บทที่ 2
การสำรวจเอกสาร

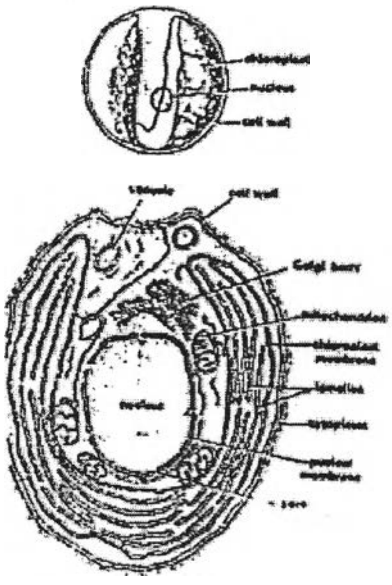
2.1 ลักษณะทางชีวภาพของสาหร่าย

อนุกรมวิธานของสาหร่ายสกุล *Chlorella* (Hoek, Mann และ Jahns 1995)

Division	Chlorophyta
Class	Chlorophyceae
Order	Chlorococcales
Family	Chlorellaceae
Genus	Chlorella

รูปร่างและลักษณะ

เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เอง มีสีเขียว มักอยู่เป็นเซลล์เดียว มีขนาดเล็กมาก โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางเซลล์ประมาณ 2 – 12 ไมโครเมตร มีรูปร่างเป็นทรงกลม เซลล์ถูกล้อมรอบด้วยผนังเซลลูโลสบาง ๆ และพบสปอโรพอลลีนินในผนังเซลล์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่สามารถพบได้ที่ผนังของอับละอองเรณูในพืชชั้นสูง มีคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วย อาจมีหรือไม่มีไพรีนอยด์ ไม่มีแฟลกเจลลา มีสติกมาและคอนแทรกไทล์แวคิวโอล พบนิวเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส 2 ชั้น พบไมโตคอนเดรีย กอลจิบอดี้ และแวคิวโอล เล็กน้อยในไซโตพลาสซึม (Bold and Wynne, 1978) (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 รูปร่างและลักษณะของคลอเรลลา (Sharma, 1992)

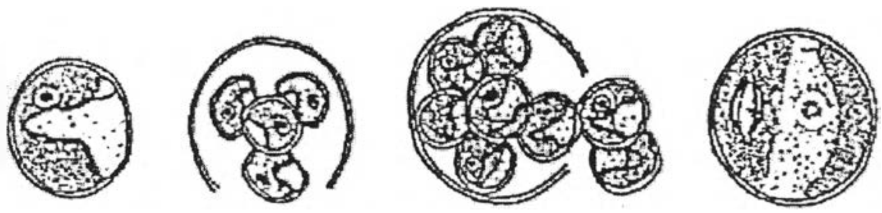
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การแพร่กระจาย

สาหร่ายสกุล *chlorella* พบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม โดยชนิดที่พบได้ในน้ำเค็มมีขนาดเล็กกว่าที่พบจากแหล่งอื่น ๆ คือจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 ไมโครเมตร รวมทั้งยังพบได้บนพื้นดินที่เปียกชื้นและบนกำแพง สาหร่ายชนิดนี้มักเป็นชนิดที่ปนเปื้อนในภาชนะบรรจุน้ำ บางชนิดอาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์ชนิดอื่น ๆ เช่น *Chlorella parasitica* มักอาศัยอยู่ร่วมกับพารามีเซียมชนิด *Paramecium bursaria* ส่วน *Chlorella lichina* พบว่าจะอาศัยอยู่ร่วมกับ ไลเคนส์ชนิด *Calicium chlorina* สาหร่ายในสกุลนี้มี 14 ชนิด ได้แก่ *C. vulgaris, C. pyrenoidosa, C. concloverata, C. simplex, C. ellipsoidea, C. miniala, C. protothecoides, C. saccharophila, C. acuminata, C. faginea, C. variegata, C. parasitica, C. conductrix* และ *C. lichina* (Bold and Wynne, 1978)

การสืบพันธุ์

คลอเรลลามีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพียงแบบเดียว (Sharma, 1992) โดยการสร้างออโตสปอร์ (autospore) ขึ้นในเซลล์แม่ ออโตสปอร์เป็นสปอร์ (spore) ที่ไม่มีแฟลกเจลลา ไม่เคลื่อนที่ มีรูปร่างเหมือนเซลล์ปกติ โดยในแต่ละครั้งของการสร้างออโตสปอร์นั้นสามารถสร้างได้ตั้งแต่ 2 – 16 เซลล์ แต่ละออโตสปอร์นี้จะค่อย ๆ พัฒนาเซลล์จนเหมือนกับเซลล์แม่ แต่ต่างกันที่ออโตสปอร์นี้จะมีขนาดเล็กกว่า และจะถูกปล่อยออกมาจากผนังเซลล์ (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 การสืบพันธุ์โดยการสร้างออโตสปอร์ของสาหร่ายคลอเรลลา (Sharma, 1992)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย แบ่งออกได้ 2 ประเภท

1.ภาวะการเพาะเลี้ยง

2.องค์ประกอบของอาหาร

2.2 ภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

2.2.1.อุณหภูมิ มีผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสง นั้นคือมีผลต่อผลผลิต ถ้าต้องการเพิ่มผลผลิตต่อวัน ควรจะควบคุมอุณหภูมิในช่วงระหว่างกลางวันให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเติบโตให้ได้มากที่สุด และควรเก็บเกี่ยวเซลล์ในช่วงก่อนค่ำเพื่อป้องกันการสูญเสียชีวมวลในเวลากลางคืน เนื่องจากการหายใจของสาหร่าย

Takeuchi. และคณะ 1992 ได้ทำการเลี้ยง Oocystis sp. ที่อุณหภูมิ 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสนั้น Oocystis sp. เติบโตได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส Oocystis sp. ไม่สามารถเติบโตได้

Sakai. และคณะ 1995 ได้ทำการแยก Chlorella หลายสายพันธุ์จากน้ำพุร้อน แล้วทำการทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิและความเข้มข้นของ CO_2 พบว่า Chlorella H-84 และ Chlorella A-2 สามารถเติบโตได้ที่ภาวะ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของ CO_2 20 %

มานิทย์ อัศวอารีย์ และธิดา เพชรมณี 2534. ได้ทำการศึกษาเลี้ยง Chlorella sp. ที่ระดับอุณหภูมิ 21, 28 และ 35 องศาเซลเซียส โดยให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซ็นต์วันละ 8 ชั่วโมง เลี้ยงจนได้ความหนาแน่นประมาณ 1×10^6 เซลล์/มล. พบว่าที่อุณหภูมิ 21, 28 และ 35 องศาเซลเซียส ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า เท่ากับ 1.3, 1.3 และ 5 วัน

2.2.2.แสง (Illumination) นับเป็นปัจจัยสำคัญมากตัวหนึ่งในการสังเคราะห์แสง การสังเคราะห์แสงเป็นการสร้างอินทรีย์สาร โดยสาหร่ายจะเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานเคมี โดยใช้ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พลังงานแสงถูกใช้ในปฏิกิริยารีดักชันแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ แสงจะถ่ายทอดพลังงานให้รงควัตถุที่มีอยู่ในสาหร่ายหรือพืช คลอโรฟิล, แคโรทีนอยด์ รงควัตถุเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นตัวรับพลังงานของโฟตอนและส่งไปยังศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยา บริเวณศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยานี้พลังงานจะเปลี่ยนรูปแบบไปอยู่ในรูปแบบที่สารสามารถใช้ประโยชน์ได้ เพื่อเปลี่ยนไปเป็นสารชนิดใหม่ สมการรวมของการสังเคราะห์แสงคือ

$$6CO_2 + 12H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 6O_2$$

พลังงานซึ่งช่วยในการสังเคราะห์แสง เป็นพลังงานที่ได้จากแสงที่ช่วงความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 400 - 700 นาโนเมตร รงควัตถุแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ แตกต่างกัน ซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะของแต่ละรงควัตถุ Chlorella sp. ประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด รงควัตถุที่พบมาก คือ คลอโรฟิล เอ สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 430 และ 680 นาโนเมตร คลอโรฟิล บี ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 470 และ 660 นาโนเมตร และแคโรทีนดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 480 และ 510 นาโนเมตร

ในการจำลองภาวะของแสงสว่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง พบว่า ควรใช้หลอดฟลูออเรสเซนส์มากกว่าใช้หลอดไฟธรรมดา เนื่องจากว่าอุณหภูมิจากแสงประเภทอื่นมักสูงกว่าแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ ซึ่งจะทำให้สภาพในถังเพาะเลี้ยงมีอุณหภูมิสูงมาก ส่งผลต่อการเติบโตของสาหร่าย

ช่วงเวลาแสงสว่างเป็นอีกปัจจัยที่มีผลกระทบในการเลี้ยงสาหร่าย พบว่าการให้แสงสว่างช่วงเวลาหนึ่งและหยุดการให้แสงสว่าง ให้ผลการเลี้ยงได้ดีกว่าการให้แสงติดต่อกันตลอดเวลา

ที่ความเข้มแสงต่ำ กระบวนการหายใจในที่ที่ไม่มีแสงจะเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อการเติบโตของสาหร่าย ในขณะที่มีความเข้มแสงสูงขึ้น สาหร่ายจะมีการผลิตแก๊ส O_2 สูงกว่าที่ความเข้มแสงต่ำ และเมื่อความเข้มแสงสูงมากจะเกิดปรากฏการณ์การยับยั้งการสังเคราะห์แสง (photoinhibition) ซึ่งมีผลทำให้อัตราการเติบโตของสาหร่ายลดลง

เมื่อสาหร่ายมีความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นในถังเลี้ยง เซลล์จะเกิดการบังแสงกันเอง (mutual shading) ซึ่งเป็นผลมาจากการที่สาหร่ายดูดกลืนแสงที่ตกกระทบบริเวณผิวหน้าจึงเป็นผลให้ปริมาณของแสงที่สาหร่ายนำไปใช้ลดลง ยิ่งความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้นการบังแสงกันเองก็ยิ่งเพิ่มขึ้นและสัดส่วนของเซลล์ที่ไม่สัมผัสกับแสงก็ยิ่งเพิ่มขึ้น ดังนั้นในภาวะที่เซลล์มีความหนาแน่นสูงการเติบโตจึงถูกจำกัดโดยแสง

Hanagata. N., และคณะ 1992. ได้ทำการทดสอบความเข้มแสงที่คลอเรลลาสามารถเติบโตได้ดี พบว่า ความเข้มแสงเพิ่มขึ้นการเติบโตของคลอเรลลาจะเพิ่มขึ้น และการเติบโตจะคงที่ที่ความเข้มแสงเท่ากับ 200 $\mu Em^{-2}s^{-1}$

มานิทย์ อัศวอารีย์ และธิดา เพชรมณี 2534. ได้ทำการศึกษาเลี้ยง Chlorella sp. ที่ระดับความเข้มแสง 1000, 3000 และ 5000 ลักซ์ โดยให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซ็นต์วันละ 8 ชั่วโมง

เลี้ยงจนได้ความหนาแน่นประมาณ 1 x 10^6 เซลล์/มล. พบว่าที่ระดับความเข้มแสง 1000, 3000 และ 5000 ลักซ์ มีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า 2, 1.2 และ 1.2 วัน

2.2.3.ความเป็นกรด-เบส (pH) เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการในระดับที่แตกต่างกัน เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมนำเงินจะเติบโตได้ดีในน้ำที่มีสภาพเป็นกลางจนถึงมีสภาพเป็นเบสหรือมีค่าของ pH ประมาณ 6.5-7.5 สาหร่ายสีเขียวบางกลุ่มเช่น เดสมิด ชอบน้ำที่สภาพเป็นกรดอ่อนหรือเป็นกรดซึ่งมีค่าของ pH ระหว่าง 5.5-6.5 โดยทั่วไป สาหร่ายส่วนมากจะเติบโตได้ดีในน้ำที่มีสภาพเป็นเบส

pH ของสารละลายอาหารเลี้ยงสาหร่าย มีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของสาหร่าย และยังมีบทบาทต่อการละลายของเกลือและสารประกอบเชิงซ้อนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายซึ่งอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษ หรือการยับยั้งการเติบโตของสิ่งมีชีวิต ขณะเดียวกันค่าความเป็นกรด-เบสยังส่งผลต่อการละลายของสารประกอบโลหะ โดยการเพิ่มค่าความเป็นกรด-เบสเป็นสาเหตุให้สารประกอบโลหะที่เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นบางชนิดตกตะกอน ดังนั้น สาหร่ายจึงอาจขาดธาตุโลหะที่จำเป็นบางตัวได้

นอกจากนี้ pH ก็มีผลต่อการละลายธาตุอาหารจำพวกฟอสฟอรัส คือที่ความเป็นกรด-เบส สูงกว่า 7 ฟอสเฟตจะเปลี่ยนเป็นฟอสเฟตไอออน ซึ่ง Chlorella นำไปใช้ไม่ได้ ในขณะที่ความเป็นกรด-เบส ในช่วง 5.6 – 6.5 ฟอสเฟตจะอยู่ในรูป ไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน และ ไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน ซึ่ง Chlorella สามารถใช้ได้ แต่ถ้าสภาพสารละลายมีความเป็นกรดมาก ฟอสเฟตจะรวมตัวกับเหล็กหรืออลูมิเนียมตกตะกอน

ช่วงค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของสาหร่ายคลอเรลลา คือช่วง 5.5 – 6 (Hirata. และคณะ 1996.)

Kodama. , Ikemoto. และ Miyachi. 1993 ได้ศึกษาผลของ pH ต่อการเติบโตของ Chlorococcum littorale. พบว่า ถ้า pH มากกว่า 4 การเติบโตไม่แตกต่างกันนัก pH 3.5 การเติบโตจะเป็น 50 % ของการเติบโตที่ pH มากกว่า 4 และที่ pH น้อยกว่า 4 การเติบโตจะลดลง และที่ pH 3 สาหร่ายไม่สามารถเติบโตได้

2.3 องค์ประกอบของอาหาร

การเติบโตของสาหร่ายขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่าย อาหารหรือธาตุอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) และกลุ่มธาตุอาหารรอง (Micronutrients) ธาตุอาหารหลักคือธาตุอาหารที่ประกอบเป็นโครงสร้างของสาหร่าย ดังนั้นจึงต้องใช้เป็นปริมาณค่อนข้างมาก ซึ่งมักมีหน่วยเป็นกรัม ประกอบด้วย คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โปแตสเซียม แมกนีเซียม และแคลเซียม ส่วนธาตุอาหารรองได้แก่ธาตุอาหารซึ่งสาหร่ายต้องการใช้น้อย มักมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม ธาตุอาหารรองเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลที่จำเป็นอาทิ เช่น สารพวกเอนไซม์ เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตหรือเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลของเอนไซม์ที่สำคัญบางชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ธาตุอาหารที่พืชต้องการใช้เรียงจากมากไปน้อย

ธาตุ	สารประกอบที่ใช้เตรียมสารอาหาร
คาร์บอน	CO_2,HCO_3^-,CO_3^{2-} โมเลกุลอินทรีย์
ออกซิเจน	O_2, H_2O โมเลกุลอินทรีย์
ไฮโดรเจน	H_2Oโมเลกุลอินทรีย์ หรือ ไฮโดรเจนซัลไฟด์(H_2S)
ไนโตรเจน	N_2,NH_4^+,NO_3^-,NO_2^- กรดอะมิโน ยูเรีย ฯลฯ
โซเดียม	ในรูปเกลืออนินทรีย์ เช่น $NaCl$,Na_2SO_4,Na_3PO_4
โปแตสเซียม	ในรูปเกลืออนินทรีย์ เช่น KCl,K_2SO_4,K_3PO_4
แคลเซียม	ในรูปเกลืออนินทรีย์ เช่น $CaCO_3$,Ca^{2+}(เช่นคลอไรด์)
ฟอสฟอรัส	ในรูปเกลืออนินทรีย์ของธาตุโซเดียมหรือโปแตสเซียมฟอสเฟต โซเดียมกลีเซโรฟอสเฟต (ชนิดมีน้ำ)
ซัลเฟอร์	ในรูปเกลืออนินทรีย์ เช่น $MgSO_4 \bullet 7H_2O$, กรดอะมิโน
แมกนีเซียม	ในรูปเกลืออนินทรีย์ เช่น CO_3^{2+},SO_4^{2-} หรือ Cl^- salts
คลอรีน	ในรูปเกลือของธาตุ Na^+,K^+,Ca^{2+} หรือ NH_4^+ salts
เหล็ก	$FeCl_3$,$FeSO_4(NH_4)_2SO_4$,เฟอริคซิเตรต
สังกะสี	SO_4^{2-} หรือ Cl^- salts
แมงกานีส	SO_4^{2-} หรือ Cl^- salts
โบรไมด์	Na^+,K^+,Ca^{2+} หรือ NH_4^+ salts
ซิลิกา	$Na_2SiO_3 \bullet 9H_2O$
โบรอน	H_3BO_3
โมลิบดินัม	Na^+ หรือ NH_4^+ molybdate salts

วานาเดียม	$Na_3VO_4 \cdot 16H_2O$
สตรอนเทียม	SO_4^{2-} หรือ Cl^- salts
อะลูมิเนียม	SO_4^{2-} หรือ Cl^- salts
ลิเธียม	SO_4^{2-} หรือ Cl^- salts
รูบิเดียม	SO_4^{2-} หรือ Cl^- salts (Rb_2SO_4, RbCl)
ทองแดง	SO_4^{2-} หรือ Cl^- salts
โคบอลท์	ไวตามิน บี 12, SO_4^{2-} หรือ Cl^- salts
ไอโอดีน	Na^+,K^+,Ca^{2+} หรือ NH_4^+ salts
เซเลเนียม	Na_2SeO_3

2.3.1.ธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) ประกอบด้วยธาตุอาหารที่สาหร่ายทุกชนิดต้องการใช้ปริมาณมากเพื่อการเติบโต ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โปแตสเซียม แมกนีเซียม และแคลเซียม

คาร์บอน สาหร่ายทุกชนิดมีการเติบโตแบบคีโมโทรป (chemotroph) หรือโฟโตลิโธโทรป (photolithotroph) ใช้คาร์บอนประเภทอนินทรีย์ในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งละลายได้ในน้ำ หรือในรูปของเกลือคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนต การที่คาร์บอนจะอยู่ในรูปใดนั้นขึ้นอยู่กับระดับของค่า pH ในสารละลาย เช่น คาร์บอนอยู่ในรูปของเกลือไบคาร์บอเนตเมื่อ ค่า pH มีค่าระหว่าง 7-9 คาร์บอนอยู่ในรูปของเกลือคาร์บอเนตเมื่อ pH มีค่าสูงกว่า 9.5 คาร์บอนจะอยู่ในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เมื่อสารละลายสภาพเป็นกรดหรือ pH มีค่าประมาณ 5

ในแหล่งน้ำจืดธรรมชาติโดยทั่วไป ระบบบัฟเฟอร์ที่สำคัญคือ CO_2-H_2CO_3-HCO_3^--CO_3^{2-} ระบบดังกล่าวเป็นระบบบัฟเฟอร์ที่มีประโยชน์ที่สุดในการเลี้ยงสาหร่ายในภาวะที่ pH เป็นเบส ปริมาณของสารอนินทรีย์คาร์บอนที่ละลายสารละลายทั้งหมดแสดงได้ดังสมการ 2.1

$$C_r = CO_2\text{(ละลายน้ำ)} + H_2CO_3 + HCO_3^- + CO_3^{2-} \qquad (2.1)$$

C_r = ความเข้มข้นของสารอนินทรีย์คาร์บอนละลายน้ำทั้งหมด (มิลลิกรัม/ลิตร หรือ โมล/ลิตร)

CO_2 (ละลายน้ำ) = ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ละลายน้ำ (โมล/ลิตร)

H_2CO_3 = ความเข้มข้นของกรดคาร์บอนิก (โมล/ลิตร)

HCO_3^- = ความเข้มข้นของไบคาร์บอเนต (โมล/ลิตร)

CO_3^{2-} = ความเข้มข้นของคาร์บอเนต (โมล/ลิตร)

สาหร่ายจะใช้คาร์บอนในรูปของ Free CO_2 และ HCO_3^-

ไนโตรเจน มีความสำคัญรองจากคาร์บอนในแง่ของปริมาณ สาหร่ายที่ขาดไนโตรเจนจะสร้างสารประกอบคาร์บอน เช่น น้ำมัน หรือแป้ง มาทดแทน สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนทั้งในรูปอนินทรีย์และอินทรีย์สาร อีกทั้งยังสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของแก๊สได้อีกด้วย แต่มีสาหร่ายบางชนิดเท่านั้น อาทิเช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ไนโตรเจนในรูปสาร อนินทรีย์ ได้แก่ เกลือ 3 ชนิด คือ ไนเตรต ไนไตรท์ และแอมโมเนีย ถ้าแหล่งไนโตรเจนอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียเพียงอย่างเดียว จะทำให้ระดับของ pH ของอาหารลดต่ำลงอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นอันตรายต่อสาหร่าย ส่วนสารอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดอื่น ได้แก่ กรดอะมิโน (โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไกลซีน เซรีนอะลามีน) กรดกลูทามิค และกรดแอสพาร์ติคนั้น สาหร่ายต้องการใช้เพื่อการเติบโตซึ่งจะแตกต่างกันตามชนิด ถ้าสาหร่ายขาดไนโตรเจนจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสง และปริมาณรงควัตถุ หรือสารสี (pigments) ของเซลล์ รวมทั้งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดลดลงด้วย

ฟอสฟอรัส ถ้าสาหร่ายขาดฟอสฟอรัสจะมีผลเสียต่อการเติบโต กล่าวคือ ปริมาณโปรตีน รงควัตถุชนิดคลอโรฟิลล์-เอ RNA และ DNA จะลดลง แต่แป้งหรือคาร์โบไฮเดรตกลับเพิ่มขึ้นมีผลทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

ซัลเฟอร์ เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายทุกชนิด ซัลเฟอร์ในเซลล์สาหร่ายมีหลายรูปแบบ เช่น ในรูปกรดอะมิโน ไวตามินบี กรดแพนโทเธนิค กรดลิโพอิค ฯลฯ ซัลเฟอร์ที่สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้อยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ ได้แก่ เกลือของโลหะ คือซัลเฟต ซัลไฟท์ และซัลไฟด์

แคลเซียม เป็นธาตุอาหารจำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่าย เช่น สาหร่ายสีเขียวบางชนิด สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและไดอะตอม สันนิษฐานว่าแคลเซียมมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเกล็ด (scale) และโครงสร้างของสาหร่าย

โปแตสเซียม เป็นธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์หลายชนิดในสาหร่าย และแมกนีเซียม เป็นธาตุอาหารที่มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์

2.3.2.ธาตุอาหารรอง (Micronutrients) เป็นธาตุอาหารซึ่งสาหร่ายต้องการใช้ในปริมาณน้อยหรือน้อยมาก ปริมาณที่ใช้เพียงมิลลิกรัมต่อลิตร จะช่วยให้สาหร่ายเติบโตได้ดีขึ้น ถ้าไม่ใช้การเติบโตจะช้าลงกว่าเล็กน้อย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ

2.3.2.1ธาตุอาหารรองอนินทรีย์ (Inorganic micronutrients)ธาตุอาหารรองอนินทรีย์ ที่สาหร่ายส่วนมากต้องการใช้ ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส แคลเซียม สังกะสี ทองแดง โคบอลต์ และโบรอน

เหล็ก เป็นธาตุอาหารที่ช่วยการดูดซึมไนโตรเจนและกระบวนการสังเคราะห์แสง คือช่วยสร้างรงควัตถุสีเขียวชนิดคลอโรฟิลล์-เอ และรงควัตถุสีน้ำเงินชนิด ซี-ไฟโคไซยานิน ถ้าสาหร่ายขาดธาตุเหล็กจะมีผลต่อการเติบโตและสรีระของเซลล์ เหล็กเป็นธาตุที่มักจะตกตะกอนในสารละลาย ฉะนั้นจึงต้องใส่สารที่ป้องกันการตกตะกอนเรียกว่า ดีเลเตอร์ หรือ Chelating agent เหล็กที่ใช้อาจอยู่ในรูปของสารประกอบ เช่น $FeSO_4 \bullet 7H_2O$ แต่จะดูดน้ำทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ ฉะนั้นจึงนิยมใช้สารประกอบพวกเหล็กอีดีทีเอ (FeEDTA) แทนเพราะมีคุณสมบัติคงรูปดี มีสารประกอบบางชนิด เช่น $FeSO_4(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งคงรูปดีกว่าเหล็กอีดีทีเอ แต่ต้องมีเทคนิคในการเตรียมคือเวลาเตรียมต้องละลายเกลือชนิดนี้ในกรดซัลโฟซาลิไซลิค (Sulfosalicylic acid) เสียก่อน โดยใช้กรดความเข้มข้น 0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่ไม่ว่าจะใช้คีเลเตอร์ตัวใดก็ตามอัตราส่วนของคีเลเตอร์กับเหล็กจะต้องเท่ากับ 1:1 (molar ratio) เสมอ และในทางปฏิบัติจะนิยมเติมสารคีเลเตอร์ให้เกินปริมาณที่กำหนดเล็กน้อยเพื่อช่วยให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ เช่น ใช้สารคีเลเตอร์ในอัตราส่วน 1.5-3:1 เป็นต้น คีเลเตอร์ที่นิยมใช้มีหลายชนิด ได้แก่

- อีดีทีเอ (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) นิยมใช้เติมอาหารที่เลี้ยงสาหร่ายทะเล
- Sodium hydroxy ethylene diamine triacetate เหมาะอย่างยิ่งกับอาหารที่ต้องการให้มีสภาพเป็นเบส เพราะคีเลเตอร์ชนิดนี้เมื่อละลายน้ำจะมีค่า pH เท่ากับ 11.4 ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับเหล็กแล้วจะคงรูปดีกว่าอีดีทีเอ
- Nitrilotriacetic acid หรือ NTA เป็นคีเลเตอร์ที่มีประสิทธิภาพด้อยกว่าอีดีทีเอ แต่สามารถใช้รวมกับกลีเซโรฟอสเฟตได้ดี
- กรดน้ำส้ม (acetic acid) เป็นคีเลเตอร์ที่ใช้แทน NTA ได้ นิยมใช้เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายทะเล

โบรอน เป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายบางชนิดต้องการใช้ ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และไดอะตอมโดยเฉพาะไดอะตอมน้ำเค็ม

แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี เป็นธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย รวมทั้งเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเอนไซม์อีกหลายชนิด ถ้าขาดจะทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงลดลงและการหายใจเพิ่มขึ้น ธาตุอาหารทั้งสามชนิดนี้ถ้ามีมากเกินไปสาหร่ายจะตาย

โมลิบดินัม วานาเดียม โคบอลต์ และนิกเกิล โมลิบดินัมมีบทบาทสำคัญในการตรึงไนโตรเจนในพวกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สภาพที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายจะอยู่ในรูปของเกลือ นอกจากนี้โมลิบดินัมยังเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ช่วยในการสังเคราะห์แสง วานาเดียมเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่ายบางชนิด เช่น *spirulina* และ วานาเดียมสามารถใช้ทดแทนโมลิบดินัมเพื่อการตรึงไนโตรเจน โคบอลต์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของไวตามิน บี 12 ซึ่งสำคัญมากต่อการเติบโตของสาหร่ายหลายชนิด นิกเกิลเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ยูเรียของสาหร่ายบางชนิด เช่น ไดอะตอม (*Phaeodactylum tricornutum*) และสาหร่ายสีเขียว (*Tetraselmis subcordiformis*)

ซิลิกา เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นที่สุดของพวกไดอะตอมเพื่อสร้างผนังเซลล์ ส่วนสาหร่ายชนิดอื่นไม่จำเป็นต้องใช้ ปริมาณของซิลิกาในแหล่งน้ำธรรมชาติแตกต่างกันตามฤดูกาล เช่น ในขณะที่มีไดอะตอมเกิดขึ้นจำนวนมากหรือเกิดการบลูมปริมาณของซิลิกาในน้ำจะลดลง ซิลิกาจะอยู่ในรูปของ silicate/silica ซึ่งอาจมีปริมาณสูงถึง 430 มิลลิกรัม/ลิตรในน้ำทะเล และ 77 มิลลิกรัม/ลิตรในน้ำจืด ไดอะตอมต้องการปริมาณซิลิกาแตกต่างกันตามชนิด เช่น *Nitaschiapalae* ต้องการมากกว่า 25 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วน *Asterionella formosa* ต้องการใช้เพียง 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

เซเลเนียม บทบาทของธาตุอาหารชนิดนี้ต่อการเลี้ยงสาหร่ายยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนักแต่มีข้อสังเกตจากการทดลองว่าปริมาณของเซเลเนียมที่เติมในแหล่งน้ำจะสามารถเปลี่ยนองค์ประกอบชนิดของสาหร่าย ถ้าปริมาณเพิ่มขึ้นจะมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพิ่มขึ้นและไดอะตอมจะลดปริมาณลง สาหร่ายบางชนิดต้องการใช้เซเลเนียมเพื่อการเติบโต เช่น *Peridinium cinctum* ซึ่งเป็นไดโนแฟลเจลเลตน้ำจืด เป็นต้น

2.3.2.2 ธาตุอาหารรองอินทรีย์ (Organic micronutrients) ธาตุอาหารประเภทนี้อาจเรียกอีกชื่อว่า แร่ธาตุที่จำเป็น (trace metals) ประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มคือ

คาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลเดกซ์โตรส เข้มข้น 0.2-0.5% ควรเติมหลังจากการฆ่าเชื้อแล้ว เพราะมิฉะนั้นน้ำตาลจะสลายตัว

เกลืออินทรีย์หรือสารประกอบที่มีเกลืออินทรีย์อยู่ด้วย ได้แก่ เกลืออะซิเตทต่าง ๆ นิยมใช้ความเข้มข้น 0.1-0.5% อยู่ในรูปของธาตุโซเดียม โปแตสเซียม

ไวตามิน ได้แก่ ไวตามิน 3 ชนิด คือ บี 1 บี 12 และบีรวม นิยมเติมในอาหารหลังจากผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

อาหารเสริม ได้แก่ อาหารที่ช่วยการเติบโตของสาหร่าย คือเป็น growth factor ตัวอย่างเช่น อะเดนิน (adenin) ไคเนติน (kinetin) ทั้ง 2 ชนิดนี้ละลายในน้ำได้เล็กน้อยแต่ละลายได้ดีในสายละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต อาหารเสริมอีก 2 ชนิดที่นิยมใช้คือ gibberellic acid ละลายในน้ำได้ดี และ indol acetic acid (IAA) มีคุณสมบัติละลายได้เล็กน้อยในน้ำร้อนและสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสงสว่าง

ประโยชน์ของสาหร่ายและการนำไปใช้

Kodama, Ikemoto และ Miyachi 1993. ได้ทำการศึกษาสาหร่ายสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากโรงงานอุตสาหกรรมและพบว่า *Chlorococcum littorale* ซึ่งแยกได้จากบ่อน้ำเค็ม สามารถเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็มร้อยละ 1.5 (15 ppt) ในภาวะที่เป็นกรดโดยให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 20 และไม่มีการปรับ pH สาหร่ายชนิดนี้สามารถเติบโตได้แม้ว่าระดับ pH จะต่ำถึง 4 ก็ตาม นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาการเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่าง ๆ พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน สาหร่ายที่เลี้ยงในภาวะที่มีความเข้มข้นของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 5 และ 20 % จะมีการเติบโตดีกว่าในระดับอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตของสาหร่ายพบว่าในภาวะที่มีความเข้มข้นของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 40 % และในภาวะที่ให้อากาศธรรมดา สาหร่ายมีอัตราการเติบโตใกล้เคียงกัน ส่วนในภาวะที่มีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 60 % นั้นสาหร่ายจะมีการเติบโตที่ต่ำมาก

Miyairi. 1995. ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *S. elongatus* ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 0.04, 0.3, 5 และ 60 % พบว่าการเติบโต ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เจริญเติบโตดีที่สุด และที่ ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 60 % นั้นจะมี lag phase 4.3 ชั่วโมง ส่วนที่ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 80 % นั้นสาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตได้

Amoroso และคณะ 1998. ศึกษาการรับคาร์บอนไดออกไซด์และส่งไบคาร์บอเนตในเซลล์และคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียว *Dunaliella tertiolecta* และ *Chlamydomonas reinhardtii* เมื่อเลี้ยงอยู่ในอาหารที่มีการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และอากาศธรรมดา พบว่า

สาหร่ายทั้งสองชนิดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และที่ให้อากาศอย่างเดียวจะมีความสามารถในการขนส่งคาร์บอนไดออกไซด์และไบคาร์บอเนตสูง สำหรับเซลล์ของ *D. Tertiolecta* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และที่ให้อากาศอย่างเดียวนั้นไบคาร์บอเนตจะเป็นอนินทรีย์คาร์บอนตัวหลักที่ถูกนำไปใช้ ในขณะที่ *C. reinhardtii* นั้นทั้งคาร์บอนไดออกไซด์และไบคาร์บอเนตถูกรับเข้าไปในอัตราที่เท่ากัน โดยที่การขนส่งไบคาร์บอเนตและรับคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นจาก 3 เป็น 9 เท่าในสาหร่ายทั้งสองชนิดในภาวะที่มีอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และที่ให้อากาศอย่างเดียว คลอโรพลาสต์ที่แยกจากสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดนั่นสามารถขนส่งไบคาร์บอเนตและคาร์บอนไดออกไซด์ได้ โดยที่ในภาวะที่ให้อากาศธรรมดาไบคาร์บอเนตและคาร์บอนไดออกไซด์ในคลอโรพลาสต์ของ *C. reinhardtii* จะลดลงจาก 446 ไมโครโมลาร์ และ 6.8 ไมโครโมลาร์ เป็น 33 ไมโครโมลาร์ และ 6.6 ไมโครโมลาร์ และสำหรับค่าไบคาร์บอเนตและคาร์บอนไดออกไซด์ในคลอโรพลาสต์ของ *D. tertiolecta* จะลดลงจาก 203 ไมโครโมลาร์ และ 5.8 ไมโครโมลาร์ เป็น 58 ไมโครโมลาร์ และ 0.5 ไมโครโมลาร์

Yan. , Yu. and Wang. 1996. ได้นำ *Chlorella vulgaris* มาศึกษาผลของการลดฟอสเฟตที่ pH และอุณหภูมิต่าง ๆ ในการศึกษาการลดของฟอสเฟตที่ pH ต่าง ๆ นั้น ได้ทำการเลี้ยง *Chlorella vulgaris* แบบยึดบน beads และปล่อยอิสระ ในน้ำเสียที่ได้เตรียมขึ้นมาโดยมีส่วนประกอบดังนี้ (หน่วย mg/L) NH_4^+-N 28; NO_3^-—N 1.4; organic N 13; PO_4^{3-}—P10. ปรับ pH ด้วย 1 M HCl/NaOH. โดยทำการเลี้ยง 5 วัน ที่ pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และมีการให้แสง ตลอดเวลา 3000 ลักซ์ จากการทดลองพบว่า *Chlorella vulgaris* แบบยึดบน beads ที่ pH 3-9 สามารถลดฟอสเฟตได้มากกว่า 90 % ส่วน *Chlorella vulgaris* แบบปล่อยอิสระ พบว่า ที่ pH 6-9 สามารถลดฟอสเฟตได้มากกว่า 90 % แต่ถ้า pH ต่ำกว่า 5 สามารถลดฟอสเฟตได้ 40 - 60 % ส่วนในการศึกษาการลดฟอสเฟตที่อุณหภูมิต่าง ๆ นั้น ทำการเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิ ที่ 10, 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่า ที่ อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส *Chlorella vulgaris* แบบยึดบน beads และปล่อยอิสระ สามารถลดฟอสเฟตได้ประมาณ 93-94% ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส *Chlorella vulgaris* แบบยึดบน beads สามารถลดฟอสเฟตได้ประมาณ 91%และแบบปล่อยอิสระ สามารถลดฟอสเฟตได้ประมาณ 47% ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส *Chlorella vulgaris* แบบยึดบน beads และแบบปล่อยอิสระ สามารถลดฟอสเฟตได้ประมาณ 50% สาเหตุที่ลดฟอสเฟตได้น้อยเพราะว่าเมื่ออุณหภูมิสูง เซลล์จะถูกทำลาย และการละลายของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จะลดลง การเติบโตของสาหร่ายจึงถูกจำกัด

Hirata. และคณะ 1996 ได้ใช้ตัวเก็บพลังงานแสงอาทิตย์ เพื่อเป็นพลังงานแสงให้กับสาหร่ายคลอเรลลา เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ความเร็วรอบในการกวน 50 รอบต่อนาที ให้แก๊สผสมอัตราส่วน CO_2 : O_2 : N_2 เท่ากับ 10:3:87 (v/v) ด้วยอัตราการป้อน 0.05 ลิตรต่อนาที ทำการศึกษาเปรียบเทียบการให้แสงระหว่าง แสงอาทิตย์, แสงจากหลอด Xenon และแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ พบว่าแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ทำให้สาหร่ายเติบโตได้ดีกว่าหลอด Xenon และดีกว่าแสงอาทิตย์ ตามลำดับ

Watanabe. and Saiki. 1997. ได้เลี้ยง *Chlorella sp.* ปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกรวย โดยทำจากท่อ PVC ใสเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.6 เซนติเมตร ยาว 27 เมตร ให้แสงด้วยหลอด Halide ซึ่งมีกำลัง 400 วัตต์ ซึ่งให้แสงช่วงมืดและช่วงสว่าง 12 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ ป้อนอากาศที่ผสมด้วย CO_2 10% ด้วยอัตรา 0.3 litre min^{-1} จะได้ ชีวมวล 0.68 g dry biomass litre $medium^{-1}$ day^{-1} และพบว่า มีคาร์บอนประกอบอยู่ในชีวมวล 46.1%

Maeda และคณะ 1995 ได้นำ *Chlorella sp.* มาเลี้ยงโดยให้ความเข้มแสง 110 μE/m.s ทำการทดสอบกับ flue gas จาก Boiler ซึ่งผ่านกระบวนการ Desulfurization โดยองค์ประกอบของ flue gas ประกอบด้วย CO_2 13% O_2 5% SO_x 10 ppm NO_x150 ppm และ Dust 10 mg/m^3N อุณหภูมิถูกลดลงในระดับอุณหภูมิห้อง ด้วยการผ่าน ท่อ silicone ก่อนที่จะเข้าถังปฏิกรณ์ จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสามารถเติบโตได้