ผลของอาหารต่างชนิดต่อการเติบโตและการผลิต Ecteinascidins ของเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891

นายชาตรี ชำนาญรักษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RECEIVED
BY 2916 DATE 25/8/51

T349003

ผลของอาหารต่างชนิดต่อการเติบโตและการผลิต Ecteinascidins ของเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891

นายชาตรี ชำนาญรักษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFEECTS OF DIFFERENT FOOD ON GROWTH AND ECTEINASCIDINS PRODUCTION OF THE TUNICATE *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891

Mr. Chatree Chumnanraksa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของอาหารต่างชนิดต่อการเติบโตและการผลิต Ecteinascidins ของเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891
โดย	นายชาตรี ชำนาญรักษา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชนา ชวนิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. วรณพ วิยกาญจน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจริญ นิติธรรมยง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชนา ชวนิชย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร. วรณพ วิยกาญจน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

ชาตรี ชำนาญรักษา ผลของอาหารต่างชนิดต่อการเติบโตและการผลิต Ecteinascidins ของเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 (EFFECTS OF DIFFERENT FOOD ON GROWTH AND ECTEINASCIDINS PRODUCTION OF THE TUNICATE *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891) อ.ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. สุชนา ชวนิชย์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: อ. ดร. วรณพ วิยกาญจน์, 67 หน้า.

เพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 ซึ่งพบเฉพาะบริเวณเกาะภูเก็ต จัดเป็นเพรียงหัวหอมชนิดแรกในทวีปเอเชียที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม Ecteinascidins (ET) ซึ่งสารชนิดดังกล่าวสามารถเปลี่ยนเป็นสาร Ecteinascidin 743 (ET 743) ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ ในการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอมนั้น "อาหาร" จัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญอย่างยิ่งที่สามารถส่งผลต่อการเติบโตและการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามพบว่า ยังไม่มีการศึกษาชนิดของอาหารที่สามารถส่งผลดังกล่าวได้ การศึกษาครั้งนี้จึงทำการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยงโดยให้อาหารที่เป็นแพลงก์ตอนพืช 3 ชนิดได้แก่ 1) *Chaetoceros gracilis* (CG) 2) *Isochrysis galbana* (IG) และ 3) *Nannochloropsis* sp. (NA) โดยให้แบบชนิดเดียวและแบบผสม เปรียบเทียบกับอาหารเม็ดสำเร็จรูป (DP) โดยมีชุดที่ไม่ให้อาหารเป็นชุดควบคุม (CTRL) กำหนดการเลี้ยงและเก็บข้อมูล 9 สัปดาห์ เพื่อศึกษาการเติบโตและหาปริมาณสาร ET ภายหลังการเลี้ยง ผลการศึกษาพบว่าจำนวนซูออยด์เฉลี่ยต่อโคโลนี ความยาวซูออยด์เฉลี่ยต่อโคโลนี และพื้นที่การปกคลุมโคโลนีเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างเพรียงหัวหอมที่ให้อาหารที่แตกต่างกัน แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเพรียงหัวหอมได้รับอาหารแบบผสม เพรียงหัวหอมที่ได้รับ CG เป็นอาหารมีจำนวนซูออยด์เฉลี่ย ความยาวซูออยด์เฉลี่ย และพื้นที่ปกคลุมเฉลี่ยสูงสุด ที่ 40.67 ซูออยด์, 5.28 มิลลิเมตร และ 6.66 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ทั้งนี้เพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารผสมระหว่าง CG และ NA มีจำนวนซูออยด์เฉลี่ยและความยาวซูออยด์เฉลี่ยสูงสุด ที่ 7.24 ซูออยด์ และ 3.59 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่เพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารผสมระหว่าง CG และ IG มีพื้นที่ปกคลุมโคโลนีเฉลี่ยสูงสุด ที่ 1.63 เปอร์เซนต์ อนึ่งพบ ET 770 ปริมาณสูงในเพรียงหัวหอมที่ให้ CG กับ CG และ IG (3.43 และ 4.53 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของเพรียงหัวหอม) ตามลำดับ ขณะที่พบสาร ET 770 ปริมาณต่ำในเพรียงหัวหอมที่ได้รับ NA กับ CG และ NA เป็นอาหาร (0.68 และ 0.63 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของเพรียงหัวหอม) ตามลำดับ ผลการศึกษาสรุปได้ว่าเพรียงหัวหอมที่ได้รับ CG เป็นอาหารเพียงชนิดเดียวและเพรียงหัวหอมที่ได้รับ CG และ IG เป็นอาหารผสม มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในระบบเพาะเลี้ยงให้มีการเติบโตที่ดีและมีปริมาณเพียงพอในการนำไปสกัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านโรคมะเร็ง

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4772273623: MAJOR BIOTEHCNOLOGY

KEYWORD: TUNICATE/ *Ecteinascidia thurstoni* / AQUACULTURE/ DIFFERENT FOOD

CHATREE CHUMNANRAKSA: EFFECTS OF DIFFERENT FOOD ON GROWTH AND ECTEINASCIDINS PRODUCTION OF THE TUNICATE *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. SUCHANA CHAVANICH, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: VORANOP VIYAKARN, Ph.D., 67 pp.

Thai tunicate, *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891. found only at Phuket Island is the first Asian tunicate contained ecteinascidins. Food is a important factor of the ascidian culture. In vitro culture of the ascidian *E. thurstoni* is one possible method for supplying ecteinascidins for phamarceutical application. However, the appropriate diets that can maximize both growth and ecteinascidins productions are unknown. In this study, *E. thurstoni* were fed either single of each type of diet or combination of two diets; *C. gracilis* (CG). *I. galbana* (IG), *Nannochloropsis* sp. (NA) or formulated shrimp feed (DP). The experiments were conducted for nine weeks of *E. thurstoni* and then zooids from each treatment were collected for ecteinascidins analysis. The results show that there were significant differences in average number of zooids, length of zooids and percent covers of zooids at single diet, while combination of two diets were no significant differences. In single diet, average highest numbers of zooids, length of zooids and percent covers of zooids were found at 40.67 zooids, 5.28 mm and 6.66 % of CG. In combination of two diets, average highest numbers of zooids and length of zooids were found at 7.24 zooids and 3.59 mm of combination diet between CG and NA, while average highest percent covers of zooids was detected at 1.63% of combination diet between CG and IG. A high concentration of ET 770 (3.43 and 4.53 mg per 100 g of tunicate dry weight) were found at single diet of CG and combination diet between CG and IG respectively, while a low concentration of ET 770 (0.68 and 0.63 mg per 100 g of tunicate dry weight) were found at single diet of NA and combination diet between CG and NA respectively. Overall, this study suggests that a single diet of CG and a combination diet between CG and IG are a good feeding diet for the in vitro culture of *E. thurstoni* to supply ecteinascidins.

Field Study Biotechnology Student's signature chatree chumnanraksa

Academic year 2007 Advisor's signature

Co- Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชนา ชวนิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. วรณพ วิยกาญจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจริญ นิติธรรมยง ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล กรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาปรับปรุงแก้ไขตลอดจนเสนอแนะข้อคิดเห็นต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์ ภาควิชาเภสัชเวท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ ขอขอบคุณคุณชุติมา เพชรประยูร และคุณสุภาพร บุญศิริลักษณ์ ที่คอยแนะนำช่วยเหลือในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ วิชญา กันบัว ที่คอยแนะช่วยเหลือการใช้เครื่องมือ HPLC อาจารย์ อุดมศักดิ์ ดรุมาศ คุณปิยะ โกยสิน คุณจิตติมา อุ้มอารีย์ ตลอดจนพี่ เพื่อน และน้องๆ ร่วมอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ช่วยเหลือ แนะนำ และให้กำลังใจ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_349003 และ ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2548

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ขอบคุณน้า ป้า สำหรับกำลังใจและกำลังทรัพย์ที่มีให้ตลอดมา ทำให้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญรูป.....ฎ

บทที่

1. บทนำ.....1

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 ลักษณะโดยทั่วไปและนิเวศวิทยาของเพรียงหัวหอม.....3

2.2 ระบบสืบพันธุ์และพฤติกรรมตัวอ่อนของเพรียงหัวหอม.....6

2.3 สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเพรียงหัวหอม.....9

2.4 การเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม.....10

2.5 เพรียงหัวหอม *E. thurstoni*.....14

3. วิธีดำเนินการวิจัย.....15

3.1 สัตว์ทดลอง สถานที่วิจัย และระบบเพาะเลี้ยง.....15

3.1.1 สัตว์ทดลองและสถานที่วิจัย.....15

3.1.2 ระบบเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E thurstoni*.....15

3.2 ขั้นตอนการทดลอง รวบรวม และวิเคราะห์ข้อมูล.....16

3.2.1 การเตรียมเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* สำหรับทำการเพาะเลี้ยง.....16

3.2.2 ชนิดของอาหารและขั้นตอนการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง.....17

3.2.3 ขั้นตอนการทดลอง.....17

หน้า

3.2.3.1 การศึกษาผลของอาหารต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบชนิดเดียว.....17

3.2.3.2 การศึกษาผลของอาหารต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบผสม.....18

3.2.3.3 การเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างชุดทดลองกับชุดควบคุม.....18

3.2.3.4 การศึกษาผลของอาหารแบบชนิดเดียวและแบบผสมต่อการผลิตสาร Ecteinascidins จากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*.....18

3.2.4. การเก็บข้อมูลการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*.....18

3.2.5 วิธีการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสาร ET 770 จากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*.....19

3.2.5.1 วิธีการสกัดแยกสาร ET 770 จากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*.....19

3.2.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร ET 770 โดยวิธี High Perfomance Liquid Chormatography (HPLC).....20

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....20

4. ผลการศึกษา.....21

4.1 ผลของอาหารต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบชนิดเดียว.....21

4.1.1 การเติบโตของเพรียงหัวหอม*E. thurstoni* ในเชิงจำนวนซูออยด์.....21

4.1.2 การเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในเชิงความยาวซูออยด์.....23

4.1.3 การเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในเชิงพื้นที่ปกคลุมของโคโลนี.....25

หน้า

4.2 ผลของอาหารต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบผสม.....27
4.2.1 การเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในเชิงจำนวนซูออยด์.....27
4.2.2 การเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในเชิงความยาวซูออยด์.....29
4.2.3 การเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในเชิงพื้นที่ปกคลุมของโคโลนี.....31
4.3 การเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างชุดทดลองกับชุดควบคุม.....33
4.3.1 จำนวนซูออยด์.....33
4.3.2 ความยาวซูออยด์.....34
4.3.3 พื้นที่ปกคลุมโคโลนี.....35
4.4 ผลของอาหารแบบชนิดเดียวและแบบผสมต่อการผลิตสาร Ecteinascidins จากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* 36
5. วิจารณ์ สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ.....38
5.1 ผลของอาหารต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบชนิดเดียว.....38
5.2 ผลของอาหารต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบผสม.....39
5.3 การเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างชุดการทดลองกับชุดควบคุม ด้านจำนวนซูออยด์ ความยาวซูออยด์ และพื้นที่ปกคลุมโคโลนี.....39
5.4 ผลของอาหารแบบชนิดเดียวและแบบผสมต่อการผลิตสาร Ecteinascidins จากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* 40
สรุปผลการศึกษา.....42
ข้อเสนอแนะ.....43

หน้า

รายการอ้างอิง.....44

ภาคผนวก.....52

ภาคผนวก ก. การเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบชนิดเดียว.....49

ภาคผนวก ข. การเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบผสม.....58

ภาคผนวก ค. การเตรียมสารเคมีเพื่อการวิเคราะห์สารกลุ่ม Ecteinascidins.....63

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....67

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2-1 ลักษณะโดยทั่วไปของเพรียงหัวหอม....4

2-2 ตัวอ่อนเพรียงหัวหอม *Diplosoma maccaldonaldi*....8

2-3 โครงสร้างโดยทั่วไปของตัวอ่อนเพรียงหัวหอม....8

2-4 การพัฒนารูปร่างของตัวอ่อนเพรียงหัวหอม....8

2-5 โครงสร้าง Ecteinascidins 743 (ET 743)....10

2-6 เพรียงหัวหอม *E. turbinata*....11

2-7 ระบบเพาะเลี้ยงแบบถังคู่ เพื่อการลงเกาะของตัวอ่อนของเพรียงหัวหอม บนเส้นเชือกสำหรับนำไปเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงหรือในทะเล....12

2-8 โครงสร้างที่สร้างจากท่อพีวีซี สำหรับการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอมในทะเล....12

2-9 การเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. turbinata* บนตาข่ายไนล่อน 3 x 6 ตารางเซนติเมตร....13

2-10 เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ตามธรรมชาติ....14

3-1 โรงเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม....15

3-2 ตีกรอบสี่เหลี่ยจตุรัสขนาด 10 X 10 ตารางเซนติเมตร บนแผ่นกระเบื้องล้อมรอบโคโลนีของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*....16

3-3 เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ถูกแขวนไว้ในถังเพาะเลี้ยง....16

4-1 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนซูออยด์เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์....22

4-2 จำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์....22

4-3 การเปลี่ยนแปลงของความยาวซูออยด์เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์....24

4-4 ความยาวซูออยด์โดยเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์....24

รูปที่ หน้า

4-5 การเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ปกคลุมโคโลนีเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์.....26

4-6 พื้นที่ปกคลุมโคโลนีโดยเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์.....26

4-7 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนซูออยด์เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์.....28

4-8 จำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์.....28

4-9 การเปลี่ยนแปลงของความยาวซูออยด์เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์.....30

4-10 ความยาวซูออยด์โดยเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์.....30

4-11 การเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ปกคลุมโคโลนีเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์.....32

4-12 พื้นที่ปกคลุมโคโลนีโดยเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์.....32

4-13 สัดส่วนของจำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองกับชุดควบคุม.....33

4-14 สัดส่วนของความยาวซูออยด์โดยเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองกับชุดควบคุม.....34

4-15 สัดส่วนของพื้นที่ปกคลุมโคโลนีโดยเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองกับชุดควบคุม.....35

4-16 ปริมาณสาร ET 770 ที่สกัดจากเพรียงหัว*หอม E. thurstoni* ทั้งจากธรรมชาติ และระบบเพาะเลี้ยงเทียบกับน้ำหนักแห้งของเพรียงหัวหอม.....37

4-17 ปริมาณสาร ET 770 ที่สกัดจากเพรียงหัว*หอม E. thurstoni* ทั้งจากธรรมชาติ และระบบเพาะเลี้ยงเทียบกับน้ำหนักเปียกของเพรียงหัวหอม 37

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ทะเลจัดเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญสำหรับมนุษย์ นอกจากนี้ทะเลยังจัดเป็นแหล่งที่มีความสำคัญในด้านการศึกษาและค้นคว้าการวิจัยสำหรับนักวิทยาศาสตร์ เนื่องด้วยสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเลหลายชนิด มีความสามารถในการสร้างสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยส่วนใหญ่เนื่องมาจากความจำเป็นในการดำรงชีวิตหรือในภาวะที่แข่งขัน เพื่อช่วยเหลือตัวเองในด้านต่างๆ เช่น หาอาหาร ที่อยู่อาศัย หรือความปลอดภัย สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถจำแนกตามแหล่งที่มาของสารจากสิ่งมีชีวิตใต้ทะเลได้ 2 แบบ คือ มาจากสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ (macroorganisms) เช่น ฟองน้ำทะเล (sponges) เพรียงหัวหอม (ascidians หรือ tunicates) ดอกไม้ทะเล (sea anemones) ปะการัง (corals) ดาวทะเล (sea stars) สาหร่ายขนาดใหญ่ (macroalgae) เป็นต้น ในขณะที่อีกส่วนหนึ่งมาจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (microorganisms) เช่น แบคทีเรีย (bacteria) รา (fungi) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green microalgae) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้สามารถนำมาใช้ทำเป็นยารักษาโรคต่างๆ ได้เช่น ยาต้านโรคเอดส์ ยารักษาโรคมะเร็ง ยาแก้อักเสบ ยาแก้ปวด ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น

เพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 เป็นสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังที่อาศัยบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลงของชายฝั่งทะเลอันดามัน เพรียงหัวหอมชนิดนี้สามารถนำมาสกัดสารเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม Ecteinascidins (ET) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นสาร Ecteinascidin 743 (ET 743) ที่สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ อย่างไรก็ตามพบว่า ปริมาณสารในกลุ่ม ET ที่สกัดจากเพรียงหัวหอมมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการนำไปสกัดให้ได้สาร ET 743 ทั้งในการวิจัยและการค้าในระดับอุตสาหกรรม การนำเพรียงหัวหอมจากธรรมชาติเป็นจำนวนมากมาใช้ โดยไม่มีการทดแทนสู่ธรรมชาติอาจส่งผลให้เพรียงหัวหอมชนิดนี้มีปริมาณลดลงและสูญพันธุ์ได้ในที่สุด ทั้งนี้เนื่องด้วยสาร ET 743 มีโครงสร้างที่ซับซ้อน ทำให้การสังเคราะห์สาร ET 743 ในห้องปฏิบัติการค่อนข้างยากและใช้ต้นทุนการผลิตสูง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ให้ได้ปริมาณที่เพียงพอจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้

การเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอมเชิงอุตสาหกรรมให้ประสบความสำเร็จนั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพที่ส่งผลต่อการเติบโต รวมถึงปริมาณการผลิตสารที่ออก

ฤทธิ์ทางชีวภาพของเพรียงหัวหอมเป็นอันดับสำคัญ ซึ่ง "อาหาร" จัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญอย่างยิ่งในการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม อย่างไรก็ตามพบว่ายังไม่มีการศึกษาชนิดของอาหารที่ส่งผลต่อการเติบโตและการผลิตสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของเพรียงหัวหอมดังกล่าวในปัจจุบัน การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของชนิดอาหารที่ส่งผลต่อการเติบโตและการสร้างสารในกลุ่ม Ecteinascidins ของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ให้มีปริมาณสูงสุด ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอมชนิดนี้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของอาหารต่างชนิดที่มีต่อการเติบโตและการผลิต Ecteinascidins ของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*

ขอบเขตการวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยง โดยการให้อาหารต่างชนิดทั้งแบบที่ให้เพียงชนิดเดียวและแบบที่ให้เป็นอาหารผสม เก็บข้อมูลการเติบโตของเพรียงหัวหอมในด้านจำนวนซูออยด์ ความยาวของซูออยด์ และพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* รวมถึงทำการตรวจวัดปริมาณสารในกลุ่ม Ecteinascidins ที่สะสมในเพรียงหัวหอมภายหลังสิ้นสุดการทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ด้วยอาหารที่มีประสิทธิภาพในการนำมาสกัดสารกลุ่ม Ecteinascidins

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะโดยทั่วไปและนิเวศวิทยาของเพรียงหัวหอม

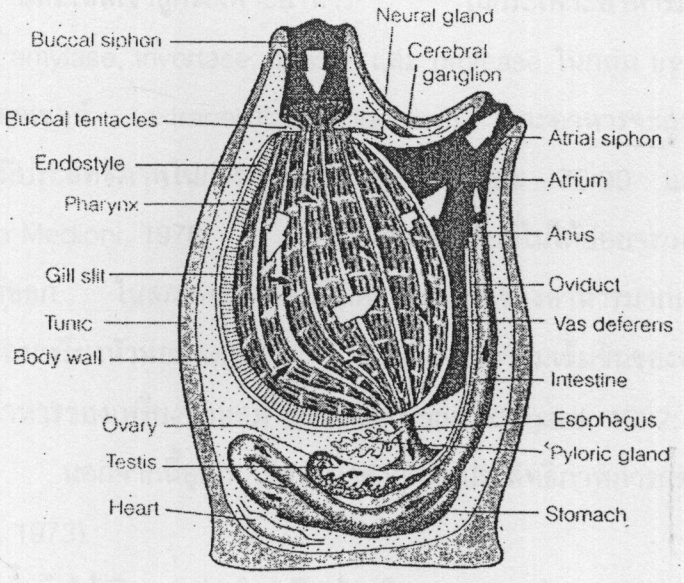
เพรียงหัวหอมเป็นสัตว์ทะเลในกลุ่มโปรโตคอร์เดต (protochordates) ซึ่งเป็นสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังที่มีโนโตคอร์ด (notochord) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญของสัตว์มีกระดูกสันหลังในระยะตัวอ่อนอยู่ส่วนท้ายของลำตัว นอกจากนั้นยังมีไขสันหลัง (dorsal nerve chord) และมีช่องเหงือก (gill slits) เหมือนสัตว์มีกระดูกสันหลังเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อโตเต็มวัยแล้วทั้งโนโตคอร์ดและไขสันหลังจะหายไปคงเหลือแค่เพียงช่องเหงือก (Ruppert and Barnes, 1994)

เพรียงหัวหอมจัดอยู่ใน Subphylum Urochordata (Tunicata) Class Ascidiacea ซึ่งประกอบด้วยจำนวนสมาชิกประมาณ 2300 สปีชีส์ เพรียงหัวหอมมีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น tunicate, ascidians หรือ sea squirt การที่เรียกเพรียงหัวหอมว่า "tunicate" เนื่องจากสัตว์ในกลุ่มนี้มีถุงเยื่อห่อหุ้มสำหรับปกป้องร่างกายเรียกว่า "tunic" (Satoh, 1994) ทูนิคส่วนใหญ่มีลักษณะอ่อนนุ่มมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นสารคล้ายเซลลูโลส (cellulose) ที่เรียกว่าสารทูนิซิน (tunicin) และมีส่วนประกอบร่วมเป็นเกลือและโปรตีนบางชนิด (Monniot and Monniot, 2001) โดยสารทูนิซินถูกสร้างจาก epidermis cell (Kimura, 1996) ทูนิคส่วนที่ใช้ยึดเกาะมีลักษณะขรุขระหรือเป็นตุ่มและมีแขนงยื่นออกไปเป็นสโตลอน (stolon) (Satoh, 1994)

เพรียงหัวหอมเป็นสัตว์ทะเลที่พบดำรงชีวิตอยู่ในทะเลแทบทุกแห่ง ทั้งบริเวณชายฝั่งทะเลและทะเลลึก โดยส่วนใหญ่อาศัยบริเวณน้ำตื้นและดำรงชีวิตอยู่ในทะเลที่มีความเค็มมากกว่า 25 ส่วนในพันส่วน (Lambert, 2005) และมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่สูงซึ่งทำให้มีการกระจายตัวอย่างรวดเร็ว (Nomaguchi *et al.*, 1997) เพรียงหัวหอมเป็นสัตว์จำพวกยึดเกาะ (sessile animals) ตัวเต็มวัยจะยึดติดกับพื้นผิวตามธรรมชาติรวมถึงที่มนุษย์สร้างขึ้น ทั้งหิน รากต้นไม้ เปลือกหอย แนวปะการัง ใต้ท้องเรือ หรือเสาบริเวณท่าเทียบเรือ (Ruppert and Fox, 1988; Newman *et al.*, 2000) ร่มเงาเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเติบโตของสัตว์จำพวกยึดติด เช่น ฟองน้ำและเพรียงหัวหอม (Wilkinson and Vacelet, 1979) เนื่องมาจากร่มเงาทำหน้าที่บดบังแสงที่มีผลต่อสัตว์เหล่านั้น แสงมีความสัมพันธ์กับความลึก โดยที่บริเวณน้ำลึกปริมาณแสงจะลดน้อยลง ซึ่งส่งผลต่อพื้นที่การปกคลุมและการกระจายตัวของสัตว์จำพวกยึดติดดังกล่าว โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของแสงต่ำพื้นที่การปกคลุมของสัตว์ยึดติดจะมากขึ้น (Klugh and Martin, 1927; Glasby, 2000)

การดำรงชีวิตของเพรียงหัวหอมมีทั้งดำรงชีวิตแบบตัวเดี่ยว (solitary) เช่นเดียวกับการหรืออยู่ด้วยกันเป็นโคโลนี (colony) หรือแบบกลุ่ม (compound) โดยที่เพรียงหัวหอมแต่ละตัวเรียกว่าซูออยด์ (zooid) (Lambert, 2001) เพรียงหัวหอมที่ดำรงชีวิตแบบตัวเดี่ยวและแบบโคโลนีจะมีเยื่อหุ้มทูนิคของตัวเองทุกตัว ส่วนเพรียงหัวหอมที่ดำรงชีวิตแบบกลุ่มจะมีหลายซูออยด์รวมอยู่ในเยื่อหุ้มร่วมเดียวกัน (Brusca and Brusca, 1990)

เพรียงหัวหอมมีลักษณะเป็นตัวกลมหรือยาวคล้ายถังเหล้าองุ่น (barrel-shaped) ส่วนใหญ่มีลำตัวใส มีส่วนฐานยึดเกาะกับหินหรือของแข็ง โดยร่างกายของเพรียงหัวหอมสามารถแบ่งได้ 3 ส่วน ส่วนแรกส่วนที่เป็นอก (thorax) คือ บริเวณคอหอย ส่วนที่สองบริเวณท้อง (abdomen) คือ บริเวณลำไส้ กระเพาะอาหาร และอวัยวะภายใน และส่วนท้องด้านท้าย (postabdomen) ซึ่งประกอบด้วยหัวใจและอวัยวะสืบพันธุ์ (Monniot *et al.*, 1991) ลำตัวด้านบนจะมีท่อยื่นออกมา 2 ท่อ คือ ท่อน้ำเข้า(buccal siphon) มีช่องปาก (buccal cavity) อยู่ภายในโดยจัดเป็นด้านหน้า (anterior) และท่อน้ำออก (atrial siphon) เป็นท่อที่นำน้ำจากช่องรอบคอหอยที่เรียกว่า “atrium” ออกสู่ภายนอกร่างกายโดยจัดเป็นลำตัว (dorsal) (รูปที่ 2-1) เพรียงหัวหอมที่อาศัยอยู่เป็นโคโลนีจะมีแขนงแยกออกจากฐานของลำตัวแผ่ออกโดยรอบ เรียกว่า สโตลอน (stolon) ซึ่งเป็นที่ที่จะแตกแขนงเป็นซูออยด์ใหม่ สโตลอนทำให้เพรียงหัวหอมรวมอยู่ด้วยกันเป็นกระจุก โดยแต่ละตัวมีท่อน้ำเข้าและท่อน้ำออกเป็นของตัวเอง สำหรับเพรียงหัวหอมที่อาศัยอยู่เป็นกลุ่มแต่ละตัวจะมีท่อน้ำเข้าเป็นของตัวเองแต่ท่อน้ำออกเป็นท่อน้ำออกร่วมกัน
(Young, 1962)



รูปที่ 2-1. ลักษณะโดยทั่วไปของเพรียงหัวหอม (ที่มา: Ruppert *et al.*, 2004)

ผนังลำตัวของเพรียงหัวหอมเรียกว่า "แมนเติล" (mantle) ซึ่งประกอบด้วยเยื่อบุผิว (epidermis) ซึ่งเป็นเยื่อที่สร้างทูนิคและเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ซึ่งเป็นชั้นที่หนาและมีส่วนของกล้ามเนื้อเรียงตัวในทิศทางต่างๆ โดยบริเวณท่อน้ำเข้าและออกมีกล้ามเนื้อหูรูด (sphincter muscle) ที่แข็งแรงสำหรับควบคุมการเปิดปิดของท่อน้ำเข้าและท่อน้ำออก เพรียงหัวหอมกินอาหารโดยการกรอง (filter feeder) แบบไม่เลือกชนิดอาหารที่กิน (non-selective feeder) (Jorgensen, 1955) อาหารของเพรียงหัวหอมส่วนใหญ่เป็นแพลงก์ตอนขนาดเล็ก ไดอะตอม และสาหร่ายขนาดเล็ก เป็นต้น รวมถึงแร่ธาตุต่างๆที่อยู่ภายในน้ำ เมื่อน้ำนำอาหารผ่านเข้ามาทางช่องน้ำเข้าบริเวณช่องปากจะมีหนวด (tentacles) อยู่รอบช่องปากเพื่อป้องกันไม่ให้วัตถุขนาดใหญ่หลุดเข้าไปภายในช่องปาก (Hecht, 1918; Goodbody, 1974) โดยอาหารที่ผ่านเข้าสู่ช่องปากได้มีขนาดประมาณ 1-50 μm จากนั้นอาหารจากช่องปากจะเข้าสู่คอหอย (pharynx) ซึ่งจัดเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดของเพรียงหัวหอม และมีขนาดที่แตกต่างกันตามชนิดของเพรียงหัวหอม (Kott, 1989; Monniot *et al.*, 1991) คอหอยมีลักษณะเป็นทรงกระบอกโดยที่ผนังของคอหอยมีช่องเปิดเป็นรอยขีดจำนวนมากและมีการเรียงตัวอย่างเป็นระบบ ซึ่งเรียกช่องเหล่านี้ว่า "ช่องเหงือก" (gill slits หรือ stigmata) โดยบริเวณช่องเหงือกมีซิเลีย (cilia) บุอยู่ โดยซิเลียทำให้เกิดการหมุนเวียนของกระแสน้ำจากคอหอยเข้าสู่ช่องลำตัว (atrium) ผ่านทางช่องเหงือก (McGinitie, 1939) เมื่อน้ำผ่านเข้าสู่ช่องลำตัวและถูกขับออกภายนอกร่างกายโดยท่อน้ำออก โดยอาหารถูกกักไว้บริเวณด้านในของช่องเหงือกและมีแผ่นเมือกที่สร้างจากเอนโดสไตล์ (endostyle) ที่อยู่ในคอหอยคอยดักจับอาหาร แผ่นเมือกมีความสามารถในการดักจับอาหารได้ร้อยละ 90-98 (Flood and Fiala-Medioni, 1981) แผ่นเมือกจะพาอาหารจากคอหอยลงสู่หลอดอาหาร (esophagus) ที่เป็นรูปตัวยู (U-shaped) และไหลเข้าสู่กระเพาะอาหาร ในกระเพาะอาหารมีเอมไซม์ต่างๆ สำหรับย่อยอาหาร เช่น amylase, invertase, lipases และ protease ในกลุ่ม tryptic เพรียงหัวหอมมีการย่อยอาหารนอกเซลล์ (extracellular digestion) และอาหารจะถูกดูดซึมที่ลำไส้ โดยทั่วไปเพรียงหัวหอมมีประสิทธิภาพในการดูดซึมอาหารอยู่ที่ร้อยละ 70-90 แล้วแต่ชนิดของเพรียงหัวหอม (Fiala-Medioni, 1978) สำหรับของเสียที่ไม่ได้ย่อยจะวกกลับไปเปิดที่ทวารหนักซึ่งอยู่ใต้ท่อน้ำออก ในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของอาหารมากเกินไปจะทำให้ประสิทธิภาพการกรองของเพรียงหัวหอมลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของอาหารมีผลต่อประสิทธิภาพการกรองอาหารของเพรียงหัวหอม (Petersen and Riisgard, 1992; Petersen *et al.*, 1995, 1999) นอกจากนี้อุณหภูมิของน้ำส่งผลต่อประสิทธิภาพการกรองอาหารของเพรียงหัวหอม (Holmes, 1973)

ระบบหมุนเวียนน้ำทำให้เกิดการประโยชน์ในด้านโภชนาการ ด้านการขับถ่าย ด้านการผสมพันธุ์ และด้านการหายใจ เพรียงหัวหอมมีหัวใจเป็นท่อสั้นอยู่บริเวณใต้หลอดอาหาร เลือดของ

เพรียงหัวหอมไม่มีสีและไม่มีรงควัตถุในการหายใจ จากหัวใจมีท่อเลือด (blood channel) เข้าสู่ผนังของคอหอย เมื่อน้ำเข้ามาในคอหอยจะมีการแลกเปลี่ยนก๊าซที่อยู่ในน้ำกับท่อเลือดเหล่านี้ จากนั้นจะมีเส้นเลือดที่ต่อจากคอหอยแตกแขนงเข้าไปสู่อวัยวะภายใน เพื่อทำการแลกเปลี่ยนก๊าซ ของเสียส่วนใหญ่ของเพรียงหัวหอมประมาณร้อยละ 90 เป็นแอมโมเนีย โดยถูกกำจัดสู่ภายนอกร่างกายโดยคอหอย ทูนิค หรือทางอวัยวะต่างๆ (Ruppert *et al.*, 2004)

เพรียงหัวหอมมีปมประสาทสมอง (cerebral ganglian) อยู่ระหว่างท่อน้ำเข้าและท่อน้ำออก จากปมประสาทนี้จะมีเส้นประสาทไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย เพรียงหัวหอมไม่มีอวัยวะรับความรู้สึกโดยเฉพาะแต่มีเซลล์รับความรู้สึก (receptor cells) อยู่มากมายบริเวณท่อน้ำบริเวณท่อน้ำเข้าและท่อน้ำออกบริเวณใต้ปมประสาทสมองมีต่อมประสาท (neural gland) ไว้รับสัมผัส วัดกระแสน้ำ นอกจากนี้ยังใช้ในการควบคุมการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยเมื่อรับสัมผัสว่าภายในน้ำมีไข่หรือเสปิร์มของเพรียงหัวหอมในชนิดเดียวกัน ก็จะทำการปล่อยไข่หรือเสปิร์มออกไปปฏิสนธิ (Thorson, 1964)

เพรียงหัวหอมมีความไวต่อความเข้มแสง โดยจุดที่ไวต่อแสงมากที่สุดคือบริเวณปมประสาท โดยบริเวณปมประสาทมีเซลล์ ocelli ซึ่งมีรูปร่างเหมือนถ้วยสีส้มอยู่ระหว่างท่อน้ำเข้าและท่อน้ำออก ซึ่งตอบสนองต่อแสง แรงโน้มถ่วง สัมผัส และสารเคมีทำให้เกิดการจัดเรียงของร่างกาย การเคลื่อนไหว การหลบหลีกผู้ล่ารวมถึงการหาพื้นที่ลงเกาะของตัวอ่อน (Thorson, 1964; Burke, 1983)

การเคลื่อนที่ของเพรียงหัวหอม เกิดจากการหดตัวของกล้ามเนื้อต่างๆ ในชั้นแมนเทิล (Day, 1919) หากได้รับการกระตุ้นอย่างรุนแรงทำให้คอหอยและช่องท้องบีบตัวทำให้เพรียงหัวหอมฉีดน้ำออกมาจากร่างกาย

2.2 ระบบสืบพันธุ์และพฤติกรรรมตัวอ่อนของเพรียงหัวหอม

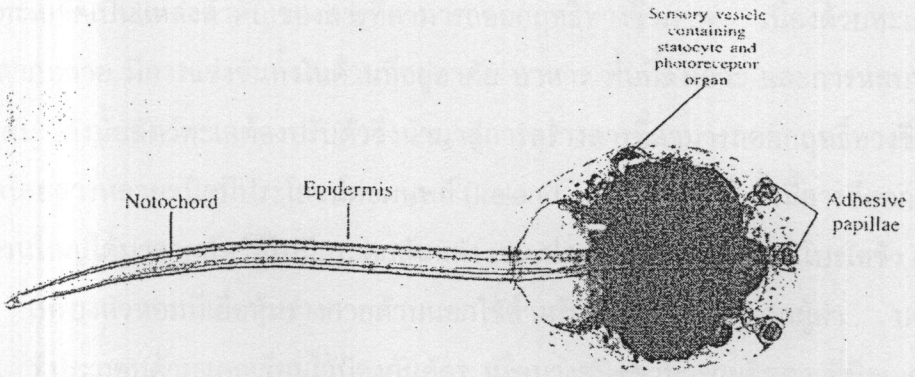
เพรียงหัวหอมมีเพศรวม (hermaphordite) โดยที่รังไข่ (ovary) และอัณฑะ (testis) อยู่ภายในตัวเดียวกันและมีลักษณะเป็นถุงอยู่บริเวณกระเพาะอาหาร ท่อนำไข่และท่อน้ำเสปิร์มเป็นท่อขนานร่วมกันไปเปิดที่ท่อน้ำออก กระบวนการควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) การฟักตัวอ่อน และการปล่อยไข่ ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ช่วงเวลาของวันและอุณหภูมิของน้ำทะเล (Lambert *et al.*, 1981; Svane and Young, 1989; Bingham, 1997)

เพรียงหัวหอมที่ดำรงชีวิตแบบตัวเดี่ยวส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ที่มีการปฏิสนธิภายนอกร่างกายและสร้างไข่ที่มีไข่แดงน้อย ส่วนเพรียงหัวหอมที่ดำรงชีวิตแบบโคโลนีมีทั้งการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ มีการปฏิสนธิภายในลำตัวและสร้างไข่ที่มีไข่แดงมาก โดยไข่จะถูกฝักภายในช่องลำตัวและแบบไม่อาศัยเพศซึ่งเป็นการแตกหน่อ (budding) ทั้งนี้เพรียงหัวหอมที่อาศัย

อยู่เป็นโคโลนีต้องมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศอย่างน้อยหนึ่งครั้งในช่วงชีวิต (Satoh, 1994) ตัวอ่อนจะออกจากไข่โดยการกระตุ้นด้วยแสงหลังจากมีการปฏิสนธิประมาณ 12 ชั่วโมงจนถึง 2-3 วัน แล้วแต่ชนิดของเพรียงหัวหอม สำหรับการออกมาของตัวอ่อนสามารถเกิดได้จาการแรงขับจากตัวพ่อแม่หรือการว่ายออกมาเองของตัวอ่อน โดยระยะเวลาการกระตุ้นโดยแสงเพื่อให้ตัวอ่อนออกมาขึ้นอยู่กับแต่ละชนิดของเพรียงหัวหอม (Svane and Young, 1989) ตัวอ่อนจะมีอวัยวะรับแสง ที่เรียกว่า photolith ซึ่งประกอบด้วย statocyte และ ocellus (Berrill, 1947; Torrence, 1980)

ลักษณะและโครงสร้างโดยทั่วไปของตัวอ่อนของเพรียงหัวหอม (tadpole larvae) แสดงในรูปที่ 2-2 และรูปที่ 2-3 ส่วนหัวของตัวอ่อนมีลักษณะที่ใหญ่ ความยาวประมาณ 1.4 มิลลิเมตร (Vazquez and Young, 1996) โดยเป็นความยาวของหางประมาณ 750 μm และความกว้างของลำตัวประมาณ 120-125 μm และมีโนโตคอร์ดอยู่บริเวณหาง (Berrill, 1955) เพรียงหัวหอมในระยะตัวอ่อนไม่กินอาหารและไม่มีการพัฒนาของลำไส้ (Lambert, 2005) คอหอยยังเป็นแถวเดี่ยวและเส้นตรงและในระยะนี้มีการว่ายน้ำโดยอิสระ (free-swimming) โดยใช้หาง สามารถเคลื่อนที่ด้วยความเร็วประมาณ 3 เซนติเมตร/วินาที หลังจากนั้นตัวอ่อนของเพรียงหัวหอมจะลงเกาะบนพื้นผิวภายใน 24 ชั่วโมง (Svane, 1984) โดยลงเกาะในบริเวณที่เหมาะสม ไม่มีแสงสว่างมากและชอบเกาะลงบนวัตถุแข็งมากว่าวัตถุที่อ่อน (Svane and Young, 1989) ตัวอ่อนทำการลงเกาะโดยใช้ sucker บริเวณปากยึดติดกับพื้นผิว จากนั้นส่วนหางที่มีในระยะตัวอ่อนจะหายไปและมีพัฒนาการของคอหอยกลายเป็นตัวเต็มวัยต่อไป (รูปที่ 2-4) ทั้งนี้ตัวอ่อนบางชนิดจะลงเกาะรวมกันเป็นกลุ่มใหญ่ เพื่อให้สะดวกต่อการปฏิสนธิภายในตัวเดียวกัน (self-fertilizezation) (Young and Braithwaite, 1980) หรือทำการลงเกาะซ้ำลงหรือไปเกาะในบริเวณอื่นแทน เมื่อพบว่ามีสิ่งมีชีวิตอื่นอาศัยอยู่ในบริเวณที่จะลงเกาะ (Grosberg, 1981; Young and Chia, 1981; Sebens, 1983)

เพรียงหัวหอมส่วนใหญ่มีช่วงชีวิตตั้งแต่ 1-3 ปีแล้วแต่ชนิด เช่น เพรียงหัวหอม *Ciona intestinalis* และเพรียงหัวหอม *Styela plicata* มีช่วงชีวิตเพียง 5-8 เดือน ในขณะที่เพรียงหัวหอม *Halocynthia roretzi* มีช่วงชีวิตยาวถึง 4-5 ปี (Miller, 1971)



รูปที่ 2-2. ตัวอ่อนเพรียงหัวหอม *Diplosoma maccaldonaldi* (ที่มา: Kozloff, 1990)

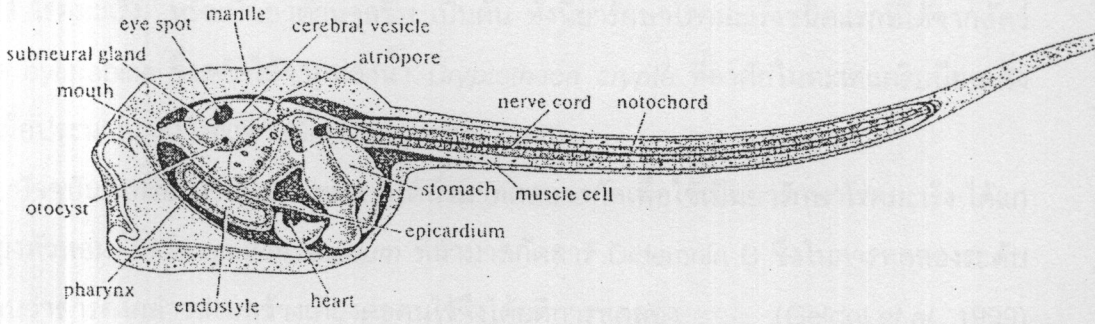
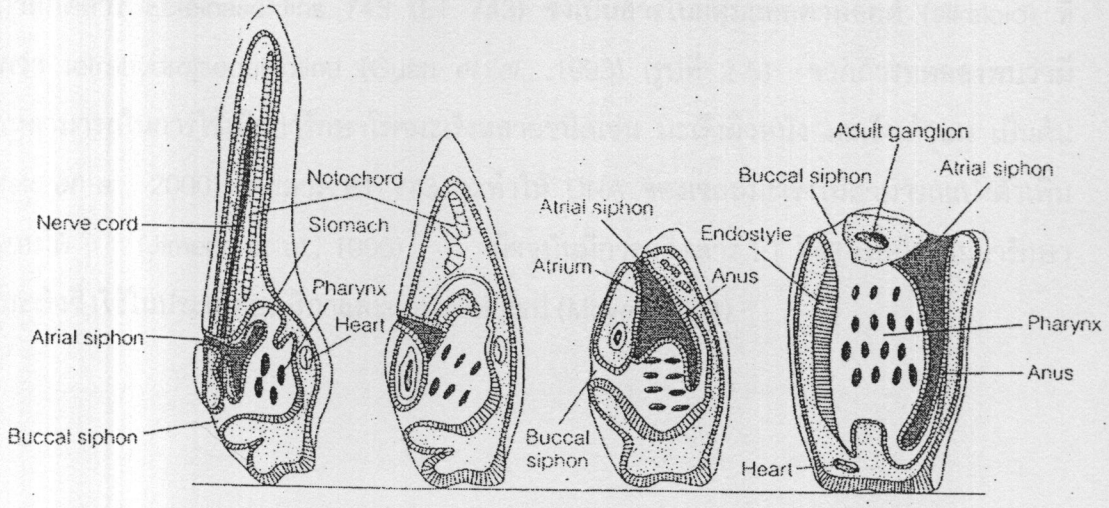


FIG. 3.18. Ascidian tadpole of *Clavelina*.

รูปที่ 2-3. โครงสร้างโดยทั่วไปของตัวอ่อนเพรียงหัวหอม (ที่มา: Young, 1981)



รูปที่ 2-4. การพัฒนารูปร่างของตัวอ่อนเพรียงหัวหอม (ที่มา: Ruppert *et al.*, 2004)

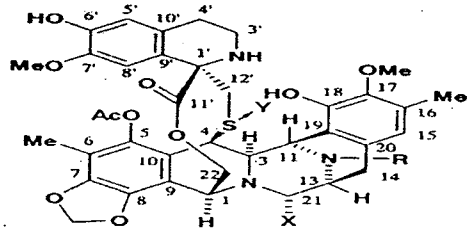
2.3 สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเพรียงหัวหอม

ทะเลจัดเป็นแหล่งสำคัญของสารที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องด้วยทะเลมีระบบนิเวศที่หลากหลาย มีการแข่งขันทั้งในด้านที่อยู่อาศัย อาหาร พื้นที่ลงเกาะ และการหลบหนีจากผู้ล่า เป็นต้น ดังนั้นสัตว์ทะเลต้องปรับตัวซึ่งนำมาสู่การสร้างสารที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสัตว์ทะเลโดยสารหลายชนิดมีประโยชน์ต่อมนุษย์ (Ireland *et al.*, 1981) ทั้งนี้สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ได้มาจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ฟองน้ำ เพรียงหัวหอม โบรโอซัว กัลปังหา เป็นต้น เพรียงหัวหอมมีเยื่อหุ้มร่างกายด้านนอกใช้สำหรับป้องกันตัวเองจากผู้ล่า บางชนิดมี spicules ที่ประกอบด้วยแคลเซียมไว้ป้องกันศัตรู หรือบางชนิดสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการป้องกันผู้ล่า เช่น ปลา เม่นทะเล ทากเปลือย หอย หนอนตัวแบน เป็นต้น (Young and Bingham, 1987; Lindquist and Fenical, 1991; Lindquist *et al.*, 1992; Lindquist and Hay, 1995, 1996)

มนุษย์ได้นำสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสัตว์ทะเลมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคเอดส์ โรคมะเร็ง หรือเป็นยาต้านจุลชีพ เป็นต้น ทั้งนี้ยารักษาโรคมะเร็งชนิดแรกที่ได้จากสัตว์ทะเลคือ cytarabine ซึ่งสกัดได้จากฟองน้ำ *Cryptotheca crypta* ที่อาศัยในทะเลแคริบบียน ซึ่งค้นพบเมื่อประมาณ 40 ปีที่แล้ว (Schwartsmann, 2000)

ปัจจุบันมีเพรียงหัวหอม 3 ชนิด ที่ได้นำมาทดลองสกัดเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง ได้แก่ 1) เพรียงหัวหอม *Tridemnum solidum* ที่นำมาสกัดสาร Didemnin B ซึ่งในการทดลองระดับคลินิกพบว่าสารดังกล่าวส่งผลข้างเคียงต่อคนไข้จึงได้ยุติการทดลอง (Geldof *et al.*, 1999) 2) เพรียงหัวหอม *Aplidium albicans* ในทะเลเมดิเตอร์เรเนียนที่ให้สาร Aplidine ซึ่งมีประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ดีกว่าสาร Didemnin B ปัจจุบันอยู่ระหว่างการพัฒนาในระดับคลินิก (Urdiales *et al.*, 1996) และ 3) เพรียงหัวหอม *Ecteinascidia turbinata* ในทะเลแคริบเบียนที่นำมาสกัดสาร Ecteinascidins 743 (ET 743) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloid) ที่เรียกว่า tetrahydroisoquinoline (Guan *et al.*, 1993) (รูปที่ 2-5) จากการทดลองพบว่ามีความสามารถในการใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งผิวหนัง มะเร็งเต้านม เป็นต้น (Zelek *et al.*, 2000) โดยสาร ET 743 จะทำให้ DNA ของเซลล์มะเร็งไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ (Jimeno *et al.*, 1996) ปัจจุบันมีการผลิตสาร ET 743 เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งซึ่งใช้ในประเทศอเมริกาและแถบทวีปยุโรป (Moyer, 2004)

โครงสร้างสาร ET-743



ecteinascidins
743 (1a): R = Me, X = OH, Y = none
729 (2): R = H, X = OH, Y = none
759B (3a): R = Me, X = OH, Y = O
770 (1b): R = Me, X = CN, Y = none
786 (3b): R = Me, X = CN, Y = O

รูปที่ 2-5. โครงสร้าง Ecteinascidins 743 (ET 743) (ที่มา: Suwanborirux *et al.*, 2002)

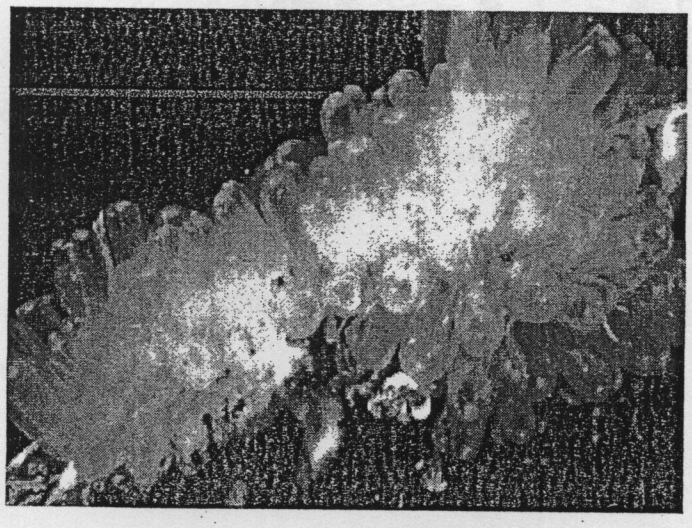
เนื่องจากการสกัดแยกสาร ET 743 มีความจำเป็นต้องใช้ปริมาณเพรียงหัวหอมเป็นจำนวนมากทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามค้นหาวิธีการสังเคราะห์สาร ET 743 ในห้องปฏิบัติการ โดย Corey *et al.* (1996) ทำการสังเคราะห์สาร ET 743 เป็นครั้งแรกซึ่งเป็นการสังเคราะห์จากสารตัวกลางและต่อมาจึงได้มีการสังเคราะห์สาร ET 743 ตั้งแต่สารเริ่มต้นเป็นผลสำเร็จ (Endo *et al.*, 2002)

2.4 การเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม

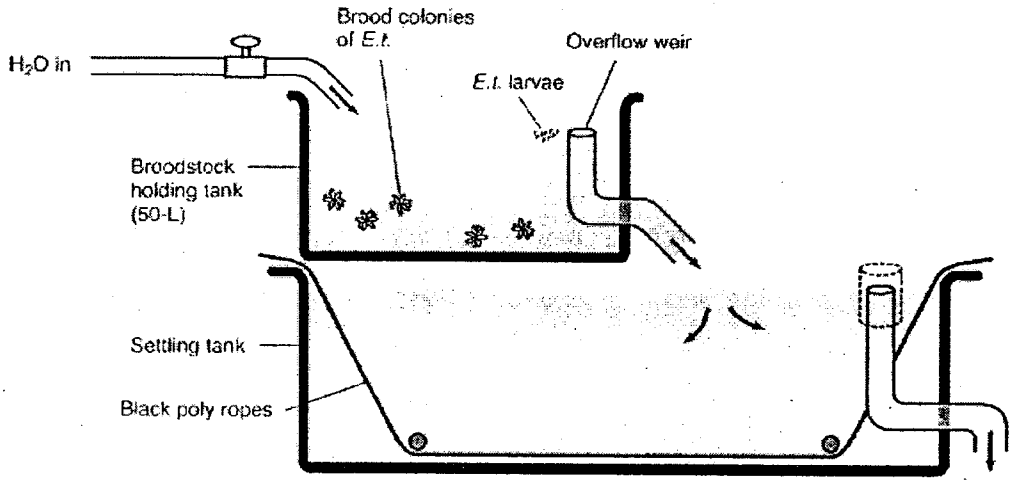
แนวคิดในการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอมเพิ่มขึ้น เมื่อพบว่าปริมาณสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากเพรียงหัวหอมมีปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณของเพรียงหัวหอมที่ใช้ หรือประมาณ 10^{-4}-10^{-6}% ของน้ำหนักเปียก (Mendola, 2003) และพบว่าสารดังกล่าวมีโครงสร้างที่ซับซ้อนและใช้ต้นทุนในการผลิตที่สูงมากเมื่อทำการสังเคราะห์สาร ET 743 ในห้องปฏิบัติการ ทำให้การเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอมในระบบเพาะเลี้ยงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะผลิตสารดังกล่าวให้ได้ปริมาณที่มากเพียงพอต่อการวิจัยและการผลิตเป็นยารักษาโรคมะเร็ง (Carballo *et al.*, 1999) โดยการศึกษาในระยะแรกเป็นการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงทั้งบนบกและในทะเล รวมถึงเทคนิคต่างๆ อย่างไรก็ตามพบว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถส่งผลต่อการเติบโตและการสร้างสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเพรียงหัวหอมได้เช่นกัน เช่นเดียวกับการพบชนิดและความเข้มข้นของอาหารที่ส่งผลต่อการเติบโตและการสร้างสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในฟองน้ำ *Axinella corrugata* (Duckworth *et al.*, 2003)

เพรียงหัวหอมที่มีการนำมาใช้เพาะเลี้ยงในปัจจุบัน คือ เพรียงหัวหอม *E. turbiana* ซึ่งพบบริเวณทะเลแคริบเบียน สีน้ำตามส้ม มีความยาวประมาณ 12-18 มิลลิเมตร อาศัยบริเวณรากป่าโกงกางแถบป่าชายเลนแต่ละซูออยด์ยึดติดกันด้วยสโตลอน (Duckworth *et al.*, 2004) (รูปที่ 2-6)

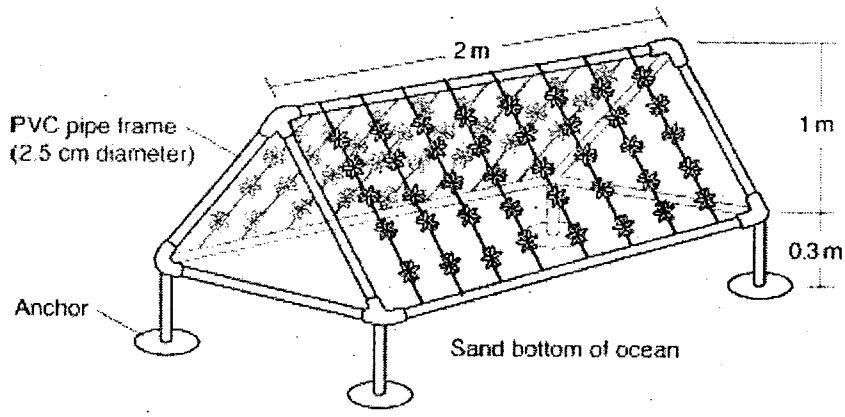
ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. turbinata* เชิงอุตสาหกรรมบริเวณรัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา เพื่อนำไปสกัดสารและใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง (Mendola, 2003) โดยทำการเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงบนบกและในทะเล การเพาะเลี้ยงในระบบเลี้ยงให้สาหร่ายมีชีวิต และอาหารเม็ดสำเร็จรูปเป็นอาหารวันละ 2 ครั้ง โดยใช้น้ำทะเลจากธรรมชาติที่ผ่านการกรองก่อนเข้าสู่ถังเพาะเลี้ยง ทั้งนี้พ่อแม่พันธุ์เพรียงหัวหอมได้มาจากการรวบรวมตามธรรมชาติและนำมาเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยง ส่วนการรวบรวมตัวอ่อนอาศัยพฤติกรรมการตอบสนองต่อแสง เมื่อตัวอ่อนถูกปล่อยออกมาจากพ่อแม่พันธุ์จะว่ายขึ้นสู่ด้านบนผิวน้ำ ใช้วิธีน้ำล้นเพื่อรวบรวมตัวอ่อนเข้าสู่ถังเพาะเลี้ยงที่อยู่ด้านล่างต่อไป จากนั้นตัวอ่อนจะลงเกาะบนเส้นเชือก หลังจากนั้นจึงอาศัยพฤติกรรมการหนีแสงของตัวอ่อนที่ว่ายน้ำเข้าหาเส้นเชือกที่เตรียมไว้ในบริเวณที่มีปริมาณแสงน้อย (รูปที่ 2-7) และนำเชือกที่ปกคลุมด้วยซูออยด์ของเพรียงหัวหอมที่ลงเกาะแล้วไปแขวนบนโครงที่สร้างจากท่อพีวีซีซึ่งตั้งและถูกยึดติดกับพื้นทะเล (รูปที่ 2-8) จากการศึกษาพบว่า เพรียงหัวหอมในทะเลเติบโตเต็มเส้นเชือกภายในเวลา 45-50 วัน ซึ่งสามารถผลิตสาร ET 743 ได้ในปริมาณเฉลี่ย 400 กรัมต่อ 1 เมตรของความยาวเชือก ในขณะที่เพรียงหัวหอมที่เลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงใช้เวลาในการเติบโตที่ยาวนานกว่าและปริมาณสาร ET 743 ที่ได้น้อยกว่าเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงในทะเล ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. turbinata* ในเชิงอุตสาหกรรมควรทำการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอมในทะเลซึ่งให้ผลที่คุ้มค่ามากกว่า



รูปที่ 2-6. เพรียงหัวหอม *E. turbinata* (ที่มา: Zewail-Foote and Hurey, 1999)



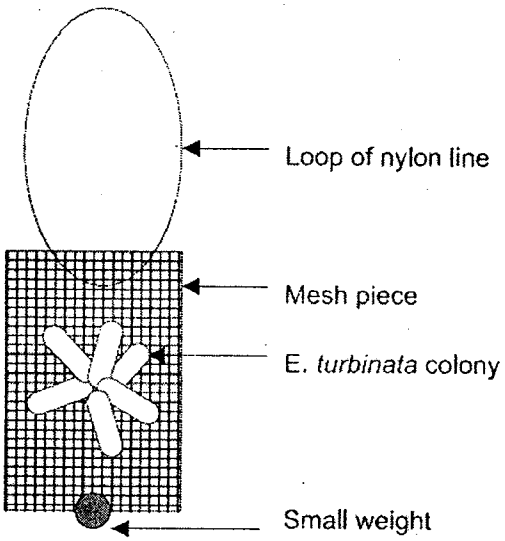
รูปที่ 2-7. ระบบเพาะเลี้ยงแบบถังคู่ เพื่อการลงเกาะของตัวอ่อนของเพรียงหัวหอมบนเส้นเชือก สำหรับนำไปเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงหรือในทะเล (ที่มา: Mendola, 2003)



รูปที่ 2-8. โครงสร้างที่สร้างจากท่อพีวีซี สำหรับการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอมในทะเล (ที่มา: Mendola, 2003)

การศึกษาปัจจัยด้านอาหารในการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. turbinata* โดยให้อาหารแพลงก์ตอนพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Chaetoceros gracilis, Isochrysis galbana* และ *Nannochloropsis* sp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 80,000, 160,000 และ 320,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงซูออยด์ที่ระดับความหนาแน่นต่อโคโลนีประมาณ 20 ซูออยด์ต่อโคโลนี ที่นำไปมัดกับตาข่ายไนลอนขนาด 3 x 6 ตารางเซนติเมตร (รูปที่ 2-9) โดยน้ำที่ใช้ในระบบเพาะเลี้ยงเป็นน้ำทะเลธรรมชาติและผ่านการกรอง ให้อาหารครั้งละ 1-2 ลิตรต่อวันทำการ

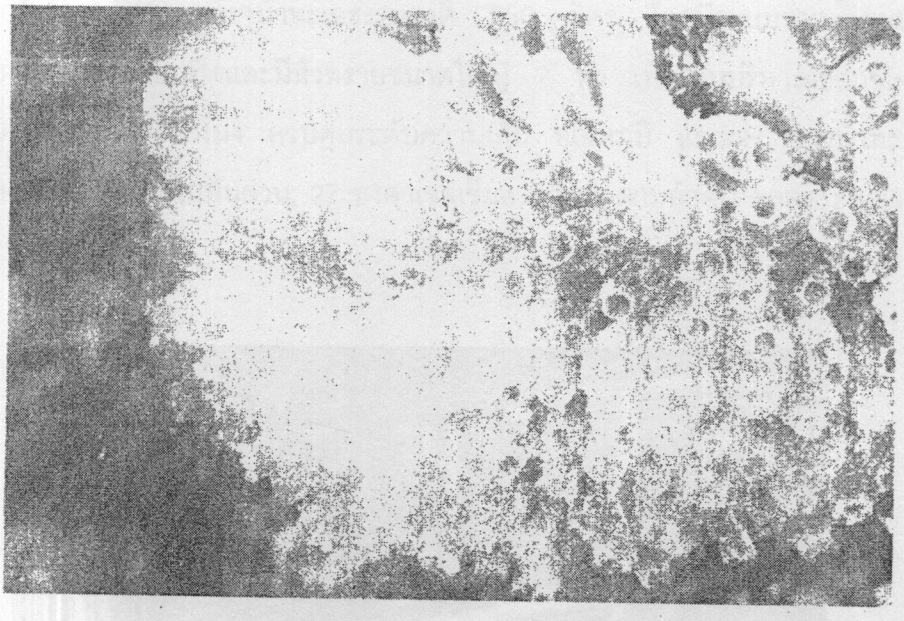
เปลี่ยนน้ำในถังเพาะเลี้ยง 5-6 ครั้งต่อสัปดาห์และทำการควบคุมอุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรดด่างให้คล้ายคลึงกับธรรมชาติ พบว่าเพรียงหัวหอมกลุ่มที่มีการเติบโตที่ดีที่สุดทั้งในด้านจำนวน ความยาวของซูออยด์ และการสร้างสาร ET 743 คือ กลุ่มที่ให้ *I. galbana* และกลุ่มที่ให้อาหารผสมระหว่าง *C. gracilis* และ *I. galbana* ที่ระดับความเข้มข้น 160,000 และ 320,000 เซลล์/มิลลิลิตรเป็นอาหาร ทั้งนี้ปริมาณสาร ET 743 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพิ่มเป็น 10 เท่าภายในระยะเวลา 31 วันเมื่อเทียบกับเพรียงหัวหอม *E. turbinata* ที่เติบโตในธรรมชาติ (Duckworth *et al.*, 2004)



รูปที่ 2-9. การเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. turbinata* บนตาข่ายไนล่อน 3 x 6 ตารางเซนติเมตร (ที่มา: Duckworth *et al.*, 2004)

2.5 **เพรียงหัวหอม** *E. thurstoni*

เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* (รูปที่ 2-10) เป็นเพรียงหัวหอมในสกุลเดียวกับเพรียงหัวหอม *E. turbiana* ซึ่งมีความสามารถในการสร้างสาร ET 743 (Wright *et al.*, 1990; Scotto, 2002) เพรียงหัวหอมชนิดนี้พบที่บริเวณท่าเทียบเรือสถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน จังหวัดภูเก็ต ที่ระดับความลึก 1-5 เมตร โดยจัดเป็นเพรียงหัวหอมชนิดแรกในทวีปเอเชียที่ให้สารในกลุ่มดังกล่าว (Suwanborirux *et al.*, 2002) เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* มีความยาวของซูออยด์อยู่ระหว่าง 0.8-1.2 เซนติเมตร พบมากสุดในเดือนมีนาคม กรกฎาคม และพฤศจิกายน โดยพบในบริเวณที่ที่มีแสงสว่างน้อย เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในธรรมชาติมีช่วงชีวิตประมาณ 60 วัน ขณะที่เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในระบบเลี้ยงมีช่วงชีวิตประมาณ 30-35 วัน จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าหลังจากตัวอ่อนถูกปล่อยออกมาจากพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ ตัวอ่อนลงเกาะบนพื้นผิวโดยใช้ anterior sucker ภายในเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นตัวอ่อนจะพัฒนารูปร่างจนสามารถกรองอาหารได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (ปิยะ โกยสิน, 2548; Chavanich *et al.*, 2005)



รูปที่ 2-10. เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ตามธรรมชาติ (ที่มา: Chavanich *et al.*, 2005)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

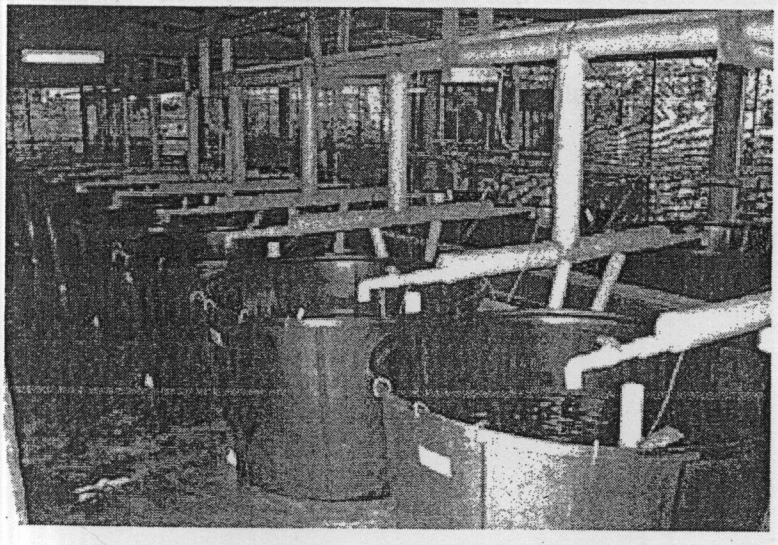
3.1 สัตว์ทดลอง สถานที่วิจัย และระบบเพาะเลี้ยง

3.1.1 สัตว์ทดลองและสถานที่วิจัย

ทำการเก็บโคโลนีเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากธรรมชาติบริเวณท่าเทียบเรือสถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน จังหวัดภูเก็ต และนำมาเลี้ยงในสถานีวิจัยสัตว์ทะเล อ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 ระบบเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*

ถังที่ใช้เพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอมเป็นถังทรงกลมขนาด 500 ลิตร มีจำนวนตัวอย่าง 8 โคโลนีต่อถังเพาะเลี้ยง บรรจุน้ำทะเลธรรมชาติ 350 ลิตร โดยมีระบบหมุนเวียนน้ำในถังเพาะเลี้ยงเป็นแบบระบบปิดและมีหัวทรายขนาดใหญ่ 2 หัว เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในถังเพาะเลี้ยงตลอด 24 ชั่วโมง ควบคุมระดับความเค็ม อุณหภูมิ และpH ของน้ำทะเลในถังเพาะเลี้ยง คือ 32 ส่วนในพันส่วน, 27 องศาเซลเซียส และ 8 ตามลำดับ ตลอดระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 3-1)

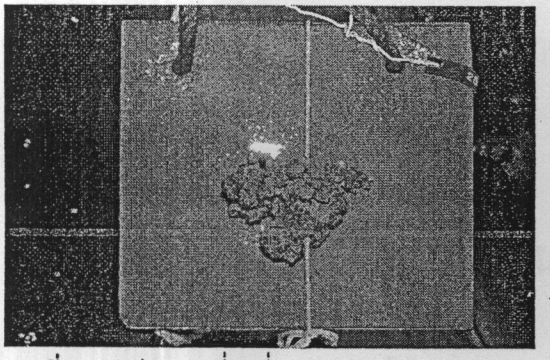


รูปที่ 3-1. โรงเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. Thurstoni*

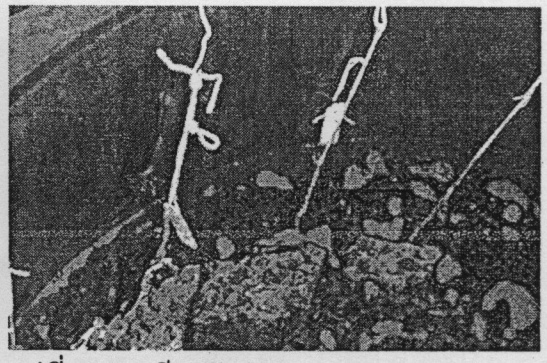
3.2 ขั้นตอนการทดลอง รวบรวม และวิเคราะห์ข้อมูล

3.2.1 การเตรียมเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* สำหรับทำการเพาะเลี้ยง

แบ่งโคโลนีเพรียงหัวหอมที่เก็บจากธรรมชาติเป็นเป็นโคโลนีย่อย ตรวจวัดการเติบโตโดยนับจำนวนซูออยด์ต่อโคโลนีและสุ่มวัดความยาวของซูออยด์ต่อโคโลนีจำนวนร้อยละ 10 ของจำนวนซูออยด์ต่อโคโลนีทั้งหมด บันทึกภาพเพรียงหัวหอมในกรอบสี่เหลี่ยมขนาด 100 ตารางเซนติเมตร (10x10 ตารางเซนติเมตร) เพื่อคำนวณพื้นที่ปกคลุม พร้อมสุ่มเก็บโคโลนีเพรียงหัวหอมจากธรรมชาติเพื่อสกัดหาปริมาณสาร Ecteinascidins ก่อนการเพาะเลี้ยง จากนั้นมัดโคโลนีของเพรียงหัวหอมติดกับแผ่นกระเบื้องขนาด 15 x 15 ตารางเซนติเมตรด้วยเชือกไนลอน และทำเชือกไนลอนเป็นห่วงทางด้านบนของแผ่นกระเบื้องสำหรับแขวนในถังเพาะเลี้ยง ตีกรอบสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาด 10 x 10 ตารางเซนติเมตร บนแผ่นกระเบื้องล้อมรอบโคโลนีของเพรียงหัวหอม (รูปที่ 3-2) เพื่อใช้สำหรับการคำนวณพื้นที่การปกคลุมของเพรียงหัวหอมแล้วนำเพรียงหัวหอมไปแขวนไว้ในถังเพาะเลี้ยง (รูปที่ 3-3)



รูปที่ 3-2. ตีกรอบสี่เหลี่ยจตุรัสขนาด 10 X 10 ตารางเซนติเมตร บนแผ่นกระเบื้องล้อมรอบโคโลนีของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*



รูปที่ 3-3. เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ถูกแขวนไว้ในถังเพาะเลี้ยง

3.2.2 **ชนิดของอาหารและขั้นตอนการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง**

อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นแพลงก์ตอน 3 ชนิด ได้แก่ *C. gracilis* (CG), *I. galbana* (IG), *Nannochloropsis* sp. (NA) และอาหารเม็ดสำเร็จรูป (DP) การเลือกใช้แพลงก์ตอนทั้ง 3 ชนิดมาเป็นแบบอาหาร เนื่องด้วยแพลงก์ตอนดังกล่าวเป็นอาหารที่จัดหาได้ง่ายและมีการใช้อย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงฟองน้ำ ซึ่งกินอาหารโดยการกรองเหมือนกับเพรียงหัวหอม สำหรับการเลือก DP มาเป็นแบบอาหารเนื่องด้วยเพรียงหัวหอมในสภาพธรรมชาติมีการกรองสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำทะเลเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหาร DP ซึ่งเป็นอาหารกุ้งซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์จำนวนมาก ทั้งนี้หัวเชื้อแพลงก์ตอนทั้ง 3 ชนิด (CG, IG และ NA) ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี มาทำการเพาะเลี้ยงในถังทรงกลมขนาด 200 ลิตร โดยนำหัวเชื้อแพลงก์ตอนดังกล่าวจำนวน 2 ลิตรผสมกับน้ำทะเลธรรมชาติที่ระดับความเค็ม 32 ส่วนในพันส่วน จำนวน 10 ลิตรและใส่ปุ๋ยน้ำจำนวน 50 มิลลิลิตร ตั้งถังเพาะเลี้ยงกลางแจ้งเป็นเวลา 3 วันก่อนนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม ทำการสุ่มน้ำในถังเพาะเลี้ยงเพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของแพลงก์ตอนให้ได้จำนวนและปริมาณที่มากพอสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม สำหรับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเป็นอาหารผงสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

3.2.3 **ขั้นตอนการทดลอง**

3.2.3.1 **การศึกษาผลของอาหารต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม** *E. thurstoni* **โดยการให้อาหารแบบชนิดเดียว**

วางแผนการทดลองออกเป็น 5 ชุด ตามอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง ได้แก่ ชุด CG, IG, NA, DP และ CTRL โดยนำมาเลี้ยงเพรียงหัวหอมชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ (ถังเพาะเลี้ยง) และในแต่ละซ้ำมีโคโลนีเพรียงหัวหอม 4 โคโลนี ทั้งนี้กำหนดชุดการทดลองที่ไม่ให้อาหารเป็นชุดควบคุม โดยทุกชุดการทดลองมีจำนวนซูออยด์ก่อนการทดลองใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ชุดการทดลองที่ให้แพลงก์ตอนเป็นอาหารให้วันละ 1 ครั้ง ครั้งละ 1.5-2.0 ลิตรต่อถังเพาะเลี้ยงและทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนในถังเพาะเลี้ยงสัปดาห์ละ 2 ครั้ง ชุดการทดลองที่ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปให้วันละ 1 ครั้ง ครั้งละ 1 ช้อนโต๊ะและทำการดูดตะกอนทุก 2 วัน

3.2.3.2 **การศึกษาผลของอาหารต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบผสม**

จัดชุดการทดลองออกเป็นอาหารที่มีการผสมของแพลงก์ตอนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ 1) CG และ IG 2) IG และ NA 3) CG และ NA และ 4) CG, IG และ Na กำหนดชุดทดลองที่ไม่ให้อาหารเป็นชุดควบคุม (CTRL) ทั้งนี้จำนวนโคโลนีและจำนวนซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง รวมถึงเงื่อนไขในการทดลองใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.2.3.1 อนึ่งการศึกษาหัวข้อนี้ไม่ได้นำอาหาร DP มาใช้ในการทดลองเนื่องจากผลการศึกษาตามข้อ 3.2.3.1 นั้นพบว่า DP ไม่เหมาะสมต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม

3.2.3.3 **การเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างชุดทดลองกับชุดควบคุม**

ทำการเปรียบเทียบสัดส่วนของจำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ย, ความยาวซูออยด์โดยเฉลี่ย และพื้นที่ปกคลุมของโคโลนีโดยเฉลี่ย ในเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารแบบชนิดเดียวและแบบผสมต่อชุดควบคุม (CTRL)

3.2.3.4 **การศึกษาผลของอาหารแบบชนิดเดียวและแบบผสมต่อการผลิตสาร Ecteinascidins จากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni***

ทำการเก็บตัวอย่างของเพรียงหัวหอมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหัวข้อ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2 เพื่อทำการสกัดหาปริมาณสาร Ecteinascidins ในเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารที่แตกต่างกัน

3.2.4 **การเก็บข้อมูลการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni***

จากการศึกษาของ ปิยะ โกยสิน (2548) พบว่าการเลี้ยงเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงมีช่วงชีวิตประมาณ 30-35 วัน ขณะที่เพรียงหัวหอมในทะเลมีช่วงชีวิตประมาณ 60 วัน ทั้งนี้จากการศึกษาของ จิตติมา อุ้มอารีย์ (2549) พบว่าการเลี้ยงเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงมี 2 ช่วงชีวิตในระยะเวลา 65 วัน ดังนั้นจึงกำหนดระยะเวลาในการเลี้ยงที่ 9 สัปดาห์ เพื่อให้เพรียงหัวหอมมีการเติบโตในวงชีวิตที่ 2 ก่อนทำการเก็บเกี่ยวเพื่อนำไปสกัดสาร ET 743 ทำการเก็บข้อมูลด้านการเติบโตของเพรียงหัวหอมสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยนับจำนวนซูออยด์ต่อโคโลนีและสุ่มวัดความยาวร้อยละ 10 ของซูออยด์ในแต่ละโคโลนี บันทึกภาพเพื่อนำมาใช้ในการคำนวณพื้นที่การปกคลุมของเพรียงหัวหอมในแต่ละชุดการทดลอง ใช้โปรแกรม ENVI ในการคำนวณพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอม โดยการนำภาพถ่ายของเพรียงหัวหอม ซึ่งประกอบด้วยโคโลนีของเพรียงหัวหอมบนกรอบสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาด 10 X 10 ตารางเซนติเมตรในรูปแบบไฟล์ดิจิตอลเข้าสู่

โปรแกรมเพื่อคำนวณพื้นที่การปกคลุมของเพรียงหัวหอมบนพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร เพื่อเปรียบเทียบพื้นที่การปกคลุมของเพรียงหัวหอมในแต่ละชุดการทดลอง

3.2.5 **วิธีการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสาร ET 770 จากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni***

แบ่งขั้นตอนการศึกษาเป็น วิธีการสกัดแยกสาร ET 770 และ การวิเคราะห์ปริมาณสาร ET 770 โดยดัดแปลงจากวิธีการของ นภรรณพ บุญถนอม และปิติ จันทรวรโชติ (2544); Charupant (2000); Suwanborirux *et al.* (2002) ดังนี้

3.2.5.1 **วิธีการสกัดแยกสาร ET 770 จากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni***

(1) ทำการชั่งน้ำหนักเปียกของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* และใส่ในขวดแก้วขนาดเล็ก

(2) ทำแห้งเพรียงหัวหอมด้วยอุณหภูมิต่ำ (freeze-drier) เพื่อนำน้ำออกจากตัวเพรียงหัวหอม จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักแห้ง

(3) บดเพรียงหัวหอมให้ละเอียดจากนั้นเติม 10 mM KCN ในสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

(4) นำขวดที่บรรจุเพรียงหัวหอม sonicate เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการเขย่าเป็นเวลา 5 ชั่วโมงด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

(5) เติมเมธานอล 6 มิลลิลิตร เพื่อทำการแช่สกัดและทำการเขย่าต่ออีก 2 ชั่วโมง

(6) นำเพรียงหัวหอม centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

(8) นำส่วน supernatant ที่อยู่ด้านบน 4 มิลลิลิตร ไปทำการสกัดแยกส่วนด้วยเอทิลอะซิเตท (EtOAc) 3 มิลลิลิตร และ brine (สารละลายอิ่มตัวของ NaCl) 11 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างเอทิลอะซิเตทกับน้ำ

(9) ดูดสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท 2 มิลลิลิตรใส่ในขวดแก้วขนาดเล็กและทำการเติม anhydrous sodium sulphate 40 มิลลิกรัม เพื่อกำจัดน้ำที่เจือปนอยู่ในสารสกัด จากนั้นดูดสารในชั้นด้านบน 1 มิลลิลิตรใส่ใน eppendorf ไปทำการเป่าให้แห้งโดยการผ่านก๊าซไนโตรเจนจนได้ dried crude EtOAc extract ลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลเข้มและนำสารที่ได้ไปเก็บไว้ใน dessicator เป็นเวลา 1 คืน

(10) เก็บสารไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เพื่อวัดปริมาณสาร ET 770

3.2.5.2. การวิเคราะห์ปริมาณสาร ET 770 โดยวิธี High Perfomance Liquid Chormatography (HPLC)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ ET 770 โดยการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยสารละลายมาตรฐาน ET 770 พร้อมทั้งวิเคราะห์ปริมาณสาร ET 770 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอมในแต่ละแบบอาหาร โดยการหนดสภาวะเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตามวิธีของ Suwanborirux *et al.* (2002) โดยมีรายละเอียดดังนี้

(1) Column ชนิด Hewlett Packard ODS Hypersil 5 ไมโครเมตร, 124 x 4 mm

(2) Solvent system คือ Methanol:Phosphate buffer, อัตราส่วน 60:40

(3) Injection volume 100 ไมโครลิตร

(4) Flow rate 1ml/min

(5) Diode array UV detector ความยาวคลื่น 286 nm

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และ Turkey-Pairwise mean comparison เพื่อเปรียบเทียบผลของอาหารต่างชนิดต่อการเติบโตและการผลิตสาร Ecteinascidins ของเพรียงหัวหอม

บทที่ 4

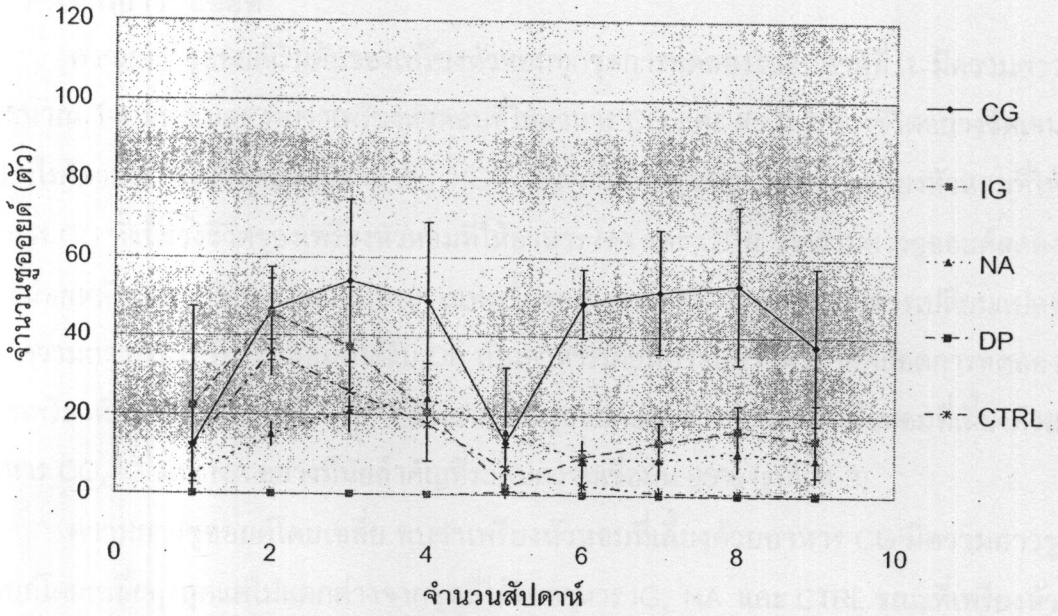
ผลการศึกษา

4.1 ผลของอาหารต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบชนิดเดียว

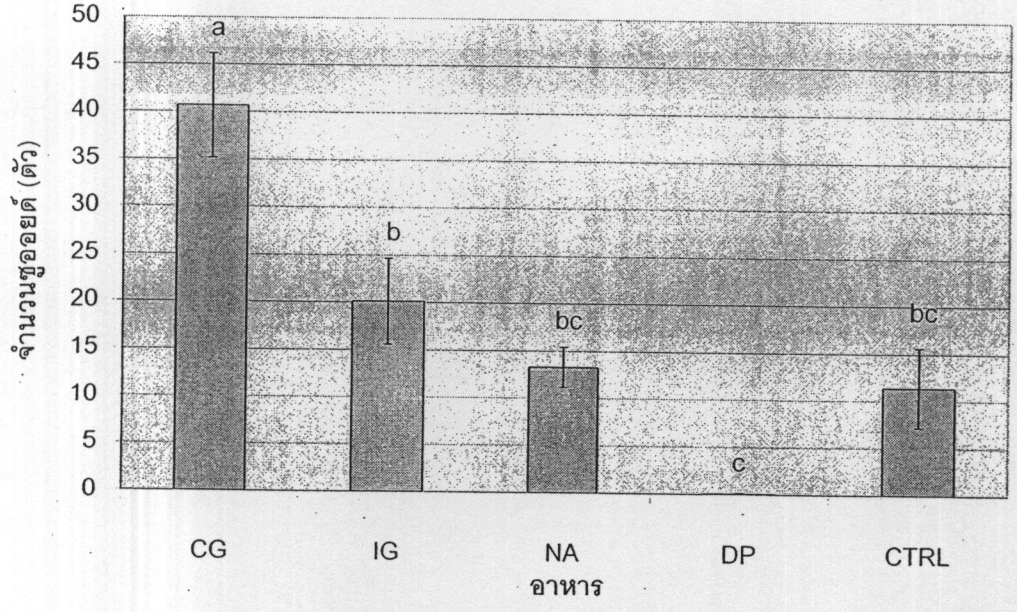
4.1.1 จำนวนซูออยด์

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนซูออยด์ของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแบบชนิดเดียวแสดงในรูปที่ 4-1 โดยจำนวนซูออยด์ในแต่ละสัปดาห์มีการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มที่ได้รับแพลงก์ตอนเป็นอาหารรวมถึงกลุ่มควบคุม ยกเว้นในแบบอาหารสำเร็จรูป (DP) ทั้งนี้เพรียงหัวหอมที่ได้รับ CG มีจำนวนซูออยด์มากกว่าแบบอาหารชนิดอื่นและมีการเปลี่ยนแปลงเป็น 2 ช่วงชีวิตอย่างชัดเจนเช่นเดียวกับเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหาร IG ซึ่งมี 2 ช่วงชีวิตแต่ในช่วงชีวิตที่ 2 มีจำนวนซูออยด์น้อยกว่าวงจรชีวิตที่ 1 และจำนวนซูออยด์ของแต่ละสัปดาห์น้อยกว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร CG ทั้งนี้พบว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร NA และ CTRL มีจำนวนซูออยด์เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากนั้นจึงลดลงและไม่ปรากฏวงจรชีวิตที่ 2 ที่ชัดเจน

จำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยของแต่ละสัปดาห์เป็นเวลา 9 สัปดาห์แสดงในรูป 4-2 เพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหาร CG มีจำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยสูงสุดซึ่งแตกต่างจากเพรียงหัวหอมที่ให้อาหารแบบชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% รองลงมาได้แก่เพรียงหัวหอมที่ได้รับ IG เป็นอาหาร ทั้งนี้เพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหาร DP มีจำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยต่ำสุดแต่ไม่แตกต่างกับเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหาร NA และ CTRL ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



รูปที่ 4-1. การเปลี่ยนแปลงของจำนวนซูออยด์เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์

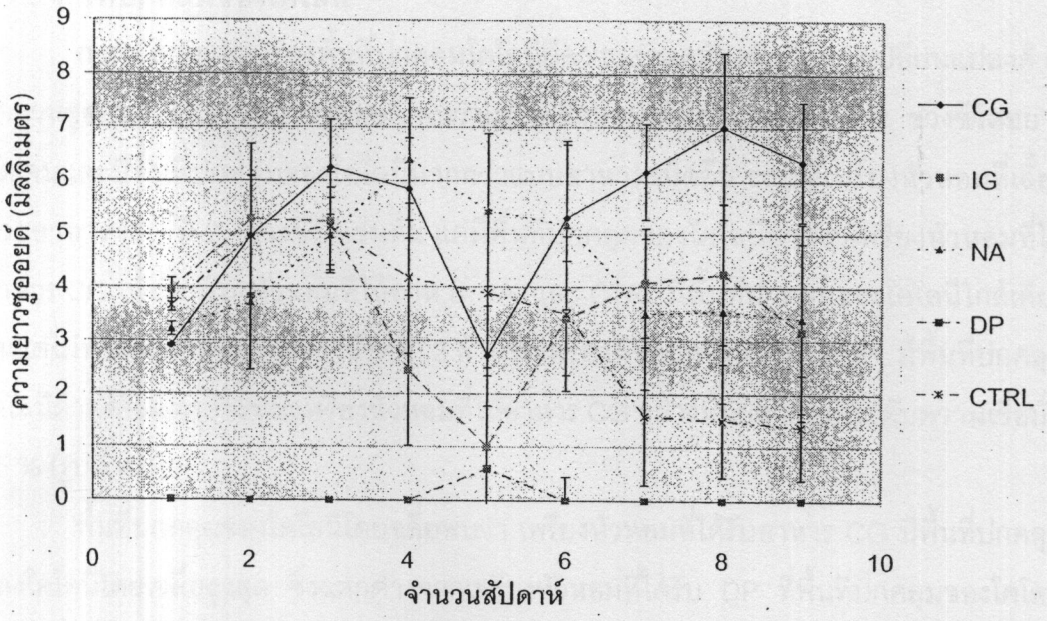


รูปที่ 4-2. จำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์

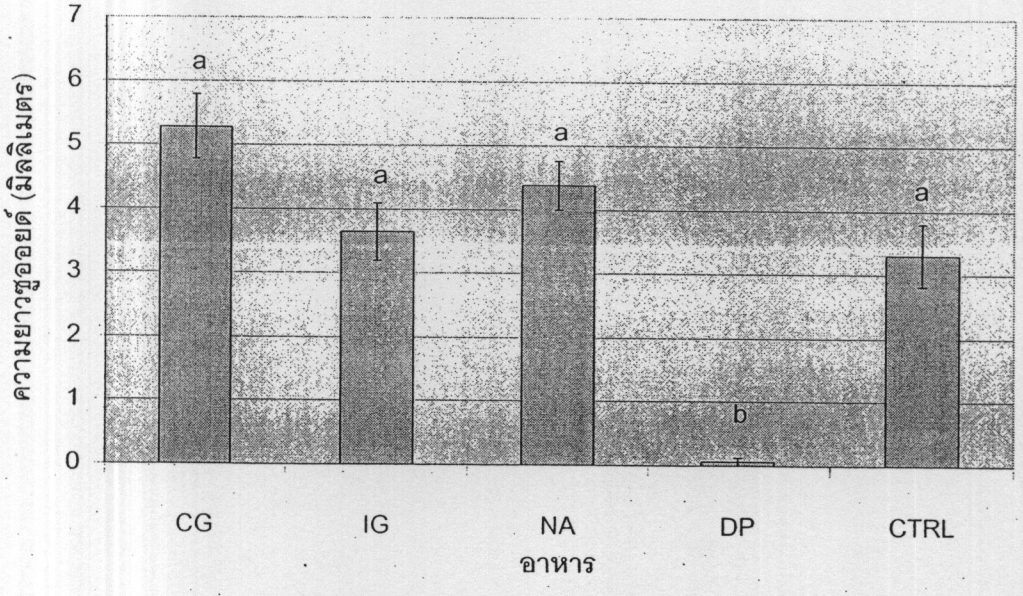
4.1.2 **ความยาวซูออยด์**

ความยาวซูออยด์เริ่มต้นของเพรียงหัวหอมทุกชุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 1 มีความยาวประมาณ 3-4 มิลลิเมตร พบว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร CG และ IG มี 2 ช่วงชีวิตอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร IG มีความยาวซูออยด์น้อยกว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร CG ทั้งนี้ช่วงชีวิตของเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร NA และ CTRL มีความยาวซูออยด์ลดลงทีละน้อยหลังสัปดาห์ที่ 3-4 และไม่พบการเพิ่มขึ้นของวงจรชีวิตที่ 2 ทั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางความยาวของเพรียงหัวหอมที่ได้รับ DP เป็นอาหารโดยมีความยาวต่ำมากตลอดการทดลอง อนึ่งเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร DP มีความยาวซูออยด์แตกต่างจากเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหาร CG, IG และ NA อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (รูปที่ 4-3)

ความยาวซูออยด์โดยเฉลี่ย พบว่าเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหาร CG มีความยาวซูออยด์โดยเฉลี่ยสูงสุดแต่ไม่แตกต่างจากชุดที่ได้รับอาหาร IG, NA และ CTRL ขณะที่เพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหาร DP มีความยาวซูออยด์โดยเฉลี่ยต่ำสุดและแตกต่างจากแบบอาหารอื่นทุกชนิดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (รูปที่ 4-4)



รูปที่ 4-3. การเปลี่ยนแปลงของความยาวซูออยด์เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์

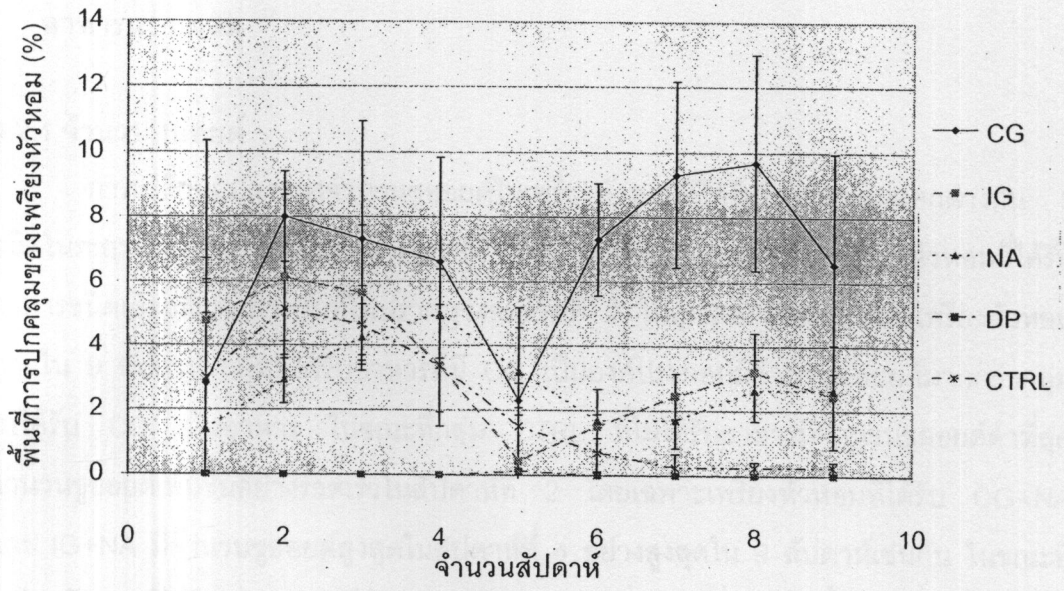


รูปที่ 4-4. ความยาวซูออยด์โดยเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์

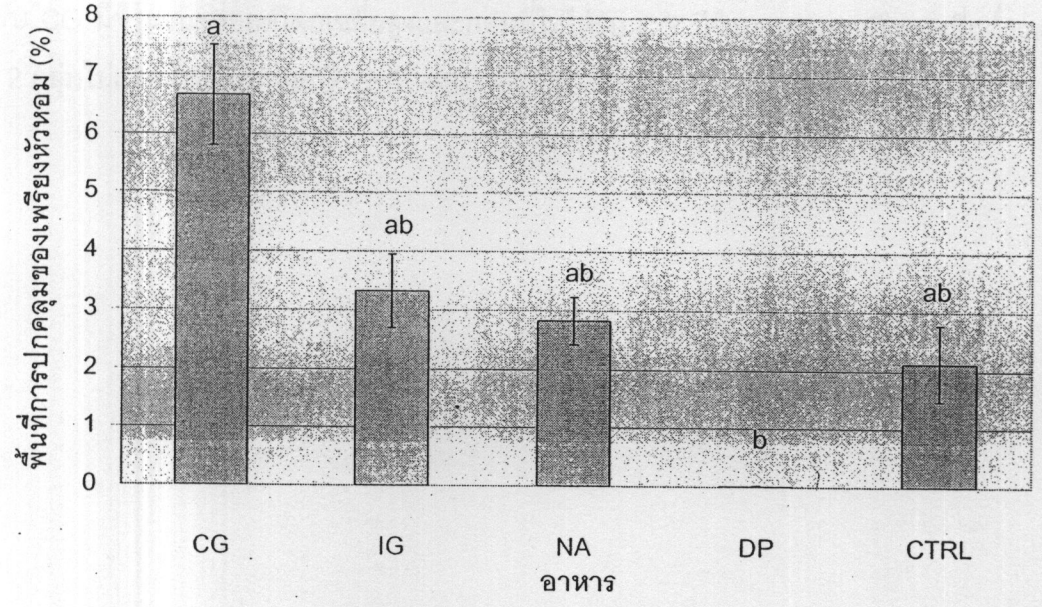
4.1.3 พื้นที่ปกคลุมของโคโลนี

การเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ปกคลุมโคโลนีมีความสอดคล้องกับกับการเปลี่ยนแปลงด้านจำนวนซูออยด์และความยาวซูออยด์ พบว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร CG มี 2 ช่วงชีวิตอย่างชัดเจนและมีพื้นที่ปกคลุมของโคโลนีมากกว่าแบบอาหารชนิดอื่น ขณะที่เพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหาร IG มี 2 ช่วงชีวิตเช่นกัน แต่มีพื้นที่ปกคลุมของโคโลนีต่ำกว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร CG ทั้งนี้เพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร NA และ CTRL มีพื้นที่ปกคลุมของโคโลนีใกล้เคียงกันแต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของช่วงชีวิตที่ 2 สำหรับเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร DP มีพื้นที่ปกคลุมโคโลนีต่ำสุดซึ่งแตกต่างจากเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร CG อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (รูปที่ 4-5)

พื้นที่ปกคลุมของโคโลนีโดยฉลี่ยพบว่า เพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหาร CG มีพื้นที่ปกคลุมของโคโลนีโดยเฉลี่ยสูงสุด ซึ่งแตกต่างจากเพรียงหัวหอมที่ได้รับ DP ที่พื้นที่ปกคลุมของโคโลนีโดยเฉลี่ยต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % อย่างไรก็ตามเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหาร IG, NA และ CTRL ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในพื้นที่ปกคลุมกับชุดที่มีพื้นที่ปกคลุมสูงสุดและต่ำสุด (รูปที่ 4-6)



รูปที่ 4-5. การเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ปกคลุมโคโลนีเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์



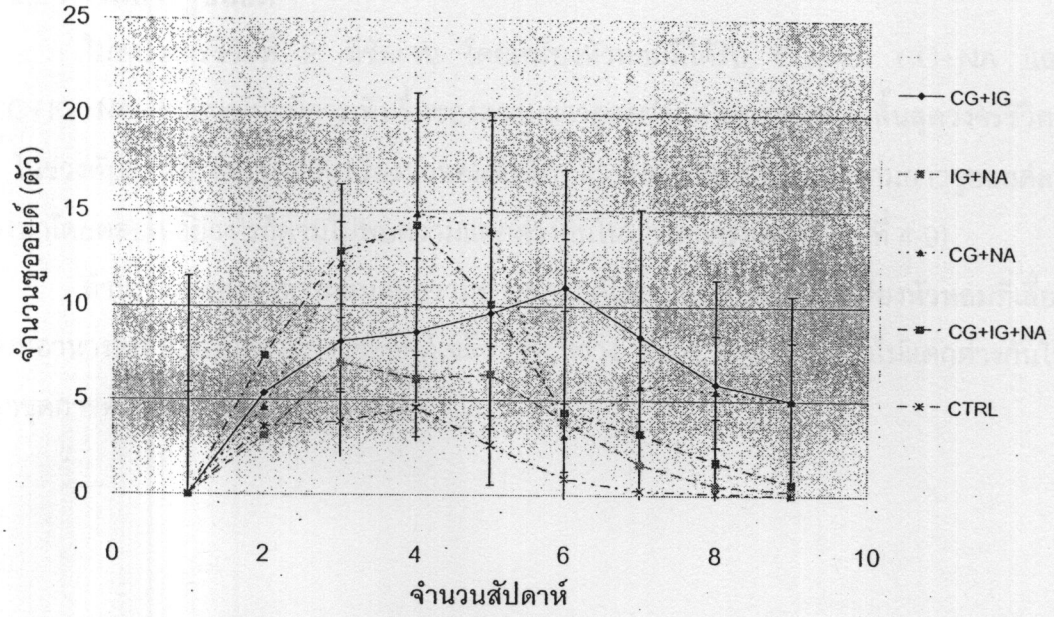
รูปที่ 4-6. พื้นที่ปกคลุมโคโลนีโดยเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์

4.2 ผลของอาหารต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบผสม

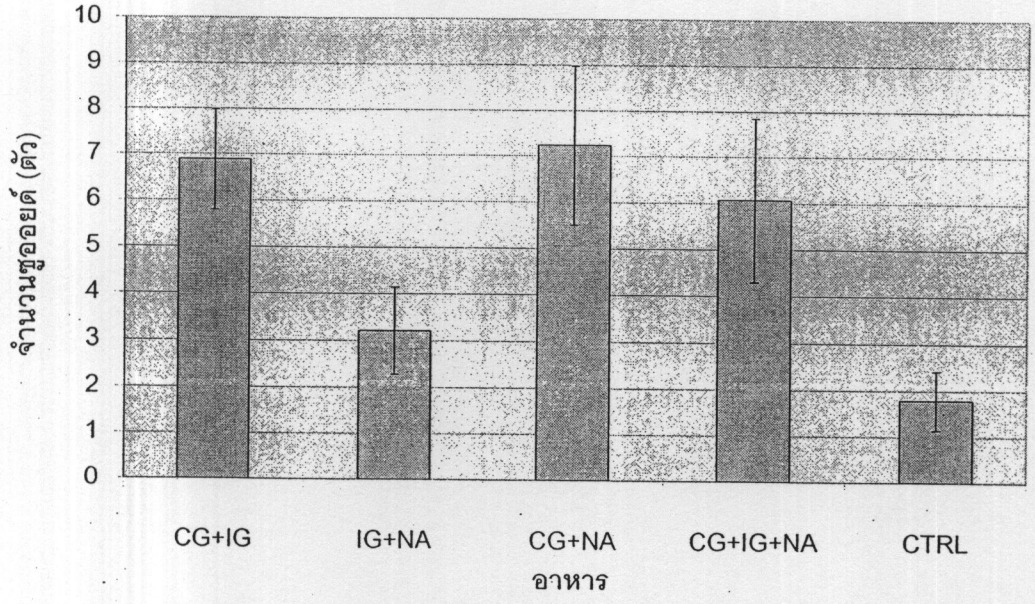
4.2.1 จำนวนซูออยด์

การเปลี่ยนแปลงของจำนวนซูออยด์ในเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารผสมแตกต่างกัน 5 ชนิดในระยะเวลา 9 สัปดาห์แสดงในรูปที่ 4-7 โดยพบว่าแตกต่างจากเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารชนิดเดียวที่แตกต่างกันที่ไม่ปรากฏวงจรชีวิตที่ 2 ในทุกชุดการทดลองของเพรียงหัวหอมภายใน 9 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มี CG เป็นองค์ประกอบมีจำนวนซูออยด์มากกว่ากลุ่มไม่ได้รับ CG เป็นอาหาร ในขณะที่กลุ่ม CTRL ที่ไม่ได้รับอาหารมีจำนวนซูออยด์ต่ำที่สุด จำนวนซูออยด์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 2 โดยเฉพาะเพรียงหัวหอมที่ได้รับ CG+NA และ IG+NA มีจำนวนซูออยด์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 อย่างสูงสุดใน 9 สัปดาห์เช่นกัน ในขณะที่เพรียงหัวหอมที่ได้รับ CG+IG มีจำนวนซูออยด์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 จากนั้นค่อยๆลดลงและยังไม่สิ้นสุดวงชีวิตที่ 1 อย่างไรก็ตามจำนวนซูออยด์ของเพรียงหัวหอมในทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน

จำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยของแต่ละสัปดาห์ พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ได้รับ CG มีจำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยสูงและกลุ่มที่ไม่ได้รับ CG มีจำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยต่ำแต่ทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 4-8)



รูปที่ 4-7. การเปลี่ยนแปลงของจำนวนซูออยด์เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์

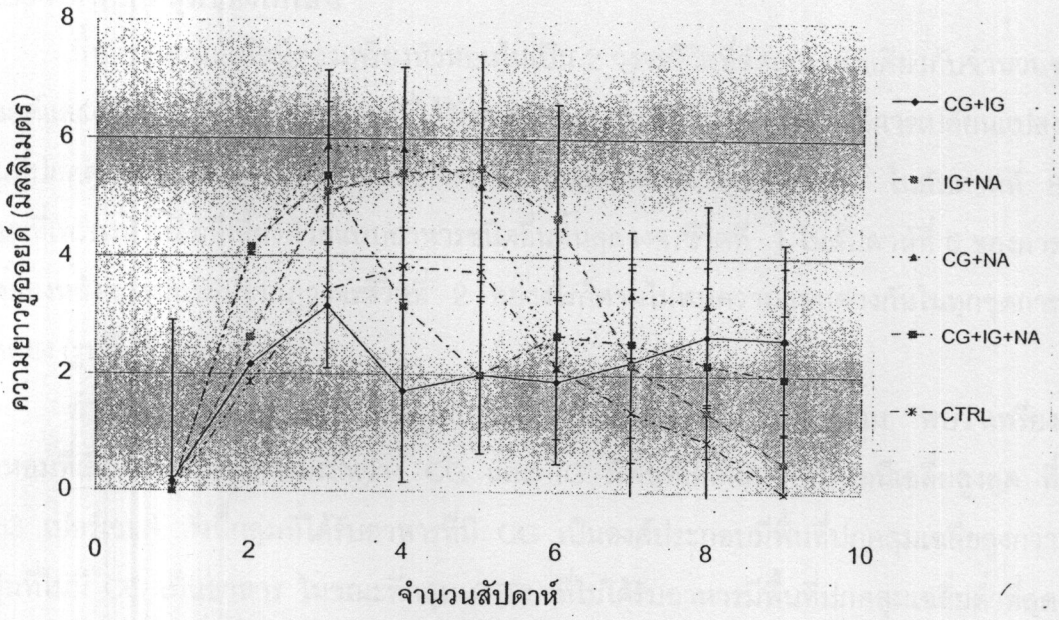


รูปที่ 4-8. จำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์

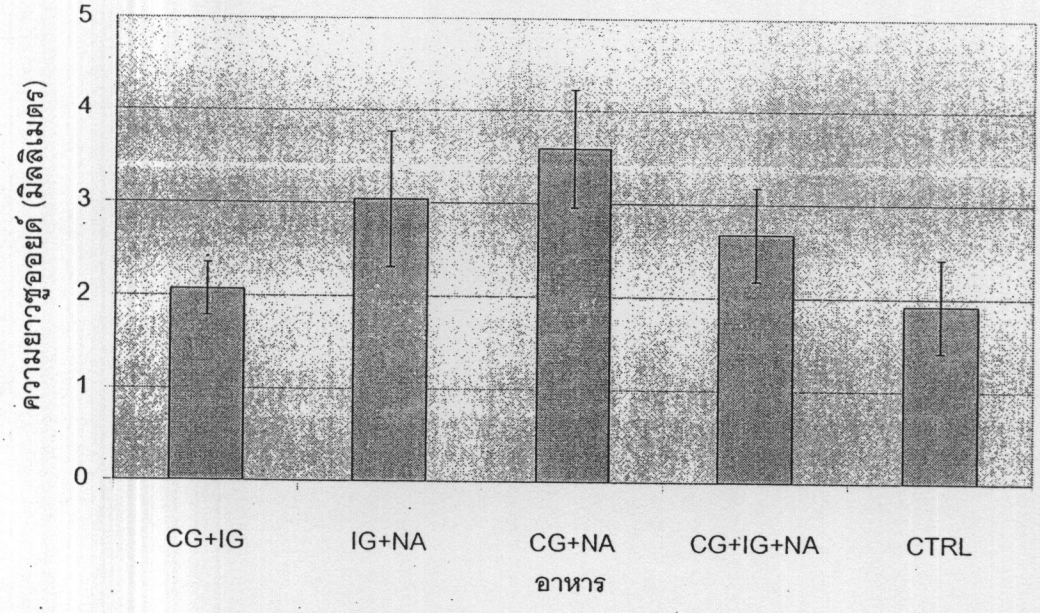
4.2.2 ความยาวซูออยด์

ไม่พบวงจรชีวิตที่ 2 ที่ชัดเจน โดยเพรียงหัวหอมที่ได้รับ CG+IG, CG+NA และ CG+IG+NA พบแนวโน้มมีการเพิ่มขึ้นของความยาวซูออยด์แต่ไม่มากนักหลังสิ้นสุดวงจรชีวิตที่ 1 ในช่วงสัปดาห์ที่ 4-6 ขณะที่เพรียงหัวหอมที่ได้รับ IG+NA และ CTRL มีความยาวซูออยด์ลดลงมาโดยตลอด อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง (รูปที่ 4-9)

สำหรับผลของอาหารผสมต่อความยาวซูออยด์โดยเฉลี่ยพบว่า เพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหารแบบผสมมีความยาวซูออยด์เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.5-4 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันในทุกชุดการทดลองเช่นกัน (รูปที่ 4-10)



รูปที่ 4-9. การเปลี่ยนแปลงของความยาวซูออยด์เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์

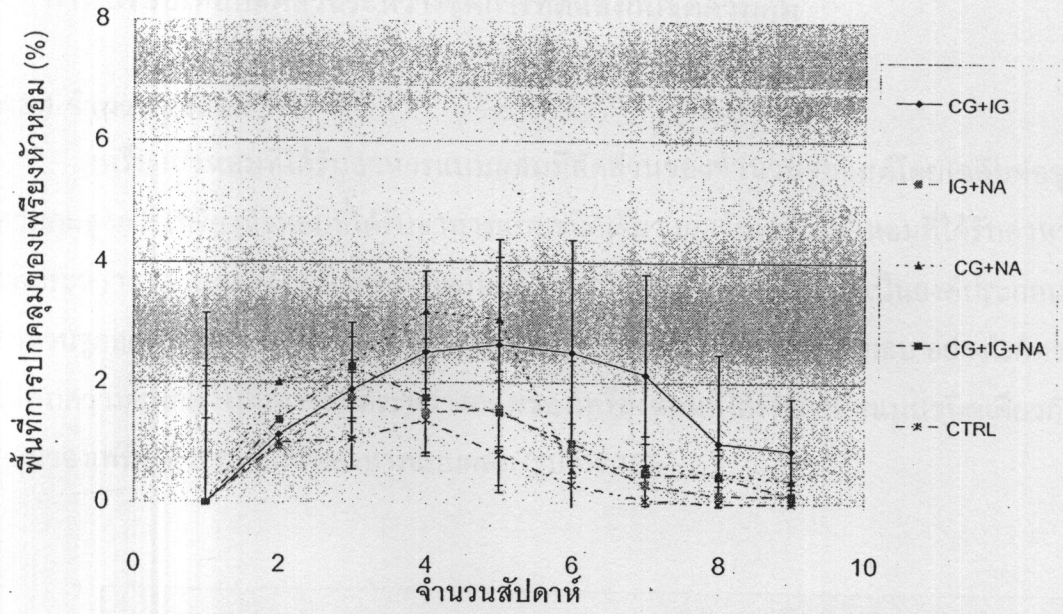


รูปที่ 4-10. ความยาวซูออยด์โดยเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์

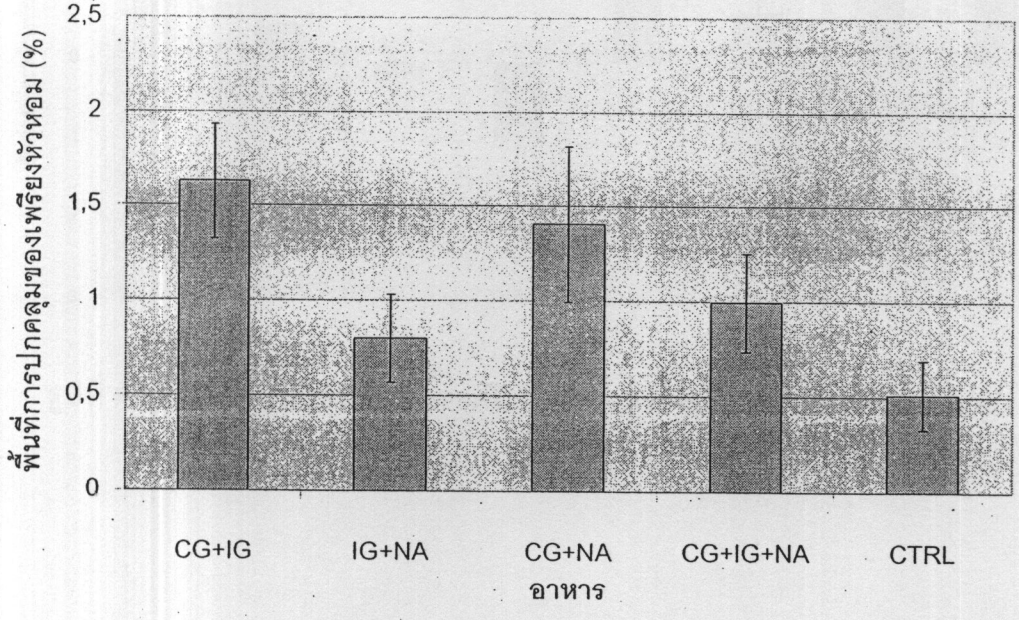
4.2.3 **พื้นที่ปกคลุมของโคโลนี**

พื้นที่ปกคลุมโคโลนีของเพรียงหัวหอมไม่เป็น 2 วงจรชีวิตที่ชัดเจน เช่นเดียวกับจำนวนซูออยด์และความยาวซูออยด์ โดยกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมระหว่าง CG และ IG มีการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ปกคลุมโคโลนีดีที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่นและสิ้นสุดวงจรชีวิตที่ 1 ในสัปดาห์ที่ 8 ขณะที่เพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยแบบอาหารชนิดอื่นสิ้นสุดวงจรชีวิตที่ 1 ในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลองหลังจากนั้นไม่ปรากฏวงจรชีวิตที่ 2 อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง (รูปที่ 4-11)

สำหรับผลของอาหารผสมต่อพื้นที่ปกคลุมโคโลนีเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม พบว่าเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมระหว่าง CG และ IG มีพื้นที่ปกคลุมของโคโลนีเฉลี่ยสูงสุด ที่ 1.63 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มี CG เป็นองค์ประกอบมีพื้นที่ปกคลุมเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ไม่มี CG เป็นอาหาร ในขณะที่กลุ่ม CTRL ที่ไม่ได้รับอาหารมีพื้นที่ปกคลุมเฉลี่ยต่ำที่สุด อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างทางกันในทุกชุดการทดลอง (รูปที่ 4-12)



รูปที่ 4-11. การเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ปกคลุมโคโลนีเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์

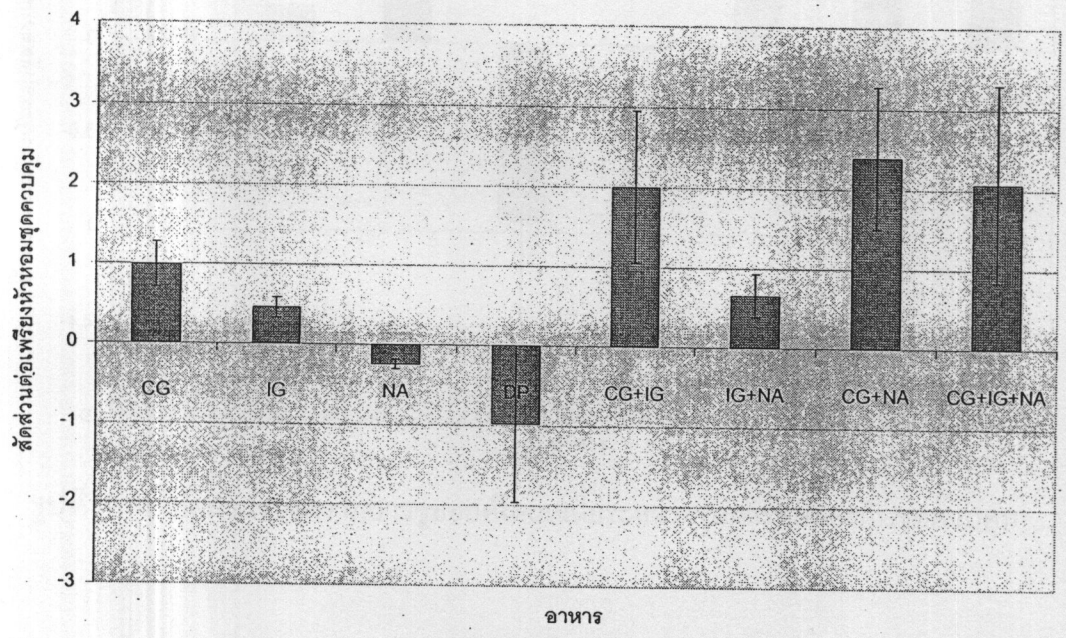


รูปที่ 4-12. พื้นที่ปกคลุมโคโลนีโดยเฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurston i*จากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เป็นเวลา 9 สัปดาห์

4.3 การเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างชุดการทดลองกับชุดควบคุม

4.3.1 จำนวนซูออยด์

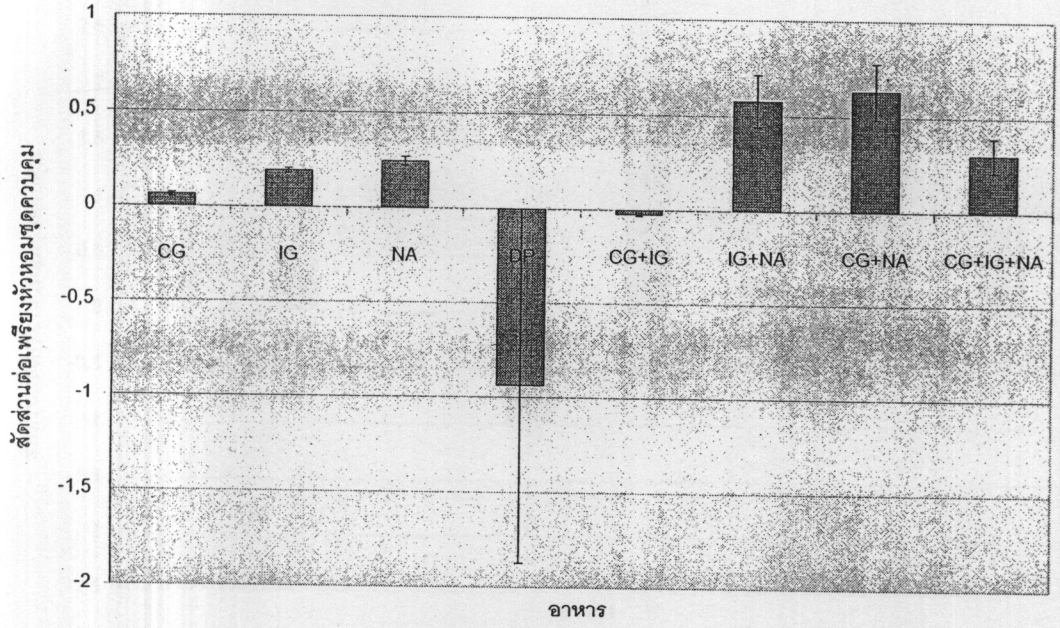
เพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารแบบผสมมีสัดส่วนของจำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยต่อชุดควบคุมสูงกว่าเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารแบบชนิดเดียว ยกเว้นเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารผสมระหว่าง IG และ NA ทั้งนี้พบว่าเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารที่มี CG เป็นองค์ประกอบมีจำนวนซูออยด์มากกว่าเพรียงหัวหอมที่ไม่ได้รับอาหารที่มี CG เป็นองค์ประกอบ อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มของเพรียงหอมที่ได้รับอาหารแบบชนิดเดียวกับกลุ่มของเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารแบบผสม (รูปที่ 4-13)



รูปที่ 4-13. สัดส่วนของจำนวนซูออยด์โดยเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองกับชุดควบคุม

4.3.2 **ความยาวซูออยด์**

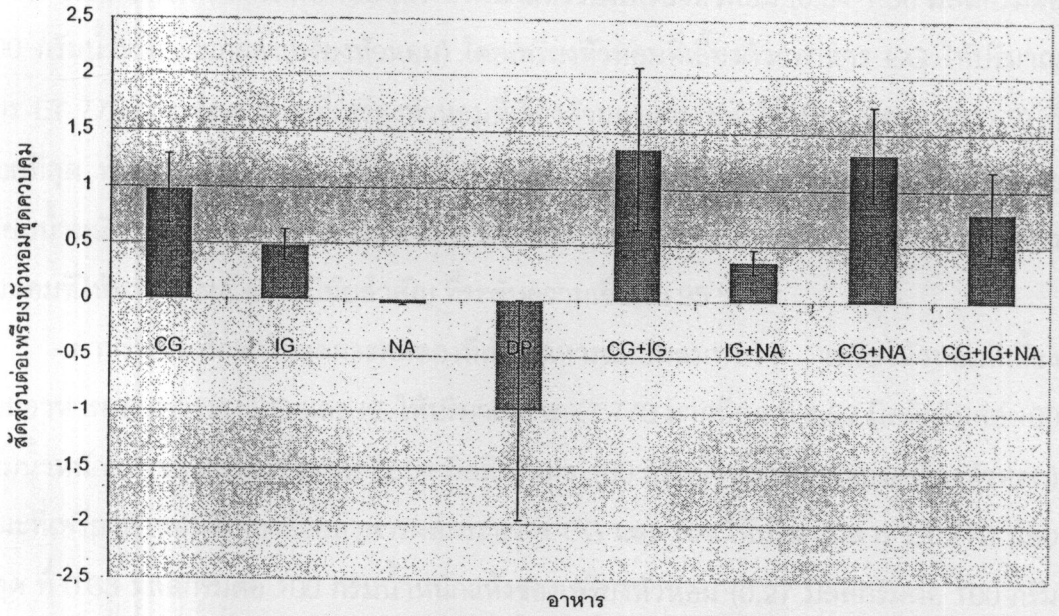
เพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารแบบผสมมีสัดส่วนของความยาวซูออยด์ต่อชุดควบคุมสูงกว่าเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารแบบชนิดเดียว ยกเว้นเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารผสม CG+IG ทั้งนี้พบว่าเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารที่มี NA เป็นองค์ประกอบมีความยาวซูออยด์มากกว่าเพรียงหัวหอมที่ไม่ได้รับอาหารที่มี NA เป็นองค์ประกอบ อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มของเพรียงหอมที่ได้รับอาหารแบบชนิดเดียวกับกลุ่มของเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารแบบผสม (รูปที่ 4-14)



รูปที่ 4-14. สัดส่วนของความยาวซูออยด์โดยเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองกับชุดควบคุม

4.3.3 พื้นที่ปกคลุมของโคโลนี

เพรียงหัวหอมที่ให้อาหารแบบผสมมีสัดส่วนของพื้นที่ปกคลุมโคโลนีต่อชุดควบคุมสูงกว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหารแบบชนิดเดียว ยกเว้นเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารผสมระหว่าง IG +NA และ CG+IG+NA ทั้งนี้พบว่าเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารที่มี CG เป็นองค์ประกอบมีพื้นที่ปกคลุมโคโลนีมากกว่าเพรียงหัวหอมที่ไม่ได้รับอาหารที่มี CG เป็นองค์ประกอบ อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มของเพรียงหอมที่ได้รับอาหารแบบชนิดเดียวกับกลุ่มของเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารแบบผสม (รูปที่ 4-15)

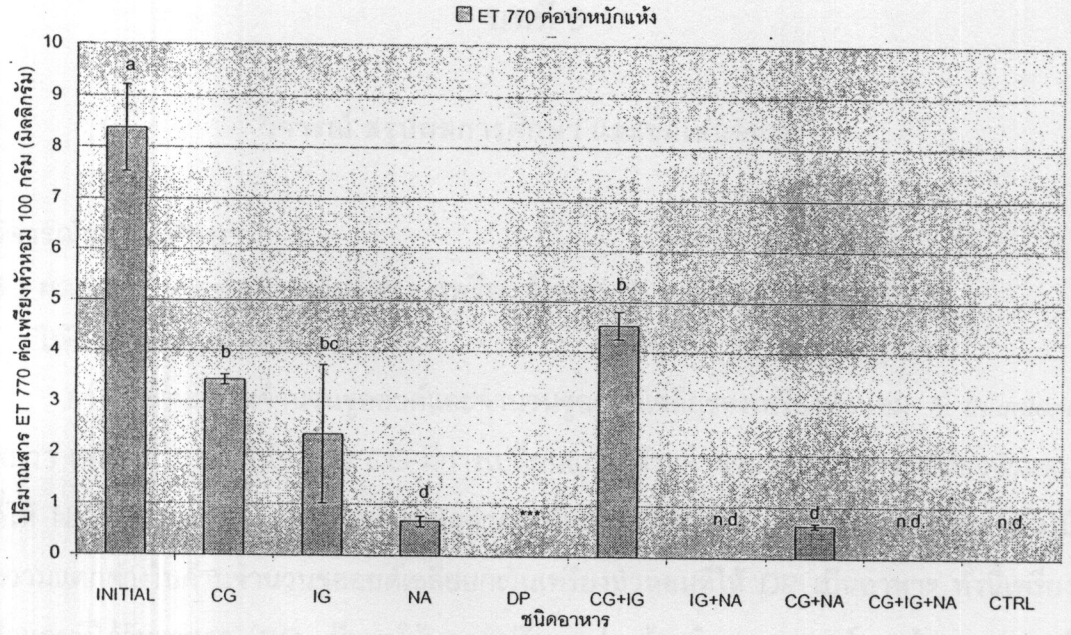


รูปที่ 4-15. สัดส่วนของพื้นที่ปกคลุมโคโลนีโดยเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองกับชุดควบคุม

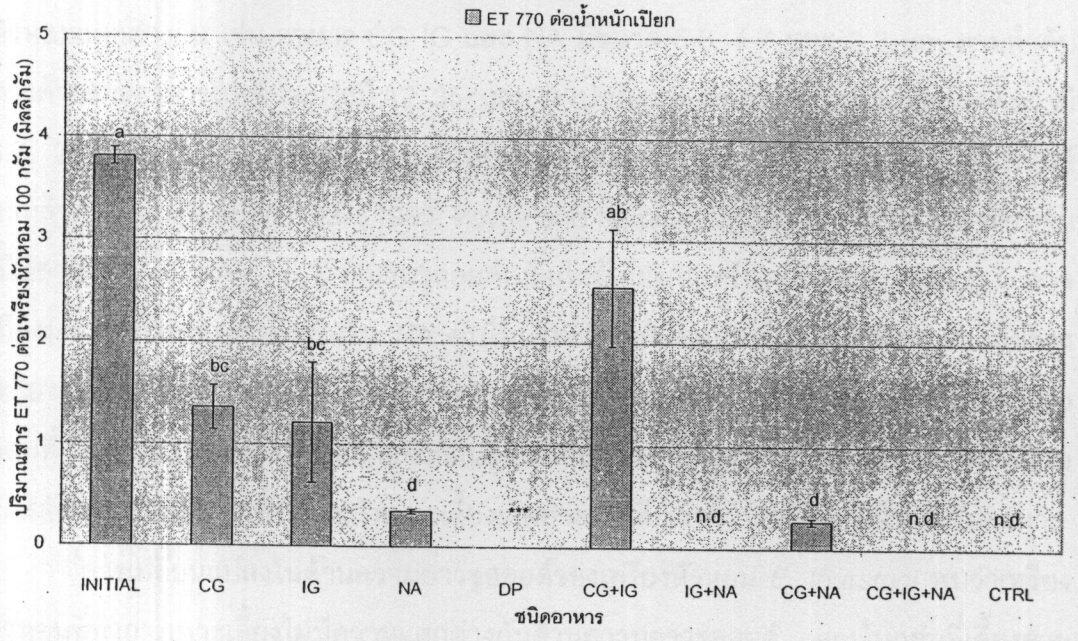
4.4 ผลของอาหารแบบชนิดเดียวและแบบผสมต่อการผลิตสาร Ecteinascidins จากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*

ผลของการสกัดสาร ET จากเพรียงหัวหอมก่อนและภายหลังการทดลองพบว่า เพรียงหัวหอมก่อนเริ่มทำการทดลอง (Initial) มีปริมาณสาร ET 770 สูงสุดที่ 8.37 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของเพรียงหัวหอม (3.81 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเปียกของเพรียงหัวหอม) ซึ่งสูงกว่าปริมาณ ET ที่ได้จากทุกกลุ่มภายหลังการทดลอง อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % สำหรับการเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหารแบบชนิดเดียวให้ปริมาณสาร ET 770 ในช่วง 0.68-3.43 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของเพรียงหัวหอม (0.34-1.36 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเปียกของเพรียงหัวหอม) โดยเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหาร CG ให้ปริมาณสาร ET 770 มากที่สุด ขณะที่เพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหาร NA ให้ปริมาณสาร ET 770 ที่น้อยที่สุด ทั้งนี้กลุ่มที่ได้รับ DP มีจำนวนซูออยด์ไม่เพียงพอต่อการสกัดสาร ET 770 ทั้งนี้เมื่อเทียบน้ำหนักแห้ง เพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร CG และ IG มีปริมาณสาร ET 770 มากกว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร NA อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

สำหรับการศึกษาในชุดการทดลองที่เป็นอาหารแบบผสมพบว่า เพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมระหว่าง CG และ IG ให้ปริมาณสาร ET 770 มากที่สุด ที่ 4.53 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของเพรียงหัวหอม (2.54 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเปียกของเพรียงหัวหอม) ขณะที่เพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมระหว่าง CG และ NA ให้ปริมาณสาร ET 770 น้อยที่สุด ที่ 0.63 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของเพรียงหัวหอม (0.27 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเปียกของเพรียงหัวหอม) ขณะที่อีก 3 ชุดการทดลองไม่พบปริมาณสาร ET 770 ทั้งนี้เมื่อเทียบน้ำหนักแห้งพบว่า อาหารผสมระหว่าง CG และ IG มีปริมาณสาร ET 770 ไม่แตกต่างจาก CG หรือ IG ที่มีค่าต่ำกว่า แต่มีความต่างจากเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร NA และเพรียงหัวหอมที่ให้อาหารผสมระหว่าง CG และ NA อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (รูปที่ 4-16 และ 4-17)



รูปที่ 4-16. ปริมาณสาร ET 770 ที่สกัดจากเพรียงหัว*หอม E. thurstoni* ตอนเริ่มต้นและจากระบบเพาะเลี้ยงเทียบกับน้ำหนักแห้งของเพรียงหัวหอม (*** คือ จำนวนซูออยด์ไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ปริมาณสาร ET 770, n.d. คือ ไม่สามารถตรวจพบสาร ET 770 จากแบบอาหารชนิดดังกล่าวได้)



รูปที่ 4-17. ปริมาณสาร ET 770 ที่สกัดจากเพรียงหัว*หอม E. thurstoni* ตอนเริ่มต้นและจากระบบเพาะเลี้ยงเทียบกับน้ำหนักเปียกของเพรียงหัวหอม (*** คือ จำนวนซูออยด์ไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ปริมาณสาร ET 770, n.d. คือ ไม่สามารถตรวจพบสาร ET 770 จากแบบอาหารชนิดดังกล่าวได้)

บทที่ 5

วิจารณ์ สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ

วิจารณ์ผลการศึกษา

5.1 ผลของอาหารต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบชนิดเดียว

การเปลี่ยนแปลงจำนวนซูออยด์และจำนวนซูออยด์เฉลี่ยของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* พบว่า เพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร CG มีการเปลี่ยนแปลงด้านจำนวนซูออยด์ดีกว่าเพรียงหัวหอมที่ให้ NA, DP และชุด CTRL อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างในด้านจำนวนซูออยด์เฉลี่ยยกเว้นเพรียงหัวหอมที่ให้ DP เป็นอาหาร ทั้งนี้เพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหาร CG มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงด้านจำนวนซูออยด์และจำนวนซูออยด์เฉลี่ยดีกว่าชุดการทดลองอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. turbinata* พบว่าเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหาร CG มีจำนวนซูออยด์ที่สูง ขณะที่เพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหาร NA มีจำนวนซูออยด์ที่น้อยกว่า (Duckworth *et al.* 2004) ทั้งนี้อาหารแต่ละชนิดที่ให้เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* มีขนาดและปริมาณสารอาหารที่แตกต่างกันซึ่งอาจส่งผลต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอมแตกต่างกัน เช่น อาหาร CG IG และ NA มีขนาด 5-8, 4-7 และ 2-3 µm ตามลำดับ ทางด้านสารอาหารโปรตีนพบว่ามี 12, 35, และ29 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ คาร์โบไฮเดรตพบว่ามี 4.7, 7.8, และ12.9 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และไขมันพบว่ามี 7.2, 18 และ23 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (Brown *et al.*, 1997, 1998; Payne and Rippingale, 2000) ทั้งนี้เพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร NA มีจำนวนซูออยด์เฉลี่ยใกล้เคียงกับเพรียงหัวหอมชุดควบคุม อาจเนื่องมาจากชนิดของสารอาหารใน NA กับในน้ำทะเลใกล้เคียงกันหรือจำนวนซูออยด์เฉลี่ยของเพรียงหัวหอมที่ได้รับ NA เกิดจากสารอาหารที่อยู่ในน้ำทะเลเพียงอย่างเดียว สำหรับเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วย DP ส่งผลลบในด้านจำนวนซูออยด์ เนื่องจากอาหาร DP มีน้ำหนักมากทำให้จมสู่ก้นถังอย่างรวดเร็ว อีกทั้งน้ำในถังเพาะเลี้ยงเกิดการเน่าเสียเร็วกว่าถังที่ไม่ได้ให้ DPเป็นอาหาร

การเปลี่ยนแปลงในด้านความยาวซูออยด์ของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* พบว่าเพรียงหัวหอมที่ทำการเพาะเลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันด้านความยาวซูออยด์ ยกเว้นกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหาร DP ที่มีความยาวซูออยด์น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % อย่างไรก็ตามพบว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร CG มีความยาวซูออยด์เฉลี่ยดีที่สุด ทั้งนี้เพรียงหัวหอมที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยส่วนใหญ่ มีความยาวใกล้เคียงกับเพรียงหัวหอมที่อยู่ในสภาพธรรมชาติซึ่งมีช่วงความยาวระหว่าง 8-12 มิลลิเมตร (Chavanich *et al.*, 2005)

ด้านพื้นที่การปกคลุมโคโลนีของเพรียงหัวหอมพบว่า เพรียงหัวหอมที่ให้ CG มีพื้นที่ปกคลุมของโคโลนีเฉลี่ยแตกต่างจากเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร DP อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ทั้งนี้พื้นที่ปกคลุมโคโลนีของเพรียงหอมที่เลี้ยงด้วยอาหาร CG ไม่แตกต่างจากเพรียงหัวหอมที่ให้ NA, DP, และ CTRL เป็นอาหาร อย่างไรก็ตามเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร CG มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของพื้นที่การปกคลุมโคโลนีสูงกว่าแบบอาหารดังกล่าว การที่เพรียงหัวหอมที่ให้ CG เป็นอาหารมีพื้นที่ปกคลุมโคโลนีสูงเนื่องจากมีจำนวนซูออยด์และความยาวซูออยด์สูง ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ปกคลุมโคโลนีของเพรียงหัวหอม

5.2 ผลของอาหารต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบผสม

การเปลี่ยนแปลงของจำนวนซูออยด์ ความยาวซูออยด์และพื้นที่ปกคลุมของโคโลนีของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ได้รับอาหาร CG เป็นองค์ประกอบมีจำนวนซูออยด์และพื้นที่ปกคลุมโคโลนีมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ให้ CG เป็นอาหาร อีกทั้งกลุ่มที่ได้รับอาหารอาหารผสมที่ไม่มี CG เป็นส่วนประกอบในแบบอาหารจะทำให้ความยาวซูออยด์ของเพรียงหัวหอมไม่มีการเพิ่มขึ้นในช่วงชีวิตที่ 2 ทั้งนี้กลุ่ม CTRL ที่ไม่ได้รับอาหารมีแนวโน้มการลดลงด้านจำนวนซูออยด์ ความยาวซูออยด์ และพื้นที่ปกคลุมโคโลนีต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น

ทั้งนี้เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ที่ให้อาหาร CG เป็นองค์ประกอบมีแนวโน้มการเติบโตที่ดีสอดคล้องกับการทดลองโดยการให้อาหารแบบชนิดเดียว ซึ่งพบว่าเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหาร CG มีการเติบโตที่ดีเช่นเดียวกัน

5.3 การเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างชุดทดลองกับชุดควบคุม ด้านจำนวนซูออยด์ ความยาวซูออยด์ และพื้นที่ปกคลุมของโคโลนี

การที่เพรียงหัวหอมที่ให้อาหารแบบผสมมีสัดส่วนระหว่างชุดการทดลองกับชุดควบคุมสูงกว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหารแบบชนิดเดียว อาจเนื่องมากจากการให้อาหารแบบผสมทำให้เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ได้รับสารอาหารที่ครบถ้วนมากกว่าการให้อาหารแบบชนิดเดียว (Brown *et al.*, 1998; Parrish *et al.*, 1998) ทั้งนี้เพรียงหัวหอมที่ให้อาหารที่มี CG เป็นองค์ประกอบในแบบอาหาร ทำให้เพรียงหัวหอมมีสัดส่วนด้านจำนวนซูออยด์และพื้นที่ปกคลุมโคโลนีต่อชุดควบคุมสูงกว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหารที่มี NA เป็นองค์ประกอบ อาจเนื่องมาจากอาหาร CG เป็นอาหารที่มีขนาดและคุณค่าทางโภชนาการที่เหมาะสมมากกว่าอาหาร NA (Payne and Rippingale, 2000)

5.4 ผลของอาหารชนิดเดียวและต่างชนิดต่อการผลิตสาร Ecteinascidins **ของเพรียงหัวหอม** *E. thurstoni*

สาร ET 770 และ ET 786 สร้างมาจากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* (นภรรณพ บุญถนอม และ ปิติ จันทรวรโชติ, 2544; Charupant, 2000; Suwanborirux *et al.*, 2002) พบว่าปริมาณสาร ET 786 ที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้สามารถวิเคราะห์สาร ET 770 ได้ในปริมาณสูง ทั้งนี้จากการทดลองพบว่าเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ก่อนการทดลอง (Initial) สามารถสกัดแยกสารได้ปริมาณ 3.81 x 10^{-3} % เมื่อเทียบกับน้ำหนักเปียก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ นภรรณพ บุญถนอม และ ปิติ จันทรวรโชติ (2544) ซึ่งสกัดแยกสาร ET 770 จากเพรียงหัวหอมตามธรรมชาติได้ปริมาณ 3 x 10^{-3} % เมื่อเทียบกับน้ำหนักเปียก

จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร ET ในแต่ละชุดการทดลองพบว่า ปริมาณสาร ET 770 ที่สกัดได้มีปริมาณน้อยกว่าเพรียงหัวหอมก่อนการทดลอง อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ทั้งนี้เนื่องจากในทะเลมีสารอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* มากกว่าในระบบเพาะเลี้ยง (Carballo *et al.*, 1999; Duckworth *et al.*, 2003)

ปริมาณผลผลิตสาร ET 770 ที่ได้จากเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิดเดียวพบว่าทุกชุดการทดลองมีปริมาณสาร ET 770 ต่างกับเพรียงหัวหอมก่อนการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหาร CG และ IG ให้ปริมาณสาร ET 770 มากกว่าเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหาร NA อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ทั้งนี้เนื่องด้วยการเติบโตที่ดีส่งผลให้เพรียงหัวหอมสามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณที่สูง (Duckworth *et al.*, 2003, 2004)

สำหรับการศึกษาในชุดการทดลองที่เป็นอาหารแบบผสมพบว่า ทุกชุดการทดลองมีปริมาณสาร ET 770 ต่างกับเพรียงหัวหอมก่อนการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ทั้งนี้เพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมระหว่าง CG และ IG ให้ปริมาณสาร ET 770 มากที่สุด ขณะที่เพรียงหัวหอมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมระหว่าง CG และ NA ให้ปริมาณสาร ET 770 น้อยที่สุด ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Duckworth *et al.* (2004) พบว่าเพรียงหัวหอม *E. turbinata* ที่ให้อาหารผสมระหว่าง CG และ IG สามารถผลิตสาร ET 770 ได้ในปริมาณที่สูง

แพลงก์ตอนที่ใช้เลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* เป็นอาหารที่จัดหาได้ง่ายและใช้อย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงสัตว์จำพวกฟองน้ำและเพรียงหัวหอม ทั้งนี้ขนาดของอาหารมีผลต่อการเติบโตของสัตว์กลุ่มดังกล่าว โดยอาหารต้องมีขนาดไม่เล็กหรือใหญ่เกินไป (Brown *et al.*,

1997, 1998; Duckworth *et al.*, 2004) ในการศึกษาครั้งนี้มีการผสมระหว่างชนิดอาหารเนื่องด้วยการให้อาหารแบบผสม อาจส่งให้เพรียงหัวหอมได้รับสารอาหารที่ครบถ้วนมากกว่าการให้อาหารแบบชนิดเดียว (Brown *et al.*, 1998; Parrish *et al.*, 1998)

จากการศึกษาพบว่า จำนวนซูออยด์ ความยาวซูออยด์ และพื้นที่ปกคลุมโคโลนี ของเพรียงหัวหอมลดลงภายในสัปดาห์แรกของการทดลอง เนื่องจากการตายของซูออยด์ การหดกลับของซูออยด์เข้าไปในสโตลอนและบางซูออยด์หลุดขณะทำการทดลอง อย่างไรก็ตามมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนซูออยด์ ความยาวซูออยด์ และพื้นที่ปกคลุมโคโลนีของเพรียงหัวหอมหลังจากสัปดาห์แรกของการทดลอง ทั้งนี้สุขภาพโคโลนีของเพรียงหัวหอมขณะเก็บขึ้นมาจากทะเลอาจส่งผลต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอมในระบบเพาะเลี้ยงเช่นกัน (Thompson *et al.*, 1985)

ช่วงชีวิตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในธรรมชาติมีช่วงชีวิตเฉลี่ยประมาณ 60 วัน (ปิยะ โกยสิน, 2548; Chavanich *et al.*, 2005) ซึ่งยาวกว่าเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงในระบบเลี้ยงซึ่งมีช่วงชีวิตเฉลี่ยประมาณ 35 วัน อนึ่งการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. turbinata* ในระบบเพาะเลี้ยงมีช่วงชีวิตเฉลี่ยใกล้เคียงกัน (Duckworth *et al.*, 2004) การที่เพรียงหัวหอมในธรรมชาติมีช่วงชีวิตที่ยาวกว่าเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยง อาจเนื่องมาจากในทะเลมีความสมบูรณ์ของอาหารรวมถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ขณะที่ในระบบเลี้ยงมีข้อจำกัดทางด้านอาหารรวมถึงสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมือนกับในทะเล (Bingham and Walters, 1989; Bingham and Young, 1991) แม้ว่าเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงมีช่วงชีวิตที่สั้นกว่าแต่มีประโยชน์ต่อการเก็บเกี่ยวเพรียงหัวหอมเพื่อสกัดแยกสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องด้วยสามารถเก็บเพรียงหัวหอมได้เป็นจำนวนครั้งที่มากขึ้นในรอบปี

ทั้งนี้พบว่าเพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารแบบชนิดเดียวมี 2 ช่วงชีวิต ขณะที่เพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารแบบผสมมี 1 ช่วงชีวิต ตลอดระยะเวลา 9 สัปดาห์ที่ทำการทดลอง การที่เพรียงหัวหอมที่ได้รับอาหารแบบผสมมีเพียง 1 ช่วงชีวิต อาจเนื่องมาจากปัจจัยทางด้านอาหารที่ไม่เหมาะสมซึ่งปัจจัยด้านอาหารมีความสำคัญต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. turbinata* ในระบบเลี้ยง โดยการให้อาหารจำพวกแพลงก์ตอนพืชที่ต่างชนิดและในปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่า *E. turbinata* มีการเติบโตที่แตกต่างกัน (Duckworth *et al.*, 2004)

วัตถุสำหรับยึดเกาะของเพรียงหัวหอมเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเติบโต การอยู่รอด และการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งนี้เพรียงหัวหอมที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นเพรียงหัวหอมที่ยึดเกาะกับเพรียงหินเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นเมื่อเลี้ยงไประยะหนึ่งเกิดการตายของเพรียงหินทำให้พื้นผิวยึดเกาะของเพรียงหัวหอมเปลี่ยนสภาพไป ซึ่งส่งผลต่อการเติบโตของ

เพรียงหัวหอม (จิตติมา อุ้มอารีย์, 2549) จากการศึกษาของ Carballo *et al.* (2000) พบว่าไม้และพลาสติกเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. turbinata* ในทะเล ขณะที่ Duckworth และ Battershill (2003) และ Duckworth *et al.* (2004) พบว่าเพรียงหัวหอม *E. turbinata* ที่ปราศจากพื้นผิวยึดเกาะสามารถเติบโตได้ดีบนตาข่ายไนลอน

นอกจากนี้อีกปัจจัยหนึ่งอาจส่งผลต่อการเติบโตและการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเพรียงหัวหอม คือ ความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งพบว่าในสภาวะที่ความเข้มข้นของอาหารสูงทำให้เพรียงหัวหอมมีการเติบโตดี (Duckworth *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตามเมื่อปริมานความเข้มข้นของอาหารมากเกินไป เพรียงหัวหอมมีการเติบโตลดลงเนื่องจากอัตราการกรองของเพรียงหัวหอมลดลง (Petersen *et al.*, 1999)

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาโดยการให้อาหารแบบชนิดเดียวพบว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร CG มีการเติบโตและการผลิตสาร ET 770 ที่ดีเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น รองมาคือ เพรียงหัวหอมที่ให้อาหาร IG สำหรับการให้อาหารผสมพบว่าไม่มีความแตกต่างด้านการเติบโตระหว่างชุดทดลองแต่เพรียงหัวหอมมีแนวโน้มการเติบโตที่ดีเมื่อให้อาหารที่มี CG เป็นองค์ประกอบ ทั้งนี้พบว่าเพรียงหัวหอมที่ให้อาหารผสมระหว่าง CG และ IG สามารถให้สาร ET 770 ปริมาณสูงที่สุด ขณะที่เพรียงหัวหอมที่ให้อาหารที่มี NA เป็นองค์ประกอบให้สาร ET 770 ในปริมาณที่ต่ำ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* เพื่อผลผลิตสาร ET 770 ควรใช้แบบอาหารที่ให้ปริมาณสาร ET 770 ที่สูง คือ เพรียงหัวหอมที่ให้อาหารผสมระหว่าง CG และ IG รองมา คือ เพรียงหัวหอมที่ให้อาหารชนิดเดียว คือ CG ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในระบบเลี้ยงให้ปริมาณสาร ET 770 น้อยกว่าเพรียงหัวหอมที่เลี้ยงในทะเลแต่เนื่องด้วยการเลี้ยงในทะเลมีค่าใช้จ่ายสูงและสภาพอากาศ อาจทำให้ไม่สามารถเลี้ยงเพรียงหัวหอมในทะเลได้ ดังนั้นการเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในระบบเลี้ยงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณเพรียงหัวหอมได้ เนื่องจากสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอมได้ อีกทั้งเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงมีช่วงชีวิตสั้นทำให้สามารถเก็บเพรียงหัวหอมนำมาสกัดแยกสาร ET 770 ได้จำนวนครั้งที่มากกว่าการเลี้ยงเพรียงหัวหอมในทะเล

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาสามารถบ่งชี้ได้ว่าขั้นตอนการเก็บ การแบ่งโคโลนีของเพรียงหัวหอม การผูกโคโลนีกับแผ่นกระเบื้อง และวิธีการขนส่งโคโลนีต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญเพื่อให้เกิดความบอบช้ำกับเพรียงหัวหอมน้อยที่สุด (Duckworth *et al.*, 2004) ขณะทำการเลี้ยงหากพบสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น ฟองน้ำหรือเพรียงหัวหอมชนิดอื่นเติบโตใกล้กับโคโลนีของเพรียงหัวหอมที่ทำการเพาะเลี้ยง ควรกำจัดทิ้งเนื่องด้วยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้อาจแย่งอาหารและพื้นที่การเติบโตของเพรียงหัวหอม ทั้งนี้ช่วงเวลาการเก็บซูออยด์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร ET 770 ควรเก็บในช่วงที่เพรียงหัวหอมมีจำนวนซูออยด์สูงที่สุดตามชุดการทดลอง เนื่องจากเพรียงหัวหอมในแต่ละชุดการทดลองมีช่วงการเติบโตสูงสุดแตกต่างกัน และควรเก็บเฉพาะตัวซูออยด์เหลือส่วนที่เป็นสโตลอนเพื่อเพิ่มอัตราการรอดของเพรียงหัวหอมในวงจรชีวิตต่อไป

ความเข้มข้นของอาหารอาจส่งผลต่อการเติบโตและการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ดังนั้นการศึกษาครั้งต่อไปควรใช้อาหารที่มี CG เป็นองค์ประกอบและให้ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน นอกจากนี้ควรนำปัจจัยทางกายภาพ เช่น แสงและความเค็มที่ส่งผลต่อการเติบโตดีที่สุดมาทำการศึกษาร่วมกับปัจจัยทางด้านอาหาร ซึ่งจะทำให้การเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในระบบเพาะเลี้ยงมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นและสามารถสกัดแยกสาร ET 770 ให้เพียงพอต่อการไปใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จิตติมา อุ้มอารีย์. 2549. **ผลของแสงและความเค็มต่อการเติบโตและการผลิตสาร** Ecteinascidins **ของเพรียงหัวหอม** *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภรรณพ บุญถนอม และ ปิติ จันทรวรโชติ. 2544. **การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านมะเร็ง** ecteinascidin alkaloids **จากเพรียงหัวหอม** *Ecteinascidia* sp. **ของไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยะ โกยสิน. 2548. **ชีววิทยาของเพรียงหัวหอม** *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 **เพื่อการเพาะเลี้ยง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Berrill, N. J. 1947. The structure, tadpole and budding ascidian *Pycnoclavella Aurilucens* Garstang. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom** 27: 245-251.

Berrill, N. J. 1955. **The Origin of Vertebrates.** London : Oxford University Press,

Bingham, B. L. 1997. Light cycles and gametogenesis in three temperate ascidian species. **Invertebrate Biology** 116: 61-70.

Bingham, B. L. and Walters, L. J. 1989. Solitary ascidians as predators of invertebrate larvae: evidence from gut analyses and plankton samples. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 131: 147-159.

Bingham, B. L. and C. M. Young. 1991. Larval behavior of the ascidian *Ecteinascidia turbinata* (Herdman): an in-situ experimental study of the effects of swimming on dispersal. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 145: 189-204.

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. and Dunstan, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture** 151: 315-331.

Brown, M. R., McCausland, M. A. and Kowalski, K. 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. **Aquaculture** 165: 281-293.

Brusca, R. C. and Brusca, G. J. 1990. **Invertebrates**. Sunderland : Sinauer Associates,

Burke, R. 1983. Neural control of metamorphosis in *Dendraster excentricus*. **Biological Bulletin** 164: 176-188.

Carballo, J. L., Hernandez-Zanuy, A., Naranjo, S., Kukurtzu, B. and Garcia Cagide, A. 1999. Recovery of *Ecteinascidia turbinata*, Herman 1880 (Ascidiacea: Perophoridae) populations after different levels of harvesting on a sustainable basis. **Bulletin of Marine Science** 65: 755–760.

Carballo, J. L., Naranjo, S., Kukurtzq, B., de La Calle, F., Herna´ndez-Zanuy, A. 2000. Production of *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea: Perophoridae) for obtaining anticancer compounds. **Journal of The World Aquaculture Society** 31: 481-490.

Charupant, K. 2000. **Chemical constituents of a Thai *Ecteinascia* tunicata**. Master' s Thesis, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

Chavanich, S., Koeysin, P., Viyakarn' V., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., Suwanborirux, K. and Poovachiranon, S. 2005. A tunicate from Thai coral reef: a potential source of new anticancer compounds. **Coral Reefs** 24: 621.

Corey, E. J., Gin, D. Y., Kania, R. S. 1996. Enantioselective total synthesis of ecteinascidin 743. **Journal of the American Chemical Society** 118: 9202-9203.

Day, E. C. 1919. The physiology of the nervous system of the tunicate. **Journal of Experimental Zoology** 28: 307–335.

Duckworth, A. R. and Battershill, C. N. 2003. Developing farming structures for production of biologically active sponge metabolites. **Aquaculture** 217: 139-156.

Duckworth, A. R., Samples, G. A., Wright, A. E. and Pomponi, S. A. 2003. In vitro culture of the tropical sponge *Axinella corrugata* (Demospongiae): effect of food cell concentration on growth, clearance rate and biosynthesis of stevensine. **Marine Biotechnology** 5: 519–527.

Duckworth, A. R., Samples, G. A., Wright, A. E. and Pomponi, S. A. 2004. In vitro culture of the ascidian Ecteinascidia turbinata to supply the antitumor compounds ecteinascidins. **Aquaculture** 241: 427-439.

Endo, A., Yanagisawa, A., Abe, M., Tohma, S., Kan., T. and Fukuyama, T. 2002. Total Synthesis of Ecteinascidin 743. **Journal of the American Chemical Society** 124: 6552.

Fiala-Médioni, A. 1978. Filter-feeding ethology of benthic invertebrates (Ascidians). IV. Pumping rate, filtration rate, filtration efficiency. **Marine Biology** 48: 243–249.

Flood, P. R. and Fiala-Medioni, A. 1981. Ultrastructure and histochemistry of the food trapping mucous film in benthic filter-feeders (Ascidians). **Acta Zoologica-Stockhholm** 62: 53-65.

Geldof, A. A., Mastbergen, S. C., Henrar, R. E., Faircloth, G.T. 1999. Cytotoxicity and neurocytotoxicity of new marine anticancer agents evaluated using *in vitro* assays. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** 44: 312-318.

Glasby, T. M. 2000. Surface composition and orientation interact to affect subtidal epibiota. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 248:177–190.

Goodbody, I. 1974. The physiology of asicdians. **Advances in Marine Biology** 12: 1-149.

Grosberg, R. K. 1981. Competitive ability influences habitat choice in marine invertebrates. **Nature** 90: 700-702.

Guan. Y., Sakai, R., Rinehart, K. L., Wang, A. H. 1993. Molecular and crystal structures of ecteinascidins: potent antitumor compounds from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics** 10: 793-818.

Hecht, S. 1918. The physiology of Ascidia atra. **Journal of Experimental Zoology** 25 : 229-299.

Holmes, N. 1973. Water transport in the ascidians *Styela clava* Herdman and *Ascidiella aspersa* (Müller). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 11: 1-13.

Ireland, C. M., Durso, A. R.,Scheuer, P. J. 1981. N,N[1] dipenethylurea a Metabolite from the Marine Ascidian *Didemnum ternatanum*. **Journal of Natural Products** 44: 360-361.

Jimeno, J. M., Faircloth, G., Cameron, L., Meely, K., Vega, E., Gomez, A., Fernandez Sousa-Faro, J. M. and Rinehart, K. 1996. Progress in the acquisition of new marine-derived anticancer compounds: development of ecteinascidin-743. **Drugs Future** 1: 1155-1165.

Jorgensen, C. B. 1955. Quantitative aspects of filter feeding in invertebrates. **Biology Reviews** 30: 391-454.

Kimura, M. 1996. Quaternary paleogeography of the Ryukyu Arc. **Journal of Geography** 105: 259-285.

Klugh, A. B. and Martin, R. J. 1927. The growth-rate of certain marine algae in relation to depth of submergence. **Ecology** 8: 221-231.

Kott, P. 1989. Form and function in the Ascidiacea. **Bulletin of Marine Science** 45: 253–276.

Kozloff, E. N. 1990. **Invertebrates**. Philadelphia : Saunders College Publishing,

Lambert, C. C. 2005. Historical introduction, overview, and reproductive biology of the protochordates. **Canadian Journal of Zoology** 83: 1-7.

Lambert, G. 2001. A global overview of ascidian introductions and their possible impact on endemic fauna. **Springer-Verlag**, Tokyo : 249–257.

Lambert, G. 2005. Ecology and natural history of the protochordates, **Canadian Journal of Zoology** 83: 34–50.

Lambert, G., Lambert, C. C. and Abbott, D P. 1981. Corella species in the American Pacific Northwest: distinction of *C. inflata* Huntsman, 1912 from C. *willmeriana* Herdman,1898 (Ascidiacea, Phlebobranchia). **Canadian Journal of Zoology** 59: 1493-1504.

Lindquist, N. and Fenical, W. 1991. New tambjamine class alkaloids from the marine ascidian *Atapozoa* sp. and its nudibranch predators – origins of the tambjamines in atapozoa. **Experientia** 47: 504–506.

Lindquist, N. and Hay, M. E. 1995. Can small rare prey be chemically defended the case for marine larvae. **Ecology** 76: 1347-1358.

Lindquist, N. and Hay, M. E. 1996. Palatability and chemical defenses of marine invertebrate larvae. **Ecological Monographs** 66: 431-450.

Lindquist, N., Hay, M. E. and Fenical, W. 1992. Defenses of ascidians and their conspicuous larvae: adult versus larval chemical defenses. **Ecological Monographs** 62: 547-568.

McGinitie, G. E. 1939. The method of feeding of *Chaetopterus* sp. **Biological Bulletin** 77: 115-180.

Mendola, D. 2003. Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economics. **Biomolecular Engineering** 20: 441–458.

Millar, R. H. 1971. The biology of ascidians. In: Russell, F. S. and Young, M (eds.). **Advances in Marine Biology** 9: 1-100.

Monniot, C., Monniot, F. and Laboute, P. 1991. Coral Reef Ascidians of New Caledonia. **Orstom**, Paris.

Monniot, F. and Monniot, C. 2001. Ascidians from the tropical western Pacific. **Zoosystema** 23:201–383.

Moyer, P. 2004. Sea squirt sheds light on advanced soft tissue sarcomas. **News Drug Discovery Today** 9: 156-157.

Newman, L. J., Norenburg, J. L. and Reed, S. 2000. Taxonomic and biological observations on the tiger flatworm, *Maritigrella crozieri* (Hyman, 1939), new combination (Platyhelminthes, Polycladida, Euryleptidae) from Florida waters. **Journal of Natural History** 34: 799-808.

Nomaguchi, T. A., Nishijima, C., Minowa, S., Hashimoto, M., Haraguchi, C., Amemiya, S. and Fujisawa, H. 1997. Embryonic thermosensitivity of the ascidian, *Ciona Savignyi*. **Zoological Science** 14: 511–516.

Payne, M. F. and Rippingale, R. J. 2000. Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. **Aquaculture** 187: 85-96.

Parrish, C. C., Wells, J. S., Yang, Z. and Dabinett, P. 1998. Growth and lipid composition of scallop juveniles, *Placopecten magellanicus*, fed the flagellate *Isochrysis galbana* with varying lipid composition and the diatom *Chaetoceros muelleri*. **Marine Biology** 133: 461-471.

Petersen, J. K., Mayer S. and Knudsen, M. A. 1999. Beat frequency of cilia in the branchial basket of the ascidian *Ciona intestinalis* in relation to temperature and algal cell concentration. **Marine Biology** 133: 185-192.

Petersen, J. K. and Riisgard, H. U. 1992. Filtration capacity of the ascidian *Ciona intestinalis* and its grazing impact in a shallow fjord. **Marine Ecology Progress Series** 88: 9-17.

Petersen, J. K., Schou, O. and Thor, P. 1995. Growth and energetics in the ascidian *Ciona intestinalis*. **Marine Ecology Progress Series** 120: 175–184.

Ruppert, E. E. and Barnes, R. D. 1994. **Invertebrate Zoology**, 6th Edition. New York : Saunders College Publishing,

Ruppert, E. E. and Fox, R. S. 1988. **Seashore animals of the Southeast**. South Carolina : University of South Carolina Press,

Ruppert, E. E. and Barnes, R. D. 1994. **Invertebrate Zoology: a Functional evolutionary approach**, 7th Edition. London : Thomson, Brooks/Cole,

Satoh, N. 1994. **Developmental biology of Ascidian**. Canbridge : Cambridge University Press,

Schwartsmann, G. 2000. Marine organisms and other novel natural sources of new cancer drugs. **Annals of Oncology** 11: 235-243.

Scotto, K. W. 2002. ET-743: a novel marine-derived anti-tumor agent, **Anti-Cancer Drugs** 13: 3–6

Sebens, K. P. 1983. The larval and juvenile recruitment of the temperate octocoral *Alcyonium siderium* Verrill. II. Fecundity, survival, and juvenile growth. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecolology** 72: 263-285.

Suwanborirux, K., Charupant, K., Amnuoypol, S., Pummangura, S., Kubo, A. and Saito, N. 2002. Ecteinascidins 770 and 786 from the Thai Tunicate *Ecteinascidia thurstoni*. **Journal of Natural Products** 65: 935- 937.

Svane, I. B. 1984. Observations on the long-term population dynamics of the perennial ascidian, *Ascidia mentula* 0. F. Muller, on the Swedish west coast. **Biological Bulletin** 167: 630-646.

Svane, I.B. and Young, C. M. 1989. The ecology and behavior of ascidian larvae. **Oceanography and Marine Biology Annual Reviews** 27: 45-90.

Thompson, J. E., Walker, R. P. and Faulkner, D. J. 1985. Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, U.S.A. **Marine Biology** 88: 11-21.

Thorson, G. 1964. Light as an ecological factor in the dispersal and settlement of larvae of marine bottom invertebrates. **Ophelia** 1: 167-208.

Torrence, S. A. 1980.The styelid photolith: A compound sense organ in ascidians. **American Zoologist** 20: A890.

Urdiales, J., Morata, P., Nunez De Castro, I. and Sanchez-Jimenez, F. 1996. Antiproliferative effect of dehydrodidemnin B (DDB), a depsipeptide isolated from Mediterranean tunicates. **Cancer Letters** 102: 31-37.

Vazquez, E. and Young, C. M. 1996. Responses of compound ascidian larvae to haloclines. **Marine Ecology Progress Series** 133: 179-190.

Wilkinson, C. R. and Vacelet, J. 1979. Transplantation of marine sponges to different conditions of light and current. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 37: 91-104.

Wright, A. E., Forleo, D. A., Gunawardana, G. P., Gunasekera, S. P., Koehn F. E. and McConnell, O. J. 1990. Antitumor tetrahydroisoquinoline alkaloids from the colonial ascidian *Ecteinascidia turbinate*. **Journal of Organic Chemistry** 55: 4508–4512.

Young, C. M. and Bingham, B. L. 1987. Chemical defense and aposematic coloration In larvae of the ascidian *Ecteinascidia turbinata*. **Marine Bilogy** 96: 539-544.

Young, C. M. and Braithwaite, L. F. 1980. Orientation and current-induced flow in the stalked ascidian *Styela montereyensis*. **Biological Bulletin** 159: 428–440.

Young, C. M., and Chia, F. S. 1981. Laboratory evidence for delay of larval settlement in response to a dominant competitor. **International Journal of Invertebrate Reproduction** 3: 221-226.

Young, J. Z. 1962. **The Life of Vertebrates**, 2nd Edition. New York : Oxford University Press,

Young, J. Z. 1981. **Life of the vertebrates**, 3rd Edition. New York : Oxford University Press,

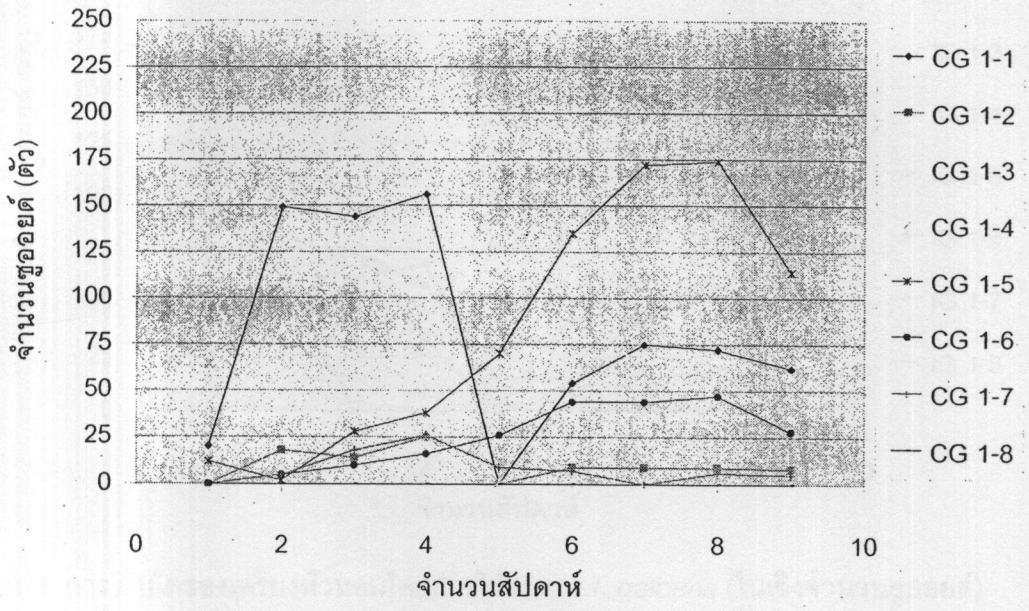
Zelek, L., Yovine, A. and Brain, E. 2000. Preliminary results of phase II study of ecteinascidin-743 (ET-743) with the 24 h (H) continuous infusion (CI) Q3weeks schedule in pretreated advanced/metastatic breast cancer (A/MBC) patients (Pts). **Proceedings of the 11th NCI EORTC-AACR Symposium on New Drugs in Cancer Therapy, Amsterdam, The Netherlands**: p. 85a.

Zewail- Foote, M. and Hurley, L. H. 1999. Ecteinascidin 743: a minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove. **Journal of Medical Chemistry** 42: 2943–2497.

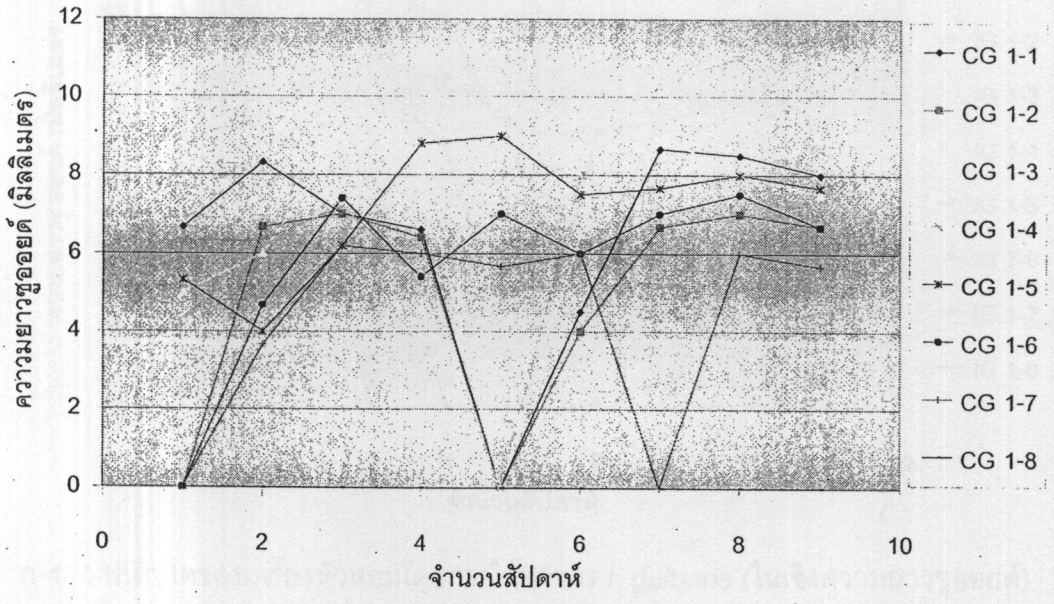
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

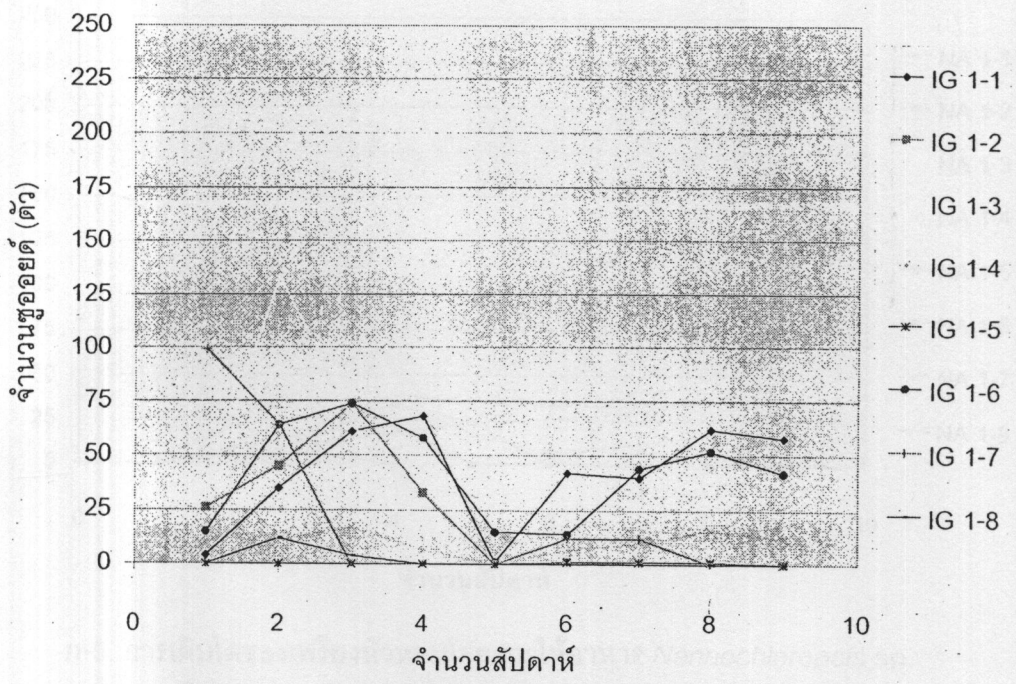
การเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบชนิดเดียว



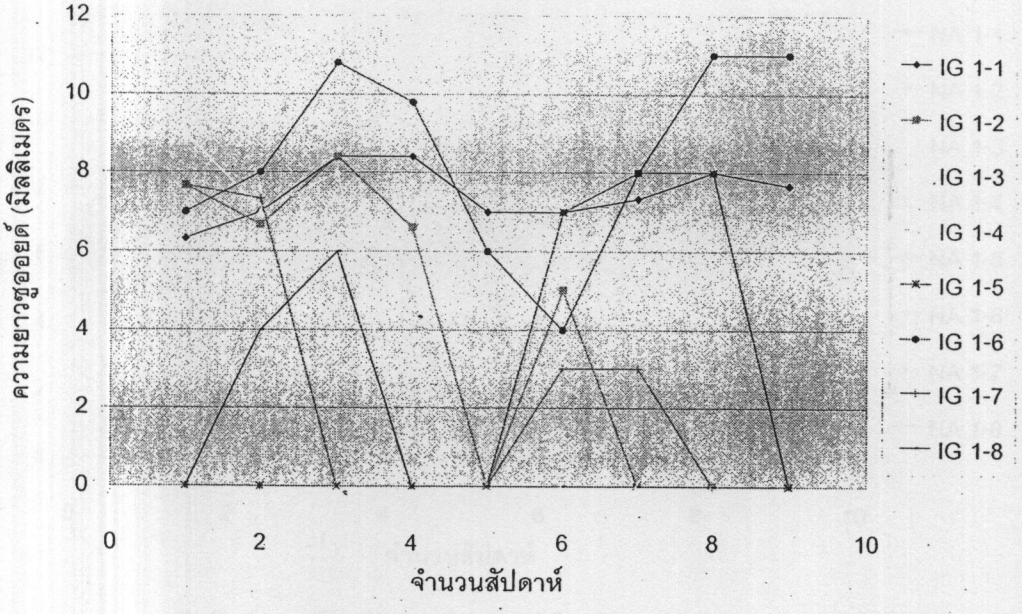
ก-1. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหาร *C. gracilis* (ในเชิงจำนวนซูออยด์)



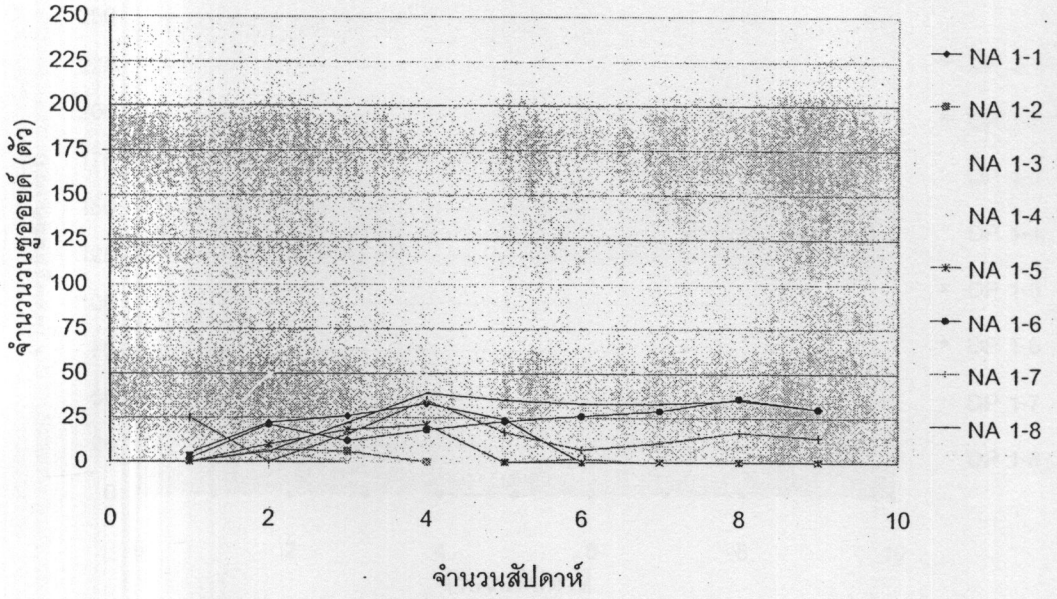
ก-2. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหาร *C. gracilis* (ในเชิงความยาวซูออยด์)



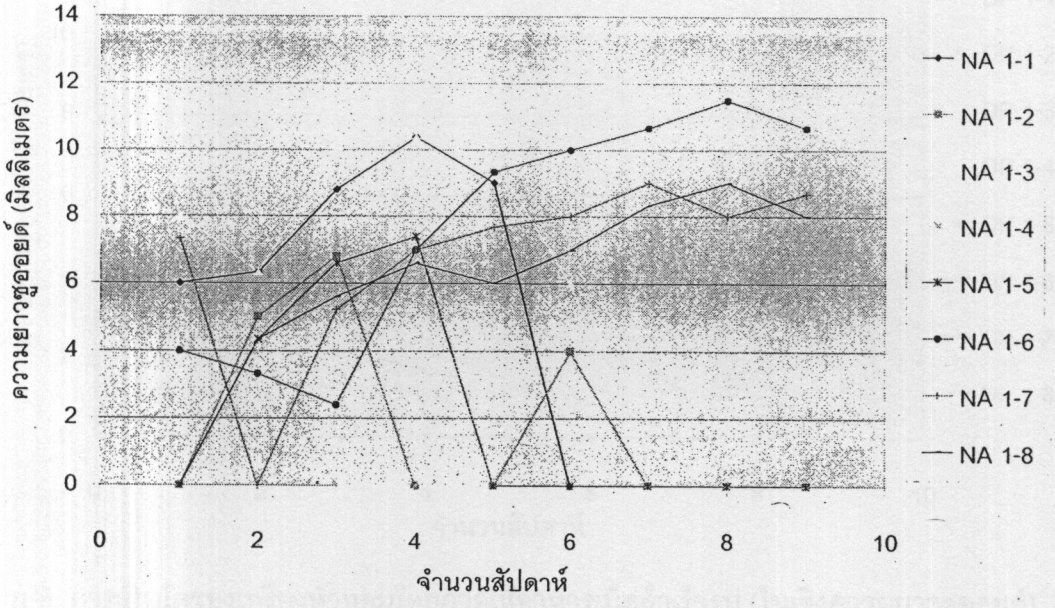
ก-3. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหาร *I. galbana* (ในเชิงจำนวนซูออยด์)



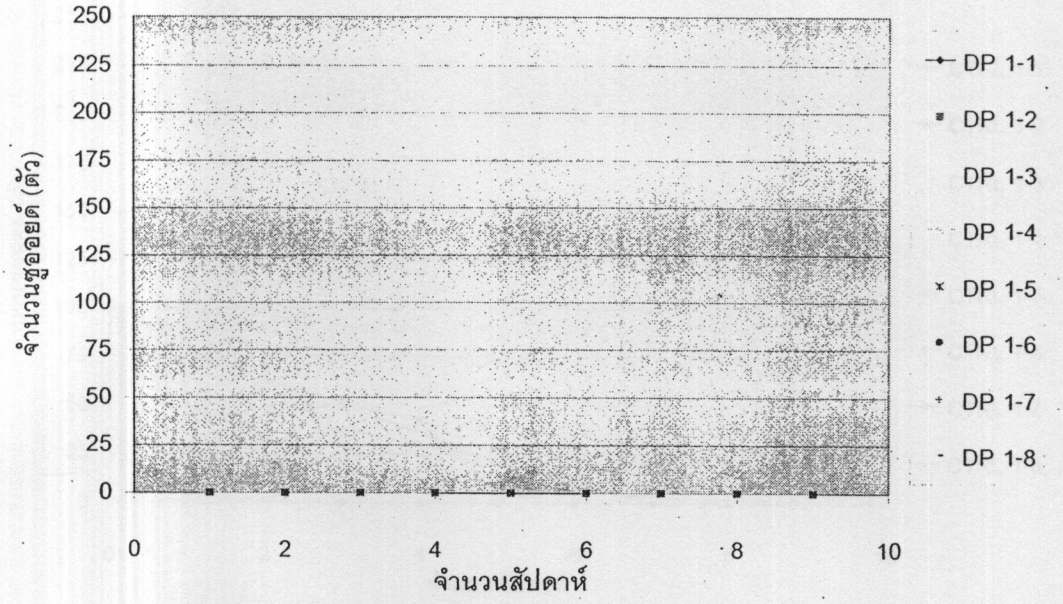
ก-4. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหาร *I. galbana* (ในเชิงความยาวซูออยด์)



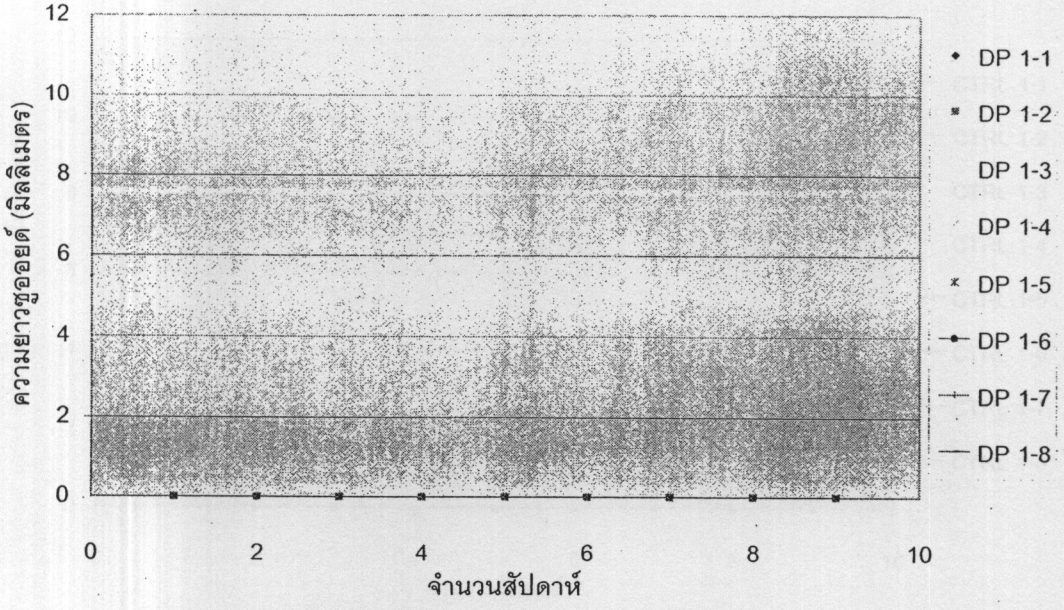
ก-5. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหาร *Nannochloropsis* sp. (ในเชิงจำนวนซูออยด์)



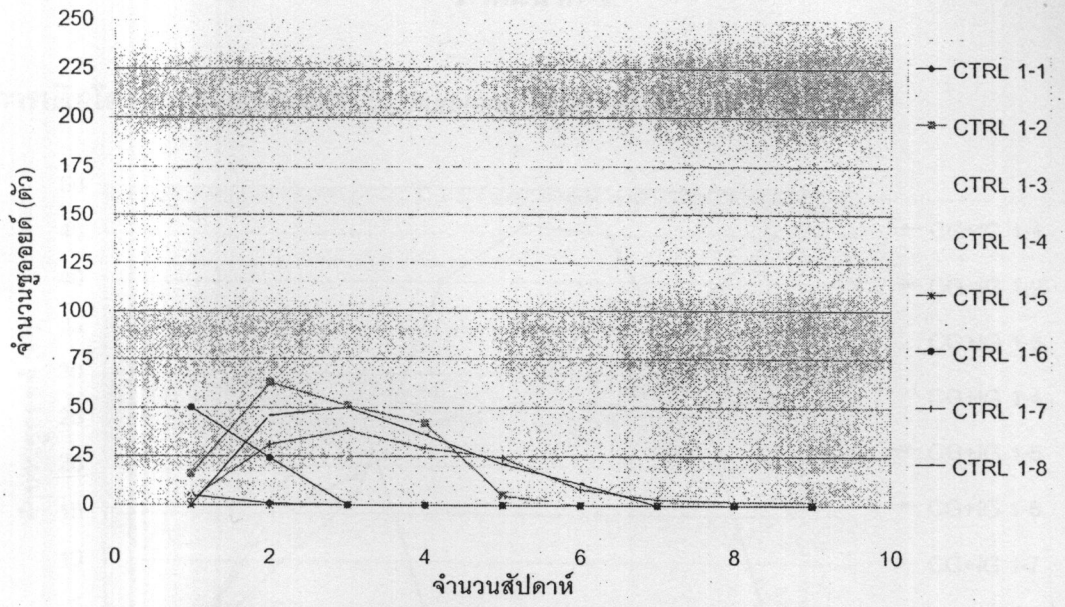
ก-6. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหาร *Nannochloropsis* sp. (ในเชิงความยาวซูออยด์)



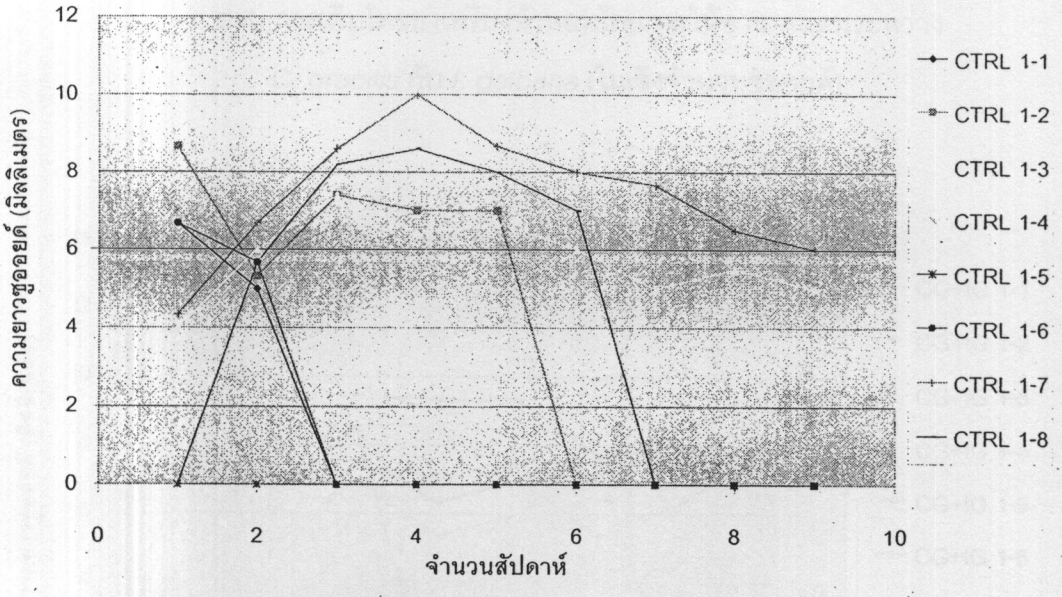
ก-7. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป (ในเชิงจำนวนซูออยด์)



ก-8. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป (ในเชิงความยาวซูออยด์)



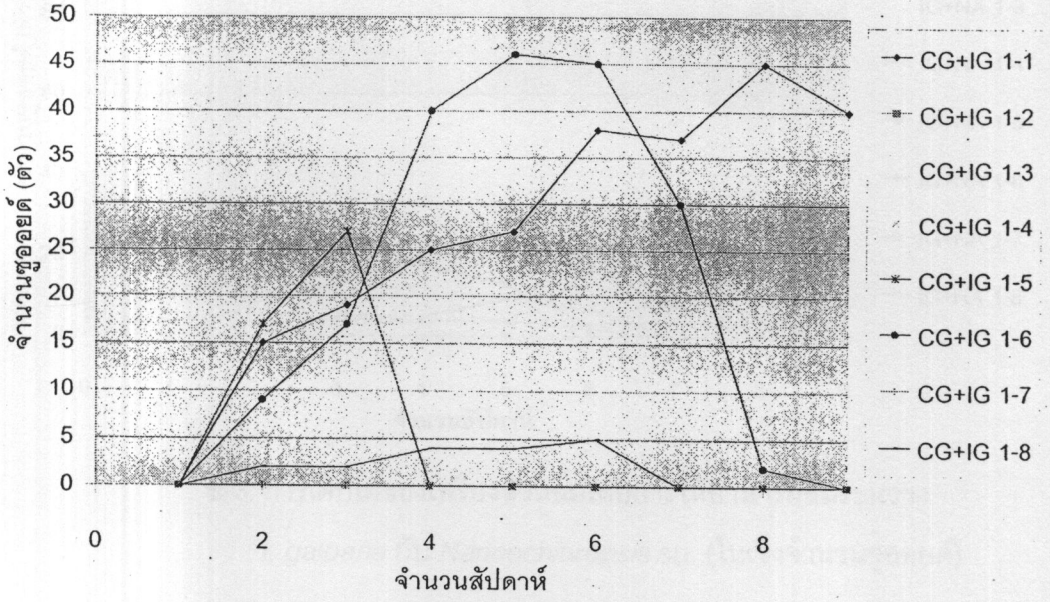
ก-9. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการไม่ให้อาหาร (ในเชิงจำนวนซูออยด์)



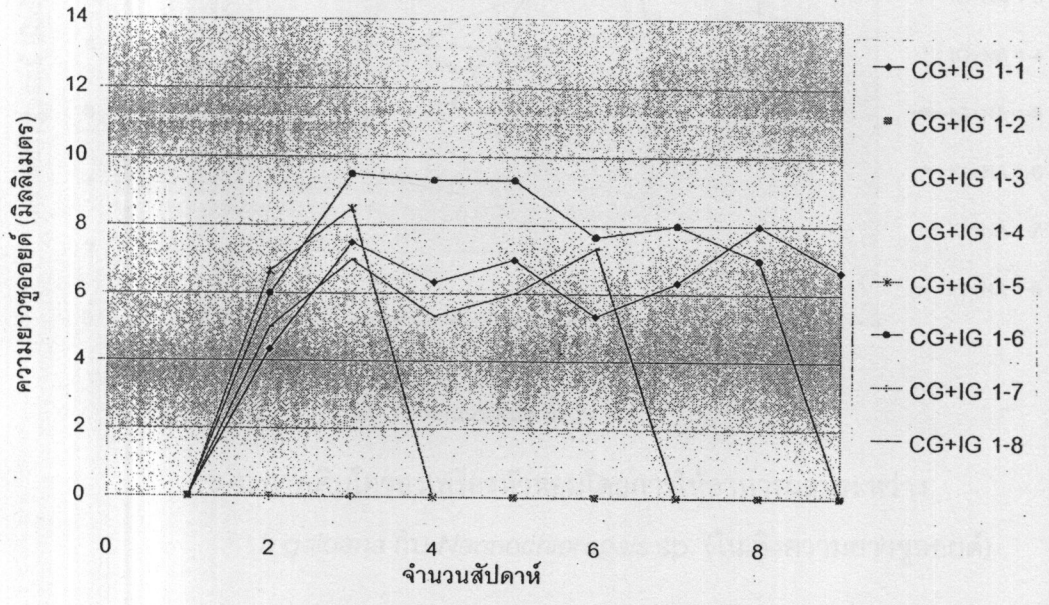
ก-10. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการไม่ให้อาหาร (ในเชิงความยาวซูออยด์)

ภาคผนวก ข.

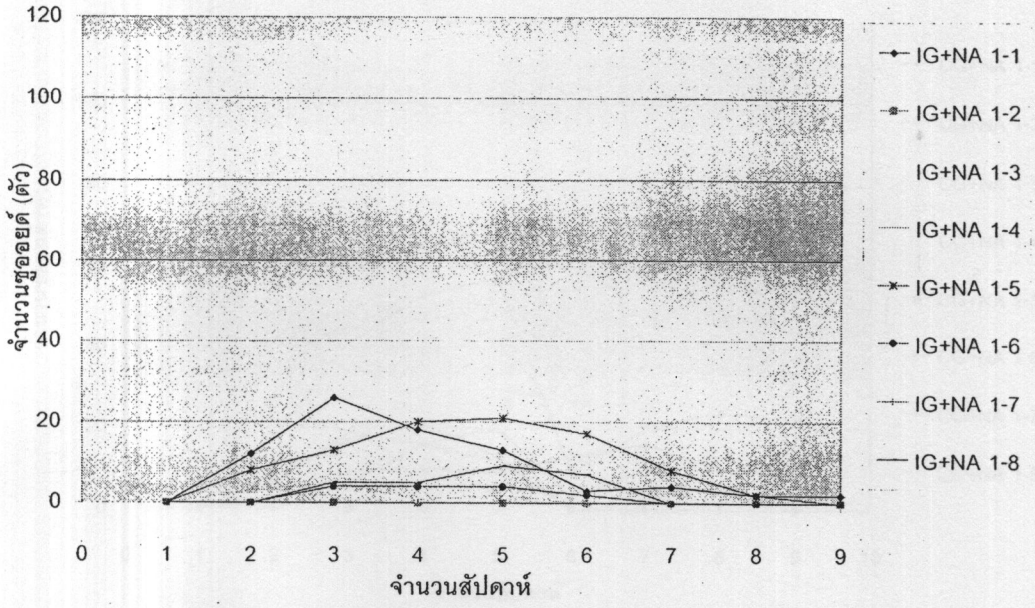
การเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยการให้อาหารแบบผสม



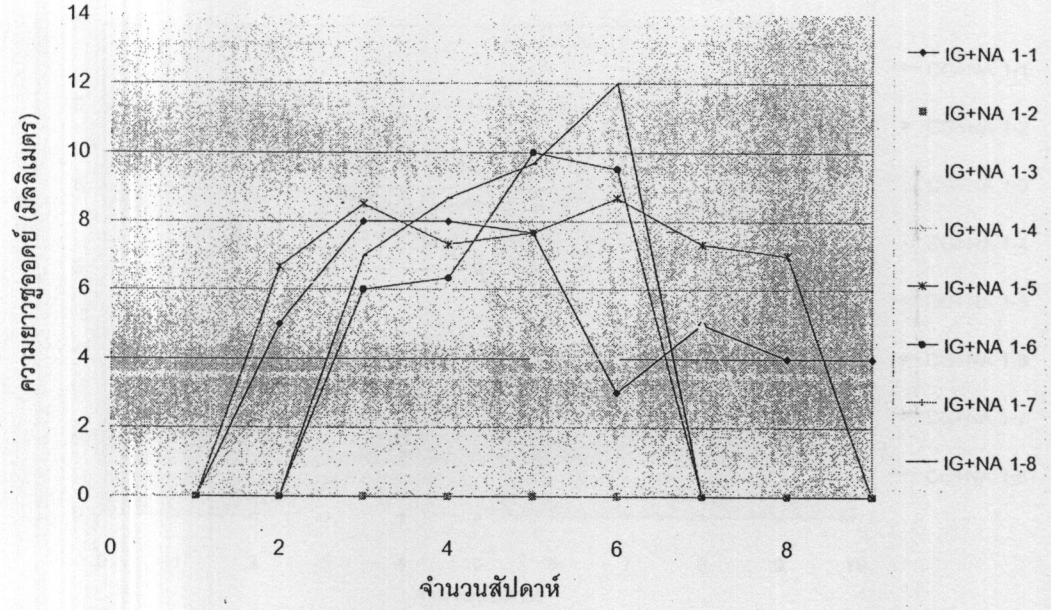
ข-1. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหารผสมระหว่าง *C. gracilis* กับ *I. galbana* (ในเชิงจำนวนซูออยด์)



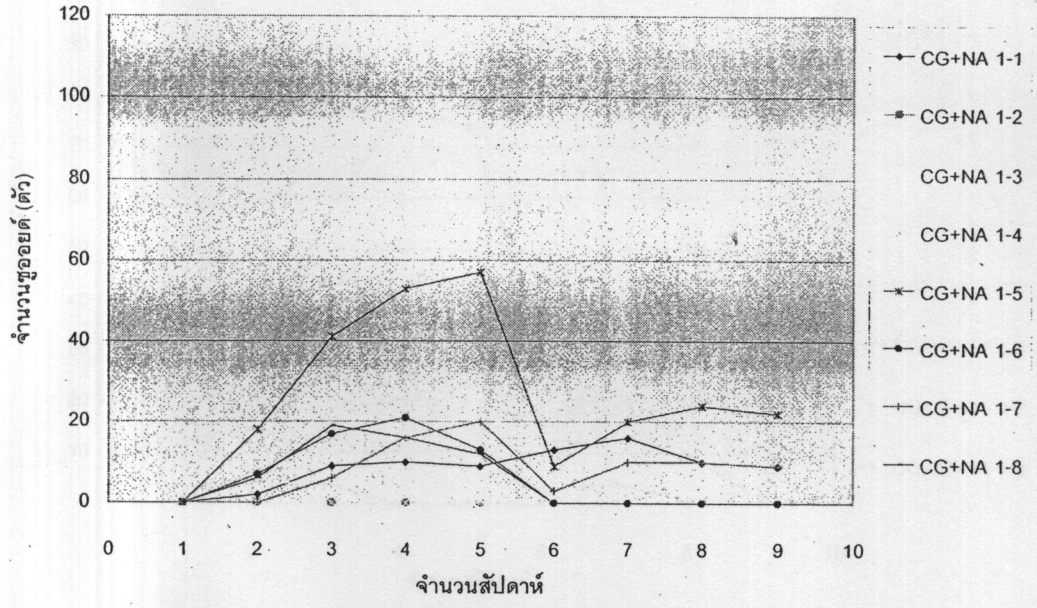
ข-2. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหารผสมระหว่าง *C. gracilis* กับ *I. galbana* (ในเชิงความยาวซูออยด์)



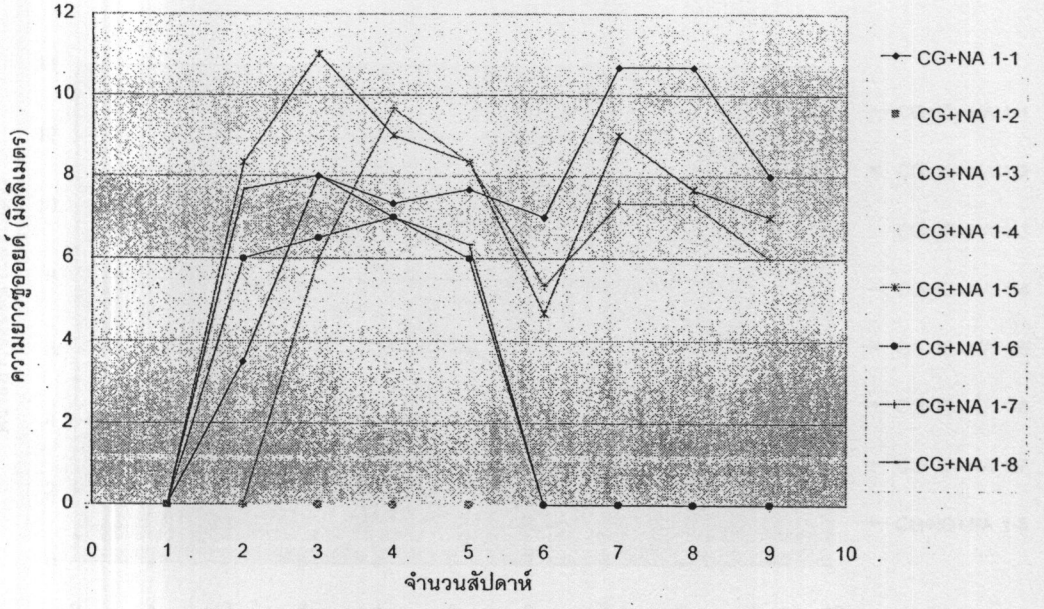
ข-3. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหารผสมระหว่าง *I. galbana* กับ *Nannochloropsis* sp. (ในเชิงจำนวนซูออยด์)



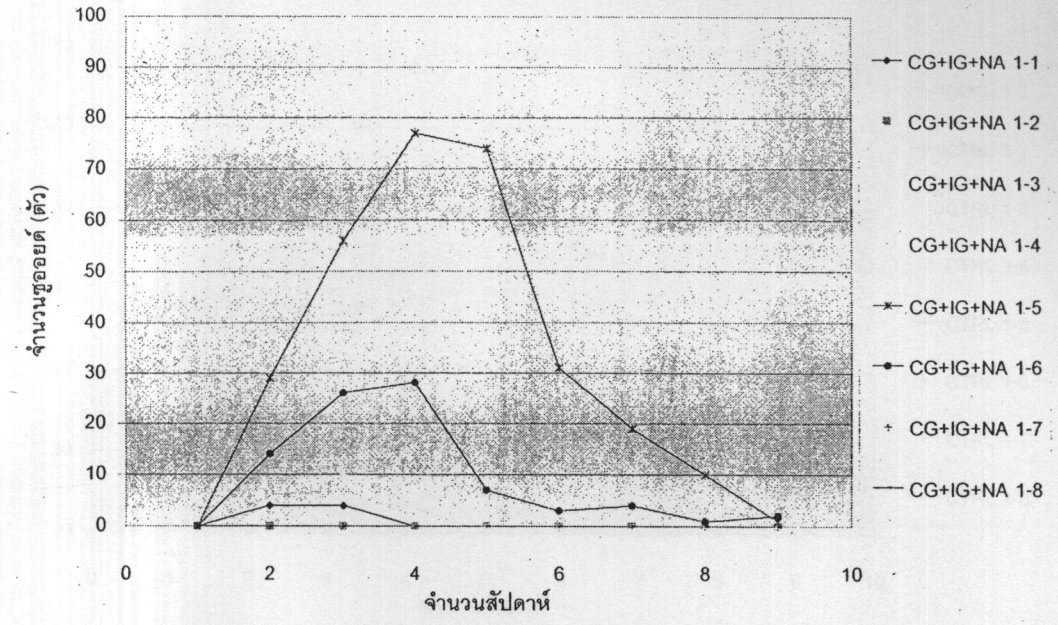
ข-4. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหารผสมระหว่าง *I. galbana* กับ *Nannochloropsis* sp. (ในเชิงความยาวซูออยด์)



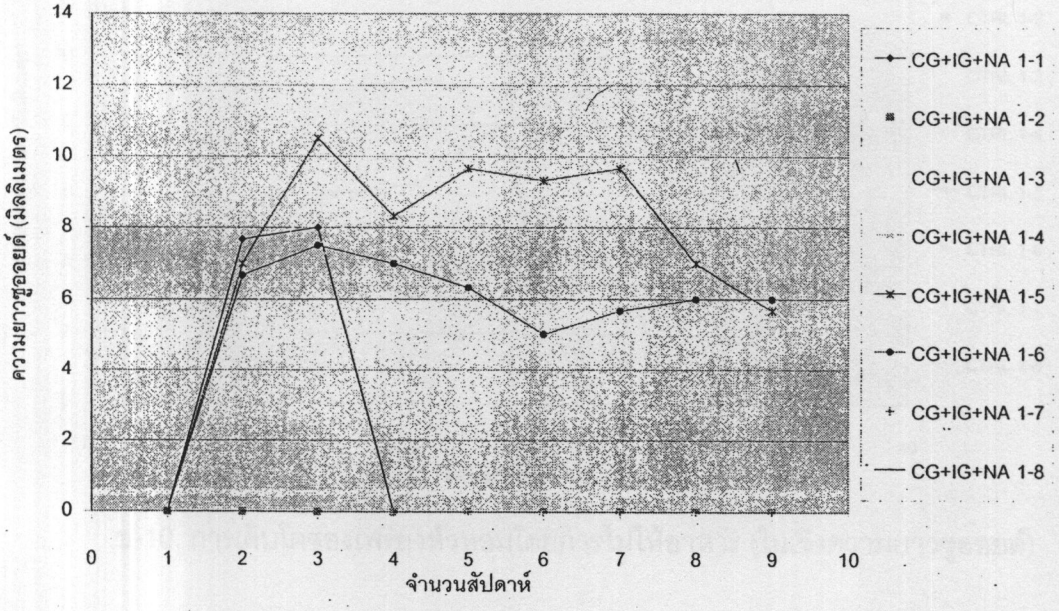
ข-5. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหารผสมระหว่าง *C. gracilis* กับ *Nannochloropsis* sp. (ในเชิงจำนวนซูออยด์)



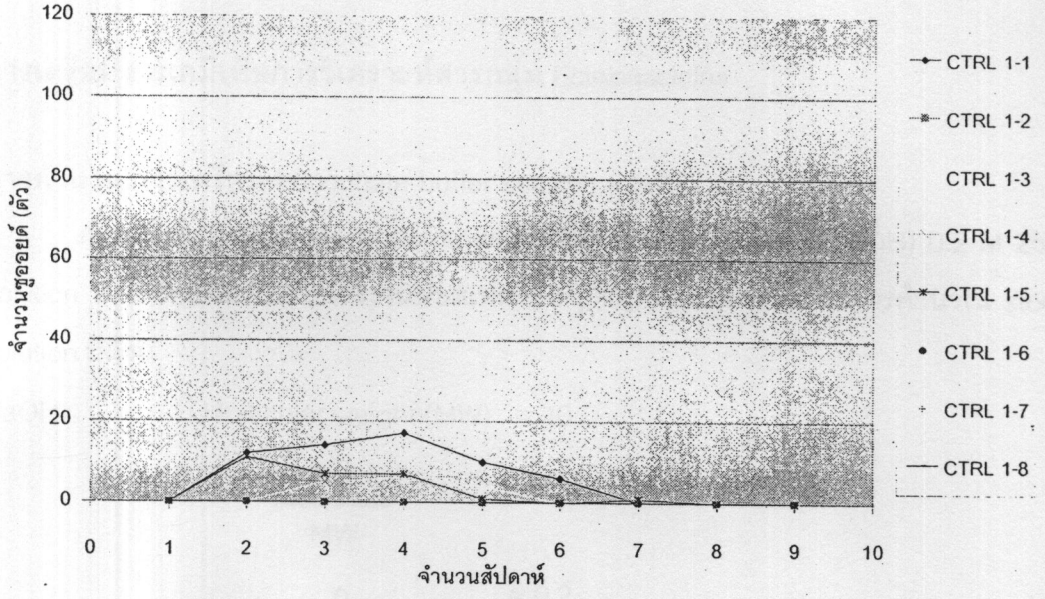
ข-6. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหารผสมระหว่าง *C. gracilis* กับ *Nannochloropsis* sp. (ในเชิงความยาวซูออยด์)



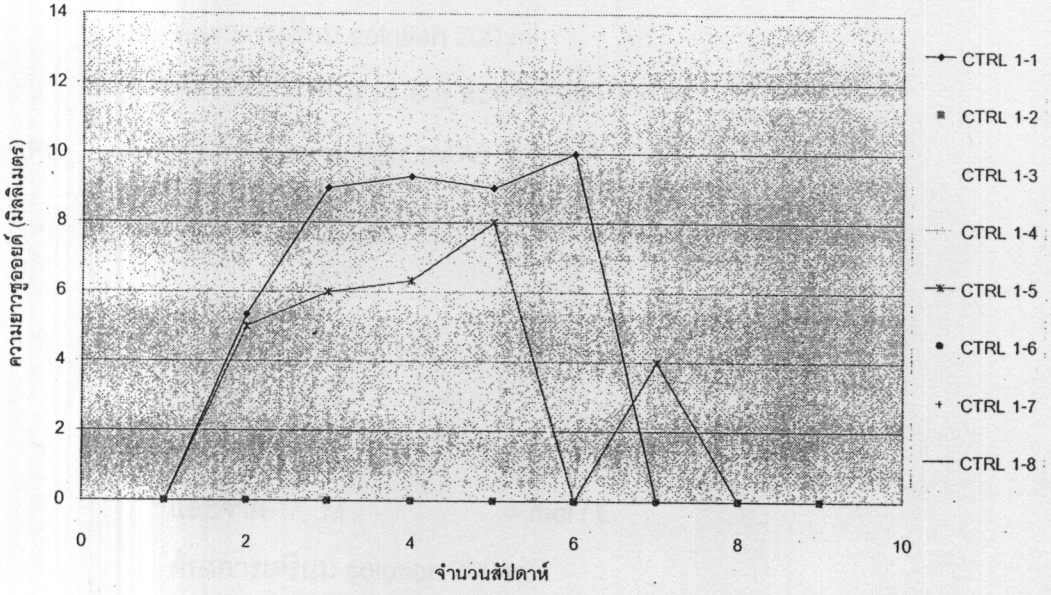
ข-7. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหารผสมระหว่าง *C. gracilis* กับ *I. galbana* และ *Nannochloropsis* sp. (ในเชิงจำนวนซูออยด์)



ข-8. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการให้อาหารผสมระหว่าง *C. gracilis* กับ *I. galbana* และ *Nannochloropsis* sp. (ในเชิงความยาวซูออยด์)



ข-9. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการไม่ให้อาหาร (ในเชิงจำนวนซูออยด์)



ข-10. การเติบโตของเพรียงหัวหอมโดยการไม่ให้อาหาร (ในเชิงความยาวซูออยด์)

ภาคผนวก ค.

การเตรียมสารเคมีเพื่อการวิเคราะห์สารกลุ่ม Ecteinascidins

การคำนวณการเตรียม Phosphate buffer solution (pH 7)

การเตรียม phosphate buffer solution ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.2 M 25% solution และ โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอตเฟต (KH_2PO_4) 0.2 M 25% วิธีการคำนวณ stock solution มีดังนี้

NaOH มี Molecular weight (MW) = 40

จาก $\frac{\text{น้ำหนัก (g)}}{\text{MW}}$ = mol

$\frac{g}{40}$ = 0.2

ดังนั้น g = 8 g / L

และจาก M = mol / L

ต้องการเตรียม solution 200 ml

ต้องชั่ง NaOH มา 1.6 g ละลายในน้ำ 200 ml

KH_2PO_4 มี Molecular weight (MW) = 136.9

จาก $\frac{\text{น้ำหนัก (g)}}{\text{MW}}$ = mol

$\frac{g}{136.9}$ = 0.2

ดังนั้น g = 22.218 g / L

และจาก M = mol / L

ต้องการเตรียม solution 200 ml

ต้องชั่ง NaOH มา 5.4436 g ละลายในน้ำ 200 ml

จากการคำนวณ stock solution ของสารทั้งสองชนิด หากต้องการเตรียม phosphate buffer solution 200 ml ต้องใช้ NaOH 0.2 M ปริมาณ 50 ml ผสมกับ KH_2PO_4 0.2 M ปริมาณ 30 ml และทำการเติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 ml ทำให้ได้ phosphate buffer solution ที่ต้องการ ต่อมาจึงทำการ calibrate ปริมาณ buffer ที่ใช้ในแต่ flask พบว่าต้องใช้ phosphate buffer solution เติม flask ละ 2 ml เพื่อให้ได้ pH เท่ากับ 7

การคำนวณการเตรียม KCN

เตรียม KCN solution โดยใช้ KCN 10 g ในน้ำ 100 ml ทำให้ได้ KCN 10 % g / ml วิธีการคำนวณ KCN solution มีดังนี้

KCN มี Molecular weight (MW) = 65.12

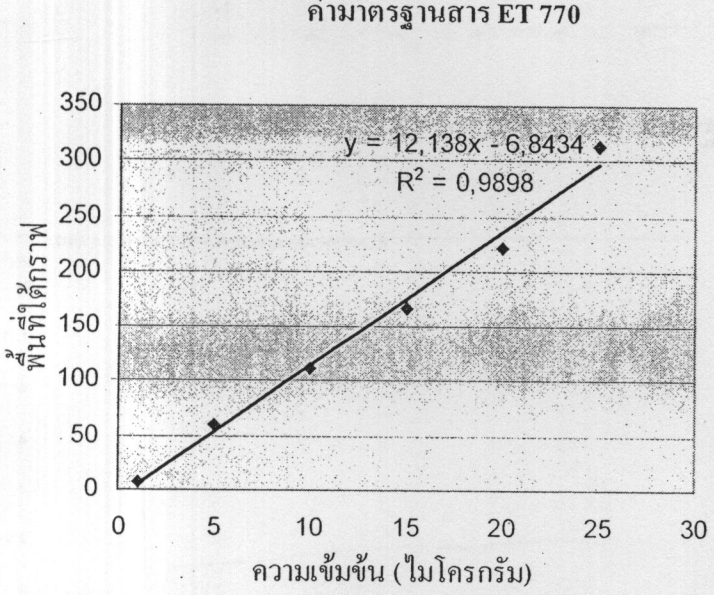
ปริมาณ ตัวอย่าง 1000 ml ใช้ KCN $= 10 \times 65.12 \times 10^{-3}$ g

ปริมาณ ตัวอย่าง 200 ml ใช้ KCN $= \frac{10 \times 65.12 \times 10^{-3}}{200}$ g $= 0.13204$ g

ใช้ KCN	10	g	ใน	100	ml
ใช้ KCN	0.13204	g	ใน	1.3204	ml
ทำการ calibrate	1		ml =	45	หยด
ดังนั้น	1.3204		ml =	1.3024 x 45 = 58.6	หยด

การเตรียม standard solution เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

1. ชั่งสาร ET 770 อย่างละเอียด 0.2 mg ใช้เป็น stock solution
2. ละลายโดยใช้ methanol (HPLC grade) ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ml
3. ทำการ dilution ให้ได้ความเข้มข้น 1, 5,10, 15, 20, 25 µg/ml
4. ทำการฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 ไมโครลิตร ในแต่ละความเข้มข้น
5. ทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้งสำหรับ standard solution แต่ละชนิด



ภาคผนวก ค-1. ค่ามาตรฐานสาร ET 770

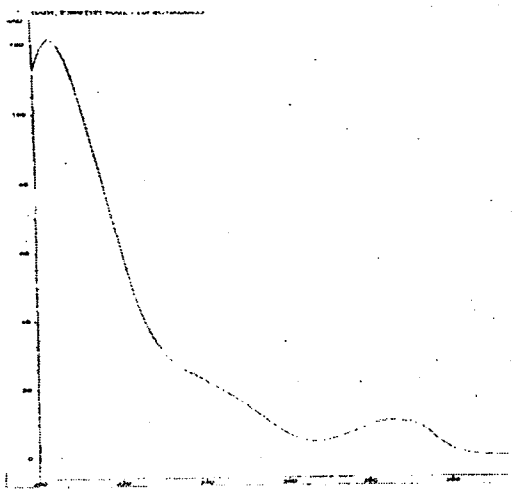
การคำณวนปริมาณสารจาก standard curve ของสาร ET 770

จากสมการ $y = 12.138x - 6.8434$

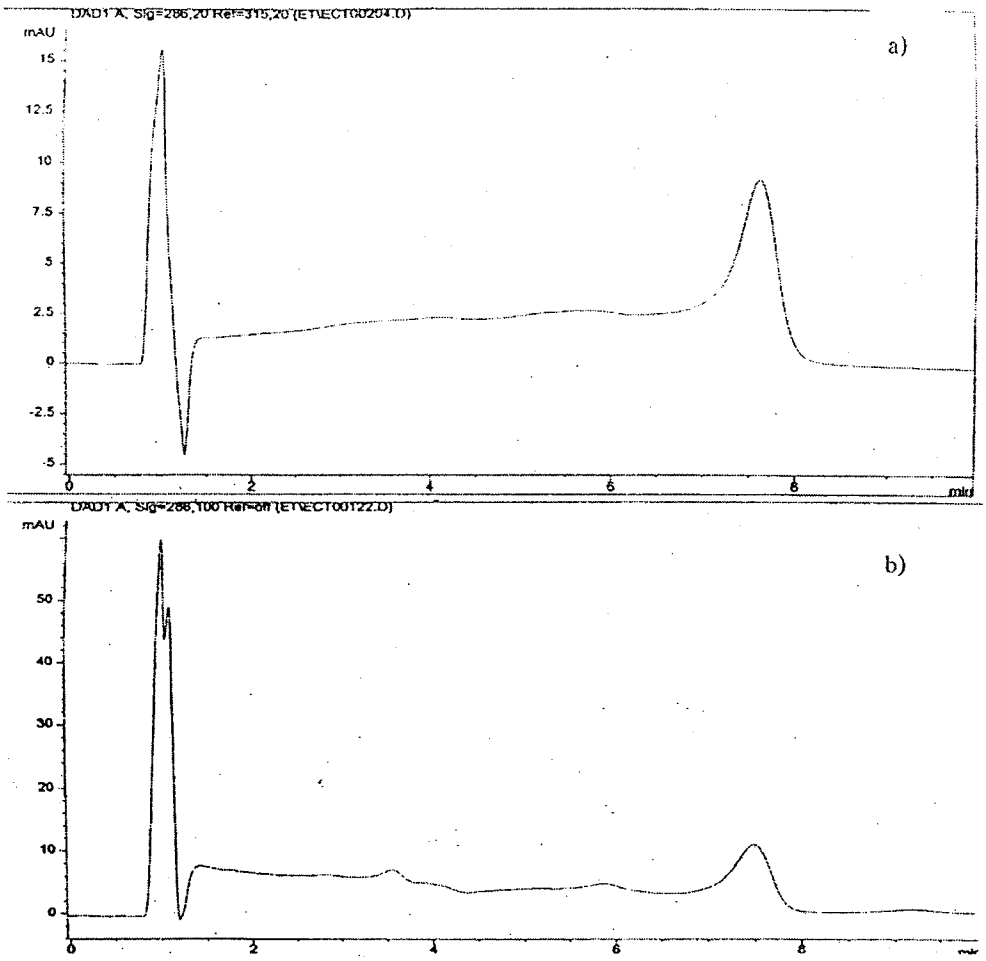
เมื่อกำหนดให้ y = พื้นที่ใต้กราฟ

x = ปริมาณสาร ET 770

ดังนั้นปริมาณสาร ET 770 $= \dfrac{\text{พื้นที่ใต้กราฟ} + 6.8434}{12.138}$ µg



ภาคผนวก ค-2. ค่าการดูดแสงของสารมาตรฐาน ET 770



ภาคผนวก ค-3. โครมาโทแกรมของสาร ET 770 ค่า retention time เท่ากับ 7.6 นาที

a) สารมาตรฐาน ET 770

b) สาร ET 770 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายชาตรี ชำนาญรักษา เกิดวันที่ 28 ธันวาคม 2525 ที่จังหวัดสมุทรปราการ สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต ชีววิทยา มหาวิทยามหิดล ในปีการศึกษา 2546 ก่อนที่จะเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2547 และได้รับทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์จาก โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพ ในประเทศไทย (BRT) ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_349003 และจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2548 นอกจากนั้นในปี พ.ศ. 2549 ได้เข้าร่วมเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในหัวข้อเรื่อง ผลของอาหารต่างชนิดต่อการเติบโตและการผลิต Ecteinascidins ของเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 ในงานประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 10