รายงานฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2557

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การคัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจากระบบนิเวศทางทะเลของหมู่เกาะแสมสารและเกาะสีชัง: องค์ประกอบทางชีวเคมีและการใช้ประโยชน์

Isolation and Culture of Microalgae from Marine Ecosystems of Samaesarn Islands and Sichang Island: Composition and Utilization

อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์
และ พรเทพ พรรณรักษ์

สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. สมภพ รุ่งสุภา หัวหน้าสถานี สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือและการอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างน้ำและสาหร่ายขนาดเล็ก รวมทั้งนางสาวจุฑาภรณ์ เรืองทวี นางสาวชิดชญา จินดานนท์ และนางสาวอณัศยา ดีสุข นิสิตผู้ช่วยวิจัยจากห้องปฏิบัติการนิเวศวิทยาทางทะเล และคุณไพบูลย์ ศีรษะ นิสิตภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนางสาวสุพัตตรา วงษ์จำรัส ผู้ช่วยวิจัย สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ สำหรับความช่วยเหลือในการเก็บรักษาสายพันธุ์และการศึกษาวิจัย

การคัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจากระบบนิเวศทางทะเลของหมู่เกาะแสมสารและเกาะสีชัง: องค์ประกอบทางชีวเคมีและการใช้ประโยชน์

Isolation and Culture of Microalgae from Marine Ecosystems of Samaesarn Islands and Sichang Island: Composition and Utilization

อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์ **และ พรเทพ พรรณรักษ์**

Ajcharaporn Piumsomboon[1,2] and Porntep Punnarak[1]

[1] สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

[2] ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

[1] Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

[2] Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำ

สาหร่ายขนาดเล็กทั้งที่ดำรงชีวิตเป็นแพลงก์ตอนและที่อาศัยอยู่หน้าดินหรือเกาะติดกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น สาหร่ายใบและหญ้าทะเลฯ จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญในระบบนิเวศทางทะเลโดยมีบทบาทเป็นผู้ผลิตสร้างสารอินทรีย์จากสารอนินทรีย์โดยอาศัยพลังงานจากแสงในกระบวนการสังเคราะห์แสง เป็นตัวตั้งต้นของสายใยอาหารแบบผู้ล่าในทะเลทำให้สิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในทะเลสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กมีองค์ประกอบทางชีวเคมีที่มีคุณค่าทางโภชนาการ คือ โปรตีน (ร้อยละ 25-40 ของน้ำหนักแห้ง) คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ 5-30 ของน้ำหนักแห้ง) ไขมัน(ร้อยละ 10-30 ของน้ำหนักแห้ง) จึงนิยมใช้สาหร่ายขนาดเล็กเป็นอาหารทั้งด้านโภชนาการ เภสัชกรรมและการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม และอุตสาหกรรมพลาสติค รวมทั้งด้านพลังงานทดแทน การจะนำสาหร่ายขนาดเล็กมาใช้ประโยชน์จำเป็นต้องมีการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ การศึกษาด้านชีววิทยาและชีวเคมี การคัดเลือกสายพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวปัจจัยสภาพแวดล้อมที่สนับสนุนให้สาหร่ายเติบโตดีและสามารถสะสมสารประกอบที่มีประโยชน์กับมนุษย์ ประกอบกับเกาะแสมสารและหมู่เกาะใกล้เคียงเป็นพื้นที่เป้าหมายของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตน์ฯ และเกาะสีชังก็เป็นเกาะที่มีความสำคัญมาแต่อดีตทั้งในด้านภูมิศาสตร์ ประวัติศาสตร์ และพาณิชยนาวีและมีพื้นที่ส่วนที่อยู่ในความรับผิดชอบของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงเหมาะสมต่อการเป็นพื้นที่ศึกษาเพื่อการคัดแยกสายพันธุ์สำหรับการเพาะเลี้ยงและเก็บรวบรวมสายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์และการอ้างอิง รวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

3.1 เพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และองค์ประกอบของสารอาหาร ต่อการเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายขนาดเล็ก

3.2 เพื่อศึกษาอัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นและอัตรารอดของฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยไดอะตอมต่างชนิดในระดับความหนาแน่นที่แตกต่างกัน

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สาหร่ายขนาดเล็กในระบบนิเวศทางทะเลของเกาะแสมสารและเกาะสีชังทั้งที่อาศัยในมวลน้ำ (pelagic ecosystem) และที่พื้นดิน (benthic ecosystem) หลายชนิดสามารถเติบโตในระบบเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้และสามารถสร้างและสะสมสารประกอบทางชีวเคมีนำไปใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านการเพาะเลี้ยงทางน้ำ โภชนาการ การแพทย์และเภสัชกรรม การปรับปรุงสภาพแวดล้อมหรือการผลิตพลังงานทางเลือก ฯลฯ สาหร่ายเหล่านี้เมื่อนำไปเป็นอาหารสัตว์ทะเลขนาดเล็กและ/หรือลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน ทำให้สัตว์ทะเลที่กินสาหร่ายสามารถเติบโตได้ในระบบเลี้ยงและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ สาหร่ายขนาดเล็กจึงเป็นทรัพยากรมีชีวิตที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้และการเพาะเลี้ยงก็เป็นแนวทางหนึ่งในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของทรัพยากรสาหร่ายขนาดเล็กจากทะเลไทย

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

สาหร่ายขนาดเล็กจัดเป็นผู้ผลิตลำดับแรกในสายใยอาหารและเป็นอาหารธรรมชาติของสัตว์ทะเลในสายใยอาหารในระบบนิเวศทางทะเล ได้มีการนำสาหร่ายขนาดเล็กมาใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำหรือเป็นอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์เพื่อนำไปเป็นอาหารสัตว์น้ำอีกทีหนึ่งในการเพาะเลี้ยงและผลิตลูกสัตว์น้ำ เช่น ลูกกุ้ง ลูกปลา หรือการเพาะเลี้ยงหอยทะเล นอกจากนี้สาหร่ายขนาดเล็กยังเป็นแหล่งของสารประกอบชีวเคมีอีกหลายประเภท ได้แก่ รงควัตถุต่าง ๆ วิตามิน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดไขมัน ซึ่งอาจใช้ผลิตเป็นอาหารเสริม ยาและปุ๋ย ฯลฯ (ตารางที่ 1และตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 การใช้ประโยชน์จากสาหร่ายขนาดเล็ก (จาก Benemann, *et al*., 1987)

Products	Uses	Approx. value	Approx.[a] market	Algal genus or type	Current product content	Reactor system or concept	Current status
Isotopic compounds	medicine research	>$1000/kg^{-1}	small	many	>5%	tubular, indoors	commercial
Phycobili-proteins	research	>$10 000 kg^{-1}	small	red	1–5%	tubular,	commercial
	food color	>$100 kg^{-1}	small	blue–greens		indoors	commercial
Pharmaceuticals	anticancer	Unknown	unknown	blue–greens	0.1–1%	tubular,	research
	antibiotics	(very high)	unknown	other		fermentor	
β-Carotene	food suppl.	>$500 kg^{-1}	small	*Dunaliella*	5%	lined pond	commercial
	food color	$300 kg^{-1}	medium	*Dunaliella*			
Xanthophylls	chicken feed	$200–500 kg^{-1}	medium	greens, diatoms, etc.	0.5%	unlined pond	research
Vitamins C & E	vitamins	C: >$10 kg^{-1}	medium	greens	<1%	fermentor	research
		E: >$50 kg^{-1}	medium	greens		fermentor	research
Health foods	supplements	$10–20 kg^{-1}	medium to large	*Chlorella, Spirulina*	100%	lined pond	commercial
Polysaccharides	viscosifiers gums	$5–10 kg^{-1}	medium to large	*Porphyridium* others	50%	lined pond	research
Bivalves feeds	seed raising	$20–100 kg^{-1}	small	diatoms	100%	lined pond	commercial
	aquaculture	$1–10 kg^{-1}	large	*Chrysophytes*			research
Soil inoculum	conditioner, fertilizers	>$100 kg^{-1}	unknown unknown	*Chlamydomona* N-fixing species	100%	indoor lined pond	commercial research
Amino acids	proline	$5–50 kg^{-1}	small	*Chlorella*	10%	lined pond	research
	arginine	$50–100 kg^{-1}	small	blue–greens	10%	lined pond	conceptual
	aspartic acid	$2–5 kg^{-1}	large	blue–greens	10%		
Single cell protein	animal feeds	$0.3–0.5 kg^{-1}	very large	green algae others	100%	unlined pond	research
Veg and marine oils	foods, feeds supplements	$0.4–0.6 kg^{-1} $3–30 kg^{-1}	very large small	greens diatoms	30%	unlined lined pond	research

[a] Market sizes: small, US$1–10 million; medium, US$10–100 million; large, more than US$100 million

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และเถ้า (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง) ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม (Bacillariophycea)

สกุล-ชนิด	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	เถ้า	ที่มา
Phaeodactulum tricornotum	33	6.6	24.0	7.6	1
Phaeodactulum tricornotum	57-59	19-26	10-13	10-17	2
Skeletonema costatum	37	4.7	20.8	39.0	1
	11-41	n.d.	49-90	n.d.	3
Coscinodiscus sp.	17	1.8	4.1	57.0	1
Chaetoceros sp.	35	6.9	6.6	28.0	1
Chaetoceros spp.	18-49	n.d.	13-69	n.d.	3
Corethron hystrix	18.5	n.d.	63.3	n.d.	3
Thalassiosira spp	40-52	n.d.	19-40	n.d.	3

ที่มา: 1. Parson *et al*., 1961; 2. Thomas *et al*., 1984; 3. Myklestad, 1974.n.d. ไม่มีข้อมูล

สาหร่ายทะเลขนาดเล็กที่คัดแยกมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการอยู่ในกลุ่มของไดอะตอม ซึ่งประกอบด้วยชนิดที่ดำรงชีวิตเป็นแพลงก์ตอนพืชล่องลอยในมวลน้ำ และสาหร่ายขนาดเล็กที่อาศัยอยู่หน้าดินหรือที่เรียกว่าเป็นาสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็ก เช่น *Navicula* และสกุล *Nitzschia* ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงลูกหอยเป๋าฮื้อ ในด้านนิเวศวิทยาสาหร่ายขนาดเล็กที่ดำรงชีพเป็นแพลงก์ตอนพืชเป็นตัวชี้วัดกระแสน้ำหรือสภาพมลพิษในแหล่งน้ำ ในด้านอุตสาหกรรมสามารถใช้สาหร่ายขนาดเล็กบางชนิดเพื่อผลิตน้ำมันได้ด้วย โดยปริมาณของไขมันอาจผันแปรได้ถึง 4-28 % ของน้ำหนักแห้ง แต่ถ้าสภาวะแวดล้อมเหมาะสมอาจผลิตไขมันสะสมได้ถึง 90 % ของน้ำหนักแห้ง ไดอะตอมเป็นกลุ่มแพลงก์ตอนพืชที่มีปริมาณไขมันสะสมมากที่สุดถึง 39 %ของน้ำหนักแห้ง หากสามารถผลิตได้เป็นจำนวนมากก็อาจสามารถนำไปผลิตน้ำมันได้และในปัจจุบันก็มีการใช้สาหร่ายขนาดใหญ่ผลิตไบโอดีเซลด้วย นอกจากนี้องค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กยังมีความหลากหลายสูง และปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดมีการผันแปรตามชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่ายด้วย ดังเห็นได้จากปริมาณของกรดไขมันในไดอะตอมชนอดต่าง ๆ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของกรดไขมันประเภทต่าง ๆ (ร้อยละของน้ำหนักแห้งปราศจากเถ้า) ในไดอะตอมชนิดต่าง ๆ

สกุล-ชนิด	กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids, SAF)	กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acids, MUFA)	กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acids, PUFA)	ที่มา
Thalassiosira sp.	24.55	32.15	33.8	Patoomyot *et al*., 2005
	16:0	16:1n-7	20:5n-3	
Nitzschia cf. *ovalis*	16.37	18.04	46.0	
	16:0	16:1n-7	20:5n-3	
Nitzschia spp.	31.1-47.9	25.6-45.1	10.0-22.3	Correa-Reyes *et al*., 2009
Navicula incerta	28.1	40.3	21.0	
Amphora paludosa var *hyalina*	29.4	31.4	28.0	

วิธีการดำเนินการศึกษา

1. **การเก็บสายพันธุ์และขยายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กเพื่อการใช้ประโยชน์**

เลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร f/20 ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เจือจางจากสูตร f/2 และ/หรือ สูตร f/2 ของ Guillard (Anderson et. Al., 2005) เพื่อให้เหมาะสมต่อการเติบโตให้ห้องปฏิบัติการและสะดวกแก่การถ่ายหัวเชื้อภายใต้สภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิและแสง

2. **การศึกษาเบื้องต้นถึงอิทธิพลของอัตราส่วนของ N:P ในอาหารต่อการสะสมของ neutral lipids ในสาหร่ายขนาดเล็ก**

นำสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม 3 ชนิด คือ *Amphora* sp. 2, *Skeletonema* sp. และ *Actinocyclus* sp. มาศึกษาการสะสมของ neutral lipids ในช่วงระยะต่าง ๆ ของการเติบโต โดยเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร f/20 ที่ปรับอัตราส่วนโดยโมลของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (N:P molar ratio) เป็น 2:1 6:1 12:1 24:1(ชุดควบคุม สูตรอาหารปกติ) และ 36:1 เมื่อสาหร่ายอายุ 12 วัน นำไปตรวจการสะสมของ neutral lipids โดยการย้อมด้วย Nile red

3. **การสะสม neutral lipids ของสาหร่ายขนาดเล็กในระยะการเติบโตคงที่ (stationary phase)**

ถ่ายหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กที่แยกมาจากเกาะสีชังและเกาะแสมสารจาก stock culture มาอย่างละ 1 มล. ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร f/20 ปริมาตร 20 มล. เมื่อ culture ของสาหร่ายอายุประมาณ 9 วัน (ในระยะ stationary phase) แยก culture ประมาณ 10 ไมโครลิตร ใส่ลงใน micro-tube ที่มีสารละลาย 0.9% NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บรรจุอยู่ ล้างเซลล์สาหร่ายโดยการเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้สักครู่ แล้วดูดสารละลายใสส่วนบนทิ้งไป เซลล์ของสาหร่ายจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ดูดเซลล์สาหร่ายมาใส่ใน microtube เติมสารละลาย Nile red (10 กรัม ในเมธานอล 10 มล.) ลงไป 3 ไมโครลิตร (ทำในที่มีแสงน้อย) เก็บตัวอย่างไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 คืน เพื่อย้อมสี neutral lipid เมื่อครบ 1 คืน ดูดตัวอย่างลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดและปิดกระจกปิดสไลด์ที่สะอาด แล้วนำไปตรวจดูการเรืองแสงของ neutral lipids ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์ที่ให้แสงสีฟ้า ส่วนที่เป็น neutral lipids และถูกย้อมด้วย Nile red จะเรืองแสงเป็นสีเหลือง (ธนะกาญจน์ มัญชุพาณี ติดต่อส่วนตัว)

4. **การศึกษาการสะสมของไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กที่ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน**

เลี้ยงสาหร่าขนาดเล็ก *Amphora costata* ที่ได้จากเกาะสีชัง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร f/20 ที่ระดับ pH ที่แตกต่างกัน 4 ค่า คือ 7.6, 7.8, 8.0 และ 8.2 เป็นเวลา 16 วัน โดยมีการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่สาหร่ายและมีการตรวจวัดค่า pH ในชุดการทดลองทุกวัน เพื่อให้แน่ใจว่าการเปลี่ยนแปลงของ pH ที่เกิดขึ้น เกิดจากการเติบโตของสาหร่าย และสุ่มตัวอย่างออกมาเมื่อสาหร่ายมีอายุอยู่ในช่วงกราฟการเติบโตที่ต่าง ๆ คือ lag phase, log phase, stationary phase และ inhibition phaseนำตัวอย่างแห้งจากตัวอย่างแต่ละช่วงของการเติบโต มาวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl method และปริมาณไขมันทั้งหมด

5. **การศึกษาอัตราการเติบโตของสัตว์ทะเลขนาดเล็กและ/หรือแพลงก์ตอนสัตว์ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก**

ทำการทดลองเลี้ยงฮาร์แพคติคอยโคพีพอด ด้วยไดอะตอมที่แยกสายพันธุ์จากเกาะแสมสารและเกาะสีชัง จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Amphora* 2 สายพันธุ์ โดยจะเริ่มเลี้ยงฮาร์แพคติคอยโคพีพอดในถังขนาดเล็กก่อนแล้วค่อยขยายปริมาณการเลี้ยงให้เพิ่มขึ้น นำฮาร์แพคติคอยโคพีพอดจำนวน 100 ตัว มาเลี้ยงบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งใส่น้ำทะเลที่พักและผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 แล้วจำนวน 30 มิลลิลิตร อุณหภูมิน้ำทะเลประมาณ 24-27 องศาเซลเซียส และให้ฟองอากาศ ให้อาหารโดยใส่สาหร่ายลงในบีกเกอร์ทุกวัน แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ที่มีความแต่ละชุดการทดลองให้อาหารสาหร่ายเข้มข้นของสาหร่ายที่เป็นอาหารต่างกัน คือ 1 และ 2 มิลลิลิตร

สังเกตและบันทึกผลการทดลองตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 21-28 วัน โดยเปลี่ยนน้ำในบีกเกอร์ครึ่งหนึ่งทุกสัปดาห์ นับจำนวนของฮาร์แพคติคอยโคพีพอดที่เกิดขึ้นในแต่ละชุดการทดลอง บันทึกจำนวนของฮาร์แพคติคอยโคพีพอดที่ระยะต่าง ๆ ของเหลืออยู่ และสังเกตการพัฒนาการของโคพีพอดจาก การปรากฏของโคพีพอดที่มีถุงไข่ และตัวอ่อนในระยะต่างๆ เช่น ระยะนอเพลียส โคพีโพดิด และโคพีพอดตัวเต็มวัย

ผลการศึกษา

1. **การเก็บสายพันธุ์และขยายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กเพื่อการใช้ประโยชน์**

   เก็บรักษาสายพันธุ์ของสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กจำนวน 21 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4) ที่แยกจากหมู่เกาะแสมสารและเกาะสีชังและเกาะใกล้เคียง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร f/20 ซึ่งดัดแปลงจากสูตร f/2

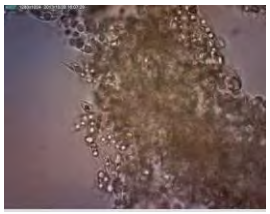
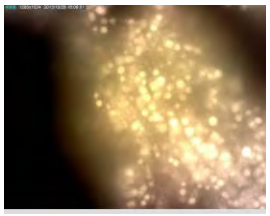
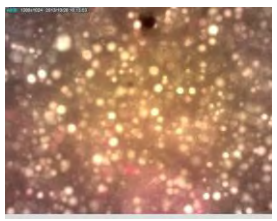
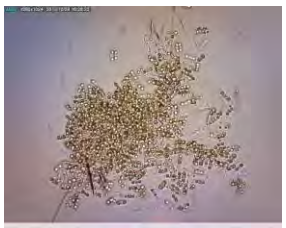
2. **การศึกษาเบื้องต้นถึงอิทธิพลของอัตราส่วนของ N:P ในอาหารต่อการสะสมของ neutral lipids ในสาหร่ายขนาดเล็ก**

   การศึกษาเชิงคุณภาพเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม ที่สามารถสร้างและสะสมกรดไขมัน ภายใต้สภาวะในห้องปฏิบัติการ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ f/20 ที่มีอัตราส่วนโดยโมล ของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (N:P molar ratio) เท่ากับ 2:1, 6:1, 12:1, 24:1 (ชุดควบคุม) และ 36:1 แสดงว่าในวันที่ 12 ของการเลี้ยงนั้นสาหร่ายขนาดเล็กทั้งสามชนิดสามารถสร้างและสะสม neutral lipids ในเซลล์ได้ โดยสาหร่ายหรือไดอะตอมชนิด *Amphora costata* และ *Actinocyclus normanii* น่าจะมีการสะสม neutral lipids สูงกว่าไดอะตอมชนิด *Skeletonema costatum* (รูปที่ 1-3)

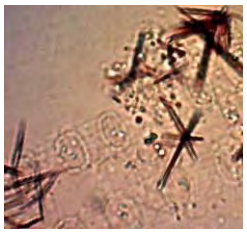
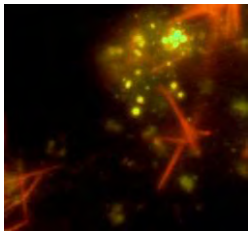
ตารางที่ 4 สายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่แยกได้ในโครงการฯ และนำมาเพาะเลี้ยง (ข้อมูล ณ วันที่ 30 กันยายน 2557)

ลำดับที่	ชนิด	บริเวณเก็บตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเลี้ยงชนิดเดียว
1	*Amphora* sp. 1	เกาะสีชัง	พ.ค. 55	f/2	/
2	*Amphora costata*	เกาะสีชัง	พ.ค. 55	f/2	/
3	*Chaetoceros* sp.	เกาะสีชัง	พ.ค. 55	f/2	/
4	*Oscillatoria* sp. 1	เกาะสีชัง	พ.ค. 55	BG-11	/
5	*Skeletonema* sp.	เกาะขามน้อย	12 ก.ค. 56	f/2	-
6	*Azpetia nodulifer*	เกาะขามน้อย	12 ก.ค. 56	f/2	-
7	*Dytilum* sp.	เกาะขามน้อย	12 ก.ค. 56	f/2	/
8	*Odontella recticulata*	เกาะขามน้อย	12 ก.ค. 56	f/2	/
9	*Actinocyclus normanii*	เกาะขามน้อย	12 ก.ค. 56	f/2	-
10	*Amphora* sp. 3	เกาะขามน้อย	12 ก.ค. 56	f/2	/
11	*Oscillatorai* sp. 2	เกาะขามน้อย	12 ก.ค. 56	f/2	/
12	*Nitzschia* sp.	เกาะขามน้อย	12 ก.ค. 56	f/2	/
13	*Odontella* cf. aurita	เกาะขาม แสมสาร	17 มี.ค. 56	f/2	/
14	*Bacillaria* sp.	เกาะขาม แสมสาร	17 มี.ค. 56	f/2	/
15	*Bellerochea horologicalis*	เกาะขาม แสมสาร	17 มี.ค. 56	f/2	/
16	*Odontella mobiliensis*	เกาะขาม แสมสาร	17 มี.ค. 56	f/2	/
17	*Pleurosigma* sp.	เกาะขาม แสมสาร	17 มี.ค. 56	f/2	/
18	*Amphora* sp. 4	เกาะแสมสาร	พ.ค. 55	f/2	/
19	*Azpetia nodulifer*	เกาะขาม แสมสาร	17 มี.ค. 56	f/2	-
20	*Actinocyclus* sp. 1	เกาะขาม แสมสาร	17 มี.ค. 56	f/2	/
21	*Actinocyclus octonarius*	เกาะขาม แสมสาร	17 มี.ค. 56	f/2	/

หมายเหตุ: “/ ” การเลี้ยงแบบชนิดเดียว “ – “ ยังมีสาหร่ายชนิดอื่นปนเปื้อน

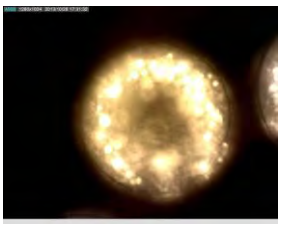
ชนิด	อัตราส่วนโมลของ N:P	รูปแสงสีขาว	รูปแสงฟลูออเรสเซนต์
Amphora costata	2:1		
	6:1		
	12:1		
	24:1		
	36:1		

รูปที่ 1 การสะสม neutral lipids ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมชนิด *Amphora costata* ภายใต้สภาวะการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนโดยโมลของ N:P แตกต่างกัน

ชนิด	**อัตราส่วนโมลของ N:P**	รูปแสงสีขาว	**รูปแสงฟลูออเรสเซนต์**
Skeletonema costatum	2:1		
	6:1	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
	12:1		
	24:1		
	36:1		

หมายเหตุ: เส้นยาวเป็นผลึกของ Nile red ที่ตกค้าง ไม่ใช่เซลล์สาหร่าย

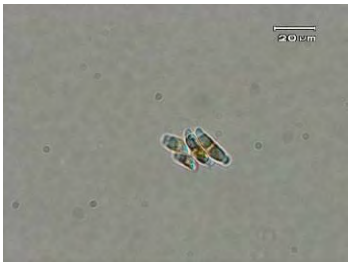
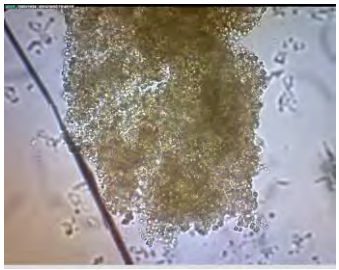
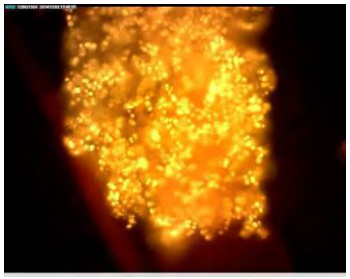
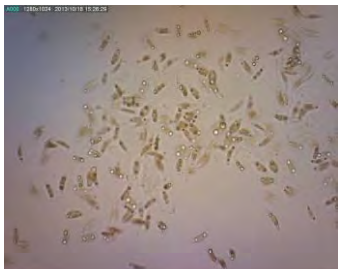
รูปที่ 2 การสะสม neutral lipids ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมชนิด *Skeletonema costatum* ภายใต้สภาวะการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนโดยโมลของ N:P แตกต่างกัน

ชนิด	**อัตราส่วนโมลของ N:P**	รูปแสงสีขาว	**รูปแสงฟลูออเรสเซนต์**
Actinocyclus normanii	2:1		
	6:1		
	12:1		
	24:1		
	36:1		

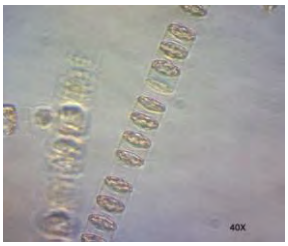
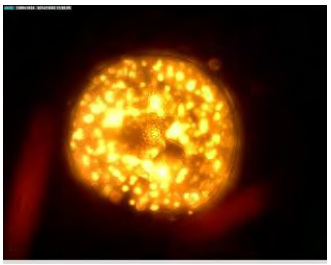
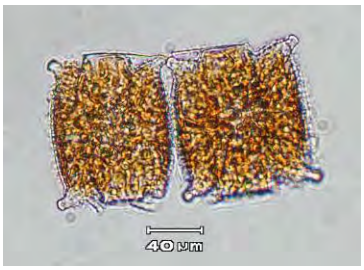
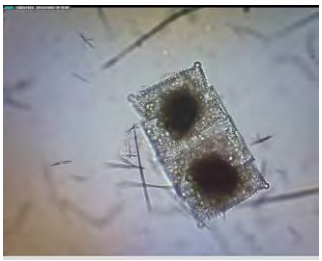
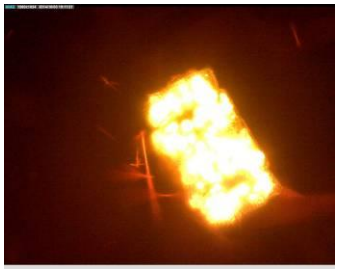
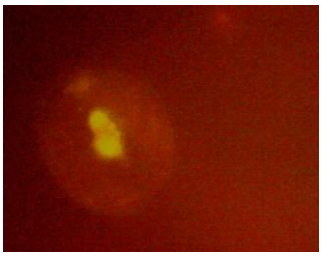
รูปที่ 3 การสะสม neutral lipids ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมชนิด *Actinocyclus normanii* ภายใต้สภาวะการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนโดยโมลของ N:P แตกต่างกัน

3. การสะสม neutral lipids ของสาหร่ายขนาดเล็กในระยะการเติบโตคงที่ (stationary phase)

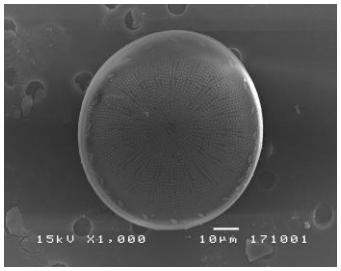
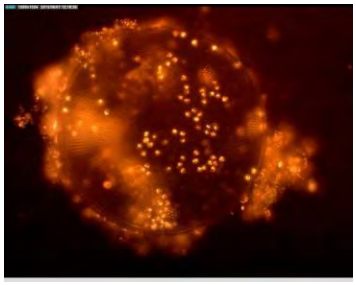
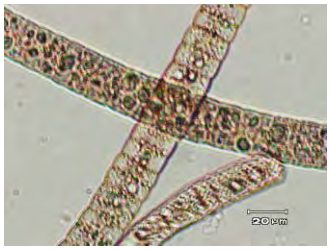
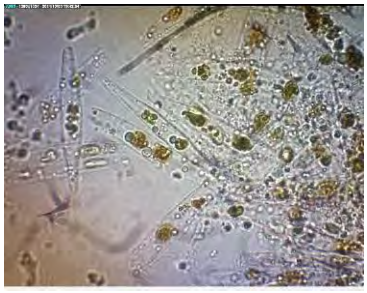
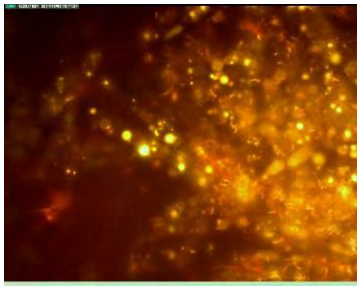
การศึกษาไดอะตอมที่แยกจากบริเวณกลุ่มเกาะสีชังและเกาะแสมสารซึ่งเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร f/20 เป็นเวลา 9 วันพบว่าไดอะตอมที่แยกมาเลี้ยงส่วนใหญ่สามารถสะสม neutral lipids ได้ โดยไขมันที่เป็นกลางนี้จะติดสีย้อม Nile และเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง UV จะเรืองแสงเป็นสีขาวอมเหลืองสว่างขึ้นมา ดังรูปที่ 4 และรูปที่ 5 ซึ่งต้องทำการศึกษาเปรียบเทียบในเชิงปริมาณต่อไป

		
Amphora sp. 1	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid
		
Amphora costata	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid
Chaetoceros sp.	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid
Oscillatoria sp.	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid

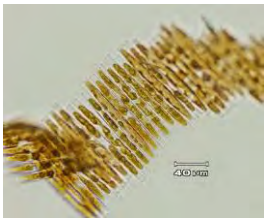
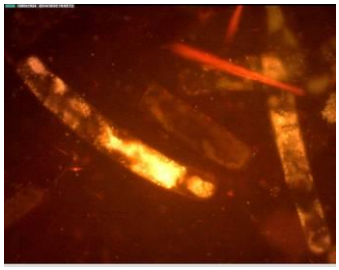
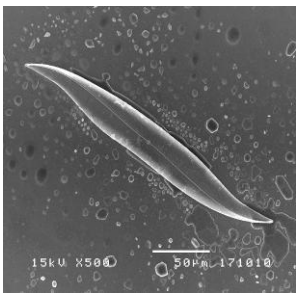
รูปที่ 4 สาหร่ายขนาดเล็กจากเกาะสีชังภายใต้สภาวะการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและการสะสม neutral lipids

		
Skeletonema sp.	อายุ 12 วัน	Nile red-stained neutral lipid
		
Azpetia nodulifer	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid
	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
Dytilum sp.		
		
Odontella recticulata	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid
		
Amphora sp. 3	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid

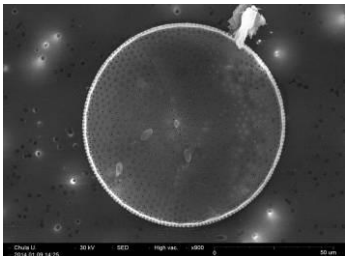
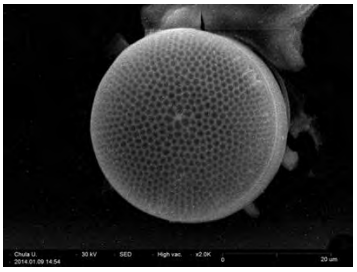
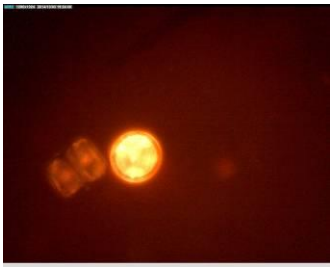
รูปที่ 4 (ต่อ)

 *Actioncyclus normanii*	อายุ 9 วัน	 Nile red-stained neutral lipid
 *Oscillatoria* sp. 2	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid
Nitzschia sp.	 อายุ 9 วัน	 Nile red-stained neutral lipid

รูปที่ 4 (ต่อ)

Odontella cf. *aurita*	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid
 *Bacillaria* sp.	ไม่พบการสะสม neutral lipids	ไม่พบการสะสม neutral lipids
Bellerochea horologicalis	ไม่พบการสะสม neutral lipids	ไม่พบการสะสม neutral lipids
Odontella mobiliensis	อายุ 9 วัน	 Nile red-stained neutral lipid
 *Pleurosigma* sp.	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid

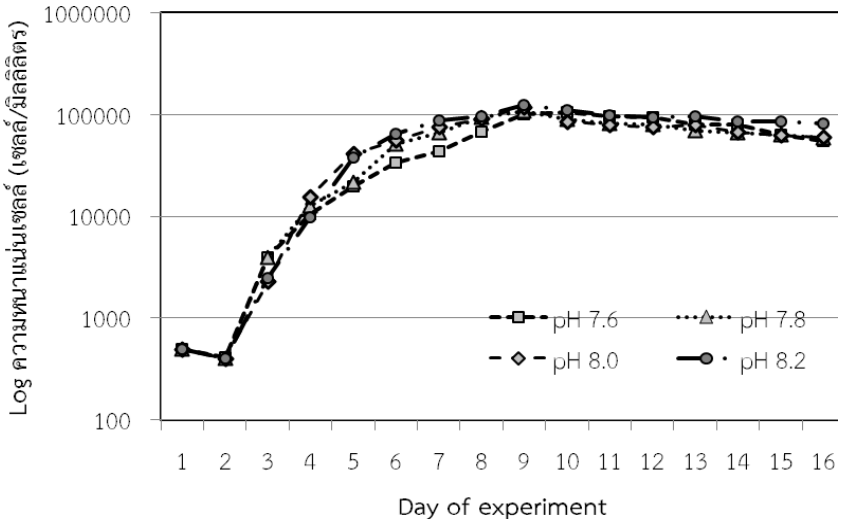
รูปที่ 5 สาหร่ายขนาดเล็กจากเกาะแสมสารภายใต้สภาวะการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและการสะสม neutral lipids

Amphora sp. 4	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid
		
Azpetia nodulifer	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid
		
Actinocyclus octonarius	อายุ 9 วัน	Nile red-stained neutral lipid

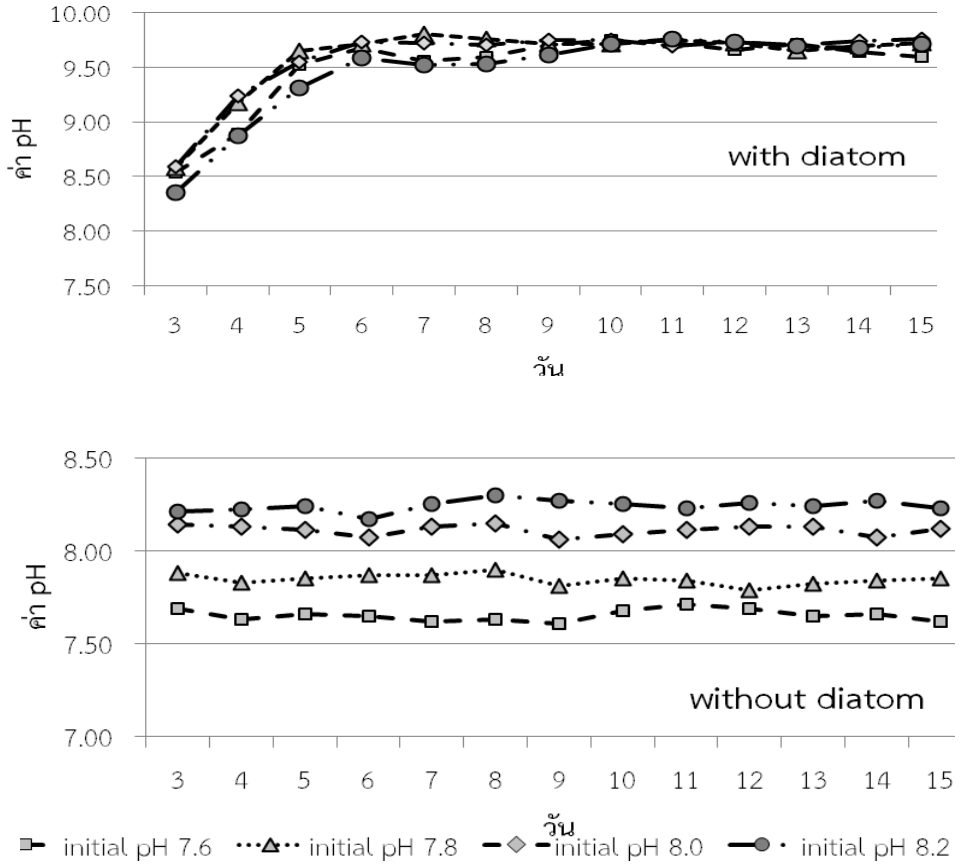
รูปที่ 5 (ต่อ)

4. การสะสมของไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กที่ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน

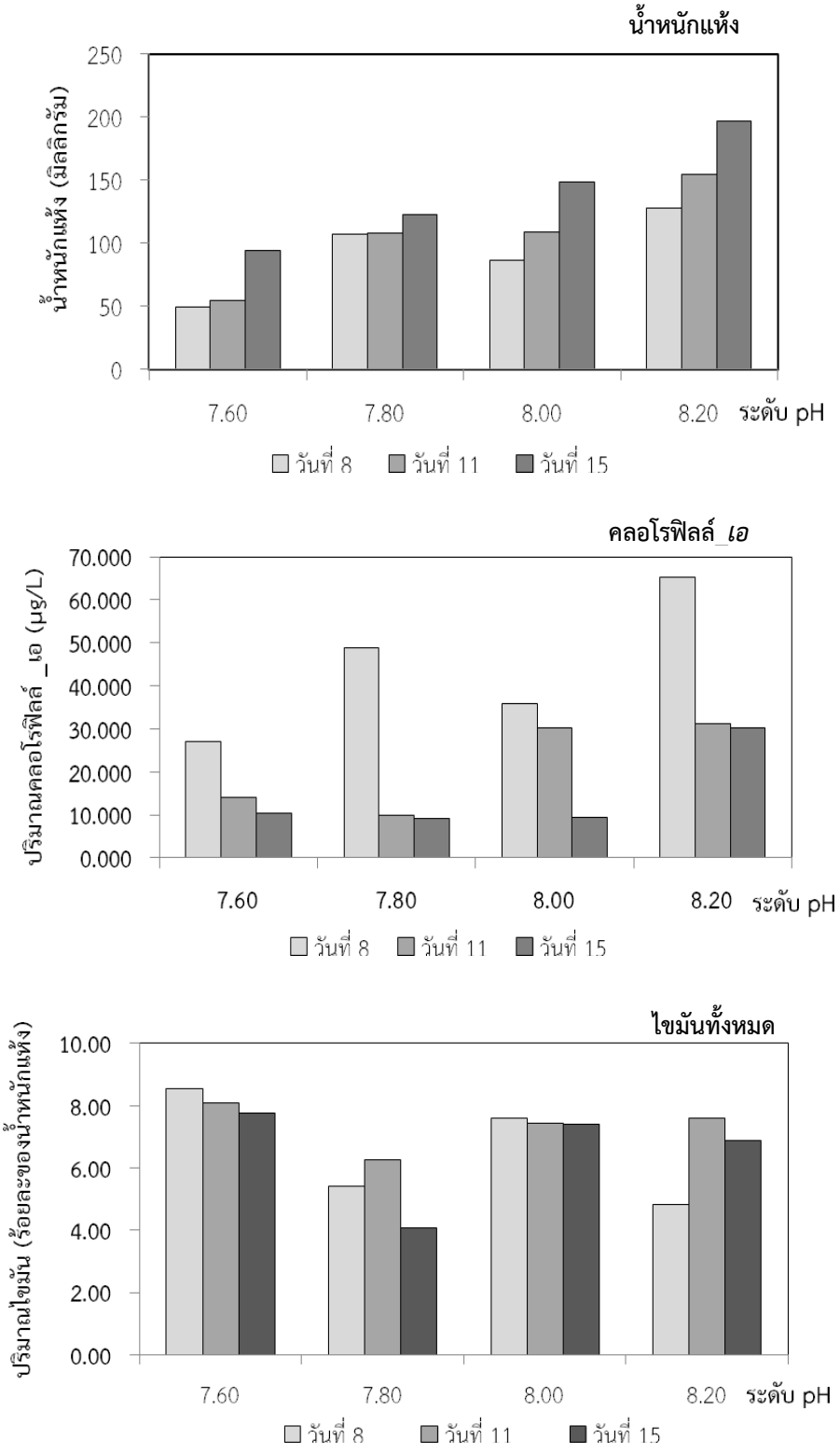
สาหร่ายขนาดเล็ก *Amphora costata* ที่นำมาศึกษามีพัฒนาอยู่ในช่วง lag phase 2 วัน จากนั้นจะเข้าสู่ระยะที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (log phase) นับจากวันที่ 3 ถึงวันที่ 8 ของการศึกษา จึงเข้าสู่ระยะ stationary phase และความหนาแน่นเริ่มลดลง และเข้าสู่ระยะ inhibition phase ในวันที่ 14 หรือ 15 ของการศึกษา (รูปที่ 6) ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าวนั้นมีการเปลี่ยนแปลง pH ในชุดการทดลองที่มีสาหร่าย โดยค่า pH ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดประมาณ 9.5 ในวันที่ 15 ของการศึกษา ในขณะที่ระดับ pH ในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ใส่สาหร่ายไม่มีการเปลียนแปลง (รูปที่ 7) มวลของสาหร่ายในรูปน้ำหนักแห้งในช่วงหลังจาก log phase มีค่าเพิ่มขึ้นจากวันที่ 8 และสูงสุดในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งสาหร่ายอยู่ในช่วงปลายของ stationary phase หรือต้น inhibition phase โดยเอะตอมที่เลี้ยงที่ pH สูง จะมีมวลชีวภาพสูงกว่าไดอะตอมที่เลี้ยงในระดับ pH ต่ำ แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ* ในช่วงวันที่ 8 ซึ่งอยู่ปลาย log phase มีค่าสูงกว่าในระยะหลังของการเติบโต คือ วันที่ 11 และวันที่ 15 ของการเติบโต ส่วนปริมาณไขมันทั้งหมด ซึ่งมีปริมาณไม่เกินร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้งนั้น สอดคล้องกับการศึกษาในไดอะตอมหลายชนิด (ตารางที่ 2) โดยที่พบไขมันสูงในสภาวะที่ pH ต่ำ และมีค่าใกล้เคียงกันในสามช่วงเวลาของการศึกษา (รูปที่ 8)



รูปที่ 6 กราฟการเติบโตของ *Amphora costata* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ f/20 ที่ระดับ pH ต่าง ๆ



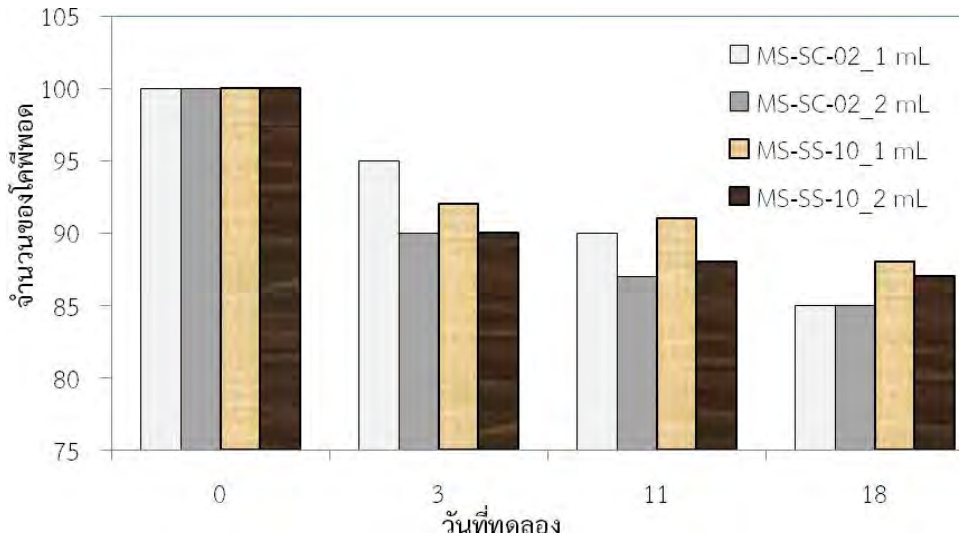
รูปที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในระบบเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Amphora costata* ที่มีค่า pH เริ่มต้นที่แตกต่างกัน



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งและองค์ประกอบทางชีวเคมีในสาหร่ายขนาดเล็ก *Amphora costata* ที่เลี้ยงในระดับ pH ที่แตกต่างกัน

5. การเติบโตของสัตว์ทะเลขนาดเล็กและ/หรือแพลงก์ตอนสัตว์ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก

ศึกษาอัตราการเติบโตของโคพีพอดกลุ่ม Harpacticoid copepods ชนิด *Microsetella* sp. m ที่แยกจากน้ำทะเลเหนือกลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาล *Padiana* sp. จากเกาะสีชัง ทั้งนี้โคพีพอดที่ใช้ศึกษาอยู่ในระยะสมบูรณ์เพศแต่ยังไม่มีถุงไข่ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสด คือ เซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กสองชนิด คือ *Amphora costata* (MS-SC-02) ที่แยกจากเกาะสีชังและ *Amphora* sp. 4 (MS-SS-10) ที่แยกจากเกาะแสมสาร โดยให้อาหารในปริมาณ 1 และ 2 มล. ต่อวัน พบว่าในวันที่ 3 ของการศึกษานั้นโคพีพอดบางตัวในแต่ละ treatment ของการศึกษามีถุงไข่ และในวันที่ 11 ของการเลี้ยงมีตัวอ่อนระยะแรกของโคพีพอด คือ นอเพลียส เกิดขึ้น ส่วนจำนวนโคพีพอดที่เริ่มเลี้ยงไว้ 100 ตัว ในแต่ละ treatment นั้น บางส่วนตายในระหว่างการศึกษาและเหลือโคพีพอดกว่าร้อยละ 80 ของจำนวนเริ่มต้นทั้งหมด (รูปที่ 9) แต่เมื่อถึงวันที่ 22 ของการศึกษานั้นโคพีพอดส่วนใหญ่ตายลงมีโคพีพอดเหลือประมาณร้อยละ 20 ของจำนวนโคพีพอดทั้งหมด ซึ่งเกิดจากการที่มีอาหารเหลือและการเปลี่ยนน้ำที่เลี้ยงสัปดาห์ละครั้งนั้นอาจไม่เพียงพอทำให้น้ำขุ่น



รูปที่ 9 ผลการศึกษาการเติบโตของโคพีพอด *Microsetella* sp. ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็กสองชนิด

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ผลการศึกษาแสดงว่าสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอมที่คัดแยกสายพันธุ์มาจากบริเวณเกาะแสมสารและเกาะสีชัง สามารถเติบโตในห้องปฏิบัติการและมีการสร้างและสะสมสารหรือองค์ประกอบทางชีวเคมีที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ เช่น รงควัตถุ และกรดไขมัน ทั้งนี้ชนิดของสารประกอบทางชีวเคมีและปริมาณที่สะสมจะเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง โดยคลอโรฟิลล์ *เอ* ซึ่งเป็นรงควัตถุหลักในสาหร่ายและพืชนั้นจะมีปริมาณสูงในช่วงที่สาหร่ายเติบโตดี ในช่วง log phase และปลาย log phase ส่วนปริมาณไขมันนั้นมีการสะสมในช่วงหลังการเติบโตแบบ exponential จนถึงระยะ inhibition phase นอกจากนี้สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงไว้ สามารถใช้เป็นอาหารของสัตว์น้ำขนาดเล็กเช่น โคพี

พอด ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นอาหารของลูกสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ หรือใช้เป็นอาหารของลูกสัตว์โดยตรงก็ได้

การศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีและการใช้ประโยชน์ของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมที่แยกได้จากระบบนิเวศชายฝั่งของเกาะแสมสารและเกาะสีชังจังหวัดชลบุรี แสดงว่าในบริเวณชายฝั่งทะเลของไทยมีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กสูงและสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นมีองค์ประกอบทางชีวเคมีที่อาจนำมาใช้ประโยชน์ทั้งด้านโภชนาการของคนและสัตว์น้ำ ด้านเภสัชกรรม รวมถึงด้านพลังงานทดแทนได้ หากแต่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณเพื่อประเมินถึงศักยภาพและประสิทธิภาพในการนำมาใช้งาน รวมถึงอนุรักษ์สายพันธุ์และความหลกาหลายทางชีวภาพ

เอกสารอ้างอิง

Anderson, R. A., Berges, J. A., Harrison, P. J. and Watanabe, M. M. 2005. Recipes for freshwater and seawater media. In: Anderson, R. A. (ed.), Algal Culturing Techniques. Elsevier, Amsterdam, pp. 429-538.

Benemann, J.R., Tillett, D.M. and Weissman, J.C. 1987. Microalgae biotechnology. Tibtech. 5:47-53.

Correa-Reyes, J.G., Sanchez-Saavedra, M., Flores-Acevedo, N. and Vasques-Pelaez. 2009. Effect of eight benthic diatoms as feed on growth of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. J. Appl. Phycol. 21:387-393.

Guillard, R. R. L. 1973. Division rates. In: J. R. Stein (ed.) Handbook of Phycological Mathods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp. 289-311.

McGinnis, K. M., Dempster, T. A. and Sommerfeld, M. R. 1997. Characterization of growth and lipid contents of the diatom *Chaetoceros mulleri*. J. Appl. Phycol. 9: 19-24.

McLachlan, J., 1973. Growth media-marine. In: J. R. Stein (ed.) Handbook of Phycological Methods: Culture methods and Growth Measurements**.** Cambridge University Press**.** pp. 25-51.

Myklestad, S. 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. J. exp. mar.Biol. Ecol. 15: 261-274.

Parsons, T.R. Stephen, K. and Strickland, J.D.H. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. J. Fish. Res. Bd. Canada 18(6):1001-1016.

Patoomyot, J., Srivilas, P. and Noiraksar, T. 2005. Fatty acids composition of 10 microalgal species. Songklanakarin J. Sci.Tech. 27(6):1179-1187.

Thomas, W.H., Siebert, D.L.R., Alden, M., Neori, A. and Eldridge, P. 1984. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. I. Introduction and *Phaedactylum tricornutum* experiment. Biomass 5:181-209.

Zaleha, K. and Jamaludin, F.I. 2010. Culture and growth of a marine Harpacticoid, *Pararobertsonia* sp. in different salinity and temperature. Sains Malaysiana 39(1): 135-140.

http://gce-lter.marsci.uga.edu/public/files/pubs/Thoresen_SEERS_2004.pdf