นิพนธ์ต้นฉบับ

การเติบโตของไดอะตอม *Amphora delicatissima* ในที่มืดภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิก

ชมพูนุท ชัยรัตนะ[1] สรวิศ เผ่าทองศุข[2] และ สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล[3]

Abstract

Chairatana, C.[1], Powtongsook, S.[1] and Piyatiratitivorakul, S.[2]

Growth of a diatom *Amphora delicatissima* in dark heterotrophic culture

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2003, 25(2) : 205-212

A diatom *Amphora delicatissima* Krasske strain AM9901 isolated from shore area in Chonburi Province, Thailand, was used for heterotrophic growth studies. It was found that this diatom could grow in total darkness using modified Guillard (F/2) algal culture medium supplied with 1 gC/L glucose or acetic acid as a sole carbon source. Growth rates were increased when organic carbon and nutrient sources such as meat extract, peptone and yeast extract according to nutrient broth medium were added into the modified algal medium. Increasing of glucose concentration from 1 to 4 gC/L provided higher growth rate than normal photoautotrophic culture condition with a specific growth rate of 0.96/day and maximum cells concentration of 7.4×10^5 cells/mL. However, higher glucose concentrations (8, 12 and 16 gC/L) showed an inhibition effect to growth of *A. delicatissima.*

Key words : *Amphora delicatissima*, heterotrophic, growth, brackish diatom, microalgae

[1]Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, [2]Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand.

[1]วท.ม. (วิทยาศาสตร์ทางทะเล) [2]Ph.D. (Molecular Biology and Biotechnology) หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล (ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย ปทุมธานี 12120
[3]Ph.D. (Biology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท กรุงเทพฯ 10330

Corresponding e-mail: sorawit@biotec.or.th

รับต้นฉบับ 28 สิงหาคม 2545 รับลงพิมพ์ 28 พฤศจิกายน 2545

บทคัดย่อ

ชมพูนุท ชัยรัตนะ สรวิศ เผ่าทองศุข และ สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล

การเติบโตของไดอะตอม *Amphora delicatissima* ในที่มืดภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิก

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2546 25(2) : 205-212

การศึกษาการเติบโตของไดอะตอม *Amphora delicatissima* Krasske สายพันธุ์ AM9901 ซึ่งแยกมาจากน้ำทะเลชายฝั่งจังหวัดชลบุรี โดยเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด พบว่า *A. delicatissima* สามารถเติบโตได้โดยไม่ต้องใช้แสงเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร Guillard (F/2) ความเค็ม 30 ส่วนในพัน ที่เสริมด้วยสารอินทรีย์คาร์บอนในรูปกลูโคสหรือกรดแอซิติกความเข้มข้น 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร และจะมีการเติบโตที่ดีขึ้นเมื่อมีการผสมสารอาหารอินทรีย์ ได้แก่ สารสกัดจากเนื้อ เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ ตามสูตรอาหารเพาะเชื้อแบคทีเรียเพิ่มลงในอาหารเพาะเชื้อที่มีกลูโคสหรือกรดแอซิติกอยู่ การเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในรูปกลูโคสขึ้นจาก 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร เป็น 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร จะทำให้ *A. delicatissima* มีอัตราการเติบโตสูงสุด 0.96/วัน และมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 7.4×10^5 เซลล์/มล. แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสให้สูงขึ้นเป็น 8 12 และ 16 กรัมคาร์บอน/ลิตร กลับพบว่า *A. delicatissima* มีการเติบโตลดลง แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์คาร์บอนที่สูงเกินไปจะยับยั้งการเติบโตของไดอะตอม

ในธรรมชาติ สาหร่ายเซลล์เดียวเป็นผู้ผลิตของระบบนิเวศในแหล่งน้ำ โดยสาหร่ายเซลล์เดียวซึ่งมีการดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนจะสร้างอาหารขึ้นเองในเซลล์จากคาร์บอนอนินทรีย์ที่อยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) เรียกว่าการเติบโตในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic) อย่างไรก็ตามในธรรมชาติก็ยังมีสาหร่ายเซลล์เดียวอีกหลายชนิดที่มีความสามารถในการนำสารคาร์บอนอินทรีย์ (organic carbon) เข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์ ทำให้สาหร่ายสามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีทั้งแสงและคาร์บอนอินทรีย์ เรียกว่าสภาวะมิกโซโทรฟิก (mixotrophic) หรือโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก (photoheterotrophic) ในขณะที่สาหร่ายเซลล์เดียวบางชนิดสามารถใช้คาร์บอนอินทรีย์เป็นแหล่งของคาร์บอนทั้งหมดในการเติบโต ทำให้ไม่จำเป็นต้องมีการสังเคราะห์อาหารด้วยแสงเลย จึงทำให้สาหร่ายเซลล์เดียวสามารถเติบโตได้โดยไม่ต้องใช้แสง เรียกว่าสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic) ซึ่งในธรรมชาติจะพบว่าสาหร่ายเซลล์เดียวโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของไดอะตอมพื้นท้องน้ำ (benthic diatom) หลายชนิดมีความสามารถในการปรับตัวโดยสามารถเติบโตได้ในทั้งสามสภาวะ เนื่องจากไดอะตอมเหล่านี้มีการเติบโตเกาะติดอยู่กับก้อนหิน เม็ดทราย และตะกอนใต้น้ำ ซึ่งมักจะมีสารอินทรีย์ที่เกิดจากการย่อยสลายซากสิ่งมีชีวิตทับถมอยู่มาก และบริเวณดังกล่าวมีแสงน้อยหรือหากไดอะตอมมีการเคลื่อนที่เข้าไปในบริเวณช่องว่างของตะกอนใต้น้ำก็จะไม่ได้รับแสงเลย (Hellebust and Lewin, 1977)

การเพาะเลี้ยงไดอะตอมหรือสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดอื่นๆ โดยทั่วไปใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบใช้แสง (photoautotrophic culture) ในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายที่มีองค์ประกอบของสารอาหารอนินทรีย์โดยให้สาหร่ายเซลล์เดียวสร้างอาหารขึ้นเองจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง แต่ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวบางชนิด เช่น สาหร่ายสีเขียวสกุล *Tetraselmis* (Day and Tsavalos, 1996) *Chlorella* (Shi *et al*., 1997) หรือไดอะตอมสกุล *Nitzschia* (Tan and Johns, 1996) โดยการเติมคาร์บอนอินทรีย์ลงในอาหารเพาะเชื้อทำให้สาหร่ายเซลล์เดียวเติบโตในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก สำหรับแหล่งคาร์บอนที่ได้มีการทดลองใช้เลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกมีหลายรูปแบบ เช่น กลูโคสสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในการเลี้ยง *Navicula* spp., *Nitzschia* spp., *Cylindrotheca* spp. (Tan and Johns,

1996) *Tetraselmis* sp. (Day and Tsavalos,1996) และ *Chlorella* spp. (Shi *et al*., 1997) กรดแอซิติกสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในการเลี้ยง *Navicula saprophila, Rhodomonas salina, Nitzschia* sp. (Kitano *et al*., 1997) แอซิเตตสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในการเลี้ยง *Navicula saprophila* (Kitano *et al*., 1998) กลีเซอรอลสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในการเลี้ยง *Phaeodactylum tricornutum* (Garcia *et al*., 2000) เมธานอลสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในการเลี้ยง *Chlorella minutissima* และนอกจากนี้ยังสามารถใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง *Euglena gracilis* (Ogbonna *et al*., 1999) ซึ่ง Chen (1996) ได้รายงานไว้ว่าการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกจะให้ผลผลิตสูงกว่าการเลี้ยงโฟโตออโตโทรฟิกในปริมาตรการเลี้ยงเท่ากัน จึงช่วยให้ประหยัดพื้นที่การเลี้ยง ประหยัดอาหารเพาะเชื้อ อีกทั้งยังเป็นการประหยัดแรงงานอีกด้วย (Gladue, 1991) สาเหตุที่สำคัญที่ทำให้การเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกได้ผลผลิตเซลล์สูงกว่าการเลี้ยงแบบใช้แสงก็เนื่องมาจากไม่มีการจำกัดในเรื่องของแสงซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดประการหนึ่งที่จำกัดการเติบโตของสาหร่าย

การเพาะเลี้ยงไดอะตอมส่วนใหญ่มีจุดมุ่งหมายเพื่อนำเซลล์ไดอะตอมมาใช้ในการเป็นอาหารสัตว์น้ำ ไม่ว่าจะเป็นการนำไปให้สัตว์น้ำบริโภคโดยตรงหรือใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงแพลงก์ตอนสัตว์ที่จะนำมาใช้เป็นอาหารของสัตว์น้ำอีกครั้งหนึ่ง สิ่งที่จะต้องคำนึงเป็นอย่างมากก็คือคุณค่าทางอาหารของไดอะตอมที่ใช้เนื่องจากจะส่งผลถึงการเติบโตและพัฒนาการของสัตว์น้ำ Kitano *et al*. (1997) พบว่าการเลี้ยงไดอะตอมแบบเฮเทอโรโทรฟิกจะทำให้องค์ประกอบของกรดไขมันเปลี่ยนแปลงไป โดยจะมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (Polyunsaturated Fatty Acids: PUFA) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้เป็นกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต เนื่องจากร่างกายของสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ทำให้จะต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น สัตว์น้ำต้องการกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะกรดไขมันในกลุ่มโอเมกา-3 และกลุ่มโอเมกา-6 ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญเพราะสัตว์น้ำมีความสามารถในการย่อยกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ดีกว่ากรดไขมันอิ่มตัว (วีรพงศ์, 2536) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงไดอะตอมในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกจึงมีจุดมุ่งหมายที่จะได้ผลผลิตสาหร่ายที่มีคุณค่าทางอาหารสูง สามารถนำไปพัฒนาสู่การเพาะเลี้ยงระดับอุตสาหกรรมในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) คล้ายกับการเลี้ยงแบคทีเรียหรือยีสต์ได้

Chen (1996) ได้สรุปปัญหาที่สำคัญของการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ได้แก่ สายพันธุ์สาหร่ายที่สามารถนำมาเลี้ยงได้ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกมีอยู่น้อย มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ง่าย มีการยับยั้งการเติบโตเกิดขึ้นได้จากสารอินทรีย์ในน้ำที่แม้จะมีความเข้มข้นไม่สูงมากนัก และอาจไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้กับการผลิตสาหร่ายบางชนิดที่ต้องการให้มีสารสี (pigments) เนื่องจากสารสีต่างๆ จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ปัญหาเหล่านี้เป็นสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงโดยเฉพาะอย่างยิ่งจะต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่สามารถเติบโตได้โดยไม่ต้องใช้แสง ซึ่งจากการทดสอบเบื้องต้นจากสายพันธุ์สาหร่ายโดยเฉพาะไดอะตอมที่มีผู้แยกเลี้ยงไว้ก่อนแล้วพบว่าไดอะตอมเหล่านั้นไม่สามารถเติบโตได้ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก งานวิจัยนี้จึงได้ทำการแยกสายพันธุ์ไดอะตอมจากธรรมชาติ นำมาเลี้ยงในสภาวะปลอดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและรา (axenic culture) โดยมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาสรีรวิทยาการเติบโตของไดอะตอมสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาได้ ภายใต้สภาวะการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิกโดยไม่ต้องใช้แสง เพื่อเป็นการพัฒนาระบบวิธีการเลี้ยงที่จะสามารถนำไปปรับปรุงใช้ผลิตสาหร่ายเพื่อเป็นอาหารสัตว์น้ำได้ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมหัวเชื้อไดอะตอมสำหรับใช้ทดลอง

ทำการแยกสายพันธุ์ไดอะตอมที่สามารถเติบโตได้ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกจากน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งแหลมแท่น ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี (มะลิวัลย์, 2543) จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหุ้มเซลล์สามารถจำแนกชนิดได้เป็น *Amphora delicatissima* Krasske ให้ชื่อสายพันธุ์ AM9901 และเก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการของหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-

มหาวิทยาลัย ก่อนการทดลองจะนำไดอะตอมที่แยกได้มาทดสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียโดยถ่ายเชื้อสาหร่ายด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ มาใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรีย (nutrient broth) ปริมาตร 1 มล. จากนั้นนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28±2ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งหากมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียทำให้อาหารเหลวมีลักษณะขุ่น จะต้องมีการทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการเติมสารละลายยาปฏิชีวนะที่ประกอบด้วย เพนนิซิลิน-จี สเตรพโตมัยซิน และคลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้น 10, 5 และ 1 มก./ล. ตามลำดับ เมื่อได้สายพันธุ์ไดอะตอมที่ปราศจากการปนเปื้อนแล้วจึงนำมาขยายพันธุ์ในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร F/2 (Guillard and Ryther, 1962) ความเค็ม 30 ส่วนในพัน โดยให้แสงความเข้ม 3,000 ลักซ์ ช่วงมืดต่อช่วงสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28±2ºC เก็บรักษาไว้สำหรับเป็นหัวเชื้อไดอะตอมสำหรับการทดลองต่อไป

2. เปรียบเทียบการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร F/2 ในสภาวะที่มีแสงและที่มืด

ทำการเปรียบเทียบการเติบโตของ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 โดยแบ่งออกเป็นสองชุด ชุดแรกจัดเป็นชุดควบคุมที่ทำการเลี้ยง *A. delicatissima* ในสภาวะปกติ คือ เลี้ยงในขวดแก้วขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ความเค็ม 30 ส่วนในพัน ปริมาตร 100 มล. ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28±2ºC ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงมืดต่อช่วงสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ส่วนชุดที่สองจัดเป็นชุดทดลองซึ่งมีการห่อขวดเลี้ยงเซลล์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ไดอะตอมได้รับแสง ตรวจวัดอัตราการเติบโตโดยการนับจำนวนเซลล์ไดอะตอมบนสไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ทุก 24 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน

3. ผลของแหล่งคาร์บอนในรูปกลูโคส กรดแอซิติก และโซเดียมไบคาร์บอเนต ต่อการเติบโตของไดอะตอม *Amphora delicatissima* ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง

ทำการทดลองเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการปรับเปลี่ยนเพิ่มเติมแหล่งคาร์บอนในรูปแบบของคาร์บอนอินทรีย์ ได้แก่ กลูโคสหรือกรดแอซิติก เปรียบเทียบกับการเติมคาร์บอนอนินทรีย์โซเดียมไบคาร์บอเนต โดยจัดเตรียมให้มีความเข้มข้นของคาร์บอนทั้งสามรูปแบบที่เติมลงในอาหารเพาะเชื้อเท่ากันคือ 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร ทำการเลี้ยงไดอะตอมในสูตรอาหารที่มีการเติมคาร์บอนทั้งสามสูตรภายใต้สภาวะการเลี้ยงทั้งแบบมีแสงและไม่มีแสงในลักษณะเดียวกับการทดลองที่ 2 ตรวจวัดอัตราการเติบโตทุก 24 ชั่วโมง

4. ผลของการเติมส่วนผสมของอาหารเพาะเชื้อแบคทีเรีย (nutrient broth) ลงในสูตรอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด

ทดลองเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหารเพาะเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ (1) อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร (2) อาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกความเข้มข้น 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร (3) อาหารสูตร F/2 ที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient broth) ที่ประกอบด้วย สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 5 กรัม/ลิตร และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ความเข้มข้น 2 กรัม/ลิตร และ (4) อาหารสูตร F/2 ที่เติมกรดแอซิติกความเข้มข้น 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเช่นเดียวกับสูตรที่สาม โดยทุกชุดการทดลองได้ทำการเลี้ยงไดอะตอมในที่มืดโดยห่อขวดรูปชมพู่ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2ºC ตรวจวัดอัตราการเติบโตทุก 24 ชั่วโมง

5. ผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร F/2 ที่ผสมอาหารเพาะเชื้อแบคทีเรียต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด

ทำการทดลองเพาะเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสดังนี้ คือ 1, 4, 8, 12 และ 16 กรัมคาร์บอน/ลิตร โดยทุกชุดการทดลองได้ทำการเลี้ยงไดอะตอมในที่มืดในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2ºC ไม่ให้แสงสว่าง ตรวจวัดอัตราการเติบโตทุก 24 ชั่วโมง

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

1. เปรียบเทียบการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร F/2 ในที่มีแสง และที่มืด

ผลการทดลองพบว่าไดอะตอม *A. delicatissim* ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร F/2 และได้รับแสงจะมีการเติบโตจนกระทั่งมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 5.77 (±0.46) × 10^5 เซลล์/มล. ในวันที่ 10 ของการเลี้ยง โดยมีอัตราการเติบโตเท่ากับ 0.46/วัน ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงในที่มืด จะมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 1 และ 2 และจะลดจำนวนลงในวันที่ 3 จนกระทั่งจะไม่พบเซลล์สาหร่ายเลยในวันที่ 5 (Figure 1)

การที่ *A. delicatissim* ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ปกติ ไม่สามารถเติบโตได้ในที่มืดก็เนื่องมาจากสาหร่ายมีการดำรงชีวิตแบบโฟโตออโตโทรป (photoautotroph) คือสร้างอาหารขึ้นเองด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งจะเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรต โดยอาศัยรงควัตถุที่มีอยู่ภายในเซลล์เป็นสิ่งสำคัญในการรับพลังงานจากแสง (JØrgensen, 1977) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ซึ่งมีองค์ประกอบทั้งหมดเป็นสารอนินทรีย์ ไม่สามารถใช้เลี้ยงไดอะตอมในสภาวะที่ไร้แสงได้ เนื่องจากไม่มีแหล่งพลังงานในรูปแบบของสารอินทรีย์คาร์บอน

2. ผลของแหล่งคาร์บอนในรูปกลูโคส โซเดียมไบคาร์บอเนตและกรดแอซิติก ต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง

เมื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนในรูปกลูโคส, ไบคาร์บอเนต และกรดแอซิติก ต่อการเติบโตของ *A. delicatissima* ในที่มีแสงและที่มืด (Figure 2) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ชุดทดลองที่มีการให้แสงสว่างไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 และมีการเติมกรดแอซิติกมีการเติบโตดีที่สุด โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 12.6 (±1.4) × 10^5 เซลล์/มล. ในวันที่ 10 ของการเลี้ยง และมีอัตราการเติบโต 0.58/วัน สภาวะการเลี้ยงดังกล่าวเรียกว่า มิกโซโทรฟิก (mixotrophic) เนื่องจากไดอะตอมได้รับทั้งแสงและสารอินทรีย์คาร์บอน ซึ่งในสภาวะดังกล่าวมีผลการเติบโตที่ดีกว่าการเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ตามปกติ (โฟโตโทรฟิก) ส่วนในชุดทดลองที่เลี้ยงไดอะตอมในที่มืดพบว่าไดอะตอมที่เลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อที่มีการเติมคาร์บอนอินทรีย์ (กลูโคสหรือกรดแอซิติก) เท่านั้นจึงจะสามารถเติบโตได้ ในขณะที่ไดอะตอมไม่สามารถเติบโตได้ในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการเติมคาร์บอนในรูปของไบคาร์บอเนตซึ่งเป็นคาร์บอนอนินทรีย์ เนื่องจากไดอะตอม

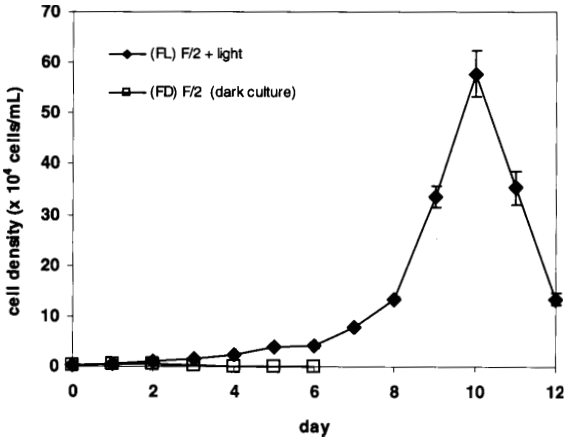

Figure 1. Growth of *A. delicatissima* in F/2 algal medium with illumination (FL) and without illumination (FD).

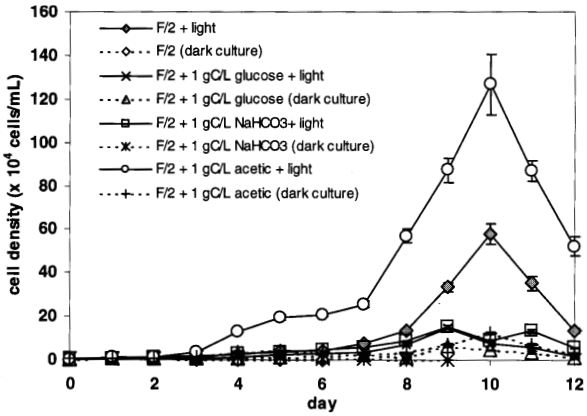

Figure 2. Growth of *A. delicatissima* in F/2 algal medium with eight culture conditions.

จะสามารถใช้ไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งของคาร์บอนได้เฉพาะเวลาที่มีการสังเคราะห์ด้วยแสงเท่านั้น

การเติมสารอินทรีย์คาร์บอนลงในอาหารจะทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน และยังเป็นแหล่งของคาร์บอนให้แก่เซลล์อีกด้วย ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเติมเฉพาะแหล่งของคาร์บอนในรูปแบบของกลูโคสหรือกรดแอซิติกลงในอาหารเพาะเชื้อนั้นช่วยให้ *A. delicatissima* สามารถเติบโตได้ในที่มืด แต่ผลการทดลองใน Figure 2 แสดงให้เห็นว่าอัตราการเติบโตของ *A. delicatissima* ในที่มืดนั้นยังต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ซึ่ง Chen (1996) ได้แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกโดยทั่วไปแล้วจะให้ผลผลิตที่มีความหนาแน่นเซลล์สูงกว่าการเลี้ยงสาหร่ายด้วยวิธีโฟโตออโต-โทรฟิก แสดงว่าการเติมสารอินทรีย์คาร์บอนเพียงอย่างเดียวลงในอาหารเพาะเชื้ออาจไม่เพียงพอต่อความต้องการของไดอะตอม เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเพาะเชื้อแบคทีเรียที่มีการเติมแหล่งของสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น สารสกัดเนื้อ เปปโตน หรือสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งจะเป็นแหล่งของสารอินทรีย์อื่นๆ ไม่เฉพาะแต่คาร์บอนเท่านั้น

3. ผลของการเติมส่วนผสมของอาหารเพาะเชื้อแบคทีเรีย (nutrient broth) ลงในสูตรอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ในที่มืด

การทดลองเลี้ยง *A. delicatissima* ในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายที่มีการเติมสารอินทรีย์คาร์บอนในรูปแบบของกลูโคสหรือกรดแอซิติก ร่วมกับการเติมส่วนผสมของอาหารเพาะเชื้อแบคทีเรีย (Nutrient Broth: NB) ที่ประกอบด้วยสารสกัดจากเนื้อ เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ พบว่าไดอะตอม *A. delicatissima* จะเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่มีการเติมทั้งกลูโคส และ NB จะโดยมีความหนาแน่นสูงสุดเท่ากับ $5.2\ (\pm 0.16) \times 10^5$ เซลล์/มล. และมีอัตราการเติบโต 0.54/วัน ซึ่งเป็นอัตราการเติบโตที่สูงกว่าการเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร F/2 ที่เติมเฉพาะกลูโคสเพียงอย่างเดียว (Figure 3) และการเติมส่วนผสมของ NB ลงในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมกรดแอซิติกเป็นแหล่งของคาร์บอนก็จะช่วยให้สาหร่ายมีการเติบโตที่ดีกว่าการเติมเฉพาะกรดแอซิติกเพียงอย่างเดียวเช่นเดียวกัน ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับ Cid *et al*. (1992) ซึ่งพบว่าสาหร่าย *Tetraselmis* ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อที่เติมเปปโตน กลูโคส และสารสกัดยีสต์ผสมกัน จะทำให้ความหนาแน่นเซลล์สาหร่ายสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารอินทรีย์คาร์บอน แสดงให้เห็นว่านอกเหนือไปจากการเติมกลูโคสซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งของพลังงานและคาร์บอนแล้ว การเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกจะต้องมีการให้สารอาหารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมอีก

การเติบโตของสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืดนั้น มีลักษณะเช่นเดียวกับการเติบโตของแบคทีเรีย คือเป็นการเติบโตโดยใช้สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นทั้งแหล่งพลังงาน และเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ แหล่งพลังงานที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่ น้ำตาล แป้ง ไขมัน โปรตีน กรดอะมิโน ฯลฯ พลังงานที่จำเป็นต่อการเติบโตจะถูกปลดปล่อยจากสารอินทรีย์โดยกระบวนการออกซิเดชัน (Brock *et al*., 1984) ดังนั้นอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด ก็ควรมีองค์ประกอบคล้ายกับอาหารเพาะเชื้อแบคทีเรีย โดยจะต้องมีแหล่งของคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดอะมิโน และโปรตีน มีฟอสฟอรัสและแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม คลอไรด์ เหล็ก (Brock and Brock, 1979) การเติมส่วนผสมของสารสกัดจากเนื้อ เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ตามสูตรอาหาร NB (Bridson, 1995) ลงในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร F/2 จึงเป็นการเพิ่มสารอาหารอินทรีย์ที่จำเป็นสำหรับการเติบโตในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกของไดอะตอม *A. delicatissima* ทำให้การเพาะเลี้ยง *A. delicatissima* แบบเฮเทอโรโทรฟิกในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เติมกลูโคสผสมกับ NB ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ให้ผลการเลี้ยงดีที่สุดในการทดลองนี้ สามารถเติบโตจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดประมาณ 5×10^5 เซลล์/มล. ใกล้เคียงกับการเติบโตของ *A. delicatissima* ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีการให้แสงตามปรกติ (Figure 2)

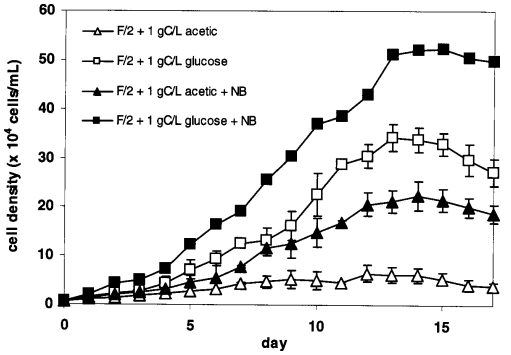

Figure 3. Growth of *A. delicatissima* in dark heterotrophic culture.

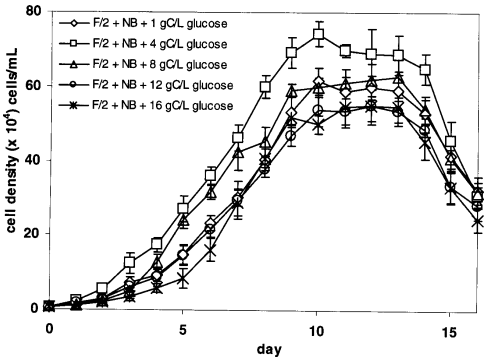

Figure 4. Heterotrophic growth of *A. delicatissima* in F/2 algal medium supplied with NB and 1, 4, 8, 12 or 16 gC/L glucose.

4. ผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร F/2 ที่ผสมอาหารเพาะเชื้อแบคทีเรียต่อการเติบโตของ *Amphora delicatissima* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด

การเพาะเลี้ยง *A. delicatissima* ในที่มืดด้วยอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมส่วนผสมของอาหารเพาะเชื้อแบคทีเรีย (NB) และมีการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสตั้งแต่ 1, 4, 8, 12 จนถึง 16 กรัมคาร์บอน/ลิตร พบว่าความเข้มข้นของกลูโคสที่ทำให้ไดอะตอมสามารถเติบโตได้ดีที่สุดคือ 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร (10 กรัมกลูโคส/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ซึ่งจะได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด 7.4 ($\pm$0.3) $\times 10^5$ เซลล์/มล. ในวันที่ 10 ของการเลี้ยง โดยมีอัตราการเติบโต 0.96/วัน ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้นเป็น 8 ถึง 16 กรัมคาร์บอน/ลิตร ไดอะตอมกลับมีอัตราการเติบโตและจำนวนเซลล์สูงสุดลดต่ำลง (Figure 4)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเชื้อมีผลทำให้ไดอะตอม *A. delicatissima* มีการเติบโตและความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ที่มากเกินไปกลับมีผลยับยั้งการเติบโต ลักษณะดังกล่าวพบรายงานในสาหร่ายชนิดอื่นๆ เช่น *Chlamydomonas* สามารถเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเชื้อที่เติมแอซิเตตเป็นแหล่งของคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้น 0.4 กรัม/ลิตร แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของแอซิเตตให้สูงกว่า 0.4 กรัม/ลิตร จะพบว่ามีการยับยั้งการเติบโตของเซลล์เนื่องจากความเข้มข้นของแอซิเตตที่มากเกินไป (Chen and Johns, 1996) หรือในสาหร่าย *Chlorella* ซึ่งสามารถเติบโตในอาหารเพาะเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในรูปเมธานอลที่ความเข้มข้นต่ำได้ดีกว่าในอาหารที่เมธานอลที่ความเข้มข้นสูง (Kotzabasis *et al*., 1999)

สรุปผลการศึกษา

ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมสารอินทรีย์คาร์บอนในรูปกลูโคสและกรดแอซิติกลงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ทำให้ไดอะตอม *A. delicatissima* สามารถเติบโตภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืดได้ ในขณะที่ไดอะตอมจะตายอย่างรวดเร็วหากเลี้ยงในที่มืดในอาหารเพาะเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอินทรีย์คาร์บอน สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ *A. delicatissima* มีการเติบโตในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เติมกลูโคส 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NB โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 7.4 ($\pm$0.4) $\times 10^5$ เซลล์/มล. งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นแนวทางของการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด ซึ่งยังมีการวิจัยอยู่น้อยมากในประเทศไทย การเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบเฮเทอโรโทรฟิกด้วยอาหารเพาะเชื้อที่มีการเติม NB จะต้องระวังไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถเติบโตได้เร็วกว่าไดอะตอมมาก ดังนั้นการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นและการเพาะเลี้ยงทุกขั้นตอนจะต้องทำในสภาวะปลอดการปนเปื้อน

(axenic culture)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือในการวิจัย ได้แก่ นส.มะลิวัลย์ คุตะโค ผศ.ชนวัฒน์ ตันติวรานุรักษ์ และ ศ.ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และได้รับการสนับสนุนทุนบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ โดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

มะลิวัลย์ คุตะโค. 2543. การแยกสายพันธุ์และการเจริญของไดอะตอมสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก จากชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา.

วีระพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย. 2536. อาหารปลา. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

Bridson, E.Y. 1995. The Oxoid Manual. 7th Edition. Unipath Limited, London

Brock, T.D. and Brock, K.M. 1979. Basic Microbiology with Application, 2nd ed. Prentice-Hall Inc., New Jersey.

Brock, T.D., Smith, D.W. and Madigan, M.T. 1984. Biology of Microorganism. 4th ed. Prentice-Hall Inc., New Jersey.

Chen, F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. TIBTECH., 14: 421-726.

Chen, F. and Johns, M.R.1996. Relationship between substrate inhibition and maintenance energy of *Chlamydomonas reinhardtii* in heterotrophic culture. J. Appl. Phycol., 8: 15-19.

Cid, A., Abalde, J. and Herrero, C. 1992. High yield mixotroph culture of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Prasinophyceae). J. Appl. Phycol., 4: 31-37.

Day, J.G. and Tsavalos, A.J. 1996. An investigation of the heterotrophic culture of the green alga *Tetraselmis* J. Appl. Phycol ., 8: 73-77.

Gladue, R. 1991. Heterotrophic microalgae production: Potential for application to aquaculture feeds. In Rotifer and Microalgae Culture System. Proceeding of a U.S.-Asia Workshop. Honolulu January 28-31, 1991. The Oceanic Institute, pp. 275-286.

Gracia, M.C., Sevilla, J. M., Fernandez, F.G., Grima, E.M. and Camacho, F.G. 2000. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. J. Appl. Phycol., 12: 239-248.

Guillard, R.R.I. and Ryther, J.H. 1962. Studies on marine phytoplanktonic diatoms. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol., 8: 229-239.

Hellebust, J.A. and Lewin, J. 1977. Heterotrophic Nutrition. In Werner, D. (ed) The Biology of Diatoms. London: Blackwell Scientific Publication.

JØrgensen, E.G. 1977. Photosynthesis. In Werner, D. (ed) The Biology of Diatoms. London: Blackwell Scientific Publication.

Kitano, M., Matsukawa, R. and Karube, I. 1997. Changes in eicosapentaenoic acid content of *Navicula saprophila, Rhodomonas salina* and *Nitzschia* sp. under mixotrophic condition. J. Appl. Phycol., 9: 559-563.

Kitano, M., Matsukawa, R. and Karube, I. 1998. Enhanced eicosapentaenoic acid production by *Navicula saprophila*. J. Appl. Phycol., 10: 101-105.

Kotzabasis, K., Hatziathanasiou, A., Bengoa, M.V., Kentouri, M. and Divanach. 1999. Methanol as alternative carbon source for quicker efficient production of the microalgae *Chlorella minutissima*: Role of the concentration and frequence of administration. J. Biotechnol., 70: 357-362.

Ogbonna, J.C., Masui, H. and Tanaka, H. 1999. Production of α-tocopherol by sequential heterotrophic-photoautotrophic cultivation of *Euglena gracilis*. J. Biotechnol., 70: 213-221.

Shi, X Chen, F., Yuan, J and Chen, H. 1997. Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains. J. Appl. Phycol., 9: 445-450.

Tan, C.K. and Johns, M.R.1996. Screening diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production. J. Appl. Phycol., 8: 59-64.