# การเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของไดอะตอม *Amphora delicatissima.* ที่เลี้ยงโดยใช้คาร์บอนอินทรีย์

นางสาว ชมพูนุท ชัยรัตนะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-0944-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# GROWTH AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF A DIATOM *Amphora delicatissima* CULTURED USING ORGANIC CARBON SOURCES

Miss Chompunut Chairattana

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Marine Science
Department of Marine Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2000

ISBN 974-13-0944-9

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของไดอะตอม *Amphora delicatissima* ที่เลี้ยงโดยใช้คาร์บอนอินทรีย์ |
| โดย | นางสาว ชมพูนุท ชัยรัตนะ |
| สาขาวิชา | วิทยาศาสตร์ทางทะเล |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | ดร. สรวิศ เผ่าทองศุข |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศุภิชัย ตั้งใจตรง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร. สรวิศ เผ่าทองศุข)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจริญ นิติธรรมยง)

ชมพูนุท ชัยรัตนะ : การเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของไดอะตอม *Amphora delicatissima* ที่เลี้ยงโดยใช้คาร์บอนอินทรีย์ (Growth and Biochemical Composition of a Diatom *Amphora delicatissima* Cultured Using Organic Carbon Soures) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข , 108 หน้า. ISBN 974-13-0944-9

การศึกษาผลของชนิดและปริมาณของสารคาร์บอนอินทรีย์ที่มีผลต่อการเติบโตของไดอะตอม *Amphora delicatissima* สายพันธุ์ AM9901 (สายพันธุ์แยกจากอ่าวไทย) ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก พบว่า *A. delicatissima* สามารถเติบโตได้โดยไม่ต้องใช้แสง เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสาหร่ายสูตร Guillard (F/2) ความเค็ม 30 ส่วนในพัน ที่เสริมด้วยสารคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคส หรือกรดแอซิติก ความเข้มข้น 1 กรัมคาร์บอน/ ในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้มีการเติมสารคาร์บอนอินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่ายไม่สามารถเติบโตได้ในที่มืดและตายหมดภายในเวลา 5 วัน ผลของการเปรียบเทียบแหล่งของคาร์บอนต่อการเติบโตพบว่า *A. delicatissima* เติบโตได้ดีขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมกลูโคส 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient broth) และสาหร่ายจะมีอัตราการเติบโตสูงขึ้นอีกเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้นอีกเป็น 8 12 และ 16 กรัมคาร์บอน/ลิตร กลับทำให้อัตราการเติบโตของสาหร่ายลดลง ผลการเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* แบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร F/2 ที่มีการเติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ในถังหมักขนาด 700 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด พบว่าจะสามารถเติบโตอยู่ในช่วง steady state เมื่อปรับอัตราการไหลของอาหารเป็น 10.8-12.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง โดย *A. delicatissima* จะมีความหนาแน่นเซลล์อยู่ระหว่าง (96.66-139.83) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร

สำหรับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีภายในเซลล์ พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด มีปริมาณโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และน้ำหนักแห้งต่อเซลล์สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงแบบปรกติในที่มีแสง (โฟโตออโตโทรฟิก) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) นอกจากนี้พบว่าองค์ประกอบกรดไขมันและองค์ประกอบของรงควัตถุในเซลล์ที่เลี้ยงต่างสภาวะนั้นมีความแตกต่างกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## 4172264423 MAJOR MARINE SCIENCE

KEY WORD: *Amphora* / DIATOM / HETEROTROPHIC CULTURE / CONTINUOUS CULTURE

CHOMPUNUT CHAIRATTANA : GROWTH AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF DIATOM *Amphora delicatissima* CULTURED USING ORGANIC CARBON SOURCES. THESIS ADVISOR : ASSOC PROF. SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL, Ph.D. ,THESIS CO-ADVISOR : SORAWIT POWTONGSOOK ,Ph.D., 108 pp. ISBN 974-13-0944-9

The study of organic carbon sources on growth of the marine diatom *Amphora delicatissima* (AM9901), isolated from the Gulf of Thailand, indicated that *A. delicatissima* could be cultured in heterotrophic condition without illumination when glucose or acetic acid 1gC/L was added into Guillard (F/2) algal medium. A control culture without organic carbon addition could not grow and then died within 5 days. Increase of growth was found by adding nutrient broth (NB: beef extract, peptone and yeast extract) into glucose containing F/2 medium. The growth optimisation experiments showed that increase of glucose concentration up to 4 gC/L provided a maximum growth rate and cell density. However, higher glucose concentration (8, 12 and 16 gC/L) gave lower growth rate and cell density than 4 gC/L. Continuous culture of *A. delicatissima*, in a custom made fermentor with 700 ml of F/2 medium + 4 g(glucose-C)/L + NB without illumination, indicated that *A. delicatissima* could be grown in a chemostat condition with 10.8-12.5 ml/hr medium flow rate at (96.66-139.83) $x10^4$ cells/ml.

Protein, fat and carbohydrate compositions in *A. delicatissima* that cultured in heterotrophic condition was significantly higher than *A. delicatissima* that cultured in photoautotrophic condition. Fatty acids compositions and pigments were different between *A. delicatissima* in different culture conditions.

| | | |
|---|---|---|
| Department | Marine Science | Student' s signature..... |
| Field of study | Marine Science | Advisor' s signature..... |
| Academic year | 2000 | Co-advisor' s signature..... |

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุน จากโครงการบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ ปี 2542 ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และได้รับความกรุณาจาก รศ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ ศ.ลัดดา วงศ์รัตน์ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำในการจำแนกชนิดไดอะตอม ผศ.ดร. สมถวิล จริตควร ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมัน และ อ.วิชญา กันบัว ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์รงควัตถุด้วย HPLC พร้อมกันนี้ขอขอบคุณ ดร.พิกุล จิระวานิชไพศาล ดร.ศิราวุธ กลิ่นบุหงา ดร.ณรงศักดิ์ พ่วงลาภ และนักวิจัยของหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง และให้คำแนะนำด้านวิชาการ ตลอดจนวิธีการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ๆ ทุกคนในโรงเพาะเลี้ยง หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รวมทั้ง คุณชลธยา ทรงรูป คุณอลิสา โชควิวัฒนวนิช คุณอภิเชษฐ์ อุไรฤกษ์กุล คุณชเนตี ชัยรัตนะ เพื่อนๆ และน้องๆ สำหรับความช่วยเหลือ และกำลังใจที่ดีตั้งแต่แรกเริ่มการทดลองในห้องปฏิบัติการ จนถึงการเขียนวิทยานิพนธ์

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่มีส่วนอย่างยิ่งในทุกด้านของงานวิทยานิพนธ์ ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ชมพูนุท ชัยรัตนะ

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญภาพ.....ญ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....25
4. ผลและอภิปรายผลการทดลอง.....37
5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....71
รายการอ้างอิง.....73
ภาคผนวก.....81
ประวัติผู้เขียน.....108

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญตาราง


ตารางที่ หน้า

4.1 การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมอินทรีย์หรืออนินทรีย์คาร์บอน ในรูปต่างๆ ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง (จากการเลี้ยงในรอบสุดท้าย).....47

4.2 การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมอินทรีย์คาร์บอน ในรูปต่างกลูโคสและกรดแอซิติกใน 2 ระดับความเข้มข้น คือ 4 และ 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง .....51

4.3 การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมอินทรีย์ในรูปกลูโคส กรดแอซิติก กลูโคสผสมกับ NB และกรดแอซิติกผสมกับ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด (จากการเลี้ยงในรอบสุดท้าย).....55

4.4 การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมอินทรีย์ในรูปกลูโคสผสมกับ NBในความเข้มข้นต่างๆ ของกลูโคสภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด (จากการเลี้ยงในรอบสุดท้าย).....59

4.5 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีของ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมรูปกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด .....63

4.6 ร้อยละของปริมาณรงควัตถุชนิดต่างในเซลล์ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมรูปกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด .....65

4.7 องค์ประกอบกรดไขมันในเซลล์ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เปรียบเทียบกับ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมรูปกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด .....69

# สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ หน้า

1. ความหนาแน่นเซลล์ของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมอินทรีย์ หรืออนินทรีย์คาร์บอน ในรูปต่างๆ ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง .....96
2. ความหนาแน่นเซลล์ของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมคาร์บอนอินทรีย์ ในรูปกลูโคสและกรดแอซิติกใน 2 ระดับความเข้มข้น คือ 4 และ 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง.....98
3. ความหนาแน่นเซลล์ของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมอินทรีย์ ในรูปกลูโคส กรดแอซิติก กลูโคสผสมกับ NB และกรดแอซิติก ผสมกับ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด .....101
4. ความหนาแน่นเซลล์ของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมอินทรีย์ ในรูปกลูโคสผสมกับ NBในความเข้มข้นต่างๆ ของกลูโคส ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด .....103
5. ความหนาแน่นเซลล์ของ *A. delicatissima* ในระบบต่อเนื่อง ในอาหารเลี้ยง สาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมอินทรีย์ ในรูปกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด .....105
6. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในเซลล์ *A. delicatissima* ที่เลี้ยง ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 เปรียบเทียบกับเซลล์ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด.....107

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | โครงสร้างฟรัสตุล (frustule) ของไดอะตอม | 6 |
| 2.2 | ส่วนประกอบของเกอเดลซองเซลล์ไดอะตอม | 8 |
| 2.3 | แกนระนาบสมมาตรที่ใช้ในการบรรยายลักษณะของไดอะตอม | 9 |
| 2.4 | กราฟการเติบโตของสาหร่าย | 18 |
| 2.5 | ไดอะแกรมระบบการเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่อง | 24 |
| 3.1 | ภาพถ่ายและไดอะแกรมระบบการเลี้ยง *A. delicatissima* แบบต่อเนื่อง ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก | 33 |
| 4.1 | การเติบโตของสาหร่าย *Nitzschia* sp. ในสภาวะปกติ (อาหารสูตร T1 ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์) | 37 |
| 4.2 | เซลล์สาหร่าย *A. delicatissima* ซึ่งถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน | 40 |
| 4.3 | การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ในที่มีแสง และที่มืด | 43 |
| 4.4 | การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมอินทรีย์หรืออนินทรีย์คาร์บอน ในรูปต่างๆ ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง | 46 |
| 4.5 | การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมอินทรีย์คาร์บอน ในรูปต่างกลูโคสและกรดแอซิติกใน 2 ระดับความเข้มข้น คือ 4 และ 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง | 49 |
| 4.6 | การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมอินทรีย์ในรูปกลูโคส กรดแอซิติก กลูโคสผสมกับ NB และกรดแอซิติกผสมกับ NB ที่เลี้ยงในสภาวะไม่มีแสง | 53 |
| 4.7 | การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมอินทรีย์ในรูปกลูโคสผสมกับ NBในความเข้มข้นต่างๆ ของกลูโคสที่เลี้ยงในสภาวะไม่มีแสง | 57 |

# สารบัญภาพ (ต่อ)


ภาพที่ หน้า

4.8 การเติบโตของ *A. delicatissima* แบบต่อเนื่อง ในถังหมักขนาดเล็ก และอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ไหลออกจากถังหมัก..... 62

4.9 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์รงควัตถุด้วย HPLC เปรียบเทียบระหว่าง *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่าย สูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ในที่มืด..... 66

4.10 absorption spectrum จากการตรวจด้วย HPLC Photodiode array detector ของรงควัตถุชนิดต่างๆ..... 67

4.11 ปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดที่พบในเซลล์สาหร่าย *A. delicatissima* ที่เลี้ยง ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ให้แสงสว่าง กับ 3,000 กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ในที่มืด..... 69

4.12 ร้อยละของไขมันชนิดต่างๆ ที่พบในเซลล์สาหร่าย *A. delicatissima* ที่เลี้ยง ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ให้แสงสว่าง กับ 3,000 กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ในที่มืด..... 70


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่1

# บทนำ

สาหร่ายเซลล์เดียวมีความสำคัญต่อมนุษย์ในหลายด้าน โดยสาหร่ายเซลล์เดียวเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นของห่วงโซ่อาหารในแหล่งน้ำ ชนิดและปริมาณของสาหร่ายที่พบในแหล่งน้ำยังสามารถบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งน้ำ, ทิศทางกระแสน้ำ และใช้ตรวจสอบมลภาวะของแหล่งน้ำ และนอกจากนี้มนุษย์ได้นำสาหร่ายเซลล์เดียวมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น เป็นอาหาร เป็นอาหารสัตว์ ยา ปุ๋ย และใช้ในการทดลองทางวิทยาศาสตร์ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540) จึงได้มีการนำสาหร่ายเซลล์เดียวจากธรรมชาติมาเลี้ยงเพื่อตอบสนองความต้องการของมนุษย์

การผลิตสาหร่ายเซลล์เดียวโดยทั่วไปใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบใช้แสง หรือ photoautotrophic culture คือให้สาหร่ายเซลล์เดียวสร้างอาหารโดยการสังเคราะห์แสง แต่ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว โดยการเติมคาร์บอนอินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งวิธีการนี้ทำให้สาหร่ายเซลล์เดียวเติบโตได้โดยไม่ต้องใช้แสง ซึ่งเรียกการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในสภาวะแบบนี้ว่า เฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic culture) ซึ่งจากรายงานของ Chen (1996) กล่าวว่า การเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกจะให้ผลผลิตมากกว่าการเลี้ยงโฟโตออโตโทรฟิกเมื่อใช้พื้นที่เท่ากัน เพราะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวแบบเฮเทอโรโทรฟิก ประหยัดพื้นที่ ปริมาณน้ำ และอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง อีกทั้งยังเป็นการประหยัดแรงงานอีกด้วย (Gladue, 1991) นอกจากนี้ Kitano *et al.*, (1997) พบว่าการเลี้ยงไดอะตอมแบบเฮเทอโรโทรฟิกจะทำให้องค์ประกอบของกรดไขมันเปลี่ยนแปลงไปโดยมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้เป็นกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต (esesntial fatty acids) คือร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้จะต้องได้รับจากอาหาร สำหรับมนุษย์กรดไขมันไม่อิ่มตัวช่วยลดโอกาสการเกิดโรคหัวใจและเส้นเลือดตีบตัน สำหรับสัตว์น้ำกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อสัตว์น้ำ โดยเฉพาะกรดไขมันในกลุ่มโอเมกา-3 และกลุ่มโอเมกา-6 (Suwanich, 1996) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญเพราะสัตว์น้ำมีความสามารถในการย่อยกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ดีกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ( วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

การศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายปัจจุบันเป็นการเลี้ยงแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียวซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงที่สิ้นเปลืองเวลาและค่าใช้จ่ายกว่าการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง การพัฒนาการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในระบบต่อเนื่อง (continuous culture) จะได้ผลผลิตที่คงที่ซึ่งจะช่วยอำนวยความสะดวกแก่ผู้เลี้ยง ทั้งยังช่วยประหยัดอาหาร น้ำ และประหยัดแรงงานเป็นอย่างมาก

**วัตถุประสงค์**

1. เพื่อศึกษาชนิดของคาร์บอนอินทรีย์ในการเพาะเลี้ยง *Amphora delicatissima* แบบเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบบโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic)
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในเซลล์สาหร่าย *Amphora delicatissima* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิก
3. เพื่อพัฒนาการเลี้ยงสาหร่าย *Amphora delicatissima.* แบบต่อเนื่อง (continuous culture) ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก

**ขอบเขตการศึกษา**

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการเลี้ยงสาหร่ายในห้องปฏิบัติการโดยใช้สาหร่ายที่มีความสามารถในการเติบโตในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก คือ สาหร่าย *Amphora delicatissima* สายพันธุ์ AM 9901 โดยมีการทดลองเลี้ยงสาหร่ายทั้งแบบการเลี้ยงแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว (batch) และการเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่อง (continuous) ในถังหมักขนาดเล็ก

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

สามารถนำผลการทดลองไปใช้เป็นแนวทางสำหรับการเพาะเลี้ยง *Amphora delicatissima* เพื่อประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อนในอนาคต เนื่องจากการเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกจะช่วยให้ผู้เลี้ยงประหยัดทั้งพื้นที่และต้นทุนการผลิต และระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะช่วยให้ได้ผล

ผลิตที่คงที่ หากมีระบบการผลิต *Amphora delicatissima* ที่ให้ผลผลิตได้เป็นจำนวนมากอาจนำมาพัฒนาทำเป็นอาหารสำเร็จรูป (artificial diet) ได้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 2

# การศึกษาจากเอกสาร

## 2.1 ชีววิทยาของไดอะตอม

ไดอะตอมจัดเป็นแพลงค์ตอนพืชหรือสาหร่ายเซลล์เดียวประเภทหนึ่ง จัดอยู่ใน Division Chromophyta Class Bacillariophyceae ไดอะตอมส่วนใหญ่จะดำรงชีวิตอยู่เดี่ยว ๆ แต่มีบางชนิดอยู่เป็นโคโลนี (colony) หรือบางชนิดอาจอยู่เป็นสายโซ่ (chain) โครงสร้างของเซลล์แตกต่างจากชั้นอื่นๆ คือ เซลล์ประกอบด้วยฝา 2 ฝาครอบกันพอดี และผนังเซลล์ประกอบด้วยซิลิกา ฝามีสมมาตรแบบรัศมีหรือแบบซ้ายขวา รวมทั้งมีลวดลายบนฝาแตกต่างกันตามชนิด คลอโรพลาสต์มีหลายสีแต่จะอยู่ในเฉดสีเหลืองถึงสีน้ำตาล สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแบ่งเซลล์ การสืบพันธ์แบบอาศัยเพศ โดยการรวมกันของเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) ได้ออกโซสปอร์ (auxospore) แต่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมไดอะตอมจะสร้างสปอร์ที่เรียกว่า resting spore ซึ่งสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้นาน

### 2.1.1 ลักษณะสำคัญของ Class Bacillariophyceae

1.สารสีสำหรับการสังเคราะห์แสง ได้แก่

- คลอโรฟิลล์ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ และ คลอโรฟิลล์ ซี

- แคโรทีนอยด์ ได้แก่ เบตา-แคโรทีน ($\beta$-carotene) และ เอบซีลอน-แคโรทีน ($\varepsilon$-carotene) แซนโทฟิลล์ ได้แก่ ฟูโคแซนทิน (fucoxanthin) ไดอะโตแซนทิน (diatoxanthin) และไดอะไดโนแซนทิน (diadinoxanthin) แต่เนื่องจากปริมาณของแคโรทีนอยด์และแซนโทฟิลล์มากกว่าคลอโรฟิลล์ ดังนั้นสีของคลอโรพลาสต์ จะมีสีตั้งแต่ เหลือง เหลืองแกมเขียว เขียวมะกอก เหลืองออกน้ำตาล น้ำตาลอ่อน น้ำตาลอมทอง จนถึงน้ำตาลเข้ม คลอโรพลาสต์ของไดอะตอมส่วนใหญ่ จะมีรูปร่างเป็นแผ่น เป็นแถบ หรือเป็นพู ซึ่งมี 1-2 แผ่น บางชนิดมีคลอโรพลาสต์เป็นรูปดาว เช่น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



*Rhabdonema* บางชนิดอาจมีคลอโรพลาสต์เป็นเม็ดกลมซึ่งมีจำนวนมาก เช่น *Melosira, Biddulphia* และ *Hemidiscus* เป็นต้น

2.เปลือกหุ้มเซลล์ มีลักษณะเป็นฝา 2 ฝา ครอบกันพอดี ประกอบด้วยเพคติน และมีซิลิกาฝังอยู่ทั่วผนัง นอกจากนี้บนฝายังมีลวดลายแตกต่างกันมากมาย

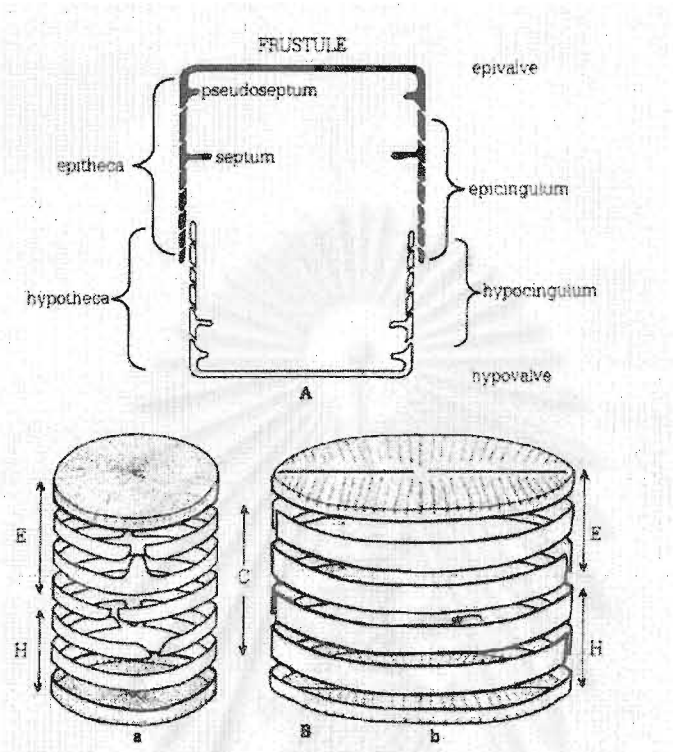
3.เซลล์ปรกติของไดอะตอม เป็นเซลล์ที่ไม่มีหนวด แต่เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะมีหนวด 1 เส้น แบบ pantonematic คือมีขน 2 แถวบนแกนหนวด) และพบเฉพาะเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ใน อันดับ Biddulphiales

4.อาหารสะสม ได้แก่ ไขมัน และแป้งในรูปของเหลว ที่เรียกว่า คริโซลามินาริน (Chrysolaminarin) บางชนิดอาจสะสมแป้งในไพรีนอยด์

### 2.1.2 โครงสร้างของไดอะตอม

โครงสร้างของไดอะตอมประกอบด้วยฝา 2 ฝา คล้ายกับลักษณะของ Petri dish เรียกว่า 1 ฟรัสตุล (frustule) 1 ฟรัสตุล ประกอบด้วย ฝาบน (epitheca) และฝาล่าง (hypotheca) พื้นที่บนฝาบนและฝาล่างเรียกว่าหน้าฝา (valve face) รอยหักพับหรือมุมฝา เรียกว่า valve mantle ฝาบนประกอบด้วย epivalve และ epicingulum โดย epicingulum ประกอบด้วย แถบ 1 แถบ เรียกว่า copula ส่วนนี้มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า intercalary band –intercalalary bands และฝาล่าง ประกอบด้วย hypovalve และ hypocingulum ทั้ง epicingulum และ hypocingulum รวมกันมีชื่อว่า girdle หรือ cingulum (ภาพที่ 2.1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**ภาพที่** 2.1 โครงสร้างของฟรัสตุล (flustule) ของไดอะตอม

(A) รูปร่างลักษณะโดยทั่วไปของไดอะตอม (B) เปรียบเทียบโครงสร้างฟรัสตุล (a) centric diatom (b) penate diatom (E = epitheca, epivalve + epicingulum H = hypotheca, hypovalve + hypocingulum C = cingulum หรือ girdle) (ที่มา Halse and Syvertsen, 1997 ; Cox, 1996 อ้างโดย ลัดดา วงศ์รัตน์ 2539)

แถบ (band) ในส่วนของ girdle หรือ cingulum แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

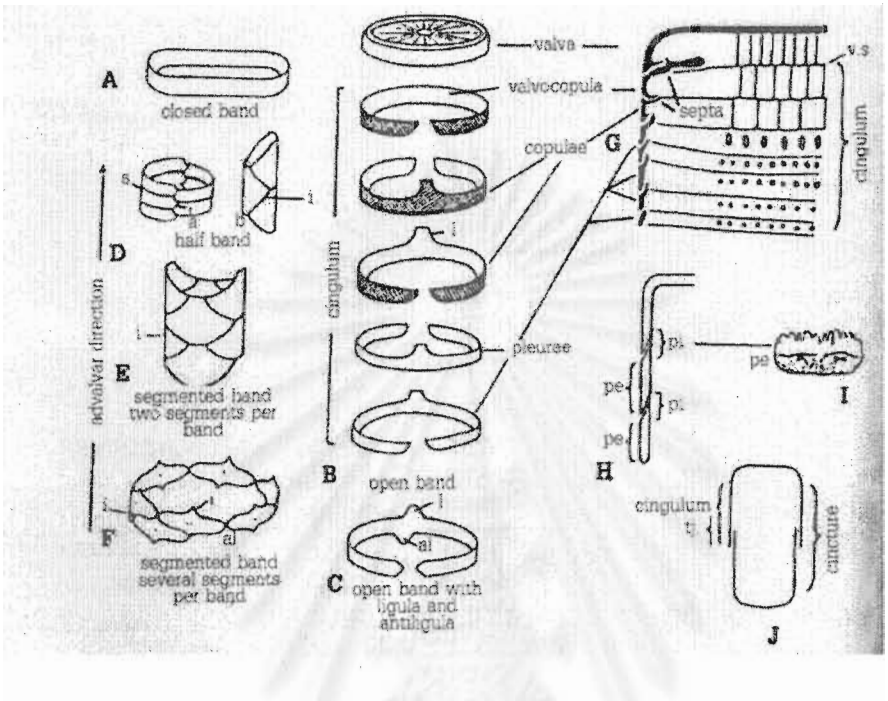
1.เซกเมนต์ (segment or scales) ซึ่งประกอบด้วยเซกเมนต์ที่ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นเกล็ดเรียงต่อกันเป็นแถบ จำนวนเกล็ดขึ้นอยู่กับขนาดของไดอะตอม (ภาพที่ 2.2 D-F) พบในสกุล *Rhizosolinia, Proboscia, Pseudosolenia, Urosolenia, Stephanopyxis, Ditylum* และ *Denticula* เป็นต้น จัดว่าเป็นแถบที่มีวิวัฒนาการน้อยที่สุด (most primitive)

2.แถบเปิด (open bands) เป็นแถบที่พบมากที่สุดในไดอะตอม ช่วงเปิดของแต่ละแถบจะถูกปิดด้วยส่วนเล็ก ๆ คล้ายลิ้น ที่ยื่นออกมาเรียกว่า ลิกูลา (ligula) ซึ่งอยู่บนแถบติดกันที่มีอายุน้อยกว่า (abvalvar band) ถ้ามีช่องเปิดอยู่อีก ช่องนี้จะถูกปิดด้วยส่วนที่เรียกว่า แอนตี้ลิกูลา (antiligula) ซึ่งอยู่บนแถบที่มีอายุมากกว่า (advalvar band) (ภาพที่ 2.2 B-C) การเชื่อมต่อของแต่ละแถบแน่นมาก ดังนั้นแถบจะหลุดออกจากกันได้ต่อเมื่อเกิดการแตกหัก หรือการฉีกขาดของฝาและเกอเดิลเท่านั้น หากต้องการแยกชิ้นส่วนแต่ละชิ้นออกจากกันต้องใช้วิธี ultrasonification

3.แถบปิด (closed bands) เป็นแถบซึ่งเป็นวงรอบเซลล์ (ภาพที่ 2.2 A) เป็นประเภทของแถบที่พบน้อยที่สุด แต่จัดว่าเป็นแถบที่พัฒนามากที่สุด พบในไดอะตอมบางสกุล เช่น *Hydrosera, Isthmia, Climacosphenia* และ *Rhabdonema*

ในฝา 1 ฝา แต่ละส่วนของเกอเดิลจะคาบเกี่ยวกันหรือซ้อนกัน (ภาพที่ 2.2 G-H) เช่น วงแรกของเกอเดิลที่ติดอยู่กับฝา ซึ่งเรียกว่า vavocopula จะซ้อนกับส่วนฝา แต่ละวงของแถบเกอเดิลประกอบด้วยส่วนที่ถูกซ้อนซึ่งอยู่ภายในเรียกว่า pars interior = p.i กับส่วนที่อยู่ภายนอกซึ่งไม่ได้อยู่ซ้อนทับ เรียกว่า pars exterior = p.e (ภาพที่ 2.2 H-I) แต่ละวงของเกอเดิลวงอื่นที่ไม่อยู่ติดกับฝามีชื่อเรียกว่า copula หรือ copulae ลักษณะของ คอพูเลอาจเหมือนกัน หรือแตกต่างกันได้ 1-2 แบบ

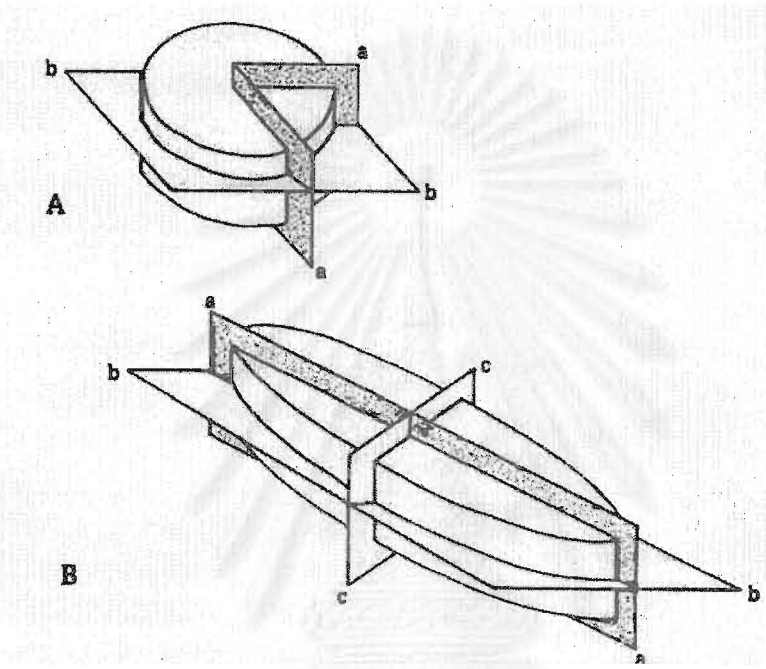
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**ภาพที่** 2.2 ส่วนประกอบของเกอเดิล (l = linula, a= antilingula, I = imbrication, s = suture, pe = pars exterior, pi = pars interior, tj = theca junction) **ที่มา** ลัดดา วงศ์รัตน์ (2539)

เซนทริคไดอะตอมมีกรอบนอก (outline) ของหน้าฝา (valve face) เป็นรูปกลม สามเหลี่ยม จนถึงหลายเหลี่ยม ส่วนเพนเนตไดอะตอมกรอบนอกของฝามีรูปร่างต่างกันหลายแบบ คือรูปเรือ รูปรี รูปไข่ รูปเข็ม ฯลฯ ลักษณะของขั้ว (pole) ของเพนเนตไดอะตอมอาจเหมือนกันเรียกว่า isopolar หรือต่างกันเรียกว่า heteropolar การบรรยายรูปร่างของไดอะตอมโดยเฉพาะเพนเนตไดอะตอม มักกล่าวถึงรูปร่างของฟรัสตุลที่สัมพันธุ์กับแกน (axis-axes) และระนาบ (plane) ของฟรัสตุลเป็นหลักเสมอ (ภาพที่ 2.3 ) แกนยาวหรือแกนตั้งของฟรัสตุลเรียกว่า แกนอะพิคัล (apical axis) แกนขวางหรือแกนที่ตั้งฉากกับแกนอะพิคัล เรียกว่า แกนทรานซอะพิคัล (transapical axis) ส่วนแกนที่เชื่อมระหว่างจุดศูนย์กลางของฝาบนและฝาล่างเรียกว่า แกนเพอร์วาลวาร์ (pervalvar axis) ในเพนเนตไดอะตอม ความยาวของฟรัสตุล คือ แกนอะพิคัล ส่วนความกว้างของฟรัสตุล คือ แกนเพอร์วาลวาร์ ส่วนเซนทริค

ไดอะตอม ความยาวของฟรัสตุล คือ แกนเพอร์วาลวาร์ ส่วนความกว้าง คือ เส้นผ่าศูนย์กลางของฟรัสตุล (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2539)




**ภาพที่** 2.3 แกนและระนาบของสมมาตรที่ใช้ในการบรรยายลักษณะของไดอะตอม (A) เซนทริคไดอะตอม (B) เพนเนตไดอะตอม (aa = apical, bb = valvar, cc = transapical) ที่มา Cox (1996) อ้างโดย ลัดดา วงศ์รัตน์ (2539)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 2.2 ชีววิทยาของไดอะตอม *Amphora* sp.

*Amphora* sp. เป็นแพลงก์ตอนพืชสกุลหนึ่งจัดอยู่ใน

Division Chromophyta,

Class Bacillariophyceae,

Order Bacillariales,

Suboder Bacillariineae,

Family Naviculaceae,

Genus *Amphora*

*Amphora* พบทั่วไปทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม เซลล์มักอยู่เดี่ยวๆ ด้านหลังและด้านท้องของเซลล์นูน เซลล์เป็นรูปไข่ที่มีปลายเซลล์ตัดตรงทางด้านเกอเดิล และรูปไข่ทางด้านวาล์วซึ่งปลายเซลล์อาจพองออกเล็กน้อยหรือตัดตรง มีอินเตอร์คาลารีแบนด์ (intercalary band) หลายแถบ ซึ่งอาจมีลวดลายที่เป็นจุดเป็นเส้น หรืออาจไม่มีอินเตอร์คาลารีแบน ราฟี (raphe) ของ *Amphora* อาจเป็นเส้นตรงหรือเส้นโค้ง หรือมีลักษณะเป็นเกลียว ปลายของราฟีโค้งงอเข้าหาด้านหลังเซลล์เสมอ และมักเห็นได้ชัดเจนมากกว่าส่วนต้นของราฟี *Amphora* อาจลอยอยู่ในน้ำ เกาะอยู่บนสาหร่ายหรือพืชน้ำอื่นๆ อยู่บนพื้นที่แข็ง ๆ เช่น ก้อนหิน ซีเมนต์ พื้นทราย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2539)

สารสีสำหรับการสังเคราะห์แสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ ซี และแคโรทีนอยด์ ซึ่งปริมาณแคโรทีนอยด์จะมีมากกว่าคลอโรฟิลล์

การสืบพันธุ์ เป็นแบบไม่อาศัยเพศ โดยการแบ่งเซลล์ในแนวขนานกับฝาเดิม นิวเคลียสแบ่งแบบไมโตซิส เมื่อนิวเคลียสแบ่งตัวเสร็จแล้ว ฝาใหม่ 2 ฝา จะถูกสร้างขึ้นในบริเวณฝาเดิม เซลล์แม่จะแบ่งโปรโตพลาสออกเป็น 2 ส่วน ดังนั้นในเซลล์ลูกประกอบด้วยโปรโตพลาสของฝาใหม่ 1 ฝา และฝาเดิมจากแม่อีก 1 ฝา

ประโยชน์ของไดอะตอม *Amphora* sp. คือเป็นไดอะตอมชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้เพาะเลี้ยงตัวอ่อนของหอยเป๋าฮื้อในระยะลงเกาะ (Qi-Hua และคณะ, 1998 ; มณฑล แก่นมณี, 2539) ซึ่งหอยเป๋าฮื้อเป็นสัตว์น้ำที่กำลังได้รับการส่งเสริมเพื่อการเลี้ยงในเชิงพาณิชย์

## 2.3 การเติบโตและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว

สาหร่ายเซลล์เดียวมีประโยชน์ต่อมนุษย์ในหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็น อาหารมนุษย์ ยารักษาโรค ปุ๋ยชีวภาพ อาหารสัตว์ เป็นดรรชนีในการทำนายสภาพแหล่งน้ำ ฯลฯ เนื่องจากการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ดังนั้นผลผลิตจากธรรมชาติจึงไม่เพียงพอกับความต้องการ จึงมีการนำสาหร่ายเซลล์เดียวมาเลี้ยง และมีศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว เพื่อให้สามารถผลิตสาหร่ายเซลล์เดียวได้ตามความต้องการ เช่น การศึกษาการสังเคราะห์แสงของ *Chlorella* เปรียบเทียบกับพืชที่เติบโตบนบกโดย Burlew 1953 อ้างโดย Chapman and Gellenbeck (1989) และตั้งแต่ช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 มนุษย์ได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับการผลผลิตมากขึ้น ได้มีการพัฒนาการเลี้ยงสาหร่ายในหลายประเทศ เช่น เยอรมัน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อิสราเอล และ เชคโกสโลวาเกีย (Burlew, 1953 อ้างโดย Becker and Venkataraman, 1982) ส่วนการเพาะเลี้ยงไดอะตอมเริ่มมีขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ.1880 (Eppley, 1977) จากนั้นพบว่าซิลิคอนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของไดอะตอม (Richter, 1905 อ้างโดย Eppley,1977) ต่อมามีความสนใจในการนำไดอะตอมมาเป็นอาหารของสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังในระยะตัวอ่อน จึงได้ทดลองเลี้ยงไดอะตอมที่แยกได้จากน้ำทะเล และเริ่มมีการศึกษาถึงธาตุอาหารหลักที่ไดอะตอมต้องการซึ่งมีความคล้ายคลึงกับธาตุอาหารหลักที่พืชชั้นสูงต้องการในการเติบโต (Allen and Nelson, 1910 อ้างโดย Eppley ,1977) จากนั้นได้มีการศึกษาเกี่ยวอาหารที่ใช้เลี้ยงไดอะตอมเรื่อยมา เช่นการเติมวิตามิน บี12 แทนการใช้สารสกัดจากดิน (Hutner and Provasoli, 1953 อ้างโดย Eppley, 1977)

### 2.3.1 ปัจจัยแวดล้อมและการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายเซลล์เดียว

การสังเคราะห์แสง คือการใช้พลังงานจากแสงเพื่อเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนซึ่งอาจมาจากน้ำหรือแหล่งไฮโดรเจนอื่นๆ ให้เป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตโดยเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่มีรงควัตถุที่สามารถดูดพลังงานจากแสงได้ ซึ่งในกรณีของไดอะตอมรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง คือ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ ดังสมการการสังเคราะห์แสงต่อไปนี้

$$CO_2 + H_2O + \text{Light energy} \xrightarrow{\text{chlorophyll}} (CH_2O) + O_2 + \text{chemical energy}$$

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสงแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ (Brock *et al*, 1984)

1. ปฏิกิริยาที่ใช้แสง (light reaction) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อมีแสงจากดวงอาทิตย์หรือแสงประดิษฐ์ก็ได้ และต้องมีน้ำและมีรงควัตถุเป็นตัวรับพลังงานรังสีในช่วงคลื่นที่เหมาะสม ทำให้คลอโรฟิลล์มีพลังงานสูงขึ้น อิเลคตรอนที่หลุดออกจากโมเลกุลของคลอโรฟิลล์จะมีสารมารับและถ่ายทอดอิเลคตรอนต่อไปเป็นทอดๆ (electron tranfer) ในขณะที่มีการถ่ายทอดอิเลคตรอนนี้ พลังงานในอิเลคตรอนจะลดลง ซึ่งพลังงานที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะถูกนำไปสร้างสารประกอบ ATP จาก ADP ในกระบวนการโฟโตฟอสฟอริเลชัน พลังงานอีกส่วนหนึ่งจะถูกนำไปสร้าง NADPH+ $H^+$ จาก $NADP^+$

2. ปฏิกิริยาไม่ใช้แสง (dark reaction) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยไม่ต้องมีแสง เป็นกระบวนการต่อเนื่องจากปฏิกิริยาใช้แสงในการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้ผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ใช้แสง คือ NADPH+ $H^+$ และ ATP เพื่อการสร้างสารประกอบคาร์โบไฮเดรต อาจเรียกกระบวนการนี้ว่า การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ($CO_2$ fixation) หรือ วัฏจักรเคลวิน (Calvin cycle)

**ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการสังเคราะห์แสง**

1. **แสง** เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากแสงเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง และแสงยังเป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) ของการเติบโตของสาหร่ายอีกด้วย โดยจุดอิ่มตัวของการสังเคราะห์แสง (light-saturation intensity) นั้นแตกต่างกันในสาหร่ายแต่ละชนิด ความเข้มแสง ณ จุดอิ่มตัวของการสังเคราะห์แสงจะทำให้สาหร่ายสามารถสังเคราะห์แสงได้มากที่สุด (Devlin and Barker, 1971) นอกจากนี้แสงยังเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองของสาหร่ายจำพวกไดอะตอมต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การสร้างสปอร์ และเป็นตัวกระตุ้นการเคลื่อนตัวของไดอะตอม (Trainor, 1978) นอกจากนี้ เมื่อทดลองเลี้ยง *Detonula confervacae* พบว่า เซลล์ไดอะตอมที่เติบโตในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำจะตอบสนองต่อแสงที่มีความเข้มแสงต่ำได้ดี ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงในที่อุณหภูมิสูงจะตอบสนองแสงที่มีความเข้มแสงสูงได้ดี (Smayda, 1969 อ้างโดย Eppley ,1977) และไดอะตอมที่อาศัยที่หน้าดิน จะมีอัตราการเติบโตสูงสุดเมื่อให้แสงเป็นเวลาน้อยกว่า 24 ชั่วโมงต่อวัน และพบว่ามีไดอะตอมบางชนิดจะมีอัตราการเติบโตสูงสุดเมื่อให้แสงต่อเนื่องตลอดเวลา (Castenholz, 1964 อ้างโดย Eppley, 1977)

2. **อุณหภูมิ** มีผลต่อการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายเซลล์เดียว เมื่ออุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมสูงขึ้นอัตราการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น อัตราการสังเคราะห์แสงจะเพิ่มตามการเพิ่มของอุณหภูมิจนถึงระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว โดยเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นกว่านี้อัตราการเติบโตจะลดลง (Darley, 1982) นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่ออัตราการละลายของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเมื่ออุณหภูมิลดลง จะทำให้อัตราการละลายของคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง ซึ่งเป็นผลให้อัตราการสังเคราะห์ลดลงด้วย (Devlin and Barker, 1971)

การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเติบโตจำเพาะของไดอะตอมกับอุณหภูมิ โดยการเลี้ยงไดอะตอมแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว พบว่าระดับของอุณหภูมิจะมีผลต่ออัตราการเติบโต ซึ่งระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตจะแตกต่างกันในไดอะตอมแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของไดอะตอมนั้นๆ ซึ่งในแต่ละแหล่งของโลกย่อมมีอุณหภูมิที่แตกต่างกัน (Braarud, 1961; Hulbert and Guillard, 1968 ทั้งหมดอ้างโดย Eppley, 1977)

3. **ความเค็ม** ชนิดของเกลืออนินทรีย์และแร่ธาตุที่ละลายอยู่ในน้ำทะเลและน้ำจืดนั้น จะมีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว และมีผลต่อการปรับสมดุลเกลือแร่ของเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขนส่งสารผ่านเนื้อเยื่อ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของอิออน ในน้ำยังมีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวอีกด้วย (Darley, 1982) การศึกษาการปรับสมดุลเกลือแร่ของเซลล์สาหร่ายสีเขียวชนิดที่สามารถทนความเค็มในช่วงกว้าง (euryhaline) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอิออนในอาหารที่เลี้ยง เซลล์สาหร่ายจะสูญเสียน้ำและเซลล์มีการหดตัวในทันที (Hellebust 1976 อ้างโดย Darley, 1982) การศึกษาการตอบสนองต่อความเค็มของไดอะตอมที่อาศัยอยู่บริเวณ ปากแม่น้ำ และในทะเล พบว่าไดอะตอมแต่ละชนิดสามารถอาศัยในแหล่งน้ำที่มีความเค็มแตกต่างกัน แต่มีไดอะตอมเพียงบางชนิดที่สามารถอาศัยได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงความเค็ม เรียกว่า euryhaline คือสามารถอาศัยในแหล่งน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงความเค็มในช่วงกว้าง (Eppley, 1977)

4. **ความเข้มข้นของธาตุอาหาร** การเติบโตของสาหร่ายซึ่งเป็นผลมาจากการสังเคราะห์แสงนั้นขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่าย ดังนั้นถ้าในน้ำที่เลี้ยงสาหร่ายมีความเข้มข้นของอาหารไม่เพียงพอกับความต้องการของสาหร่าย จะทำให้อัตราการเติบโตลดลง

(ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540) จากการศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของอาหารต่อการเติบโตของไดอะตอม พบว่าอัตราการเติบโตและความเข้มข้นของธาตุอาหารที่เป็นปัจจัยจำกัด จะมีความสัมพันธ์เป็นกราฟรูปพาราโบลา ซึ่งเป็นผลมาจากอัตราการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ ธาตุอาหารที่เป็นปัจจัยจำกัดในการเติบโตของไดอะตอมได้แก่ ฟอสเฟต ไนเตรต วิตามิน บี12 และกรดซิลิซิก เป็นต้น (Eppley, 1977)

**ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว**

ธาตุอาหารเป็นปัจจัยทางเคมีที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ทั้งในด้านปริมาณ และด้านชนิดของธาตุอาหาร โดยทั่วไปธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวจะแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ธาตุอาหารหลัก (macronutrients) และธาตุอาหารรอง (micronutrients)

**ธาตุอาหารหลัก** ประกอบด้วยธาตุต่อไปนี้

1. คาร์บอน คาร์บอนที่พืชนำไปใช้แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ คาร์บอนอินทรีย์และคาร์บอนอนินทรีย์ สาหร่ายจะใช้อนินทรีย์คาร์บอนในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายน้ำหรือในรูปของเกลือคาร์บอเนต และไบคาร์บอเนต คาร์บอนไดออกไซด์จะอยู่ในสภาวะใดนั้นขึ้นกับค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำ (pH) เมื่อน้ำมี pH เท่ากับ 7-9 จะอยู่ในรูปของเกลือไบคาร์บอเนต เมื่อ pH มากกว่า 9.5 จะอยู่ในรูปเกลือคาร์บอเนต เมื่อ pH มีค่าประมาณ 5 คาร์บอนไดออกไซด์จะอยู่ในรูปก๊าซ ซึ่งในสภาวะนี้สาหร่ายจะใช้คาร์บอนอินทรีย์ เช่น กลูโคส ซูโครส หรือคาร์บอนอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ตามความต้องการของสาหร่ายแต่ละชนิด (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540) อัตราการสังเคราะห์แสงจะขึ้นอยู่กับปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์มีมากถึงจุดอิ่มตัว อัตราการสังเคราะห์แสงจะเพิ่มขึ้น (Devlin and Barker, 1971)

2. ไนโตรเจน สาหร่ายส่วนใหญ่สามารถใช้ ไนเตรท ไนไตรท์ และแอมโมเนียมได้ มีสาหร่ายบางชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จากอากาศ ได้แก่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Darley, 1982) โดยสาหร่ายส่วนใหญ่จะเลือกใช้แอมโมเนียก่อน เนื่องจากสาหร่ายสามารถใช้แอมโมเนียในกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยเฉพาะการสร้างกรดอะมิโนได้โดยตรง ในขณะที่ถ้าใช้ไนเตรทต้องเปลี่ยนไนเตรทให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียก่อน เซลล์จึงจะสามารถนำไปใช้ได้ (Lobban and Harrison, 1994)

ถ้าสาหร่ายขาดไนโตรเจนจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสง และปริมาณรงควัตถุ รวมทั้งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดลดลงด้วย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540)

3.ฟอสฟอรัส เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่าย เนื่องจากฟอสฟอรัสมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายทอดพลังงาน และกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิก ออโธฟอสเฟต เป็นแหล่งฟอสฟอรัสอนินทรีย์ที่สำคัญต่อการเติบโตของสาหร่าย สาหร่ายส่วนใหญ่จะเก็บฟอสฟอรัสส่วนเกินไว้ในรูป โพลีฟอสเฟต ในไซโตพลาสมิก เกรนูล (Darley, 1982)

4.ซัลเฟอร์ เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายทุกชนิด ซัลเฟอร์ในสาหร่ายมีหลายรูป แบบเช่น กรดอะมิโน วิตามิน บี กรดแพนโทเธนิค ซัลเฟอร์ที่สาหร่ายใช้อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ ได้แก่ ซัลเฟต (sulfate=$SO^{-}_{4}$) (Schiff, 1962)

5.แคลเซี่ยม มีส่วนในการสร้างโครงสร้างของสาหร่ายโดยเฉพาะในสาหร่ายทะเล และมีบทบาทในการสร้างผนังเซลล์ของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540)

6.โซเดียม และโปแทสเซี่ยม โซเดียมเป็นธาตุอาหารที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด และสาหร่ายบางชนิดสามารถใช้โซเดียมทดแทนโปแทสเซี่ยมเมื่อในน้ำขาดแคลนธาตุชนิดนี้ แต่สำหรับสาหร่ายบางชนิดนั้นโปแทสเซี่ยมมีผลในการยับยั้งการเติบโตของสาหร่าย (Wiessner, 1962)

7.แมกนีเซียม เป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540)

**ธาตุอาหารรอง**

เป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการใช้ในปริมาณที่น้อยมาก แบ่งเป็นธาตุอาหารรองอนินทรีย์ และธาตุอาหารรองอินทรีย์

ธาตุอาหารรองอนินทรีย์ ได้แก่

1.เหล็ก เป็นธาตุอาหารที่ช่วยดูดซึมไนโตรเจน และเหล็กเป็นองค์ประกอบของรงควัตถุ ถ้าสาหร่ายขาดเหล็กจะมีผลต่อสรีระและการเติบโตของสาหร่าย (Brock *et al.*,1984) นอกจากนี้เหล็กยังเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์หลายชนิด เช่น เฟอริดอกซิน (ferredoxin) คะตะเลส (catalase) อีกทั้งยังเป็นองค์ประกอบของไซโตโครม (cytochrome) และพอไฟริน (porphyrins) (Warburg, 1948

อ้างโดย Wiessner, 1962) สาหร่ายสามารถดูดซึมเฟอริกไฮดรอกไซด์ได้โดยตรงทางผนังเซลล์ (Harvey, 1937 อ้างโดย Yentsch,1962) ในขณะที่สารประกอบอินทรีย์ของเหล็กนั้นไม่มีความจำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่าย (Yentsch,1962)

2.โบรอน เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายบางชนิด เช่นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและไดอะตอม Werner (1970) อ้างโดย Eppley (1977) รายงานว่าจากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมที่แยกได้จากน้ำทะเลจำนวน 16 ชนิด และไดอะตอมที่แยกได้จากน้ำจืดจำนวน 8 ชนิด ในอาหารสังเคราะห์พบว่าโบรอนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นในการเติบโตของไดอะตอม และอัตราการเติบโตของ *Cylindrotheca fusiformis* ถูกจำกัดด้วยความเข้มข้นของโบรอนในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Lewin, 1966 อ้างโดย Eppley, 1977)

3.แมงกานีส เป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวหลายชนิด ซึ่งแมงกานีสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย (Weissner, 1962) Harvey (1955) อ้างโดย Yentsch (1962) ได้ทดลองเติมแมงกานีสลงในอาหารเลี้ยงสาหร่าย พบว่ามีผลในการเพิ่มอัตราการเติบโตของสาหร่าย

4.สังกะสี เป็นธาตุอาหารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งมีผลต่อการเติบโตของ *Stichococus bacillaris* (Wiessner, 1962) ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายหลายชนิดจะมีสังกะสีอยู่ในความเข้มข้นประมาณ 0.01-0.1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมี EDTA เป็นคีเลเตอร์ นอกจากนี้ Stagmann (1940) อ้างโดย Wiessner (1962) พบว่าเมื่อปริมาณสังกะสีลดลงจะทำให้การสร้างคลอโรฟิลล์ลดลง

5.ซิลิกา ไดอะตอมนั้นมีความต้องการใช้ซิลิกาในการเติบโต ในกลไกของการสร้างเปลือก ในขณะที่สาหร่ายชนิดอื่นไม่จำเป็นต้องใช้ ไดอะตอมสามารถใช้ประโยชน์จากกรดซิลิซิก ($C_{16}H_{36}O_4Si$) ที่เติมลงในอาหารเลี้ยง (Jørgensen, 1953 อ้างโดย Eppley, 1977) การแบ่งเซลล์ของไดอะตอมจะหยุดลงเมื่อในอาหารเลี้ยงมีกรดซิลิซิกอยู่น้อยเกินไป และนอกจากนี้ยังทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอนั้นหยุดลงด้วย (Eppley, 1977) การแปรปรวนของอัตราการรวมตัวของกรดซิลิซิกกับความเข้มข้นของกรดซิลิซิก จะเป็นไปตามจลนพลศาสตร์ของจุดอิ่มตัว (saturation kinetics) ของกรดซิลิซิก (Azam *et al.* 1973 อ้างโดย Eppley, 1977) ส่วนธาตุเจอร์มาเนียม (germanium) เป็นตัวยับยั้งการการเติบโตของไดอะตอม โดยการไปขัดขวางการรวมตัวกันของกรดซิลิซิก (Lewin, 1966; Werner, 1966 ทั้งหมดอ้างโดย Eppley, 1977)

6.ทองแดง พบในเอนไซม์สำกรับกระบวนการออกซิเดชัน และนอกจากนี้ทองแดงยังมีความสำคัญต่อกระบวนการหายใจ โดยพบว่าการหายใจลดลงเมื่อปริมาณทองแดงลดลง (Weissner, 1962) สำหรับ *Chlorella* sp. ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการจะมีอาการผิดปกติ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่มีทองแดงต่ำกว่า $10^{-7}$ โมลาร์ (Walker, 1953 อ้างโดย Weissner, 1962)

ธาตุอาหารรองอินทรีย์ ได้แก่ธาตุอาหารจำพวกวิตามิน เช่น ไบโอติน และไธอามีนซึ่งมีความจำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่ายทะเล (McLachlan,1973) โดยเฉพาะในสาหร่ายเซลล์เดียวจำพวกไดอะตอมต้องการสารอินทรีย์ในรูปวิตามิน บี 12 (Eppley, 1977)

### 2.3.3 การศึกษาการเติบโตของสาหร่ายในการเลี้ยงแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว

การเลี้ยงสาหร่ายแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว คือการเลี้ยงสาหร่ายในภาชนะที่บรรจุอาหารเลี้ยงที่มีปริมาตรคงที่ไม่มีการเติมอาหารเลี้ยง สาหร่ายชนิดที่สนใจจะถูกเติมลงในภาชนะเลี้ยงเพื่อเป็นเซลล์ตั้งต้น ให้มีการเพิ่มจำนวนต่อไป ลักษณะการเติบโตของไดอะตอม หรือ ของสาหร่ายทั่วไปจะแบ่งเป็น 5 ระยะ ดังนี้ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540) ดังภาพที่ 2.4

1.ระยะปรับตัว (lag phase or inductional phase) เป็นระยะที่เซลล์ปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ เช่น แสง อุณหภูมิ และธาตุอาหาร ฯลฯ ระยะจะไม่มีการแบ่งเซลล์ ดังนั้น ถ้าเซลล์ไม่สามารถปรับตัวได้จะตายลง การที่สาหร่ายจะผ่านระยะปรับตัวนี้เร็วมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของเซลล์ และความอุดมสมบูรณ์ของอาหารที่เลี้ยง ถ้าสภาพทั้งสองเหมาะสม สาหร่ายจะเข้าสู่ระยะที่สองได้เร็วขึ้น

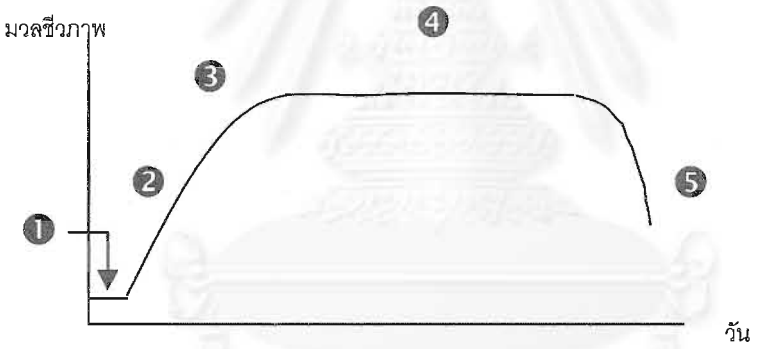
2.ระยะเติบโต (exponential phase) เป็นระยะที่สาหร่ายเติบโตและแพร่ขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ระยะนี้จะนานเท่าใดขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารและคุณสมบัติทางกายภาพ ของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงแสงสว่าง รวมทั้งผลผลิตนอกเซลล์ของสาหร่าย ลักษณะการเติบโตในระยะนี้เป็นแบบที่รวดเร็วในช่วงแรก และจะค่อยๆ ช้าลง ตามลำดับ

3.ระยะเฉื่อย (retardation phase or phase of declining relative growth) เป็นช่วงเวลาที่เซลล์มีการเติบโตช้าลงเพราะขาดสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน เหล็ก คาร์บอน ออกซิเจน เนื่องจากปริมาณเซลล์หนาแน่นเกินไป การเสียสมดุลของ pH เพราะเกิดแอมโมเนียมากขึ้น หรือแสงสว่างลดลงเนื่องจากเซลล์เกิดการบังกันเอง (auto-shading) วิธีแก้ไขให้การเติบโตเพิ่มขึ้นเป็นปกติ โดยการเติม

สารอาหารที่ขาดแคลนลงไป ถ้ามีการตกตะกอนของเฟอริกฟอสเฟตอาจแก้ไขโดยการเติมสารคีเลเตอร์ เช่น โซเดียมอีดีทีเอ ลงไปละลายตะกอนเหล็ก ส่วนการป้องกันการขาดแคลนคาร์บอนและออกซิเจนนั้น อาจทำโดยการเขย่าภาชนะตลอดเวลา หรือใช้การพ่นอากาศซึ่งนอกจากจะช่วยเพิ่มคาร์บอนและออกซิเจนแล้ว ยังช่วยให้เกิดการผสมผสานของมวลน้ำในภาชนะเลี้ยง ทำให้เซลล์สาหร่ายได้แสงสว่างโดยทั่วถึงกัน

4.ระยะคงที่ (stationary phase) เป็นระยะที่การเติบโตของสาหร่ายหยุดนิ่ง เนื่องจากธาตุอาหารน้อยลงและเกิดสารพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึม หรือจากการสลายตัวของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

5.ระยะตาย (death phase) เป็นระยะที่เซลล์หยุดการเติบโตโดยสิ้นเชิงเนื่องจากธาตุอาหารหมดลง เซลล์จะเริ่มตายเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และรวดเร็วขึ้น




**ภาพที่** 2.4 กราฟการเติบโตของสาหร่าย หมายเลขในภาพแสดงระยะการเติบโตของสาหร่ายดังนี้ (ที่มา Fox, 1983 อ้างโดย ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540)

1.ระยะปรับตัว (lag phase or inductional phase)

2.ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (exponential phase)

3.ระยะเฉื่อย (retardation phase or phase of declining relative growth)

4.ระยะคงที่ (stationary phase)

5.ระยะตาย (death phase)

## 2.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก

เนื่องจากสาหร่ายนั้นมีประโยชน์ต่อมนุษย์มากมาย เช่นเป็นอาหารของมนุษย์ อาหารสัตว์น้ำ และยังเป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น วุ้น โปรตีน กรดไขมันไม่อิ่มตัว ฯลฯ แต่การผลิตสาหร่ายยังไม่สามารถให้ผลผลิตที่เพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นการผลิตสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก จึงเป็นวิธีการใหม่ที่นำมาใช้ในการผลิตสาหร่าย (Chen and John, 1996) การผลิตสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก เป็นวิธีการเลี้ยงสาหร่ายที่มีการเติมสารคาร์บอนอินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งสารคาร์บอนอินทรีย์นี้ทำหน้าที่เป็นทั้งแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานแทนพลังงานที่สาหร่ายจะได้รับจากแสง (Ogbonna. *et al.*, 1997) ดังนั้นการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก สาหร่ายจะสามารถเติบโตได้แม้จะเลี้ยงในที่มืด สารคาร์บอนอินทรีย์ที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ได้แก่ น้ำตาล ไขมัน กรดอินทรีย์ ฯลฯ (Gladue, 1991) ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบนี้สามารถตัดปัญหาเรื่องการหาพลังงานแสงที่จะนำมาใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย ทั้งยังช่วยให้ผลผลิตสาหร่ายที่ได้มีความหนาแน่นมากกว่าการเลี้ยงแบบปกติ การเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกได้รับการพัฒนาระบบให้สามารถเลี้ยงได้ในระดับอุตสาหกรรม เช่นในปี 1970 ในประเทศญี่ปุ่นและไต้หวัน มีการเลี้ยง *Chlorella* 2 สกุล ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในถังสแตนเลส โดยใช้กลูโคสเป็นสารคาร์บอนอินทรีย์ เพื่อผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ (Chen,1996)

เมื่อเริ่มมีการศึกษาถึงกระบวนการนำพลังงานจากสารประกอบอินทรีย์ไปใช้โดยสาหร่าย พบว่ามีสาหร่ายหลายชนิดที่สามารถเติบโตได้ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก (Neilson and Lewin, 1974 อ้างโดย Gladue 1991) ตัวอย่างเช่น *Tetraselmis* sp. สามารถเติบโตได้ในอาหารที่เติมสารคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคส 40 กรัม/ลิตร (Day and Tsavalos, 1996) *Chlamydomonas reinhardtii* สามารถเติบโตได้ในอาหารที่เติมสารคาร์บอนอินทรีย์ในรูปแอซิเตต 0.4 กรัม/ลิตร (Chen and John, 1996) Ming Shi และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาการผลิต Lutein โดยสาหร่ายสกุล *Chlorella* จำนวน 9 ชนิดพบว่า *Chlorella* ทั้ง 9 สกุลสามารถเติบโตในอาหารที่เติมสารคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคส 9 กรัม/ลิตร และนอกจากนี้สาหร่ายบางชนิดยังสามารถใช้พลังงานทั้งจากแสงและสารคาร์บอนอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายมาใช้ในการเติบโตได้ ซึ่งการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะแบบนี้เรียกว่า มิกโซโทรฟิก (mixotrophic) (Gladue 1991)

อย่างไรก็ดีสาหร่ายบางชนิดเท่านั้นที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก จากการทดลองของ Tan and Johns (1996) ได้ทดลองเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกโดยใช้กลูโคส 10 กรัม/ลิตร รวมกับ tryptone 0.01 กรัม/ลิตร และ yeast extract 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Navicula* spp., *Nitzschia* spp. , และ *Cylindrotheca* spp. พบว่าไดอะตอม 2 สกุลแรกสามารถเติบโตได้ดีในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก แต่ *Cylindrotheca* spp. เติบโตไม่ได้

การเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก และเฮเทอโรโทรฟิก ในปัจจัยต่างๆ มีข้อแตกต่างกันดังนี้

1.ต้นทุนการผลิต

ในการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิกนั้น แสงเป็นปัจจัยสำคัญ และเป็นปัจจัยที่จำกัดในการเติบโตของสาหร่าย ถ้าขาดแสงสาหร่ายไม่สามารถเจิญได้ หรือถ้าปริมาณแสงไม่เพียงพอจะทำให้สาหร่ายโตช้า และมีองค์ประกอบทางชีวเคมีเปลี่ยนแปลงไป โดยทั่วไปการเลี้ยงสาหร่ายแบบโฟโตออโตโทรฟิก สาหร่ายจะถูกจำกัดการเติบโตเมื่อมีความหนาแน่นเซลล์ประมาณ $5x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร หรือ 100 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง/ลิตร (Soong, 1980 อ้างโดย Gladue 1991) เนื่องความหนาแน่นเซลล์ที่เพิ่มขึ้นทำให้แสงไม่สามารถผ่านลงไปยังก้นภาชนะเลี้ยงสาหร่ายได้เต็มที่ นอกจากนี้ในการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก ยังมีต้นทุนสำหรับพลังงานแสงที่จะนำมาใช้เลี้ยงสาหร่ายค่อนข้างสูง แต่สำหรับการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกจะไม่เกิดปัญหาเกี่ยวกับความต้องการแสง และยังให้เซลล์สาหร่ายที่มีความหนาแน่นเซลล์สูงกว่า การเลี้ยงในบ่อกลางแจ้งอาจช่วยลดปัญหาต้นทุนในการจัดหาพลังงานแสง แต่จะพบปัญหาการปนเปื้อนของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มากินสาหร่ายที่เลี้ยงไว้ และมีการปนเปื้อนของสาหร่ายชนิดอื่นๆ และผลผลิตของการเลี้ยงสาหร่ายในบ่อกลางแจ้งยังขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศอีกด้วย (Gladue, 1991)

2.การควบคุมการปนเปื้อน

การเลี้ยงสาหร่ายโดยทั่วไป จะพบปัญหาการปนเปื้อนของสิ่งมีชีวิตที่กินสาหร่ายเป็นอาหาร เช่น โคพีพอด โปรโตซัว หรือสาหร่ายชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ การปนเปื้อนทำให้เกิดการสูญเสียผลผลิตสาหร่ายไปบางส่วน ซึ่งการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก จะไม่พบปัญหานี้ เพราะการ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



เลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก เป็นการเลี้ยงแบบปลอดเชื้อ (axenic culture) อาหารเลี้ยงที่จะถูกส่งเข้าในถังหมัก จะผ่านการฆ่าเชื้อก่อน อากาศที่จะผ่านเข้าในถังหมักก็จะผ่านวัสดุกรอง ซึ่งสามารถกรองเอาจุลินทรีย์ออกได้ (Crueger and Crueger, 1989 อ้างโดย Gladue 1991)

3.การควบคุมคุณภาพ

การควบคุมคุณภาพของสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิกนั้น ขึ้นอยู่กับการควบคุมคุณภาพน้ำ การควบคุมปริมาณธาตุอาหาร และปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย เช่น แสง อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งปัจจัยต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วนั้น ควบคุมได้ยากทั้งในระบบที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการและกลางแจ้ง แต่สำหรับซึ่งการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก จะไม่พบปัญหานี้ เนื่องการเลี้ยงสาหร่ายในถังหมักจะสามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วได้ (Gladue 1991)

4.คุณค่าทางอาหารจากเซลล์สาหร่าย

สาหร่ายที่ผลิตได้จากวิธีการเลี้ยงที่แตกต่างกัน จะมีคุณค่าทางอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างของคุณค่าทางอาหารในเซลล์สาหร่ายจะส่งผลต่อ อัตราการเติบโต อัตราการตาย ความสมบูรณ์เพศ และความทนทานต่อโรค ของสัตว์น้ำที่บริโภคสาหร่ายเป็นอาหาร (Gladue 1991) ซึ่ง Kitano *et al.*, (1997) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก สาหร่ายจะสามารถสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิดได้มากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อสัตว์น้ำ โดยเฉพาะกรดไขมันในกลุ่มโอเมกา-3 และกลุ่มโอเมกา-6 (Suwanich, 1996) และนอกจากนี้กรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ เพราะสัตว์น้ำมีความสามารถในการย่อยกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ดีกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ( วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

**2.5 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่อง (Continuous culture)**

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องและแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว แตกต่างกันตรงที่การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เข้าสู่ภาชนะเลี้ยงในอัตราที่คงที่ ซึ่งอัตราการเติมอาหารใหม่ลงในภาชนะเลี้ยงเรียกว่า dilution rate และในขณะเดียวกันมีการปล่อยอาหารออกจากภาชนะเลี้ยงใน

อัตราเดียวกับการเติมอาหารลงในภาชนะเลี้ยงสาหร่าย เพื่อรักษาปริมาตรอาหารในขวดเลี้ยงให้คงที่ การเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องนี้ ถ้าอัตราการการไหลเข้าและออกของอาหารอยู่ในสภาวะสมดุล จะให้ผลผลิตอยู่ในช่วง exponential phase ตลอดเวลา (Simmons, 2001) เมื่อจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงคงที่ตลอดเวลา dilution rate จะเท่ากับอัตราการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย จำนวนเซลล์ที่ถูกปล่อยออกพร้อมกับอาหารเก่าที่ไหลออกจากภาชนะเลี้ยงจะถูกแทนที่ด้วยเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มขึ้นมาในภาชนะเลี้ยง นั่นคือเมื่อมีการเติมอาหารใหม่อย่างต่อเนื่องในอัตราคงที่ ประชากรของเซลล์ที่อยู่ในขวดเลี้ยงจะอยู่ในช่วง steady state คือ ช่วงที่อัตราการเติบโตและจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรนั้นคงที่ หากต้องการรักษาประชากรให้อยู่ในช่วง steady state จะต้องรักษาระดับน้ำในขวดเลี้ยงให้มีปริมาตรคงที่ โดยการกำหนดให้อัตราการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าในขวดเลี้ยงเท่ากับอัตราการปล่อยอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าออกจากขวดเลี้ยง ซึ่งเรียกการเลี้ยงแบบนี้ว่า chemostat ซึ่งในระบบนี้อาหารใหม่จะถูกเติมลงในภาชนะเลี้ยงในอัตราที่คงที่โดย peristaltic pump หรือ solenoid gate ซึ่งสามารถควบคุมอัตราการไหลของอาหารโดยการปรับการทำงานของ peristaltic pump อาหารใหม่จะถูกเติมลงในภาชนะเลี้ยงในอัตราที่คงที่โดย peristaltic pump หรือ solenoid gate ซึ่งส่วนใหญ่อัตราการไหลจะเท่ากับ 20% ของปริมาตรอาหารในภาชนะเลี้ยง/วัน (Kubitschek, 1970)

นอกจากนี้การเลี้ยงเซลล์แบบต่อเนื่องนี้ยังมีแบบ turbidostat คือระบบการเลี้ยงที่มีการเติมอาหารใหม่เข้าในภาชนะเลี้ยง เมื่อความหนาแน่นเซลล์ในภาชนะเลี้ยงมีความหนาแน่นมากจนถึงระดับที่กำหนดไว้เท่านั้น ซึ่งความหนาแน่นเซลล์วัดจากค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงสาหร่าย เมื่อถึงระดับนี้อาหารใหม่จะถูกเติมลงในภาชนะเลี้ยงในปริมาตรที่เท่ากับอาหารเก่าที่ปล่อยออกมาจากภาชนะเลี้ยง เมื่อเซลล์ในภาชนะเลี้ยงถูกเจือจางด้วยอาหารใหม่ที่เติมลงไป ก็จะมีการเติบโตเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ จนกระทั่งเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นถึงระดับที่กำหนด อาหารใหม่จะถูกเติมลงในภาชนะเลี้ยงอีกครั้ง (Simmons, 2001)

ในกรณีที่มีการให้อากาศโดยใช้ปั๊มอากาศ อากาศที่ผ่านเข้าในขวดเลี้ยงจะผ่านวัสดุกรองซึ่งสามารถกำจัดแบคทีเรียออกได้ ซึ่งการให้อากาศจะช่วยเพิ่มออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และช่วยทำให้มีการไหลเวียนของน้ำในขวดเลี้ยง ในภาชนะเลี้ยงสาหร่ายจะต้องปลอดเชื้อโดยจะมีตัวหนีบหนีบไว้ที่สายยางสำหรับสุ่มตัวอย่าง ส่วน magnetic stirrer ช่วยทำให้เซลล์กระจายอยู่ทั่วไปในอาหารเลี้ยงสาหร่าย ไม่ตกตะกอน (Simmons,2001)

การประเมินอัตราการเจือจางและการเติบโตของสาหร่ายที่เลี้ยงในระบบต่อเนื่องสามารถคำนวณได้จากสูตรดังต่อไปนี้ (Kubitschek, 1970)

$$\omega = w/ V_0$$

เมื่อ $\omega$ = อัตราการเจือจาง (dilution rate)

w = อัตราการไหลของอาหารเลี้ยงสาหร่าย (มิลลิลิตร/ชั่วโมง)

$V_0$ = ปริมาตรของอาหารเลี้ยงสาหร่ายในขวดเลี้ยง

$$\tau = V_0/ w = 1/\omega$$

เมื่อ $\tau$ = เวลาที่สาหร่ายเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (generation time)

**ข้อดีของระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง** (continuous culture) **เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว** (batch culture) (Kubitschek, 1970)

1.สามารถควบคุมอัตราการเติบโตและอัตราการแบ่งเซลล์ และสามารถรักษาระดับอัตราการเติบโตและอัตราการแบ่งเซลล์ ได้เป็นระยะเวลานาน

2. สามารถควบคุมและรักษาระดับความหนาแน่นเซลล์ในขวดเลี้ยง

3.เซลล์สามารถเติบโตได้เป็นระยะเวลานานในสภาวะที่สารอาหารมีความเข้มข้นคงที่

4.สามารถกำหนดและรักษาขนาดของเซลล์และองค์ประกอบทางชีวเคมีให้คงที่ เพราะลักษณะของเซลล์ขึ้นอยู่กับอัตราการเติบโตของเซลล์

**อุปกรณ์พื้นฐานสำหรับการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง**

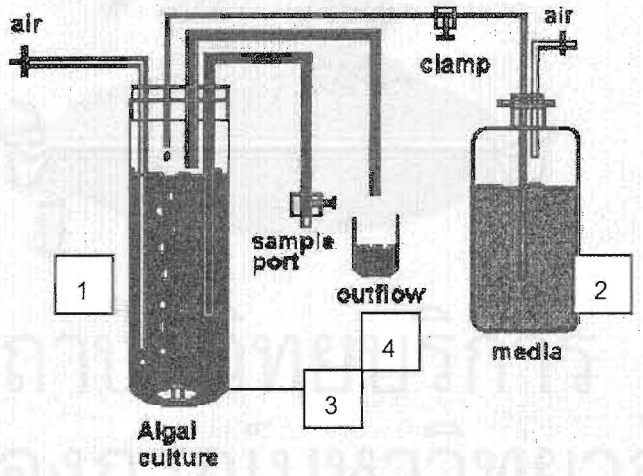
อุปกรณ์พื้นฐาน ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ (Kubitschek, 1970)

1.ภาชนะเลี้ยงอาจเป็นขวดหรือเป็นหลอดซึ่งเซลล์สามารถเติบโตในภาชนะนั้นได้โดยปราศจากการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตอื่น

2.ระบบการนำอาหารใหม่เข้าสู่ภาชนะเลี้ยง มีส่วนประกอบ 2 ส่วน ได้แก่ ภาชนะสำหรับเก็บอาหารใหม่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเครื่องมือสำหรับส่งอาหารจากภาชนะเก็บอาหารไปยังภาชนะเลี้ยง (นิยมใช้ peristaltic pump) ซึ่งต้องมีการควบคุมให้อัตราการนำอาหารใหม่เข้าสู่ภาชนะเลี้ยงนั้นอยู่ในระดับที่คงที่ หรืออาจใช้ระบบแรงดันอากาศช่วยถ่ายอาหารจากภาชนะเก็บอาหารไปยังภาชนะเลี้ยง

3.อุปกรณ์สำหรับกวนทำให้เกิดการผสมกันของก๊าซและอาหารในภาชนะเลี้ยง ได้แก่ magnetic stirrer หรือระบบใบพัดกวนน้ำซึ่งการกวนอาหารในภาชนะเลี้ยงยังช่วยให้เซลล์ไม่ตกตะกอนอยู่ที่พื้น ช่วยลดความคลาดเคลื่อนเมื่อสุ่มตัวอย่างเพื่อวัดการเติบโต นอกจากการใช้ใบพัดกวนแล้ว การให้อากาศลงในขวดเลี้ยงก็สามารถช่วยกวนอาหารและทำให้เซลล์ไม่ตกตะกอนได้เช่นกัน

4.ระบบการนำอาหารเก่าออกจากขวดเลี้ยง ซึ่งต้องมีการควบคุมให้อัตราการนำอาหารเก่าพร้อมด้วยเซลล์สาหร่ายบางส่วนออกจากภาชนะเลี้ยงเท่ากับอัตราการนำอาหารใหม่เข้าสู่ภาชนะอยู่ตลอดเวลา ซึ่งอาจใช้ปั๊มหรือใช้ระบบแรงดันอากาศในการถ่ายอาหารเลี้ยงสาหร่ายออกจากภาชนะเลี้ยง




**ภาพที่** 2.5 ไดอะแกรมระบบการเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่อง (ที่มา Simmons, 2001) ประกอบด้วย ขวดเลี้ยงสาหร่าย (1) ขวดเก็บอาหารใหม่สำหรับเติมลงในขวดเลี้ยง (2) magnetic stirrer (3) และขวดรองรับอาหารและเซลล์ที่ไหลออกจากขวดเลี้ยง (4)

# บทที่ 3

# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 การแยกสาหร่ายให้ปราศจากโปรโตซัว โดยวิธี single cell isolation

ใช้ Pasteur pipette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร เพื่อทำเป็นอุปกรณ์สำหรับดูดเซลล์สาหร่าย โดยเผาปลายหลอดด้วยไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์จนกระทั่งหลอดแก้วอ่อนตัว ขณะเดียวกันใช้ปากคีบดึงปลายหลอดเพื่อให้หลอดยาวขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดจะเล็กลง และตัดส่วนที่ไม่ต้องการทิ้งไป ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งใส่หลอดยางเพื่อใช้ดูดเซลล์ การแยกสาหร่ายทำโดยหยดตัวอย่างลงบนสไลด์ แล้วเลือกดูดเฉพาะเซลล์สาหร่ายทีละเซลล์ภายใต้กล้อง inverted light microscope ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำเซลล์เลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงสาหร่าย บรรจุอยู่ 1 มิลลิลิตร (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540) นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสง 3000 ลักซ์ ช่วงมืดต่อช่วงสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่งสาหร่ายมีการแบ่งเซลล์จนได้เซลล์จำนวนมากขึ้น สังเกตจากน้ำเลี้ยงสาหร่ายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จึงถ่ายเชื้อสาหร่ายที่ได้ไปเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงสาหร่ายอยู่ 10 มิลลิลิตร รอจนกระทั่งสาหร่ายมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น จากนั้นขยายพันธุ์สาหร่าย โดยถ่ายเชื้อไปเลี้ยงในภาชนะที่ใหญ่ขึ้นและมีปริมาตรอาหารมากขึ้นจนกว่าจะได้ปริมาณสาหร่ายมากพอสำหรับการทดลอง การถ่ายเชื้อสาหร่ายทุกครั้งต้องทำในตู้ถ่ายเชื้อ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียในขวดเลี้ยงสาหร่าย

## 3.2 การทดสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย

เพื่อทดสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในสาหร่าย โดยทดสอบตามวิธีดังต่อไปนี้ เตรียมอาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรีย (nutrient broth หรือ NB) (ภาคผนวก ก.) ใส่หลอดทดลองที่มีจุกสำลีปิด ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ถ่ายเชื้อสาหร่ายจากขวดที่ต้องการทดสอบมาใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรียบรรจุอยู่ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงมืดต่อช่วงสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงในหลอด NB ถ้าลักษณะใสแสดงว่าในขวด

เลี้ยงสาหร่ายไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย แต่ถ้าในหลอด NB มีลักษณะขุ่นแสดงว่าในขวดเลี้ยงสาหร่ายมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย

### 3.3 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์

จากข้อ 3.2 หากพบว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ต้องทำเชื้อให้บริสุทธิ์ปราศจากแบคทีเรีย (axenic culture) โดยการใช้ยาปฏิชีวนะ ที่ประกอบด้วย เพนนิซิลิน จี, สเตรพโตมัยซิน และคลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้น 10, 5 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (ภาคผนวก ข.) เติมสารละลายยาปฏิชีวนะในปริมาตรต่างๆ ดังนี้ 3.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 และ 0.125 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงสาหร่าย 50 มิลลิลิตร และเติมหัวเชื้อสาหร่าย 1 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงมืดต่อช่วงสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อสาหร่ายจากขวดที่มียาปฏิชีวนะใส่ในขวดใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งปราศจากยาปฏิชีวนะ จากนั้นทดสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในสาหร่ายที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ การทดสอบระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่อการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย เพื่อตรวจสอบว่าระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำให้สาหร่ายปลอดเชื้อได้คือระดับใด และเมื่อต้องการทำให้สาหร่ายปลอดเชื้อแบคทีเรียก็ให้เลือกใช้ยาปฏิชีวนะในความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำให้สาหร่ายปลอดเชื้อแบคทีเรียได้

### 3.4 การตรวจวัดการเติบโตของสาหร่าย

สุ่มตัวอย่างสาหร่ายจากภาชนะเลี้ยงด้วยปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นนำหลอดทดลองวางลงใน sonicator เปิดให้เครื่องทำงานประมาณ 15-20 นาที เพื่อให้สาหร่ายกระจายตัวไม่กระจุกเป็นกลุ่ม ทำให้สะดวกแก่การนับจำนวนเซลล์ การนับจำนวนเซลล์ทำได้โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) และคำนวณความหนาแน่นเซลล์ตามวิธีการในภาคผนวก ค. ส่วนอัตราการเติบโตของสาหร่ายคำนวณได้ตามสูตรในภาคผนวก ง.

**3.5 การตรวจสอบชนิดของสาหร่ายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน** (scanning electron microscope)

เนื่องจากไดอะตอม *Amphora. delicatissima* AM 9901 มีขนาดเล็กมาก (ประมาณ 6-12 ไมครอน) ทำให้การส่องตรวจเพื่อจำแนกชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดากำลังขยายสูงสุด ไม่สามารถเห็นรายละเอียดทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ได้ จึงต้องใช้ Scanning electron microscope (SEM) ซึ่งการเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบชนิดสาหร่ายด้วย SEM มีวิธีการดังนี้ (โสภณา บุญญาภิวัฒน์, 2526)

1 นำตัวอย่างไดอะตอมมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อชำระล้างเกลือ

2 เติม potassium permanganate เข้มข้นลงไปในปริมาตรเท่ากับตัวอย่างไดอะตอม วางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

3 ค่อยๆ เติมกรด hydrochloric เข้มข้นลงไปในปริมาตรเท่ากับตัวอย่างไดอะตอมที่ผสมกับ potassium permanganate จนส่วนผสมเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม เนื่องจากการ reduction ของ permaganate เป็น manganese dioxide

4 นำส่วนผสมนี้ไปต้มบนไฟอ่อนๆ จนเกือบเดือด จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีของส่วนผสม จากสีน้ำตาลเข้มเป็นสีเขียวมะกอก สีเขียว และสีเหลืองตามลำดับ

5 นำส่วนผสมที่มีสีเหลืองไปปั่นแยกเอาไดอะตอมออก เติมน้ำกลั่นลงในตัวอย่างไดอะตอม ปั่นและดูดส่วนใสออก ล้างไดอะตอมซ้ำ 6 ครั้ง

6 เก็บรักษาตัวอย่างไดอะตอมโดยใช้น้ำยาที่ประกอบด้วยฟอร์มาลินและกรดแอซิติกในอัตราส่วน 1 : 1 หยดลงในตัวอย่างไดอะตอม 2-3 หยด

7 เมื่อได้ตัวอย่างไดอะตอมที่ปราศจากสารอินทรีย์และเกลือแล้ว นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Millipore หรือ Nucleopore ที่มี pore size เล็กกว่าขนาดเซลล์ของไดอะตอม หยดน้ำกลั่นลงบน filter tower เพื่อล้างเซลล์ที่อาจติดอยู่ใน tower และล้างตัวอย่างให้ปราศจากกรดและฟอร์มาลิน ประมาณ 4-5 ครั้ง วางกระดาษกรองที่มีเซลล์อยู่ไว้ในที่แห้งและมีการป้องกันฝุ่นละออง จากนั้นนำกระดาษกรองมาติดบนแท่นติดตัวอย่าง (metal stub)

8 นำตัวอย่างที่ติดอยู่บนแท่นติดตัวอย่าง ไปเคลือบด้วยทอง แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**3.6 การทดลองที่ 1 ทดสอบการเติบโตของ *Nitzschia* sp. ในสภาวะการเติบโตแบบปกติและในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก**

**3.6.1 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง**

ในช่วงแรกของการทดลองใช้ *Nitzschia* sp. เป็นสาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง โดยนำหัวเชื้อสาหร่ายชนิด *Nitzschia* sp. จากสถานีวิจัยสัตว์ทะเลอ่างศิลา มาขยายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร T1 (สูตรดัดแปลง) ความเค็ม 30 ส่วนในพัน (ภาคผนวก จ.) จากนั้นทำการแยกสาหร่ายให้ปราศจากโปรโตซัว ตามวิธีการในข้อ 1

**3.6.2 การเติบโตของ *Nitzschia* sp. ในสภาวะปกติ**

เลี้ยง *Nitzschia* sp. ในอาหารในอาหารสูตร T1 ดัดแปลง (ภาคผนวก จ.) โดยใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสาหร่ายจาก stock culture 5 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหาร 95 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 3000 ลักซ์ ช่วงมืดต่อช่วงสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ตรวจวัดอัตราการเติบโตทุก 24 ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 3.4

**3.6.3 การเติบโตของ *Nitzschia* sp. ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก**

เพื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และผลของสภาวะการเลี้ยงในที่สว่างและที่มืดต่อการเติบโตของ *Nitzschia* sp. โดยเลี้ยง *Nitzschia* sp. ในอาหารสูตร T1 ดัดแปลง และในอาหารสูตร T1 ดัดแปลงที่มีการเติมคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส, กรดแอซิติก และคาร์บอเนต ในปริมาณที่เท่ากันคือ 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร โดยแยกเป็นสองชุด คือ ชุดแรกให้แสงสว่าง 3000 ลักซ์ ช่วงมืดต่อช่วงสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ชุดที่สองเลี้ยงในที่มืด โดยห่อขวดรูปชมพู่ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ทั้งสองชุดเลี้ยงในตู้เลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2 ตรวจวัดอัตราการเติบโตทุก 24 ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 3.4

**3.7 การทดลองที่ 2 ทดสอบการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ในสภาวะการเติบโตแบบปกติและในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก**

**3.7.1 สาหร่ายสำหรับการทดลอง**

จากการทดลองในข้อ 5 พบว่าเมื่อใช้ *Nitzschia* sp. ในการทดลอง ไม่สามารถแยกสาหร่ายออกจากเชื้อแบคทีเรียได้ และสาหร่ายจะตายเมื่อทำการเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกโดยจะพบแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ จึงเปลี่ยนชนิดสาหร่ายที่นำมาทดลองเป็น *A. delicatissima* สายพันธุ์ AM9901 ซึ่งเป็นสาหร่ายเซลล์เดียวจำพวกไดอะตอม ที่แยกได้จากบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี โดยมะลิวัลย์ คุตะโค (2543) ซึ่งได้ทำการเก็บก้อนหินที่มีลักษณะมีเมือกลื่นหุ้ม นำก้อนหินนั้นมาแช่ในอาหารเหลวสูตร F/2 ให้อากาศตลอดเวลาและวางในที่มีแสง จากนั้นแยกสาหร่ายแต่ละชนิดและแยกสาหร่ายออกจากโปรโตซัวด้วยวิธี single cell isolation มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ โดยให้แสง 5200 ลักซ์ อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ความชื้น 75% แล้วคัดเลือกพันธุ์สาหร่ายที่สามารถเติบโตได้ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อย้ายสาหร่ายจาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร F/2 ที่มีส่วนผสมของคาร์บอนอินทรีย์ ประกอบด้วย กลูโคส เพปโตนและสารสกัดยีสต์ โดยมีความเข้มข้น 0.5, 0.25 และ 1 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และใช้วุ้นผง 1.2 กรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงสาหร่ายในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่ควบคุมอุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ความชื้น 75%โดยไม่ให้แสงสว่าง จนกระทั่งเกิดการเติบโตของสาหร่ายบนผิวอาหารวุ้น หลังจากนั้นย้ายเชื้อสาหร่ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร F/2 ในส่วนของวิธีการทำหัวเชื้อสาหร่ายให้บริสุทธิ์ และการทดสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียทำเช่นเดียวกับวิธีที่แสดงในหัวข้อ 3.3 และ 3.2

**3.7.2 การเติบโต *Amphora delicatissima* ในอาหารสูตร F/2 ในสภาวะที่มีแสงและที่มืด**

เมื่อทดสอบแล้วว่าใน stock culture ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย จึงทำการเลี้ยง *A. delicatissima* ในสองชุดการทดลองคือ ชุดแรกทำการเลี้ยง *A. delicatissima* ในสภาวะปกติ คือ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 (ภาคผนวก ฉ.) ความเค็ม 30 ส่วนในพัน โดยใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสาหร่ายจาก stock culture มา 5 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารสูตร F/2 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 95 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงมืดต่อช่วงสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ส่วนชุดที่สองเตรียมการทดลองเช่นเดียวกับชุดแรกแต่เลี้ยงในที่ไม่มีแสง โดยห่อขวดรูปชมพู่ด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ตรวจวัดอัตราการเติบโตทุก 24 ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 3.4

**3.7.3 ผลของแหล่งคาร์บอนในรูปกลูโคส, โซเดียมไบคาร์บอเนต และกรดแอซิติก ต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง**

เพาะเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหารสูตร F/2 ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ กลูโคส, โซเดียมไบคาร์บอเนต หรือกรดแอซิติกในความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร เตรียมการทดลองโดย ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดหัวเชื้อสาหร่ายมา 5 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารอยู่ 95 มิลลิลิตร ซึ่งทำการทดลอง 2 ชุดคือ ชุดแรกเลี้ยงในที่มีแสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงมืดต่อช่วงสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมงและชุดที่สองเลี้ยงในที่มืดโดยห่อขวดรูปชมพู่ด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ ทั้งสองชุดเลี้ยงในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ตรวจวัดอัตราการเติบโต ตามวิธีการในข้อ 4 ทุก 24 ชั่วโมง ในการเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เติมคาร์บอนในรูปกรดแอซิติก เมื่อเตรียมเสร็จแล้วต้องปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีค่าประมาณ 8

**3.7.4 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสและกรดแอซิติกต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง**

เพาะเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหาร 4 แบบ ประกอบด้วย อาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส หรือกรดแอซิติก ในสองระดับความเข้มข้นคือ 4 และ 20 กรัมคาร์บอนต่อลิตร เตรียมการทดลองโดย ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดหัวเชื้อสาหร่ายมา 5 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารอยู่ 95 มิลลิลิตร ซึ่งทำการทดลอง 2 ชุดคือ ชุดแรกเลี้ยงในที่มีแสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงมืดต่อช่วงสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมงและชุดที่สองเลี้ยงในที่มืดโดยห่อขวดรูปชมพู่ด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ ทั้งสองชุดเลี้ยงในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ตรวจวัดอัตราการเติบโต ตามวิธีการในข้อ 3.4 ทุก 24 ชั่วโมง

**3.7.5 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient broth หรือ NB) ต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด**

เพาะเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหาร 4 แบบ ดังนี้ อาหารสูตร F/2 ที่เติม, กลูโคส, กรดแอซิติก, กลูโคสกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย หรือกรดแอซิติกกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (กลูโคสและแอซิติก เติมในปริมาณที่เท่ากันคือ 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร ส่วน NB เติมตามสูตรในภาคผนวก ก.) เตรียมการทดลองโดย ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดหัวเชื้อสาหร่ายมา 5 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารอยู่ 95 มิลลิลิตร โดยทุกชุดการ

ทดลองเลี้ยงในที่มืดโดยห่อขวดรูปชมพู่ด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ ในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ตรวจวัดอัตราการเติบโต ตามวิธีการในข้อ 3.4 ทุก 24 ชั่วโมง

### 3.7.6 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด

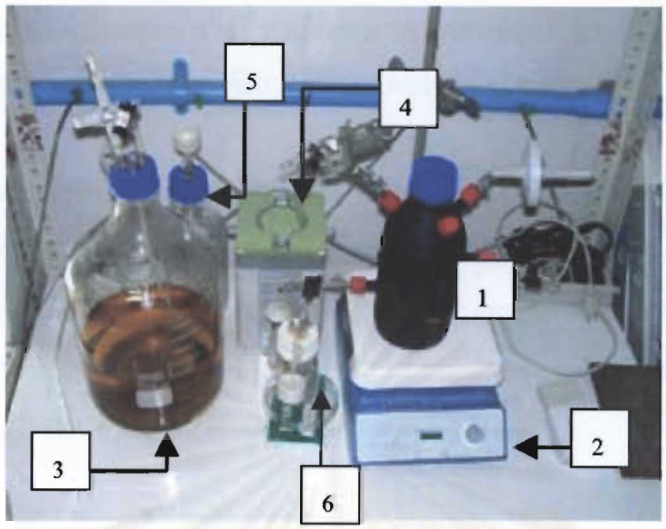
เพาะเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหารสูตร F/2 ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (NB) ที่มีการเติมกลูโคสในปริมาณต่างๆ ดังนี้ คือ 1, 4, 8, 12 และ 16 กรัมคาร์บอน/ลิตร เตรียมการทดลองโดย ใช้ปิเป็ตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดหัวเชื้อสาหร่ายมา 5 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารอยู่ 95 มิลลิลิตร โดยทุกชุดการทดลองเลี้ยงในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ไม่ให้แสงสว่าง ตรวจวัดอัตราการเติบโต ตามวิธีการในข้อ 3.4 ทุก 24 ชั่วโมง

## 3.8 การเติบโตของ *Amphora delicatissima* แบบต่อเนื่องในถังหมัก (fermentor) ขนาดเล็ก

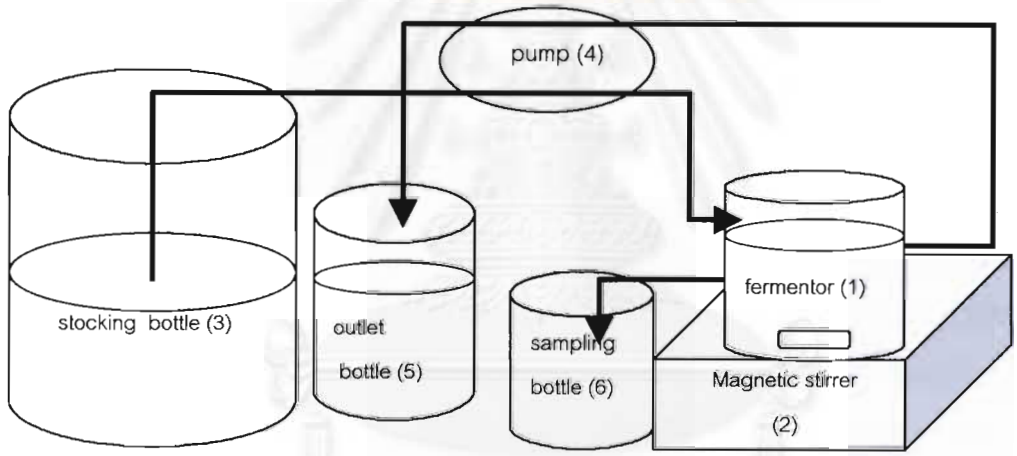
ภาพและไดอะแกรมของระบบถังหมักขนาดเล็กแสดงในภาพที่ 3.1 ก. และ 3.1 ข. ตามลำดับ การศึกษาการเติบโตของ *A. delicatissima* ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังหมักทำการทดลองโดยเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่ผสมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และNB ความเค็ม 30 ส่วนในพัน ปริมาตร 5,000 มิลลิลิตร แบ่งอาหารเลี้ยงสาหร่ายเติมลงในถังหมัก (fermentor) 700 มิลลิลิตร ถังหมักนี้สร้างขึ้นเพื่อการทดลองเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องมีลักษณะเป็นขวดมีฝาปิดมีท่อต่อจากขวดจำนวน 4 ท่อ ซึ่งใช้เป็นทางเข้าของอาหารใหม่ ทางระบายน้ำเลี้ยงออก ท่อสุ่มตัวอย่าง และท่อทางเข้าของอากาศโดยมีวัสดุกรองอากาศ Gelman Laboratory รุ่น Acro 50 ขนาดรู 0.2 um. เสียบอยู่เพื่อป้องกันแบคทีเรียจากอากาศเข้ามาปนเปื้อนในขวดเลี้ยง และอาหารส่วนที่เหลือเติมลงในขวดเก็บอาหารสำหรับเติมลงในขวดเลี้ยง (stocking bottle) ซึ่งเป็นขวดมีฝาปิดมีท่อต่อจากขวด 2 ท่อ คือท่อส่งอาหารเข้าในขวดเลี้ยง และท่อทางเข้าของอากาศโดยมีวัสดุกรองอากาศเสียบอยู่เพื่อป้องกันแบคทีเรียจากอากาศเข้ามาปนเปื้อนในขวดเก็บอาหาร นำถังหมักไปผ่านการฆ่าเชื้อ (autoclave) ทิ้งให้เย็น จากนั้นจึงเติมหัวเชื้อสาหร่ายลงไป 35 มิลลิลิตร ในระยะแรกได้ทำการเลี้ยงสาหร่ายในถังหมักโดยที่ไม่มีการเติมอาหารเลี้ยงสาหร่ายใหม่ลงในถังหมัก (ไม่เปิดปั๊ม) เมื่อสาหร่ายมีการเติบโตจนกระทั่งมีเซลล์เพิ่มมากขึ้น จึงเริ่มเปิดปั๊มควบ

คุมอัตราการไหลของอาหารซึ่งเป็นการเริ่มต้นการเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่อง ช่วงแรกกำหนดอัตราการไหลของอาหารเท่ากับ 5-7.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมาได้เปลี่ยนแปลงอัตราการไหล เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลกับการเติบโตของสาหร่ายในที่มืด ตรวจวัดอัตราการเติบโตด้วยการสุ่มตัวอย่างจากขวดเลี้ยงโดยดูดน้ำตัวอย่างผ่านทางขวดสุ่มตัวอย่าง (sampling bottle) ซึ่งเป็นขวดมีฝาปิดมีท่อต่อกับขวด 2 ท่อ คือท่อสุ่มตัวอย่าง และท่อทางเข้าของอากาศโดยมีวัสดุกรองอากาศเสียบอยู่เพื่อป้องกันแบคทีเรียจากอากาศเข้ามาปนเปื้อนในขวดเลี้ยง จากนั้นนับเซลล์สาหร่ายตามวิธีการในข้อ 3.4 และวัดปริมาตรอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ไหลออกจากระบบ ทุก 24 ชั่วโมง โดยนำน้ำที่อยู่ในขวดเก็บอาหารที่ไหลออกจากขวดเลี้ยง (outlet bottle) ไปวัดปริมาตร ซึ่งขวดเก็บอาหารที่ไหลออกจากขวดเลี้ยงเป็นขวดมีฝาปิดมีท่อต่อกับขวด 2 ท่อ คือท่อที่นำน้ำจากขวดเลี้ยงมาเก็บในขวด และท่อทางเข้าของอากาศโดยมีวัสดุกรองอากาศเสียบอยู่เพื่อป้องกันแบคทีเรียจากอากาศเข้ามาปนเปื้อนในขวดเลี้ยง การทำงานของ peristaltic pump และ magnetic stirrer ถูกควบคุมด้วยเครื่องตั้งเวลา ให้ทำงานต่อเนื่องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วหยุดพักการทำงานเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดังนั้นใน 1 วัน ทั้ง peristaltic pump และ magnetic stirrer จะทำงานเป็นเวลา 20 ชั่วโมงและหยุดพัก 5 ชั่วโมง โดยเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




(ก)




(ข)

**ภาพที่** 3.1 (ก) ภาพระบบถังหมักขนาดเล็ก (ข) ไดอะแกรมระบบการเลี้ยงสาหร่าย *A. delicatissima* แบบต่อเนื่องโดยใช้ fermentor (1) ที่สร้างขึ้นเป็นภาชนะสำหรับเลี้ยงสาหร่ายภายในบรรจุอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่ผสมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร กับ NB และบรรจุหัวเชื้อสาหร่ายไว้ ภาชนะเลี้ยงนี้จะวางไว้บนเครื่อง magnetic stirrer (PMC) (2) โดยภาชนะเลี้ยงจะเป็นที่รองรับอาหารใหม่จาก stocking bottle (3) ที่จะไหลเข้าสู่ภาชนะเลี้ยงตลอดเวลา ซึ่งอัตราการไหลจะถูกกำหนดด้วย peristaltic pump (Eyela MP-3N)(4) ส่วน outlet bottle (5) จะเป็นภาชนะรองรับน้ำที่ไหลจากขวดเลี้ยงตลอดเวลา ซึ่งอัตราการไหลจะถูกควบคุมด้วย peristaltic pump เครื่องเดียวกับที่ควบคุมอัตราการไหลของอาหารสู่ขวดเลี้ยง การสุ่มนับเซลล์ทำโดยดูดอาหารจาก fermentor (1) ผ่านทาง sampling bottle (6)

**3.9 การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางชีวเคมีของเซลล์สาหร่าย *Amphora delicatissima* ในสภาวะการเลี้ยงแบบโฟโตออโตโทรฟิก และแบบเฮเทอโรโทรฟิก**

3.9.1 **การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน** ศึกษาปริมาณโปรตีนในเซลล์ เปรียบเทียบระหว่าง *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ของ Lowry (1951) ดัดแปลงโดย Scopes (1982) อ้างโดย Bollag *et al.*, (1996) (ภาคผนวก ช.)

3.9.2 **การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน** ศึกษาปริมาณไขมันในเซลล์ เปรียบเทียบระหว่าง *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ของ Blight and Dyer (1959 อ้างโดย Chu *et al.*, 1996) (ภาคผนวก ช.)

3.9.3 **การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต** ศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเซลล์ เปรียบเทียบระหว่าง *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ของ Kochert,1978 (ภาคผนวก ฌ.)

3.9.4 **การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง** (starch) ศึกษาปริมาณแป้งในเซลล์เปรียบเทียบระหว่าง *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ของ Takeda and Hirokawa (1978) (ภาคผนวก ญ.)

3.9.5 **การหาน้ำหนักแห้ง** ศึกษาน้ำหนักแห้งของเซลล์ เปรียบเทียบระหว่าง *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ

NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ของ Chu *et al.*, (1996) (ภาคผนวก ฏ.)

3.9.6 **การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ** ศึกษาปริมาณรงควัตถุภายในเซลล์ เปรียบเทียบระหว่าง *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ของ Strickland and Parson (1972) (ภาคผนวก ฏ.) และวิเคราะห์องค์ประกอบของรงควัตถุด้วย HPLC ตามวิธีการของ Repeta and Mantoura (1997)

ระบบ HPLC ประกอบด้วย

WATERS 600 pump and controller

WATERS Nova-pak C18 (3.9x150 mm; 5μm) column

WATERS 996 photodiode array detector

sample loop 100μL

solvent A : 80:20 MeOH:0.5M ammonium acetate

solvent B: 80:20 MeOH:acetone

Flow rate 1 ml/min

Gradient table:

| Time | %A | %B | curve |
|---|---|---|---|
| 0 | 100 | 0 | |
| 12 | 0 | 100 | 6 |
| 13 | 0 | 100 | 6 |
| 14 | 100 | 0 | 6 |

3.9.7 **การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน** ศึกษากรดไขมันภายในเซลล์ เปรียบเทียบระหว่าง *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด โดยวิธี Gas chromatography (Shimadzu GC-17A) ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย บูรพา ตรวจด้วย detector แบบ FID โดยมี condition ดังนี้

column : เส้นผ่านศูนย์กลาง0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร

Carrier gas : He (flow rate 1 มิลลิเมตร/นาที)

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

| | |
|---|---|
| Column oven | 220 |
| SPL 1 | 250 |
| FID 1 | 260 |

Split ratio 1:100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

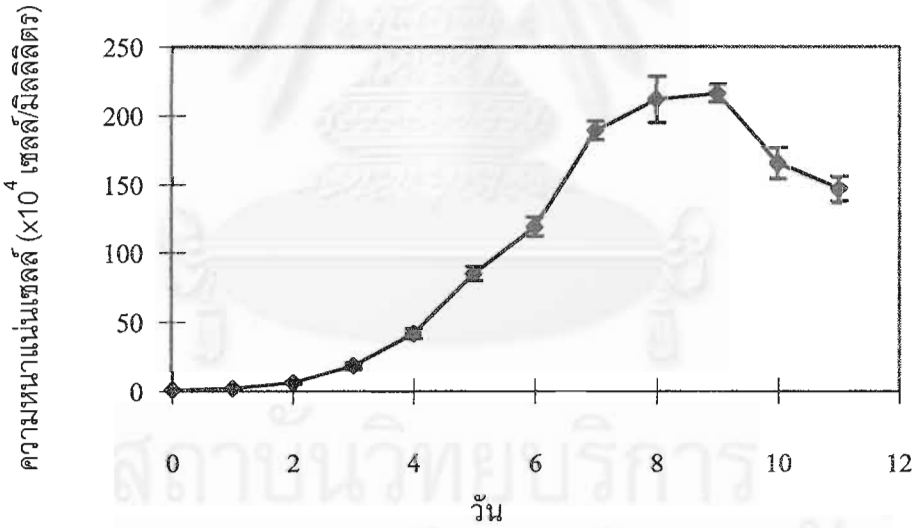
# บทที่ 4

# ผลและอภิปรายผลการทดลอง

## 4.1 การเติบโตของสาหร่าย *Nitzschia* sp.

### 4.1.1 การเติบโตของสาหร่าย *Nitzschia* sp. ในสภาวะปกติ

เมื่อเลี้ยง *Nitzschia* sp. ในอาหารสูตร T1 ดัดแปลง (ภาคผนวก ค.) โดยเลี้ยงในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 3000 ลักซ์ ช่วงมืดต่อช่วงสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง สาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในวันที่ 9 เท่ากับ 216.03 x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร (ภาพที่ 4.1)




**ภาพที่** 4.1 การเติบโตของสาหร่าย *Nitzschia* sp. ในสภาวะปกติ (อาหารสูตร T1 ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์)

### 4.1.2 การเติบโตของ *Nitzschia* sp. ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก

หลังจากเลี้ยงสาหร่ายไปได้ 2 วัน พบว่าในขวดเลี้ยงสาหร่ายที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์น้ำเลี้ยงมีสีขาวขุ่นและสาหร่าย *Nitzschia* sp.ไม่สามารถเติบโตในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก เมื่อ

ทดสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียพบว่า ใน stock culture มีการปนเปื้อน จึงทำการแยกสาหร่ายให้ปลอดเชื้อแบคทีเรีย แต่ปรากฏว่าไม่สามารถแยกสาหร่ายให้ปราศจากเชื้อแบคทีเรียได้ จึงเปลี่ยนชนิดของสาหร่ายที่นำมาใช้ทดลองเป็น *Amphora* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายเซลล์เดียวจำพวกไดอะตอม ที่แยกได้จากบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี โดยมะลิวัลย์ คุตะโค (2543) นำมาเลี้ยงแบบให้แสงสว่างบนอาหารวุ้น จนกระทั่งเกิดการเติบโตของสาหร่ายบนผิวอาหารวุ้น หลังจากนั้นย้ายเชื้อสาหร่ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร F/2

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวด้วยวิธีเฮเทอโรโทรฟิก ซึ่งมีการเติมสารคาร์บอนอินทรีย์ลงในอาหารนี้ ต้องเลี้ยงแบบปลอดเชื้อ (axenic culture) เนื่องจากเมื่อมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียจะมีผลให้สาหร่ายที่เลี้ยงมีการเติบโตช้าลง เนื่องจากแบคทีเรียมีการเติบโตเร็วกว่า และสารคาร์บอนอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารก็เป็นแหล่งธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของแบคทีเรียเช่นกัน แบคทีเรียจึงแย่งใช้ธาตุอาหารที่อยู่ในอาหารเลี้ยง ธาตุอาหารจึงไม่เพียงพอต่อการเติบโตของสาหร่าย (Chen, 1996)

## 4.2 การตรวจสอบชนิดของสาหร่ายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

จากการนำตัวอย่างสาหร่ายที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมตามข้อ 3.5 ไปตรวจสอบด้วย กล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (scaning electron microscope) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สามารถจำแนกชนิดของสาหร่ายได้ตามลักษณะที่ ลัดดา วงศ์รัตน์ (2539) อธิบายไว้ดังนี้

Division Chromophyta คือเป็นสาหร่ายที่มีสีออกเหลือง หรือน้ำตาล ได้แก่ สีน้ำตาลแกมเหลือง สีน้ำตาลแกมทอง สีเหลืองแกมเขียว

Class Bacillariophyceae เป็นสาหร่ายจำพวกไดอะตอม ซึ่งส่วนใหญ่มักเป็นเซลล์เดี่ยวๆ โครงสร้างของเซลล์แตกต่างจากคลาสอื่น คือ เซลล์ประกอบด้วยฝา 2 ฝา ครอบกันพอดี คล้ายกับ petri dish เรียกว่า 1 ฟรัสตุล และผนังประกอบด้วยซิลิกา ฝาอาจเป็นสมมาตรแบบรัศมี หรือแบบซ้ายขวา (bilateral) รวมทั้งมีลวดลายบนฝาแตกต่างกันตามชนิด คลอโรพลาสต์มีหลายสีแต่จะอยู่ในเฉดสีเหลือง จนถึงน้ำตาล

Order Bacillarales สำหรับไดอะตอมใน Order Bacillarales มีชื่อเรียกสามัญว่า Pennate diatom มีรูปร่างทางด้านวาล์วมีหลายลักษณะ เช่น รูปรี รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าปลายมน รูปเมล็ดข้าวสาร ฯลฯ แต่ทางด้านเกอร์เดิลมีรูปร่างคล้ายกัน คือมักเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส หรือเซลล์งอไปทางด้านในด้านหนึ่ง

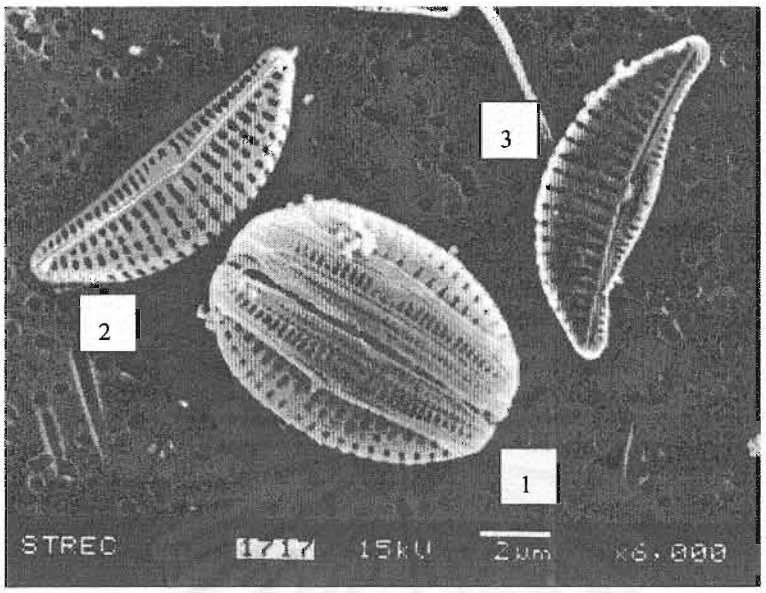
Suborder Bacillarineae สำหรับไดอะตอมใน Suborder Bacillarineae ฝาจะมีราฟีและสเตอร์นัม

Family Naviculaceae เนื่องจากมีราฟีอยู่บนหน้าฝา มีราฟีอยู่ทั้ง 2 ฝา ทั้งวงจรชีวิตมีรูปร่างเพียงแบบเดียว ส่วนใหญ่เซลล์มีสมมาตร 2 ด้าน (Bilateral symetry) บน 2-3 ระนาบ โครงสร้างเซลล์ ราฟี และสเตอร์นัมเป็นแบบง่าย

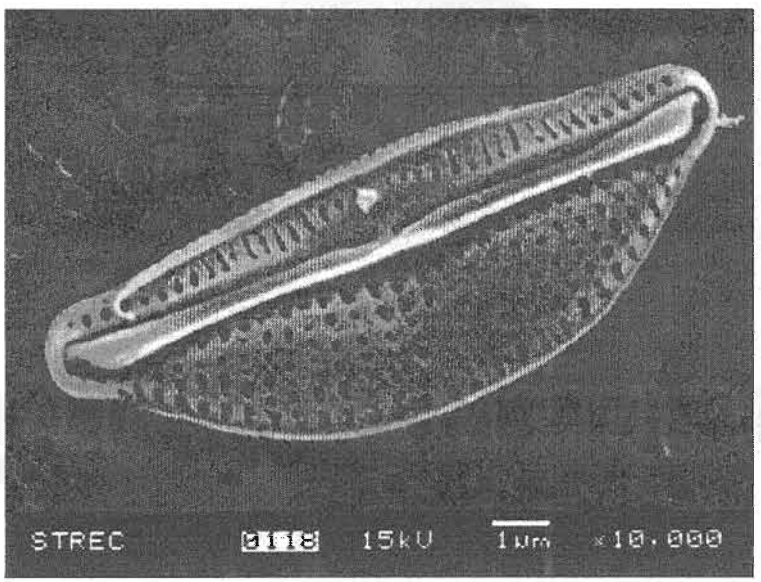
Genus *Amphora* เซลล์มักอยู่เดี่ยวๆ ซึ่งจะพบทางด้านเกอร์เดิลเสมอ เนื่องจากด้านหลังและด้านท้องของเซลล์นูนเซลล์เป็นรูปไข่ที่มีปลายเซลล์ตัดตรงทางด้านเกอเดิล และรูปไข่ทางด้านวาล์วซึ่งปลายเซลล์อาจพองออกเล็กน้อยหรือตัดตรง มีอินเตอร์คาลารีแบนด์ (intercalary band) หลายแถบหลาย ซึ่งอาจมีลวดลายที่เป็นจุดเป็นเส้น หรืออาจไม่มีอินเตอร์คาลารีแบน ราฟี (raphe) ของ *Amphora* อาจเป็นเส้นตรงหรือเส้นโค้ง หรือมีลักษณะเป็นเกลียว ปลายของราฟีอาจโค้งงอเข้าหาด้านหลังเซลล์เสมอ และมักเห็นได้ชัดเจนมากกว่าส่วนต้นของราฟี อาจมีหรือไม่มี terminal nodule ถ้ามีจะเป็นขนาดเล็ก ลวดลายบนเซลล์เป็นเส้นบาง (Striae) หรือเส้นหนา (punctae) ซึ่งพบไม่บ่อยนัก ฉะนั้นจำนวนเส้นบนเซลล์จึงไม่ใช่ลักษณะสำคัญในการจำแนกชนิด *Amphora* อาจลอยอยู่ในน้ำ เกาะอยู่บนสาหร่ายหรือพืชน้ำอื่นๆ อยู่บนพื้นที่แข็ง ๆ เช่น ก้อนหิน ซีเมนต์ พื้นทราย

และจากเอกสารของ Lange-Bertalot *et al.*, (1985) สามารถจำแนกชนิด *Amphora* sp. สายพันธุ์ AM 9901 ได้เป็น *Amphora delicatissima* Krasske (1932) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แสดงในภาพที่ 4.2

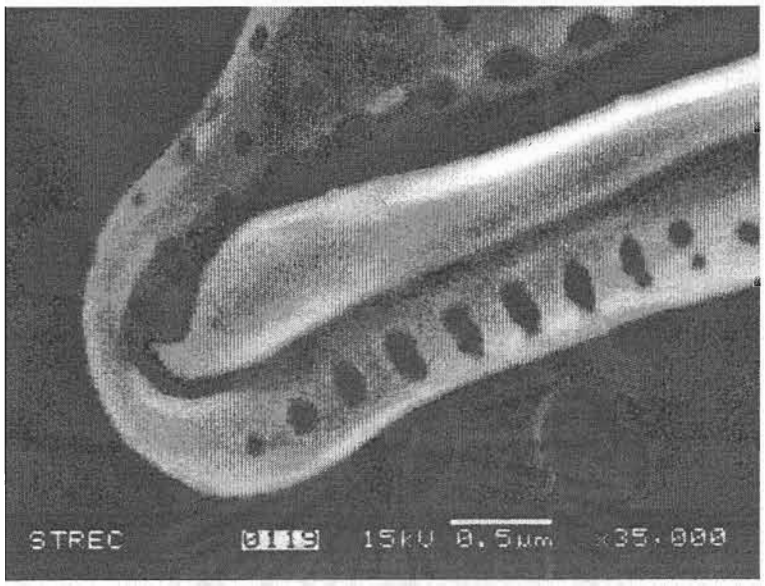
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



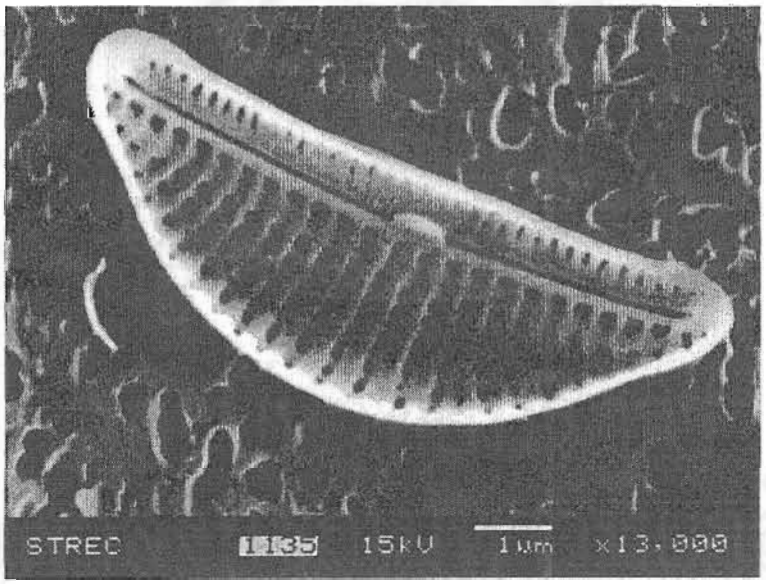

**ภาพที่** 4.2 **ก.** เซลล์สาหร่าย *A. delicatissima* ทั้งเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยฝา 2 ฝา โดยมองจากด้านฝา (valve view) และเป็นระยะที่เซลล์กำลังแบ่งเซลล์ (1) ในภาพจะสังเกตเห็น ฝาด้านนอก (2) และฝาด้านใน (3) ที่หลุดออกจากกัน



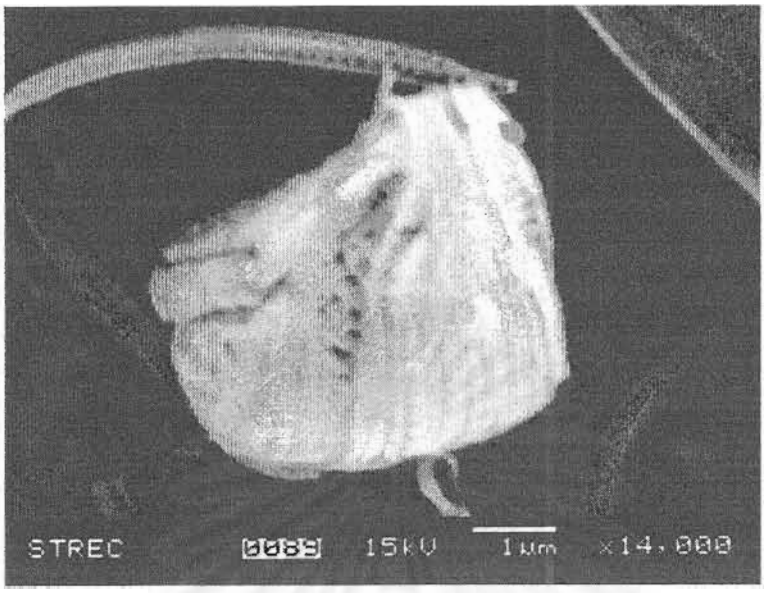

**ภาพที่** 4.2 **ข.** เซลล์สาหร่าย *A. delicatissima* เฉพาะฝานอก มองจากด้านฝา (valve view)




**ภาพที่** 4.2 **ค.** ภาพขยายเซลล์สาหร่าย *A. delicatissima* ส่วนปลายราฟีของฝาด้านนอก




**ภาพที่** 4.2 **ง.** เซลล์สาหร่าย *A. delicatissima* เฉพาะฝาด้านใน



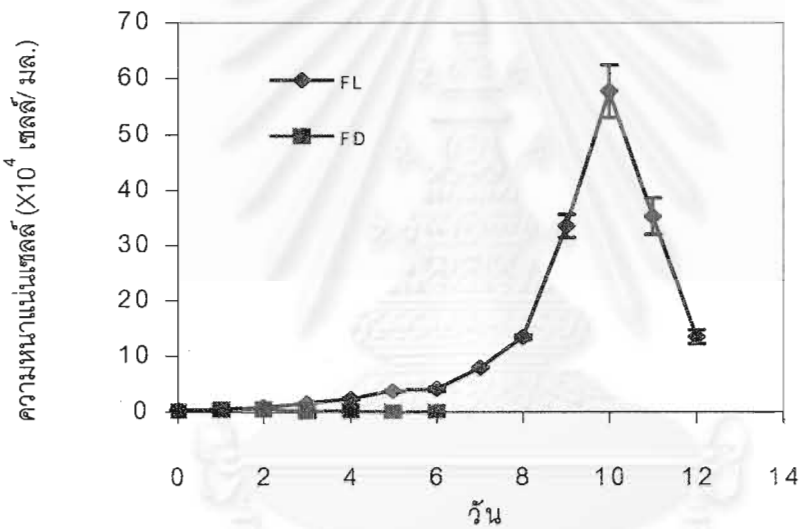

**.ภาพที่** 4.2 จ. เซลล์สาหร่าย *A. delicatissima* ซึ่งประกอบด้วยฝา 2 ฝา ประกบกัน มองจากปลายเซลล์ ซึ่งจะสังเกตเห็น intercalary bands

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 4.3 การเติบโตของสาหร่าย *Amphora delicatissima*

### 4.3.1 การเติบโตของ *Amphora delicatissima* ในอาหารสูตร F/2 ในที่มีแสงและที่มืด

พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงโดยให้แสงมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในวันที่ 10 เท่ากับ 57.72 ($\pm$4.63) x$10^4$ เซลล์/ มิลลิลิตร. ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงในที่มืด จะมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 1 และ2 และจะลดจำนวนลงในวันที่ 3 จนกระทั่งจะไม่พบเซลล์สาหร่ายเลยในวันที่ 5 (ภาพที่ 4.2)




**ภาพที่** 4.3 การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารสูตร F/2 ในที่มีแสง (FL) และที่มืด (FD)

โดยทั่วไปสาหร่ายจะดำรงชีวิตแบบโฟโตออโตโทรป คือสร้างอาหารขึ้นเองด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการสังเคราะห์แสงนี้ต้องการพลังงานรังสีจากแสง ในการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน ให้เป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรต โดยรงควัตถุที่มีอยู่ภายในเซลล์เป็นสิ่งสำคัญในการรับพลังงานจากแสงเพื่อมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Trainor, 1978) จากผลการทดลองพบว่า *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ปกติ ไม่สามารถเติบโตได้ในที่มืด เนื่องจากสาหร่ายไม่ได้รับแสงจึงขาดแหล่งพลังงานที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์แสง ทำให้ไม่เกิดการสร้างสารอินทรีย์ต่างๆ ในเซลล์ และยังทำให้ *A. delicatissima* ไม่มีพลังงานสำหรับใช้ในการแบ่งเซลล์ ดังนั้น *A. delicatissima* ที่ได้เติมเป็นเชื้อตั้งต้นในช่วงแรกก็

ค่อยๆ ตายลง จนในที่สุดไม่พบเซลล์ *A. delicatissima* ในภาชนะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ มะลิวัลย์ คุตะโค (2542) ที่ทดลองเลี้ยง *Amphora* sp. ในที่มืดด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ปกติ พบว่าสาหร่ายไม่สามารถเติบโตได้ และไม่พบเซลล์สาหร่ายในภาชนะเลี้ยงในวันที่ 6 ของการทดลอง

**4.3.2 ผลของแหล่งคาร์บอนในรูปกลูโคส โซเดียมไบคาร์บอเนต และกรดแอซิติกต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง**

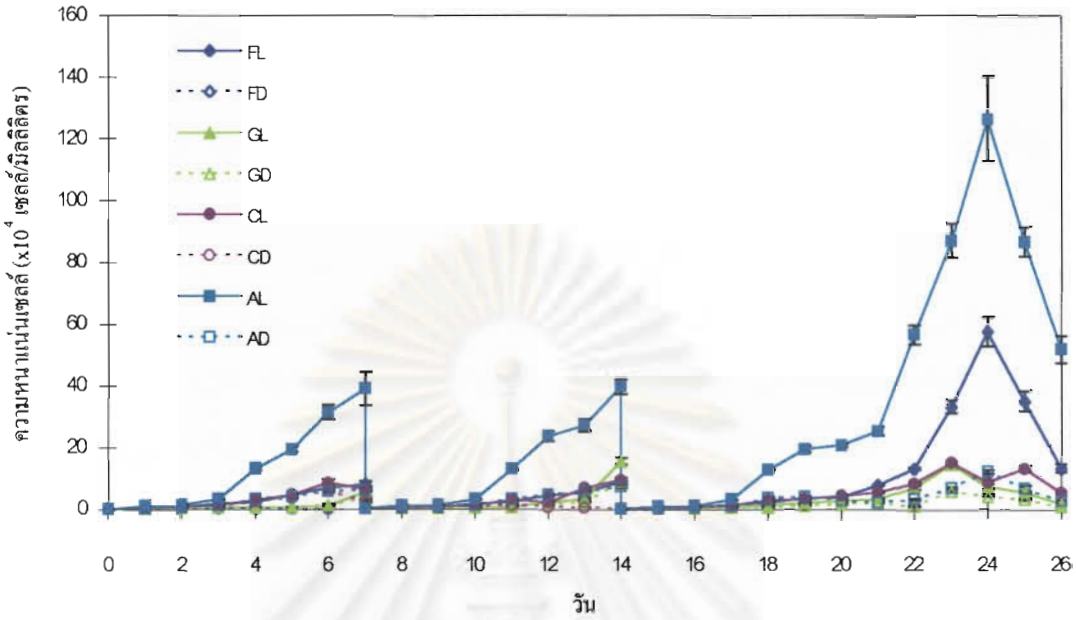
เมื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนในรูปกลูโคส, คาร์บอเนต และกรดแอซิติกต่อการเติบโตของ *A. delicatissima* ในที่มีแสงและที่มืด (ภาพที่ 4.4) ผลการทดลองพบว่าในที่มีแสงสว่างสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่มีการเติมกรดแอซิติกมีการเติบโตดีที่สุดซึ่งให้ผลการเติบโตดีกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ปกติ โดยมี ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในการเลี้ยงรอบสุดท้ายเท่ากับ 126.67($\pm$13.86) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร อัตราการเติบโตเท่ากับ 0.58 ต่อวัน และเวลาที่ *A. delicatissima* เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า เท่ากับ 1.18 วัน (ตารางที่ 4.1) ส่วนในที่มืดนั้นสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์เท่านั้นที่สามารถเติบโตได้ ซึ่งในที่นี้ก็คืออาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกและกลูโคส ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมคาร์บอนในรูปของไบคาร์บอเนตซึ่งเป็นคาร์บอนนอนอินทรีย์นั้นพบว่าสาหร่ายไม่สามารถเติบโตได้ (ภาพที่ 4.4) เนื่องจากสาหร่ายจะสามารถใช้คาร์บอนอนินทรีย์ได้เมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์แสงเท่านั้น

การเลี้ยงสาหร่ายเซลล์ด้วยวิธีเฮเทอโรโทรฟิก เป็นการเลี้ยงสาหร่ายโดยปลอดเชื้อแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ลงในอาหาร คาร์บอนอินทรีย์ในอาหารจะทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน และนอกจากนี้คาร์บอนอินทรีย์ยังเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่เซลล์อีกด้วย Chen (1996) รายงานว่า การเลี้ยงสาหร่ายด้วยวิธีเฮเทอโรโทรฟิกจะให้ผลผลิตที่มีความหนาแน่นเซลล์สูงกว่าการเลี้ยงสาหร่ายด้วยวิธีโฟโตออโตโทรฟิก ซึ่งไม่ตรงกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าการเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ปกติ ให้แสงสว่างความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ สามารถเติบโตได้ดีกว่า *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมคาร์บอนอินทรีย์ในที่มืด อาจเป็นเพราะคาร์บอนอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารนั้นยังไม่เหมาะสมต่อการเติบโตภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืดของสาหร่ายชนิดนี้ จึงได้มีการทดลองหาชนิดและปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ที่เหมาะสมกับการเติบโตของ *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในการทดลองต่อไป ซึ่งการที่สาหร่าย *A. delicatissima* สามารถเติบโตได้ในสภาวะไม่มีแสงนั้น เพราะสารคาร์บอนอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารไปทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน

และแหล่งพลังงานให้แก่สาหร่าย ทดแทนพลังงานที่ปกติจะได้รับจากแสง สำหรับแหล่งคาร์บอนที่ได้มีการทดลองใช้เลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกมีหลายรูปแบบเช่น กลูโคส สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในการเลี้ยง *Navicula* spp. *Nitzschia* spp. *Cylindrotheca* spp (Tan and Johns,1996) *Tetraselmis* sp. (Day and Tsavalos,1996) และ*Chlorella* spp. (Ming-Shi *et al.*, 1997) กรดแอซิติก สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในการเลี้ยง *Navicula saprophila* *Rhodomonas salina* *Nitzschia* sp. (Kitano *et al.*, 1997) แอซิเตต สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในการเลี้ยง *Navicula saprophila* (Kitano *et al.*, 1998) กลีเซอรอล สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในการเลี้ยง *Phaeodactylum tricornutum* (Garcia *et al.*, 2000) เมธานอลสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในการเลี้ยง *Chlorella minutissima* และนอกจากนี้ยังสามารถใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง *Euglena gracilis* (Ogbonna *et al.*, 1999)

ในการทดลองครั้งนี้พบว่า *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่าย สูตร F/2 ที่เติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกรดแอซิติก ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ มีการเติบโตสูงกว่า *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่าย สูตร F/2 ปกติ ในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิกและ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่าย สูตร F/2 ที่เติมคาร์บอนอินทรีย์ในที่มืด แสดงให้เห็นว่า *A. delicatissima* ได้รับพลังงานทั้งจากแสง และจากสารคาร์บอนอินทรีย์ที่เติมลงในอาหาร ทำให้สาหร่ายสามารถสร้างอาหารด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง และนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานร่วมด้วย ซึ่งการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่เติมสารคาร์บอนอินทรีย์และให้แสงสว่างด้วยนั้น เรียกว่าการเลี้ยงด้วยวิธี มิกโซโทรฟิก (mixotrophic culture) หรือ โฟโตเฮเทอโรโทรฟิก (photoheterotrophic culture) (Trainor, 1978) อย่างไรก็ดีแม้การเลี้ยงสาหร่ายแบบมิกโซโทรฟิกจะให้การเติบโตดีกว่าการเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด แต่เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตสาหร่ายด้วยวิธีการเลี้ยงสาหร่ายทั้งสองแบบแล้วพบว่าการผลิตสาหร่ายแบบมิกโซโทรฟิกมีต้นทุนการผลิตสูงกว่า ดังนั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายแบบเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืดจึงเป็นประโยชน์ต่อการผลิตสาหร่ายเป็นอย่างมาก

จากรูปที่ 4.4 การทดลองเลี้ยงสาหร่าย 3 ครั้ง (Batch) ซึ่งเป็นการทดสอบว่าหากสาหร่ายมีการปรับตัวเข้ากับอาหารและสภาพการเลี้ยงในที่มืดเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้ว จะมีการเติบโตแตกต่างกับการเติบโตในการเลี้ยงครั้งแรกหรือไม่ ในการทดลองนี้พบว่า ในการทดลองรอบที่ (Batch)1




**ภาพที่ 4.4** การเติบโตของ A. *delicatissima*ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปต่างๆ ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง โดย

FL คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ปรกติในที่มีแสง

FD คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ปรกติในที่ไม่มีแสง,

GL คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคสในที่มีแสง

GD คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคสในที่ไม่มีแสง

CL คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมไบคาร์บอเนตในที่มีแสง

CD คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมไบคาร์บอเนตในที่ไม่มีแสง

AL คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกในที่มีแสง

AD คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกในที่ไม่มีแสง

(เติมแหล่งคาร์บอนทุกชนิดในความเข้มข้นที่เท่าคือ 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร)

รอบที่ 2 และ รอบที่ 3 ให้ผลการทดลองที่มีแนวโน้มเดียวกันคือ สาหร่ายที่เลี้ยงอาหารสูตร F/2 ที่เติมสารคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกรดแอซิติก ให้แสงสว่างความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นั้นมีความหนาแน่นเซลล์สูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ

ผลการเปรียบเทียบอัตราการเติบโตและความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในการเลี้ยงรอบสุดท้ายในภาพ 4.4 แสดงในตารางที่ 4.1

**ตารางที่** 4.1 การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมอินทรีย์ หรือ อนินทรีย์คาร์บอนในรูปต่างๆ ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง โดยเติมแหล่งคาร์บอนทุกชนิดในความเข้มข้นที่เท่าคือ 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร) (จากการเลี้ยงในรอบสุดท้าย)

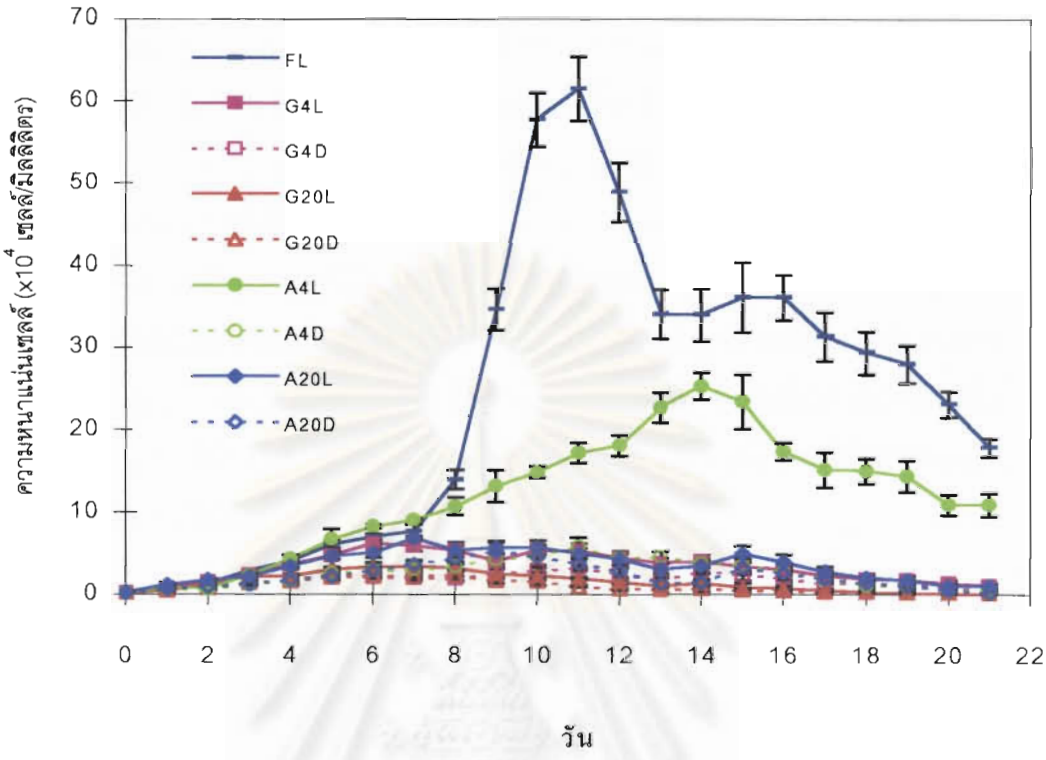
| ชุดการทดลอง | ให้แสงสว่าง | | | ไม่ให้แสงสว่าง | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | อัตราการเติบโต (ต่อวัน) | เวลาที่สาหร่ายเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (วัน) | จำนวนเซลล์สูงสุด ( x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร) | อัตราการเติบโต (ต่อวัน) | เวลาที่สาหร่ายเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (วัน) | จำนวนเซลล์สูงสุด ( x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร) |
| F/2 | 0.50 | 1.38 | 57.72 ± 4.63 | - | - | - |
| F/2+ กลูโคส | 0.39 | 1.77 | 14.89 ± 0.93 | 0.30 | 2.27 | 6.24 ± 0.54 |
| F/2+ โซเดียมไบคาร์บอเนต | 0.39 | 1.73 | 15.33 ± 0.50 | - | - | - |
| F/2+กรดแอซิติก | 0.58 | 1.18 | 126.67 ± 13.86 | 0.40 | 1.73 | 12.44 ± 0.68 |

**4.3.3 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสและกรดแอซิติกต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง**

จากการทดลอง 4.3.2 ทำให้ทราบว่า *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่มีการเติมกลูโคสและกรดแอซิติก สามารถเติบโตได้ในที่มืด การทดลองนี้จึงเพิ่มความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนในอาหาร เพื่อหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมการเติบโตของ *A. delicatissima* โดยเพาะเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหาร 4 แบบ คือ อาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส และกรดแอซิติก ในสองระดับความเข้มข้นคือ 4 และ 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ซึ่งทำการทดลอง 2 ชุดคือ ชุดแรกเลี้ยงในที่มีแสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงมืดต่อช่วงสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมงและชุดที่สองเลี้ยงในที่มืด ทั้งสองชุดเลี้ยงในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่า แม้จะเพิ่มปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารแต่สาหร่ายก็ไม่สามารถเติบโตได้ดีกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ในที่มีแสง ซึ่งมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 61.5 (±3.98) x$10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร (ภาพที่ 4.5) ซึ่งผลการเติบโตของ *A. delicatissima* ในชุดการทดลองต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 4.2

การทดลองนี้ทำให้ทราบว่าสามารถใช้กลูโคสและกรดแอซิติกเป็นสารคาร์บอนอินทรีย์ในการเลี้ยง *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิก และมิกโซโทรฟิกได้ ซึ่งกลูโคสนั้นเป็นสารตั้งต้นของกระบวนการไกลโคไลซิส ซึ่งจากกระบวนการไกลโคไลซิสจะได้สารตั้งต้นของวัฏจักรเครบส์ และเกิดกระบวนการขนส่งอิเลคตรอนเป็นขั้นสุดท้าย เมื่อรวมกระบวนการทั้ง 3 แล้ว จะให้พลังงานแก่เซลล์ 38 ATP ส่วนกรดแอซิติก นั้นเซลล์ต้องมีเอนไซม์ในการเปลี่ยนรูปกรดแอซิติกให้อยู่ในรูปของแอซิเตต ต่อจากนั้น เปลี่ยนรูปเป็น แอซิติล โค เอ (Frobisher, 1957) ซึ่งแอซิติล โค เอ เป็นสารตั้งต้นของวัฏจักรเครบส์ และต่อจากนั้นเกิดกระบวนการขนส่งอิเลคตรอน ซึ่งกระบวนการเหล่านี้สามารถสร้างพลังงานแก่เซลล์ได้

แต่การที่สาหร่ายเติบโตได้ไม่ดีในอาหารที่เติมกลูโคสและกรดแอซิติกอาจเนื่องมาจากชนิดและปริมาณของสารคาร์บอนอินทรีย์ไม่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก เนื่องจากไดอะตอมแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากสารคาร์บอนอินทรีย์แต่ละประเภทแตกต่างกัน (Swift, 1967 อ้างโดย Hellebust and Lewin, 1977) เช่น ไดอะตอม *Merosira nummuloides* มีระบบในการนำกรดอะมิโนเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในสภาวะที่ไม่มีแสง แต่สำหรับสารคาร์บอนอินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น น้ำตาล กรดอินทรีย์ และแอลกอฮอล์ ไดอะตอมชนิดนี้ไม่สามารถนำไปใช้ได้ (Hellebust, 1970 อ้างโดย Hellebust and Lewin, 1977)




**ภาพที่ 4.5** การเติบโต A. *delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคสและกรดแอซิติกใน 2 ระดับความเข้มข้น ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง โดย

FL คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ปรกติในที่มีแสง

G4L คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่มีแสง

G4D คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่มีไม่แสง

G20L คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่มีแสง

G20D คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่มีไม่แสง

A4L คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่มีแสง

A4D คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่ไม่มีแสง

A20L คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่มีแสง

A20D คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่ไม่มีแสง

นอกจากนี้สาเหตุที่ทำให้ *A. delicatissima* เติบโตได้ไม่ดีในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก และกลูโคส ในระดับความเข้มข้นต่างๆ อาจเป็นเพราะสาหร่ายต้องสารอินทรีย์อื่นๆ เช่น ไนโตรเจนอินทรีย์ อันได้แก่ โปรตีน กรดอะมิโน ที่จะนำไปใช้ในการสร้างองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ (Brock and Brock, 1979) เนื่องจากสาหร่ายสามารถใช้กรดอะมิโนจากภายนอกมาเป็นกรดอะมิโนของสาหร่ายได้โดยไม่ต้องผ่านการเปลี่ยนรูป Syrett (1981) อ้างโดย Lobban and Harrison (1994) แต่ถ้าสาหร่ายได้รับไนโตรเจนในรูปไนเตรท ไนไตรท์ และแอมโมเนียต้องมีกระบวนการในการเปลี่ยนไนโตรเจนในรูปอนินทรีย์ ให้เป็นไนโตรเจนในรูปอินทรีย์ซึ่งได้แก่ กรดอะมิโน ก่อนที่สาหร่ายจะนำกรดอะมิโนไปสร้างเป็นโปรตีนของเซลล์ต่อไป ดังนั้นจึงได้ทดลองหาชนิดและปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ที่เหมาะสมกับการเติบโตของ *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในการทดลองต่อไป (4.3.4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่** 4.2 การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคสและกรดแอซิติกใน 2 ระดับความเข้มข้น คือ 4 และ 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง

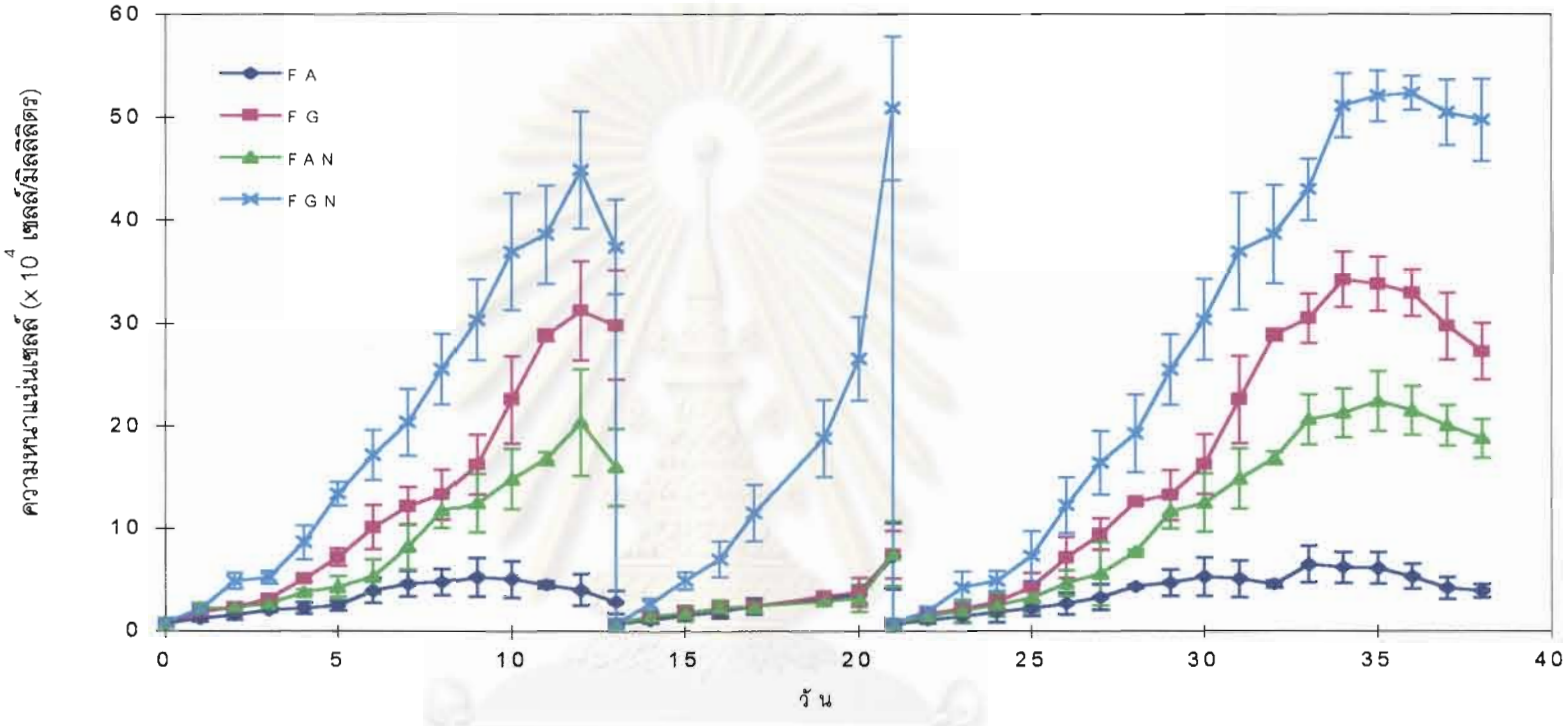
| ชุดการทดลอง | ให้แสงสว่าง | | | ไม่ให้แสงสว่าง | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | อัตราการเติบโต (ต่อวัน) | เวลาที่สาหร่ายเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (วัน) | จำนวนเซลล์สูงสุด ( x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร) | อัตราการเติบโต (ต่อวัน) | เวลาที่สาหร่ายเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (วัน) | จำนวนเซลล์สูงสุด ( x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร) |
| F/2 | 0.59 | 0.87 | 61.5±3.89 | - | - | - |
| F/2+ กลูโคส 4gC/L | 0.52 | 1.33 | 6.16±0.22 | 0.35 | 1.98 | 3.15±0.14 |
| F/2+ กลูโคส 20gC/L | 0.22 | 3.15 | 3.34±0.70 | 0.16 | 4.33 | 2.24±0.52 |
| F/2+กรดแอซิติก 4gC/L | 0.14 | 4.73 | 25.35 ±1.67 | 0.15 | 4.39 | 5.79±1.09 |
| F/2+กรดแอซิติก 20gC/L | 0.31 | 2.21 | 6.8±0.21 | 0.24 | 2.88 | 5.23±0.99 |

**4.3.4 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient broth หรือ NB) ต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด**

การหาปริมาณและชนิดของแหล่งคาร์บอน ที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *A. delicatissima* ในที่มืด โดยทดลองเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหาร 4 แบบ ดังนี้ อาหารสูตร F/2 ที่เติม, กลูโคส, กรดแอซิติก, กลูโคสกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (NB) และกรดแอซิติกกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (NB) โดยทุกชุดการทดลองจะเติมกลูโคสหรือ แอซิติกในปริมาณที่เท่ากันคือ 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร ส่วน NB ประกอบด้วย เพพโตน สารสกัดจากยีสต์และสารสกัดจากเนื้อ (ภาคผนวก ข) โดยทุกชุดการทดลองเลี้ยงในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ไม่ให้แสงสว่าง ผลปรากฏว่า ในการเลี้ยงรอบที่ 3 สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมทั้งกลูโคสและ NB ให้ผลการเลี้ยงที่ดีที่สุดคือ มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดมากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารแบบอื่นๆ โดยมีความหนาแน่นสูงสุดเท่ากับ 52.30 (±1.65) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร รองลงมาคือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 34.20 (±2.69) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร รองลงมาคือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกและ NB มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 22.40(±2.90) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกมีความหนาแน่นเซลล์ต่ำที่สุดเท่ากับ 6.49 (±1.76) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร (ภาพที่ 4.6)

เมื่อพิจารณาอัตราการเติบโตของ *A. delicatissima* ในการทดลองรอบที่ 3 พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมทั้งกลูโคสและ NB มีอัตราการเติบโตสูงสุด เท่ากับ 0.54 รองลงมาคือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส มีอัตราการเติบโตเท่ากับ 0.35 รองลงมาคือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกและ NB มีอัตราการเติบโตเท่ากับ 0.26 และ สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกมีอัตราการเติบโตต่ำที่สุดเท่ากับ 0.23 (ตารางที่ 4.3)

จากผลการทดลองพบว่า NB ที่เติมลงในอาหารมีส่วนช่วยส่งเสริมการเติบโตของ *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด โดยพบว่าเมื่อเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคสผสมกับ NB และอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกผสมกับ NB นั้น *A. delicatissima* สามารถเติบโตได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส และอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Cid *et al.*, (1992) ที่พบว่า




**ภาพที่** 4.6 การเติบโตของ A. *delicatissima*ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคส, กรดแอซิติก, กลูโคสผสมกับ NB และ กรดแอซิติกผสมกับ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด โดย

FA คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร

FG คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส1 กรัมคาร์บอน/ลิตร

FAN คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับ NB

FGN คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับ NB

เมื่อเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่เติมสารคาร์บอนอินทรีย์ในรูปเพพโตน กลูโคส และสารสกัดยีสต์ผสมกันทำให้ความหนาแน่นเซลล์สาหร่ายนั้นมากกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารคาร์บอนอินทรีย์

การเติบโตของสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืดนั้น คล้ายกับการเติบโตของแบคทีเรีย คือเป็นการเติบโตโดยใช้ประโยชน์จากสารคาร์บอนอินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสารอินทรีย์นี้ทำหน้าที่เป็นทั้งแหล่งพลังงาน และเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ แหล่งพลังงานที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่ น้ำตาล แป้ง ไขมัน โปรตีน กรดอะมิโน ฯลฯ พลังงานที่จำเป็นต่อการเติบโตจะถูกปลดปล่อยจากสารอินทรีย์โดยกระบวนการออกซิเดชั่น (Frobisher, 1957) ซึ่งสารอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของแบคทีเรียและสาหร่าย ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดอะมิโน และโปรตีน ฟอสฟอรัส แร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม คลอไรด์ เหล็ก (Brock and Brock, 1979)

ดังนั้น *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคสผสมกับ NB และอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกผสมกับ NB จึงเติบโตได้ดีกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม NB เพราะใน NB เป็นแหล่งของไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ แร่ธาตุและวิตามิน ซึ่งช่วยเพิ่มการเติบโตของสิ่งมีชีวิต (Bridson,1995) และสารอาหารที่เป็นสารอินทรีย์นั้นเซลล์สาหร่ายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านการเปลี่ยนรูป นอกจากนี้ Cid *et al.*, (1992) ยังรายงานว่าการเพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพของสาหร่าย ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารสกัดยีสต์และกลูโคส

นอกจากนี้ยังพบว่า *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคสผสมกับ NB ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ให้ผลการเลี้ยงดีที่สุดในการทดลองนี้มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 52.30 ($\pm$1.65) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร ใกล้เคียงกับการเติบโตของ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ให้แสงสว่างในตารางที่ 4.1 ซึ่งมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 57.72 ($\pm$4.63) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร หากมีการปรับสภาวะการเลี้ยงให้เหมาะสมกับการเติบโตของ *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืดมากกว่าในการทดลองนี้ อาจทำให้สาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืดมีการเติบโตดีกว่าสาหร่ายที่เติบโตในสภาวะปกติ (เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ให้แสงสว่าง) ดังนั้นจึงได้ทดลองหาชนิดและปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ที่เหมาะสมกับการเติบโตของ *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในการทดลองต่อไป (4.3.5)

ผลการเปรียบเทียบอัตราการเติบโตและความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในการทดลองเลี้ยงในครั้งที่ 3 ในภาพที่ 4.6 แสดงในตารางที่ 4.3

**ตารางที่ 4.3** การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคส กรดแอซิติก กลูโคสผสมกับ NB และ กรดแอซิติกผสมกับ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด (จากการเลี้ยงในรอบสุดท้าย)

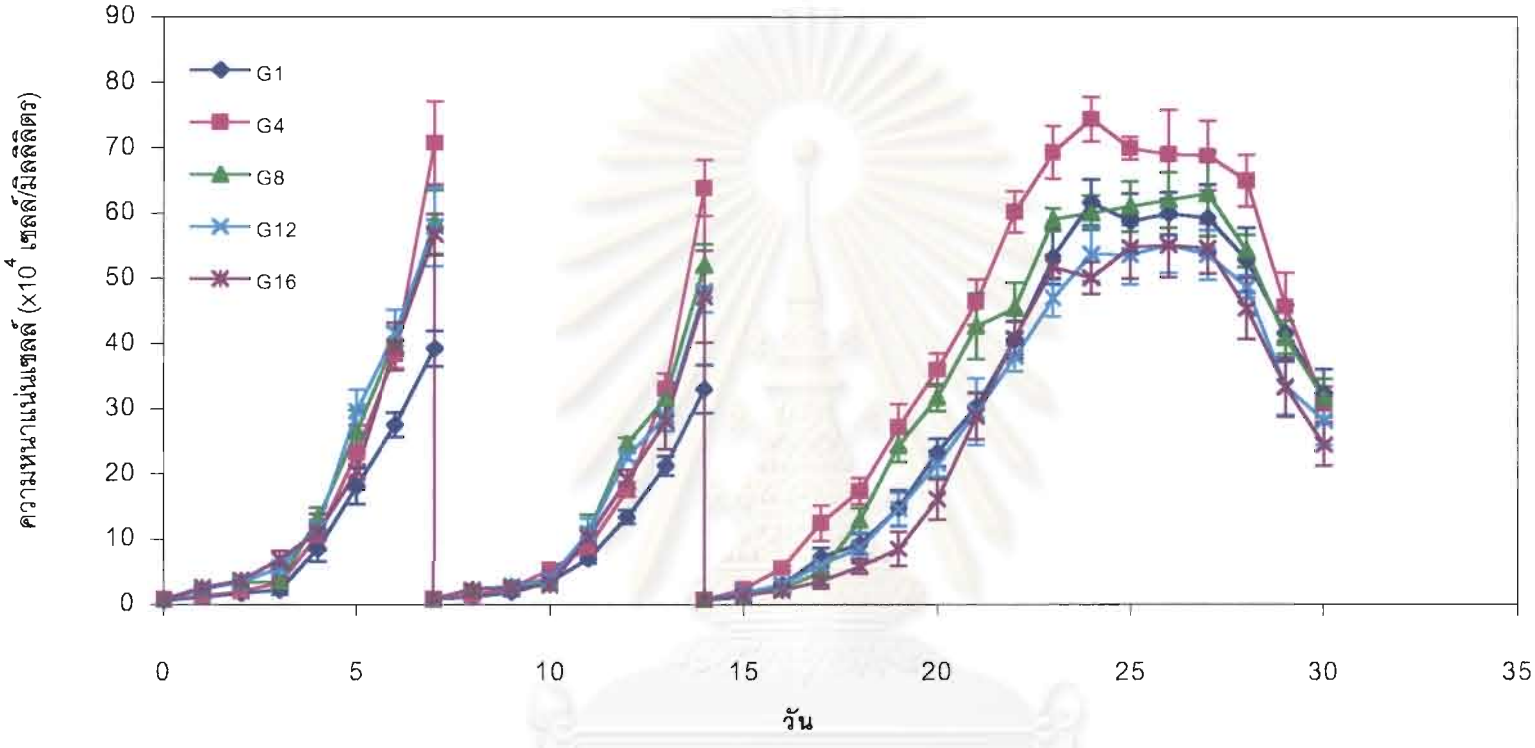
| ชุดการทดลอง | อัตราการเติบโต (ต่อวัน) | เวลาที่สาหร่ายเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (วัน) | จำนวนเซลล์สูงสุด ( x $10^4$ เซลล์/ มิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|
| F/2 +กรดแอซิติก | 0.23 | 2.93 | 6.49±1.76 |
| F/2+กลูโคส | 0.35 | 1.96 | 34.20±2.69 |
| F/2+กรดแอซิติก +NB | 0.26 | 2.62 | 22.40±3.90 |
| F/2+กลูโคส+ NB | 0.54 | 1.28 | 52.30±1.65 |

### 4.3.5 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด

จากผลการทดลอง 4.3.4 ทำให้ทราบว่า *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมทั้งกลูโคส 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (NB) มีการเติบโตดีที่สุด จึงทดลองเพิ่มปริมาณกลูโคสเพื่อหาระดับที่เหมาะสมกับการเติบโตของ *A. delicatissima* ในที่มืด โดยทดลองเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหารสูตร F/2 + อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (NB) ที่มีการเติมกลูโคสในปริมาณต่างๆ ดังนี้ คือ 1, 4, 8, 12 และ 16 กรัมคาร์บอน/ลิตร โดยทุกชุดการทดลองเลี้ยงในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ไม่ให้แสงสว่าง ปรากฏว่าระดับของกลูโคสที่ทำให้สาหร่ายสามารถเติบโตได้ดีที่สุดในการทดลองเลี้ยงในครั้งที่ 3 คือ 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร หรือ 10 กรัมกลูโคส โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 74.28 (±3.37) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร รองลงเลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร หรือ 2.5 กรัมกลูโคส มีความหนาแน่น

เซลล์สูงสุดเท่ากับ 62.90 (±6.46) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร รองลงมาคือ สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร หรือ 2.5 กรัมกลูโคส มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 61.55 (±3.54) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร รองลงมาคือ สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 12 กรัมคาร์บอน/ลิตร หรือ 30 กรัมกลูโคส มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 55.01(±4.23) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร รองลงมาคือ สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 16 กรัมคาร์บอน/ลิตร หรือ 40 กรัมกลูโคส มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 54.99 (±4.84) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร (ภาพที 4.7)

จากผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยง *A. delicatissima* ที่ให้ผลดีที่สุด คือการทดลองเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด ซึ่งให้ผลผลิตที่มีความหนาแน่นเซลล์สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบ การเลี้ยง *A. delicatissima* ที่เติมสารคาร์บอนอินทรีย์ในรูปอื่นๆ จากทุกการทดลองที่ได้ทำการทดลองในครั้งนี้ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ยังให้ผลผลิตที่มีความหนาแน่นเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ปกติ (จากผลการทดลอง 4.3.1) แสดงให้เห็นว่าการเติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับ NB ช่วยส่งเสริมการเติบโตของ *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด และยังแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของอัตราส่วนระหว่างกลูโคสและ NB ซึ่งจะเห็นว่า มีการทดลองเติมกลูโคสในระดับความเข้มข้นต่างๆ แต่ผลปรากฏว่าที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร นั้นเป็นระดับที่ *A. delicatissima* มีการตอบสนองดีที่สุด คือมีความหนาแน่นเซลล์สูงที่สุด แสดงว่าอัตราส่วนระหว่าง กลูโคสและ NB มีผลต่อการเติบโตของ *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Cid *et al.*, (1992) ที่พบว่ามวลชีวภาพของสาหร่าย *Tetraselmis suecica* เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมสารอินทรีย์ในรูปกลูโคสและสารสกัดจากยีสต์ ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าจากผลการทดลองในตารางที่ 4.1 จนถึงผลการทดลองในตารางที่ 4.4 สามารถปรับสภาวะการเติบโตของ *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืดได้ในระดับหนึ่ง โดยผลการทดลองที่ 4.3.2 และ 4.3.3 ยังพบว่าสาหร่ายมีการเติบโตต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการเติบโตของ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ในที่มีแสง แต่เมื่อได้ทดลองปรับชนิดและความเข้มข้นของสารอินทรีย์คาร์บอนในผลการทดลองที่ 4.3.4 พบว่าสาหร่ายมีการเติบโตที่ดีขึ้นจนกระทั่งในผลการทดลองที่ 4.3.5 สามารถปรับชนิดและความเข้มข้นของสารคาร์บอนอินทรีย์จน




**ภาพที่ 4.7** การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคสผสมกับNB ในความเข้มข้นต่างๆ ของกลูโคส ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด โดยที่ G1 – G16 คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่มีการเติม NB ผสมกับ กลูโคส 1 – 16 กรัม คาร์บอน/ลิตร ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำให้ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด มีการเติบโตดีกว่า *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ในที่มีแสง

จากผลการทดลองยังพบว่าการเพิ่มขึ้นของกลูโคสมีผลทำให้สาหร่ายนั้นมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเพิ่มมากขึ้น แต่การเพิ่มขึ้นของแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ที่มากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเติบโตของสาหร่าย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Chen and Johns (1996) ซึ่งพบว่าสาหร่ายสามารถเติบโตได้ดีในอาหารที่เติมแอซิเตตที่ความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่า 0.4 กรัม/ลิตร) แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมแอซิเตตที่ความเข้มข้นสูง(มากกว่า 0.4 กรัม/ลิตร) พบว่ามีการยับยั้งการเติบโตของเซลล์ ซึ่งเป็นผลมาจากความเข้มข้นของแอซิเตตที่มากเกินไป และนอกจากนี้ Kotzabasis *et al.*, (1999) พบว่าสาหร่ายสามารถเติบโตในอาหารที่เติมเมธานอลที่ความเข้มข้นต่ำ ได้ดีกว่าในอาหารที่เมธานอลที่ความเข้มข้นสูง

ผลการเปรียบเทียบอัตราการเติบโตและความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในการทดลองเลี้ยงในครั้งที่ 3 แสดงในตารางที่ 4.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่** 4.4 การเติบโตของ *A. delicatissima*ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคสผสมกับNB ในความเข้มข้นต่างๆ ของกลูโคส ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด

| ชุดการทดลอง | อัตราการเติบโต (ต่อวัน) | เวลาที่สาหร่ายเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (วัน) | จำนวนเซลล์สูงสุด ( x $10^4$ เซลล์/ มิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|
| F/2+กลูโคส 1 gC/L +NB | 0.46 | 1.50 | 61.55±3.54 |
| F/2+กลูโคส 4 gC/L +NB | 0.96 | 0.71 | 74.28±3.37 |
| F/2+กลูโคส 8 gC/L +NB | 0.77 | 0.89 | 62.90±6.46 |
| F/2+กลูโคส 12 gC/L +NB | 0.61 | 1.12 | 55.01±4.23 |
| F/2+กลูโคส 16 gC/L +NB | 0.47 | 1.45 | 54.99±4.84 |

### 4.3.6 การเพาะเลี้ยง *Amphora delicatissima* แบบต่อเนื่องในถังหมัก (fermentor) ขนาดเล็ก

ผลการศึกษาการเติบโตของ *A. delicatissima* ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่ผสมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในถังหมักขนาดเล็ก แสดงในภาพที่ 3.1 (ก) และ 3.1 (ข) โดยช่วงแรกเลี้ยงสาหร่ายโดยยังไม่มีการถ่ายเทอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 2 วัน สาหร่ายมีการเติบโตจนกระทั่งมีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 65.50 (±4.30) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร จึงเริ่มเปิดปั๊มควบคุมอัตราการไหลของอาหารซึ่งเป็นการเริ่มต้นการเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่อง ช่วงแรกกำหนดอัตราการไหลของอาหารเท่ากับ 5.75 มิลลิลิตร/ชั่วโมง พบว่าความหนาแน่นของสาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนขึ้นจนถึงวันที่ 7 และลดจำนวนลงในวันที่ 8 จนมีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 54.50 (±4.81) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นความหนาแน่นเซลล์ก็คงที่จนถึงวันที่ 13 มีความหนาแน่น

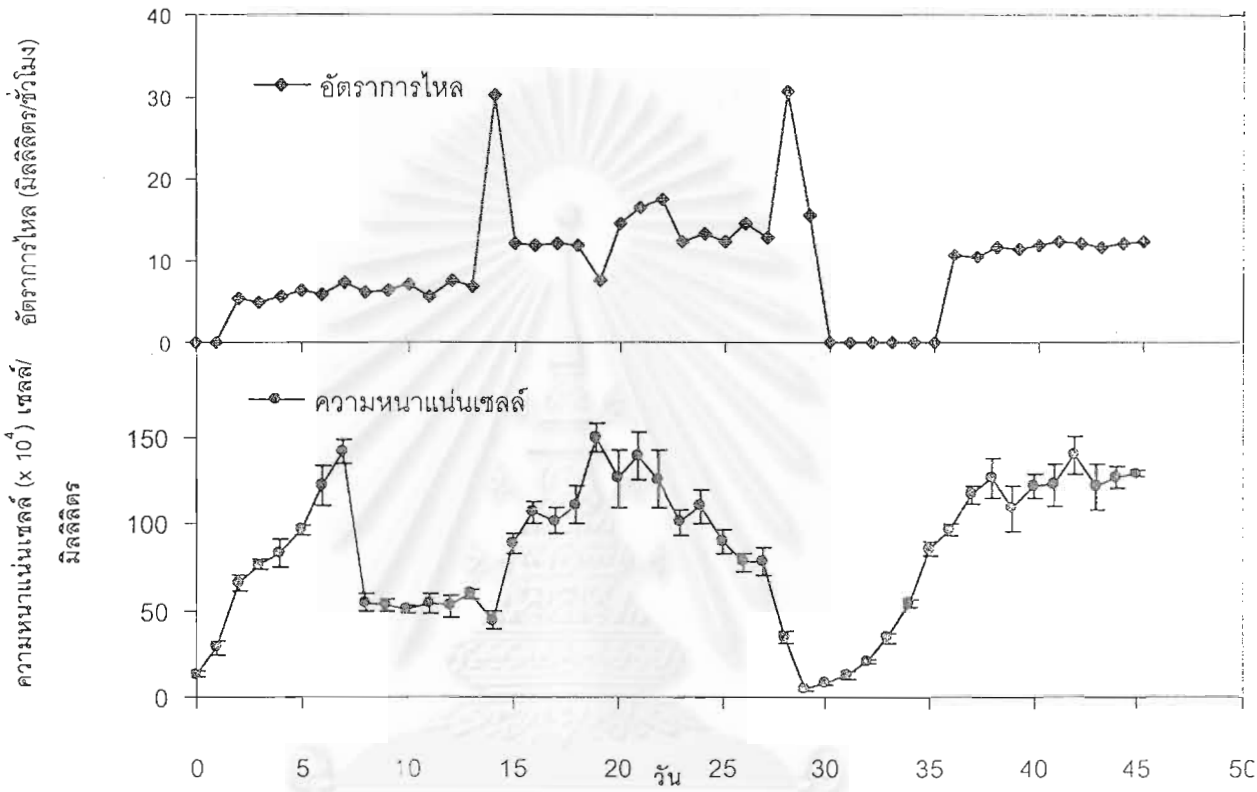
เซลล์เท่ากับ 59.33 (±3.06) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งในช่วงวันที่ 8-13 นี้มีอัตราการเจือจาง (dilution rate) เท่ากับ 0.0093 ต่อชั่วโมง และมี generation time เท่ากับ 106.72 ชั่วโมง จึงได้ทดลองปรับอัตราการไหลของอาหารให้เพิ่มขึ้นเป็น 30 มิลลิลิตร/ ชั่วโมง แต่พบว่าทำให้เซลล์สาหร่ายลดจำนวนลงเหลือ 44.00 (±5.21) x$10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร จึงได้ปรับอัตราการไหลของอาหารให้ลดลงเหลือประมาณ 12.5-16.6 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ปรากฏว่าในวันต่อมาเซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นจนมีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 88.17 (±5.57) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร และเมื่อทำการทดลองเลี้ยงแบบต่อเนื่องต่อไปเป็นระยะเวลา 12 วัน พบว่าความหนาแน่นเซลล์มีค่าอยู่ระหว่าง 77.66-139.33 (x $10^4$) เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นการเติบโตในระยะ steady state (exponential phase) ซึ่งอัตราการเติบโตจะเท่ากับอัตราการเจือจาง เท่ากับ 0.0187 ต่อชั่วโมง และ generation time เท่ากับ 53.47 ชั่วโมง ต่อมาจึงทดลองเพิ่มอัตราการไหลของอาหารเป็น 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ปรากฏว่าในวันต่อมาความหนาแน่นเซลล์ลดเหลือ 34.83 (±3.47) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าอัตราการเจือจางมากกว่าอัตราการเติบโต ทำให้เซลล์ถูกกำจัดออกจากระบบ จึงปรับอัตราการไหลของอาหารลดลงเป็น 15 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แต่ในวันต่อมาความหนาแน่นเซลล์ยังคงลดลงจนมีค่าเท่ากับ 4.17 (±1.03) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร จึงหยุดปั๊มเพื่อให้เซลล์สาหร่ายได้เติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ หลังจากนั้นเป็นเวลา 6 วัน สาหร่ายในขวดเลี้ยงเริ่มหนาแน่นจนมีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 85.17 (±3.97) x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร จึงเปิดปั๊มและปรับอัตราการไหลเป็น 10.8-12.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง และทำการเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 8 วัน พบว่าสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์อยู่ในช่วง 96.66-139.83 x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร และมีอัตราการเจือจาง (dilution rate) เท่ากับ 0.0167 ต่อชั่วโมง และมี generation time เท่ากับ 59.68 ชั่วโมง ใกล้เคียงกับการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในวันที่ 15-25 ความหนาแน่นเซลล์ในแต่ละวัน และอัตราการไหลของอาหารแสดงในภาพที่ 4.8

ระบบการเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องที่ทำการทดลองในครั้งเป็นแบบ chemostat เป็นระบบที่อาหารใหม่จะถูกเติมเข้าในถังหมักตลอดเวลาในอัตราการไหลที่เท่ากับอัตราการปล่อยอาหารเลี้ยงสาหร่ายออกจากถังหมัก การเติบโตของสาหร่ายที่เลี้ยงในระบบต่อเนื่องจะแปรผันตามอัตราการไหลของอาหาร เมื่ออัตราการไหลต่ำ ความหนาแน่นเซลล์จะต่ำ (สังเกตได้จากผลการทดลองวันที่ 8-13) เมื่ออัตราการไหลสูง ความหนาแน่นเซลล์จะสูง (Simmons, 2001) (สังเกตได้จากผลการทดลองวันที่ 15-25) การเพิ่มของความหนาแน่นเซลล์สาหร่ายตามอัตราการไหลที่เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากสาหร่ายสามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ทันกับการถูกเจือจางด้วยอาหารใหม่ที่ถูกเติมเข้าในถังหมักตลอดเวลา แต่ถ้าหากอัตราการไหลมากเกินไปเซลล์ถูกกำจัดออกจากระบบ

มากกว่าการเพิ่มจำนวนขึ้นทดแทน ทำให้ความหนาแน่นเซลล์ในถังหมักลดลง (สังเกตได้จากผลการทดลองในวันที่ 14 และวันที่ 28) ซึ่งในระหว่างการเลี้ยงถ้าอัตราของอาหารมีความสมดุลกับอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนของสาหร่ายแล้ว จะพบว่าความหนาแน่นเซลล์สาหร่ายจะคงที่ เรียกการเติบโตในช่วงนี้ว่า steady state สังเกตได้จากผลการทดลองในระหว่างวันที่ 8-14 ระหว่างวันที่ 15-24 และระหว่างวันที่ 36-45

จากการทดลองนี้พบว่าสามารถเลี้ยง *A. delicatissima* ได้ในระบบต่อเนื่อง ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB โดย *A. delicatissima* มีอัตราการเติบโตสูงสุด เมื่อเลี้ยงในระบบที่มีอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.0167 ต่อชั่วโมง โดยมีความหนาแน่นเซลล์ระหว่าง 96.66-139.83 x $10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าความหนาแน่นเซลล์ที่เลี้ยงได้จากการเลี้ยงแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว ทั้งในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (ตารางที่ 4.2) และสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก (ตารางที่ 4.4) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**ภาพที่** 4.8 การเติบโตของ *A. delicatissima* แบบต่อเนื่องในถังหมัก (fermentor) ขนาดเล็ก และอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงสาหร่ายออกจากถังหมัก

## 4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมี

ผลการวิเคราะห์ ปริมาณโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แป้ง น้ำหนักแห้ง, คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ เปรียบเทียบระหว่าง *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด แสดงในตารางที่ 4.5

**ตารางที่** 4.5 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีของ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด

| องค์ประกอบทางชีวเคมี | อาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง | F/2+NB+กลูโคส 4 gC/l ในที่มืด |
|---|---|---|
| โปรตีน (mg/$10^6$ cells) | $0.6085 \pm 0.0309^a$ | $4.4130 \pm 0.3233^b$ |
| ไขมัน (mg/$10^6$ cells) | $0.0621 \pm 0.0068^a$ | $0.0781 \pm 0.0078^b$ |
| คาร์โบไฮเดรต (mg/$10^6$ cells) | $0.0032 \pm 0.0010^a$ | $0.0456 \pm 0.0091^b$ |
| แป้ง (mg/$10^6$ cells) | $0.0045 \pm 0.0008^a$ | $0.0027 \pm 0.0013^b$ |
| น้ำหนักแห้ง (mg/$10^6$ cells) | $0.3038 \pm 0.0762^a$ | $0.4862 \pm 0.0587^b$ |
| คลอโรฟิลล์ เอ (ug/$10^6$ cells) | $0.1101 \pm 0.0042^a$ | $0.0446 \pm 0.0031^b$ |
| คลอโรฟิลล์ ซี (ug/$10^6$ cells) | $0.0536 \pm 0.0153^a$ | $0.0472 \pm 0.0084^b$ |
| แคโรทีนอยด์ (ug/$10^6$ cells) | $0.1646 \pm 0.0041^a$ | $0.0512 \pm 0.0041^b$ |

หมายเหตุ ตัวอักษรเหนือตัวเลขที่ต่างกันภายในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($P < 0.05$)

จากตารางจะเห็นได้ว่าในเซลล์ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกนั้น มีองค์ประกอบทางชีวเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต มากกว่าในเซลล์ที่เลี้ยงแบบปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Cid *et al.*,(1992) พบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่เติมสารคาร์บอนอินทรีย์ทำให้ องค์ประกอบทางชีวเคมีในเซลล์ ได้แก่ โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต นั้นมากกว่าในชุดทดลองซึ่งเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ไม่เติมสารคาร์บอนอินทรีย์ นอกจากนี้ Tan and John (1996) รายงานว่าเซลล์ของไดอะตอมที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก จะมีปริมาณไขมันมากกว่าไดอะตอมที่เลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก เนื่องจากการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกนั้นจะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีการเติมสารคาร์บอนอินทรีย์ ซึ่งในที่นี้คือ กลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับ NB เนื่องจากองค์ประกอบของ NB และกลูโคสทำให้ในอาหารอุดมไปด้วยแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน กรดอะมิโน ซึ่งโมเลกุลของสารเหล่านี้ ล้วนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ ไม่ว่าจะเป็น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก ฯลฯ และสารอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารนี้ยังเป็นแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์ซึ่งเซลล์จะนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์สารที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์อีกด้วย (Brock and Brock, 1979)

จากการทดลองพบว่าองค์ประกอบทางชีวเคมีที่เป็นรงควัตถุ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ ซี และคาร์โรทีนอยด์ นั้น จะพบในเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิกมากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % สอดคล้องกับรายงานของ Day and Tsavalos (1996) พบว่า เซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก มีปริมาณ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ ซี และแคโรทีนอยด์ น้อยกว่าในเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก ซึ่งการลดลงของแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์เป็นการปรับตัวของสาหร่ายเมื่อเลี้ยงในที่มืด นอกจากนี้ Chen (1996) รายงานว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในที่มืดนั้นจะมีความสามารถในการสร้างรงควัตถุลดลง

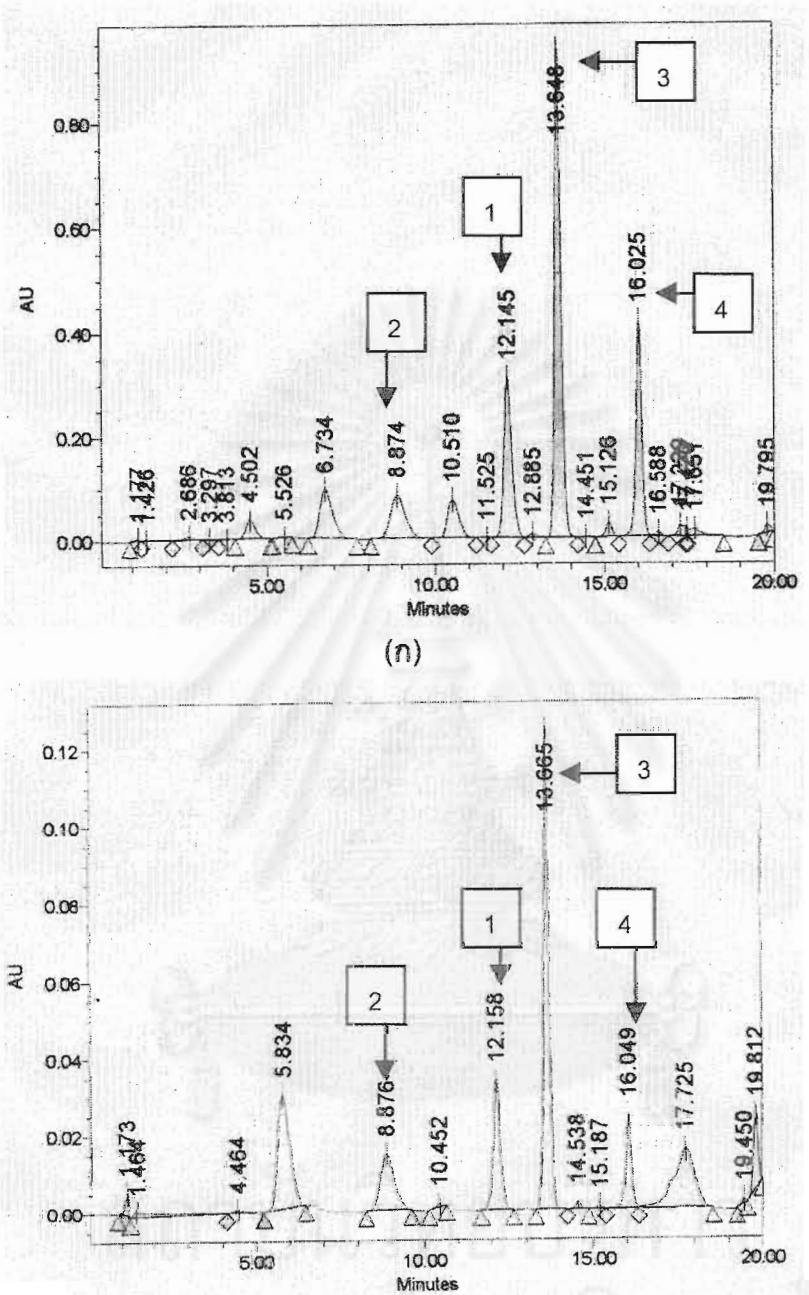
### 4.4.1. ผลการวิเคราะห์รงควัตถุด้วย HPLC

การวิเคราะห์รงควัตถุแบบคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) ด้วย HPLC ทำให้ทราบว่าสัดส่วนของรงควัตถุต่างๆ ซึ่งสามารถจำแนกชนิดได้โดยลักษณะของสเปคตรัมของสารแต่ละชนิดจาก photodiode array detector ใน *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่างความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติม

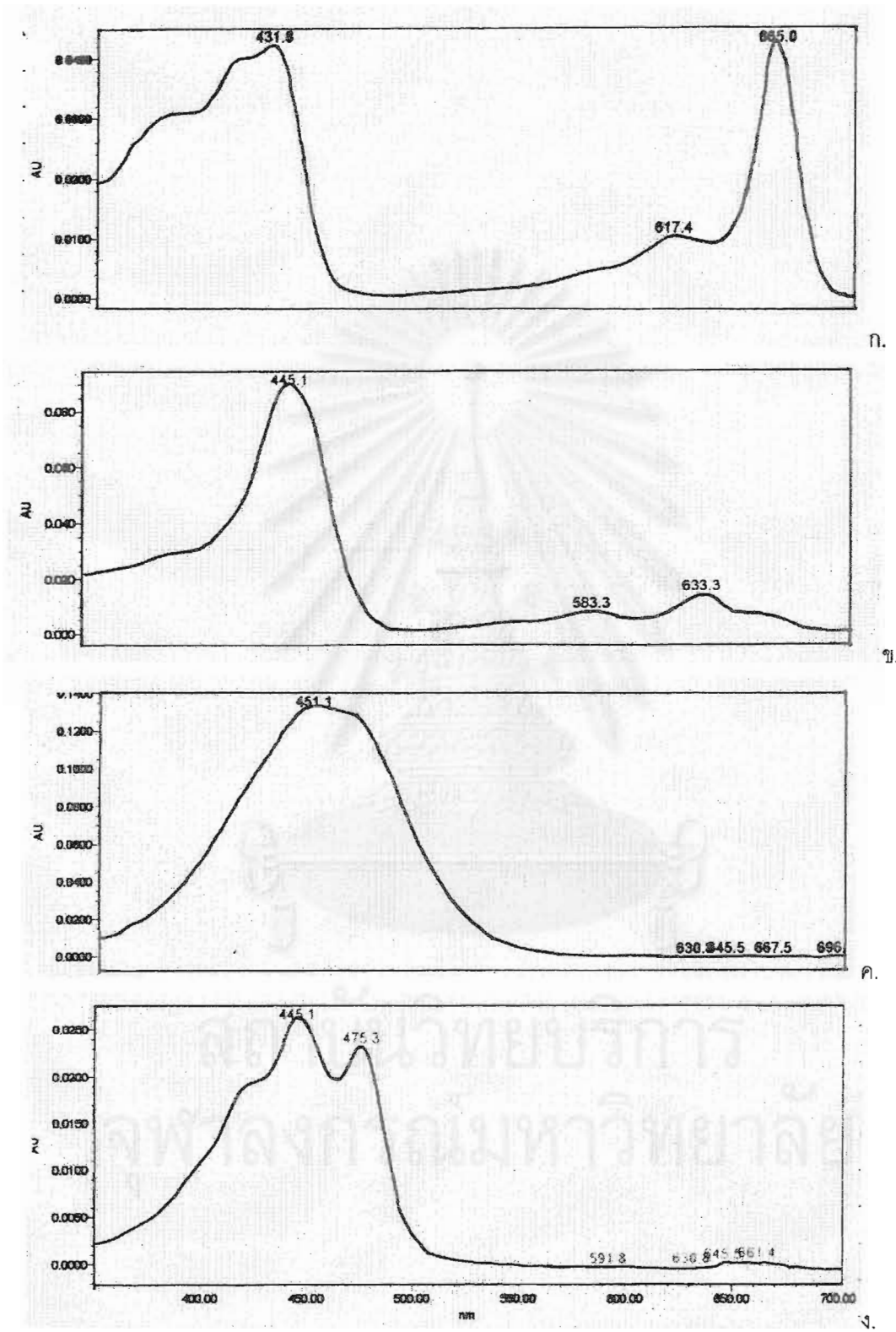
กลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืดนั้น มีความแตกต่างกัน โดยมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของรงควัตถุชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงในสภาวะต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ส่วนโครมาโตแกรมจาก HPLC แสดงในภาพที่ 4.9 และสเปคตรัมของคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่แยกได้แสดงในภาพที่ 4.10

**ตารางที่ 4.6** ร้อยละของปริมาณรงควัตถุชนิดต่างๆในเซลล์ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด

| รงควัตถุ | *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ | | | *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | retention time | peak area | ร้อยละของ peak area | retention time | peak area | ร้อยละของ peak area |
| คลอโรฟิลล์เอ | 12.145 | 5176735 | 20.5879 | 12.158 | 502894 | 18.87205 |
| คลอโรฟิลล์ซี1 | 8.874 | 2705409 | 10.75942 | 8.876 | 443011 | 16.62482 |
| ฟูโคแซนทิน | 13.648 | 12085241 | 48.06306 | 13.665 | 1416341 | 53.15087 |
| ไดอะไดโนแซนทิน | 16.025 | 5177166 | 20.58961 | 16.049 | 302510 | 11.35226 |




**ภาพที่** 4.9 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์รงควัตถุด้วย HPLC เปรียบเทียบระหว่าง เปรียบเทียบระหว่าง *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (ก) กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัม คาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด (ข.) โดยหมายเลข 1-4 แสดง peak ของรงควัตถุ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ ซี 1 ฟูโคแซนทิน และไดอะไดโนแซนทิน ตามลำดับ




**ภาพที่** 4.10 absorption spectrum จากการตรวจวัดด้วย HPLC Photodiode array detector ของรงควัตถุ คลอโรฟิลล์ เอ (ก) คลอโรฟิลล์ ซี1 (ข) ฟูโคแซนทิน (ค) ไดอะไดโนแซนทิน (ง) ในโครมาโตแกรมในภาพที่ 4.9

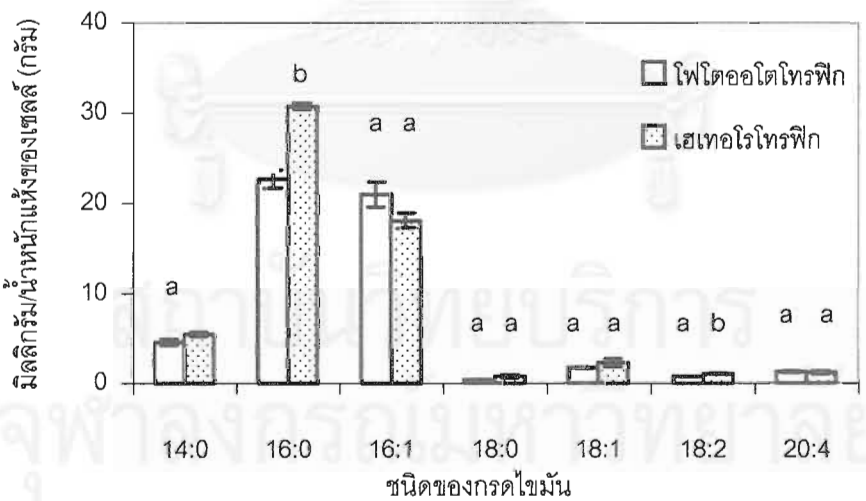
**4.4.2. ผลการวิเคราะห์กรดไขมัน**

การวิเคราะห์กรดไขมันด้วย GC เปรียบเทียบระหว่างองค์ประกอบกรดไขมันของ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด พบว่ากรดไขมันที่มีมากที่สุดทั้งใน *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด คือ 16:0 haxadecanoic acid (palmitic) และ 16:1 haxadecenoic acid (palmitoleic) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Tan and Johns (1996) ที่ทดลองเลี้ยง *Nitzschia* sp. *Navicula* spp. และ *Cylindrotheca* spp.ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด ที่พบว่ากรดไขมันที่พบมากที่สุดคือ 16:0 และ 16:1 (ภาพที่ 4.11 และ ภาพที่ 4.12)

นอกจากนี้จากผลการทดลองพบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่างความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ จะมีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวแตกต่างจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB เลี้ยงในที่มืด โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในที่มืดมีการสร้างกรดไขมันอิ่มตัวมากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในที่มีแสง และสาหร่ายที่เลี้ยงในที่มืดยังมีร้อยละของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่ำกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในที่มีแสง (ตารางที่ 4.7) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Day and Tsavalos (1996) นอกจากนี้ Tan and Johns (1996) อ้างโดย Garcia *et al.*, (2000) พบว่า *Phaeodactylum tricornutum* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่ำ ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงในที่มืดจะมีการลดลงของคลอโรพลาสต์ และ Scheerer and Parthier (1982) อ้างโดย Day and Tsavalos (1996) พบว่าเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด จะมีการลดลงของปริมาณคลอโรพลาสต์ในเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีน้อยกว่าในเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก เนื่องจากในคลอโรพลาสต์มีไขมันไม่อิ่มตัวสะสมอยู่ และไดอะตอมแต่ละชนิดจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์อันเนื่องมาจากสภาวะการเลี้ยง นั้นต่างกัน โดย *Cylindrotheca* spp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกนั้นสามารถสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้มากกว่า *Cylindrotheca* spp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก ส่วนใน *Nitzschia* sp. จะไม่พบความแตกต่างของชนิดและปริมาณกรดไขมันเมื่อเปรียบระหว่างเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกและเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (Tan and Johns, 1996)

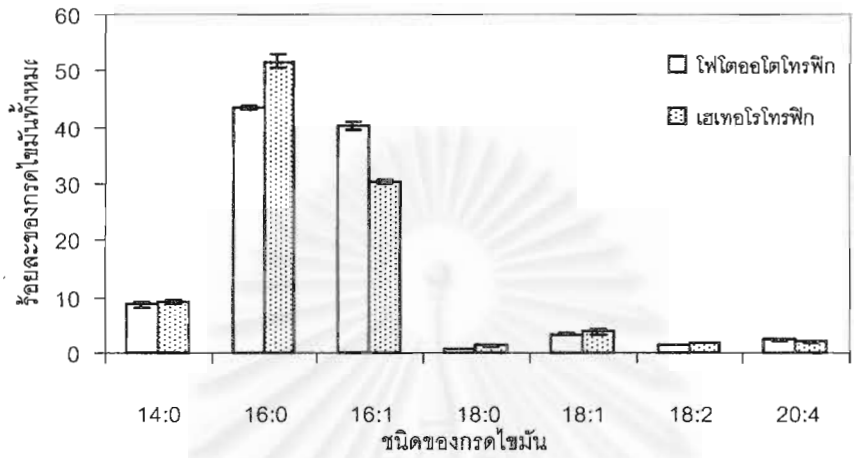
**ตารางที่** 4.7 ปริมาณกรดไขมัน และร้อยละของกรดไขมันในเซลล์ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด

| ชนิดกรดไขมัน | เลี้ยงในที่มีแสง | | เลี้ยงในที่มืด | |
|---|---|---|---|---|
| | มิลลิกรัม/กรัม (น้ำหนักแห้งของสาหร่าย) | ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด | มิลลิกรัม/กรัม (น้ำหนักแห้งของสาหร่าย) | ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด |
| กรดไขมันอิ่มตัว | 24.5 | 47.31 | 26.95 | 37.96 |
| กรดไขมันไม่อิ่มตัว | 24.23 | 52.69 | 37.35 | 62.04 |
| รวม | 48.73 | 100 | 64.30 | 100 |




**ภาพที่** 4.11 ปริมาณของกรดไขมันแต่ชนิดที่พบในเซลล์สาหร่าย *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงใน

อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด (ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$)




**ภาพที่** 4.12 ร้อยละของไขมันชนิดต่างๆ ที่พบในเซลล์สาหร่าย *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ กับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 5

## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

### สรุปผลการทดลอง

1. *Amphora delicatissima* ซึ่งแยกได้จากหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี เป็นไดอะตอมที่สามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมสารคาร์บอนอินทรีย์

2. สารคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคสและกรดแอซิติก สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืดได้

3. สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ *A. delicatissima* มีการเจริญในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NB โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 74.28 ($\pm$4.6) x$10^4$ เซลล์/ มิลลิลิตร โดยสาหร่ายจะมีอัตราการเจริญและความหนาแน่นเซลล์สูงสุดลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เติมกลูโคสมากกว่า 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร

4. ปริมาณโปรตีน ไขมัน และ คาร์โบไฮเดรตในเซลล์ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ให้แสงสว่าง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ มีน้อยกว่าในเซลล์ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร และ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

5.การทดลองเลี้ยง *A. delicatissima* ในระบบต่อเนื่องพบว่า อัตราการไหลของอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ทำให้เซลล์ *A. delicatissima* เจริญอยู่ในช่วง steady state เท่ากับ 10.8-12.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ในภาชนะเลี้ยงที่บรรจุอาหารเลี้ยงสาหร่าย 700 มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการเจือจาง (dilution rate) 0.0167 ต่อชั่วโมง โดยมีความหนาแน่นเซลล์ระหว่าง 96.66-139.83 x$10^4$ เซลล์/ มิลลิลิตร

**ข้อเสนอแนะ**

1.ควรศึกษาผลของสารอินทรีย์คาร์บอนชนิดอื่นๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด ซึ่งอาจจะให้ผลการเจริญที่ดีกว่าการศึกษาในครั้งนี้ และอาจทำให้องค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเซลล์ *A. delicatissima* มีเพิ่มมากขึ้นด้วย

2.ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเลี้ยง *A. delicatissima* ในระบบต่อเนื่อง โดยการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลในหลายๆ ระดับ เพื่อหาอัตราการไหลที่ทำให้ *A. delicatissima* สามารถเจริญได้สูงสุด และเจริญอยู่ในช่วง steady state เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตไดอะตอมสำหรับเป็นอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อน

3. ควรมีการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *A. delicatissima* ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# รายการอ้างอิง

## ภาษาไทย


มะลิวัลย์ คุตะโค. 2543. การแยกสายพันธุ์และการเจริญของไดอะตอมสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก จากชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี. ปัญหาพิเศษ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา, 74 หน้า.

มณฑล แก่นมณี. 2539. การศึกษาเปรียบเทียบอาหารพวกสาหร่ายต่อการเจริญเติบโตของหอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis ovina* (GMELIN, 1791) . วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 109 หน้า.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2539. แพลงก์ตอนพืช. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 851 หน้า.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 250 หน้า.

วีระพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย. 2536. อาหารปลา. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์. หน้า 89-95.

โสภณา บุญญาภิวัฒน์. 2526. การเตรียมตัวอย่างไดอะตอมเพื่อการวิเคราะห์ชนิด. วารสารการประมง. ปีที่ 38 ฉบับที่ 1. หน้า 67-71.


## ภาษาอังกฤษ


Allen, E. J. and Nelson, E. W. 1910. On the artificial culture of marine plankton organisms. Journal of the Marine Biological Association of the Kingdom 10: 417-439.

Azam, F., Hemmingsen, B. B. and Volcani, B. E. 1973. Germanium incorporation into the silica of diatom cell walls. Archiv Fuer Mikrobiologie 92: 11-20.

Braarud, T. 1961. Cultivation of marine organisms as a means of understanding environment influences on population. In Sears, M. (ed) Oceanography. Washinton, D.C. : AAAS. pp. 271-289.

Becker E.W. and Venkataraman, L.V. 1982. Biotechnology and Exploitation of algae . German Agency for Technical Coorperation. pp.1-20.

Blight, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37: 911-917.

Bollag, D.M., Rozycki, M.D. and Edelstein, S.J.1996. Protein Method. New York: A John Wiley and Sons. pp. 57-83.

Bridson, E.Y. 1995. The Oxoid manual. 7th Edition. London: Unipath Limited. p.166.

Brock, T.D. and Brock, K.M. 1979. Basic Microbiology with Application. 2nd ed. Prentice-Hall Inc. New Jersey. 605 pp.

Brock, T.D., Smith, D.W. and Madigan, M.T. 1984. Biology of Microorganisms. U.S.A.: Prentice-Hall Inc. 130-223 pp.

Burlew, J.S. 1953. Current status of the large-scale culture of algae. Carnegie Institution of Washington Pub. pp 3-23.

Castenholz, R. W. 1964. The effect of daylength and light intensity on the growth of littoral marine diatoms in culture. Physiologia Plantarum 17: 951-963.

Chapman,D.J. and Gellenbeck, K.W. 1989. An historical perspective of algal biotechnology. In Cresswell *et al.*, (eds). Algal and Cyanobacteria Biotechnology. England: Longman Scientific and Technology. pp.1-23.

Chen, F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. Trends in Biotechnology 14: 421-726 .

Chen, F. and Johns, M.R.1996. Relationship between substrate inhibition and maintenance energy of *Chlamydomonas reinhardtii* in heterotrophic culture. Journal of Applied Phycology 8: 15-19.

Cid , A., Abalde, J. and Herrero, C. 1992. High yield mixotroph culture of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Prasinophyceae). Journal of Applied Phycology 4: 31-37.

Chu, W., Phang, S. and Goh, S. 1996. Environment effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow. Journal of Applied phycology 8: 389-396.

Cox, E. (ed). 1996. Identification. of Freshwater Diatom from Live Material. London: Chapman and Hall. 158 p.

Crueger, W. and Crueger, A. 1989. Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology . U.S.A. : Associates Inc. pp.100-113.

Day, J.G. and Tsavalos, A.J. 1996. An investigation of the heterotrophic culture of the green alga *Tetraselmis* Journal of Applied Phycology 8: 73-77.

Darley, W.M. 1982. Algal biology a physiological approch. In Wilkinson, J.F. (ed) Basic Microbiology. London: Blackwell scientific publication. pp. 21-53 .

Devlin, R.M. and Barker, A.V. 1971. Photosynthesis. London: Litton Educational Publication Inc. pp. 251-277.

Eppley, R.W. 1977. Growth and culture of diatom. In Werner, D. (ed) The biology of diatoms. London: The Whitefairs Press , 498 p.

Fox, J. M. 1983. Intensive algae culture techniques. In Mcvey J.P. (ed) CRC Hanbook of Mariculture. Vol.1 Crustacean Aquaculture. Florida: CRC Press. 442 p.

Frobisher, 1957. Fundamental of microbiology 6th ed,. London: W. B. Saunders company, 615 p.

Gladue, R. R. L.1991. Heterotrophic microalgae production : Potential for application to aquaculture feeds.In Rotifer and Microalgae Culture System. Proceeding of a U.S.-Asia Workshop. Honolulu. The Oceanic Institute, pp. 275-286.

Gracia, M.C., Sevilla, J. M., Fernandez, F.G., Grima, E. M. and Camacho, F.G. 2000. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol : growth rate and fatty acid profile. Journal of Applied Phycology 12: 239-248.

Guillard,R.L. 1973. Method for microflagellates and nanoplankton. In Stein, J.R. (ed) Handbook of Phycological Methods. Cambridge University Press. pp. 69-86.

Harvey, H.W. 1937. The supply of iron to diatoms. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 22:208-219.

Harvey, H.W. 1955. The Chemical and Fertility of Sea Waters. London: Cambridge University Press. 224 p.

Hasle, G.R. and Syvertsen, E. E. 1997. Marine diatoms. In Tomas, C. R. (ed) Identifying Marine Phytoplankton. San Diego: Academic Press. pp. 5-385.

Hellebust, J. A. 1970. The uptake and Utilization of organic substances by marine phytoplankters. In Hood, D. W. (ed) Symposium on Organic Matter in Natural Water. University of Alaska Publication. pp. 223-256.

Hellebust, J.A. 1976. Effect of salinity on photosynthesis and mannitol synthesis in the green flagellate Platymonas suecica. Canadian Journal of Botany 54: 1735-1741.

Hellebust, J.A. and Lewin,J. 1977. Heterotrophic nutrition. In Werner, D. (ed) The Biology of Diatoms. London : Blackwell Scienctific Publications. 498 p.

Hulburt, E. M. and Guillard, R. R. L. 1968. The relationship of the distribution of the diatom *Skeletonema tropicum* to temperature . Ecology 49: 337-339.

Hutner, S.H. and Provasoli, L. 1953. A pigment marine diatom requireing vitamin $B_{12}$ and Uracil. Journal of Phycology 18: 7-8.

JØrgensen, E. G. 1953. Silicate assimilation by diatoms. Physiologia Plantarum 6: 301-315.

Kitano, M., Matsukawa, R. and Karube, I. 1997. Changes in eicosapentaenoic acid content of *Navicula Saprophila, Rhodomonas salina* and *Nitzschia* sp. under mixotrophic condition. Journal of Applied Phycology 9: 559-563.

Kitano, M., Matsukawa, R. and Karube, I. 1998. Enhanced eicosapentaenoic acid production by *Navicula saprophila.* Journal of Applied phycology 10: 101-105.

Kochert, A.G. 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulphuric acid method. In Hellebust JA, and Craigie JS (eds), Handbook of Phycological method – Physiological and Biochemical Method. Cambridge : Cambridge University Press, pp. 95-97.

Kotzabasis, K., Hatziathanasiou, A., Bengoa, M.V., Kentouri, M. and Divanach. 1999. Methanol as alternative carbon source for quicker efficient production of the

microalgae *Chlorella minutissima* : Role of the concentration and frequence of administration. Journal of Biotechnology 70: 357-362.

Kubitschek, H.E. 1970. Introduction to research with continuous cultures. USA.: Prentice-Hall. 187 p.

Lange-Bertalot, H., Kulbst, K., Lauser, T., Norpel-Schempp, M. and Willmann, M. 1996. Iconographia Diatomologica Vol.3. Koelt Scientific Books. p. 38.

Lewin, J. C. 1966. Boron as a growth requirement of the diatom Cylindrotheca fusiformis. Journal of Experimental Botany 12: 160-163.

Lobban, C.S. and Harrison, P.J. 1994. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press. pp. 181-182.

Lowry, O. H., Rosebrought, N. J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagnt. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

McLachlan, J. 1973. Growth media-marine. In Stein, J.R. (ed) Handbook of Phycological methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University press. pp.25-54.

Ming-Shi, X., Chen, F., Yuan, J. and Chen, H. 1997. Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains. Journal of Applied phycology 9: 445-450.

Neilson, A. H. and Lewin, R. A. 1974. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. Phycologia 13: 227-264.

Ogbonna, J.C., Masui, H. and Tanaka, H. 1997. Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation – An efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. Journal of Applied phycology 9: 359-366.

Ogbonna, J.C., Masui, H. and Tanaka, H. 1999. Production of α-tocopherol by sequential heterotrophic-photoautotrophic cultivation of *Euglena gracilis*. Journal of Biotechnology 70: 213-221.

Qi-Hua, W., Mei, L., Shu-Hong, W., Ming-Lin, D., Juan, L. and Ai-Hua, C. 1998. Study on culture condition of benthic diatoms for feeding abalone. Chinese Journal of Oceanography and Limnology 16: 78-83.

Repeta, D.J. and Mantoura, R.F.C. 1997. Calibration method for HPLC. In Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. and Wright, S.W. (eds) Phytoplankton Pigments in Oceanography : Guielines to Modern Methods. France: UNESCO Publishing. pp. 407-429.

Richter, O. 1905. Uber Reinkuturen von Diatomeen und die Notwendigkeit von Kieselsaure fur die Diatomee Nitzschia palea (kutz) W. Sm. Verh. Ges.dt.Naurf.u. Arzte, 76. Versammlung zu Breslau. Verlag F. C. W. Vogel, Leipzig. 50-249

Scheerer, A. and Parthier, B. 1982. Dark induced chloroplast dedifferentiation in Euglena gracilis. Planta 156: 274-281.

Schiff, J.A. 1962. Sulfer. In Lewin, R.A. (ed) Physiology and Biochemistry of Algae . London: Academic Press. pp. 239-244.

Scopes, R.K. 1982. Protein Purification: Principles and Practice. New York: Springer-Verlag. pp. 240-266.

Simmons, K. 2001. Continuous Culture.http:// www.uwinnipeg.ca/~simmons/ysesp/iso7.htm

Smayda, T. J. 1969. The suspension and sinking of phytoplankton in the sea. Marine Biology 8: 353-414.

Soong, p. 1980 Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. In Shelef and Soeder, C. J. (eds) Algae Biomass. Amsterdam: Elsevier/ North Holland Press. pp. 97-113.

Stagman, G. 1940. Die Bedeutung der Spurenelemente fur *Chlorella* . Journal of Botany 35: 385-422.

Strickland, J.D.H. and Parson, T.R. 1972. A Practical handbook of water analysis. Otawa : Fishery Research Board of Canada. 310 p.

Suwanich, R.1996. Effect of highly unsaturated fatty acids and ratio of the eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid on growth and survival of black tiger prawn *Penaeus*

*monodon* postlarvae. Master Thesis. Inter-department of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University. pp. 2-24 .

Swift, E. 1967. Isolation, description, purification, nutrition, and physiology of unicellular algae from the tropical Atlantic Ocean. Ph.D. Thesis. The John Hopskins University. 144 p.

Syrett, P.J. 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. Plant Physiology 9: 19-27.

Tan, C.K. and Johns, M.R.,1991. Fatty acid production by heterotrophic *Chlorella saccharophila*. Hydrobiologia 215: 13-19.

Tan, C.K. and Johns, M.R.,1996. Screening diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production. Journal of Applied Phycology 8: 59-64.

Takeda, H. and Hirokawa, T. 1978. Studies on the cell wall of Chlorella I. Quantitative change in cell wall polysaccharides during the cell cycle of *Chlorella ellipsoidea*. Plant and Cell Physiology 19: 591-598.

Trainor, F.R. 1978. Introductory phycology. USA. : John Wiley and Sons. 525 p.

Vonshak, A. 1986.Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In Richmond, A. (ed) CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. Florida: CRC Press, Inc. pp. 117-118.

Walker, J. B. 1953. Inorganic micronutrient requirement of *Chlorella* . I. Requirements for cakcium (or strontium), copper and molybdenum. Archives of Biochemistry and Biophysic 46: 1-11.

Werner, D. 1966. Die Kieselsaure im Stoffwechsel von *Cyclotella cryptica* . Archiv Fuer Mikrobiologie 55: 278-308.

Werner, D. 1970. Productivity studies on diatom cultures. Helgolander wiss Meeresunters 20:97-103.

Warburg, O. 1948. Schwermetalle aks Wirkungsgruppen von Fermenten. Burlin: Springer. pp.170-184.

Wiessner, W. 1962. Inorganic micronutrients. In Lewin, R.A. (ed) Physiology and Biochemistry of Algae . London. Academic Press. pp. 239-244.

Yentsch, C.S. 1962. Marine plankton. In Lewin, R.A. (ed) Physiology and Biochemistry of algae . London: Academic Press. pp 788-793

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ก

**อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเหลว (NB)** (Bridson, 1995)

| | | |
|---|---|---|
| beef extract | 1.0 | กรัม |
| peptone | 5.0 | กรัม |
| yeast extract | 2.0 | กรัม |
| น้ำทะเล | 1 | ลิตร |

เติมส่วนผสมทั้งสามชนิด ใช้แท่งแก้วคนจนละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข.

**การเตรียม** antibiotic solution (Guillard, 1973)

ประกอบด้วยสารละลาย 2 ส่วน คือ

สารละลายส่วนที่ 1

| | | |
|---|---|---|
| เพนนิซิลิน จี | 100 | มิลลิกรัม |
| สเตรพโตมัยซิน | 50 | มิลลิกรัม |
| น้ำกลั่น | 10 | มิลลิลิตร |

สารละลายส่วนที่ 2

| | | |
|---|---|---|
| คลอแรมเฟนิคอล | 10 | มิลลิกรัม |
| 95% ethanol alcohol | 1 | มิลลิลิตร |

นำสารละลายส่วนที่ 1 ผสมกับสารละลายส่วนที่ 2 ได้เป็น antibiotic solution

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค.

**การคำนวณความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายจากวิธีการนับเซลล์** (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540)

จากสูตร

$$\text{ความหนาแน่นเซลล์สาหร่ายใน 1 มิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ } X10^4}{\text{จำนวนช่องของสไลด์นับเม็ดเลือดที่ใช้นับ}}$$

**ตัวอย่างการคำนวณ**

จากตัวอย่างสาหร่ายที่หยดลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด นับเซลล์ได้ทั้งหมด 180 เซลล์ จำนวนช่องที่ใช้นับ 9 ช่อง (1ช่อง มีขนาดเท่ากับ 1 ตารางมิลลิเมตร)

$$\text{ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายใน 1 มิลลิลิตร} = \frac{180}{9} \times 10^4$$

$$= 20 \times 10^4 \text{ เซลล์/มิลลิลิตร}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ง.

## การคำนวณอัตราการเติบโตของสาหร่าย

อัตราการเติบโตของสาหร่ายคำนวณได้จากกราฟการเติบโตในช่วงที่กราฟมีความชันสูง (exponential phase) โดยใช้สูตร (Vonshak, A.)

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$$

เมื่อ $\mu$ = อัตราการเติบโต

x = ความหนาแน่นของเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)

t = ระยะเวลา (วัน)

**การคำนวณระยะเวลาที่สาหร่ายใช้ในการแบ่งตัวเป็นสองเท่า** (Doubling time)
คำนวณโดยใช้สูตร (Vonshak, A.)

$$t_d = \ln 2 / \mu$$

$$= 0.693 / \mu$$

เมื่อ $t_d$ = ระยะเวลาที่สาหร่ายใช้ในการแบ่งตัวเป็นสองเท่า(วัน)

$\mu$ = อัตราการเติบโต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก จ.

**อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร T1** สูตรดัดแปลง (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540)

เติม stock solution 1 มล. ลงในน้ำทะเล 1 ลิตร ยกเว้น stock solution ที่ 7 เติม 2 มล.

| Stock solution | | |
|---|---|---|
| 1.Tris-HCl buffer (pH 8.0) | 5 | M |
| 2.$NaNO_3$ | 1 | M |
| 3.$NaH_2PO_4$ | 100 | mM |
| 4.Fe-EDTA | 5 | mM |
| * 5.Vitamin Mix I | | |
| ** 6.Trace metal solution | | |
| ***7. $Na_2SiO_3.9H_2O$ | 16.50 | g/l |

| * Vitamin Mix I (pH 4.0) | | |
|---|---|---|
| 1.Thiamine HCl | 200 | mg/l |
| 2.Biotin | 1 | mg/l |
| 3.Cyanocobalamine (B 12) | 1 | mg/l |

| **Trace metal solution ประกอบด้วย | | |
|---|---|---|
| 1.$ZnSO_4$ | 1 | mM |
| 2.$MnCl_2$ | 10 | mM |
| 3.$Na_2MoO_4$ | 0.5 | mM |
| 4.$CoCl_2$ | 0.2 | mM |
| 5.$CuSO_4$ | 0.01 | mM |
| 6.EDTA (as $Na_2$ salt) | 24 | mM |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร T1 เลี้ยงสาหร่ายจำพวกไดอะตอม จึงดัดแปลงสูตรอาหาร โดยเติมซิลิเกตลงไปในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร T1

***$Na_2SiO_3.9H_2O$ 16.50 g/l

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2SiO_3.9H_2O$ | 16.50 | กรัม |

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

เมื่อผสม Stock solution กับน้ำทะเลแล้ว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ฉ.

**อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร** (Guillard Medium) **หรือ** F/2 (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540)

ประกอบด้วยสารละลาย 3 ส่วนคือ

<u>สารละลายส่วนที่ 1</u>

| | | |
|---|---|---|
| $NaNO_3$ | 42.074 | กรัม |
| $Na_2HPO_4.H_2O$ | 3.0 | กรัม |
| $FeCl_3$ | 1.45 | กรัม |
| $Na_2EDTA$ | 5.0 | กรัม |
| Vitamin B1 | 0.2 | กรัม |
| Vitamin B12 | 0.001 | กรัม |
| Biotin | 0.005 | กรัม |

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

<u>สารละลายส่วนที่ 2</u>

| | | |
|---|---|---|
| $CuSO_4.H_2O$ | 1.96 | กรัม |
| $ZnSO_4$ | 4.40 | กรัม |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 1.26 | กรัม |
| [หรือใช้ $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ แทน โดยใช้น้ำหนัก 6.43 กรัม] | | |
| $MnCl_2.4H_2O$ | 36.0 | กรัม |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 2.0 | กรัม |

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

<u>สารละลายส่วนที่ 3</u>

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2SiO_3.9H_2O$ | 16.50 | กรัม |

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

เตรียมอาหารโดยนำสารละลายส่วนที่ 1 และ 3 มาอย่างละ 2 มิลลิลิตร และสารละลายส่วนที่ 3 มา 1 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำทะเลที่กรองแล้ว 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ช.

**การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน** Lowry (1951) อ้างโดย Scope (1982)

เตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์

**สารละลายที่** 1

| | | |
|---|---|---|
| $CuSO_4$ 5 $H_2O$ | 0.5 | กรัม |
| $Na_3C_6H_5O_7$ 2 $H_2O$ | 1.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

**สารละลายที่** 2

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2CO_3$ | 20 | กรัม |
| NaOH | 4.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

**สารละลายที่** 3

| | | |
|---|---|---|
| สารละลายที่ 1 | 1 | มิลลิลิตร |
| สารละลายที่ 2 | 50 | มิลลิลิตร |

**สารละลายที่** 4

| | | |
|---|---|---|
| Folin-Ciocalten phenol reagent | 10 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 10 | มิลลิลิตร |

**วิธีการวิเคราะห์**

1. นำสาหร่าย 1.5 มิลลิลิตร มาปั่นแยกตะกอน ทิ้งส่วนใส
2. นำตะกอนที่ได้ เติม 10% SDS 50 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง
3. เติมสารละลายที่ 3 2.5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที
4. เติมสารละลายที่ 4 2.5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20-30 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน เตรียมจาก Bovin Serum Albumin 15 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ซ.

**การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน** (Bligh and Dyer 1959 อ้างโดย Chu *et al.*, (1996)

เตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์

**สารละลายที่** 1

| | | |
|---|---|---|
| Ammonium formate | 40.95 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

**สารละลายที่** 2

methanol: chloroform: double deionised water (2: 1: 0.8 v/v/v)

**วิธีการวิเคราะห์**

1. กรองสาหร่ายปริมาร 100 มิลลิลิตร ขณะกรองเติมสารละลายที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
2. นำกระดาษกรองมาบด ขณะบดเติมสารละลายที่ 2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
3. กรองเอากระดาษกรองทิ้งไป แล้วเติมสารละลายที่ 2 ปริมตร 0.7 มิลลิลิตร
4. เติม chloroform 1.5 มิลลิลิตร และ double deionised water 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
5. เมื่อเกิดการแยกชั้นใช้หลอดหยดดูดส่วนที่เป็นสีเขียวซึ่งอยู่ชั้นล่าง มาใส่ในขวดแก้วขนาดเล็กซึ่งอบและชั่งน้ำหนักแล้ว
6. นำไปเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน เมื่อใกล้จะแห้งหยด toluene 2-3 หยด เป่าต่อไปจนแห้ง จากนั้นน้ำวางใน desiccator ที่มี KOH 1 คืน จากนั้นน้ำขวดแก้วมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือน้ำหนักไขมันที่สกัดได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ฌ.

**การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต** Kochert (1978)

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

**สารละลายที่** 1

| | | |
|---|---|---|
| Ammonium formate | 40.95 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

**สารละลายที่** 2

| | | |
|---|---|---|
| $H_2SO_4$ | 56 | มิลลิลิตร |
| ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ | 1.0 | ลิตร |

**สารละลายที่** 3

| | | |
|---|---|---|
| phenol | 5.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

วิธีการวิเคราะห์

1. นำสาหร่ายปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นแยกตะกอนทิ้งส่วนใส เติมสารละลายที่ 1 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกตะกอนอีกครั้ง ทิ้งส่วนใส
2. นำตะกอนที่ได้มาเติม 1M $H_2SO_4$ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวางใน water bath 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
3. วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นแยกตะกอน ดูดส่วนใสมา 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร
4. เติม Phenol 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม $H_2SO_4$ เข้มข้น 5 มิลลิลิตร ทันที วางที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของคาร์โบไฮเดรต

## ภาคผนวก ญ.

**การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง** Takeda and Hirokawa (1978)

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

**สารละลายที่ 1**

Perchloric acid 65 %

**สารละลายที่ 2**

Iodine 0.01 % (w/v)

**สารละลายที่ 3**

| | | |
|---|---|---|
| KI | 4.98 | กรัม |
| สารละลายที่ 2 | 1 | ลิตร |

**วิธีการวิเคราะห์**

1. นำสาหร่ายปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นแยกตะกอนทิ้งส่วนใส
2. เติมสารละลายที่ 1 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร วางใน water bath 45 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที
3. นำไปปั่นแยกตะกอน ดูดส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของปริมาณแป้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ฏ.

**การวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง** Chu *et al.*, (1996)

1. อบกระดาษกรอง GF/C วางให้เย็นใน desiccator นำไปชั่งน้ำหนัก
2. นำกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักไปกรองสาหร่ายปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3. นำกระดาษกรองไปอบที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง
4. นำกระดาษกรองที่อบแล้วไปชั่งน้ำหนัก น้ำหนักกระดาษกรองที่เพิ่มขึ้นคือน้ำหนักแห้งของสาหร่าย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ฏ.

**การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ** ดัดแปลงจาก Strickland and Parson (1972)

**เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์**

| | | |
|---|---|---|
| $MgCO_3$ | 1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

**วิธีการวิเคราะห์**

1.นำสาหร่าย 50 มิลลิลิตร เติม $MgCO_3$ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง GF/C

2.พับกระดาษกรองใส่ลงในหลอดทดลอง เติม methanol 8 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นนาน 20 ชั่วโมง

3.วางในที่มืดให้อุณหภูมิสูงเท่าอุณหภูมิห้อง เติม methanol 2 มิลลิลิตร กรองเอากระดาษออก

4.วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750, 665, 645, 630 และ 480 นาโนเมตร

สมการในการคำนวณ

Chlorophyll a $= 11.6\ E_{665} - 1.31\ E_{645} - 0.14\ E_{630}$

Chlorophyll b $= 20.7\ E_{645} - 4.34\ E_{665} - 4.42\ E_{630}$

Chlorophyll c $= 55\ E_{630} - 4.64\ E_{665} - 16.3\ E_{645}$

Plant carotenoid $= 10\ E_{480}$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางผนวกที่** 1 การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมอินทรีย์ หรือ อนินทรีย์คาร์บอนในรูปต่างๆ ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง โดยเติมแหล่งคาร์บอนทุกชนิดในความเข้มข้นที่เท่าคือ 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร)

| ความหนาแน่นเซลล์ (x $10^4$) เซลล์/มิลลิลิตร | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| วัน | FL | S.D. | FD | S.D. | GL | S.D | GD | S.D. | CL | S.D. | CD | S.D. | AL | S.D. | AD | S.D. |
| 0 | 0.20 | 0.13 | 0.17 | 0.10 | 0.16 | 0.14 | 0.18 | 0.11 | 0.16 | 0.12 | 0.20 | 0.12 | 0.21 | 0.12 | 0.18 | 0.08 |
| 1 | 0.62 | 0.12 | 0.49 | 0.08 | 0.55 | 0.09 | 0.37 | 0.08 | 0.69 | 0.08 | 0.54 | 0.08 | 1.23 | 0.07 | 0.60 | 0.10 |
| 2 | 0.96 | 0.09 | 0.60 | 0.08 | 0.78 | 0.08 | 0.52 | 0.08 | 0.95 | 0.06 | 0.88 | 0.09 | 1.46 | 0.10 | 0.71 | 0.12 |
| 3 | 1.85 | 0.09 | 0.26 | 0.07 | 0.77 | 0.07 | 0.66 | 0.05 | 1.43 | 0.07 | 1.19 | 0.05 | 3.40 | 0.16 | 1.25 | 0.13 |
| 4 | 2.41 | 0.24 | 0.09 | 0.07 | 0.78 | 0.08 | 0.69 | 0.06 | 3.25 | 0.21 | 2.45 | 0.14 | 13.13 | 0.51 | 3.35 | 0.16 |
| 5 | 4.69 | 0.25 | 0.00 | 0.00 | 0.88 | 0.07 | 0.73 | 0.05 | 4.72 | 0.26 | 3.81 | 0.22 | 19.37 | 0.83 | 4.28 | 0.28 |
| 6 | 7.00 | 1.11 | 0.00 | 0.00 | 1.29 | 0.21 | 1.48 | 0.34 | 8.66 | 0.95 | 6.20 | 0.62 | 31.56 | 2.30 | 5.77 | 0.45 |
| 7 | 8.13 | 0.93 | | | 5.81 | 0.41 | 3.71 | 0.32 | 6.51 | 0.66 | 2.48 | 0.20 | 39.06 | 5.36 | 6.29 | 0.39 |
| 7 | 0.37 | 0.14 | | | 0.37 | 0.10 | 0.36 | 0.14 | 0.35 | 0.11 | 0.31 | 0.09 | 0.37 | 0.09 | 0.33 | 0.10 |
| 8 | 0.58 | 0.07 | | | 0.61 | 0.11 | 0.38 | 0.07 | 0.64 | 0.06 | 0.47 | 0.06 | 1.18 | 0.15 | 0.55 | 0.07 |
| 9 | 0.96 | 0.08 | | | 0.78 | 0.09 | 0.53 | 0.08 | 0.98 | 0.15 | 0.88 | 0.10 | 1.33 | 0.13 | 0.67 | 0.09 |
| 10 | 1.72 | 0.12 | | | 0.77 | 0.09 | 0.65 | 0.08 | 1.43 | 0.07 | 1.21 | 0.12 | 3.39 | 0.15 | 1.21 | 0.14 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)** การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมอินทรีย์ หรือ อนินทรีย์คาร์บอนในรูปต่างๆ ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง โดยเติมแหล่งคาร์บอนทุกชนิดในความเข้มข้นที่เท่าคือ 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร)

| ความหนาแน่นเซลล์ (x $10^4$) เซลล์/มิลลิลิตร | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| วัน | FL | S.D. | FD | S.D. | GL | S.D | GD | S.D. | CL | S.D. | CD | S.D. | AL | S.D. | AD | S.D. |
| 11 | 2.39 | 0.21 | | | 0.73 | 0.07 | 0.69 | 0.06 | 3.21 | 0.16 | 1.41 | 0.15 | 12.96 | 0.28 | 3.39 | 0.14 |
| 12 | 4.77 | 0.22 | | | 2.55 | 0.29 | 1.74 | 0.13 | 2.53 | 0.14 | 0.92 | 0.12 | 23.78 | 1.62 | 4.71 | 0.33 |
| 13 | 5.63 | 0.29 | | | 3.55 | 0.39 | 2.37 | 0.15 | 7.06 | 0.22 | 0.65 | 0.09 | 27.26 | 2.09 | 5.78 | 0.22 |
| 14 | 9.06 | 0.27 | | | 15.67 | 1.12 | 9.01 | 0.28 | 9.77 | 0.38 | 0.47 | 0.11 | 39.94 | 2.40 | 7.60 | 0.51 |
| 14 | 0.29 | 0.07 | | | 0.29 | 0.08 | 0.28 | 0.06 | 0.33 | 0.10 | 0.00 | 0.00 | 0.27 | 0.10 | 0.31 | 0.10 |
| 15 | 0.50 | 0.08 | | | 0.64 | 0.07 | 0.33 | 0.07 | 0.59 | 0.09 | 0.00 | 0.00 | 1.07 | 0.07 | 0.51 | 0.08 |
| 16 | 0.93 | 0.09 | | | 0.73 | 0.11 | 0.54 | 0.07 | 0.94 | 0.10 | | | 1.26 | 0.13 | 0.63 | 0.10 |
| 17 | 1.56 | 0.12 | | | 0.78 | 0.09 | 0.63 | 0.07 | 1.39 | 0.11 | | | 3.27 | 0.15 | 1.13 | 0.10 |
| 18 | 2.34 | 0.15 | | | 1.43 | 0.11 | 0.65 | 0.09 | 3.17 | 0.15 | | | 12.81 | 0.18 | 3.74 | 0.24 |
| 19 | 3.93 | 0.12 | | | 2.26 | 0.18 | 1.47 | 0.15 | 3.46 | 0.20 | | | 19.56 | 1.13 | 4.26 | 0.19 |
| 20 | 4.12 | 0.39 | | | 2.81 | 0.39 | 1.71 | 0.20 | 4.58 | 0.41 | | | 20.82 | 0.58 | 3.08 | 0.29 |
| 21 | 7.95 | 0.10 | | | 3.46 | 0.29 | 2.20 | 0.16 | 5.62 | 0.26 | | | 25.46 | 1.42 | 2.34 | 0.19 |
| 22 | 13.42 | 0.36 | | | 7.23 | 0.65 | 1.27 | 0.19 | 8.58 | 0.36 | | | 56.78 | 3.15 | 3.45 | 0.24 |
| 23 | 33.56 | 2.07 | | | 14.89 | 0.93 | 6.24 | 0.54 | 15.33 | 0.50 | | | 87.17 | 5.60 | 6.96 | 0.47 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)** การเติบโตของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมอินทรีย์ หรือ อนินทรีย์คาร์บอนในรูปต่างๆ ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง โดยเติมแหล่งคาร์บอนทุกชนิดในความเข้มข้นที่เท่าคือ 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร)

| ความหนาแน่นเซลล์ (x $10^4$) เซลล์/มิลลิลิตร | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| วัน | FL | S.D. | FD | S.D. | GL | S.D | GD | S.D. | CL | S.D. | CD | S.D. | AL | S.D. | AD | S.D. |
| 24 | 57.72 | 4.63 | | | 7.56 | 0.98 | 4.49 | 0.52 | 9.02 | 0.48 | | | 126.67 | 13.86 | 12.44 | 0.68 |
| 25 | 35.28 | 3.24 | | | 5.75 | 0.45 | 3.44 | 0.43 | 13.35 | 0.71 | | | 86.89 | 4.64 | 6.89 | 0.83 |
| 26 | 13.47 | 1.25 | | | 1.88 | 0.27 | 1.02 | 0.17 | 5.70 | 0.49 | | | 52.06 | 4.41 | 2.92 | 0.45 |

หมายเหตุ

FL คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ปรกติในที่มีแสง

FD คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ปรกติในที่ไม่มีแสง,

GL คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคสในที่มีแสง

GD คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคสในที่ไม่มีแสง

CL คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมไบคาร์บอเนตในที่มีแสง

CD คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมไบคาร์บอเนตในที่ไม่มีแสง

AL คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกในที่มีแสง

AD คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกในที่ไม่มีแสง

S.D. ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางผนวกที่** 2 ความหนาแน่นเซลล์ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคสและกรดแอซิติก ใน 2 ระดับความเข้มข้น คือ 4 และ 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง

| ความหนาแน่นเซลล์ (x $10^4$) เซลล์/มิลลิลิตร | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| วัน | FL | S.D. | G4L | S.D. | G4D | S.D. | G20L | S.D. | G20D | S.D. | A4L | S.D. | A4D | S.D. | A20L | S.D. | A20D | S.D. |
| 0 | 0.16 | 0.09 | 0.18 | 0.12 | 0.16 | 0.09 | 0.12 | 0.08 | 0.20 | 0.13 | 0.16 | 0.06 | 0.16 | 0.05 | 0.22 | 0.08 | 0.17 | 0.05 |
| 1 | 0.64 | 0.12 | 0.71 | 0.16 | 0.40 | 0.15 | 0.45 | 0.16 | 0.36 | 0.12 | 0.72 | 0.12 | 0.51 | 0.15 | 1.10 | 0.07 | 0.56 | 0.05 |
| 2 | 1.22 | 0.12 | 1.50 | 0.24 | 0.67 | 0.20 | 1.18 | 0.23 | 0.73 | 0.17 | 0.72 | 0.16 | 0.55 | 0.12 | 1.70 | 0.11 | 0.87 | 0.09 |
| 3 | 2.83 | 0.23 | 2.38 | 0.33 | 1.24 | 0.25 | 2.09 | 0.18 | 1.48 | 0.21 | 2.27 | 0.32 | 1.10 | 0.16 | 2.14 | 0.27 | 1.17 | 0.14 |
| 4 | 4.03 | 0.12 | 3.53 | 0.31 | 1.52 | 0.43 | 2.11 | 0.25 | 1.54 | 0.48 | 4.27 | 0.45 | 1.56 | 0.08 | 3.37 | 0.34 | 1.65 | 0.23 |
| 5 | 6.04 | 0.50 | 4.73 | 0.53 | 2.07 | 0.47 | 2.99 | 0.23 | 2.05 | 0.08 | 6.69 | 1.25 | 2.58 | 0.25 | 4.61 | 0.40 | 2.18 | 0.40 |
| 6 | 6.97 | 0.30 | 6.16 | 0.22 | 2.06 | 0.25 | 3.32 | 0.40 | 2.18 | 0.14 | 8.23 | 0.23 | 2.89 | 0.38 | 4.95 | 0.54 | 2.90 | 0.38 |
| 7 | 7.61 | 0.83 | 5.86 | 0.67 | 1.88 | 0.27 | 3.34 | 0.70 | 2.14 | 0.34 | 9.01 | 0.14 | 2.97 | 0.11 | 6.80 | 0.21 | 3.56 | 0.54 |
| 8 | 13.85 | 1.17 | 5.39 | 0.49 | 1.86 | 0.29 | 3.12 | 0.38 | 2.24 | 0.52 | 10.67 | 1.08 | 3.38 | 0.43 | 5.37 | 0.90 | 4.33 | 0.64 |
| 9 | 34.61 | 2.50 | 4.02 | 0.77 | 2.52 | 0.65 | 2.42 | 0.57 | 1.59 | 0.37 | 13.11 | 1.94 | 4.17 | 0.58 | 5.66 | 0.78 | 5.23 | 0.99 |
| 10 | 57.72 | 3.24 | 5.32 | 0.47 | 2.85 | 0.61 | 2.21 | 0.43 | 1.53 | 0.48 | 14.85 | 0.69 | 4.53 | 1.08 | 5.67 | 0.88 | 4.53 | 1.39 |
| 11 | 61.50 | 3.89 | 5.27 | 0.80 | 3.15 | 0.14 | 1.92 | 0.16 | 0.92 | 0.14 | 17.19 | 1.24 | 5.79 | 1.09 | 4.92 | 0.66 | 3.64 | 0.79 |
| 12 | 48.83 | 3.60 | 4.39 | 0.79 | 2.47 | 0.68 | 1.48 | 0.32 | 0.61 | 0.16 | 18.11 | 1.29 | 4.35 | 0.78 | 4.24 | 0.62 | 2.77 | 0.71 |
| 13 | 34.06 | 2.97 | 3.72 | 0.68 | 1.55 | 0.51 | 0.97 | 0.24 | 0.48 | 0.26 | 22.74 | 1.82 | 4.56 | 0.65 | 2.99 | 0.59 | 1.32 | 0.57 |

**ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)** ความหนาแน่นเซลล์ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคสและกรดแอซิติกใน 2 ระดับความเข้มข้น คือ 4 และ 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสง

| ความหนาแน่นเซลล์ (x $10^4$) เซลล์/มิลลิลิตร | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| วัน | FL | S.D. | G4L | S.D. | G4D | S.D. | G20L | S.D. | G20D | S.D. | A4L | S.D. | A4D | S.D. | A20L | S.D. | A20D | S.D. |
| 14 | 34.00 | 3.15 | 3.95 | 0.77 | 2.82 | 0.39 | 1.21 | 0.49 | 0.55 | 0.24 | 25.35 | 1.67 | 3.75 | 0.47 | 3.36 | 0.68 | 1.38 | 0.35 |
| 15 | 36.12 | 4.29 | 3.30 | 0.96 | 2.25 | 0.57 | 0.84 | 0.40 | 0.45 | 0.19 | 23.40 | 3.31 | 3.51 | 0.75 | 4.83 | 1.06 | 3.17 | 0.64 |
| 16 | 36.11 | 2.75 | 3.02 | 0.63 | 2.00 | 0.61 | 0.66 | 0.27 | 0.38 | 0.21 | 17.33 | 1.06 | 2.75 | 0.56 | 3.89 | 0.85 | 2.60 | 0.82 |
| 17 | 31.33 | 2.92 | 2.20 | 0.69 | 1.18 | 0.55 | 0.46 | 0.15 | 0.24 | 0.19 | 15.09 | 2.13 | 1.72 | 0.42 | 2.72 | 0.60 | 1.82 | 0.64 |
| 18 | 29.33 | 2.59 | 1.82 | 0.44 | 1.33 | 0.36 | 0.24 | 0.19 | 0.22 | 0.17 | 14.95 | 1.48 | 1.06 | 0.40 | 2.01 | 0.39 | 1.30 | 0.49 |
| 19 | 27.92 | 2.33 | 1.69 | 0.44 | 1.25 | 0.41 | 0.13 | 0.16 | 0.08 | 0.08 | 14.33 | 1.91 | 0.93 | 0.37 | 1.70 | 0.53 | 0.95 | 0.23 |
| 20 | 23.10 | 1.59 | 1.34 | 0.33 | 0.83 | 0.31 | 0.09 | 0.09 | 0.04 | 0.06 | 10.86 | 1.27 | 0.43 | 0.18 | 0.95 | 0.34 | 0.48 | 0.23 |
| 21 | 17.80 | 1.06 | 1.02 | 0.32 | 0.38 | 0.19 | 0.02 | 0.05 | 0.00 | 0.00 | 10.86 | 1.39 | 0.45 | 0.23 | 0.94 | 0.22 | 0.13 | 0.09 |

**หมายเหตุ**

FL คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ปรกติในที่มีแสง

G4L คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่มีแสง

G4D คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่มีไม่แสง

G20L คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่มีแสง

G20D คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่มีไม่แสง

A4L คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่มีแสง

A4D คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่ไม่มีแสง

A20L คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่มีแสง

A20D คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก 20 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในที่ไม่มีแสง

S.D. ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางผนวกที่** 3 ความหนาแน่นเซลล์ของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคส กรดแอซิติก กลูโคสผสมกับ NB และ กรดแอซิติกผสมกับ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด

| ความหนาแน่นเซลล์ (x $10^4$) เซลล์/มิลลิลิตร | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| วัน | FA | S.D. | FG | S.D. | FAN | S.D. | FGN | S.D. |
| 0 | 0.67 | 0.12 | 0.67 | 0.24 | 0.74 | 0.23 | 0.75 | 0.2 |
| 1 | 1.16 | 0.3 | 1.76 | 0.48 | 2.11 | 0.55 | 2.02 | 0.44 |
| 2 | 1.5 | 0.46 | 2.2 | 0.56 | 2.27 | 0.31 | 4.82 | 0.76 |
| 3 | 1.98 | 0.23 | 3.06 | 0.16 | 2.58 | 0.17 | 5.19 | 0.61 |
| 4 | 2.16 | 0.59 | 5.05 | 0.27 | 3.71 | 0.25 | 8.58 | 1.66 |
| 5 | 2.38 | 0.44 | 7.11 | 0.84 | 4.25 | 1.01 | 13.3 | 1.15 |
| 6 | 3.86 | 1.23 | 10.1 | 2.14 | 5.25 | 1.68 | 17.1 | 2.44 |
| 7 | 4.53 | 1.24 | 12.1 | 1.85 | 8.15 | 2.22 | 20.3 | 3.26 |
| 8 | 4.7 | 1.29 | 13.2 | 2.43 | 11.7 | 1.71 | 25.4 | 3.43 |
| 9 | 5.29 | 1.88 | 16.2 | 2.9 | 12.5 | 2.85 | 30.3 | 3.9 |
| 10 | 5.08 | 1.81 | 22.6 | 4.25 | 14.8 | 2.92 | 36.9 | 5.69 |
| 11 | 4.56 | 0.32 | 28.8 | 0.57 | 16.8 | 0.62 | 38.6 | 4.8 |
| 12 | 4.06 | 1.53 | 31.2 | 4.82 | 20.4 | 5.21 | 44.9 | 5.68 |
| 13 | 2.87 | 1.13 | 29.8 | 5.31 | 16 | 3.73 | 37.4 | 4.61 |
| 13 | 0.73 | 0.2 | 0.75 | 0.3 | 0.7 | 0.24 | 0.74 | 0.23 |
| 14 | 1.09 | 0.31 | 1.36 | 0.28 | 1.51 | 0.3 | 2.65 | 0.59 |
| 15 | 1.55 | 0.61 | 1.85 | 0.68 | 1.75 | 0.78 | 4.95 | 0.86 |
| 16 | 1.93 | 0.61 | 2.22 | 0.68 | 2.32 | 0.69 | 7.02 | 1.76 |
| 17 | 2.45 | 0.79 | 2.5 | 0.63 | 2.46 | 0.58 | 11.5 | 2.74 |
| 19 | 3.19 | 0.16 | 3.43 | 0.15 | 2.94 | 0.16 | 18.8 | 3.75 |
| 20 | 3.6 | 0.87 | 3.82 | 1.41 | 3.22 | 1.28 | 26.5 | 4.05 |
| 21 | 7.31 | 3.21 | 7.47 | 2.33 | 7.56 | 3.13 | 50.9 | 6.94 |
| 21 | 0.66 | 0.26 | 0.71 | 0.11 | 0.73 | 0.12 | 0.76 | 0.09 |

**ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)** ความหนาแน่นเซลล์ของ *A. delicatissima* ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคส กรดแอซิติก กลูโคสผสมกับ NB และกรดแอซิติกผสมกับ NB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด

| ความหนาแน่นเซลล์ (x $10^4$) เซลล์/มิลลิลิตร | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| วัน | FA | S.D. | FG | S.D. | FAN | S.D. | FGN | S.D. |
| 22 | 1.05 | 0.32 | 1.7 | 0.51 | 1.46 | 0.45 | 1.95 | 0.4 |
| 23 | 1.38 | 0.61 | 2.18 | 0.57 | 1.95 | 1.08 | 4.24 | 1.52 |
| 24 | 1.86 | 0.98 | 2.83 | 0.65 | 2.55 | 1.09 | 4.91 | 0.95 |
| 25 | 2.2 | 0.7 | 4.29 | 1.39 | 3.24 | 1.35 | 7.32 | 2.44 |
| 26 | 2.67 | 1.02 | 7.16 | 2 | 4.65 | 1.24 | 12.2 | 2.7 |
| 27 | 3.26 | 1.24 | 9.44 | 1.49 | 5.56 | 3.08 | 16.4 | 3.11 |
| 28 | 4.32 | 0.14 | 12.6 | 0.24 | 7.74 | 0.19 | 19.2 | 3.78 |
| 29 | 4.7 | 1.29 | 13.2 | 2.43 | 11.7 | 1.71 | 25.4 | 3.43 |
| 30 | 5.29 | 1.88 | 16.2 | 2.9 | 12.5 | 2.85 | 30.3 | 3.9 |
| 31 | 5.08 | 1.81 | 22.6 | 4.25 | 14.8 | 2.92 | 36.9 | 5.69 |
| 32 | 4.56 | 0.32 | 28.8 | 0.57 | 16.8 | 0.62 | 38.6 | 4.8 |
| 33 | 6.49 | 1.76 | 30.4 | 2.44 | 20.6 | 2.45 | 43 | 2.98 |
| 34 | 6.19 | 1.51 | 34.2 | 2.69 | 21.2 | 2.38 | 51.1 | 3.12 |
| 35 | 6.12 | 1.5 | 33.8 | 2.59 | 22.4 | 2.9 | 52.1 | 2.48 |
| 36 | 5.31 | 1.21 | 32.9 | 2.24 | 21.5 | 2.35 | 52.3 | 1.65 |
| 37 | 4.16 | 1.09 | 29.7 | 3.24 | 20 | 1.99 | 50.4 | 3.18 |
| 38 | 3.89 | 0.64 | 27.2 | 2.75 | 18.7 | 1.89 | 49.7 | 4.01 |

หมายเหตุ FA คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร

FG คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส1 กรัมคาร์บอน/ลิตร

FAN คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติก 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับ NB

FGN คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับ NB

S.D. ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**ตารางผนวกที่ 4** ความหนาแน่นเซลล์ *A. delicatissima*ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคสผสมกับNB ในความเข้มข้นต่างๆ ของกลูโคส ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด

| ความหนาแน่นเซลล์ (x $10^4$) เซลล์/มิลลิลิตร | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| วัน | G1 | S.D. | G4 | S.D. | G8 | S.D. | G12 | S.D. | G16 | S.D. |
| 0 | 0.55 | 0.16 | 0.72 | 0.16 | 0.69 | 0.17 | 0.69 | 0.20 | 0.71 | 0.23 |
| 1 | 1.08 | 0.18 | 1.18 | 0.18 | 2.26 | 0.24 | 2.16 | 0.56 | 2.52 | 0.32 |
| 2 | 1.62 | 0.63 | 1.90 | 0.52 | 3.28 | 0.48 | 3.24 | 0.83 | 3.61 | 0.65 |
| 3 | 2.09 | 0.63 | 3.17 | 0.54 | 3.32 | 0.78 | 5.45 | 1.11 | 6.70 | 1.33 |
| 4 | 8.52 | 1.99 | 10.50 | 2.20 | 13.09 | 1.71 | 11.89 | 1.95 | 11.06 | 2.82 |
| 5 | 18.06 | 2.76 | 23.21 | 4.16 | 26.43 | 3.27 | 29.53 | 3.30 | 20.34 | 2.73 |
| 6 | 27.51 | 1.83 | 38.30 | 2.10 | 40.53 | 1.90 | 41.59 | 3.47 | 39.47 | 3.62 |
| 7 | 39.16 | 2.69 | 70.67 | 6.36 | 58.56 | 4.88 | 57.89 | 6.05 | 56.61 | 3.15 |
| 7 | 0.72 | 0.16 | 0.74 | 0.17 | 0.73 | 0.13 | 0.74 | 0.16 | 0.80 | 0.15 |
| 8 | 1.02 | 0.09 | 1.29 | 0.18 | 2.27 | 0.20 | 2.17 | 0.21 | 2.18 | 0.64 |
| 9 | 1.76 | 0.55 | 2.43 | 0.46 | 2.73 | 0.67 | 2.72 | 0.54 | 2.43 | 0.72 |
| 10 | 3.37 | 0.94 | 5.21 | 0.31 | 3.16 | 0.76 | 3.90 | 0.98 | 2.92 | 0.59 |
| 11 | 6.97 | 0.72 | 8.61 | 1.65 | 10.90 | 2.83 | 10.90 | 2.25 | 10.20 | 1.51 |
| 12 | 13.38 | 1.07 | 17.59 | 1.16 | 24.63 | 0.92 | 22.58 | 0.59 | 19.14 | 1.46 |
| 13 | 21.19 | 1.48 | 33.01 | 2.39 | 31.53 | 2.32 | 28.78 | 2.27 | 27.97 | 4.17 |
| 14 | 32.97 | 3.66 | 63.72 | 4.29 | 51.93 | 3.23 | 47.93 | 3.21 | 47.08 | 7.05 |
| 14 | 0.68 | 0.18 | 0.66 | 0.16 | 0.75 | 0.17 | 0.71 | 0.18 | 0.69 | 0.18 |
| 15 | 1.05 | 0.24 | 2.30 | 0.19 | 1.18 | 0.18 | 1.78 | 0.34 | 1.29 | 0.23 |
| 16 | 2.96 | 0.30 | 5.53 | 0.42 | 2.40 | 0.55 | 2.99 | 0.52 | 2.10 | 0.50 |
| 17 | 7.22 | 1.42 | 12.43 | 2.69 | 4.90 | 1.87 | 6.07 | 1.07 | 3.54 | 1.13 |
| 18 | 9.22 | 1.57 | 17.32 | 2.00 | 12.82 | 1.87 | 8.59 | 2.35 | 5.79 | 1.16 |
| 19 | 14.72 | 2.79 | 27.11 | 3.56 | 24.22 | 2.38 | 14.58 | 2.46 | 8.45 | 2.61 |
| 20 | 23.24 | 2.09 | 35.94 | 2.51 | 31.64 | 2.03 | 21.54 | 1.99 | 16.07 | 3.10 |
| 21 | 30.26 | 2.19 | 46.28 | 3.48 | 42.54 | 4.98 | 29.45 | 5.11 | 28.79 | 3.52 |

**ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)** ความหนาแน่นเซลล์ *A. delicatissima*ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคสผสมกับNB ในความเข้มข้นต่างๆ ของกลูโคส ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด

| ความหนาแน่นเซลล์ (x $10^4$) เซลล์/มิลลิลิตร | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| วัน | G1 | S.D. | G4 | S.D. | G8 | S.D. | G12 | S.D. | G16 | S.D. |
| 22 | 40.48 | 2.86 | 60.06 | 3.14 | 45.32 | 3.89 | 37.89 | 2.18 | 40.75 | 2.49 |
| 23 | 53.21 | 4.16 | 69.22 | 4.06 | 58.95 | 1.74 | 46.93 | 2.81 | 51.73 | 1.72 |
| 24 | 61.55 | 3.54 | 74.28 | 3.37 | 60.00 | 2.59 | 53.68 | 4.10 | 50.02 | 2.48 |
| 25 | 58.70 | 4.22 | 69.85 | 1.73 | 60.95 | 3.83 | 53.54 | 4.52 | 54.71 | 4.79 |
| 26 | 59.89 | 3.22 | 68.91 | 6.82 | 61.96 | 4.24 | 55.01 | 4.23 | 54.99 | 4.84 |
| 27 | 59.16 | 5.12 | 68.69 | 5.31 | 62.90 | 6.46 | 53.55 | 3.80 | 54.55 | 3.83 |
| 28 | 52.81 | 4.92 | 64.90 | 3.97 | 54.14 | 2.48 | 48.69 | 1.74 | 45.34 | 4.69 |
| 29 | 41.57 | 4.35 | 45.64 | 5.23 | 40.90 | 2.51 | 33.38 | 4.27 | 33.29 | 4.54 |
| 30 | 32.35 | 3.68 | 30.74 | 2.69 | 31.66 | 2.92 | 28.18 | 3.68 | 24.48 | 3.23 |

หมายเหตุ

G1 – G16 คือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่มีการเติม NB ผสมกับ กลูโคส 1 – 16 กรัมคาร์บอน/ลิตร ตามลำดับ

S.D. คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางผนวกที่** 5 ความหนาแน่นเซลล์ของ *A. delicatissima* ในระบบต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับNB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด

| วัน | ความหนาแน่นเซลล์ (x $10^4$) cell/ml | | | ค่าเฉลี่ย | S.D. | ปริมาตรอาหารที่ไหลออก (มิลลิลิตร/ชั่วโมง) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| 0 | 15.00 | 14.00 | 10.50 | 13.17 | 1.93 | 0.00 |
| 1 | 23.50 | 28.00 | 33.00 | 28.17 | 3.88 | 0.00 |
| 2 | 71.00 | 60.50 | 65.00 | 65.50 | 4.30 | 5.42 |
| 3 | 75.00 | 80.50 | 73.00 | 76.17 | 3.17 | 5.00 |
| 4 | 90.50 | 85.50 | 71.50 | 82.50 | 8.04 | 5.63 |
| 5 | 100.00 | 93.00 | 96.50 | 96.50 | 2.86 | 6.25 |
| 6 | 132.50 | 106.50 | 127.00 | 122.00 | 11.19 | 5.83 |
| 7 | 141.50 | 132.50 | 150.00 | 141.33 | 7.15 | 7.29 |
| 8 | 53.00 | 49.50 | 61.00 | 54.50 | 4.81 | 6.04 |
| 9 | 56.00 | 48.00 | 54.50 | 52.83 | 3.47 | 6.25 |
| 10 | 48.00 | 53.50 | 49.00 | 50.17 | 2.39 | 7.08 |
| 11 | 51.00 | 62.00 | 48.50 | 53.83 | 5.86 | 5.63 |
| 12 | 45.00 | 51.50 | 60.50 | 52.33 | 6.36 | 7.50 |
| 13 | 55.50 | 59.50 | 63.00 | 59.33 | 3.06 | 6.88 |
| 14 | 42.50 | 38.50 | 51.00 | 44.00 | 5.21 | 30.21 |
| 15 | 83.50 | 85.00 | 96.00 | 88.17 | 5.57 | 12.29 |
| 16 | 115.50 | 104.50 | 100.50 | 106.83 | 6.34 | 12.00 |
| 17 | 96.50 | 112.00 | 95.50 | 101.33 | 7.55 | 12.08 |
| 18 | 116.00 | 95.50 | 120.50 | 110.67 | 10.88 | 12.00 |
| 19 | 160.50 | 141.50 | 147.00 | 149.67 | 7.98 | 7.50 |
| 20 | 131.00 | 103.50 | 144.00 | 126.17 | 16.88 | 14.58 |
| 21 | 155.50 | 141.00 | 121.50 | 139.33 | 13.93 | 16.67 |
| 22 | 102.50 | 132.00 | 143.00 | 125.83 | 17.10 | 17.50 |
| 23 | 111.00 | 93.50 | 98.00 | 100.83 | 7.42 | 12.50 |
| 24 | 106.00 | 100.50 | 123.50 | 110.00 | 9.81 | 13.33 |

**ตารางผนวกที่** 5 **(ต่อ)** ความหนาแน่นเซลล์ของ *A. delicatissima* ในระบบต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับNB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด

| วัน | ความหนาแน่นเซลล์ (x $10^4$) cell/ml | | | ค่าเฉลี่ย | S.D. | ปริมาตรอาหารที่ไหลออก (มิลลิลิตร/ชั่วโมง) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| 25 | 80.50 | 91.50 | 97.00 | 89.67 | 6.86 | 12.50 |
| 26 | 79.50 | 83.00 | 70.50 | 77.67 | 5.27 | 14.58 |
| 27 | 88.50 | 69.50 | 75.00 | 77.67 | 7.98 | 12.92 |
| 28 | 36.50 | 38.00 | 30.00 | 34.83 | 3.47 | 30.83 |
| 29 | 5.50 | 3.00 | 4.00 | 4.17 | 1.03 | 15.54 |
| 30 | 8.50 | 7.00 | 9.50 | 8.33 | 1.03 | 0.00 |
| 31 | 13.50 | 10.00 | 15.00 | 12.83 | 2.09 | 0.00 |
| 32 | 22.00 | 19.50 | 20.00 | 20.50 | 1.08 | 0.00 |
| 33 | 38.50 | 30.50 | 33.00 | 34.00 | 3.34 | 0.00 |
| 34 | 55.00 | 50.50 | 57.00 | 54.17 | 2.72 | 0.00 |
| 35 | 81.00 | 90.50 | 84.00 | 85.17 | 3.97 | 0.00 |
| 36 | 93.00 | 96.50 | 100.50 | 96.67 | 3.06 | 10.83 |
| 37 | 123.50 | 116.00 | 111.00 | 116.83 | 5.14 | 10.42 |
| 38 | 141.00 | 125.50 | 113.00 | 126.50 | 11.45 | 11.67 |
| 39 | 126.00 | 104.50 | 95.50 | 108.67 | 12.80 | 11.46 |
| 40 | 131.00 | 120.50 | 114.00 | 121.83 | 7.00 | 11.88 |
| 41 | 129.00 | 133.00 | 105.50 | 122.50 | 12.13 | 12.50 |
| 42 | 151.00 | 124.50 | 144.00 | 139.83 | 11.21 | 12.29 |
| 43 | 138.50 | 119.00 | 107.00 | 121.50 | 12.98 | 11.67 |
| 44 | 126.50 | 119.50 | 134.50 | 126.83 | 6.13 | 12.08 |
| 45 | 127.00 | 131.00 | 129.50 | 129.17 | 1.65 | 12.50 |

หมายเหตุ

S.D. คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**ตารางผนวกที่** 6 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ในรูปกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับNB ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด เปรียบเทียบกับ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ให้แสงสว่างความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

| ชนิดของกรดไขมัน | เลี้ยงในที่มีแสง | | เลี้ยงในที่มืด | |
|---|---|---|---|---|
| | มิลลิกรัม/น้ำหนักสาหร่าย (กรัม) | S.D. | มิลลิกรัม/น้ำหนักสาหร่าย (กรัม) | S.D. |
| 14:0 | 4.53 | 0.32 | 5.39 | 0.21 |
| 16:0 | 22.69 | 1.00 | 30.73 | 0.36 |
| 16:1 | 21.02 | 1.38 | 18.13 | 0.83 |
| 18:0 | 0.34 | 0.05 | 0.77 | 0.18 |
| 18:1 | 1.72 | 0.07 | 2.25 | 0.46 |
| 18:2 | 0.76 | 0.02 | 1.04 | 0.05 |
| 20:4 | 1.24 | 0.07 | 1.16 | 0.16 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวชมพูนุท ชัยรัตนะ เกิดเมื่อวันที่ 28 พฤษภาคม พ.ศ. 2520 อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาชั้นประถมศึกษาจากโรงเรียนอนุบาลสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษา จากโรงเรียนสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาขั้นปริญญาตรีสาขา วาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เมื่อปีการศึกษา 2540 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2541 ได้รับทุนผู้ช่วยสอนในปีการศึกษา 2541 โดยเป็นผู้ช่วยสอนวิชา Marine Ecology และปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอน ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2542 ได้รับทุนในโครงการบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ปี พ.ศ. 2543 ร่วมเสนอผลงานเรื่อง การเจริญและองค์ประกอบทางชีวเคมีของไดอะตอม *Amphora* sp. ที่เลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิก ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26 และสำเร็จการศึกษาเมื่อ ปีการศึกษา 2543

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย