# บทที่ 3

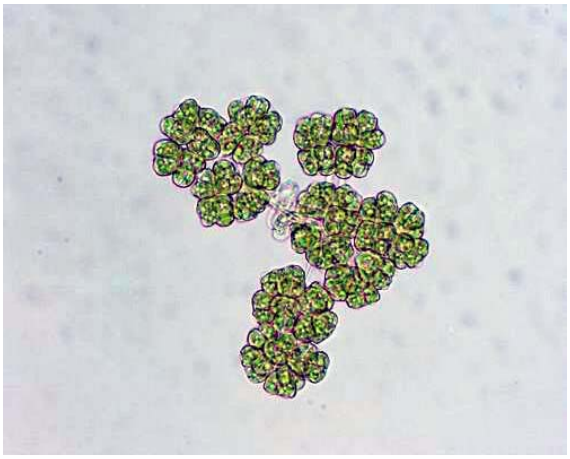
# ผลการทดลองและวิจารณ์

## 1. การแยกสาหร่าย

เก็บตัวอย่างน้ำจากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2545 พบว่าตัวอย่างน้ำมีค่ากรด-เบสเท่ากับ 6.7 เมื่อทำการแยกสาหร่าย *B. braunii* พบว่าสาหร่ายมีโคโลนีสีเขียว บางโคโลนีมีสีส้ม มีสายบางไซโตพลาสซึมเชื่อมต่อระหว่างโคโลนี โคโลนีมีเมือกหุ้ม และผิวโคโลนีไม่เรียบ มีจำนวนประมาณ 75 โคโลนีต่อน้ำ 1 ลิตร โดยสาหร่ายมีขนาดโคโลนีประมาณ 120-175 μm

คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีเขียว (ภาพที่ 5) มาเลี้ยงในอาหาร Modified Chu 13 ค่ากรด-เบส 6.7 (ค่ากรด-เบสเท่ากับน้ำในอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สาหร่ายเพิ่มขนาดของโคโลนีโดยเซลล์แบ่งตัวตามยาว เมื่อเซลล์มีจำนวนมากพอ (วัดค่า OD ประมาณ 0.4) จึงนำมาทดลองขั้นต่อไป

สาหร่าย *B. braunii* สามารถพบได้ในแหล่งน้ำต่างๆ ในหลายๆ ประเทศ ทั้งในสหรัฐอเมริกา, โปรตุเกตุ, โบลิเวีย, ฝรั่งเศส, โมรอคโค, ฟิลิปปินส์, อินเดียใต้ และประเทศไทย โดยในประเทศไทยสามารถพบได้ในอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งในปี 1981 พิมพรรณ ตันสกุล และกรรณิกา สรรพานิช พบสาหร่ายชนิดนี้จำนวนมากในเดือนมีนาคม และกันยายน ส่วน Vongprasert (1986) พบสาหร่ายชนิดนี้จำนวนมากในเดือนเมษายนและมิถุนายน ปี 1984 และเดือนมกราคม ปี 1985 โดยพบเป็นสายพันธุ์เด่นคู่กับสาหร่าย *Microcystis* sp. โคโลนีลอยอยู่บริเวณผิวน้ำเนื่องจากสาหร่ายมีการสะสมน้ำมันไว้ภายในเซลล์, มีเมือกหุ้มรอบโคโลนี และสาหร่ายขึ้นมาสังเคราะห์แสง (จึงควรเก็บตัวอย่างในเวลาสาย เพื่อได้สาหร่ายปริมาณมาก) จะเห็นได้ว่าช่วงเวลาที่พบสาหร่ายชนิดนี้ในปริมาณมากต่างกันอาจเนื่องจากอ่างเก็บน้ำมีการขุดลอกหลายครั้ง ทำให้ค่าคุณภาพน้ำทั้งทางกายภาพและทางเคมีที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้เปลี่ยนไป



ภาพที่ 5 สาหร่าย *B. braunii* ที่แยกได้จากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (กำลังขยาย 33 เท่า)

Figure 5 Isolation of *B. braunii* from Prince of Songkhla University's reservoir (Magnification x 33)

**2. คัดเลือกและวิเคราะห์คุณลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล**

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานทรอปิคอล-แคนนิ่งจำกัด (มหาชน) และบริษัทห้องเย็นโชติวัฒน์จำกัด (มหาชน) ดังตารางที่ 4 พบว่าน้ำทิ้งจากโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งจำกัด (มหาชน) มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เลี้ยงสาหร่ายมากกว่า โดยมีค่ากรด-เบสเท่ากับ 7.8 มีปริมาณไนเทรตและฟอสเฟตในปริมาณสูงเท่ากับ 25.9 และ 22.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยไนเทรตและฟอสเฟตเป็นสารอาหารซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* มีปริมาณสูงกว่าในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ซึ่งมีปริมาณไนเทรตและฟอสเฟตเท่ากับ 12.39 และ 2.73 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ค่าจากการวิเคราะห์ภายหลังการฆ่าเชื้อ) ดังนั้นน้ำทิ้งจากโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งจำกัด (มหาชน) จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในลำดับต่อไป

ตารางที่ 4 คุณลักษณะทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) และบริษัทห้องเย็นโชติวัฒน์จำกัด (มหาชน)

Table 4 Characteristics of effluent from seafood processing plant at Tropical canning company and Chotiwat frozen company

| Parameters | | Tropical canning company | Chotiwat frozen company |
|---|---|---|---|
| pH | | 7.8 | 7.1 |
| COD | | 24.2 | 800 |
| SS | (g/l) | 2.0 | 0.92 |
| $NO_3^-$ | (mg/l) | 25.9 | 0.01 |
| $PO_4^{3-}$ | (mg/l) | 22.9 | 0.06 |
| $NH_3$ | (mg/l) | 2.2 | 0.02 |
| TKN | (mg/l) | 12.2 | 9 |

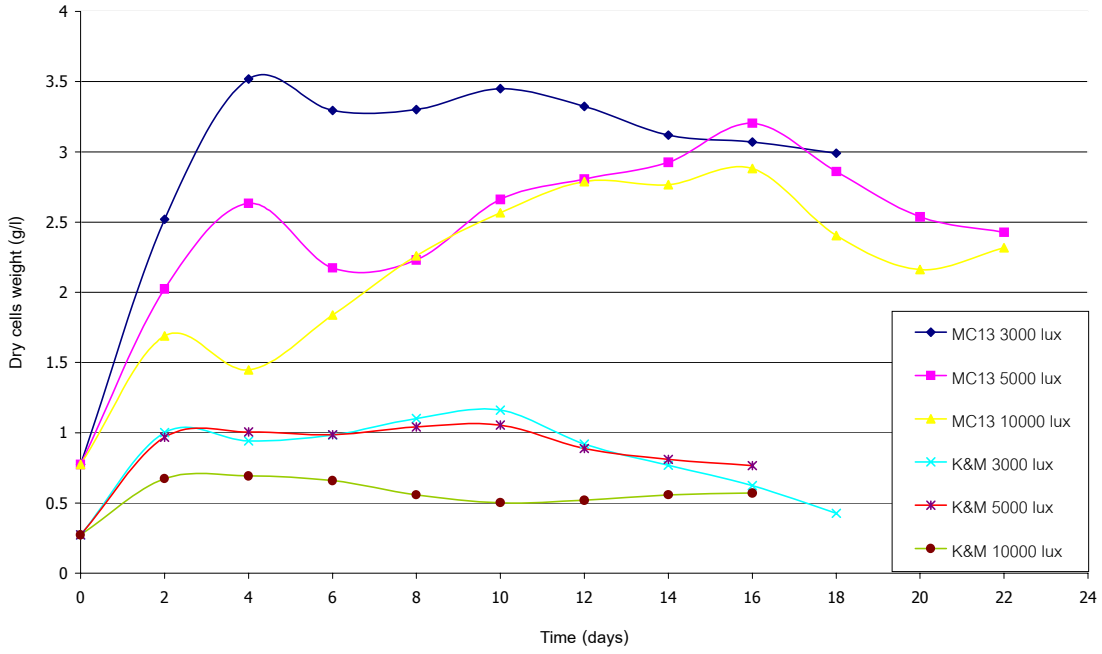
## 3. ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย

### 3.1 ความเข้มแสง

เลี้ยงสาหร่ายในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ค่ากรด-เบส 6.7 และอาหารสังเคราะห์ Kratz and Myers ค่ากรด-เบส 6.7 ที่ความเข้มแสง 3000, 5000 และ 10,000 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายเติบโตได้ดีที่สุดในอาหาร Modified Chu 13 ค่ากรด-เบส 6.7 เมื่อเลี้ยงที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (ภาพที่ 6) โดยเซลล์มีการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน มีความหนาแน่น ($OD_{435}$) เท่ากับ 0.96 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.52 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าใกล้เคียงกับสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เพิ่มปริมาณโพแทสเซียมไนเทรต 3 เท่า โดยมีค่าเท่ากับ 3.7 กรัมต่อลิตร (ระยะเวลาเลี้ยง 21 วัน) (Wolf *et al*., 1985a) ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ Kratz and Myers มีการเติบโตช้ากว่า โดยมีความหนาแน่นเท่ากับ 0.96 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.16 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงภายใน 10 วัน ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ซึ่งให้ผลแตกต่างจาก Vongprasert (1986) โดยทดลองเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ที่ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายเติบโตในอาหารสังเคราะห์ Kratz and Myers ได้ดีกว่าอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 โดยมีค่าการเจริญเป็น 2 เท่า เท่ากับ 0.65 และ 1.75 วัน ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้นเป็น 10,000 ลักซ์ มีผลทำให้การเติบโตของสาหร่ายในอาหารทั้ง 2 ชนิดลดลง โดยทั่วไปความเข้มแสงที่สูงขึ้นจะเพิ่มการสังเคราะห์แสงและเร่งการทำงานของเซลล์ (Kosaric *et al*., 1974 อ้างโดย กรองจันทร์ รัตน

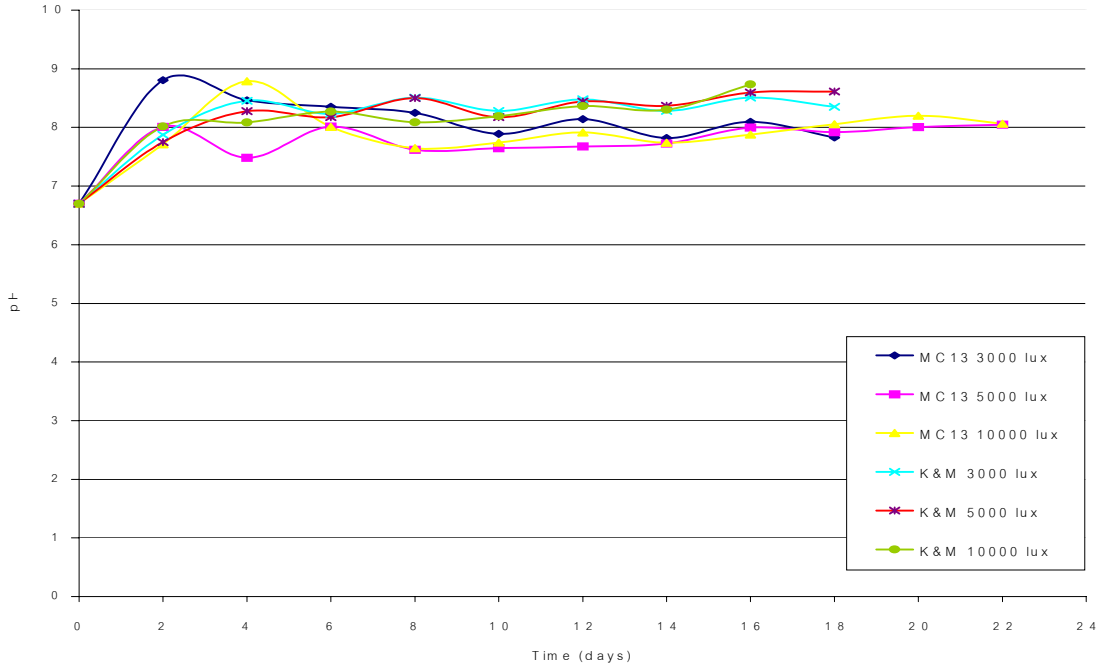
ประดิษฐ์, 2536) แต่จากการศึกษาครั้งนี้ให้ผลในทางตรงข้าม อาจเนื่องจากเลี้ยงสาหร่ายในปริมาตรน้อยเพียง 200 มิลลิลิตร ซึ่งความเข้มแสงที่สูงเกินไปจะมีผลยับยั้งการหายใจของเซลล์ ซึ่งขึ้นกับช่วงระยะเวลาได้รับแสงด้วย (Vonshak *et al.*, 1974) แต่จากรายงานของ Kojima และ Zhang (1999) พบว่าสาหร่าย *B. braunii* เติบโตสูงสุดที่ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ แต่ต้องเตรียมเชื้อเริ่มต้นด้วยแสง 10,000 ลักซ์ ด้วยเช่นกัน โดยเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน สาหร่ายมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า 7 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ สำหรับการทดลองครั้งต่อไป

การเปลี่ยนแปลงค่ากรด-เบสในระหว่างการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ค่ากรด-เบส 6.7 และอาหารสังเคราะห์ Kratz and Myers ค่ากรด-เบส 6.7 ที่ความเข้มแสง 3000, 5000 และ 10,000 ลักซ์ ดังภาพที่ 7 พบว่า ในการทดลองทุกชุดค่ากรด-เบสปรับตัวสูงขึ้นเล็กน้อยใน 2-4 วัน หลังจากนั้นค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง




ภาพที่ 6 การเติบโตของสาหร่าย *B. braunii* ในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 (MC13) ค่ากรด-เบส 6.7 และอาหารสังเคราะห์ Kratz and Myers (K&M) ค่ากรด-เบส 6.7 ที่ความเข้มแสง 3000, 5000 และ 10,000 ลักซ์

Figure 6 Growth of *B. braunii* in Modified Chu 13 (MC13) pH 6.7 and Kratz and Myers (K&M) pH 6.7 at light intensity 3000, 5,000 and 10,000 lux




ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงค่ากรด-เบสระหว่างการเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 (MC13) ค่ากรด-เบส 6.7 และอาหารสังเคราะห์ Kratz and Myers (K&M) ค่ากรด-เบส 6.7 ที่ความเข้มแสง 3000, 5000 และ 10,000 ลักซ์

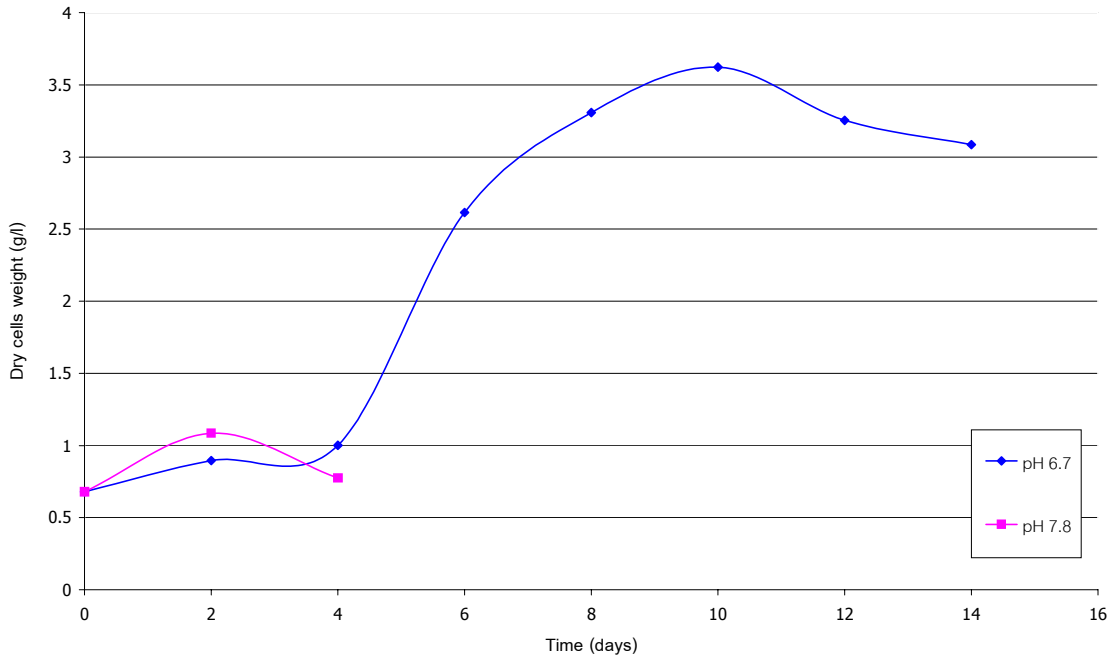
Figure 7 Variation in pH during *B. braunii* cultivation in Modified Chu 13 (MC13) pH 6.7 and Kratz and Myers (K&M) pH 6.7 at light intensity 3000, 5,000 and 10,000 lux

### 3.2 ค่ากรด-เบสเริ่มต้น

เมื่อเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ปรับค่ากรด-เบสเท่ากับ 6.7 และไม่ปรับค่ากรด-เบส (ค่ากรด-เบสเท่ากับ 7.8) โดยเลี้ยงที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (ภาพที่ 8) พบว่าในน้ำทิ้งที่ไม่ปรับค่ากรด-เบส เซลล์สาหร่ายตายหมดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน โดยสาหร่ายมีการเติบโตสูงสุดในน้ำทิ้งที่มีการปรับค่ากรด-เบส เท่ากับ 6.7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน โดยมีความหนาแน่นเท่ากับ 1.06 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.53 ต่อวัน, ค่าการเจริญเป็น 2 เท่า เท่ากับ 1.29 วันและน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.62 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 (3.52 กรัมต่อลิตร, ภาพที่ 6) และที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เพิ่มปริมาณโพแทสเซียมไนเทรต 3 เท่า (3.7 กรัมต่อลิตร) (Wolf *et al.*, 1985a) แต่ใช้ระยะเวลาต่างกันโดย Wolf และคณะ (1985a) ใช้ระยะเวลาเลี้ยงนานที่สุด 21 วัน ดังนั้น ค่ากรด-เบสเท่ากับ 6.7 จึงเป็นค่ากรด-เบสที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย *B. braunii* โดยค่า

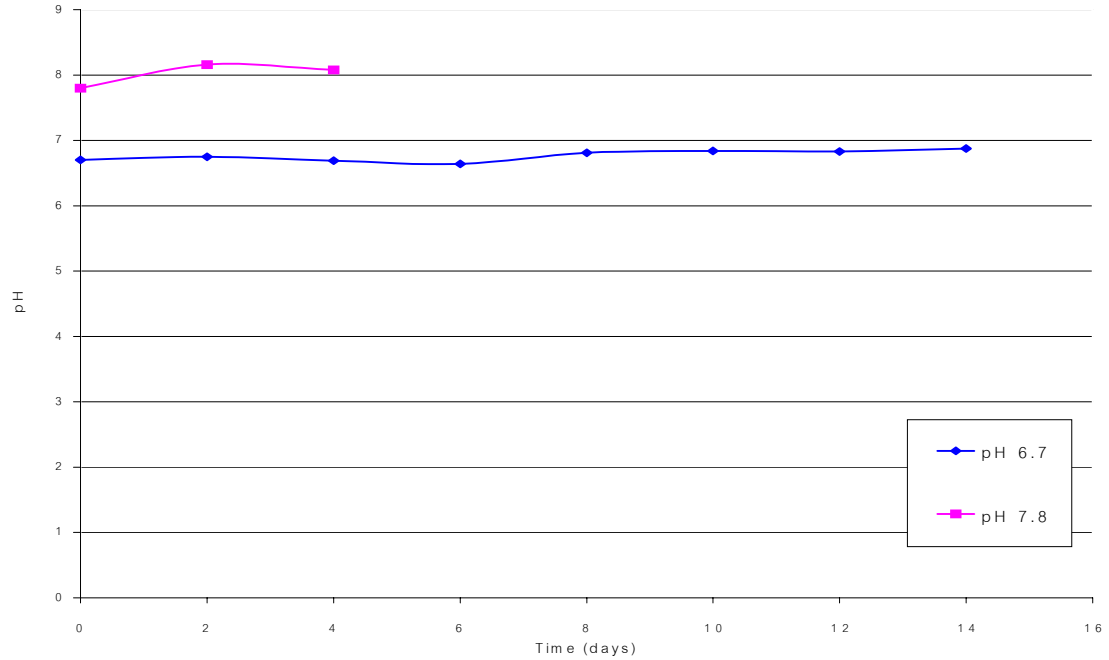
กรด-เบส 6.7 นี้เป็นค่ากรด-เบสของน้ำในอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งเป็นแหล่งน้ำที่มีสาหร่ายชนิดนี้ เติบโตอยู่ตามธรรมชาติในปริมาณมาก และตรงกับรายงานของ Vongprasert (1986) ซึ่งเก็บสาหร่าย *B. braunii* จากอ่างน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์เพื่อทำการทดลองพบว่าสาหร่ายชนิดนี้เติบโตได้ดีที่สุดที่ค่ากรด-เบสเท่ากับ 6.7 เช่นกัน

การเปลี่ยนแปลงค่ากรด-เบสระหว่างการเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ปรับค่ากรด-เบสเท่ากับ 6.7 และไม่ปรับค่ากรด-เบส (ค่ากรด-เบสเท่ากับ 7.8) โดยเลี้ยงที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (ภาพที่ 9) พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล (ปรับค่ากรด-เบสเท่ากับ 6.7) มีค่ากรด-เบสค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าระหว่าง 6.7-6.8




ภาพที่ 8 การเติบโตของสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ปรับค่ากรด-เบสเท่ากับ 6.7 และไม่ปรับค่ากรด-เบส (ค่ากรด-เบสเท่ากับ 7.8) ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

Figure 8 Growth of *B. braunii* in effluent from Tropical canning company pH 6.7 and pH 7.8 at light intensity 3,000 lux




ภาพที่ 9 การเปลี่ยนแปลงค่ากรด-เบสระหว่างการเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ปรับค่ากรด-เบสเท่ากับ 6.7 และไม่ปรับค่ากรด-เบส (ค่ากรด-เบสเท่ากับ 7.8) ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

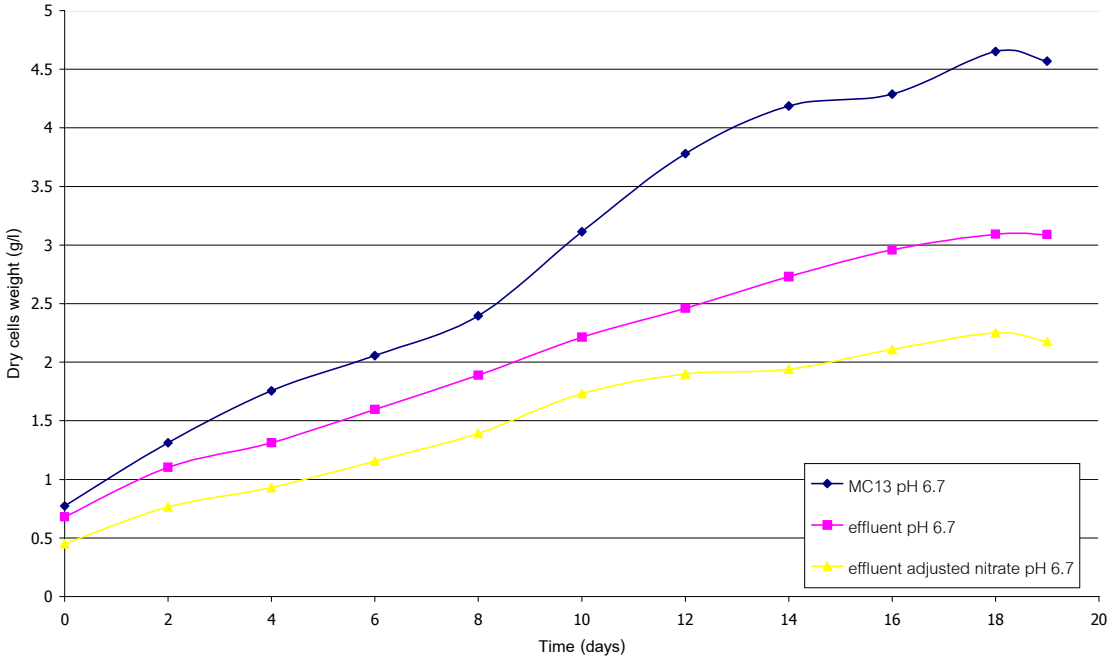
Figure 9 Variation in pH during *B. braunii* cultivation in effluent from Tropical canning company pH 6.7 and pH 7.8 at light intensity 3,000 lux

### 3.3 สารอาหาร

ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัท ทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ค่ากรด-เบส 6.7 ปรับปริมาณสารอาหาร (ไนเทรต) ให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 โดยการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 0.6 เท่า, น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลค่ากรด-เบส 6.7 ไม่ปรับปริมาณสารอาหาร เลี้ยงเปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ค่ากรด-เบส 6.7 โดยใช้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายมีการเจริญสูงสุดในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 รองลงมาคือน้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหารและน้ำทิ้งไม่ปรับปริมาณสารอาหาร โดยเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน (ภาพที่ 10) สาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.27, 1.04 และ 0.91 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.108, 0.105 และ 0.087 ต่อวัน, ค่าการเจริญเป็น 2 เท่า เท่ากับ 6.39, 6.62 และ 7.98 วัน และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.65, 2.22 และ 3.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่าการศึกษาของ Lupi และคณะ (1994)

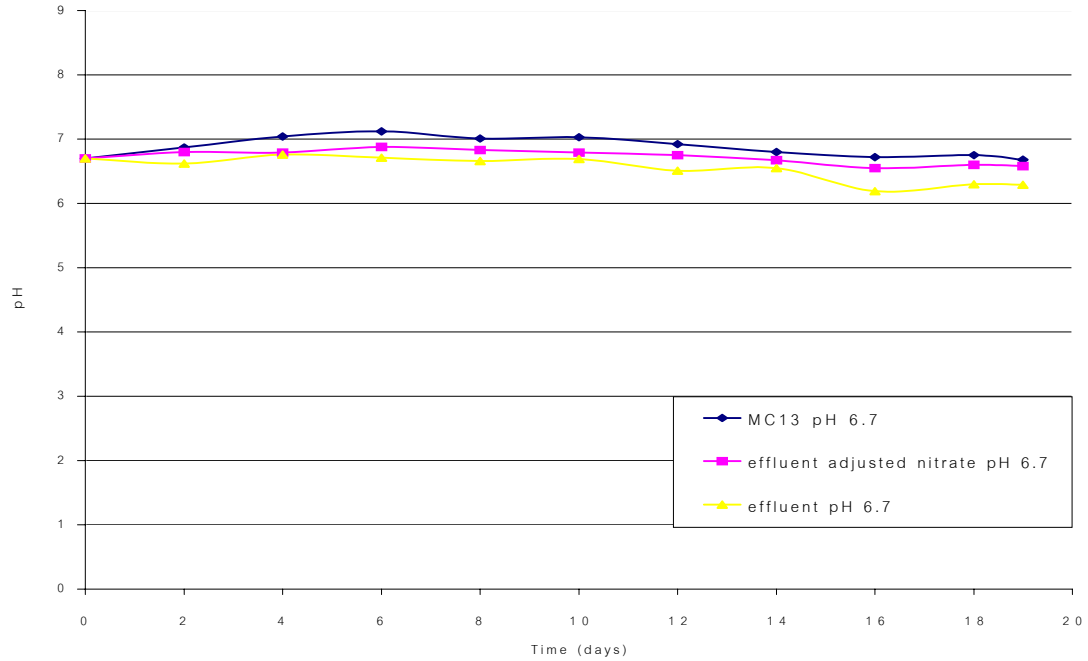
ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.3 กรัมต่อลิตร อาจเนื่องจากใช้ความเข้มแสงแตกต่างกัน (250 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ ประมาณ 20,000 ลักซ์) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการทดลองชุดนี้ใช้ระยะเวลานานถึง 18 วัน มากกว่าชุดที่แล้ว (ข้อ 3.2) ซึ่งใช้ระยะเวลาเพียง 10 วัน อาจเนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นในข้อ 3.2 นั้นใช้ความเข้มแสงเพียง 5,000 ลักซ์ จึงทำให้หัวเชื้อสาหร่ายเจริญเติบโตช้า แต่เมื่อนำมาทำการทดลองโดยใช้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ซึ่งเป็นความเข้มแสงที่แตกต่างกันไม่มาก ทำให้สาหร่ายสามารถปรับตัวได้เร็ว แต่การทดลองชุดนี้ใช้ความเข้มแสงในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น 10,000 ลักซ์ เพื่อให้หัวเชื้อสาหร่ายเจริญเติบโตเร็ว เมื่อนำมาทดลองที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ซึ่งเป็นความเข้มแสงที่แตกต่างกันมาก สาหร่ายจึงมีช่วงการปรับตัวช้า ทำให้ใช้ระยะเวลานานในการเจริญสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kojima และ Zhang (1999) ทดลองโดยเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายเริ่มต้นที่ความเข้มแสง 3,000 และ 10,000 ลักซ์ และนำไปทดลองเลี้ยงสาหร่ายที่ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ พบว่าชุดที่เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายด้วยความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุดได้เร็วกว่าชุดที่เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายด้วยความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

การเปลี่ยนแปลงค่ากรด-เบสระหว่างการเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ปรับปริมาณสารอาหาร (ไนเทรต) ให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13, น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลไม่ปรับปริมาณสารอาหาร และอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 (ภาพที่ 11) พบว่าค่ากรด-เบส มีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าประมาณ 6.5-7.1




ภาพที่ 10 การเติบโตของสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัท ทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ค่ากรด-เบส 6.7, น้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหาร (ไนเทรต) ให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 และอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

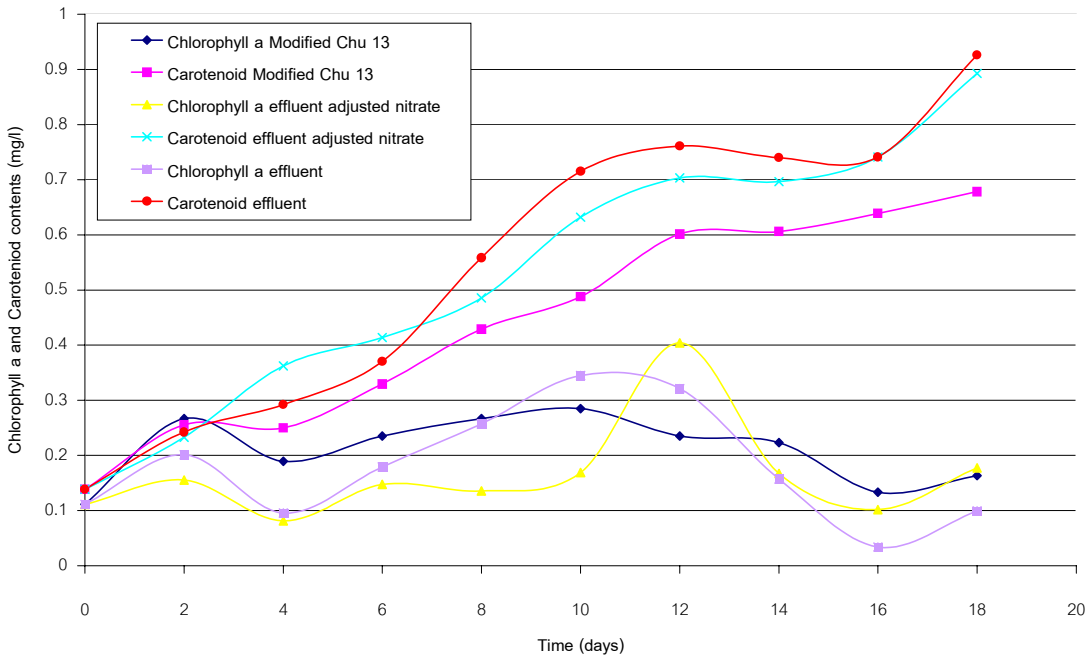
Figure 10 Growth of *B. braunii* in effluent from Tropical canning company pH 6.7, effluent in which nitrate adjusted nearly equivalence to the Modified Chu 13 and in Modified Chu 13 at light intensity 3,000 lux




ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงค่ากรด-เบสระหว่างการเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ค่ากรด-เบส 6.7, น้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหาร (ไนเทรต) ให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 และอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

Figure 11 Variation in pH during *B. braunii* cultivation in effluent from Tropical canning company pH 6.7, effluent in which nitrate adjusted nearly equivalence to the Modified Chu 13 and Modified Chu 13 at light intensity 3,000 lux

เมื่อนำสาหร่ายที่เลี้ยงเป็นเวลา 18 วันมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ a และคาโรทีนอยด์ (ภาพที่ 12) พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ a มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนปริมาณคาโรทีนอยด์ในน้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหารมีค่าสูงสุด (0.93 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กับปริมาณคาโรทีนอยด์ในน้ำทิ้งไม่ปรับปริมาณสารอาหาร แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางภาคผนวกที่ ง1) ระหว่างน้ำทิ้งทั้ง 2 ชนิดและอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.68 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าสาหร่าย *B. braunii* เมื่อเจริญเข้าสู่ระยะพัก โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวส้ม, สีน้ำตาลหรือสีส้ม (ภาพที่ 13) เนื่องจากมีการสะสม ketocarotenoids พวก canthaxanthin และ/หรือ echinenone ไว้ภายในเซลล์ ส่วนเซลล์ในระยะเจริญเติบโต (growth phase) โคโลนีจะมีสีเขียวและสาหร่ายจะสะสมคาโรทีนอยด์พวก botryoxanthins (Okada *et al.*, 1996)




ภาพที่ 12 ปริมาณคลอโรฟิลล์ a และคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ไม่ปรับปริมาณสารอาหาร, น้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหาร (ไนเทรต) ให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 และอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

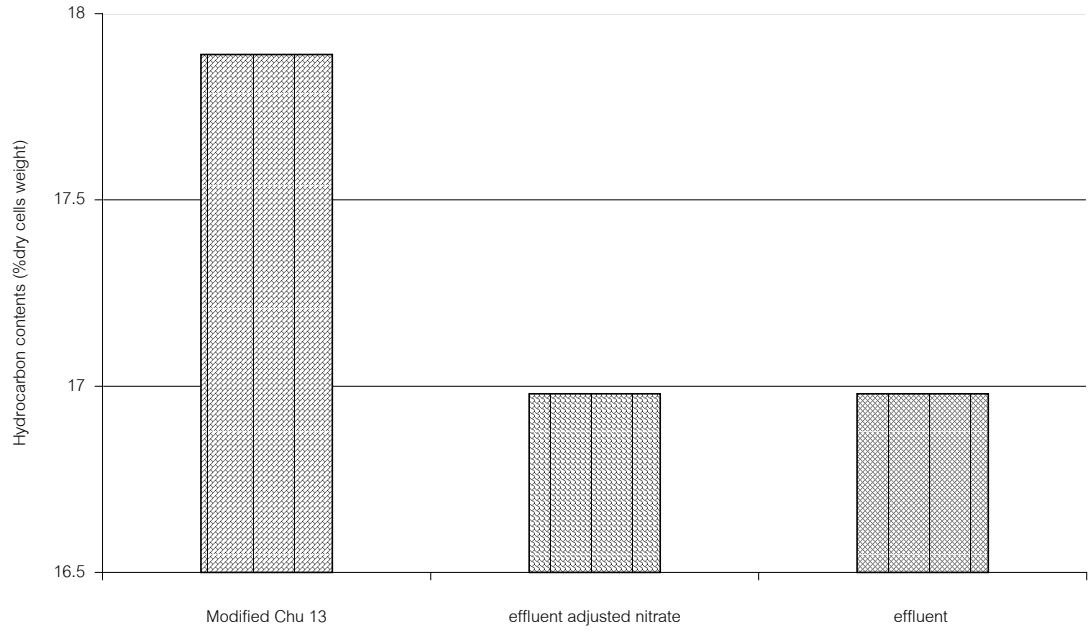
Figure 12 Chlorophyll a and Carotenoid contents of *B. braunii* in effluent from Tropical canning company pH 6.7, effluent in which nitrate adjusted nearly equivalence to the Modified Chu 13 and Modified Chu 13 at light intensity 3,000 lux

ภาพที่ 13 สาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งไม่ปรับปริมาณสารอาหาร (ขวา), น้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหาร (กลาง) และอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 (ซ้าย) ระยะเวลาเลี้ยง 18 วัน

Figure 13 *B. braunii* in effluent from Tropical canning company pH 6.7 (right), effluent in which nitrate adjusted nearly equivalence to the Modified Chu 13 (middle) and Modified Chu 13 (left) cultivation 18 days

เมื่อนำสาหร่ายในระยะ early stationary phase (ระยะเวลาเลี้ยง 18 วัน) มาสกัดไฮโดรคาร์บอน พบว่าสาหร่าย *B. braunii* ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนมากที่สุดเท่ากับ 17.89% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนในน้ำทิ้งที่ปรับและไม่ปรับปริมาณสารอาหารนั้น มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเท่ากันคือ 16.98% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 14) อาจเป็นเพราะน้ำทิ้งทั้ง 2 ชนิดยังคงมีอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสเท่ากันนั่นเอง (N : P = 1.41 : 1) โดยปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้จากสาหร่าย *B. braunii* ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (ตารางภาคผนวกที่ ง2) และสาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 0.045, 0.020 และ 0.017 กรัม/ลิตร.วัน สำหรับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13, น้ำทิ้งที่ปรับและไม่ปรับปริมาณสารอาหารตามลำดับ แต่จากการทดลองของ Vongprasert (1986) พบว่าสาหร่าย *B. Braunii* ที่คัดแยกได้จากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 และอาหารสังเคราะห์ Kratz and Myers มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 11.04 และ 10.57 % ของน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ โดยพบว่าปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้ในการทดลองครั้งนี้มีปริมาณสูงกว่าเล็กน้อยอาจเนื่องจากวิธีการทำแห้งสาหร่ายและสภาวะการเลี้ยงแตกต่างกันโดย Vongprasert เลี้ยงที่ความ เข้มแสงสูงถึง 10,000 ลักซ์

ส่วนการทดลองของ Sawayama และคณะ (1992) เลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งจากบ้านเรือนเปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 พบว่าสาหร่ายมีการเจริญสูงสุดในอาหาร Modified Chu 13 โดยมีค่าเท่ากับ 1.34 กรัมต่อลิตร และเมื่อสกัดไฮโดรคาร์บอนพบว่าได้ปริมาณถึง 58% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนในน้ำทิ้งจากบ้านเรือนสาหร่ายมีการเจริญสูงสุด 0.34 กรัมต่อลิตร และสกัดไฮโดรคาร์บอนได้ปริมาณถึง 53% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยพบว่าปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้ในการทดลองครั้งนี้มีปริมาณน้อยกว่าการทดลองของ Sawayama และคณะ (1992) มาก ทั้งที่การเจริญสูงสุดของสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร Modified Chu 13 และน้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหารสูงกว่า (4.65 และ 3.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ซึ่งอาจเป็นเพราะสาหร่าย *B. braunii* มาจากแหล่งที่ต่างกัน และ/หรือวิธีทำแห้งสาหร่ายก่อนนำไปสกัดไฮโดรคาร์บอนแตกต่างกัน โดยการทดลองครั้งนี้ใช้การทำแห้งสาหร่ายแบบอบแห้ง แต่ Sawayama และคณะ (1992) ใช้การอบแห้งสาหร่ายแบบ freeze drying ซึ่งวิธีการอบแห้งอาจทำให้ไฮโดรคาร์บอนบางส่วนสูญเสียไปเนื่องจากความร้อน




ภาพที่ 14 ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่สกัดจากสาหร่าย *B. braunii* ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13, น้ำทิ้งไม่ปรับปริมาณสารอาหารและน้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหารค่ากรด-เบส 6.7

Figure 14 Hydrocarbon contents of *B. braunii* in Modified chu 13, effluent from Tropical Canning Company and effluent in which nitrate adjusted nearly equivalence to the Modified Chu 13 pH 6.7 at light intensity 3,000 lux

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13, น้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหารและน้ำทิ้งไม่ปรับปริมาณสารอาหาร ภายหลังการเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 18 วัน พบว่าปริมาณไนโตรเจนในรูปไนเตรทมีค่าเท่ากับ 1.32, 1.25 และ 3.27 มิลลิกรัมต่อลิตรไนโตรเจน (ตารางที่ 5) โดยสาหร่ายใช้ไปเท่ากับ 89.35%, 89.90% และ 84.15% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่ปรับปริมาณสารอาหารสามารถใช้ไนเทรตในการเติบโตได้ดีเท่ากับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 อาจเนื่องจากปริมาณไนเทรตในอาหารทั้ง 2 ชนิดเพียงพอที่จะใช้ในการเติบโตของสาหร่ายและจากการทดลองพบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ Kratz and Myers ที่มีปริมาณโพแทสเซียมไนเทรตมากกว่าอาหาร Modified Chu 13 ถึง 40 เท่า การเติบโตมีค่าน้อยกว่าอาหาร Modified Chu 13 เช่นกัน (ภาพที่ 6) แต่จากการศึกษาของ Sawayama และคณะ (1992) สาหร่าย *B. braunii* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากบ้านเรือนสามารถใช้ปริมาณไนเทรตไปเท่ากับ 99.8% ในวันที่ 9 ของการทดลอง ซึ่งการทดลองครั้งนี้สาหร่ายใช้ไนเทรตในปริมาณน้อยกว่า Sawayama และคณะ (1992) อาจเนื่องจากวิเคราะห์ปริมาณไนเทรตในระยะที่สาหร่ายเจริญสูงสุด (early stationary phase) สาหร่ายยังต้องการใช้ไนเทรต โดยวันที่สาหร่ายใช้ปริมาณไนเทรตได้สูงสุดควรเป็นระยะที่สาหร่ายเริ่มจะตาย (last stationary phase) ส่วน กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ (2536) ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลพบว่าสาหร่ายใช้ปริมาณไนเทรตไปเท่ากับ 100% ภายใน 2 วัน ทั้งนี้เนื่องจากสาหร่าย *Chlorella* sp. มีลักษณะรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยวจึงสามารถรับแสงและสัมผัสสารอาหารได้ดี ซึ่งต่างจากสาหร่าย *B. braunii* ที่มีลักษณะรูปร่างเป็นโคโลนีทำให้เซลล์รับแสงและสัมผัสสารอาหารได้ไม่ทั่วถึง ทำให้การใช้สารอาหารได้ช้ากว่า

ปริมาณฟอสเฟตในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13, น้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหารและน้ำทิ้งไม่ปรับปริมาณสารอาหาร ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน พบว่ามีปริมาณฟอสเฟตเท่ากับ 0.86, 3.82 และ 7.81 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5) โดยสาหร่ายใช้ปริมาณฟอสเฟตไปเท่ากับ 68.50%, 56.49% และ 46.61% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ Sawayama และคณะ (1992) โดยสาหร่าย *B. braunii* สามารถใช้ปริมาณฟอสเฟตในน้ำทิ้งจากบ้านเรือนไปเท่ากับ 96.5% ภายใน 5 วัน เนื่องจากสาหร่ายมีการเจริญสูงสุดภายใน 6 วัน ซึ่งระยะการเติบโตเร็วกว่าการทดลองในครั้งนี้มากประมาณ 3 เท่า นอกจากนี้อาจเนื่องจากในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของสาหร่าย *B. braunii* พบว่าปริมาณฟอสเฟตลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากสาหร่ายเก็บไว้ในเซลล์ในรูป polyphosphate granules เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต หลังจากนั้นในช่วง growth phase สาหร่ายจะปล่อยฟอสเฟตออกมาอย่างต่อเนื่องมากกว่า 85% และจะหยุดปล่อยเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase (Casadevall *et al*., 1985) จึงทำให้การหาปริมาณการใช้ฟอสเฟตที่แท้จริงเป็นไปได้ยาก โดยจากการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารในน้ำทิ้งที่ผ่านการเลี้ยงสาหร่ายในครั้งนี้ ได้วิเคราะห์

ในช่วง early stationary phase จึงทำให้ค่าที่ได้อาจไม่ใช่ค่าสูงสุดของปริมาณสารอาหารที่สาหร่ายใช้ไปจริงๆ ส่วน กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ (2536) ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลพบว่าสาหร่ายใช้ปริมาณฟอสเฟตไปเท่ากับ 99.9% ภายใน 2 วัน ซึ่งพบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. T9 สามารถใช้ปริมาณฟอสเฟตได้เร็วกว่าสาหร่าย *B. braunii* มากเหตุผลเช่นเดียวกับการใช้ปริมาณไนเทรต

ตารางที่ 5 ปริมาณไนเทรตและฟอสเฟตในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13, น้ำทิ้งไม่ปรับปริมาณสารอาหารและน้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหาร ก่อนและหลังการเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii*

Table 5 Nitrate and phosphate contents before and after cultivation of *B. braunii* in Modified Chu 13, effluent and effluent in which nitrate adjusted nearly equivalence to the Modified Chu 13

| Media | Nitrate (mg/l) | | | Phosphate (mg/l) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | before | after | % reduced | before | after | % reduced |
| Modified Chu 13 pH 6.7 | 12.39 | 1.32 | 89.35 | 2.73 | 0.86 | 68.50 |
| Effluent pH 6.7 | 20.63 | 3.27 | 84.15 | 14.63 | 7.81 | 46.61 |
| Effluent adjusted nitrate pH 6.7 | 12.38 | 1.25 | 89.90 | 8.78 | 3.82 | 56.49 |

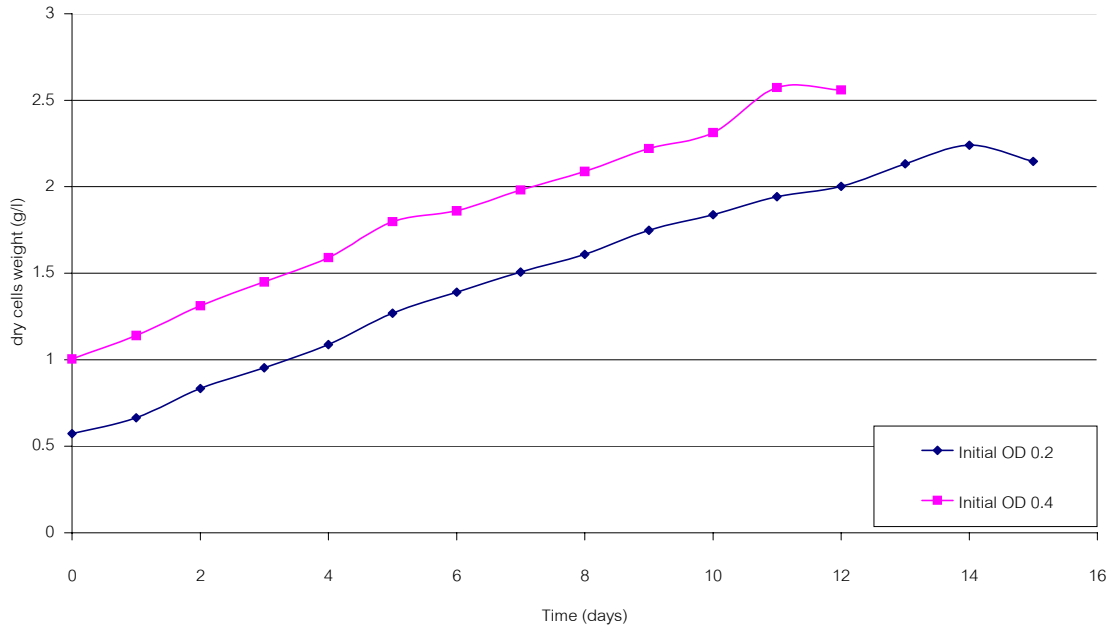
## 4. การเพิ่มปริมาณการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อสกัดไฮโดรคาร์บอน

### 4.1 ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้น

ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งจากโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ค่ากรด-เบส 6.7 ปรับปริมาณสารอาหารให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 โดยเลี้ยงใน ขวดแก้วก้นแบนปริมาตรเลี้ยง 2 ลิตร ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ ให้อากาศผสม $CO_2$ 1% อัตรา 5 ลิตรต่อนาที ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้น ($OD_{435}$) เท่ากับ 0.2 (ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.77 กรัมต่อลิตร) และ 0.4 (ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.54 กรัมต่อลิตร) (ภาพที่ 15) พบว่า สาหร่ายมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเมื่อเลี้ยงที่ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 โดยเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน สาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.04 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.24 กรัมต่อลิตร, อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.13 ต่อวัน และมีค่าการเจริญเป็น 2 เท่า เท่ากับ 5.34 วัน โดยเมื่อเลี้ยงสาหร่ายที่ความหนาแน่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.4 เป็นเวลา 11 วัน พบว่าสาหร่ายมีความหนา

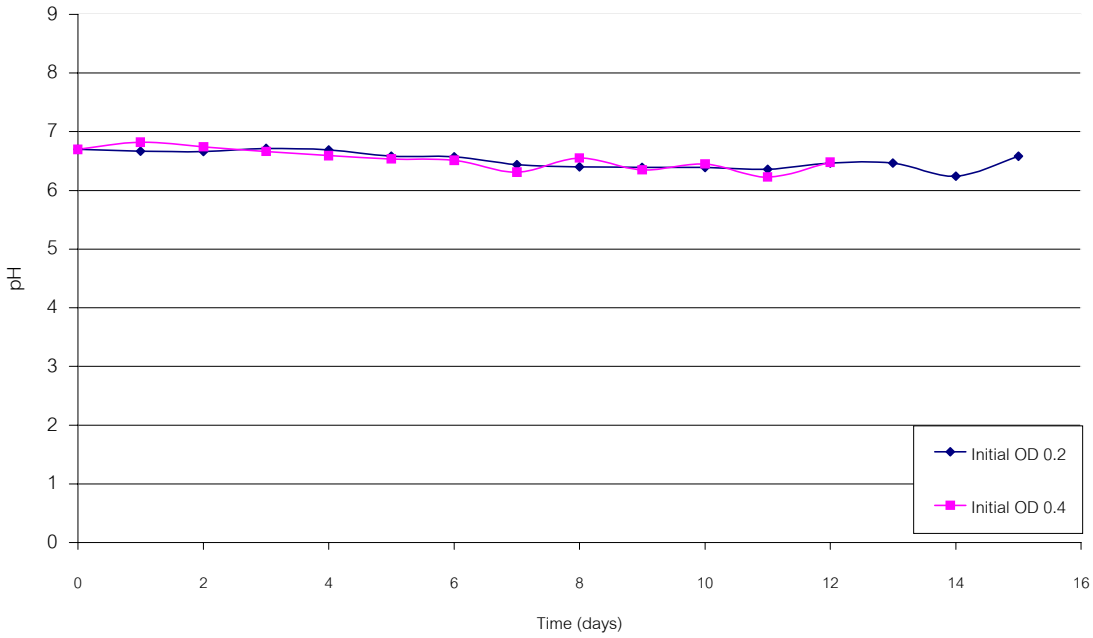
แน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.20 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.58 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.12 ต่อวัน และมีค่าการเจริญเป็น 2 เท่า เท่ากับ 5.95 วัน โดยสาหร่ายเติบโตได้ดีในน้ำทิ้งที่มีความหนาแน่นของสาหร่ายน้อยกว่า อาจเนื่องจากสาหร่ายสามารถสัมผัสอาหารได้อย่างทั่วถึง และสามารถรับแสงได้อย่างเต็มที่มากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูง จึงทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้มากกว่านั่นเอง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Casadevall และคณะ (1985) โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.25-0.35 กรัมต่อลิตรซึ่งใช้ในปริมาณน้อยกว่าแต่สาหร่ายสามารถเติบโตได้ดีเช่นเดียวกับ Lupi และคณะ (1994) ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.25 กรัมต่อลิตร สาหร่ายสามารถเติบโตได้ดีเช่นเดียวกัน

การเปลี่ยนแปลงค่ากรด-เบสระหว่างการเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งจากโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ปรับปริมาณสารอาหารให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 และ 0.4 (ภาพที่ 16) พบว่าค่ากรด-เบสค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าระหว่าง 6.5-6.8




ภาพที่ 15 การเติบโตของสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหารให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ค่ากรด-เบส 6.7 ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ ให้อากาศผสม $CO_2$ 1% อัตรา 5 ลิตรต่อนาที ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 และ 0.4

Figure 15 Growth of *B. braunii* in effluent in which nitrate adjusted nearly equivalence to the Modified Chu 13 pH 6.7 at light intensity 10,000 lux, air with 1%$CO_2$, rate 5 l/min and initial algal density of 0.2 and 0.4




ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงค่ากรด-เบสระหว่างการเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหารให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ค่ากรด-เบส 6.7 ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ ให้อากาศผสม $CO_2$ 1% อัตรา 5 ลิตรต่อนาที ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 และ 0.4

Figure 16 Variation in pH during *B. braunii* cultivation in effluent in which nitrate adjusted nearly equivalence to the Modified Chu 13 pH 6.7 at light intensity 10,000 lux, air with 1%$CO_2$, rate 5 l/min and initial algal density of 0.2 and 0.4

เมื่อสกัดไฮโดรคาร์บอนจากสาหร่าย *B. braunii* ในระยะ early stationary phase ด้วยวิธีทำแห้งสาหร่ายโดยการอบแห้ง (ตารางที่ 6) พบว่าชุดที่เลี้ยงโดยความหนาแน่นสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนสูงสุดท่ากับ 16.72% ของน้ำหนักแห้ง สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 0.025 กรัม/ลิตร.วัน ส่วนชุดที่เลี้ยงโดยความหนาแน่นสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.4 มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 13.70% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีปริมาณไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% (ตารางภาคผนวกที่ ง3) และสาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 0.030 กรัม/ลิตร.วัน โดย Casadevall และคณะ (1985) ทดลองเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ในอาหาร Modified Chu 13 ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.25-0.35 กรัมต่อลิตร ปริมาตรเลี้ยง 250 มิลลิลิตร ให้แสง 26 วัตต์ต่อตารางเมตร ช่วงเวลาให้แสง 14 ชั่วโมง และอากาศผสม $CO_2$ 1%

สกัดไฮโดรคาร์บอนจากเซลล์เปียกด้วยคลอโรฟอร์ม : เมทานอลอัตราส่วน 1:1 พบว่าได้ปริมาณ 27% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ 6 ปริมาณไฮโดรคาร์บอนจากสาหร่าย *B. braunii* ที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 และ 0.4

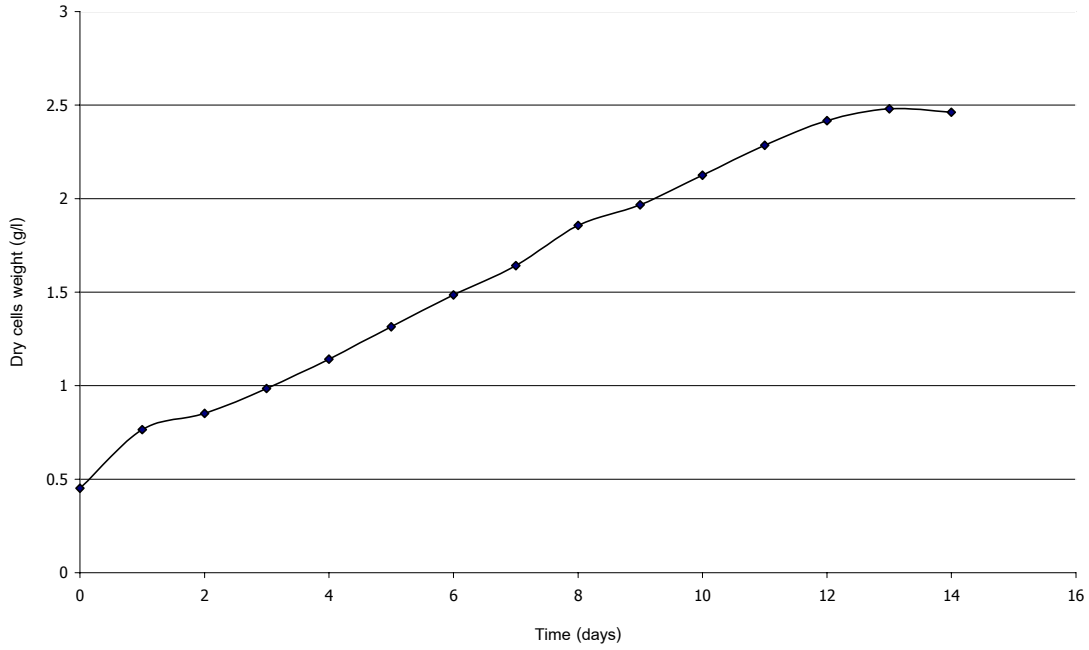
Table 6 Hydrocarbon contents of *B. braunii*, cultivation at initial algal density of 0.2 and 0.4

| Initial algal density ($OD_{435}$) | Hydrocarbon (%dry cells weight) |
|---|---|
| 0.2 | 16.72 |
| 0.4 | 13.70 |

**4.2 อัตราการให้อากาศ**

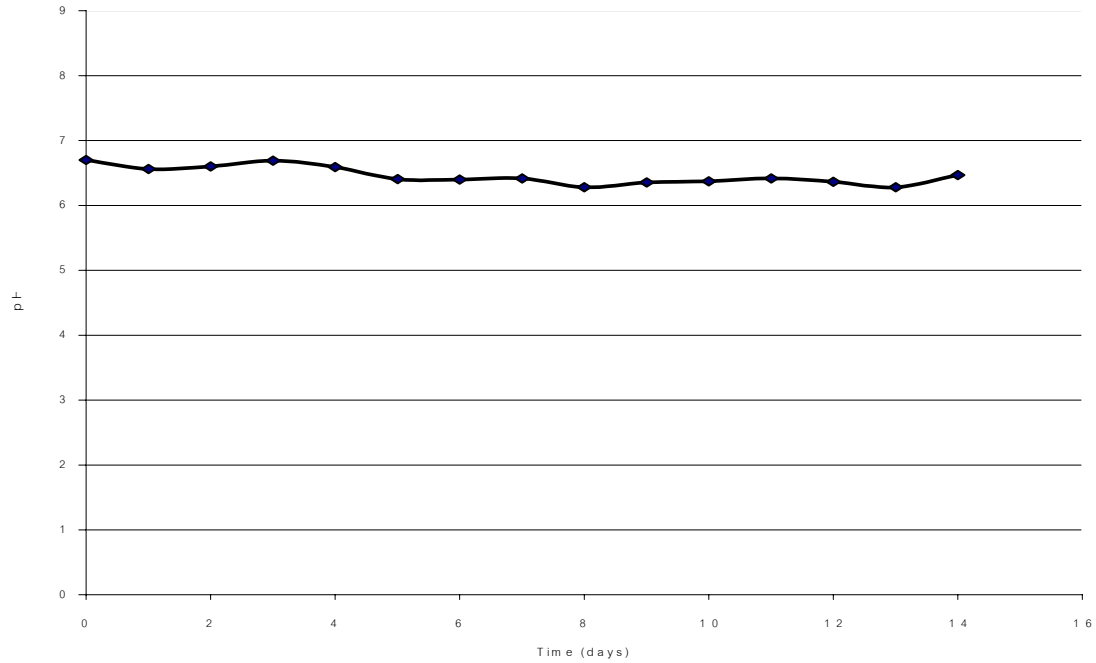
ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล ค่ากรด-เบส 6.7 ปรับปริมาณสารอาหารให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 (ภาพที่ 17) ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.2 หรือปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.77 กรัมต่อลิตร ให้อากาศผสม $CO_2$ 1% อัตรา 7 ลิตรต่อนาที ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ พบว่าเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน สาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.15 โดยมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 2.49 กรัมต่อลิตร, อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.14 ต่อวัน และมีการเจริญเป็น 2 เท่า เท่ากับ 4.94 วัน โดยเมื่อให้อากาศในอัตราเพิ่มขึ้นพบว่าสาหร่ายเติบโตเร็วขึ้น เนื่องจากการเพิ่มอัตราการให้อากาศทำให้สาหร่ายหลุดออกเป็นโคโลนีเล็กๆมากมาย ทำให้สาหร่ายสามารถรับสารอาหาร ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ทั่วถึงส่งผลให้สาหร่ายมีการเติบโตดีขึ้น และยังพบว่าสามารถย่นระยะเวลาเลี้ยงสาหร่ายได้เร็วขึ้น 5 วัน

การเปลี่ยนแปลงค่ากรด-เบสระหว่างการเลี้ยง (ภาพที่ 18) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าประมาณ 6.4-6.7 ซึ่งค่อนข้างเป็นกรดเล็กน้อยเนื่องจากสาหร่ายใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในน้ำ (ประมาณร้อยละ 1) ในระหว่างการสังเคราะห์แสงเพื่อการเติบโต ค่ากรด-เบสจึงเพิ่มสูงขึ้นเพราะจะเหลืออนุมูลของ $OH^-$ มากขึ้น จากการแตกตัวของ $HCO_3^{2-}$, $H_2CO_3^-$ และ $CO_3^{2-}$ เมื่อคาร์บอนไดออกไซด์ถูกดึงไปใช้ ทำให้ช่วงมืดมีค่ากรด-เบสลดลงซึ่งเป็นช่วงที่สาหร่ายไม่ได้สังเคราะห์แสง ใช้ออกซิเจนเพียงอย่างเดียวเพื่อการหายใจ ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในน้ำเป็นกรดคาร์บอนิค ค่ากรด-เบสจึงลดลง (Richmond, 1986)




ภาพที่ 17 การเติบโตของสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหารให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ค่ากรด-เบส 6.7 ให้อากาศผสม $CO_2$ 1% อัตรา 7 ลิตรต่อนาที

Figure 17 Growth of *B. braunii* in effluent in which nitrate adjusted nearly equivalence to the Modified Chu 13 pH 6.7, air with 1%$CO_2$ ,rate 7 l/min




ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงค่ากรด-เบสระหว่างการเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหารให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ค่ากรด-เบส 6.7 ให้อากาศผสม $CO_2$ 1% อัตรา 7 ลิตรต่อนาที

Figure 18 Variation in pH during *B. braunii* cultivation in which nitrate adjusted nearly equivalence to the Modified Chu 13 pH 6.7, air with 1%$CO_2$, rate 7 l/min

เมื่อนำสาหร่ายในระยะ early stationary phase มาสกัดไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีทำแห้งสาหร่ายโดยการอบแห้ง และทำแห้งสาหร่ายโดยการ freeze drying พบว่า ชุดที่ทำแห้งสาหร่ายโดยการ freeze drying สามารถสกัดไฮโดรคาร์บอนได้สูงถึง 23.87% มีอัตราการผลิตไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 0.044 กรัม/ลิตร.วัน ส่วนชุดที่ทำแห้งสาหร่ายโดยการอบแห้ง พบว่าสกัดไฮโดรคาร์บอนได้ 9.49% มีอัตราการผลิตไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 0.017 กรัม/ลิตร.วัน ซึ่งปริมาณไฮโดรคาร์บอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (ตารางภาคผนวกที่ ง4) เนื่องจากการทำแห้งสาหร่ายโดยการ freeze drying อาศัยหลักการระเหิดน้ำในสถานะของแข็งกลายเป็นไอน้ำ โดยผลิตภัณฑ์ที่ต้องการทำแห้งจะถูกทำให้อยู่ในรูปแช่แข็งก่อน แล้วจึงให้ความร้อนแก่ผิวผลิตภัณฑ์ และไอน้ำที่เกิดขึ้นจะถูกกำจัดออกทันทีที่เครื่องควบแน่น (เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, 2541) ทำให้สาหร่ายที่ได้มีคุณภาพดี ไม่มีการเสื่อมเสียขององค์ประกอบภายในเซลล์ จึงทำให้สกัดไฮโดรคาร์บอนได้ในปริมาณมากกว่าการทำแห้งสาหร่ายโดยการอบแห้งซึ่งสาหร่ายมีการเสื่อมสภาพจากความร้อนที่ใช้ในการอบแห้งและการอบแห้งอาจทำให้เซลล์สาหร่ายหดตัวทำให้สกัดไฮโดรคาร์บอนได้ยากขึ้น

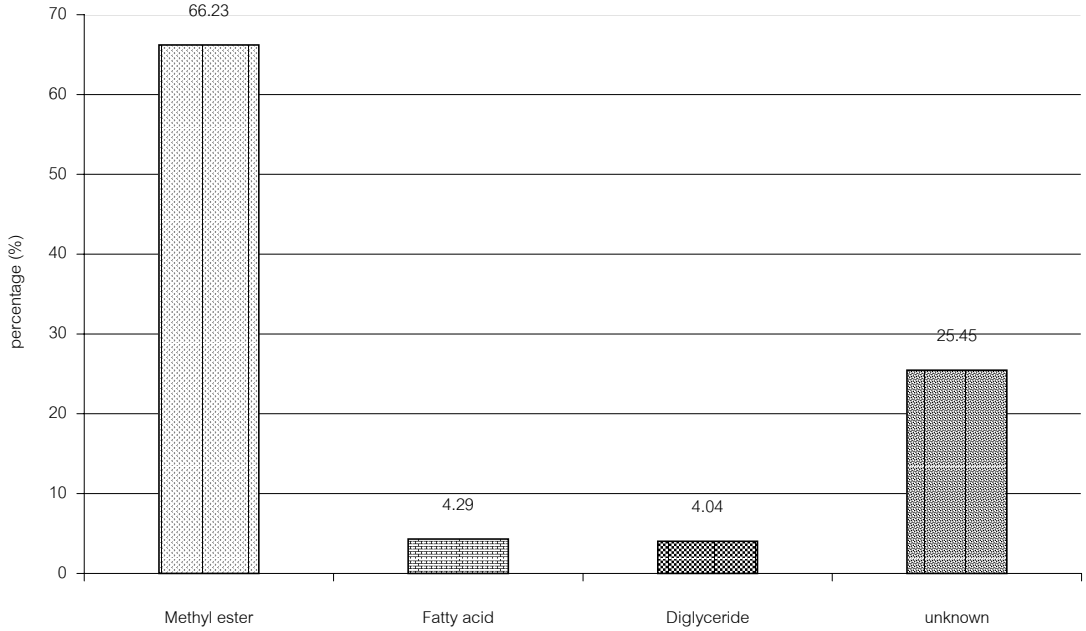
ในปี 1987 Yamaguchi และคณะ ทดลองเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ในอาหาร Modified Chu 13 เช่นกัน โดยให้แสง 5,000 ลักซ์ อย่างต่อเนื่อง และอากาศผสม $CO_2$ 1% ทำแห้งสาหร่ายด้วยวิธี freeze dryingสกัดไขมันทั้งหมดด้วย คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ ด้วยอัตราส่วน 1 : 2 : 0.8 ปริมาตร/ปริมาตร พบว่าสกัดได้ 71.6% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในปี 1992 Sawayama และคณะ ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วจากแหล่งต่างๆ 3 แหล่งคือ น้ำทิ้งจากบ้านเรือน 2 แหล่ง ให้แสง 3,000 ลักซ์ อย่างต่อเนื่อง ทำแห้งสาหร่ายด้วยวิธี freeze drying สกัดไฮโดรคาร์บอนด้วยเฮกเซน และใช้เครื่อง sonicator พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากบ้านเรือนสามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้สูง 53 และ 40% ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 สาหร่ายสามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ 58% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อมาในปี 1994 Sawayama และคณะ ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* อย่างต่อเนื่อง (continuous culture) ในน้ำทิ้งจากบ้านเรือนที่ผ่านการบำบัดแล้วด้วยวิธีตะกอนเร่ง ให้แสง 5000 ลักซ์ ทำแห้งสาหร่ายด้วยวิธี freeze drying สกัดไฮโดรคาร์บอนด้วยเฮกเซน และใช้เครื่อง sonicator พบว่าสามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ 49% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าสาหร่ายผลิตไฮโดรคาร์บอนได้สูงสุด 23.87% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งปรับปริมาณสารอาหารค่ากรด-เบส 6.7 ที่ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ ให้อากาศผสม $CO_2$ 1% อัตรา 7 ลิตรต่อนาที โดยเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน สาหร่ายมีปริมาณเซลล์แห้ง 2.49 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 0.5944 กรัมต่อลิตร ดังนั้นสาหร่ายผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ในอัตรา 0.0457 กรัมต่อลิตรต่อวัน หากต้องการผลิตไฮโดรคาร์บอนจากสาหร่ายให้ได้ 1 กิโลกรัมภายใน 13 วัน จะต้องเลี้ยงสาหร่ายเท่ากับ 1,682 ลิตร และหากต้องการผลิตไฮโดรคาร์บอนจากสาหร่ายให้ได้อัตรา 1 กิโลกรัมต่อวัน จะต้องเลี้ยงสาหร่ายพร้อมกัน 21,866 ลิตร

## 7. องค์ประกอบของไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้

- Thin Layer Chromatography

เมื่อนำไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้จากสาหร่าย *B. braunii* มาวิเคราะห์องค์ประกอบ โดยใช้เครื่อง Thin Layer Chromatography (ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) พบว่าไม่สามารถวิเคราะห์ได้ว่าเป็นไฮโดรคาร์บอนชนิดใด แต่เมื่อนำไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเตอร์ พบว่ามีเมทิลเอสเตอร์ 66.23% กรดไขมัน 4.29% ไดกลีเซอไรด์ 4.04% และไม่สามารถบอกชนิดได้อีก 25.45% (ภาพที่ 19)




ภาพที่ 19 องค์ประกอบของไฮโดรคาร์บอนที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Thin Layer Chromatography

Figure 19 Analysis of hydrocarbon composition by Thin Layer Chromatography

- Gas Chromatography

จากการส่งวิเคราะห์องค์ประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ด้วยเครื่อง Gas Chromatography โดยไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้จากสาหร่าย *B. braunii* และไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้ผ่านการทำปฏิกิริยาให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเตอร์แล้ว พบว่าไฮโดรคาร์บอนที่ยังไม่ได้ทำให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเตอร์ วิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ HP-1 MS ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้ว พบว่าได้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 7 ซึ่งองค์ประกอบที่วิเคราะห์ได้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปไฮโดรคาร์บอน ส่วนไฮโดรคาร์บอนที่ผ่านการทำปฏิกิริยาให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเตอร์แล้ว วิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ HP-INNOWAX ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่มีคุณสมบัติมีขั้ว สารที่วิเคราะห์ได้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปเมทิลเอสเตอร์ โดยองค์ประกอบที่วิเคราะห์ได้ตรงกันระหว่างไฮโดรคาร์บอนที่ทำปฏิกิริยาแล้วและยังไม่ได้ทำปฏิกิริยาคือ palmitic acid และ methyl oleate (ตารางที่ 8) และพบว่ามีสารสควาลีน ซึ่งเป็นสารที่ *B. braunii* สายพันธุ์ B ผลิตขึ้น โดยที่สายพันธุ์อื่นไม่มีการผลิตสารชนิดนี้ จึงสามารถสรุปได้ว่า สาหร่าย *B. braunii* ที่นำมาทดลองนี้เป็นสายพันธุ์ B แม้ว่าจะไม่พบสารโบไทรโอคอกคีนก็ตาม เนื่องจากพบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในห้องทดลองเมื่อมีอายุมากจะมีการสะสมคาโรทีนอยด์ เซลล์สาหร่ายจึงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีส้ม ดังภาพที่ 12 และ 13 โดยที่สาหร่ายยังไม่มีการผลิตโบไทรโอคอกคีน จึงยังคบพบไฮโดรคาร์บอนชนิดเดียวกันกับที่พบในโคโลนีสีเขียว ซึ่งต่างจากสาหร่ายที่พบในธรรมชาติ

เมื่อสาหร่ายเข้าสู่ระยะพักโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือส้มและมีการสะสมโบไทรโอคอกคีนถึง 31-76% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Maxwell *et al*., 1968) สาเหตุอาจเนื่องจากสาหร่ายที่เลี้ยงในห้องทดลองไม่ได้สร้างเอนไซม์ botryococcene synthase ที่จะเปลี่ยน cyclopropyl carbinyl cation ไปเป็น botryococcene (ภาพที่ 2) และจากการนำสาหร่าย *B. braunii* ในระยะพักที่เจริญเป็นจำนวนมากในอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ไปวิเคราะห์องค์ประกอบของไฮโดรคาร์บอน พบว่าองค์ประกอบของไฮโดรคาร์บอนที่วิเคราะห์ได้เป็นชนิดโบไทรโอคอกคีนและไอโซโบไทรโอคอกคีนเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสาหร่าย *B. braunii* ที่เก็บจากอ่างน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นสายพันธุ์ B (Vongprasert, 1986)

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของไฮโดรคาร์บอนที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography - Mass Spectrometry (ยังไม่ทำปฏิริยาให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเตอร์)

Table 7 Analysis of hydrocarbon composition by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (non-methyl ester reaction)

| Molecular formula | Type | Molecular weight |
|---|---|---|
| $C_{10}H_{18}O$ | Trans-2-Decenal* | 154.14 |
| $C_{16}H_{34}$ | Tetradecane* | 226.27 |
| $C_{17}H_{36}O$ | 1-Hexadecanol** | 256 |
| $C_{18}H_{36}O$ | 2-Pentadecanone* | 268.28 |
| $C_{19}H_{38}$ | 1-Nonadecene* | 266.30 |
| $C_{9}H_{18}$ | 2-Pentene** | 126 |
| $C_{14}H_{28}$ | 5-Tetradecene* | 196.22 |
| $C_{16}H_{32}O_2$ | Palmitic acid* | 256.24 |
| $C_{20}H_{40}$ | 3-Eicosene* | 280.31 |
| $C_{20}H_{42}$ | Octadecane** | 282 |
| $C_{19}H_{36}O_2$ | Methyl Oleate* | 296.27 |
| $C_{9}H_{20}$ | Heptane** | 128 |
| $C_{14}H_{28}$ | 1-Tetradecene** | 196 |
| $C_{36}H_{74}$ | Hexatriacontane** | 507 |
| $C_{35}H_{70}$ | 17-Pentatriacontene** | 491 |
| $C_{31}H_{64}$ | Hentriacontane** | 437 |
| $C_{29}H_{60}$ | Nonacosane* | 408.47 |
| $C_{30}H_{62}$ | Squalane* | 422.49 |
| $C_{20}H_{26}O_4$ | Dicyclohexyl ester* | 330.18 |

* Hydrocarbon composition were certainly analysed by GC-MS

** Hydrocarbon composition were not certainly analysed by GC-MS

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของไฮโดรคาร์บอนที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography - Mass Spectrometry (ผ่านการทำปฏิริยาให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเตอร์)

Table 8 Analysis of hydrocarbon composition by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (methyl ester reaction)

| Molecular formula | Type | Molecular weight |
|---|---|---|
| $C_{16}H_{32}O_2$ | Palmitic acid* | 256.24 |
| $C_{19}H_{36}O_2$ | Methyl Oleate* | 296.27 |
| $C_{17}H_{34}O_2$ | Methyl Palmitate* | 270.26 |
| $C_{14}H_{22}O$ | Phenol* | 206.17 |
| $C_{19}H_{32}O_2$ | Methyl Linolenate* | 292.24 |
| $C_{14}H_{28}O_2$ | Myristic acid* | 228.21 |
| $C_{19}H_{36}O_2$ | 9-Octadecenoic acid methyl ester** | 296 |
| $C_{28}H_{34}O$ | 2,4-Bis(dimethylbenzyl)-6-t-butlyphenol* | 386.26 |
| $C_{30}H_{50}$ | Squalene* | 410.39 |
| $C_{18}H_{36}O_2$ | Stearic acid* | 284.27 |
| $C_{18}H_{34}O_2$ | Oleic acid* | 282.26 |
| $C_{18}H_{32}O_2$ | Linolenic acid* | 280.24 |
| $C_{20}H_{38}$ | Decane** | 278 |
| $C_{24}H_{26}O$ | 2,4-Bis(dimethylbenzyl)phenol* | 330.20 |
| $C_{18}H_{36}$ | 1-Octadecene** | 252 |
| $C_{20}H_{28}O_2$ | 1-Phenanthrene carboxylic acid* | 300.21 |

* Hydrocarbon composition were certainly analysed by GC-MS

** Hydrocarbon composition were not certainly analysed by GC-MS