2125

การเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

Cultivation of *Chlorella* sp. T9 in Effluent from Seafood Processing Plant

กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

Krongchan Ratanaphadit

QK 569.C49 N45 2536 ก.2
032753
7 ก.ค. 2538
11 33937

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2536

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

ผู้เขียน นางสาวกรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์พิมพรรณ ตันสกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวภา อังสุภานิช)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์พิมพรรณ ตันสกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวภา อังสุภานิช)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(ดร.สมทิพย์ ด่านธีรวนิชย์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(ดร.ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

ผู้เขียน นางสาวกรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2535

บทคัดย่อ

ศึกษาชนิดและแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปอาหารทะเล (บริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด) พบสาหร่าย 4 ดิวิชั่น 12 สกุล โดยพบสาหร่าย *Chlorella* ในน้ำทิ้งทุกตัวอย่าง และสามารถแยกได้ 3 สายพันธุ์ คือ T7, T9 และ T12 เปรียบเทียบการเติบโตของ *Chlorella* sp. 3 สายพันธุ์ และ *Chlorella* sp. K_3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III พบว่า สายพันธุ์ T9 ให้มวลชีวภาพ (1.95 กรัม/ลิตร) สูงกว่าสายพันธุ์ T7, T12 และ K_3 ที่ระยะเวลาเลี้ยง 14 วัน มีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.017, 0.016, 0.017 และ 0.017 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำทิ้งจากบ่อที่ 7-12 พบว่าน้ำทิ้งจากบ่อที่ 9 (มีค่า ซีโอดี 450 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 105 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณฟอสเฟต 16 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีความเหมาะสมต่อการนำมาเลี้ยงสาหร่าย เมื่อเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากบ่อที่ 9 พบว่าได้มวลชีวภาพ (2.7 กรัมต่อลิตร) สูงและเซลล์มีสีเขียวเข้มกว่าที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 18 วัน มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.024 ต่อชั่วโมง ส่วน *Chlorella* sp. T9 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เซลล์มีสีเขียวอมเหลือง เมื่อเติมโพแทสเซียมไนเทรตปริมาณ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เซลล์มีสีใกล้เคียงกับสีของเซลล์สาหร่ายซึ่งเลี้ยงในน้ำทิ้ง

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากบ่อที่ 9 พบว่าสาหร่ายให้มวลชีวภาพเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้นเป็น 5,200 ลักซ์ และการเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 2 ลงในน้ำทิ้งระหว่างการเลี้ยง เป็นผลให้ระยะเวลาการเลี้ยงสาหร่ายลดลงเกือบครึ่งหนึ่ง และได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 3.2 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 10 วัน จากการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ [$NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, NH_4Cl และ $(NH_4)_2HPO4$] ลงในน้ำทิ้งพบว่า $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของ *Chlorella* sp. T9 และเมื่อทดลองเติมโซเดียมไนเทรต (ช่วง 42.5-127.4 มิลลิกรัม/ลิตร) ลงในน้ำทิ้ง พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 85 มิลลิกรัมต่อลิตร (คิดเป็นไนโตรเจน ร้อยละ 1.4) ให้มวลชีวภาพสูงสุดคือมีค่าเท่ากับ 5.4 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยง 10 วัน ส่วนการเติมฟอสฟอรัส ไม่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย

การบำบัดน้ำทิ้งด้วย *Chlorella* sp. T9 พบว่า ประสิทธิภาพในการบำบัดสูงสุด ที่ระยะเวลาเลี้ยง 2 วัน ค่าซีโอดี ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณแอมโมเนีย ปริมาณไนเทรตและปริมาณฟอสเฟตลดลง คิดเป็นร้อยละ 60-90 *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้ง และน้ำทิ้งที่เติมโซเดียมไนเทรต ที่ระยะเวลาเลี้ยง 8 วัน มีปริมาณโปรตีนและโลหะหนักไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 33 และ 30 ตามลำดับ มีเหล็กในปริมาณ 0.05 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกรัม และทองแดงในปริมาณ 0.04 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ไม่พบโครเมียมและแคดเมียม

Thesis title Cultivation of *Chlorella* sp. T9 in Effluent from Seafood Processing Plant

Author Miss Krongchan Ratanaphadit

Major program Biotechnology

Academic year 1992

Abstract

Microalgae presented in the effluent from a seafood processing plant (Tropical Canning Co., Ltd.) was studied and isolated. Four divisions and twelve families of algae were found. *Chorella* was present in every samples of wastewater and three strains, T7, T9 and T12, were isolated. Comparison the growth of these three strains of *Chlorella* sp. and *Chlorella* sp. K_3, the reference strain, in NS III medium revealed that strain T9 had a higher biomass (1.95 g/l) than strains T7, T12 and K_3 after 14 day of cultivation. Analysis composition of the effluent from ponds no. 7-12 showed that the effluent from pond no.9 (COD:450 mg/l, total nitrogen : 105 mg/l and phosphate : 16 mg/l) was the most suitable for algal cultivation. *Chlorella* sp. T9 cultured in the effluent from pond no. 9 produced a higher biomass (2.7 g/l) and cells were greener than *Chlorella* grown in NS III medium after 18 days of cultivation. In NS III medium, cells were yellowish green. When KNO_3 (150 mg/l) was added to the NS III medium, the color of cells was similar to that of cells

cultivated in the effluent.

Studies on factors affecting growth of *Chlorella* sp. T9 cultivated in the effluent from pond no. 9 showed that algal biomass increased as the light intensity increased to 5,200 lux. Moreover, the feeding of 2% CO_2 approximately halved the cultivation time. $NaNO_3$ was found to be a better nitrogen source for growth than $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, NH_4Cl and $(NH_4)_2HPO_4$, respectively. Effect of $NaNO_3$ (range 42.5-127.4 mg/l) added into the effluent was investigated and the optimum concentration was found to be 85 mg/l (1.4% N). The maximum biomass was 5.4 g/l after 10 days cultivation. Phosphorus had no effect on algal growth.

Treatment of effluent by *Chlorella* sp. T9 revealed that the highest efficiency of treatment was within two days and the reduction of COD, total nitrogen, ammonia, nitrate and phosphate was in the range of 60-90%. *Chlorella* sp. T9 cultivated in the effluent and the effluent supplemented with $NaNO_3$ for 8 days had no significant difference in protein, 33 and 30% iron, 0.05 and 0.05 mg/g and copper, 0.04 and 0.02 mg/g respectivety. No cromium and cadmium was found in the cells.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ ประธานคณะกรรมการ รศ.พิมพรรณ ตันสกุล ผศ.ดร.เสาวภา อังสุภานิช กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล กรรมการผู้แทน ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร ดร.สมทิพย์ ด่านธีรวนิชย์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้วิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย บริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบ รวมทั้ง ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาวารีชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ ๆ และน้องที่ให้ความอุปการะและเป็นกำลังใจอย่างดียิ่ง ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์กรรณิกา สรรพานิช รศ.ดร.เริงชัย ตันสกุล ดร.อารักษ์ จันทรศิลป์ และอาจารย์สุภาพร รักเชียว ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านและเป็นกำลังใจอย่างดีเสมอมา ขอขอบพระคุณอาจารย์ท่านอื่นที่มิได้เอ่ยนามที่ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน และขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ นักศึกษาปริญญาโท เจ้าหน้าที่ในภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาชีววิทยา และผู้ที่มิได้เอ่ยนามทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดี

กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	ฌ
รายการรูป	ญ
1. บทนำ	1
2. การตรวจเอกสาร	3
สาหร่าย	3
คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	5
สาหร่าย *Chlorella*	5
ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของ *Chlorella*	8
1. แหล่งอาหาร	8
2. แสง	12
3. อุณหภูมิ	13
4. พีเอช	15
ประโยชน์ของ *Chlorella*	16
1. แหล่งโปรตีน	16
2. ใช้เป็นอาหารสัตว์	18
3. ใช้ในวงการแพทย์และอุตสาหกรรม	19
4. ผลิตสารปฏิชีวนะ	20
5. ใช้บำบัดน้ำเสีย	20
3. วัตถุประสงค์	23
4. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	24
วัสดุ	24
อุปกรณ์	25

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	วิธีการ	26
	1. การศึกษาชนิดและแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำทิ้งของโรงงานแปรรูปอาหารทะเล	26
	2. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่แยกได้	27
	3. การคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งเพื่อใช้เลี้ยงสาหร่าย	29
	4. เปรียบเทียบการเติบโตของสาหร่ายในน้ำทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III และน้ำประปา	30
	5. ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย	30
	6. ศักยภาพในการบำบัดน้ำทิ้งและคุณค่าทางอาหารของสาหร่าย	32
5.	ผลการทดลองและวิจารณ์	33
	1. การศึกษาชนิดและแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำทิ้งของโรงงานแปรรูปอาหารทะเล	33
	2. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่แยกได้	37
	3. การคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งเพื่อใช้เลี้ยงสาหร่าย	39
	4. เปรียบเทียบการเติบโตของสาหร่ายในน้ำทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III และน้ำประปา	41
	5. ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย	50
	6. ศักยภาพในการบำบัดน้ำทิ้งและคุณค่าทางอาหารของสาหร่าย	63
6.	บทสรุป	73
7.	ข้อเสนอแนะ	75
8.	เอกสารอ้างอิง	76

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
9. ภาคผนวก	86
ก. สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย	87
ข. วิธีการวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำทิ้ง	93
ค. การวิเคราะห์การเติบโตของสาหร่าย	115
ง. องค์ประกอบทางเคมีของ *Chlorella* sp.	125

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ประเภทของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว	6
2	เปรียบเทียบส่วนประกอบทางเคมีของ *Chlorella* สายพันธุ์ต่าง ๆ	17
3	สาหร่ายขนาดเล็กที่เจริญตามธรรมชาติในบ่อบำบัดน้ำทิ้งบ่อที่ 7-12 ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด	34
4	ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กที่เจริญบนอาหารวุ้นสูตรต่าง ๆ	36
5	คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของน้ำทิ้งบ่อ 7 ถึง บ่อ 12 ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด	40
6	คุณลักษณะทางเคมีของน้ำทิ้งจากบ่อที่ 9 ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด	42

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	กระบวนการผลิตสาหร่าย	4
2	การเลี้ยง *Chlorella* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ปริมาตร 200 มล. ให้อากาศประมาณ 5 ลิตรต่อนาที ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์	28
3	เปรียบเทียบการเติบโตของ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ (T7, T9, T12 และ K3) และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์	38
4	การเติบโตและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล อาหารเลี้ยงเชื้อ NS III และน้ำประปา	43
5	เปรียบเทียบสีของเซลล์ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล (ก) และในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III (ข)	45
6	ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล	46
7	ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III	47
8	ผลของความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเทรตต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล	48

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
9	ลักษณะสีของเซลล์ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลเลี้ยงเชื้อ NS III ซึ่งเติมและไม่เติมโพแทสเซียมไนเทรต	49
10	ผลของความเข้มแสงต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III	51
11	ผลของการเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล	53
12	ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเทรตต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล	55
13	ผลของชนิดของไนโตรเจน(ไนโตรเจนร้อยละ 1.75) ต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล	57
14	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไนเทรตต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล	59
15	ผลของความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและไดโพแทสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของพีเอช ระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลซึ่งเติมและไม่เติมโซเดียมไนเทรต 85 มก/ล	61

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16	ลักษณะกำรตกตะกอนของ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลและในน้ำทิ้ง ซึ่งเติมโซเดียมไนเทรต 85 มก/ล และแหล่งฟอสฟอรัสที่ระยะเวลาเลี้ยง 4 วัน	64
17	ลักษณะของ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลซึ่งเติมและไม่เติมโซเดียมไนเทรต 85 มก/ล และแหล่งฟอสฟอรัสที่ระยะเวลาเลี้ยง 12 วัน	65
18	การเปลี่ยนแปลงของค่าซีโอดี และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลที่เติมและไม่เติม $NaNO_3$ เป็นเวลา 8 วัน	66
19	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเทรตและแอมโมเนียระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรปอาหารทะเลที่เติมและไม่เติม $NaNO_3$ เป็นเวลา 8 วัน	67
20	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณฟอสเฟตระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลที่เติมและไม่เติม $NaNO_3$ เป็นเวลา 8 วัน	69
21	ลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลก่อนและหลังการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 เป็นเวลา 2 วัน	70
22	ลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลก่อนและหลังการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 เป็นเวลา 8 วัน	71

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยเป็นหนึ่งในเจ็ดของประเทศผู้ส่งออกอาหารทะเลรายใหญ่ที่สุดของโลก โดยมีตลาดสำคัญ คือ สหรัฐอเมริกา อังกฤษ แคนาดา ญี่ปุ่นและไต้หวัน ผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องและอาหารทะเลแช่เยือกแข็งของไทย เป็นสินค้าที่ได้รับความนิยมจากต่างประเทศเป็นอย่างมาก คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 80 ของอาหารทะเลที่ส่งออกทั้งหมด (กรุงเทพ, 2533) สินค้าประมงและผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญต่อการส่งออกเป็นอันดับหนึ่งคือ อาหารทะเลบรรจุกระป๋อง รองลงมาคือ กุ้งสดแช่เยือกแข็ง ซึ่งมีมูลค่าคิดเป็นร้อยละ 10.10 ในปี พ.ศ. 2532 และเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 20.66 ในปี พ.ศ.2533 (ศิริลักษณ์ สุวรรณรังษี, 2533) จึงนับว่า สินค้าประมงและผลิตภัณฑ์มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ ที่สามารถนำเงินตราต่างประเทศเข้ามาคิดเป็นมูลค่าไม่ต่ำกว่าปีละ 50,000 ล้านบาทและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี โดยในปี พ.ศ. 2534 มีมูลค่า 54,920 ล้านบาท หรือเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2533 ร้อยละ 4.2 (พูนทรัพย์ วิรุฬหกุล, 2534)

ตลอดแนวชายฝั่งทะเลทางภาคใต้มีโรงงานแปรรูปอาหารทะเลมากกว่า 40 โรงงาน จากการขยายตัวของสินค้าประมงและผลิตภัณฑ์ส่งผลให้มีการเพิ่มกำลังการผลิต ทำให้มีวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปอาหารทะเลมากขึ้นโดยเฉพาะปริมาณน้ำเสีย จากการสำรวจพบว่า โรงงานแปรรูปอาหารทะเลมีปริมาณน้ำเสียในช่วง 300-600 ลูกบาศก์เมตรต่อวันต่อโรงงาน และเสียค่าใช้จ่ายในการบำบัดประมาณ 10 บาทต่อน้ำเสีย 1 ลูกบาศก์เมตร (Prasertsan, *et al.*, 1988) ซึ่งการบำบัดน้ำเสียเป็นการลงทุนที่ไม่มีผลตอบแทน และเป็นการลงทุนที่ค่อนข้างสูง การเพิ่มอัตราการผลิตโรงงานต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียด้วย

สาหร่ายขนาดเล็กที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในบ่อบำบัดน้ำเสียมีบทบาทสำคัญเป็นตัวให้ออกซิเจนแก่แบคทีเรีย เช่น ในระบบบ่อธรรมชาติ (Oxidation pond) และสามารถใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เหลืออยู่ในน้ำทิ้งในบ่อพัก

การใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดเป็นสารอาหารเลี้ยงสาหร่าย เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว และเป็นการบำบัดน้ำเสียขั้นสุดท้าย เป็นแนวทางการศึกษาในการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานแปรรูปอาหารทะเลเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่ม เป็นการเพิ่มรายได้ให้กับผู้ประกอบการและช่วยลดปัญหามลภาวะสิ่งแวดล้อมด้วย

การตรวจเอกสาร

สาหร่าย

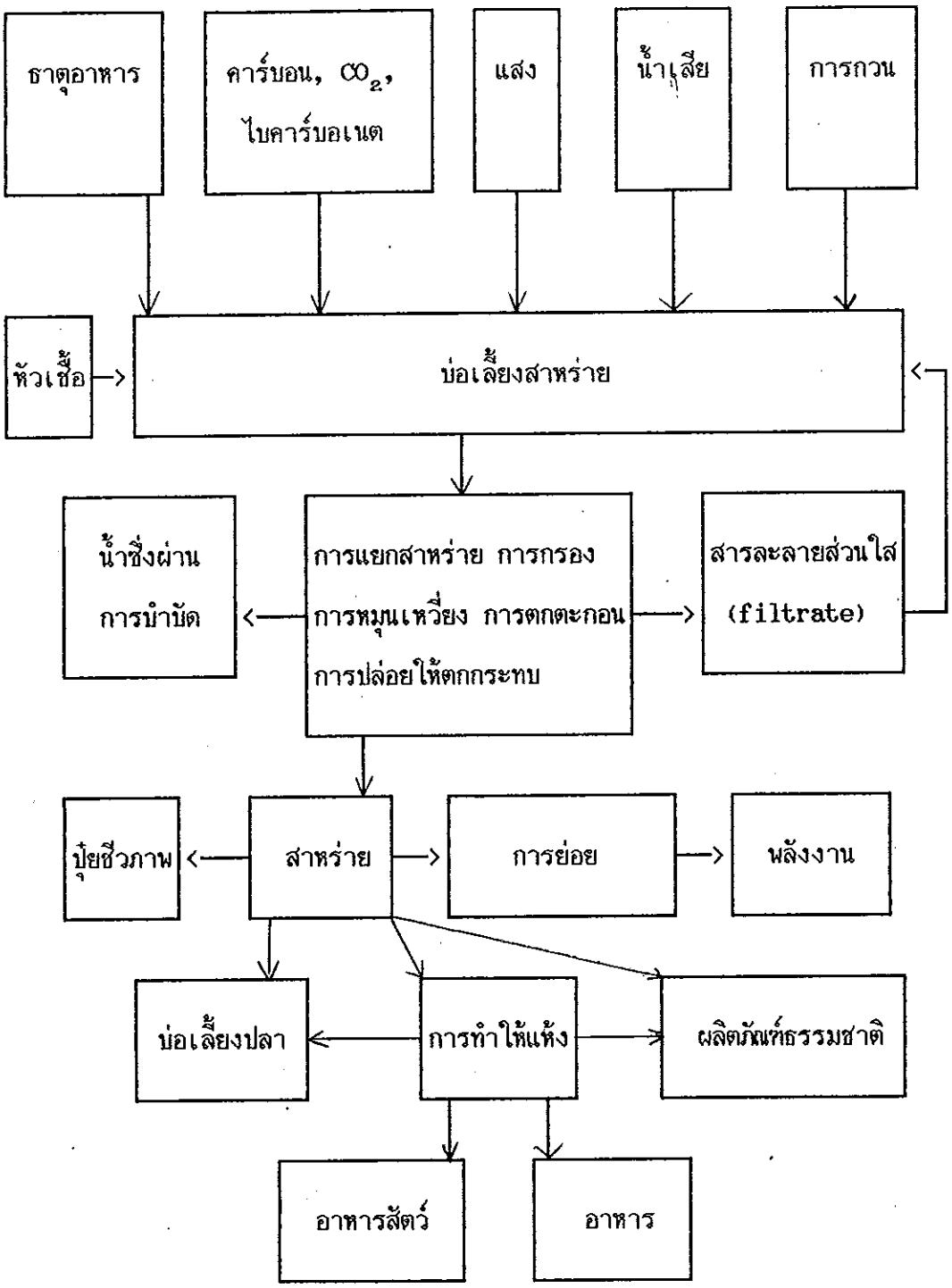
สาหร่ายเป็นพวกโปรติสซึ่งมีลักษณะเซลล์เป็นพวก eukaryote จึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเห็ด รา ราเมือก และโปรโตซัว ซึ่งมีทั้งหมด 8 ดิวิชั่น (เช่น ดิวิชั่น Chlorophyta หรือสาหร่ายสีเขียว) ยกเว้นมีเพียง 1 ดิวิชั่น คือ ดิวิชั่น Cyanophyta หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งมีลักษณะเซลล์เป็นพวก prokaryote จึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับแบคมีเรีย โดยทั่วไปขนาดของสาหร่ายมีตั้งแต่ขนาดเล็กมองด้วยตาเปล่าไม่เห็นจนถึงขนาดใหญ่คล้ายกับพืช แต่ไม่มีรากลำต้นและใบที่แท้จริง อาศัยอยู่ทั้งในรูปแขวนลอยในน้ำและยึดเกาะติดกับสิ่งอื่น สาหร่ายต่างจากจุลินทรีย์กลุ่มอื่นเพราะมีคลอโรฟิลล์จึงสามารถสังเคราะห์แสงโดยใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ และขณะสังเคราะห์แสงให้แก๊สออกซิเจนออกมา (William, 1986)

ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขึ้นกับวัตถุดิบที่ใช้ คือ (ดวงพร คันธโชติ, 2528)

1. <u>ระบบที่ใช้น้ำสะอาด</u> โดยมีการเติมธาตุอาหาร แหล่งคาร์บอน และใช้แสงอาทิตย์ ซึ่งสาหร่ายที่เลี้ยงโดยวิธีนี้ใช้เป็นอาหารของมนุษย์

2. <u>ระบบที่ใช้น้ำทิ้งจากบ้านเรือน หรือโรงงานอุตสาหกรรม</u> โดยที่ไม่เติมธาตุอาหารและแหล่งคาร์บอน ระบบนี้ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งโดยมีผลพลอยได้ คือ เซลล์จุลินทรีย์ซึ่งใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยต้องผ่านการตรวจสอบสารที่เป็นพิษหรือใช้เป็นแหล่งของพลังงาน

ปัจจุบันสาหร่ายได้รับความสนใจในการผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ ใช้เป็นส่วนประกอบต่าง ๆ ในทางอุตสาหกรรมและทางการแพทย์ และใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ได้แก่ สาหร่าย *Chlorella* spp. *Scenedesmus* spp. *Spirulina* spp. และ *Dunaliella* spp. เป็นต้น กระบวนการผลิตสาหร่ายแสดงในรูปที่ 1 (Becker and Venkataraman, 1982)



รูปที่ 1 กระบวนการผลิตสาหร่าย

ที่มา : Becker และ Venkataraman (1982)

คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

โปรตีนจากจุลินทรีย์ เป็นแหล่งอาหารที่คาดว่าจะมีความสำคัญในอนาคต จุลินทรีย์ที่สำคัญ ได้แก่ สาหร่าย รา ยีสต์ และ แบคทีเรีย ซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็นเซลล์เดียว คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เหมาะแก่การผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว (Becker and Venkataraman, 1982) ได้แก่

1. ผลผลิตมีปริมาณโปรตีนสูง
2. คุณค่าทางด้านโภชนศาสตร์ของโปรตีนสูง
3. ไม่เป็นพิษและไม่ทำให้เกิดอาการภูมิแพ้
4. สามารถย่อยได้ง่าย มีปริมาณกรดนิวคลีอิคต่ำ
5. เจริญได้เร็วในอาหารที่มีส่วนประกอบแบบง่าย ๆ
6. มีความต้านทานต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ
7. ให้พลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ
8. แยกและเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่าย
9. ผลผลิตจะต้องปราศจากกลิ่นรส

การเลือกจุลินทรีย์สำหรับใช้ในการผลิตโปรตีนนั้น ต้องคำนึงถึงประเภทของวัตถุดิบ คุณค่าทางอาหารและวัตถุประสงค์ในการนำผลผลิตจากจุลินทรีย์โปรตีนมาใช้ (ตารางที่ 1)

สาหร่าย *Chlorella*

ในปี ค.ศ. 1890 เอ็ม ดับพลิว ไบเจอร์นิค นักจุลชีววิทยาชาวดัตช์ ได้ค้นพบ *Chlorella* sp. เป็นคนแรกและได้ตั้งชื่อว่า *Chlorella* มาจากภาษากรีกว่า คลอโรส (Chloros) แปลว่า สีเขียว กับภาษาลาตินว่า เอลล่า (Ella) แปลว่า เล็ก ชนิดของ *Chlorella* ที่พบครั้งแรก คือ *Chlorella vulgaris* และเชื่อกันว่า

ตารางที่ 1 ประเภทของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

จุลินทรีย์	อาหารที่ใช้เลี้ยง	%โปรตีน (น้ำหนักแห้ง)	ผลผลิตเซลล์ (กรัม/ลิตร)	อ้างอิง
สาหร่าย				
Spirulina platensis	น้ำทิ้งบ้านเรือน	40-50	0.6	Chaudhari และคณะ (1980)
Chlorella sp. (K_3)	น้ำทิ้งจากโรงงานนมถั่วเหลือง	48	1.82	หยกแก้ว ยามาลี และคณะ (2525)
แบคทีเรีย				
Rhodopseudomonas gelatinosa	น้ำทิ้งจากโรงงานเต้าเจี้ยว	64	8.3	Sasaki และคณะ (1981)
Rhodopseudomonas PV I	น้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง	53.58	5	จารุวรรณ หวะสุวรรณ (2532)
ฟังไจ				
Schwanniomyces alluvius	แป้งมันฝรั่ง	52.75	51[b]	Calleja และคณะ (1986)
Candida utilis	น้ำกากส่า	43	19.81	พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และประกฤติ สุขสวัสดิ์ (2525)
Fusarium oxysporum	Vinasse[a]	50	15.8	Silva และ Nicoli (1985)
Aspergillus fumigatus I-21	มันสำปะหลัง	34.27	36.4[b]	Santos และคณะ (1988)

หมายเหตุ a: ส่วนเหลือหลังจากการกลั่นแอลกอฮอล์

b : ร้อยละ

Chlorella sp. อาจเป็นลูกโซ่วงจรอาหารอย่างแรกที่เกิดขึ้นในโลกในสภาพของพืชเซลล์เดียวที่มีนิวเคลียสและมีผนังเซลล์ที่สมบูรณ์ (วิสัย วงศ์สายปิ่น, 2534; วงศ์เมือง หงสกุล, 2530; Steenblock, 1987)

Chlorella sp. เป็นสาหร่ายสีเขียว จัดอยู่ในดิวิชั่น Chlorophyta ชั้น Chlorophyceae ตระกูล Chlorellaceae สกุล *Chlorella* ซึ่งมีลักษณะสำคัญ คือ เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว มีขนาดเล็ก ประมาณ 1-10 ไมครอน อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือรวมกันเป็นกลุ่มก้อน ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างหลายแบบ เช่น ทรงกลม รูปไข่ และรูปรี เซลล์มีหลายขนาดในสภาพแวดล้อมเดียวกัน *Chlorella* sp. มีคลอโรพลาสรูปร่างคล้ายถ้วยหรือระฆัง หรือเป็นแบบแถบข้าง (parietal) อาจมีหรือไม่มีเม็ดแป้ง ไม่มีระยางค์และคอนแทคไทค์แวคิวโอล (contractile vacuole) (Kumar and Singh, 1971 ; Fritsch, 1976 ; Richmond, 1986) ผนังเซลล์หนาและแข็ง มี 3 ชั้น ผนังเซลล์ชั้นกลางหนาที่สุดประกอบด้วย เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ผนังเซลล์ชั้นนอกเป็นสารประกอบโพลีเมอร์ ซึ่งจะทำหน้าที่จับกับโลหะหนักหรือสารพิษในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว และชั้นในสุดเป็นชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (วิสัย วงศ์สายปิ่น, 2534; Becker and Venkataraman, 1982) การสืบพันธุ์ เป็นแบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้าง autospore ภายในเซลล์ที่เจริญเต็มวัย เซลล์ของ *Chlorella* sp. เติบโตได้ในแหล่งที่มีความเข้มข้นของสารอาหารช่วงกว้าง ในธรรมชาติจึงพบ *Chlorella* sp. ทั้งในสภาพน้ำจืด น้ำเค็มและน้ำเสีย (Kumar and Singh, 1971 ; Richmond, 1986) โดยทั่วไป *Chlorella* sp. มีทั้งที่อยู่อย่างอิสระ และบางชนิดก็อาศัยอยู่ภายในตัวของสัตว์อื่น เช่น ฟองน้ำ ไฮดรา โปรโตซัว เป็นต้น บางครั้งเรียก *Chlorella* sp. ชนิดนี้ว่า *Zoochlorella* (Kumar and Singh, 1971)

การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของ *Chlorella* sp. อาศัยคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี แต่มีข้อยกเว้นสำหรับบางสายพันธุ์ซึ่งไม่สามารถจัดหมวดหมู่โดยวิธีนี้ได้ (Kessler และ Socder, 1962 อ้างโดย Richmond, 1986) จำแนกชนิดและสายพันธุ์ของ *Chlorella* sp. ได้ 25 สายพันธุ์ โดยอาศัยคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

คุณสมบัติทางชีวเคมี โดยศึกษาลักษณะการสร้างคาโรทีนอยด์ ในสภาวะการขาดไนโตรเจน ศึกษาไฮโดจีเนสแอคติวิตี และลักษณะของผนังเซลล์ เป็นต้น *Chlorella* sp. สามารถจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโครงสร้างของเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ ลักษณะของคลอโรพลาส การมีหรือไม่มีไพรีนอยด์ จำนวน autospore ลักษณะการแบ่งเซลล์และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ (Fott and Navakova, 1969 อ้างโดย Richmond, 1986) นอกจากนี้ *Chlorella* sp. สามารถจำแนกกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสรีระวิทยา เช่น ผลของแหล่งน้ำตาลกลูโคส กาแลคโทส แมนโนส ฟรักโทส และซูโครส ที่มีต่อการเติบโตในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสง ความต้องการไทอามิน ผลของไนเทรต กรดอะมิโน กลูโคส ซึ่งมีผลต่อรูปร่างของเซลล์ สี ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลาง เป็นต้น (De Silva and Gyllenvberg, 1972 อ้างโดย Richmond, 1986)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของ *Chlorella*

1. แหล่งอาหาร

1.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย การเติมสารอาหารที่จำเป็นต่าง ๆ มากขึ้นจะไม่มีผลทำให้ปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้นเมื่อปริมาณคาร์บอนถูกจำกัด สาหร่ายสามารถใช้คาร์บอนได้ทั้งในรูปของอนินทรีย์สารและอินทรีย์สาร แหล่งคาร์บอนในรูปอนินทรีย์สารในแหล่งน้ำธรรมชาติโดยทั่วไป จะพบในรูปของ CO_2, H_2CO_3, HCO_3^- และ CO_3^{-2} ขึ้นอยู่กับค่าพีเอชของน้ำ ส่วนแหล่งคาร์บอนในรูปอินทรีย์สารที่สำคัญ คือ กลูโคส อะซิเทต เอทธานอล อะลานีน แอสพาร์เทต ฟรักโทส กาแลคโทส ไพรูเวต และ ซักซิเนต (Becker and Venkataraman, 1982 ; Richmond, 1986)

Richmond (1986) กล่าวว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต้องการคาร์บอนสูงกว่าสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากโดยทั่วไปจะเติบโตในน้ำที่มีค่าพีเอชค่อนข้างสูง

ประมาณ 8.5-11.0 สาหร่ายแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการผลิตมวลชีวภาพของ *Scenedesmus* sp. และ *Chlorella* sp. จากการศึกษาพบว่า ชนิดของน้ำตาลและความเข้มของแสงมีผลต่ออัตราการเติบโตของ *Chlorella pyrenoidosa* และ *Chlorella ellipsoidea* (Samejima and Myers, 1958 อ้างโดย Richmond, 1986)

Lee และคณะ (1989) พบว่า *Chlorella* sp. ที่เลี้ยงโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถให้ปริมาณเซลล์สูงกว่าการใช้อะซิเทตเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน *Chlorella pyrenoidosa* 7-11-05 ที่เลี้ยงโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแซนโธฟิลล์ (xanthophyll) สูงกว่าที่เลี้ยงโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน (Theriaulte, 1965)

Burris และคณะ (1981) พบว่า ความเข้มของแสงและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการสังเคราะห์แสง โดยจะขึ้นกับปริมาณของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในน้ำ เมื่อปริมาณความเข้มข้นของ HCO_3^- สูงประมาณ 2-3 มิลลิโมล จะทำให้ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนย้ายคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่เซลล์

Richmond (1986) รายงานว่า อัตราการเติบโตของ *Chlorella* sp. ในอาหารที่เติมและไม่เติมคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 0.56-4.43 มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ควรให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของสาหร่ายแต่อาจหยุดให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในช่วงมืด ซึ่งจะไม่มีผลกระทบต่อการเติบโตของสาหร่าย ส่วน Bhumiratana และคณะ (1972) พบว่า การให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 2 ผสมกับอากาศเพียงพอต่อการเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

Miyachi และ Shiraiwa (1979) พบว่า การให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 2 พอเพียงกับความต้องการคาร์บอนภายในเซลล์ของ *Chlorella* sp. และ สาหร่ายเติบโตได้ดีกว่าการได้รับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศ

(ประมาณ ร้อยละ 0.04) เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ การเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต เป็นแหล่งคาร์บอน *Chlorella* sp. จะใช้ได้น้อย เนื่องจากไม่สามารถดูดซับประจุของไบคาร์บอเนตเข้าสู่เซลล์ได้ แต่จะใช้ได้ดีเมื่อเติม คาร์บอนิคแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) ร่วมด้วย โดยเอนไซม์นี้จะเป็นตัวเร่งให้เกิดการเปลี่ยนรูปของ HCO_3^- เป็น CO_2 เร็วขึ้น จึงเป็นผลให้มีการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น

1.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเติบโตของสาหร่าย เป็นตัวที่มีบทบาทเกี่ยวกับน้ำหนักแห้งของสาหร่าย โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ สาหร่ายมีปริมาณไนโตรเจนคิดเป็นร้อยละ 1-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งในรูปของอินทรีย์สารและอนินทรีย์สาร ได้แก่เกลือแอมโมเนีย (NH_4^+) ไนเทรต (NO_3^-) และไนไตรท์ (NO_2^-) แต่พบว่าอัตราการเติบโตสูงเมื่อใช้ในรูปไนเทรตหรือแอมโมเนีย นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายด้วย โดยทั่วไปพบว่าสาหร่ายใช้แอมโมเนียหมดก่อนแล้วจึงใช้ไนเทรต สำหรับสาหร่ายบางชนิด สามารถใช้ไนไตรท์ได้แต่จะใช้ได้ในความเข้มข้นต่ำประมาณ 1 มิลลิโมล ที่ความเข้มข้นสูงไนไตรท์มีผลยับยั้งการเติบโตของสาหร่าย ส่วนการใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าจะทำให้ค่าพีเอชของอาหารลดลง ก่อให้เกิดความเป็นพิษได้ สาหร่ายบางชนิดมีความไวสูงต่อความเข้มข้นของแอมโมเนีย โดยจะเกิดการยับยั้งการเติบโตที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลของแอมโมเนีย (Richmond, 1986 ; Abeliovich, 1980)

ไนโตรเจนในรูปอินทรีย์สารที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้ ได้แก่ อมีน ยูเรีย กลูตามีน และแอสพาราจีน เป็นต้น การใช้ยูเรียให้ผลผลิตใกล้เคียงกับการใช้ไนเทรต และแอมโมเนีย ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่าย (Richmond, 1986 ; Darley, 1982 ; Abeliovich, 1980)

Syrett (1981 อ้างโดย Richmond, 1986) พบว่า *Chlorella eillipsoidea* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปของไนเทรตและยูเรียได้

แต่ไม่สามารถใช้แอมโมเนียได้ ส่วน *Chlorella pyrenoidosa* สามารถใช้ได้ทั้งแอมโมเนีย ไนเทรตและยูเรีย

Bhumiratana และคณะ (1974) ทดลองเลี้ยง *Scenedesmus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไนเทรต แอมโมเนีย และยูเรีย พบว่า การเติมแอมโมเนียเพียงอย่างเดียวสาหร่ายจะตาย สาหร่ายเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมยูเรีย และเติบโตดีที่สุดเมื่อใช้ยูเรียร่วมกับไนเทรต

ธิดา วีระสกุล และ นิเวศน์ เรืองพานิช (2517) ทดลองสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงแพลงตอนพืชในแง่ที่มีต้นทุนต่ำ พบว่า สารไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Chlorella* sp. คือ โพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) ที่ปริมาณความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับ Saxena และคณะ (1983) รายงานว่า โซเดียมไนเทรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณผลผลิตของสาหร่ายสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยูเรียและแอมโมเนียมไนเทรต

1.3 <u>แหล่งฟอสฟอรัส</u>

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเติบโต มีบทบาทในกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ การเคลื่อนย้ายพลังงานและการสังเคราะห์กรดนิวคลิอิค รวมทั้งทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ช่วยให้ค่าพีเอชค่อนข้างคงที่ ซึ่งโดยปกติเซลล์จะใช้ฟอสฟอรัสได้ดีในรูปออโธฟอสเฟต (orthophosphate) ในแหล่งน้ำธรรมชาติพบฟอสฟอรัสในรูปอนินทรีย์ฟอสเฟตมากกว่าอินทรีย์ฟอสเฟต โดยทั่วไปสาหร่ายจะใช้ฟอสฟอรัสในรูปอนินทรีย์ฟอสเฟต ได้แก่ $H_2PO_4^-$ และ HPO_4^{2-} ปริมาณฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการเติบโตแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสาหร่าย การขาดฟอสฟอรัสมีผลใกล้เคียงกับการขาดไนโตรเจน คือ ทำให้ปริมาณโปรตีน คลอโรฟิลล์ อาร์เอ็นเอ และดีเอ็นเอลดลง แต่คาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น (Hosakul, 1972 ; De la Noue and Basseres, 1989 ; Richmond, 1986)

สาหร่ายสีเขียวต้องการฟอสฟอรัสร้อยละ 2-3 ของน้ำหนักแห้งเพื่อใช้ในการเติบโต *Chlorella* sp. *Ankistrodesmus* sp. และ *Hydrodictyon* sp. สามารถดูดซึมสารประกอบเมตาฟอสเฟตและโพลีฟอสเฟตได้มากเมื่อได้รับแสง ส่วน

ในสภาพมืดสาหร่ายสามารถดูดซึมสารประกอบทั้ง 2 ชนิดนี้ได้น้อยลง แต่สามาถดูดซึมสารประกอบ ออโธฟอสเฟตได้มากขึ้น (Ketehum and Redfiele, 1949 อ้างโดย จรูญ ลีไตรรงค์, 2531)

Hosakul (1972) พบว่า *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. เติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นของฟอสเฟต 1 มิลลิโมลต่อลิตร และที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตต่ำกว่า 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร สาหร่ายชะงักการเติบโต รวมทั้งเป็นผลให้ความเป็นบัพเฟอร์ของฟอสเฟตสูญเสียไปด้วย และ Knauss and Porter (1954 อ้างโดย Hosakul, 1972) พบว่า ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส 6-45 มิลลิโมลต่อลิตรไม่มีผลยับยั้งการเติบโตของสาหร่าย

De la Noue และ Basseres (1989) เลี้ยง *Chlorella* sp. *Scenedesmus obliquus* และ *Phormidium bohneri* ในห้องปฏิบัติการพบว่า *Chlorella* sp. เติบโตได้ดีในน้ำมูลสุกรที่เจือจางร้อยละ 2 ซึ่งมีค่า $P\text{-}PO_4^{3-}$ 5.5 มก.ต่อลิตร แต่สาหร่ายอีก 2 ชนิด คือ *Scenedesmus obliquus* และ *Phormidium bohneri* เจริญได้ดีที่น้ำสุกรเจือจางร้อยละ 3 ซึ่งมีค่า $P\text{-}PO_4^{3-}$ 8.3 มก.ต่อลิตร

2. <u>แสง</u>

แสงเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อมจากภายนอก มีความสำคัญในการเลี้ยงสาหร่าย โดยเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดการสังเคราะห์แสง ความเข้มของแสงเพิ่มขึ้น การเติบโตของสาหร่ายจะเพิ่มขึ้นสูงด้วย โดยจะเพิ่มการสังเคราะห์แสงและเร่งการทำงานของเซลล์ (Kosaric, *et al.*, 1974) แต่ความเข้มแสงที่สูงเกินไปจะมีผลไปยับยั้งการหายใจของเซลล์ ส่วนการเกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยแสง (photoinhibition) ขึ้นกับ สายพันธุ์ของสาหร่าย และ ช่วงระยะเวลาได้รับแสง สาหร่ายได้รับแสงที่ความเข้มสูงเป็นเวลานาน จะเกิดการยับยั้งการหายใจของเซลล์ (Vonshak, *et al.*, 1982)

Lorenzen (1963 อ้างโดย Richmond, 1986) รายงานว่า *Chlorella* sp. เติบโตในสภาพที่มีทั้งช่วงมืดและสว่าง แต่ไม่สามารถเติบโตในสภาวะ

ที่มีแสงอย่างต่อเนื่อง การให้แสงที่ความเข้มสูงอย่างต่อเนื่องจะมีผลทำให้เซลล์มีสีซีดหรือปรากฏลักษณะสีเหลืองอมน้ำตาล ซึ่งเป็นผลจากการที่เม็ดสีถูกทำลาย

Pipes และ Koutsoyannis (1962) เลี้ยง *Chlorella* sp. โดยให้แสงอย่างต่อเนื่อง พบว่ามีผลยับยั้งการเติบโตโดยตรง ส่วน Bhumiratana และคณะ (1974) รายงานว่า การเลี้ยงสาหร่ายโดยทั่วไป ควรให้ได้รับแสงช่วงสว่าง : ช่วงมืด เท่ากับ 16 : 8

โดยทั่วไป *Chlorella* sp. ต้องการความเข้มแสงสูงกว่า *Spirulina* sp. Becker และ Venkataraman (1982) รายงานว่า ความเข้มแสงที่เหมาะสมของ *Spirulina* sp. คือ 30-35 กิโลลักซ์ ส่วน *Chlorella* sp. ต้องการความเข้มแสงประมาณ 45 กิโลลักซ์ โดยเลี้ยงในบ่อเปิดกลางแจ้ง แต่ Bhumiratana และคณะ (1972) พบว่า สาหร่าย *Scenedesmus* sp. ต้องการแสงประมาณ 12.5±0.7 กิโลลักซ์ ในสภาพห้องปฏิบัติการ ส่วน หยกแก้ว ยามาลี และคณะ (2525) พบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. K_3 เติบโตได้ดีที่ความเข้มแสง 100 กิโลลักซ์ เช่นเดียวกับ Takada และ Hirokawa (1978) พบว่า *Chlorella ellipsoidea* เติบโตได้ดีที่ความเข้มแสง 120 กิโลลักซ์ ส่วน Alias (1988) รายงานว่า *Chlorella virginica* ซึ่งเลี้ยงที่ความเข้มแสง 3,040 ลักซ์ เติบโตได้ดีและให้ปริมาณเซลล์สูงกว่าการเลี้ยงที่ความเข้มแสง 2,260 และ 1,140 ลักซ์ อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

3. อุณหภูมิ

สาหร่ายแต่ละชนิดตอบสนองต่อช่วงอุณหภูมิแตกต่างกันและทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงจำกัดต่างกัน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างรวดเร็วประมาณ 10-15 องศาเซลเซียสหรือมากกว่า สาหร่ายไม่สามารถปรับตัวได้จะชะงักการเติบโต ส่วนการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเล็กน้อยจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสง อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการเติบโตและการแบ่งเซลล์ของ *Chlorella* sp.

Hosakul (1972) เลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. และ *Chlorella* sp. จำนวน 19 สายพันธุ์ พบว่า แต่ละสายพันธุ์ต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสม

ต่อการเติบโตและอุณหภูมิที่มีผลยับยั้งการเติบโตแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ เช่น *Chlorella* sp. 50C เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และถูกยับยั้งการเติบโตที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ส่วน *Chlorella vulgaris* 49A เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสส่วนที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เติบโตได้น้อย และที่ 42 องศาเซลเซียส จะถูกยับยั้งการเติบโต

Chlorella sp. เติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในตอนกลางวัน และ 15 องศาเซลเซียสในตอนกลางคืนในสภาพห้องปฏิบัติการ และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในตอนกลางวัน และ 20 องศาเซลเซียสในตอนกลางคืนในสภาพบ่อเปิดกลางแจ้ง (Richmond, 1986) แต่ Payer (1971) เลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. ในสภาพบ่อเปิดกลางแจ้งในประเทศไทย พบว่า อุณหภูมิเหมาะสมอยู่ในช่วง 35-36 องศาเซลเซียส การเติบโตจะลดลงที่อุณหภูมิสูงกว่า 41 องศาเซลเซียส และในห้องปฏิบัติการ เซลล์จะตายหลังจากเลี้ยง 2-3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Novak และ Brune (1985) พบว่า *Chlorella* sp. เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ในสภาพห้องปฏิบัติการมีอัตราเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.070 ต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 15, 22 และ 33 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.015, 0.025 และ 0.045 ต่อชั่วโมงตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส สาหร่ายไม่สามารถเติบโตได้

De la Noue และ Basseres (1989) พบว่า *Chlorella* sp. ซึ่งเลี้ยงในน้ำมูลสุกรที่เจือจางร้อยละ 2 สามารถเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และมีค่าอัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 41 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน สูงกว่าที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 36 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน

Sadakane และคณะ (1981) พบว่า *Chlorella ellipsoidea* เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปทรีตด้วยความเย็นที่อุณหภูมิ 10, 15 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ไม่มีความแตกต่างกัน แต่

ที่อุณหภูมิ 3, 5 และ 7 องศาเซลเซียส ปริมาณเซลล์มีความแตกต่างกันและปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด

Nakamura และ Miyachi (1982) เลี้ยง *Chlorella vulgaris* 11 cell พบว่า ที่อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส เซลล์มีการสะสมแป้งได้สูงสุด แต่จะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และจะคงที่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4. พีเอช

พีเอชของอาหารเลี้ยงสาหร่าย มีผลต่อกระบวนการต่าง ๆ ทางชีววิทยาของเซลล์ ค่าพีเอชเป็นตัวบ่งบอกการละลายของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ หรือปริมาณของไบคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์สาหร่าย (Becker and Venkatanaman, 1982)

สาหร่ายตอบสนองต่อค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสาหร่าย สำหรับ *Chlorella* sp. เติบโตได้ดีในพีเอชช่วงกว้าง แต่โดยทั่วไปสามารถเติบโตได้ดีในช่วงพีเอชที่มีค่าเป็นกรดเล็กน้อยจนถึงกลาง และบางสายพันธุ์เช่น *Chlorella saccharophila* สามารถเติบโตได้ดีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2 และ *Chlorella homosphaera* เติบโตได้ดีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6 (Richmond, 1986) ส่วนค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Chlorella* sp. K_3 อยู่ในช่วง 7-8 (จรูญ ลีไตรรงค์, 2531)

Malis-Arad และ McGowan (1982) พบว่า *Chlorella vulgaris* เติบโตได้ดีที่พีเอช 6.3 โดยจะให้ปริมาณเซลล์สูงและเกิดการแบ่งเซลล์สูงสุด แต่มีปริมาณของโพลีแซคคาไรด์และเซลลูเลสแอคติวิตี้ต่ำ แต่เมื่อนำไปทรีตที่พีเอช 9.5 เป็นเวลา 16,20 และ 24 ชั่วโมง พบว่าไม่มีการแบ่งเซลล์ แต่มีปริมาณของโพลีแซคคาไรด์และเซลลูเลสแอคติวิตี้เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า

Hosakul (1972) พบว่า *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. ทั้ง 18 สายพันธุ์มีความต้องการพีเอชในการเติบโตแตกต่างกัน แต่ที่พีเอช 3.5 หรือ 9.5 จะหยุดชะงักการเติบโต และเซลล์จะผิดปกติ นอกจากนี้ถ้าแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ก็มี

ผลทำให้มีเอช์ในระหว่าง การเติบโตแตกต่างกันด้วย

ประโยชน์ของ *Chlorella*

1. แหล่งโปรตีน

Chlorella sp. มีปริมาณโปรตีนในเซลล์สูงปริมาณร้อยละ 55-60 (ตารางที่ 2) เป็นโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด ในปริมาณค่อนข้างมาก เช่น ทรีโอนิน ไลซีน และลูซีน เป็นต้น รวมทั้งกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปกรดไขมันไม่อิ่มตัว

Chlorella sp. ประกอบด้วยวิตามิน และเกลือแร่ที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น วิตามินเอ บี1 บี2 บี6 บี12 และไนอาซีน เป็นต้น ส่วนเกลือแร่ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น นอกจากนี้มีปริมาณ เบต้า-คาโรทีน ประมาณ 180 มิลลิกรัมต่อเซลล์แห้ง 100 กรัม ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดวิตามินเอและเป็นตัวต่อต้านออกซิเดชัน (วิสัย วงศ์สายปิ่น, 2534)

Dam และคณะ (1965) ได้ศึกษาการใช้ *Scenedesmus obliquus* เพื่อเป็นแหล่งอาหารโปรตีนของมนุษย์ พบว่าร่างกายสามารถย่อย (digestibility) สาหร่ายแห้งของ *Scenedesmus obliquus* ได้ร้อยละ 68 ของไนโตรเจน และร่างกายสามารถย่อยสาหร่ายแห้งของ *Chlorella pyrenoidosa* ได้ร้อยละ 58 ของไนโตรเจน จากสาหร่ายแห้งซึ่งผ่านการสกัดผนังเซลล์ด้วยเอธานอล

Steenblock (1987) กล่าวว่า ผลิตภัณฑ์จาก *Chlorella* sp. มีส่วนประกอบที่แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของสาหร่าย และวัตถุดิบอื่น ๆ ที่ใช้เป็นส่วนประกอบ ซึ่งเซลล์ที่บดให้แตกด้วยเครื่อง Dyno-mill เซลล์ที่ถูกความร้อนและผ่านการลอกผนังเซลล์ออก โดยที่สภาพสีของเซลล์ยังสมบูรณ์มีค่าความสามารถที่ร่างกายจะย่อยได้ เท่ากับร้อยละ 79.5,50 และ 47

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบส่วนประกอบทางเคมีของ *Chlorella* สายพันธุ์ต่าง ๆ

	กรัม/100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง				
	Chl. pyrenoidosa[a]	*Chl. pyrenoidosa*[b]	*Chl. vulgalis*[c]	*Chl.* sp. NO. 650818[d]	*Chl.* sp.[e]
โปรตีน	60.2	56.5	55.52	60.2	58.4
คาร์โบไฮเดรต	18.5	17.8	21.04	20.1	23.2
ไขมัน	10.7	7.5	8.07	11	9.3
เยื่อใย	2.8	2.5	12.09	0.2	0.3
เถ้า	7.2	8.25	3.28	4.6	4.2

หมายเหตุ *Chl.* : *Chlorella*

ที่มา a : Taiwan chlorella (1964)

b : Lubitz (1963)

c : Kobayashi และ Kurata (1978)

d : Steenblock (1987)

e : วิสัย วงศ์สายปิ่น (2534)

Lubitz (1963) พบว่า *Chlorella pyrenoidosa* 71105 ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 56.5 ไขมันร้อยละ 7.5 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 17.8 และเยื่อใยร้อยละ 2.5 (ตารางที่ 2) คุณภาพของโปรตีน แสดงในรูป protein efficiency ratio (PER) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.19 ส่วนโปรตีนจากเคซีน และโปรตีนจากไข่ที่สกัดไขมันออก (deffated egg protein) มีค่า PER เท่ากับ 3.30 และ 4.10 ตามลำดับ และค่า PER ของสาหร่ายสูงกว่าโปรตีนจากผักและธัญญพืชมาก แต่สูงกว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองเล็กน้อย

2. ใช้เป็นอาหารสัตว์

หยกแก้ว ยามาลี และคณะ (2526) เลี้ยง *Chlorella* sp. K_3 ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลืองเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาเลี้ยงไรแดง (*Moina macrocopa*) โดยใช้ความหนาแน่น (optical density) ของสาหร่ายเริ่มต้น เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ตามลำดับ ใช้เวลาเลี้ยง 5-6 วัน ใช้ไรแดงเริ่มต้น 10 ตัวต่อ 100 มิลลิลิตร พบว่า มีปริมาณไรแดงเพิ่มขึ้น เท่ากับ 252, 629, 1,042 และ 1,356 ตัวต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

จรูญ ลีไตรรงค์ (2531) เลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. K_3 ในน้ำกากส่าเหล้าเข้มข้นร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 10 วัน ได้เซลล์สาหร่ายมีโปรตีนร้อยละ 16.6 นำไปเลี้ยงไรแดง ในระยะเวลา 3 วัน ได้ปริมาณไรแดงเพิ่มมากที่สุด คิดเป็นโปรตีนร้อยละ 53.23

วีระ วัชรกรโยธิน และคณะ (2526) เลี้ยง *Chlorella* sp. K_3 เพื่อใช้เป็นอาหารโรติเฟอร์ โดยใช้ปุ๋ยชนิดต่าง ๆ พบว่า ปุ๋ยที่ให้ความหนาแน่นของจำนวนเซลล์สาหร่ายสูงสุด คือ น้ำคาวปลา (liquid fish) ผสมกับอาหารสังเคราะห์ NS I โดยให้ความหนาแน่นสูงสุดเท่ากับ 20.2×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ในระยะเลา 4 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผงชูรส ผสมกับอาหารสังเคราะห์ NS I, NS I, น้ำทิ้งโรงงานผงชูรส และน้ำคาวปลาเพียงอย่างเดียว ซึ่งให้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 18.3×10^7, 15.8×10^7, 15.4×10^7 และ 2.3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Abu-Rezeq และ James (1985) พบว่า ความหนาแน่นของ *Chlorella* sp. $50x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เหมาะสมที่สุดจะใช้เป็นแหล่งอาหารแก่โรติเฟอร์ เป็นผลทำให้ผลผลิตโรติเฟอร์สูงขึ้น และทำให้มีโอเมก้า 3 ในเซลล์สูง

Zhihui และคณะ (1988) ทดลองอาหารที่เหมาะสมต่อการเติบโตของไรแดง (*Moina mongolica* Daday) โดยใช้ *Chlorella* sp., *Platymonas* sp., *Dunaliella salina* และ *Diorateria zhanjiangensis* พบว่า *Chlorella* sp. เป็นแหล่งอาหารที่ดีที่สุด ในการเลี้ยงไรแดง เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ 45-70 มิลลิกรัมต่อลิตร

Arakawa และคณะ (1960, อ้างโดย Richmond, 1986) รายงานว่าเมื่อผสม *Chlorella* sp. ร้อยละ 10 ลงในกากถั่วเหลืองที่นำไปเลี้ยงไก่ไข่ พบว่า ไข่ที่ได้มีสีสดกว่าไข่ไก่ที่ได้จากไก่ที่เลี้ยงโดยไม่เติมสาหร่ายลงในกากถั่วเหลือง

3. ใช้ในวงการแพทย์และอุตสาหกรรม

ภายในเซลล์ของ *Chlorella* จะมีสารเร่งการเจริญที่เรียกว่า Chlorella Growth Factor (CGF) ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโน เปปไทด์ โปรตีน วิตามิน น้ำตาล และกรดนิวคลีอิค CGF มีคุณสมบัติต่อต้านมะเร็งที่เรียกว่า "SARCONA 180" โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู และระงับการเจริญของเนื้องอกในหนูได้ปริมาณร้อยละ 52.9 นอกจากนี้มีรายงานการใช้ CGF ในการชลอความชราโดยใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง *Chlorella* และ CGF มีผลต่อระบบย่อยอาหาร โดยจะเข้าไปช่วยทำให้เชื้อแลคโตบาซิลลัสในลำไส้เพิ่มจำนวนมากขึ้น และมีบทบาทในการล้างพิษในลำไส้ และผนังเซลล์ของ *Chlorella* จะดูดซับพิษในลำไส้ มีรายงานว่า โรงพยาบาลในญี่ปุ่นบางแห่งใช้ *Chlorella* รักษาแผลในกระเพาะ โดย CGF จะกระตุ้นให้เกิดการสมานแผล *Chlorella* sp. ได้ถูกทดลองนำไปใช้ในงายวิจัยพบว่า สามารถลดระดับโคเรสเตอรอลในเลือด ตับและน้ำเหลือง เพิ่มวิตามินบี 12 และธาตุเหล็กให้กับผู้บริโภคมังสวิรัต และยังช่วยป้องกันและต้านสารพิษ โดยพบว่า หนูทดลองกิน *Chlorella* sp. วันละ 8 กรัม สามารถขับแคดเมียมออกจากร่างกายได้มากกว่า หนูซึ่งไม่กิน *Chlorella* sp.

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

เป็นต้น (วิสัย วงศ์สายปิ่น, 2534; Steenblock, 1987; Vonshak, 1990)

คลอโรฟิลล์ที่ได้จาก *Chlorella* sp. ซึ่งมีปริมาณประมาณ 40 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัม มีบทบาทสำคัญต่อการเติบโตของร่างกาย มีผลต่อปฏิกิริยาของฮอร์โมนและการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง เป็นต้น นอกจากนี้การนำคลอโรฟิลล์มาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ผสมสีเทียนไข ชี้ฝึ้ง ยางสน ไขมัน น้ำมัน ขนมหวาน หมากฝรั่ง และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เป็นต้น

4. ผลิตสารปฏิชีวนะ

Kumar และ Singh (1971) รายงานว่า *Chlorella* sp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ชื่อ คลอเรลลิน (Chlorellin) ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และ *Mycobacterium* sp.

5. ใช้บำบัดน้ำเสีย

Chlorella sp. พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ในแหล่งน้ำธรรมชาติ บ่อน้ำเสีย สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีคลอโรฟิลล์ จึงสามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์จำพวกคาร์โบไฮเดรตขึ้นด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และแสงแดด นำคาร์โบไฮเดรตไปใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่และผลพลอยได้ คือ ออกซิเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อแบคทีเรีย นอกจากนี้สาหร่ายจะช่วยใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งมีอยู่ในน้ำด้วย

จรูญ ลีไตรรงค์ (2531) เลี้ยง *Chlorella* sp. K_3 ในน้ำกากส่าเข้มข้นร้อยละ 1.5 พีเอช 7.2 พบว่า สาหร่ายเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุดที่ระยะเวลา 10 วัน ได้เซลล์สาหร่ายมีโปรตีนร้อยละ 26.6 และค่าบีโอดีของน้ำหลังเลี้ยงไรแดงลดลงร้อยละ 67.93-78.80

หยกแก้ว ยามาลี และคณะ (2525) เลี้ยง *Chlorella* sp. K_3, *Scenedesmus acutus* 272-3a, *Chlamydomonas* sp. 1K และ *Chlorella* sp. Chx. ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลือง (น้ำแช่ถั่วเหลือง) พบว่า *Chlorella* sp. K_3 เติบโตได้ที่สุดในน้ำทิ้งที่มีการให้อากาศและสามารถบำบัดน้ำเสียร่วมกับแบคทีเรีย

032753

ได้ โดยทำให้ค่าบีโอดี ลดลงร้อยละ 95 ภายในเวลา 2 วัน ได้ปริมาณเซลล์สาหร่าย 2.86 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และปริมาณเซลล์แบคทีเรีย 1.87 x 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 3 วัน คิดเป็นน้ำหนักแห้งของตะกอนทั้งหมดเท่ากับ 1,820 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากสาหร่ายเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) และปริมาณโปรตีนในตะกอนเท่ากับร้อยละ 47.85

ชิต ชัยสังฆะ และไพศาล รัตนปฏิมากร (2525) เลี้ยง *Chlorella* sp. ในน้ำทิ้งจากการหมักแก๊สชีวภาพ โดยเจือจางน้ำทิ้งในอัตราส่วน 1:1 ให้ผลดีที่สุด พบว่า ค่าซีโอดี และบีโอดี ลดลงร้อยละ 82.62 และ 92.07 ตามลำดับ หลังการเลี้ยง 10 วัน ได้สาหร่ายที่มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 39.38

Boongorsrang และคณะ (1986) เลี้ยง *Spirulina* sp.SP-1 และสาหร่ายสีเขียว ได้แก่ *Uronema* sp. 80, *Ulothrix* sp. 81 และ *Chlorella* sp. K_3 เพื่อใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งจากบ้านเรือนที่ผ่านการบำบัดแล้ว พบว่าหลังจากการเลี้ยง 5 วัน สาหร่ายสีเขียว มีศักยภาพในการกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้ว มีค่าไนโตรเจนที่ถูกใช้ไป 7.27 ,5.70 และ 5.57 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ต่อวัน และค่าฟอสฟอรัสที่ถูกใช้ไป 0.78, 0.94 และ 1.08 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ต่อวันตามลำดับ สำหรับ *Spirulina* sp. SP-1 ไม่เติบโตในน้ำทิ้งเนื่องจากค่าพีเอชไม่เหมาะสม และขาดแหล่งคาร์บอนที่จำเป็นต่อการเติบโต

Nakayama (1975) เลี้ยง *Chlorella pyrenoidosa* C-28 ในยีสต์สกัดเจือจาง ซึ่งประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และ กลูโคสร้อยละ 0.38 คิดเป็นค่าซีโอดี เริ่มต้นเท่ากับ 3,639 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยเลี้ยงทั้งในสภาพระบบเปิดและระบบปิด ได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 264.8 และ 272.8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และค่าซีโอดีของน้ำลดลงร้อยละ 93.7 และ 94.4 ตามลำดับ

De la Noue และ Basseres (1989) เลี้ยง *Chlorella* sp. *Scenedesmus obliquus* และ *Phormiduium bohneri* ในน้ำมูลสุกรซึ่งผ่านการย่อย

สลายขึ้นต้นแล้ว พบว่า สาหร่ายสามารถเติบโตได้ดีในน้ำเสียเมื่อเจือจางด้วยน้ำประปาให้มีความเข้มข้นของน้ำมูลสุกรร้อยละ 2 โดยใช้หัวเชื้อ 80 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่ายต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถลดค่าแอมโมเนียไนโตรเจนและฟอสเฟต ได้มากกว่าร้อยละ 90 ปริมาณซีโอดีลดลงร้อยละ 60-90 โดยขึ้นกับชนิดของสาหร่าย ให้ปริมาณผลผลิตของมวลชีวภาพ 500-750 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้งต่อลิตร หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน ค่าอัตราการผลิตของ *P. Bohneri*, *Chlorella* sp. และ *S. obliquus* คิดเป็น 31,37 และ53 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ

Przytocka-Jusiak และคณะ (1984) เลี้ยง *Chlorella vulgaris*/AA ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตไนโตรเจนซึ่งผ่านการบำบัดขั้นที่สอง ซึ่งมีปริมาณแอมโมเนีย 25-250 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนเทรต 50-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรท์ 0-30 มิลลิกรัมต่อลิตร และฟอสเฟต 5-30 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังหมักชนิด packed bed พบว่า ค่าซีโอดีลดลงร้อยละ 94.0-99.9

Govindan และ Sundaralingan (1979) เลี้ยง *Chlorella pyrenoidesa* ร่วมกับแบคทีเรียในน้ำทิ้งจากโรงงานทอผ้าในอัตราส่วนน้ำทิ้งต่อน้ำเท่ากับ 1:5 พบว่า ค่าบีโอดีลดลงร้อยละ 98 ในเวลา 8-12 วัน

Govindan (1983) เลี้ยง *Chlamydomonas* sp., *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus quadricauda* และ *Merismopedia tennissima* ร่วมกันในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตสาคู พบว่า สามารถลดค่าบีโอดีได้ร้อยละ 93-97 และลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 93

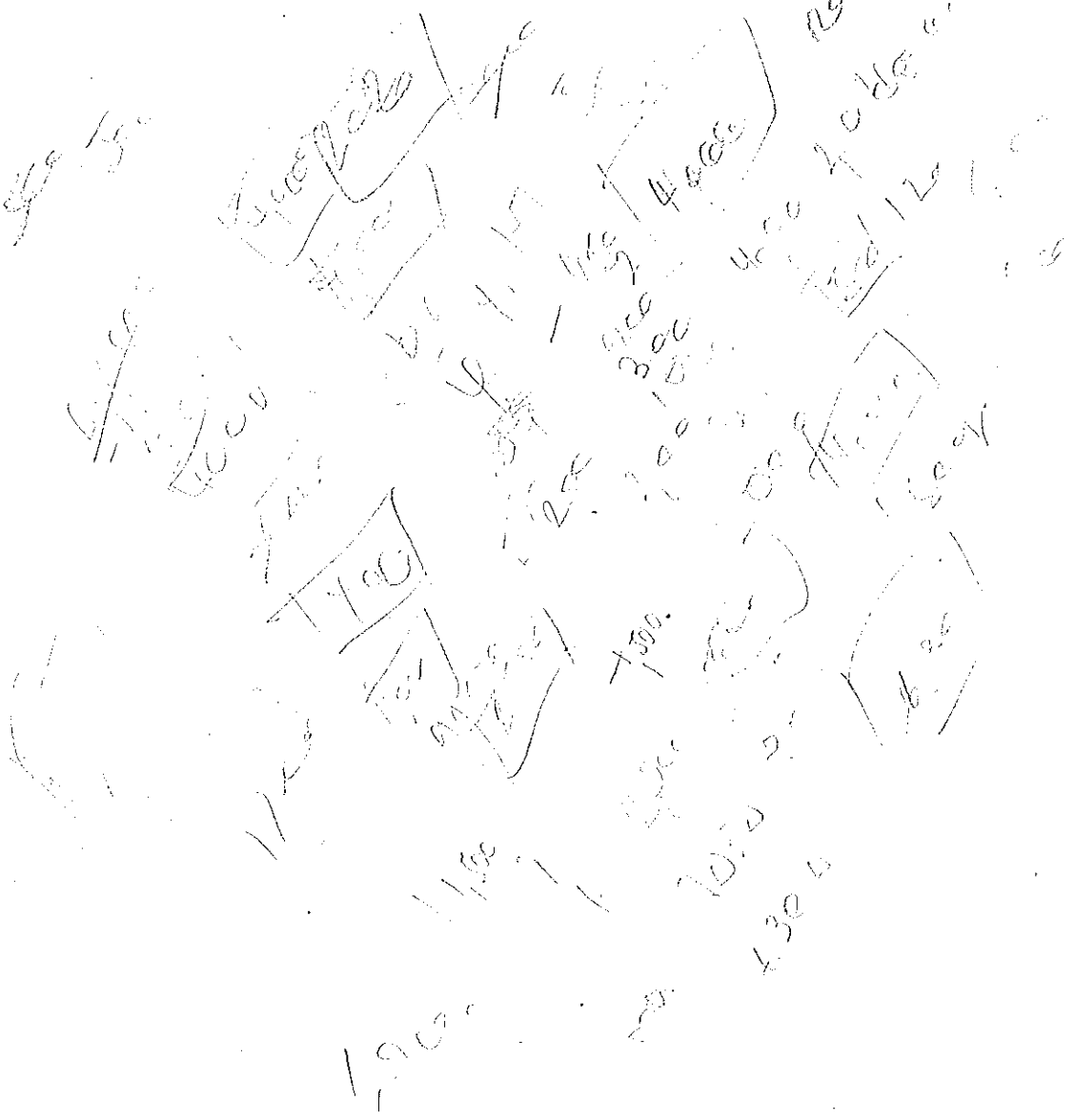
Wong และ Chan (1990) เลี้ยง *Chlorella salina* ในน้ำทิ้งจากบ้านเรือนซึ่งผ่านการบำบัดขั้นที่สองแล้ว โดยมีค่าความเค็ม 14 พีพีที ในระบบบ่อเปิด พบว่า สาหร่ายสามารถใช้ประโยชน์จากแอมโมเนีย ไนเทรต และฟอสเฟต ได้สูงคิดเป็นร้อยละ 89-100, 35-66 และ 100 ตามลำดับ ได้ปริมาณเซลล์ในอัตรา 5.1 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 46.8

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและจำแนกชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำในบ่อบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

2. ศึกษาการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่แยกได้ ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

3. ศึกษาความเป็นไปได้เพื่อใช้สาหร่ายในการบำบัดน้ำทิ้ง



วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

2. สาหร่ายขนาดเล็ก

สาหร่ายขนาดเล็กที่แยกได้จากน้ำทิ้ง

สาหร่าย *Chlorella* sp. K_3 ซึ่งได้รับจากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการแยกสาหร่าย

แยกสาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้อาหารวุ้นสูตรต่าง ๆ จำนวน 6 สูตร (รายละเอียดดูภาคผนวก ก.)

NS III (Payer, 1971)

Beijerick (Stein, 1973)

Chu no. 10 (Stein,1973)

Rodhe VIII (Stein,1973)

Zarrouk (Becker and Venkataraman, 1984)

$KNO_3 + Na_2HPO_4 .12H_2O$ (ธิดา วีระสกุล และ นิเวศน์ เรืองพานิช, 2517)

3.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เลี้ยงสาหร่ายที่แยกได้

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาชนิดและแยกสาหร่าย

จานเพาะเชื้อ

หลอดแก้วทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร

ปาสเจอร์ปิเปต

ชั้นเลี้ยงสาหร่ายพร้อมหลอดไฟฟ้าฟลูออเรสเซนต์ (หลอดละ 20 วัตต์ จำนวน 1 หลอด)

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) Model. HS-225 ของบริษัท International Scientific Co., Ltd.

กล้องจุลทรรศน์ Model Olympus COI ของบริษัท Olympus Ltd.

เครื่องหมุนเหวี่ยง Model H.103 N series ของบริษัท Kikusan Enshinki Ltd.

หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)

2. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย

หลอดแก้วทดลองขนาด 340x34 มิลลิเมตร

ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

หลอดไฟฟ้าฟลูออเรสเซนต์ (หลอดละ 40 วัตต์ จำนวน 8 หลอด)

อ่างแก้ว ขนาด 50x91x45 ลูกบาศก์เซนติเมตร

หลอดแก้วกรองอากาศ

จุกยางพร้อมท่อแก้ว

ถังบรรจุแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ series RMA (Rate-master flow meter) ของบริษัท Dawyer Instruments, Inc.

เครื่องวัดความดันแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (pressure regulator) type CR 25F ของบริษัท Ming Shen Ent. Co., Ltd.

Botryococcus braunii

เครื่องควบคุมเวลา Model TB 318 ของบริษัท Matsushita Electric Works, Ltd.

เครื่องปั๊มอากาศ (air pump)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาการเติบโตของสาหร่าย

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Model CE 202 Ultraviolets ของบริษัท Cecil Instrument Ltd.

เครื่องวัดพีเอช Model PHM29 ของบริษัท Radiometer Copenhagen

เครื่องหมุนเหวี่ยง Model H-103 NR scries ของบริษัท Kikusan Enshinki Ltd.

เครื่องกรองเซลล์

4. อุปกรณ์วิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำทิ้ง

ชุดวิเคราะห์ปริมาณซีโอดี

ชุดวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

ชุดวิเคราะห์ปริมาณไนเทรต

ชุดวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย

วิธีการ

1. การศึกษาชนิดและแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำทิ้งของโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

1.1 ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็ก

สุ่มตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อที่ 7-12 ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (รูปภาคผนวกที่ ข1.) หยดลงบนสไลด์ ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ทำซ้ำหลาย ๆ ครั้ง เพื่อศึกษาชนิดของสาหร่ายจนถึงระดับสกุล (genus) ตามแนววินิจฉัยของ Prescott (1962, 1980) ; Whitford และ Schumacher (1973)

1.2 การแยกสาหร่ายขนาดเล็ก

1) นำตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อ 7-12 เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 3,500

รอบต่อนาที (1,630 x g) เป็นเวลา 15 นาที

2) ตะกอนเซลล์ที่ได้นำไปแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยเกลี่ยเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NS III, Beijerick, Chu no.10, Rodhe VIII, Zarrouk และ KNO_3 + $Na_2HPO_4.12H_2O$

3) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ เพื่อให้เชื้อเจริญเต็มที่

4) ถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่หลาย ๆ ครั้ง จนได้เชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ จึงเขี่ยลงบนอาหารวุ้นเอียง NS III

5) ทดสอบความบริสุทธิ์ของสาหร่ายโดยใช้ peptone water (Stein, 1973) ก่อนนำไปศึกษา

6) เก็บรักษาสาหร่ายที่แยกได้บนอาหารวุ้นเอียงสูตร NS III ในตู้เลี้ยงเชื้อ (growth chamber) ที่อุณหภูมิ 20±2 องศาเซลเซียส และให้แสงประมาณ 1,500 ลักซ์ ช่วงสว่าง : ช่วงมืด เท่ากับ 12 : 12 ถ่ายเชื้อทุก 2 เดือน

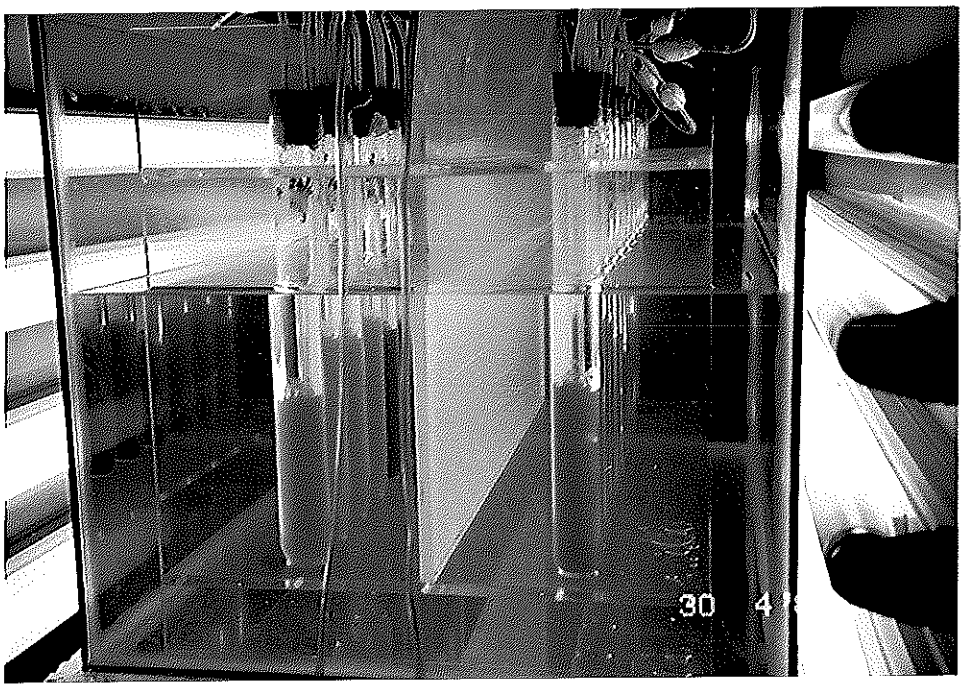
2. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่แยกได้

2.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

โดยการถ่ายเชื้อ *Chlorella* sp. ที่แยกได้จากแต่ละบ่อ และ *Chlorella* sp. K_3 ลงในแต่ละฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร NS III ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 96 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.2 การเลี้ยงเชื้อ

โดยการถ่ายเชื้อจากแต่ละฟลาสก์ลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ เจือจางด้วยอาหารเหลว NS III ปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในอ่างแก้วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้อากาศประมาณ 5 ลิตรต่อนาที ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ โดยมีช่วงสว่าง : ช่วงมืด 16 : 8 เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 การเลี้ยง *Chlorella* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ปริมาตร 200 มล. ให้อากาศประมาณ 5 ลิตรต่อนาที ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์

2.3 เปรียบเทียบการเติบโตของสาหร่ายที่แยกได้แต่ละบ่อกับ *Chlorella* sp. K_3

โดยเลี้ยงสาหร่ายในหลอดเลี้ยงเชื้อ ใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณร้อยละ 10 วัดค่าความหนาแน่นของเชื้อเริ่มต้น โดยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เจือจางด้วยอาหารเหลวสูตร NS III ให้ได้ความความหนาแน่นเท่ากับ 0.2 (หยกแก้ว ยามาลี และคณะ, 2525) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เลี้ยงในอ่างแก้วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้อากาศประมาณ 5 ลิตรต่อนาที ให้แสงที่ความเข้ม 4,000 ลักซ์ โดยมีช่วงสว่าง : ช่วงมืด 16 : 8 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง โดยวิธีปลอดเชื้อเพื่อวัดค่าพีเอช วัดการเติบโตโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร หาน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Vonshak and Borowitzka, 1991) ตรวจสอบรูปร่างลักษณะของเซลล์ สี ความเข้มของสี และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) (Pirt, 1975) จากสูตร

$$\mu = \frac{1}{x}\frac{dx}{dt} \quad \text{หรือ} \quad \frac{\ln x - \ln X_o}{t}$$

เมื่อ X_o = มวลของสาหร่ายเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

x = มวลของสาหร่ายที่เวลา (t) (กรัมต่อลิตร)

t = เวลา (ชั่วโมง)

3. การคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งเพื่อใช้เลี้ยงสาหร่าย

3.1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของตัวอย่างน้ำทิ้ง

นำตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อที่ 7-12 ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด มาวัดค่าพีเอช เปรียบเทียบสีโดยใช้ Muncell color charts และ วิเคราะห์ค่าซีโอดี ของแข็งทั้งหมด ไนเทรต ฟอสเฟต แอมโมเนีย (APWA, AWWA and WPCF, 1976, 1985) และไนโตรเจนทั้งหมด (A.O.A.C., 1984)

3.2 การเตรียมน้ำทิ้งและการเก็บรักษา

คัดเลือกตัวอย่างน้ำทิ้งที่มีคุณค่าทางอาหารเหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่ายที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 3.1) กรองผ่านผ้าขาวบาง เพื่อลดปริมาณสารแขวนลอย นำไปเก็บรักษาในห้องแช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการนำมาเลี้ยงสาหร่าย นำมาทำให้ละลายและกรองซ้ำด้วยผ้าขาวบางอีก 2-3 ครั้งก่อนนำมาใช้

4. เปรียบเทียบการเติบโตของสาหร่ายในน้ำทิ้ง อาหารเลี้ยงเชื้อ NS III และน้ำประปา

เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งที่คัดเลือกไว้ (จากข้อ 3.2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III และในน้ำประปา โดยให้ความเข้มแสง 5,200 ลักซ์ และทดสอบผลของไนเทรตต่อความเข้มของรงควัตถุ (pigment) ของเซลล์ โดยการเติมโพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) ที่ระดับความเข้มข้น 100 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (คิดเป็นปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 1.39, 2.08 และ 2.77) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เปรียบเทียบกับการเติบโตของสาหร่ายซึ่งเลี้ยงในน้ำทิ้ง และในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย

เลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ (จากข้อ 2) ในหลอดเลี้ยงเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้แสงช่วงสว่าง : ช่วงมืด 16:8 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน จนอัตราการเติบโตของสาหร่ายลดลง แต่ละปัจจัยศึกษาอัตราการเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตรวจสอบรูปร่างลักษณะของเซลล์ สี ความเข้มของสี และคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะของสาหร่าย วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย DMRT

ปัจจัยที่ศึกษามีดังนี้

5.1 ความเข้มแสง

เลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการ

เติบโตของสาหร่าย ที่ระดับความเข้มแสงเท่ากับ 2,700 4,000 และ 5,200 ลักซ์

5.2 แหล่งอาหาร

เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 3.2) ให้แสงที่ระดับความเข้มที่เหมาะสม (จากข้อ 5.1) ศึกษาผลของแหล่งอาหารต่อการเติบโตของสาหร่ายดังนี้

5.2.1 แหล่งคาร์บอน

ศึกษาความต้องการแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ของสาหร่าย โดยให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 2 ร่วมกับการให้อากาศร้อยละ 98 (ให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที และให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 100 มิลลิลิตรต่อนาที) เลี้ยงเปรียบเทียบกับการไม่ให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

5.2.2 แหล่งไนโตรเจน

5.2.2.1 ความเข้มข้นของไนโตรเจน เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งโดยให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 2 ร่วมกับการให้อากาศร้อยละ 98 เติมแอมโมเนียมไนเทรตที่ระดับความเข้มข้น 50, 70, 150, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (คิดเป็นปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 1.75, 2.45, 5.25, 7.00 และ 10.50) เลี้ยงเปรียบเทียบกับการไม่เติมแอมโมเนียมไนเทรต

5.2.2.2 ชนิดของไนโตรเจน เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งที่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และเติมไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสม (จากข้อ 5.2.2.1) ชนิดไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และโซเดียมไนเทรต ($NaNO_3$) เลี้ยงเปรียบเทียบกับการไม่เติมไนโตรเจน

5.2.2.3 ความเข้มข้นของไนโตรเจน ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของชนิดของไนโตรเจนที่คัดเลือกไว้ (จากข้อ 5.2.2.2) ในปริมาณคิดเป็นไนโตรเจนร้อยละ 0.7, 1.05, 1.40, 1.75 และ 2.10 เลี้ยงเปรียบเทียบกับการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน

5.2.3 แหล่งฟอสฟอรัส

เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งโดยให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 2 เติมไนโตรเจนที่เหมาะสม (จากข้อ 5.2.2.3) ศึกษาผลของแหล่งฟอสฟอรัสโดยใช้ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 10, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเปรียบเทียบกับการไม่เติมแหล่งฟอสฟอรัส

6. ศักยภาพในการบำบัดน้ำทิ้ง และคุณค่าทางอาหารของสาหร่าย

6.1 ศักยภาพในการบำบัดน้ำทิ้ง

เลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 5) เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เป็นเวลาประมาณ 8 วัน นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที (2,650 x *g*) เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายใสมากรองผ่านกระดาษกรอง GF/C แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่า ซีโอดี (APWA, AWWA and WPCF, 1985) ฟอสเฟตไนเทรต แอมโมเนีย และไนโตรเจนทั้งหมด (UNESCO, 1983; Strickland and Parson, 1972)

6.2 คุณค่าทางอาหาร

นำตะกอนเซลล์ของสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้ง (จากข้อ 6.1) และที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (A.O.A.C, 1984) และวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในเซลล์ของสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้ง ได้แก่ เหล็ก ทองแดง แคดเมียม และโครเมียม ด้วยเครื่อง atomic absorption (A.O.A.C, 1990) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่หน่วยวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาชนิดและแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำทิ้งของโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

1.1 ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็ก

จากการศึกษาชนิดของสาหร่ายขนาดเล็ก ที่พบในบ่อบำบัดน้ำทิ้งจำนวน 6 บ่อ ของโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด พบสาหร่ายทั้งสิ้น 4 ดิวิชั่น 12 สกุล ประกอบด้วยสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) 7 สกุล สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanophyta) 3 สกุล ไดอะตอม (Chrysophyta) 1 สกุล และยูกลีนอยด์ (Euglenophyta) 1 สกุล (ตารางที่ 3) พบสาหร่ายมากชนิดที่สุดในบ่อที่ 9 จำนวน 11 สกุล และบ่อที่ 8 จำนวน 9 สกุล ทั้งนี้อาจเนื่องจาก บ่อที่ 9 เป็น facultative pond ความขุ่นของน้ำน้อยกว่าบ่อที่ 7 และ 8 ซึ่งเป็นบ่อที่มีการให้อากาศ (aerated lagoon) ความขุ่นเป็นตัวบดบังแสง ซึ่งจำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่าย ในบรรดาสาหร่ายที่พบในน้ำทิ้ง *Chlorella* sp. พบทุกบ่อและมีปริมาณมากที่สุด เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้สามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี เติบโตได้ในทุกแหล่งน้ำทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม (Richmond, 1986)

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการเก็บรวมรวมพรรณสาหร่ายขนาดเล็กจากบ่อบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานแปรรูปอาหารทะเลในจังหวัดสงขลา จำนวน 6 แห่ง (ภิมุข รักขนาม, 2534) พบสาหร่าย 14 สกุล และสาหร่ายที่พบเหมือนกันคือ *Chlorella* sp. *Oocystis* sp., *Chlamydomonas* sp. *Euglena* sp. *Oscillatoria* sp. และ *Navicula* sp. นอกจากนี้ สาหร่ายที่พบในน้ำทิ้งสามารถพบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ แต่จะมีจำนวนชนิดของสาหร่ายแตกต่างกัน เช่น พบสาหร่ายน้ำจืด 6 ดิวิชั่น 32 สกุล ในเขตจังหวัดสงขลา (พิมพรรณ ตันสกุล, 2528) และ พบสาหร่าย 5 ดิวิชั่น 41 สกุล ในเขตจังหวัดปัตตานี (นิตยา พงศ์พีรโชติ และ พิมพรรณ ตันสกุล, 2528) สาหร่ายที่พบเหมือนกับที่พบในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล คือ *Chlorella* sp. *Euglena*

ตารางที่ 3 สาหร่ายขนาดเล็กที่เจริญตามธรรมชาติในบ่อบำบัดน้ำทิ้งจากบ่อที่ 7-12 ของโรงงานเทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด

สาหร่ายขนาดเล็ก	บ่อที่					
	7	8	9	10	11	12
Chlorophyta						
Chlorella sp.	+	+	+	+	+	+
Oocystis sp.	-	+	+	+	-	-
Chlamydomonas sp.	-	-	+	-	-	-
Sphaerocystis sp.	+	+	-	-	-	-
Mougeotia sp.	-	+	+	-	-	-
Dictyosphaerium sp.	+	+	+	+	-	-
Rhizoclonium sp.	-	-	+	-	-	-
Cyanophyta						
Oscillatoria sp.	-	+	+	+	+	+
Gomphosphaeria sp.	+	+	+	-	-	-
Anabaena sp.	-	-	+	+	+	-
Chrysophyta						
Navicula sp.	+	+	+	+	+	+
Euglenophyta						
Euglena sp.	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + : พบ

\- : ไม่พบ

sp. *Navicula* sp. *Oscillatoria* sp. *Oocystis* sp. *Chlamydomonas* sp. และ *Anabaena* sp. ซึ่งจะเห็นได้ว่า ในแหล่งน้ำทิ้งจะพบจำนวนชนิดของสาหร่ายน้อยกว่าในแหล่งน้ำธรรมชาติ แต่จากการสังเกตพบว่า สาหร่ายที่พบในน้ำทิ้งจะมีปริมาณมากกว่าในแหล่งน้ำธรรมชาติ ทั้งนี้เพราะน้ำทิ้งมีปริมาณธาตุอาหารสูง ทำให้สาหร่ายบางชนิดเติบโตเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ซึ่งในแหล่งน้ำทิ้งที่ทำการศึกษาจะพบ *Chlorella* sp. ในปริมาณมาก

1.2 การแยกสาหร่ายขนาดเล็ก

จากการเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 สูตร คือ NS III, Beijerick, Chu no. 10, Rodhe VIII, KNO_3 + $Na_2HPO_4.12H_2O$ และ Zarrouk พบว่า ในระยะแรก ๆ สาหร่ายเติบโตช้า โดยใช้เวลาประมาณ 12-14 วัน จึงเติบโตได้ประมาณครึ่งหนึ่งของจานเพาะเชื้อ ทั้งนี้เพราะสาหร่ายอยู่ในระยะการปรับตัวในการเติบโตบนอาหารวุ้น หลังการถ่ายเชื้อ 2 ครั้ง สาหร่ายเติบโตได้รวดเร็วขึ้น และเต็มจานเพาะเชื้อ ภายในระยะเวลา 10-12 วัน *Chlorella* sp. เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตร และสาหร่ายทุกชนิดเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III (ตารางที่ 4) จากการสังเกตการเติบโตของ *Chlorella* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร พบว่า *Chlorella* sp. เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III และ Beijerick ได้รวดเร็วกว่าบน Chu no. 10, Rodhe VIII และ KNO_3+Na_2HPO_4. $12H_2O$ และเติบโตได้น้อยมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Zarrouk ทั้งนี้อาจเนื่องจาก สูตรอาหาร Beijerick และ NS III เหมาะสมสำหรับใช้แยกสาหร่ายสีเขียว ส่วน Zarrouk เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับใช้เลี้ยง *Spirulina* sp. ซึ่งสาหร่ายส่วนใหญ่ไม่สามารถเติบโตได้เนื่องจากมีค่าพีเอชสูง (พีเอช 8-11) ยกเว้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดที่สามารถเติบโตในสภาวะที่มีพีเอชสูง จึงพบว่า *Oscillatoria* sp. สามารถเติบโตได้ แต่ *Anabaena* sp. ไม่เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ ส่วนการที่สาหร่ายเติบโตได้น้อยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chu no. 10 และ Rodhe VIII อาจเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สูตรไม่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารรอง (micronutrient) อนึ่ง *Chlorella* sp. ที่เติบโต

ตารางที่ 4 ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กที่เจริญบนอาหารวุ้นสูตรต่าง ๆ

สกุล	NS III	Bejerick	Chu no.10	Rodhe VIII	Zarrouk	KNO_3+ $Na_2HPO_4 .12H_2O$
Chlorella sp.	+	+	+	+	+	+
Oscillatoria sp.	+	-	+	+	+	-
Navicular sp.	+	+	+	+	-	-
Anabeana sp.	+	-	+	-	-	-
Oocystis sp.	+	+	-	-	-	-
Chlamydomonas sp.	+	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + : เจริญ

- : ไม่เจริญ

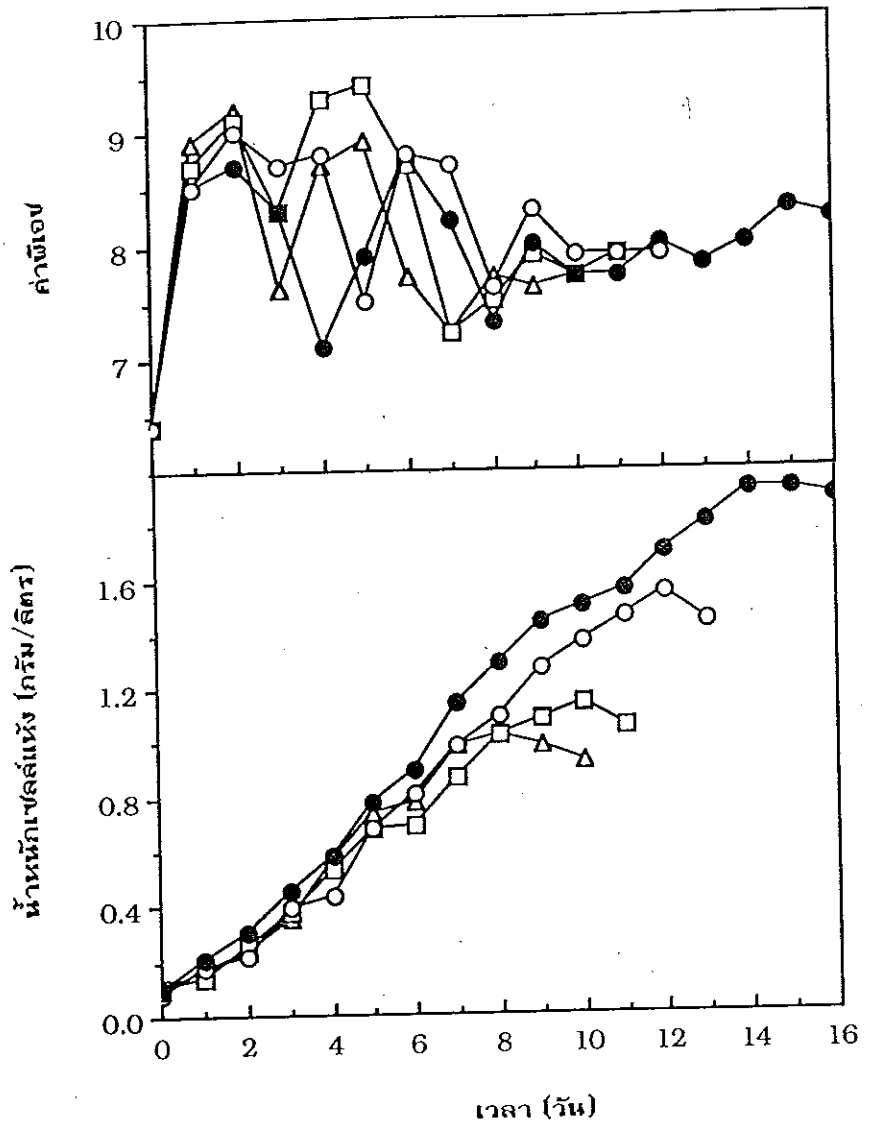
บนอาหารเลี้ยงเชื้อ KNO_3 + Na_2 $HPO_4.12H_2O$ เซลล์มีสีซีดจางมาก อาจเนื่องจากมีองค์ประกอบของธาตุอาหารน้อยไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้แยกสาหร่าย แต่เหมาะสมต่อการใช้เลี้ยงสาหร่ายในสภาพบ่อเปิดกลางแจ้ง เพื่อใช้เซลล์เป็นอาหารของไรแดง ซึ่งสามารถลดต้นทุนการผลิตได้สูง (ธิดา วีระสกุล และ นิเวศน์ เรืองพานิช, 2517)

ผลการแยก *Chlorella* sp. ที่พบในน้ำทิ้ง สามารถแยกได้ 3 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ T7 T9 และ T12 จากตัวอย่างน้ำในบ่อที่ 7, 9 และ 12 เซลล์ของทุกสายพันธุ์มีรูปร่างกลม แต่มีการเรียงตัว ขนาดและสีแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ T7 เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม มีขนาดของเซลล์ 4-6 ไมครอน เซลล์มีสีเขียวเข้มมากที่สุด สายพันธุ์ T9 เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ขนาดของเซลล์ 2-6 ไมครอน เซลล์สีเขียวเข้ม และ สายพันธุ์ T12 เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ขนาดของเซลล์ 4-6 ไมครอน เซลล์มีสีเขียวอมเหลือง

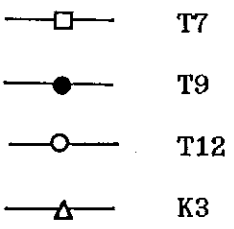
2. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่แยกได้

เปรียบเทียบการเติบโตของ *Chlorella* sp. สามสายพันธุ์ที่แยกได้ (T7 T9 และ T12) กับ *Chlorella* sp. K_3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III พบว่า สายพันธุ์ T9 เติบโตดีที่สุด ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด เท่ากับ 1.95 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยง 14 วัน รองลงมาคือ สายพันธุ์ T12 T7 และ K_3 ซึ่งให้ปริมาณเซลล์สูงสุด เท่ากับ 1.55, 1.13 และ 1.05 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยง 12, 10 และ 8 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 3) *Chlorella* sp. T9 มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.017 ต่อชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ T12, T7 และ K_3 มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.017, 0.016 และ 0.017 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

จากการสังเกตสีและลักษณะของเซลล์ของ *Chlorella* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III พบว่า เซลล์ของสายพันธุ์ T9 มีสีเขียวอมเหลือง แต่เหลืองน้อยกว่าสายพันธุ์ T12 เซลล์ของทั้งสองสายพันธุ์ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ส่วนสายพันธุ์ T7 มีสีเขียวเข้มกว่าสายพันธุ์ T9 และ T12 แต่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ K_3



รูปที่ 3 เปรียบเทียบการเติบโตของ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ (T7, T9, T12 และ K_3) และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์



เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม มีการตกตะกอนของเซลล์สูง เป็นผลให้วัดการเติบโตได้น้อยกว่าอีก 2 สายพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ไม่ได้สัมผัสกับธาตุอาหารและรับแสงอย่างเพียงพอ (Becker and Venkataraman, 1982)

Chlorella sp. K_3 เติบโตน้อยกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ อาจเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ ที่ต้องการความเข้มแสงสูงถึง 10,000 ลักซ์ (หยกแก้ว ยามาลี และคณะ, 2525) ดังนั้น เมื่อนำมาศึกษาโดยเลี้ยงที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จึงเติบโตช้า อย่างไรก็ตาม เซลล์ที่ได้มีสีเขียวเข้มกว่าสายพันธุ์ที่แยกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์

การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช ในระหว่างการเติบโตของ *Chlorella* sp. ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 3) โดยค่าพีเอชเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ที่ระยะเวลาเลี้ยง 1 วัน โดยเพิ่มจาก พีเอช 6 เป็น พีเอช 8.5-9.0 และลดลงอยู่ในช่วงพีเอช 7.3-8.5 ที่ระยะเวลาเลี้ยง 8 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการเลี้ยง *Chlorella* sp. ในน้ำแช่ถั่วเหลืองซึ่งมีค่าพีเอชเริ่มต้น 7.2-7.5 และเพิ่มขึ้นเป็น 7.5-10.4 หลังการเลี้ยง 1 วัน (หยกแก้ว ยามาลีและคณะ, 2526) และการเลี้ยง *Chlorella* sp. K_3 ในน้ำกากส่าสด ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 7-8 หลังการเลี้ยง 1 วัน (จรูญ ลีไตรรงค์, 2530)

3. การคัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งเพื่อใช้เลี้ยงสาหร่าย

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของน้ำทิ้งจากบ่อที่ 7-12 ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (ตารางที่ 5) พบว่า ทุกบ่อมีค่าพีเอชใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 7.8-8.3 แต่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบแล้วได้คัดเลือกน้ำทิ้งจากบ่อที่ 9 มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากมีปริมาณของแข็งทั้งหมด (2774 มก/ล) และค่าซีโอดี (543 มก/ล) ต่ำกว่าทุกบ่อ ยกเว้นบ่อที่ 12 ที่สำคัญ คือ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และฟอสเฟตสูงกว่าค่าที่ได้จากบ่อ 11 และ 12 คือมีค่าเท่ากับ 152 มก/ล และ 84 มก/ล ตามลำดับ ซึ่งไนโตรเจนทั้งหมดมีค่าไม่แตกต่างจากบ่อ 8 และ 10 อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากบ่อที่ 9 เป็นบ่อบำบัดน้ำทิ้ง แบบ facultative

ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของน้ำทิ้งบ่อ 7 ถึงบ่อ 12 ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด

องค์ประกอบ	แหล่งน้ำทิ้ง (บ่อที่)					
	7	8	9	10	11	12
พีเอช	8.0	7.8	7.9	8.1	8.2	8.3
สี+	2.5Y8/2	2.5Y8/4	2.5Y8/2	2.5GY8/4	2.5GY8/6	2.5GY7/8
ซีโอดี (มก/ล)	646±12	634±6	543±16	550±2.5	599±4	341±7
ของแข็งทั้งหมด (มก/ล)	3688±2.3	3443±6	2774±7	2871±3	2971±7	2382±9
ฟอสเฟต (มก/ล)	55±2	65±2	84±4	76±2	43±1	55±2
ไนโตรเจนทั้งหมด (มก/ล)	175±9	160±4	152±4	164±1	127±6	110±2
ไนเทรต(มก/ล)	37±1	34±2	28±3	32±2	23±1	18±2
แอมโมเนีย(มก/ล)	56±2	51±1	47±1	42±0.6	36±0.2	30±1

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

+ : วัดโดยใช้ Muncell color chart

pond ได้รับน้ำเสียที่ไหลจากบ่อที่ 8 ซึ่งเป็นระบบบ่อที่มีการเติมอากาศ มีการทำงานของแบคทีเรียซึ่งย่อยสลายสารอินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนียมอิออน ไนเทรตอิออน และฟอสเฟตอิออน ขึ้นในปริมาณมาก ซึ่งสาหร่ายสามารถใช้สารอาหารเหล่านี้ในการเติบโตได้ดี (Loehr, 1974) ความขุ่นในบ่อที่ 8 ทำให้เกิดการบดบังแสงซึ่งมีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย ส่วนบ่อที่ 9 ไม่มีการเติมอากาศ ทำให้ความขุ่นลดลง สาหร่ายจึงสามารถใช้สารอาหารดังกล่าวได้ดีกว่า อย่างไรก็ตามจากการวัดสีของน้ำทิ้ง พบว่า น้ำทิ้งในบ่อที่ 10-12 มีสีเขียวกว่าน้ำทิ้งในบ่อที่ 7,8 และ 9 แสดงว่ามีสาหร่ายอยู่ในน้ำทิ้งซึ่งในการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน ทำให้ค่าไนโตรเจนที่ได้มีค่าต่ำกว่าที่เป็นจริง เพราะสาหร่ายใช้แหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเติบโต ในบ่อที่ 12 ค่าซีโอดี ปริมาณไนเทรตและฟอสเฟตมีค่าน้อย อาจเป็นเพราะสารอินทรีย์ต่าง ๆ ถูกใช้ไปมากในบ่อที่ 9-11 น้ำทิ้งจึงมีค่าต่าง ๆ ต่ำ และสีของน้ำทิ้งมีสีเขียวอ่อนกว่าในบ่อที่ 10 และ 11

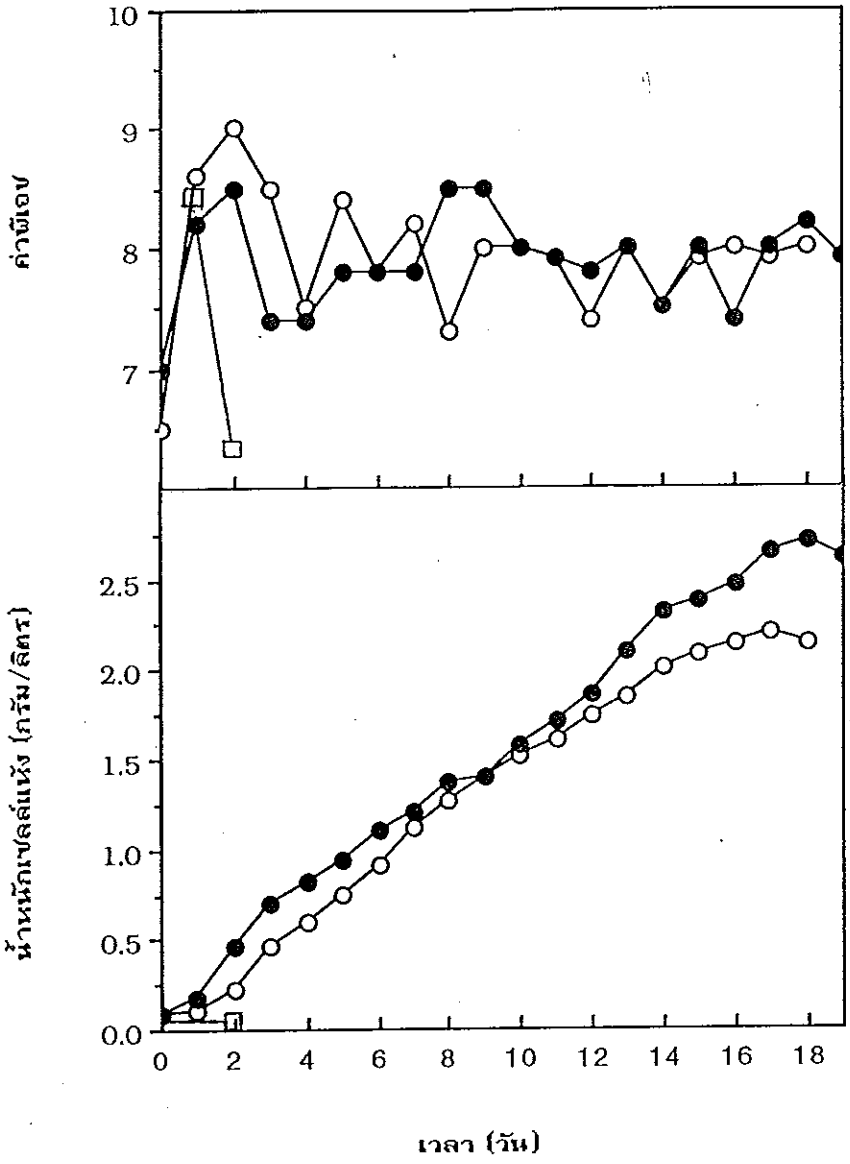
องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากบ่อที่ 9 ซึ่งนำมาใช้เลี้ยง *Chlorella* sp. ตลอดการทดลอง แสดงในตารางที่ 6 จะเห็นว่า น้ำทิ้งที่สุ่มมาครั้งหลัง มีค่าต่าง ๆ ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเวลาที่เก็บตัวอย่างอยู่ในช่วงฤดูฝน (ปลายเดือน พฤศจิกายน) เกิดการเจือจางจากน้ำฝนเป็นผลให้ค่าต่าง ๆ ต่ำกว่าค่าที่เคยวิเคราะห์ได้ (ตารางที่ 5) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และฟอสเฟตมีค่าเท่ากับ 105 และ 16 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

4. เปรียบเทียบการเติบโตของสาหร่ายในน้ำทิ้ง อาหารเลี้ยงเชื้อ NS III และน้ำประปา

ผลการเปรียบเทียบการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งกับการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III และน้ำประปา ที่ความเข้มแสง 6200 ลักซ์ (รูปที่ 4) พบว่าสาหร่ายเติบโตในน้ำทิ้งได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ (NS III) และน้ำประปาอย่างมีนัยสำคัญ โดยให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.7 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยง 18 วัน และมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.024 ต่อชั่วโมง ในน้ำทิ้งเซลล์มีสีเขียวเข้มมาก

ตารางที่ 6 คุณลักษณะทางเคมีของน้ำทิ้งจากบ่อที่ 9 ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด

องค์ประกอบ	
พีเอช	7.1
ซีโอดี (มก/ล)	450±9
ฟอสเฟต (มก/ล)	16±1
ไนโตรเจนทั้งหมด (มก/ล)	105±5
ไนเทรต (มก/ล)	15±1
แอมโมเนีย (มก/ล)	42±2



รูปที่ 4 การเติบโตและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล อาหารเลี้ยงเชื้อ NS III และน้ำประปา

—●— น้ำทิ้ง

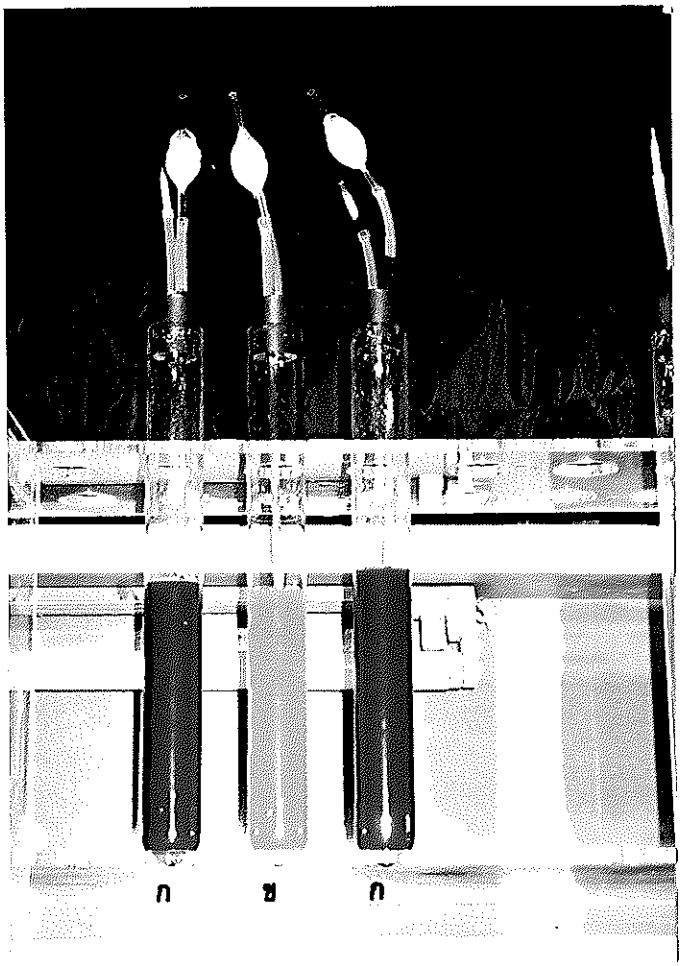
—○— อาหารเลี้ยงเชื้อ NS III

—□— น้ำประปา

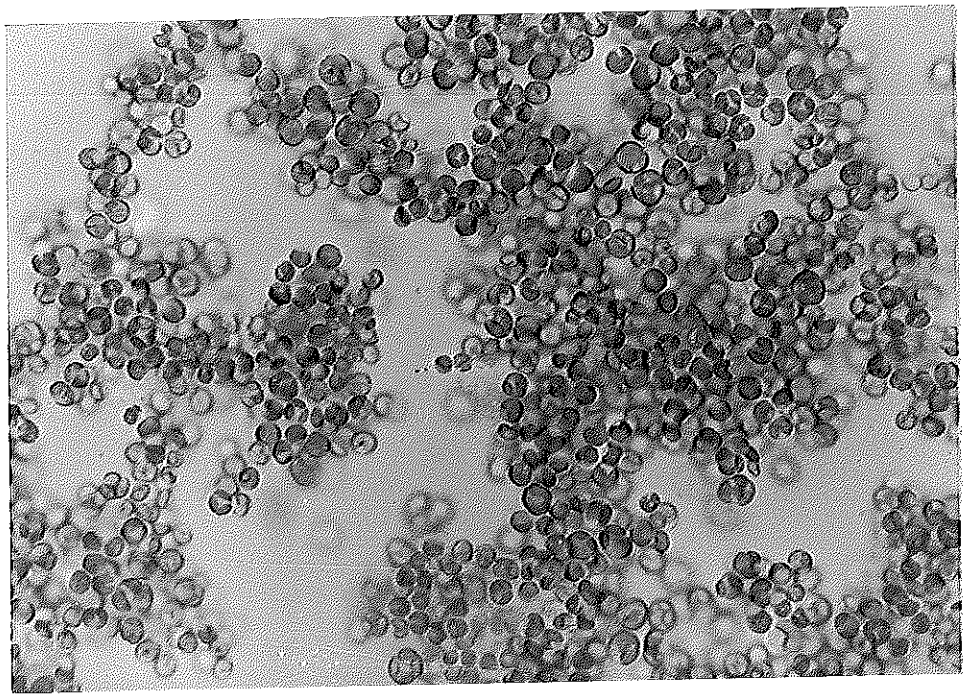
(รูปที่ 5) ลักษณะเซลล์จะจับกันเป็นกลุ่ม (รูปที่ 6) ส่วนปริมาณเซลล์สูงสุดที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เท่ากับ 2.20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยง 18 วัน และมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.019 ต่อชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เซลล์มีสีเขียวอมเหลือง (รูปที่ 5) ลักษณะเซลล์จะกระจายทั่วไปเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ (รูปที่ 7) สำหรับการเลี้ยงสาหร่ายในน้ำประปา พบว่า เซลล์ของสาหร่ายมีสีซีดจางและตายที่ระยะเวลาเลี้ยง 2 วัน เนื่องจากขาดสารอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโต สีของเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งแตกต่างจากสีของเซลล์ที่เลี้ยงในในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III มาก ความแตกต่างด้านสีของเซลล์ อาจเนื่องจาก *Chlorella* sp. T9 นี้แยกได้จากน้ำทิ้งซึ่งมีไนโตรเจนสูง ทำให้เป็นสายพันธุ์ที่ต้องการปริมาณไนโตรเจนในการเติบโตมากกว่า *Chlorella* sp. ที่แยกได้จากแหล่งอื่น ดังนั้นการที่เซลล์ของ *Chlorella* sp.T9 มีสีเขียวอมเหลืองอาจเนื่องจากปริมาณไนโตรเจนไม่เพียงพอต่อความต้องการของสาหร่าย

จากผลการศึกษาความต้องการไนโตรเจนของ *Chlorella* sp. T9 โดยเติมโพแทสเซียมไนเทรต ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III 3 ระดับ คือ 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (คิดเป็นไนโตรเจน ร้อยละ 1.39, 2.08 และ 2.77 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) (รูปที่ 8) พบว่า ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.30, 2.34 และ 1.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาเลี้ยง 18 วัน เซลล์มีสีเขียวเข้มขึ้นมากกว่าการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เพียงอย่างเดียว และเซลล์มีสีเขียวใกล้เคียงกับเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้ง (รูปที่ 9)

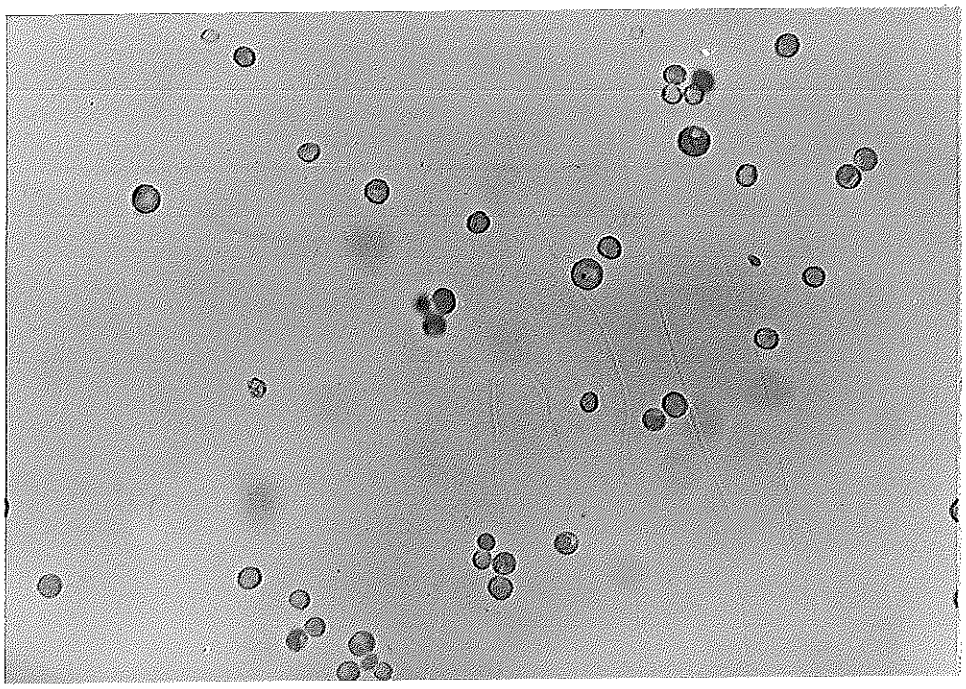
การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเติบโตของสาหร่ายในน้ำทิ้ง (รูปที่ 4) พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงน้อยโดยค่าพีเอชสูงในช่วง 1-3 วันแรก หลังจากนั้นพีเอชค่อนข้างคงที่ ซึ่งผลที่ได้เช่นเดียวกับผลของการเลี้ยง *Chlorella* sp. K_3 ในน้ำกากส่าสด (จรูญ ลีไตรรงค์, 2531) ส่วนพีเอชระหว่างการเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ผ่านมา



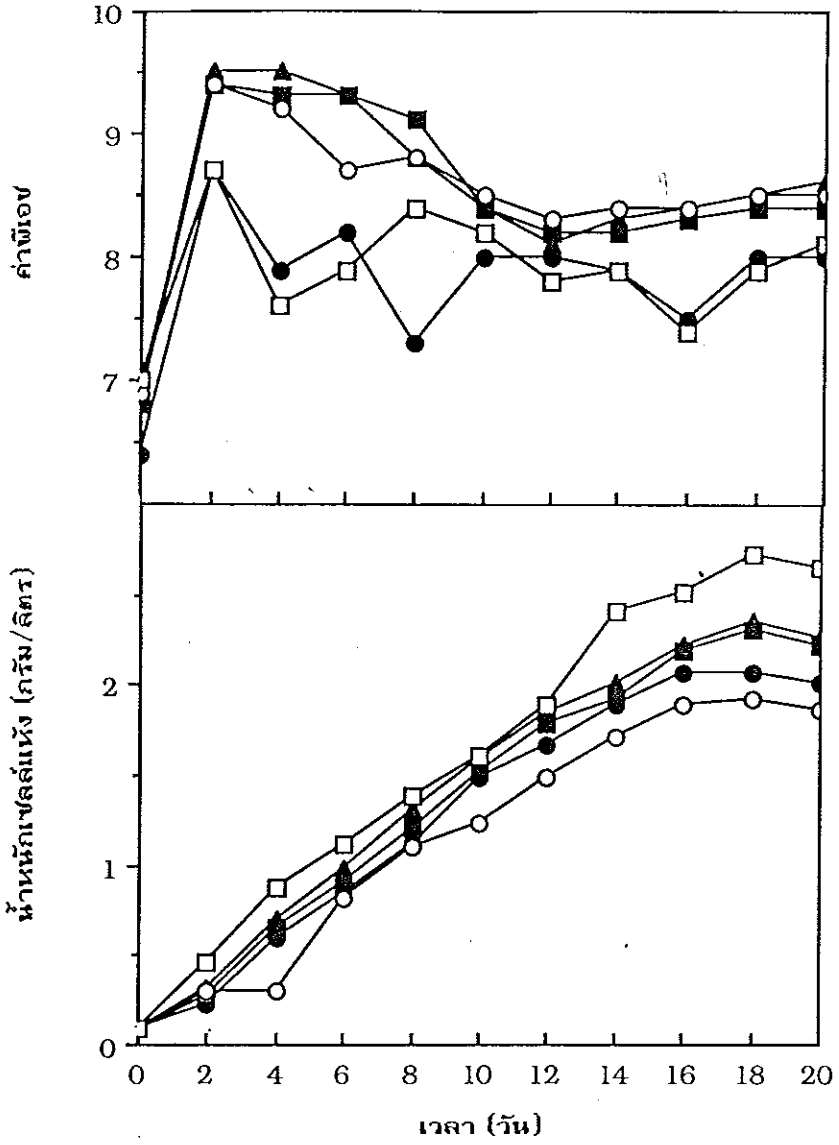
รูปที่ 5 เปรียบเทียบสีของเซลล์ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล (ก) และในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III (ข)



รูปที่ 6 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล (กำลังขยาย 140 เท่า)



รูปที่ 7 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III (กำลังขยาย 140 เท่า)



รูปที่ 8 ผลของความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเทรตต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

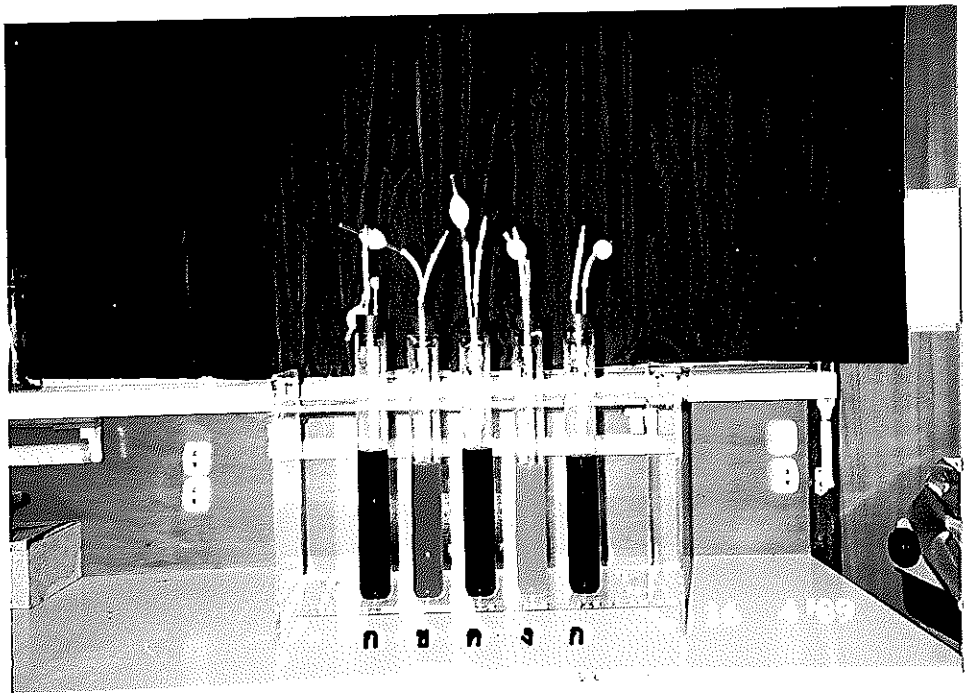
—□— น้ำทิ้ง

—●— NS III

—■— NS III + KNO_3 100 มก/ล

—▲— NS III + KNO_3 150 มก/ล

—○— NS III + KNO_3 200 มก/ล



รูปที่ 9 ลักษณะสีของเซลล์ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล และอาหารเลี้ยง NS III ซึ่งเติมและไม่เติมโพแทสเซียมไนเทรต

ก น้ำทิ้ง

ข อาหารเลี้ยงเชื้อ NS III + KNO_3 100 มก/ล

ค อาหารเลี้ยงเชื้อ NS III + KNO_3 150 มก/ล

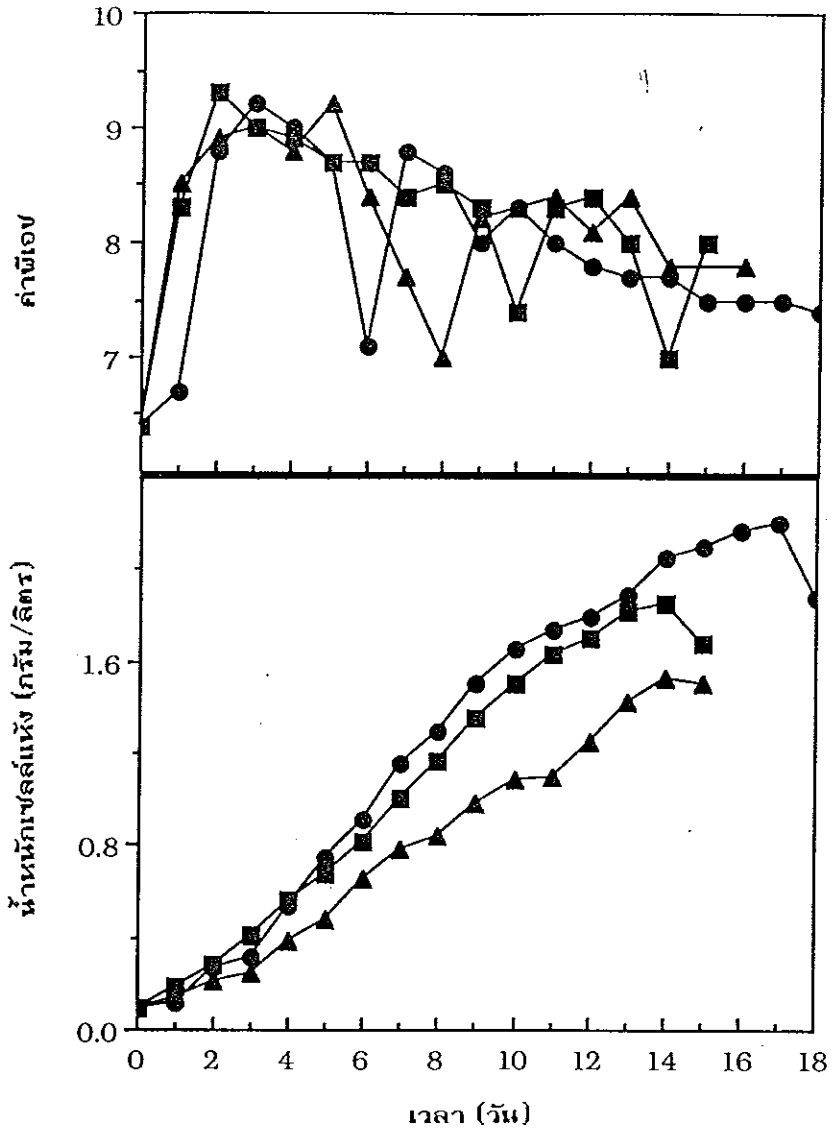
ง อาหารเลี้ยงเชื้อ NS III

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของ *Chlorella*

5.1 ความเข้มแสง

ผลของความเข้มแสง 3 ระดับ (2,700, 4,000 และ 5,200 ลักซ์) ต่อการเติบโตของ *Chlorella* sp. T9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III (รูปที่ 10) จะเห็นว่า ความเข้มแสงมีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย โดยพบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้น คือให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.53 1.85 และ 2.05 กรัมต่อลิตร ที่ระดับความเข้มแสง 2,700, 4,000 และ 5,200 ลักซ์ ตามลำดับ ที่ระยะเวลาเลี้ยง 14 วันมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.014, 0.016 และ 0.018 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และให้ปริมาณเซลล์สูงสุดในวันที่ 17 เท่ากับ 2.20 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มแสง 5,200 ลักซ์ และมีแนวโน้มว่าปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับแสงที่มีความเข้มเพิ่มขึ้น ความเข้มแสงที่สูงขึ้นมีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายโดยเพิ่มการสังเคราะห์แสง และเร่งการทำงานของเซลล์ (Kosaric, *et al.*, 1974) ความเข้มของแสงที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของสาหร่ายแต่ละชนิดแตกต่างกัน สำหรับความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อสาหร่ายสีเขียวอยู่ในช่วง 5,000-7,000 ลักซ์ โดยที่ *Chlorella* sp. เติบโตได้ในความเข้มแสงช่วงกว้าง แต่โดยทั่วไปจะเติบโตได้ดีที่ความเข้มแสง 4,000-5,000 ลักซ์ (Ellis, *et al.*, 1981 ; Becker and Venkataraman, 1982) อย่างไรก็ตาม หยกแก้ว ยามาลี และคณะ (2525) พบว่า *Chlorella* sp. K_3 เติบโตได้ดีที่ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Takada และ Hirokawa (1978) ซึ่งพบว่า *Chlorella ellipsoida* เติบโตได้ดีที่ความเข้มแสง 12,000 ลักซ์

การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในอาหาร NS III (รูปที่ 10) พบว่า หลังการเลี้ยง 2 วัน พีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นที่ความเข้มแสงทุกระดับ โดยเพิ่มจากพีเอช 6.3 เป็นพีเอช 8.8-9.3 และค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงมากในช่วงวันที่ 3-10 ของการเลี้ยง โดยมีค่าพีเอชสูงสุด 9.2 และต่ำสุด 7.2 และหลังการ



รูปที่ 10 ผลของความเข้มแสงต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของพีเอช ระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III

—●— 5,200 ลักซ์

—■— 4,000 ลักซ์

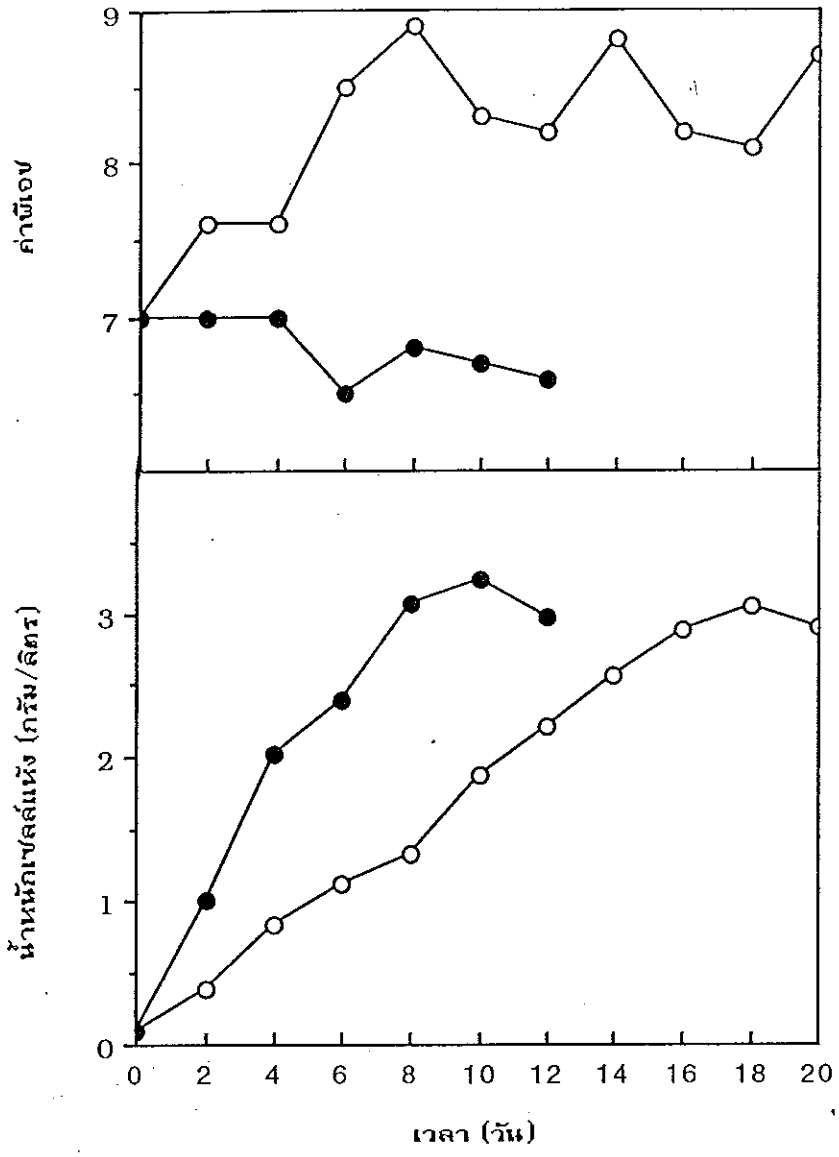
—▲— 2,700 ลักซ์

เลี้ยงเป็นเวลา 11 วัน จนสิ้นสุดการทดลอง ค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก อยู่ในช่วง 7.5-8.5 ส่วนที่ความเข้มแสง 2,700 ลักซ์ พีเอชมีการเปลี่ยนแปลงมาก อยู่ในช่วงพีเอช 7-9 จนสิ้นสุดการทดลอง และที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ พีเอชสูงขึ้นอยู่ในช่วง 8.5-9.1 ในระยะเวลาการเลี้ยง 1-5 วันแรก จากนั้นค่อย ๆ ลดต่ำลง โดยมีค่าพีเอช 8-8.5 จนสิ้นสุดการทดลอง การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เป็นผลจากการที่สาหร่ายใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในน้ำ (ประมาณร้อยละ 0.03) ในระหว่างการสังเคราะห์แสงเพื่อการเติบโต ค่าพีเอชจึงเพิ่มสูงขึ้น เพราะจะเหลืออนุมูลของ OH มากขึ้น จากการแตกตัวของ HCO_3 H_2CO_3 และ CO_3^{2-} เมื่อคาร์บอนไดออกไซด์ถูกดึงไปใช้ ทำให้ในช่วงมืดมีค่าพีเอชลดลงซึ่งเป็นช่วงที่สาหร่ายไม่ได้สังเคราะห์แสงใช้ออกซิเจนเพียงอย่างเดียวเพื่อการหายใจ ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในน้ำเป็นกรดคาร์บอนิค พีเอชจึงลดลง (Richmond, 1986)

5.2 แหล่งอาหาร

5.2.1 แหล่งคาร์บอน

ผลของการเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 2 ร่วมกับการให้อากาศร้อยละ 98 ลงในน้ำทิ้งระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 (รูปที่ 11) พบว่าการเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลทำให้ระยะเวลาการเติบโตลดลงเกือบร้อยละ 50 (คือจาก 18 วัน เหลือเพียง 10 วัน) และได้ปริมาณเซลล์สูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เวลาเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 3.24 และ 1.86 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 10 วัน มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.033 และ 0.024 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นผลจากการที่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถเข้าสู่เซลล์ของสาหร่าย ได้ง่ายประกอบกับสาหร่ายใช้คาร์บอนไดออกไซด์ได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์ยังทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ ทำให้ค่าพีเอชของน้ำทิ้งเปลี่ยนแปลงน้อย และอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Chlorella* sp. (Richmond, 1986) ส่วนการเติบโตของ *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งที่ไม่เติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์นั้น



รูปที่ 11 ผลของการเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

—○— น้ำทิ้ง

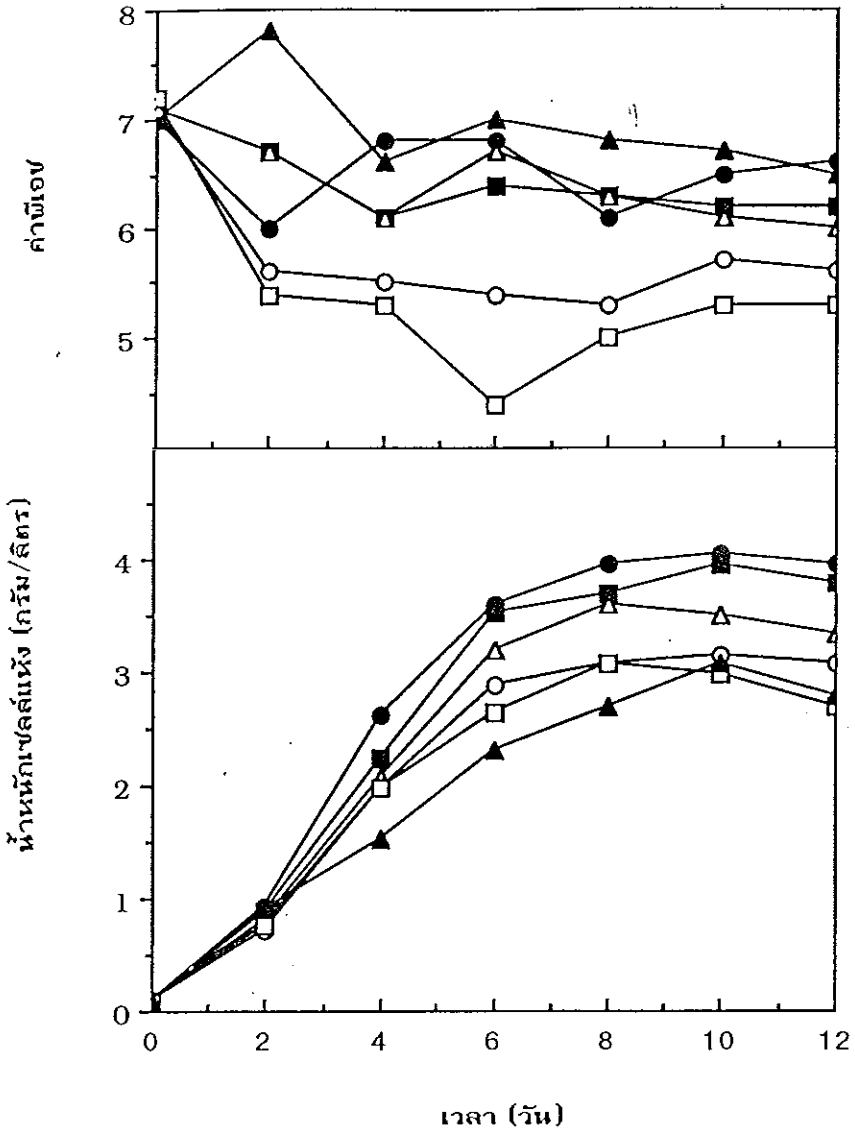
—●— น้ำทิ้ง + คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 2

Chlorella sp. T9 จะใช้แหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง เป็นผลให้ค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงมาก (รูปที่ 11) พีเอชจะอยู่ในช่วง 7-9 ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Chlorella* sp. และมีผลต่อการดูดซึมคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ของ *Chlorella* sp. ด้วย ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเติมคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 2 ผสมกับการให้อากาศร้อยละ 98 ลงในน้ำทิ้งระหว่างการเลี้ยงสาหร่าย

5.2.2 แหล่งไนโตรเจน

5.2.2.1 ความเข้มของไนโตรเจน

การเติมแอมโมเนียมไนเทรตที่ระดับความเข้มข้น 50, 70, 150, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นไนโตรเจนร้อยละ 1.75, 2.45, 5.25, 7.00 และ 10.50 ลงในน้ำทิ้งระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp.T9 พบว่าสาหร่ายเติบโตดีที่สุดในน้ำทิ้งซึ่งเติมแอมโมเนียมไนเทรต 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 4.05 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยง 10 วัน มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.036 ต่อชั่วโมง (รูปที่ 12) รองลงมาคือ สาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งซึ่งเติมแอมโมเนียมไนเทรต 70 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์ 3.98 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับการเติมแอมโมเนียมไนเทรต 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.034 ต่อชั่วโมง ส่วนสาหร่ายซึ่งเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมแอมโมเนียมไนเทรต 150, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 3.51, 3.15 และ 2.97 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.033, 0.033 และ 0.033 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ที่ระยะเวลาเลี้ยง 10 วัน ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการเติมแอมโมเนียมไนเทรต 50 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจะเห็นว่า ปริมาณเซลล์ที่ได้มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการถูกยับยั้งการเติบโตโดยแอมโมเนียมที่มีความเข้มข้นสูง (Richmond, 1986) ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับรายงานของ Poutiot และคณะ (1989) ที่ว่าแอมโมเนียมมีผลต่อการยับยั้งการใช้ไนเทรตของสาหร่าย ในกรณีที่ประจุของแอมโมเนียมสูง อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษในสาหร่ายบางชนิดได้ ดังนั้น การศึกษาในขั้นต่อไปจึงเลือก



รูปที่ 12 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเทรตต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

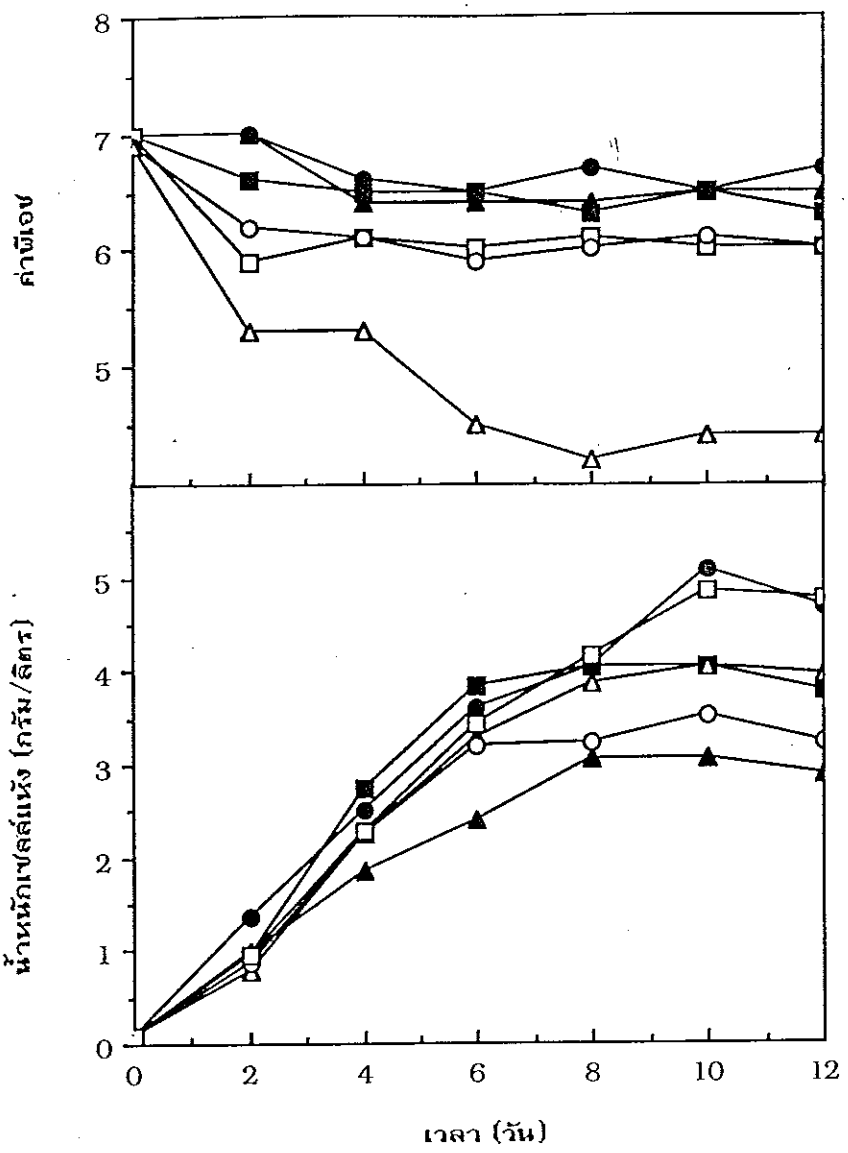
- น้ำทิ้ง
- น้ำทิ้ง + NH_4NO_3 50 มก/ล
- น้ำทิ้ง + NH_4NO_3 70 มก/ล
- น้ำทิ้ง + NH_4NO_3 150 มก/ล
- น้ำทิ้ง + NH_4NO_3 200 มก/ล
- น้ำทิ้ง + NH_4NO_3 300 มก/ล

ใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนร้อยละ 1.75

การเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งที่เติมแอมโมเนียมไนเทรตค่าต่ำกว่าค่าพีเอชของการเลี้ยงในน้ำทิ้งอย่างเดียว (รูปที่ 12) อาจเนื่องจากสาหร่ายจะใช้เกลือแอมโมเนีย เกลือไนเทรต ทำให้พีเอชของอาหารลดลง (Richmond, 1986) ค่าพีเอชลดลงมากที่ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเทรต 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตรในช่วง 2 วันแรก หลังจากนั้นจนสิ้นสุดการทดลองค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5-6 ดังนั้นอัตราการเติบโตของสาหร่ายจึงต่ำกว่าชุดอื่น ๆ เนื่องจากระดับของพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเติบโต ส่วนการเติมแอมโมเนียมไนเทรต 50, 70 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอชจะเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 6-7

5.2.2.2 <u>ชนิดของไนโตรเจน</u>

การเติมไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเทรต แอมโมเนียมคลอไรด์ ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียมไนเทรต โดยมีปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนร้อยละ 1.75 ลงในน้ำทิ้งเพื่อใช้เลี้ยง *Chlorella* sp. T9 เปรียบเทียบกับการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (รูปที่ 13) พบว่าสาหร่ายเติบโตได้ดีในน้ำทิ้งซึ่งเติมโซเดียมไนเทรต ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 5.08 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.035 ต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาเลี้ยง 10 วัน รองลงมาคือ สาหร่ายซึ่งเติบโตในน้ำทิ้งเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 4.86 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยง 10 วัน มีค่าแตกต่างจากการเติมโซเดียมไนเทรตอย่างมีนัยสำคัญ มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.034 ต่อชั่วโมง ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมแอมโมเนียมไนเทรต ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งอย่างเดียว ให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 4.05, 3.15, 4.05 และ 3.06 กรัมต่อลิตร และอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.036, 0.034, 0.034 และ 0.032 ต่อชั่วโมงตามลำดับ ที่ระยะเวลาเลี้ยง 10 วัน ส่วนผลการทดลองของ Saxena และคณะ (1983) ซึ่งพบว่า โซเดียมไนเทรต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด ในการเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทองในน้ำทิ้งจากบ้านเรือน ได้ผลผลิตสูงสุด



รูปที่ 13 ผลของไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ (ไนโตรเจนร้อยละ 1.75) ต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

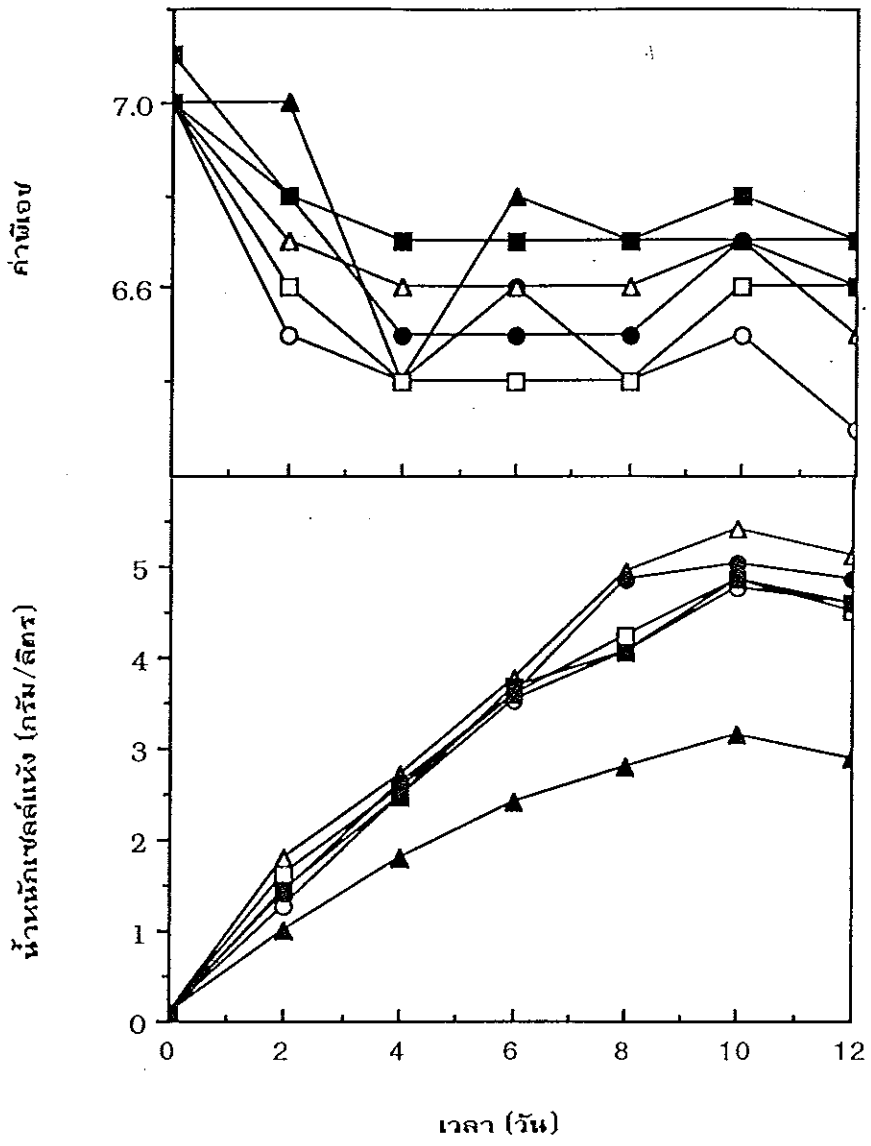
น้ำทิ้ง
น้ำทิ้ง + NH_4NO_3
น้ำทิ้ง + $NaNO_3$
น้ำทิ้ง + $(NH_4)_2SO_4$
น้ำทิ้ง + $(NH_4)_2HPO_4$
น้ำทิ้ง + NH_4Cl

(9.5 กรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยูเรีย แอมโมเนียมไนเทรต ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และ แอมโมเนียมซัลเฟต ทั้งนี้เนื่องจากโซเดียมไนเทรตแตกตัวให้อนุภาคอิออนของ NO_3^- ซึ่งจะผ่านกระบวนการรีดักชันให้เป็น NH_4^+ ก่อนที่จะนำไปใช้ ส่วนการใช้แอมโมเนียมโดยตรงอาจจะมีความเข้มข้นสูงเกินไป ทำให้เกิดการยับยั้งการเติบโตของสาหร่าย (Richmond, 1986)

การเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ซึ่งเติมไนโตรเจนชนิดต่างๆ ยกเว้นแอมโมเนียมคลอไรด์ มีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชใกล้เคียงกับการเลี้ยงในน้ำทิ้งเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 13) คือ มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6-7 ส่วนการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ ค่าพีเอชของน้ำเลี้ยงอยู่ในช่วง 4-5.3 ในช่วง 2-12 วัน ทั้งนี้เนื่องจากแอมโมเนียมคลอไรด์แตกตัวให้ Cl^- ซึ่ง Cl^- จะรวมตัวกับ H^+ ในน้ำได้กรดไฮโดรคลอริค (HCl) ทำให้ค่าพีเอชในอาหารต่ำลงมาก แหล่งไนโตรเจนต่างกันจะให้ค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงสาหร่ายต่างกัน และค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตจะแตกต่างกันด้วย (Myers, 1951 อ้างโดย Hosakul, 1972) ดังนั้น การศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกใช้โซเดียมไนเทรต

5.2.2.3 <u>ความเข้มข้นของไนโตรเจน</u>

การเติมโซเดียมไนเทรต ที่ระดับความเข้มข้น 42.5, 63.7, 85.0, 106.2 และ 127.4 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นไนโตรเจนร้อยละ 0.7, 1.1, 1.4, 1.7 และ 2.1 ตามลำดับ ลงในน้ำทิ้งเพื่อเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 (รูปที่ 14) พบว่า สาหร่ายเติบโตดีที่การเติมปริมาณโซเดียมไนเทรต 85.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 5.4 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยง 10 วัน มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.036 ต่อชั่วโมง ซึ่งแตกต่างจากระดับความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเทรต 106.2, 63.7, 127.4, 42.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำทิ้งเพียงอย่างเดียว ให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 5.04, 4.86, 4.86, 4.77 และ 3.15 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยง 10 วัน มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.036, 0.036, 0.035, 0.035 และ 0.032 ต่อชั่วโมงตามลำดับ



รูปที่ 14 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไนเทรตต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

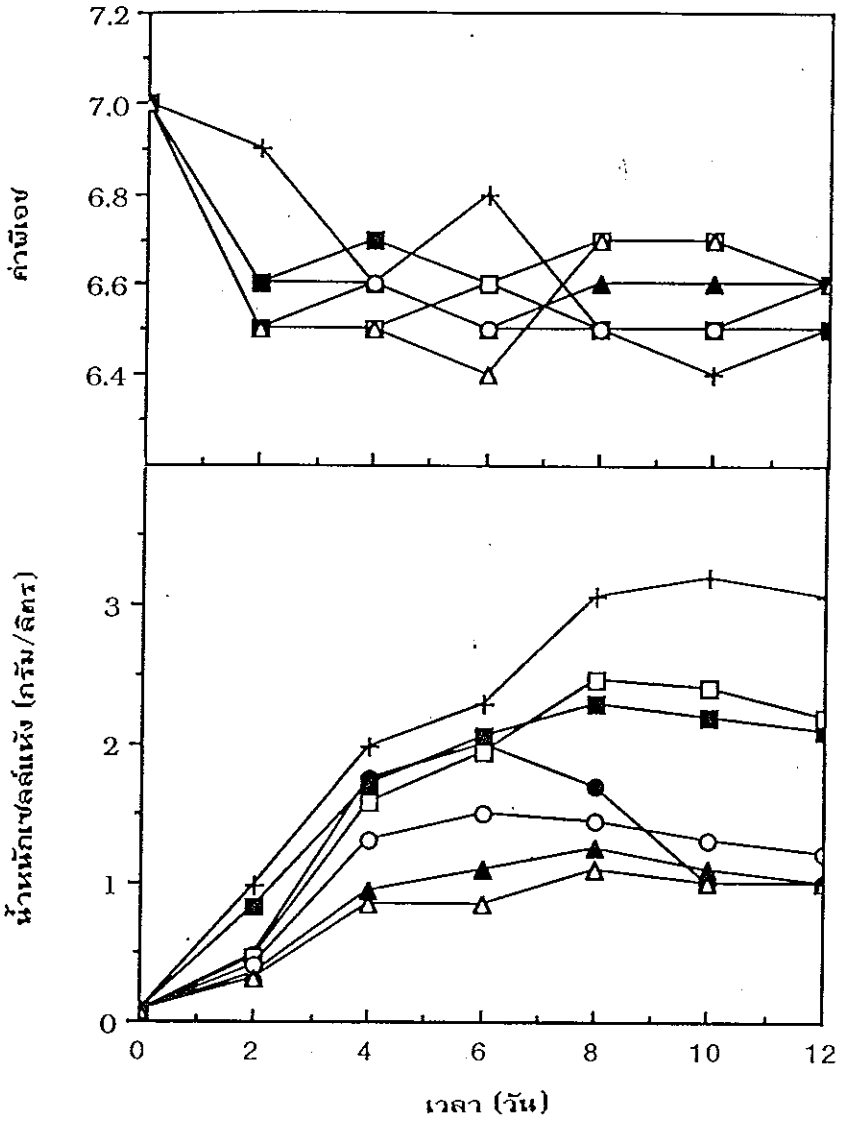
น้ำทิ้ง
น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ 85.0 มก/ล
น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ 42.5 มก/ล
น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ 106.2 มก/ล
น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ 63.7 มก/ล
น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ 127.4 มก/ล

จากการทดลองของ Chaudhari และคณะ (1980) พบว่า การเติมโซเดียมไนเทรต 8 กรัมต่อลิตร มีผลให้สาหร่ายเกลียวทองเติบโตได้สูงสุด (คิดเป็นไนโตรเจนร้อยละ 16.48) และเติบโตช้าลงที่ปริมาณโซเดียมไนเทรต 10 หรือมากกว่า 10 กรัมต่อลิตร แต่ นิมพรรณ ตันสกุล และ อารักษ์ จันทศิลป์ (2531) พบว่า การเติมโซเดียมไนเทรตลงในน้ำทิ้งโรงงานยางพารา ทำให้สาหร่ายเกลียวทองมีอัตราการเติบโตดีที่สุดที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเทรต 2.5 กรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มว่าอัตราการเติบโตของสาหร่ายจะสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไนเทรตเพิ่มมากขึ้น

การเติมโซเดียมไนเทรต มีผลให้ค่าพีเอชลดต่ำลงอยู่ในช่วง 6.5-6.8 ทุกระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน และค่อนข้างคงที่ในช่วงวันที่ 4-8 ของการเลี้ยง และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 10 (รูปที่ 14) ส่วนการเลี้ยงในน้ำทิ้งเพียงอย่างเดียว พีเอชมีค่าลดลงจาก 7.0 เป็น 6.4 ในวันที่ 4 ของการเลี้ยง และเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วงพีเอช 6.7-6.8 จนสิ้นสุดการทดลอง ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปแหล่งไนโตรเจนจึงเลือกใช้โซเดียมไนเทรตที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนร้อยละ 1.4

5.2.3 <u>แหล่งฟอสฟอรัส</u>

จากการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งและน้ำทิ้งซึ่งเติมโซเดียมไนเทรต และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (คิดเป็นฟอสฟอรัสร้อยละ 0.18, 0.36 และ 0.54) (รูปที่ 15) พบว่า สาหร่ายซึ่งเลี้ยงในน้ำทิ้งให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.2 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.033 ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งซึ่งเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตอย่างมีนัยสำคัญ ทั้ง 3 ระดับ รองลงมา คือ สาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งซึ่งเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.20 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.031 ต่อชั่วโมง ส่วนการเติมที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร สาหร่ายเติบโตได้ต่ำสุดให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.20 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะ



รูปที่ 15 ผลของความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของพีเอช ระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลซึ่งเติมและไม่เติมโซเดียมไนเทรต 85 มก/ล

- น้ำทิ้ง
- น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ + KH_2PO_4 10 มก/ล
- น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ + KH_2PO_4 20 มก/ล
- น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ + KH_2PO_4 30 มก/ล
- น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ + K_2HPO_4 10 มก/ล
- น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ + K_2HPO_4 20 มก/ล
- น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ + K_2HPO_4 30 มก/ล

เท่ากับ 0.025 ต่อชั่วโมง เช่นเดียวกับการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (คิดเป็น ฟอสฟอรัสร้อยละ 0.23, 0.46 และ 0.68) (รูปที่ 15) พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์ 1.10 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.024 ต่อชั่วโมง ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 2.4 กรัมต่อลิตร (อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.030 ต่อชั่วโมง) ซึ่งน้อยกว่าการเลี้ยงในน้ำทิ้งเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษา พบว่า การเติมแหล่งฟอสฟอรัสลงในน้ำทิ้งจะให้ปริมาณเซลล์ต่ำกว่าการไม่เติม ทั้งนี้อาจเนื่องจากในน้ำทิ้งมีปริมาณฟอสฟอรัสเพียงพอต่อการเติบโตของ *Chlorella* sp. T9 สาหร่ายแต่ละชนิดและแต่ละสายพันธุ์มีความต้องการปริมาณฟอสฟอรัสแตกต่างกัน โดยทั่วไปสามารถแบ่งความต้องการฟอสฟอรัสของสาหร่ายน้ำจืดได้ 3 กลุ่ม ซึ่งทนต่อความเข้มข้นของฟอสเฟตต่างกัน คือ ในช่วงน้อยกว่ามากกว่า หรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อลิตร (Soeder, *et al.*, 1971 อ้างโดย Richmond, 1986) และมีสาหร่ายหลายชนิดเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำ แต่จากการศึกษาของ Hosakul (1972) พบว่า *Chlorella* sp. เติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นของฟอสเฟต 1 มิลลิโมลต่อลิตร และจะถูกยับยั้งการเติบโตที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตต่ำกว่า 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร ส่วน พิมพรรณ ตันสกุล และ อารักษ์ จันทศิลป์ (2531) พบว่า การเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทองในน้ำทิ้งโรงงานยางพารา ไม่ควรเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เนื่องจากอัตราการเติบโตลดลงเมื่อความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเพิ่มสูงขึ้น และ Chaudhari และคณะ (1980) พบว่าการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.01-0.04 กรัมต่อลิตร (10-40 มิลลิกรัมต่อลิตร) เฟอรัสซัลเฟต 0.01-0.04 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายเกลียวทอง จากการศึกษาของ Wikfors (1986) เลี้ยง *Tetraselmis maculata* โดยใช้อัตราส่วนของโซเดียมไนเทรตต่อโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในอัตรา 77.5:20, 77.5:10 และ 77.5:5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ทั้ง 3 ระดับให้ปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างกัน

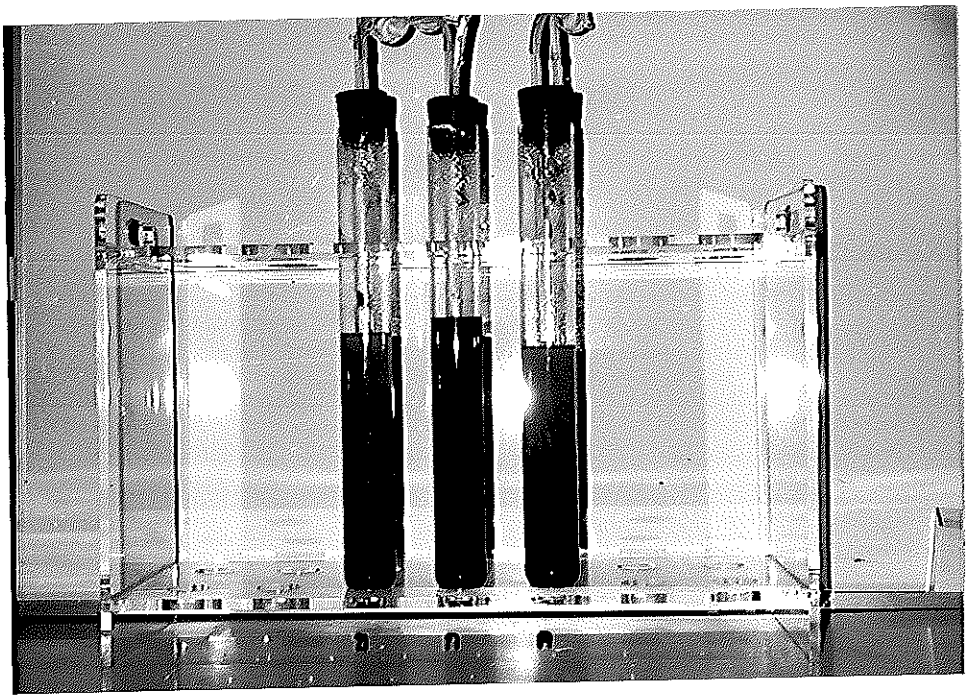
ลักษณะเซลล์ในน้ำทิ้งซึ่งเติมฟอสฟอรัส พบว่า เซลล์มีการจับเป็นกลุ่มอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 4 วัน (รูปที่ 16) และเมื่อตั้งทิ้งไว้เซลล์มีการตกตะกอนภายในเวลา 2-3 นาที สาหร่ายซึ่งเติมทั้งปริมาณไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและโพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 30 มิลลิกรัมต่อลิตร สีของเซลล์ในน้ำทิ้งมีสีเหลืองและมีฟองเกิดขึ้น เซลล์จับกันเป็นกลุ่มเห็นได้ชัด ซึ่งต่างจากสีของเซลล์ซึ่งเลี้ยงในน้ำทิ้งเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 17)

สาหร่ายซึ่งเติบโตในน้ำทิ้งซึ่งเติมแหล่งฟอสฟอรัสทั้ง 3 ระดับมีค่าพีเอชใกล้เคียงกัน (รูปที่ 15) ที่การเลี้ยงเป็นเวลา 2 วันจนสิ้นสุดการทดลอง โดยมีพีเอชขึ้นลงอยู่ในช่วง 6.5-6.7 และมีการเปลี่ยนแปลงของพีเอชน้อยกว่าการเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งเพียงอย่างเดียว เป็นผลเนื่องจากฟอสฟอรัสมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ จึงเป็นตัวช่วยปรับพีเอชให้มีค่าคงที่ (Richmond, 1968 ; Hosakul, 1972)

6. ศักยภาพในการบำบัดน้ำทิ้ง และคุณค่าทางอาหารของสาหร่าย

6.1 ศักยภาพในการบำบัดน้ำทิ้ง

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำทิ้งและน้ำทิ้งซึ่งเติมโซเดียมไนเทรตหลังการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 (รูปที่ 18-20 และตารางภาคผนวกที่ ค3.) พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงทั้งในน้ำทิ้งและน้ำทิ้งซึ่งเติมโซเดียมไนเทรต มีค่าต่างๆ ลดลง ดังนี้ หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน ค่าซีโอดีลดลงจาก 450 และ 548 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 168 และ 195 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 63 และ 64 ตามลำดับ (รูปที่ 18) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดลดลงจาก 105 และ 109 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 2.7 และ 2.8 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 97 (รูปที่ 18) ส่วนปริมาณไนเทรตลดลงเกือบทั้งหมด (รูปที่ 19) ปริมาณแอมโมเนียลดลงจาก 42 และ 49 เหลือ 0.18 และ 0.18 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 99 (รูปที่ 19) ปริมาณฟอสเฟตลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง

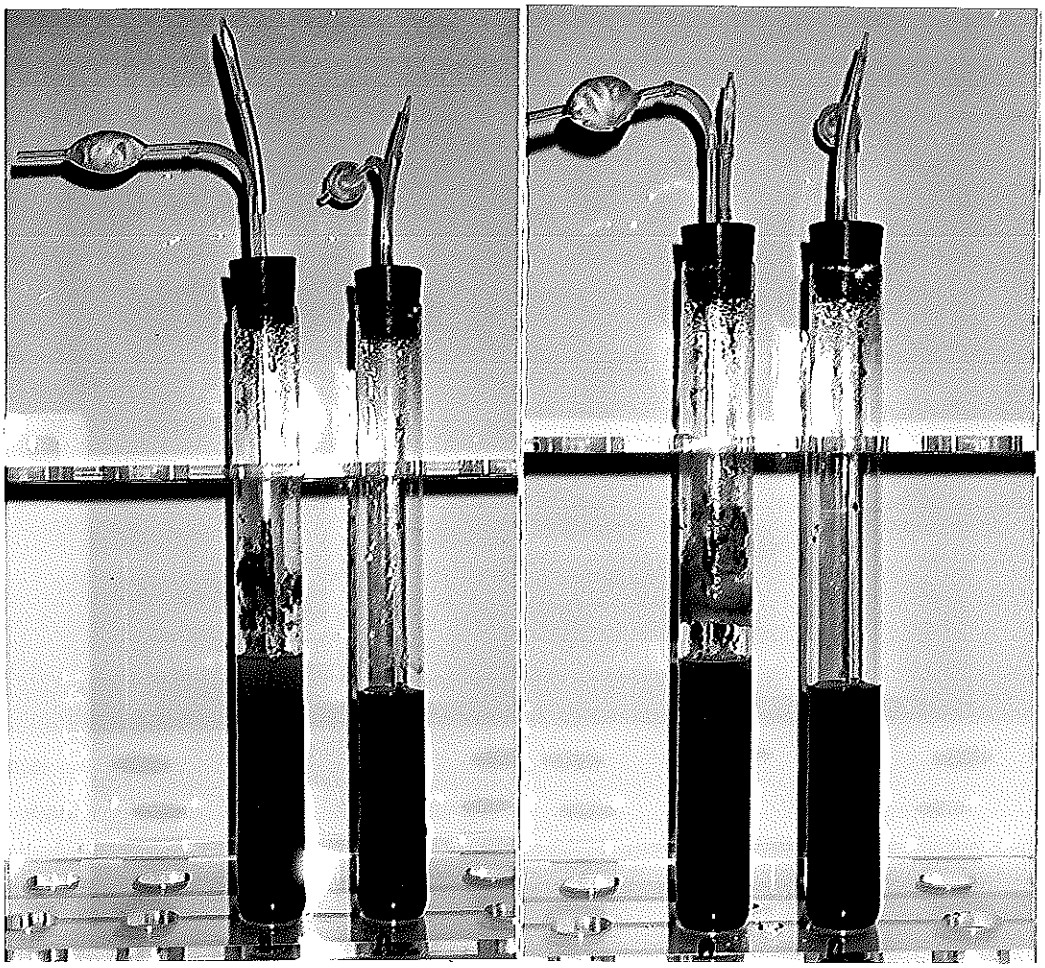


รูปที่ 16 ลักษณะการตกตะกอนของ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลและในน้ำทิ้ง ซึ่งเติมโซเดียมไนเทรต 85 มก/ล และแหล่งฟอสฟอรัสที่ระยะเวลาเลี้ยง 4 วัน

ก น้ำทิ้ง

ข น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ + KH_2PO_4 30 มก/ล

ค น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ + K_2HPO_4 30 มก/ล

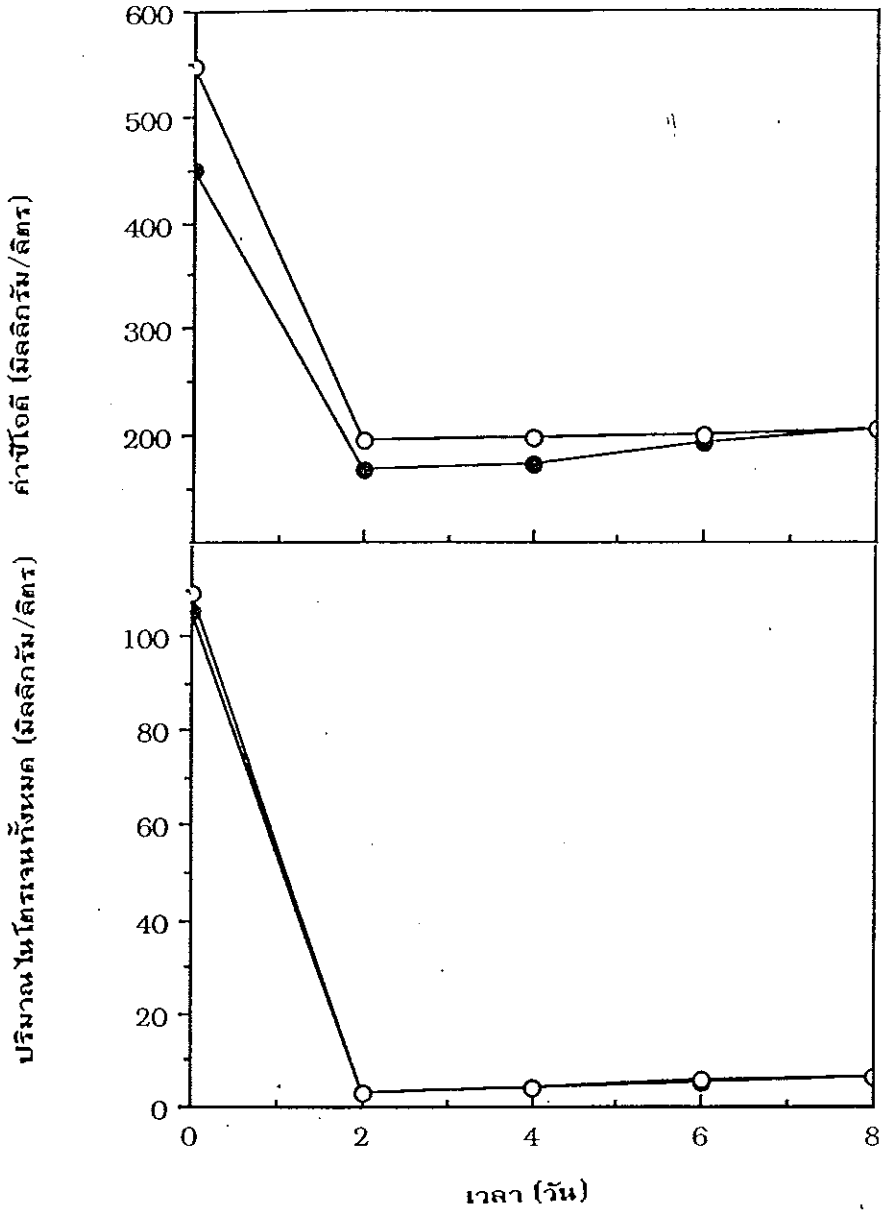


รูปที่ 17 ลักษณะของ *Chlorella* sp. T9 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลซึ่งเติมและไม่เติมโซเดียมไนเทรต 85 มก/ล และแหล่งฟอสฟอรัสที่ระยะเวลาเลี้ยง 12 วัน

ก น้ำทิ้ง

ข น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ + K_2HPO_4 30 มก/ล

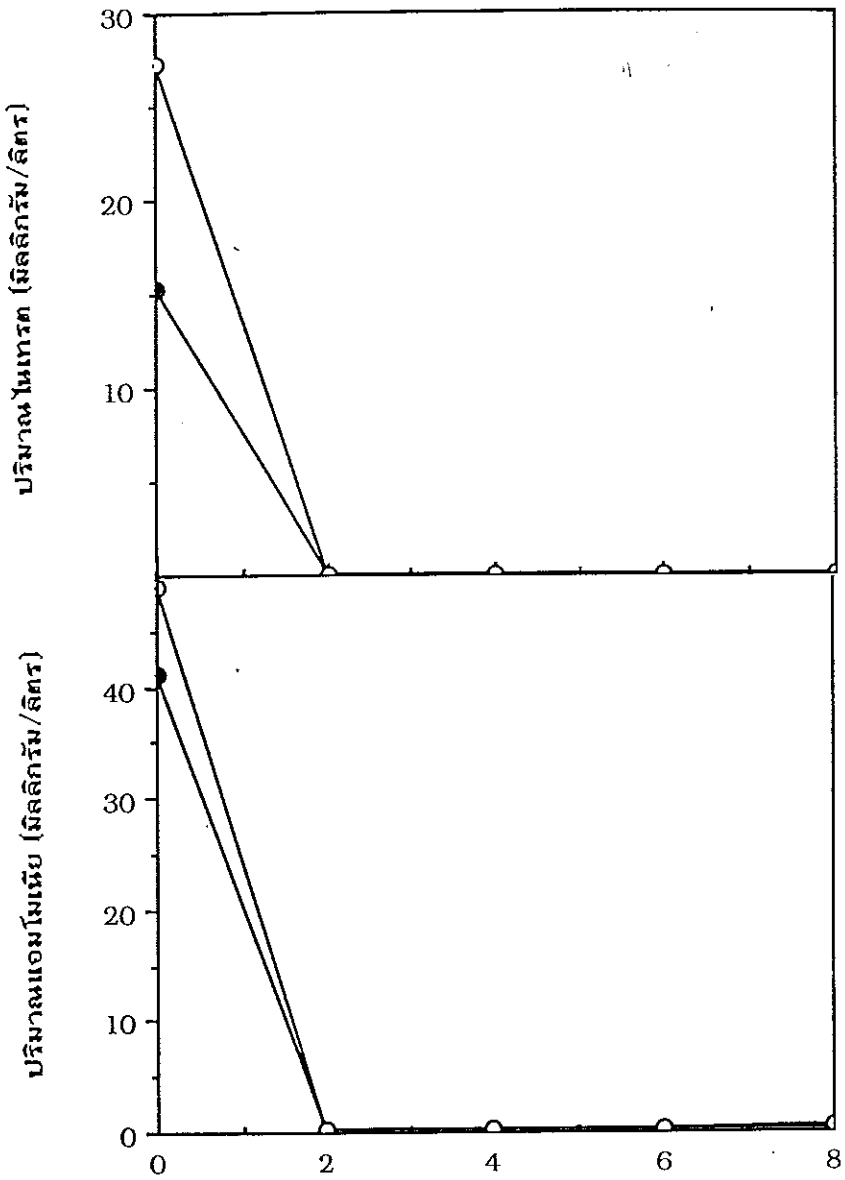
ค น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ + KH_2PO_4 30 มก/ล



รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงของค่าซีโอดี และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล ที่เติมและไม่เติม $NaNO_3$ ระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 เป็นเวลา 8 วัน

—●— น้ำทิ้ง

—○— น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ 85 มก/ล



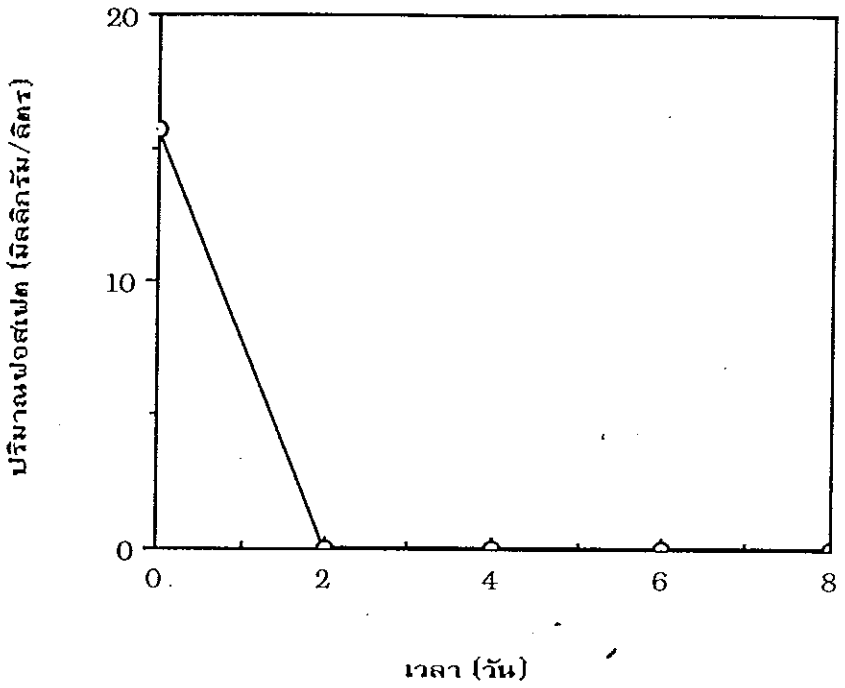
รูปที่ 19 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเทรตและแอมโมเนียในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลที่เติมและไม่เติม $NaNO_3$ ระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 เป็นเวลา 8 วัน

—●— น้ำทิ้ง

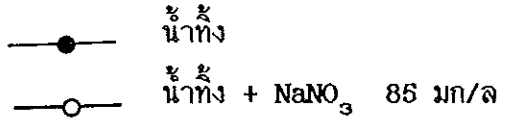
—○— น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ 85 มก/ล

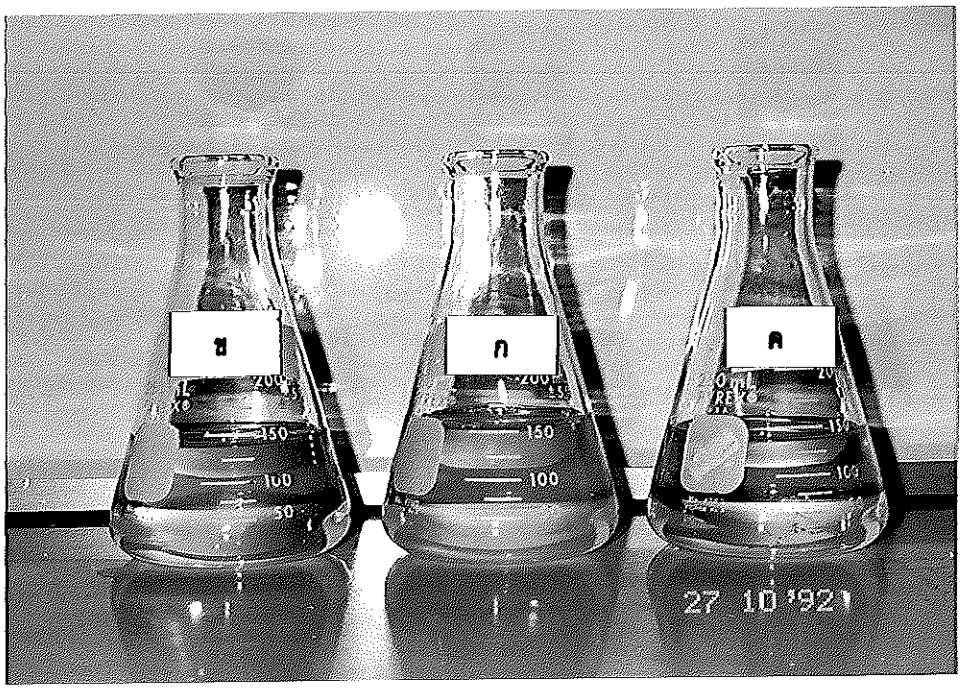
(รูปที่ 20) พบว่า หลังจากการเลี้ยง 2 วัน มีปริมาณฟอสเฟตลดลงจาก 16 เหลือ 0.01 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 99.9

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด แอมโมเนียมและซีโอดีเพิ่มขึ้นเล็กน้อย หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนสิ้นสุดการทดลอง (8 วัน) โดยพบว่า ระยะเวลาเลี้ยง 8 วัน มีค่าไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 6.21 และ 5.97 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียมีค่าเท่ากับ 0.34 และ 0.38 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าซีโอดีเท่ากับ 205 และ 205 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการตายของสาหร่าย ซึ่งสังเกตพบว่า น้ำที่ไม่ผ่านการเลี้ยงสาหร่ายจะไม่ใสและมีกลิ่น เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำซึ่งผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน จะมีลักษณะใสและไม่มีกลิ่น (รูปที่ 21) ส่วนน้ำหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 8 วันมีลักษณะขุ่นและมีสีเล็กน้อย (รูปที่ 22) และมีกลิ่น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเซลล์แตกทำให้สีเขียวของคลอโรฟิลล์ภายในเซลล์ปะปนออกมา ดังนั้นถ้าต้องการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์ควรเก็บเซลล์หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน ซึ่งให้ศักยภาพสูงสุด เช่นเดียวกับการเลี้ยง *Chlorella* sp. K_3 ในน้ำแช่ถั่วเหลือง 1 วัน พบว่าค่าบีโอดีลดลงร้อยละ 65 และ 2 วันค่าบีโอดีลดลงร้อยละ 95 (หยกแก้ว ยามาลี และคณะ, 2525) แต่ Boongorsrang และคณะ (1986) เลี้ยง *Chlorella* sp. ในน้ำทิ้งจากบ้านเรือนที่ผ่านการบำบัดแล้ว มีค่าไนโตรเจน 10-30 มิลลิกรัมต่อลิตร และฟอสฟอรัส 1.2-10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน สาหร่ายมีศักยภาพในการกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสสูง โดยมีค่าที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 5.57 และ 1.08 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ต่อวัน ส่วน Przytocka - Jusiak และคณะ (1984) เลี้ยง *Chlorella vulagaris*/AA ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตไนโตรเจนบริสุทธิ์ พบว่าสาหร่ายใช้แอมโมเนียได้ดีคิดเป็นร้อยละ 94-99 ในวันที่ 3 ของการเลี้ยง ส่วนค่าฟอสเฟตลดลงในวันที่ 2 ของการเลี้ยง และวันที่ 3 ปริมาณฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เช่นเดียวกับค่าซีโอดี พบว่า ค่าจะลดลงในช่วง 2 วันแรก จากนั้นจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังนั้นการใช้สาหร่ายในการบำบัดน้ำทิ้งควรปล่อยน้ำลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติหลังจากเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 2 วัน



รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณฟอสเฟตในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลที่เติมและไม่เติม $NaNO_3$ ระหว่างการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 เป็นเวลา 8 วัน



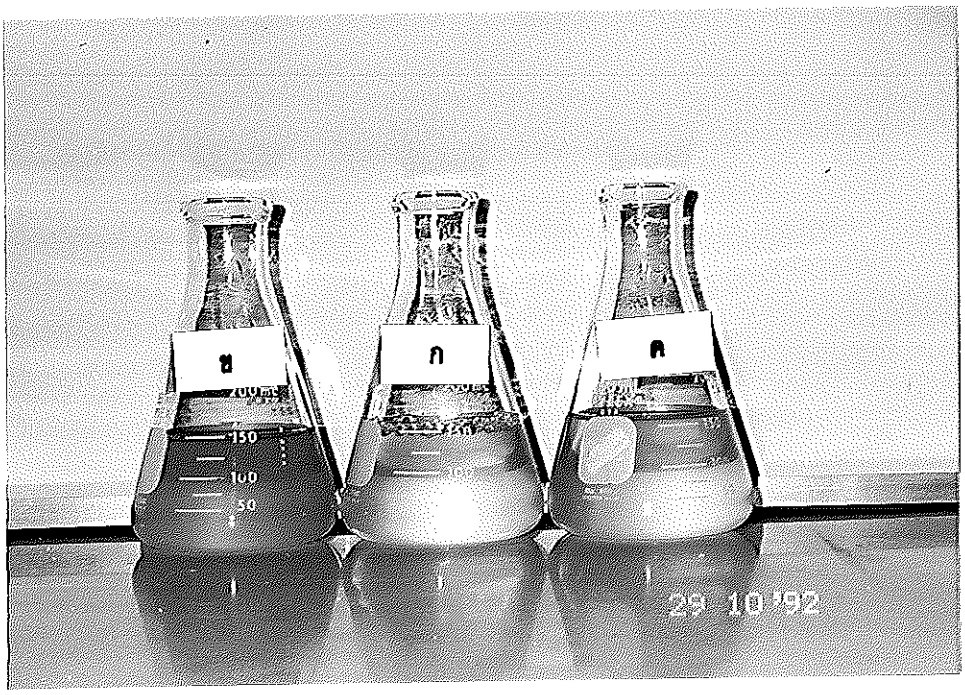


รูปที่ 21 ลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลก่อนและหลังการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 เป็นเวลา 2 วัน

ก น้ำทิ้งก่อนการเลี้ยง

ข น้ำทิ้งหลังการเลี้ยง

ค น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ หลังการเลี้ยง



รูปที่ 22 ลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลก่อนและหลังการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 เป็นเวลา 8 วัน

ก น้ำทิ้งก่อนการเลี้ยง

ข น้ำทิ้งหลังการเลี้ยง

ค น้ำทิ้ง + $NaNO_3$ หลังการเลี้ยง

6.2 คุณค่าทางอาหารของ *Chlorella*

ผลการวิเคราะห์ คุณค่าทางอาหาร พบว่า *Chlorella* sp.T9 ซึ่งเลี้ยงในน้ำทิ้ง และน้ำทิ้งซึ่งเติมโซเดียมไนเทรต ให้ปริมาณโปรตีนร้อยละ 33.3 และ 30.6 ตามลำดับ โดยมีค่าต่ำกว่าสาหร่ายซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ซึ่งให้ปริมาณโปรตีนร้อยละ 46.4 หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ทั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของชิต ชัยสังฆะ และไพศาล รัตนปฏิมากร (2525) ที่เลี้ยง *Chlorella* sp. ในน้ำทิ้งจากการหมักแก๊สชีวภาพ หลังการเลี้ยง 10 วัน ให้ปริมาณโปรตีน 39.3 เป็นผลเนื่องจากการเลี้ยงในแหล่งอาหาร และสภาวะแวดล้อมต่างกัน ซึ่งมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของ *Chlorella* sp. (Richmond, 1986) จากการศึกษาครั้งนี้เก็บเกี่ยวสาหร่ายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดสภาวะการขาดแคลนไนโตรเจน สำหรับการเติบโตของสาหร่ายในน้ำทิ้ง เป็นผลทำให้สาหร่ายย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ทำให้ไนโตรเจนภายในเซลล์ลดลงและเกิดสะสมสารประกอบคาร์บอน เช่น การสะสมไลปิดและ คาร์โบไฮเดรต (Richmond, 1986) เช่นเดียวกับการเลี้ยง *Chlorella* sp. K_3 ในน้ำแช่ถั่วเหลือง ซึ่งมีความเข้มข้นแตกต่างกันจะให้ปริมาณโปรตีนแตกต่างกัน และให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด หลังจากการเลี้ยง เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นปริมาณโปรตีนค่อย ๆ ลดลง (หยกแก้ว ยามาลี และคณะ 2525)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในเซลล์ของ *Chlorella* sp. T9 หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน พบว่า เซลล์มีการสะสมโลหะหนัก คือ เหล็กในปริมาณสูงทั้งในเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้ง และน้ำทิ้งซึ่งเติมโซเดียมไนเทรต มีค่าเท่ากับ 0.05 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ รองลงมา คือ ทองแดง มีค่าเท่ากับ 0.04 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ แต่ไม่พบโครเมียมและแคดเมียมในเซลล์ของสาหร่าย ซึ่งตามมาตรฐานของ ไอยูแพ็ก (IUPAC) กำหนดค่าแคดเมียมไม่เกิน 1.00 มิลลิกรัมต่อกรัม ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ส่วนปริมาณทองแดงที่พบนี้น้อยกว่าปริมาณที่สะสมในเซลล์ของสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากบ้านเรือน ซึ่งมีปริมาณ ทองแดงสะสม 24.20 มิลลิกรัมต่อกรัม (Richmond, 1986)

บทสรุป

1. การศึกษาชนิดและแยกสาหร่ายขนาดเล็กที่พบในน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปอาหารทะเล พบสาหร่าย 4 ดิวิชั่น 12 สกุล แต่มีเพียงชนิดเดียวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในปัจจุบัน คือ *Chlorella* sp. และสามารถแยก *Chlorella* sp. ได้ 3 สายพันธุ์คือ T7 T9 และ T12

2. การคัดเลือก สายพันธุ์ *Chlorella* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III โดยเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ ช่วงสว่าง : ช่วงมืด เท่ากับ 16:8 ให้อากาศตลอดเวลา ผลปรากฏว่า *Chlorella* sp. T9 มีการเติบโตให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.95 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยง 14 วัน

3. จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำทิ้งจากบ่อที่ 7-12 ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด พบว่า น้ำทิ้งจากบ่อที่ 9 มีความเหมาะสมต่อการที่จะนำมาเลี้ยงสาหร่าย โดยน้ำทิ้งนี้มีค่าซีโอดี 450 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 105 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณไนเทรต 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณฟอสเฟต 16 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอมโมเนียม 42 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. ผลการเปรียบเทียบการเติบโตของ *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III และ น้ำประปา พบว่า สาหร่ายเติบโตในน้ำทิ้งได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III และน้ำประปา โดยให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.7 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยง 18 วัน เซลล์มีสีเขียวเข้มมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ซึ่งให้เซลล์สีเขียวอมเหลือง ส่วนการเลี้ยงในน้ำประปาเซลล์มีสีซีดจางและตายที่ระยะเวลาเลี้ยง 2 วัน และจากการทดลองเติมโพแทสเซียมไนเทรตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III พบว่าที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเทรต 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ของสาหร่ายมีสีเขียวเข้มขึ้นมากกว่าในการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เพียงอย่างเดียว และ มีสีเซลล์ใกล้เคียงกับสีเซลล์ในน้ำทิ้ง

5. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณมวลชีวภาพของ *Chlorella* sp. T9 พบว่า การเลี้ยง *Chlonella* sp. T9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ความเข้มแสงที่เหมาะสม คือ 5,200 ลักซ์ ให้ปริมาณเซลล์ 2.2 กรัมต่อลิตร และผลของการเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้ง ซึ่งเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 2 ร่วมกับการให้อากาศร้อยละ 98 เป็นผลให้ระยะเวลาการเลี้ยงสาหร่ายลดลงเกือบครึ่งหนึ่ง (จากเดิม 18 วันเหลือเพียง 10 วัน) และได้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 3.24 กรัมต่อลิตร ส่วนการเติมโซเดียมไนเทรตที่ความเข้มข้น 85 มิลลิกรัมต่อลิตร (คิดเป็นไนโตรเจนร้อยละ 1.75) ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเพิ่มขึ้นเป็น 5.4 กรัมต่อลิตร แต่การเติมฟอสฟอรัสไม่มีผลต่อการเติบโตและการเพิ่มปริมาณเซลล์ของสาหร่าย และจะทำให้เซลล์จับกันเป็นกลุ่มตกตะกอนได้ง่าย เซลล์ในน้ำทิ้งมีสีเหลืองและมีฟองเกิดขึ้น

6. การบำบัดน้ำทิ้งด้วย *Chlorella* sp. T9 พบว่า ประสิทธิภาพในการบำบัดสูงสุดที่ระยะเวลาเลี้ยง 2 วัน ซึ่งคุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ ซีโอดี ไนโตรเจนทั้งหมด แอมโมเนีย ไนเทรต ไนไตรท์ และฟอสเฟต มีปริมาณลดลงคิดเป็นร้อยละ 60-99

จากการวิเคราะห์โปรตีนและโลหะหนักในเซลล์ของสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งและน้ำทิ้งที่เติมโซเดียมไนเทรต พบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 33 และ 30 ตามลำดับ และมีเหล็กในปริมาณเท่ากับ 0.05 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกรัม ทองแดงในปริมาณ 0.04 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ไม่พบโครเมียมและแคดเมียม

ข้อเสนอแนะ

1. ปริมาณมวลชีวภาพและปริมาณโปรตีนของ *Chlorella* sp. T9 ที่ได้ยังต่ำ จึงควรหาวิธีการเพิ่มปริมาณมวลชีวภาพและปริมาณโปรตีน โดยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ *Chlorella* sp. T9 เพิ่มเติม เช่นอาจเพิ่มความเข้มแสงสูงขึ้น การเติมแหล่งฟอสฟอรัสเพียงอย่างเดียวเปรียบเทียบกับการเติมแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เป็นต้น และตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ในระหว่างการเติบโต เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของเซลล์ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม

2. การเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ควรมีการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ ตามมาตรฐานของ IUPAC ก่อนนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรุงเทพ, ธนาคาร. ส่วนวิจัยเศรษฐกิจ. 2533. ผลิตภัณฑ์ประมง. ว.เศรษฐกิจ. 22 (2) : 80-87.

จรูญ ลีไตรรงค์. 2531. การนำ *Chlorella* sp. K_3 ที่ได้จากการเลี้ยงในน้ำกากส่าเหล้าเพื่อเป็นอาหารของ *Moina macrocopa* Straus. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 168 หน้า.

จารุวรรณ หวะสุวรรณ. 2532. การกำจัดและใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงร่วมกับ heterotrophic bacteria. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์. 128 หน้า.

ชิต ชัยสังฆะ และ ไพศาล รัตนปฏิมากร. 2525. การใช้น้ำทิ้งจากการหมักแก๊สชีวภาพเพื่อเป็นอาหารเลี้ยงสาหร่าย. ปริญญานิพนธ์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า วิทยาเขตธนบุรี. 45 หน้า.

ดวงพร คันธโชติ. 2528. โปรตีนเซลล์เดียว. ว. คณะครุศาสตร์ อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์. 4(1):85-100.

ธิดา วีระสกุล และ นิเวศน์ เรืองพานิช. 2517. การทดลองเลือกใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับแพลงตอนพืช รายงานประจำปี 2516-2517. สถานีประมงทะเลสงขลา. หน้า 145-152.

นิตยา พงศ์พีรโชค และ พิมพรรณ ตันสกุล. 2528. พรรณสาหร่ายน้ำจืด ในเขตจังหวัดปัตตานี. ว. สงขลานครินทร์. 8(3): 287-293.

พูนทรัพย์ วิรุฬหกุล. 2534. การส่งออกสินค้าสัตว์น้ำ. ว. อุตสาหกรรมเกษตร. 2: 79-89.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และ ประกฤติ สุขสวัสดิ์. 2525. การผลิต Single cell protein จากน้ำทิ้งโรงงานสุรา. ว. สงขลานครินทร์. 4: 138-143.

พิมพรรณ ตันสกุล. 2528. พรรณสาหร่ายน้ำจืดในเขตจังหวัดสงขลา. ว. สงขลานครินทร์. 7: 279-282.

พิมพรรณ ตันสกุล และ อารักษ์ จันทศิลป์. 2531. การเพาะเลี้ยง *Spirulina* sp. ในน้ำทิ้งโรงงานยางพารา. ว. สงขลานครินทร์. 10: 149-155.

ภิมุข รักชนาม. 2534. การเก็บรวมบรวมพรรณสาหร่ายขนาดเล็กจากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปอาหารทะเล. โครงงานทางชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 32 หน้า.

วงศ์เมือง หงสกุล. 2530. คลอเรลลา อภิโภชนาสารจากพลังงานแสงอาทิตย์และนานาประโยชน์. กรุงเทพฯ: เพชรสยาม. 30 หน้า.

วิสัย วงศ์สายปิ่น. 2534. สาหร่ายเซลล์เดียว สารอาหารจากแสงตะวัน. กรุงเทพฯ: รวมทรรศ์. 137 หน้า.

วีระ วัชรกรโยธิน, ทัศนีย์ สุขสวัสดิ์ และ สุภานี นวลศรี. 2526. การศึกษาการเจริญเติบโตของ *Chlorella* sp. (K_3) โดยการใช้ปุ๋ยชนิดต่าง ๆ. สถานีพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลา. ปทุมธานี. 11 หน้า.

ศิริลักษณ์ สุวรรณรังษี. 2533. เป้าหมายการส่งออกสินค้าประมงปี 2533. ว.การประมง. 43(1): 63-66.

หยกแก้ว ยามาลี, วิเชียร ยามนิตชัย, สมบูรณ์ ผู้พัฒน์, กัญญา สุจริตวงศานนท์, ไปรมา ภัทรกุลพงษ์ และ ไพลิน ผู้พัฒน์. 2525. การกำจัดน้ำทิ้งจากนมถั่วเหลืองโดยใช้สาหร่ายสีเขียว (*Chlorella* sp.) สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 1-32.

หยกแก้ว ยามาลี, สมบูรณ์ ผู้พัฒน์, กัญญา สุจริตวงศานนท์, วิเชียร ยงมานิตชัย และ ไปรมา ภัทรากุลพงษ์. 2526. การนำ *Chlorella* sp. ที่ได้จากการเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลืองมาเลี้ยงไรแดง. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 1-30.

Abeliovich, A. 1980. Factors Limiting Algal Growth in High-Rate Oxidation Ponds. Algae Biomass. 205-215.

Abu-Rezeq, T. and James, C.M. 1985. Production and Nutritional Quality of the Rotifer *Brachionus plicatilis* in Relation to Different *Chlorella* sp. Cell Denstites. ANNU. RES. REP. KUWAIT INST. SEC. RES. 10: 30- 34.

Alias, AZ. 1988. Effect of Salinity and Light Intersity on the Growth of *Chlorella virgineca*. Pertanika. 11(3):459-474.

A.O.A.C. 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemists, 14th ed. the Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C. 1015 pp.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis of Association of Official Chemists, 15th ed.1 the Association of Official Analytical Chemists. Verginia. 648 pp.

APHA, AWWA and WPCF. 1975. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Pulic Health Assoc. New York. 1200 pp.

APHA, AWWA and WPCF. 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Pulic Health Assoc. Washington D.C. 1193 pp.

Becker, E.W. and Venkataraman, L.V. 1982. Biotechnology and Exploitation of Algae - The Indian Approach. German Agency for Technical Cooperation (GTZ), Eschborn. 216 pp.

Becker, E.W. and Venkataraman, L.V. 1984. Production and Utilization of the Blue Green Algae *Spirulina* sp. in

India. Biomass. 4: 105-125.

Bhumiratana, A., Payer, G.D., Feldheim w., Phithakpol, B., Polsiri, A., Prabharalesa, C., Kongpanichkul, C., Thananunkul, D., Duerr, C,M., Hosakul, K., Kugler, F. Kugler, M., Kraidej, L, and Chiemichak, Y. 1972. Algal Project. Institute of Food Research and Product Development. Kasetsart University, Bangkok. 41 pp.

Bhumiratana, A., Kugler, F., Phithakpol, B., Nquitragool, M., Polsiri, A., Prabharaksa, C., Kongpanichkul, C., Thananunkul, D., Kugler, M., Kraidej, L., Prabhavat, M., Kornkasem, P., Paramadilok, P., Karuewana, P., Patarakulpong, P., Reungmanipytoon, S., Chavana, S., Nakareseisoon, S. and Somchit W, 1974. Algal Projcet. Institute of Food Research and Product Development. Kasetsart University, Bangkok. 15 pp.

Boongorsrang, A., Thongtong, T., Yamali, Y. and Sitachitta, C. 1986. Nitrogen and Phosphorus Removal Efficiencies of Different Algae for Wastewater Treatment Purpose, Microbial Utilization of Renewable Resources Vol. 5 NRCT, NUS, NSTA - JSPS Joint Seminar on Biotechnology, November 20 - 22, 1986, Osaka, Japan. p. 268-273.

Burris, J.E., Wedge, R. and Lane, A. 1981. Carbondioxide Limitation of Photosynthesis of Freshwater Phytoplankton. J. Freshwater Ecology. 1(1): 81-96.

Calleja, G.B., Yoguchi, M., Levy - Rick, S., Seguin, J.R.H., Roy, C. and Lusena, C.V. 1986. Single - cell Protein Productuon From Potato Starch by the Yeast *Schwanniomyces alluvius*. J. Ferment. Technol. 64(1): 71-75.

Chaudhari, P.R., Krishnamoorthi, K.P. and Vittalrao, M. 1980. Growth Potential of *Spirulina* sp. a Blue Green Algae in Sewage, Proc. Indian Acad Sci. (Plant Sci.) 89: 203-211.

Dam, R., Lee, S., Fry, P.C. and Fox, H. 1965. Utilization of Algae as a Protein Source for Humans. J. Nutrition. 86: 376-382.

Darley, W. M. 1982. Algae Biology: a Physiological Approach. Butler and Tanner, London. 168 pp.

De la Noue, J. and Basseres, A. 1989. Biotreatment of Anaerobically Digested Swine Manure with Microalgae. Biological Wastes. 29 : 17 - 31.

Ellis, R., Moore, D. and Shure, R. 1981. Characteristics of Chlorophyll Formation in the Green Algae Golenkinia. Plant and Cell Physiol. 22(6): 999-1009.

Fritsch, F.E. 1975. The Structure and Reproduction of The Algae Volume 1. Cambridge University Press, Cambridge. 791 pp.

Govindan, V.S. 1983. Studies on Sago Mill Waste - Water by Stabilization Pond Method. IAWPC Tech. ANNU. 10 :115-120.

Govidan, V.S. and Sundaralingan S.V. 1979. Studies on the Treatment of Textile Mill Waste Water Stabilization Pond Method. India J. Environ. Health. 24(4) : 321-331.

Hosakul, K. 1972. The Selection and Growth Characteristics of Some Local Microalgae Tolerating High Temperature. Master of Science in Microbiology, Kasetsart University. 92 pp.

Kobayashi, M. and Kurata, S. 1978. The Mass and Cell Utilization of Photosynthetic Bacteria. Process Biochem. 13(9): 27-30.

Kosaric, N., Nguyen, H.T. and Bengognou, M.A. 1974. Growth of *Spirulina maxima* Algae in Effluents from Secondary Waste - Water Treatment Plant. Biotechnol. Bioeng. 16 :881-869.

Kumar, H.D. and Singh, H.N. 1971. A Textbook on Algae. Affiliated East - West Press PVT. Ltd. New Delhi, India. 200 pp.

Lee, H. Y., Lee, S. Y. and Park, B. K. 1989. The Estimation of Algal Yield Parameters Associated with Mixotrophic and Photoheterotrophic Growth under Batch Cultivation. Biomass. 18: 153-160.

Loehr, R.C. 1974. Agricultural Waste Management. Academic Press, New York. 576 pp.

Lubitz, J.A. 1963. The Protein Quality, Digestibility and Composition of Algae, *Chloerlla* 71105. J. Food Science. 28: 229-232.

Malis-Arad, S. and McGowan, R.E. 1982. Alkalinity - Induced Aggregation in *Chlorella vulgaris* II. Changes in the Cell Wall during the Cell Cycle. Plant and Cell Physiol. 23(1) : 11-17.

Miyachi, S. and Shiraiwa, Y. 1979. Form of Inorganic Carbon Utilized for Photosynthesis in *Chlorella vulgaris* 11h

Cells. Plant and Cell Physiol. 20(2): 341-348.

Nakamura, Y. and Miyachi, S. 1982. Effect of Temperature on Starch Degradation in *Chlorella vulgaris* 11h Cells. Plant and Cell Physiol. 23(2): 333-341.

Nakayama, O. 1975. Actions of Microalgae in Anaerobic Enviroments. Proceedings of The First Intersectional Congress of IAMS. Science. Cowncil of Japan. 2 : 507-511.

Novak, J.T. and Brune, D.E. 1985. Inorganic Carbon Limited Growth Kinetics of Some Freshwater Algae. Water Res. 19(2): 215-225.

Payer, H.D. 1971. Algal Project. Institute of Food Research and Product Development. Kasetsart University, Bangkok. 8-23.

Pipes, W.O. and Koutsoyannis, S.P. 1962. Light - Limited Growth of *Chlorella* in Continuous Cultures. Appl. Microbiol. 10:1-6.

Pirt, S.J. 1975. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 274 pp.

Pouliot, Y., Buelna, G., Racine, C. and De la None, J. 1989. Culture of Cyanobacteria for Tertiary Wastewater Treatment and Biomass Production. Biological Wastes. 29: 81-91.

Prasertsan, P., Wuttijumnong, P., Sophanodora, P. and Choorit, W. 1988. Seafood Processing Industries within Songkla - Hatyai Region: The Survey of Basic Data Emphasis on Wastes. Songklanakarin J. Sci. Technol. 10 (4): 447-452.

Prescott, G.W. 1962. Algae of The Western Great Lake Area. Wm. C. Brown Co., Inc., lowa. 972 pp.

Prescott, G.W. 1980. How to Know the Freshwater Algae. Wm. C. Brown co., Inc., Iowa. 293 pp.

Przytocka - Jusiak, M., Duszota, M., Matusiak, K. and Mycielski, R. 1984. Intensive Culture of *Chlorella vulgaris*/AA as The Second Stage of Biological Purification of Nitrogen Industry Wastewaters. Water Res. 18(1) : 1-17.

Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Inc. Boca Raton Florida. 528 pp.

Sadakane, H., Ishibashi, K., Yoshimato, M. and Hatano, S. 1981. Effect of Low Temperature, Light and O_2 on Chlilling-sensitive and-resistant Strains in *Chlorella ellipsoidea*. Plant and Cell Physiol. 22(4): 657-666.

Santos, J., Gomez, G. and Alexander, J.C. 1988. Production of Fungal Protein from Rasped Fresh Cassava Roots Using 200 and 3,000 liter Fermentors. Ani. Feed Sci. and Technol. 8: 313-324.

Sasaki, K., Noparatnaraporn, N., Hayashi, M. Nishizawa, Y. and Nagai, S. 1981. Single - cell Protein Production by Treatment of Soybean Wastes with *Rhodopseudomonas gelatinosa*. J. Ferment. Technol. 59(6): 471-477.

Saxena, P. N., Ahmand, M. R., Shyam, R. and Amla, D.V. 1983. Cultivation of Spirulina in Sewage for Poultry Feed. Experientia. 39 : 1077 - 1083.

Silva, M.E.S.T. and Nicoli, J.R. 1985. Production and Nutritive Value of Single Cell Protein from *Fusarium oxysporum* var. lini. Grown in Vinasse. J. Ferment. Technol. 63(1):91-94.

Steenblock, D. 1987. Chlorella Natural Medicinal Algal. Aging Research Institute. El Toro, California. 50 pp.

Stein, J.R. 1973. Handbook of Phycological Methods Culture Methods and Growth Measurements. Cambirdge University Press. New York. p. 7 -180.

Strickland, J.D.H. and Parson, T.R. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis, Fisheries Research Board of Canada. Ontario. p. 49 - 135.

Taiwan chlorella. 1964. *Chlorella*. Taiwan Chlorella Manufacture CO., Ltd. R.O.C. Taipei Taiwan. 16 pp.

Takada, H. and Hirokawa, T. 1978. Studies on the Cell Wall of Chlorella I. Quantitative Changes in Cell Wall Polysaccharides during the Cell Cycle of *Chlorella ellipsoidea*. Plant and Cell Physiol. 19(4): 591-598.

Theriaulte, R.J. 1965. Heterotrophic Growth and Production of Xanthophylls by *Chlorella pyrenoidosa*. Appl. Microbiol. 13(3): 402-416.

UNESCO. 1983. Chemical Methods for Use in Marine Enviromental Monitoring. UNESCO. 53 pp.

Vonshak, A. 1990. Recent Advances in Microalgal Biotechnology. Biotech. Adv. 8 : 709-727.

Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Arad, S. and Richmond, A. 1982. On the Production of *Spirulina* Biomass: Effects of Environmental factors and of the Population Density. Biomass. 2: 175-185.

Vonshak, A. and Borowitzka, M.A. 1991. Mass Culture of Microalgae Laboratory Manual. Research Seminar and Workshop, November, 1991. Silpakorn University Nakornphatom Thailand. p.8-9.

Waslien, C. I., Colloway, D.H., Morgan, S. and Costa, F. 1970. Uric Acid Levels in Men Fed Algae and Yeast as Protein Sources. J. Food Science. 35: 294-298.

Whitford, L.A. and Schumacher, G.J. 1973. A Manual of Fresh-Water Algae. Spark Press, Religh, North Carolina. 342 pp.

Wikfors, G.H. 1986. Altering Growth and Gross Chemical Composition of Two Microalgal Molluscan Food Species by Varying Nitrate and Phosphate. Aquaculture. 59 : 1-14.

William, D.P. 1986. The World of Biology. The Dryden Press, New York. 831 pp.

Wong, P.K. and Chan, K.Y. 1990. Growth and Value of *Chlorella salina* Grown on Highly Saline Sewage Effluent. Agric. Ecosyst. Environ. 30(3-4): 235-253.

Zhihui, H, Liguang, Y. and Yi, Z. 1988. Effect of Food Condition on the Growth Reproductive Ability and Intrinsic Rate of Increase of *Moina mongolica* Daday. J. Dalian Fish. Coll/ Dalian Shuichan Xueyuan Xuebao. (3-4): 21-28.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย

1. NS III medium (Payer, 1971)

ปริมาณธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง ที่เตรียมจาก stock solution แบ่งตามชนิดอาหารว่าเป็นอาหารแข็ง หรืออาหารเหลว ดังแสดงไว้ ดังนี้

	อาหารแข็ง (มิลลิลิตร)	อาหารเหลว (มิลลิลิตร)
1. ธาตุอาหารหลัก		
KNO_3	10	2.0
KH_2PO_4	2	0.4
$K_2HPO_4.3H_2O$		
$MgSO_4.7H_2O$	2	0.4
$CaCl_2.2H_2O$	2	0.4
NaCl	2	0.4
2. ธาตุอาหารรอง		
Micro A	2	0.2
Micro B	2	0.2
Micro C	2	0.2
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร		
พีเอช	6.4	

วิธีการเตรียม stock solution ของธาตุอาหารหลัก

KNO_3	100	กรัม/1,000 มล.
KH_2PO_4 120 กรัม และ K_2HPO_4	142	กรัม/1,000 มล.
$MgSO_4.7H_2O$	6.2	กรัม/100 มล.
$CaCl_2.2H_2O$	0.74	กรัม/100 มล.
NaCl	0.6	กรัม/100 มล.

วิธีการเตรียม stock solution ของธาตุอาหารรอง

1. Micro A

1.1 KBr	595	มก.
KI	415	มก.
LiCl	21.2	มก.
H_3BO_3	77.0	มก.

น้ำกลั่น 1,000 มล. + 3 มล. HCl 35% ——→ 200 มล.

↓

นำมาผสมรวมกัน

↓

1.2 $ZnSO_4.7H_2O$	144	มก.
$NiSO_4.6H_2O$	658	มก.
$CoSO_4.7H_2O$	70	มก.
$CuSO_4.5H_2O$	125	มก.
$Al_2(SO_4)_3.18H_2O$	167	มก.
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	44	มก.
NH_4VO_3	29	มก.

——→ น้ำกลั่น 100 มล + 0.3 มล. HCl 35% ——→ น้ำกลั่น 798 มล.

2. Micro B

$MnCl_2.4H_2O$	50	มก.
น้ำกลั่น	1,000	มล.
HCl (35%)	3	มล.

3. Micro C

$Fe(NO_3)_3.9H_2O$	810 มก.
Titriplex III (EDTA)	750 มก.
น้ำกลั่น	100 มล.

หมายเหตุ ห้ามถูกแสง

2. **Zarrouk'medium** (Becker and Venkataraman, 1984)

$NaHCO_3$	16.8	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$NaNO_3$	2.5	กรัม
K_2SO_4	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	2.0	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.04	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
EDTA	0.08	กรัม
A_5	1	มิลลิลิตร
B_6	1	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นครบ	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	8.5	

วิธีการเตรียม Stock solution ของ A_5 และ B_6

1. A_5 ประกอบด้วย

H_3BO_3	2.860	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	1.810	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.222	กรัม

$CuSO_4.5H_2O$	0.074	กรัม
MoO_3	0.015	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2. B_6 ประกอบด้วย

NH_4VO_3	23	กรัม
$K_2Cr_2(SO_4)_4.24H_2O$	96	กรัม
$NiSO_4.7H_2O$	47.85	กรัม
$Na_2WO_4.2H_2O$	17.94	กรัม
$Ti_2(SO_4)_3$	40	กรัม
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	44	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3. **Beijerick medium** (Stein, 1973)

ประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองที่จะเตรียมจาก Stock Solution

1. ธาตุอาหารหลัก	ปริมาณที่ใช้	
Stock I	100	มิลลิลิตร
Stock II	40	มิลลิลิตร
Stock III	60	มิลลิลิตร
2. ธาตุอาหารรอง	1	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นครบ	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	6.8	

วิธีการเตรียม Stock solution

1. ธาตุอาหารหลัก ประกอบด้วย

-Stock I

NH_4NO_3	1.5	กรัม
K_2HPO_4	0.2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

- Stock II

KH_2PO_4	9.07	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

- Stock III

K_2HPO_4	11.61	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2. ธาตุอาหารรอง ประกอบด้วย

H_3BO_3	1.0	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.15	กรัม
EDTA	5.0	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	2.2	กรัม
$MnCl_2 4H_2O$	0.5	กรัม
$FeSO_4\ 7H_2O$	0.5	กรัม
$CoCl_2\ 6H_2O$	0.15	กรัม
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4. Chu no. 10 (Stein, 1973)

$Ca(NO_3)_2$	0.04	กรัม
K_2HPO_4	0.01	กรัม

$MgSO_4.7H_2O$	0.025	กรัม
Na_2CO_3	0.02	กรัม
Na_2SiO_3	0.025	กรัม
$FeCl_3$	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	6.5-7.0	

5. Rodhe VIII (Stein, 1973)

$Ca(NO_3)_2$	60	มิลลิกรัม
$MgSO_4$	5	มิลลิกรัม
Na_2SiO_3	20	มิลลิกรัม
K_2HPO_4	5	มิลลิกรัม
Ferric citrate	1	มิลลิกรัม
Citric acid	1	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	0.03	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	7.0-7.5	

6. KNO_3 + Na_2 HPO_4 (ธิดา วีระสกุล และ นิเวศน์ เรืองพานิช, 2517)

KNO_3	0.1	กรัม
Na_2 HPO_4	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
พีเอช	6.8-7	

ภาคผนวก ข.

วิธีการวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำทิ้ง

1. ซีโอดี (APHA, AWWA, and WPCF, 1985)

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์กลั่นไหลกลับ

- ขวดกลมขนาด 250 มิลลิลิตร
- เครื่องควบแน่น
- เตาให้ความร้อน (hot plate)

2. บิวเรต

1.2 สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.025 นอร์แมล

ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 12.259 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟามิก (NH_2SO_3H) 0.12 กรัม แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. Sulfuric acid reagent

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 22 กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้นบรรจุขวดขนาด 1 ปอนด์ (2.65 ลิตร) เนื่องจากซิลเวอร์ซัลเฟตละลายยากมาก อาจต้องใช้เวลา 1-2 วัน จึงละลายหมด

3. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.10 นอร์แมล

3.1 การเตรียมสารละลาย

ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$] จำนวน 39 กรัมในน้ำกลั่นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.2 การหาความเข้มข้นของสารละลาย

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต (0.25 นอร์แมล) จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น ไทเทรตด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต เติมเฟอร์โรอิน 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์แมล)} = \frac{\text{ปริมาตรสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (มล.)} \times 0.25}{\text{ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มล.)}}$$

4. สารละลายเฟอร์โรอิน

ละลาย 1-10 ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_8N_2.H_2O$) จำนวน 1.485 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) จำนวน 0.695 กรัม เติมน้ำจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) ชนิดผง

6. เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดผลึกบริสุทธิ์หรือเป็นผง ใช้เป็นตัวกำจัดอนุภาคคลอไรด์ (Cl^-) ในอัตราส่วน $HgSO_4$ ต่อ Cl^- = 10 : 1

7. กรดซัลฟามิก (Sulfamic acid) ใช้ในกรณีที่กำจัดไนไตรท์เท่านั้น

1.3 วิธีการวิเคราะห์

1. เติมเมอร์คิวรีซัลเฟต 0.4 กรัม ลงในขวดกลม

2. เติมตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร และลูกแก้ว (glass beads) 3-5 เม็ด

4. ค่อย ๆ เติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อละลายเมอร์คิวรีซัลเฟต ควรทำให้เย็นขณะเขย่าเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียของสารที่เป็นไอในตัวอย่าง (อาจแช่ในอ่างน้ำ)

5. กลั่นด้วยอุปกรณ์กลั่นไหลกลับ ประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น

6. ไทเทรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เกินพอด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอร์โรอีนเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากเขียวปนน้ำเงินไปเป็นสีน้ำตาลปนแดง

7. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำ ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง (ข้อ 1-6)

$$\text{ซีโอดี (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(A-B) \times N \times 8 \times 1{,}000}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (มล.)}}$$

A คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต blank

B คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์แมล)

2. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method

(A.O.A.C., 1984)

2.1 <u>วัสดุอุปกรณ์</u>

1. ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250-300 มิลลิลิตร
2. อุปกรณ์ให้ความร้อน (Heating mentle)
3. อุปกรณ์กลั่นโปรตีน (Semi-micro distillation apparatus)
4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmyer flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
5. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร

6. ปิเปต

7. บิวเรต

8. ลูกแก้ว

9. กระดาษกรอง

2.2 สารเคมี

1. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)

2. เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$)

- ละลายผงเมอร์คิวรีออกไซด์จำนวน 10 กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้นจำนวน 12 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำ 92 มิลลิลิตร

3. กรดซัลฟูริกเข้มข้น

4. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ร้อยละ 60

- ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 60 กรัม และโซเดียมไธโอซัลเฟต 5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4

6. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์แมล

7. อินดิเคเตอร์

- ละลายเมทิลเรด 0.2 กรัม และเมทิลีนบลู 0.1 กรัม และในเอทธานอล (95%) 100 มิลลิลิตร

2.3 วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักแน่นอน ประมาณ 0.5-1.0 กรัม ห่อให้มิดชิดใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน

2. เติมโซเดียมซัลเฟต 2 กรัม และเมอร์คิวรีซัลเฟต 5 มิลลิลิตร

3. ใส่ลูกแก้ว

4. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร

5. ย่อยบนอุปกรณ์ให้ความร้อน จนกระทั่งได้สารละลายใส

6. ปล่อยทิ้งให้เย็น

7. ล้างบริเวณคอขวดด้วยน้ำกลั่นที่ต้มร้อนจนทั่ว

8. ย่อยต่อจนกระทั่งหมดควัน

9. ทิ้งให้เย็นแล้วถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นล้างขวดย่อยให้หมดสารละลายตัวอย่าง แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

10. จัดอุปกรณ์กลั่นรวมทั้งเปิดสวิทช์ไฟ และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น

11. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ 1-2 หยดเรียบร้อยแล้ว ไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

12. เติมสารละลายตัวอย่างปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง

13. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 60 โดยโซเดียมไธโอซัลเฟต ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง

14. กลั่นนานประมาณ 10 นาที

15. ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์แมล สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง

16. ทำ blank ตามข้อ 1-14 โดยไม่ใส่ตัวอย่าง

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{(A-B) \times N \times 14}{W}$$

A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก (นอร์แมล)

กรณีคิดปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) คูณด้วย 6.25

3. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (UNESCO, 1983)

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ชนิดฝาเกลียว (ควรแช่กรดและล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนนำมาใช้)

2. ไมโครไปเปต ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3. หม้อนึ่งอัดไอ

4. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

3.2 สารเคมี

1. สารละลายกรดเกลือเจือจาง (0.2 โมล)

- เจือจางกรดเกลือ (HCl) 17 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 ไมโครโมลต่อลิตร)

- ละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40 กรัมในน้ำกลั่น 50-60 มิลลิลิตร และเจือจางให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

3. สารออกซิเดชั่น

- ละลาย $K_2S_2O_8$ 50 มิลลิลิตร และกรดบอริค (H_3BO_3) 30 กรัมในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 350 มิลลิลิตร และทำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น (เก็บไว้ในขวดแก้ว)

4. สารละลายมาตรฐาน

- ละลายโพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) 0.5055 กรัม และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1361 กรัม ในน้ำกลั่น และทำให้ได้ปริมาตร 100

มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดแก้ว)

1 มล. = 50.0 ไมโครอะตอม N

5. สารละลายมาตรฐานเจือจาง

นำสารละลายมาตรฐานเจือจางให้ได้ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน ดังนี้

1 มล. = 50.0 ไมโครอะตอม N

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อลิตร)	สารละลายมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
20,000	10	250
200.0	50	500
100.0	250	500
50.0	250	500
25.0	250	500
12.5	250	500
6.25	250	500

3.3 วิธีการวิเคราะห์

1. ไปเปตน้ำตัวอย่างใส่หลอดทดลอง 15 มิลลิลิตร เติมสารออกซิเดชัน 2 มิลลิลิตร

2. นำเข้าหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 110-115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. นำออกมาตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและนำไปหาไนเทรต (NO_3) ตามวิธีการหา ไนเทรต ตามลำดับ ก่อนหาไนเทรตให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า (น้ำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร : น้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร)

4. ปริมาณฟอสเฟต (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

4.1 วัสดุอุปกรณ์

1. ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250-300 มิลลิลิตร
2. อุปกรณ์ให้ความร้อน (heating mentle)
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร
4. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 50, 100 มิลลิลิตร
5. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์
6. กระดาษกรองของ Whatman เบอร์ 42
7. ผงถ่านกัมมันต์ (Activated carbon)

4.2 สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. กรดไนทริกเข้มข้น
3. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์แมล
5. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น
6. Vanadate-molybdate reagent

- ก. สารละลาย A ละลาย 25 กรัมแอมโมเนียมโมลิบเดท $(NH_4)_8Mo_7O_{24}.4H_2O$ ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร

- ข. สารละลาย B ละลาย 1.25 กรัม แอมโมเนียมเมตาแวนาเดท NH_4VO_3 โดยการต้มให้เดือดในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 330 มิลลิลิตร

ทิ้งสารละลาย B ให้เย็นจนเท่าอุณหภูมิห้อง เทสารละลาย A ลงในสารละลาย B แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

7. สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต

- ละลาย 219.5 มิลลิกรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตรของสารละลายนี้เท่ากับ 50.0 ไมโครกรัม PO_4-P

4.3 วิธีการวิเคราะห์

1. กำจัดสีจากตัวอย่าง โดยเขย่าตัวอย่างจำนวนหนึ่งด้วยผงถ่านกัมมันต์ 200 มิลลิกรัมในขวดชมพู่ 5 นาที กรองโดยใช้กระดาษกรองของ Whatman เบอร์ 42

2. นำตัวอย่างที่กำจัดสี 15 มิลลิลิตร ใส่ในขวดย่อยโปรตีน เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร และกรดไนทริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร

3. ย่อยตัวอย่างบนชุดอุปกรณ์ให้ความร้อนจนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วย่อยต่อจนกระทั่งได้สารละลายที่ไม่มีสีเพื่อไล่กรดไนทริก

4. ทำให้เย็นโดยเติมน้ำกลั่นประมาณ 20 มิลลิลิตร และฟีนอร์ฟทาลีน 1 หยด ค่อย ๆ เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์แมล จนได้สีชมพูอ่อน เทลงขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5. นำตัวอย่าง 35 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Vanadate-molybdate reagent 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดบนขวด ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที (นับจากที่เติม Vanadate-molybdate reagent) วัดค่าความส่งผ่าน (Transmittant) ของตัวอย่างเทียบกับ blank ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร สีที่เกิดจะอยู่ตัวหลายวัน และความเข้มของสีไม่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากอุณหภูมิห้อง

6. การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายฟอสเฟต (50 ไมโครกรัมต่อลิตร) โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน สารละลายนี้มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วปิเปตสารละลายที่เตรียมใหม่ 0, 2, 5, 10, 30 และ 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50

มิลลิลิตร ทุกขวดจะได้ความเข้มข้นของฟอสเฟตเท่ากับ 0, 40, 100, 200, 600 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วทำตามข้อ 2-5 เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการหาค่าฟอสเฟต

$$\text{ปริมาณฟอสเฟต (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{มก.ฟอสเฟต x 1,000}}{\text{มล. ตัวอย่าง}}$$

5. **ปริมาณฟอสเฟต** (Strickland and Parson, 1972)

5.1 <u>วัสดุอุปกรณ์</u>

1. หลอดทดลอง (ควรแช่กรดและล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนนำมาใช้) พร้อมจุกยาง
2. ไมโครไปเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร
3. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

5.2 <u>สารเคมี</u>

1. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท

ละลาย $(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$ 15 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดพลาสติกในที่มืด)

2. สารละลายกรดซัลฟูริก

เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 140 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร (ตั้งไว้ให้เย็น เก็บไว้ในขวดแก้ว)

3. สารละลายกรดแอสคอบิก

ละลาย $C_6H_8O_6$ 13.5 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดพลาสติกและแช่แข็งไว้)

4. สารละลายโพแทสเซียมแอนติโมนิลทาเทรต

ละลาย $K(SbO)C_4H_4O_6$ 0.34 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ถ้าไม่

ละลายให้อุ่นบนไฟ (เก็บไว้ในขวดแก้วหรือขวดพลาสติก)

5. สารผสม

ผสมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท 100 มิลลิลิตร สารละลายกรดซัลฟูริก 250 มิลลิลิตร สารละลายกรดแอสคอบิก 100 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมแอนติโมนิลทาเทรต 50 มิลลิลิตร (เก็บไว้ได้ไม่เกิน 6 ชั่วโมง หลังผสม)

6. สารละลายมาตรฐาน

ละลาย KH_2PO_4 (anhydrous อบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้) 0.816 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (ใส่ Chloroform 1 มิลลิลิตร สามารถเก็บไว้ได้นานหลายเดือน)

1 มิลลิลิตร = 6.0 ไมโครกรัมอะตอม P

7. สารละลายมาตรฐานเจือจาง

นำสารละลายมาตรฐานมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน ดังนี้

สารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร = 6.0 ไมโครกรัมอะตอบ P

(Standard solution)

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ลิตร)	สารละลายมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
60.0	5	500
4.8	8	100
2.4	50	100
1.2	50	100
0.6	50	100
0.3	50	100

5.3 <u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. ไปเปตน้ำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมสารผสม 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ทิ้งไว้ 5 นาที (ไม่เกิน 2-3 ชั่วโมง)

2. นำไปวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร

3. Blank และ สารละลายมาตรฐานเจือจาง solution ทำเช่นเดียวกันกับน้ำตัวอย่าง

6. ของแข็งทั้งหมด (Total solids) (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

6.1 วัสดุอุปกรณ์

1. ถ้วยกระเบื้องสำหรับระเหย
2. ตู้อบ ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 103 องศาเซลเซียส
3. อ่างไอน้ำ
4. เดซิกเคเตอร์
5. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด

6.2 วิธีการวิเคราะห์

1. นำถ้วยระเหยล้างให้สะอาด อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ตวงตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่าใส่ลงในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
3. นำไประเหยให้แห้งในอ่างไอน้ำ
4. อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ ประมาณ 45 นาที
6. ชั่งน้ำหนัก

$$\text{ของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็ง (มก.)} \times 1{,}000}{\text{มล. ตัวอย่าง}}$$

7. ไนเทรต (APHA,AWWA and WPCF, 1975)

7.1 วัสดุอุปกรณ์

1. ถ้วยกระเบื้องสำหรับระเหย
2. อ่างไอน้ำ
3. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์
4. เครื่องวัดพีเอช
5. ขวดปรับปริมาตร

7.2 สารเคมี

1. กรดฟีนอลไดซัลโฟนิค

- ละลายฟีนอลบริสุทธิ์ 25 กรัม ในกรดซัลฟูริก เข้มข้น 150 มิลลิลิตร เติม fuming H_2SO_4 (15% free SO_3) 75 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ต้มในอ่างน้ำร้อน 2 ชั่วโมง

2. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น
3. สารละลายสต็อคไนเทรต

- ละลาย 721.8 มิลลิกรัม โพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้มีไนเทรต 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

4. สารละลายมาตรฐานไนเทรต

- ระเหยสารละลายสต็อคไนเทรต 50 มิลลิลิตร ในอ่างไอน้ำจนแห้ง ละลายตะกอนด้วยกรดฟีนอลไดซัลโฟนิค 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตรเท่ากับ 10 ไมโครกรัมไนโตรเจนหรือเท่ากับ 44.3 ไมโครกรัมไนเทรต

5. อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์

- ละลายอลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟต 125 กรัมเติมน้ำกลั่น จนครบ 1,000 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 55 มิลลิลิตร คนเสมอ ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง รินลงขวด ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน รินน้ำใสข้างบนทิ้งเหลือแต่น้ำยาที่เข้มข้น

6. กรดซัลฟูริก 1 นอร์แมล

7. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซค์เจือจาง

- เจือจาง 10 มิลลิลิตรของ 30 เปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซค์ เติมน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร

7.3 วิธีการวิเคราะห์

1. กำจัดสีจากตัวอย่าง โดยเติมอลูมิเนียมไฮดรอกไซค์ 3 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 150 มิลลิลิตร คน ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที กรองโดยใช้กระดาษกรองของ Whatman เบอร์ 42 กรองทิ้งส่วนแรกของน้ำที่กรองออกมา

2. เปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเทรต โดยเติมกรดซัลฟูริก 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร คนค่อย ๆ เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซค์ ลงไปทีละหยดคนเรื่อย ๆ ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

3. ปรับพีเอชของตัวอย่าง มีค่าเท่ากับ 7 เทลงบนถ้วยกระเบื้องสำหรับระเหย นำไประเหยให้แห้งในอ่างไอน้ำ

4. เติมกรดฟีนอลไดซัลโฟนิค 2 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนจนละลายหมด แล้วเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และแอมโมเนียมไฮดรอกไซค์เข้มข้น 6 มิลลิลิตร คนจนกระทั่งเกิดสีสมบูรณ์ เทใส่ขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทน วัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ของตัวอย่างเทียบกับ blank ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

6. การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายไนเทรต โดยใช้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานไนเทรต 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 3.5, 6.0, 10, 15, 20 และ 30 มิลลิลิตร แล้วทำตามข้อ 4 และ 5 เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการหาไนเทรต

$$\text{ปริมาณไนเทรตไนโตรเจน} = \frac{\text{ไมโครกรัมไนเทรต}}{\text{มิลลิลิตรตัวอย่าง}}$$

ปริมาณไนเทรต (มิลลิกรัมต่อลิตร) = ปริมาณไนเทรตไนโตรเจน x 4.43

8. ไนเทรต (Strickland and Parson,1972)

8.1 วัสดุอุปกรณ์

1. column
2. กระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร
3. กระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร
4. บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
5. แท่งแก้วคน
6. ใยแก้ว
7. หลอดทดลอง (ควรแช่กรดและล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนนำมาใช้ พร้อมจุกยาง)
8. ไมโครไปเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
9. เครื่องเขย่า
10. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

8.2 สารเคมี

1. สารละลายซัลฟานิลาไมด์

- ละลาย 5 กรัม ซัลฟานิลาไมด์ ($NH_2C_6H_4SO_2NH_2$) ในกรดเกลือเจือจาง (เจือจางกรดเกลือ 50 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร) และเจือจางให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น (เก็บในขวดแก้วหรือขวดพลาสติก)

2. สารละลาย N-(1-napthyl)-ethylene diamine dihydrochloride

- ละลาย 0.50 กรัมไดไฮโดรคลอไรด์ ($C_{10}H_7NHCH_2NH_2.2HCl$) ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดแก้วสีน้ำตาล (ควรเตรียมใหม่ทุกเดือน หรือถ้าสารมีสีน้ำตาลให้เตรียมใหม่)

3. สารละลาย แอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น

- ละลาย 125 กรัมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดแก้ว หรือขวดพลาสติก)

4. สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เจือจาง

- เจือจาง 25 มิลลิลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้นในน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

5. การบรรจุ Cadmium - copper

เติม 100 กรัม ผงแคดเมียม (ใช้ได้ประมาณ 2 column) ใน ร้อยละ 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของ คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) คนจนกระทั่งสีน้ำเงินของคอปเปอร์หายไป ผงแคดเมียมจะมีสีดำ (หากเกิดตะกอนสีน้ำตาลแดงให้ดูดออกด้วยหลอดหยด ระวังอย่าให้ผงแคดเมียมที่เคลือบผิวแล้วสัมผัสอากาศ) นำผงแคดเมียมเติมลงไปใน column โดยดำเนินการขั้นต่อไปดังนี้

1. เติมน้ำกลั่น หรือสารละลายแอมโมเนียมเจือจางลงใน column

2. ใส่ใยแก้วลงในก้น column (เป็นชั้นบาง ๆ เพื่อรองรับผงแคดเมียม)

3. เติมผงแคดเมียมที่เคลือบผิวแล้วลงใน column ให้ได้ความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร

4. เติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เจือจาง ปริมาณ 50 มิลลิลิตร วัดอัตราการไหลผ่าน column ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ภายในเวลา 8-12 นาที (ถ้าอัตราการไหลเร็วหรือช้ากว่าที่กำหนดไว้มากเกินไป ให้ทำการบรรจุผงแคดเมียมใหม่)

5. ใส่ใยแก้วเหนือผงแคดเมียม

6. ล้าง column ด้วยสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เจือจาง

7. หากไม่ใช้งานทันที จะต้องเติม สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เจือจาง

เมื่อใช้งาน column ได้ประมาณ 100 ตัวอย่าง ต้องทำการเคลือบผงแคดเมียมใหม่ โดยล้างด้วย 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของกรดเกลือ 300 มิลลิลิตร แล้วเททิ้ง 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น (200-300 มิลลิลิตร ต่อครั้ง) จน น้ำที่ล้างใสขึ้น

และพีเอชมากกว่า 5 เทน้ำทิ้งให้แห้งเท่าที่ทำได้ แล้วเคลือบผิวแคดเมียมตามวิธีการข้างต้น

6. สารละลายมาตรฐาน

ละลาย โพแตสเซียมไนเทรต 1.02 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร (เก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วสีน้ำตาล)

1 มล. = 10.0 ไมโครกรัมอะตอม N

7. สารละลายมาตรฐานเจือจาง

นำสารละลายมาตรฐาน มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน ดังนี้

สารละลายมาตรฐาน 1 มล. = 10 ไมโครกรัมอะตอม N

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ลิตร)	สารละลายมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
450.0	4.5	100
45.0	10.0	100
22.5	50.0	100
11.25	50.0	100
5.625	50.0	100
2.3125	50.0	100

8.3 <u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. ตวงน้ำตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร เติม 1 มิลลิลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น เทใส่ลงใน column ปริมาณ 30 มิลลิลิตร (ใช้ล้าง column)

2. รองรับน้ำตัวอย่างที่ผ่าน column 30 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร (เททิ้ง) เติมตัวอย่างที่เหลือลงไปทั้งหมด ใช้กระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร รองรับปริมาณ 7-9 มิลลิลิตร (เพื่อล้างกระบอกตวงแล้วเททิ้งไป) รองรับน้ำตัวอย่างที่เหลือ 10 มิลลิลิตร เพื่อทำการวิเคราะห์

3. นำน้ำตัวอย่างที่ผ่าน column แล้ว 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ 0.2 มิลลิลิตร ผสมกันทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 2-8 นาที

4. เติม N-(-1-napthyl)-ethylene diamine dihydrochloride 2 มิลลิลิตร และผสมทันที (ภายใน 10 นาที) และต้องทำการวัดภายใน 2 ชั่วโมง (จะต้องไม่ทิ้งไว้เกิน 2 ชั่วโมง) ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

5. Blank และสารละลายมาตรฐานเจือจาง ทำเช่นเดียวกับน้ำตัวอย่าง

9. แอมโมเนีย (Strickland and Parson, 1972)

9.1 วัสดุอุปกรณ์

1. หลอดทดลอง พร้อมฝาจุกพลาสติก หรือแก้ว

ก่อนใช้ควรใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างและเติมสารเคมี ตั้งทิ้งไว้ตามวิธีการวิเคราะห์แอมโมเนียทุกอย่าง เพื่อชะล้าง แอมโมเนียที่ค้างภายในหลอดออก จากนั้นล้างหลอดด้วยน้ำกลั่น De-ionized ปิดฝาให้แน่นเก็บไว้วิเคราะห์แอมโมเนียต่อไป

2. ไมโครไปเป็ต ขนาด 1,5 มิลลิลิตร

3. กระดาษตะกั่ว

4. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

9.2 สารเคมี

1. สารละลายฟีนอลไนโตรพลัสไซด์

- ละลาย 17.5 กรัม ฟีนอลบริสุทธิ์และ 0.2 กรัม โซเดียมไนโตร-พลัสไซด์ ($Na_2Fe(CN)_5NO.2H_2O$) ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (ทำในขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วมืดและเก็บไว้ในตู้เย็น)

2. สารละลายบัฟเฟอร์

- ละลาย 33.35 กรัมไตรโซเดียมซิเทรตไดไฮเดรต ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) 17 กรัม กรดบอริค (H_3BO_3) และ 9.7 กรัม กรดซิตริก ($C_6H_8O_7.H_2O$) ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (เก็บในขวดแก้ว)

3. สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรค์ (NaClO)

4. สารละลายมาตรฐาน

- ละลาย 0.5350 กรัม แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) หรือ 1.320 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$) (ก่อนชั่งควรอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเก็บไว้ในเดซิกเคเตอร์ เพื่อให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน) ในน้ำกลั่น และทำให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หยดคลอโรฟอร์ม เก็บไว้ในขวดแก้วและแช่ไว้ในตู้เย็น (เก็บไว้ได้เป็นเดือน)

1 มล. = 10 ไมโครกรัมอะตอม N

= 10 ไมโครโมล NH_4-N

5. สารละลายมาตรฐานเจือจาง

นำสารละลายมาตรฐานมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กันดังนี้

1 มล. = 10 ไมโครกรัมอะตอม N

ความเข้มข้น (ไมโครโมล/ลิตร)	สารละลายมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
20.00	1.0	500
10.00	50.0	100
5.00	50.0	100
2.50	50.0	100
1.25	50.0	100
0.625	50.0	100

9.3 <u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. ไปเปตน้ำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. เติม 0.4 มิลลิลิตร สารละลายฟีนอลไนโตรพลัสไซด์ ผสมให้เข้ากัน

3. เติม 0.4 มิลลิลิตร โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ผสมให้เข้ากัน

4. ปิดปากหลอดด้วยกระดาษตะกั่ว ให้แน่นเก็บไว้ในที่มืด 2-6 ชั่วโมง แล้ว

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

5. Blank และ สารละลายมาตรฐานเจือจาง ทำเช่นเดียวกับน้ำตัวอย่าง

หมายเหตุ ทุกขั้นตอนในการวิเคราะห์และเตรียมสารเคมีใช้น้ำ Deionize เท่านั้น

10. แอมโมเนีย (APHA, AWWA, and WPCF, 1985)

10.1 วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องกลั่น
2. เครื่องวัดพีเอช
3. บิวเรต

10.2 สารเคมี

1. น้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย
2. สารละลายกรดบอริค

ละลายกรดบอริค 20 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนียจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

3. สารละลายมาตรฐานกรดกำมะถัน 0.02 นอร์แมล
4. อินดิเคเตอร์

- ละลายเมทิลเรด 0.2 กรัม และเมทิลีนบลู 0.1 กรัม ในเอทธานอล (95%) 100 มิลลิลิตร

10.3 วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำทิ้ง 500 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่า เติมบอเรทบัฟเฟอร์ 25 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้เป็น 9.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 นอร์แมล

2. ทำการกลั่นตัวอย่างน้ำทิ้ง โดยให้ปลายหลอดที่ต่อนำไอน้ำและแอมโมเนียที่กลั่นออกมาจุ่มใต้สารละลายกรดบอริค เก็บ distillate ในขวดกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งใส่กรดบอริค 50 มิลลิลิตร เก็บ distillate อย่างน้อย 300 มิลลิลิตร

แล้วจึงดึงปลายหลอดให้พ้นผิวสารละลาย ทำการกลั่นต่อประมาณ 2 นาที เพื่อทำความสะอาด condenser และหลอด นำ distillate ออกมาเจือจางจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย

3. ทิเทรตแอมโมเนียใน distillate ด้วยกรดกำมะถัน 0.02 นอร์แมล จนกระทั่งอินดิเคเตอร์เปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อน

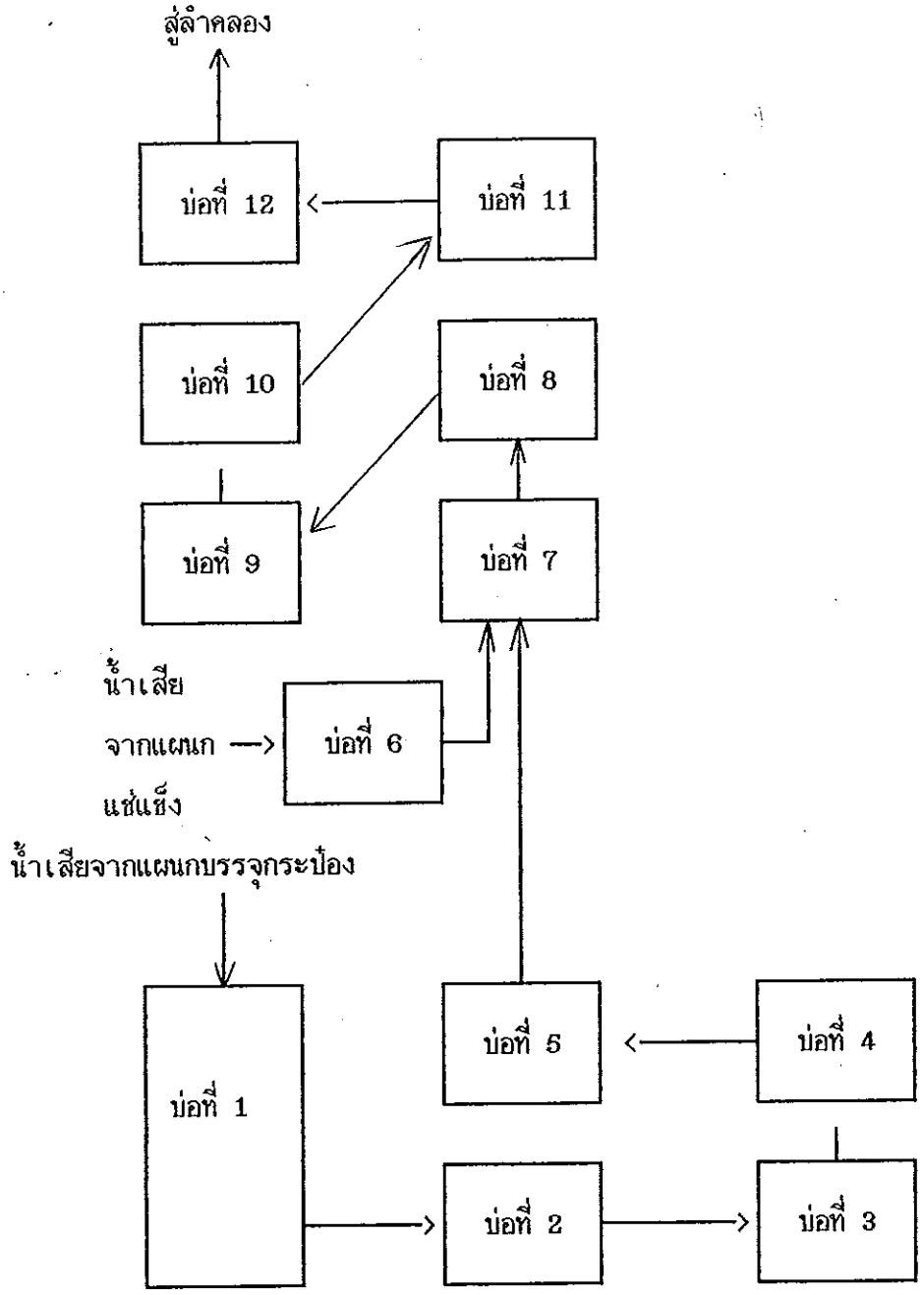
4. Blank โดยใช้น้ำกลั่น และผ่านขั้นตอนทุกอย่างเหมือนตัวอย่างน้ำทิ้ง

การคำนวณ

$$\text{มิลลิกรัม/ลิตร} = \frac{(A-B) \times 280}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่าง}}$$

เมื่อ A = มิลลิลิตรของกรดกำมะถันที่ใช้ในการทิเทรตตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของกรดกำมะถันที่ใช้ในการทิเทรต Blank



รูปภาคผนวกที่ ข1 แผนภูมิแสดงระบบบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด

หมายเหตุ : บ่อที่ 1,2 เป็นแบบ anaerobic lagoon

บ่อที่ 3 เป็นแบบ facultative lagoon

บ่อที่ 4,7,8 เป็นแบบ aerated lagoon

บ่อที่ 5,6,9,10,11,12 เป็นแบบ facultative lagooon

ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์การเติบโตของสาหร่าย

1. การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย (Vonshak and Borowitzka, 1991)

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ
2. ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 70 องศาเซลเซียส
3. เดซิกเคเตอร์
4. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด
5. เครื่องกรองเซลล์
6. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์
7. กระดาษกรองเซลล์ GF/C

1.2 วิธีการ

1. นำจานเพาะเชื้ออบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วนำออกใส่ในเดซิกเคเตอร์ เมื่อเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่

2. เลี้ยงสาหร่าย ในอาหารที่ใช้ทดลอง จนเซลล์เจริญสูงสุดนำเซลล์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น วัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความขุ่นเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 และ 0.8 ส่วน blank ใช้น้ำกลั่น

3. นำเซลล์ที่ระดับความขุ่นต่าง ๆ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร กรองด้วยเครื่องกรองเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น

4. นำกระดาษกรองซึ่งมีเซลล์สาหร่ายติดอยู่ ใส่ในจานเพาะเชื้อแล้วอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. นำจานเพาะเชื้อใส่ในในเดซิกเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่

6. บันทึกค่าความชุ่น กับน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ (กรัมต่อลิตร) (ตารางภาคผนวกที่ ค1 และ ค2) และพล้อตกราฟของค่าที่ได้เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้ง (รูปภาคผนวกที่ ค1, ค2, ค3, ค4 และ ค5)

2. การหาอัตราการเติบโตจำเพาะ (Pirt, 1975)

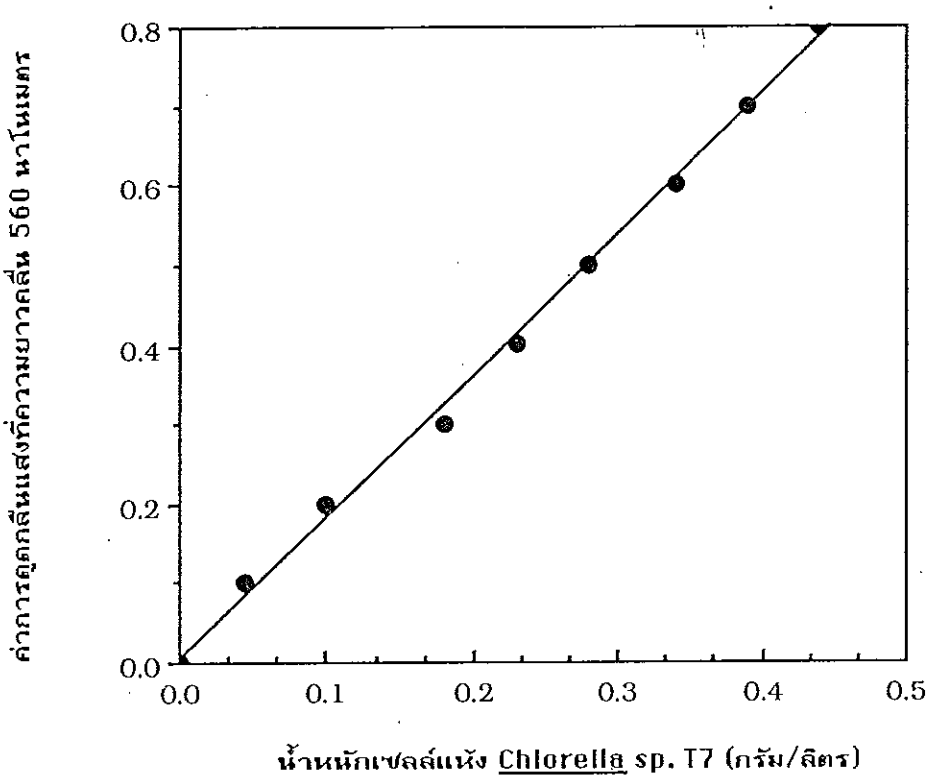
นำค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่าย มาคำนวณหาค่า ln จากนั้นพล้อตค่าที่ได้กับเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง โดยใช้ linear regression program ค่าความชันของเส้นจะเป็นค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ ดังตัวอย่างแสดงในรูปภาคผนวกที่ ค6

ตารางภาคผนวกที่ ค1 ค่าความขุ่นและน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. T9 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น

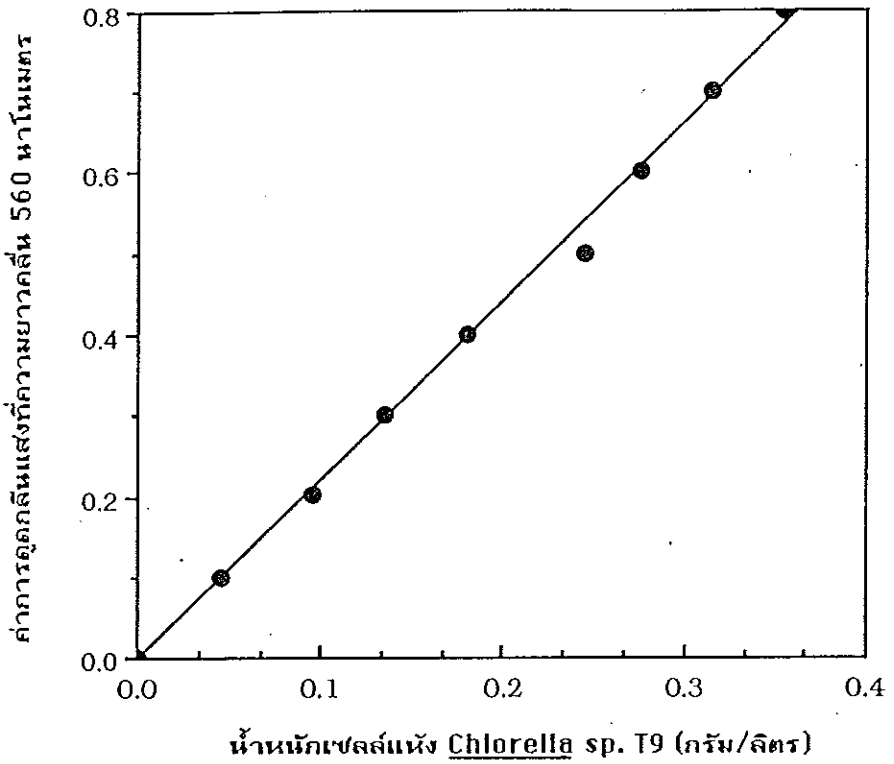
ค่าความขุ่น	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)			
	T7	T9	T12	K_3
0.1	0.045	0.045	0.045	0.04
0.2	0.10	0.095	0.075	0.095
0.3	0.18	0.135	0.12	0.14
0.4	0.23	0.180	0.16	0.19
0.5	0.28	0.245	0.21	0.23
0.6	0.34	0.275	0.26	0.285
0.7	0.39	0.315	0.32	0.32
0.8	0.44	0.355	0.36	0.35

ตารางภาคผนวกที่ ค2 ค่าความขุ่นและน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. T9 เลี้ยงในน้ำทิ้งบ่อที่ 9 ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งจากบ่อที่ 9

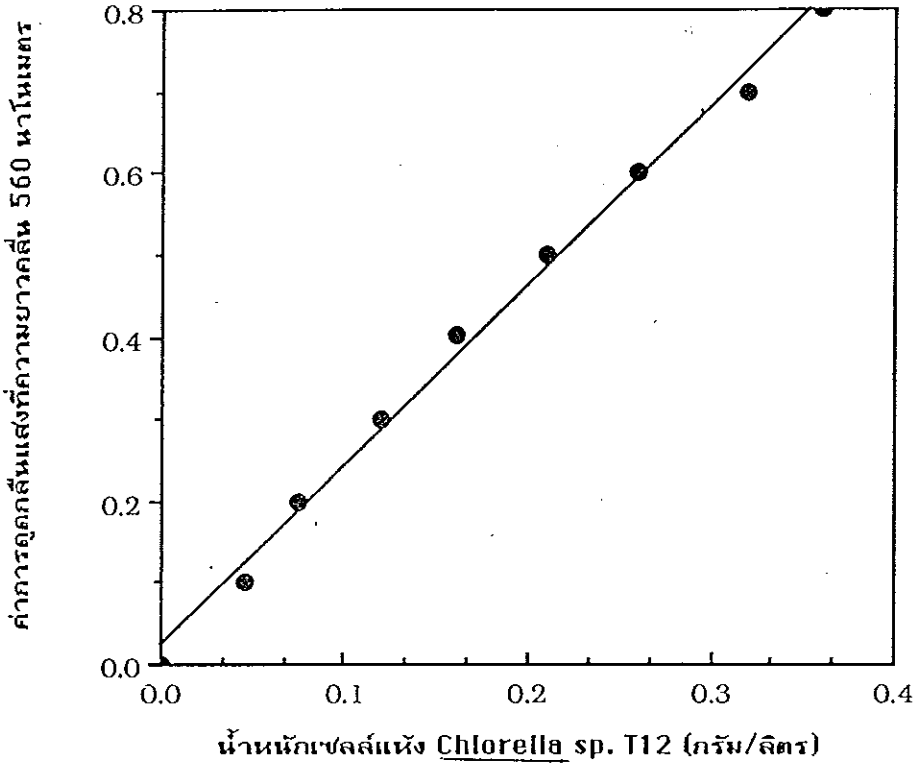
ค่าความขุ่น	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0.1	0.045
0.2	0.085
0.3	0.13
0.4	0.17
0.5	0.215
0.6	0.26
0.7	0.3
0.8	0.34



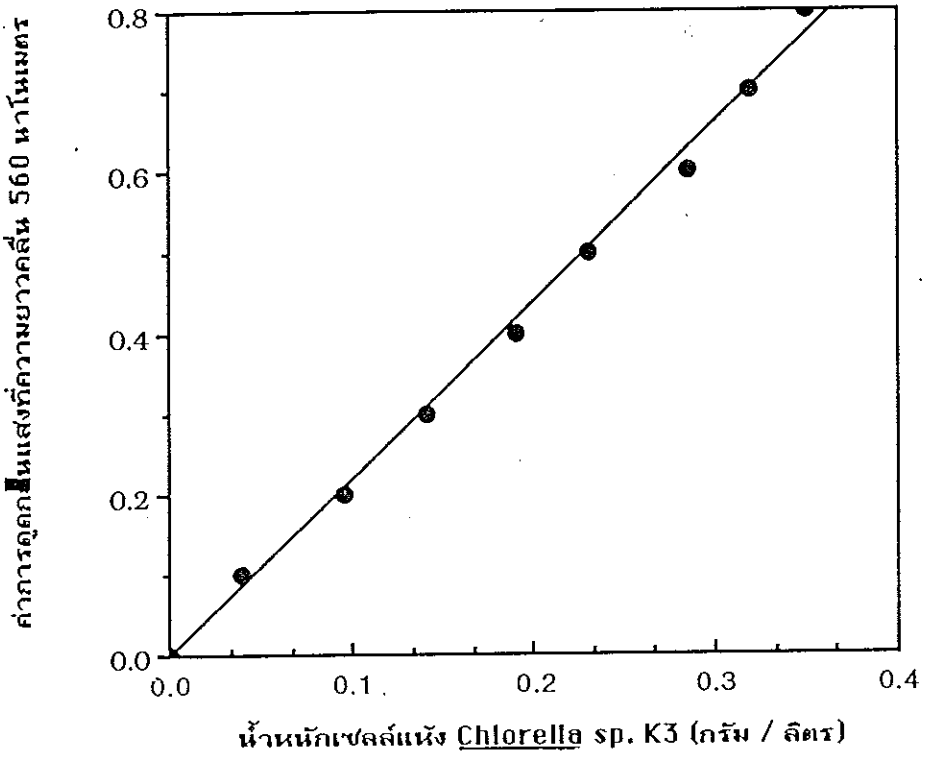
รูปภาคผนวกที่ ค1 กราฟมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Chlorella* sp. T7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เจือจางด้วยน้ำกลั่น



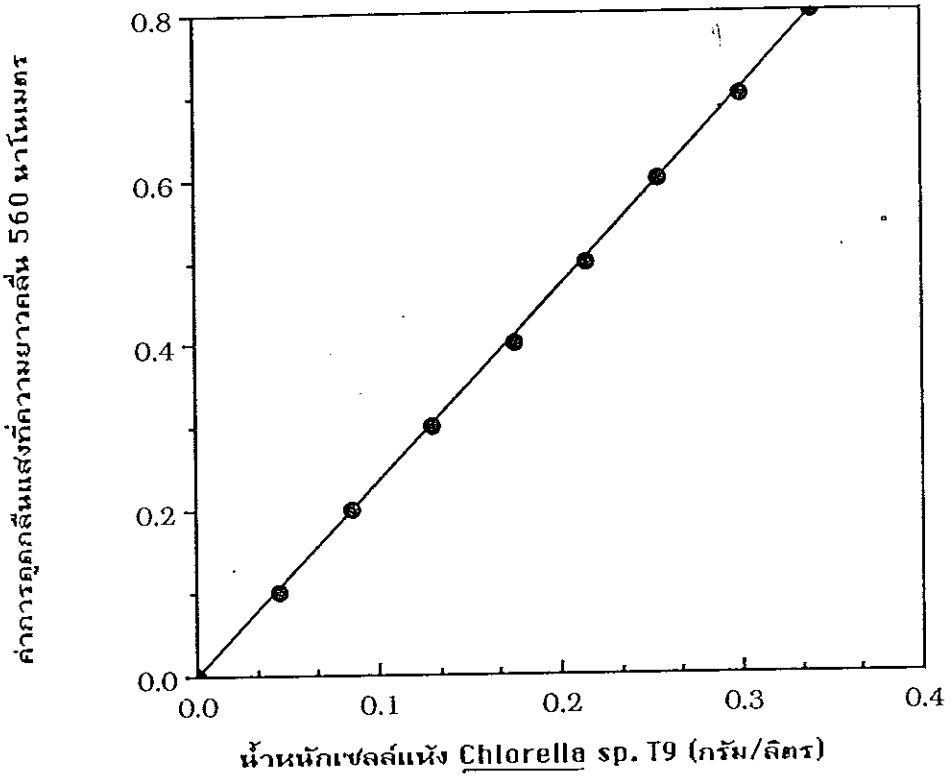
รูปภาคผนวกที่ ค2 กราฟมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Chlorella* sp. T9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เจือจางด้วยน้ำกลั่น



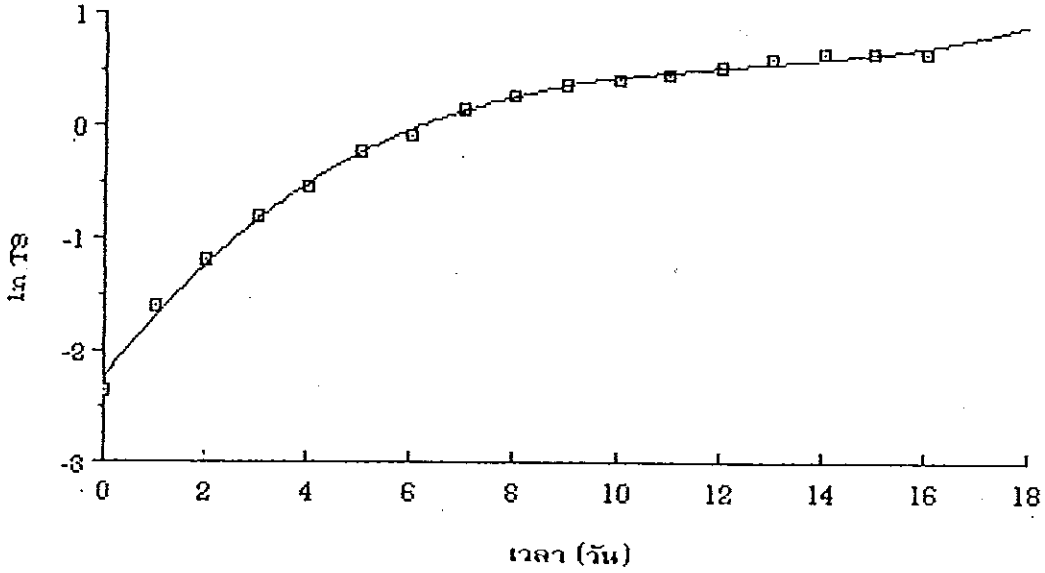
รูปภาคผนวกที่ ค3 กราฟมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Chlorella* sp. T12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เจือจางด้วยน้ำกลั่น

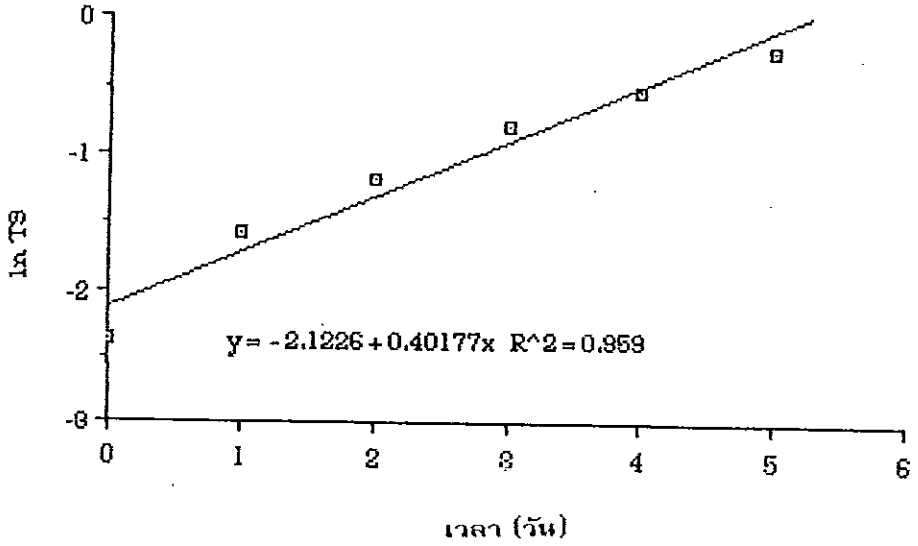


รูปภาคผนวกที่ ค4 กราฟมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Chlorella* sp. K_3 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ NS III เจือจางด้วยน้ำกลั่น



รูปภาคผนวกที่ ค5 กราฟมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Chlorella* sp. T9 ใน น้ำทิ้งบ่อที่ 9 เจือจางด้วยน้ำทิ้งบ่อที่ 9





รูปภาคผนวกที่ ค6 ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและค่าการถดถอย (regreesion) ของสาหร่าย *Chlorella* sp. T9 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NS III ที่ความเข้มแสง 4000 ลักซ์

ภาคผนวก ง

องค์ประกอบทางเคมีของ *Chlorella* sp. แต่ละสายพันธุ์

ตารางที่ ง1 เปรียบเทียบปริมาณของกรดอะมิโนจำเป็นในเซลล์ *Chlorella* sp. และไข่

กรดอะมิโน	*Chl. pyrenoidosa* [a] (กรัม/100 กรัม)	*Chl. vulgaris* [b] (กรัม/15 กรัมไนโตรเจน)	*Chl. pyrenoidesa* (71105)[c] (กรัม/กรัมไนโตรเจน)	*Chl.* sp. NO. 650818[d] (กรัม/100 กรัม)	*Chl. elipsoida* [b] (กรัม/16 กรัมไนโตรเจน)	*Chl.* sp.[E] (กรัม/100 กรัม)	ไข่[b] (กรัม/16 กรัมไนโตรเจน)
ไลซีน	3.05	6.4	0.49	3.46	5.9	3.1	7.0
ฮีสติดีน	0.98	2.0	0.09	1.29	1.7	1.1	2.4
ทรีโอนีน	2.76	5.3	0.02	2.70	4.9	2.4	5.0
วาลีน	3.60	7.03	0.32	3.64	7.9	3.2	3.64
เมทิโอนีน	1.38	1.3	0.11	1.45	0.6	1.3	2.3
ไอโซลิวซีน	2.34	3.2	0.21	2.63	4.5	2.3	6.6
ลิวซีน	4.89	9.5	0.25	5.26	9.3	4.5	8.8
ฟีนาบอลานีน	3.03	5.5	0.28	3.08	4.2	2.8	5.8
อาร์จินีน	3.48	6.9	0.35	3.64	5.8	3.3	6.2
ไทโรซีน	1.93	2.8	0.17	2.09	1.7	-	4.2
อะลานีน	4.58	9.4	0.37	4.80	12.2	4.3	9.0

ตารางที่ ง1 (ต่อ)

กรดอะมิโน	*Chl. pyrenoidosa* [a] (กรัม/100 กรัม)	*Chl. vulgaris* [b] (กรัม/15 กรัมไนโตรเจน)	*Chl. pyrenoidesa* (71105) [c] (กรัม/กรัมไนโตรเจน)	*Chl.* sp. NO. 650818 [d] (กรัม/100 กรัม)	*Chl. elipsoida* [b] (กรัม/16 กรัมไนโตรเจน)	*Chl.* sp. [E] (กรัม/100 กรัม)	ไข่ [b] (กรัม/16 กรัมไนโตรเจน)
ไกลซีน	3.31	6.3	0.30	3.40	10.4	3.1	4.2
โปรลีน	2.47	5.0	0.25	2.93	5.0	2.5	4.2
กรดกลูตามิก	5.83	13.7	0.58	6.29	10.5	5.8	12.6
ซีรีน	2.20	5.8	0.14	2.78	5.2	2.0	6.9
กรดแอสปาติก	5.26	9.3	0.37	5.20	8.8	4.7	11.0
ทริปโตแฟน	1.20	-	0.09	0.59	-	0.5	4.2
ซีสตีน	0.61	-	-	0.3	0.7	-	2.3

หมายเหตุ - : ไม่ได้วิเคราะห์

ที่มา : a : Taiwan chlorella (1964)
b : Richmond (1986)
c : Lubitz และคณะ (1962)
d : Steenblock (1987)
E : วิสัย วงศ์สายปิ่น (2533)

ตารางที่ ง2 เปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันในเซลล์ *Chlorella* sp.

กรดไขมัน	รูปสูตร	*Chl.* sp.[a] NO. 650168	*Chl. vulgaris*[b] สายพันธุ์				*Chl. pyrenoidosa*[b] สายพันธุ์			*Chl. ellipsoidea*[b] สายพันธุ์		*Chl.* sp.[b] สายพันธุ์				*Chl.*[c] *vulgaris*
			62	157	large-1	23	99n/v	TKH-11-05	82	SK	Large-2	37	R-1			
ร้อยละไขมันทั้งหมดต่อน้ำหนักแห้ง																
ไมริสติก	14:0	0.6	0.4	0.2	1.5	0.7	0.4	0.7	-	1.4	1.0	0.5	4.5	0.6	0.3	0.9
-	14:1	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	14:2	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ปาลมิติค	16:0	15.6	27.1	16.8	20.9	18.8	23.8	19.8	22.5	21.8	25.0	21.0	24.0	15.3	19.6	20.4
ปาลมิโตลีอิค	16:1	9.1	7.3	6.9	5.5	4.6	5.3	3.9	2.1	4.4	7.5	5.3	8.4	4.3	4.6	5.8
เฮกซาเด็คคาไดโนอิค	16:2	5.5	16.7	16.7	13.1	13.5	23.5	19.8	16.7	15.6	12.6	19.1	20.9	14.8	23.2	1.7
เฮกซาเด็คคาไตรโนอิค	16:3	17.1	2.8	7.5	0.3	2.6	3.9	8.5	7.4	7.7	9.4	3.0	4.5	2.6	4.3	-
สเตียริค	18:0	2.0	0.8	1.4	0.6	0.7	1.1	1.0	0.7	0.7	1.3	1.0	0.8	0.6	1.3	15.3
โอลีอิค	18:1	10.0	6.5	7.5	5.6	2.7	4.3	1.4	4.4	5.3	2.2	3.9	3.9	2.6	4.4	6.6
ลิโนลีอิค	18:2	15.5	30.0	28.5	45.6	42.3	31.7	29.3	28.3	25.5	24.1	38.1	27.3	42.5	34.6	1.5
ลิโนลีนิค	18:3	22.8	5.3	10.8	6.8	12.9	4.8	13.0	16.8	15.9	14.7	5.4	3.9	16.0	5.9	20.5

หมายเหตุ - : ไม่ได้วิเคราะห์

ที่มา a : Steenblock (1987)

b : Gurvich และคณะ (1969)

c : Richmond (1986)

ตารางที่ ง3 เปรียบเทียบปริมาณวิตามินและรงควัตถุในเซลล์ *Chlorella* sp. และไข่

	Chl. pyrenoidosa [E]	*Chl.* sp. NO. 650618 [F]	*Chl. pyrenoidosa* [G]	ไข่ [H]
วิตามิน (มิลลิกรัม)/ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง				
เรตินอล (เอ)	-	55,500[b]	480[d]	-
ไธอามีน (บี 1)	1.90	1.5	11.5[d]	1.2[d]
ไรโบฟลาวิน (บี 2)	4.59	4.8	26.9[d]	3.4[d]
ไนอาซีน (บี 3)	20	23.8	-	-
กรดแพนโทเทอนิก (บี 5)	-	1.3	20[d]	-
ไพริดอกซีน (บี 6)	1.44	1.7	22.9[d]	2.5[d]
โคบารามีน (บี 12)	0.57	125.9[c]	0.02	0.02
กรดแอสคอบิค (ซี)	50	15.6	-	-
ไบโอติน	228	191.6[c]	0.15	0.2[d]
อินโนซิทอล	89	165	-	-
โทโคเฟอรอล (อี)	7.7	<1[b]	-	-
กรดโฟลิก	1.2	26.9[c]	-	-
คลอโรฟิลล์ เอ	2.14[a]	1,469	-	-
คลอโรฟิลล์ บี	-	613	-	-
แซนโทฟิลล์	425	-	-	-
เบต้าแคโรทีน	58.2	180.8	-	-

หมายเหตุ a : ร้อยละ
b : ไอยู/100 มิลลิกรัม
C : ไมโครกรัม/100 กรัม
- : ไม่ได้วิเคราะห์
d : มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

ที่มา E : Taiwan chlorella (1964)
F : steenblock (1987)
G : Richmond (1986)
H : Becker and Venkataraman (1981)