อิทธิพลของอาหารต่ออัตราการผลิตไข่และองค์ประกอบทางชีวเคมี ของฮาร์แพคติคอยด์โคพิพอดทะเลสกุล *Euterpina*

Dietary effects on egg production and biochemical characterization of marine harpacticoid copepod, *Euterpina* sp.

โดย

วรพร ธารางกูร

สุวัจน์ ธัญรส

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

กระทรวงศึกษาธิการ

ประจำปี ๒๕๕๘

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
Abstract	II
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
วิธีวิจัยดำเนินการวิจัย	4
ผลการศึกษา	11
วิจารณ์ผลการศึกษา	21
สรุปผลการศึกษา	25
กิตติกรรมประกาศ	26
เอกสารอ้างอิง	27

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	แพลงก์ตอนพืชสำหรับเป็นอาหารของ *E. acutrifrons*	4
2.	ลักษณะเซลล์ของยีสต์ขนมปังสำหรับเป็นอาหารของ *E. acutrifrons*	4
3.	สถานที่เก็บตัวอย่างและอุปกรณ์ (a) จุดเก็บตัวอย่าง *Euterpina* sp. บริเวณคลองในป่าชายเลนในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง ; (b) ถุงลากแพลงก์ตอนขนาดตา 60 µm ที่ใช้เก็บตัวอย่าง *Euterpina* sp. ; (c) การเก็บตัวอย่าง *Euterpina* sp. โดยการลากถุงลากแพลงก์ตอนจากพื้นท้องน้ำสู่ผิวน้ำ	5
4.	การคัดแยกสำหรับการเพาะเลี้ยง *E. acutrifrons* (a) การแยก *E. acutrifrons* โดยใช้การจับทีละตัว; (b) การเริ่มต้น stock culture ของ *E. acutrifrons* ในห้องปฏิบัติการ	6
5.	สภาวะการทดลองอัตราการกินอาหารของตัวเต็มวัย *E. acutrifrons*	7
6.	อัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons* ในอาหารชนิดต่างๆและระดับความเข้มข้นของอาหารที่ต่างกัน (a) *I. galbana* (b) *I. galbana* และ *T. suecica* (c) *I. galbana* และ *Dunaliella* sp. (d) *I. galbana* และ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*)	11
7.	อัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons* เพศผู้และเพศเมียในอาหารชนิดต่างๆและระดับความเข้มข้นของอาหารที่ต่างกัน a) *I. galbana* (b) *I. galbana* และ *T. suecica* (c) *I. galbana* และ *Dunaliella sp.* (d) *I. galbana* และ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*)	13
8.	จำนวนไข่ที่ตัวเมียผลิตได้ต่อครั้งของ *E. acutifron* เมื่อได้รับอาหารชนิดต่างๆ	14
9.	ปริมาตรไข่ที่ตัวเมียผลิตของ *E. acutifron* เมื่อได้รับอาหารชนิดต่างๆ	15
10.	ปริมาตรถุงไข่ที่ตัวเมียผลิตของ *E. acutifron* เมื่อได้รับอาหารชนิดต่างๆ	15

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	สูตรอาหารที่ใช้ทดลองอัตราการกินอาหารของ *E. acutrifrons*	7
2.	สูตรอาหารที่ใช้ทดลองอัตราการผลิตไข่ของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutrifrons*	9
3.	สูตรอาหารที่ใช้ทดลององค์ประกอบทางชีวเคมีของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutrifrons*	10
4.	ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารแตกต่างกัน 6 สูตร	17
5.	ชนิดและสัดส่วน (%) ของกรดไขมัน (fatty acid) ที่เป็นองค์ประกอบใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารแตกต่างกัน 6 สูตร	20

บทคัดย่อ

การศึกษาอิทธิพลของอาหารที่แตกต่างกันต่ออัตราการผลิตไข่และองค์ประกอบทางชีวเคมีของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเลสกุล *Euterpina* ที่ในห้องปฏิบัติการ เริ่มจากทดลองอิทธิพลของอาหารต่ออัตราการกินอาหารของ *E. acutrifrons* โดยกำหนดอาหารทดลอง 4 สูตร ที่เตรียมจากสาหร่ายเซลล์เดียว ได้แก่ *Isochrysis galbana Tetraselmis suecica Dunaliella* sp. และยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*) โดยชนิดและสัดส่วนที่แตกต่างกัน ที่ระดับความเข้มข้นของเซลล์อาหารที่แตกต่างกันดังนี้ 500, 700, 1,000, 1,500, 10,000 และ 20,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ พบว่า *E. acutifrons* สามารถกินอาหารได้หลากหลายจากแพลงก์ตอนพืชไปจนถึงยีสต์ ระดับความเข้มข้นของอาหารมีอิทธิพลต่ออัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons* อัตราการกินสูงสุดของ *E. acutifrons* พบเมื่อกินอาหารผสมระหว่าง *I. galbana* และ *Dunaliella* sp. ในขณะที่อิทธิพลของอาหารที่แตกต่างกันต่ออัตราการผลิตไข่ดำเนินการทดลองโดยใช้อาหาร 6 สูตร ที่เตรียมจากสาหร่ายเซลล์เดียว ได้แก่ *I. galbana T.suecica Chaetoceros calcitrans* และยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*) โดยชนิดและสัดส่วนที่แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นของอาหาร 2.0×10^{5} cell ml^{-1} ผลการศึกษาพบว่าอาหารมีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตไข่ของ *E. acutifrons* โดย *E. acutifrons* กินอาหารผสม *I. galbana* กับ *C. calcitrans* สามารถผลิตจำนวนไข่ที่ตัวเมียผลิตได้ต่อครั้งสูงที่สุด จากอาหารทั้งหมด 6 สูตร และศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีของ *E. acutifrons* จากอาหารทั้งหมด 6 สูตรที่เตรียมจากสาหร่ายเซลล์เดียว ได้แก่ *I. galbana T.suecica C. calcitrans* ยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*) และ *Schizochytrium limacinum* โดยชนิดและสัดส่วนที่แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นของอาหาร 1.0×10^{5} cell ml^{-1} พบกรดอะมิโนที่จำเป็นจำนวน 10 ชนิดและกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น 9 ชนิด โดยพบกลูตามีน (Glutamine) มีปริมาณสูงสุดใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในอาหาร 4 สูตรจาก 6 สูตร พบกรดไขมันอิ่มตัว 6 ชนิด กรดไขมันไม่อิ่มตัว 4 ชนิด โดยกรดปาล์มิติก (C16 : 0) เป็นชนิดกรดไขมันเด่นที่พบใน *E. acutifrons* อย่างไรก็ตามควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ *E.acutifrons* ในการตัวเลือกที่ดีชนิดหนึ่งของอาหารมีชีวิตสำหรับอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

คำสำคัญ : *Euterpina acutifrons* , อัตราการกิน, การผลิตไข่, องค์ประกอบชีวเคมี

ABSTRACT

The effect of diets on egg production and biochemical characterization of marine harpacticoid copepod, *Euterpina* sp were determined experimentally in laboratory conditions. Firstly, the experiment on the effect of diets on ingestion rates were investigated . Four assigned diets were prepared from the sole and mixed microalgae *(Isochrysis galbana, Tetraselmis suecica*, *Dunaliella* sp.) and Baker's yeat (*Saccharomyces cerevisiae*) with varying proportions and varyings densities including 500, 700, 1,000, 1,500, 10,000 and 20,000 cell ml^{-1} , respectively Our results showed that *E. acutifrons* can ingest all diet offered including variety of microalgae and Baker's yeat. The densities of diets significantly affected on ingestion of *E. acutifrons*. The maximum ingestion rate of *E. acutifrons* was found when *E. acutifrons* was fed with mixed diets, *I. galbana* and *Dunaliella* sp. Secondary, the experiment on the effect of diets on egg production were examinned. Six assigned diets were prepared from the sole and mixed microalgae *(I. galbana, T. suecica, Chaetoceros calcitrans*) and Baker's yeat (*Saccharomyces cerevisiae*) with varying proportions. During the experiment, the initial cell densities for all diets was set at 2.0×10^{5} cell ml^{-1}. Our results showed that the different diet significantly affected on egg production of *E. acutifron.* The highest egg production per egg sac per female was found when *E. acutifrons* was fed with *I. galbana* mixed *C. calcitrans*. The third experiment were set to examine the effect of different diet on biochemical composition of *E. acutifrons*. Six assigned diets were prepared from the sole and mixed microalgae *(I. galbana, T. suecica, C. calcitrans*), Baker's yeat (*Saccharomyces cerevisiae*) and *Schizochytrium limacinum* with varying proportions. During the experiment, the initial cell densities for all diets were set at 1.0×10^{5} cell ml^{-1}. Ten essential amino acids (EAA) and nine of nonessential amino acid were found from *E. acutifron* culture. Glutamin was a dominance amino acid from 4 diets. The saturated fatty acid (SFA) and unsaturated fatty acid were 6 and 4,respectively. Palmitic acid was a dominant fatty acid in *E. acutifron* culture. Further studies on *E. acutifrons* as a good candidate using as live feed in aquaculture industry are required.

Keywords : *Euterpina acutifrons* ,ingestion rate, egg production, biochemical composition

บทนำ

การเพาะเลี้ยงปลาทะเลเชิงพาณิชย์ในปัจจุบันยังคงประสบปัญหาในเรื่องของอัตรารอดและคุณภาพของลูกปลาวัยอ่อน ปัจจัยสำคัญนอกจากโรคแล้ว คือ อาหาร เนื่องจากขนาดของอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อขนาดปากของลูกปลา อาหารที่อนุบาลลูกปลาวัยอ่อนมีคุณค่าทางอาหารที่ต่ำ

โคพีพอดที่ดำรงชีพอิสระมีการศึกษากันมากเพราะเป็นตัวการสำคัญในเรื่องมวลชีวภาพในระบบนิเวศในมวลน้ำทะเลโดยพบว่าโคพีพอดเป็นองค์ประกอบสูงถึง 80 % ของมีโซแพลงก์ตอน (mesoplankton) (Drillet et al., 2011; Mauchline et al., 1998) โคพีพอดมีความสำคัญในการเป็นแหล่งอาหารของปลาที่กินแพลงก์ตอน (planktivorous fish) และลูกปลาวัยอ่อนหลายชนิด (ตัวอย่างเช่น Fox et al., 1999; Möllmann et al., 2004) ในต่างประเทศในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมามีความสนใจอย่างมากในการเลี้ยงโคพีพอดทะเลแบบมหภาคเพื่อใช้ในวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การศึกษาทางพิษนิเวศวิทยา โดยใช้เป็นสัตว์จำลองเพื่อการทำนายผลกระทบของสารเคมีต่อสรีรวิทยาของแพลงก์ตอนสัตว์ทะเล (Buttino et al., 2011; Gorbi et al., 2012) หรือในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นอาหารมีชีวิตสำหรับลูกปลาวัยอ่อน (Drillet et al., 2006; Kraul 2006; Olivotto et al., 2008; Buttino et al., 2011; Zhang et al., 2013) โคพีพอดมีความสามารถในการสังเคราะห์ HUFAs จากสาหร่าย ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นในการเสริมอาหาร (Kraul, 2006) การผลิตลูกปลาทะเลวัยอ่อนที่ได้ผลผลิตที่มากซึ่งเป็นผลมาจากการเพาะเลี้ยงด้วยโคพีพอด ได้แก่ ปลาเก๋า (grouper) ประเทศฟิลิปปินส์ (Toledo et al., 1999) และประเทศไต้หวัน (Liao et al., 2001) ปลากะพงแดง (red snapper) ในสหรัฐอเมริกา (Ajiboye et al., 2011 อ้างถึง Ogle et al., 2005) ปลาตาเดียว (flounder) ในประเทศฝรั่งเศส ปลาค็อด (Cod) ในประเทศนอร์เวย์ (Ajiboye et al., 2011 อ้างถึง Støttrup, 2003)

โคพีพอดเป็นอาหารมีชีวิตตัวเลือกหนึ่งที่มีคุณค่าอาหารที่สูงสำหรับการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อน ถึงแม้ว่าตั้งแต่ช่วงปี1960 การเพาะเลี้ยงโคพีพอดเพิ่มขึ้นและเป็นไปได้สูงขึ้นโดยมีรายงานว่าโคพีพอดจำนวนสูงถึง 60 ชนิดประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงแล้ว (Drillet et al., 2011 อ้างถึง Mauchline et al., 1998) อย่างไรก็ตามยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของระบบการเลี้ยงเพื่อผลิตตัวอ่อนโคพีพอดอย่างต่อเนื่องและเพียงพอต่อความต้องการของตลาดการเพาะเลี้ยงลูกปลา อัตราผลิตไข่ จำนวนไข่ที่สามารถฟักออกเป็นตัว เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงศักยภาพกำลังการผลิตตัวอ่อนโคพีพอดชนิดนั้นๆ นอกจากนั้นข้อมูลในเรื่ององค์ประกอบทางชีวเคมีของโคพีพอดยังคงมีน้อย โคพีพอดชนิดเดียวกันแต่คนละสายพันธุ์ (strain) หรือสถานที่พบและให้อาหารชนิดเดียวกันกลับพบว่ามีคุณสมบัติทางชีวเคมียังแตกต่างกัน

ฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดเป็นโคพีพอดที่อยู่เหนือหรือบนหน้าดิน (epi-benthic copepod) ที่หลายกรณีมีระยะนอเพลียสว่ายอยู่ในมวลน้ำ บางชนิดดำรงชีพเป็นแพลงก์ตอน (planktonic harpacticoid copepod) ได้แก่ สกุล *Euterpina*, *Microsetella* เป็นต้น นอกจากนั้นฮาร์แพคติคอยด์

โคพีพอดมีความอ่อนไหวน้อยกว่าและทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมได้ดีกว่าคาลานอยด์โคพีพอด เช่น สามารถทนความเค็มในช่วง 15-70 มิลลิกรัมต่อกรัม อุณหภูมิได้ในช่วง 17-30 องศาเซลเซียส (Delbare et al., 1996) มีการยืนยันถึงคุณค่าทางอาหารที่สูงของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดที่สูงกว่าอาร์ทีเมียและโรติเฟอร์มาก (Cutts, 2003; Drillet et al., 2011) ฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดมีกำลังการขยายพันธุ์ที่สูงกว่าคาลานอยด์โคพีพอด (Delbare et al., 1996) ฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดส่วนใหญ่สามารถเลี้ยงได้ในความหนาแน่นที่สูง จาก 10,000 ถึง 400,000 ตัว/ลิตร ในถังเลี้ยงขนาดใหญ่ที่มีอัตราส่วนของพื้นที่ต่อปริมาตรที่สูง (Drillet et al., 2011 อ้างถึง Støttrup, 2003) ฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดเป็นโคพีพอดกลุ่มหนึ่งที่มีรายงานว่าเป็นอาหารที่มีขนาดและคุณค่าทางอาหารที่สูงเหมาะกับการเลี้ยงลูกปลาวัยอ่อน (ตัวอย่างเช่น Ajiboye et al., 2011; Drillet et al., 2011) ฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดสามารถกินอาหารได้หลายชนิด ได้แก่ สาหร่ายขนาดเล็ก แบคทีเรีย เศษซาก (detritus) หรืออาหารสำเร็จรูป (Delbare et al., 1996) อย่างไรก็ตามการศึกษาและการเพาะเลี้ยงฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดยังมีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับโคพีพอดกลุ่มอื่นๆ

การศึกษาฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดในบริเวณน้ำกร่อยและทะเลของประเทศไทยได้รับความสนใจน้อยและมีข้อมูลจำกัด โดยเกือบทั้งหมดเป็นข้อมูลจากการศึกษาแพลงก์ตอนสัตว์โดยรวมและการศึกษาเกี่ยวกับการแพร่กระจายและความหลากหลายของโคพีพอด (ตัวอย่างเช่น สุนีย์ 2523; พรเทพ 2547; Maiphae & Sa-ardrit, 2011) ในประเทศไทยการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน เช่น ลูกปลากะพงขาว ลูกปลากะรัง ลูกปู ลูกกุ้งทะเล มีการให้โรติเฟอร์ (*Brachionus* sp.) ไรน้ำเค็ม (*Artemia* sp.) เป็นอาหารเนื่องจากง่ายในการเตรียม อย่างไรก็ตามคุณค่าทางอาหารที่จำเป็นของค่อนข้างต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันที่จำเป็น (long chain fatty acids) ได้แก่ 20:4 ω6, 20:5 ω3, และ 22:6 ω3 (Han et al., 2000) ฮาร์แพคติคอยด์ทะเลสกุล *Euterpina* เป็นสกุลที่พบได้ทั่วไปตามแนวชายฝั่งของประเทศไทย (สุนีย์ 2523; บัณฑิต 2545; พรเทพ 2547; Maiphae & Sa-ardrit, 2011) ฮาร์แพคติคอยด์สกุลนี้อาจเป็นอีกทางเลือกของอาหารมีชีวิตที่อาจมีคุณค่าทางอาหารที่สูงกว่าและมีกำลังผลิตที่เพียงพอ สามารถนำมาใช้ทดแทนโรติเฟอร์และไรน้ำเค็มสำหรับการอนุบาลลูกปลาทะเลวัยอ่อนของประเทศไทย นอกจากนั้นยังไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงหรือใช้ฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเลเป็นอาหารมีชีวิตแก่สัตว์น้ำวัยอ่อนทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับมหภาคในประเทศไทย

มีรายงานเกี่ยวกับชนิดของอาหารมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการผลิตไข่ การฟักไข่ในโคพีพอดหลายชนิด ได้แก่ *Acartia sinjiensis* (Milione & Zeng 2007), *A. tonsa* (Dana) (Zhang et al., 2013), *Paracalanus parvus* (Claus, 1863) (Jeyaraj & Santhanam 2013), *Bestiolina similis* (Camus et al., 2009) เป็นต้น

ดังนั้นการศึกษาอิทธิพลของอาหารที่แตกต่างกันต่ออัตราการผลิตไข่และองค์ประกอบทางชีวเคมีของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเลสกุล *Euterpina* เป็นข้อมูลที่จำเป็นเพื่อใช้ในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงแบบมหภาคของอาหารมีชีวิตสำหรับการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน และถือเป็นอาหารมีชีวิตทางเลือกหนึ่งเพื่อเพิ่มผลผลิตลูกพันธุ์สัตว์น้ำที่มีคุณภาพ ซึ่งช่วยส่งเสริมศักยภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของอาหารที่แตกต่างกันต่ออัตราการผลิตไข่ของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเลสกุล *Euterpina* ในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีของฮาร์แพคติคอยด์โคพิพอดทะเลสกุล *Euterpina* ในห้องปฏิบัติการ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

คัดแยกฮาร์แพคติคอยด์โคพิพอดทะเลสกุล *Euterpina* จากพื้นที่ชายฝั่ง จังหวัดตรัง นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารเลี้ยงที่แตกต่างกัน ศึกษาอัตราการผลิตไข่และองค์ประกอบทางเคมีของฮาร์แพคติคอยด์โคพิพอดทะเลสกุล *Euterpina* ในห้องปฏิบัติการ

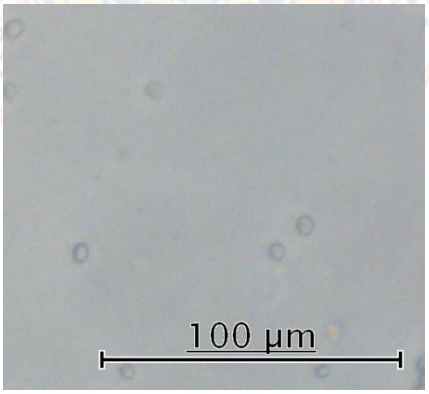
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมอาหารสำหรับการเลี้ยงฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอด *Euterpina acutrifrons* แบบ Stock culture และการทดลอง

1.1 แพลงก์ตอนพืช *Isochrysis galbana Tetraselmis suecica Dunaliella* sp. และ *Chaetoceros calcitrans* เลี้ยงในอาหาร Conway (Walne, 1974) อุณหภูมิในห้องเลี้ยงแพลงก์ตอน 25±1 องศาเซลเซียส ความเค็ม 25±3 psu ความเข้มแสง 50 μmol photons m^{-2} s^{-1} หรือ 3, 700lux โดยให้แสง: มืด ในอัตรา 12 : 12 ชั่วโมง น้ำทะเลสำหรับเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชผ่านกระบวนการกรองผ่านกระบอกกรอง 5, 1 μm ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 แพลงก์ตอนพืชสำหรับเป็นอาหารของ *E. acutrifrons*

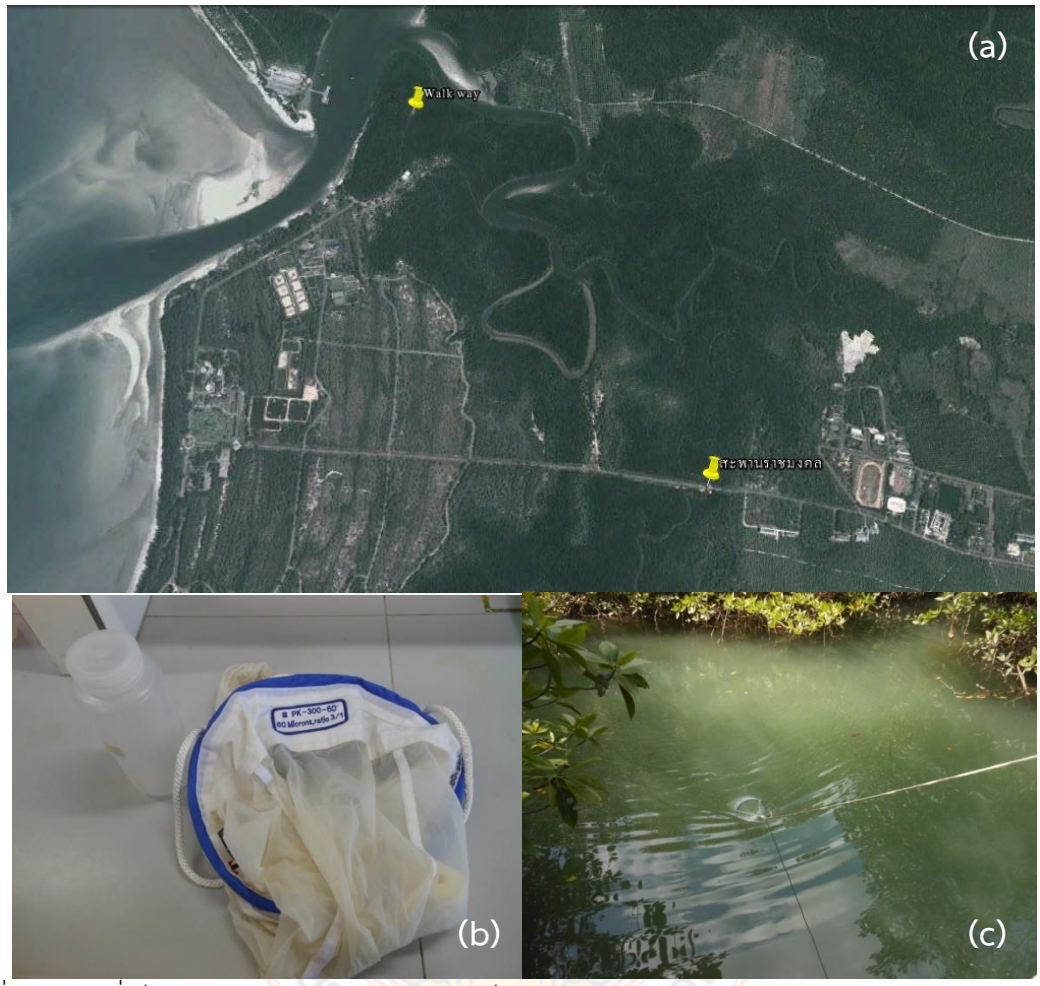
1.2 ยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*) ก่อนการทดลองนำยีสต์แช่น้ำทะเลกรองผ่านตาข่ายขนาดตา 1 μm ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 0.4 g L^{-1} เพื่อกระตุ้นให้ยีสต์ทำงานเป็นเวลาอย่างน้อย นาที 30 (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ลักษณะเซลล์ของยีสต์ขนมปังสำหรับเป็นอาหารของ *E. acutrifrons*

2. การเพาะเลี้ยงฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเลสกุล *E. acutrifrons*

2.1 เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์จากจากบริเวณป่าชายเลนและชายฝั่ง อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง โดยใช้ถุงลากแพลงก์ตอนขนาดตา 60 μm โดยใช้ลากจากพื้นท้องน้ำสู่ผิวน้ำ (ภาพที่ 3) ตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์ที่ได้จะใส่ในถังน้ำที่ใส่น้ำจากบริเวณที่เก็บตัวอย่างมีการให้อากาศตลอดเวลา และขนย้ายตัวอย่างกลับไปยังห้องเพาะเลี้ยงสาหร่าย ณ หน่วยวิจัยเพาะเลี้ยงหอยทะเล



ภาพที่ 3 สถานที่เก็บตัวอย่างและอุปกรณ์ (a) จุดเก็บตัวอย่าง *Euterpina* sp. บริเวณคลองในป่าชายเลนในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง ; (b) ถุงลากแพลงก์ตอนขนาดตา 60 μm ที่ใช้เก็บตัวอย่าง *Euterpina* sp. ; (c) การเก็บตัวอย่าง *Euterpina* sp. โดยการลากถุงลากแพลงก์ตอนจากพื้นท้องน้ำสู่ผิวน้ำ

2.2 การคัดแยกฮาร์แพคติคอยด์ทะเลสกุล *Euterpina* โดยทำการจำแนกฮาร์แพคติคอยด์ทะเลสกุล *Euterpina* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ยี่ห้อ Olympus รุ่น SZ-40 โดยจำแนกชนิดตามคู่มือของ Goswami (1976) พบว่าสกุล *Euterpina* ที่พบในบริเวณนี้มีเพียงชนิด (species) เดียว คือ *Euterpina acutrifrons* ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะระบุชนิด *E. acutrifrons* แทนสกุล *Euterpina*

ทำการคัดแยกฮาร์แพคติคอยด์ทะเล *E. acutrifrons* ในระยะตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีถุงไข่ (gravid female) และเพศผู้ ครั้งละ 1 ตัว (single cell isolation technique) ใส่ลงในขวดเลี้ยงขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีปริมาตรอาหารเลี้ยง 50 มิลลิลิตร โดยอาหารที่เลี้ยงสำหรับ stock culture ของ *E. acutrifrons* เป็นแพลงก์ตอนพืช *I. galbana* หรือ *I. galbana* ผสมกับ *T. suecica* เป็นอาหาร อุณหภูมิในห้องเลี้ยงแพลงก์ตอน 25$\pm$3 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 50 μmol photons m^{-2} s^{-1} หรือ 3, 700 lux โดยให้แสง: มืด ในอัตรา 12 : 12 ชั่วโมง และให้อากาศตลอดเวลา จนได้จำนวนตัวที่หนาแน่น ทำการย้ายไปเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 250 มิลลิลิตร, 1 ลิตร และขวด 5 ลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4 การคัดแยกสำหรับการเพาะเลี้ยง *E. acutrifrons* (a) การแยก *E. acutrifrons* โดยใช้การจับทีละตัว; (b) การเริ่มต้น stock culture ของ *E. acutrifrons* ในห้องปฏิบัติการ

3. ทดลองอิทธิพลของอาหารต่ออัตราการผลิตไข่ของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอด *E. acutrifrons*

เมื่อได้ประชากรของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutrifrons* ที่อยู่ในระยะโตเต็มวัย เลือกฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดเพศผู้และเมียที่สุขภาพแข็งแรง โดยดูจากการมีรยางค์ที่สมบูรณ์และว่ายน้ำตลอดเวลา

3.1 ศึกษาอิทธิพลของอาหารต่ออัตราการกินอาหารของ *E. acutrifrons*

เมื่อได้ประชากรของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอด *E. acutrifrons* ที่อยู่ในระยะโตเต็มวัย คัดเลือกตัวเต็ม *E. acutrifrons* ตัวผู้ 3 ตัว ตัวเมีย 3 ตัว โดยใส่ *E. acutrifrons* 1 ตัว/หลอดทดลอง ในหลอดทดลองที่มีความจุ 125 มิลลิลิตรซึ่งมีอาหารเลี้ยงบรรจุอยู่ 25 มิลลิลิตร (ภาพที่ 5) โดยอาหารเป็นแพลงก์ตอนพืชและยีสต์ขนมปัง ที่ระดับความเข้มข้นของเซลล์อาหารที่แตกต่างกันดังนี้ 500, 700, 1,000, 1,500, 10,000 และ 20,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ พร้อมทั้งชุดควบคุมที่มีเฉพาะอาหารไม่มี *E. acutrifrons* ดำเนินการทดลอง 3 รอบ ในแต่ละความเข้มข้นของเซลล์อาหารในแต่ละชุด *E. acutrifrons* จะถูกเลี้ยงโดยอาหารในแต่ละชุดก่อนการทดลองเป็นเวลา 2 วัน เพื่อปรับสภาพฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดให้คุ้นเคยกับอาหาร ทำการทดลองทั้งหมด 4 ชุดการทดลอง โดยกำหนดชนิดของชุดอาหารแต่ละชุดในการทดลอง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สูตรอาหารที่ใช้ทดลองอัตราการกินอาหารของ *E. acutrifrons*

สูตรอาหาร	องค์ประกอบ	สัดส่วน
ชุดที่ 1	*Isochrysis galbana*	
ชุดที่ 2	*I. galbana* กับ *Tetraselmis suecica*	1:1
ชุดที่ 3	*I. galbana* กับ *Dunaliella* sp.	1:1
ชุดที่ 4	*I. galbana* กับ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*)	1:1

ในการทดลองหลอดตัวอย่างทั้งหมดจะถูกพลิกไปมาทุก 4 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการตกตะกอนของอาหาร ภายใต้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง:มืด 12 ชั่วโมง ความเค็มที่ 32 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาการทดลองในแต่ละชุดทั้งหมด 24 ชั่วโมง สุ่มเก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ทำการเก็บรักษาตัวอย่างด้วยฟอร์มาลินที่เป็นกลาง 5 % ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ทำการนับเซลล์อาหารโดยใช้ Sedgewick Rafter Cell และ Hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบประกอบ (Olympus CH30) นับเซลล์อาหารเริ่มต้นก่อนการทดลองและนับเซลล์อาหารสุดท้ายหลังสิ้นสุดการทดลอง

ภาพที่ 5 สภาวะการทดลองอัตราการกินอาหารของตัวเต็มวัย *E. acutrifrons*

อัตราการกินอาหาร (*U*) จะขึ้นอยู่กับปริมาณเหยื่อ (*x*) ซึ่งถูกประมาณค่าโดย คำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\frac{dx}{dt} = \mu_x - U_y$$

$$\frac{dy}{dt} = \mu_y y$$

อัตราการกินอาหารของ *Euterpina* sp. ถูกคำนวณภายใต้สมมติฐานว่าผู้ล่า (*y*) และเหยื่อ (*x*) เจริญเติบโตในระยะ exponential อย่างคงที่ เท่ากับ μ_y และ μ_x ตามลำดับ โดยการลดลงของเหยื่อเกิดจากการกิน U_y อัตราการกินนี้คำนวณโดยใช้ซอฟท์แวร์ “Prey” (โดย B. Vismann) ที่อธิบายใน Jakobsen and Hansen (1997)

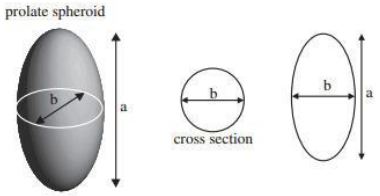
3.2 ศึกษาอิทธิพลของอาหารต่ออัตราการผลิตไข่ของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutrifrons*

ทำการคัดเลือก *E. acutifrons* เพศเมียและเพศผู้ที่แข็งแรงจำนวน 40 คู่ โดยดูจากรยางค์ที่สมบูรณ์และการว่ายน้ำตลอดเวลา ใส่ในขวดชมพู่ 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำทะเลกรองผ่านชุดกรองที่มีขนาดตา 1µm และผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ปรับความเค็มให้ได้ 25 psu ปริมาตร125 มิลลิลิตร โดยสภาวะในการทดลองให้แสงที่มีความเข้มแสง 3700 lux โดยใช้แสงสว่าง: มืด เวลา 12:12 ชั่วโมง โดยในน้ำทะเลดังกล่าวมีอาหารเป็นแพลงก์ตอนพืชและยีสต์ขนมปัง ที่ระดับความเข้มข้น 200,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีชุดควบคุมที่ไม่มี *E. acutifrons* ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีอาหาร 6 ชุดดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สูตรอาหารที่ใช้ทดลองอัตราการผลิตไข่ของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutrifrons*

สูตรอาหาร	องค์ประกอบ	สัดส่วน
ชุดที่ 1	*I. galbana* กับ *Chaetoceros calcitrans*	1:1
ชุดที่ 2	*I. galbana* กับ *T. suecica*	1:1
ชุดที่ 3	*T. suecica* กับ *C. calcitrans*	1:1
ชุดที่ 4	*I. galbana* กับ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*)	1:1
ชุดที่ 5	*C. calcitrans* กับ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*)	1:1
ชุดที่ 6	*T. suecica* กับ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*)	1:1

ให้อาหารและตรวจเช็คทุกวันเป็นระยะเวลา 32 วัน โดยการสุ่มออกมา 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง *E. acutifrons* ที่ได้รับการผสมพันธุ์ จะมีการสร้างถุงไข่และไข่ นำตัวเมียที่มีไข่ (gravid female) นำไปใส่ในขวดขนาด 10 มิลลิลิตร หยดฟอร์มาลินที่เป็นกลางที่ความเข้มข้น 5 % ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทำการวัดขนาดถุงไข่ *E. acutifrons* คำนวณขนาดถุงไข่โดยใช้สูตรขนาดรูปทรงกระสวย (polate) ตาม Hillebrand et al. (1999) และบันทึกข้อมูลจำนวนไข่ต่อตัวเมียโดยทำการนับจำนวนไข่ในถุงไข่ในแต่ละตัว



$$V = \frac{\pi}{6} \times b^2 \times a$$

เมื่อ V คือ ปริมาตร
b คือ เส้นผ่านศูนย์กลาง
a คือความสูง

นับจำนวนไข่ในถุงโดยใช้เข็มเขี่ย เพื่อให้ถุงไข่ขาดออกจากตัวแม่ และสุ่มวัดขนาดไข่ 5 ฟอง/ตัวเมีย ในแต่ละซ้ำ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ Olympus IX70 คำนวณโดยใช้รูปทรงกลม (sphere) ตามสูตรของ Hillebrand et al. (1999)

$$V = \frac{\pi}{6} \times d^3$$

เมื่อ V คือ ปริมาตร และ a คือ เส้นผ่านศูนย์กลาง

4. ศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ทำการเพาะเลี้ยง *E. acutifrons* ในถังเลี้ยงความจุ 50 ลิตร โดยให้สูตรอาหารดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สูตรอาหารที่ใช้ทดลององค์ประกอบทางชีวเคมีของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutrifrons*

สูตรอาหาร	องค์ประกอบ	สัดส่วน
ชุดที่ 1	*I. galbana* กับ *C. calcitrans*	1:1
ชุดที่ 2	*I. galbana* กับ *T. suecica*	1:1
ชุดที่ 3	*T. suecica* กับ *C. calcitrans*	1:1
ชุดที่ 4	*I. galbana* กับ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*)	1:1
ชุดที่ 5	*T. suecica* กับ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*)	1:1
ชุดที่ 6	*I. galbana* กับ *Schizochytrium limacinum*	1:1

โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์อาหารอยู่ที่ 100,000 เซลล์/มล. โดยให้อาหารและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกๆ 2 วัน โดยใช้เวลาเลี้ยง 7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บเกี่ยวโดยใช้ถุงแพลงก์ตอนที่มีขนาดตา 60 µm หลังจากนั้นเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่ได้จะถูกส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด โดยวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ยี่ห้อ Agilent model SL G1956 B, Agilent Technologies, USA และวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography ยี่ห้อ Agilent Model 6890, Agilent Technologies, USA)

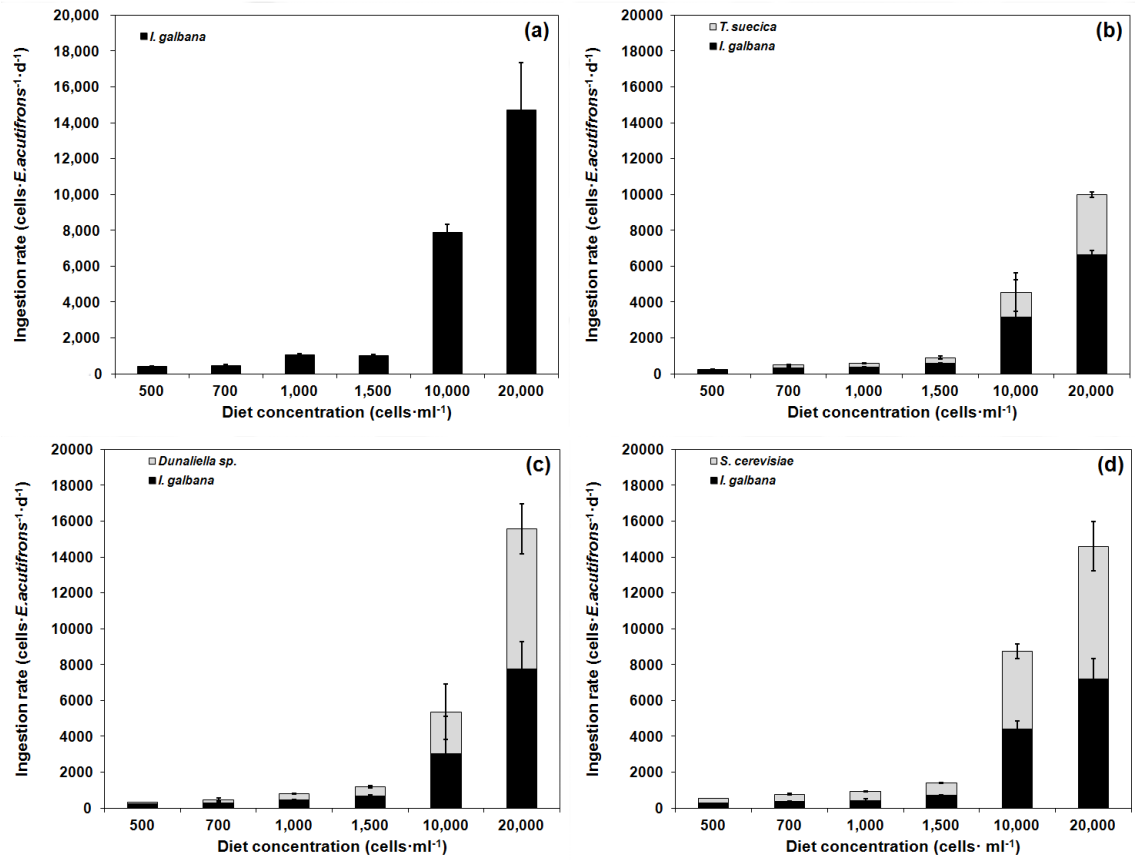
5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลอัตราการกินอาหาร ผลิตไข่ ปริมาตรไข่ ปริมาตรถุงไข่ สัดส่วนของกรดไขมัน และกรดอะมิโนในฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutifrons* มาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One-way ANOVA หากพบว่ามีความแตกต่างจะมีการทดสอบค่าเฉลี่ยโดยการใช้วิธี Tukey’s multiple comparisons

ผลการศึกษา

1. อิทธิพลของอาหารต่ออัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons*

E. acutifrons สามารถกินอาหารได้ทุกชนิดในการทดลองนี้ ซึ่งได้แก่ *I. galbana*, *T. suecica*, *Dunaliella* sp. และยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*) โดยไม่แสดงถึงความชอบในอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งอย่างชัดเจน (ภาพที่ 6)

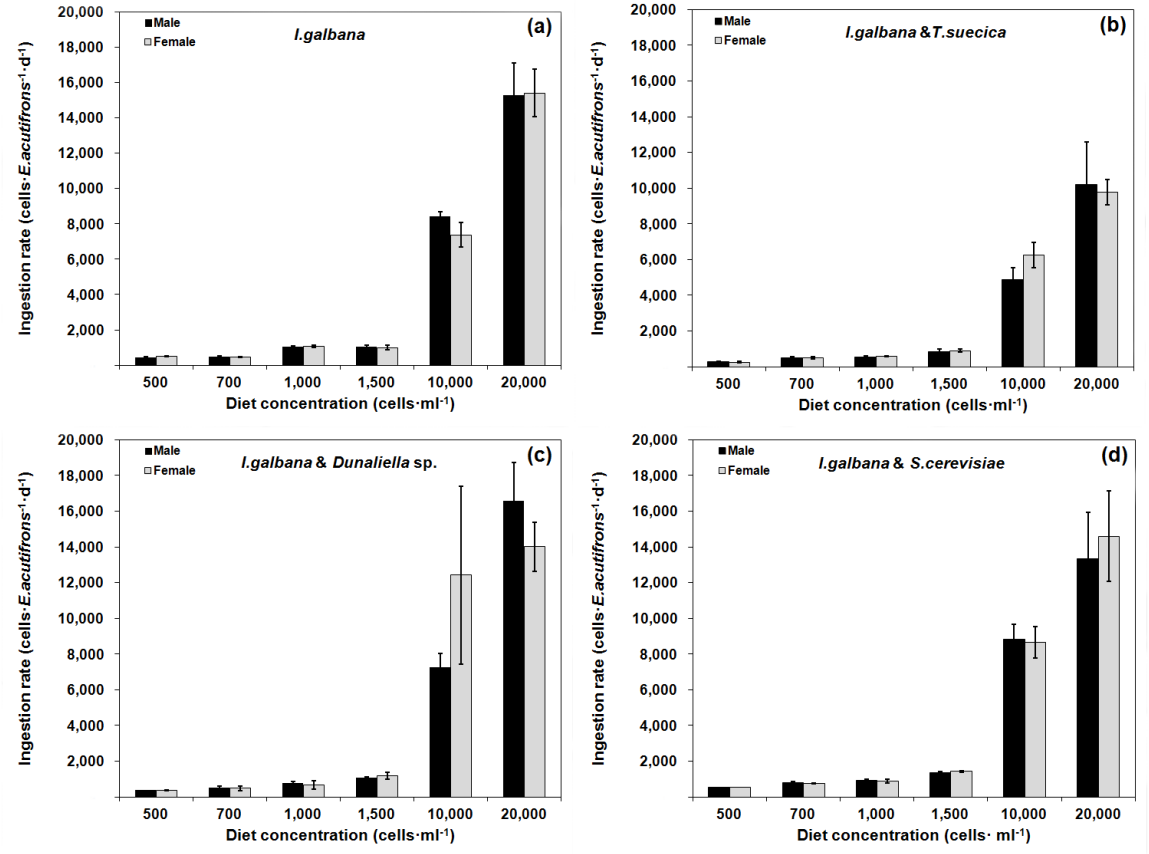


ภาพที่ 6 อัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons* ในอาหารชนิดต่างๆและระดับความเข้มข้นของอาหารที่ต่างกัน (a) *I. galbana* (b) *I. galbana* และ *T. suecica* (c) *I. galbana* และ *Dunaliella* sp. (d) *I. galbana* และ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*)

อัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons* เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของอาหารในทุกชนิดของอาหารทดลอง ($p< 0.05$) (ภาพที่ 6 และ 7) ที่ระดับความเข้มข้นของอาหาร 20,000 cell ml^{-1} พบค่าเฉลี่ยของอัตราการกินต่ำสุด ($1.00\times10^{4}\pm1.61\times10^{2}$ cells *E. acutifrons*$^{-1}$ day^{-1}) ในอาหารผสมระหว่าง *I. galbana* และ *T. suecica* ในขณะที่พบอัตราการกินอาหารสูงสุดเท่ากับ 1.55

$\times 10^{4} \pm 2.83 \times 10^{3}$ cells *E. acutifrons*$^{-1}$ day^{-1}เมื่อ *E. acutifrons* กินอาหารผสมระหว่าง *I. galbana* และ *Dunaliella* sp.

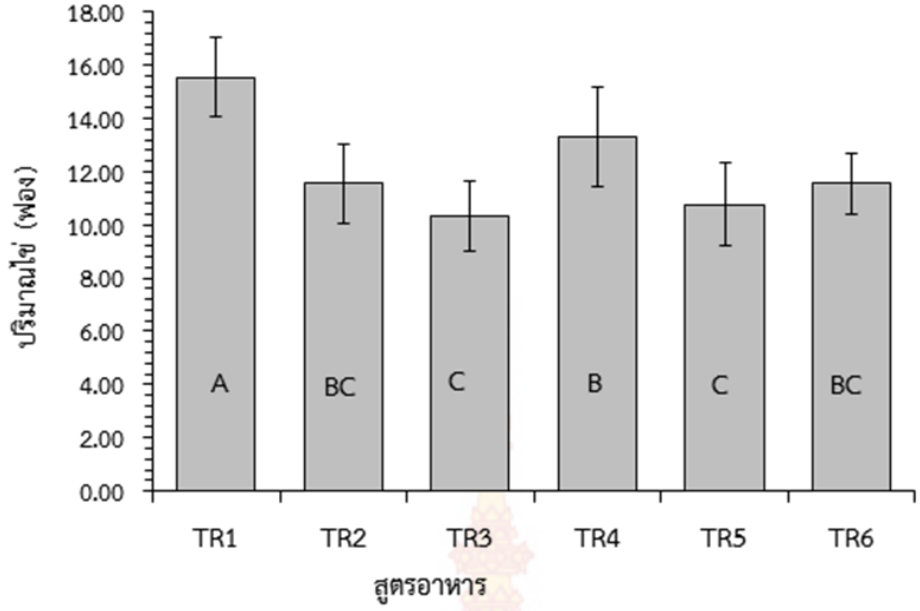
เพศที่แตกต่างกันของ *E. acutifrons* ไม่แสดงอิทธิพลต่ออัตราการกินอาหาร ($p>0.05$) *E. acutifrons* แสดงอัตราการกินอยู่ระหว่าง 4.45×10^{2} ถึง 1.53×10^{4} cells *E. acutifrons*$^{-1}$ day^{-1} ในขณะเพศเมีย *E. acutifrons* แสดงอัตราการกินอยู่ระหว่าง 5.08×10^{2} ถึง 1.54×10^{4} cells *E. acutifrons*$^{-1}$ day^{-1} เมื่อกินอาหาร *I. galbana* ที่มีระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 7a). อัตราการกินอาหารของเพศผู้และเพศเมียของ *E. acutifrons* เมื่อกินอาหารผสมระหว่าง *I. galbana* และ *T. suecica* มีค่าอยู่ระหว่าง 2.68×10^{2} ถึง 1.02×10^{4} cells *E. acutifrons*$^{-1}$ day^{-1} และจาก 2.41×10^{2} ถึง 9.78×10^{3} cells *E. acutifrons*$^{-1}$ day^{-1}, ตามลำดับ (ภาพที่ 7b) *E. acutifrons* เพศผู้กินอาหารผสมระหว่าง *I. galbana* และ *Dunaliella* sp. พบอัตราการกินอาหารอยู่ระหว่าง 3.79×10^{2} ถึง 1.66×10^{4} cells *E. acutifrons*$^{-1}$ day^{-1} และเพศเมีย *E. acutifrons* แสดงอัตราการกินอาหารมีค่าระหว่าง 3.50×10^{2} ถึง 1.40×10^{4} cells *E. acutifrons*$^{-1}$ day^{-1} (ภาพที่ 7c) อัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons* เพศผู้และเพศเมียที่กินอาหารผสม *I. galbana* และยีสต์ขนมปัง มีอัตราตั้งแต่ 5.28×10^{2} ถึง 1.33×10^{4} cells *E. acutifrons*$^{-1}$ day^{-1} และจาก 5.20×10^{2} ถึง 1.46×10^{4} cells *E. acutifrons*$^{-1}$ day^{-1}, ตามลำดับ (ภาพที่ 7d)



ภาพที่ 7 อัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons* เพศผู้และเพศเมียในอาหารชนิดต่างๆและระดับความเข้มข้นของอาหารที่ต่างกัน a) *I. galbana* (b) *I. galbana* และ *T. suecica* (c) *I. galbana* และ *Dunaliella* sp. (d) *I. galbana* และ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*)

2. อิทธิพลของอาหารต่ออัตราการผลิตไข่ของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutifrons*

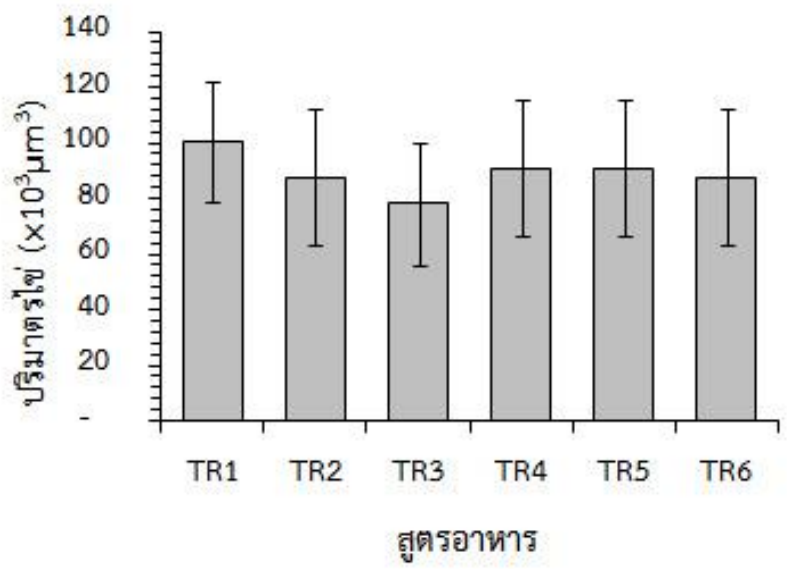
ผลการศึกษาจำนวนไข่ที่ตัวเมียผลิตได้ต่อครั้งของ *E. acutifrons* เปลี่ยนแปลงตามชนิดอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อได้รับอาหารที่มีความเข้มข้น 200,000 cell ml^{-1} จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าจำนวนไข่ที่ตัวเมียผลิตได้ต่อครั้งของ *E. acutifron* อยู่ระหว่าง 10 ฟอง ถึง 16 ฟอง (ภาพที่ 8) โดย *E. acutifrons* กินอาหารผสม *I. galbana* กับ *C. calcitrans* จำนวนไข่ที่ตัวเมียผลิตได้ต่อครั้งสูงที่สุด และเมื่อ *E. acutifrons* ได้รับ *I. galbana* กับ *S. cerevisiae* (TR 4) สามารถผลิตไข่ได้รองลงมา ในขณะที่เมื่อ *E. acutifrons* ได้รับ *T. suecica* กับ *C. calcitrans* พบมีจำนวนไข่ที่ตัวเมียผลิตได้ต่อครั้งน้อยที่สุด ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันกับเมื่อ *E. acutifrons* ได้รับอาหารในสูตรที่ 5 คืออาหารผสม *C. calcitrans* กับ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*) และสูตรอื่นๆที่เหลือ



ภาพที่ 8 จำนวนไข่ที่ตัวเมียผลิตได้ต่อครั้งของ *E. acutifron* เมื่อได้รับอาหารชนิดต่างๆ

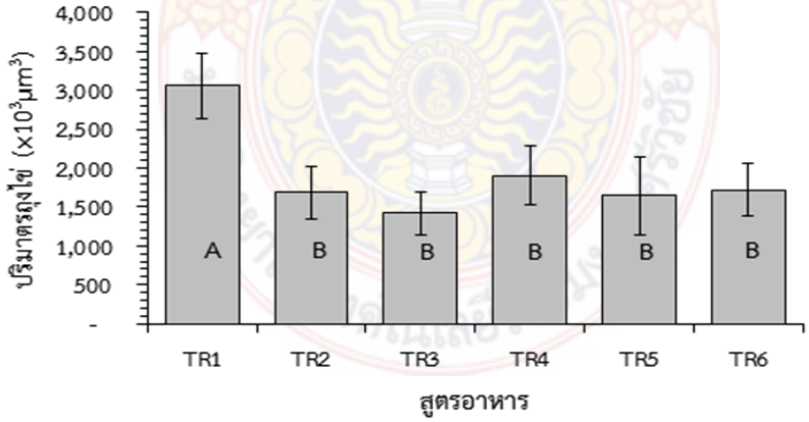
หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน (a, b, c) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษาปริมาตรไข่ที่ตัวเมียผลิตของ *E. acutifrons* ไม่เปลี่ยนแปลงตามชนิดอาหาร เมื่อได้รับอาหารที่มีความเข้มข้น 200,000 cell ml^{-1} จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาตรไข่ที่ตัวเมียผลิตของ *E. acutifrons* อยู่ระหว่าง $7.81\times10^{4} \pm 2.18\times10^{4}$ μm^{3} ถึง $1.00\times10^{5} \pm 2.18\times10^{4}$ μm^{3} (ภาพที่ 9) โดย *E. acutifrons* กินอาหารผสม *I. galbana* กับ *C. calcitrans* ปริมาตรไข่ที่ตัวเมียผลิตสูงที่สุด ในขณะที่เมื่อ *E. acutifrons* ได้รับอาหารผสม *T. suecica* กับ *C. calcitrans* ปริมาตรไข่ที่ตัวเมียผลิตต่ำที่สุด



ภาพที่ 9 ปริมาตรไข่ที่ตัวเมียผลิตของ *E. acutifron* เมื่อได้รับอาหารชนิดต่างๆ

ผลการศึกษาปริมาตรถุงไข่ที่ตัวเมียผลิตของ *E. acutifrons* เปลี่ยนแปลงตามชนิดอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อได้รับอาหารที่มีความเข้มข้น 200,000 cell ml^{-1} พบว่าปริมาตรถุงไข่ที่ตัวเมียผลิตของ *E. acutifrons* อยู่ระหว่าง $1.42\times10^{6} \pm 2.80\times10^{5}$ μm^{3} ถึง $3.06\times10^{6} \pm 4.19\times10^{5}$ μm^{3} (ภาพที่ 10) โดย *E. acutifrons* กินอาหารผสม *I. galbana* กับ *C. calcitrans* ปริมาตรถุงไข่ที่ตัวเมียผลิตสูงที่สุด ในขณะที่เมื่อ *E. acutifrons* ได้รับอาหารอื่นๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน



ภาพที่ 10 ปริมาตรถุงไข่ที่ตัวเมียผลิตของ *E. acutifron* เมื่อได้รับอาหารชนิดต่างๆ

<u>หมายเหตุ</u> ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน (a, b) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. องค์ประกอบทางชีวเคมีของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอด *E. acutifrons* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารต่างกัน 6 สูตรที่มีสาหร่ายเซลล์เดียว ได้แก่ *I.galbana T. suecica C. calcitrans* ยีสต์ *S. cerevisiae* และ *S. limacinum* ได้แก่ ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน (ตารางที่ 4) ชนิดและสัดส่วนของกรดไขมัน (ตารางที 5)

ผลการศึกษาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่พบใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารต่างกัน 6 สูตร ครั้งนี้พบกรดอะมิโนที่จำเป็นจำนวน 10 ชนิดใน *E. acutifrons* จากการเลี้ยงในทุกสูตรอาหารและกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น 9 ชนิดใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร คือ TR1 (*I. galbana* กับ *C. calcitrans*) TR2 (*I. galbana* กับ *T. suecica*) TR3 (*T. suecica* กับ *C. calcitrans*) และ TR6 (*I. galbana* กับ *S. limacinum*) ในขณะที่ *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร TR4 (*I. galbana* กับยีสต์ *S. cerevisiae*) และ TR5 (*T. suecica* กับยีสต์ *S. cerevisiae*) กลับพบกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นเพียง 8 ชนิด

ผลการศึกษาครั้งนี้ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดที่พบใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 6 สูตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.5$) โดยพบว่า *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร TR5 (*T. suecica* กับยีสต์ *S. cerevisiae*) มีปริมาณกรดอะมิโนสูงสุด และพบปริมาณกรดอะมิโนต่ำสุดใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร TR2 (*I. galbana* กับ *T. suecica*) ในขณะที่ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 6 สูตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.5$) โดยพบว่า *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร TR5 (*T. suecica* กับยีสต์ *S. cerevisiae*) มีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นสูงสุด และพบปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่ำสุดใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร TR6 (*I. galbana* กับ *S. limacinum*)

สัดส่วนโดยปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นสูงกว่ากรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นเมื่อเลี้ยง *E. acutifrons* ในอาหาร 3 สูตร ดังนี้ TR 2 คือ อาหารผสมที่มี *I. galbana* กับ *T. suecica* สูตร TR 4 คือ *I. galbana* กับยีสต์ *S. cerevisiae* และ สูตร TR 5 คือ *T. suecica* กับยีสต์ *S. cerevisiae*

กลูตามีน (Glutamine) เป็นชนิดกรดอะมิโนที่พบว่ามีปริมาณสูงสุดใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร TR1 TR2 TR3 และTR6 ในขณะที่ *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร TR4 พบอาร์จินีน (Arginine) เป็นชนิดกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงสุด ในขณะที่พบ ไลซีน (Lysine) เป็นชนิดกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงสุดใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร TR5

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารแตกต่างกัน 6 สูตร

Type	Amino acid content (mg/100g DW)					
	E. acutifrons fed *I. galbana* + *C. calcitrans*	*E. acutifrons* fed *I. galbana* + *T. suecica*	*E. acutifrons* fed *T. suecica* + *C. calcitrans*	*E. acutifrons* fed fed *I. galbana* + *S. cerevisiae*	*E. acutifrons* fed fed *T. suecica* + *S. cerevisiae*	*E. acutifrons* fed *I. galbana* +*S. limacinum*
Essential amino acid						
Valine	18.90±0.64	7.67±0.56	7.88±0.40	137.29±0.14	157.75±0.29	9.81±1.24
Methionine	188.81±4.89	203.62±2.97	193.83±3.32	246.02±1.10	259.49±3.19	151.81±4.13
Lysine	66.87±3.40	100.95±1.02	126.24±5.42	234.80±1.97	261.49±1.01	88.95±2.02
Isoleucine	2.91±0.57	2.13±0.06	6.49±0.82	126.08±0.41	146.22±1.30	5.73±0.38
Leucine	6.12±0.82	21.49±0.96	32.06±0.44	150.69±3.04	184.97±0.97	28.76±1.30
Phenylalanine	4.18±0.47	9.41±0.67	15.25±0.63	128.56±0.54	161.05±2.01	15.47±0.25
Threonine	0.37±0.07	10.45±0.62	10.24±1.51	139.99±1.16	172.42±2.25	10.14±0.88
Thyptophan	29.3±0.16	26.57±0.05	28.54±0.10	122.95±0.11	128.24±0.10	27.91±0.07
Histidine	0.78±0.04	0.29±0.07	0.65±0.03	80.04±0.84	84.52±0.91	0.25±0.03
Arginine	186.07±2.11	143.12±3.13	127.08±3.20	248.70±1.61	167.50±0.84	142.22±0.98
Total Essential	504.32±6.83 [e]	525.70±5.70 [d]	548.26±8.30 [c]	1,615.12±5.81 [b]	1,723.64±4.48 [a]	481.05±6.75 [f]
Non-Essential Amino acid						
Aspartic acid	15.12±0.71	31.00±0.25	33.48±1.85	138.78±0.72	179.25±1.54	35.70±0.32
Serine	2.09±0.07	7.15±0.60	7.16±0.07	145.24±1.98	157.28±2.98	5.89±0.22

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารแตกต่างกัน 6 สูตร (ต่อ)

Type	Amino acid content (mg/100g DW)					
	E. acutifrons fed *I. galbana* + *C. calcitrans*	*E. acutifrons* fed *I. galbana* + *T. suecica*	*E. acutifrons* fed *T. suecica* + *C. calcitrans*	*E. acutifrons* fed fed *I. galbana* + *S. cerevisiae*	*E. acutifrons* fed fed *T. suecica* + *S. cerevisiae*	*E. acutifrons* fed *I. galbana* +*S. limacinum*
Glutamic acid	10.03±1.19	46.61±4.74	41.67±3.85	134.48±2.24	181.28±4.76	50.31±4.47
Glycine	23.37±1.44	28.29±0.76	44.12±0.85	163.35±1.60	187.66±1.55	38.68±0.81
Alanine	17.01±0.80	16.65±0.69	18.43±0.21	161.28±1.16	175.73±0.99	19.22±0.59
Proline	4.73±1.12	16.32±0.39	23.10±2.00	152.38±1.52	183.83±2.55	15.55±1.07
Tyrosine	3.1±0.62	2.29±0.12	6.58±0.46	134.61±1.62	171.25±1.60	0.33±0.03
Glutamine	597.6±47.60	341.05±13.09	510.37±53.83	0.00	0.00	582.74±31.96
Hydroxyproline	8.75±0.16	5.31±0.64	17.97±3.19	128.32±23.88	113.02±1.06	20.15±0.24
Total non essential	681.79±45.42[c]	495.97±17.55[d]	702.89±52.79[c]	1,162.87±22.75[b]	1,349.29±7.78[a]	768.58±36.48[c]
Total amino acid	**1,186.11±38.66**[c]	**1,018.40±18.32**[d]	**1,251.15±51.49**[c]	**2,779.94±16.08**[b]	**3,072.93±10.47**[a]	**1,249.62±39.14**[c]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน (a, b, c, d, e, f) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สัดส่วนของปริมาณกรดไขมันของ *E. acutifrons* ที่เลี้ยงสูตรอาหารแตกต่างกัน 6 สูตร พบอยู่ระหว่าง 0.0012-0.36% โดยพบสัดส่วนปริมาณกรดไขมันที่สูงที่สุดใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงสูตรอาหาร TR6 (*I. galbana* กับ *S. limacinum*) กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลัก *E. acutifrons* ที่เลี้ยงสูตรอาหารแตกต่างกัน 6 สูตร ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acids : MUFAs) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acids : PUFAs) (ตารางที่ 4) โดยพบกรดไขมันอิ่มตัว 6 ชนิดได้แก่ กรดลอริก (Lauric acid C12:0) กรดไมริสติก (Myristic acid C14:0) กรดปาล์มิติก (Palmitic acid C16:0) Heptadecanoic acid/Margaric (C17:0) กรดไขมันสเตียริก (Stearic acid C18:0) และกรดลิกโนซีริก (Lignoceric acid C24:0) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว 2 ชนิด ได้แก่ กรดไขมันปาล์มิโตเลอิก (Palmitoleic acid/ Hexadecenoic C16:1) และกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid C18:1n9c) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน 2 ชนิดได้แก่ กรดลิโนเลนิก (Linoleic acid/Octadecdienoic C18:2n6c) และ cis-11,14-Eicosadienoic acid (C20:2)

กรดปาล์มิติก (C16 : 0) เป็นชนิดกรดไขมันเด่นที่พบใน *E. acutifrons* โดยมีสัดส่วนอยู่ระหว่าง 37.86-44.37%ของกรดไขมันทั้งหมด และพบกรดไขมันสเตียริก (C18:0) เป็นชนิดเด่นรองลงมา ซึ่งกรดไขมันทั้งสองชนิดจัดเป็นกรดไขมันอิ่มตัว ในขณะที่กรดไขมันโอเลอิก (C18:1n9c) เป็นซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวเป็นกรดไขมันที่พบมากเป็นอันดับ 3 ใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงสูตรอาหาร TR1 TR2 TR3 และ TR6 ส่วน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงสูตรอาหาร TR4 และ TR5 พบกรดปาลมิโตเลอิก (C16:1) มีสัดส่วนปริมาณเป็นอันดับสาม

ผลการศึกษาครั้งนี้สัดส่วนของปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 6 สูตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.5$) โดยพบว่า *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร TR6 (*I. galbana* กับ *S. limacinum*) มีสัดส่วนของปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสุด และพบสัดส่วนของปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่ำสุดใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร TR4 (*I. galbana* กับยีสต์ *S. cerevisiae*) ในขณะที่สัดส่วนของปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 6 สูตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.5$) โดยพบว่า *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร TR4 (*I. galbana* กับยีสต์ *S. cerevisiae*) มีสัดส่วนของปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวสูงสุด และพบสัดส่วนของปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวต่ำสุดใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร TR6 (*I. galbana* กับ *S. limacinum*)

ตารางที่ 5 ชนิดและสัดส่วน (%) ของกรดไขมัน (fatty acid) ที่เป็นองค์ประกอบใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารแตกต่างกัน 6 สูตร

Component	Treatment					
	I. galbana + *C. calcitrans*	*I. galbana* + *T. suecica*	*T. suecica* + *C. calcitrans*	*I. galbana* + *S. cerevisiae*	*T. suecica* + *S. cerevisiae*	*I. galbana* + *S. limacinum*
Lauric acid (C12:0)			3.64±0.27			
Myristic acid (C14:0)			2.17±0.36	4.12±0.09	2.50±0.08	
Palmitic acid (C16:0)	42.29±1.27	40.49±0.81	38.35±0.26	37.86±0.28	44.37±0.40	38.98±1.61
Palmitoleic acid/ Hexadecenoic (C16:1)				12.28±0.12	16.35±0.22	
Heptadecanoic acid/Margaric (C17:0)				5.29±0.03	4.18±0.07	
Stearic acid (C18:0)	32.15±2.67	33.99±1.34	31.16±0.33	25.07±0.09	20.49±0.58	31.65±1.82
Oleic acid (C18:1n9c)	25.55±1.56	25.52±2.15	24.68±0.16	5.45±0.15	7.00±0.01	23.36±0.96
Linoleic acid/Octadecdienoic (C18:2n6c)						6.01±2.56
cis-11,14-Eicosadienoic acid (C20:2)				4.19±0.09	5.11±0.11	
Lignoceric acid (C24:0)				5.73±0.44		
Saturated fatty acid	74.44±1.56^{ab}	74.48±2.15^{ab}	75.32±0.16^{ab}	78.08±0.29^{a}	71.54±0.12^{b}	70.63±3.42^{b}
Monounsaturated fatty acid	25.55±1.56^{a}	25.52±2.15^{a}	24.68±0.16^{a}	17.73±0.21^{b}	23.35±0.23^{a}	23.36±0.96^{a}
Polyunsaturated fatty acid				4.19±0.09	5.11±0.11	6.01±2.56

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน (a, b) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วิจารณ์ผลการศึกษา

1. อิทธิพลของอาหารต่ออัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons*

หนึ่งในปัญหาที่สำคัญที่สุดในการเพาะเลี้ยงโคพีพอดให้ได้อย่างยั่งยืน คือ ชนิดและปริมาณของอาหารที่ต้องการสำหรับการเจริญเติบโตที่เหมาะสม (Matias-Peralta *et al.,* 2012) ผลการศึกษาของครั้งนี้แสดงว่า *E. acutifrons* สามารถกินอาหารที่ใช้ทดลองได้ คือ แพลงก์ตอนพืช ได้แก่ *I. galbana T. suecica Dunaliella* sp. และ ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Sautour and Castel (1993) ที่แสดงว่า *E. acutifrons* เป็นพวกกรองกิน (a passive filter feeder) เมื่ออาหารขนาดเล็กปรากฏ ผลการศึกษาของครั้งนี้บ่งชี้ว่ายีสต์ขนมปังมีศักยภาพใช้เป็นอาหารสำหรับ *E. acutifrons* ทำให้ลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการดูแล *E. acutifrons* ในการเพาะเลี้ยงเมื่อเปรียบเทียบกับแพลงก์ตอนพืช สอดคล้องกับการศึกษาของ Tanyaros *et al.* (2016) พบว่าหอยนางรมตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*) ระยะวัยรุ่น (juvenile) สามารถที่จะเพาะเลี้ยงโดยให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนพืชผสมด้วยยีสต์ 25%

อัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons* เพิ่มขึ้นในทุกอาหารที่ทดลองเมื่อความเข้มข้นของอาหารเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามอัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons* ยังไม่ถึงจุดคงที่ เมื่อความเข้มข้นสูงสุดของอาหารที่ให้ในการทดลองครั้งนี้ บ่งชี้ว่าอัตราการกินของ *E. acutifrons* ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ถึงอัตราการกินสูงสุด (maximum ingestion rate) สอดคล้องกับการศึกษาที่รายงานก่อนหน้านี้ใน *E. acutifrons* และโคพีพอดชนิดอื่นๆ (Sautour & Castel, 1993; Abu-Rezq *et al.*, 1997; Oliveira Lemos *et al*., 2006) โดยการศึกษาของ Oliveira Lemos *et al*., (2006) พบว่าอัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons* ที่ให้ไดอะตอม *Thalassiosira weissflogii* เป็นอาหารมีอัตราอยู่ระหว่าง 4.32×10^{3} ถึง 1.95×10^{5} cell.copepod^{-1}.d^{-1} อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้ไม่มีความแตกต่างระหว่างอัตราการกินอาหารชนิดต่างๆ และระหว่างเพศผู้และเพศเมียของ *E. acutifrons* ทั้งนี้อาจเป็นเพราะช่วงขนาดของอาหารที่ให้ในการทดลองของเราอยู่ในช่วงที่มีรายงานว่า *E. acutifrons* สามารถกินได้คือ ระหว่าง 6-16 µm และ *E. acutifrons* สามารถกินอนุภาคอื่นที่ไม่ใช่แพลงก์ตอนพืชได้อีกด้วย (Guisande *et al.,* 1996 อ้างถึง Kinne, 1977; Sautour & Castel, 1993; Díaz *et al.,* 2003) และผลการศึกษาครั้งนี้น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าอัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons* ไม่ได้รับอิทธิพลจากเพศดังเช่นที่เกิดขึ้นกับโคพีพอดชนิดอื่นๆ (Dhanker & Hwang, 2013)

2. อิทธิพลของอาหารต่ออัตราการผลิตไข่ของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutifrons*

โคพีพอดที่สร้างถุงไข่ (sac spawner) โดยทั่วไปจะมีอัตราการผลิตไข่ที่ต่ำกว่า (ต่ำกว่าได้มากถึง 7.5 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับพวกที่เป็นปล่อยไข่ (broadcast spawner) (Kiørboe & Sabatini 1995; Bunker & Hirst 2004) ในกลุ่มของโคพีพอดที่สร้างถุงไข่ (sac spawner) อัตราการผลิตไข่ของโคพีพอดโดยทั่วไปจะมีลักษณะความสัมพันธ์ในรูปไฮเปอร์โบลิคกับความเข้มข้นของอาหาร (Guisande *et al.*, 2000 อ้างถึง Checkley 1980; Runge 1985) อย่างไรก็ตามยังคงไม่กระจ่างว่าการประสบสำเร็จในการฟักของไข่ (egg hatching success) ได้รับผลกระทบจากการมีอยู่ของอาหารหรือไม่ มีผลการศึกษาที่แสดงว่าโคพีพอดบางชนิดมีลักษณะแลกกัน (trade off) ระหว่างขนาดของไข่และจำนวนของไข่ ได้แก่ Guisande *et al.,* (1996) และ Pond *et al.* (1996) ซึ่งแสดงถึงกลยุทธ์การขยายพันธุ์เพื่อให้เกิดความสำเร็จสูงสุดของการแพร่พันธุ์ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของอาหารที่ต่ำและความเข้มข้นของอาหารที่สูง (Guisande *et al.,* 2000 อ้างถึง Hutchinson 1967) ในทางตรงกันข้าม มีรายงานว่าโคพีพอด *Calanus helgolandicus* มีการประสบความสำเร็จในการฟักที่สูงขึ้นเมื่อขนาดไข่ใหญ่ขึ้น (Guisande & Harris 1995)

การศึกษาครั้งนี้พบจำนวนไข่ของ *E. acutifrons* ต่อตัวเมีย อยู่ระหว่าง 10-16 ฟองต่อถุงไข่ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Melo Júnior *et al.* (2013) ที่รายงานว่า *E. acutifrons* ภายในไหล่ทวีปนอกฝั่ง Ubatuba บริเวณตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศบราซิล มีค่าเฉลี่ยจำนวนไข่ 16.9±6.9 ฟองต่อถุงไข่ พบในช่วง 10.8±5.7 และ 30.8±7.4 ฟองต่อถึงไข่ โดยขนาดของ clutch (clutch size คือ จำนวนไข่ที่ถูกสร้างในหนึ่งครั้งโดยสัตว์ที่ออกลูกเป็นไข่) มีความสัมพันธ์ทางบวกกับอุณหภูมิและปริมาณคลอโรฟิลล์ และ Hopcroft & Roff (1996) ที่ศึกษาบริเวณรอบเกาะจาไมก้า รายงานว่าพบ *E. acutifrons* มีขนาดของ clutch 8-29 ฟอง นอกจากนั้นผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า *E. acutifrons* กินอาหารผสม *I. galbana* กับ *C. calcitrans* มีจำนวนไข่ที่ตัวเมียผลิตได้ต่อครั้งสูงที่สุดสอดคล้องกับ Guisande et al. (1999) ที่พบว่าค่าความสัมพันธ์ของการผลิตนอเพลียสที่สูงพบเมื่อ *E. acutifrons* กินอาหารเป็น *I. galbana* ที่แสดงว่าองค์ประกอบอื่นๆ ของอาหารได้แก่ ขนาดของอาหาร และองค์ประกอบของกรดไขมันเป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการผลิตโคพีพอด

ในโคพีพอดที่เป็นพวกสร้างถุงไข่ ขนาดของไข่โดยทั่วไปมักเป็นสัดส่วนความยาวของตัวเมียนอกเหนือจากอุณหภูมิ หรือน้ำหนักของตัวเมีย ในขณะที่ความดกของไข่ (fecundity) มีความสัมพันธ์ไปทางบวกกับอุณหภูมิและน้ำหนักร่างกาย (Bunker & Hirst 2004) การศึกษาครั้งนี้พบว่าไข่ของ *E. acutifrons* มีปริมาตรอยู่ระหว่าง $7.81\times10^{4} \pm 2.18\times10^{4}$ μm^{3} ถึง $1.00\times10^{5} \pm 2.18\times10^{4}$ μm^{3} ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Melo Júnior *et al.* (2013) พบว่า *E. acutifrons* ภายในไหล่ทวีปนอกฝั่ง Ubatuba บริเวณตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศบราซิล มีขนาดไข่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 53.1±2.9

μm โดยพบค่าอยู่ระหว่าง 39.3-71.9 μm โดยมีปริมาตรของไข่เฉลี่ย $79.39\times10^{3}\pm13.48\times10^{3}$ μm^{3} ซึ่งพบปริมาตรไข่อยู่ระหว่าง 57.19×10^{3} - 132.18×10^{3} μm^{3}

ปริมาตรถุงไข่ที่ตัวเมียผลิตของ *E. acutifrons* อยู่ค่าเฉลี่ยจากอาหารทั้งหกสูตรเท่ากับ $1.91\times10^{6}\pm6.53\times10^{5}$ μm^{3} โดยปริมาตรถุงไข่ของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอด *E. acutifrons* สูงสุดในอาหารTR 1 *I. galbana* กับ *C. calcitrans* มีปริมาตรถุงไข่อยู่ที่ $3.06\times10^{6}\pm4.19\times10^{5}$ μm^{3} ไม่มีการรายงานเรื่องของขนาดปริมาตรถุงไข่มาก่อนใน *E. acutifrons*

3. องค์ประกอบทางชีวเคมีของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

การคัดเลือกอาหารมีชีวิต (live feed) สำหรับอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะปลาทะเลวัยอ่อน มีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง ได้แก่ ขนาดที่เหมาะสมของอาหารมีชีวิตชนิดนั้นต่อสัตว์น้ำเป้าหมาย คุณภาพของอาหารมีชีวิตที่ตรงหรือเพียงพอต่อตามความต้องการสัตว์น้ำเป้าหมายสำหรับการเจริญเติบโตและการรอดตาย การตอบสนองต่ออาหารมีชีวิต เช่น ประสิทธิภาพในการจับอาหารของสัตว์น้ำเป้าหมาย ศักยภาพอาหารมีชีวิตนั้นๆ ในการผลิตให้มีต้นทุนต่ำ เป็นต้น (Guisande et al., 1999; Bell et al., 2003; Conceição et al., 2010)

คุณภาพของอาหาร หมายถึง สัดส่วนและองค์ประกอบของโมเลกุลทางชีวภาพ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เป็นต้น หรือ แร่ธาตุ แม้จะพบว่ากรดไขมันที่เฉพาะบางชนิดมีความสำคัญ (Guisande et al., 1999 อ้างถึง Prahl et al., 1984; Jo´nasdo´ttir 1994; Jo´nasdo´ttir et al., 1995; Jo´nasdo´ttir and Kiørboe 1996; Pond et al., 1996) ไนโตรเจน (โปรตีน) ก็อาจเป็นปัจจัยจำกัดในผลผลิตของโคพีพอดด้วยเช่นกัน (Guisande et al., 1999 อ้างถึง Checkley 1980; Ambler 1986) การจำกัดของโปรตีนสามารถอธิบายได้ว่าทำไมโคพีพอดมีการกินไนโตรเจนให้ได้มากที่สุดโดยการเลือกกินเซลล์ที่มีปริมาณโปรตีนสูงกว่า (Guisande et al., 1999 อ้างถึง Cowles et al., 1988) และทำไมกรดอะมิโนถูกย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Guisande et al., 1999 อ้างถึง Cowie and Hedges 1996)

Wacker and Martin-Creuzburg (2012) ชี้ให้เห็นว่า กรดอะมิโนเป็นสารอาหารที่จำกัดได้ถูกละเลยในการศึกษาคุณภาพของอาหาร เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาในกรดไขมันและสเตอรอล อย่างไรก็ตามมีรายงานว่ากรดอะมิโนที่จำเพาะในอาหารมีความเกี่ยวพันกับความดกไข่ (fecundity) และการฟักไข่ที่สำเร็จของโคพีพอดทะเล (Guisande *et al.*, 1999; Guisande *et al.*, 2000; Helland *et al*., 2003) กรดอะมิโนอาจีนีนที่ใช้ได้เป็นปัจจัยจำกัดเนื่องจากพบในปริมาณที่ต่ำ (Anderson *et al*., 2004) โดยเปรียบเทียบโปรไฟล์ (profile) ของกรดอะมิโนของตัวโคพีพอดกับอาหารของโคพีพอด ยิ่งไปกว่านั้นกรดอะมิโนเฉพาะในอาหารโดยเฉพาะอาร์จีนีนและฮีสติดีน เกี่ยวเนื่องกับการก่อให้เกิดการสลับระหว่าง

รูปแบบการสืบพันธุ์ใน Daphnia ที่ทำให้พวกมันหลบเลี่ยงการรวมกลุ่มที่ทำการผลิต resting egg และเพื่อเพิ่มการสืบพันธุ์แบบ subitaneous reproduction (Koch *et al*., 2011)

องค์ประกอบของกรดอะมิโนของอาหารมีบทบาทสำคัญในความประสบความสำเร็จในการสืบพันธุ์ของ *E.acutifrons* (Guisande et al., 1999) การศึกษาครั้งนี้พบกลูตามีน (Glutamine) เป็นชนิดกรดอะมิโนที่พบว่ามีปริมาณสูงสุดใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของ *I. galbana T. suecica C. calcitrans* และ *S. limacinum* ในขณะที่ *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร *I. galbana* ผสมกับยีสต์ *S. cerevisiae* พบอาร์จินีน (Arginine) เป็นชนิดกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงสุด ในขณะที่พบ ไลซีน (Lysine) เป็นชนิดกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงสุดใน *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่มี *T. suecica* ผสมกับ *S. cerevisiae* ในขณะที่ Guisande et al. (1999) รายงานว่า *E. acutifrons* ตัวเมียที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดเดี่ยว ได้แก่ *I. galbana T. suecica* และ *C. calcitrans* มีสัดส่วนของกรดอะมิโนที่สูงสุด 4 ลำดับคิดเป็นค่าเฉลี่ย % ต่อน้ำหนักของกรดอะมิโนทั้งหมด คือ Glutamic acid (มีค่าอยู่ระหว่าง 14.5-14.8%) Aspartic acid (มีค่าอยู่ระหว่าง 8.2-8.5%) Tyrosine (มีค่าอยู่ระหว่าง 8.2-8.3%) อาร์จินีน (Arginine) มีค่าอยู่ระหว่าง 7.9-8.5 % ในขณะที่ไข่ของ *E. acutifrons* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดดังกล่าวมีสัดส่วนของ Glutamic acid (มีค่าอยู่ระหว่าง 14.4-15.6%) Arginine (มีค่าอยู่ระหว่าง 10.4-11.1%) และ Aspartic acid (มีค่าอยู่ระหว่าง8.3-8.7%) นอกจากนั้น Guisande et al., (2000) พบว่า *E. acutifrons* มีผลผลิตไข่ และการฟักไข่ที่สำเร็จถูกสนับสนุนเพิ่มขึ้นถ้าไข่และตัวเมียมีองค์ประกอบกรดอะมิโนของอาหารใกล้เคียงกับ homeostasis ของกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งพบได้เช่นกันในกรณีของโคพีพอด *Centropages hamatus* และ *Acartia tonsa* และไข่ของพวกมัน (Sørensen et al., 2007).

คุณค่าทางโภชนาการที่สูงของโคพีพอด ซึ่งแสดงออกโดยมีปริมาณสูงของฟอสโฟลิปิด ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว (highly unsaturated fatty acids :HUFA) และสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ (Kraul et al., 1992; Sargent et al., 1997; Støttrup & Nosker 1997; Støttrup 2000; Helland et al., 2003) ทำให้มีการใช้โคพีพอดในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างกว้างขวาง แต่ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าการทดลองเลี้ยง *E. acutifrons* ในอาหารทั้ง 6 สูตร ไม่พบ EPA DHA และ ARA ในตัวของ *E. acutifrons* ซึ่งแตกต่างจากฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอด *Tisbe furcata* ที่มีรายงานว่าพบ % น้ำหนักของ EPA DHA และ ARA ต่อกรดไขมันทั้งหมด เท่ากับ 11.2% 3.0% และ 1.2% ตามลำดับ (Bell et al., 2003) ในขณะที่ฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *Nitokra lacustris* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดเดี่ยว *T. suecica* มีชนิดกรดไขมันชนิดเด่น 5 ชนิด ได้แก่ Linolelaidic acid (18:2*n*6) Oleic acid (18:1*n*9) Palmitic acid (16:0) Stearic acid (18:0) และ Docosahexaenoic acid (22:6*n*3) เป็น % ต่อกรดไขมันทั้งหมด เท่ากับ 22.4% 14.8% 13.8% 8.5% และ 8.2% ตามลำดับ (Rhodes&Boyd 2005)

สรุปผลการศึกษา

1. *E. acutifrons* สามารถกินอาหารได้หลากหลายจากแพลงก์ตอนพืชไปจนถึงยีสต์ ระดับความเข้มข้นของอาหารมีอิทธิพลต่ออัตราการกินอาหารของ *E. acutifrons* อัตราการกินสูงสุดของ *E. acutifrons* พบเมื่อกินอาหารผสมระหว่าง *I. galbana* และ *Dunaliella* sp.
2. อาหารมีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตไข่ของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutifrons* โดย *E. acutifrons* กินอาหารผสม *I. galbana* กับ *C. calcitrans* จำนวนไข่ที่ตัวเมียผลิตได้ต่อครั้งสูงที่สุด
3. องค์ประกอบทางชีวเคมีของฮาร์แพคติคอยด์โคพีพอดทะเล *E. acutifrons* ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ในอาหารผสมที่แตกต่างกัน 6 สูตร พบกรดอะมิโนที่จำเป็นจำนวน 10 ชนิดและกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น 9 ชนิด พบกรดไขมันอิ่มตัว 6 ชนิด กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว 2 ชนิด และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน 2 ชนิด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวพิมพ์ใจ อุตมา นางสาวพลอยไพลิน มัธยันต์ นางสาววชิราพรรณ คงนวล ที่ช่วยเหลือในการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชและการเลี้ยง *E. acutifrons* ขอขอบคุณ Dr. Christian Lønborg แห่ง Australian Institute of Marine Scienceประเทศออสเตรเลีย และ Dr. Cátia Carreira สำหรับข้อเสนอแนะที่มีประโยชน์ในการเขียนบทความวิจัย ขอขอบคุณ William Martin สำหรับการตรวจแก้ไขบทความวิจัยภาษาอังกฤษ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย กระทรวงศึกษาธิการ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

เอกสารอ้างอิง

บัณฑิต สิขัณฑกสมิต. 2545. การแปรผันในรอบปีของประชากร Copepod, Cladocera และ Rotifer ในป่าชายเลนบ้านคลองโคน จังหวัดสมุทรสงคราม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรเทพ พรรณรักษ์. 2547. ความหลากหลายทางชีวภาพของแพลงก์ตอนสัตว์บริเวณชายฝั่งทะเล คลองปากเมง จังหวัดตรังวิทยานิพนธ์ .ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุนีย์ สุวภีพันธ์. 2523. แพลงก์ตอนสัตว์ในอ่าวไทย. รายงานวิชาการ ที่ สจ/22/4. สถานวิจัยประมงทะเล. กองประมงทะเล. กรมประมง.

Abu-Rezq, T. S., Yule, A. B. and Teng, S. K. 1997. Ingestion, fecundity, growth rates and culture of the harpacticoid copepod, *Tisbe furcata*, in the laboratory. Hydrobiologia 347: 109-118.

Ajiboye, O. O., Yakubu, A. F., Adams, T. E., Olaji, E. D. and Nwogu, N. A. 2011. A review of the use of copepods in marine fish larvicuture. Reviews in Fish Biology and Fisheries 21: 225-246.

Bell, J. G., L. A. McEvoy, A. Estevez, R. J. Shields, and Sargent, J. R. 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. Aquaculture 227: 211–220

Bunker, A. J. and Hirst, A. G. 2004. Fecundity of marine planktonic copepods: global rates and patterns in relation to chlorophyll a, temperature and body weight. Marine Ecology Progress Series 279: 161–181.

Buttino, I., Pellegrini, D., Romano, G., Hwang, J.-S., Liu, T.-M., Sartori, D., Sun, C.-K., Macchia, S. and Ianora, A. 2011. Study of apoptosis induction using fluorescent and higher harmonic generation microscopy techniques in *Acartia tonsa* nauplii exposed to chronic concentrations of nickel. Hydrobiologia 27 (S2), 97–104.

Conceição, L.E.C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S. and Dinis, M.T. 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. Aquaculture Research. 41: 613–640.

Camus, T., Zeng, C., McKinnon A.D. 2009. Egg production, egg hatching success and population increase of the tropical paracalanid copepod, *Bestiolina similis* (Calanoida: Paracalanidae) fed different microalgal diets. Aquaculture 297: 169–175.

Cutts, C.J. 2003. Culture of harpacticoid copepods: potential as live feed for rearing marine fish. Advances in Marine Biology 44: 295–316.

Delbare, D., Dhert, P. and Lavens, P. 1996. Zooplankton: Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Papers 361:252-282.

Dhanker, R. and Hwang, J. 2013. Predation by *Apocyclops royi* (Cyclopoid : copepod) on ciliates and rotifers. Journal of Marine Science and Technology (Taiwan) 21:246-251.

Drillet, G., Jørgensen, Sørensen, T.F., Ramløv, H. and Hansen, B.W. 2006. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as relevant live feed organisms in marine larviculture. Aquaculture Research 37: 756–772.

Drillet, G., Frouël, S., Sichlau, M. H., Jepsen, P. M., Højgaard, J. K., Joarder, A. K. & Hansen, B. W. 2011. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. Aquaculture 315:155-166.

Díaz, E., Cotano, U. and Villate, F. 2003. Reproductive response of *Euterpina acutifrons* in two estuaries of the Basque Country (Bay of Biscay) with contrasting nutritional environment. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 292: 213-230.

Fox, C.J., Harrop, R., Wimpenny, A., 1999. Feeding ecology of herring (*Clupea harengus*) larvae in the turbid Blackwater Estuary. Marine Biology 134: 353–365.

Gorbi, G., Invidia, M., Savorelli, F., Faraponova, O., Giacco, E., Cigar, M., Buttino, I., Leoni, T., Prato, E., Lacchetti, I., Sei, S., 2012. Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. Environmental Toxicology and Chemistry 31: 2023–2028.

Guisande, C. and Harris, R. P. 1995. Effect of total organic content of eggs on hatching success and naupliar survival in the copepod *Calanus helgolandicus*. Limnology and Oceanography 40(3): 476–482.

Guisande, C., Maneiro, I. and Riveiro I. 1999. Homeostasis in the essential amino acid composition of the marine copepod *Euterpina acutifrons*. Limnology and Oceanography 44(3): 691-696.

Guisande, C., Riveiro, I. and Maniero I. 2000. Comparisons among amino acid composition of females, eggs and food to determine the relative importance of food quantity and food quality to copepod reproduction. Marine Ecology Progress Series 202: 135–142.

Guisande, C., Sanchez, J., Maneiro, I. and Miranda, A. 1996. Trade-off between offspring number and offspring size in the marine copepod *Euterpina acutifrons* at different food concentrations. Marine Ecology Progress Series 143(1): 37-44.

Helland, S., Terjesen, B. F. and Berg, L. 2003. Free amino acid and protein content in the planktonic copepod *Temora longicornis* compared to *Artemia franciscana*. Aquaculture 215: 213–228.

Hopcroft, R. R. and Roff, J. C. R. 1996. Zooplankton growth rates: diel egg production in the copepods *Oithona*, *Euterpina* and *Corycaeus* from tropical waters. Journal of Plankton Research 18(5): 789-8O3.

Jakobsen, H. H. and Hansen, P. J. 1997. Prey size selection, growth and grazing responses of a small heterotrophic dinoflagellate *Gymnodinium* sp. and a ciliate *Balanion comatum*: a comparative study. Marine Ecology Progress Series 158:75-86.

Jeyaraj, N., Santhanam, P. 2013. Influence of algal diet on population density, egg production and hatching succession of the calanoid copepod, *Paracalanus parvus* (Claus, 1863) . Journal of Algal Biomass Utilization 4 (1): 1–8.

Jitchum, P. and Wongrat, L. 2009. Community structure and abundance of epipelagic copepods in a shallow protected bay, Gulf of Thailand. **K**asetsart University Fisheries Research Bulletin 33(1): 28-40.

Johnson, M. W. and Olson, J. B. 1948. The life history and biology of a marine harpacticoid copepod, *Tisbe furcata* (Baird). The Biological Bulletin 95(3): 320-332.

Kraul, S. 2006. Live food for marine fish larvae, pp. 55-60. *In* Suárez E C, Marie D R, Salazar M T, Nieto López M G, Villareal Cavazos D A, Puello Cruzy Armando Garcia Ortega AC (Eds.). *Advances en Nutricion Acuicola VIII*.VIII Symposium International de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Univesidad Autónoma de Nuevo León, Mexico.

Kiørboe, T. and Sabatini, M. 1995. Scaling of fecundity, growth and development in marine planktonic copepods. Marine Ecology Progress Series 120: 285–298.

Kraul, S., Ako, H., Nelson, A., Brittain, K. and Ogasawara, A. 1992. Evaluation of live feeds for larval and postlarval mahimahi, *Coryphaena hippurus*. Journal of the World Aquaculture Society 23: 299-306.

Liao I.C., Su, H.M. and Chang, E.Y. 2001. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. Aquaculture 200:1–31.

Matias-Peralta, H. M., Yusoff, F. M. Shariff, M. and Mohamaed, S. 2012. Reproductive performance, growth and development time of a tropical harpacticoid copepod, *Nitocra affins californica* Lang, 1965 fed with different microalgal diets. Aquaculture 344-349 (1):168-173.

Maiphae, S. and Sa-Ardrit, P. 2011. Marine copepods at Mo Ko Thale Tai, Gulf of Thailand. Songklanakarin Journal of Science and Technology 33: 641-651.

Melo Júnior M., Miyashita L. K., Silva N. J., Gaeta, S.A. and Lopes R. M. 2013. Reproductive traits of *Euterpina acutifrons* in a coastal area of Southeastern Brazil, Marine Ecology 34(3): 363-372.

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.

Möllmann, C., Kornilovs, G., Fetter, M., Köster, F.W., 2004. Feeding ecology of central Baltic Sea herring and sprat. Journal of Fish Biology 6: 1563–1581.

Nanton, D. A. and Castell, J. D. 1999. The effect of temperature and dietary fatty acids on the fatty acid composition of harpacticoid copepods for use as live food for marine fish larvae. Aquaculture 175: 167-181.

Oliveira Lemos, V., Marinho ca Costa, R. and Pereira, L. C. C. 2006. Filtration and ingestion rates of *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyta) by *Euterpina acutifrons* Dana (Copepoda). Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais 1(3):121-127.

Pond, D., Harris, R., Head, R., Harbour, D. 1996. Environmental and nutritional factors determining seasonal variability in the fecundity and viability of *Calanus helgolandicus* in coastal waters off Plymouth, UK. Marine Ecology Progress Series 143: 45–63.

Promkaew, S., Piumsomboon, A. and Paphavasit, N. 2012. Diversity of copepods in Pak Phanang Bay, Nakhon Si Thammarat Province. KKU Science Journal 40(1): 281-292. (in Thai)

Rhodes, A. & Boyd, L. 2005. Formulated feeds for harpacticoid copepods: Implications for population growth and fatty acid composition. 61-73 In: Copepods in aquaculture (Lee, C. O'Bryen, P.J., Marcus, N.H. (eds) Blackwell Publishing, Iowa, USA.

Sargent, J.R., MC Evoy, L.A. and Bell, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine larval feeds. Aquaculture 155: 117–127.

Sautour, B. and Castel, J. 1993. Feeding behaviour of the coastal copepod *Euterpina acutifrons* on small particles. Cahiers de Biologie Marine 34: 239-251.

Støttrup, J.G. 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. Aquaculture Research 31: 703–711.

Støttrup, J.G. and Nosker, N.H. 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. Aquaculture 155: 231–247.

Sørensen, T. F., Drillet, G., Engell- Sørensen, K., Hansen, B. W. and Ramløv, H. 2007. Production and biochemical composition of eggs from neritic calanoid copepods reared in large outdoor tanks (Limfjord, Denmark). Aquaculture 263: 84–96.

Tanyaros, S., Sujarit, C., Jansri, N. and Tarangkoon, W. 2016. Baker's yeast as a substitute for microalgae in the hatchery rearing of larval and juvenile tropical oyster (*Crassostrea belcheri*, Sowerby 1871). Journal of Applied Aquaculture 28(1): 35-46.

Toledo J.D., Golez M.S., Doi M., Ohno, A. 1999. Use of copepod nauplii during early feeding stage of grouper *Epinephelus coioides*. Fisheries Science 65: 390–397.

Walne, P. R. 1974. Culture of bivalve molluscs, 50 years experience at Conway. Fishing News (Books) Ltd., London.173 pp.

Zaleha, K., Ibrahim, B., Akbar John, B. and Kamaruzzaman, B. Y. 2012. Generation time of some marine harpacticoid species in laboratory condition. Journal of Biological Sciences 12: 433-437.

Zhang, J., Wu, C., Pellegrini, D., Romano, G., Esposito, F., Ianora, A. and Buttino, I. 2013. Effects of different monoalgal diets on egg production, hatching success and apoptosis induction in a Mediterranean population of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). Aquaculture 400-401: 65-72.