



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการวิจัย

ผลของความเค็ม และ ปริมาณไนโตรเจน ต่อการเจริญเติบโต, รูปแบบของกรดไขมัน และ ปริมาณแคโรทีนอยด์ ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม

### แผนการวิจัย

การพัฒนาศักยภาพทางเภสัชวิทยาของสาหร่ายทะเลขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมใน  
จังหวัดชลบุรี

### ที่ปรึกษางานวิจัย

ดร.รวิวรรณ วัฒนติก

### ผู้ร่วมงานวิจัย

ดร.อมรรัตน์ กนกรุ่ง

ณิชา สิรินนท์ธนา

สุพัตรา ตะเหลบ

ดร. คณางค์ รัตนานิคม

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
(เงินอุดหนุนรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๕๕๙๖๖

สัญญาเลขที่ ๒/๒๕๖๒

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

ผลของความเค็ม และ ปริมาณไนโตรเจน ต่อการเจริญเติบโต, รูปแบบของกรดไขมัน และ ปริมาณแคโรทีนอยด์ ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม

### แผนการวิจัย

การพัฒนาศักยภาพทางเภสัชวิทยาของสาหร่ายทะเลขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมใน  
จังหวัดชลบุรี

### ผู้ร่วมงานวิจัย

ดร.อมรรัตน์ กนกรุ่ง

ณิชา สิรินนท์ธนา

สุพัตรา ตะเหลบ

ดร. คณางค์ รัตนานิคม

หน่วยงานได้รับทุนสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนของรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญาการวิจัย 12/2562

## Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 12/2562).

บทคัดย่อ

จากการวิจัยได้ทำการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมเพื่อใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure microalgae) สำหรับการทดลองจำนวน 10 ชนิด คือ *Chaetoceros* sp., *Odontella* sp., *Thalassiosira* sp., *Actinocyclus* sp., *Amphora* sp., *Bellerochea* sp., *Coscinodiscus* sp., *Entomoneis* sp., *Navicula* sp. และ *Cymatosira* sp. เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” จากการศึกษาการเจริญเติบโตของ *Thalassiosira* sp., *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp. ที่เลี้ยงด้วยความเค็มแตกต่างกัน 4 ระดับ 10, 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 4000 ลักซ์ โดยทำการให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และไม่ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน จากการศึกษาพบว่า สาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 3 ชนิดมีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยระดับความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ในการศึกษาปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน พบว่า *Thalassiosira* sp. มีปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมสูงสุดที่ระดับความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน (454.62  $\mu\text{g/g}$  ของน้ำหนักเปียก) สาหร่าย *Chaetoceros* sp. มีปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมสูงสุดที่ระดับความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน (67.72  $\mu\text{g/g}$  ของน้ำหนักเปียก) และ สาหร่าย *Odontella* sp. มีปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมสูงสุดที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน (187.00  $\mu\text{g/g}$  ของน้ำหนักเปียก)

ผลของปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน (0.44, 0.88 (ชุดควบคุม) 1.76 และ 2.64  $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ต่อการเจริญเติบโตสาหร่ายขนาดเล็ก *Thalassiosira* sp., *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp. พบว่าสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด มีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวดัดแปลงสูตร 1 (1.76  $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ในส่วนของ การศึกษา ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในสาหร่าย 3 ชนิด (*Thalassiosira* sp., *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp.) โดยเลี้ยงในระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ (20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน) ด้วยอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” โดยใช้สาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) พบว่าสาหร่าย *Thalassiosira* sp. มีปริมาณกรดไขมันกลุ่ม PUFAs โอเมก้า 3 สูงสุดเมื่อเทียบกับสาหร่ายขนาดเล็กอีก 2 ชนิด *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp.

**คำสำคัญ :** สาหร่ายขนาดเล็ก, ความเค็ม, ไนโตรเจน, กรดไขมัน และแคโรทีนอยด์

The current research, the diatom microalgae were classified into 10 species: *Chaetoceros* sp., *Odontella* sp., *Thalassiosira* sp., *Actinocyclus* sp., *Amphora* sp., *Bellerocha* sp., *Coscinodiscus* sp., *Entomoneis* sp., *Navicula* sp., and *Cymatosira* sp. for using as pure microalgae and the microalgae were cultured with Guillard “f/2” medium. From the study of the growth of *Chaetoceros* sp., *Thalassiosira* sp., and *Odontella* sp. which were cultured at 4 different salinity levels including 10, 20, 30, and 40 ppt in Guillard “f/2” medium, temperature 25°C, and light supply intensity 4000 lux with 12:12 hour light/dark cycle, cultured for 6 days. The results showed that all 3 species of microalgae had the best growth when cultured at salinity level 30 ppt. In the study of the total carotenoid content of all 3 species of microalgae cultured at 3 different salinity levels including 20, 30, and 40 ppt founded that *Thalassiosira* sp. had the highest total carotenoid content at salinity level 20 ppt (454.62 µg/g of wet basis), *Chaetoceros* sp. had the highest total carotenoid content at salinity level 20 ppt (67.72 µg/g of wet basis), and *Odontella* sp. had the highest total carotenoid content at salinity level 30 ppt (187.00 µg/g of wet basis).

Effect of nitrogen (0.44, 0.88 (controlled), 1.76, and 2.64 mM-L<sup>1</sup>) on the growth of microalgae i.e. *Thalassiosira* sp., *Chaetoceros* sp., and *Odontella* sp. founded that all 3 species showed the highest growth rate when were cultured in the medium of formula 1 (1.76 mM-L<sup>1</sup>). In the study of types and amount of fatty acids in 3 species of microalgae (*Thalassiosira* sp., *Chaetoceros* sp., and *Odontella* sp.) at 3 different level of salinity (20, 30, and 40 ppt) with Guillard “f/2” medium and using stationary growth phase microalge, the findings indicated that *Thalassiosira* sp. had the highest amount of PUFAs omega-3 fatty acid comparing with *Chaetoceros* sp. and *Odontella* sp.

**Keywords:** microalgae, salinity, nitrogen, fatty acid, and carotenoid

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ขอบเขตในการศึกษา	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
สถานที่ทำการวิจัย	3
บทที่ 2 เนื้อเรื่อง	4
วิธีดำเนินการวิจัย	4
ผลการศึกษา	9
บทที่ 3 อภิปรายผลการทดลอง	29
สรุปและข้อเสนอแนะ	35
ผลผลิต (Output)	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	38
ประวัตินักวิจัยและคณะวิจัย	43

## สารบัญญัตราสาร

ตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	อาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ	5
ตารางที่ 2	แสดงขนาดความกว้างและความยาวของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม จำนวน 10 ชนิด ที่ได้จากการคัดแยกเป็นเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์	9
ตารางที่ 3	แสดงชนิดและปริมาณกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Thalassiosira</i> sp. ที่เลี้ยงในระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ด้วยอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ของระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase)	24
ตารางที่ 4	แสดงชนิดและปริมาณกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chaetoceros</i> sp. ที่เลี้ยงในระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ด้วยอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ของระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase)	25
ตารางที่ 5	แสดงชนิดและปริมาณกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chaetoceros</i> sp. ที่เลี้ยงในระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ด้วยอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ของระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase)	26

## สารบัญรูปภาพ

รูปภาพ	หน้า
รูปภาพที่ 1 สาหร่าย <i>Chaetoceros</i> sp.	10



รูปภาพที่ 2	สาหร่าย <i>Thalassiosira</i> sp.	10
รูปภาพที่ 3	สาหร่าย <i>Odontella</i> sp.	11
รูปภาพที่ 4	สาหร่าย <i>Coscinodiscus</i> sp.	11
รูปภาพที่ 5	สาหร่าย <i>Cymatosira</i> sp.	12
รูปภาพที่ 6	สาหร่าย <i>Navicula</i> sp.	12
รูปภาพที่ 7	สาหร่าย <i>Entomoneis</i> sp.	13
รูปภาพที่ 8	สาหร่าย <i>Actinocyclus</i> sp.	13
รูปภาพที่ 9	สาหร่าย <i>Amphora</i> sp.	14
รูปภาพที่ 10	สาหร่าย <i>Bellerochea</i> sp.	14
รูปภาพที่ 11	แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Thalassiosira</i> sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่ระดับความเค็มแตกต่างกัน	16
รูปภาพที่ 12	แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chaetoceros</i> sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่ระดับความเค็มแตกต่างกัน	16
รูปภาพที่ 13	แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Odontella</i> sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่ระดับความเค็มแตกต่างกัน	17
รูปภาพที่ 14	แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Thalassiosira</i> sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีปริมาณของไนโตรเจนแตกต่างกัน	19
รูปภาพที่ 15	แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chaetoceros</i> sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีปริมาณของไนโตรเจนแตกต่างกัน	19
รูปภาพที่ 16	แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Odontella</i> sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีปริมาณของไนโตรเจนแตกต่างกัน	20
รูปภาพที่ 17	แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Thalassiosira</i> sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ	21
รูปภาพที่ 18	แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chaetoceros</i> sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ	21
รูปภาพที่ 19	แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Odontella</i> sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ	22

# บทที่ 1

## บทนำ

ไดอะตอมเป็นสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ลอยอยู่ตามกระแสน้ำ มีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งต่อระบบนิเวศของแหล่งน้ำ เนื่องจากเป็นผู้ผลิตเบื้องต้น (primary producer) โดยใช้พลังงานจากแสงแดดหรือพลังงานจากแหล่งอื่นเพื่อผลิตและสะสมอาหารในรูปของไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และ แคโรทีนอยด์ ไดอะตอมมีการแพร่กระจายหลากหลายรูปแบบทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมของในแต่ละบริเวณว่ามีการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติน้ำ เช่น ระดับ pH ระดับความเค็ม ความขุ่นของน้ำ เนื่องจากมีตะกอนแขวนอยู่ในน้ำจึงทำให้ส่งผลถึงการส่องแสงถึงของแสงสว่างจากดวงอาทิตย์ ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมานั้นนับว่าเป็นสิ่งสำคัญต่อกระบวนการการเจริญเติบโตการแพร่กระจายของสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้ ปัจจัยที่สำคัญอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กและสาหร่ายขนาดเล็กจะขาดสิ่งสำคัญสิ่งนี้ไม่ได้ นั่นคือ ธาตุอาหาร ซึ่งประกอบไปด้วยชนิดของธาตุอาหาร โดยเฉพาะธาตุอาหารไนโตรเจนซึ่งปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนมีความสำคัญรองมาจากคาร์บอนในแง่ของปริมาณ ปริมาณไนโตรเจนของพืชมีปริมาณร้อยละ 7-10 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ ยกเว้นไดอะตอม ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่น เนื่องจากเป็นธาตุอาหารที่สำคัญของเซลล์ไดอะตอม ในสาหร่ายที่ขาดธาตุอาหารไนโตรเจนจะสร้างสารประกอบคาร์บอน เช่น น้ำมัน หรือแป้ง มาทดแทน สาหร่ายขนาดเล็กสาหร่ายที่จะใช้ไนโตรเจนทั้งในรูปของอินทรีย์สาร และ อินทรีย์สาร แต่มีสาหร่ายขนาดเล็กบางชนิดหรือบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของแก๊สได้ เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถดึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ได้แก่ เกลือ 3 ชนิด คือ ไนเตรต ไนไตรท์ และ แอมโมเนีย ถ้าแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียเพียงอย่างเดียวจะทำให้ระดับของ pH ในอาหารลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งจะเป็นผลเสียต่อสาหร่ายไนโตรเจนเป็นสารละลายอินทรีย์ซึ่งพืชหลายชนิดต้องการในปริมาณไม่เกิน 1 มิลลิโมลล์ ถ้ามากกว่านี้จะทำให้เกิดอันตราย ส่วนประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่พืชนำมาใช้ประโยชน์ได้แก่ ยูเรีย เอไมด์ (amide) กลูตามีน (glutamine) และ แอสพาราจีน (asparagine) ซึ่งได้ว่าเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ดี ส่วนสารอินทรีย์ไนโตรเจนอื่น ได้แก่ กรด (โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไกลซีน เซรีนอะลามีน) กรดกลูตามิก และกรดแอสพาร์ติก นั้นสาหร่ายใช้เพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กด้วย ส่วนในกรณีที่มีการขาดธาตุอาหารไนโตรเจนนั้นจะส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและปริมาณของรงควัตถุ หรือสารสี (pigment) ของเซลล์สาหร่าย รวมถึงในส่วนของกระบวนการที่มีการสร้างเอนไซม์บางชนิดลดลงด้วย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2543)

สิ่งเหล่านี้ นับว่าเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญและจำเป็นต่อกระบวนการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตและการสร้างสารอาหารเก็บไว้ภายในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก แต่อย่างไรก็ตามสิ่งที่มีผลต่อการสะสมสารอาหารโดยเฉพาะกรดไขมันที่จำเป็น และแคโรทีนอยด์ เป็นองค์ประกอบคุณค่าทางอาหารภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กอีกอย่างหนึ่งคือ ระบบภายในเซลล์หรือกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก แต่ละชนิดที่มีความแตกต่างกันออกไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กด้วย สิ่งดังกล่าวนี้จะส่งผลโดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงหรือสะสมองค์ประกอบทางด้านเคมีของไดอะตอม ซึ่งเป็นสารทางด้านชีวโมเลกุลในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม ที่มีความสำคัญต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตหลายชนิด อาหารเสริมเป็นอีกหนึ่ง

สิ่งที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก สารอาหารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ซึ่งเป็นสารกลุ่มลิพอฟิลิก (lipophilic) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแคโรทีนมีรงควัตถุสีส้มแดง และกลุ่มแซนโทฟิลล์ที่มีรงควัตถุสีส้มเหลือง สารแคโรทีนอยด์สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นพืชและสัตว์ แคโรทีนอยด์ที่พบในพืช เช่น ผัก ผลไม้ ดอกไม้ ส่วนแคโรทีนอยด์ที่พบในสัตว์โดยพบในสัตว์หลายชนิด เช่น ปลาแซลมอน และปลาแซลมอน เป็นต้น แคโรทีนอยด์ที่พบในสัตว์นั้นเป็นแคโรทีนอยด์ที่ถูกสร้างโดยผ่านกระบวนการเมตาโบลิซึม (metabolism) ภายในตัวของสัตว์ ซึ่งสัตว์ไม่สามารถสร้างแคโรทีนอยด์ได้ด้วยตัวเองจึงอาศัยจากการกินอาหารเข้าไปเท่านั้น

ในปัจจุบันนี้สาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้จึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีประโยชน์หลายประการ เช่น สาหร่ายขนาดเล็กบางชนิดสามารถผลิตไขมันได้สูงทำให้เรานำไปใช้ประโยชน์กันในการผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ และที่สำคัญในเรื่องของคุณค่าทางอาหารนั้นคือ กรดไขมัน ซึ่งกรดไขมันเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมากและเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของไขมันหลายชนิด กรดไขมันจัดเป็น carboxylic acid ที่มีหมู่ -COOH เพียงหมู่เดียวที่ต่อสายกับไฮโดรคาร์บอนสายยาวเป็นเส้นตรง กรดไขมันที่พบในธรรมชาติมักมีจำนวนคาร์บอนเป็นจำนวนคู่ ส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่ละลายในไขมัน กรดไขมันในพืชและสัตว์ทั่วไปมีคาร์บอนระหว่าง 14-18 อะตอม (วีระพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535) สารอาหารที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในมนุษย์นั้นเป็นสารอาหารสำคัญต่อมนุษย์เช่นกับสารอาหารชนิดอื่นที่กล่าวมาแล้ว นั่นคือแคโรทีนอยด์มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตและยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสัตว์น้ำหลายชนิด แคโรทีนอยด์มีหลายชนิดซึ่งในแต่ละชนิดมีความสำคัญและบทบาทที่แตกต่างกันไป สัตว์น้ำเหล่านี้ไม่สามารถสร้างมาจากภายในร่างกายของตัวเองได้ แต่จะได้รับจากการกินอาหารเข้าไปเท่านั้น ซึ่งอาหารของสัตว์น้ำพวกนี้เช่น แพลงก์ตอนสัตว์ แคโรทีนอยด์จะถูกนำมาเข้าสู่สัตว์น้ำโดยการกินแพลงก์ตอนสัตว์ และแพลงก์ตอนสัตว์ก็จะได้รับแคโรทีนอยด์จากการกินสาหร่ายขนาดเล็กและซึ่งสาหร่ายขนาดเล็กจะเป็นตัวตั้งต้น (precursor) ของแคโรทีนอยด์ และเมื่อสัตว์ได้รับเข้าไปในร่างกายแล้วจะเกิดการสะสมของแคโรทีนอยด์ในรูปแบบที่แตกต่างกัน (Anderson et al., 2003) จากโครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์นั้นทำให้สามารถจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม Hydrogenated Carotenoid Derivatives หรือ กลุ่มแคโรทีน (Carotene) และ กลุ่ม Oxygenated Carotenoid Derivatives หรือ กลุ่มแซนโทฟิล (Xanthophyll) พบว่าแคโรทีนอยด์ทั้ง 2 กลุ่มนี้มีความแตกต่างกันในโครงสร้างหลัก คือ โมเลกุลของแคโรทีนอยด์ในกลุ่มแคโรทีนจะมีลักษณะเป็นสายยาวของไฮโดรคาร์บอน ทำให้มีสมบัติไม่มีขั้วและละลายได้ดีในไขมัน ซึ่งสารที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน (Beta-carotene) และ ลycopene) ในทางกลับกัน จะสามารถพบอะตอมของออกซิเจนในโครงสร้างของสารแคโรทีนอยด์กลุ่มแซนโทฟิลได้ ทำให้สารในกลุ่มนี้มีขั้วน้อยกว่าสารกลุ่มแรก จึงสามารถละลายในไขมันได้น้อยกว่าสารกลุ่มแรกเช่นกัน ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ที่สำคัญ ได้แก่ ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) แอสตาแซนทิน (astaxanthin) (Simpson, et al., 1989)

สาหร่ายขนาดเล็กบางชนิดสามารถสร้างสารแคโรทีนอยด์ที่สำคัญคือ เบต้าแคโรทีน (Beta carotene) ลูทีน (lutene) ซีแซนทิน (Zeaxanthin) คริปโตแซนทิน (Cryptoxanthin) และ ฟิวโคแซนทิน

(Fucoxanthin) สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมเป็นกลุ่มของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีจำนวนชนิดมากกว่าสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มอื่น และมีข้อดีที่สำคัญคือสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มนี้สามารถนำมาเลี้ยงและทำการขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางค์ รวมถึงอุตสาหกรรมผลิตยา (Kuczynska, 2015) เนื่องจากคุณประโยชน์ที่มีมากมายของสาหร่ายขนาดเล็กไดอะตอมเหล่านี้จึงนำสู่ความสนใจที่จะทำการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างสูงสุดในการใช้ประโยชน์กับทรัพยากรภายในประเทศ โดยมุ่งเน้นที่จะทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม ต่อการสร้างสารประกอบทางชีวเคมี เช่น กรดไขมัน โดยเฉพาะกลุ่มของ PUFA และ แคโรทีนอยด์ เช่น Astaxanthin, Beta carotene, Zeaxanthin, Cryptoxanthin และ Fucoxanthin

### วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความเหมาะสมของระดับความเค็ม ต่อการเจริญเติบโต, ชนิด ปริมาณของกรดไขมัน และ ชนิด ปริมาณของแคโรทีนอยด์ ของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม
2. ศึกษาความเหมาะสมของปริมาณไนโตรเจน ต่อการเจริญเติบโต, ชนิด ปริมาณของกรดไขมัน และ ชนิด ปริมาณของแคโรทีนอยด์ ของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม

### ขอบเขตในการศึกษา

ศึกษาหาความเหมาะสมของระดับความเค็ม และ ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ต่อการเจริญเติบโต, ชนิด ปริมาณของกรดไขมัน และ แคโรทีนอยด์ ของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม ที่อยู่ในบริเวณจังหวัดชลบุรี

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบถึงสภาวะความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การสร้างกรดไขมัน และสภาวะในการสร้างสะสมแคโรทีนอยด์รวม ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม จำนวน 3 คือ *Thalassiosira* sp., *Odontella* sp. และ *Chaetoceros* sp. ซึ่งเป็นชนิดของสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดแยกในธรรมชาติที่บริเวณจังหวัดชลบุรี

### สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอนพืช งานวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์และพืชทะเล ฝายวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา 169 ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

## บทที่ 2

### เนื้อเรื่อง

#### วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาโดยเริ่มตั้งแต่การคัดเลือกเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมจากธรรมชาติ บริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี ทำการคัดแยกเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีการคัดแยกเซลล์สาหร่ายให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการล้างเซลล์ (Isolation of microalgae) จากนั้นจึงนำมาทำการศึกษาวิจัยตามลำดับ

**การทดลองที่ 1** การคัดเลือกเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการล้างเซลล์ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542 และ Tomas,1997)

ทำการเก็บรวบรวมสาหร่ายขนาดเล็กด้วยถุงลากลากแพลงก์ตอนขนาดตาถี่ 20 ไมโครเมตร โดยทำการลากในแนวตั้ง และแนวนอน เพื่อให้ได้ความหลากหลายของชนิดสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม หลังจากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างที่ได้ใส่ในขวดเก็บตัวอย่างขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำขวดตัวอย่างที่ทำการเก็บเรียบร้อยแล้วใส่ไว้ในถังเก็บความเย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 20 - 25 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถึงห้องปฏิบัติการที่จะทำการคัดแยกเชื้อสาหร่ายให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการล้างเซลล์ ใส่ในหลอดทดลองที่มีการเตรียมอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่ระดับความเค็ม 2 ระดับ คือ 25 และ 30 ppt. ทำการคัดเลือกให้ได้จำนวน 1 เซลล์ ต่อ 1 หลอดอาหารที่เตรียมไว้ โดยทำการคัดแยกตามวิธีนี้ชนิดละ 10 หลอดทดลอง ต่อระดับน้ำที่มีความเค็ม 2 ระดับ คือ 25 และ 30 ppt. หลังจากนั้นจึงนำเอาหลอดอาหารที่มีเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่ทำการคัดแยกเชื้อสาหร่ายให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการล้างเซลล์ วางไว้บนชั้นเพาะเลี้ยงสาหร่ายในห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3500 - 4000 ลักซ์ โดยทำการให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และ ไม่ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง

หลังจากนั้นประมาณ 15 - 20 วัน ทำการตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กถ้าสังเกตด้วยตาเปล่าจะพบว่าน้ำตาลเกิดขึ้นที่บริเวณก้นหลอดทดลอง ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และความสะอาดของเซลล์สาหร่ายไดอะตอมด้วยใช้ฟาสเจอปปิเปตดูดขึ้นมาจากหลอดทดลอง หลังจากนั้นจึงหยดบนสไลด์และทำการปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ นำไปทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูง เมื่อพบว่าเซลล์สาหร่ายไม่มีชนิดอื่นปนเปื้อนจึงนำมาทำการขยายไว้ในระดับหลอดทดลอง เลี้ยงไว้บนชั้นเพาะเลี้ยงสาหร่ายประมาณ 7- 15 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมนี้ และทำการเปลี่ยนอาหารเพื่อเป็นการรักษาสภาพเซลล์สาหร่ายให้มีความสมบูรณ์ของเซลล์จนกว่าจะนำมาทำการศึกษาในลำดับถัดไป

**การทดลองที่ 2** การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระดับความเค็มต่อการเจริญเติบโต ของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

นำน้ำทะเลผ่านการกรองด้วยถุงกรองขนาดตาถี่ 50 ไมครอน มาปรับความเค็มให้ได้ในระดับความเค็มที่แตกต่างกัน 4 ระดับความเค็ม คือ 10, 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ระดับความเป็นกรด - เบส เริ่มต้นที่ 7.8 ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงสาหร่าย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนำมาทำการทดลอง ซึ่งในการทำการศึกษาของแต่ละระดับความเค็มมีจำนวนซ้ำทดลองในการศึกษาจำนวน

3 ชั่วโมง ทำการใส่อาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ตามปริมาตรอย่างละ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปวางไว้บนชั้นที่มีไฟโดยใช้ความเข้มแสงที่ 4000 ลักซ์ ทำการให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และไม่ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการเป่าลมตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา เลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมแต่ละชนิดจนถึงระยะตาย (dead phase) ในระหว่างที่ทำการศึกษามีการเก็บตัวอย่างสาหร่ายทุก 24 ชั่วโมง ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา จากนั้นมีการเก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กในแต่ละวัน

**การทดลองที่ 3** การศึกษาผลของปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต การสะสมปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

นำน้ำทะเลผ่านการกรองด้วยถุงกรองขนาดตาถี่ 50 ไมครอน มาปรับความเค็มให้ได้ในระดับความเค็มที่ได้ผลจากการศึกษาของการทดลองที่ 2 ทำการปรับระดับความเป็นกรด - เบส เริ่มต้นที่ 7.8 ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงสาหร่าย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนำมาทำการทดลอง ซึ่งในการทำการศึกษาของแต่ละระดับความเค็มมีจำนวนชั่วโมงทดลองในการศึกษาจำนวน 3 ชั่วโมง ทำการใส่อาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ (ตารางที่ 2.1 ) ตามปริมาตรอย่างละ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปวางไว้บนชั้นที่มีแสงสว่างโดยใช้ความเข้มแสงที่ 4000 ลักซ์ ทำการให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และไม่ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการเป่าลมตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา เลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมแต่ละชนิดจนถึงระยะตาย (dead phase) ในระหว่างที่ทำการศึกษามีการเก็บตัวอย่างสาหร่ายทุก 24 ชั่วโมง ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา จากนั้นมีการเก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กในแต่ละวัน

**ตารางที่ 1** อาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ

สูตรอาหาร	NaNO <sub>3</sub> (mM N-L <sup>-1</sup> )
ชุดควบคุม	0.88
อาหารเหลวสูตรที่ 1	1.76
อาหารเหลวสูตรที่ 2	2.64
อาหารเหลวสูตรที่ 3	0.44

**การทดลองที่ 4** การศึกษาปริมาณการสะสมของแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่ายขนาดเล็กไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยความเค็มต่างกัน (Britton et al, 1995 และ Carvalho et al, 2012)

ทำการชั่งตัวอย่างประมาณ 3 - 5 กรัม แล้วจึงทำการสกัดตัวอย่างโดยใส่สาร acetone ในปริมาณ 10 - 15 มิลลิลิตร ทำการคนให้ตัวอย่างของสาหร่ายและสารละลายให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงนำตัวอย่างไปใส่เครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบ 20 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงทำการดูดสารละลายส่วนบนที่มีสีใสในขวดที่บดแสง และทำการเติมสาร acetone ใส่ในหลอดทดลองนำไปทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำทำเช่นนี้จนกว่าจะพบว่า

สารละลายด้านบนของหลอดทดลองไม่มีสี จากนั้นจึงทำการแยกน้ำออกจากตัวอย่างที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยสารโซเดียมซัลเฟต (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) แล้วจึงนำตัวอย่างที่ได้มาทำการวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV – Visible Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 450 และ 750 นาโนเมตร (nm) แล้วจึงทำการบันทึกค่าที่ได้จากการวัดนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่ายขนาดเล็กที่เลี้ยงด้วยความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ ด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Carotenoids content } (\mu\text{g/g}) = \frac{A \times V \text{ (ml)} \times 10^4}{A^{1\%} \times P \text{ (g)} \times 1 \text{ cm}}$$

เมื่อ A คือ ค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่น 450 nm

B คือ ปริมาตรรวมของตัวอย่าง

C คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด

A<sup>1%</sup> มีค่าเท่ากับ 2592

1 cm

**การทดลองที่ 5** การศึกษา ชนิด และปริมาณ ของกรดไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็กโตอะตอมที่เลี้ยงด้วยความเค็มต่างกัน (Folch et al., 1975; Christie, 2003)

นำตัวอย่างนำตัวอย่างออกจากตู้แช่เย็น - 40 องศาเซลเซียส ส rotary evaporator สาหร่ายขนาดเล็กไปชั่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง โดยใช้ตัวอย่างประมาณ 0.5 - 1 กรัม น้ำหนักเปียก ทำการจดบันทึกปริมาณการชั่งของตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มโตอะตอมที่เลี้ยงด้วยสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน ในระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ทำการเติมสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ผสมสารบิเอชที 0.01% นำไปผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วย Ultrasonic เป็นเวลา 10 นาที ทำการการสกัดซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้มารวมกันในกรวยแยกสาร เติมสารละลาย 0.88% โพแทสเซียมคลอไรด์ กรองสารละลายชั้นล่างผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำสารสกัดไขมันที่ผ่านการแยกน้ำด้วยสารโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator ก่อนที่จะทำขั้นตอนถัดไปคือการทำ transesterification ต่อไป

#### การทำ transesterification

นำตัวอย่างไขมันที่ได้มาทำ transesterification ด้วยการเติม 10 มิลลิลิตร 1% กรดซัลฟูริกในเมทานอล นำไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำตัวอย่างออกจากตู้อบวางไว้ให้เย็นแล้วจึงทำการเติม 5% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เฮกเซนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยกสาร ทำการสกัดเก็บสารละลายของตัวอย่างที่อยู่ในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน สกัดซ้ำ 2 ครั้ง เก็บรวบรวมส่วนของชั้นเฮกเซนไว้ นำไปทำการระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง rotary evaporator และเป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน นำตัวอย่างที่แห้งมาทำละลายด้วยตัวทำละลายเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ได้ไปทำการตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดไขมันด้วยเครื่อง GC

## การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

นำกรดไขมันที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดไขมันด้วยเครื่อง GC – FID Agilent Technologies 7820A GC system ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้สารมาตรฐานของ Supelco 37 component FAME Mix, USA คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกคือ HP-INNOWAX อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม (แก๊สพา) 1.1 มิลลิลิตรต่อนาที ณ อุณหภูมิที่ฉีดสารเท่ากับ 240 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เทอร์โมคอปเตอร์คือ 260 องศาเซลเซียส ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิวิเคราะห์เริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงทำการเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 190 องศาเซลเซียส และที่ 121 องศาเซลเซียส รวมระยะเวลาในการวิเคราะห์ 54 นาที

**การทดลองที่ 6** การศึกษาปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ และ ซี ของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยความเค็มต่างระดับ (Stickland and Parsons, 1975)

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม 3 ชนิด คือ *Thalassiosira* sp., *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp. ด้วยระดับความเค็ม 3 ระดับ คือ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ซึ่งที่ระดับความเค็ม 10 ส่วนในพันส่วนนั้นสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 3 ชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นำน้ำทะเลผ่านการกรองด้วยถุงกรองขนาดตาถี่ 50 ไมครอน มาปรับความเค็มให้ได้ในระดับความเค็มที่ได้ผลจากการศึกษาของการทดลองที่ 2 ทำการปรับระดับความเป็นกรด – เบส เริ่มต้นที่ 7.8 ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงสาหร่าย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนำมาทำการทดลอง ซึ่งในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้ใช้อาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” โดยทำการใส่อาหารเหลวตามอัตราส่วนคือ สารละลายส่วนละ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำทะเล 1000 มิลลิลิตร ในการศึกษาหาปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ และ ซี นั้น จะทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่ทำการศึกษาโดยเริ่มศึกษาปริมาณของคลอโรฟิลล์ตั้งแต่สาหร่ายอายุ 0 วัน จนถึงระยะการเจริญเติบโตที่เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ทุกวันจนสิ้นการทดลอง นำเอาตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กทำการตรวจวัดปริมาตรและทำการจดบันทึกหลังจากนั้นจึงทำการกรองสาหร่ายโดยใช้กระดาษ GF/C เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องปั๊มที่มีชุดกรองแบบสุญญากาศ ใส่สารละลาย magnesium carbonate ในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อน้ำตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปเก็บในถุงที่อลูมิเนียมฟอล์ยที่ทึบแสงที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะทำการสกัด เมื่อมีตัวอย่างครบแล้วจึงทำการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีการบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยโกรนบดตัวอย่างปรับปริมาตรด้วย 90% acetone ให้ได้ที่ 10 มิลลิลิตร ด้วยหลอดตัวอย่างที่มีขนาดบรรจุ 12 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงทำการปิดด้วยฝาดำหรือห่อหุ้มตัวอย่างด้วยอลูมิเนียมฟอล์ย ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อครบ 20 ชั่วโมงแล้วจึงนำเอาตัวอย่างไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงทำการเก็บสารละลายที่มีสีด้านบน ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างแบบทึบแสงเพื่อรอการตรวจวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 630, 645, 665 และ 750 nm ทำการ



บันทึกค่าที่ได้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และ ซี ของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมโดยใช้สมการของ Stickland and Parsons (1975) ซึ่งมีสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Chlorophyll } a \text{ (mg/m}^3\text{)} = \frac{[11.6(E665) - 1.31(E645) - 0.14(E630)]}{\text{Volume of sample (L)}}$$

$$\text{Chlorophyll } c \text{ (mg/m}^3\text{)} = \frac{[55(E630) - 4.64(E665) - 16.3(E645)]}{\text{Volume of sample (L)}}$$

### การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและกรดไขมัน

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม 3 ชนิด คือ *Thalassiosira* sp., *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp. ด้วยระดับความเค็ม 3 ระดับ คือ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ซึ่งที่ระดับความเค็ม 10 ส่วนในพันส่วนนั้นสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 3 ชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นำน้ำทะเลผ่านการกรองด้วยถุงกรองขนาดตาถี่ 50 ไมครอน มาปรับความเค็มให้ได้ในระดับความเค็มที่ได้ผลจากการศึกษาของการทดลองที่ 2 ทำการปรับระดับความเป็นกรด - เบส เริ่มต้นที่ 7.8 ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงสาหร่าย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนำมาทำการทดลอง ซึ่งในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้ใช้อาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” โดยทำการใส่อาหารเหลวตามอัตราส่วนคือ สารละลายส่วนละ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำทะเล 1000 มิลลิลิตร ในส่วนนี้ที่ต้องเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์หาสารอาหารทั้ง กรดไขมัน และแคโรทีนอยด์รวม นั้นจะทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด ที่ระยะการเจริญเติบโตระยะแรกของการเจริญเติบโตคงที่ (Early stationary phase) จากนั้นจึงนำไปวางไว้บนชั้นที่มีไฟโดยใช้ความเข้มแสงที่ 4000 ลักซ์ ทำการให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และไม่ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการเป่าลมตลอดระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามที่กำหนดแล้วจึงทำการเก็บเซลล์สาหร่ายด้วยถุงกรองที่มีขนาดตาถี่ 20 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำเอาเซลล์สาหร่ายที่ได้จากการกรองด้วยถุงกรองไปล้างด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้เกลือที่เกาะติดมากับเซลล์สาหร่ายหลุดออกไปทำเช่นนี้ประมาณ 2-3 ครั้ง หลังจากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายที่ได้ใส่ในถุงเก็บตัวอย่างแช่ในตู้ที่มีการควบคุมอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์หาสารอาหารในลำดับถัดไป

### ขั้นตอนและวิธีการในการวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละชุดทดลองของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ One-Way ANOVA ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูล IBMS SPSS statistic version 20 และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลทางสถิติโดยวิธี Duncan’s New Multiple test (วิภูษิต, 2548)

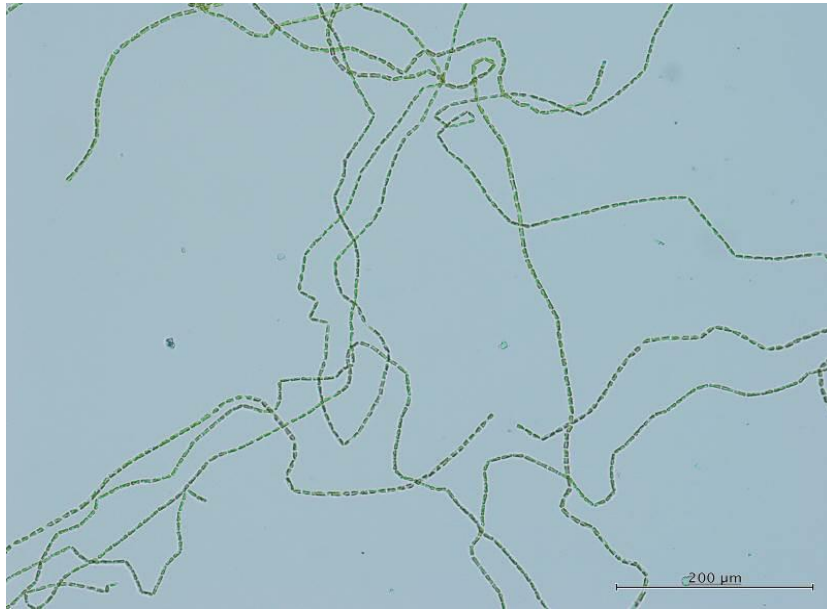
## ผลการศึกษา

**ผลการศึกษาของชุดการทดลองที่ 1** การคัดเลือกเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมให้บริสุทธิ์ด้วย วิธีการล้างเซลล์ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542 และ Tomas,1997)

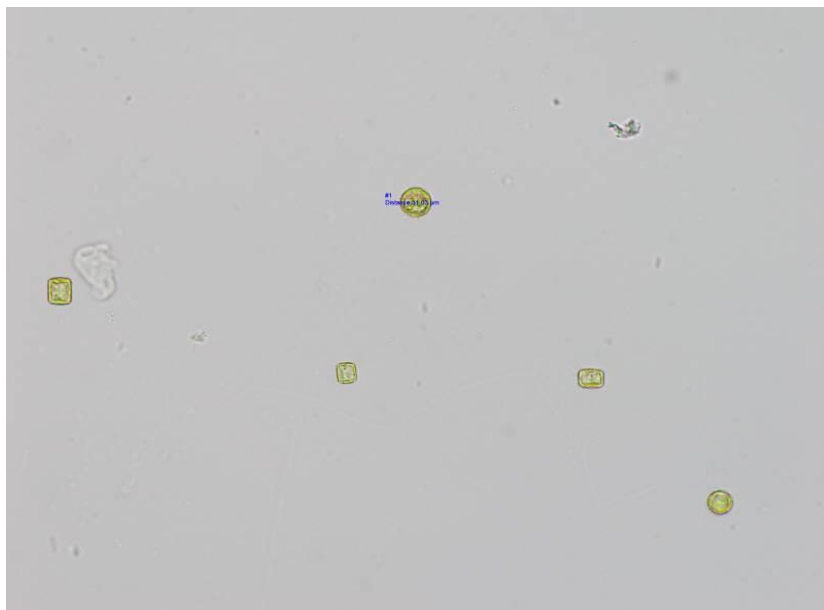
ทำการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมจากน้ำทะเลธรรมชาติที่บริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี ได้เชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์จำนวน 10 ชนิด คือ *Chaetoceros* sp., *Odontella* sp., *Thalassiosira* sp., *Actinocyclus* sp., *Amphora* sp., *Bellerochea* sp., *Coscinodiscus* sp., *Entomoneis* sp., *Navicula* sp. และ *Cymatosira* sp. สาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 10 ชนิด ที่คัดแยกจากธรรมชาติให้เป็นเชื้อสาหร่ายแบบบริสุทธิ์มีลักษณะของเซลล์ที่แตกต่างกันทั้งในด้านของขนาดความกว้าง และความยาวของเซลล์สาหร่าย สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมที่พบโดยส่วนใหญ่จะพบอยู่ตามบริเวณชายฝั่งทะเลที่มีระดับความเค็มของน้ำทะเลอยู่ในช่วงที่กว้างคือ 23 ถึง 34 ส่วนในพันส่วน ซึ่งขึ้นอยู่กับฤดูกาลของพื้นที่ลักษณะของเซลล์สาหร่ายไดอะตอมเหล่านี้มีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่มีความแตกต่างกันทั้งในส่วนของลวดลายบนเซลล์สาหร่ายและความแตกเปราะง่ายของเซลล์สาหร่าย

**ตารางที่ 2** แสดงขนาดความกว้างและความยาวของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมจำนวน 10 ชนิด ที่ได้จากการคัดแยกเป็นเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์

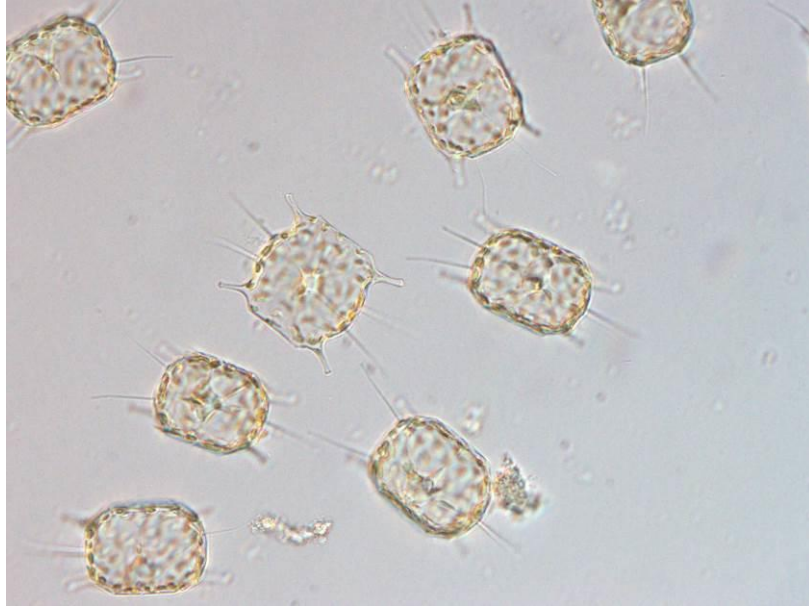
ชนิดของสาหร่าย	ความกว้างของเซลล์ ( $\mu\text{m}$ )	ความยาวของเซลล์ ( $\mu\text{m}$ )
<i>Chaetoceros</i> sp.	5.26	10.18
<i>Odontella</i> sp.	38.50	42.88
<i>Thalassiosira</i> sp.	31.03	20.72
<i>Actinocyclus</i> sp.	80	70
<i>Amphora</i> sp.	14.65	31.80
<i>Bellerochea</i> sp.	25.08	12.5
<i>Coscinodiscus</i> sp.	50.21	42.03
<i>Entomoneis</i> sp.	23.12	56.93
<i>Navicula</i> sp.	3.40	14.01
<i>Cymatosira</i> sp.	16.12	60.28



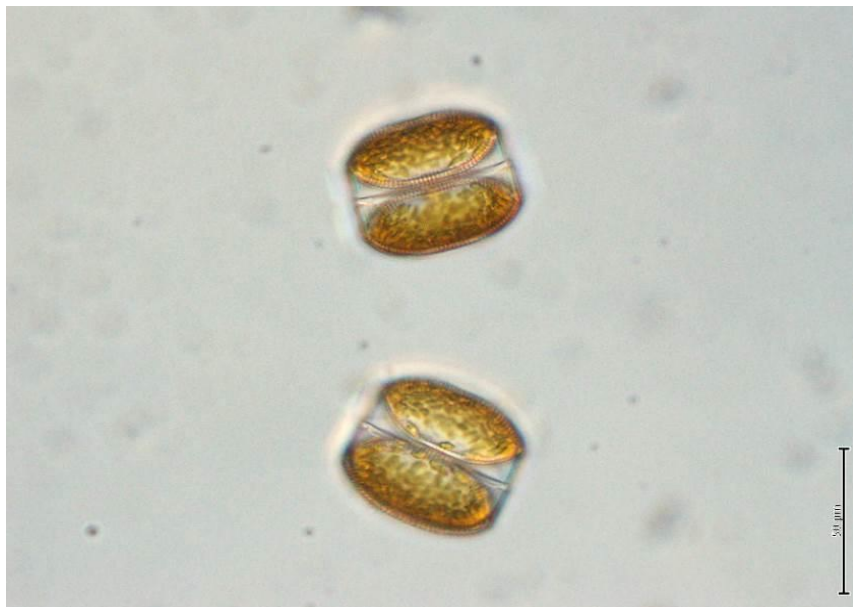
รูปภาพที่ 1 สำหรับ *Chaetoceros* sp.



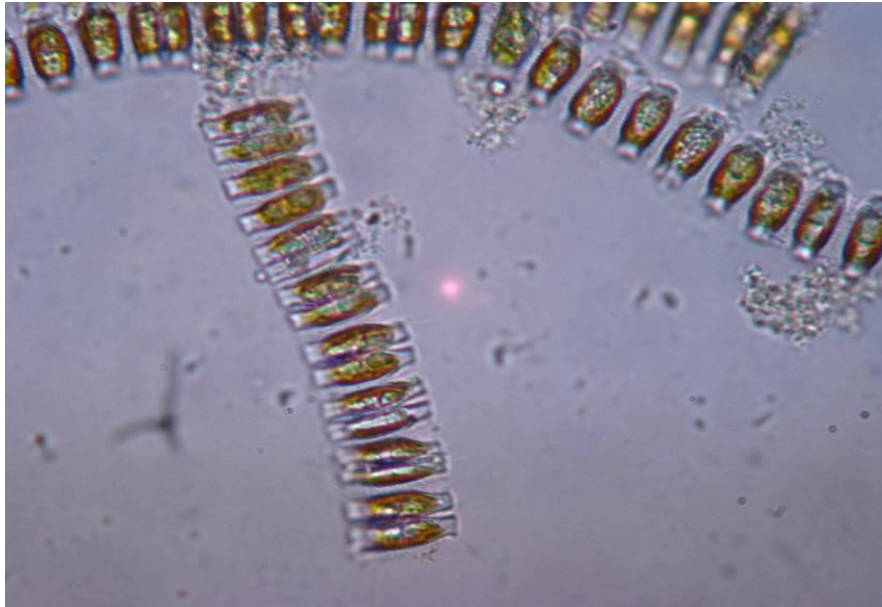
รูปภาพที่ 2 สำหรับ *Thalassiosira* sp.



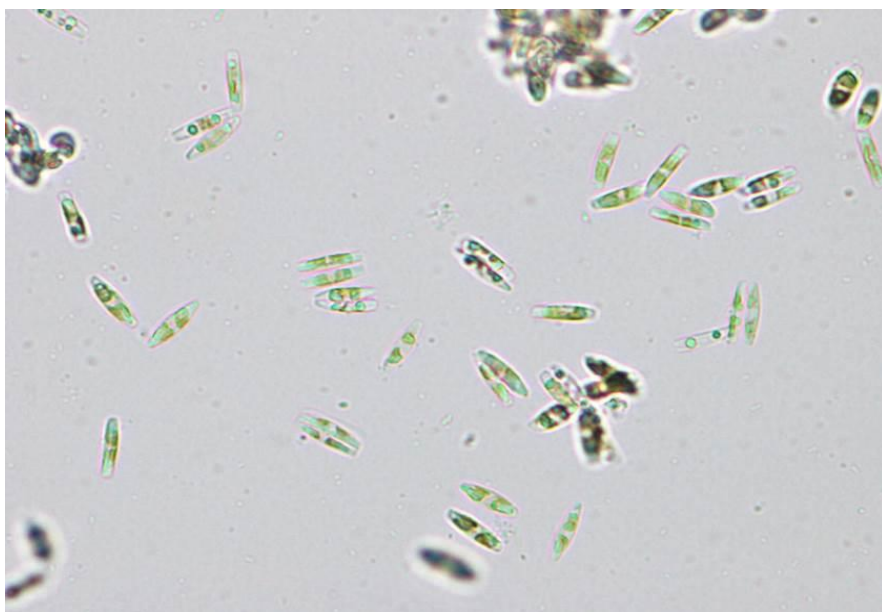
รูปภาพที่ 3 สำหรับ *Odontella* sp.



รูปภาพที่ 4 สำหรับ *Coscinodiscus* sp.



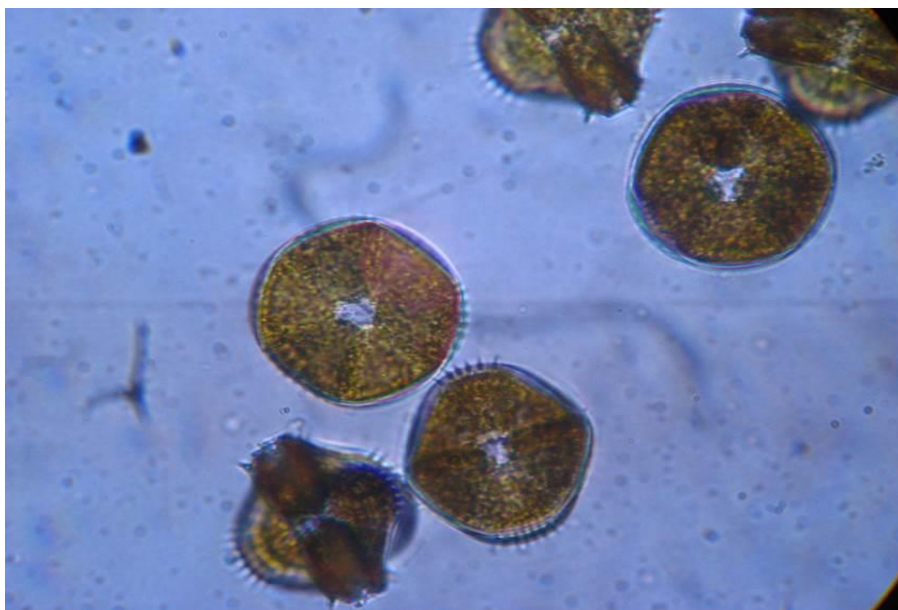
รูปภาพที่ 5 สำหรับ *Cymatosira* sp.



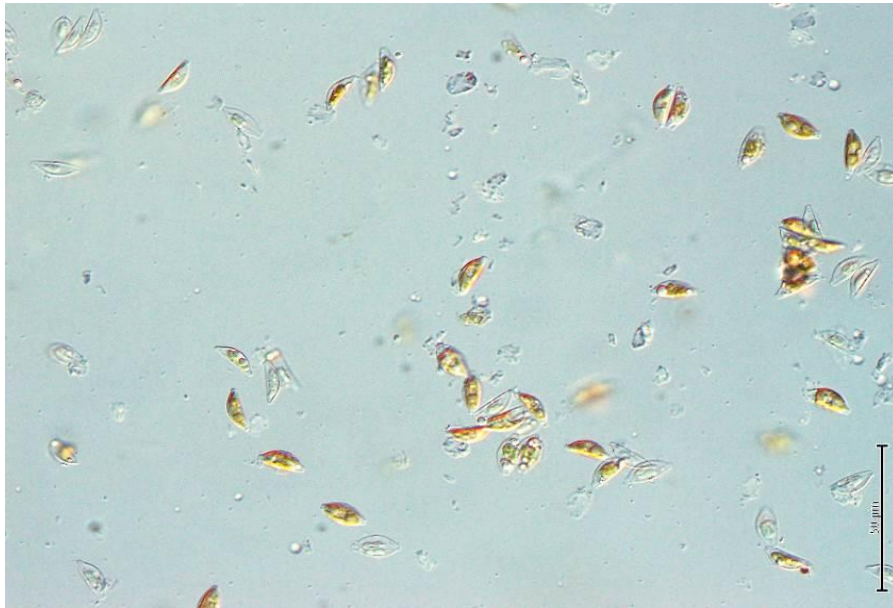
รูปภาพที่ 6 สำหรับ *Navicula* sp.



รูปภาพที่ 7 สำหรับ *Entomoneis* sp.



รูปภาพที่ 8 สำหรับ *Actinoptyclus* sp.



รูปภาพที่ 9 สำหรับ *Amphora* sp.



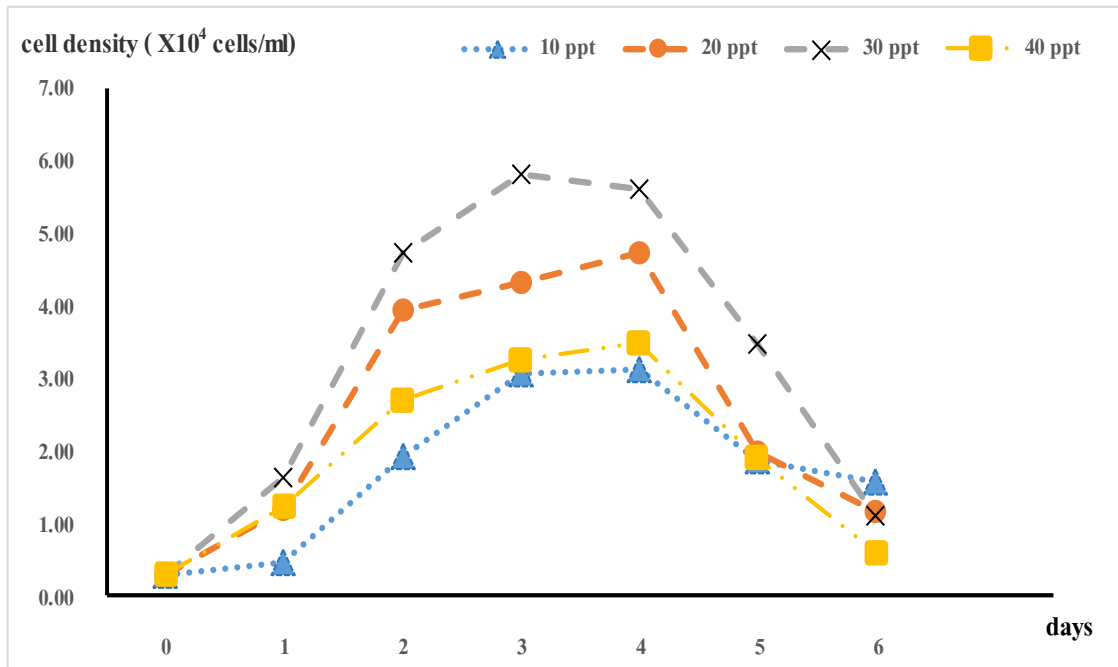
รูปภาพที่ 10 สำหรับ *Bellerochea* sp.

**ผลการศึกษารทดลองที่ 2** การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระดับความเค็มต่อการเจริญเติบโต ของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

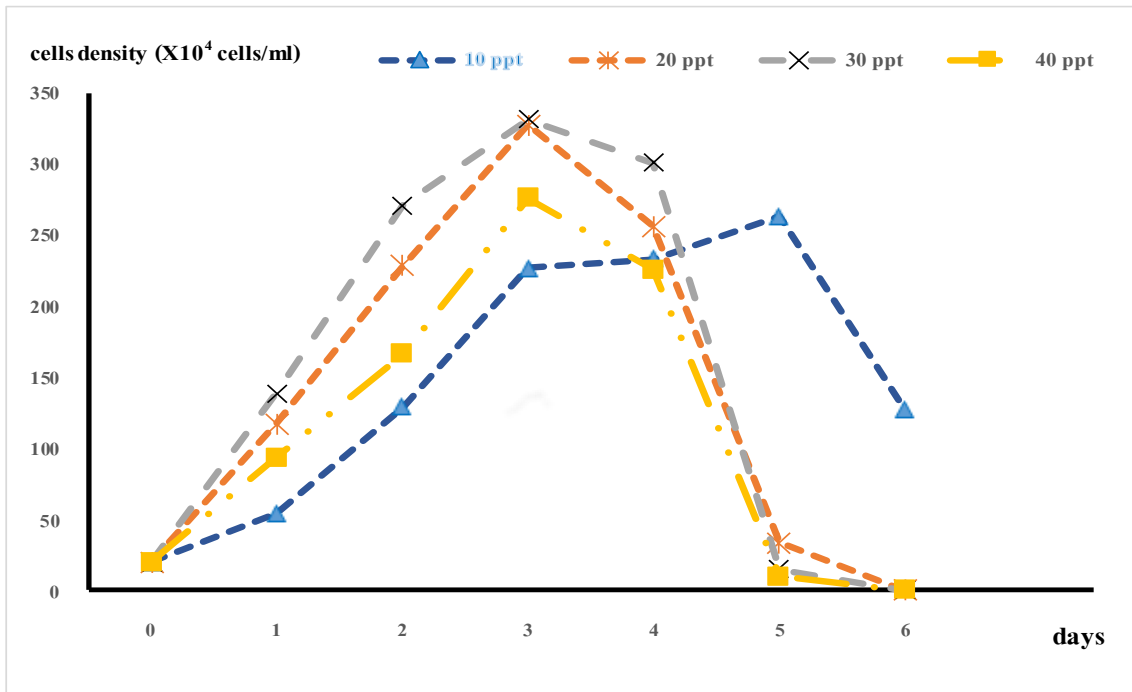
จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายทะเลขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม 3 ชนิด คือ *Thalassiosira* sp. , *Odontella* sp. และ *Chaetoceros* sp. ทำการเลี้ยงภายใต้อาหารเหลวที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 10, 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน พบว่าสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Thalassiosira* sp. มีการเจริญเติบโตสูงสุดภายใต้สภาวะความเค็มที่ 30 ส่วนในพันส่วน รองลงมาคือสภาวะความเค็มที่ 20, 40 และ 10 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ (รูปภาพที่ 11) อีกทั้งสาหร่าย *Thalassiosira* sp. เข้าสู่ระยะ Exponential phase (ระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ) เมื่อทำการเลี้ยงที่อายุสาหร่ายได้ 2 วัน และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดที่เลี้ยงด้วยระดับความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน รองลงมาคือ 20, 40 และ 10 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ ( 1.27, 1.19, 0.81 และ 0.66 ต่อวัน ตามลำดับ)

สาหร่ายทะเลขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมชนิด *Chaetoceros* sp. มีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่มีระดับความเค็มที่ 30 ส่วนในพันส่วน และพบรองลงมาเป็นสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ที่มีการเจริญเติบโตในสภาวะความเค็มที่ 20, 40 และ 10 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ (รูปภาพที่ 12) จากการศึกษาหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่ายชนิดนี้พบว่า มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะความเค็มที่ 20 ส่วนในพันส่วน รองลงจะเป็นการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเค็ม 30, 40 และ 10 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ (0.95, 0.94, 0.87 และ 0.81 ต่อวัน ตามลำดับ) ส่วนในการศึกษาการเจริญเติบโตในของสาหร่ายทะเลขนาดเล็กไดอะตอมชนิด *Odontella* sp. พบว่าสาหร่ายทะเลขนาดเล็กชนิดนี้มีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีระดับความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน รองลงมาคือสภาวะความเค็มที่ 40, 20 และ 10 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ (รูปภาพที่ 13) สาหร่าย *Odontella* sp. เข้าสู่ระยะ Exponential phase เมื่ออายุสาหร่ายได้ 2 วัน มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเมื่ออยู่ในสภาวะความเค็มที่ 30 ส่วนในพันส่วน รองลงมาคือ 20, 40 และ 10 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ (2.21, 0.75, 0.69 และ 0.56 ต่อวัน ตามลำดับ)

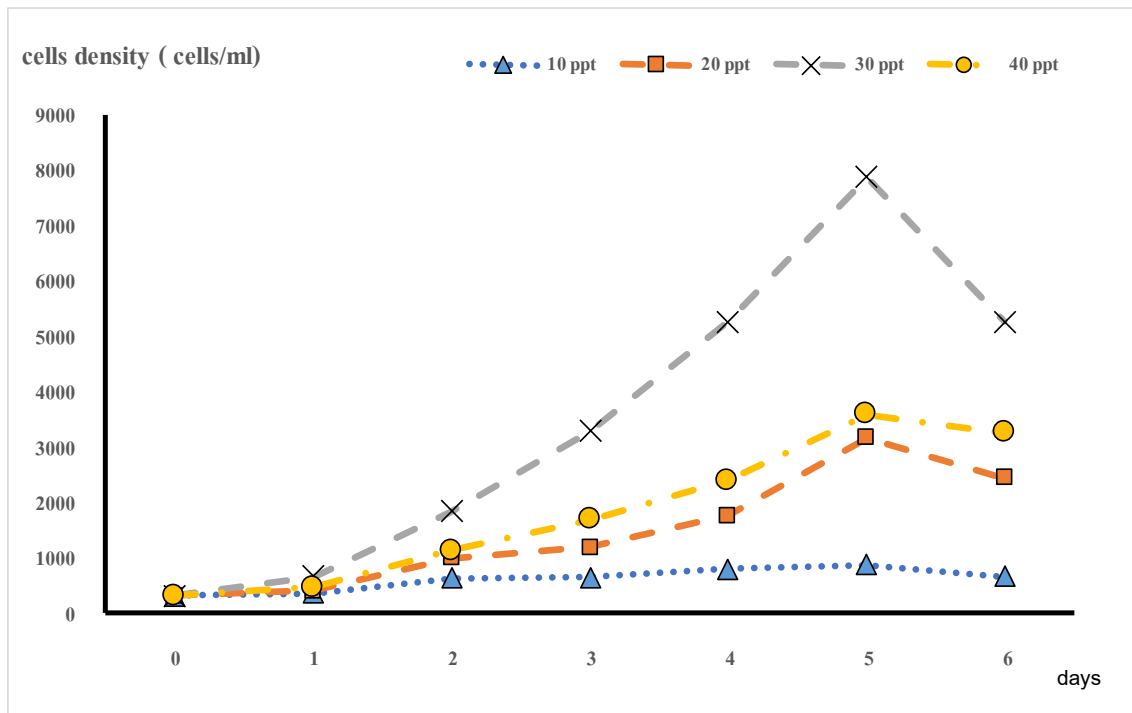




รูปภาพที่ 11 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Thalassiosira sp.* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่ระดับความเค็มแตกต่างกัน



รูปภาพที่ 12 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chaetoceros sp.* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่ระดับความเค็มแตกต่างกัน



รูปภาพที่ 13 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Odontella* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่ระดับความเค็มแตกต่างกัน

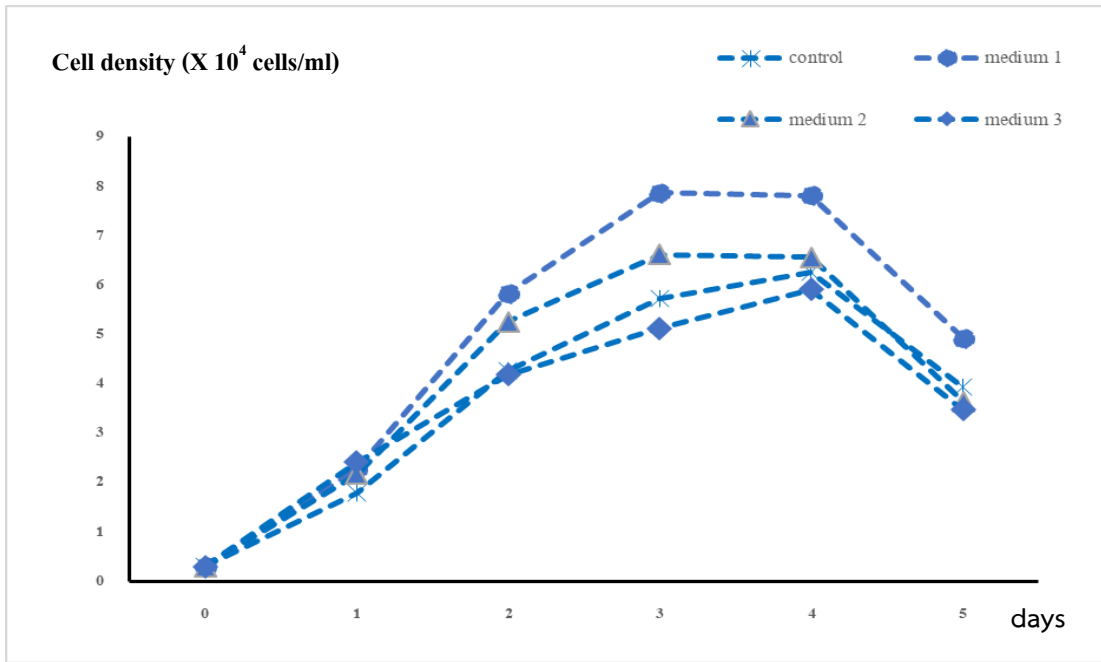
ผลการศึกษการทดลองที่ 3 การศึกษาผลของปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต การสะสมปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

ทำการศึกษการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กที่เจริญเติบโตด้วยความเค็มระดับเดียวกันคือ 30 ส่วนในพันส่วน ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการศึกษาของการทดลองที่ 2 ที่ทำการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 3 ชนิดนี้ด้วยความเค็มแตกต่างกัน 4 ระดับ พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมทั้ง 3 ชนิดนี้มีการเจริญเติบโตไปในทิศทางเดียวกันคือ มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่มีการปรับระดับความเค็มที่ 30 ส่วนในพันส่วน การศึกษาในส่วนนี้จึงใช้ความเค็มที่เป็นจากการศึกษาของการทดลองที่ 2 เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ (ตารางที่ 2.1 ) ตามปริมาตรอย่างละ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปวางไว้บนชั้นที่มีแสงสว่างโดยใช้ความเข้มแสงที่ 4000 ลักซ์ ทำการให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และไม่ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง อนุกรมมี 25 องศาเซลเซียส ทำการเป่าลมตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา เลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมแต่ละชนิดจนถึงระยะตาย (dead phase) ในระหว่างที่ทำการศึกษามีการเก็บตัวอย่างสาหร่ายทุก 24 ชั่วโมง ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา จากนั้นมีการเก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กในแต่ละวัน

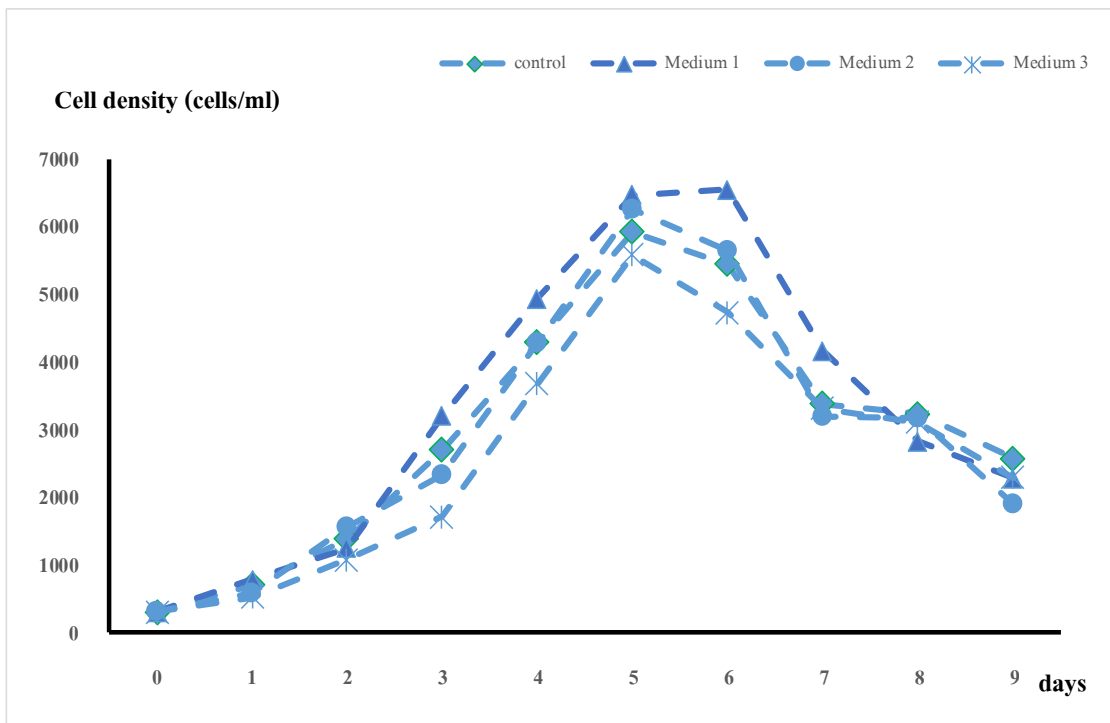
จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็ก *Thalassiosira* sp. มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวตัดแปลงสูตรที่ 1 มีความหนาแน่นเซลล์ที่  $7.88 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่ออายุ 3 วัน รองลงมาคือสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรตัดแปลงที่ 2 มีความหนาแน่นเซลล์ที่  $6.63 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่ออายุ 3 วัน ส่วนสาหร่ายชนิดนี้ที่ทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรควบคุม การทดลองและอาหารเหลวตัดแปลงสูตรที่ 3 มีการเจริญเติบโตของความหนาแน่นเซลล์สาหร่ายเมื่ออายุ 4 วัน เหมือนกัน มีความหนาแน่นเซลล์ที่  $6.26 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ  $5.91 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สาหร่ายขนาดเล็ก *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวตัดแปลงสูตรที่ 1 และอาหารเหลวตัดแปลงสูตรที่ 2 มีการเจริญเติบโตไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งทั้งสองสูตรอาหารนี้สาหร่ายเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ในวันแรก (early stationary phase) เมื่อสาหร่ายชนิดนี้มีอายุ 3 วัน เข้าสู่ระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโตคงที่ (late stationary phase) เมื่อสาหร่ายอายุ 4 วัน ( $7.81$  และ  $6.56 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ, รูปภาพที่ 14)

ส่วนสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนแตกต่างกัน 4 ชุดทดลอง พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กชนิดนี้มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวตัดแปลงสูตรที่ 1 มีความหนาแน่นเซลล์ที่  $160.41 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่ออายุ 3 วัน รองลงมาคือสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร 2 ชุดควบคุม และ อาหารเหลวสูตรตัดแปลงสูตรที่ 3 ( $158.83$ ,  $151.66$  และ  $119.58 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) สาหร่ายขนาดเล็ก *Chaetoceros* sp. นี้มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วมากเมื่อพัฒนาการเจริญเติบโตถึงระยะการเจริญเติบโตคงที่ คือวันที่สาหร่ายมีอายุ 3 วัน พออายุสาหร่ายชนิดนี้เข้าสู่อายุ 4 วัน สาหร่ายจะเข้าสู่ระยะตาย (dead phase) อย่างรวดเร็วเช่นกัน สาหร่ายมีระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) เมื่อสาหร่ายมีอายุ 1 – 2 วัน ไม่มีการเจริญเติบโตของระยะที่เข้าสู่ระยะเฉื่อย (retardation phase) เหมือนสาหร่ายขนาดเล็กชนิดอื่น (รูปภาพที่ 15)

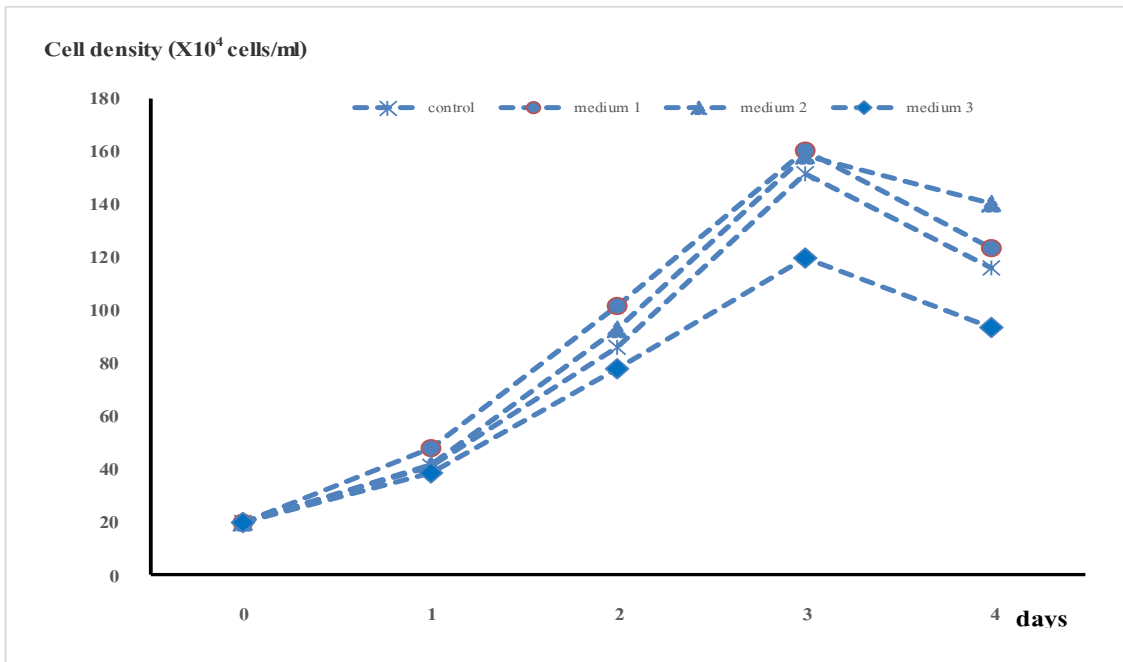
สาหร่ายขนาดเล็ก *Odontella* sp. เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนแตกต่างกัน 4 ระดับ โดยใช้  $\text{NaNO}_3$  เป็นแหล่งของธาตุอาหารไนโตรเจนนั้น พบว่าสาหร่ายชนิดนี้มีการเจริญเติบโตของระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) จำนวน 2 วัน คือเมื่อสาหร่ายอายุ 5 – 6 วัน เป็นการเจริญเติบโตของความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายสูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรตัดแปลงสูตรที่ 1 รองลงมาคือ สูตรอาหารตัดแปลงสูตรที่ 2 ชุดควบคุม และ สูตรอาหารตัดแปลงสูตรที่ 3 ตามลำดับ ( $6483.88$ ,  $6268.33$ ,  $5935.00$  และ  $5593.33$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) สาหร่าย *Odontella* sp. มีลักษณะของเซลล์ที่มีขนาดใหญ่จึงทำให้มีความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายต่ำกว่าสาหร่ายชนิดอื่นที่ทำการศึกษา สาหร่ายชนิดนี้มีการเจริญเติบโตของระยะการเจริญเติบโตระยะแรกของการเจริญเติบโตคงที่เมื่อสาหร่ายอายุได้ 5 วัน (early stationary phase) เข้าสู่ระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโตคงที่ (late stationary phase) เมื่อสาหร่ายมีอายุ 6 วัน และเริ่มเข้าสู่ระยะตายซึ่งเป็นระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้ในวันที่ 7 (รูปภาพที่ 16)



รูปภาพที่ 14 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีปริมาณของไนโตรเจนแตกต่างกัน



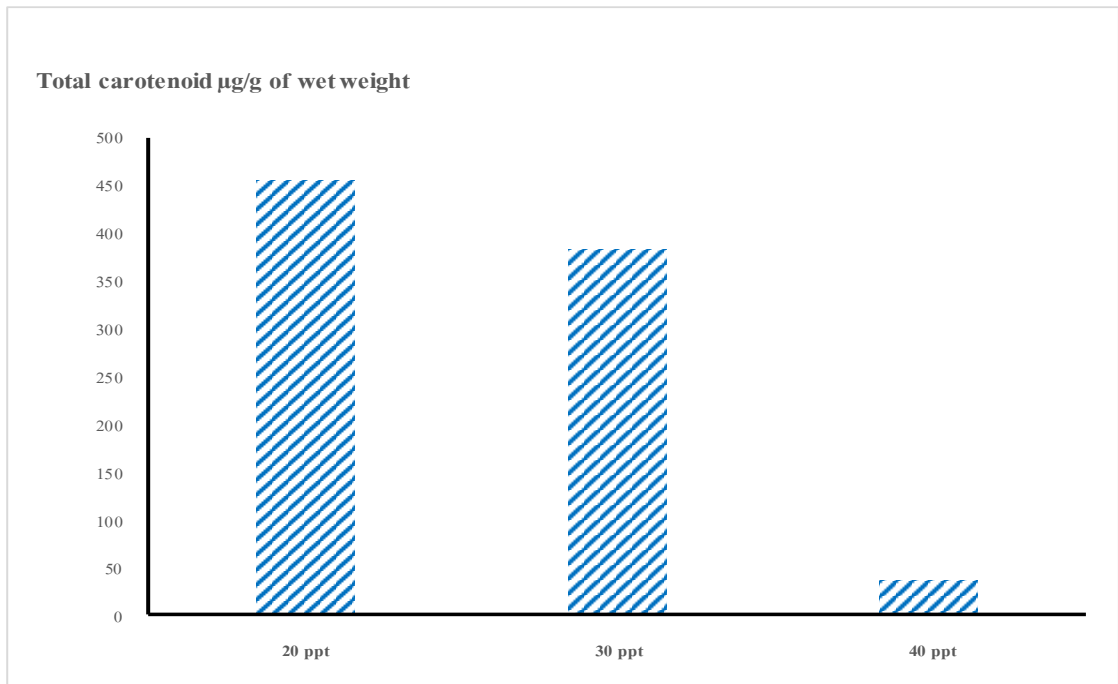
รูปภาพที่ 15 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chaetoceros* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีปริมาณของไนโตรเจนแตกต่างกัน



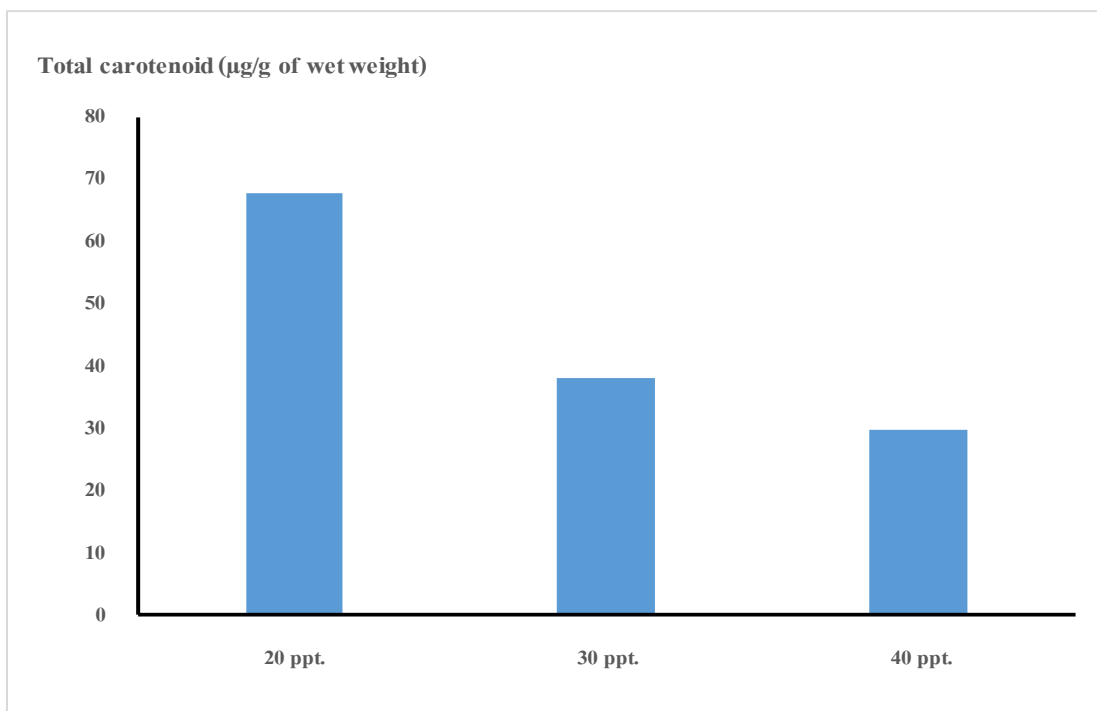
รูปภาพที่ 16 แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Odontella* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีปริมาณของไนโตรเจนแตกต่างกัน

ผลการศึกษการทดลองที่ 4 การศึกษาปริมาณการสะสมของแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่ายขนาดเล็กโตอะตอมที่เลี้ยงด้วยความเค็มต่างกัน (Britton et al, 1995 และ Carvalho et al, 2012)

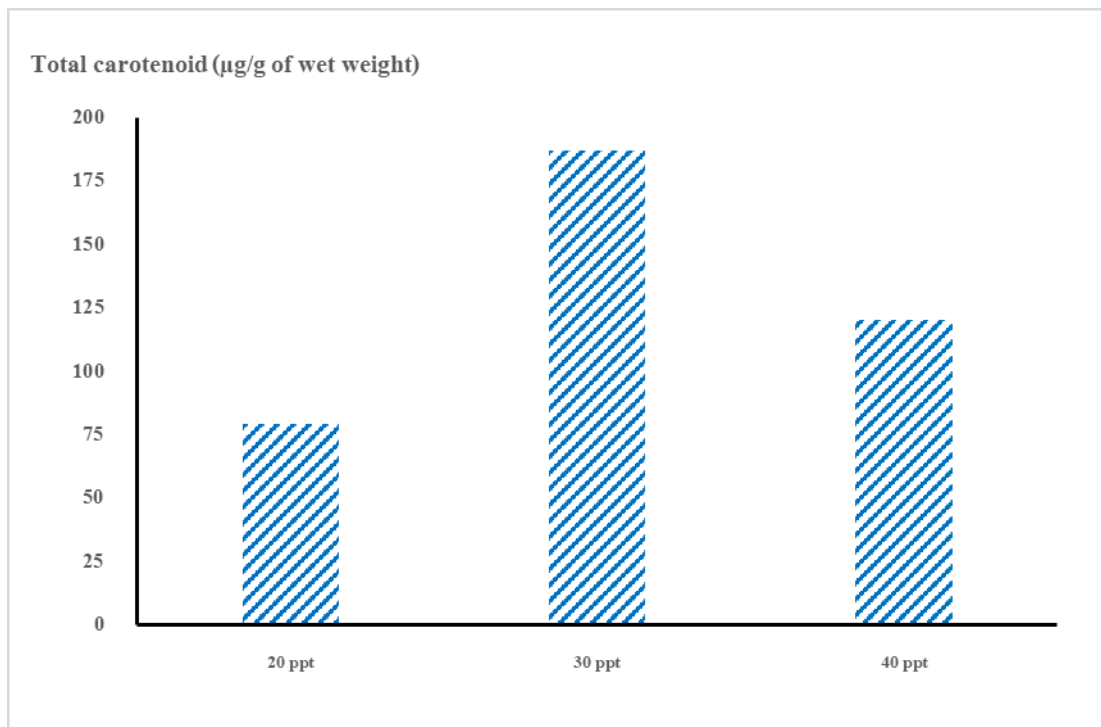
จากการศึกษาปริมาณการสะสมแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่ายขนาดเล็ก 3 ชนิด คือ *Thalassiosira* sp. , *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีระดับความเค็มที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ด้วยสูตรอาหารเหลว Guillard “f/2” ทำการศึกษาปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่ายที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ทั้ง 3 ชนิด โดยพบว่าสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงด้วยระดับความเค็มที่ 20 ส่วนในพันส่วน มีปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมสูงสุด คือ 454.62 µg/g ของน้ำหนักเปียก รองลงมาคือสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงด้วยระดับความเค็มที่ 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ (381.37 และ 34.68 µg/g ของน้ำหนักเปียก ตามลำดับ, รูปภาพที่ 17) ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่ายชนิด *Chaetoceros* sp. พบว่ามีปริมาณสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ด้วยระดับความเค็มที่ 20 ส่วนในพันส่วน คือ 67.72 µg/g ของน้ำหนักเปียก รองลงมาคือสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ที่เลี้ยงด้วยระดับความเค็มที่ 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ (38.09 และ 29.58 µg/g ของน้ำหนักเปียก ตามลำดับ, รูปภาพที่ 18) ส่วนปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่าย *Odontella* sp. พบว่ามีปริมาณของการสะสมแคโรทีนอยด์รวมสูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน คือ 187.00 µg/g ของน้ำหนักเปียก รองลงมาคือสาหร่าย *Odontella* sp. ที่เลี้ยงด้วยระดับความเค็มที่ 40 และ 20 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ



รูปภาพที่ 17 แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่ายขนาดเล็ก *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ



รูปภาพที่ 18 แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chaetoceros* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ



รูปภาพที่ 19 แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่ายขนาดเล็ก *Odontella* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ

**ผลการศึกษการทดลองที่ 5** การศึกษา ชนิด และปริมาณ ของกรดไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็กไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยความเค็มต่างกัน (Folch et al., 1975; Christin, 2003)

จากการศึกษา ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 3 ชนิด คือ *Thalassiosira* sp. , *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีระดับความเค็มที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ด้วยสูตรอาหารเหลว Guillard “f/2” ทำการศึกษา ชนิด และปริมาณของกรดไขมันในสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด ที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) โดยพบว่าสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงด้วยความเค็มทั้ง 3 ระดับความเค็ม พบว่าในการเจริญเติบโตที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตคงที่ของการเพาะเลี้ยงด้วยความเค็มที่ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วนนั้นพบว่าสาหร่ายชนิดนี้มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่เมื่ออายุสาหร่ายเข้าสู่วันที่ 2 วันที่ 3 และ วันที่ 4 แต่ในการศึกษาหา ชนิด และ ปริมาณของกรดไขมันนั้นได้ใช้วันแรกของระยะการเจริญเติบโตคงที่ (early stationary phase) จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายชนิดนี้มีความสามารถในการสร้างกรดไขมันกลุ่ม PUFAs โอเมก้า 3 สูงสุดเมื่อเทียบกับสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp. ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสาหร่าย *Thalassiosira* sp. มีการสร้างสูงสุดที่ระดับความเค็ม 40 ส่วนในพันส่วน รองลงคือ ที่ระดับความเค็ม 20 และ 30 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ (17.28, 16.47 และ 9.55 % Total Fatty Acid ตามลำดับ) กรดไขมันชนิด C20:5n3 สูงในสถานะการเลี้ยงที่ระดับความเค็ม 40 และ 20 ส่วนใน

พื้ส่วน คื้ 14.22 และ 14.00 % Total Fatty Acid of wet weight ตามลําดับ และพบต่ำสุดในการเลี้ียง สาหร่ายชนิดนี้ด้ว้ความเค้้มที่ระดับ 30 ส่วนในพื้ส่วน (7.74 %Total Fatty Acid of wet weight) และพบ C22:6n3 สูงในสภาวะการเลี้ียงที่ความเค้้ม 20 ส่วนในพื้ส่วน และพบรองลงมา คื้ ที่ระดับความเค้้ม 40 และ 30 ส่วนในพื้ส่วน (1.64, 1.28 และ 0.90 %Total Fatty Acid of wet weight ตามลําดับ, ตารางที่ 2)

สาหร่ายขนาดเลี้กชนิด *Chaetoceros* sp. พบว่ามีปริมาณของกรดไขมันกลุ่ม PUFAs โอเมก้า 3 มีปริมาณที่ใกล้เคียงกันทั้ง 3 ระดับความเค้้ม แต่มีปริมาณสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ียงสาหร่ายชนิดนี้ภายใต้สภาวะความเค้้มที่ระดับ 30 ส่วนในพื้ส่วน คื้ 9.61 % Total Fatty Acid พบรองลงมาคื้สาหร่ายที่เลี้ียงในสภาวะความเค้้มที่ระดับ 20 และ 40 ส่วนในพื้ส่วน ตามลําดับ (9.52 และ 4.60 % Total Fatty Acid of wet weight) กรดไขมันชนิด C20:5n3 สูงในสภาวะการเลี้ียงที่ระดับความเค้้ม 30 ส่วนในพื้ส่วน คื้ 8.05 % Total Fatty Acid of wet weight พบรองลงมาเมื่อเลี้ียงสาหร่ายชนิดนี้ด้ว้ความเค้้ม 20 และ 40 ส่วนในพื้ส่วน (7.90 และ 3.74 %Total Fatty Acid of wet weight ตามลําดับ) กรดไขมันชนิด C22:6n3 สูงในสภาวะการเลี้ียงที่ความเค้้ม 20 ส่วนในพื้ส่วน และพบรองลงมา คื้ ที่ระดับความเค้้ม 30 ส่วนในพื้ส่วน (0.80 และ 0.59 % Total Fatty Acid of wet weight ตามลําดับ, ตารางที่ 3) แต่ไม่พบกรดไขมันชนิดนี้เมื่อเลี้ียงในสภาวะความเค้้มที่ 40 ส่วนในพื้ส่วน ส่วนในการศึกษากรดไขมันของสาหร่ายขนาดเลี้ก *Odontella* sp. พบว่ามีปริมาณของกรดไขมันในกลุ่ม PUFAs โอเมก้า 3 สูงสุดในสภาวะการเพาะเลี้ียงสาหร่ายชนิดนี้ที่ระดับความเค้้มที่ 30 ส่วนในพื้ส่วน (10.42 % Total Fatty Acid of wet weight) พบรองลงมาในสภาวะความเค้้มที่ 40 และ 20 ส่วนในพื้ส่วน ตามลําดับ (5.85 และ 5.14 % Total Fatty Acid of wet weight ตามลําดับ, ตารางที่ 4 )



**ตารางที่ 3** แสดงชนิดและปริมาณกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงในระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ด้วยอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ของระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase)

ชนิดของกรดไขมัน		ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ( % total fatty acid $\pm$ SD)	ระดับความเค็ม 40 ส่วนในพันส่วน ( % total fatty acid $\pm$ SD)
C6:0	0.00	0.00	0.00
C12:0	0.00	0.00	0.00
C13:0	0.00	0.00	0.00
C14:0	5.71 $\pm$ 0.38	3.04 $\pm$ 3.77	6.83 $\pm$ 0.37
C14:1	0.00	0.00	0.00
C15:0	0.47 $\pm$ 0.41	0.44 $\pm$ 0.04	0.51 $\pm$ 0.45
C15:1	0.00	0.00	0.00
C16:0	19.29 $\pm$ 1.10	10.19 $\pm$ 12.86	22.02 $\pm$ 2.03
C16:1	16.04 $\pm$ 1.44	8.74 $\pm$ 10.32	16.11 $\pm$ 0.74
C17:0	6.24 $\pm$ 0.99	3.62 $\pm$ 3.71	7.75 $\pm$ 1.06
C17:1	7.66 $\pm$ 0.81	4.24 $\pm$ 4.85	6.80 $\pm$ 0.35
C18:0	2.40 $\pm$ 1.76	2.08 $\pm$ 0.46	2.69 $\pm$ 1.70
C18:1n9 (c+t)	0.76 $\pm$ 0.83	0.79 $\pm$ 0.05	0.64 $\pm$ 1.11
C18:2n6 c	0.52 $\pm$ 0.45	0.48 $\pm$ 0.05	0.51 $\pm$ 0.45
C18:2n6 t	0.00	0.00	0.00
C18:3n6	0.00	0.00	0.00
C18:3n3	0.00	0.00	0.00
C20:0	0.00	0.00	0.00
C20:1n9	0.00	0.00	0.00
C20:2	0.00	0.00	0.00
C20:3n6	0.00	0.00	0.00
C21:0	0.00	0.00	0.00
C20:4n6	0.32 $\pm$ 0.55	0.43 $\pm$ 0.16	1.27 $\pm$ 0.06
C20:3n3	0.00	0.00	0.00
C20:5n3	14.00 $\pm$ 1.48	7.74 $\pm$ 8.85	14.22 $\pm$ 0.62
C22:0	0.00	0.00	0.00
C22:1n9	0.00	0.00	0.00
C22:2	0.00	0.00	0.00
C23:0	0.00	0.00	0.00
C24:0	0.00	0.00	0.00
C22:6n3	1.64 $\pm$ 0.15	0.90 $\pm$ 1.06	1.28 $\pm$ 0.05
C24:1n9	0.00	0.00	0.00
SUM	75.05	42.70	80.63
SFAs	34.11	19.37	39.81
MUFAs	24.46	13.77	23.54
PUFAs	16.47	9.55	17.28

**ตารางที่ 4** แสดงชนิดและปริมาณกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *Chaetoceros* sp. ที่เลี้ยงในระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ด้วยอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ของระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase)

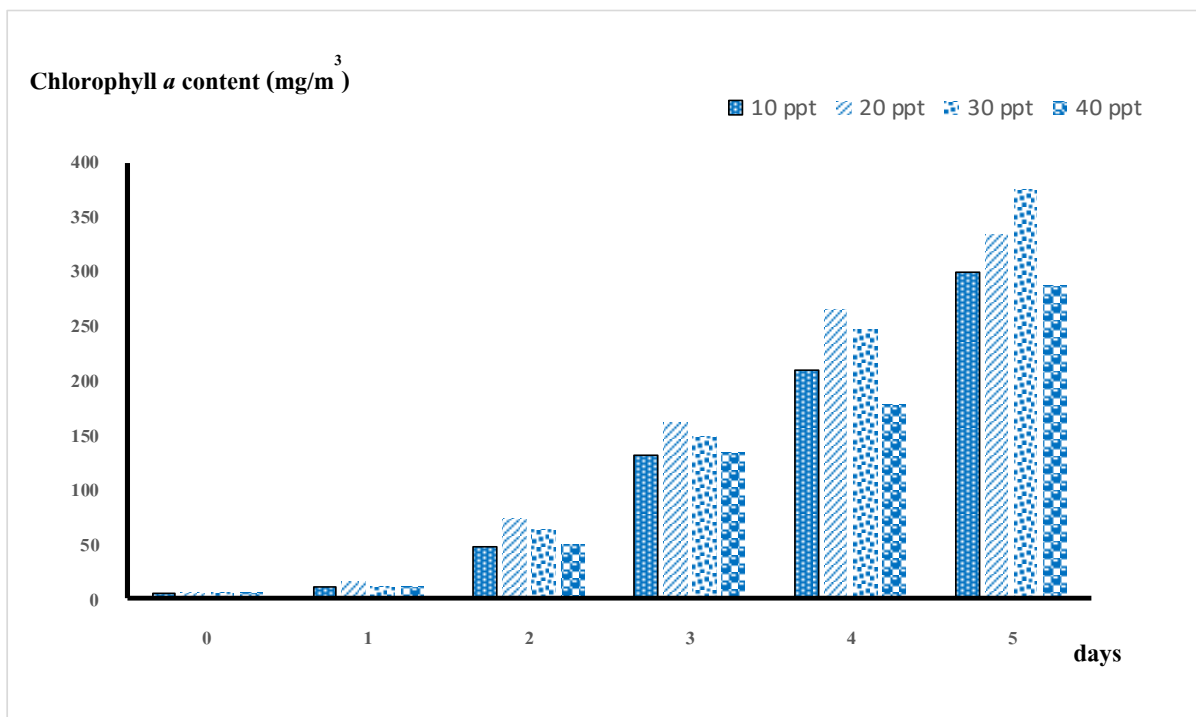
ชนิดของกรดไขมัน	ระดับความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ( % total fatty acid $\pm$ SD)	ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ( % total fatty acid $\pm$ SD)	ระดับความเค็ม 40 ส่วนในพันส่วน ( % total fatty acid $\pm$ SD)
C6:0	0.00	0.00	0.00
C12:0	0.00	0.00	0.00
C13:0	0.00	0.00	0.00
C14:0	3.66 $\pm$ 3.23	15.12 $\pm$ 0.22	13.78 $\pm$ 0.82
C14:1	0.00	0.00	0.00
C15:0	0.33 $\pm$ 0.25	0.63 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.46
C15:1	0.00	0.00	0.00
C16:0	12.31 $\pm$ 10.01	10.44 $\pm$ 0.05	13.57 $\pm$ 0.85
C16:1	9.06 $\pm$ 7.76	19.07 $\pm$ 0.07	18.56 $\pm$ 0.89
C17:0	4.17 $\pm$ 3.37	6.40 $\pm$ 0.26	6.86 $\pm$ 0.30
C17:1	4.00 $\pm$ 3.30	9.42 $\pm$ 0.07	7.31 $\pm$ 0.33
C18:0	1.61 $\pm$ 1.12	1.07 $\pm$ 0.02	3.29 $\pm$ 1.21
C18:1n9 (c+t)	0.60 $\pm$ 0.53	0.00	1.08 $\pm$ 0.28
C18:2n6 c	0.33 $\pm$ 0.25	0.00	0.00
C18:2n6 t	0.00	0.00	0.00
C18:3n6	0.00	0.00	0.00
C18:3n3	0.00	0.00	0.00
C20:0	0.00	0.00	0.00
C20:1n9	0.00	0.00	0.00
C20:2	0.00	0.00	0.00
C20:3n6	0.00	0.00	0.00
C21:0	0.00	0.00	0.00
C20:4n6	0.50 $\pm$ 0.67	0.96 $\pm$ 0.04	0.86 $\pm$ 0.05
C20:3n3	0.00	0.00	0.00
C20:5n3	7.90 $\pm$ 6.85	8.05 $\pm$ 0.29	3.74 $\pm$ 0.31
C22:0	0.00	0.00	0.19 $\pm$ 0.32
C22:1n9	0.00	0.00	0.00
C22:2	0.00	0.00	0.00
C23:0	0.00	0.00	0.00
C24:0	0.00	0.00	0.00
C22:6n3	0.80 $\pm$ 0.66	0.59 $\pm$ 0.02	0.00
C24:1n9	0.00	0.00	0.00
SUM	45.26	71.76	69.77
SFAs	22.08	33.66	38.22
MUFAs	13.65	28.49	26.95
PUFAs	9.52	9.61	4.60

**ตารางที่ 5** แสดงชนิดและปริมาณกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *Odontella* sp. ที่เลี้ยงในระดับความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ด้วยอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ของระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase)

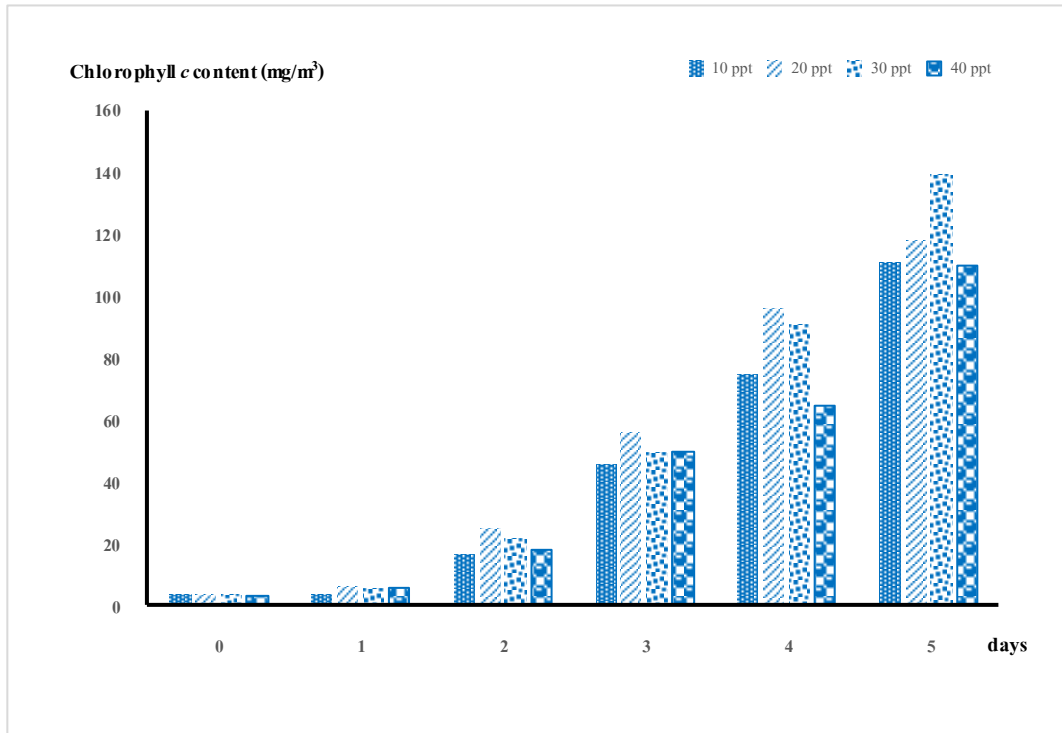
ชนิดของกรดไขมัน	ระดับความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ( % total fatty acid $\pm$ SD)	ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ( % total fatty acid $\pm$ SD)	ระดับความเค็ม 40 ส่วนในพันส่วน ( % total fatty acid $\pm$ SD)
C6:0	0.00	0.00	0.00
C12:0	0.00	0.00	0.00
C13:0	0.00	0.00	0.00
C14:0	6.34 $\pm$ 2.23	9.83 $\pm$ 0.78	5.39 $\pm$ 2.90
C14:1	0.00	0.00	0.00
C15:0	0.00	0.00	0.00
C15:1	0.00	0.00	0.00
C16:0	16.02 $\pm$ 4.89	20.86 $\pm$ 0.67	13.73 $\pm$ 6.96
C16:1	11.12 $\pm$ 4.12	17.61 $\pm$ 1.46	8.63 $\pm$ 4.66
C17:0	17.67 $\pm$ 2.50	9.94 $\pm$ 0.70	15.26 $\pm$ 3.82
C17:1	1.22 $\pm$ 1.11	4.41 $\pm$ 0.35	1.81 $\pm$ 1.87
C18:0	2.34 $\pm$ 0.48	2.72 $\pm$ 2.29	1.63 $\pm$ 1.59
C18:1n9 (c+t)	0.00	0.50 $\pm$ 0.86	0.00
C18:2n6 c	0.00	0.96 $\pm$ 0.06	0.00
C18:2n6 t	0.00	0.00	0.00
C18:3n6	0.00	0.00	0.00
C18:3n3	0.00	0.00	0.00
C20:0	0.00	0.00	0.00
C20:1n9	0.00	0.00	0.00
C20:2	0.00	0.00	0.00
C20:3n6	0.00	0.00	0.00
C21:0	0.00	0.00	0.00
C20:4n6	0.00	0.00	0.00
C20:3n3	0.00	0.00	0.00
C20:5n3	5.14 $\pm$ 1.91	8.48 $\pm$ 0.65	5.85 $\pm$ 3.34
C22:0	0.00	0.52 $\pm$ 0.46	0.00
C22:1n9	0.00	0.00	0.00
C22:2	0.00	0.00	0.00
C23:0	0.00	0.00	0.00
C24:0	0.00	0.00	0.00
C22:6n3	0.00	0.98 $\pm$ 0.08	0.00
C24:1n9	0.00	0.00	0.00
SUM	59.85	76.80	52.31
SFAs	42.36	43.87	36.01
MUFAs	12.34	22.52	10.44
PUFAs	5.14	10.42	5.85

**การทดลองที่ 6** การศึกษาปริมาณของคลอโรฟิลล์ *a* และ *c* ของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยความเค็มต่างระดับ (Stickland and Parsons, 1975)

จากการศึกษาปริมาณของคลอโรฟิลล์ *a* และ *c* ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมทั้ง 3 ชนิด คือ *Thalassiosira* sp. , *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp. ที่เลี้ยงด้วยความเค็มแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 10, 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” โดยทำการเพาะเลี้ยงถึงระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ทำการเก็บตัวอย่างที่ทำการทดลองทุก 24 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการทดลอง จากการศึกษาปริมาณของคลอโรฟิลล์ *a* ในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Thalassiosira* sp. สูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยความเค็มที่ 30 ส่วนในพันส่วน (375.09 mg/m<sup>3</sup>) ของระยะการเจริญเติบโตคงที่ พบปริมาณคลอโรฟิลล์ *a* รองลงมาในสภาวะความเค็มที่ 20, 10 และ 40 ส่วนในพันส่วน (333.66, 299.83 และ 286.95 mg/m<sup>3</sup> ตามลำดับ, รูปภาพที่ 20) การสร้างปริมาณคลอโรฟิลล์ *a* ในสาหร่ายชนิดนี้จะมีปริมาณสูงเพิ่มขึ้นตามอายุของสาหร่ายโดยเฉพาะสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเค็มที่ 20 ส่วนในพันส่วน ที่มีการเพิ่มปริมาณของคลอโรฟิลล์ *a* เป็นการเพิ่มปริมาณแบบทวีคูณซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ชนิดนี้ภายใต้สภาวะความเค็มอีก 4 ระดับ ส่วนในการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ *c* ในสาหร่ายชนิดนี้พบว่าปริมาณสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน คือ 139.48 mg/m<sup>3</sup> พบปริมาณรองลงมาในสภาวะความเค็มที่ 20, 10 และ 40 ส่วนในพันส่วน (117.72 , 110.92 และ 110.13 mg/m<sup>3</sup> ตามลำดับ, รูปภาพที่ 21)



**รูปภาพที่ 20** แสดงปริมาณของคลอโรฟิลล์ *a* ในสาหร่ายขนาดเล็ก *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน 4 ระดับ



รูปภาพที่ 21 แสดงปริมาณของคลอโรฟิลล์ c ในสาหร่ายขนาดเล็ก *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว สูตร Guillard “f/2” ที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน 4 ระดับ

อภิปรายผลการทดลอง

**การคัดเลือกเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมในบริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี**

การคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมจากน้ำทะเลธรรมชาติที่บริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี ได้เชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์จำนวน 10 ชนิด คือ *Chaetoceros* sp., *Odontella* sp., *Thalassiosira* sp., *Actinocyclus* sp., *Amphora* sp., *Bellerochea* sp., *Coscinodiscus* sp., *Entomoneis* sp., *Navicula* sp. และ *Cymatosira* sp. สาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 10 ชนิด ซึ่งความเค็มเฉลี่ยจะอยู่ในช่วง 23 – 34 ส่วนในพันส่วน ในบริเวณชายฝั่งมีชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมหลากหลายชนิด แต่ละชนิดมีโครงสร้างของเซลล์ที่แตกต่างกันโดยสามารถจำแนกตามการเชื่อมต่อของเซลล์ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของเซลล์เดี่ยว คือ *Odontella* sp., *Thalassiosira* sp., *Navicula* sp., *Actinocyclus* sp., *Entomoneis* sp., *Coscinodiscus* sp., *Cymatosira* sp. และ *Amphora* sp. อีกกลุ่มคือกลุ่มของเซลล์ที่เป็นลักษณะการต่อแบบเส้นสาย มี 2 คือ *Chaetoceros* sp. และ *Bellerochea* sp. จากการศึกษาสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมโดยส่วนใหญ่ที่พบบริเวณชายฝั่งเหล่านี้มักจะเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เป็นลักษณะเซลล์เดี่ยว และเป็นไดอะตอมที่มีลักษณะของการเคลื่อนที่แบบกระตุก (jerkin) ซึ่งไดอะตอมกลุ่มนี้ได้แก่ *Navicula* sp., *Entomoneis* sp. และ *Amphora* sp. โดยมีการเคลื่อนที่ของเซลล์แบบใช้ไซโทพลาสซึมเคลื่อนที่ตามร่องของราฟี การไหลของไซโทพลาสซึมที่เป็นลักษณะของเหลวภายในเซลล์นั้นจะสัมพันธ์กับพื้นวัสดุและเซลล์จะมีการขับสารเมือกออกมาจากตัวเซลล์ทำให้มีการเกาะติดกันเป็นกลุ่มและติดกับวัสดุ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544) ส่วนไดอะตอมชนิด *Thalassiosira* sp., *Coscinodiscus* sp., และ *Actinocyclus* sp. ทั้ง 3 ชนิดนี้มีลักษณะโครงสร้างของเซลล์เป็นแบบ centric diatom เซลล์จะอยู่แบบเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลมทางด้านวาล์ว ผนังเซลล์หยาบด้านหน้ามีลักษณะเป็นเหมือนคลื่นไม่เรียบ มีลวดลายบนฝา ซึ่งลักษณะของลวดลายจะไม่เหมือนกันขึ้นอยู่กับชนิดของไดอะตอม

**การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระดับความเค็มต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม**

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม 3 ชนิด ได้แก่ *Thalassiosira* sp. , *Odontella* sp. และ *Chaetoceros* sp. พบว่าสาหร่ายทะเลขนาดเล็กทั้งสามชนิดมีการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะของอาหารเหลวที่มีระดับความเค็มที่ 30 ส่วนในพันส่วน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็กทั้งสามชนิดนี้เป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่พบบริเวณชายฝั่งทะเลของภาคตะวันออกจึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะความเค็มระดับเดียวกัน สาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Thalassiosira* sp. มีความความแน่นของเซลล์สูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อายุ 3 วัน ( $5.82 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ภายใต้สภาวะความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ซึ่งเป็นระยะการเจริญเติบโตที่เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ของสาหร่ายชนิดนี้ คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Garcia และคณะ (2012) ที่ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Thalassiosira weissflogii* ภายใต้สภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน คือ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 ส่วนในพันส่วน พบว่าสาหร่าย มีการเจริญเติบโตและมีการสร้างองค์ประกอบทางด้านเคมีได้ดีที่สุดที่สภาวะความเค็มระหว่าง 25 – 30 ส่วนในพัน

ส่วน ถ้าเลี้ยงภายใต้สภาวะความเค็มที่สูงจะส่งผลทำให้การเจริญเติบโตทางด้านความหนาแน่นของเซลล์  
สาหร่ายลดลง อีกทั้งยังส่งผลให้รูปร่างของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงทางด้าน  
morphology ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Thalassiosira weissflogii*

สาหร่ายขนาดเล็ก *Chaetoceros* sp. ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน พบว่ามีการเจริญเติบโตทางด้านความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายสูงสุดเมื่ออายุของสาหร่าย 3 วัน ( $331.94 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้มีการเจริญเติบโตทางด้านความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายรวดเร็วมากเมื่อเทียบกับความหนาแน่นเซลล์ที่เริ่มต้น เป็นสาหร่ายขนาดเล็กชนิดที่มีการพัฒนาทางด้านความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและถึงระยะที่เป็นระยะตาย (dead phase) ที่รวดเร็วเช่นกัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Asulabh และคณะ (2012) ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก 3 ชนิด คือ *Microcystis* sp. และ *Chlorococccum* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายขนาดเล็กน้ำจืด และสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Chaetoceros* sp. ซึ่งทำการแยกเซลล์บริสุทธิ์จากแหล่งน้ำธรรมชาติ มาทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาพบว่า สาหร่ายขนาดเล็ก *Chaetoceros* sp. มีการเจริญเติบโตทางการพัฒนาความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายรวดเร็วมากเช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ อีกทั้งสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ที่ทำการศึกษามีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเมื่อสาหร่ายอายุ 3 วัน และคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Raghavan และคณะ (2008) ซึ่งทำการศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายขนาดเล็กไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* f. ในการศึกษาได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยความเค็มที่ 25 และ 35 ส่วนในพันส่วน จากการศึกษาพบว่าสาหร่าย *Chaetoceros calcitrans* f. มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อมีการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะความเค็มที่ 25 ส่วนในพันส่วน และมีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะความเค็มที่ 35 ส่วนในพันส่วน สาหร่ายขนาดเล็ก *Odontella* sp. ที่ทำการศึกษานั้นพบว่าการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกันกับสาหร่าย *Thalassiosira* sp. และ *Chaetoceros* sp. แต่ขนาดของเซลล์สาหร่ายชนิดนี้มีขนาดใหญ่กว่าสาหร่ายทั้งสองชนิดจึงทำให้สามารถทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ดีกว่าอีกสองชนิดนั้น ในกรณีที่มีการทำวิจัยศึกษาการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายทะเลขนาดเล็กชนิดนี้ซึ่งมีกระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตเพื่อนำมาใช้ประโยชน์นั้น สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตโดยใช้ถุงกรองไนลอนที่มีขนาดตาถี่ 20 ไมครอน โดยไม่ต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิซึ่งทำให้สามารถลดต้นทุนในการเก็บเกี่ยวผลผลิตเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ สาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Odontella* sp. มีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (Stationary phase) ภายใต้สภาวะความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ( $3,285.53$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งจะเป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่มีการเจริญเติบโตอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับสาหร่าย *Thalassiosira* sp. และ *Chaetoceros* sp.

## การศึกษาผลของปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต การสะสมปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม

ทำการศึกษการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กที่เจริญเติบโตด้วยความเค็มระดับเดียวกันคือ 30 ส่วนในพันส่วน โดยใช้อาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนแตกต่างกัน 4 ระดับ รวมชุดการทดลองที่เป็นชุดควบคุม (0.44, 0.88, 1.76 และ 2.64 mM-L<sup>-1</sup>) จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมทั้ง 3 ชนิดนี้มีการพัฒนาทางด้านความหนาแน่นเซลล์ไปในทางเดียวกันคือ มีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรดัดแปลงสูตรที่ 1 ซึ่งมีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจน 1.76 mM-L<sup>-1</sup> พบการเจริญเติบโตทางด้านความหนาแน่นเซลล์สูงรองลงมาคือสูตรอาหารเหลวดัดแปลงสูตรที่ 2 มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจน 2.64 mM-L<sup>-1</sup> และมีการเจริญเติบโตต่ำสุดในสูตรอาหารดัดแปลงสูตรที่ 3 ที่มีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจน 0.44 mM-L<sup>-1</sup> คล้ายคลึงกับงานวิจัยของอมรรัตน์ และคณะ (2017) ที่ได้ทำการศึกษาผลของธาตุอาหารไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก 4 ชนิด (*Tetraselmis gracilis*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis oculata* และ *Isochrysis galbana*) พบว่าปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจน 2.64 mM-L<sup>-1</sup> ส่งผลต่อการเจริญเติบโตในด้านของการเพิ่มปริมาณความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก *T. gracilis*, *D. salina* และ *N. oculata* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก ส่วนปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน 1.76 mM-L<sup>-1</sup> มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *I. galbana* ซึ่งเป็นที่สังเกตได้ว่าสาหร่ายขนาดเล็กของแต่ละ Division นั้นจะมีความต้องการของธาตุอาหารไนโตรเจนแตกต่างกันออกไป ซึ่งในส่วนนี้สอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้นี้ที่พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมนี้มีความต้องการธาตุอาหารไนโตรเจนในระดับเดียวกับสาหร่าย *I. galbana*

ทำการศึกษาปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่ายที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ทั้ง 3 ชนิด โดยพบว่าสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงด้วยระดับความเค็มที่ 20 ส่วนในพันส่วน มีปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมสูงสุด คือ 454.62 µg/g ของน้ำหนักเปียก รองลงมาคือสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงด้วยระดับความเค็มที่ 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ (381.37 และ 34.68 µg/g ของน้ำหนักเปียก ตามลำดับ, รูปภาพที่ 17) ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่ายชนิด *Chaetoceros* sp. พบว่ามีปริมาณสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ด้วยระดับความเค็มที่ 20 ส่วนในพันส่วน คือ 67.72 µg/g ของน้ำหนักเปียก รองลงมาคือสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ที่เลี้ยงด้วยระดับความเค็มที่ 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ (38.09 และ 29.58 µg/g ของน้ำหนักเปียก ตามลำดับ, รูปภาพที่ 18) ส่วนปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่าย *Odontella* sp. พบว่ามีปริมาณของการสะสมแคโรทีนอยด์รวมสูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” ที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน คือ 187.00 µg/g ของน้ำหนักเปียก รองลงมาคือสาหร่าย *Odontella* sp. ที่เลี้ยงด้วยระดับความเค็มที่ 40 และ 20 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ ปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมจะพบในปริมาณที่สูงในการเลี้ยงภายใต้สภาวะความเค็มที่ 30 ส่วนในพันส่วน คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ G. Döhler (1985) ที่ได้ทำการศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 ชนิด คือ *Lauderia annulata* และ



*Thalassiosira rotula* ที่พบว่ามีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะความเค็ม 20 - 35 ส่วนในพันส่วน และมีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่สูงขึ้น เหมือนการวิจัยในครั้งนี้นี้ที่พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไดอะตอมทั้ง 3 ชนิดนี้ ภายใต้สภาวะความเค็มที่ 40 ส่วนในพันส่วน พบว่ามีการเจริญเติบโตลดลงอย่างเห็นได้ชัดจนเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะความเค็มที่ 20 และ 30 ส่วนในพันส่วน

### การศึกษา ชนิด และปริมาณ ของกรดไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็กไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยความเค็มต่างกัน

จากการศึกษาพบว่าในการเจริญเติบโตที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตคงที่ของการเพาะเลี้ยงด้วยความเค็มที่ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน นั้นพบว่าสาหร่ายไดอะตอมกลุ่มนี้มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่เมื่ออายุสาหร่ายเข้าสู่วันที่ 2 วันที่ 3 และ วันที่ 4 แต่ในการศึกษาหา ชนิด และ ปริมาณของกรดไขมันนั้นได้ใช้ช่วงแรกของระยะการเจริญเติบโตคงที่ (early stationary phase) จากการศึกษพบว่าสาหร่ายชนิด *Thalassiosira* sp. นี้มีความสามารถในการสร้างกรดไขมันกลุ่ม PUFAs โอเมก้า 3 สูงสุดเมื่อเทียบกับสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp. ซึ่งในการศึกษครั้งนี้พบว่าสาหร่าย *Thalassiosira* sp. มีการสร้างสูงสุดที่ระดับความเค็ม 40 ส่วนในพันส่วน รองลงคือ ที่ระดับความเค็ม 20 และ 30 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ จากการวิเคราะห์คุณค่าอาหาร ในตัวอย่างสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร Guillard's "f/2" ความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 25 °C เก็บเกี่ยวในระยะ stationary phase พบความชื้นมีค่าในช่วง 85.2 - 87.7 % ปริมาณไขมัน โปรตีนพบมีความแตกต่างกัน และพบปริมาณไขมันและโปรตีนสูงสุดในการเลี้ยงที่สภาวะความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน (9.0%, 16.6% dry weight) ปริมาณเถ้าไม่มีความแตกต่างกัน ถึงแม้จะทำการเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกันพบปริมาณในช่วง 49.8-51.4 % ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเทียบกับแหล่งวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำจะพบว่าปริมาณโปรตีนในสาหร่าย มีปริมาณของโปรตีนสูงกว่าปลายข้าว (7.1%) รำละเอียด (12.2%) ข้าวสาลี (12%) ข้าวโพด (9.4%) และ ข้าวฟ่าง (10.6%) อีกทั้งในการศึกษครั้งนี้ยังพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กไดอะตอม *Thalassiosira* sp. มีปริมาณของแร่ธาตุสูงกว่าในแหล่งวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดที่กล่าวมาแล้ว แต่ถ้าเปรียบเทียบปริมาณไขมันของสาหร่ายขนาดเล็กกับปลาหมึกป่นนั้นพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กไดอะตอมมีค่าใกล้เคียงกับปลาหมึกป่น (8.8%) กากเมล็ดงา (10.6%) เนื้อและกระดูกป่น (10.3%) (กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ, 2534)

ชนิดและปริมาณกรดไขมันใน *Thalassiosira* sp. มีคุณลักษณะเด่นเป็นกรดไขมันอิ่มตัว; SFAs (34.1-39.8 %TFA wet weight) โดยกรดไขมัน SFAs มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่สูงขึ้น ส่วนกรดไขมัน MUFAs มีแนวโน้มที่ไม่เปลี่ยนแปลง สาหร่ายที่เลี้ยงด้วยสภาวะความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วนพบกรดไขมันจำเป็น PUFAs สูงถึง 22.5 % TFA wet weight และกรดไขมันชนิด DHA และ EPA ยังพบได้ในปริมาณที่สูงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะความเค็มที่ 30 ส่วนในพันส่วน เช่นกัน ในส่วนของการศึกษากรดไขมันชนิด ARA ยังพบปริมาณสูงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยความเค็ม 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน คือ 1.2, 1.3 %TFA wet weight ตามลำดับ ซึ่งในการศึกษครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการพบปริมาณของกรดไขมันที่จำเป็นเหล่านี้พบในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Pratoomyot et al. (2005) ที่เลี้ยงสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ด้วยอาหาร Guillard's "f/2" อุณหภูมิ 28°C ความเค็ม 30 ส่วนในพัน

ส่วน ซึ่งมีระยะเก็บเกี่ยวเหมือนการศึกษาในครั้งนี คือในระยะ stationary phase ซึ่งพบ EPA ปริมาณ 11.32% และพบ DHA ในปริมาณ 0.80% TFA wet weight

ผลผลิตชีวมวลการเจริญเติบโต และองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายขนาดเล็ก จะแตกต่างกันตามสภาพแวดล้อมและการเพาะเลี้ยง (Becker, 2004) อาหาร อุณหภูมิ ความเข้มข้น คลื่นแสง และระยะเก็บเกี่ยว ล้วนมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมี García et al.(2012) รายงานว่าความเค็มและระยะการเจริญเติบโต เป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อคุณค่าอาหารในสาหร่าย *Thalassiosira weissflogii* โดยในระดับความเค็มต่ำ ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนจะมีค่าสูงขึ้น ในขณะที่ความเค็มสูง อัตราการเติบโต ปริมาณเซลล์ และองค์ประกอบอินทรีย์สารจะลดลง ส่วนไขมันมีการเปลี่ยนแปลงน้อย ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจะมีค่าสูงสุดที่ความเค็ม 25 และ 30 ส่วนในพันส่วน ในช่วงของระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase)

สาหร่ายขนาดเล็กหลายสายพันธุ์จะทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็ม แต่องค์ประกอบทางเคมี (ปริมาณโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต) จะเปลี่ยนแปลงจากปัจจัยดังกล่าว (Richmond, 1986) จากการศึกษาแสดงให้เห็นผลของความเค็มต่อปริมาณคุณค่าอาหาร และองค์ประกอบกรดไขมันในสาหร่ายทะเล เช่น การเลี้ยงสาหร่าย 3 ชนิด *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis oculata* และ *Nitzschia frustulum* ที่ความเค็มแตกต่างกัน พบว่าปริมาณกรดไขมันเพิ่มขึ้นเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี ส่วนปริมาณไขมันของสาหร่าย *Isochrysis* sp. และ *N. oculata* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นในช่วง 10 - 35 ส่วนในพันส่วน ส่วนในสาหร่าย *N. frustulum* เมื่อเลี้ยงในความเค็ม 10 - 15 ส่วนในพันส่วน พบว่ามีปริมาณของไขมันลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่อย่างไรก็ตามระดับของความเค็มมีผลเพียงเล็กน้อยต่อปริมาณของโปรตีน และพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กไดอะตอมเหล่านี้ที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน เหมาะสมสำหรับการสร้างและผลิตกรดไขมันจำเป็นชนิด DHA ของสาหร่าย *Isochrysis* sp. ความเค็ม 20 - 30 ส่วนในพันส่วน เหมาะสำหรับการผลิต EPA ของสาหร่าย *N. oculata* และความเค็มที่ 10-15 ส่วนในพันส่วนมีความเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไขมันชนิด EPA และ DHA ของสาหร่าย *N. frustulum* และจากการศึกษาผลของความเค็มต่อการผลิตกรดไขมันใน *Dunaliella* sp. เมื่อความเค็มในอาหารเพิ่มขึ้นจาก 0.4 M เป็น 4 M NaCl ทำให้มีปริมาณของกรดไขมันกลุ่ม PUFAs ลดลง และการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มสาหร่ายสีเขียวจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella vulgaris* และ *Acutodesmus obliquus* ด้วยอาหาร BG11 ความเค็มตั้งแต่ 0.06 ถึง 0.4 M NaCl พบองค์ประกอบกรดไขมัน ของ *C. vulgaris* และ *A. obliquus* มีความแตกต่างกัน ส่วนการศึกษาเมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Nannochloropsis* sp. ในสถานะความเค็มที่ 13, 27 และ 40 g/l ของ NaCl พบว่า LC-PUFA กับ EPA มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Renaud and Parry, 1994; Xu and Beardall, 1997; Pal et al., 2011; Pandit et al., 2017)

## การศึกษาปริมาณของคลอโรฟิลล์ $a$ และ $c$ ของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยความเค็มต่างระดับ

จากการศึกษาปริมาณของคลอโรฟิลล์  $a$  และ  $c$  ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมทั้ง 3 ชนิด คือ *Thalassiosira* sp. , *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp. ที่เลี้ยงด้วยความเค็มแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 10, 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ในอาหารเหลวสูตร Guillard “f/2” โดยทำการเพาะเลี้ยงถึงระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ทำการเก็บตัวอย่างที่ทำการทดลองทุก 24 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการทดลอง จากการศึกษาปริมาณของคลอโรฟิลล์  $a$  ในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Thalassiosira* sp. สูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยความเค็มที่ 30 ส่วนในพันส่วน ( $375.09 \text{ mg/m}^3$ ) ของระยะการเจริญเติบโตคงที่ พบปริมาณคลอโรฟิลล์  $a$  รองลงมาในสภาวะความเค็มที่ 20, 10 และ 40 ส่วนในพันส่วน ( $333.66$ ,  $299.83$  และ  $286.95 \text{ mg/m}^3$  ตามลำดับ, รูปภาพที่ 20) การสร้างปริมาณคลอโรฟิลล์  $a$  ในสาหร่ายชนิดนี้จะมีปริมาณสูงเพิ่มขึ้นตามอายุของสาหร่ายโดยเฉพาะสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเค็มที่ 20 ส่วนในพันส่วน ที่มีการเพิ่มปริมาณของคลอโรฟิลล์  $a$  เป็นการเพิ่มปริมาณแบบทวีคูณซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Thalassiosira* sp. ชนิดนี้ภายใต้สภาวะความเค็มอีก 4 ระดับ ส่วนในการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์  $c$  ในสาหร่ายชนิดนี้พบว่าปริมาณสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน คือ  $139.48 \text{ mg/m}^3$  พบปริมาณรองลงมาในสภาวะความเค็มที่ 20, 10 และ 40 ส่วนในพันส่วน ( $117.72$  ,  $110.92$  และ  $110.13 \text{ mg/m}^3$  ตามลำดับ, รูปภาพที่ 21) คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Pisal และ Lele (2005) ซึ่งได้ทำการศึกษาปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายขนาดเล็ก *Dunaliella salina* ภายใต้สภาวะความเค็มและมีปริมาณของไนโตรเจนแตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่าความเค็มมีผลต่อปริมาณการผลิตคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายขนาดเล็กยิ่งถ้ามีความเค็มสูงขึ้นจะทำให้การสร้างคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้ลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาวิจัยของ Liang et al. (2014) ที่ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณของคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม 2 ชนิด คือ *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros gracilis* พบว่าเมื่อมีการเพิ่มระดับความเค็มสูงขึ้นมีผลทำให้การสร้างปริมาณของคลอโรฟิลล์ลดลง จากการศึกษาครั้งนี้ผลของการเลือกใช้ระดับความเค็มเพื่อให้สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมมีการเจริญเติบโตทั้งทางด้านความหนาแน่นเซลล์และทางด้านปริมาณการผลิตคลอโรฟิลล์มีการส่งผลโดยตรงกับการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้

## สรุปและข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมชนิดอื่นที่มีศักยภาพในการเพาะขยายพันธุ์ได้อย่างต่อเนื่องและเป็นปริมาณมากเพื่อเป็นการนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างต่อเนื่องและสูงสุด
2. ควรมีการพัฒนาการเจริญเติบโตและปริมาณของแคโรทีนอยด์รวมเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ดังนั้นในการศึกษาขั้นสูงถัดไปควรมีการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรม โดยเฉพาะใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรชายฝั่งได้อย่างเต็มที่และมีความยั่งยืน
3. ควรมีการศึกษาสภาวะของธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อปริมาณการสร้างกรดไขมัน EPA และ DHA เพื่อการได้ใช้ประโยชน์ของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น
4. ควรมีการศึกษาถึงปัจจัยที่แตกต่างจากงานวิจัยในครั้งนี้ เช่น ระดับความเข้มแสง ระยะเวลาการให้แสงสว่าง ระดับของความเป็นกรดเบส ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิต ต่อการผลิต คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์รวม ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์
5. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมทางด้านการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมที่พบในบริเวณชายฝั่งของจังหวัดชลบุรี

## ผลผลิต (Output)

จากการวิจัยของโครงการได้มีการนำเสนอผลงานวิจัยที่การประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 21 ประจำปี 2563 วันที่ 27-28 มกราคม 2563 ณ อาคาร AG08 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้รับการตีพิมพ์ในวารสารของการประชุมดังกล่าวข้างต้น

1. อมรรัตน์ กนกรุ่ง, สุพัตรา ตะเหลบ, ณิชชา สิรินนธ์ธนา และ คคนางค์ รัตนานิคม.2563.ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม 3 ชนิด *Thalassiosira* sp., *Odontella* sp. และ *Chaetoceros* sp. เลี้ยงด้วยระดับความเค็มที่แตกต่างกัน. วารสารแก่นเกษตร 48 ฉบับพิเศษ 1: 975-982.
2. ณิชชา สิรินนธ์ธนา และ อมรรัตน์ กนกรุ่ง.2563. ผลของความเค็มต่อคุณค่าทางอาหารและกรดไขมันจำเป็นในสาหร่ายขนาดเล็ก *Thalassiosira* sp. วารสารแก่นเกษตร 48 ฉบับพิเศษ 1: 899-906.

## เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ 2534. อาหารสัตว์น้ำ กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. แพลงก์ตอนพืช. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2543. คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิภูษิต มัณฑะวิจิตร. 2548. ระเบียบวิธีการวิจัยทางวาริชศาสตร์. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. ISBN: 9741332246.
- อมรรัตน์ กนกรุ่ง, รวีวรรณ วัฒนดิถ, ศิริวรรณ ชูศรี และ ทิฆัมพร นามกร. 2017. ผลของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ขนาดเล็ก 4 ชนิด *Tetraselmis gracilis*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis oculata* และ *Isochrysis galbana*. วารสารแก่นเกษตร 45 ฉบับพิเศษ 1 : 852 – 858.
- Asulabh, K.S., Supriya, G. and Ramachandra, T.V. 2012. Effect of salinity concentration on growth rate and lipid concentration in *Microcystis* sp., *Chlorococum* sp. and *Chaetoceros* sp. National conference on conservation and management of wetland ecosystems. 06th – 09th November 2012 School of Environmental Sciences Mahatma Gandhi University, Kottayam, Kerala.
- Günter Döhler. 1984. Effect of UV-B radiation on the marine diatoms *Lauderia annulata* and *Thalassiosira rotula* grown in different salinities. *Marine Biology*. Volume 83. 247 – 253.
- Ying Liang, Y., Sun, M., Tian, C., Cao, C. and Li, Z. (2014). Effects of salinity stress on the growth and chlorophyll fluorescence of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae). *Botanica Marina*. 57(6): 469–476.
- Carmelo Tomas. 1977. *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press. 858 pp
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrate. In, W.L. Smith & M.H. Chanley (eds.). Culture of marine invertebrate animals. New York: Plenum Press. 29-60.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander. 1995. Carotenoids volume 1A: Isolation and Analysis. ISBN 3-7643-2908-4.
- Carvalho, L.M.G.D., Gomes, P.B., Godoy, R.L.D.O., Pacheco, S., Monte, P.H.F.D., Carvalho, J.L.V.D., Nutti, M.R., Neves, A.C.L., Vieira, A.C.R.A. and Ramos, S.R.R. 2012. Total carotenoid content,  $\alpha$ - carotene and  $\beta$  – carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food research International*. 47. 337-340.

- Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane-Stanlet. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- Christie, W.W. 2003. Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipid Analysis: Isolation, Separation of Lipids (3rd ed.) The Oily press. United Kingdom
- Pratoomyot, J., P. Srivilas and T. Noiraksar. 2005. Fatty acids composition of 10 microalgal species. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 27(6) :1180-1187.
- Richmond, A. 1986. Cell response to environmental factors. In: A. Richmond (ed.). Handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Boca Raton.
- Renaud, S. M. and D. L. Parry. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology.* 6(3): 347-356.
- Raghavan, G., Haridevi, C.K. and Gopinathan, C.P. 2008. Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. *Aquaculture Research.* 39: 1053-1058.
- Xu, X.Q. and J. Beardall. 1997. Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalga from an antarctic hypersaline lake. *Phytochemistry.* 45: 655-658.
- Pal, D., I. Khozin-Goldberg, Z. Cohen and S. Boussiba. 2011. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol.* 90(4): 1429-1441.
- Pandit, PR., MH, Fulekar and MSL, Karuna. 2017. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. *Environ Sci Pollut Res Int.* 24(15):13437-13451.

ภาคผนวก

## อาหารเหลวสูตร Guillard “f/2”

### Stock 1

$\text{NaNO}_3$  75 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 g

adjust the final volume to 1 liter with filtered distilled water

### Stock 2

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  3.15 g

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  4.36 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01 g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0058 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.022 g

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.01 g

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.18 g

adjust the final volume to 1 liter with filtered distilled water

### Stock 3

$\text{NaSiO}_3$  15 g

adjust the final volume to 1 liter with filtered distilled water



## อาหารเหลวสูตร Guillard “f/2”ดัดแปลง สูตรที่ 1

### Stock 1

$\text{NaNO}_3$  37.50 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 g

Adjust the final volume to 1 liter with filtered distilled water

Used 1 ml per 1 liter of seawater

### Stock 2

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  3.15 g

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  4.36 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01 g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0058 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.022 g

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.01 g

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.18 g

Adjust the final volume to 1 liter with filtered distilled water

Used 1 ml per 1 liter of seawater

### Stock 3

$\text{NaSiO}_3$  15 g

Adjust the final volume to 1 liter with filtered distilled water

Used 1 ml per 1 liter of seawater

## อาหารเหลวสูตร Guillard “f/2”ดัดแปลง สูตรที่ 2

### Stock 1

$\text{NaNO}_3$  112.50 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 g

Adjust the final volume to 1 liter with filtered distilled water

Used 1 ml per 1 liter of seawater

### Stock 2

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  3.15 g

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  4.36 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01 g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0058 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.022 g

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.01 g

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.18 g

Adjust the final volume to 1 liter with filtered distilled water

Used 1 ml per 1 liter of seawater

### Stock 3

$\text{NaSiO}_3$  15 g

Adjust the final volume to 1 liter with filtered distilled water

Used 1 ml per 1 liter of seawater

### อาหารเหลวสูตร Guillard “f/2”ดัดแปลง สูตรที่ 3

#### Stock 1

$\text{NaNO}_3$  150 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 g

Adjust the final volume to 1 liter with filtered distilled water

Used 1 ml per 1 liter of seawater

#### Stock 2

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  3.15 g

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  4.36 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01 g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0058 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.022 g

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.01 g

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.18 g

Adjust the final volume to 1 liter with filtered distilled water

Used 1 ml per 1 liter of seawater

#### Stock 3

$\text{NaSiO}_3$  15 g

Adjust the final volume to 1 liter with filtered distilled water

Used 1 ml per 1 liter of seawater