บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

2.1 ชีววิทยาของสาหร่าย *Isochrysis galbana*

สาหร่ายสีน้ำตาลแกมทอง *Isochrysis galbana* เป็นสาหร่ายที่จัดอยู่ในดิวิชั่น Chrysophyta คลาส Prymesiophyceae เป็นพวกที่เซลล์มีหนวดเคลื่อนไหวได้ ซึ่งกาญจนภาชน์ (2527) รายงานลักษณะที่สำคัญประจำคลาส ดังนี้

1. เซลล์มีหนวด 2 เส้น ซึ่งไม่มีระยางค์ อาจยาวเท่ากัน เกือบเท่ากัน หรือไม่เท่ากัน และอาจมีแฮปโทนีมา (haptonema) ระหว่างหนวด 2 เส้นนี้

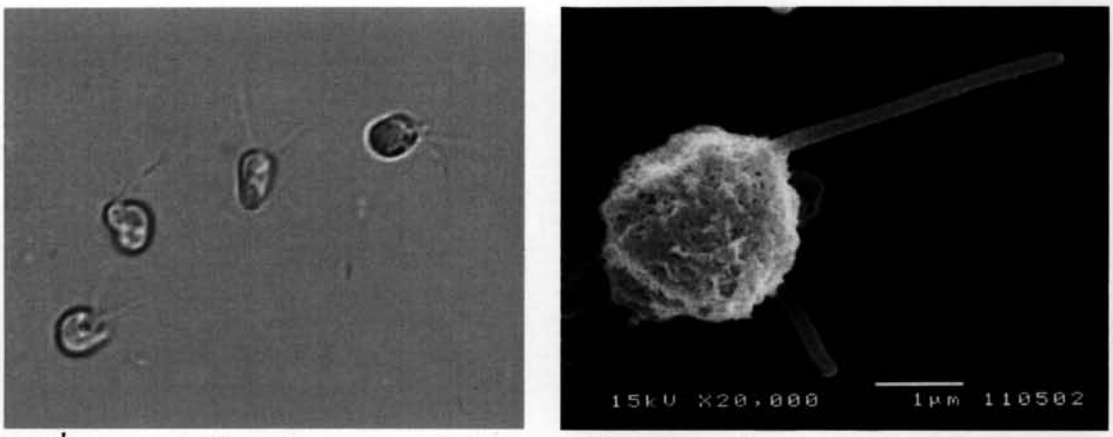
2. บนเซลล์มีเกล็ด ซึ่งอาจเป็นพวกสารอินทรีย์ หรือเซลลูโลส หรืออาจมีหินปูนในรูปของแคลไซต์ (calcite) เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย เรียกว่า คอกโคลิท (coccolith) ดังนั้น สาหร่ายที่มีหินปูนบนเกล็ดจึงเรียก coccolithophorids สาหร่ายกลุ่มนี้พบมากในเขตร้อนเนื่องจากน้ำมักมีแคลเซียมคาร์บอเนตอยู่ถึงจุดอิ่มตัว (saturate) หรือเกินอิ่มตัว (super-saturate)

3. การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแบ่งเซลล์หรือสร้างซูโอสปอร์ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมักเป็นแบบไอโซแกมี

4. วัฏจักรชีวิตยังไม่ยืนยันแน่นอน อาจมี 2 ระยะสลับกัน ระหว่างระยะดิพลอยด์ที่เคลื่อนไหวได้ (motile diploid phase) กับระยะแฮพลอยด์ที่ยึดเกาะ (haploid benthic phase)

สาหร่ายในคลาสนี้พบในทะเลมากกว่าในน้ำจืด บางสกุลอาจเกิดการบลูมขึ้นได้ เช่น *Phaeocystis* เป็นกลุ่มเซลล์ซึ่งมีสารเมือกลอยอยู่เป็นอิสระ เมื่อเกิดการบลูมจะทำให้น้ำเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลปนเหลือง

ในคลาสนี้มีทั้งเซลล์เดี่ยว ที่มีหนวด 2 เส้น แต่ไม่มีแฮปโทนีมา เช่น *Isochrysis* ส่วนเซลล์เดี่ยวที่มีหนวด 2 เส้นและมีแฮปโทนีมา เช่น *Chrysochromulina* เซลล์เดี่ยวที่มีคอกโคลิท เช่น *Calcidiscus* กลุ่มเซลล์ที่มีเมือก เช่น *Phaeocystis* ซึ่งลักษณะของ *Isochrysis galbana* แสดงดังภาพที่ 2-1



ภาพที่ 2-1 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ซ้าย) และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน (ขวา) ของ *Isochrysis galbana*

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย

ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย ตามเอกสารของ ลัดดา (2541) แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ปัจจัยทางฟิสิกส์และทางเคมี

2.2.1 ปัจจัยทางฟิสิกส์

2.2.1.1 แสงสว่าง (illumination) การถ่ายหัวเชื้อสาหร่ายไปใส่สารอาหารที่เตรียมขึ้นมาใหม่นั้นควรใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยวางหลอดแก้วที่มีเชื้อสาหร่ายในที่มีแสงฟลูออเรสเซนส์ประมาณ 400 แรงเทียน นาน 7-10 วัน เพื่อให้สาหร่ายเติบโต เมื่อสาหร่ายเจริญดีแล้วควรย้ายหลอดแก้วไปเลี้ยงในที่มีแสงน้อยลง เพื่อให้การเติบโตของสาหร่ายลดลงจะได้เก็บเชื้อได้เป็นเวลานาน ควรใช้หลอดฟลูออเรสเซนส์ดีกว่าใช้หลอดไฟธรรมดาหรือแสงแดด เนื่องจากว่าอุณหภูมิจากแสงประเภทอื่นมักสูงกว่าแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ หากจำเป็นต้องใช้แสงจากดวงอาทิตย์ควรมีฉากกำบังเพื่อลดความจ้าของแสง

2.2.1.2 อุณหภูมิ (Temperature) สาหร่ายน้ำเค็มชอบอุณหภูมิระหว่าง 5-15 องศาเซลเซียส และจะตายถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส แต่มีสาหร่ายบางชนิดสามารถทนอุณหภูมิสูงๆ ได้ดี ซึ่งทนอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียสได้ แต่ต้องควบคุมอุณหภูมิในการเลี้ยงให้คงที่ตลอดเวลา

2.2.1.3 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งเพราะสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการ pH ในระดับที่แตกต่างกัน เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะเติบโตได้ดีในน้ำที่มีสภาพเป็นกลางจนถึงมีสภาพเป็นด่าง หรือมีค่าของ pH ประมาณ 6.5-7.5 โดยทั่วไปสาหร่ายส่วนมากจะเติบโตได้ดีในน้ำที่มีสภาพเป็นด่าง

2.2.1.4 ความเค็ม (Salinity) มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม สาหร่ายบางชนิดชอบอยู่ในน้ำกร่อยที่มีความเค็มประมาณ 28-30 พีเอสยู บางชนิดทนต่อความเค็มสูงได้ดี เช่น สาหร่ายสีเขียวสกุล *Dunaliella* เป็นต้น

นอกจากปัจจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีปัจจัยชนิดอื่นที่มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเติบโตของสาหร่ายอีก เช่น แก๊สออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ ความกระด้างของน้ำ เป็นต้น (ลัดดา, 2541) ซึ่งมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสาหร่าย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งพืชใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง และในเวลาเดียวกันปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์จะมีผลต่อระดับความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ หากพืชสังเคราะห์แสงมาก ค่า pH จะสูงขึ้น และหากสูงถึง 9-11 จะทำให้สาหร่ายไม่เติบโตหรือตายได้

2.2.2 ปัจจัยทางเคมี

การเติบโตของสาหร่ายขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่าย อาหารหรือธาตุอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 2 กลุ่ม คือ

2.2.2.1 ธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) คือ ธาตุอาหารที่ประกอบเป็นโครงสร้างของสาหร่าย ดังนั้น จึงต้องใช้เป็นปริมาณค่อนข้างมาก ซึ่งมักมีหน่วยเป็นกรัม ประกอบด้วยธาตุต่อไปนี้

คาร์บอน คาร์บอนที่พืชนำไปใช้แบ่งออกได้ 2 ประเภท คือ อนินทรีย์คาร์บอน สาหร่ายใช้คาร์บอนประเภทอนินทรีย์ในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งละลายได้ในน้ำหรือในรูปของเกลือคาร์บอเนต และไบคาร์บอเนต การที่คาร์บอนจะอยู่ในรูปใดนั้นขึ้นอยู่กับระดับของ pH สาหร่ายจะใช้คาร์บอนประเภทอินทรีย์ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ซึ่งช่วยในการเติบโต เช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ (ซูโครส กลูโคส กาแลคโตส ฯลฯ)

ไนโตรเจน มีความสำคัญรองจากคาร์บอนในแง่ของปริมาณ โดยปริมาณไนโตรเจนในพืชมีปริมาณร้อยละ 7-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ยกเว้นไดอะตอม ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่น เนื่องจากซิลิกาเป็นธาตุที่สำคัญของผนังเซลล์ไดอะตอม ในสาหร่ายที่ขาดไนโตรเจนจะสร้างสารประกอบคาร์บอน เช่น น้ำมัน หรือแป้งมาทดแทน สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนทั้งในรูปอนินทรีย์และอินทรีย์ อีกทั้งยังสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของแก๊สได้อีกด้วย แต่มีสาหร่ายบางชนิดเท่านั้น ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ไนโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ ได้แก่ เกลือ 3 ชนิด คือ ไนเตรต ไนไตรท์ และแอมโมเนีย ถ้าแหล่งไนโตรเจนอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียเพียงอย่างเดียวจะทำให้ระดับของ pH ของอาหารลดต่ำอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นอันตรายต่อสาหร่าย ถ้าสาหร่ายขาดไนโตรเจนจะมีผลต่อการ

สังเคราะห์แสง และปริมาณรงควัตถุหรือสารสี (pigments) ของเซลล์ รวมทั้งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดลดลงด้วย

ฟอสฟอรัส เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของพืช เพราะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายเทพลังงาน และกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิค แม้ว่าในแหล่งน้ำธรรมชาติจะมีปริมาณสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสสูงกว่าอนินทรีย์ฟอสฟอรัส แต่พืชต้องการใช้ฟอสฟอรัสในรูปของสารอนินทรีย์มากกว่า ฉะนั้นสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสจึงจัดว่าเป็นแหล่งเบื้องต้นของฟอสฟอรัสซึ่งจะแตกตัวเป็นสารอนินทรีย์ ถ้าสาหร่ายขาดฟอสฟอรัสจะมีผลเสียต่อการเติบโต คือปริมาณโปรตีน รงควัตถุชนิดคลอโรฟิลล์ เอ RNA และ DNA จะลดลง แต่แป้งหรือคาร์โบไฮเดรตกลับเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

ซัลเฟอร์ เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายทุกชนิด ซัลเฟอร์ในเซลล์สาหร่ายมีหลายรูปแบบ เช่น ในรูปของกรดอะมิโน วิตามินบี กรดแพนโทเธนิค กรดลิโพอิค ฯลฯ ซัลเฟอร์ที่สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ ได้แก่ เกลือของโลหะ คือ ซัลเฟต ซัลไฟท์ และซัลไฟด์

แคลเซียม เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่าย เช่น สาหร่ายสีเขียวบางชนิด สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและไดอะตอม โดยแคลเซียมมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเกล็ด (scale) และโครงสร้างของสาหร่ายโดยเฉพาะสาหร่ายน้ำเค็ม หรือมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างผนังของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ปริมาณแคลเซียมที่พืชต้องการขึ้น อยู่กับปริมาณของธาตุอาหารชนิดอื่นด้วย เช่น แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี โคบอลท์ ฯลฯ

โซเดียม โปแตสเซียม และคลอรีน โซเดียมเป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายบางชนิดต้องการ เป็นธาตุอาหารที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด และพืชสามารถใช้โซเดียมทดแทนโปแตสเซียมในกรณีที่แหล่งน้ำขาดโลหะชนิดนี้ โปแตสเซียมเป็นธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์หลายชนิด อัตราส่วนของโซเดียมและโปแตสเซียมจะมีผลต่อการใช้คลอรีนของสาหร่าย

แมกนีเซียม เป็นธาตุอาหารที่มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์

2.2.2.2 ธาตุอาหารรอง (Micronutrients) เป็นธาตุอาหารซึ่งสาหร่ายต้องการใช้ปริมาณน้อยหรือน้อยมาก ปริมาณที่ใช้เพียงมิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแบ่งย่อยออกได้อีก 2 ประเภทคือ

ธาตุอาหารรองอนินทรีย์ (Inorganic micronutrients)

เหล็ก เป็นธาตุอาหารที่ช่วยในการดูดซึมไนโตรเจนและกระบวนการสังเคราะห์แสง คือช่วยสร้างสารสีสีเขียวชนิด คลอโรฟิลล์-เอ และสารสีสีน้ำเงินชนิด ซี-ไฟโคไซยานิน ถ้าสาหร่ายขาดธาตุเหล็กจะมีผลต่อการเติบโตและสรีรวิทยาของเซลล์

โบรอน เป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายบางชนิดต้องการใช้ ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและไดอะตอม โดยเฉพาะไดอะตอมน้ำเค็ม

แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี เป็นธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย รวมทั้งเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเอนไซม์อีกหลายชนิด ถ้าขาดจะทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงลดลงและการหายใจเพิ่มขึ้น ธาตุอาหารทั้งสามชนิดนี้ถ้ามีมากเกินไปสาหร่ายจะตาย

โมลิบดินัม วานาเดียม โคบอลท์ นิคเกิล โมลิบดินัมมีบทบาทสำคัญในการตรึงไนโตรเจน เวลาใช้เลี้ยงสาหร่ายจะอยู่ในรูปของเกลือ นอกจากนี้โมลิบดินัมยังเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ช่วยในการสังเคราะห์แสง วานาเดียมเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่ายบางชนิดและสามารถใช้ทดแทนโมลิบดินัมเพื่อการตรึงไนโตรเจน โคบอลท์เป็นส่วนประกอบของวิตามินบี 12 ซึ่งสำคัญมากต่อการเติบโตของสาหร่ายหลายชนิด นิคเกิลเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ยูเรียของสาหร่ายบางชนิด เช่น ไดอะตอมและสาหร่ายสีเขียว

ซิลิกา เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นที่สุดของพวกไดอะตอมเพื่อสร้างผนังเซลล์ ส่วนสาหร่ายชนิดอื่นไม่จำเป็นต้องใช้ปริมาณของซิลิกาในแหล่งน้ำธรรมชาติแตกต่างกันตามฤดูกาล ไดอะตอมต้องการปริมาณซิลิกาแตกต่างกันตามชนิด

เซเลเนียม บทบาทของธาตุอาหารชนิดนี้ต่อการเลี้ยงสาหร่ายยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก แต่มีข้อสังเกตจากการทดลองว่าปริมาณของเซเลเนียมที่เติมในแหล่งน้ำจะสามารถเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบชนิดของสาหร่าย ถ้าปริมาณเซเลเนียมเพิ่มขึ้นจะมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพิ่มขึ้นและไดอะตอมจะลดปริมาณลง สาหร่ายบางชนิดต้องการเซเลเนียมเพื่อการเติบโต

ธาตุอาหารรองอนินทรีย์ (Inorganic micronutrients) ธาตุอาหารประเภทนี้อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า แร่ธาตุที่จำเป็น (trace metals) ซึ่งแบ่งย่อยออกได้ 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น เดกซ์โตรส ความเข้มข้นที่ใช้ 0.2-0.5 เปอร์เซ็นต์ ควรเติมน้ำตาลในอาหารเลี้ยงสาหร่ายหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วมิฉะนั้นน้ำตาลจะสลายตัว

กลุ่มที่ 2 : เกลืออินทรีย์หรือสารประกอบที่มีเกลืออินทรีย์ ได้แก่ เกลืออะซิเตท เช่น โซเดียมอะซิเตท โปแตสเซียมอะซิเตท ความเข้มข้นที่ใช้ 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 3 : วิตามิน ได้แก่ วิตามินบี 3 ชนิด คือ บี 1 บี 12 และบีรวม นิยมเติมในอาหารหลังจากผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

กลุ่มที่ 4 : อาหารเสริม ได้แก่ อาหารที่ช่วยในการเติบโตของสาหร่ายคือเป็น growth factor เช่น อะเดนิน (adenin) ไคเนติน (kinetin) ทั้ง 2 ชนิดนี้ละลายในน้ำได้เล็กน้อยแต่ละลายได้ดีในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต อาหารเสริมอีก 2 ชนิดที่นิยมใช้คือ gibberellic acid

ละลายในน้ำได้ดี และ indol acetic acid (IAA) มีคุณสมบัติละลายได้เล็กน้อยในน้ำร้อนและสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสงสว่าง

ลักษณะของสาหร่ายที่ขาดธาตุอาหาร สามารถสรุปได้ 3 ประการ ดังนี้

1. ปริมาณรงควัตถุสำหรับใช้ในการสังเคราะห์แสงลดลง เช่น ถ้าขาดธาตุอาหาร ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ ซิลิกา แมกนีเซียม เหล็ก โปแตสเซียม และโมลิบดินัม จะทำให้สีของเซลล์ซีดลง

2. เซลล์มีการสะสมอาหารเพิ่มขึ้นกว่าปกติ เช่น สะสมแป้ง ไขมัน โปรตีน การสะสมแป้งหรือแป้งกับไขมันจะเกิดขึ้นเมื่อสาหร่ายขาดธาตุอาหารบางชนิดหรือหลายชนิด

3. เซลล์มีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิคและโปรตีนลดลง ทั้งนี้เป็นผลต่อเนื่องจากการที่เซลล์มีการสะสมแป้งหรือไขมันเพิ่มขึ้น

2.3 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

2.3.1 การเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบกะเป็นการเพาะเลี้ยงในระบบปิด โดยใช้ปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัดและไม่มีการเติมอาหารเข้าในระบบการเลี้ยง ทำให้อัตราการเติบโตของสาหร่ายลดลงเรื่อยๆ และมีแนวโน้มลดลงจนเป็นศูนย์เนื่องจากภาวะขาดอาหารและสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม ซึ่งเกิดจากการสะสมของเสียและผลผลิตต่างๆ ที่สาหร่ายสร้างขึ้น (Stanbury, 1995)

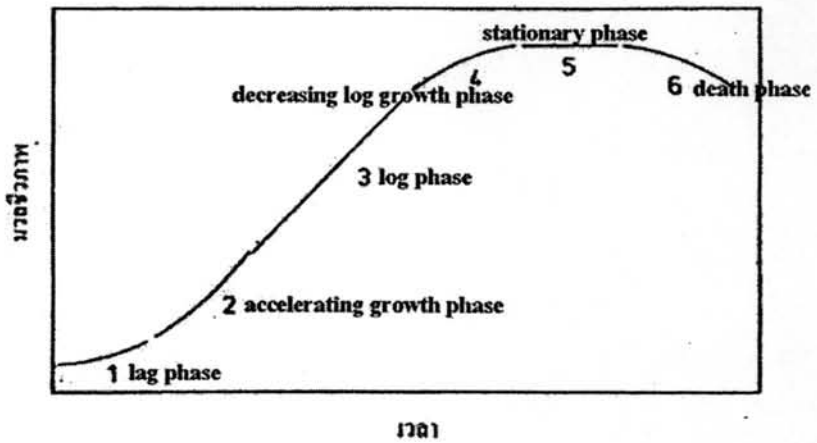
หลักการของการเลี้ยงแบบกะคือเมื่อเริ่มทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งในช่วงวันแรกๆ นั้น เซลล์ยังไม่มีการเพิ่มจำนวน แต่เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์เริ่มมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จากนั้นอัตราการเติบโตของเซลล์จะเริ่มคงที่และมีจำนวนเซลล์ลดลงเรื่อยๆ ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้

2.3.1.1 ระยะพักเซลล์ (lag phase) การเติบโตในระยะนี้เป็นระยะที่เซลล์มีการปรับตัวให้เข้ากับอาหารเพาะเชื้อและสภาวะแวดล้อมใหม่ ทำให้เซลล์ไม่มีการเพิ่มจำนวน แต่ขนาดของเซลล์จะใหญ่ขึ้น เนื่องจากเซลล์จะมีการสังเคราะห์โปรโตพลาสซึมและสารที่จำเป็นชนิดต่างๆ เพื่อเตรียมพร้อมในการแบ่งเซลล์

2.3.1.2 ระยะทวีคูณ (exponential growth or log phase) เป็นระยะที่เซลล์เติบโตและขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ระยะนี้จะนานเท่าใดขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารและคุณสมบัติทางฟิสิกส์และทางเคมีของสิ่งแวดล้อม ซึ่งระหว่างการเติบโตของเซลล์ในระยะนี้ความเข้มข้นของสารอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากสาหร่ายนำไปใช้ในการเติบโต จากนั้นเซลล์จะปล่อยของเสียที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมชนิดต่างๆ ออกนอกเซลล์มีผลทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลงตามลำดับ

2.3.1.3 ระยะคงที่ (stationary phase) เป็นระยะที่มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและคงที่ เนื่องจากเกิดภาวะสมดุลระหว่างอัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการตาย เนื่องจากธาตุอาหารลดน้อยลงและเกิดสารพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือการสลายตัวของเซลล์เพิ่มขึ้น

2.3.1.4 ระยะตาย (death phase) เป็นระยะที่เซลล์หยุดการเติบโตเนื่องจากธาตุอาหารหมดลง เซลล์จะเริ่มตายและการตายจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และรวดเร็วขึ้น ดังนั้นความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจึงขึ้นอยู่กับความสามารถของผู้เลี้ยงที่จะควบคุมการเลี้ยงให้มีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณ (log phase) นานที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยทั่วการเติบโตของสาหร่ายภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกะ แสดงดังภาพที่ 2-2



ภาพที่ 2-2 การเติบโตของสาหร่ายในระบบการเลี้ยงแบบกะ (Becker, 1994)

1 คือ ระยะพักเซลล์ (lag phase)

2 คือ ระยะเร่งการเติบโต (accelerating growth phase)

3 คือ ระยะทวีคูณ (exponential growth or log phase)

4 คือ ระยะทวีคูณลดลง (decreasing log growth phase)

5 คือ ระยะคงที่ (stationary phase)

6 คือ ระยะเร่งตาย (accelerated death phase)

2.3.2 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture)

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้เซลล์มีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณตลอดเวลา โดยทำการเติมอาหารเพาะเชื้อและดึงน้ำเลี้ยงออกอย่างต่อเนื่อง ทำให้เซลล์อยู่ในภาวะคงที่หรือภาวะสมดุล (steady state) โดยมีอัตราการไหลเข้าและออกของสารอาหารตลอดเวลา ซึ่งนิยมใช้ปั๊มช่วยในการเติมอาหารเพาะเชื้อเข้าและดึงน้ำเลี้ยงออก หรืออาจใช้วิธีการ

ไหลล้น (Overflow method) เมื่อสาหร่ายเติบโตมีผลทำให้ปริมาณสารอาหารในอาหารเพาะเชื้อลดลง จนกระทั่งความเข้มข้นของสารอาหารที่เหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยงส่งเสริมให้สาหร่ายมีอัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ) ในอัตราที่เท่ากับอัตราการเจือจาง (dilution rate, D) ซึ่งอัตราการเจือจางสามารถคำนวณได้ ดังสมการ 2.1

$$D = F/V \qquad (2.1)$$

เมื่อ F = อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรอาหารเพาะเชื้อในถังเพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)

D = อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)

อัตราการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต่อเวลาขึ้นอยู่กับอัตราการเติบโตของสาหร่ายและความเข้มข้นของเซลล์ที่หายไป เนื่องจากไหลออกไปกับน้ำเลี้ยง ดังสมการ 2.2

$$dC_x/dt = \mu C_x - DC_x \qquad (2.2)$$

เมื่อ C_x = ความหนาแน่นเซลล์ (10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

ณ ภาวะสมดุล ความหนาแน่นเซลล์ของสาหร่ายจะคงที่ ดังนั้นอัตราการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต่อเวลาจะเท่ากับศูนย์ ทำให้อัตราการเติบจำเพาะเท่ากับอัตราการเจือจาง ดังสมการ 2.3

$$\mu C_x = DC_x$$

$$\mu = D \qquad (2.3)$$

หากอัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นจนกระทั่งจำนวนเซลล์ในถังเพาะเลี้ยงถูกชะล้างหมดไป เรียกการเกิดลักษณะแบบนี้ว่า wash out ทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารสูงขึ้น

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องสามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

2.3.2.1 แบบ chemostat คือระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่มีการควบคุมอัตราการเติบโตของสาหร่ายโดยใช้สภาพแวดล้อมทางเคมี ได้แก่ ความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเพาะเชื้อ เรียกว่าระบบเคโมแสตต (chemostat culture) ในระบบการเพาะเลี้ยง พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารมีผลทำให้การเติบโตของสาหร่ายเพิ่มขึ้น จนกระทั่งที่ความเข้มข้นของสารอาหารสูงถึงระดับหนึ่งจะมีผลให้การเติบโตของสาหร่ายลดลง

การอธิบายลักษณะการเติบโตในระยะคงที่ (steady stage) สำหรับการเลี้ยงแบบ chemostat ต้องอธิบายถึงความสัมพันธ์ของความหนาแน่นเซลล์และความเข้มข้นของปริมาณสารอาหารที่จำกัดที่มีกับอัตราการไหลของอาหารที่เติมลงสู่ระบบ (Wang *et al*, 1979) โดยความสัมพันธ์ของ

ความหนาแน่นเซลล์ (X) และปริมาณสารอาหารที่จำกัด (S) กับอัตราการเจือจาง สามารถอธิบายได้ดังสมการต่อไปนี้

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \qquad (2.4)$$

K_s คือ ค่าคงที่ (half-rate saturation)

S คือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

μ คือ อัตราการเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate)

μ_{max} คือ อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด

จากสมการ (2.4) เมื่อนำมาใช้ในการเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะกลายเป็น

$$D = D_c \frac{S}{(Ks + S)} \qquad (2.5)$$

D_c คือ ค่าอัตราการเจือจางสูงสุด

2.3.2.2 แบบ turbidostat (McNeil and Harvey, 1990) การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องในระบบนี้จะมีการให้อาหารที่เป็นธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณที่มากเกินพอ ดังนั้นการเติบโตจะไม่มีสารอาหารที่เป็นตัวจำกัด สาหร่ายจะมีอัตราการเติบโตสูงสุดที่จำเพาะ (μ_{max}) ระบบจะควบคุมความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในปริมาณที่ต้องการ โดยทำการตรวจวัดความหนาแน่นของสาหร่ายด้วย Nephelometer หรือ Spectrophotometer เมื่อพบว่าความหนาแน่นของสาหร่ายมีค่าต่างจากที่ตั้งไว้ เครื่องจะส่งสัญญาณไปยังตัวควบคุมซึ่งจะทำการปรับโดยเติมอาหารลงสู่ภาชนะ

ข้อดีของวิธีการเลี้ยงแบบต่อเนื่องคือให้ผลผลิตเซลล์สาหร่ายที่มีคุณภาพและคงที่ สาหร่ายจะมีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณให้ผลผลิตสูงกว่าและเป็นระบบอัตโนมัติ แต่สิ่งที่สำคัญในการเลี้ยงแบบต่อเนื่องคือการปรับอัตราการเจือจางจนเกิดการชะล้างเซลล์ออกจากระบบ (wash out) ซึ่งอัตราการเจือจางที่ใช้ควรต่ำกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะเล็กน้อย (Fulks and Main, 1991)

2.4 ชีววิทยาของโคพีพอด

โคพีพอดเป็นแพลงก์ตอนสัตว์มีคุณค่าทางอาหารและสามารถเพาะเลี้ยงง่าย จึงมีการเพาะเลี้ยงโคพีพอดเพื่อใช้เป็นอาหารปลาทะเลและสัตว์น้ำอื่นๆ กันอย่างแพร่หลาย อีกทั้งโคพีพอดเป็นแหล่งของไคทินและไคโทแซน (chitin-chitosan) ซึ่งมีการประเมินว่า Lake Tjeukemeer ในประเทศเนเธอร์แลนด์ ผลิตไคทินเป็นปริมาณ 136 – 302 มิลลิกรัม/ตารางเมตร/ปี ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะพยายามเพาะเลี้ยงโคพีพอดเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไคโทแซน (ละออศรี, 2545)

2.4.1 ลักษณะทั่วไปของโคพีพอด

โคพีพอดส่วนใหญ่มีรูปร่างทรงกระบอก รูปไข่หรือรูปกระบอง ลำตัวแบ่งเป็นปล้อง และมีรยางค์ โคพีพอดที่อาศัยบริเวณผิวน้ำ ลำตัวค่อนข้างใสหรือบางทีมีสีฟ้า เนื่องจากมีแคโรทีนอยด์บนผิวหุ้มตัว ชนิดที่อาศัยอยู่ในน้ำลึกมากลำตัวจะมีสีแดง เนื่องจากมีสารที่เรียกว่า crusta แสดงว่าโคพีพอดเป็นสัตว์ที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี

2.4.1.1 ลำตัว (Body) ลำตัวของโคพีพอดประกอบด้วยปล้อง จำนวน 16 – 17 ปล้อง ส่วนใหญ่มีปล้องจำนวน 11 ปล้องเนื่องจากบางปล้องเชื่อมกัน ลำตัวแบ่งออกเป็น 2 ส่วน เรียกว่า prosome และ urosome prosome ประกอบด้วยหัว (cephalosome or head) และอก (metasome or thorax) prosome มีชื่ออีกชื่อหนึ่งว่า cephalothorax หัวประกอบด้วยปล้อง 5 ปล้อง ซึ่งมักเชื่อมติดกัน อกประกอบด้วยปล้องจำนวน 1 – 5 ปล้อง ปล้องอกทุกปล้องมีรยางค์ 1 คู่ เรียกว่า pereiopods ส่วนบนสุดของ prosome เรียกว่า frontal plate ซึ่งเป็นจะงอยปากและมักมีตา 1 ข้างอยู่ตรงกลาง หรือมีเลนซ์ 1 คู่ อยู่บนด้านหลัง ลักษณะนี้พบในพวกโคพีพอดทะเล Order Calanoida มุมของปล้องสุดท้ายของ metasome หรืออก จะมีลักษณะแตกต่างกันตามชนิด

Urosome (abdomen) หรือส่วนท้อง เป็นส่วนท้ายของลำตัว ประกอบด้วยปล้อง 1 – 2 ปล้องของ metasome (thorax) ซึ่งเชื่อมกับปล้องท้อง ส่วนท้องมักแคบ มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกและไม่มีรยางค์ ส่วนนี้มักงอพับ ตำแหน่งที่งอแตกต่างกันตามกลุ่มของโคพีพอด ปกติส่วนท้องประกอบด้วยปล้อง 5 ปล้อง แต่ปล้องท้อง 2 ปล้องแรกของโคพีพอดตัวเมียมักเชื่อมรวมกับปล้องที่เรียกว่า genital segment ปล้องสุดท้ายของส่วนท้อง เรียกว่า anal segment หรือ caudal segment ซึ่งตรงปลายแยกออกเป็น 2 แฉก เรียกว่า caudal rami หรือ caudal furca ปลายของ caudal ramus มีซีตี 5 เส้น

2.4.1.2 รยางค์ (Appendages) โคพีพอดมีรยางค์ทั้งหมด 11 คู่ ซึ่งมีทั้งแบบ biramous และ uniramous หัว (cephalosome) มีรยางค์ 5 คู่ ได้แก่ antennule, antennae, mandibles, maxillules และ maxillae อก (metasome) มีรยางค์ 6 คู่ ได้แก่ maxilliped (อยู่บนปล้องอกปล้องแรกซึ่งเชื่อมติดกับส่วนหัว) 1 คู่ และ pereiopods (swimming legs) จำนวน 5 คู่

หนวดคู่ที่ 1 (Antennules) มีลักษณะเป็น uniramous แบ่งเป็นข้อ และบางข้อมีขน ตัวผู้มีหนวดข้างขวาหรือทั้ง 2 ข้าง เปลี่ยนรูปไปเพื่อจับตัวเมียในขณะสืบพันธุ์ หน้าที่ของหนวดคู่ที่ 1 ส่วนใหญ่เกี่ยวกับการทรงตัว ความยาวและจำนวนปล้องมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่ เช่น Order Calanoida ซึ่งจัดเป็นแพลงก์ตอนถาวรมีหนวดยาวเรียวประกอบด้วยข้อ 23 – 25 ข้อ ส่วนหนวดของโคพีพอดใน Order Cyclopoida ซึ่งดำรงชีวิตทั้งแบบแพลงก์ตอนถาวรและแพลงก์ตอนชั่วคราวค่อนข้างสั้น ประกอบด้วยปล้องจำนวน 5 – 9 ปล้อง

หนวดคู่ที่ 2 (Antennae) ตั้งอยู่ใต้หนวดคู่ที่ 1 หนวดคู่นี้มีลักษณะแบบ biramous แต่ในโคพีพอดหลายกลุ่มจะไม่มี exopodite เช่น พวก cyclopoid

แมนดิเบิลส์ (Mandibles) เป็นรยางค์แบบ biramous ที่เจริญดี อยู่สองข้างของปาก โดยอยู่ระหว่าง labrum ซึ่งอยู่ด้านบน และ labium ซึ่งอยู่ด้านล่าง coxa ของ mandible พัฒนารูปร่างไปเพื่อทำหน้าที่บดอาหาร จึงประกอบด้วยฟันหลายซี่ รูปร่างและจำนวนฟันขึ้นอยู่กับนิสัยการกินอาหาร mandibular palp เป็นส่วนฐานซึ่งเชื่อมต่อระหว่าง exopodite และ endopodite ซึ่งมีซีตี

แมกซิลลูลล์ (Maxillules) เป็นรยางค์ขนาดเล็ก แบบ biramous อยู่ใต้ปาก maxillules มีโครงสร้างที่ซับซ้อน คือ exopod มี protopod และบน endopodite มีพู ขอบพูมีซีตีคล้ายขนนก ขอบในของ coxa มีก้านซึ่งเป็นจัก หรือมีหนามทู่บนก้านที่ใช้สำหรับการกินอาหาร ส่วนนี้เรียกว่า gnathobase (masticatory edge)

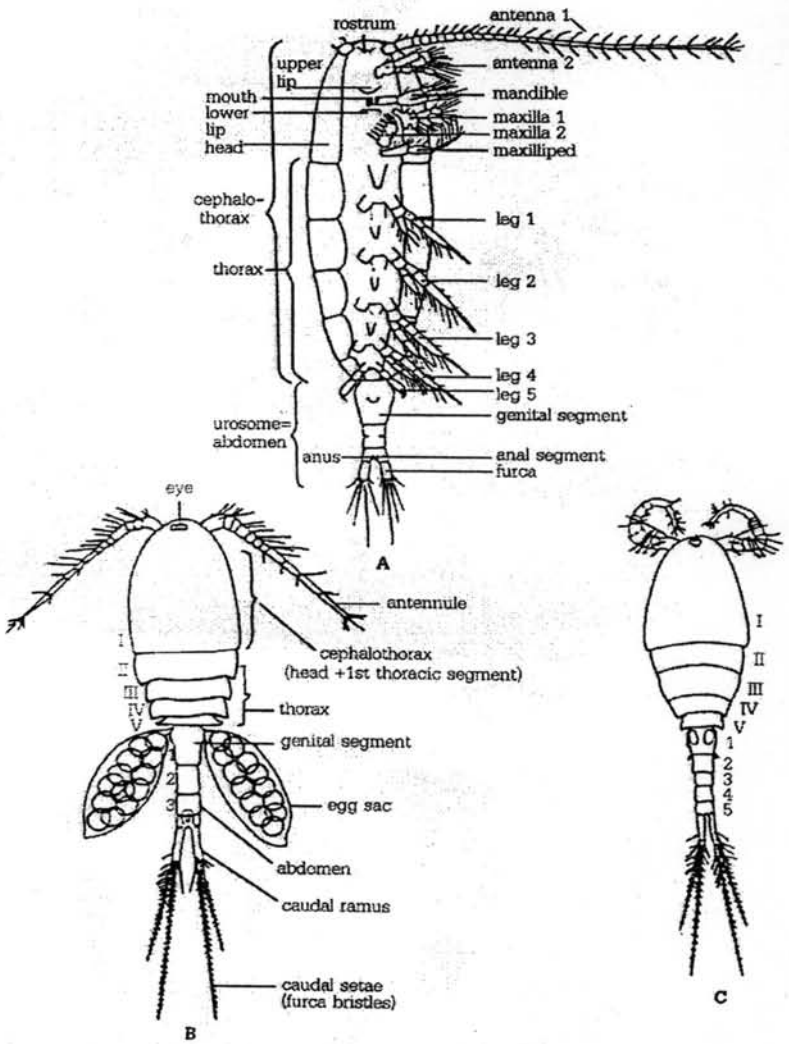
แมกซิลเล (Maxillae) เป็นรยางค์ขนาดเล็กแบบ uniramous ประกอบด้วย protopod ซึ่งเจริญดี 2 ข้อ และ endopod อีก 5 ข้อ บน endopod มีชุดของ endites ซึ่งมีขนยาว

แมกซิลลิเพดส์ (Maxillipeds) เป็นขาอกคู่แรก มีลักษณะเป็น uniramous ซึ่งพัฒนารูปร่างเพื่อกินอาหาร ประกอบด้วย protopod 2 ข้อ และ endopods 2 ข้อ ซึ่งมีซีตี โครงสร้างของซีตีแตกต่างกันตามนิสัยการกินอาหาร เช่น โคพีพอดที่กินสัตว์อื่นเป็นอาหารบน endopods จะมีซีตีแรงและมีหนาม ตัวอย่างเช่น พวก euchaetids endopods ที่มีโครงสร้างที่คล้ายอุ้งเล็บ ส่วนโคพีพอดที่กินอาหารด้วยการกรอง (filter feeders) มี endopods ที่มีซีตีเป็นขนยาว ตัวอย่างเช่นพวก oncaeid

2.4.1.3 ขาอก (Thoracic legs) เป็นรยางค์ที่อยู่บนปล้องอกมีทั้งหมด 5 คู่ ขา 4 คู่แรก เรียกว่าขาว่ายน้ำ (swimming legs) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกันทั้ง 4 คู่ และเหมือนกันในเพศเมียและเพศผู้ ขาคู่ที่ 5 มีลักษณะต่างจากคู่อื่น ใน Order Calanoida ขาคู่ที่ 5 มีลักษณะเด่นชัดขึ้นอยู่กับเพศ จึงนิยมใช้เป็นลักษณะแยกชนิด ใน Order Cyclopoida และ Order Harpacticoid ส่วนใหญ่มีขาคู่ที่ 5 ขนาดเล็กแต่มีลักษณะเหมือนกันทั้ง 2 ข้าง ลักษณะของขาคู่ที่ 5 แตกต่างจากขาอีก 4 คู่ โดยขาคู่ที่ 5 มักประกอบด้วยข้อ 1-2 ข้อ (ยกเว้นบางชนิดมี 3 ข้อ) ข้อบนสุดเรียกว่า basis หรือ basipodite ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 แขนง ที่มุมนอกสุดของข้อมีขน 1 เส้น และบนขนเส้นนี้ยังมีขนบางๆ เรียงเป็นแถวคล้ายขนนก

โดยทั่วไปขาว่ายน้ำประกอบด้วยข้อต่อกัน แต่ละข้อเรียกว่า coxa หรือ coxopodite ข้อที่อยู่บนสุดเรียกว่า basis หรือ basipodite ซึ่งแบ่งเป็นแขนง 2 แขนงที่อยู่ด้านนอกเรียกว่า exopodite แขนงที่อยู่ด้านในเรียกว่า endopodite โคพีพอดบางชนิดมีข้อพิเศษ เรียกว่า precoxal joint ซึ่งเป็นข้อที่อยู่เหนือข้อ coxa หรือ coxopodite ข้อดังกล่าวนี้จะมีขนาดเล็กมาก ด้านในมุมล่างของข้อ coxa และ basis มีหนามยาวที่ขอบมีขน หนามนี้จะชี้ลงด้านล่างเสมอ นอกจากนี้ที่ขอบด้านนอกของ basis มักมีหนามบางๆ อีก 1 อัน ขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 มีลักษณะพิเศษ คือมีหนามซึ่งมีขน หนามนี้อยู่ใกล้กับมุมล่างด้านในของ basis โดยทั่วไปทั้ง exopodite และ endopodite มีจำนวนข้อไม่เกิน 3 ข้อ แต่อาจมี 1-2 ข้อในโคพีพอดบางชนิด บริเวณรอยต่อของทุกข้อมีหนามหรือขนยาว หรือมีขนบางเรียงเป็นแถวที่ด้านนอก จำนวนหนามบนข้อสุดท้ายของ exopodite ของขาว่ายน้ำใช้เป็นลักษณะ

สำคัญในการจำแนกชนิดของโคพีพอด โดยเฉพาะโคพีพอดใน Order Cyclopoida จำนวนหนามนี้เขียนเป็นสูตรเรียกว่า spine formula เช่น spine formula 2. 3. 3. 3. แสดงว่าข้อสุดท้ายของ exopodite ของขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 มีหนาม 2 อัน และปล้องอื่นอีก 3 ปล้อง มีหนามปล้องละ 3 อัน เป็นต้น นอกจากนี้ โครงสร้างของ apical armature ที่อยู่บนข้อสุดท้ายของ endopodite ของขาว่ายน้ำคู่ที่ 4 สามารถใช้เป็นสัญลักษณ์ในการจำแนกชนิดโคพีพอด ใน Order Cyclopodia ส่วนใหญ่ apical armature จะประกอบด้วยหนาม 2 อัน ซึ่งยาวไม่เท่ากัน (ลัดดา, 2543) ซึ่งรูปร่างและลักษณะของโคพีพอด ดังแสดงในภาพที่ 2-3



ภาพที่ 2-3 รูปร่างลักษณะของโคพีพอด (A) Calanoida (B) Female Cyclopoida (C) Male Cyclopoida ที่มา : ลัดดา วงศ์รัตน์ (2543)

2.4.2 ระยะการเติบโต (Developmental stage)

โคพีพอดเติบโตด้วยวิธีการลอกคราบ (metamorphosis) หลังการฟักตัวออกจากไข่ โดยทำการลอกคราบทั้ง 10 ครั้งก่อนเป็นตัวเต็มวัย ตัวอ่อนของโคพีพอด มี 2 ระยะ ระยะแรกเรียกว่า นอเพลียส (nauplius larva) ตัวอ่อนระยะต่อมาเรียกว่า โคพีโพดิด (copepodid larva) ระยะนอเพลียส (nauplius) มีอีก 5 ระยะ และระยะ โคพีโพดิด มีอีก 5 ระยะ หลังระยะโคพีโพดิดที่ 5 จะเป็นระยะเต็มวัย (adult) บางท่านแบ่งระยะโคพีโพดิดออกเป็น 6 ระยะ โดยระยะที่ 6 เป็นระยะ adult

ลักษณะของตัวอ่อนโคพีพอดแต่ละระยะมีดังนี้

2.4.2.1 ระยะนอเพลียส (Nauplius stages)

ระยะที่ 1 ลำตัวไม่แบ่งเป็นปล้อง โดยทั่วไปตัวมีรูปไข่ ค่อนข้างแบนจากบนลงล่าง ท้ายลำตัวมีขน 1 เส้น (furcal bristle) เมื่อโตขึ้นจำนวนขนจะเพิ่มขึ้น มีรยางค์ 3 คู่ คู่ที่ 1 คือหนวดคู่ที่ 1 (antennule or first antenna) เป็นแบบ uniramous และมี 3 ข้อ คู่ที่ 2 คือหนวดคู่ที่ 2 (antenna or second antenna) เป็นแบบ biramous คู่ที่ 3 คือ กรามบน (mandibles) ริมฝีปากบนเป็นแผ่นกลมขนาดใหญ่

ระยะที่ 2 เริ่มมีกรามล่าง (maxillules) ลักษณะเป็นตุ่มขนาดเล็กอยู่เหนือหนวดและ mandibles

ระยะที่ 3 แตกต่างจากระยะนอเพลียส 2 คือ มีขนที่ปลายสุดลำตัว (furcal bristle) คู่ที่ 2

ระยะที่ 4 แตกต่างจากระยะนอเพลียส 3 คือมี furcal bristles คู่ที่ 3ระยะนี้กรามล่าง (maxillues) เจริญเต็มที่

ระยะที่ 5 มีรยางค์เกิดขึ้นอีก 4 คู่ คือกรามล่าง คู่ที่ 2 กราม (maxillipeds) 1 คู่ ขาว่ายน้ำ 2 คู่ (คู่ที่ 1 และ 2) แต่ยังมีขนาดเล็ก

2.4.2.2 ระยะโคพีโพดิด (Copepodid stages)

ระยะนี้แตกต่างจากระยะนอเพลียส คือ ลำตัวแบ่งเป็นปล้อง

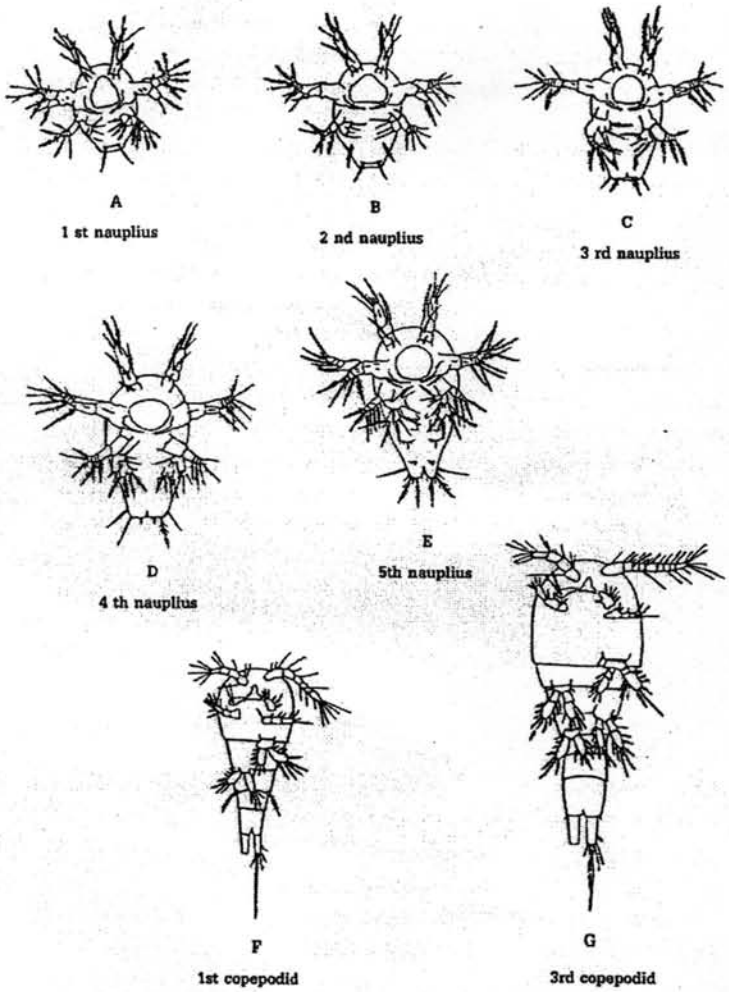
ระยะที่ 1 ลำตัวมี 5 ปล้อง antennules มีมากกว่า 3 ข้อ (อาจมี 3-6) basipodite ของ antennae ยังมี exopodite ขนาดเล็กอยู่ รยางค์รอบปากเจริญขึ้นจนเกือบเท่าระยะ adult แต่ mandibles ยังคงมี exopodite ขนาดเล็ก มีขาว่ายน้ำ 3 คู่ ขา 2 คู่แรกเป็นแบบ biramous ส่วนขาคู่ที่ 3 ยังมีขนาดเล็กอยู่ ส่วน exopodite และ endopodites ของขา 2 คู่แรกมีเพียง 1 ข้อ caudal rami เจริญดีและมีซีตีที่ตำแหน่ง lateral, dorsal และ apical ที่ตำแหน่ง apical มีซีตี 4 เส้น แต่ยังไม่มีขนบางๆ (hairs)

ระยะที่ 2 ลำตัวมี 6 ปล้อง antennules มีข้อ 6-7 ข้อ (ส่วนน้อยมี 5 ข้อ) antennae และรยางค์รอบปากยังมีลักษณะคล้ายระยะที่ 1 แต่ริมฝีปากแยกออกเห็นได้ชัดเจน มีขาว่ายน้ำ 4 คู่ ขา 3 คู่แรกเจริญดี ส่วนขาคู่ที่ 4 ยังมีขนาดเล็กอยู่ ส่วน exo-endopodite ของขา 2 คู่แรกมี 2 ข้อ ซีตีที่ caudal rami ยาวและมีขนบางๆ

ระยะที่ 3 ลำตัวมี 7 ปล้อง ขาว่ายน้ำ 4 คู่เจริญดี ส่วนของ exo-endopodite ของขาคู่ที่ 1-3 มี 2 ข้อ แขนงของขาคู่ที่ 4 มี 1 ข้อ ขาคู่ที่ 5 ยังมีขนาดเล็กอยู่ ระยะนี้ antennules มีหลายข้อ (4-8 ข้อ) รยางค์รอบปากเจริญเต็มที่ ระยะที่ 3 นี้เพศเมียเริ่มมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้

ระยะที่ 4 ลำตัวมี 8 ปล้อง ข้อแตกต่างเรื่องขนาดเริ่มเห็นชัดมากขึ้นในระยะนี้ หนวดทั้ง 2 คู่ มีข้อเพิ่มขึ้น exopodite และ endopodite ของขาว่ายน้ำทุกคู่มี 2 ข้อ บางชนิดขาคู่ที่ 1 อาจมี 2 ข้อ ข้อที่ 1 มีซีตีที่ด้านนอก 1 เส้น ขาคู่ที่ 2 มีหนามและซีตี บางชนิดขาคู่ที่ 5 มี 1 ข้อ

ระยะที่ 5 ลำตัวมี 9 ปล้อง ความแตกต่างของ 2 เพศ เริ่มปรากฏ โดยบางปล้องของหนวดคู่ที่ 1 เริ่มหนาและใหญ่ขึ้น บางชนิดจำนวนปล้องของตัวผู้เพิ่มมากขึ้นกว่าตัวเมียและบางปล้องใหญ่ขึ้นด้วย โคพีพอดทั้ง 2 เพศของบางชนิดมีจำนวนปล้องเท่ากัน ในพวก calanoid หนวดข้างขวาของตัวผู้จะพัฒนารูปร่างเพียงข้างเดียว ส่วนพวก cyclopoid และพวก harpacticoid มี antennae ที่เปลี่ยนรูปร่างไปทั้ง 2 ข้าง ระยะนี้ขาว่ายน้ำมี exopodite และ endopodite 2 ข้อ บางชนิดอาจมี 3 ข้อ ขาว่ายน้ำคู่ที่ 5 เกิดขึ้น ระยะนี้ตัวอ่อนจะลอกคราบและมีอวัยวะเพศเกิดขึ้น ซึ่งเป็นระยะที่เจริญวัยเต็มที่ (adult) (ลัดดา, 2543) ซึ่งลักษณะตัวอ่อนของโคพีพอด แสดงดังภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2-4 ตัวอ่อนระยะ nauplius และ copepodid ของโคพีพอด

ที่มา : ลัดดา วงศ์รัตน์ (2543)

2.4.3 การสืบพันธุ์ (Reproduction)

โคพีพอดมีเพศผู้และเพศเมียแยกกันคนละตัว (dioecious) ระบบสืบพันธุ์ของตัวเมียประกอบด้วยถุงไข่ 1-2 ถุง ท่อนำไข่ (oviducts) 2 ท่อ แต่ละท่อมี diverticula ซึ่งจะเปิดออกนอกตัวที่ genital opening ที่ด้านท้องของปล้องท้องปล้องแรก genital opening ทั้ง 2 ช่อง มีถุงเก็บสเปิร์ม (seminal receptacle หรือ spermathecae) 1 คู่ พวก cyclopoid ส่วนใหญ่มี genital opening 1 คู่ แต่พวก harpacticoid และ calanoid ส่วนใหญ่มี genital opening เพียง 1 ช่อง

ระบบสืบพันธุ์ของตัวผู้ประกอบด้วย testes 1 ข้าง และท่อน้ำเชื้อ 1 ท่อ ซึ่งเปิดออกนอกตัวที่ปล้องอกปล้องที่ 1 โดยช่องเปิดอยู่ที่ด้านข้างของด้านท้อง พวก calanoid และ harpacticoid มีท่อน้ำเชื้อ 1 ท่อ ส่วนพวก cyclopoid มีท่อน้ำเชื้อ 1 คู่

ระยะการเติบโตของแต่ละชนิดแตกต่างกันไป โคพีพอดบางชนิดมีการสืบพันธุ์เพียง1 ครั้ง ในรอบปีหรือมี 1 generation ต่อปี เรียกว่า monocyclic ชนิดที่มีการสืบพันธุ์ 2 ครั้งในรอบปี เรียกว่า bicyclic แต่จำนวนครั้งการสืบพันธุ์อาจเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่สำคัญมีผลต่อการเติบโตหรือการลอกคราบของโคพีพอด (ลัดดา, 2543)

2.5 ปัจจัยที่สำคัญในการการเพาะเลี้ยงโคพีพอด

2.5.1 อุณหภูมิของน้ำ อุณหภูมิของน้ำมีผลต่อชีววิทยาบางประการของโคพีพอด ได้แก่ จำนวนช่วงชีวิต (generation) ต่อปี ระยะเวลาสำหรับการพัฒนาของตัวอ่อน ขนาดและความดกของไข่ (fecundity) ซึ่งมีอุณหภูมิของน้ำต่ำจะมีจำนวนช่วงชีวิตต่อปีน้อยกว่าพวกที่อาศัยในเขตร้อน ที่อุณหภูมิของน้ำต่ำระยะเวลาที่ใช้ในการสร้างไข่ชุดแรกจะเพิ่มมากขึ้น หากอุณหภูมิของน้ำสูงขึ้น จำนวนไข่ในแต่ละครั้งที่สร้างจะน้อยลง

2.5.2 แสงสว่าง ความยาวคลื่นของแสงและระยะเวลาที่มืดและสว่าง (photoperiod) เป็นปัจจัยที่ควบคุมอัตราการพัฒนาการของโคพีพอด โดยแสงที่มีความยาวคลื่นที่ยาวจะเร่งอัตราพัฒนาการ

2.5.3 พีเอช โคพีพอดส่วนใหญ่อาศัยในน้ำที่เป็นกลาง มีค่าพีเอช อยู่ระหว่าง 6-8 บางชนิดสามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่ค่อนข้างเป็นกรด หรือเป็นด่าง

2.5.4 ความเค็ม โคพีพอดน้ำจืดส่วนใหญ่ไม่สามารถอาศัยในที่มีความเค็มเท่ากับน้ำทะเล แหล่งน้ำจืดบางแห่งมีปริมาณเกลือสูง แต่ไม่ใช่เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่พบมากในน้ำทะเล โคพีพอดสามารถปรับตัวให้อาศัยอยู่ในน้ำที่มีความค็มต่างกัน ดังนี้

2.5.4.1 พวกที่อาศัยในน้ำจืดหรือน้ำเค็มเล็กน้อย (oilgohaline species) ได้แก่ โคพีพอดน้ำจืดทั้งหลาย โดยเฉพาะคาลานอยด์ที่อยู่ในวงศ์ Diaptomidae

2.5.4.2 พวกที่อาศัยในน้ำที่มีความเค็มปานกลาง (mesohaline species) ได้แก่ โคพีพอดที่อยู่ในน้ำกร่อยที่มีความเค็มอยู่ระหว่าง 5 – 16 พีเอสยู ได้แก่ คาลานอยด์ที่อยู่ในวงศ์ Boekellidae และ Pseudodiaptomidae

2.5.4.3 พวกที่อาศัยในน้ำที่มีความค็มสูง (polyhaline species) ได้แก่ โคพีพอดที่อยู่ในน้ำทะเล (ละออศรี, 2545)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาชีววิทยาพื้นฐานของโคพีพอดเป็นข้อมูลที่สำคัญในการออกแบบและจัดการระบบการเพาะเลี้ยง ธิดาและสุนิตย์ (2527) ได้อธิบายวิธีการเลี้ยงโคพีพอดชนิด *Tigriopus japonicus* ซึ่งเป็นโคพีพอดขนาดค่อนข้างเล็ก พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งทะเลเขตอบอุ่นของประเทศญี่ปุ่น เป็นชนิดที่นิยมเลี้ยงกันทั่วไปและได้นำมาทดลองเลี้ยงในประเทศไทยเนื่องจากทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและให้ผลผลิตอย่างสม่ำเสมอ โดยการเลี้ยงจะทำในถังขนาดเล็กก่อนแล้วจึงค่อยขยายปริมาตรการเลี้ยงให้เพิ่มขึ้น โดยเริ่มเลี้ยงในถังพลาสติกความจุ 30 ลิตร จำนวนตามต้องการ ใส่น้ำทะเลที่พักและกรองแล้วถังละ 25 ลิตร เติมหัวเชื้อโคพีพอดลงในถังเลี้ยงและให้อากาศ ใช้รำข้าวปริมาณ 0.3 กรัมเป็นอาหารทุกวัน ซึ่งโคพีพอดเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิน้ำประมาณ 24-27 องศาเซลเซียส ซึ่งวิธีการแบบนี้เรียกว่าการเลี้ยงแบบกะ (batch culture) ตัวอ่อนระยะนอเพลียสเติบโตจนเข้าสู่ระยะโตเต็มวัยผสมพันธุ์ได้โดยใช้เวลา 8-10 วัน ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วจะฟักเป็นตัวภายใน 3-4 วันตัวเมียจะให้ไข่ประมาณ 10-48 ฟองต่อครั้ง โดยที่ตัวเมียแต่ละตัวสามารถผลิตไข่ได้ 6-9 ครั้ง ช่วงการให้ไข่แต่ละครั้งห่างกัน 2-4 วัน ด้วยวิธีนี้สามารถเลี้ยงโคพีพอดได้นานประมาณ 24 วัน โดยไม่มีการเปลี่ยนน้ำในถังเลี้ยง แต่เมื่อเลี้ยงได้นานประมาณ 2 สัปดาห์ควรเติมน้ำจืดลงในถังเลี้ยงประมาณวันละ 2 ลิตร เพื่อไม่ให้ความเค็มของน้ำสูงเกินไป

นอกจากการนำสายพันธุ์ของโคพีพอดจากต่างประเทศเข้ามาเพาะเลี้ยง ขวัญเรือนและสุภาวดี (2541) ได้เก็บตัวอย่าง *Apocyclops* sp. ซึ่งเป็น cyclopoid copepods อาศัยในน้ำกร่อยบริเวณป่าชายเลนของเกาะช้าง จังหวัดตราด ประเทศไทย นำมาทำการเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการมากกว่า 7 ชั่วอายุ เริ่มจากการนำโคพีพอดเพศเมียที่มีพวงไข่เลี้ยงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซียเซียส ความเค็ม 30 พีเอสยู ให้ *Isochrysis galbana* เป็นอาหาร จากนั้นเปลี่ยนถ่ายสู่ขวดเลี้ยงขนาด 500 มิลลิลิตร และ2 ลิตร ตามลำดับ และนำมาขยายปริมาตรเป็น 200 ลิตร ภายในระยะเวลาที่เลี้ยง 9 - 13 วัน โดยเริ่มจากไข่จนถึงตัวเต็มวัยจะได้ *Apocyclops* sp ที่ความหนาแน่น 289 ตัวต่อลิตร จากการศึกษาได้ตัวอ่อนนอเพลียสระยะที่ 6 ใช้เวลา 4 - 5 วัน และจากระยะ copepodid ระยะที่ 1 ถึงระยะที่ 2 ใช้เวลาอีก 4 - 5 วัน และหลังจากนั้นจะใช้เวลาอีก 1 วัน เพื่อพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย โดย *Apocyclops* sp. มีช่วงอายุประมาณ 18 - 28 วัน

จากระบบการเลี้ยงแบบกะที่เกษตรกรนิยมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและแพลงก์ตอนสัตว์ทำให้พบกับปัญหาของผลผลิตมีปริมาณไม่เพียงพอจึงก่อให้เกิดงานวิจัยที่พัฒนาระบบผลิตสาหร่ายและแพลงก์ตอนสัตว์แบบต่อเนื่องเพื่อใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยการเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องนั้นมีการวิจัยมานานแล้ว เช่นงานวิจัยของ Fukami *et al.* (1977) ซึ่งได้รายงานผลการเลี้ยงไดอะตอม *Nitzchia* sp. แบบต่อเนื่อง โดยใช้น้ำจากทะเลลึกพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอที่ได้จากการเลี้ยงแบบต่อเนื่องสูงกว่าการเลี้ยงแบบกะ แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงแบบต่อเนื่องสาหร่ายให้

ผลผลิตที่ดีและมีความคงที่ และยังสามารถนำระบบผลิตสาหร่ายแบบต่อเนื่องมาเชื่อมโยงกับระบบผลิตแพลงก์ตอนสัตว์แบบต่อเนื่อง เช่นในงานวิจัยของปวีณา (2548) ซึ่งได้ศึกษาการเติบโตของโรติเฟอร์ *Brachionus plicatilis* ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยใช้สาหร่ายเตตราเซลมิส *Tetraselmis suecica* เป็นอาหาร พบว่าในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ความหนาแน่นของสาหร่าย *T. suecica* แปรผกผันกับอัตราการเจือจาง โดยสาหร่าย *T. suecica* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอัตราการเจือจาง 0.94 ต่อวัน ให้ความหนาแน่นผลผลิตเซลล์สูงสุด 1.1 x 10^9 เซลล์ต่อลิตรต่อวัน ส่วนการเติบโตของโรติเฟอร์พบว่า ความหนาแน่นของโรติเฟอร์จะมีความแปรปรวนสูง แต่ก็สามารถเติบโตแบบต่อเนื่องได้ดีในช่วงอัตราการเจือจาง 0.4 ถึง 1.7 ต่อวัน โดยให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 230,000 ตัวต่อลิตรต่อวัน ที่อัตราการเจือจาง 0.74 ต่อวัน

โคพีพอดถูกใช้เป็นอาหารเบื้องต้นสำหรับอนุบาลลูกปลา โดยส่วนใหญ่จะใช้โคพีพอดระยะนอเพลียสเป็นอาหารสำหรับลูกปลา เช่นในการอนุบาลลูกปลา turbot (*Psetta maxima* syn. *Scophthalmus maximus*) (Stottrup and Norsker, 1997) ในการเพาะเลี้ยงโคพีพอด พบว่าผลผลิตของโคพีพอดขึ้นกับปริมาณการผลิตสาหร่ายด้วยเช่นกัน หากผลิตสาหร่ายได้ไม่เพียงพอจะทำให้ผลผลิตโคพีพอดไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้อนุบาลลูกปลา ซึ่งสาหร่ายเซลล์เดียวที่นิยมให้เป็นอาหารของโคพีพอด ได้แก่ *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas baltica* (Stottrup *et al.*, 1986) *Chaetoceros, Tetraselmis,* และ *Nannochloropsis* เป็นต้น (Kraul, 1990) จากความเหมาะสมทางด้านคุณค่าทางอาหารและความต้องการของโคพีพอดที่มากขึ้น ทำให้เกิดการพัฒนาระบบการเลี้ยงโคพีพอดหลายรูปแบบ

ปัจจุบันมีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงโคพีพอดในหลากหลายรูปแบบซึ่งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบการเลี้ยงโคพีพอด แสดงในตารางที่ 2-1 โดยภาพรวมจะเห็นได้ว่ามีการเพาะเลี้ยงโคพีพอด 3 ระบบ คือ ระบบการเลี้ยงแบบกะ ระบบการเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องและระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ซึ่งระบบการเลี้ยงแบบกะนั้นให้ผลผลิตมากกว่าระบบอื่นๆ แต่ก็ให้ผลผลิตได้ไม่นาน ในขณะที่ระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องให้ความหนาแน่นของโคพีพอดในถังเลี้ยงน้อยกว่าแต่ให้ผลผลิตได้นานกว่า

ตารางที่ 2-1 การวิจัยและพัฒนาระบบการเลี้ยงโคพีพอด

ชนิดโคพีพอด	รูปแบบการเลี้ยง/ขนาดของระบบ	อาหารที่ใช้เลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
Acartia spp.	เพาะเลี้ยงในถังปริมาตร 100 และ 1,000 ลิตร ทำการกรองเป็นประจำทุก 8 วัน เพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตโคพีพอดในระยะตัวเต็มวัย (adults) และระยะ late-stage	*Rhodomonas* sp., *Tetraselmis* sp. และ *Isochrysis* sp.	Schipp *et al.* (1999)

	copepodids สามารถผลิตโคพีพอด (ในระยะ adult และ late-stage copepodids) ได้ 1000 ตัว/ลิตร ในรอบ 8 วัน		
Gladioferens imparipes	เลี้ยงในถังปริมาตร 500 ลิตร ประมาณ 14-21 วัน โคพีพอดเพศเมียจะฟักไข่ออกมาเป็นตัวอ่อนระยะนอเพลียส จากนั้นนอเพลียสจะถูกส่งไปยังอีกถังซึ่งมีปริมาตร 200 ลิตร และเลี้ยงต่อไปอีก 40 วัน พบว่าจะให้ผลผลิตของโคพีพอดระยะนอเพลียส 540,000 ตัวต่อวัน (1080 ตัว/ลิตร/วัน)	*Isochrysis galbana*	Rippingale (2000)
Tisbe holothuriae	เลี้ยงโคพีพอดแบบต่อเนื่องในถังปริมาตร 150 ลิตร ได้ผลผลิตโคพีพอดระยะนอเพลียสและโคพีโพดิด 500,000 ตัว/ลิตร/วัน	*Rhodomonas baltica*	Stottrup and Norsker (1997)
Gladioferens imparipes	เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปริมาตร 60 ลิตร พบว่าสามารถให้ผลผลิตนอเพลียส 1117±59 ตัว/ลิตร/วัน ระยะเวลาในการเลี้ยง 53 วัน	*Isochrysis galbana* และ *Rhodomonas baltica*	Payne and Rippingale (2001)
Gladioferens imparipes	เพาะเลี้ยงในถังปริมาตร 500 ลิตร เป็นระบบหมุนเวียนแบบอัตโนมัติ พบว่าสามารถให้ผลผลิตนอเพลียส 878±46 ตัว/ลิตร/วัน ซึ่งระบบนี้สามารถเลี้ยงต่อไปได้เป็นเวลามากถึง 420 วัน	*Isochrysis galbana* และ *Rhodomonas baltica*	Payne and Rippingale (2001)
Gladioferens imparipes	เพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องในถังปริมาตร 1000 ลิตร พบว่าสามารถให้ผลผลิตนอเพลียส 520±15 ตัว/ลิตร/วัน ซึ่งระบบนี้สามารถเลี้ยงต่อไปได้เป็นเวลามากถึง 242 วัน	*Isochrysis galbana* และ *Rhodomonas baltica*	Payne and Rippingale (2001)

Tisbe holothuriae	เลี้ยงโคพีพอดในถาดปริมาตร 3 ลิตร ได้ผลผลิตโคพีพอดระยะนอเพลียส 100,000 ตัว/ลิตร/วัน ระยะเวลาในการเลี้ยง 53 วัน	*Rhodomonas baltica*	Stottrup and Norsker (1997)
Acartia tonsa	เลี้ยงโคพีพอดในถังปริมาตร 1890 ลิตร ได้ผลผลิตระยะนอเพลียสและตัวเต็มวัย 91 ตัวต่อลิตรต่อวัน ในรอบการเลี้ยง 16 วัน	แพลงก์ตอนพืชจากธรรมชาติ	Ogle (1979)
Acartia tonsa	เลี้ยงโคพีพอดในถังปริมาตร 200-450 ลิตร ได้ผลผลิตระยะนอเพลียส 213 ตัวต่อลิตรต่อวัน ในรอบการเลี้ยง 28 วัน	*Rhodomonas baltica* และ *Isochrysis galbana*	Stottrup *et al.* (1986)

จากตาราง 2-1 จะเห็นได้ว่า ระบบการเลี้ยงโคพีพอดจะให้ผลผลิตระหว่าง 91-500,000 ตัวต่อลิตรต่อวัน ซึ่งความแตกต่างของผลผลิตที่ได้จะขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของโคพีพอด ชนิดและปริมาณของอาหาร (สาหร่ายเซลล์เดียว) ที่ให้ และสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง