บทที่ 5 วิจารณ์ สรุป และข้อเสนอแนะ

วิจารณ์

การใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษา *Chaetoceros calcitrans* และ *Chlorella* spp.

การเก็บเกี่ยว *C. calcitrans* และ *Chlorella* spp. ด้วยวิธีการตกตะกอนโดยใช้ไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 40 ppm หลังจากนั้นใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ก่อนนำไปเก็บรักษา พบว่าการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ไม่มีผลต่ออัตรารอดของเซลล์แพลงก์ตอนพืช เนื่องจากการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C (biomass-freezing) โดยไม่เติมสารรักษาสภาพเซลล์ กับการเก็บรักษาโดยการเติมทรีฮาโลสเข้มข้น 0.5%, 1% และ 2% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 $^{\circ}$C อัตรารอดของ *C. calcitrans* และ *Chlorella* spp. ไม่มีความแตกต่างกัน โดยจะลดลงเหลือ 0% ตั้งแต่ระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 2 สัปดาห์เป็นต้นไป แต่การเก็บรักษาที่ความเย็น 4 $^{\circ}$C (refrigerating) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 – 6 สัปดาห์ *C. calcitrans* และ *Chlorella* spp. จะมีอัตรารอดสูงกว่าการเก็บรักษาที่ความเย็น -20 $^{\circ}$C ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 0.5%, 1% และ 2% โดยปริมาตร ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียที่พบใน *C. calcitrans* และ *Chlorella* spp. ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ นอกจากนี้ การใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 0.5%, 1% และ 2% โดยปริมาตร ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันที่พบในแพลงก์ตอนพืชทั้งสองชนิดนี้ แต่ปริมาณกรดไขมัน EPA และ DHA ของ *C. calcitrans* ที่เก็บรักษาโดยใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 0.5%, 1% และ 2% จะมีปริมาณน้อยกว่าชุดการทดลองที่ไม่ใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ของโปรตีน และเยื่อหุ้มเซลล์จากการแช่เย็น การแช่แข็ง และการละลาย เนื่องจากทรีฮาโลสสามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์โดยการเข้าไปรวมกับฟอสโฟลิปิด โดยปกติเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่มีทรีฮาโลสเป็นส่วนประกอบ 20% โดยน้ำหนัก สามารถทนต่อการสูญเสียน้ำได้โดยสมบูรณ์ โดยทรีฮาโลสสามารถดึงโมเลกุลน้ำเข้าเป็นองค์ประกอบได้มากกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ ถึง 2 เท่า จึงทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันภายในเซลล์ (Crowe *et al*., 1984)

การเก็บรักษาแพลงก์ตอนแบบปริมาณมากเพื่อใช้ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำในยามขาดแคลนนั้นทำได้โดยการแช่เย็น (อุณหภูมิ 3 ถึง 4°C) และแช่แข็ง (อุณหภูมิ -18 ถึง -20°C) เพื่อรักษาให้มีคุณภาพดีตลอดการเก็บรักษา การศึกษาและพัฒนาวิธีการเก็บรักษาแพลงก์ตอนให้มีคุณภาพดี และมีการสูญเสีย

องค์ประกอบทางเคมีน้อยที่สุดด้วยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ก่อนนำไปแช่แข็ง หรือเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นธรรมดาก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถรักษาคุณภาพของเซลล์แพลงก์ตอนได้ แต่ต้องคำนึงถึงผลข้างเคียงของสารที่ใช้เก็บรักษาแพลงก์ตอนด้วย เนื่องจากสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ซึ่งอาจทำให้องค์ประกอบของโปรตีนเปลี่ยนโครงสร้างไป บางชนิดเป็นสารละลายเข้มข้นที่ช่วยให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้เร็ว บางชนิดมีคุณสมบัติทำให้เซลล์แพลงก์ตอนรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน เป็นต้น (ผุสดี, 2523; นิธิวดี, 2543; Linhart *et al*., 1993; Conlon *et al*., 1998)

สารรักษาสภาพเซลล์มีหลายชนิด ซึ่งประสิทธิภาพของสารรักษาสภาพเซลล์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความสามารถในการป้องกันการเกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ของเซลล์ เช่น การเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ การเกิดความสมดุลของเกลือแร่ภายในเซลล์ และการเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ขนาดแช่แข็ง เป็นต้น ซึ่งทรีฮาโลสเป็นหนึ่งในสารรักษาสภาพเซลล์ที่นิยมใช้ เนื่องจากทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ โดยมีกลไกในการทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ (Linhart *et al*., 1993; Conlon *et al*., 1998)

การใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*)

จากผลการศึกษาการเก็บรักษาโรติเฟอร์ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 – 12 สัปดาห์ พบว่า การเก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 1 - 2% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 $^{\circ}$C สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับดี คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก < 10% ส่วนการเก็บรักษาโดยการเติมทรีฮาโลสเข้มข้น 0.5% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 $^{\circ}$C พบว่า สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับน่าพอใจ คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก < 50% ส่วนการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C โดยไม่เติมสารรักษาสภาพเซลล์ พบว่า สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับไม่ดี ถึงแย่มาก คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก > 50% และ >75% เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ตามลำดับ ดังนั้น การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 1 – 2% โดยปริมาตรสามารถใช้รักษาสภาพเซลล์ของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C ได้นานถึง 12 สัปดาห์ และได้ดีกว่าการใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5% โดยไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน รวมไปถึงกรดไขมัน EPA และ DHA ของโรติเฟอร์ นอกจากนี้ การเก็บรักษาโรติเฟอร์ด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C โดยการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ที่ระดับ 0.5 – 2% สามารถควบคุมปริมาณแบคที่เรียไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง หรือเพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษาได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่ความเย็น 4 $^{\circ}$C

ทรีฮาโลสเป็นหนึ่งในสารรักษาสภาพเซลล์ที่นิยมใช้ เนื่องจากทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ โดยมีกลไกในการทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ Conlon *et al*., (1998) รายงานไว้ว่า ประสิทธิภาพของสารรักษาสภาพเซลล์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความสามารถในการป้องกันการเกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ เช่น การเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ การเกิดความสมดุลของเกลือแร่และอิเลคโทรไลท์ และการเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ ทั้งนี้เนื่องจากสารรักษาสภาพเซลล์แต่ละชนิดมีกลไกการทำงานในการป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น 2% กลูโคสมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพเซลล์น้อยกว่า 1% ทรีฮาโลสในการรักษาสภาพไข่ริ้นน้ำจืด (*Chironomus fuscipes*) เนื่องจากทรีฮาโลสเป็นกลุ่มของสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ ส่วนกลูโคสเป็นกลุ่มของสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ ซึ่งสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายในจำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นขณะแช่แข็ง และละลาย ในขณะที่กลุ่มสารรักษาสภาพที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์จะทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ ซึ่งขณะแช่แข็งเยื่อหุ้มเซลล์จะเป็นส่วนที่ได้รับความเสียหายมากที่สุด ดังนั้น การใช้สารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์จึงมีประสิทธิภาพสูงกว่า (นิทัศน์, 2553) นอกจากนี้ ธีรเดช (2552) รายงานว่า ระดับความเข้มข้นของทีฮาโลสที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาไรแดง หนอนแดง และอาร์ทีเมียแช่แข็ง คือ 10, 15 และ 15% ของปริมาตรตามลำดับ ซึ่งสามารถเก็บรักษาได้นาน 28 วัน โดยรูปร่างเสียสภาพไม่เกิน 30%

สรุป

1. การเก็บรักษาแพลงก์ตอนพืชที่ความเย็น 4 °C อัตรารอดของ *Chaetoceros calcitrans* และ *Chlorella* spp. จะลดลงที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น และอัตรารอดจะเป็น 0% ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 8 และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ ซึ่งการการเก็บรักษาแพลงก์ตอนพืชด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C โดยไม่ใช้ และใช้ทรีฮาโลสที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2% โดยปริมาตรเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ของการศึกษาครั้งนี้พบว่า การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2% โดยปริมาตร ไม่มีผลต่ออัตรารอดของเซลล์แพลงก์ตอนพืช โดยอัตรารอดของ *C. calcitrans* และ *Chlorella* spp. จะลดลงเหลือ 0% ตั้งแต่ระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 2 สัปดาห์เป็นต้นไป นอกจากนี้ การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2% โดยปริมาตร ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย ปริมาณโปรตีน ปริมาณคาร์โบไฮเดรต และปริมาณไขมันที่พบในแพลงก์ตอนพืชทั้งสองชนิดนี้ แต่จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมัน EPA และ DHA ของ *C. calcitrans* ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 สัปดาห์ขึ้นไป

2. การใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) ของการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 1% และ 2% โดยปริมาตร สามารถใช้รักษาสภาพเซลล์ของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C ได้นานถึง 12 สัปดาห์ และได้ดีกว่าการใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5% โดยไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย ปริมาณโปรตีน ปริมาณคาร์โบไฮเดรต และปริมาณไขมัน รวมไปถึงปริมาณกรดไขมัน EPA และ DHA ของโรติเฟอร์

ข้อเสนอแนะ

1. การตกตะกอนด้วยไคโตซานทำให้แพลงก์ตอนพืชจับตัวเป็นกลุ่ม และไม่กระจายตัวเมื่อนำมาเจือจาง ดังนั้น ถ้าจะนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควรหาวิธีที่ทำให้แพลงก์ตอนพืชกระจายตัวก่อน หรือในการศึกษาครั้งต่อไปควรทดลองการตกตะกอนแพลงก์ตอนพืชแบบปริมาณมากด้วยสารตกตะกอนชนิดอื่น

2. ผลของการใช้แพลงก์ตอนพืชชนิด *Chaetoceros calcitrans* และ *Chlorella* spp. และแพลงก์ตอนสัตว์ชนิดโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) โดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสที่ระดับความเข้มข้น 1 - 2% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 °C ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 – 12 สัปดาห์ ต่อการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนน่าจะเป็นประเด็นที่ควรทำการศึกษาในลำดับต่อไป ทั้งนี้ เพื่อเป็นการต่อยอดองค์ความรู้ และเพื่อการนำผลงานวิจัยมาใช้ประโยชน์ในแก้ไขปัญหาด้านการผลิตแพลงก์ตอนสำหรับการอนุบาลลูกสัตว์น้ำของเกษตรกรต่อไป