

บทคัดย่อ

การคัดแยก *Schizochytrium* sp. จากตัวอย่างที่เก็บจากป่าชายเลน 2 ครั้ง สามารถรวบรวมได้ทั้งหมด 580 ไอโซเลท ประกอบด้วย 174 ไอโซเลท แยกจากป่าชายเลนฝั่งอ่าวไทย และ 406 ไอโซเลท แยกจากตัวอย่างที่เก็บจากป่าชายเลน จังหวัดชายฝั่งทะเลอันดามัน จากการคัดเลือกในรอบแรกพบว่ามี 36 ไอโซเลท ได้แก่ PTI1-13, PTI1-15, PTI1-27, PTI2-08, PTI2-13, PTI2-16, PTI2-20, PTI2-33, PTI-3-04, PTI3-26, PTI3-27, PTI3-29, PTI3-33, PTI3-36, TM1-14, TM1-15, TM2-31, TM3-30, TM4-16, KKN-5, BPU-3, ASR-1, BPS-5, BPS-7, PPJ-5, PPJ-10, BTB-4, BTB-7, BTB-10, BTB-11, BTB-17, BTB-20, BTB-25, PBR-3, MCCP-23 และ MCCP-26 ที่มีปริมาณ DHA สูงกว่า 25 % ของกรดไขมันทั้งหมด และเมื่อนำทั้ง 36 ไอโซเลท ไปทำการคัดเลือกกรองสองและสาม พบว่าไอโซเลท BTB-10 ปริมาณของ DHA ในเซลล์สูงที่สุดที่ 30.7 % ของกรดไขมันทั้งหมด จึงได้คัดเลือกสายพันธุ์นี้ไว้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต่อไป

การศึกษาองค์ประกอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างกรดไขมัน DHA ของ BTB-10 พบว่าปริมาณและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้แก่น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 4% สำหรับแหล่งไนโตรเจนประกอบด้วยยีสต์สกัด 0.5% เปปโตน 0.5% และ monosodium glutamate 0.67% ระดับความเค็มเท่ากับน้ำทะเลที่ 30 ppt และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยในสภาวะนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์จะได้มวลเซลล์ประมาณ 15 กรัมต่อลิตร และ DHA ประมาณ 5 – 6 กรัมต่อลิตร คิดเป็นสัดส่วนของ DHA ประมาณ 35 – 40% ของกรดไขมันทั้งหมด อย่างไรก็ตามเมื่อนำสภาวะนี้ไปใช้กับถังหมักขนาด 100 ลิตร พบว่าปริมาณเซลล์ที่ได้สูงขึ้นเล็กน้อยที่ 19 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณ DHA ที่สะสมกลับลดลงค่อนข้างมากอยู่ที่ประมาณ 3.6 กรัมต่อลิตร

การทดลองนำ *Schizochytrium* sp. BTB-10 ไปใช้ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) ตั้งแต่ระยะไข่ 1 ถึงระยะชูเอี้ย 3 โดยการทดแทนและเสริมคีโตเซอรอส (*Chaetoceros* sp.) ต่างกัน 3 ระดับคือ คีโตเซอรอส และจุลินทรีย์น้ำเค็ม อัตราส่วน 50 *Schizochytrium* sp. BTB-10 และคีโตเซอรอส 100% เสริมด้วย *Schizochytrium* sp. BTB-10 25% (ชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้คีโตเซอรอส 100% (วิธีปกติ) และอนุบาลด้วยอาร์ทีเมียตั้งแต่ระยะไมซิส 1 ถึงระยะโพสต์ลาร์วา 15 พบว่าที่ระยะไมซิส 1 ชุดการทดลองที่อนุบาลด้วยคีโตเซอรอส 100% เสริมด้วย *Schizochytrium* sp. BTB-10 25% มีอัตราการรอดสูงสุดที่ $89.81 \pm 0.69\%$ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และที่ระยะโพสต์ลาร์วา 1 ชุดการทดลองที่ให้คีโตเซอรอส 50% และ *Schizochytrium* sp. BTB-10 50% มีอัตราการรอดสูงสุดคือ $67.31 \pm 1.10\%$ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ที่ระยะโพสต์ลาร์วา 15 ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของอัตราการรอด ($P > 0.05$) การเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างทุกชุดทดลองและชุดควบคุมในด้านความยาวของลูกกุ้งในระยะโพสต์ลาร์วา 1,

7, และ 15 และน้ำหนักของลูกกุ้งระยะโพสท์ลาร์วา 15 ($P>0.05$) การทดสอบความทนทานต่อความเครียดโดยการแช่ฟอร์มาลิน 200 ppm นาน 24 ชั่วโมง พบว่าชุดการทดลองที่ได้รับคีโตเซอโรส 100% เสริม *Schizochytrium* sp. BTB-10 25% มีอัตราการตายสะสมต่ำที่สุดคือ $63.22\pm15.16\%$ ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การลดความเค็มจาก 30 ppt เหลือ 5 ppt พบว่าชุดการทดลองที่ให้คีโตเซอโรส 75% และ *Schizochytrium* sp. BTB-10 25% มีอัตราการตายสะสมต่ำที่สุดคือ $24.33\pm5.86\%$ และต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ไม่พบความแตกต่างของอัตราการตายสะสมตลอดช่วงการทดลอง ($P>0.05$) การทดลองนี้แสดงถึงศักยภาพของการใช้จุลินทรีย์น้ำเค็ม *Schizochytrium* sp. ในการอนุบาลลูกกุ้งทะเลในลักษณะการทดแทนบางส่วนหรือการเสริมการใช้คีโตเซอโรส

การทดลองอนุบาลลูกกุ้งขาวด้วยการเสริม *Schizochytrium* sp. BTB-10 ในฟาร์มของเอกชนพบว่าความหนาแน่นของลูกกุ้งในบ่อเพาะพักมีความสำคัญ การปล่อยลูกกุ้งในอัตรา 1,500,000 ตัวต่อบ่อขนาด 5 ตัน มีผลต่ออัตราการรอดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนจาก 26% เป็น 71% ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ความยาวของลูกกุ้งก็มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดในทุกระยะ post larva รวมทั้งเวลาที่ใช้ในการพัฒนาระยะของลูกกุ้งก็สั้นลง จึงอาจสรุปได้ว่าการเสริมอาหารให้ลูกกุ้งด้วย *Schizochytrium* sp. BTB-10 ทำให้อัตราการรอดของลูกกุ้งเพิ่มขึ้นเกือบ 3 เท่า ลูกกุ้งมีขนาดใหญ่ขึ้นช่วยลดการแตกขนาดของลูกกุ้ง ส่งผลให้การพัฒนาระยะของลูกกุ้งสมบูรณ์และเร็วขึ้น จากการสังเกตพบว่าลูกกุ้งในบ่อทดลองกินอาหารเพิ่มมากขึ้น ดังจะเห็นได้จากขนาดของลูกกุ้ง การเจริญเติบโตดีขึ้น และสุขภาพโดยรวมของกุ้งแข็งแรงมากขึ้น

ABSTRACT

Isolation of marine microalgae, *Schizochytrium* sp., from samples collected yielded the total of 580 isolates, including 174 isolates from samples collected from mangrove forests in the Gulf of Thailand and 406 isolates from samples obtained from mangrove forests in Andaman Sea. Primary screening of the isolates for strain that could produce DHA 25% or more of total fatty acids resulted in 36 isolates that met the criterion. They were PTI1-13, PTI1-15, PTI1-27, PTI2-08, PTI2-13, PTI2-16, PTI2-20, PTI2-33, PTI-3-04, PTI3-26, PTI3-27, PTI3-29, PTI3-33, PTI3-36, TM1-14, TM1-15, TM2-31, TM3-30, TM4-16, KKN-5, BPU-3, ASR-1, BPS-5, BPS-7, PPJ-5, PPJ-10, BTB-4, BTB-7, BTB-10, BTB-11, BTB-17, BTB-20, BTB-25, PBR-3, MCCP-23 และ MCCP-26. Secondary and tertiary screening of the 36 isolates revealed that BTB-10 accumulated largest amounts of DHA in their cells at the level of 30.7 % of total fatty acids,

respectively. Therefore, this strain was selected for further studies on optimization of culture conditions.

Optimization of medium composition for growth and DHA production by *Schizochytrium* sp. BTB-10 revealed that glucose concentration at 4% was the most favorable carbon source while 0.5% yeast extract, 0.5% peptone and 0.67% monosodium glutamate was the optimal combined nitrogen source. Salinity at 30 ppt and temperature at 30 °C provided good growth. Cultivation in 500 ml Erlenmeyer flasks under these conditions yielded 15 g/L of biomass and 5 -6 g/L of DHA which constituted about 35 – 40% of total fatty acids. However, when these conditions were applied in 100 liter fermentor cell mass increased slightly to 19 g/L but DHA content was considerably lower to 3.6 g/L.

Application of the microalga *Schizochytrium* sp. BTB-10 during zoea stage 1 to stage 3 of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone) as a partial replacement and supplementation of *Chaetoceros* sp., i.e., Treatment 1 - 50% *Chaetoceros* sp. + 50% *Schizochytrium* sp. BTB-10, Treatment 2 - 75% *Chaetoceros* + 25% *Schizochytrium* sp. BTB-10 and Treatment 3 - 100% *Chaetoceros* sp. + 25% *Schizochytrium* sp. BTB-10 compared with control (only *Chaetoceros*) was studied. The survival rate of mysis 1 was highest in Treatment 3 at $89.81 \pm 0.69\%$ which was significantly different from control ($P < 0.05$). For postlarva 1 (PL1), the highest survival rate was found in Treatment 1 at $67.31 \pm 1.10\%$ which was significantly different from the control ($P < 0.05$). However, no significant difference of survival rates were found at PL15 stage ($P < 0.05$). For the growth rate, there was no significant difference amongst the length of PL1, PL7 and PL15 and weight of PL15 ($P < 0.05$). Study on stress tolerance of PL15 by immersion in 200 ppm formalin for 24 hrs indicated significant difference of mortality rate ($P < 0.05$) in which treatment 3 showed the lowest mortality rate at $63.22 \pm 15.16\%$. Salinity change from 30 to 5 ppt also caused significant difference of mortality rate ($P < 0.05$) which Treatment 2 had the lowest value at $24.33 \pm 5.86\%$. However, disease resistance against pathogenic bacteria, *Vibrio harveyi*, were not significantly different ($P < 0.05$). This study clearly indicates the benefits of microalgae *Schizochytrium* sp. BTB-10 as a potential feed for the nursing of marine shrimp larva.

Experiment trial of supplementary feeding of *Schizochytrium* sp. BTB-10 in a private hatchery showed that larval density was vital to the success of shrimp development. At lower density of 1,500,000 larva/ 5 tons pond, the survival rate was increased abruptly from 26% to 71% which was coincided with laboratory experiment.

The length of larva also obviously improved in every post larval stage. Time requires for each development stage was also shorten noticeably. In conclusion, supplementary feed of *Schizochytrium* sp. BTB-10 in nursing white pacific shrimp larvae improved survival rates almost three times as compared to control. Size of post larva were significantly longer resulted in shorten time for development stages. By observation shrimp larvae received *Schizochytrium* sp. BTB-10 consumed more feed as clearly seen from increase in body length, better growth and better health conditions.

คำนำ

ในระยะ 2-3 ทศวรรษที่ผ่านมา นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการวิจัยและศึกษาอย่างต่อเนื่องถึงความสำคัญของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acids, PUFAs หรือ highly unsaturated fatty acids, HUFAs) ต่อโภชนาการของสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์น้ำเค็ม PUFAs เป็นส่วนประกอบที่จำเป็นและสำคัญต่อเยื่อเซลล์สัตว์ และระบบส่งสัญญาณของเซลล์ (cell signaling) ภาวะการขาด PUFAs ในสัตว์น้ำวัยอ่อนทั้งปลาและกุ้งจะมีผลทำให้อัตราการเจริญลดลง อัตราการรอดต่ำ และสัตว์น้ำอ่อนแอต่อโรค (Sorgeloos and Leger, 1992)

กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูงอาจแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มโอเมกา-6 (ω 6 หรือ n-6) และ โอเมกา-3 (ω 3 หรือ n-3) กรดไขมัน arachidonic (ARA) ในกลุ่ม n-6 PUFAs เป็นกรดที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เพราะเป็นสารตั้งต้นของสารประกอบคล้ายฮอร์โมน (hormone-like compounds) ที่เรียกว่า prostaglandins และ eicosanoids ในขณะที่กรดไขมัน eicosapentaenoic (EPA) และ docosahexaenoic (DHA) ในกลุ่ม n-3 PUFAs ก็มีความสำคัญในการเป็นสารตั้งต้นของ prostaglandins และ eicosanoids อีกกลุ่มหนึ่งเช่นเดียวกัน แต่เดิม ARA ถูกกำหนดว่าเป็นกรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acid) ต่อสัตว์ แต่ในปัจจุบันนี้ได้รวมเอา EPA และ DHA ไว้ด้วยเพราะมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อระบบสรีระของสัตว์ชั้นสูงทั่วไป

น้ำมันปลาทะเลและสาหร่ายบางสายพันธุ์ เป็นแหล่งของกรดไขมัน PUFAs ที่สำคัญทางอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง อย่างไรก็ตามแหล่งจากน้ำมันปลามีความไม่แน่นอนสูงเพราะจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆของการประมง การแสวงหาแหล่งทางเลือกของ PUFAs ทั้งในกลุ่ม n-3 และ n-6 จากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาหร่ายขนาดเล็กจะแหล่งที่มีศักยภาพเป็นอย่างยิ่ง (Yongmanitchai and Ward, 1989)

ปัญหาการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยในขณะนี้ มี 2 ประการหลัก คือ การระบาดของโรคไวรัส และการแตกขนาดของกุ้งในบ่อเพาะเลี้ยง ซึ่งปัญหาประการแรกงานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปในแนวทางการรักษา และป้องกันไม่ให้อุณหภูมิติดโรคไวรัสตั้งแต่เริ่มต้น (ผลิตลูกกุ้งปลอดเชื้อ) ซึ่งเป็นการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุ ในขณะที่แนวทางการป้องกันโดยวิธีการเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับลูกกุ้งเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้น เช่น การใช้สารเบต้า-กลูแคนเป็น immuno-stimulant มีเพิ่มมากขึ้น (Suphantharika และคณะ, 2003) ซึ่งกรดไขมันในกลุ่มโอเมกา-3 ก็มี