ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
245560

MRG5180131 ดร. ระพีพร เรืองช่วย

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva (Enteromorpha) intestinalis*”

โดย

ดร. ระพีพร เรืองช่วย
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

มิถุนายน 2553

b00251180

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
245560

สัญญาเลขที่ MRG5180131

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva (Enteromorpha) intestinalis*"

โดย

ดร. ระพีพร เรืองช่วย
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Project Code : MRG5180131

(รหัสโครงการ)

Project Title : การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva (Enteromorpha) intestinalis*

(ชื่อโครงการ)

Investigator : ดร. ระพีพร เรืองช่วย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลา- นครินทร์ อ. เมือง จ. ปัตตานี

(ชื่อนักวิจัย)

E-mail Address :rrapee@bunga.pn.psu.ac.th

Project Period : 15 พฤษภาคม 2551 ถึงวันที่ 14 พฤษภาคม 2552

(ระยะเวลาโครงการ)

บทคัดย่อ

245560

สาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* Linnaeus (Ulvales, Chlorophyta) เป็นสาหร่ายที่ใช้เลี้ยงร่วมกับกุ้งทะเล เพื่อช่วยรักษาคุณภาพน้ำและเป็นแหล่งเกิดของอาหารธรรมชาติ การศึกษาเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ในสภาพแวดล้อมต่างๆ กัน มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการเพาะเลี้ยงต่อไป โดยใช้กลุ่มก้อนต้นอ่อน ที่มีความยาว 0.3 -0.8 มิลลิเมตร ที่ได้รับด้วยการนำต้นแม่จากบ่อเลี้ยงกุ้งมาเพาะเลี้ยงในความเค็มแตกต่างกันช่วง 0-40 ppt ให้แตกต่างกันช่วงละ 10 ppt (ที่ 25 ° C, 50 µmol m^{-2} s^{-1}และ ให้แสง:มืดเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง) พบว่าที่ 20 ppt ได้ความยาวแทลลัสสูงสุด 174.3 ± 37.6 มิลลิเมตร รองลงมาเป็นที่ 30 ppt ได้ความยาวแทลลัส 160.9 ± 43.0 มิลลิเมตร สำหรับแทลลัสเลี้ยงที่ 40 ppt จะปล่อย zoospores จากปลายแทลลัสเร็วที่สุด โดยปล่อยใน สัปดาห์ที่ 3 สำหรับต้นอ่อนสาหร่ายที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกันที่ 20, 25 และ 30 ° C (20 ppt และ 60 50 µmol $^{-2}$ s $^{-1}$, 12:12 ชั่วโมง) พบว่าที่ 25 ° C ต้นอ่อนมีความยาวสูงสุดเท่ากับ 197.7 ± 46.5 มม ใน 4 สัปดาห์และ ปล่อยซูโอสปอร์ ในสัปดาห์ 5 สำหรับต้นอ่อนที่เลี้ยงที่ความเข้มแสงระดับต่างๆ ได้แก่ 40, 80 และ 120 µmol m^{-2} s^{-1}, (ที่ 20 ppt, 25°C,ให้แสง:มืดเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง) พบว่าที่ 80 µmol m^{-2} s^{-1}2 แทลลัสมีความยาวสูงสุด 137.4 ± 37.4 มิลลิเมตร ใน 3 สัปดาห์ และปล่อยซูโอสปอร์ ใน 4 สัปดาห์ แต่ที่ 120 µmol m^{-2} s^{-1} จะปล่อยซูโอสปอร์ออกมาเร็วที่สุด ใน 3 สัปดาห์ ความเค็มอุณหภูมิและความเข้มแสงมีผลต่อการเติบโตและปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ สำหรับเลี้ยงในบ่อดินโดยใช้ต้นอ่อนที่ได้จากโรงเพาะฟักที่เกาะบนเส้นเชือกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ใช้ต้นอ่อนอายุ 2 สัปดาห์ ขนาดเริ่มต้น 6.75 ± 0.17 มม นำเลี้ยงในบ่อดิน 2 บ่อ ขนาด 2.5 x 10.0 มิลลิเมตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าต้นอ่อน มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ 6 สัปดาห์ ได้ความยาว 21.20 ± 0.25 เซนติเมตร อัตราการเจริญเติบโตพบร้อยละ 5.45 ต่อวัน และพบเซลล์สืบพันธุ์ที่เป็นซูโอสปอร์ที่ปลายแทลลัสซึ่งพองตัวออกในสัปดาห์ที่ 6 ของการเลี้ยง จากการเลี้ยง 8 สัปดาห์ ได้ชีวมวลมี

245560

น้ำหนักเปียก 202.00 ± 31.11 กรัมต่อตารางเมตร หรือ 26.65 กรัมน้ำหนักแห้ง สำหรับการเลี้ยงกลุ่มต้นอ่อนขนาด 1.15 ± 0.031 ใน ถังไฟเบอร์ 200 ลิตร พบว่าเมื่อเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ ได้ต้นอ่อนยาว 15.06 ± 0.64 เซนติเมตร มีการเจริญเติบโตเท่ากับร้อยละ 9.18 ± 2.96 ต่อวัน ได้ผลผลิตน้ำหนักสดหลังจากเลี้ยงไป 4 สัปดาห์ เท่ากับ 202.00 ± 25.40 กรัมต่อตารางเมตร หรือ 25.35 กรัมน้ำหนักแห้ง และไม่พบการปล่อยสปอร์ รูปร่างและอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายไก่ *Ulva intestinalis* มีความแตกต่างกันระหว่างการเลี้ยงในบ่อดินและการเลี้ยงในถัง การเลี้ยงในบ่อดินในสัปดาห์ที่ 6 มีการพองตัวของแทลลัส และพบว่ามีการสร้างและปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ น่าจะเป็นช่วงเวลาที่ทำให้ผู้บริโภคที่เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ทั้งหลายมารวมตัวกัน เหมาะที่จะปล่อยกุ้งลงเลี้ยงต่อไป

คำหลัก: สาหร่ายไส้ไก่, *Ulva intestinalis*, สาหร่ายสีเขียว

245560

Abstract

Green laver or Sarai Sai Kai, *Ulva intestinalis* Linnaeus (Ulvales, Chlorophyta), was utilized to co-culture with shrimp as source of supplementary feed and water treatment. Growth and reproduction of the alga in laboratory and in the earthen pond were aimed to get information for the further cultivation. The germling clusters of 0.8 ± 0.3 mm in length was achieved with mother plants from shrimp pond. In different salinity experiments of 0 - 40 ppt with 10 ppt interval (25°C, 50 µmol m^{-2} s^{-1} and 12:12 hrs), the maximum blade area of 174.3 ± 37.6 mm was found at 20 ppt. The blade area 160.9 ± 43.0 mm^2 was obtained at 30 ppt. The thalli cultured at 40 ppt were the first to release zoospores from the tips (3^{rd} week). Among different light intensity levels of 40, 80 and 120 µmol m^{-2} s^{-1} (20 ppt, 25 °C, 12:12 hrs), they showed the maximum blade area of 137.4 ± 37.4 mm^2 at 80 µmol m^{-2} s^{-1} in 3^{rd} week and released zoospore in 4^{th} week. At 120 µmol m^{-2} s^{-1} they released zoospore in 3^{rd} week. The thallus width was affected by salinity levels, the higher salinity level, the broader the thalli. Only zoosporangia were obtained from the cultured *Ulva intestialis*. All factors of salinity, temperature, and light intensity affected the growth and zoosporangial formation. For pond cultivation, the germlings of 6.75 ± 0.17 mm were obtained from in hatchery by isolation reproductive cells to culture in fiber tanks for 2 weeks. Then, germlings attached on synthetic lines of 0.5 mm in diameter were transferred to cultivation in 2 earthen ponds of 2.5 x 10.0 m^2 for 2 months. The result indicated that germling clusters showed the highest growth at 6^{th} weeks of cultivation with the length of 21.20 ± 0.25 cm. Relative growth rate showed 5.45% day^{-1}. Reproductive cells as zoosporangia were found on the tip of thalli at 6th weeks of the cultivation. Swollen thalli were found in 6^{th} weeks with some reproductive cells on the surface. After 8 weeks of cultivations, biomass showed 202.00 ± 31.11g wet wt m^{-2} or 26.65 g dry wt m^{-2}. The cultivation of germling cluster of 1.15 ± 0.031 in 200 L fiber tank showed 15.06 ± 0.64 cm in length after 4 weeks of cultivation and growth rate showed 9.18± 2.96% day^{-1}. The biomass after 4 weeks was 202.00 ± 25.40 g fw m^{-2} or 25.35 g dw m^{-2}. Shape and growth rate of Green laver or Sarai Sai Kai, *Ulva intestinalis*, were different between the earthen pond cultivation and tank cultivation. For cultivation in earthen pond in 6 weeks, the algae became swollen and released reproductive cells. It should be the time of zooplankton gathering that suitable to start shrimp cultivation.

Key words: Green laver, Sarai Sai Kai, *Ulva intestinalis*

Executive Summary

Green laver or Aonori (in Japanese) was common names of *Ulva intestinalis*. The green algae was tube form of 1-2 mm generally. It was up to 2 cm sometime in length, one layer thick, cell irregularly arrange. Surface blade of the alga was smooth when young and became winkle when getting age, yellow green to dark green in color. Branching occurred near holdfast which was small and narrow of 1 mm. This alga was world wide distribution. It commonly occurred in several habitats. It was edible alga and its cultivation was successful in Japan. In Thailand, the algae were used to co-cultured with giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) in earthen pond for balancing of food chain. Organic prawns were product from that system. However the cultivation system was (Thailand Environmental Institute, 2007) faced to fluctuation of *U. intestinalis* production due to the variety environmental of the shrimp pond. For the sustainable system, it was necessary to understand the optimal conditions to cultivate the alga. Its growth and reproduction should be observed in laboratory for basic information. Its production and growth in pond and tank should be conduct.

Materials and Method

1) Mother plants of *U. intestinalis* were collected from abandoned shrimp pond. Some water quality parameters while sample collect were measured.

2) The algal samples were brushed out of epiphyte and contamination. It was then washed several times with seawater of the same salinity level while sample collect.

3) The algal thalli were cut into 2 cm each. The pieces then were taken to observe under microscope for contamination checking. The clean pieces were selected to conduct for reproductive stimulation.

4) The pieces were incubated in dark condition at 25 °C laboratory for 12 hrs. The pieces were transfer to culture in 500 ml flask with enriched seawater of MGM medium and 25 ppt salinity under 50 µmol m^{-2} s^{-1} and 12:12 hr light: dark period until reproductive cell liberate. The pieces was

5) For study on the optimal salinity, reproductive clusters were then separated to culture in different salinity levels at 0, 10, 20, 30, and 40 ppt with density of 10 clusters per ml. The seawater levels were enriched with Modified Gillard's Medium (MGM) and cultures were done in 500 ml flask at 25°C under 50 µmol m^{-2} s^{-1} and 12:12 hrs light : dark period. Thirty maximal length thalli were measured every week and reproductionof the thalli were observed under microscope. The seawater was renewed every week after growth and reproduction checking.

6) For study on the optimal temperature, the germling clusters were transferred to culture at different temperatures of 20, 25, and 30°C. The seawater levels obtained from 5 of 20 ppt were

used and enriched with MGM medium in 500 ml flasks. The cultures incubated under 50 µmol m^{-2} s^{-1} and 12:12 hrs light : dark period. Sampling for growth and reproductive study were acted as same as the study of the optimal temperature.

7) For study on optimal light intensity, reproductive clusters were transferred to culture in different light intensity levels of 40, 80, and 120 µmol E.m-2s-1. Seawater levels of 20 ppt were used and enriched with MGM medium in 500 ml flask. The cultures were incubated at 25°C under 12:12 hrs light : dark period. Sampling for growth and reproductive study were done as same as above.

8) For earthen pond cultivation, synthetic lines of germlings were stretch in the earthen ponds of 2.5 x 10 m2 with were dept 50-70 cm of seawater. Thirty thalli were random kept out to measure the length every two weeks. The product was harvest after 8 weeks. The specific growth rate (% day-1) was calculated using the formula of Lobban and Harrison (1994):

Specific growth rate (% day-1) = [ln Wt- ln Wo]·t-1 (days)

where Wt = final weight (g); Wo = initial weight; and t = time interval (days)

9) For tank cultivation, germlings clusters cal. 1 cm length were transfer to cultivation in 200 L plastic tanks. The density was 10 cluster / L. Thallus length was measured every week. The product was harvest after 4 weeks. The specific growth rate (% day-1) was calculated using the formula of Lobban and Harrison (1994).

Results

Germling cluster obtaining

After the stimulation of the thalli fragments by kept them in dry and dark for 12 hrs, cells mostly formed zoosporangia except the piece matured before stimulation. Zoosporangia showed round in shape and showed 20-40 µm in size. Protoplast in each cell divided into small cells and formed zoospores. The zoospores were then released from cell wall to swim in the flask. The zoospore almost release within 8-15 days after stimulation. Then spores were attached together and became to clusters. The germling clusters were cultured for a few days until developed in one row filament of 6-12 cells. They were used for the experiments.

Effect of salinity on growth and reproduction of *U. intestinalis*

Germling clusters of 0.78 ± 0.61 mm in length grew well in 10, 20 30, and 40 ppt while they died in 0 ppt. The germlings in 30 ppt showed maximal length of 174.3 + 36.37 mm at 4th weeks. The second maximal growth of the germlings showed at 20 ppt with of 160.93 + 43.98 mm in length in 4th weeks. After 4 weeks of culture, thallus cultured at 10, 20, 30 and 40 ppt

showed width in the range of 0.25-0.35, 0.30-0.52, 0.40-0.80 and 0.70-1.10 mm respectively . The tip of thalli cultured 30 and 40 ppt produced reproductive cells. The earliest reproductive release was found in the filaments cultured at 40 ppt in 3rd weeks. The second earliest release of reproductive cells was found in filament cultured at 30 ppt in 4th weeks. However, reproductive release could not found in filaments cultured at 10 and 20 ppt.

Effect of temperature on growth and reproduction of *U. intestinalis*

In different temperatures, the germlings cultured at 25°C showed highest growth of 197.76 ± 47.3 mm in length in 4th week. The second highly growth found in germling culture at 20 °C with of 130.53 ± 68.46 mm in length at 4th week. Thallus characteristics showed similarity in width at all temperatures and the widths showed non significantly effect between temperature. Early reproductive releasing was found at 25°C in 5th week and the second early release was found at 30°C in 7th week. The last release was at 20°C at 8th week.

Effect of light intensity on growth and reproduction of *U. intestinalis*

Germlings cultured in different light intensity found that maximum length of 132.4 ± 65.07 mm showed in germlings cultured under 80 µmol m^{-2} s^{-1} . The second maximum length of 130.3 ± 45.96 mm was found in thalli under 120 µmol m^{-2} s^{-1}. Characteristics of the thalli showed similarity in width at all temperatures and the widths showed non significantly effect between temperatures. The earliest reproductive release was obtained from thalli cultured under 80 µmol m^{-2} s^{-1} at 4th weeks and the second earliest release was obtain from thalli cultured at 120 µmol m^{-2} s^{-1} in 6th weeks.

Pond cultivation of *U. intestinalis*

The germlings of 6.75 ± 0.17 mm length showed the highest growth of 21.20 ± 0.25 cm. at 6th weeks of cultivation. An average relative growth rate showed 5.45% day^{-1}. Reproductive cells of zoosporangia were found on the tip of thalli at 6th weeks of the cultivation. Swollen and winkle surface were found and reproductive cells was produced on the surface in 6th weeks. After 8 weeks of cultivations, biomass showed 202.00 ± 31.11g wet wt m^{-2} or 26.65 g dry wt m^{-2}.

Tank cultivation of *U. intestinalis*

The germling cluster of 1.15 ± 0.031 in 200 L fiber tank showed 15.06 ± 0.64 cm in length at 4 weeks of cultivaton. It showed an average growth of 9.18% per day. Product at 4 weeks was 202.00 ± 25.40 g fw/ m^3 or 25.35 g dw/ m^3.

Discussions

The green laver, *U. intestinalis*, which collected from the shrimp pond to stimulate reproductive release by keeping in dark and dry was found that reproductive release within 8-15 days. The behavior of spore release was similar to *Ulva prolifera* that the releasing spores attached each others and formed to clusters (Hiraoka and Oka, 2008). However, *U. prolifera* could produced two type reproduction both sexual and a sexual reproduction while *U. intestinalis* in present study found only produced asexual reproduction of zoospores (Lin et al. 2008).

It was agreed with Prud'homme van Reine and Trono (2001) on *U. intestinalis* could grow in wide range of salinity level. In present study, the statistics test showed non significantly effect on thallus length cultured at salinity of 10, 20, 30 and 40 ppt. It was died in 0 ppt. The result was similar to Martins *et.al* (1999) has been report in *U. intestinalis* of Portuguese that available grow in low salinity of 3 psu (1psu equal 1 ppt) and died at 1 psu. However, the mention of optimal salinity range of the Portuguese green laver was 15 -20 psu. The result showed lower than optimal salinity range of Thai green laver in the present study that obtained in the range of 20-30 ppt.

The optimal temperature of *U. intestinalis* in present study was 25 ºC. The statistics test on thallus length showed significantly effects ($p<0.05$) between thallus cultured at 20, 25, and 30 ºC. It was seemed that growth of *U. intestinalis* restrict to narrow temperature. Pellizzari and Oliveira (2007) also reported in *Gayralia* spp (Class Ulvophyceae, Order Ulvales) from the south of Brazil that showed good growth in the temperature range of 20-21.5 ºC within 30 days of culture. It was similar to Thai green laver, *U. intestinalis* that grow in narrow temperature.

The optimal light intensity of *U. intestinalis* in present study was 80 µmol m^{-2} s^{-1}. However, the statistic test found no significantly effect that between thallus length at 40, 80, and 120 µmol m^{-2} s^{-1}. It was similar to the green algae *Gayralia* spp. from south of Brazil could survive in light intensity range of 50-100 µmol m^{-2} s^{-1} and grow well in optimal light intensity level at 100 µmol m^{-2} s^{-1} in 30 days of culture.

As same as other seaweeds, relative growth rate in plastic tank of 9.18% per day in present study showed higher than relative growth in the earthen pond of 5.45% per day. However, relative growth rate in present study showed higher than *Ulva clathrata* (Roth) Greville 1830 cultivate in plastic tank of 3.72 ± 0.45 % per day. It may due to different species or different culture conditions.

Crop and growth rate of Green laver or Sarai Sai Kai, *Ulva intestinalis*, were different between the earthen pond cultivation and tank cultivation. The thallus shape of *U. intestinalis* cultured in pond showed swollen and produced reproductive cells in 6 weeks while those were slim and non produced reproductive cells for cultivation in the tanks. It was seemed zooplanktons

occurred to gather surround the seaweed living area in earthen pond. It was suggested that was an optimal time to start of shrimp culture. The production from earthen pond was contaminated with zooplankton and others while those from the plastic tank were not. Production form plastic tank should be suitable for consumption.

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลงได้ต้องขอขอบคุณ รศ. ดร. อนงค์ จีรภัทร์ แห่ง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ Prof. Dr. Masahiro Notoya แห่ง Laboratory of Applied Phycology, Tokyo University of Marine Science and Technology ที่ให้คำปรึกษาในการวิจัย และชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหาต่างๆ หรับการวิจัยในครั้งนี้ ทำให้การดำเนินงานได้เสร็จลุล่วง

ขอขอบคุณ คุณ ซอฟฮานี ดาหะมะ แห่ง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยเหลือในการจัดเตรียมอุปกรณ์และเก็บข้อมูล

ระพีพร เรืองช่วย

มิถุนายน 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจสอบเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการศึกษา	8
บทที่ 4 ผลการศึกษา	11
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	32
เอกสารอ้างอิง	35
Output ที่ได้จากโครงการ	37
ภาคผนวก 1 manuscript	41
ภาคผนวก 2 บทความสำหรับการเผยแพร่	48
ภาคผนวก 3 กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลงานจากโครงการไปใช้ประโยชน์	55