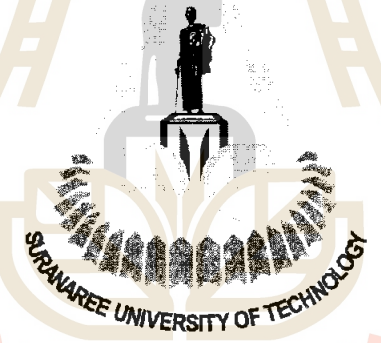
บทปฏิบัติการวิชา 303435 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีชีวิต

โดย

อ.ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์

อ.ดร. สุรินทร บุญอนันธนสาร



สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2549

303 435 การเพาะเลี้ยงอาหารสัตว์น้ำมีชีวิต (Aquatic Live Feeds Culture) **3(2-3-6)**

ผู้สอน อ.ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์

รายละเอียดวิชา

ความสำคัญของแพลงค์ตอนสัตว์ ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของโรติเฟอร์น้ำเค็ม โรติเฟอร์น้ำจืด อาร์ทีเมีย และไรแดง วิธีการเพาะเลี้ยง ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเพาะฟัก การเตรียมสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงโรติ-เฟอร์น้ำเค็ม โรติเฟอร์น้ำจืด อาร์ทีเมีย และไรแดง การเก็บเกี่ยวและการลำเลียง การทำหัวเชื้อ plankton ให้บริสุทธิ์ ตลอดจนการเพาะเลี้ยง รวมถึงการศึกษาและปฏิบัติการในสถานประกอบการจริง

เค้าโครงรายวิชา

ทฤษฎี

1.	ความสำคัญของแพลงค์ตอนสัตว์ ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	2	ชั่วโมง
2.	ชีววิทยาการสืบพันธุ์	4	ชั่วโมง
3.	เทคนิคการเพาะและการเลี้ยง การเก็บเกี่ยวและการลำเลียง	10	ชั่วโมง
4.	ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเพาะฟัก	4	ชั่วโมง
5.	การเตรียมสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแพลงค์ตอนสัตว์ แต่ละชนิด	4	ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปฏิบัติการ

ผู้สอน อ.ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์ (ปฏิบัติการที่ 1-4, 6-7)

อ.ดร. สุรินทร บุญอนันธนสาร (ปฏิบัติการที่ 8-12)

สัปดาห์ที่	เรื่อง	สถานที่
1	การเพาะเลี้ยงอาร์ทีเมีย และการเก็บเกี่ยว	F3
2	การเพาะเลี้ยงไรแดง และการเก็บเกี่ยว	ฟาร์มประมง
3	การเปรียบเทียบการใช้ไรแดง Power feed และไข่แดง ในการอนุบาลลูกปลาดุก	ฟาร์มประมง
4	การเตรียมวัสดุอุปกรณ์ และอาหารเลี้ยงสาหร่ายแบบเหลว	F3
5		**Midterm**
6	การเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์ และการเก็บเกี่ยว	สถานีประมงชายฝั่งระยอง
7	นักศึกษาดูงาน	สถานีประมงชายฝั่งระยอง
8	การทำหัวเชื้อ plankton ให้บริสุทธิ์	F3
9-11	การเลี้ยง plankton plankton พืชน้ำจืดและน้ำเค็มในห้องปฏิบัติการและการขยายปริมาตรในถังขนาดใหญ่	F3
12	การวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กด้วยการสุ่มนับและการดูดกลืนแสง	F3

วิธีวัดผล

7.1 แบบฝึกหัดย่อย (QUIZ) 10%

7.2 การสอบกลางภาค 30%

7.3 การสอบปลายภาค 30%

7.4 ปฏิบัติการ 10%

7.5 รายงาน (assignment + ดูงาน) 20%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 1 เรื่อง การเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว

สาหร่ายเซลล์เดียวหรือแพลงก์ตอนพืชคือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่แขวนลอยและล่องลอยอยู่ในมวลน้ำ แพลงก์ตอนพืชจะใช้สารอนินทรีย์และพลังงานแสงอาทิตย์ในการสังเคราะห์เพื่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ สาหร่ายเซลล์เดียวเป็นอาหารสำหรับสัตว์น้ำขนาดเล็กหรือแพลงก์ตอนสัตว์ แพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหารของสัตว์น้ำขนาดใหญ่ต่อไป ดังนั้นแพลงก์ตอนพืชหรือสาหร่ายเซลล์เดียวจึงจัดเป็นสิ่งมีชีวิตเริ่มต้นในห่วงโซ่อาหารของระบบนิเวศน์ในน้ำ

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสาหร่ายเซลล์เดียวมีความจำเป็นต่อการใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนในการอนุบาลสัตว์น้ำวันอ่อนการเลือกอาหารที่มีขนาดเหมาะสมอละมีคุณค่าทางอาหารครบตามที่ต้องการมีความสำคัญอย่างยิ่งต่ออัตราการรอดการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของลูกสัตว์น้ำ ในธรรมชาติสัตว์น้ำวัยอ่อนจะล่องลอยไปตามมวลน้ำและเลือกกินสาหร่ายเซลล์เดียวที่อยู่ในมวลน้ำเป็นอาหาร ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อนจะเลือกเลี้ยงและขยายพันธุ์สาหร่ายเซลล์เดียวที่เหมาะสมเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนแต่ละชนิดให้ได้จำนวนมากพอเพื่อใช้ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน

สาหร่ายเซลล์เดียวในแหล่งน้ำธรรมชาติมีหลายชนิด แต่ที่เหมาะสมจะใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนมีไม่กี่ชนิด เช่น สาหร่ายสีเขียนจำพวก คลอเรลลา (*Chlorella*) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำพวก สไปรูไรนา (*Spirulina*) และไดอะตอมจำพวกสเกลลีโตนีมา (*Skeletonema*) เป็นต้น ซึ่งรายละเอียดจะได้เรียนในภาคบรรยาย ในการอุตสาหกรรมอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนต้องการสาหร่ายเซลล์เดียวจำนวนมากและปราศจากเชื้อโรค ดังนั้นการนำสาหร่ายเซลล์เดียวจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อนจึงไม่เหมาะสมเพราะว่า จำนวน ชนิดไม่แน่นอน และอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของโรคสัตว์น้ำได้ ดังนั้นจึงนิยมนำสาหร่ายเซลล์เดียวจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาแยกเพาะเลี้ยงให้เป็นชนิดเดียวและเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และทำการขยายพันธุ์ให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อโรคเพื่อให้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนต่อไป

ปัจจุบันมีการศึกษาสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในห้องปฏิบัติการอย่างแพร่หลาย อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในห้องปฏิบัติการมีหลายชนิด ขึ้นกับชนิดของสาหร่ายเซลล์เดียวที่ต้องการเลี้ยงอย่างไรก็ตามสามารถแบ่งประเภทของอาหารที่ใช้สาหร่ายเซลล์เดียวอย่างกว้างๆ ตามวัตถุประสงค์ได้ดังนี้

1. อาหารแข็งหรืออาหารแข็ง (Solid or agar media)

อาหารแข็งนิยมใช้สำหรับการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในระยะยาว มักใส่ธาตุอาหารให้ครบเพื่อที่จะสามารถเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวได้นาน และไม่ต้องทำการถ่ายเซลล์สาหร่ายบ่อย (subculture) อาหารแข็งสามารถเตรียมได้โดยเตรียมอาหารเหลวก่อนแล้วเติมวุ้นลงไปให้ได้ความเข้มข้น 1.5 – 2 เปอร์เซ็นต์

2. อาหารเหลว **(Liquid media)**

อาหารเหลวมักใช้ในการเตรียมสาหร่ายเซลล์เดียวเพื่อใช้งานในระยะสั้น ใช้เตรียมอาหารที่เร่งการเติบโตสาหร่ายเซลล์เดียวเรียกอาหารชนิดนี้ว่า enriched medium

สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวมักประกอบด้วยธาตุอาหาร 2 ประเภท

1. ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) หมายถึง ธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการใช้ปริมาณมากเพื่อการเจริญเติบโต ได้แก่ คาร์บอน (C) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) ซัลเฟอร์ (S) โปแตสเซียม (K) แมกนีเซียม (Mg) และแคลเซียม (Ca)

2. ธาตุอาหารรอง (Micronutrient) หมายถึง ธาตุอาหารที่พืชต้องการใช้ปริมาณน้อย เมื่อเติมลงไปจะทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ถ้าไม่ใช้จะเจริญเติบโตช้าลงกว่าเล็กน้อย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย

2.1 ธาตุอาหารรองอนินทรีย์ (Inorganic micronutrient)

ธาตุอาหารรองอนันทรีย์ที่สาหร่ายส่วนมากต้องการใช้ ได้แก่ เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) แคลเซียม (Ca) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) โคบอลท์ (Co) และโบรอน (B) นอกจากนี้สาหร่ายเซลล์เดียวต่างชนิดกันอาจต้องการธาตุอาหารเพิ่มที่แตกต่างกันไป เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ต้องการโซเดียม (Na) สาหร่ายไดอะตอมต้องการซิลิกา (Si)

2.2 ธาตุอาหารรองอินทรีย์ (Organic micronutrient) ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลเดกซ์โตรส เกลืออินทรีย์ เกลืออะซิเตท ในรูปธาตุโซเดียม โปแตสเซียม ไวตามิน ไวตามิน 3 ชนิด บี 1 บี 12 และบีรวม นิยมเติมหลังจากผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

Growth factor เช่น adenine และ kinetin เป็นต้น เช็ค

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาเตรียมสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวบางชนิด เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน คลอเรลลา และไดอะตอม ในสภาพปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการได้

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

อลูมินัมฟอยล์ แท่งกวนแม่เหล็ก และช้อนตักสาร

บีกเกอร์ขนาด	250 ml	3 บีกเกอร์
	500 ml	1 บีกเกอร์
	1000 ml	1 บีกเกอร์
กระบอกตวง ขนาด	250 ml	3 อัน
ขวดวัดปริมาตร ขนาด	250 ml	1 ขวด
	1000 ml	1 ขวด
flask ขนาด	250 ml	6 flask
	500 ml	1 flask
	1000 ml	1 flask
Petri disc	10	คู่

Micropipette 1000 ไมโครลิตร พร้อม tip

หม้อนึ่งความดัน

ตู้ปลอดเชื้อ

pH meter

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

สารเคมี ดังรายละเอียดของสูตรอาหารแต่ละชนิดดังแนบ

วิธีการเตรียมอาหาร

1. การเตรียมอาหารเหลว

1.1 ชั่งสารเคมีสำหรับธาตุอาหารรอง ละลายน้ำจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรสารละลายตามที่กำหนด

1.2 ชั่งสารเคมีสำหรับธาตุอาหารหลักทั้งหมด ละลายน้ำให้ได้ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เติมสารละลายธาตุอาหารรองตามปริมาตรที่กำหนดแบ่ง 100 มิลลิลิตรใส่ลงใน flask ปิดปากขวดด้วยอลูมินัมฟอยล์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. การเตรียมอาหารแข็ง

นำสารละลายธาตุอาหารที่เหลือจากข้อ 1 (50 มิลลิลิตร) ใส่ลงใน flask มาเติมผงวุ้นให้ได้ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปิดปากขวดด้วยอลูมินัมฟอยล์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อแล้วรอให้สารอาหารเย็นลงประมาณ 55 – 60 องศาเซลเซียส แล้วเทใส่ Petri disc ขั้นตอนนี้ให้ทำในตู้ปลอดเชื้อ รอจนอาหารเย็นให้ครั่ว Petri disc แล้วเก็บเข้าตู้เย็น

ตัวอย่างสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่ายเซลเดียวบางชนิด

1. Modified Allen Medium (สูตรอาหาร สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) ประกอบด้วยธาตุอาหารดังนี้

สารละลายธาตุอาหารหลัก			
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	1.59	0.2385	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.039	0.0059	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต 7-ไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.075	0.0113	กรัม
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	0.02	0.003	กรัม
แคลเซียมไนเตรต 4-ไฮเดรต [$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	0.02	0.003	กรัม
โซเดียมเมตาซิลิเกต 9-ไฮเดรต ($Na_2SiO_3.9H_2O$)	0.058	0.0087	กรัม
EDTA	0.01	0.0015	กรัม
Citric acid ($C_6H_8O_{10}$)	0.06	0.009	กรัม
เฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3$)	0.02	0.003	กรัม
น้ำกลั่น	999 ml	150 ml	
ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.8			
สารละลายธาตุอาหารรอง			
กรดบอริค (H_3BO_2)	2.86	0.715	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ 4-ไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	1.81	0.4525	กรัม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ซิงค์ซัลเฟต 7-ไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.222	0.0555	กรัม
โซเดียมโมลิบเดต 2-ไฮเดรต ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.391	0.09775	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต 5-ไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.079	0.0198	กรัม
โคบอลท์ไนเตรต 6-ไฮเดรต [$Co(NO_3)_2.6H_2O$]	0.0494	0.0124	กรัม
น้ำกลั่น	1000 ml	250 ml	

สารละลายที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว 1 ลิตร เตรียมได้จากนำสารละลายธาตุอาหารหลัก	999	มิลลิลิตร
สารละลายธาตุอาหารรอง	1	มิลลิลิตร
สารละลายที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว 150 มิลลิ ลิตร เตรียมได้จากนำสารละลายธาตุอาหารหลัก	150	มิลลิลิตร
สารละลายธาตุอาหารรอง	150	ไมโครลิตร

ถ้าต้องการเตรียมอาหารแข็งให้ใส่ผงวุ้น (bacto-agar) 1.5 %
ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

2. Chlorella medium (สูตรอาหารเลี้ยงคลอเรลลา)

โปแตสเซียมไนเตรต (KNO_3)	1.250	0.1875	กรัม
โมโนโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.250	0.1875	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต 7-ไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.000	0.1500	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.084	0.0126	กรัม
กรดบอริค (H_3BO_3)	0.114	0.0171	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต 7-ไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.050	0.0075	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต 7-ไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.088	0.0132	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ 4-ไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	0.014	0.0021	กรัม
โมลิบดินัมออกไซด์ (MoO_3)	0.007	0.0011	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต 5-ไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.016	0.0024	กรัม
โคบอลท์ไนเตรต 6-ไฮเดรต [$Co(NO_3)_2.6H_2O$]	0.005	0.0008	กรัม
EDTA	0.500	0.0750	กรัม
น้ำกลั่น	1000 ml	150 ml	

ปรับ pH สารละลายให้เท่ากับ 6.8
ถ้าตองการเตรียมอาหารแข็งให้ใส่ผงวุ้น (bacto-agar) 1.5 %
ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. Nitzschia Medium (สูตรอาหารเลี้ยงไดอะตอม)

สารละลายธาตุอาหารหลัก

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	0.75	กรัม
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	1.0	0.15	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.1	0.015	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต 7-ไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.2	0.18	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.6	0.09	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.3	0.045	กรัม
Tris [Tris (Hydroxymethyl) amino methane	0.1	0.015	กรัม
น้ำกลั่น	990 ml	150 ml	

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.8

สารละลายธาตุอาหารรอง

กรดบอริค (H_3BO_2)	0.6	กรัม
โซเดียมอีดีทีเอ (Na_2EDTA)	3.0	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ 4-ไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	0.14	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต 7-ไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.033	กรัม
เฟอรัสไฮเดรต 7-ไฮเดรต ($FeSO_4.H_2O$)	0.2	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต 5-ไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.0002	กรัม
โคบอลท์ไนเตรต 6-ไฮเดรต [$Co(NO_3)_2.6H_2O$]	0.0007	กรัม
น้ำกลั่น	1000 ml	

ถ้าตองการเตรียมอาหารแข็งให้ใส่ผงวุ้น (bacto-agar) 1.5 %

สารละลายที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว 1 ลิตร เตรียมได้จากนำสารละลายธาตุอาหารหลัก 999 มิลลิลิตร

สารละลายธาตุอาหารรอง 1 มิลลิลิตร

สารละลายที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว 150 มิลลิลิตร เตรียมได้จากนำสารละลายธาตุอาหารหลัก 150 มิลลิลิตร

สารละลายธาตุอาหารรอง 150 ไมโครลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปฏิบัติการที่ 2. เรื่องการเพาะเลี้ยงไรแดง

ไรแดงเป็นอาหารธรรมชาติที่ดีชนิดหนึ่งในการอนุบาลลูกปลากินเนื้อทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อยโดยเฉพาะปลาน้ำจืดปลาที่มีสำคัญทางเศรษฐกิจที่นิยมเลี้ยงกันในปัจจุบัน เช่น ปลาดุก ปลาสวาย ปลาบู่ และปลาสวยงามทั่วๆไป การเพาะไรแดง เพาะได้ทั้งในบ่อซีเมนต์และบ่อดิน อาจใช้มูลสัตว์หรือปุ๋ยวิทยาศาสตร์ก็ได้ โดยมีสูตรการเพาะที่ใช้ต่างๆ กัน ดังนี้

สูตรที่ 1

กากผงชูรส (อามิ-อามิ)	0.5	ลิตร/ลูกบาศก์เมตร
ปุ๋ยนา (16-20-0)	200	กรัม/ลูกบาศก์เมตร
รำ	500	กรัม/ลูกบาศก์เมตร
กรณีถังน้ำค่อนข้างเป็นกรดให้เติมปูนขาว	300	กรัม/ลูกบาศก์เมตร

อย่างไรก็ตาม ถ้าไม่มี อามิ-อามิ ใช้ สูตร 2 หรือ 3 ก็ได้ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

สูตรที่ 2

ยูเรีย (46-0-0)	300	กรัม/ลูกบาศก์เมตร
ปุ๋ยนา (16-20-0)	150	กรัม/ลูกบาศก์เมตร
รำ	1	กรัม/ลูกบาศก์เมตร
กรณีถังน้ำค่อนข้างเป็นกรดให้เติมปูนขาว	300	กรัม/ลูกบาศก์เมตร

สูตรที่ 3

มูลไก่แห้ง	175	กรัม/ลูกบาศก์เมตร
กรณีถังน้ำค่อนข้างเป็นกรดให้เติมปูนขาว	300	กรัม/ลูกบาศก์เมตร

สูตรที่ 4 (สูตรที่นักศึกษาปฏิบัติ)

กากผงชูรส (อามิ-อามิ)	0.5	ลิตร/ลูกบาศก์เมตร
ปุ๋ยนา (16-20-0)	75	กรัม/ลูกบาศก์เมตร
ปูนขาว	150	กรัม/ลูกบาศก์เมตร
ยูเรีย (46-0-0)	75	กรัม/ลูกบาศก์เมตร

บ่อที่ใช้ในการเพาะพันธุ์ไรแดง อาจเป็นบ่อซีเมนต์ หรือบ่อดินก็ได้ บ่อซีเมนต์ที่ใช้มีรูปร่างแบบใดก็ได้ แต่ความสูงประมาณ 60เซนติเมตร ผนังบ่อควรฉาบและขัดมันทำความสะอาดบ่อและตากทิ้งไว้ 1 วัน เปิดน้ำลงบ่อความสูงของระดับน้ำ 20 เซนติเมตร ถ้าใช้น้ำจากแม่น้ำ ลำคลองหรือบ่อเลี้ยงปลา ควรกรองด้วยผ้ากรองแพลงค์ตอนขนาด 69 ไมครอน เพื่อกำจัดศัตรูของไรแดง จากนั้นละลายปุ๋ยสูตรใดสูตรหนึ่งลงในบ่อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การเพาะไรแดงในบ่อดิน (จากวิธีการของสถานีประมงน้ำจืด จังหวัดปทุมธานี) บ่อดินควรมีขนาด 200-800ตารางเมตร กำจัดวัชพืชบริเวณขอบบ่อออกให้หมด ใช้ยาเบื่อฆ่าปลาและศัตรูอื่นๆ เติมน้ำในบ่อให้ระดับน้ำสูงประมาณ 25-40 เซนติเมตร จากนั้นเติมปุ๋ยตามสูตรต่อไปนี้

1. ส่วนผสม	2. บ่อขนาด 200 ตารางเมตร	3. บ่อขนาด 800 ตารางเมตร
4. ปูนขาว	5. 1.5 กิโลกรัม	6. 60 กิโลกรัม
7. อามิ อามิ	8. 25 ลิตร	9. 100 ลิตร
10. ปุ๋ยนา (16-20-0)	11. 2.5 กิโลกรัม	12. 10 กิโลกรัม
13. ยูเรีย	14. 1.2 กิโลกรัม	15. 5 กิโลกรัม

ถ้าไม่มีอามิ-อามิ ใช้มูลไก่แห้งแทนโดยใช้ประมาณ 20 กิโลกรัม ในบ่อ 200 ตารางเมตร หรือ 80 กิโลกรัมต่อบ่อ 800 ตารางเมตร หมักไว้ 3 วัน จนน้ำเขียวจัด จากนั้นเติมไรแดงประมาณ 2 กิโลกรัม หลังจากนั้น 1-4 วัน จะเริ่มเก็บเกี่ยวไรแดงได้ เมื่อปริมาณไรแดงลดลงจึงเติมอาหาร ซึ่งอาจใช้รำหรือน้ำเขียวหรือมูลสัตว์ ไรแดงจะเพิ่มจำนวนขึ้นอีก 2-3 วัน จนกระทั่งเมื่อเห็นว่าเติมอาหารแล้วไรแดงก็ไม่เพิ่มจำนวนก็ล้างบ่อเพื่อเพาะใหม่

2. การเพาะไรแดงในในบ่อซิเมนต์ บทปฏิบัติการนี้ให้นักศึกษาเพาะไรแดงในบ่อซิเมนต์ ขนาด 5×10 m ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. ทำความสะอาดบ่อ ตากบ่อให้แห้ง เติมน้ำให้ได้ระดับ 0.4 m
2. คำนวณปริมาตรน้ำที่ใช้ในบ่อดังนี้

ปริมาตรน้ำ = $5\times10\times0.4 = 20\ m^3 = 20{,}000\ L$, ($1\ m^3 = 1000\ L$)

3. ใส่ปุ๋ยตามสูตรที่ 4

กากผงชูรส (อามิ-อามิ)	0.5	ลิตร/ลูกบาศก์เมตร ในบทปฏิบัติการนี้ใช้ 10 L
ปุ๋ยนา (16-20-0)	75	กรัม/ลูกบาศก์เมตร ในบทปฏิบัติการนี้ใช้ 1.5 kg
ปูนขาว	150	กรัม/ลูกบาศก์เมตร ในบทปฏิบัติการนี้ใช้ 3 kg
ยูเรีย (46-0-0)	75	กรัม/ลูกบาศก์เมตร ในบทปฏิบัติการนี้ใช้ 1.5 kg

4. เติม stock Chlorella 2,000 L ทิ้งไว้ 2 -3 วัน น้ำจะมีสีเขียวระหว่างนี้ควรคนบ่อยๆ เพื่อป้องกันน้ำเขียวตกตะกอน

5.เมื่อน้ำเป็นสีเขียวเข้มเติมเชื้อไรแดงประมาณ 150-200 กรัม/ลูกบาศก์เมตร หลังจากนั้นประมาณ 3 วัน ก็จะเก็บเกี่ยวไรแดงไปใช้ได้โดยถ้าเก็บเกี่ยวหมดจะได้ไรแดงประมาณ 1 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร หรือถ้าต้องการเก็บเกี่ยวแบบต่อเนื่อง ก็ให้เก็บผลผลิตเพียงบางส่วน (วันละประมาณ 5 kg) แล้วเติมน้ำสะอาดและน้ำเขียวอย่างละ 5 เซนติเมตร ทำเช่นนี้ทุกวัน จะเก็บไรแดงต่อไปได้อีก 5-7 วัน เมื่อสภาพไม่เหมาะสม (มีโรติเฟอร์เกิดขึ้น) ผลผลิตไรแดงจะลดลง ก็ทำการล้างบ่อ เพื่อเพาะใหม่

ปัญหาที่พบในการเพาะไรแดงคือ

1. น้ำที่เพาะมีศัตรูของไรแดงโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรติเฟอร์ ซึ่งจะทำให้ไรแดงลดจำนวนลง

2. แสงแดดเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลมาก ถ้าแดดไม่ดี น้ำเขียวซึ่งเป็นอาหารของไรแดงจะขยายพันธุ์ไม่เต็มที่ มีผลให้ผลผลิตไรแดงลดจำนวนลง
3. เกษตรกรบางรายเติมปุ๋ยอินทรีย์ปริมาณมากเกินไป ทำให้น้ำเสีย ไรแดงก็จะไม่เกิด

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาฝึกปฏิบัติวิธีการเตรียมสูตรอาหารสำหรับการเลี้ยงไรแดง และสามารถเพาะพันธุ์ไรแดงได้

วัสดุและอุปกรณ์

1. บ่อซีเมนต์
2. เครื่องเป่าลม
3. ผ้าใยแก้ว
4. กากผงชูรส
5. ปูนขาว
6. ปุ๋ยยูเรีย
7. ปุ๋ยวิทยาศาสตร์
8. ไรแดง

วิธีการศึกษา

ให้นักศึกษาปฏิบัติการเพาะไรแดงในบ่อซิเมนต์ตามวิธีการในข้อที่ 2. โดยการบันทึกผลการทดลอง ให้นักศึกษาสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำ ตลอดการทดลอง และอภิปรายผลการเปลี่ยนแปลงสีน้ำมาจากสาเหตุใดบ้าง เก็บเกี่ยวผลผลิตไรแดง และให้บันทึกน้ำหนักไรแดงที่ได้ ให้นักศึกษาอภิปรายผลว่า ผลผลิตที่ได้ มีความเหมาะสมหรือไม่อย่างไร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปฏิบัติการที่ 3. เปรียบเทียบการใช้ไรแดง, Powder feed, ไข่ตุ๋น และ ไข่แดง อนุบาลลูกปลาดุกบิ๊กอุย

วัตถุประสงค์

เพื่อ เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและอัตราการรอด ของลูกปลาดุกบิ๊กอุย โดยการให้กินอาหารชนิดต่างๆกัน (ไรแดง, Powder feed, ไข่ตุ๋น และ ไข่แดง)

วัสดุและอุปกรณ์

1. บ่อซีเมนต์สำหรับอนุบาลลูกปลาดุกขนาด 1 ตารางเมตร
2. เครื่องให้อากาศ
3. ไข่แดง
4. Powder feed
5. ไรแดง
6. ลูกปลาดุกขนาด 1 cm จำนวน 2000 ตัวต่อกลุ่ม
7. ถังน้ำ
8. สายยาง
9. สวิงสำหรับตักปลา
10. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

วิธีการศึกษา

1. ทำความสะอาดบ่อบ่อซีเมนต์สำหรับอนุบาลลูกปลาดุกขนาด 1 ตารางเมตร ใส่น้ำให้ได้ระดับ 20 cm พร้อมเตรียมเครื่องให้อากาศ
2. สุ่มชั่งน้ำหนักลูกปลาดุกจำนวน 100 ตัว โดยการสุ่มชั่ง 3 ครั้ง บันทึกน้ำหนักที่ได้
3. ปล่อยลูกปลาดุก จำนวน 2000 ตัว/บ่อ ลงในบ่อบ่อซีเมนต์ที่เตรียมไว้

แต่ละกลุ่มแบ่งให้อาหารคนละ 1 ชนิด (ไรแดง, Powder feed ไข่ตุ๋น หรือ ไข่แดง) โดยให้อาหารวันละ 3 เวลาดังนี้ 8.00 am, 12.00 am และ 17.00 pm สำหรับรายละเอียดการให้อาหารแต่ละชนิดมีดังต่อไปนี้

การให้ไรแดงเป็นอาหาร

การให้ไรแดงจะให้ในอัตรา 0.5 -0.8 kg/ลูกปลา 100,000 ตัว/วัน โดยแบ่งให้อาหาร 4-6 ครั้ง แต่ละครั้งควรห่างกัน 4-6 ชม. **(โดยในอาทิตย์แรกให้อาหารในอัตรา 0.5 /ลูกปลา 100,000 ตัว/วัน และหลังจาก 1 อาทิตย์ ชั่งน้ำหนักลูกปลาและปรับอาหารเป็น 0.8 kg/ลูกปลา 100,000 ตัว/วัน)**

ในปฏิบัติการนี้อาทิตย์แรกให้ไรแดง 10 g/ลูกปลา 2,000 ตัว/วัน โดยแบ่งให้อาหาร 3 ครั้ง แต่ละครั้งให้อาหารประมาณ 3.4 g (ควรสังเกตให้มีไรแดงเหลืออยู่ในบ่อตลอดเวลา มิเช่นนั้นลูกปลาจะกินกันเอง) ในกรณีมีไรแดงตายอยู่ในบ่อให้ใช้สายยางดูดออก

การให้ไข่แดงเป็นอาหาร

นำไข่แดงต้มมาบดผ่านผ้าขาวบางละเอียด ให้ไข่แดงครั้งละเล็กน้อย และให้ไข่แดงเฉพาะมุมที่ลูกปลาอยู่เท่านั้น สังเกตอย่าให้มีอาหารเหลือในบ่อเพราะจะทำให้น้ำเสีย โดยให้กินไข่แดงเป็นเวลา 2 อาทิตย์ จากนั้นอีก 2 สัปดาห์ให้ไรแดงโดยให้ในอัตรา 0.8 kg/ลูกปลา 100,000 ตัว/วัน

การให้อาหารด้วย Powder feed (อาหารผง)

นำอาหารมาปั้นเป็นก้อนโดยให้ 50% BW/วัน สำหรับอาทิตย์แรก และหลังจาก 1 อาทิตย์ ชั่งน้ำหนักลูกปลาและปรับอาหารเป็น 35% BW **นักศึกษาต้องคำนวณปริมาณการให้อาหารใน 1 วัน และในแต่ละมื้อ** โดยให้กินอาหารผงเป็นเวลา 2 อาทิตย์ ให้สังเกตการกินได้ของปลาหากมีอาหารเหลือให้นำอาหารออกและลดการให้อาหารในมื้อต่อไป จากนั้นให้ไรแดงอีก 2 สัปดาห์โดยให้ในอัตรา 0.8 kg/ลูกปลา 100,000 ตัว/วัน

การให้ไข่ตุ๋นเป็นอาหาร

นำไข่ไก่ 1 ฟอง มาผสมกับนมผง 1.25 กรัม และเติมน้ำ 60 ml จากนั้นทำการตุ๋นไข่ต้มมาบดผ่านผ้าขาวบางละเอียด ให้ไข่แดงครั้งละเล็กน้อย และให้ไข่แดงเฉพาะมุมที่ลูกปลาอยู่เท่านั้น สังเกตอย่าให้มีอาหารเหลือในบ่อเพราะจะทำให้น้ำเสีย โดยให้กินไข่แดงเป็นเวลา 2 อาทิตย์ จากนั้นอีก 2 สัปดาห์ให้ไรแดงโดยให้ในอัตรา 0.8 kg/ลูกปลา 100,000 ตัว/วัน

4. นักศึกษาควรเปลี่ยนถ่ายน้ำ และดูดตะกอนทุกเช้า ถ้ามีลูกปลาดุกตายให้นับจำนวนและจดบันทึกไว้ และย้ายออกจากบ่อทันที หลังจากถ่ายน้ำออกให้เติมน้ำใหม่เข้าไปให้ได้ระดับน้ำที่ดูดออกมาครั้งแรก การดูดตะกอนและถ่ายน้ำควรทำหลังจากมีการให้อาหารลูกปลาไปแล้ว 2-3 ชม.
5. ควรระวังอย่าให้อาหารลูกปลามากเกินไปในแต่ละครั้ง เพราะจะทำให้อาหารเหลือตกค้างอยู่ในบ่อ และเป็นสาเหตุของน้ำเสีย ส่งผลให้ลูกปลาตายได้
6. ให้นักศึกษาให้อาหารเป็นเวลา 4 อาทิตย์ จากนั้นให้สุ่มชั่งน้ำหนักลูกปลาดุกจำนวน 100 ตัว โดยแต่ละกลุ่ม สุ่มชั่ง 3 ครั้ง บันทึกน้ำหนักที่ได้ เขียนกราฟเพื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น และให้ plot graph หาเปอร์เซ็นต์การรอด dairy weight gain
7. ให้นำผลทั้ง 4 กลุ่มในอาหารแต่ละชนิด มาสรุปและอภิปรายผลร่วมกัน
8. นำเสนอรายงานกลุ่ม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 4. การฟักไข่อาร์ทีเมีย

อาร์ทีเมีย หรือไรสีน้ำตาลเป็นสัตว์จำพวกเดียวกับกุ้ง ปู ตัวโตเต็มวัยมีความยาวประมาณ 1.2 เซนติเมตรตัวอ่อนอาร์ทีเมียมีโปรตีนสูงทั้งยังมีขนาดเล็กเป็นอาหารที่ดีของลูกปลากินเนื้อ และลูกกุ้งทะเล สำหรับปลาดุกอุย บิ๊กอุย และปลาดุกยักษ์นั้น ลูกปลาที่เพิ่งฟักเป็นตัวมีขนาดค่อนข้างใหญ่สามารถกินอาหารอื่นๆ เช่น ไรแดงได้ แต่ในกรณีที่ขาดแคลนไรแดงในช่วงสัปดาห์แรก การให้กินอาร์ทีเมียจะช่วยทดแทนไรแดงได้ดีที่สุดแต่จากการสังเกตพบว่าถ้าให้ลูกปลากินอาร์ทีเมียไปนานๆ การเจริญเติบโตจะต่ำกว่าชุดที่เลี้ยงด้วยไรแดง นอกจากนี้อาร์ทีเมียยังช่วยในการบำบัดน้ำเสียในบ่อกุ้ง ไข่อาร์ทีเมียมีขายทั่วไปโดยบรรจุในกระป๋องสุญญากาศน้ำหนักกระป๋องละประมาณ 500 กรัม ราคาประมาณ 500 บาท ต้องนำไข่มาฟักประมาณ 20-30 ชั่วโมง จึงจะฟักเป็นตัว วิธีฟักไข่จะมีบอกไว้ข้างกระป๋อง

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาทราบวิธีการฟักไข่อาร์ทีเมียและสามารถปฏิบัติได้จริงในภาคสนาม

วัสดุและอุปกรณ์

1. ผ้ากรองอาร์ทีเมีย ขนาด 60 T (105 u)
2. เครื่องให้อากาศ
3. โหลขนาด 2.5 ลิตร จำนวน 4 โหล
4. ไข่อาร์ทีเมีย
5. Formalin
6. เครื่อง refractometer
7. เกลือทะเล

วิธีการฟักไข่อาร์ทีเมียมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมน้ำที่มีความเค็มตามที่ระบุไว้สำหรับอาร์ทีเมียแต่ละสายพันธุ์ ปกติจะอยู่ในช่วง10-30 ส่วนในพันส่วน (เกลือ10-30 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร) ใส่น้ำในโหลแก้วใสทรงกระบอกและให้อากาศตลอดเวลา ไข่อาร์ทีเมียที่เพาะฟัก บรรจุในกระป๋อง 500 g/ กระป๋อง ใช้ ไข่อาร์ทีเมีย 1-5 กรัม/น้ำ 1 ลิตร (ในบทปฏิบัติการนี้ใช้ 5 กรัม)

2. ทำความสะอาดไข่แช่ในสารละลาย Ca (OCl2) 285 mg/น้ำจืด 10 L ต่อไข่ 500 g แช่นาน 1-2 ชม หรือ ใช้ Formlin 2 ml + น้ำจืด 1 L แช่นาน 40 นาที ตักเปลือกไข่ที่ลอยอยู่ด้านบนทิ้ง เอาเฉพาะไข่ส่วนล่าง ไปล้างให้สะอาดด้วยน้ำจืดจากนั้นนำไข่ไปฟัก

3. นำไข่ไปฟักในน้ำเค็ม ความเค็มของน้ำที่ใช้เพาะฟัก 25-30 ppt (g/L) ขึ้นกับสายพันธุ์ให้ดูจากข้างกระป๋อง อุณหภูมิน้ำควรอยู่ระหว่าง 20-34 °C และ PH (7.5-9) วิธีการคำนวณความเค็มของน้ำ ใช้สูตร C1V1 = C2V2 (เมื่อ C คือความเข้มข้น และ V คือ ปริมาตรน้ำ)

4. ควรให้ O_2 (4-6 ppm ⟶ mg/l) ตลอดเวลา และไม่ควรต่ำกว่า 2 ppm เวลาในการเพาะฟักเป็นตัวประมาณ 15-35 ชม. ขึ้นกับอุณหภูมิน้ำ

5. แยกตัวอ่อนออกจากเปลือกไข่โดยการ หยุดให้อากาศทิ้งไว้ 10-20 นาที เปลือกไข่จะลอยขึ้นด้านบน ส่วนตัวอ่อนจะจมอยู่ที่ก้น ใช้สายยางดูดออกโดยวิธีกาลักน้ำ

6. ชั่งปริมาณตัวอ่อนที่ได้ เพื่อคำนวณหา hatching output (g/dry cyst 1 g) จากนั้นนำตัวอ่อนไปล้างให้สะอาดด้วยน้ำจืดและนำไปให้สัตว์น้ำวัยอ่อนกิน

7. ให้นักศึกษาสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำในกรวยฟัก อาร์ทีเมีย และอภิปรายผลว่าทำไมถึงเป็นเช่นนั้น และให้อภิปรายผล ค่า hatching output ที่ได้

หมายเหตุ: วิธีการคำนวณปริมาตรน้ำ

บ่อสี่เหลี่ยมผืนผ้า

ปริมาตรน้ำ (ลบ.ม) = ด้านกว้าง (ม.) x ด้านยาว (ม.) x ความลึกของน้ำ (ม.)

บ่อสี่เหลี่ยมจัตุรัส

ปริมาตรน้ำ (ลบ.ม) = ด้าน (ม.) x ด้าน (ม.) x ความลึกของน้ำ (ม.)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 5. การเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์น้ำเค็ม

โรติเฟอร์เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ในไฟลัม Rotifera ชนิดโรติเฟอร์ที่นิยมเลี้ยงมี 1 ชนิดคือ *Brachionus plicatilis* Mueller (น้ำกร่อย-น้ำเค็ม) ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะอย่างยิ่งสำหรับอนุบาลลูกสัตว์น้ำ เช่น ลูกกุ้งทะเลในระยะไมซิส และลูกปลาระยะเริ่มกินอาหาร เช่น ปลากระพง ปลาบู่ ปลาดุก ปลาแรด ฯลฯ โรติเฟอร์เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่นิยมใช้เป็นอาหารอนุบาลลูกสัตว์น้ำในช่วงต่อจากการเลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนพืชและก่อนระยะที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย ข้อดีของการเลี้ยงโรติเฟอร์เพื่ออนุบาลลูกสัตว์น้ำโดยเฉพาะสัตว์น้ำเค็ม โรติเฟอร์แพร่พันธุ์ได้รวดเร็วด้วยวิธีสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศที่เรียกว่า พาร์เธโนเจเนลิส โดยจะมีไข่ 1-2 ฟอง (ขนาดลำตัวกว้าง 80-100 ไมครอน ยาว 110-130 ไมครอน) แต่ถ้าสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนไปจากเดิม เช่น อาหารลดลง หรืออุณหภูมิของน้ำเย็นลง โรติเฟอร์จะสืบพันธุ์แบบมีเพศได้เพียงอย่างเดียว ไข่พวกนี้จะมีขนาดเล็กกว่าไข่ที่ผลิตจากการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ (ขนาดลำตัวกว้าง 50-70 ไมครอน ยาว 80-100 ไมครอน)

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาฝึกปฏิบัติวิธีการเตรียมสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงโรติเฟอร์น้ำเค็ม ตลอดจนการเพาะพันธุ์โรติเฟอร์น้ำเค็ม

วัสดุและอุปกรณ์

1. Flask ขนาด 500 และ 1000 mL
2. เครื่องให้อากาศ
3. โหลแก้วขนาด 1-3 L
4. หัวเชื้อโรติเฟอร์
5. หัวเชื้อคลอเรลลาทะเล และ เตตราเซลมิส
6. เครื่อง refractometer
7. น้ำทะเลที่ผ่านการทรีตเรียบร้อยแล้ว
8. อาหารสำหรับเลี้ยงคลอเรลลาทะเล และ เตตราเซลมิส ดังแสดงในตารางที่ 1
9. ถุงกรองโรติเฟอร์ ขนาดตา 100T ~ 58 ไมครอน

สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงโรติเฟอร์

ตารางที่1 ส่วนประกอบของสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงโรติเฟอร์

ชนิดปุ๋ย (mg/L)	คลอเรลลาทะเล	เตตราเซลมิส
แอมโมเนียมซัลเฟต	150 มิลลิกรัม/ลิตร	1200 มิลลิกรัม/ลิตร
ยูเรีย	7.5 มิลลิกรัม/ลิตร	60 มิลลิกรัม/ลิตร
แคลเซียมซุปเปอร์ฟอสเฟต	25 มิลลิกรัม/ลิตร	-
ปุ๋ย N-P-K (16-20-0)	15 มิลลิกรัม/ลิตร	120 มิลลิกรัม/ลิตร
น้ำทะเลที่กรองแล้ว 1 L		

หมายเหตุ: ในบทปฏิบัติการนี้ ใช้คลอเรลลาทะเลสำหรับเลี้ยงโรติเฟอร์

สิ่งที่นักศึกษาแต่ละกลุ่มต้องปฏิบัติในการการเพาะ โรติเฟอร์มีดังนี้

I. เตรียมสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงโรติเฟอร์โดยใช้คลอเรลลาทะเล ดังตารางที่ 1.

II. เตรียมเพาะโรติเฟอร์ ดังขั้นตอนด้านล่างนี้

ขั้นตอนการเพาะโรติเฟอร์มีดังนี้

1. ใส่น้ำทะเลที่ผ่านการทรีตแล้ว 3 L ลงในโหลแก้วใสทรงกระบอก (ความเค็ม จะอยู่ระหว่าง 20-30 ppt)

2. เติมน้ำเขียว (คลอเรลลาน้ำเค็ม) ลงไป 0.86 L (ทางห้องปฏิบัติการเตรียมไว้แล้ว)

3. เติมหัวเชื้อโรติเฟอร์ลงไป โดยความหนาแน่นประมาณ 5-10 ตัว/ mL และให้อากาศตลอดเวลา

4. อุณหภูมิน้ำที่เหมาะสมในการการเพาะโรติเฟอร์อยู่ระหว่าง 22-30 C , pH 7.5-8

5. อีก 2 วันสามารถเก็บเกี่ยวโรติเฟอร์โดยใช้ ถุงกรองโรติเฟอร์ ขนาดตา 100T ~ 58 ไมครอน (ใช้วิธีการเก็บผลผลิตแบบครั้งเดียว)

6. ให้นักศึกษานับจำนวนโรติเฟอร์ต่อ 1 ml โดยใช้ Haemacytometer

กรณีไม่เจือจาง จำนวนโรติเฟอร์ต่อ 1 ml = จำนวนโรติเฟอร์ที่นับได้ $\times 10^4$

กรณีเจือจาง จำนวนโรติเฟอร์ต่อ 1 ml = จำนวนโรติเฟอร์ที่นับได้ $\times$ dilution rate $\times 10^4$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 6 เรื่อง การแยกเชื้อและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อหรือเซลล์สาหร่ายเพื่อนำมาเลี้ยงชนิดเดียว (unialgal) จะเริ่มต้นจากสาหร่าย 1 เซลล์ หรือ 2-3 เซลล์ หรือ 1 เส้น (clones) นำสาหร่ายที่แยกได้มาหนึ่งโคลนมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในหลอดทดลอง เพื่อเก็บเป็นหัวเชื้อสำหรับขยายพันธุ์ต่อไป เทคนิคการแยกเซลล์สาหร่ายให้บริสุทธิ์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น โดยการใช้ micropipette ดูดเอาเซลล์เดี่ยวมาเลี้ยงในหลอดทดลอง หรือ การเลือกใช้สูตรอาหาร การเพาะเซลล์สาหร่ายบนอาหารวุ้น เป็นต้น ในปฏิบัติการครั้งนี้จะทำการแยกเซลล์สาหร่ายโดยใช้เทคนิคพาสเจอร์ไปเปต (Pasteur pipette) และการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายบนอาหารวุ้น และอาหารเหลวเพื่อเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเซลล์สาหร่ายสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายชนิดเดียวโดยวิธีการใช้ไมโครไปเปต
2. เพื่อแยกเซลล์สาหร่ายสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายชนิดเดียวโดยวิธีการเพาะบนอาหารวุ้น

วัสดุ เครื่องแก้ว และสารเคมี

วัสดุ	อลูมินัมฟอยล์ แท่งกวนแม่เหล็ก และช้อนตักสาร	
เครื่องแก้ว	บีกเกอร์ ขนาด	250 ml 5 ใบ
	กระบอกตวง ขนาด	250 ml 2 อัน
	Flask ขนาด	500 ml 1 flask
	Pipette ขนาด	5 ml
	Petridisc	10 คู่
	Pasteur pipette	40 อัน
สารเคมี	ดังรายละเอียดของสูตรอาหาร	

เครื่องมือและอุปกรณ์

หม้อนึ่งความดัน
ตู้ปลอดเชื้อ
เครื่องชั่งความละเอียด 4 ตำแหน่ง
กล้อง Stereo จำนวน 5 ตัว

งานที่ต้องปฏิบัติ

1. การเตรียมอาหารแข็ง โดยใช้สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงคลอเรลลา ปริมาตร 250 มิลลิลิตร มีขั้นตอนดังนี้

1.1 เตรียมสารละลายธาตุอาหารปริมาตร 250 มิลลิลิตร ตามสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงคลอเรลลา ใส่ลงใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร มาเติมผงวุ้นให้ได้ความเข้มข้น 1.5-2.0% ปิดปากขวดด้วยอลูมินัมฟอยล์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1.2 เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อแล้วรอให้สารอาหารเย็นลงประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส แล้วเทใส่ Petridisc ขั้นตอนนี้ให้ทำในตู้ปลอดเชื้อ รอจนอาหารเย็น ให้คว่ำ Petridisc แล้วเก็บเข้าตู้เย็น ทำการเขี่ยเชื้อเซลล์สาหร่ายในสภาพปลอดเชื้อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.3 เทวุ้นใส่หลอดทดลองที่ autoclave เรียบร้อยแล้ว เติมอาหารเหลวและวุ้น 2% ลงในหลอดทดลองขนาด 7 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดหลวมๆ เพื่อไม่ให้หลอดแตก

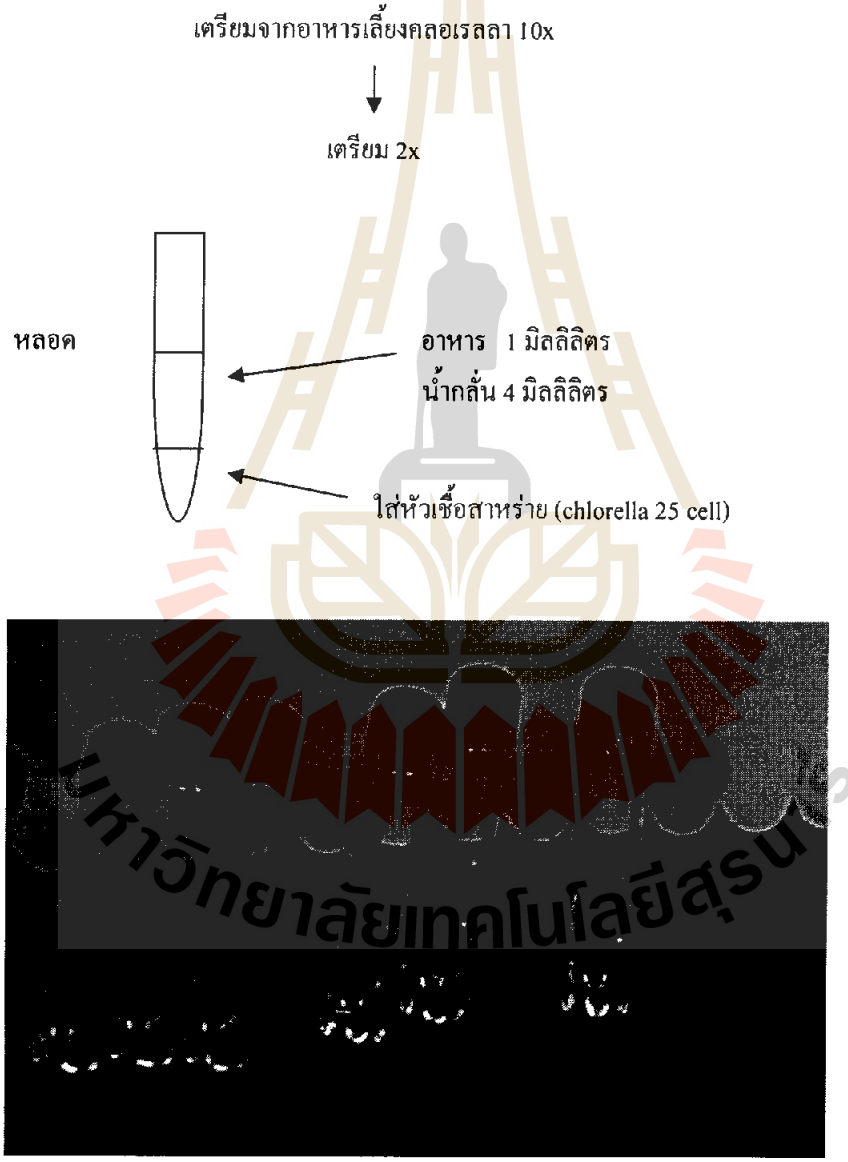
2. การแยกเชื้อเซลล์สาหร่ายคลอเรลลา ด้วยเทคนิคพาสเจอร์ไปเปต

2.1 นำพาสเจอร์ไปเปต มาเผาลนไฟ จนแก้วอ่อนตัว แล้วดึงแก้วออกจากกันเพื่อให้ได้ปลายแหลม จากนั้นใช้ปากคีบหักปลายตรงบริเวณที่ต้องการ

2.2 เตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่ายในหลอดทดลอง ประมาณ 5 มิลลิลิตร

2.3 หยดน้ำสาหร่ายตัวอย่างที่ต้องการแยกลงใน Petridisc จากนั้นใช้พาสเจอร์ไปเปตจาก ข้อ 2.1 ดูดเซลล์สาหร่ายแล้วไปถ่ายสู่ในหลอดทดลองข้อ 2.2 ให้ได้ประมาณ 25 เซลล์ จากนั้นนำไปเลี้ยงที่ตู้เลี้ยงสาหร่าย

2.4 เขย่าหลอดทดลองทุกวันประมาณวันละ 2-3 ครั้ง ประมาณ 2-3 เดือน



ภาพที่ 1 การเทวุ้นใส่หลอดทดลองที่ เติมอาหารแข็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 7-10 เรื่อง การเลี้ยง plankton ในห้องปฏิบัติการ และการขยายปริมาตรในถังขนาดใหญ่

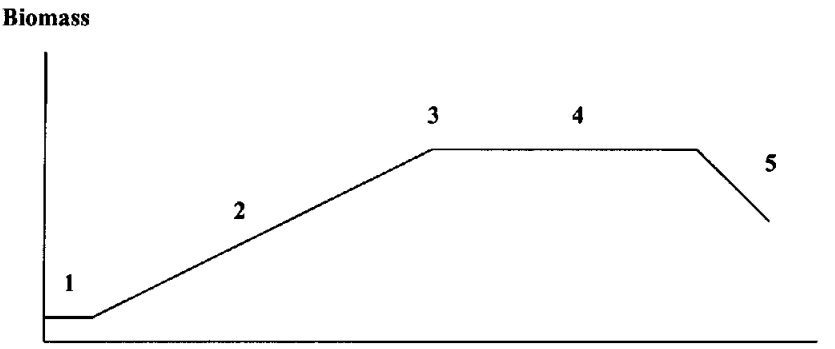
การเลี้ยงแพลงก์ตอนในห้องปฏิบัติการมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างหัวเชื้อบริสุทธิ์ ทำได้โดยเมื่อแยกแพลงก์ตอนได้บริสุทธิ์แล้ว ก็ทำการเลือกแพลงก์ตอนมา 1 โคลน เลี้ยงในหลอดทดลองซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เลี้ยงโดยเขย่าหลอดทุกวัน ประมาณ 2-3 สัปดาห์ จะทำการขยายสาหร่ายส่วนหนึ่งไปยัง flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยทำการเขย่า flask ทุกวัน ประมาณ 2-3 สัปดาห์ การเลี้ยงจนถึงระยะดังกล่าวเป็นการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวปราศจากเชื้อโรคในห้องปฏิบัติการ จากนั้นจะขยายไปยัง flask ขนาด 1 ลิตร ให้อากาศตลอดเวลาเพื่อเป็นการเร่งการเจริญเติบโต ผลผลิตที่ได้จนถึงขั้นนี้สามารถนำมาจำหน่ายเป็นหัวเชื้อสาหร่ายให้กับเกษตรกรที่ต้องการนำไปขยายเป็นขนาดถังใหญ่เพื่ออนุบาลลูกสัตว์น้ำต่อไป

ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีดัชนีชี้วัดที่ใช้กันมาก คือ ดูผลผลิตของสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยง ผลผลิตคือปริมาณของสาหร่ายที่ผลิตได้ใน 1 หน่วยเวลา โดยทั่วไปผลผลิตจะเพิ่มขึ้นตามเวลาการเลี้ยง ซึ่งเรียกได้อีกอย่างหนึ่งว่า "การเติบโต" หรือ "growth" การวัดการเติบโตของสาหร่าย เป็นการวัดความหนาแน่นของเซลล์ หรือวัด optical density (turbidity) ของเซลล์สาหร่าย ดัชนีชี้วัดการเติบโตของสาหร่ายด้านสรีรวิทยาและชีวเคมีเป็นการวัดปริมาณอินทรีย์สารที่เซลล์ผลิตขึ้น ซึ่งได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และลิพิด เป็นต้น

การเจริญเติบโตหรือการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแพลงก์ตอนเมื่อนำมาสร้างเป็นกราฟจะได้ดังในภาพที่ 1 ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 5 ระยะ ดังนี้

1. ระยะปรับตัว (Lag phase or induction phase) เป็นระยะหลังจากการเพาะเชื้อ (inoculation) และเซลล์เริ่มปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง ระยะนี้เซลล์จึงไม่มีการแบ่งเซลล์
2. ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) เป็นระยะที่เซลล์มีการเติบโตและแบ่งเซลล์รวดเร็วมาก ระยะนี้จะยาวนานเท่าใดขึ้นอยู่กับปัจจัยสิ่งแวดล้อมทางกายภาพและอาหารที่เลี้ยง ลักษณะการเติบโตจะรวดเร็วในช่วงต้นและลดลงตามลำดับ
3. ระยะเฉื่อย (Retardation phase) เป็นระยะที่การเติบโตของเซลล์ช้าลงเพราะขาดแคลนอาหาร รวมทั้งปริมาณเซลล์ในภาชนะเลี้ยงหนาแน่นขึ้นเรื่อยๆ ฉะนั้นระดับ pH เริ่มเสียสมดุลเพราะเกิดแอมโมเนียขึ้นมาก แสงสว่างลดลงเนื่องจากเซลล์เกิดการบังกันเอง
4. ระยะคงที่ (Stationary phase) เป็นระยะที่การเจริญเติบโตหยุดนิ่ง เนื่องจากสารอาหารลดน้อยลง และอาจมีสารพิษที่เกิดจากขบวนการเมตาบอลิซึม
5. ระยะตาย (Death phase) ระยะนี้ความหนาแน่นของเซลล์จะทยอยตายลงจนหมด เนื่องจากการเลี้ยงประเภทเก็บเกี่ยวครั้งเดียวไม่มีการเติมสารอาหาร (media) ลงในภาชนะเลี้ยงอีก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 1 กราฟการเติบโต (growth curve) ของสาหร่ายขนาดเล็กที่เลี้ยงแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว (bath culture)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกขยายพันธุ์สาหร่ายที่แยกมาให้บริสุทธิ์ มาเลี้ยงเป็นหัวเชื้อแบบปราศจากเชื้อในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อทำการขยายสาหร่ายหัวเชื้อ เพื่อนำไปขยายต่อเป็นขนาดถังใหญ่เพื่อใช้อนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน
3. เพื่อศึกษากราฟการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอน
4. เพื่อศึกษาน้ำหนักแห้งของแพลงก์ตอนที่ผลิตได้

วัสดุ เครื่องแก้ว และสารเคมี

วัสดุ	อลูมินัมฟอยล์ แท่งกวนแม่เหล็ก และช้อนตักสาร	
เครื่องแก้ว	กระบอกตวง ขนาด	250 ml 2 อัน
	Flask ขนาด	500 ml 1 flask
	Flask ขนาด	1000 ml 1 flask
	โหลแก้ว	1 โหล
	ท่อแท่งแก้ว	
	Pipette ขนาด	5 ml
	Petridisc	10 คู่
	Pasteur pipette	40 อัน
	ถ้วยอลูมิเนียม	
สารเคมี	ดังรายละเอียดของสูตรอาหาร	

เครื่องมือและอุปกรณ์

หม้อนึ่งความดัน

ตู้ปลอดเชื้อ

เครื่องชั่งความละเอียด 4 ตำแหน่ง

กล้องจุลทรรศน์ แบบ Stereo และ compound อย่างละ 5 ตัว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

งานที่ต้องปฏิบัติ

1. การขยายแพลงก์ตอนเซลล์เดียวจากจานอาหารเลี้ยงเซลล์แพลงก์ตอนสู่หลอดทดลอง

1.1 นำจานเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เลือกเซลล์ที่ปราศจากสิ่งปนเปื้อน มาจุ่มลงในอาหารเหลว ส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบว่าเป็นเซลล์แพลงก์ตอนชนิดที่ต้องการหรือไม่ ถ้าใช่ให้ใช้ loop เขี่ยไปเลี้ยงในจานวุ้นชุดใหม่ ทำซ้ำจนกว่าจะไม่มีแบคทีเรียหรือเชื้อราขึ้นในจานวุ้นอีก

1.2 ถ่ายเซลล์ลงเลี้ยงในหลอดอาหารวุ้นที่เทแบบเอียง

1.3 นำหลอดอาหารวุ้นที่เทแบบเอียงไปเลี้ยงใต้แสงสว่าง ประมาณ 1-2 สัปดาห์ จนแพลงก์ตอนขึ้นเป็นสีเขียวเข้ม

1.4 เขี่ยแพลงก์ตอนจากหลอดอาหารวุ้นที่เทแบบเอียงไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบเหลวในหลอดทดลอง ประมาณ 5 มิลลิลิตร ทำการเขย่าทุกวัน ประมาณ 1-2 สัปดาห์

2. การขยายแพลงก์ตอนปริมาณมาก

2.1 เตรียมอาหารเหลวประมาณ 100 มิลลิลิตร ใน Flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเขี่ยเซลล์แพลงก์ตอนจากหลอดทดลอง 1.4 ไปสู่อาหารเหลวใน flask

2.2 เลี้ยงแพลงก์ตอนใน flask ดังกล่าวโดยทำการเขย่าขวดทุกวัน ประมาณ 1-2 สัปดาห์

2.3 เตรียมอาหารเหลวประมาณ 900 มิลลิลิตร ใน Flask ขนาด 1 ลิตร

2.4 นำหัวเชื้อแพลงก์ตอนจากข้อ 2.3 ถ่ายลงสู่ Flask ขนาด 1 ลิตร ปิดด้วยจุกสำลี เขย่าให้เซลล์แพลงก์ตอนแพร่กระจายอย่างสม่ำเสมอ และให้อากาศตลอดเวลา นำไปเลี้ยงในที่ที่มีแสง ประมาณ 1 สัปดาห์

3. การศึกษาการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืช (สำหรับแพลงก์ตอนที่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้)

3.1 นับจำนวนเซลล์แพลงก์ตอนโดยใช้ สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer)

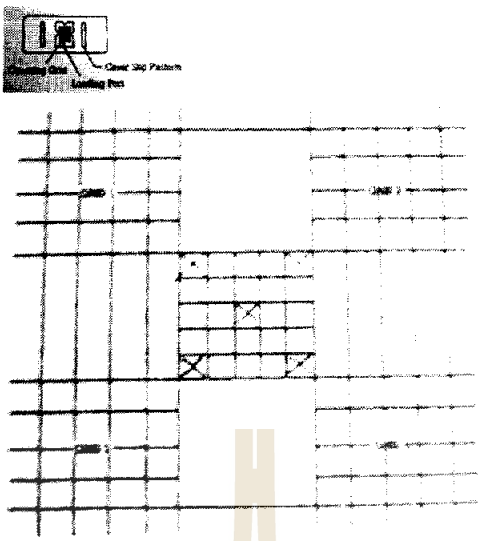
3.1.1 นำกระดาษเช็ดสไลด์จุ่มลงใน 75%Ethanol เช็ดสไลด์นับเม็ดเลือดให้แห้งด้วยกระดาษเช็ดเลนส์

3.1.2 ใช้หลอดแก้วที่ให้อากาศ จุ่มแพลงก์ตอนในน้ำเลี้ยงในข้อ 2.4 มาหยดในสไลด์นับเม็ดเลือด ในช่องใส่ตัวอย่าง (Loading port) ปิดด้วย cover slip

3.1.3 ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับเซลล์แพลงก์ตอนในช่องที่กากะบาท

$$\text{จำนวนแพลงก์ตอนต่อ 1 มิลลิลิตร} = \frac{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4 + X_5) \times 25 \times 10^4}{5}$$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



3.2 โดยวิธีการวัดน้ำหนักแห้ง (Dry weight method) (สำหรับแพลงก์ตอนที่นับจำนวนเซลล์ไม่ได้)

3.2.1 นำถ้วยอลูมิเนียมไปอบจนได้น้ำหนักที่คงที่ แล้วจดน้ำหนักเอาไว้

3.2.2 เขย่าขวดเลี้ยงแพลงก์ตอนให้เข้ากัน ใช้ไปเปตปลอดเชื้อดูดน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนออกมา 5 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยอลูมิเนียม

3.2.3 นำถ้วยอลูมิเนียมที่ใส่แพลงก์ตอนไปอบในตู้อบ อุณหภูมิ 100±5 องศาเซลเซียส 3-4 ชั่วโมง

3.2.4 นำถ้วยอลูมิเนียมออกจากตู้อบ แล้วนำไปเก็บในโถอบแห้ง ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งจดน้ำหนัก

น้ำหนักแห้งของแพลงก์ตอน/มิลลิลิตร = (B-A)/5

A = น้ำหนักคงที่ของถ้วยอลูมิเนียม

B = น้ำหนักคงที่ของถ้วยอลูมิเนียม + แพลงก์ตอน

4. การหามวลน้ำหนักแห้งของแพลงก์ตอน

4.1 นำแพลงก์ตอนที่เลี้ยงมา 250 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อวินาที

4.2 เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง นำส่วนที่เป็นเซลล์แพลงก์ตอนมาอบแห้งตามวิธีข้อ 3.2

มวลน้ำหนักแห้ง/ลิตร = (B-A) * 4

รายงานผล

1. กราฟการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอน
2. มวลน้ำหนักแห้งของสาหร่าย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางบันทึกผล ปฏิบัติการ เรื่อง การติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์

ลำดับ	ชนิดสาหร่ายขนาดเล็ก	รหัสสายพันธุ์	เจือจาง	จำนวนเซลล์ที่นับได้จากการสุ่มตัวอย่างด้วยสไลด์นับเม็ดเลือดแดง ตามอายุของ culture								
				จำนวนเซลล์เริ่มต้น (t0)			วันที่ 2 (t2)			วันที่ 3 (t3)		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												