


ภาวะเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ระบบแบบเบตซ์และแบบต่อเนื่อง



นางสาวรัชนพร วิริยะยิ่งศิริ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

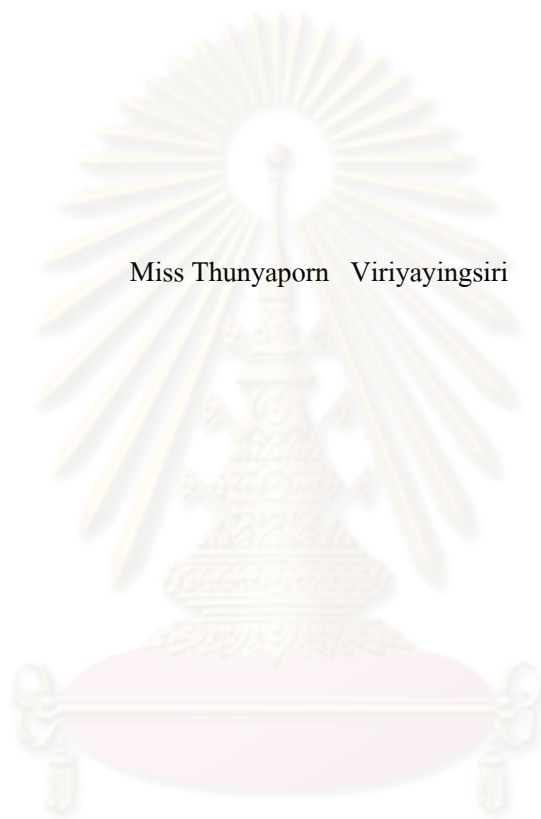
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMAL CONDITIONS FOR DIATOM *ENTOMONEIS* SP. CULTIVATION IN BATCH
AND CONTINUOUS CULTURES

Miss Thunyaporn Viriyayingsiri



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering
Department of Chemical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2009
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ภาวะเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงไคอะตอม

Entomoneis sp. ระบบแบบเบตซ์และแบบต่อเนื่อง

โดย

นางสาว รัชนพร วิริยะยั้งศิริ

สาขาวิชา

วิศวกรรมเคมี


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. กษิตศ หนูทอง

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

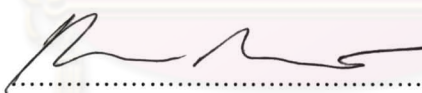
อาจารย์ ดร. สรวิศ เผ่าทองสุข

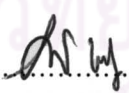
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เลิศหิรัญวงศ์)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนงค์นาฏ สมหวังชน โรจน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.กษิตศ หนูทอง)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. สรวิศ เผ่าทองสุข)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชูติมฉาน สติรพิพัฒน์กุล)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. วิภาวรรณ เลียงดั่ง)

ธัญพร วิริยะอิงศิริ : ภาวะเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Entomoneis* sp.
ระบบแบบแบตช์และแบบต่อเนื่อง (OPTIMAL CONDITIONS FOR DIATOM
ENTOMONEIS SP. CULTIVATION IN BATCH AND CONTINUOUS
CULTURES) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร. กษิตศ หนูทอง, อ. ที่ปริกษา
วิทยานิพนธ์ร่วม : อ.ดร. สรวิศ เผ่าทองสุข, 132 หน้า.

ไดอะตอม *Entomoneis* sp. เป็นไดอะตอมที่พบทั่วไปในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งข้อดีของการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Entomoneis* sp. คือเซลล์มีปริมาณไขมันสูงและสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่ายด้วยวิธีการกรองหรือการตกตะกอน งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเติบโตของไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์และแบบต่อเนื่อง โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตช์และแบบเฟดแบตช์ในขวดแก้วขนาด 1 ลิตร ผลการศึกษาพบว่าไดอะตอมสามารถเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 1.7 ต่อวัน และมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 15.69×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเมื่อเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในระบบแบบเฟดแบตช์ได้มีการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาอย่างต่อเนื่องจนมีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 11.92 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร และมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 31.48×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในขวดแก้วขนาด 5 ลิตร โดยใช้อัตราการเจือจางอยู่ในช่วง 0.58-0.70 ต่อวัน มีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 11.87×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับภาวะความเข้มข้นของสารอาหารหลักไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องพบว่ามีค่าเท่ากับ 3.09 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร 2.24 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตรและ 11.92 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ตามลำดับ ในส่วนของการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนซึ่งมีปริมาตรการทำงาน 20 ลิตรพบว่าไดอะตอมสามารถเติบโตได้ดีในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการทดลอง 17 วัน โดยมีความหนาแน่นเฉลี่ยเท่ากับ 15.43×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อปรับตั้งอัตราการเจือจางอยู่ในช่วง 0.58-0.70 ต่อวัน และมีปริมาณไขมันสะสมเท่ากับ 13.15 ± 1.05 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิติศ.....พี่แนน.....ณัฐช.สิงห์ศิริ.....
สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา.....2552.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5170577821 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : DIATOM *ENTOMONEIS* SP. / BATCH CULTURE / CONTINUOUS CULTURE / NUTRIENTS / FLAT-PLATE PHOTOBIOREACTOR

THUNYAPORN VIRIYAYINGSIRI : OPTIMAL CONDITIONS FOR DIATOM *ENTOMONEIS* SP. CULTIVATION IN BATCH AND CONTINUOUS CULTURES. THESIS ADVISOR : KASIDIT NOOTONG, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : SORAWIT POWTONGSOOK, Ph.D., 132 pp.

Entomoneis sp. is a diatom that occasionally bloom in aquaculture pond in Thailand. The advantage of *Entomoneis* sp. cultivation is that it has high lipids content and harvesting can be easily performed by simple filtration or sedimentation. This research, therefore, aims to study the optimal culture condition and determine the appropriate nutrient composition to enhance growth of *Entomoneis* sp. in batch and continuous cultures. The experiment started with batch and fed-batch culture conditions in 1-L Duran glass bottles. The results showed that the diatom grew well in F/2 medium with specific growth rate of 1.70 day^{-1} and maximum density of 15.69×10^4 cells/ml in batch culture. With fed-batch mode, however, *Entomoneis* sp. could reach the maximum cell density as high as 31.48×10^4 cells/ml when silica was repeatedly added during the cultivation and the total concentration was 11.92 mg-Si/L. Continuous culture of *Entomoneis* sp. in 5-L Duran glass bottle with the dilution rate between $0.58\text{-}0.70 \text{ day}^{-1}$ provided an average cell density of 11.87×10^4 cells/ml. The appropriate concentration of nitrogen, phosphorous, and silica concentrations in modified F/2 medium for continuous culture was 3.09 mg-N/L, 2.24 mg-P/L, and 11.92 mg-Si/L, respectively. Finally, *Entomoneis* sp. was cultured in 20 L flat-plate photobioreactor with modified F/2 medium. It was found that the average cell density of 15.43×10^4 cells/ml was obtained during 17 days experiment at $0.58\text{-}0.7 \text{ day}^{-1}$ dilution rate and the lipid content was 13.15 ± 1.05 % dry weight.

Department :	Chemical Engineering.....	Student's Signature	<i>Thunyaporn Viriyayingsiri</i>
Field of Study : ..	Chemical Engineering.....	Advisor's Signature	<i>[Signature]</i>
Academic Year :	2009.....	Co-Advisor's Signature	<i>[Signature]</i>

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. กษิธิศ หนูทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร. สรวิศ เผ่าทองสุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ชี้แนะให้ความรู้ คำแนะนำ และ คำปรึกษา ตลอดจนได้ให้ความช่วยเหลือในแต่ละขั้นตอนของการทำงานวิจัย รวมทั้งตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนงค์นาฏ สมหวังชน โรจน์ ประธานกรรมการ สอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ชุติมฉนน์ สติรพิพัฒน์กุลและ อาจารย์ ดร. วิภาวรรณ เสียงด้ง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจทานวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำทำให้ วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่สำหรับทำการวิจัย และตลอดจน ให้ความกรุณาสำหรับเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และตลอดจนคำแนะนำในการวิเคราะห์ทาง วิทยาศาสตร์ด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้กรุณามอบความรู้อันเป็นประโยชน์ คำแนะนำ และ ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการศึกษา ณ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการทำวิจัยวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ ให้ความช่วยเหลือในด้านเงินทุนสำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ปิณดา พี่นฤมล และพี่รุ่งนภา ที่ได้ให้คำแนะนำในเรื่องเทคนิคการวิเคราะห์ คุณภาพน้ำ การจัดหาหัวเชื้อไดอะตอม และเทคนิคการเพาะเลี้ยง ตลอดจนการใช้เครื่องมือต่างๆ และขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกคน ที่ได้ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จ ลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ จากภาควิชาวิศวกรรมเคมี สำหรับมิตรภาพ กำลังใจ ตลอดจนความ ช่วยเหลือทั้งในด้านการเรียนและในด้านการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่มอบความรัก กำลังใจ และสนับสนุน ข้าพเจ้าในทุกๆ ด้าน ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 สันฐานวิทยาและลักษณะทั่วไปของไคอะตอม.....	4
2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย.....	8
2.3 อาหารเลี้ยงสาหร่าย.....	13
2.4 รูปแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	15
2.5 ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	17
2.6 วิธีการวัดการเจริญเติบโต.....	25
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	26
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	29
3.1 การศึกษาการเติบโตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp.....	30
3.2 การศึกษาอัตราการเติบโตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง.....	36
3.3 การศึกษาอัตราการเติบโตและปริมาณไขมันของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร.....	39
3.4 การวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมี.....	44

บทที่	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	48
4.1 การศึกษาการเติบโตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp.....	48
4.2 การศึกษาอัตราการเติบโตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในสภาวะการเพาะเลี้ยง แบบต่อเนื่อง.....	66
4.3 การศึกษาอัตราการเติบโตและปริมาณไขมันของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในถัง ปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร.....	75
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	81
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	81
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	83
รายการอ้างอิง.....	84
ภาคผนวก.....	91
ภาคผนวก ก.....	92
ภาคผนวก ข.....	93
ภาคผนวก ค.....	95
ภาคผนวก ง.....	97
ภาคผนวก จ.....	100
ภาคผนวก ฉ.....	118
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	132

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับความเข้มแสงสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	9
2.2	ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับช่วงอุณหภูมิสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	9
2.3	ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับค่าความเป็นกรด-ด่างและความเค็มสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	10
2.4	ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสูตรอาหารและภาวะของสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	14
2.5	ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่อง.....	17
2.6	คุณสมบัติและข้อจำกัดสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	22
2.7	ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบเปิด.....	23
2.8	ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิด.....	23
2.9	ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสัดส่วนของ Riser ต่อ Downcomer ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	24
2.10	แหล่งที่มาและปริมาณไขมันจากพืช.....	27
2.11	ปริมาณไขมันที่พบในจุลสาหร่าย.....	27
2.12	องค์ประกอบทางชีวเคมีของไคอะตอม <i>Entomoneis cf. punctulata</i>	28
2.13	ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับพลังงานทางเลือกจากสาหร่าย.....	28
3.1	ตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลอง.....	31
3.2	ตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลอง.....	31
4.1	อัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์.....	52
4.2	อัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟอสฟอรัส และซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์.....	56
4.3	อัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบคซ์.....	60
4.4	อัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์.....	63
4.5	ความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจริญเฉลี่ยน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องครั้งที่ 1.....	68

4.6	ความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจริญเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์ใต้อะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องครั้งที่ 2.....	72
4.7	ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจริญเฉลี่ย น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์ใต้อะตอม ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน.....	76
จ-1	ความหนาแน่นเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในการเพาะเลี้ยงใต้อะตอม <i>Entomoneis</i> sp. แบบเบดซ์ จากผลการทดลอง ในหัวข้อที่ 4.1.2.....	100
จ-2	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดเบดซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาเท่ากับ $F/2+5N$ ในหัวข้อที่ 4.1.3.....	101
จ-3	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดเบดซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 5N + 3.97$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.3.....	102
จ-4	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดเบดซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 5N + 2P + 3.97$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.3.....	103
จ-5	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดเบดซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นฟอสฟอรัสและซิลิกา ในหัวข้อที่ 4.1.4.....	104
จ-6	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดเบดซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นฟอสฟอรัสและซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 1.12$ มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.4.....	105
จ-7	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดเบดซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นฟอสฟอรัสและซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 3.97$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.4.....	106

จ-8	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคต์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้น ฟอสฟอรัสและซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 1.12$ มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร·วัน และ $+ 3.97$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.4.....	107
จ-9	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบคต์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 7.94$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ในหัวข้อที่ 4.1.5.....	108
จ-10	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบคต์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 11.92$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ในหัวข้อที่ 4.1.5.....	109
จ-11	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคต์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นซิลิกา ในหัวข้อที่ 4.1.6.....	110
จ-12	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคต์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 0.397$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.6.....	111
จ-13	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคต์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นซิลิกา $F/2 + 0.794$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.6.....	112
จ-14	ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคต์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นซิลิกาเท่ากับ 1.192 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.6.....	113
จ-15	ความหนาแน่นเซลล์โคอะตอมในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคต์ที่มีหัวเชื้อโคอะตอมที่ความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 1 เท่าของสูตรปรกติ ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 1.192 1.59 และ 1.86 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ตามลำดับ ในหัวข้อที่ 4.1.6.....	114
จ-16	การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกาก่อนและหลังการเติมซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคต์ที่มีหัวเชื้อโคอะตอมที่ความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 1 เท่าของสูตรปรกติ ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 1.192 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.6.....	115

จ-17	การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซัลฟิคาก่อนและหลังการเติมซัลฟิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดเบคท์ที่มีหัวเชื้อ ไคอะตอมที่ความเข้มข้นของซัลฟิกาเท่ากับ 1 เท่าของสูตรปรกติ ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของซัลฟิกาเท่ากับ 1.590 มิลลิกรัม ซัลฟิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.6.....	116
จ-18	การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซัลฟิคาก่อนและหลังการเติมซัลฟิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดเบคท์ที่มีหัวเชื้อ ไคอะตอมที่ความเข้มข้นของซัลฟิกาเท่ากับ 1 เท่าของสูตรปรกติ ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของซัลฟิกาเท่ากับ 1.860 มิลลิกรัม ซัลฟิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.6.....	117
ฉ-1	การคำนวณอัตราการไหล (มิลลิลิตร) และอัตราการเจือจาง (ต่อวัน) ของปั๊มแบบรีดสาย (Peristaltic Pump) ในระบบแบบต่อเนื่อง ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2.....	118
ฉ-2	ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจือจาง น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์ ไคอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องครั้งที่ 1.....	119
ฉ-3	การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซัลฟิกาของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ครั้งที่ 1.....	121
ฉ-4	ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจือจาง น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตเซลล์ไคอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องครั้งที่ 2.....	124
ฉ-5	การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซัลฟิกาของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ครั้งที่ 2.....	126
ฉ-6	การคำนวณอัตราการไหล (มิลลิลิตร) และอัตราการเจือจาง (ต่อวัน) ของระบบเครื่องสูบลมที่ใช้ไคอะแฟรม (Diaphragm dosing pump) ในการเพาะเลี้ยงไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. แบบต่อเนื่อง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน...	129
ฉ-7	ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจือจาง น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน.	130
ฉ-8	การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซัลฟิกาของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน...	131

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างฟรุตของไคอะตอม.....	5
2.2	ลักษณะของไคอะตอม (ก.) กลุ่มเซนตริก (ข.) กลุ่มเพนเนต.....	5
2.3	ตัวอย่างของบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบเปิด (1) Raceway pond (2) Circular ponds.....	18
2.4	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบน (Flat-plate photobioreactor).....	20
2.5	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบท่อยาว (Tubular photobioreactor).....	21
2.6	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพถังปฏิกรณ์รูปทรงกระบอกแนวตั้ง (Vertical-column photobioreactor).....	21
2.7	กราฟการเติบโตของสาหร่าย.....	25
3.1	แผนผังสรุปการทดลองในช่วงที่ 1.....	30
3.2	หัวเชื้อไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp.....	32
3.3	ภาพถ่ายแสดงระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. แบบแบดซ์.....	33
3.4	แผนผังสรุปการทดลองในช่วงที่ 2.....	36
3.5	แผนภาพ (ซ้าย) และ ภาพถ่าย (ขวา) แสดงระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. แบบต่อเนื่องในขวดแก้วขนาด 5 ลิตร.....	38
3.6	แผนผังสรุปการทดลองในช่วงที่ 3.....	39
3.7	แผนภาพระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. แบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนขนาด 20 ลิตร.....	41
3.8	ภาพถ่ายระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. แบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนขนาด 20 ลิตร.....	41
3.9	ภาพถ่าย (ซ้าย) และ แผนภาพ (ขวา) แสดงถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร.....	42
3.10	แผนภาพลักษณะการไหลวนของของไหลภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร.....	43
3.11	ภาพถ่ายระบบการกรองเก็บเกี่ยวเซลล์ไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. (1) ลักษณะไส้กรองแบบจีบ (2) เครื่องกรองแบบแบ่งส่วน.....	44
4.1	การเติบโตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบดซ์ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2.....	49

4.2	ปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซัลเฟตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบคทีเรียในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2.....	50
4.3	การเติบโตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซัลเฟต.....	52
4.4	ปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซัลเฟต ในอาหารเพาะเชื้อเหลวสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซัลเฟต.....	54
4.5	การเติบโตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. แบบเฟดแบคทีเรียในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เติมฟอสฟอรัสและซัลเฟตความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร และ 3.97 มิลลิกรัมซัลเฟตต่อลิตร วันละหนึ่งครั้งทุกวัน.....	56
4.6	ปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซัลเฟต ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เติมฟอสฟอรัสและซัลเฟตความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร และ 3.97 มิลลิกรัมซัลเฟตต่อลิตร ทุกวัน ตามลำดับ.....	58
4.7	การเติบโตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของซัลเฟตเป็น 7.94 (2 เท่า) และ 11.92 (3 เท่า) มิลลิกรัมซัลเฟตต่อลิตร ตามลำดับ.....	60
4.8	ปริมาณซัลเฟตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของซัลเฟตเป็น 7.94 (2 เท่า) และ 11.92 (3 เท่า) มิลลิกรัมซัลเฟตต่อลิตร ตามลำดับ.....	61
4.9	การเติบโตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. โดยใช้หัวเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร F/2 ที่มีซัลเฟตสูง 5 เท่า นำมาเลี้ยงแบบเฟดแบคทีเรียโดยมีการเติมซัลเฟตความเข้มข้น 0.397 0.794 และ 1.192 มิลลิกรัมซัลเฟตต่อลิตร ทุกวัน.....	62
4.10	การเติบโตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. โดยใช้หัวเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ปรกติ นำมาเลี้ยงแบบเฟดแบคทีเรียโดยมีการเติมซัลเฟตความเข้มข้น 1.192 1.59 และ 1.986 มิลลิกรัมซัลเฟตต่อลิตร ทุกวัน.....	63
4.11	ปริมาณซัลเฟตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการเติมซัลเฟตความเข้มข้น 0.397 0.794 และ 1.192 มิลลิกรัมซัลเฟตต่อลิตร ทุกวัน.....	65
4.12	ปริมาณซัลเฟตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ก่อนการเติมซัลเฟตความเข้มข้น 1.192 1.59 และ 1.986 มิลลิกรัมซัลเฟตต่อลิตรทุกวัน....	65
4.13	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดระหว่างการเพาะเลี้ยงไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ด้วยระบบแบบแบคทีเรียและแบบเฟดแบคทีเรีย.....	66

4.14	ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจริญในการเพาะเลี้ยง ไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ในการทดลองครั้งที่ 1.....	67
4.15	ปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิเกตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในระบบ การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในการทดลองครั้งที่ 1.....	69
4.16	ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจริญในการเพาะเลี้ยง ไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ในการทดลองครั้งที่ 2.....	71
4.17	ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจริญของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ในการทดลองครั้งที่ 2.....	71
4.18	ปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิเกตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในระบบการ เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในการทดลองครั้งที่ 2.....	74
4.19	ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจริญในการเพาะเลี้ยง ไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง แบบแผ่นแบน.....	76
4.20	ปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิเกตของไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp. ในระบบการ เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน.....	78
4.21	ภาพถ่ายแสดงระบบการกรองเก็บเกี่ยวเซลล์ไคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp.....	80
ง-1	สไลด์นับเม็ดเลือดของ American Optical.....	97
ง-2	กราฟมาตรฐานสารละลายไนเตรท ที่มีความเข้มข้น 0 0.5 0.8 1.0 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมไนโตรเจน-ไนเตรทต่อลิตร.....	98
ง-3	กราฟมาตรฐานสารละลายฟอสเฟต ที่มีความเข้มข้น 0 0.0186 0.093 0.372 และ 0.744 มิลลิกรัมฟอสฟอรัส-ฟอสเฟตต่อลิตร.....	99
ง-4	กราฟมาตรฐานสารละลายซิลิเกต ที่มีความเข้มข้น 0 0.02987 0.05974 0.14935 0.2987 1.4935 และ 2.987 มิลลิกรัมซิลิกา-ซิลิเกตต่อลิตร.....	99

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ในปัจจุบันทั่วโลกกำลังประสบปัญหาด้านวิกฤติพลังงานเนื่องมาจากมีความต้องการพลังงานทั้งในภาคอุตสาหกรรม ภาคเกษตร และภาคครัวเรือน ด้วยเหตุนี้หลายประเทศจึงเริ่มต้นตัวในการศึกษาแหล่งพลังงานทดแทนเพื่อเป็นทางเลือกแก่วิกฤติด้านพลังงานซึ่งการผลิตไบโอดีเซลจากจุลสาหร่าย (microalgae) เป็นหนึ่งในทางเลือกที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากจุลสาหร่ายมีการสะสมกรดไขมันในปริมาณสูง จึงคาดว่าจะมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตพลังงานชีวภาพ นอกจากนี้จุลสาหร่ายยังมีข้อได้เปรียบในด้านของการเพาะเลี้ยงซึ่งสามารถทำได้ทุกฤดูกาลเพียงมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมไม่ว่าจะเป็นแสงแดด แหล่งน้ำหรืออุณหภูมิ ไม่จำเป็นต้องใช้พื้นที่สำหรับเพาะเลี้ยงมากนัก และใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นซึ่งทำให้สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เร็วเมื่อเทียบกับพืชพลังงานอื่นๆ (Chisti, 2007) นอกจากนี้แล้วชีวมวลของจุลสาหร่ายยังสามารถย่อยสลายได้ง่าย ซึ่งแตกต่างจากชีวมวลพืชที่มีโครงสร้างที่ทลายได้ยากจึงทำให้มีของเสียหลงเหลือจากกระบวนการผลิตเกิดขึ้นมาก

ไดอะตอมเป็นจุลสาหร่ายชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างเปลือกหุ้มเซลล์ประกอบไปด้วยซิลิกาและภายในเซลล์มีปริมาณไขมันสูง โดยไขมันที่เกิดจะมีปริมาณแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาวะการเติบโต ไดอะตอมสามารถเติบโตได้ง่ายและเซลล์สามารถเติบโตในระยะคงที่ได้เป็นเวลานาน รวมทั้งทนต่อสภาวะแวดล้อมที่มีความเป็นกรดต่างและทนต่อน้ำที่มีระดับความเค็มสูงกว่าน้ำทะเลได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับพืชพลังงานชนิดอื่นจะพบว่าไดอะตอมมีศักยภาพในการนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นแหล่งพลังงานได้สูงกว่าถึง 30 เปอร์เซ็นต์ (Mata *et al.*, 2010) จึงคาดว่าจะมีศักยภาพในการนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ

Entomoneis sp. เป็นไดอะตอมที่พบทั่วไปในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางโครงสร้างทำให้พบว่ามีไขมันสูงถึง 43 เปอร์เซ็นต์ (Whyte, 1987) นอกจากนี้ไดอะตอม *Entomoneis* sp. ยังมีเซลล์ขนาดใหญ่ซึ่งง่ายต่อการตกตะกอนและเก็บเกี่ยวผลผลิต อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับไดอะตอมชนิดนี้โดยเฉพาะปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมยังมีจำนวนจำกัดและไม่เป็นที่แพร่หลาย จึงทำให้ขาดข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงไดอะตอมชนิดนี้อยู่มาก ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการพัฒนาศักยภาพเพื่อผลิตเป็นพลังงานทดแทนต่อไป

จากปัญหาดังกล่าวจึงนำไปสู่การวางแผนและออกแบบระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ให้มีอัตราผลผลิตสูงขึ้น รวมถึงการศึกษาปริมาณสารอาหารในอาหารเพาะเชื้อให้เหมาะสมและเพียงพอต่อการเติบโต การศึกษานี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ทั้งในแบบแบตช์ (Batch) แบบเฟดแบตช์ (Fed-batch) และแบบต่อเนื่อง (Continuous) โดยทำการปรับปริมาณสารอาหารในอาหารเพาะเชื้อ ภาวะเหมาะสมที่ได้จากการทดลองจะนำมาประยุกต์ในการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน (Flat-Plate Photobioreactor) ซึ่งถูกออกแบบเพื่อแก้ไขปัญหาเรื่องการจำกัดปริมาณแสงและการกระจายตัวของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันภายในเซลล์ไคอะตอม *Entomoneis* sp. จากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ทั้งนี้ ข้อมูลที่ได้รับจะเป็นพื้นฐานในการพัฒนาระบบผลิตที่มีขนาดใหญ่ขึ้นในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาภาวะและปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ แบบเฟดแบตช์ และแบบต่อเนื่อง
- 1.2.2 เพื่อนำภาวะเหมาะสมของปริมาณสารอาหารดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ด้วยระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน (Flat-Plate Photobioreactor)
- 1.2.3 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไขมันภายในเซลล์ไคอะตอม *Entomoneis* sp. จากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

สถานะในการเพาะเลี้ยงเป็นสภาวะภายใต้ห้องปฏิบัติการ ความเข้มแสงที่ได้จากหลอดฟลูออเรสเซนต์อยู่ที่ 5,000-6,000 ลักซ์ แหล่งคาร์บอนไดออกไซด์มาจากการให้อากาศผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Gelman Acrodisc 50) ส่วนอัตราการไหลของอากาศอยู่ที่ 45-50 ลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งขอบเขตของงานวิจัยมีดังต่อไปนี้

- 1.3.1 ทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบแบตช์ และเฟดแบตช์ ในขวดแก้ว Duran ขนาด 1 ลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องทำการทดลองในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของ

สารอาหารหลักซึ่งพัฒนาจากสูตร F/2 ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกา ที่เหมาะสมต่อการเติบโตของไคอะตอม

- 1.3.2 ทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร ด้วยภาวะเหมาะสมของปริมาณสารอาหารซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบแบบต่อเนื่อง
- 1.3.3 ทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันที่สะสมภายในไคอะตอม *Entomoneis* sp. จากการเพาะเลี้ยงด้วยภาวะของปริมาณสารอาหารหลักที่ได้จากระบบแบบต่อเนื่อง
- 1.3.4 ตัวแปรหลักที่ใช้ในการติดตามผลการทดลองประกอบด้วย (1) ความหนาแน่นของเซลล์ (2) น้ำหนักเซลล์แห้ง และ (3) ความเข้มข้นของสารอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกา
- 1.3.5 ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ แบบเฟดแบตช์และแบบต่อเนื่องเท่ากับ $1-2 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องทำการควบคุมอัตราการเจือจางอยู่ในช่วง 0.58-0.7 ต่อวัน

1.4 ประโยชน์จากงานวิจัย

- 1.4.1 ได้รับแนวทางในการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. รวมทั้งไคอะตอมหรือจุลสาหร่ายอื่นๆ
- 1.4.2 เนื่องจากไคอะตอม *Entomoneis* sp. ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก ข้อมูลที่ได้จึงสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สัณฐานวิทยาและลักษณะทั่วไปของไดอะตอม

การจัดเรียงตามลำดับอนุกรมวิธานของไดอะตอมตั้งแต่ดิวิชันลงไปจนถึงระดับสกุล ซึ่งยึดตามหลักการจำแนกของลัดดา วงศ์รัตน์ (2542)

Division Chromophyta

Class Bacillariophyceae

Order Bacillariales

Suborder Bacillariineae

Family Surirellaceae

Genus *Entomoneis*

โดยทั่วไปไดอะตอม *Entomoneis* เดิมมีชื่อว่า *Amphiproa* เป็นสกุลที่มักพบในน้ำกร่อย และน้ำเค็ม มีเพียง 2-3 ชนิดเท่านั้นที่พบในน้ำจืด

2.1.1 โครงสร้างภายนอกของไดอะตอม

ไดอะตอมเป็นจุลสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดหนึ่ง มีขนาดเซลล์ตั้งแต่ 1-500 ไมครอน ไดอะตอมมีลักษณะเด่นคือ ผนังเซลล์มีซิลิกา เป็นส่วนประกอบและทำให้เกิดลวดลายบนฝาที่แตกต่างกันตามชนิดของไดอะตอม ไดอะตอมหนึ่งเซลล์ประกอบด้วยฝาสองฝาที่สามารถครอบกันได้พอดีคล้ายจานเลี้ยงเชื้อ โดยเรียกว่า ฟรัสตุล (frustule) ฝาบนเรียกว่า อีพิทิกา (epitheca) ประกอบด้วยอีพิวาล์ว (epivalve) และอีพิซิงกูลัม (epicingulum) ฝาล่างเรียกว่า ไฮโปทีกา (hypotheca) ประกอบด้วยไฮโปวาล์ว (hypovalve) และไฮโปซิงกูลัม (hypocingulum) ทั้งส่วนที่เป็นอีพิซิงกูลัมและไฮโปซิงกูลัมสามารถเรียกรวมกันได้ว่า เกอร์เดิล (girdle) ซึ่งเป็นด้านข้างที่เป็นขอบของฝาบนและฝาล่างครอบกันอยู่ และมีแถบหลายๆแถบ เรียกว่า อินเทอร์คาลารีแบนด์ (intercalary band) โครงสร้างฟรัสตุลของไดอะตอมแสดงดังรูปที่ 2.1

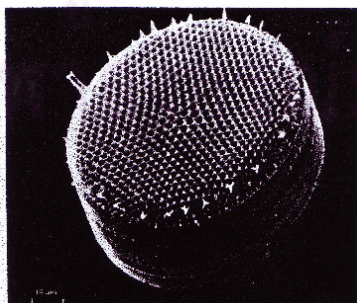


รูปที่ 2.1 โครงสร้างฟอสซิลของไดอะตอม (Van den Hock *et al.*, 1995
อ้างถึงใน มะลิวัลย์ คุตะ โค, 2004)

ลักษณะโครงสร้างของฟอสซิลของไดอะตอมสามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดของไดอะตอมได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.1.1.1 เซนตริกไดอะตอม (centric diatom) ลักษณะฟอสซิลของไดอะตอมกลุ่มนี้ส่วนมากมีรูปร่างทางด้านหน้าฝายเป็นรูปร่างกลม ซึ่งมีสมมาตรแบบรัศมี (radial symmetry) ไดอะตอมบางสกุลอาจมีรูปร่างทางด้านหน้าฝายเป็นรูปสามเหลี่ยม สี่เหลี่ยมหรือครึ่งวงกลม ด้านเกอร์เดิลหรือด้านข้างมักเป็นรูปสี่เหลี่ยม ลวดลายบนฝามักเรียงกันในแนวรัศมีโดยยึดศูนย์กลางของฝายเป็นหลัก ลักษณะของไดอะตอมกลุ่มเซนตริกแสดงดังรูปที่ 2.2 (ก.)

2.1.1.2 เพนเนตไดอะตอม (pennate diatom) เป็นไดอะตอมกลุ่มที่มีสมมาตรแบบสองด้าน (bilateral symmetry) ด้านหน้าฝายของไดอะตอมมีร่องแคบ (slit) พาดตามยาวเรียกร่องนี้ว่า ราฟี (raphe) ตลอดแนวของร่องราฟียาวไม่ติดกัน แต่จะแบ่งออกเป็นสองช่วง เนื่องจากกึ่งกลางของฝามีตุ่มหนาที่เกิดขึ้นจากการฝังตัวของซิลิกาบนผนังเซลล์เรียกว่า เซนทรัล โนดูล (central nodule) ลักษณะของไดอะตอมกลุ่มเพนเนตแสดงดังรูปที่ 2.2 (ข.)



(ก.)



(ข.)

รูปที่ 2.2 ลักษณะของไดอะตอม (ก.) กลุ่มเซนตริก (ข.) กลุ่มเพนเนต

(Van den Hock *et al.*, 1995 อ้างถึงใน มะลิวัลย์ คุตะ โค, 2004)

2.1.2 องค์ประกอบภายในเซลล์ของไดอะตอม

องค์ประกอบภายในเซลล์ของไดอะตอมประกอบด้วยออร์แกเนลล์ (organelle) ต่างๆ คล้ายกับสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตชนิดอื่น โดยออร์แกเนลล์ถูกล้อมรอบด้วยโปรโตพลาสต์ ภายในโปรโตพลาสต์ (protoplast) ประกอบด้วย นิวเคลียส (nucleus) คลอโรพลาสต์ (chloroplast) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) กอลจิแอปพาราตัส (golgi apparatus) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) ไรโบโซม (ribosome) และแวคคิวโอล (vacuole) ตำแหน่งที่พบนิวเคลียสเป็นบริเวณกึ่งกลางเซลล์ คลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็นแผ่นจำนวน 1-4 แผ่น หรืออาจมีลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ จำนวนมาก สีของคลอโรพลาสต์แตกต่างกันตามชนิดของไดอะตอม เช่น สีเหลือง สีน้ำตาลแกมเขียว จนถึงสีน้ำตาลเข้ม พื้นที่ภายในเซลล์ส่วนใหญ่เป็นช่องว่างเรียกว่า แวกคิวโอล อาจมีจำนวน 1-2 ช่อง อาหารสะสมของไดอะตอมส่วนมากอยู่ในรูปของหยดน้ำมัน (oil droplet) ซึ่งมองเห็นได้อย่างชัดเจนในเซลล์ที่ยังมีชีวิต นอกจากนี้ยังพบว่าภายในเซลล์ของไดอะตอมประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลหลายชนิดดังนี้

2.1.2.1 โปรตีน (protein) โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยๆ ที่เรียกว่า กรดอะมิโน (amino acid) ไดอะตอมมีโปรตีนหลายชนิดเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ ซึ่งความแตกต่างของชนิดและปริมาณโปรตีนจะขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมของไดอะตอมแต่ละชนิดและสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม โดยเซลล์ไดอะตอมมีการผลิตกรดอะมิโนชนิดเซอรีน (serine) มากที่สุด รองลงมาคือ ไกลซีน (glycine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) และกรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) ตามลำดับ (Chau *et al.*, 1967)

2.1.2.2 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เมื่อไดอะตอมเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) จะผลิตและปลดปล่อยโพลีแซคคาไรด์ออกมาภายนอกเซลล์ในรูปของเจลาติน (gelatin) ทำให้มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวห่อหุ้มเซลล์เรียกว่า แคปซูล (capsule) ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของแคปซูลที่ไดอะตอมผลิตขึ้นจะแตกต่างกันไปตามชนิดของไดอะตอม เช่น แคปซูลของไดอะตอม *Phaeodactylum tricornutum* ประกอบด้วย แมนโนส (mannose) กาแลคโตส (galactose) และไซโลส (xylose) ส่วนไดอะตอม *Navicula pelliculosa* มีแคปซูลที่ประกอบด้วยกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) หลายๆ โมเลกุลมาเชื่อมต่อกัน (Lewin, 1955)

2.1.2.3 ไขมัน (lipid) ชนิดของไขมันภายในเซลล์ไดอะตอมมีความคล้ายคลึงกับสาหร่ายสีเขียวและพวกพืชชั้นสูง ไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในไดอะตอมได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) เลซิธิน (Lecithin) ฟอสโฟดีลิลกลีเซอรอล

(phosphotidyl glycerol) และฟอสโฟติดิลอิโนซิทอล (phosphotidyl inositol) กรดไขมันที่พบใน ไดอะตอมประกอบด้วย กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่มีคาร์บอน 14, 16 และ 20 อะตอม เป็นองค์ประกอบ ในขณะที่การผลิตกรดไขมันลิโนเลนิก (linolenic acid, C18:3) ของไดอะตอมมีปริมาณน้อยมาก

2.1.2.4 รังควัตถุ (pigment) ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ ไดอะตอมมีคลอโรฟิลล์-เอและคลอโรฟิลล์-ซี สหายชนิดต่างๆ รวมทั้งไดอะตอมมีปริมาณ คลอโรฟิลล์-เอ ร้อยละ 0.3-2 ของน้ำหนักแห้ง ส่วนคลอโรฟิลล์-ซี ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์-ซี₁ และคลอโรฟิลล์-ซี₂ ในเซลล์ไดอะตอมมีอัตราส่วนระหว่าง คลอโรฟิลล์-ซี₁ ต่อซี₂ เท่ากับ 1 เสมอ แต่บางครั้งอัตราส่วนดังกล่าวอาจมีมากหรือน้อยกว่า 1 ก็ได้ ซึ่งจะขึ้นกับชนิดของไดอะตอม ปริมาณ คลอโรฟิลล์-ซี ในไดอะตอมเท่ากับ ร้อยละ 11-37 ของปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ส่วน แคโรทีนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบของไดอะตอมสองประเภทคือ ประเภทแคโรทีน ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) และแอบซิลอน-แคโรทีน (E -carotene) ประเภทแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ได้แก่ ฟูโคแซนทิน (fucoxanthin) ไดอะโตแซนทิน (diatoxanthin) แต่เนื่องจากปริมาณของแคโรทีนอยด์และแซนโทฟิลล์มากกว่าคลอโรฟิลล์ จึงทำให้สีของคลอโรพลาสต์มีสีตั้งแต่เหลือง เหลืองแกมเขียว เขียวมะกอก เหลืองอมน้ำตาล น้ำตาลอ่อน น้ำตาลทอง จนถึงสีน้ำตาลเข้ม

เซลล์ไดอะตอม (Diatom) ที่พบในทะเล เมื่อตายลงจะตกตะกอน โดยผนังเซลล์ของ ไดอะตอมซึ่งมีสารซิลิกาเป็นองค์ประกอบจะสลายตัวได้ยากทำให้เกิดการทับถมกันนานนับล้านปี และกลายเป็นส่วนของพื้นดิน เรียกซากเหล่านี้ว่า ไดอะโตไมท์ หรือ ไดอะโตมาเซียสเอิร์ท (diatomaceous earth) ประกอบด้วยสารซิลิกอนไดออกไซด์ประมาณ 95% นำมาใช้ประโยชน์ใน อุตสาหกรรมได้ เช่น ผลิตภัณฑ์ เครื่องกรองน้ำยาต่างๆ เนื่องจากไม่ทำปฏิกิริยากับสารกรอง อีกทั้งยังเป็นแหล่งรวมของแร่ธาตุและน้ำมัน

2.1.3 การสืบพันธุ์

การสืบพันธุ์ของไดอะตอมมี 2 แบบ คือ แบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบ ไม่อาศัยเพศโดยการแบ่งเซลล์ (binary fission) ฝาของเซลล์เดิมจะถูกแยกไปเซลล์ใหม่ 2 เซลล์ ฝานี้จะไปเป็นฝาบน (epitheca) ส่วนฝาล่างแต่ละเซลล์จะสร้างขึ้นมาใหม่ เนื่องจากฝาล่างของเซลล์แม่ (hypotheca) จะเปลี่ยนเป็นฝาบนของเซลล์ลูก ดังนั้นจำนวนไดอะตอมส่วนใหญ่จึงมีขนาดของเซลล์เล็กลงเรื่อยๆตามจำนวนครั้งของการแบ่งเซลล์ ยกเว้นบางชนิดที่มีผนังเซลล์ยืดหยุ่นตัวดีเท่านั้นที่สามารถคงขนาดของเซลล์เป็นเวลานาน เมื่อสามารถแบ่งเซลล์ได้อีกจึงมีการ

สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สร้างออกโซสปอร์ (auxospore) ซึ่งมีขนาดใหญ่ซึ่งเกิดจากไซโกต (zygote) และใน (resting spore) ที่มีคุณสมบัติทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ด้วย

การสืบพันธุ์ ส่วนใหญ่ไคอะตอมสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแบ่งเซลล์ในแนวนานกับฝาเดิมก่อนการแบ่งเซลล์ เซลล์จะยืดยาวออกทำให้ขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้นเล็กน้อย นิวเคลียสแบ่งตัวแบบไมโทซิส เมื่อนิวเคลียสแบ่งตัวเสร็จแล้ว ฝาใหม่ 2 ฝาจะถูกสร้างขึ้นในบริเวณฝาเดิม เซลล์หลักจะแบ่งโปรโตพลาสต์ออกเป็น 2 ส่วน ฉะนั้นเซลล์จะถูกประกอบด้วยโปรโตพลาสต์ของฝาใหม่ 1 ฝา และฝาเดิมจากเซลล์แม่อีก 1 ฝา ระยะแรกฝาใหม่จะลอยอยู่อย่างอิสระภายในเซลล์แม่ ต่อมาฝาใหม่จะมีความหนาเพิ่มขึ้น ช่วงนี้ถ้าเซลล์แม่มี Intercalary bands หรือส่วนประกอบของเซลล์อื่นๆ เซลล์ลูกก็จะสร้างส่วนประกอบขึ้นมาใหม่ให้เหมือนเซลล์แม่ การแบ่งเซลล์ด้วยวิธีนี้ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ลูก 1 เซลล์ ยาวน้อยกว่าเซลล์แม่ เนื่องจากฝาล่างของเซลล์แม่จะเปลี่ยนเป็นฝาบนของเซลล์ลูก ดังนั้นประชากรของไคอะตอมส่วนใหญ่จึงมีการลดขนาดของเซลล์ลงเรื่อยๆ ตามจำนวนครั้งของการแบ่งเซลล์ ยกเว้นบางกรณีที่มีผนังเซลล์ยืดหยุ่นตัวดีเท่านั้นที่สามารถคงขนาดของเซลล์ไว้ได้เป็นเวลานาน รูปร่างลักษณะโดยทั่วไปเปลี่ยนแปลงทุกครั้งที่มีการแบ่งเซลล์ การดำรงชีวิตของไคอะตอมชนิดนี้ ในกลุ่มที่มีรงควัตถุใช้ในการสังเคราะห์แสง สร้างอาหารเองได้ เป็นอาหารให้กับสิ่งมีชีวิตอื่น ส่วนกลุ่มที่ไม่มีรงควัตถุช่วยในการสังเคราะห์แสงจะดำรงชีวิตแบบเฮเทอโอฟิติก ต้องกินซากของสารอินทรีย์

อัตราการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งของไคอะตอมแตกต่างกันตามชนิดและสภาวะแวดล้อมในสภาวะการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เซลล์ไคอะตอมอาจแบ่งตัว 1 ครั้ง ใน 1 วัน ในสภาพธรรมชาติ อัตราการแบ่งเซลล์ 1 ครั้ง ใช้เวลา 1-2 วัน (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544)

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2541) แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท

2.2.1 ปัจจัยทางฟิสิกส์

- **แสงสว่าง (Illumination)** การเปลี่ยนถ่ายเชื้อของสาหร่ายจากสต็อกสาหร่ายไปใส่สารอาหารที่เตรียมขึ้นมาใหม่นั้น ควรมีปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยนำสาหร่ายมาวางบริเวณรับแสงซึ่งเป็นแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้สาหร่ายเติบโต จากนั้นจึงย้ายไปสู่บริเวณที่มีแสงลดลง ทั้งนี้เพื่อให้การเติบโตของสาหร่ายลดลงจะได้เก็บเชื้อได้เป็นเวลานาน โดยการใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ดีกว่าใช้หลอดไฟธรรมดาหรือแสงแดด เนื่องจากว่าอุณหภูมิจากแสงอื่นมักสูงกว่าแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ สำหรับช่วงแสงสว่างเป็นเรื่องที่จำเป็นมากในการเลี้ยงสาหร่ายโดยการใช้แสงช่วงเวลาหนึ่งและหยุดการให้แสงช่วงเวลาหลังจะทำให้การเลี้ยงได้ผลดีกว่าการให้แสงติดต่อกันตลอดเวลา

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับความเข้มแสงสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ชนิดของจุลสาหร่าย	ความเข้มแสง	อ้างอิง
<i>Amphora</i> sp.	150 μ mol photon $m^{-2} s^{-1}$	Janae (2008)
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	200 μ mol photon $m^{-2} s^{-1}$	Krichnavaruk <i>et al.</i> (2005)
<i>Chlorella</i> sp.	320 μ mol photon $m^{-2} s^{-1}$	Hsieh and Wu (2009)
<i>Porphyridium cruentum</i>	200 μ mol photon $m^{-2} s^{-1}$	Molina <i>et al.</i> (2000)
<i>Synechocystis aquatilis</i> SI-2	4.6 μ mol photon $m^{-2} s^{-1}$	Zhang <i>et al.</i> (2001)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	20 μ mol photon $m^{-2} s^{-1}$	Issarapayup <i>et al.</i> (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i> 211/11c	100 μ mol photon $m^{-2} s^{-1}$	Iain and Howard (1992)
<i>Thalassiosira</i> sp.	143 μ mol photon $m^{-2} s^{-1}$	Pratoomyot <i>et al.</i> (2002)
<i>Chlorella vulgaris</i>	980 μ mol photon $m^{-2} s^{-1}$	Degen <i>et al.</i> (2001)
<i>Entomoneis cf punctulata</i>	120 μ mol photon $m^{-2} s^{-1}$	Knuckey <i>et al.</i> (2002)

- อุณหภูมิ (Temperature) สาหร่ายน้ำจืดเกือบทุกชนิดเติบโตได้ดีที่ระดับอุณหภูมิตั้งแต่ 15-25 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิกว่า 30 องศาเซลเซียส สาหร่ายจะตาย สาหร่ายน้ำเค็มชอบอุณหภูมิ 5-15 องศาเซลเซียส และจะตายถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส แต่มีสาหร่ายบางชนิดสามารถทนอุณหภูมิสูงๆ ได้ดี

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับช่วงอุณหภูมิสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ชนิดของจุลสาหร่าย	อุณหภูมิ (°C)	เอกสารอ้างอิง
<i>Amphora</i> sp.	25	Janae (2008)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-30	Wang <i>et al.</i> (2008)
<i>Chlorella vulgaris</i>	20±2	Liu <i>et al.</i> (2008)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	30	Morais and Costa (2007)
<i>Spirulina</i> sp.	30	Morais and Costa (2007)
<i>Synechocystis aquatilis</i> SI-2	40±3	Zhang <i>et al.</i> (2001)
<i>Chaetoceros</i> sp.	27-30	Renaud <i>et al.</i> (2002)
<i>Chlorella protothecoides</i>	28±1	Xu <i>et al.</i> (2007)
<i>Isochrysis</i> sp.	27-30	Renaud <i>et al.</i> (2002)
<i>Entomoneis cf punctulata</i>	20-22	Knuckey <i>et al.</i> (2002)

- **ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)** เป็นปัจจัยที่สำคัญ อีกอย่างหนึ่งเพราะสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการ pH ที่แตกต่างกัน เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะเติบโตได้ดีในน้ำที่มีสภาพเป็นกลางจนถึงมีสภาพเป็นด่างหรือมีค่าของ pH ประมาณ 6.5-7.5

- **ความเค็ม (Salinity)** มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม สาหร่ายบางชนิดชอบอยู่ในน้ำกร่อยที่มีความเค็ม 28-30 ส่วนในพัน บางชนิดทนต่อความเค็มสูงได้ดี

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับค่าความเป็นกรด-ด่างและความเค็มสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ชนิดของจุลสาหร่าย	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ความเค็ม	อ้างอิง
<i>Dunaliella</i>	N/A	High	Borowitzka (1999)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	7	N/A	Issarapayup <i>et al.</i> (2009)
<i>Scenedesmus sp.</i>	8	High	Renaud <i>et al.</i> (2002)
<i>Spirulina sp.</i>	High	N/A	Borowitzka (1999)
<i>Anabaena variabilis</i>	7	N/A	Yoon <i>et al.</i> (2008)
<i>Cryptomonas sp.</i>	8.3	2	Iain and Howard (1992)
<i>Chlorella vulgaris</i>	6.8 ± 0.1	N/A	Degen <i>et al.</i> (2001)
<i>Entomoneis cf punctulata</i>	N/A	35	Knuckey <i>et al.</i> (2002)

นอกจากปัจจัยที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นแล้ว ยังมีปัจจัยชนิดอื่นที่มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเติบโตของสาหร่ายอีก เช่น ก๊าซออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ ความกระด้างของน้ำ เป็นต้น ซึ่งมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสาหร่าย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ กล่าวคือ พืชใช้ คาร์บอนไดออกไซด์ ในกระบวนการสังเคราะห์แสง และในเวลาเดียวกันปริมาณ คาร์บอนไดออกไซด์ จะมีผลต่อระดับความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ หากพืชสังเคราะห์แสงมาก ค่าความเป็นกรดเป็นด่างจะสูงขึ้น และหากสูงขึ้นถึง 9-11 จะทำให้สาหร่ายไม่เติบโตหรือตายได้

2.2.2 ปัจจัยทางเคมี

การเติบโตของสาหร่ายขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่ายซึ่งจำเป็นสำหรับการเติบโตของสาหร่ายโดยแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) และ กลุ่มธาตุอาหารรอง (Micronutrients)

2.2.2.1 กลุ่มธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) เป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายใช้เป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง ซึ่งสาหร่ายจำเป็นต้องใช้ในปริมาณค่อนข้างมาก อาทิเช่น

- **คาร์บอน** คาร์บอนที่พืชนำไปใช้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ อนินทรีย์คาร์บอนและอินทรีย์คาร์บอน สาหร่ายใช้คาร์บอนประเภทอนินทรีย์ในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งละลายได้ในน้ำหรือในรูปของเกลือคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนต

- **ไนโตรเจน** ไนโตรเจนมีความสำคัญรองจากคาร์บอนในแง่ของปริมาณ ปริมาณไนโตรเจนของพืชมีปริมาณร้อยละ 7-10 ของน้ำหนักของเซลล์ ยกเว้น ไดอะตอม ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่น เนื่องจากซิลิกาเป็นธาตุที่สำคัญของผนังเซลล์ ไดอะตอม สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งในรูปอนินทรีย์หรืออินทรีย์ อีกทั้งยังสามารถใช้ในไนโตรเจนในรูปของก๊าซได้อีกด้วย ไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ได้แก่ ไนเตรท ไนไตรท์ และแอมโมเนีย ถ้าแหล่งไนโตรเจนอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียเพียงอย่างเดียวจะทำให้ระดับของ pH ของอาหารลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นอันตรายต่อสาหร่าย ไนเตรทเป็นสารอนินทรีย์ที่พืชหลายชนิดต้องการใช้ในปริมาณไม่เกิน 1 มิลลิโมลล์ ถ้ามากกว่านี้จะทำให้เกิดอันตราย ส่วนสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่พืชนำไปใช้ได้แก่ ยูเรีย เอไมด์ กลูตามีน และแอสพาราจีน ซึ่งจัดว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดดี ส่วนสารอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดอื่น ได้แก่ กรดอะมิโน กรดกลูตามิก และกรดแอสพาร์ตินิกนั้น สาหร่ายต้องการใช้เพื่อการเติบโตซึ่งจะแตกต่างกันตามชนิด ถ้าสาหร่ายขาดไนโตรเจนจะส่งผลต่อการสังเคราะห์แสง และปริมาณรงควัตถุหรือสารสี (pigment) ของเซลล์รวมทั้งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดลดลงด้วย

- **ฟอสฟอรัส** เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของพืชเพราะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายเทพลังงาน และกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิก แม้ว่าในแหล่งน้ำธรรมชาติ จะมีปริมาณสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสสูงกว่าอนินทรีย์ฟอสฟอรัส แต่พืชต้องการใช้ฟอสฟอรัสในรูปของสารอนินทรีย์มากกว่า ฉะนั้นสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสจึงจัดว่าเป็นแหล่งเบื้องต้นของฟอสฟอรัสซึ่งจะแตกตัวเป็นสารอนินทรีย์ ได้แก่ ฟอสฟอรัส และอโรฟอสเฟต หรือฟอสเฟต ถ้าสาหร่ายขาดฟอสฟอรัสจะมีผลต่อการเจริญเติบโต

คือปริมาณโปรตีน รังควัตถุชนิดคลอโรฟิลล์-เอ RNA และ DNA จะลดลง แต่แป้งหรือคาร์โบไฮเดรตกลับเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลต่อทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

- **ซัลเฟอร์** เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายทุกชนิด ซัลเฟอร์ในเซลล์สาหร่ายมีหลายรูปแบบ เช่น ในรูปของกรดอะมิโน ไบโตามีน บี กรดแพนโทอิก กรดลิโปอิก ซัลเฟอร์ที่สาหร่าย ส่วนใหญ่ใช้อยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ ได้แก่ เกลือของโลหะ คือ ซัลเฟต ซัลไฟต์ และซัลไฟด์

- **แคลเซียม** เป็นธาตุอาหารจำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่าย เช่น สาหร่ายสีเขียวบางชนิด สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและไดอะตอม สันนิษฐานว่าแคลเซียมมีส่วนเกี่ยวข้องกับ การสร้างเกล็ด (Scale) และโครงสร้างของสาหร่ายโดยเฉพาะสาหร่ายน้ำเค็ม หรือมีบทบาทสำคัญ ในการสร้างผนังของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ปริมาณแคลเซียมที่พืชต้องการขึ้นอยู่กับปริมาณของธาตุอาหารชนิดอื่นๆด้วย เช่น แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี โคบอลต์ ทองแดง โมลิบดีนัม นิกเกิล อะลูมิเนียม โซเดียม โปรท เงิน ฯลฯ

2.2.2.2 กลุ่มธาตุอาหารรอง (Micronutrients) เป็นธาตุอาหารซึ่งสาหร่ายต้องการใช้ ปริมาณน้อย ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกได้อีก 2 ประเภทคือ ธาตุอาหารรองอนินทรีย์ และธาตุอาหารรองอินทรีย์ อาทิเช่น

- **เหล็ก** เป็นธาตุอาหารที่ช่วยในการดูดซึมของไนโตรเจนและขบวนการสังเคราะห์แสงคือ ช่วยสร้างสารสีเขียวชนิดคลอโรฟิลล์-เอ และสารสีน้ำเงินชนิด ซี-ไฟโคไซยานิน ถ้าสาหร่ายขาดธาตุเหล็กจะมีผลต่อการเติบโตของเซลล์

- **โบรอน** เป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายบางชนิดต้องการใช้ เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และไดอะตอม โดยเฉพาะไดอะตอมน้ำเค็ม

- **แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี** แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี เป็นธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย รวมทั้งเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเอนไซม์หลายชนิด ถ้าขาดจะทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงลดลงและการหายใจเพิ่มขึ้น ธาตุอาหารทั้งสามชนิดนี้ถ้ามากเกินไปสาหร่ายจะตาย

- **โมลิบดีนัม วานาเดียม โคบอลต์ และนิกเกิล** โมลิบดีนัมมีบทบาทสำคัญในการตรึงไนโตรเจนในพวกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ช่วยในการสังเคราะห์แสง วานาเดียมเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่ายบางชนิด โคบอลต์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของวิตามินบี 12 ซึ่งสำคัญมากต่อการเติบโตของสาหร่ายหลายชนิด นิกเกิลเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ยูเรียของสาหร่ายบางชนิด เช่น ไดอะตอม

- ซิลิกา เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นที่สุดของพวกไดอะตอมเพื่อสร้างผนังเซลล์ ส่วนสำหรับชนิดอื่นจำเป็นต้องใช้ปริมาณของซิลิกา ในแหล่งน้ำธรรมชาติแตกต่างกันตามฤดูกาล เช่น ในขณะที่มีไดอะตอมเกิดขึ้นจำนวนมากหรือเกิดการบลูมปริมาณของซิลิกาในน้ำจะลดลงไป ซิลิกาจะอยู่ในรูปของ Silicate/Silica ซึ่งอาจมีปริมาณสูงสุดถึง 430 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำทะเลและ 77 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำจืด ไดอะตอมต้องการปริมาณซิลิกาแตกต่างกันตามชนิด

2.3 อาหารเลี้ยงสาหร่าย

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการธาตุอาหารตลอดจนพีเอชที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ จึงต่างกันไปตามความต้องการของจุลินทรีย์และวัตถุประสงค์ของการใช้โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ แบ่งออกเป็น

2.3.1 อาหารเหลว (Liquid media) เป็นอาหารทั่วไปสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย แบ่งเป็น

2.3.1.1 ธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) ประกอบด้วยธาตุอาหารที่สาหร่ายทุกชนิดต้องการใช้ปริมาณมากเพื่อการเติบโต ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แมกนีเซียม และแคลเซียม

2.3.1.2 ธาตุอาหารรอง (Micronutrients) ประกอบด้วยธาตุอาหารที่พืชต้องการใช้ปริมาณค่อนข้างน้อย ซึ่งเมื่อเติมลงในอาหารจะช่วยให้สาหร่ายเติบโตดีขึ้น ถ้าไม่ใช้ การเติบโตของสาหร่ายจะช้าลงกว่าเล็กน้อย ทั้งนี้ธาตุอาหารรองจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ

- ธาตุอาหารรองอนินทรีย์ (Inorganic micronutrients) สาหร่ายส่วนมากต้องการใช้ ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส แคลเซียม สังกะสี ทองแดง โคบอลต์ และโบรอน
- ธาตุอาหารรองอินทรีย์ (Organic micronutrients) ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต เกลืออินทรีย์หรือสารประกอบที่มีเกลืออินทรีย์ปนอยู่ด้วย และวิตามิน

2.3.2 อาหารแข็งหรืออาหารวุ้น (Solid or agar media) ทำจากอาหารเหลวที่มีการเติมวุ้นลงไป 0.5% โดยวุ้นที่ใช้เป็นวุ้นที่บริสุทธิ์เรียกว่า Bacto-agar ถ้าอาหารวุ้นบรรจุในหลอดทดสอบและทำให้แข็งในลักษณะที่เอียงเป็นแนวลาดเรียกว่า slant agar แต่ถ้าแข็งในลักษณะหลอดทดสอบตั้งตรงเรียกว่า deep tube agar แต่ถ้าบรรจุในจานเพาะเชื้อเรียกว่า plate agar

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสูตรอาหารและภาวะของสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ชนิดของจุลสาหร่าย	สูตรอาหาร	สถานะเหมาะสม	อ้างอิง
<i>Asterionella formosa</i>	Guillard & Lorenzen	N= 100 μ M P= 1 μ M	Gotham and Rhee (1982)
<i>Fragilaria crotonensis</i>		N= 21 μ M P= 10 μ M	
<i>Anabaena variabilis</i>	N/A	P= 55 mg L ⁻¹	Yoon <i>et al.</i> (2008)
<i>Amphora delicatissima</i>	F/2	F/2+NB+4C+2.4 mM	มะลิวัลย์ กุตะ โท (2547)
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	F/2	F/2+2P+2Si	Loataweesup (2002)
<i>Nitzschia laevis</i>	N/A	F/2+Glucose+NO ₃ +Tr	Wen and Chen (2002)
<i>Chlorella</i> sp.	Walne's	Walne's + 0.1% (v/v) trace metal	Hsieh and Wu (2009)
<i>Entomoneis cf punctulata</i>	F/2	N/A	Knuckey <i>et al.</i> (2002)
<i>Chlorella vulgaris</i> 211/11c	ASM	N/A	Iain and Howard (1992)

2.4 รูปแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

2.4.1 การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (Batch culture)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบตช์หรือแบบกะ เป็นการเพาะเลี้ยงในระบบปิด โดยใช้ปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัดและไม่มีการเติมสารอาหารเข้าในระบบการเพาะเลี้ยง ทำให้อัตราการเติบโตของสาหร่ายลดลงเรื่อยๆ และมีแนวโน้มลดลงจนเป็นศูนย์เนื่องจากสภาวะขาดสารอาหารและสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม ซึ่งเกิดจากการสะสมของเสียและผลิตภัณฑ์ต่างๆที่สาหร่ายสร้างขึ้น โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะเป็นการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (Stanbury, 1995)

2.4.2 การเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ (Fed-batch culture)

การเพาะเลี้ยงในระบบแบบเฟดแบตช์เป็นการดำเนินการที่มีความหมายได้หลายประการ อาจเป็นระบบที่มีการป้อนสารอาหารเข้า แต่ไม่มีการดึงสารอาหารออกจากระบบ หรือเป็นระบบที่มีการดึงสารอาหารออกแต่ไม่มีการป้อนสารอาหารเข้าสู่ระบบ หรืออาจเป็นระบบที่มีการป้อนสารอาหารเข้าเป็นระยะๆ ซึ่งระบบการเพาะเลี้ยงแบบนี้จะมีประโยชน์ในแง่การควบคุมปฏิกิริยา โดยเฉพาะในกรณีที่สารตั้งต้นสามารถมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ หรือที่รู้จักกันในชื่อของ Substrate Inhibition นั่นคือเมื่อมีสารอาหาร (Substrate) ในปริมาณมากจะทำให้ปฏิกิริยาเดินไปได้ช้าลง เราก็สามารถลดผลกระทบจากปริมาณสารอาหารที่มากเกินไปได้โดยการค่อยๆเติมสารอาหารเข้าไปในระบบ หรือในบางกรณีสารอาหารที่มีมากเกินไปอาจจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเซลล์ชนิดอื่นๆได้ (เนื่องจากปริมาณเซลล์ที่ต้องการเริ่มต้นจะมีน้อยเกินไปเมื่อเทียบกับปริมาณสารอาหาร ทำให้เซลล์อื่นๆ สามารถเติบโตได้ทัน) อย่างไรก็ตามการดำเนินการของถังปฏิกรณ์ประเภทนี้มีข้อที่ต้องระมัดระวัง เนื่องจากระบบดังกล่าวเป็นระบบที่มีปริมาณสารอาหารเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา แต่ขนาดของถังปฏิกรณ์จะมีค่าคงที่ ดังนั้นจึงต้องออกแบบเพื่อให้แน่ใจว่าสารอาหารที่ใส่ให้กับระบบจะไม่เกิดการล้นออกจากถังปฏิกรณ์ก่อนเวลาอันสมควร

2.4.3 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous culture)

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้เซลล์มีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณตลอดเวลา โดยทำการเติมอาหารเพาะเชื้อและดึงน้ำเลี้ยงออกอย่างต่อเนื่อง ทำให้เซลล์อยู่ในภาวะคงที่หรือภาวะสมดุล (Steady state) โดยมีอัตราการไหลเข้าและออกของสารอาหารตลอดเวลา การคงสภาพดังกล่าวข้างต้นนิยมใช้ปั๊มรีดสายยาง (Peristaltic Pump) ช่วยในการเติม

อาหารเพาะเชื้อเข้าและดึงน้ำเลี้ยงออกตลอดเวลา หรืออาจใช้วิธีการไหลล้น (Overflow method) เมื่อสาหร่ายเติบโตมีผลทำให้ปริมาณสารอาหารในอาหารเพาะเชื้อลดลง จนกระทั่งความเข้มข้นของสารอาหารที่เหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยงส่งเสริมให้สาหร่ายมีอัตราการเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ในอัตราที่เท่ากับอัตราการเจือจาง (Dilution rate, D) ซึ่งอัตราการเจือจางสามารถคำนวณได้ดังสมการ

$$D = \frac{F}{V}$$

เมื่อ F = อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรอาหารเพาะเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (มิลลิลิตร)

D = อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)

อัตราการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต่อเวลาขึ้นอยู่กับอัตราการเติบโตของสาหร่ายและความเข้มข้นของเซลล์ที่หายไปเนื่องจากการไหลออกไปกับน้ำเลี้ยง สามารถแสดงได้ดังสมการ

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu C_x - DC_x$$

เมื่อ C_x = ความหนาแน่นของเซลล์ (10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

ณ ภาวะสมดุล ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายจะคงที่ ดังนั้นอัตราการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่อเวลาจะเท่ากับศูนย์ ทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับอัตราการเจือจาง ดังสมการ

$$\mu C_x = DC_x$$

$$\mu = D$$

หากอัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นจนกระทั่งจำนวนเซลล์ในถังเพาะเลี้ยงถูกชะล้างหมดไป เรียกการเกิดลักษณะแบบนี้ว่า Washout ทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารสูงขึ้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องสามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

2.4.3.1 Chemostat คือ ระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่มีการควบคุมอัตราการเติบโตของสาหร่ายโดยใช้สภาวะแวดล้อมทางเคมี ได้แก่ ความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเพาะเชื้อ เรียกว่า ระบบเคโมสแตต (Chemostat culture) ในระบบการเพาะเลี้ยงพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารสูงถึงระดับหนึ่งจะมีผลให้การเติบโตของสาหร่ายลดลง (Wang *et al.*, 1979)

2.4.3.2 Turbidostat (McNeil and Harvey, 1990) การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องในระบบนี้จะมีการให้อาหารที่เป็นธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณที่มากเกินไป ดังนั้นการเติบโตจะไม่มีสารอาหารที่เป็นตัวจำกัด สาหร่ายจะมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ระบบจะควบคุมความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในปริมาณที่ต้องการ โดยทำการตรวจวัดความหนาแน่นของสาหร่ายด้วย Nephelometer หรือ Spectrophotometer เมื่อพบว่าความหนาแน่นของสาหร่ายมีค่าแตกต่างจากที่ตั้งไว้ เครื่องจะส่งสัญญาณไปยังตัวควบคุมซึ่งจะทำการปรับโดยการเติมอาหารลงสู่ภาชนะ

ข้อดีของระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องคือ การที่สาหร่ายให้ผลผลิตในการเก็บเกี่ยวสูง และมีค่าคงที่เนื่องจากการเติบโตจะอยู่ในช่วงระยะทวีคูณ แต่ข้อเสียของระบบดังกล่าวคือ มีโอกาสปนเปื้อนจากพวกแบคทีเรียและโปรโตซัวได้ง่ายกว่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบอื่น นอกจากนี้ระบบแบบต่อเนื่องช่วยให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมและจำเป็นต่อการเติบโต รวมทั้งการปรับอัตราการเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมความเข้มข้นของสาหร่ายอีกด้วย

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่อง

ชนิดของสาหร่าย	อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)	อ้างอิง
<i>Tetraselmis suecica</i>	0.97	ปวีณา ตปนียวรวงศ์ (2548)
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0.5	ปวีณา ตปนียวรวงศ์และคณะ (2547)
<i>Isochrysis galbana</i>	0.54-1.56	นฤมล ไบพิตและคณะ (2550)
<i>Nitzschia laevis</i>	0.6	Wen and Chen (2001)

2.5 ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ระบบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีหลายรูปแบบ แต่โดยทั่วไปแล้วจะแบ่งออกเป็นระบบเปิด (open system) และระบบปิด (closed system) โดยที่ทั้ง 2 ระบบดังกล่าวมีข้อได้เปรียบและข้อด้อยแตกต่างกัน การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบเปิดแบ่งออกเป็น large open ponds, circular ponds, raceway ponds และ large bags (Hase *et al.*, 2000) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติหรือการเพาะเลี้ยงในบ่อที่สร้างจากคอนกรีตหรือเป็นบ่อพื้นดินที่ปูทับพื้นด้วยวัสดุป้องกันการรั่วซึมของน้ำเช่น พลาสติก เป็นต้น ทั้งนี้จะมีการติดตั้งใบพัดเพื่อให้น้ำเกิดการไหลวนไปตามแนวร่องน้ำของบ่อ ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสให้สาหร่ายมีการหมุนเวียนขึ้นมาเพื่อรับแสงแดด โดยบ่อแบบเปิดที่นิยมมากที่สุดคือ บ่อน้ำวน (Raceway) ซึ่งมีลักษณะเป็นบ่อตื้น ความลึกของบ่อ

ประมาณ 15-40 เซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.3 รวมทั้งมีรูปแบบการไหลของของไหล ทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่าบ่อที่ไม่มีรูปแบบการไหลของของไหลสูงถึง 10 เท่า



รูปที่ 2.3 ตัวอย่างของบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบเปิด (1) Raceway pond
(2) Circular ponds (Benemann, 2009)

อย่างไรก็ตามการการเพาะเลี้ยงในระบบเปิดนั้นสาหร่ายที่จะเพาะเลี้ยงได้ในระยะยาวในบ่อแบบเปิดมักถูกจำกัดเพียงไม่กี่ชนิด โดยเป็นสาหร่ายที่มีคุณสมบัติพิเศษที่จะเติบโตได้ในน้ำที่มีคุณสมบัติที่สาหร่ายชนิดอื่นเติบโตไม่ได้ เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา หรือความเค็มสูงสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคูนาลิเอลลา นอกจากนี้แล้วในระบบแบบเปิดจะสูญเสียปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ไปในอากาศอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาระบบการกักเก็บปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์สำหรับบ่อเปิดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเติมคาร์บอนไดออกไซด์ และยังคงคำนึงถึงการระเหยของน้ำในบ่อซึ่งเกิดเนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศมาก รวมทั้งข้อจำกัดในเรื่องของแสงซึ่งสาหร่ายจะนำไปใช้ประโยชน์น้อยเนื่องจากการบดบังแสงของสาหร่าย รวมทั้งมีโอกาสสูงต่อการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือ โปรโตซัว และยากต่อการควบคุมไม่ว่าจะเป็นอุณหภูมิหรือแสงแดด ในขณะที่อัตราการถ่ายเทมวลสารต่ำ ทำให้ได้ผลผลิตต่ำและด้อยคุณภาพ

การพัฒนาารูปแบบของบ่อเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจากข้อจำกัดของบ่อเปิดกลางแจ้งที่มีผลผลิตต่ำและมีโอกาสปนเปื้อนสูง ทำให้มีวิจัยและพัฒนาระบบถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสงซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงในระบบปิดที่มีสภาวะแวดล้อมภายในถึงปฏิกรณ์ซึ่งเหมาะสมต่อลักษณะของสาหร่ายมากกว่า อีกทั้งสามารถทำความสะดวกง่าย ประสิทธิภาพการให้แสงดี ผลผลิตสูงและมีคุณภาพ ความควบคุมอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างได้ง่าย หลีกเลี่ยงต่อการปนเปื้อน และ

สามารถลดการใช้พื้นที่บริเวณกว้าง แต่ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมจะนิยมใช้บ่อขนาดใหญ่ในระบบเปิดมากกว่าเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง และการใช้แสงจากธรรมชาติสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายเรื่องของพลังงาน ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิต อย่างไรก็ตามถึงปฏิกรณ์ชีวภาพดังกล่าวยังมีข้อในเรื่องของต้นทุนที่มีราคาแพง แนวโน้มในอนาคตจึงเน้นรูปแบบของถังปฏิกรณ์ที่ให้ผลผลิตสูงแต่มีราคาถูก

การพัฒนาารูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพในระบบแบบปิดเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยมีการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสูงถึง 1000 ลิตร (Baynes *et al.*, 1979) ซึ่งมีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแบ่งออกเป็นระบบแบบแบตช์ แบบกึ่งต่อเนื่อง และแบบต่อเนื่อง ซึ่งเป็นระบบที่ง่ายต่อการควบคุมไม่ว่าจะเป็น อุณหภูมิ ความเข้มแสง หรือแม้กระทั่งขนาดของถังปฏิกรณ์ โดยรูปแบบของถังปฏิกรณ์มีการพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องและสามารถแบ่งออกเป็นหลายประเภทขึ้นอยู่กับหลักเกณฑ์ในการแบ่ง อาทิเช่น

การใช้รูปร่างของถังปฏิกรณ์เป็นเกณฑ์ (Lee, 1992)

- (1) ประเภทของถัง (Tank reactor) ซึ่งมีความสูงกับความกว้างพอๆกัน
- (2) ประเภทท่อทรงกระบอก (Column reactor) มีความสูงมากกว่าความกว้างมากๆ (อัตราส่วนระหว่างความสูงและเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3)
- (3) ประเภทที่มีลักษณะของการไหลวน (Loop reactor) มีการไหลวนของของเหลวจากจุดหนึ่งกลับมามีอีกจุดหนึ่งอย่างเห็นได้ชัด

การใช้ลักษณะทางจลนพลศาสตร์ (Hydrodynamics) ภายในถังปฏิกรณ์เป็นเกณฑ์

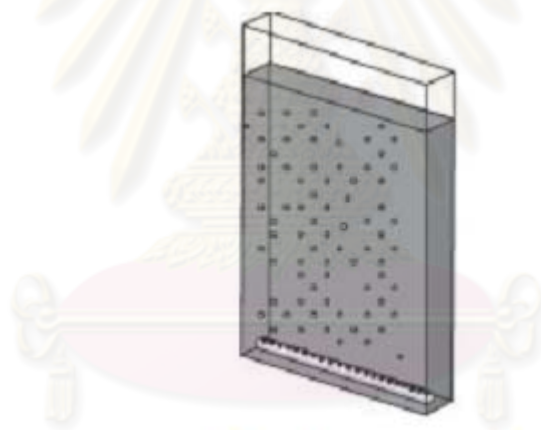
- (1) ถังปฏิกรณ์ชนิดกวนและให้อากาศ (Aeration tank)
ถังปฏิกรณ์ที่ใช้ใบพัดเพื่อด้วย ความเร็วค่อนข้างสูงเพื่อให้อากาศตลอดเวลา ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมสำหรับของเหลวที่มีความหนืดสูง เนื่องจากทำให้เกิดแรงเฉือนสูงไปด้วย ซึ่งจะส่งผลเสียต่อเซลล์สาหร่าย
- (2) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบให้อากาศ (Bubble column bioreactor)
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบธรรมดาหลายรูปแบบ แต่ละรูปแบบมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน คือ ไม่มีชิ้นส่วนทางกลที่เคลื่อนไหวอย่างรุนแรง และมีการให้อากาศทางด้านล่างหรือด้านบนของระบบแบบนี้จะไม่มีการไหลวนของของเหลวภายในระบบเลย ของเหลวอาจเคลื่อนที่ขึ้นหรือลงบ้างตามแรงดึงดูดของฟองอากาศและแรงดึงดูดจากการเคลื่อนที่ขึ้นของของเหลว และถือว่าการเคลื่อนที่ที่เกิดขึ้นมีน้อยมาก และในหลายๆกรณีจะถือว่าความเร็วในการเคลื่อนที่เป็นศูนย์
- (3) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยาน (Airlift bioreactor)

ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกเป็นระบบถังอากาศสัมผัสที่มีลักษณะการไหลวนของของเหลวอย่างชัดเจน ทั้งนี้สามารถควบคุมการไหลของของเหลวภายในระบบได้ในระดับหนึ่ง โดยการปรับค่าตัวแปรในการออกแบบและตัวแปรในการดำเนินการของถึงปฏิกรณ์ชนิดดังกล่าวนี้

นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาถึงปฏิกรณ์ชีวภาพในรูปแบบอื่นๆ ขึ้นมาอีก ได้แก่

(1) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบน (Flat-plate photobioreactor)

ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบนจะมีความหนาช่วงให้แสงลอดผ่านประมาณ 5-10 เซนติเมตร ทำให้ลดปัญหาการบดบังกันเองของสาหร่าย อีกทั้งมีพื้นที่ผิวสูงในการรับแสงแดด ทำให้แสงเกิดการกระจายตัวได้ดี แต่หากสาหร่ายมีความเข้มข้นของสีมาก อาจทำให้เกิดการบดบังทางเดินของแสงได้เช่นกัน นอกจากนี้แล้วได้มีพัฒนาถึงปฏิกรณ์ชีวภาพดังกล่าวโดยการให้แสงทั้ง 2 ข้างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ และนำมาประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอีกหลายชนิด เช่นกัน (Hoekema *et al.*, 2002)

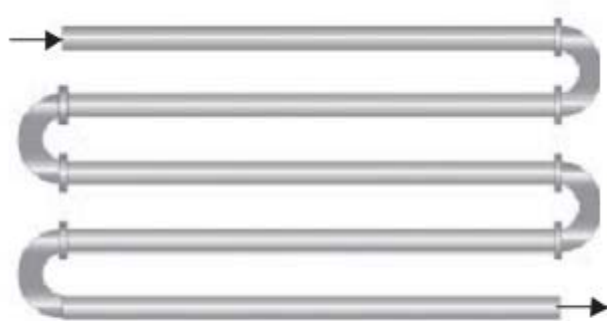


Flat plate reactor

รูปที่ 2.4 ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบน (Flat-plate photobioreactor) (Posten, 2009)

(2) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบท่อยาว (Tubular photobioreactor)

ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบริเวณกลางแจ้ง โดยมีลักษณะเป็นท่อยาวหลายๆท่อติดกัน ซึ่งทำมาจากวัสดุที่เป็นแก้วหรือพลาสติก มีให้อากาศและการผสมผสานกันอย่างสมบูรณ์ของระบบ ทำให้มีประสิทธิภาพในการรับแสงแดดของเซลล์สาหร่ายได้สูง ทั้งนี้การพัฒนาจะมีทั้งในแนวนอนและแนวตั้ง (Molina *et al.*, 2000)



Tubular Reactor

รูปที่ 2.5 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบท่อยาว (Tubular photobioreactor) (Posten, 2009)

(3) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปทรงกระบอกแนวตั้ง (Vertical-column photobioreactor)
ข้อดีของถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้คือ มีราคาถูก เบาและง่ายต่อการขยายขนาด นอกจากนั้นแล้วได้มีการพัฒนาโดยมีการติดตั้งท่อขนาดเล็กด้านใน (Draft tubes) เพื่อให้เกิดลักษณะการไหลวนของของเหลวและอากาศอย่างชัดเจน ทำให้เกิดการผสมผสานกันอย่างสมบูรณ์ระหว่างบริเวณ riser และ downcomer ตลอดแนวยาวของท่อ



Annular Reactor

รูปที่ 2.6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปทรงกระบอกแนวตั้ง (Vertical-column photobioreactor)
(Posten, 2009)

นอกจากนี้ยังได้มีการเปรียบเทียบคุณสมบัติและข้อจำกัดระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบเปิดและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิดที่มีการพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 คุณสมบัติและข้อจำกัดสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Ugwu, 2008)

ระบบการเพาะเลี้ยง	คุณสมบัติ	ข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยง
ระบบเปิด (Open ponds)	ต้นทุนต่ำ ง่ายต่อการทำความสะอาด รวมทั้งให้ผลผลิตสูง	ยากต่อการเพาะเลี้ยงระยะยาวและการควบคุม รวมทั้งผลผลิตที่ได้จะไม่ มีประสิทธิภาพ
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ แผ่นแบน (Flat-plate bioreactors)	พื้นที่ผิวในการรับแสงสูง ทำให้ ได้รับแสงในปริมาณที่มากพอ ง่าย ต่อการเพาะเลี้ยงภายนอก ผลผลิตที่ ได้มีปริมาณสูง ง่ายต่อการควบคุม อุณหภูมิและออกซิเจน	ยากต่อการควบคุม อุณหภูมิ และการเกิดของ สาหร่ายชนิดอื่น
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ ท่อยาว (Tubular bioreactors)	พื้นที่ผิวในการรับแสงสูง ง่ายต่อการ เพาะเลี้ยงภายนอก ผลผลิตที่ได้มี ปริมาณสูง	เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า pH ค่าการละลายของ ออกซิเจนและปริมาณ คาร์บอนไดออกไซด์ตลอด แนวท่อ ใช้พื้นที่ บริเวณกว้าง
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูป ทรงกระบอกแนวตั้ง (Vertical-column bioreactor)	การถ่ายเทมวลสารเกิดขึ้นได้ดี ทำให้ ผสมเข้ากันได้ง่ายและลดแรงเฉือน ใช้พลังงานน้อย ศักยภาพสูง ง่ายต่อ การฆ่าเชื้อ ลดปัญหาในเรื่องของการ บังแสง	พื้นที่ผิวใน การรับแสงลดลง

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้งในระบบเปิดและระบบปิด ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.7 และ 2.8 สำหรับตารางที่ 2.9 แสดงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยก (Airlift Photobioreactor) ที่มีอัตราส่วนของพื้นที่ riser ต่อ downcomer ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบเปิด

ชนิดของถังปฏิกรณ์	ชนิดของสาหร่าย	ผลผลิต	อ้างอิง
Open ponds	<i>Anabaena azollae</i>	17 g m ⁻² d ⁻¹	Boussiba (1988)
Open ponds	<i>Anabaena variabilis</i>	22 g m ⁻² d ⁻¹	Fontes <i>et al.</i> (1989)
Open raceway ponds	<i>Anabaena siamensis</i>	0.086 g L ⁻¹ d ⁻¹	Richmond <i>et al.</i> (1993)
Raceway ponds	<i>Spirulina platensis</i>	14.5 g m ⁻² d ⁻¹	Pushparaj <i>et al.</i> (1997)
Fiber glass tanks	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	2.65 × 10 ⁶ cell/mL	Samonte <i>et al.</i> (1993)

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิด

ชนิดของถังปฏิกรณ์	ชนิดของสาหร่าย	ผลผลิต	อ้างอิง
Tubular Airlift Photobioreactors	<i>Porphyridium cruentum</i>	1.5 g L ⁻¹ d ⁻¹	Camacho Rubio <i>et al.</i> (1999)
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	2.05-2.47 g L ⁻¹ d ⁻¹	Sobczu <i>et al.</i> (1999)
Bubble-column	<i>Haematococcus pluvialis</i>	0.06 g L ⁻¹ d ⁻¹	Garc'ia-Malea Lo 'pez <i>et al.</i> (2006)
	<i>Porphyridium sp.</i>	1.062 × 10 ⁶ cell/mL	Merchuk <i>et al.</i> (1998)
Flat plate air lift photobioreactors (FPALR)	<i>Nannochloropsis sp.</i>	0.27 g L ⁻¹ d ⁻¹	Cheng-Wu <i>et al.</i> (2001)
	<i>Spirulina platensis</i>	51 g m ⁻¹ d ⁻¹	Qiang and Richmond (1996)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	1.48 g L ⁻¹	Ratchford and
	<i>Scenedesmus sp.</i>	2.27 g L ⁻¹	Fallowfield (1992)

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิด (ต่อ)

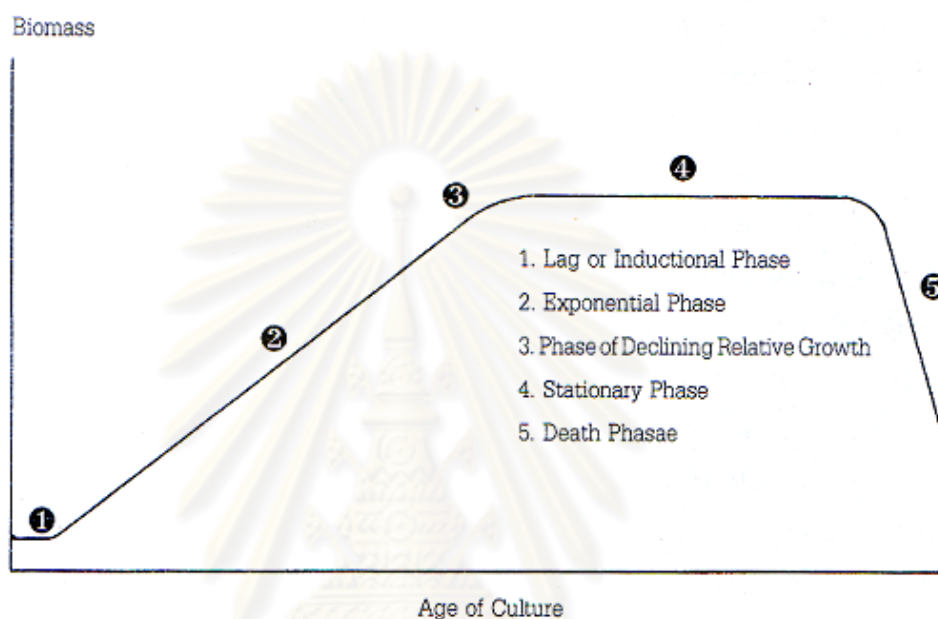
ชนิดของถังปฏิกรณ์	ชนิดของสาหร่าย	ผลผลิต	อ้างอิง
Transparent rectangular chambers (TRCs)	<i>Chlorella sp.</i>	0.340 g L ⁻¹ d ⁻¹	Hsieh and Wu (2009)
Tubular	<i>Isocrysis galbana</i>	0.32 g L ⁻¹ d ⁻¹	Grima <i>et al.</i> (1994)
Inclined tubular	<i>Chlorella sorokiniana</i>	1.47 g L ⁻¹ d ⁻¹	Ugwu <i>et al.</i> (2002)
Vertical Alveolar Panel (VAP)	<i>Spirulina platensis</i>	15.8 g m ⁻² d ⁻¹	Tredici <i>et al.</i> (1991)
	<i>Anabaena azollae</i>	11 g m ⁻² d ⁻¹	
Porous centric-tube photobioreactor	<i>Chlorella sp. NCTU-2</i>	5.15 g L ⁻¹	Chiu <i>et al.</i> (2009)
Stirred tank reactor (CSTR)	<i>Chlorella vulgaris</i>	1.11 g L ⁻¹	Ratchford and Fallowfield (1992)
	<i>Scenedesmus sp.</i>	1.27 g L ⁻¹	

ตารางที่ 2.9 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสัดส่วนของ Riser ต่อ Downcomer ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ชนิดของถังปฏิกรณ์	ชนิดของสาหร่าย	อัตราส่วน riser:downcomer	อ้างอิง
Airlift photobioreactor	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	2.63	Krichnavaruk <i>et al.</i> (2005)
Airlift photobioreactor	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 640	1.24	Miron <i>et al.</i> (2000)
Flate-Plate Airlift Photobioreactor	<i>Haematococcus pluvialis</i>	0.4	Issarapayup <i>et al.</i> (2009)

2.6 วิธีการจัดการเจริญเติบโต

ตามหลักการเพาะเลี้ยงทั่วไปนั้นในช่วงวันแรกๆ เซลล์จะยังไม่มี的增加จำนวนมากนัก แต่เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์จะเริ่มมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จากนั้นอัตราการเติบโตของเซลล์จะเริ่มคงที่และมีจำนวนเซลล์ลดลงเรื่อยๆ ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้



รูปที่ 2.7 กราฟการเติบโตของสาหร่าย (Fox, 1983 อ้างถึงใน ลัดดา วงศ์รัตน์, 2541)

- **ระยะปรับตัว (Lag phase)** เป็นระยะที่เซลล์ปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ เช่น แสง อุณหภูมิและธาตุอาหาร ระยะนี้แพลงก์ตอนพืชไม่มีการแบ่งเซลล์ ฉะนั้น ถ้าเซลล์ที่ไม่สามารถปรับตัวได้จะตายลง การที่เซลล์จะผ่านระยะปรับตัวนี้เร็วมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของเซลล์และความอุดมสมบูรณ์ของอาหารที่เลี้ยง ถ้าสภาวะทั้งสองอย่างเหมาะสมกันจะเข้าสู่ระยะที่ 2 เร็วขึ้น

- **ระยะทวีคูณ (Exponential phase or log phase)** เป็นระยะที่เซลล์เติบโตและขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว ระยะนี้จะนานเท่าใดขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารและคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงแสงสว่าง รวมทั้งผลผลิตนอกจากเซลล์ของแพลงก์ตอนพืช สภาวะรวมของสิ่งแวดล้อม ลักษณะการเติบโตในระยะนี้เป็นแบบที่รวดเร็วในระยะแรกและจะค่อยๆ ช้าลงตามลำดับ

- **ระยะถดถอย (Retardation phase or phase of declining relative growth)** เป็นช่วงที่เซลล์มีการเติบโตช้าลงเนื่องจากขาดแคลนอาหาร เช่น ไนโตรเจน เหล็ก คาร์บอน หรือออกซิเจน เนื่องจากปริมาณเซลล์เกิดความหนาแน่นเกินไป หรือแสงสว่างลดลงเนื่องจากเซลล์เกิดการบดบังกันเอง (Auto-shading)
- **ระยะคงที่ (Stationary phase)** เป็นระยะที่การเติบโตของเซลล์หยุดนิ่ง เนื่องจากขาดอาหารลดน้อยลงและเกิดสารพิษจากขบวนการเมตาบอลิซึมหรือการสลายตัวของเซลล์
- **ระยะตาย (Death phase)** เป็นระยะที่เซลล์หยุดการเติบโตโดยสิ้นเชิง เนื่องจากขาดอาหารหมดลง เซลล์จะเริ่มตายและการตายจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและรวดเร็วขึ้น ดังนั้นความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจึงขึ้นอยู่กับความสามารถของผู้เลี้ยงที่จะควบคุมการเลี้ยงให้มีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณ (log phase) นานที่สุดเท่าที่จะทำได้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การใช้พลังงานเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมอย่างต่อเนื่องในเวลานี้เป็นที่รู้กันว่าเป็นแหล่งพลังงานที่ไม่ยั่งยืน เนื่องจากใช้แล้วหมดไปและยังเป็นแหล่งสะสมคาร์บอนไดออกไซด์ในสิ่งแวดล้อม แหล่งพลังงานหมุนเวียนจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อสิ่งแวดล้อมและความยั่งยืนทางเศรษฐกิจ ไบโอดีเซลที่ได้จากพืชน้ำมันเป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนที่สามารถนำมาใช้แทนปิโตรเลียมได้ และมีความเป็นกลางทางคาร์บอน อย่างไรก็ตามในความเป็นจริง ไบโอดีเซลจากพืชน้ำมัน ของเสียจากการประกอบอาหาร และไขมันจากสัตว์ไม่สามารถนำมาใช้ได้ตามความต้องการ แม้จะมีความต้องการเพียงส่วนน้อยก็ตาม ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น จุลสาหร่ายจึงเป็นแหล่งไบโอดีเซลหมุนเวียนเพียงแหล่งเดียวที่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดสำหรับแหล่งเชื้อเพลิงเพื่อการขนส่ง จุลสาหร่ายใช้แสงอาทิตย์เพื่อผลิตน้ำมันเช่นเดียวกับพืชแต่สามารถสร้างน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า จุลสาหร่ายหลายชนิดสามารถผลิตน้ำมันได้ดีกว่าพืชน้ำมันที่ดีที่สุดมาก (Chisti, 2007) การพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลจากจุลสาหร่ายสามารถศึกษาได้จากหลายๆงานวิจัย โดยในการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุดนั้นต้องทำการวางแผนระบบก่อนการผลิตเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด รวมทั้งความเป็นไปได้ในการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงหมุนเวียนดังกล่าว

อย่างไรก็ตาม จุลสาหร่าย *Entomoneis* นั้นเป็นสาหร่ายชนิดที่ยังมีการศึกษาอยู่น้อย โดยมีในประเทศไทยมีรายงานการพบ *Entomoneis* ในบ่อเลี้ยงกุ้ง ส่วนที่มีการนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนั้นมีเพียงรายงานของวรวิศรา อนุสุทธิ (2548) เท่านั้น สำหรับองค์ประกอบทางชีวเคมีของไดอะตอม *Entomoneis cf. punctulata* ซึ่งรายงานโดย Hong et al. (2008) มีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2.12

ตารางที่ 2.10 แหล่งที่มาและปริมาณไขมันจากพืช (Chisti, 2007)

แหล่งผลิตไขมัน	Oil yield (L/ha)
Corn	172
Soybean	446
Canola	1190
Jatropha	1892
Coconut	2689
Oil plum	5950
Microalgae (70% oil by wt)	136,900
Microalgae (30% oil by wt)	58,700

ตารางที่ 2.11 ปริมาณไขมันที่พบในจุลสาหร่าย (Chisti, 2007)

ชนิดของจุลสาหร่าย	ปริมาณไขมัน ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง(%)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Chlorella sp.</i>	28–32
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25–33
<i>Nannochloris sp.</i>	20–35
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31–68
<i>Nitzschia sp.</i>	45–47

ตารางที่ 2.12 องค์ประกอบทางชีวเคมีของไลอะตอม *Entomoneis cf. punctulata* (Hong *et al.*, 2008)

องค์ประกอบ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (%)
โปรตีน	27.3
คาร์โบไฮเดรต	25.1
ไขมัน	47.1

ตารางที่ 2.13 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับพลังงานทางเลือกจากสาหร่าย

ชนิดของสาหร่าย	การเพาะเลี้ยง	ปริมาณไขมัน	ผลผลิต	อ้างอิง
<i>Botryococcus braunii</i> ,	phototrophic	50% dry weight	Hydrocarbon	Benemann (2009)
<i>Chlorella protothecoides</i>	heterotrophic	55.2 %	H ₂ , methane, HC or	Xu <i>et al.</i> (2006)
<i>Oedogonium</i> sp.	N/A	9.2 %	Bioethanol	Hossain <i>et al.</i>
<i>Spirogyra</i> sp.	N/A	7.3 %		(2008)

บทที่ 3

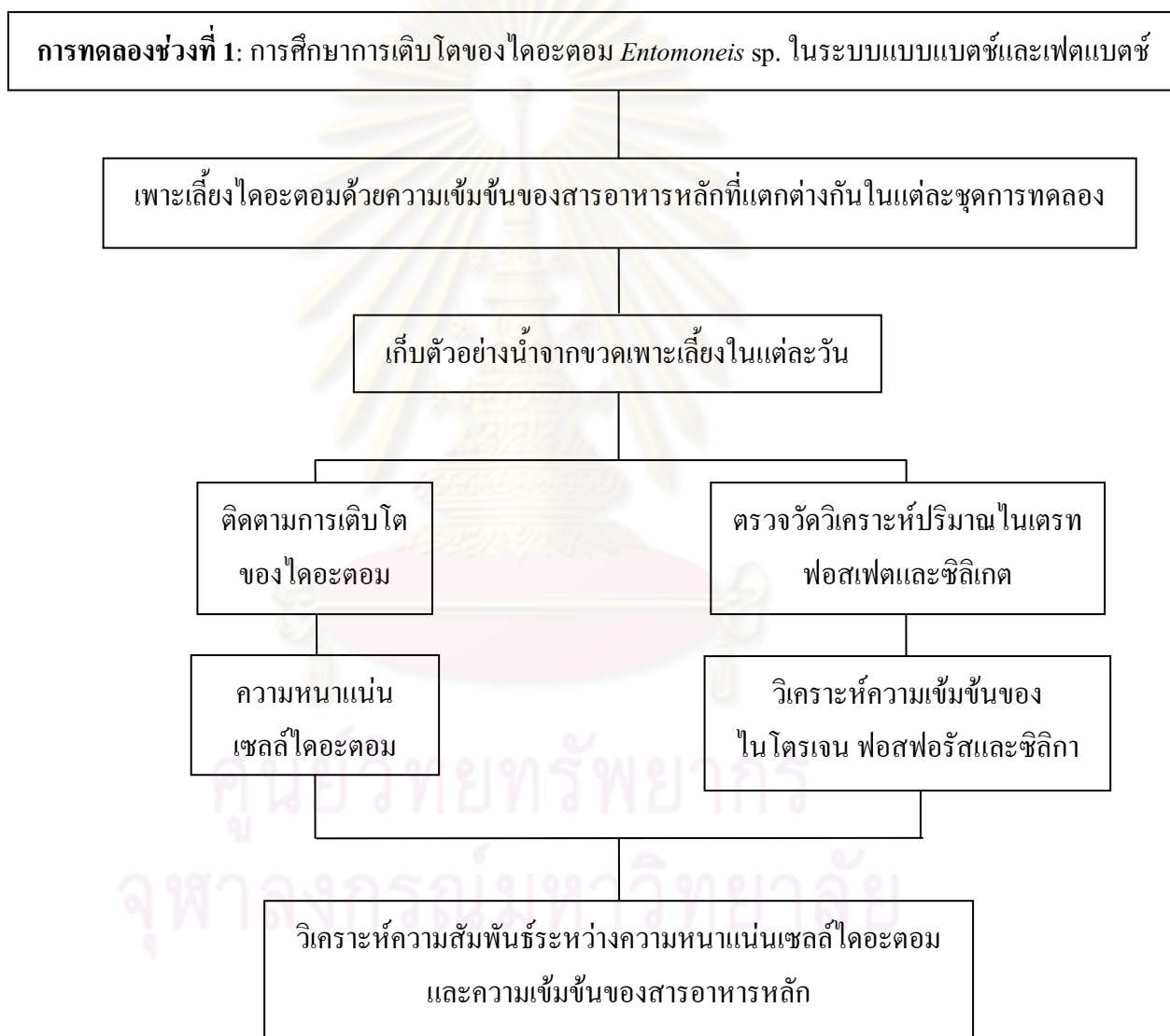
วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์เชี่ยวชาญทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยในการเพาะเลี้ยงจะแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วนในการทดลองส่วนแรก (หัวข้อ 3.1) ทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อไคอะตอม *Entomoneis* sp. และทำการศึกษากาเรเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. เพื่อหาความเข้มข้นของปริมาณสารอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสเฟต และซิลิเกต ที่เหมาะสม โดยปรับระดับความเข้มข้นแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง ทั้งในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์และแบบเฟดแบตช์ในขวดแก้ว Duran ขนาด 1 ลิตร สำหรับการทดลองในส่วนที่ 2 (หัวข้อ 3.2) เป็นการนำภาวะความเข้มข้นของสารอาหารหลักที่ได้จากการทดลองส่วนแรกมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ที่มีการปรับระดับความเข้มข้นของสารอาหารหลักที่เติมให้กับระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร รวมทั้งการหาอัตราการผลิตที่เหมาะสม และในส่วนสุดท้ายของการทดลอง (หัวข้อ 3.3) เป็นการนำภาวะความเข้มข้นของสารอาหารหลักที่ได้จากการทดลองในส่วนที่สองไปประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงไคอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร รวมทั้งทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 การศึกษาการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp.

งานวิจัยนี้ในส่วนนี้ทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อไคอะตอม *Entomoneis* sp. และทำการศึกษาการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. เพื่อหาความเข้มข้นของปริมาณสารอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสเฟต และซิลิกา ที่เหมาะสม โดยมีความเข้มข้นแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง ทั้งในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบคทีเรียและแบบเฟดแบคทีเรียในขวดแก้ว Duran ขนาด 1 ลิตร ซึ่งแผนผังของการทดลองมีรายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังสรุปการทดลองในช่วงที่ 1

ตารางที่ 3.1 ตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลอง

ตัวแปรควบคุม	ค่าที่ใช้ในการทดลอง
1. ความเข้มข้นของสารอาหาร	- ปรับปรุงจากสูตร F/2
2. ค่าความเค็มของน้ำทะเล	- 30 พีเอสยู
3. ความหนาแน่นเซลล์โคอะตอมเริ่มต้น	- $1-2 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
4. ความเข้มแสง	- 5,000-6,000 ลักซ์
5. อุณหภูมิ	- 28-30 องศาเซลเซียส
6. อัตราการไหลของอากาศ	- 45-50 ลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ 3.2 ตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลอง

ตัวแปรตาม	พารามิเตอร์ที่วิเคราะห์
1. ความหนาแน่นเซลล์โคอะตอม	- สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer)
2. ปริมาณสารอาหารหลักในระบบการเพาะเลี้ยง	- วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกา
3. อัตราการเจริญ	- ปริมาตรของน้ำจากระบบการเพาะเลี้ยง
4. ปริมาณไขมันสะสมของโคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp.	- วิเคราะห์ปริมาณไขมันภายในเซลล์โคอะตอม <i>Entomoneis</i> sp.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อโคอะตอม *Entomoneis* sp.



รูปที่ 3.2 หัวเชื้อโคอะตอม *Entomoneis* sp.

นำหัวเชื้อโคอะตอม *Entomoneis* sp. ที่ทำการขยายเพิ่มปริมาณแล้ว มาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีเพื่อป้องกันการปนเปื้อน ทำการฆ่าเชื้อน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยู ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเติมอาหารเพาะเชื้อเหลวสูตรของกิลลาร์ด (F/2) (ภาคผนวก ก.) ลงในน้ำทะเลที่ผ่านการกรองและการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว โดยให้มีหัวเชื้อโคอะตอมประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำขวดรูปชมพู่ไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงโคอะตอมที่ความเข้มแสง 5,000-6,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 24-28 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ในระหว่างการทดลองได้มีการเปลี่ยนถ่ายหัวเชื้อทุกสัปดาห์เพื่อขยายให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับการทดลอง จากนั้นทำการขยายปริมาณหัวเชื้อโคอะตอมในขวดแก้ว Duran ขนาด 1 ลิตร และ 5 ลิตร ตามลำดับ แหล่งคาร์บอนไดออกไซด์มาจากการอากาศที่ผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Gelman Acrodisc 50) อัตราการไหลของอากาศอยู่ที่ 45-50 ลิตรต่อชั่วโมง เพื่อเตรียมไว้ใช้สำหรับการทดลองในครั้งต่อไป

3.1.2 การศึกษาการเติบโตของโคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงโคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบแบคทีเรีย ในขวดแก้ว Duran ขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 10 วัน ด้วยน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยู ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมอาหารเพาะเชื้อเหลวสูตรปรับปรุงของกิลลาร์ด (F/2) (ในภาคผนวก ก.) โดยสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเข้มแสง 5,000-6,000 ลักซ์ ทั้งนี้คาร์บอนไดออกไซด์มาจากการให้อากาศผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Gelman Acrodisc 50) ตลอดเวลา อัตราการไหลของอากาศ 45-50 ลิตรต่อชั่วโมง ใน

การเพาะเลี้ยงไคอะตอมใช้เซลล์เริ่มต้นที่ได้จากหัวข้อ 3.1.1 ประมาณ 100 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ทั้งนี้เพื่อหาภาวะการเพาะเลี้ยงและปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมของไคอะตอม *Entomoneis* sp. เพื่อเปรียบเทียบกับระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์และแบบต่อเนื่อง ทั้งนี้ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ของไคอะตอมเพื่อติดตามผลการเติบโตด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า และวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสเฟตและซิลิเกต ดังแสดงในภาคผนวก ก. ข. และค. ตามลำดับ ทุกวัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำผลที่ได้ไปคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์ดังสมการ

$$\text{Specific growth rate}(\mu) = \frac{\text{Ln}_{x2} - \text{Ln}_{x1}}{T_2 - T_1}$$

โดย คือ μ อัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate) (ต่อวัน)

X คือ ความหนาแน่นของเซลล์ (10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

T คือ เวลา (วัน)

Ln คือ Natural logarithm



รูปที่ 3.3 ภาพถ่ายแสดงระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบแบตช์

3.1.3 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาต่อการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

ทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบแบตช์ ในขวดแก้ว Duran ขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 (ในภาคผนวก ก.) ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อเท่ากับ 30 พีเอสยู โดยมีสถานะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.1.1 ทำการทดลองปรับระดับความเข้มข้นของอาหารเพาะเชื้อ โดยแบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ดังนี้ (1) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 61.8 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (คิดเป็น 5 เท่า ของสูตร F/2) (2) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 61.8 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (คิดเป็น 5 เท่า ของสูตร F/2) ร่วมกับการเติมซิลิกาความเข้มข้น 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ทุกวัน และ (3) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เท่ากับ 61.8 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ 2.24 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร (คิดเป็น 5 เท่า และ 2 เท่า ของสูตร F/2) ตามลำดับ ร่วมกับการเติมซิลิกาความเข้มข้น 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน โดยมีหัวเชื้อเริ่มต้นของไคอะตอมที่ได้จากหัวข้อ 3.1.1 ประมาณ 100 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ของไคอะตอมเพื่อติดตามผลการเติบโต และวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารหลักได้แก่ ไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิกา ทุกชุดทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.4 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของฟอสฟอรัสและซิลิกาต่อการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์

ทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบเฟดแบตช์ในขวดแก้ว Duran ขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 (ในภาคผนวก ก.) ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู โดยมีสถานะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.1.1 ซึ่งชุดการทดลองแบ่งออกเป็น 4 ชุด ดังนี้ (1) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปรกติ (2) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ร่วมกับการเติมซิลิกาความเข้มข้น 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ทุกวัน (คิดเป็น 8 เท่าของสูตร F/2) (3) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ร่วมกับการเติมฟอสฟอรัสความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อ ลิตร ทุกวัน (คิดเป็น 8 เท่าของสูตร F/2) และ(4) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ร่วมกับการเติมฟอสฟอรัสและซิลิกาความเข้มข้น 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร และ 1.12 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร ทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน โดยมีหัวเชื้อเริ่มต้นของไคอะตอมที่ได้จากหัวข้อ 3.1.1 ประมาณ 100 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ของไคอะตอมเพื่อติดตามผลการเติบโต และวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารหลักได้แก่ ไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิกา ทุกชุดทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.5 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาต่อการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

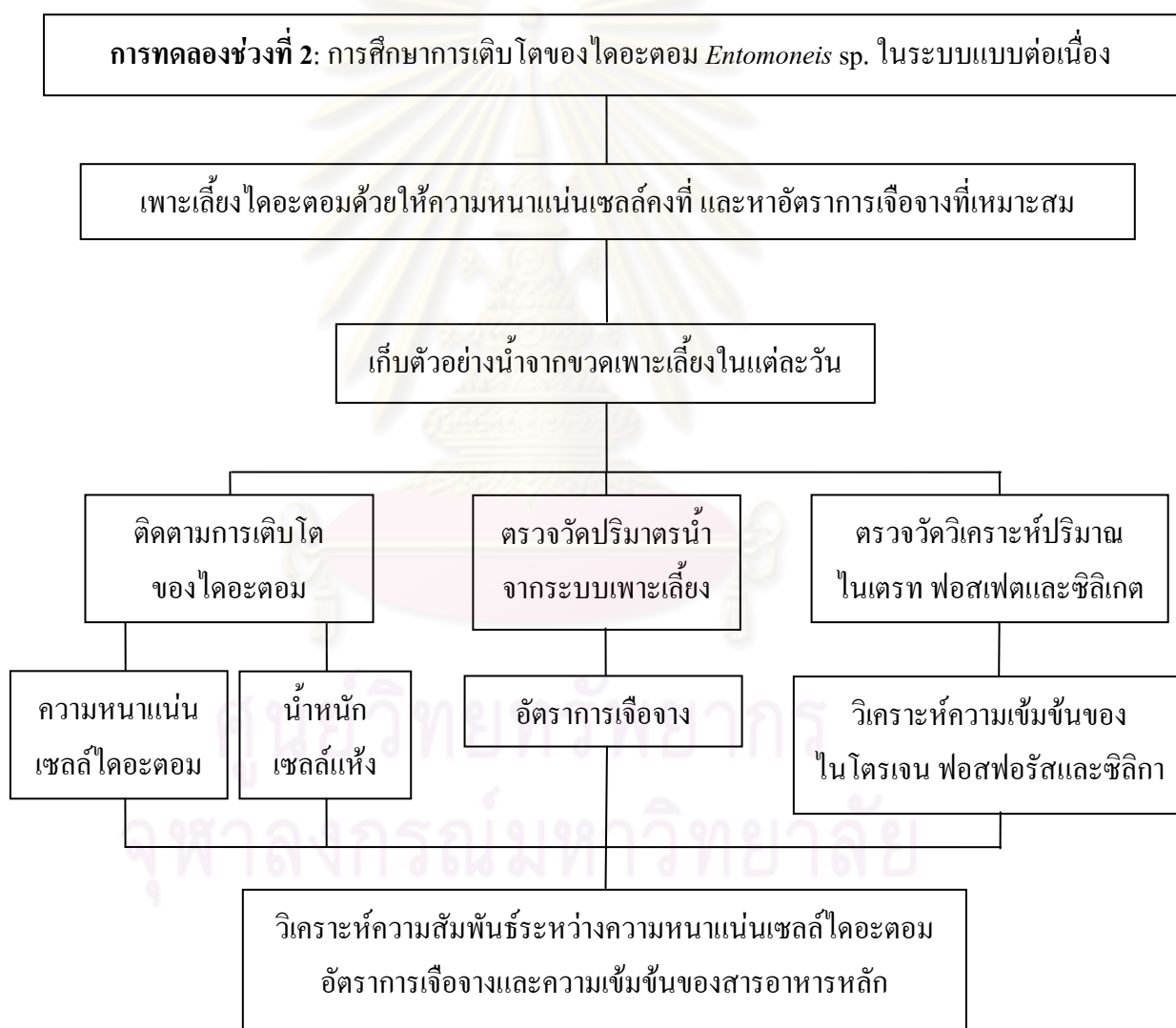
ทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบแบตช์ ในขวดแก้ว Duran ขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ดังแสดงในภาคผนวก ก. ความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู โดยมีสถานะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.1.1 ทำการทดลองแปรผันความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 โดยใช้สารละลายโซเดียมเมตาซิลิเกต-9-ไฮเดรต โดยมีความเข้มข้นของซิลิกาเป็น 3.97 7.94 และ 11.92 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตรทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน ตามลำดับ (คิดเป็น 1, 2 และ 3 เท่า ของสูตร F/2 ตามลำดับ) (ความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปรกติเท่ากับ 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร) โดยมีหัวเชื้อเริ่มต้นของไคอะตอมที่ได้จากหัวข้อ 3.1.1 ประมาณ 100 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ของไคอะตอม เพื่อติดตามผลการเติบโต และวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารหลักได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสเฟตและซิลิเกต ทุกชุดทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.6 ผลของความเข้มข้นของซิลิกาต่อการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์

ทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบเฟดแบตช์ ในขวดแก้ว Duran ขนาด 1 ลิตร ทั้งนี้ทำการทดลองเติมหัวเชื้อที่เปลี่ยนถ่ายด้วยอาหารสูตร F/2 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ (1) อาหารเพาะเชื้อไคอะตอมที่มีความเข้มข้นของซิลิกาเป็น 5 เท่าของสูตร F/2 ร่วมกับการเติมซิลิกาความเข้มข้น 0.397 0.794 และ 1.192 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตรทุกวัน เป็นเวลา 10 วันในระบบการเพาะเลี้ยง (คิดเป็น 1, 2 และ 3 เท่า ของสูตร F/2 ตามลำดับ) และ (2) อาหารเพาะเชื้อไคอะตอมที่มีความเข้มข้นของซิลิกาสูตร F/2 ปรกติ ร่วมกับการเติมซิลิกาความเข้มข้นที่สูงขึ้นเป็น 1.192 1.59 และ 1.986 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน เช่นเดียวกันในระบบการเพาะเลี้ยง (คิดเป็น 3, 4 และ 5 เท่า ตามลำดับ) โดยมีชุดการทดลองที่มีการเติมซิลิกาความเข้มข้น 1.192 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตรเป็นชุดควบคุม เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองจากทั้งสองสถานะดังกล่าว โดยมีสถานะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.1.1 และมีการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นของไคอะตอมที่ได้จากการเปลี่ยนถ่ายเชื้อหัวที่ความเข้มข้นดังกล่าวประมาณ 100 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ของไคอะตอมเพื่อติดตามผลการเติบโต และวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารหลักได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสเฟตและซิลิเกต ทุกชุดทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 การศึกษาอัตราการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในสถานะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous culture)

การทดลองในส่วนนี้เป็นการนำภาวะความเข้มข้นของสารอาหารหลักที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 3.1 มาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ที่มีการปรับระดับความเข้มข้นของสารอาหารหลักที่เติมให้กับระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร เพื่อหาอัตราการเจริญและปริมาณสารอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสเฟตและซิลิเกต ที่เหมาะสม ซึ่งแผนผังของการทดลองมีรายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 3.4

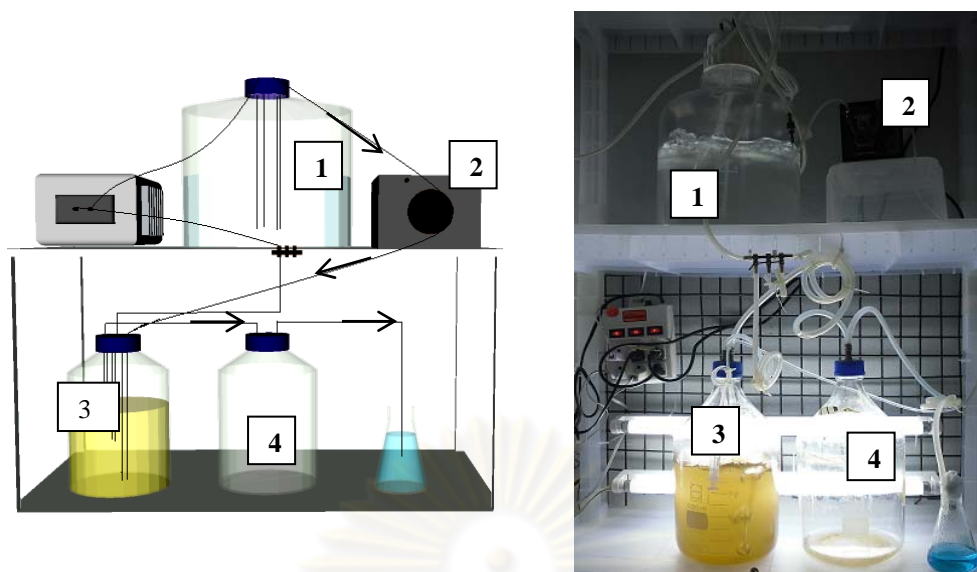


รูปที่ 3.4 แผนผังสรุปการทดลองในช่วงที่ 2

3.2.1 การเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2

ทำการจำลองระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบต่อเนื่องในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร ในอาหารเพาะเชื้อเริ่มต้นสูตร F/2 ทั้งนี้เพื่อหาภาวะเหมาะสมของความเข้มข้นของสารอาหารหลักโดยทำการเพาะเลี้ยงด้วยความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู สภาวะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.1.1 เริ่มต้นการเพาะเลี้ยงด้วยระบบแบบแบตซ์ในช่วงวันแรกของการทดลอง จนกระทั่งไคอะตอมมีการเติบโตเข้าสู่ระยะทวีคูณ จึงเริ่มทำการเพาะเลี้ยงในระบบแบบต่อเนื่องด้วยการเติมอาหารเพาะเชื้อเริ่มต้นสูตร F/2 จากถังปริมาตร 10 ลิตร โดยใช้ปั๊มแบบรีดสาย (Peristaltic Pump) เพื่อควบคุมการไหลของสารอาหาร และควบคุมอัตราการเจือจาง (Dilution rate) เริ่มต้นที่ 0.25 ต่อวัน ซึ่งเป็นค่าอัตราการเจือจางต่ำสุดที่ปั๊มแบบรีดสายสามารถทำงานได้ และเมื่อเซลล์เข้าสู่ภาวะคงที่จึงทำการปรับอัตราการเจือจางให้สูงขึ้น โดยการปรับระดับความเร็วรอบของปั๊มรีดสายให้เพิ่มขึ้น และวัดอัตราการไหลของอาหารเพาะเชื้อ (มิลลิลิตรต่อวัน) จากปริมาตรอาหารเพาะเชื้อที่ไหลออกจากถังเพาะเลี้ยง จนกระทั่งได้อัตราการเจือจางที่เหมาะสม ทั้งนี้ปริมาณของอาหารเพาะเชื้อเหลวที่ถูกเติมจะทำให้ น้ำในถังเพาะเลี้ยงล้นออกเข้าสู่ขวดเก็บเกี่ยว ผลผลิตทางท่อด้านบน ในอัตราที่เท่ากันตลอดเวลา นอกจากนั้นในถังเก็บสารอาหารจะมีการให้อากาศตลอดเวลา เพื่อป้องกันการตกตะกอนของสารอาหาร และเพื่อให้สารอาหารผสมกันอย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 3.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



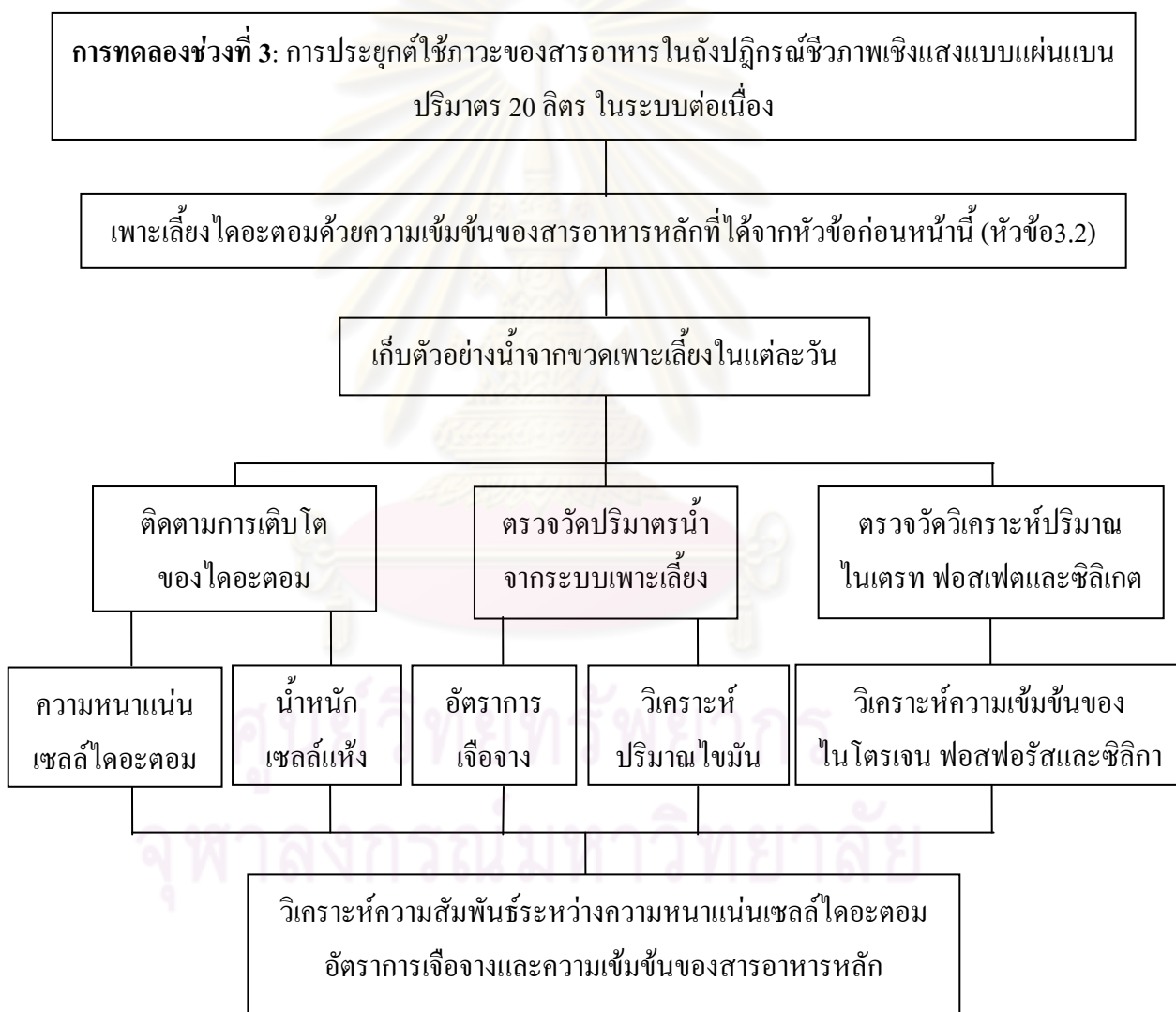
รูปที่ 3.5 แผนภาพ (ซ้าย) และภาพถ่าย (ขวา) แสดงระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบต่อเนื่องในขวดแก้วขนาด 5 ลิตร (1) ถังเก็บอาหารเพาะเชื้อไคอะตอมขนาด 10 ลิตร (2) ปั๊มแบบรีดสาย (Peristaltic pump) (3) ขวดเพาะเลี้ยงไคอะตอมแบบต่อเนื่องปริมาตร 5 ลิตร (4) ขวดเก็บเกี่ยวผลผลิตไคอะตอม

การวัดอัตราการเติบโตของไคอะตอมด้วยการตรวจนับจำนวนเซลล์ การวัดน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร และวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารหลักไนโตรเจน ฟอสเฟตและซิลิกาทุกวัน ในแต่ละชุดการทดลอง 3 ชั่วโมง หลังจากการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารหลักและตัวแปรอื่นๆ จะเริ่มทำการปรับระดับความเข้มข้นของสารอาหารหลักเพื่อให้เพียงพอต่อการเติบโตของไคอะตอมทำการทดลองซ้ำโดยเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้น จนกระทั่งได้สภาวะความเข้มข้นของสารอาหารหลักที่เหมาะสม โดยระดับอัตราการเจือจางที่เหมาะสมต้องไม่เกิดการชะล้างเซลล์ออกจากระบบจนหมด (wash out)

หลังจากการทดลองหาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมแล้ว ทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ด้วยอาหารเพาะเชื้อ F/2 สูตรปรับปรุง โดยในระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารอาหารหลัก ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกา จากนั้นนำมาพิจารณาผลของความเข้มข้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยภาวะของสารอาหารดังกล่าว และทำการปรับระดับความเข้มข้นของสารอาหารหลัก โดยการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของสารอาหารหลักเพื่อให้เพียงพอต่อการเติบโตของไคอะตอม ในขณะที่ความเข้มข้นของสารอาหารดังกล่าวต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม คือ ต้องมีปริมาณไม่น้อยจนเกิดภาวะขาดแคลนสารอาหารหรือมีปริมาณไม่มากจนเหลือตกค้างอยู่ในระบบการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามการปรับลดความเข้มข้นของสารอาหารหลักต้องไม่ส่งผลต่ออัตราการเติบโตของเซลล์ไคอะตอม

3.3 การศึกษาอัตราการเติบโตและปริมาณไขมันของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร

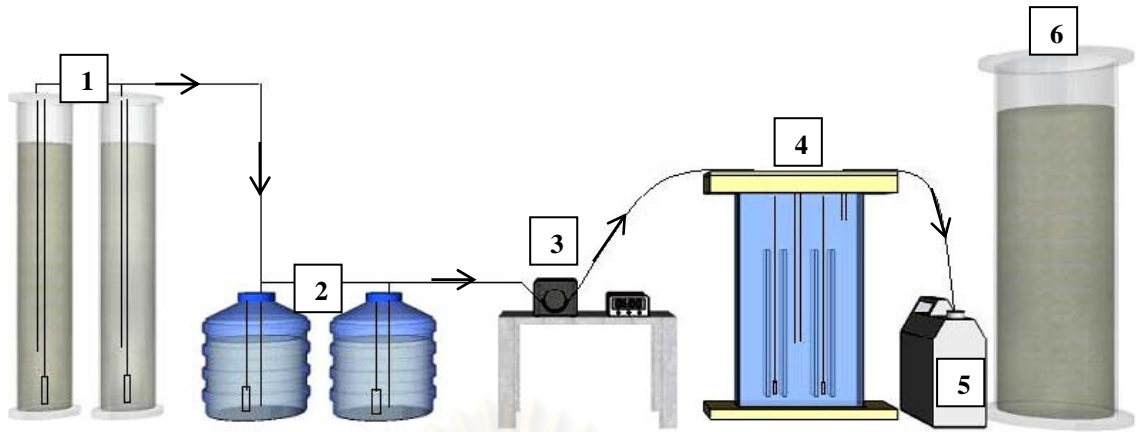
การทดลองในส่วนนี้เป็นการนำภาวะความเข้มข้นของสารอาหารหลักและอัตราการเจริญที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 3.2 ไปประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงไคอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ซึ่งแผนผังของการทดลองมีรายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 3.6



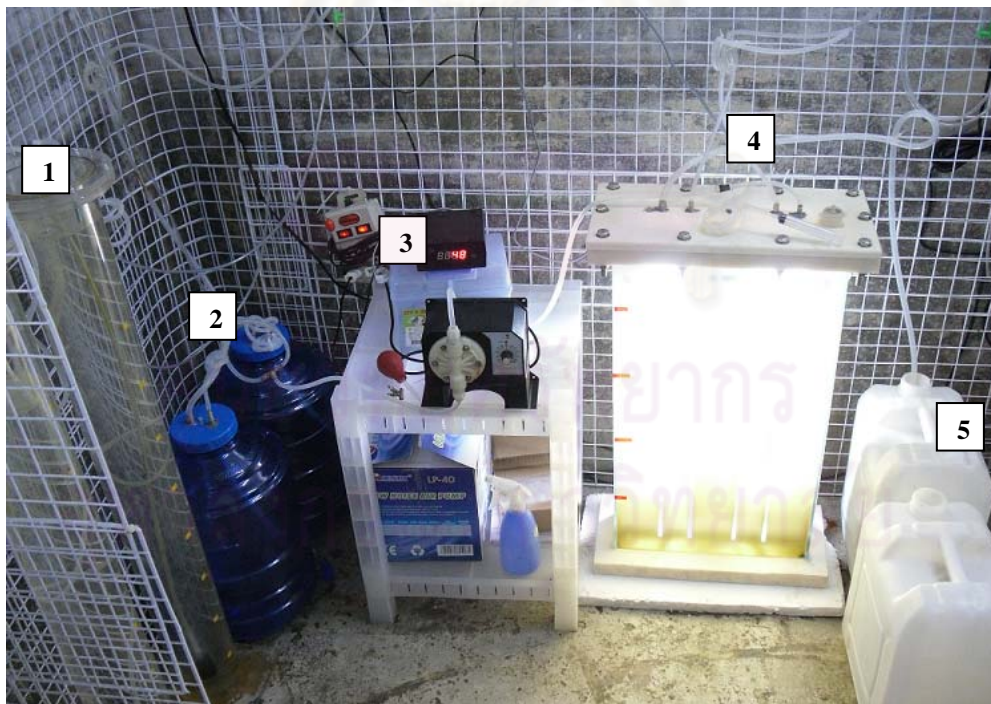
รูปที่ 3.6 แผนผังสรุปการทดลองในช่วงที่ 3

3.3.1 การเพาะเลี้ยงโคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอาหารเพาะเชื้อที่ปรับปรุงจากสูตร F/2

ทำการขยายขนาดระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องของโคอะตอม *Entomoneis* sp. ไปเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนขนาด 20 ลิตรดังแสดงในรูปที่ 3.7 และ 3.8 ซึ่งออกแบบ เพื่อแก้ไขปัญหาในเรื่องการจำกัดปริมาณของแสง โดยมีความเข้มแสงอยู่ในระดับใกล้เคียงกับการทดลองในหัวข้อก่อนหน้า (ความเข้มแสง 5,000-6,000 ลักซ์) ทำการเพาะเลี้ยงด้วยความเค็มของอาหารเพาะเชื้อ 30 พีเอสยู ที่อุณหภูมิห้อง แหล่งคาร์บอนไดออกไซด์มาจากการอากาศที่ผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Gelman Acrodisc 50) อัตราการไหลของอากาศอยู่ที่ 45-50 ลิตรต่อชั่วโมง ทั้งนี้ก่อนเริ่มทำการทดลองจะทำการกักเก็บน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยูที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนผงในถังขนาด 10 ลิตร ในส่วนที่ 1 เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียหรือโพรโตซัว ในส่วนถังกักเก็บสารอาหารขนาด 20 ลิตร (ส่วนที่ 2) จะทำการกักเก็บอาหารเพาะเชื้อเหลว F/2 สูตรปรับปรุงซึ่งเป็นภาวะของสารอาหารหลักที่ได้จากระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในหัวข้อ 3.2.1 จากนั้นเริ่มทำการเพาะเลี้ยงโคอะตอม *Entomoneis* sp. ด้วยระบบแบบแบคทีเรียในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปรกติในวันแรกของการทดลอง (ส่วนที่ 4) ถัดมาจึงทำการเพาะเลี้ยงโคอะตอมในระบบแบบต่อเนื่องด้วยการประยุกต์ใช้อาหาร F/2 สูตรปรับปรุง โดยอาหารเพาะเชื้อเหลวในถังเก็บสารอาหารส่วนที่ 2 จะถูกป้อนเข้าสู่ระบบเครื่องสูบลมที่ใช้โคอะแฟรม (Diaphragm dosing pump) โดยมีนาฬิกาตั้งเวลา (Timer) เพื่อตั้งเวลาการทำงานของปั๊มในการป้อนอาหาร ซึ่งปั๊มดังกล่าวมีราคาถูกกว่าปั๊มแบบบริดสายและมีอัตราการไหลที่คงที่ รวมทั้งเหมาะสมกับระบบการเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ (ส่วนที่ 3) จากนั้นจึงป้อนอาหารเพาะเชื้อเหลวเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 20 ลิตร (ส่วนที่ 4) และควบคุมการไหลของสารอาหารโดยควบคุมอัตราการเจือจาง (Dilution rate) ให้อยู่ระหว่าง 0.58-0.7 ต่อวัน นอกจากนี้ในส่วนที่ 1 และ 2 จะมีการให้อากาศตลอดเวลาเพื่อป้องกันการตกตะกอนของสารอาหาร และให้เกิดการผสมกันอย่างสมบูรณ์ จากนั้นทำการวัดอัตราการไหลของอาหารเพาะเชื้อ (มิลลิลิตรต่อวัน) จากปริมาตรอาหารเพาะเชื้อที่ไหลออกจากถังเพาะเลี้ยง โดยปริมาตรของอาหารเพาะเชื้อเหลวที่ถูกเติมจะทำให้ น้ำในถังเพาะเลี้ยงล้นออกเข้าสู่ ขวดเก็บเกี่ยวผลผลิตขนาด 20 ลิตรทางท่อด้านบน (ส่วนที่ 5) ในอัตราที่เท่ากันตลอดเวลา โดยน้ำจากถังเพาะเลี้ยงที่ล้นออกเมื่อทำการวัดปริมาตรแล้วจะนำไปเก็บไว้ถังขนาด 60 ลิตร (ส่วนที่ 6) เพื่อเตรียมไว้สำหรับการกรองเก็บเกี่ยวเซลล์ซึ่งเซลล์ที่ได้จะนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไขมันต่อไป

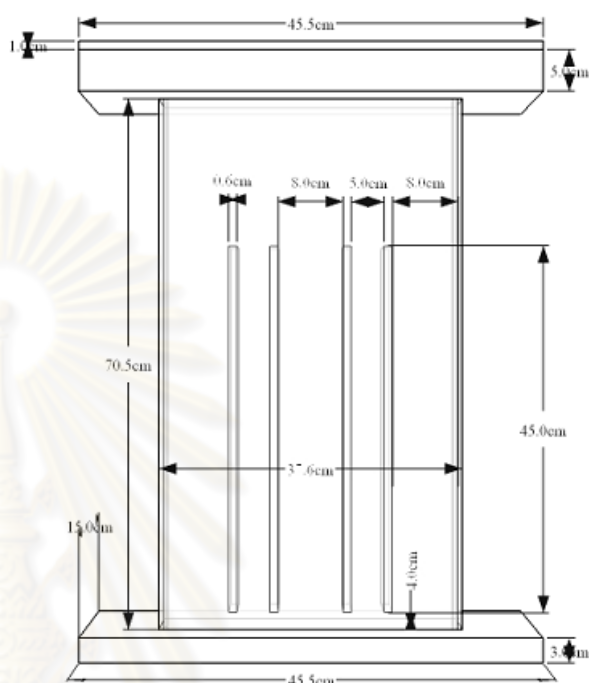


รูปที่ 3.7 แผนภาพแสดงระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนขนาด 20 ลิตร (1) ถังเก็บน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยู (2) ถังเก็บอาหารเพาะเชื้อไคอะตอมขนาด 20 (3) ปั๊มป้อนอาหาร (Diaphragm dosing pump) (4) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนขนาด 20 ลิตร (5) ขวดเก็บเกี่ยวผลผลิตไคอะตอม (6) ถังเก็บเกี่ยวผลผลิตไคอะตอมขนาด 60 ลิตร เพื่อรอการกรอง



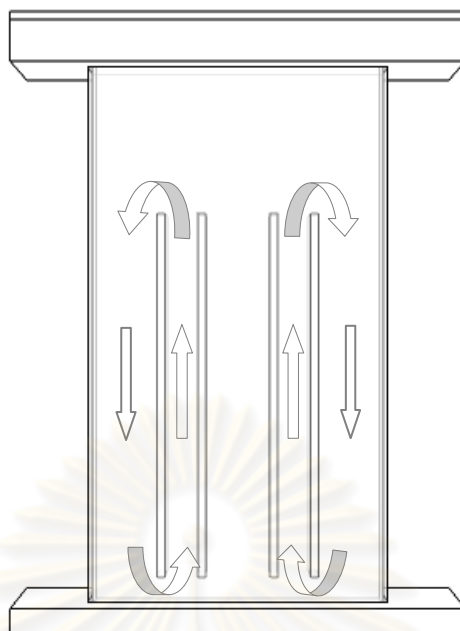
รูปที่ 3.8 ภาพถ่ายระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนขนาด 20 ลิตร

ทำการวัดอัตราการเติบโตของไดอะตอมด้วยการตรวจนับจำนวนเซลล์ การวัดน้ำหนักรวบรวมเซลล์แห้งด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร และวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารหลักไนโตรเจน ฟอสเฟตและซิลิเกต ทุกวัน ในแต่ละชุดการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 3.9 ภาพถ่าย (ซ้าย) และแผนภาพ (ขวา) แสดงถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร

จากรูปที่ 3.9 แสดงถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนขนาด กว้างxยาวxสูง เท่ากับ 11x37.6x70.6 ซึ่งมีปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร โดยส่วนของถังปฏิกรณ์ทำมาจากกระจก ในขณะที่ ส่วนฝาด้านบนและฐานด้านล่างของถังปฏิกรณ์ทำมาจากพลาสติก (ซูเปอร์สีน) โดยระบบการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Entomoneis* sp. ภายในถังปฏิกรณ์ดังกล่าวมีหลักการทำงานเป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยก (Airlift photobioreactor) ที่มีการไหลวนของอากาศอยู่ภายใน โดยมีการติดตั้งแผ่นกระจกกั้นการไหล (Baffle) จำนวน 4 แผ่น เข้าไปภายในเพื่อแบ่งสัดส่วนภายในออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของ Riser (A_r) และส่วนของ Downcomer (A_d) ซึ่งการไหลวนของของไหลระหว่างทั้งสองส่วนจะเกิดภายในบริเวณแผ่นกั้น ดังแสดงในรูปที่ 3.10 โดยมีอัตราส่วน $A_d : A_r$ เท่ากับ 1.6

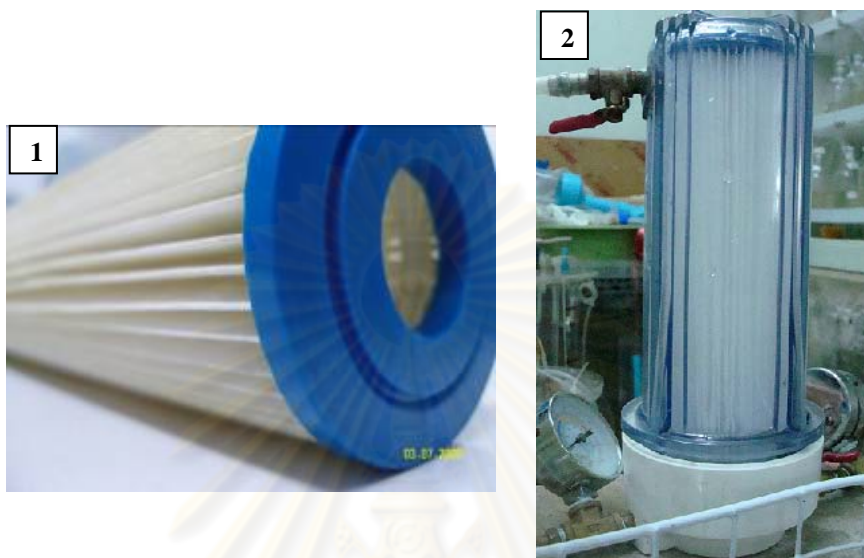


รูปที่ 3.10 แผนภาพลักษณะการไหลวนของของไหลภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงานขนาด 20 ลิตร

3.3.2 การศึกษาปริมาณไขมันของไคอะตอม *Entomoneis* sp. จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร

หลังจากทำการทดลองเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนขนาด 20 ลิตร ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ในอาหารเพาะเชื้อเหลว F/2 สูตรปรับปรุง ทำการกรองเก็บเกี่ยวเซลล์ไคอะตอมด้วยเครื่องกรองแบบแบ่งส่วน (Cross-flow filtration) ที่บรรจุไส้กรองแบบจิบอยู่ภายใน ดังแสดงในรูปที่ 3.11 โดยมีขนาดรูพรุนของเส้นใยแบบจิบประมาณ 30 ไมครอน หลังจากการกรองทำการชุดเก็บเกี่ยวเซลล์ไคอะตอมที่ติดอยู่บริเวณไส้กรอง นำตะกอนเซลล์ไคอะตอมที่ได้ไปแช่แข็งและผ่านการทำให้แห้ง (Freeze dry) จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของไคอะตอม โดยใช้วิธีการของ Bligh และ Dyer (1959) โดยการนำเซลล์ไคอะตอมที่ผ่านการทำให้แห้งประมาณ 20 มิลลิกรัมมาบดและขณะที่ทำการบดต้องเติมสารละลายเมทานอลต่อคลอโรฟอร์มต่อน้ำกลั่นปราศจากไอออนในอัตราส่วน 2:1:0.8 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องเซนตริฟิวที่ความเร็วรอบ 2500 อาร์พีเอ็ม เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ได้มาเติมสารละลายเมทานอลต่อคลอโรฟอร์มต่อน้ำกลั่นปราศจากไอออน ในอัตราส่วน 2:1:0.8 ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร โดยเติมคลอโรฟอร์ม 1.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและวางทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น ทำการดูดสารละลายที่อยู่ชั้นล่างมาใส่ขวดแก้วที่ผ่านการอบและชั่งน้ำหนักจนคงที่แล้ว จากนั้นนำไป

พ่นด้วยก๊าซไนโตรเจน เมื่อสารละลายเริ่มแห้งให้หยุดสารละลายโทลูอิน แล้วพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนอีกครั้งจนสารละลายแห้ง นำไปวางในโถดูดความชื้นที่บรรจุโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์และทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำขวดแก้วมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



รูปที่ 3.11 ภาพถ่ายระบบการกรองเก็บเกี่ยวเซลล์ไคอะตอม *Entomoneis* sp. (1) ลักษณะได้กรองแบบจิบ (2) เครื่องกรองแบบแบ่งส่วน

3.4 การวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมี

3.4.1 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- การนับเซลล์ไคอะตอม

ทำการสุ่มตัวอย่างของเซลล์ไคอะตอมจากชุดการทดลอง จากนั้นนับจำนวนเซลล์ไคอะตอมด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer) โดยนำกระจกปิดแผ่นสไลด์วางลงบนแผ่นสไลด์ หยดตัวอย่างของเซลล์ไคอะตอมให้ทั่วแผ่นสไลด์ทั้งช่องด้านบนและช่องด้านล่าง วางสไลด์ลงบนกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า ทำการนับเซลล์ไคอะตอม ทั้งนี้แต่ละตัวอย่างจะทำการนับเซลล์ 3 ซ้ำ

- การหาน้ำหนักเซลล์แห้งของไคอะตอม

ใช้วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้งที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chu *et al.* (1996) ทำการซั่งกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งกระดาษกรองแห้งและมีน้ำหนักคงที่ นำมาใส่ในโถดูดความชื้น (Dessicator) จากนั้นนำกระดาษกรองที่เตรียมไว้ข้างต้นไปกรองเซลล์ไคอะตอมที่เตรียมไว้โดยมีปริมาตรในการกรองเท่ากับ 200 มิลลิลิตร แล้วจึงนำกระดาษกรองที่ผ่านการกรองเซลล์แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียสอีกครั้ง ให้น้ำหนักแห้งของไคอะตอมครั้งที่ ซั่งกระดาษกรองอีกครั้ง เพื่อหาน้ำหนักที่แท้จริงของเซลล์ไคอะตอม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- การหาอัตราการผลิตเซลล์ของไคอะตอม

การเพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตช์และแบบเฟดแบตช์จะสามารถคำนวณหาอัตราการผลิตเซลล์ไคอะตอมได้จากสมการดังนี้

$$\text{Productivity} = \text{Avg.} \frac{X_2 - X_1}{T_2 - T_1}$$

สำหรับอัตราการผลิตเซลล์ไคอะตอมในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องคำนวณหาได้จาก

$$\text{Specific productivity} = X \cdot D$$

โดย Productivity คือ ผลผลิตของเซลล์ไคอะตอมในระบบแบบแบตช์และเฟดแบตช์

(เซลล์ต่อลิตรต่อวัน)

Specific productivity คือ ผลผลิตของเซลล์ไคอะตอมในระบบแบบต่อเนื่อง

(เซลล์ต่อลิตรต่อวัน)

Avg. คือ ค่าเฉลี่ยของผลผลิตเซลล์ไคอะตอม

X คือ ความหนาแน่นของเซลล์ (10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

T คือ เวลา (วัน)

D คือ อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)

3.4.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

- การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเพาะเชื้อไคอะตอม

การตรวจวัดไนโตรเจนในรูปของไนเตรท โดยใช้วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร (ultraviolet spectrophotometric screening method) ตามวิธีของ Standard Methods (APHA) (1992) โดยเก็บตัวอย่างอาหารเพาะเชื้อไคอะตอมจากชุดการทดลองและกรองเซลล์ออกด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร ทำการเจือจางตัวอย่างอาหารเพาะเชื้อด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร นำค่าผลต่างของการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณความเข้มข้นของไนเตรทจากกราฟมาตรฐาน การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนโตรเจนทำได้โดยนำไปแตสเซียมนิเตรท (KNO_3) ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.5-5 มิลลิกรัมไนเตรท-ไนโตรเจนต่อลิตร

- การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในอาหารเพาะเชื้อไคอะตอม

การตรวจวัดฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต โดยใช้วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร ตามวิธีของ Strickland and Parson (1972) ดังแสดงในภาคผนวก ข. และ ค. โดยเก็บตัวอย่างอาหารเพาะเชื้อไคอะตอมจากชุดการทดลองและกรองเซลล์ออกด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร เติมตัวอย่างอาหารเพาะเชื้อไคอะตอม 1 มิลลิลิตร ตามด้วยรีเอเจนต์ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร นำค่าผลต่างของการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณความเข้มข้นของฟอสเฟตจากกราฟมาตรฐาน สำหรับการเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตทำได้โดยนำไปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.0186-0.744 มิลลิกรัมฟอสฟอรัส-ฟอสเฟตต่อลิตร

- การวิเคราะห์ปริมาณซิลิกาในอาหารเพาะเชื้อไคอะตอม

การตรวจวัดซิลิกาในรูปของซิลิเกต โดยใช้วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 810 นาโนเมตรตามวิธีของ Strickland and Parson (1972) โดยเก็บตัวอย่างอาหารเพาะเชื้อไคอะตอม จากชุดการทดลองและกรองเซลล์ออกจากด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร เติม แอมโมเนียม โมลิบเดต 0.2 มิลลิลิตร ตัวอย่างอาหารเพาะเชื้อไคอะตอม 0.5 มิลลิลิตร และรีเอเจนต์ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมงเพื่อให้สารทำปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 810 นาโนเมตร นำค่าผลต่างของการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณความเข้มข้นของซิลิเกตจากกราฟมาตรฐาน สำหรับการเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเกตทำได้โดยนำ โซเดียมซิลิโคฟลูออไรด์ (Na_2SiF_6) ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.02987-2.987 มิลลิกรัม ซิลิเกตต่อลิตร



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

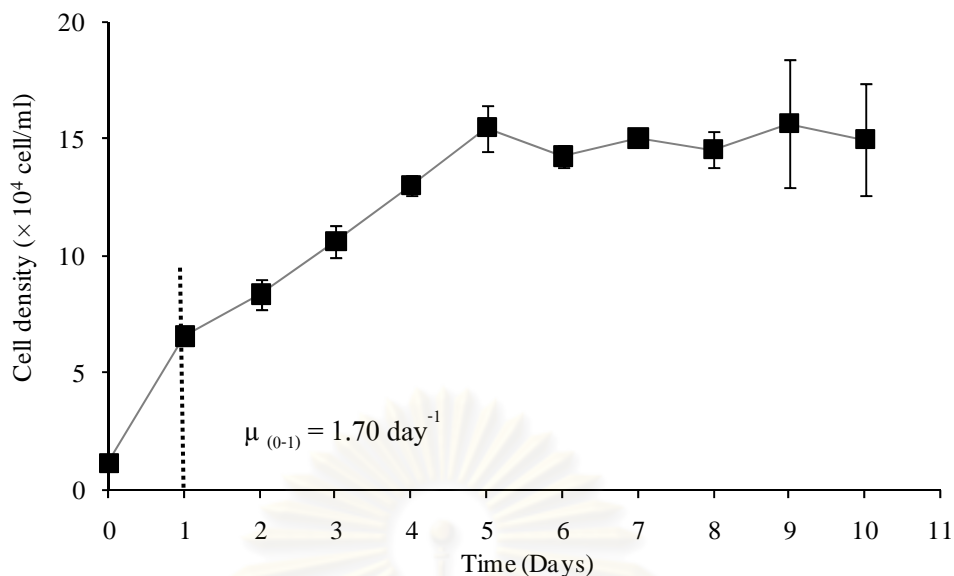
4.1 การศึกษาการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp.

4.1.1 การเตรียมหัวเชื้อไคอะตอม *Entomoneis* sp.

จากการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีเพื่อป้องกันการปนเปื้อน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าเมื่อทำการสุ่มตัวอย่างไคอะตอมชนิดดังกล่าวมาตรวจนับจำนวนเซลล์ของไคอะตอมด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า พบว่าไคอะตอมมีการเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นและมีความหนาแน่นเซลล์ประมาณ $1-2 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ไคอะตอมที่ได้ไปทำการทดลองต่อไป

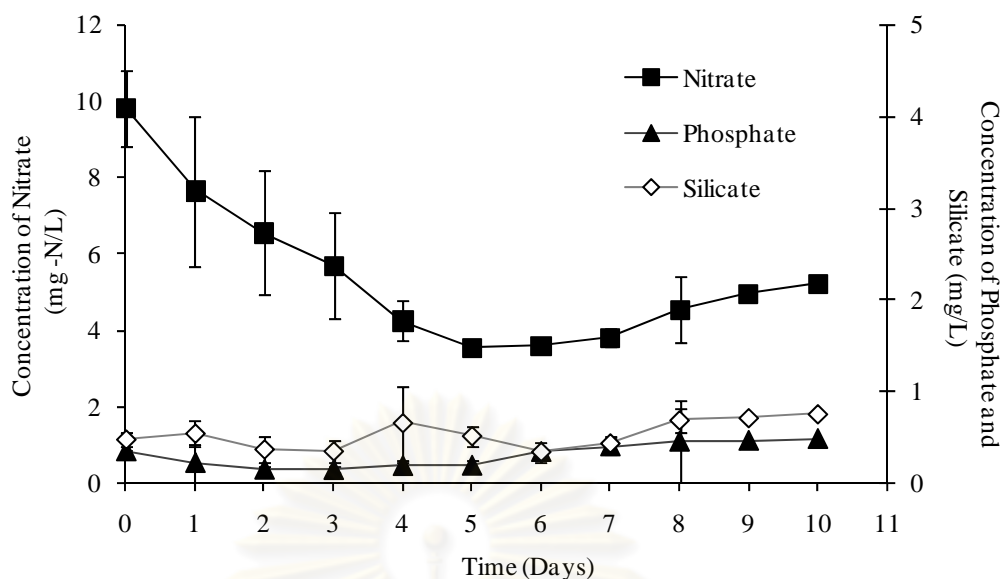
4.1.2 การศึกษาการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

จากการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในขวดแก้วขนาด 1 ลิตร เติมหอาหารเพาะเชื้อเหลวสูตรกิลลาร์ด (F/2) ด้วยสภาวะการเพาะเลี้ยงในหัวข้อใน 3.1.1 โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน พบว่าไคอะตอมมีการเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นและมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 15.69×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และสามารถคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะได้ในระหว่างวันที่ 0 ถึง 1 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 1.7 ต่อวัน ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* cf. *punctulata* ที่มีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 1.73 ต่อวัน (Knuckey *et al.*, 2002) และมีอัตราผลิตเซลล์ไคอะตอมตลอดการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 2.87×10^7 เซลล์ต่อลิตร·วัน



รูปที่ 4.1 การเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2

เมื่อทำการทดลองตรวจวัดความเข้มข้นของสารอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 พบว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรทที่วัดได้ในช่วงระหว่างวันที่ 0-5 ของการเพาะเลี้ยงลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างโปรตีนและสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนหลายชนิด ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์และออร์แกเนลล์ต่างๆ ในขณะที่วันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่าไคอะตอมมีจำนวนเซลล์ที่เนื่องมาจากเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่และบางส่วนตายลง ซึ่งจะทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของสารอินทรีย์ละลายน้ำที่อาจส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทซึ่งเป็นวิธีวัดการดูดกลืนแสงช่วง UV ที่ 220 และ 275 นาโนเมตร ซึ่งจะเกิดความคลาดเคลื่อนได้หากในน้ำมีปริมาณสารอินทรีย์ละลายน้ำสูงเพราะสารอินทรีย์หลายชนิดก็จะมี การดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น UV เช่นเดียวกัน (APHA, 1992) ปัญหาดังกล่าวทำให้พบการเพิ่มขึ้นของไนเตรทในน้ำหลังจากวันที่ 6 ของการทดลอง ในขณะที่การวัดความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต พบว่าไคอะตอม *Entomoneis* sp. มีการใช้ฟอสเฟตในการเติบโตอย่างต่อเนื่อง แต่ยังคงมีฟอสเฟตเหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยง ซึ่งคงเหลือในปริมาณที่ต่ำโดยตลอดการทดลอง และสำหรับการตรวจวัดความเข้มข้นของซิลิกาในรูปของซิลิเกต พบว่าไคอะตอม *Entomoneis* sp. มีการใช้ซิลิกาในการเติบโตอย่างต่อเนื่องเช่นกัน และความเข้มข้นของซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงมีค่าต่ำโดยตลอดการทดลองเช่นเดียวกับฟอสเฟต ดังแสดงในรูปที่ 4.2



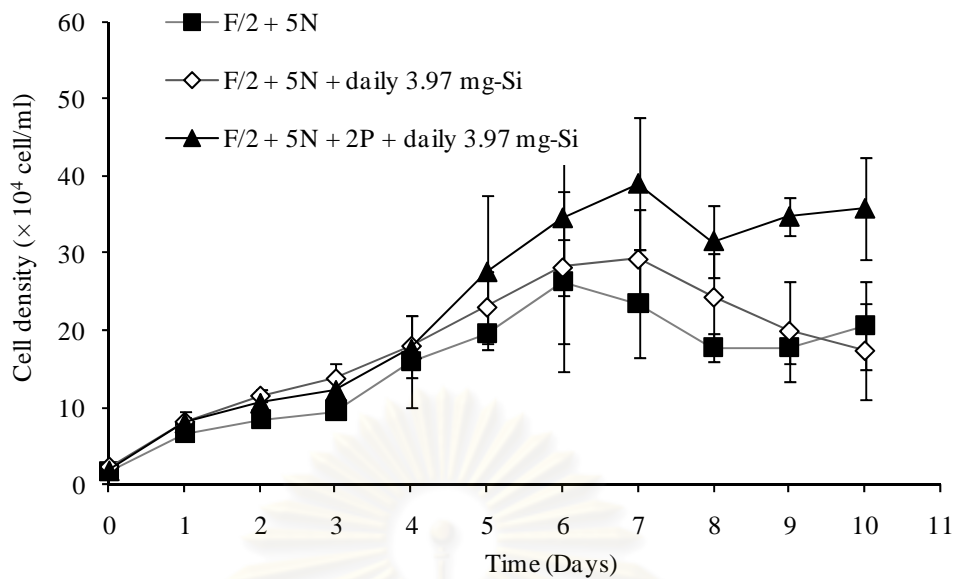
รูปที่ 4.2 ปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิกาของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบคทีเรียในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2

4.1.3 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาต่อการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคทีเรีย

ผลจากการศึกษาในหัวข้อ 4.1.2 พบว่าความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกา มีการลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากไคอะตอมได้นำไปใช้ในการเติบโต ดังนั้นการศึกษาในหัวข้อต่อไปจึงเลือกปรับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนให้มากเกินไป โดยจากผลการวิเคราะห์พบการลดลงของไนโตรเจนมากกว่าการลดลงของฟอสฟอรัสและซิลิกา ดังนั้นจึงปรับเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนให้มากเกินไป ซึ่งคิดเป็น 5 เท่า ของสูตร F/2 ทั้งนี้ เนื่องมาจากไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์และออร์แกเนลล์ต่างๆ เช่น เอนไซม์และกรดนิวคลีอิก และสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงและการแบ่งเซลล์ ดังนั้นความเข้มข้นของไนโตรเจนควรมีในปริมาณที่มากเกินไป นอกจากนั้นยังทำการปรับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเพิ่มเป็น 2 เท่า แต่สำหรับซิลิกาจากการศึกษาพบว่าในระบบการเพาะเลี้ยงซิลิกาจะเกิดการตกตะกอนอยู่ที่บริเวณก้นขวด โดยสังเกตเห็นได้เนื่องจากมีสีค่อนข้างขุ่น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารในหัวข้อก่อนหน้านี้พบว่า มีปริมาณซิลิกาละลายอยู่ในระบบในปริมาณที่สูง ดังนั้นจึงปรับเปลี่ยนวิธีการเติมซิลิกา โดยเติมแบบเฟดแบคทีเรีย เพื่อป้องกันการตกตะกอน ดังนั้นจึงเติมซิลิกาด้วยความเข้มข้นเริ่มต้น 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาทุกวันเพื่อให้มีปริมาณดังกล่าวมีมากเกินไป เนื่องมาจากซิลิกาเป็นองค์ประกอบหลักในการสร้างผนังเซลล์ของไคอะตอม ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบคทีเรียในขวดแก้ว

ขนาด 1 ลิตร เติมหาอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 61.8 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (คิดเป็น 5 เท่า ของสูตร F/2) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน พบว่า ไคอะตอมมีการเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้น โดยในระหว่างวันที่ 0-1 ของการเพาะเลี้ยง ไคอะตอมมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.25 ต่อวัน และในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 26.43×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอมแบบเฟดแบคส์ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 61.8 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (คิดเป็น 5 เท่า ของสูตร F/2) ร่วมกับการเติมซัลฟิคาความเข้มข้นเท่ากับ 3.97 มิลลิกรัมซัลฟิคาต่อลิตรทุกวัน (คิดเป็น 10 เท่าของสูตร F/2) พบว่าการเติมซัลฟิกาในระบบการเพาะเลี้ยงทำให้ไคอะตอมสามารถเติบโตได้เพิ่มขึ้น โดยมีอัตราการเติบโตในระหว่างวันที่ 0-1 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 1.27 ต่อวัน และมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 29.33×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงไคอะตอมแบบเฟดแบคส์ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเท่ากับ 61.8 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ 2.24 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร (คิดเป็น 5 เท่า และ 2 เท่าของสูตร F/2) ตามลำดับ ร่วมกับการเติมซัลฟิคาความเข้มข้น 3.97 มิลลิกรัมซัลฟิคาต่อลิตรทุกวัน (คิดเป็น 10 เท่าของสูตร F/2) พบว่าไคอะตอมมีการเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้น โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.48 ต่อวัน และมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 39.1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นความหนาแน่นที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่ไม่ได้เพิ่มฟอสเฟต ดังแสดงในรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของซัลฟิกาและฟอสฟอรัสมีผลอย่างมากต่อการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. เนื่องจากผนังเซลล์ของไคอะตอมมีซัลฟิกาเป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อไคอะตอมมีการเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์จึงจำเป็นต้องใช้ซัลฟิกาในการสร้างเปลือกหุ้มเซลล์ใหม่ (Van den Hock *et al.*, 1995) ในขณะที่ฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบสำคัญของสารชีวโมเลกุลหลายชนิด เช่น กรดนิวคลีอิกและฟอสโฟลิปิด ดังนั้นการขาดฟอสฟอรัสมีผลทำให้การเติบโตของไคอะตอมลดลง แต่หากมีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสสูงเกินไปอาจยับยั้งการเติบโตของไคอะตอมได้เช่นกัน (มะลิวัลย์ คุตะโค, 2547) ซึ่งผลการคำนวณหาผลผลิตเซลล์ไคอะตอมแสดงในตารางที่ 4.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.3 การเติบโตของไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกา

ตารางที่ 4.1 อัตราผลผลิตเซลล์ไดอะตอม *Entomoneis* sp. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์

สถานะการเพาะเลี้ยง	ระยะเวลาการเลี้ยงจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (days)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/L-day)
F/2 + 5N	6	26.43	4.10
F/2 + 5N + daily 3.97 mg-Si	7	29.33	4.32
F/2 + 5N + 2P + daily 3.97 mg-Si	7	39.10	5.16

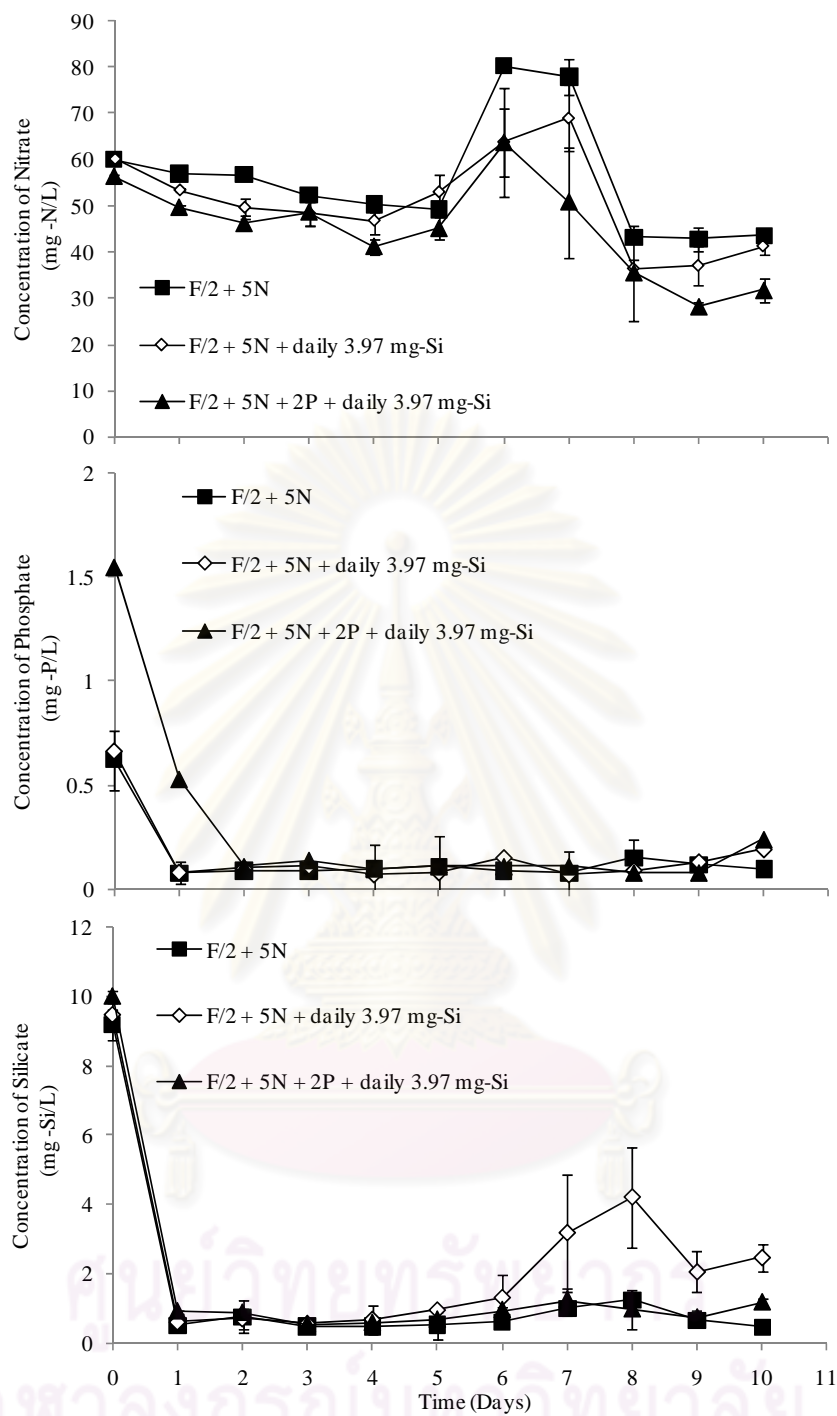
เมื่อทำการทดลองตรวจวัดความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกา โดยทำการเก็บตัวอย่างจากระบบการเพาะเลี้ยงประมาณ 10 มิลลิลิตร ตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับสูตรความเข้มข้นของไนโตรเจนเป็น 5 เท่า ของสูตร F/2 ในทุกชุดการทดลอง พบว่าปริมาณไนเตรทที่วัดได้มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงวันที่ 0-5 ของการ

เพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามพบการเพิ่มขึ้นของไนโตรเจนช่วงวันที่ 6-7 ของการทดลอง ซึ่งการเพิ่มขึ้นนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างแน่ชัด

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ให้กับระบบการเพาะเลี้ยงพบว่าปริมาณไนโตรเจนตกค้างอยู่ในระบบเป็นจำนวนมาก โดยที่ไคอะตอมไม่ได้มีนำไปใช้ประโยชน์ และไนโตรเจนที่เป็นสารเคมีที่มีราคาสูงที่สุด ส่งผลโดยตรงต่อค่าใช้จ่ายสารเคมีในอาหารเพาะเชื้อ ดังนั้นการปรับลดความเข้มข้นของไนโตรเจนลงจากสูตรปกติ F/2 จึงมีความเป็นไปได้ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ส่วนหนึ่ง

ในส่วนของความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต พบว่าความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับลดความเข้มข้นของไนโตรเจนเป็น 5 เท่าของสูตร F/2 มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยง และค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยมีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงไคอะตอมที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนคิดเป็น 5 เท่าของสูตร F/2 ร่วมกับการเติมซิลิกาวันละ 1 มิลลิตรทุกวัน โดยปริมาณฟอสเฟตลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยง และค่อนข้างคงที่เช่นกัน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงไคอะตอมที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสคิดเป็น 5 เท่า และ 2 เท่า ของสูตร F/2 ตามลำดับ ร่วมกับการเติมซิลิกาวันละ 1 มิลลิตรทุกวัน พบว่าปริมาณฟอสเฟตในวันแรกของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณสูงกว่า 2 ชุดการทดลองในข้างต้น แต่แนวโน้มของฟอสเฟตลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยงและค่อนข้างคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยงเช่นกัน แต่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเหลืออยู่ในระดับต่ำ

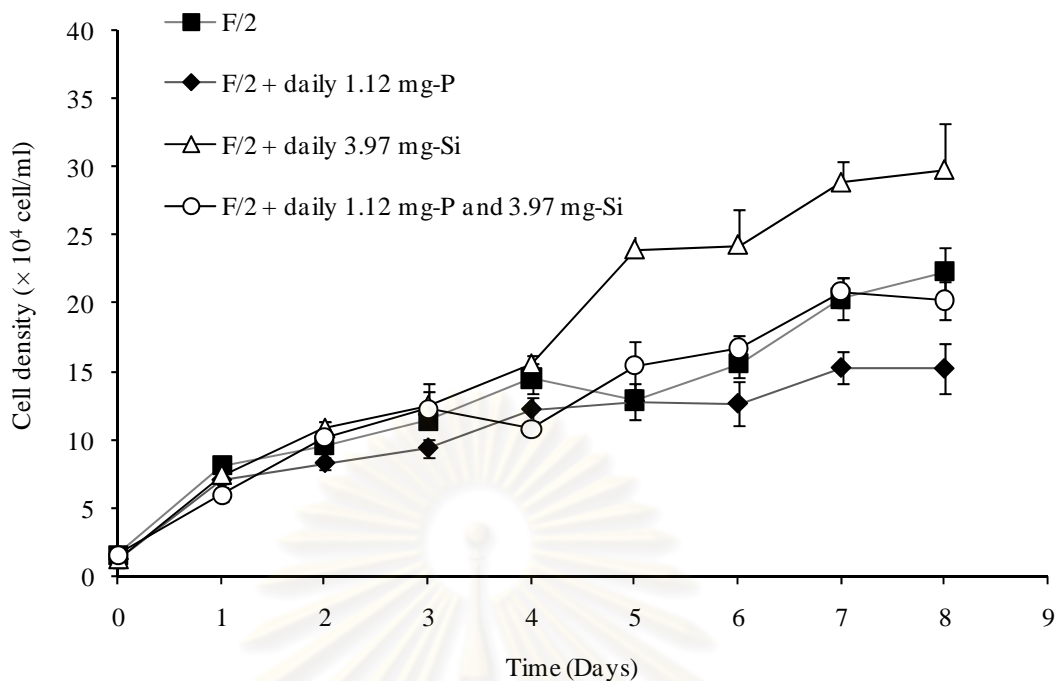
สำหรับความเข้มข้นของซิลิกาในรูปของซิลิเกต พบว่าการเพาะเลี้ยงไคอะตอมในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับลดความเข้มข้นของไนโตรเจนเป็น 5 เท่าของสูตร F/2 และการเพาะเลี้ยงไคอะตอมในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับลดความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็น 5 เท่า และ 2 เท่าของสูตร F/2 ตามลำดับ ร่วมกับการเติมซิลิกาวันละ 1 มิลลิตรทุกวัน มีแนวโน้มสอดคล้องกัน โดยปริมาณซิลิเกตลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยง และค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง แต่มีความเข้มข้นของซิลิกาอยู่ในระดับต่ำ แต่สำหรับการเพาะเลี้ยงไคอะตอมที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนคิดเป็น 5 เท่าของสูตร F/2 ร่วมกับการเติมซิลิกาวันละ 1 มิลลิตรทุกวัน พบว่า ปริมาณซิลิเกตลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน แต่ในวันที่ 4-8 ของ การเพาะเลี้ยง ปริมาณซิลิเกตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างรวดเร็วอีกครั้งในวันที่ 8 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิเกต ในอาหารเพาะเชื้อเห็ดหลินจือ F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกา

4.1.4 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของฟอสฟอรัสและซิลิกา ต่อการเติบโตของ ไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์

จากการเพาะเลี้ยงในหัวข้อก่อนหน้านี้ (4.1.3) แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของสารอาหารในปริมาณที่สูงเกินไป ไม่ส่งผลต่อการเติบโตของไคอะตอม จากการวิเคราะห์ พบว่าปริมาณไนโตรเจนในสูตร F/2 เริ่มต้นยังคงเหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสและซิลิกาได้ลดลงอย่างรวดเร็วจนมีค่าอยู่ในระดับต่ำ แสดงให้เห็นว่าการเติมฟอสฟอรัสและซิลิกาในปริมาณมากเพียงใด ปริมาณดังกล่าวจะลดลงเนื่องจากการใช้ในการเติบโตของไคอะตอมดังนั้นจึงปรับเปลี่ยนรูปแบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. เป็นระบบแบบเฟดแบคซ์ในขวดแก้ว duran ขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ร่วมกับการเติมฟอสฟอรัสความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตรต่อวัน และซิลิกาความเข้มข้น 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตรต่อวัน โดยเติมวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 8 วัน ผลการเพาะเลี้ยงพบว่า ทั้งการเพาะเลี้ยงไคอะตอมในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปรกติ การเพาะเลี้ยงไคอะตอมที่มีการเติมฟอสฟอรัสหรือซิลิกาอย่างใดอย่างหนึ่ง และการเพาะเลี้ยงไคอะตอมที่มีการเติมทั้งฟอสฟอรัสและซิลิกา ไคอะตอมมีการเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงระหว่างวันที่ 0-4 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะและความหนาแน่นเซลล์ใกล้เคียงกัน แต่หลังจากวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่าการเพาะเลี้ยงไคอะตอมในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการเติมซิลิกาความเข้มข้น 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ทุกวัน (การเติมทุกวันจนถึงสิ้นสุดการทดลองคิดเป็น 8 เท่าของสูตร F/2) ไคอะตอมสามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่อง โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.77 ต่อวัน และความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 29.83×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 4.5 (ผลการคำนวณอัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอมแสดงในตารางที่ 4.2) โดยผลการศึกษาสอดคล้องกับผลการศึกษาของมะลิวัลย์ กุตะโค (2547) ที่เพาะเลี้ยงไคอะตอม *Amphora delicatissima* AM 9901 ด้วยอาหารสูตร F/2 ร่วมกับการเติมซิลิกาความเข้มข้น 2.4 มิลลิโมลาร์ จะให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ในขณะที่การเพาะเลี้ยงไคอะตอมด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปรกติ และการเพาะเลี้ยงไคอะตอมที่มีการเติมทั้งฟอสฟอรัสและซิลิกา จะมีความหนาแน่นเซลล์อยู่ในช่วงระหว่าง $20-22 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่สำหรับการเพาะเลี้ยงไคอะตอมที่มีการเติมฟอสฟอรัสเพียงอย่างเดียว พบว่าการเติบโตของไคอะตอมอยู่ในระดับต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัด โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 15.37×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า การเติมฟอสฟอรัสในปริมาณสูงเท่ากับวันละ 1.12 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร เป็นเวลา 8 วัน ไม่ส่งผลต่อการเติบโตของไคอะตอม



รูปที่ 4.5 การเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบเฟดแบดจ์ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เติมฟอสฟอรัสและซิลิกาความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร และ 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร วันละหนึ่งครั้งทุกวัน

ตารางที่ 4.2 อัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอม *Entomoneis* sp. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟอสฟอรัสและซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบดจ์

สถานการณ์เพาะเลี้ยง	ระยะเวลาการเลี้ยงจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (days)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/L·day)
F/2 + daily 1.12 mg-P	7	15.37	2.32
F/2 + daily 3.97 mg-Si	8	29.83	3.57
F/2 + daily 1.12 mg-P and 3.97 mg-Si	7	20.93	2.75

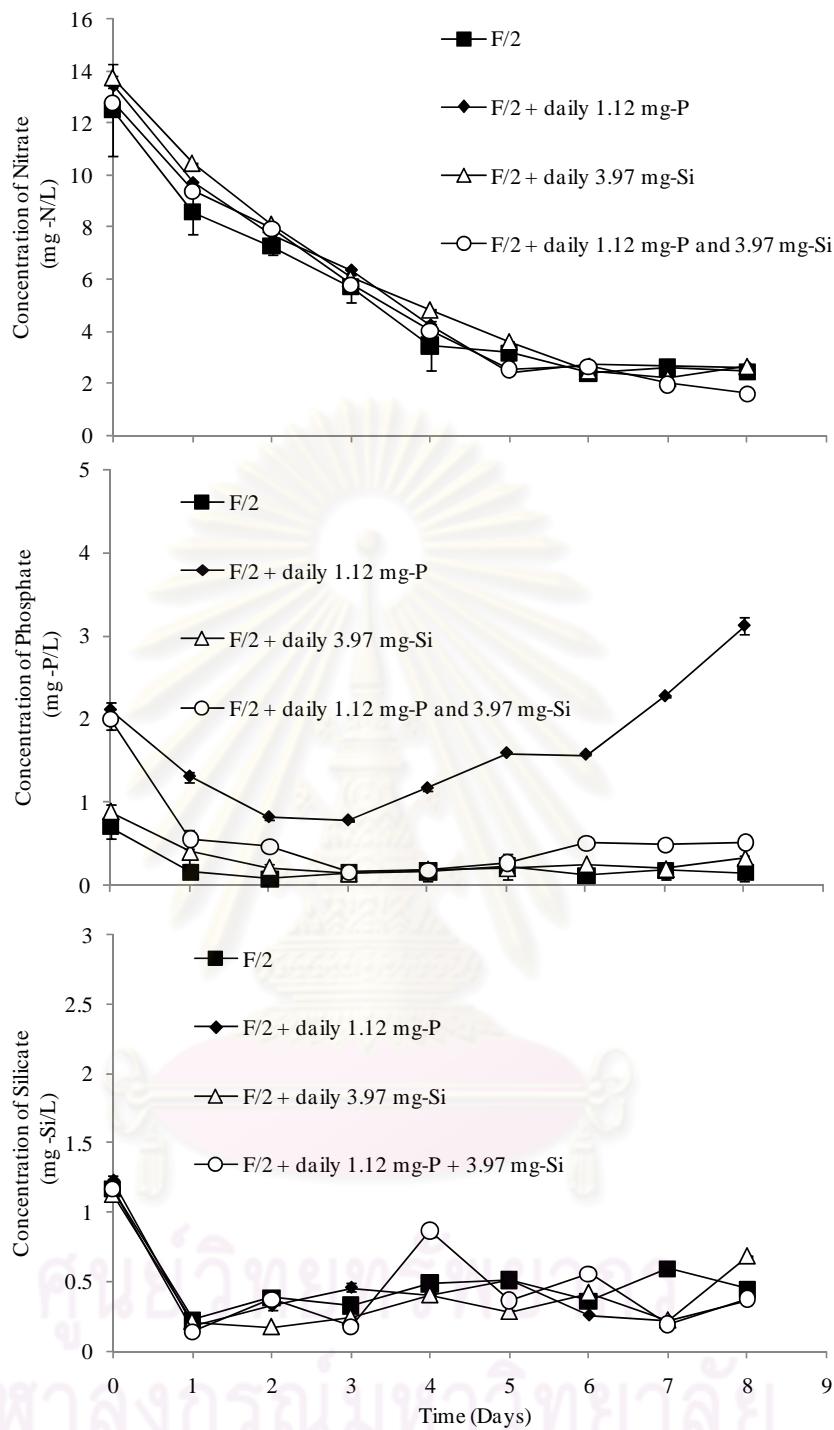
เมื่อทำการทดลองตรวจวัดความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรทในระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เติมฟอสฟอรัสและซิลิกาความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร และ 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ตามลำดับ โดยทำการเก็บตัวอย่างจากระบบการเพาะเลี้ยงประมาณ 10 มิลลิลิตร ตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง พบว่า

ปริมาณไนเตรทในทั้ง 4 ชุดการทดลองมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่แรกจนถึงวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงเนื่องจากไดอะตอมมีการนำไนเตรทไปใช้ในการเติบโต แต่ปริมาณไนเตรทที่เหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยงยังคงมีความเข้มข้นของไนโตรเจนเพียงพอที่ไดอะตอมนำไปใช้ในการเติบโต

ในขณะที่การตรวจวัดความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปรกติและการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการเติมซิลิกา ความเข้มข้น 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร มีปริมาณฟอสเฟตลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยง และเริ่มคงที่ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป แต่ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่ตรวจพบอยู่ในระดับต่ำ (0.26 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร) สำหรับการเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ร่วมกับการเติมฟอสฟอรัสและซิลิกาวนละ 1 มิลลิตรทุกวัน พบว่าฟอสเฟตมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน เนื่องจากไดอะตอมมีการนำฟอสเฟตไปใช้ในการเติบโต และเริ่มคงที่ในช่วงวันที่ 3-4 ของการเพาะเลี้ยง แต่กลับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป ในขณะที่การเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการเติมฟอสฟอรัสความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตรเพียงอย่างเดียว พบว่า ปริมาณฟอสเฟตมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงวันที่ 0-2 ของการเพาะเลี้ยง แต่กลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป

ผลการตรวจวัดความเข้มข้นของซิลิกาในรูปของซิลิเกตในระบบการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เติมฟอสฟอรัสและซิลิกาความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร และ 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าปริมาณซิลิเกตในทั้ง 4 ชุดการทดลองมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่แรกของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และมีความเข้มข้นต่ำตลอดการทดลองแม้จะมีการเติมซิลิเกตทุกวันก็ตาม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

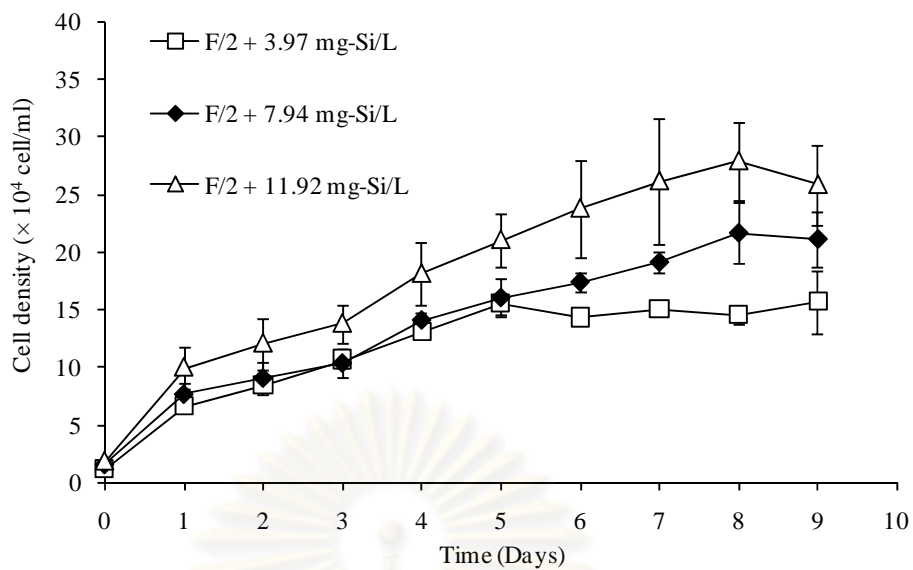


รูปที่ 4.6 ปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิเกต ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เติมฟอสฟอรัส และซิลิกาความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร และ 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตรทุกวัน ตามลำดับ

4.1.5 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของซลิเกาต่อการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบคทีเรีย

จากผลการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ด้วยสภาวะที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของซลิเกาในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 มีผลอย่างมากต่อการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. เนื่องจากผนังเซลล์ไคอะตอมมีซลิเกาเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอมในระบบแบบแบคทีเรียในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของซลิเกาเป็น 7.94 และ 11.92 มิลลิกรัมซลิเกาต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น 2 และ 3 เท่าของสูตร F/2 ตามลำดับ พบว่า การเพาะเลี้ยงไคอะตอมในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปรกติและที่ปรับระดับความเข้มข้นของซลิเกาเป็น 7.94 มิลลิกรัมซลิเกาต่อลิตร มีอัตราการเติบโตอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันในช่วงระหว่างวันที่ 0-5 ของการเพาะเลี้ยง แต่หลังจากวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าการเพาะเลี้ยงไคอะตอมที่ความเข้มข้นของซลิเกา 7.94 มิลลิกรัมซลิเกาต่อลิตร ไคอะตอมสามารถเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 21.67×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงไคอะตอมในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปรกติที่ปรับระดับความเข้มข้นของซลิเกาเป็น 11.92 มิลลิกรัมซลิเกาต่อลิตร พบว่าไคอะตอมมีการเติบโตอย่างต่อเนื่องและมีแนวโน้มการเติบโตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.68 ต่อวัน และมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 27.90×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และทำการหาอัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอมดังแสดงในตารางที่ 4.3

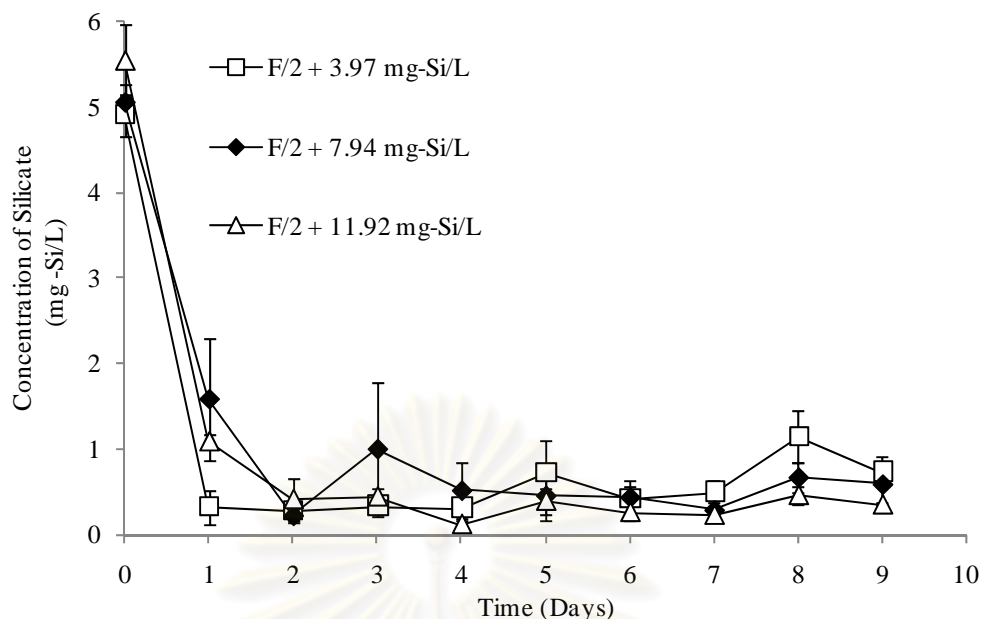
นอกจากนั้นได้ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของซลิเกาในรูปของซลิเกตซึ่งเป็นสารอาหารหลักที่ได้ทำการปรับระดับความเข้มข้นในการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีความเข้มข้นของซลิเกาเป็น 7.94 และ 11.92 มิลลิกรัมซลิเกาต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า ซลิเกตมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยงไคอะตอม โดยแม้ว่าจะปรับความเข้มข้นขึ้นสูงกว่าสูตรปรกติถึง 3 เท่า ความเข้มข้นของซลิเกตที่ตรวจวัดได้ในวันเริ่มต้นของทุกชุดการทดลอง มีค่าใกล้เคียงกันที่ประมาณ 5 มิลลิกรัมซลิเกาต่อลิตร และต่อมาพบการลดลงของซลิเกตในทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกัน ทำให้ความเข้มข้นเฉลี่ยของซลิเกตในระหว่างการเลี้ยงไคอะตอมอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมซลิเกาต่อลิตรตลอดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.7 การเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของซิลิกาเป็น 7.94 (2 เท่า) และ 11.92 (3 เท่า) มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตรตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 อัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอม *Entomoneis* sp. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

สถานะการเพาะเลี้ยง	ระยะเวลาการเลี้ยงจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (days)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/L·day)
F/2 + 3.97 mg-Si/L	9	15.69	2.88
F/2 + 7.94 mg-Si/L	8	21.67	2.50
F/2 + 11.92 mg-Si/L	7	27.90	3.25



รูปที่ 4.8 ปริมาณซิลิกาเกิดของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับระดับความเข้มข้นของซิลิกาเป็น 7.94 (2 เท่า) และ 11.92 (3 เท่า) มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตรตามลำดับ

4.1.6 ผลของความเข้มข้นของซิลิกาต่อการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์

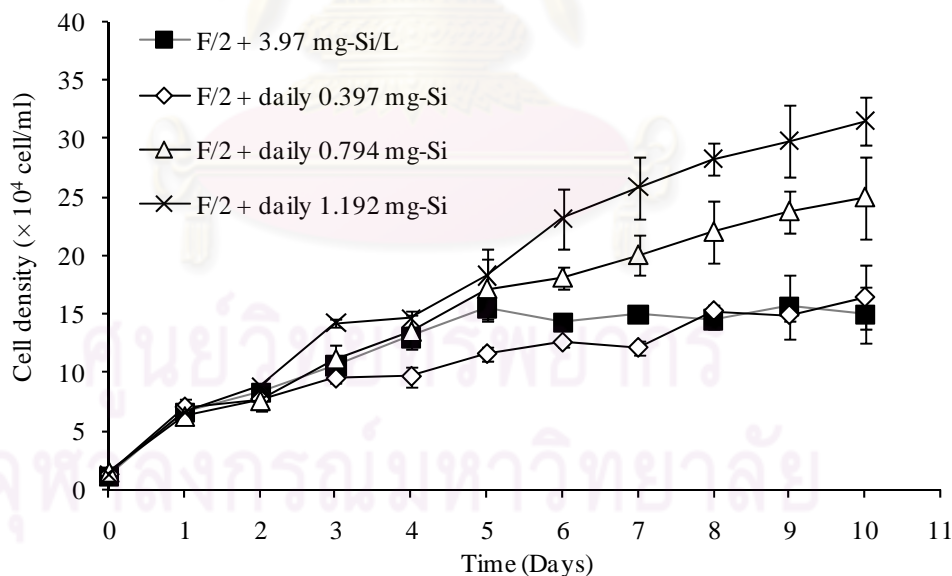
จากการศึกษาในหัวข้อก่อนหน้านี้ (4.1.5) พบว่า ในระบบแบบแบคซ์ความหนาแน่นเซลล์ไคอะตอมแปรผันตามระดับความเข้มข้นของซิลิกา แต่การที่ปริมาณซิลิกาเกิดในอาหารเพาะเชื้อมีค่าต่ำ แสดงว่าซิลิกาส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบที่ไม่ใช่ซิลิกาซึ่งไคอะตอมไม่สามารถนำไปใช้ในการเติบโตได้ การเพาะเลี้ยงไคอะตอมในระบบแบบแบคซ์จะเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มปริมาณซิลิกาเกิดโดยตรงเพื่อให้ไคอะตอมมีโอกาสใช้ซิลิกาในรูปแบบซิลิกาได้อย่างต่อเนื่อง การทดลองนี้ทำในขวดแก้ว Duran ขนาด 1 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อไคอะตอมที่ทำการเลี้ยงด้วยอาหารสูตร F/2 ที่มีความเข้มข้นซิลิกา 2 ระดับ คือความเข้มข้นสูง 5 เท่าของสูตรปกติ และความเข้มข้นตามสูตร F/2 ปกติ และนำหัวเชื้อดังกล่าวมาเป็นเชื้อตั้งต้นในการทดลองเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์ โดยใช้หัวเชื้อ 1 ส่วนต่ออาหารเพาะเชื้อ 9 ส่วน (10%) ทำการเพาะเลี้ยงโดยจะมีการเติมซิลิกาทุกวันในความเข้มข้นที่แตกต่างกันออกไป

รูปที่ 4.9 แสดงผลการเพาะเลี้ยงไคอะตอมที่ใช้หัวเชื้อที่เลี้ยงด้วยซิลิกาความเข้มข้นคิดเป็น 5 เท่าของสูตร F/2 ร่วมกับการเติมซิลิกาความเข้มข้น 0.397 0.794 และ 1.192 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตรทุกวัน พบว่าการเติมซิลิกาที่ความเข้มข้นสูง 1.192 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร จะทำให้ไคอะตอม

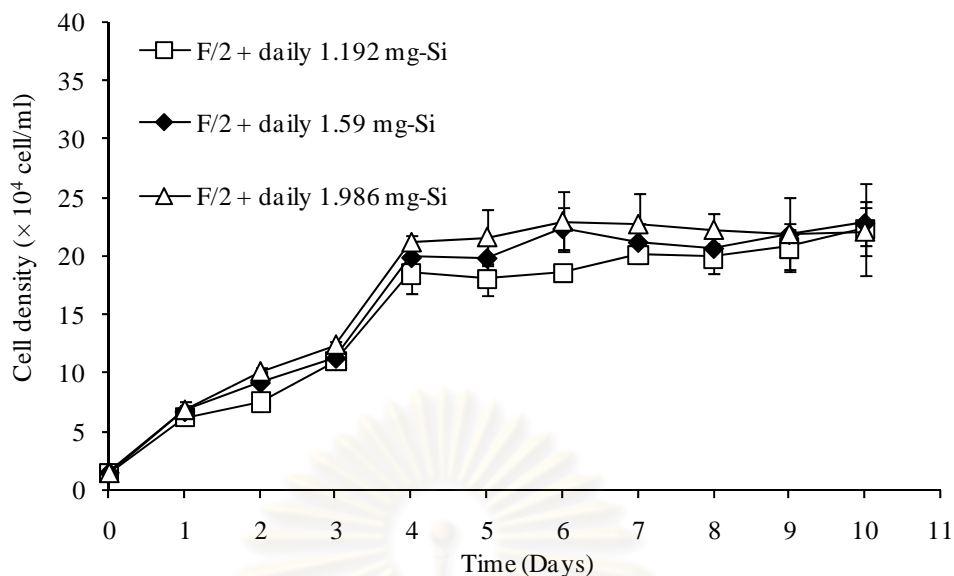
มีอัตราการเติบโตและความหนาแน่นสูงที่สุด โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.64 ต่อวันและความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 31.48×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การเติมซิลิกาเกิดทุกวันที่ความเข้มข้น 0.397 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ให้ผลไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่เลี้ยงในอาหารสูตรปรกติ

การทดลองเลี้ยงไคอะตอมโดยใช้หัวเชื้อที่มีความเข้มข้นของซิลิกาตามสูตร F/2 ปรกตินำมาเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ร่วมกับการเติมซิลิกาเกิดความเข้มข้นสูง 1.192 1.59 และ 1.986 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตรทุกวัน พบว่าไคอะตอมสามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีอัตราการเติบโตในช่วงระหว่างวันที่ 0-1 ของการเพาะเลี้ยงใกล้เคียงกัน แต่หลังจากวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่าการเติบโตของไคอะตอมเริ่มอยู่ในระดับคงที่ และมีค่าความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยใกล้เคียงกัน ในทุกระดับความเข้มข้นของซิลิกา โดยมีความหนาแน่นสูงสุดต่ำกว่า 25×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในทุกชุดการทดลอง และเมื่อคำนวณอัตราหาผลผลิตเซลล์ไคอะตอมจะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณสารอาหาร โดยเฉพาะซิลิกาที่มีอยู่ในอาหารเพาะเชื้อของหัวเชื้อไคอะตอมนั้นมีผลต่อการเติบโตของไคอะตอม โดยปริมาณสารอาหารดังกล่าวยังคงเหลือตกค้างหลังจากการถ่ายเชื้อซึ่งใช้หัวเชื้อคิดเป็น 10% จึงทำให้ไคอะตอมสามารถนำสารอาหารดังกล่าวที่ยังคงมีอยู่ในระบบการเพาะเลี้ยงไปใช้ในการเติบโต



รูปที่ 4.9 การเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. โดยใช้หัวเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร F/2 ที่มีซิลิกาสูง 5 เท่า นำมาเลี้ยงแบบเฟดแบตช์โดยมีการเติมซิลิกาความเข้มข้น 0.397 0.794 และ 1.192 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ทุกวัน



รูปที่ 4.10 การเติบโตของไดอะตอม *Entomoneis* sp. โดยใช้หัวเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ปรกติ นำมาเลี้ยงแบบเฟดแบดจ์โดยมีการเติมซิลิกาความเข้มข้น 1.192 1.59 และ 1.986 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ทุกวัน

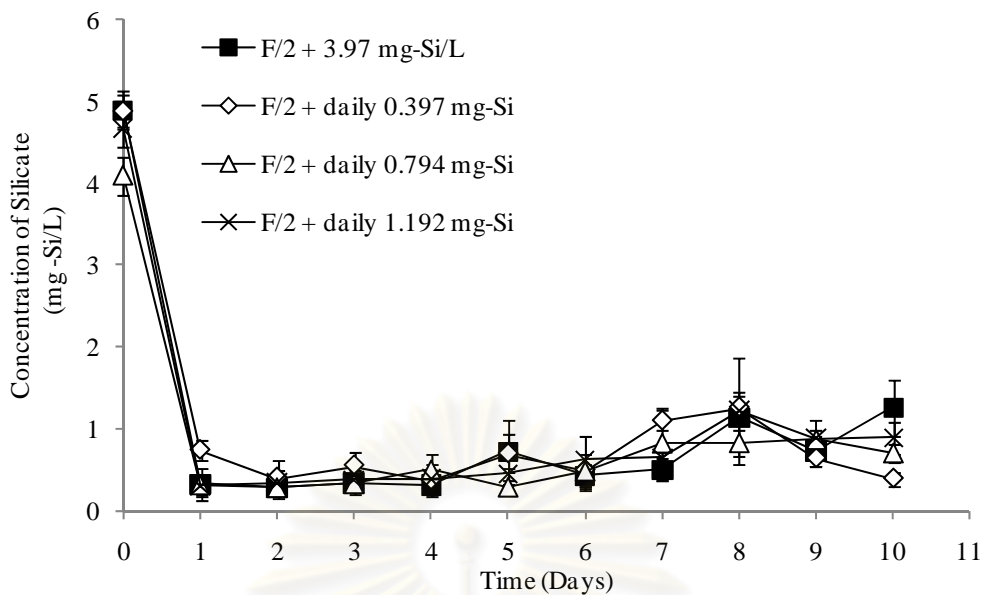
ตารางที่ 4.4 อัตราผลผลิตเซลล์ไดอะตอม *Entomoneis* sp. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาในระบบ การเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบดจ์

ความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อไดอะตอม	สถานะการเพาะเลี้ยง	ระยะเวลาการเลี้ยงจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (days)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/L·day)
19.86 mg-Si/L (Si 5 เท่า)	F/2 + daily 0.397 mg-Si	10	16.47	1.87
	F/2 + daily 0.794 mg-Si	10	25.02	2.35
	F/2 + daily 1.192 mg-Si	10	31.48	3.02

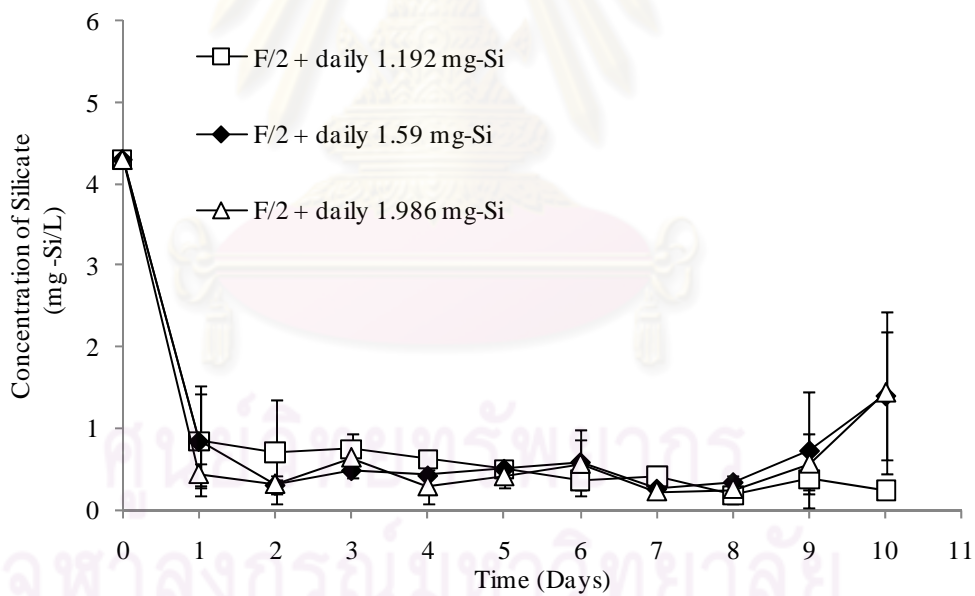
ตารางที่ 4.4 อัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอม *Entomoneis* sp. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟตแบคซ์ (ต่อ)

ความเข้มข้นของซิลิกาในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อไคอะตอม	สถานะการเพาะเลี้ยง	ระยะเวลาการเลี้ยงจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (days)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/L·day)
3.97 mg-Si/L (Si 1 เท่า)	F/2 + daily 1.192 mg-Si	10	22.34	4.26
	F/2 + daily 1.59 mg-Si	10	22.88	4.61
	F/2 + daily 1.986 mg-Si	6	23.00	3.59

สำหรับผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของซิลิกะนั้น เป็นที่ทราบกันดีว่าสถานะการขาดแคลนซิลิกาจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการลดลงของเซลล์ไคอะตอม (Lewin, 1955) อย่างไรก็ตามพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของไซโตเดียมเมตาซิลิกตซึ่งเป็นแหล่งของซิลิกาให้สูงกว่าสูตรอาหารปกติ ทั้งในระบบแบคซ์และแบบเฟตแบคซ์ ไม่ทำให้ปริมาณซิลิกตในอาหารเพาะเชื้อเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด โดยปริมาณซิลิกตในน้ำยังคงมีค่าคงที่ต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมซิลิกตต่อลิตรในทุกการทดลอง (รูปที่ 4.11 และ 4.12)

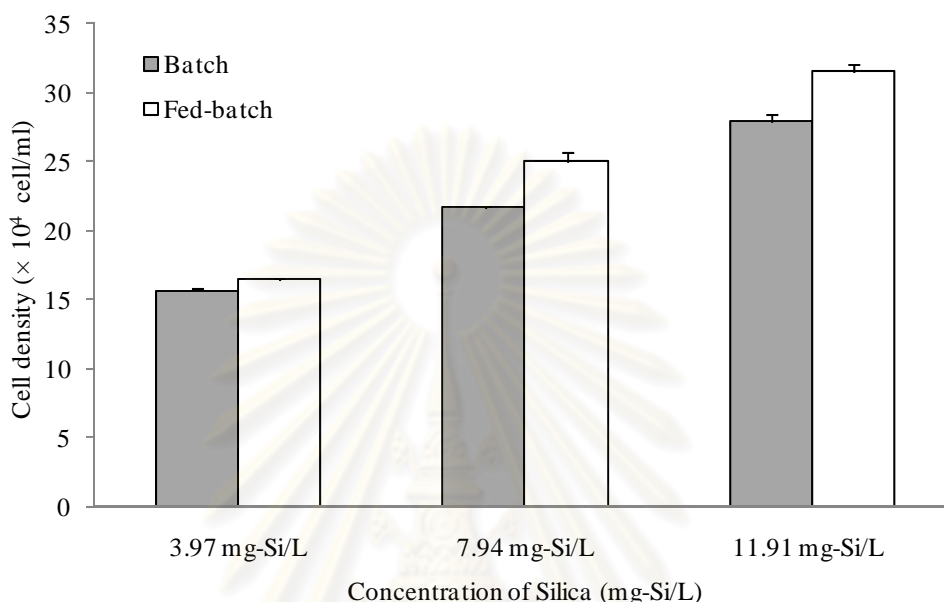


รูปที่ 4.11 ปริมาณซิลิกาของไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการเติมซิลิกาความเข้มข้น 0.397 0.794 และ 1.192 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ทุกวัน



รูปที่ 4.12 ปริมาณซิลิกาของไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการเติมซิลิกาความเข้มข้น 1.192 1.59 และ 1.986 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตรทุกวัน

จากผลการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบเฟดแบตช์ (หัวข้อ 4.1.5) ที่ความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากัน คือ 3.97 7.94 และ 11.92 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร (คิดเป็น 1 2 และ 3 เท่าของสูตร F/2) จะให้ความหนาแน่นเซลล์ไคอะตอมสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตช์ในทุก ๆ ความเข้มข้นของซิลิกา ดังแสดงในรูปที่ 4.13



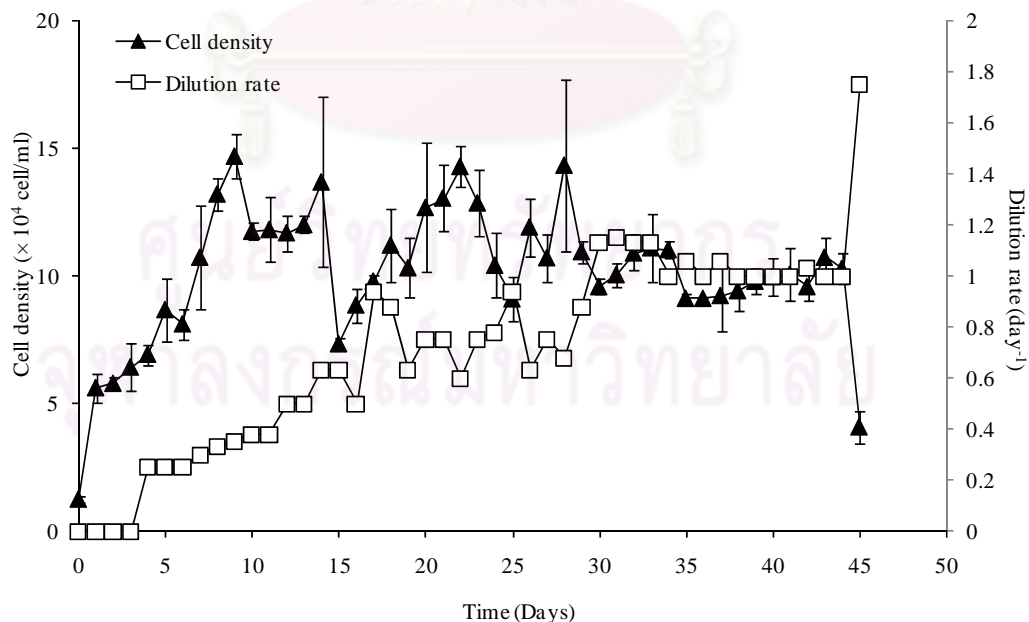
รูปที่ 4.13 ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดระหว่างการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ด้วยระบบแบบแบตช์และแบบเฟดแบตช์

4.2 การศึกษาการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous culture)

4.2.1 การเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ในการทดลองครั้งที่ 1

จากผลการศึกษาที่ผ่านมา จึงเลือกภาวะของสารอาหารที่ได้มาพิจารณาเพื่อประยุกต์ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงในระบบแบบต่อเนื่อง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ในขวดแก้วขนาด 5 ลิตร ด้วยอาหารเพาะเชื้อเริ่มต้นสูตร F/2 ความเต็ม 30 พีเอสยู อัตราการให้อากาศ 45-50 ลิตรต่อชั่วโมง เป็นเวลา 45 วัน ในการทดลองครั้งที่ 1 ซึ่งเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงด้วยระบบแบบแบตช์เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เซลล์มีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณ จากนั้นในช่วงวันที่ 6-45 ของการเพาะเลี้ยงจึงได้เริ่มการเพาะเลี้ยงไคอะตอมแบบต่อเนื่อง ทำการปรับอัตราการเจือจาง (Dilution rate) เริ่มต้นที่ 0.25 ต่อวัน โดยการปรับระดับความเร็วรอบของปั๊มรีดสายและ

วัดอัตราการไหลของอาหารเพาะเชื้อจากปริมาณอาหารเพาะเชื้อที่ไหลออกจากถังเพาะเลี้ยง (มิลลิลิตรต่อวัน) พบว่า ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์อยู่ระหว่าง $6-9 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.50 ต่อวัน ทั้งนี้เมื่อไคอะตอมเข้าสู่ภาวะคงที่จึงทำการปรับอัตราการเจือจางให้สูงขึ้น โดยการปรับเพิ่มระดับความเร็วรอบของปัมป์รีดสาย โดยในวันที่ 4-7 ของการเพาะเลี้ยงมีอัตราการเจือจางอยู่ในช่วง 0.25-0.3 ต่อวัน พบว่าไคอะตอมมีความหนาแน่นเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรเพาะเลี้ยงในระบบเบตซ์ จากนั้นในวันที่ 8-11 ของการเพาะเลี้ยงทำการปรับอัตราการเจือจางให้สูงขึ้นอยู่ในช่วง 0.3-0.4 ต่อวัน พบว่าไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยเพิ่มขึ้น แต่เมื่อปรับระดับอัตราการเจือจางให้สูงขึ้นอยู่ในช่วง 0.5-0.6 ต่อวันในวันที่ 12-16 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์ลดลงเล็กน้อย และเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางให้สูงขึ้นอยู่ในช่วง 0.6-0.9 ต่อวัน พบว่าความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยของไคอะตอมมีค่าใกล้เคียงกัน จากนั้นเมื่อทำการปรับระดับอัตราการเจือจางให้สูงขึ้นเข้าใกล้ 1 จึงพบว่าความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยของไคอะตอมมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว และในวันที่ 45 ของการเพาะเลี้ยงพบว่าอัตราการเจือจางมีค่าสูงถึง 1.75 ต่อวัน ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ไคอะตอมลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งก็อาจจะเกิดการชะล้างเซลล์ออกจากระบบจนหมด (wash out) แสดงให้เห็นว่าอัตราการเจือจางจะแปรผกผันกับความหนาแน่นเซลล์ (Bailey and Oillis, 1986) ดังแสดงในรูปที่ 4.14 โดยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องดังกล่าวมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 10.61×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร



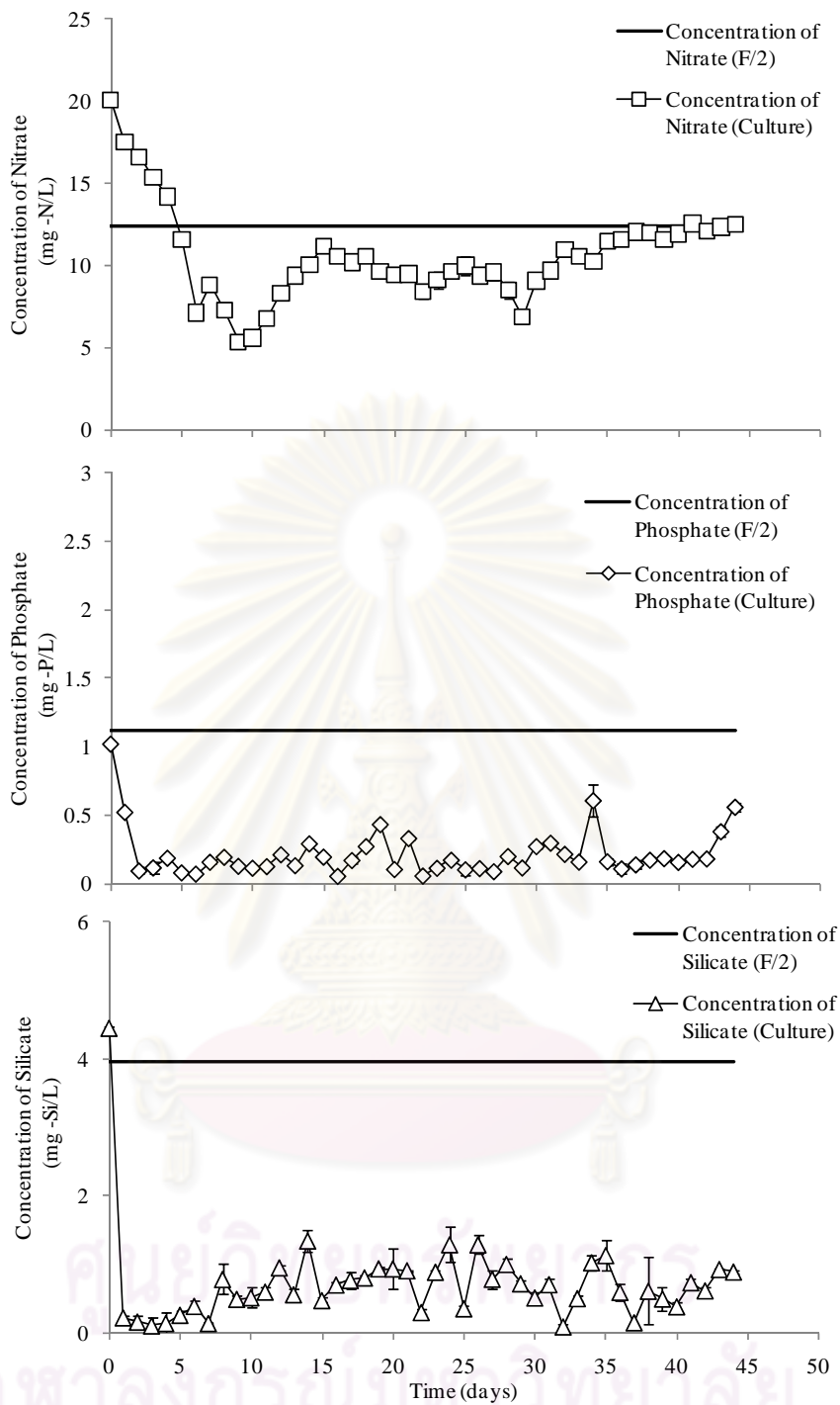
รูปที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ในการทดลองครั้งที่ 1

ตารางที่ 4.5 ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลิตเซลล์ ไคอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องครั้งที่ 1

วันที่	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราการเจริญ (day ⁻¹)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g-dry weight/L· day)	อัตราผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/ L· day)
0-3	4.78	0	0	0
4-7	8.63	0.26	0.14	2.29
8-11	12.88	0.36	0.18	4.62
12-16	12.73	0.55	0.12	5.91
17-21	11.42	0.79	0.09	8.98
22-26	11.73	0.74	0.08	8.49
27-31	11.14	0.92	0.10	9.97
32-36	10.26	1.06	0.11	10.95
37-41	9.70	1.01	0.12	9.81
42-45	8.68	1.19	0.08	9.52

และเมื่อทำการทดลองตรวจวัดปริมาณสารอาหารหลักได้แก่ การวัดความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรท ฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต และซิลิกาในรูปของซิลิเกต ในการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ด้วยระบบแบบต่อเนื่อง ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 พบว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรทที่วัดได้ในช่วงระหว่างวันที่ 0-8 ของการเพาะเลี้ยงลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากไคอะตอม *Entomoneis* sp. มีการนำไนเตรทไปใช้ในการเติบโต ในขณะที่วันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป พบว่าปริมาณไนเตรทเริ่มเข้าสู่ภาวะสมดุลโดยมีความเข้มข้นค่อนข้างคงที่ ในขณะที่การวัดความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต พบว่าปริมาณฟอสเฟตลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยง แต่ยังคงมีฟอสเฟตเหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยงในมีความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร สำหรับการตรวจวัดความเข้มข้นของซิลิกาในรูปของซิลิเกต พบว่า ปริมาณซิลิเกตลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นพบว่ายังคงมีปริมาณซิลิเกตเหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่

4.15



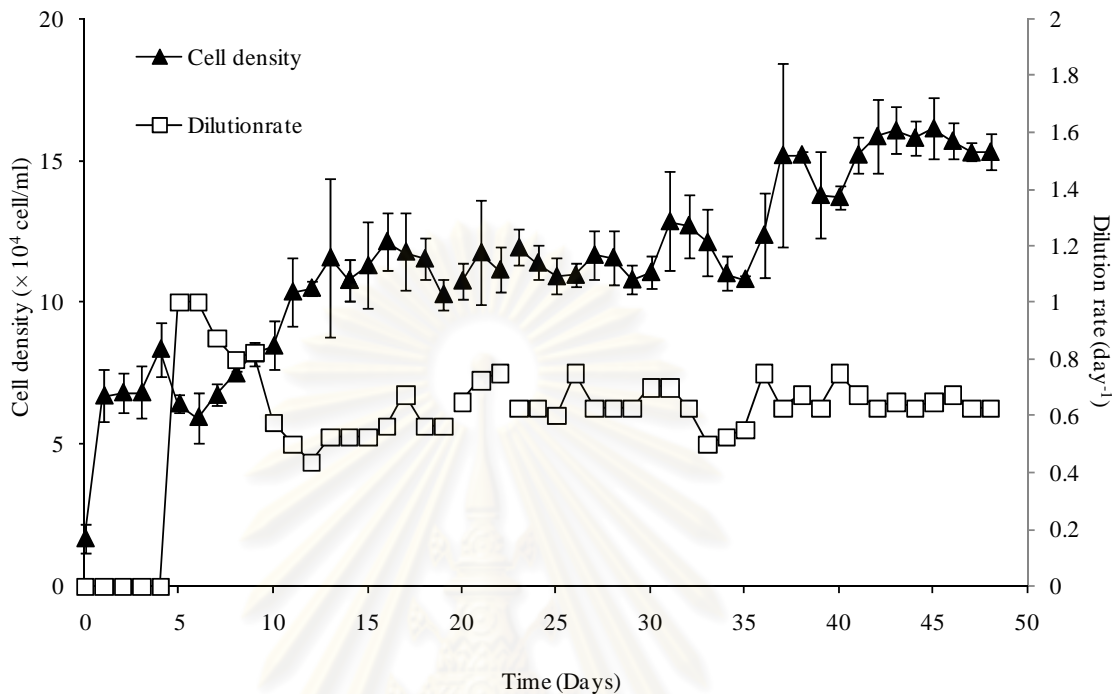
รูปที่ 4.15 ปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิเกตของไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในการทดลองครั้งที่ 1

4.2.2 การเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ในการทดลองครั้งที่ 2

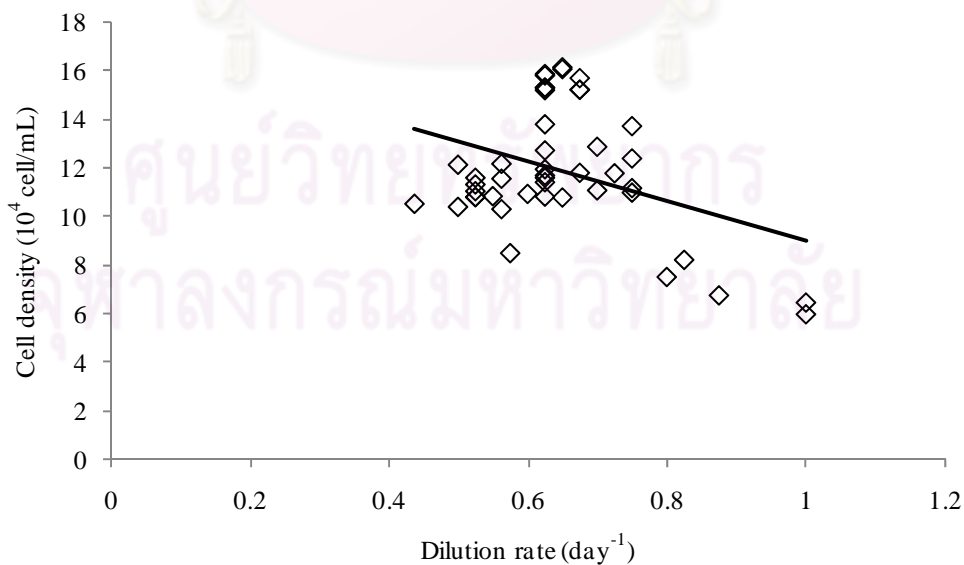
จากการทดลองเพาะเลี้ยงไคอะตอมแบบต่อเนื่องครั้งที่ 1 (รูปที่ 4.15) พบว่าในวันที่ 45 ของการเพาะเลี้ยงมีอัตราการเจริญมีค่าสูงถึง 1.75 ต่อวัน ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ไคอะตอมลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งก็คือจะเกิดการชะล้างเซลล์ออกจากระบบจนหมด (wash out) ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อระบบการเพาะเลี้ยงมีอัตราการเจริญสูงกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด โดยอัตราการเติบโตจำเพาะของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในการเลี้ยงแบบแบตช์เท่ากับ 1.7 ต่อวัน (รูปที่ 4.1) แต่จากผลการทดลองพบว่า เมื่ออัตราการเจริญมีค่าเข้าใกล้ 1.0 ต่อวัน ความหนาแน่นเซลล์ไคอะตอมลดลงอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อไคอะตอมมีค่าอัตราการเจริญเท่ากับ 1.75 ต่อวัน พบว่าเกิดการชะล้างเซลล์ออกจากระบบ ซึ่งผลการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Nitzschia lavis* แบบต่อเนื่องที่เพาะเลี้ยงด้วยอัตราการเจริญต่ำจะมีความหนาแน่นเซลล์ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงที่อัตราการเจริญสูง และเมื่อเพิ่มอัตราการเจริญเท่ากับ 1.0 ต่อวัน มีผลทำให้เซลล์ถูกชะล้างออกจากระบบจนหมด (Wen and Chen, 2001) ทั้งนี้สาเหตุของปัญหาดังกล่าวในระหว่างการทดลองเกิดจากการทำงานผิดพลาดของปั๊มรีดสายที่มีระดับความเร็วรอบเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. เป็นครั้งที่ 2 โดยมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการทดลองครั้งที่ 1 แต่ได้ทำการปรับลดระดับความเร็วรอบของปั๊มรีดสาย โดยมีค่าอัตราการเจริญเริ่มต้นใกล้เคียงกับอัตราการเจริญสุดท้ายจากการทดลองที่ 1 โดยทำการเพาะเลี้ยงด้วยระบบแบบแบตช์เป็นเวลา 5 วัน ต่อจากนั้นจึงเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 48 วัน

ผลการทดลองเลี้ยงไคอะตอมแบบต่อเนื่องครั้งที่สอง แสดงในรูปที่ 4.16 พบว่า ไคอะตอมมีการเติบโตได้ดี โดยในช่วงต้นที่เป็นการเลี้ยงแบบแบตช์มีอัตราการเติบโตจำเพาะและความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 1.38 ต่อวัน และ 8.39×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ต่อจากนั้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องและไคอะตอมเติบโตในภาวะคงที่ (steady stage) ทำการปรับอัตราการเจริญเท่ากับ 1.0 ต่อวัน พบว่า ไคอะตอมความหนาแน่นลดลง และในวันที่ 10 ของการทดลองได้ปรับลดระดับอัตราการเจริญลงอยู่ในช่วง 0.5-0.7 ต่อวัน พบว่า ไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้น จนกระทั่งมีค่าคงที่โดยมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 11.87×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการเจริญเฉลี่ยจริงอยู่ในช่วง 0.58-0.7 ต่อวัน ดังแสดงในตารางที่ 4.6 โดยมีปริมาณไคอะตอมและอาหารเพาะเชื้อที่ออกจากถังเพาะเลี้ยงมีค่าระหว่าง 2000-3000 มิลลิลิตรต่อวัน จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า อัตราการเจริญจะแปรผกผันกับความหนาแน่นเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4.17 ผลการทดลองนี้มีลักษณะเช่นเดียวกันกับการทดลองของ Fernandez Sevilla *et al.* (1998) ที่ได้

เพาะเลี้ยง ไดอะตอม *Isochrysis galbana* แบบต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจางต่ำ ซึ่งสามารถให้ความหนาแน่นเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อัตราการเจือจางสูง



รูปที่ 4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยง ไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ในการทดลองครั้งที่ 2



รูปที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจือจางของ ไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ในการทดลองครั้งที่ 2

ตารางที่ 4.6 ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจริญเฉลี่ย น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์
โคอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องครั้งที่ 2

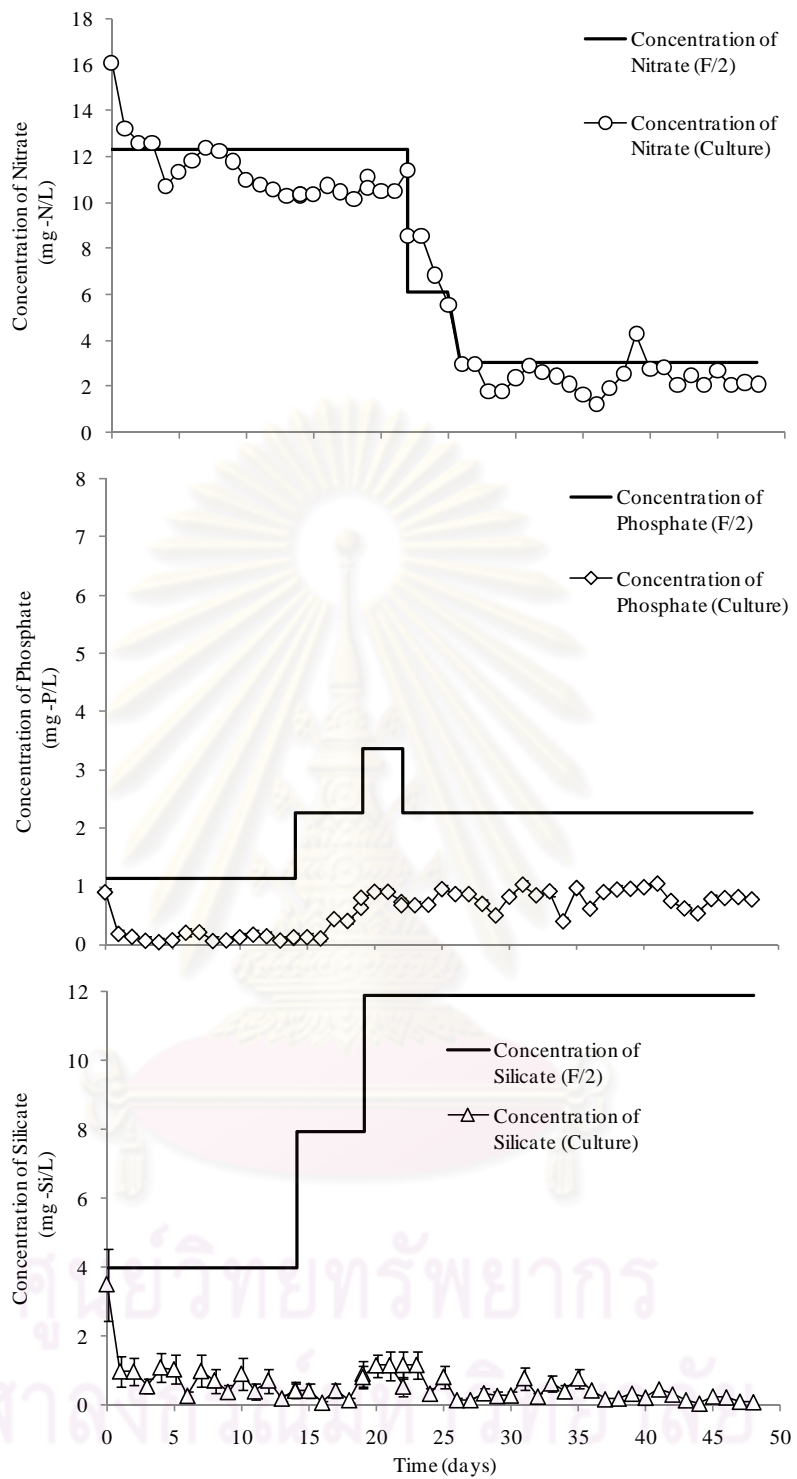
วันที่	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราการเจริญ (day^{-1})	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g-dry weight/L· day)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/ L· day)
0-4	6.09	-	-	-
5-9	6.97	0.9	0.12	6.21
10-14	10.43	0.51	0.12	5.29
15-19	11.43	0.58	0.11	6.61
20-23	11.42	0.68	0.10	7.85
24-28	11.32	0.65	0.12	7.29
29-33	11.92	0.61	0.23	7.51
34-38	12.94	0.64	0.20	8.16
39-43	14.94	0.62	0.18	9.91
44-48	15.66	0.63	0.18	10.02

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงโคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบต่อเนื่องในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ในการทดลองครั้งที่ 2 เป็นเวลา 48 วัน โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงด้วยระบบแบบแบตช์เป็นเวลา 5 วัน เมื่อโคอะตอมเข้าสู่ภาวะคงที่จึงเริ่มทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ในระหว่างการทดลองได้มีการปรับลดความเข้มข้นของไนโตรเจน และปรับเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตและซิลิเกต พบว่าความเข้มข้นของไนโตรเจน 12.36 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในสูตรอาหาร F/2 นั้นเพียงพอต่อการเติบโตของโคอะตอม โดยยังคงพบไนโตรเจนปริมาณมากเหลือตกค้างในอาหารเพาะเชื้อ ดังนั้นจึงทำการปรับลดระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนลงครึ่งหนึ่ง (เหลือความเข้มข้นของไนโตรเจน 6.18 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ในวันที่ 23 ของการทดลอง จะเห็นได้ว่าปริมาณไนโตรเจนที่พบในอาหารเพาะเชื้อของการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องมีความเข้มข้นลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ยังคงเพียงพอต่อการเติบโตของโคอะตอมเพราะความหนาแน่นเซลล์ยังมีค่าคงที่ และเมื่อพิจารณาปริมาณของไนโตรเจนที่เหลือตกค้างอยู่ในระบบในวันที่ 23-25 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าปริมาณไนโตรเจนดังกล่าวยังคงเพียงพอต่อการเติบโตของโคอะตอม เพราะฉะนั้นจึงทำการปรับลดระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนลงอีกครั้งหนึ่ง (เหลือความเข้มข้นของไนโตรเจน 3.09 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร คิดเป็น $\frac{1}{4}$ เท่าของสูตร F/2) และทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งโคอะตอมเข้าสู่ภาวะคงที่ ทั้งนี้เพื่อให้ปริมาณสารดังกล่าวไม่เหลือตกค้างอยู่ในระบบมากเกินไป โดยที่โคอะตอมไม่ได้นำไปใช้งาน และเมื่อพิจารณาการปรับลดระดับ พบว่า ที่ความเข้มข้นดังกล่าวหลังจากการปรับลด

ความเข้มข้นของไนโตรเจน ไคอะตอมยังคงเติบโตได้เหมือนเดิม และมีความหนาแน่นเซลล์อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับค่าก่อนการปรับระดับความเข้มข้นจึงคาดว่าปริมาณดังกล่าวเพียงพอต่อการนำไปใช้ในการเติบโตของไคอะตอม

ในขณะที่การตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต พบว่า ปริมาณฟอสเฟตในสูตร F/2 เริ่มต้นลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณคงเหลืออยู่ในระดับต่ำจนเข้าใกล้ศูนย์ ดังนั้นในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงจึงทำการปรับระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นเป็น 2.24 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร (คิดเป็นสองเท่าของสูตร F/2) พบว่า ปริมาณดังกล่าวเพียงพอต่อการเติบโตของไคอะตอมและคงเหลือในระดับที่วัดค่าความเข้มข้นได้ จากนั้นจึงทำการปรับเพิ่มระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเป็น 6.72 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร (คิดเป็นสามเท่าของสูตร F/2) พบว่า เมื่อไคอะตอมเติบโตเข้าสู่ภาวะคงที่ ความเข้มข้นที่คงเหลือตกค้างอยู่ในระบบการเพาะเลี้ยงมีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่ให้กับระบบ 2 เท่า และที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่ส่งผลต่อการเติบโตของไคอะตอม ดังนั้นจึงทำการปรับระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสลงเหลือสองเท่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Krichnavaruk *et al.* (2005) ที่พบว่าไคอะตอม *Chaetoceros calcitrans* สามารถเติบโตให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดที่ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเท่ากับ 2.24 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตรในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 เช่นกัน

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของซิลิกาในรูปของซิลิเกต พบว่า ปริมาณซิลิเกตในสูตร F/2 เริ่มต้นลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณคงเหลืออยู่ในระดับต่ำจนเข้าใกล้ศูนย์ ดังนั้นในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงจึงทำการปรับระดับความเข้มข้นของซิลิเกตเพิ่มขึ้นเป็น 7.94 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร (คิดเป็นสองเท่าของสูตร F/2) พบว่าปริมาณดังกล่าวเพียงพอต่อการเติบโตของไคอะตอมในช่วงแรก จากนั้นจะมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงทำการปรับเพิ่มระดับความเข้มข้นของซิลิกาเป็น 11.91 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร (คิดเป็นสามเท่าของสูตร F/2) พบว่าปริมาณดังกล่าวเพียงพอต่อการเติบโตของไคอะตอม และยังคงมีความเข้มข้นเหลือตกค้างอยู่ในระบบการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของซิลิกาในหัวข้อ 4.1.6 ซึ่งพบว่าเมื่อความเข้มข้นของซิลิกาเพิ่มขึ้นมากกว่า 3 เท่า ของสูตร F/2 จะไม่ส่งผลต่อการเติบโตของไคอะตอม จึงปรับระดับความเข้มข้นของซิลิกาที่เหมาะสมเท่ากับ 11.91 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร (คิดเป็น 3 เท่าของสูตร F/2) ซึ่งผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 4.18

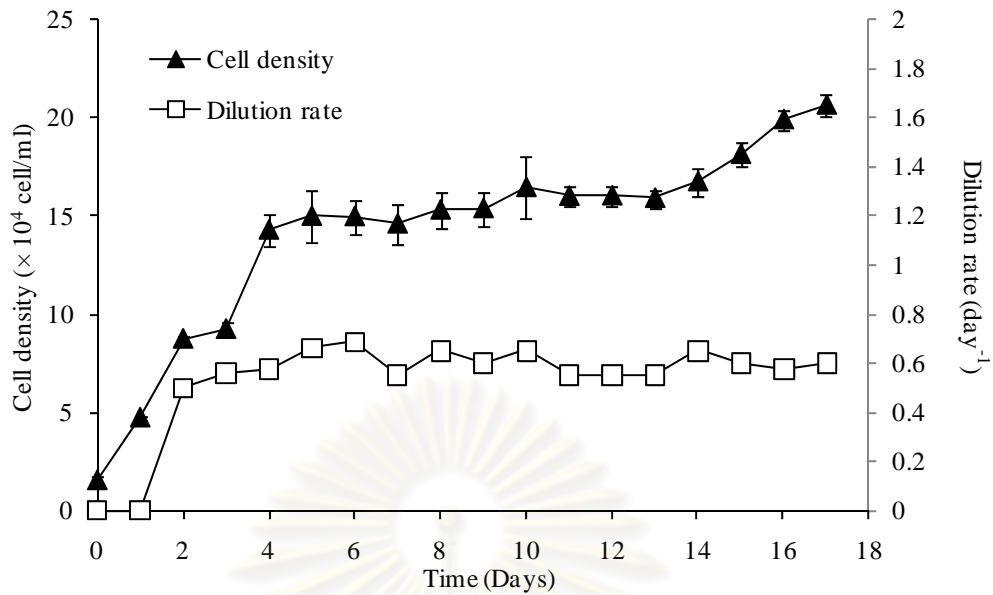


รูปที่ 4.18 ปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิเกตของไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในการทดลองครั้งที่ 2

4.3 การศึกษาอัตราการเติบโตและปริมาณไขมันของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร

4.3.1 การเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอาหารเพาะเชื้อที่ปรับปรุงจากสูตร F/2

หลังจากการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร ได้ทำการขยายขนาดระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ไปเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนขนาด 20 ลิตร โดยให้มีความเข้มแสงอยู่ในระดับใกล้เคียงกับการทดลองในขวดแก้วขนาด 5 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงด้วยระบบแบบแบตช์ในอาหารเพาะเชื้อเหลวสูตร F/2 ปรกติเป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้เซลล์มีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในระบบแบบต่อเนื่องด้วยการประยุกต์ใช้ปริมาณของสารอาหารหลัก ไนโตรเจน ฟอสเฟตและซิลิเกตที่ได้จากระบบแบบต่อเนื่องในขวดแก้ว 5 ลิตร อัตราส่วน 0.25:2:3 เท่าของสูตร F/2 และปรับอัตราการเจือจาง (Dilution rate) จากระบบเครื่องสูบลมที่ใช้ไคอะแฟรม (Diaphragm dosing pump) ให้อยู่ในช่วง 0.58-0.7 ต่อวัน ซึ่งเป็นอัตราการเจือจางที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 4.2.2 ผลการทดลองพบว่า ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง ไคอะตอมสามารถเติบโตได้ดี โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.3 ต่อวันและความหนาแน่นเซลล์ 4.7×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าไคอะตอมสามารถเติบโตเพิ่มสูงขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง โดยมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 15.43×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ในการเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่าความหนาแน่นเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากเกิดการตกตะกอนของเซลล์ไคอะตอมบริเวณด้านล่างของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และเมื่อทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเซลล์ไคอะตอมได้ทำการกวนเพื่อให้ระบบผสมกันอย่างสมบูรณ์ ทำให้ความหนาแน่นเซลล์ที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.19 โดยจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าความหนาแน่นเซลล์จากระบบการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนมีค่าไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในขวด Duran ขนาด 5 ลิตรมากนัก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเข้มแสงที่ใช้มีค่าค่อนข้างต่ำ (5000-6000 ลักซ์) ประกอบกับข้อจำกัดของการสร้างถังปฏิกรณ์ในงานวิจัยนี้มีความหนา 11 เซนติเมตร (ไม่รวมความหนากระจก) ในขณะที่ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นแบนในงานวิจัยอื่นๆ มีความหนาเพียง 5-10 เซนติเมตร (Tredici and Zitelli, 1997) ทำให้เซลล์ได้รับแสงที่จำกัดส่งผลโดยตรงต่อการเติบโต



รูปที่ 4.19 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจือจางในการเพาะเลี้ยงไคโอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน

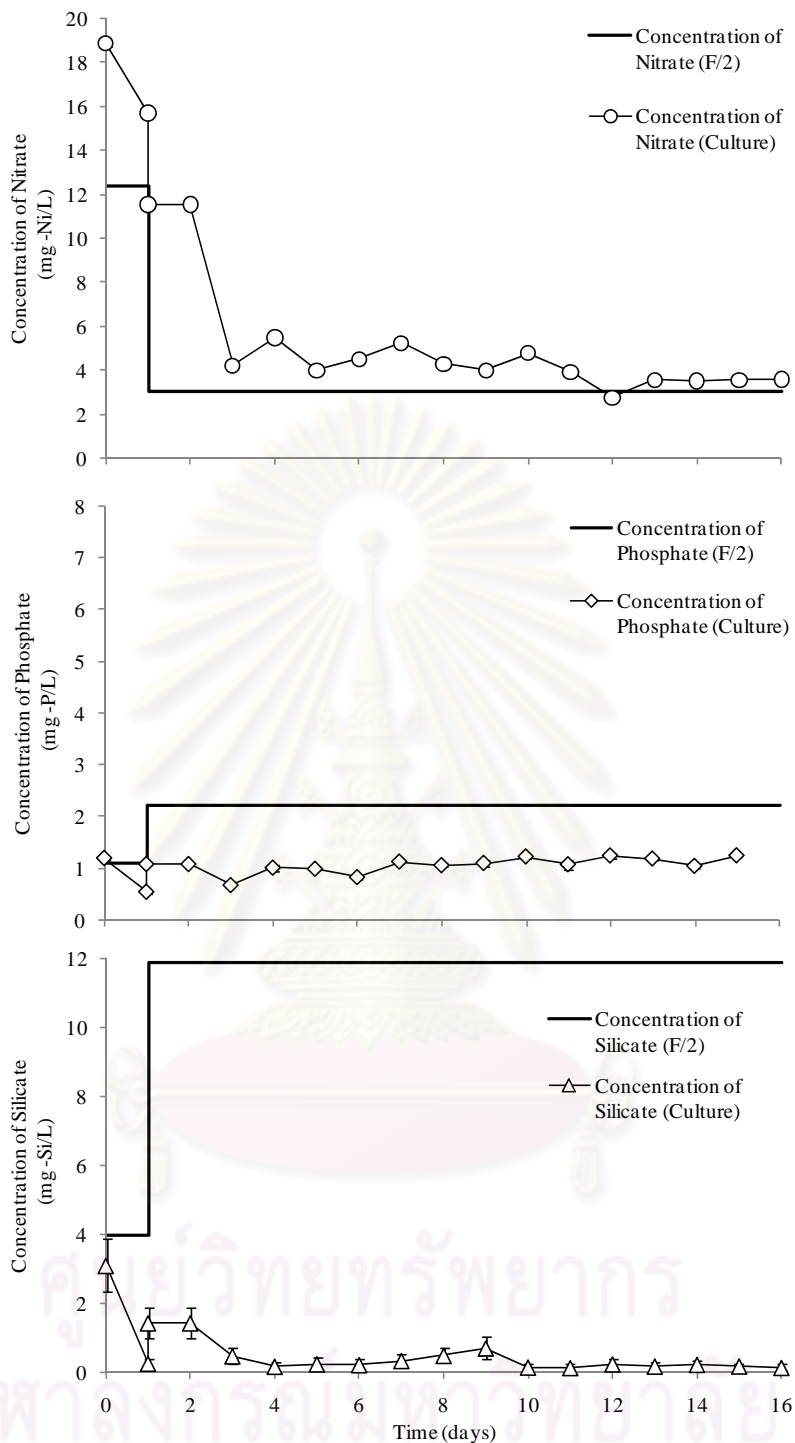
ตารางที่ 4.7 ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจือจางเฉลี่ย น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์ไคโอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน

วันที่	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราการเจือจาง (day^{-1})	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g-dry weight/L·day)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/L·day)
0-1	3.13	0	0	0
2-4	10.73	0.55	0.16	5.91
5-7	14.83	0.63	0.17	9.38
8-10	15.69	0.63	0.19	9.94
11-13	15.95	0.55	0.18	8.77
14-17	18.83	0.61	0.21	11.38

และเมื่อทำการทดลองตรวจวัดปริมาณสารอาหารหลักได้แก่ การวัดความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรท ฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต และซิลิกาในรูปของซิลิเกต ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Entomoneis* sp. ด้วยระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน พบว่า ปริมาณไนเตรทลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากไดอะตอม *Entomoneis* sp. มีการนำไนเตรทไปใช้ในการเติบโต ในขณะที่เมื่อการวัดความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต พบว่า ปริมาณฟอสเฟตลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน แต่ยังคงมีฟอสเฟตเหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยง สำหรับการตรวจวัดความเข้มข้นของซิลิกาในรูปของซิลิเกต พบว่า ปริมาณซิลิเกตลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากการใช้ไปของไดอะตอม แต่ยังคงมีปริมาณซิลิเกตเหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยง ซึ่งอยู่ในระดับต่ำ ดังแสดงในรูปที่ 4.20



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.20 ปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิเกตของไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน

4.3.2 การศึกษาปริมาณไขมันของไคอะตอม *Entomoneis* sp. จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร

จากการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร และทำการกรองเก็บเกี่ยวเซลล์ผลิตด้วยเครื่องกรองแบบแบ่งส่วน (Cross-flow filtration) ที่บรรจุไส้กรองแบบจิบอยู่ภายใน ดังแสดงในรูปที่ 4.21 และทำการขูดเก็บเซลล์ไคอะตอมที่ติดอยู่บริเวณไส้กรอง จะได้เซลล์ไคอะตอม *Entomoneis* sp. ที่มีลักษณะคล้ายโคลนสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นนำไปทำให้แห้ง (Freeze drying) เพื่อเตรียมไว้สำหรับนำไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันต่อไป

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารชีวโมเลกุลของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร F/2 สูตรปรับปรุงที่มีความเข้มข้นไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกา เท่ากับ 3.09 2.24 และ 11.91 มิลลิกรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนเป็นเวลา 17 วัน พบว่าไคอะตอมที่เพาะเลี้ยงด้วยภาวะดังกล่าวมีปริมาณไขมัน 13.15 ± 1.05 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้ปริมาณไขมันที่ได้มีค่าแตกต่างจากการศึกษาของ Knuckey *et al.* (2002) ที่ทำการศึกษ ปริมาณไขมันของไคอะตอม *Entomoneis cf punctulata* ด้วยสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบแบคซ์ โดยมีปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 24.6 ± 1.3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งการที่เซลล์มีปริมาณไขมันต่ำเนื่องมาจากเซลล์ของไคอะตอมที่ผลิตได้จากระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง จะเป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะการเติบโตทวีคูณ (Log phase) ในขณะที่เซลล์จากการเพาะเลี้ยงแบบแบคซ์จะเป็นเซลล์ในระยะคงที่ (Stationary phase) ซึ่งจะเป็นระยะที่เซลล์มีการสะสมไขมันได้มากกว่า



รูปที่ 4.21 ภาพถ่ายแสดงระบบการกรองเก็บเกี่ยวเซลล์ไคอะตอม *Entomoneis* sp. (1) ถังเก็บเกี่ยวเซลล์ขนาด 60 ลิตร (2) ระบบการกรองแบบแบ่งส่วน (3) ลักษณะสีของน้ำที่ผ่านการกรอง (4) ผลผลิตเซลล์ไคอะตอมที่ผ่านการกรอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ช่วง การทดลองช่วงที่ 1 เป็นการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อไคอะตอม *Entomoneis* sp. และทำการศึกษาการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. เพื่อหาความเข้มข้นของปริมาณสารอาหารหลัก ไนโตรเจน ฟอสเฟต และซิลิกา ที่เหมาะสม ทั้งในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบคทีเรียและแบบเฟดแบคทีเรีย สำหรับการทดลองช่วงที่ 2 เป็นการนำสถานะความเข้มข้นของสารอาหารหลักที่ได้จากการทดลองส่วนแรกมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องและการทดลองช่วงที่ 3 เป็นการนำสถานะความเข้มข้นของสารอาหารหลักที่ได้จากการทดลองในส่วนที่สองไปประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงไคอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการทำงาน 20 ลิตร รวมทั้งทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ซึ่งผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

1. การเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบคทีเรียด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตรกลลาร์ด (F/2) มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.7 ต่อวัน และความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 15.69×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และให้อัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอมเท่ากับ 2.87×10^7 เซลล์ต่อลิตร·วัน

2. ในระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบเฟดแบคทีเรียที่ภาวะของสารอาหารที่ปรับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 61.8 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและฟอสฟอรัสเท่ากับ 2.24 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร (คิดเป็น 5 เท่าและ 2 เท่าของสูตร F/2 ตามลำดับ) ร่วมกับการเติมซิลิกาความเข้มข้น 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตรทุกวัน ไคอะตอมสามารถเติบโตได้ความหนาแน่นสูงกว่าที่ภาวะอื่น โดยให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 39.1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอมเท่ากับ 5.16×10^7 เซลล์ต่อลิตรต่อวัน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคทีเรียที่มีการเติมทั้งฟอสฟอรัสความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตรและซิลิกาความเข้มข้น 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตรร่วมกันทุกวัน ให้ผลการเติบโตของไคอะตอมที่ต่ำกว่าการเติมเฉพาะซิลิกาเพียงอย่างเดียว

3. การเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบเฟตแบตซ์ที่เพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาเป็น 3.97 7.94 และ 11.92 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร (คิดเป็น 1, 2 และ 3 เท่าของสูตร F/2) จะให้ความหนาแน่นเซลล์ไคอะตอมเฉลี่ยสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตซ์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 31.48×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 11.92 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร

4. การเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาเป็น 11.92 15.90 และ 19.86 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร (คิดเป็น 3, 4 และ 5 เท่าของสูตร F/2) ไม่ส่งผลให้ไคอะตอมมีการเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงขึ้นอีก จึงเลือกภาวะของปริมาณซิลิกาที่เหมาะสมที่ความเข้มข้น 11.92 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายในส่วนของโซเดียมเมตาซิลิเกตด้วยเนื่องจากมีราคาแพง

5. ในระบบการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบต่อเนื่องในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร เมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางในระบบขึ้นจะทำให้ความหนาแน่นเซลล์ไคอะตอมลดลง โดยในการวิจัยนี้เมื่อปรับตั้งอัตราการเจือจางของไคอะตอมอยู่ในช่วงระหว่าง 0.58-0.7 ต่อวัน จะได้ความหนาแน่นเซลล์ไคอะตอมเฉลี่ยในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเท่ากับ 11.87×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอมเฉลี่ยเท่ากับ 7.44×10^7 เซลล์ต่อลิตร·วัน

6. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องการปรับลดความเข้มข้นของสารอาหารหลักไนโตรเจนเหลือ 3.09 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (หนึ่งในสี่ส่วนของสูตร F/2) สามารถใช้เลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบต่อเนื่องได้โดยมีความหนาแน่นเซลล์ไม่ต่างไปจากการเลี้ยงด้วยสูตร F/2 แต่จะช่วยลดต้นทุนของอาหารเพาะเชื้อได้เนื่องจากไนเตรทเป็นสารเคมีที่มีราคาแพง

7. เมื่อนำค่าอัตราการเจือจางและสูตรอาหารที่ได้รับการปรับปรุงให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* แบบต่อเนื่อง มาใช้เลี้ยงไคอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 20 ลิตร ด้วยระบบต่อเนื่อง พบว่าเมื่อปรับตั้งอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.58-0.7 ต่อวัน ไคอะตอมมีการเติบโตที่ดี โดยมีความหนาแน่นเซลล์ไคอะตอมเฉลี่ยเท่ากับ 15.43×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราผลผลิตเซลล์ไคอะตอมเฉลี่ยเท่ากับ 9.22×10^7 เซลล์ต่อลิตร·วัน

8. ไคอะตอม *Entomoneis* มีความเหมาะสมสำหรับการนำมาเพาะเลี้ยงเนื่องจากสามารถเติบโตได้ง่าย และเซลล์สามารถเติบโตในระยะคงที่ได้เป็นเวลานาน รวมทั้งไคอะตอมชนิดดังกล่าวมีขนาดใหญ่ จึงง่ายต่อการตกตะกอนและเก็บเกี่ยวผลผลิต รวมทั้งปริมาณไขมันที่ได้สูงถึง 13.15 ± 1.05 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นไคอะตอม *Entomoneis* sp. จึงเป็นจุลสาหร่ายอีกชนิดหนึ่งที่มีความเหมาะสมสำหรับการนำมาศึกษาเพื่อผลิตเป็นพลังงานทดแทนต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของซิลิเกตนับเป็นปัจจัยสำคัญที่จำกัดการเติบโตของไดอะตอม โดยแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมเมตาซิลิเกตในอาหารเพาะเชื้อ แต่ปริมาณซิลิเกตที่วิเคราะห์ได้ก็ยังคงมีค่าต่ำ แสดงว่าการหายไปของซิลิเกตเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีของซิลิกาในน้ำทำให้ซิลิกาส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบที่ไม่ใช่ซิลิเกต ซึ่งไดอะตอมไม่สามารถนำไปใช้ในการเติบโตได้ จึงควรมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงไดอะตอมโดยใช้แหล่งของซิลิกาชนิดอื่นๆ หรือหาวิธีการเพิ่มความสามารถในการละลายของซิลิเกตในอาหารเพาะเชื้อ

2. สำหรับการเพาะเลี้ยงในระบบแบบต่อเนื่อง ในทางปฏิบัติพบว่าเกิดปัญหาในเรื่องของค่าอัตราการเจริญที่ไม่คงที่ เนื่องมาจากปัญหาจากการใช้ปั๊มแบบรีดสาย (peristaltic pump) ซึ่งต้องทำการทดลองเป็นระยะเวลานาน อาจทำให้ปั๊มเกิดความเสื่อมสภาพและหยุดการทำงานในบางช่วงเวลา อีกทั้งต้องเปลี่ยนตำแหน่งของสายรีดไปเรื่อยๆ เพื่อป้องกันการอุดตันหรือการกดทับทำให้สายฉีกขาด ส่งผลให้อัตราการเจริญของระบบมีค่าไม่คงที่ นอกจากนั้นแล้วปั๊มชนิดดังกล่าวมีราคาแพงแต่เหมาะสมกับระบบการเพาะเลี้ยงขนาดเล็กภายในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นหากมีการนำปั๊มชนิดอื่นมาใช้แทนที่จะเป็นการลดค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ไปได้ ในการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 20 ลิตรจึงได้เปลี่ยนมาใช้ปั๊มแบบไดอะแฟรม ซึ่งมีราคาถูกและมีอัตราการไหลที่คงที่กว่า แต่ปั๊มชนิดนี้มีข้อจำกัดทำให้ไม่สามารถใช้กับถังปฏิกรณ์ที่มีขนาดเล็กมากได้

3. หากมีการขยายขนาดระบบการเพาะเลี้ยงในอนาคตควรมีการศึกษาการไหลเวียนของของไหลภายในถัง การปรับเพิ่มความเข้มแสงที่เหมาะสม รวมทั้งการเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อเพิ่มผลผลิตของไดอะตอมให้สูงขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- นฤมล ไบพัด. การผลิตโคฟีพอดด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญา
มหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.
- ปวีณา ตปนิยารวงศ์และคณะ. การเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Chaetoceros calcitrans* แบบต่อเนื่อง. ใน
รายงานการประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 30, ตุลาคม 2547
ณ เมืองทองธานี, 2547.
- ปวีณา ตปนิยารวงศ์. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraselmis suecica* และโรติเฟอร์ *Brachionus*
placatilis แบบต่อเนื่องสำหรับอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อน วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.
- มะลิวัลย์ กุตะโต. การเติบโตแบบเฮเทอโรโทrophic ของไคอะตอมน้ำเค็ม *Amphora delicatissima*
สายพันธุ์ AM9901 ในการเพาะเลี้ยงแบบเบดซ์และแบบต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญา
มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง,
2547.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2541.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. แพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์, 2542.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. แพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์, 2544.
- วริศรา อนุสุทธิ. ศึกษาการจำแนกชนิดของไคอะตอมสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งระบบ
ปิดจังหวัด นนทบุรี, ปัญหาพิเศษระดับปริญญาบัณฑิต, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา, 2549.

ภาษาอังกฤษ

- APHA. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Maryland: Victor Graphics, 1992.
- Bailey, J. E. and Oillis, D. F. Biochemical Engineering Fundamental. 2^{ed} edition. Singapore : Mcgraw-Hill, 1986.
- Baynes, S. M., Emerson, L. and Scott, A. P. Production of algae for use in the rearing of larval fish. Fisheries Research Technical Report 53 (1979) : 13–18.
- Belay, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors-The Earthrise Farms experience. In: Vonshak A. (Ed.), Spirulina platensis (Arthrospira). Physiology, Cell-biology and Biotechnology (1997) : 131-158.
- Benemann, J. R. Microalgal Biofuels: A Brief Introduction [Online]. 2009. Available from : <http://www.genifuel.com/text/20090723%20Algal%20Biofuels-An%20Introduction%20by%20John%20Benemann.pdf> [2009, July]
- Bligh, E. G. and Dry, W. T. A rapid method of Total Lipid Extraction and Purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 38 (1959) : 911-917.
- Borowitzka, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology 70 (1999) : 313–321.
- Boussiba, S. N₂-fixing cyanobacteria as nitrogen biofertilizer, a study with the isolate *Anabaena azllae*. Symbiosis 6 (1988) : 129-138.
- Camacho Rubio, F., Acien Fernandez, F. G., Sanchez Perez, J. A., Garcia Camacho, F. and Molina, G. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. Biotechnology and Bioengineering 62 (1999) : 71-86.
- Cheng-Wu, Z., Zmora, O., Kopel, R. and Richmond, A. An industrial-size flat glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (*Eustigmatophyceae*). Aquaculture 195 (2001) : 35–49.
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 25 (2007) : 294–306.
- Chiu, S. Y., Tsai, M. T., Kao, C. Y., Ong, S. C. and Lin, C. S. The air-lift photobioreactors with flow patterning for high-density cultures of microalgae and carbon dioxide removal. Engineering in Life Sciences 9 (2009) : 254–260.

- Chu, W. L., Phang, S. M. and Goh, S. H. Environmental Effect on Growth and Biochemical Composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow. Journal of Applied Phycology 8 (1996) : 389-396.
- Degen, J., Uebele, A., Retze, A., Ulrike, S. S. and Walter, T. A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. Journal of Biotechnology 92 (2001) : 89–94.
- Fernandez Sevilla, J. M., Molina Grima, E., Garcia Camacho, F., Acien Fernandez, F. G. and Sanchez Perez, J. A. Photolimitation and Photoinhibition as Factors Determinating Optimal Dilution Rate to Production Eicosapentaenoic Acid from Cultures of Microalga *Isocrysis alba*. Applied Microbiology Biotechnology 50 (1998) : 199-205.
- Fontes, A. G., Moreno, J. and Vargas, M. A. Analysis of the biomass quality and photosynthetic efficiency of a nitrogen-fixing cyanobacterium grown outdoors with two agitation systems. Biotechnology and Bioengineering 34 (1989) : 819-824.
- Fox, J. M. Intensive algae culture techniques. Handbook of Mariculture 1442 (1983) : 15-41.
- García-Malea López, M. C., Del Río Sánchez, E., Casas López, J. L., Acien Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M., Rivas, J., Guerrero, M.G. and Molina Grima, E. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. Journal of Biotechnology 123 (2006) : 329–342.
- Gotham, I. J. and Rhee, G. Y. Effects of Nitrate and Phosphate Limitation on Cyclostat Growth of Two Freshwater Diatoms. Journal of General Microbiology 128 (1982) : 199-205.
- Grima, E. M., Sanchez Perez, A. S., Camacho, F. G., Garcia Sanchez, J. L., Acien Fernandez, F. G. and Alonso, D. L. Outdoor culture of *Isochrysis galbana* AL11-4 in a closed tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology 37 (1994) : 159-166.
- Guillard, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of Marine Invertebrate Animals (1975) : 26-60.
- Hase, R., Oikawa, H., Sasao, C., Morita, M. and Watanabe, Y. Photosynthetic production of microalgal biomass in a raceway system under greenhouse conditions in Sendai City. Journal of Bioscience and Bioengineering 89 (2000) : 157–163.
- Hoekema, S., Bijmans, M., Janssen, M., Tramper, J. and Wijffels, R. H. A pneumatically agitated flat-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium. International Journal of Hydrogen Energy 27 (2002) : 1331–1338.

- Honga, H. C., Mazumder, A., Wonga, M. H. and Liang, Y. Yield of trihalomethanes and haloaceticacids upon chlorinating algal cells, and its prediction via algal cellular biochemical composition. Water Research 42 (2008) : 4941–4948.
- Hossain, A.B. M. S., Salleh, A., Boyce, A. N., Chowdhury, P. and Najiuddin, M. Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy. Journal of Biochemistry and Biotechnology 4 (3) (2008) : 250-254.
- Hsieh, C. H. and Wu, W.T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. Bioresource Technology 100 (2009) : 3921–3926
- Iain, A. J. and Howard, J. Performance of a flat plate, air-lift reactor for the growth of high biomass algal cultures. Journal of Applied Phycology 4 (1992) : 1-9.
- Issarapayup, K., Powtongsook, S. and Pavasant, P. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis* . Journal of Biotechnology 142 (2009) : 227–232.
- Janae, L. C. The Optimization of Growth Rate and Lipid Content from Select Algae Strains. Master's Thesis, Department of Civil Engineering and the Russ College of Engineering and Technology Faculty of the Russ College of Engineering and Technology Ohio University, 2008.
- Knuckey, R. M., Brown, M. R., Barrett, S. M. and Hallegraeff, G. M. Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Aquaculture 211 (2002) : 253–274.
- Krichnavaruk, S., Loataweesup, W., Powtongsook, S. and Pavasant, P. Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactor. Chemical Engineering Journal 105 (2005) : 91–98.
- Lee, J. M. Biochemical Engineering. New Jersey: Prentice Hall, 1992.
- Lewin, J. C. The Capsule of the Diatom *Navicula pelliculosa*. Journal of General Microbiology 13 (1955) : 162-169.
- Liu, Z. Y., Wang, G. C. and Zhou, B. C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella Vulgaris*. Bioresource Technology 99 (2008) : 4717–4722.
- Loataweesup, W. Cultivation of a diatom *chaetoceros calcitrans* in airlift bioreactor. Master's Thesis, Department of Chemical Engineering Faculty of Engineering Chulalongkorn University, 2002.

- Mata, T. M., Martins, A. A. and Caetano, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14 (2010) : 217–232.
- McNeil, B. and Harvey, L.M. Fermentation a practical approach. Oxford : Information Press. 1990 : 99-121.
- Merchuk, J. C., Ronen, M., Geris, S. and Arad, S. Light/dark Cycles in the Growth of the Red Microalga *Porphyridium* sp. Biotechnology and Bioengineering 59 (1998) : 705-713.
- Miron, A. S., Camacho, F. G., Gomez, A. C., Grima, E. M. and Chisti, Y. Bubble-Column and Airlift Photobioreactors for Algal Culture. AIChE Journal 46 (2000) : 1882-1887.
- Molina, G. E., Acien, F. G., García, C. F., Camacho, R. F. and Chisti, Y. Scale-up of tubular photobioreactors. Journal of Applied Phycology 12 (2000) : 355–68.
- Morais, M. G. and Costa, J. A. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology 129 (2007) : 439–445.
- Posten, C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. Engineering in Life Sciences 3 (2009) : 165–177.
- Pratoomyot, J., Srivilas, P. and Noiraksar, T. Fatty acids composition of 10 microalgal species. Songklanakarin Journal of Science and Technology 27 (6) 2005 : 1179-1187.
- Pushparaj, B., Pelosi, E., Tredici, M. R., Pinzani, E. and Materassi, R. An integrated culture system for outdoor production of microalgae and cyanobacteria. Journal of Applied Phycology 9 (2) (1997) : 113-119.
- Qiang, H. and Richmond, A. Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light Intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate photobioreactor. Journal of Applied Phycology 8 (1996) : 139-145.
- Ratchford, I. A. J. and Fallowfield, H. J. Performance of a flat plate, air-lift reactor for the growth of high biomass algal cultures. Journal of Applied Phycology 4 (1992) : 1-9.
- Renaud, S. M., Thinh, L. V., Lambrinidis, G. and Parry, D. L. Effect of temperature on growth, chemical position and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. Aquaculture 211 (2002) : 195–214.
- Richmond, A., Boussiba, S., Vonshak, A. and Kopel, R. A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. Journal of Applied Phycology 5 (1993) : 327–332.

- Samonte, G. P.B., Esoergadera, C. C. and Caturao, R. D. Economics of microalgae (*Chaetoceros calcitrans*) production using the multi-step method in the Philippines. Aquaculture 112 (1993) : 39-45.
- Sobczuk, T. M., Camacho, F. G., Rubio, F. C., Acie'n Ferna'ndez, F. G. and Grima M. Carbon Dioxide Uptake Efficiency by Outdoor Microalgal Cultures in Tubular Airlift Photobioreactors. Biotechnology and Bioengineering 67(1999) : 465-475.
- Stanbury, F. P. Principles of Fermentation Technology. Great Britian: BPC Wheaton, 1995.
- Strickland, J. D. and Parson, T. R. A Practical Handbook of Water Analysis. 2nd edition. Ottawa: Fishery Research Board of Canada, 1972.
- Tredici, M. R., Carlozzi, P., Zittelli, G. C. and Materassi, R. A vertical Alveolar Panel (VAP) for Outdoor Mass Cultivation of Microalgae and Cyanobacteria. Bioresource Technology 38 (1991) : 153-159.
- Tredici, M. R. and Zitelli, G. C. Cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis* in flat plate reactors. In: Vonshak, A. (Ed.), Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology. London: Taylor and Francis (1997) : 117–130.
- Ugwu, C. U., Ogbonna, J. C. and Tanaka, H. Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers. Applied Microbiology and Biotechnology 58 (2002) : 600–607.
- Ugwu, C. U. Photo bioreactors for mass cultivation of algae. Bioresource Technology 99 (2008) : 4021–4028.
- Van den Hock, C., Mann, D. G. and Johns, H. M. Algae: Introduction to Phycology. New York : Cambridge University, 1995.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N. and Lan, C. Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. Journal of Applied Microbiology 79 (2008) : 707–718.
- Wang, D. I. C., Cooney, C. L., Demain, A. L., Dunnill, P., Humphrey, A. E. and Lilly, M. D. Fermentation and Enzyme Technology. Newyork : John Wiley and Sons, 1979.
- Wen, Z. Y. and Chen, F. Perfusion-Cell Bleeding Culture Strategy for Enhancing the Productivity of Eicosapentaenoic acid by *Nitzschia laevis*. Applied Microbiology Biotechnology 57 (2001) : 316-322.
- Wen , Z. Y., Jiang, Y. and Chen, Y. High cell density culture of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production : fed-batch development. Process Biochemistry 37 (2002) : 1447-1453.

Whyte, J. N. C. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture 60 (1987) : 231-241.

Xu H., Miao, X. and Wu, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. Journal of Biotechnology 126 (2006) : 499–507.

Yoon, J. H., Shin, J. H. and Park, T. H. Characterization of factors influencing the growth of *Anabaena variabilis* in a bubble column reactor. Bioresource Technology 99 (2008) : 1204–1210.

Zhang K., Miyachi, S. and Kurano, N. Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency. Applied Microbiology and Biotechnology 55 (2001) : 428–433.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเพาะเชื้อไคอะตอม

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

สารละลายส่วนที่ 1 (ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร)

โซเดียมไนเตรท (NaNO ₃)	42.074 กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O)	3.0 กรัม
เฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl ₃)	1.45 กรัม
โซเดียมเอทิลีน ไคอะมีน เตตระอะซิติก (Na ₂ EDTA)	5.0 กรัม

สารละลายส่วนที่ 2 (ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร)

คอปเปอร์ซัลเฟต-5-ไฮเดรต (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	1.96 กรัม
ซิงค์ซัลเฟต (ZnSO ₄)	4.40 กรัม
โซเดียมโมลิบเดต-4-ไฮเดรต (Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	1.26 กรัม
แมงกานีสคลอไรด์-4-ไฮเดรต (MnCl ₂ · 4H ₂ O)	3.60 กรัม
โคบอลท์คลอไรด์-6-ไฮเดรต (CoCl ₂ · 6H ₂ O)	2.0 กรัม

สารละลายส่วนที่ 3 (ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร)

โซเดียมเมตาซิลิเกต-9-ไฮเดรต (Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O)	16.50 กรัม
--	------------

เตรียมอาหารเพาะเชื้อไคอะตอม โดยเปิดสารละลายส่วนที่ 1 และ 3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
และสารละลายส่วนที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยู ปรับปริมาตร
ให้ครบ 1 ลิตร

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในอาหารเพาะเชื้อไคอะตอม

การเตรียมรีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณอนินทรีย์ฟอสเฟต ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) ในอาหารเพาะเชื้อไคอะตอมตามวิธีของ Strickland and Parsons (1972)

สารเคมีที่ใช้

1. Ammonium molybdate; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
2. Sulfuric Acid; H_2SO_4
3. Ascorbic Acid
4. Potassium antimonyl tartrate; $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$

การเตรียมสารละลายรีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ฟอสเฟต

1. Ammonium molybdate solution
ละลาย $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดพลาสติก ห่างจากแสง)
2. Sulfuric Acid solution
เติม Sulfuric Acid concentrated ปริมาตร 140 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร (ควรเก็บไว้ในที่เย็นและเก็บไว้ในขวดแก้ว)
3. Ascorbic Acid solution
ละลาย Ascorbic Acid (AR grade) 27 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดพลาสติก นำไปแช่ไว้ในช่องเย็น (แต่ไม่ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเกิน 1 สัปดาห์)
4. Potassium antimonyl-tartrate solution
ละลาย Potassium antimonyl-tartrate 0.34 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดแก้วหรือพลาสติก สารละลายดังกล่าวจะเก็บไว้ได้นานหลายเดือน)
5. Mixed reagent
 - Ammonium molybdate solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อัตราส่วน 2 มิลลิลิตร
 - Sulfuric Acid solution ปริมาตร 250 มิลลิลิตร อัตราส่วน 5 มิลลิลิตร
 - Ascorbic Acid solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อัตราส่วน 2 มิลลิลิตร
 - Potassium antimonyl- tartrate solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตร อัตราส่วน 1 มิลลิลิตร

(ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ ไม่สามารถเก็บสารได้นานเกิน 6 ชั่วโมง ปริมาตรดังกล่าวนี้สามารถใช้ได้กับตัวอย่างน้ำจำนวน 50 ตัวอย่าง)

การเตรียม Phosphate stock solution (ความเข้มข้น 186 มิลลิกรัมฟอสเฟต-ฟอสฟอรัสต่อลิตร)

ชั่ง K_2HPO_4 (anhydrous potassium dihydrogen phosphate) 0.816 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

ขั้นตอนการวิเคราะห์

เปิดน้ำตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร หยดรีเอเจนต์ที่เตรียมไว้เรียงตามลำดับดังต่อไปนี้

1. เติม Mixed Reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง
2. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร
นำค่าที่ได้จากการวัดดังกล่าวไปสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่าความเข้มข้นของปริมาณฟอสเฟต



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ในอาหารเพาะเชื้อโคอะตอม

การเตรียมรีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ในอาหารเพาะเชื้อโคอะตอมตามวิธีของ Strickland and Parsons (1972)

สารเคมีที่ใช้

1. Molybdate solution; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
2. Metol-sulphite solution
3. Oxalic acid solution
4. Sulphuric acid solution; H_2SO_4

การเตรียมสารละลายรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ซัลไฟต์

1. Molybdate solution
ละลาย $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4 กรัม ด้วย D.I 300 มิลลิลิตร เติม HCl concentration 12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ D.I (เก็บไว้ในขวดพลาสติก ห่างจากแสง)
2. Metol-sulphite solution
ละลาย Na_2SO_3 6 กรัม ในน้ำ D.I 500 มิลลิลิตร เติม Metol 10 กรัม (P-methylaminophenol sulphate) เมื่อละลายแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง No.1 เก็บในขวดแก้ว เตรียมทุกเดือน ปิดฝาให้แน่น
3. Oxalic acid solution
Oxalic acid dehydrate $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 กรัม ละลายในน้ำ D.I 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดแก้ว
4. Sulphuric acid solution
กรด sulphuric acid 50 % โดยปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติลงในน้ำ D.I 250 มิลลิลิตร รอจนเย็นปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร
5. Mixed reagent
ผสม metol 100 มิลลิลิตร กับ oxalic acid 60 มิลลิลิตร เติม sulphuric 50% โดยปริมาตร 60 มิลลิลิตรอย่างช้าๆ ปรับปริมาตรเป็น 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ D.I

การเตรียม Silicate stock solution (ความเข้มข้น 14.935 มิลลิกรัมซิลิเกตต่อลิตร)

ชั่ง Na_2SiF_6 (Sodium silico fluoride) 0.1 กรัม ละลายใน D.I ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้ว

การเตรียมน้ำทะเลเทียมสำหรับวิเคราะห์ Standard solution

ละลาย NaCl 27 กรัม ผสมกับ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8 กรัม ในน้ำ D.I 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดพลาสติก

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. เติม Molybdate solution 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ปล่อยให้ปฏิกิริยาประมาณ 10 นาที
2. เติม Mixed Reagent ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน
3. ปล่อยให้ปฏิกิริยาประมาณ 2-3 ชั่วโมง
4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 810 นาโนเมตร
นำค่าที่ได้จากการวัดดังกล่าวไปสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่าความเข้มข้นของปริมาณซิลิเกต

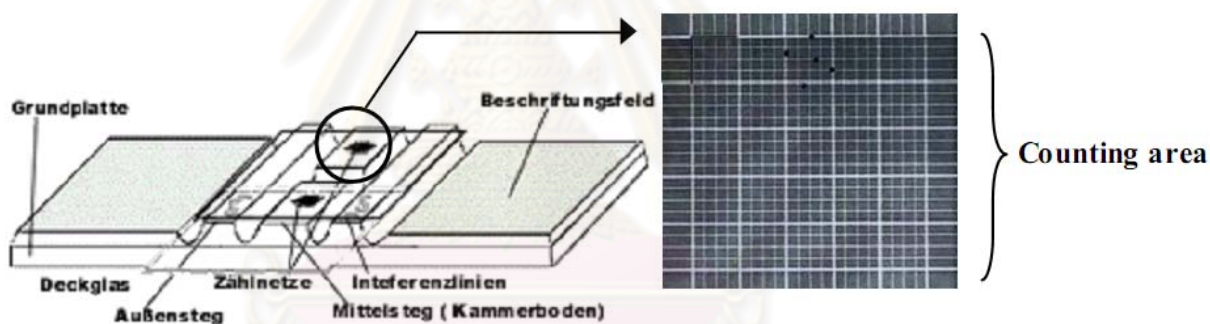
ภาคผนวก ง

การติดตามผลการทดลอง

การคำนวณความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของโคอะตอม และความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

1. การคำนวณหาความหนาแน่นของโคอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์

เมื่อทราบจำนวนเซลล์โคอะตอมที่ได้จากการนับบนสไลด์นับเม็ดเลือดแล้วนั้น สามารถคำนวณหาความหนาแน่นเซลล์ของโคอะตอม (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เนื่องจากช่องที่ใช้ในการนับเซลล์บนสไลด์ที่มีความกว้าง 1 มิลลิลิตร ยาว 1 มิลลิลิตร สูง 0.1 มิลลิลิตร ดังนั้นปริมาตรของช่องสไลด์นับเซลล์ 1 ช่อง เท่ากับ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิลิตร ลักษณะของช่องในสไลด์นับเซลล์ที่ใช้ในการนับเซลล์โคอะตอมแสดงดังรูปที่ ง.1



รูปที่ ง-1 สไลด์นับเม็ดเลือดของ American Optical (Fox, 1983)

ตัวอย่างการคำนวณ นับเซลล์โคอะตอมในช่องนับเซลล์บนสไลด์จำนวน 4 ช่อง (75%) ได้จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้ 480 เซลล์

$$\text{สูตร} \quad \frac{n}{x} \times \frac{10,000}{1} = \text{จำนวนเซลล์ใน 1 มิลลิลิตร}$$

$$\begin{aligned} \text{เมื่อ} \quad n &= \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้} \\ X &= \text{ตัวหารซึ่งใช้ค่าร้อยละของพื้นที่ของแต่ละช่องที่นับ} \end{aligned}$$

2. การคำนวณหาอัตราการเติบโตของไดอะตอม

เมื่อทราบความหนาแน่นของเซลล์จากการนับเซลล์บนสไลด์แล้ว สามารถคำนวณหาอัตราการเติบโตของไดอะตอมได้จากสมการ

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

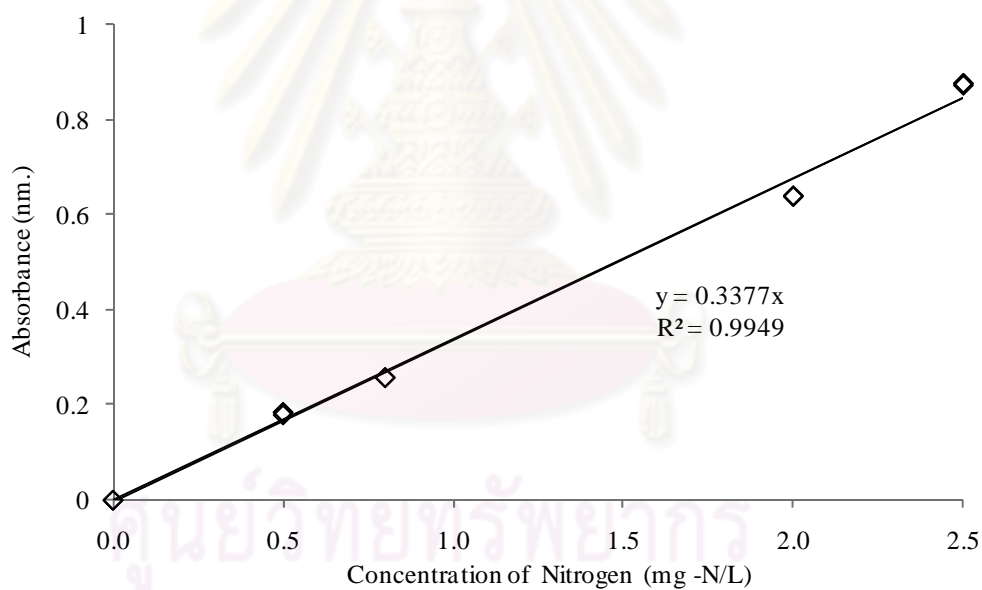
เมื่อ μ คือ อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)

X_1 คือ ความหนาแน่นของเซลล์ไดอะตอม ณ เวลา t_1 (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

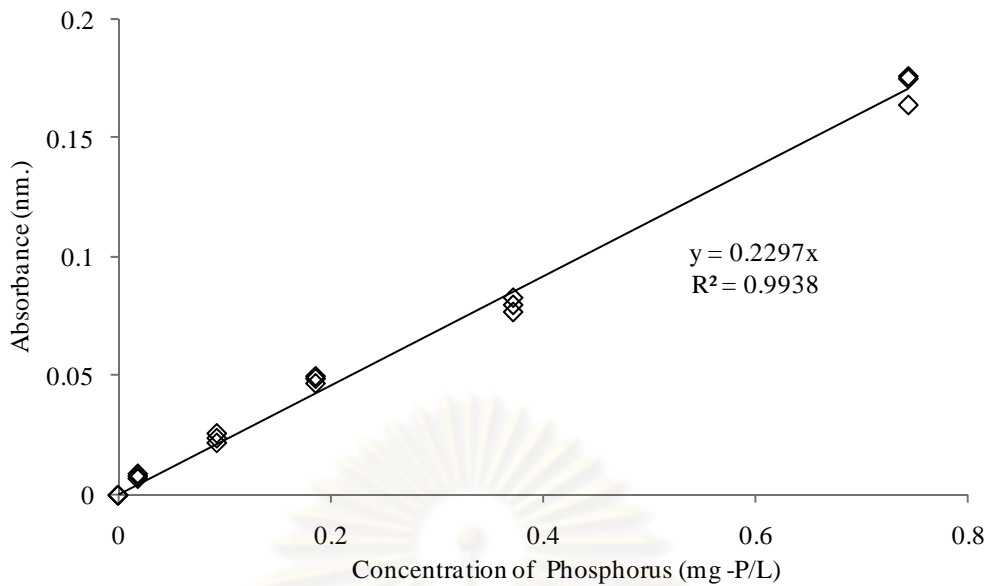
X_2 คือ ความหนาแน่นของเซลล์ไดอะตอม ณ เวลา t_2 (เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร)

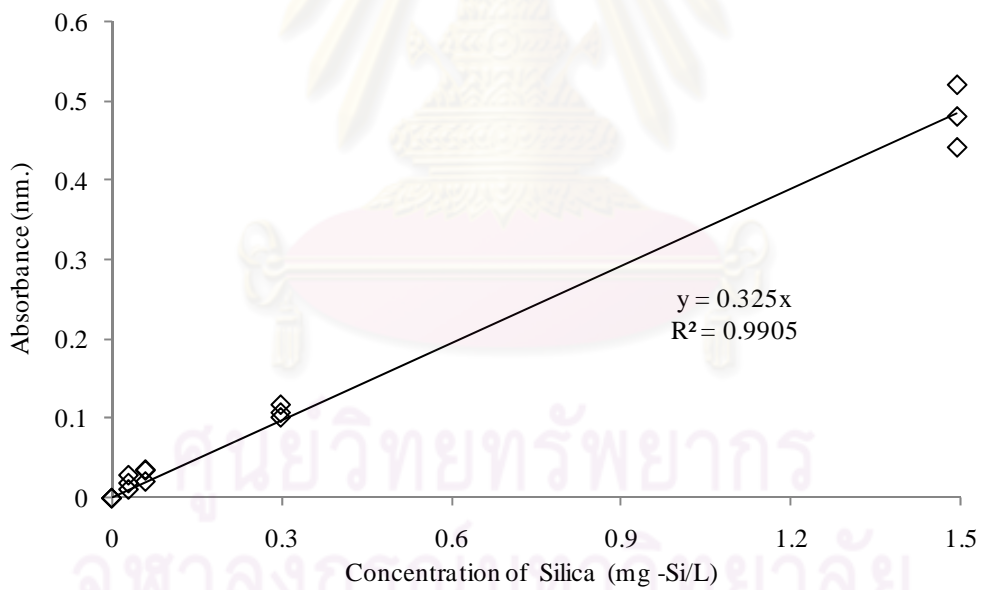
3. ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน



รูปที่ ง-2 กราฟมาตรฐานสารละลายไนเตรท ที่มีความเข้มข้น 0 0.5 0.8 1.0 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมไนโตรเจน-ไนเตรทต่อลิตร



รูปที่ ๓-3 กราฟมาตรฐานสารละลายฟอสเฟต ที่มีความเข้มข้น 0 0.0186 0.093 0.372 และ 0.744 มิลลิกรัมฟอสฟอรัส-ฟอสเฟตต่อลิตร



รูปที่ ๓-4 กราฟมาตรฐานสารละลายซิลิกา ที่มีความเข้มข้น 0 0.02987 0.05974 0.14935 0.2987 1.4935 และ 2.987 มิลลิกรัมซิลิกา-ซิลิกาต่อลิตร

ภาคผนวก จ

ผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.1 ได้ทำการศึกษาการเติบโตของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบคทีเรีย ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ตารางที่ จ-1 ความหนาแน่นเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. แบบแบคทีเรีย จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.1.2

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกา (mg-Si/L)
12/6/2552	1.19±0.14	9.82±0.99	0.35±0.005	0.48±0.07
13/6/2552	6.60±0.07	7.66±1.96	0.22±0.21	0.54±0.15
14/6/2552	8.39±0.63	6.55±1.61	0.15±0.04	0.37±0.14
15/6/2552	10.65±0.72	5.70±1.41	0.15±0.03	0.35±0.13
16/6/2552	13.04±0.44	4.25±0.53	0.19±0.05	0.66±0.41
17/6/2552	15.52±0.98	3.56±0.12	0.19±0.05	0.51±0.11
19/6/2552	14.30±0.46	3.60±0.18	0.34±0.04	0.34±0.10
20/6/2552	15.06±0.12	3.58±0.25	0.40±0.09	0.43±0.08
21/6/2552	14.57±0.78	4.54±0.88	0.45±0.46	0.69±0.14
22/6/2552	15.69±2.72	4.97±0.88	0.46±0.46	0.71±0.14
23/6/2552	14.99±2.40	5.22±0.88	0.48±0.46	0.76±0.14

ตารางที่ จ-2 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาเท่ากับ F/2+5N ในหัวข้อที่ 4.1.3

อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 + 5N				
วันที่ทำการ เพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิเกต (mg-Si/L)
15/8/2009	1.81±0.22	60.11±1.25	0.62±0.11	9.20±0.44
16/8/2009	6.85±0.03	57.05±0.10	0.08±0.02	0.51±0.05
17/8/2552	8.47±0.14	56.74±0.41	0.09±0.02	0.78±0.46
18/8/2009	9.68±0.38	52.33±0.30	0.09±0.02	0.49±0.03
19/8/2552	16.07±5.85	50.34±1.55	0.10±0.03	0.49±0.24
20/8/2552	19.63±0.33	49.25±0.74	0.11±0.01	0.55±0.42
21/8/2552	26.43±11.79	80.40±1.08	0.09±0.01	0.61±0.02
22/8/2552	23.57±6.93	78.01±3.72	0.08±0.01	1.02±0.24
23/8/2552	17.92±1.77	43.29±0.58	0.15±0.06	1.27±0.14
24/8/2552	17.83±2.07	42.86±2.61	0.12±0.04	0.68±0.07
25/8/2552	20.78±5.68	43.53±0.44	0.10±0.00	0.48±0.01

ตารางที่ จ-3 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 5N + 3.97$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.3

อาหารเพาะเชื้อสูตร $F/2 + 5N + 3.97$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน				
วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ไนโตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกต (มก./ลิตร)
15/8/2009	2.31±0.33	60.20±0.82	0.66±0.05	9.47±0.36
16/8/2009	8.18±0.62	53.46±0.41	0.08±0.02	0.61±0.18
17/8/2552	11.55±0.78	49.68±1.82	0.10±0.03	0.71±0.30
18/8/2009	13.80±2.08	48.43±2.60	0.11±0.04	0.57±0.09
19/8/2552	18.03±4.03	46.84±3.05	0.07±0.01	0.69±0.38
20/8/2552	23.08±4.65	53.05±3.72	0.08±0.01	0.96±0.06
21/8/2552	28.24±3.71	63.90±11.83	0.15±0.12	1.32±0.68
22/8/2552	29.33±6.41	69.06±7.11	0.07±0.02	3.19±1.69
23/8/2552	24.40±5.62	36.40±2.10	0.09±0.02	4.22±1.44
24/8/2552	19.98±6.53	37.04±4.24	0.13±0.07	2.06±0.59
25/8/2552	17.42±6.24	41.28±1.84	0.19±0.06	2.47±0.39

ตารางที่ จ-4 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 5N + 2P + 3.97$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.3

อาหารเพาะเชื้อสูตร $F/2 + 5N + 2P + 3.97$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน				
วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกา (mg-Si/L)
15/8/2009	2.31±0.33	60.20±0.82	0.66±0.05	9.47±0.36
16/8/2009	8.18±0.62	53.46±0.41	0.08±0.02	0.61±0.18
17/8/2552	11.55±0.78	49.68±1.82	0.10±0.03	0.71±0.30
18/8/2009	13.80±2.08	48.43±2.60	0.11±0.04	0.57±0.09
19/8/2552	18.03±4.03	46.84±3.05	0.07±0.01	0.69±0.38
20/8/2552	23.08±4.65	53.05±3.72	0.08±0.01	0.96±0.06
21/8/2552	28.24±3.71	63.90±11.83	0.15±0.12	1.32±0.68
22/8/2552	29.33±6.41	69.06±7.11	0.07±0.02	3.19±1.69
23/8/2552	24.40±5.62	36.40±2.10	0.09±0.02	4.22±1.44
24/8/2552	19.98±6.53	37.04±4.24	0.13±0.07	2.06±0.59
25/8/2552	17.42±6.24	41.28±1.84	0.19±0.06	2.47±0.39

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ-5 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้น ฟอสฟอรัสและซิลิกา ในหัวข้อที่ 4.1.4

อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2				
วันที่ทำการ เพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกต (mg-Si/L)
30/6/2552	1.62 \pm 0.13	12.52 \pm 1.80	0.71 \pm 0.15	1.17 \pm 0.09
1/7/2552	8.15 \pm 0.52	8.59 \pm 0.84	0.16 \pm 0.06	0.23 \pm 0.21
2/7/2552	9.63 \pm 1.19	7.28 \pm 0.35	0.07 \pm 0.02	0.39 \pm 0.19
3/7/2552	11.43 \pm 0.41	5.70 \pm 0.55	0.14 \pm 0.03	0.33 \pm 0.11
4/7/2552	14.57 \pm 1.12	3.46 \pm 0.96	0.16 \pm 0.11	0.49 \pm 0.18
5/7/2552	12.97 \pm 0.59	3.14 \pm 0.25	0.23 \pm 0.15	0.52 \pm 0.07
6/7/2552	15.67 \pm 1.01	2.39 \pm 0.15	0.11 \pm 0.04	0.37 \pm 0.03
7/7/2552	20.46 \pm 1.51	2.61 \pm 0.18	0.17 \pm 0.10	0.60 \pm 0.31
8/7/2552	22.39 \pm 1.80	2.45 \pm 0.15	0.15 \pm 0.10	0.45 \pm 0.16

ตารางที่ จ-6 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้น ฟอสฟอรัสและซิลิกาเท่ากับ F/2 + 1.12 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.4

อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 + 1.12 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร·วัน				
วันที่ทำการ เพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกัด (mg-Si/L)
30/6/2552	1.28 \pm 0.50	13.45 \pm 0.07	2.11 \pm 0.10	1.23 \pm 0.05
1/7/2552	7.11 \pm 0.20	9.72 \pm 0.05	1.31 \pm 0.07	0.19 \pm 0.01
2/7/2552	8.35 \pm 0.50	7.73 \pm 0.02	0.82 \pm 0.02	0.33 \pm 0.03
3/7/2552	9.46 \pm 0.70	6.36 \pm 0.09	0.78 \pm 0.01	0.46 \pm 0.03
4/7/2552	12.31 \pm 0.88	4.24 \pm 0.02	1.17 \pm 0.02	0.41 \pm 0.01
5/7/2552	12.91 \pm 1.30	2.43 \pm 0.02	1.59 \pm 0.01	0.52 \pm 0.02
6/7/2552	12.73 \pm 1.67	2.74 \pm 0.02	1.57 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01
7/7/2552	15.37 \pm 1.20	2.69 \pm 0.04	2.27 \pm 0.01	0.23 \pm 0.02
8/7/2552	15.30 \pm 1.85	2.65 \pm 0.03	3.12 \pm 0.11	0.37 \pm 0.01

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ-7 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้น ฟอสฟอรัสและซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 3.97$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วันในหัวข้อที่ 4.1.4

อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 + 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน				
วันที่ทำการ เพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกัด (mg-Si/L)
30/6/2552	1.28±0.29	13.74±0.08	0.88±0.10	1.13±0.01
1/7/2552	7.46±0.52	10.46±0.04	0.40±0.14	0.21±0.01
2/7/2552	10.87±0.50	8.11±0.03	0.22±0.03	0.18±0.01
3/7/2552	12.54±1.72	6.04±0.14	0.15±0.01	0.24±0.01
4/7/2552	15.59±0.63	4.82±0.03	0.19±0.01	0.41±0.02
5/7/2552	24.00±1.78	3.60±0.02	0.21±0.01	0.28±0.01
6/7/2552	24.33±2.60	2.48±0.00	0.26±0.01	0.42±0.01
7/7/2552	28.90±1.61	2.20±0.02	0.20±0.01	0.22±0.02
8/7/2552	29.83±3.44	2.65±0.02	0.32±0.04	0.69±0.010

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ-8 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้น ฟอสฟอรัสและซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 1.12$ มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร·วัน และ $+ 3.97$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.4

อาหารเพาะเชื้อสูตร $F/2 + 1.12$ มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร·วัน และ 3.97 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน				
วันที่ทำการ เพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกेट (mg-Si/L)
30/6/2552	1.67±0.30	12.80±0.07	2.00±0.12	1.16±0.02
1/7/2552	6.04±0.53	9.40±0.03	0.56±0.11	0.14±0.02
2/7/2552	10.26±1.20	7.99±0.05	0.47±0.00	0.38±0.01
3/7/2552	12.37±1.26	5.80±0.04	0.17±0.01	0.18±0.01
4/7/2552	10.89±0.31	4.05±0.06	0.19±0.01	0.87±0.04
5/7/2552	15.50±1.74	2.57±0.03	0.28±0.010	0.37±0.01
6/7/2552	16.77±1.01	2.65±0.03	0.51±0.06	0.56±0.02
7/7/2552	20.93±1.10	1.99±0.03	0.50±0.01	0.20±0.03
8/7/2552	20.30±1.40	1.63±0.03	0.52±0.02	0.38±0.02

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ-9 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเบตซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นซิลิกาเท่ากับ F/2 + 7.94 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ในหัวข้อที่ 4.1.5

อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 + 7.94 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร		
วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ซิลิกต (mg-Si/L)
17/2/2010	1.65 \pm 0.25	5.060 \pm 0.209
18/2/2010	7.72 \pm 0.90	1.582 \pm 0.713
19/2/2010	9.12 \pm 1.38	0.214 \pm 0.081
20/2/2010	10.41 \pm 1.21	0.996 \pm 0.774
21/2/2010	14.14 \pm 0.65	0.509 \pm 0.334
22/2/2010	16.08 \pm 1.59	0.448 \pm 0.276
23/2/2010	17.43 \pm 0.84	0.428 \pm 0.209
24/2/2010	19.14 \pm 0.92	0.279 \pm 0.058
25/2/2010	21.67 \pm 2.66	0.662 \pm 0.180
26/2/2010	21.14 \pm 2.40	0.580 \pm 0.235
27/2/2010	1.65 \pm 0.25	5.060 \pm 0.209

ตารางที่ จ-10 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเบตซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นซิลิกาเท่ากับ F/2 + 11.92 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร ในหัวข้อที่ 4.1.5

อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 + 11.92 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร		
วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ซิลิกเกต (mg-Si/L)
17/2/2010	1.86 \pm 0.26	5.553 \pm 0.426
18/2/2010	10.00 \pm 1.81	1.088 \pm 0.081
19/2/2010	12.09 \pm 2.25	0.411 \pm 0.236
20/2/2010	13.81 \pm 1.68	0.442 \pm 0.093
21/2/2010	18.13 \pm 2.75	0.118 \pm 0.071
22/2/2010	21.06 \pm 2.25	0.391 \pm 0.144
23/2/2010	23.79 \pm 4.15	0.260 \pm 0.093
24/2/2010	26.16 \pm 5.49	0.227 \pm 0.046
25/2/2010	27.90 \pm 3.32	0.459 \pm 0.106
26/2/2010	25.84 \pm 3.41	0.348 \pm 0.040
27/2/2010	1.86 \pm 0.26	5.553 \pm 0.426

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ-11 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นซิลิกา ในหัวข้อที่ 4.1.6

อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2		
วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ซิลิกา (mg-Si/L)
13/01/10	1.19 \pm 0.14	4.902 \pm 0.238
14/01/10	6.60 \pm 0.07	0.319 \pm 0.202
15/01/10	8.39 \pm 0.63	0.281 \pm 0.053
16/01/10	10.65 \pm 0.72	0.338 \pm 0.094
17/01/10	13.04 \pm 0.44	0.315 \pm 0.016
18/01/10	15.52 \pm 0.98	0.719 \pm 0.389
19/01/10	14.30 \pm 0.46	0.419 \pm 0.156
20/01/10	15.06 \pm 0.12	0.502 \pm 0.135
21/01/10	14.57 \pm 0.78	1.146 \pm 0.306
22/01/10	15.69 \pm 2.72	0.730 \pm 0.176
23/01/10	14.99 \pm 2.40	1.255 \pm 0.340

ตารางที่ จ-12 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟตแบตซ์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นซิลิกาเท่ากับ $F/2 + 0.397$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.6

อาหารเพาะเชื้อสูตร $F/2 + 0.397$ มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน		
วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ซิลิเกต (mg-Si/L)
13/01/10	1.39±0.15	4.89±0.20
14/01/10	7.12±0.73	0.74±0.13
15/01/10	7.79±0.55	0.40±0.21
16/01/10	9.56±0.36	0.55±0.17
17/01/10	9.73±0.82	0.37±0.20
18/01/10	11.66±0.55	0.70±0.24
19/01/10	12.63±0.33	0.50±0.20
20/01/10	12.19±0.64	1.10±0.12
21/01/10	15.31±0.54	1.26±0.13
22/01/10	14.97±0.46	0.64±0.08
23/01/10	16.47±2.74	0.39±0.09

ตารางที่ จ-13 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นซิลิกา F/2 + 0.794 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.6

อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 + 0.794 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน		
วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ซิลิเกต (mg-Si/L)
13/01/10	1.53 \pm 0.08	4.10 \pm 0.24
14/01/10	6.28 \pm 0.36	0.32 \pm 0.14
15/01/10	7.63 \pm 0.81	0.28 \pm 0.10
16/01/10	11.19 \pm 1.15	0.33 \pm 0.12
17/01/10	13.54 \pm 1.51	0.50 \pm 0.20
18/01/10	17.19 \pm 2.60	0.29 \pm 0.04
19/01/10	18.16 \pm 0.95	0.48 \pm 0.21
20/01/10	20.09 \pm 1.75	0.82 \pm 0.44
21/01/10	22.07 \pm 2.69	0.83 \pm 0.15
22/01/10	23.83 \pm 1.80	0.87 \pm 0.24
23/01/10	25.02 \pm 3.54	0.71 \pm 0.12

ตารางที่ จ-14 ความหนาแน่นเซลล์และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นซิลิกาเท่ากับ 1.192 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.6

อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 + 1.192 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน		
วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	ซิลิเกต (mg-Si/L)
13/01/10	1.31 \pm 0.21	4.67 \pm 0.21
14/01/10	6.63 \pm 0.35	0.30 \pm 0.10
15/01/10	8.83 \pm 0.09	0.33 \pm 0.17
16/01/10	14.22 \pm 0.34	0.37 \pm 0.13
17/01/10	14.64 \pm 0.63	0.38 \pm 0.04
18/01/10	18.25 \pm 2.36	0.44 \pm 0.07
19/01/10	23.19 \pm 2.59	0.61 \pm 0.31
20/01/10	25.82 \pm 2.62	0.64 \pm 0.07
21/01/10	28.28 \pm 1.37	1.22 \pm 0.65
22/01/10	29.80 \pm 3.04	0.88 \pm 0.10
23/01/10	31.48 \pm 2.04	0.89 \pm 0.19

ตารางที่ จ-15 ความหนาแน่นเซลล์ไคอะตอมในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่มีหัวเชื้อไคอะตอมที่ความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 1 เท่าของสูตรปกติ ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 1.192 1.59 และ 1.86 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ตามลำดับ ในหัวข้อที่ 4.1.6

ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)			
วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	F/2 + 1.192 (mg-Si/L/day)	F/2 + 1.59 (mg-Si/L/day)	F/2 + 1.86 (mg-Si/L/day)
26/02/2010	1.47±0.30	1.49±0.13	1.46±0.21
27/02/2010	6.26±0.73	6.73±0.94	6.86±1.29
28/02/2010	7.52±0.44	9.20±1.41	10.15±0.60
01/03/10	11.05±0.20	11.30±0.75	12.45±1.64
02/03/10	18.53±1.65	19.93±0.79	21.22±1.17
03/03/10	18.04±1.33	19.88±1.26	21.67±2.02
04/03/10	18.56±0.30	22.41±1.82	23.00±1.58
05/03/10	20.13±0.70	21.24±1.53	22.77±2.82
06/03/10	19.88±1.27	20.72±1.04	22.29±0.07
07/03/10	20.76±2.06	21.91±0.47	21.94±1.37
08/03/10	22.34±3.92	22.88±1.86	22.14±1.01

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ-16 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ก่อนและหลังการเติมซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคต์ที่มีหัวเชื้อ ไดอะตอมที่ความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 1 เท่าของสูตรปรกติ ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 1.192 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.6

อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 + 1.192 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน		
วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความเข้มข้นของซิลิกา ก่อนเติม (mg-Si/L)	ความเข้มข้นของซิลิกา หลังเติม (mg-Si/L)
26/02/2010	4.31±0.00	4.37±0.58
27/02/2010	0.85±0.57	0.67±0.15
28/02/2010	0.71±0.64	0.71±0.02
01/03/10	0.75±0.20	1.10±0.05
02/03/10	0.63±0.05	0.89±0.05
03/03/10	0.51±0.09	1.21±0.15
04/03/10	0.37±0.05	0.99±0.14
05/03/10	0.42±0.08	1.00±0.12
06/03/10	0.19±0.10	0.83±0.07
07/03/10	0.38±0.12	0.93±0.11
08/03/10	0.25±0.08	0.93±0.11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ-17 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ก่อนและหลังการเติมซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบคต์ที่มีหัวเชื้อไดอะตอมที่ความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 1 เท่าของสูตรปรกติ ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 1.590 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.6

อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 + 1.59 (มก.ซิลิกา /ลิตร·วัน)		
วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความเข้มข้นของซิลิกา ก่อนเติม (mg-Si/L)	ความเข้มข้นของซิลิกา หลังเติม (mg-Si/L)
26/02/2010	4.31±0.00	4.48±0.37
27/02/2010	0.85±0.68	0.96±0.09
28/02/2010	0.31±0.05	1.24±0.54
01/03/10	0.49±0.09	1.15±0.19
02/03/10	0.43±0.18	1.01±0.14
03/03/10	0.51±0.09	0.80±0.04
04/03/10	0.59±0.40	1.11±0.06
05/03/10	0.26±0.02	1.08±0.13
06/03/10	0.34±0.08	1.12±0.31
07/03/10	0.73±0.71	1.61±0.50
08/03/10	1.43±0.78	1.61±0.50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ-18 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซิลิกา ก่อนและหลังการเติมซิลิกาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่มีหัวเชื้อ ไดอะตอมที่ความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 1 เท่าของสูตรปกติ ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของซิลิกาเท่ากับ 1.860 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน ในหัวข้อที่ 4.1.6

อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 + 1.86 มิลลิกรัมซิลิกาต่อลิตร·วัน		
วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความเข้มข้นของซิลิกา ก่อนเติม (mg-Si/L)	ความเข้มข้นของซิลิกา หลังเติม (mg-Si/L)
26/02/2010	4.31±0.00	4.48±0.40
27/02/2010	0.43±0.13	0.79±0.05
28/02/2010	0.31±0.12	1.20±0.21
01/03/10	0.64±0.09	1.46±0.33
02/03/10	0.28±0.20	1.15±0.07
03/03/10	0.41±0.13	1.19±0.15
04/03/10	0.56±0.31	1.27±0.07
05/03/10	0.22±0.04	1.69±0.56
06/03/10	0.25±0.09	1.40±0.06
07/03/10	0.56±0.37	1.75±0.37
08/03/10	1.05±0.99	1.75±0.37

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ในผลการทดลองที่ 4.2 ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ในขวดแก้วขนาด 5 ลิตร ด้วยอาหารเพาะเชื้อเริ่มต้นสูตร F/2 ความเต็ม 30 พีเอช โดยทำการหาอัตราการเจริญและภาวะของสารอาหารหลักไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิเกตที่เหมาะสม ซึ่งมีรายละเอียดของผลการทดลองดังต่อไปนี้

ตารางที่ จ-1 การคำนวณอัตราการไหล (มิลลิลิตร) และอัตราการเจริญ (ต่อวัน) ของปั๊มแบบรีดสาย (Peristaltic Pump) ในระบบแบบต่อเนื่อง ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

ระดับ	เวลา (นาที)	อัตราการไหลของสารอาหาร (L/day)	อัตราการเจริญ (day ⁻¹)
1	30	1.344	0.37
2	20	1.584	0.40
3	20	2.160	0.54
4	20	2.880	0.72
5	20	3.600	0.90
6	20	3.744	0.94
7	20	8.712	2.18

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๓-2 ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจริญงอก น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์
ไคอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องครั้งที่ 1

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราการเจริญงอก (day ⁻¹)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g-dry weight/L· day)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/ L· day)
13/01/10	1.26±0.14	-	-	-
14/01/10	5.63±0.56	-	-	-
15/01/10	5.80±0.22	-	-	-
16/01/10	6.44±0.93	-	-	-
17/01/10	6.94±0.40	0.25	0.16±0.01	1.74
18/01/10	8.69±1.25	0.25	0.13±0.01	2.17
19/01/10	8.13±0.61	0.25	0.13±0.01	2.03
20/01/10	10.74±2.06	0.30	0.12±0.01	3.22
21/01/10	13.22±0.63	0.33	0.10±0.00	4.36
22/01/10	14.70±0.88	0.35	0.29±0.06	5.15
23/01/10	11.76±0.34	0.38	0.16±0.01	4.47
24/01/10	11.83±1.28	0.38	0.18±0.05	4.50
25/01/10	11.70±0.70	0.50	0.12±0.03	5.85
26/01/10	12.02±0.32	0.50	0.16±0.01	6.01
27/01/10	13.69±3.31	0.63	0.12±0.00	8.62
28/01/10	7.35±0.23	0.63	0.11±0.00	4.63
29/01/10	8.87±0.67	0.50	0.11±0.00	4.44
30/01/10	9.80±0.26	0.94	0.11±0.01	9.21
31/01/10	11.22±1.42	0.88	0.08±0.00	9.87
1/02/10	10.33±1.16	0.63	0.10±0.00	6.51
2/02/10	12.69±2.53	0.75	0.08±0.01	9.52

ตารางที่ ๓-2 ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจริญงอก น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์
ไคโตะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องครั้งที่ 1 (ต่อ)

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราการเจริญงอก (day ⁻¹)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g-dry weight/L· day)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/ L· day)
3/02/10	13.06±1.28	0.75	0.09±0.00	9.80
4/02/10	14.30±0.78	0.60	0.10±0.00	8.58
5/02/10	12.87±1.27	0.75	0.10±0.02	9.65
6/02/10	10.43±1.28	0.78	0.08±0.01	8.14
7/02/10	9.11±0.89	0.94	0.07±0.02	8.56
8/02/10	11.93±1.14	0.63	0.08±0.00	7.52
9/02/10	10.72±0.92	0.75	0.08±0.01	8.04
10/02/10	14.35±2.28	0.68	0.12±0.01	9.76
11/02/10	10.96±0.42	0.88	0.07±0.01	9.64
12/02/10	9.59±0.31	1.13	0.05±0.00	10.84
13/02/10	10.06±0.48	1.15	0.12±0.02	11.57
14/02/10	10.91±0.70	1.13	0.08±0.00	12.33
15/02/10	11.11±1.33	1.13	0.11±0.00	12.55
16/02/10	11.04±0.33	1.00	0.10±0.03	11.04
17/02/10	9.13±0.18	1.06	0.08±0.00	9.68
18/02/10	9.13±0.06	1.00	0.10±0.01	9.13
19/02/10	9.24±1.38	1.06	0.29±0.24	9.79
20/02/10	9.43±0.81	1.00	0.07±0.01	9.43
21/02/10	9.80±0.50	1.00	0.11±0.01	9.80
22/02/10	9.98±0.75	1.00	0.05±0.00	9.98
23/02/10	10.07±1.01	1.00	0.04±0.01	10.07
24/02/10	9.59±0.56	1.03	0.12±0.02	9.88

ตารางที่ ฉ-2 ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจริญงอก น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์
ไคอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องครั้งที่ 1 (ต่อ)

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราการเจริญงอก (day ⁻¹)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g-dry weight/L· day)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/ L· day)
25/02/10	10.74±0.79	1.00	0.08±0.01	10.74
26/02/10	10.30±0.62	1.00	0.11±0.00	10.30
27/02/10	4.09±0.61	1.75	0.01±0.01	7.16

ตารางที่ ฉ-3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาของไคอะตอม
Entomoneis sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ครั้งที่ 1

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกา (mg-Si/L)
13/01/10	20.06±0.24	1.02±0.01	4.44±0.03
14/01/10	17.54±0.05	0.52±0.01	0.23±0.02
15/01/10	16.63±0.02	0.10±0.03	0.17±0.09
16/01/10	15.35±0.07	0.12±0.05	0.11±0.11
17/01/10	14.20±0.02	0.19±0.01	0.15±0.16
18/01/10	11.62±0.05	0.08±0.01	0.26±0.06
19/01/10	7.14±0.06	0.07±0.01	0.39±0.08
20/01/10	8.82±0.05	0.16±0.01	0.14±0.02
21/01/10	7.30±0.02	0.20±0.00	0.79±0.22
22/01/10	5.36±0.05	0.13±0.00	0.50±0.05
24/01/10	5.59±0.02	0.12±0.00	0.52±0.14
25/01/10	6.79±0.06	0.13±0.01	0.60±0.06

ตารางที่ ฉ-3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาของไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ครั้งที่ 1 (ต่อ)

วันที่ทำการ เพาะเลี้ยง	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกา (mg-Si/L)
26/01/10	8.33±0.06	0.22±0.00	0.95±0.04
27/01/10	9.38±0.02	0.14±0.01	0.56±0.08
28/01/10	10.08±0.02	0.29±0.01	1.35±0.15
29/01/10	11.14±0.05	0.20±0.01	0.48±0.04
30/01/10	10.56±0.06	0.06±0.01	0.71±0.05
31/01/10	10.19±0.02	0.17±0.02	0.77±0.12
1/02/10	10.57±0.05	0.28±0.02	0.81±0.03
2/02/10	9.65±0.04	0.44±0.01	0.94±0.02
3/02/10	9.46±0.08	0.11±0.01	0.94±0.28
4/02/10	9.49±0.11	0.33±0.01	0.91±0.01
5/02/10	8.41±0.38	0.06±0.01	0.30±0.04
6/02/10	9.15±0.53	0.12±0.01	0.89±0.02
7/02/10	9.64±0.34	0.18±0.01	1.29±0.26
8/02/10	9.99±0.59	0.11±0.04	0.36±0.03
9/02/10	9.39±0.40	0.11±0.01	1.29±0.13
10/02/10	9.60±0.48	0.09±0.00	0.79±0.13
11/02/10	8.53±0.53	0.20±0.01	1.00±0.09
12/02/10	6.85±0.04	0.12±0.01	0.72±0.05
13/02/10	9.07±0.05	0.28±0.02	0.52±0.09
14/02/10	9.71±0.02	0.30±0.02	0.71±0.08
15/02/10	10.97±0.04	0.22±0.01	0.10±0.04
16/02/10	10.56±0.02	0.16±0.01	0.51±0.04

ตารางที่ ฉ-3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาของไคอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ครั้งที่ 1 (ต่อ)

วันที่ทำการ เพาะเลี้ยง	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกา (mg-Si/L)
17/02/10	10.25±0.07	0.61±0.12	1.03±0.1
18/02/10	11.45±0.02	0.16±0.02	1.13±0.22
19/02/10	11.62±0.02	0.11±0.04	0.60±0.13
20/02/10	12.05±0.07	0.14±0.03	0.16±0.00
21/02/10	11.97±0.07	0.18±0.02	0.61±0.5
22/02/10	11.60±0.07	0.19±0.01	0.50±0.17
23/02/10	11.93±0.04	0.16±0.02	0.39±0.06
24/02/10	12.57±0.12	0.18±0.00	0.74±0.04
25/02/10	12.09±0.00	0.18±0.00	0.62±0.04
26/02/10	12.34±0.00	0.38±0.04	0.93±0.00
27/02/10	12.53±0.02	0.56±0.03	0.89±0.02

ตารางที่ จ-4 ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจริญงอก น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์
ไคอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องครั้งที่ 2

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราการเจริญงอก (day ⁻¹)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g-dry weight/L· day)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/ L· day)
28/2/10	1.69±0.50	-	-	-
01/03/10	6.72±0.92	-	-	-
02/03/10	6.83±0.69	-	-	-
03/03/10	6.83±0.92	-	-	-
04/03/10	8.37±0.95	-	-	-
05/03/10	6.44±0.29	1	0.14±0.03	6.44
06/03/10	5.96±0.89	1	0.20±0.08	5.96
07/03/10	6.74±0.38	0.875	0.07±0.03	5.90
08/03/10	7.50±0.11	0.8	0.06±0.00	6.00
09/03/10	8.20±0.42	0.825	0.11±0.00	6.77
10/03/10	8.48±0.86	0.575	0.06±0.01	4.88
11/03/10	10.39±1.20	0.5	0.05±0.00	5.19
12/03/10	10.52±0.25	0.4375	0.16±0.01	4.60
13/03/10	11.59±2.81	0.525	0.14±0.04	6.09
14/3/10	10.80±0.75	0.525	0.16±0.01	5.67
15/3/10	11.31±1.53	0.525	0.14±0.04	5.94
16/3/10	12.17±1.03	0.5625	0.10±0.01	6.84
17/3/10	11.80±1.36	0.68	0.12±0.01	7.96
18/3/10	11.56±0.75	0.56	0.11±0.04	6.50
19/3/10	10.30±0.53	0.56	0.07±0.01	5.79
20/3/10	10.78±0.63	0.65	0.08±0.00	7.01
21/3/10	11.78±1.86	0.73	0.09±0.01	8.54

ตารางที่ ๓-4 ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจริญงอก น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์
ไดอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องครั้งที่ 2 (ต่อ)

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราการเจริญงอก (day ⁻¹)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g-dry weight/L· day)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/ L· day)
22/3/10	11.17±0.78	0.75	0.14±0.03	8.38
23/3/10	11.94±0.64	0.63	0.12±0.03	7.47
24/3/10	11.41±0.60	0.63	0.09±0.00	7.13
25/3/10	10.93±0.64	0.60	0.10±0.00	6.56
26/3/10	10.98±0.43	0.750	0.09±0.01	8.24
27/3/10	11.69±0.87	0.625	0.11±0.01	7.30
28/3/10	11.59±0.97	0.625	0.21±0.02	7.25
29/3/10	10.81±0.50	0.625	0.22±0.01	6.76
30/3/10	11.07±0.56	0.700	0.24±0.00	7.75
31/3/10	12.87±1.76	0.700	0.29±0.03	9.01
1/4/2010	12.72±1.11	0.625	0.19±0.00	7.95
2/4/2010	12.13±1.17	0.500	0.20±0.01	6.06
3/4/2010	11.04±0.61	0.525	0.21±0.01	5.79
4/4/2010	10.83±0.10	0.550	0.19±0.01	5.96
5/4/2010	12.39±1.50	0.750	0.20±0.01	9.29
6/4/2010	15.20±3.22	0.625	0.19±0.02	9.50
7/4/2010	15.22±0.10	0.875	0.22±0.03	10.28
8/4/2010	13.80±1.53	0.625	0.22±0.02	8.62
9/4/2010	13.72±0.42	0.750	0.17±0.00	10.29
10/4/2010	15.22±0.64	0.675	0.16±0.03	10.28
11/4/2010	15.87±1.31	0.625	0.18±0.08	9.92
12/4/2010	16.07±0.82	0.650	0.17±0.01	10.45

ตารางที่ ฉ-4 ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจริญงอก น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์
ไคอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องครั้งที่ 2 (ต่อ)

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราการเจริญงอก (day ⁻¹)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g-dry weight/L· day)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/ L· day)
13/4/2010	15.81±0.61	0.625	0.19±0.01	9.88
14/4/2010	16.15±1.08	0.650	0.19±0.03	10.50
15/4/2010	15.70±0.63	0.675	0.17±0.04	10.60
16/4/2010	15.30±0.32	0.625	0.18±0.03	9.56
17/4/2010	15.31±0.61	0.625	0.18±0.04	9.57

ตารางที่ ฉ-5 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาของไคอะตอม
Entomoneis sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ครั้งที่ 2

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ไนโตรเจน (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกา (mg-Si/L)
28/2/10	16.12±0.04	0.89±0	3.5±1.03
01/03/10	13.25±0.06	0.18±0.01	0.99±0.43
02/03/10	12.64±0.06	0.13±0.01	0.98±0.39
03/03/10	12.62±0.04	0.07±0.01	0.56±0.22
04/03/10	10.76±0.02	0.04±0	1.1±0.42
05/03/10	11.37±0.05	0.07±0	1.05±0.42
06/03/10	11.88±0.05	0.2±0.06	0.28±0.14
07/03/10	12.42±0.04	0.21±0.04	1±0.46
08/03/10	12.27±0.05	0.06±0	0.73±0.35
09/03/10	11.83±0.08	0.07±0.01	0.39±0.19
10/03/10	11.03±0.04	0.12±0	0.92±0.45

ตารางที่ ๓-5 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาของไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ครั้งที่ 2 (ต่อ)

วันที่ทำการ เพาะเลี้ยง	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกา (mg-Si/L)
11/03/10	10.8±0.02	0.17±0.03	0.41±0.22
12/03/10	10.61±0.05	0.14±0.03	0.73±0.34
13/03/10	10.3±0.04	0.07±0	0.21±0.1
14/3/10	10.36±0.09	0.11±0.01	0.46±0.23
15/3/10	10.41±0.02	0.13±0.01	0.43±0.21
16/3/10	10.78±0.06	0.1±0.04	0.08±0.05
17/3/10	10.5±0	0.43±0.03	0.44±0.19
18/3/10	10.17±0.02	0.4±0.04	0.16±0.08
19/3/10	11.18±0.02	0.63±0.03	0.92±0.38
20/3/10	10.65±0.02	0.8±0.02	0.83±0.33
21/3/10	10.52±0.05	0.9±0.01	1.16±0.43
22/3/10	11.45±0.02	0.73±0.01	0.55±0.28
23/3/10	8.59±0	0.67±0.01	1.17±0.39
24/3/10	6.87±0.02	0.68±0.03	0.34±0.17
25/3/10	5.58±0.05	0.95±0.02	0.83±0.33
26/3/10	2.96±0.17	0.86±0	0.16±0.08
27/3/10	1.8±0	0.69±0.04	0.36±0.15
28/3/10	1.8±0	0.5±0.01	0.28±0.15
29/3/10	2.37±0.02	0.82±0.01	0.29±0.14
30/3/10	2.91±0.05	1.02±0.02	0.8±0.33
31/3/10	2.62±0.02	0.84±0.04	0.26±0.13
1/4/2010	2.45±0.02	0.91±0.07	0.64±0.25

ตารางที่ ๓-5 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาของไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบต่อเนื่อง ครั้งที่ 2 (ต่อ)

วันที่ทำการ เพาะเลี้ยง	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกา (mg-Si/L)
2/4/2010	2.1±0.1	0.39±0.01	0.41±0.18
3/4/2010	1.65±0.05	0.96±0	0.78±0.29
4/4/2010	1.23±0.05	0.61±0.02	0.44±0.18
5/4/2010	1.91±0.11	0.9±0	0.18±0.1
6/4/2010	2.55±0.02	0.94±0.04	0.2±0.08
7/4/2010	4.31±0.02	0.95±0.04	0.34±0.16
8/4/2010	2.78±0.02	0.98±0.06	0.23±0.1
9/4/2010	2.82±0.02	1.04±0.03	0.47±0.21
10/4/2010	2.05±0.02	0.74±0.04	0.32±0.14
11/4/2010	2.51±0.05	0.62±0.05	0.16±0.1
12/4/2010	2.08±0.02	0.53±0.04	0.06±1.39
13/4/2010	2.71±0.02	0.78±0.03	0.26±0.11
14/4/2010	2.08±0.02	0.8±0.06	0.24±0.11
15/4/2010	2.16±0.02	0.81±0.02	0.11±0.05
16/4/2010	2.13±0.02	0.77±0.03	0.10±0.05
17/4/2010	2.13±0.06	0.79±0.03	0.10±0.01

ตารางที่ ๓-6 การคำนวณอัตราการไหล (มิลลิลิตร) และอัตราการเจือจาง (ต่อวัน) ของระบบเครื่องสูบลมที่ใช้ไดอะแฟรม (Diaphragm dosing pump) ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Entomoneis* sp. แบบต่อเนื่อง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน

เวลาที่ปั๊มทำงาน (นาที)	เวลาที่ปั๊มหยุดทำงาน (min)	ปริมาตรของอาหารเข้าระบบ (L/min)	ปริมาตรของอาหารออกระบบ (L/day)	อัตราการเจือจาง (day^{-1})
60	60	0.036	25.92	1.30
60	60	0.022	15.84	0.80
60	60	0.018	12.96	0.65
60	100	0.036	19.44	0.97
60	100	0.022	11.88	0.60
60	100	0.018	9.72	0.48

ตารางที่ ๗-7 ความหนาแน่นเซลล์ อัตราการเจือจาง น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราผลผลิตเซลล์
ไคอะตอมในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่น
แบน

วันที่ทำ การเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ ($\times 10^4$ cell/mL)	อัตราการเจือจาง (day ⁻¹)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g-dry weight/L· day)	อัตราผลผลิตเซลล์ ($\times 10^7$ cell/ L· day)
30/3/10	1.54±0.17	-	-	-
31/3/10	4.72±0.11	-	-	-
01/04/10	8.72±0.15	0.5	0.1770	4.36
02/04/10	9.22±0.39	0.56	0.1408	5.16
03/04/10	14.26±0.81	0.575	0.1738	8.20
04/04/10	14.96±1.32	0.66	0.2000	9.88
05/04/10	14.94±0.88	0.685	0.1523	10.24
06/04/10	14.57±0.99	0.55	0.1440	8.02
07/04/10	15.28±0.89	0.65	0.2480	9.93
08/04/10	15.35±0.89	0.6	0.1668	9.21
09/04/10	16.43±1.59	0.65	0.1495	10.68
10/04/10	15.98±0.49	0.55	0.1930	8.79
11/04/10	16±0.5	0.55	0.2103	8.80
12/04/10	15.87±0.45	0.55	0.1413	8.73
13/04/10	16.72±0.7	0.65	0.2040	10.87
14/04/10	18.11±0.59	0.60	0.2045	10.87
15/04/10	19.87±0.53	0.58	0.2070	11.43
16/04/10	20.61±0.54	0.60	0.2063	12.37

ตารางที่ ๘-8 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกาของไดอะตอม *Entomoneis* sp. ในระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน

วันที่ทำการ เพาะเลี้ยง	ไนเตรท (mg-N/L)	ฟอสเฟต (mg-P/L)	ซิลิกา (mg-Si/L)
30/3/10	18.87±0.1	1.21±0.02	3.12±0.76
31/3/10	15.72±0.02	0.55±0.03	0.29±0.13
01/04/10	11.54±0.04	1.09±0.02	1.46±0.44
02/04/10	4.24±0.04	0.68±0.01	0.5±0.25
03/04/10	5.48±0.04	1.02±0.07	0.2±0.14
04/04/10	4.01±0.09	1±0.02	0.27±0.16
05/04/10	4.5±0.06	0.84±0.03	0.25±0.15
06/04/10	5.25±0	1.14±0.04	0.37±0.18
07/04/10	4.31±0.02	1.07±0.03	0.51±0.22
08/04/10	4.02±0.06	1.11±0.07	0.73±0.31
09/04/10	4.78±0.06	1.24±0.02	0.18±0.09
10/04/10	3.94±0.02	1.08±0.1	0.16±0.09
11/04/10	2.77±0	1.26±0.04	0.27±0.13
12/04/10	3.54±0.02	1.2±0.02	0.2±0.12
13/04/10	3.52±0.02	1.05±0.03	0.25±0.09
14/04/10	3.58±0.02	1.26±0.02	0.21±0.07
15/04/10	3.59±0.04	1.16±0.04	0.17±0.1
16/04/10	3.69±0.02	1.23±0.04	0.18±0.1

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรัชนพร วิริยะยิ่งศิริ เกิดเมื่อวันที่ 19 สิงหาคม 2528 ที่กรุงเทพมหานคร ได้รับการศึกษาระดับประถมศึกษาปีที่ 1 ถึงมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิตสาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี พ.ศ. 2551 หลังจากนั้นได้รับการคัดเลือกเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2551 โดยได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต มาใช้ในการทำงานวิจัยนี้

ผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่

Viriyaingsiri T., Nootong K. and Powtongsook S. Optimal Nutrient Requirement of *Entomoneis* sp. Cultivated under Batch and Fed-Batch Conditions. **Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2010)** Ubon Ratchathani, Thailand, January 21 - 23, 2010 (Oral presentation)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย