รายงานการวิจัย

การสะสมปริมาณสารสีในลูกปลาแมนดาริน, *Synchiropus splendidus* (Herre, 1927) เมื่ออนุบาลด้วยแพลงก์ตอนสัตว์ที่เลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนพืชต่างชนิด

Pigment accumulation in mandarinfish larvae, *Synchiropus splendidus* (Herre,1927) feed with zooplankton culture in different algae species

คณะผู้วิจัย

ดร. อมรรัตน์ กนกรุ่ง
ดร. รวิวรรณ วัฒนดิลก
นางสาวศิริวรรณ ชูศรี

งบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ 2557
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การสะสมปริมาณสารสีในลูกปลาแมนดาริน, *Synchiropus splendidus* (Herre, 1927) เมื่ออนุบาลด้วยแพลงก์ตอนสัตว์ที่เลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนพืชต่างชนิด แผนงานวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงปลาแมนดาริน, *Synchiropus splendidus* (Herre, 1927) เพื่อการอนุรักษ์และการผลิตเชิงพาณิชย์ ซึ่งเป็นโครงการวิจัยหนึ่งที่ได้รับการสนับสนุนเงินอุดหนุนทุนวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

คณะวิจัยต้องขอขอบพระคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้เล็งเห็นความสำคัญของการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลาแมนดาริน อีกทั้งยังเป็นแนวทางในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำให้มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลถึงแนวทางในการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคม ด้วยการใช้ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

นอกจากนี้ต้องขอขอบคุณคณะทำงานวิจัยของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้อย่างดีและต่อเนื่อง จนทำให้งานวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

อมรรัตน์ กนกรุ่ง
หัวหน้าโครการวิจัย

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata* และ *Dunaliella salina* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มีปริมาณแตกต่างกัน 6 ระดับ จากผลการศึกษาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็ก *T. gracilis* มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 3 (1.760 mmol N, 0.041 mmol P, 126.97 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) สาหร่ายขนาดเล็ก *I. galbana* พบว่ามีปริมาณความหนาแน่นเซลล์สูงสุด เมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร 5 (1.760 mmol N, 0.082 mmol P, 744.83 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร) สาหร่ายขนาดเล็ก *N. oculata* พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กชนิดนี้มีการเจริญเติบโตทางด้านความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 5 (1714.37 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร) และสาหร่ายขนาดเล็ก *D. salina* พบว่ามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 3 (1.760 mmol N, 0.041 mmol P, 252.76 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร)

ในการศึกษาการสะสมสารสีในแพลงก์ตอนสัตว์อาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) ที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 3 ชนิด (*T. gracilis*, *N. oculata* และ *D. salina*) พบว่า มีการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ 4 ชนิด คือ มีสารสีแคโรทีนอยด์ canthaxanthin, batacarotene, zeaxanthin และ echinenone สารสีที่เด่นและพบในปริมาณสูงกว่าสารสีชนิดอื่นในอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด คือ canthaxanthin แต่ไม่พบการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ในอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *I. galbana*

ในส่วนของการศึกษาการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ในลูกปลาแมนดารินที่ทำการให้อาหารด้วยอาร์ทีเมีย (*A. salina*) ซึ่งมีการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด พบว่ามีการสะสมสารสี Betacarotene สูงในปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *T. gracilis* สารสีแคโรทีนอยด์ Echinenone พบการสะสมในปริมาณสูงในปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *D. salina* และสารสีแคโรทีนอยด์ canthaxanthin พบว่ามีการสะสมสูงในปลาที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก *I. galbana* และสาหร่ายขนาดเล็ก *T. gracilis*

Abstract

The study on the growth of four species microalgae (*Tetraselmis gracilis*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata* and *Dunaliella salina*) cultured in Guillard "f/2" medium with 6 different levels of nitrogen and phosphorus. The result showed that the best condition for culture of *T. gracilis* was the third formula. (1.760 mmol N, 0.041 mmol P, 126.97 X 10^4 cells / ml). The *I. galbana* showed the highest density of cells when were cultured in the medium of formula 5 (1.760 mmol N, 0.082 mmol P, 744.83 X 10^4 cells/ ml) while the *N. oculata* showed the best growth when cultured in the medium of formula 5 (1714.37 X 10^4 cells/ml). And the microalgae of *D. salina* had rapidly grown in culture medium of formula 3 medium (1.760 mmol N, 0.041 mmol P, 252.76 X 104 cells/ ml).

The study on pigment accumulation in *Artemia* (*Artemia salina*) which were increased nutritive value with 3 types of microalgae (*T. gracilis*, *N. oculata* and *D. salina*) found that *Artemia* contained canthaxanthin as the dominant pigments whereas the recessive pigments were batacarotene, zeaxanthin and echinenone, respectively. But it was found that there is no pigment accumulation in the *Artemia* which were increased nutritive value with *I. galbana.*

The study on pigment accumulation in mandarinfish larvae which fed with *Artemia* (*A. salina*) that was increased nutritive value with 4 different types of microalgae. The results showed that the betacarotene were the highest accumulation in mandarinfish larvae which fed with the enriched *Artemia* (*A. salina*) with *T. gracilis.* In addition there were the high rate of Echinenone accumulation in mandarinfish larvae fed with enriched *Artemia* with *D. salina.* And it was found that the mandarinfish larvae which fed with *I. galbana* and *T. gracilis* showed the highest rate of canthaxanthin accumulation.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญภาพภาคผนวก	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญตารางภาคผนวก	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
ชีววิทยาของสาหร่ายเซลล์เดียว	3
ชีววิทยาของแพลงก์ตอนสัตว์	4
ชีววิทยาของปลาแมนดาริน	5
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	10
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	10
วิธีดำเนินการทดลอง	13
บทที่ 4 ผลการศึกษา	15
ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย	18
ศึกษาการเจริญเติบโต อัตราการรอด ของปลาแมนดาริน	22
ศึกษาการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์	27
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	30
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	37

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีระดับของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 6 ระดับ	19
ภาพที่ 2 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Isochrysis galbana* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีระดับของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 6 ระดับ	20
ภาพที่ 3 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Nannochloropsis oculata* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีระดับของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 6 ระดับ	20
ภาพที่ 4 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Dunaliella salina* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีระดับของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 6 ระดับ	21
ภาพที่ 5 แสดงการเจริญเติบโตทางด้านความยาวรวม (total length) ของปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิดที่มีการเจริญเติบโตในอาหารเหลวซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน	24
ภาพที่ 6 แสดงการเจริญเติบโตทางด้านความยาวมาตรฐาน (standard length) ของปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิดที่มีการเจริญเติบโตในอาหารเหลวซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน	24
ภาพที่ 5 แสดงการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนัก (weight) ของปลาแมนดาริน ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิดที่มีการเจริญเติบโตในอาหารเหลวซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน	25

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 8 แสดงอัตราการรอดตาย(survival rate) ของ ปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ที่มีการเจริญเติบโตในอาหารเหลวซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 26

สารบัญภาพภาคผนวก

	หน้า
รูปภาพภาคผนวกที่ 1 แสดงการวัดค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Echinenone	38
รูปภาพภาคผนวกที่ 2 แสดงการวัดค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Beta-carotene	39
รูปภาพภาคผนวกที่ 3 แสดงการตรวจหาชนิดและปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ของปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *T. gracilis* ด้วยเครื่อง HPLC	40
รูปภาพภาคผนวกที่ 4 แสดงการตรวจหาชนิดและปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ของปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *I. galbana* ด้วยเครื่อง HPLC	41
รูปภาพภาคผนวกที่ 5 แสดงการตรวจหาชนิดและปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ของปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *N. oculata* ด้วยเครื่อง HPLC	42
รูปภาพภาคผนวกที่ 6 แสดงการตรวจหาชนิดและปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ของปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *D. salina* ด้วยเครื่อง HPLC	43
รูปภาพภาคผนวกที่ 7 แสดงการตรวจหาชนิดและปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ของปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งไม่มีการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *D. salina* ด้วยเครื่อง HPLC (ชุดควบคุมการทดลอง)	44
รูปภาพภาคผนวกที่ 8 แสดงการตรวจหาสารสีมาตรฐานของแคโรทีนอยด์ 4 ชนิดคือ Betacarotene, Canthaxanthin, Zeaxanthin และ Echinenone ด้วยเครื่อง HPLC	45
รูปภาพภาคผนวกที่ 9ปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ทิเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *T. gracilis* ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรที่ 3	46

สารบัญภาพภาคผนวก

	หน้า
รูปภาพภาคผนวกที่ 10 ปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย ซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *I. galbana* ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรที่ 5	46
รูปภาพภาคผนวกที่ 11 ปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย ซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *N. oculata* ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรที่ 5	47
รูปภาพภาคผนวกที่ 12 ปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย ซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *D. salina* ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรที่ 3	47

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ในอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอากหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด (*T. gracilis*, *I. galbana* , *N. oculata* และ *D. salina*) ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน	28
ตารางที่ 2 แสดงปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ในลูกปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่มีการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด (*T. gracilis*, *I. galbana* , *N. oculata* และ *D. salina*) ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัสแตกต่างกัน	29

สารบัญตารางภาคผนวก

	หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านความยาวรวม (total length) ด้วยวิธี One-Way ANOVA ของปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน	48
ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านความยาวมาตรฐาน (standard length) ด้วยวิธี One-Way ANOVA ของปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโต ในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน	48
ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนัก (weight) ด้วยวิธี One-Way ANOVA ของปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน	49
ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านความยาวรวม (total length) ด้วยวิธี One-Way ANOVA ของปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง	49

สารบัญตารางภาคผนวก (ต่อ)

	หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านความยาวมาตรฐาน (standard length) ด้วยวิธี One-Way ANOVA ของปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโต ในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง	50
ตารางภาคผนวกที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนัก (weight) ด้วยวิธี One-Way ANOVA ของปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง	50
ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างชุดทดลองของการเจริญเติบโตทางด้านความยาวมาตรฐาน (standard length) ของปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน โดยวิธี Duncan’s New Multiple Range test	51
ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างชุดทดลองของการเจริญเติบโตทางด้านความยาวรวม (total length) ของปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน โดยวิธี Duncan’s New Multiple Range test	51

สารบัญตารางภาคผนวก (ต่อ)

	หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างชุดทดลองของการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนัก (weight) ของปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน โดยวิธี Duncan’s New Multiple Range test	52
ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างชุดทดลองของการเจริญเติบโตทางด้านความยาวมาตรฐาน (standard length) ของปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยวิธี Duncan’s New Multiple Range test	52
ตารางภาคผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างชุดทดลองของการเจริญเติบโตทางด้านความยาวรวม (total length) ของปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยวิธี Duncan’s New Multiple Range test	53
ตารางภาคผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างชุดทดลองของการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนัก (weight) ของปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยวิธี Duncan’s New Multiple Range test	53

บทที่ 1
คำนำ

การเลี้ยงปลาสวยงามเป็นงานอดิเรก เพื่อการพักผ่อนหย่อนใจ ได้ก่อให้เกิดธุรกิจปลาสวยงามที่มีมูลค่าการซื้อขายทั่วโลก จำนวนผู้เลี้ยงปลาทะเลมีแนวโน้มเพิ่มทั่วโลก ทั้งนี้เนื่องจากเทคโนโลยีการเลี้ยงปลาทะเลสวยงามที่พัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็ว ในจำนวนปลาทะเลที่นิยมนำมาเลี้ยงได้แก่ ปลาการ์ตูน (Clownfish), ปลาสินสมุทร (Angelfish), ปลาสลิดน้ำเงินหางเหลือง (Yellowtail Damsels) ขี้ตังเบ็ดน้ำเงิน (Blue tang) และปลาแมนดาริน (mandarin dragonet) เป็นต้น

ปลาแมนดารินที่นำมาเลี้ยงกันนั้นส่วนใหญ่เป็นปลาที่จับมาจากธรรมชาติ และมีปริมาณที่น้อยมากที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเมื่อเทียบกับปลาน้ำจืด แล้วซึ่งปลาน้ำจืดได้มาจากการเพาะเลี้ยงตามฟาร์มเป็นส่วนใหญ่ (Dawes, 1999) “ปลาแมนดาริน” จัดเป็นปลาที่มีรูปร่างใกล้เคียงกับปลาบู่ แต่ถูกจัดอยู่ในตรอบครัว callionymidae หรือที่เรียกกันว่า “Dragonets” ในปัจจุบันมีฟาร์มเอกชนทำการเพาะเลี้ยงปลาทะเลสวยงามกันมากขึ้นจนถึงระดับเพาะเลี้ยงเพื่อการส่งออก ปลาแมนดารินเป็นปลาที่ได้รับความสนใจจากผู้ประกอบการเพาะเลี้ยงปลาทะเลสวยงาม แต่ยังประสบกับปัญหาของการเลี้ยงปลาเพื่อให้ได้สีสันสวยงามเหมือนปลาที่นำมาจากธรรมชาติ ปัญหาสำคัญของการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงปลาแมนดารินให้มีสีสันสวยงามเหมือนปลาธรรมชาตินั้น ยังไม่มีข้อมูลที่จะนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงปลาแมนดารินเพื่อให้มีสีสันสวยงาม

ปลาสวยงามที่พบและมีสีสวยงามนั้นเนื่องมาจากรงควัตถุสารสีหรือที่เรียกกันว่า “แคโรทีนอยด์” ซึ่งแคโรทีนอยด์มีด้วยกันหลายชนิด เช่น เบต้า แคโรทิน (beta carotene), ลูเทอีน (lutein), แอสตาแซนทิน (astaxanthin) และ คาทีโนโปรตีน ที่ชื่อว่า Cyanophores แคโรทีนอยด์เป็นเม็ดสีที่ทำให้เกิดสีต่างๆในปลา และสัตว์น้ำสวยงามอีกหลายชนิด ปลาแมนดารินเป็นสัตว์น้ำอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับแคโรทีนอยด์จากการกินอาหารเข้าไปเท่านั้น และสารอาหารที่ปลาได้รับเข้าไปนั้นมีส่วนสำคัญต่อการเพิ่มความเข้มสีของปลาให้มีสีสันสวยงาม (Urich, 1994)

สัตว์น้ำโดยส่วนใหญ่จะกินแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหาร เช่น โรติเฟอร์ โคพีพอด และอาร์ทีเมีย ส่วนแพลงก์ตอนสัตว์ใช้แพลงก์ตอนพืชขนาดเล็กเป็นอาหารเพื่อช่วยในขบวนการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ให้ได้ในปริมาณมาก แพลงก์ตอนพืชมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของลูกปลาโดยส่งผ่านทางแพลงก์ตอนสัตว์ (Reitan et al., 1997) แพลงก์ตอนพืชต้องการใช้ธาตุอาหารหลายชนิดเพื่อช่วยในขบวนการเจริญเติบโต โดยเฉพาะธาตุอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ซึ่งธาตุอาหารทั้งสองมีความสำคัญต่อการขยายพันธุ์และการสร้างสารอาหารภายในเซลล์แพลงก์ตอนพืช (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2543) อีกทั้งยังส่งผลต่อการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ในแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ด้วย ถ้าแพลงก์ตอนพืชมีการเจริญเติบโตดีส่งผลให้แพลงก์ตอนสัตว์มีการสะสมแคโรทีนอยด์สูงตามไปด้วย (Andersson et al., 2003)

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้มุ่งถึงปัญหาปริมาณความเหมาะสมของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ก่อนนำมาทำการเลี้ยงแพลงก์ตอนสัตว์ทั้ง 2 ชนิด เพื่อเลี้ยงปลาแมนดาริน ซึ่งเป็นการพัฒนาเพิ่มศักยภาพของลูกปลาแมนดารินวัยอ่อน ในการสะสมของสารสีเพื่อให้ลูกปลามีสีสวยงาม การเจริญเติบโต และอัตราการรอดสูง ซึ่งเมื่อการศึกษาเสร็จสิ้นแล้วสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนากระบวนการผลิตปลาแมนดารินนำสู่การพัฒนาแนวทางของการประกอบธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามน้ำเค็มและปลาทะเลชนิดอื่น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาปริมาณความเหมาะสมของธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ต่อการเจริญเติบโตและการสะสมสารสี ของแพลงก์ตอนพืชขนาดเล็ก 4 ชนิด คือ *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis* sp., *Dunaliella salina* และ *Nannochloropsis oculata*
2. ศึกษาการสะสมสารสี ในโรติเฟอร์ที่ทำการเลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 4 ชนิด
3. ศึกษาการสะสมสารสี การเจิญเติบโต และอัตราการรอด ของลูกปลาแมนดารินวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโรติเฟอร์ ที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาหาปริมาณความเหมาะสมธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด คือ *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis* sp., *Dunaliella salina* และ *Nannochloropsis oculata* ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงแพลก์ตอนสัตว์ โรติเฟอร์ และทำการศึกษาปริมาณสารสี การเจริญเติบโต และอัตราการรอด ในลูกปลาแมนดารินวัยอ่อนซึ่งเลี้ยงด้วยโรติเฟอร์ที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาของสาหร่ายเซลล์เดียว (http://www.marinespecies.org)

1.1 อนุกรมวิธานสาหร่าย *Tetraselmis gracilis*

Kingdom : Plantae
Phylum : Chlorophyta
Class : Prasinophyceae
Order : Chlorodendrales
Family : Chlorodendraceae
Genus : *Tetraselmis*
Species : *Tetraselmis gracilis*

1.2 อนุกรมวิธานสาหร่าย *Dunaliella salina*
Kingdom : Plantae
Phylum : Chlorophyta
Class : Chlorophyceae
Order : Volvocales
Family : Dunaliellaceae
Genus : *Dunaliella*
Species : *Dunaliella salina*
1.3 อนุกรมวิธานสาหร่าย *Isochrysis galbana*
Kingdom : Chromista
Phylum : Haptophyta
Class : Prymnesiophyceae
Order : Isochrysidales
Family : Isochrysidacaae
Genus : *Isochrysis*
Species : *Isochrysis galbana*

1.4 อนุกรมวิธานสาหร่าย *Nannochloropsis oculata*

Kingdom : Chromista

Phylum : Ochrophyta

Class : Eustigmatophyceae

Order : Eustigmatales

Family : Monodopsidaceae

Genus : *Nannochloropsis*

Species : *Nannochloropsis oculata*

2. ชีววิทยาของแพลงก์ตอนสัตว์ **(http://www.marinespecies.org)**

2.1 อนุกรมวิธานของโรติเฟอร์

Kingdom : Animalia

Phylum : Rotifera

Class : Eurotatoria

Order : Ploimia

Family : Brachionidae

Genus : *Brachionus*

Species : *Brachionus rotundiformis*

2.2 อนุกรมวิธานของอาร์ทีเมีย

Kingdom : Animalia

Phylum : Arthopoda

Class : Branchiopoda

Order : Anostraca

Family : Artemiidae

Genus : *Artemia*

Species : *Artemia salina*

3. ชีววิทยาของปลาแมนดาริน (http://www.marinespecies.org)

3.1 อนุกรมวิธานของปลากรีนแมนดาริน (*Synchiropus splendidus*, Herre,1927)

Kingdom Animalia
Phylum Chordata
Subphylum Vertebrata
Class Actinopteri
Order Perciformes
Family Callionymidae
Genus Synchiropus
Species *Synchiropus splendidus*

4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สาหร่ายเซลล์เดียวขนาดเล็ก หรือเรามักเรียกกันว่า แพลงก์ตอนพืช เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์อาหารด้วยตัวมันเองได้และมีบทบาทในการเป็นผู้ผลิตเบื้องต้น (Primary producer) ของระบบห่วงโซ่อาหาร สาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้มีสารสีภายในเซลล์หรือเราเรียกกันว่า รงควัตุ ซึ่งสามารถดูดซับพลังงานแสงและใช้พลังงานแสงสว่างร่วมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและสร้างสารอาหารภายในเซลล์สาหร่ายเซลล์เดียว ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดไขมัน และ รงควัตถุสารสี (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีปริมาณของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มีอัตราส่วนแตกต่างกันระหว่าง 0.5-80 เลี้ยงที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 15, 20, 25, 28 และ 32 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณของโปรตีนและคลอโรฟิลล์ มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไนโตรเจน แต่ในทางกลับกันปริมาณของไขมันกลับมีแนวโน้มลดลง ส่วนผลของกรดไขมันในกลุ่ม n-3 และ n-6 (polyunsaturated fatty acid) มีปริมาณค่อนข้างใกล้เคียงกันจนถึงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่มีอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสถึงระดับ 40 (Molina *et al*, 1991)

Evjemo และ Olsen (1999) ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของอาหารต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของอาร์ทีเมีย (*Artemia franciscana*) ซึ่งอาหารที่ใช้ในการทดอลงคือ สาหร่ายขนาดเล็ก *Isochrysis galban*a (*T*. iso) ในการศึกษาครั้งนี้อาร์ทีเมียจะเลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก *I. galban*a (*T*. iso) ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยมีระดับความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เลี้ยงแตกต่างกัน 6 ระดับ คือตั้งแต่ช่วงความเข้มข้น 0.2 – 20 mg/L เลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 วัน อาร์ทีเมียเลี้ยงที่ระดับความเค็ม 34 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 26-28 $^{\circ}$C จากการศึกษาพบว่า ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของอาหารที่ใช้เลี้ยงคือ 10 mg/L มีผลต่อการเจริญเติบโตของอาร์ทีเมียสูงที่สุด

Dhont และ คณะ (2013) ได้กล่าวถึงการเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์ซึ่งเลี้ยงโดยวิธีการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ในบ่อเดิมไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่ใช้เลี้ยง พบว่ามีปริมาณของผลผลิตโรติเฟอร์ที่ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณภาพของน้ำต่ำ ถ้ามีการเลี้ยงโรติเฟอร์แบบต่อเนื่องควรที่จะมีการจัดการคุณภาพของน้ำที่ใช้เลี้ยงในบ่อเลี้ยง การเลี้ยงโรติเฟอร์อาหารที่ใช้เลี้ยงโรติเฟอร์จะต้องมีขนาดตั้งแต่ 0.3 – 21 μm อีกทั้งในการเลี้ยงโรติเฟอร์นี้นอกจากขนาดของอาหารที่ใช้เลี้ยง คุณภาพของน้ำเลี้ยง ความหนาแน่นของสาหร่ายที่ใช้ในการเลี้ยงก็มีส่วนสำคัญ อีกทั้งสิ่งที่สำคัญอีกประการที่ควรคำนึงถึงนั่นคือ การเก็บรักษาคุณภาพของอาหาร (สาหร่าย) ให้มีระยะเวลาในการเก็บยาวนาน และยังมีคุณค่าทางอาหารสูง สิ่งเหล่านี้มีความสำคัฐต่อการเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์

Sick (1976) ได้กล่าวถึงงานวิจัยที่มีการใช้สาหร่าย 5 ชนิด (*Chlamydomonas sphagnicolo*, *Dunaliella viridis*, *Platymonas elliptica*, *Chlorella conductrix* และ *Nitzschia closterium*) ซึ่งเป็นสาหร่ายขนาดเล็กเซลล์เดียวทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 5 ชนิดนี้ในสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละชนิด จากนั้นจึงนำมาทำการเลี้ยงอาร์ทีเมียในระยะของอาร์ทีเมียที่แตกต่างกัน จากการศึกษาคุณค่าทางอาหารในอาร์ทีเมียที่ทำการเลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 5 ชนิด พบว่าอาร์ทีเมียปริมาณโปรตีน และ ไขมัน สูงสุดในสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlamydomonas sphagnicolo*, *D. viridis*, *P. elliptica* และ *Chlorella conductrix* และพบว่ามีปริมาณต่ำสุดในสาหร่าย *N. closterium* ซึ่งมีความแตกต่างกันทางด้านสถิติ ในการศึกษามีนำเอาสาหร่ายทั้ง 5 ชนิดนี้ไปเลี้ยงอาร์ทีเมียหลังจากนั้นจึงนำเอาอาร์ทีเมียไปทำการเลี้ยงกุ้ง ในการศึกษาส่วนนี้พบว่า กุ้งมีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlamydomonas sphagnicolo*, *D. viridis* และ *P. elliptica*

Claus และ คณะ (1979) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*, L.) แรกฟัก และอาร์ทีเมียที่มีอายุ 48 ชั่วโมง จากการศึกษาในส่วนนี้พบว่าอาร์ทีเมียที่มีอายุ 48 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารอาหารภายในตัว คือ ปริมาณของสารอาหารคาร์โบไฮเดรต และ ไขมัน จะลดลงจากระยะแรกฟัก ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการศึกษาถึงปริมาณสารอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยการเลี้ยงอาร์ทีเมียระยะแรกฟัก ด้วยสาหร่ายแห้ง (dried algae) จำนวน 2 ชนิด คือ สาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus* และ *Spirulina* เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าอาร์ทีเมียที่ทำการเลี้ยงด้วยสาหร่ายแห้งทั้งสองชนิดนี้มี โปรตีน และ ไขมัน เพิ่มขึ้นซึ่งแตกต่างจากอาร์ทีเมียที่ไม่มีการเลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดนี้ อีกทั้งในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่ารูปแบบของกรดไขมันที่พบในอาร์ทีเมียที่ทำการเลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดนี้มีความแตกต่างจากอาร์ทีเมียแรกฟัก

จากการศึกษาทดลองเลี้ยงลูกปลาระยะแรกด้วยโรติเฟอร์ ซึ่งในการทดลองได้มีการแยกโรติเฟอร์ออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดแรกทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารโรติเฟอร์ด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก และชุดที่สองไม่มีการเพิ่มคุณค่าทางอาหาร ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงลูกปลาพบว่า ลูกปลาที่เลี้ยงด้วยโรติเฟอร์ที่มีการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็กมีปริมาณและรูปแบบชนิดของกรดไขมันแตกต่างกัน ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยเฉพาะในกลุ่มของกรดไขมัน n-3 ช่วยให้ลูกปลามีอัตราการรอด และการเจริญเติบโตดีกว่าลูกปลาที่ทำการเลี้ยงด้วยโรติเฟอร์ที่ไม่มีการเพิ่มคุณค่าทางอาหาร (Reitein *et al*,1997)

Chien และ Shiau (2005) ได้ทำการศึกษาผลของอาหารที่ใช้แหล่งของสารสีแตกต่างกัน 3 แหล่ง คือ จากสาหร่ายขนาดเล็ก *Haematococcus pluvialis*, *Spirulina pacifica* และ สารสีแอสตาแซนทินสังเคราะห์ (synthetic astaxaxnthin Carophyll Pink) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้สาหร่ายขนาดเล็ก *H. pluvialis* เป็นแหล่งของสารสีแอสตาแซนทิน ใช้สาหร่ายขนาดเล็ก *S. pacifica* เป็นแหล่งของสารสีที่ไม่มีแอสตาแซนทิน และสารสีสังเคราะห์แอสตาแซนทินเป็นแหล่งของสารสีแอสตาแซนทินในการทดลอง ในการทดลองได้ใช้แหล่งของสารสีทั้ง 3 ชนิดนี้ผสมในอาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงกุ้ง และในชุดควบคุมการทดลอง ใช้อาหารสำเร็จรูปที่ไม่มีการผสมสารสี ทั้ง 3 ชนิดนี้ ทำการเลี้ยงกุ้ง Kuruma (*Marsupenaes japonicas*) เป็นระยะ 9 สัปดาห์ เพื่อที่จะดูผลของแคโรทีนอยด์ ต่ออัตราการรอด การเจริญเติบโต และสารสี จาการศึกษาพบว่า อาหารสำเร็จรูปที่มีแหล่งของสารสีแคโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิด มีผลต่อการเจริญเติบ อัตราการรอด และปริมาณการสะสมสารสีแตกต่างจากชุดควบคุมการทดลอง ซึ่งกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเหร็จรูปของชุดควบคุมการทดลองมีอัตราการรอด และ การเจริญเติบโต ต่ำกว่าชุดทดอลงทั้ง 3 ชุด มีความแตกต่างกันทางด้านสถิติ แต่ในส่วนของอัตราการรอด การเจริญเติบโตของกุ้ง Kuruma ที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปของทั้ง 3 ชุดทดลองนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางด้านสถิติ

Masahiro และ Mitsuo (1969) ได้ทำการศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงภายในของอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก *Chaetoceros gracilis* เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของแคโรทีนอยด์ในอาร์ทีเมีย จากการศึกษาพบว่ากระบวนการภายในตัวของอาร์ทีเมียไม่สามารถที่จะเปลี่ยนจากสารสี Betacarotene เป็น Astaxanthin ได้ การเปลี่ยนแปลงภายในของอาร์ทีเมียที่ทำการเลี้ยงโดยให้อาหารที่มีแคโรทีนอยด์ Betacarotene, Echinenone และ Canthaxanthin ในการศึกษาพบว่าในอาร์ทีเมียมีการสะสมแคโรทีนอยด์ที่พบเป็นแคโรทีนอยด์หลัก คือ Canthaxanthin แต่ไม่พบการสะสมของ Astaxanthin ในตัวอาร์ทีเมียของทุกชุดการทดลอง

Nelis และ คณะ (1984) ได้ทำการศึกษาหาแคโรทีนอยด์ในไข่อาร์ทีเมีย และในอาร์ทีเมียระยะตัวเต็มวัยที่ผลิตไข่อาร์ทีเมีย จากการศึกษาพบว่าอาร์ทีเมียแรกฟักมีปริมาณของสารสีแคโรทีนอยด์ชนิด cis/trans-canthaxanthin ที่มากกว่าสารสีชนิดอื่น จึงนับได้ว่า canthaxanthin เป็นแคโรทีนอยด์หลักของอาร์ทีเมียแรกฟัก แต่เมื่ออาร์ทีเมียมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะต่าง ๆ คือตั้งแต่ระยะแรกฟักจนกระทั่งถึงระยะที่เริ่มมีการพัฒนามีส่วนของระยางค์ออกมาจากลำตัวอาร์ทีเมีย (nauplius) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณของสารสี cis/trans cathaxanthin มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วตามการพัฒนาของอาร์ทีเมีย สารสี Betacarotene และ Xanthaxanthin จะมีปริมาณการสะสมในระบบทางเดินอาหารของอาร์ทีเมียมากกว่าสารสีแคโรทีนอยด์ชนิดอื่น อีกทั้งในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าในอาร์ทีเมียเพศผู้ไม่มีการสะสมสารสีชนิด cis/trans canthaxanthin นี้เลย ซึ่งการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ของอาร์ทีเมียเพศผู้และเพศเมียมีความแตกต่างกัน

ปลาโดยส่วนใหญ่จะมีการสะสมสารสีที่ได้รับจากอาหารที่กินเข้าไป สารอาหารจะผ่านขบวนการเมตาโบลิซึมบางส่วนสามารถสร้างเป็นสารสีและถูกเก็บสะสมไว้ที่บริเวณกล้ามเนื้อปลาและบริเวณผิวหนังของปลา อีกทั้งปลามีความสามารถที่จะนำเอารงควัตถุสารสีที่สะสมไว้นี้มาใช้ประโยชน์ได้เมื่อมีความจำเป็นโดยเห็นได้จาก การที่ปลาทำการเปลี่ยนแคโรทีนอดย์เหล่านี้เป็นวิตามิน เอ เมื่อร่างกายของปลาต้องการ ได้โดยผ่านขบวนการทางด้าน สรีรวิทยาของปลานั่นเอง (Storebakken and No , 1992)

จากการศึกษาของ Choubert และคณะ (1998) ซึ่งได้ทำการศึกษาเมตาโบลิซึมของปลา rainbow trout พบว่าอาหารเป็นปัจจัยสำคัญในการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุสารสี่ที่อยู่ในปลา cantaxanthin เป็น carotenoid ที่มีความสำคัญต่อปลาที่เลี้ยงเพื่อพัฒนาเป็นพ่อแม่พันธุ์ เนื่องจากรงควัตุแคโรทีนอยด์ cantaxanthin จะถูกส่งไปยังไข่ปลา และเมื่อปลาฟักเป็นตัวอ่อนลูกปลาที่ฟักในช่วงแรกนั้นยังมี cantaxanthin อยู่ในตัวของลูกปลา และปริมาณของ รงควัตถุแคโรทีนอยด์ cantaxanthin จะเริ่มมีปริมาณลดลงเมื่อลูกปลาฟักออกมาได้หลายวันหรือลูกปลามีอายุมากขึ้น

Eda และ คณะ (1996) ได้ทำการศึกษาพัฒนาการของลูกปลาดราก้อน (*Paradiplogrammus enneactic*) ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยเริ่มทำการศึกษาพัฒนาจากเริ่มฟักคือตั้งแต่วันแรกของการฟัก จนถึงลูกปลามีอายุ 35 วัน โดยใช้โรติเฟอร์ *Brachionus rotundiformis* เลี้ยงตลอดระยะเวลาทดลอง จากการศึกษาพบว่าลูกปลามีการพัฒนาการเปิดปากลูกปลาเมื่ออายุ 3 วัน ลูกปลาจะมีการใช้สารอาหารจากไข่แดงที่ติดตัวมาหลังจากฟักจนกระทั่งไข่แดงยุบตัวลงหรือลูกปลาใช้หมดแล้วลูกปลาจะมีความยาวรวม (Total length) 1.9 มิลลิเมตร

แคโรทีนอยด์มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตและยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น สัตว์ที่อยู่ในกลุ่มของ crustacean และ ปลาซามอน แคโรทีนอยด์มีหลายชนิดซึ่งในแต่ละชนิดมีความสำคัญและบทบาทที่แตกต่างกันไป astaxanthin เป็นแคโรทีนอยด์ที่พบในสัตว์กลุ่ม crustacean สัตว์น้ำเหล่านี้ไม่สามารถสร้างมาจากภายในร่างกายของตัวมันเองได้ แต่จะได้รับจากการกินอาหารเข้าไปเท่านั้น ซึ่งอาหารของสัตว์น้ำพวกนี้เช่น โคพีพอด แคโรทีนอยด์จะถูกนำมาเข้าสู่สัตว์น้ำโดยการกินโคพีพอด โคพีพอดจะได้รับแคโรทีนอยด์จากการกินสาหร่ายขนาดเล็กและซึ่งสาหร่ายขนาดเล็กจะเป็นตัวตั้งต้น(precursor) ของแคโรทีนอยด์ อีกทั้งจากการศึกษาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กที่มีความต่างชนิดและความหนาแน่นแตกต่างกัน เมื่อนำมาเลี้ยงโคพีพอดจะทำให้โคพีพอดมีการสะสมแคโรทีนอยด์ที่แตกต่างกัน (Anderson *at al*, 2003)

การเลือกชนิดอาหารให้มีความเหมาะสมกับชนิดของปลานั้นเป็นที่จำเป็นและควรคำนึงถึงเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งมีความสำคัญมากสำหรับการเพาะเลี้ยงลูกปลาวัยอ่อน อาหารมีชีวิตเป็นอาหารที่มีขนาดเล็กและมีหลายขนาดทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแพลงก์ตอนสัตว์เช่น โรติเฟอร์ โคพีพอด และอาร์ทีเมีย ซึ่งแพลงก์ตอนสัตว์ดังกล่าวนี้จะมีขนาดที่แตกต่างกัน การเลือกใช้จึงใช้ในระยะของลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนที่ต่างกัน พราะว่าผู้ที่ทำการเลี้ยงสัตว์น้ำจะต้องทำการเลือกชนิดของแพลงก์ตอนสัตว์ให้เหมาะสมกับลูกสัตว์น้ำ โดยส่วนใหญ่แล้วจะต้องคำนึงถึงขนาดของปากลูกปลาเป็นสำคัญ นอกจากชนิดและขนาดลูกปลาแล้วสิ่งที่สำคัญอีกประการหนึ่งต่อการเพิ่มการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของลูกปลาคือการเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้แพลงก์ตอนสัตว์ก่อนให้ลูกปลากิน (Kraul, S.2006)

แคโรทีนอยด์มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตและยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น สัตว์ที่อยู่ในกลุ่มของ crustacean และ ปลาซามอน แคโรทีนอยด์มีหลายชนิดซึ่งในแต่ละชนิดมีความสำคัญและบทบาทที่แตกต่างกันไป astaxanthin เป็นแคโรทีนอยด์ที่พบในสัตว์กลุ่ม crustacean สัตว์น้ำเหล่านี้ไม่สามารถสร้างมาจากภายในร่างกายของตัวมันเองได้ แต่จะได้รับจากการกินอาหารเข้าไปเท่านั้น ซึ่งอาหารของสัตว์น้ำพวกนี้เช่น โคพีพอด แคโรทีนอยด์จะถูกนำมาเข้าสู่สัตว์น้ำโดยการกินโคพีพอด โคพีพอดจะได้รับแคโรทีนอยด์จากการกินสาหร่ายขนาดเล็กและซึ่งสาหร่ายขนาดเล็กจะเป็นตัวตั้งต้น(precursor) ของแคโรทีนอยด์ อีกทั้งจากการศึกษาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กที่มีความต่างชนิดและความหนาแน่นแตกต่างกัน เมื่อนำมาเลี้ยงโคพีพอดจะทำให้โคพีพอดมีการสะสมแคโรทีนอยด์ที่แตกต่างกัน (Anderson *at al*, 2003)

ปลาที่ทำการเลี้ยงโดยส่วนใหญ่แล้วมีความต้องการกรดไขมันเพื่อช่วยในส่วนของการพัฒนาเจริญเติบโตโดยเฉพาะในกลุ่มของ n-3 HUFA จากการศึกษาพบว่าสัตว์น้ำมีความต้องการกรดไขมันกลุ่ม n-3 ในปริมาณ 1-2 เปอร์เซนต์ในอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงปลา ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงปลานวลจันทร์ทะเล ด้วยอาหารที่มีปริมาณของกรดไขมันกลุ่มของ n-3 HUFA พบว่าปลามีอัตรารอดสูงขึ้น และการพัฒนาการเจริญเติบโตที่ดี (Boonyaratpalin,1997)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ทำวิจัย

1.1.1 ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 2000 มิลลิลิตร
1.1.2 หม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ (autoclave)
1.1.3 ชุดให้ลม (สายยางซิลิโคน, หลอดแก้ว, ท่อลม และ เตรื่องปั๊มลม)
1.1.4 แผงชุดหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์
1.1.5 กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)
1.1.6 ชุดสไลค์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) และกระจกปิดสไลค์
1.1.7 เครื่องมือวัดความเป็นกรดเป็นด่าง
1.1.8 เครื่องมือวัดความเค็มของน้ำ (hand refractometer)
1.1.9 เครื่องนับ (counter)
1.1.10 ตัวดูดสารละลายอัตโนมัติ (automatic pipette)
1.1.11 เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง
1.1.12 เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง
1.1.13 เครื่องมือวัดความเข้มแสง
1.1.14 โกร่งบดตัวอย่าง
1.1.15 UV-Visible spectrophotometer
1.1.16 Centrifuge
1.1.17 Drying oven
1.1.18 Magnetic stirrer
1.1.19 โถดูดความชื้น
1.1.20 กระบอกตวงขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
1.1.21 บีกเกอร์ขนาด 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
1.1.22 หลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร
1.1.23 เครื่อง centrifuge แบบควบคุมอุณหภูมิ
1.1.24 ชุดกรองสาร (suction flask และ ปั๊ม)
1.1.25 เครื่อง HPLC
1.1.26 Column carotenoid
1.1.27 เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromotography)
1.1.28 เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (analytical balance) Alsep EU- 198 No. 700142
1.1.29 กระบอกตวง
1.1.30 ขวดน้ำกลั่น

1.1.31 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
1.1.32 Analytical balance บริษัทผู้ผลิต A&D, Japan
1.1.33 เครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ บริษัทผู้ผลิต Tomy Seiko, Japan
1.1.34 เครื่องระเหยสาร บริษัทผู้ผลิต Buchi, Switzerland
1.1.35 ขวดแก้วก้นกลม ขนาด 100 และ 200 มิลลิลิตร
1.1.36 คอลัมน์ C18 (dimensions 5 X 250 mm)
1.1.37 Separated funnel
1.1.38 บีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร
1.1.39 บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
1.1.40 พาสเจอร์ปิเปตขนาดเส้นผ่าศูนย์ 5 มิลลิเมตร
1.1.41 กรวยแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซ็นติเมตร
1.1.42 กรวยแยกสาร (separatory funnel) ขนาด 100 มิลลิลิตร
1.1.43 ขวดใส่ตัวอย่างสีชาฝาเกลียวขนาดบรรจุ 2 มิลลิลิตร
1.1.44 แผ่นกรองสารเคมี ใส่ขนาดด้วย
1.1.45 แผ่นกรองน้ำใส่ขนาดด้วย
1.1.46 Syring กรองตัวอย่างก่อนฉีด HPLC
1.1.47 เข็มฉีดตัวอย่าง

2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโตของปลาแมนดาริน

2.1 เครื่องคอมพิวเตอร์และโปรแกรม Image – pro PLUS
2.2 ชุดให้ลม (หัวทราย สายท่อลม)
2.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (analytical balance)
Alsep EU- 198 No. 700142
2.4 พู่กันขนาดเล็ก
2.5 บีกเกอร์
2.6 ตู้กระจกแก้วใสขนาดบรรจุ 80 ลิตร
2.7 ยาสลบปลา MS222
2.8 แผ่นแถบวัดขนาดปลา

3. สารเคมีที่ใช้ในการในการทดลอง

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Methanol, HPLC Grade	BDH, England
Dichloromethane, HPLC Grade	BDH, England
Acetonitrile, HPLC Grade	BDH, England
n-Hexane, AR Grade	Merck, Germany
Acetone, AR Grade	Merck, Germany
Sodium chloride, AR Grade	Merck, Germany
Sodium sulfate anhydrous, AR Grade	BDH, England
Petroleum ether 40 –60 $^{\circ}$c , AR grade	BDH, England
Ethanol, AR Grade	Merck, Germany
Chloroform, AR Grade	Merck, Germany
Diethyl ether, AR Grade	Merck, Germany
Nitrogen (N_2)	

Standard astaxanthin

- Astaxanthin (Dr. Ehrentorfer GmbH; Geramany. CA 10307000)
- Beta-carotene (Dr. Ehrentorfer GmbH; Geramany. CA 11045800)
- Canthaxanthin (Dr. Ehrentorfer GmbH; Geramany. CA 10947000)
- Zeaxanthin (Chromadex, Inc.; California, USA, Lot: 00026504-1700)
- Lutein (PhytoLab, GmbH & co; Germany, article No: 89723)

4. วิธีการดำเนินการทดลอง ในการศึกษาได้ทำการแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด การทดลอง คือ

4.1. ศึกษาปริมาณความเหมาะสมของธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ต่อการการสะสมสารสี การเจริญเติบโต ของแพลงก์ตอนพืชขนาดเล็ก 4 ชนิด คือ *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis gracilis*, *Dunaliella salina* และ *Nannochloropsis oculata*

นำน้ำทะเลผ่านการกรองด้วยถุงกรองขนาดตาถี่ 50 ไมครอน มาปรับความเค็มให้ได้ในระดับความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ระดับความเป็นกรด – เบส เริ่มต้นที่ 7.8 ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงสาหร่าย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงทำการเติมอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในปริมาณที่แตกต่างกัน 6 ระดับความเข้มข้น ในการศึกษาการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอน จะทำการนับความหนาแน่นของเซลล์แพลงก์ตอนทุกวันจนกว่าการเจริญเติบโตลดลง เพื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชทั้ง 4 ชนิด ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน

การเตรียมอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด

การเตรียมอาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด โดยใช้ $NaNo_3$ เป็นแหล่งของธาตุอาหารไนโตรเจน และ NaH_2Po_4 เป็นแหล่งของธาตุอาหารฟอสฟอรัส โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลงของ Guillards “f/2” (Guillard,1975) โดยมีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 6 ระดับ คือ

อาหารเหลวสูตรที่ 1 มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน 0.880 mmol และธาตุอาหารฟอสฟอรัส 0.041 mmol

อาหารเหลวสูตรที่ 2 มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน 0.880 mmol และธาตุอาหารฟอสฟอรัส 0.020 mmol

อาหารเหลวสูตรที่ 3 มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน 1.760 mmol และธาตุอาหารฟอสฟอรัส 0.041 mmol

อาหารเหลวสูตรที่ 4 มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน 2.640 mmol และธาตุอาหารฟอสฟอรัส 0.041 mmol

อาหารเหลวสูตรที่ 5 มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน 1.760 mmol และธาตุอาหารฟอสฟอรัส 0.082 mmol

อาหารเหลวสูตรที่ 6 มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน 2.640 mmol และธาตุอาหารฟอสฟอรัส 0.082 mmol

4.2. ศึกษาการสะสมสารสี ในแพลงก์ตอนสัตว์ ซึ่งทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 4 ชนิด

ทำการเตรียมสาหร่ายที่ทำการศึกษาทั้ง 4 ชนิด คือ *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis gracilis*, *Dunaliella salina* และ *Nannochloropsis oculata* ที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน เพื่อใช้ในการเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับ โรติเฟอร์ และที่ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน สำหรับเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับอาร์ทีเมีย กรองเอาตะกอนออกด้วยผ้ากรองที่มีตาถี่ 50 ไมครอน ซึ่งในขั้นตอนของการเพิ่มคุณค่าทางอาหารในแพลงก์ตอนสัตว์นี้ ใช้สาหร่ายทั้ง 4 ชนิด ที่ระยะการเจริญเติบโตที่ ระยะแรกของการเจริญเติบโตคงที่ ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยเป็นระยะเลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วสกัดหาสารสี ตามวิธีของ Schuep and Schierle (1995)

4.3. ศึกษาการสะสมสารสี การเจิญเติบโต และอัตราการรอด ของลูกปลาแมนดารินวัยอ่อนซึ่งเลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนสัตว์ อาร์ทีเมีย ที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด

ทำการเลี้ยงลูกปลาแมนดาริน (*Synchiropus splendidus*) วัยอ่อน ด้วยแพลงก์ตอนสัตว์ อาร์ทีเมีย ทำการเตรียมตู้ทดลองโดยใส่น้ำทะเลที่ผ่านการกรองเอาตะกอนออก ที่ความเค็ม 32 ส่วนในพันส่วน ในปริมาตรน้ำ 25 ลิตร ให้อากาศผ่านทางหัวทรายเพื่อเป็นการเพิ่มออกซิเจนภายในน้ำ ขณะที่ทำการทดลอง ในแค่ละชุดทดลองมีจำนวนตู้ปลาที่เป็นซ้ำ 3 ซ้ำทดลอง หลังจากนั้นจึงทำการสุ่มลูกปลามาใส่ในตู้ทดลองตู้ละ 12 ตัว (ความหนาแน่น 2 ตัวต่อลิตร) เลี้ยงลูกปลาเป็นระยะเวลา 2 เดือน ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของลูกปลาที่ทำการศึกษาทุก 1 เดือน จนสิ้นสุดการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บตัวอย่างลูกปลาเพื่อทำการศึกษาหาปริมาณสารสี ตามวิธีของ Schuep and Schierle (1995)

4.3.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์หาชนิด และปริมาณสารสี

ชั่งตัวอย่างสดของอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด (*I. galbana*, *T. gracilis*, *D. salina* และ *N. oculata*) โดยชั่งแต่ละตัวอย่างประมาณ 10 กรัม ในส่วนที่เป็นตัวอย่างของปลาที่ทำการทดลอง ชั่งตัวอย่างปลาชุดทดลองละประมาณ 4-5 ตัว น้ำหนักประมาณ 4-5 กรัม ก่อนทำการสกัดหาปริมาณสารสีทำการล้างตัวปลาให้สะอาดด้วยน้ำเปล่าก่อน หลังจากนั้นจึงทำการบดตัวอย่างใส่ sodium sulphate anhydrous (Na_2SO_4) และสารสะลาย acetone 20-40 มิลลิลิตร จากนั้นทำการคนตัวอย่างด้วยแท่งแก้วเบาๆ นำไปสกัดด้วยเครื่อง Ultrasonic ประมาณ 30 นาที จากนั้นแช่ตัวอย่างในตู้เย็นนาน 3-4 วัน ทำการ centrifuge ตัวอย่าง ด้วยความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นดูดเอาส่วนสารละลายใสชั้นบน แล้วทำซ้ำจนสารละลายที่ได้ไม่มีสีของตัวอย่าง ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสาร

ทำการสกัดแยกส่วนของสารละลายด้วย hexane-acetone (3:1, v/v) เขย่าเบา ๆ ตั้งให้แยกชั้นสมบูรณ์ ทำซ้ำจนสารสะลาย hexane-acetone ไม่มีสี นำตัวอย่างชั้น hexane ที่ได้ทำการแยกเอาน้ำออกโดยผ่าน Na_2SO_4 นำตัวอย่างที่ได้ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสาร และเป่าตัวอย่างให้แห้งด้วยไนโตรเจน หลังจากนั้นปรับปริมาตรตัวอย่างแคโรทีนอยด์ที่ได้ในขวดตัวอย่างสีชา เก็บไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนที่นำตัวอย่างไปคำนวณหา total carotenoids ด้วย Spectrophotometric method และวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วย HPLC

4.3.2 ศึกษาชนิดรูปแบบสารสีในปลาแมนดาริน

ชั่งตัวอย่างปลาแมนดารินประมาณ 5-6 กรัม ทำการตัดชิ้นส่วนของตัวอย่างให้มีขนาดเล็ก แล้วจึงทำการบดด้วยโกร่งบดตัวอย่างประมาณ 1-2 นาที หลังจากนั้นจึงเติม acetone ในปริมาณ 20 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างและทำการคนตัวอย่างด้วยแท่งแก้วเบาๆ ประมาณ 10 นาที ก่อนที่จะนำตัวอย่างไปใส่ในเครื่อง Ultrasonic ประมาณ 10 นาที ทำการ centrifuge ตัวอย่าง ด้วยความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเราจะสังเกตุเห็นว่าในหลอดตัวอย่างจะมีการแยกชั้นระหว่างส่วนของตัวอย่างปลากับสารตัวทำละลายที่ใส่ลงไปพร้อมกับตัวอย่างมีการแยกชั้นอย่างชัดเจน ให้ทำการดูดส่วนสารละลายที่มีสีด้านบนตัวอย่าง แต่ต้องระวังไม่ให้ตัวอย่างฟุ้งขึ้นมา แล้วทำซ้ำในขั้นตอนนี้จนกว่าสารละลารส่วนบนไม่มีสีของตัวอย่าง หลังจากนั้นนำเอาสารละลายที่ได้มาทำการแยกเพื่อเอาน้ำออกจากตัวอย่างโดยการใช้กรวยแยกสาร ก่อนที่จะทำการแยกด้วยกรวยแยกสารให้ใส่น้ำกลั่นในปริมาณที่เท่ากับสารตัวอย่างทำการเขย่าเบาๆ หลังจากนั้นให้วางทิ้งไว้สักครู่เมื่อสังเกตุว่ามีการแยกชั้นแล้วให้ทำการแยกตัวอย่างออกมาทำการแยกสารละลายอะซีโตนโดยทำการแยกส่วนระหว่าง H_2O-hexane-chloroform(1:1, v/v) เติมสารละลาย 0.1% NaCl เขย่าเบา ๆ ตั้งให้แยกชั้นสมบูรณ์ ทำซ้ำจนสารสะลาย hexane-chloroformไม่มีสีนำตัวอย่างชั้น hexane-chloroform ที่ได้มาทำการแยกเอาน้ำออก โดยใช้ Na_2SO_4นำตัวอย่างที่ได้ทำให้แห้งด้วยวิธี Rotaryvacuum evaporator และทำการเป่าตัวอย่างให้แห้งด้วยไนโตรเจน หลังจากนั้นปรับปริมาตรตัวอย่างแคโรทีนอยด์ที่ได้ในขวดตัวอย่างสีชา เก็บไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนที่นำตัวอย่างไปคำนวณหา total carotenoids ด้วย Spectrophotometric methodและวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วย HPLC (Britton, G. and *et al*, 1995)

4.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (Total carotenoid)

ชั่งตัวอย่างประมาณ 5-10 กรัม แล้วจึงทำการสกัดตัวอย่างโดยใส่สาร acetone ในปริมาณ 10-15 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างไป centrifuge ตัวอย่าง ด้วยความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทำเช่นนี้หลายครั้งจนกว่าน้ำตัวอย่างจะใส แล้วจึงนำเอาตัวอย่างที่ได้ไปทำการวัดด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometry (SPEKOL 2000, Analytik Jena, Germany) ที่ความยาวคลื่น 450 และ 470 นาโนเมตร ทำการบันทึกผลที่ได้แล้วจึงคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมของสารสกัด คำนวณค่าความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ตามกฎของ Lambert-Beer law($E^{1\%}_{1cm}$ 2500, acetone)

4.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วย HPLC

เตรียมสารละลายแคโรทีนอยด์ตัวอย่าง กรองผ่าน filter membrane ขนาดช่องผ่านสารละลาย 0.22มิลลิเมตร เมื่อทำการกรองตัวอย่างเรียบร้อยแล้วจึงฉีดตัวอย่างในปริมาณ 20 µL เข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC; Agilent 1200 Series Quaternary Pump) โดยใช้ UV-visphotodiode array detector (ตัวอย่างและสารมาตรฐานที่ λ=450 nm;). คอลัมน์ที่ใช้ Venusil XBP Silica column (Bonna-Agela Technologies Inc., 150 x 4.6 mmØ) ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ hexane : acetone ในอัตรส่วน 90:10 ที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 mL/min. ระบบที่ใช้ในการตรวจวัดสารแคโรทีนอยด์จะใช้ช่วงคลื่นแสงระหว่าง 380 – 600 nm ชนิดและปริมาณของสารแคโรทีนอยด์ตัวอย่างถูกเปรียบเทียบ retention time และ area กับของสารมาตรฐานที่ทำการฉีดในสภาวะเดียวกัน (เบต้าแคโรทีน, แอสตาแซนทีน) เตรียมสารละลายแคโรทีนอยด์ตัวอย่าง กรองผ่าน filter membrane ฉีดตัวอย่าง 20 µLเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง(HPLC; Agilent 1200 Series Quaternary Pump) โดยใช้ UV-Vis photodiode array detector (ตัวอย่างและสารมาตรฐานที่ λ=470 nm;). คอลัมน์ที่ใช้ Venusil XBP Silica column (Bonna-Agela Technologies Inc., 150 x 4.6 mmØ) ใช้ระบบ gradient ของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ได้แก่ hexane : acetone 95:5 4 นาที; hexane : acetone 88:12 นาน 15 นาที; hexane : acetone 80:20 นาน 20 นาที; hexane : acetone 95:5 นาน 25 นาที ที่อัตราการไหล 1.0-1.2 mL/min. ชนิดและปริมาณของสารแคโรทีนอยด์ตัวอย่างถูกเปรียบเทียบ retention time และ area ของสารมาตรฐานที่สภาวะเดียวกัน (beta carotene, echinenone, canthaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin และ fucoxanthin)

4.3.5 วิธีการเตรียมสารมาตรฐานของแคโรทีนอยด์

เตรียมสารมาตรฐาน betacarotene, canthaxanthin, zeaxanthin, fucoxanthin และ echinenone ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับต่อชนิดของสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 50 พีพีเอ็ม โดยทำการละลายสารแคโรทีนอยด์มาตรฐานด้วย Petroleum

5. ขั้นตอนและวิธีการในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลทางสถิติ (Analysis of Variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS for windows version 10.0 และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี multiple range test

6. สถานที่ทำการทดลอง

งานวิจัยเพาะเลี้ยงสัตว์และพืชทะเล ฝ่ายวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา 169 ถนนลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี 20131

บทที่ 4
ผลการศึกษา

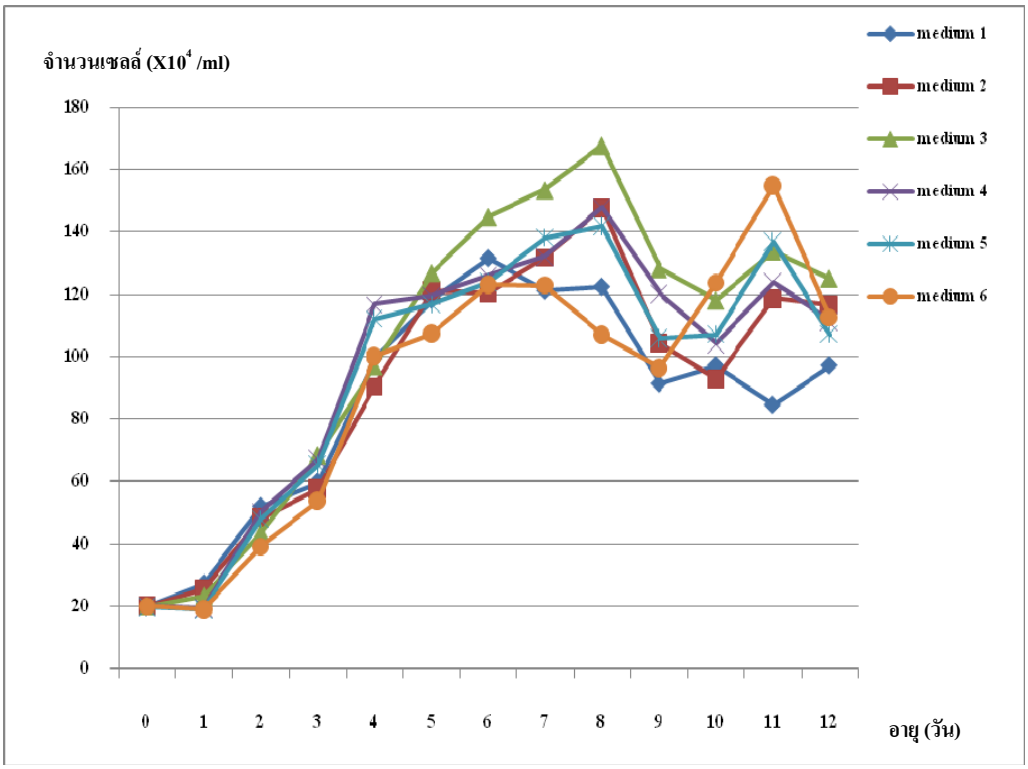
1. การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด (*Tetraselmis gracilis* , *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata* และ *Dunaliella salina*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มีปริมาณแตกต่างกัน 6 ระดับ จากผลการศึกษาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 3 (1.760 mmol N, 0.041 mmol P) ดังรูปภาพที่ 1 มีความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายคือ 126.97 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบรองลงมาคือสาหร่าย *T. gracilis* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 2 (121.30 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลตร) และพบการเจริญเติบโตต่ำสุดในสาหร่ายขนาดเล็กชนิดนี้ที่เลี้ยงอาหารเหลวสูตรที่ 6 (2.640 mmol N, 0;082 mmol P) ซึ่งมีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 107.50 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปภาพที่ 1)

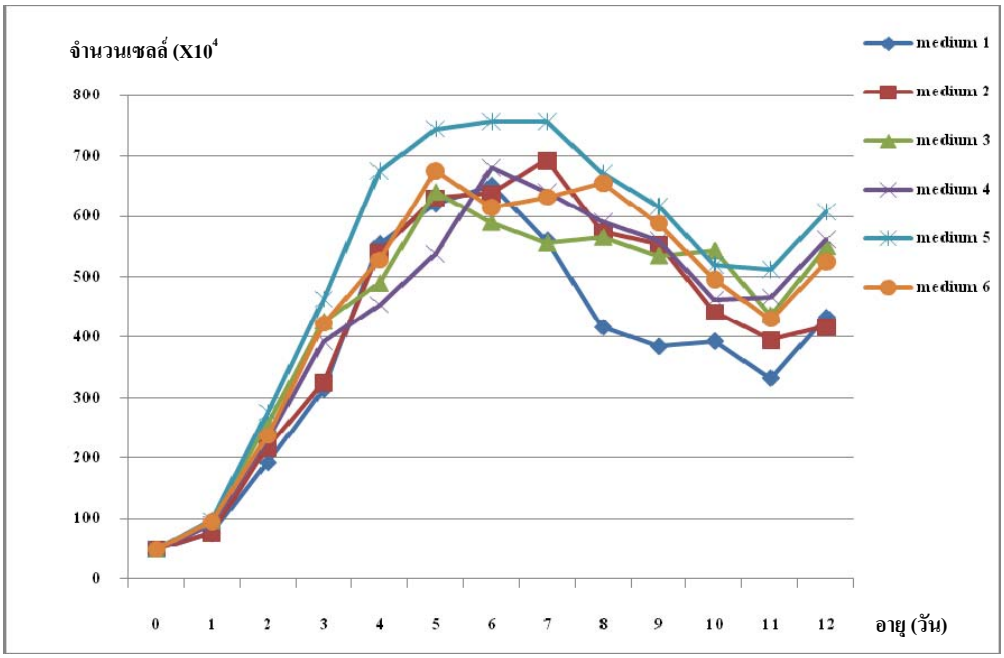
สาหร่าย *Isochrysis galbana* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัส แตกต่างกัน 6 ระดับ จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กชนิดนี้มีการเจริญเติบโตทางด้านความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด เมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร 5 (1.760 mmol N, 0.082 mmol P) สาหร่ายมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 744.83 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร พบรองลงมาคือสาหร่าย *I. galbana* ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาหารสูตร 6 (2.640 mmol N, 0.082 mmol P) ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 676.75 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร และพบความหนาแน่นของเซลล์ต่ำสุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 4 (2.640 mmol N, 0.041 mmol P) ที่ 538.50 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร (รูปภาพที่ 2)

สาหร่าย *Nannochloropsis oculata* จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กชนิดนี้มีการเจริญเติบโตทางด้านความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด เมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 5 สาหร่ายมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 1714.37 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร พบรองลงมาคือสาหร่าย *N. occulata* ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 4 พบมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 1636.87 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร และพบการเจริญเติบโตต่ำสุดเมื่อทำการเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 2 (0.880 mmol N, 0.020 mmol P) ซึ่งมีความหนาแน่นเซลล์อยู่ที่ 1211.87 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร (รูปภาพที่ 3)

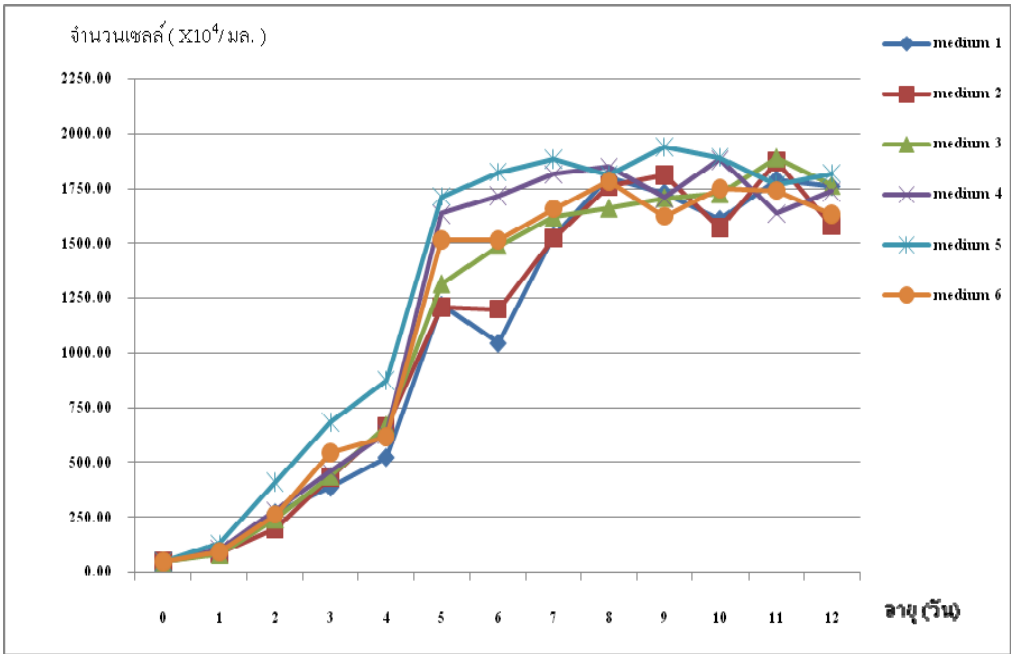
ส่วนในการศึกษาการจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Dunaliella salina* ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรดัดแปลง Guillard “f/2” ซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัสแตกต่างกัน ผลของการศึกษาแสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดอยู่ที่ 252.76 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 3 (1.760 mmol N, 0.041 mmol P) รองลงมาคือ สาหร่ายขนาดเล็กชนิดนี้เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 5 (1.760 mmol N,0.082 mmol P) ซึ่งมีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 225.02 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร และมีการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* ต่ำสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร 2 (0.880 mmol N, 0.020 mmol P) มีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ที่ 173.28 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร (รูปภาพที่ 4)



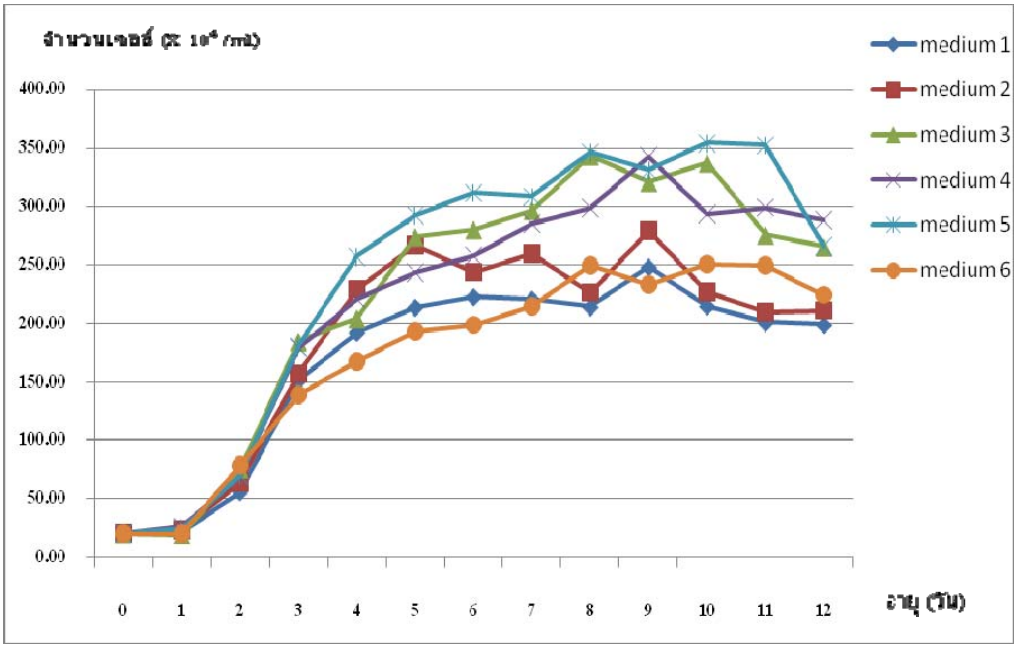
รูปภาพที่ 1 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีระดับของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 6 ระดับ



รูปภาพที่ 2 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Isochrysis galbana* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีระดับของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 6 ระดับ



รูปภาพที่ 3 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Nannochloropsis oculata* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีระดับของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 6 ระดับ



รูปภาพที่ 4 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Dunaliella salina* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีระดับของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 6 ระดับ

2. ศึกษาการเจิญเติบโต และอัตราการรอด ของลูกปลาแมนดารินวัยอ่อนซึ่งเลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนสัตว์อาร์ทีเมีย ที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด

การศึกษาเลี้ยงลูกปลาแมนดาริน (*Synchiropus splendidus*) วัยอ่อน ที่เลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนสัตว์อาร์ทีเมีย ซึ่งมีการเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้อาร์ทีเมียด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ทำการวิจัย 5 ชุดการทดลอง ซึ่งแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ซึ่งแยกการทำวิจัยดังต่อไปนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ทำการเลี้ยงปลาแมนดารินด้วยอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *Tetraselmis gracilis*

ชุดการทดลองที่ 2 ทำการเลี้ยงปลาแมนดารินด้วยอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *Isochrysis galbana*

ชุดการทดลองที่ 3 ทำการเลี้ยงปลาแมนดารินด้วยอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *Nannochloropsis oculata*

ชุดการทดลองที่ 4 ทำการเลี้ยงปลาแมนดารินด้วยอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *Dunaliella salina*

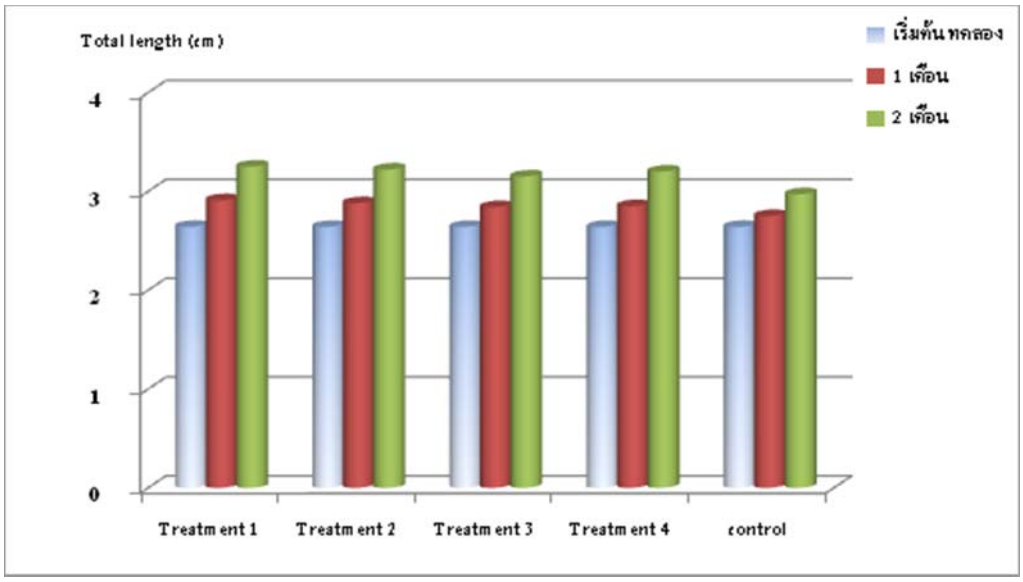
ชุดควบคุมการทดลอง ทำการเลี้ยงปลาแมนดารินด้วยอาร์ทีเมียที่ไม่มีการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก

ในทดลองเลี้ยงได้ทำการเลี้ยงลูกปลาเป็นระยะเวลา 2 เดือน ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของลูกปลาที่ทำการศึกษาทุก 1 เดือน จนสิ้นสุดการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บตัวอย่างลูกปลาเพื่อทำการศึกษาหาปริมาณสารสี ตามวิธีของ Schuep and Schierle (1995) ผลการศึกษาทางด้านการเจริญเติบโตเมื่อทำการเลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนสัตว์อาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด (ผลการศึกษาจากการศึกษาที่ 1) ซึ่งแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกันโดยสาหร่ายขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 3 สาหร่ายขนาดเล็ก *Isochrysis galbana* มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร 5 สาหร่ายขนาดเล็ก *Nannochloropsis oculata* มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร 5 และ สาหร่ายขนาดเล็ก *Dunaliella salina* มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 3

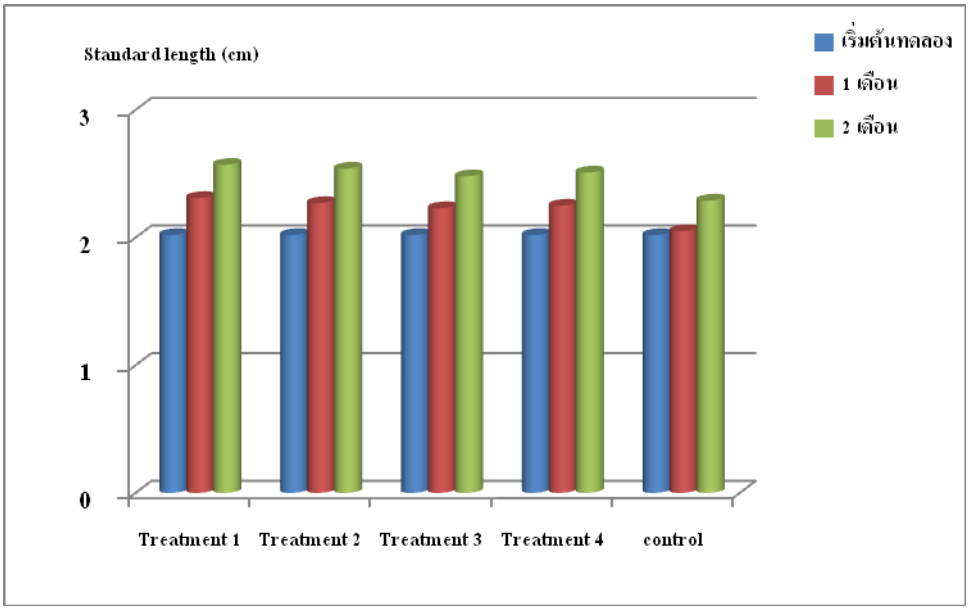
ผลการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงลูกปลาแมนดารินได้ 1 เดือน พบว่าลูกปลาแมนดารินมีการเจริญเติบโตทางด้านความยาวรวมสูงที่สุด (2.91 เซ็นติเมตร) เมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยชุดการทดลองที่ 1 รองลงมาคือปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยชุดทดลองที่ 2 (2.88 เซ็นติเมตร) และพบความยาวรวมของปลาแมนดารินต่ำสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียชุดควบคุมการทดลอง (2.75 เซ็นติเมตร) เมื่อทำการตรวจสอบข้อมูลทางด้านสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในส่วนของการพัฒนาการเจริญเติบโตของลูกปลาทางด้านความยาวมาตรฐานพบว่ามีการพัฒนาทางด้านนี้สูงที่สุด เมื่อลูกปลาเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยชุดทดลองที่ 1 (2.31 เซ็นติเมตร) คือปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยชุดทดลองที่ 2 (2.27 เซ็นติเมตร) และพบความยาวมาตรฐานของปลาแมนดารินต่ำสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียชุดควบคุมการทดลอง

(2.05 เซ็นติเมตร) เมื่อทำการตรวจสอบข้อมูลทางด้านสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางด้านสถิติ ($p \geq 0.05$)การเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนักพบว่าปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารในชุดการทดลองที่ 1 (0.95 กรัม) มีน้ำหนักสูงกว่า 4 ชุดการทดลอง รองลงมาคือปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุค่าทางอาหารในชุดการทดลองที่ 2 (0.90 กรัม) และมีน้ำหนักต่ำสุด เมื่อทำการเลี้ยงปลาแมนดารินด้วยอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยชุดการทดลองที่ 5 (0.78 กรัม) เมื่อทำการตรวจสอบข้อมูลทางด้านสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

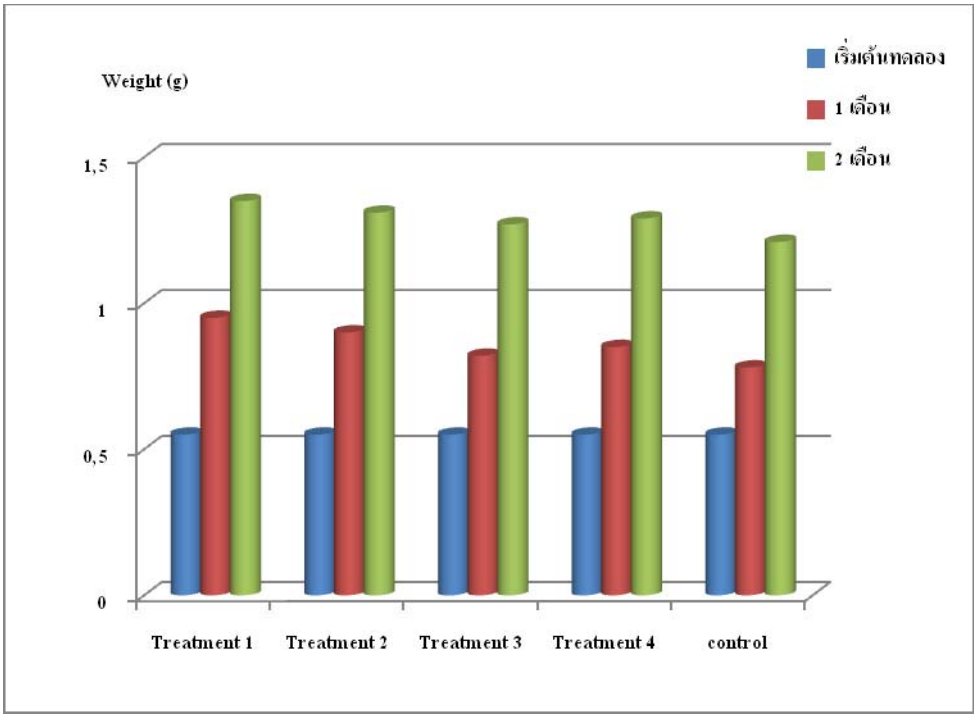
ผลการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงลูกปลาแมนดารินได้ 2 เดือนหรือสิ้นสุดการทดลอง พบว่าลูกปลาแมนดารินมีการเจริญเติบโตทางด้านความยาวรวมสูงที่สุด (3.25 เซ็นติเมตร) เมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยชุดการทดลองที่ 1 รองลงมาคือปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยชุดทดลองที่ 2 (3.22 เซ็นติเมตร) และพบความยาวรวมของปลาแมนดารินต่ำสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียชุดควบคุมการทดลอง (2.97 เซ็นติเมตร) เมื่อทำการตรวจสอบข้อมูลทางด้านสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในส่วนของการพัฒนาการเจริญเติบโตของลูกปลาทางด้านความยาวมาตรฐานพบว่ามีการพัฒนาทางด้านนี้สูงที่สุด เมื่อลูกปลาเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยชุดทดลองที่ 1 (2.57 เซ็นติเมตร) คือปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยชุดทดลองที่ 2 (2.54 เซ็นติเมตร) และพบความยาวมาตรฐานของปลาแมนดารินต่ำสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียชุดควบคุมการทดลอง (2.29 เซ็นติเมตร) เมื่อทำการตรวจสอบข้อมูลทางด้านสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันทางด้านสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) การเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนักพบว่าปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารในชุดการทดลองที่ 1 (1.35 กรัม) มีน้ำหนักสูงกว่า 4 ชุดการทดลอง รองลงมาคือปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุค่าทางอาหารในชุดการทดลองที่ 2 (1.31 กรัม) และมีน้ำหนักต่ำสุด เมื่อทำการเลี้ยงปลาแมนดารินด้วยอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยชุดการทดลองที่ 5 (1.21 กรัม) เมื่อทำการตรวจสอบข้อมูลทางด้านสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางด้านสถิติ ($p \geq 0.05$) ดังแสดงในรูปภาพที่ 5,6 และ 7



รูปภาพที่ 5 แสดงการเจริญเติบโตทางด้านความยาวรวม (total length) ของปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิดที่มีการเจริญเติบโตในอาหารเหลวซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน

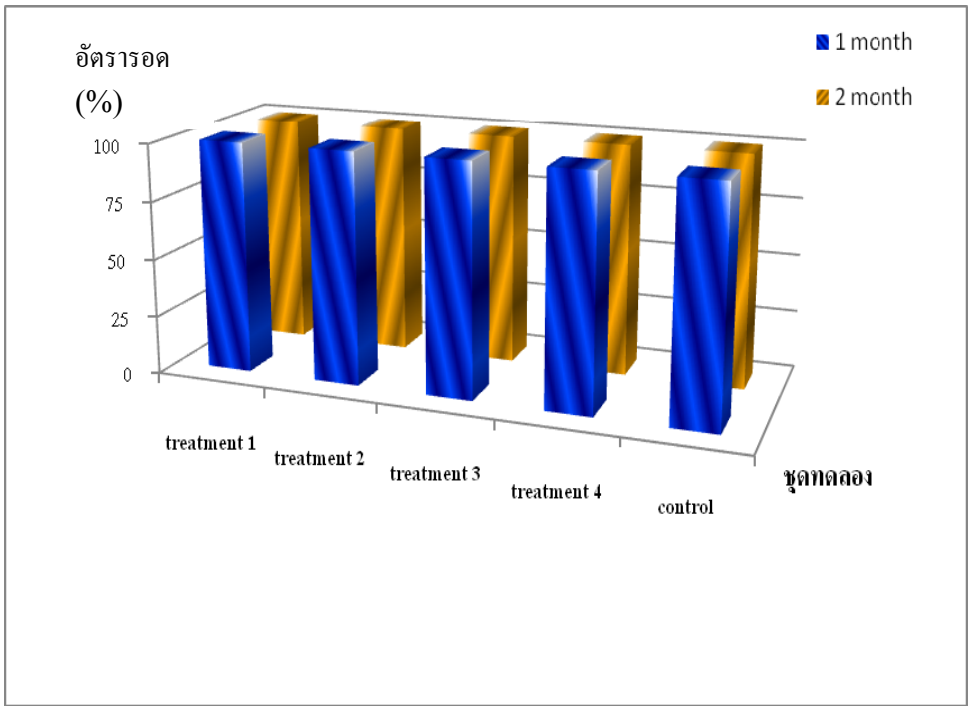


รูปภาพที่ 6 แสดงการเจริญเติบโตทางด้านความยาวมาตรฐาน (standard length) ของปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิดที่มีการเจริญเติบโตในอาหารเหลวซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน



รูปภาพที่ 7 แสดงการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนัก (weight) ของปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิดที่มีการเจริญเติบโตในอาหารเหลวซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน

อัตราการรอดตายของปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งอาร์ทีเมียมีการเพิ่มคุณค่าทางอาหาร 8 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปเป็นอาหารให้ลูกปลาแมนดาริน จากการศึกษาพบว่า ปลาแมนดารินที่ทำการเลี้ยงมีอัตราการรอดตายเท่ากันทุกชุดการทดลอง คือ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปภาพ ที่ 8



รูปภาพที่ 8 แสดงอัตราการรอดตาย(survival rate) ของปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิดที่มีการเจริญเติบโตในอาหารเหลวซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน

3. การสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ของลูกปลาแมนดารินวัยอ่อนซึ่งเลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนสัตว์อาร์ทีเมีย ที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด

ทำการเลี้ยงปลาแมนดารินด้วยอาร์ทีเมีย ซึ่งอาร์ทีเมียจะทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด โดยที่ปลาแมนดารินในชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มอาหารด้วยสาหร่าย *T. gracilis* ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มอาหารด้วยสาหร่าย *I. galbana* ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มอาหารด้วยสาหร่าย *N. oculata* ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มอาหารด้วยสาหร่าย *D. salina* และเลี้ยงปลาแมนดารินด้วยอาร์ทีเมียแรกฟักที่ไม่มีการเพิ่มคุณค่าทางอาหารเป็นชุดควบคุมการทดลอง เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ในปลาแมนดารินเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าทุกชุดการทดลองมีการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ คือ betacarotene, echinenone และ canthaxanthin และการทดลองที่เป็นชุดควบคุมการทดลอง มีสารสีแคโรทีนอยด์ 3 ชนิด เหมือนกันทุกชุดการทดลอง ซึ่งมีปริมาณของการสะสมแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน คือ ชุดการทดลองที่ 1 มีการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ Betacarotene, Echinenone และ Cathaxanthin คือ 396.82, 286.72 และ 261.49 μg/g ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลองที่ 2 ลูกปลาแมนดารินมีการสะสมแคโรทีนอยด์ คือ 285.79, 279.09 และ 267.54 μg/g ตามลำดับ ชุดการทดลองที่ 3 ลูกปลาแมนดารินมีการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ คือ 303.97, 249.80 และ 251.26 μg/g ตามลำดับ ชุดการทดลองที่ 4 ลูกปลาแมนดารินมีการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ คือ 350.03, 290.50 และ 183.15 μg/g ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการศึกษาปริมาณการสะสมสารสีในอาร์ทีเมียที่ใช้เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงลูกปลาแมนดารินที่ทำการทดลอง พบว่าอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *T. gracilis* มีสารสีแคโรทีนอยด์ 2 ชนิด คือ betacarotene และ cathaxanthin มีการสะสมอยู่ที่ 22.33 และ 691.34 μg/g ตามลำดับ การสะสมสารสีในอาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *I. galbana* พบว่าไม่มีการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ อาร์ทีเมียของชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *N. oculata* พบการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์จำนวน 4 ชนิด คือ cathaxanthin, zeaxanthin , betacarotene และ echinenone มีการสะสมอยู่ที่ 1194.09, 284.37, 227.43 และ 49.70 μg/g ตามลำดับ การเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *D. salina* มีสารสีแคโรทีนอยด์ 1 ชนิด คือ Canthaxanthin มีการสะสมสารสีอยู่ที่ 364.16 μg/g ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ในอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด (*T. gracilis*, *I. galbana* , *N. oculata* และ *D. salina*) ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มี ปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัสแตกต่างกัน องค์ประกอบสารสี (µg/g)

ตัวอย่าง	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (µg/g)			
	Beta carotene	Echinenone	Canthaxanthin	Zeaxanthin
อาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *T. gracilis*	22.33	-	691.34	-
อาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *I. galbana*	-	-	-	-
อาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *N. oculata*	227.43	49.70	1194.09	284.37
อาร์ทีเมียที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *D. salina*	510.40	120.71	97.75	1083.55
อาร์ทีเมียที่ไม่มีการเพิ่มคุณค่าทางอาหาร	-	-	Major	-

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ในลูกปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย ที่มีการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด (*T. gracilis*, *I. galbana*, *N. oculata* และ *D. salina*) ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มี ปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัสแตกต่างกัน

ตัวอย่าง	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (μg/g)			
	Beta carotene	Echinenone	Canthaxanthin	Asthaxanthin
ปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *T. gracilis*	396.82	283.72	261.49	-
ปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *I. galbana*	285.79	279.09	267.54	-
ปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *N. oculata*	303.97	249.80	251.26	-
ปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *D. salina*	350.03	290.50	183.15	-

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก ทั้ง 4 ชนิด ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มีปริมาณแตกต่างกัน 6 ระดับ จากผลการศึกษาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 3 สาหร่าย *Isochrysis galbana* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัส แตกต่างกัน 6 ระดับ จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กชนิดนี้มีการเจริญเติบโตทางด้านความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด เมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร 5 สาหร่าย *Nannochloropsis oculata* จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กชนิดนี้มีการเจริญเติบโตทางด้านความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด เมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 5 ส่วนในการศึกษาการจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Dunaliella salina* ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรดัดแปลง Guillard “f/2” ซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัส แตกต่างกัน ผลของการศึกษาแสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 3 คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Molina และคณะ (1991) ที่ทำการศึกษาสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน ที่ 0.5-80 mmol พบว่ามีปริมาณของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารไนโตรเจน

แพลงก์ตอนพืชและอาร์ทีเมียเป็นอาหารมีชีวิต ซึ่งนับได้ว่าเป็นสภาวะแวดล้อมอย่างหนึ่งที่ทำให้มีความแตกต่างกันในส่วนขององค์ประกอบทางเคมีในตัวปลา เพราะอาหารมีชีวิตที่พบตามธรรมชาติ แต่ละบริเวณจะมีความแตกต่างกันซึ่งสิ่งแวดล้อมเหล่านี้จะส่งผลถึงความหลากหลายของการเก็บสะสมสารสีหรือเรียกกันว่าองค์ประกอบภายในตัวของสัตว์น้ำที่กินอาหารมีชีวิตเหล่านี้เป็นอาหาร เพราะอาหารเหล่านี้จะส่งต่อถึงระบบห่วงโซ่อาหาร ซึ่งระบบห่วงโซ่อาหารที่แตกต่างกันนั้นก็ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ความเค็ม อุณหภูมิ โดยฉพาะห่วงโซ่อาหารเบื้องต้นนั่นก็คือผู้ผลิตเบื้องต้น ซึ่งมักรู้จักกันดีว่าเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นของห่วงโซ่อาหารนั่นคือสาหร่ายขนาดเล็กหรือแพลงก์ตอนพืช (Maoka, 2011) สาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้เป็นอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์ และสัตว์ที่กินแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหาร ซึ่งบริโภคเหล่านี้จะกินสาหร่ายขนาดเล็กเข้าไปแล้วเกิดกระบวนการสังเคราะห์สารอาหารต่างๆ ภายในร่างกายรวมถึงแคโรทีนอยด์ที่มีการสะสมในสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ สาหร่ายขนาดเล็กจะมีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถสร้างแคโรทีนอยด์สะสมไว้ในเซลล์ของสาหร่ายเอง (Delgodo-Vargas และคณะ, 2000) จึงทำให้สัตว์น้ำที่บริโภคแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหาร ปลาแมนดารินก็เป็นสัตว์น้ำอีกชนิดหนึ่งที่กินแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหาร หลังจากนั้นจะผ่านกระบวนการในต่างกายเพื่อเก็บสะสมแคโรทีนอยด์ไว้ตามบริเวณอวัยวะส่วนต่างๆ โดยเฉพาะในปลาสวยงาม เช่น ปลาแมนดาริน ซึ่งจะมีการแสดงออกของสีและลวดลายความสวยงามของปลาที่บริเวณผิวหนังด้านนอกของตัวปลา สีที่เราพบเห็นนั้นเกิดจากการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ ปลาหรือสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ไม่สามารถที่จะสร้างแคโรทีนอยด์ขึ้นมาเองได้ ที่มีการสะสมในสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะได้จากการกินอาหารเข้าไปเท่านั้น สาหร่ายขนาดเล็กเป็น

สิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างแคโรทีนอยด์ขึ้นมาได้ด้วยกระบวนการสร้างอาหารภายในเซลล์ของมันเอง (Pisal และ Lele, 2005) อาร์ทีเมียมีสารสีเป็นองค์ประกอบภายในและส่งต่อสารสีนี้ถึงผู้บริโภค เช่น ปลาแมนดาริน ซึ่งเมื่อปลาแมนดารินกินแพลงก์ตอนสัตว์ชนิดนี้เข้าไปแล้วสารสีแคโรทีนอยด์จะถูกเก็บสะสมไว้ที่บริเวณ หรืออวัยวะส่วนที่สัตว์แต่ละชนิดสามารถเก็บสะสมไว้ได้ เช่น บริเวณผิวหนัง หรือ เนื้อ ซึ่งได้รับยอมรับจากงานวิจัยของ Holeton และคณะ (2009) ที่ทำการศึกษาการสะสมสารสีในแพลงก์ตอนสัตว์ โคพีพอด (*Acartia bifilosa*) ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก *Tetraselmis suecica* พบว่า โคพีพอดสามารถที่จะสะสมสารสีได้ตามความหนาแน่นและคุณค่าทางอาหาร ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Tetraselmis suecica* จากงานวิจัยของ Nieuwerburgh และคณะ (2005) ที่ทำการศึกษาการสะสมแคโรทีนอยด์ในแพลงก์ตอนสัตว์ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 2 ชนิด พบว่าแพลงก์ตอนสัตว์สามารถสะสม beta-carotene ไว้ภายตัวของมันได้เมื่อกินสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้เข้าไปเพื่อใช้ในขบวนการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนสัตว์เอง คล้ายคลึงกับผลการวิจัยในครั้งนี้ที่พบการสะสมของ beta-carotene ในปลากรีนแมนดาริน มีการสะสมของแคโรทีนอยด์ beta-carotene อยู่ที่ 396.82 μg/g น้ำหนักเปียก ของชุดทดลองที่ทำการเลี้ยงปลาแมนดารินด้วยอาร์ทีเมียซึ่งทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก *T. gracilis*

ในส่วนของอัตราการรอดของปลาแมนดารินที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดสูงเท่ากัน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าอาร์ทีเมียที่ใช้เลี้ยงปลาแมนดารินของการศึกษาครั้งนี้ได้มีการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็กก่อนที่จะนำไปเลี้ยงลูกปลา อาร์ทีเมียจึงมีคุณค่าทางอาหารสูง คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Evjemo และ Olsen (1999) ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของอาหารต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของอาร์ทีเมีย (*Artemia franciscana*) ซึ่งอาหารที่ใช้ในการทดอลงคือ สาหร่ายขนาดเล็ก *Isochrysis galban*a (*T*. iso) ในการศึกษาครั้งนี้อาร์ทีเมียจะเลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก *I. galban*a (*T*. iso) ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยมีระดับความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เลี้ยงแตกต่างกัน 6 ระดับ คือตั้งแต่ช่วงความเข้มข้น 0.2 – 20 mg/L เลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 วัน อาร์ทีเมียเลี้ยงที่ระดับความเค็ม 34 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 26-28 °C จากการศึกษาพบว่า ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของอาหารที่ใช้เลี้ยงคือ 10 mg/L มีผลต่อการเจริญเติบโตของอาร์ทีเมียสูงที่สุด Sick (1976) ได้ทำการศึกษาโดยมีการใช้สาหร่าย 5 ชนิด (*Chlamydomonas sphagnicolo*, *Dunaliella viridis*, *Platymonas elliptica*, *Chlorella conductrix* และ *Nitzschia closterium*) ซึ่งเป็นสาหร่ายขนาดเล็กเซลล์เดียวทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 5 ชนิดนี้ในสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละชนิด จากนั้นจึงนำมาทำการเลี้ยงอาร์ทีเมียในระยะของอาร์ทีเมียที่แตกต่างกัน จากการศึกษาคุณค่าทางอาหารในอาร์ทีเมียที่ทำการเลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 5 ชนิด พบว่าอาร์ทีเมียปริมาณโปรตีน และ ไขมัน สูงสุดในสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlamydomonas sphagnicolo*, *D. viridis*, *P. elliptica* และ *Chlorella conductrix* และพบว่ามีปริมาณต่ำสุดในสาหร่าย *N. closterium* ซึ่งมีความแตกต่างกันทางด้านสถิติ ในการศึกษามีนำเอาสาหร่ายทั้ง 5 ชนิด นี้ไปเลี้ยงอาร์ทีเมียหลังจากนั้นจึงนำเอาอาร์ทีเมียไปทำการเลี้ยงกุ้ง ในการศึกษาส่วนนี้พบว่า กุ้งมีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก จากการศึกษาของงานวิจัยครั้งนี้พบว่าอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารนั้นมีผลต่ออัตราการรอดของปลาแมนดารินที่ทำการศึกษาในครั้งนี้

จากการศึกษาในส่วนของการสะสมสารสีในอาร์ทีเมียพบว่า อาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก มีการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์สูง โดยเฉพาะอาร์ทีเมียที่ทำการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก *Nanachloropsis oculata* มีการสะสมสารสี Canthaxanthin สูงสุด (1194.09 μg/g) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการพบการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ Astaxanthin ในตัวของอาร์ทีเมีย ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Masahiro และ Mitsuo (1969) ซึ่งได้ทำการศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงภายในของอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของแคโรทีนอยด์ในอาร์ทีเมีย จากการศึกษาพบว่ากระบวนการภายในตัวของอาร์ทีเมียไม่สามารถที่จะเปลี่ยนจากสารสี การเปลี่ยนแปลงภายในของอาร์ทีเมียที่ทำการเลี้ยงโดยให้อาหารที่มีแคโรทีนอยด์ Betacarotene, Echinenone และ Canthaxanthin ในการศึกษาพบว่าในอาร์ทีเมียมีการสะสมแคโรทีนอยด์ที่พบเป็นแคโรทีนอยด์หลักคือ Canthaxanthin แต่ไม่พบการสะสมของ Astaxanthin ในตัวอาร์ทีเมียของทุกชุดการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

ลัดดา วงศ์รัตน์.2542. *แพลงก์ตอนพืช*.ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1 - 21.

ลัดดา วงศ์รัตน์.2543. *คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน*.ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 127.

Andersson, M., Nieuwerburgh, L.V., and Snoeijs, P. 2003. pigment transfer from phytoplankton to zooplankton with emphasis on astaxanthin production in the Baltic Sea food web. *Marine Ecology Progress Series*. 254: 213-224.

AOAC., 1990. Official method of Analysis of the Association of Official Chemists Arlington, VA, USA. 648.

Baker, R.T.M., Pfeiffer, A.M., Schoner, F.J. and Smith-Lemmon, L., 2002. Pigmenting efficacy of astaxanthin and canthaxanthin in fresh-water reared Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Animal Feed Science and Technology*. 99(1-4): 97-106.

Berge, G.M., Baeverfjord, G., Skrede, A. and Storebakken, T., 2005. Bacterial protein grown on natural gas as protein source in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* , in saltwater.*Aqualture*. 244 : 233-240.

Boonyaratpalin, M.,1997. Nutrient requirements of marine food fish cultured in Southeast Asia. *Aquaculture* . 151: 283-313.

Careri, M., Furlattini, L., Mangia, A., Musci, M., Anklam, E., Theobald, A. and Holst, C.V., 2001. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina* Pacifica algae : a chemometric approach. *Journal of Chromatography A*. 912 : 61-71.

Chien, Y-H. and Shiau, W-C. 2005. The effects of dietary supplementation of algae and synthetic astaxanthin on body astaxanthin, survival, growth, and low dissolved oxygen stress resistance of kuruma prawn, Marsupenaeus japonicas Bate. Journal of Experimental Marine Biology. 318 : 201-211.

Choubert, G., Blanc, J-M. and Poisson, H., 1998. Effects of dietary keto-carotenoids (canthaxanthin and astaxanthin) on the reproductive performance of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*. 4 (4) :249-254.

Choubert, G., Manuela, M-P. and Morais, R., 2006. Pigmenting efficacy of astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* : Effect of dietary astaxanthin and lipid sources. *Aquaculture*. 257 : 429-436.

Claus, C., Benijts, F. and Vandeputte, G. 1979. The biochemical composition of the larvae of two strains of *Artemia salina* (L.) reared on two different algal foods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 36 (2) : 171-183.

Dhont, J. and Dierckens, K. 2013. Rotifers, *Artemia* and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. Woodhead Publishing Limited. 157-167.

Eda, E. Fujiwara, T. Kuno, Y., Takita, T. 1996. Larval and juvenile development of the dragonet, *Paradiplogrammus enneactis*. reared in a laboratory. Ichthyological Research. The Ichthyological Society of Japan.

El-Sayed, A-F. and Kawanna, M., 2008.Effects of dietary protein and energy levels on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock in recycling system. *Aquaculture*. 280 : 179-184.

Evjemo, J.O. and Olsen, Y. 1999. Effect of food concentration on the growth and production rate of Artemia francana feeding on algae (T. iso). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 242 : 273-296.

Gouveia, L., Rema, P., Pereira, O. and Empis, J., 2003. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. *Aquaculture nutrition*. 9 : 123-129.

Masahiro, H. and Mitsuo, H. 1969. Carotenoid metabolism in *Artemia salina* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 29 (3) : 985-994.

Milione, M., and Zeng, C., 2007. The effects of algal diets on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture*. 273: 656-664.

Molina, E., Martinez, M.E., Sanchez, S., Garcia, F., and Contreras, A. 1991. Growth and biochemical composition with emphasis on the fatty acid of *Tetraselmis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36:21-25.

Nelis, H.J.C.F., Lavens, P., Moens, L., Sorgeloos, P., Jonckheere, J.A., Criel, G.R. and Leenheer, A.P.D. 1984. Cis-canthaxanthins unusual carotenoids in the eggs and the reproductive system of female brine shrimp *Artemia*. *The journal of Biological Chemistry*.
259 (10) : 6063-6066.

Nielsen, H.D. and Nielsen, S.L., 2005. Photosynthetic responses to Cu^{2+} exposure are independent of light acclimation and uncoupled from growth inhibition in *Fucus serratus* (Phaeophyceae). *Marine Pollution Bulletin*. 51 : 715-721.

Paripatananont, T., Tangtrongpairoj, J. Sailasuta, A. and Chansue, N., 1999. Effect of astaxanthin on the pigmentation of goldfish *Carassius auratus*. *Journal of the world aquaculture society*. 30 (4) : 454-460.

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

Schuepp, W., and Schierle, J. 1995. Example 9: Astaxanthine. Determination of stabilized, added astaxanthin in fish feeds and premixs. In: *Carotenoids*. Vol. 1A: Isolation and Analysis (ed. by G. Brition, S. Liaaen-Jensen & H. Pfander). 273-276. Birkhauser, Brasel.

Sick, L.V. 1976. Nutritional effect of live species of marine algae on the growth, development, and survival of the brine shrimp Artemia salina. *Marine Biology*. 35 (1) : 69-78.

Syd Kraul. 2006. Live food for marine fish larvae. VIII Symposium International. 15-17 November 2006. Monterrey, Mexico. ISBN 970-694-333-5.

Urich, K., 1994. Comparative animal biochemistry. Springer Verlag. Germany.

Usydus, Z., Szlinder-Richert, J. and Adamczyk, M., 2009. Protein quality and amino acid profiles of fish products available in Poland. *Food Chemistry*. 112 : 139-145.

Wang, Y., Kong, L-J., Li, K. and Bureau, D.P., 2007. Effects of feeding frequency and ration level on growth, feed utilization and nitrogen waste output of cuneate drum (*Nibea miichthioides*) reared in net pens. *Aquaculture*. 271 : 350-356.

Wang, Y-J., Chien, Y-H. and Pan, C-H., 2006. Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins , *Hyphessobrycon callistus*. *Aquaculture*. 261: 641-648.

Wilkerson, J. D., 1998. Clownfish : A guide to their captive care, Breeding natural history. Printed and bound in the U.S.A. by World Color Book Services. 183-207.

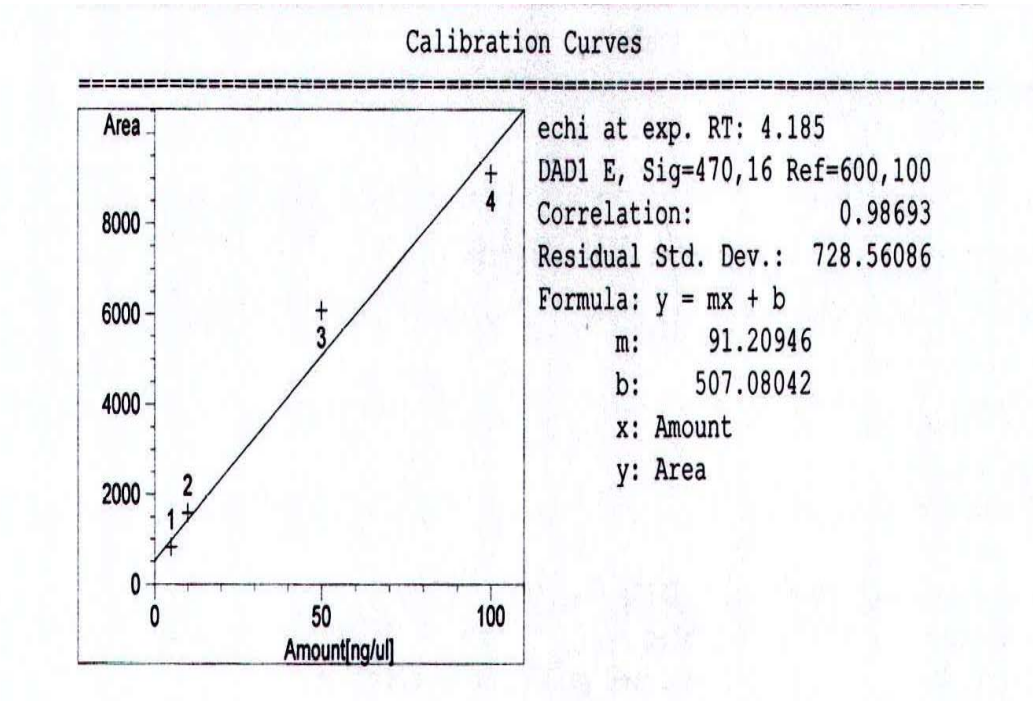
Yamasak, T., Aki, T., Mori, Y., Yamamoto, T., Shinozaki, M., Kawamoto, S., and Ono K.2007. Nutritional enrichment of larval fish feed with *Thraustochytrid* producing polyunsaturated fatty acid and xanthophylls. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 104 No.3, 200-206.

YtretØyl, T., G. C-H., Hatlen, B., Robb, D.H.F. and Bjerkeng, B. 2004.Carotenoid and lipid content in muscle of Atlantic salmon, *Salmo salar*, transferred to seawater as 0 + or 1 + smolts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 138 : 29-40.

http://www.marinespecies.org. ทำการสืบค้นข้อมูลของฐานนี้เมื่อวันที่ 9 กันยายน 2558

ภาคผนวก

รูปภาพภาคผนวก

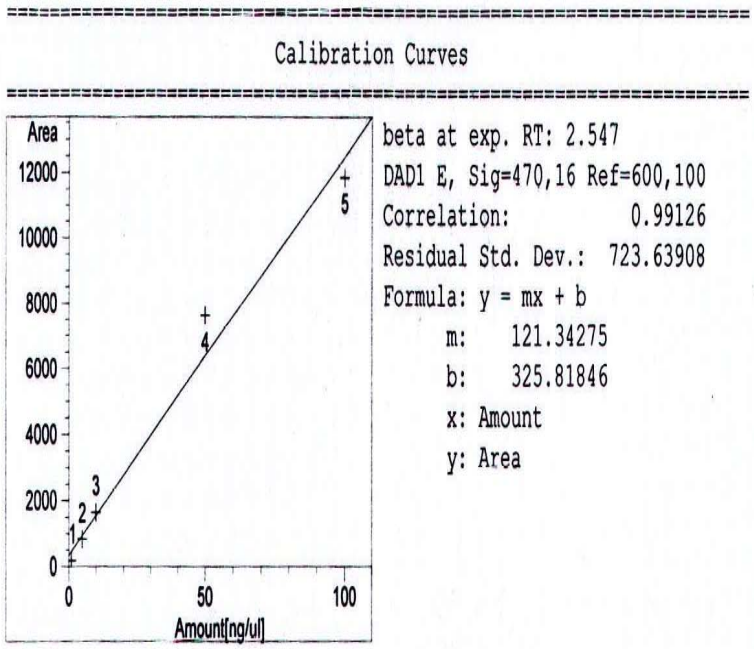


รูปภาพภาคผนวกที่ 1 แสดงการวัดค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Echinenone

จากกราฟมาตรฐานของ สารมาตรฐาน Echinenone (รูปภาพภาคผนวกที่ 1) ได้สมการเส้นตรง ดังต่อไปนี้

สารมาตรฐาน Echinenone มีสูตรสมการเส้นตรง คือ

$y = 91.2095x + 507.080$ ($r^2 = 0.9869$)

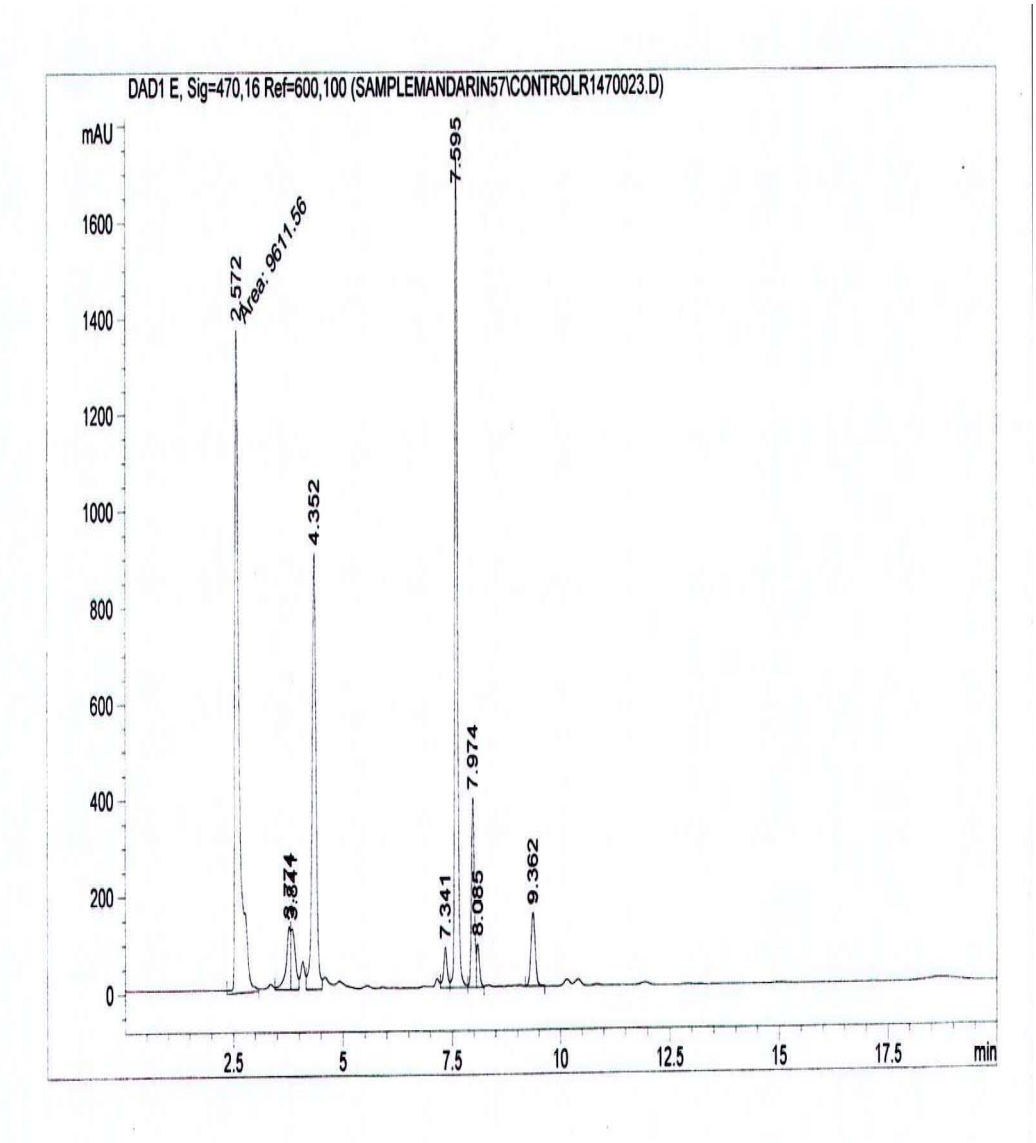


รูปภาคผนวกที่ 2 แสดงการวัดค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Beta-carotene

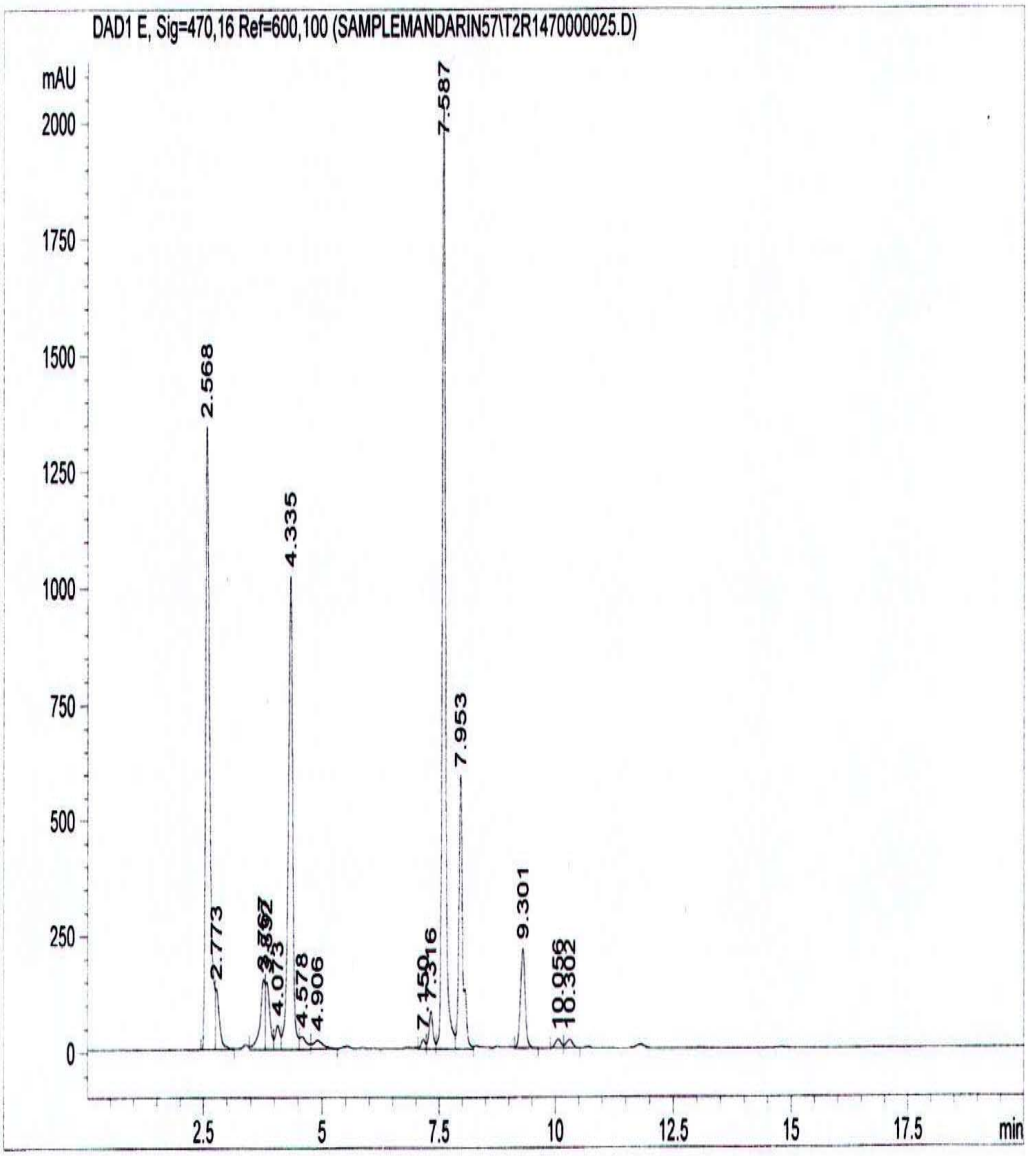
จากกราฟมาตรฐานของ สารมาตรฐาน Betacarotene (รูปภาพภาคผนวกที่ 2) ได้สมการเส้นตรง ดังต่อไปนี้

สารมาตรฐาน Betacarotene มีสูตรสมการเส้นตรง คือ

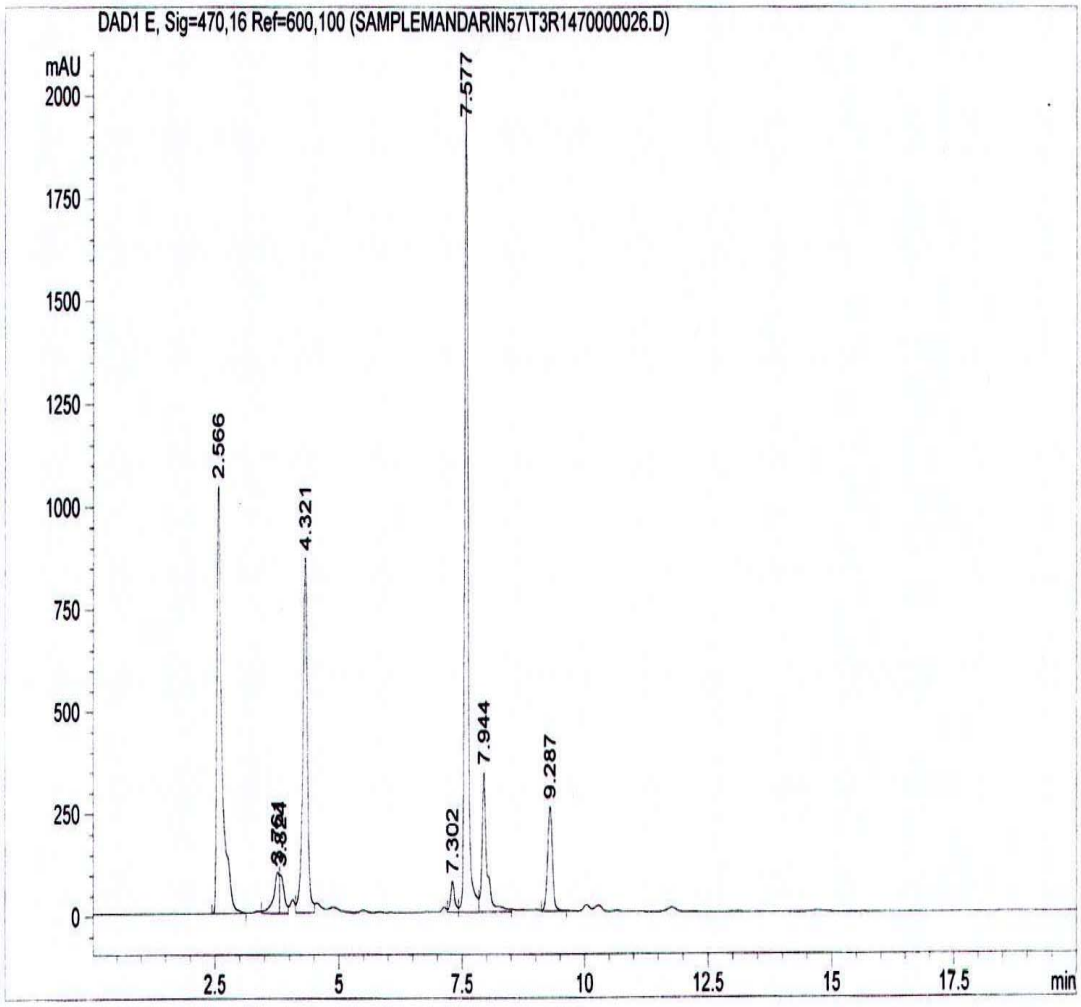
$y = 121.343x + 325.8185$ ($r^2 = 0.9913$)



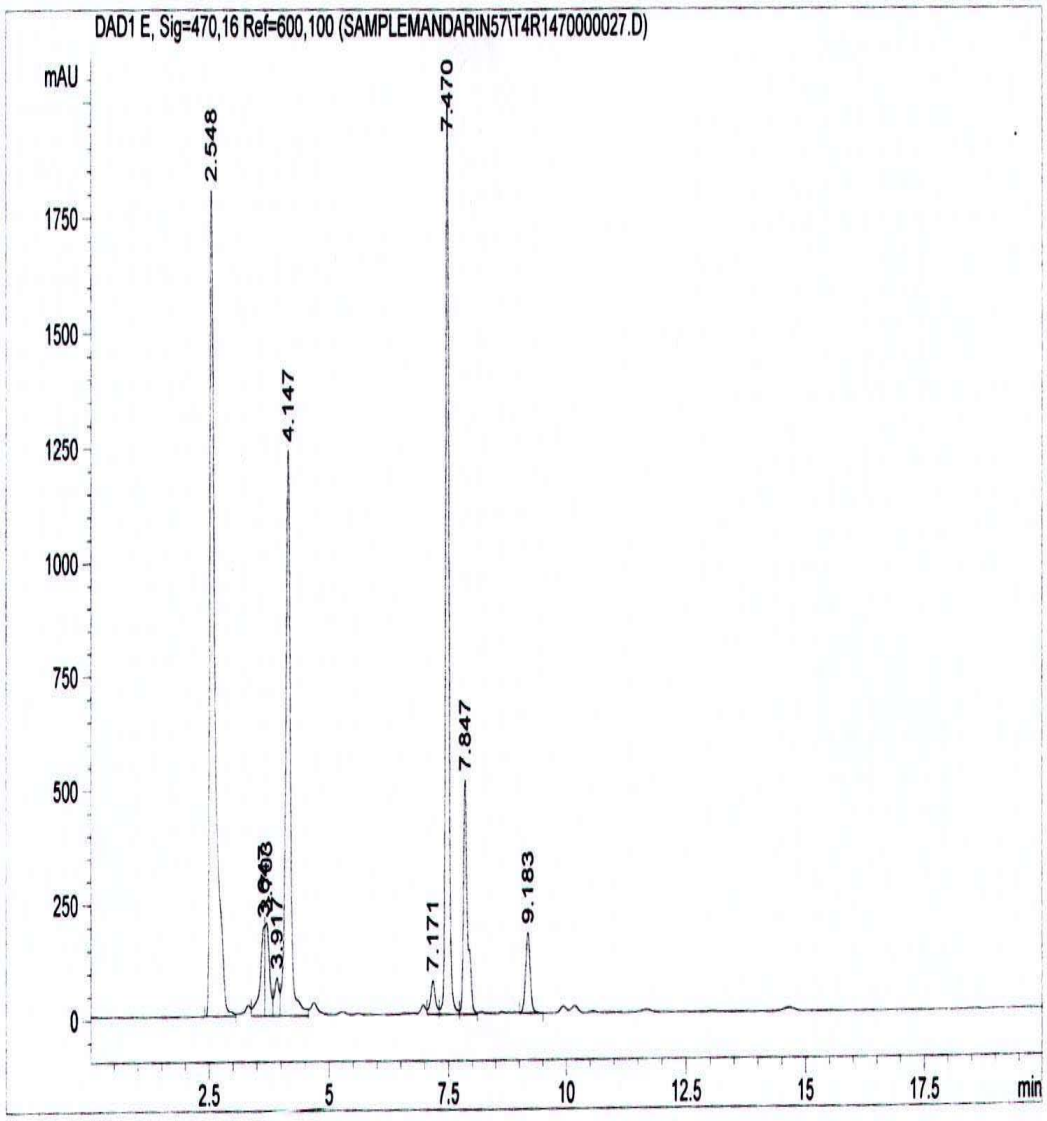
รูปภาพภาคผนวกที่ 3 แสดงการตรวจหาชนิดและปริมาณของสารสีแคโรทีนอยด์ของตัวอย่างปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย*T. gracilis* ด้วยเครื่อง HPLC



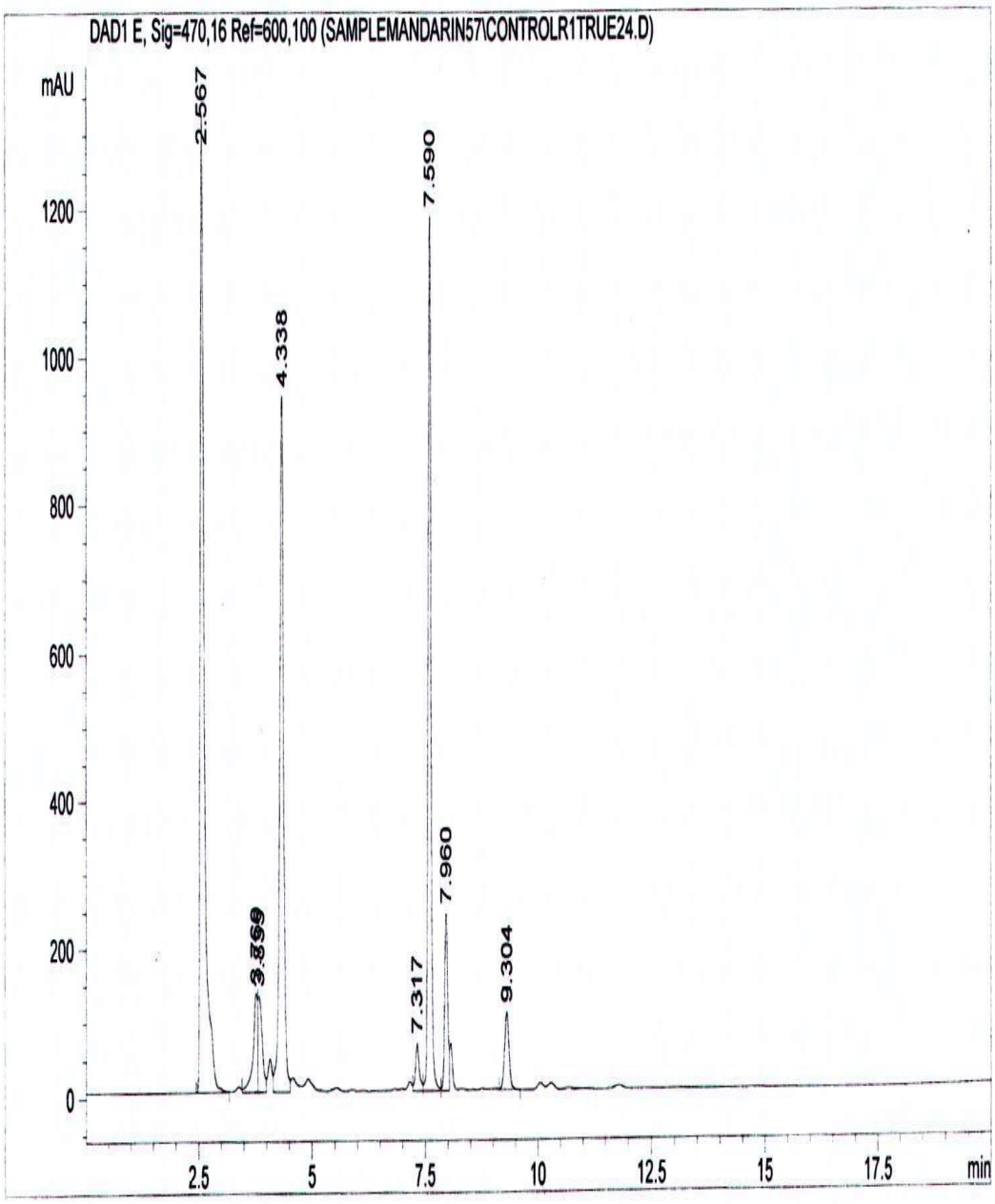
รูปภาพภาคผนวกที่ 4 แสดงการตรวจหาชนิดและปริมาณของสารสีแคโรทีนอยด์ของตัวอย่างปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย*I. galbana* ด้วยเครื่อง HPLC



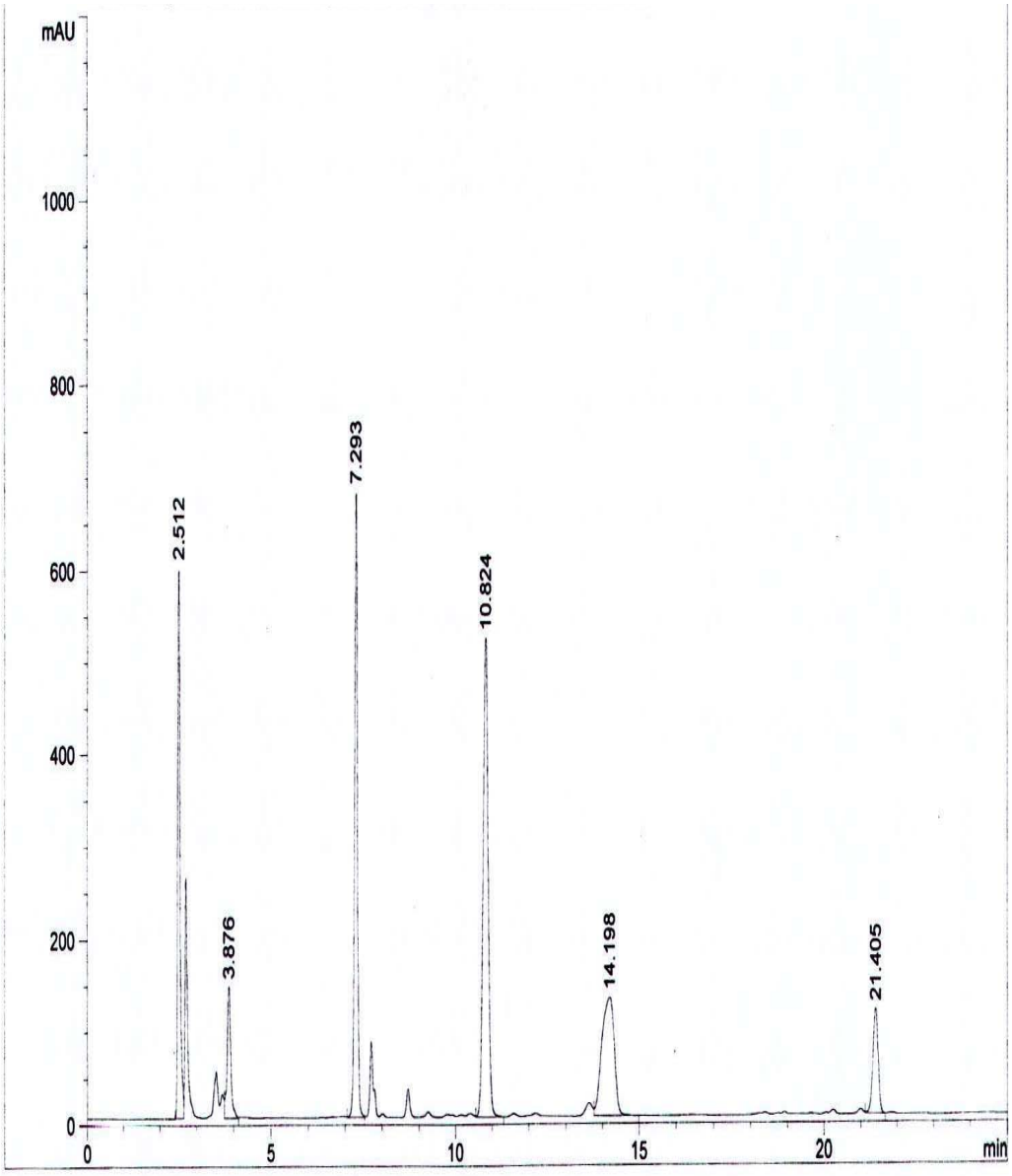
รูปภาพภาคผนวกที่ 5 แสดงการตรวจหาชนิดและปริมาณของสารสีแคโรทีนอยด์ของตัวอย่างปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *N. oculata* ด้วยเครื่อง HPLC



รูปภาพภาคผนวกที่ 6 แสดงการตรวจหาชนิดและปริมาณของสารสีแคโรทีนอยด์ของตัวอย่างปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย*D. salina* ด้วยเครื่อง HPLC

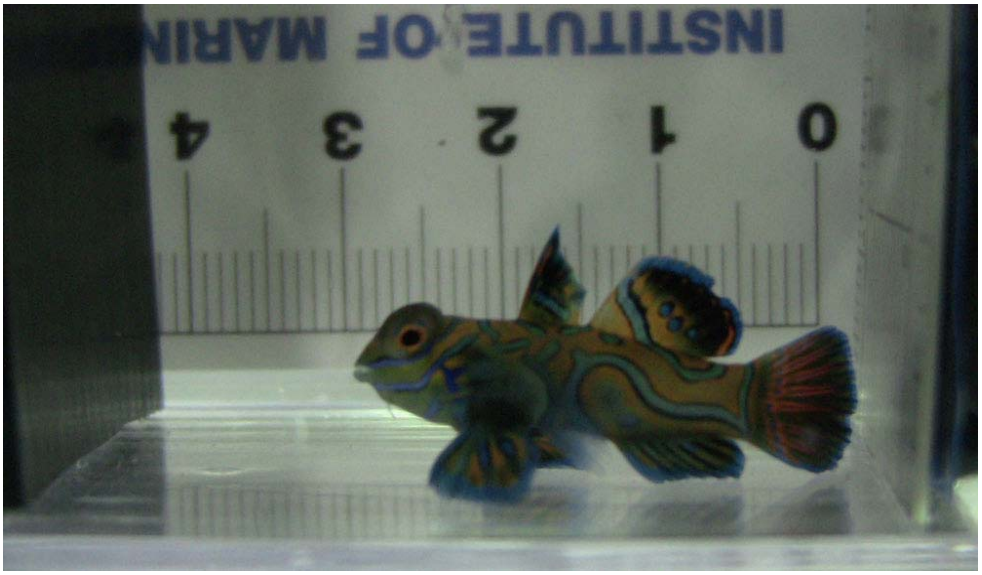


รูปภาพภาคผนวกที่ 7 แสดงการตรวจหาชนิดและปริมาณของสารสีแคโรทีนอยด์ของตัวอย่างปลาแมนดารินที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งไม่มีการเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเครื่อง HPLC (ชุดควบคุมการทดลอง)



รูปภาพภาคผนวกที่ 8 แสดงการตรวจหาสารสีมาตรฐานของแคโรทีนอยด์ 4 ชนิด คือ Betacarotene, Canthaxanthin, Zeaxanthin และ Echinenone ด้วยเครื่อง HPLC

รูปภาพภาคผนวกที่ 9 ปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *T. gracilis* ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรที่ 3



รูปภาพภาคผนวกที่ 10 ปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *I. galbana* ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรที่ 5

รูปภาพภาคผนวกที่ 11 ปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *N. oculata* ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรที่ 5

รูปภาพภาคผนวกที่ 12 ปลาแมนดาริน (*S. splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่าย *D. salina* ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรที่ 3

ตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านความยาวรวม (total length) ด้วยวิธี One-Way ANOVA ของปลาแมนดาริน ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Total length	Between Groups	1.252	4	0.313	7.258	0.000
	Within Groups	7.545	175	0.043		
	Total	8.797	179			

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านความยาวมาตรฐาน (standard length) ด้วยวิธี One-Way ANOVA ของปลาแมนดาริน ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Standard length	Between Groups	0.131	4	0.078	1.428	0.227
	Within Groups	9.595	175	0.055		
	Total	9.908	179			

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนัก (weight) ด้วยวิธี One-Way ANOVA ของปลาแมนดาริน ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Weight	Between Groups	0.652	4	0.163	9.435	0.000
	Within Groups	3.021	175	0.017		
	Total	3.673	179			

ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านความยาวรวม (total length) ด้วยวิธี One-Way ANOVA ของปลาแมนดาริน ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Total length	Between Groups	5.067	4	1.267	17.398	0.000
	Within Groups	12.741	175	0.073		
	Total	17.808	179			

ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านความยาวมาตรฐาน (standard length) ด้วยวิธี One-Way ANOVA ของปลาแมนดาริน ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Standard length	Between Groups	5.312	4	1.328	19.143	0.000
	Within Groups	12.139	175	0.069		
	Total	17.451	179			

ตารางภาคผนวกที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนัก (weight) ด้วยวิธี One-Way ANOVA ของปลาแมนดาริน ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Weight	Between Groups	0.537	4	0.134	1.667	0.160
	Within Groups	14.098	175	0.081		
	Total	14.635	179			

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างชุดทดลอง ของการเจริญเติบโตทางด้านความยาวมาตรฐาน (standard length) ของปลาแมนดาริน ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test

	Subset for alpha = 0.05		
treatment	N	1	2
5	36	2.1797	
3	36	2.2339	2.2339
4	36	2.2464	2.2464
2	36	2.2722	2.2722
1	36		2.3050
Sig.		0.129	0.246

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างชุดทดลอง ของการเจริญเติบโตทางด้านความยาวรวม (total length) ของปลาแมนดาริน ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test

	Subset for alpha = 0.05		
treatment	N	1	2
5	36	2.6689	
3	36		2.8397
4	36		2.8514
2	36		2.8797
1	36		2.9061
Sig.		1.00	0.222

ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างชุดทดลอง ของการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนัก (Weight) ของปลาแมนดาริน ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test

		Subset for alpha = 0.05			
treatment	N	1	2	3	4
5	36	0.7833			
3	36	0.8203	0.8203	0.8531	
4	36		0.8531	0.9044	
2	36				0.9044
1	36				0.9531
Sig		0.235	0.291	0.099	0.118

ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างชุดทดลอง ของการเจริญเติบโตทางด้านความยาวมาตรฐาน (standard length) ของปลาแมนดาริน ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test

		Subset for alpha = 0.05	
treatment	N	1	2
5	36	2.1006	
3	36		2.4794
4	36		2.5125
2	36		2.5394
1	36		2.5650
Sig.		1.000	0.214

ตารางภาคผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างชุดทดลอง ของการเจริญเติบโตทางด้านความยาวรวม (total length) ของปลาแมนดาริน ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test

	Subset for alpha = 0.05		
treatment	N	1	2
5	36	2.7917	
3	36		3.1494
4	36		3.1950
2	36		3.2231
1	36		3.2458
Sig.		1.000	0.171

ตารางภาคผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างชุดทดลอง ของการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนัก (weight) ของปลาแมนดาริน ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียซึ่งเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test

	Subset for alpha = 0.05		
treatment	N	1	2
5	36	1.1844	
3	36	1.2736	1.2736
4	36	1.2906	1.2906
2	36	1.3125	1.3125
1	36		1.3478
Sig.		0.082	0.319