สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *Amphora delicatissima* สายพันธุ์ AM9901 ในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์และแบบต่อเนื่อง

HETEROTROPHIC GROWTH OF A MARINE DIATOM *Amphora delicatissima* AM9901 IN BATCH AND CONTINUOUS CULTURES

T050955

มะลิวัลย์ คุตะโค

MALIWAN KUTAKO

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-9680-06-5

วว.
ม 272 ก
2547

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 50955
วัน,เดือน,ปี 26 พ.ค. 2547

.b.....
.i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b11778105x

COPYRIGHT 2004

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *Amphora delicatissima* สายพันธุ์ AM9901 ในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์และแบบต่อเนื่อง
ชื่อนักศึกษา	นางสาวมะลิวัลย์ คุตะโค
รหัสประจำตัว	43065206
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ. ศ.	2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข

บทคัดย่อ

ไดอะตอมน้ำเค็ม *Amphora delicatissima* สายพันธุ์ AM9901 ซึ่งคัดเลือกได้จากชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคในที่มืด โดยใช้อาหารเพาะเชื้อที่ดัดแปลงจากอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร F/2 ที่เสริมด้วยสารอาหารอินทรีย์ จากการทดลองเพาะเลี้ยง *A. delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคในขวดรูปชมพู่ พบว่าไดอะตอมเติบโตได้สูงที่สุดให้ความหนาแน่นเซลล์ $88x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการเติมเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 4 กรัมคาร์บอนต่อลิตร (อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C) จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร และ 5 ลิตร พบว่าไดอะตอมเติบโตได้สูงที่สุดให้ความหนาแน่นเซลล์ $75x10^4$ และ $61x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และการเติมกลูโคสและอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในระหว่างที่เซลล์มีการเติบโตในระยะคงที่มีผลทำให้การเติบโตของไดอะตอมเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ การเพิ่มซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C จาก 0.12 เป็น 2.4 มิลลิโมลาร์ (อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si) ทำให้ไดอะตอมมีการเติบโตได้สูงที่สุด โดยมีความหนาแน่นเซลล์ $792x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ถึง 9 เท่า และสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟีคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เสริมด้วยซิลิกา 1.2 มิลลิโมลาร์ (อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si) ถึง 4 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการใช้อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si เพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $320x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่อง พบว่าที่อัตราการเจือจางต่ำ (0.14 ต่อวัน) ไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูง (291-$310x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ในระยะคงที่ (steady state) และการเพิ่มอัตราการเจือจางมีผลทำให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลงแต่ผลผลิตเซลล์ทั้งหมดกลับเพิ่มขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอัตราการเจือจาง 1.24 ต่อวัน ซึ่งเป็นอัตราการเจือจางที่สูงกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ พบว่าเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ออกจากระบบเพาะเลี้ยง

จากการวิเคราะห์สารประกอบทางชีวเคมีที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si มีปริมาณไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดไขมันบางชนิด เช่น ปาล์มิติค (C16:0) ปาล์มิโตเลอิค (C16:1) สเตียริค (C18:0) โอเลอิค (C18:1) ลิโนเลอิค (C18:2) ลิโนเลนิค (C18:3) และอีโคซะเพนตะอีโนอิค (อีพีเอ, C20:5) รวมทั้งรงควัตถุชนิด คลอโรฟิลล์-เอ คลอโรฟิลล์-ซี ฟูโคแซนทิน ไดอะไดโนแซนทินและไดอะโตแซนทินสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Heterotrophic Growth of a Marine Diatom *Amphora delicatissima* AM9901 in Batch and Continuous Cultures
Student	Miss. Maliwan Kutako
Student ID.	43065206
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2004
Thesis Adivisor	Saranya Phunpruch, Dr. rer.nat
Thesis Co-Adivisor	Sorawit Powthongsook, PhD

ABSTRACT

The marine diatom *Amphora delicatissima* AM9901 isolated from Bangsaen beach, Chonburi Province was cultured under a heterotrophic condition in darkness using a modified F/2 algal medium supplemented with organic nutrients. Under a heterotrophic condition in a shaking flask scale, *A. delicatissima* showed the maximum growth at cell density $88x10^4$ cells/mL when cultivated in the modified F/2 medium supplemented with 5 g/L peptone, 2 g/L yeast extract, 1 g/L meat extract and 4 g-carbon/L glucose (F/2+NB+4C medium). Under a heterotrophic condition in bioreactor 1 and 5 L, cells gave the maximum growth at cell density $75x10^4$ and $61x10^4$ cells/mL, respectively. An addition of glucose and fresh medium into the cell culture during the stationary growth phase resulted in an increase of the diatom growth. In addition, an increase of silica concentration from 0.12 to 2.4 mM (F/2+NB+4C+2.4mM Si medium) resulted in the maximum growth at cell density $792x10^4$ cells/ml and the significant enhance in the growth of *A. delicatissima.* (9-fold higher than cells cultivated in F/2+NB+4C medium and 4- fold higher than cells cultivated photoautotrophically in F/2+1.2 mM Si medium)

From using F/2+NB+4C+2.4 mM Si medium in batch cultivation in the bioreactor 1 L *A. delicatissima* produced the maximum cell concentration of $320x10^4$ cells/mL under heterotrophic condition. With the continuous cultivation, the high cell density (291-$310x10^4$ cells/mL) was found in the steady state in the low dilution rate (0.14 day^{-1}). When the dilution rate was increased, cell density was proportionally decreased but cell productivity was increased. Cells

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

were washed out from the vessel when the dilution rate higher than 1.24 day^{-1} whose rate was higher than the maximum specific growth rate of the diatom in the batch cultivation.

Biochemical analysis of *A. delicatissima*, cells cultured under a heterotrophic condition in F/2+NB+4C+2.4 mM Si medium showed higher amount of lipid, protein, carbohydrate, some fatty acids (plamitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), linolenic acid (C18:3) and eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5) including some pigments (chlorophyll-*a*, chlorophyll-*c*, fucoxanthin, diadinoxanthin and diatoxanthin) than cells cultured under a photoautotrophic condition in F/2+1.2 mM Si medium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ ปี พ.ศ. 2543 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ การที่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาและคำแนะนำจาก ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ผู้ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข ผู้ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม คำแนะนำและประสบการณ์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จักมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อข้าพเจ้าในภายหน้า ข้าพเจ้ามีความซาบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับจากทั้งสองท่านเป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล และ ผศ.ดร.สมถวิล จริตควร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

การวิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ภายใต้โครงการวิจัยเรื่องการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Amphora* sp. ในสภาวะการเจริญแบบเฮเทอโรโทรฟิค (โดย ดร. สรวิศ เผ่าทองศุข)

ขอขอบพระคุณ ดร.อรพร หมื่นพล นักวิจัยหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล และ รศ.บุศยา บุนนาค คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน ที่ให้ความกรุณาในการวิเคราะห์กรดไขมัน อ. วิชญา กันบัว ภาควิชาวาริชศาสตร์ ที่ให้ความกรุณาในการวิเคราะห์รงควัตถุ และ ผศ.ชนวัฒน์ ตันติวรานุรักษ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้คำปรึกษาในทุกเรื่องตลอดมา

ขอขอบคุณคุณชมพูนุท ชัยรัตนะ ดร.ชลี และ ดร.เบ็ญจมาศ ไพบูลย์กิจกูล คุณเสรี คอนเหนือ นางสาวปนัดา มีจริง นายปริญญา ลีพหานนท์ พี่และน้องๆ ทุกคนในหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล (ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ แก่ข้าพเจ้าตั้งแต่เริ่มต้นทำงานวิจัย

ขอขอบคุณนางสาววิภาวี แบบประเสริฐ นางสาวจุฑามาศ มณีวงศ์ นางสาวพรรณวิภา แพงศรี นางสาวจันทิมาภรณ์ นววงศ์วิวัฒน์ นางสาวจินตนา บัวหลวง นางสาวอังคณา กระจ่าง นางสาวอัมพร อุดมศักดิ์สกุล นางสาวอรวรรณ วรรณศรี นางสาวมลฤดี สารวิจิตร และนางสาวปวีณา ใจกระเสน เพื่อนที่ให้ความช่วยเหลือในทุกเรื่องและให้มิตรภาพที่ดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าต้องขอกราบขอบพระคุณนายสุริยาและนางสุพรรณ์ คุตะโค ผู้เป็นบิดาและมารดา รวมทั้ง นางสร้อย ธิวโต ผู้เป็นยายที่คอยให้กำลังใจและคำปรึกษาในทุกเรื่องเรื่อยมา

มะลิวัลย์ คุตะโค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III

กิตติกรรมประกาศ V

สารบัญ VI

สารบัญตาราง XIII

สารบัญรูป XVII

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย 3

บทที่ 2 การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 สัณฐานวิทยาของไดอะตอม 4

2.1.1 โครงสร้างภายนอกของไดอะตอม 4

2.1.2 องค์ประกอบภายในเซลล์ของไดอะตอม 5

2.13 การสืบพันธุ์ของไดอะตอม 8

2.1.4 นิเวศวิทยาของไดอะตอม 10

2.1.5 ชีววิทยาของไดอะตอม *Amphora delicatissima* 10

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไดอะตอม 10

2.2.1 สารอาหาร 10

2.2.2 สภาวะแวดล้อม 13

2.3 สภาวะการเติบโตของสาหร่าย 14

2.3.1 สภาวะการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิค 15

2.3.2 สภาวะการเติบโตแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟิค 15

2.3.3 สภาวะการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิค 16

2.4 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.1 การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ 17
2.4.2 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง 19
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 22

บทที่ 3 วิธีการทดลอง 24
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 24
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 25
3.3 การคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค 26
3.3.1 การเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงสาหร่าย 25
3.3.2 การแยกสายพันธุ์สาหร่าย 25
3.3.3 การคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค 26
3.3.4 การแยกสาหร่ายให้บริสุทธิ์ 27
3.3.5 การจัดจำแนกชนิดของสาหร่าย 27
3.4 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง 27
3.5 การเตรียมไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 สำหรับใช้ในการทดลอง 28
3.6 การวัดการเติบโตของไดอะตอม *A. delicatissima* AM990 28
3.6.1 การนับเซลล์ไดอะตอม 28
3.6.2 การวัดน้ำหนักแห้งของไดอะตอม 28
3.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 29
3.7.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม 29
3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม 29
3.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม 28
3.8 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในขวดรูปชมพู่ 30
3.8.1 ผลของสารอาหารอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.8.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม 32
3.9 ลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 32
3.9.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ 32
3.9.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่อง 34
3.10 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 35
3.10.1 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร 35
3.10.2 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 36
3.11 ผลของซิลิกาต่อการเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ 37
3.11.1 ผลของการเติมซิลิกาต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม 37
3.11.2 ผลของความเข้มข้นของซิลิกาต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม 37
3.11.3 ผลของความเข้มข้นของซิลิกาต่อการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิคของไดอะตอม 37
3.12 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม 38
3.12.1 การเปรียบเทียบการเติบโตของไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิคที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ 38
3.12.2 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร 38
3.12.3 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.13 การวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคและโฟโตออโตโทรฟีค 41

3.13.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของไดอะตอม..... 41

3.13.2 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของไดอะตอม..... 42

3.13.3 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของไดอะตอม 42

3.13.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของไดอะตอม 43

3.13.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณรงควัตถุที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของไดอะตอม 43

บทที่ 4 ผลการทดลอง 45

4.1 การคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีค..... 45

4.2 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในขวดรูปชมพู่..... 48

4.2.1 ผลของสารประกอบอาหารอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม..... 47

4.2.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม..... 52

4.3 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ..... 54

4.3.1 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร 54

4.3.2 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 57

4.4 ผลของซิลิกาต่อการเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ 60

4.4.1 ผลของการเติมซิลิกาต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม..... 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4.2 ผลของความเข้มข้นของซิลิกาต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม 61
4.4.3 ผลของความเข้มข้นของซิลิกาต่อการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟีคของไดอะตอม 62
4.5 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si 64
4.5.1 การเปรียบเทียบการเติบโตของไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคและโฟโตออโตโทรฟีคที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ 64
4.5.2 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร 66
4.5.3 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร 67
4.6 การวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคและโฟโตออโตโทรฟีค 77
4.6.1 การวิเคราะห์ไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของไดอะตอม 77
4.6.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่ผลิตขันภายในเซลล์ของไดอะตอม 77
4.6.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารรงควัตถุที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของไดอะตอม 80

บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง 85
5.1 การคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่เติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีค 85
5.2 การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ภายใตสภาวะเฮเทอโรโทรฟีคในขวดรูปชมพู่ 86
5.2.1 ผลของสารอาหารอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม 86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.2.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม 87
5.3 การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีค ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร 88
5.3.1 ผลของการให้อากาศต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม 88
5.3.2 ผลของการเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม 89
5.4 การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีค ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 90
5.4.1 การผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 90
5.4.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม 91
5.5 ผลของความเข้มข้นของซิลิกาต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 91
5.6 การเปรียบเทียบการเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตรต่างๆ 93
5.7 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si 93
5.8 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร 94
5.8.1 ผลของการกวนต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม 94
5.8.2 ความสัมพันธ์ของอัตราการเจือจางกับความหนาแน่นเซลล์ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง 95
5.8.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจาง ความหนาแน่นเซลล์และผลผลิตเซลล์ไดอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง 95
5.8.4 การเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ในระบบการเพาะเลี้ยงไดอะตอม 96
5.8.5 ผลของฟอสฟอรัสต่อการเติบโตของไดอะตอม 97
5.9 การผลิตสารชีวโมเลกุลในเซลล์ของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคและโฟโตออโตโทรฟีค 97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.9.1 การผลิตโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตในเซลล์ของไดอะตอม 95
5.9.2 การผลิตกรดไขมันของไดอะตอม 99
5.9.3 การผลิตสารรงควัตถุของไดอะตอม 100

บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 102
6.1 สรุปผลการทดลอง 102
6.2 ข้อเสนอแนะ 103

เอกสารอ้างอิง 105

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม 113
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะ 114
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม 115
ภาคผนวก ง การคำนวณความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเติบโตจำเพาะของไดอะตอมและ
ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและสารละลายมาตรฐาน 116
ภาคผนวก จ ข้อมูลการทดลอง 120

ประวัติผู้เขียน 140

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในไดอะตอม (ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด)..... 7

2.2 แหล่งของสารอาหารอินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค 12

2.3 การจำแนกสิ่งมีชีวิตตามแหล่งอาหารและพลังงาน..... 14

3.1 โปรแกรมการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์รงควัตถุของไดอะตอม. 44

4.1 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีความเข้มข้นของซิลิกาแตกต่างกัน..... 64

4.2 การเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ในขวดรูปชมพู่ที่เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที..... 66

4.3 การเติบโตและผลผลิตของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอัตราการเจือจางต่างๆ..... 71

4.4 การเติบโตและผลผลิตของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอัตราการเจือจางต่างๆ..... 74

4.5 การเติบโตและผลผลิตของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอัตราการเจือจางต่างๆ..... 76

4.6 ปริมาณไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (ในหน่วยร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค (ในที่มืด) ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si และสภาวะโฟโตออโตโทรฟิค (ให้แสง 500 ลักซ์) ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู..... 77

4.7 การผลิตกรดไขมันของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si และภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si..... 80

4.8 ชนิดและปริมาณรงควัตถุภายในเซลล์ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si และภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารสูตร F/2+1.2 mM Si 83

5.1 องค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ต่างกัน..... 98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

5.2 การผลิตกรดไขมันของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ต่างกัน 99

จ.1 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารเพาะเชื้อสูตร NB มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของเปปโตน 0 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร 120

จ.2 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารสูตร NB มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 2 4 และ 8 กรัมต่อลิตร 121

จ.3 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารเพาะเชื้อสูตร NB มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของเนื้อสกัด 0 1 2 และ 4 กรัมต่อลิตร 122

จ.4 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารเพาะเชื้อสูตร NB มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง มีการเติมสารละลายกลูโคสเพื่อให้ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อสูงขึ้น 10 กรัมต่อลิตร 123

จ.5 การเติบโตของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ไม่ให้อากาศแต่กวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที 124

จ.6 การเติบโตของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ให้อากาศ 6.50 ลิตรต่อนาที และกวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที 124

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

จ.7 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C จากนั้นได้มีการเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เพิ่มลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง 125

จ.8 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C 126

จ.9 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C และมีการเติมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 และ 25 ของการเพาะเลี้ยง 127

จ.10 การเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ภายหลังการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อจาก 0.12 เป็น 1.2 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง 128

จ.11 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 0 0.12 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์ 129

จ.12 การเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 0 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์ 130

จ.13 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคและโฟโตออโตโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในขวดรูปชมพู่ ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตรแตกต่างกันๆ 131

จ.14 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร 131

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

จ.15 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si โดยแปรผันอัตราการกวนระหว่างการเพาะเลี้ยง 2 ระดับ โดยอัตราการกวนระดับที่ 1 เท่ากับ 300 รอบต่อนาที และอัตราการกวนระดับที่ 2 เท่ากับ 600 รอบต่อนาที 132

จ.16 ความสัมพันธ์ของความหนาแน่นเซลล์กับอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ความเค็ม 30 พีเอสยู 133

จ.17 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ความเค็ม30 พีเอสยู เพื่อแปรผันอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงจนเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ 134

จ.18 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si เพาะเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์อยู่ในภาวะคงที่ จากนั้นทำการแปรผันอัตราการเจือระหว่างการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นจนเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ 135

จ.19 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+Si 2.4mM โดยในวันที่ 35 ของการเพาะเลี้ยง มีการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อจาก 8.5 ขึ้นเป็น 15.15 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร 136

จ.20 ความสัมพันธ์ของอัตราการเจือจางกับผลผลิตและความหนาแน่นเซลล์ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในหัวข้อ 4.5.3.3-4.5.3.5 ... 137

จ.21 ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่ผลิตขึ้นในไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si และภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟีคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si 138

จ.22 ปริมาณรงควัตถุของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคและโฟโตออโตโทรฟีค 139

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างฟรัสตุลของไดอะตอม 4

2.2 ลักษณะของเซนตริคและเพนเนตไดอะตอม 5

2.3 การแบ่งเซลล์แบบไม่อาศัยเพศของไดอะตอม 8

2.4 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของไดอะตอม 9

2.5 การเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ 18

2.6 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ทำการควบคุมกิจกรรมของสาหร่ายแบบเคโมสแตต 21

2.7 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ทำการควบคุมกิจกรรมของสาหร่ายแบบเทอบิโดสแตต 21

3.1 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค ในขวดรูปชมพู่ 31

3.2 ลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ 33

3.3 ไดอะแกรมแสดงระบบการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 33

3.4 ลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่อง 34

3.5 ไดอะแกรมแสดงการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร 35

4.1 ลักษณะก้อนหินและตะกอนทรายที่เก็บจากชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี 46

4.2 การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มความหนาแน่นเซลล์สาหร่ายจากตัวอย่างก้อนหินและตะกอนทราย 46

4.3 ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 47

4.4 เปลือกหุ้มเซลล์หรือฟรัสตุลของ ไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน 47

4.5 ลักษณะด้านหน้าฝาของไดอะตอม น้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 47

4.6 ลักษณะฝาด้านในของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่กึ่งกลางร่องราฟีมีตุ่มหนาเรียกว่า เซนทรัลโนดุล ซึ่งเกิดจากการฝังตัวของซิลิกา 47

4.7 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารเพาะเชื้อสูตร NB มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของเปปโตน 0 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ความเค็มของอาหาร 30 พีเอสยู 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.8 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารสูตร NB มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 2 4 และ 8 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู 50

4.9 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารเพาะเชื้อสูตร NB มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของเนื้อสกัด 0 1 2 และ 4 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ความเค็มของอาหาร 30 พีเอสยู 52

4.10 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารเพาะเชื้อสูตร NB มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (จุดที่ลูกศรชี้คือ การเติมสารละลายกลูโคสเพื่อให้ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อสูงขึ้น 10 กรัมต่อลิตร) 53

4.11 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C เพาะเลี้ยงโดยไม่ให้อากาศแต่กวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที 55

4.12 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ให้อากาศ 0.65 ลิตรต่อชั่วโมง และกวน 300 รอบต่อนาที ระหว่างการเพาะเลี้ยง 56

4.13 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C จากนั้นได้มีการเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เพิ่มลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.14 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C 58

4.15 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C และมีการเติมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 และ 25 ของการเพาะเลี้ยง 59

4.16 การเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ภายหลังการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อจาก 0.12 เป็น 1.2 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง 60

4.17 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 0 0.12 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์ 62

4.18 การเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟีคของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 0 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์ 63

4.19 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคและโฟโตออโตโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในขวดรูปชมพู่ ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตรแตกต่างกันๆ 65

4.20 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร 67

4.21 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si โดยแปรผันอัตราการกวนระหว่างการเพาะเลี้ยง 2 ระดับ โดยอัตราการกวนระดับที่ 1 เท่ากับ 300 รอบต่อนาที และอัตราการกวนระดับที่ 2 เท่ากับ 600 รอบต่อนาที 68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.22 ความสัมพันธ์ของความหนาแน่นเซลล์กับอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ความเค็ม 30 พีเอสยู 69

4.23 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ความเค็ม30 พีเอสยู เพื่อแปรผันอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงจนเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ 71

4.24 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si เพาะเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์อยู่ในภาวะคงที่ จากนั้นทำการแปรผันอัตราการเจือระหว่างการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นจนเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ 73

4.25 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+Si 2.4mM โดยในวันที่ 35 ของการเพาะเลี้ยง มีการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อจาก 8.5 ขึ้นเป็น 15.15 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร 75

4.26 ความสัมพันธ์ของอัตราการเจือจางกับผลผลิตและความหนาแน่นเซลล์ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในหัวข้อ 4.5.3.3-4.5.3.5 76

4.27 ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่ผลิตขึ้นในไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si และภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si 79

4.28 (ก.) โครมาโตแกรมแสดงผลของการวิเคราะห์รงควัตถุของไดอะตอม *A. delicatissima* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si (ข.) โครมาโตแกรมแสดงผลของการวิเคราะห์รงควัตถุของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si 82

4.29 ลักษณะสเปคตรัมของคลอโรฟิลล์-เอในเซลล์ของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.30 ปริมาณรงควัตถุของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิค 84

5.1 (ก.) การไหลวนของอาหารเพาะเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ไม่มีการติดตั้งแบฟเฟิล
(ข.) การไหลของอาหารเพาะเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการติดตั้งแบฟเฟิล 94

5.2 โครงสร้างของฟูโคแซนทิน 101

ง.1 ลักษณะของช่องบนสไลด์นับเม็ดเลือดที่ใช้ในการนับเซลล์ไดอะตอม 116

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของงานวิจัย

ไดอะตอมเป็นจุลสาหร่าย (microalgae) ที่มีลักษณะเด่นแตกต่างจากจุลสาหร่ายชนิดอื่นๆ คือมีเปลือกหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยซิลิกาและมีลวดลายบนเปลือกเซลล์ ในธรรมชาติจะพบไดอะตอมได้ในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม บทบาทที่สำคัญของไดอะตอมในแหล่งน้ำคือการเป็นผู้ผลิตเบื้องต้น (primary producer) โดยไดอะตอมเป็นแหล่งอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์และสัตว์น้ำชนิดต่างๆ ด้วยสาเหตุนี้จึงมีการนำไดอะตอมบางชนิด เช่น *Navicula* sp., *Chaetoceros* sp., *Thalassiosira* sp. และ *Amphora* sp. (Peterson and Curiel, 2002) มาใช้เป็นอาหารในเพาะเลี้ยงและอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน และจากรายงานพบว่าไดอะตอมเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีผลต่อการเพิ่มการเติบโตและการอยู่รอดของสัตว์น้ำ (Brett and Muller-Navarra, 1997; Renaud *et al.*, 1994) ในปัจจุบันจึงมีการเพาะเลี้ยงไดอะตอมกันอย่างแพร่หลายเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจ

ตามปรกติไดอะตอมและสาหร่ายชนิดต่างๆ มีการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิค (photoautotrophic growth) ซึ่งเป็นสภาวะการเติบโตที่สาหร่ายสามารถสร้างอาหารได้เองจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) โดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน (energy source) และใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon source) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อการค้าส่วนใหญ่จึงทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค เช่น เพาะเลี้ยงในบ่อเปิดกลางแจ้ง (open pond) หรือในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง (photobioreactor) ปัญหาหนึ่งที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคคือ สาหร่ายได้รับแสงไม่เพียงพอหรือได้รับแสงมากเกินไป รวมทั้งเซลล์เกิดการบดบังแสงกันเอง (auto-shading) ทำให้เซลล์ที่อยู่ด้านตรงข้ามกับแหล่งแสงได้รับแสงไม่เพียงพอต่อการเติบโต เป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลทำให้การเติบโตและผลผลิตของสาหร่ายลดลง (Chen and Jonhs, 1994) อย่างไรก็ตามแนวทางที่จะหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดจากแสงเป็นปัจจัยจำกัดการเติบโตของสาหร่าย สามารถทำได้โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิค (heterotrophic growth) ซึ่งเป็นสภาวะที่สาหร่ายมีการเติบโตในที่มืดจึงไม่เกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง แต่สาหร่ายจะบริโภคสารอาหารพวกสารประกอบอินทรีย์คาร์บอน (organic carbon) จากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ จากนั้นสารอาหารจะผ่านกระบวนเมแทบอลิซึมกลายเป็นแหล่งพลังงานและถูกใช้ในกระบวนการสร้างสารเชิงซ้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดต่างๆ แต่สาหร่ายที่เติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคมีน้อยสายพันธุ์ จึงต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายหรือไดอะตอมจากแหล่งธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ รวมทั้งการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเฮเทอโรโทรฟิคจำเป็นต้องเติมสารประกอบอินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน จึงมักเกิดปัญหาที่เกี่ยวกับความเข้มข้นของสารอาหารเป็นปัจจัยจำกัดการเติบโต (substrate inhibition) ซึ่งการแก้ปัญหาดังกล่าวสามารถทำได้โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่อง (continuous culture) ทั้งนี้เพราะระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องมีควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารให้คงที่ตลอดเวลา จึงมีผลทำให้เซลล์มีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณ (exponential phase) ตลอดเวลาเช่นกัน

งานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดเลือกไดอะตอมสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคจากชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี จากนั้นศึกษาการเติบโตของไดอะตอม โดยเพาะเลี้ยงในที่มืดด้วยอาหารเพาะเชื้อที่เสริมด้วยเปปโตน ยีสต์สกัดและเนื้อสกัด ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่และขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ที่ออกแบบขึ้นเฉพาะเพื่อใช้สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ โดยทำการเพาะเลี้ยงทั้งแบบแบตช์ (batch culture) และแบบต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์สารชีวโมเลกุลในเซลล์ของไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและแบบโฟโตออโตโทรฟิค

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 คัดเลือกไดอะตอมสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคจากชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี

1.2.2 ศึกษาผลของสารอาหารอินทรีย์และซิลิกาต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในขวดรูปชมพู่

1.2.3 ศึกษาการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์และแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.2.4 วิเคราะห์ปริมาณสารชีวโมเลกุลของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคและแบบโฟโตออโตโทรฟิค

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คัดเลือกไดอะตอมสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค จากหาดหินบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี และนำไดอะตอมไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในที่มืด โดยเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในขวดรูปชมพู่เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารอาหารต่อการเติบโตของไดอะตอม จากนั้นขยายขนาดการเพาะเลี้ยงไดอะตอม โดยเพาะเลี้ยงแบบแบตช์และแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็กที่ออกแบบขึ้นเพื่อใช้ในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และวิเคราะห์ปริมาณสารชีวโมเลกุล ได้แก่ โปรตีน ไขมัน กรดไขมัน คาร์โบไฮเดรต และรงควัตถุของไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิค

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ผลการทดลองที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงไดอะตอมและจุลสาหร่ายชนิดอื่นๆ ภายใต้สภาวะการเติบโตแบบเฮเทอโร-โทรฟิคเพื่อผลิตมวลชีวภาพ (biomass) และสารชีวโมเลกุลที่มีประโยชน์ รวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อขยายขนาดการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสู่ระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สัณฐานวิทยาของไดอะตอม

2.1.1 โครงสร้างภายนอกของไดอะตอม

ไดอะตอมเป็นจุลสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดหนึ่ง มีขนาดเซลล์ตั้งแต่ 1-500 ไมครอน ไดอะตอมมีลักษณะเด่นคือ ผนังเซลล์มีซิลิกาเป็นส่วนประกอบและทำให้เกิดลวดลายบนฝาที่แตกต่างกันตามชนิดของไดอะตอม ไดอะตอมหนึ่งเซลล์ประกอบด้วยฝาสองฝาที่สามารถครอบกันได้พอดีคล้ายจานเลี้ยงเชื้อโดยเรียกว่า ฟรัสตุล (frustule) ฝาบนเรียกว่า อีพิทีกา (epitheca) ประกอบด้วยอีพิวาล์ว (epivalve) และอีพิซินกูลัม (epicingulum) ฝาล่างเรียกว่า ไฮโปทีกา (hypotheca) ประกอบด้วยไฮโปวาล์ว (hypovalve) และไฮโปซินกูลัม (hypocingulum) ทั้งส่วนที่เป็นอีพิซินกูลัมและไฮโปซินกูลัมสามารถเรียกรวมว่า เกอร์เดิล (girdle) ซึ่งเป็นด้านข้างที่เป็นขอบของฝาบนและฝาล่างครอบกันอยู่ และมีแถบหลายๆ แถบเรียกว่า อินเตอร์คาลารีแบนด์ (intercalary band) โครงสร้างฟรัสตุลของไดอะตอมแสดงดังรูปที่ 2.1

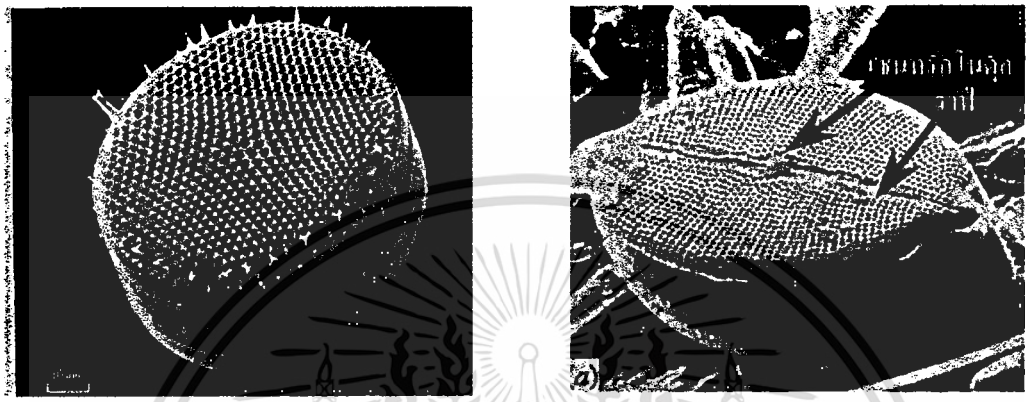
รูปที่ 2.1 โครงสร้างฟรัสตุลของไดอะตอม
ที่มา: van den Hock *et al.* (1995)

ลักษณะโครงสร้างฟรัสตุลของไดอะตอมสามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดของไดอะตอมได้เป็น 2 ชนิดคือ

2.1.1.1 เซนตริคไดอะตอม (centric diatom) ลักษณะฟรัสตุลของไดอะตอมกลุ่มเซนตริคส่วนมากมีรูปร่างทางด้านหน้าฝาเป็นรูปวงกลม ซึ่งมีสมมาตรแบบรัศมี (radial symmetry) ไดอะตอมบางสกุลอาจมีรูปร่างทางหน้าฝาเป็นรูปสามเหลี่ยม สี่เหลี่ยมหรือครึ่งวงกลม ด้านเกอร์เดิลหรือด้านข้างมักเป็นรูปสี่เหลี่ยม ลวดลายบนฝามักเรียงกันในแนวรัศมีโดยยึดศูนย์กลางของฝาเป็นหลัก ลักษณะของไดอะตอมกลุ่มเซนตริคแสดงดังรูปที่ 2.2(ก.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.2 เพนเนตไดอะตอม (pennate diatom) เป็นไดอะตอมกลุ่มที่มีสมมาตรแบบสองด้าน (bilateral symmetry) ด้านหน้าฝาของไดอะตอมมีร่องแคบ (slit) พาดตามยาวเรียกร่องนี้ว่า ราฟี (raphe) ตลอดแนวของร่องราฟียาวไม่ติดกัน แต่จะแบ่งออกเป็นสองช่อง เนื่องจากกึ่งกลางของฝามีตุ่มหนาที่เกิดจากการฝังตัวของซิลิกาบนผนังเซลล์เรียกว่า เซนทรัลโนดุล (central nodule) ลักษณะของไดอะตอมกลุ่มเพนเนตแสดงดังรูปที่ 2.2(ข.)



(ก.) (ข.)

รูปที่ 2.2 ลักษณะของไดอะตอม (ก.) กลุ่มเซนตริค (ข.) กลุ่มเพนเนต
ที่มา: van den Hock *et al.* (1995)

2.1.2 องค์ประกอบภายในเซลล์ของไดอะตอม

องค์ประกอบภายในเซลล์ของไดอะตอมประกอบด้วยออร์กาเนลล์ (organelle) ต่างๆ คล้ายกับสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตชนิดอื่น โดยออร์กาเนลล์ถูกล้อมรอบด้วยโปรโตพลาสต์ (protoplast) ภายในโปรโตพลาสต์ประกอบด้วย นิวเคลียส (nucleus) คลอโรพลาสต์ (chloroplast) ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) กอลจิแอพพาราตัส (golgi apparatus) เอนโดพลาสมิคเรติคูลัม (endoplastmic reticulum) ไรโบโซม (ribosome) และแวคคิวโอล (vacuole) ตำแหน่งที่พบนิวเคลียสเป็นบริเวณกึ่งกลางเซลล์ คลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็นแผ่นจำนวน 1-4 แผ่น หรืออาจมีลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ จำนวนมาก สีของคลอโรพลาสต์แตกต่างกันตามชนิดของไดอะตอม เช่น สีเหลือง สีน้ำตาลแกมเขียว จนถึงสีน้ำตาลเข้ม พื้นที่ภายในเซลล์ส่วนใหญ่เป็นช่องว่างเรียกว่า แวคคิวโอล อาจมีจำนวน 1-2 ช่อง อาหารสะสมของไดอะตอมส่วนมากอยู่ในรูปของหยดน้ำมัน (oil droplet) ซึ่งมองเห็นได้อย่างชัดเจนในเซลล์ที่ยังมีชีวิต นอกจากนี้ยังพบว่าภายในเซลล์ของไดอะตอมประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลหลายชนิดดังนี้

2.1.2.1 โปรตีน (protein) ไดอะตอมมีโปรตีนหลายชนิดเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ ทั้งนี้ความแตกต่างของชนิดและปริมาณโปรตีนจะขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไดอะตอมแต่ละชนิดและสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม ในเซลล์ไดอะตอมมีการผลิตกรดอะมิโนชนิดเซอรีน (serine) มากที่สุด รองลงมาคือ ไกลซีน (glycine) กรดกลูตามิค (glutamic acid) และกรดแอสพาร์ติค (aspartic acid) ตามลำดับ (Chau *et al.*, 1967 อ้างโดย Werner, 1977)

2.1.2.2 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) โพลีแซคคาไรด์ที่พบสะสมในไดอะตอมมักอยู่ในรูปของคริสโซลามินาแรน (chrysolaminaran) หรือ เบต้า-1,3 กลูแคน (β-1, 3 glucan) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สามารถละลายน้ำได้ เมื่อไดอะตอมเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) จะผลิตและปลดปล่อยโพลีแซคคาไรด์ออกมาภายนอกเซลล์ในรูปของเจลาติน (gelatin) ทำให้มีลักษณะเป็นเมือกลื่นห่อหุ้มเซลล์เรียกว่า แคปซูล (capsule) ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของแคปซูลที่ไดอะตอมผลิตขึ้นจะแตกต่างกันไปตามชนิดของไดอะตอม เช่น แคปซูลของไดอะตอม *Phaeodactylum tricornutum* ประกอบด้วย แมนโนส (mannose) กาแลคโตส (galactose) และไซโลส (xylose) ส่วนไดอะตอม *Navicula pelliculosa* มีแคปซูลที่ประกอบด้วยกรดกลูคูโรนิค (glucuronic acid) หลายๆ โมเลกุลมาเชื่อมต่อกัน (Lewin, 1955a อ้างโดย Werner, 1977)

2.1.2.3 ไขมัน (lipid) ชนิดของไขมันภายในเซลล์ไดอะตอมมีความคล้ายคลึงกับสาหร่ายสีเขียวและพวกพืชชั้นสูง ไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในไดอะตอมได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) เลซิติน (lecithin) ฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (phosphotidyl glycerol) และฟอสโฟติดิลอิโนซิทอล (phosphotidyl inositol) กรดไขมันที่พบในไดอะตอมประกอบด้วย กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่มีคาร์บอน 14, 16 และ 20 อะตอม เป็นองค์ประกอบ การผลิตกรดไขมันลิโนเลนิค (linolenic acid, C18:3) ของไดอะตอมมีปริมาณน้อยมาก ในขณะที่พืชชั้นสูงพบกรดลิโนเลนิคเป็นองค์ประกอบหลัก เพราะกรดไขมันชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการทำงานของคลอโรพลาสต์ ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในไดอะตอมบางชนิดแสดงดังตารางที่ 2.1 โดยชนิดของกรดไขมันที่พบในไดอะตอมจะขึ้นกับชนิดของไดอะตอมและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันภายในเซลล์ของไดอะตอมบางชนิด (ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด)

ชนิดของกรดไขมัน (จำนวนคาร์บอนอะตอม: จำนวนพันธะคู่)	ชนิดของไดอะตอม				
	Navicula elliculosa[1]	*Cylindrotheca gracilis*[2]	*Nitzschia palea*[3]	*Skeletonema costatum*[4]	*Thalassiosira fluviatili*[5]
กรดไมริสติค (myristic acid, 14:0)	2.8	7.0	6.2	6.2	7.9
กรดปาล์มิติค (palmitic acid, 16:0)	9.1	16.4	22.8	11.1	23.2
กรดปาล์มิโตเลอิค (palmitoleic acid, 16:1)	30.8	21.3	44.7	21.7	44.8
กรดเฮกซะเดคาไดอีโนอิค (hexadecadienoic acid, 16:2)	7.4	4.2	3.6	6.1	2.8
กรดเฮกซาเดคาไตรอีโนอิค (hexadecatrienoic acid, 16:3)	18.3	-	1.6	11.4	6.5
กรดสเตียริค (stearic acid, 18:0)	-	1.0	-	-	0.3
กรดโอเลอิค (oleic acid, 18:1)	6.2	5.3	2.5	1.8	0.4
กรดลิโนเลอิค (linoleic acid, 18:2)	3.9	2.9	-	2.1	0.5
กรดลิโนเลนิค (linolenic acid, 18:3)	2.6	-	-	-	0.2
กรดอะราชิโดนิค (arachidonic acid, 20:4)	4.5	6.2	6.3	3.9	0.6
กรดอีโคซะเพนตะอีโนอิค (eicosapentaenoic acid, 20:5)	14.5	24.4	12.0	30.2	8.0

ที่มา: [1]Kates and Volcani (1966); [2]de Mort *et al.* (1972); [3]Opute (1974); [4]Chuecas and Riley (1969); [5]Tornabene *et al.* (1974)

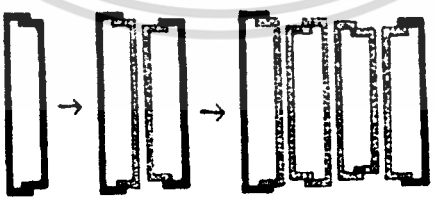
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.4 รงควัตถุ (pigment) ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ ไดอะตอมมีคลอโรฟิลล์-เอและคลอโรฟิลล์-ซี สาหร่ายชนิดต่างๆ รวมทั้งไดอะตอมมีปริมาณคลอโรฟิลล์-เอ ร้อยละ 0.3-2 ของน้ำหนักแห้ง ส่วนคลอโรฟิลล์-ซี ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์-ซี$_1$ และคลอโรฟิลล์-ซี$_2$ ในเซลล์ไดอะตอมมีอัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์-ซี$_1$ต่อซี$_2$ เท่ากับ 1 เสมอ แต่บางครั้งอัตราส่วนดังกล่าวอาจมีมากหรือน้อยกว่า 1 ก็ได้ ซึ่งจะขึ้นกับชนิดของไดอะตอม ปริมาณคลอโรฟิลล์-ซี ในไดอะตอมเท่ากับ ร้อยละ 11-37 ของปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (Jeffery, 1972) ส่วนแคโรทีนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบของไดอะตอมมีสองประเภทคือ ประเภทแคโรทีน ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) และแอบซิลอน-แคโรทีน (ε-carotene) ประเภทแซนโทฟิลล์ (xantophyll) ได้แก่ ฟูโคแซนทิน (fucoxanthin) ไดอะโตแซนทิน (diatoxanthin) แต่เนื่องจากปริมาณของแคโรทีนอยด์และแซนโทฟิลล์มากกว่าคลอโรฟิลล์ จึงทำให้สีของคลอโรพลาสต์มีสีตั้งแต่เหลือง เหลืองแกมเขียว เขียวมะกอก เหลืองอมน้ำตาล น้ำตาลอ่อน น้ำตาลทอง จนถึงสีน้ำตาลเข้ม

2.1.3 การสืบพันธุ์

โดยทั่วไปการสืบพันธุ์ของไดอะตอมมีสองแบบคือ แบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ (บัญญัติ, 2534)

2.1.3.1 การสืบเพศไม่อาศัยเพศ เป็นการแบ่งส่วนประกอบของเซลล์ออกเป็นสองส่วน แล้วจึงแบ่งไซโตพลาสซึมทำให้เซลล์ใหม่ที่ได้อยู่ในแต่ละฝาของผนังเซลล์นั่นคือ ส่วนประกอบของเซลล์ที่ได้ส่วนหนึ่งจะอยู่ในฝาบนหรืออีพิทีกา อีกส่วนอยู่ที่ฝาล่างหรือไฮโปทีกาซึ่งเป็นฝาเดิมของเซลล์ จากนั้นจะมีการสร้างผนังเซลล์ส่วนที่เหลือขึ้นมาใหม่เป็นส่วนของไฮโปทีกา สรุปได้ว่าทั้งอีพิทีกาและไฮโปทีกาของเซลล์เดิมจะกลายเป็นอีพิทีกาของเซลล์ใหม่เสมอ ดังนั้นเมื่อไดอะตอมแบ่งเซลล์จะทำให้ไดอะตอมมีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ (รูปที่ 2.3)

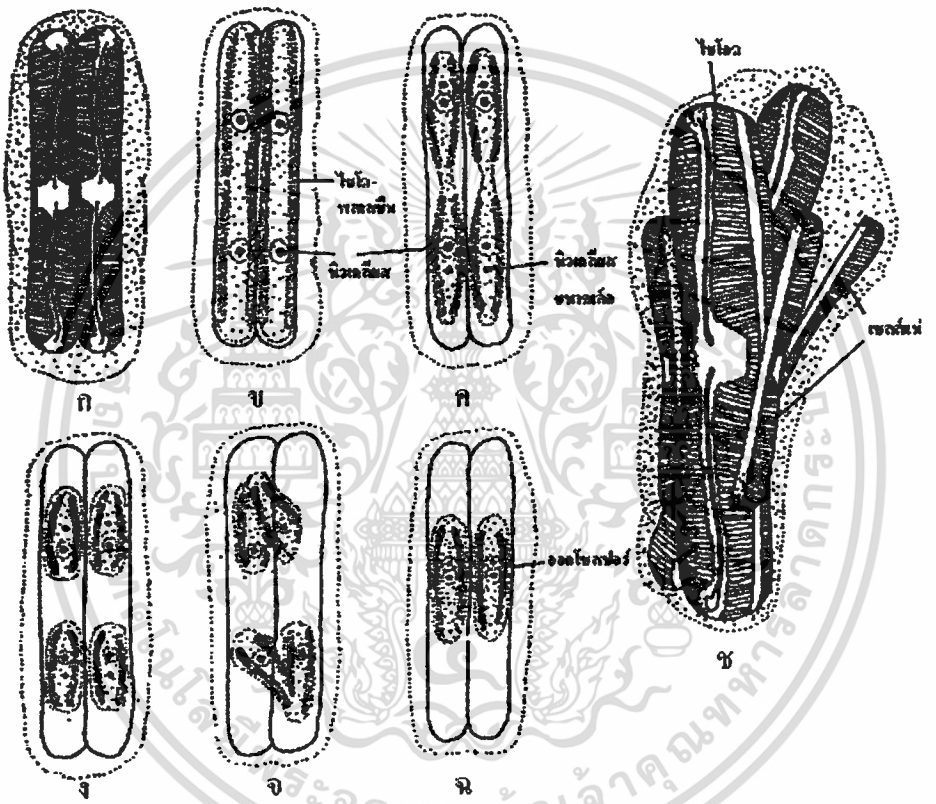


รูปที่ 2.3 การแบ่งเซลล์แบบไม่อาศัยเพศของไดอะตอม
ที่มา: Lee (1989)

2.1.3.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เป็นการสร้างออกโซสปอร์ (auxospore) ซึ่งเป็นสปอร์ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้มโปรโตพลาสซึมทำให้ไดอะตอมขยายขนาดได้ กระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของไดอะตอมแสดงดังรูปที่ 2.4 เริ่มต้นจากไดอะตอม 2 เซลล์ จับคู่กัน (รูปที่ 2.4ก-ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นไดอะตอมทั้งสองเซลล์มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ทำให้ได้ไดอะตอมแต่ละเซลล์มี 4 นิวเคลียส (รูปที่ 2.4ค) โดยมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ 2 นิวเคลียสและนิวเคลียสขนาดเล็ก 2 นิวเคลียส จากนั้นนิวเคลียสขนาดเล็กก็จะสลายตัวพร้อมๆ กับเกิดการแบ่งไซโตพลาสซึมออกเป็น 2 ส่วน ที่มีขนาดไม่เท่ากันและทำหน้าที่เป็นเซลล์สืบพันธุ์ (รูปที่ 2.4ง) โดยเซลล์สืบพันธุ์ขนาดเล็กของแต่ละเซลล์จะเข้าผสมและปฏิสนธิกับเซลล์สืบพันธุ์ขนาดใหญ่ของอีกฝ่ายได้เป็นไซโกต (รูปที่ 2.4จ) ต่อมาไซโกตมีการขยายขนาดเพื่อสร้างออกโซสปอร์ (รูปที่ 2.4ฉ) มีการสร้างผนังเซลล์หุ้มเป็นไดอะตอมที่สมบูรณ์ และมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์แม่ (รูป 2.4ช)



รูปที่ 2.4 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของไดอะตอม

ที่มา: Lee (1989)

2.1.4 นิเวศวิทยาของไดอะตอม

ไดอะตอมเป็นจุลสาหร่ายที่พบในแหล่งน้ำจืด น้ำเค็มและน้ำกร่อย นอกจากนี้ยังพบในดินและตามที่ชื้น ไดอะตอมถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะที่อยู่อาศัยคือ

2.1.4.1 ไดอะตอมที่อาศัยอยู่ตามหน้าดิน (benthic diatom) เป็นไดอะตอมชนิดที่สามารถสร้างก้าน (stalk) ออกจากเซลล์เพื่อใช้ในการยึดเกาะกับพืชน้ำหรือวัตถุต่างๆ ในน้ำ เช่น ก้อนหิน นอกจากนี้ไดอะตอมบางชนิดสามารถดำรงชีวิตอยู่โดยการฝังตัวในทราย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4.2 ไดอะตอมที่เป็นแพลงก์ตอน (plantonic diatom) เป็นไดอะตอมที่ใช้เวลาส่วนมากหรือตลอดระยะเวลาในวัฏจักรชีวิตอยู่ในมวลน้ำ และมีไดอะตอมบางชนิดที่บางช่วงของวัฏจักรชีวิตอาศัยเกาะติดกับพื้น (Werner, 1977)

2.1.5 ชีววิทยาของไดอะตอม *Amphora delicatissima*

ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* เป็นพวกเพนเนตไดอะตอมและเซลล์อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ มีรูปร่างคล้ายรูปไข่ที่ปลายเซลล์ตัดตรง สามารถจัดจำแนกชนิดของไดอะตอมได้ดังนี้ (ลัดดา, 2542)

ดิวิชั่น (Division) Chlromophyta
คลาส (Class) Bacillariophyceae
อันดับ (Order) Bacillariales
สกุล (Genus) *Amphora*
สปีชีส์ (Species) *A. delicatissima*

ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* สามารถเคลื่อนที่ได้ และเนื่องจากด้านหน้าฝามีลักษณะนูนจึงมักพบเซลล์ด้านเกอร์เดิลเสมอ มีอินเตอร์คาลารีแบนด์หลายแถบ ซึ่งอาจมีลวดลายเป็นจุดหรือเป็นเส้นหรืออาจไม่มีอินเตอร์คาลารีแบนด์ก็ได้ ราฟีมีลักษณะเป็นเส้นตรง เส้นโค้งหรืออาจมีลักษณะเป็นเกลียว (ลัดดา, 2542) ไดอะตอม *Amphora* sp. มักพบแพร่กระจายอยู่ในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็มจัดเป็นพวกไดอะตอมหน้าดิน เนื่องจากอาศัยอยู่บนพื้นทราย เกาะอยู่บนพืชน้ำหรือวัตถุต่างๆ ในน้ำ เช่น ก้อนหินและพื้นซีเมนต์ (Cooksey and Chansang, 1976)

ในปัจจุบันไดอะตอม *Amphora* sp. สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงและอนุบาลสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น นำมาเป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ และใช้ในการอนุบาลกุ้งวัยอ่อน (Peterson and Curiel, 2002)

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของไดอะตอม

2.2.1. สารอาหาร

2.2.1.1 คาร์บอน คาร์บอนมีอิทธิพลต่อการสร้างตัวเซลล์และผลิตสารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และทุติยภูมิ (secondary metabolite) สาหร่ายสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ในรูปของสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ สาหร่ายพวกออโตโทรฟมีการดำรงชีวิตเหมือนพืชชั้นสูง โดยต้องการสารอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยแสง นอกจากนี้สาหร่ายสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในรูปของเกลือคาร์บอเนตหรือไบคาร์บอเนต การเปลี่ยนรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำสามารถแสดงได้ดังสมการ (Becker, 1994)

$$CO_2 + H_2O \longleftrightarrow H_2CO_3 \longleftrightarrow H^+ + HCO_3^- \longleftrightarrow 2H^+ + CO_3^{2-}$$

จากสมการข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ในน้ำมีระบบบัฟเฟอร์ที่ควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเพาะเชื้อให้คงที่ โดยอยู่ในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กรดคาร์บอนิค (H_2CO_3) ไบคาร์บอเนตอิออน (HCO_3^-) และคาร์บอเนตอิออน (CO_3^{2-}) การเปลี่ยนรูปของคาร์บอนในน้ำจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิและความเข้มข้นของสารอาหาร สาหร่ายหลายชนิดสามารถเปลี่ยนการดำรงชีวิตจากแบบออโตโทรฟิคเป็นแบบเฮเทอโรโทรฟิคได้ โดยเปลี่ยนจากการใช้สารอนินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีแสง เป็นการใช้สารอินทรีย์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง สาหร่ายพวกเฮเทอโรโทรฟได้รับคาร์บอนจากสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรตและไขมัน การศึกษาการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคนิยมใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลชนิดต่างๆ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (ตารางที่ 2.2)

2.2.1.2 ไนโตรเจน โดยทั่วไปแล้วสาหร่ายสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปสารประกอบอนินทรีย์และสารประกอบอินทรีย์ สารประกอบอนินทรีย์ที่สาหร่ายใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนจะอยู่ในรูปของก๊าซแอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียหรือไนเตรต เมื่อสาหร่ายใช้แอมโมเนียจะทำให้อาหารเพาะเชื้อมีความเป็นกรดมากขึ้น ในกรณีที่ใช้แอมโมเนียหรือไนเตรตจะทำให้อาหารเพาะเชื้อมีความเป็นด่างเพิ่มขึ้น ส่วนสารอินทรีย์ไนโตรเจนอาจอยู่ในรูปของกรดอะมิโน โปรตีนหรือยูเรีย โดยทั่วไปแล้วสาหร่ายสามารถเติบโตในอาหารที่มีสารอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีสารอนินทรีย์ไนโตรเจน วัตถุดิบที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะเป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่ประกอบด้วยสารประกอบไนโตรเจนหลายชนิดรวมกัน เช่น ยีสต์สกัด การขาดไนโตรเจนของสาหร่ายมีผลต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงและปริมาณรงควัตถุ รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดด้วย (ลัดดา, 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค

ชนิดของสาหร่าย	แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษา	เอกสารอ้างอิง
Nitzschia laevis	กลูโคส	Wen and Chen (2001)
Euglena gracilis	กลูโคส เอทานอล กรดซัคซินิค กรดกลูตามิค กรดไพรูวิค อะซิเตต อะลานีน แอสพาเตต แอสพาราจีน	Kusmic *et al.* (1999); Ogbonna *et al.* (1998)
Haematococcus pluvialis	อะซิเตต แอสพาราจีน	Kobayashi *et al.* (1997)
Dunaliella salina	กลูโคส อะซิเตต แลคเตต กลูตาเมต	Gladue and Maxey (1994)
Nitzschia alba	กลูโคส อะซิเตต กลูตาเมต	Barclay *et al.* (1994)
Tetraselmis suecica	กลูโคส อะซิเตต แลคเตต กลูตาเมต	Day and Tsavalos (1991)
Cyclotella cryptica	กลูโคส กาแลคโตส	White (1974)
Cocconeis diminuta	กลูโคส แลคเตต อะซิเตต	Cooksey (1972)

2.2.1.3 ซิลิกา ไดอะตอมมีความต้องการซิลิกาเพื่อใช้ในการเติบโต ทั้งนี้เนื่องจากเปลือกเซลล์ของไดอะตอมมีซิลิกาเป็นองค์ประกอบ โดยทั่วไปแล้วไดอะตอมสามารถใช้ซิลิกาได้ทั้งในรูปของกรดซิลิซิค (silicic acid) และซิลิเกต (silicate) ปริมาณซิลิกาที่เป็นองค์ประกอบของฟรัสตุลของไดอะตอมอยู่ในช่วง 45-200 พิโคกรัมต่อเซลล์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของเซลล์ เช่น ไดอะตอม *Cyclotella glomerata* มีขนาดเซลล์ 7x5 ไมโครเมตร มีซิลิกาเป็นองค์ประกอบในเซลล์เท่ากับ 100 พิโคกรัมต่อเซลล์ การเปลี่ยนแปลงปริมาณซิลิกาในเซลล์ไดอะตอมขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณซิลิกาที่เติมในอาหารเพาะเชื้อ สภาวะแวดล้อมระหว่างการเพาะเลี้ยง เช่น แสง อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของสารอาหารและความหนาแน่นของเซลล์ไดอะตอม รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ไดอะตอม (Werner, 1977)

2.2.1.4 เกลือแร่ เกลือแร่เป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการน้อยมากเมื่อเทียบกับคาร์บอนและไนโตรเจน แต่สาหร่ายก็ไม่สามารถขาดเกลือแร่ได้เพราะเกลือแร่มีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการอิเล็คโตรไลท์ (electrolyte) ของเซลล์ สาหร่ายที่ดำรงชีวิตในน้ำเค็มมีความจำเป็นต้องใช้โซเดียม (Na) โปแตสเซียม (K) และคลอไรด์ (Cl) ในการเติบโต นอกจากนี้สาหร่ายยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความต้องการแมกนีเซียม (Mg) ฟอสฟอรัส (P) กำมะถัน (S) โคบอลท์ (Co) ทองแดง (Cu) แมงกานีส (Mn) และแคลเซียม (Ca) เพื่อใช้เป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์บางชนิดและเป็นองค์ประกอบของสารบางชนิด เช่น โคบอลท์เป็นองค์ประกอบของวิตามินบี 12 (บัญญัติ, 2534)

2.2.1.5 วิตามิน วิตามินมีความจำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่าย โดยวิตามินทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) วิตามินที่มีความสำคัญต่อการเติบโตของสาหร่าย เช่น ไบโอติน (biotin) วิตามินบี 1 (thiamine)

2.2.2 สภาวะแวดล้อม

2.2.2.1 อุณหภูมิ สาหร่ายน้ำเค็มสามารถเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมีผลต่อการละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำ (dissolved CO_2) และการละลายของออกซิเจนในน้ำ (dissolved O_2) โดยเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นมีผลทำให้การละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำลดลง แต่การละลายของออกซิเจนในน้ำเพิ่มขึ้น (Lee and Ding, 1995)

2.2.2.2 แสงสว่าง แสงเป็นแหล่งพลังงานที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยปกติแล้วแหล่งพลังงานแสงที่ให้ระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นแสงจากดวงอาทิตย์และแสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ การให้แสงที่ระดับความเข้มแสงสูงๆ ส่งผลให้อุณหภูมิของอาหารเพาะเชื้อสูงขึ้นทำให้มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย

2.2.2.3 อากาศ การให้อากาศในเพาะเลี้ยงสาหร่ายนิยมให้ในรูปของอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเติมอากาศที่ผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงในอาหารเพาะเชื้อ พบว่าความเป็นกรดด่างจะคงที่ในช่วง 7.8-8.0 แต่การให้อากาศที่ผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จำเป็นต้องมีการกรอง ด้วยตัวกรองขนาดรูพรุน 0.3-0.5 ไมครอน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

2.2.2.4 ความเค็ม ระดับความเค็มที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่ายแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เช่น ความเค็มในช่วง 25-30 พีเอสยู (practical salinity unit, psu) เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่ายกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลต (dinoflagellate) ส่วนความเค็มในช่วง 20-25 พีเอสยู จะเหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่ายกลุ่มไดอะตอม

2.2.2.5 ความเป็นกรดด่าง (pH) สาหร่ายสามารถเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง แต่สาหร่ายบางชนิดสามารถเติบโตได้ในสภาวะที่ความเป็นด่างสูง เช่น สาหร่าย *Spirulina* sp. นอกจากนี้ความเป็นกรดด่างยังมีผลต่อการละลายของธาตุอาหารบางชนิด เช่น ที่ระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.6-6.5 ฟอสเฟตสามารถละลายน้ำและอยู่ในรูปของไดไฮโดรเจนฟอสเฟตอิออน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งสาหร่ายสามารถนำไปใช้ในการเติบโตได้ แต่ถ้าความเป็นด่างสูงกว่านี้ฟอสเฟตจะจับกับเหล็กหรืออลูมิเนียมเป็นผลทำให้อาหารเพาะเชื้อเกิดการตกตะกอน

2.3 สภาวะการเติบโตของสาหร่าย

แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่สิ่งมีชีวิตนำมาใช้ในการดำรงชีวิต สามารถใช้เป็นหลักเกณฑ์ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ พวกที่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานจัดเป็นพวกโฟโตโทรฟ (phototroph) ส่วนพวกที่ใช้สารอาหารที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายเป็นแหล่งพลังงานจัดเป็นเคโมโทรฟ (chemotroph) สิ่งมีชีวิตที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์จะเป็นพวกเฮเทอโรโทรฟ (heterotroph) แต่ถ้าใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนจัดเป็นพวกออโตโทรฟ (autotroph) ซึ่งสามารถสรุปการจำแนกสิ่งมีชีวิตตามการใช้แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การจำแนกสิ่งมีชีวิตตามแหล่งอาหารและพลังงาน

แหล่งคาร์บอน	แหล่งพลังงาน	
	เคมี	แสง
สารประกอบอินทรีย์	เคโมเฮเทอโรโทรฟ - สัตว์ชั้นสูง - โปรโตซัว - เห็ดรา - แบคทีเรีย	โฟโตเฮเทอโรโทรฟ - แบคทีเรียบางชนิด - สาหร่าย
ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	เคโมออโตโทรฟ - แบคทีเรียบางชนิด	โฟโตออโตโทรฟ - พืชชั้นสูง - สาหร่าย - ไซยาโนแบคทีเรีย - แบคทีเรียบางชนิด

ที่มา: สาโรจน์ และ ประวิทย์ (2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 สภาวะการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิค (photoautotrophic growth)

การเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิคของสาหร่าย เป็นสภาวะการเติบโตที่สาหร่ายสร้างอาหารได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคมีดังนี้

2.3.1.1 การเพาะเลี้ยงในบ่อเปิดกลางแจ้ง (open pond) เป็นระบบการเพาะเลี้ยงที่ใช้แหล่งพลังงานจากดวงอาทิตย์ การเพาะเลี้ยงแบบนี้มีข้อดีคือ ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเรื่องแหล่งพลังงานแสงเพราะใช้แสงจากดวงอาทิตย์ แต่การเพาะเลี้ยงในระบบเปิดกลางแจ้งมีข้อเสียคือ เกิดการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (สาหร่ายชนิดอื่น โปรโตซัวและแบคทีเรีย) ปัญหาที่เกิดขึ้นสามารถแก้ไขได้ โดยต้องเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดที่มีสามารถทนต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมได้ เช่น สาหร่าย *Dunaliella salina* ทนต่อความเครียดเนื่องจากความเค็มสูง สาหร่าย *Spirulina* sp. สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูงได้ การเติบโตของสาหร่ายในการเพาะเลี้ยงแบบเปิดมักแปรผันตามฤดูกาล ซึ่งแต่ละฤดูจะมีความเข้มแสงและอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป จึงเป็นการยากที่จะควบคุมให้สภาวะแวดล้อมเหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย อย่างไรก็ตามในประเทศไทย จีน เม็กซิโกและสหรัฐอเมริกา ยังมีการผลิตสาหร่าย *Spirulina* sp. เพื่อการค้าโดยทำการเพาะเลี้ยงในระบบเปิดกลางแจ้ง (Metting, 1996; Li and Qi, 1997)

2.3.1.2 การเพาะเลี้ยงในระบบปิด (close system) เป็นระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ทำการพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในระบบเปิด การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิดทำได้โดยเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง (photobioreactor) ซึ่งสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่ายได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิดจึงมีการนำไปใช้อย่างกว้างขวาง เช่น เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp. และ *Spirulina* sp. เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Borowitzka, 1999)

2.3.2 สภาวะการเติบโตแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟิค (photoheterotrophic growth)

การเติบโตแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟิคหรือมิกโซโทรฟิค (mixotrophic growth) เป็นสภาวะการเติบโตที่สาหร่ายใช้แสงและใช้สารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน (Vonshak *et al.*, 2000) การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิคมักใช้ความเข้มแสงต่ำๆ จึงสามารถหลีกเลี่ยงปัญหาการเติบโตของสาหร่ายถูกยับยั้งเนื่องจากความเข้มแสงสูงๆ (photoinhibition) และในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบางชนิดภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคไม่สามารถชักนำให้เซลล์สะสมสารรงควัตถุได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิคเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบางชนิดเพื่อผลิตสารรงควัตถุ จากรายงานพบว่าการเพาะลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* ภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิค สาหร่ายมีอัตราการเติบโตจำเพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.026 ต่อชั่วโมง และให้ผลผลิตไฟโคไซยานิน 120 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Chen *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิคเพื่อผลิตชีวมวล เช่น สาหร่าย *Chlorella sorokiniana* (Lee *et al.*, 1996)

2.3.3 สภาวะการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิค (heterotrophic growth)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค เป็นการเพาะเลี้ยงแบบระบบปิดและมีการนำเทคนิคนี้มาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายบางชนิดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งสาหร่ายสามารถเติบโตได้ดีและมีศักยภาพในการผลิตเซลล์สูง (Apt and Behrens, 1999) แต่เมื่อเปรียบเทียบราคาของอาหารเพาะเชื้อ พบว่าอาหารเพาะเชื้อของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคมีราคาสูงกว่าอาหารเพาะเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค นอกจากนี้ Chen (1996) ได้อธิบายถึงปัญหาและแนวทางแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเฮเทอโรโทรฟิคดังนี้

2.3.3.1 สาหร่ายที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคมีน้อยชนิด แนวทางที่ใช้ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้นคือ คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค จากการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายพบว่ามีสาหร่ายหลายชนิดที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค เช่น สาหร่าย *Cholrella pyrenoidosa* สามารถผลิตกรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid) ได้ดีกว่ายีสต์และสาหร่ายชนิดอื่นด้วย (Running *et al.*, 1994) ไดอะตอม *Nitzschia alba* และไดโนแฟลกเจลเลตน้ำเค็ม *Crypthecodinium cohnii* เป็นแหล่งผลิตที่ดีของกรดไขมันอีพีเอและกรดดีเอชเอ ตามลำดับ (Jing *et al.*, 1999; Kyle, 1996)

2.3.3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคจะเกิดปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย หากเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่สาหร่ายมีการเติบโตได้ช้ากว่าแบคทีเรียมาก การแก้ปัญหาที่เกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อ (axenic culture) การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิคในระดับห้องปฏิบัติการไม่ค่อยประสบปัญหาการปนเปื้อน แต่หากขยายขนาดการเพาะเลี้ยงมักเกิดปัญหาการปนเปื้อนได้ง่าย

2.3.3.3 ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคมักเกิดปัญหาเติบโตของสาหร่ายลดลงเมื่อสารอาหารที่อยู่ในอาหารเพาะเชื้อหมดลง รวมทั้งในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์มีรายงานที่พบว่าการเติบโตของสาหร่ายลดลงเนื่องจากความเข้มข้นของสารอาหารสูงเกินไป เช่น การเติบโตของสาหร่าย *Chlorella protothecoides* ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นของกลูโคสมากกว่า 40 กรัมต่อลิตร (Shi *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบครั้งคราว (fed-batch culture) และแบบต่อเนื่อง (continuous culture) เพื่อใช้ในการแก้ปัญหานี้

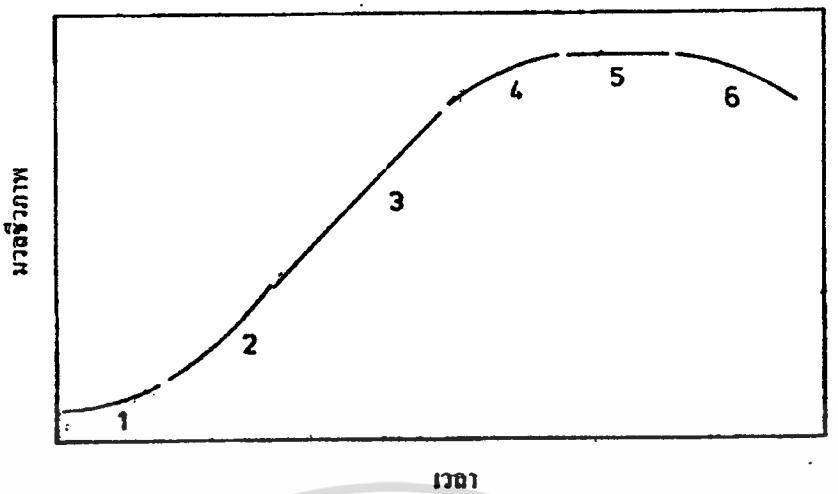
2.3.3.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคไม่สามารถผลิตสารเมแทบอไลต์พวกรงควัตถุได้ เนื่องจากการสะสมสารรงควัตถุในเซลล์สาหร่ายจำเป็นต้องใช้แสงเป็นตัวชักนำให้เกิดการสะสม ดังนั้นหากต้องการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตสารรงควัตถุบางชนิดสามารถทำได้โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิค เช่น การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* เพื่อผลิตไฟโคไซยานิน (Chen *et al.*, 1996) และเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. เพื่อผลิตแอสตาแซนทีน (astaxanthin) (Ma and Chen, 2001)

2.4 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

2.4.1 การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบตช์เป็นการเพาะเลี้ยงในระบบปิด โดยใช้ปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัดและไม่มีการเติมอาหารเข้าในระบบการเลี้ยง ทำให้อัตราการเติบโตของสาหร่ายลดลงเรื่อยๆ และมีแนวโน้มเป็นศูนย์เนื่องจากภาวะขาดอาหารและสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม ซึ่งเกิดจากการสะสมของเสียและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่สาหร่ายสร้างขึ้น โดยทั่วไปการเติบโตของสาหร่ายภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์แสดงดังรูปที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 การเติบโตของสาหร่ายภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

เมื่อ 1 คือ ระยะพักเซลล์ (lag phase)

2 คือ ระยะเร่งการเติบโต (accelerating growth phase)

3 คือ ระยะทวีคูณ (exponential growth or log phase)

4 คือ ระยะทวีคูณลดลง (decreasing log growth phase)

5 คือ ระยะคงที่ (stationary phase)

6 คือ ระยะเร่งการตาย (accelerated death phase)

ที่มา: Becker (1994)

จากกราฟพบว่า เมื่อเริ่มทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยังไม่มีการเพิ่มจำนวน แต่ในเวลาต่อมาเซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จากนั้นอัตราการเติบโตของเซลล์จะเริ่มคงที่และมีจำนวนเซลล์ลดลงเรื่อยๆ ซึ่งระยะการเติบโตของสาหร่ายสามารถอธิบายได้ดังนี้

2.4.1.1 ระยะพักเซลล์ การเติบโตในระยะนี้เป็นระยะที่เซลล์มีการปรับตัวให้เข้ากับอาหารเพาะเชื้อและสภาวะแวดล้อมใหม่ ทำให้เซลล์ไม่มีการเพิ่มจำนวน แต่ขนาดของเซลล์จะใหญ่ขึ้น เนื่องจากเซลล์จะมีการสังเคราะห์โปรโตพลาสซึมและสารที่จำเป็นชนิดต่างๆ เพื่อเตรียมพร้อมในการแบ่งเซลล์ เช่น เอนไซม์และดีเอ็นเอ ช่วงเวลาระยะพักตัวของเซลล์แต่ละชนิดจะต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย สภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงและระยะของเซลล์ที่นำมาทำการเพาะเลี้ยง

2.4.1.2 ระยะทวีคูณ ในช่วงระยะแรกของการเติบโตในระยะทวีคูณเป็นระยะที่สาหร่ายมีการแบ่งเซลล์อย่างทวีคูณ ระหว่างการเติบโตของเซลล์ในระยะนี้ความเข้มข้นของสารอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากสาหร่ายนำไปใช้ในการเติบโต แต่ภายหลังเซลล์จะปลดปล่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเสียที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมชนิดต่างๆ ออกนอกเซลล์มีผลทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลง

2.4.1.3 ระยะคงที่ เป็นระยะที่มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและคงที่ เนื่องจากเกิดภาวะสมดุลระหว่างอัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการตาย อันเนื่องมาจากเซลล์มีการปลดปล่อยของเสียออกนอกเซลล์มากขึ้น เช่น กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ มีผลทำให้อาหารเพาะเชื้อมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น เซลล์จึงไม่สามารถทนต่อความเป็นกรดที่มีเพิ่มขึ้นได้ ปัจจัยที่เป็นสาเหตุให้เซลล์ตายในระยะนี้คือ ความเข้มข้นของสารอาหารและปริมาณของเสียที่เซลล์ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์

2.4.1.4 ระยะตาย เป็นระยะสุดท้ายของการเติบโตของเซลล์ ซึ่งเซลล์จะตายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากขาดสารอาหารและไม่สามารถทนต่อของเสียที่มีมากขึ้น

ในกรณีที่พบว่าความเข้มข้นของสารอาหารเพียงชนิดเดียวเป็นปัจจัยจำกัดการเติบโตของสาหร่าย โดยสารอาหารดังกล่าวเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่าย เช่น กลูโคสหรืออะซิเตต ความเข้มข้นของสารอาหารที่สูงเกินไปจะทำให้การเติบโตของสาหร่ายลดลง แต่หากเตรียมอาหารเพาะเชื้อให้มีความเข้มข้นของสารอาหารต่ำ เมื่อสาหร่ายมีการเติบโตจะทำให้สารอาหารไม่เพียงพอต่อการเติบโต ปัญหาเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารที่สูงเกินไปมีผลทำให้การเติบโตของสาหร่ายลดลง สามารถหลีกเลี่ยงได้โดยใช้ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบครั้งคราว ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ที่มีการเติมอาหารเพาะเชื้ออย่างต่อเนื่องหรือเป็นระยะๆ โดยไม่มีการถ่ายเทอาหารเพาะเชื้อออกจากระบบเพาะเลี้ยง ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดจากสารอาหารบางชนิดเป็นพิษต่อสาหร่าย เช่น เมทานอลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จึงมีการเติมเมทานอลลงในระบบเพาะเลี้ยงทีละน้อยเพื่อรักษาความเข้มข้นของเมทานอลให้คงที่ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ (Whiteaker, 1980)

2.4.2 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture)

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้เซลล์มีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณตลอดเวลา โดยทำการเติมอาหารเพาะเชื้อและดึงน้ำเลี้ยงออกอย่างต่อเนื่อง ทำให้เซลล์อยู่ในภาวะคงที่หรือภาวะสมดุล (steady state) โดยมีอัตราการไหลเข้าและออกของสารอาหารตลอดเวลา การคงสภาพดังกล่าวข้างต้นนิยมใช้ปั๊มพ์ช่วยในการเติมอาหารเพาะเชื้อเข้าและดึงน้ำเลี้ยงออก หรืออาจใช้วิธีการไหลล้น (overflow method) เมื่อสาหร่ายเติบโตมีผลทำให้ปริมาณสารอาหารในอาหารเพาะเชื้อลดลง จนกระทั่งความเข้มข้นของสารอาหารที่เหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยงส่งเสริมให้สาหร่ายมีอัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ) ในอัตราที่เท่ากับอัตราการเจือจาง (dilution rate, D) ซึ่งอัตราการเจือจางสามารถคำนวณได้ดังสมการ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$D = \frac{F}{V} \quad (2.1)$$

เมื่อ F = อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรอาหารเพาะเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (มิลลิลิตร)

D = อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)

อัตราการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต่อเวลาขึ้นอยู่กับอัตราการเติบโตของสาหร่ายและความเข้มข้นของเซลล์ที่หายไปเนื่องจากไหลออกไปกับน้ำเลี้ยง สามารถแสดงได้ดังสมการ 2.2

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu C_x - DC_x \quad (2.2)$$

เมื่อ C_x = ความหนาแน่นเซลล์ (10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

ณ ภาวะสมดุล ความหนาแน่นเซลล์ของสาหร่ายจะคงที่ ดังนั้นอัตราการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต่อเวลาจะเท่ากับศูนย์ ทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับอัตราการเจือจาง แสดงดังสมการ 2.3

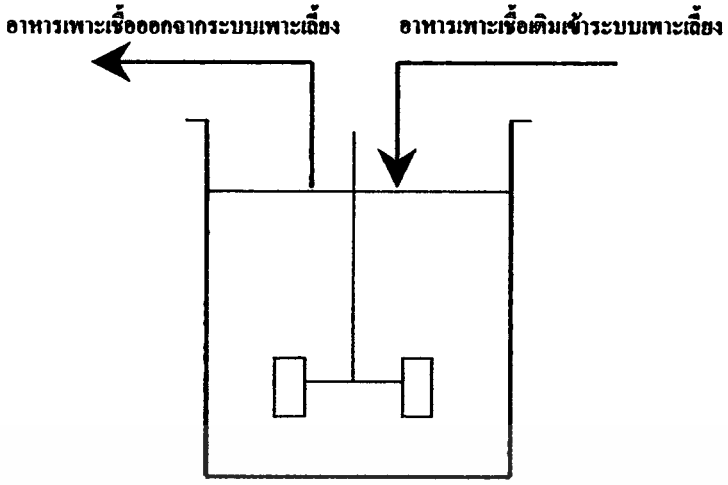
$$\mu C_x = DC_x$$

$$\mu = D \quad (2.3)$$

หากอัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นจนกระทั่งจำนวนเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพถูกชะล้างหมดไป เรียกสถานการณ์ดังกล่าวว่า wash out ทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารสูงขึ้น การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

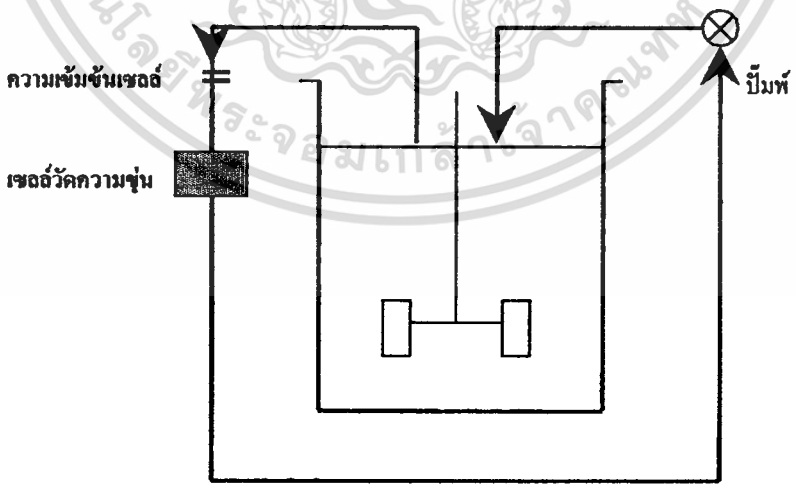
2.4.2.1 ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องที่มีการควบคุมอัตราการเติบโตของสาหร่ายโดยใช้สภาพแวดล้อมทางเคมี ได้แก่ ความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเพาะเชื้อ เรียกว่าระบบเคโมแสตต (chemostat culture) ในระบบการเพาะเลี้ยง พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารมีผลทำให้การเติบโตของสาหร่ายเพิ่มขึ้น จนกระทั่งที่ความเข้มข้นของสารอาหารสูงถึงระดับหนึ่งจะมีผลให้การเติบโตของสาหร่ายลดลง (รูปที่ 2.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ทำการควบคุมกิจกรรมของสาหร่ายแบบเคโมสแตต
ที่มา: บุษบา (2540)

2.4.2.2 ระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ควบคุมความหนาแน่นเซลล์ให้คงที่โดยใช้วิธีการวัดความขุ่นของเซลล์ เรียกว่าระบบแบบเทอร์บิโดแสตต (turbidostat culture) ซึ่งจำเป็นต้องควบคุมอัตราการไหลของอาหารเพาะเชื้อให้เหมาะสมเพื่อให้เซลล์มีการเติบโตและความหนาแน่นเซลล์คงที่ การควบคุมความหนาแน่นเซลล์ทำได้โดยวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง และส่งข้อมูลไปยังปั๊มพ์อาหารเพาะเชื้อเพื่อส่งอาหารเพาะเชื้อเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ทำการควบคุมกิจกรรมของสาหร่ายแบบเทอร์บิโดสแตต
ที่มา: บุษบา (2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องสามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคและให้ความหนาแน่นเซลล์สูง ปัญหาเรื่องการเติบโตของสาหร่ายลดลงเนื่องจากความเข้มข้นของสารอาหารสูงเกินไปสามารถแก้ไขได้ โดยเติมสารอาหารเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยงโดยใช้อัตราการเจือจางที่เหมาะสมควบคุมความเข้มข้นของสารอาหาร แต่การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องมีข้อเสียคือ มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียได้มากกว่าเนื่องจากใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานกว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์และแบบครั้งคราว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมกระบวนการเพาะเลี้ยงให้สะอาดปราศจากเชื้อปนเปื้อนมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งอากาศที่ให้ในระบบการเพาะเลี้ยงต้องปราศจากเชื้อปนเปื้อน (สมใจ, 2537)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Tan and Johns (1991) ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella saccharophila* เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นกลูโคสต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของสาหร่าย โดยพบว่าการเติบโตของสาหร่ายลดลงเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสมากกว่า 15 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่ายคือ 14 กรัมต่อลิตร

Chen and Johns (1994) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* แบบแบตช์ภายใต้สภาวะการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิค โดยใช้อะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของอะซิเตตที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่ายเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร

de Swaaf *et al.* (1999) ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Crypthecodinium cohnii* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคเพื่อผลิตกรดไขมันดีเอชเอ พบว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0-10 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้การเติบโตของสาหร่ายเพิ่มขึ้น แต่การผลิตกรดไขมันของสาหร่ายลดลง จากการศึกษายังพบว่าความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่ายคือ 75 กรัมต่อลิตร

Shi *et al.* (1999) ศึกษาการเติบโตและการผลิตลูเตอีน (lutein) ของสาหร่าย *Chlorella protothecoides* โดยเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 30 ลิตร และเติมกลูโคส 36 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.92 ต่อวัน ให้น้ำหนักแห้งและผลผลิตลูเตอีนเท่ากับ 16.4 กรัมต่อลิตร และ 4.85 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ โดยกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อหมดในชั่วโมงที่ 136 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นเวลาที่เซลล์ให้มวลชีวภาพสูงสุด

Jing *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษาการใช้กลูโคสของสาหร่าย *Crypthecodinium cohnii* ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค พบว่าในชั่วโมงที่ 60 การเติบโตของสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลดลง สาเหตุเนื่องจากความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเลี้ยงลดลงจาก 2.7 กรัมต่อลิตร เหลือเพียง 0.2 กรัมต่อลิตร

Zhang *et al.* (1999) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* แบบแบตช์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของสาหร่าย พบว่าความเข้มข้นของไนเตรต แอมโมเนียและยูเรียที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่ายเท่ากับ 0.48, 0.44 และ 0.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ พบว่ายูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.071 ต่อชั่วโมง จากนั้นทำการเลี้ยงสาหร่ายแบบครั้งคราวโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย ที่ได้จากการทดลองเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ พบว่าการเพาะลี้ยงแบบครั้งคราวให้ความหนาแน่นเซลล์ 1.1482 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าความหนาแน่นเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ 1.9 เท่า

Fabregas *et al.* (2000) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* แบบต่อเนื่อง โดยทดลองแปรผันอัตราการเจือจางระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่าที่สภาวะคงที่มีอัตราการเจือจางเท่ากับการเติมอาหารเพาะเชื้อและนำอาหารเพาะเชื้อออกจากระบบเพาะเลี้ยงในปริมาตร ร้อยละ 20 ของปริมาตรอาหารเพาะเชื้อทั้งหมดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และสาหร่ายให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.77×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

Wen and Chen (2001) เพาะเลี้ยงไดอะตอม *Nitzchia laevis* แบบต่อเนื่อง พบว่าที่สภาวะคงที่อัตราการเจือจางต่ำ (0.1-0.3 ต่อวัน) ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงที่สุด ในขณะที่อัตราการเจือจาง 1.0 ต่อวัน จะเกิดภาวะชะล้างเซลล์ และพบว่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงไดอะตอมเท่ากับ 0.6 ต่อวัน โดยให้ผลผลิตเซลล์สูงที่สุด 2.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เปปโตน (Scharlau Chemie, European Union)

3.1.2 ยีสต์สกัด (Scharlau Chemie, European Union)

3.1.3 เนื้อสกัด (Scharlau Chemie, European Union)

3.1.4 กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) (BDH, England)

3.1.5 กรดบอริค (H_3BO_3) (Fluka, Switzerland)

3.1.6 กรดไฮโดรคลอริค (HCL) (Labscan, Thailand)

3.1.7 เมทานอล (HPLC grade) (Labscan, Thailand)

3.1.8 เฮกเซน (HPLC grade) (Labscan, Thailand)

3.1.9 คลอโฟอร์ม (Labscan, Thailand)

3.1.10 โปแตสเซียมไนเตรต (KNO_3) (Merck, German)

3.1.11 ฟีนอล (C_6H_5OH) (Fisher Chemicals, England)

3.1.12 โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) (Fluka, Switzerland)

3.1.13 โปแตสเซียมไธโอซัลเฟต($K_2S_2O_3$) (Merck, German)

3.1.14 ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.H_2O$) (Fluka, Switzerland)

3.1.15 เฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3$) (Fluka, Switzerland)

3.1.16 โซเดียมเอทิลีน ไดอะมีน เตตระอะซิติก (Na_2EDTA) (Fluka, Switzerland)

3.1.17 คอปเปอร์ซัลเฟต-5-ไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) (Fluka, Switzerland)

3.1.18 ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) (Fluka, Switzerland)

3.1.19 โซเดียมโมลิบเดท-4-ไฮเดรต ($Na_2MoO_4.2H_2O$) (Fluka, Switzerland)

3.1.20 แมงกานีสคลอไรด์-4-ไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Merck, German)

3.1.21 โคบอลท์คลอไรด์-6-ไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$) (Fluka, Switzerland)

3.1.22 โซเดียมเมตาซิลิเกต-9-ไฮเดรต ($Na_2SiO_3.9H_2O$) (Merck, German)

3.1.23 โปรตีนมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin, BSA) (Fluka, Switzerland)

3.1.24 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Labscan, Thailand)

3.1.25 โซเดียมโพแตสเซียมทาเทรต (potassium sodium tatrate) (Fluka, Switzerland)

3.1.26 Folin-Ciocalteu reagent (Fluka, Switzerland)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 กล้องจุลทรรศน์ (Nikon รุ่น Alphaphot YS, Japan)

3.2.2 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น BX50, Japan) และชุดถ่ายภาพดิจิตอล (Olympus รุ่นDP11, Japan)

3.2.3 เครื่องวัดความเค็ม (salino meter)(Atago รุ่น S-8, Japan)

3.2.4 หม้อนึ่งความดัน (autoclave) (Hirayama รุ่น Hiclave HV-50, Japan)

3.2.5 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow)(Nuaire Class II รุ่น NU-440-300E, USA)

3.2.6 เครื่องนับจำนวนเซลล์ (Diamond counter, Taiwan)

3.2.7 สไลด์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) (Neubaer improved brigth-line, Germany)

3.2.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Milton Roy รุ่น Genesys 5, Germany)

3.2.9 เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ (log Meter) (Microlog Fourier, Israel)

3.2.10 เครื่องวัดความเข้มแสง (lux Meter) (Lx-101, China)

3.2.11 กระดาษกรอง GF/C ขนาด 25 และ 47 มิลลิเมตร (Whatman International Ltd., England)

3.2.12 ตัวกรองอากาศ (air filter) ขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน (Gelman Sciences รุ่น ACRO 50, England)

3.2.13 เครื่องกวนระบบแม่เหล็ก (magnetic Stirrer) (HL-MS115, Thailand)

3.2.14 ปั๊มพ์แบบรีดสาย (peristaltic pump) (Eyela รุ่น MP-3N, USA)

3.2.15 เครื่องปั๊มพ์อากาศ (air pump) (Hailea รุ่น ACO-318, China)

3.2.16 เครื่องทำแห้งด้วยวิธีการระเหิด (freeze dryer) (Labconco รุ่น Freezone 4.5, USA.)

3.2.17 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) (Shimazu รุ่น CBP20, Japan)

3.2.18 เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) (Water, U.S.A.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค

3.3.1 การเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ทำการเก็บก้อนหินที่มีเมือกลื่นและตะกอนทรายรอบๆ ก้อนหิน จากบริเวณหาดหินที่ชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี นำก้อนหินและตะกอนทรายใส่โหลแก้วเพื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้มีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้น โดยเติมอาหารเพาะเชื้อสูตรของกิลลาร์ด (Guillard's medium) หรือ F/2 ปกติ (ลัดดา, 2541) (ภาคผนวก ก) ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลจากบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างก้อนหิน ซึ่งมีความเค็ม 24 พีเอสยู (practical salinity units, psu) เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิห้องและพ่นอากาศตลอดเวลา ระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่ายต้องปรับความเค็มของอาหารเพาะเชื้อให้คงที่ โดยเติมน้ำกลั่นเพื่อชดเชยน้ำที่ระเหยออกจากภาชนะ

3.3.2 การแยกสายพันธุ์สาหร่าย

เมื่อสาหร่ายที่เพาะเลี้ยง (หัวข้อ 3.3.1) มีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้น สังเกตได้จากคราบสีน้ำตาลเกาะติดที่ผนังโหลแก้ว เก็บคราบสีน้ำตาลมาทำการแยกเซลล์สาหร่ายโดยใช้วิธี single cell isolation (Hoshaw and Rosowski, 1975) โดยนำหลอดแก้วขนาดเล็กที่เรียกว่า พาสเจอร์ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใช้เป็นอุปกรณ์ในการดูดเซลล์สาหร่าย ใช้ปากคีบจับปลายด้านหนึ่งของพาสเจอร์ปิเปต เผาปลายพาสเจอร์ปิเปตจนกระทั่งพาสเจอร์ปิเปตอ่อนตัว ขณะเดียวกันใช้ปากคีบดึงปลายพาสเจอร์ปิเปตให้ยาวขึ้น เพื่อทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางของพาสเจอร์ปิเปตมีขนาดเล็กลง จากนั้นใช้ปากคีบหักปลายพาสเจอร์ปิเปตและใช้สายยางซิลิโคนต่อกับปลายอีกด้านหนึ่งของพาสเจอร์ปิเปตเพื่อใช้ดูดเก็บเซลล์สาหร่าย โดยทำการดูดเก็บเซลล์สาหร่ายทุกชนิดที่มองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted light microscope) ทีละเซลล์ จากนั้นนำสาหร่ายทุกชนิดที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปกติ ความเค็ม 24 พีเอสยู และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 5,200 ลักซ์ เมื่อสาหร่ายมีการเติบโตจึงนำไปคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค

3.3.3 การคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค

นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้ (จากหัวข้อ 3.3.2) เขี่ยลงในอาหารแข็งสูตร F/2 ปกติ ที่เสริมด้วยสารอาหารอินทรีย์ที่ดัดแปลงมาจากสูตรของ Cid *et al.* (1992) ซึ่งประกอบด้วย เปปโตน 0.25 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 0.5 กรัมต่อลิตร โดยอาหารเพาะเชื้อมีความเค็ม 24 พีเอสยู เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในที่มืด โดยห่อจานเพาะเชื้อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เมื่อสาหร่ายมีการเติบโตขึ้นบนผิวอาหารแข็ง จึงย้ายสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลวสูตร F/2 ที่เสริมด้วย เปปโตน 0.25 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 0.5 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การแยกสาหร่ายให้บริสุทธิ์

นำสาหร่ายที่คัดเลือกได้จากหัวข้อ 3.3.3 มาแยกให้บริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตอื่น (axenic culture) โดยใช้วิธี single cell isolation ดังหัวข้อ 3.3.2 และนำเซลล์สาหร่ายที่แยกได้ล้างหลายๆ ครั้งในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่หยดอยู่บนแผ่นสไลด์เพื่อทำการล้างแบคทีเรียออกจากเซลล์สาหร่าย จากนั้นนำสาหร่ายหนึ่งเซลล์มาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (clone culture) จนกระทั่งสาหร่ายมีการเติบโตจึงย้ายเซลล์มาเขี่ยเชื้อสาหร่ายลงบนอาหารแข็งสูตร F/2 ที่เสริมด้วยอาหารเพาะเชื้อแบคทีเรีย (nutrient broth, NB) ซึ่งมีส่วนประกอบคือ เปปโตน ยีสต์สกัดและเนื้อสกัดในปริมาณ 5 2 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Bridson, 1995) และเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (4 กรัมคาร์บอนต่อลิตร) ในที่นี้จะเรียกว่าอาหารสูตร F/2+NB+4C (ชมพูนุท, 2543) ผสมสารละลายยาปฏิชีวนะที่ประกอบด้วยเพนนิซิลิน จี (penicillin G) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) และคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) เข้มข้น 10 5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Guillard, 1973) (ภาคผนวก ข) ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อเท่ากับ 30 พีเอสยู เมื่อสาหร่ายเติบโตจึงทำการย้ายเชื้อสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร F/2+NB+4C

3.3.5 การจัดจำแนกชนิดของสาหร่าย

เมื่อคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค (หัวข้อ 3.3.3) และทำให้บริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย (หัวข้อ 3.3.4) จากนั้นทำการจัดจำแนกชนิดของสาหร่าย โดยศึกษาลักษณะของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพเพื่อใช้เปรียบเทียบกับเอกสารที่ใช้ในการจัดจำแนก (ลัดดา, 2542) รวมทั้งได้รับความอนุเคราะห์ในการจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายจากศาสตราจารย์ลัดดา วงศ์รัตน์ และ นางสาวอรรชนีย์ ชำนาญศิลป์ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.4 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองเป็นสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากหัวข้อ 3.3 โดยเป็นสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในที่มืดคือ ไดอะตอมน้ำเค็ม *Amphora delicatissima* สายพันธุ์ AM9901 ซึ่งเก็บรักษาหัวเชื้อไดอะตอมในสภาพที่ปลอดแบคทีเรีย (axenic culture) ในห้องปฏิบัติการของหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเก็บไดอะตอมไว้ในอาหารแข็งสูตร F/2+NB+4C ให้แสง 500 ลักซ์ ด้วยหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ตลอดเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การเตรียมไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 สำหรับใช้ในการทดลอง

เตรียมไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 สำหรับใช้ในการทดลองโดยเขี่ยเชื้อไดอะตอมจากอาหารแข็งที่ผ่านวิธีแยกให้บริสุทธิ์ปราศจากเชื้อปนเปื้อน (หัวข้อ 3.3.3 และ 3.3.4 ตามลำดับ) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร หลังจากไดอะตอมมีการเติบโตแล้วจึงย้ายเชื้อไดอะตอมมาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีความเค็ม 30 พีเอสยู และให้แสง 500 ลักซ์ ด้วยหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ตลอดเวลาระหว่างการเพาะเลี้ยง ในการทดลองศึกษาการเติบโตของไดอะตอมภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค สามารถเตรียมหัวเชื้อไดอะตอมได้โดยเพาะเลี้ยงไดอะตอมในอาหารเหลวสูตร F/2 ปกติ ส่วนการศึกษาการเติบโตของไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค เตรียมหัวเชื้อไดอะตอมโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C

3.6 การวัดการเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

3.6.1 การนับเซลล์ไดอะตอม

สุ่มเก็บตัวอย่างไดอะตอมจากชุดการทดลอง จากนั้นนับจำนวนเซลล์ไดอะตอมด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) โดยนำกระจกปิดสไลด์วางลงบนแผ่นสไลด์นับเม็ดเลือด หยดตัวอย่างไดอะตอมลงบนสไลด์ทั้งช่องบนและล่าง วางสไลด์บนแท่นของกล้องจุลทรรศน์และทำการนับเซลล์ไดอะตอมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่ละตัวอย่างจะทำการนับซ้ำ 3 สไลด์

3.6.2 การวัดน้ำหนักแห้งของไดอะตอม

ใช้วิธีการวัดน้ำหนักแห้งที่ดัดแปลงจากวิธีของ Chu *et al.* (1996) เริ่มต้นจากนำกระดาษกรอง Whatman GF/C มาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่แล้วชั่งน้ำหนักกระดาษกรองและเก็บไว้ในโถดูดความชื้น เก็บตัวอย่างไดอะตอม ปริมาตร 40 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองที่เตรียมไว้ในข้างต้น ใช้น้ำกลั่นล้างอาหารเพาะเชื้อออกจากกระดาษกรอง 3 ครั้ง นำกระดาษกรองที่ผ่านการกรองเซลล์แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักคงที่ จากนั้นชั่งน้ำหนักกระดาษกรองอีกครั้งหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

3.7.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม

ใช้วิธีฟีนอล-ซัลฟูริค (Phenol-sulfuric method) (Dobois *et al.*, 1956) โดยเก็บตัวอย่างอาหารที่เพาะเชื้อไดอะตอมจากชุดการทดลอง นำมากรองเซลล์ไดอะตอมออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 93 ปิเปตสารละลายที่กรองไดอะตอมออกแล้ว 1 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอล ร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งหลอดทดลองไว้ 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำไปวางในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณความเข้มข้นของกลูโคส โดยเทียบจากกราฟสารละลายมาตรฐานที่เตรียมจากกลูโคสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อลิตร (รูปที่ ง.2)

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม

ใช้วิธีของ Strickland and Parson (1972) โดยเก็บตัวอย่างอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมจากชุดการทดลอง กรองเซลล์ไดอะตอมออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 93 ปิเปตสารละลายที่กรองไดอะตอมออกแล้ว 1 มิลลิลิตร เติมรีเอเจนต์ 0.1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตเท่ากับ 0-100 ไมโครกรัมฟอสเฟตต่อลิตร (รูปที่ ง.3)

3.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม

3.7.3.1 การตรวจวัดไนโตรเจนในรูปของไนเตรต ใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร (ultraviolet spectrophotometric screening method) ตามวิธีของ Greenberg *et al.* (1992) โดยเก็บตัวอย่างอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมและกรองเซลล์ออก ทำการเจือจางตัวอย่างอาหารเพาะเชื้อด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร นำค่าผลต่างของการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณความเข้มข้นของไนเตรตจากกราฟมาตรฐาน การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนโตรเจนทำได้โดยนำโปแตสเซียมไนเตรต (KNO_3) อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0-10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (รูปที่ ง.4)

3.7.3.2 การวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ในอาหารเพาะเชื้อ ทำได้โดยนำอาหารเพาะเชื้อที่ผ่านการกรองเซลล์ออกมาออกซิไดซ์ด้วยวิธีของ Grasshoff *et al.* (1999) โดยเติมออกซิเดชั่นรีเอเจนท์ (ประกอบด้วย โพแตสเซียมไธโอซัลเฟต หรือ $K_2S_2O_3$ 5 กรัม และกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

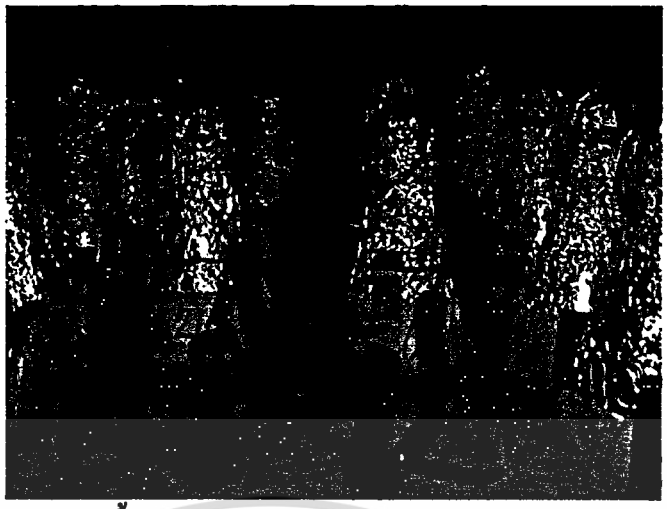
บอริค หรือ H_3BO_3 3 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.375 โมลลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเพาะเชื้อที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันสูง โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ไนเตรตตามวิธี ultraviolet spectrophotometric screening method ที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.7.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานทำได้โดยนำโปแตสเซียมไนเตรตไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0-10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (รูปที่ ง.2)

3.8 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเชื้อในขวดรูปชมพู่

3.8.1 ผลของสารอาหารอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

เพาะเลี้ยงไดอะตอมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ห่อขวดรูปชมพู่ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสงส่องผ่านเข้าไป (รูปที่ 3.1) และทำให้สภาวะในการเพาะเลี้ยงเป็นแบบเฮเทอโรโทรฟิคในที่มืด การเพาะเลี้ยงไดอะตอมใช้เซลล์เริ่มต้นในการทดลองประมาณ $1x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเค็มอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู ทดลองแปรผันความเข้มข้นของสารอาหารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเชื้อสูตร NB ซึ่งได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัดและเนื้อสกัด โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารอาหารอินทรีย์ไนโตรเจนในอาหารสูตร NB เป็นกลุ่มควบคุม (เปปโตน ยีสต์สกัด และเนื้อสกัด 5 2 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีค ในขวดรูปชมพู่

3.8.1.1 ผลของเปปโตนต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

เพาะเลี้ยงไดอะตอมในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เสริมด้วย ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร ทำการแปรผันความเข้มข้นของเปปโตนในอาหารเพาะเชื้อเป็น 0 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

3.8.1.2 ผลของยีสต์สกัดต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

ทำการทดลองในลักษณะเดียวกันกับหัวข้อ 3.8.1.1 แต่แปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมเท่ากับ 0 2 4 และ 8 กรัมต่อลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของเนื้อสกัด 1 และเปปโตนเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร (ได้จากการทดลองหัวข้อ 3.8.1.1)

3.8.1.3 ผลของเนื้อสกัดต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

ทำการทดลองในลักษณะเดียวกันกับหัวข้อ 3.8.1.1 แต่เพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เสริมด้วยเนื้อสกัดเท่ากับ 0 1 2 และ 4 กรัมต่อลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัดเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร (ได้จากการทดลองหัวข้อ 3.8.1.2) และเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

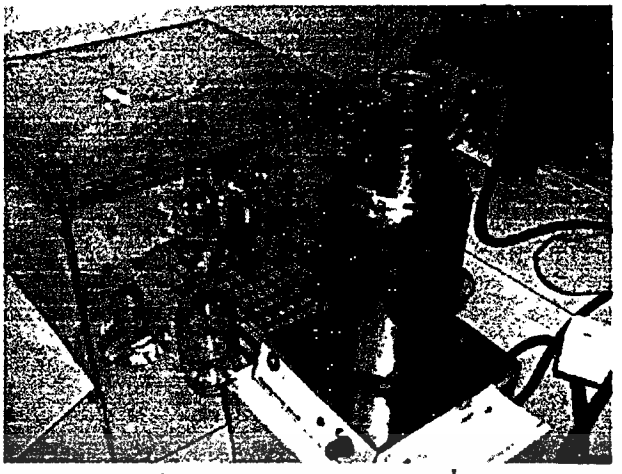
เพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB ที่มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร (จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.8.1) และเติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอนต่อลิตร หรือเรียกว่า อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที เมื่อไดอะตอมมีการเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) เติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงไดอะตอม ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์ (หัวข้อ 3.6.1)

3.9 ลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในทดลองการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

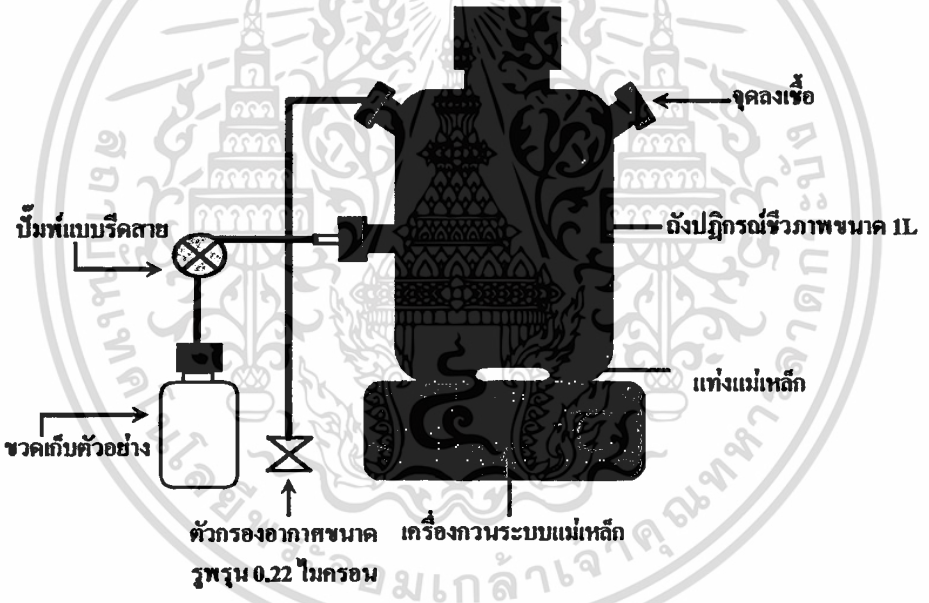
3.9.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์มีสองขนาดคือ 1 และ 5 ลิตร ถังปฏิกรณ์ชีวภาพทำจากขวดแก้ว (Duran bottle) ที่พ่นด้วยสเปรย์สีดำทึบเพื่อป้องกันการส่องผ่านของแสง ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร มีปริมาตรการทำงาน (working volume) 700 มิลลิลิตร และขนาด 5 ลิตร มีปริมาตรการทำงาน 4 ลิตร การเก็บตัวอย่างเซลล์ไดอะตอมทำได้โดยใช้ปั๊มพ์แบบรีดสาย (peristaltic pump) ดึงน้ำเลี้ยงให้ไหลออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเข้าสู่ขวดเก็บตัวอย่าง (sampling bottle) ส่วนการให้อากาศทำได้โดยใช้ปั๊มพ์ (air pump) พ่นอากาศ 0.65 ลิตรต่อนาที ลงในสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตแล้วอากาศไหลผ่านตัวกรอง (air filter) ที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน ไหลเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อากาศที่ออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะพ่นผ่านสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเช่นกัน ระหว่างที่ทำการเพาะเลี้ยงทำการกวนตลอดเวลาโดยใช้เครื่องกวนระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ลักษณะถังปฏิกรณ์ชีวภาพและระบบการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์แสดงดังรูปที่ 3.2 และรูปที่ 3.3 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 ลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์

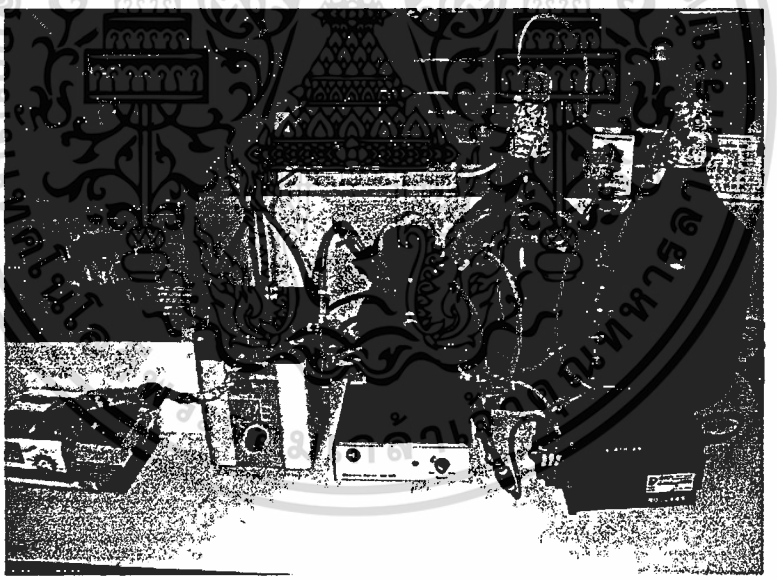


รูปที่ 3.3 ระบบการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

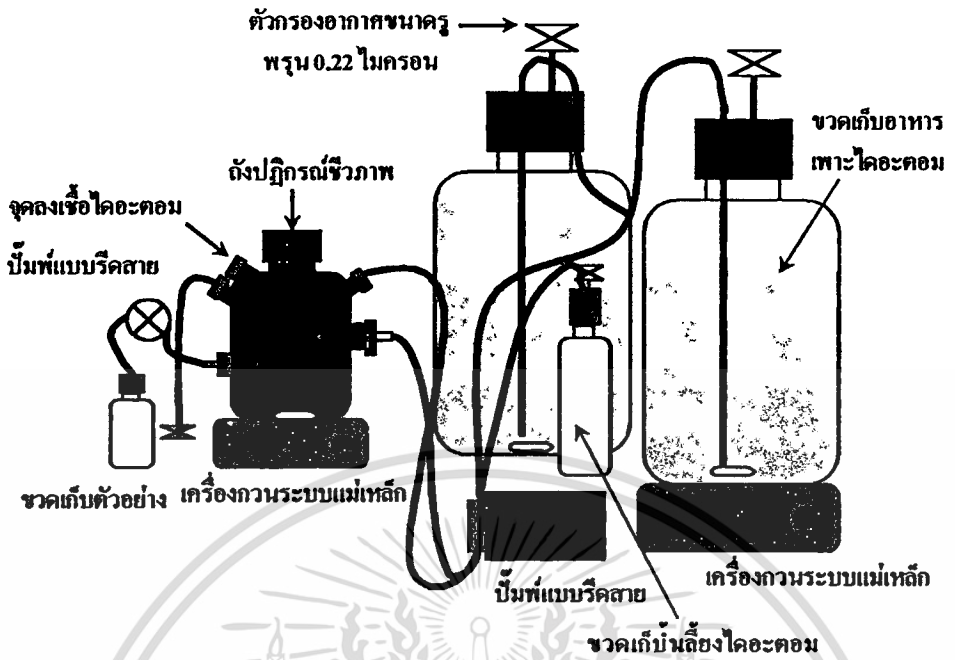
3.9.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่อง

ทำจากขวดเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 1 ลิตร พ่นสเปรย์สีดำเพื่อให้ทึบแสง ตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีท่อเข้าและออกจำนวนหกท่อ โดยท่อที่หนึ่งต่อกับตัวกรองอากาศซึ่งมีขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน เพื่อให้อากาศในระบบเพาะเลี้ยงออกสู่ภายนอก ท่อที่สองต่อกับขวดเก็บอาหารเพาะเชื้อขนาด 5 ลิตร ที่ใช้ในการเติมระหว่างที่ทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ท่อที่สามใช้ในการลงเชื้อไดอะตอมเมื่อเริ่มทำการทดลองเพาะเลี้ยง ท่อที่สี่มีไว้เพื่อทำการเติมสารอาหารบางชนิด ท่อที่ห้าใช้ในการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงไดอะตอมเป็นท่อที่ต่อกับขวดเก็บตัวอย่าง ท่อที่หกใช้นำน้ำเลี้ยงไดอะตอมออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเวลาทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องต้องเติมอาหารเพาะเชื้อเข้าและนำน้ำเลี้ยงไดอะตอมออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยเปิดปั๊มพ์ให้อาหารเพาะเชื้อและน้ำเลี้ยงจะไหลผ่านท่อซิลิโคนเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพและขวดเก็บน้ำเลี้ยง (outlet bottle) ตามลำดับ ลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องแสดงดังรูปที่ 3.4 และระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องแสดงดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.4 ลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.5 ระบบการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่อง

3.10 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

3.10.1 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

3.10.1.1 ผลของการให้อากาศต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

เพาะเลี้ยงไดอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C (ผลการทดลองในหัวข้อ 3.8.1) 700 มิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบไม่ให้อากาศแต่กวนตลอดเวลาด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที และอีกชุดการทดลองทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบให้อากาศและกวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบให้อากาศต้องทำการฆ่าเชื้ออากาศดังวิธีการที่อธิบายในหัวข้อ 3.9.1 และให้อากาศด้วยอัตรา 0.65 ลิตรต่อชั่วโมง ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์และวัดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค (หัวข้อ3.7.1.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10.1.2 ผลของการเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

เพาะเลี้ยงไดอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตรอาหารเพาะเชื้อ 700 มิลลิลิตร ไม่ให้อากาศในการเพาะเลี้ยง (ผลการทดลองในหัวข้อ 3.10.1.1) แต่กวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์มีการเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ ซึ่งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีปริมาตรอาหารเพาะเชื้อที่คงเหลือจากการเก็บตัวอย่างเพื่อนับเซลล์ประมาณ 400 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์

3.10.2 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

3.10.2.1 การผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะแบบเฮเทอโรโทรฟิค

เพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 4 ลิตร ไม่ให้อากาศในการเพาะเลี้ยงแต่กวน 300 รอบต่อนาที ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมโดยใช้วิธีการนับเซลล์และวัดน้ำหนักแห้ง (หัวข้อ 3.6.2) รวมทั้งวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค

3.10.2.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

เพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อ F/2+NB+4C ปริมาตร 4 ลิตร ไม่ให้อากาศในการเพาะเลี้ยงแต่กวน 300 รอบต่อนาที ในการทดลองครั้งนี้ได้เติมสารละลายกลูโคสสองครั้ง โดยเติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อประมาณ 10 กรัมต่อลิตร การสารละลายกลูโคสครั้งที่หนึ่งทำได้ก็ต่อเมื่อพบว่าไดอะตอมมีการเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ เมื่อไดอะตอมมีการเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นจนเข้าสู่ระยะคงที่เป็นครั้งที่สอง ทำการเติมกลูโคสลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพอีกครั้ง ตลอดการทดลองวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์และวัดความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11 ผลของซิลิกาต่อการเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่

3.11.1 ผลของการเติมซิลิกาต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

เพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ซึ่งมีความเข้มข้นของซิลิกา 0.12 มิลลิโมลาร์ จนกระทั่งไดอะตอมมีการเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ จึงเติมสารละลายโซเดียมเมตาซิลิเกต-9-ไฮเดรต ($Na_2SiO_3.9H_2O$) เข้มข้น 32.60 กรัมซิลิกาต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเชื้อซึ่งทำให้มีความเข้มข้นของซิลิกาประมาณ 1.2 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเพาะเลี้ยงไดอะตอมต่อไป และการทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงไดอะตอมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที การทดลองทำ 3 ซ้ำ ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด

3.11.2 ผลของความเข้มข้นของซิลิกาต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

เพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในที่มืด โดยเพาะเลี้ยงไดอะตอมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการทดลองแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมเมตาซิลิเกต-9-ไฮเดรต ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 โดยใช้สารละลายโซเดียมเมตาซิลิเกต-9-ไฮเดรต 0 0.32 3.26 6.52 และ 13.00 กรัมซิลิกาต่อลิตร หรือมีความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 0 0.12 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปกติเท่ากับ 0.12 มิลลิโมลาร์) ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์

3.11.3 ผลของซิลิกาต่อการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

เพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค โดยเพาะเลี้ยงไดอะตอมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ระหว่างเพาะเลี้ยงไดอะตอมให้แสง 500 ลักซ์ ทดลองแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมเมตาซิลิเกต-9-ไฮเดรต ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 โดยเติมเท่ากับ 0 0.32 3.26 6.52 และ 13.00 กรัมซิลิกา

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อลิตร ซึ่งเป็นผลให้ซิลิกามีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.12, 1.2, 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์ วัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์

3.12 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม

3.12.1 การเปรียบเทียบการเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิคที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่

เพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค โดยเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้แสง 500 ลักซ์ อาหารเพาะเชื้อที่ใช้ทดลองมี 2 สูตร คือ (1) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปกติ (2) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เติมซิลิกาในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิคของไดอะตอม (ได้จากการทดลองหัวข้อ 3.11.3) และทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยอาหารเพาะเชื้อที่ใช้ทดลองมี 5 สูตร คือ (1) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอนต่อลิตร หรืออาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+4C (2) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ผสมอาหารเพาะเชื้อสูตร NB หรืออาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB (3) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C (ผลการทดลองในหัวข้อ 3.8.1) (4) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 3.26 กรัมซิลิกาต่อลิตร (1.2 มิลลิโมลาร์) หรืออาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+1.2 mM Si (5) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่มีความเข้มข้นของซิลิกาที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม (ผลจากการทดลองหัวข้อ 3.11.2) ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์

3.12.2 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

เพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม (ได้จากการทดลองในหัวข้อ 3.11.2) 700 มิลลิลิตร (ลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแสดงดังหัวข้อ 3.9.1) ไม่ให้อากาศในการเพาะเลี้ยง (ได้จากการทดลองหัวข้อ 3.10.1.1) แต่กวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.12.3 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

เพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร (ลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพอธิบายดังข้อ 3.9.2) ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม (จากการทดลองในหัวข้อ 3.10.1.2) ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ในการเพาะเลี้ยงไม่มีการให้อากาศแต่มีการกวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์จนกระทั่งเซลล์มีการเติบโตเข้าสู่ระยะทวีคูณ จากนั้นเริ่มเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องโดยเปิดปั๊มพ์แบบรีดสายเพื่อให้มีการเติมนำอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพและมีการนำน้ำเลี้ยงออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเข้าสู่ขวดเก็บเกี่ยวเซลล์ การทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องแบ่งเป็น 5 หัวข้อดังนี้

3.12.3.1 ผลของอัตราการกวนต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

ทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์เป็นเวลา 8 วัน จากนั้นเริ่มทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยเปิดปั๊มพ์แบบรีดสายเพื่อให้มีการเติมนำอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม (ได้จากการทดลองในหัวข้อ 3.10.1.2) เข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพและมีการนำน้ำเลี้ยงไดอะตอมออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเข้าสู่ขวดเก็บเกี่ยวเซลล์ ในอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.96 ต่อวัน เมื่อไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์อยู่ในภาวะคงที่ (steady state) ซึ่งเป็นภาวะที่อัตราการเจือจาง (dilution rate) เท่ากับอัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) ทำการแปรผันอัตราการกวนระหว่างเพาะเลี้ยง โดยปรับระดับอัตราการกวนของแท่งแม่เหล็กที่เครื่องกวนระบบแม่เหล็กให้มีความเร็ว 600 รอบต่อนาที ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์

3.12.3.2 ความสัมพันธ์ของความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจือในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่อง

เพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์เป็นเวลา 13 วัน จากนั้นเริ่มทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยเปิดปั๊มพ์แบบรีดสายเพื่อให้มีการเติมนำอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม (จากการทดลองในหัวข้อ 3.10.1.2) เข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพและมีการนำน้ำเลี้ยงไดอะตอมออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเข้าสู่ขวดเก็บเกี่ยวเซลล์ ในอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.24 ต่อวัน เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะคงที่ทำการปรับอัตราการเจือจางให้สูงขึ้นเป็น 0.45 ต่อวัน โดยปรับอัตราการไหล (flow rate) ของการนำอาหารเพาะเชื้อเข้าและน้ำเลี้ยงไดอะตอมออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งทำได้โดยปรับระดับความเร็วรอบของปั๊มพ์แบบรีดสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้น เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะคงที่อีกครั้งปรับอัตราการเจือจางลงเท่ากับ 0.34 ต่อวัน การวัดอัตราการไหลของอาหารเพาะเชื้อ (มิลลิลิตรต่อวัน) ทำได้โดยวัดปริมาตรอาหารเพาะเชื้อที่ไหลออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์

3.12.3.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจาง ความหนาแน่นเซลล์และผลผลิตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

ลำดับต่อมาทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม (ได้จากการทดลองในหัวข้อ 3.10.1.2) ปริมาตร 700 มิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ก่อนเป็นเวลา 9 วัน จากนั้นเริ่มทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยใช้อัตราการเจือจาง 0.14 ต่อวัน เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะคงที่ทำการปรับอัตราการเจือจางเป็น 0.35 0.44 และ 1.00 ต่อวัน ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอมที่ระดับอัตราการเจือจางสูงเท่ากับ 1.00 ต่อวัน ความหนาแน่นเซลล์ลดลงมากจนอาจเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ (wash out) จึงทดลองหยุดระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง แต่เพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ต่อไปโดยไม่มีการเติมอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมและนำน้ำเลี้ยงไดอะตอมออกจากระบบการเพาะเลี้ยง ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์และคำนวณผลผลิตของเซลล์ไดอะตอมในหน่วยกรัมต่อลิตรต่อวัน

3.12.3.4 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมและปริมาณไนโตรเจนในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

ทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิค (ได้จากการทดลองในหัวข้อ 3.10.1.2) ปริมาตร 700 มิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ก่อนเป็นเวลา 8 วัน จากนั้นเริ่มทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยใช้อัตราการเจือจาง 0.23 ต่อวัน เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะคงที่ทำการปรับอัตราการเจือจางเป็น 0.38 0.52 0.94 และ 1.24 ต่อวัน ตามลำดับ โดยในที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.94 ต่อวัน ได้ตรวจวัดปริมาณโปรตีน (ตามวิธีของ Lowry *et al*, 1951 วิธีการอธิบายไว้ในหัวข้อ 13.3.1) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณไนเตรต (ตามวิธีการในหัวข้อ 3.7.3) ทั้งในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม ที่เตรียมไว้เติมเข้าสู่ระบบเพาะเลี้ยงและในน้ำเลี้ยงไดอะตอมที่อยู่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ รวมทั้งตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์และคำนวณผลผลิตของเซลล์ไดอะตอมในหน่วยกรัมต่อลิตรต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.12.3.5 ผลของการเติมสารละลายฟอสเฟตต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

ทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิค (ได้จากการทดลองในหัวข้อ 3.10.1.2) ปริมาตร 700 มิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ก่อนเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเริ่มทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยใช้อัตราการเจือจาง 0.17 ต่อวัน เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะคงที่ทำการปรับอัตราการเจือจางเป็น 0.35 0.56 0.74 และ 0.82 ต่อวัน ตามลำดับ ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์และคำนวณผลผลิตของเซลล์เมื่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอัตราการเจือจาง 0.82 ต่อวัน มีความหนาแน่นเซลล์อยู่ในภาวะคงที่ ทำการลดอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงเป็น 0.2 ต่อวัน และในวันที่ 35 ของการเพาะเลี้ยง ได้ทดลองเติมสารละลายฟอสเฟต (ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, $Na_2HPO_4.H_2O$) ลงในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมที่เตรียมไว้เติมเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยง และเพาะเลี้ยงไดอะตอมต่อไปอีกเป็นเวลา 3 วัน ในการทดลองนี้ได้ตรวจวัดปริมาณฟอสเฟต (ตามวิธีการในหัวข้อ 3.7.2) ในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมที่เตรียมไว้เติมเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยงและในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมที่มีการเติมสารละลายฟอสเฟตแล้ว รวมทั้งตรวจวัดปริมาณฟอสเฟตในน้ำเลี้ยงไดอะตอมที่อยู่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

3.13 การวิเคราะห์ปริมาณสารชีวโมเลกุลของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิค

3.13.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

เพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค ในอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม (ได้จากการทดลองหัวข้อ 3.11.2) ปริมาตร 4 ลิตร และเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิคของไดอะตอม (ผลการทดลองหัวข้อ 3.11.3) ปริมาตร 4 ลิตร ให้แสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์ แล้วเก็บเซลล์ไดอะตอมโดยใช้กรวยแยกเซลล์ แล้วนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งสารละลายส่วนบน แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 2-3 ครั้ง เก็บเซลล์ไดอะตอมในตู้เย็น -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไดอะตอมมาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยวิธีการระเหิด (freeze dryer) พ่นก๊าซไนโตรเจนลงในหลอดฝาเกลียวที่เก็บเซลล์แห้ง นำเซลล์ไดอะตอมที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดมาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry *et al.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1951) โดยนำตัวอย่างเซลล์ไดอะตอม 20 มิลลิกรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แยกสารละลายส่วนบน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ออกมาเติมสารละลายคอปเปอร์ที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (เตรียมจากสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ร้อยละ 2 ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ร้อยละ 0.5 ในสารละลายโซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรต ร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เติม Folin-Ciocalteu reagent เข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin, BSA) ที่มีความเข้มข้น 0-400 ไมโครกรัมต่อลิตร (รูปที่ ง.5)

3.13.2 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901

การสกัดไขมันจากไดอะตอม ใช้วิธีของ Bligh and Dyer (1959) อ้างโดย Chu *et al.* (1996) โดยนำเซลล์ไดอะตอมที่ผ่านการทำให้แห้ง (ในหัวข้อ 3.13.1) มาบดและในขณะที่ทำการบดต้องเติมสารละลายเมทานอล ต่อ คลอโรฟอร์ม ต่อ น้ำกลั่นปราศจากไอออน อัตราส่วน 2 ต่อ 1 ต่อ 0.8 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กรองกระดาษกรองออก นำสารละลายที่กรองได้มาเติมสารละลายเมทานอล ต่อ คลอโรฟอร์ม ต่อ น้ำกลั่นปราศจากไอออน อัตราส่วน 2 ต่อ 1 ต่อ 0.8 ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม 1.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น แยกสารละลายสีเขียวที่อยู่ชั้นล่างมาใส่ในขวดแก้วที่ผ่านการอบและชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจน เมื่อสารละลายเกือบแห้งหยดโทลูอีน 2-3 หยด พ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนจนสารละลายแห้ง นำขวดแก้วไปวางในโถดูดความชื้นที่มีโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง แล้วนำขวดแก้วมาชั่งน้ำหนัก

3.13.3 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901

การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตของไดอะตอม ทำการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตของไดอะตอมโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kochert (1978) โดยชั่งเซลล์ไดอะตอมที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิด 20 มิลลิกรัม เติมกรดซัลฟูริค 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็น ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 0.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล ร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟูริค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานคาร์โบไฮเดรตที่เตรียมจากแป้ง

3.13.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901

3.13.4.1 การสกัดกรดไขมันจากไดอะตอม ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lapage and Roy (1984) โดยนำเซลล์ไดอะตอมที่ผ่านการทำให้แห้ง 50 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลายมาตรฐานกรดไขมันชนิดไตรโคซาโนอิค (tricosanoic acid, C23:0) (0.0115 กรัมต่อเฮกเซน 10 มิลลิลิตร) 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมทานอล-กรดไฮโดรคลอริค อัตราส่วน 95 ต่อ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วปิดปากหลอดทดลองด้วยพาราฟิน บ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฮกเซนที่ผสมบูทิลเลตไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxytoluene, BHT) ร้อยละ 0.01 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี จากนั้นวางทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น แยกสารละลายชั้นบนออกมาและกรองผ่านโซเดียมซัลเฟต สารละลายที่แยกได้พ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนและปิดปากหลอดด้วยพาราฟิน

3.13.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของไดอะตอม โดยนำสารละลายกรดไขมันที่ทำการสกัดได้ (หัวข้อ 3.13.4.1) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่องโครมาโตกราฟฟีแบบก๊าซ ที่ประกอบด้วยคอลัมน์ DBWax capillary (25 x 0.25 มิลลิเมตร) (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 ไมครอน) เครื่องวัดสัญญาณแบบ FID (Flame Ionize Detector) ใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็นก๊าซตัวนำทำการฉีดตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันเมื่ออุณหภูมิของจุดฉีดตัวอย่างเท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์ที่เริ่มต้นในการวิเคราะห์เท่ากับ 205 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเครื่องวัดสัญญาณเท่ากับ 260 องศาเซลเซียส ซึ่งในการวิเคราะห์กรดไขมันใช้สารละลายมาตรฐานกรดไขมันที่มีเฉพาะกรดไขมันชนิดที่มีคาร์บอนอะตอม 16 และ 18 อะตอม รวมทั้งได้ใช้สารละลายกรดไขมันอีโคซะเพนเตโนอิคหรืออีพีเอ (C20:5)

3.13.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารรงควัตถุที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

เพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสม (ได้จากการทดลองหัวข้อ 3.11.1) ปริมาตร 4 ลิตร และเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารสูตรที่เหมาะสม (ผลการทดลองหัวข้อ 3.11.2) ปริมาตร 4 ลิตร ให้แสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์ แล้วเก็บเซลล์ไดอะตอมโดยใช้กรวยแยกเซลล์ แล้วนำเซลล์ไปปั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งสารละลายส่วนบน แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ไดอะตอมมาสกัดสารรงควัตถุภายในเซลล์ โดยใช้วิธีของ Repeta and Mantoura (1997) โดยนำไดอะตอม 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเพาะเชื้อทิ้ง เก็บเซลล์ไดอะตอมให้พ้นแสง โดยห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นเติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร เขย่าและเก็บในตู้เย็นนาน 1 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำสารละลายส่วนบนมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ โดยนำสารละลายที่สกัดผสมกับสารละลาย 0.5 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตต ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 จากนั้นนำไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ที่ประกอบด้วยปั๊มพ์ (pump) และตัวควบคุม (controller) WATERS 600 ใช้คอลัมน์ WATERS Nova-pak C18 (3.9x150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 5ไมโครเมตร) เครื่องตรวจวัดสัญญาณ (photodiode array detector) WATERS 996 ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ฉีดเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง เท่ากับ 50 ไมโครลิตร ตัวทำละลาย A ประกอบด้วย เมทานอล และ 0.5 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตต อัตราส่วน 80 ต่อ 20 ตัวทำละลาย B ประกอบด้วย เมทานอลและอะซิโตน อัตราส่วน 80 ต่อ 20 อัตราการไหลของตัวทำละลายเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งสภาวะการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 3.1

ตารางที่ 3.1 โปรแกรมการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์รงควัตถุของไดอะตอม

เวลา (นาที)	ร้อยละของ ตัวทำละลาย A	ร้อยละของ ตัวทำละลาย B	สัดส่วนการเปลี่ยนแปลง จากตัวทำละลาย A เป็น B
0	100	0	-
3	0	100	เส้นตรง
17	0	100	เส้นตรง

การจัดจำแนกชนิดของรงควัตถุ ทำได้โดยเปรียบเทียบสเปคตรัม (spectrum) ของสารรงควัตถุแต่ละชนิดที่แยกได้จากเครื่อง HPLC (ในช่วงความยาวคลื่น 350-700 นาโนเมตร) กับสเปคตรัมของสารมาตรฐานของรงควัตถุในเอกสารของ Repeta and Mantoura (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค

จากการเก็บตัวอย่างสาหร่าย โดยเก็บก้อนหินที่มีเมือกลื่นและเก็บตะกอนทรายรอบๆ ก้อนหิน (รูปที่ 4.1) จากหาดหินบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี และนำตัวอย่างมาใส่ในโหลแก้วแล้วเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เตรียมจากน้ำทะเลบริเวณที่เก็บตัวอย่าง (ความเค็ม 24 พีเอสยู) เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิห้องและให้อากาศตลอดเวลา (รูปที่ 4.2) ระหว่างการเพาะเลี้ยงต้องรักษาระดับความเค็มของอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายให้คงที่ โดยเติมน้ำกลั่นเพื่อชดเชยน้ำที่ระเหยออกไป ตรวจสอบชนิดและปริมาณของสาหร่าย โดยใช้หลอดแก้วขูดที่ผนังโหลแก้วและที่ก้อนหินนำมาส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าสาหร่ายมีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ในเวลา 5 วัน จะพบสาหร่ายอยู่รวมกลุ่มกัน มีลักษณะเป็นคราบเมือกสีน้ำตาลเกาะที่ก้อนหินและผนังโหลแก้ว จากนั้นจึงทำการแยกสายพันธุ์สาหร่ายด้วยพาสเจอร์ปิเปตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้วิธี single cell isolation ดูดเก็บเซลล์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนำสาหร่ายที่แยกได้แต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร F/2 ให้มีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้นเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค

การคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค ทำได้โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นสูตร F/2 ที่เสริมด้วยสารอาหารอินทรีย์ที่ประกอบด้วย เปปโตน 0.25 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 0.5 กรัมต่อลิตร (Cid *et al*., 1992) ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 24 พีเอสยู เพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในที่มืด โดยห่อจานเพาะเชื้อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสงส่องผ่าน หลังจากนั้น 4 วัน พบว่ามีสาหร่ายเพียงชนิดเดียวที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค โดยมีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่บนอาหารวุ้น ดังนั้นจึงย้ายเชื้อสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร F/2 ที่เสริมด้วยสารอาหารอินทรีย์เพื่อให้สาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้น จากนั้นย้ายสาหร่ายไปเขี่ยลงบนอาหารเพาะเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะ ซึ่งประกอบด้วย เพนนิซิลิน จี 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สเตรปโตมัยซิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 4 วัน พบว่าสาหร่ายมีการเติบโตขึ้นบนอาหารแข็งและปราศจากการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น จึงย้ายสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร F/2 ที่เสริมด้วยสารอาหารอินทรีย์เพื่อนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองขั้นต่อไป

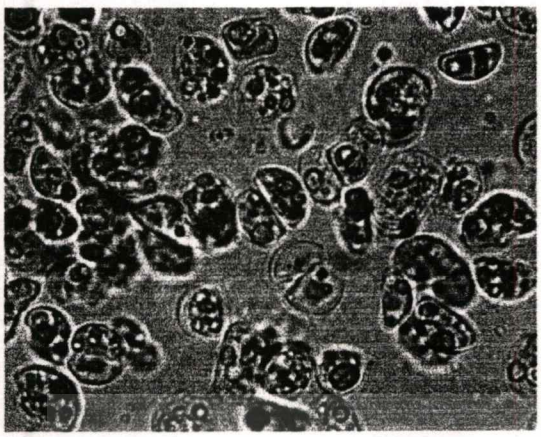
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.1 ลักษณะก้อนหินและตะกอนทรายที่เก็บจากชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี

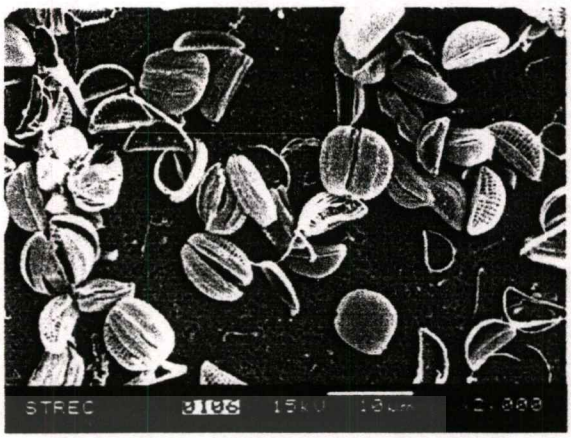
รูปที่ 4.2 การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มความหนาแน่นเซลล์สาหร่ายจากตัวอย่างก้อนหินและตะกอนทราย โดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ความเค็ม 24 พีเอสยู ที่อุณหภูมิห้องและให้อากาศตลอดเวลา

การจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค ทำโดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกเป็นไดอะตอมเซลล์เดียว รูปร่างเมื่อมองจากด้านหน้าฝามีลักษณะคล้ายรูปกระสวย แต่เมื่อมองจากด้านเกอร์เดิลหรือด้านข้างตรงกลางเซลล์มีลักษณะโค้งนูน และที่ปลายเซลล์มีลักษณะแคบเล็กปลายเซลล์ตัดตรง ขนาดเซลล์วัดจากด้านหน้าฝา ประมาณ 4x11 ไมครอน เซลล์มีสีน้ำตาลแกมเหลือง และสังเกตเห็นหยดน้ำมัน (oil droplet) ได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.3) จัดจำแนกชนิดของไดอะตอมได้เป็นเพนเนตไดอะตอม *Amphora delicatissima* และให้ชื่อสายพันธุ์ว่า AM9901 โดยไดอะตอมชนิดนี้เป็นไดอะตอมที่ชอบอาศัยอยู่หน้าดิน (benthic diatom) ลักษณะของฝาหรือเปลือกของไดอะตอมแสดงดังรูปที่ 4.4-4.6

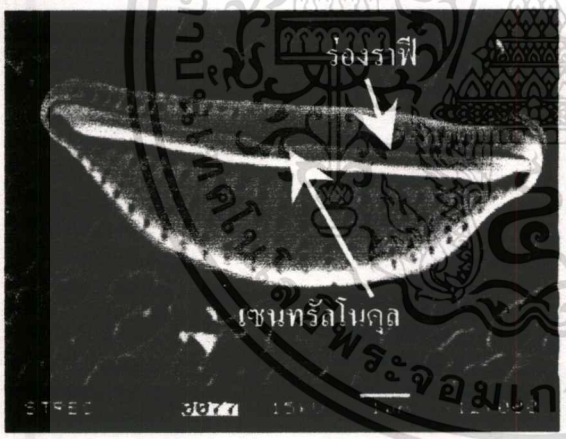
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



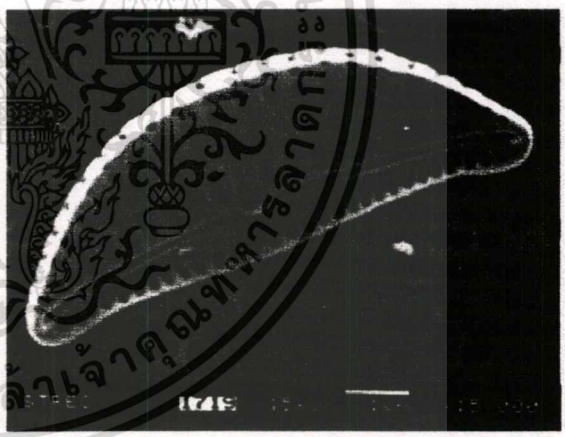
รูปที่ 4.3 ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า)



รูปที่ 4.4 เปลือกหุ้มเซลล์หรือฟรัสตุลของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน



รูปที่ 4.5 ลักษณะด้านหน้าฝาของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 มีร่องแคบพาดตามแนวยาวเรียกร่องนี้ว่า ราฟี และที่ฝาจะปรากฏลวดลายเป็นเส้นที่เกิดจากรูเรียงกันเป็นแถว และเป็นแนวตั้งฉากกับร่องราฟี



รูปที่ 4.6 ลักษณะฝาด้านในของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่กึ่งกลางร่องราฟีมีตุ่มหนาเรียกว่า เซนทรัลโนดุล ซึ่งเกิดจากการฝังตัวของซิลิกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

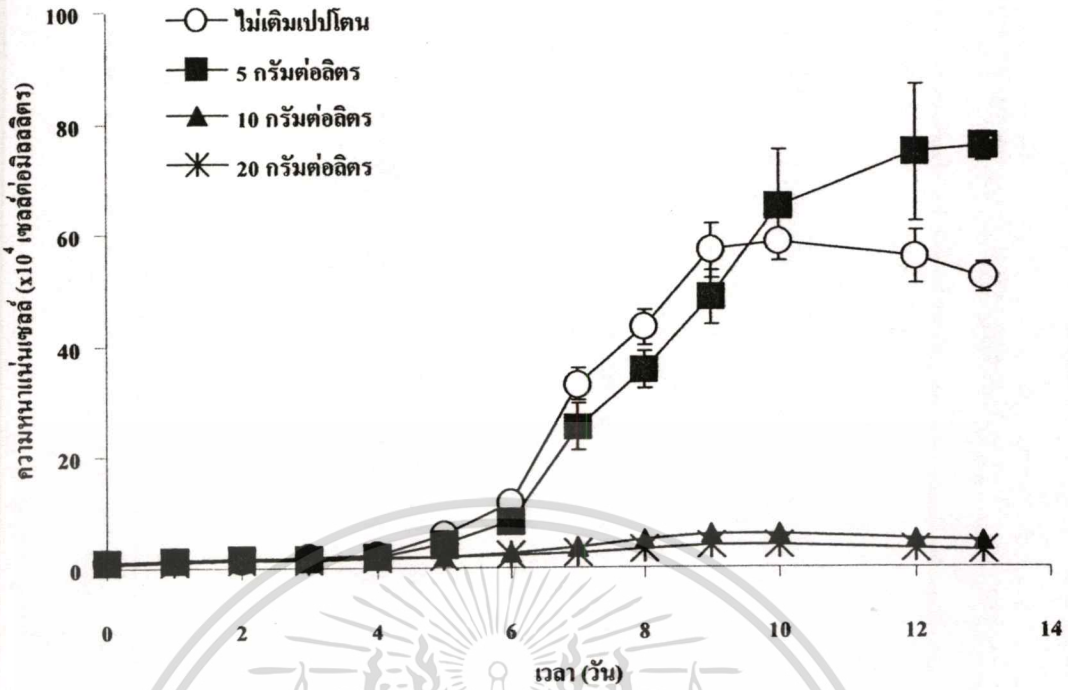
4.2 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่

4.2.1 ผลของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

4.2.1.1 ผลของเปปโตนต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

ผลการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในที่มืด ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่แปรผันความเข้มข้นของเปปโตนระดับต่างๆ คือ 0 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ตามสูตรอาหาร NB ของ Bridson (1995) เป็นกลุ่มควบคุม ให้ยีสต์สกัดและเนื้อสกัดมีความเข้มข้นตามสูตรอาหาร NB คือ 2 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร มีการเติบโตได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นของเปปโตนระดับอื่นๆ โดยพบว่ามีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $75x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และไดอะตอมมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.36 ต่อวัน ในวันที่ 4-7 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อที่ไม่เติมเปปโตน พบว่าไดอะตอมมีการเติบโตต่ำกว่า โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $58x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นของเปปโตนสูงกว่า 5 กรัมต่อลิตร (10 และ 20 กรัมต่อลิตร) มีผลทำให้การเติบโตลดลง โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเปปโตน 10 กรัมต่อลิตร มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย $6x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะ 0.19 ต่อวัน และที่ระดับความเข้มข้นของเปปโตน 20 กรัมต่อลิตร มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเพียง $4x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



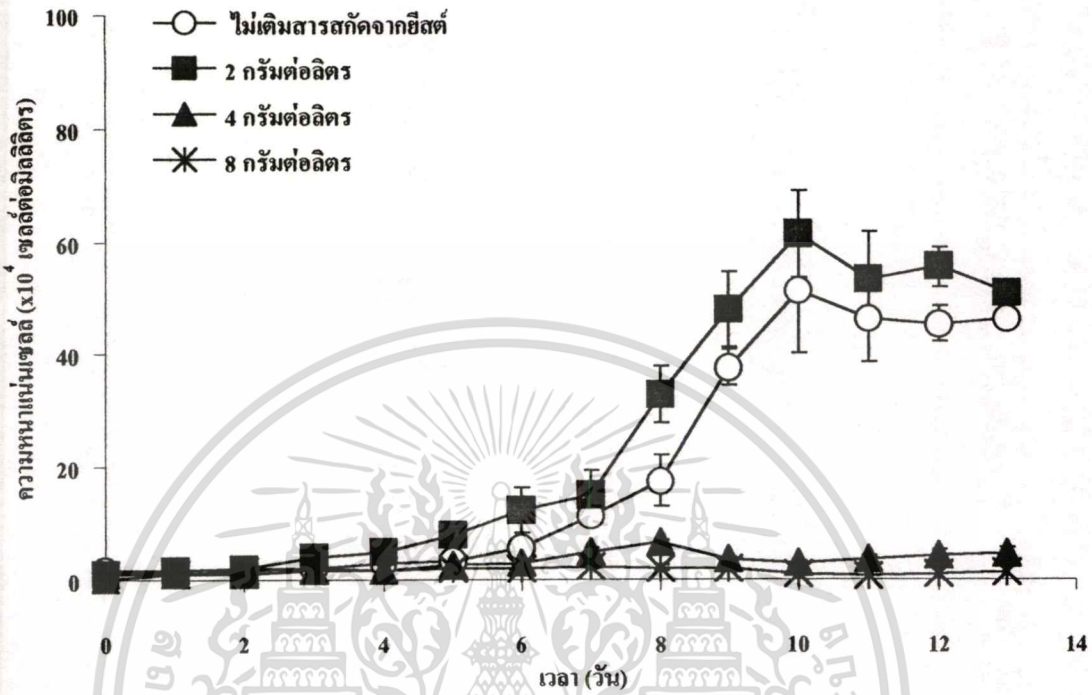
รูปที่ 4.7 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารเพาะเชื้อสูตร NB มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของเปปโตน 0 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ความเค็มของอาหาร 30 พีเอสยู

4.2.1.2 ผลของยีสต์สกัดต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

จากการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในที่มืดเป็นเวลา 13 วัน โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่แปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดในอาหารเพาะเชื้อเป็น 0 2 4 และ 8 กรัมต่อลิตร แต่มีความเข้มข้นของเนื้อสกัดตามสูตรอาหาร NB คือ 1 กรัมต่อลิตร และใช้ความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ผลจากการทดลองพบว่าไดอะตอมมีการเติบโตได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัดเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร โดยในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงไดอะตอมให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย 61×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.39 ต่อวัน และการเติบโตของไดอะตอมจะลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อที่ไม่เติมยีสต์สกัด ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดเป็น 4 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ไดอะตอมมีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติบโตลดลง โดยให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $6x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 8 กรัมต่อลิตร พบว่าไดอะตอมไม่สามารถที่จะเติบโตได้ (รูปที่ 4.8)



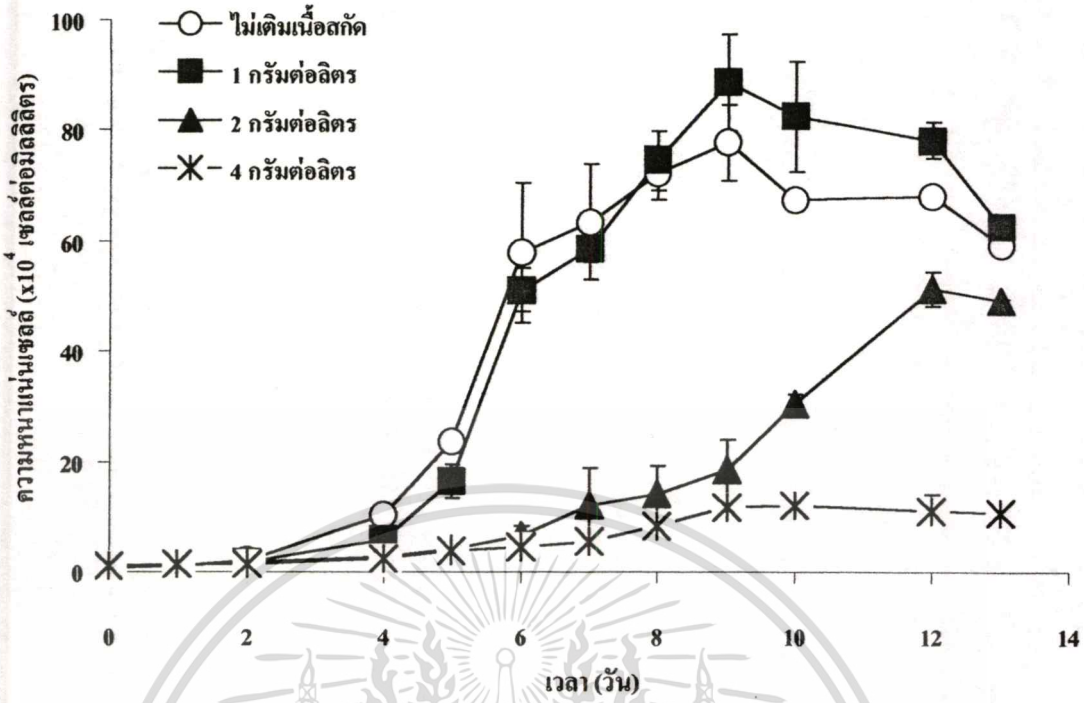
รูปที่ 4.8 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารสูตร NB มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 2 4 และ 8 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.3 ผลของเนื้อสกัดต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

จากการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่แปรผันความเข้มข้นของเนื้อสกัดในอาหารเพาะเชื้อสูตร NB เป็น 0 1 2 และ 4 กรัมต่อลิตร ใช้ความเข้มข้นของเปปโตนเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร (จากผลการทดลองหัวข้อ 4.2.1.1) และยีสต์สกัดเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร (จากผลการทดลองหัวข้อ 4.2.1.2) พบว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นของเนื้อสกัดเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ไดอะตอมสามารถเติบโตได้สูงที่สุด โดยให้ความหนาแน่นเซลล์ $88x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะ 0.58 ต่อวัน (ในวันที่ 4-7 ของการเพาะเลี้ยง) และพบว่าไดอะตอมมีการเติบโตลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อที่ไม่เติมเนื้อสกัด โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $77x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของเนื้อสกัดเป็น 2 กรัมต่อลิตร พบว่าไดอะตอมมีการเติบโตลดลงมาก โดยมีความหนาแน่นเซลล์ $51x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.31 ต่อวัน ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของเนื้อสกัดเป็น 4 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ไดอะตอมมีอัตราการเติบโตลดลง โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเพียง $11x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.24 ต่อวัน (ในวันที่ 2-6 ของการเพาะเลี้ยง) (รูปที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



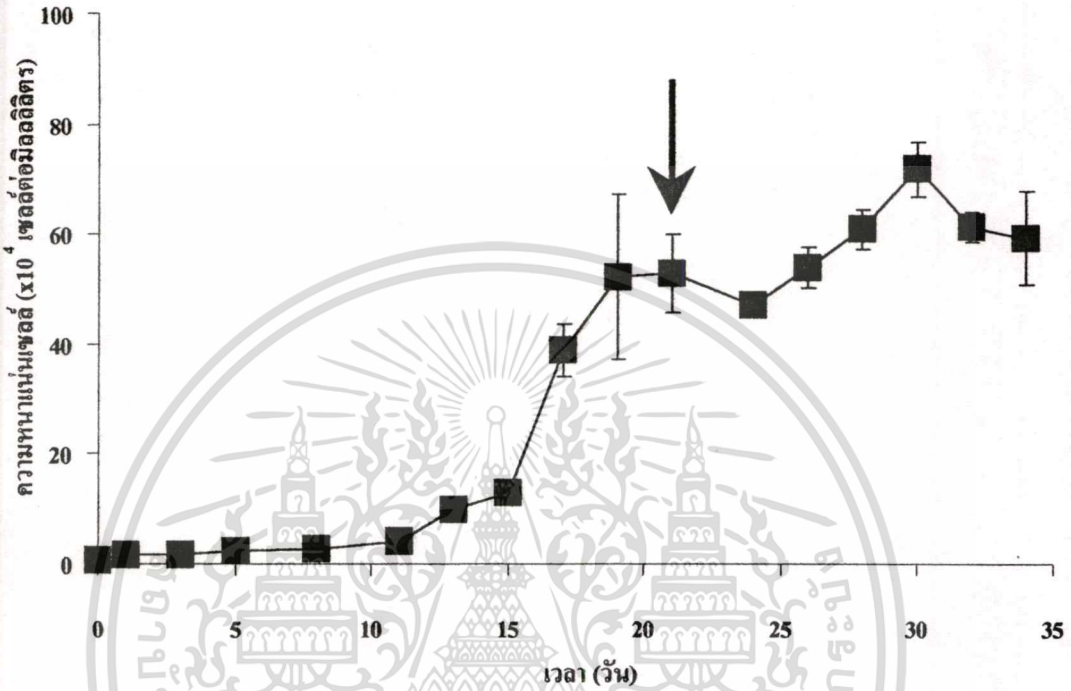
รูปที่ 4.9 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารเพาะเชื้อสูตร NB มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของเนื้อสกัด 0 1 2 และ 4 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ความเค็มของอาหาร 30 พีเอสยู

4.2.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

การศึกษาผลของการเติมกลูโคสต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ทำได้โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยที่อาหารเพาะเชื้อสูตร NB ประกอบด้วย เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารอาหารอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 (จากผลการทดลองหัวข้อ 4.2.1) และในอาหารเพาะเชื้อสูตรนี้มีการเติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอนต่อลิตร จากการทดลองพบว่าไดอะตอมมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.34 ต่อวัน (ในวันที่ 13-19 ของการเพาะเลี้ยง) และมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $52x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อไดอะตอมมีการเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ ได้ทำการเติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเชื้อ (แสดงด้วยลูกศรในรูปที่ 4.10) ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเพาะเชื้อเพิ่มขึ้นประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าการเติมกลูโคสลงในอาหารเพาะเชื้อจะทำให้ไดอะตอมมีการเติบโตเพิ่มสูงขึ้นอีกเล็กน้อย โดยความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้นจาก $52x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น $72x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารเพาะเชื้อสูตร NB มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (จุดที่ลูกศรชี้คือ การเติมสารละลายกลูโคสเพื่อให้ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อสูงขึ้น 10 กรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

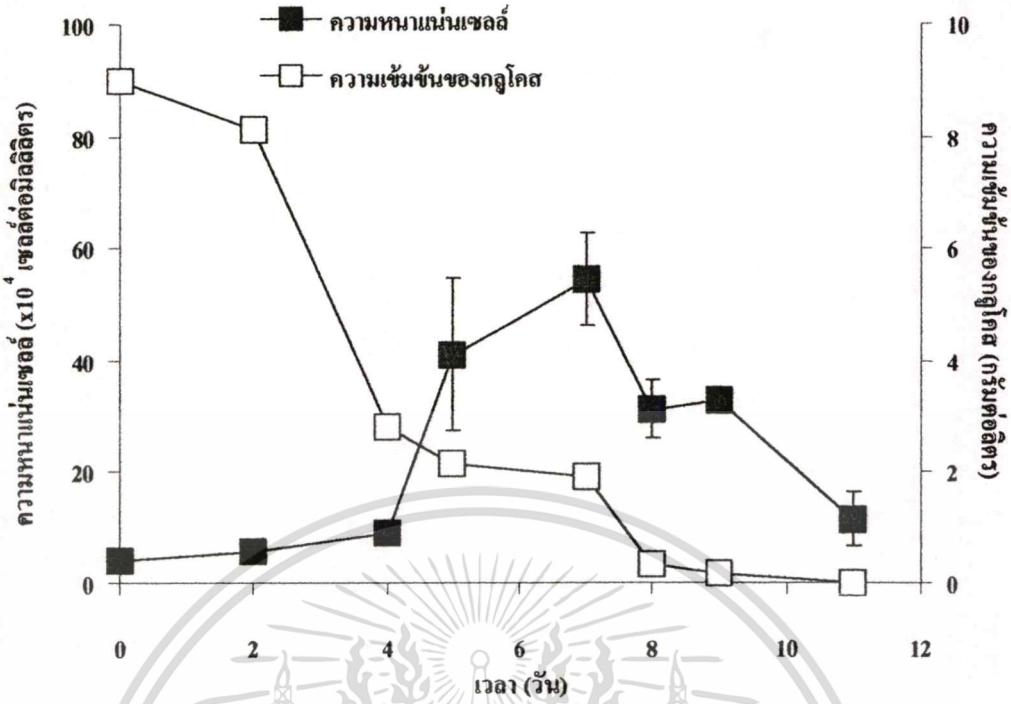
4.3 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

4.3.1 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

4.3.1.1 ผลของการให้อากาศต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

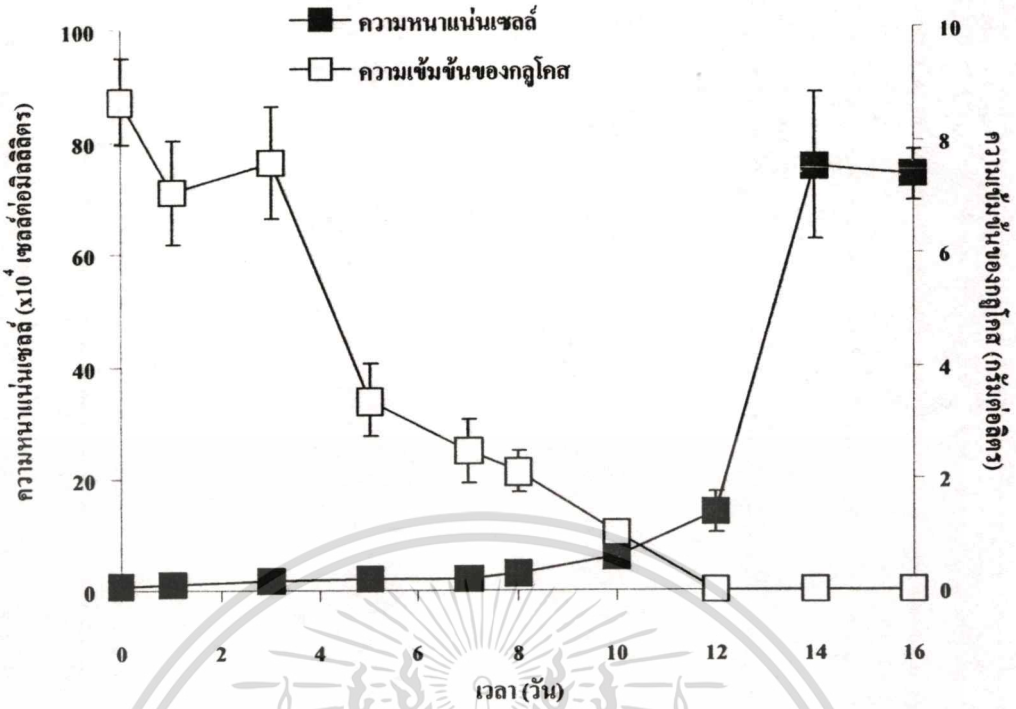
จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและมีการกวนอาหารเพาะเชื้อตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนระบบแม่เหล็กทั้งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เพาะเลี้ยงโดยไม่ให้อากาศและให้อากาศ จากการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมโดยไม่ให้อากาศ พบว่าไดอะตอมมีการเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้น ส่งผลให้ปริมาณกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมมีความเข้มข้นลดลง โดยในวันที่ 4-7 ของการเพาะเลี้ยง ไดอะตอมมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.60 ต่อวัน และในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $54x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.11) หลังจากวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าไดอะตอมมีจำนวนเซลล์ลดลงเนื่องจากในอาหารเพาะเชื้อมีความเข้มข้นของกลูโคสลดลงมาก ส่วนการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบให้อากาศ ด้วยอัตรา 0.65 ลิตรต่อชั่วโมง ผ่านตัวกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน เข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ผลการทดลองพบว่าการให้อากาศระหว่างการเพาะเลี้ยงมีผลชักนำให้ไดอะตอมอยู่ในระยะพักตัวนานตั้งแต่วันที่ 0-5 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจึงเพิ่มจำนวนขึ้นโดยในวันที่ 7-10 ของการเพาะเลี้ยง ไดอะตอมมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.84 ต่อวัน และมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $75x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.12) อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าไดอะตอมจะมีความหนาแน่นเซลล์สูงที่สุดในการเพาะเลี้ยงแบบให้อากาศ แต่การเพาะเลี้ยงแบบให้อากาศจะทำให้เกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียได้ง่ายกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้อากาศ ดังนั้นในการทดลองหัวข้อต่อไปจึงทำการเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้อากาศ ซึ่งจะควบคุมการปนเปื้อนได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C เพาะเลี้ยงโดยไม่ให้อากาศแต่กวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

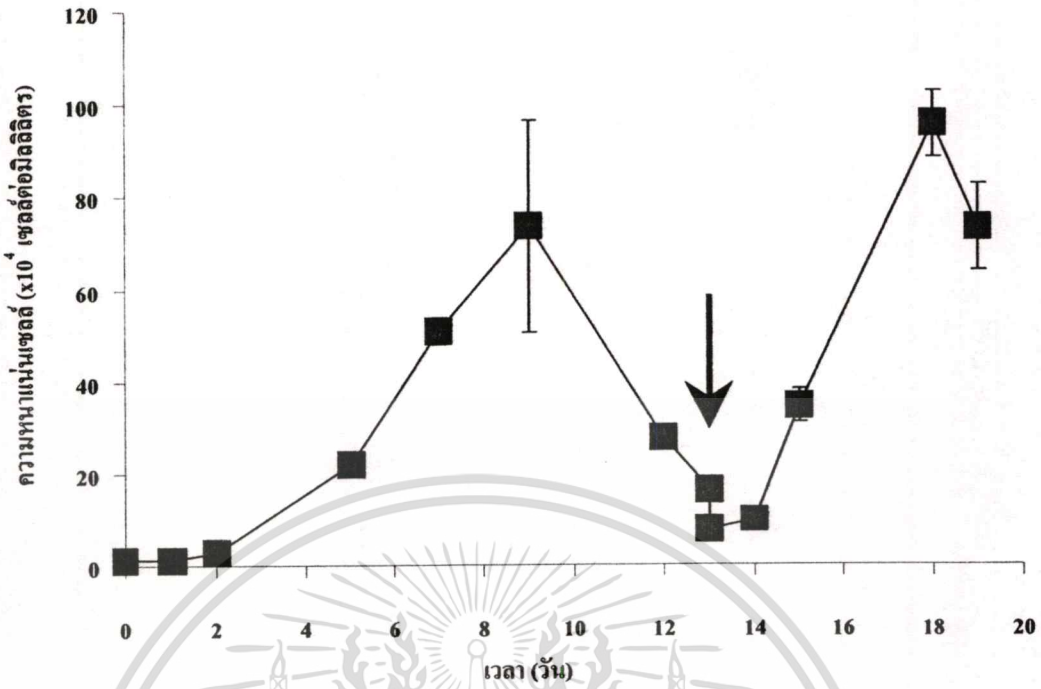


รูปที่ 4.12 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ให้อากาศ 0.65 ลิตรต่อชั่วโมง และกวน 300 รอบต่อนาที ระหว่างการเพาะเลี้ยง

4.3.1.2 ผลของการเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

จากการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 700 มิลลิลิตร และไม่ให้อากาศ พบว่าในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย $75x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีจำนวนเซลล์ลดลงอย่างมากในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง ($16x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) การเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (ก่อนเติมอาหารเพาะเชื้อปริมาตรอาหารเพาะเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเหลือเพียง 400 มิลลิลิตร) มีผลทำให้ไดอะตอมสามารถเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นได้อีก โดยมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $95x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าการเติมอาหารเพาะเชื้อในระยะที่เซลล์มีการเติบโตลดลงอาจเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเติบโตของไดอะตอม (รูปที่ 4.13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C จากนั้นได้มีการเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เพิ่มลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง (จุดที่ลูกศรชี้คือมีการเติมอาหารเพาะเชื้อลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ)

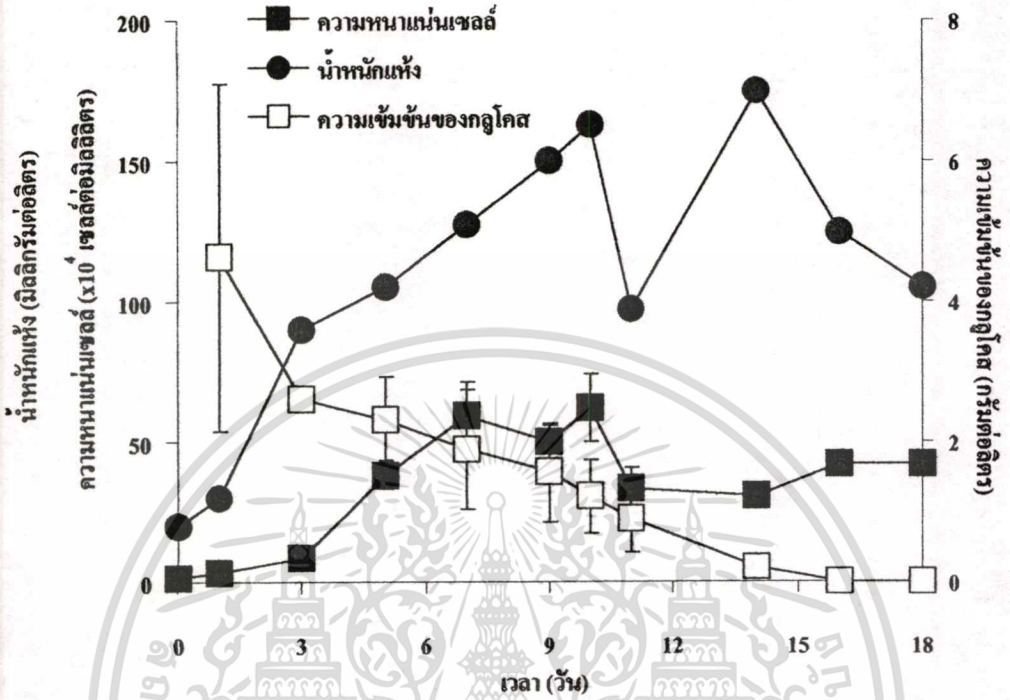
4.3.2 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะแบบเฮเทอโรโทรฟิคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

4.3.2.1 การผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

จากการผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 โดยเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 4 ลิตร และไม่ให้อากาศ (จากผลการทดลองหัวข้อ 4.3.1.1) เป็นเวลา 18 วัน พบว่าเมื่อไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้น และปริมาณกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อจะลดลง โดยในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย 61x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (0.16 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร) (รูปที่ 4.14) หลังจากวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์ลดลงและกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อลดลง แสดงว่าไดอะตอมมีการนำกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปใช้ในการเติบโตในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง จึงทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อในช่วงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงลดลงและหมดลงในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง



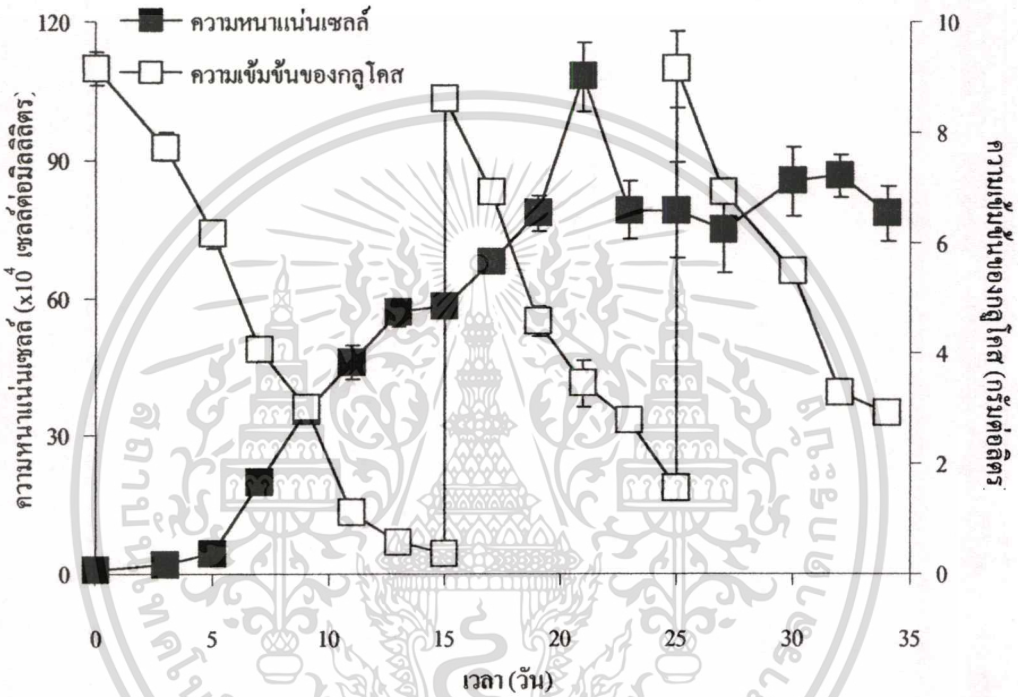
รูปที่ 4.14 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C

4.3.2.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A .delicatissima* AM9901

จากการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 4 ลิตร พบว่าในขณะที่ไดอะตอมมีการเติบโตเพิ่มขึ้นจะทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อลดลง และในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าไดอะตอมเริ่มมีการเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ โดยมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย $58x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.15) ส่วนความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อลดลงเหลือ 0.39 กรัมต่อลิตร หลังจากการเติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม (ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง) ทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อเพิ่มสูงขึ้นเป็น 9 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ไดอะตอมสามารถเติบโตได้เพิ่มขึ้นอีก โดยมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้นจาก $58x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง เป็น $108x10^4$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ต่อมาในวันที่ 25 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์ลดลง (ความหนาแน่นเซลล์ $79x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และมีกลูโคสเหลือในอาหารเพาะเชื้อเพียง 1.5 กรัมต่อลิตร จึงทำการเติมกลูโคสเป็นครั้งที่สอง ซึ่งมีผลให้ไดอะตอมสามารถเติบโตเพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อย โดยมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้นจาก $79x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 25 ของการเพาะเลี้ยง เป็น $86x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 32 ของการเพาะเลี้ยง



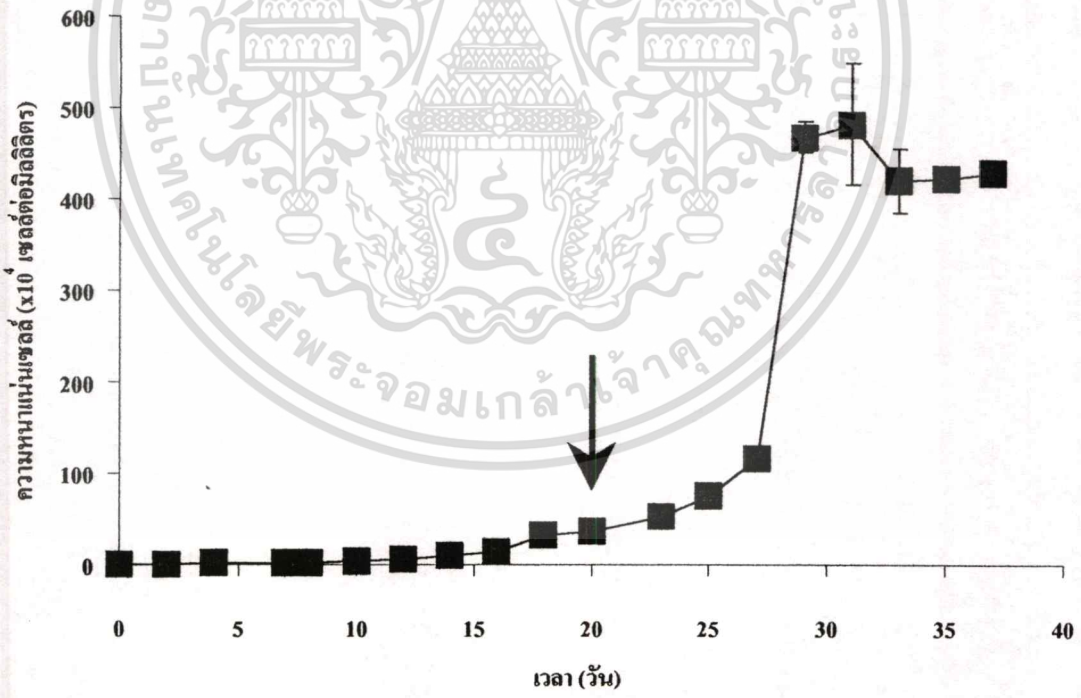
รูปที่ 4.15 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C และมีการเติมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 และ 25 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของซิลิกาต่อการเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่

4.4.1 ผลของการเติมซิลิกาต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

จากการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที พบว่าไดอะตอมให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย $37x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.31 ต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอมเป็นเวลา 20 วัน ได้ทดลองเติมสารละลายซิลิกาลงในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม โดยเติมสารละลายซิลิกาให้มีความเข้มข้น 1.2 มิลลิโมลาร์ คิดเป็น 10 เท่าของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 (ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 มีซิลิกาเข้มข้น 0.12 มิลลิโมลาร์) หลังจากเติมสารละลายซิลิกา พบว่าไดอะตอมสามารถเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเป็น $482x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.16)



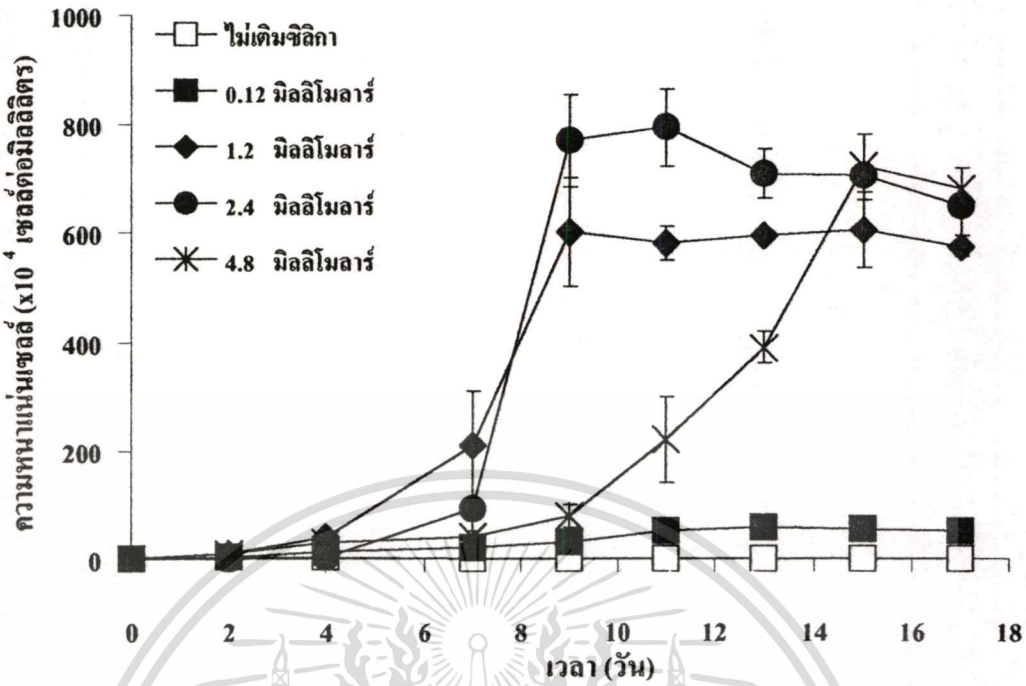
รูปที่ 4.16 การเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ภายหลังการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อจาก 0.12 เป็น 1.2 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง (จุดที่ลูกศรชี้)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลของความเข้มข้นของซิลิกาต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

จากการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่แปรผันความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อเป็น 0 0.12 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์ พบว่าการไม่เติมซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อมีผลทำให้ไดอะตอมไม่สามารถเติบโตได้ ส่วนการเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C (มีความเข้มข้นของซิลิกา 0.12 มิลลิโมลาร์) พบว่ามีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย $37x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารเพาะเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของซิลิกา 2.4 มิลลิโมลาร์ พบว่าไดอะตอมมีการเติบโตได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ โดยไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย $792x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 1.13 ต่อวัน ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาเป็น 4.8 มิลลิโมลาร์ พบว่าไดอะตอมมีการเติบโตต่ำกว่าที่ระดับความเข้มข้น 2.4 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.17) ดังนั้นในการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในลำดับต่อไปจึงเลือกใช้อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 2.4 มิลลิโมลาร์ หรือเรียกว่าอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si เนื่องจากอาหารเพาะเชื้อสูตรนี้สามารถผลิตเซลล์ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตรเดิม (F/2+NB+4C ซึ่งมีความเข้มข้นของซิลิกา 0.12 มิลลิโมลาร์) ถึง 14 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



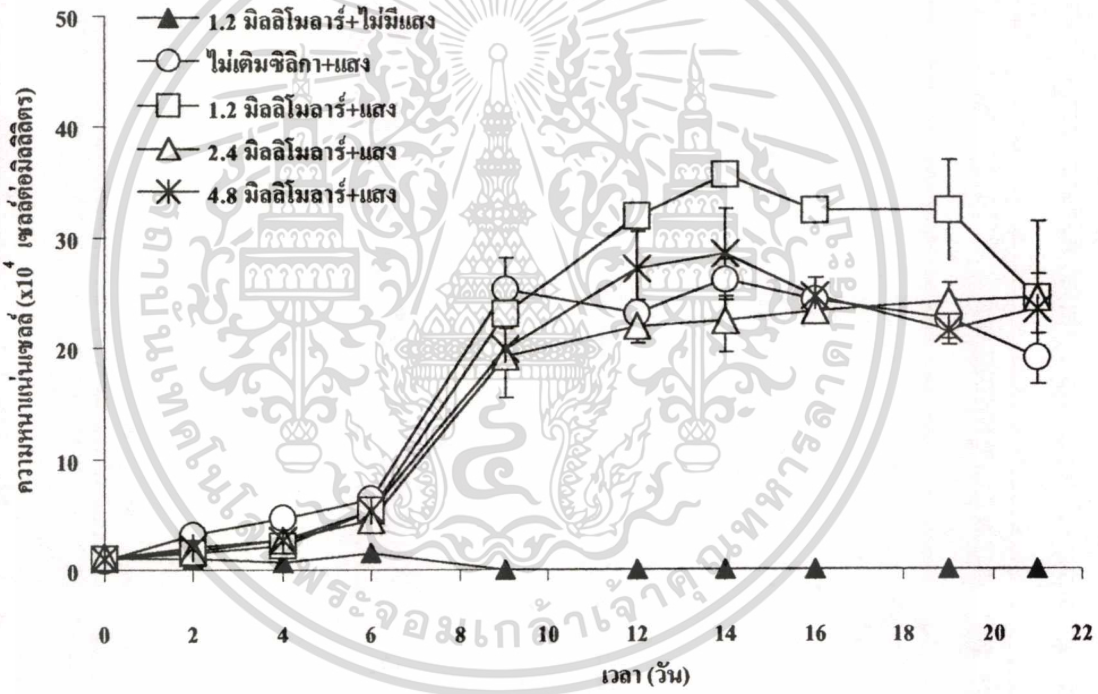
รูปที่ 4.17 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 0 0.12 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์

4.4.3 ผลของความเข้มข้นของซิลิกาต่อการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโร-โทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si (มีความเข้มข้นของซิลิกา 2.4 มิลลิโมลาร์) พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้นถึง 14 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ซึ่งมีความเข้มข้นของซิลิกา 0.12 มิลลิโมลาร์ (ผลการทดลองหัวข้อ 4.4.2) แสดงว่าความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อมีผลต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม ในธรรมชาติไดอะตอมมีการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิค (สภาวะการเติบโตที่ไดอะตอมสร้างอาหารจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง) และมีการนำสารอาหารชนิดต่างๆ รวมทั้งซิลิกาในแหล่งน้ำเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการเติบโต ซึ่งความเข้มข้นของซิลิกาในแหล่งน้ำที่มีอยู่อย่างจำกัดอาจส่งผลต่อการเติบโตของไดอะตอม ดังนั้นการทดลองในหัวข้อนี้จึงเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคที่ให้แสง 500 ลักซ์ และเพาะเลี้ยงไดอะตอมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 เป็น 0 1.2 2.4 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 มิลลิโมลาร์ ส่วนกลุ่มควบคุมได้เพาะเลี้ยงไดอะตอมในที่มืดด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 1.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 21 วัน พบว่าไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงเป็นกลุ่มควบคุมไม่สามารถเติบโตได้และตายหมดภายในเวลา 6 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 1.2 มิลลิโมลาร์ หรือเรียกว่าอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si พบว่าไดอะตอมมีการเติบโตได้สูงที่สุด โดยมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย $35x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.48 ต่อวัน ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาเป็น 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์ พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 1.2 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.18 และตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.18 การเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 0 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 อัตราการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 0 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์

สภาวะการเพาะเลี้ยง	ความเข้มข้นของซิลิกา (มิลลิโมลาร์)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)
ในที่มืด	1.2	$1x10^4$	ไม่เติบโต
ให้แสง	0	$26 x10^4$	0.35
ให้แสง	1.2	$35 x10^4$	0.48
ให้แสง	2.4	$24 x10^4$	0.41
ให้แสง	4.8	$28 x10^4$	0.41

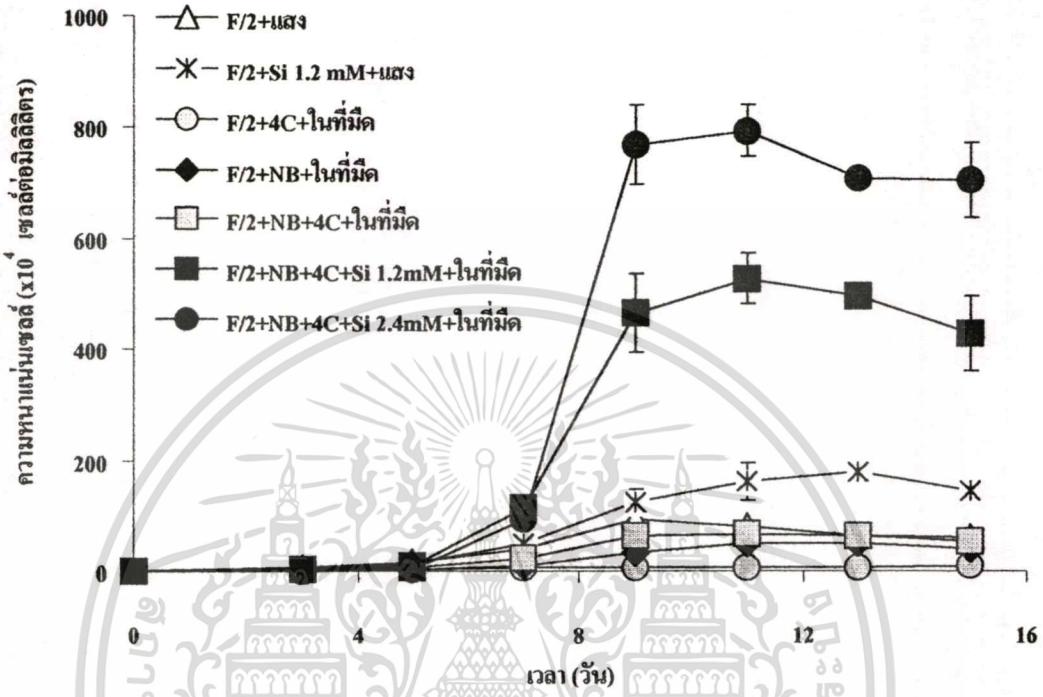
4.5 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM

4.5.1 การเปรียบเทียบการเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิคที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 วัน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค (ให้แสง 500 ลักซ์) ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปกติที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 0.12 มิลลิโมลาร์ (อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2) และอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 1.2 มิลลิโมลาร์ (อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+Si 1.2 mM) ไดอะตอมมีการเติบโตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปกติที่เติมกลูโคส (อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+4C) หรืออาหารเพาะเชื้อสูตร NB เพียงอย่างเดียว (อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB) (รูปที่ 4.19) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปกติที่มีการเติมทั้งกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และอาหารเพาะเชื้อสูตร NB (อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C) ไม่สามารถชักนำให้ไดอะตอมมีการเติบโตได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค แต่การเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโร-โทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาจาก 0.12 เป็น 2.4 มิลลิโมลาร์ (อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si) ไดอะตอมมีการเติบโตได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+4C F/2+NB และ F/2+NB+4C รวมทั้งการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคด้วย (ตารางที่ 4.2) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si เป็นอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901



รูปที่ 4.19 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในขวดรูปชมพู่ ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตรแตกต่างกันๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

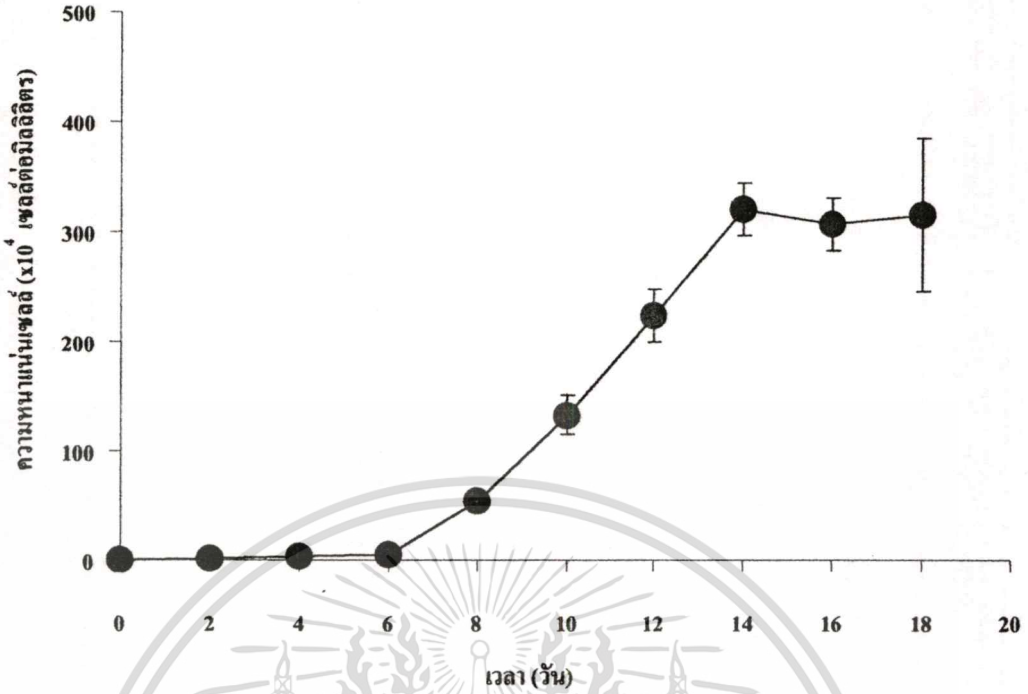
ตารางที่ 4.2 การเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตรต่างๆ ในขวดรูปชมพู่ที่เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที

สูตรอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม	สภาวะการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)
F/2	ให้แสง 500 ลักซ์	94×10^4	0.51
F/2+1.2 mM Si	ให้แสง 500 ลักซ์	177×10^4	0.54
F/2+4C	ในที่มืด	9×10^4	0.30
F/2+NB	ในที่มืด	52×10^4	0.49
F/2+NB+4C	ในที่มืด	67×10^4	0.47
F/2+NB+4C+1.2 mM Si	ในที่มืด	526×10^4	0.97
F/2+NB+4C+2.4 mM Si	ในที่มืด	792×10^4	1.38

4.5.2 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM99021 แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si (จากผลการทดลองหัวข้อ 4.4.2) ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ความเค็มของอาหาร 30 พีเอสยู เป็นเวลา 18 วัน โดยกวนอาหารเพาะเชื้อตลอดเวลาแต่ไม่ให้อากาศ พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 320×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.82 ต่อวัน (รูปที่ 4.20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

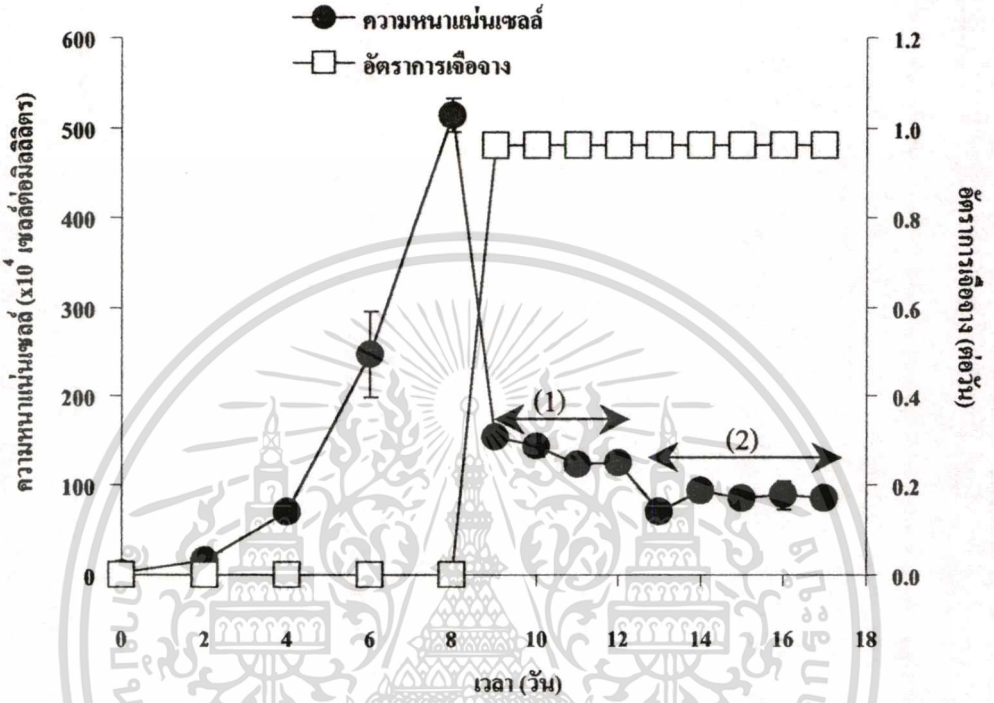
4.5.3 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

4.5.3.1 ผลของอัตราการกวนต่อการเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร (คุณสมบัติของถังปฏิกรณ์ชีวภาพอธิบายในหัวข้อ 3.10.1) ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ความเค็ม 30 พีเอสยู และเพาะเลี้ยงโดยไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 17 วัน โดยเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์เป็นเวลา 8 วัน เพื่อให้เซลล์มีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณ จากนั้นในวันที่ 9-12 ของการเพาะเลี้ยง จึงได้เริ่มเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องโดยปรับอัตราการเจือจาง 0.96 ต่อวัน และใช้อัตราการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที พบว่ามีความหนาแน่นเซลล์อยู่ระหว่าง 123-154x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อความหนาแน่นเซลล์คงที่เพื่อให้เซลล์มีการปรับตัว จากนั้นได้เพิ่มอัตราการกวนให้เร็วขึ้นเป็น 600 รอบต่อนาที พบว่าไดอะตอมให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลงเล็กน้อย โดยอยู่ระหว่าง 71-94x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ในวันที่ 13-17 ของการเพาะเลี้ยง) (รูปที่ 4.21) ซึ่งผลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มอัตราการกวนในระบบเพาะเลี้ยงไดอะตอมไม่มีผลต่อการเติบโตของไดอะตอม ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องในการทดลองลำดับต่อมาจึงเลือกใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที



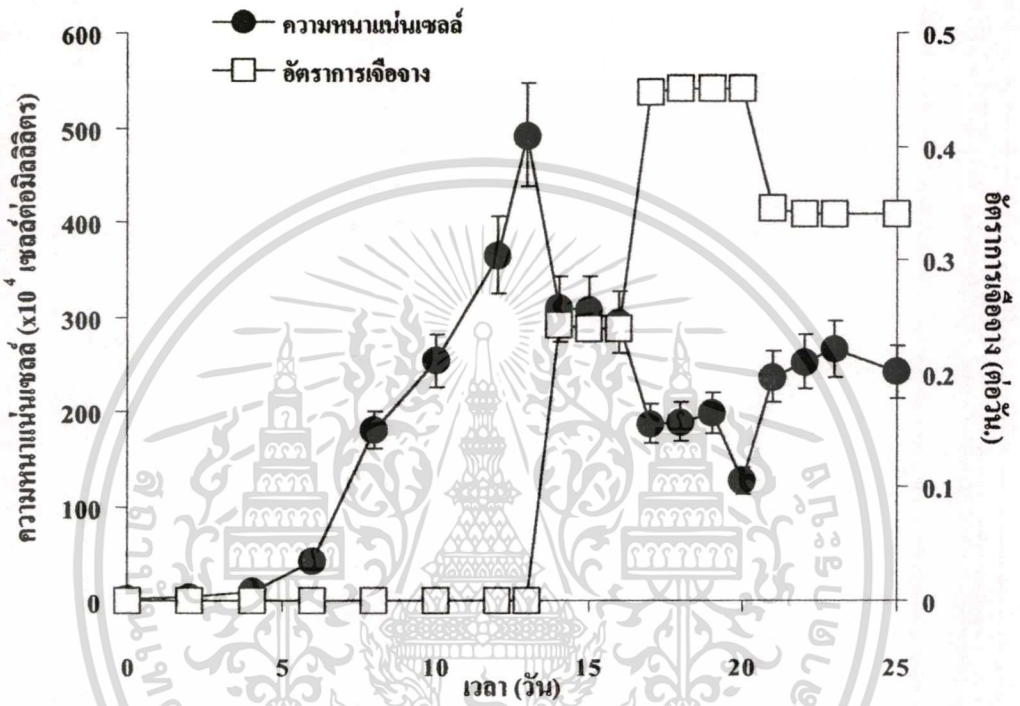
รูปที่ 4.21 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si โดยแปรผันอัตราการกวนระหว่างการเพาะเลี้ยง 2 ระดับ โดยอัตราการกวนระดับที่ 1 เท่ากับ 300 รอบต่อนาที และอัตราการกวนระดับที่ 2 เท่ากับ 600 รอบต่อนาที

4.5.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่อง

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ความเค็ม 30 พีเอสยู ไม่ให้อากาศแต่กวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที (ผลการทดลองหัวข้อ 4.5.3.1) เป็นเวลา 25 วัน เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์เป็นเวลา 13 วัน พบว่าไดอะตอมมีการเติบโตแบบทวีคูณและมีความหนาแน่นเซลล์ 491×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นในวันที่ 14-16 ของการเพาะเลี้ยง ได้เริ่มทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยปรับอัตราการเจือจางเป็น 0.24 ต่อวัน พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์คงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่ระหว่าง 293-308x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และในวันที่ 17-20 ของการเพาะเลี้ยง ได้เพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 0.45 ต่อวัน ซึ่งมีผลทำให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลงเป็น 126-198x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อลดอัตราการเจือจางลงเหลือ 0.34 ต่อวัน (ในวันที่ 21-25 ของการเพาะเลี้ยง) พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 236-265x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.22) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องอัตราการเจือจางแปรผกผันกับความหนาแน่นเซลล์



รูปที่ 4.22 ความสัมพันธ์ของความหนาแน่นเซลล์กับอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ความเค็ม 30 พีเอสยู

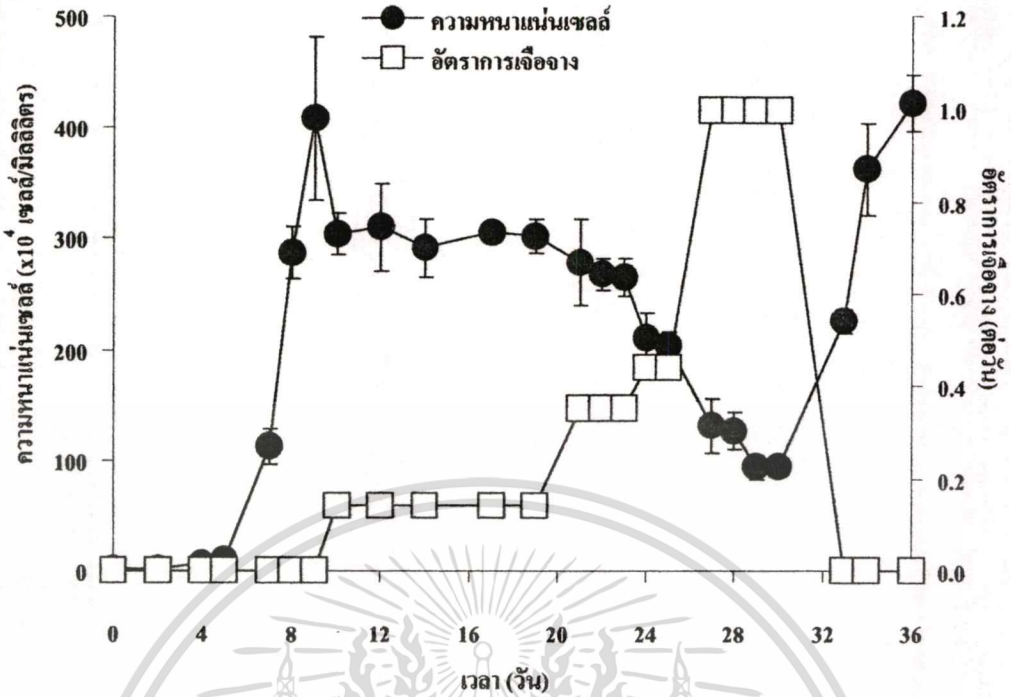
4.5.3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจาง ความหนาแน่นเซลล์และผลผลิตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.5.3.2 พบว่าอัตราการเจือจางแปรผกผันกับความหนาแน่นเซลล์ โดยความหนาแน่นเซลล์ลดลงเมื่ออัตราการเจือจางสูงขึ้น แต่จากการทดลองในหัวข้อ 4.5.3.2 ยังไม่ทราบถึงระดับอัตราการเจือจางที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ออกจากระบบการเพาะเลี้ยง ในการทดลองนี้จึงทำการแปรผันอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมเพื่อให้ทราบถึงระดับอัตราการเจือจางที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ โดยเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเค็ม 30 พีเอสยู ไม่ให้อากาศแต่กวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 วัน โดยในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์ $408x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ได้เริ่มเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยปรับอัตราการเจือจางเป็น 0.14 ต่อวัน และคงที่อัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงนาน 9 วัน พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์ระหว่าง $291-310x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และในวันที่ 21-23 และ 24-25 ของการเพาะเลี้ยง ได้ปรับเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 0.35 และ 0.44 ต่อวันตามลำดับ พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์ลดลงมาอยู่ระหว่าง 264-278 และ $204-211x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จนกระทั่งในวันที่ 27-30 ของการเพาะเลี้ยง ได้เพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นอีกเป็น 1.00 ต่อวัน มีผลทำให้ไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์ลดลงเหลือเพียง $94-131x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หากเพิ่มอัตราการเจือจางสูงกว่า 1.00 ต่อวันอาจเกิดการชะล้างเซลล์ออกจากระบบเพาะเลี้ยงจนหมด ดังนั้นในวันที่ 33 ของการเพาะเลี้ยงจึงหยุดการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยหยุดการเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si เข้าและนำผลผลิตของไดอะตอมออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากนั้นเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ต่อเป็นเวลา 4 วัน พบว่าไดอะตอมสามารถเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นได้อีก โดยมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ $422x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.23) จากการคำนวณผลผลิตในตารางที่ 4.3 จะพบว่าความหนาแน่นเซลล์ลดลงเมื่ออัตราการเจือจางสูงขึ้น ในขณะที่ผลผลิตทั้งหมดของไดอะตอม (ในหน่วยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรต่อวัน) จะเพิ่มสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ความเค็ม30 พีเอสยู เพื่อแปรผันอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงจนเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์

ตารางที่ 4.3 การเติบโตและผลผลิตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในระดับอัตราการเจือจางต่างๆ

อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ผลผลิตเซลล์ไดอะตอม (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อวัน)	ปริมาตรอาหารเพาะเชื้อที่ออกจากระบบเพาะเลี้ยง (มิลลิลิตรต่อวัน)
0.14	201-310x10^4	0.08	98
0.35	264-278 x10^4	0.19	246
0.44	204-211x10^4	0.18	310
1.00	94-131x10^4	0.22	698

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.3.4 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมและปริมาณไนโตรเจนในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ความเค็ม 30 พีเอสยู ไม่ให้อากาศแต่กวนอาหารเพาะเชื้อด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 วัน ได้ทำการทดลองแปรผันอัตราการเจือจางที่ระดับต่างๆ โดยเริ่มต้นด้วยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในวันที่ 0-8 ซึ่งในช่วงดังกล่าวไดอะตอมมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 1.01 ต่อวัน หลังจากนั้นจึงเริ่มทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะคงที่ได้ปรับเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นเป็นขั้นๆ โดยในวันที่ 9-11 ของการเพาะเลี้ยง ได้ปรับอัตราการเจือจางเป็น 0.23 ต่อวัน พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์ ณ ภาวะคงที่สูงที่สุดคือ 219-239x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงได้เพิ่มอัตราการเจือจางให้สูงขึ้นซึ่งมีผลทำให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลงตามลำดับ (รูปที่ 4.24 และตารางที่ 4.4) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเพิ่มอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมจาก 0.23 เป็น 0.94 ต่อวัน สามารถเพิ่มผลผลิตของเซลล์ให้สูงขึ้นจาก 0.11 เป็น 0.18 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อวัน แต่หากเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 1.24 ต่อวัน ซึ่งเป็นอัตราการเจือจางที่สูงกว่าอัตราการเติบโตสูงสุดในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ พบว่าผลผลิตเซลล์จะลดลงเหลือ 0.10 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตารางที่ 4.4)

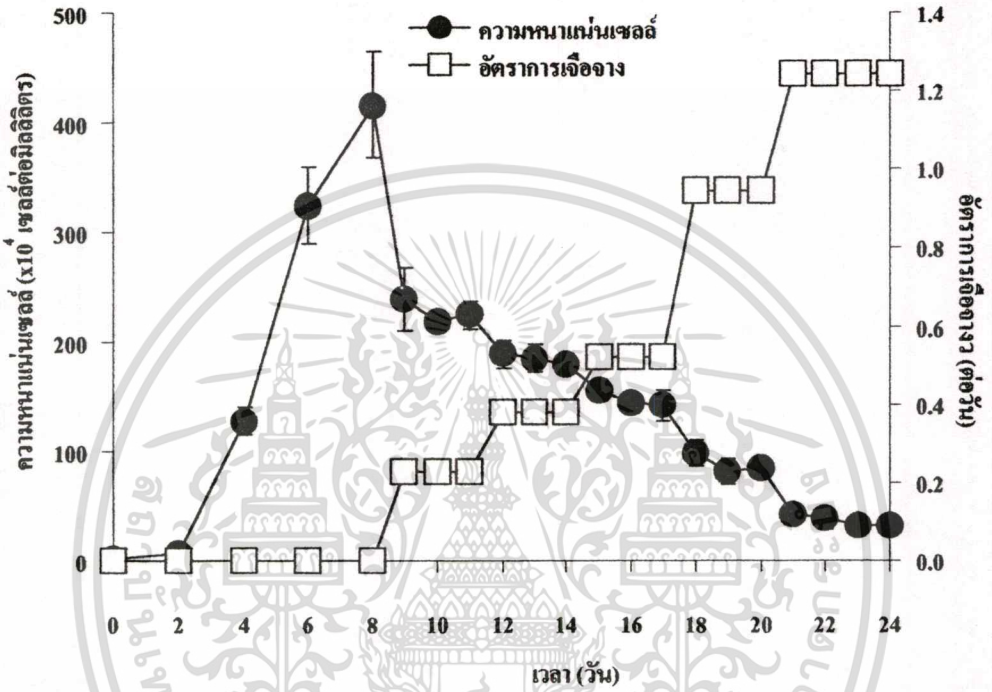
จากการทดลองตรวจวัดความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง ที่มีอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยง 0.94 ต่อวัน พบว่าปริมาณโปรตีนในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ที่ใช้เติมเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเท่ากับ 4.4 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในอาหารเพาะเชื้อที่อยู่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเท่ากับ 0.39 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าไดอะตอมมีการนำโปรตีนเกือบทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหารเพาะเชื้อไปใช้ในการเติบโตได้เกือบหมด

ส่วนการตรวจวัดปริมาณทั้งหมดในอาหารเพาะเลี้ยงไดอะตอม โดยตรวจวัดในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ที่ใช้เติมเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 11.5 กรัมต่อลิตร และในอาหารเพาะเชื้อที่ทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอมอยู่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 1.06 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไดอะตอมมีการนำสารอาหารอินทรีย์ไนโตรเจนในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ไปใช้ในการเติบโตดี โดยมีการนำไปใช้มากถึงร้อยละ 92 ของไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเพาะเชื้อ

แต่เมื่อตรวจวัดปริมาณไนโตรเจนในรูปของไนเตรตในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ที่ใช้ในการเติมเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยตรวจวัดในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง พบว่ามีปริมาณไนโตรเจนในรูปของไนเตรตเท่ากับ 110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมไนโตเจนต่อลิตร และมีไนเตรตเหลืออยู่ในอาหารเพาะเชื้อที่ทำการเลี้ยงไดอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งจากผลการตรวจวัดไนเตรตชี้ให้เห็นว่าไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 มีการนำไนเตรตไปใช้ในการเติบโต แต่แหล่งของไนโตรเจนหลักที่ใช้ในการเติบโตคือสารอาหารอินทรีย์ไนโตรเจน



รูปที่ 2.24 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si เพาะเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์อยู่ในภาวะคงที่ จากนั้นทำการแปรผันอัตราการเจือระหว่างการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นจนเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลผลิตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในอัตราการเจือจางต่างๆ

อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ผลผลิตเซลล์ไดอะตอม (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อวัน)	ปริมาตรอาหารเพาะเชื้อที่ออกจากระบบเพาะเลี้ยง (มิลลิลิตรต่อวัน)
0.23	219-239 x10^4	0.11	160
0.38	180-189 x10^4	0.14	266
0.52	141-156 x10^4	0.16	364
0.94	81-98 x10^4	0.18	660
1.24	31-42 x10^4	0.10	870

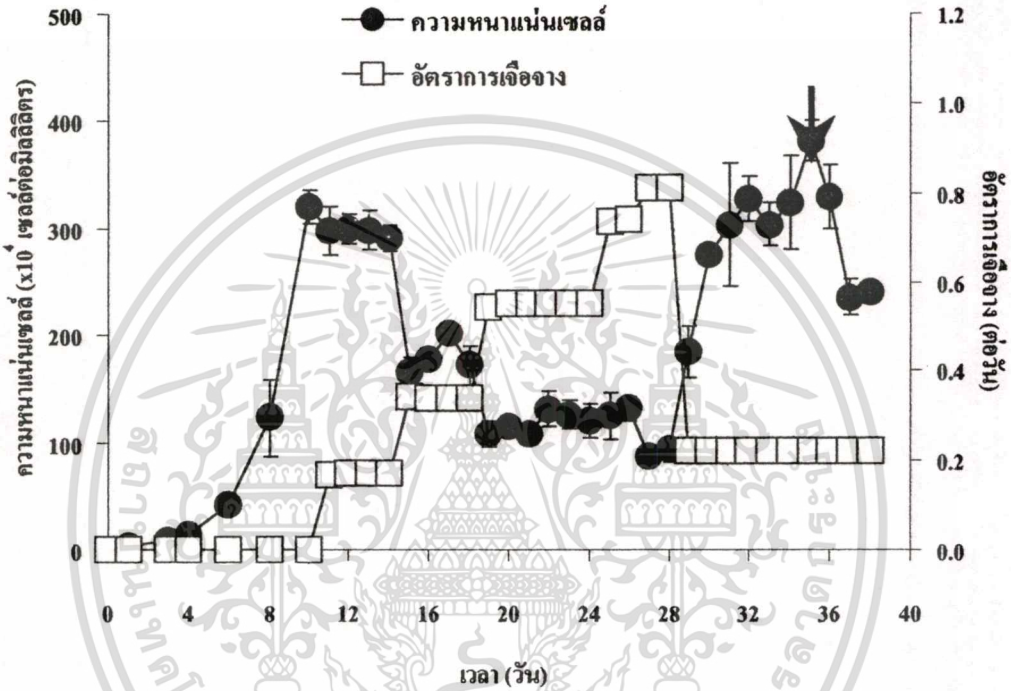
4.5.3.5 ผลของการเติมฟอสเฟตต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si เป็นเวลา 38 วัน และปรับเพิ่มอัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ พบว่าการเพิ่มอัตราการเจือจางมีผลทำให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลง โดยความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางและผลผลิตเซลล์แสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งการปรับอัตราเจือจางเป็น 0.81 ต่อวัน ในวันที่ 27-28 ของการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลงเหลือเพียง 87-93x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และหากเพิ่มอัตราการเจือจางให้สูงกว่านี้อาจเกิดการชะล้างเซลล์ออกจากระบบจนหมด ดังนั้นจึงได้ทดลองลดอัตราการเจือจางลงให้ใกล้เคียงกับอัตราการเจือจางที่ระดับเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง (ประมาณ 0.2 ต่อวัน) พบว่าไดอะตอมสามารถเติบโตเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีความหนาแน่นเซลล์ 320x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.25)

เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องมีการเติมอาหารเพาะเชื้อเข้าและนำออกจากระบบเพาะเลี้ยงตลอดเวลา จึงสามารถควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารให้คงที่ได้ เมื่อต้องการศึกษาความเข้มข้นของสารอาหารบางชนิดต่อการเติบโตของไดอะตอมก็สามารถทำได้โดยเติมสารอาหารนั้นลงในระบบเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีผลให้ความเข้มข้นของสารอาหารชนิดที่ต้องการศึกษาจะเพิ่มสูงขึ้น แต่ความเข้มข้นของสารอาหารชนิดอื่นๆ ในอาหารเพาะเชื้อยังคงที่ ดังนั้นในช่วงท้ายของการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องในครั้งนี้ได้ทดลองเติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงในอาหารเพาะเชื้อที่อยู่ในขวดเก็บอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ที่เตรียมไว้เติมเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยง ในวันที่ 35 ซึ่งมีผลให้ความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 8.5 เป็น 15.15 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องต่อไป พบว่าหลังจากทำการเติมฟอสเฟตไดอะตอมกลับมีความหนาแน่นเซลล์ลดลง และในวันที่ 38 ของการเพาะเลี้ยง ได้ตรวจวัดปริมาณของฟอสเฟตที่เหลืออยู่ในถังปฏิกรณ์ พบว่ามีปริมาณฟอสเฟตเท่ากับ 14 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มฟอสเฟตในการเพาะเลี้ยง *A. delicatissima* ไม่ได้ส่งเสริมให้เซลล์มีการเติบโตได้ดีขึ้น แต่กลับทำให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลง



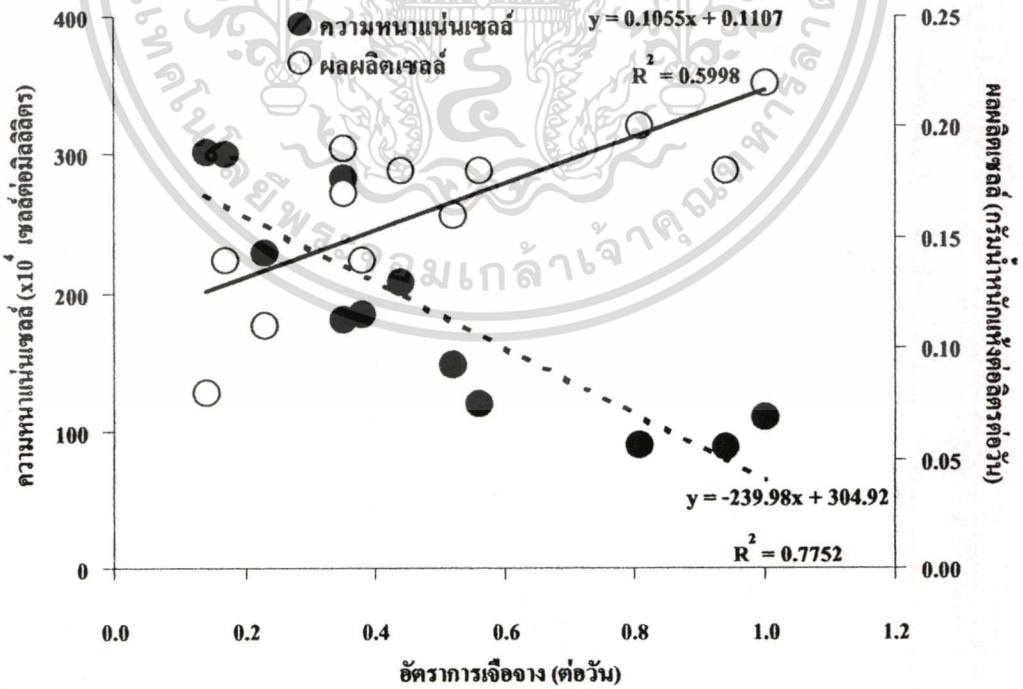
รูปที่ 4.25 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+Si 2.4mM โดยในวันที่ 35 ของการเพาะเลี้ยง มีการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อจาก 8.5 ขึ้นเป็น 15.15 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลผลิตของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในอัตราการเพาะเลี้ยงต่างๆ

อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ผลผลิตของไดอะตอม (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อวัน)	ปริมาตรอาหารเพาะเชื้อที่ออกจากระบบเพาะเลี้ยง (มิลลิลิตรต่อวัน)
0.17	290-300 x10^4	0.14	117
0.35	166-201 x10^4	0.17	247
0.56	105-131 x10^4	0.18	353
0.74	112-122 x10^4	0.19	467
0.81	87-93x10^4	0.20	565

จากการผลการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องในหัวข้อ 4.5.3.3-4.5.3.5 พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ไดอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพและผลผลิตของเซลล์ไดอะตอมที่ผลิตได้จะมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจือจาง โดยเมื่อปรับเพิ่มอัตราการเจือจางให้สูงขึ้นจะทำให้ความหนาแน่นของไดอะตอมลดลงแต่ผลผลิตน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ได้จะเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.26



รูปที่ 4.26 ความสัมพันธ์ของอัตราการเจือจางกับผลผลิตและความหนาแน่นเซลล์ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในหัวข้อ 4.5.3.3-4.5.3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคและโฟโตออโตโทรฟีค

4.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ผลิตขึ้นในเซลล์ของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารชีวโมเลกุลของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีค (ในที่มืด) ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟีค (ให้แสง 500 ลักซ์) ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si โดยทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 14 วัน พบว่าไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคมีการผลิตไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟีค ซึ่งปริมาณการผลิตไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของไดอะตอมแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ปริมาณไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (ในหน่วยร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายสภาวะเฮเทอโรโทรฟีค (ในที่มืด) ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si และสภาวะโฟโตออโตโทรฟีค (ให้แสง 500 ลักซ์) ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู

สภาวะการเพาะเลี้ยงไดอะตอม	ไขมัน	โปรตีน	คาร์โบไฮเดรต
สภาวะเฮเทอโรโทรฟีค	5.04±1.57	35.51±3.18	33.30±0.02
สภาวะโฟโตออโตโทรฟีค	4.26±1.52	25.63±0.34	11.40±0.03

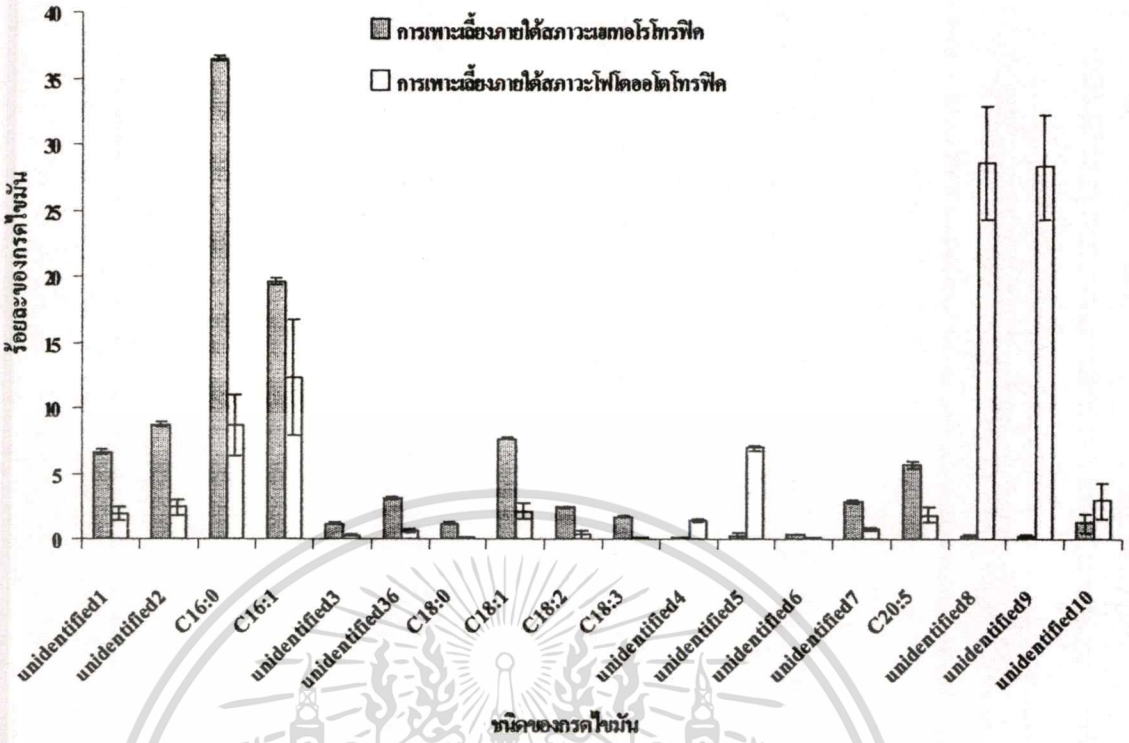
4.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่ผลิตขึ้นในไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีค (ในที่มืด) ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟีค (ให้แสง 500 ลักซ์) ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si โดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีที่คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บางขุนเทียน ซึ่งมีการปรับตั้งสภาวะของการวิเคราะห์คือ ใช้อุณหภูมิของจุดฉีดตัวอย่างเท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์ที่เริ่มต้นในการวิเคราะห์เท่ากับ 205 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเครื่องวัดสัญญาณเท่ากับ 260 องศาเซลเซียส ซึ่งในการวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้สารละลายมาตรฐานกรดไขมันที่มีเฉพาะกรดไขมันชนิดที่มีคาร์บอนอะตอม 16 และ 18 อะตอม และสารละลายกรดไขมันอีโคซะเพนตะโนอิดหรืออีพีเอ (C20:5) จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน พบว่ามีกรดไขมันบางชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ (Unidentified) เนื่องจากไม่มีสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้เปรียบเทียบ และในรูปที่ 4.27 ชี้ให้เห็นว่าไดอะตอม *A. delicatissima* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคมีสัดส่วนของกรดไขมันสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโต-โทรฟีค ยกเว้นกรดไขมัน Unidentified 4 5 8 9 และ 10 ที่พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟีคมีสัดส่วนสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีค อย่างไรก็ตามพบว่าเซลล์ *A. delicatissima* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีคมีการผลิตกรดไขมันอีพีเอสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะโฟโตออโตโทรฟีค สำหรับกรดไขมันที่ถูกจัดเป็น Unidentified 1 และ 2 เมื่อพิจารณาจากเวลาที่สารแยกออกจากคอลัมน์ (Retention Time) แล้ว น่าจะเป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 14 อะตอม (C14) ซึ่งจะมีสัดส่วนมากในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟีค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4. 27 ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่ผลิตขึ้นในไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si และภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si

เมื่อนำผลจากการวิเคราะห์กรดไขมันมาแสดงผลในรูปของปริมาณกรดไขมันต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมันชนิดไตรโคซาโนอิค (C23:0, internal standard) แสดงผลได้ดังตารางที่ 4.7 ซึ่งในตารางดังกล่าวได้นำผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันเฉพาะชนิดที่มีสารมาตรฐานเปรียบเทียบมาจัดเรียงตามลำดับเวลาที่สารแยกออกจากคอลัมน์ ผลการวิเคราะห์พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si มีการผลิตกรดไขมันทุกชนิดที่สามารถจำแนกชนิดได้สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 +1.2 mM Si

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การผลิตกรดไขมันของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si และภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si

ชนิดของกรดไขมัน	ปริมาณกรดไขมันที่ผลิตในเซลล์ไดอะตอม (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	
	สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค	สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค
กรดปาล์มิติค (C16:0)	31.80±6.60	3.62±1.58
กรดปาล์มิโตเลอิค (C16:1)	17.06±3.57	5.13±0.53
กรดสเตียริค (C18:0)	1.07±0.26	0.04±0.03
กรดโอเลอิค (C18:1)	6.71±1.40	0.89±0.39
กรดลิโนเลอิค (C18:2)	2.11±0.42	0.16±0.14
กรดลิโนเลนิค (C18:3)	1.49±0.28	0.04±0.03
กรดอีพีเอ (C20:5)	5.00±1.19	0.77±0.36
กรดไขมันอิ่มตัวที่จำแนกชนิดได้	32.87±13.65	3.67±0.01
กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำแนกชนิดได้	32.38±6.86	6.98±1.61
กรดไขมันทั้งหมด	65.25±6.80	10.65±3.45

4.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารรงควัตถุที่ผลิตขึ้นในเซลล์ของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

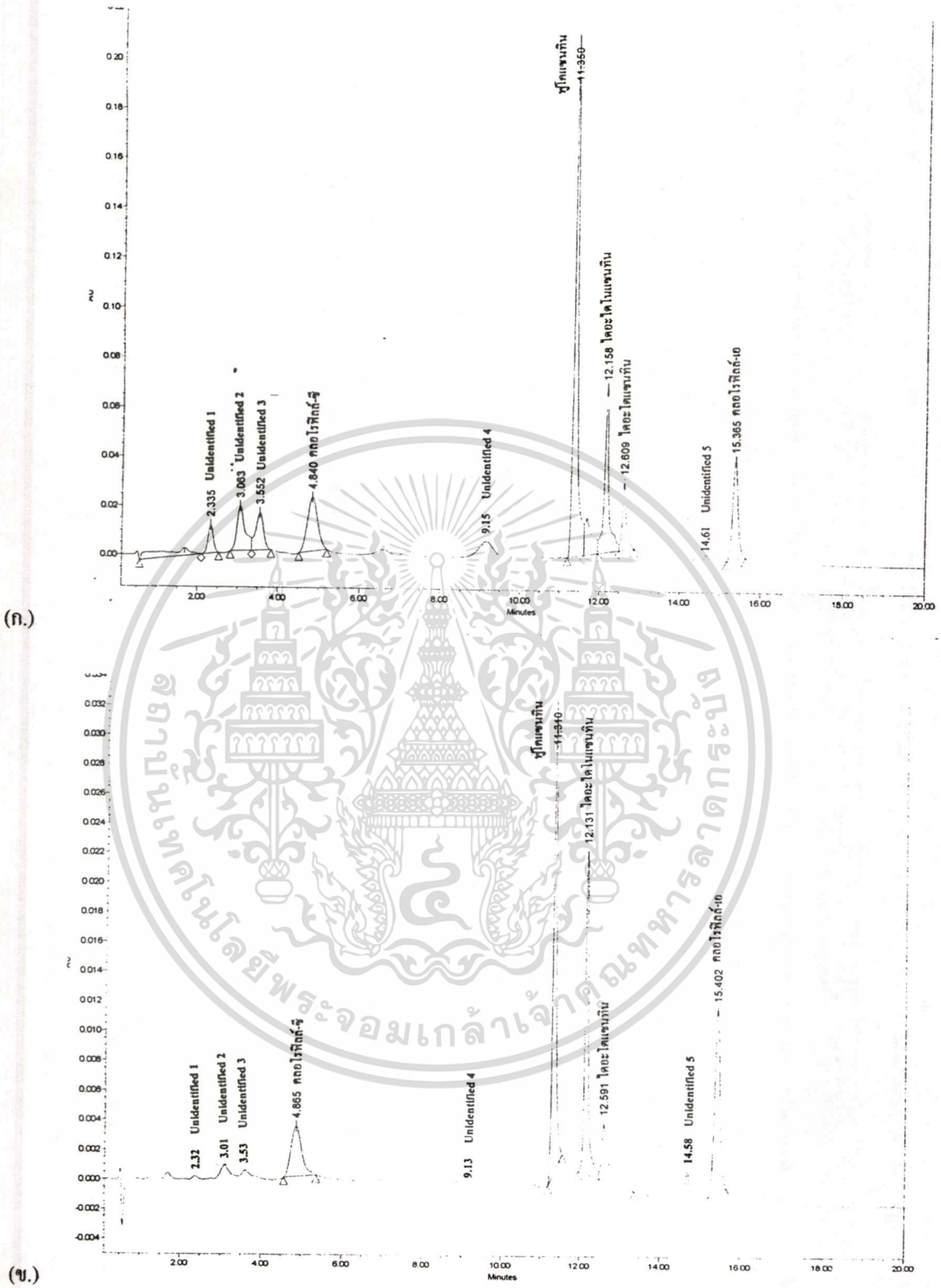
จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณรงควัตถุของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 โดยใช้เทคนิคการแยกสารด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้เฮเทอโรโทรฟิค (ในที่มืด) ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค (ให้แสง 500 ลักซ์) ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si มีองค์ประกอบของรงควัตถุที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.28) โดยรงควัตถุหลักที่พบในเซลล์ของไดอะตอม *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิคได้แก่ คลอโรฟิลล์-เอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอโรฟิลล์-ซี ฟูโคแซนทิน (Fucoxanthin) ไดอะไดโนแซนทิน (Diadinoxanthin) และไดอะโต-แซนทิน (Diatoxanthin) ในขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคจะพบสารรงควัตถุที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ (Unidentified 1-5) เพิ่มขึ้น โดยจากการตรวจสอบสเปคตรัมของรงควัตถุดังกล่าวด้วย photodiode array detector ในเครื่อง HPLC พบว่าเป็นรงควัตถุที่มีสเปคตรัมคล้ายกับคลอโรฟิลล์-เอ โดยจะพบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของคลอโรฟิลล์และจะไม่พบในรงควัตถุกลุ่มคาโรทีนอยด์ (สเปคตรัมของคลอโรฟิลล์-เอ แสดงในรูปที่ 4.29) แสดงว่ารงควัตถุที่จำแนกชนิดไม่ได้เหล่านี้น่าจะเป็นรงควัตถุที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของคลอโรฟิลล์-เอหรืออนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์-เอ

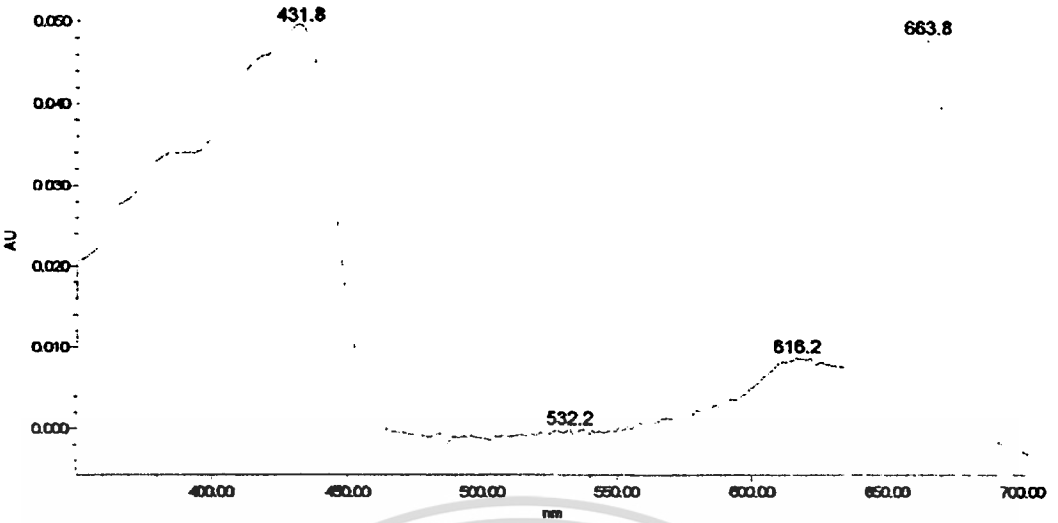
จากการวิเคราะห์สัดส่วนองค์ประกอบรงควัตถุของไดอะตอมแสดงให้เห็นว่าเซลล์ของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโต-ออโตโทรฟิคมีสัดส่วนของรงควัตถุแตกต่างกัน พบว่ารงควัตถุหลักที่มีสัดส่วนมากที่สุดได้แก่ ฟูโคแซนทิน คลอโรฟิลล์-เอและคลอโรฟิลล์-ซี ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) โดยรงควัตถุที่มีสัดส่วนลดลงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอมในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิคได้แก่ คลอโรฟิลล์-เอและไดอะไดโนแซนทิน แต่เมื่อพิจารณาปริมาณการผลิตรงควัตถุภายในเซลล์ (รูปที่ 4.30) พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิคจะทำให้รงควัตถุภายในเซลล์ของไดอะตอมมีปริมาณเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.28 (ก.) โครมาโตแกรมแสดงผลของการวิเคราะห์รงควัตถุของไดอะตอม *A. delicatissima* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si (ข.) โครมาโตแกรมแสดงผลของการวิเคราะห์รงควัตถุของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

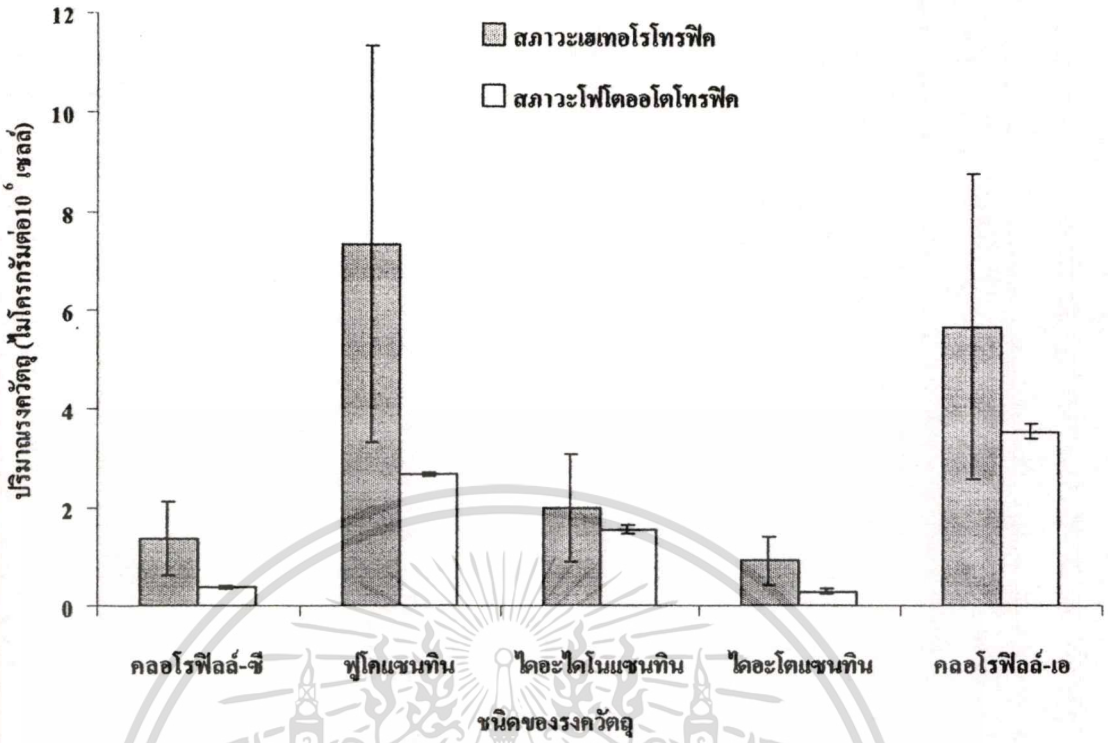


รูปที่ 4.29 ลักษณะสเปคตรัมของคลอโรฟิลล์-เอ ในเซลล์ของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

ตารางที่ 4.8 ชนิดและปริมาณรงควัตถุภายในเซลล์ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si และภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารสูตร F/2+1.2 mM Si

ชนิดของสารรงควัตถุ	สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค		สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค	
	Retention time (นาที)	ร้อยละของสารสีทั้งหมด	Retention time (นาที)	ร้อยละของสารสีทั้งหมด
Unidentified 1	2.34	2.93±0.19	2.32	0.38±0.10
Unidentified 2	3.07	4.51±0.68	3.01	1.05±0.94
Unidentified 3	3.56	2.00±1.29	3.53	1.19±0.80
คลอโรฟิลล์-ซี	4.84	6.83±0.20	4.87	5.30±3.29
Unidentified 4	9.15	4.49±0.56	9.13	0.27±0.28
ฟูโคแซนทิน	11.35	36.40±0.73	11.31	35.98±7.98
ไดอะไดโนแซนทิน	12.16	9.85±0.58	12.13	20.56±2.36
ไดอะโตแซนทิน	12.61	4.52±0.65	12.60	3.57±0.75
Unidentified 5	14.61	0.39±0.01	14.58	4.96±0.51
คลอโรฟิลล์-เอ	15.37	28.12±1.02	15.40	47.71±4.95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.30 ปริมาณรงควัตถุของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค

ในการคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในที่มืด จะต้องคำนึงถึงแหล่งที่อยู่ของสาหร่ายในแหล่งน้ำธรรมชาติ ทั้งนี้สาหร่ายที่สามารถเติบโตได้ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิคมักจะพบในบริเวณที่ได้รับแสงน้อยหรือไม่ได้รับแสงเลย และจะต้องมีปริมาณสารอินทรีย์มาก เนื่องจากสาหร่ายที่มีการเติบโตภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในที่มืดไม่สามารถที่จะสร้างอาหารเองได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง จึงจำเป็นต้องใช้สารอาหารอินทรีย์จากภายนอกเซลล์เป็นแหล่งพลังงาน โดยสาหร่ายกลุ่มนี้มักจะเป็นสาหร่ายกลุ่มไดอะตอมชนิดที่อาศัยตามพื้นดินตะกอนในแหล่งน้ำ (benthic diatom) ซึ่งบริเวณดังกล่าวจะมีซากอินทรียสารสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายโดยเก็บก้อนหินและตะกอนทราย จากหาดหินบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี และคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในที่มืดในอาหารเพาะสาหร่ายที่เสริมด้วยสารอาหารอินทรีย์ตามสูตรของ Cid *et al.* (1992) จากการเก็บตัวอย่าง พบว่าแม้ว่าในตัวอย่างน้ำและตะกอนทรายจะมีไดอะตอมอยู่ปะปนกันหลายชนิด แต่สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่เติบโตได้ในที่มืดได้เพียงชนิดเดียวคือไดอะตอมน้ำเค็ม *Amphora delicatissima* ซึ่งได้ให้ชื่อสายพันธุ์ว่า AM9901 (ผลการทดลองหัวข้อ 4.1) ไดอะตอมดังกล่าวมีรูปทรงกระสวยจัดอยู่ในกลุ่มเพนเนตไดอะตอม อาศัยเกาะติดแทรกตัวในตะกอนทรายหรือยึดเกาะกับวัตถุต่างๆ ที่อยู่ในน้ำ (epiphytic) โดยเฉพาะในบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์สูงๆ (Lee *et al.*, 1975) ในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไปมักจะพบเพนเนตไดอะตอม *Nitzschia* spp. และ *Amphora* spp. เป็นไดอะตอมชนิดเด่น (dominant species) และสามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค ในขณะที่สาหร่ายเซลล์เดียวชนิดอื่นๆ รวมทั้งพวกเซนตริคไดอะตอมเกือบทั้งหมดจะมีพฤติกรรมล่องลอยอยู่ในมวลน้ำ (planktonic) และมีการสร้างอาหารด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยบริเวณที่พบแพลงก์ตอนพืชเหล่านี้อาศัยอยู่มักเป็นบริเวณที่มีแสงและมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ต่ำ (Werner, 1977)

แม้ว่าจากการสำรวจเอกสารจะพบว่านอกเหนือจากไดอะตอมบางชนิดแล้วก็ยังมีสาหร่ายกลุ่มอื่นๆ ที่มีความสามารถในการเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค เช่น *Chlorella regularis*, *Chlamydomonas humicola*, *Euglena gracilis* และ *Crypthecodinium cohnii* (Endo *et al.*, 1977; Laliberte and de la Noue, 1993; Takeyama *et al.*, 1997; Jing and Chen, 1999) แต่ก็ยังนับเป็นเพียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายทั่วไปที่จะต้องอาศัยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในการเติบโต ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปัญหาประการหนึ่งของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบไร้แสงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคก็คือจำนวนชนิดของสาหร่ายที่สามารถเติบโตได้ในสภาวะดังกล่าวมีอยู่น้อย (Chen, 1996)

5.2 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในขวดรูปชมพู่

5.2.1 ผลของความเข้มข้นของสารอาหารอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

เปปโตน ยีสต์สกัดและเนื้อสกัดเป็นสารอาหารอินทรีย์ที่มีกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบหลัก เพราะฉะนั้นเปปโตน ยีสต์สกัดและเนื้อสกัดจึงเป็นแหล่งของสารอาหารไนโตรเจนที่มีคุณค่าต่อการเติบโตของไดอะตอม นอกจากนี้เปปโตน ยีสต์สกัดและเนื้อสกัดยังมีคาร์โบไฮเดรตและวิตามินชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ ไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนหลายชนิด ในไดอะตอมพบว่าโปรตีนจะเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์และออร์กาเนลล์ต่างๆ ดังนั้นเมื่ออยู่ในภาวะขาดไนโตรเจนพบว่าการเติบโตของไดอะตอมจะลดลง เนื่องจากในระยะพักก่อนที่จะมีการแบ่งเซลล์ ต้องมีการสร้างโปรโตพลาสซึมและสารชีวโมเลกุลชนิดต่างๆ เพื่อเตรียมพร้อมในการแบ่งเซลล์ เช่น เอนไซม์และกรดนิวคลีอิค ซึ่งสารชีวโมเลกุลเหล่านี้ล้วนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้พบว่าการขาดไนโตรเจนของไดอะตอมก็มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เพราะไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์และรงควัตถุชนิดอื่นด้วย เช่นเดียวกับผลจากการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เสริมด้วยสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่ประกอบด้วยเปปโตน ยีสต์สกัดและเนื้อสกัดเพื่อเป็นไนโตรเจนและเติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ไดอะตอม พบว่าการขาดแหล่งของสารอาหารอินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นเปปโตน ยีสต์สกัดหรือเนื้อสกัดเพียงชนิดเดียวมีผลทำให้ไดอะตอมมีการเติบโตต่ำ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Cid *et al.* (1992) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Tetraselmis suecica* ในอาหารเพาะเชื้อที่เติมเปปโตนหรือยีสต์สกัดเพียงอย่างเดียว มีผลทำให้การเติบโตของสาหร่ายต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมทั้งเปปโตนและยีสต์สกัด

การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* ด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ผสมสารอาหารอินทรีย์ไนโตรเจนตามสูตรของอาหารเพาะเชื้อสูตร NB ประกอบด้วยเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยกลูโคส 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัมต่อลิตร (4 กรัมคาร์บอนต่อลิตร) เรียกว่าอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C สามารถทำให้ไดอะตอมมีการเติบโตได้สูงที่สุด การทดลองแปรผันความเข้มข้นของสารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบของ NB ในอาหารเพาะเชื้อ พบว่าหากความเข้มข้นของเปปโตนสูงกว่า 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัดสูงกว่า 2 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัดสูงกว่า 1 กรัมต่อลิตร จะทำให้การเติบโตของไดอะตอมลดลงต่ำกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C และจากการสำรวจเอกสาร de Swaaf *et al.* (1999) พบว่าการให้สารอาหารอินทรีย์ในโตรเจนในรูปของยีสต์สกัดมากกว่า 10 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้การเติบโตของไดโนแฟลกเจลเลต *Crypthecodinium cohnii* ลดลง ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในอาหารเพาะเชื้อสามารถทำให้การเติบโตของสาหร่ายลดลงได้ อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการวิจัยนี้แม้ว่าจะยังไม่สามารถสรุปผลของความเข้มข้นของสารอาหารที่สูงเกินไปต่อการทำให้การเติบโตของไดอะตอมลดลง แต่จากการพิจารณาองค์ประกอบของอาหารเพาะเชื้อที่ประกอบด้วยเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร จะมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบประมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร และโปแตสเซียม 0.34 กรัมต่อลิตร คิดเป็นสัดส่วนของโซเดียมคลอไรด์กับโปแตสเซียมเท่ากับ 1 ต่อ 3.4 ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของเปปโตน ยีสต์สกัด หรือเนื้อสกัดก็จะมีผลทำให้สัดส่วนของโซเดียมคลอไรด์กับโปแตสเซียมเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติของระบบการขนส่งสารเข้าออกเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนโซเดียมและโปแตสเซียม (sodium-potassium pump)

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เสริมด้วยสารอาหาร NB ที่ประกอบด้วย เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร รวมทั้งเสริมด้วยกลูโคส 4 กรัมคาร์บอนต่อลิตร (อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C) ทำให้ไดอะตอมมีการเติบโตได้สูงที่สุด $88x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคขั้นต่อไปจึงเลือกที่จะใช้อาหารเพาะเชื้อสูตรดังกล่าว

5.2.2 ผลของกลูโคสต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

กลูโคสเป็นสารอาหารอินทรีย์คาร์บอนที่มีความสำคัญต่อการเติบโตของไดอะตอม สาเหตุเพราะว่าเซลล์มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 50 ของน้ำหนักเซลล์ และพบคาร์บอนในโครงสร้างของสารชีวโมเลกุลชนิดต่างๆ เช่น โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต ซึ่งสารชีวโมเลกุลเหล่าล้วนมีบทบาทในการสร้างเซลล์ เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะขาดกลูโคสก็ย่อมมีผลให้การเติบโตลดลง สอดคล้องกับผลการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ในขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปชมพู่ ด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C พบว่าในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงไดอะตอมมีการเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เข้าสู่ระยะทวีคูณ จากนั้นเข้าสู่ระยะคงที่ซึ่งมีอัตราการเติบโตเท่ากับอัตราการตาย โดยทั่วไปเมื่อเข้าสู่ระยะคงที่ความเข้มข้นของสารอาหารที่เหลืออยู่ในอาหารเพาะเชื้อจะมีความเข้มข้นต่ำ และเซลล์ก็อาจมีการปลดปล่อยของเสียต่างๆ ออกมาทำให้สภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเติบโต (Becker, 1994) แต่เมื่อทำการเติมเฉพาะสารละลายกลูโคสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนลงในอาหารเพาะเชื้อ พบว่ากลูโคสสามารถชักนำให้ไดอะตอมมีการเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นได้อีกแม้ว่าความหนาแน่นเซลล์จะเพิ่มขึ้นไม่มากนักก็ตาม แม้ว่ากลูโคสจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประโยชน์ต่อการเติบโตของไดอะตอม แต่การให้กลูโคสมากเกินไปก็ไม่เป็นผลดีต่อการเติบโตของไดอะตอม เช่นเดียวกับผลการศึกษาของชมพูนุทและคณะ (2546) ที่พบว่าการให้สารอาหารอินทรีย์ในโตรเจนในรูปของอาหารเพาะเชื้อสูตร NB ร่วมกับการให้สารอาหารอินทรีย์คาร์บอนในรูปของกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (4 กรัมคาร์บอนต่อลิตร) มีผลทำให้ไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 เติบโตได้ดีกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อที่ให้เพียงสารอาหารอินทรีย์คาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสสูงกว่า 10 กรัมต่อลิตรนั้น นอกจากจะไม่ช่วยให้ไดอะตอมมีอัตราการเติบโตที่ดีขึ้นแล้วยังทำให้เกิดการเติบโตลดลง สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Shi *et al.* (1999) และ Zhang and Lee (2001) ที่พบว่าการให้กลูโคสมากกว่า 40 กรัมต่อลิตรในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella protothecoides* ส่งผลให้การเติบโตของสาหร่ายลดลง ในขณะที่การให้กลูโคสมากกว่า 72 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้การเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ลดลงเช่นกัน

5.3 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโร-โทรฟิคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

5.3.1 ผลของการให้อากาศต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในขวดรูปชมพู่ที่เขย่า 120 รอบต่อนาที พบว่าไดอะตอมมีการเติบโตสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C จากนั้นได้ขยายขนาดการเพาะเลี้ยงไดอะตอมสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตรดังกล่าวข้างต้นและมีการกวนตลอดเวลาด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงไดอะตอมทั้งแบบให้อากาศและไม่ให้อากาศ โดยทั่วไปแล้วการให้อากาศในระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะให้อากาศในรูปของอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แต่ในการทดลองนี้ได้ให้อากาศที่ผ่านการกรองเพียงอย่างเดียวโดยใช้ปั๊มพ์อากาศ เนื่องจากไดอะตอมในสภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฮเทอโรโทรฟิคจะไม่มีการสังเคราะห์อาหารด้วยแสง จึงไม่ต้องการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบให้อากาศสามารถให้ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย $75x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้อากาศที่มีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย $54x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าการให้อากาศมีผลให้การเติบโตของไดอะตอมเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ทั้งนี้สาเหตุอาจมาจากการเพาะเลี้ยงแบบให้อากาศจะช่วยเพิ่มทั้งการกวนและการให้ออกซิเจนไปพร้อมๆ กัน ซึ่งการกวนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเกิดจากการหมุนของแท่งแม่เหล็กรวมกับการพ่นอากาศ จะช่วยให้เซลล์มีการกระจายสม่ำเสมอและช่วยในการตีฟองอากาศให้เล็กลงทำให้ประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนก๊าซของเซลล์สูงขึ้น (กำเนิด, 2532) แต่สิ่งที่พบในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบให้อากาศคือ เซลล์อยู่ในระยะพักตัวนานก่อนที่จะเริ่มแบ่งเซลล์ แสดงให้เห็นว่าไดอะตอมจะต้องมีการปรับตัวจากสภาพของการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อซึ่งไม่มีการให้อากาศ นอกจากนี้ยังเกิดปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่ปนมากับการให้อากาศ ซึ่งระบบการฆ่าเชื้ออากาศนั้นมีความยุ่งยาก ในงานวิจัยนี้ได้ใช้การเป่าอากาศลงในสารละลายคอปเปอร์-ซัลเฟตเพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอากาศ ก่อนที่จะผ่านการกรองด้วยระบบกรองอากาศอีกครั้ง ซึ่งหากเกิดความผิดพลาด เช่น การที่มีสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตปนเปื้อนลงในอาหารเพาะเชื้อจะส่งผลให้ผนังเซลล์และคลอโรฟิลล์ถูกทำลาย (Coello Oviedo *et al.*, 2002) หรือแม้แต่การหลุดรอดของแบคทีเรียผ่านระบบกรองอากาศ ก็จะทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้อากาศไม่มีปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย

เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตของไดอะตอมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบให้อากาศและไม่ให้อากาศ พบว่าการให้อากาศมีผลให้ไดอะตอมมีการเติบโตสูงกว่าการไม่ให้อากาศเล็กน้อย ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจึงเลือกที่จะเพาะเลี้ยงโดยไม่ให้อากาศ

5.3.2 ผลของการเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทร-ฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

จากผลการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ไดอะตอมจะมีการเติบโตขึ้นโดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย $132x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเซลล์มีการเติบโตลดลงโดยมีความหนาแน่นเซลล์ $16x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากสารอาหารชนิดต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงไดอะตอมหมดลง รวมทั้งมีการสะสมของเสียและสารเมแทบอไลท์ชนิดต่างๆ ที่เป็นพิษต่อเซลล์ไดอะตอมออกสู่อาหารเพาะเชื้อ (บุษบา, 2540) ดังนั้นจึงได้ทำการเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มได้อีก โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cultivation) แต่จากผลการทดลองพบว่าความหนาแน่นเซลล์สูงสุดของไดอะตอมที่ได้หลังจากเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ($75x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในระยะแรกที่ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย $95x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงว่าไดอะตอมสามารถนำสารอาหารไปใช้ในการเติบโตได้ดีกว่าในการเพาะเลี้ยงในช่วงแรก ทั้งนี้สาเหตุเพราะสภาพเซลล์ของไดอะตอมมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมได้ดี โดยทั่วไปเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวนิยมใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวและสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เพราะสามารถให้ผลผลิตเซลล์และผลิตภัณฑ์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang *et al.* (1999) พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* แบบครั้งคราวให้ความหนาแน่นเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ถึง 1.9 เท่า เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวสามารถควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารบางชนิดให้มีความเหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่ายได้ตลอดเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง

5.4 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโร-โทรฟิคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

5.4.1 การผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

จากการขยายขนาดของการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 สู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C แบบไม่ให้อากาศแต่มีการกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 18 วัน พบว่าในระยะแรกของการเพาะเลี้ยง (วันที่ 0-5 ของการเพาะเลี้ยง) ไดอะตอมมีการเติบโตช้า เนื่องจากมีการปรับสภาพเซลล์ให้พร้อมในการแบ่งเซลล์ จากนั้นในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ไดอะตอมมีการเติบโตเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับน้ำหนักแห้ง โดยให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย $61x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นผลผลิตน้ำหนักแห้ง 0.16 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อลดลง หลังจากนั้นความหนาแน่นเซลล์ลดลงและกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อก็หมดลง อย่างไรก็ตามความหนาแน่นเซลล์สูงสุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ใกล้เคียงกับความหนาแน่นสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร แต่ผลผลิตเซลล์ทั้งหมดจากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร จะสูงกว่าขนาด 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

การทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่พบว่าในระยะแรกของการเพาะเลี้ยง (ในวันที่ 0-11 ของการเพาะเลี้ยง) เซลล์มีการเติบโตเพิ่มขึ้น และความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อลดลง จากนั้นในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย $58x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อก็หมดลง จึงเติมกลูโคสลงในอาหารเพาะเชื้อ หลังจากนั้นในวันที่ 21 ของการทดลอง พบว่าเซลล์มีการเติบโตได้สูงขึ้น โดยให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $108x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 25 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ จึงเติมสารละลายกลูโคสลงในอาหารเพาะเชื้อ แต่พบว่าเซลล์ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย $79x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าความหนาแน่นเซลล์ได้จากการเติมกลูโคสในครั้งแรก แสดงให้เห็นว่าไม่ใช่เพียงกลูโคสเท่านั้นที่มีผลต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม การปรับปรุงการเติบโตของไดอะตอมโดยการเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารเพาะเชื้อยังต้องพิจารณาสารอาหารอื่นๆ ไม่ว่าจะเป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ โดยเฉพาะธาตุอาหารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 เช่น ไนเตรต ฟอสเฟต และซิลิเกต เป็นต้น รวมทั้งได้ทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอมเป็นเวลานานถึง 34 วัน ซึ่งเป็นไปได้ว่าเซลล์อยู่ในระยะที่ไม่สมบูรณ์แล้ว จึงไม่สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มได้อีกถึงแม้ว่าจะมีแหล่งคาร์บอนที่เพียงพอ

5.5 ผลของความเข้มข้นของซิลิกาต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

แม้ว่าการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคโดยการเพิ่มสารอาหารอินทรีย์คาร์บอนและไนโตรเจน สามารถชักนำให้เซลล์มีการเติบโตได้ดี อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C (ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย $88x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ก็ยังไม่สามารถให้ผลผลิตเซลล์ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปกติ ที่ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย $94x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ยังขาดสารอาหารสำคัญที่จะช่วยกระตุ้นการเติบโตของไดอะตอม ต่อมาได้ทดลองแปรผันความเข้มข้นสารละลายซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C (ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C มีความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 0.12 มิลลิโมลาร์) เป็น 0 0.12 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์ พบว่าไดอะตอมไม่สามารถเติบโตได้เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขาดซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อ ในขณะที่การเพิ่มซิลิกาจาก 0.12 เป็น 2.4 มิลลิโมลาร์ พบว่าไดอะตอมมีการเติบโตได้ดีที่สุด โดยให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย $792x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 11 วัน คิดเป็น 21 เท่าของความหนาแน่นเซลล์สูงสุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C (ความหนาแน่นเซลล์ $35x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แสดงให้เห็นว่าซิลิกามีผลอย่างมากต่อการเติบโตของไดอะตอม ทั้งนี้เนื่องจากไดอะตอมเป็นจุลสาหร่ายที่มีเปลือกหุ้มเซลล์เป็นซิลิกา เมื่อไดอะตอมมีการเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์จึงจำเป็นต้องใช้ซิลิกาในการสร้างเปลือกหุ้มเซลล์ใหม่ (van den Hock *et al.*, 1995) ดังนั้นเมื่อไดอะตอมใช้ซิลิกาที่อยู่ในอาหารเพาะเชื้อจนหมดก็จะเกิดภาวะการขาดซิลิกาทำให้ไม่สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นได้อีก (Lewin, 1955b) อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มซิลิกาให้สูงกว่า 2.4 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้การเติบโตของไดอะตอมช้าลง จึงเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของซิลิกาที่สูงเกินไปก็อาจมีผลต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม จากการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคจาก 0.12 เป็น 2.4 มิลลิโมลาร์ สามารถทำให้เซลล์เติบโตเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก โดยผลการศึกษาได้สูตรอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบเฮเทอโรโทรฟิคซึ่งได้ให้ชื่อว่า อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si

แต่ในธรรมชาติไดอะตอมมีการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิคและในแหล่งน้ำมีซิลิกาในปริมาณที่จำกัด เพราะฉะนั้นซิลิกาจึงเป็นสารอาหารอีกชนิดหนึ่งที่เป็นปัจจัยจำกัดการเติบโตของไดอะตอม หากทดลองเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค ผลที่เกิดขึ้นอาจคล้ายคลึงกับผลของการทดลองเพิ่มซิลิกาในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค ดังนั้นจึงได้ทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของซิลิกาเป็น 0 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์ พบว่าไดอะตอมไม่สามารถเติบโตได้เมื่อขาดซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อ ในขณะที่การให้ซิลิกา 1.2 มิลลิโมลาร์ พบว่าไดอะตอมให้ความหนาแน่นเซลล์สูงที่สุด โดยให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $35x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 14 วัน ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาให้สูงกว่านี้ พบว่าความหนาแน่นเซลล์ที่ได้ไม่สูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคเซลล์มีการแบ่งตัวช้าทำให้มีการนำซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อไปใช้ได้น้อย

เมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นเซลล์สูงสุด พบว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si ประมาณ 22 เท่า และสูงกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ถึง 21 เท่า ดังนั้นในการทดลองลำดับต่อไปจึงได้เลือกใช้อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค ส่วนการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคจะใช้อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si

5.6 การเปรียบเทียบการเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตรต่างๆ

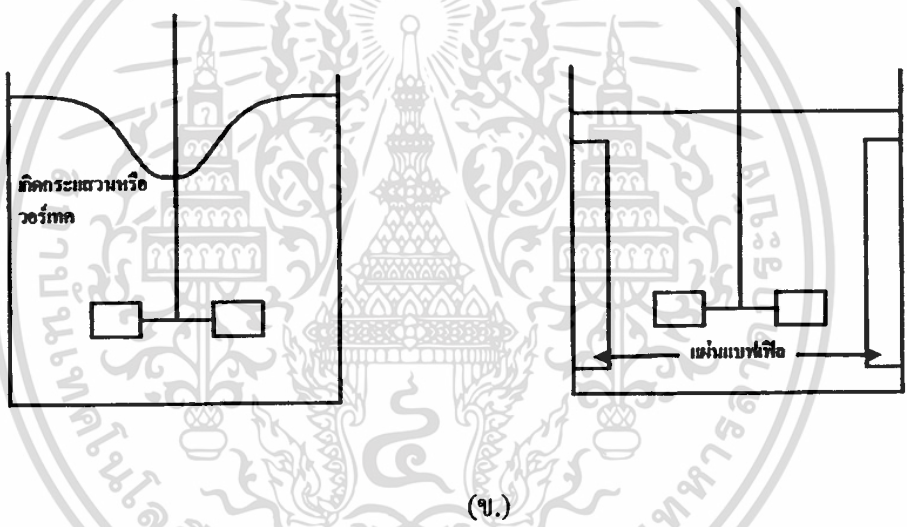
เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตของไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการเติมสารอาหารชนิดต่างๆ ที่ปรับปรุงมา รวมทั้งอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่เติมซิลิกาในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค และอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการเติมซิลิกาในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค (กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 5.5) แสดงให้เห็นเด่นชัดว่าการเพิ่มซิลิกา 2.4 มิลลิโมลาร์ ในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค ให้ความหนาแน่นสูงที่สุด และสูงกว่าความหนาแน่นเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตรที่เติมซิลิกา 1.2 มิลลิโมลาร์ 1.2 เท่า ภายในเวลา 15 วัน จากการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโร-โทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+4C F/2+NB F/2+NB+4C F/2+NB+4C+1.2 mM Si และ F/2+NB+4C+2.4 mM Si เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 และ F/2+1.2 mM Si ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเติมสารอาหารชนิดอื่น (กลูโคสและสารอาหาร NB) ไม่สามารถชักนำให้เซลล์มีการเติบโตได้สูงกว่าการเติมซิลิกา ซึ่งผลการทดลองนี้ก็ยืนยันให้เห็นอย่างเด่นชัดว่าซิลิกาเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมากในการเติบโตแบบเฮเทอโร-โทรฟิค

5.7 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในขวดรูปชมพู่ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si สามารถชักนำให้ไดอะตอมมีการเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะและผลผลิตของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดังกล่าวระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในขวดรูปชมพู่กับในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 792×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 320×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สาเหตุสำคัญเนื่องจากการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่มีการเขย่าอยู่ตลอดเวลา (120 รอบต่อนาที) ทำให้ประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนก๊าซสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และการเขย่ายังทำให้เซลล์ไดอะตอมมีการกระจายอยู่ในอาหารเพาะเชื้ออย่างสม่ำเสมอ มีผลทำให้เซลล์ได้สัมผัสกับสารอาหารอย่างทั่วถึง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพอาจมีประสิทธิภาพแลกเปลี่ยนก๊าซต่ำกว่าขวดรูปชมพู่ ทั้งนี้เนื่องจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นขวดทรงสูง และมีการกวนโดยใช้แท่งแม่เหล็ก ทำให้กระแสการไหลวนของอาหารเพาะเชื้อเกิดเฉพาะบริเวณส่วนกลางของถังปฏิกรณ์ชีวภาพหรือเรียกว่าวอร์เทค (vortex) (รูปที่ 5.1) และส่งผลให้การผสมของเซลล์กับอาหารเพาะเชื้อไม่ทั่วถึงดีนัก เนื่องจากเซลล์จะเคลื่อนที่ตามกันซึ่งเป็นไปตามกระแสการไหลของอาหารเพาะเชื้อ ดังนั้นในการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพจึงมักจะมีการติดตั้งแผ่นกั้นตามแนวตั้งของถังปฏิกรณ์หรือเรียกว่าแบฟเฟิล (baffle) เพื่อแก้ไขปัญหาการเกิดวอร์เทค (สาโรจน์ และคณะ, 2544) แต่จากข้อจำกัดของอุปกรณ์ในการทดลอง ทำให้ยังคงต้องใช้วิธีการกวนโดยแท่งแม่เหล็กเหมือนเดิม



(ก.) (ข.)

รูปที่ 5.1 (ก.) การไหลวนของอาหารเพาะเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ไม่มีการติดตั้งแบฟเฟิล
(ข.) การไหลของอาหารเพาะเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการติดตั้งแบฟเฟิล

ที่มา: Bailey and Oillis (1986)

5.8 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

5.8.1 ผลของการกวนต่อการเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. Delicatissima* AM9901

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si พบว่าได้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ แต่ผลผลิตเซลล์ทั้งหมดจะสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ดังนั้นใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองลำดับต่อมาจึงทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่อง เพราะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ตลอดเวลา จึงทำให้ผลผลิตทั้งหมดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ ลำดับแรกของการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องได้ทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ไม่ให้อากาศแต่กวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที และเมื่อเซลล์มีการเติบโตคงที่ได้ปรับเปลี่ยนอัตราการกวนระหว่างการเพาะเลี้ยง เพื่อศึกษาผลของการกวนต่อการเติบโตของไดอะตอม จากการทดลองได้เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในวันที่ 0-8 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าไดอะตอมมีการเติบโตเพิ่มขึ้นและมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $510x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเริ่มเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยปรับอัตราการเจือจางเป็น 0.96 ต่อวัน พบว่าความหนาแน่นเซลล์ลดลงเหลือ $123\text{-}154x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นได้ปรับเปลี่ยนอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที พบว่าความหนาแน่นเซลล์ที่ได้ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที เพียงเล็กน้อย ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มการกวนไม่มีผลช่วยเพิ่มการเติบโตของไดอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแต่อย่างใด ดังนั้นการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องในการทดลองลำดับต่อไปจึงเลือกใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที

5.8.2 ความสัมพันธ์ของอัตราการเจือจางกับความหนาแน่นเซลล์ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ใช้ความเข้มข้นของสารอาหารควบคุมอัตราการเติบโตของไดอะตอม หรือเรียกว่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบเคโมสแตต (chemostat) พบว่าอัตราการเจือจางจะแปรผกผันกับความหนาแน่นของเซลล์ แต่ผลผลิตของเซลล์จะแปรผันตรงกับอัตราการเจือจาง (Bailey and Oillis, 1986) ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความหนาแน่นเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ไม่ให้อากาศแต่กวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงแบบแบตช์เป็นเวลา 13 วัน พบว่าเซลล์มีการเติบโตขึ้นและมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $491x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเริ่มเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยใช้อัตราการเจือจาง 0.24 ต่อวัน เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเซลล์มีความหนาแน่น $293\text{-}308x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อปรับอัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ต่อวัน พบว่าความหนาแน่นเซลล์ลดลงเหลือ $126\text{-}198\ x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอัตราการเจือจางจะแปรผกผันกับความหนาแน่นเซลล์ โดยการเพิ่มอัตราการเจือจางมีผลทำให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลง เช่นเดียวกับผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Isochrysis galbana* แบบต่อเนื่อง ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอัตราการเจือจางต่ำ 0.005 ต่อวัน สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้อัตราการเจือจางที่สูงกว่า (Fernandez Sevilla *et al.*, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.8.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจาง ความหนาแน่นเซลล์และผลผลิตเซลล์ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของอัตราการเจือจางกับความหนาแน่นเซลล์ (หัวข้อ 5.8.2) พบว่าอัตราการเจือจางจะแปรผกผันกับความหนาแน่นเซลล์ แต่จากการทดลองข้างต้นได้แปรผันอัตราการเจือจางเพียง 3 ระดับ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้แปรผันอัตราการเจือจางเป็น 4 ระดับ โดยเพาะเลี้ยงไดอะตอมในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si พบว่าการเพิ่มอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงมีผลทำให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลง เมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 1.00 ต่อวัน พบว่าความหนาแน่นเซลล์ลดลงต่ำมากและหากปรับอัตราการเจือจางสูงกว่านี้ อาจทำให้เกิดการชะล้างเซลล์ออกจากระบบการเพาะเลี้ยง เนื่องจากไดอะตอมไม่สามารถเติบโตเพิ่มจำนวนได้ทันกับอัตราการเจือจาง แม้ว่าการเพิ่มอัตราการเจือจางมีผลให้ความหนาแน่นลดลงแต่ผลผลิตทั้งหมดที่เก็บเกี่ยวได้จากระบบเพาะเลี้ยงกลับเพิ่มสูงขึ้น ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Wen and Chen (2001) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Nitzchia lavis* ด้วยอัตราการเจือจางต่ำจะให้ความหนาแน่นเซลล์สูง ในขณะที่การเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 1.00 ต่อวัน มีผลทำให้เซลล์ถูกชะล้างออกนอกระบบจนหมด

จากการทดลองหยุดการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องหลังจากที่พบว่าเซลล์ถูกชะออกจากระบบเพาะเลี้ยงจนเกือบหมด (ใช้อัตราการเจือจาง 1.00 ต่อวัน) แต่ได้เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ต่อเป็นเวลา 8 วัน พบว่าเซลล์สามารถเติบโตเพิ่มขึ้น โดยให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 422×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5.8.4 การเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ในระบบการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ใช้อัตราการเจือจางสูง จะเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ออกจากระบบเพาะเลี้ยง โดยปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ก็ต่อเมื่ออัตราการเจือจางสูงกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่าที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 1.00 ต่อวัน มีผลให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลงมาก แต่ยังไม่ทราบถึงอัตราการเจือจางที่ทำให้เกิดการชะล้างเซลล์ ดังนั้นการทดลองในหัวข้อนี้จึงทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่อง โดยมีการปรับอัตราการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ผลการทดลองพบว่าการเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 1.24 ต่อวัน ให้ความหนาแน่นเซลล์ต่ำมาก และหากเพิ่มอัตราการเจือจางให้สูงกว่านี้ คาดว่าน่าจะเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ สอดคล้องกับทดลองของชมพูนุท (2543) พบว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* แบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ด้วยอัตราการเจือจางต่ำ 0.0167 ต่อชั่วโมง สามารถให้ความหนาแน่นเซลล์สูงที่สุดประมาณ 96-139×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเกิดการชะล้างเซลล์เมื่อปรับอัตราการเจือจางเพิ่มเป็น 1.2 ต่อวัน ในขณะที่การใช้อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นจากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ *A. delicatissima* มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ในงานของชมพูนุท (2543) นอกจากนี้อัตราการเติบโตของเซลล์ที่แตกต่างกันยังอาจมีผลต่อสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ของไดอะตอม

5.8.5 ผลของฟอสฟอรัสต่อการเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

ฟอสฟอรัสเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญต่อการเติบโตของไดอะตอม เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบสำคัญของสารชีวโมเลกุลหลายชนิด เช่น กรดนิวคลีอิคและฟอสโฟลิปิด ดังนั้นการขาดฟอสฟอรัสก็มีผลให้การเติบโตของไดอะตอมลดลง ในทางกลับกันหากความเข้มข้นของฟอสฟอรัสสูงเกินไปก็อาจมีผลต่อการเติบโตของไดอะตอมได้เช่นกัน จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่อง โดยเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะคงที่แล้ว ทำการเติมสารละลายฟอสฟอรัสเพิ่มลงในอาหารเพาะเชื้อที่เตรียมไว้เติมเข้าสู่ระบบ ผลการทดลองพบว่าการเติมฟอสฟอรัสทำให้การเติบโตของไดอะตอมลดลง เมื่อตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัส พบว่าความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในอาหารเพาะเชื้อที่อยู่ในถังปฏิกรณ์ไม่ได้ลดลงเลย แสดงว่าเซลล์มีการนำสารอาหารฟอสฟอรัสไปใช้ในการเติบโตน้อยมาก

5.9 การผลิตสารชีวโมเลกุลในเซลล์ของไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิค

5.9.1 การผลิตโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตในเซลล์ของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

จากการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล ได้แก่ โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ซึ่งเป็นสูตรอาหารเพาะเชื้อที่เซลล์มีการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคได้สูงที่สุด และสภาวะโฟโออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si ซึ่งเป็นสูตรอาหารเพาะเชื้อที่เซลล์มีการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิคได้สูงที่สุด พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคมีการผลิตไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค เนื่องจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si มีการแบ่งเซลล์เติบโตได้ดีกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si มาก ดังนั้นภายในเซลล์จะมีการผลิตสารชีวโมเลกุลไว้มากเพื่อเตรียมพร้อมในการแบ่งเซลล์ จากตารางที่ 5.1 พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคหรือมิกโซโทรฟิคจะมีองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลที่แตกต่างจากเซลล์ที่เติบโตในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิค

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5.1 องค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน

ชนิดสาหร่าย	สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)			เอกสารอ้างอิง
	สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค	สภาวะมิกโซโทรฟิค	สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค	
Spirulina maxima	โปรตีน 62 ไขมัน 13 คาร์โบไฮเดรต 18	-	-	Torzillo *et al.* (1986)
Porphyridium cruentum	-	โปรตีน 37 ไขมัน 7 คาร์โบไฮเดรต 36	-	Rebolloso Fuentes *et al.* (2000)
Chlorella pyrenoidosa	-	โปรตีน 65 คาร์โบไฮเดรต 6	-	Sanchez *et al.* (2001)
Isochrysis galbana	โปรตีน 37 ไขมัน 20 คาร์โบไฮเดรต 33	-	-	Zhu *et al.* (1997)
Amphora delicatissima	โปรตีน 26 ไขมัน 4 คาร์โบไฮเดรต 11	-	โปรตีน 36 ไขมัน 5 คาร์โบไฮเดรต 33	ผลการศึกษาในครั้งนี้

การที่สาหร่ายมีกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิค ทำให้องค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคไม่เกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และเซลล์สามารถแบ่งตัวได้ดี เนื่องจากภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคมีการเติมสารอาหารอินทรีย์คาร์บอนและไนโตรเจนลงในอาหารเพาะเชื้อ เป็นการเพิ่มสารที่เป็นองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลชนิดต่างๆ ซึ่งอาจอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้ปริมาณสารชีวโมเลกุลไม่ว่าจะเป็นไขมัน คาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีนภายในเซลล์มีค่าสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.9.2 การผลิตกรดไขมันของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

จากการสำรวจการศึกษาปริมาณกรดไขมันของสาหร่ายชนิดอื่นเทียบกับไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันมีผลทำให้องค์ประกอบกรดไขมันของไดอะตอมมีความแตกต่างกันด้วย (ตารางที่ 5.2) ซึ่งผลในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์ไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิคมีความแตกต่างจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคอย่างชัดเจน เนื่องจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคมีการผลิตไขมัน ร้อยละ 5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคที่มีการผลิตไขมัน ร้อยละ 4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่งผลให้ปริมาณกรดไขมันของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคจึงสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค สาเหตุเพราะไขมันอยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ซึ่งมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นหากมีการผลิตไขมันสูงก็จะมีการผลิตกรดไขมันในปริมาณสูงเช่นกัน ในสภาวะที่เซลล์มีสารอาหารและพลังงานเหลือพอ จะมีการสร้างกรดไขมันและเก็บสะสมในรูปของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งสารอาหารที่จำเป็นในการสร้างกรดไขมันคือ กลูโคส โดยกลูโคสจะถูกสลายในวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) กลายเป็นไพรูเวต จากนั้นไพรูเวตถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอด้วยเอนไซม์ อะซิติลโคเอก็จะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดไขมัน

ตารางที่ 5.2 การผลิตกรดไขมันของสาหร่ายที่เติบโตภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

ชนิดสาหร่าย	ปริมาณกรดไขมันภายในเซลล์ไดอะตอม (ร้อยละจากน้ำหนักเซลล์แห้ง)			เอกสารอ้างอิง
	สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค	สภาวะมิกโซโทรฟิค	สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค	
Nannochlorosis oculata	C14:0 3.2 C16:0 15.9 C18:0 1.4 C18:1 5.5 กรดไขมันอิ่มตัว 21.0 กรดไขมันไม่อิ่มตัว 39.5	-	-	Hodgson *et al.* (1991)
Crythecodinium cohnii	-	-	C14:0 14.4 C16:0 19.8 C18:0 9.2 C18:1 0.4 กรดไขมันอิ่มตัว 46.0	Jing and Chen (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5.2 (ต่อ)

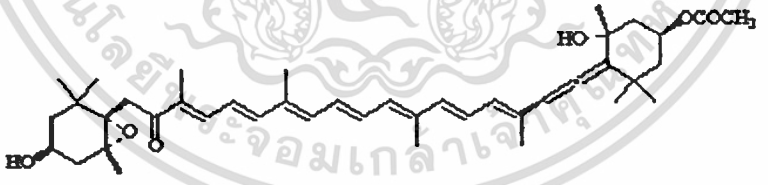
ชนิดสาหร่าย	ปริมาณกรดไขมันภายในเซลล์ไดอะตอม (ร้อยละจากน้ำหนักเซลล์แห้ง)			เอกสารอ้างอิง
	สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค	สภาวะมิกโซโทรฟิค	สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค	
Isochrysis sp.	-	C14:0 18.4 C16:0 15.5 C18:1 27.7 กรดไขมันไม่อิ่มตัว 33.6	-	Liu and Lin (2001)
Tetraselmis sp.	C14:0 0.9 C16:0 4.7 C18:0 0.7 C18:1 27.6 กรดไขมันอิ่มตัว 20.6	C14:0 0.7 C16:0 19.7 C18:0 0.4 C18:1 13.1 กรดไขมันไม่อิ่มตัว 49.9	C14:0 0.9 C16:0 79.3 C18:0 3.3 C18:1 2.5 กรดไขมันไม่อิ่มตัว 5.5	Fabregas *et al.* (2001); Day and Tsavalos (1991)
Isochrysis sp.	-	C14:0 18.4 C16:0 15.5 C18:1 27.7 กรดไขมันไม่อิ่มตัว 33.6	-	Liu and Lin (2001)
Amphora delicatissima AM9901	C16:0 8.0 C16:1 12.0 C18:0 1.0 C18:1 3.0 C18:2 1.5 C18:3 0.5 20:5 2.0	-	C16:0 37.0 C16:1 18.0 C18:0 2.0 C18:1 7.0 C18:2 3.0 C18:3 2.0 C20:5 5.0	ผลจากการศึกษาครั้งนี้

5.9.3 การผลิตสารรงควัตถุของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบรงควัตถุของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและสภาวะโฟโตออโตโทรฟิค แสดงให้เห็นว่าแม้จะทำการเลี้ยงไดอะตอมในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิคซึ่งไม่มีการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้น เซลล์ของไดอะตอมก็ยังคงมีรงควัตถุอยู่เช่นเดียวกับไดอะตอมที่มีการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยเมื่อพิจารณาองค์ประกอบหรือสัดส่วนของรงควัตถุชนิดต่างๆ จะพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิคมีการสะสมแคโรทีนอยด์ชนิดฟูโคแซนทิน (โครงสร้างของฟูโคแซนทินแสดงดังรูปที่ 5.2) สูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รงควัตถุชนิดอื่น สาเหตุอาจเนื่องมาจากรงควัตถุสร้างมาจากสารพื้นฐานที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ (คาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน) และธาตุบางชนิด เช่น คลอโรฟิลล์มีแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบ รงควัตถุจึงมีความจำเป็นต่อการเติบโตของไดอะตอม รวมทั้งรงควัตถุในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคมีการสามารถสร้างได้สูง เพราะมีสารอาหารต่างๆ ในอาหารเพาะเชื้อเพียงพอ ส่วนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคมีการสะสมคลอโรฟิลล์-เอในสัดส่วนที่สูงกว่ารงควัตถุชนิดอื่น ซึ่งก็อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเนื่องจากคลอโรฟิลล์นั้นเป็นรงควัตถุหลักที่เป็นองค์ประกอบของศูนย์ปฏิกริยา (reaction center) ของการสังเคราะห์ด้วยแสง การที่ไดอะตอมมีการสะสมรงควัตถุประเภทแคโรทีนอยด์สูงจึงมีผลให้เซลล์มีสีเหลืองแกมน้ำตาลตามลักษณะสีของแคโรทีนอยด์ (ลัดดา 2542) นอกจากนี้ยังพบรงควัตถุที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิค ซึ่งมีลักษณะสเปคตรัมคล้ายคลอโรฟิลล์เกิดขึ้น (Unidentified 1-4) เพราะมีค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร เหมือนคลอโรฟิลล์ ดังนั้นรงควัตถุดังกล่าวน่าจะเกิดจากการสลายตัวหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ (Degraded-Chlorophyll) จึงทำให้สัดส่วนของคลอโรฟิลล์ลดลง ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิค กลับมีปริมาณสารสีคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสง อย่างไรก็ตามจากการสืบค้นเอกสารยังไม่พบงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุในสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิค จึงยังไม่สามารถทำการอภิปรายผลโดยการเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ได้ในครั้งนี้ และน่าจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติมอีกในอนาคต



รูปที่ 5.2 โครงสร้างของฟูโคแซนทิน

ที่มา: Repeta and Mantoura (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

6.1.1 จากการคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค จากหาดหินบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี พบว่าคัดเลือกได้ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* สายพันธุ์ AM9901

6.1.2 ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 มีการเติบโตได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในขวดรูปชมพู่ ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เสริมด้วยสารอาหารอินทรีย์ไนโตรเจนในรูปของอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วย เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และเติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอนต่อลิตร (เรียกว่าอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C) ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของเปปโตน ยีสต์สกัดและเนื้อสกัดสูงกว่า 5 2 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีผลทำให้การเติบโตของไดอะตอมลดลง

6.1.3 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่มีการกวนและให้อากาศด้วยอัตราเร็ว 0.65 ลิตรต่อนาที ส่งผลให้เซลล์มีการเติบโตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบที่มีการกวนแต่ไม่ให้อากาศเพียงเล็กน้อย

6.1.4 การเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C และการเติมกลูโคสเพียงอย่างเดียวระหว่างการเพาะเลี้ยงที่มีผลทำให้ไดอะตอมมีการเติบโตเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

6.1.5 ความเข้มข้นของซิลิกาที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 คือ 2.4 มิลลิโมลาร์ และเรียกอาหารสูตรที่พัฒนาได้ว่า อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ส่วนความเข้มข้นของซิลิกาที่เหมาะสมต่อการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิคของไดอะตอมคือ 1.2 มิลลิโมลาร์ และเรียกสูตรอาหารนี้ว่า อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si

6.1.6 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 320×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะ 0.91 ต่อวัน ซึ่งให้ความหนาแน่นเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ถึง 4 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.1.7 การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 แบบต่อเนื่องภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+Si 2.4 mM พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์ลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้น ในขณะที่การเพิ่มอัตราการเจือจางมีผลทำให้ผลผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอมเพิ่มขึ้น

6.1.8 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตที่มีอยู่ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si เพียงพอต่อการเติบโตของไดอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง จึงไม่จำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารดังกล่าวเพิ่มในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม

6.1.9 ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si มีการผลิตไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si

6.1.10 ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si มีการผลิตกรดไขมันปาล์มิติค (C16:0), ปาล์มิโตเลอิค (C16:1), สเตียริค (C18:0), โอเลอิค (C18:1), ลิโนเลอิค (C18:2), ลิโนเลนิค (C18:3) และอีพีเอ (C20:5) สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si

6.1.11 รงควัตถุของไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิคมีสัดส่วนของรงควัตถุแตกต่างกัน โดยมีรงควัตถุที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ คลอโรฟิลล์-เอ คลอโรฟิลล์-ซี ฟูโคแซนทิน ไดอะไดโนแซนทินและไดอะโตแซนทิน

6.2 ข้อเสนอแนะ

ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค มีการเติมสารอาหารอินทรีย์ ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด เนื้อสกัดและกลูโคส ซึ่งถือว่าเป็นสารอาหารอินทรีย์ที่มีราคาแพง เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนของอาหารเพาะเชื้อ พบว่าอาหารเพาะเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิคมีต้นทุนสูงกว่าอาหารเพาะเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโตโทรฟิค ดังนั้นควรมีการพัฒนาและดัดแปลงสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค โดยหาสารอาหารอินทรีย์ชนิดอื่นที่มีราคาถูกทดแทนการใช้เปปโตน ยีสต์สกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อสกัดและกลูโคส เพื่อลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำลง รวมทั้งควรมีการศึกษาการเติมออกซิเจนในระหว่างการเพาะเลี้ยงไดอะตอม ซึ่งการเติมออกซิเจนอาจจะช่วยเพิ่มการเติบโตของไดอะตอมได้อีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กำเนิด สุภัณวงษ์. 2534. **จุลชีวอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ชมพูนุท ชัยรัตนะ. 2543. "การเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของไดอะตอม *Amphora delicatissima* ที่เลี้ยงโดยใช้คาร์บอนอินทรีย์" **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต** สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชมพูนุท ชัยรัตนะ สรวิศ เผ่าทองศุข และ สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล. 2546. "การเติบโตของไดอะตอม *Amphora delicatissima* ในที่มืดภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค." **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** 25(2) 205-212.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2540. **จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2541. **คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2542. **แพลงก์ตอนพืช.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และ ประวิทย์ วงศ์คงคา. 2538. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล วรสิทธิ์ โทจำปา และ ประวิทย์ วงศ์คงคา. 2544. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ สิริภัค. 2537. **เทคโนโลยีการหมัก.** กรุงเทพฯ: สหมิตร.

Apt, K. E. and Behrens, P. W. 1999. "Commercial Development in Microalgal Biotechnology." **Journal of Phycology.** 35: 215-226.

Bailey, J. E. and Oillis, D. F., 1986. **Biochemical Engineering Fundamental.** 2^{cd}. Singapore. McGraw-Hill. 965 p.

Barclay, W. R., Meager, K. M. and Abril, J. R 1994. "Heterotrophic Production of Long Chain Omega–3 Fatty Acids Utilizing Algae and Algae like Microorganisms." **Journal of Applied Phycology.** 6: 123-129.

Becker, E. W. 1994. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology.** New York: Cambridge University. 293 p.

Bligh, E. G. And Dryer, W. T. 1959. "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification" **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology.** 38(8): 911-917.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Borowitzka, M. A. 1999. "Commercial Production of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes and Fomenters." **Journal of Biotechnology.** 70: 313-321.

Brett, M. T. and Muller-Navarra, D. C. 1997. "The Role of Highly Unsaturated Fatty Acids in Aquatic Foodweb Processes." **Freshwater Biology.** 38: 483-499.

Bridson, E. Y. 1995. **The Oxoid Manual.** 7^{cd}. London: Unipath Limited.

Chau, Y. K., Chuecas, L. and Riley, J. P. 1967. "The Component Combined Amino Acids of some Marine Phytoplankton Species." **Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom.** 47: 543-554.

Chen, F. and Johns, M. R. 1994. "Substrate Inhibition of *Clamydomonas reinhardtii* by Acetate in Heterotrophic Culture." **Process Biochemistry.** 29: 245-252.

_____. 1995. "A Strategy for High Cell Density Culture of Heterotrophic Microalgae with Inhibitory Substrate." **Journal of Applied Phycology.** 7: 43-46.

Chen, F. 1996. "High Cells Density Culture of Microalgae in Heterotroophic Growth." **Trends in Biotechnology.** 14: 421-426.

Chen, F., Zhang, Y. and Guo, S. 1996. "Growth and Phycocyanin Formation of *Spirulina platensis* in Photobioreactor Culture." **Biotechnology Letters.** 18(5): 603-608.

Chu, W. L., Phang, S. M. and Goh, S. H. 1996. "Environmental Effects on Growth and Biochemical Composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow." **Journal of Applied Phycology.** 8: 389-396.

Chuecas, L. and Riley, J. P. 1969. "Component Fatty Acids of the Total Lipids of some Marine Phytoplankton." **Journal of Marine Biology Association of the United Kingdom** 49: 97-116.

Cid, A., Abalde, J. and Herrero, C. 1992. "High Yeild Mixotroph Culture of the Marine Microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Prasinophyceae)." **Journal of Applied Phycology.** 4: 31-37.

Coello Oviedo, M. D., Sales Marquez, D. and Quiroga Alonso, J. M. 2002. "Toxic Effects of Metals on Microbial in the Activated Sluds Process." **Chemistry and Biochemistry Engineering.** 16(3): 139-144.

Cooksey, K. E. 1972. "Metabolism of Organic Acids by A Pennate Diatom." **Plant Physiology.** 50: 1-6.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cooksey, K. E. and Chansang, H. 1976. "Isolation and Physiological Studies on Three Isolates of *Amphora* (Bacillariophyceae)." **Journal of Applied Phycology**. 12: 455-460.

de Mort, C. T., Lowry, R., Tinsley, I. and Phinney, H. K. 1972. "The Biochemical Analysis of Estuarine Phytoplankton Species. I. Fatty Acid Composition." **Journal of Phycology.** 8: 211-216.

de Swaaf, M. E., de Rijk, T. O., Eggink, G. and Sijtsma, L. 1999. " Optimization of Docosahexaenoic Acid Production in Batch Cultivations by *Crythecodinium cohnii*." **Journal of Biotechnology**. 70: 185-192.

Day, J. G. and Tsavalos, A. J. 1991. "An Investigation of the Heterotrophic Culture of the Green Alga *Tetraselmis*." **Journal of Applied Phycology**. 8: 73-77.

Dobois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. "Calorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances." **Analysis Chemistry.** 28(3): 350-356.

Endo, H., Hosoya, H. and Koibuchi, T. 1977. "Growth Yields of *Chlorella regularis* in Dark-Heterotrophic Continuouss Culture Using Acetate. **Journal of Fermentation Technology**. 55: 369-379.

Fabregas, J., Dominguez, A., Regueiro, M., Maseda, A. and Otero, A. 2000. "Optimization of Culture Medium for the Continuous Cultivation of the Microalgae *Haematococcus pluvialis*." **Applied Microbiology Biotechnology**. 55: 530-535.

Fabregas, J., Otero, A., Dominguez, A. and Patinot, M. 2001. "Growth Rate of the Microalgae *Tetraselmis suecica* Changes the Biochemical Composition of *Artemia* Species." **Marine Biotechnology**. 3: 256-263.

Fernandez Sevilla, J. M., Molina Grima, E., Garcia Camacho, F., Acien Fernandez, F. G. And Sanchez Perez, J. A. 1998. "Photolimitation and Photoinhibition as Factors Determining Optimal Dilution Rate to Production Eicosapentaenoic Acid from Cultures of the Microalga *Isochrysis albana*." **Applied Microbiology Biotechnology.** 50: 199-205.

Gladue, R. M. and Maxey, J. E. 1994. "Microalgae Feeds for Aquaculture." **Journal of Applied Phycology.** 6: 131-142.

Grasshoff, K., Kremling, K. and Ehrhardt, M. 1999. **Method of Seawater Analysis.** 3rd. New York. Wiley-VCN.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Greenberg, A. E., Clesceri, L. S. and Eaton, A. D. 1992. **Standard Method for the Examination of Water and Wastewater.** Maryland: Victor Graphic. p 4-87.

Guillard, R. R. L. 1973. "Method for Microflagellates and Nanoplankton." In Stein, J. R. (ed). **Handbook of Phycological Methods**: Culture Methods and Growth Measurements. New York: Cambridge University. pp. 69-89.

_____. 1975. "Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates." In Smith, W. L. and Chanley, M. H. (eds). **Primary Productivity in the Sea.** New York: Plenum Press. pp. 26-60.

Hodgson, P. A., Henderson, R. J., Sargent, J. R. And Leftly, J. W. 1991. "Patterns of Variation in the Lipid Class and Fatty Acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) During Batch Culture." **Journal of Applied Phycology.** 3: 169-181.

Hoshaw, R. W. and Rosowski, J. R. 1975. "Method for Microscopic Algae." In Stein, J. R. (ed). **Handbook of Phycological Methods**: Culture Methods and Growth Measurements. New York: Cambridge University. pp. 53-68.

Jeffery, S. W. 1972. "Preparation and some Properties of Crystalline Chlorophyll c_1 and c_2 from Marine Algae." **Biochimica Biophysica Acta.** 279: 15-33.

Jing, Y. and Chen, F. 1999. "Effects of Salinity on Cell Growth and Docosahexenoic Acid Content of the Heterotrophic Marine Microalga *Crythecodinium cohnii*." **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.** 23: 508-513.

Jing, Y., Chen, F. and Liang, S. Z. 1999. "Production Potential of Docosahexaenoic Acid by the Heterotrophic Marine Dinoflagellate *Crythecodinium cohnii*." **Process Biochemistry.** 34: 633-637.

Kates, M. and Volcani, B. E. 1966. "Lipid Component of Diatom." **Biochemica and Biophysica Acta** 166: 264-278.

Kobayashi, M., Kurimura, Y. and Tsuji, Y. 1997. Light-Independent Astaxanthin Production by the Green Microalgae *Haematococcus pluvialis* Under Salt Stress. **Biotechnology Letters.** 19(6): 507-509.

Kusmic, C., Barsacchi, R., Barsanti, L., Gualtieri, A. and Passarelli, V. 1999. "*Euglena gracilis* as Source of the Antioxidant Vitamin E: Effect of Culture Conditions in the Wild Strain and in the Nature Mutant WZSL." **Journal of Applied Phycology.** 10: 555-559.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kochert, A. G. 1978. "Carbohydrate Determination by the Phenol-Sulphuric Acid Method." In Hellebust, J. A. and Cragie, J. S. (eds). **Handbook of Phycological Method:** Physiological and Biochemistry Method. New York: Cambridge University. pp. 95-97.

Kyle, D. J. 1996. "Production and Use of Single Cell Oil Which is Highly Enriched in Docosahexaenoic Acid." **Lipid Technology**. 2: 106-112.

Laliberte, G. and de la Noue, J. 1993. "Auti-, Hetero and Mixotrophic Growth of *Chlamydomonas humicola* (Chlorophyceae) on Acetate. **Journal of Phycology**. 29: 612-620.

Lapage, G. and Roy, C. C. 1984. "Improved Recovery of Fatty Acid through Direct Transesterification without Prior Extraction of Purification." **Journal of Lipid Research.** 25: 1391-1396.

Lee, R. E. 1989. **Phycology**. 2nd ed. New York: Cambridge University. 645 p.

Lee, J. J., McEnery, M. E., Kennedy, E. M. and Rubon, H. 1975. "A Nutritional Analysis of A Sublittoral Diatom Assemblage Epiphytic on *Enteromorpha* From A Long Island Salt Marsh." **Journal of Phycology. 11**:14-49.

Lee, Y. K. and Ding, S. K. 1995. "Effect of Dissolved Oxygen Partial Pressure on the Accumulation of Astaxathin in Chemostat Cultures of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)." **Journal of Phycology**. 31: 922-924.

Lee, Y. K., Dimg, S. Y., Hoe, C. H. and Low, C. S. 1996. "Mixotrophic Growth of *Chlorella sorokiniana in* Outdoor Enclose Photobioreactor." **Journal of Applied Phycology**. 8: 163-169.

Lewin, J. C. 1955a. "The Capsule of the Diatom *Navicula pelliculosa*." **Journal of General Microbiology**. 13: 162-169.

_____ 1955b. "Silicon Metabolism in Diatom." **Journal of General Physiology**. 39: 1-10.

Li, D. M. and Qi, Y. Z. 1997. "*Spirulina* Industry in China: Present Status and Future Prospects." **Journal of Applied Phycology.** 9: 25-28.

Liu, C. P. and Lin, L. P. 2001. "Ultrastructural Study and Lipid Formation of *Isohrysis* sp. CCMP1324." **Botanic Bulletin Acad Sin.** 42: 207-214.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L and Randall, R. J. 1951. " Protein Measurement with Folin Phenol Reagent." **Journal of Biology Chemistry**. 193: 265-275.

Ma, R. Y. N. and Chen, F. 2001. "Induction of Astaxathin Formation by Reactive Oxygen Species in Mixotrophic Culture of *Chlorococcum* sp." **Biotechnology Letters**. 23: 519-523.

Metting, F. B. 1996. "Biodiversity and Application of Microalgae." **Journal of Industrial Microbiology**. 17: 477-489.

Ogbonna, J. C., Tomiyama, S. and Tanake, H. 1998. "Heterotrophic Cultivation of *Euglena gracilis* Z for Efficient Production of α-Tocopherol." **Journal of Applied Phycology**. 10: 67-74.

Opute, F. I. 1974. "Lipid and Fatty-Acid Composition of Diatom." **Journal of Experimental Botany** 25: 823-835.

Peterson, J. J. and Curiel, J. L. 2002. "Improved Shrimp Larviculture Using Diatom." **The Advocate**. 7(2): 72-73.

Rebolloso Fuentes, M.M., Acien Fernandez, G.G, Sanchez Perez, J. A. and Guil Guerrero, J. L. 2000. "Biomass Nutrient Profiles of the Microalgae *Porphyridium cruentum*." **Food Chemistry**. 70: 345-353.

Renaud, S. M., Parry, D. L. and Thinh, L. V. 1994. "Microalgae for Use in Tropical Aquaculture I: Gross Chemical and Fatty Acid Composition of Twelve Species of Microalgae from the Northern Territory, Australia." **Journal of Applied Phycology**. 6: 337-345.

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

Running, J. A., Huss, R. J. and Olson, P. T. 1994. "Heterotrophic Production of Ascorbic Acid by Microalgae." **Journal of Applied Phycology**. 6: 99-104.

Sanchez, S., Martine, M. E., Espejo, M. T., Pacheco, R. and Hodaifa, G. 2001. "Mixotrophic Culture of *Chlorella pyrenoidosa* with Olive-Mill Wastewater as the Nutrient Medium." **Journal of Applied Phycology**. 13: 443-449.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shi, X. M., Lin, H. J., Zhang, X. W. and Chen, F. 1999. "Production of Biomass and Lutein by *Chlorella protothecoides* at Various Glucose Concentrations in Heterotrophic Cultures." **Process Biochemistry**. 34:341:347.

Smith, W. L. and Chanley, M. H. 1975. **Primary Productivity in the Sea**. New York: Plenum Press. 650 p.

Stein, J. R. 1975. **Handbook of Phycological Methods**: Culture Methods and Growth Measurements. New York: Cambridge University. 448 p.

Strickland, J. D. and Parson, T. R. 1972. **A Partical Handbook of Water Analysis**. 2nd Otawa: Fishery Research Board of Canada. 310 p.

Takeyama, H., Kanamaru, A., Yoshino, Y., Kakuta, H., Kawamura, Y. and Matsunaga, T. 1997. "Production of Antioxidant Vitamins, β-Carotene, Vitamin C, Vitamin E, by Two-Step Culture of *Euglena gracilis* Z." **Biotechnology and Bioengineering**. 53: 185-190.

Tan, C. K. and Johns, M. J. 1991. "Fatty Acid Production by Heterotrophic *Chlorella saccharophila*." **Hydrobiologia**. 215: 13-19.

Tornabene, T. G., Kates, M. and Volcani, B. E. 1974. "Sterol, Aliphatic Hydrocarbons and Fatty Acids of A Nonphotosynthetic Diatom *Nitzchia alba*." **Lipids**. 9: 279-284.

Torzillo, G., Pushparaj, B., Bocci, F., Balloni, W. Materassi, R and Florenzano. 1986. "Production of *Spirulina* Biomass in Closed Photobioreactors." **Biomass**. 11: 61-74.

van den Hock, C., Mann, D. G. and Johns, H. M. 1995. **Algae**: Introduction to Phycology. New York: Cambridge University. 627 p.

Vonshak, A., Cheung, S. M. and Chen, F. 2000. "Mixotrophic Growth Modifies the Response of *Spirulina* (Arthrospira) *platensis* (Cyanobacteria) Cell to Light." **Journal of Applied Phycology**. 36: 675-679

Wen, Z. Y. and Chen, F. 2001. "A Perfusion-Cell Bleeding Culture Strategy for Enhancing the Productivity of Eicosapentaenoic acid by *Nitzschia laevis*." **Applied Microbiology Biotechnology**. 57: 316-322.

Werner, D. 1977. **The Biology of Diatom**. Los Angeles:Blackwell Scientific. 498 p.

Wikfors, G. H. and Ohno, M. 2001. "Impact of Algae Research in Aquaculture." **Journal of Phycology**. 37: 968-974.

White, A. W. 1974. "Uptake of Organic Compounds by Two Facultatively Heterotrophic Marine Centric Diatoms." **Journal of Phycology**. 10: 433-438.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Whiteaker, A. 1980. "Fed-batch Culture." **Process Biochemistry.** 15(4): 10-15.

Zhang, X. W., Chen, F. and Johns, M. R. 1999. "Kinetic Models for Heterotrophic Growth of *Clamydomonas reinhardtii* in Batch and Fed-Batch Cultures." **Process Biochemistry.** 35: 385-389.

Zhang, D. H. and Lee, Y. K. 2001. "Two-Step Process for Ketocarotenoid Production by a Green Alga, *Chlorococcum* sp. Strain MA-1." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 55: 537-540.

Zhu, C. J., Lee, Y. K., Chao, T. M. and Lim, S. H. 1997. "Diurnal Changes in Gross Chemical Composition and Fatty Acid Profiles of *Isochrysis galbana* TK1 in Outdoor Closed Tubular Photobioreactors." **Journal of Marine Biotechnology.** 5: 153-157.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตรของกิลลาร์ดหรืออาหารสูตร F/2 (Guillard medium) (Guillard, 1975 อ้างโดย Smith, 1975)

สารละลายส่วนที่ 1 (ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร)

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	42.074	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 . H_2O$)	3.0	กรัม
เฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3$)	1.45	กรัม
โซเดียมเอทิลีน ไดอะมีน เตตระอะซิติก (Na_2EDTA)	5.0	กรัม

สารละลายส่วนที่ 2 (ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร)

คอปเปอร์ซัลเฟต-5-ไฮเดรต ($CuSO_4 . 5H_2O$)	1.96	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$)	4.40	กรัม
โซเดียมโมลิบเดท-4-ไฮเดรต ($Na_2MoO_4 . 2H_2O$)	1.26	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์-4-ไฮเดรต ($MnCl_2 . 4H_2O$)	3.60	กรัม
โคบอลท์คลอไรด์-6-ไฮเดรต ($CoCl_2 . 6H_2O$)	2.0	กรัม

สารละลายส่วนที่ 3 (ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร)

โซเดียมเมตาซิลิเกต-9-ไฮเดรต ($Na_2SiO_3 . 9H_2O$)	16.50	กรัม

เตรียมอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม โดยปิเปตสารละลายส่วนที่ 1 และ 3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายส่วนที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 พีเอสยู ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะ

สารละลายยาปฏิชีวนะ (antibiotic solution) ที่ดัดแปลงจากวิธีของกิลลาร์ด (Guillard, 1975 อ้างโดย Stein, 1975)

ละลายยาปฏิชีวนะสองชนิดคือ เพนนิซิลิน จี 100 มิลลิกรัม และสเตรปโตไมซิน 50 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผสมกับสารละลายยาคลอเรมเฟอนิคอล 10 มิลลิกรัม ที่ละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายยาปฏิชีวนะด้วยกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอม

การเตรียมรีเอเจนต์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมตามวิธีของ Strickland and Parson (1972)

สารละลายส่วนที่ 1 สารละลายแอมโมเนียมพาราโมลิบเดต/7-ไฮเดรต

ชั่งแอมโมเนียมพาราโมลิบเดต/7-ไฮเดรต $(NH_4)_2 Mo_7O_{24}.7H_2O$ 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดพลาสติกและห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสง จากนั้นเก็บในตู้เย็น

สารละลายส่วนที่ 2 สารละลายกรดซัลฟูริค

นำกรดซัลฟูริคเข้มข้น ปริมาตร 140 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้วและแช่ตู้เย็น

สารละลายส่วนที่ 3 สารละลายกรดแอสคอร์บิค

ชั่งกรดแอสคอร์บิค 27 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดพลาสติกและแช่ตู้เย็น

สารละลายส่วนที่ 4 สารละลายโปแตสเซียม แอนตีโมนิลทาเทรต

ชั่งโปแตสเซียม แอนตีโมนิลทาเทรต $(C_4H_4KO_7Sb)$ 0.34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดพลาสติกและแช่ตู้เย็น

เตรียมรีเอเจนต์เมื่อทำการวิเคราะห์ฟอสเฟต โดยปิเปตสารละลายส่วนที่ 1 2 3 และ 4 ในอัตราส่วน 2 ต่อ 5 ต่อ 2 ต่อ 1 ตามลำดับ

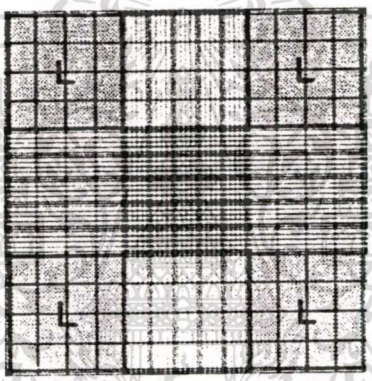
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การคำนวณความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเติบโตจำเพาะของไดอะตอม และความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

1. การคำนวณหาความหนาแน่นของไดอะตอมจากวิธีการนับเซลล์

เมื่อทราบจำนวนเซลล์ไดอะตอมจากการนับบนสไลด์นับเม็ดเลือดแล้ว สามารถคำนวณหาความหนาแน่นเซลล์ของไดอะตอม (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เนื่องจากช่องที่ใช้ในการนับเซลล์บนสไลด์นับเม็ดเลือดมีความกว้าง 1 มิลลิเมตร ยาว 1 มิลลิเมตร สูง 0.1 มิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรของช่องสไลด์ที่ใช้นับเซลล์ 1 ช่อง เท่ากับ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ลักษณะของช่องในสไลด์นับเม็ดเลือดที่ใช้ในการนับเซลล์ไดอะตอมแสดงดังรูปที่ ง.1



รูปที่ ง.1 ลักษณะของช่องบนสไลด์นับเม็ดเลือดที่ใช้ในการนับเซลล์ไดอะตอม
ที่มา: Becker (1994)

ตัวอย่างการคำนวณ นับเซลล์ไดอะตอมในช่องนับเซลล์บนสไลด์นับเม็ดเลือดจำนวน 4 ช่อง ได้จำนวนเซลล์ 45 เซลล์ ความหนาแน่นเซลล์สามารถคำนวณได้ดังนี้

ปริมาตร 4 ช่องบนสไลด์นับเม็ดเลือดเท่ากับ 0.4 ลูกบาศก์เซนติเมตร นับไดอะตอมได้ 45 เซลล์

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร) มีเซลล์ $= \dfrac{45 \text{ เซลล์} \times 1000 \text{ ลูกบาศก์เซนติเมตร}}{0.4 \text{ ลูกบาศก์เซนติเมตร}}$

ความหนาแน่นเซลล์ไดอะตอม $= 11.25 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การคำนวณหาอัตราการเติบโตเพาะของไดอะตอม

เมื่อทราบความหนาแน่นเซลล์ของไดอะตอมจากวิธีการนับเซลล์ สามารถคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะของไดอะตอมได้จากสมการ

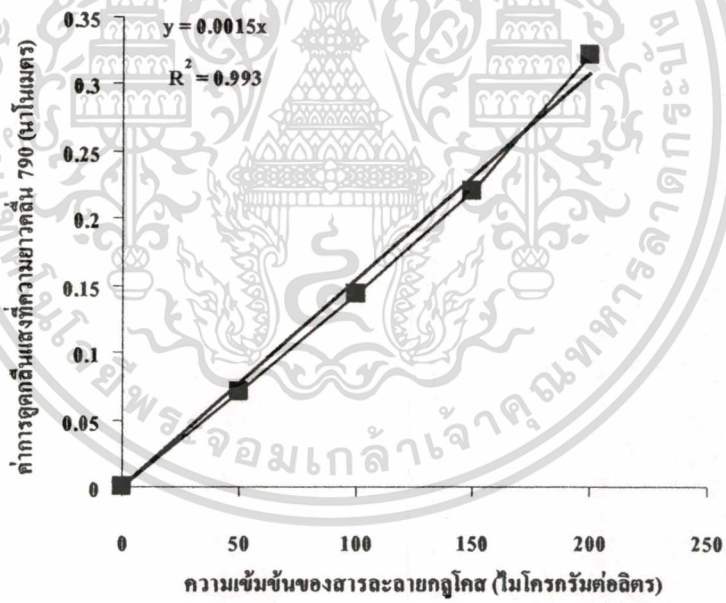
$$\mu = \frac{(\ln X_2 - \ln X_1)}{t_2 - t_1}$$

เมื่อ μ คือ อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)

X_1 คือ ความหนาแน่นของเซลล์ไดอะตอม ณ เวลา t_1 (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

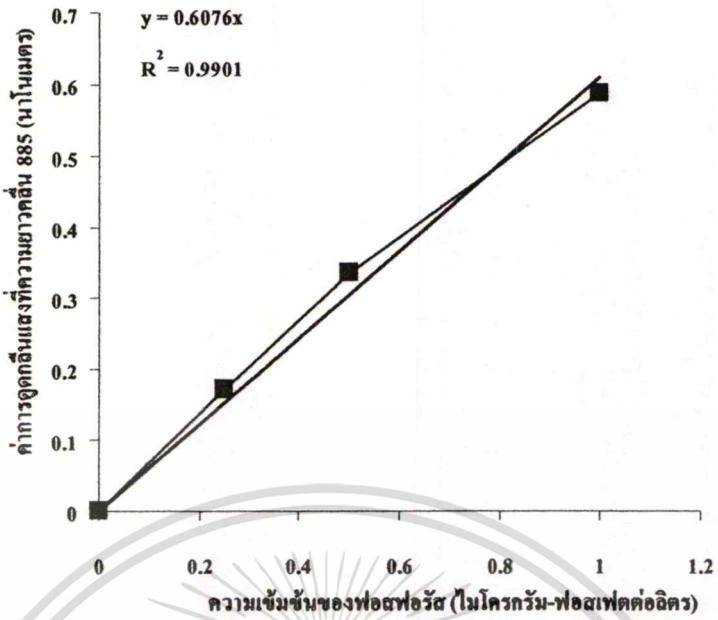
X_2 คือ ความหนาแน่นของเซลล์ไดอะตอม ณ เวลา t_2 (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

3. ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

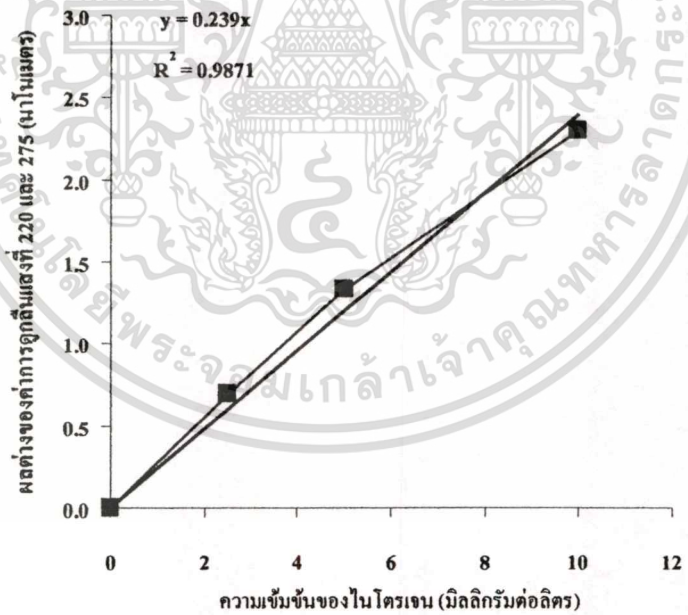


รูปที่ ง.2 กราฟมาตรฐานกลูโคส ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

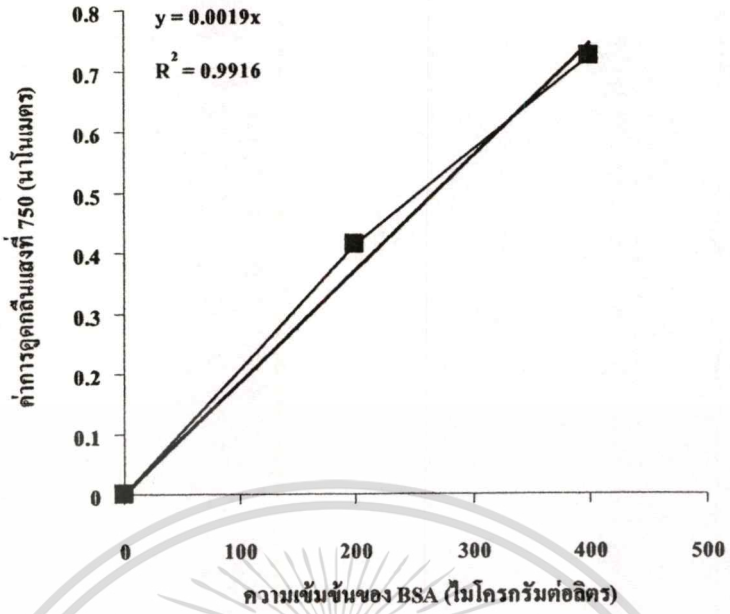


รูปที่ ง.3 กราฟมาตรฐานฟอสเฟต ที่เตรียมจากสารละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่มีความเข้มข้น 0 0.25 0.5 และ 1 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร



รูปที่ ง.4 กราฟมาตรฐานไนเตรต ที่เตรียมจากสารละลายโปแตสเซียมไนเตรตที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 2.5 5 และ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง.5 กราฟมาตรฐานโปรตีน ที่เตรียมจากสารละลายโปรตีนไข่ขาว (bovin serum albumin, BSA) เข้มข้น 0 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ จ.1 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารเพาะเชื้อสูตร NB มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของเปปโตน 0 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	ไม่เติมเปปโตน	5 กรัมต่อลิตร	10 กรัมต่อลิตร	20 กรัมต่อลิตร
0	0.99±0.06	0.98±0.04	0.79±0.12	0.91±0.19
1	1.20±0.18	1.25±0.21	1.01±0.09	0.92±0.19
2	1.32±0.56	1.53±0.33	1.41±0.06	1.27±0.14
3	1.95±0.22	1.77±0.16	1.56±0.10	1.43±0.13
4	2.42±0.25	2.11±0.47	1.97±0.19	1.65±0.22
5	5.98±0.73	4.44±0.30	2.09±0.20	1.86±0.31
6	11.88±1.51	8.37±0.92	2.66±0.25	2.43±0.29
7	33.00±2.78	25.33±4.31	3.72±0.97	2.84±0.44
8	43.17±3.25	35.61±3.41	5.07±0.37	3.45±0.27
9	56.95±4.84	48.50±4.84	6.14±0.65	3.97±0.51
10	58.42±1.66	64.92±9.83	5.94±0.38	4.07±0.53
12	55.83±4.72	74.42±12.22	4.99±0.27	3.44±0.52
13	51.92±2.67	75.40±2.60	4.71±0.63	3.00±0.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.2 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารสูตร NB มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 2 4 และ 8 กรัมต่อลิตร

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	ไม่เติมเนื้อสกัด	2 กรัมต่อลิตร	4 กรัมต่อลิตร	8 กรัมต่อลิตร
0	1.56±0.35	0.10±0.12	0.92±0.10	1.07±0.15
1	1.74±0.46	1.14±0.57	0.90±0.18	0.86±0.13
2	1.87±0.19	1.14±0.52	1.13±0.24	1.80±0.48
3	2.04±0.22	1.80±0.79	1.80±0.36	1.90±0.41
4	2.93±0.51	1.72±0.64	1.38±0.27	1.80±0.54
5	3.20±0.76	2.57±1.03	2.34±0.56	1.84±0.79
6	5.80±0.92	3.00±1.28	4.25±0.86	1.95±1.04
7	11.23±0.45	5.07±0.46	5.30±2.30	2.22±0.16
8	17.50±4.62	6.60±0.56	7.00±1.87	2.11±0.47
9	37.50±3.18	3.63±0.38	3.20±0.18	1.92±0.02
10	51.25±11.05	2.87±0.31	1.56±0.63	1.06±0.09
11	46.00±7.42	3.82±0.57	1.17±0.08	0.69±0.12
12	45.25±3.09	4.35±0.89	1.67±0.21	1.06±0.11
13	46.00±0.71	4.81±0.90	1.35±0.41	1.28±0.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.3 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารเพาะเชื้อสูตร NB มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของเนื้อสกัด 0 1 2 และ 4 กรัมต่อลิตร

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ (10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	ไม่เติมเนื้อสกัด	1 กรัมต่อลิตร	2 กรัมต่อลิตร	4 กรัมต่อลิตร
0	0.88±0.21	0.78±0.12	0.75±0.14	0.86±0.06
1	1.02±0.10	1.02±0.12	1.16±0.15	1.26±0.14
2	2.17±0.47	1.57±0.11	1.56±0.23	1.45±0.02
4	10.18±3.23	5.77±0.72	2.89±0.28	2.36±0.39
5	23.54±3.03	16.52±1.81	4.21±0.61	3.60±0.81
6	58.00±3.97	51.08±12.63	6.42±1.79	4.60±1.10
7	63.50±2.29	58.56±10.54	12.02±6.74	5.34±1.29
8	72.25±5.34	74.50±4.88	14.02±5.24	8.23±0.79
9	77.75±8.77	88.58±6.76	18.55±5.30	11.75±1.58
10	67.33±9.87	82.50±0.00	30.50±1.36	11.85±2.66
12	68.25±3.18	78.25±0.00	51.34±3.06	10.91±3.16
13	59.42±0.23	62.75±0.00	49.17±0.47	10.52±0.98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.4 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C โดยอาหารเพาะเชื้อสูตร NB มีความเข้มข้นของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 1 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ (10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
0	0.84±0.02
1	1.25±0.56
3	4.78±0.79
5	8.96±2.36
8	10.47±2.59
11	12.36±4.26
13	17.95±5.89
15	19.50±8.3
17	38.79±6.32
19	49.75±12.58
21*	52.96±23.58
24	48.58±9.65
26	58.63±8.25
28	62.50±5.46
30	72.98±10.58
32	60.12±7.69
34	59.89±19.56

หมายเหตุ * คือ การเติมสารละลายกลูโคสเพื่อให้ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อสูงขึ้น 10 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.5 การเติบโตของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ไม่ให้อากาศแต่กวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	3.96±0.62	9.01±0.03
2	5.71±0.45	8.12±0.25
4	8.96±1.14	2.83±0.16
5	41.00±13.59	2.14±0.89
7	54.50±8.61	1.92±0.30
8	31.33±5.20	0.33±0.04
9	33.00±1.73	0.16±0.01
11	11.55±4.80	0.00±0.00

ตารางที่ จ.6 การเติบโตของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ให้อากาศ 0.65 ลิตรต่อนาที และกวนด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	0.56±0.06	8.73±0.77
1	0.96±0.31	7.10±0.93
3	1.50±0.10	7.65±0.99
5	2.09±0.14	3.39±0.65
7	1.92±0.37	2.50±0.56
8	2.98±0.51	2.13±0.37
10	5.91±1.54	1.01±0.19
12	14.00±3.65	0.00±0.00
14	75.50±13.14	0.00±0.00
16	74.00±4.50	0.00±0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.7 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C จากนั้นได้มีการเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เพิ่มลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
0	1.22±0.51
1	1.37±0.17
2	3.02±2.68
5	21.91±2.33
7	50.83±3.01
9	75.55±23.00
12	27.85±2.44
13	16.09±0.23
13*	7.69±2.85
14	9.93±1.36
15	34.55±3.48
18	95.49±7.03
19	73.33±9.29

หมายเหตุ * คือ มีการเติมอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งก่อนเติมมีอาหารเพาะเชื้อเหลือประมาณ 400 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.8 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟีคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	0.93±0.23	-	-
1	1.24±0.08	0.02	4.63±2.46
3	3.56±0.45	0.03	2.61±0.16
5	8.43±1.92	0.09	2.33±0.61
7	38.33±5.11	0.11	1.89±0.86
9	59.33±11.86	0.13	1.56±0.71
10	49.83±6.33	0.15	1.22±0.52
11	61.83±11.60	0.16	0.90±0.48
14	33.67±7.04	0.10	0.21±0.06
16	30.67±3.82	0.18	0.00±0.00
18	42.00±3.77	0.13	0.00±0.00

หมายเหตุ – คือ ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.9 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C และมีการเติมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 และ 25 ของการเพาะเลี้ยง

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	0.67±0.06	0.00	9.17±0.31
3	2.00±0.42	0.05	7.74±0.26
5	4.63±0.49	0.06	6.16±0.26
7	20.00±1.80	0.08	4.08±0.18
9	35.50±1.32	0.11	3.03±0.13
11	46.00±3.50	0.13	1.13±0.19
13	56.92±3.09	0.15	0.59±0.15
15	58.17±1.76	0.15	0.39±0.11
15*	58.17±1.76	0.15	8.62±0.16
17	68.00±2.50	0.15	6.93±0.23
19	78.33±3.88	0.17	4.58±0.27
21	108.00±7.70	0.35	3.45±0.42
23	79.00±6.26	0.23	2.78±0.20
25	83.67±10.32	0.28	1.54±0.18
25*	83.67±10.32	0.28	9.14±0.68
27	74.67±9.00	0.33	6.93±0.12
30	85.33±7.57	0.32	5.48±0.12
32	83.17±4.73	0.18	3.29±0.13
34	78.33±5.97	0.16	2.91±0.07

หมายเหตุ * คือ การเติมสารละลายกลูโคสเพื่อให้ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อสูงขึ้น 10 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.10 การเติบโตของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ภายหลังการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อจาก 0.12 เป็น 1.2 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง

วันที่ในการ เพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
0	0.94±0.02
2	1.69±0.78
4	5.48±1.56
7	8.56±2.89
8	13.98±5.75
10	21.89±5.69
12	26.79±8.91
14	29.88±4.65
16	32.56±9.12
18	35.69±11.00
20*	37.23±5.59
23	79.58±19.23
25	97.89±25.10
27	125.95±20.14
29	472.14±30.56
31	482.69±90.15
33	439.48±45.26
35	445.56±23.89
37	458.78±19.87

หมายเหตุ * คือ มีการเติมของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อจาก 0.12 เป็น 1.2 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวมะลิวัลย์ คุตะโค เกิดเมื่อวันที่ 14 พฤศจิกายน พ.ศ. ในปี พ.ศ. 2543 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2546

ในปี พ.ศ. 2543 ได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาจากโครงการบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

การนำเสนอผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์

มะลิวัลย์ คุตะโค สรวิศ เผ่าทองศุข และสรัญญา พันธุ์พฤกษ์. 2545. "ผลของการเติมสารอาหารอินทรีย์ กลูโคสและการให้อากาศต่อการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *Amphora delicatissima* AM9901 ในสภาวะการเลี้ยงแบบไร้แสง." **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28.** กรุงเทพฯ. (นำเสนอแบบบรรยาย)

Kutako, M., Powtongsook, S., Phunpruch, S. and Tantiwaranurak, C. 2002. "Heterotrophic Growth of a Marine Diatom *Amphora delicatissima* AM9901 in Batch Cultivations." In **The 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology: Biotechnology for Better Living in the New Economy.** Khon Kaen: Khon Kaen University. (นำเสนอแบบบรรยาย)

มะลิวัลย์ คุตะโค สรวิศ เผ่าทองศุข และสรัญญา พันธุ์พฤกษ์. 2546. "การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *Amphora delicatissima* AM9901 แบบกะและแบบต่อเนื่องในสภาวะเฮเทอโรโทร-ฟิค." การประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)

มะลิวัลย์ คุตะโค สรวิศ เผ่าทองศุข และสรัญญา พันธุ์พฤกษ์. 2546. "การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *Amphora delicatissima* AM9901 แบบกะและแบบต่อเนื่องในสภาวะเฮเทอโรโทร-ฟิค." วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (ได้รับการตอบรับเพื่อการตีพิมพ์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.22 ปริมาณรงควัตถุ (ในหน่วยไมโครกรัมต่อ10^6 เซลล์) ของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิค

ชนิดของรงควัตถุ	สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค	สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค
คลอโรฟิลล์ ซี	1.38±0.75	0.39±0.04
ฟูโคแซนทีน	7.35±4.01	2.68±0.04
ไดอะไดโนแซนทีน	1.99±1.09	1.55±0.08
ไดอะโตแซนทีน	0.91±0.50	0.28±0.05
คลอโรฟิลล์ เอ	5.67±3.10	3.53±0.16

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.21 ชนิดและปริมาณ กรดไขมัน (ในหน่วยร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด) ที่ผลิตขึ้นในไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si และภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิคในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+1.2 mM Si

ชนิดของสารรงควัตถุ	สภาวะเฮเทอโรโทรฟิค	สภาวะโฟโตออโตโทรฟิค
unidentified1	6.69±0.18	1.93±0.51
unidentified2	8.71±0.19	2.43±0.62
C16:0	36.51±0.18	8.74±2.35
C16:1	19.60±0.28	12.37±4.40
unidentified3	1.21±0.02	0.31±0.09
unidentified36	3.15±0.11	0.67±0.11
C18:0	1.22±0.06	0.10±0.03
C18:1	7.70±0.07	2.14±0.58
C18:2	2.43±0.03	0.37±0.34
C18:3	1.72±0.04	0.09±0.03
unidentified4	0.08±0.07	1.39±0.15
unidentified5	0.28±0.09	6.97±0.17
unidentified6	0.41±0.00	0.07±0.01
unidentified7	2.83±0.11	0.78±0.17
C20:5	5.71±0.23	1.85±0.09
unidentified8	0.22±0.18	28.59±4.27
unidentified9	0.25±0.18	28.29±3.95
unidentified10	1.27±0.74	2.93±1.34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.20 ความสัมพันธ์ของอัตราการเจือจางกับผลผลิตและความหนาแน่นเซลล์ไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในหัวข้อ 4.5.3.3-4.5.3.5

อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ผลผลิตเซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อวัน)
0.17	300.00	0.14
0.35	180.00	0.17
0.56	120.00	0.18
0.81	90.00	0.20
0.23	229.00	0.11
0.38	184.50	0.14
0.52	148.50	0.16
0.94	89.50	0.18
0.14	302.00	0.08
0.35	283.00	0.19
0.44	208.00	0.18
1.00	111.00	0.22
1.24	36.50	0.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.19 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+Si 2.4mM โดยในวันที่ 35 ของการเพาะเลี้ยง มีการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อจาก 8.5 ขึ้นเป็น 15.15 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)	วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)
0	0.67±0.10	0.00	22	131.33±4.65	0.55
1	2.67±0.42	0.00	23	125.83±16.65	0.55
3	8.08±0.45	0.00	24	120.33±13.14	0.55
4	14.40±1.66	0.00	25	125.17±16.17	0.74
6	41.33±9.80	0.00	26	131.67±21.55	0.74
8	122.83±6.29	0.00	27	87.83±11.24	0.81
10	320.83±36.43	0.00	28	93.33±6.29	0.81
11	297.50±15.21	0.17	29	185.00±11.46	0.22
12	300.00±22.91	0.17	30	275.83±24.66	0.22
13	298.33±13.77	0.17	31	303.33±9.46	0.22
14	290.33±18.54	0.17	32	327.50±57.28	0.22
15	166.17±12.41	0.34	33	304.00±21.67	0.22
16	177.50±12.50	0.34	34	324.00±19.31	0.22
17	201.67±7.64	0.34	35*	381.50±44.32	0.22
18	171.67±8.78	0.34	36	329.17±19.09	0.22
19	108.33±17.56	0.55	37	236.00±29.14	0.22
20	114.17±11.72	0.55	38	240.00±16.39	0.22
21	108.33±6.29	0.55			

หมายเหตุ * คือ มีการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อจาก 8.5 ขึ้นเป็น 15.15 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.18 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si เพาะเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์อยู่ในภาวะคงที่ จากนั้นทำการแปรผันอัตราการเจือระหว่างการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นจนเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)
0	1.00±0.11	0.00
2	6.13±1.01	0.00
4	127.50±12.50	0.00
6	324.33±34.46	0.00
8	415.83±47.85	0.00
9	239.17±28.98	0.23
10	219.00±8.54	0.23
11	225.00±12.99	0.23
12	189.17±12.56	0.38
13	185.46±12.20	0.38
14	180.00±9.01	0.38
15	156.67±6.29	0.52
16	143.33±16.52	0.52
17	141.67±13.77	0.52
18	98.33±12.58	0.94
19	81.67±11.98	0.94
20	85.50±7.12	0.94
21	42.67±6.90	1.24
22	38.67±2.47	1.24
23	32.33±9.35	1.24
24	31.83±11.23	1.24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.17 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ความเค็ม30 พีเอสยู เพื่อแปรผันอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงจนเกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)
0	0.89±0.15	0.00
2	1.70±0.09	0.00
4	6.54±1.47	0.00
5	10.27±0.71	0.00
7	112.83±15.83	0.00
8	287.00±23.15	0.00
9	408.33±73.50	0.00
10	304.33±18.64	0.14
12	310.00±39.29	0.14
14	291.83±25.93	0.14
17	305.33±8.61	0.14
19	301.67±15.07	0.14
21	278.20±38.92	0.35
22	267.80±14.84	0.35
23	264.90±17.03	0.35
24	211.83±20.74	0.44
25	204.17±11.27	0.44
27	131.00±23.79	1.00
28	126.83±16.33	1.00
29	94.50±11.06	1.00
30	94.67±5.01	1.00
33	225.67±10.49	0.00
34	362.50±41.31	0.00
36	422.33±26.10	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.16 ความสัมพันธ์ของความหนาแน่นเซลล์กับอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมเต็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ความเค็ม 30 พีเอสยู

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)
0	1.11±0.20	0.00
2	4.11±0.46	0.00
4	9.17±1.02	0.00
6	42.00±4.67	0.00
8	180.83±20.06	0.00
10	253.50±28.17	0.00
12	365.33±40.59	0.00
13	491.83±54.65	0.00
14	303.06±34.26	0.24
15	303.06±34.17	0.24
16	303.06±32.59	0.24
17	174.96±20.74	0.45
18	174.96±20.93	0.45
19	174.96±22.02	0.45
20	174.96±14.07	0.45
21	249.04±26.26	0.34
22	249.04±28.04	0.34
23	249.04±29.54	0.34
25	249.04±56.85	0.34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.15 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si โดยแปรผันอัตราการกวนระหว่างการเพาะเลี้ยง 2 ระดับ โดยอัตราการกวนระดับที่ 1 เท่ากับ 300 รอบต่อนาที และอัตราการกวนระดับที่ 2 เท่ากับ 600 รอบต่อนาที

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)	อัตราการกวน (รอบต่อนาที)
0	1.52±0.17	0.00	300
2	17.53±3.89	0.00	300
4	70.50±9.66	0.00	300
6	246.67±48.88	0.00	300
8	514.17±18.09	0.00	300
9	154.17±8.78	0.96	300
10	143.67±10.59	0.96	300
11	123.33±5.77	0.96	300
12	125.50±10.66	0.96	300
13	71.67±6.29	0.96	600
14	94.50±7.26	0.96	600
15	86.00±6.26	0.96	600
16	89.17±16.07	0.96	600
17	85.83±5.20	0.96	600

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.12 การเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 0 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์ เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที และให้แสง 500 ลักซ์

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				
	1.2 (มิลลิโมลาร์) ในที่มืด	0 (มิลลิโมลาร์)	1.2 (มิลลิโมลาร์)	2.4 (มิลลิโมลาร์)	4.8 (มิลลิโมลาร์)
0	0.99±0.11	0.92±0.06	0.96±0.18	1.15±0.26	1.02±0.28
2	1.00±0.20	3.17±20.73	2.08±0.42	1.74±0.40	1.96±0.29
4	0.63±0.14	4.70±0.72	4.47±0.60	2.61±0.40	2.65±0.18
6	1.57±2.01	6.40±0.46	5.32±1.51	4.50±0.72	5.40±1.15
9	-	25.25±2.84	25.33±3.88	19.17±3.17	19.92±1.88
12	-	23.00±1.32	35.50±3.12	21.83±1.53	27.17±3.33
14	-	26.08±1.88	48.17±4.25	22.33±2.79	28.50±4.00
16	-	24.17±20.2	55.50±4.77	23.25±0.66	24.50±1.80
19	-	22.50±1.75	67.67±6.33	24.00±1.80	21.50±1.32
21	-	19.00±2.29	66.33±5.86	24.33±7.20	23.33±3.25

หมายเหตุ – คือ ไม่มีการเติบโตของไดอะตอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.13 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคและโฟโตออโตโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในขวดรูปชมพู่ ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตรแตกต่างกันๆ

วันที่เลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)						
	F/2 500 ลักซ์	F/2+1.2 mM Si 500 ลักซ์	F/2+4c ในที่มืด	F/2+NB ในที่มืด	F/2+NB+4C ในที่มืด	F/2+NB+4c +1.2 mM Si ในที่มืด	F/2+NB+4c +2.4 mM Si ในที่มืด
0	0.98±0.14	1.13±0.19	0.98±0.21	0.79±0.06	0.98±0.17	1.15±0.08	0.93±0.14
3	5.12±1.56	4.42±0.53	2.74±0.50	3.42±0.95	3.30±0.42	3.79±0.34	1.19±0.09
5	15.58±2.98	13.73±3.07	4.40±1.08	4.97±0.31	7.87±0.85	9.60±1.49	3.13±0.75
7	40.00±9.58	50.67±8.89	5.50±0.87	9.80±1.28	23.83±5.03	113.83±25.01	92.83±24.03
9	94.17±21.08	124.17±25.67	6.77±2.78	34.67±9.80	65.13±9.51	465.33±96.62	768.50±70.62
11	80.33±5.80	160.67±33.63	8.10±1.39	52.00±7.76	67.83±6.11	526.00±81.37	792.50±45.96
13	63.67±3.75	177.67±13.33	5.15±0.96	49.17±8.33	63.50±6.93	494.33±91.95	707.75±10.25
15	61.50±3.46	145.00±9.76	9.23±1.74	39.00±6.26	52.67±3.25	428.00±71.41	702.75±66.82

ตารางที่ จ.14 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอมน้ำเค็ม *A. delicatissima* AM9901 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C+2.4 mM Si ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

วันที่ในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
0	0.72±0.11
2	1.74±0.18
4	3.44±0.44
6	5.72±0.69
8	27.73±5.00
10	132.50±17.68
12	223.33±23.63
14	320.67±50.16
16	306.83±23.72
18	271.67±40.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.11 การเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิคของไดอะตอม *A. delicatissima* AM9901 ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2+NB+4C ที่มีความเข้มข้นของซิลิกา 0 0.12 1.2 2.4 และ 4.8 มิลลิโมลาร์

วันที่เพาะเลี้ยง (วัน)	ความหนาแน่นเซลล์(x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				
	ไม่เติมซิลิกา	0.12 มิลลิโมลาร์	1.2 มิลลิโมลาร์	2.4 มิลลิโมลาร์	4.8 มิลลิโมลาร์
0	0.98±0.13	0.85±0.9	0.97±0.05	1.01±0.89	0.95±0.02
2	1.12±0.08	2.49±0.98	21.21±5.89	16.22±2.89	26.98±6.98
4	0.75±0.01	8.98±2.78	54.98±10.69	32.97±10.69	41.25±11.02
7	0.56±0.06	12.56±3.20	216.58±50.98	116.12±12.56	124.33±21.89
9	-	28.44±4.02	624.31±60.21	779.89±64.23	154.23±14.69
11	-	30.45±4.89	611.01±20.14	792.06±61.23	254.96±60.23
13	-	37.21±9.58	625.14±10.78	732.89±32.95	412.78±25.62
15	-	33.21±4.26	630.78±25.46	703.65±38.97	710.52±30.12
17	-	30.45±7.90	612.89±9.87	682.74±40.55	695.25±19.75

หมายเหตุ – คือ ไม่มีการเติบโตของไดอะตอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้