คุณค่าทางโภชนาการและการทดลองเลี้ยงซิลิเอตบางชนิดเพื่อเป็นแหล่งอาหารมีชีวิตทางเลือกสำหรับการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน

Nutritional quality and culture of some marine ciliates propose as alternative live food for larviculture

โดย

วรพร ธารางกูร

สุวัจน์ ธัญรส

นพรัตน์ มะเห

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

กระทรวงศึกษาธิการ

ประจำปี ๒๕๕๗

บทคัดย่อ

ประชาคมซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอน (planktonic ciliates) ในป่าชายเลนบริเวณคลองสิเกา บริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ.ตรัง ศึกษาในเดือนเมษายนและเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2558 โดยทำการสำรวจความหลากหลายและความชุกชุมของซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอน ปัจจัยสิ่งแวดล้อมได้แก่ ความลึกของน้ำ ความเค็ม อุณหภูมิของน้ำ pH และปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำถูกตรวจวัดในขณะเก็บตัวอย่าง ผลการศึกษาพบซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอนใน Subclass Spirotricha Order Tintinnida Suborder Tintinnoinea ซึ่งพบทั้งหมด 4 Family ได้แก่ Family Codonellidae Family Codonellopsidae Family Tintinnidae Family Dictyocysta โดยพบจำนวนสกุล (genus) ทั้งหมด 5 สกุล และซิลิเอตที่ไม่สามารถจำแนกได้ *Tintinnopsis* spp. เป็นประชากรเด่นในการศึกษาครั้งนี้ ความชุกชุมของซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอนอยู่ในช่วง 10^2–10^3 เซลล์/ลิตร ในทั้งสองเดือน

การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอตทะเลสกุล *Euplotes* sp. โดยให้อาหารที่แตกต่างกันภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ โดยชนิดอาหารทั้งแบบเดี่ยวและผสม ประกอบด้วย สาหร่ายเซลล์เดียว ได้แก่ *Isochrysis galbana* และ *Tetraselmis suecica*, ยีสต์ขนมปัง baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae)* และทรอสโทไคตริดส์ทะเล (marine thraustochytrid *Schizochytrium limacinum*) โดยกำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 60,000 เซลล์/มิลลิลิตร ซิลิเอต *Euplotes* sp. เดี่ยวๆ จำนวน 20 เซลล์ต่อชนิดอาหาร อัตราการเจริญเติบโตของ *Euplotes* sp. แปรเปลี่ยนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อได้รับอาหารที่แตกต่างกัน อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยสูงสุดพบใน *Euplotes* sp. ที่ให้อาหารเป็น *T. suecica* เดี่ยว ซึ่งไม่แตกต่างกับเมื่อ *Euplotes* sp. ได้รับอาหารผสม *T. suecica* *S. cerevisiae* และ *S. limacinum* ผลการศึกษาพบว่า อาหารที่แตกต่างกันมีอิทธิพลต่อประชากรของ *Euplotes* sp. ทำการศึกษาองค์ประกอบชนิดของกรดอะมิโน กรดไขมันและสเตอรอลของประชากร *Euplotes* sp. ที่ให้อาหารเดี่ยวๆ เป็น *S. cerevisiae* and *S. limacinum* ผลการศึกษาทางองค์ประกอบชีวเคมีของ *Euplotes* sp. และอาหารที่ให้ พบว่า *Euplotes* sp. สามารถเปลี่ยนรูปสารอาหารจากอาหารเกือบทั้งหมดที่ได้รับมาเป็นตัวมันเอง สิ่งที่น่าสนใจคือ *Euplotes* sp. กิน *S. limacinum* มีแนวโน้มแสดงออกว่ามีความสามารถในการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (de novo biosynthesis) ของกรดอะมิโนบางชนิดและกรดไขมันบางชนิด ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถในการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ *Euplotes* sp. เพื่อสนับสนุนว่าซิลิเอตชนิดนี้เป็นอาหารมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางอาหารเหมาะสมสำหรับการอนุบาลลูกสัตว์น้ำทะเลวัยอ่อน

Abstract

Planktonic ciliates communities in Sikao mangrove canal of Sikao district, Trang province were studied in April and June 2015. Diversity and abundance of planktonic ciliates was investigated. Environment parameters including salinity, water temperature, pH were investigated *in situ*. Our results indicated ciliates are member in Subclass Spirotricha Order Tintinnida Suborder Tintinnoinea which compose of 4 Families including family Codonellidae, family Codonellopsidae, family Tintinnidae and family Dictyocysta. Five genera of ciliates were identified, however, there was one unidentified ciliate in this study. *Tintinnopsis* spp. was dominant in this study. The abundance of planktonic ciliates was in the range of 10^2–10^3 cells/l in both months.

The growth rates of marine ciliates *Euplotes* sp. on different diets were determined experimentally under laboratory conditions. The algal (*Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*), baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae)* and marine thraustochytrid *Schizochytrium limacinum* were assigned as the mono or mixed diets with the initial diet concentration was 60,000 cell ml^{-1}. Twenty single cell of *Euplotes* sp. were used for each diet treatments. The growth rates of *Euplotes* sp. varied significantly among diet. The highest average growth rates of *Euplotes* sp. showed no significantly different between fed on monoalgal diet *T.suecica* and the mixed diet (*T. suecica*, *S. cerevisiae* and *S. limacinum*). Our results indicate varied diet influenced differently on the population of *Euplotes* sp. The amino acid, fatty acid and sterol compositions of *Euplotes* sp. fed on the mono diet of *S. cerevisiae* and *S. limacinum* were investigated. Our findings from biochemical composition of *Euplotes* sp. and its assigned diet indicate *Euplotes* sp. transform most nutrients from its diet to itself. Interestingly, *Euplotes* sp. fed on *S. limacinum* tend to having the ability in de novo biosynthesis including some amino acid and some essential fatty acid. More further studies on the ability in de novo biosynthesis of *Euplotes* sp. are required to approve its potential as a live feeding option for marine larviculture.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
Abstract	II
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
วิธีการดำเนินการวิจัย	3
ผลการวิจัย	6
วิจารณ์ผลการวิจัย	22
สรุปผลการวิจัย	25
กิตติกรรมประกาศ	26
บรรณานุกรม	27

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	สกุลซิลิเอตที่พบบริเวณป่าชายเลนในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง	7
2.	จุดเก็บตัวอย่างบริเวณในป่าชายเลน บริเวณคลองสิเกา โดยแสดงตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของสถานีเก็บตัวอย่าง	8
3.	ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในน้ำในป่าชายเลนบริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ. ตรัง	9-10
4.	การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงซิลิเอต ได้แก่ แพลงก์ตอนพืชในสกุล *Chlorella* สกุล *Isochrysis* และสกุล *Tetraselmis*	13
5.	แยกซิลิเอตโดยใช้การดึงเซลล์ทีละเซลล์ (Single cell technique)	13
6.	culture mutiwell plate	14
7.	การทดลองเลี้ยงซิลิเอตในขวดเลี้ยง 270 ml ในห้องปฏิบัติการ	14
8.	การทดลองเลี้ยงซิลิเอตในขวดเลี้ยง 270 ml นอกห้องปฏิบัติการ	14
9.	การทดลองเลี้ยงซิลิเอตในขวดรูปชมพู่ 500 ml ให้อากาศนอกห้องปฏิบัติการ	15
10.	อัตราการกินอาหารของซิลิเอต *Euplotes* sp. ชนิดต่างๆ ในระดับความเข้มข้นของอาหารเริ่มต้น 60,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร	16
11.	อัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอต *Euplotes* sp. ชนิดต่างๆ ในระดับความเข้มข้นของอาหารเริ่มต้น 60,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร	17

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ชนิดของอาหารและความเข้มข้นของอาหารที่ให้กับซิลิเอต *Euplotes* sp	5
2.	ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในบริเวณป่าชายเลนในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง	6
3.	ประชาคมซิลิเอตที่พบบริเวณป่าชายเลนในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง	6
4.	ประชาคมและความหนาแน่น ของซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอน (planktonic ciliates) ในป่าชายเลนบริเวณคลองสิเกา บริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ.ตรัง ณ วันที่ 16 เมษายน พ.ศ. 2558	11
5.	ประชาคมซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอน (planktonic ciliates) ในป่าชายเลนบริเวณคลองสิเกา บริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ.ตรัง ณ วันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2558	12
6.	การเปลี่ยนแปลงจำนวนซิลิเอตในการทดลอง	15
7.	ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในอาหารได้แก่ ยีสต์ *S. cerevisiae* และ *S. limacinum* และในซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว	18
8.	ชนิดและสัดส่วน (%) ของกรดไขมัน (fatty acid) ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารได้แก่ ยีสต์ *S. cerevisiae* และ *S. limacinum* และในซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว	19-20
9.	ชนิดและปริมาณของสเตอรอล (sterol) ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารได้แก่ ยีสต์ *S. cerevisiae* และ *S. limacinum* และในซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว	21

บทนำ (Introduction)

Heterotrophic protists เป็นผู้บริโภค (grazer) ที่สำคัญของแพลงก์ตอนพืชหลากหลายขนาด (พิโค-, นาโน-,และไมโครแพลงก์ตอน) และตัวมันเองก็เป็นอาหารหรือเหยื่อของสัตว์อื่น เช่น โคพิพอด ไรน้ำ ดังนั้น Heterotrophic protist เป็นช่องทางเชื่อมต่อพลังงานและสารอาหารจากฐานของสายใยอาหารในมวลน้ำผ่าน microbial loop ไปยังผู้บริโภคอันดับสูงขึ้นไป จากการที่เป็นตัวกลาง พบว่า Heterotrophic protist บางพวกไม่เพียงแค่ดูดซึมหรือเก็บรวบรวมสารอาหารใหม่ (repackage) จากพิโค-, นาโนแพลงก์ตอน ไว้สำหรับแพลงก์ตอนที่สัตว์ที่กินพวกมันในลำดับถัดไปเท่านั้น มีการเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายคาร์บอนจากแพลงก์ตอนพืชไปยังแพลงก์ตอนสัตว์ แต่ยังเลื่อนชั้น (upgrade)องค์ประกอบทางเคมีที่ประกอบอยู่ในสาหร่ายที่เป็นอาหารของ Heterotrophic protist ไปยังผู้บริโภคลำดับถัดไปโดยการสร้างไขมันที่จำเป็นที่ไม่มีในสาหร่ายที่เป็นอาหารอีกด้วย (Klein Breteler et al., 1999; Bec et al., 2003; Tang and Taal 2005; Veloza et al. 2006; Bec et al. 2006; Chu et al. 2008)

การศึกษาคุณค่าทางอาหารของ Heterotrophic protist ซึ่งประกอบไปด้วยซิลิเอต และแฟลกเจลเลตในทะเล รายงานส่วนใหญ่พบว่ามีองค์ประกอบของไขมัน (กรดไขมัน neutral lipid และ sterol) คล้ายคลึงกับเหยื่อซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย หรือสาหร่าย (Ederington et al. 1995; Boëchat and Adrian, 2005) อย่างไรก็ตามมีรายงานการสังเคราะห์กรดไขมันที่จำเป็นได้เองของ Heterotrophic protist นอกเหนือจากการได้รับจากเหยื่อ เช่น Heterotrophic nanoflagellate ชนิด *Paraphysomonas* sp. สามารถสังเคราะห์ PUFAs (Bec et al. 2010) ส่วน Heterotrophic dinoflagellate ชนิด *Oxyrrhis marina* และ *Gyrodinium dominans* เมื่อได้รับอาหารเป็นสาหร่ายชนิด *Rhodomonas salina* พบปริมาณของคลอเรสเตอรอลเพิ่มสูงขึ้นเป็น 5 และ 30 เท่า และคิดเป็นผลผลิตเท่ากับ 172.5 $\pm$16.2 และ 987.7 $\pm$ 377.7 นาโนกรัมของคลอเรสเตอรอลต่อมิลลิกรัมของคาร์บอนสาหร่าย *R. salina* ที่ถูกกินโดย *O. marina* และ *G. dominans* ตามลำดับ (Chu et al. 2008) ซึ่งเป็นการแสดงความสามารถในการเพิ่มคุณค่าทางอาหารของ Heterotrophic protist ต่อผู้บริโภคลำดับต่อไปในสายใยอาหาร ซึ่งได้แก่ แพลงก์ตอนสัตว์ขนาดใหญ่ เช่น ครัสเตเซียน

ซิลิเอตเป็นโปรโตซัวที่มีความชุกชุมสูงในระบบนิเวศทั้งน้ำจืดและน้ำทะเล และมักพบว่าซิลิเอตมีบทบาทสำคัญในการส่งถ่ายมวลและพลังงานจากแพลงก์ตอนขนาดพิโคแพลงก์ตอนผ่าน microbial loop ไปยังระดับการบริโภคที่สูงขึ้นไปเสมอ (Stoecker and Capuzzo 1990) เช่น Nakagawa et al. (2004) พบว่าซิลิเอตเป็นอาหารที่สำคัญของเคอย Euphausiid (*Euphausia pacifica*) ในบริเวณทางตะวันตกเฉียงเหนือของมหาสมุทรแปซิฟิก

องค์ประกอบของกรดไขมันในซิลิเอตมีความหลากหลายสูงและดูเหมือนจะมีความจำเพาะต่อชนิดที่มีความสามารถที่แตกต่างกันในการสังเคราะห์ PUFAs ซึ่งเป็นกรดไขมันที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนสัตว์ (Martin-Creuzburg et al. 2005) ซิลิเอต *Cyclidium glaucoma* ซึ่งมีปริมาณไขมันทั้งหมดประกอบด้วยปริมาณมากของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวโดยมี 16 : 0, 18 : 0 และไอโซเมอร์ของ 18 : 1 เป็นชนิดเด่น นอกจากนั้น *C. glaucoma* มี PUFA เป็นสัดส่วนที่มาก โดยมีชนิดหลักเป็น18 : 2(n-6), 18 : 3(n-6) และ 20 :4(n-3) (Bec et al. 2003) ซิลิเอตในทะเลที่กินแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหาร (algivorous marine ciliates) มีองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวและ PUFAs ประกอบอยู่ 32% และ 57% ตามลำดับของกรดไขมันทั้งหมด (Klein Breteler et al. 1999) นอกจากนั้น Yih and Shim (1997) พบว่า Mixotrophic marine ciliate เช่น *Mesodinium rubrum* เป็นอาหารที่ดี เนื่องจากมีโปรตีนสูงเหมาะสำหรับแพลงก์ตอนสัตว์

ในต่างประเทศมีรายงานการใช้ซิลิเอตเป็นอาหารในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำ เช่น ลูกปลา Nagano et al. (2000) ทดลองให้ซิลิเอต *Euplotes* sp. และ *Favella taraikaensis* เป็นอาหารสำหรับลูกปลากะรังแรกกิน (first-feeding larval grouper, *Epinephelus septemfasciatus*) พบว่าอัตราการรอดตายสูงขึ้นในระยะ 4-6 วันหลังจากฟักออกจากไข่ แสดงให้เห็นว่าซิลิเอตมีบทบาทที่สำคัญในการเป็นอาหารทางเลือกที่เพิ่มอัตราการรอด โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาที่มีขนาดปากที่เล็ก นอกจากนั้นในธรรมชาติบทบาทของซิลิเอตเป็นอาหารที่สำคัญของลูกปลา เช่น บริเวณทะเลไอริช (Figueiredo et al. 2007) ทะเลรอบเกาะ Shilkoku ประเทศญี่ปุ่น (Fukami et al. 1999)

วัตถุประสงค์ (Objective)

1 ศึกษาสกุลหรือชนิดซิลิเอตในบริเวณป่าชายเลนและชายฝั่ง อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง
2 คัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงซิลิเอตในห้องปฏิบัติการ
3 ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของซิลิเอตที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and Method)

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร Conwy

1.1.2 สารเคมีสำหรับรักษาตัวอย่าง ได้แก่ Lugol's Solution, Formalin, Sodium Thiosulfate

1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.2.1 YSI 85 multiprobe สำหรับวัดอุณหภูมิ ความเค็ม

1.2.2 YSI 60 สำหรับวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH)

1.2.3 Depth sounder สำหรับวัดความลึกของน้ำ

1.2.4 Secchi disk สำหรับวัดความโปร่งใสของน้ำ

1.2.5 ถุงลากแพลงก์ตอนขนาดตาต่างๆ

1.2.6 ขวดสำหรับเก็บตัวอย่าง

1.2.7 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ Olympus IX70

1.2.8 เครื่องแก้วสำหรับเตรียมอาหาร

1.2.9 ระบบเลี้ยงซิลิเอต ได้แก่ ถัง สายอากาศ

2. วิธีการ

2.1 สำรวจชนิดซิลิเอตบริเวณป่าชายเลนและชายฝั่ง อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง

ทำการสำรวจชนิดของซิลิเอตป่าชายเลนและชายฝั่ง อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง โดย การเก็บตัวอย่างน้ำ 3 ลิตร ที่ระดับกลางน้ำ (1-1.5 เมตร ใต้ผิวน้ำ) แล้วดองตัวอย่างด้วย Lugol's Solution :Formalin: Sodium Thiosulfate และเก็บในมืดและเย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส (Sherr and Sherr 1993) ในขณะที่เก็บตัวอย่างน้ำ จะทำการตรวจวัดคุณภาพสิ่งแวดล้อม เช่น ความเค็ม ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ อุณหภูมิ และ pH นำตัวอย่างน้ำกลับมายังห้องปฏิบัติการมาตกตะกอนในท่อ PVC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.11 เมตร สูง 0.5 เมตร หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ใช้สายยางติดผ้ากรองขนาดตา 20 ไมครอน ดูดน้ำจากด้านบนออกไป 75% ของตัวอย่างน้ำทิ้งไปและ 50 – 100 มิลลิลิตร ที่เหลือจะเก็บไว้ในขวดเก็บตัวอย่าง (ดัดแปลงจาก Johansson et al. 2004) เพื่อนำไปวิเคราะห์หาชนิดหรือระดับต่ำสุดของอนุกรมวิธานเท่าที่สามารถจำแนกได้และปริมาณภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ OLYMPUS IX70 โดยจำแนกชนิดตามคู่มือของ Foissner et al. (1999), Pettigrosso (2003), Alekperov et al. (2007), Lynn (2007), Lee et al. (2012)

2.2 คัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงซิลิเอตในห้องปฏิบัติการ

2.2.1 นำผลการศึกษาจากข้อ 2.1 มาเลือกชนิดหรือสกุลซิลิเอตที่มีพฤติกรรมการกินสาหร่าย (algivorous ciliate) หรือ mixotrophic ciliate โดยตรวจสอบจากรายชื่อชนิดหรือสกุลที่ได้จากการทบทวนเอกสารและลักษณะสีของเซลล์ที่เห็นจากตัวอย่างจากข้อ 13.1

2.2.2 การเตรียมห้องปฏิบัติการสำหรับการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเป็นอาหารของซิลิเอต อุณหภูมิในห้องเลี้ยงแพลงก์ตอน 25±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 50 μmol photons m^{-2} s^{-1} หรือ 3,700 lux ตามการประมาณค่า 1 μmol photons m^{-2} s^{-1} = 74 lux (Thimijan and Heins 1982) พร้อมทั้งเตรียมและอาหารสูตร conwy สำหรับ *Isochrysis* และ *Tetraselmis* ที่ความเค็ม 25 psu

2.2.3 เก็บตัวอย่างและแยก (isolate) ตัวอย่างมีชีวิตของซิลิเอตที่ได้จากบริเวณที่เก็บตัวอย่างในข้อ 13.1 มาเลี้ยงใน multiwell plate ที่มีอาหารเลี้ยง ที่มีสาหร่าย *Isochrysis*, *Tetraselmis* จนได้เซลล์ที่หนาแน่น ทำการย้ายไปเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 65 ml ที่มีอาหาร conwy

2.2.4 ทดลองอัตราส่วนของสาหร่ายเซลล์เดียวต่อซิลิเอตที่เหมาะสม บันทึกข้อมูลอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) และอัตราการกินอาหาร (ingestion rate) ของซิลิเอตแต่ละชนิดที่เพาะเลี้ยงได้ ตามวิธีการและสมการใน Smith and Hansen (2007)

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

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

อัตราการกินอาหารและอัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอต *Euplotes* sp. ทำการคัดเลือก *Euplotes* sp. สมบูรณ์ ใส่ตัวอย่างซิลิเอต *Euplotes* sp. ทั้งหมด 20 ตัว ในถาดหลุม 24 หลุม หลุมควบคุมจำนวนสี่หลุม ปริมาตรน้ำหลุมละ 2 มิลลิลิตร ทำการทดลองทั้งหมดสี่ชุดการทดลอง ที่ระดับความเข้มข้นของอาหารที่ 60,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดของอาหารและความเข้มข้นของอาหารที่ให้กับซิลิเอต *Euplotes* sp.

Diet Code	Diets	Initial diet density (cell ml^{-1})
TR 1	*Isochrysis galbana*	60,000
TR 2	*Tetraselmis suecica*	60,000
TR 3	baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)	60,000
TR 4	*Schizochytrium limacinum*	60,000
TR 5	*T. suecica* + *I. galbana*	30,000+30,000
TR 6	*I. galbana* + *S. cerevisiae* + *S. limacinum*	20,000+20,000+20,000
TR 7	*T. suecica* + *S. cerevisiae* + *S. limacinum*	20,000+20,000+20,000

ทำการทดลองภายในห้องปฏิบัติการ ภายใต้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง:มืด 12 ชั่วโมง ความเค็มที่ 25 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาการทดลองในแต่ละชุดการทดลอง 24 ชั่วโมง ทำการนับเซลล์อาหารโดยใช้ Sedgewick Rafter Cell นับจำนวนซิลิเอตและนับจำนวนเซลล์อาหารเริ่มต้นก่อนการทดลองและหลังสิ้นสุดการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างโดยการดองด้วยฟอร์มาลิน 5 % ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร

2.3 ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของซิลิเอตที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของซิลิเอตที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดจากการเลี้ยงด้วยสาหร่ายแต่ละชนิด (ข้อมูลจากข้อ 13.2.4) โดยวิเคราะห์กรดอะมิโน ด้วยเครื่อง HPLC วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว (HUFAs) กรดไขมันอิ่มตัว (PUFAs) และ Sterol ด้วยเครื่อง Gass Chromatography

2.4 การวิเคราะข้อมูล

ข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีในแต่ละซิลิเอตมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One-way ANOVA หากพบว่ามีความแตกต่างจะมีการทดสอบค่าเฉลี่ยโดยการใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ผลการวิจัย (Results)

1.ผลการสำรวจภาคสนามเบื้องต้น (Preliminary survey)

ทำการสำรวจชนิดของซิลิเอตป่าชายเลนและชายฝั่ง อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง โดยทำการตรวจวัดคุณภาพสิ่งแวดล้อม เช่น ความเค็ม ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ อุณหภูมิ และ pH ดังตารางที่ 2 และผลการศึกษาพบซิลิเอต 4 สกุล ดังภาพที่ 1 และไม่สามารถจำแนกได้ ดังตารางที่ 3

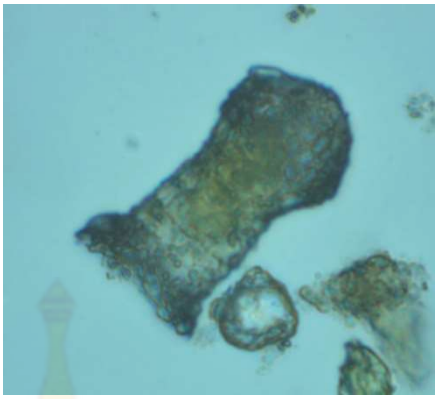
ตารางที่ 2 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในบริเวณป่าชายเลนในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

สถานที่	ความเค็ม (psu)	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ (mg L^{-1})
ทางเดินศึกษาธรรมชาติป่าชายเลน	25.9	30.6	6.58	3.08
คลองในป่าชายเลน	27.4	30.2	6.66	3.29

ตารางที่ 3 ประชาคมซิลิเอตที่พบบริเวณป่าชายเลนในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

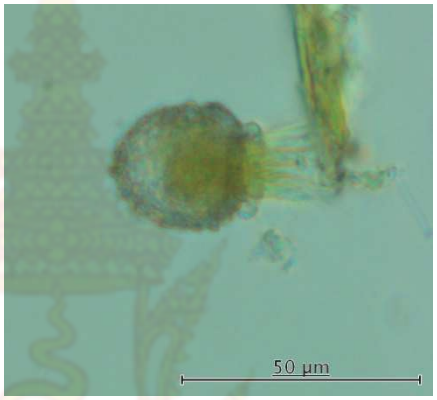
สกุลของซิลิเอต	ทางเดินศึกษาธรรมชาติป่าชายเลน (เซลล์/ลิตร)	คลองในป่าชายเลน (เซลล์/ลิตร)
Stenosemella sp.	88	6,164
Tintinnopsis spp.	88	45
Eutintinnus sp.	-	89
Strombilidium sp.	-	134
Unidentified ciliate	44	-
รวม	221	6,432

Eutintinnus sp.



Tintinnopsis sp.

Strombilidium sp.

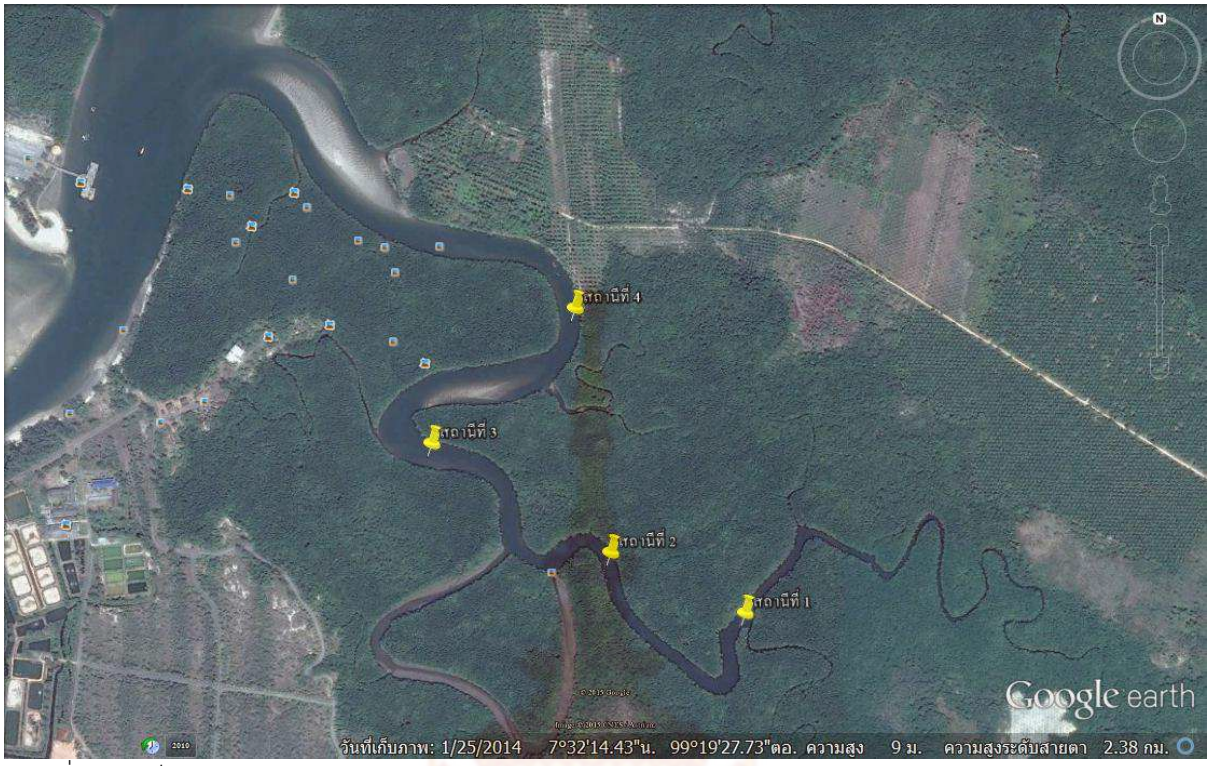


Stenosemella sp.

ภาพที่ 1 สกุลซิลิเอตที่พบบริเวณป่าชายเลนในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

2. ผลการสำรวจซิลิเอตในป่าชายเลน บริเวณคลองสิเกา

จากการสำรวจคุณภาพสิ่งแวดล้อมและเก็บตัวอย่างซิลิเอต 2 ครั้ง ในวันที่ 16 เมษายน พ.ศ. 2558 วันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2558 จากจุดเก็บตัวอย่าง 4 สถานี (ภาพที่ 2) ในคลองป่าชายเลน บริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ.ตรัง



ภาพที่ 2 จุดเก็บตัวอย่างบริเวณในป่าชายเลน บริเวณคลองสิเกา โดยแสดงตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของสถานีเก็บตัวอย่างดังนี้

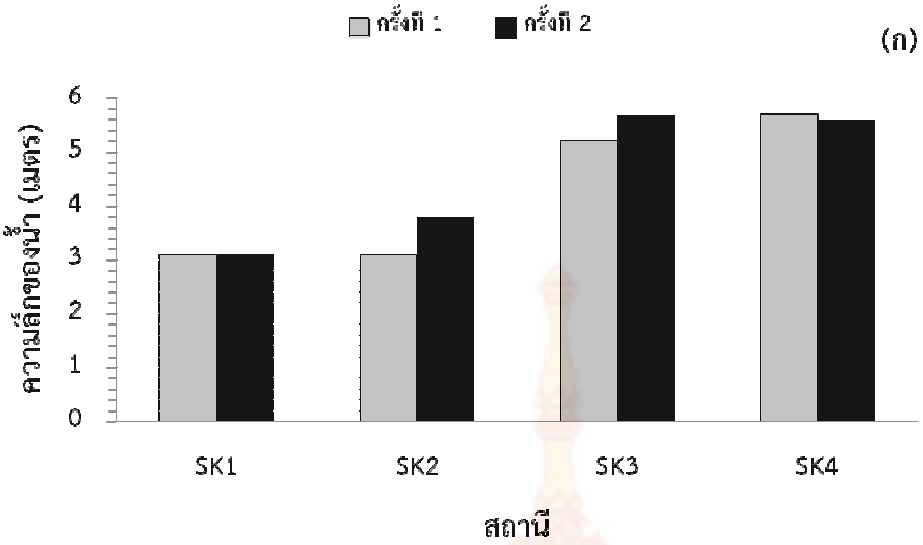
สถานีที่ 1 (SK1) N 0536154 , E 0832686

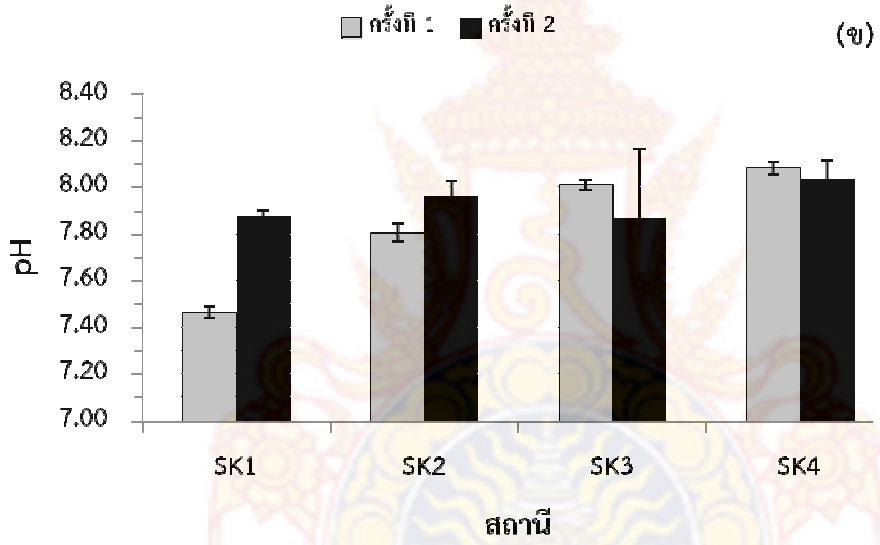
สถานีที่ 2 (SK2) N 0535799 , E 0832727

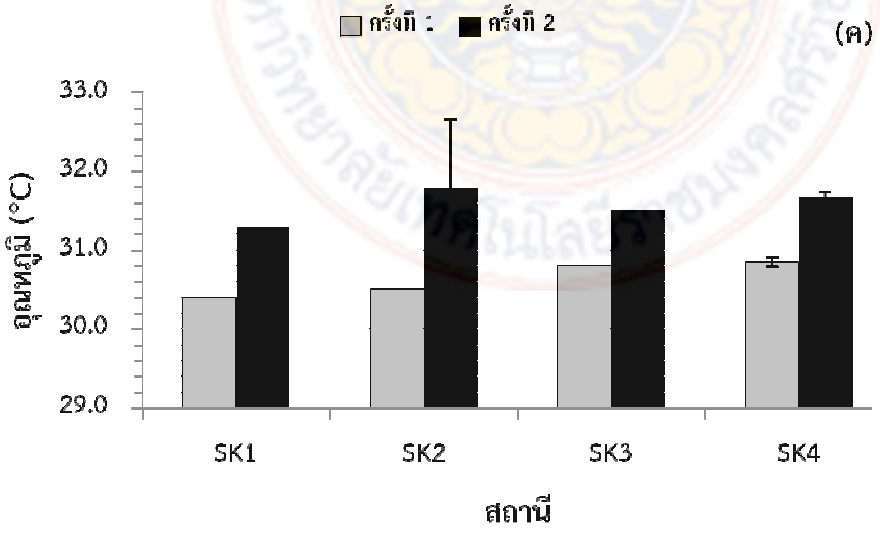
สถานีที่ 3 (SK3) N 0535404 , E 0833009

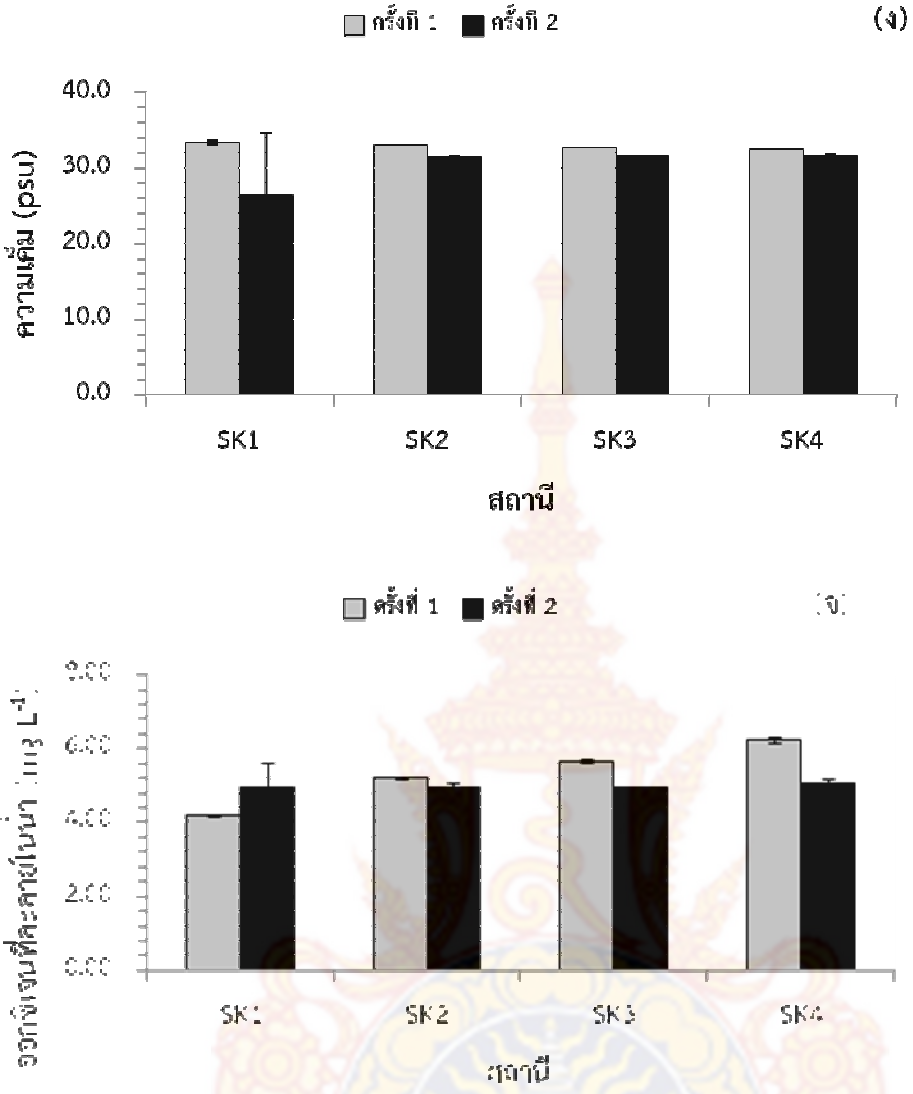
สถานีที่ 4 (SK4) N 0535600 , E 0833253

ผลการศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมในป่าชายเลนบริเวณคลองสิเกา บริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ.ตรัง ณ ณ วันที่ 16 เมษายน พ.ศ. 2558 และวันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2558 (ภาพที่ 3) โดยพบความลึกของน้ำในระหว่างการเก็บตัวอย่างอยู่ระหว่าง 3.1-5.7 เมตร โดยพบความลึกน้ำเฉลี่ยสูงสุดในสถานีที่ 4 (ภาพที่ 3 ก) ปัจจัยสิ่งแวดล้อม ได้แก่ pH อุณหภูมิ ความเค็ม และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ได้จากการเฉลี่ยข้อมูลจากการวัดที่ผิวหน้าน้ำ ระดับความลึก 0.5 เมตร 1.0 เมตร และความลึก 1.5 เมตร โดยพบค่า pH อยู่ในช่วง 7.47-8.08 (ภาพที่ 3 ข) อุณหภูมิของน้ำพบอยู่ระหว่าง 30.4-31.8 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3 ค) ความเค็มอยู่ระหว่าง 26.4-33.3 psu (ภาพที่ 3 ง) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำพบค่าในระหว่าง 4.21-6.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 3 จ)


ครั้งที่ 1
ครั้งที่ 2
(ก)
ความลึกของน้ำ (เมตร)
6
5
4
3
2
1
0
SK1
SK2
SK3
SK4
สถานี


ครั้งที่ 1
ครั้งที่ 2
(ข)
pH
8.40
8.20
8.00
7.80
7.60
7.40
7.20
7.00
SK1
SK2
SK3
SK4
สถานี


ครั้งที่ 1
ครั้งที่ 2
(ค)
อุณหภูมิ (°C)
33.0
32.0
31.0
30.0
29.0
SK1
SK2
SK3
SK4
สถานี



ภาพที่ 3 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในน้ำในป่าชายเลนบริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ. ตรัง (ก) ความลึกของน้ำ (ข) pH (ค) อุณหภูมิ (ง) ความเค็ม และ (จ) ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

ผลการศึกษาประชาคมซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอน (planktonic ciliates) ในป่าชายเลนบริเวณคลองสิเกา บริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ.ตรัง ณ วันที่ 16 เมษายน พ.ศ. 2558 (ตารางที่ 4) และวันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2558 (ตารางที่ 5) โดยพบซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอนใน Subclass Spirotricha Order Tintinnida Suborder Tintinnoinea ซึ่งพบทั้งหมด 4 Family ได้แก่ Family Codonellidae Family Codonellopsidae Family Tintinnidae Family Dictyocysta โดยพบจำนวนสกุล (genus) ทั้งหมด 5 สกุล และซิลิเอตที่ไม่สามารถจำแนกได้

ความชุกชุมเฉลี่ยรวม (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอนที่พบในป่าชายเลนบริเวณคลองสิเกา บริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ.ตรัง ณ วันที่ 16 เมษายน พ.ศ. 2558 อยู่ระหว่าง 321±159 ถึง 1,187±507 เซลล์ต่อลิตร โดยพบความหนาแน่นของซิลิเอตสูงสุดในสถานี SK1 และพบ *Tintinnopsis* sp1 เป็นชนิดเด่น (dominant species) ในทุกสถานี ในขณะที่ ณ วันที่ 16 เมษายน พ.ศ. 2558 พบความหนาแน่นของซิลิเอตอยู่ระหว่าง 1,253±861 ถึง 2,796±1,165 เซลล์ต่อลิตร โดยพบความหนาแน่นของซิลิเอตสูงสุดในสถานี SK2 และพบ *Tintinnopsis* sp2 เป็นชนิดเด่น (dominant species) ในสถานี SK1 และ SK2 ในขณะที่ *Tintinnopsis* sp4 และ *Tintinnopsis* sp3 เป็นชนิดเด่น (dominant species) ในสถานี SK3 และ SK4 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ประชาคมและความหนาแน่น ของซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอน (planktonic ciliates) ในป่าชายเลนบริเวณคลองสิเกา บริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ.ตรัง ณ วันที่ 16 เมษายน พ.ศ. 2558

Taxa/Stations	Density (cell L^{-1})			
	SK1	SK2	SK3	SK4
Phylum Protozoa				
Class Ciliata				
Subclass Spirotricha				
Order Tintinnida				
SuborderTintinnoinea				
Family Codonellidae				
Tintinnopsis sp1	595±407	684±9	721±166	229±79
Tintinnopsis sp2	459±58	167±45	126±17	-
Tintinnopsis sp3	138	118±27	134	-
Tintinnopsis sp4	-	124±21	122±23	134
Family Codonellopsidae				
Stenosemella sp.	131	135	-	-
Codonellopsis sp.	-	135	-	141
Family Tintinnidae				
Eutintinnus sp.	131	-	-	-
Unidentified ciliate			136±3	
Total	1,187±507	1,088±128	1,063±279	321±159

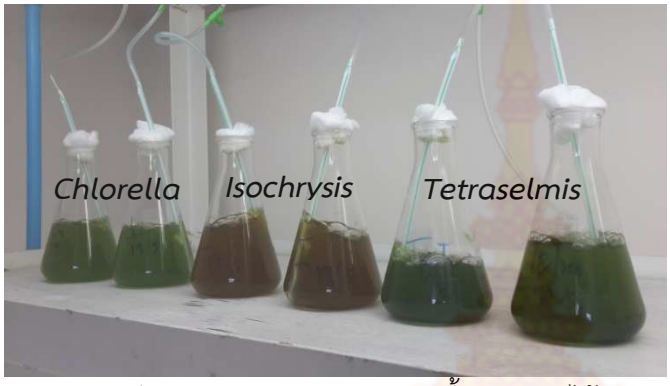
ตารางที่ 5 ประชาคมซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอน (planktonic ciliates) ในป่าชายเลนบริเวณคลองสิเกา บริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ.ตรัง ณ วันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2558

Taxa/Stations	Density (cell L^{-1})			
	SK1	SK2	SK3	SK4
Phylum Protozoa				
Class Ciliata				
Subclass Spirotricha				
Order Tintinnida				
SuborderTintinnoinea				
Family Codonellidae				
Tintinnopsis sp1	651±538	750±156	292±158	197±144
Tintinnopsis sp2	950±718	1,124±521	398±508	211
Tintinnopsis sp3	171±75	414±269	277±279	450±324
Tintinnopsis sp4	128±91	461±420	555±402	484±357
Family Codonellopsidae				
Stenosemella sp.		142	109	
Codonellopsis sp.			138±79	143
Family Tintinnidae				
Eutintinnus sp.				
Family Dictyocysta				
Dictyocysta sp.			135±95	
Unidentified ciliate				
Total	1,857±197	2,796±1,165	1,695±1,281	1,253±861

3. คัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงซิลิเอตในห้องปฏิบัติการ

3.1 การเตรียมห้องปฏิบัติการสำหรับการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเป็นอาหารของซิลิเอต

3.1.1 เตรียมการเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Isochrysis* สกุล *Tetraselmis* และสกุล *Chlorella* ด้วยอาหาร Conwy media ที่ระดับความเค็ม 25 psu ในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิในห้องเลี้ยงแพลงก์ตอน 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงแบบเปิดไฟ 8 ชั่วโมง ปิดไฟ 16 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4

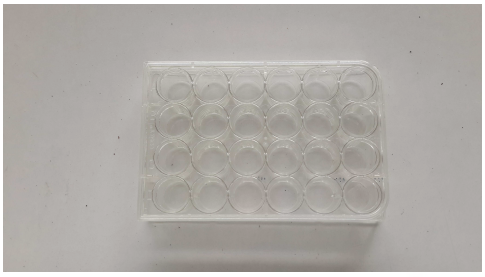


ภาพที่ 4 การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงซิลิเอต ได้แก่ แพลงก์ตอนพืชในสกุล *Chlorella* สกุล *Isochrysis* และสกุล *Tetraselmis*

3.2 ทำการทดลองเลี้ยงใน culture mutiwell plate

ทำการแยกเซลล์ซิลิเอตจากธรรมชาติ โดยจากการเก็บตัวอย่างพบ *Paramecium* sp. มีความชุกชุมสูง จึงคัดเลือกซิลิเอตสกุลนี้มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ทำการแยกซิลิเอตโดยใช้ single cell technique (ภาพที่ 5) ลงมาเลี้ยงใน culture mutiwell plate (ภาพที่ 6) โดยให้อาหารซิลิเอตเป็นสาหร่ายสกุล *Isochrysis* และทำการตรวจสอบสภาพอาหารและซิลิเอตทุกวัน

ภาพที่ 5 แยกซิลิเอตโดยใช้การดึงเซลล์ทีละเซลล์ (Single cell technique)



ภาพที่ 6 culture mutiwell plate

วันที่ 1-2 พบซิลิเอตมีชีวิตปกติ ไม่พบการแบ่งเซลล์

วันที่ 3 พบซิลิเอตมีการแบ่งตัวเพียง 2 หลุม จากทั้งหมด 24 หลุม

วันที่ 4 น้ำใน culture mutiwell plate ลดลง ความเค็มสูง 50 psu พบซิลิเอตตายทุกหลุม ดังนั้นจึงปรับการทดลอง ตามข้อ 3.3

3.3 ทำการทดลองเลี้ยงในขวดเลี้ยง 270 ml ในห้องปฏิบัติการ โดยให้อาหารซิลิเอตเป็นสาหร่ายสกุล *Isochrysis* (ภาพที่ 7) ผลการศึกษาพบซิลิเอตไม่มีการเพิ่มจำนวนและตาย

ภาพที่ 7 การทดลองเลี้ยงซิลิเอตในขวดเลี้ยง 270 ml ในห้องปฏิบัติการ

3.4 ทำการทดลองเลี้ยงในขวดเลี้ยง tissue culture 270 ml ในนอกห้องปฏิบัติการ โดยให้อาหารซิลิเอตเป็นสาหร่ายสกุล *Isochrysis* สกุล *Tetraselmis* สกุล *Chlorella* และ รวมอาหาร 3 ชนิด ในสภาพที่ไม่ให้อากาศ

ภาพที่ 8 การทดลองเลี้ยงซิลิเอตในขวดเลี้ยง 270 ml นอกห้องปฏิบัติการ

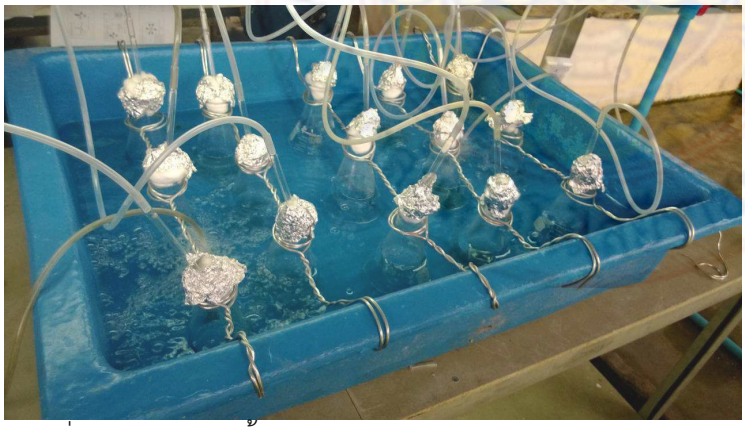
จากการทดลองพบว่าซิลิเอตมีแนวโน้มลดลง แม้ว่าจะให้อาหารที่แตกต่างกัน อุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้างในรอบวัน อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของซิลิเอต (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงจำนวนซิลิเอตในการทดลอง

อาหาร	ซิลิเอตวันที่เริ่มต้น (เซลล์/ลิตร)	วันที่ 4 สิ้นสุดการทดลอง (เซลล์/ลิตร)
Isochrysis sp.	100	126
Tetraselmis sp.	200	108
Chlorella sp.	100	90
Isochrysis sp. + *Tetraselmis* sp. + *Chlorella* sp.	168	90

3..5 ทำการทดลองเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ 500 ml ให้อากาศนอกห้องปฏิบัติการ และควบคุมอุณหภูมิโดยการหล่อด้วยน้ำและมีการให้อากาศในน้ำ (ภาพที่ 9) โดยให้อาหารซิลิเอตเป็น 4 สูตร ดังนี้

- สูตรที่ 1 สาหร่ายสกุล *Isochrysis*
- สูตรที่ 2 สาหร่ายสกุล *Tetraselmis*
- สูตรที่ 3 สาหร่าย 2 ชนิด (*Isochrysis* sp. *Tetraselmis* sp.) และยีสต์
- สูตรที่ 4 ยีสต์

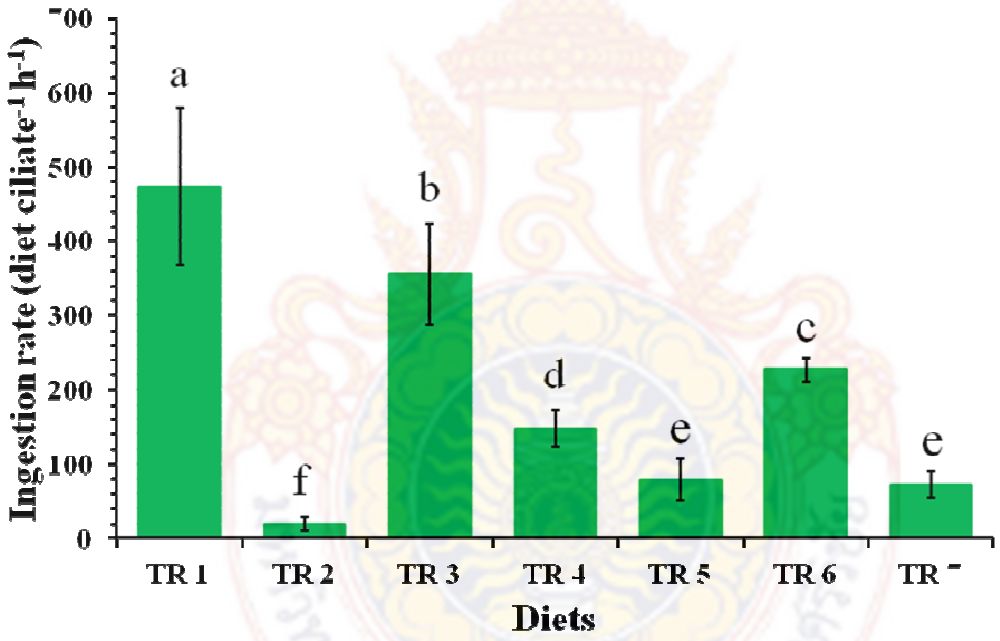


ภาพที่ 9 การทดลองเลี้ยงซิลิเอตในขวดรูปชมพู่ 500 ml ให้อากาศนอกห้องปฏิบัติการ

ผลการทดลองพบว่าซิลิเอตที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เป็นสาหร่ายชนิดเดี่ยวและยีสต์เดี่ยวๆ (สูตรที่ 1 สูตรที่ 2 และสูตรที่ 4) คือ ซิลิเอตจะตายหมดในวันที่ 3 ของการทดลอง ในขณะที่ซิลิเอตที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 3 สาหร่าย 2 ชนิดนี้ผสมยีสต์ พบว่าสามารถรอดจนถึงวันที่ 5 จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า สภาวะแวดล้อมและอาหารทั้ง 4 สูตรยังไม่เหมาะสมต่อการเลี้ยงซิลิเอตชนิดนี้

3.6 อัตราการการกินและอัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอต

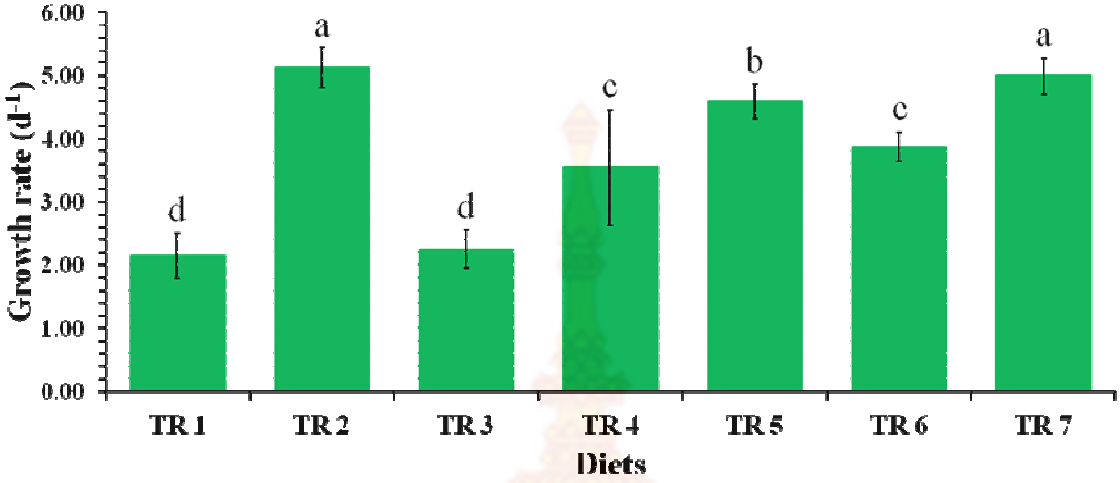
ผลการศึกษาอัตราการการกินของซิลิเอต *Euplotes* sp. ชนิดต่างๆ ในระดับความเข้มข้นของอาหารเริ่มต้น 60,000 เซลล์ต่อมิลลิตร พบว่า อัตราการกินของ *Euplotes* sp. แตกต่างกันตามชนิดอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อัตราการการกินเฉลี่ยพบอยู่ระหว่าง 19-472 เซลล์อาหารต่อ *Euplotes* sp.ต่อชั่วโมง โดยพบอัตราการกินของ *Euplotes* sp. สูงสุดเมื่อกินอาหาร *Isochrysis galbana* และพบอัตราการกินต่ำสุดเมื่อได้อาหารเป็น *Tetraselmis suecica* (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 อัตราการกินอาหารของซิลิเอต *Euplotes* sp. ชนิดต่างๆ ในระดับความเข้มข้นของอาหารเริ่มต้น 60,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาอัตราการการเจริญเติบโตของซิลิเอต *Euplotes* sp. ในอาหารชนิดต่างๆ ในระดับความเข้มข้นของอาหารเริ่มต้น 60,000 เซลล์ต่อมิลลิตร พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของ *Euplotes* sp. แตกต่างกันตามชนิดอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยพบอยู่ระหว่าง 2.15±0.36 ถึง 5.12±0.32 เซลล์ต่อวัน โดยพบอัตราการเจริญเติบโตของ *Euplotes* sp. สูงสุดเมื่อกินอาหาร *Tetraselmis suecica* (TR 2) ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหาร

TR 7 ซึ่งเป็นอาหารผสมระหว่าง *T. suecica* , *S. cerevisiae* และ *S. limacinum* และพบอัตราการเจริญเติบโตต่ำสุดเมื่อได้อาหารเป็น *Isochrysis galbana* (TR 1) ซึ่งซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหาร TR 3 คือ baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 อัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอต *Euplotes* sp. ชนิดต่างๆ ในระดับความเข้มข้นของอาหารเริ่มต้น 60,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

4.คุณค่าทางโภชนาการของซิลิเอตที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน (ตารางที่ 7) ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน (ตารางที่ 8) และชนิดและปริมาณสเตอรอล (ตารางที่ 9) ของซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วยยีสต์ *S. Cerevisiae* และ *S. Limacinum*

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงว่า ซิลิเอต *Euplotes* sp. มีองค์ประกอบกรดอะมิโนที่จำเป็นมากกว่ากรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น Lysine และ Arginine มีความชุกชุมในซิลิเอต *Euplotes* sp. และอาหารที่ใช้เลี้ยง คือ *S. Cerevisiae* และ *S. Limacinum* นอกจากนั้นยังพบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโนในซิลิเอต *Euplotes* sp. มีความคล้ายคลึงกับอาหารที่ซิลิเอตกิน ยกเว้นในกรณีของกรดอะมิโนชนิด cystine และ tryptophan ที่ไม่พบในซิลิเอตที่ให้อาหารเป็น *S. Cerevisiae* แต่พบในอาหาร *S. Cerevisiae* ส่วนซิลิเอต *Euplotes* sp. พบ tryptophan เลี้ยงโดยให้ *S. Limacinum* ซึ่งไม่มีกรดอะมิโนตัวนี้ในอาหารชนิดนี้ (ตารางที่ 7) กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นชนิดเด่นที่พบในอาหารทั้ง *S. Cerevisiae* และ *S. Limacinum* คือ กลูตามิก (glutamic acid) ในขณะที่ซีรีน (serine) กลับเป็นกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นชนิดเด่นที่พบในซิลิเอตที่กินอาหารทั้งสองชนิดนี้

ตารางที่ 7 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในอาหารได้แก่ ยีสต์ *S. cerevisiae* และ *S. limacinum* และในซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว

Amino acid	Amino acid content (mg/100g DW)			
	S. cerevisiae	*Euplotes* sp. fed *S. cerevisiae*	*S. limacinum*	*Euplotes* sp. fed *S. limacinum*
Essential amino acid				
Valine	1,520.90	110.61	131.02	117.47
Methionine	308.78	168.11	104.44	78.12
Lysine	4,316.49	172.05	156.31	103.12
Isoleucine	1,337.03	146.81	155.11	148.75
Leucine	2,257.70	151.18	179.44	136.88
Phenylalanine	1,332.55	150.60	164.98	156.93
Threonine	1,035.45	124.62	137.24	114.02
Cystine	240.76	0.00	0.00	0.00
Thyptophan	332.13	0.00	0.00	178.60
Histidine	776.08	128.40	132.62	119.45
Arginine	1,029.35	493.21	560.77	361.95
Total Essential amino acid	14,487.20	1,645.57	1,721.92	1,515.27
Non-essential amino acid				
Aspartic acid	1,570.28	118.53	126.45	103.01
Serine	939.86	172.85	189.45	165.62
Glutamic acid	2,122.31	158.16	245.95	142.90
Glycine	1,058.06	121.89	144.77	121.10
Alanine	1,501.03	123.23	171.21	128.25
Proline	1,088.28	162.09	183.75	155.46
Tyrosine	1,046.91	130.37	145.81	143.80
Total non-Essential amino acid	9,326.72	1,145.25	1,207.38	960.14
Total amino acid	**23,813.91**	**2,790.82**	**2,929.29**	**2,475.41**

กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วย *S. cerevisiae* และ *S. limacinum* ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acids : MUFAs) (ตารางที่ 8) กรดโอเลอิก (C18 : 1n9c) เป็นชนิดกรดไขมันเด่นในอาหาร *S. cerevisiae* และซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิดนี้ ในขณะที่กรดปาล์มิติก (C16 : 0) ชนิดกรดไขมันเด่นในอาหาร *S. limacinum* และซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิดนี้ Eicosapentaenoic acid (EPA) ไม่พบในอาหาร *S. limacinum* แต่ซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่กินอาหารชนิดนี้กลับพบกรดไขมันที่จำเป็นชนิดนี้ในปริมาณน้อย ในขณะที่กรดไขมันที่จำเป็นชนิด cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (DHA) พบใน *S. limacinum* และซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิดนี้ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าซิลิเอต *Euplotes* sp. ได้รับ DHA จากอาหารที่ซิลิเอตชนิดนี้กินซิลิเอต *Euplotes* sp.

ตารางที่ 8 ชนิดและสัดส่วน (%) ของกรดไขมัน (fatty acid) ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารได้แก่ ยีสต์ *S. cerevisiae* และ *S. limacinum* และในซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว

Type of fatty acid	% Content			
	S. cerevisiae	*Euplotes* sp. fed *S. cerevisiae*	*S. limacinum*	*Euplotes* sp. fed *S. limacinum*
Myristic acid (C14:0)	0.22	0.60	4.46	4.74
Myristoleic acid/Tetradecenenoic (C14 : 1)	0.00	1.33	0.00	1.17
Pentadecanoic acid (C15 : 0)	0.21	0.53	5.14	3.96
cis-10-Pentadecenoic acid (C15 : 1)	0.13	0.36	0.00	0.00
Palmitic acid (C16 : 0)	17.41	16.32	80.53	73.11
Palmitoleic acid/ Hexadecenoic (C16 : 1)	24.71	18.6	0.00	2.47
Heptadecanoic acid/Margaric (C17 : 0)	0.55	1.16	2.17	1.62
cis-10-Heptadecenoic acid/Margaroleic (C17 : 1)	0.93	1.11	0.00	0.00
Stearic acid (C18 : 0)	13.27	10.71	2.81	2.87
Elaidic acid (C18 : 1n9t)	0.20	0.00	0.00	0.00
Oleic acid (C18 : 1n9c)	34.01	41.68	0.19	3.92
Linoleic acid/Octadecdieoic (C18 : 2n6c)	7.11	1.40	0.00	0.00
Linolenic acid (ALA) (C18 :	0.11	0.00	0.00	0.00

3n3)				
Arachidic acid (C20 : 0)	0.13	0.86	0.35	0.73
cis-11,14-Eicosadienoic acid (C20 : 2)	0.67	0.00	0.00	0.00
Arachidonic acid (C20 : 4n6)	0.00	0.00	0.00	0.67
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (EPA) (C20 : 5n3)	0.00	0.00	0.00	0.92
Behenic acid (C22 : 0)	0.10	0.68	0.00	1.19
Erucic acid/Docosaenoic (C22 : 1n9)	0.00	3.45	0.00	1.28
cis-13,16-Docosadienoic acid (C22 : 2)	0.18	0.00	0.00	0.00
Lignoceric acid (C24 : 0)	0.05	0.00	0.17	0.00
Nervonic acid (C24 : 1)	0.00	1.21	0.00	0.00
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (DHA) (C22 : 6n3)	0.00	0.00	4.19	1.33
Saturated fatty acid	31.95	30.86	95.62	88.22
Monounsaturated fatty acid	59.98	67.74	0.19	8.85
Polyunsaturated fatty acid	8.07	1.40	4.19	2.92

สเตอรอล (sterol) ที่พบในอาหาร *S. cerevisiae* และ *S. Limacinum* มีความคล้ายคลึงกับซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิดทั้งสองชนิดนี้ (ตารางที่ 9) อย่างไรก็ตาม Fucosterol ซึ่งพบในอาหาร *S. cerevisiae* แต่ไม่พบในซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิดนี้ ในขณะที่ปริมาณ Stigmasterolพบในซิลิเอต *Euplotes* sp. มากกว่าในอาหารที่นำมาใช้เลี้ยงทั้งสองชนิด และเป็นสเตอรอลชนิดที่มีมากที่สุดในซิลิเอต *Euplotes* sp. ในการทดลองครั้งนี้

ตารางที่ 9 ชนิดและปริมาณของสเตอรอล (sterol) ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารได้แก่ ยีสต์ *S. cerevisiae* และ *S. limacinum* และในซิลิเอต *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว

Sterol Type	Sterol content (mg /100g DW)			
	S. cerevisiae	*Euplotes* sp. fed *S. cerevisiae*	*S. limacinum*	*Euplotes* sp. fed *S. limacinum*
β-sitosterol	23.136	5.252	22.570	9.979
Stigmasterol	7.309	9.418	5.302	10.481
Campesterol	121.226	3.713	0.000	0.000
Fucosterol	15.689	0.000	0.000	0.000
Desmosterol	10.530	4.738	6.510	2.461
Ergocalciferol	0.793	0.000	0.000	0.000

วิจารณ์ผลการวิจัย (Discussions)

ประชาคมซิลิเอตในป่าชายเลน บริเวณคลองสิเกา

ประชาคมซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอน (planktonic ciliates) ในป่าชายเลนบริเวณคลองสิเกา บริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ.ตรัง โดยพบซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอนใน Subclass Spirotricha Order Tintinnida Suborder Tintinnoinea ซึ่งพบทั้งหมด 4 Family ได้แก่ Family Codonellidae Family Codonellopsidae Family Tintinnidae Family Dictyocysta โดยพบจำนวนสกุล (genus) ทั้งหมด 5 สกุล และซิลิเอตที่ไม่สามารถจำแนกได้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นซิลิเอตที่มีเปลือก (loricate ciliate) ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของซิลิเอตที่พบอยู่ระหว่าง 321±159 ถึง 2,796±1,165 เซลล์ต่อลิตร และมี *Tintinnopsis* เป็นสกุลเด่นในบริเวณนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ ศิริมาศ (2549) ที่รายงานว่าซิลิเอตกลุ่มทินทินิด (Tintinnids) เป็นกลุ่มเด่น โดยพบ 14 สกุล จำนวนชนิดสูงสุดคือ 22 ชนิด ในบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา การศึกษาแพลงก์ตอนทะเลที่บริเวณเกาะคราม จังหวัดชลบุรี (อภิญญา, 2548) และบริเวณป่าชายเลนและหาดทราย ตำบลตันหยงโป จังหวัดสตูล (วราภรณ์ คณะ, 2547) ที่พบ *Tintinnopsis* เป็นสกุลเด่นเช่นเดียวกัน ในขณะที่ เสาวภา และคณะ (2542 อ้างถึง เสาวภา และคณะ, 2541) รายงานว่าพบสกุล *Codonella* เป็นสกุลเด่น บริเวณปากแม่น้ำพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี และทะเลสาบสงขลาตอนนอก ความหนาแน่นของซิลิเอตในการศึกษาครั้งนี้ใกล้เคียงกับที่ ศิริมาศ (2549) ที่ศึกษาในบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา พบ Tintinnids เป็นโพรโทซัวขนาดไมโครแพลงก์ตอนกลุ่มเด่นที่มีความชุกชุมสูงสุดทั้งสองฤดูกาล มีความหนาแน่นเฉลี่ย 5.0×10^2 และ 2.6×10^2 เซลล์/ลิตร ในฤดูแล้งและในฤดูฝน

อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในช่วงที่สั้น และวิธีการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกันอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้มีจำนวนชนิดที่น้อยกว่าที่เคยมีรายงาน เช่น ศิริมาศ 2549, อภิญญา, 2548

อัตราการการเจริญเติบโตของซิลิเอต *Euplotes* sp.

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า *Euplotes* sp. สามารถกินอาหารได้หลากหลาย (ตารางที่ 1) อาจเนื่องจากขนาดที่พอเหมาะของอาหารที่สอดคล้องกับ Wilks & Sleigh (2008) รายงานว่า *Euplotes mutabilis* สามารถจับและกินอาหารที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.57-10 μm ผลการศึกษาครั้งนี้พบอัตราการเจริญเติบโตของ *Euplotes* sp. แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อได้รับอาหารที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับ Saikia & Nandi (2010) รายงานว่าแพลงก์ตอนสัตว์ที่กินพืช (Herbivorous zooplankton) กินแพลงก์ตอนพืชที่ต่างชนิดกันจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันเนื่องจากคุณภาพอาหารที่แตกต่างกัน (ในรูปของ PUFAs หรือ สารอาหาร หรือทั้งคู่) ในขณะที่ Côrtes *et al.* (2013) พบการเจริญเติบโตของ *Euplotes* sp. ดีที่สุดเมื่อได้รับอาหารเป็นยีสต์ขนมปังเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่นได้แก่ สาหร่ายเซลล์เดียว *Nannochloropsis oculata*

และอาหารเลี้ยงโรติเฟอร์ยี่ห้อ Selco 3000 ผลการศึกษาครั้งนี้ มีอัตราการเจริญเติบโต *Euplotes* sp. ที่สูงกว่าผลการศึกษาก่อนหน้าที่ให้อาหารเป็นสาหร่ายเซลล์เดียว *Nannochloropsis* spp. *Dunaliella* sp.แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และยีสต์ (Ushilo *et al.,* 1998; Goltz *et al.,* 2015) และ Turley *et al.* (1986) รายงานว่า *Euplotes* sp. กินแบคทีเรียมีอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ 1.32 ต่อวัน

คุณค่าทางโภชนาการของซิลิเอตที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

องค์ประกอบทางชีวเคมีของซิลิเอตเป็นส่วนสำคัญในความเข้าใจในประโยชน์ทางโภชนาการสำหรับการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของสัตว์หลายเซลล์ (metazoan) ได้รับจากการกินซิลิเอตเป็นอาหาร (Harvey et al., 1997) การศึกษาครั้งนี้ต้องการทราบว่า *Euplotes* sp. มีศักยภาพในการเป็นอาหารมีชีวิตของลูกปลาวัยอ่อนหรือลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมี ได้แก่ กรดไขมัน กรดอะมิโน และสเตอรอล

กรดไขมันไม่อิ่มตัว Highly unsaturated fatty acids (HUFA) ประกอบด้วย eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n−3) และ docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n−3) มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาสมองและระบบประสาทส่วนกลาง รักษาโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์และมีบทบาทในการทนต่อความเครียด การพัฒนาการที่และการทำหน้าที่ๆ เหมาะสมของระบบประสาทและระบบการมองเห็นในปลา (Sargent *et al.,* 1997) การศึกษาครั้งนี้พบว่า *Euplotes* sp. มีองค์ประกอบของกรดไขมันที่จำเป็น โดยพบบางชนิดของ PUFAs (ตัวอย่างเช่น EPA) พบใน *Euplotes* sp. ที่เลี้ยงแต่ไม่พบในอาหารของซิลิเอต (Zhukova & Kharlamenko 1999; Drillet & Dutz 2014) ซึ่งบ่งชี้ว่า ใน *Euplotes* sp. มีความสามารถในการใช้และสังเคราะห์กรดไขมันบางตัวได้

การเจริญเติบโตของปลาหลักการคือการเพิ่มขึ้นของมวลกล้ามเนื้อของตัวปลาโดยการสังเคราะห์โปรตีนและการเพิ่มขึ้นของโปรตีน ลูกปลาวัยอ่อนมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงมาก ดังนั้นจึงต้องการอาหารที่มีกรดอะมิโนที่สูง (Rønnestad *et al.,* 1999; Rønnestad *et al.,* 2003) ผลศึกษาครั้งนี้พบว่า *Euplotes* sp. มีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบตามความต้องการของลูกปลาวัยอ่อนและมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนบางตัวที่ไม่พบในอาหารที่เลี้ยงซิลิเอต ซึ่งบ่งชี้ว่า *Euplotes* sp. มีความสามารถในการใช้และสังเคราะห์กรดอะมิโนบางตัวได้

สเตอรอล ถือว่าเป็นโครงสร้างที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ยูคาริโอต อย่างไรก็ตามในซิลิเอต triterpenoid alcohol tetrahymanol และ hopanoid อื่นๆ เป็นตัวแทนของสเตอรอล เมื่อแหล่งอาหารไม่มีสเตอรอล ตัวอย่างเช่น เมื่อซิลิเอตกินเหยื่อที่เป็นโปรคาริโอต (แบคทีเรีย พิโคไซยาโนแบคทีเรีย อ้างถึงใน Martin-Creuzburg et al., 2005b, 2006) ค้นพบว่า ซิลิเอตทำหน้าที่เป็นตัวกลาง (intermediary grazer) ช่วยยกระดับอาหารที่มีคุณภาพต่ำของพิโคไซยาโนแบคทีเรีย (ไม่มีสเตอรอล) ที่เป็นอาหารของ *Daphnia magna* เป็นการแสดงนัยว่า tetrahymanol และสารอนุพันธุ์ที่เกี่ยวข้องสามารถถูกใช้เป็นตัวแทนสเตอรอลได้ในเนื้อเยื่อของครัสเตเชียน (Martin-Creuzburg et

al., 2005b) Ederington et al. 1995 รายงานว่า การดูดซึมไปใช้ของ tetrahymanol ในเนื้อเยื่อของโคพีพอด (ส่วนใหญ่ในไข่) เมื่อได้รับซิลิเอตเป็นอาหาร และเสนอว่า tetrahymanol ทำหน้าที่เทียบเท่ากับคลอเรสเตอรอลในครัสเตเชียนด้วยเหตุนี้ทำให้รักษาการผลิตไข่ที่ต่ำที่สุดไว้ได้

นอกเหนือจากบทบาทในการเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ สเตอรอลทำหน้าที่เป็นสารประกอบ (precusor) ที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นโมเลกุลออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่นได้ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาถึงปริมาณของ tetrahymanol ผลการศึกษาครั้งนี้พบชนิดของสเตอรอลที่คล้ายคลึงกับ Sul et al. (2000) ที่รายงานว่า ซิลิเอตทะเล *Parauronema acutum* ประกอบด้วยคลอเลสเตอรอล (53%), campesterol (32%) desmosterol (7%) และ β-sitosterol (8%) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบหลักฐานที่ชัดเจนในเรื่องความสามารถในการสังเคราะห์สเตอรอล ต่างจากที่มีรายงานโดย Klein Breteler et al. (2004 อ้างถึง Harvey & McManus 1991) ว่า *Euplotes* sp. เป็นซิลิเอตที่มีความสามารถในการสร้างสเตอรอล

อย่างไรก็ตามความสามารถในการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (de novo biosynthesis) ของ *Euplotes* sp. ควรตรวจสอบเพิ่มเติมโดยวิธีการที่จำเพาะเพื่อยืนยันความสามารถของซิลิเอตสกุลนี้

สรุปผลการวิจัย (Conclusion)

1. ประชาคมซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอน (planktonic ciliates) ในป่าชายเลนบริเวณคลองสิเกา บริเวณคลองสิเกา อ.สิเกา จ.ตรัง โดยพบซิลิเอตที่เป็นแพลงก์ตอนใน Subclass Spirotricha Order Tintinnida Suborder Tintinnoinea ซึ่งพบทั้งหมด 4 Family ได้แก่ Family Codonellidae Family Codonellopsidae Family Tintinnidae Family Dictyocysta โดยพบจำนวนสกุล (genus) ทั้งหมด 5 สกุล และซิลิเอตที่ไม่สามารถจำแนกได้
2. *Euplotes* sp. สามารถเลี้ยงได้ในสภาวะอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 25-27 psu และสามารถกินอาหารได้หลายชนิด โดยอาหาร *Tetraselmis suecica* และอาหารผสมที่ประกอบด้วย *T. suecica* , *S. cerevisiae* และ *S. limacinum* ให้อัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด
3. *Euplotes* sp. มีองค์ประกอบส่วนใหญ่ของกรดอะมิโน กรดไขมัน และสเตอรอลคล้ายคลึงกับอาหารที่กิน และแสดงความสามารถในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็น ไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิด อย่างไรก็ตามควรศึกษาเพิ่มเติมในความสามารถในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็น กรดไขมันไม่อิ่มตัว และสเตอรอลโดยวิธีการที่จำเพาะยิ่งขึ้นเพื่อยืนยันความสามารถนี้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวพิมพ์ใจ อุตมา นางสาวพลอยไพลิน มัธยันต์ ในการเตรียมอาหารและเลี้ยงซิลิเอต *Euplotes* sp. นางสาวทิพวรรณ บุญเพ็ชร สำหรับการวิเคราะห์ซิลิเอต งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๕๗

บรรณานุกรม (Bibliography)

วราภรณ์ เรืองรัตน์ เสาวภา อังสุภานิช และ เพ็ญใจ สมพงษ์ชัยกุล. 2547. ความชุกชุมตามฤดูกาลของแพลงก์ตอนสัตว์บริเวณป่าชายเลนและหากทรายตำบลตันหยงโป จังหวัดสตูล. ใน สนิท อักษรแก้ว และคณะ. การจัดการสวนป่าชายเลนแบบผสมผสานเพื่อการพัฒนาทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมบริเวณชายฝั่งของประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. หน้า 559-578.

ศิริมาศ สุขประเสริฐ. 2549. องค์ประกอบและความชุกชุมของแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มโพรโทซัว บริเวณปากแม่น้ำบางปะกงจังหวัดฉะเชิงเทรา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เสาวภา อังสุภานิช พูนสิริ มณีสะอาด และ ดุสิตา ธาดาหิตะกุล. 2542. ประชาคมแพลงก์ตอนสัตว์ขนาดเล็กบริเวณแปลงปลูกป่าชายเลนใกล้คลองพุนพิน อ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี ใน สนิท อักษรแก้ว และคณะ. การฟื้นฟูและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนเพื่อสังคมและเศรษฐกิจอย่างยั่งยืนของประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. หน้า 291-302.

อภิญญา ปานโชติ. 2548. ความหลากหลายของชนิดและการแพร่กระจายของแพลงก์ตอนทะเลบริเวณเกาะคราม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Alekperov I, Buskey E, Snegovaya N (2007) The free-living ciliates of the Mexican Gulf coast near Port Aransas city and its suburbs (South Texas, USA). Protistology 5: 101–130

Bec A, Desvilettes C, Vera A, Lemarchand C, Fontvielle D, Bourdier G (2003) Nutritional quality of a freshwater heterotrophic dinofagellate: trophic upgrading of its microalgal diet for *Daphnia hyalina*. Aquatic Microbial Ecology 32 : 203–207.

Bec A, Martin-Creuzburg D, Elert EV (2010) Fatty acid composition of the Heterotrophic nanoflagellate *Paraphysomonas* sp.: influence of diet and de novo biosynthesis. Aquat Biol 9: 107–112.

Boëchat IG, Adrian R (2005) Biochemical composition of algivorous freshwater ciliates: You are not what you eat. FEMS Microbiology Ecology 53:393–400.

Broglio E, Jonasdottir SH, Calbet A, Jakobsen HH, Saiz E (2003) Effect of heterotrophic

versus autotrophic food on feeding and reproduction of the calanoid copepod *Acartia tonsa*: relationship with prey fatty acid composition. Aquatic Microbial Ecology 31:267–278

Brown MR (2002) Nutritional value of microalgae for aquculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

Brown, M., and Robert, R. 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquaculture 207: 289-309.

Cheng, S. H., Aoki, S., Maeda, M., and Hino, A. (2004) Competition between the rotifer *Brachionus rotundiformis* and the ciliate *Euplotes vannus* fed on two different algae. Aquaculture 241(26): 331-343.

Chu F-L E, Lund ED, Littreal P R, Ruck K E, Harvey E, Le Coz J-R, Marty Y, Moal J, Soudant, P. (2008) Sterol production and phytosterol bioconversion in two species of heterotrophic protists, *Oxyrrhis marina* and *Gyrodinium dominas*. Marine Biology. 156; 155–169.

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

Coutteau P (1996) MICRO-ALGAE . In: Lavens, P., and P. Sorgeloos (Eds). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper No. 361. Rome, FAO. 295p.

Côrtes, G.F., Tsuzuki, M.Y. and Melo, E.M.C. (2013) Monoculture of the ciliate protozoan *Euplotes* sp. (Ciliophora;Hypotrichia) fed with different diets. Acta Scientiarum Biological Sciences 35:15-19.

Ederington MC, McManus GB, Harvey HR (1995) Trophic transfer of fatty acids sterols, and triterpenoid alcohol between bacteria, a ciliate, and the copepod *Acartia tonsa*. Limnology and Oceanography 40 (5):860–867.

Foissner W, Berger H, Schaumburg J (1999) Identification and ecology of limnetic plankton ciliates. Informationsber. des Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft, Heft 3/99.

Han KM, Geurden I, Sorgeloos P (2000). Enrichment strategies for *Artemia* using

emulsions providing different levels of ω3 highly unsaturated fatty acids. Aquaculture 183: 335-347.

Hansen PJ, Moldrup M, Tarangkoon W, Garcia-Cuetos L, Moestrup Ø (2012) Direct evidence for symbiont sequestration in the marine red tide ciliate *Mesodinium rubrum*. Aquat Microb Ecol 66: 63-75

Harvey HR, Ederington MC, McManus GB. (1997) Lipid composition of the marine ciliates *Pleuronema* sp. and *Fabrea salina*: shifts in response to change diets. Journal of Eukaryotic Microbiology 44: 189-193.

Johansson M, Gorokhova E, Larsson U (2004) Annual variability in ciliate community structure, potential prey and predators in the open northern Baltic Sea proper. Journal of Plankton Research 26:67–80.

Klein Breteler WCM, Schogt N, Baas M, Schouten S, Kraay GW (1999) Trophic upgrading of food quality by protozoa enhancing copepod growth: role of essential lipids. Marine Biology 135:191–198.

Lubzens, E., O. Zmora (2003) Production and nutritional value of rotifers. In: Stottrup, J. G., L. A. McEvoy (Eds.), Live Feeds in Marine Aquaculture. Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford, pp. 17–64.

Madhu K, Madhu R. (2014) Captive spawning and embryonic development of marine ornamental purple firefish *Nemateleotris decora* (Randall & Allen, 1973). Aquaculture 424-425:1-9.

Mukai, Y., Sani, M.Z ., Mohammad-Noor, N ., Kadowaki, S (2016) Effective method to culture infusoria, a highly potential starter feed for marine finfish larvae. International Journal of Fisheries and Aquatic studies 4(3): 124-127.

Nagano N, Iwatsuki Y, Kamiyama T, Shimizu H, Nakata H (2000) Ciliated protozoans as food for first-feeding larval grouper, *Epinephelus septemfasciatus*: laboratory experiment. Plankton Biology & Ecology 47: 93–99

Nakagawa, Y., Ota, T., Endo, Taki K, Sugisaki H (2004) Importance of ciliates as prey of the euphausiid Euphausia pacifica in the NW North Pacific. Marine Ecology Progress Series 271: 261–266

Pettigrosso, RE (2003) Planktonic ciliates Choreotrichida and Strombidiidae from the inner zone of Bahía Blanca estuary, Argentina. Iheringia, série Zoologia, 93: 117-126

Putt M, Stoecker DK (1989) An experimentally determined carbon:volume ratio for marine ‘oligotrichous’ ciliates from estuarine and coastal waters. Limnology and Oceanography 34:1097–1103.

Rønnestad I., Thorsen A., and Finn R N. (1999) Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. Aquaculture 177:201–216.

Rønnestad, I., Tonheim, S.K., Fyhn, H.J., Rojas-García, C.R., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R.N., Terjesen, B.F., Barr, Y., Conceição, L.E.C. (2003) The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. Aquaculture 227: 147–164.

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

Sherr EB, Sherr BF (1993) Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists. p. 207-212, In: PF Kemp, BF Sherr, EB Sherr,JJ Cole (eds), Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology, Lewis Publ., NY.

Stoecker DK, Capuzzo JM (1990) Predation of protozoa: its importance to zooplankton. Journal of Plankton Research 12:891–90.

Stoecker DK, Silver MW, Michaels AE, Davis LH (1988) Obligate mixotrophy in *Laboea strobila*, a ciliate which retains chloroplasts. Marine Biology 99:415-423

Sul D, Kaneshiro ES, Jayasimhulu K, Erwin JA (2000) Neutral lipids, their fatty acids, and the sterols of the marine ciliated protozoon, *Parauronema acutum*. Journal Eukaryotic Microbiology 47:373–378.

Tang K, Taal M (2005) Trophic modiWcation of food quality by heterotrophic protests : species-specific effects on copepod egg production and egg hatching. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 318 :85–98.

Tarangkoon, W., and Hansen, P.J., 2011. Prey selection, ingestion and growth responses of the common marine ciliate *Mesodinium pulex* in the light and in the dark. Aquatic Microbial Ecology 62: 25–38.

Thimijan R W, Heins RD (1982) Photometric, Radiometric, and Quantum Light Units of Measure: A Review of Procedures for Interconversion. HortScience 18:818-822.

Turley, C.M., R.C. Newell and D.B. Robins (1986) Survival strategies of two small marine ciliates and their role in regulating bacterial community structure under experimental conditions. Marine Ecology Progress Series 33:59-70.

Veloza AJ, Chu F-E, Tang KW (2006) Trophic modiWcation of essential fatty acids by heterotrophic protists and its effects on the fatty acid composition of the copepod *Acartia tonsa*. Marine Biology 148:779–788

Yih W, Shim JH (1997) The planktonic phototrophic ciliate, *Mesodinium rubrum*, as a useful organism for marine biotechnological applications. Journal of Marine Biotechnology 5:82–85.

Zhukova NV and Kharlamenko VI (1999) Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. Aquatic Microbial Ecology 17:153–157.