

การเติบโตของไดอะตอมขนาดเล็ก *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 ที่แยกจากปากแม่น้ำ จังหวัดจันทบุรี ในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์และแบบต่อเนื่อง

Growth of a small-sized diatom *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 isolated from estuary, Chanthaburi Province, under batch and continuous cultivation

ปวีณา ตปนิยวรวงศ์^{1,2*}, ณัฐชา พึงละออ³, ปาริชาติ ชุมทอง^{1,2}, มะลิวัลย์ คุตะโค³
และ สรวิศ เผ่าทองสุข^{1,2}

Paveena Tapaneeyaworawong^{1,2*}, Natchya Peungla-aw³, Parichat Chumtong²,
Maliwan Kutako³ and Sorawit Powtongsook^{1,2}

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้ได้คัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กที่แยกได้จากบริเวณปากแม่น้ำ ในจังหวัดจันทบุรี โดยใช้เทคนิค single cell isolation โดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร F/2 พบว่าคัดแยกได้ไดอะตอม *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 ซึ่งเซลล์มีความยาว 33 ไมครอน จากการเพาะเลี้ยง *A. coffeaeformis* BUUC1601 แบบแบทช์ในขวดปริมาตร 1 ลิตร พบว่าสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 220.44×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 2.54 ต่อวัน ส่วนการขยายปริมาตรการเพาะเลี้ยงเป็น 5 และ 10 ลิตร พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเติบโตจำเพาะลดลงเล็กน้อยเป็น 1.55 และ 1.24 ต่อวัน ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องในขวดปริมาตร 2 ลิตรด้วยอัตราการเจือจางในช่วง 0.17-1.27 ต่อวัน พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องได้นานกว่า 50 วัน และที่อัตราการเจือจาง 1.27 ต่อวัน มีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย $57.39 \pm 7.21 \times 10^4 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อวัน ให้ผลผลิตเซลล์สูงที่สุด 73.00×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อวัน
คำสำคัญ: ไดอะตอม, การคัดแยก, การเลี้ยงแบบแบทช์, การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง, ผลผลิตมวลชีวภาพ

ABSTRACT: In this study, the microalgae were isolated from estuary in Chanthaburi Province using single cell isolation technique and culturing with F/2 culture medium. After isolation and molecular identification, the diatom *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 with the cell length of 33 microns was selected. Batch culture of *A. coffeaeformis* BUUC1601 in 1L bottle provided the maximum cell density of 220.44×10^4 cells/ml and specific growth rate of 2.54 per day. Scaling up the culture to 5 and 10 L slightly reduced specific growth rates to 1.55 and 1.24 per day, respectively. Continuous culture of *A. coffeaeformis* BUUC1601 in 2 L bioreactor with the dilution rate between 0.17-1.27 per day was accomplished for more than 50 days. With the dilution rate of 1.27 per day in continuous cultivation, average cell density of $57.39 \pm 7.21 \times 10^4 \times 10^4$ cell/ml/day and the maximum productivity of 73.00×10^7 cells/L/day were achieved.

Keywords: diatom, isolation, *Amphora coffeaeformis*, continuous culture, biomass productivity

¹ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency

² ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Center of Excellence for Marine Biotechnology, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University

³ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี
Faculty of Marine Technology, Burapha University, Chanthaburi Campus

* Corresponding author: paveena.tap@biotec.or.th

บทนำ

สาหร่ายน้ำเค็มขนาดเล็กถูกนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อน ไม่ว่าจะเป็นลูกกุ้ง ลูกปู ลูกปลา หรือแม้แต่หอยสองฝา สาหร่ายที่ถูกนำมาใช้เป็นอาหารได้แก่ *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Tetraselmis*, *Isochrysis* และ *Nannochloropsis* โดยให้กับสัตว์น้ำโดยตรงหรือให้เป็นอาหารแพลงก์ตอนสัตว์ และนำแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหารแก่ลูกสัตว์น้ำอีกต่อหนึ่ง (Duerr, 1997) นอกจากนี้ประโยชน์ในการเป็นอาหารสำหรับอาหารสัตว์น้ำแล้ว สาหร่ายน้ำเค็มขนาดเล็กยังถูกนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตน้ำมันเป็นพลังงานทางเลือก เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กก็ยังมีข้อได้เปรียบอยู่มากได้แก่ 1) สาหร่ายขนาดเล็กให้ผลผลิตน้ำมันต่อพื้นที่สูงกว่าพืชชนิดอื่น 2) สาหร่ายขนาดเล็กเติบโตในน้ำแต่ใช้น้ำน้อยกว่าพืชบก 3) สาหร่ายขนาดเล็กสามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย หรือน้ำทะเล โดยไม่ต้องแย่งพื้นที่เพาะปลูกกับพืชชนิดอื่นๆ 4) สาหร่ายขนาดเล็กสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เปลี่ยนเป็นมวลชีวภาพได้ 5) สามารถใช้น้ำเสียหรือน้ำทิ้งมาเป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กได้ 6) สาหร่ายขนาดเล็กไม่จำเป็นต้องใช้ยาปราบศัตรูพืช 7) เศษสาหร่ายหลังจากการสกัดน้ำมันแล้วยังสามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ย หรือนำมาผลิตเป็นเอทานอล หรือมีเทนได้อีกด้วย และ 8) องค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายสามารถควบคุมได้จากการกำหนดสภาวะการเลี้ยง (Rodolfi et al., 2008)

จากความต้องการสาหร่ายสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติพิเศษ ได้แก่ สาหร่ายที่มีเซลล์ขนาดเล็กมาก มีคุณค่าทางอาหารสูง และสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่ายด้วยการตกตะกอน ทำให้จำเป็นต้องทำการแยกสายพันธุ์สาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยงานวิจัยนี้มีเป้าหมายเป็นสาหร่ายกลุ่มเพนเนทไดอะตอม (pennate diatom) ที่มีขนาดเซลล์เล็กเพียง 5 ไมครอน ซึ่งจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นใช้เป็นอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์ที่มีขนาดเล็กมาก การใช้เป็นอาหารสำหรับตัวอ่อนหอยฝาเดียว และ

การเลือกไดอะตอมที่สามารถตกตะกอนได้เอง ทำให้การแยกผลผลิตไดอะตอมออกจากอาหารเพาะเชื้อทำได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่มีราคาแพง โดยในการวิจัยครั้งนี้ทำการแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำทะเลธรรมชาติในจังหวัดจันทบุรี มาทำการเพาะเลี้ยงในระบบการเลี้ยงแบบแบทช์และต่อเนื่องในสภาวะห้องปฏิบัติการเพื่อประเมินผลผลิตที่ได้จากระบบการเลี้ยงที่แตกต่างกัน

วิธีการศึกษา

สถานที่และการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณคลองปากน้ำ จังหวัดจันทบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรเจนในเตรต และฟอสเฟต (Strickland and Parsons, 1972) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.21, 0.14 และ 0.90 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรและ 0.15 มล.ฟอสฟอรัสต่อลิตร ตามลำดับ และน้ำมีความเค็ม 31 เพื่อสอย ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 4.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และ pH เท่ากับ 7.92

การแยกสาหร่ายขนาดเล็ก *Amphora coffeaeformis* BUUC1601

นำน้ำที่เก็บได้จากคลองปากน้ำ หมู่ 1 ตำบลกระแจะ อำเภอนายายอาม จังหวัด จันทบุรี (Latitude: 12.67043N, Longitude: 101.841369E) มาทำการส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อแยกเซลล์สาหร่ายให้ได้เซลล์เดี่ยวด้วยเทคนิค Single cell isolation จากนั้นนำเซลล์เดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 PSU (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ) บ่มในสภาวะห้องปฏิบัติการที่ให้แสงตลอดเวลา (ประมาณ 1,000 ลักซ์) หลังจากนั้นทำมีความบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยการเขี่ย (streak) ลงบนอาหารแข็งสูตร F/2 เมื่อพบโคโลนีเดี่ยวและย้ายที่ลงในอาหารเหลว รอจนกระทั่งสาหร่ายเติบโตจึงเก็บเซลล์ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง 12000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที นำตะกอนเซลล์มาสกัด DNA ตามวิธีที่ดัดแปลง

มาจาก Winnepeenninckx (1993) จากนั้นเพิ่มขึ้นส่วน 18s RNA gene ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis และนำ PCR product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit จากนั้นทำการโคลนและสกัดพลาสมิดด้วย HiYield™ Plasmid Mini Kit แล้วทำการส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดสาหร่าย

การเพาะเลี้ยง *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 ในระบบการเลี้ยงแบบแบทช์

นำไคอะตอมขนาดเล็ก *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่แยกได้จากบริเวณคลองปากน้ำ จังหวัดจันทบุรี มาทำการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในขวดแก้ว 1, 5 และ 10 ลิตร ด้วยความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 5.67, 12.67 และ 8.90×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งสิ้น 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 (ความเค็ม 30 PSU) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเพาะเลี้ยงไคอะตอมภายในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 5,500 ลักซ์ ด้วยหลอด LED ตลอดเวลา เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้แตกตะกอนจึงต้องมีการกวนตลอดเวลา โดยใช้เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) ร่วมกับการให้อากาศตลอดเวลา และติดตามการเติบโตของการนับจำนวนด้วยสไลด์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน และคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะของไคอะตอมตามวิธีของ Becker (1994) วิเคราะห์ข้อมูลโดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเติบโตจำเพาะของสาหร่าย ด้วยวิธี One-way Anova ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS

การเพาะเลี้ยงไคอะตอม *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 แบบต่อเนื่อง

การศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงไคอะตอมขนาดเล็ก *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่แยกได้จากธรรมชาติในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

เป็นการเลี้ยงที่มีการเติมอาหารให้กับสาหร่ายตลอดเวลาด้วยเครื่องสูบน้ำแบบรีดสาย (Masterflex C/L model 77120-62) ที่จะทำหน้าควบคุมอัตราการไหลเข้าของอาหารเพาะเชื้อ ในขณะที่เดียวกันผลผลิตจะไหลออกจากท่อด้านบนด้วยแรงดันอากาศเข้าขวดเก็บผลผลิต ก่อนทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะทำการเลี้ยงสาหร่ายแบบแบทช์ในขวดแก้วขนาด 2 ลิตรเป็นเวลา 3-4 วัน จนสาหร่ายเติบโตอยู่ในระยะที่วุ้นคือสาหร่ายมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น จึงทำการเริ่มการเลี้ยงสาหร่ายในขวดแก้วขนาด 2 ลิตรแบบต่อเนื่อง โดยเริ่มเติมอาหารด้วยอัตราการเจือจาง 0.2 ต่อวัน เมื่อความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจือจางคงที่จึงทำการปรับอัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นเป็น 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.2 ต่อวัน ตามลำดับโดยอัตราการเจือจางคำนวณได้จาก $D=F/V$ โดยที่ D = อัตราการเจือจาง (ต่อวัน), F =อัตราการไหลของน้ำเลี้ยง (ลิตรต่อวัน) และ V =ปริมาตรการทำงานของถังเลี้ยง (ลิตร) (Bailey and Ollis, 1986) ในระหว่างการทดลองได้ติดตามการเติบโตของสาหร่ายด้วยการนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวัดปริมาณผลผลิตที่ได้เพื่อคำนวณอัตราการเติบโตทุกวัน วิเคราะห์ข้อมูลโดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลผลิตของสาหร่าย ด้วยวิธี One-way Anova ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการศึกษา

การจำแนกชนิด

จากการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาทำการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาพบว่าเป็นสาหร่ายในกลุ่มไคอะตอมชนิด *Amphora coffeaeformis* โดยให้ชื่อสายพันธุ์ BUUC1601 ไคอะตอมนี้มีขนาดประมาณ 5 ไมครอน

การเติบโตของสาหร่าย *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *A. coffeaeformis* BUUC

1601 แบบแบทช์โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $5.67 \pm 1.33 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขวดแก้วปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 6 วัน พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 2.54 ต่อวัน (ในวันที่ 0-1 ของการเลี้ยง) มีความหนาแน่นสูงสุดถึง $220.44 \pm 53.21 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Figure 1) ในวันที่ 4 ของการเลี้ยง ส่วนการทดลองเพิ่มปริมาตรการเพาะเลี้ยงไดอะตอมในขวดแก้ว 5 ล. เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น $10.89 \pm 1.32 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จนในวันที่ 4 ของการเลี้ยง สาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ $211.33 \pm 30.18 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด

เท่ากับ 1.55 ต่อวัน ในวันที่ 0-1 ของการเลี้ยง (Figure 1) และเมื่อทำการขยายปริมาตรการเลี้ยงเป็นปริมาตร 10 ลิตร เมื่อทำการเลี้ยงที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น $7.62 \pm 2.98 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเติบโตเพิ่มจำนวนจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $166.67 \pm 10.10 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.24 ต่อวัน ในวันที่ 0-2 ของการเลี้ยง จากการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเติบโตจำเพาะและความหนาแน่นเซลล์สูงสุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

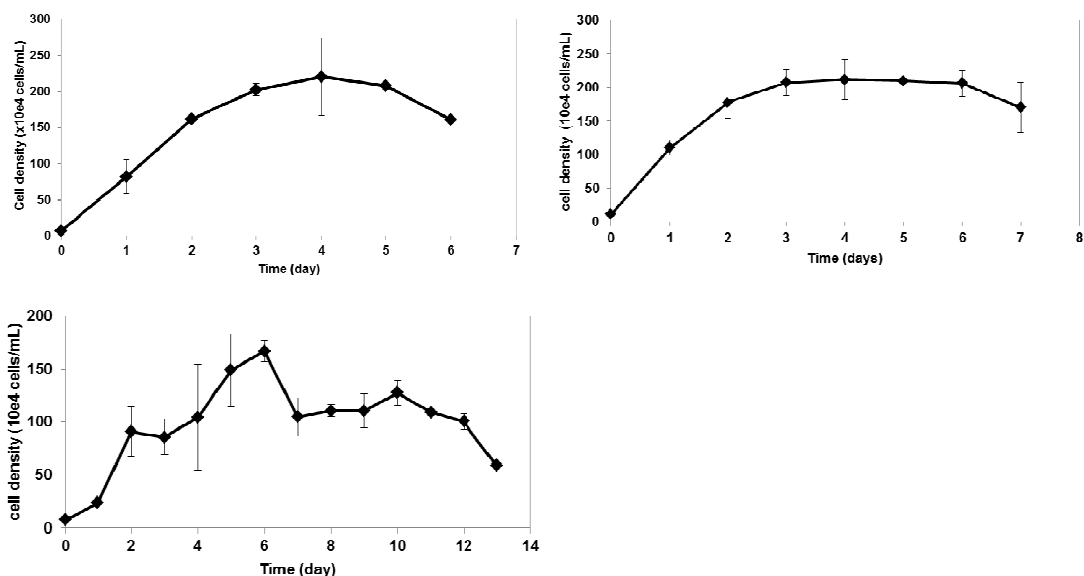


Figure 1 Growth of *A. coffeaeformis* BUUC1601 in 1 L (left), 5L (right) and 10L (bottom) bottles under batch culture condition.

การเติบโตของสาหร่าย *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

Figure 2 แสดงให้เห็นการเติบโตของสาหร่าย *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยเริ่มจากการเลี้ยงสาหร่ายแบบแบทช์เป็นเวลา 2 วัน จนสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์ $175.00 \pm 22.21 \times 10^4$ เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร จึงเริ่มทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจาง 0.17 ± 0.03 ต่อวัน มีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย $186.21 \pm 28.17 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการปรับอัตราการเจือจางขึ้นเป็น 0.44 ± 0.03 , 0.62 ± 0.02 , 0.83 ± 0.02 และ 1.27 ± 0.07 ต่อวัน ตามลำดับ พบว่ามีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย 117.44 ± 38.21 , 54.57 ± 7.77 , 49.17 ± 10.31 และ $57.39 \pm 7.21 \times 10^4$ เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อคำนวณผลผลิตมวลชีวภาพพบว่าที่ระดับอัตราการเจือจาง 0.17 ± 0.03 , 0.44 ± 0.03 , 0.62 ± 0.02 , 0.83 ± 0.02 และ 1.27 ± 0.07 ต่อวัน มีผลผลิตมวลชีวภาพเท่ากับ 31.19, 51.33, 33.90, 40.69 และ 73.00×10^7 เซลล์ต่อลิตรวัน ตาม

ลำดับ โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 50 วัน จากการทดสอบทางสถิติพบว่าที่ระดับอัตราการเจือจาง 1.27 ต่อวัน ให้ผลผลิตเซลล์สูงสุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

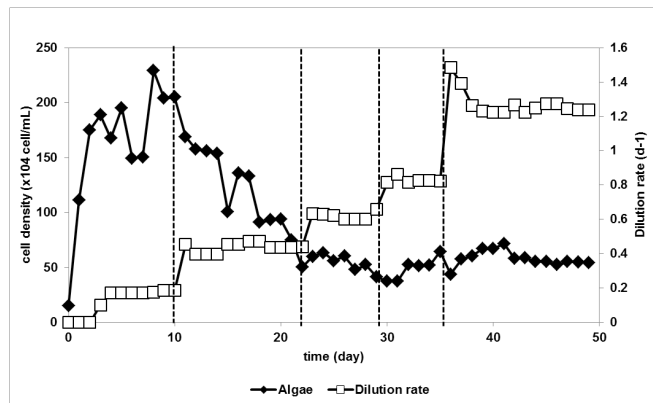


Figure 5 Growth of *A. coffeaeformis* BUUC1601 in 2 L bottle under continuous culture condition

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำในจังหวัดจันทบุรีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Single cell isolation แล้วทำการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางอนุชีวโมเลกุลพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กที่แยกได้เป็นไดอะตอมชนิด *Amphora coffeaeformis* ผลการเลี้ยงไดอะตอมภายในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเพาะเลี้ยงสูตรกลิลาร์ด F/2 พบว่า *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่เลี้ยงในระบบการเลี้ยงแบบแบทช์ในขวดแก้วขนาด 1 ลิ. ให้ความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด ($220.44 \pm 53.21 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร, 2.54 ต่อวัน) เนื่องจากขวดแก้วขนาด 1 ลิตรสามารถรับแสงได้ดีกว่าในขวด 5 และ 10 ลิตร เนื่องจากแสงมีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายโดยปกติสาหร่ายสามารถเติบโตได้ดีในช่วงแสง 5,000 – 10,000 ลักซ์ และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเติบโตของไดอะตอม *A. coffeaeformis* BUUC1601 ทั้งที่เพาะเลี้ยงในขวดขนาด 1, 5 และ 10 ลิตร ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้มีอัตราการเติบโตสูงกว่าการศึกษาของ Doan et

al. (2011) ที่ทำการศึกษการเติบโตของไดอะตอมที่เกาะอยู่บนสาหร่ายขนาดใหญ่ ในบริเวณชายฝั่งประเทศสิงคโปร์มาทำการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ด้วยอาหารสูตรกลิลาร์ด F/2 พบว่าเป็นไดอะตอม *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira* sp. และ *Chaetoceros* sp. และมีอัตราการเติบโตเท่ากับ 0.95, 0.61 และ 0.87 ต่อวัน และเมื่อเปรียบเทียบกับเบนทิกไดอะตอมในการศึกษาของ Yang et al. (2014) พบว่าอัตราการเติบโตจำเพาะของ *Navicula patrickae*, *Nitzschia panduriformis*, *Navicula thienemannii*, *Nitzschia longissima* และ *Navicula atomus* มีค่าเท่ากับ 0.17, 0.18, 0.07, 0.27 และ 0.13 ต่อวัน แสดงให้เห็นว่าไดอะตอม *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่เป็นไดอะตอมในบริเวณปากแม่น้ำที่ไหลลงสู่อ่าวไทย บริเวณจังหวัดจันทบุรี มีศักยภาพที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อนำมวลชีวภาพไปใช้ประโยชน์ได้เพราะมีการเติบโตได้อย่างรวดเร็ว เมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *A. coffeaeformis* BUUC1601 ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจางตั้งแต่ 0.17 ± 0.03 จนถึง 1.27 ± 0.07 ต่อวัน พบว่าเมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น

ความหนาแน่นเซลล์จะลดลงซึ่งเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ออกจากระบบ (washout) (Shozen et al., 2001) แต่จากการวิจัยในครั้งนี้ถึงแม้ว่าจะเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นเป็น 1.28 ต่อวัน ก็ยังไม่พบสภาวะการชะล้างเซลล์ออกจากระบบ และยังให้ผลผลิตมวลชีวภาพสูงสุดที่อัตราเจือจาง 1.27 ต่อวัน โดยการเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นการเลี้ยงที่มีการเติมอาหารเพาะเชื้อให้กับสาหร่ายอย่างต่อเนื่อง ทำให้สาหร่ายเติบโตได้ตลอดเวลา อีกทั้งการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแบบต่อเนื่องให้ผลผลิตสูงกว่าการเลี้ยงแบบแบทช์ (James and Al-Khars, 1990) นอกจากนี้ให้ผลผลิตที่สูงแล้วการเลี้ยงแบบต่อเนื่องยังสามารถสร้างเป็นระบบอัตโนมัติทำให้ลดการใช้แรงงานลงได้และยังให้สาหร่ายคงที่ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ เนื่องจากควบคุมสภาวะที่ใช้ในการเติบโตได้ (Marchetti et al., 2012)

ไดอะตอมถือได้ว่าเป็นแหล่งของสารประกอบทางชีวภาพที่มีมูลค่าสูง จึงมีหลายงานวิจัยที่ได้ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงไดอะตอมเพื่อเป็นแหล่งของกรดไขมัน เช่น Wen and Chen (2002) ได้เพาะเลี้ยงไดอะตอม *Nitzschia laevis* แบบต่อเนื่องเพื่อผลิตกรดไขมัน EPA (Eicosapentaenoic Acid) พบว่าการเลี้ยงไดอะตอม *Nitzschia laevis* ที่อัตราการเจือจาง 0.5 ต่อวัน และใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดไขมัน EPA สูงสุด ส่วนไดอะตอม *Amphora subcutiscuba* สามารถผลิต EPA ได้สูงถึง 11.9-19.0% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (Wah et al., 2015) จึงชี้ให้เห็นว่าไดอะตอม *A. coffeaeformis* BUUC1601 อาจใช้เป็นแหล่งผลิต EPA ได้ นอกจากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมขนาดเล็กเพื่อใช้ผลิตสารมูลค่าสูงหรือเพื่อผลิตพลังงานทางเลือกแล้ว ไดอะตอมยังมีประโยชน์ในการเป็นอาหารสำหรับลูกสัตว์น้ำขนาดเล็กอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งหอยเป่าชื่อ *Haliotis discus* ซึ่ง Gordon et al. (2006) โดยใช้ไดอะตอม *Navicula cf lenzii* และ *Amphora lucia* ร่วมกันในการอนุบาลลูกหอยเป่าชื่อในระยะลงเกาะพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดได้ถึงร้อยละ 50 อัตราการสร้างเปลือก 36 ไมครอนต่อวัน และมีขนาด 1.4 มม. ใน 30 วันหลังลงเกาะ

สรุป

จากการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากบริเวณปากแม่น้ำ จังหวัดจันทบุรี จำแนกได้เป็นไดอะตอม *Amphora* sp. BUUC1601 และสามารถเพาะเลี้ยงไดอะตอมได้ผลดีภายในสภาวะห้องปฏิบัติการทั้งในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์และแบบต่อเนื่อง โดยในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในขวดแก้ว 1 ลิตร มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 2.54 ต่อวัน มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด $220.44 \pm 53.21 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในขวด 5 ลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องพบว่าที่อัตราการเจือจาง 1.27 ต่อวัน สามารถให้ผลผลิตไดอะตอมได้ดีที่สุดโดยมีผลผลิตสูงสุด 77.00×10^7 เซลล์ต่อลิตรต่อวัน

คำขอบคุณ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 42/2559

เอกสารอ้างอิง

- Abu-Rezq, T. S. J. Al-Shimmari, and P. Dias. 1997. Live food production using batch culture and chemostat system in Kuwait. *Hydrobiologia*. 358: 173-178.
- Bailey, J. E., and D. F. Oillis. 1986. *Biochemical Engineering Fundamental*.^{2^{ed}}. McGraw-Hill. Singapore.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, UK.
- Doan, T. T. Y., B. Sivaloganathan, and J. P. Obbard. 2011. Screening of marine microalgae for biodiesel feedback. *Biomass and Bioenergy*. 35: 2534-2544.
- Duerr, E. O., A. Molnar, and V. Sato. 1998. Culture microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology*. 7: 65-70.
- Gordon, N., A. Neori, M. Shpigel, J. Lee, and S. Harpaz. 2006. Effect of diatom diets on growth and survival of the abalone *Haliotis discus hannai* postlarvae. *Aquaculture*. 252: 225-233.

- Guillard, R.R.L. 1973. Method for Microflagellates and Nanoplankton. In J.R. Stein (Ed.), *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, UK.
- James, C. M., and A. M. Al-Khars. 1990. An intensive continuous culture system using tubular photoreactors for producing microalgae. *Aquaculture*. 87: 381-393.
- Marchetti, J., G. Bougaran, L. Le Dean, C. Megrier, E. Lukomska, R. Kass, E. Olivo, R. Baron, R. Robert, and J. P. Cadoret. 2012. Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture*. 326-329: 106-115.
- Ramirez, E. E., M. A. Gonzalez, A. S. Cifuentes, I. Inostroza, and R. E. Urrutia. 2015. Culture and growth of two benthic diatoms species isolated from the Salar Del Huasco (North of Chile, 20°S) at different conditions of temperature, light and nutrient. *Gayana Botany*. 72(2): 165-176.
- Rodolfi, L., G. C. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, and M. R. Tredici. 2008. Microalgae for oil: Selection, introduction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*. 102: 100-112.
- Shozen, K., I. Umeda, T. Nakashima, and A. Honma. 2001. Continuous cultivation of a diatom, *Chaetoceros ceratosporum*, in deep-sea water pumped from Toyama Bay. *IOA Newsletter*. 12(4).
- Strickland, J.D.H., and T. R. Parson. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Research of board of Canada, Canada.
- Wah, N. B., A. L. Ahmad, D. C. Juinn, D. C. J. Chieh, and A. T. S. Hwai. 2015. Changes in lipid profiles of a tropical benthic diatom in different cultivation temperature. *Asian Journal of Applied Science and Engineering*. 4(20): 91-101.
- Wen, Z. Y., and F. Chen. 2002. Continuous cultivation of the Diatom *Nitzschia laevis* for Eicosapentaenoic Acid Production: physiological study and process optimization. *Biotechnology Progress*. 18: 21-28.
- Winnepenninckx, B., T. Backeljau, and R. Wacquier. 1993. Extraction of High Molecular Weight DNA from Molluscs. *Trends Genetics*. 9: 40.
- Yang, M. W. Zhao, and X. Xie. 2014. Effect of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth of five species of marine benthic diatoms. *Acta Ecologica Sinica*. 34: 311-319.