รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง

ตัวแบบที่เหมาะสมในการเพาะและขยายพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* Linnaeus

Optimizing Cultivation Model of Green Laver, *Ulva intestinalis* Linnaeus

ระพีพร เรืองช่วย
โชคชัย เหลืองธุวปราณีต

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555
รหัสโครงการวิจัย SAT5500605

22 เมษายน 2559

ตัวแบบที่เหมาะสมในการเพาะและขยายพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* Linnaeus

Optimizing Cultivation Model of Green Laver, *Ulva intestinalis* Linnaeus

คณะนักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ระพีพร เรืองช่วย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย เหลืองธุวปราณีต

แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมง
ภาควิชาเทคโนโลยีและการอุตสาหกรรม
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ข
รายการภาพประกอบ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
บทคัดย่อ	ฉ
Abstract	ซ
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
การตรวจเอกสาร	3
วิธีการทดลอง	9
ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล	15
สรุปผลการทดลอง	39
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	45

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลักษณะของสาหร่ายไส้ไก่ และคุณสมบัติของน้ำที่เก็บจากแหล่งต่างๆ 17

ตารางที่ 2 ร้อยละของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ขนาดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 °C ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในขวดขนาด ลาที่มีแสงมิลลิลิตร ระยะเว 250: มืด 12:12 ชม.(n=30) 19

ตารางที่ 3 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ทั้งหมดที่ระดับต่างๆ ที่ความเค็ม 25 ppt ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml ระยะเวลาที่มี แสงมืด : 12:12 ชม .(n=30) 20

ตารางที่ 4 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ทั้งหมดที่ระดับการผึ่งแห้งต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 °C ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} ความเค็ม 25 ppt เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml ระยะเวลาที่มีแสง: มืด 12:12 21

ตารางที่ 5 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ระดับความเค็ม ต่างๆ อุณหภูมิ 25±2 °C ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ระยะเวลาที่มีแสง: มืด 12:12 ชม. 22

ตารางที่ 6 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ระดับการเพิ่มปริมานแคลเซียมไอออนระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 °C ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ระยะเวลาที่มีแสง:มืด 12:12 ชม. (n=30) 23

ตารางที่ 7 ผลของการใช้ปัจจัยต่างๆ ในการประตุ้นให้สาหร่ายไส้ไก่สร้างเซลล์สืบพันธ์ และชนิดของเซลล์สืบพันธ์ที่สร้างที่สภาวะแวดล้อมต่างๆ 24

ตารางที่ 8 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ (x 106 ± SD สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่ระดับความเค็ม 5, 10, 15, 20 และ 25 ppt ระยะเวลาต่างๆ อุณหภูมิ 25 °C ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ระยะเวลาที่มีแสง: มืด 12:12 ชม. 25

ตารางที่ 9 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์รวม (x 106 ± SD สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่ระดับการให้แสงต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 °C ความเค็ม 25 ppt ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ระยะเวลารับแสง แสง:มืด 12 : 12 ชม. 26

ตารางที่ 10 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่รวม x 10^{6} ± SD สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด ที่ระยะเวลาการผึ่งแห้ง ต่างๆ ที่ ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} อุณหภูมิ 25°C 25 ความเค็มppt เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ระยะเวลารับแสง แสง:มืด 12:12 ชม. 27

ตารางที่ 11 ผลของการใช้ปัจจัยต่างๆ ในการประตุ้นให้สาหร่ายไส้ไก่ปล่อยเซลล์สืบพันธ์ และชนิดของเซลล์สืบพันธ์ที่สร้างที่สภาวะแวดล้อมต่างๆ 28

ตารางที่ 12 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ (x10^{6}±SE สปอร์/ตร.ซม.) ของสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* ที่การเกาะวัสดุแตกต่างกันในระยะเวลาเลี้ยง 14 วัน (n=3) 29

ตารางที่ 13 การเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไกในบ่อซิเมนต์ที่ความหนาแน่นต่างๆ 32

ตารางที่ 14 การเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไกในบ่อดินที่ใช้วัสดุยึดเกาะประเภทต่างๆ 35

ตารางที่ 15 การเปรียบเทียบรายการต่างของการเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อซิเมนต์และบ่อดิน 38

รายการภาพประกอบ

หน้า

ภาพที่ 1. ลักษณะทั่วไปของสาหร่าย *Ulva intestinalis* 4
ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของสาหร่ายไส้ไก่ 6
ภาพที่ 3 ตัวอย่างสาหร่ายไส้ไก่จากแหล่งที่มาแตกต่างกัน 9
ภาพที่ 4 การกระตุ้นการสร้างและปล่อยสปอร์ของสาหร่ายไส้ไก่ 10
ภาพที่ 5 การลงเกาะของสปอร์สาหร่ายไส้ไก่บนวัสดุ 11
ภาพที่ 6 การเลียงสาหร่ายไส้ไกในบ่อซีเมนต์ 13
ภาพที่ 7 การเพาะพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่บนวัสดุเกาะ 14
ภาพที่ 8 ลักษณะเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ 15
ภาพที่ 9 ค่าความสัมพันธ์ของความแปรปรวนระหว่างชนิดเซลล์สืบพันธุ์และสภาพแวดล้อม 18
ภาพที่ 10 ร้อยละการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ความยาวต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 °C ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} ระยะเวลาที่มีแสง: มืด 12:12. เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml 19
ภาพที่ 11 ร้อยละการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ระดับต่างๆ การผึ่งแห้ง 2 ชั่วโมง ความเค็ม 25 ppt ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} ระยะเวลาที่มีแสง: มืด 12:12 ชม. เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml 20
ภาพที่ 12 ร้อยละการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ระดับการผึ่งแห้ง 0, 2, 4, และ 6 ชั่วโมง ระยะเวลาต่างๆอุณหภูมิ 25±2 °C ความเค็ม 25 ppt ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} ระยะเวลาที่มีแสง: มืด 12:12 ชม. เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml 21
ภาพที่ 13 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ระดับความต่างๆ อุณหภูมิ 25±2 °C ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} ระยะเวลาที่มีแสงมืด : 12:12 .เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml ระยะเวลา 4 วัน 22
ภาพที่ 14 ร้อยละการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ของสาหร่ายไส้ไก่ ที่ระดับการเพิ่มสารแคลเซียมไอออนโดยการเติมสารละลายของ $CaCl_2$ ที่ระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 °C ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} ระยะเวลาที่มีแสง:มืด 12:12 ชม. เลี้ยงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ระยะเวลาเลี้ยง 4 วัน 23
ภาพที่ 15 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ ที่ระดับ (รัมน้ำหนักสดสปอร์ต่อก) ความต่างๆ อุณหภูมิ ±252 °C ความเค็ม 25 ppt เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ระยะเวลารับแสง แสง:มืด 12 : 12 ชม. 25
ภาพที่ 16 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ (สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่ระดับการเพิ่มแสง 0, 80, 100, 150 µmol m^{-2} s^{-1} อุณหภูมิ 25±2 °C ความเค็ม 25 ppt เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ระยะเวลารับแสง แสง:มืด 12 : 12 ชม. 26
ภาพที่ 17 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ (สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่ระยะเวลาการผึ่งแห้ง ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 °C ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} ความเค็ม 25 ppt เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ระยะเวลารับแสง แสง:มืด 12 : 12 ชม. 27
ภาพที่ 18 พฤติกรรมการลงเกาะของสปอร์ของสาหร่ายไส้ไก่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ ที่ส่วนต่างๆของวัสดุยึดเกาะ 30
ภาพที่ 19 จำนวนการลงเกาะของสปอร์ของสาหร่ายไส้ไก่บนวัสดุชนิดต่างๆ ในระยะเวลา 14 วัน 30
ภาพที่ 20 พฤติกรรมการลงเกาะกันเองของสปอร์สาหร่ายไส้ไก่ได้เป็นช่อสปอร์ หรือ กลุ่มก้อนสปอร์ (Germling cluster) 31

ภาพที่ 21 มวลชีวภาพของสาหร่ายไส้ไก่ที่เลี้ยงในบ่อซิเมนต์ที่ความหนาแน่นต่างๆ 33
ภาพที่ 22 การเลี้ยงสาหร่ายไส้ไกในบ่อซิเมนต์ 34
ภาพที่ 21 มวลชีวภาพของสาหร่ายไส้ไก่ที่เลี้ยงในบ่อดินด้วยวัสดุเกาะของสปอร์แตกต่างกัน 36
ภาพที่ 22 การเลี้ยงสาหร่ายไส้ไกในบ่อดิน 37
ภาพที่ 25 ไดอะแกรมตัวแบบที่เหมาะสมในการเพาะและขยายพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* 42

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง ตัวแบบที่เหมาะสมในการเพาะและขยายพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* Linnaeus สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือ ในการเก็บข้อมูลของ นางสาวอาริณี มูน๊ะ และ นายสุธน คงเรือง ซึ่งต้องขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณแหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้คือ ศูนย์วิทยาศาสตร์อาหารฮาลาล คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมง และเจ้าหน้าที่ของศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

บทคัดย่อ

การศึกษาตัวแบบที่เหมาะสมในการเพาะและขยายพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* ประกอบด้วย สภาวะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในต้นพันธุ์จากแหล่งธรรมชาติที่แตกต่างกัน การเหนี่ยวนำให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ และการกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ และการเลือกชนิดของวัสดุที่เหมาะสมกับการเกาะของเซลล์สืบพันธุ์ และรูปแบบการเลี้ยงในบ่อซิเมนต์และในบ่อดิน เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการขยายพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่ได้อย่างต่อเนื่อง การศึกษาสภาวะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่เก็บจาก 4 แหล่ง ได้แก่ บ่อดิน บ่อซิเมนต์ อ่าวปัตตานี และห้องปฏิบัติการ พบว่า รูปแบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์สัมพันธ์กับลักษณะและแหล่งที่พบสาหร่าย การสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบผสมทั้งสองแบบคือแบบอับแกมีตและอับซูโอสปอร์ในต้นเดียวกันสัมพันธ์เชิงบวกกับความกว้างของแทลลัส ส่วนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศ หรือแกมีต เพียงอย่างเดียว สัมพันธ์แบบผกผันกับค่าความเป็นด่างและแสง แต่มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับ ความยาวของแทลลัส

สำหรับการเหนี่ยวนำการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยใช้ปัจจัยกระตุ้น 5 ปัจจัย ขนาดความยาวท่อนพันธุ์ 5 ระดับ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 ซม. การผึ่งแห้ง 4 ระดับ คือ 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 25, 30 และ 35 ℃ 5 ระดับ และความเค็ม 5 ระดับ คือ 10, 15, 20, 25 และ 30 ppt และการเติม $CaCl_2$ 0, 6, 12 และ 18 mg/L พบว่า ความยาวท่อนพันธุ์ 0.5-3.0 เซนติเมตร สามารถเหนี่ยวนำให้สร้างอับซูโอสปอร์ได้ร้อยละ 100±0 ในระยะเวลา 4 วัน ส่วนการผึ่งแห้งพบว่าที่เวลา 0 ชม.หรือการไม่ผึ่งแห้ง สร้างอับสปอร์ได้ร้อยละ 97±2 ในเวลา 4 วัน และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับที่เวลาการผึ่งแห้งอื่นๆ ส่วนที่อุณหภูมิ 25°C ทำให้เกิดการสร้างอับซูโอสปอร์ได้มากที่สุดคือร้อยละ 100±0 ในวันที่ 4 สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับอุณหภูมิอื่น ที่ระดับความเค็ม 15-30 ppt สามารถสร้างอับซูโอสปอร์ได้ร้อยละ 100±0 ในวันที่ 4 ส่วนการเติมสารละลายของแคลเซียมไอออนโดยการเติมสารละลายของ $CaCl_2$ 6 และ 18 mg/L ส่งผลให้มีการสร้างอับซูโอสปอร์มากที่สุดร้อยละ 100±0 ในวันที่ 4 ซึ่งร้อยละการสร้างไม่แตกต่างกับการเติม $CaCl_2$ 12 และ 18 mg/L

การกระตุ้นให้ปล่อยซูโอสปอร์ใช้ท่อนพันธุ์ ที่สร้างอับซูโอสปอร์แล้วมากระตุ้นให้ปล่อยสปอร์ ด้วย 3 ปัจจัย ประกอบด้วย ความเค็ม 5 ระดับคือ 5, 10, 15, 20 และ 25 ppt การได้รับแสงของท่อนพันธุ์ก่อนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 4 ระดับคือ 0, 80, 100 และ 150 μmol $m^{-2}s^{-1}$ และ การผึ่งแห้งที่เวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง พบว่าที่ความเค็ม 25 ppt ปล่อยสปอร์ได้มากที่สุดจำนวน 12.16±0.37 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด โดยที่ระดับความเค็ม 5-25 ppt ปริมาณการปล่อยสปอร์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ส่วนการนำต้นพันธุ์ไปกระตุ้นด้วยระดับความเข้มแสงต่าง ๆ พบว่าท่อนพันธุ์ที่ไม่ให้แสง (0 μmol $m^{-2}s^{-1}$) ให้จำนวนสปอร์มากที่สุด คือ 10.10±0.24 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด ส่วนปัจจัยด้านการผึ่งแห้งพบว่าที่ระดับการผึ่งแห้ง 0 ชั่วโมง ให้จำนวนสปอร์สูงกว่าที่เวลาอื่น จำนวน 9.91±1.01 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการผึ่งแห้งอื่น ($p<0.05$)

การยึดเกาะของสปอร์โดยใช้วัสดุเกาะแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ เชือกพีอี พลาสติกรังผึ้ง และอวนไนล่อน ที่พันกรอบสี่เหลี่ยม ขนาด 30x50 ตารางเซนติเมตร วางในถังพลาสติกสี่เหลี่ยมปริมาตรน้ำ 150 ลิตร ที่สภาวะกลางแจ้ง มีสปอร์ว่ายอยู่ในมวลน้ำที่ระดับความหนาแน่น 33 ล้าน สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการสุ่มตัวอย่างสปอร์ที่ระดับความสูงทุก 10 เซนติเมตร บน กลาง และล่างของกรอบสี่เหลี่ยมพบว่า สปอร์เริ่มเกาะวัสดุทั้ง 3 ชนิดตั้งแต่วันที่ 1 และเกาะมากที่สุดในวันที่ 9 ของการเลี้ยง โดยการเกาะของสปอร์รวมบนวัสดุทั้ง 3 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p>0.05$) โดยเชือกมีความหนาแน่นสปอร์มากที่สุด ถึง $1.4\pm1.7x10^{9}$ สปอร์/ตารางเซนติเมตร รองลงมาคืออวน และพลาสติกมีความหนาแน่นของสปอร์ถึง $1.1\pm0.0X10^{9}$ สปอร์/ตารางเซนติเมตร และ $0.8\pm0.1X10^{9}$ สปอร์/ตารางเซนติเมตรตามลำดับ สำหรับระดับการเกาะของสปอร์ พบว่ามีปริมาณสปอร์เกาะที่ระดับบนมากที่สุด

การเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อซีเมนต์ จากการทดลองเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ ในบ่อซีเมนต์ ขนาด 2 ตัน ที่เลี้ยงโดยใช้ต้นพันธุ์ เริ่มต้นขนาดยาว 2.9±0.3 ซม. ในความหนาแน่น 25000, 37500 และ 50000 ต้นต่อตร.ม. เมื่อเลี้ยงไป 3 สัปดาห์ พบว่า 50000 ต้นต่อตร.ม. มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สุด โดยคิดเป็นการเพิ่มของน้ำหนัก ร้อยละ 14,398±14,713 และเป็นการเพิ่มของความยาวร้อยละ 123±77 ซึ่งเป็นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยโดยน้ำหนักเท่ากับ 23.7±0.1 g ต่อวัน มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจนเก็บเกี่ยวได้ เท่ากับร้อยละ 49.8 กรัม ต่อวัน และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะโดยความยาวเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 20.8 ซม. ต่อ วัน ซึ่งทั้งหมดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับที่ความหนาแน่น 37500 ต้นต่อตร.ม. สำหรับการทดลองเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ ในบ่อดิน โดยใช้วัสดุเกาะของต้นอ่อนที่แตกต่างกัน ได้แก่ วัสดุเชือกพีอี พลาสติกรังผึ้ง และอวนไนล่อน ที่เลี้ยงโดยใช้ต้นพันธุ์ น้ำหนักเริ่มต้น 3±0 กรัมต่อตร.ม. เริ่มต้นความยาวเริ่มต้น เท่ากับ 2.9±0.4 ซม เมื่อเลี้ยงไป 6 สัปดาห์ พบว่า มวลชีวภาพ บนวัสดุเชือกพีอี พลาสติกรังผึ้ง และอวนไนล่อน มีน้ำหนักสาหร่ายเพิ่มขึ้นมากที่สุด 91±15, 67±16 และ 34±2 กรัมต่อตร.ม. และมีความยาวเพิ่มขึ้น เท่ากับ 13.2±1.0, 10.5±1.1, 6.2±1.4 เซนติเมตร โดยมีการเพิ่มของน้ำหนัก ร้อยละ 1,360±238, 974±257 และ 438±31ตามลำดับ และเป็นการเพิ่มของความยาวร้อยละ 955±25, 863±85 และ 491±76 ตามลำดับ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน โดยน้ำหนักร้อยละ 8.5±0.4, 7.8±0.6 และ 6.2±0.1 g ต่อวัน และ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน โดยความยาวร้อยละเท่ากับ 5.8±3.0, -7.1±0.8 และ -9.0±0.3 ซม. ต่อวัน ตามลำดับ

จากการวิจัยสรุปได้ว่าความกว้าง และความยาวของแทลลัสสาหร่ายมีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบผสม และแบบอาศัยเพศ ของสาหร่ายไส้ไก่ ส่วนความเป็นด่าง และความเข้มแสง มีความสัมพันธ์เชิงลบต่อการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ทั้งนี้ในห้องปฏิบัติการพบเพียงการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสร้างซูโอสปอร์ การเหนี่ยวนำให้สร้างซูโอสปอร์ควรตัดสาหร่ายให้ยาวเป็นท่อน 0.5-3.0 เซนติเมตร ใช้ความเค็มในช่วง 10-30 ppt ไม่ผึ่งแห้ง วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C และในน้ำเลี้ยงควรเติมสารละลายของแคลเซียมไอออนจาก $CaCl_2$ 6-18 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อจะกระตุ้นให้สาหร่ายปล่อยซูโอสปอร์ควรลดความเค็มลงให้อยู่ในช่วง 5-25 ppt ให้ความเข้มแสง 0-150 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ เป็นเวลา 3 ชม. และไม่ให้แทลลัสผึ่งลม ทั้งนี้สามารถใช้วัสดุใดก็ได้ เพื่อให้สปอร์ยึดเกาะ ได้แก่ เชือก อวน และพลาสติกรังผึ้ง เพื่อล่อให้สปอร์เกาะเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากการเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ที่ใช้ต้นพันธุ์จากช่อต้นอ่อน ที่ความหนาแน่น 50,000 ต้น/ตร.ม. ได้ผลผลิต 1,160 กรัม นน. สด ต่อ ตร.ม. หรือ 95 กรัม นน. แห้ง/ตร.ม. ส่วนการเลี้ยงในบ่อดินที่ใช้ต้นพันธุ์จากต้นอ่อนบนเชือกหรืออวน ที่ความหนาแน่น 20,000-25,000 ต้น/ตร.ม. มีความเหมาะสม ได้ผลผลิต 125 กรัม นน. สด/ตร.ม. หรือ 8.7 กรัม นน. แห้ง/ ตร.ม.

Abstract

Effects of environmental factors on reproductive behavior of Gut Weed, Ulva intestinalis Linnaeus: conditions of reproductive type in the thalli from different sources, induction of reproductive formation, stimulation on spore release and type of optimal materials on spore adhesion were conducted for basic information to propagate the algae. The study on reproductive type from different sources was done in mature thalli collected from 4 sources: earthen pond, cement tank, Pattani bay and the laboratory. Type of reproductive cell was checked under microscope and some environmental factors were investigated. It was found that the type of reproductive formation relates to the character and source of the thalli. The mixed reproductive type between gametangia and zoosporangia was related to the width of thalli while the single type of the reproductive cell showed inversed relation to alkalinity and light intensity but related to thallus length.

Induction of reproductive cells formation by using 5 factors by individual running: fragment length 5 levels of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 cm; desiccation time of 0, 1, 2 and 3 hrs; salinity in 5 levels of 10, 15, 20, 25 and 30 ppt; temperature in 3 levels at 25, 30 and 35 °C; and the addition of calcium from calcium chloride 4 levels of 0, 6, 12 and 18 mg L^{-1}. The result found that the fragment of the thallus in the range of 0.5-3.0 cm showed the formation of zoosporangium 100±0 % at 4 days. The desiccation of 0 hr showed highest zoosporangium formation of 97±3 % within 4 days and showed significant different ($p<0.05$) with those of the others. At a salinity range of 10-30 ppt, the fragment showed a 100±0% zoosporangium formation in 4 days. Under 25°C, the fragment form the zoosporangium of 100±0 % on day 4^{th} and showed a significant difference if those with the other temperatures. The addition of $CaCl_2$ 6 mg L^{-1} provided 100±0 % of zoosporangium formation within 4 days and showed no significant difference between those at 18 and 12 mg L^{-1}.

Stimulation on zoospore release in the zoosporangium thalli were used 3 factors: the salinity in 5 levels at 5, 10, 15, 20 and 25 ppt; light intensity for the fragment 3 hrs before in 4 levels at 0, 80, 100 and 150 µmol $m^{-2}s^{-1}$; and desiccation period in 4 levels at 0, 1, 2 and 3 hrs. The results showed that at 25 ppt showed maximum number of spore release of $12.16\pm0.37x10^6$ spores per g FW and the salinity in the range of 5-25 ppt showed no significant difference of the spores ($p>0.05$). Under 0 µmol m^{-2} s^{-1}, the fragment provided the highest spores $9.91\pm1.01x10^6$ spores per g FW and showed significant differences of those with the other desiccation time.

The adhesion of spores on three different materials: PE rope, Honeycomb plastic sheet, and nylon nets. The materials hung on set on a 30x50 cm^2 of the frame and put in 150 L plastic tanks under outdoor conditions. The concentration of swimming spores in the water was $3.3 x10^7$ spores per mL. The number of spore was checked every day at different heights of the frame at 10 cm

interval on the top, middle, and bottom. The results found that the adhesion of spores on 3 types of material from the first day and showed the highest number of spores on day 9^{th}. The number of spores showed non significantly affect ($p>0.05$) among the 3 types of materials. The rope provided the highest number of spores with $1.4\pm1.7x10^{9}$ spores per square meter and the next was the nets and plastic with $1.1\pm0.0X10^{9}$ and $0.8\pm0.5X10^{9}$ spores per square, respectively. At top of the frame found the number of spores attach to those of both other levels.

The cultivation of the gut weed in cement tank of 2 tons with the initial of 2.9 ±0.3 cm long with a density of 25000, 37500, 50000 plants/m^2. After 3 weeks of cultivation, at 50000 plants/m2 provided the highest yield of 14,398±14,713 % by weight and 123±77% by length. The specific growth rate by weight equals. 23.7±0.1 g day^{-1} and the provided the specific growth rate until harvest by weight of 49.8 g % day^{-1} and by the length of 20.8 cm % day^{-1}. Those showed a significant difference with the density of 37500 plants per m^2. For the cultivation in the pond under different attachment materials of spore: PE rope, Honeycomb plastic sheet, and nylon nets were conducted with an initial weight of 3±0 g m^{-2} and the initial seedling length of 2.9±0.4 cm. After 6 weeks of cultivation, the biomass on PE rope, Honeycomb plastic sheet, and nylon nets showed the increased weight of 91±15, 67±16 and 34±2 g m^{-2} and increased weight of 13.2±1.0, 10.5±1.1, 6.2±1.4 cm, respectively. Percentage of increased weights of those were 1,360±238, 974±257 and 438±31 and percentage of increased length of 955±25, 863±85 and 491±76 g m^{-2}, respectively. The growth rate of weights were 8.5±0.4, 7.8±0.6 and 6.2±0.1 $\%day^{-1}$ and the growth rates of length were 5.8±3.0, -7.1±0.8 and -9.0±0.3 $\%day^{-1}$, respectively.

The research concluded that the wide and the length of the thallus showed positively correlated to mixed reproduction and gametangial reproduction, respectively. The water alkalinity and light intensity showed a negative relationship with the sexual reproduction of zoosporangia. The induction of zoospore formation should be cut the thalli to 0.5-3.0 cm at 10-30 ppt salinity, not dry of thalli, set under 25 °C and adding $CaCl_2$ 6-18 mg L^{-1}. For the stimulation of the zoospore release should set the mature thalli under salinity in the range of 5-25 ppt, light intensity of 0-150 umol $m^{-2}s^{-1}$ and should not dry the thalli. However, any material can be used for spore adhesion, including PE ropes, honeycomb plastic sheets, and nylon nets as the substrate of spore for 1 week. Culture in cement tank from germling cluster with the density of 50,000 plants m^{-2} provided 1 160 g FW m-2 or 95 g DW m^{-2}. For cultivation in the pond should use the initial of 20,000-25,000 plants m2a and could obtain 125 g FW m^{-2} yield or 8.7 g DW m^{-2}.

.

บทนำ

สาหร่าย *Ulva* spp. หรือ green laver เป็นสาหร่ายสีเขียว ในวงศ์ Ulvaceae แพร่กระจายบริเวณเขตน้ำกร่อย ทั่วโลก หลายชนิดมีการนำมาใช้ประโยชน์ โดยใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อประกอบอาหาร ในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี อินเดีย และอินโดนีเซีย เนื่องจากเป็นสาหร่ายที่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นอยู่ในระดับสูง นอกจากนี้ยังมีเยื่อใยและแร่ธาตุมาก และ สาร Ulvan ซึ่งเป็นอนุพันธ์ oligosaccharide ที่พบในสาหร่ายกลุ่มนี้ จะประโยชน์ต่อระบบการย่อยและการดูดซึมอาหาร ทำให้มีการแนะนำ ให้ผู้สูงอายุ บริโภคสาหร่ายไส้ไก่ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นอาหารเสริมสุขภาพ จึงใช้สาหร่ายกลุ่มนี้เป็นส่วนประกอบ (Briand et al., 2005) ในบางประเทศ เช่น ญี่ปุ่น มีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายกลุ่มนี้กันหลายชนิด เพื่อนำมาใช้เป็นอาหารคนโดยตรง และการที่สาหร่ายชนิดนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นตัวต้านจุลชีพ เนื่องจากมีสารต้านแบคทีเรีย รา อยู่ด้วย จึงมักมีการนำมาเป็นส่วนผสมของเครื่องสำอาง แชมพู โลชั่น (Briand 1995; Hasebe and Yamada, .2004; Adey and Purgason, 1998)

สำหรับประเทศไทยได้ใช้สาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติในพื้นที่เปิดหรือจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำกร่อย มาเป็นแหล่งของแร่ธาตุ สำหรับเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ และยังมีการนำสาหร่ายชนิดนี้ไปเลี้ยงร่วมกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อดินตั้งแต่ระยะเริ่มต้นเลี้ยง เพื่อลดต้นทุนในเรื่องอาหาร ปรับสภาพน้ำ และระบบนิเวศในบ่อเลี้ยง ทำให้ลูกกุ้งสามารถกินอาหารจากสิ่งมีชีวิตอื่นที่มาอยู่ร่วมกับสาหร่าย (จริยาวดี และ คณะ 2547) จึงช่วยลดต้นทุนอาหารในช่วง 2 เดือนแรก และช่วยให้ระบบการเลี้ยงปลอดจากสารเคมี อันจะเกิดปัญหาตกค้างในกุ้ง ซึ่งจะมีผลดีต่อผู้บริโภค ทำให้แนวทางการเลี้ยงกุ้งระบบเกษตรอินทรีย์โดยเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายไส้ไก่ มีความเป็นไปได้และได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง (สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย, 2550) จากการใช้ประโยชน์ดังกล่าว ทำให้มีการเลี้ยงและจำหน่ายสาหร่ายไส้ไก่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามด้วยสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย และยังไม่มีรูปแบบการเลี้ยงที่แน่นอน แม้ว่าบางพื้นที่จะมีการนำสาหร่ายไปเลี้ยงร่วมกับกุ้งในบ่อดิน ก็ไม่สามารถขยายพันธุ์ต่อไปได้ จึงเกิดอุปสรรคต่อการผลิตระบบดังกล่าว การศึกษารูปแบบการผลิตสาหร่ายชนิดนี้ในเชิงพาณิชย์โดยการเพาะจากสปอร์ในโรงเพาะที่เป็นต้นแบบจากสายพันธุ์ของไทย เพื่อให้ได้ต้นอ่อนที่สามารถนำไปเลี้ยงในบ่อดิน ทำให้ได้ข้อมูล และรูปแบบการเพาะเลี้ยง ที่จะช่วยทำให้การเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่เป็นไปได้อย่างต่อเนื่องและยั่งยืน สามารถขยายผลให้มีการเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นรายได้ นอกจากนี้ยังจะได้นำพื้นที่ชายฝั่งและบ่อกุ้งร้างที่มีอยู่มาใช้ให้เกิดประโยชน์แล้ว และยังขยายผลให้ เกษตรกรมีความรู้ หรือมีผลผลิตที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ จะทำให้เกษตรกรหรือผู้สนใจ ได้ข้อมูลที่จะนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างแท้จริง

วัตถุประสงค์

1 เพื่อสร้างรูปแบบการผลิตการเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่จากสปอร์ในโรงเพาะ
2 เพื่อให้ได้วิธีการเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่แบบเดี่ยว ในบ่อดิน
3 เพื่อรู้รอบการผลิตและปริมาณผลผลิตสาหร่ายไส้ไก่ ในบ่อดิน

การตรวจเอกสาร

1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis*

สาหร่ายไส้ไก่ เป็นกลุ่มสาหร่ายสีเขียว เรียกกันภาษาอังกฤษว่า green laver หรือภาษาญี่ปุ่นว่า อาโอโนริ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ulva intestinalis* ซึ่งมีชื่อเดิมว่า *Enteromorpha intestinalis* (Linnaeus) Nees เนื่องจากข้อมูลทางโมเลกุลและการเลี้ยงได้แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายในสกุล *Enteromorpha* และ *Ulva* ไม่มีความแตกต่างด้านเอกลักษณ์ทางวิวัฒนาการ จึงมีการเปลี่ยนชื่อกลับมาใช้ *Ulva intestinalis* Linnaeus ในปัจจุบัน (จริยาวดี และคณะ, 2547)

สาหร่ายไส้ไก่มีรูปร่างเป็นท่อหรือหลอด ต้นแทลลัสตั้งเป็นพุ่ม สูง 6-50 เซนติเมตร กว้าง 1-2 มิลลิเมตร มีสีเหลืองอมเขียว มีความหนาเพียง 1 ชั้นเซลล์ เซลล์เรียงตัวไม่เป็นระเบียบเมื่อดูจากที่ผิว ส่วนโคนต้นมีรากเล็กๆ ยึดเกาะ ส่วนโคนแคบ ตอนล่างของท่อจะสอบ ส่วนตอนปลายท่อมักจะพองออกขยายใหญ่ขึ้นจนมีความกว้างได้ถึง 2 เซนติเมตร บริเวณส่วนโคนอาจมีหรือไม่มีการแตกแขนง มีที่ยึดเกาะเป็นรูปกลม เซลล์ที่ผิวเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ มีหลายเหลี่ยมหรือเป็นรูปทรงกลม มีขนาด 8-18 ไมโครเมตร คลอโรพลาสต์เป็นรูปกลม หรือรูปไข่ หรือรูปถ้วย ที่มีเม็ดแป้งอยู่เป็นจำนวนมาก ต้นอ่อนอาจเรียบ ต้นแก่มีรอยยับย่น หรือพองมีลักษณะเป็นลอนหรือหงิกย่น สีเขียวเหลืองหรือเขียวเข้ม สาหร่ายชนิดนี้เมื่อเจริญเต็มที่มีความยาวมากอาจยาวถึง 150 เซนติเมตร หรือมีความกว้างได้ถึง 2 เซนติเมตร ท่อมีการหลุดออกจากต้นแม่ได้ง่ายและสามารถเจริญเติบโตได้ (Lewmanomont and Ogawa, 1995) ลักษณะของสาหร่ายไส้ไก่ดัง**ภาพที่ 1**

อนุกรมวิธาน

สาหร่ายในสกุล *Ulva* spp. มีลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้

Division Chlorophyta
- Class Ulvophyceae
  - Order Ulvales
    - Family Ulvaceae
      - Genus Ulva
        - Species *Ulva intestinalis*

ภาพที่ 1. ลักษณะทั่วไปของสาหร่าย *Ulva intestinalis*

2 นิเวศวิทยาและการแพร่กระจาย

2.1 นิเวศวิทยาของสาหร่ายไส้ไก่

สาหร่ายไส้ไก่ เจริญเติบโตตามธรรมชาติหรือจากการเลี้ยง สาหร่ายจะเกาะตามก้อนหิน เชือกหรือวัสดุอื่น และตามพื้นที่มีสารอินทรีย์ บริเวณแหล่งน้ำกร่อย ปากแม่น้ำ แอ่งน้ำหรือบนก้อนหิน เปลือกหอย หรือบ่อเลี้ยงปลา ไปจนถึงเขตต่ำกว่าระดับน้ำลงต่ำสุด ตามความยาวชายฝั่งทะเล (Stewart, 1991) สามารถอยู่ได้ในที่มืด เจริญอยู่ได้ในน้ำที่มีความเค็มต่ำ และทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ในช่วงกว้าง และสภาวะแวดล้อมที่มีน้ำจืด หากสภาพความเค็มลดลงโดยที่สาหร่ายไส้ไก่สามารถเจริญเติบโตได้ในความเค็มที่ 0 psu หรือเท่ากับ 0 ppt ในเวลาที่จำกัดประมาณ 5 วัน. (Kamer and Fong, 2000) สาหร่ายไส้ไก่มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ดีมาก บางชนิดขึ้นอยู่ใต้ท้องเรือโดยสารที่แล่นไปมาระหว่างน้ำจืดและน้ำเค็ม ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงความเค็มตลอดเวลา (จริยาวดี, 2547) โดยเฉพาะตามชายฝั่งที่มีปริมาณธาตุอาหารสูงจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณมาก (Villares and Carballeira, 2003) พบได้ตลอดทั้งปี มีวงจรชีวิตเพียงช่วงสั้นๆ (Reine and Trono Jr, 2001) นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียว *Enteromorpha prolifera* (Muell.) J. Agardh ยังมีการกระจายอย่างกว้างขวางในเขตระหว่างน้ำขึ้น-น้ำลง ของมหาสมุทร (Lin *et al*., 2008)

2.2 การแพร่กระจายสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva* spp.

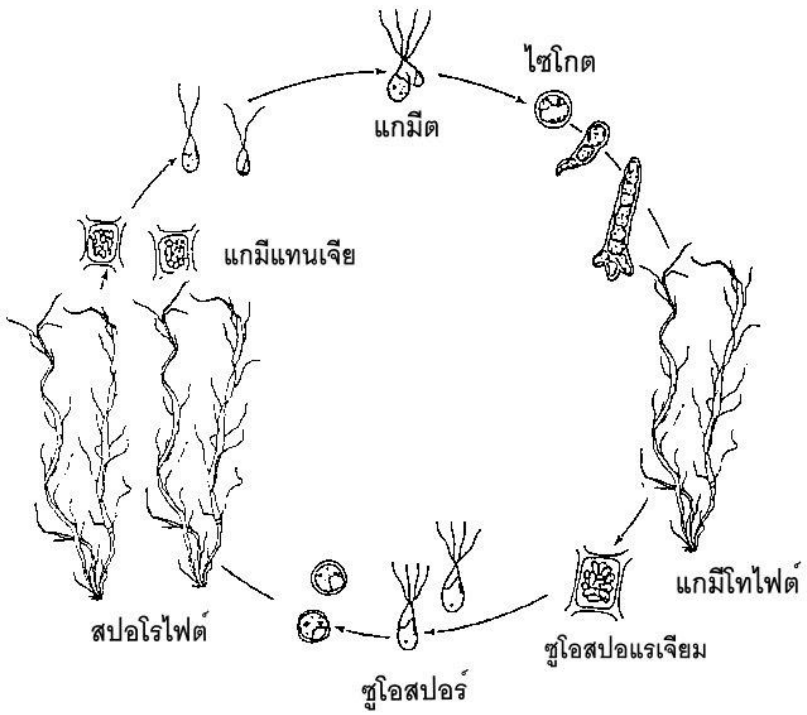
สาหร่ายชนิดนี้มีแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก พบขึ้นบนพื้นโคลนหรือบนก้อนหิน มักจะเกิดในเขตน้ำกร่อย สามารถเจริญอยู่ได้ในน้ำที่มีความเค็มต่ำ และทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ในช่วงกว้าง และบริเวณปากแม่น้ำตั้งแต่เขตน้ำขึ้นน้ำลง ซึ่งสามารถทนต่อการผึ่งแห้งขณะน้ำลงได้ ไปจนถึงเขตต่ำกว่าระดับน้ำลงต่ำสุด นอกจากนี้ยังพบในบ่อเลี้ยงปลา สาหร่ายชนิดนี้ชอบขึ้นในที่ที่มีธาตุอาหารสูง (Lobbon and Harrison, 2000) โดยสาหร่าย *Ulva intestinalis* สามารถเจริญเติบโตได้ดี ที่ความเค็ม 15 และ 25 psu และการเจริญเติบโตลดลงมาก

เมื่อความเค็มต่ำกว่า 5 หรือสูงกว่า 25 psu (Martins *et al.* 1999) และเนื่องจากสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม จึงพบได้ตามบริเวณปากแม่น้ำ ในพื้นทรายที่มีน้ำจืดไหลซึมเล็กน้อย สาหร่ายจะอาศัยรวมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ตามพื้นที่น้ำขึ้นน้ำลง บริเวณที่มีสารอินทรีย์โดยที่สาหร่ายชนิดนี้ทนทานต่อแร่ธาตุต่างๆ สาหร่ายจะยึดเกาะกับหินหรือปะการังซึ่งจะโดนอากาศระหว่างที่น้ำลด สามารถเป็นแหล่งกำบังแก่สัตว์อื่น ผนังเซลล์จะยึดติดกับหินพร้อมกับพืชชนิดอื่นๆ โดยเซลล์จะขยายออกเมื่อมีน้ำจืดไหลเข้าทำให้น้ำมีความเค็มต่ำและสามารถอาศัยในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28 ºC หรือสูงกว่า โดยสามารถเจริญเติบโตในน้ำที่ไหลตลอด อย่างไรก็ตามสาหร่ายไส้ไก่มีอัตราการเจริญเติบโตดีภายใต้สภาวะแสงมาก บางครั้งสาหร่ายสีเขียวอยู่รวมตัวเป็นจำนวนมากร่วมกับ *Ulva* spp. ชนิดอื่น พบตามบริเวณชายฝั่ง เมื่อน้ำลดสาหร่ายโผล่พ้นผิวน้ำเมื่อน้ำขึ้นตามปกติสาหร่ายมีการปล่อยสปอร์อย่างรวดเร็ว โดยที่สปอร์จะไปยึดติดกับวัตถุและเจริญเติบโตต่อไป

3 ชีววิทยาของสาหร่ายไส้ไก่

3.1 วงจรชีวิตของสาหร่ายไส้ไก่

สาหร่ายไส้ไก่มักเกิดขึ้นตลอดทั้งปีต่อเนื่องกัน แม้มีวงจรชีวิตสั้น วงจรชีวิตของสาหร่ายไส้ไก่เป็นแบบฤดูเดียว แบบสลับ คือระยะแกมีโตไฟต์สลับกับระยะสปอโรไฟต์ ระยะแกมีโตไฟต์จะสร้างแกมีต มีความยาว 6-7 ไมครอน รูปยาว และรูปไข่ มีหนวดสองเส้น และมีจุดรับแสง 1 อัน ทั้งแกมีตเพศผู้และแกมีตเพศเมียที่มีรูปร่างเหมือนกัน แต่เมื่อแกมีตคอนจูเกตกันจะมีพฤติกรรมเป็นแบบหนีแสง เมื่อได้ไซโกตจะเจริญเป็น ระยะสปอโรไฟต์ซึ่งเมื่อถึงระยะสืบพันธุ์จะสร้างเป็นซูโอสปอแรนเจียม รูปร่างคล้ายแกมีตแต่มีหนวด 4 เส้น และมีขนาดใหญ่กว่าแกมีต (9-10 μm) และเมื่อมีการปล่อยซูโอสปอร์ จะเจริญขึ้นเป็นระยะแกมีโตไฟต์ แต่ถ้าแกมีตเพศผู้และเพศเมียไม่คอนจูเกตกันจะเข้าสู่ขบวนการที่เรียกว่า พาทีโนเจนีซิส (parthenogenesis) ซึ่งเมื่อแก่เต็มที่จะปล่อยสปอร์มีหนวด 4 เส้น ซึ่งสปอร์เหล่านั้นจะเกาะกับที่ยึดเกาะต่างๆ และจะเจริญเติบโตต่อไป ซึ่งวงจรชีวิตของสาหร่ายไส้ไก่ ดัง **ภาพที่ 2** (Ohno 1997)



ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของสาหร่ายไส้ไก่ (ดัดแปลงจาก Ohno, 1997)

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Ulva* spp.

ปัจจัยและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม แสง และสารอาหาร ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไก่ โดยจะมีการศึกษาในเรื่องปัจจัยต่างๆ เช่น

Martins *et.al.* (1999) รายงานว่า สาหร่าย *Ulva intestinalis* จากชายฝั่งโปรตุเกส เจริญเติบโตได้ในที่ความเค็มต่ำสุด คือ 3 psu (1 psu ประมาณ 1 ppt) และสาหร่ายตายเมื่อความเค็มต่ำกว่าหรือเท่ากับ 1 psu และสาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ความเค็ม 15 และ 20 psu อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตในช่วงความเค็มที่สูงกว่า คือ 20-30 psu

สุวรรณา (2551) ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva (Enteromorpha) clathrata* (Roth) Greville 1830 ในน้ำทะเลที่ความเค็ม 9 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 psu ตามลำดับ ระดับละ 3 ซ้ำ เติมอากาศและปุ๋ยสูตรของกิลลาร์ด : F/2 ผูกติดกับตะกว้าในถังพลาสติกกลมปริมาตรน้ำ 40 ลิตร พบว่าสาหร่ายไส้ไก่ มีการเจริญเติบโตได้ดีอยู่ที่ระดับความเค็ม 15, 25 และ 15 psu โดยระยะเวลาที่ให้ผลผลิตสูงสุดในการเก็บเกี่ยวเป็นเวลา 10, 25 และ 15 วัน มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดเป็น 95.82±6.82 กรัม อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยมีค่าเป็น 3.72±0.45 กรัมต่อวัน และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าเป็นร้อยละ 26.78±0.80 ต่อวัน

Kamer และ Fong (2000) ได้นำสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* จากเขตน้ำกร่อยมาทิ้งไว้ในน้ำที่ความเค็ม 25 psu เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่ให้อาหาร หลังจากนั้นนำสาหร่ายไส้ไก่นำไปเลี้ยงที่ความเค็ม 0, 5, 15 และ 25 psu และให้อาหาร 1, 5, 11 และ 23 วัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะกลับมาเลี้ยงที่ความเค็มเดิม 25 psu ทำเช่นนี้มากกว่า 24 วัน พบว่าสาหร่ายไส้ไก่ที่สัมผัสกับน้ำความเค็ม 0 และ 5 psu ทำให้เม็ดสีลดลง มวลชีวภาพของ

น้ำหนักแห้งและเปียกลดลง และเพิ่มอัตราส่วนของน้ำหนักแห้ง : น้ำหนักสด และลดการดึงไนโตรเจน ฟอสฟอรัส จากน้ำและมีการสะสมของแอมโมเนียในน้ำที่ลดความเค็มลง 1 วัน และส่งผลกระทบต่อความเค็มน้อยที่สุด ส่วนการทดสอบที่ทุกระดับความเค็ม พบว่ามวลชีวภาพของสาหร่ายไส้ไก่เพิ่มขึ้นเมื่อมีความถี่ของการสัมผัสความเค็มเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ความเค็มต่ำมีผลทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไก่ลดลง และสาหร่ายไส้ไก่สามารถทนต่อการจุ่มในน้ำที่ 0 psu แต่ได้ในช่วงเวลาที่จำกัดและทนได้ประมาณ 1 และ 5 วัน

ชนัดดา และ คณะ (2549) ได้ทำการศึกษาสารอาหารต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* Linnaeus ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ตั้งแต่ในช่วงเริ่มเตรียมบ่อหลังจากการเก็บเกี่ยว โดยไม่นำเลนจากก้นบ่อออก สูบน้ำจากบ่อพักน้ำ เข้ามาในบ่อเลี้ยงขนาด 4 ไร่ จากนั้นนำสาหร่าย *U. intestinalis* มาขยายพันธุ์ในบ่อทดลองทั้ง 3 บ่อ และวัดมวลชีวภาพของสาหร่ายทุก 10 วัน ตั้งแต่ก่อนปล่อยลูกกุ้งและเลี้ยงจนกระทั่งสาหร่ายหมดจากบ่อทดลอง ผลจากการศึกษาพบว่า ปริมาณ NH^{+}_{3}-N, NO_4-N, และ PO^{3-}_{4} –P ในน้ำมีผลต่อการเจริญเติบโตและมวลชีวภาพของสาหร่าย *U. intestinalis* เมื่อปริมาณ NH^{+}_{3}-N เพิ่มขึ้น มวลชีวภาพของสาหร่ายเพิ่มขึ้น ปริมาณสารอินทรีย์ในดินและไนโตรเจนรวม ไม่มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต ของสาหร่าย *U. intestinalis* แต่ฟอสฟอรัสรวมในดินมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *U. intestinalis* มวลชีวภาพของสาหร่าย *U. intestinalis* ทั้ง 3 บ่อทดลอง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

Pellizzari และ Oliveira (2007) ได้ทำการศึกษา วงจรชีวิต วิวัฒนาการ และปัจจัย ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Gayralia* spp. ซึ่งเป็นสาหร่ายที่อยู่ใน Class Ulvophyceae และ Order Ulvales เช่นเดียวกับ *Ulva* จากตัวอย่างที่เก็บในทางตอนใต้ของบราซิล โดยพบว่าสาหร่าย *Gayralia* spp สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 16-30 ºC และสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20.0-21.5 ºC โดยใช้ระยะเวลาการเลี้ยง 30 วัน

4 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Ulva* spp.

ในประเทศญี่ปุ่นจึงมีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Ulva intestinalis* และ *Ulva prolifera* โดยวิธีการรวมรวมพันธุ์ มี 2 วิธี คือ จากธรรมชาติ และจากการเพาะเลี้ยง วิธีแรกทำโดย นำอวนขนาด 1.2 x 18.0 ม.^{2}. ขนาดตา 1.5 ซม. ไปดักสปอร์จากธรรมชาติ ในบริเวณที่มีสาหร่าย *Ulva* ขึ้นอยู่ ในระหว่างน้ำขึ้น ในเดือนกันยายน –เดือนตุลาคม เมื่อต้นสปอโรไฟต์สร้างซูโอสปอร์ที่มีหนวด สี่เส้น เมื่อปล่อยออกมาจะว่ายน้ำมาเกาะกับอวน จึงนำอวนที่มีสปอร์เกาะไปยังแหล่งอนุบาลบริเวณชายฝั่ง เลี้ยงไว้ 2-3 สัปดาห์ ก็จะเห็นต้นอ่อนงอกออก ส่วนวิธีการเพาะในโรงเพาะทำได้โดยเก็บต้นพันธุ์ที่สะอาด ไม่มีอิพิไฟต์ และ เจริญพันธุ์แล้ว มากระตุ้นให้ปล่อยสปอร์ โดยนำแทลลัส หรือต้นสาหร่ายมาผึ่งลม วางในที่มืดระยะหนึ่ง แล้วจึงนำแทลลัสไปใส่ในถังที่มีน้ำทะเลที่ผ่านการกรองอยู่ สปอร์จะปล่อยใน 6-12 ชม. จึงทำการเก็บสปอร์โดยใช้แสงล่อ สปอร์จะว่ายน้ำมาออยู่บริเวณที่ได้รับแสงในเวลา 30 นาที ตักใส่น้ำที่มีสปอร์หนาแน่นใส่ภาชนะ นำไปใส่ในถัง ที่มีอวนขนาด 1.2 x 18.0 ม.^{2}. ขนาดตา 1.5 ซม. โดยการสาดน้ำทะเลที่มีสปอร์อยู่ในทั่วถัง จากนั้นจึงปิดถังให้มืด สปอร์จึงลงเกาะ ปล่อยทิ้งไว้หลายวัน ให้สปอร์งอกเป็นต้นอ่อน จึงนำอวนไปอนุบาลที่ปากแม่น้ำ โดยซ้อนอวนหลายชั้น อนุบาลไว้ 2-3 สัปดาห์ จนงอกเป็นต้นอ่อน จึงลำเลียงไปยังแหล่งเลี้ยง โดยการผูกติดกับหลัก ขึงอวนที่มีสปอร์ให้อยู่ในแนวน้ำขึ้นน้ำลง ให้อวนผึ่งแห้ง ประมาณ 4 ชม ช่วงน้ำลง หรือการใช้ทุ่นขึง เพื่อเลี้ยงในที่น้ำลึก ใช้ทุ่นลอย อวนต่ำกว่าผิวน้ำ 30-50 เซนติเมตร เลี้ยง 3-4 เดือน เก็บเฉพาะแทลลัสที่โตได้ขนาด โดยผลผลิต ได้ 300-500 กรัมน้ำหนักแห้ง ต่อผืน หรือ ได้ 60-220 กรัมน้ำหนักแห้ง ต่อ ตร.ม. เลี้ยงได้ปี

ละ 3-4 ครั้ง การเก็บใช้ได้ทั้งมือหรือเครื่องจักร การเก็บด้วยมือจะได้สาหร่ายที่มีคุณภาพดี ส่วนการเก็บด้วยเครื่องจักรจะทำได้รวดเร็ว ผลผลิตที่ได้นำไปแปรรูป โดยการล้าง น้ำจืด ตากแดด หรือ อบให้แห้ง สำหรับใช้เป็นอาหาร ใช้ ทำแยม ซุป ทำผงโรยข้าว (Ohno and Critchley, 1997)

พฤติกรรมการยึดเกาะของสปอร์สาหร่าย *Ulva intestinalis* คล้ายคลึงกับ *Ulva prolifera* โดยซูโอสปอร์มีการยึดเกาะกันเอง และการเกิดการงอกแบบกลุ่มก้อน (germling cluster) (Hiraoka and Oka, 2008) แม้ว่า *Ulva prolifera* จะมีการสืบพันธุ์ได้ทั้งสองแบบคือแบบอาศัยเพศ และแบบไม่อาศัยเพศ แต่ส่วนใหญ่ในสาหร่าย *Ulva prolifera* ที่ปล่อยจากปลายแทลลัสเป็นแบบไม่อาศัยเพศ ได้ซูโอสปอร์ออกมา (Lin *et al.* 2008)

สำหรับประเทศไทยได้มีการนำสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* มาเลี้ยงร่วมกับกุ้งกุลาดำ (สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย, 2550) และได้มีการส่งเสริมให้เลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากพบว่าในบ่อที่มีสาหร่ายไส้ไก่เป็นจำนวนมากจะมีสัตว์และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กซึ่งเป็นอาหารธรรมชาติอย่างอุดมสมบูรณ์ ทำให้ไม่มีความจำเป็นต้องให้อาหารในระยะแรกของการเลี้ยงเมื่อสาหร่ายเริ่มลดปริมาณลงและหมดไป อาจจะนานถึง 50-60 วัน จะได้กุ้งมีขนาดความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร จึงเริ่มให้อาหารวันละ 2 มื้อ เลี้ยงนาน 5-6 เดือนอย่างไม่มีปัญหาโรคระบาด เมื่อจับกุ้งจะได้ขนาด 20-30 ตัวต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นกุ้งขนาดใหญ่ ทำให้ได้ราคาสูง เป็นแนวทางของการเลี้ยงกุ้งอินทรีย์ที่มีผลดีต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2550) โดย ประยูร และคณะ (2549) รายงานว่า ในบ่อที่มีสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* เจริญเติบโตประมาณ 30% ของพื้นที่บ่อ เมื่อปล่อยลูกกุ้งกุลาดำลงไปเลี้ยง กุ้งจะมีการเจริญเติบโตดีโดยไม่ต้องให้อาหารจนกว่าสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อหมดไป ซึ่งใช้เวลาประมาณ 50 วัน หลังจากนั้นจึงเริ่มให้อาหาร วิธีการนี้สามารถผลิตกุ้งกุลาดำได้ขนาดใหญ่และมีต้นทุนต่ำ

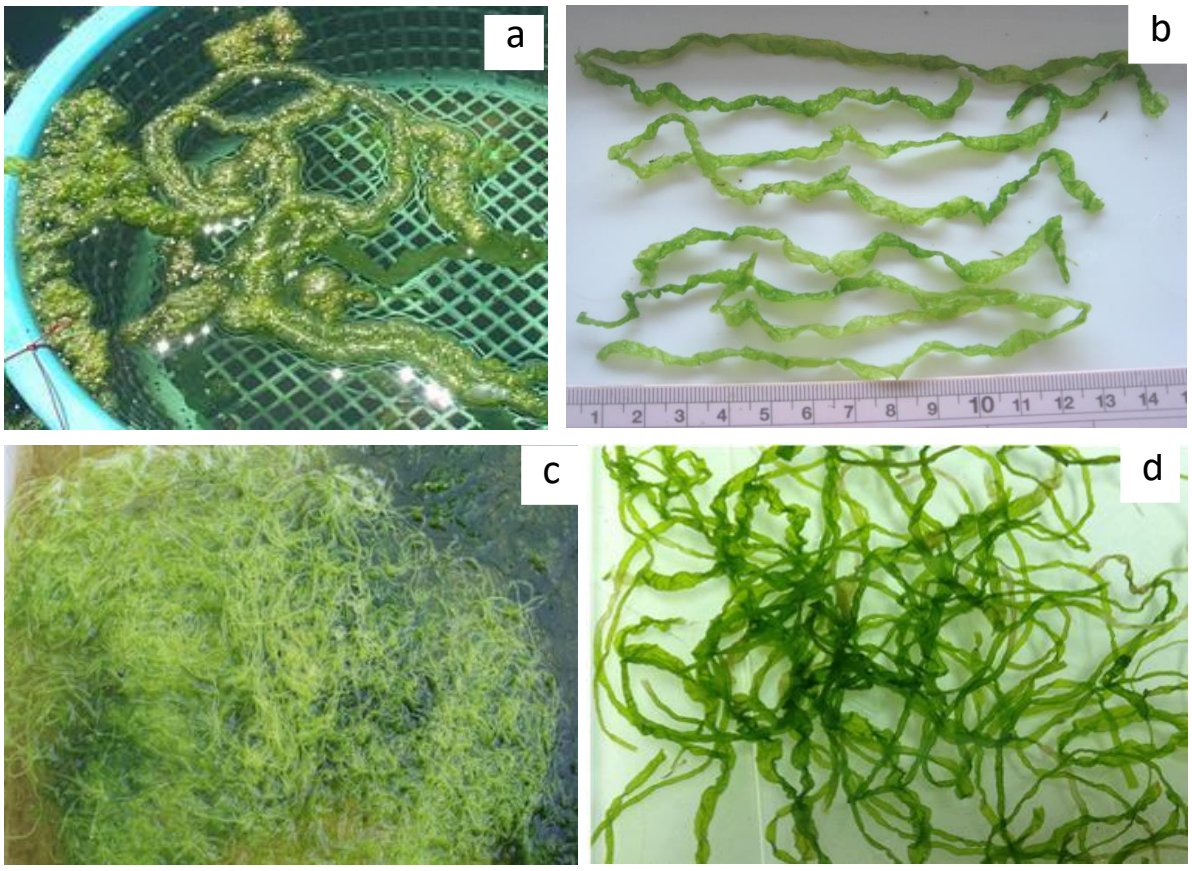
5. คุณค่าสารอาหารของสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis*

คุณค่าสารอาหารของสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 19.5 ไขมันร้อยละ 0.3 คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำร้อยละ 58.1 คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ 6.8 และเถ้าร้อยละ 15.2 ของน้ำหนักแห้ง โดยมีแร่ธาตุที่สำคัญ ในหน่วยของมิลลิกรัม ต่อร้อยกรัม น้ำหนักแห้ง คือ แคลเซียม 910 ฟอสฟอรัส 800 เหล็ก 35 โซเดียม 570 โพแทสเซียม 3,500 (Aguilera - Morales et al. 2005; FAO, 1987)

วิธีการศึกษา

1 การเพาะพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่

1.1 การศึกษารูปแบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่จากธรรมชาติ โดยการเก็บต้นพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่จาก 4 แหล่ง ได้แก่ อ่าวปัตตานี บ่อดิน บ่อซีเมนต์ มาล้างทำความสะอาด สุ่มสาหร่ายแหล่งละ 30 ต้น มาตรวจสอบดูลักษณะภายนอก ได้แก่ สี ลักษณะผิว และ แทลลัส ตรวจสอบการสร้างและไม่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ ในขณะเก็บตัวอย่างมีการตรวจสอบคุณสมบัติบางประการของสภาวะแวดล้อม ได้แก่ ความเข้มแสง อุณหภูมิอากาศ อุณหภูมิน้ำ ความเค็ม พีเอช ไนเตรท ฟอสเฟต วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสภาวะแวดล้อมกับการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยใช้ ซอร์ฟแวร์ PAST ตัวอย่างการเก็บสาหร่ายไส้ไก่จากแหล่งที่แตกต่างกันดัง **ภาพที่ 3**

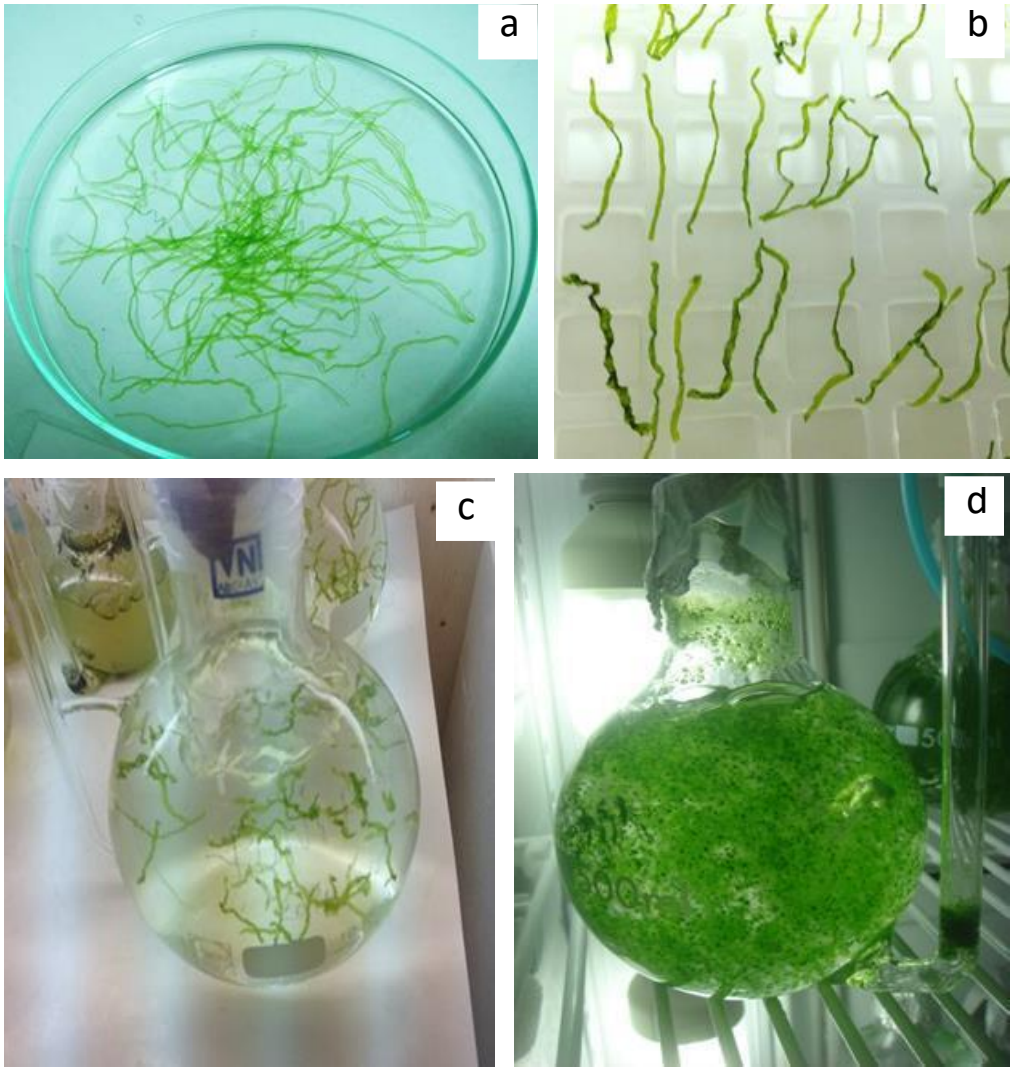


ภาพที่ 3 ตัวอย่างสาหร่ายไส้ไก่จากแหล่งที่มาแตกต่างกัน: จากบ่อซีเมนต์ (a และ b) และ จากชายฝั่งปัตตานี c และ b

1.2 การศึกษาสภาวะการกระตุ้นให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ นำต้นพันธุ์ที่ยังไม่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยนำสาหร่ายไส้ไก่มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำที่มีความเค็มระดับเดียวกับในธรรมชาติ การชั่งสาหร่าย 0.5 กรัม นำมากระตุ้นด้วยวิธีการซึ่งเลียนแบบจากธรรมชาติ จากที่สาหร่ายเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่มักขาดหลุดลอยบริเวณผิวน้ำและถูกพัดพาไปติด

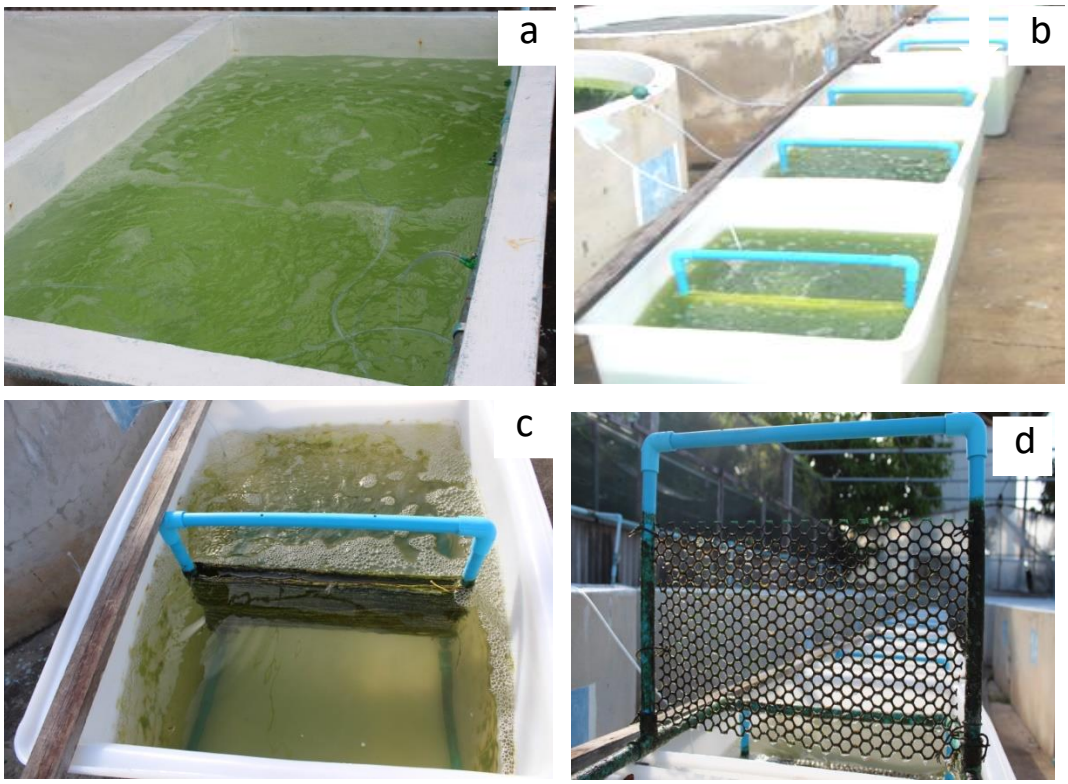
ที่แห้งบริเวณขอบบ่อ การกระตุ้นด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ การผึ่งลมและเก็บในที่มืด 12 ชั่วโมง การเพิ่มอุณหภูมิ (35 °C) หลังจากกระตุ้น นำสาหร่ายไส้ไก่ลงเลี้ยงในจานแก้วขนาดใหญ่ ใส่น้ำท่วม เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 20-25 °C (Hiraoka and Oka, 2008) ตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก 1-2 วัน เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์

1.3 การศึกษาวิธีการล่อหรือกระตุ้นให้ปล่อยสปอร์ โดยนำต้นพันธุ์ที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แล้ว จาก ข้อ 1.2 มากระตุ้นให้ปล่อยสปอร์ โดยวิธีการได้แก่ การลดความเค็ม (10 ppt) การได้รับแสงสูงที่ 200 µmol m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 3 ชั่วโมง การเติมสารอาหารใหม่ และการตัดสาหร่ายเป็นชิ้นเล็ก 2-3 มิลลิเมตร (Hiraoka and Oka, 2008) ในใส่ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรซึ่งมีขาต่อพิเศษเพื่อให้อากาศ แลมีน้ำทะเลใหม่ที่มีความเค็มเท่าเดิม วางเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25 °C ให้แสง 80 µmol m^{-2} s^{-1} โดยทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ หลังจากนั้น จึงนำสาหร่าย ตรวจสอบการปล่อยสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์ และ ตรวจ ความหนาแน่น ในแต่ละฟลาสก์ทุกวัน โดยการสุ่มนับเซลล์สืบพันธุ์ที่ปล่อยด้วยสไลด์ Hemacytometer จนกระทั่งมีการปล่อยสปอร์ลดลง **ภาพที่ 4**



ภาพที่ 4 การกระตุ้นการสร้างและปล่อยสปอร์ของสาหร่ายไส้ไก่: การตัดท่อนพันธุ์ (a) การผึ่งแห้งท่อนพันธ์ (b) การเลี้ยงเพื่อกระตุ้นท่อนพันธุ์ (c) และ ต้นอ่อนจากสปอร์ (d)

1.4 การศึกษาวิธีดักสปอร์จากถังลงบนอวนและ เชือก โดยกระตุ้นให้สาหร่ายปล่อยสปอร์ออกมาในถังพลาสติก ขนาด 200 ลิตร หลังจากนั้นจึงเก็บสปอร์ใช้วิธีปิดถังที่มีสปอร์ให้มืด และเปิดช่องให้แสงส่องเล็กน้อย ทิ้งไว้ 30 นาที จึงตักน้ำทะเลดังกล่าวนำน้ำดังกล่าวไปเทในบ่อหรือถังพลาสติกสีเหลี่ยม ขนาด 1 ตัน ที่มีน้ำทะเล 500 ลิตร เจือจางให้มีสปอร์ 10,000,000 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร ใช้วัสดุเกาะ 3 ชนิด ได้แก่ แผ่นพลาสติก อวน ขนาดตา 2-3 ซม และ เชือกโพลีเอทธีลีนพันกรอบสี่เหลี่ยม จุ่มในน้ำเลี้ยงที่มีสปอร์ ในระยะเวลาต่างๆ กัน ได้แก่ ทำการสุ่มตัวอย่างอวนขึ้นมาตรวจสอบความหนาแน่นและการเกาะของสปอร์ ที่ 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ จนสปอร์เกาะติดดี จึงยกอวนออก สปอร์ส่วนที่เหลือทิ้งไว้ให้เกิดการเกาะกันเองเป็นกลุ่มก้อน (germling cluster) (Hiraoka and Oka, 2008) การศึกษาการกระตุ้นการสร้างและปล่อยสปอร์ของสาหร่ายไส้ไก่ **ดังภาพที่ 5**



ภาพที่ 5 การลงเกาะของสปอร์สาหร่ายไส้ไก่บนวัสดุต่างๆ : มวลของสปอร์ในน้ำ (a) ถังทดลอง (b) วัสดุอวนในถังทดลอง (c) และ วัสดุรังผึ้ง (d)

2 การเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่

2.1 **การเลี้ยงในบ่อซีเมนต์** ใช้บ่อขนาด 1x1x2 เมตร นำต้นอ่อนขนาด 2 เซนติเมตร จากการเพาะเลี้ยงแบบ free floating ที่ความหนาแน่น 25,000 37,500 และ 50,000 ต้นต่อตร.ม.ใส่ในบ่อมีการให้อากาศตลอดเวลา และมีการเติมสารอาหาร (MGM) สัปดาห์ละครั้ง ระหว่างการเลี้ยงมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกสัปดาห์ ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยเก็บเกี่ยวสาหร่ายทั้งหมดขึ้นมาชั่งน้ำหนักสด ทุกๆ 1 สัปดาห์ และนำกลับไปเลี้ยงต่อ สังเกตลักษณะสีแทลลัส ความสมบูรณ์และตรวจดูการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และสุ่มเก็บชิ้นส่วน บ่อละ 30 แทลลัส มาตรวจวัดความยาว วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในบ่อซีเมนต์ดัง **ภาพที่ 6**

จากนั้นนำมาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตดังสูตร

$$\mu = 100 \ln (N_t / N_0) \cdot t^{-1}$$

เมื่อ μ = ร้อยละของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

N_0 = น้ำหนักเมื่อเริ่มเลี้ยง

N_t = น้ำหนักผลผลิตสุดท้าย

t = ระยะเวลาในการเลี้ยง

2.2 การศึกษารูปแบบการเลี้ยงในบ่อดิน โดยการเตรียมบ่อดินขนาด กว้าง 3 เมตร ยาว12เมตร โดยทำการขุดลอกทางน้ำเข้า ปล่อยน้ำเข้าบ่อในช่วงน้ำขึ้น โดยทำการวิจัย ที่แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ตรวจสอบระดับน้ำและคุณภาพน้ำในบ่อ โดยใช้วัสดุ 3 รูปแบบคือ เชือก อวน และแผ่นพลาสติกในการล่อสปอร์ให้ลงเกาะแล้ว สุ่มชั่งน้ำหนักก่อนเลี้ยงนำต้นพันธุ์ลงเลี้ยงในบ่อดิน โดยการนำแผ่นพลาสติก อวน เชือกที่สปอร์ลงเกาะแล้วขนาด 0- 3 มิลลิเมตรนำอวน เชือก และแผ่นพลาสติกผูกติดกับไม้ที่ปัก เป็น 4 เหลี่ยมลงเลี้ยงในบ่อดินจำนวน 6 บ่อ และกลุ่มต้นอ่อนเกิดการเกาะกลุ่มกันเองเป็นกลุ่มก้อน (germling cluster) อยู่อิสระลงเลี้ยงโดยปล่อยลงไปในบ่อดินจำนวน 6 บ่อ โดยให้มีความหนาแน่น ของต้นอ่อนเท่ากันหรือ 10,000 ต้น ต่อตร.ม. ในการเลี้ยงในบ่อดิน ไม่ให้มีการหมุนเวียนน้ำ ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในบ่อดินโดยสุ่มเก็บสาหร่ายบ่อละ 30 แทลลัส มาตรวจวัดความยาวนำสาหร่ายขึ้นมาชั่งน้ำหนักทุกสัปดาห์ สังเกตลักษณะสีแทลลัส ความสมบูรณ์และตรวจดูการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ **ภาพที่ 7**

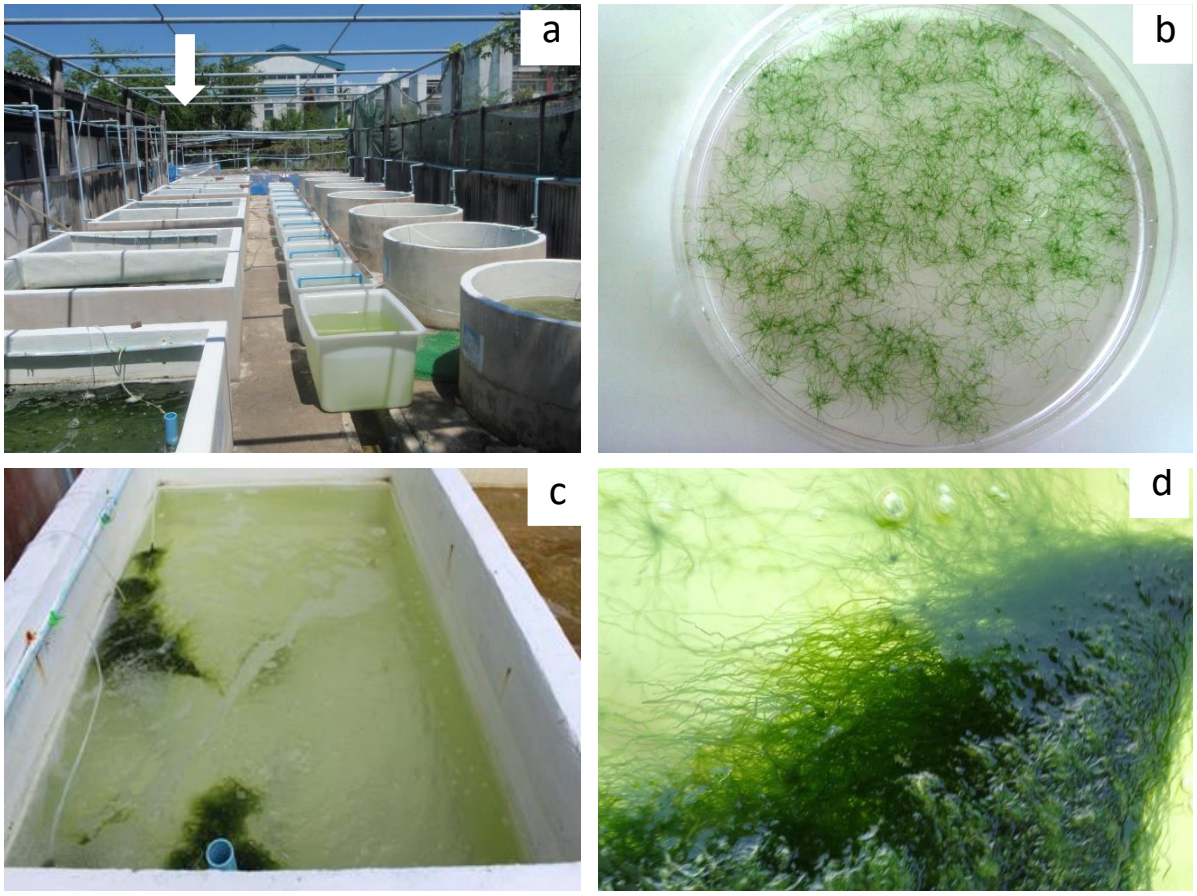
2.3 การศึกษาสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำบางประการที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของสาหร่าย ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ไนเตรท และฟอสเฟต ในบ่อสาหร่ายสัปดาห์ก่อนลงสาหร่าย และระหว่างการเลี้ยงสาหร่ายทุกสัปดาห์

2.4 การศึกษาปริมาณผลผลิต โดยเลี้ยงรุ่นละ 2 เดือน โดยทำการเก็บเกี่ยวสาหร่าย มาชั่งน้ำหนักสด และแบ่งตัวอย่างจากในบ่อดิน และ บ่อซีเมนต์ นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เพื่อหาสัดส่วนของน้ำหนักสด ต่อน้ำหนักแห้ง

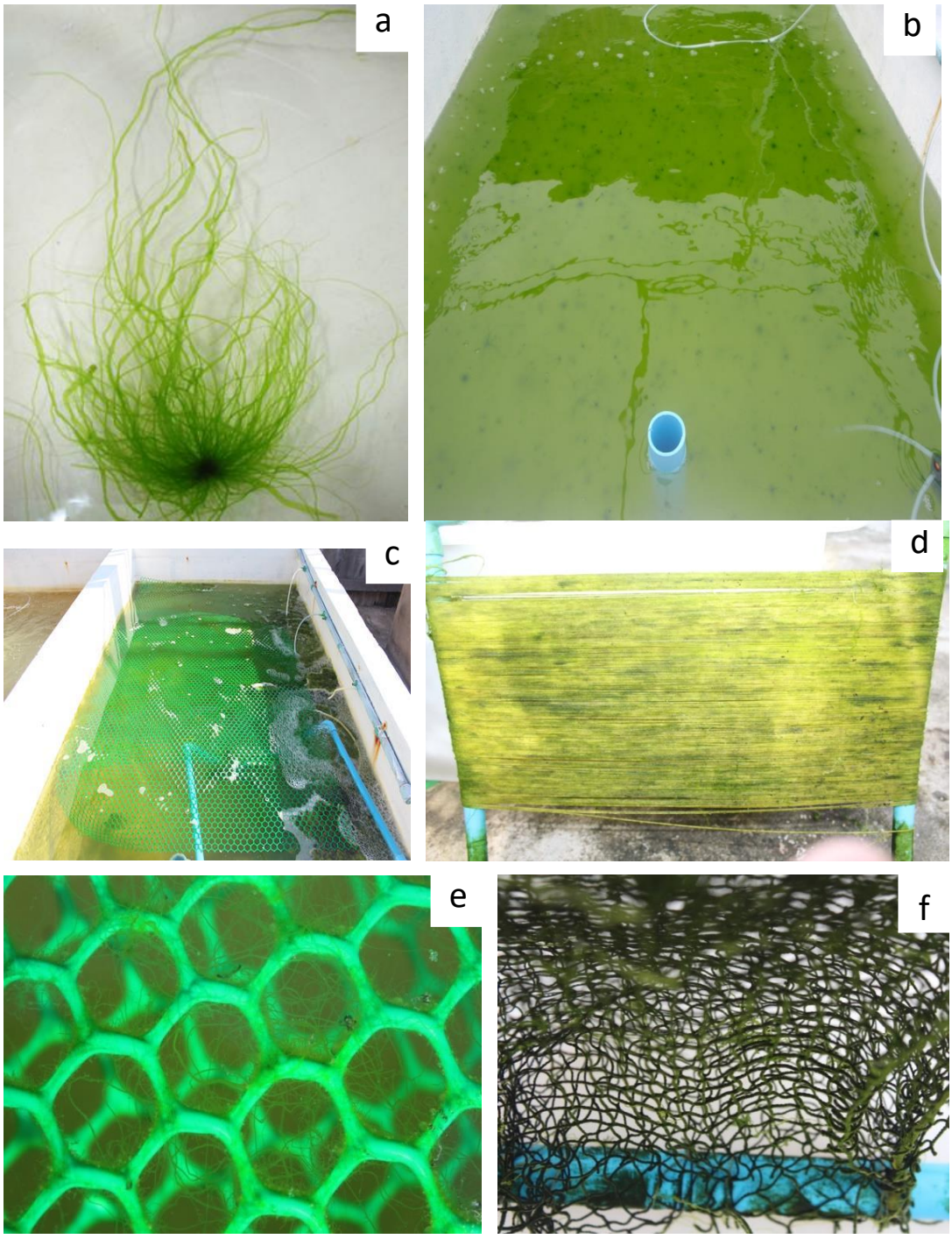
2.5 การศึกษาการลงทุนและผลตอบแทน

คำนวณหาการลงทุนและผลตอบแทนการเลี้ยง 3 แบบ ได้แก่ ในบ่อดิน และในบ่อซีเมนต์

2.6 วิเคราะห์หาความแตกต่างของการเจริญเติบโตในบ่อดิน และในบ่อซีเมนต์ โดยเก็บข้อมูลความยาวครั้งละ 30 ค่า และสุ่มวัดจากตารางสุ่ม 3 ค่า นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผล โดยใช้โปรแกรม SPSS แบบ One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นคู่ โดยวิธีของ Kukey HSDa การสรุปผลการศึกษา เขียนรายงาน และเผยแพร่



ภาพที่ 6 การเลียงสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อซีเมนต์: บ่อเลี้ยง (ศรชี้ a) ต้นอ่อน (b) การเลี้ยงในบ่อ 1 สัปดาห์ (c) สาหร่ายไส้ไก่ ในบ่ออายุ 1 สัปดาห์ (d)

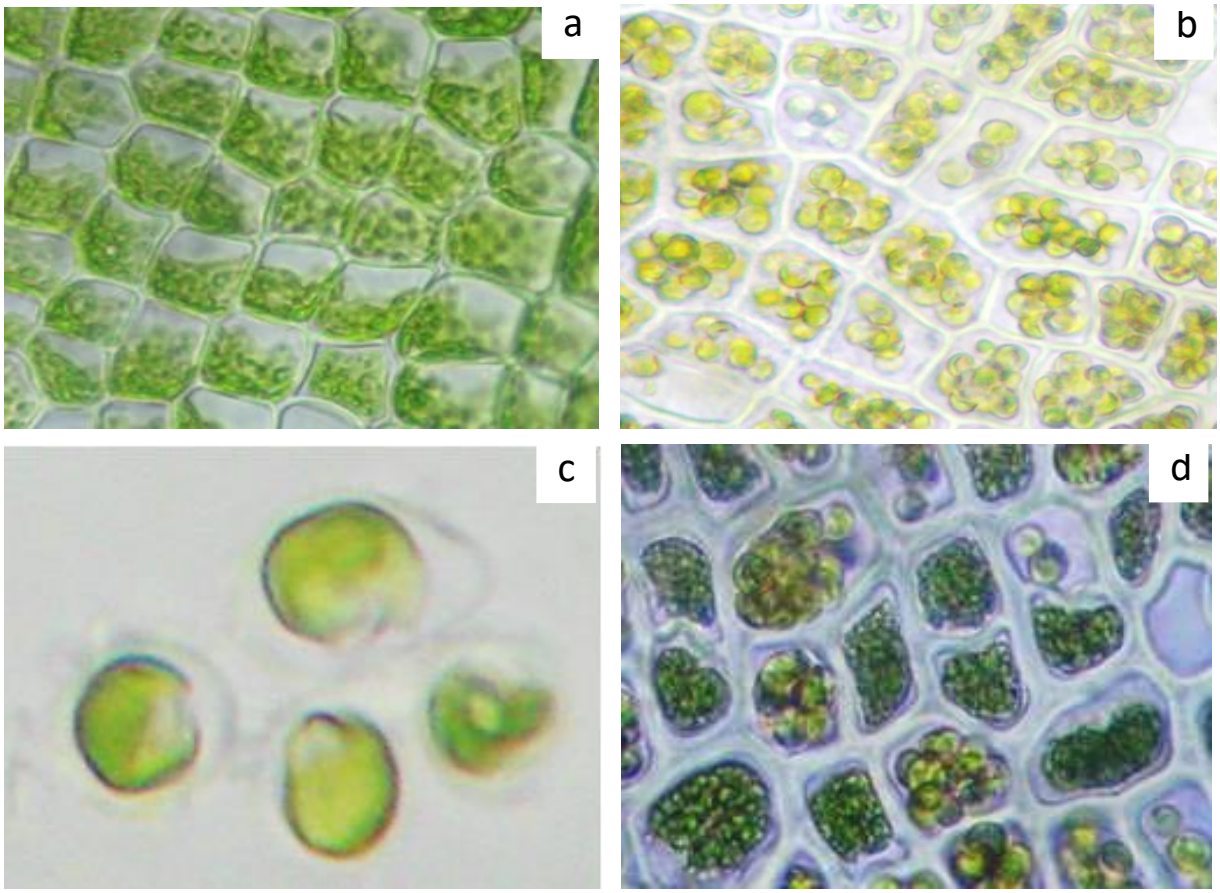


ภาพที่ 7 การเพาะพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่บนวัสดุเกาะ: ต้นพันธุ์ (a) การเพาะสปอร์ในบ่อ (b) การล่อสปอร์ด้วยวัสดุเกาะ (c) วัสดุเกาะอวน (d) วัสดุเกาะพลาสติกรังผึ้ง (e) วัสดุเกาะอวน (f)

ผลการศึกษา

1.1 การศึกษารูปแบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่จากธรรมชาติ

การศึกษารูปแบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ จาก 4 แหล่ง โดยการเก็บต้นพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่จาก 4 แหล่ง ได้แก่ อ่าวปัตตานี บ่อดิน บ่อซีเมนต์ และ ห้องปฏิบัติการ พบว่าลักษณะเซลล์ของสาหร่ายไส้ไก่มีรูปร่างหลายเหลี่ยมเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ ขนาดของเซลล์ก่อนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมเส้นผ่านศูนย์กลาง 7±1 μm ขอบเซลล์มีคลอโรพลาสต์ ข้างในเซลล์พบ ไพรีนอยด์ 2.0±0.6 เซลล์ สาหร่ายไส้ไก่จากห้องปฏิบัติการมีการสร้างอับซูโอสปอร์เพียงอย่างเดียว ในอับซูโอสปอร์มี 13±3 โพรโทพลาสต์ แต่ละโพรโท พลาสต์มีขนาด 3±1x4±1 μm มีสีเขียวอ่อน เมื่อมีการปล่อยซูโอสปอร์มีขนาด 4±1x5±1 μm สำหรับอับของเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศ มีสีเขียวเข้ม พบในสาหร่ายที่ได้จากบ่อดินและบ่อซิเมนต์ โดยแกมีตที่อยู่ภายในมีเซลล์ขนาดเล็กกว่าซูโอสปอร์ 3 เท่า ส่วนสาหร่ายไส้ไก่จากอ่าวปัตตานีมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งแบบแกมีตและแบบซูโอสปอร์ในท่อนพันธุ์เดียวกัน ดัง**ภาพที่ 8**



ภาพที่ 8 ลักษณะเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ (a) เซลล์ผิวที่ยังไม่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ (b) เซลล์สืบพันธุ์แบบอับซูโอสปอร์ (c) เซลล์สืบพันธุ์แบบแกมีต (d) เซลล์สืบพันธุ์แบบแกมีตและซูโอสปอร์

ต้นพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่จากบ่อซีเมนต์ที่ แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พบว่า แทลลัสมีขนาดเส้นเล็ก ลอยบริเวณผิวน้ำ มีสีเขียวอ่อน บางต้นพันธุ์มีการพองเป็นหลอดกลวง ต้นพันธุ์ที่อยู่ในน้ำมีสีเขียวเข้มลักษณะหงิกงอ มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศหรือแบบแกมีตร้อยละ 100 โดยสาหร่ายมีความยาวเฉลี่ย 13.7±4.2 เซนติเมตร ความกว้างเฉลี่ย 1.9±0.1 มิลลิเมตร **(ตารางที่ 1)** ตรวจสอบคุณภาพน้ำพบว่า ระดับอุณหภูมิในช่วง 32±1°C ในระดับความเค็ม 20±0 ppt ปริมาณฟอสเฟตอยู่ในช่วง 0.129±0.001 mgL^{-1} ปริมาณไนเตรท 0.0053±0.0001 mg L^{-1} ค่าความเข้มแสง 1,142±211 µmol m^{-2} s^{-1}

สาหร่ายที่เก็บจากบ่อดินบริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แทลลัสที่บริเวณผิวน้ำมีสีเขียวอ่อนถึงเหลือง (ภาพที่ 5b) ลักษณะหงิกงอมีขนาดกว้าง 2.1±0.6 มิลลิเมตร ความยาวประมาณ 9.7±2.0. เซนติเมตร พบสาหร่ายมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบแกมีตทั้งหมด ปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจน 0.0007±0.0006 mgL^{-1} ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส 0.03±0.00 mgL^{-1} ค่าความเข้มแสง 1,137±217 µmol m^{-2} s^{-1} **(ตารางที่ 1)**

สาหร่ายที่เก็บรวบรวมจากบริเวณชายฝั่งปัตตานี อ่าวปัตตานี แทลลัสมีขนาด 2.0±0.2 มิลลิเมตร ยาว 13.1± 2.9 เซนติเมตร (ตารางที่ 5) แทลลัสมีสีเขียวถึงเขียวเข้ม หงิกงอคล้ายลำไส้ พบการปนเปื้อนจากหอย (ภาพที่ 5c) มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบแกมีต และแบบผสมระหว่าง แกมีตและซูโอสปอร์ pH ของน้ำอยู่ระหว่าง 8.0 ± 0.0 อัลคาไลด์ และ Hardness ของน้ำอยู่ในช่วง 131±7 , 2,308 ± 155 mgL^{-1} ปริมาณไนเตรท 0.0002 ± 0.0001 mgL^{-1} ฟอสเฟต 0.05 ± 0.01 mgL^{-1} ค่าความเข้มแสง 967±160 µmol $m^{-2}s^{-1}$ **(ตารางที่ 1)**

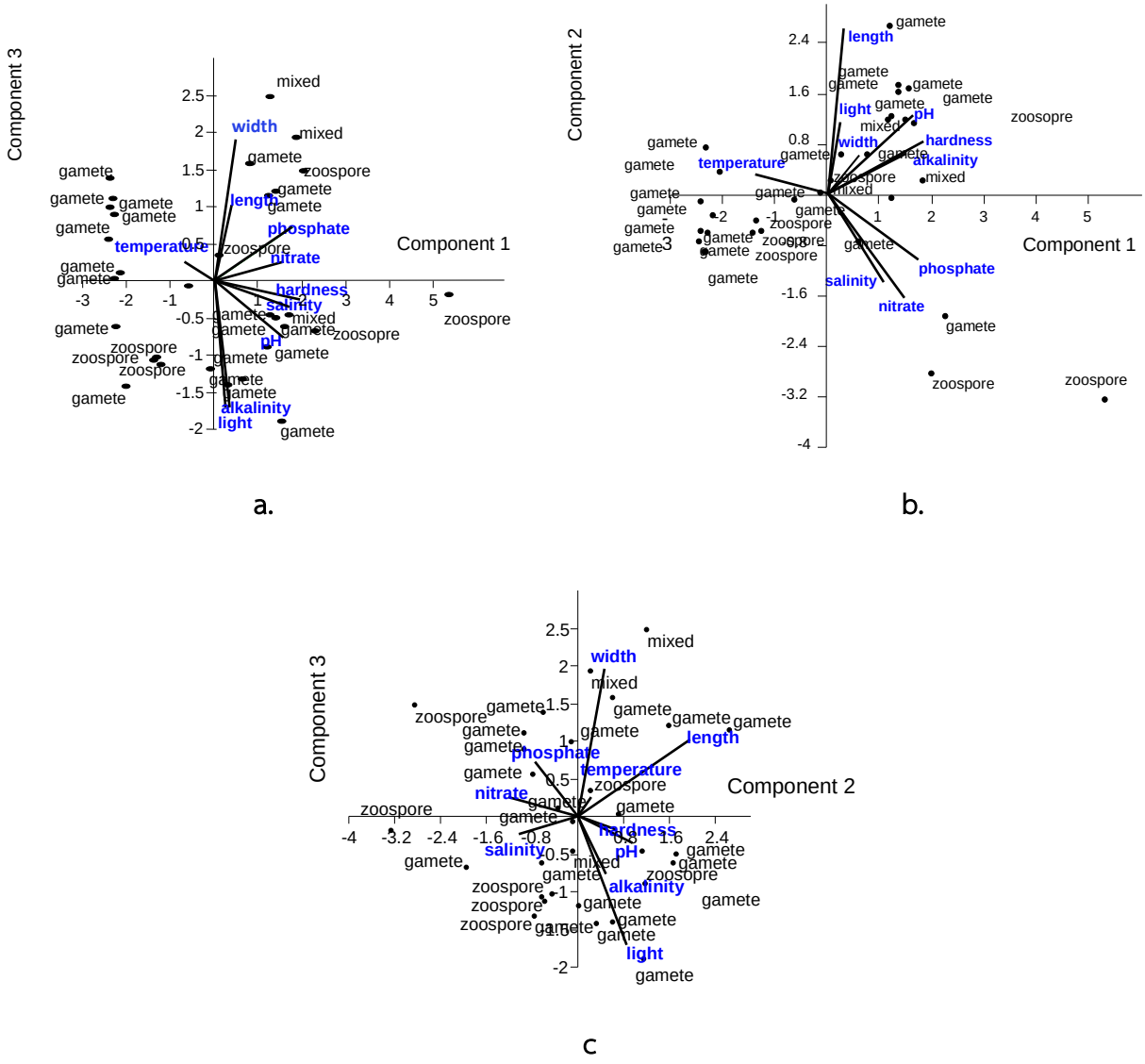
สาหร่ายที่เก็บจากห้องปฏิบัติการมีอัตราการเจริญเติบโตช้า มีการปนเปื้อนน้อย พบการสร้างเซลล์แบบซูโอสปอร์ 100 เปอร์เซ็นต์ มีสีเขียว ขนาดแทลลัส 1.9 ± 0.0 มิลลิเมตร ความยาว 9.5 ± 0.7 เซนติเมตร pH ของน้ำอยู่ระหว่าง 8.12 อัลคาไลด์ของน้ำอยู่ในช่วง 130 ± 4 mgL^{-1} Hardness 2,957 ± 78 mgL^{-1} ปริมาณไนเตรท 0.0001 ± 0.0000 mgL^{-1} ฟอสเฟต 0.0034 ± 0.0007 mgL^{-1} ค่าความเข้มแสง 60±1 µmol m^{-2} s^{-1} **(ตารางที่ 1)**

ตารางที่ 1 ลักษณะของสาหร่ายไส้ไก่ และคุณสมบัติของน้ำที่เก็บจากแหล่งต่างๆ

Parameters	Source of thalli			
	Tank	Pond	Bay	Laboratory
The alga				
Length (cm)	13.7±4.2	9.7±2.0	13.1±4.9	9.5±0.7
Width (cm)	1.9±0.1	2.1±0.6	2.0±0.8	1.9±0.0
Gamete type	gamete	gamete	gamete, mixed	zoospore
Thallus habit	floating on water surface	floating on water surface	Attach on bottom	floating
Color	green	bright green	green	dark green
The water				
Alkalinity (mg/l)	132±7	127±2	131±7	130±4
Phosphate-phosphorous (mg/l)	0.129±0.001	0.033±0.001	0.056±0.019	0.003±0.001
Nitrate-nitrogen (mg/l)	0.0053±0.0001	0.0008±0.0007	0.0002±0.0002	0.0001±0.0001
Hardness (mg/l)	2586±50	2068±137	2308±155	2957±78
pH	7.8±0.2	8.3±0.0	8.0±0.0	8.1±0.0
Salinity (ppt)	20±0	20±0	22±0	25±0
Water temperature (°C)	32±1	35±1	33±1	25±1
Light intensity ($\mu molm^{-2}s^{-1}$)	1,142±211	1,137±217	967±160	1,010±1

หมายเหตุ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ± ยาเฉลี่แสดงค่า :(n=3)

จากการหาค่าความสัมพันธ์พบว่าร้อยละของความแปรปรวนขององค์ประกอบที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 37.33, 16.407 และ 13.174 ซึ่งพบว่า การสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบผสมทั้งสองแบบในต้นเดียวกันสัมพันธ์เชิงบวกกับความกว้างของแทลลัส ส่วนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศ หรือแกมีต สัมพันธ์แบบผกผันกับค่าความเป็นด่างและแสง แต่มีสัมพันธ์ในเชิงบวกกับ ความยาวของแทลลัส **ภาพที่ 9**



ภาพที่ 9 ค่าความสัมพันธ์ของความแปรปรวนระหว่างชนิดเซลล์สืบพันธุ์และสภาพแวดล้อม

1.2 การศึกษาสภาวะการกระตุ้นให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์

การศึกษาสภาวะแวดล้อมต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้วยปัจจัยต่างๆ

1) ขนาดท่อนพันธุ์ต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

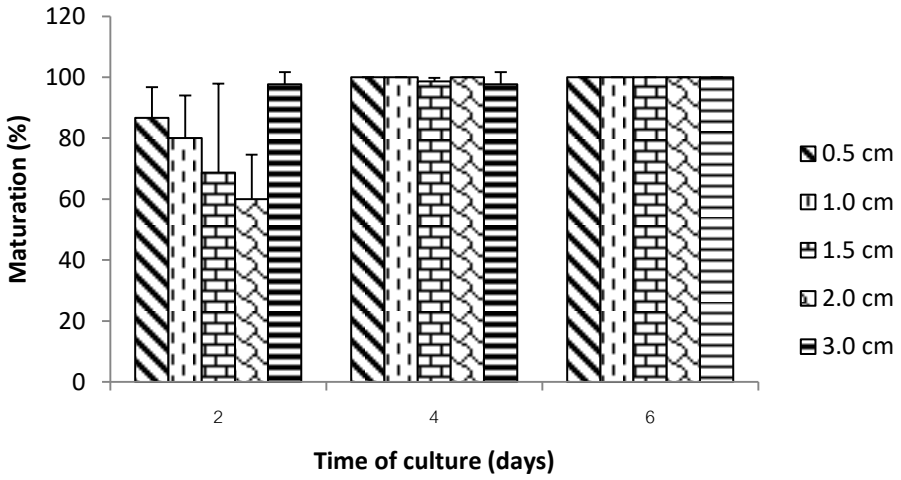
การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* ได้ทดลองปัจจัยด้านขนาดท่อนพันธุ์ต่างกันพบว่า ในวันที่ 2 ของการกระตุ้นให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ ที่ท่อนพันธุ์ยาว 3 cm สามารถกระตุ้นให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้เร็วและมีปริมาณร้อยละ 98±4 รองลงมาคือที่ความยาวท่อนพันธุ์ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2 cm สามารถกระตุ้นให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ ร้อยละ 86±10, 80±14, 69±29 และ ร้อยละ 61±15 ตามลำดับ สหที่ความยาวท่อนพันธุ์ 0.5 1.0 และ 2.0 เซนติเมตร สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ร้อยละร้อย รองลงมาคือที่ความยาวท่อน

พันธุ์ 1.5 และ 3.0 เซนติเมตร สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ร้อยละ 98 และ ร้อยละ 97 ตามลำดับ ในวันที่ 4 ของการกระตุ้น ทั้งนี้ท่อนพันธุ์สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ร้อยละ 100 ในวันที่ 6 ของการกระตุ้น โดยเซลล์สืบพันธุ์ที่สร้างเป็นอับซูโอสปอร์ทั้งหมด **(ตารางที่ 2 ภาพที่ 10)**

ตารางที่ 2 ร้อยละของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ขนาดท่อนพันธุ์ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 ℃ ความเข้มแสง 60 μmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ระยะเวลาที่มีแสง: มืด 12:12 ชม. (n=30)

Time of stimulation	Fragment length (cm)				
(days)	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
2	86±10[a]	80±14[a]	69±29[a]	61±15[a]	98±4[a]
4	100±0[a]	100±0[a]	99±1[a]	100 ± 0[a]	98±4[a]
6	100±0[a]	100±0[a]	100±0[a]	100 ± 0[a]	100 ± 0[a]
Reproductive type	Zoospor-angium	Zoospor-angium	Zoospor-angium	Zoospor-angium	Zoospor-angium

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่มีตัวอักษร a ,b กำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 10 ร้อยละการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ความยาวต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 ℃ ความเข้มแสง 60 μmol m^{-2} s^{-1} ระยะเวลาที่มีแสง: มืด 12:12 เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml

2) **การกระตุ้นที่ระดับอุณหภูมิต่างกัน**

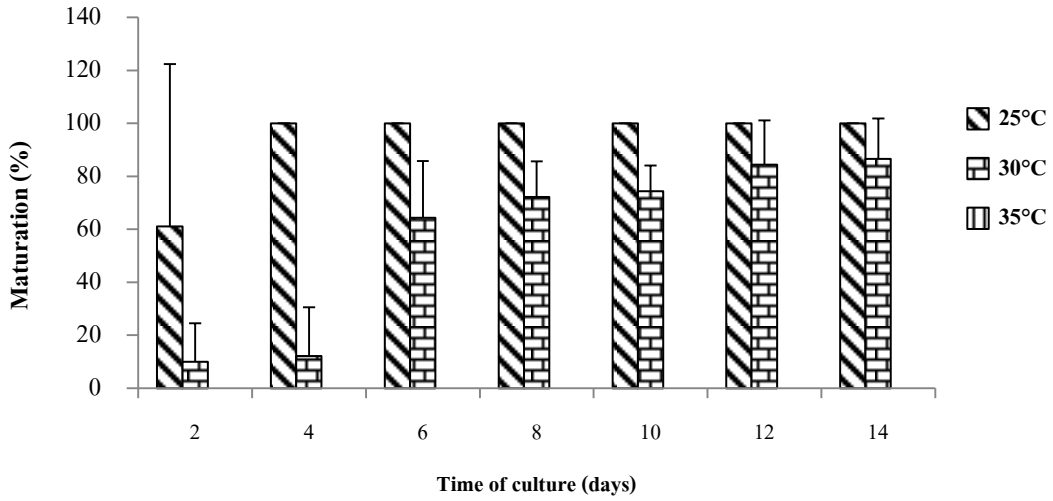
การกระตุ้นให้มีการเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* ด้วยปัจจัยด้านอุณหภูมิพบว่า ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ℃ สามารถสร้างสปอร์แบบซูโอสปอร์ได้ร้อยละ 61 ในวันที่ 2 ของการกระตุ้นและสามารถสร้างได้ร้อยละ 100 ในวันที่ 4 ของการกระตุ้น รองลงมาคือที่ระดับอุณหภูมิ 30 ℃ สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ร้อยละ 70 จนถึงวันที่ 14 ของการกระตุ้นนอกนั้นสาหร่ายไม่มีการสร้างเซลล์และตายในที่สุด ส่วนที่ระดับอุณภูมิ 35 ℃ สาหร่ายไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เอื้อต่อการสร้างเซลล์ (ตารางที่ 3 ภาพที่ 11)

ตารางที่ 3 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ทั้งหมดที่ระดับต่างๆ ที่ความเค็ม 25 ppt ความเข้มแสง 60 μmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml ระยะเวลาที่มี แสงมืด : 12:12 ชม .(n=30)

Time of stimulation (days)	Temperature (°C)		
	25	30	35
2	61 ± 16[a]	10 ± 15[b]	0 ± 0[b]
4	100 ± 0[a]	12 ± 18[b]	0 ± 0[b]
6	100 ± 0[a]	64 ± 21[b]	0 ± 0[c]
8	100 ± 0[a]	72 ± 13[b]	0 ± 0[b]
10	100 ± 0[a]	74 ± 10[b]	0 ± 0[c]
12	100 ± 0[a]	84 ± 17[b]	0 ± 0[b]
14	100 ± 0[a]	87 ± 15[a]	0 ± 0[b]
Reproductive type	Zoospor-angium	Zoospor-angium	Zoospor-angium

หมายเหตุ : แสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่มีตัวอักษร a, b กำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 11 ร้อยละการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ระดับต่างๆ ที่ความเค็ม 25 ppt ความเข้มแสง 60 μmol m^{-2} s^{-1} ระยะเวลาที่มีแสง: มืด 12:12 เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml

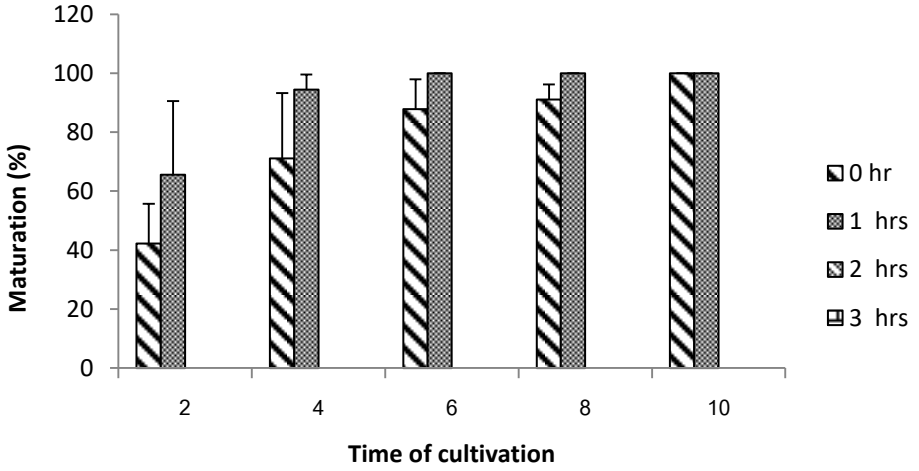
3) ปัจจัยด้านการผึ่งแห้งต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

การกระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* ด้วยปัจจัยด้านการผึ่งแห้งพบว่า การผึ่งแห้งสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างอับซูโอสปอร์ โดยที่การผึ่งแห้งที่เวลา 2 ชั่วโมงและการไม่ผึ่งแห้ง สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างสปอร์ได้ร้อยละ 66 และ 42 ตามลำดับ ในวันที่ 2 ของการกระตุ้น การผึ่งแห้งที่เวลา 2 ชั่วโมงและไม่ผึ่งแห้งสามารถสร้างเซลล์ได้ร้อยละ 94 และ 71 ตามลำดับ ในวันที่ 4 ของการกระตุ้น การผึ่งแห้งที่เวลา 2 ชั่วโมงและไม่ผึ่งแห้งสามารถสร้างเซลล์ได้ร้อยละ 100 และ 88 ตามลำดับ ในวันที่ 6 ของการกระตุ้น โดยที่การไม่ผึ่งแห้งสามารถสร้างเซลล์ได้ร้อยละ 100 ในวันที่ 10 ของการกระตุ้น (**ตารางที่ 4 ภาพที่ 12**)

ตารางที่ 4 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ทั้งหมดที่ระดับการผึ่งต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 °C ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} ความเค็ม 25 ppt เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml ระยะเวลาที่มีแสงมืด : 12:12 (n=30)

Time of stimulation	Dessication (hrs)			
(days)	0	1	2	3
2	97 ± 3^{d}	78 ± 11^{c}	46 ± 5^{b}	0 ± 0^{a}
4	100 ± 0^{b}	100 ± 0^{b}	100 ± 0^{b}	0 ± 0^{a}
6	100 ± 0^{b}	100 ± 0^{b}	100 ± 0^{b}	0 ± 0^{a}
8	100 ± 0^{b}	100 ± 0^{b}	100 ± 0^{b}	0 ± 0^{a}
10	100 ± 0^{b}	100 ± 0^{b}	100 ± 0^{b}	0 ± 0^{a}
Reproductive type	Zoospor-angium	Zoospor-angium	Zoospor-angium	Zoospor-angium

หมายเหตุ : แสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=30



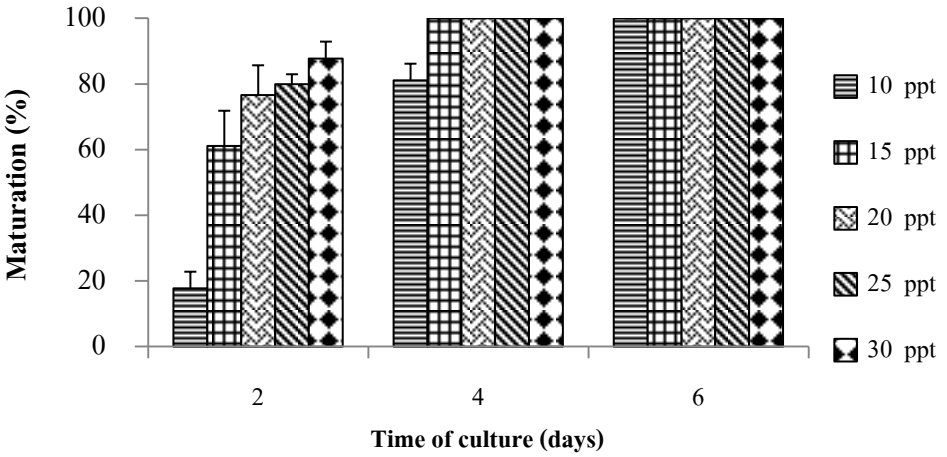
ภาพที่ 12 ร้อยละการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ระยะเวลาการผึ่งแห้งต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 °C ความเค็ม 25 ppt ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} ระยะเวลาที่มีแสง: มืด 12:12 ชม. เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml

4) ปัจจัยด้านความเค็มต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* Linnaeus ได้ทดลองปัจจัยด้านความเค็ม พบว่า ความเค็มสามารถกระตุ้นให้สร้างเซลล์แบบซูโอสปอร์ (zoosporangium) โดยที่ระดับความเค็ม 15, 20, 25 และ 30 ppt สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ร้อยละ 100 ในวันที่ 4 ของการกระตุ้นและที่ระดับความเค็ม 10 ppt สามารถสร้างเซลล์ได้ร้อยละ 18 ในวันที่ 2 ของการกระตุ้น โดยสามารถสร้างเซลล์ได้ร้อยละ100 ในวันที่ 6 ของการกระตุ้น (**ตารางที่ 5 ภาพที่ 13**)

ตารางที่ 5 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ระดับความเค็มต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 °C ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml ระยะเวลาที่มีแสง: มืด 12:12 ชม. (n=30)

Time of stimulation	Salinity (ppt)				
(days)	10	15	20	25	30
2	18 ± 5	61 ± 11	77 ± 9	80 ± 3	88 ± 5
4	81 ± 5	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
6	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
Reproductive type	Zoospor-angium	Zoospor-angium	Zoospor-angium	Zoospor-angium	Zoospor-angium



ภาพที่ 13 ร้อยละการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ระดับความเค็มต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 °C ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} ระยะเวลาที่มีแสงมืด : 12:12.ชม. เลี้ยงในขวดขนาด 250 ml

5) ปัจจัยด้านการเติมสารละลายของแคลเซียมไอออน ต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

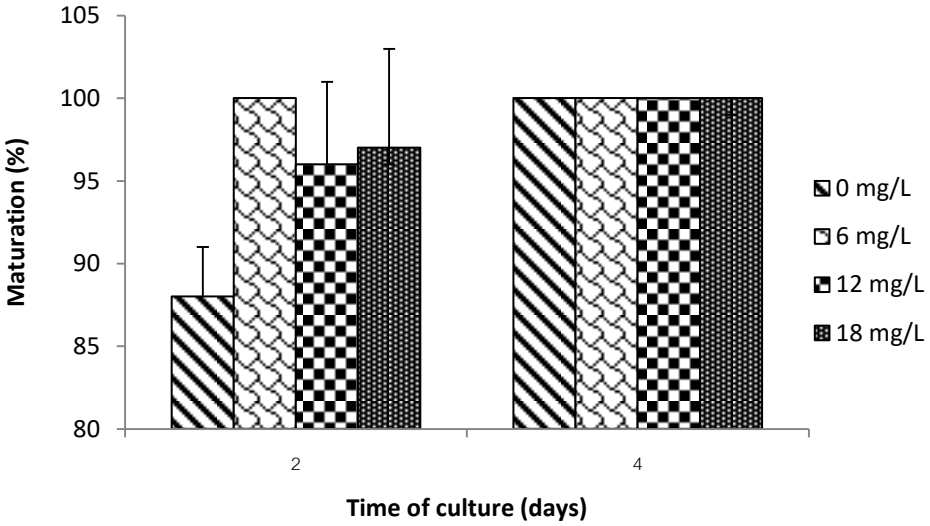
ผลของปัจจัยด้านการเพิ่มปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ พบว่า การเพิ่มปริมาณแคลเซียมคลอไรด์สามารถเหนี่ยวนำให้สร้างอับซูโอสปอร์ (zoosporangium) โดยที่การเพิ่มปริมาณแคลเซียม 6 mg/L สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 100±0 รองลงมาคือ การเพิ่มปริมาณแคลเซียม 18, 12 และ 0 mg/L สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ร้อยละ 97±6, 96±5 และ 88±3 ตามลำดับ ในวันที่ 2 ของการเหนี่ยวนำ และสามารถสร้างสปอร์ได้ร้อยละ 100±0 ในวันที่ 4 ของการเหนี่ยวนำ (**ตารางที่ 6 และภาพที่ 14)**

ตารางที่ 6 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ที่ระดับการเพิ่มปริมานแคลเซียมไอออนระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 ℃ ความเข้มแสง 60 μmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ระยะเวลาที่มีแสง:มืด 12:12 ชม. (n=30)

Time of stimulation (days)	$CaCl_2$ concentration (mg/L)			
	0	6	12	18
2	88±3[a]	100±0[b]	96±5[b]	97±6[b]
4	100±0[a]	100±0[a]	100±0[a]	100±0[a]
Reproductive type	Zoospor-angium	Zoospor-angium	Zoospor-angium	Zoospor-angium

หมายเหตุ :ค่าเฉลี่ยค่า±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)



ภาพที่ 14 ร้อยละการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ของสาหร่ายไส้ไก่ ที่เติมสารละลายของ $CaCl_2$ ที่ระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 ℃ ความเข้มแสง 60 μmol m^{-2} s^{-1} ระยะเวลาที่มีแสง:มืด 12:12 ชม. เลี้ยงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ระยะเวลาเลี้ยง 4 วัน

ผลการใช้ปัจจัยต่างๆในการกระตุ้นให้สาหร่ายไส้ไก่สร้างเซลล์สืบพันธุ์

จากการใช้ปัจจัยต่างๆ ในการกระตุ้นพบว่าๆ การตัดขนาดท่อนพันธุ์ 0.5-3.0 เซนติเมตร (ที่อุณหภูมิ 25℃ แสง 60 μmol m^{-2} s^{-1} ความค็ม 25 ppt ระยะเวลาที่มีแสง:มืด=12:1 สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายไส้ไก่สร้างอับเซลล์สืบพันธุ์ได้ร้อยละ 100 ในเวลา 4-6 วัน แต่ในการทดลองต่อไป ได้เลือกใช้ที่ขนาดท่อนพันธุ์ 3 เซนติเมตร เนื่องจากสามารถปล่อยสปอร์ได้เร็วที่สุดและมากที่สุด ส่วนอุณหภูมิพบว่าที่อุณหภูมิ 25℃มีความเหมาะสมสำหรับ

สร้างเซลล์สืบพันธุ์มากกว่าที่ 20 และ 30 ℃ ส่วนการผึ่งลมที่นานกว่า 1 ชั่วโมง ทำให้สาหร่ายไม่สร้างอับสปอร์ นอกจากนี้สาหร่ายยังสร้างอับซูโอสปอร์ได้ที่ความเค็มในช่วงกว้างคือ 10-30 ppt ในเวลา 4-6 วัน (**ตารางที่ 7**)

ตารางที่ 7 ผลของการใช้ปัจจัยต่างๆ ในการประตุ้นให้สาหร่ายไส้ไก่สร้างเซลล์สืบพันธ์ที่สภาวะแวดล้อมต่างๆ

Factor of stimulation	Levels	Maturation (%)	Duration (days)	Type of reproductive cell	Embient conditions
Frangment length (cm)	0.5	100	4	Zoosporangium	25°C , salinity 25ppt 60 μmol m^{-2} s^{-1}, Light:Dark=12:12,
	1	100	4	Zoosporangium	
	1.5	100	6	Zoosporangium	
	2	100	6	Zoosporangium	
	3*	100	6	Zoosporangium	
Temperature (°C)	25*	100	4	Zoosporangium	3 cm long, 60 μmol m^{-2} s^{-1}, salinity 25ppt, Light:Dark=12:12
	30	87	14	Zoosporangium	
	35	0	14	Zoosporangium	
Dessicatoin (hrs)	0*	100	4	Zoosporangium	3 cm long, 25°C , 60 μmol m^{-2} s^{-1}, salinity 25ppt,Light:Dark=12:12
	1	100	4	Zoosporangium	
	2	100	4	Zoosporangium	
	3	0	8	Zoosporangium	
Salinity (ppt)	10	100	6	Zoosporangium	3 cm long, 25°C , 60 μmol m^{-2} s^{-1}, Light:Dark=12:12
	15	100	4	Zoosporangium	
	20	100	4	Zoosporangium	
	25	100	4	Zoosporangium	
	30*	100	4	Zoosporangium	
Enrichment concentration of $CaCl_2$ (mg/L)	0	100	4	Zoosporangium	3 cm long, 25°C , 60 μmol m^{-2} s^{-1}, Light:Dark=12:12
	6	100	4	Zoosporangium	
	12	100	4	Zoosporangium	
	18	100	4	Zoosporangium	

1.3 การกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ด้วยปัจจัยต่างๆ

1) ปัจจัยด้านความเค็มต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

ในวันที่ 2 ของการกระตุ้นที่ระดับความเค็ม 5 ppt สามารถปล่อยซูโอสปอร์ถึง 4.50±0.12 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือระดับความเค็ม 15, 25, 20 และ 10 ppt โดยมีปริมาณสปอร์ 3.39±0.04, 2.29±0.06, 2.21±0.11 และ 0.39±0.01 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนวันที่ 4 ของการกระตุ้นที่ระดับความเค็ม 25 ppt มีการปล่อยสปอร์มากกว่าระดับความเค็มอื่นที่ 9.87±0.54 สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือที่ระดับความเค็ม 10, 15, 5 และ 20 ppt มีปริมาณสปอร์ 6.95±0.33, 2.52±0.04, 2.29±0.28 และ 1.34±0.02 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อพิจารณาปริมาณสปอร์รวม พบว่าที่ระดับความเค็ม 25 ppt มีปริมาณสปอร์มากที่สุดที่ 12.16±5.36 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือที่ระดับความเค็ม 10, 5, 15 และ 20 ppt พบ

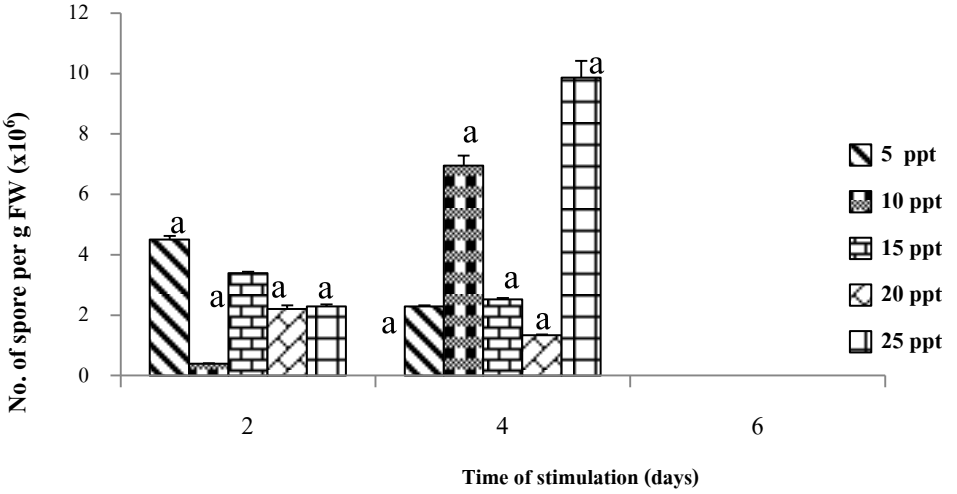
ปริมาณสปอร์ 7.34±4.63, 6.79±1.56, 5.92±0.61 และ 3.55±0.61 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รายละเอียดการปล่อยสปอร์ดัง**ตารางที่ 8 ภาพที่ 15**

ตารางที่ 8 การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ ($x\ 10^6 \pm$ SD สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่ระดับความเค็ม ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 °C ความเข้มแสง 60 µmol $m^{-2}\ s^{-1}$ เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ระยะเวลาที่มีแสง: มืด 12:12

Time of stimulation	Salinity (ppt)				
(days)	5	10	15	20	25
2	4.50±0.12[a]	0.39±0.01[a]	3.39±0.04[a]	2.21±0.11[a]	2.29±0.06[a]
4	2.29±0.28[a]	6.95±0.33[a]	2.52±0.04[a]	1.34±0.02[a]	9.87±0.54[a]
6	-	-	-	-	-
Total±SD	6.79±1.56[a]	7.34±4.63[a]	5.92±0.61[a]	3.55±0.61[a]	12.16±5.36[a]

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยค่า±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (n=10)

ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่มีตัวอักษร a,b กำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)



ภาพที่ 15 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ (สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่ระดับความเค็ม ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 °C ความเค็ม 25 ppt เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ระยะเวลารับแสง แสง:มืด 12 : 12 ชม.

2) ปัจจัยด้านการให้แสงต่อการปล่อยสปอร์

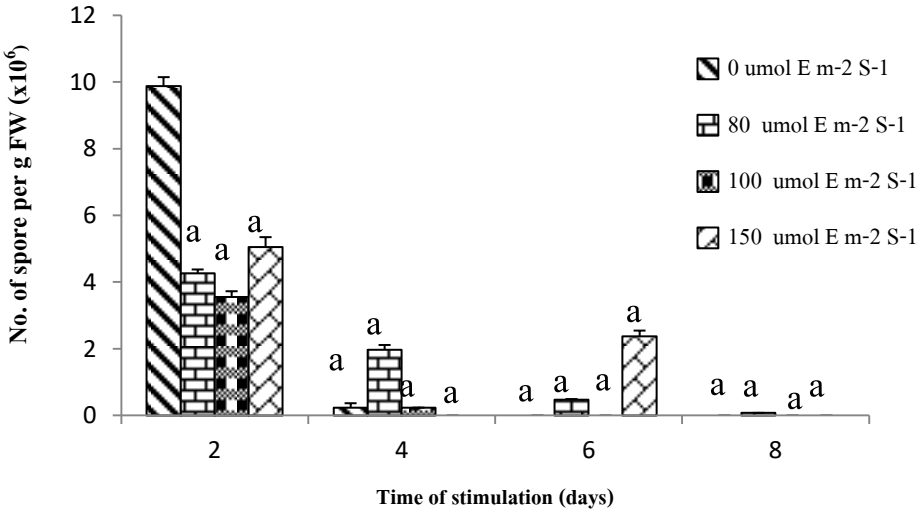
การกระตุ้นให้ปล่อยสปอร์ด้วยปัจจัยด้านความเข้มแสง พบว่าในวันที่ 2 ของการกระตุ้นที่ระดับความเข้มแสง 0 µmol $m^{-2}\ s^{-1}$ หรือไม่มีการให้แสงมีการปล่อยสปอร์มากที่สุดถึง 9.87±0.27 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือที่ระดับการให้แสง 150, 80 และ 100 µmol $m^{-2}\ s^{-1}$ สามารถปล่อยสปอร์ 5.05±0.29, 4.26±0.11 และ 3.55±0.16 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อพิจารณาจำนวนสปอร์ทั้งหมดในระยะเวลา 8 วัน พบว่าที่ไม่มีแสง 0 µmol $m^{-2}\ s^{-1}$ ทำให้การปล่อยสปอร์มากที่สุด

10.10±5.63 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือที่ระดับการเพิ่มแสง 150, 80 และ 100μmol m^{-2} s^{-1} ที่มีจำนวนสปอร์ 7.42±2.52, 6.79±1.89 และ 3.79±1.98 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รายละเอียดการปล่อยสปอร์ดัง **ตารางที่ 9 ภาพที่ 16**

ตารางที่ 9 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์รวม (x 10^6 ± SD สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่ปล่อยจากการให้แสงแก่ท่อนพันธุ์ก่อนเลี้ยงที่ระดับความเข้มแสงต่างๆ ที่ อุณหภูมิ 25 °C ความเค็ม 25 ppt ความเข้มแสง 60 μmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ระยะเวลาให้ แสง:มืด 12 : 12 ชม.

Time of stimulation (days)	Illumination for fragment (μmol m^{-2} s^{-1})			
	0	80	100	150
2	9.87±0.27[a]	4.26±0.11[a]	3.55±0.16[a]	5.05±0.29[a]
4	0.23±0.01[a]	1.97±0.13[a]	0.23±0.00[a]	0.00±0.00[a]
6	0.00±0.00[a]	0.47±0.01[a]	0.00±0.00[a]	2.36±0.17[a]
8	0.00±0.00[a]	0.07±0.00[a]	0.00±0.00[a]	0.00±0.00[a]
Total±SD	10.10±5.63[a]	6.79±1.89[a]	3.79±1.98[a]	7.42±2.52[a]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยค่า±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (n=10)
ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่มีตัวอักษร a,b กำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 16 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ (สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่ระดับการให้แสงระดับต่างๆ 24 ชม. แก่ท่อนพันธุ์ก่อนเลี้ยงระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 °C ความเค็ม 25 ppt เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ระยะเวลามีแสง:มืด 12: 12 ชม.

3) การกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ด้วยปัจจัยด้านการผึ่งแห้ง

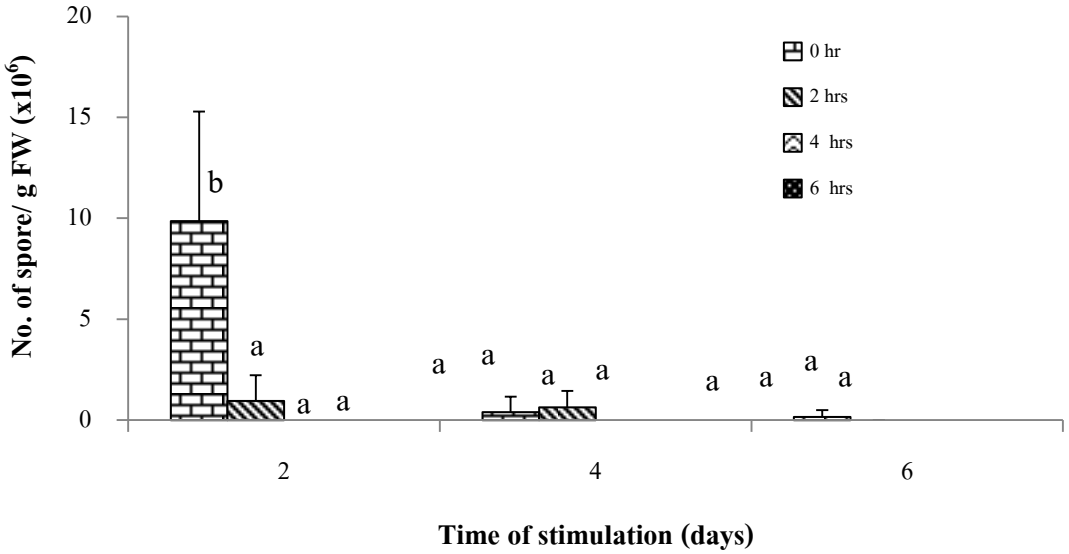
การกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ด้วยปัจจัยด้านการผึ่งแห้ง พบว่า สาหร่ายที่ไม่ผึ่งแห้งสามารถกระตุ้นให้มีการปล่อยสปอร์ถึง 9.87 ±5.41 ล้านสปอร์/กรัมน้ำหนักสด ระยะเวลา 2 วันของการกระตุ้น วันที่ 4 และวันที่ 6 ของการกระตุ้นสามารถปล่อยได้ 0.39±0.76 และ 0.15±0.33 ล้านสปอร์/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ รองลงมาคือ สาหร่ายที่ทำการผึ่งแห้งที่เวลา 2 ชม. มีการปล่อยสปอร์ 0.94± 1.00 ล้านสปอร์/กรัมน้ำหนักสดในวันที่ 2 ของการกระตุ้นและมีการปล่อย

สปอร์ในวันที่ 4 จำนวน 0.63±0.81 ล้านสปอร์/กรัมน้ำหนักสด และสาหร่ายที่ทำการผึ่งแห้งที่เวลา 4 และ 6 ชั่วโมง ของการกระตุ้นทั้งนี้เนื่องจากน้ำในเซลล์สาหร่ายแห้งส่งผลให้สาหร่ายมีสีซีดและตายในที่สุด เมื่อพิจารณาการปล่อยสปอร์ทั้งหมดพบว่า การไม่ผึ่งแห้งมีการปล่อยสปอร์มากกว่าการผึ่งแห้งเป็นเวลา 2 ชั่วโมงถึง 10.42±5.54 ล้านสปอร์/กรัมน้ำหนักสดใช้ระยะเวลาในการปล่อย 6 วัน ในการปล่อยสปอร์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สาหร่ายที่มีการผึ่งแห้ง 2 ชั่วโมงมีการปล่อยสปอร์รวม 1.57±0.48 ล้านสปอร์/กรัมน้ำหนักสด ใช้ระยะเวลา 4 วัน ในการปล่อยสปอร์ **(ตารางที่ 10 และภาพที่ 17)**

ตารางที่ 10 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่รวม x 10^6 ± SD สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด ที่ระยะเวลาการผึ่งแห้งต่างๆ ที่ อุณหภูมิ 25 °C ความเค็ม 25 ppt ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ระยะเวลารับแสง แสง:มืด 12:12

Time of stimulation	Desiccation (hrs)			
(days)	0	2	4	6
2	9.87 ±5.41[a]	0.94± 1.00[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]
4	0.39±0.76[a]	0.63±0.81[a]	0.00±0.00[a]	0.00±0.00[a]
6	0.15±0.33[a]	0.00±0.00[a]	0.00±0.00[a]	0.00±0.00[a]
8	0.00±0.00[a]	0.00±0.00[a]	0.00±0.00[a]	0.00±0.00[a]
Total±SD	10.42±5.54[a]	1.57±0.48[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยค่า±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (n=10)
ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่มีตัวอักษร a,b กำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 17 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ (สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่ระยะเวลาต่างๆ ที่ระดับการผึ่งต่างๆที่ อุณหภูมิ 25 °C ความเค็ม 25 ppt ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ระยะเวลารับแสง แสง: มืด 12 : 12

ผลของปัจจัยกระตุ้นให้สาหร่ายไส้ไก่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

จากการใช้ปัจจัยต่างในการกระตุ้นให้สาหร่ายไส้ไก่ปล่อยซูโอสปอร์พบว่าๆ เมื่อความเค็มเปลี่ยนไป ในช่วง 5-20 ppt ทำให้การปล่อยสปอร์ปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับความเค็มคงเดิม คือ 25 ppt เท่ากับ 12.16±5.36 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด เป็นการตัดขนาดท่อนพันธุ์ 0.5-3.0 เซนติเมตร (ที่อุณหภูมิ 25°C แสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} ระยะเวลาที่มีแสง:มืด=12:1) สำหรับการกระตุ้นด้วยแสงก่อนเลี้ยง จะทำให้การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ลดลงจาก 3.79±1.98-7.42±2.52 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด กว่าการไม่ให้แสงไม่มีการผึ่งลม 10.10±5.63 ล้านสปอร์ต่อกรัมน้ำหนักสด และการผึ่งแห้ง (**ตารางที่ 11**)

ตารางที่ 11 ผลของการใช้ปัจจัยต่างๆ ในการประตุ้นให้สาหร่ายไส้ไก่ปล่อยเซลล์สืบพันธ์ และชนิดของเซลล์สืบพันธ์ที่สร้างที่สภาวะแวดล้อมต่างๆ

Factor of stimulation	Levels	No. of spore x10^6 per g FW	Dauration (Days)	Embiant condotion
Salinity (ppt)	5	6.79±1.56[a]	4	25±2 °C , 60 µmol m^{-2} s^{-1},
	10	7.34±4.63[a]	4	Light:Dark=12:12, 3 cm
	15	5.92±0.61[a]	4	
	20	3.55±0.61[a]	4	
	25	12.16±5.36[a]	4	
Illumination for fragment (µmol m^{-2} s^{-1})	0	10.10±5.63[a]	4	25±2 °C, 60 µmol m^{-2} s^{-1},
	80	6.79±1.89[a]	6	Light:Dark=12:12, , 25 ppt 3 cm
	100	3.79±1.98[a]	4	
	150	7.42±2.52[a]	6	
Desiccation (hrs)	0	10.42±5.54[a]	6	25±2 °C , 60 µmol m^{-2} s^{-1},
	2	1.57±0.48[b]	4	Light:Dark=12:12, 25 ppt , 3 cm
	4	0.00±0.00[b]	8	No desiccation
	6	0.00±0.00[b]	8	Kept in dakl 3 hrs before

หมายเหตุ : ค่าสปอร์รวม ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=10)

1.4 ผลของพฤติกรรมการลงเกาะของสปอร์สาหร่ายไส้ไก่

ผลของพฤติกรรมการลงเกาะของสปอร์จากการทำการทดลอง 14 วัน ปริมาณสปอร์ในน้ำ ใช้ดักสปอร์ในถังพลาสติกสี่เหลี่ยมปริมาตรน้ำ 150 ลิตร ที่สภาวะกลางแจ้ง มีสปอร์ว่ายอยู่ในมวลน้ำที่ระดับความหนาแน่น 33 ล้าน พบว่า สปอร์เริ่มเกาะวัสดุเชือกพีอี พลาสติกรังผึ้ง และอวนไนล่อน ตั้งแต่วันแรกของการทดลองทดลองโดยที่ทุกวัสดุมีปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้นพร้อมกันในวันที่ 6 ของการเลี้ยง และทุกวัสดุมีปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 9 ของการเลี้ยง ในวันที่ 10 ทุกวัสดุพบปริมาณสปอร์เกาะน้อยที่สุด ใกล้เคียงกับปริมาณสปอร์ในน้ำเลี้ยงของวันที่ 1 และพบว่าสปอร์หลุดออกมาเป็นกลุ่มลอยตามผิวน้ำ ส่วนวันที่ 11–14 ของการทดลอง พบว่ามีการเกาะของสปอร์เล็กน้อย ในวันที่ 9 สาหร่ายมีความหนาแน่นมากที่สุดถึง 3.6 X 10^8 สปอร์ต่อตารางเซนติเมตร วันที่ 13 พบว่าวัสดุจากเชือกมีความหนาแน่นสปอร์มากที่สุด ถึง 2.7 x 108± 1.2 x 10^8 สปอร์/ตารางเซนติเมตร รองลงมาคืออวนและพลาสติกมีความหนาแน่นของสปอร์ถึง 9.7X 10^7 สปอร์/ตารางเซนติเมตร และ 4.7 X 10^7 สปอร์/ตารางเซนติเมตรตามลำดับ

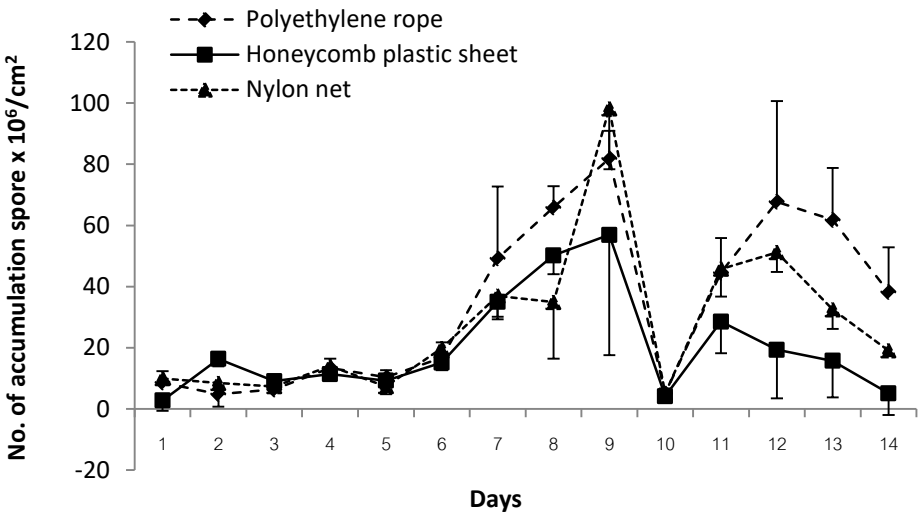
ผลจากการทดสอบทางสถิติจำนวนสปอร์ที่เกาะเชือกมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับสปอร์ที่เกาะอวนและพลาสติก เมื่อพิจารณาระดับที่สปอร์เกาะผิววัสดุเชือก พลาสติกและอวนพบว่า สปอร์ที่เกาะบริเวณผิวน้ำมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับบริเวณกลางน้ำและท้องน้ำ จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* ที่การเกาะวัสดุแตกต่างกันดัง **ตารางที่ 12 ภาพที่ 18-19**

สปอร์สาหร่ายไส้ไก่ที่ไม่มีวัสดุยึดเกาะ จะเกาะกับข้างถังและเกาะกันเอง จำนวนมากในช่วงใกล้เคียงกับพฤติกรรมการเกาะบนวัสดุ โดยน้ำเลี้ยงจะใสในเวลา 9-10 วัน หลังจากที่สปอร์แขวนลอย ส่วนสปอร์ที่เกาะกันเองจะมีการเจริญได้เป็นกลุ่มก้อน หรือช่อสปอร์ (Germling cluster) ดัง**ภาพที่ 20**

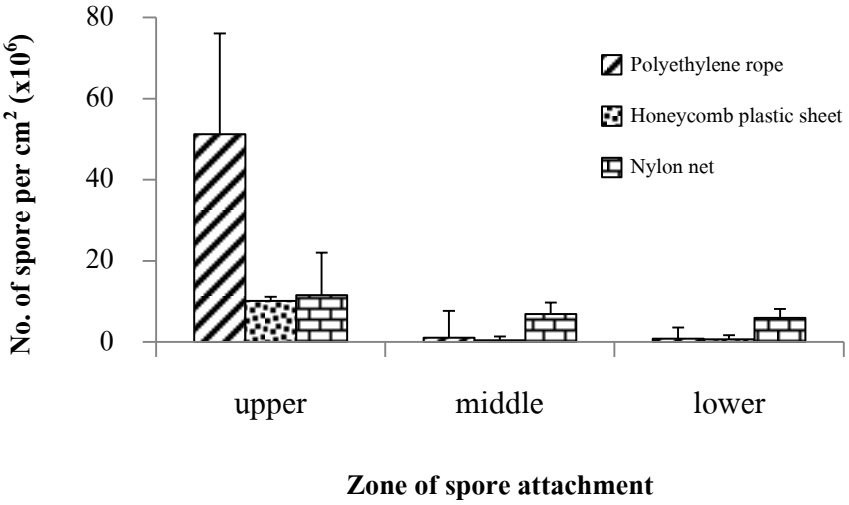
ตารางที่ 12 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ ($x10^6$±SE สปอร์/ตารางเซนติเมตร) ของสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* ที่เกาะวัสดุแตกต่างกันในระยะเวลาเลี้ยง 14 วัน (n=3)

Days	Matterial for spore attachment								
	Polyethylene rope			Honeycomb plastic sheet			Nylon net		
	Upper	Middle	Lower	Upper	Middle	Lower	Upper	Middle	Lower
1	8.56±4.34	12.81±5.70	4.46±1.13	2.05±1.04	2.48±0.91	3.76±1.50	5.11±1.80	18.83±7.16	5.88±1.37
2	4.21±2.72	7.16±4.77	3.06±1.20	10.49±0.25	31.20±21.94	7.42±0.99	13.55±3.81	5.47±1.82	6.30±1.61
3	6.09±1.17	7.50±1.65	5.45±2.63	9.32±2.81	10.09±2.58	7.77±0.58	9.66±3.88	5.55±0.21	6.83±1.83
4	13.03±1.01	11.77±1.90	15.25±6.35	14.05±2.58	11.40±1.37	8.69±1.57	16.30±1.55	10.97±2.16	14.72±2.28
5	9.25±2.62	13.63±2.81	8.27±1.37	6.51±4.09	15.12±2.13	6.12±1.34	8.94±1.97	10.88±2.99	2.28±2.16
6	20.71±7.96	14.34±4.97	15.21±2.03	17.60±9.44	18.88±5.17	9.01±1.38	17.91±1.66	28.72±4.37	13.00±1.63
7	62.09±41.83	48.64±20.63	36.81±8.21	56.97±15.16	28.92±4.84	19.09±2.80	50.00±10.21	27.63±1.99	33.21±2.24
8	76.39±0.23	84.07±19.74	37.25±0.88	56.67±21.37	44.90±12.94	49.00±21.21	52.67±5.32	24.94±5.23	27.08±7.78
9	141.78±1.49	56.17±16.70	47.53±9.24	89.86±45.49	53.12±12.16	27.71±1.66	166.86±78.96	67.91±24.29	59.80±14.84
10	10.79±3.55	1.87±0.62	2.40±0.71	9.11±1.80	2.09±0.41	1.29±0.33	6.88±2.07	5.56±1.93	3.05±0.62
11	96.86±22.13	14.19±5.40	22.51±6.48	58.80±22.31	12.94±1.55	13.83±3.05	47.41±15.31	49.44±12.22	40.33±3.54
12	149.48±69.35	19.16±7.56	34.56±21.79	33.20±12.61	8.27±2.17	16.57±4.55	58.00±22.39	34.55±4.15	61.02±21.18
13	136.47±38.27	28.76±10.20	20.17±2.58	23.44±14.67	8.10±1.48	15.58±2.96	46.22±24.10	27.63±6.42	23.67±5.17
14	85.82±37.66	11.70±1.76	17.13±4.37	4.74±0.20	6.77±2.16	3.73±0.71	30.08±14.19	13.08±3.52	14.05±3.40

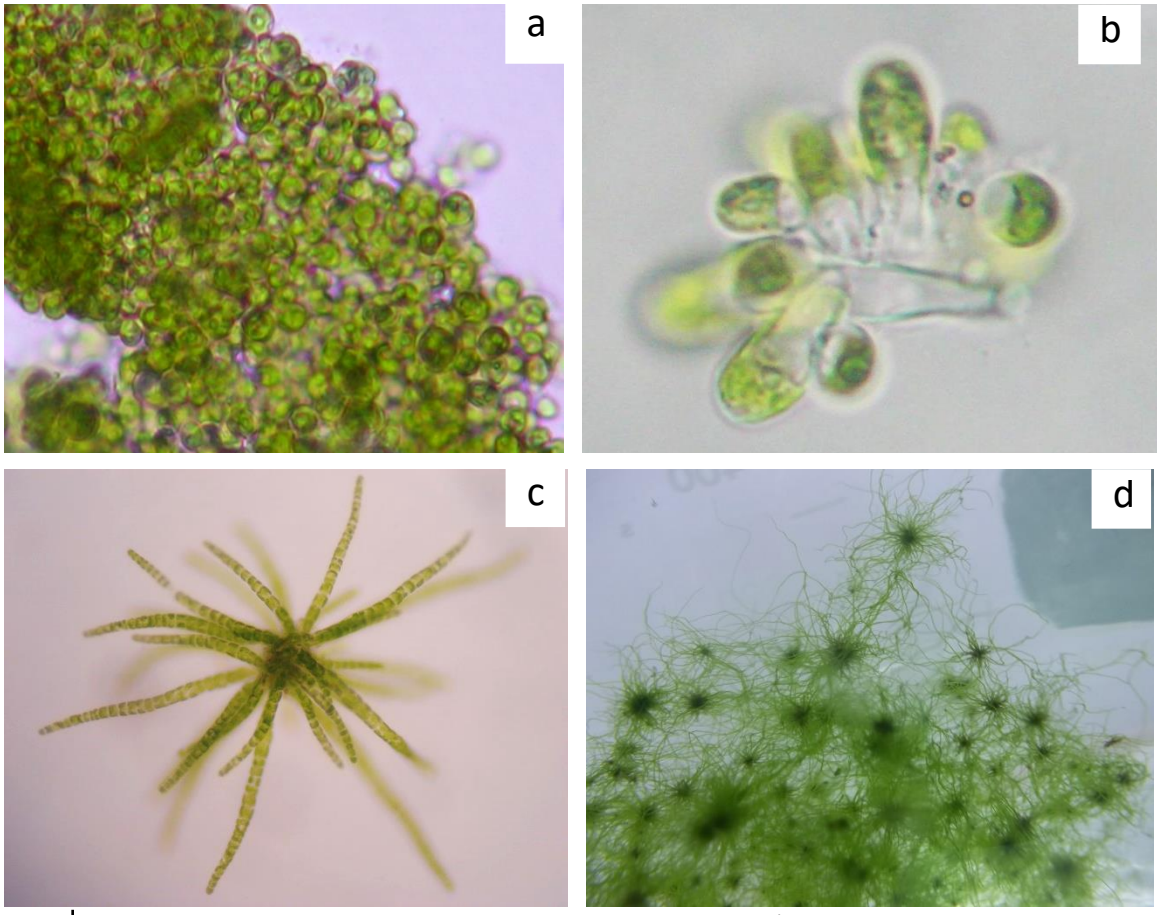
หมายเหตุ :ค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



ภาพที่ 18 จำนวนการลงเกาะของสปอร์ของสาหร่ายไส้ไก่บนวัสดุชนิดต่างๆ ในระยะเวลา 14 วัน



ภาพที่ 19 พฤติกรรมการลงเกาะของสปอร์ของสาหร่ายไส้ไก่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ ที่ส่วนต่างๆของวัสดุยึดเกาะ



ภาพที่ 20 พฤติกรรมการลงเกาะกันเองของสปอร์สาหร่ายไส้ไก่ได้เป็นช่อสปอร์ หรือ กลุ่มก้อนสปอร์ (Germling cluster): (a), กลุ่มก้อนสปอร์ระยะ 1-2 เซลล์ (b), กลุ่มก้อนสปอร์ระยะ 10-20 เซลล์ (c), กลุ่มก้อนต้นอ่อนขนาด 3 ซม. (d)

1.5 การเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อซิเมนต์ที่ความหนาแน่นต่างๆ

จากการทดลองเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ ในบ่อซีเมนต์ ที่เลี้ยงโดยใช้ต้นพันธุ์ เริ่มต้นขนาด 2.9±0.3 ในความหนาแน่น 25000, 37500 และ50000 ต้นต่อตร.ม. หรือ น้ำหนักเริ่มต้น เท่ากับ 3, 6 และ 9 กรัม เมื่อเลี้ยงไป 3 สัปดาห์ พบว่า มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สุด เท่ากับ 882.52±430.65, 1,293.28±13.85 และ 1,304.86±444.38 กรัมต่อตร.ม. ตามลำดับ และมีความยาวเพิ่มขึ้น เท่ากับ เฉลี่ยร้อยละ 9.3±6.0, 11.4±4.5 และ 4.9±2.2 ตามลำดับ โดยคิดเป็นการเพิ่มของน้ำหนัก ร้อยละ 29,317±14,255, 21,455±362 และ 14,398±14,713 ตามลำดับ และเป็นการเพิ่มของความยาวร้อยละ 552±473, 342±72 และ 123±77 ตามลำดับ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะโดยน้ำหนักเท่ากับ 27.1±1.5, 25.6±0.5 และ 23.7±0.1 และ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะโดยความยาวเท่ากับ17.5±1.5, 24.2±4.7 และ 11.0±5.0 สภาพแวดล้อมที่เลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อซิเมนต์ที่ความหนาแน่นต่างๆ รายละเอียดดัง **ตารางที่ 13 ภาพที่ 21-22**

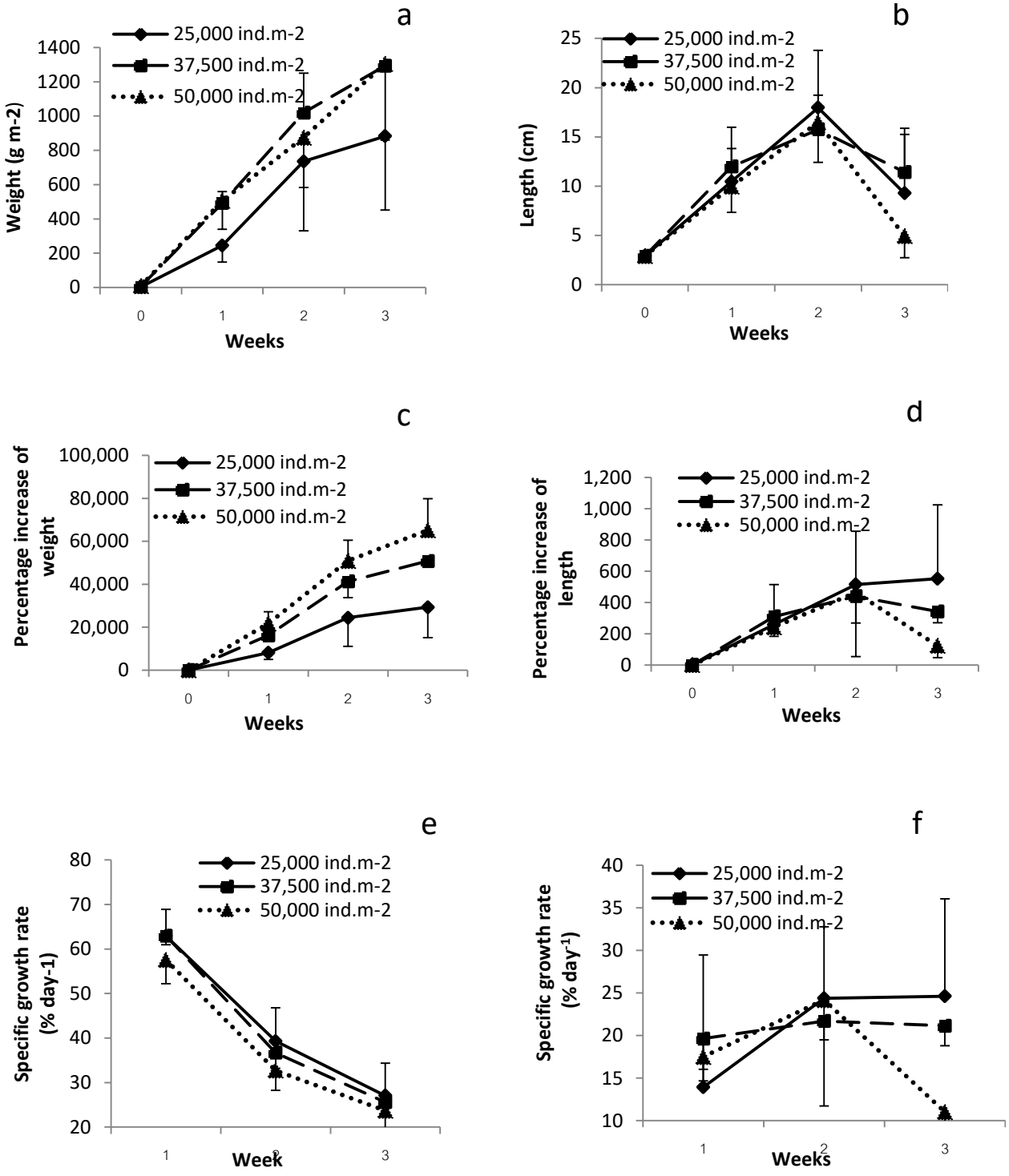
สภาพแวดล้อมในขณะเลี้ยง พบว่าอุณหภูมิน้ำในบ่อเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ที่ความหนาแน่นต่างๆได้แก่ 25000, 37500และ 50000 ต้นต่อตร.ม. เฉลี่ยเท่ากับ 29.00±3.37, 27.00±0.00°C, และ 32.00±0.69 °C ความเค็มของน้ำเลี้ยง เฉลี่ยเท่ากับ 16.00±0.19, 18.00±3.54 และ 21.00±0.69 ppt ค่าฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส เท่ากับ 0.76±0.22,

0.34± 0.01 และ 0.04±0.01 ที่ ค่าไนเตรท-ไนโตรเจน เฉลี่ยเท่ากับ 0.48±0.37, 0.36±0.23 และ 1.65±0.44 mgL^{-1} และมีค่าความเข้มแสงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ในช่วง 472.85±259.03-960.30±63.03 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-}$

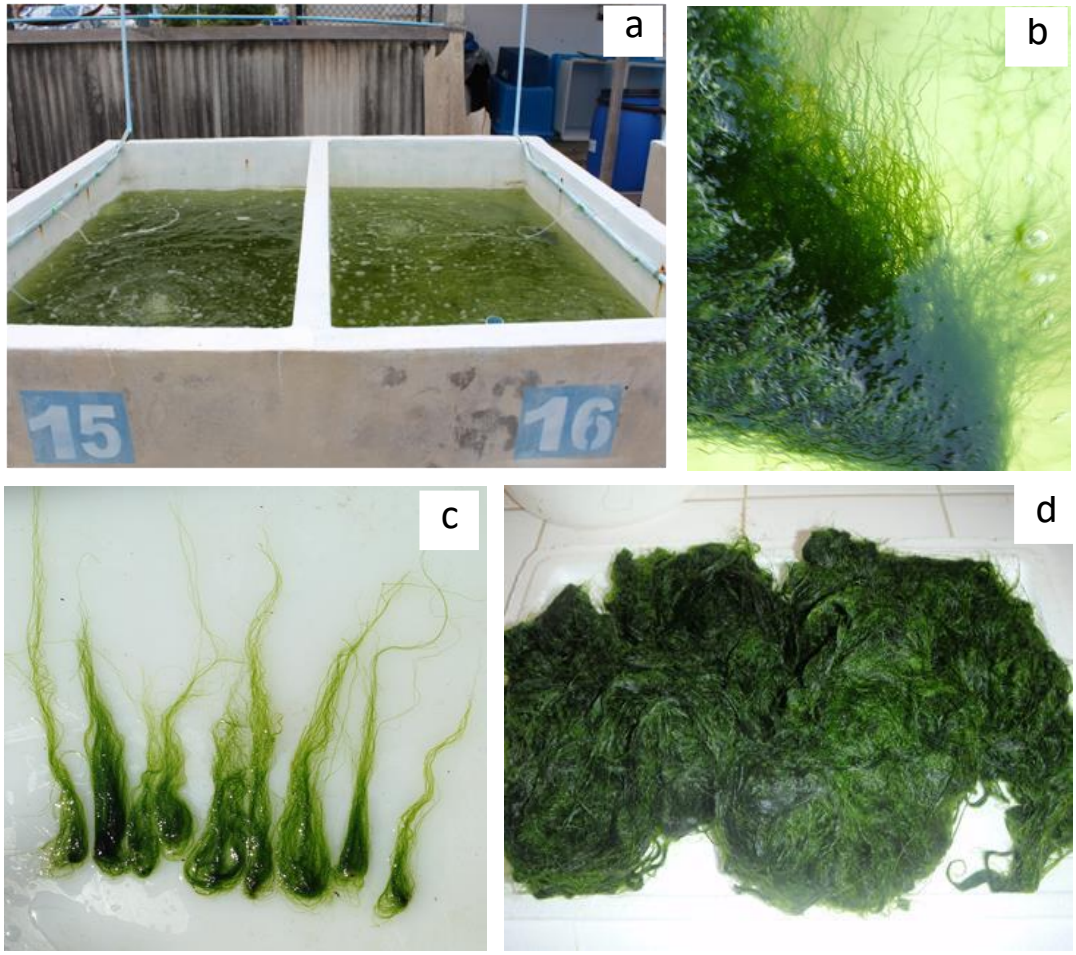
ตารางที่ 13 การเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อซีเมนต์ที่ความหนาแน่นต่างๆ

Growth items	Density (ind.m-2)	Time of culture (weeks)			
		0	1	2	3
Weight (g FW /m^{-2})	25,000	3.000.00±	245.27±97.79	735.27±404.31	882.52±430.65
	37,500	6.00±0.00	492.31±67.68	1019.54±231.37	1,293.28±13.85
	50,000	9.00±0.00	505.85±166.07	874.84±290.84	1,304.86±444.38
Length (cm)	25,000	2.9±0.3	10.5±3.4	18.0±5.8	9.3±6.0
	37,500	2.9±0.3	12.0±4.0	15.8±3.5	11.4±4.5
	50,000	2.9±0.3	10.0±2.6	16.5±4.1	4.9±2.2
Percentage increase of weight	25,000	0±0	8,076±3,160	24,409±13,377	29,317±14,255
	37,500	0±0	8,105±2,156	16,892±7,612	21,455±362
	50,000	0±0	5,521±5,436	9,620±9,595	14,398±14,713
Percentage increase of length	25,000	0±0	258±256	515±341	552±473
	37,500	0±0	310±126	439±386	342±72
	50,000	0±0	241±34	464±196	123±77
Specific growth rate (% day^{-1}) by weight	25,000	-	62.9±6.0	39.3±1.3	27.1±1.5
	37,500	-	63.0±2.0	36.7±2.3	25.6±0.5
	50,000	-	57.6±5.4	32.7±2.8	23.7±0.1
Specific growth rate (% day^{-1}) by Length	25,000	-	13.9±15.5	19.6±5.0	17.5±1.5
	37,500	-	24.4±8.4	21.7±10.0	24.2±4.7
	50,000	-	24.6±11.4	21.1±2.3	11.0±5.0

หมายเหตุ : แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 21 มวลชีวภาพของสาหร่ายไส้ไก่ที่เลี้ยงในบ่อซีเมนต์ที่ความหนาแน่นต่างๆ: น้ำหนัก (a) ความยาว (b) ร้อยละของการเพิ่มของน้ำหนัก (c) ร้อยละของการเพิ่มของความยาว (d) การเจริญเติบโตจำเพาะโดยน้ำหนัก € การเจริญเติบโตจำเพาะโดยความยาว (f)



ภาพที่ 22 การเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อซีเมนต์: บ่อเลี้ยง (a), แทลลัสไส้ไก่ที่เจริญในบ่อ (b), แทลลัสไส้ไก่ (c) และผลผลิตไส้ไก่ (d)

1.6 การเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อดิน

1) การเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อดินโดยใช้วัสดุเกาะต่างๆ

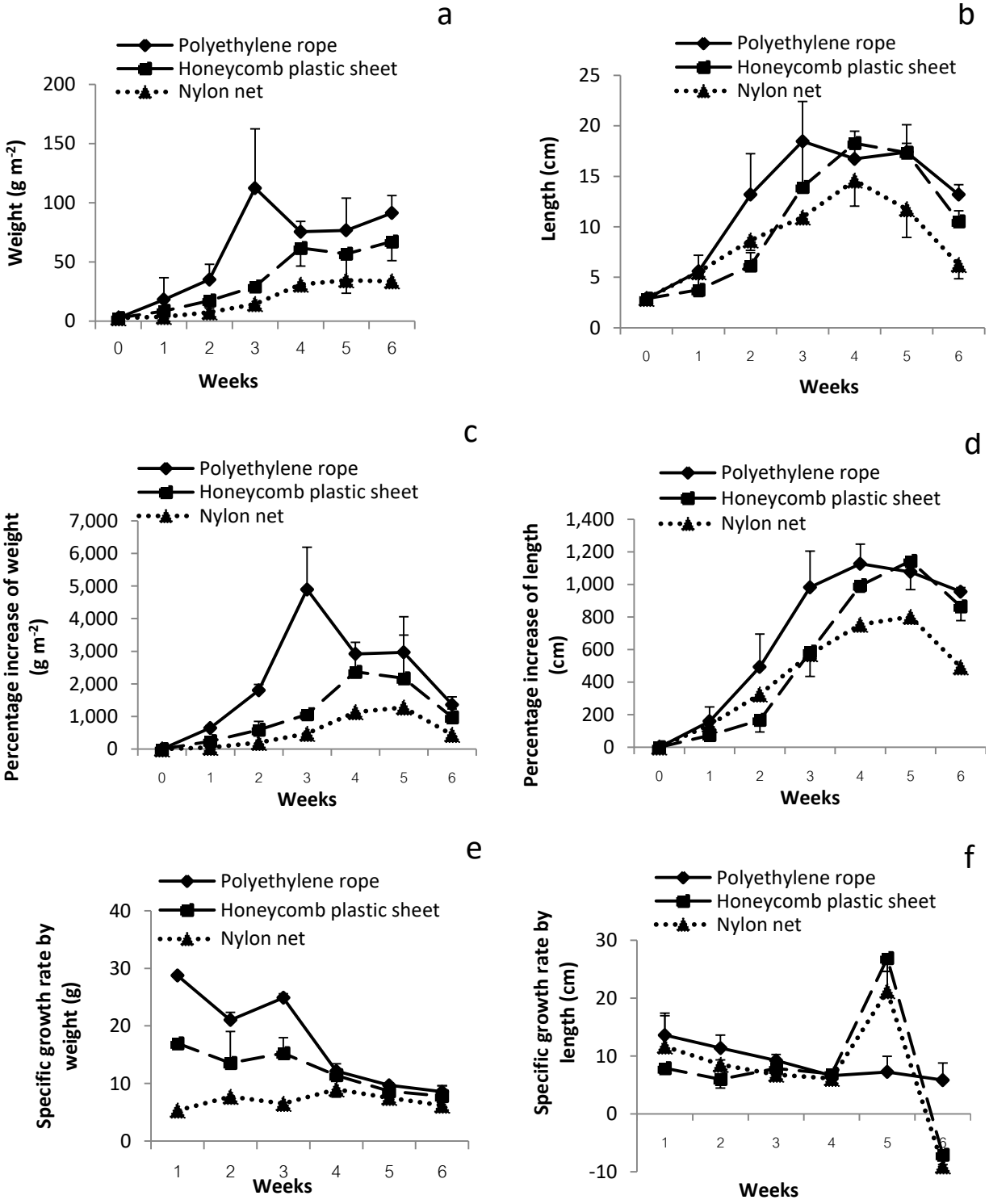
จากการทดลองเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ ในบ่อดิน ที่เลี้ยงโดยใช่ต้นพันธุ์ เริ่มต้นขนาด 3±0 กรัมต่อตร.ม. หรือ น้ำหนักเริ่มต้น เท่ากับ 2.9±0.4 กรัม เมื่อเลี้ยงไป 6 สัปดาห์ เกาะวัสดุเชือกพีอี พลาสติกรังผึ้ง และอวนไนล่อน พบว่า มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สุด 91±15, 67±16 และ 34±2 กรัมต่อตร.ม. และมีความยาวเพิ่มขึ้น เท่ากับ 13.2±1.0, 10.5±1.1, 6.2±1.4 เซนติเมตร โดยมีการเพิ่มของน้ำหนัก ร้อยละ 1,360±238, 974±257 และ 438±31ตามลำดับ โดยในสัปดาห์ที่ 3 สาหร่ายที่เลี้ยงบนอวน มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สุด 125±32, 30±1 และ 14±4 และเป็นการเพิ่มของความยาวร้อยละ 955±25, 863±85 และ 491±76 ตามลำดับ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน โดยน้ำหนักร้อยละ 8.5±0.4, 7.8±0.6 และ 6.2±0.1และ 11.0±5.0 และ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน โดยความยาวร้อยละเท่ากับ 5.8±3.0, -7.1±0.8 และ -9.0±0.3 (**ตารางที่ 14 ภาพที่ 23-24**)

2) สภาพแวดล้อมที่เลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อดินที่โดยใช้วัสดุเกาะต่างๆ

สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่อุณหภูมิน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อดินในช่วง 28±0 – 32±2 ℃ ความเค็มในช่วง 20±0 – 27± 1ppt ค่าฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส ของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 0.27± 0.08 -0.31±0.09 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าไนเตรท 0.23±0.08-0.31±0.19 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าความเข้มแสงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ เฉลี่ย 884±439 μmol m^{-2} s^{-}

ตารางที่ 14 การเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อดินที่ใช้วัสดุยึดเกาะประเภทต่างๆ

Growth items	Density(ind.m^{-2})	Time of culture (weeks)						
		0	1	2	3	4	5	6
Weight (g FW/m-2)	Polyethylene rope	3±0	19±2	48±5	125±32	76±9	77±27	91±15
	Honeycomb plastic sheet	3±0	9±3	17±6	30±1	62±15	57±33	67±16
	Nylon net	3±0	4±0	7±1	14±4	31±1	35±1	34±2
Length (cm)	Polyethylene rope	2.9±0.4	5.6±1.6	13.2±4.1	18.5±4.0	16.7±1.3	17.4±0.8	13.2±1.0
	Honeycomb plastic sheet	2.9±0.4	3.8±0.3	6.1±1.3	13.9±4.2	18.3±1.2	17.3±2.8	10.5±1.1
	Nylon net	2.9±0.4	5.5±2.4	8.7±1.0	10.9±0.1	14.6±2.6	11.8±2.8	6.2±1.4
Percentage increase of weight	Polyethylene rope	0.0±0.0	650±71	1,800±184	4,895±1,294	2,920±354	2,965±1,096	1,360±238
	Honeycomb plastic sheet	0.0±0.0	240±127	590±255	1,065±21	2,370±608	2,170±1,329	974±257
	Nylon net	0.0±0.0	45±7	195±35	475±163	1,135±21	1,280±85	438±31
Percentage increase of length	Polyethylene rope	0.0±0.0	160±87	494±202	982±222	1,126±120	1,076±49	955±25
	Honeycomb plastic sheet	0.0±0.0	74±11	168±73	586±150	993±41	1,143±175	863±85
	Nylon net	0.0±0.0	137±113	326±74	572±7	754±156	801±151	491±76
Specific growth rate (% day^{-1}) by weight	Polyethylene rope	-	28.8±1.3	21.0±0.7	24.9±1.2	12.2±0.4	9.7±1.0	8.5±0.4
	Honeycomb plastic sheet	-	17.0±5.5	13.5±2.7	15.3±0.1	11.4±0.9	8.7±1.8	7.8±0.6
	Nylon net	-	5.3±0.7	7.7±0.9	6.5±1.4	9.0±0.1	7.5±0.2	6.2±0.1
Specific growth rate (% day^{-1}) by Length	Polyethylene rope	-	13.6±3.4	11.4±2.2	9.2±1.0	6.6±0.3	7.2±2.7	5.8±3.0
	Honeycomb plastic sheet	-	7.9±0.9	6.0±1.5	7.8±1.5	6.9±0.2	26.9±2.3	-7.1±0.8
	Nylon net	-	11.7±5.7	8.5±0.8	6.8±0.0	6.1±0.6	21.2±3.4	-9.0±0.3



ภาพที่ 23 มวลชีวภาพของสาหร่ายไส้ไก่ที่เลี้ยงในบ่อดินด้วยวัสดุเกาะของสปอร์แตกต่างกัน: น้ำหนัก (a) ความยาว (b) ร้อยละของการเพิ่มของน้ำหนัก (c) ร้อยละของการเพิ่มของความยาว (d) การเจริญเติบโตจำเพาะโดยน้ำหนัก € การเจริญเติบโตจำเพาะโดยความยาว (f)

ภาพที่ 24 การเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อดิน: บ่อเลี้ยง (a), แทลลัสไส้ไก่บนเชือกพีอี (b) แทลลัสไส้ไก่บนพลาสติกรังผึ้ง (c) แทลลัสไส้ไก่บนอวนไนล่อน (d) ผลผลิตไส้ไก่จากพลาสติกรังผึ้ง (e) และผลผลิตไส้ไก่จากอวนไนล่อน (f)

การเปรียบเทียบวิธีการเลี้ยงสาหร่ายในบ่อซีเมนต์และบ่อดิน

จากการเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ที่ใช้ต้นพันธุ์จากช่อต้นอ่อน (Germling cluster) ที่ความหน่าแน่น 50,000ต้น/ตร.ม. มีความเหมาะสม โดยมีค่าใช้จ่ายในการผลิตต้นพันธุ์ ได้แก่ ค่าอุปกรณ์ สารอาหาร ไฟฟ้า แรงงาน น้ำประปา เฉลี่ยรวม 2.2 บาท/ตร.ม. เมื่อนำไปเลี้ยงในบ่อดินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ได้ผลผลิต 1,160 กรัม นน. สด ต่อ ตร.ม. หรือ 95 กรัม นน. แห้ง/ตร.ม. พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะร้อยละ 45-50 ต่อวัน ค่าใช้จ่ายในการผลิตมวลสาหร่ายไส้ไก่ ได้แก่ ค่าวัสดุทำบ่อ ค่าอุปกรณ์ ค่าสารเคมี ค่าไฟฟ้า ค่าแรง ต่อ ตร.ม. เท่ากับ 54.4 บาท

จากการเลี้ยงในบ่อดินที่ใช้ต้นพันธุ์จากต้นอ่อนบนเชือกหรืออวน ที่ความหนาแน่น 20,000-25,000 ต้น/ตร.ม. มีความเหมาะสม โดยมีค่าใช้จ่ายในการผลิตต้นพันธุ์ ได้แก่ ค่าวัสดุเชือก ค่าอุปกรณ์ สารเคมี ไฟฟ้า แรงงาน น้ำประปา รวม 4.6 บาท ต่อ ตร.ม. เมื่อนำไปเลี้ยงในบ่อดินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ได้ผลผลิต 90 กรัม นน. สด/ตร.ม. หรือ 6 กรัม นน. แห้ง/ ตร.ม. พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะร้อยละ 25 ต่อวัน ค่าใช้จ่ายในการผลิตมวลสาหร่ายไส้ไก่ ได้แก่ ค่าวัสดุทำหลัก ค่าอุปกรณ์ ค่าแรง ต่อ ตร.ม. เท่ากับ 29.4 บาท/ตร.ม. การเปรียบเทียบรายการต่างๆ ของการเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อซีเมนต์และบ่อดิน ดัง**ตารางที่ 15**

ตารางที่ 15 การเปรียบเทียบรายการต่างๆของการเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อซิเมนต์และบ่อดิน

Item	Cement tank	Earthen pond
Seedling preparation		
Type of seedling	Germling cluster	Germling on the rope
Duration of nursing	4 weeks	4 weeks
Cost per m^2	2.2 Bath	4.6 Bath
Mass Production		
No. of initial seedling	50,000 plants per m^2	20,000-25,000 plants per m^2
Duration of cultivation	2 weeks	4 weeks
SGR	45-50 % day^{-1}	25 % day^{-1}
Production	1,160 g FW m^{-2}	125 g FW m^{-2}
Ratio of FW:DW	12.2:1.0	14.3:1.0
Cost per m^2	54.4 Bath	29.4 Bath

สรุปและวิจารณ์ผล

รูปแบบการสืบพันธุ์และการเพาะพันธุ์

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ มีการสืบพันธุ์จากธรรมชาติ มี 2 รูปแบบ ได้แก่ คือ แบบแกมีตและแบบ ซูโอสปอร์ ซึ่งมีผลจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม และธาตุอาหารในแหล่งน้ำ ซึ่งการสืบพันธ์แบบซูโอสปอร์ มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความกว้างของแทลลัส ส่วนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศ หรือแกมีต สัมพันธ์แบบผกผันกับค่าความเป็นด่างและแสง ซึ่งสัมพันธ์ในเชิงบวกกับ ความยาวของแทลลัส อย่างไรก็ตาม สอดคล้องกับรายงานของ Rapaport *et al*. (2010) พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และแบบไม่อาศัยเพศของสาหร่าย *U. intestinalis* บริเวณหาด Baltic เกาะ Riddarskaret ประเทศสวีเดนที่ขึ้นอยู่กับลักษณะของแทลลัสสาหร่ายที่มีผลต่อการสืบพันธุ์ รวมทั้งสภาวะแวดล้อมได้แก่ ธาตุอาหาร ความเค็ม แสง และอุณหภูมิ (Ganesan *et al*., 2010) ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบซูโอสปอร์หรือแบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณความกระด้าง และความเค็มในแหล่งน้ำ

การนำสาหร่ายมาเหนี่ยวนำให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์พบว่า ปัจจัยด้านขนาดท่อนพันธุ์ โดยแทลลัสขนาด 3 เซนติเมตร สามารถเหนี่ยวนำให้สร้างสปอร์ได้ร้อยละ 90 ในวันที่ 2 และได้ร้อยละ 100 ภายในวันที่ 4 อย่างไรก็ตาม การตัดท่อนพันธุ์ยาว 0.5-3.0 เซนติเมตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยคล้ายคลึงกับสาหร่ายในกลุ่มเดียวกัน ดังรายงานของ Lin *et al*. (2008) ซึ่งกล่าวว่า การตัดสาหร่าย *E. prolifera* เป็นชิ้นเล็กสามารถกระตุ้นให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ ส่วนการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมินั้น พบว่าที่ 25 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมกับการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างอับซูโอสปอร์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับที่ระดับอุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับ Mantri et al. (2011) รายงานว่า ปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความเค็ม 15 ppt เป็นสภาวะกระตุ้นที่เหมาะสมสำหรับสาหร่าย *U. fasciata* ให้สร้างซูโอสปอร์ (zoospore) แม้ว่าในบริเวณที่เก็บสาหร่าย *U. intestinalis* ครั้งนี้มีอุณหภูมิ 27±5 องศาเซลเซียส แต่การเพิ่มอุณหภูมิทำให้สาหร่ายสร้างอับซูโอสปอร์ ได้น้อยกว่าการลดอุณหภูมิ สำหรับปัจจัยด้านการผึ่งแห้งพบว่า การผึ่งแห้งที่ 0 นาที หรือการไม่ผึ่งแห้งสามารถสร้างสปอร์ได้ร้อยละ 97 ในวันที่ 2 และในวันที่ 4 ของการเหนี่ยวนำ ส่วนที่เวลาการผึ่งแห้ง 0, 1 และ 2 ชม. สามารถสร้างได้ร้อยละ 100 สำหรับความเค็มสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอับซูโอสปอร์ โดยที่ระดับความเค็ม 25 ppt สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ร้อยละ 100 ในวันที่ 4 ของการเหนี่ยวนำ โดยที่ทุกระดับความเค็มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p> 0.05$) เนื่องจากสาหร่ายสามารถอยู่ได้ในความเค็มช่วงกว้าง (Lobbon and Harrison, 1994) ทำให้พบการสร้างสปอร์ในทุกระดับความเค็ม

ปัจจัยที่กระตุ้นให้สร้างอับซูโอสปอร์มีความสอดคล้องกับรายงานของ Dan *et al*. (2002) ที่เลี้ยงชิ้นส่วนของสาหร่าย *E. prolifera* ซึ่งตัดเป็นชิ้นส่วนรูปกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.2 มิลลิเมตร ที่ระดับความเค็ม 5-52 ppt ทำให้มีการสืบพันธุ์ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ของชิ้นส่วนทั้งหมดในเวลา 4-5 วัน และจากการเหนี่ยวนำให้สาหร่ายมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในห้องปฏิบัติการครั้งนี้ พบเพียงอับซูโอสปอร์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lin *et al.* (2008) พบว่า *E. prolifera* ในห้องปฏิบัติการพบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพียงเฉพาะแบบอับซูโอสปอร์ ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์ที่ไม่อาศัยเพศ สามารถปล่อยซูโอสปอร์ (zoospore) ที่จะเจริญเป็นต้นใหม่ได้โดยตรง แม้ว่าในแทลลัสที่สมบูรณ์สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ สองแบบได้ในท่อนเดียวกัน คือ อับเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศ (gametangium) และอับซูโอ

สปอร์ (Reine and Trono, 2001) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบเฉพาะอับซูโอสปอร์เท่านั้น อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ใช้เหนี่ยวนำดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศ

การศึกษาให้สาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* ปล่อยสปอร์ด้วยปัจจัยต่าง ๆ พบว่า ปัจจัยด้านความเค็มสามารถกระตุ้นให้มีการปล่อยสปอร์ได้มากที่สุด ที่ระดับความเค็ม 25 ppt สามารถปล่อยสปอร์ได้สูงกว่าที่ระดับความเค็มอื่น ๆ โดยที่ทุกระดับความเค็มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสอดคล้องจากการรายงานของสุวรรณา และคณะ (2550) สาหร่ายชนิดนี้เจริญเติบโตดีในความเค็ม 25 ppt และจากการรายงานของ Sousa *et al.* (2007) พบว่า ความเค็มส่งผลโดยตรงต่อการพัฒนาการสร้าง และการเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไก่ ทั้งนี้ความเค็มต่ำทำให้การพัฒนาของสาหร่ายไส้ไก่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปัจจัยด้านการเพิ่มแสง 20 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นให้ปล่อยสปอร์ได้มากกว่าระดับความเข้มแสงที่ระดับอื่น ๆ โดยที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ปัจจัยด้านการผึ่งแห้งพบว่าการผึ่งแห้งที่เวลา 1 ชั่วโมง สามารถปล่อยสปอร์ได้มากกว่าการผึ่งแห้งที่เวลาอื่น ๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แตกต่างจากการรายงานของ ทิพวรรณ และคณะ (2552) พบว่า การผึ่งแห้งที่ 30 นาที สามารถปล่อยสปอร์ได้มากที่สุด การใช้วัสดุล่อสปอร์ ควรนำวัสดุมาล่อในวันที่ 1-9 เท่านั้น เนื่องจากทุกวัสดุมีปริมาณสปอร์เกาะสูงที่สุดในวันที่ 9 ของการเลี้ยงหลังจากนั้นจำนวนสปอร์ที่เกาะมีจำนวนลดลงพฤติกรรมการเกาะของสปอร์ยังไม่พบการรายงานมาก่อน เมื่อพิจารณาจำนวนสปอร์รวมที่เกาะวัสดุ พบว่า วัสดุที่มีปริมาณสปอร์เกาะมากที่สุดคือ เชือกพีอี แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับวัสดุอวนไนล่อน และพลาสติกรังผึ้ง โดยผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการเลี้ยงสาหร่าย *Enteromorpha* sp., *Monostroma* และ *Porphyra* ในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งใช้ตาข่ายอวนพีอีมีขนาดตา 30x50 ม.^{2} ล่อสปอร์สาหร่ายในธรรมชาติ (Critchley and Ohno, 1998; Ohno and Critchley, 1993) ซึ่งผิวสัมผัสของตาข่ายหรือขนาดตาที่ใช้ล่อสปอร์ ส่วนระดับหรือบริเวณที่มีการเกาะของสปอร์พบว่า ระดับบนปริมาณสปอร์เกาะเชือกมีความแตกต่าง ($p<0.05$) กับปริมาณสปอร์ที่เกาะอวน และพลาสติกขณะที่ระดับกลาง และระดับล่าง ปริมาณสปอร์ที่เกาะวัสดุเชือก พลาสติก และอวนไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากการเกาะระดับบนมีปริมาณแสงมากกว่าระดับกลาง และระดับล่าง

รูปแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่

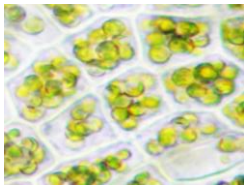
สภาวะแวดล้อมของสาหร่ายไส้ไก่ที่เลี้ยงในบ่อซีเมนต์ พบว่าสาหร่ายมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบ แกมีต โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในระบบเปิดไม่สามารถควบคุมแสง อุณหภูมิได้ ซึ่งการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในแต่ละครั้งจะขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมของธรรมชาติ เมื่อนำต้นพันธุ์ที่เหมาะสมมาทดลองการกระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* ในห้องปฏิบัติการ พบว่า สาหร่ายมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบซูโอสปอร์ สอดคล้องกับรายงานของ Lin *et al*., (2008) พบการสร้างแบบซูโอสปอร์ ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ การทดลองครั้งนี้พบว่า การกระตุ้นให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้วยปัจจัยด้านขนาดท่อนพันธุ์ที่ยาว 3 เซนติเมตร สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ร้อยละร้อยในวันที่ 2 ของการกระตุ้นอย่างไรก็ตามทุกระดับขนาดท่อนพันธุ์สามารถนำมากระตุ้นให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Lin *et al*., (2008) รายงานว่า การตัดสาหร่าย *E. prolifera* เป็นชิ้นเล็กสามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ โดยสาหร่ายที่กระตุ้นในระดับความเค็ม 15-30 ppt.สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ภายในระยะเวลา 2 วัน สอดคล้องจากการรายงานของ Lobbon and Horrison, (1994) ที่พบว่าสาหร่ายไส้ไก่สามารถอยู่ได้ในความเค็มช่วงกว้างส่วนการเพิ่มสาร $CaCl_2$ ปริมาณ 6 mg/l สามารถกระตุ้นให้มีการ

สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้เร็วกว่าอย่างไรก็ตามทุกระดับปริมาณสารแคลเซียมสามารถกระตุ้นให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้แต่ยังไม่พบการรายงาน และปัจจัยด้านอุณหภูมิพบว่าอุณหภูมิ 25 ℃ สามารถสร้างสปอร์ได้ร้อยละร้อยภายในระยะเวลา 4 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงาน Killita and Tytianor (2003) รายงานว่าอุณหภูมิมีผลต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการเจริญเติบโตของ *U. fenetrata* โดยสาหร่ายสามารถอาศัยได้ในระดับอุณหภูมิ 28 ℃ หรืออุณหภูมิที่ใกล้เคียงที่กล่าวมา (Reine and Trono, 2001) จากการเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อซีเมนต์ขนาดความยาวเริ่มต้น 3 เซนติเมตร พบว่าควรเลี้ยงที่ความหน่าแน่น 50,000 ต้นต่อตร.ม.ที่ให้อุณหภูมิไม่เกิน 30 ℃ เลี้ยงใช้ระยะเวลา 2 สัปดาห์ ควรหลีกเลี่ยงการเลี้ยงในช่วงหน้าร้อน โดยตัวแบบที่เหมาะสมในการเพาะและขยายพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* **ดังแสดงในภาพที่ 25**

ต้นพันธุ์จากบ่อเลี้ยง/จากธรรมชาติ ที่ยังไม่สร้างเซลล์สืบพันธุ์

ตัดเป็นท่อนขนาดเล็ก 0.5-3.0 ซม.

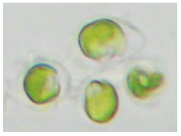
เลี้ยงที่ 25±2 °C , 60 µmol m^{-2} s^{-1} , ความเค็ม 10-30 ppt, Light:Dark=12:12 เติม $CaCl_2$ 6 mg/L



อับซูโอสปอร์

เก็บในที่มืดก่อน 24 ชม.

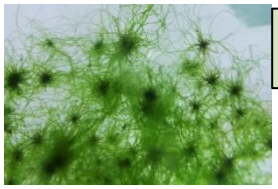
เลี้ยงที่ 25±2 °C , 60 µmol m^{-2} s^{-1} , ความเค็ม 10-25 ppt, Light:Dark=12:12



ซูโอสปอร์

ไม่มีวัสดุเกาะ
อนุบาล 4 สัปดาห์

มีวัสดุเกาะ ล่อสปอร์ 3-8 วัน
10 ล้าน ต้น/ตร.ซม.
อนุบาล 4 สัปดาห์



ช่อต้นอ่อน

ต้นอ่อนบนเชือก/อวน

การเลี้ยงในบ่อซีเมนต์

ต้นอ่อนยาว 2.5-3.0 ซม.
40,000-50,000 ต้น/ตร.ม.
เลี้ยงนาน 2 สัปดาห์
SGR 45-50 % ต่อวัน
ผลผลิต 1,160 กรัม/ตร.ม.

การเลี้ยงในบ่อดิน

ต้นอ่อนบนเชือกยาว 2.5-3.0 ซม.
20,000-25,000 ต้น/ตร.ม.
เลี้ยงนาน 4 สัปดาห์
SGR 25% ต่อวัน
ผลผลิต 125 กรัม/ตร.ม.

ภาพที่ 25 ไดอะแกรมตัวแบบที่เหมาะสมในการเพาะและขยายพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis*

เอกสารอ้างอิง

จริยาวดี สุริยพันธุ์, ชัชรี แก้วสุรลิขิต, ชนัดดา เกตุมาและชะลอ ลิ้มสุวรรณ. 2547. ผลของสาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva intestinalis* Linnaeus) ต่อสัตว์หน้าดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). โครงงานวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. [ออนไลน์]http://kucon.lib.ku.ac.th/cgibin/KUCON.exe?rec_id=011137&database (14 เมษายน 2552)

ชนัดดา เกตุมา, ชัชรี แก้วสุรลิขิต, จริยาวดี สุริยพันธุ์และชะลอ ลิ้มสุวรรณ. 2549. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Ulva intestinalis Linnaeus) ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. [ออนไลน์] สืบค้นได้จาก http://kucon.lib.ku.ac.th/cgibin/KUCON.exe?rec_id=011136&database (3 เมษายน 2552)

สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย .ห่งแรก แก้วิกฤตราคาตกต่ำฟาร์มกุ้งอินทรีย์แ .2550 .(สสท)[ออนไลน์] สืบค้นได้จาก http://www.tei.or.th/hotnews/070920-other5-manager.htm (20 สิงหาคม 2552 (

สุวรรณา วรสิงห์. 2551. ผลของระดับความเค็มน้ำต่อสาหร่ายหนาม. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 25/2550, ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี. [ออนไลน์] http://www.nicaonline.com/articles10/site/view_article.asp?idarticle=3035 (9 พฤศจิกายน 2551)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 2550. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำร่วมกับสาหร่ายไส้ไก่. เอกสารเผยแพร่สำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง [ออนไลน์] สืบค้นได้จาก http://www.fisheries.go.th/cf-kung_krabaen/research.html (25 สิงหาคม 2552)

Algaebase. 2552. Ulva Linnaeus, 1753: 1163. [ออนไลน์] Avialable http://www.algaebase.org/search/genus/detail (25 สิงหาคม 2552)

Adey, W. H., Purgason, R. 1998. Animal feedstocks comprising harvested algal turf and a method of preparing. USA. Patent number: 5715774. Feb 10

Aguilera-Morales, M. Casas-Valdez, M. Carrillo-Domínguez, S. , González-Acosta, B. and Pérez-Gil, F. 2005.Chemical composition and microbiological assays of marine algae Enteromorpha spp. as a potential food source. J. Food Composition and Analysis. 18(1):79-88.

Briand, X.. 1995. Utilization of algae extract for the preparation of pharmaceutical, cosmetic. Patent number: 5508033. Feb 14.

Briand, X., Stephanie, C., Dumas, B., Esquerre-Tugaye, M-T., Salamagne, S.. 2005. Use of Ulvans as Elicitors of Mechanisms for Nitrogen Absorption and Protein.USA. Patent No. US 2008/0127695 A1. Mar 30.

Cohen, R. A. and Fong. P 2004, Nitrogen uptake and assimilation in *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link (Chlorophyta): using ^{15}N to determine preference during simultaneous pulses of nitrate and ammonium. J. Exp. Marine Biol. and Ecol.: 309 (1), 67-77

Fong, P. K., Boyer E. and Zedler, J. B. 1998. Developing an indicator of nutrient enrichment in coastal estuaries and lagoons using tissue nitrogen content of the opportunistic alga, *Enteromorpha intestinalis* (L. Link) Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 231(1), 63-79

Hasebe, K. and Yamada, K. .2004. Hair treatment composition and hair cosmetic for damaged hair. USA. Patent No. US 2006/0165636 A1. Mar 3.

Hiraoka, M. and Oka, N. 2008. Tank cultivation of *Ulva prolifera* in deep seawater using a new "germling cluster" method. J. Appl. Phycol. 20:97-102.

Iovanni, C. F. and Alexiou, M. S.. 2006. Skin care compositions including marine extracts Patent No. US 2007/0248563. Apr.,19.

Kamer, Kr. and Fong, P. 2000. A fluctuating salinity regime mitigates the negative effects of reduced salinity on the esturine macrialga, *Enteromorpha intestinadis*. Department of Organismic Biology, University of California, 254 : 53-69.

Lewmanomont, K. and Ogawa, H. Common Seaweeds and Seagrasses of Thailand. Intergrated Promotion Technology Co., Ltd. Bangkok. 163 p.

Lin, A., Shen, S., Wang, J, and Yan, B. 2008. Reproductive Diversity of *Enteromorpha prolifera*. J. Integrative Plant Biol. 50(5): 622-629.

Lobbon, S. C. and Harrison, A. P. 2000. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, USA. 366 p.

Martins, I., Oliveira, J. M., Flindt, M. R. and Marques, J. C. 1999. The effect of salinity on the growth rate of the macroalgae *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) in the Mondego estuary (west Portugal) Acta Oecologica, 20(4), 259-265

Ohno, M. 1993. Cultivation of green algae, *Monostroma* and *Enteromorpha* "Aonori*". In* Ohno, M. and Critchley, A. T. Seaweed Cultivation and Marine Ranching. Kanagawa International fisheries Training Center, Japan International Cooperation Agency (JICA). 151 p

Pellizzari, F. and Oliveira, E. C. 2007. Life-history, thallus ontogeny, and the effectsof temperature, irradiance and salinity on growth of the edible green seaweed *Gayralia spp*. (Chlorophyta) from Southern Brazil, 80 : 75-82.

ภาคผนวก

การตีพิมพ์เผยแพร่ในฐานข้อมูล TCI

แก่นเกษตร 43 ฉบับพิเศษ 1 : (2558). KHON KAEN AGR. J. 43 SUPPL. 1 : (2015).

การเหนี่ยวนำการสร้างอับซูโอสปอร์ของสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* Linnaeus (Chlorophyta) ในห้องปฏิบัติการ

Induction of Zoosporangial Formation of Gut Weed, *Ulva intestinalis* Linnaeus (Chlorophyta) in Laboratory

อาริณี มูน๊ะ[1], ระพีพร เรืองช่วย[1*] และ โชคชัย เหลืองธุวปราณีต[1]

Arinee Muna[1], Rapeeporn Ruangchuay[1*] and Chokchai Lueangthuvapranit[1]

บทคัดย่อ: การเหนี่ยวนำการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับใช้ในขยายพันธุ์ได้อย่างต่อเนื่อง ใช้ปัจจัยกระตุ้น 3 ปัจจัย ประกอบด้วย 1) ขนาดความยาวท่อนพันธุ์ 5 ระดับ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 ซม. 2) อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 25, 30 และ 35°C และ 3) การเติมสารแคลเซียม จากคลอไรด์ 4 ระดับ คือ 0, 6, 12 และ 18 มก./ล. เซลล์สืบพันธุ์ที่สร้าง คือ อับซูโอสปอร์ พบว่ามีจำนวนโพรโทพลาสต์ 13±3 อัน/เซลล์ โดยความยาวท่อนพันธุ์ 0.5-3.0 ซม. ไม่มีผลต่อการสร้างอับซูโอสปอร์ โดยสร้างได้ร้อยละ 98±4-100±0 ในเวลา 4 วัน ส่วนอุณหภูมิ 25°C ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำสร้างอับซูโอสปอร์ ได้มากที่สุด คือ ร้อยละ 100±0 ในวันที่ 4 สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับอุณหภูมิอื่น ส่วนการเพิ่มสาร $CaCl_2$ 6 และ 18 มก./ล. ส่งผลให้มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มากที่สุดร้อยละ 100±0 ในวันที่ 2 ใกล้เคียงกับการเติม $CaCl_2$ 12 มก./ล ดังนั้น การตัดสาหร่ายเป็นชิ้นส่วนขนาด 0.5-3.0 ซม. การเลี้ยงชิ้นส่วนสาหร่ายที่ 25°C และการเพิ่มสาร $CaCl_2$ 6-18 มก./ล. ลงในน้ำเลี้ยงจะช่วยเหนี่ยวนำให้สาหร่ายไส้ไก่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ภายใน 2 วัน

คำสำคัญ สาหร่ายไส้ไก่, *Ulva intestinalis*, อับซูโอสปอร์

ABSTRACT: Induction of zoosporangial formation in *Ulva intestinalis* [by using the environmental factor] in laboratory condition was aimed to obtain the beneficial information for the continuous culture. Three factors including: 1) fragment length, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 cm; 2) temperature 25, 30 and 35°C; and 3) calcium chloride ($CaCl_2$) 0, 6, 12 and 18 mg/L. The results found only zoosporangia. Each cell contained of sporangial protoplasts 13±3 individuals. The fragment length, 0.5-3.0 cm long, were not significantly different on sporangia formation ($p>0.05$). Every fragment lengths were induced zoosporangia 98±4-100±0% in 4 days. At 25°C the fragments were produced sporangia 100±0 % within 4 days and showed significantly affect with those of the remained temperatures. The enriched of $CaCl_2$ at 6 and 18 mg/L inducted 100±0% zoosporangia in 2 days and which similar to 12 mg/L. $CaCl_2$ Inconclusion cutting of the thallus length into 0.5-3.0 cm and cultured at 25°C were induced zoosporangia in 4 days while adding 6-18 mg/L $CaCl_2$ induced zoosporangia within 2 days.

Keywords: Gut weed, *Ulva intestinalis*, zoosporangia

[1] แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ.ปัตตานี 94000
Division of Fishery Technology, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani Province 94000

* Corresponding author: rrapee@bunga.pn.psu.ac.th

บทนำ

สาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* ซึ่งอาจรู้จักในชื่อเดิมว่า *Enteromorpha intestinalis* เป็นสาหร่ายทะเลสีเขียว ในดิวิชัน Chlorophyta มีแทลลัสเป็นหลอดกลวง หงิกงอ หรือเป็นลอน และย่นเหมือนไส้ไก่ แตกแขนงได้ อยู่เป็นกลุ่มหรือเป็นสาย (ยุวดี, 2549) มีลักษณะอ่อนนุ่มและมีวงจรชีวิตสั้น (Reine and Trono, 2001) พบได้ทั่วไปตามบริเวณแหล่งน้ำกร่อย ปากแม่น้ำ ขึ้นบนพื้นโคลนหรือบนก้อนหิน ในบริเวณที่มีธาตุอาหารสูง (Algaebase, 2014) มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในช่วงกว้าง (Kamer and Fong, 2000)) เนื่องจากสาหร่าย ในสกุล *Ulva* มีวิตามิน เกลือแร่ โปรตีนสูง ช่วยกระตุ้นกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค ประเทศในแถบเอเชียจึงมีการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น ประเทศญี่ปุ่นและจีน ใช้เป็นพืชผักสมุนไพร โดยนำมาบดเป็นผง ใช้โรยหน้าอาหารต่าง ๆ (Critchley and Ohno, 1998) ในประเทศฟิลิปปินส์นำมาเป็นอาหารปลานวลจันทร์ทะเล *Chanos chanos* (Reine and Trono, 2001) นอกจากนี้ ยังนำสารสกัดจากสาหร่ายกลุ่มนี้มาเป็นส่วนผสมของเครื่องสำอาง แชมพู และ โลชั่น เนื่องจากมีสารต้านจุลชีพอยู่ด้วย (Adey and Purgason, 1998; Briand 1995; Briand et al. 2005; Hasebe and Yamad, 2004)

สำหรับในประเทศไทยได้นำสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* มาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่าสาหร่ายไส้ไก่สามารถดูดซับแอมโมเนีย ไนไตรท์ และฟอสฟอรัสในบ่อกุ้ง เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และบ่อเลี้ยงที่มีสาหร่ายไส้ไก่จะมีปริมาณสัตว์หน้าดินมาก จึงเป็นแหล่งสร้างอาหารจากธรรมชาติให้กับกุ้งกุลาดำในบ่อดินตั้งแต่ระยะเริ่มต้นเลี้ยง ซึ่งช่วยลดต้นทุนค่าอาหารกุ้งได้ในช่วงเวลาการเลี้ยง 2 เดือนแรก (จริยาวดี และคณะ, 2550) นอกจากนี้ยังทำให้ระบบการเลี้ยงปลอดจากสารเคมี ซึ่งมีผลดีต่อผู้บริโภค จากการใช้ประโยชน์ดังกล่าวทำให้มีความพยายามในการขยายพันธุ์และเพาะเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่กันมากขึ้น แต่ยังไม่พบรูปแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ได้อย่างต่อเนื่องที่จะได้ต้นอ่อนมากพอซึ่งนำไปใช้เลี้ยงในบ่อดินได้ ดังนั้นการเหนี่ยวนำการสืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่โดยใช้ปัจจัยเด่นต่างๆ ได้แก่ ปัจจัยทางชีวภาพ คือ ขนาดของท่อนพันธุ์ ปัจจัยทาง ฟิสิกส์ ได้แก่ อุณหภูมิ และ ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ปริมาณสารแคลเซียม ที่จะทำให้การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* ได้ในเวลาที่รวดเร็วขึ้น เพื่อจะนำไปใช้ในการเลี้ยงได้ต่อไป

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมท่อนพันธุ์

แทลลัสสาหร่าย *U. intestinalis* เก็บจากฟาร์มสาหร่ายที่เลี้ยงในบ่อซีเมนต์ บริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำมาคัดเลือกต้นพันธุ์ที่สมบูรณ์ จัดสิ่งปนเปื้อนต่างๆ แล้วนำตัวอย่างมาล้างหลายครั้งด้วยน้ำทะเลที่ระดับความเค็มเดียวกันจากสภาพแวดล้อมที่เก็บ และตรวจสอบการลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกแทลลัสที่ยังไม่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ นำมาเหนี่ยวนำด้วยวิธีต่าง ๆ

2. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

2.1 ขนาดของท่อนพันธุ์ที่แตกต่างกัน

ตัดแทลลัสสาหร่าย *U. intestinalis* ที่ความยาวแตกต่างกัน 5 ขนาด ได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 ซม. ชั่งน้ำหนักรวม 0.5 ก. ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ซึ่งมีขาต่อพิเศษเพื่อให้อากาศ ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้น้ำความเค็ม 25 ppt เติมอาหาร สูตร Modified Gillard'S Medium (MGM) (Guillard, 1975) ภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ที่ความเข้มแสง 60 µmol m^{-2} s^{-1} การให้แสง:มืด เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ทำตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 2 วัน และนำผลที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 ระดับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

นำแทลลัสที่ยังไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาตัด

ให้ได้ขนาด 3 ซม. (โดยใช้เงื่อนไขที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาจากข้อ 2.1) ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ซึ่งมีขาต่อพิเศษเพื่อให้อากาศ ที่มีน้ำความเค็ม 25 ppt และ สูตรอาหาร MGM ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ เลี้ยงในอ่างควบอุณหภูมิที่ระดับ ต่างกัน 25, 30 และ 35 ºC การให้แสง: มืด 12:12 ชั่วโมง ทำการนับตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 2 วันและนำผลที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.3 การเพิ่มสารแคลเซียมจาก $CaCl_2$ ในปริมาณที่แตกต่างกัน

เพิ่มสารแคลเซียมจาก $CaCl_2$ ในปริมาณ 0, 6, 12 และ 18 มก./ล. โดยนำแทลลัสที่ยังไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มา ตัดแทลลัสให้ยาว 3 ซม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ซึ่งมีขาต่อพิเศษเพื่อให้อากาศ ความเค็ม 25 ppt ใช้สูตรอาหาร MGM เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เลี้ยงที่ระดับความเข้มแสง 60 µmol $m^{-2}s^{-1}$ การให้แสง: มืด 12:12 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก ๆ 2 วัน

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณหาร้อยละของท่อนพันธุ์ที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ และหาความแตกต่างของทางสถิติ แบบ One-way ANOVA และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นคู่แบบ Tukey HSD[a] (Steel and Torrie, 1980)

ผลการศึกษา

1. พฤติกรรมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis*

แทลลัสสาหร่ายที่นำมากระตุ้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีความยาวเฉลี่ย 9.2±3.8 ซม. และความกว้างเฉลี่ย 1.8±0.8 มม.คุณภาพน้ำในบ่อที่เก็บสาหร่าย มีอุณหภูมิ 27±5°C ความเค็ม 16±5 ppt ปริมาณฟอสเฟตอยู่ในช่วง 0.76±0.22 มก./ล. ปริมาณไนเตรท 0.48±0.37 มก./ล. ค่าความเข้มแสง 1,126±113 µmol m^{-2} s^{-1} pH 7.8±0.2 ความกระด้าง 2,586±50 มก./ล. และ ความเป็นด่าง 132±7 มก./ล. เซลล์สาหร่ายก่อนสร้างเซลล์สืบพันธุ์ มีรูปร่างหลายเหลี่ยม ขนาด 15±3x19±3 µm มีคลอโรพลาสต์อยู่บริเวณขอบเซลล์ ในเซลล์มีไพรีนอยด์ 2±1 อัน เมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยปัจจัยสภาพแวดล้อมต่างๆ พบว่า การสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบทั่วไปบนผิวชิ้นส่วนของสาหร่ายไส้ไก่ที่นำมากระตุ้น โดยเฉพาะบริเวณปลายเซลล์ที่มีรอยตัด โดยเซลล์สืบพันธุ์ที่สร้างเป็นแบบไม่อาศัยเพศ คือ อับซูโอสปอร์ (zoosporangium) ภายในมีการแบ่งตัวของโพรโทพลาสต์ (protoplast) มีจำนวน 13±3 อัน/เซลล์ ขนาดของ โพรโทพลาสต์ภายในเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 7±1 µm (Figure 1)

2. ปัจจัยต่าง ๆที่มีผลต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis*

2.1 ผลของขนาดท่อนพันธุ์ต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

จากการศึกษา พบว่าท่อนพันธุ์สาหร่ายที่ความยาว 0.5–3.0 ซม. มีการสร้างเซลล์แบบสืบพันธุ์ แบบ อับซูโอสปอร์ ได้จำนวนร้อยละ 98±4-100±0 ในวันที่ 4 ของการเหนี่ยวนำโดยที่ทุกขนาดของท่อนพันธุ์ พบร้อยละของท่อนพันธุ์ที่สร้างอับซูโอสปอร์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามในวันที่ 2 ของการเลี้ยง พบว่าที่ความยาวของท่อนพันธุ์ 3 ซม. พบจำนวนท่อนพันธุ์ที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์มากที่สุด คือร้อยละ 90±3 จึงใช้ขนาดของท่อนพันธุ์ที่ 3 ซม. (Table 1)

2.2 ผลการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิระดับแตกต่างกันต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

จากการศึกษาพบว่า ในวันที่ 4 ที่อุณหภูมิ 25 ท่อนพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่สามารถสร้างอับซูโอสปอร์ได้ร้อยละ 100±0 โดยมีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) กับที่อุณหภูมิ 30°C ซึ่งสร้างอับซูโอสปอร์ได้เพียงร้อยละ 12±8 ขณะที่อุณหภูมิ 35°C ไม่พบการสร้างระหว่างอับซูโอสปอร์และท่อนพันธุ์ตายในวันที่ 6 (Table 1)

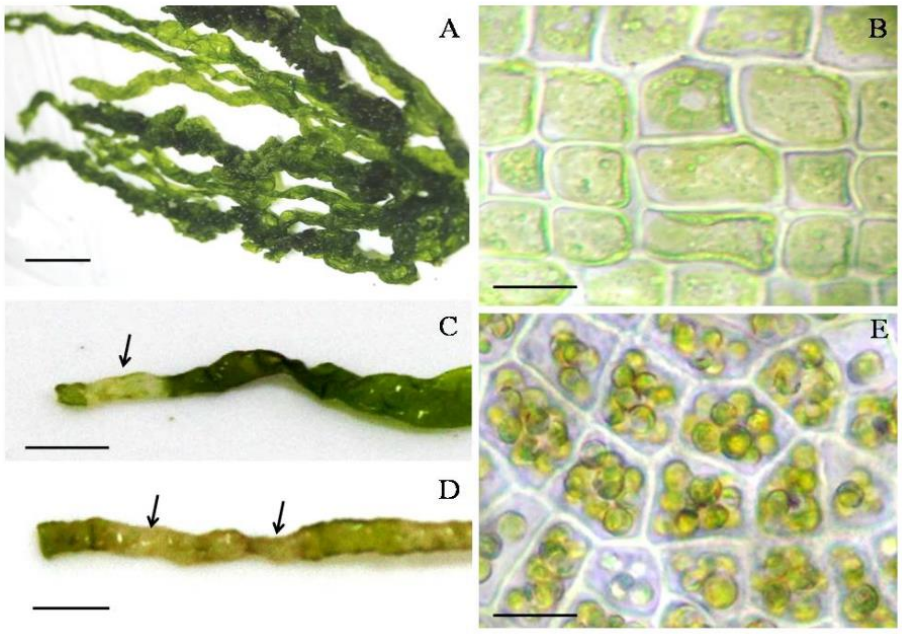


Figure 1 Characteristics of *Ulva intestinalis*: A. Immature thalli, scale bar= 2 mm; B. Surface cells, scale bar= 20 μm; C. Formation of reproductive cell at the end of fragment (arrow point), scale bar= 2 mm; D. Formation of reproductive cell at the inner part of fragment (arrow point), scale bar= 2 mm and D. Zoosporangia, scale bar= 20 μm

Table 1 Stimulating factors on percentage reproductive formation (n=90) in *Ulva intestinalis*

Factors	Level	Percentage of the formation (mean±sd) at 2nd and 4th day		Type of Repro-ductive cell	Incubated conditions
		2nd	4th		
1. Fragment length (cm)	0.5	86±10[a]	100±0[a]	zoosporangia	Temperature 25°C, light intensity 60 μmol m^{-2} s^{-1}, light:dark 12:12 hrs and salinity 25 ppt
	1.0	80±14[a]	100±0[a]	zoosporangia	
	1.5	69±10[a]	99±1[a]	zoosporangia	
	2.0	61±15[a]	100±0[a]	zoosporangia	
	3.0*	90±3[a]	98±4[a]	zoosporangia	
2. Temperature (°C)	25*	61±16[b]	100±0[c]	zoosporangia	Fragment 3 cm, light intensity 60 μmol m^{-2} s^{-1}, light:dark 12:12hrs and salinity 25 ppt
	30	10±7[a]	12±8[b]	zoosporangia	
	35	0±0[a]	0±0[a]	-	
3. Enrichment concentration of $CaCl_2$ (mg/L)	0	88±3[a]	100±0[a]	zoosporangia	Fragment 3 cm, temperature 25°C, light intensity 60 μmol m^{-2} s^{-1}, light:dark 12:12 hrs and salinity 25 ppt
	6	100±0[b]	100±0[a]	zoosporangia	
	12	96±5[b]	100±0[a]	zoosporangia	
	18	97±6[b]	100±0[a]	zoosporangia	

Different alphabets in colomn of each factor show significant ($p<0.05$)

*The selected condition for the next experiment

2.3 ผลของการเพิ่มสารแคลเซียมจาก $CaCl_2$ ต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

การเพิ่มสาร $CaCl_2$ สามารถกระตุ้นให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอับซูโอสปอร์ โดยที่การเพิ่มสารแคลเซียม 6 มก./ล. สามารถสร้างอับซูโอสปอร์ ได้มากและเร็วที่สุดคือร้อยละ100±0 ในวันที่ 2 รองลงมาคือการเพิ่มสารแคลเซียม 18 และ12 มก./ล. สามารถสร้างอับซูโอสปอร์ ได้ร้อยละ 97±6 และ 96±5 ในวันที่ 2 เช่นกัน โดยที่ระดับการเติม $CaCl_2$ 6, 12 และ 18 มก./ล. พบว่ามีร้อยละสร้างอับซูโอสปอร์ในวันที่ 2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างจากที่ไม่ได้เติมสาร $CaCl_2$ (Table 1)

วิจารณ์

เมื่อนำแทลลัสของสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* มีความยาวเฉลี่ย 9.2±3.8 ซม. มาเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยตัดแทลลัสให้มีขนาดเล็กลง ให้ท่อนพันธุ์ยาว 0.5-3.0 ซม. สามารถสร้างอับซูโอสปอร์ได้เกือบร้อยละ 100 ภายในวันที่ 4 ของการเหนี่ยวนำ โดยคล้ายคลึงกับสาหร่ายในกลุ่มเดียวกัน ดังการรายงานของ Lin et al. (2008) ซึ่งกล่าวว่า การตัดสาหร่าย *Enteromorpha prolifera* เป็นชิ้นเล็กสามารถเหนี่ยวนำให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อตัดสาหร่ายไส้ไก่เป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กลง มีแนวโน้มทำให้สาหร่ายสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้มากขึ้น ส่วนการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมินั้น พบว่าที่ 25ºC มีความเหมาะสมกับการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างอับซูโอสปอร์ ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับ Mantri et al. (2011)รายงานว่าปัจจัยร่วมระหว่าง อุณหภูมิ 25 ºC และความเค็ม 15 psu (=15ppt) เป็นสภาวะเหนี่ยวนำที่เหมาะสมสำหรับสาหร่าย *Ulva fasciata* ให้สร้างซูโอสปอร์ (zoospore) แม้ว่าในบริเวณที่เก็บสาหร่าย *U. intestinalis* ครั้งนี้มีอุณหภูมิ 27±5°C แต่การเพิ่มอุณหภูมิทำให้สาหร่ายสร้างอับซูโอสปอร์ได้น้อยกว่าการลดอุณหภูมิ ส่วนการเพิ่มสาร $CaCl_2$ ปริมาณ 6-18 มก./ล. สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างอับซูโอสปอร์ ได้เร็วยิ่งขึ้น เนื่องจาก Ca^{2+} เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างและการทำงานที่สำคัญของเซลล์พืช มีบทบาทในการสร้างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ (Volotovski, 2011) ซึ่งมีความจำเป็นต่อพืชที่มีคลอโรฟิลล์ทุกชนิด โดยมีความสำคัญในการแบ่งเซลล์ และการแพร่พันธุ์ (พรพิมล, 2552) ดังนั้นเมื่อมีการเพิ่มสาร $CaCl_2$ ลงในน้ำเลี้ยง ทำให้สาหร่ายแบ่งโพรโทพลาสต์ได้เร็วขึ้น ทำให้สาหร่าย *U. intestinalis* สร้าง อับซูโอสปอร์ ภายในเวลา 2 วัน ทั้งนี้ จากการใช้ปัจจัยต่างๆ ในการกระตุ้น *U. intestinalis* สร้างอับซูโอสปอร์ได้ครั้งนี้ภายในเวลา 2-4 วัน ซึ่งระยะเวลาสอดคล้องกับรายงานของ Dan et al. (2002) ที่เลี้ยงชิ้นส่วนของสาหร่าย *E. prolifera* ซึ่งตัดเป็นชิ้นส่วนรูปกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 มม. ที่ระดับความเค็ม 5-52 psu (=5-52 ppt) ทำให้มีการสืบพันธุ์ได้มากกว่าร้อยละ 70 ของชิ้นส่วนทั้งหมดในเวลา 4-5 วัน และจากการกระตุ้นให้ในสาหร่ายมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ห้องปฏิบัติการครั้งนี้ พบเพียงอับซูโอสปอร์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lin et al. (2008) พบว่า *E. prolifera* ในห้องปฏิบัติการพบสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพียงเฉพาะแบบอับซูโอสปอร์ ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์ที่ไม่มีเพศ สามารถปล่อยซูโอสปอร์ (zoospore) ที่จะเจริญเป็นต้นใหม่ได้โดยตรง แม้ว่า ในทัลลัสที่สมบูรณ์สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ สองแบบได้ในท่อนเดียวกัน คือ อับเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศ (gametangium) และ อับซูโอสปอร์ (Reine and Trono, 2001) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบเฉพาะ อับซูโอสปอร์เท่านั้น อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ใช้เหนี่ยวนำดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อการสร้างอับเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศ หรืออาจเป็นเพราะท่อนพันธุ์ไม่สมบูรณ์พร้อม

สรุป

การกระตุ้นให้สาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* สร้างเซลล์สืบพันธุ์ ในห้องปฏิบัติการ ควรตัดท่อนพันธุ์ให้มีขนาดเล็ก 0.5-3 ซม. เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ ระยะเวลาที่ได้รับแสง:มืด เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ที่ระดับความเค็ม

25 ppt สูตรอาหาร MGM ทำให้ท่อนพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่สร้างอับซูโอสปอร์ได้เกือบทั้งหมดภายในเวลา 4 วัน และการเพิ่มสาร $CaCl_2$ อย่างน้อย 6 mg/L ลงในน้ำเลี้ยงจะช่วยกระตุ้นให้เกิดอับซูโอสปอร์ได้เร็วขึ้นภายใน 2 วัน

เอกสารอ้างอิง

จริยาวดี สุริยพันธุ์, ชัชรี แก้วสุรลิขิต, ชนัดดา เกตุมา, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด, สาธิต ประเสริฐ, เดชานาท ทองพิทักษ์, และ ประยูร หงส์รัตน์. 2550. ผลของสาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva intestinalis* Linnaeus) ต่อสัตว์หน้าดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). http://tdc.thailis.or.th/tdc/basic.php. ค้นเมื่อ 28 มิถุนายน 2557.

พรพิมล สุริยภัทร. 2552. หน้าที่และอาการขาดธาตุอาหารสำคัญ. http//www.agri.ubu.ac..th/~ponpimon/1202320. ค้นเมื่อ 2 พฤศจิกายน 2557.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา (Phycology). ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Adey, W. H. and R. Purgason. 1998. Animal Feedstock Comprising Harvested Algal Turf and a Method of Preparing. United States Patent No. US 1998/5715774, Feb 10, 1998.

Algaebase. 2014. Ulva Linnaeus, 1753: 1163. http://www.algaebase.org/search/genus/detail, Accessed Aug. 25, 2014.

Briand, X. 1995. Utilization of algae extract for the preparation of pharmaceutical, cosmetic. United States Patent No. US 5508033/1996, Feb 14, 1996.

Briand, X., C. Stephanie, B. Dumas, T .M. Esquerre-Tugayeand, S. Salamagne. 2005. Use of Ulvans as Elicitors of Mechanisms for Nitrogen Absorption and Protein. United States Patent No. US 2005/0127695 A1, Mar 30, 2005.

Critchley, A.T. and M. Ohno, 1998. SEAWEED RESOURCES OF THE WORLD. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, Japan.

Dan, A., M. Hiraoka., M. Ohno. and T. Critchley. 2002. Observations on the effect of salinity and photon effluent rate on the induction of sporulation and rhizoid formation in the green alga *Enteromorpha prolifera* (Muller) J.Agardh (Chlorophyta, Ulvales). Journal of Fisheries science. 68:1182-1188

Hasebe, K. and K. Yamada. 2004. Hair treatment composition and hair cosmetic for damaged hair. United States Patent No. US2004/0165636 A1, Mar 3, 2004.

Kamer, K. and P. Fong. 2000. A fluctuating salinity regime mitigates the negative effects of reduced salinity on the estuarine microalga, *Enteromorpha intestinalis*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 254:53-69.

Lin, A., C. Shen, J. Wang, and B. Yan. 2008. Reproduction Diversity of *Enteromorpha prolifera.* J. Integr. Plant Biol. 50:622–629.

Mantri, V.A., R.P. Singh, A.J. Bijo, P. Kumari, C. R. K. Reddy, and B. Jha. 2011. Differential response of varying salinity and temperature on zoospore induction, regeneration and daily growth rate in *Ulva fasciata* (Chlorophyta, Ulvales). J. Appl. Phycol. 23:243-250.

Reine, P.V. and Trono, G.C. 2001. PLANT RESOURCES OF ROUTH-EAST ASIA. Backhuys Publishers, Leiden.

Steel, R. G. D. and J.H. Torrid, 1980. PRINCIPLE AND PROCEDURES OF STATISTICS, 2nd ed. Mc Grawhill, New York

Volotovski, I. D. 2011. Role of calcium ions in photo signaling processes in a plant cell. Biophys. J. 56:778-788.

Manuscript พร้อม ตีพิมพ์ใน SCOPUS หรือ ISI

Reproductive Phenomena of Gut Weed *Ulva intestinalis* Linnaeus (Ulvales, Chlophyta) in Manipulated Environmental Conditions

Rapeeporn Ruangchuay1, Arinee Muna 1, Anong Chirapart2, and Masahiro Notoya3

1Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani, 94000 Thailand
2Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, 10900 Thailand
3 Notoya Research Institute of Applied Phycology, Mukojima, Sumida-ku, 15-21-4Tokyo-131 8505, Japan
*Correspondence: rrapee@bunga.pn.psu.ac.th

Key words: Gut Weed, *Ulva intestinalis*, Ulvales, Ulvaceae, *Enteromorpha intestinalis*

Abstract

Effects of environmental conditions on reproductive development in gut weed *Ulva intestinalis* Linnaeuswere examined experimentally, for the cultivation of this alga. Thirteen mature thalli of the alga were collected from different sources, bay, pond, tank culture and *in vitro* culture, to examine the types of reproductive cells. Explants of the alga from *in vitro* were incubated in manipulated conditions; salinity, light intensity, and temperature experiments were run as single factor designs separately. Thirty fragments (3 cm long) of immature thalli were divided to cultures in three petri dishes, with 10 explants in each. Only asexual reproduction was found in thalli from the tank and *in vitro* cultures, while sexual and mixed reproduction were found in thalli from the bay and pond. The optimal conditions for maturation in laboratory culture were salinity 25 ppt, light intensity 40- 80 μmol/m2/s1, 30 °C temperature, and 60- 120 minutes of desiccation: the explants were 100% mature within 2-6 days. Maximal spore release was obtained at salinity 25 ppt, 80 μmol/m2/s light intensity, 25˚C, and no desiccation: 60-160 million spores/g fresh weight were obtained within 10 days. Light intensity and desiccation affected strongly the early development of zoosprorangium, while light intensity affected strongly early spore release.

Introduction

Ulva spp. algae are utilized in many Asian countries, including Japan, Korea, India, and Indonesia, due to their high content of minerals and vitamins. For example, *Ulva prolifera* is commercially marketed for consumption both in Japan and Korea, *Ulva pertusa* is similarly consumed in Japan, and *Ulva compressa* is used as a snack ingredient in India [1] In addition to *Ulva* spp. being a food source, also its extracts are used in cosmetics and pharmaceutical industries due to their anti-biotic, anti-bacterial, anti-fungal, and anti-tumorigenic properties [2].

Ulva (Enteromorpha) intestinalis Linnaeus is a green alga in the division Chlorophyta, also known by the common name “gut weed”, and is worldwide spread. In general, the alga grows as a tube form of 1-2 mm length (though it can reach up to 2 cm), with irregularly arranged cells in a single layer in thickness direction. The surface blade of the alga is smooth at young stages and

becomes wrinkled with age, changing from dark green to light green or yellowish green in color. Branching occurs near the holdfast, which is small and narrow (1 mm) [3] .

The life cycle of *Ulva* consists of two phases: haploid and diploid. The haploid plants produce biflagellated gametes, which may or may not fuse, whereas the sporophyte plants produce quadriflagellated zoospores that develop into gametophytes. Although cultivation of the genus using parthinogenic thalli has been reported [4]), a new method using germling clusters has been presented by Hiraoka and Oka [5] for the production of a free-floating form in tank cultivation.

In Thailand, *U. intestinalis* is called Sarai Sai Kai. The alga has been used as fish feed and in bio-filters for aquaculture, especially in earthen-pond co-cultures with shrimp. However, the cultivation systems experience fluctuations in algal population due to variable environmental conditions of shrimp ponds. To implement a controllable and sustainable system it is necessary to control the generation of algal mass by manipulation of its reproduction and growth; thus, we employed laboratory conditions to observe the reproductive behavior and spore release of this species, varying factors that can be manipulated in ordinary culture conditions.

Materials and Methods

1. Sources of Thalli

Mature thalli of *Ulva intestinalis* were collected from 4 different the following sources: shrimp ponds, Pattani Bay (on the rim of South China Sea in Thailand), tanks made from cement, and *in vitro* cultures (at Fishery and Technology Division, Prince of Songkla University, Pattani Province). Some environmental parameters were recorded. The samples were immediately transported to the laboratory. Thirty matured plants of each place were investigated for the type thalli from each source were sampled, their lengths and widths measured, and their reproductive statuses were checked the type (zoosporangia, gametnagia or mixed reproductive cells between the both) under microscope.

2. Preparation of thalli for reproductive experiments

Immature plants from vitro were cut in 3 cm pieces and examined under microscope; thirty explants were then used as samples for the ensuing experiments (on effects of salinity, temperature, light intensity and desiccation) on the formation of reproductive cells. Each manipulated factor was examined singly, in the succession listed above, with three replications.

Effect of salinity

The explants were separated for incubation under different salinity levels, at 10, 20, 30, or 40 ppt. The seawater used was enriched with modified Guillard's medium (MGM), and culturing was carried out in 500-ml flasks at 25ºC under 50 μmol/m2/s, and a 12:12-hr light:dark cycle. The maturation status of the explants was observed every two days by light microscopy.

Effect of temperature

The explants were transferred to cultures at different temperatures, 20, 25, or 30 ºC, in incubators using the empirically determined optimal salinity level and optimal light intensity; the medium was enriched with MGM. The cultures were incubated under 50 μmol/m2/s with a 12:12-hr light:dark cycle. Microscopy observations were similar to previous.

Effect of light intensity

The immature explants were transferred to cultures at different light intensity levels, 40, 80, or 120 μmol/m2/s. The empirically determined optimal salinity level of the seawater (30 ppt) was used in the medium, enriched with modified Gillard's medium (MGM), in 500-ml flasks. The

cultures were incubated at 25ºC under a 12:12-hr light:dark cycle. The formation of reproductive cells was monitored by microscopy, as above.

Effect of desiccation

For the desiccation, the samples were transferred to cultures at different times, 30, 60, 90 or 120 min. The empirically determined optimal salinity and temperature were used for the medium enriched with MGM, in 500-ml flasks. The cultures were incubated at 25ºC under a 12:12-hr light:dark cycle. Microscopy of reproductive cells was similar to previous.

3. Preparation of thalli for reproductive release

Zoosporangial thalli of *U. intestinalis* from the experiment above were cut in 3 cm pieces and examined under microscope; samples weighing one gram were used in the ensuing experiments: to determine the effects of salinity, temperature, light intensity, and desiccation on the release of zoospores. Number of zoospores was estimated based on random sampling, and counting them in samples with a Haemacytomer chamber under microscope. Each manipulated factor was again examined in succession (as listed above) with three replications.

4. Data analysis

The data are reported as mean ± SD. The data on spore release were analyzed by one-way ANOVA to test for differences between the treatments. Tukey's test was performed at an $\alpha = 0.05$ significance level.

Results

Characteristics of U. intestinalis Thalli from different sources

The thalli from different sources varied in width and color. The thalli from the bay and pond were wider than thalli from tank and *in vitro* cultures. Those from bay and pond were habited on the water surface and entangled with weeds, those from tank were attached as weeds on the sides of the tank, while thalli from *in vitro* were also attached to each other. Color also varied from bright green to grass green; thalli from the bay were darker green than the others. (Fig. 1)

Reproductive characteristics of U. intestinalis from different sources

Asexual reproduction was dominant in cultured thalli (100% in laboratory, and 89.3% in tank), while sexual reproduction was found in 78.7% of thalli from the bay. Both reproductive types were mixed in 72.7% of the thalli from an earthen pond. The fractions of thalli with the different reproductive types are shown in Figure 3.

Surface cells of *U. intestinalis* from each source were similar: the cells were dense with 105-125 cell/mm2 (Fig. 2 a), while the reproductive cells had a slightly different 56-108 cell/mm2 density (Fig. 2 b, c and d). Thallus length and thallus width among the different sources showed significant effects ($p>0.05$) of environment factors: salinity, light intensity, water temperature and nitrate-nitrogen also showed significant effects ($p>0.05$) (Table 1)

Effect of culture conditions on reproductive cell formation by U. intestinalis

The thalli fragments formed only zoosporangia. At 25 ppt salinity level (with other factor levels 60 µmol/m2/s, 25˚C, 0 minutes), 100% maturation of explants took place within 12 days. At light intensities 40, 60 and 80 µmol/m2/s (other factor levels 25 ppt, 25°C, 0 minutes), 100 % maturation occurred within 2 days. At 30 °C temperature (other factor levels 25 ppt, 80 µmol/m2/s, 0 minutes), 100 % maturation was reached within 4 days. At 60, 90 and 120 minutes of desiccation (other factor levels 25 ppt, 80 µmol/m2/s, 25 ˚C), the explants matured within two days (Table 1).

Effect of culture conditions on reproductive release of U. intestinalis

As for the stimulation of spore release, the maximum of 19.05±4.39 million spores/ g fresh weight was found at 25 ppt salinity (other factor levels 60 µmol/m2/s1, 25°C, 0 minute for dissication) within six days. At 25˚C (25 ppt, 80 µmol/m2/s, 0 minute for desiccation), the maximum of 55.62±95.33 million spores/g fresh weight occurred within 6 days. Under 80 µmol/m2/s light intensity (25 ppt, 25°C, 0 minute for dessication) the maximum of 167.72±110.29 million spores/g fresh weight was reached within 10 days. At desiccation of 0 min (25 ppt, 80 µmol/m2/s, 25 °C) the highest spore release of 400 million spores/g fresh weight took 10 days. Stimulation of zoosporangia formation in *Ulva intestinalis* should be done at 25 ppt, 80 µmol/m2/s, 30 ° C, and 60, 90, or 120 minutes of desiccation, while stimulation on spore release should be done at 25 ppt, 25 °C, 80 µmol/m2/s1, and no desiccation. (Table 1)

Reproductive behavior of U. intestinalis in laboratory

Only asexual reproduction of *U. intestinalis* was found. The vegetative cells were of 8-20 µm size (Fig. 2 a). The zoosporangia formed at the tip of the thallus in an area of 1-3 mm and were 8-18 µm in diameter, and there were 13-20 zoosporangia per cell (Fig. 2 b). The zoospores were released approximately one week after their formation. The cells of the tips were emptied retaining only the cell walls (Fig. 2 c); these decayed and the thalli became shorter. The zoospores moved apparently aimlessly for 12-18 hrs, and then clustered and attached together (Fig. 2 d).

Discussion

We expand on the earlier observation of Prud'homme and Trono [3] that a mature thallus has wrinkled surface, while young thalli are smooth. The present study found both wrinkled and smooth mature thalli, and thalli from tank and in vitro were mostly smooth when mature, while thalli from pond and bay were mostly wrinkled. The observations on reproductive release of *U. intestinalis* also partly agree with Eriksson and Johanssan [6] in that reproductive cells occur at the tip; this was the case in samples from tank and *in vitro*. However, the present study also found reproductive cells on the thallus surface of samples from the pond and the bay, extending also those prior observations. Possibly thalli from the tank and an *in vitro* tend to circulate while thalli from the other sources tend to float.

The salinity levels seemed to affect reproductive formation of *U. intestinalis*, while temperature, light intensity and desiccation did not. The early maturation of zoosporangia of these algae that occurred within 2-4 days was earlier than for *Ulva fenestrata* [7] and *Enteromorpha (Ulva) prolifera* [8]), whose sporulation could induced in 5 days by manipulating temperature. The sporulation in *Ulva fenestrata* from culture normally forms with both sporangia and gametangia [9], and the maturation of *Enteromorpha (Ulva) prolifera* has been reported with mainly asexual reproduction [8]. Lin *et al.* [10] has reported reproductive diversity of *U. prolifera* with sexual, asexual and vegetative reproduction; but in our study we found only asexual reproduction of *U. intestinalis* in laboratory.

Although *U. intestinalis* (*Enteromorpha intestinalis*) is a euryhaline and has showed alive in freshwater within 1-5 days [11] in this study salinity affected release of reproductive cells, possibly due to osmotic effects. The optimal salinity for reproductive cell formation and release should be in the range 20-30 ppt. At a low salinity of 15 ppt less spores were released than in other conditions, due to low salinity limiting growth [12]. Temperature range covered in the present study was narrow, but the optimum temperature for spore release should be in the range 25-30°C. The salinity levels and desiccations were more affected to early zoosprorangial maturation than temperature and light intensity. Although, the result disagreed with Fu *et al.* [9] conclude that sporulation of *Ulva fenestrata*.could induced in by manipulating temperature. However,

desiccation for 0-30 minutes induced spore release. This discrepancy with prior observations may be due to different species, or adaptations to different environmental conditions. Stimulation on zoosporangia formation in *U. intestinalis* should be done at 25 ppt, 80 µmol/m2/s, 30°C, and 60, 90, or 120 minutes of desiccation; while stimulation of spore release should be done at 25 ppt, 25°C 80 µmol/m2/s, and 30 min. of desiccation.

Sporification of *Enteromorpha (Ulva) prolifera* took place in 5 days and [9] and in 8 days in *Enteromorpha (Ulva) prolifera* [7], but *U. intestinalis* in the present study matured earlier than this and could form sporangia within 2 days. This might be due to species difference. Thus, the main influencing factors on reproductive cell formation and release were salinity and desiccation, for *U. intestinalis*. The behavior of released spores was similar to *Ulva prolifera*, in that after release they attach to each other and form clusters [5]. We found zoosporangia on the explant surface in all culture conditions, which is in agreement with Millner *et al.* [13], who report that stimulation of reproductive release in *U. intestinalis* can be achieved by cutting the thalli into small pieces.

The current study is the first to report on the number of spores in *Ulva* spp. Generally, formation of gametes or spores attains a periodicity of 10, 15, or more days and under unfavorable conditions, one or more reproduction cycles are omitted [7]. In the present study the maturation could be obtained within 2-10 days with the maximum number of 167.72±110.29 million spores/g fresh weight at 25 ppt, 25°C 80 µmol/m2/s1, and no desiccation. The fragments should be left for 10 days and then the released spores should be collected to continue cultivation.

In the present study only zoosporangia were found in mature *U. intestinalis* and they were produced continuously by the sporulation cycle. At high salinity, especially at 40 ppt, early reproduction caused shorter thallus lengths than in the other conditions. Thus, in conditions promoting early zoosprangium one has lower biomass, and the optimal conditions to obtain zoospore may be different from optimal conditions for biomass production. The complete asexual life cycle of *U. intestinalis* was similar to *Gayralia* spp described by Pellizzari and Oliveira [14].

Acknowledgment

We gratefully acknowledge the Thailand Research Fund (TRF) for its financial support.

References

1 Mamatha BS, Namitha KK, Senthil A, Smitha J, Ravishankar GA (2007) Studies on use of *Enteromorpha* in snack food. Food Chem. 101: 1707-1713

2 Aguilera-Morales M, Casas-Valdez M, Carrillo-Dominguez S, Gonzalez-Acosta B, Perez-Gil F (2005) Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorph*a spp. as a potential food source. J Food Compos Anal 18 (1): 79-88

3 Prud'homme van Reine WF, Trono GC (2001) Plant Resources of South-East Asia. No. 15 (1) Cryptogams: Algae. Backhuys Publishers, Leiden, the Netherlands. 318 p

4 Ohno M (1993) Cultivation of green algae, *Monostroma* and *Enteromorpha* "Aonori*".* In Ohno M, Critchley AT (eds) Seaweed Cultivation and Marine Ranching, Kanagawa International fisheries Training Center, Japan International Cooperation Agency (JICA), pp. 7-15

5 Hiraoka M, Oka N (2008) Tank cultivation of *Ulva prolifera* in deep seawater using a new "germling cluster" method. J Appl Phycol 20: 97-102

6 Erikssan BK, Johanssan G (2005) Effect of sedimentation on macroalgae: species-specific responses are related to reproductive traits. Oecologia 43: 138-148

7 Kalita TL, Titlyanov EA (2011) The effect of temperature and infradian rhythms of reproduction in *Ulva fenestrata* Postels et Ruprecht, 1840 (Chlorphyta: Ulvales). Russ J Mar Biol 37(1): 52-61

8 Fu G, Yao J, Liu F, Liu J , Wang X, Fu W, Li D, Zhou M, Sun S, Duan D (2008) Effect of temperature and irradiance on the growth and reproduction of *Enteromorpha prolifera* J. Ag. (Chlorophyta, Chlorophyceae). Chin J Oceanol Limn 26(4): 357-362

9 Kalita TL, Titlyanov EA (2003) Effect of temperature and illumination on growth and reproduction of the green alga *Ulva fenestrata*. Russ J Mar Biol 29(5): 316-322.

10 Lin A, Shen S, Wang J, Yan B (2008) Reproductive Diversity of *Enteromorpha prolifera*. J Integr Plant Biol 50(5): 622-629

11 Kamer K, Fong P. (2000) A fluctuating salinity regime mitigates the negative effects of reduced salinity on the estuarine macroalga, *Enteromorpha intestinalis* (L.) link. J Exp Mar Biol Ecol 254: 53–69

12 Murthy MS, Sharma CLNS, Rao YN (1988) Salinity induced changes in peroxidase activity in the green seaweed *Ulva lactuca*. Bot Mar 31: 307–310.

13 Millner PA, Maureen E, Evans LV (1979) Preparation of Protoplasts from the Green Alga *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. Planta 147: 174-177.

14 Pellizzari F, Oliveira EC (2008) Life-history, thallus ontogeny, and the effects of temperature, irradiance and salinity on growth of the edible green seaweed *Gayralia* spp. (Chlorophyta) from Southern Brazil. J App Phycol 20: 75-82