ผลของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อลักษณะทางสัณฐาน การเจริญเติบโต โปรตีนและพฤกษเคมีของสาหร่าย *Spirulina platensis*

พิทักษ์พงษ์ หอมนาน

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
มีนาคม 2565

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

ผลของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อลักษณะทางสัณฐาน การเจริญเติบโต โปรตีนและพฤกษเคมีของสาหร่าย *Spirulina platensis*

พิทักษ์พงษ์ หอมนาน

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
มีนาคม 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

EFFECT OF NITROGEN AND PHOSPHORUS ON MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS, GROWTH, PROTEIN AND PHYTOCHEMICALS IN *SPIRULINA PLATENSIS*

PITAKPONG HOMNAN

A Thesis Submitted to University of Phayao

in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Master of Science Degree in Environmental Science

March 2022

Copyright 2022 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อลักษณะทางสัณฐาน การเจริญเติบโต โปรตีนและพฤกษเคมีของสาหร่าย *Spirulina platensis*

ของ พิทักษ์พงษ์ หอมนาน

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชยากร ภูมาศ)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัฐภูมิ พรหมณะ)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร. สุมล นิลรัตน์นิศากร)

..... คณบดีคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ต่อพงศ์ กรีธาชาติ)

เรื่อง: ผลของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อลักษณะทางสัณฐาน การเจริญเติบโต โปรตีนและพฤกษเคมีของสาหร่าย *Spirulina platensis*

ผู้วิจัย: พิทักษ์พงษ์ หอมนาน, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2564

อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัฐภูมิ พรหมณะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.สุมล นิลรัตน์นิศากร

คำสำคัญ: สูตรอาหารเพาะเลี้ยง, Spirulina platensis, ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, สัณฐาน, การเจริญเติบโต, พฤกษเคมี

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อลักษณะทางสัณฐาน การเจริญเติบโต ปริมาณโปรตีนรวม และพฤกษเคมีของสาหร่าย *Spirulina platensis* ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง 6 กรรมวิธี ได้แก่ กรรมวิธี ORG1, กรรมวิธี ORG2, กรรมวิธี ORG3, กรรมวิธี ORG4, กรรมวิธี ORG5, กรรมวิธี ORG6 เปรียบเทียบกับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานปรับปรุง (MZ และ MJU) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะค่า pH 10 ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บผลโดยการนับจำนวนเส้นสาย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร วัดปริมาณน้ำหนักแห้งชีวมวลและศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก ๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า สูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง กรรมวิธี ORG3 และกรรมวิธี ORG5 มีศักยภาพเพียงพอในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* โดยไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของเส้นสายในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน และกรรมวิธี ORG5 มีความเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* เพื่อผลิตสารพฤกษเคมี เนื่องจากสามารถผลิตแคโรทีนอยด์รวม และคลอโรฟิลล์ เอ ได้เทียบเท่ากับสูตรอาหารมาตรฐาน แต่อาจต้องใช้ชีวมวล 2 เท่า และ 3 เท่า สำหรับการผลิตสารไฟโคบิลิโปรตีน และปริมาณโปรตีนรวม ตามลำดับ ทั้งนี้ถือว่ามีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจเนื่องจากสูตรอาหารดัดแปลงมีต้นทุนที่ต่ำกว่าสูตรอาหารมาตรฐานอยู่มาก และยังสามารถลดการใช้สารเคมี ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้

Title: EFFECT OF NITROGEN AND PHOSPHORUS ON MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS, GROWTH, PROTEIN AND PHYTOCHEMICALS IN *SPIRULINA PLATENSIS*

Author: Pitakpong Homnan, Thesis: M.S. (Environmental Science), University of Phayao, 2021

Advisor: Assistant Professor Dr. Rattapoom Prommana Co-advisor Dr.Sumol Nilratnisakon

Keywords: Media, Spirulina platensis, Nitrogen, Phosphorus, Organic cultivation, Morphological characteristics, Growth

ABSTRACT

This study aims to evaluate and compare the nitrogen and phosphorus on morphological characteristic, growth, total protein and phytochemicals in *Spirulina platensis* that cultivated with modified culture media (ORG1, ORG2, ORG3, ORG4, ORG5 and ORG6) and modified standard culture media (MZ and MJU). The microalgal cultivated with a working volume of 1,000 mL, carried out with the pH 10 and cultivated at room temperature. *S. platensis* growth was determined every 3 days for 30 days. The biomass concentration was determined by optical density at 560 nm (OD_{560}) and measured the biomass dry weight. The filament count and morphological characteristics (shape, color and length of filaments) were determined under compound light microscope. As the results, the modified culture media, ORG3 and ORG5 had the potential to promote the growth of *S. platensis* without resulting in morphological changes during 12 days of cultivation period and ORG5 was suitable for cultivated *S. platensis* to produce phytochemicals because it can produce total carotenoids and Chlorophyll a, equivalent to modified standard culture media. However, 2 and 3 times of biomass cultivated by ORG5 may be required for the production of phycobiliprotein and total protein, respectively. Furthermore, the ORG5 economically is worth as modified culture medium and it can also reduce the use of chemicals which may affects the environment.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษาอาจารย์ผู้ควบคุมการทำวิจัย อาจารย์ผู้เป็นกรรมการสอบและผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัฐภูมิ พรหมณะ และ ดร.สุมล นิลรัตน์นิศากร ที่ให้ความกรุณาวางแผน ประสานงาน ควบคุม กำกับดูแลในการทำวิจัย รวมทั้งตรวจสอบ แก้ไขการศึกษาจนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชยากร ภูมาศ ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณโครงการส่งเสริมบุคลากรด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและนวัตกรรมจากมหาวิทยาลัยและสถาบันวิจัยของภาครัฐ ไปปฏิบัติงานเพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันในภาคเอกชน (Talent mobility) สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สป.อว.) และสำนักงานสภานโยบายการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรมแห่งชาติ (สอวช.) ขอขอบคุณ นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ในการทำปฏิบัติการ ตลอดจนอาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม และศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ และตรวจสอบคุณภาพมาตรฐานผลิตภัณฑ์สถาบันนวัตกรรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีทุกท่านที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณ ดร.สุลาวัลย์ ยศธนู และ ดร.เขมวดี ปรีดาลิขิต อาจารย์ประจำหลักสูตรสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์และการแปลผลทางสถิติในงานวิจัย ขอขอบคุณ อาจารย์ธนปริญ สำเริง ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจน นางสาวรุ่งทิภา อ่องใจงาม นายณัฐกิตติ์ ตาคำไชย นางสาวจิดาภา กอวงค์ นางสาวภานุชนารถ บุญมาสืบ และนางสาวณิชาภัทร รอดเจริญ ที่ให้ความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการและการดำเนินงานวิจัยจนลุล่วงเหนือสิ่งอื่นใด ขอขอบคุณ คุณพ่อและคุณแม่ คนในครอบครัว และกัลยาณมิตรทุกท่านที่คอยอบรม ดูแลเอาใจใส่ และเป็นกำลังใจตลอดมาคุณค่าอันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแดผู้มีพระคุณทุกท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะก่อประโยชน์ให้แก่ผู้ที่สนใจสืบไป จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

พิทักษ์พงษ์ หอมนาน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

สมมติฐานการวิจัย 2

ขอบเขตการศึกษา 2

นิยามศัพท์เฉพาะ 4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

ความรู้เบื้องต้นของสาหร่าย 6

การจัดจำแนกสาหร่าย (Classification) 9

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับสาหร่าย *S. platensis* 11

ความรู้เบื้องต้นของปุ๋ย 22

ความรู้เบื้องต้นของปูนขาว 23

เอกสารที่เกี่ยวข้อง 24

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 27

กลุ่มตัวอย่าง 27
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี 27
การวางแผนการวิจัย และแผนการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* 29
การวิเคราะห์ข้อมูล 32
แผนผังการศึกษา 42
บทที่ 4 ผลการวิจัย 44
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน และการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* 44
การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis* 61
การวิเคราะห์ความคุ้มค่าทางเศษฐกิจของสูตรอาหารเพาะเลี้ยง 65
บทที่ 5 สรุปผล 67
สรุปผลการวิจัย 67
อภิปรายผลการทดลอง 67
บรรณานุกรม 74
ภาคผนวก 82
ภาคผนวก ก องค์ประกอบสารละลายปุ๋ย 83
ภาคผนวก ข การศึกษาอิทธิพลร่วมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis* 84
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) เพื่อหาความสัมพันธ์ของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงต่อปริมาณโปรตีนรวมและองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis* 87
ภาคผนวก ง ภาพเปรียบเทียบขวดเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* วันที่ 12 ของการทดลอง 88
ภาคผนวก จ ภาพประกอบการวิจัย 89
ประวัติผู้วิจัย 96

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 โภชนาการและองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย S. platensis 20

ตาราง 2 การเปรียบเทียบลักษณะเส้นสายของสาหร่าย S. platensis ในแต่ละกรรมวิธีเป็นระยะเวลา 30 วัน 45

ตาราง 3 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย Spirulina platensis ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร 47

ตาราง 4 จำนวนเส้นสายของสาหร่าย Spirulina platensis ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน ($\times 10^7$ เส้นสาย/ลิตร) 50

ตาราง 5 ค่าน้ำหนักแห้งชีวมวลของสาหร่าย Spirulina platensis ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน (กรัมต่อลิตร).....53

ตาราง 6 ผลวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารอาหารในแต่ละกรรมวิธีเพาะเลี้ยงสาหร่าย Spirulina platensis.....56

ตาราง 7 การเปรียบเทียบความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจของอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย Spirulina platensis 66

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae).....6
ภาพ 2 สาหร่ายขนาดใหญ่ (Macroalgae).....7
ภาพ 3 โครงสร้างของเซลล์โพรแคริโอต (สาหร่ายแกมน้ำเงิน) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....9
ภาพ 4 วงจรชีวิตของสาหร่าย S. platensis.....13
ภาพ 5 การเจริญเติบโตของสาหร่าย.....14
ภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของไฟโคไซยานิน (Chemical structure of C-phycocyanin).....17
ภาพ 7 โครงสร้างทางเคมีของคลอโรฟิลล์ เอ (Chemical structure of Chlorophyll a).....18
ภาพ 8 โครงสร้างทางเคมีของบีตา-แคโรทีน(Chemical structure of β-Carotene).....19
ภาพ 9 ตารางสี่เหลี่ยมของชุด Haemocytometer ใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า 37
ภาพ 10 แผนการศึกษา.....42
ภาพ 11 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย Spirulina platensis ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ 46
ภาพ 12 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย Spirulina platensis 48
ภาพ 13 จำนวนเส้นสายของสาหร่าย Spirulina platensis ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ 49
ภาพ 14 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากจำนวนเส้นสายของสาหร่าย Spirulina platensis.....51
ภาพ 15 ค่าน้ำหนักแห้งชีวมวลของสาหร่าย Spirulina platensis ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธี 52
ภาพ 16 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากค่าน้ำหนักแห้งชีวมวลของสาหร่าย 54
ภาพ 17 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนเตรตแต่ละกรรมวิธีเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....57
ภาพ 18 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนไตรต์แต่ละกรรมวิธีเพาะเลี้ยงสาหร่าย Spirulina platensis.....57
ภาพ 19 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียแต่ละกรรมวิธีเพาะเลี้ยง 58
ภาพ 20 เปรียบเทียบปริมาณสารอาหารต่าง ๆ กลุ่มไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง 59

ภาพ 21 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลง TKN และสารอินทรีย์ไนโตรเจนแต่ละกรรมวิธี 60
ภาพ 22 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟอสฟอรัสรวมแต่ละกรรมวิธีเพาะเลี้ยง 61
ภาพ 23 ปริมาณโปรตีนรวมในสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ.....62
ภาพ 24 ปริมาณรงควัตถุกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีน ในสาหร่าย Spirulina platensis 63
ภาพ 25 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในสาหร่าย Spirulina platensis ที่เพาะเลี้ยง.....64
ภาพ 26 ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ในสาหร่าย Spirulina platensis ที่เพาะเลี้ยง 65
ภาพ 27 การเปลี่ยนรูปของสารประกอบไนโตรเจนทางชีวภาพ 71
ภาพ 28 เปรียบเทียบขวดเพาะเลี้ยงสาหร่าย S. platensis วันที่ 12 ของการทดลอง.....88
ภาพ 29 การเติมหัวเชื้อสาหร่าย S. platensis ลงในขวดเพาะเลี้ยง 89
ภาพ 30 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย S. platensis ในชั้นเพาะเลี้ยงแบบสุ่ม.....89
ภาพ 31 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน และการนับจำนวนเส้นสายของสาหร่าย.....90
ภาพ 32 การนับจำนวนเส้นสายของสาหร่าย S. platensis ด้วยชุด Haemocytometer.....90
ภาพ 33 การกรองตัวอย่างสาหร่าย S. platensis เพื่อวัดค่าน้ำหนักแห้งชีวมวล..... 91
ภาพ 34 การกรองตัวอย่างสาหร่าย S. platensis เพื่ออบแห้งและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวม 91
ภาพ 35 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่าย S. platensis 92
ภาพ 36 การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีนของสาหร่าย S. platensis 92
ภาพ 37 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย S. platensis.....93
ภาพ 38 อุปกรณ์สำหรับการกรองเพื่อเก็บตัวอย่างอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย S. platensis.....94
ภาพ 39 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ ในวันที่ 0 ของการทดลอง.....94
ภาพ 40 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ ในวันที่ 30 ของการทดลอง.....95

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สาหร่าย *Spirulina platensis* เป็นสาหร่ายที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน หรือ Division Cyanophyta เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโพรแคริโอต (Prokaryote) คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2546) สาหร่าย *S. platensis* มีลักษณะเซลล์เป็นรูปทรงกระบอก หลายเซลล์เรียงต่อกันจนกลายเป็นเส้นสาย โดยเส้นสายของสาหร่าย *S. platensis* จะมีการบิดเกลียว (Helix) (Ajay, 2002) ภายในเซลล์มีองค์ประกอบของรงควัตถุที่ช่วยในกระบวนการสร้างอาหารและพลังงานโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เช่น คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) และด้วยคุณค่าทางโภชนาการที่โดดเด่นดังเช่นการมีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 70 ของน้ำหนักแห้งชีวมวล กรดอะมิโน และวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิด (ขจรเกียรติ ศรีนวลสม, 2550; Venkataraman, 1983) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ช่วยขับของเสียออกจากร่างกาย และฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Tulika, 2013) จากคุณสมบัติและคุณค่าทางโภชนาการดังกล่าว ทำให้สาหร่าย *S. platensis* ได้รับความสนใจและถูกนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ทั้งอาหารของคนและอาหารของสัตว์ แต่ด้วยการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเป็นอาหารของคนนั้นต้องอาศัยกรรมวิธีผลิตที่สะอาดและใช้สารอาหารหลากหลายชนิดเพื่อยกระดับความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภค จึงทำให้ต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง ทำให้งานวิจัยจำนวนมาก มุ่งเน้นพัฒนากรรมวิธีการผลิตสาหร่าย *S. platensis* เพื่อเพิ่มผลผลิตชีวมวล ลดต้นทุนการผลิตและตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค แต่ด้วยกรรมวิธีการผลิตโดยทั่วไปนั้นมีการใช้สารเคมีสังเคราะห์ (Habib, 2008) ดังเช่นในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐาน มีการใช้สารประกอบไนโตรเจน และฟอสฟอรัสในปริมาณที่มาก ซึ่งการใช้สารเคมีในแต่ละครั้งนั้นจะสามารถใช้ประโยชน์ได้เพียงร้อยละ 25 เท่านั้น ส่วนอีกร้อยละ 75 จะตกค้างในสิ่งแวดล้อม (รสสุคนธ์ พุ่มพันธุ์วงศ์, 2548) หากมีการตกค้างในสิ่งแวดล้อมอาจส่งผลต่อระบบนิเวศ หรือแหล่งน้ำ จนอาจก่อให้เกิดการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพได้ (พงศ์ศักดิ์ หนูพันธ์ และรัฐชา ชัยชนะ, 2557) และกรรมวิธีการผลิตโดยทั่วไปนั้น มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง แต่หลายครั้งที่มีการรายงานเกี่ยวกับสภาวะที่ไม่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงซึ่งอาจส่งผลให้เส้นสายของสาหร่าย *S. platensis* มีรูปร่างที่ผิดปกติ

เช่น เส้นสายที่เหยียดตรง หรือเกิดการคลายเกลียวของเส้นสาย แต่ทั้งนี้ยังมีรายงานไม่มากนักที่อธิบายถึงผลของวิธีการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารดัดแปลงต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและคุณค่าทางพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis*

ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ปริมาณโปรตีนรวม และองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ในอาหารเหลวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง

2. เพื่อทราบผลการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน และการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง

3. เพื่อทราบปริมาณโปรตีนรวม และองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis* ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง

สมมติฐานการวิจัย

ปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง มีผลต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ปริมาณโปรตีนรวม และองค์ประกอบทางพฤกษเคมี ของสาหร่าย *S. platensis*

ขอบเขตการศึกษา

1. ด้านการศึกษา

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ในอาหารเพาะเลี้ยง

1.1.1 การวิเคราะห์แอมโมเนีย

1.1.2 การวิเคราะห์ไนไตรต์

1.1.3 การวิเคราะห์ไนเตรต

1.1.4 การวิเคราะห์ทีเคเอ็น (Total Kjeldahl Nitrogen)

1.1.5 การวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total Phosphorus)

1.2 การวัดการเจริญ

1.2.1 การนับจำนวนเส้นสาย (เส้นสายต่อลิตร)

1.2.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 560 นาโนเมตร

1.2.3 การวัดปริมาณน้ำหนักแห้งชีวมวล (กรัมต่อลิตร)

1.2.4 การหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate)

1.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน

1.3.1 การถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4 เท่า, 10 เท่า, 40 เท่า และ 100 เท่า

1.4 การวัดองค์ประกอบทางพฤกษเคมี

1.4.1 การวัดปริมาณโปรตีนรวม

1.4.2 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

1.4.3 การวัดปริมาณแคโรทีนอยด์

1.4.4 การวัดปริมาณไฟโคไซยานิน

2. ด้านระยะเวลา

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ในอาหารเพาะเลี้ยง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ถึง เดือนมิถุนายน 2563

2.2 การศึกษาการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของสาหร่าย *S. platensis* ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ถึง เดือนมิถุนายน 2563

2.3 การศึกษาคุณค่าทางพฤกษเคมี ตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึง เดือนกรกฎาคม 2563

3. ด้านสถานที่

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ในอาหารเพาะเลี้ยง ห้อง SEEN 2401 คณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา

3.2 ศึกษาการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของสาหร่าย *S. platensis*

3.2.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ห้อง SEEN 2201 คณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา

3.2.2 การนับจำนวนเส้นสาย และการถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ห้อง SEEN 2306B คณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา

3.2.3 การวัดค่าการดูดกลืนแสง ห้อง SEEN 2405 คณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา

3.2.4 การวัดปริมาณน้ำหนักแห้งชีวมวล ห้อง SEEN 2406 คณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา

3.3 ศึกษาคุณค่าทางพฤกษเคมี

3.3.1 วัดปริมาณโปรตีนรวม และองค์ประกอบทางพฤกษเคมี ห้องปฏิบัติการสาขาชีวเคมีและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

นิยามศัพท์เฉพาะ

กรรมวิธี คือ การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนประกอบต่าง ๆ ตามสูตรอาหารเพาะเลี้ยงในการศึกษา

สูตรอาหารเพาะเลี้ยง คือ สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* โดยมีอัตราส่วนและส่วนปร

MZ สูตรอาหารมาตรฐานปรับปรุง (Modified Zarrouk's Medium) ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก

MJU สูตรอาหารจากห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก

ORG สูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง

CT สูตรอาหารเพาะเลี้ยง ที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงลบะกอบของสารตามแต่ละกรรมวิธี

การเพาะเลี้ยงดัดแปลง คือ การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ด้วยสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้สารละลายปุ๋ยเป็นส่วนประกอบ และทำการปรับค่า pH ด้วยสารละลายน้ำปูนใส

การเพาะเลี้ยงแบบเคมี คือ การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ด้วยสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้สารเคมีอื่น ร่วมกับสารละลายจากปุ๋ย และทำการปรับค่า pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide: NaOH)

การปนเปื้อน คือ การเจริญของสาหร่ายหรือแพลงก์ตอนชนิดอื่นในการเพาะเลี้ยงขณะทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. Platensis*

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ดีที่สุด คือ สูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้สารละลายปุ๋ยเป็นส่วนประกอบ และทำการปรับค่า pH ด้วยสารละลายน้ำปูนใส แล้วให้การเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* มากที่สุด

ชุดควบคุมเชิงบวก คือ สูตรอาหารที่ส่งเสริมให้สาหร่าย *S. platensis* มีการเจริญเติบโต ในการศึกษาครั้งนี้ คือ สูตรอาหารมาตรฐานปรับปรุง (Modified Zarrouk's Medium) และสูตรอาหารจากห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยแม่โจ้ (จงกล พรมยะ, 2549)

ชุดควบคุมเชิงลบ คือ สูตรอาหารที่ไม่ส่งเสริมให้สาหร่าย *S. platensis* มีการเจริญเติบโต ในการศึกษาครั้งนี้ คือ สูตรอาหารที่ใช้เพียงน้ำกลั่นที่ปรับค่า pH เท่ากับ 10 และสูตรอาหารที่เติมสารละลายปุ๋ย แต่ไม่มีการปรับค่า pH

สารพฤกษเคมี คือ สารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ รงควัตถุกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีน (ไฟโคไซยานิน, อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริธริน), รงควัตถุแคโรทีนอยด์รวม (Total Carotenoids), รงควัตถุคลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll a)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ลดการใช้สารเคมีในการเพาะเลี้ยงและลดโอกาสการปนเปื้อนสารเคมีในสิ่งแวดล้อมจากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis*

2. ทราบผลของการเพาะเลี้ยงดัดแปลงต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานการเจริญเติบโต ปริมาณโปรตีนรวม และองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis*

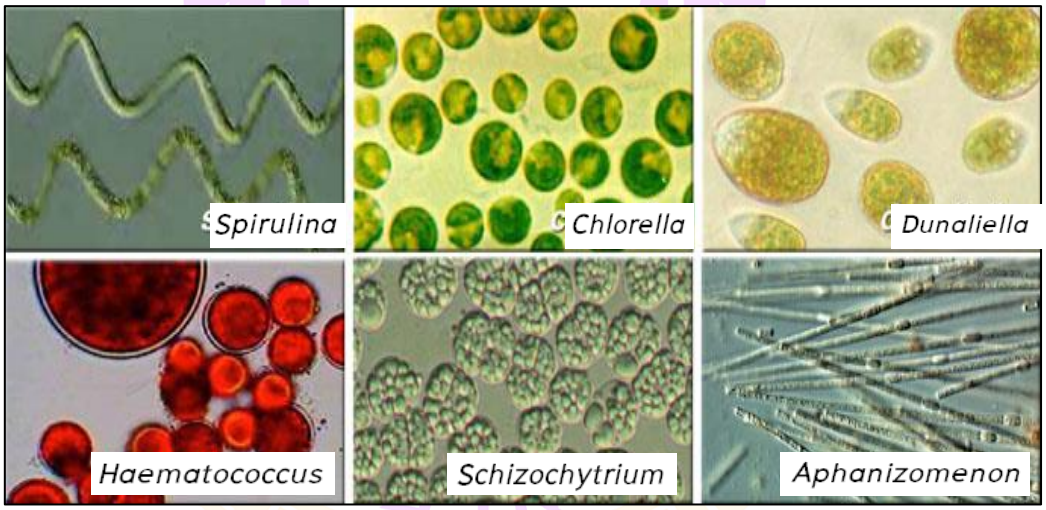
3. ทราบความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจของการเพาะเลี้ยงดัดแปลงของสาหร่าย *S. platensis*

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความรู้เบื้องต้นของสาหร่าย

ปัจจุบันได้มีการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายขนาดเล็ก จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติต่าง ๆ ของสาหร่าย (นุชนาถ แช่มช้อย, 2557) ซึ่ง Phycology หรือ Algology เป็นการศึกษาเกี่ยวกับสาหร่าย (Algae) โดยสาหร่ายจัดเป็น Thallophytes หรือ ทัลลัส (Thallus) ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายพืช แต่ไม่มีราก ใบ และลำต้นที่แท้จริง จัดเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำประเภทหนึ่งที่ไม่มีระบบท่อลำเลียง (Vascular System) มีขนาดตั้งแต่เล็กมากที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เรียกว่า สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) (ภาพ 1) ไปจนถึงมีขนาดใหญ่ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เรียกว่า สาหร่ายขนาดใหญ่ (Macroalgae) (ภาพ 2)



ภาพ 1 สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae)

ที่มา: http://www.therootstock.org/micro_algae_la

ภาพ 2 สาหร่ายขนาดใหญ่ (Macroalgae)

ที่มา: https://www.ibioworld.com/Ingredients0000000075

โดยทั่วไปสามารถพบสาหร่ายได้ตามแหล่งน้ำ ทั้งในน้ำจืด (Freshwater) น้ำทะเล (Marine) และน้ำกร่อย (Brackish) แต่อย่างไรก็ตามสามารถพบสาหร่ายได้ในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ บนโลก เช่น สาหร่ายที่เจริญเติบโตในหิมะบนเทือกเขา สาหร่ายที่อาศัยอยู่ในไลเคน สาหร่ายเซลล์เดียว (Unicellular algae) ในทะเลทราย ตลอดจนสาหร่ายที่อาศัยอยู่ในบ่อน้ำพุร้อน (Hot spring) ในแต่ระบบนิเวศของสาหร่ายนั้น สาหร่ายจะทำหน้าที่ (Function) ในการเป็นผู้ผลิต ซึ่งเป็นขั้นปฐมภูมิของห่วงโซ่อาหาร (Food chain) ทำหน้าที่ผลิตสารอินทรีย์ (Organic material) จากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ และอาศัยแสงอาทิตย์ในการกระตุ้นผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยใช้คลอโรฟิลล์ เอ เป็นหลักในการรับพลังงานจากแสง (Antenna molecules) นอกจากนี้สาหร่ายยังสามารถสังเคราะห์ก๊าซออกซิเจน (O_2) ซึ่งมีความจำเป็นต่อกระบวนการเมแทบอริซึม (Metabolism) ของสิ่งมีชีวิตที่เป็นผู้บริโภค (Consumer organism) สาหร่ายสามารถดำรงชีวิตได้ทั้งแบบออโตโทรฟิก (Autotrophic) คือ สร้างอาหารได้เองโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และแบบเฮเทอโรโทรฟิค (Heterotrophic) คือ ไม่สามารถสร้างอาหารได้เองจากสารอนินทรีย์จึงต้องมีการบริโภคสารอินทรีย์อื่นเข้าสู่เซลล์

ส่วนประกอบของสาหร่าย

สาหร่ายประกอบด้วยโครงสร้าง 3 ส่วนที่สำคัญ (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527) ได้แก่

1. ผนังเซลล์ (Cell wall)

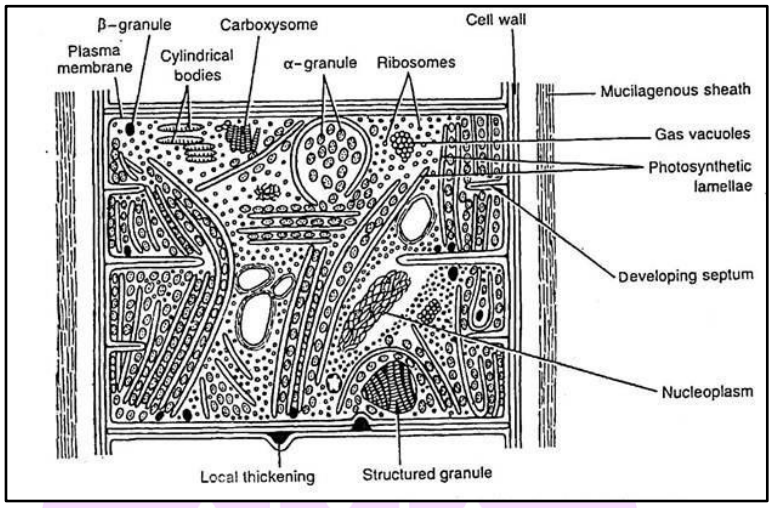
ผนังเซลล์ของสาหร่ายจะมีสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต บางชนิดเป็นพวกซิลิเกต บางชนิดประกอบด้วยโปรตีน ซึ่งมีหินปูน เหล็ก หรือไคตินหุ้มอยู่ สาหร่ายโดยทั่วไปจะมีผนังเซลล์ 2 ชั้น คือ ผนังชั้นนอกซึ่งจะเป็นสารพวกเพกทิน มีลักษณะอ่อนนิ่มและเป็นเมือก ส่วนผนังชั้นในเป็นสารพวกเซลลูโลสทำหน้าที่ในการให้ความแข็งแรงกับเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถคงรูปอยู่ได้

2. นิวเคลียส (Nucleus)

นิวเคลียสเป็นส่วนที่สำคัญที่สุดของเซลล์ สาหร่ายบางชนิดเป็นพวกโพรแคริโอต (Procaryote) เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria or Blue-green algae) จะไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริง แต่เก็บดีเอ็นเอ (DNA) ไว้ในนิวคลอยด์รีเจียน (Nucleoid Region) และไม่มีออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้มเมมเบรน ส่วนสาหร่ายที่เป็นยูแคริโอต (Eukaryote) จะมีนิวเคลียสที่แท้จริงและเก็บดีเอ็นเอไว้ในออร์แกเนลล์ที่หุ้มด้วยเยื่อเมมเบรน ทำให้โครโมโซมอยู่ภายในนิวเคลียส ไม่ปะปนกับออร์แกเนลล์ (Organelle) อื่น ๆ ที่อยู่ในไซโทพลาสซึม

3. ไซโตพลาสซึม (Cytoplasm)

ประกอบด้วยสารประกอบเคมีที่จำเป็นน้ำ และออร์แกเนลล์ต่าง ๆ เช่น พลาสติด (Plastid) เป็นแหล่งรวมของรงควัตถุต่าง ๆ ในเซลล์ ถ้าพลาสติดมีคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) จะทำให้มีสีเขียวเรียกว่า คลอโรพลาสต์ (Chloroplast) แต่ถ้ามีแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) จะทำให้มีสีเหลือง ส้ม หรือแดง เรียกว่า โครโมพลาสต์ (Chromoplast) ไพรีนอยด์ (Pyrenoid) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แป้ง สติกมา (Stigma) มักพบในเซลล์ที่เคลื่อนไหวได้ และแวคิวโอล (Vacuole) ทำหน้าที่ขับน้ำและของเสียออกจากเซลล์ ฯลฯ (ภาพ 3)



ภาพ 3 โครงสร้างของเซลล์โพรแคริโอต (สาหร่ายแกมน้ำเงิน) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ที่มา: http://www.biologydiscussion.com/algae/cell–structures–in–algae–ithdiaGram/46759

การจัดจำแนกสาหร่าย (Classification)

การจัดจำแนกสาหร่ายนั้น นักสาหร่ายวิทยาจะใช้เกณฑ์ในการจัดจำแนกแตกต่างกันออกไป แต่มักจะใช้เกณฑ์ตามคุณสมบัติพื้นฐานของเซลล์ เช่น รงควัตถุที่อยู่ในเซลล์ องค์ประกอบของผนังเซลล์ อาหารที่สะสมในเซลล์ หรือแม้แต่จำนวนและตำแหน่งของแฟลเจลลัม ดังเช่น Robert (2018) ซึ่งได้จัดกลุ่มสาหร่ายไว้ 4 กลุ่ม 9 ดิวิชัน โดยใช้ประเภทและองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Type and cell wall components of cell) (Robert, 2018) แต่การศึกษาครั้งนี้อ้างอิงวิธีการจัดจำแนกสาหร่ายตามหลักของ Blod and Wynne (1978) ซึ่งได้จัดจำแนกไว้ทั้งหมด 9 ดิวิชัน (Blod and Wynne, 1978) ดังนี้

1. Division Cyanophyta (Cyanobacteria) คือ กลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินซึ่งเป็นสาหร่ายกลุ่มโพรแคริโอต (Prokaryotic algae) คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส คำว่า Cyanophytes หรือ Blue–green algae เป็นคำที่ใช้อ้างถึงสาหร่ายในดิวิชัน Cyanophyta นักวิทยาศาสตร์ได้ตั้งสมมติฐานเกี่ยวกับสาหร่ายในดิวิชันนี้ว่า ได้มีวิวัฒนาการเกิดขึ้นในแหล่งน้ำจืดเมื่อ 2.5 พันล้านปีก่อน (2.5 billion years ago: 2.5 bya) (Blank, 2013) และมีการกระจายสู่สิ่งแวดล้อมที่เป็นระบบนิเวศน้ำเค็ม หรือทะเล (Marine environment) ในยุคที่มีการเพิ่มขึ้นของก๊าซออกซิเจนในบรรยากาศโลกครั้งใหญ่ (the Great Oxidation Event: GOE) เมื่อประมาณ 2.35

พันล้านปีก่อน โดยสาหร่ายพวก Cyanobacteria ได้เพิ่มระดับก๊าซออกซิเจนในบรรยากาศโดยอาศัยกระบวนสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้เกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ต้องใช้ออกซิเจน (Aerobic life) และเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของสิ่งมีชีวิตบนโลก (Schirrmeister et al., 2014) หลังจาการพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว Blank (2013) ได้อธิบายเกี่ยวกับการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส (Sucrose synthesis) โดยสาหร่าย Cyanobacteria จะสามารถสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสได้ดี เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำ (Low–salinity environment) และสาหร่ายในดิวิชันนี้มักจะมีรงควัตถุชนิด Chlorophyll a และ Phycobiliprotein เป็นหลัก

2. Division Chlorophyta (Green algae) คือ กลุ่มสาหร่ายสีเขียว Chlorophyta หรือสาหร่ายสีเขียวจะมีรงควัตถุชนิด Chlorophyll a และ b เป็นหลัก และมักจะมีการสร้างแป้งแล้วสะสมไว้ใน pyrenoid โดยทั่วไปสามารถพบสาหร่ายสีเขียวได้ทั้งในแหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำกร่อย แต่ส่วนใหญ่มักพบในแหล่งน้ำจืดมากถึงร้อยละ 90 และอีกร้อยละ 10 พบในแหล่งน้ำกร่อยและแหล่งน้ำเค็ม (Smith, 1955)

3. Division Charophyta (Stoneworts) คือ กลุ่มสาหร่ายไฟ มีลักษณะคล้ายพืชชั้นสูง เส้นสายมักแตกกิ่งแขนง มีไรซอยด์ยึดเกาะพื้นดินคล้ายราก ทัสลัสมีลักษณะเป็นข้อ (node) และปล้อง (Internode) เหมือนพืชชั้นสูง สาหร่ายไฟส่วนใหญ่มักพบในแหล่งน้ำจืด

4. Division Euglenophyta (Euglenoids) คือ กลุ่มสาหร่ายยูกลีนอยด์ สาหร่ายกลุ่มนี้ดำรงชีวิตในรูปแบบของแพลงก์ตอนพืชทั้งหมด (Phytoplankton) สาหร่ายในกลุ่มนี้ทุกชนิดมีแฟลเจลลัมที่ใช้ช่วยในการเคลื่อนที่ และยังสามารถเจริญได้ดีในแหล่งน้ำที่มีสารอาหารสูงได้มากกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่น ๆ

5. Division Phaeophyta (Brown algae) คือ กลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาล เป็นสาหร่ายที่ทัลลัสมีขนาดใหญ่ สาหร่ายกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มักพบในแหล่งน้ำเค็ม และเป็นพวกสาหร่ายยึดเกาะ ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาลจะประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลสและกรดอัลจินิก (alginic acid) ซึ่งนิยมนำมาสกัดสารอัลจิน (Algin) หรืออัลจิเนต (Alginate) มาใช้ประโยชน์ได้

6. Division Chrysophyta (Chrysophytes) คือ กลุ่มสาหร่ายคริสโซไฟต์ สาหร่ายกลุ่มนี้มักดำรงชีวิตในรูปแบบของแพลงก์ตอนพืช คือ มีการล่องลอยอย่างอิสระ และบางชนิดเป็นสาหร่ายยึดเกาะ โดยสามารถพบได้ทั้งในแหล่งน้ำจืด และแหล่งน้ำเค็ม รูปร่างของสาหร่ายในกลุ่มนี้จะมีลักษณะเป็นรูปทรงเรขาคณิต โดยชนิดของสาหร่ายในกลุ่มนี้มักเป็นที่รู้จักกันดี คือ ไดอะตอม

7. Division Pyrrhophyta (Dinoflagellate) คือ กลุ่มสาหร่ายไดโนแฟลเจลเลต โดยปกติมักพบสาหร่ายกลุ่มนี้ได้ทั้งแหล่งน้ำจืด และแหล่งน้ำเค็ม ดำรงชีวิตในรูปแบบของแพลงก์ตอน

พืช เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว ผนังเซลล์เป็นเซลลูโลส สาหร่ายกลุ่มนี้จะมีแฟลเจลลัม 2 เส้น ช่วยในการเคลื่อนที่ ในทางนิเวศวิทยาสาหร่ายกลุ่มนี้จะเป็นผู้ผลิต ซึ่งมีปริมาณรองจากสาหร่ายกลุ่มไดอะตอม หรือกลุ่มสาหร่ายคริสโซไฟต์ สาหร่ายกลุ่มนี้มักเป็นสาหร่ายที่สร้างสารพิษซึ่งมีฤทธิ์ต่อระบบประสาท เมื่อมีสาหร่ายกลุ่มนี้จำนวนมากในแหล่งน้ำเค็มหรือทะเลจะทำให้มองเห็นผิวน้ำเป็นสีแดง ที่เรียกว่า ปรากฏการณ์ขี้ปลาวาฬ หรือ Red tide (Hoppenrath and Juan, 2012)

8. Division Cryptophyta (Cryptomonads) คือ กลุ่มสาหร่ายคริปโตโมแนดส์ โดยปกติสามารถพบสาหร่ายกลุ่มนี้ได้ทั้งในแหล่งน้ำจืดและแหล่งน้ำเค็ม รูปร่างของเซลล์ไม่สมมาตร มีแฟลเจลลัม 2 เส้นที่มีขนาดไม่เท่ากัน มีดำรงชีวิตในรูปแบบของแพลงก์ตอนพืช (Gilson and McFadden, 2002; Archibald, 2007)

9. Division Rhodophyta (Red algae) คือ กลุ่มสาหร่ายสีแดง โดยปกติสามารถพบสาหร่ายสีแดงในแหล่งน้ำเค็มมากกว่าในแหล่งน้ำจืด ทัลลัสของสาหร่ายกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะเป็นเส้นสายที่แตกแขนงคล้ายต้นไม้เล็ก ๆ การแตกแขนงของทัลลัสมักจะแตกจากแกนกลาง (Main axis) สาหร่ายสีแดงมีความคล้ายคลึงสาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน คือ มีรงควัตถุ กลุ่มไฟโคบิลิน ซึ่งประกอบไปด้วยไฟโคไซยานินและไฟโคอิริธริน เป็นหลัก จึงนิยมนำสาหร่ายกลุ่มนี้มาใช้ประโยชน์ในหลากหลายอุตสาหกรรม และจัดเป็นสาหร่ายเศรษฐกิจที่สำคัญอีกกลุ่มหนึ่ง

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับสาหร่าย *S. platensis*

1. ข้อมูลและลักษณะทั่วไปของสาหร่าย *S. platensis*

สาหร่าย *S. platensis* หรือสาหร่ายเกลียวทอง จัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-Green Algae หรือ Cyanobacteria) เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโพรแคริโอต (Prokaryote) คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2546) สามารถจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธาน (Bold and Wynne, 1978; Venkataraman, 1983) ได้ดังนี้

Kingdom Monera

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

Order Oscillatoriales

Family Oscillatoriaceae

Genus *Spirulina*

Species *Spirulina platensis*

สาหร่าย *Spirulina* sp. ถูกค้นพบแล้วมีประมาณ 35 ชนิด ชนิดที่มีรายงานการทดลองและใช้ประโยชน์มากที่สุดคือสาหร่าย *S. platensis* และ *S. maxima* (Ciferri, 1983)

สาหร่าย *S. platensis* ประกอบด้วยเซลล์ทรงกระบอกหลายเซลล์เรียงต่อกันเป็นเส้นสายที่ไม่แตกแขนง เรียกว่า trichome เส้นสายจะบิดเป็นเกลียวตามลักษณะของสกุล (Genus) ความกว้างของเกลียว (Helix) ระยะห่างระหว่างเกลียว (Pitch) และความยาวของ Trichome (Length) จะแตกต่างกันไปตามชนิด (Species) แต่สาหร่าย *S. platensis* ชนิดเดียวกัน เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ขนาดและรูปร่างก็อาจจะแตกต่างกันด้วย เช่น เมื่อใช้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงต่างกัน พบว่าสาหร่าย *S. platensis* มีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน และหากเจริญในถังเพาะเลี้ยงที่มีการหมุนเวียนตลอดเวลา จะมีสีเข้มและมีขนาดไตรโครม (Trichome) สั้นกว่าสาหร่ายที่เจริญในถังเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการหมุนเวียนเพื่อเป็นการปรับตัวให้สามารถเคลื่อนที่ตามการหมุนเวียนของน้ำได้ดีขึ้น (สุชาติ อิงธรรมจิตร์ และคณะ, 2531)

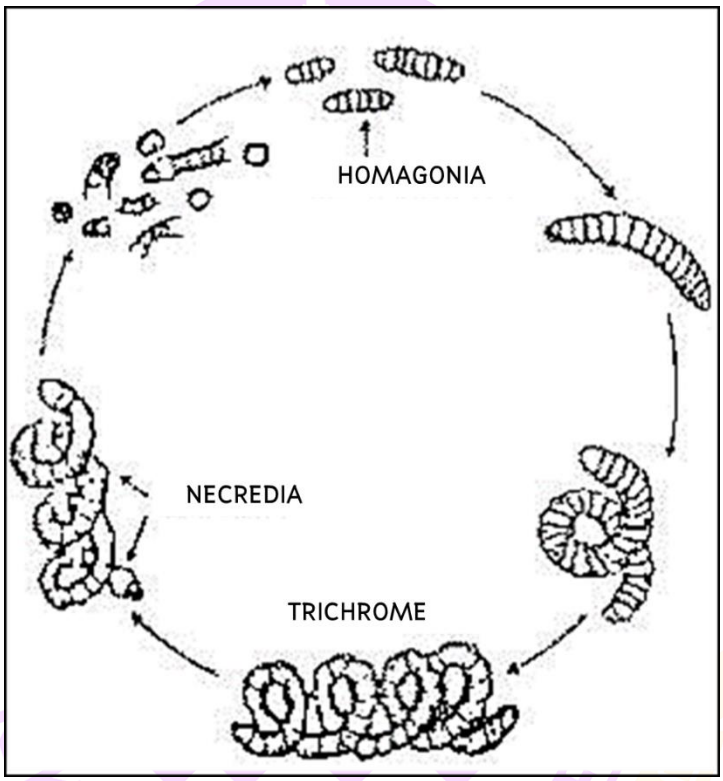
เซลล์สาหร่าย *S. platensis* ไม่มีเยื่อเมือก (Mucous Membrane) ปกคลุมเหมือนกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั่วไป ผิวของเซลล์จะไม่มีจุลินทรีย์มาเกาะ รวมถึงมีความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ที่เข้าทำอันตรายต่อเซลล์ได้สูง และสาหร่าย *S. platensis* เป็นสายพันธุ์ที่ทนความร้อน คือเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 35–40 องศาเซลเซียส ซึ่งการมีคุณสมบัติข้อนี้ทำให้สามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ ภายในเซลล์จะมีเม็ดอากาศเล็ก ๆ ส่งผลให้มีความสามารถในการลอยตัวสูง ส่วนองค์ประกอบทางพฤกษเคมี พบว่ามีปริมาณของไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) และมีโปรตีนสูง Trainor (1978) กล่าวว่าสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เจริญเพิ่มเป็นจำนวนมากตามธรรมชาติในทะเลสาบที่มีสภาพเป็นด่างค่อนข้างสูงของประเทศเม็กซิโก และประเทศในแถบแอฟริกา โดยปกติหากมีมากเกินไปจะทำให้เกิดมลพิษได้ แต่เนื่องจากสามารถนำมาบริโภคได้และมีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 65 ของน้ำหนักแห้ง จึงเป็นที่ดึงดูดความสนใจให้หลายประเทศหันมาศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้

2. วงจรชีวิตของสาหร่าย *S. platensis*

เมื่อสาหร่าย *S. platensis* โตเต็มที่จะมี ไตรโครม (Trichrome) ที่มีลักษณะของเซลล์ทรงกระบอกเรียงต่อกันโดยจะมีการพัฒนาเป็นเซลล์ชนิดพิเศษ เรียกว่า นิคริเดีย (Necredia) แล้วแตกเป็นเส้นสายขนาดเล็กประกอบด้วยเซลล์จำนวน 2–4 เซลล์ เรียกแต่ละสายว่า ฮอร์โมโกเนีย (Hormogonia) โดยอาศัยวิธี Cell Fusion ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ของฮอร์โมโกเนีย แล้วปลายทั้งสองด้านของฮอร์โมโกเนียจะค่อย ๆ ม้วนเป็นเกลียว เนื่องจากไซโตพลาสซึมมีองค์ประกอบของกรานูลที่น้อย (Glanule) ทำให้ลักษณะเซลล์ของฮอร์โมโกเนียมีลักษณะสีซีดจางแต่เมื่อฮอร์โม

โกเนียเจริญไปเป็นไตรโครม ไซโตพลาสซึมจะมีองค์ประกอบของกรานูลที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์มีสีเขียวแกมน้ำเงินที่เข้มมากขึ้น

สาหร่าย *S. platensis* มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual Reproduction) โดยการขาดเป็นท่อน (Fragmentation) ในแต่ละท่อนจะเกิดการแบ่งเซลล์ ทำให้ไตรโคม (Trichrome) มีลักษณะยืดยาว (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527)

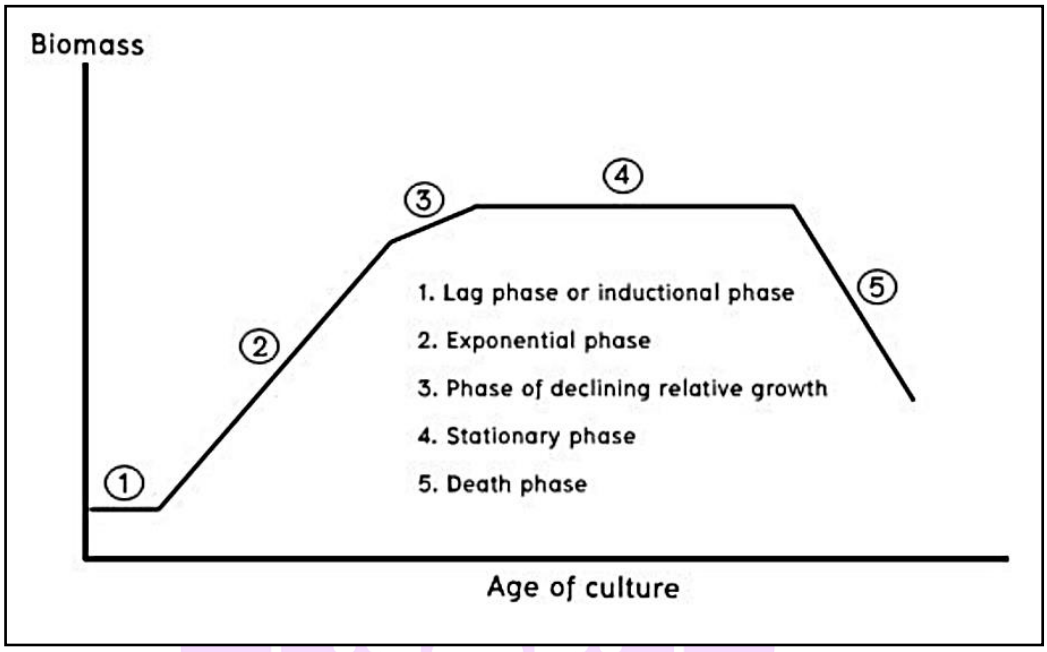


ภาพ 4 วงจรชีวิตของสาหร่าย *S. platensis*

ที่มา: Richmond, A. (1986)

3. การเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis*

ช่วงการเจริญเติบโต (Growth Phase) สาหร่าย *S. platensis* เริ่มมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์จนถึงอัตราการเจริญลดลง อาจเกิดจากการทนต่อสารพิษจำนวนมากที่เซลล์สาหร่ายปล่อยออกมาเองไม่ได้ หรือ การมีแร่ธาตุอาหาร ปริมาณแสงสว่างที่ไม่เพียงพอ (Richmond, 1986) โดยการแบ่งเซลล์ จะมีระยะการเจริญเติบโต แบ่งออกเป็น 5 ระยะ และเมื่อทำการสร้างแผนภาพจะได้แผนภาพรูปตัว S (ภาพ 5) ดังนี้



ภาพ 5 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

ที่มา: ลัดดา วงศ์รัตน์, 2543

3.1 ระยะปรับตัว (Lag Phase or Inductional Phase)

ระยะที่เซลล์ทำการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม มีการเจริญเติบโตได้น้อย เซลล์จะตายลงหากไม่มีการปรับตัว ตัวบ่งบอกถึงการปรับตัวจะเกิดขึ้นได้เร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของเซลล์และความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหารที่เลี้ยง หากมีสภาพเหมาะสมทำให้เข้าสู่ระยะต่อไปได้เร็วขึ้น

3.2 ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential Phase or Log Phase)

ระยะที่มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งเซลล์ การแพร่ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหาร คุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมี และปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงแสงสว่าง รวมไปถึง สภาวะแวดล้อม การเจริญเติบโตในระยะนี้จะเกิดขึ้นได้เร็วในระยะแรก และจะช้าลง ตามลำดับ (ธิดา เพชรมณี, 2542)

3.3 ระยะเฉื่อย (Retardation Phase or Phase of Declining Relative Growth)

ระยะที่มีการเจริญเติบโตช้า จากการมีปริมาณสารอาหารอยู่อย่างจำกัด ของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน หรือ ออกซิเจน ผลจากการที่เซลล์มีความหนาแน่น ค่า pH

เกิดการเสียสมดุล ทำให้แอมโมเนียเพิ่มขึ้น หรือแสงสว่างที่ลดลงเนื่องจากเซลล์เกิดการบังกันเอง (Auto-Shading)

3.4 ระยะคงที่ (Stationary phase)

ระยะที่มีอัตราการเจริญเติบโตและจำนวนเซลล์ที่ตายใกล้เคียงกัน ซึ่งเกิดจากธาตุอาหารลดน้อยลงเกิดการสลายตัวของเซลล์เพิ่มขึ้น และการเกิดสารพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์

3.5 ระยะตาย (Death phase)

ระยะที่เซลล์หยุดการเจริญเติบโต ธาตุอาหารลดน้อยลง เซลล์จะเริ่มตาย อัตราการตายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการเพาะเลี้ยงที่ดีจึงต้องทำการควบคุมการเลี้ยงให้มีกราฟการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียลนานที่สุด (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2543)

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย S. platensis

4.1 ธาตุอาหารและแหล่งคาร์บอน

4.1.1 คาร์บอน (Carbon)

คาร์บอนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* ซึ่งภายในเซลล์ของสาหร่าย *S. platensis* จะมีปริมาณคาร์บอนมากถึงร้อยละ 50 (เจียมจิตต์ บุญสม, 2531) โดยคาร์บอนที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้มีอยู่ 2 รูปแบบ คือ อินทรีย์คาร์บอน และอนินทรีย์คาร์บอน (ศิริวรรณ คิดประเสริฐ, 2544) คาร์บอนในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จะเป็นวัตถุดิบในการสร้างอาหารและพลังงาน โดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง การมีปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปหรือน้อยเกินไปจะส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตชีวมวลของสาหร่าย *S.* platensis ลดลง (Song-Gun, 2004)

4.1.2 ไนโตรเจน (Nitrogen)

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำหนักแห้งชีวมวลของสาหร่าย *S. platensis* โดยไนโตรเจนเป็นสารอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ ทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรท ไขมัน รวมทั้งรงควัตถุต่าง ๆ ภายในเซลล์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยสาหร่าย *S.* platensis จะสามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งในรูปของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ คือ แอมโมเนีย (NH_4^+) ไนเตรต (NO_3^-) และไนไตรท (NO_2^-) ไนโตรเจนมีหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ การขาดไนโตรเจนในสาหร่าย *S. platensis* จะทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และอาร์เอ็นเอ (RNA) ลดลง แต่จะมีผลทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น (Hosakul, 1972; Denesi, 2002; Xiaoting, 2018)

4.1.3 ฟอสฟอรัส (Phosphorus)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่มีผลต่อกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิก โดยสาหร่าย *S.* platensis จะสามารถใช้ฟอสฟอรัสได้ในรูปของออร์โธฟอสเฟต (Ortho phosphate) (ศิริวรรณ คิดประเสริฐ, 2544) ในสาหร่าย *S. platensis* จะมีปริมาณฟอสฟอรัสอยู่ประมาณร้อยละ 0.69 ของน้ำหนักแห้ง (Richmond, 1986; เจียมจิตต์ บุญสม, 2531) ในแหล่งน้ำธรรมชาติมักพบฟอสฟอรัสในรูปอนินทรีย์ฟอสเฟต ซึ่งสาหร่ายสไปรูลินาสามารถใช้ฟอสฟอรัสของสารอินทรีย์ฟอสเฟตได้ดีกว่าอนินทรีย์ฟอสเฟต (Baldia et al., 1994) การเติมสารประกอบฟอสฟอรัส เช่น โปแตสเซียมไดซัลเฟตและไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงไปในอาหารไม่มีผลทำให้การเจริญของสาหร่าย *S. platensis* เพิ่มขึ้นเนื่องจากมีปริมาณฟอสเฟตที่มากเกินไป ทำให้สาหร่ายไม่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์แสงให้เพิ่มขึ้นได้ (พิมพรรณ ตันสกุล และอารักษ์ จันทศิลป์, 2531; Chaudfari, 1980)

4.1.4 โพแทสเซียม (Potassium)

โพแทสเซียมเป็นธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์และจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง หากเกิดการขาดโพแทสเซียมจะส่งผลให้ประสิทธิภาพของการสร้างอาหารและพลังงานลดลง (ศิริวรรณ คิดประเสริฐ, 2544)

4.1.5 แมกนีเซียม (Magnesium)

เป็นธาตุอาหารที่มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม สาหร่ายจะนำไปใช้ในการสร้างคลอโรฟิลล์ โดยแมกนีเซียมเป็นส่วนประกอบของนิวเคลียสในคลอโรฟิลล์ (Bollivar, 1997) หากขาดแมกนีเซียมจะทำให้การสร้างคลอโรฟิลล์ลดลง ส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงด้วย ในขณะเดียวกันการที่ในอาหารเพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตสูงจะส่งผลให้เกิดการแบ่งเซลล์ที่มากขึ้น

4.2 แสง (Light) แสงมีอิทธิพลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เพื่อสร้างอาหารและพลังงาน ความเข้มแสงจากแหล่งกำเนิดแสง ในช่วง 1,000–4,000 ลักซ์ จะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ และคณะ, 2558) แต่ในภาพอุตสาหกรรมที่ใช้แสงแดดนั้น ความเข้มแสงที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 35,000–45,000 ลักซ์ (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2546)

4.3 การเติมอากาศ (Aeration) มีผลช่วยในการเคลื่อนที่ของอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของสาหร่ายช่วยให้สาหร่าย *S. platensis* ที่อยู่ด้านล่างมีโอกาสได้รับแสงอย่างสม่ำเสมอ ทำให้สามารถดูดซึมสารอาหารไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นการช่วยให้ก๊าซต่าง ๆ ในอากาศสามารถละลายเข้าสู่อาหารเพาะเลี้ยงได้ดีขึ้น (เพ็ญรัตน์ หงส์วิทยาการ และ

โฉมยง ไชยอุบล, 2545) ในการให้ระบบเติมอากาศนั้น หากหยุดชะงัก หรือหยุดการให้ระบบเติมอากาศ จะทำให้ไม่มีการเติมอากาศลงในระบบการเพาะเลี้ยง ทำให้ไม่เกิดการหมุนเวียนของอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งส่งผลให้สาหร่าย *S. platensis* เกิดการจับตัวกันเป็นกลุ่มร่วมด้วย (ดวงกมล ปิ่นทอง, พิทักษ์พงษ์ หอมนาน และมัญชุพร คำใส, 2561)

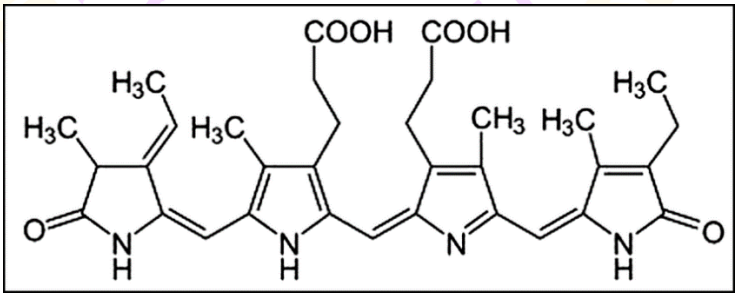
4.4 อุณหภูมิ (Temperature) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* จะอยู่ในช่วง 20–35 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 37 องศาเซลเซียสจะส่งผลให้การเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* ลดลง (Venkataraman, 1983) ซึ่งอุณหภูมิมีผลต่อการดูดซึมธาตุอาหาร และกระบวนการเมแทบอลิซึม ของเซลล์ หากอุณหภูมิสูงจะทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมสูงขึ้น ส่งผลให้การดูดซึมธาตุอาหารของสาหร่าย *S. platensis* เพิ่มขึ้นด้วย

4.5 ความเป็นกรด–ด่าง (pH) สาหร่าย *S. platensis* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่เป็นด่าง อยู่ในช่วงระหว่าง 8–10 แต่ความเป็นกรด–ด่าง ที่ต่ำกว่า 8 และสูงกว่า 11 จะทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* ลดลง (Venkataraman, 1983) ค่าความเป็นกรด–ด่างมีผลต่อการละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือปริมาณของไบคาร์บอเนต และมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์สาหร่าย *S. platensis* หากค่าความเป็นกรด–ด่าง ในอาหารเพาะเลี้ยงลดลงสามารถปรับได้ด้วยการเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตเพื่อในเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

5. สารชีวโมเลกุลของสาหร่าย *S. platensis*

รงควัตถุหรือสารที่ให้สีที่พบในสาหร่าย *S. platensis* ดังนี้

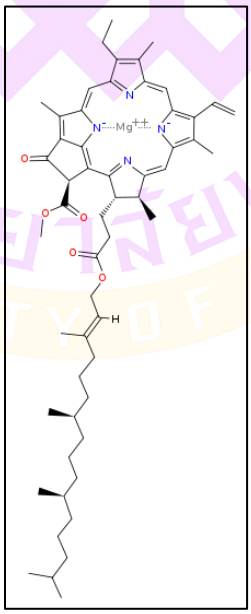
5.1 ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin)



ภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของไฟโคไซยานิน (Chemical structure of C–phycocyanin)

ไฟโคไซยานินเป็นโปรตีนที่มีสีน้ำเงิน มีความเข้มข้นร้อยละ 14 โดยน้ำหนัก ซึ่งจะพบแต่ในสาหร่าย *S. platensis* เท่านั้น ในสาหร่ายคลอเรลล่า (*Chlorella* sp.) ซึ่งเคยเป็นสาหร่ายสีเขียวที่นิยมบริโภค แต่ไม่มีไฟโคไซยานิน จึงทำให้ไม่มีสีน้ำเงินอยู่ด้วย (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ และคณะ, 2558) รงควัตถุประเภทไฟโคบิลิโปรตีน (Phycobiliprotein) แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย คือ ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycocyanin) ซี-อัลโลไฟโคไซยานิน (C-Allophycocyanin) และ ซี-ไฟโคอิริธริน (C-Phycoerythrin) (การมีหรือแสดงอักษร C นำหน้า เพื่อบ่งบอกว่าเป็นรงควัตถุที่อยู่ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) ไฟโคบิลิโปรตีนมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สามารถละลายในน้ำได้ดี ซึ่งจะอยู่ใกล้กับโปรตีน จึงกลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเรียกว่าไฟโคบิลิโปรตีน ในสาหร่าย *S. platensis* ซี-ไฟโคไซยานิน จะอยู่รวมกับไฟโคบิลิโปรตีนชนิดอื่น ๆ กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้น เรียกว่า ไฟโคบิลิโซม (Phycobilisomes) ซึ่งจะเกาะอยู่บนผิวด้านนอกของไทลาคอยด์ (Thylakoid) ภายในไทลาคอยด์จะบรรจุคลอโรฟิลล์ เอ อยู่ ไฟโคบิลิโซมทำหน้าที่รับพลังงานรังสีจากแสงแล้วส่งให้คลอโรฟิลล์ เอ จากการที่ทำหน้าที่เป็นรงควัตถุประกอบ จะทำให้ไฟโคบิลิโซมมีปริมาณลดลง หากความเข้มแสงเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีไฟโคไซยานินเป็นแหล่งสะสมไนโตรเจนซึ่งจะให้ธาตุไนโตรเจนแก่เซลล์สาหร่ายเมื่อขาดแคลนธาตุไนโตรเจน (สุมาลี ดุลยอนุกิจ, 2535)

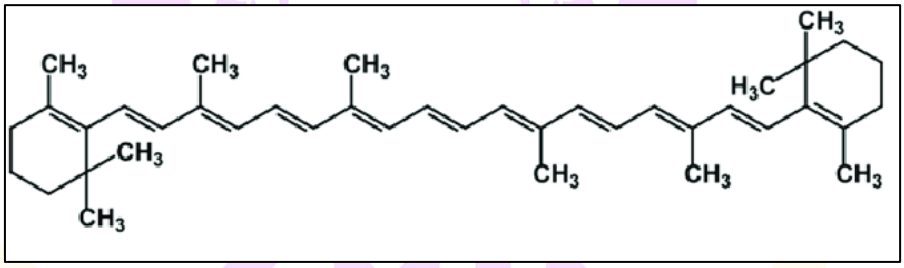
5.2 คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll)



ภาพ 7 โครงสร้างทางเคมีของคลอโรฟิลล์ เอ (Chemical structure of Chlorophyll a)

คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุสีเขียว มีความสำคัญต่อกระบวนการการสังเคราะห์ด้วยแสง คลอโรฟิลล์มีหลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ ซี คลอโรฟิลล์ ดี และคลอโรฟิลล์ อี ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะมีคลอโรฟิลล์ เอ เท่านั้น คลอโรฟิลล์ เอ จัดเป็นรงควัตถุสังเคราะห์แสงขั้นต้น สามารถรับอิเล็กทรอนจากแสงได้ส่วนคลอโรฟิลล์อื่น ๆ จัดเป็นรงควัตถุสังเคราะห์แสงขั้นสอง ซึ่งทำหน้าที่ดูดซับพลังงานอิเล็กทรอนจากแสงแล้วส่งต่อให้คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่พบในสาหร่ายทั่วไปมีร้อยละ 0.5-1.5 ของน้ำหนักแห้ง และสามารถเพิ่มสูงถึงร้อยละ 6 ในสาหร่ายที่ถูกเลี้ยงไว้ในที่ที่มีแสงอ่อน ๆ คลอโรฟิลล์ เอ เป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการแสดงมวลสาหร่าย ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณมวลสาหร่าย ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ จะผันแปรได้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มแสง ปริมาณไนโตรเจนในอาหาร อายุเซลล์สาหร่าย และปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ

5.3 บีตา-แคโรทีน (β-Carotene)



ภาพ 8 โครงสร้างทางเคมีของบีตา-แคโรทีน(Chemical structure of β-Carotene)

พืชและจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ บีตา-แคโรทีน ซึ่งเป็นแหล่งวิตามินของมนุษย์ ร่างกายจะเปลี่ยนบีตา-แคโรทีน เป็นวิตามินเมื่อต้องการ สาหร่าย *S. platensis* เป็นแหล่งที่มีบีตา-แคโรทีนสูง และพบว่าบีตา-แคโรทีนสามารถจับกับอนุมูลอิสระ Peroxyl โดยเฉพาะในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ สมบัติการต้านออกซิเดชันของบีตา-แคโรทีนขึ้นอยู่กับสมบัติในการจับ Singlet Oxygen และอนุมูลอิสระ Peroxyl ซึ่งขึ้นกับโครงสร้างของโมเลกุลและจำนวนพันธะคู่ของโมเลกุล (Sergio et al., 1999) นอกจากนี้ยังช่วยลดความเป็นพิษของอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายเซลล์จนนำไปสู่โรคมะเร็งได้ มีการทดสอบถึงผลในการต้านมะเร็งของบีตาแคโรทีนและสารสกัดจากสาหร่าย *S. platensis* ที่มีต่อก้อนเนื้อร้ายในปากหนูพบว่าสามารถลดทั้งจำนวน ขนาด และทำให้ก้อนเนื้อหายไปได้

6. คุณค่าทางโภชนาการสาหร่าย *S. platensis*

ในสาหร่าย *S. platensis* อุดมไปด้วยสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ได้แก่ โปรตีน เถ้า เยื่อใย และไขมัน อยู่ในช่วงร้อยละ 60–70, ร้อยละ 3–11, ร้อยละ 3–7 และร้อยละ 4–7 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Habib et al., 2008 อ้างโดย Holman and Malau-Aduli, 2012) โดยสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนเสริมในอาหารสัตว์ได้ซึ่งสอดคล้องกับ เริงฤทธิ์ สัปปพันธ์ (2556) ที่ได้รายงานว่า สาหร่าย *S. platensis* มีปริมาณโปรตีนรวมสูงมากถึงร้อยละ 60–80 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าที่พบในไข่ไก่ ประมาณ 6 เท่า และมากกว่าที่พบในน้ำนมประมาณ 5 เท่า นอกจากนี้ยังมีกรดไขมัน และกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid), ไลซีน (Lysine), เมไทโอนีน (Methionine) และ ลิวซีน (Leucine) เป็นต้น (ตาราง 1)

ตาราง 1 โภชนาการและองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย *S. platensis*

Amount		Amount	
Proximate		**Vitamin/Carotenoids**	
Moisture	4–9 % DM	B_1	0.8–15.4 mg/100 g
Protein (N x 6.25)	60–70 % DM	B_2	0.2–0.9 mg/100 g
Ash	3–11 % DM	B_3	0.6–5.3 mg/100 g
Carbohydrates (total)	14–19 % DM	B_6	0.3–4.0 mg/100 g
Crude fiber	3–7 % DM	B_{12}	0.3–0.8 mg/100 g
Crude lipid	4–7 % DM	C	42.0–195.3 mg/100 g
Fatty acid		D	12,000 U
Palmitic acid	44.6–54.1% of total fatty acids	E	10–19 mg/100 g
Oleic acid	1.0–15.5 % of total fatty acids	β–carotene	64–140 mg/100 g
Linoleic acid	10.8–30.7 % of total fatty acids		
Gamma–linolenic acid	8.0–31.7 % of total fatty acids		
Amino acid			
Lysine	2.60–4.63 % DM		
Phenylalanine	2.60–4.10 % DM		
Tyrosine	2.60–3.42 % DM		

ตาราง 1 (ต่อ)

Amount	Amount
Proximate	**Vitamin/Carotenoids**
Leucine	5.90–8.37 % DM
Methionine	1.30–2.75 % DM
Glutamic acid	7.04–7.30 % DM
Aspartic acid	5.20–6.00 % DM

ที่มา: Habib et al. (2008); Babadzhanov et al., (2004)

7. ประโยชน์ของสาหร่าย *S. platensis*

7.1 ทางด้านการแพทย์

นอกจากสาหร่าย *S. platensis* จะเป็นแหล่งอาหารที่มีปริมาณสารอาหารสูงกว่าพืชหรือสาหร่ายชนิดอื่นแล้ว ยังสามารถใช้เป็นยาที่มีผลช่วยป้องกันโรคต่าง ๆ มีปริมาณโปรตีนและซีสทีอินสูงจึงเหมาะที่จะใช้รักษาแผลมีหนองได้เป็นอย่างดี (เจียมจิตต์ บุญสม, 2531)

กรดไขมัน Gamma-Linolenic Acid ในสาหร่าย *S. platensis* (Gamma Linolenic acid (GLA); 18: 3 ω6) เป็นกรดไขมันที่ช่วยลดปัญหาเรื่องโคเลสเตอรอล (ลด Low Density Lipoprotein) ลดอาการปวดประจำเดือน (Pre – Menstrual Syndrome) และลดผื่นแพ้จากกรรมพันธุ์ (Atopic Dermatitis / Eczema) GLA โดยทั่วไปจะพบมากในพืชพวก Evening Primrose และในราบางชนิด ดังนั้นการผลิต GLA จากสาหร่าย *S. platensis* จึงเป็นทางเลือกที่ดีโดย Cohen et al. (1993) ได้รายงานว่าสภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ที่ทำให้ปริมาณกรดไขมัน และ GLA สูงขึ้น คือการเลี้ยงในสภาวะความเข้มแสงที่ต่ำหรือในสภาวะที่มีความหนาแน่นของเซลล์สูง ๆ เช่น การเลี้ยงแบบ Batch และ Semi-Continuous Culture ในขณะที่ความเค็มของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีผลทำให้อัตราการเจริญลดลงนั้นไม่ได้ช่วยเพิ่มปริมาณกรดไขมันแต่อย่างใด นอกจากนี้การลดอุณหภูมิขณะเพาะเลี้ยงให้ต่ำกว่าอุณหภูมิปกติ เช่น การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะทำให้ปริมาณ GLA เพิ่มขึ้น (Siangdung et al.,1996)

7.2 ใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์

สาหร่าย *S. platensis* มีคุณค่าทางอาหารที่อุดมไปด้วย วิตามินบี 12 โปรตีน และสารไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ช่วยสร้างระบบภูมิคุ้มกันแก่ร่างกาย ช่วยควบคุมปริมาณและความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดง

ช่วยคลายความอ่อนเพลีย เร่งประสิทธิภาพการทำงานของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย ช่วยบำรุงเลือด สร้างเม็ดเลือดใหม่ให้ร่างกาย ช่วยยับยั้งผมร่วงได้ และเนื่องจากเซลล์สาหร่ายไม่มีเซลลูโลส (Cellulose) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถดูดซึมสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้มากถึงร้อยละ 85-95

7.3 ใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์

นอกจากสาหร่าย *S. platensis* จะเป็นแหล่งสารอาหารจำพวกโปรตีนแล้ว ยังมีส่วนประกอบของ สารแคโรทีน ซึ่งเป็นสารสำคัญในการสร้างวิตามินเอ เมื่อนำสาหร่าย *S. platensis* ไปทดลองเลี้ยงไก่ พบว่าไข่แดงมีสีเข้มขึ้น จึงใช้เป็นส่วนผสมของอาหารปลาประเภทปลาสวยงาม เนื่องจากบีตา-แคโรทีน จากสาหร่ายจะช่วยเร่งสีผิวของปลาให้สวยเข้มขึ้น Stanley and Jones (1976) ได้ทดลองนำสาหร่าย *S. platensis* ผสมกับอาหารเลี้ยงปลา Bigmouth Buffalo และปลา Blue Tilapia พบว่าปลาทั้งสองชนิดมีการเจริญเติบโตดีมาก แต่เมื่อลดปริมาณของสาหร่ายลง อัตราการเจริญเติบโตก็ลดลงด้วย

7.4 ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

จากการศึกษาพบว่าสาหร่าย *S. platensis* มีความสามารถในการกำจัดน้ำเสียได้ เนื่องจากในขณะที่สาหร่ายมีการสังเคราะห์ด้วยแสงนั้น นอกจากจะให้ออกซิเจนแก่แหล่งน้ำแล้ว ยังต้องการไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจากแหล่งน้ำเพื่อใช้ในการดำรงชีวิตอีกด้วย (Ciferri and Tiboni, 1983)

Soong (1980) ได้นำของเสียจากการเน่าสลายของมูลสัตว์มาเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* เนื่องด้วยของเสียดังกล่าวยังเน่าสลายไม่สมบูรณ์ จึงทำให้เกิดกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับสาหร่ายได้ และนอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ดี

สุชาติ อิงธรรมจิตร์ และคณะ (2531) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* โดยใช้น้ำจากกองปลาสด พบว่าสามารถใช้อาหารในน้ำจากกองปลาสดทดแทนไนโตรเจนได้ทั้งหมดและสามารถทดแทนคาร์บอนได้บางส่วน ช่วยลดค่า COD ของน้ำจากกองปลาสดที่เติมลงไปในบ่อถึงร้อยละ 81.50 และลดแอมโมเนียลงถึงร้อยละ 92.42

ความรู้เบื้องต้นของปุ๋ย

พระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 ได้ให้ความหมายของปุ๋ย ดังนี้

"ปุ๋ย" หมายความว่า สารอินทรีย์ หรืออนินทรีย์ ไม่ว่าจะเกิดขึ้นโดยธรรมชาติ หรือทำขึ้นก็ตาม สำหรับใช้เป็นธาตุอาหารแก่พืชได้ไม่ว่าโดยวิธีใด หรือ ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในดินเพื่อบำรุงความเติบโตแก่พืช

“ปุ๋ยเคมี” หมายความว่า ปุ๋ยที่ได้จากสารอนินทรีย์หรืออินทรีย์สังเคราะห์ รวมถึงปุ๋ยเชิงเดี่ยว ปุ๋ยเชิงผสมและปุ๋ยเชิงประกอบ และ หมายความตลอดถึงปุ๋ยอินทรีย์ที่มีปุ๋ยเคมีผสมอยู่ด้วย ไม่รวมถึงปูนขาว ดินมาร์ล ปูนพลาสเตอร์หรือยิบซั่ม

“ปุ๋ยอินทรีย์” หมายความว่า ปุ๋ยที่ได้จากอินทรีย์วัตถุซึ่งผลิตด้วยกรรมวิธีทำให้ชื้น สับ บด หมัก ร่อน หรือวิธีการอื่นแต่ไม่ใช่ปุ๋ยเคมี

ความรู้เบื้องต้นของปูนขาว

ปูนขาว หรือ ปูนเผา มีชื่อตามระบบการเรียกชื่อสารเคมี หรือ IUPAC (IUPAC nomenclature) ว่า Calcium oxide (CaO) มีสถานะเป็นของแข็ง มีสีขาว มีลักษณะเป็นก้อนหรือผงที่มีมีรูพรุน ไม่มีกลิ่น โดยปกติมีความสามารถในการละลายน้ำ (Water) และกลีเซอรีน (Glycerin) แต่จะไม่สามารถละลายได้ในแอลกอฮอร์ (Insoluble in alcohol) โดยส่วนมากจะใช้ปูนขาวในการปรับค่า pH (Institute of Medicine National Research Council, 1982)

ปูนขาว หรือ Calcium oxide (CaO) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเผาหินปูน หรือ Calcium carbonate ($CaCO_3$) เมื่อเผาแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์ออกมา คือ Calcium oxide และ Carbondioxide ดังสมการ

$$CaCO_3 \xrightarrow{\text{Heat}} CaO + CO_2 \quad (1)$$

เมื่อนำปูนขาว หรือ Calcium oxide (CaO) ที่มีคุณสมบัติในการละลายในน้ำ มาทำปฏิกิริยากับน้ำจะได้เป็น Calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$) (พรศักดิ์ สมรไกรสรกิจ,

$$CaO + H_2O \longrightarrow Ca(OH)_2 \quad (2)$$

แคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรือ Calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง ปูนขาวกับน้ำ โดยเมื่อปูนขาวละลายกับน้ำแล้วทิ้งไว้ จะเกิดการแยกเป็น 2 ชั้น คือ ส่วนล่างจะเป็นผลึกของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ มีลักษณะสีขาว เรียกว่า Milk of lime และส่วนบนจะได้เป็นสารละลายอิ่มตัวของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรือเรียกทั่วไปว่า น้ำปูนใส (Limewater) โดยทั่วไปน้ำปูนใส จะมีคุณสมบัติ คือ เป็นสารละลายใส ไม่มีสี มีกลิ่นเล็กน้อย มีสภาวะเป็นด่างในธรรมชาติ มีค่า pH เท่ากับ 12 โดยประมาณ สารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์นี้ยังใช้ในงานด้านสิ่งแวดล้อม คือ ใช้ในการบำบัดน้ำ ช่วยแก้ปัญหาน้ำกระด้างโดยเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่เป็นสาเหตุให้เกิดน้ำกระด้างให้กลายเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำแล้วเกิดเป็นตะกอนและเกิดการตกตะกอนต่อไป เช่น การบำบัดไบคาร์บอเนตของแคลเซียมและแมกนีเซียม ดังสมการ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2548)

$$a(HCO_3)_2 + Ca(OH)_2 = 2CaCO_3 \text{ ตกตะกอน} + 2H_2O \quad (3)$$

$$Mg(HCO_3)_2 + 2Ca(OH)_2 = Mg(OH)_2 \text{ ตกตะกอน} + 2CaCO_3 \text{ ตกตะกอน} + 2H_2O \quad (4)$$

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

Simental and Sanchez–Saavedra (2003) ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไดอะตอม (*Nitzschia laevis, Nitzschia thermalis* var.*minor* และ *Navicula incerta*) ด้วยอาหารสูตรปรับปรุงที่มีปุ๋ยเป็นองค์ประกอบ เปรียบเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐาน *f*/2 พบว่าปริมาณเซลล์ และอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอาหารทั้ง 2 สูตร อีกทั้งต้นทุนในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรปรังปรุงที่มีปุ๋ยเป็นองค์ประกอบ มีการใช้ต้นทุนที่ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐาน *f*/2 มากถึง 8 เท่า ดังนั้นจึงสามารถใช้สูตรปรังปรุงที่มีปุ๋ยเป็นองค์ประกอบในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไดอะตอมเพื่อลดต้นทุนการผลิตได้

นภกานต์ หน่ายคอน (2554) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* โดยใช้ปุ๋ยน้ำชีวภาพที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ของปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง ส่งเสริมให้สาหร่าย *S. platensis* มีการเจริญโตได้ดี โดยให้ค่าจำนวนเส้นสาย และปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่ายมากที่สุด เนื่องจากในอัตราส่วนที่เหมาะสมของปุ๋ยน้ำชีวภาพนั้นจะส่งเสริมให้สาหร่าย *S. platensis* นั้นใช้ในการเจริญเติบโต แต่ความเข้มข้นที่มากเกินไปจะส่งผลให้ค่าการเจริญน้อยที่สุดและไม่เหมาะสมต่อการเจริญ

Ilknur (2012) ได้ทำการศึกษาผลของปุ๋ยน้ำอินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบชีวมวลของ *S. platensis* จากการศึกษาพบว่าการใช้ปุ๋ยน้ำอินทรีย์ รวมกับไนเตรต ฟอสเฟส และไบคาร์บอเนต สามารถให้ผลผลิตชีวมวลและปริมาณโปรตีนได้พอ ๆ กับการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารมาตรฐาน Zarrouk และยังสามารถลดต้นทุนการผลิตได้

อรพรรณ พรหมธนพันธ์, คมศักดิ์ พินธะ และรัฐภูมิ พรหมณะ (2558) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ด้วยสารเพาะเลี้ยงต่างกัน 8 ชนิด พบว่า สารเพาะเลี้ยงที่มีน้ำเสียสารอินทรีย์ทำให้สาหร่ายมีผลผลิตชีวมวลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารเพาะเลี้ยงที่ปราศจากน้ำเสียสารอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นถึงการเพาะเลี้ยงที่อุดมด้วยปุ๋ยแร่ธาตุหรือสารอินทรีย์นั้น เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มพูนชีวมวลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วโรทัย รุ่งแสง, สาวิตรี จันทรานุรักษ์ และ พีรพงษ์ เชาวนพงษ์ (2558) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ในน้ำหมักชีวภาพมูลไส้เดือนดิน 4 สูตร คือ มูลโค มูลโคผสมกากถั่วเหลือง มูลโคผสมใบมะรุม และมูลโคผสมใบกระถิน เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วย

อาหารสังเคราะห์ สูตร N8 พบว่า ปริมาณน้ำหนักแห้งชีวมวล (Dry weight cells) ของอาหารเพาะเลี้ยงน้ำหมักชีวภาพมูลไส้เดือนดินทุกสูตร มีค่ามากกกว่าปริมาณน้ำหนักแห้งชีวมวลที่เลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์ สูตร N8 เนื่องจากในอาหารเพาะเลี้ยงน้ำหมักชีวภาพมูลไส้เดือนดินทั้ง 4 สูตร มีสมบัติทางเคมีและปริมาณธาตุอาหารสูงทำให้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการต่าง ๆ เช่น กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง กระบวนการหายใจ กระบวนการสร้างน้ำตาลและแป้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. มากกว่าอาหารสังเคราะห์ สูตร N8

Rajeswari and Deepika (2017) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* โดยใช้ของเสียจากการเกษตร (Agro-wasted) ได้แก่ บีทรูท องุ่น รากของต้น Casuarina รำข้าว และแกลบ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารมาตรฐานซาร์รุค (Zarrouk medium) พบว่าค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงไม่มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากมีการเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate) และสาหร่าย *Spirulina* sp. ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงแบบอินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและปริมาณรงควัตถุ เช่น คลอโรฟีล์ล เอ (Chlorophyll a), แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) และ ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) มากกว่าสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารมาตรฐาน Zarrouk โดยให้ค่าสูงสุดในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง

ณัฐพร จันทร์ฉาย และจุฑารัตน์ สนธิรอด (2561) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) ในน้ำหมักเศษเหลือข้าวโพดอาหารสัตว์ โดยนำเศษของ เปลือก ต้น ซัง และฝุ่นข้าวโพด ผลการศึกษาพบว่า สูตรน้ำหมักจากต้นข้าวโพดเหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้ค่าอัตราความหนาแน่นของเซลล์ (OD) จำนวนเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และปริมาณรงควัตถุแคโรทีนอยด์ให้ค่าสูงสุด และทำการศึกษาเพื่อหาอัตราส่วนในการผสมน้ำหมักเศษเหลือข้าวโพดอาหารสัตว์ พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นอัตราส่วนที่ดีที่สุด เนื่องจากน้ำหมักต้นทุนต่ำนี้มีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของสาหร่าย ทั้งนี้ยังช่วยลดต้นทุนการผลิต ลดปริมาณของเสียทางการเกษตร และลดปัญหามลพิษทางอากาศจากการเผาเศษเหลือจากการปลูกข้าวโพดอาหารสัตว์ได้

ดวงกมล ปิ่นทอง, พิทักษ์พงษ์ หอมนาน และมัญชุพร คำใส (2561) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนตและแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* พบว่า ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานซาร์รุคปรับปรุงที่ความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนตและแมกนีเซียมซัลเฟต เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สาหร่าย *S. platensis* สามารถเจริญเติบโตได้ดีและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นตามสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานซาร์รุค และทุกความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนตและแมกนีเซียมซัลเฟตไม่พบการปนเปื้อนของสาหร่ายชนิดอื่น

อภิชญา ใจด้วง และรัฐภูมิ พรหมณะ (2562) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S.platensis* และปริมาณรงควัตถุของ ไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริธริน ด้วยสูตรอาหารดัดแปลง 4 ชนิด พบว่า ปริมาณไนโตรเจนที่เพียงพอในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถส่งผลต่อปริมาณไฟโคไซยานินในสาหร่าย *S. platensis* ได้ เนื่องจากหากมีการขาดไนโตรเจนสาหร่ายจะสลายโครงสร้างของไฟโคไซยานินไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตแทนการสร้างรงควัตถุ

Bunnag (2010) ได้ทำการศึกษาความสามารถของสาหร่าย *S. platensis* ในการลดปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอุตสาหกรรมผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยว พบว่า ค่าออกซิเจนละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen; DO) มีค่าสูงขึ้นจาก 0.07±0.04 เป็น 0.24±0.12 และยังสามารถลดปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้

Le Thi Hong and Le Minh Thanh (2014) ได้ทดลองใช้สาหร่าย *S. platensis* ในการบำบัดน้ำเสียของโรงผลิตนมโค พบว่าสามารถลดค่าปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Biochemical Oxygen Demand; BOD), ค่าปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ใช้ในการออกซิไดส์สารอินทรีย์ (Chemical Oxygen Demand; COD), ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำ (Total Dissolve Solid; TDS), แคลเซียม และแมกนีเซียมได้ และยังพบว่าสามารถลดค่าไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซัลเฟตได้ถึงร้อยละ 77.53, ร้อยละ 75 และร้อยละ 61.23 ตามลำดับ

Deshmane (2015) ได้ทำการทดลองเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ด้วยน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำตาล เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียและผลของการใช้น้ำเสียจากการผลิตน้ำตาล พบว่า สามารถลดค่าปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ใช้ในการออกซิไดส์สารอินทรีย์ (Chemical Oxygen Demand; COD) มีค่าลดลงถึงร้อยละ 91 ภายในระยะเวลา 108 ชั่วโมง และยังลดปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียมน้ำเสียได้ และจากการวิเคราะห์ทางชีวเคมีพบว่า สาหร่าย *S. platensis* มีปริมาณโปรตีนสะสมภายในเซลล์มากขึ้นจากปกติ

Pamon Pumas and Chayakorn Pumas (2016) ได้รายงานการใช้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงต้นทุนต่ำ (CMU02) ร่วมกับน้ำเสียครั่ง (lac wastewater) พบว่าสาหร่าย *S. platensis* สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยให้ชีวมวลเพิ่มขึ้นถึง 0.624 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีน 59.11 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณแคโรทีนอยด์และไฟโคไซยานิน 0.17 และ 71.30 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ทั้งนี้น้ำเสียจากครั่งสามารถลดต้นทุนการเพาะเลี้ยงได้มากถึง 4.43 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารมาตรฐาน Zarrouk จึงสามารถใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงต้นทุนต่ำได้ในระบบการเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย คือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สาหร่ายสายพันธุ์ *S. platensis* ลักษณะเส้นสายแบบบิดเกลียว (Spiral filament) จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด จังหวัดเชียงใหม่

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

1. ขวด Polyethylene ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร จำนวน 30 ขวด
2. กระบอกตวง (Cylinder) ปริมาตร 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
3. บีกเกอร์ (Beaker) ปริมาตร 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร
4. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
5. หลอดหยด (Dropper)
6. ไมโครปิเปต (Micropipette) และทิป (Tips)
7. ชุด Haemocytometer
8. คิวเวทต์ (Cuvette)
9. น้ำกลั่น
10. กระดาษกรอง Pore size 11 ไมโครเมตร
11. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์
12. ปั๊มเติมอากาศ (Air Pump) ชุดอุปกรณ์สำหรับต่อออกซิเจน (สายออกซิเจน, วาล์ว, ข้อต่อ 3 ทาง และ 4 ทาง)
13. คีมคีบ (Forceps)
14. ผ้าขาวบาง (ขนาดตาข่าย 60 ไมโครเมตร)
15. กระดาษชำระ
16. สำลี

17. แผ่นฟลอยด์อะลูมิเนียม
18. หลอดทดลอง (Tube)
19. ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
20. กรวยกรอง

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV–vis spectrophotometer)
3. เครื่องชั่งดิจิตอล 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
4. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด–ด่าง (pH meter)
6. ชุดเครื่องกรองสุญญากาศ (Suction pump)
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)

สารเคมีที่ใช้

1. โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 16.8 กรัม/ ลิตร
2. ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.5 กรัม/ ลิตร
3. โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) 2.5 กรัม/ ลิตร
4. โปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 1.0 กรัม/ ลิตร
5. เกลือแกง (NaCl) 1.0 กรัม/ ลิตร
6. แมกนีเซียมซัลเฟต 7–ไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.2 กรัม/ ลิตร
7. แคลเซียมคลอไรด์ 2–ไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) 0.04 กรัม/ ลิตร
8. เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.2H_2O$) 0.01 กรัม/ ลิตร
9. Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) 0.1 กรัม/ ลิตร
10. กรดบอริค (H_3BO_3) 2.85 กรัม/ ลิตร
11. แมงกานีสคลอไรด์ 4–ไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) 1.81 กรัม/ ลิตร
12. ซิงค์ซัลเฟต 5–ไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) 0.22 กรัม/ ลิตร
13. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 0.08 กรัม/ ลิตร
14. โมลิบดินัมออกไซด์ (MoO_3) 0.015 กรัม/ ลิตร
15. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
16. คอปเปอร์ซัลเฟต (Cu_2SO_4)

17. โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)

18. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)

19. 4 % กรดบอริก (4 % H_3BO_3)

20. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

21. 95 % Ethanol

22. โปแตสเซียม ไฮดรอกไซด์ (KOH)

23. Dimethyl Ether

24. Potassium Phosphate Buffer (pH 7)

การวางแผนการวิจัย และแผนการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis*

1. การวางแผนการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 เป็นการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัสในอาหารเพาะเลี้ยงทำการวิเคราะห์น้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ของแต่ละกรรมวิธี ในวันแรก และวันสุดท้ายของการทดลอง (วันที่ 0 และวันที่ 30 ของการทดลองในส่วนที่ 2 ระยะที่ 1) เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนในรูปต่าง ๆ คือ ไนเตรต (Nitrate) ไนไตร์ท (Nitrite) แอมโมเนีย (Ammonia) และสารอินทรีย์ไนโตรเจนรวมกับแอมโมเนีย (Total Kjeldahl Nitrogen) และสารประกอบฟอสฟอรัส คือ การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total Phosphorus)

ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน การเจริญเติบโต และองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis* แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน และการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ลักษณะเส้นสายแบบบิดเกลียว (Spiral filament) ตามกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน ทำการศึกษาทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ แล้วทำการเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis*

ระยะที่ 2 นำสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ดีที่สุด ที่ได้จากการวิเคราะห์ในการศึกษาระยะที่ 1 มาเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* เพื่อศึกษาปริมาณโปรตีนรวมและองค์ประกอบทางพฤกษเคมีโดยทำการเพาะเลี้ยง ทั้งหมด 3 ซ้ำ และทำการเพาะเลี้ยงตามจำนวนวันเพาะเลี้ยงที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดจากผลการศึกษาในระยะที่ 1

1. สูตรอาหารเพาะเลี้ยง

เตรียมสารละลายปุ๋ย (ภาคผนวก ก) ที่ใช้เป็นส่วนประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง โดย เตรียมสารละลายปุ๋ยความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร

1. ทำการชั่งปุ๋ย 500 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2. ทิ้งสารละลายปุ๋ยไว้ 24 ชั่วโมง จนเกิดการแยกชั้นระหว่างสารละลาย และตะกอนปุ๋ย

3. ดูดสารละลายปุ๋ยส่วนบนไปใช้ร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง สาหร่าย *S. platensis* ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเพาะเลี้ยงในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ดังนั้นสามารถคำนวณปริมาตรของสารละลายปุ๋ยได้ ดังนี้

จาก $\frac{\text{ปริมาตรสารละลายปุ๋ยที่ต้องการ}}{\text{ปริมาตรเต็ม 100 เปอร์เซ็นต์}} = \frac{\text{ปริมาตรสารละลายปุ๋ยที่ต้องใช้}}{\text{ปริมาตรที่ต้องการเพาะเลี้ยง}}$

แทนค่า $\frac{0.5}{100} = \frac{X}{1,000}$

จะได้ปริมาตรสารละลายปุ๋ยที่ต้องใช้ = 5 มิลลิลิตรต่อ 1,000 มิลลิลิตรอาหารเพาะเลี้ยง

ดังนั้น ต้องทำการเติมสารละลายปุ๋ย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในสูตรอาหารดัดแปลงได้แก่ กรรมวิธี ORG1, ORG2, ORG3, ORG4, ORG5 และ CT3 โดยแต่ละสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเตรียมได้ตามแต่ละกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธี MZ สูตรอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานซาร์รุค

กรรมวิธี MJU สูตรอาหารจากห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยแม่โจ้

กรรมวิธี ORG1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ทำการปรับ pH ด้วยสารละลายน้ำปูนใส

กรรมวิธี ORG2 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ทำการปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

กรรมวิธี ORG3 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO4) ลงไป 1 กรัมต่อลิตร แล้วปรับ pH ด้วยสารละลายน้ำปูนใส

กรรมวิธี ORG4 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่เติมปุ๋ย NPK16:16:16 ลงไป 0.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับ pH ด้วยสารละลายน้ำปูนใส

กรรมวิธี ORG5 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และปุ๋ย NPK16:16:16 ลงไปอย่างละ 1 และ 0.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วปรับ pH ด้วยสารละลายน้ำปูนใส

กรรมวิธี ORG6 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารละลายปุ๋ย แล้วไม่ทำการปรับค่า pH

กรรมวิธี CT1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมสารอาหาร แล้วปรับค่า pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

กรรมวิธี CT2 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมสารอาหาร แล้วปรับค่า pH ด้วยสารละลายน้ำปูนใส

1. การเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงในระยะที่ 1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน และการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis*

2. เตรียมขวดเพาะเลี้ยง ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร อย่างละ 3 ขวดต่อกรรมวิธี (3 ซ้ำของการศึกษา) ปิดฉลากบนขวด พร้อมระบุอักษร แทนการบอกซ้ำของการทดลองโดยระบุ A, B และ C แทนซ้ำที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

3. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงตามแต่ละกรรมวิธี ปริมาตร 4 ลิตรต่อกรรมวิธี กรองอาหารเพาะเลี้ยงทุกกรรมวิธีด้วยผ้าขาวบาง แล้วเทลงในขวดเพาะเลี้ยงตามแต่ละกรรมวิธีในปริมาตรขวดละ 900 มิลลิลิตร จนครบทุกกรรมวิธี ทุกซ้ำ

4. เตรียมหัวเชื้อสาหร่าย *S. platensis* บริสุทธิ์ (ความเข้มข้นหัวเชื้อ OD ≥ 1) แล้วเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงทุกขวด ๆ ละ 100 มิลลิลิตร (ร้อยละ 10 โดยปริมาตรเพาะเลี้ยง)

5. นำขวดเพาะเลี้ยงที่เตรียมเสร็จแล้ว วางแปลงโดยการสุ่มวางตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design:CRD) ซึ่งจะทำการตีแปลง 3 แปลงทดลอง คือ

ซ้ำที่ 1 เพาะเลี้ยงใน แปลง A

ซ้ำที่ 2 เพาะเลี้ยงใน แปลง B

ซ้ำที่ 3 เพาะเลี้ยงใน แปลง C

4. ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ที่อุณหภูมิห้องเติมอากาศเพื่อให้เกิดการตีกวนระบบและให้สาหร่าย *S. platensis* เกิดการพลิกตัวในการรับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ให้ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ ตลอด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 วัน

5. บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน และการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* ทุก ๆ 3 วัน จนครบ 30 วัน

6. วิเคราะห์ผลทางสถิติ แล้วเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ดีที่สุด

การเพาะเลี้ยงในระยะที่ 2 การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis*

1. ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* เพื่อให้ได้ปริมาณชีวมวลสูงสุด โดยการเติมหัวเชื้อสาหร่าย *S. platensis* ลงในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ดีที่สุดที่ได้จากการศึกษาในระยะที่ 1 ปริมาตรเพาะเลี้ยง 6 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อสาหร่าย *S. platensis* ร้อยละ 10 โดยปริมาตร (v/v)

2. ทำการเพาะเลี้ยงโดยการสุ่มวางตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD)

3. ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ที่อุณหภูมิห้อง เติมอากาศเพื่อให้เกิดการตีกวนระบบและให้สาหร่าย *S. platensis* เกิดการพลิกตัวในการรับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ให้ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ ตลอด 24 ชั่วโมง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงยึดตามจำนวนวันเพาะเลี้ยงที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดตามการศึกษาในระยะที่ 1

4. ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตชีวมวลสาหร่าย *S. platensis* โดยการกรองผ่านผ้าขาวบางขนาด 60 ไมโครเมตร ทำการล้างผลผลิตชีวมวลที่ได้ ด้วยน้ำกลั่น 2–3 ครั้ง เพื่อลดค่า pH ให้เป็นกลาง

5. นำผลผลิตชีวมวลที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง Shomchai and Lamtham, 2013) จนน้ำหนักแห้งชีวมวลไม่มีการเปลี่ยนแปลง แล้วเก็บรักษาในที่มืดและปลอดความชื้น

6. นำชีวมวลแห้งของสาหร่าย *S. platensis* ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี

7. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ในอาหารเพาะเลี้ยง

1.1 การการวิเคราะห์แอมโมเนีย ด้วยวิธีไตเตรชัน (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2551)

แอมโมเนียเกิดจากการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีไตรเตรชัน ดังนี้

1.1.1 ตวงน้ำตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่า แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ ทำการเติมสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 25 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 9.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 นอร์มัล แล้วเทลงขวดกลั่น

1.1.2 ตวงสารละลายกรดบอริค 50 มิลลิลิตร และหยดอินดิเคเตอร์ ใส่ในขวดรูปชมพู่ แล้วนำติดตั้งเข้าเครื่องกลั่นพร้อมขวดกลั่น แล้วทำการกลั่นด้วยอัตรา 6–10 มิลลิลิตร

ต่อนาที ในได้สารละลายในขวดรูปชมพู่อย่างน้อย 300 มิลลิลิตร หากมีแอมโมเนียสารละลายจะมีสีเขียว หากไม่มีแอมโมเนียจะเป็นสีม่วง

1.1.3 นำสารละลายที่ได้จากการกลั่น มาไตรเตรตด้วยกรดกำมะถัน 0.02 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง แล้วทำการคำนวณปริมาณแอมโมเนีย (ใช้แบลงค์เป็นน้ำกลั่น) ดังสมการ

$$\text{ปริมาณแอมโมเนีย (มิลลิกรัมต่อลิตร ในรูป N)} = \frac{(A-B) \times N \times 14{,}000}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}} \quad (5)$$

เมื่อ A คือ มิลลิลิตรของกรดกำมะถันที่ใช้ไตรเตรตตัวอย่าง

B คือ มิลลิลิตรของกรดกำมะถันที่ใช้ไตรเตรตแบลงค์

N คือ ความเข้มข้นของกรดกำมะถันที่เป็นนอร์มัลลิตี้

1.2 การวิเคราะห์ไนไตรต์ ด้วย 1–แนพทิลเอทธีลีนไดอามีนไดไฮโดรคลอไรด์ (N–(1–Naphthyl)–Ethylenediamine Dihydrochloride: NED) หรือวิธีวัดสี (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2551)

ไนไตรต์เป็นรูปหนึ่งของสารประกอบไนโตรเจนโดยสามารถถูกรีดิวซ์ไปเป็นแอมโมเนียและถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไนเตรตได้ โดยสามารถวัดปริมาณไนไตรต์ได้ดังนี้

1.2.1 สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานไนไตรต์ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ไมโครกรัม เติมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ 1 มิลลิลิตร เขย่า แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 – 8 นาที แล้วเติมสารละลายเอ็นอีดีไดไฮโดรคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้ววัดค่าสีที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นเป็นไมโครกรัมกับ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

1.2.2 ตวงตัวอย่างน้ำที่กรองแล้ว 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่า แล้วตั้งทิ้งไว้ 2–8 นาที แล้วเติมสารละลายเอ็นอีดีไดไฮโดรคลอไรด์ จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

1.2.3 ทำการวัดค่าสีที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ นำมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณหาปริมาณไนไตรต์ ดังสมการ

$$\text{ปริมาณไนไตรต์–ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ไมโครกรัมที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน}}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (มิลลิลิตร)}} \quad (6)$$

1.3 การวิเคราะห์ไนเตรต ด้วยวิธีบรูซีน (Brucine method) (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2551)

ไนเตรตเกิดจากการที่สิ่งมีชีวิตปล่อยของเสียซึ่งมีสารประกอบไนโตรเจนออกมา หรือเมื่อสิ่งมีชีวิตตายลงโปรตีนที่อยู่ภายในสิ่งมีชีวิตจะถูกย่อยสลายเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย หากแอมโมเนียมีปริมาณมากเกินไปจะถูกออกซิไดซ์กลายเป็นไนเตรตต่อไป โดยสามารถวัดปริมาณไนเตรต ได้ดังนี้

1.3.1 สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานไนเตรตความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปริมาตร 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ปิเปตใส่หลอดทดลอง แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 10 มิลลิลิตร (ใช้แบลงค์เป็นน้ำกลั่น)

1.3.2 เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วเติมกรดซัลฟูริก 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้หายร้อน จากนั้นเติมสารละลายบรูซีน–กรดซัลฟานิลิค 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปอังความร้อน ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เมื่อครบเวลาตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนเท่าอุณหภูมิห้อง

1.3.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นเป็นไมโครกรัมกับ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

1.3.4 ทำการปิเปตน้ำตัวอย่างที่กรองแล้ว 10 มิลลิลิตร ทดลอง ทำตามขั้นตอนเหมือนการสร้างกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ได้มาอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน คำนวณปริมาณไนเตรต ดังสมการ

$$\text{ปริมาณไนเตรต–ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ไมโครกรัมที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน}}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (มิลลิลิตร)}} \qquad (7)$$

1.4 การวิเคราะห์ทีเคเอ็น (Total Kjeldahl Nitrogen) (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2551)

ทีเคเอ็นคือผลรวมของแอมโมเนียและสารอินทรีย์ไนโตรเจน การหาค่าทีเคเอ็นจะทำโดยการเปลี่ยนสารอินทรีย์ไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียแล้วจึงวัดปริมาณแอมโมเนียทั้งหมด จากนั้นนำไปลบด้วยปริมาณแอมโมเนียที่วัดได้จากการหาปริมาณแอมโมเนียด้วยวิธีไตรเตรชัน โดยทีเคเอ็นสามารถทำการวิเคราะห์ได้ดังนี้

1.4.1 ตวงน้ำตัวอย่าง 50–100 มิลลิลิตร ลงในหลอดเจลดาห์ล ขนาด 800 มิลลิลิตร เติมลูกแก้วกันเดือด 3–4 ลูก เติมน้ำยาสำหรับย่อย 50 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องย่อย 45 นาที หรือจนได้สารละลายใส ทิ้งให้เย็นลง

1.4.2 ตวงสารละลายกรดบอริค 2 เปอร์เซน 50 มิลลิลิตร และหยดอินดิเคเตอร์ใส่ในขวดรูปชมพู่ แล้วนำติดตั้งเข้าเครื่องกลั่นพร้อมหลอดเจลดาห์ล แล้วทำการกลั่นด้วยอัตรา 6–10 มิลลิลิตรต่อนาที ในได้สารละลายในขวดรูปชมพู่อย่างน้อย 300 มิลลิลิตร (ใช้แบลงค์เป็นน้ำกลั่น ทำวิธีการเดียวกันกับน้ำตัวอย่าง)

1.4.3 นำสารละลายที่ได้จากการกลั่น มาไตรเตรตด้วยกรดกำมะถัน 0.02 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง แล้วทำการคำนวณปริมาณแอมโมเนีย (ใช้แบลงค์เป็นน้ำกลั่น) ค่าแอมโมเนียที่ได้ คือ ค่าทีเคเอ็น ดังสมการ

$$\text{ปริมาณแอมโมเนีย-ทีเคเอ็น (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(A-B) \times N \times 14,000}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}} \quad (8)$$

1.4.4 คำนวณหาปริมาณความเข้มข้นสารอินทรีย์ไนโตรเจน ดังสมการสารอินทรีย์ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร) = ค่าทีเคเอ็น – ปริมาณแอมโมเนียของแต่ละตัวอย่าง

1.5 การวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total Phosphorus) (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2551)

ฟอสฟอรัสสามารถจำแนกได้คือออร์โธฟอสเฟต โพลีฟอสเฟตต่าง ๆ และสารอินทรีย์ฟอสเฟต อาจพบได้ทั้งในรูปที่ละลายน้ำหรือสารแขวนลอย การหาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดทำได้ดังนี้

1.5.1 สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต ความเข้มข้น 5, 50, 15, 20, 25 และ 30 ไมโครกรัม ใส่ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน เทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำยารวม 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร

1.5.2 ตวงน้ำตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วหยดฟีนอฟทาลีน 1 หยด เขย่าให้กัน หากสารละลายที่ได้เป็นสีชมพู ให้หยด 5 นอร์มัลกรดซัลฟูริก ลงไปทีละหยดจนสารละลายเปลี่ยนเป็นใส ไม่มีสี หากไม่เปลี่ยนเป็นสีชมพูตั้งแต่แรกให้เติม 5 นอร์มัลกรดซัลฟูริก 1 มิลลิลิตร

1.5.3 เติมแอมโมเนียซัลเฟต 0.4 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ข้างต้น แล้วนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) นาน 2–3 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วหยดฟีนอฟทาลีน 1 หยด เขย่าให้กัน เติม 6 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ (จะได้สารละลายสีชมพู) แล้วทำการหยด 5 นอร์มัลกรดซัลฟุริค ลงไปทีละหยดจนสารละลายเปลี่ยนเป็นใส ไม่มีสี

1.5.4 ทำการเติมน้ำยารวม 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร แล้วทำการคำนวณปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดดังสมการ

$$\text{ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ไมโครกรัมฟอสฟอรัสที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน}}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (มิลลิลิตร)}} \quad (9)$$

2. การวัดการเจริญ

2.1 การนับจำนวนเส้นสาย (เส้นสายต่อลิตร)

ในการนับจำนวนเส้นสาย ทำการนับโดยใช้ชุดสไลด์ Haemocytometer ซึ่งชุดสไลด์ Haemocytometer 1 อัน จะมีตารางสี่เหลี่ยม (Counting chamber) 2 ตาราง อยู่บริเวณตรงกลางสไลด์โดยแต่ละตารางมีพื้นที่เท่ากับ 1 ตารางมิลลิเมตร มีความลึก 0.1 มิลลิเมตร บริเวณรอบตารางสี่เหลี่ยมจะล้อมรอบด้วยร่องลึกขนาดใหญ่ให้น้ำขังได้ นิยมใช้สำหรับนับเซลล์ และสาหร่ายขนาดเล็ก (ตั้งแต่ 0.5–10 ไมครอน) สไลด์นับเซลลแบบนี้จะสะสามารถจุตัวอย่างได้ปริมาตรที่แน่นอน สามารถใช้นับสาหร่ายที่ยังมีชีวิตและตายแล้ว ในการนับสาหร่ายจะหยดน้ำตัวอย่างลงไป 1 หยด และนับจำนวนเซลล์สาหร่ายที่อยู่บนตารางสี่เหลี่ยม และสามารถคำนวณค่าเป็นจำนวนสาหร่ายต่อปริมาตรตัวอย่างได้ดังนี้

ปริมาตรของ Haemocytometer Counting Chamber = ความกว้าง x ความยาว x ความลึก(ภายในตารางสี่เหลี่ยม 1 ตาราง) = 1 มิลลิเมตร x 1 มิลลิเมตร x 0.1 มิลลิเมตร

= 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

หรือ 1/10 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

= 0.0001 ลูกบาศก์เซนติเมตร

หรือ $1/10^4$ ลูกบาศก์เซนติเมตร

= $1/10^4$ มิลลิลิตร หรือ 1×10^{-4} มิลลิลิตร

วิธีการใช้ Haemocytometer

1. หยดตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการนับจำนวนลงไป 1 หยด ในช่องใส่ตัวอย่าง (Load Port) ของสไลด์ Haemocytometer ที่มีกระจกปิดสไลด์ปิดอยู่ ตัวอย่างสาหร่ายจะกระจายไปทั่วตารางสี่เหลี่ยม

2. วางสไลด์ Haemocytometer ทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อให้เซลล์สาหร่ายจมลงสู่พื้นสไลด์

3. วางสไลด์ Haemocytometer บนแท่นกล้องจุลทรรศน์ ปรับกล้องโดยเริ่มปรับจากกำลังขยายจากต่ำไปสูง (4 เท่า, 10 เท่า, 40 เท่า และ 100 เท่า)

4. นับเซลล์สาหร่ายบนช่องสี่เหลี่ยมตรงกลางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า (25 ช่องใหญ่ ซึ่งภายในมีตารางขนาดเล็กจำนวน 16 ช่อง) (ภาพ 9)

5. ทำการนับจำนวนเซลล์สาหร่ายทั้ง 2 ตาราง สมมตินับได้ n และ m เซลล์ ตามลำดับ สามารถคำนวณและรายงานผลจาก สมการ

$$\text{จำนวนเส้นสายสาหร่าย} = \frac{n + m}{2} \times 10^4 \text{ เซลล์/มิลลิลิตร} \quad (10)$$

เมื่อ n คือ จำนวนเส้นสายที่นับได้จากตารางที่ 1

m คือ จำนวนเส้นสายที่นับได้จากตารางที่ 2

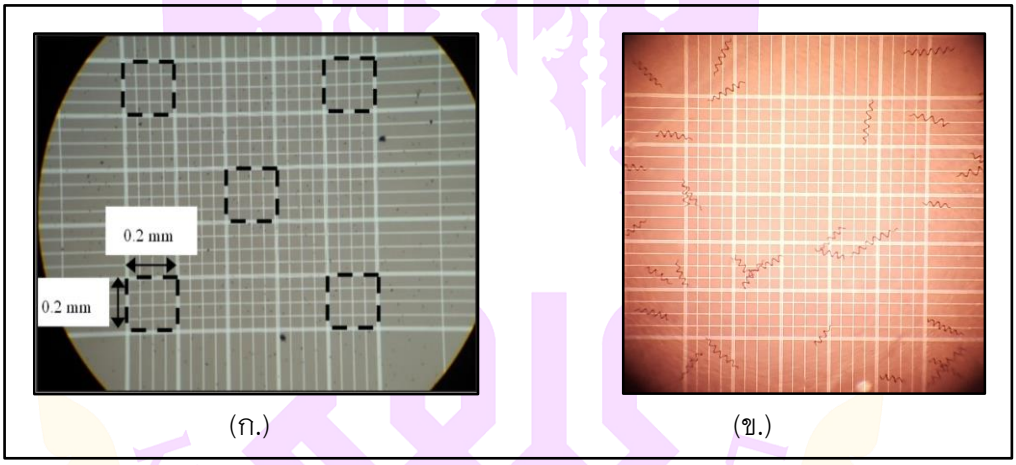
$$\text{หรือคำนวณจำนวนเส้นสายสาหร่ายจากสูตร ปริมาณมิลลิลิตร}^{-1} = \frac{C \times 1000 \text{ ลูกบาศก์มิลลิเมตร}^{1}}{A \times D \times F}$$

เมื่อ C = จำนวนสาหร่ายที่นับได้

A = พื้นที่ของ grids; 0.04 ตารางมิลลิเมตร

D = ความลึกของพื้นที่ที่นับ; 0.1 มิลลิเมตร

F = จำนวนช่องหรือตารางที่นับ; 25 ช่อง



ภาพ 9 ตารางสี่เหลี่ยมของชุด Haemocytometer ใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

ที่มา: (ก.) เดชาวุฒิ วานิชสรรพ์, (2558)

2.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density: OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 560 นาโนเมตร

การวัดค่าการดูดกลืนแสงเป็นการวัดความหนาแน่นของสาหร่ายด้วยแสงใช้ได้ทั้งวัดปริมาณและการวัดเพื่อบอกการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยง (Pure Microalgal Culture) โดยวัดค่า OD ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ซึ่งข้อดีของวิธีนี้ คือวัดได้สะดวก รวดเร็วให้ข้อมูลเกี่ยวกับมวลชีวภาพของสาหร่ายได้ดี แต่มีข้อเสียคืออาจเกิดความผิดพลาดจากสิ่ง

แขวนลอยที่ไม่มีชีวิต เซลล์ที่ตายและตะกอนปุ๋ยที่ใช้เลี้ยง หรือสาหร่ายชนิดอื่น เป็นต้น (ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม, 2550) วิธีการหาความหนาแน่นโดยอาศัยแสง ทำได้ดังนี้

2.2.1 นำตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการหาความหนาแน่นใส่ในคิวเวทท์ แล้วนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

2.2.2 บันทึกค่า OD_{560} ที่วัดได้ หมายเหตุ Blank ที่ใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงในแต่ละกรรมวิธี

2.3 การวัดปริมาณน้ำหนักแห้งชีวมวล (กรัมต่อลิตร)

น้ำหนักเปียก หรือ การวัดมวลสด เป็นวิธีที่นิยมใช้เนื่องจากสะดวกและรวดเร็ว โดยการชั่งน้ำหนักของสิ่งมีชีวิตนั้นโดยตรง แต่วิธีการนี้ไม่อาจถือได้ว่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นนั้นเป็นการเติบโตที่แท้จริง เนื่องจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเหลวในเซลล์ เช่น การที่เซลล์ดูดน้ำเข้าไป หรือสิ่งมีชีวิตกินน้ำเข้าไป เป็นต้นและการวัดน้ำหนักแห้ง (Dry Weight) หรือน้ำหนักคงที่ คือ น้ำหนักของสิ่งมีชีวิตหลังจากที่ความชื้นถูกขจัดออกจนหมดสิ้นโดยใช้ความร้อน ทำได้โดย (Xiaoting et al., 2018; Ilknur, 2012)

2.3.1 ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองก่อนนำไปทำการกรอง (เรียกว่า น้ำหนักก่อนกรอง)

2.3.2 กรองสาหร่าย *S. platensis* ในแต่ละกรรมวิธี จนครบทุกซ้ำ

2.3.3 นำไปอบด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักของตัวอย่างคงที่

2.3.4 พักให้อุณหภูมิหลังทำการอบลดลงในตู้ดูดความชื้น แล้วทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง (เรียกว่า น้ำหนักหลังกรอง)

2.3.5 หาค่าน้ำหนักแห้งชีวมวลจาก

น้ำหนักแห้งชีวมวล (กรัมต่อลิตร) = น้ำหนักหลังกรอง – น้ำหนักก่อนกรอง

2.4 การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

โดยปกติแล้วสาหร่าย *S. platensis* จะมีการเจริญเติบโตเป็นแบบระยะต่าง ๆ ตามช่วงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั่วไป (Growth Phase) เมื่อทำการสร้างแผนภาพจากการเจริญในระยะต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาตามหลักการของ Exponential จะสามารถอธิบายได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของเส้นสายของสาหร่ายเพิ่มขึ้นแล้ว อัตราการเพิ่มของความเข้มข้นของเส้นสายก็เพิ่มขึ้นด้วย แสดงให้เห็นว่าเส้นสายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองได้ นอกจากจะเป็นตัวทำให้เกิดปฏิกิริยาแล้ว ยังเพิ่มจำนวนของตัวเร่งปฏิกิริยาด้วย และเมื่อจำนวนเส้นสายเพิ่มขึ้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาก็เพิ่มขึ้น ดังนั้นหากสภาวะแวดล้อมและปัจจัยอื่น ๆ คงที่ อัตราการเพิ่มของเส้นสาย จะแปรผันตามความเข้มข้นของเส้นสายในขณะนั้น

(Time) ซึ่งอัตราการเพิ่มขึ้นของเส้นสายต่อเวลานี้ เรียกว่า ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate: μ) เป็นค่าที่บอกความเร็วของการเพิ่มจำนวนเส้นสาย เมื่อมีค่ามากก็แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มจำนวนเส้นสายได้รวดเร็ว แต่ถ้าไม่มีการเจริญ หรือ ค่า μ มีค่าเท่ากับ ศูนย์ จะแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญค่อนข้างคงที่ (เจริญ เจริญชัย, 2554) ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังสมการต่อไปนี้ (Xiaoting et al., 2018, ประเสริฐ ภวสันต์, 2550)

$$\mu = \frac{\ln\ (X_{i+1}) - \ln\ (X_i)}{t_{i+1} - t_i} \qquad (11)$$

เมื่อ μ คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

X_i คือ ค่าการเจริญ (จำนวนเส้นสาย, น้ำหนักแห้งชีวมวล) ในวันที่ t_i

i คือ วันในการทดลอง (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30)

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของสาหร่าย *S. platensis*

นำตัวอย่างสาหร่าย *S. platensis* มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วทำการบันทึกภาพลักษณะเส้นสายที่กำลังขยาย 4 เท่า, 10 เท่า, 40 เท่า และ 100 เท่า

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวม และองค์ประกอบทางพฤกษเคมี

ในการวัดองค์ประกอบทางพฤกษเคมีนั้น เป็นการศึกษาในระยะที่ 2 ใช้ตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในปริมาณ 6 ลิตรและอบลมร้อนจนได้ชีวมวลแห้ง แล้วนำมาศึกษาดังนี้

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธีเจดาห์ล (Kjeldahl, 1883)

ชั่งตัวอย่างสาหร่าย *S. platensis* แห้ง 0.25 กรัม ลงในหลอดเจดาห์ล เติม Cu_2SO_4 และ K_2SO_4 ซึ่งเป็นสารเร่งปฏิกิริยา ในอัตราสวน 1:9 จากนั้นเติม H_2SO_4 เข้มข้นปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำหลอดเจดาห์ลต่อเข้ากับเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปกลั่นต่อ เตรียม 4% H_3BO_3 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่หยดอินดิเคเตอร์แล้ว (สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูเข้ม) เมื่อกลั่นตัวอย่างจนสารละลายเป็นสีเขียวอมฟ้าใส นำมาไทเทรตด้วย 0.1 M HCl และบันทึกปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเทรต นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นไนโตรเจน และโปรตีน ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นไนโตรเจน} = \frac{(A - B) \times N \times 0.014}{W} \qquad (12)$$

เมื่อ A คือ ปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเทรต Blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของ HCl (0.1 M)

และ W คือ น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)

เปอร์เซ็นโปรตีน = เปอร์เซ็นไนโตรเจน × 6.25

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ด้วยวิธี Wintermans and De mots (1965)

ชั่งตัวอย่างสาหร่าย *S. platensis* แห้ง 0.1 กรัม ลงในหลอดเซนทริฟิวขนาด 15 มิลลิลิตร เติม 95% Ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แช่เย็นทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนใสลงในหลอดเซนทริฟิวหลอดใหม่ และปั่นตกตะกอนอีกครั้ง นำสารละลายที่สกัดได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 665 และ 649 นาโนเมตร โดยใช้ 95% Ethanol เป็น Blank คำนวณปริมาณคลอโรฟลล์ เอ จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{คลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัมต่อลิตร)} = \frac{((13.7 \times (A665 - A750)) - (5.76 \times (A649 - A750))) \times v}{V \times l} \quad (13)$$

เมื่อ v คือ ปริมาตรที่สกัด (มิลลิลิตร)

V คือ ปริมาตรตัวอย่างที่กรอง (มิลลิลิตร)

และ l คือ ความกว้างของคิวเวต (เซนติเมตร)

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ด้วยเทคนิค UV–spectro photometer (Sommer, Souza and Morrisy, 1992)

ชั่งตัวอย่างสหร่าย *S. platensis* แห้ง 0.2 กรัม ลงในหลอดเซนทริฟิวขนาด 15 มิลลิลิตร เติม 95% Ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 60% Potassium Hydroxide (KOH) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนบนใส่ลงในหลอดเซนทริฟิวขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติม 95% Ethanol และ 60% KOH ลงในส่วนที่เป็นตะกอนเพื่อสกัดซ้ำอีกครั้ง รวมสารละลาย ที่สกัดได้ จากนั้นเติม 9% NaCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ Dimethyl Ether ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น ปิเปตสารละลายส่วนบนลงในหลอดใหม่ เติม Dimethyl Ether เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร นำไปวัดคาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดจากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{แคโรทีนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{A450 \times 10}{260 \times W} \quad (14)$$

เมื่อ A450 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

10 คือ ปริมาตรสารละลายที่สกัดได้แล้วปรับปริมาตรด้วย Dimethyl Ether

260 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของแคโรทีนอยด์

และ W คือ น้ำหนักแห้ง (กรัม)

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณไฟโคบิลิโปรตีน ด้วยวิธีของ Siegelman and Kycia (1978)

ชั่งตัวอย่างสาหร่าย *S. platensis* 0.01 กรัมลงในหลอดเซนทริฟิวขนาด 15 มิลลิลิตร เติม Potassium Phosphate Buffer (pH 7) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง นำไปปั่นด้วย Vortex แล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 615 และ 652 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไฟโคบิลิโปรตีน ได้แก่ ไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริธรินจากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{ไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(A615 - (0.474 \times A652))}{5.34} \quad (15)$$

$$\text{อัลโลไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(A652 - (0.208 \times A615))}{5.09} \quad (16)$$

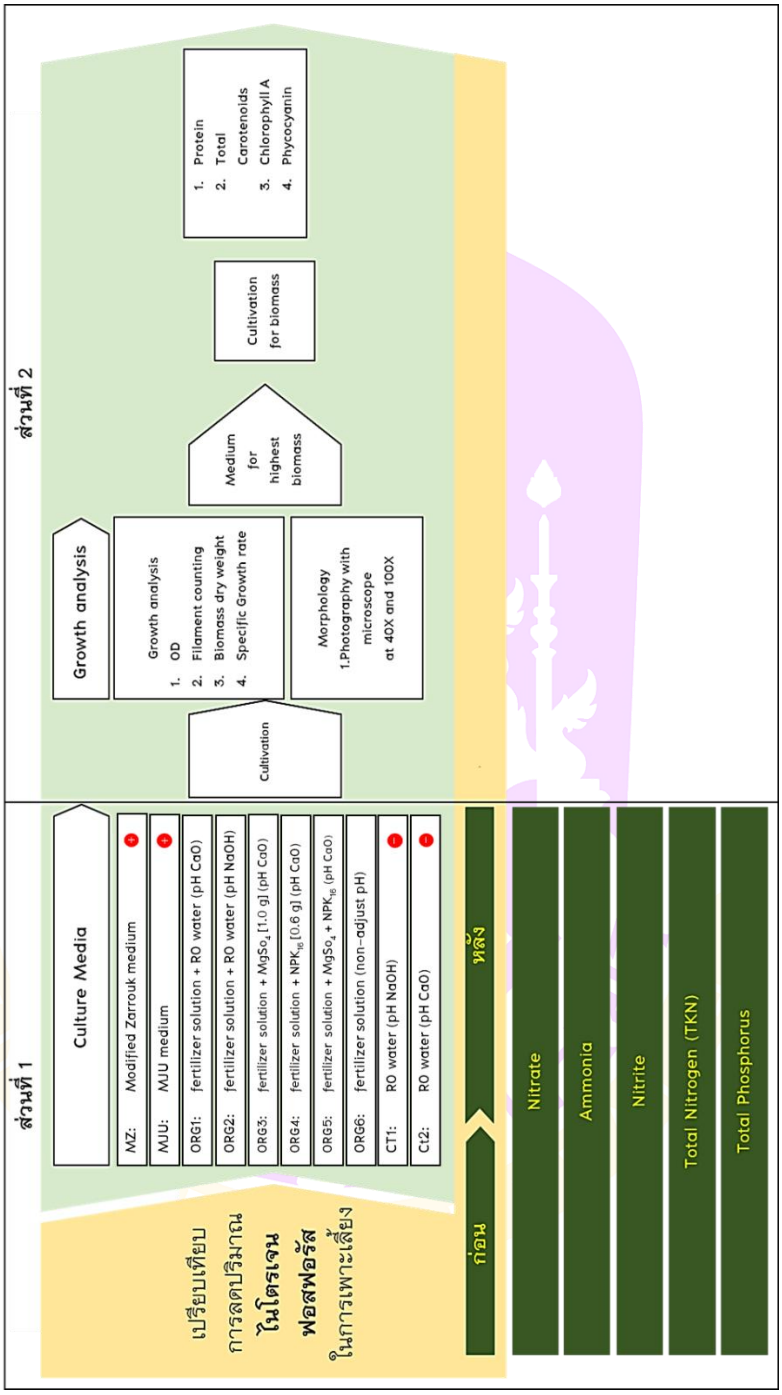
$$\text{ไฟโคอิริธริน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(A562 - (2.41 \times \text{ไฟโคไซยานิน}) - (0.849 \times \text{อัลโลไฟโคไซยานิน}))}{9.62} \quad (17)$$

เมื่อ A562 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

A615 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 615 นาโนเมตร

A652 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 652 นาโนเมตร

แผนผังการศึกษา



ภาพ 10 แผนการศึกษา

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาครั้งนี้ มีตัวแปรอิสระ 2 ตัวแปร คือ กรรมวิธีเพาะเลี้ยงและจำนวนวันเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็น 2 ปัจจัยตามสมมติฐาน คาดว่าส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* (ตัวแปรตามซึ่งจัดเป็นตัวแปรเชิงปริมาณ) ดังนั้นจึงเลือกใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูลแบบการวิเคราะห์ความแปรปรวน 2 ทาง (Two-way ANOVA) เพื่อทดสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระดังกล่าว โดยข้อมูลในการวิเคราะห์ความแปรปรวน 2 ทางนั้น มีเงื่อนไขคือ หน่วยตัวอย่างต้องได้จากการสุ่มและเป็นอิสระต่อกัน และประชากรแต่ละกลุ่มมีการแจกแจงแบบปกติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ μ_i และความแปรปรวนเท่ากันทุกประชากร ทำให้ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง $\sum ij$ มีความเป็นอิสระ มีการแจกแจงแบบปกติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0 และความแปรปรวนเท่ากับ σ^2 โดยใช้สถิติ Kolmogorov – Smirnov Test โดยมีสมมติฐานของการทดสอบคือ

H_0: ข้อมูลการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* มีการแจกแจงแบบปกติ

H_1: ข้อมูลการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* มีการแจกแจงแบบไม่ปกติ

และการทดสอบความเป็นเอกพันธของความแปรปรวนของประชากรหลายกลุ่ม โดยการทดสอบ Levene Test แบบ Univariate Analysis of Variance ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) โดยมีสมมติฐานของการทดสอบคือ

H_0: $\mu_1 = \mu_2 = \ldots = \mu_n$

H_1: $\mu_i \neq \mu_j$ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ $i \neq j$

พบว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติและการทดสอบความแปรปรวนของประชากรหลายกลุ่ม ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอย่างน้อย 1 ค่าที่แตกต่างจากค่าอื่น ๆ หมายถึงมีอิทธิพลร่วมต่อกันของกรรมวิธีเพาะเลี้ยงที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* ดังนั้นจึงทำการทดสอบเพื่อหาค่าเฉลี่ยจากกรรมวิธีที่มีความแตกต่างจากกรรมวิธีอื่น ๆ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรรมวิธี (Post Hoc. Multiple Comparisons)

แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงแบนมาตรฐานของข้อมูล 3 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way analysis of variance (ANOVA)) และใช้สถิติ Duncan's Multiple Rang Test (DMRT) เพื่อประเมินความแตกต่างของปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ปริมาณโปรตีนรวมและองค์ประกอบพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis* ภายใต้การเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) และ การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) เพื่อหาความสัมพันธ์ของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงต่อปริมาณโปรตีนรวมและองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis*

บทที่ 4

ผลการวิจัย

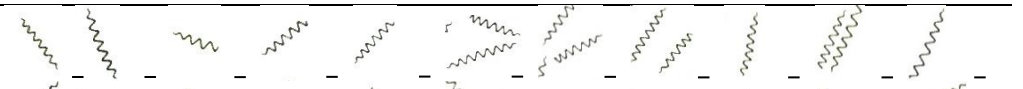
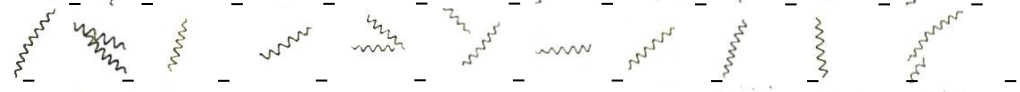
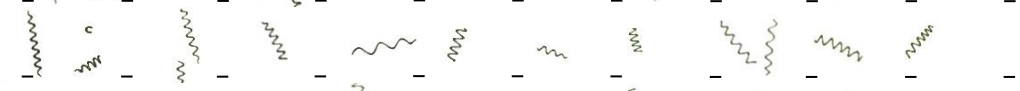
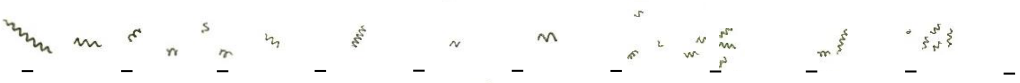
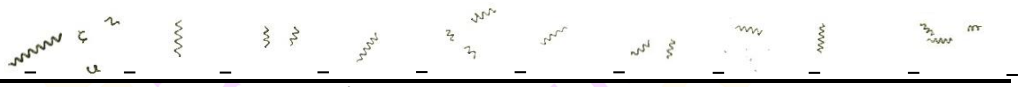
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน และการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis*

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของสาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงในแต่ละกรรมวิธีเป็นระยะเวลา 30 วัน โดยทำการสังเกตด้วยตาเปล่าและบันทึกภาพการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4 เท่า, 10 เท่า, 40 เท่า และ 100 เท่า พบว่า สาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงในทุกกรรมวิธี มีลักษณะเส้นสายบิดเกลียว โดยสาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธี ORG3, ORG4 และ ORG5 มีสีเขียวเข้มและมีความยาวของเส้นสายใกล้เคียงกับสาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธี MZ และ MJU แต่มีสีเขียวเข้มและมีความยาวเส้นสายมากกว่าสาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธี ORG1, ORG2 และ ORG6 (ตาราง 3) นอกจากนี้พบว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ด้วยกรรมวิธี ORG1, ORG2, ORG3, ORG4, ORG5, ORG6, CT1 และ CT2 มีการปนเปื้อน (Contamination) ด้วยแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ตั้งแต่วันที่ 6 จนถึงวันที่ 30 ของการทดลอง (ตาราง 2) และตั้งแต่วันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงในกรรมวิธี ORG1 เกิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่(Ecological succession) ของแพลงก์ตอนพืชอย่างสมบูรณ์

การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* จากอิทธิพลร่วมระหว่างกรรมวิธีเพาะเลี้ยงและจำนวนวันในการเพาะเลี้ยง พบว่าทั้งสองปัจจัยเกิดอิทธิพลร่วมต่อกัน แสดงให้เห็นว่าแต่ละกรรมวิธีในแต่ละวันเพาะเลี้ยงมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* ยกเว้นในวันที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากมีการควบคุมให้ปริมาณสาหร่าย *S. platensis* เริ่มต้นใกล้เคียงกันมากที่สุด จึงส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสง (ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร) จำนวนเส้นสายและค่าน้ำหนักแห้งชีวมวลมีค่าใกล้เคียงกันและข้อมูลไม่มีการแจงแจกแบบปกติ จึงไม่สามารถวิเคราะห์หาอิทธิพลร่วมของปัจจัยในวันเพาะเลี้ยงดังกล่าวได้ (ภาคผนวก ข) เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างคาเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงและจำนวนเส้นสายของแต่ละกรรมวิธีในแต่ละวันเพาะเลี้ยง ตั้งแต่วันที่ 12 ถึงวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) และจากผลการวิเคราะห์ข้างต้นที่สามารถเก็บเกี่ยวสาหร่าย *S. platensis* ได้ในช่วงระยะเวลาตั้งแต่ 12 วันเป็นต้นไปและเพื่อศึกษาความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจในการเพาะเลี้ยง จึงเลือกวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลในช่วงวันที่ 12 ถึงวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง

สาหร่าย *S. platensis* เท่านั้น และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบทีละคู่ของค่าน้ำหนักแห้งชีวมวล พบว่า ในวันที่ 6, 9, 12, 21 และ 27 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) จึงเลือกวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลในวันดังกล่าวต่อไป

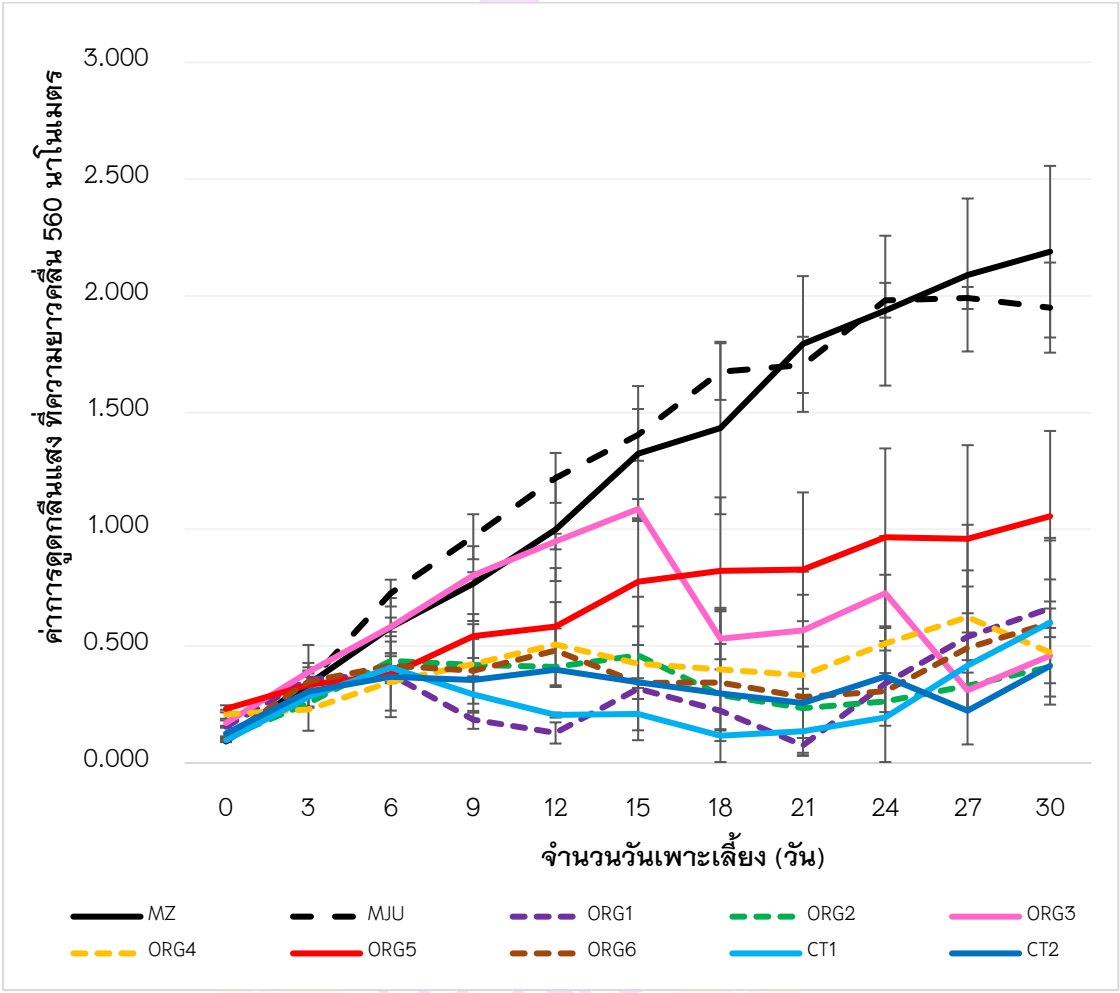
ตาราง 2 การเปรียบเทียบลักษณะเส้นสายของสาหร่าย *S. platensis* ในแต่ละกรรมวิธี เป็นระยะเวลา 30 วัน

กรรมวิธี	จำนวนวันเพาะเลี้ยง (วัน)										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
MZ											
MJU											
ORG1											
RG2											
ORG3											
ORG4											
ORG5											
ORG6											
CT1											
CT2											

หมายเหตุ: Bar marker มีความยาวเท่ากับ 50 ไมโครเมตร

ผลการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ของแต่ละกรรมวิธี ในวันที่ 12 ถึง 24 ของการเพาะเลี้ยง พบว่า กรรมวิธี ORG3 ในวันที่ 15, กรรมวิธี ORG5 วันที่ 24 และกรรมวิธี ORG3 วันที่ 12 มีค่ามากที่สุด เท่ากับ 1.087±0.042, 0.966±0.381 และ 0.948±0.033 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) กับกรรมวิธี MZ และ MJU (ชุดควบคุมเชิงบวก) ในจำนวนวันเพาะเลี้ยงเดียวกัน และกรรมวิธี ORG3 วันที่ 12 และกรรมวิธี ORG5 วันที่ 12 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) ซึ่งมีค่า

เท่ากับ 0.583±0.251 (ตาราง 3) และเมื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ พบว่ากรรมวิธี ORG3 และกรรมวิธี ORG5 ในวันที่ 12 มีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างใกล้เคียงกันและค่อนข้างคงที่ (ภาพ 11) จึงเลือกกรรมวิธี ORG3 และ ORG5 จำนวนวันเพาะเลี้ยง 12 วัน เพื่อพิจารณาเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ดีที่สุดต่อไป



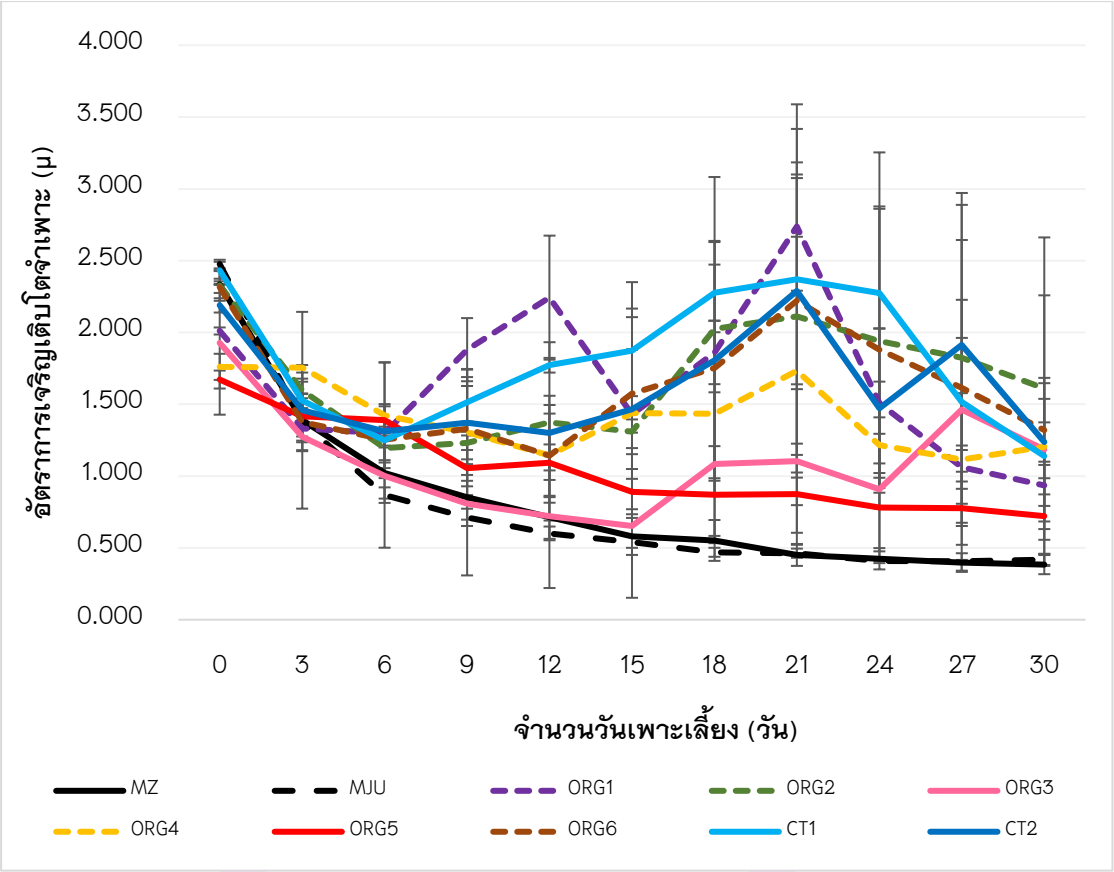
ภาพ 11 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

ตาราง 3 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

กรรมวิธี	จำนวนวันเพาะเลี้ยง (วัน)										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
MZ	0.107±0.001	0.338±0.058	0.582±0.125	0.768±0.160	0.999±0.220^{def}	1.325±0.289^{bcd}	1.434±0.369^{bcd}	1.794±0.291^{ab}	1.936±0.321^{a}	2.089±0.327	2.189±0.367
MJU	0.092±0.003	0.342±0.049	0.727±0.057	0.968±0.096	1.220±0.107^{cde}	1.404±0.111^{bcd}	1.675±0.121^{abc}	1.704±0.120^{abc}	1.981±0.075^{a}	1.990±0.047	1.949±0.193
ORG1	0.155±0.004	0.360±0.023	0.378±0.037	0.185±0.038	0.128±0.045^{l}	0.318±0.044^{hijkl}	0.224±0.220^{kl}	0.075±0.032^{l}	0.341±0.181^{hijkl}	0.541±0.100	0.662±0.124
ORG2	0.109±0.011	0.256±0.032	0.438±0.050	0.419±0.069	0.411±0.193 ^{hijkl}	0.461±0.230^{ghijkl}	0.290±0.294^{ijkl}	0.235±0.226^{kl}	0.263±0.220^{jkl}	0.331±0.234	0.412±0.262
ORG3	0.171±0.011	0.389±0.020	0.582±0.040	0.803±0.013	0.948±0.033 ^{defg}	1.087±0.042^{de}	0.532±0.132 ^{fghijkl}	0.568±0.251 ^{fghijkl}	0.726±0.245 ^{eghijk}	0.311±0.076	0.460±0.118
ORG4	0.209±0.019	0.229±0.091	0.347±0.122	0.424±0.170	0.507±0.182 ^{fghijkl}	0.426±0.286 ^{hijkl}	0.400±0.256 ^{hijkl}	0.375±0.345 ^{hijkl}	0.512±0.294 ^{fghijkl}	0.624±0.395	0.473±0.188
ORG5	0.232±0.015	0.335±0.093	0.379±0.183	0.543±0.094	0.583±0.251 ^{fghijkl}	0.776±0.271 ^{efghij}	0.823±0.314 ^{efghi}	0.828±0.330^{efgh}	0.966±0.381^{defg}	0.959±0.401	1.056±0.365
ORG6	0.110±0.004	0.348±0.158	0.417±0.103	0.394±0.137	0.481±0.095 ^{ghijkl}	0.343±0.242^{hijkl}	0.344±0.305 ^{hijkl}	0.283±0.324^{jkl}	0.307±0.271^{hijkl}	0.493±0.332	0.600±0.364
CT1	0.096±0.005	0.282±0.046	0.408±0.061	0.293±0.078	0.205±0.011^{kl}	0.209±0.112^{kl}	0.116±0.022^{l}	0.136±0.103^{l}	0.194±0.190^{kl}	0.417±0.338	0.601±0.351
CT2	0.126±0.006	0.306±0.038	0.369±0.014	0.356±0.094	0.398±0.133 ^{hijkl}	0.345±0.175 ^{hijkl}	0.298±0.248hijkl	0.256±0.279^{jkl}	0.370±0.216 ^{hijkl}	0.224±0.138	0.416±0.072

หมายเหตุ: * (ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)

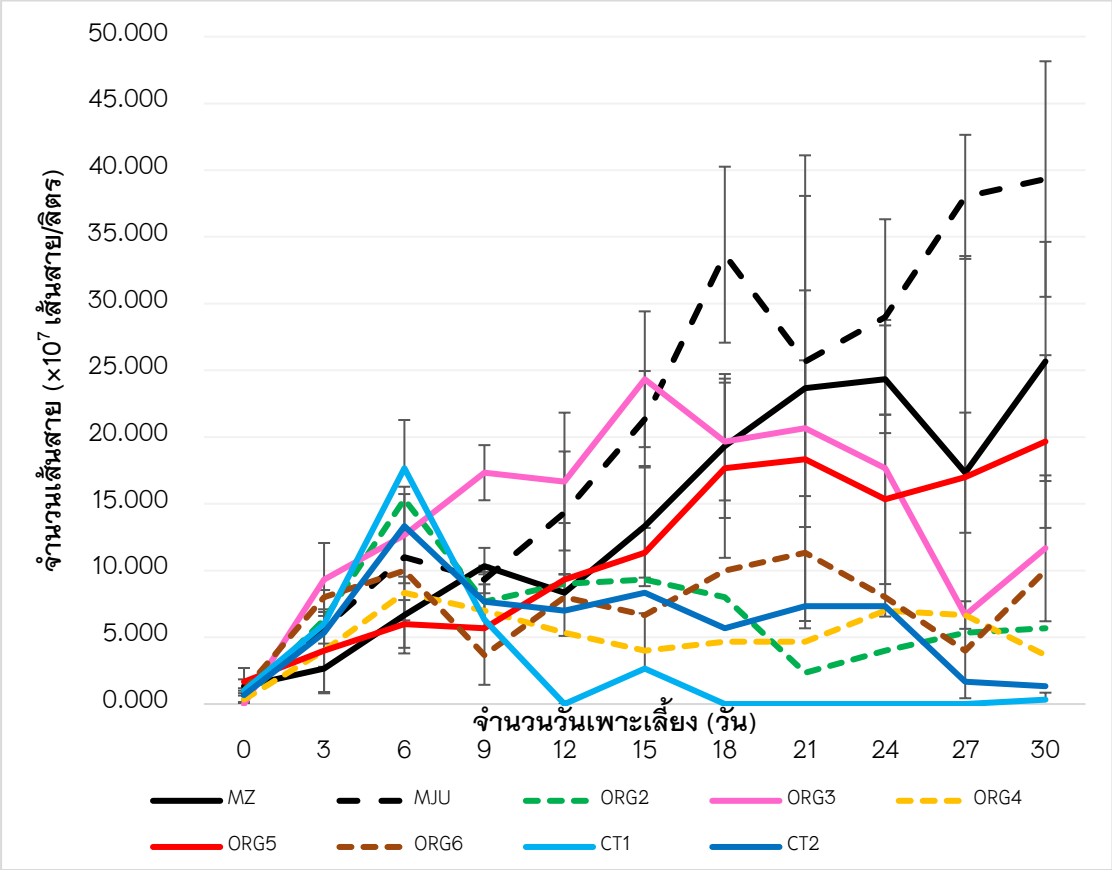
** ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กหลังตัวเลขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value ≤ 0.05) (a-z จากมากไปน้อย)



ภาพ 12 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน ที่ความยาว คลื่น 560 นาโนเมตร

ผลการเปรียบเทียบจำนวนเส้นสายของสาหร่าย *S. platensis* ด้วย Haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงที่กำลังขยาย 40 เทา ทุก ๆ 3 วัน (30 วัน) พบว่า จำนวนเส้นสายที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธี ORG3 วันที่ 15, 21 และ 18 ให้ค่าจำนวนเส้นสายมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 24.333±5.086, 20.667±5.086 และ 19.667±4.412 ($\times 10^7$ เส้นสาย/ลิตร) ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) กับกรรมวิธี MZ และกรรมวิธี MJU ในจำนวนวันเพาะเลี้ยงเดียวกัน และกรรมวิธี ORG3 วันที่ 12 และกรรมวิธี ORG5 วันที่ 12 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) กับกรรมวิธี ORG3 วันที่ 15, 21 และ 18 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 16.667±5.164 และ 9.333±4.227 ($\times 10^7$ เส้นสาย/ลิตร) ตามลำดับ (ตาราง 4) โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกรรมวิธี ORG3 และกรรมวิธี ORG5 ในวันที่ 12 มีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างใกล้เคียงกันและค่อนข้างคงที่ (ภาพ 13) จึงเลือกกรรมวิธี ORG3 และ

ORG5 จำนวนวันเพาะเลี้ยง 12 วัน เพื่อพิจารณาเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ดีที่สุดต่อไป



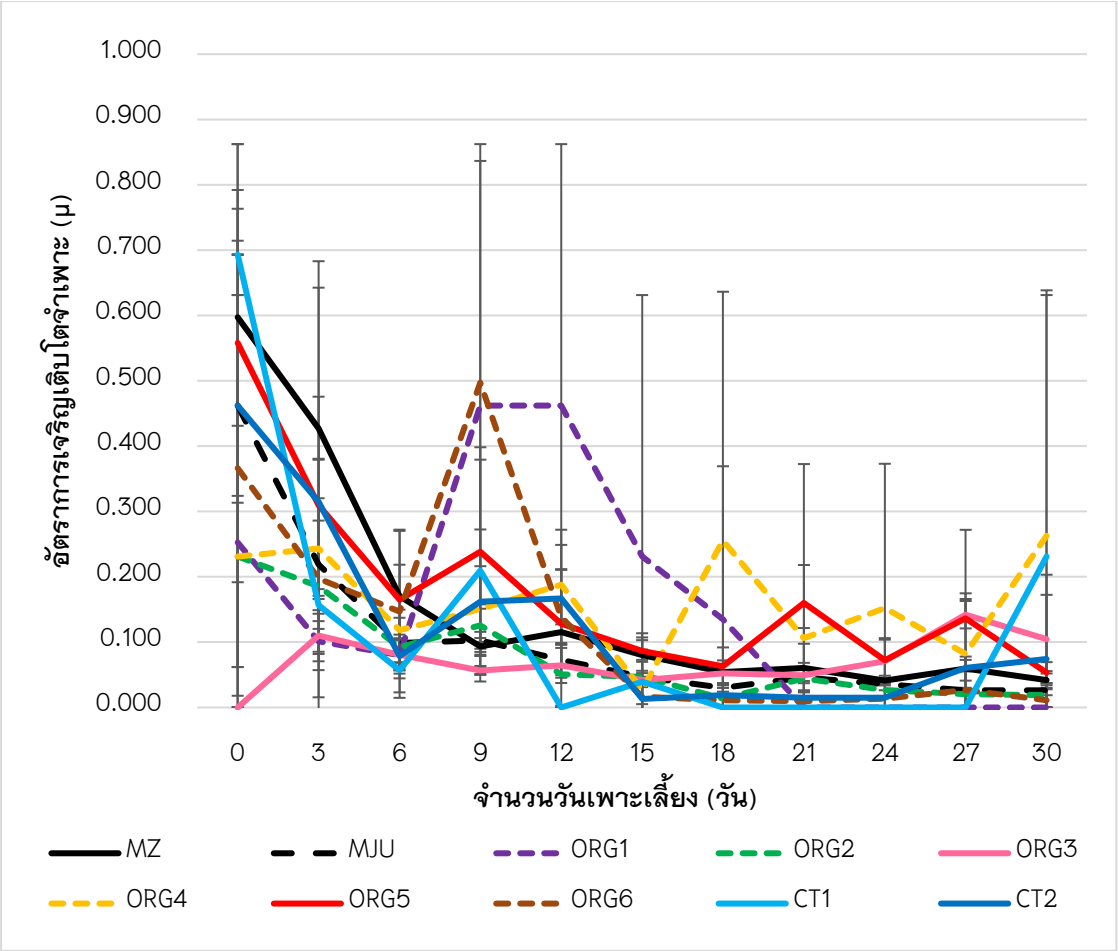
ภาพ 13 จำนวนเส้นสายของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน (×10^7 เส้นสาย/ลิตร)

ตาราง 4 จำนวนเส้นสายของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน ($\times 10^7$ เส้นสาย/ลิตร)

กรรมวิธี	จำนวนวันเพาะเลี้ยง(วัน)										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
MZ	1.333±0.516	2.667±1.862	6.667±2.875	10.333±1.366	8.333±1.366^{cdefghi}	13.333±4.502^{bcdefghi}	19.333±5.391^{abcdefg}	23.667±17.443^{abcde}	24.333±4.033^{abcd}	17.333±4.502	25.667±8.959
MJU	0.667±0.516	5.667±2.875	11.000±4.733	9.333±1.033	14.333±4.590^{bcdefghi}	21.333±3.615^{abcdef}	33.667±6.593^{a}	25.667±12.404^{abc}	29.000±7.321^{ab}	38.000±4.648	39.333±8.824
ORG1	3.667±1.033	9.667±1.862	12.667±3.141	0.667±0.516	0.667±0.516^{hi}	0.333±0.516^{i}	0.667±1.033^{hi}	0.000±0.000^{i}	0.000±0.000^{i}	0.000±0.000	0.000±0.000
ORG2	0.333±0.516	6.333±3.724	15.333±8.017	7.667±1.366	9.000±7.642^{cdefghi}	9.333±7.448^{cdefghi}	8.000±12.394^{defghi}	2.333±3.615^{ghi}	4.000±6.197^{fghi}	5.333±8.262	5.667±8.779
ORG3	0.000±0.000	9.333±2.733	12.667±3.615	17.333±2.066	16.667±5.164^{bcdefghi}	24.333±5.^{086abcd}	19.667±4.412^{abcdefg}	20.667±5.086^{abcdef}	17.667±11.112^{abcdefghi}	6.667±1.033	11.667±5.465
ORG4	0.333±0.516	4.000±1.549	8.333±1.862	7.000±2.683	5.333±2.066^{fghi}	4.000±6.197^{fghi}	4.667±6.470^{fghi}	4.667±4.502^{fghi}	7.000±9.338^{defghi}	6.667±6.831	3.667±4.926
ORG5	1.667±1.033	4.000±3.098	6.000±1.789	5.667±4.227	9.333±4.227^{cdefghi}	11.333±1.862^{cdefghi}	17.667±6.713^{abcdefghi}	18.333±12.660^{abcdefgh}	15.333±6.346^{bcdefghi}	17.000±16.565	19.667±6.470
ORG6	1.000±0.894	8.000±5.367	10.000±6.261	3.667±4.131	8.000±3.098^{defghi}	6.667±10.328^{fghi}	10.000±15.492^{cdefghi}	11.333±17.558^{cdefghi}	8.000±12.394^{defghi}	4.000±6.197	10.000±15.492
CT1	1.000±0.000	6.000±0.894	17.667±3.615	6.333±3.386	0.000±0.000^{i}	2.667±4.131^{ghi}	0.000±0.000^{i}	0.000±0.000^{i}	0.000±0.000^{i}	0.000±0.000	0.333±0.516
CT2	0.667±0.516	5.333±3.386	13.333±4.590	7.667±4.033	7.000±3.225^{defghi}	8.333±12.910^{cdefghi}	5.667±8.779^{fghi}	7.333±11.361^{defghi}	7.333±11.361^{defghi}	1.667±2.582	1.333±2.066

หมายเหตุ: * (ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)

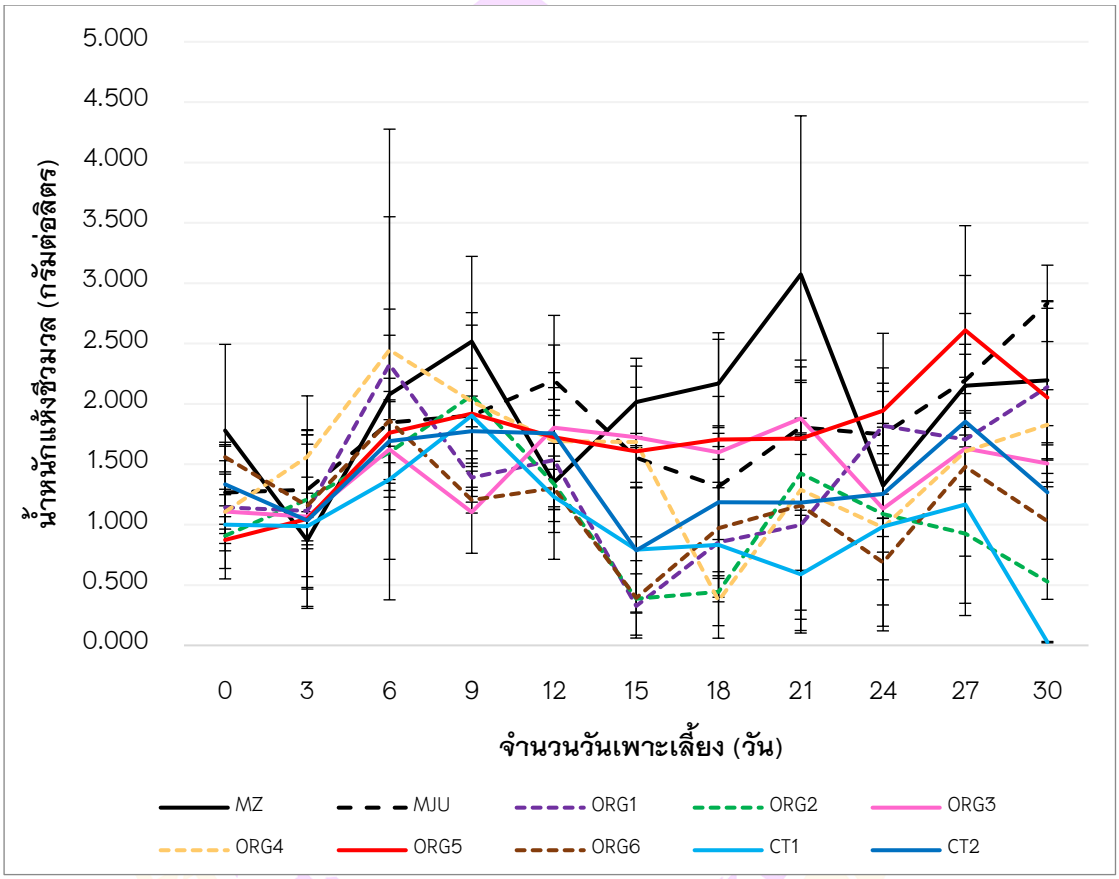
** ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กหลังตัวเลขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p–value ≤ 0.05) (a–z จากมากไปน้อย



ภาพ 14 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากจำนวนเส้นสายของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน ($\times 10^7$ เส้นสาย/ลิตร)

ผลการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักแห้งชีวมวลทุก ๆ 3 วัน (30 วัน) พบว่า น้ำหนักแห้งชีวมวลของสาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธี ORG5 วันที่ 27, กรรมวิธี ORG4 วันที่ 6 และกรรมวิธี ORG2 วันที่ 9 มีค่าน้ำหนักแห้งชีวมวลมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 2.610±0.867, 2.447±1.104 และ 2.070±0.184 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) กับกรรมวิธี MZ และ MJU ในจำนวนวันเพาะเลี้ยงเดียวกัน และน้ำหนักแห้งชีวมวลของสาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธี ORG3 และกรรมวิธี ORG5 ในจำนวนวันเพาะเลี้ยง 12 วัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) กับกรรมวิธี ORG5 วันที่ 27, กรรมวิธี ORG4 วันที่ 6 และกรรมวิธี ORG2 วันที่ 9 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.803±0.235

และ 1.723±1.010 ตามลำดับ (ตาราง 5) โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกรรมวิธี ORG3 และกรรมวิธี ORG5 ในวันที่ 12 มีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างใกล้เคียงกันและค่อนข้างคงที่ (ภาพ 15) จึงเลือกกรรมวิธี ORG3 และ ORG5 จำนวนวันเพาะเลี้ยง 12 วัน เพื่อพิจารณาเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ดีที่สุดต่อไป



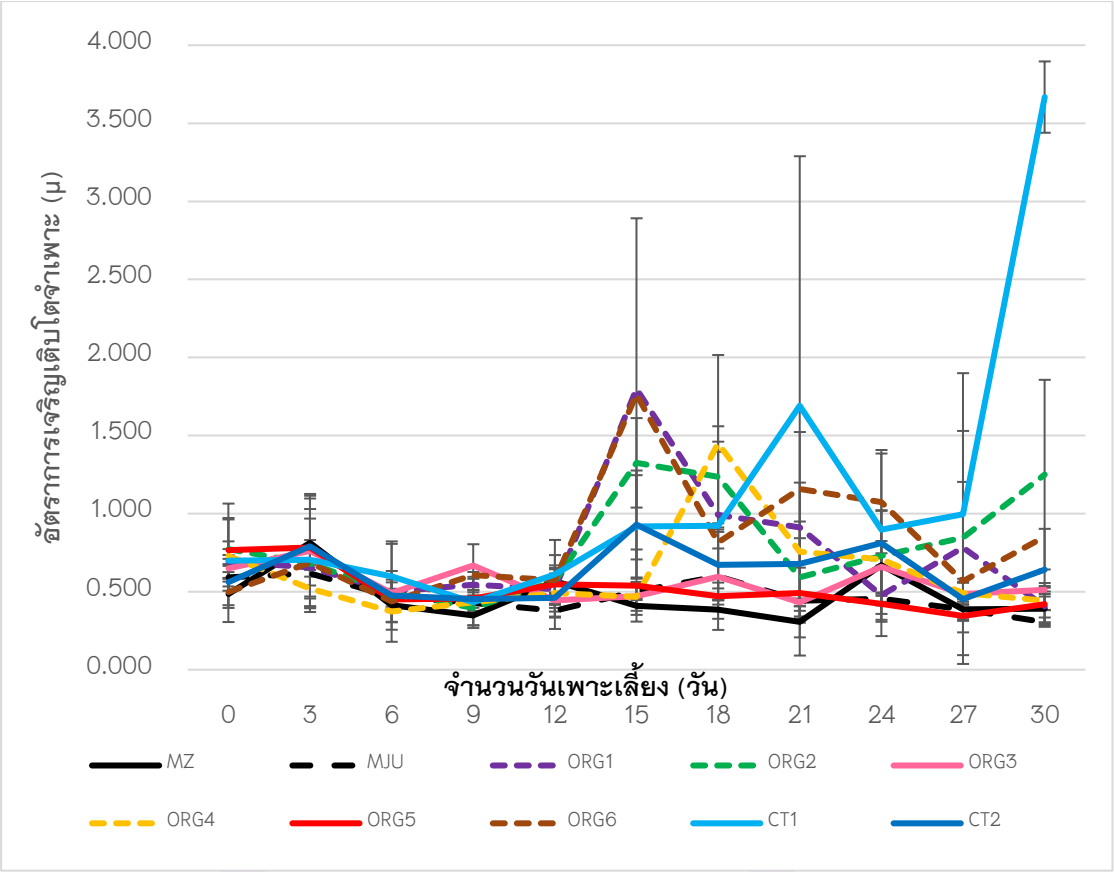
ภาพ 15 ค่าน้ำหนักแห้งชีวมวลของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน (กรัมต่อลิตร)

ตาราง 5 ค่าน้ำหนักแห้งชีวมวลของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน (กรัมต่อลิตร)

กรรมวิธี	จำนวนวันเพาะเลี้ยง(วัน)										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
MZ	1.780±0.714	0.870±0.391	2.080±0.706^{abcdef}	2.517±0.706^{abc}	1.350±0.324^{bcdefg}	2.017±0.362	2.170±0.366	3.073±1.313^{a}	1.323±0.780	2.150±0.344^{abcdef}	2.197±0.650
MJU	1.267±0.263	1.290±0.490	1.847±0.723^{abcdefg}	1.903±0.292^{abcdefg}	2.197±0.292^{abcdef}	1.553±0.203	1.317±0.440	1.807±0.075^{abcdefg}	1.747±0.092	2.197±0.553^{abcdef}	2.833±0.317
ORG1	1.143±0.506	1.113±0.280	2.327±1.950^{abcde}	1.390±0.156^{bcdefg}	1.537±0.412^{bcdefg}	0.327±0.266	0.853±0.794	0.997±0.705^{efg}	1.820±0.765	1.707±1.358^{bcdefg}	2.140±0.715
ORG2	0.907±0.275	1.210±0.652	1.600±0.370^{bcdefg}	2.070±0.184^{abcdef}	1.337±0.240^{bcdefg}	0.387±0.152	0.443±0.167	1.423±0.636^{bcdefg}	1.087±0.560	0.927±0.605^{fg}	0.527±0.355
ORG3	1.110±0.184	1.067±0.600	1.623±0.396^{bcdefg}	1.103±0.340^{defg}	1.803±0.235^{abcdefg}	1.723±0.415	1.600±0.990	1.880±0.298^{abcdefg}	1.133±0.361	1.630±0.315^{bcdefg}	1.506±0.155
ORG4	1.107±0.556	1.563±0.504	2.447±1.104^{abcd}	2.020±0.737^{abcdef}	1.693±0.566^{bcdefg}	1.683±0.045	0.370±0.207	1.290±1.074^{bcdefg}	0.977±0.075	1.607±0.318^{bcdefg}	1.827±0.291
ORG5	0.873±0.090	1.047±0.740	1.760±0.110^{abcdefg}	1.920±0.733^{abcdefg}	1.723±1.010^{abcdefg}	1.607±0.707	1.707±0.356	1.713±0.593^{bcdefg}	1.943±0.355	2.610±0.867^{ab}	2.053±0.739
ORG6	1.560±0.123	1.157±0.587	1.863±0.350^{abcdefg}	1.203±0.107^{cdefg}	1.303±0.155^{bcdefg}	0.393±0.309	0.970±0.571	1.160±1.037^{cdefg}	0.687±0.567	1.480±0.741^{bcdefg}	1.030±0.649
CT1	1.000±0.156	0.987±0.121	1.373±0.660^{bcdefg}	1.903±0.393^{abcdefg}	1.230±0.295^{cdefg}	0.793±0.517	0.833±0.473	0.590±0.488^{g}	0.983±0.825	1.167±0.919^{cdefg}	0.027±0.006
CT2	1.333±0.085	1.033±0.711	1.693±0.410^{bcdefg}	1.773±0.292^{abcdefg}	1.757±0.379^{abcdefg}	0.787±0.519	1.187±0.632	1.183±0.561^{cdefg}	1.253±0.919	1.853±0.558^{abcdefg}	1.267±0.554

หมายเหตุ: * (ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)

** ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กหลังตัวเลขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value ≤ 0.05) (a-z จากมากไปน้อย



ภาพ 16 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากค่าน้ำหนักแห้งชีวมวลของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน (กรัมต่อลิตร)

จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบทีละคู่ระหว่างกรรมวิธีเพาะเลี้ยงและจำนวนวันในการเพาะเลี้ยงซึ่งเกิดอิทธิพลร่วมกัน ส่งผลต่อค่าการเจริญเติบโต ได้แก่ ค่าการดูดกลืนแสง (ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร) จำนวนเส้นสาย และค่าน้ำหนักแห้งชีวมวล จึงพิจารณาเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ดีที่สุด คือ กรรมวิธี ORG3 และ ORG5 ในจำนวนวันเพาะเลี้ยง 12 วัน ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) กับกรรมวิธี MZ และ MJU (ชุดควบคุมเชิงบวก) โดยทำการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายชีวมวล และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมและสารพฤกษเคมีต่อไป

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอาหารกลุ่มไนโตรเจน และฟอสฟอรัสในอาหารเหลวแต่ละกรรมวิธีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* โดยทำการเก็บตัวอย่างอาหารเหลวในวันที่ 0 และวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณ

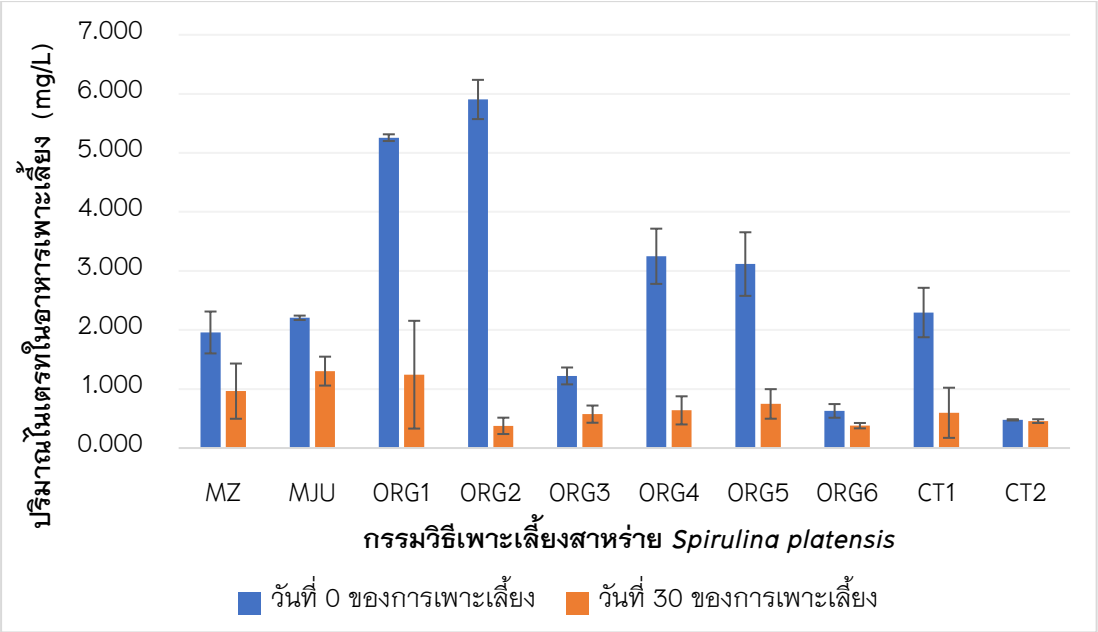
ของสารดังกล่าว โดยการหาค่าการเปลี่ยนแปลงจากผลการเพิ่มและการลดของปริมาณสารต่าง ๆ พบว่า ปริมาณสารไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยงทุกกรรมวิธีมีปริมาณลดลงจากวันที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณสารไนไตรต์ในอาหารเพาะเลี้ยงกรรมวิธี MJU และกรรมวิธี ORG1 มีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.019 และ 0.025 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณสารแอมโมเนียในอาหารเพาะเลี้ยงกรรมวิธี ORG6, CT1 และ CT2 มีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.093, 0.019 และ 0.084 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณ TKN ในอาหารเพาะเลี้ยงกรรมวิธี ORG1, ORG2, ORG3, ORG6, CT1 และ CT2 มีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นเท่ากับ 3.267, 4.573, 4.639, 2.893, 1.773 และ 3.453 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงกรรมวิธี ORG1, ORG2, ORG3, ORG6, CT1 และ CT2 มีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นเท่ากับ 3.327, 4.597, 4.648, 2.809, 1.792 และ 3.369 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณฟอสฟอรัสรวมในอาหารเพาะเลี้ยงทุกกรรมวิธีมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง ยกเว้นกรรมวิธี ORG5 ที่มีปริมาณลดลงจากวันที่ 0 ของการเพาะเลี้ยงโดยมีปริมาณลดลงเท่ากับ 1.269 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตาราง 6)

ตาราง 6 ผลวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารอาหารในแต่ละกรรมวิธีเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis*

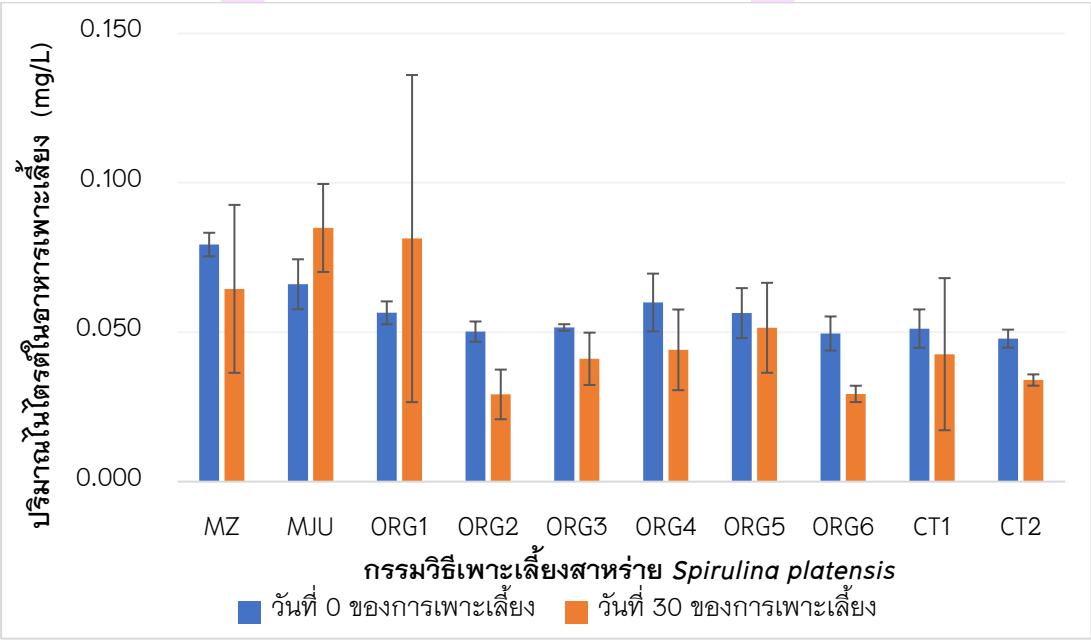
กรรมวิธี	ปริมาณไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยง (mg/L)			ปริมาณไนไตรต์ในอาหารเพาะเลี้ยง (mg/L)			ปริมาณแอมโมเนียในอาหารเพาะเลี้ยง (mg/L)			ปริมาณ TKN (mg/L)			ปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจน (mg/L)			ปริมาณฟอสฟอรัสรวม (mg/L)		
	วันที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง	วันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลง	วันที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง	วันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลง	วันที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง	วันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลง	วันที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง	วันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลง	วันที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง	วันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลง	วันที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง	วันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลง
MZ	1.957±0.355	0.963±0.468	-0.994	0.079±0.004	0.065±0.028	-0.015	0.289±0.032	0.196±0.056	-0.093	4.200±3.564	3.733±0.647	-0.467	3.920±3.603	3.537±0.649	-0.383	3.206±0.060	4.374±0.136	+1.167
MJU	2.206±0.037	1.303±0.245	-0.903	0.066±0.008	0.085±0.015	+0.019	2.016±0.572	0.233±0.016	-1.783	12.908±0.040	3.173±0.647	-9.735	11.214±0.218	2.940±0.655	-8.274	3.485±0.084	4.643±0.503	+1.159
ORG1	5.257±0.057	1.242±0.913	-4.015	0.056±0.004	0.081±0.055	+0.025	0.280±0.048	0.233±0.090	-0.047	0.840±0.396	4.107±0.855	+3.267	0.546±0.455	3.873±0.933	+3.327	0.162±0.017	2.416±0.696	+2.254
ORG2	5.904±0.332	0.376±0.138	-5.529	0.050±0.003	0.029±0.008	-0.021	0.233±0.016	0.215±0.043	-0.019	0.840±0.396	5.413±0.647	+4.573	0.602±0.416	5.199±0.615	+4.597	0.597±0.016	4.459±0.183	+3.862
ORG3	1.221±0.143	0.574±0.146	-0.647	0.052±0.001	0.041±0.009	-0.010	0.224±0.028	0.215±0.032	-0.009	0.588±0.040	5.227±0.647	+4.639	0.364±0.000	5.012±0.631	+4.648	0.062±0.016	2.506±0.334	+2.444
ORG4	3.248±0.468	0.638±0.238	-2.611	0.060±0.010	0.044±0.014	-0.016	3.425±0.086	0.146±0.020	-3.280	23.800±0.396	3.659±4.877	-20.141	20.328±0.356	3.513±4.897	-16.815	1.005±0.018	1.928±0.062	+0.923
ORG5	3.117±0.539	0.747±0.250	-2.370	0.056±0.008	0.051±0.015	-0.005	3.285±0.065	0.149±0.043	-3.136	24.640±4.752	3.920±2.019	-20.720	21.336±4.673	3.771±1.976	-17.565	2.873±0.028	1.604±0.143	-1.269
ORG6	0.629±0.116	0.379±0.045	-0.250	0.050±0.006	0.029±0.003	-0.020	0.159±0.032	0.252±0.074	+0.093	0.840±0.396	3.733±0.647	+2.893	0.672±0.436	3.481±0.697	+2.809	0.158±0.016	2.649±0.320	+2.492
CT1	2.295±0.419	0.597±0.425	-1.698	0.051±0.006	0.043±0.025	-0.009	0.131±0.086	0.149±0.016	+0.019	1.400±0.396	3.173±0.323	+1.773	1.232±0.317	3.024±0.339	+1.792	0.165±0.010	2.710±0.049	+2.545
CT2	0.477±0.010	0.456±0.031	-0.021	0.048±0.003	0.034±0.002	-0.014	0.112±0.028	0.196±0.056	+0.084	0.280±0.396	3.733±0.323	+3.453	0.168±0.356	3.537±0.373	+3.369	0.158±0.018	1.930±0.187	+1.773

หมายเหตุ: เครื่องหมาย + หมายถึง ปริมาณสารอาหารในวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยงมีการเพิ่มขึ้น

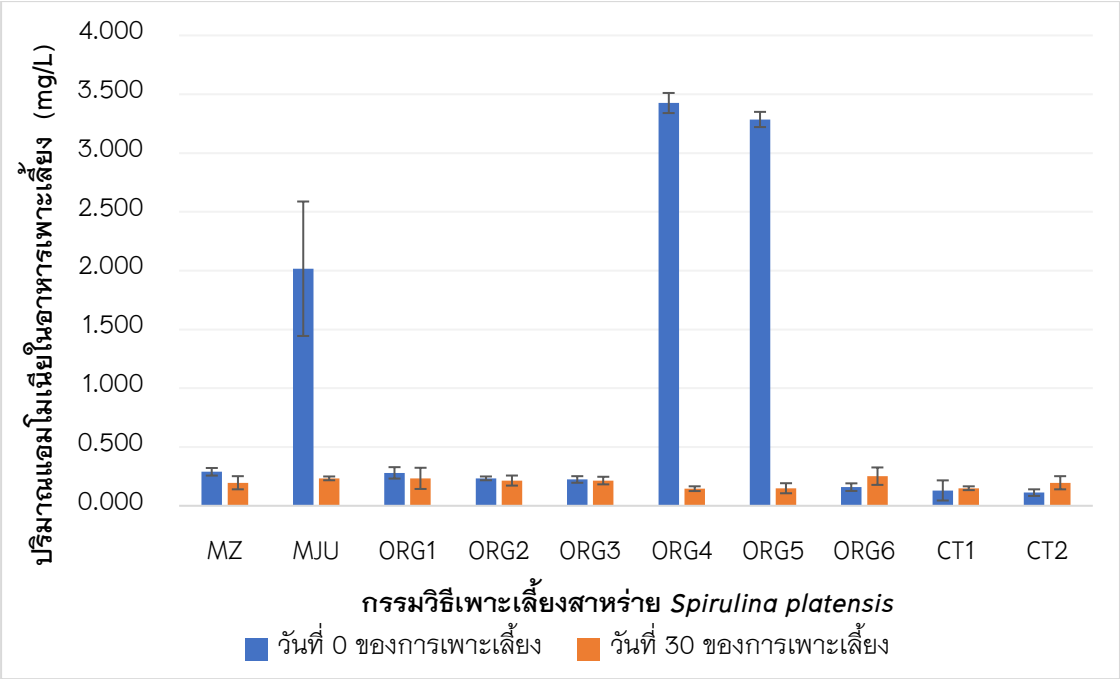
เครื่องหมาย – หมายถึง ปริมาณสารอาหารมีในวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยงมีการลดลง



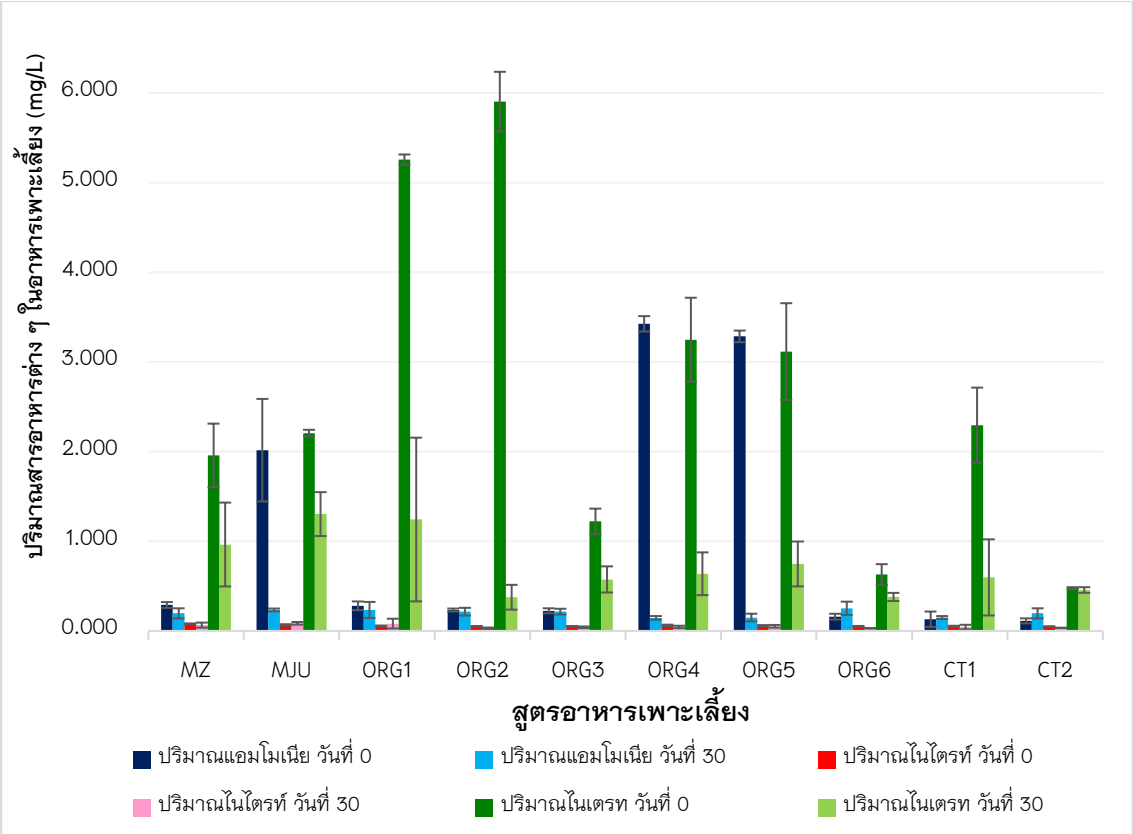
ภาพ 17 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนเตรตแต่ละกรรมวิธีเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis*



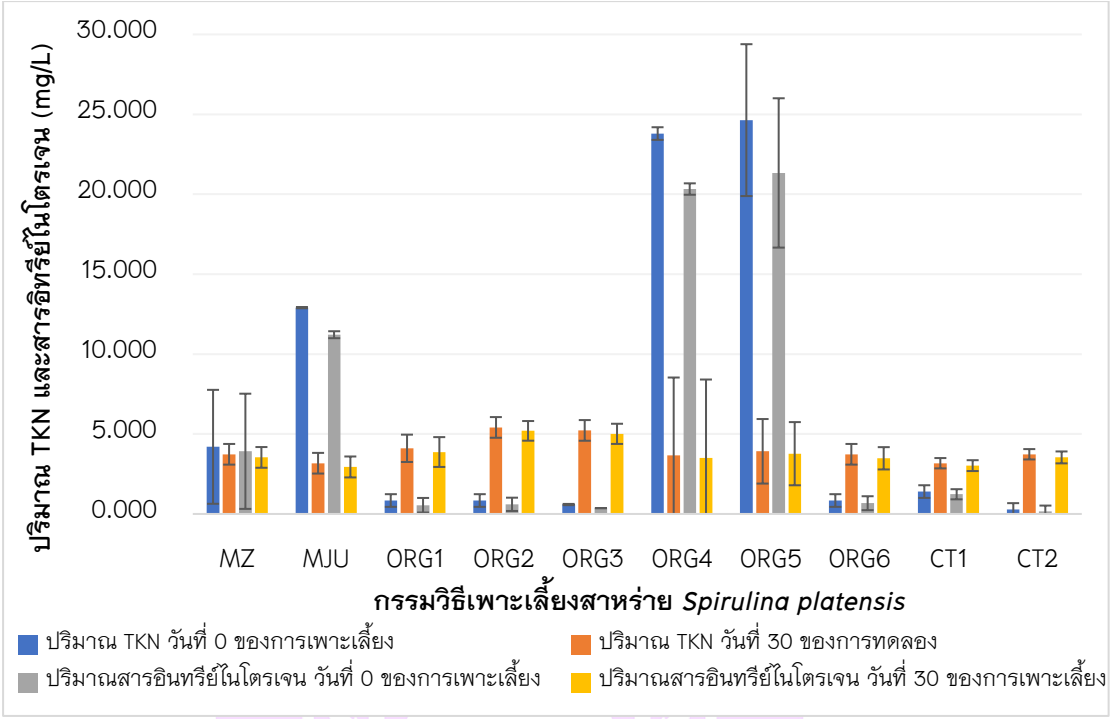
ภาพ 18 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนไตรต์แต่ละกรรมวิธีเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis*



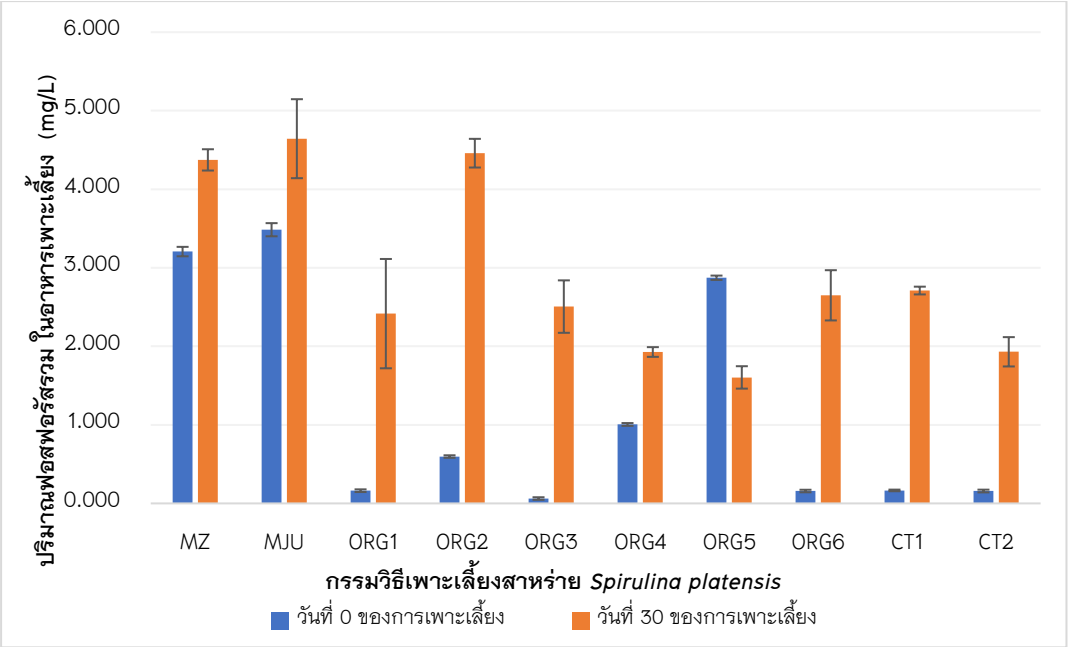
ภาพ 19 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียแต่ละกรรมวิธีเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis*



ภาพ 20 เปรียบเทียบปริมาณสารอาหารต่าง ๆ กลุ่มไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis (mg/L)*



ภาพ 21 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลง TKN และสารอินทรีย์ไนโตรเจนแต่ละกรรมวิธีเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis*

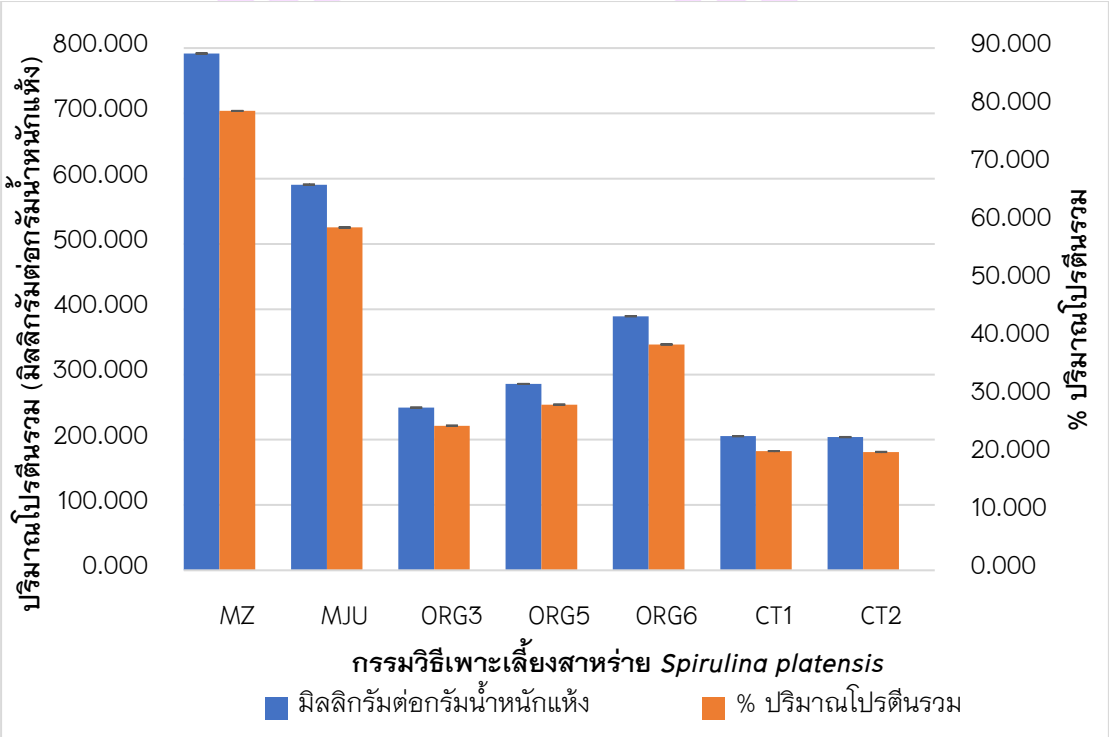


ภาพ 22 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟอสฟอรัสรวมแต่ละกรรมวิธีเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis*

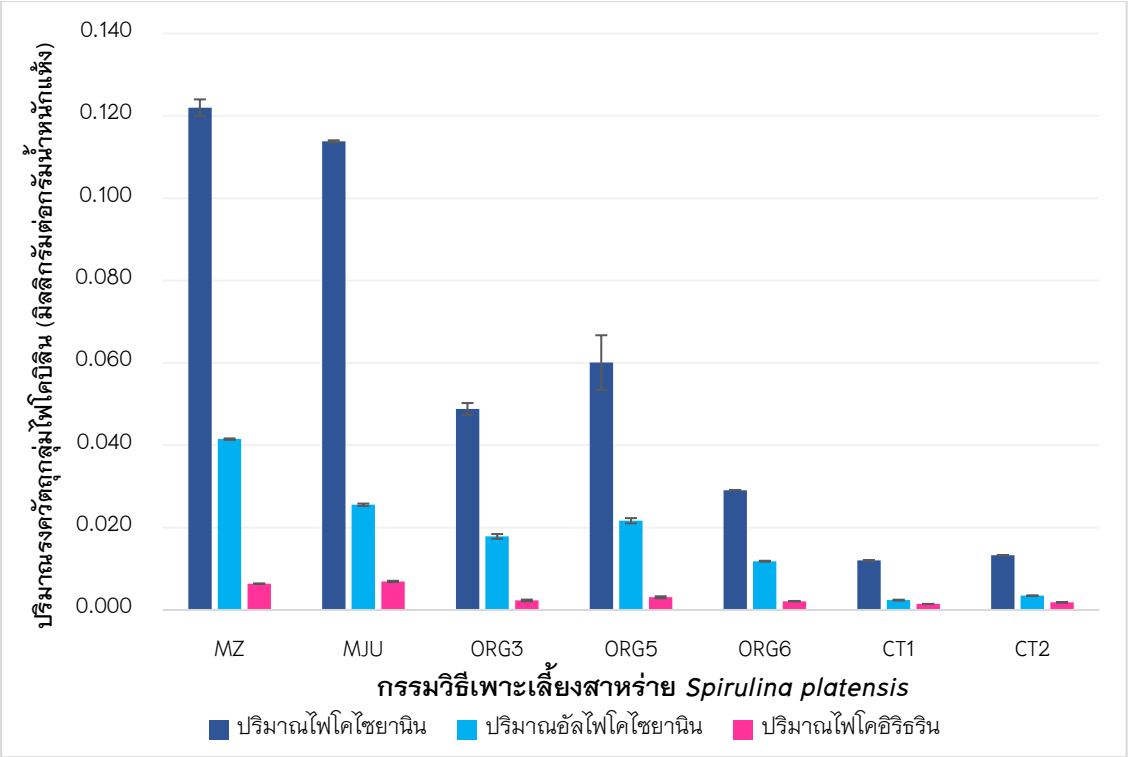
การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis*

จากการพิจารณาเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงที่ดีที่สุด คือ กรรมวิธี ORG3 และ ORG5 ในจำนวนวันเพาะเลี้ยง 12 วัน ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) กับกรรมวิธี MZ และ MJU (ชุดควบคุมเชิงบวก) และทำการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายชีวมวล จากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) พบว่า สารพฤกษเคมีกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีนมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนรวม และปริมาณคลอโรฟิล์ล เอ และปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนรวมและสารพฤกษเคมีทุกชนิด (ภาคผนวก ค) และจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณโปรตีนรวมและสารพฤกษเคมี พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมของทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) (ภาพ 23) โดย กรรมวิธี ORG5 มีค่ามากกว่ากรรมวิธี ORG3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 249.208±0.095 และ 285.521±0.072 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณของรงควัตถุกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีน (Phycobiliprotein) ของกรรมวิธี ORG3 และ ORG5 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) และมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธี MZ และ MJU โดยปริมาณไฟโคไซยานิน ปริมาณอัลโลไฟโคไซยานิน และปริมาณไฟโคอิริธริน

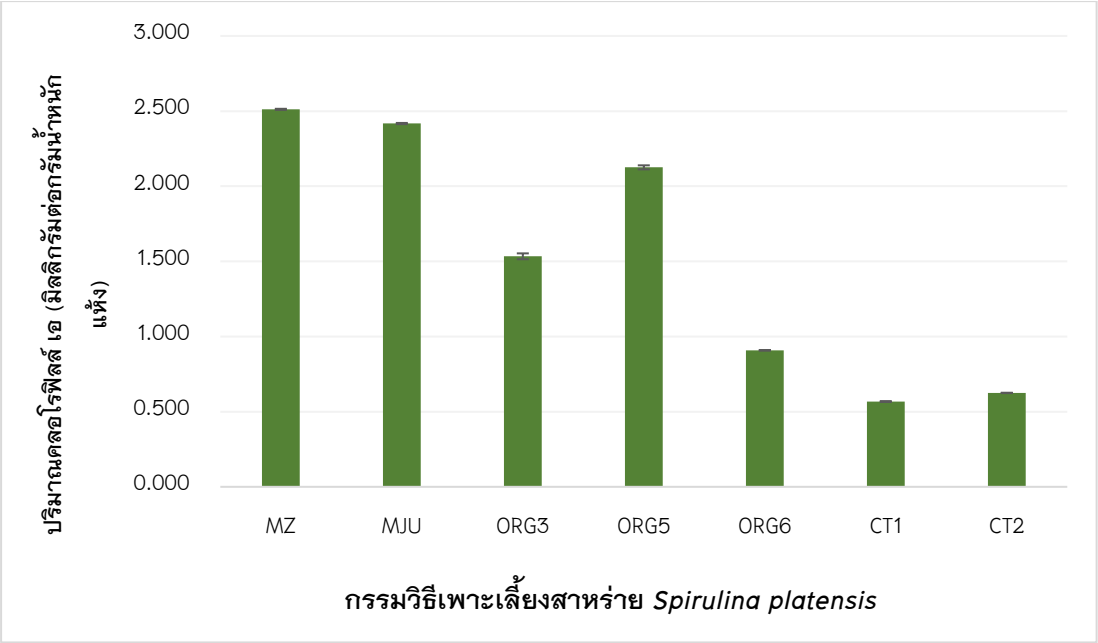
ของกรรมวิธี ORG5 มีค่ามากกว่า ORG3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.060±0.007, 0.022±0.001 และ 0.003±0.000, 0.049±0.001, 0.018±0.001 และ 0.002±0.000 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ภาพ 24) การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ พบว่า ของสาหร่าย *S. platensis* ในกรรมวิธี MZ, MJU, ORG3 และ ORG5 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) โดยมีค่าเท่ากับ 2.511±0.004, 2.417±0.004, 1.534±0.020, 2.126±0.013 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ภาพ 25) การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม พบว่า กรรมวิธี MJU และ กรรมวิธี ORG5 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) และกรรมวิธี MZ, กรรมวิธี ORG6, กรรมวิธี CT1 และ กรรมวิธี CT2 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) แต่กรรมวิธี ORG3 และ กรรมวิธี ORG5 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) โดยมีค่าเท่ากับ 0.366±0.019 และ 0.556±0.004 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ภาพ 26)



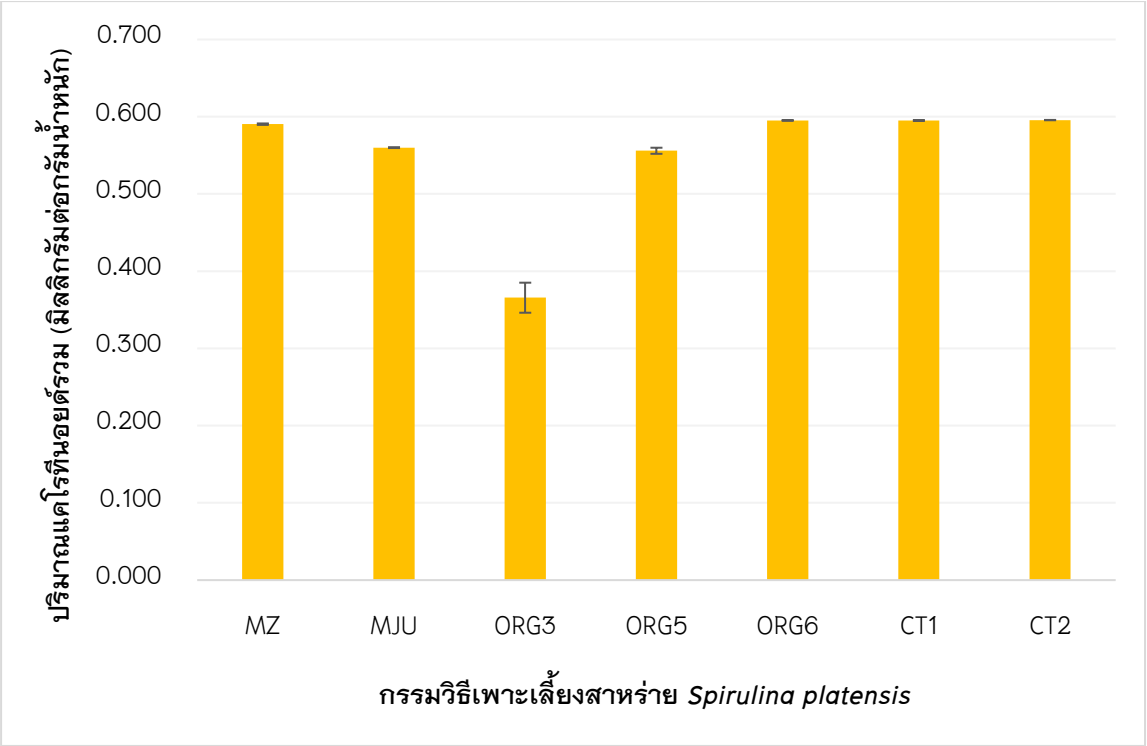
ภาพ 23 ปริมาณโปรตีนรวมในสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ



ภาพ 24 ปริมาณรงควัตถุกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีน ในสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ



ภาพ 25 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ



ภาพ 26 ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ในสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ

การวิเคราะห์ความคุ้มค่าทางเศษฐกิจของสูตรอาหารเพาะเลี้ยง

จากผลการวิจัย พบว่า สูตรอาหารเพาะเลี้ยงกรรมวิธี ORG 5 ความเหมาะสมต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* ได้ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงกรรมวิธี MZ และ MJU ตลอดจนปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและคลอโรฟิลล์ เอ ที่สามารถสังเคราะห์และสะสมได้เทียบเท่ากับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงกรรมวิธี MZ และ MJU ด้วย แต่อาจต้องใช้ชีวมวล 2 เท่า และ 3 เท่า สำหรับการผลิตสารกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีน และโปรตีน ตามลำดับ และเมื่อคำนวณความคุ้มค่าทางเศษฐกิจแล้วนั้น สามารถสรุปได้ว่า สูตรอาหารเพาะเลี้ยงกรรมวิธี ORG 5 เป็นสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าสูตรอาหารเพาะเลี้ยงกรรมวิธี MZ และ MJU ถึง 3.25 และ 1.69 เท่า ตามลำดับ (ตาราง 7)

ตาราง 7 การเปรียบเทียบความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจของอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis*

สารอาหาร	ต้นทุนของแต่ละสูตรอาหาร (บาทต่อลิตร)									
	MZ	MJU	ORG1	ORG2	ORG3	ORG4	ORG5	ORG6	CT1	CT2
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	7.00	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	3.00	3.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sodium Nitrate ($NaNO_3$)	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Potassium Sulphate (K_2SO_4)	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sodium Chloride (NaCl)	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Magnesium Sulphate ($MgSO_4.\ 7H_2O$)	1.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00
Calcium Chloride (CaCl)	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ferrous Sulphate ($FeSO_4.\ 2H_2O$)	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ethylene DiamineTetra Acetate (EDTA)	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Boric acid (H_3BO_3)	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Manganese Chloride ($MnCl_2.\ 4H_2O$)	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Zinc Sulphate ($ZnSO_4.\ 7H_2O$)	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sodium Molybedate (MoO_3)	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Copper Sulphate ($CuSO_{45}.\ H_2O$)	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ปุ๋ย NPK 16:16:16	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00
ปุ๋ยอินทรีย์	0.00	0.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	0.00	0.00
รวม	26.00	13.50	2.00	2.00	7.00	3.00	8.00	2.00	0.00	0.00
เปรียบเทียบกับสูตรอาหาร MZ (เท่า)	-	1.93	13.00	13.00	3.71	8.67	3.25	13.00	0.00	0.00
เปรียบเทียบกับสูตรอาหาร MJU (เท่า)	-	-	6.75	6.75	1.93	4.50	1.69	6.75	0.00	0.00

หมายเหตุ: เป็นราคาประมาณการจากราคาสาร Analytical Reagent grade ยังไม่รวมราคาสารปรับ pH และค่าน้ำ

บทที่ 5

สรุปผล

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาผลของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง กรรมวิธี ORG3 และกรรมวิธี ORG5 มีศักยภาพเพียงพอในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* โดยไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของเส้นสายในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน และกรรมวิธี ORG5 มีความเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* เพื่อผลิตสารพฤกษเคมี เนื่องจากสามารถผลิตแคโรทีนอยด์รวม และคลอโรฟิลล์ เอ ได้เทียบเท่ากับสูตรอาหารมาตรฐาน แต่อาจต้องใช้ชีวมวล 2 เท่า และ 3 เท่า สำหรับการผลิตสารกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีน และปริมาณโปรตีนรวม ตามลำดับ ทั้งนี้ถือว่ามีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจเนื่องจากสูตรอาหารดัดแปลงมีต้นทุนที่ต่ำกว่าสูตรอาหารมาตรฐานอยู่มากและยังสามารถลดการใช้สารเคมี ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

1. การใช้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงจากผลการวิจัยสามารถช่วยลดการใช้สารเคมี โดยเฉพาะสารประกอบไนโตรเจน และฟอสฟอรัส และสามารถลดต้นทุนการผลิตได้

2. สามารถใช้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง กรรมวิธี ORG5 เป็นกลยุทธ์ในการกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุแคโรทีนอยด์รวมได้

3. ปัจจัยร่วมทางสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลาการให้แสง และปัจจัยอื่นที่มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานควบคู่กับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง อาจต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

อภิปรายผลการทดลอง

สาหร่าย *Spirulina platensis* เป็นสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเซลล์รูปทรงกระบอกเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย โดยบิดเกลียวเวียนซ้ายปลายเปิดตลอดทั้งเส้น หรือ Left-hand helix (Avigad, 2002) ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอุณหภูมิ (Ven Eykelenburg, 1979) ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของกรรมวิธีเพาะเลี้ยง สามารถส่งผลต่อลักษณะการบิดเกลียว

ของเส้นสาย (jeeji Bai and Seshadri, 1980) และภายใต้กรรมวิธีการเพาะเลี้ยงหลายกรรมวิธี พบว่า สาหร่าย *S. platensis* มีลักษณะเส้นสายที่ผิดปกติ คือ เกิดกลายคลายเกลียว (Helix to Spiral) และกลายเป็นเส้นตรง (Helix to Linear or Straight) ซึ่งเส้นสายเหล่านี้จะสามารถเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกับเส้นสาย ที่มีลักษณะบิดเกลียว แต่อาจเกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) จากปัจจัยเร้าของสิ่งแวดล้อมและเกิดเป็นลักษณะถาวรในรุ่นถัดไป (Avigad, 2002) จากผลการวิจัย อาจเป็นไปได้ว่าสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง ได้แก่ กรรมวิธี ORG1, กรรมวิธี ORG2, กรรมวิธี ORG3, กรรมวิธี ORG4, กรรมวิธี ORG5 และกรรมวิธี ORG6 เป็นกรรมวิธีที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐาน หรือไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของสาหร่าย *S. platensis* ทั้งนี้อาจต้องทำการศึกษาในระดับยีน (Gene Test) ต่อไป และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะและความยาวของเส้นสายด้วยตาเปล่าพบว่า สาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธี ORG3 และกรรมวิธี ORG5 มีลักษณะบิดเกลียวและมีความยาวใกล้เคียงกับสูตรอาหารเพาะเลี้ยง กรรมวิธี MZ และกรรมวิธี MJU ซึ่งเป็นชุดควบคุมเชิงบวก

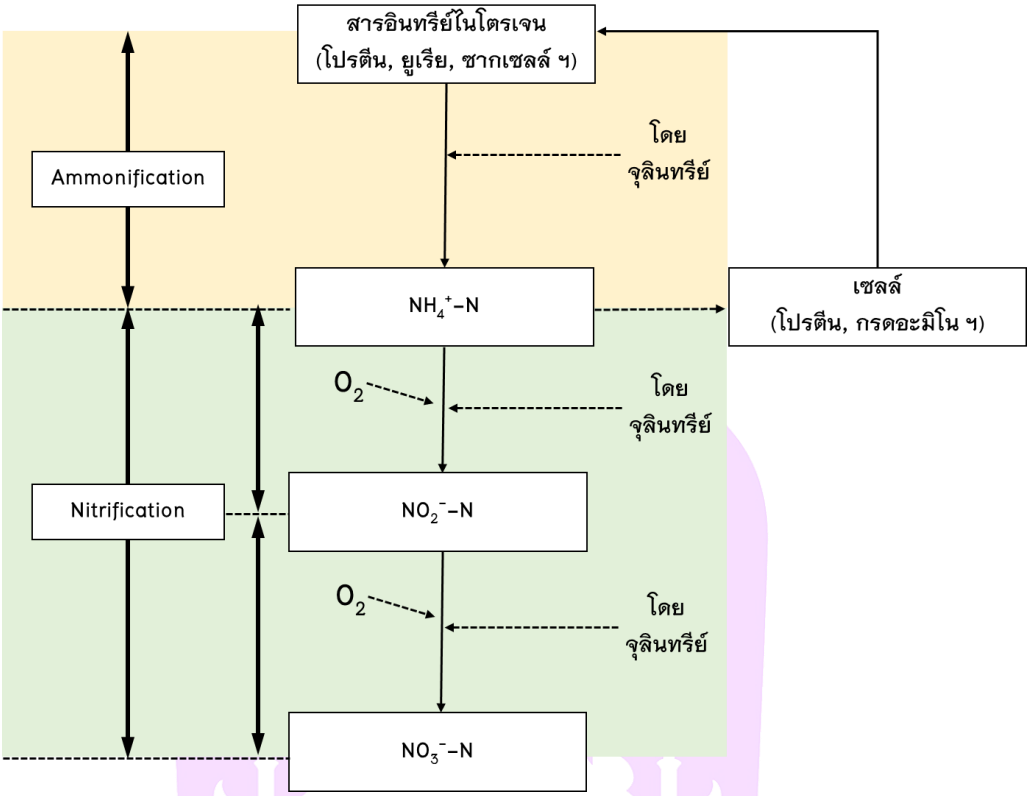
การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* โดยสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง ทำการเติมสารละลายปุ๋ยอินทรีย์ ซึ่งมีธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) ได้แก่ หินฟอสเฟต (Rock Phosphate) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการขุดและการถลุงแร่ที่มีธาตุฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ (วิทยา มะเสนา, 2531) ธาตุอาหารรอง (Micronutrients) ได้แก่ แมงกานีส (Mn) เป็นธาตุอาหารที่ส่งเสริมกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและการทำงานของเอนไซม์ที่ส่งผลต่อการในการควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น การนำธาตุเหล็กและไนโตรเจนมาใช้ประโยชน์ โดโลไมท์ (Dolomite) หรือ แคลเซียมแมกนีเซียมคาร์บอเนต ($CaMg(CO_3)_2$) เป็นสารที่มีธาตุแคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีสมบัติทางเคมีเป็นด่าง จึงใช้ในการปรับ pH ให้มีความเป็นด่างเพิ่มขึ้น และสารอื่น ๆ ได้แก่ ซีโอไลท์ (ZioliteX) และภูไมท์ เป็นสารประกอบที่มีความสามารถในการดูดซับและแลกเปลี่ยนประจุบวกได้สูง ซึ่งจะช่วยดูดยึดธาตุอาหารจากปุ๋ยไว้และปลดปล่อยออกมาอย่างช้า ๆ ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมดนี้มีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ilknur (2012) โดยทำการศึกษาผลของปุ๋ยน้ำอินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบชีวมวลของสาหร่าย *S. platensis* พบว่าการใช้ปุ๋ยน้ำอินทรีย์ ร่วมกับไนเตรต ฟอสเฟส และไบคาร์บอเนต สามารถให้ผลผลิตชีวมวลและปริมาณโปรตีนรวมใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารมาตรฐาน Zarrouk (Ilknur, 2012) ทั้งนี้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง กรรมวิธี ORG3 และ กรรมวิธี ORG5 มีการเพิ่มปริมาณธาตุไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปแทสเซียม (K)

และแมกนีเซียม (Mg) โดยธาตุอาหารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบหลักในการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ หากเกิดสภาวะจำกัดของธาตุอาหารเหล่านี้ จะส่งผลต่อกระบวนยับยั้งการเจริญเติบโต (Growth Inhibition) โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานว่า สาหร่าย *S. platensis* จะรักษาสารอาหารและพลังงานที่เหลืออยู่อย่างจำกัด ในการสังเคราะห์ส่วนประกอบหลักภายในเซลล์ เช่น กรดนิวคลิอิก โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต มากกว่ารงควัตถุจึงทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงและการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* ลดลง (Apitchaya J. , Rattapoom P. (2019), Xiaoting Li et al. (2018). ทั้งนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่า ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงกรรมวิธี ORG1, กรรมวิธี ORG2, กรรมวิธี ORG4 และ กรรมวิธี ORG6 อาจมีปริมาณสารอาหารไม่เพียงพอจึงส่งผลให้สาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธีดังกล่าว มีการเจริญเติบโตที่น้อยกว่าสาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงในกรรม ORG3 และกรรมวิธี ORG5 นอกจากนี้กลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการพัฒนาสัณฐานของวงจรชีวิตเข้าสู่ระยะไตรโครม (Trichome) ลดลง จึงส่งผลให้สาหร่ายมีความยาว ของเส้นสายลดลงด้วย ดังผลการศึกษาพบว่า แม้จำนวนเส้นสายของสาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงกรรมวิธี ORG1, กรรมวิธี ORG2, กรรมวิธี ORG4 และ กรรมวิธี ORG6 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) เมื่อเทียบกับกรรมวิธี MZ และกรรมวิธี MJU แต่ความยาวเส้นสายที่เปรียบเทียบจากภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์นั้น มีความยาวของเส้นสายที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน และการเพาะเลี้ยงด้วยปุ๋ยชีวภาพมักพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากปุ๋ยอินทรีย์ส่วนใหญ่จะมีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ หรือปลดปล่อยสารอนินทรีย์สู่ระบบ (Napakan, 2011) ทำให้สาหร่าย *S. platensis* สามารถใช้ประโยชน์จากธาตุอาหารเหล่านั้นในการเจริญเติบโต สอดคล้องกับผลการศึกษาในสูตรอาหารเพาะเลี้ยง กรรมวิธี ORG1, กรรมวิธี ORG2, กรรมวิธี ORG3, กรรมวิธี ORG4, กรรมวิธี ORG5, กรรมวิธี ORG6 สาหร่าย *S. platensis* สามารถเจริญเติบโตร่วมกับจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ ทั้งนี้อาจเกิดผลกระทบด้านอื่น ๆ เช่น การพบการเจริญแทนที่ของแพลงก์ตอนพืชชนิดอื่น ตั้งแต่วันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงในกรรมวิธี ORG1 อย่างสมบูรณ์ เป็นต้น

การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis* และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอาหารกลุ่มไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ในอาหารเหลวแต่ละกรรมวิธี เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารอาหารและประสิทธิภาพการนำสารอาหารไปใช้

ในการทดลอง หลังจากที่สาหร่าย *S. platensis* สามารถปรับตัวเข้าสู่สภาพแวดล้อมใหม่ (Lag phase) ในช่วงแรกของการทดลองได้แล้ว จึงสามารถดูดซึมสารประกอบไนโตรเจนไปใช้

ในการเจริญเติบโตได้ตามกลไกการเจริญเติบโต โดยดูดซึมสารประกอบไนโตรเจน ที่อยู่ในรูปแอมโมเนีย ไปใช้เป็นอันดับแรก และดูดซึมสารประกอบไนโตรเจนในรูปของไนเตรตเป็นลำดับถัดไป เนื่องจากสาหร่ายต้องใช้พลังงานเพื่อเปลี่ยนจากไนเตรตให้เป็นแอมโมเนียก่อนการใช้ประโยชน์ จึงทำให้สาหร่ายดูดซึมแอมโมเนียก่อน เพื่อลดการสูญเสียพลังงาน (Yuqin Li, 2014) ทั้งนี้ผลการทดลองที่เกิดขึ้นเป็นไปตามกลไกโดยทั่วไปของวัฏจักรไนโตรเจน หรือ การเปลี่ยนรูปของสารประกอบไนโตรเจนทางชีวภาพ โดยสารอินทรีย์ไนโตรเจนจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแอมโมเนียด้วยปฏิกิริยาแอมโมเนียฟิเคชัน (Ammonification) แอมโมเนียจะถูกดึงเข้าสู่กระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ของสาหร่าย ทั้งการสร้างเซลล์ใหม่ หรือ การสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลต่าง ๆ และในการเกิดกิจกรรมดังกล่าวหากปริมาณคาร์บอนลดลงแต่ระบบยังอยู่ในสภาวะแอโรบิค (Aerobic condition) จะเกิดการหายใจขึ้นและเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (Nitrification) ซึ่งเป็นการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์ และเกิดการออกซิไดซ์อีกครั้งเพื่อเปลี่ยนไนไตรต์ให้อยู่ในรูปของไนเตรต ปฏิกิริยาดังกล่าวอาจมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นตัวช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาร่วมด้วย ซึ่งกระบวนการดังกล่าวสามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับ เพื่อเปลี่ยนไนเตรตและไนไตรต์ให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียได้ (ภาพ 26) สอดคล้องกับผลการวิจัยที่แสดงความสัมพันธ์ของสารอาหารกลุ่มสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งพบว่า ในวันที่ 30 ของการทดลอง ปริมาณไนเตรตมีการลดลงทุกกรรมวิธี สอดคล้องกับปริมาณของไนไตรต์ แอมโมเนีย สารอินทรีย์ไนโตรเจน และปริมาณไนโตรเจนรวม (ปริมาณ TKN) ที่มีค่าลดลง สามารถบ่งชี้ได้ว่าสาหร่าย *S. platensis* มีการใช้สารประกอบไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนีย และไนเตรต เพื่อการเจริญเติบโต แต่ทั้งนี้พบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงกรรมวิธี ORG1, กรรมวิธี ORG2, กรรมวิธี ORG3, กรรมวิธี ORG6, กรรมวิธี CT1 และกรรมวิธี CT2 มีค่าของปริมาณแอมโมเนีย สารอินทรีย์ไนโตรเจน และปริมาณ TKN ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการตายของเซลล์และมีการปลดปล่อยสารชีวโมเลกุล รวมถึงสารประกอบไนโจเจนออกสู่ระบบ ทำให้ค่า TKN ซึ่งเป็นการนับรวมค่าของสารอินทรีย์ไนโตรเจนและปริมาณแอมโนเนียเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 30 ของการทดลอง ขณะเดียวกันอาจเกิดกระบวนการเปลี่ยนสารอินทรีย์ไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนีย



ภาพ 27 การเปลี่ยนรูปของสารประกอบไนโตรเจนทางชีวภาพ

ฟอสฟอรัส (P) เป็นสารอาหารสำคัญอีกชนิดหนึ่ง ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต สาหร่าย *S. platensis* เมื่อเข้าสู่ระยะ Exponential phase หรือ ระยะ Log phase จะมีการดูดซึมนำฟอสฟอรัสในรูปของออโธฟอสเฟต (PO_4^{3-}) ได้มาก เพื่อใช้สร้างเซลล์ และเป็นโครงสร้างของสารพันธุกรรม ดังเช่น RNA และ DNA ตลอดจนการสร้างพลังงานในรูปของ ATP และเก็บสะสมไว้ในเซลล์ในรูปของ เม็ดโพลีฟอสเฟต (Polyphosphate granules) (Feroci LT et al, 1976, Rasoul-A. Et al, 2014) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งฟอสเฟตสำรองไว้ใช้ในสภาวะที่จำเป็น จากผลการวิจัย พบว่าในวันที่ 30 ของการทดลองทุกกรรมวิธีมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณฟอสฟอรัสรวม (Total Phosphorus) ในอาหารเพาะเลี้ยง ยกเว้นสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง กรรมวิธี ORG5 ที่มีการลดลงของปริมาณฟอสฟอรัสรวม ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะแสดงให้เห็นว่าในวันที่ 30 ของการทดลอง สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในทุกกรรมวิธีอาจเข้าสู่ระยะ Stationary phase หรือ ระยะ Death phase ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตจะลดลงและมีอัตราการตายของเซลล์หรือเส้นสายมากขึ้น เซลล์สาหร่ายที่ตายจะเกิดการแตกสลายของเซลล์ (Cell lysis) และสารอินทรีย์ต่าง ๆ จะถูกปลดปล่อยสู่ระบบ ทำให้ในน้ำหรืออาหารเพาะเลี้ยงมีปริมาณฟอสฟอรัสที่สูงขึ้น

นอกจากนี้ภาวะจำกัดสารอาหารดังเช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ถือเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารชีวิโมเลกุลภายในเซลล์ เนื่องด้วยสารหร่าย *S. platensis* เป็นสาหร่ายที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (non-nitrogen fixing หรือ non-diazotrophic) (Vonshak, A, 2000) เมื่อเข้าสู่สภาวะจำกัดไนโนตเจน หรือ ปริมาณไนโตรเจนลดลงอย่างรวดเร็ว สาหร่ายในกลุ่ม non-diazotrophic นี้ จะมีกลไกรักษาสมดุลภายในเซลล์ 3 ลำดับ โดยในระยะแรกจะเกิดการย่อยสลายรงควัตถุ phycocyanin และ phycoerythrin จากนั้นจะเกิดการสลายของคลอโรฟิลล์ เอ ซึ่งเป็นศูนย์กลางของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งนำไปสู่ภาวการณ์สลายรงควัตถุอย่างสมบูรณ์ และเข้าสู่ระยะเฉื่อยของเซลล์ (Sauer et al., 2001) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานถึงภาวะจำกัดไนโตรเจนในสภาวะเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic จะส่งผลให้สาหร่าย *S. platensis* มีผลผลิตชีวมวลที่เพิ่มขึ้น โดยการลดการสังเคราะห์รงควัตถุ (กลุ่มไฟโคบิลิน คลอโรฟิลล์ เอ กลุ่มแคโรทีนอยด์) เพื่อรักษาระดับไนโตรเจนไว้สำหรับสังเคราะห์องค์ประกอบหลักของเซลล์โปรตีน คาร์โบไฮเดท ไขมัน และกรดนิวคลีอิก ทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงด้วย (Xiaoting L. et al, 2018) มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปริมาณแคโรทีนอยดและไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* ในสภาวะจำกัดไนโตรเจนนั้น สาหร่าย *Spirulina* ยังคงสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้อย่างต่อเนื่อง และมีการสะสมแคโรทีนอยด์, คาโบไฮเดรต และไตรกลีเซอไรด์ เนื่องจากสาหร่าย *Spirulina* ในภาวะจำกัดไนโตรเจนจะมีการกระตุ้นให้เกิดการสลายไขมัน ซึ่งมีการผลิต acetyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งตนในการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และบีตาแคโรทีน (Sujitha, K. and Nagarajan,P., 2013) และนอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไซยาโนแบคทีเรีย กลุ่ม non-diazotrophic จะตอบสนองต่อภาวการณ์ขาดแหล่งไนโตรเจนโดยการฟอกขาว ซึ่งเป็นกระบวนการที่เรียกว่า คลอโรซิส (Chlorosis) โดยการที่เนื้อเยื่อของสาหร่ายจะมีการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือขาว เนื่องจากการขาดรงควัตถุสีเขียว หรือ คลอโรฟิลล์ (Allen and Smith, 1969) สอดคล้องกับผลการวิจัย เนื่องด้วยอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงมีการเติมสารละลายปุ๋ยความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร ในสัดส่วนร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง กรรมวิธี ORG3 และ กรรมวิธี ORG5 มีการเพิ่มปริมาณธาตุไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปแทสเซียม (K) และแมกนีเซียม (Mg) เมื่อสารอาหารถูกใช้จนหมด อาจส่งผลให้เกิดภาวะจำกัดสารอาหาร โดยเฉพาะภาวะจำกัดไนโตรเจน (Nitrogen limitation) ดังแสดงให้เห็นจากการที่สาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงทุกกรรมวิธี มีปริมาณสารกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีน คลอโรฟิลล์ เอ และ ปริมาณโปรตีนรวม ที่น้อยกว่าที่เพาะเลี้ยงในกรรมวิธี MZ และกรรมวิธี MJU และอาจด้วยสาเหตุจากภาวะกำจัดไนโตรเจนดังกล่าวจึงทำให้

สาหร่ายมีการสะสมของปริมาณแคโรทีนอยด์ที่เทียบเท่ากับการเพาะเลี้ยงในกรรมวิธี MZ และกรรมวิธี MJU

ปริมาณโปรตีน ที่จัดเป็นสารชีวโมเลกุลที่โดดเด่นในสาหร่าย *S. platensis* เนื่องจากมีปริมาณเฉลี่ยที่สูงถึงร้อยละ 70 ของน้ำหนักแห้งชีวมวล และถูกจัดให้เป็นแหล่งโปรตีนทางเลือก (Tom M.M.Bernaerts, 2019) การสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์อาจมีปัจจัยจากอายุของสาหร่าย ซึ่งสงผลต่อเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้ปริมาณสารอาหารดังเช่นปริมาณของแหล่งคาร์บอน ทั้งจากสารอาหารและการละลายของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบในการสังเคราะห์โปรตีน ส่งผลโดยตรงกับปริมาณโปรตีนที่สาหร่ายสามารถสังเคราะห์ได้ (Fowden, 1962) สอดคล้องกับผลการวิจัย พบว่า สาหร่าย *S. platensis* ที่เพาะเลี้ยงด้วยทุกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลง มีปริมาณโปรตีนรวมที่ต่ำกว่าสูตรอาหารเพาะเลี้ยง กรรมวิธี MZ และ กรรมวิธี MJU เนื่องจากทุกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงไม่มีการเติมสารประกอบคาร์บอน เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มเติม ซึ่งคาดว่าสาหร่าย *S. platensis* ใช้คาร์บอนที่เกิดจากการละลายของแก๊สในการเจริญเติบโต และสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานผลของอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง สาหร่าย *S. platensis* สามารถเจริญเติบโตได้ โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายอยู่ในน้ำ หรือในอาหารเพาะเลี้ยง และใช้สารอาหารอื่นเป็นแหล่งพลังงานทดแทนได้ (ดวงกมล และคณะ, 2018.) ซึ่งการละลายของคาร์บอนไดออกไซด์จะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด–ด่างของอาหารเพาะเลี้ยง โดย

ค่าความเป็นกรด–ด่าง	เท่ากับ 5	อยู่ในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
ค่าความเป็นกรด–ด่าง	เท่ากับ 7–9	อยู่ในรูปแบบของเกลือไบคาร์บอเนต
ค่าความเป็นกรด–ด่าง	สูงกว่า 9.5	อยู่ในรูปของเกลือคาร์บอเนต

ทั้งนี้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปหรือน้อยเกินไปจะส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตชีวมวลของสาหร่าย *S. platensis* ลดลง

บรรณานุกรม

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2546). **เกษตรอินทรีย์ เล่ม1 การผลิต แปรรูป แสดงฉลาก และจำหน่ายเกษตรอินทรีย์**. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติฯ

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. (2527). **สาหร่าย (Algae)** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม. (2550). **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย (การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก).** สืบค้นเมื่อ 30 มกราคม 2561, จาก www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/files/LkJ6JYXThu 30027.pdf.

จงกล พรมยะ. (2549). **ผลของสาหร่ายสไปรูลิน่าต่อการเจริญเติบโตของลูกปลานิลแดง** (พิมพ์ครั้งที่ 1). เชียงใหม่: สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร.

เจริญ เจริญชัย. (2554). **การหมักแบบครั้ง: การเจริญแบบ Exponential.** สืบค้นเมื่อ 27 มีนาคม 2563, จาก https://drcharoen.wordpress.com/2011/07/14/ batch/

เจียมจิตต์ บุญสม. (2531). **ความลับของสาหร่ายเกลียวทอง**. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ณัฐพร จันทร์ฉาย และจุฑารัตน์ สนธิรอด. (2561). การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) ในน้ำหมักเศษเหลือข้าวโพดอาหารสัตว์. **วารสารเกษตรพระวรุณ,** 15(1), 194–203.

ดวงกมล ปิ่นทอง, พิทักษ์พงษ์ หอมนาน และมัญชุพร คำใส. (2561). **ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนตและแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis*.** การศึกษาค้นคว้าด้วยตนเอง วท.บ., มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา.

เดชาวุฒิ วานิชสรรพ์. (2558). ขั้นตอนวิธีนับจำนวนเชื้อบนแผ่นฮีโมซิโตมิเตอร์ด้วยเทคนิคประมวลผลภาพและดีบีสแกน. **วารสารเทคโนโลยีสารสนเทศ**, 11(2), 58–59.

ธิดา เพชรมณี. (2542). **คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงตอน**. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

นภกานต์ หน่ายคอน. (2554). การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา *(Spirulina platensis)* เสริมด้วยปุ๋ยน้ำชีวภาพ. **วารสารราชนครินทร์**, 8(1), 61–64.

นุชนาถ แซ่มช้อย. (2557). สาหร่ายขนาดเล็ก : การเพาะเลี้ยงและการนำมาใช้ประโยชน์ Microalgae : Cultivation and Utilization. **วารสาร มฉก.วิชาการ**, 17(34), 169–190.

ประเสริฐ ภวสันต์. (2550). **การพัฒนาระบบถังปฏิกรณ์ทางชีวภาพแบบอากาศยกสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวและไดอะตอมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นและผลผลิตสูง.** รายงานวิจัย กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พงศ์ศักดิ์ หนูพันธ์ และรัฐชา ชัยชนะ. (2557). ผลกระทบของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อการเกิดยูโทรฟิเคชันในแหล่งน้ำและการกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส. **วิศวกรรมสาร มก,** 27(88), 57–67.

พรศักดิ์ สมรไกรสรกิจ. (มปป). การคำนวณน้ำหนักปูนขาว (Quick Lime). **การเตรียมปูนขาว Quick Lime(CaO).** กรุงเทพฯ: กองจัดการสิ่งแวดลอมและมลพิษ.

พิมพรรณ ตันสกุล และอารักษ์ จันทศิลป์. (2531). การเพาะเลี้ยง *Spirulina* spp. ในน้ำทิ้งจากโรงงานยางพารา. **วารสารสงขลานครินทร์**, 10, 149–155.

เพ็ญรัตน์ หงส์วิทยาการ และโฉมยง ไชยอุบล. (2545). **การถ่ายทอดเทคโนโลยีในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน.** รายงานผลการวิจัย เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และมั่นรักษ์ ตัณฑุลเวศม์. (2551). **คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ยุวดี พีรพรพิศาล. (2546). **สาหร่ายสไปรูลินา**. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, กนกนันท์ เอกบรรพต, มะลิวัลย์ คุตะโค และศรีภาพรรณ ธาระนาถ. (2558). ผลของความเข้มแสงต่อปริมาณซี–ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. **แก่นเกษตร,** (43)1, 548–555.

รสสุคนธ์ พุ่มพันธุ์วงศ์. (2548). **เกษตรอินทรีย์:ทางเลือกใหม่ของเกษตรกร.** กรุงเทพฯ: บริษัทโรงพิมพ์ประสานมิตร จำกัด.

เริงฤทธิ์ สัปปพันธ์. (2556). **คู่มืออาหารเสริมฉบับสมบูรณ์.** กรุงเทพฯ: เอ็มไอเอส.

ลัดดา วงศ์รัตน์. (2543). **คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,

วโรทัย รุ่งแสง, สาวิตรี จันทรานุรักษ์ และพีรพงษ์ เชาวนพงษ์. (2558). **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ในน้ำหมักชีวภาพมูลไส้เดือนดินเพื่อทดแทนอาหารสังเคราะห์.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิทยา มะเสนา. (2531). การใช้หินฟอสเฟตแทนปุ๋ยเคมีฟอสฟอรัส. **เคหการเกษตร**. 12(139), 88–92.

ศิริวรรณ คิดประเสริฐ. (2544). **เอกสารประกอบการสอนวิชาสาหร่าย.** ชลบุรี: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตบางพระ.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2548). **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมปูนไลม์.** กรุงเทพฯ: กระทรวงอุตสาหกรรม.

สุชาติ อิงธรรมจิตร์, ชัยประดิษฐ์ แก้วปาคำ, บรรจง โคกกระเทียม, เฉลิมวรรณ คงสงวนชัย และเจียมจิตต์ บุญสม. การทดสอบเบื้องต้นโดยการใช้น้ำจากกองปลาสดเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina* spp.). **ประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 26 สาขาสัตว์ สัตวแพทย์และประมง,** 26(1), 385-392.

สุมาลี ดุลยอนุกิจ. (2535). **ผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในสูตรอาหาร Zarrouk ต่อการเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,

อภิชญา ใจด้วง และรัฐภูมิ พรหมณะ. (2562). ไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริธรินในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร 4 ชนิด. **วารสารนเรศวรพะเยา**, 12(2), 46-49.

อรพรรณ พรหมธนพันธ์, คมศักดิ์ พินธะ และรัฐภูมิ พรหมณะ. (2558). ผลของสารอาหารต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสไปรูลินา พลาเทนซิส. **วารสารนเรศวรพะเยา**, 8(3), 150-154.

Ajay K.V. AND Avigad V. (2002). Genetics of *Spirulina*. In A. VONSHAK (Ed.), ***Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis Ltd.

Allen, M.M., and Smith, A.J. (1969). Nitrogen chlorosis in blue-green algae. **Archiv. Mikrobiol**. 69, 114–120.

Apitchaya Jaidaung and Rattapoom Prommana. (2019). Phycocyanin, Allophycocyanin and Phycoerythrin in *Spirulina platensis* Cultivated in 4 Culture Media. **Naresuan Phayao Journal**. 12(2), 46-49.

Archibald, JM. (2007). Nucleomorph genomes: structure, function, origin and evolution. **BioEssays**, 29, 392-402.

Avigad Vonshak. (2002). ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology**. New York: CRC press.

Babadzhanov, A.S., Abdusamatova, N., Yusupova, F.M., Faizullaeva, n., Mezhlumyan, L.G. and Malikova, M.Kh. (2004). Chemical Composition of *Spirulina platensis* Cultivated in Uzbekistan, **Chemistry of Natural Compounds**, 40(3), 276–279.

Baldia, S. F., Fukami, K., Nishijima, T. and Y. Hata. (1994). Growth responses of *Spirulina platensis* to some physio – chemical factors and the kinetics of phosphorus utilization. **Fisheries Science**, 61(2), 331 – 335.

Blank, C.E. (2013). Phylogenetic distribution of compatible solute synthesis genes support a freshwater origin for cyanobacteria. **Journal of Phycology**, 49, 880–895.

Bold, H.C. and M.J. Wynne. (1978). **Introduction to the Algae: Structure and Reproduction**. America: Prentice–Hall Engle wood Cliff.

Bollivar DW, Suzuki JY and Bauer CE. (1997). Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis. **Annual Review of Genetics**, 31, 61–89.

Chaudfari, P. P., Krishnamoorthi, K. P. and M. Vittalrao. (1980). Growth potential of *Spirulina* sp., a blue green alga in sewage. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences**, 89(3), 203–211.

Ciferri, O. and O. Tiboni. (1983). The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. **Annual Review of Microbiology,** 39, 503–526.

Cohen Z., Reungjitchachawali M., Siangdung W. and Tanticharoen M. (1993). Production and partial purification of y–Linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, 5, 109–115.

Denesi, E. D., Rang E. L. Yagui, C. O. Carvalho, C. M. and S. Sato. (2002). An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, 23(4), 261–269.

Deshmane, Amol, Darandale, V., Nimbalkar, D., Nikam, T. and Ghole, Vikram. (2015). Sugar mill effluent treatment using *Spirulina* for recycling of water, saving energy and producing protein. **International Journal of Environmental Science and Technology,** 13, 749–754.

Feroci LT, Margheri MC and Pelosi E. Die. (1976). Ultrastructure of Spirulina in comparison with Oscillatoria. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg**. 131(7), 592–601.

Fowden L. (1962). **Amino acids and protein In Physiology and Biochemistry of Algae** (1). London: Academic Press.

Gilson PR. and McFadden GI. (2002). Jam packed genomes--a preliminary, comparative analysis of nucleomorphs. **Genetica,** 115, 13–28.

Habib, M. A. B., M. Parvin, T. C. Huntington. and M. R. Hasan. (2008). **A Review on culture production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish**. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Holman, B. W. B. and A. E. O. Malau–Aduli. (2012). *Spirulina* as a livestock supplement and animal feed. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 2012,** (97), 615–623.

Hosakul, K. (1972). **The Selection and Growth Characteristics of some Local Microalgae Tolerating High Temperature**. Thesis M.s, Kasetsart University, Bangkok.

Ilknur Ak. (2012). Effect of an organic fertilizer on growth of blue–green alga *Spirulina platensis*. **Aquaculture International**. 20(3), 413–422.

Institute of Medicine National Research Council. (1982). **Calcium Oxide (Lime, Quicklime). Water Chemicals Codex.** Washington, DC.: The National Academies Press.

JEEJI BAI, N. and SESHADRI, C.V. (1980). On coiling and uncoiling of trichomes in the genus *Spirulina*, Arch. **Hydrobiol**, 60, 26–32.

Kjeldahl, J. (1883)."NeueMethodezur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern" (New method for the determination of nitrogen in organic substances). **Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie**, 22(1), 366–383.

Le Thi Hong and Le Minh Thanh. (2014). Wastewater treatment using *Spirulina* platensis at TH true milk dairy farm – Nghia Dan district – Nghe an province. **Khon Kaen agriculture journal,** 42(4), 73–78.

Napakan Naikhon. (2011). Cultivation of *Spirulina platensis* by using effective Microorganisms (EM). **Journal of Rajanagarindra**. 8(19), 61–65.

Pumas, P., Pumas, C. (2016). Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using low cost medium supplemented with Lac wastewater. **Chiang Mai Journal of Science**. 43(5), 1037–1047.

Rajeswari P. and Deepika K. (2017). Formulation of organic medium for the cultivation of *Spirulina* using agro–wastes. **International Research Journal of Biological Sciences**, 6(3), 52–54

Rasoul–Amini, S, Montazeri–Najafabady, N, Shaker, S, Safari, A, Kazemi, A., Mousavi, P, Mobasher, MA, et.al., (2014). Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 3(2), 126–131.

Richmond, A. (1986). **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Florida: CRC Press.

Robert Edward Lee. (2018). Classification. **Phycology** (Fifth edition). New York: Cambridge University Press.

Sauer, J., U. Schreiber, R. Schmid, U. Volker and K. Forchhammer. (2001). Nitrogen starvation–induced chlorosis in Synechococcus PCC 7942. Low–level photosynthesis as a mechanism of long–term survival. **Plant Physiol.,** 126, 233–243.

Schirrmeister. B. E., de Vos, J. M., Antonelli, A., and Bagheri, H. C. (2014). Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110(5), 1791–1796.

Sergio, A. R., and Russel, R. M. (1999). b–carotene and other carotenoids as antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, (18), 426–33.

Shornchai, P. and Iamtham, S., (2013). Using *Spirulina maxima* to manage the environment of Vermicelli Factory and produce bio–products from *Spirulina maxima*. **Seminar on Natural Resources Adaptation to the Global Climate Change: Extended Abstracts**, 2(1), 233–239.

Siangdung, W., Bunnag, B. and Tanticharoen, M. (1996). **Effect of temperature and NAD on D – 12 desaturase of *Spirulina platensis*** (ed1). Germany: Cologne.

Siegelman, H.W. and Kycia, J.H. (1978). Algal Biliproteins. In Hellebust, J. A. and Craigie, J. S. (Eds.). **Handbook of Physiological and Biochemical Methods**. Cambridge: Cambridge University Press.

Simental, J.A. and Sanchez–Saavedra, M.P. (2003). The effect of agricultural fertilizer on

growth rate of benthic diatoms. **Aquacultural Engineering**, 27, 265–272.

Smith, G. M. (1955). **Cryptogamic Botany**. New York: McGraw–Hill.

Sommer, T.R., Souza, F.M.L. and Morrisy, N.M. (1992). Pigmentation of adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the green algae *Haematococcus pluvialis* **Aqua cult**, 106, 63–74.

Song–Gun kim et. al., (2004). Effect of CO_2 Concentration on growth and Photosynthesis of *spirulina platensis*. **Studies in Surface Science and Catalysis**. 153, 295–298.

Soong, P. (1980). **Production and Development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan (ed 1).** Elsevier/North– Amsterdam: Holland Biomedical Press.

Stanley, J.G. and J.B. Jones. (1976). Feeding algae to fish. **Aquaculture**. 7(3), 219 – 223.

Sumontip Bunnag, Witaya Pimda and Sirinapa Pongpera. (2010). Utilization of *Spirulina platensis* for wastewater treatment in fermented rice noodle factory. **ELBA Bioflux**, 2(2), 39–44.

Tom M.M.Bernaerts, LoreGheysen, ImogenFoubert, Marc E.Hendrickx, and Ann M.Van Loey. (2019). The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food. **Biotechnology Advances**. 37(8), 1–22.

Trainor F.R. (1978). **Introductory Phycology**. New York: John Wiley & Sons.

Tulika Mishra, Mahavir Joshi, Sanpreet Singh, Pallavi Jain, Ratan Kaur, Sakeena Ayub, Karamjeet Kaur. (2013). *SPIRULINA*: THE BENEFICIAL ALGAE. **International Journal of Applied Microbiology Science**, 2(3), 21–35.

VAN EYKELENBURG, C. (1979). The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity, **Antonie Van Leeuwenhoek**, 45(3), 369–390.

Venkataraman, L.V. (1983). Bluegreen Alga: *Spirulina*. **Central Food Technological Research Institute.** India: Mysore.

Vonshak, A. and L. Tomaselli. (2000). *Arthrospira* (*Spirulina*): Systematics and Ecophysiology. **The Ecology of Cyanobacteria**, 1(1), 505–522.

Wintermans, J.F.G.M. and De Mots, A. (1965). Spectrophotometric Characteristics of Chlorophylla a and B and Their Pheophytins in Ethanol. **Biochimica et Biophysica Acta**, 109, 448–453.

Xiaoting Li, Wei Li, Jun Zhai and Haoxuan Wei. (2018). Effect of nitrogen limitation on biochemical

composition and photosynthetic performance for fed-batch mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology,** 263, 555-561.

Yuqin Li, Fangxin Han, Hua Xu, Jinxiu Mu, Di Chen, Bo Feng et.al., (2014). Potential lipid accumulation and growth characteristic of the green alga Chlorella with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P), **Bioresource Technology**, 174, 24-32.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก องค์ประกอบสารละลายปุ๋ย

ธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) ได้แก่

หินฟอสเฟต (Rock Phosphate) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการขุดและการถลุงแร่ที่มีธาตุฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ (วิทยา มะเสนา, 2531)

ธาตุอาหารรอง (Micronutrients) ได้แก่

1. แมงกานีส (Mn) เป็นธาตุอาหารที่ส่งเสริมกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและการทำงานของเอนไซม์ที่ส่งผลต่อการในการควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น การนำธาตุเหล็กและไนโตรเจนมาใช้ประโยชน์

2. โดโลไมท์ (Dolomite) หรือ แคลเซียมแมกนีเซียมคาร์บอเนต ($CaMg(CO_3)_2$) เป็นสารที่มีธาตุแคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีสมบัติทางเคมีเป็นด่าง จึงใช้ในการปรับ pH ให้มีความเป็นด่างเพิ่มขึ้น

สารอื่น ๆ ได้แก่

ซีโอไลท์ (ZioliteX) และภูไมท์ เป็นสารประกอบที่มีความสามารถในการดูดซับและแลกเปลี่ยนประจุบวกได้สูง ซึ่งจะช่วยดูดยึดธาตุอาหารจากปุ๋ยไว้และปลดปล่อยออกมาอย่างช้า ๆ

ภาคผนวก ข การศึกษาอิทธิพลร่วมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis*

การทดสอบความเป็นเอกพันธของความแปรปรวนของประชากรหลายกลุ่ม โดยการทดสอบ Levene Test แบบ Univariate Analysis of Variance ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติร้อยละ 95 (p-value ≤ 0.05) โดยมีสมมติฐานของการทดสอบคือ

H_0: $\mu_1 = \mu_2 = \ldots = \mu_n$

H_1: $\mu_i \neq \mu_j$ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ $i \neq j$

พบว่าข้อมูลการเจริญเติบโตมีการแจกแจงแบบปกติและการทดสอบความแปรปรวนของประชากรหลายกลุ่ม ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอย่างน้อย 1 ค่าที่แตกต่างจากค่าอื่น ๆ หมายถึงมีอิทธิพลของกรรมวิธีเพาะเลี้ยงที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis*

การศึกษาอิทธิพลร่วมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis*

(ค่าการดูดกลืนแสง)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: DATA

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	110.653	1	110.653	79.954	.000
	Error	13.840	10	1.384[a]		
treatments	Hypothesis	42.913	9	4.768	18.427	.000
	Error	23.289	90	.259[b]		
Day	Hypothesis	13.840	10	1.384	5.348	.000
	Error	23.289	90	.259[b]		
treatments * Day	Hypothesis	23.289	90	.259	4.842	.000
	Error	11.758	220	.053[c]		

a. MS(Day)

b. MS(treatments * Day)

c. MS(Error)

การศึกษาอิทธิพลร่วมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis* (จำนวนเส้นสาย)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: DATA

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	27345.503	1	27345.503	83.664	.000
	Error	3268.497	10	326.850[a]		
treatments	Hypothesis	10036.679	9	1115.187	10.076	.000
	Error	9960.655	90	110.674[b]		
Day	Hypothesis	3268.497	10	326.850	2.953	.003
	Error	9960.655	90	110.674[b]		
treatments * Day	Hypothesis	9960.655	90	110.674	2.199	.000
	Error	11072.667	220	50.330[c]		

a. MS(Day)

b. MS(treatments * Day)

c. MS(Error)

มหาวิทยาลัยพะเยา UNIVERSITY OF PHAYAO

การศึกษาอิทธิพลร่วมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis* (ค่าน้ำหนักแห้งชีวมวล)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: DATA

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	.069	1	.069	299.339	.000
	Error	.002	10	.000[a]		
treatments	Hypothesis	.003	9	.000	6.345	.000
	Error	.005	90	5.228E-5[b]		
Day	Hypothesis	.002	10	.000	4.421	.000
	Error	.005	90	5.228E-5[b]		
treatments * Day	Hypothesis	.005	90	5.228E-5	1.537	.006
	Error	.007	220	3.403E-5[c]		

a. MS(Day)

b. MS(treatments * Day)

c. MS(Error)

มหาวิทยาลัยพะเยา UNIVERSITY OF PHAYAO

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) เพื่อหาความสัมพันธ์ของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงต่อปริมาณโปรตีนรวมและองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสาหร่าย *S. platensis*

Correlations

		Phyco	Alophy	PhycoEr	Chlo-A	Car	Protein
Phyco	Pearson Correlation	1	.940**	.958**	.948**	-.031	.901**
	Sig. (2-tailed)		.000	.000	.000	.894	.000
Alophy	Pearson Correlation		1	.827**	.931**	-.086	.884**
	Sig. (2-tailed)			.000	.000	.711	.000
PhycoEr	Pearson Correlation			1	.869**	.085	.873**
	Sig. (2-tailed)				.000	.714	.000
Chlo-A	Pearson Correlation				1	-.151	.758**
	Sig. (2-tailed)					.515	.000
Car	Pearson Correlation					1	.230
	Sig. (2-tailed)						.316
Protein	Pearson Correlation						1
	Sig. (2-tailed)						

หมายเหตุ: **. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

มหาวิทยาลัยพะเยา UNIVERSITY OF PHAYAO

ภาคผนวก ง ภาพเปรียบเทียบขวดเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* วันที่ 12 ของการทดลอง

ภาวะ Chlorosis หรือ การฟอกขาว

ภาพ 28 เปรียบเทียบขวดเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* วันที่ 12 ของการทดลอง

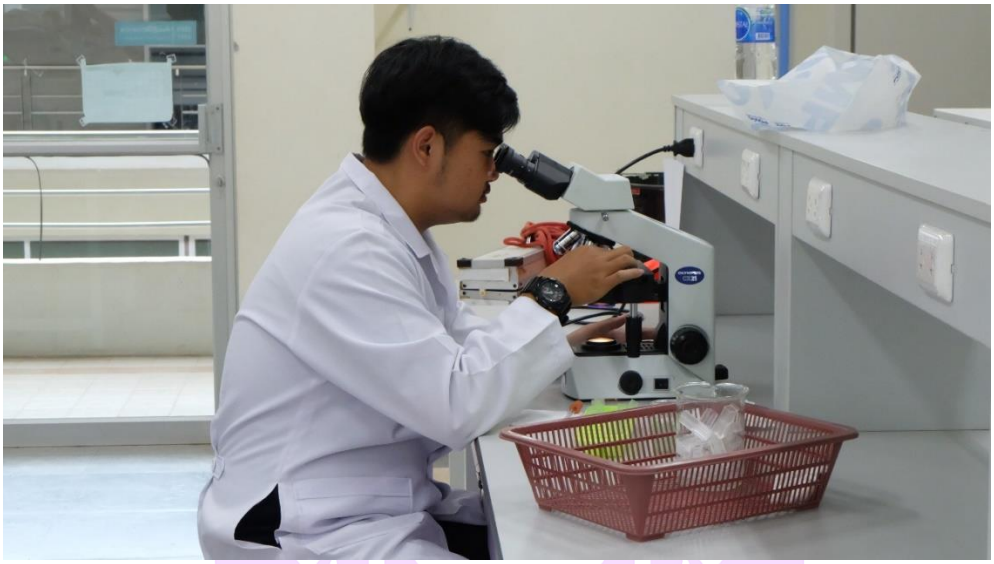
ภาคผนวก จ ภาพประกอบการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ด้วยสูตรอาหารเพาะเลี้ยงกรรมวิธีต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ

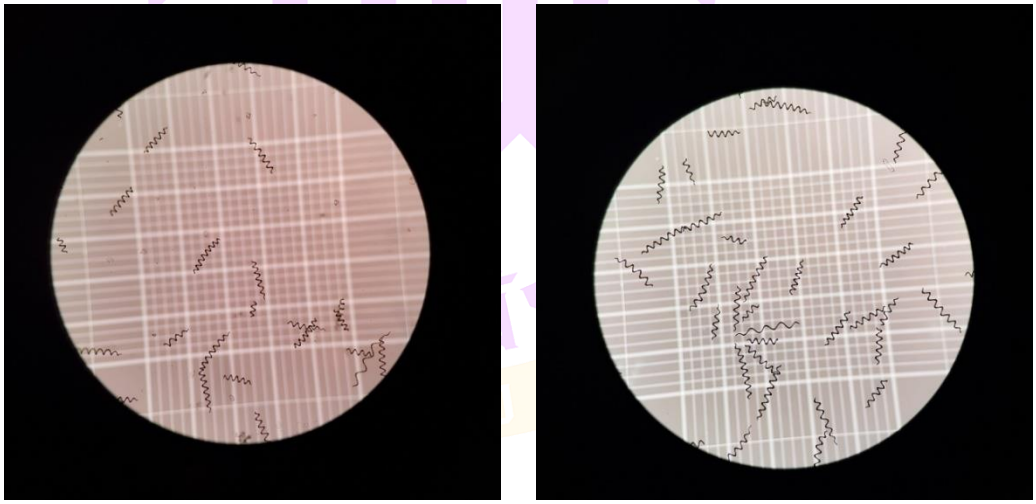
ภาพ 29 การเติมหัวเชื้อสาหร่าย S. platensis ลงในขวดเพาะเลี้ยง

ภาพ 30 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ในชั้นเพาะเลี้ยงแบบสุ่ม

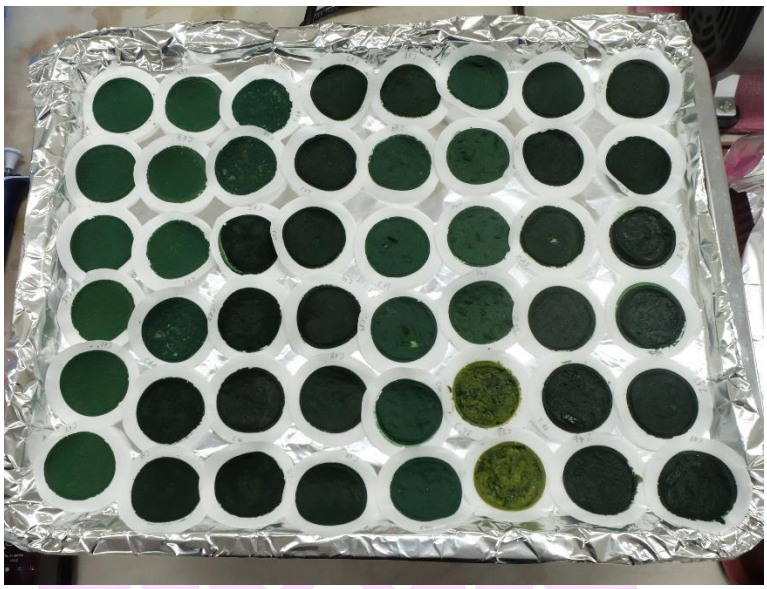
2. การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis*



ภาพ 31 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน และการนับจำนวนเส้นสายของสาหร่าย *S. platensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพ 32 การนับจำนวนเส้นสายของสาหร่าย *S. platensis* ด้วยชุด Haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพ 33 การกรองตัวอย่างสาหร่าย *S. platensis* เพื่อวัดค่าน้ำหนักแห้งชีวมวลหลังจากอบแห้ง

ภาพ 34 การกรองตัวอย่างสาหร่าย *S. platensis* เพื่ออบแห้งและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมและสารพฤกษเคมี

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวม และสารพฤกษเคมีในสาหร่าย *S. platensis*

ภาพ 35 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่าย *S. platensis*

ภาพ 36 การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีนของสาหร่าย *S. platensis*

ภาพ 37 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิล์ล เอ ของสาหร่าย *S. platensis*

5. การวิเคราะห์เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงแต่ละกรรมวิธี

ภาพ 38 อุปกรณ์สำหรับการกรองเพื่อเก็บตัวอย่างอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis*

ภาพ 39 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ ในวันที่ 0 ของการทดลอง

ภาพ 40 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ ในวันที่ 30 ของการทดลอง

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	พิทักษ์พงษ์ หอมนาน
วัน เดือน ปี เกิด	16 สิงหาคม 2539
สถานที่เกิด	จังหวัดเชียงราย
วุฒิการศึกษา	2561 วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	263 หมู่ 10 ตำบลเชียงบาน อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา 56110
ผลงานตีพิมพ์	พิทักษ์พงษ์ หอมนาน และรัฐภูมิ พรหมณะ (ผู้บรรยาย). (25-28 มกราคม 2564). ผลการเพาะเลี้ยงแบบอินทรีย์ต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโต และสัณฐานของสาหร่าย Spirulina platensis ใน การประชุมวิชาการระดับชาติพะเยาวิจัย ครั้งที่ 10 (หน้า 2279-2288). พะเยา: มหาวิทยาลัยพะเยา