ การศึกษาของ Day and Brand (2005) ได้ศึกษาถึงวิธีการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งสำหรับการเก็บรักษาสาหร่ายจากการเพาะเลี้ยง พบว่า ความสำเร็จในการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งเซลล์สาหร่ายทะเลขึ้นอยู่กับ การประยุกต์ใช้อัตราการทำความเย็น ร่วมกับการเติมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมจะช่วยให้เกิดสมดุลออสโมติก (osmotic balance) และลดการที่นิวเคลียสเกิดการเกาะรวมตัวกันเป็นน้ำแข็ง (ice nucleation) ลดความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ และอาจเพิ่มขึ้นถึงระดับที่เป็นพิษ

#### 4.3.2 ประเภทของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง

กิจกรรมของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง จะสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของสารนั้น โดยทั่วไปแล้วสารที่สามารถป้องกันความเย็นได้จะต้องมีหมู่ไฮโดรเจนคาร์บอนอยู่ในโมเลกุลด้วยสามหมู่หรือมากกว่า ซึ่งการเติมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง นี้สามารถเลือกใช้ได้แตกต่างกัน สามารถแบ่งกลุ่มสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง หรือสารที่ใช้เคลือบเซลล์ตามคุณสมบัติความเป็นกรดหรือเบส การเป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) คือ สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่สารอื่น และขนาดของโมเลกุล ได้ดังนี้ (สมบูรณ์ चनाศุกวัฒน์, 2553)

4.3.2.1 สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกกรด (Acidic Monomers) เช่น กลูตาเมต (glutamate) แอสพาราจีน (asparagine) มาเลต (malate) และแอสปาเตต (aspartate) เป็นต้น

4.3.2.2 สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกเป็นกลาง (Neutral Monomers) เช่น กลีเซอรอล (glycerol) กลูโคส (glucose) แลคโตส (lactose) ซูโครส (sucrose) แรฟฟิโนส (raffinose) ซอร์บิทอล (sorbitol) ไซลิตอล (xylitol) อินโนซิทอล (inositol) และดีแอล-ทรีโอนีน (DL-threonine) เป็นต้น

4.3.2.3 สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกเบส (Basic Monomers) เช่น ไลซีน (lysine) และอาร์จินีน (arginine) เป็นต้น



4.3.2.4 สารประกอบจำพวกโพลีเมอร์และดีเกรเดทีฟ(Polymers and its Degradatives) เช่น อัลบูมิน (albumin) เจลาติน มิวซิน (mucin) เปปโตน (peptone) แป้ง เดกสตริน (dextrin) เพคติน (pectin) โพลีเมอร์ของซูโครส เดกสเตรน (dextran) ส่วนสกัดจากเนื้อ ส่วนสกัดจากยีสต์ โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinylpyrrolidone) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose) และ ฟีคอล (phocol) เป็นต้น

4.3.2.5 สารประกอบธรรมชาติ (Natural Substances) เช่น หางนมและซีรัม เป็นต้น

4.3.2.6 สารประกอบจำพวกรีดิวซ์ (Reducing Agents) เช่น แอสคอร์เบต (ascorbate) ซีสทีอีน (cysteine) ไฮดรอกซีลามีน (hydroxylamine) และ เซมิคาร์บาไซด์ (semicarbazide) เป็นต้น

4.3.3 ชนิดของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง ที่นิยมใช้ในการเก็บรักษาเซลล์

4.3.3.1 กลีเซอรอล (glycerol)

กลีเซอรอล หรือที่นิยมเรียกว่า กลีเซอริน (glycerine) มีชื่อทางเคมีว่า 1,2,3 โพรเพนไตรออล (1,2,3 Propanetriol) ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1779 โดยนักเคมีชาวสวีเดนชื่อ K.W. Scheele ในขณะที่ทำการสกัดน้ำมันมะกอก สารที่ค้นพบนี้มีความหวานตามธรรมชาติ แต่มีคุณสมบัติแตกต่างจากน้ำตาล ต่อมามีการค้นพบว่า สารดังกล่าวสามารถสกัดได้จากน้ำมันพืช และไขมันสัตว์ในรูปของเอสเทอร์ที่เรียกกันทั่วไปว่า กลีเซอไรด์ โดยคุณสมบัติ และลักษณะทั่วไปของกลีเซอรอล มีดังนี้ (วิชา สุนทรเวช, 2546)

#### 1. คุณสมบัติของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่พบได้โดยทั่วไปมีสูตรโครงสร้าง คือ  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$  ลักษณะเป็นของเหลว สี ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีความข้นหนืด มีจุดหลอมเหลว (melting point) ที่อุณหภูมิ 17.8 องศาเซลเซียส จุดเดือด (boiling point) ที่อุณหภูมิ 290 องศาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.261 และมีมวลโมเลกุล เท่ากับ 92.09 กลีเซอรอลเป็นสารประเภท ไตรไฮดริกแอลกอฮอล์ (trihydric alcohol) เนื่องจากโครงสร้างมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ทำให้สามารถละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ คุณสมบัติที่สำคัญของกลีเซอรอลมีดังนี้

- 1) กลีเซอรอลไม่สามารถถูกออกซิไดซ์ (oxidize) จึงมีความคงตัวสูง (high stability)
- 2) ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของ สี และกลิ่นรส เมื่อถูกเก็บไว้เป็นเวลานาน

3) สามารถเกิดสภาวะซูเปอร์คูล (supercool) ได้และทนต่อสภาวะการแช่เยือกแข็งและการละลาย

4) มีความดันไอต่ำและไม่ระเหยที่อุณหภูมิปกติ เป็นสารที่ไม่มีพิษ (nontoxic) ต่อระบบการย่อยอาหาร ผิวหนัง และเนื้อเยื่ออ่อน ๆ

5) ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

## 2. ความเป็นพิษของกลีเซอรอล

ปกติแล้วกลีเซอรอลจะมีความเป็นพิษต่ำ แต่มีรายงานในสัตว์ทดลอง พบว่า การสูดดมกลีเซอรอลเข้าไป หรืออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูง ๆ อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองระบบทางเดินหายใจ หรือทำให้ผิวหนังเสียความชุ่มชื้นได้

3. ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์ กรมควบคุมมลพิษ, 2544 ข)

กลีเซอรอลสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่าย ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในระดับต่ำ ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ หากมีการใช้และการจัดการอย่างเหมาะสม

4.3.3.2 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide: DMSO) (ศูนย์พัฒนานโยบายแห่งชาติด้านสารเคมี สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2552)

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ หรือนิยมเรียกย่อ ๆ ว่า ดีเอ็มเอสโอ (DMSO) มีสูตรทางเคมี คือ  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$  ลักษณะเป็นของเหลว ไม่มีสี สามารถละลายตัวเมื่อได้รับความร้อน หรือการเผาไหม้ ทำให้เกิดเป็นควันพิษ มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 18.5 องศาเซลเซียส จุดเดือดที่อุณหภูมิ 189 องศาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.1 และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 78.1 หากมีการสัมผัสสารในระยะยาว หรือได้รับสารซ้ำ ๆ ที่ผิวหนังอาจก่อให้เกิดอาการอักเสบที่ผิวหนัง มีผลต่อตับและเลือด ทำให้การทำงานของปอดพร่อง ทำลายเม็ดเลือดแดง

4.3.3.3 เมทานอล (Methanol) (ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์ กรมควบคุมมลพิษ, 2544 ค)

เมทานอล หรือ เมทิลแอลกอฮอล์ สูตรโครงสร้าง คือ  $\text{CH}_3\text{O}$  ลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีกลิ่นเฉพาะตัว มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ  $-97.8$  องศาเซลเซียส จุดเดือดที่อุณหภูมิ  $64.6$  องศาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ  $0.79$  และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ  $32$  หากมีการสัมผัสสารบ่อย ๆ หรือเป็นเวลานาน จะทำให้ผิวหนังอักเสบ เมทานอลสามารถดูดซึมผ่านผิวหนังมีผลทำให้ระบบประสาทส่วนกลางถูกกดทำให้ปวดศีรษะ ง่วงนอน เวียนศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ถ้ามีการสัมผัสปริมาณมาก

อาจทำให้เกิดอาการ โคม่า และตายได้ นอกจากนี้ยังมีผลกระทบต่ออาการมองเห็น โดยปกติอาการจะรุนแรงขึ้นหลังจากการสัมผัสสาร 12 - 18 ชั่วโมง

4.3.3.4 เอทิลีนไกลคอล (Ethylene glycol) (ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์ กรมควบคุมมลพิษ, 2544 ก)

เอทิลีนไกลคอล มีชื่อทางเคมีว่า 1, 2-เอเทนไดออล (1,2-Ethanediol) สูตรโครงสร้างคือ  $C_2H_6O_2$  ลักษณะเป็น ของเหลว ใส คล้ายน้ำมัน ไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ -13 องศาเซลเซียส จุดเดือดที่อุณหภูมิ 197.6 องศาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.1 และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 62.07 หากมีการสัมผัสสารในระยะยาว หรือได้รับสารซ้ำ ๆ อาจก่อให้เกิดปัญหาารุนแรงต่อตับ ไต และก่อให้เกิดอันตรายต่อสมอง และทารกในครรภ์ได้

4.3.3.5 โพรไพลีนไกลคอล (Propylene glycol) (ศูนย์พัฒนานโยบายแห่งชาติด้านสารเคมี สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2540)

โพรไพลีนไกลคอล มีชื่อทางเคมีว่า 1,2-โพรเพนไดออล (1,2-Propanediol) สูตรโครงสร้างคือ  $CH_3CHOHCH_2OH$  ลักษณะเป็น ของเหลวหนืด ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ -59 องศาเซลเซียส จุดเดือดที่อุณหภูมิ 188.2 องศาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.04 และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 76.09 โพรไพลีนไกลคอล สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้จากการสูดดม ไอของสาร และการกลืนกิน

4.3.4 ผลของการใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง

Hubálek (2003) ได้รวบรวมรายงานการใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งที่ใช้ในการรักษาเซลล์ของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กลง ๆ คือ ไวรัส แบคทีเรีย รา สาหร่าย และโปรโตซัว พบว่า สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดในการรักษาเซลล์ ได้แก่ ไคเมทิลซัลฟอกไซด์ เมทานอล เอทิลีนไกลคอล โพรไพลีนไกลคอล และซีรัม หรือซีรัมอัลบูมิน สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ประสบความสำเร็จปานกลาง ได้แก่ กลีเซอรอล โพลีเอทิลีนไกลคอล โพลีไวนิลไพโรลิโดล และซูโครส ส่วนสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ประสบความสำเร็จน้อยที่สุด ได้แก่ น้ำตาลต่าง ๆ เดกซ์ทราน ไฮดรอกซีเอทิลสตาร์ต ซอร์บิทอล และนม เป็นต้น ซึ่ง ไคเมทิลซัลฟอกไซด์ เป็นสารที่ได้รับนิยมใช้กันมากโดยทั่วไปในปัจจุบัน แม้ว่าจะมีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งชนิดอื่นที่ให้ผลดีต่อการฟื้นตัวของเซลล์มากกว่า เนื่องจาก ไคเมทิลซัลฟอกไซด์ มีประสิทธิภาพดีที่สุดต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด แต่ก็แสดงให้เห็นถึงเป็นพิษสูงเช่นกัน

4.3.4.1 ผลของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งต่อเซลล์สาหร่าย  
 สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง ถูกนำมาใช้เพื่อยืดอายุในการ  
 เก็บรักษาสาหร่ายที่เป็นอาหารสำรองในโรงเพาะฟัก เพื่อเพิ่มความสะดวกในให้อาหาร และการจัดการ  
 โดยสามารถนำหัวเชื้อสาหร่ายที่เก็บรักษาไว้มาใช้ได้ทันทีตามความต้องการ (Tzovenis et al., 2004)  
 ทั้งนี้ ได้มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องต่อการใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งชนิดต่าง ๆ  
 ในการเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย แสดงในตารางที่ 2-1 ดังนี้

ตารางที่ 2-1 การศึกษาที่เกี่ยวข้องต่อการใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งโดยการลดจุดเยือกแข็งชนิดต่าง ๆ  
 ในการเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย

สาร	การศึกษาที่เกี่ยวข้อง	อ้างอิง
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)	- เป็นพิษกับสาหร่าย <i>Chlorella</i> และ <i>Cryptocodinium</i> เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่ > 2.5 เปอร์เซ็นต์	Morris (1976); Simione and Daggett (1976); Joseph et al. (2000)
	- ใช้เก็บรักษาสาหร่าย <i>Chaetoceras</i> , <i>Nannochloris</i> , <i>Rhodomonas</i> , <i>Isochrysis</i> , <i>Nannochloropsis</i> และ <i>Tetraselmis</i> พบว่า จะเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุดเมื่อเก็บ รักษาที่อุณหภูมิ 0 ถึง -5 องศาเซลเซียส โดยเซลล์ สามารถทนได้ถึงระดับความเข้มข้น 20 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์	Cañavate and Lubian (1994)
	- มีความเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่ายทะเลในระดับความ เข้มข้น > 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาเก็บใน ไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ยกเว้นใน <i>Tetraselmis chuii</i> ที่สามารถทนต่อความเป็นพิษได้ถึง ระดับความเข้มข้นที่ > 20 เปอร์เซ็นต์ - ใช้เก็บรักษาเซลล์ของ <i>Chaetoceros</i> sp. ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่อเก็บรักษาเซลล์จำนวน $1 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะให้ผลดีที่สุด คือ 15 วัน	Cordero and Voltolina (1997)

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

สาร	การศึกษาที่เกี่ยวข้อง	อ้างอิง
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) (ต่อ)	- เมื่อนำมาใช้ในการเก็บรักษาเซลล์ของสาหร่าย พบว่า สาหร่าย <i>Chlorella minutissima</i> , <i>C. stigmatophora</i> สามารถทนได้จนถึงระดับความเข้มข้นที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในขณะที่สาหร่าย <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> นั้นไม่สามารถทนต่อระดับความเข้มข้นที่ > 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรได้	Tzovenis et al. (2004)
	- เมื่อนำมาใช้ในการเก็บรักษาเซลล์ของสาหร่าย <i>Nannochloropsis oculata</i> ที่ระดับความเข้มข้น 10-50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในไนโตรเจนเหลว พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น > 30 เปอร์เซ็นต์ จะส่งผลเป็นพิษต่อเซลล์	Gwo et al. (2005)
	- เมื่อนำมาใช้ในการเก็บรักษา <i>Haslea ostrearia</i> ที่ความหนาแน่น $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สามารถยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในการเก็บรักษาได้ดี แต่ให้อัตราการรอดชีวิตที่ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์	Anaëlle et al. (2012)
กลีเซอรอล (Glycerol)	- มีความเป็นพิษน้อยกว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์ เมื่อใช้กับสาหร่าย <i>C. marina</i> , <i>C. calcitrans</i> และ <i>Tetraselmis gracilis</i>	Fenwick and Day (1992); Joseph et al. (2000)

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

สาร	การศึกษาที่เกี่ยวข้อง	อ้างอิง
กลีเซอรอล (Glycerol) (ต่อ)	- นำมาใช้เก็บรักษา <i>Chartoceros</i> sp. ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่า ให้ผลดีที่สุด สามารถเก็บรักษาได้นานถึง 30 วัน โดยให้ผลดีกว่าการใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน	Cordero and Voltolina (1997)
	- นำมาใช้เก็บรักษาเซลล์ในระดับความเข้มข้นสุดท้าย ที่ 1.1 โมล จะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการปกป้องเซลล์ <i>N. oculata</i> โดยเซลล์สามารถฟื้นตัวอย่างรวดเร็ว และมีความหนาแน่นเซลล์ในการเพาะเลี้ยงภายหลังการละลายดีที่สุดเมื่อผ่านไป 13 วัน	Poncet and Véron (2003)
	- เมื่อนำมาใช้ในการเก็บ <i>N. oculata</i> ในไนโตรเจนเหลว พบว่า มีอัตราการรอดสูงที่ระดับความเข้มข้น 10 - 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร	Gwo et al. (2005)
	- เมื่อนำมาใช้เก็บรักษา <i>H. ostrearia</i> พบว่า เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งดีกว่าการใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน แม้ไม่สามารถยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียได้	Anaëlle et al. (2012)
	- วิธีที่ดีที่สุดในการเก็บรักษา <i>C. calcitrans</i> คือ การแช่แข็งโดยเติมกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะสามารถเก็บรักษาเซลล์ให้มีชีวิตรอดทั้งหมดได้ นานถึง 6 สัปดาห์	นิริวดี ทุมวัน (2543)

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

สาร	การศึกษาที่เกี่ยวข้อง	อ้างอิง
เมทานอล (Methanol)	- เมื่อนำไปใช้ในการเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว พบว่า หากใช้เมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะไม่ให้ผลในการปกป้องเซลล์สาหร่าย <i>Rhodomonas baltica</i> , <i>I. galbana</i> , <i>C. gracilis</i> และ <i>T. chuii</i>	Cañavate and Lubinn (1994)
	- เมื่อนำมาใช้ในการเก็บรักษาเซลล์ของสาหร่ายทะเล พบว่า <i>I. galbana</i> ไม่สามารถทนต่อการใช้เมทานอลใน ระดับความเข้มข้นที่ > 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรได้ ในขณะที่ <i>C. stigmatophora</i> และ <i>D. tertiolecta</i> สามารถอยู่รอดได้ดีจนถึงความเข้มข้นที่ 1.6 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร	Tzovenis et al. (2004)
	- เมื่อนำมาใช้เก็บรักษา <i>N. oculata</i> ที่ระดับความเข้มข้น 10 - 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในไนโตรเจนเหลว พบว่า ความเข้มข้น > 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะเป็นพิษต่อเซลล์	Gwo et al. (2005)
	- ให้ผลดีที่สุดในการเก็บรักษาเซลล์ <i>H. ostrearia</i> ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แต่ไม่สามารถยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียได้	Anaëlle et al. (2012)

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

สาร	การศึกษาที่เกี่ยวข้อง	อ้างอิง
เอทานอล (Ethanol)	- เมื่อนำมาใช้ที่ระดับความเข้มข้น 2 - 10 เปอร์เซ็นต์ (ค่ามาตรฐาน 9 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับการเก็บรักษาด้วยวิธีการลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ ในอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที พบว่า เอทานอลจะมีความเป็นพิษสูง และสามารถปกป้องเซลล์ของสาหร่าย <i>Chlorella</i> ได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับเมทานอล	Morris (1980); Hubálek (2003)
เอทิลีนไกลคอล (Ethylene glycol)	- เมื่อนำมาใช้เก็บรักษา <i>N. oculata</i> ที่ระดับความเข้มข้น 10 - 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในไนโตรเจนเหลว พบว่า ความเข้มข้น > 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์	Gwo et al. (2005)
โพรพิลีนไกลคอล (Propylene glycol)	- เมื่อนำมาใช้ในการเก็บรักษาเซลล์ของสาหร่ายทะเล พบว่า มีความเป็นพิษที่ทำให้ <i>I. galbana</i> ตายในทุก ๆ ความเข้มข้น ในขณะที่ <i>D. tertiolecta</i> สามารถอยู่รอดได้ดีจนถึงระดับความเข้มข้นที่ 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร	Tzovenis et al. (2004)
	- เมื่อนำมาใช้เก็บรักษา <i>N. oculata</i> ที่ระดับความเข้มข้น 10 - 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในไนโตรเจนเหลว พบว่า ความเข้มข้น > 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์	Gwo et al. (2005)



ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

สาร	การศึกษาที่เกี่ยวข้อง	อ้างอิง
ซอร์บิทอล (Sorbitol)	- มีการนำไปใช้เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 1 - 36 เปอร์เซ็นต์ (ค่ามาตรฐาน 9 เปอร์เซ็นต์) ในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและมีการใช้ซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.5 โมล ผสมกับ ไคเมทิลซัลโฟลอสไตรีนความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ในสาหร่าย <i>Porphyra</i> และ <i>Tetraselmis</i>	Mazur (1966); Kuwano et al. (1993); Kuwano et al. (1996); Terauchi et al. (1997); Hubálek (2003)
โพลีไวนิลไพโรลิโดน (Polyvinylpyrrolidone)	- นำมาใช้ช่วยโดยทั่วไปในการเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 2 - 20 เปอร์เซ็นต์ (ค่ามาตรฐาน 10 เปอร์เซ็นต์) และมีการนำมาใช้เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งในการเก็บรักษาสาหร่าย	Morris (1976); Morris (1980); Benhra et al. (1994); Kono et al. (1997); Hubálek (2003)
แอล-โพรลีน (L-Proline)	- เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ได้จากธรรมชาติ พบว่า สามารถป้องกันความเย็นได้ในสาหร่าย	Kono et al. (1997); Kono et al. (1998)
กรดกลูตามิก หรือ โซเดียมกลูตาเมต (Glutamic acid or Sodium glutamate)	- มักใช้ในช่วงระดับความเข้มข้นระหว่าง 1 - 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น กลีเซอรอล หรือนมเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ในสาหร่ายทั่วไป เช่น <i>Scenedesmus</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Nitzschia</i> และ <i>Phaeodactylum</i>	Daily and Higgens (1973); Tsuru (1973)

สรุป สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายในปัจจุบันมีอยู่หลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดต่างให้ผลการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน โดยไคเมทิลซัลโฟลอสไตรีนให้ผลดีที่สุดในการเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย แต่เป็นพิษค่อนข้างสูง ขณะที่กลีเซอรอลเป็นสารที่สามารถสังเคราะห์ได้จากธรรมชาติ มีความเป็นพิษที่น้อยกว่า ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้กลีเซอรอล

เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง ในการเก็บรักษาเซลล์ *Chaetoceros* ที่ระดับอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อยืดระยะเวลาในการเก็บรักษา *Chaetoceros* อีกทั้งยังมีความปลอดภัยต่อลูกกุ้ง และสิ่งแวดล้อมมากกว่าสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งโดยการลดจุดเยือกแข็งชนิดอื่น ๆ เมื่อนำออกมาใช้เป็นอาหารในการอนุบาล

4.3.4.2 ผลของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งโดยการลดจุดเยือกแข็ง ต่อตัวอ่อนลูกกุ้ง จากการศึกษาถึงความเป็นพิษของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งโดยการลดจุดเยือกแข็งต่อเอ็มบริโอ และตัวอ่อนของลูกกุ้งระยะต่าง ๆ พบว่า กลีเซอรอลและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ก่อนข้างจะมีความเป็นพิษสูงต่อลูกกุ้งในเอ็มบริโอระยะต้น (morula stage embryos หรือ early-stage embryos) มากกว่าในเอ็มบริโอที่มีอายุมาก ซึ่งสามารถทนต่อความเข้มข้นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง และระยะเวลาในการสัมผัสสารที่เพิ่มขึ้นได้สูงกว่า โดยการศึกษาของ Newton and Subramoniam (1996) พบว่า เอ็มบริโอระยะต้นของกุ้งแช่บัว (*Penaeus indicus*) สามารถทนต่อการสัมผัสกับกลีเซอรอลและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ได้ไม่เกิน 0.5 และ 1.9 โมล ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอ่อนระยะนอเพเลียส (nauplius stage larvae) สามารถทนต่อการสัมผัสสารได้ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า โดยสามารถทนต่อกลีเซอรอล และเมทานอล ได้ถึง 3.2 และ 12.5 โมล ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Alfaro et al. (2001) ที่ทำการศึกษาใน เอ็มบริโอระยะต้น และเอ็มบริโอระยะปลาย (setae development stage หรือ late-stage embryos) ของกุ้งทราย (*Trachypenaeus byrdi*) ผลพบว่า เอ็มบริโอทั้งสองระยะสามารถทนต่อกลีเซอรอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ได้ไม่เกิน 1 โมล เช่นเดียวกับในกุ้งขาว พบว่า เอ็มบริโอระยะก่อนนอเพเลียส (pre-nauplius embryos) สามารถทนต่อไดเมทิลซัลฟอกไซด์ได้ที่ระดับความเข้มข้นไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ภายใต้การสัมผัสสารเป็นระยะเวลา 30 นาที หากนานกว่านี้จะส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การฟักที่ลดลง (Dong et al., 2004) และการศึกษาของ Vuthiphandchai et al. (2005) ที่ศึกษาถึงความเป็นพิษของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งโดยการลดจุดเยือกแข็งต่อเอ็มบริโอระยะต้น, เอ็มบริโอระยะกลาง (gastrula stage หรือ mid-stage embryos) และเอ็มบริโอระยะปลายของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบว่า เอ็มบริโอระยะต้นสามารถทนต่อการสัมผัสสารกลีเซอรอลได้ที่ระดับความเข้มข้นไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (ประมาณ 0.685 โมล) ภายใต้การสัมผัสสารเป็นเวลา 10 นาที ส่งผลให้มีอัตราการฟักดำไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เอ็มบริโอระยะกลาง และเอ็มบริโอระยะปลายสามารถทนได้และให้อัตราการฟักที่สูงกว่า คือ 61.8 - 65 และ 68 - 82.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันในสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ โดยเอ็มบริโอในแต่ละระยะจะมีอัตราการฟักต่ำลงเมื่อความเข้มข้นและระยะเวลาในการสัมผัสสารเพิ่มขึ้น แต่ในเอ็มบริโอระยะปลายจะทนต่อความเป็นพิษของ

สารแต่ละชนิดได้มากกว่า และเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารเอทิลีนไกลคอล พบว่า มีความเป็นพิษต่ำกว่ากลีเซอรอล และ ไคเมทิลซัลฟอกไซด์ ในเอ็มบริโอระยะต่าง ๆ ทั้งนี้ยังรวมถึงตัวอ่อนของ ลูกกุ้งนอเพเลียสระยะที่ 5 (nauplius V) และระยะโปรโตซัว (protozoa I) ของกุ้งขาว (Newton & Subramoniam, 1996; Dong et al., 2004)

#### 4.4 ผลของการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายในระยะยาว

Cordero and Voltolinah (1997) ได้ทำการศึกษาถึงผลของการเก็บรักษา *Charoceros* sp. ด้วยเทคนิคการแช่แข็งอย่างช้าที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ผลพบว่า เมื่อไม่มีการใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง การรอดชีวิตของเซลล์ *Charoceros* sp. ให้ผลดีหลังผ่านไป 7 วัน หากนานกว่านี้ การเจริญเติบโตของเซลล์จะลดลงตามลำดับ และเมื่อมีการใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง พบว่า กลีเซอรอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ต่ออัตราความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ที่  $1 \times 10^5$  ถึง  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ผลดีที่สุดในการเก็บรักษา โดยให้อัตราการรอดของเซลล์อยู่ในเกณฑ์ดีถึงปานกลาง สามารถเก็บรักษาเซลล์ *Charoceros* sp. ได้นานถึง 30 วัน นับได้ว่าให้ผลดีกว่าการใช้ ไคเมทิลซัลฟอกไซด์ในการเก็บรักษาที่ระดับความเข้มข้นและความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน

นิริวดี ทุมวัน (2543) ศึกษาถึงผลของการเก็บรักษา *C. calcitrans* พบว่า วิธีการเก็บแช่แข็ง ร่วมกับการเติมกลีเซอรอลเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง ที่ระดับเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เพื่อรักษาเซลล์สาหร่ายไม่ให้แตกระหว่างกระบวนการแช่แข็ง ก่อนจะนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -150 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปเก็บรักษาต่อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการที่ให้ผลดีที่สุดต่ออัตราการรอดของเซลล์ *C. calcitrans* โดยสามารถรักษาเซลล์ให้มีชีวิตรอดทั้งหมดได้นานถึง 6 สัปดาห์ และสามารถเก็บรักษาต่อได้นานถึง 18 สัปดาห์ ขณะที่วิธีการเก็บรักษาอื่น สามารถเก็บรักษารักษาเซลล์ให้มีชีวิตรอดทั้งหมดได้ในช่วง 2 - 4 สัปดาห์แรกเท่านั้น

วัชรวิ กัลยาลัง (2550) ศึกษาถึงเทคนิคการเก็บรักษาสาหร่ายพันธุ์สาหร่ายในระยะยาวจำนวน 150 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคการแช่แข็ง พบว่า อิทธิพลร่วมระหว่างคุณลักษณะของสายพันธุ์สาหร่าย ชนิดของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง และระยะเวลาการเก็บรักษา มีผลต่อการรอดชีวิตของสาหร่ายอย่างมีนัยสำคัญ โดยในกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวเมื่อใช้ไคเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และเมทานอลความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งจะสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 6 เดือน และมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าสาหร่ายที่ได้รับสิ่งทดลองอื่น ๆ

มานิตา โมธรรม (2552) ศึกษาถึงการเก็บรักษาสาหร่าย *S. platensis* สองสายพันธุ์ คือ *S. platensis* CMU2 และ *S. platensis* GD1 ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง โดยการลดชั้นของอุณหภูมิเป็นที่ 25, 4 และ -20 องศาเซลเซียส ขึ้นละ 30 นาที ตามลำดับ และนำตัวอย่างมาเก็บรักษาต่อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 เดือน โดยใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง 4 ชนิด ได้แก่ ไดมทิลซัลฟอกไซด์ ซีรัมม้า ซีรัมวัว และกลีเซอรอล ผลพบว่า อัตราการรอดชีวิตของสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) หลังการเก็บรักษา พบว่า โครงสร้างภายนอกและภายในเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ ผนังเซลล์ ไทลาคอยด์ และบริเวณนิวคลีโอพลาสซึม ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต ได้แก่ ความเข้มข้นของเซลล์ ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง และอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายเซลล์ ทั้งนี้ สภาวะที่เก็บรักษาสาหร่าย *S. platensis* ได้ดีที่สุด คือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์แบบไม่เจือจาง โดยใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง และการละลายเซลล์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าการละลายเซลล์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

โดยสรุป การเก็บรักษาเชื้อ โดยการแช่แข็งอย่างช้า ที่อุณหภูมิประมาณ -20 ถึง -80 องศาเซลเซียส น่าจะมีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษา *Chaetoceros* มากที่สุด เนื่องจากสามารถรักษาคุณภาพเซลล์ให้มีชีวิตรอดได้ดีเป็นเวลานาน แต่ในทางปฏิบัติจริงแล้วผู้แช่แข็งเชิงพาณิชย์อาจทำได้ไม่ถึง -80 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม วิธีการแช่แข็งนี้เป็นวิธีการที่เสียค่าใช้จ่ายน้อย สามารถทำได้ง่าย และปลอดภัยกว่าการแช่เยือกแข็งด้วยไนโตรเจนเหลว ส่วนการเติมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง นั้นมีความจำเป็นมากต่ออัตราการรอดของเซลล์ เพราะจะทำหน้าที่ช่วยปกป้องเซลล์จากการแข็งตัว และการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ที่จะส่งผลทำให้เซลล์แตกและเสียหายได้ โดยชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง นั้นมีผลเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่ายแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาถึงผลการเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษา *Chaetoceros* ระยะเพิ่มจำนวนทวีคูณ (ระยะที่ 2) ด้วยวิธีการตกตะกอนโดยใช้ไคโตซานเป็นสารตกตะกอน และนำมาทำการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้กลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งเพื่อให้ทราบถึงปริมาณของสารไคโตซานที่เหมาะสมในการตกตะกอน และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา *Chaetoceros* แบบเข้มข้น รวมถึงเทคนิคหรือวิธีการที่เหมาะสมในการนำ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาออกมาใช้อุบลาลูกกุ้งขาว เพื่อให้มั่นใจว่ากระบวนการเก็บเกี่ยวเก็บรักษา *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ได้นี้จะป็นวิธีที่เหมาะสม มีความปลอดภัย ปราศจากสารเคมีที่เป็นพิษ เป็นอันตรายต่อ

ลูกกึ่ง ผู้บริโภคร และสิ่งแวดล้อม สามารถนำไปใช้ได้จริง ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากทั้งในการใช้เป็นอาหารในการอนุบาลลูกกึ่ง และการอนุบาลลูกสัตว์น้ำอื่น ๆ

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 1. วัสดุและอุปกรณ์

##### ชนิดของสัตว์น้ำ

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ระยะนาอเพลียส (Nauplii) จากฟาร์มเอกชน

##### ชนิดของแพลงก์ตอนพืช

หัวเชื้อ *Chaetoceros* (*Chaetoceros gracilis*) จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตบางแสน จังหวัดชลบุรี หรือจากฟาร์มเอกชน

##### สารเคมีที่ใช้ในการตกตะกอน

1. สารไคโตซาน (chitosan) 3 ชนิด ได้แก่ ไคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง ไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง และไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปู
2. กรดอะซิติก ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ )

##### สารเคมีที่ใช้เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ในการเก็บรักษา

1. กลีเซอรอล (glycerol)
2. น้ำกลั่น

##### สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยง *Chaetoceros*

ตามสูตรอาหารของ กิลลาร์ด (Guillard medium หรือ F/2) (กัลดดา วงศ์รัตน์, 2541) มีส่วนประกอบ ดังนี้

1. น้ำทะเลความเค็มเฉลี่ยประมาณ 27 ส่วนในพัน (ppt)
2. โซเดียมไนเตรด ( $\text{NaNO}_3$ )
3. โซเดียมอีดีทีเอ ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )

4. ไบโอดีน (Biotin)
5. โมโนโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
6. เฟอริกคลอไรด์ 6-ไฮเดรต ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
7. แมงกานีสคลอไรด์ 4-ไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
8. วิตามิน บี 1 (Thiamine)
9. วิตามิน บี 12 (Cyanocobalamin)
10. ซิงค์ซัลเฟต 7-ไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
11. โคบอลต์คลอไรด์ 6-ไฮเดรต ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
12. โซเดียมโมลิบเดต 2-ไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
13. คอปเปอร์ซัลเฟต 5-ไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
14. โซเดียมเมตาซิลิเกต 9-ไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )
15. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

#### สารเคมีที่ใช้ในการนับเซลล์เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ *Chaetoceros*

1. สีย้อม Evan's blue

#### สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำและมาเชื้ออุปกรณ์

1. แคลเซียมไฮโปคลอไรด์ ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ )
2. โปวิดอน ไอโอดีน (Povidone Iodine)

#### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. ชุดเครื่องแก้ว ได้แก่ ปีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) แท่งแก้วคนสาร (stirring rod) โหลแก้วทรงกระบอก กระบอกดวง (cylinder) ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ (duram) เป็นต้น
3. เครื่องวัดความเค็ม (salinometer) แบบ hand refractometer
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
5. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (micropipette)

6. เครื่องเขย่าสารละลาย (vortex mixer)
7. เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)
8. กระดาษกรองแบคทีเรีย ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
9. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
10. หลอดเก็บตัวอย่าง (sample tube)
11. นาฬิกาจับเวลา
12. สไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer)
13. เครื่องนับจำนวน (hand counter)
14. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
15. เครื่องควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิ (Control Rate Freezer)
16. ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ  $-20 \pm 2$  องศาเซลเซียส
17. ก๊าซจุลทรรศน์
18. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์
19. ถังไฟเบอร์กลาสขนาด 300 ลิตร
20. เครื่องเติมอากาศ (air pump)
21. ไมโครมิเตอร์ (Micrometer)
22. อุปกรณ์สำหรับอนุบาลลูกกุ้ง ได้แก่ หัวทราย สายยาง สวิง ถุงกรอง ถังพลาสติกกลมขนาด 15 ลิตร พลาสติกสีดำ เป็นต้น
23. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ ขวดสีชา เป็นต้น
24. พรอทวัดอุณหภูมิ (Thermometer)
25. เครื่องวัดค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำ (Dissolved Oxygen Meter)

## 2. แผนการดำเนินการวิจัย

ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น การวิจัยครั้งนี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ 3 ตอน ดังนี้

**2.1 ตอนที่ 1** ศึกษาผลของการเก็บเกี่ยว *Chaetoceros* ด้วยวิธีการตกตะกอนร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH โดยนำเซลล์ *Chaetoceros* จำนวนมากกว่า  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาทำการตกตะกอนและเปรียบเทียบผลระหว่างชุดทดลองกับชุดควบคุม โดยชุดทดลองจะใช้โคโคซานเป็นสารตกตะกอนที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH



ในระหว่างการตกตะกอน คัดแปลงมาจาก วิธีการของ Lertsutthiwong et al. (2009) โดยเริ่มทำการตกตะกอนที่ pH 6.5 หลังจากผ่านไป 60 นาที ค่า pH จะถูกปรับให้เป็น 8.5 ส่วนชุดควบคุมจะเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากโคโคซาน จากนั้นนำมาคำนวณหา ประสิทธิภาพในการรวมตะกอน ตามวิธีการของ Cheng et al. (2011) ในช่วงก่อนและหลังการตกตะกอนที่ระยะเวลา 0, 15, 30, 45, 60, 120 และ 180 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของกิลลาร์ด (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2541) แล้วทำการตรวจนับความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามวิธีการของ Fox (1983) ทุก ๆ 24 ชั่วโมง นำมาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโต

**2.2 ตอนที่ 2** ศึกษาผลของการเก็บรักษา *Chaetoceros* แบบเข้มข้นกำหนดความหนาแน่นของเซลล์ *Chaetoceros* จำนวนมากกว่า  $10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรในการเก็บรักษา ร่วมกับการใช้กลีเซอรอลความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งเป็นชุดทดลอง และชุดที่ไม่เติมกลีเซอรอลเป็นชุดควบคุม มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20 \pm 2$  องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาทดสอบการแตกตัวของตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* และหาเปอร์เซ็นต์ การรอดตายของเซลล์ด้วยวิธีการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม Evan's blue ตามวิธีการของ Harris (1988 อ้างถึงใน นิธิวิดิ ทูมวัน, 2543) เพื่อทำการตรวจนับเซลล์ที่รอดชีวิต

**2.3 ตอนที่ 3** ศึกษาผลของเทคนิคหรือวิธีการในการนำ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษามาใช้อุบลาลูกกุ้งขาวระยะซุเอีย (Zoea) ด้วยการนำ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษามาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลายก่อนนำไปอนุบาลลูกกุ้ง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

**ชุดการทดลองที่ 1** ให้ *Chaetoceros* สด (ชุดควบคุม)

**ชุดการทดลองที่ 2** ให้ *Chaetoceros* สด นำมาผสมโคโคซานและกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v)

**ชุดการทดลองที่ 3** ให้ *Chaetoceros* แบบเข้มข้น ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลายก่อนนำมาอนุบาลลูกกุ้ง

**ชุดการทดลองที่ 4** ให้ *Chaetoceros* แบบเข้มข้น ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลายและนำมาแช่ 60 วินาที ก่อนนำมาอนุบาลลูกกุ้ง

ชุดการทดลองที่ 5 ให้ *Chaetoceros* แบบเข้มข้น ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลายและนำมาปรับลดค่า pH ให้เป็น 5.0 ก่อนนำมาอนุบาลลูกกุ้ง

เริ่มทดลองเมื่อลูกกุ้งเข้าสู่ระยะชูเอีย 1 โดยให้ *Chaetoceros* ความหนาแน่นเซลล์ที่  $10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร แก่ลูกกุ้งทุก 4 ชั่วโมง ในแต่ละหน่วยการทดลอง จนกระทั่งลูกกุ้งเข้าสู่ระยะไมซิส (Mysis) ที่ 1 ครบ 100 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบปริมาณอาหารเหลือในบ่ออนุบาลทุก ๆ 8 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ทุกวันระหว่างการทดลอง ตรวจสอบคุณภาพน้ำทุกวัน ได้แก่ อุณหภูมิ pH ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ไนโตรเจน แอมโมเนีย อัลคาไลน์ดี และค่าบีโอดี

### 3. ขั้นตอนดำเนินการวิจัย แบ่งออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้

**ระยะที่ 1** การทดสอบประสิทธิภาพการตกตะกอนของ *Chaetoceros* ด้วยโคโคซานร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH

#### 1. การเตรียมเซลล์ *Chaetoceros* สำหรับการตกตะกอน

นำหัวเชื้อ *C. gracilis* จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ในช่วงระยะเพิ่มจำนวนทวีคูณ (Log phase) มาแขวนลอย ในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพัน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จากนั้น ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่ามากกว่า  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

จากนั้น ทำการตรวจนับความหนาแน่นของจำนวนเซลล์อีกครั้งด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวณหาปริมาณเซลล์ได้ ตามวิธีการของ Fox (1983) โดยมีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\left(\frac{n}{x}\right) \frac{10,000}{1} = \text{จำนวนเซลล์ใน 1 มิลลิลิตร}$$

เมื่อ  $n$  คือ จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้  
 $x$  คือ ตัวหารซึ่งใช้ค่าเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ของแต่ละกริด (ใน 4 กริด) ที่นับ

## 2. การเตรียมสารละลายโคโตซาน

นำโคโตซานทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ โคโตซาน โพลิเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง โคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง และโคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปู ที่ได้จากบริษัท ต้าหมิง เอ็นเตอร์ไพรส์ จำกัด มาละลายในกรดอะซิติก 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) และปรับให้มีความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายตั้งต้น (stock solution) ของสารละลายโคโตซานแต่ละชนิดมา กวนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนสาร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 3-1 ลักษณะเฉพาะของโคโตซาน

พารามิเตอร์	น้ำหนักโมเลกุล (Da)	ความชื้น (%)	ปริมาณเถ้า (%)	Degree of deacetylation (%)
โคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้ง ในรูปแบบโพลิเมอร์	$2.8 \times 10^8$	< 10	< 2	> 80
โคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้ง ในรูปแบบโอลิโกเมอร์	$7.9 \times 10^6$	< 10	< 2	> 80
โคโตซานสกัดจากเปลือกปู ในรูปแบบโอลิโกเมอร์	$7.9 \times 10^6$	< 10	< 2	> 80

## 3. การเก็บเกี่ยว *Chaetoceros* ด้วยวิธีการตกตะกอน

ดำเนินการโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lertsutthiwong et al. (2009) ทำการย้าย น้ำทะเลที่มี *Chaetoceros* แขนวลอยอยู่ปริมาตร 1 ลิตร ซึ่งผ่านการปรับความหนาแน่นแล้วในข้อ 1 ไปยังบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตร และทำการกวนในอัตรา 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติมสารละลายตั้งต้นของโคโตซาน ทั้ง 3 ชนิดที่เตรียมไว้ในข้อ 2 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของโคโตซานที่ 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ตัวอย่างน้ำจะยังถูกกวนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนสารเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยการปรับ ลดค่า pH ให้เป็น 6.5 โดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นกวนสารให้ผสมกันประมาณ 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 60 นาที จึงนำมาปรับค่า pH ให้เป็น 8.5 โดยใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นกวนสารให้ผสมกันประมาณ 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้

ตกตะกอน เพื่อทำการเก็บตัวอย่างตามช่วงเวลาที่กำหนด มีการดำเนินการ ทดลองที่ระดับความเข้มข้น  
ละ 3 ซ้ำ

#### 4. การวัดประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ของโคโคซาน

นำ *Chaetoceros* บางส่วนมาวัดความหนาแน่นด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงของแต่ละ  
ระดับความเข้มข้น โดยนำตัวอย่างที่ทำการตกตะกอนทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องมาวัดค่าดูดกลืนแสงหลัง  
การตกตะกอนที่ระยะเวลา 0, 15, 30, 45, 60, 120 และ 180 นาที โดยใช้น้ำทะเลเป็นค่าตั้งต้น (blank)  
เพื่อนำไปหาค่าประสิทธิภาพการตกตะกอน ประเมินโดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง (optical  
density: OD) ของตัวอย่างที่ระดับ 550 นาโนเมตร โดยการใช้เครื่องดูดจ่ายสารละลายดูดตัวอย่างห่าง  
จากกันบีกเกอร์ประมาณ 1 เซนติเมตร ออกมาครั้งละ 10 มิลลิลิตร ตามวิธีการของ Riaño et al. (2012)  
ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบการ ตกตะกอนที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ทำการทดลองความเข้มข้นละ  
3 ซ้ำ จากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตกตะกอน ตามวิธีการของ Cheng et al. (2011) มีสูตรดังนี้

$$Flc \% = \frac{(Abs_{550,initial} - Abs_{550,post\ flocculation})}{(Abs_{550,initial} - Abs_{550,blank})} \times 100\%$$

เมื่อ	Flc %	คือ	ประสิทธิภาพในการตกตะกอน
	$Abs_{550, initial}$	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ในช่วงเริ่มต้นก่อนการตกตะกอน
	$Abs_{550, post\ flocculation}$	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ในช่วงหลังการตกตะกอน
	$Abs_{550, blank}$	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ในน้ำหรือสารละลายตั้งต้นก่อนการแขวนลอย ตัวอย่าง

## 5. การหาอัตราการฟื้นตัวของ *Chaetoceros* ภายหลังจากตกตะกอน มีขั้นตอน ดังนี้

### 5.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้สูตรอาหารของกิลลาร์ด (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2541) โดยแบ่งการเตรียมสารละลาย ออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่

#### 5.1.1 สารละลายส่วนที่ 1 ประกอบด้วย

โซเดียมไนเตรต ( $\text{NaNO}_3$ )	75.0	กรัม
โมโนโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	5.0	กรัม
นำทั้งหมดมาผสมกัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 ลิตร		

#### 5.1.2 สารละลายส่วนที่ 2 ประกอบด้วย

โซเดียมเมตาซิลิเกต 9-ไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )	30.0	กรัม
นำทั้งหมดมาผสมกัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 ลิตร		

#### 5.1.3 สารละลายส่วนที่ 3 ประกอบด้วย

เฟอร์ริกคลอไรด์ 6-ไฮเดรต ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	3.15	กรัม
โซเดียมอีดีทีเอ ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	4.36	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต 5-ไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	9.8	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต 2-ไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	6.3	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต 7-ไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	22	มิลลิกรัม
โคบอลท์คลอไรด์ 6-ไฮเดรต ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	10	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์ 4-ไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	180	มิลลิกรัม
นำทั้งหมดมาผสมกัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 ลิตร		

#### 5.1.4 สารละลายส่วนที่ 4 ประกอบด้วย

วิตามิน บี 1 (Thiamine)	200	มิลลิกรัม
วิตามิน บี 12 (Cyanocobalamine)	1	มิลลิกรัม
ไบโอติน (Biotin)	1	มิลลิกรัม

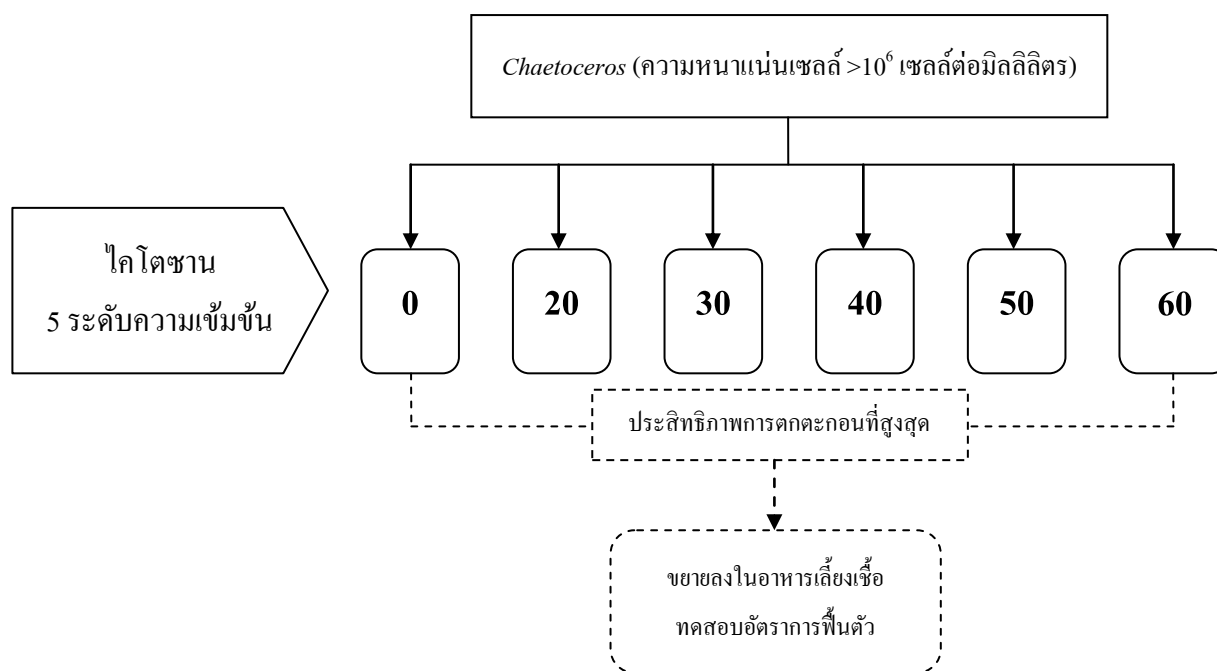
นำทั้งหมดมาผสมกัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 ลิตร

จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ 1-3 ส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร และสารละลายส่วนที่ 4 ส่วน 0.5 มิลลิลิตร เติมลงไปใต้น้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพัน ที่มีปริมาตร 1 ลิตร ที่ผ่านการปรับค่า pH แล้วด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์ ให้อยู่ในช่วง pH ประมาณ 7.8

5.2 การเพาะเลี้ยง *Chaetoceros* ภายหลังจากเก็บรักษา และการหาอัตราการเจริญเติบโตของ *Chaetoceros* มีขั้นตอน ดังนี้

นำเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการ ตกตะกอน มาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ตามข้อที่ 5.1 ภายใต้น้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพัน ควบคุมอุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้อากาศตลอดเวลา และให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่ระดับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจนับความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามวิธีการของ Fox (1983) ทุก ๆ 24 ชั่วโมง

โดยสามารถสรุปเป็นแผนการทดลองได้ ดังนี้ (ภาพที่ 3-1)



ภาพที่ 3-1 แผนการทดลองในระยะที่ 1 ศึกษาผลการเก็บเกี่ยว *Chaetoceros* โดยใช้โคโคซาน เป็นสารตกตะกอน

**ระยะที่ 2** ศึกษาผลของการเก็บรักษา *Chaetoceros* แบบเข้มข้นด้วยวิธีการแช่แข็งที่ระดับ อุณหภูมิต่ำ  $-20 \pm 2$  องศาเซลเซียส

1. การเตรียมเซลล์ *Chaetoceros* สำหรับการเก็บรักษา

เลือกผลการเก็บเกี่ยว *Chaetoceros* ที่ดีที่สุดจากตอนที่ 1 มาทำการตรวจนับความหนาแน่นของจำนวนเซลล์อีกครั้งด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำทะเลมาเชื้อ และปรับความหนาแน่นของเซลล์ใหม่ให้ได้จำนวนมากกว่า  $10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง

เตรียมสารละลายตั้งต้นของกลีเซอรอล ที่ระดับความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ มวลต่อปริมาตร (w/v) ด้วยการนำกลีเซอรอลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น และกรองด้วยกระดาษกรองแบคทีเรีย ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3. การเก็บรักษาเซลล์ *Chaetoceros*

นำเซลล์ *Chaetoceros* ที่เตรียมไว้จากข้อ 1 มาผสมกับสารละลายตั้งต้นของกลีเซอรอล ที่เตรียมได้ในข้อ 2 จนได้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลสุดท้ายที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) ทำการบ่มทิ้งไว้ 10 นาที ต่อมาทำการดูดสารละลายใส่หลอดเก็บตัวอย่าง จากนั้น นำมาลดอุณหภูมิลงด้วยน้ำแข็งแห้ง จนถึงจุดเยือกแข็งที่ระดับ  $-20$  องศาเซลเซียส แล้วจึงย้ายไปเก็บรักษาต่อในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ  $-20 \pm 2$  องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง *Chaetoceros* ภายหลังจากการเก็บรักษาที่เวลา 0, 24 และ 72 ชั่วโมง

4. การทดสอบการแตกตัวของตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษา

นำเซลล์ *Chaetoceros* ที่เก็บรักษามาตรวจสอบลักษณะการจับกลุ่มของตะกอน ความสามารถในการแตกตัวของตะกอนเซลล์ และลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อหาลักษณะของตะกอนเซลล์ที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปปรับใช้ต่อการอนุบาลลูกกุ้ง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 นำตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาด้วย กลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาทีให้ละลาย

ชุดการทดลองที่ 2 นำตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาด้วย กลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาทีให้ละลายก่อนจากนั้นนำมาแช่ในตู้แช่แข็งเป็นเวลา 60 วินาที

ชุดการทดลองที่ 3 นำตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาทีให้ละลายก่อนจากนั้นนำมาปรับลดค่า pH ให้เป็น 7.0 โดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 1 โมลาร์

ชุดการทดลองที่ 4 นำตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาทีให้ละลายก่อนจากนั้นนำมาปรับลดค่า pH ให้เป็น 6.0 โดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 1 โมลาร์

ชุดการทดลองที่ 5 นำตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาทีให้ละลายก่อนจากนั้นนำมาปรับลดค่า pH ให้เป็น 5.0 โดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 1 โมลาร์

#### 5. การหาเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษา

ทดสอบเซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธีการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม Evan's blue โดยใช้เครื่องดูดจ่ายสารละลายดูดตัวอย่าง *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาออกมาจำนวน 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง และเติมน้ำทะเลจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางความหนาแน่นของเซลล์ จากนั้นดูดเซลล์ที่เจือจางความหนาแน่นแล้วออกมา 2 มิลลิลิตร และหยดสีย้อม Evan's blue ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร (w/v) เขย่าให้สารผสมกันประมาณ 30 วินาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที (นิชิวดี ทูมวัน, 2543) แล้วนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตโดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ โดยการสังเกตเซลล์ตายจะเป็นเซลล์ที่ติดสีย้อมของ Evan's blue

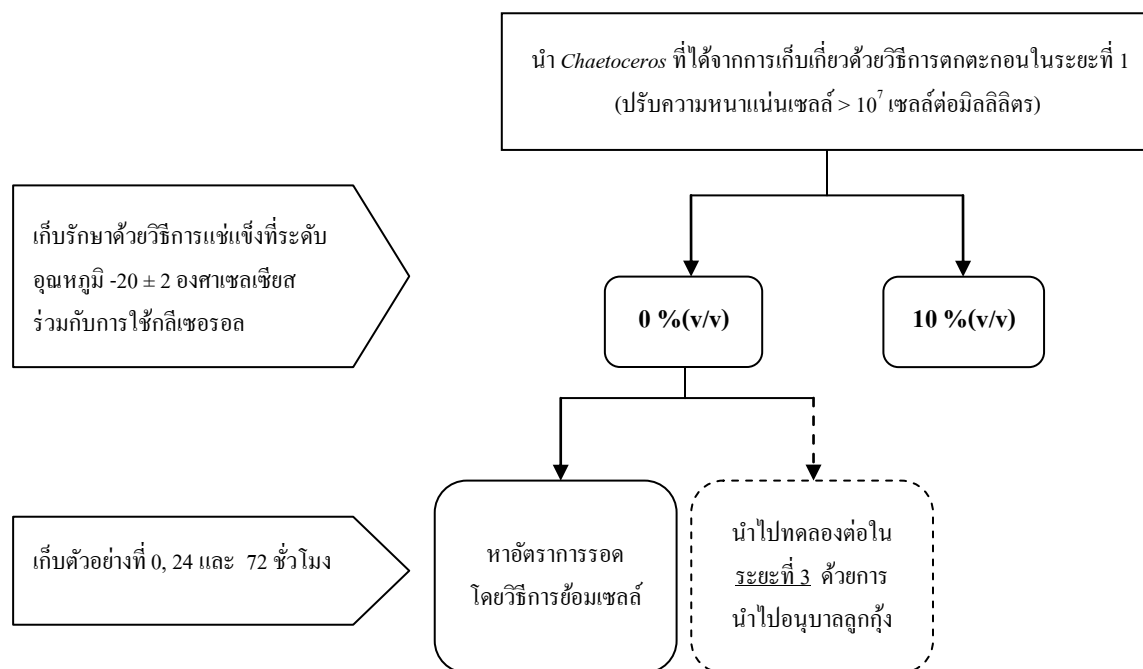
หาเปอร์เซ็นต์การรอดของ *Chaetoceros* จากการนับจำนวนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผสมกับกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) ก่อนนำไปเก็บรักษาเป็นจำนวนเริ่มต้น และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของ *Chaetoceros* ภายหลังการเก็บรักษาที่เวลา 0, 24 และ 72 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การรอดของ *Chaetoceros* ของแต่ละระยะเวลาการเก็บรักษา มีสูตรดังนี้

$$(\text{จำนวนเซลล์ } Chaetoceros \text{ เริ่มต้น} - \text{จำนวนเซลล์ } Chaetoceros \text{ ที่มีชีวิตรอดภายหลังการเก็บรักษา}) \times 100$$

จำนวนเซลล์ *Chaetoceros* เริ่มต้น



โดยสามารถสรุปเป็นแผนการทดลองได้ ดังนี้ (ภาพที่ 3-2)



ภาพที่ 3-2 แผนการทดลองในระยะที่ 2 ศึกษาผลของการเก็บรักษา *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอน ร่วมกับกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง

**ระยะที่ 3** ศึกษาผลของเทคนิคหรือวิธีการในการนำ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษามาใช้ออนุบาลลูกกุ้งขาวระยะซูเอีย

#### 1. การเตรียมน้ำ

ใช้น้ำทะเลที่ผ่านการกรองมาผสมน้ำจืดปรับให้ได้ความเค็ม 30 ส่วนในพัน ฆ่าเชื้อด้วยการเติมแคลเซียมไฮโปคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 20 ส่วนในล้าน ให้อากาศอย่างเต็มที่ตลอดเวลานาน 5 วัน เพื่อให้คลอรีนสลายตัวจนหมด จึงนำมาเก็บไว้ในถังเก็บน้ำไฟเบอร์กลาสขนาดใหญ่ เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

## 2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

การปรับสภาพสัตว์ก่อนการทดลอง โดยนำลูกกุ้งขาวระยะอเพลียด จากฟาร์มเอกชนแห่งหนึ่ง 50,000 ตัว มาพักในถังไฟเบอร์กลาสที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพัน ปริมาตร 25 ลิตร จนกระทั่งลูกกุ้งเข้าสู่ระยะชูเอียงจึงเริ่มการทดลอง

## 3. การดำเนินการทดลอง

ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ มีการควบคุมอุณหภูมิน้ำที่  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส ค่า pH ในช่วง 7.5-8.5 และความเค็มน้ำทะเลที่ 30 ส่วนในพัน นำลูกกุ้งระยะชูเอียงที่ 1 มาจำนวน 800 ตัว ใส่โหลทดลองขนาด 10 ลิตร ที่บรรจุน้ำทะเล 8 ลิตร และหุ้มด้วยพลาสติกเพื่อควบคุมอุณหภูมิ วางแผน การทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ให้ *Chaetoceros* สด (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ให้ *Chaetoceros* สด นำมาผสมไคโตซานและกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v)

ชุดการทดลองที่ 3 ให้ *Chaetoceros* แบบเข้มข้น ที่ผ่านการเก็บรักษา ด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาทีให้ละลายก่อน นำมาอนุบาลลูกกุ้ง

ชุดการทดลองที่ 4 ให้ *Chaetoceros* แบบเข้มข้น ที่ผ่านการเก็บรักษา ด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาทีให้ละลายและนำมาเขย่า 60 วินาทีก่อนนำมาอนุบาลลูกกุ้ง

ชุดการทดลองที่ 5 ให้ *Chaetoceros* แบบเข้มข้น ที่ผ่านการเก็บรักษา ด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาทีให้ละลายและนำมาปรับลดค่า pH ให้เป็น 5.0 โดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ก่อนนำมาอนุบาลลูกกุ้ง

## 4. การให้อาหารอนุบาลลูกกุ้ง

เริ่มอนุบาลเมื่อลูกกุ้งเข้าสู่ระยะชูเอียงที่ 1 โดยให้ *Chaetoceros* ความหนาแน่นเซลล์ที่  $10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร แก่ลูกกุ้งทุก 4 ชั่วโมง (6 มื้อต่อวัน ในเวลา 06.00, 10.00, 14.00, 18.00, 22.00 และ 02.00 นาฬิกา) ตรวจสอบปริมาณอาหารเหลือในบ่ออนุบาลทุก 8 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ทุกวันระหว่างการทดลอง ทำการอนุบาลจนกระทั่งลูกกุ้งจากชุดการทดลองใดการทดลองหนึ่งเข้าสู่

ระยะไมซิสที่ 1 ครบ 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงทำการตรวจนับจำนวนลูกกึ่งทั้งหมด วัดขนาดความยาว และน้ำหนักลูกกึ่งที่เพิ่มขึ้น

## 5. การประเมินผล

### 5.1 อัตราการเจริญเติบโต

#### 5.1.1 ความยาว

วัดความยาวจากปลายกรีสูดปลายหาง (Total length) โดยใช้ไมโครมิเตอร์วัดความยาวของลูกกึ่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในช่วงเริ่มต้นการทดลองและช่วงสิ้นสุดการทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความยาวที่เพิ่มขึ้น (% Length gain หรือ % Lg) มีสูตรดังนี้

$$\frac{(\text{ความยาวกึ่งสุดท้าย} - \text{ความยาวกึ่งเริ่มต้น}) \times 100}{\text{ความยาวกึ่งเริ่มต้น}}$$

#### 5.1.2 น้ำหนัก

ชั่งน้ำหนัก โดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งในช่วงเริ่มต้นการทดลองและช่วงสิ้นสุดการทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%Weight gain หรือ % Wg) มีสูตรดังนี้

$$\frac{(\text{น้ำหนักกึ่งสุดท้าย} - \text{น้ำหนักกึ่งเริ่มต้น}) \times 100}{\text{น้ำหนักกึ่งเริ่มต้น}}$$

### 5.2 เปอร์เซ็นต์การรอดตาย

โดยการนับจำนวนของลูกกึ่งที่เหลือทั้งหมดในแต่ละชุดการทดลองแล้วนำมาคำนวณได้จากสูตร

$$\frac{(\text{จำนวนกึ่งสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}) \times 100}{\text{จำนวนกึ่งเริ่มต้น}}$$

### 5.3 ตรวจสอบระยะเวลาพัฒนาการ

โดยเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงเพื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ของลูกกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง จากการอนุบาล ลูกกุ้งระยะชูเอี้ยที่ 1 จนกระทั่งชุดการทดลองใดการทดลองหนึ่งมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะไมซิสที่ 1 ครบ 100 เปอร์เซ็นต์

### 6. ตรวจสอบคุณภาพน้ำในการอนุบาลทุกวัน ดังนี้

6.1 อุณหภูมิ น้ำ วัดโดยใช้ Thermometer แบบปรอท

6.2 ความเค็ม น้ำ วัดโดยใช้เครื่อง hand refractometer

6.3 pH น้ำ วัดโดยใช้เครื่อง pH meter

6.4 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen, DO) วัดโดยใช้เครื่อง Dissolved Oxygen Meter

6.5 ปริมาณแอมโมเนีย (Ammonia) วิเคราะห์โดยวิธี Phenol - hypochlorite Method ตามวิธีการของ Strickland and Parsons (1972)

6.6 ปริมาณไนไตรท์ (Nitrite) วิเคราะห์โดยวิธี Sulfanilic acid method ตามวิธีการของ Strickland and Parsons (1972)

6.7 ความเป็นด่าง (Alkalinity) วิเคราะห์โดยวิธี Titration ตามวิธีการของ APHA, AWWA and WPCF (1980)

6.8 ค่าบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) วิเคราะห์โดยวิธี Azide modification winkler method ตามวิธีการของ APHA, AWWA and WPCF (1995)

## 4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) วิเคราะห์ ข้อมูลทั้งหมดโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีข้อมูลที่ต้องทำการวิเคราะห์ตามลำดับ ดังนี้

4.1 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ของไคโตซาน และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอน

4.2 เปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ *Chaetoceros* ภายหลังจากเก็บรักษาในช่วงเวลาต่าง ๆ

4.3 อัตราการเจริญเติบโตเปอร์เซ็นต์การรอดตายของลูกกุ้ง และคุณภาพน้ำระหว่างการอนุบาล

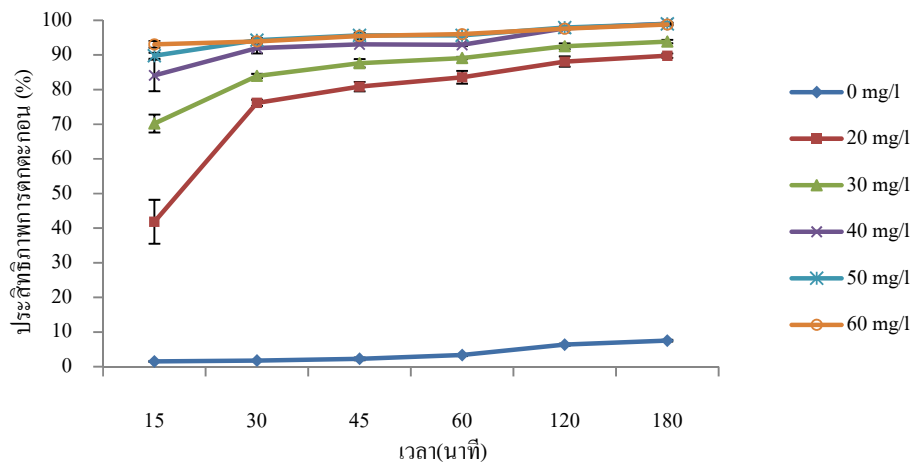
## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### การทดลองที่ 1 ผลการตกตะกอน *Chaetoceros* ด้วยไคโตซานร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH

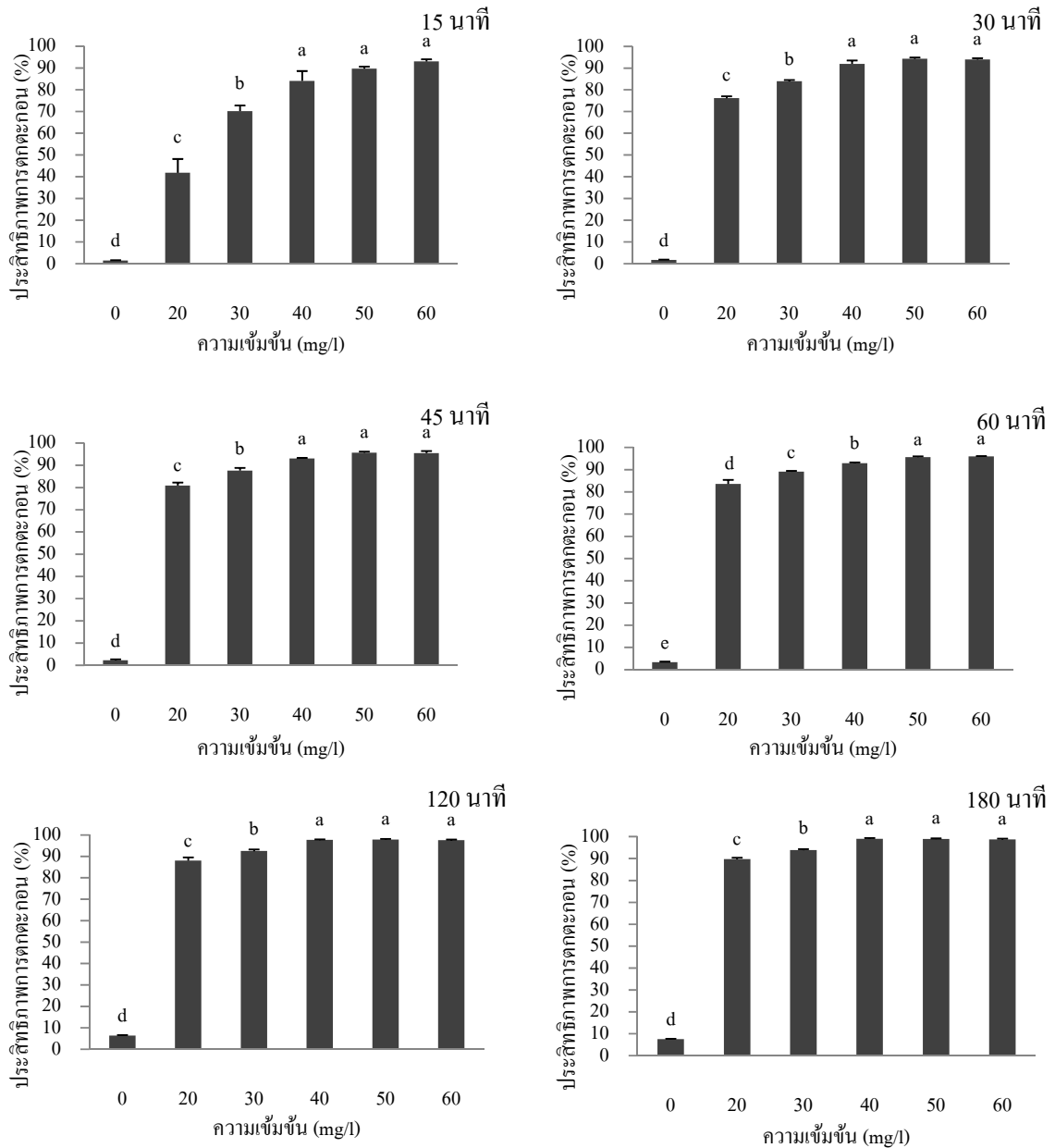
##### 1. ประสิทธิภาพการตกตะกอนด้วยไคโตซานโพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

จากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อใช้สารไคโตซานโพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งในระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไป (ภาพที่ 4-1) กล่าวคือที่ระยะเวลา 15 - 45 นาที การใช้สารไคโตซานโพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งที่ความเข้มข้น 40 - 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนอย่างไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ซึ่งประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงมากกว่าที่ความเข้มข้น 30, 20 และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ภาพที่ 4-2) โดยพบว่ามีประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงมากตั้งแต่ 15 นาที (84 - 93 เปอร์เซ็นต์) โดยยังคงมีค่าประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ต่อเนื่องระหว่างช่วงเวลา 60, 120 และ 180 นาที (ภาพที่ 4-2)



ภาพที่ 4-1 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* เมื่อใช้สารไคโตซานโพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งเป็นสารตกตะกอนที่ 5 ระดับความเข้มข้น

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



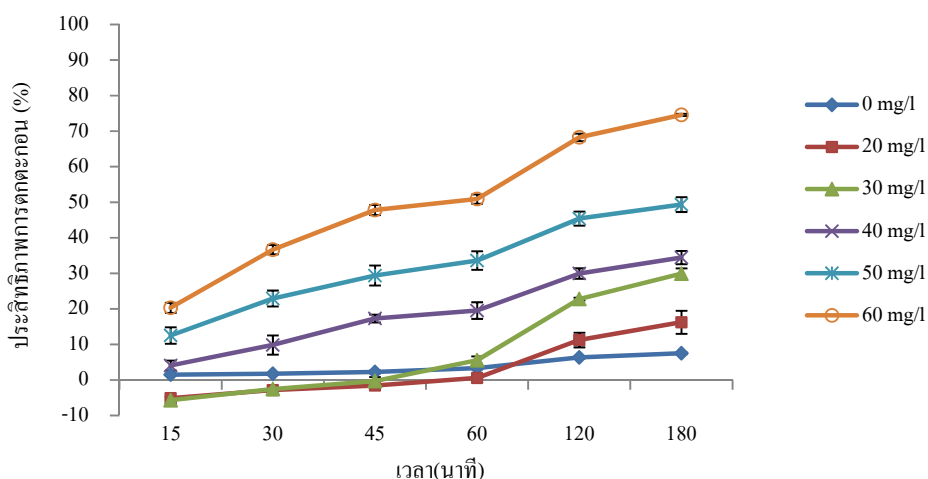
ภาพที่ 4-2 ประสิทธิภาพการตรึงคาร์บอนเซลล์ *Chaetoceros* ในแต่ละช่วงระยะเวลาเมื่อใช้สารโพลีเมอร์ซิลิเกตจากเปลือกกุ้งเป็นสารตรึงคาร์บอนที่ 5 ระดับความเข้มข้น

**หมายเหตุ**

- ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
- อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

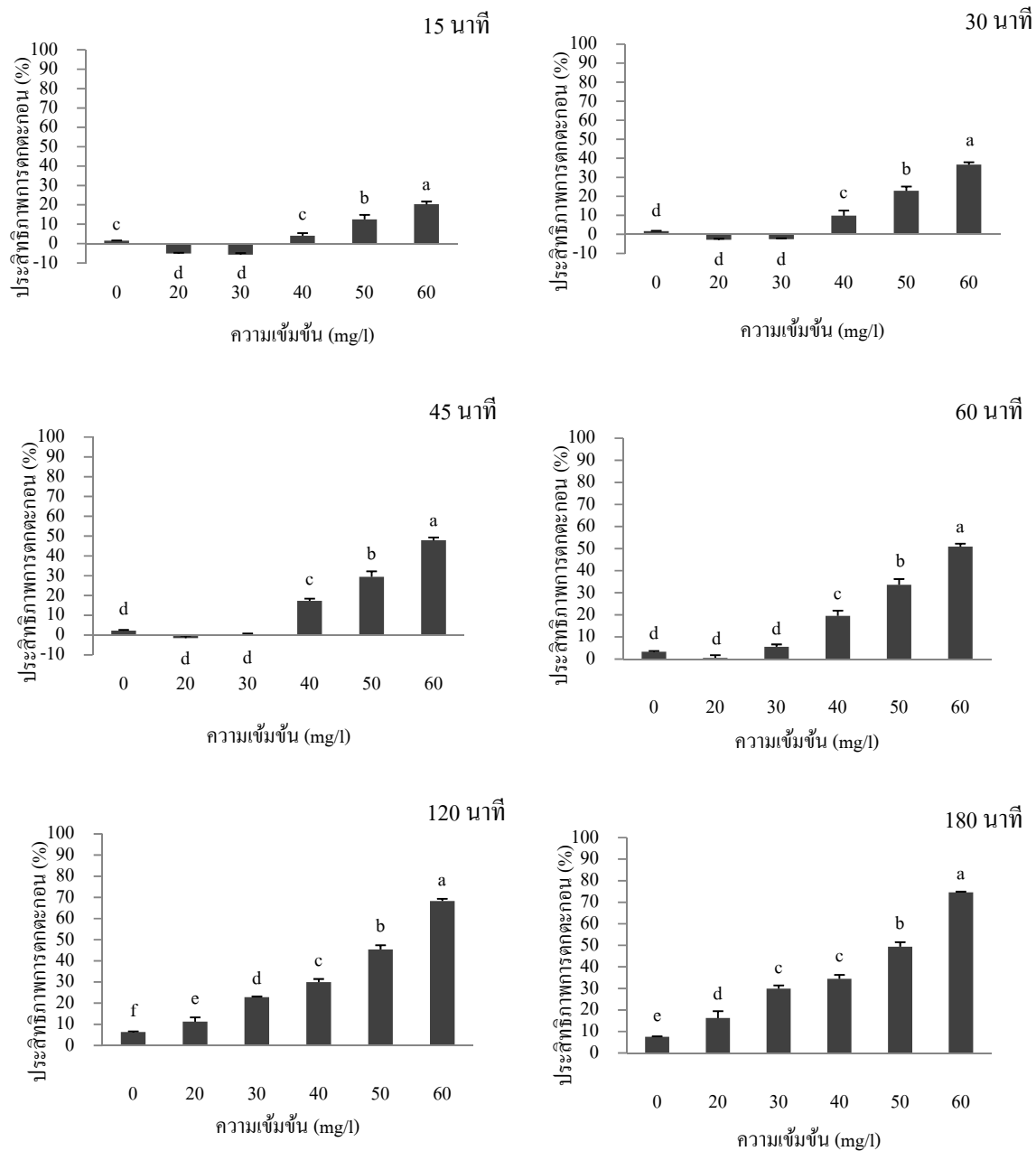
## 2. ประสิทธิภาพการตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* มากขึ้น เมื่อใช้สารไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งในระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ภาพที่ 4-3) กล่าวคือที่ระยะเวลา 15 - 180 นาที การใช้สารไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งที่ความเข้มข้น 40 - 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงมากกว่าที่ความเข้มข้น 30, 20 และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยพบว่าประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงมากที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ตลอดระยะเวลาการตกตะกอนจาก 15 ถึง 180 นาที (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-3 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* เมื่อใช้สารไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งเป็นสารตกตะกอนที่ 5 ระดับความเข้มข้น

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



ภาพที่ 4-4 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ในแต่ละช่วงระยะเวลาเมื่อใช้สารไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งเป็นสารตกตะกอนที่ 5 ระดับความเข้มข้น

**หมายเหตุ**

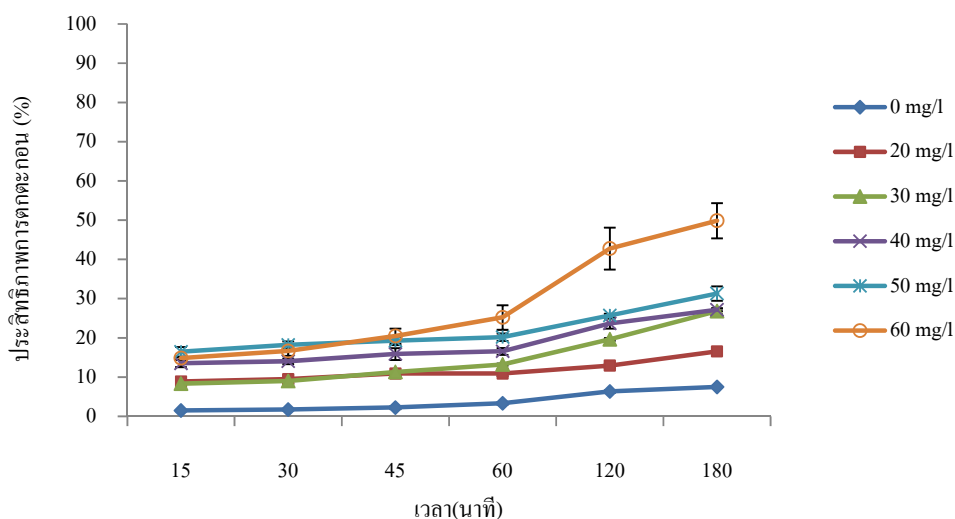
- ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

- อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



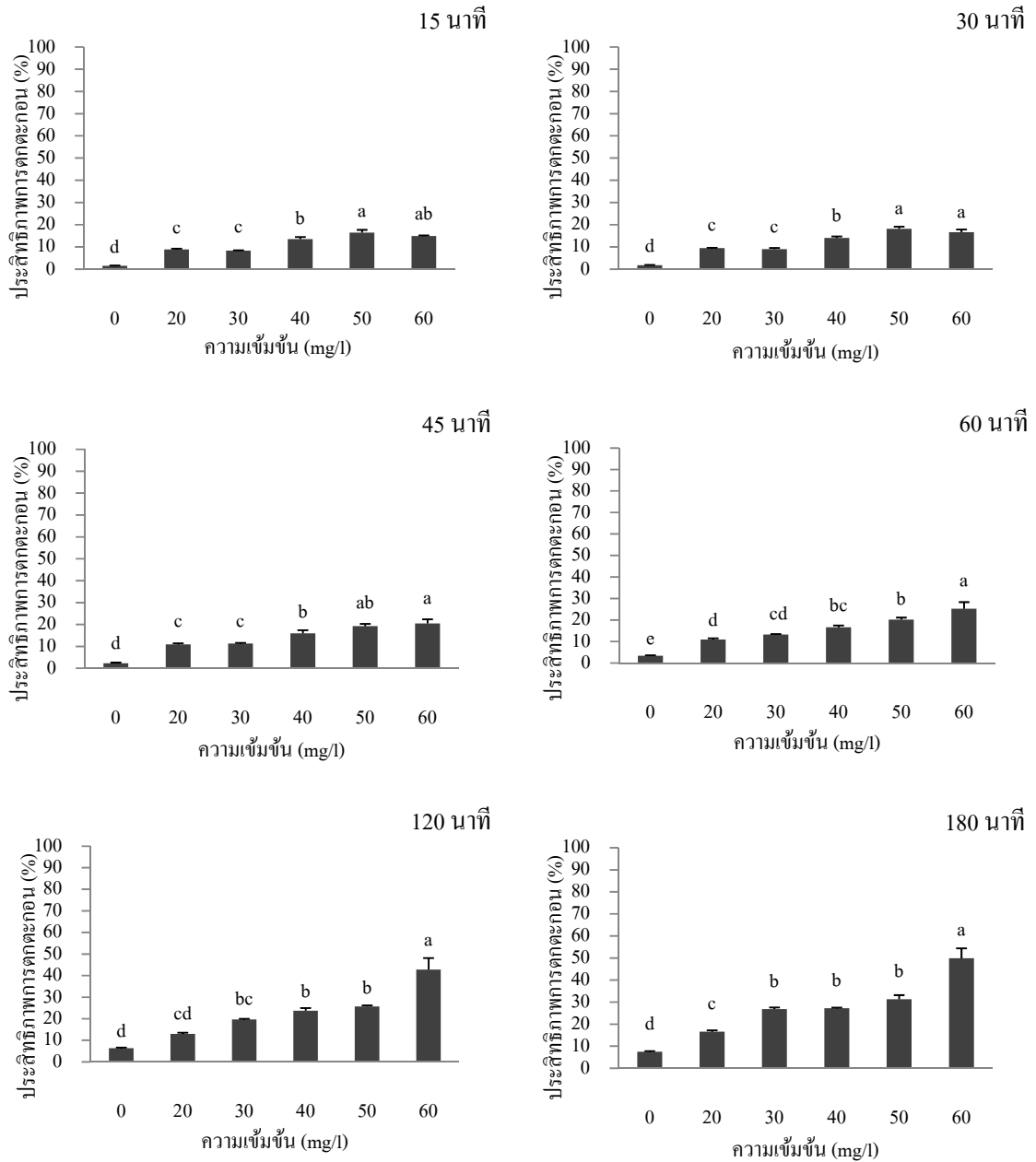
### 3. ประสิทธิภาพการตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปู

ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* มากขึ้น เมื่อใช้สารไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปูในระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ภาพที่ 4-5) กล่าวคือที่ระยะเวลา 60 - 180 นาที การใช้สารไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปูที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงมากกว่าที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยมีประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงที่สุดคือ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 180 นาที (ภาพที่ 4-6)



ภาพที่ 4-5 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* เมื่อใช้สารไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปูเป็นสารตกตะกอนที่ 5 ระดับความเข้มข้น

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



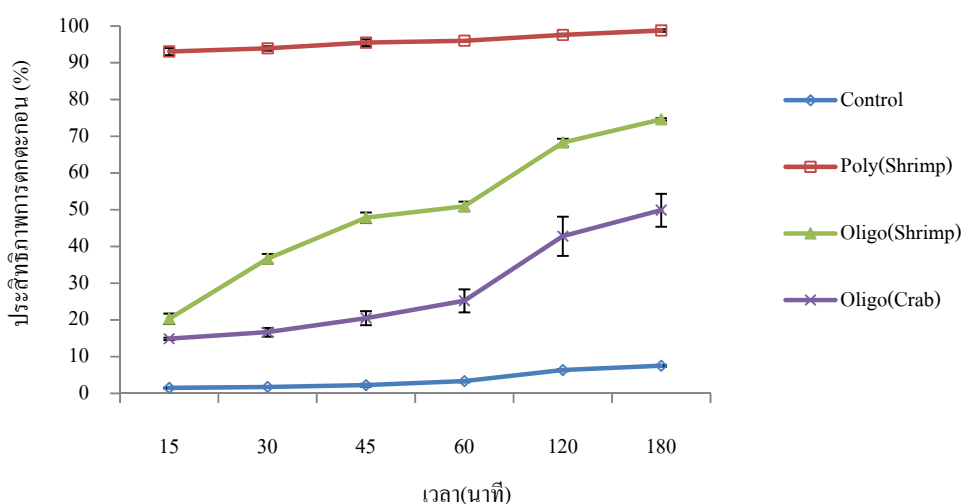
ภาพที่ 4-6 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ในแต่ละช่วงระยะเวลาเมื่อใช้สารโคโคซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปูเป็นสารตกตะกอนที่ 5 ระดับความเข้มข้น

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

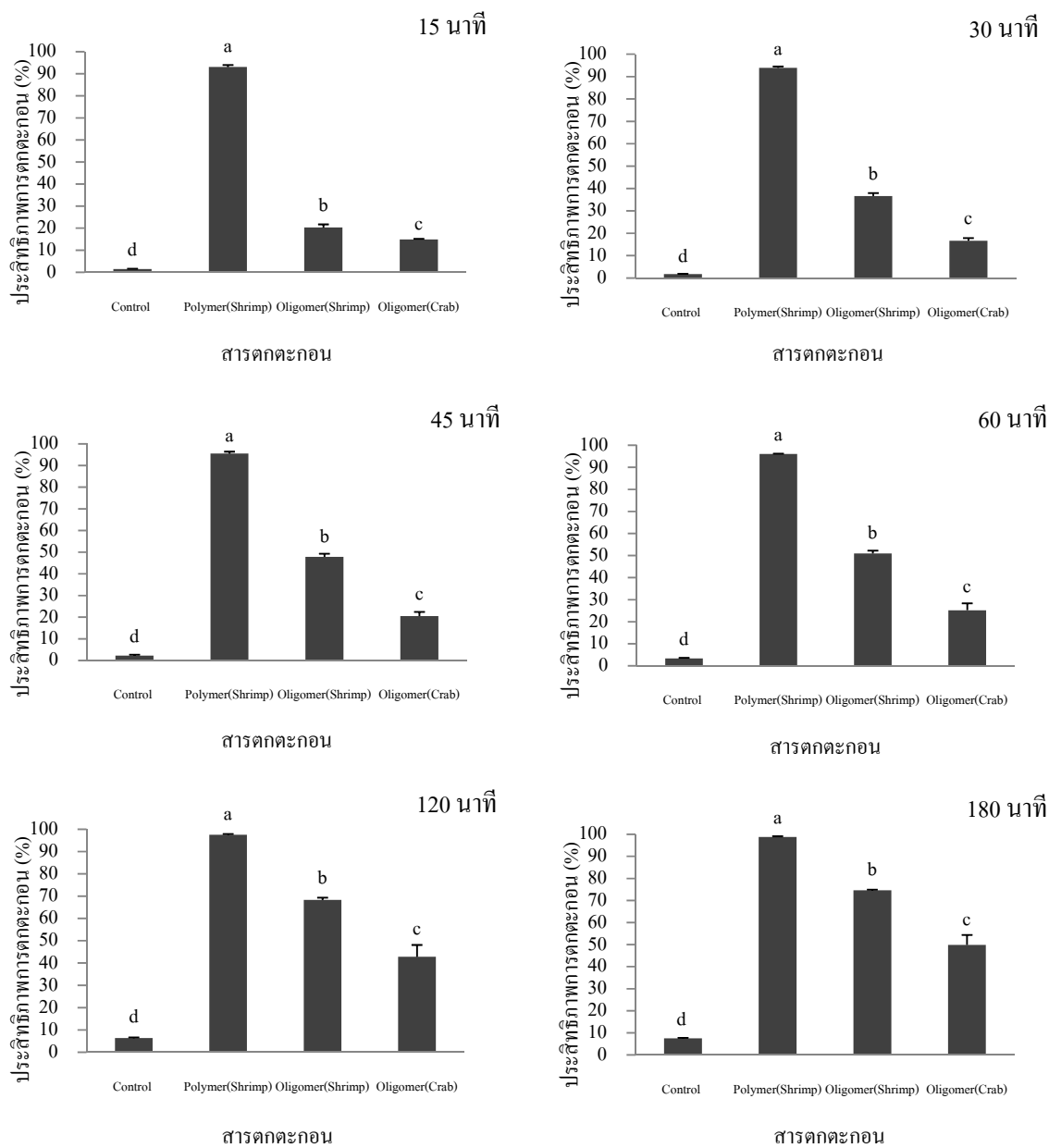
- อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

4. ประสิทธิภาพการตกตะกอนด้วยไคโตซานทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร การตกตะกอนของเซลล์ *Chaetoceros* เมื่อใช้สารไคโตซานโพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งมีประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงที่สุด โดยสูงกว่าการใช้สารไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้ง สารไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกปู และหูดควบคุม (ภาพที่ 4-7) ตั้งแต่ที่ระยะเวลา 15 - 180 นาที โดยมีประสิทธิภาพการตกตะกอนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในการใช้สารไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้ง สารไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกปู ตามลำดับ (ภาพที่ 4-8)



ภาพที่ 4-7 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* เมื่อใช้สารไคโตซาน 3 ชนิดเป็นสารตกตะกอนที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



ภาพที่ 4-8 ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ในแต่ละช่วงระยะเวลาเมื่อใช้สารไคโตซาน 3 ชนิดเป็นสารตกตะกอนที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

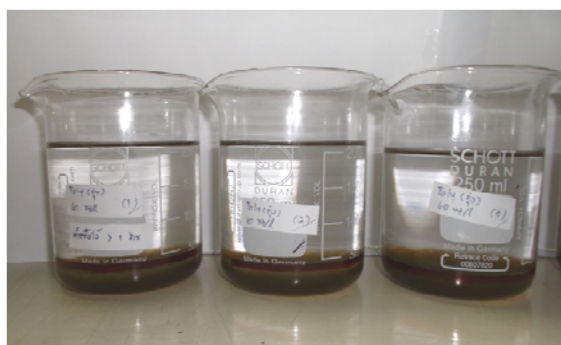
- อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

5. ลักษณะทางกายภาพของตะกอน *Chaetoceros* ที่ได้จากการใช้โคโตซานทั้ง 3 ชนิด เป็นสารตกตะกอน

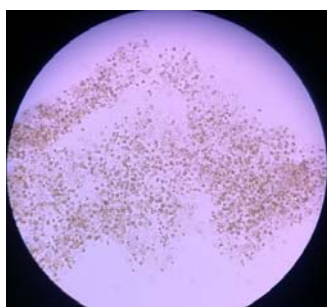
5.1 *Chaetoceros* ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยโคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง เซลล์ *Chaetoceros* จับกลุ่มกันเป็นก้อนตะกอนอย่างรวดเร็วหลังปรับ pH เป็น 8.5 ลักษณะตะกอนเป็นกลุ่มแน่น ขนาดใหญ่ แยกตัวจากมวลน้ำอย่างชัดเจน และจมตัวลงอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 4-9 ก) เมื่อตั้งทิ้งไว้ 180 นาทีเซลล์ *Chaetoceros* ถูกตกตะกอนออกจากมวลน้ำจนใส ตะกอนจะตกลงรวมที่ก้นภาชนะอย่างหนาแน่น (ภาพที่ 4-9 ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตะกอนที่เกิดขึ้นมาจากการรวมตัวของเซลล์ *Chaetoceros* จำนวนมาก ตะกอนขนาดใหญ่ ภายในก้อนตะกอนตัวเซลล์มีการจับตัวกันหนาแน่นสูงมาก (ภาพที่ 4-9 ค)



(ก)



(ข)



(ค)

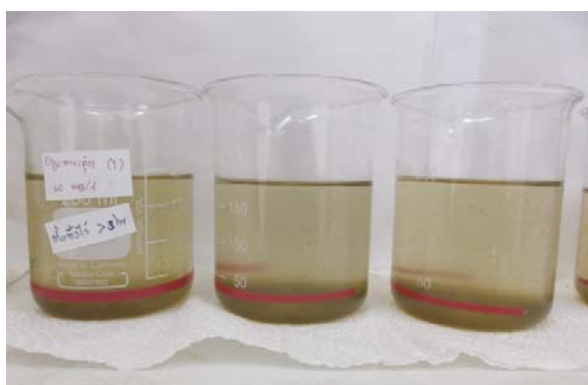
ภาพที่ 4-9 ลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่เกิดขึ้นหลังเติมสารโคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งแล้วปรับ pH เป็น 8.5

(ก) สภาพ *Chaetoceros* เมื่อ ตั้งทิ้งไว้ 0 นาที

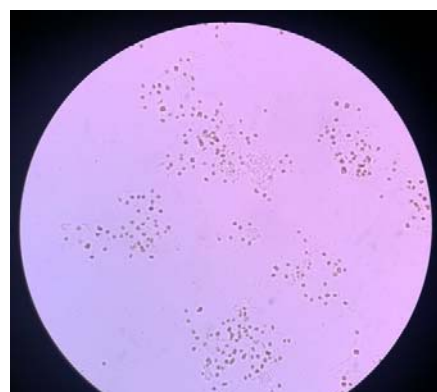
(ข) สภาพ *Chaetoceros* เมื่อ ตั้งทิ้งไว้ 180 นาที

(ค) ลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5.2 *Chaetoceros* ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง หลังเติมสารไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งแล้วปรับ pH เป็น 8.5 ตั้งทิ้งไว้ 180 นาที เซลล์ *Chaetoceros* จับกลุ่มกันเป็นกลุ่มก้อนตะกอนอย่างหลวม ๆ ขนาดเล็กในมวลน้ำ เมื่อก้อนตะกอนใหญ่ขึ้นจะตกลงก้นภาชนะอย่างช้า ๆ (ภาพที่ 4-10 ก) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตะกอนที่เกิดขึ้นมาจากการรวมตัวของเซลล์ *Chaetoceros* จับตัวกันอยู่แบบไม่หนาแน่น(ภาพที่ 4-10 ข)



(ก)



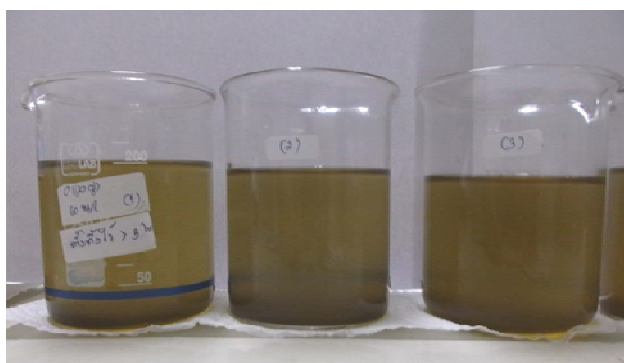
(ข)

ภาพที่ 4-10 ลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่เกิดขึ้นหลังเติมสารไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งแล้วปรับ pH เป็น 8.5

(ก) สภาพ *Chaetoceros* เมื่อ ตั้งทิ้งไว้ 180 นาที

(ข) ลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5.3 *Chaetoceros* ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปู การรวมตัวจับกลุ่มกันเป็นก้อนตะกอนเกิดอย่างช้า ๆ หลังปรับ pH เป็น 8.5 โดยเซลล์ *Chaetoceros* ค่อย ๆ จับกันเป็นกลุ่มหลวม ๆ คล้ายผงละเอียดสีน้ำตาลในมวลน้ำ (ภาพที่ 4-11 ก) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตะกอนที่เกิดขึ้นมาจากการรวมตัวของเซลล์ *Chaetoceros* แบบไม่หนาแน่นพบเซลล์เดี่ยว หรือตะกอนเซลล์จำนวนไม่เกิน 10 เซลล์ เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 4-11 ข)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4-11 ลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่เกิดขึ้นหลังเติมสารโคโตซาน โอลิโกเมอร์ สกัดจากเปลือกปูแล้วปรับ pH เป็น 8.5

(ก) สภาพ *Chaetoceros* เมื่อ ตั้งทิ้งไว้ 180 นาที

(ข) ลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

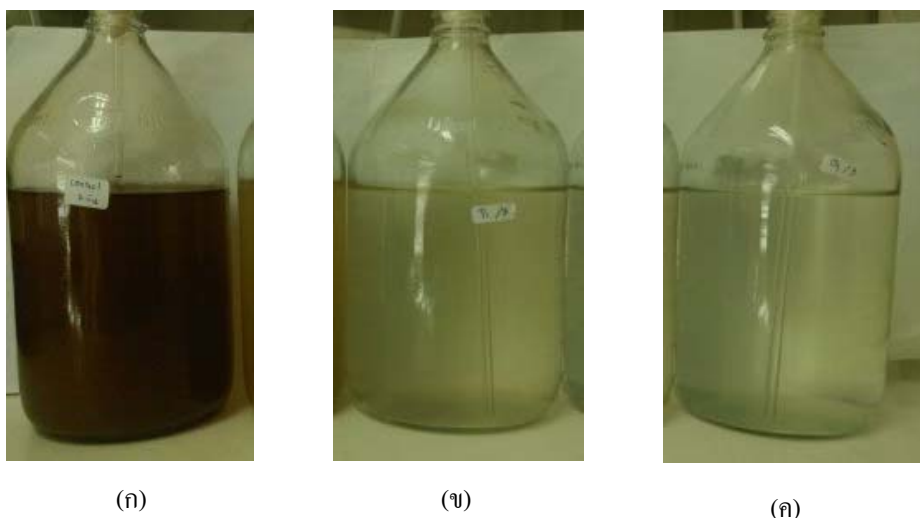
## 6. การฟื้นตัวของเซลล์ *Chaetoceros* ภายหลังจากการตกตะกอนด้วยโคโตซาน

จากการทดลองตกตะกอน *Chaetoceros* ด้วยโคโตซานร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH ที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตรสารโคโตซาน โพลีเมอร์ และสารโคโตซาน โอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงสุด (> 70 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลา 180 นาที จึงนำตะกอน *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ตกตะกอนได้จากสารทั้ง 2 ชนิดนี้มาขยายต่อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทดสอบความสามารถในการฟื้นตัวของเซลล์ ปรากฏผลดังนี้

### 6.1 ลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อใช้สารโคโตซาน โพลีเมอร์ และสารโคโตซาน โอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตรมาทำการตกตะกอน พบว่าเซลล์ *Chaetoceros* ที่ใช้สารโคโตซาน โพลีเมอร์ ยังคงจับตัวกันเป็นก้อนกลุ่มตะกอนขนาดใหญ่ลอยในมวลน้ำสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าชัดเจน ไม่มีการแตกตัวของก้อนตะกอนเมื่อใส่อากาศลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ใช้สารโคโตซาน โอลิโกเมอร์ ในการตกตะกอนนั้นก้อนตะกอนที่ได้มีลักษณะเป็นก้อนกลุ่มขนาดเล็กเมื่อขยายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงมีลักษณะตะกอนผงละเอียดลอยค่อนข้างเป็นเนื้อเดียวกับมวลน้ำ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านมากกว่า 24 ชั่วโมง ในชุดการทดลองที่ใช้สารโคโตซานทั้ง

2 ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อไฮ เริ่มมีคราบตะกอน *Chaetoceros* สีน้ำตาลอ่อนติดตามก้นขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4-12 ก ถึง 4-12 ค)



ภาพที่ 4-12 สภาพ *Chaetoceros* เมื่อขยายด้วยหัวเชื้อ *Chaetoceros* แบบต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

(ก) *Chaetoceros* สด

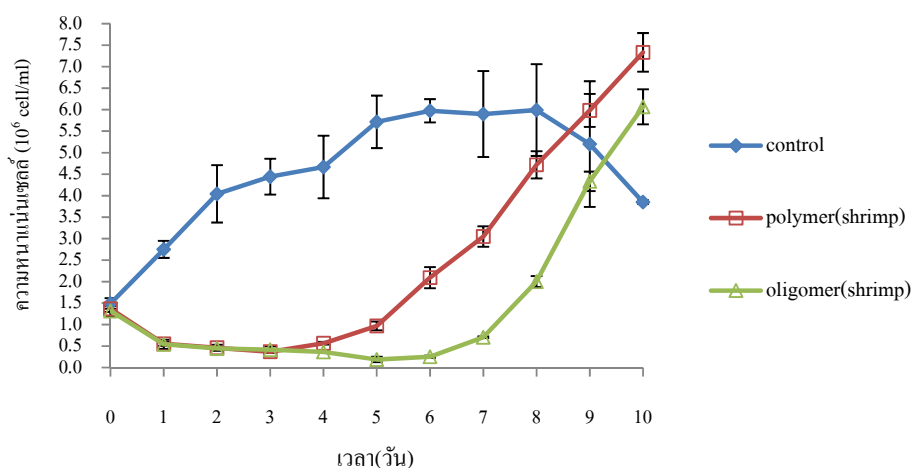
(ข) *Chaetoceros* ที่ตะกอนด้วยสารไคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

(ค) *Chaetoceros* ที่ตะกอนด้วยสารไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

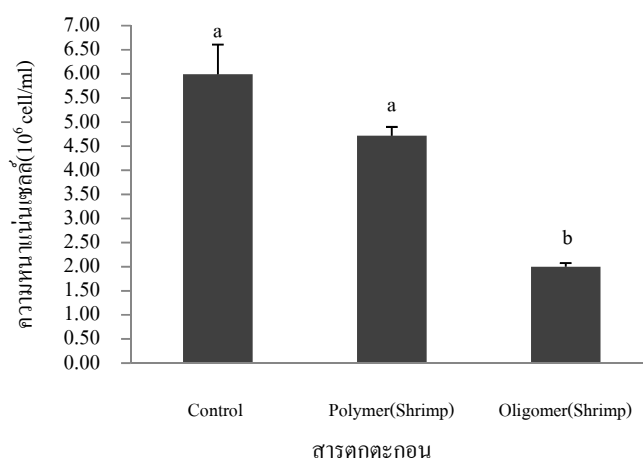
#### 6.2 อัตราการฟื้นตัวของเซลล์ *Chaetoceros* ภายหลังจากการตกตะกอน

นำตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยสารไคโตซาน โพลีเมอร์ และสารไคโตซาน โอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตรมาขยายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับอัตราการฟื้นตัวของเซลล์ *Chaetoceros* ปกติ (ชุดควบคุม) ในช่วงระยะที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดในการทดลองคือ อายุเชื้อที่ 8 วัน (ภาพที่ 4-13) พบว่าเซลล์ *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยสารไคโตซาน โพลีเมอร์สามารถขยายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี โดยจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) กับชุดควบคุม และมากกว่าเซลล์ *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยสารไคโตซาน โอลิโกเมอร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ภาพที่ 4-14)





ภาพที่ 4-13 อัตราการฟื้นตัวของเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการตะกอนหลังขยายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ  
 หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



ภาพที่ 4-14 จำนวนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการตะกอนหลังขยายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8 วัน  
 หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน  
 - อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## การทดลองที่ 2 ผลของการเก็บรักษาเซลล์ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

จากการทดลองตกตะกอน *Chaetoceros* ด้วยไคโตซานร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH เมื่อใช้สารไคโตซานโพลีเมอร์ และสารไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงที่สุด (> 70 เปอร์เซ็นต์) ที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตรแต่ตะกอน *Chaetoceros* ที่ได้จากสารไคโตซานทั้ง 2 ชนิดนี้มีความแตกต่างกันในลักษณะความหนาแน่นในการจับกลุ่มของตะกอน จึงทดสอบเพิ่มเติมถึงความในการแตกตัวของตะกอนเซลล์ เพื่อให้ได้ถึงลักษณะเซลล์ ที่เหมาะต่อการนำไปอนุบาลลูกกุ้ง โดยสังเกตลักษณะการจับกลุ่มรวมตัวตะกอนด้วยตาเปล่า และลักษณะตะกอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์

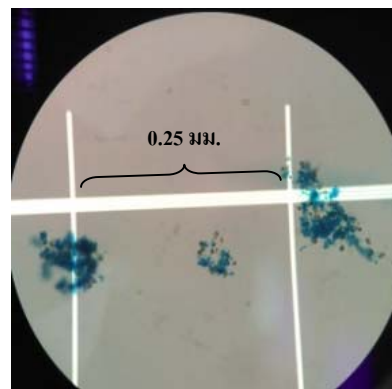
### 1. ลักษณะการแตกตัวของตะกอน *Chaetoceros* ภายหลังเก็บรักษา

#### 1.1 ละลายที่อุณหภูมิห้อง

นำตัวอย่างตะกอน *Chaetoceros* ของทั้งสารไคโตซานโพลีเมอร์ และสารไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้ง มาเก็บรักษา แล้วนำมาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที พบว่า *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไคโตซานโพลีเมอร์ตะกอนรวมตัวกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ อยู่ที่ก้นหลอดเก็บตัวอย่างแยกกับมวลน้ำชัดเจน (ภาพที่ 4-15 ก) เมื่อส่องดูตะกอนใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์มีลักษณะจับกันอย่างหนาแน่น พบเซลล์เดี่ยว ๆ น้อยมาก (ภาพที่ 4-15 ข) ส่วน *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์ภายหลังการละลายตะกอนรวมตัวกันมีลักษณะเป็นก้อนกลุ่ม ๆ สีนํ้าตาลเข้ม ในมวลน้ำ (ภาพที่ 4-15 ค) เมื่อส่องดูตะกอนใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีลักษณะจับตัวกันอย่างหลวม ๆ พบเซลล์เดี่ยว ๆ กระจายอยู่ทั่วไป (ภาพที่ 4-15 ง)



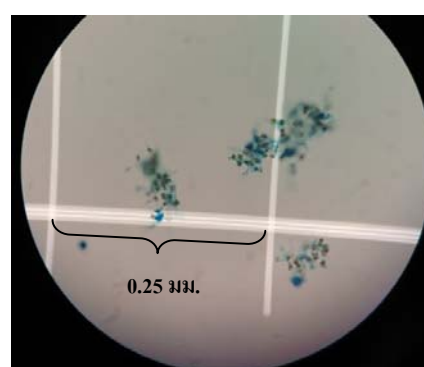
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4-15 เซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส  
 ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิห้อง

(ก) สภาพ *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไลโอดซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

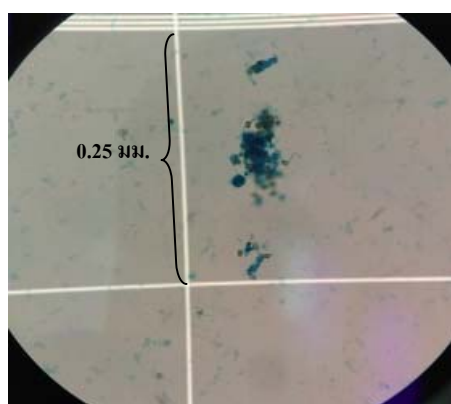
(ข) ลักษณะเซลล์ *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไลโอดซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง  
 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(ค) สภาพ *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไลโอดซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

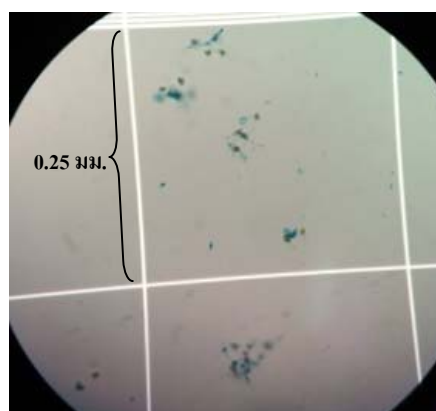
(ง) ลักษณะเซลล์ *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไลโอดซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง  
 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

## 1.2 เขย่า

นำตัวอย่างตะกอน *Chaetoceros* ของทั้งสารไลโคซาน โพลีเมอร์ และสารไลโคซาน โอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งที่ผ่านการเก็บรักษามาทำการละลายโดยนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 15 นาที แล้วนำมาเขย่าเป็นเวลา 60 วินาที พบว่า *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไลโคซาน โพลีเมอร์ ตะกอนมีการแตกตัวในมวลน้ำเมื่อทิ้งไว้ สัปดาห์ประมาณ 5 นาที ตะกอนจะจับรวมตัวใหม่อีกครั้ง เป็นกลุ่มขนาดเล็ก ๆ ค่อย ๆ ตกกลับกันหลออย่างรวดเร็ว เมื่อส่องดูตะกอนใต้กล้องจุลทรรศน์ พบสาย โพลีเมอร์ที่ติดสีย้อมมากระจายอยู่เป็นจำนวนมาก เซลล์จับกลุ่มกันอย่างหนาแน่น แต่มีขนาดการจับ กลุ่มตะกอนเล็กลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ทำการละลายที่อุณหภูมิห้องเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4-16 ก) *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไลโคซาน โอลิโกเมอร์ภายหลังการละลายและนำมาเขย่า ตะกอนแตกออก คล้ายผงละเอียดผสมกับมวลน้ำจนดูเป็นสีน้ำตาลเนื้อเดียวกัน เมื่อทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จะจับกันเป็น กลุ่มบาง ๆ ค่อย ๆ ตกกลับกันหลอ ลักษณะตะกอนใต้กล้องจุลทรรศน์ ตะกอนมีจำนวนเซลล์ไม่หนาแน่นมาก ในกลุ่มตะกอน เซลล์จับกันเป็นกลุ่มอย่างหลวม ๆ มีเซลล์เดี่ยว หลุดกระจายอยู่เล็กน้อย (ภาพที่ 4-16 ข)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4-16 ลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาเขย่าเป็นเวลา 60 วินาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(ก) ตกตะกอนด้วยไลโคซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

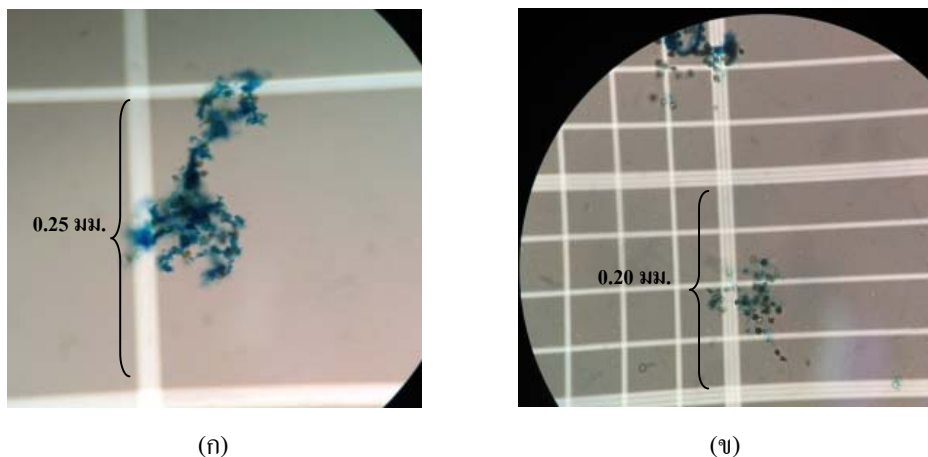
(ข) ตกตะกอนด้วยไลโคซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

### 1.3 ปรับ pH หลังละลาย

เนื่องจากค่า pH มีผลต่อการหดและคลายตัวของสายพันธะโพลีเมอร์จึงมีการทดลองใช้เทคนิคในการปรับค่า pH สุดท้ายของตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที เพื่อทดสอบความสามารถในการคลายตัวของพันธะโพลีเมอร์ของตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ถูกตกตะกอนด้วยสารไคโตซานโพลีเมอร์ และสารไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้ง และลักษณะของเซลล์ *Chaetoceros* ให้ได้ลักษณะตะกอนที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นอาหารอนุบาลลูกกุ้งขาวนั้น พบว่าค่า pH สุดท้ายของตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาภายหลังการละลายอยู่ในช่วง 7.4-8.2 จึงทดลองปรับค่า pH สุดท้ายลงมา 3 ระดับ คือ pH 7.0, pH 6.0 และ pH 5.0 ด้วยการเติมสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปรากฏผลดังนี้

#### 1.3.1 pH 7.0

นำตัวอย่างตะกอน *Chaetoceros* ของทั้งสารไคโตซานโพลีเมอร์ และสารไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งที่ผ่านการเก็บรักษามาทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาปรับ pH เป็น 7.0 ด้วยสารละลายกรดอะซิติก พบว่า *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไคโตซานโพลีเมอร์ ตะกอนมีลักษณะจับกันหลวมขึ้นเล็กน้อยคล้ายกลุ่มเซลล์ ขนาดใหญ่ในมวลน้ำ เมื่อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที กลุ่มตะกอนเริ่มจับรวมตัวกัน และค่อย ๆ ตกลงก้นหลอดอย่างรวดเร็ว เมื่อส่องดูตะกอนใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์ *Chaetoceros* ยังคงจับกลุ่มกันอย่างหนาแน่น (ภาพที่ 4-17 ก) *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาปรับ pH เป็น 7 ลักษณะตะกอนเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลในมวลน้ำ เมื่อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ตะกอนลักษณะเป็นผงหนาขึ้นเล็กน้อยตกลงที่ก้นหลอดเล็กน้อย แต่ตะกอนเซลล์ส่วนใหญ่ยังคงแขวนลอยอยู่ในมวลน้ำ ลักษณะตะกอนใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์ *Chaetoceros* ส่วนใหญ่ยังคงจับกันเป็นกลุ่มก้อน ขนาดค่อนข้างใหญ่ (ภาพที่ 4-17 ข)



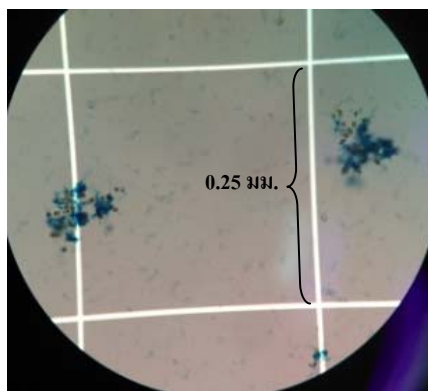
ภาพที่ 4-17 ลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาปรับ pH เป็น 7.0 ภายใต้อุปกรณ์จลทรรศน์

(ก) ตกตะกอนด้วยไคโตซานโพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

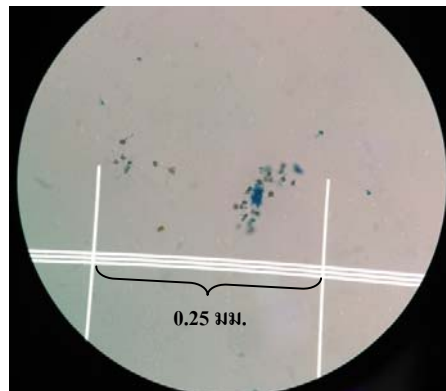
(ข) ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

### 1.3.2 pH 6.0

นำตัวอย่างตะกอน *Chaetoceros* ของทั้งสารไคโตซานโพลีเมอร์ และสารไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งที่ผ่านการเก็บรักษามาทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาปรับ pH เป็น 6.0 ด้วยสารละลายกรดอะซิติก พบว่า *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไคโตซานโพลีเมอร์ ตะกอนมีลักษณะคล้ายผงละเอียดในมวลน้ำ ขนาดตะกอนเล็กละเอียดกว่าตะกอนที่ได้จากวิธีการแช่ เมื่อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เกิดกลุ่มตะกอนบาง ๆ ขนาดเล็กแตกละเอียดได้ง่าย ในมวลน้ำยังไม่ตกลงก้นหลอด เมื่อส่องดูตะกอนใต้อุปกรณ์จลทรรศน์ เซลล์ *Chaetoceros* ยังคงจับกลุ่มกันอย่างหนาแน่น ขนาดตะกอนเล็กลง สายพินธะโพลีเมอร์ที่ติดสีข้อมแตกออกเป็นสายสั้น ๆ ค่อนข้างแหลกหลุดกระจายอยู่ที่สไลด์ (ภาพที่ 4-18 ก) *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โอลิโกเมอร์ภายหลังจากการละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาปรับ pH เป็น 6.0 ลักษณะตะกอนเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลในมวลน้ำ เมื่อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ผงก้อนตะกอนหนาขึ้นเล็กน้อย แต่ยังคงแขวนลอยอยู่ในมวลน้ำ ลักษณะตะกอนใต้อุปกรณ์จลทรรศน์เซลล์ *Chaetoceros* ส่วนใหญ่ยังคงจับกันเป็นกลุ่มก้อน มีขนาดเล็ก ๆ จับกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ (ภาพที่ 4-18 ข)



(ก)



(ข)

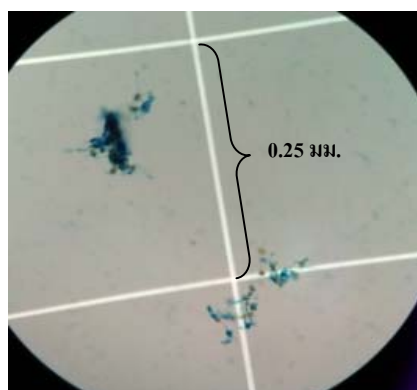
ภาพที่ 4-18 ลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาปรับ pH เป็น 6.0 ภายใต้อุปกรณ์จลทรรศน์

(ก) ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

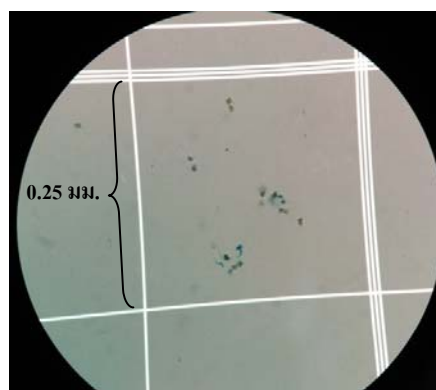
(ข) ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

### 1.3.3 pH 5.0

นำตัวอย่างตะกอน *Chaetoceros* ของทั้งสารไคโตซาน โพลีเมอร์ และสารไคโตซาน โอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งที่ผ่านการเก็บรักษามาทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาปรับ pH เป็น 5.0 ด้วยสารละลายกรดอะซิติก *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โพลีเมอร์ พบว่าตะกอนมีลักษณะเป็นผง ๆ ละเอียดในมวลน้ำ มองด้วยตาเปล่าเป็นสีน้ำตาลเนื้อเดียวกับน้ำ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อส่องดูตะกอนใต้อุปกรณ์จลทรรศน์ เซลล์ *Chaetoceros* ยังคงจับกลุ่มกันอย่างหนาแน่นในบางส่วน ขนาดตะกอนเล็กลง สายพันธะ โพลีเมอร์ที่ติดสีข้อมแดงออกเป็นสายสั้น ๆ (ภาพที่ 4-19 ก) ใน *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไคโตซาน โอลิโกเมอร์ภายหลังจากการละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาปรับ pH เป็น 5.0 ลักษณะตะกอนเป็นสีน้ำตาลเนื้อเดียวกับน้ำ เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง ไม่มีการกลับมารวมตัวกันของตะกอนอีกและไม่พบตะกอนตกลงกันหลุดทดลอง ลักษณะตะกอนใต้อุปกรณ์จลทรรศน์เซลล์ *Chaetoceros* ส่วนใหญ่หลุดจากกลุ่มเซลล์ออกเป็นเดี่ยวจำนวนมาก พบเซลล์ที่ยังจับกันเป็นกลุ่มแบบไม่หนาแน่นกระจายอยู่เล็กน้อย (ภาพที่ 4-19 ข)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4-19 ลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาปรับ pH เป็น 5.0 ภายใต้อ่างจุลทรรศน์

(ก) ตกตะกอนด้วยไลโคโตซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

(ข) ตกตะกอนด้วยไลโคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

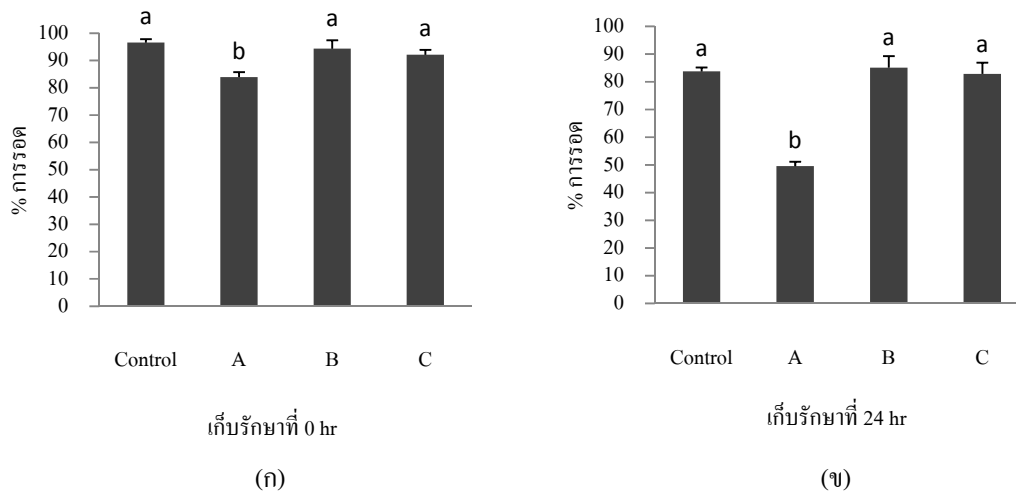
## 2. เปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษา

จากการทดลองลักษณะการแตกตัวของตะกอน พบว่า *Chaetoceros* เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาซึ่งได้จากการตกตะกอนด้วยสารไลโคโตซาน โอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งมีลักษณะการแตกตัวของตะกอนเหมาะสมที่สุดในการนำไปปรับใช้สำหรับการอนุบาลลูกกุ้ง จึงเลือกใช้ตะกอน *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยสารไลโคโตซาน โอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งมาทดสอบการเก็บรักษาต่อเพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ *Chaetoceros* ที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยใช้กลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (v/v) เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งแล้วนำมาเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปรากฏผลดังนี้

### 2.1 เก็บรักษาเป็นเวลา 0 และ 24 ชั่วโมง

ในการเก็บรักษาหุคควบคุม คือหัวเชื้อ *Chaetoceros* สด ที่ระยะเวลา 0 และ 24 ชั่วโมงของการเป็นรักษา พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การรอดที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) กับตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วยไลโคโตซาน ทั้งที่มีการผสมกลีเซอรอลและไม่ผสมกลีเซอรอล มีเปอร์เซ็นต์การรอดมากกว่าเซลล์ *Chaetoceros* สดที่ผสมกับกลีเซอรอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ภาพที่ 4-20 ก และ 4-20 ข)





ภาพที่ 4-20 เปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อมีการผสมและไม่ผสมกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) ในการเก็บรักษา

(ก) เก็บรักษาเป็นเวลา 0 ชั่วโมง

(ข) เก็บรักษาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Control = *Chaetoceros* สด

A = *Chaetoceros* สดผสมกลีเซอรอล

B = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยใช้ไลโอดานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์

C = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยใช้ไลโอดานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์ผสมกลีเซอรอล

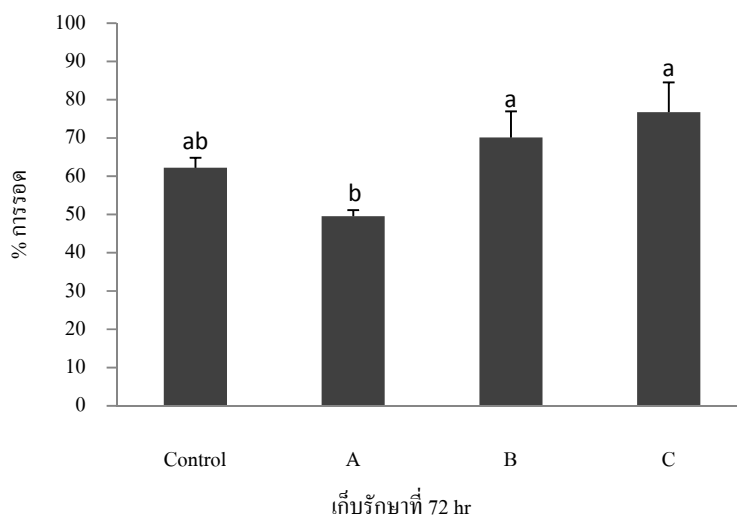
**หมายเหตุ** - ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

- อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

2.2 เก็บรักษาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผสมกลีเซอรอลมีเปอร์เซ็นต์การรอดที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) กับตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ไม่ผสมกับผสมกลีเซอรอล และ

ชุดควบคุม โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดมากกว่าเซลล์ *Chaetoceros* สดที่ผสมกับกลีเซอรอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การรอดที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) กับเซลล์ *Chaetoceros* สดที่ผสมกับกลีเซอรอล (ภาพที่ 4-21)



ภาพที่ 4-21 เปอร์เซนต์การรอดของเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อมีการผสมและไม่ผสมกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร (v/v) เก็บรักษาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Control = *Chaetoceros* สด

A = *Chaetoceros* สดผสมกลีเซอรอล

B = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยใช้ไโคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์

C = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยใช้ไโคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์ผสมกลีเซอรอล

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

- อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

### การทดลองที่ 3 ผลการทดลองการใช้ *Chaetoceros* สดและ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาในการอนุบาลลูกกุ้งขาว(*L. vannamei*)

ในการทดลองใช้ *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยสารไลโคซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร และเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาใช้ออนุบาลลูกกุ้งขาวระยะซูเอีย ด้วยวิธีการต่าง ๆ กัน ดังนี้ อนุบาลด้วย *Chaetoceros* สด (ชุดควบคุม) อนุบาลด้วย *Chaetoceros* สดผสมไลโคซานกับกลีเซอรอลก่อนนำไปให้ลูกกุ้ง อนุบาลด้วย *Chaetoceros* เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษามาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที อนุบาลด้วย *Chaetoceros* เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษามาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาแช่เป็นเวลา 60 วินาที จนตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* แยกตัวเป็นเนื้อละเอียดเพื่อให้พันธะโพลีเมอร์ของไลโคซานที่จับกับเซลล์ *Chaetoceros* หลุดออกก่อนนำไปให้ลูกกุ้ง และอนุบาลด้วย *Chaetoceros* เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษามาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาปรับค่า pH สุดท้ายของสารละลายเป็น 5.0 ก่อนนำไปให้ลูกกุ้งเพื่อให้พันธะโพลีเมอร์ของไลโคซานที่จับกับเซลล์ *Chaetoceros* เกิดการคลายตัวมากขึ้นช่วยลดภาวะการเข้าจับรวมตะกอนใหม่ของสายพันธะโพลีเมอร์

#### 1. พัฒนาการและเปอร์เซ็นต์การรอดตายของลูกกุ้งขาว

การอนุบาลด้วย *Chaetoceros* สดลูกกุ้งมีการพัฒนาดีที่สุด โดยสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะไมซิสที่ 1 ได้ครบ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทุกชุดการทดลอง ภายในเวลา 5 วันของการอนุบาล นอกจากนี้ยังพบว่า *Chaetoceros* เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาและการเติมสารไลโคซานในการตกตะกอนเซลล์ และการเติมสารกลีเซอรอลเพื่อใช้ป้องกันเซลล์จากการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดตายของลูกกุ้งที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 4-1) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* สด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของลูกกุ้งสูงที่สุด

ตารางที่ 4-1 ระยะการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเปอร์เซ็นต์การรอดตายของลูกกุ้งขาว (*L. vannamei*) ภายหลังจากการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* สด และ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน

การทดลอง	ระยะลูกกุ้ง	การพัฒนาการ (%)	เปอร์เซ็นต์การรอดตาย
control	Mysis1	100	34±6 <sup>a</sup>
A	Mysis1	40	22±1 <sup>b</sup>
B	Zoea3	30	25±1 <sup>b</sup>
C	Zoea3	40	22±1 <sup>b</sup>
D	Zoea3	20	24±1 <sup>b</sup>

Control = *Chaetoceros* สด

A = *Chaetoceros* สดผสมกับโคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์ และกลีเซอรอล

B = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยโคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์และกลีเซอรอล หลังจากทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง

C = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยใช้โคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์ผสมกลีเซอรอล หลังจากทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง และนำมาเขย่าก่อนนำไปใช้

D = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยใช้โคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์ผสมกลีเซอรอล หลังจากทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง และนำมาปรับ pH เป็น 5.0 ก่อนนำไปใช้

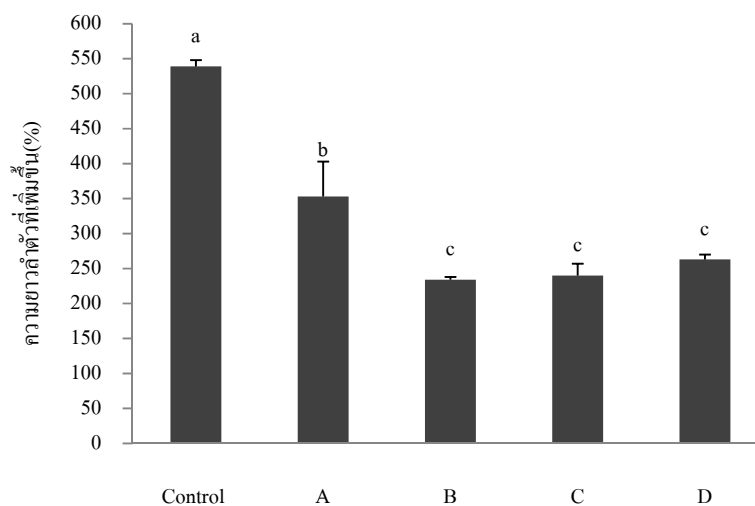
หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

- อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## 2. การเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาว

### 2.1 ความยาวลำตัว

การอนุบาลด้วย *Chaetoceros* สด (ชุดควบคุม) ลูกกุ้งมีความยาวลำตัวสูงที่สุด โดยสูงกว่าใน ทุกชุดทดลอง ทั้งการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* ผสมสารโคโคซานกับกลีเซอรอล และ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าการอนุบาล *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่เก็บรักษามีผลต่อพัฒนาการด้านความยาวลำตัวของลูกกุ้งอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* สด แต่อย่างไรก็ตาม การอนุบาลด้วย *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่เก็บรักษาในวิธีที่ต่างกัน ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ต่อพัฒนาการด้านความยาวลำตัวของลูกกุ้ง (ภาพที่ 4-22)



ภาพที่ 4-22 ความยาวที่เพิ่มขึ้นของลูกกุ้งขาว (*L. vannamei*) ภายหลังจากการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* สด และ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษา

Control = *Chaetoceros* สด

A = *Chaetoceros* สดผสมกับไคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์ และกลีเซอรอล

B = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยไคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์และกลีเซอรอล หลังจากทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง

C = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยใช้ไคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์ผสมกลีเซอรอล หลังจากทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง และนำมาเขย่าก่อนนำไปใช้

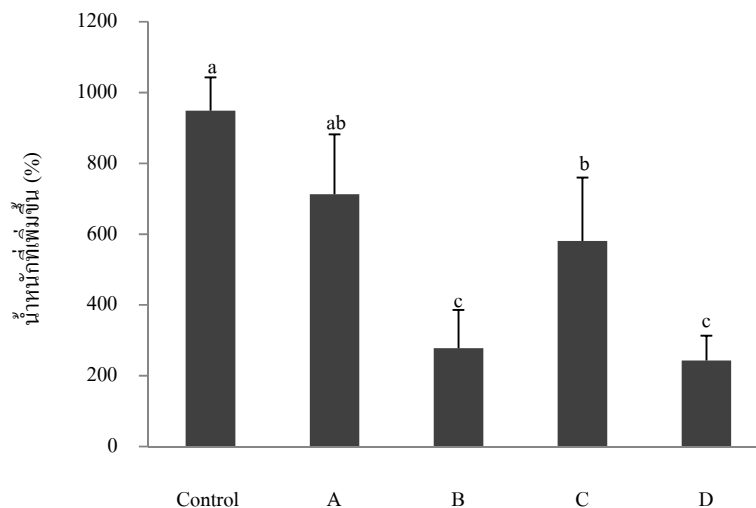
D = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยใช้ไคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์ผสมกลีเซอรอล หลังจากทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง และนำมาปรับ pH เป็น 5.0 ก่อนนำไปใช้

**หมายเหตุ** - ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

- อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## 2.2 น้ำหนัก

น้ำหนักของลูกกุ้งทั้งที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* สด และ *Chaetoceros* สดผสมสารไคโตซาน กับสารกลีเซอรอล มีผลต่ออัตราการน้ำหนักของลูกกุ้งที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด โดยสูงกว่าอนุบาลด้วย *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้แล้วพบว่า การนำ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านเก็บรักษามาใช้ในการอนุบาล เมื่อทำการเขย่าก่อนนำไปใช้ออนุบาล น้ำหนักของลูกกุ้งเพิ่มขึ้นมากกว่าการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านเก็บรักษาด้วยเทคนิคอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับ *Chaetoceros* สดผสมสารไคโตซานกับสารกลีเซอรอล (ภาพที่ 4-23)



ภาพที่ 4-23 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของลูกกุ้งขาว (*L. vannamei*) ภายหลังจากอนุบาลด้วย *Chaetoceros* สด และ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษา

Control = *Chaetoceros* สด

A = *Chaetoceros* สดผสมกับไลโคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์ และกลีเซอรอล

B = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยไลโคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์และกลีเซอรอล หลังจากทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง

C = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยใช้ไลโคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์ผสมกลีเซอรอล หลังจากทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง และนำมาเขย่าก่อนนำไปใช้

D = *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยใช้ไลโคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งในรูปแบบโอลิโกเมอร์ผสมกลีเซอรอล หลังจากทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง และนำมาปรับ pH เป็น 5.0 ก่อนนำไปใช้

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

- อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



### 3. คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง

จากการตรวจสอบคุณภาพน้ำในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งขาว พบว่าระดับ pH ของน้ำอยู่ในช่วง 8.13-8.25 ระดับความเค็ม 30.08-30.81 ส่วนในพัน ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 4.76-5.09 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าอุณหภูมิน้ำอยู่ในช่วง 30.24-30.84 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นด่างอยู่ในช่วง 87.60-99.98 มิลลิกรัมต่อลิตรของแคลเซียมคาร์บอเนต (mg/l-CaCO<sub>3</sub>) ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันในทุกตัวอย่างของการอนุบาล แตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างที่มีการเติมสารไคโตซานและกลีเซอรอลร่วมด้วยทั้งใน *Chaetoceros* สด และ *Chaetoceros* เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษา พบว่ามีปริมาณแอมโมเนีย ปริมาณไนไตรท์ และค่าบีโอดี สูงกว่าการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* สดที่เป็นชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 4-2)

ตารางที่ 4-2 คุณภาพน้ำระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งขาว (*L. vannamei*)

ชุดการทดลอง	pH	ความเค็ม (ppt)	ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (mg/l)	อุณหภูมิ (°C)	แอมโมเนีย (mg-N/l)	ไนไตรท์ (mg-N/l)	ความเป็นด่าง (mg/l-CaCO <sub>3</sub> )	บีโอดี (mg/l)
Control	8.22±0.01	30.81±0.04	5.09±0.05	30.24±0.15	0.09±0.01 <sup>b</sup>	1.17±0.34 <sup>b</sup>	87.69±9.31	4.94±0.45 <sup>b</sup>
A	8.13±0.01	30.35±0.07	4.78±0.05	30.28±0.14	0.15±0.01 <sup>a</sup>	1.67±0.44 <sup>a</sup>	99.98±4.56	6.51±0.22 <sup>a</sup>
B	8.20±0.02	30.79±0.02	4.90±0.07	30.76±0.19	0.18±0.02 <sup>a</sup>	2.17±0.45 <sup>a</sup>	88.94±7.88	6.65±0.17 <sup>a</sup>
C	8.23±0.03	30.71±0.02	4.89±0.06	30.75±0.18	0.18±0.02 <sup>a</sup>	2.17±0.47 <sup>a</sup>	92.96±8.41	6.36±0.30 <sup>a</sup>
D	8.25±0.02	30.08±0.04	4.76±0.05	30.84±0.20	0.15±0.01 <sup>a</sup>	2.83±0.59 <sup>a</sup>	98.28±8.22	6.29±0.39 <sup>a</sup>

Control = อนุบาลด้วย *Chaetoceros* สด

A = อนุบาลด้วย *Chaetoceros* สดผสมสารไคโตซานและสารป้องกันความเย็น

B = อนุบาลด้วยเซลล์ *Chaetoceros* เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษา

C = อนุบาลด้วยเซลล์ *Chaetoceros* เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษา นำมาเขย่าก่อนนำไปใช้

D = อนุบาลด้วยเซลล์ *Chaetoceros* เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษา นำมาปรับ pH เป็น 5.0 ก่อนนำไปใช้

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

- อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผล

#### 1. ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ด้วยไคโตซาน

จากการศึกษาถึงประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ด้วยสารไคโตซาน 3 ชนิด คือ ไคโตซาน โพลิเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง ไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง และไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปู ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH ในระหว่างการตกตะกอนคัดแปลงมาจากวิธีการของ Lertsutthiwong et al. (2009) เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการรวมตะกอนของ โดยสารไคโตซาน 3 ชนิด คือ ไคโตซาน โพลิเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง ไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง และไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปู มีประสิทธิภาพการตกตะกอนที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารและระยะเวลาในการรวมตะกอน ซึ่งไคโตซาน โพลิเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง ให้ประสิทธิภาพในการรวบรวมตะกอนดีที่สุด ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 40 - 60 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถตกตะกอนได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Lertsutthiwong et al. (2009) ที่พบว่า ประสิทธิภาพการรวมตะกอนของไคโตซาน โพลิเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง สามารถรวมตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ได้มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นไคโตซาน 40 - 80 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองนี้ประสิทธิภาพการรวมตะกอนของไคโตซานยังขึ้นกับชนิดของไคโตซานที่นำมาใช้ด้วย ซึ่งมีผลอย่างมากต่ออัตราการตกตะกอน และลักษณะของก้อนตะกอนที่เกิดขึ้น โดยเมื่อใช้ไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง เป็นสารตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมคือตั้งแต่ 60 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป จึงสามารถตกตะกอนได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 180 นาที และไคโตซาน โอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปู ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมคือตั้งแต่ 60 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป จึงสามารถตกตะกอนได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 180 นาที ซึ่งลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ได้จากการตกตะกอนของไคโตซาน โอลิโกเมอร์ทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะเป็นกลุ่มหลวม ๆ หรือเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลในมวลน้ำค่อย ๆ จมลงด้านล่างอย่างช้า ๆ ต่างจากตะกอนที่เกิดจากไคโตซานแบบโพลิเมอร์ มีลักษณะเป็นกลุ่มแน่น ขนาดใหญ่ จับตัวและจมตัวลงด้านล่างอย่างรวดเร็ว เนื่องจากไคโตซานแบบโพลิเมอร์มีโครงสร้างของสายพันระย้า จึงสามารถจับเซลล์ *Chaetoceros* ในมวลน้ำได้ดี ทั้งนี้การที่

เซลล์ *Chaetoceros* เกิดการรวมตัวและจับกลุ่มกันนั้น เป็นผลมาจากการที่ไคโตซานเป็นสารที่มีคุณสมบัติทางไฟฟ้าคือ เป็นโพลีเมอร์ที่มีประจุบวกอย่างรุนแรง ประกอบกับสารประกอบในธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็นโพลีเมอร์ที่เป็นประจุลบ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก จูลินทรีย์ เซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น มีผลทำให้ไคโตซานเป็นตัวสร้างตะกอนและตัวตกตะกอนที่ดี เพราะสายโพลีเมอร์ของไคโตซานจะเข้าไปเป็นสะพานเชื่อมต่อระหว่างอนุภาคของสารแขวนลอยที่มีประจุลบนั้นแข็งแรงและทนทานต่อแรงผลึก โดยเฉพาะสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จนเกิดเป็นตะกอนขึ้น (สราวุธ เจียรพร, 2555; Lalov et al., 2000; Divakaran & Pillai, 2001; Wibowo et al., 2007) เมื่อเกิดการเชื่อมโยงระหว่างเซลล์ *Chaetoceros* โดยสายโซ่ของไคโตซานจนมีน้ำหนักมากพอจะตกตะกอนลงอย่างรวดเร็ว (Divakaran and Pillai, 2002a) ซึ่งประสิทธิภาพการตกตะกอนโดยไคโตซานนั้นจะมีการรวมตัวเป็นกลุ่มตะกอนได้เร็วเมื่อมีความหนาแน่นของสารแขวนลอยสูง (สราวุธ เจียรพร, 2555)

## 2. การฟื้นตัวของเซลล์ *Chaetoceros* ภายหลังการตกตะกอนด้วยไคโตซาน

หลังจากตกตะกอน *Chaetoceros* ด้วยไคโตซาน พบว่าเซลล์จะจับกลุ่มกันเป็นก้อนทำให้มีความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มมากขึ้น จึงศึกษาต่อถึงวิธีการที่จะนำตะกอน *Chaetoceros* ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ ทั้งนี้จึงเลือกใช้ตะกอน *Chaetoceros* จากการตกตะกอนด้วยสารไคโตซานโพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง และสารไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง มาทดลองขยายต่อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับ การขยายด้วยหัวเชื้อ *Chaetoceros* สด ในระดับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่เท่ากัน เมื่อขยายลงอาหารเลี้ยงเชื้อเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยสารไคโตซานโพลีเมอร์ และสารไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งมีการตายเกิดขึ้น โดยเซลล์ลดจำนวนลงในระยะแรกแล้วค่อย ๆ ปรับตัวขยายจำนวนอีกครั้งเมื่อระยะเวลาผ่านไปโดย *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยสารไคโตซานโพลีเมอร์มีการฟื้นตัวได้เร็วกว่าการตกตะกอนด้วยสารไคโตซานโอลิโกเมอร์ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกับชุดควบคุม

ถึงแม้ว่าสารไคโตซานโพลีเมอร์จะให้ผลด้านการฟื้นตัวแต่เมื่อสังเกตจากลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่เกิดขึ้นนั้น เป็นตะกอนที่มีขนาดใหญ่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า ก้อนตะกอนที่เกิดขึ้นเมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์จับตัว และขดรวมกันอย่างหนาแน่น ไม่แตกตัวในสภาวะปกติ ไม่เหมาะสมต่อการนำไปปรับใช้เป็นอาหารอนุบาลลูกกุ้งขาววัยอ่อนระยะซูเอีย (Zoea) เนื่องจาก เป็น

ระยะที่ลูกกุ้งเริ่มกินอาหารแต่เนื่องจากขนาดปากยังมีขนาดเล็กจึงต้องการอาหารที่มีความกว้างเหมาะสมกับขนาดปากของลูกกุ้ง (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2544) ต่างจากลักษณะของตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยสารไคโตซาน โอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้ง ที่ลักษณะการจับตัวของกลุ่มตะกอนหลวม และกลุ่มตะกอนแตกตัวง่าย เซลล์จับกันอย่างหลวม ๆ เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากลักษณะดังกล่าวทำให้การเลือกใช้สารไคโตซาน โอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งมาตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* มีความเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในการอนุบาลลูกกุ้งมากกว่า จึงมีการนำมาทดลองเพิ่มเติมถึงความสามารถในการยืดอายุการเก็บรักษาตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ได้จากการตกตะกอน โดยการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งต่อไป

### 3. การเก็บรักษาเซลล์ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นด้วยวิธีการแช่แข็ง

การทดลองนี้เลือกใช้การเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งในการเก็บรักษาโดยใช้กลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ได้จากการตกตะกอนโดยสารไคโตซาน โอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้ง เนื่องจากในระหว่างการแช่แข็งจะมีการก่อตัวของผลึกน้ำแข็ง สามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อตัวเซลล์ได้ (Nakhla et al., 2002) สอดคล้องกับ Acker and McGann (2003) ที่ทำการศึกษาถึงผลของการป้องกันการเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์ในระหว่างการแช่แข็ง พบว่า ความเย็นและการแช่แข็งส่งผลต่อการได้รับบาดเจ็บของเซลล์ในระหว่างแช่แข็ง ทั้งนี้จากการศึกษาของ Yu and Quinn (2000) พบว่า ประสิทธิภาพของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง ช่วยจำกัดการเกิดผลึกน้ำแข็งอย่างสมบูรณ์ หลีกเลี่ยงเกิดผลึกน้ำแข็งหรือช่วยลดขนาดผลึกน้ำแข็งซึ่งมักจะเกิดได้อย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับ Brand (2005) ที่ศึกษาถึงวิธีการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งสำหรับการเก็บรักษาสาหร่ายจากการเพาะเลี้ยง พบว่า ความสำเร็จในการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งเซลล์สาหร่ายทะเลขึ้นอยู่กับการประยุกต์ใช้อัตราการทำความเย็น ร่วมกับการเติมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมจะช่วยให้เกิดสมดุลออสโมติก (osmotic balance) และลดการที่นิวเคลียสเกิดการเกาะรวมตัวกันเป็นน้ำแข็ง (ice nucleation) ลดความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ และอาจเพิ่มขึ้นถึงระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์

จากการทดลองตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* โดยสารไลโคซานโพลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้ง พบว่า ในระหว่างกระบวนการเก็บรวบรวมตะกอนหรือในช่วงระหว่างนำตัวอย่างตะกอนใส่หลอดเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปเก็บรักษาต่อ นั้น ไลโคซานยังคงมีประสิทธิภาพในการจับกับเซลล์ *Chaetoceros* อยู่จึงมีการตกตะกอนอย่างต่อเนื่องภายในหลอดเก็บตัวอย่าง ซึ่งภายหลังการเก็บรักษาเมื่อนำตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษามาทำการละลายโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตะกอนมีลักษณะจับกันเป็นกลุ่มสีน้ำตาลเข้มในมวลน้ำ เมื่อส่องดูตะกอนใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีลักษณะจับตัวกันอย่างหลวม ๆ พบเซลล์เดี่ยว ๆ กระจายอยู่ทั่วไป จึงทดสอบความสามารถในการแตกตัวของตะกอนเพิ่มเติมก่อนนำมาใช้เป็นอาหารอนุบาลลูกกุ้ง ด้วยเทคนิคอย่างง่ายใช้การเขย่าตัวอย่าง และการปรับลด pH สุดท้ายของตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ภายหลังการละลาย เมื่อเขย่าตัวอย่างตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่เก็บรักษา ตะกอนแตกออกคล้ายผงละเอียดผสมกับมวลน้ำจนเป็นสีน้ำตาลเนื้อเดียวกัน เมื่อทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จะจับกันเป็นกลุ่มตะกอนบาง ๆ ค่อย ๆ ตกลงกันหลอด ลักษณะตะกอนใต้กล้องจุลทรรศน์ ตะกอนมีจำนวนเซลล์ไม่หนาแน่นมากในกลุ่มตะกอน เซลล์จับกันเป็นกลุ่มอย่างหลวม ๆ มีเซลล์เดี่ยว หลุดกระจายอยู่เล็กน้อย ต่างจากการใช้วิธีการปรับลด pH สุดท้ายของตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* เป็นการเติมสารที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง ให้มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสภาพประจุในมวลน้ำ ซึ่งมีผลต่อการหดและคลายตัวของพันธะ โพลิเมอร์ที่จับกับเซลล์ *Chaetoceros* ซึ่งเทคนิคการปรับค่า pH เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอน ได้ถูกนำมาปรับใช้ตั้งแต่การทดลองแรก และให้ผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอนได้ดีในสารไลโคซานแต่ละชนิด เมื่อเทียบกับการตกตะกอนด้วยไลโคซานโดยทั่วไป (Lertsutthiwong et al., 2009) จากผลการทดลอง pH สุดท้ายที่เหมาะสมต่อการปรับลักษณะของตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* คือ pH ที่ 5.0 ลักษณะตะกอนเป็นสีน้ำตาลเนื้อเดียวกับน้ำ เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า ตั้งทิ้งไว้ไม่มีการกลับมารวมตัวกันของปุ๋ยตะกอนอีกและไม่พบตะกอนตกลงกันหลอดทดลอง ลักษณะตะกอนใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์ *Chaetoceros* ส่วนใหญ่หลุดจากกลุ่มเซลล์ออกเป็นเดี่ยวจำนวนมาก พบเซลล์ที่ยังจับกันเป็นกลุ่มแบบหลวม ๆ กระจายอยู่เล็กน้อย อาจเป็นผลมาจากในสภาพที่เป็นกลาง โครงสร้างของไลโคซานจะมีการขดม้วนมากขึ้นสามารถ จับเซลล์ได้มากจนมีขนาดใหญ่และได้ก้อนตะกอนที่หนาแน่น ในขณะที่เมื่อสารละลายมีสภาพเป็นกรดสายโซ่ของไลโคซานจะขยายมากขึ้น การสร้างตะกอนจึงหลวม และมีขนาดเล็ก (Huang et al., 2000 อ้างถึงใน Riano et al., 2012) สอดคล้องกับการศึกษาของ Cheng et al. (2011)

ศึกษาถึงผลกระทบจากองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในผนังเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* โดยใช้ไคโตซานเป็นสารในการรวมตะกอนสาหร่าย พบว่า ในสภาวะที่สารละลายตัวอย่างมี pH 5.5 หมู่อะมิโนในสายโพลิเมอร์ของไคโตซานจะมีประจุบวก และมีแวนโน้มผลึกซึ่งกันและกัน ด้วยเหตุนี้ลักษณะสายโพลิเมอร์ของไคโตซาน ก่อนข้างกลายเป็นเส้นตรง กระจายตัวในส่วนแขวนลอย ส่งผลให้เซลล์สาหร่ายมีแวนโน้มที่จะเข้ามาจับรวมตัวเป็นตะกอนได้ต่ำลง อีกทั้ง Grima et al. (2003) อ้างถึงใน Lertsutthiwong et al. (2009) พบว่าที่ pH 5 ไคโตซานมีประจุบวกสูงกว่าที่ pH 7 หรือ 9 การให้ไคโตซานเกินขนาดในสภาพที่เป็นกรดส่งผลให้มีประจุบวกจำนวนมากและเกิดประจุย้อนกลับที่ผิวเซลล์ของแพลงก์ตอนพืชซึ่งโดยทั่วไปมีประจุลบ จึงเป็นผลให้ประสิทธิภาพสายโพลิเมอร์ของไคโตซานที่มีประจุบวกอยู่แล้วเข้าจับกับผิวเซลล์ของแพลงก์ตอนได้น้อยลง ในการวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นการปรับใช้ *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย ไคโตซานเพื่อมาอนุบาลลูกกุ้งจึงเลือกใช้เทคนิคการเขย่า การปรับ pH สุดท้ายที่ 5.0 มาทดลองกับตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการละลาย เนื่องจากเป็นเซลล์ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นมีความหนาแน่นสูงในการเก็บรักษาอยู่แล้ว ทั้งนี้จึงต้องตรวจสอบอัตราการรอดและความสมบูรณ์ของเซลล์ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วย การใช้เซลล์ *Chaetoceros* ที่มีชีวิตย่อมให้ผลทางคุณค่าทางอาหารมากกว่า จึงได้ทำการทดสอบอัตราการรอดและความสมบูรณ์ของเซลล์

ทดสอบอัตราการรอดและความสมบูรณ์ของเซลล์ *Chaetoceros* ด้วยการนำตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษาช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือที่ 0, 24 และ 72 ชั่วโมง มาละลายแล้วย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม Evan's blue โดยการสังเกตเซลล์ตายจะเป็นเซลล์ที่ติดสีย้อม พบว่า ภายใต้ระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 72 ชั่วโมง เซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้ง ทั้งในตัวอย่างที่มีการผสมและไม่ผสมกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) ซึ่งเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งในการเก็บรักษา มีอัตราการรอดหลังการละลายดีที่สุดคือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ในกลุ่มตัวอย่างที่ผสมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง มีอัตราการรอดสูงสุดที่สุดคือ  $76.75 \pm 7.77$  เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และหัวเชื้อปกติที่มีการผสมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็งในการเก็บรักษา ลักษณะเซลล์ภายหลังการละลายเซลล์มีความสมบูรณ์ และจับกลุ่มกันแบบหลวม ๆ ด้วยสายโพลิเมอร์จากการตกตะกอนสังเกตได้จากการย้อมติดสีของสายโพลิเมอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์ การที่พบอัตราการรอดสูงในเฉพาะกลุ่มตัวอย่าง *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งนั้น

อาจเป็นผลมาจากการจับกลุ่มกันของเซลล์ และการถูกห่อหุ้มด้วยสายโพลิเมอร์ที่ใช้เป็นตัวจับเซลล์ *Chaetoceros* แขนงลอยในมวลน้ำให้เกิดการตกตะกอน สายโพลิเมอร์ของไคโตซานโอลิโกเมอร์อาจมีคุณสมบัติในการเป็นฉนวนปกป้องเซลล์ลดการถูกทำลายของผลิตภัณฑ์น้ำแข็งที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเก็บรักษา ถึงแม้ว่ามีการใช้กลีเซอรอลร่วมด้วยแต่พบว่าอัตราการรอดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) กับ *Chaetoceros* ตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งที่เก็บรักษาโดยไม่เติมสารกลีเซอรอล ทั้งนี้ไคโตซานอาจมีความสามารถในการปกป้องเซลล์มากกว่าการเลือกใช้กลีเซอรอล เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บรักษา *Chaetoceros* ชนิดผสมสารกลีเซอรอลในการเก็บรักษา ซึ่งมีอัตราการรอดต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ระยะเวลาการเก็บรักษาที่เท่ากันคือ 72 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลไม่สอดคล้องกับนิริวดี ทูมวัน (2543) ที่ศึกษาการเก็บรักษา *C. calcitrans* ด้วยวิธีการเดียวกัน ชนิด และความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลิตภัณฑ์น้ำแข็งที่เท่ากัน คือการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ร่วมกับกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) เป็นสารป้องกันการเกิดผลิตภัณฑ์น้ำแข็ง สามารถรักษาเซลล์ *Chaetoceros* ให้มีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ ได้นานถึง 6 สัปดาห์ โดยเซลล์ *Chaetoceros* มีอัตราการรอดต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 14 ของการเก็บรักษา

อย่างไรก็ตาม สารป้องกันการเกิดผลิตภัณฑ์น้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง สามารถจำแนกได้หลายประเภท ไคโตซานอาจสามารถจัดอยู่ในประเภทของสารประกอบจำพวกโพลิเมอร์และดีเกรดิทีฟ (Degraditive) ซึ่งประสิทธิภาพของสารป้องกันการเกิดผลิตภัณฑ์น้ำแข็ง จะสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของสารนั้น โดยทั่วไปแล้วสารที่สามารถป้องกันความเย็นได้ดีจะต้องมีหมู่ไฮโดรเจนคาร์บอนอยู่ในโมเลกุลด้วยสามหมู่หรือมากกว่า (สมบุญ ธินาสุวัฒน์, 2553) สอดคล้องกับการศึกษาของภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ (2543) พบว่าไคโตซานเกิดจากปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซีติลของไคตินด้วยด่างเข้มข้น ทำให้โครงสร้างของไคตินบางส่วนเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะหมู่ฟังก์ชันที่มีธาตุไนโตรเจนในรูปของหมู่ อะซีตามิโด ( $-NHCOCH_3$ ) เปลี่ยนไปเป็นรูปของหมู่อะมิโน ( $-NH_2$ ) ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 และเนื่องด้วยไคโตซานมีการจับกันของพันธะเป็นสายยาว อีกทั้งหมู่อะมิโนจำนวนมากอยู่ในโครงสร้าง อาจเป็นผลให้ไคโตซานมีความสามารถป้องกันความเย็นได้ดี จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกใช้เซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้ง ผสมกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) เป็นสารป้องกันการเกิดผลิตภัณฑ์น้ำแข็ง ซึ่งให้อัตราการรอดของเซลล์ภายหลังการเก็บรักษาดีที่สุด ร่วมกับเทคนิคการแช่ และการปรับ pH สุดท้ายที่ 5.0 ของ



ตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ผ่านการละลายเพื่อให้เกิดการแตกตัวของตะกอนที่เหมาะสมต่อลักษณะการกินอาหารของลูกกุ้งขาวระยะชูเอี้ยง

#### 4. การอนุบาลลูกกุ้งขาว (*L. vannamei*) ด้วย *Chaetoceros* เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษา

จากวัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อศึกษาเทคนิคหรือวิธีการที่เหมาะสมในการนำ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษามาใช้ออนุบาลลูกกุ้งขาว จึงนำเซลล์ *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไลโคโทซาน โอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งมาผสมกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) ที่เก็บรักษาด้วยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง มาอนุบาลลูกกุ้งขาว รวมถึงการเสริมเทคนิคการเขย่า และการปรับ pH สุดท้ายที่ 5.0 ของตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ภายหลังจากการละลาย เปรียบเทียบกับการอนุบาลลูกกุ้งขาวด้วย *Chaetoceros* สดเป็นชุดควบคุม และการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* สดผสมสารไลโคโทซาน โอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร(v/v) เพื่อดูผลของสารไลโคโทซาน และกลีเซอรอลต่อลูกกุ้ง

##### 4.1 การเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาว

จากการศึกษา พบว่าการอนุบาลลูกกุ้งขาวด้วย *Chaetoceros* สดมีอัตราการรอดดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทุกชุดการทดลอง โดยการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* สดผสมสารไลโคโทซานและกลีเซอรอล หรือการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาร่วมกับการเสริมเทคนิคต่าง ๆ นั้นมีอัตราการรอดที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

เมื่อเปรียบเทียบพัฒนาการของลูกกุ้งทางด้านความยาว พบว่า การอนุบาลด้วย *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่เก็บรักษามีผลต่อพัฒนาการด้านความยาวลำตัวของลูกเมื่อเทียบกับการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* สด ซึ่งการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่เก็บรักษาในวิธีการที่ต่างกันไม่มีผลต่อพัฒนาการด้านความยาวลำตัวของลูกกุ้ง แต่ให้ผลการเพิ่มความยาวต่ำกว่าชุดควบคุม

การพัฒนาทางด้านน้ำหนักของลูกกุ้งภายหลังจากการอนุบาล พบว่าการอนุบาลลูกกุ้งขาวด้วย *Chaetoceros* สด ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวลูกกุ้งดีที่สุด โดยให้ผลน้ำหนักลูกกุ้งที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันทั้งในกลุ่มตัวอย่างที่มีการผสมและไม่ผสมสารไลโคโทซานกับกลีเซอรอลลงใน *Chaetoceros* สดที่ในการอนุบาล อย่างไรก็ตามการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่เก็บรักษา ร่วมกับเขย่า

ตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ภายหลังการละลายก่อนนำไปอนุบาล ลูกกุ้งมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ไม่แตกต่างกับการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* ชนิดที่ผสมสาร โคโคซานกับกลีเซอรอล

#### 4.2 การพัฒนาการของลูกกุ้งขาว

จากการศึกษาและตรวจสอบพัฒนาการของลูกกุ้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* ชนิดที่ผสมสาร โคโคซานกับกลีเซอรอล และ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่เก็บรักษาทุกกลุ่มตัวอย่าง ลูกกุ้งมีพัฒนาการเปลี่ยนระยะซ้าและมีลักษณะการลอกคราบที่ไม่สมบูรณ์ โดยลูกกุ้งระยะซ้าที่ทำกรอนุบาลไม่สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะไมซิสได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะไมซิส (Mysis) ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จึงส่งผลกระทบต่ออัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนัก ความยาว และอัตราการรอดของลูกกุ้ง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสาร โคโคซาน หรือสารกลีเซอรอลที่มีการเพิ่มลงไปเนื่องจากคุณภาพน้ำระหว่างการอนุบาลมีค่า pH อยู่ในช่วง 8.13 -8.25 มีค่าใกล้เคียงกับ pH ที่ 8.5 ซึ่งมีประจุลบมากในโมเลกุลของโคโคซานทำให้สายโพลิเมอร์มีแนวโน้มที่จะขดม้วน เป็นการเพิ่มปฏิสัมพันธ์ของอนุภาคให้เกิดการเชื่อมโยงกับเซลล์ *Chaetoceros* ที่แขวนลอยอยู่ได้ดีขึ้น (Cheng et al., 2011) ถึงแม้มีการปรับลักษณะเซลล์ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่เก็บรักษาแต่เมื่อนำไปอนุบาลคุณภาพน้ำในบ่ออนุบาลมีผลต่อความสามารถในการจับรวมตะกอนของสารโคโคซานให้เพิ่มขึ้น เกิดการจับกลุ่มของเซลล์จำนวนมาก ไม่เหมาะสมต่อการกรองกินอาหารของลูกกุ้ง อีกทั้งมีการใช้สารกลีเซอรอลร่วมด้วย ถึงแม้ว่ากลีเซอรอลสามารถสกัดได้จากน้ำมันพืช และไขมันสัตว์ในรูปของเอสเทอร์ (วิภา สุโรจนะเมธากุล, 2546) อาจเป็นผลให้มีคราบมันเกิดขึ้นได้ ซึ่งจากการอนุบาลพบคราบมันเล็กน้อยที่เกิดขึ้นในทุกตัวอย่างที่มีการใช้กลีเซอรอลร่วมด้วยในระหว่างการอนุบาล จากการที่ลูกกุ้งไม่สามารถกรองกินอาหารคือ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่เก็บรักษาได้นั้น ส่งผลให้ลูกกุ้งมีพัฒนาการการลอกคราบที่ไม่สมบูรณ์ต่อเนื่องไปยังพัฒนาการด้านต่าง ๆ ที่พัฒนาได้ช้าลงทั้งความยาวและน้ำหนัก รวมถึงอัตราการรอดต่ำลงของลูกกุ้งขาว

จากการศึกษาด้านความเป็นพิษของกาลีเซอรอลต่อลูกกุ้งนั้นส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะ เอ็มบริโอ และตัวอ่อน โดยใช้กาลีเซอรอลเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ในกระบวนการเก็บรักษา ตัวอ่อน จากการศึกษา Newton and Subramoniam (1996) พบว่า เอ็มบริโอระยะต้นของกุ้งแช่บ๊วย (*Penaeus indicus*) สามารถทนต่อการสัมผัสกับกาลีเซอรอล 0.5 โมล (ประมาณ 3.652 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ในขณะที่ตัวอ่อนระยะนอเพเลียส สามารถทนต่อการสัมผัสสารได้ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า โดยสามารถทนต่อกาลีเซอรอลได้ถึง 3.2 โมล (เท่ากับ 23.37 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Alfaro et al. (2001) ที่ทำการศึกษาในเอ็มบริโอระยะต้น และเอ็มบริโอระยะปลาย ของกุ้งทราย (*Trachypenaeus byrdi*) ผลพบว่าเอ็มบริโอทั้งสองระยะสามารถทนต่อกาลีเซอรอลได้ไม่เกิน 1 โมล (ประมาณ 7.303 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) เช่นเดียวกับ Vuthiphandchai et al. (2005) ที่ศึกษาถึงความ เป็นพิษของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ต่อเอ็มบริโอระยะต้น เอ็มบริโอระยะกลางและเอ็มบริโอ ระยะปลายของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบว่า เอ็มบริโอระยะต้นสามารถทนต่อการสัมผัสสาร กาลีเซอรอลได้ในระดับความเข้มข้นไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (ประมาณ 0.685 โมล) ภายใต้การ สัมผัสสารเป็นเวลา 10 นาที ส่งผลให้มีอัตราการฟักต่ำไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เอ็มบริโอระยะ กลาง และเอ็มบริโอระยะปลายสามารถทนได้และให้อัตราการฟักที่สูงกว่า คือ 61.8 - 65 และ 68 - 82.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่อลูกกุ้งมีพัฒนาการสูงขึ้นความสามารถในการทนต่อความเป็นพิษ ของกาลีเซอรอลจะเพิ่มขึ้นด้วย ทั้งนี้การทดลองอนุบาลลูกกุ้งได้ใช้ลูกกุ้งขาวระยะซูเอีย โดยให้อาหาร 6 มื้อต่อวัน คุณภาพน้ำระหว่างการอนุบาลในตัวอย่างทีอนุบาลด้วย *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่เก็บรักษา จะมีระดับความเข้มข้นของกาลีเซอรอลอยู่ระหว่าง 0.014 - 0.084 โมล (เท่ากับ 0.1 - 0.6 เปอร์เซ็นต์โดย ปริมาตร) และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน กาลีเซอรอลจึงไม่น่าจะส่งผลความเป็นพิษที่สูงต่อลูกกุ้งระยะนี้ ทั้งนี้จากการที่ลูกกุ้งมีอัตราการรอดต่ำและพัฒนาการที่ไม่สมบูรณ์ เป็นผลมาจากการกรองกินอาหารได้ไม่ดี พอ เนื่องจากลักษณะอาหารยังไม่เหมาะสม ทำให้ลูกกุ้งขาดอาหาร และแร่ธาตุสำคัญที่มีผลต่อพัฒนาการ และการลอกคราบของลูกกุ้งในเวลาต่อมา

นอกจากนี้ยังพบว่าคุณภาพน้ำในตัวอย่างทีอนุบาลด้วย *Chaetoceros* สดที่มีการผสมไคโตซาน กับกาลีเซอรอล และ *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่เก็บรักษานั้นมีค่าแอมโมเนีย ไนโตรเจน และ ค่าบีโอดีที่ สูงกว่าการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* สดที่เป็นชุดควบคุม อาจเกิดจากของเสียจากการขับถ่าย การตาย ของลูกกุ้งระหว่างการอนุบาล และการเติมกาลีเซอรอลลงไป เนื่องจากกาลีเซอรอลเป็นสารอินทรีย์

ประเภทแอลกอฮอล์ ตามกฎของตัวของสสาร มวลส่วนหนึ่งของสารอินทรีย์จะถูกเปลี่ยนเป็นมวลของแบคทีเรีย ซึ่งอาหารของแบคทีเรียต้องอยู่ในรูปของสารละลายเท่านั้นแบคทีเรียจะมีการเผาผลาญสารอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ เกิดเป็นพลังงานและการสร้างเซลล์ใหม่ ดังนั้นเมื่อมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมแก่การเจริญด้วยแล้วทั้งอุณหภูมิ pH และปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอ จึงมีแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนเกิดขึ้นในน้ำอนุบาลที่มีการเติมสารกลีเซอรอลผสมไปกับอาหารที่ใช้อนุบาล (เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์, 2539) ด้วยเหตุผลข้างต้น จึงเป็นไปได้ที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดตายของลูกกุ้งเมื่อใช้ *Chaetoceros* ร่วมกับกลีเซอรอลในการเก็บรักษามานุบาลลูกกุ้ง

### สรุปผลการทดลอง

1. สารไลโคซานที่มีประสิทธิภาพการรวมตะกอน *Chaetoceros* ดีที่สุด ได้แก่ ไลโคซาน โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือตั้งแต่ 40 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป สามารถตกตะกอนได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 30 นาที รองลงมาคือไลโคซานโพลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งความเข้มข้นที่เหมาะสมคือตั้งแต่ 60 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป จึงสามารถตกตะกอนได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 180 นาที

2. ความสามารถในการฟื้นตัวของเซลล์ *Chaetoceros* ภายหลังจากตกตะกอนด้วยไลโคซานพบว่า *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไลโคซานโพลิเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งมีการฟื้นตัว ได้เร็วกว่า *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไลโคซานโพลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง และสามารถขยายจำนวนเซลล์ได้ให้ผลไม่แตกต่างกับชุดควบคุม ซึ่งมีจำนวนเซลล์สูงสุดของระยะการเจริญเติบโตอยู่ในระยะคงที่

3. ลักษณะตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไลโคซานโพลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า มีลักษณะการจับกันของเซลล์อย่างหลวม ๆ อยู่เป็นกลุ่มขนาดเล็ก ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการนำไปปรับใช้เพื่อการเก็บรักษาต่อและอนุบาลลูกกุ้งขาวมากกว่าตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยไลโคซานโพลิเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งที่ลักษณะของตะกอนเป็นก้อนใหญ่ เซลล์จับกลุ่มรวมกันอย่างหนาแน่นมาก

4. การอนุบาลลูกกุ้งขาวด้วย *Chaetoceros* สดให้ผลดีกว่าการอนุบาลด้วย *Chaetoceros* เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษา ทั้งด้านพัฒนาการ การเจริญเติบโต และอัตราการรอดตาย

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถในการป้องกันความเย็นของสารโคโตซาน เนื่องจากในกลุ่มตัวอย่าง *Chaetoceros* ที่ตกตะกอนด้วยโคโตซานแล้วนำมาเก็บรักษา ทั้งที่ผสมและไม่ผสมกลีเซอรอลในการเก็บรักษา ซึ่งมีอัตราการรอดของเซลล์ *Chaetoceros* หลังการเก็บรักษาไม่แตกต่างกัน อีกทั้งมีอัตราการรอดที่สูงกว่า *Chaetoceros* สดที่มีการผสมกลีเซอรอล
2. ควรศึกษาความเป็นพิษของกลีเซอรอลในระยะยาวต่อลูกกุ้งขาว
3. ควรศึกษาเพิ่มเติม เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมที่สามารถทำให้ *Chaetoceros* ที่เก็บรักษาสามารถแตกตัวได้ดี ภายใต้สภาวะของน้ำที่ใช้อนุบาลลูกกุ้ง

## บรรณานุกรม

- เกรียงศักดิ์ อุคมสินโรจน์. (2539). *การบำบัดน้ำเสีย*. กรุงเทพฯ: มิตรนารายการพิมพ์.
- เฉลิมชัย อยู่สำราญ, และปรเมษฐ์ พลอยประดับ. (2546). การศึกษาผลของสารตกตะกอนต่อ  
คิโตเซอรอส. ใน *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41:  
สาขาประมง* (หน้า 368-374). ม.ป.ท.
- ชาญวิทย์ ศรีแก้ว. (2544). *การกำจัดลิกนินจากน้ำเสียโรงงานผลิตเยื่อกระดาษด้วยไคโตซาน*.  
วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม, คณะ  
วิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ทรศนวรรณ อินทดีสิงห์. (2545). *การลดปริมาณสารแขวนลอยของน้ำเสียจากโรงงานถลุงมือยางโดย  
การใช้ไคโตซานเป็นสารช่วยสร้างตะกอน*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต,  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ชิตา เพชรมณี. (2542). *คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน*. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- นิชวีดี ทุมวัน. (2543). *ผลของการเก็บรักษาคิโตเซอรอสที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันอีพีเอ*.  
วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาผลิตภัณฑ์ประมง, คณะประมง,  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นุจรินทร์ โชคบัณฑิต. (2553). การเพิ่มมูลค่าไคโตซานจากเปลือกกุ้ง. *AQUA BIZ*, 4(35), 66-67.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ. (2544). *เอกสารประกอบการสอนวิชาการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง*. ชลบุรี:  
ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. (2545 ก). ศาสตร์ของกุ้งขาว ลิโทพีเนียส แวนาไม (ตอนที่ 1). *สัตว์น้ำ*,  
14(158), 87-90.
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. (2545 ข). ศาสตร์ของกุ้งขาว ลิโทพีเนียส แวนาไม (ตอนที่ 3). *สัตว์น้ำ*,  
14(160), 121-124.
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. (2546). ศาสตร์ของกุ้งขาว ลิโทพีเนียส แวนาไม (ตอนที่ 4). *สัตว์น้ำ*, 14(161),  
109-112.
- ภาวดี เมธะคานนท์, อริศรา เฟื่องฟูชาติ และก้องเกียรติ คงสุวรรณ. (2543). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ  
ไคติน-ไคโตซาน. *เอ็มเทค*, (19), 69-75.

- มันสิน ตันทุลเวศม์. (2537). *วิศวกรรมการประปา เล่ม 1*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มานิตา โมธรรม. (2552). *การเก็บรักษาสาหร่าย Spirulina platensis ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- มาลินี ฉัตรมงคลกุล และชิตชัย จันท์ตั้งสี. (2548). *เพลงก่ตอน*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ยุวดี อินสำราญ. (2543). *ผลของสารตกตะกอนที่มีต่อการเก็บเกี่ยวสาหร่ายและการเจริญหลังเก็บเกี่ยว*. วิทยานิพนธ์ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ยุวดี พิรพรพิศาล และฉมาภรณ์ นิวาสะบุตร. (2546). *คู่มือปฏิบัติการสาหร่ายวิทยา* (พิมพ์ครั้งที่ 5). เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. (2541). *คู่มือการเพาะเลี้ยงเพลงก่ตอน* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. (2542). *เพลงก่ตอนพืช*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ลิลิตา เรืองแป้น. (2542). *ความรู้เกี่ยวกับชีววิทยากุ้งทะเล* (ตอน 5). *สัตว์น้ำ*, 10(20), 113-116.
- วัชรวิทย์ กัลยาณัง. (2550). *การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาสาหร่ายที่ผลิตสารมูลค่าสูงระยะยาว*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- วันเพ็ญ ภูติจันทร์. (2549). *วิทยาศาสตร์สาหร่าย*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- วิภา สุโรจน์เมธากุล. (2546). *คุณสมบัติและประโยชน์ของกลีเซอรอล*. *อาหาร*, 33(2), 87-89.
- ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์ กรมควบคุมมลพิษ. (2544 ก). *Ethylene glycol*. เข้าถึงได้จาก <http://msds.pcd.go.th/pdf/566.pdf>
- ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์ กรมควบคุมมลพิษ. (2544 ข). *Glycerol*. เข้าถึงได้จาก <http://msds.pcd.go.th/pdf/1568.pdf>
- ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์ กรมควบคุมมลพิษ. (2544 ค). *Methanol*. เข้าถึงได้จาก <http://msds.pcd.go.th/pdf/164.pdf>

- ศูนย์พัฒนานโยบายแห่งชาติด้านสารเคมี สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2540). *Propylene glycol*. เข้าถึงได้จาก <http://ipcs.fda.moph.go.th/csnetNEW/icscPDF/0321.pdf>
- ศูนย์พัฒนานโยบายแห่งชาติด้านสารเคมี สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2552). *DMSO*. เข้าถึงได้จาก <http://ipcs.fda.moph.go.th/csnetNEW/icscPDF/0459.pdf>
- สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์. (2553). *เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมพงษ์ คุณจินดาชบาพร. (2544). *เพลงก็ตอนพีช*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สรารัฐ เจียรพร. (2554 ก). ไโคโตซานกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. *AQUA BIZ*, 4(42), 72-75.
- สรารัฐ เจียรพร. (2554 ข). ประโยชน์ของไโคโตซาน. *AQUA BIZ*, 4(50), 70-71.
- สรารัฐ เจียรพร. (2555). แนวทางการใช้ไโคโตซานในการเลี้ยงกุ้ง. *AQUA BIZ*, 4(52), 74-77.
- สุวบุญ จิราญชัย, รังรอง ชกसान, โกสุม สมัครรัตน์. (2544). สมบัติทางเคมีและกายภาพของไโคตินไโคโตซาน. ใน *เอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการไโคตินและไโคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้* (หน้า 15-17). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุวดี จันทร์กระจ่าง. (2546). ไโคโตซานและการประยุกต์ใช้ในประเทศ. *สัตว์น้ำ*, 14(168), 31-34.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2555). *สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2555*. กรุงเทพฯ: อักษรสยามการพิมพ์.
- อัชฌา ป่านแก้ว, สรวิต เผ่าทองสุข, วรณวิมล คล้ายประดิษฐ์ และจินตนา สและน้อย. (2554). การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษา *Thalassiosira* sp. สำหรับการอนุบาลลูกกุ้ง. *แก่นเกษตร*, 39(4), 369-378.
- Acker, J.P., & McGann, L.E. (2003). Protective effect of intracellular ice during freezing?. *Cryobiology*, 46, 197-202.
- Alfaro, J., Komen, J., & Huisman, E.A. (2001). Cooling, cryoprotectant and hypersaline sensitivity of penaeid shrimp embryos and nauplius larvae. *Aquaculture*, 195, 353-366.
- Anaëlle, T., Vincent, T., & Thierry, L. (2012). Comparison of cryopreservation methods for the long term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia* (simonsen). *Cryobiology, Journal of Personality and Social Psychology*, (n.d.), n.p.



- APHA, AWWA and WPCF. (1980). *Standard methods for the examination of water and waste water* (15<sup>th</sup> ed.). New York: American Public Health.
- APHA, AWWA and WPCF. (1995). *Standard method for the examination of water and waste water* (19<sup>th</sup> ed.). Washington DC: America Public Health Association.
- Benhra, A., Ferard, J.F., & Vasseur, P. (1994). Factorial design to optimize the viability of the alga *Scenedesmus subspicatus* after cryopreservation. *Cryo-Letters*, 15, 269–278.
- Cañavate, J.P., & Lubian, L.M. (1994). Tolerance of six marine microalgae to the cryoprotectants dimethylsulfoxide and methanol. *Journal of Phycology*, 30(3), 559-565.
- Cheng, Y.-S., Zheng, Y., Labavitch, J.M., & VanderGheynst, J.S. (2011) The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*. *Process Biochemistry*, 46, 1927-1933.
- Chihpin, H., Shuchuan, C., & Jill, R.P. (2000). Optimal condition for modification of chitosan: A biopolymer for coagulation of colloidal particles. *Water Research*, 34, 1057-1062.
- Cordero, B., & Voltolinah, D. (1997). Viability of mass algal cultures preserved by freezing and freeze-drying. *Aquacultural Engineering*, 16, 205-211.
- Daily, W.A., & Higgens, C.E. (1973). Preservation and storage of microorganisms in the gas phase of liquid nitrogen. *Cryobiology*, 10, 364–367.
- Day ,J.G., & Brand, J.J. (2005) Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures. In R.A. Andersen (Ed.), *Algal culturing techniques* (pp. 165-187). London: Elsevier Academic Press.
- De Godos, I., Guzman, H.O., Soto, R., García-Encina, P.A., Becares, E., Muñoz, R., & Vargas, V.A. (2011). Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 102(2), 923-927.
- Divakaran, R., & Pillai, V.N.S. (2001). Flocculation of kaolinite suspensions in water by chitosan. *Water Research*, 35(16), 3904-3908.
- Divakaran, R., & Pillai, V.N.S. (2002 a). Flocculation of algae using chitosan. *Journal of Applied Phycology*, 14, 419-422.

- Divakaran, R., & Pillai, V.N.S. (2002 b). Flocculation of river silt using chitosan. *Water Research*, 36, 2414-2418.
- Dong, Q., Lin, J., & Huang, C. (2004). Effects of cryoprotectant toxicity on the embryos and larvae of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 242, 655-670.
- Fenwick, C., & Day, J.G. (1992). Cryopreservation of *Tetraselmis suecica* cultured under different nutrients regimes. *Journal of Applied Phycology*, 4(2), 105-109.
- Fox, J.M. (1983). Intensive algal culture techniques. In J.P. Mcvey (Ed.), *CRC Handbook of Mariculture. Crustacean Aquaculture. Vol.1* (pp. 15-41). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Franks, F. (1982). The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In F. Franks (Ed.), *“Water: A Comprehensive Treatise”*. Vol.7 (pp. 215-338). New York: Plenum Press.
- Franks, G.V. (2005). Stimulant sensitive flocculation and consolidation for improved solid/liquid separation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 292(2), 598-603.
- Golueke, C.G., & Oswald, W.J. (1965). Harvesting and processing sewage growth planktonic algae. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 37(4), 471-498.
- Gwo, J.C., Chiu, J.Y., Chou, C.C., & Cheng, H.Y. (2005). Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Cryobiology*, 50(3), 338-343.
- Hargreaves, J.A. (2006). Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 344-363.
- Holthuis, L.B. (1980). Shrimp and prawns of the world : An annotated catalogue of species of interest to fisheries. *FAO Fisheries Synopsis*, 125, 152-271.
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46, 205-229.
- Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, 15(9), 1326-1331.
- Jones, D.S., & Mawhinney, H.J. (2006). Chitosan. In R.C. Rowe, P.J. Sheskey, & S.C. Owen (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients, fifth ed.* (pp. 159–162). Washington DC: American Pharmaceutical Association and The Pharmaceutical Press.

- Joseph, I., Panigrahi, A., & Chandra, P.K. (2000). Tolerance of three marine microalgae to cryoprotectants dimethylsulfoxide, methanol and glycerol. *Indian journal of marine sciences*, 29, 243-247.
- Kas, H.S. (1997). Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *Journal of Microencapsulation*, 14(6), 689-711.
- Kono, S., Kuwano, K., Ninomyia, M., Onishi, J., & Saga, N. (1997). Cryopreservation of *Enteromorpha intestinalis* (Ulvales, Chlorophyta) in liquid nitrogen. *Phycologia*, 36(1), 76-78.
- Kono, S., Kuwano, K., & Saga, N. (1998). Cryopreservation of *Eisenia bicyclis* (Laminariales, Phaeophyta) in liquid nitrogen. *Journal of Marine Biotechnology*, 6(4), 220–223.
- Kuwano, K., Aruga, Y., & Saga, N. (1993). Cryopreservation of the conchocelis of the marine alga *Porphyra yezoensis* Ueda (Rhodophyta) in liquid nitrogen. *Plant Science*, 94, 215- 225.
- Kuwano, K., Aruga, Y., & Saga, N. (1996). Cryopreservation of clonal gametophytic thalli of *Porphyra* (Rhodophyta). *Plant Science*, 116(1), 117-124.
- Lalov, I.G., Guerginov, I.I., Krysteva, M.A., & Fartsov, K. (2000). Treatment of waste water from distilleries with chitosan. *Water Research*, 34(5), 1503-1506.
- Lee, R.E. (1995). *Phycology* (2<sup>nd</sup> ed.). New York: Cambridge University Press.
- Lertsutthiwong, P., Sutti, S., & Powtongsook, S. (2009). Optimization of chitosan flocculation for phytoplankton removal in shrimp culture ponds. *Aquacultural Engineering*, 41(3), 188-193.
- Lobban, C.S., Harrison, P.J., & Duncan, M.J. (1985). *The Physiological Ecology of Seaweeds*. London: Cambridge University Press.
- Mazur, P. (1966). Physical and chemical basis of injury in singlecelled micro-organisms subjected to freezing and thawing. In H.T. Meryman (Ed.), *Cryobiology* (pp. 213–315) London-New York: Academic Press.
- McGahren, W.J., Perkinson, G.A., Growich, J.A., Leese, R.A., & Ellestad, G.A. (1984). Chitosan by fermentation. *Process Biochemistry*, 19, 88-90.

- Millamena, O.M., Jereos, E.J., & Gorriceta, I.R. (1977). Methods of harvesting and preservation of the diatom *Chaetoceros calcitrans*. *SEAFDEC Aquaculture Department Fourth Quarterly Report*, 1, 4.
- Morris, G.J. (1976). The cryopreservation of *Chlorella* 1. Interactions of rate of cooling, protective additive and warming rate. *Archives of Microbiology*, 107, 57-62.
- Morris, G.J., Clarke, A., & Fuller, B.J. (1980). Methanol as a cryoprotective additive for *Chlorella*. *Cryo-Letters*, 1, 121-128.
- Muchlisin, Z.A. (2005). REVIEW: Current Status of Extenders and Cryoprotectants on Fish Spermatozoa Cryopreservation. *Biodiversitas*, 6, 12-15.
- Nakhla, T., Marek, M., & Kovalcik, T. (2002). Issues associated with large-scale production of liposomal formulations. *Drug Delivery Technology*, 2, 1-6.
- Newton, S. S., & Subramoniam, T. (1996). Cryoprotectant Toxicity in Penaeid Prawn Embryos. *Cryobiology*, 33, 172-177.
- Pérez Farfante, I., & Kensley, B. (1997). Penaeoid and Sergestoid Shrimp and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera. *Mémoires du Muséum National d'Historie Naturelle*, 175, 1-233.
- Poncet, J.-M., & Véron, B. (2003). Cryopreservation of the unicellular marine alga, *Nannochloropsis oculata*. *Biotechnology Letters*, 25, 2017-2022.
- Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, 1457-1465.
- Riaño, B., Molinuevo, B., & García-González, M.C. (2012). Optimization of chitosan flocculation for microalgal-bacterial biomass harvesting via response surface methodology. *Ecological Engineering*, 38(1), 110– 113.
- Richmond, A., & Becker, E.W. (1986). Technological Aspects of Mass Cultivation: A General Outline. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Mass Culture* (pp. 245-264). Boca Raton, Florida: CRC Press.

- Simione, F.P., & Daggett, P.-M. (1976). First successful cryopreservation of a suctorian ciliate (*Tokophrya infusionum*). *Cryobiology*, 13, 668–669.
- Stark, B., Pabst, G., & Prassl, R. (2010). Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41, 546-555.
- Strand, S.P., Nordengen, T., & Ostgaard, K. (2002). Efficiency of chitosans applied for flocculation of different bacteria. *Water Research*, 36, 4745-4752.
- Strickland, J.D.H., & Parsons, T.R. (1972) *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Ottawa: Fishery Research Board of Canada.
- Terauchi, E., Kuwano, K., Okauchi, M., & Saga, N. (1997). A method for cryopreservation of the *Tetraselmis tetrathele* (Prasinophyceae, Chlorophyta). *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture*, 26, 13–25.
- Tsuru, S. (1973). Preservation of marine and fresh water algae by means of freezing and freeze-drying. *Cryobiology*, 10, 445-452.
- Tzovenis, I., Triantaphyllidis, G., Naihong, X., Chatzinikolaou, E., Papadopoulou, K., Xouri, G., & Tafas, T. (2004). Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. *Aquaculture*, 230, 457-473.
- Vuthiphandchai, V., Pengpun, B., & Nimrat, S. (2005). Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 246, 275– 284.
- Wang, D., & Tang, H. (2001). Modified inorganic polymer flocculant-PFSi: Its preparation, Characterization and coagulation behavior. *Water Research*, 35(14), 3418-3428.
- Weber, W.J. Jr. (1972). *Physicochemical Processes for Water Quality Control*. New York: Wiley Interscience.
- Wibowo, S., Velazquez, G., Savant, V., & Torres, J.A. (2007). Effect of chitosan type on protein and water recovery efficiency from surimi wash water treated with chitosan-alginate complexes. *Bioresource Technology*, 98(3), 539-545.

Yu, Z.-W., & Quinn, P.J. (2000). The effect of dimethyl sulfoxide on the structure and phase behaviour of palmitoleoylphosphatidylethanolamine. *Biochim Biophys Acta* , 1509, 440-450.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการวิเคราะห์ผลทางสถิติ



ตารางภาคผนวก ก-1 ข้อมูลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ด้วยไคโตซาน  
โพลีเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Min15	Between Groups	19034.122	5	3806.824	109.953	.000
	Within Groups	415.466	12	34.622		
	Total	19449.588	17			
Min30	Between Groups	19360.259	5	3872.052	1820.063	.000
	Within Groups	25.529	12	2.127		
	Total	19385.788	17			
Min45	Between Groups	19960.881	5	3992.176	1739.304	.000
	Within Groups	27.543	12	2.295		
	Total	19988.425	17			
Min60	Between Groups	19732.188	5	3946.438	1996.208	.000
	Within Groups	23.724	12	1.977		
	Total	19755.912	17			
Min120	Between Groups	19767.281	5	3953.456	2360.335	.000
	Within Groups	20.099	12	1.675		
	Total	19787.380	17			
Min180	Between Groups	19818.848	5	3963.770	7581.970	.000
	Within Groups	6.273	12	.523		
	Total	19825.121	17			

## Post Hoc Tests

### Min15

Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	1.5000			
20.00	3		41.8433		
30.00	3			70.2000	
40.00	3				84.0833
50.00	3				89.7600
60.00	3				93.0567
Sig.		1.000	1.000	1.000	.100

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## ตารางภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

**Min30**Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	1.7533			
20.00	3		76.1667		
30.00	3			83.9467	
40.00	3				91.9733
60.00	3				93.9233
50.00	3				94.2700
Sig.		1.000	1.000	1.000	.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Min45**Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	2.2567			
20.00	3		80.8533		
30.00	3			87.6200	
40.00	3				93.0600
60.00	3				95.4867
50.00	3				95.6567
Sig.		1.000	1.000	1.000	.068

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

**Min60**

Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
.00	3	3.3433				
20.00	3		83.5467			
30.00	3			89.1167		
40.00	3				92.9233	
50.00	3					95.6567
60.00	3					96.0033
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.768

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Min120**

Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	6.3500			
20.00	3		88.0833		
30.00	3			92.5167	
60.00	3				97.5733
40.00	3				97.6867
50.00	3				97.9200
Sig.		1.000	1.000	1.000	.761

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

## ตารางภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

## Min180

Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	7.5200			
20.00	3		89.7867		
30.00	3			93.8767	
60.00	3				98.7867
50.00	3				98.9600
40.00	3				99.0467
Sig.		1.000	1.000	1.000	.683

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## Means

## Report

con		Min15	Min30	Min45	Min60	Min120	Min180
.00	Mean	1.5000 d	1.7533 d	2.2567d	3.3433e	6.3500e	7.5200 d
	Std. Error of Mean	.14434	.14723	.38407	.30046	.30370	.25000
20.00	Mean	41.8433 c	76.1667c	80.8533c	83.5467d	88.0833d	89.7867c
	Std. Error of Mean	6.33560	.88631	1.36774	1.85794	1.49350	.65029
30.00	Mean	70.2000 b	83.9467b	87.6200b	89.1167c	92.5167c	93.8767b
	Std. Error of Mean	2.59230	.59266	1.20835	.36159	.82830	.47054
40.00	Mean	84.0833 a	91.9733a	93.0600a	92.9233b	97.6867b	99.0467a
	Std. Error of Mean	4.54701	1.53143	.23671	.36159	.36159	.35844
50.00	Mean	89.7600 a	94.2700a	95.6567a	95.6567a	97.9200a	98.9600a
	Std. Error of Mean	.87000	.60044	.45860	.34667	.30022	.30022
60.00	Mean	93.0567a	93.9233a	95.4867a	96.0033a	97.5733a	98.7867a
	Std. Error of Mean	.96508	.62496	.91972	.17333	.34667	.34667

ตารางภาคผนวก ก-2 ข้อมูลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ด้วยโคโคซาน  
โพลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Min15	Between Groups	1561.378	5	312.276	60.782	.000
	Within Groups	61.652	12	5.138		
	Total	1623.030	17			
Min30	Between Groups	3792.680	5	758.536	103.192	.000
	Within Groups	88.208	12	7.351		
	Total	3880.888	17			
Min45	Between Groups	5870.252	5	1174.050	166.841	.000
	Within Groups	84.443	12	7.037		
	Total	5954.695	17			
Min60	Between Groups	5995.953	5	1199.191	144.580	.000
	Within Groups	99.531	12	8.294		
	Total	6095.485	17			
Min120	Between Groups	7989.963	5	1597.993	272.838	.000
	Within Groups	70.283	12	5.857		
	Total	8060.246	17			
Min180	Between Groups	8720.455	5	1744.091	168.765	.000
	Within Groups	124.013	12	10.334		
	Total	8844.468	17			

## Post Hoc Tests

### Min15

Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
30.00	3	-5.6967			
20.00	3	-5.1267			
.00	3		1.5000		
40.00	3		4.0800		
50.00	3			12.5200	
60.00	3				20.3233
Sig.		.763	.189	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## ตารางภาคผนวก ก-2 (ต่อ)

**Min30**Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
20.00	3	-2.8500			
30.00	3	-2.5633			
.00	3	1.7533			
40.00	3		9.8467		
50.00	3			22.9300	
60.00	3				36.6767
Sig.		.070	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Min45**Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
20.00	3	-1.5667			
30.00	3	-.2867			
.00	3	2.2567			
40.00	3		17.3000		
50.00	3			29.3933	
60.00	3				47.8300
Sig.		.118	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## ตารางภาคผนวก ก-2 (ต่อ)

## Min60

Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
20.00	3	.5700			
.00	3	3.3433			
30.00	3	5.5567			
40.00	3		19.5500		
50.00	3			33.6133	
60.00	3				50.9267
Sig.		.066	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## Min120

Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
.00	3	6.3500					
20.00	3		11.2500				
30.00	3			22.7900			
40.00	3				29.9567		
50.00	3					45.4300	
60.00	3						68.2767
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## ตารางภาคผนวก ก-2 (ต่อ)

## Min180

Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
.00	3	7.5200				
20.00	3		16.2400			
30.00	3			29.9133		
40.00	3			34.4600		
50.00	3				49.3667	
60.00	3					74.5967
Sig.		1.000	1.000	.109	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## Report

con		Min15	Min30	Min45	Min60	Min120	Min180
.00	Mean	1.5000c	1.7533d	2.2567d	3.3433d	6.3500f	7.5200e
	Std. Error of Mean	.14434	.14723	.38407	.30046	.30370	.25000
20.00	Mean	-5.1267d	-2.8500d	-1.5667d	.5700d	11.2500e	16.2400d
	Std. Error of Mean	.42667	.57000	1.21469	1.16672	2.05516	3.23522
30.00	Mean	-5.6967d	-2.5633d	-.2867d	5.5567d	22.7900d	29.9133c
	Std. Error of Mean	.86584	.49364	1.11371	1.07552	.37608	1.50157
40.00	Mean	4.0800c	9.8467c	17.3000c	19.5500c	29.9567c	34.4600c
	Std. Error of Mean	1.38443	2.71584	1.11689	2.34148	1.48164	1.85770
50.00	Mean	12.5200b	22.9300b	29.3933b	33.6133b	45.4300b	49.3667b
	Std. Error of Mean	2.31623	2.25000	2.81333	2.60616	1.98487	2.08026
60.00	Mean	20.3233a	36.6767a	47.8300a	50.9267a	68.2767a	74.5967a
	Std. Error of Mean	1.42871	1.29338	1.43117	1.30604	1.05903	.32631



ตารางภาคผนวก ก-3 ข้อมูลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์ *Chaetoceros* ด้วยไคโตซาน  
โพลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปู

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Min15	Between Groups	455.864	5	91.173	68.806	.000
	Within Groups	15.901	12	1.325		
	Total	471.765	17			
Min30	Between Groups	550.460	5	110.092	69.430	.000
	Within Groups	19.028	12	1.586		
	Total	569.487	17			
Min45	Between Groups	677.881	5	135.576	35.791	.000
	Within Groups	45.456	12	3.788		
	Total	723.337	17			
Min60	Between Groups	870.015	5	174.003	29.082	.000
	Within Groups	71.798	12	5.983		
	Total	941.813	17			
Min120	Between Groups	2344.372	5	468.874	30.270	.000
	Within Groups	185.878	12	15.490		
	Total	2530.250	17			
Min180	Between Groups	3088.865	5	617.773	50.011	.000
	Within Groups	148.234	12	12.353		
	Total	3237.099	17			

### Post Hoc Tests

#### Min15

Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	1.5000			
30.00	3		8.3333		
20.00	3		8.9067		
40.00	3			13.5233	
60.00	3			14.8633	14.8633
50.00	3				16.4667
Sig.		1.000	.553	.179	.114

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## ตารางภาคผนวก ก-3 (ต่อ)

**Min30**Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	1.7533			
30.00	3		9.0067		
20.00	3		9.4833		
40.00	3			14.0567	
60.00	3				16.6667
50.00	3				18.2067
Sig.		1.000	.651	1.000	.160

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Min45**Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	2.2567			
20.00	3		10.9200		
30.00	3		11.3000		
40.00	3			15.9267	
50.00	3			19.2767	19.2767
60.00	3				20.4933
Sig.		1.000	.815	.057	.459

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## ตารางภาคผนวก ก-3 (ต่อ)

## Min60

Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
.00	3	3.3433				
20.00	3		10.9167			
30.00	3		13.2200	13.2200		
40.00	3			16.6000	16.6000	
50.00	3				20.2133	
60.00	3					25.2267
Sig.		1.000	.271	.116	.096	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## Min120

Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	6.3500			
20.00	3	12.9300	12.9300		
30.00	3		19.6367	19.6367	
40.00	3			23.6967	
50.00	3			25.7033	
60.00	3				42.7900
Sig.		.063	.059	.097	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## ตารางภาคผนวก ก-3 (ต่อ)

## Min180

Duncan<sup>a</sup>

con	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	7.5200			
20.00	3		16.5700		
30.00	3			26.8167	
40.00	3			27.1767	
50.00	3			31.3267	
60.00	3				49.8867
Sig.		1.000	1.000	.160	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## Report

con		Min15	Min30	Min45	Min60	Min120	Min180
.00	Mean	1.5000d	1.7533d	2.2567d	3.3433e	6.3500d	7.5200d
	Std. Error of Mean	.14434	.14723	.38407	.30046	.30370	.25000
20.00	Mean	8.9067c	9.4833c	10.9200c	10.9167d	12.9300cd	16.5700c
	Std. Error of Mean	.33198	.16455	.49652	.57667	.59808	.63058
30.00	Mean	8.3333c	9.0067c	11.3000c	13.2200cd	19.6367bc	26.8167b
	Std. Error of Mean	.16455	.58225	.34530	.29000	.34299	.74923
40.00	Mean	13.5233b	14.0567b	15.9267b	16.6000bc	23.6967b	27.1767b
	Std. Error of Mean	.93667	.69571	1.50836	.87763	1.28893	.35277
50.00	Mean	16.4667a	18.2067a	19.2767ab	20.2133b	25.7033b	31.3267b
	Std. Error of Mean	1.22529	.93595	1.06145	.93905	.46477	1.83958
60.00	Mean	14.8633ab	16.6667a	20.4933a	25.2267a	42.7900a	49.8867a
	Std. Error of Mean	.33667	1.19311	1.91333	3.13168	5.34180	4.49173

ตารางภาคผนวก ก-4 ข้อมูลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตกตะกอนด้วยไคโตซานทั้ง 3 ชนิด  
ที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Min15	Between Groups	15262.250	3	5087.417	2183.370	.000
	Within Groups	18.641	8	2.330		
	Total	15280.890	11			
Min30	Between Groups	14687.647	3	4895.882	1860.521	.000
	Within Groups	21.052	8	2.631		
	Total	14708.699	11			
Min45	Between Groups	14807.842	3	4935.947	981.917	.000
	Within Groups	40.215	8	5.027		
	Total	14848.056	11			
Min60	Between Groups	14272.996	3	4757.665	545.284	.000
	Within Groups	69.801	8	8.725		
	Total	14342.797	11			
Min120	Between Groups	13495.170	3	4498.390	200.807	.000
	Within Groups	179.213	8	22.402		
	Total	13674.383	11			
Min180	Between Groups	13658.076	3	4552.692	296.619	.000
	Within Groups	122.789	8	15.349		
	Total	13780.865	11			

## Post Hoc Tests

### Min15

Duncan<sup>a</sup>

trt	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	1.5000			
3.00	3		14.8633		
2.00	3			20.3233	
1.00	3				93.0567
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวก ก-4 (ต่อ)

**Min30**

Duncan<sup>a</sup>

trt	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	1.7533			
3.00	3		16.6667		
2.00	3			36.6767	
1.00	3				93.9233
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Min45**

Duncan<sup>a</sup>

trt	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	2.2567			
3.00	3		20.4933		
2.00	3			47.8300	
1.00	3				95.4867
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวก ก-4 (ต่อ)

**Min60**

Duncan<sup>a</sup>

trt	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	3.3433			
3.00	3		25.2267		
2.00	3			50.9267	
1.00	3				96.0033
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Min120**

Duncan<sup>a</sup>

trt	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	6.3500			
3.00	3		42.7900		
2.00	3			68.2767	
1.00	3				97.5733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## ตารางภาคผนวก ก-4 (ต่อ)

## Min180

Duncan<sup>a</sup>

trt	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
.00	3	7.5200			
3.00	3		49.8867		
2.00	3			74.5967	
1.00	3				98.7867
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## Report

trt		Min15	Min30	Min45	Min60	Min120	Min180
.00	Mean	1.5000d	1.7533d	2.2567d	3.3433d	6.3500d	7.5200d
	Std. Error of Mean	.14434	.14723	.38407	.30046	.30370	.25000
1.00	Mean	93.0567a	93.9233a	95.4867a	96.0033a	97.5733a	98.7867a
	Std. Error of Mean	.96508	.62496	.91972	.17333	.34667	.34667
2.00	Mean	20.3233b	36.6767b	47.8300b	50.9267b	68.2767b	74.5967b
	Std. Error of Mean	1.42871	1.29338	1.43117	1.30604	1.05903	.32631
3.00	Mean	14.8633c	16.6667c	20.4933c	25.2267c	42.7900c	49.8867c
	Std. Error of Mean	.33667	1.19311	1.91333	3.13168	5.34180	4.49173



ตารางภาคผนวก ก-5 ข้อมูลการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ของเซลล์ *Chaetoceros* ในการฟื้นตัว  
 ภายหลังจากการตกตะกอนด้วยไคโตซาน ที่ระยะเวลา 8 วันหลังขยายลงใน  
 อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### ANOVA

Cell

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	24.939	2	12.470	29.754	.001
Within Groups	2.515	6	.419		
Total	27.454	8			

#### Cell

Duncan<sup>a</sup>

Trt	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	2.0000	
1.00	3		4.7167
.00	3		5.9917
Sig.		1.000	.052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### Report

Cell

Trt	Mean	Std. Error of Mean
.00	5.9917	.61650
1.00	4.7167	.18276
2.00	2.0000	.07500
Total	4.2361	.61750

ตารางภาคผนวก ก-6 ข้อมูลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ *Chaetoceros* ภายหลังจากการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
h0	Between Groups	273.993	3	91.331	6.788	.014
	Within Groups	107.642	8	13.455		
	Total	381.635	11			
hr24	Between Groups	2666.403	3	888.801	30.739	.000
	Within Groups	231.314	8	28.914		
	Total	2897.717	11			
h72	Between Groups	1230.291	3	410.097	4.691	.036
	Within Groups	699.338	8	87.417		
	Total	1929.629	11			

**h0**

Duncan<sup>a</sup>

Trt	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.00	3	83.9300	
3.00	3		92.1267
2.00	3		94.3400
.00	3		96.5800
Sig.		1.000	.192

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**hr24**

Duncan<sup>a</sup>

Trt	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.00	3	49.5567	
3.00	3		82.9033
.00	3		83.7800
2.00	3		85.1167
Sig.		1.000	.641

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวก ก-6 (ต่อ)

**h72**

Duncan<sup>a</sup>

Trt	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.00	3	49.5567	
.00	3	62.2033	62.2033
2.00	3		70.1100
3.00	3		76.7533
Sig.		.136	.105

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Report**

Trt		h0	hr24	h72
.00	Mean	96.5800	83.7800	62.2033
	Std. Error of Mean	1.27165	1.42095	2.63192
1.00	Mean	83.9300	49.5567	49.5567
	Std. Error of Mean	1.85829	1.61048	1.61048
2.00	Mean	94.3400	85.1167	70.1100
	Std. Error of Mean	3.11861	4.18333	6.82584
3.00	Mean	92.1267	82.9033	76.7533
	Std. Error of Mean	1.77319	4.05453	7.77455
Total	Mean	91.7442	75.3392	64.6558
	Std. Error of Mean	1.70035	4.68534	3.82340

ตารางภาคผนวก ก-7 ข้อมูลการวิเคราะห์การเจริญเติบโตและเปอร์เซ็นต์การรอดตายของลูกกุ้งขาว (*L. vannamei*) ระยะชุกเฉียบ เมื่อใช้อาหารสด และอาหารเข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษาในการอนุบาล

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
wg	Between Groups	1065835.590	4	266458.898	15.483	.000
	Within Groups	172099.321	10	17209.932		
	Total	1237934.911	14			
lg	Between Groups	196979.410	4	49244.852	82.482	.000
	Within Groups	5970.340	10	597.034		
	Total	202949.750	14			
sur	Between Groups	338.644	4	84.661	10.461	.001
	Within Groups	80.932	10	8.093		
	Total	419.576	14			

### Wg

Duncan<sup>a</sup>

trt	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4.00	3	243.0233		
2.00	3	277.8267		
3.00	3		580.7000	
1.00	3		713.1867	713.1867
.00	3			949.2900
Sig.		.752	.244	.052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวก ก-7 (ต่อ)

**Lg**

Duncan<sup>a</sup>

trt	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2.00	3	233.7167		
3.00	3	240.3733		
4.00	3	263.4667		
1.00	3		353.1667	
.00	3			538.5167
Sig.		.185	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**sur**

Duncan<sup>a</sup>

Trt	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.00	3	21.6267	
1.00	3	21.7533	
4.00	3	23.6300	
2.00	3	24.9600	
.00	3		34.4600
Sig.		.210	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวก ก-7 (ต่อ)

Report				
trt		wg	lg	sur
.00	Mean	949.2900	538.5167 a	34.4600 a
	Std. Deviation	93.75252	8.65296	6.02784
1.00	Mean	713.1867	353.1667 b	21.7533 b
	Std. Deviation	169.17363	50.38747	1.43897
2.00	Mean	277.8267	233.7167 c	24.9600 b
	Std. Deviation	108.44053	4.40256	.94064
3.00	Mean	580.7000	240.3733 c	21.6267 b
	Std. Deviation	178.87784	17.41595	.65241
4.00	Mean	243.0233	263.4667 c	23.6300 b
	Std. Deviation	69.88401	6.97861	.86603

ตารางภาคผนวก ก-8 ข้อมูลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งขาว (*L. vannamei*)

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
NH3	Between Groups	.078	4	.019	6.145	.000
	Within Groups	.221	70	.003		
	Total	.299	74			
No2	Between Groups	19.707	4	4.927	1.692	.164
	Within Groups	171.763	59	2.911		
	Total	191.470	63			
alk	Between Groups	1795.498	4	448.875	.486	.746
	Within Groups	64587.718	70	922.682		
	Total	66383.216	74			
BOD	Between Groups	28.683	4	7.171	4.543	.003
	Within Groups	110.484	70	1.578		
	Total	139.167	74			

ตารางภาคผนวก ก-8 (ต่อ)

**NH3**

Duncan<sup>a</sup>

trt	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
.00	15	.0893	
4.00	15		.1453
1.00	15		.1520
2.00	15		.1773
3.00	15		.1773
Sig.		1.000	.161

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

**No2**

Duncan<sup>a,b</sup>

trt	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
.00	12	1.1675	
1.00	10	1.6660	1.6660
2.00	15	2.1673	2.1673
3.00	13	2.1723	2.1723
4.00	14		2.8286
Sig.		.185	.125

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.552.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

## ตารางภาคผนวก ก-8 (ต่อ)

**alk**Duncan<sup>a</sup>

trt	N	Subset for alpha = 0.05
		1
.00	15	87.6920
2.00	15	88.9353
3.00	15	92.9613
4.00	15	98.2773
1.00	15	99.9840
Sig.		.333

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

**BOD**Duncan<sup>a</sup>

trt	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
.00	15	4.9400	
4.00	15		6.2867
3.00	15		6.3600
1.00	15		6.5133
2.00	15		6.6533
Sig.		1.000	.474

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.



ตารางภาคผนวก ก-8 (ต่อ)

**Report**

trt		NH3	No2	alk	BOD
.00	Mean	.0893 b	1.1675b	87.6920a	4.9400b
	Std. Error of Mean	.00581	.33745	9.30566	.45217
1.00	Mean	.1520 a	1.6660a	99.9840a	6.5133a
	Std. Error of Mean	.01317	.44061	4.55660	.21949
2.00	Mean	.1773a	2.1673a	88.9353a	6.6533a
	Std. Error of Mean	.01739	.44727	7.87575	.17399
3.00	Mean	.1773a	2.1723a	92.9613a	6.3600a
	Std. Error of Mean	.02046	.47167	8.40714	.29790
4.00	Mean	.1453a	2.8286a	98.2773a	6.2867a
	Std. Error of Mean	.01125	.58621	8.21555	.39302

## ภาคผนวก ข

ลักษณะของลูกกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่อนุบาลด้วย

*Chaetoceros* สด และ *Chaetoceros* ที่ผ่านการเก็บรักษา



อนุบาลด้วย *Chaetoceros* สด



อนุบาลด้วย *Chaetoceros* สด  
ผสมไคโตซานและกลีเซอรอล



อนุบาลด้วย *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่าน  
การเก็บรักษาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง



อนุบาลด้วย *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่าน  
การเก็บรักษาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง  
และเขย่า 60 วินาทีก่อนอนุบาล

ภาพภาคผนวก ข-1 ลูกกุ้งขาว (*L. vannamei*) ระยะชูเอี้ยง ที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* สดและ  
*Chaetoceros* เข้มข้นที่ผ่านการเก็บรักษา



อนุบาลด้วย *Chaetoceros* แบบเข้มข้นที่ผ่าน  
การเก็บรักษาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง  
และปรับลดค่า pH ให้เป็น 5.0 ก่อนนำมาอนุบาล

ภาพภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

## ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวกุลวดี ว่องวิไลรัตน์
วัน เดือน ปีเกิด	5 เมษายน พ.ศ. 2531
สถานที่เกิด	จังหวัดราชบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 124/168 ถนนเสือป่า ซอย 5 ตำบลหน้าเมือง อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2552	วิทยาศาสตรบัณฑิต (การประมง) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2558	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วาริชศาสตร์) มหาวิทยาลัยบูรพา
ทุนการศึกษา	ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำภาคปลาย ปีการศึกษา 2555 ทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่อ อุตสาหกรรม-พวอ. ระดับปริญญาโท ประจำปี 2556 และ บริษัท เมฆา คอร์ปอเรชั่น จำกัด