นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของอัตราการเจือจางและความเข้มแสงต่อการเติบโตของไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปทรงแผ่นแบน

มะลิวัลย์ คุตะโค[1] และ สรวิศ เผ่าทองศุข[2]

Abstract

Kutako, M. and Powtongsook, S.

Effect of dilution rate and light intensity on growth of a diatom *Chaetoceros calcitrans* under continuous cultivation in flat-panel photobioreactor

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2006, 28(5) : 965-975

Batch and continuous cultures of a marine diatom *Chaetoceros calcitrans* were conducted in flat-panel photobioreactors. The photobioreactor was made of transparent plastic sheet filled with 5.5 L of Guillard's F/2 culture medium (prepared with 30 PSU salinity seawater). The photobioreactor was continuously illuminated at 16 μmol photon m^{-2} s^{-1} with fluorescence lamps and operated under ambient room temperature (26-38ºC). With batch cultivation, *C. calcitrans* had the maximum cell density of $160x10^4$ cells ml^{-1} and maximum specific growth rate of 1.03 day^{-1}. During continuous cultivation, addition of fresh medium and removal of diatom cells were conducted using a peristaltic pump. The dilution rate was varied

Center of Excellence for Marine Biotechnology (c/o Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Phathum Thani 12120, Thailand.

[1]วท.ม.(เทคโนโลยีชีวภาพ) [2]Ph.D.(Molecular Biology and Biotechnology) นักวิจัย 2 ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล (ณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

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

รับต้นฉบับ 28 กรกฎาคม 2548 รับลงพิมพ์ 24 กุมภาพันธ์ 2549

from 0.52 to 1.97 day^{-1} in 12 steps. The results showed that the highest cell density of 193x10^4 cells ml^{-1} was obtained at the lowest dilution rate (0.52 day^{-1}). When the dilution rate was increased to 1.97 day^{-1}, cell density of the diatom at steady state was decreased to 6x10^4 cells ml^{-1}. However, the highest productivity was obtained at 0.98 day^{-1} dilution rates which provided cell productivity of 132x10^4 cell ml^{-1} day^{-1}. In addition, increase in light intensity from 16 to 40 µmol photon m^{-2} s^{-1} resulted in an increase of the diatom growth and productivity, especially at low dilution rate. With this study, the recommended dilution rate for continuous cultivation of *C. calcitrans* was approximately 0.8 day^{-1}. At this dilution rate, cell productivity of approximately 112x10^4 cells ml^{-1} day^{-1} or cell dry weight productivity of 64 mg L^{-1} day^{-1} could be expected.

Key words : microalgae, diatom, *Chaetoceros*, continuous culture, photobioreactor

บทคัดย่อ

มะลิวัลย์ คุตะโค และ สรวิศ เผ่าทองศุข

ผลของอัตราการเจือจางและความเข้มแสงต่อการเติบโตของไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปทรงแผ่นแบน

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2549 28(5) : 965-975

การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* แบบแบตช์และแบบต่อเนื่อง ทำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปทรงแผ่นแบนที่ทำจากพลาสติกใสวางในแนวตั้ง ภายในบรรจุอาหารเพาะสาหร่ายสูตร Guillard F/2 ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 PSU ปริมาตร 5.5 ลิตร ให้แสงความเข้ม 16 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ และทำการทดลองในห้องที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ (อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 26-38°C) พบว่าในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 160x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ และมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด 1.03 วัน$^{-1}$ จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่มีการเติมอาหารเพาะเชื้อใหม่และนำเซลล์ออกตลอดเวลาโดยใช้เครื่องสูบน้ำแบบรีดสาย ในระหว่างการทดลองได้แปรผันอัตราการเจือจาง (dilution rate) ระหว่าง 0.52 วัน$^{-1}$ ถึง 1.97 วัน$^{-1}$ จำนวน 12 ระดับ พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอัตราการเจือจางต่ำ 0.52 วัน$^{-1}$ ไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 193x 10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ และการเพิ่มอัตราการเจือจางส่งผลให้ความหนาแน่นของเซลล์ไดอะตอมลดลง โดยเมื่อปรับอัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นเป็น 1.97 วัน$^{-1}$ พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นลดลงเหลือ 6x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ แต่เมื่อพิจารณาอัตราผลผลิต (productivity) พบว่าระดับอัตราการเจือจาง 0.98 วัน$^{-1}$ จะให้อัตราผลผลิตเซลล์สูงสุด 132x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ วัน$^{-1}$ นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มแสงจาก 16 เป็น 40 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ ส่งผลให้เซลล์มีความหนาแน่นและอัตราผลผลิตสูงขึ้น โดยความเข้มแสงจะมีผลมากในการเลี้ยงด้วยอัตราการเจือจางต่ำ โดยอัตราการเจือจางที่ควรใช้สำหรับการเพาะเลี้ยง *C. calcitrans* แบบต่อเนื่องอยู่ที่ประมาณ 0.8 วัน$^{-1}$ ซึ่งจะให้อัตราผลผลิตเซลล์ประมาณ 112x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ วัน$^{-1}$ หรือคิดเป็นอัตราผลผลิตน้ำหนักแห้ง 64 มก. ลิตร$^{-1}$ วัน$^{-1}$

ไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวที่นิยมนำมาใช้เป็นอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงและอนุบาลสัตว์น้ำเค็ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งลูกกุ้ง ลูกปู และหอยสองฝา เนื่องจากองค์ประกอบทางชีวเคมีของไดอะตอมชนิดนี้อุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) เช่น EPA (eicosapentaenoic acid, C20: 5ω3) AA (arachidonic acid, C20:4ω6) และ DHA (docosahexaenoic acid, C22:6ω3) ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการ อัตราการเติบโตและอัตราการรอดของสัตว์น้ำ การสำรวจเอกสารงานวิจัยพบว่าไดอะตอม *Chaetoceros* sp. มีการสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวดังกล่าวในปริมาณที่สูงกว่าสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดอื่นๆ เช่น *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira* sp. และ *Isochrysis* sp. (Enright *et al*., 1986; Whyte, 1984)

โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อใช้ในอุตสาห-

กรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนิยมทำในระบบเปิด (open system) ซึ่งทำได้ง่ายและลงทุนไม่มาก แต่ระบบการเพาะเลี้ยงแบบเปิดมักเกิดการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะโปรโตซัวและแบคทีเรียต่างๆ ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อคุณภาพของผลผลิตสาหร่ายและอาจก่อให้เกิดโรคแก่สัตว์น้ำ (Chaumont, 1993; Richmond, 1996) ปัญหาดังกล่าวสามารถหลีกเลี่ยงได้โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบปิดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง (enclosed photobioreactor system) ซึ่งมีข้อดีคือ (1) สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมทางกายภาพในการเพาะเลี้ยงได้ (2) สาหร่ายมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทำให้สัมผัสกับแสงได้อย่างทั่วถึง (3) อัตราการระเหยของน้ำในอาหารเพาะเชื้อระหว่างการเพาะเลี้ยงมีน้อย (4) สามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้ดี (5) ให้ผลผลิตที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในบ่อเปิด (6) ลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเนื่องจากสามารถเลี้ยงสาหร่ายได้ด้วยความหนาแน่นสูงขึ้น (Chen, 1996) ในปัจจุบันมีการผลิตสาหร่ายโดยเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ เช่น การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Porphyridium cruentum* (Rebolloso Fuentes *et al*., 1999), *Isochrysis galbana* (Zhu *et al*., 1997) และ *Phaeodactylum tricornutum* (Chrismadha and Borowitzka, 1994) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบท่อยาว (tubular photobioreactor) การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum littorale* (Hu *et al*., 1998) และ *Spirulina platensis* (Hu *et al*., 1996) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบน (flat-panel photobioreactor) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทั้งสองแบบจะพบว่าถังปฏิกรณ์แบบแผ่นแบนมีข้อได้เปรียบคือ ถังปฏิกรณ์มีความบางทำให้แสงสามารถส่องผ่านได้ดี มีพื้นที่ในการรับแสงมากและรูปแบบของถังปฏิกรณ์ที่ปราศจากข้อต่อทำให้ลดปัญหาในระหว่างการใช้งาน รวมทั้งสามารถปรับเปลี่ยนวัสดุที่ใช้ทำถังปฏิกรณ์ได้ตามความเหมาะสม ไม่ว่าจะเป็นแก้ว พลาสติกอะคริลิก (acrylic) และแผ่นพลาสติกใสชนิดอื่นๆ (Richmond and Cheng-Wu, 2001)

งานวิจัยนี้ได้สร้างถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบนเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *C. calcitrans* แบบต่อเนื่อง โดยได้เลือกใช้วัสดุที่เป็นแผ่นพลาสติก PVC ชนิดใส ความหนา 0.7 มม. นำมาพับขึ้นรูปเป็นถังปฏิกรณ์ การใช้พลาสติก PVC ทำให้ถังปฏิกรณ์ขนาดความจุ 5.5 ลิตร มีต้นทุนการสร้างเพียง 140 บาท ซึ่งจะถูกกว่าการใช้กระจกหรือพลาสติกชนิดอื่น แต่มีความคงทนเพียงพอสำหรับการใช้งานในระยะเวลา 1-2 ปี โดยในการทดลองจะนำถังปฏิกรณ์ดังกล่าวมาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องเพื่อให้ได้ผลผลิตเซลล์ที่เติบโตในระยะทวีคูณ (exponential phase) ตลอดเวลา ซึ่งจะเป็นผลผลิตสาหร่ายที่มีคุณภาพสูงและมีองค์ประกอบทางชีวเคมีคงที่ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบตช์ (batch culture) ทั่วไปจะได้เซลล์ที่เติบโตอยู่ในช่วงปลายของระยะเติบโต และในความเป็นจริงพบว่าเกษตรกรทั่วไปมักปล่อยให้เซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) หรือระยะตาย (death phase) เนื่องจากขาดการดูแลและถ่ายเชื้อที่เหมาะสม โดยผลจากการทดลองที่ได้จะนำมาใช้เป็นแนวทางในการผลิตไดอะตอม *C. calcitrans* แบบต่อเนื่อง เพื่อใช้สำหรับการอนุบาลลูกสัตว์น้ำต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

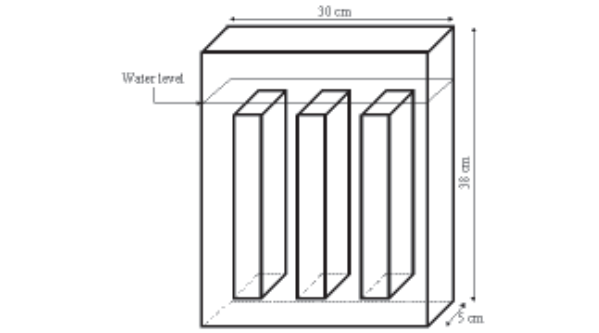
1. หัวเชื้อไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* ที่ใช้ในการทดลอง

หัวเชื้อของไดอะตอม *C. calcitrans* ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา นำมาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเพาะสาหร่ายสูตร F/2 (Guillard and Ryther, 1962) ปริมาตร 100 มล. ซึ่งเตรียมจากน้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 PSU เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2ºC และมีแสงความเข้มประมาณ 16 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ ตลอด 24 ชั่วโมง เมื่อไดอะตอมมีการเติบโตเข้าสู่ระยะทวีคูณจึงทำการขยายปริมาตรการเพาะเลี้ยงเพื่อนำไปใช้เป็นเซลล์เริ่มต้น (starter) ในการทดลอง โดยย้ายไดอะตอมลงเพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพาะสาหร่ายสูตร F/2 ปริมาตร 4 ลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับการเลี้ยงหัวเชื้อไดอะตอมแต่มีการพ่นอากาศตลอดเวลา

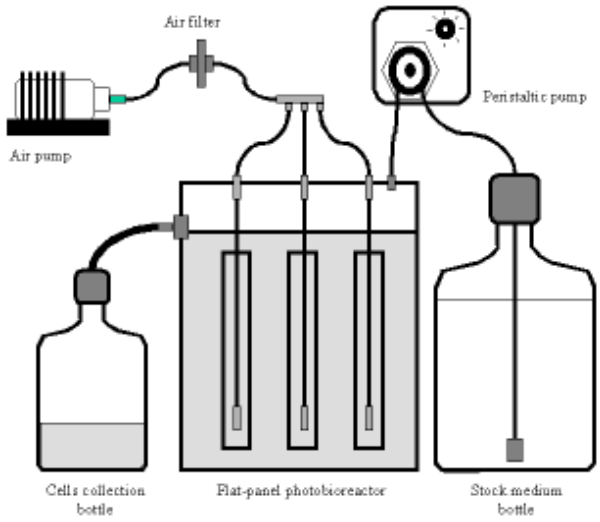
2. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *C. calcitrans*

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *C. calcitrans* มีรูปทรงแบบแผ่นแบนวางในแนวตั้ง ทำจากแผ่นพลาสติก PVC ใสที่มีขนาดกว้าง 30 ซม. สูง 38 ซม. และหนา 5 ซม. (Figure 1A) ปริมาตรการทำงานของถังปฏิกรณ์เท่ากับ 5.5 ลิตร ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ประกอบด้วย ท่อพลาสติกใสรูปทรงสี่เหลี่ยมขนาด 3 x 28 x 5 ซม. จำนวน 3 ท่อ ติดตั้งห่างจากก้นถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 4 ซม. พ่นอากาศที่กรองผ่านชุดกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร (Gelman Sciences รุ่น Acro 50) ลงในท่อพลาสติกทั้ง 3 ท่อ อากาศจากด้านล่างจะลอยตัวขึ้นสู่ด้านบนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เกิดกระแสการหมุนของมวลน้ำแบบอากาศยก (air-lifted) ทำให้เซลล์ไดอะตอมมีการเคลื่อนที่และกระจายตัวอยู่ในมวลน้ำอย่างสม่ำเสมอตลอดเวลา ส่วนด้านบนของถังปฏิกรณ์ปิดผนึกด้วยฝาที่ทำจากพลาสติกใส ก่อนเริ่มเพาะเลี้ยงไดอะตอมจะทำการฆ่าเชื้อภายในถังปฏิกรณ์และในน้ำทะเลที่ใช้เตรียมอาหารเพาะสาหร่ายโดยการพ่นแก๊สโอโซนเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นพ่นอากาศทิ้งไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง ก่อนที่จะเติมสารละลายเข้มข้นของอาหารเพาะสาหร่ายสูตร F/2 ลงในถังปฏิกรณ์

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่าย มีการให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์แสงสีขาวอย่างต่อเนื่องตลอด 24 ชั่วโมง โดยการบันทึกความเข้มแสงทำการวัดค่าความเข้มแสงที่บริเวณผิวหน้าของถังปฏิกรณ์และวัดค่าความเข้มแสงที่ส่องผ่านออกมาทางด้านหลังของถังปฏิกรณ์ที่มีการบรรจุน้ำทะเลอยู่ภายใน จากนั้นจึงนำค่าความเข้มแสง



(A)



(B)

Figure 1. Schematic design of a flat-panel photobioreactor (A) and continuous culture system used in this study (B).

ทั้งสองค่ามาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและใช้เป็นค่าความเข้มแสงจริงที่สาหร่ายได้รับภายในถังปฏิกรณ์

3. การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *C. calcitrans* แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบน

การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *C. calcitrans* แบบแบตช์ (batch) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีอาหารเพาะสาหร่ายสูตร F/2 ปริมาตร 5.5 ลิตร ทำโดยใช้เซลล์เริ่มต้นความหนาแน่น $5x10^4$ เซลล์ มล.$^{-1}$ นำมาทดลองเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ภายในห้องทดลองที่ไม่ติดตั้งเครื่องปรับอากาศซึ่งทำให้อุณหภูมิของอากาศมีการเปลี่ยนแปลงไปตามธรรมชาติเช่นเดียวกับอุณหภูมิที่พบได้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วไป และจัดให้มีแสงส่องสว่างอย่างต่อเนื่องตลอด 24 ชั่วโมง โดยมีความเข้มแสงในถังปฏิกรณ์เท่ากับ 16 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ ในระหว่างการทดลองมีการตรวจและบันทึกอุณหภูมิอากาศที่บริเวณถังปฏิกรณ์โดยใช้เครื่องบันทึกอัตโนมัติ และทำการตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer) และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate: μ) ของไดอะตอมดังสมการ (1)

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \qquad (1)$$

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (วัน$^{-1}$)
x = ความเข้มข้นเซลล์ (เซลล์ มล.$^{-1}$)
t = เวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (วัน)

4. การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *C. calcitrans* แบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบน

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *C. calcitrans* แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบนที่มีอาหารเพาะสาหร่ายสูตร F/2 ปริมาตร 5.5 ลิตร ระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องแสดงใน Figure 1B ในการทดลองเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง เริ่มต้นจากเพาะเลี้ยงแบบแบตช์เพื่อให้เซลล์มีการเติบโตในระยะทวีคูณ จากนั้นทำการเปลี่ยนระบบเพาะเลี้ยงจากแบบแบตช์เป็นแบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องสูบน้ำแบบรีดสายยาง (Masterflex® L/S peristaltic pump) สูบอาหารเพาะสาหร่ายสูตร F/2 จากถังเก็บขนาด 70 ลิตร เติมลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพอย่างต่อเนื่องและในขณะเดียวกันเซลล์ที่เติบโตอยู่ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพก็จะไหลออกจากระบบอย่างต่อเนื่องในอัตราที่เท่ากัน ในระหว่างการทดลองมีการตรวจวัดปริมาตรของอาหารเพาะสาหร่ายที่ไหลออกจากระบบเพาะเลี้ยงเป็นประจำทุกวัน เพื่อใช้ในการคำนวณอัตราการเจือจาง (dilution rate: D) ดังสมการ (2)

$$D = \frac{F}{V} \qquad (2)$$

D = อัตราการเจือจาง (วัน$^{-1}$)
F = อัตราการไหล (ลิตร วัน$^{-1}$)
V = ปริมาตรของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (ลิตร)

ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง เมื่อเซลล์มีการเติบโตในภาวะคงที่ (steady state) หมายถึงเซลล์มีการเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นทดแทนเซลล์ส่วนที่ถูกกำจัดออกจากระบบพอดี ดังนั้นอัตราการเติบโตจำเพาะของไดอะตอมจะเท่ากับอัตราการเจือจาง (μ = D) ซึ่งการแปรผันอัตราการเจือจางของถังปฏิกรณ์ในระหว่างการทดลอง จะต้องคงระดับอัตราการเจือจางที่ทำให้เซลล์เติบโตในภาวะคงที่เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน

4.1 ผลของอัตราการเจือจางต่อการเติบโตของไดอะตอม *C. calcitrans* ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบน

การทดลองในหัวข้อนี้ทำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจำนวน 3 ถัง ในแต่ละถังปฏิกรณ์เริ่มจากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์โดยใช้เซลล์เริ่มต้นประมาณ $33x10^4$ เซลล์ มล.$^{-1}$ จากนั้นเมื่อพบว่าเซลล์เริ่มมีการแบ่งตัวแบบทวีคูณจึงเริ่มปรับระบบการเพาะเลี้ยงเป็นแบบต่อเนื่อง โดยอัตราการเจือจางต่ำสุดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 50% ของอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (หัวข้อ 3) ซึ่งมีค่าประมาณ 0.52 วัน$^{-1}$ และเมื่อพบว่าเซลล์เติบโตในภาวะคงที่เป็นเวลานานกว่า 3 วัน จึงทำการเร่งความเร็วของเครื่องสูบน้ำเพื่อเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นดังแสดงใน Table 1

สภาวะแวดล้อมในระหว่างการทดลองคล้ายกับการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ โดยอุณหภูมิ

Table 1. Variation of dilution rates (average±SD) during continuous culture of *C. calcitrans* in each photobioreactor.

Reactor number	Dilution rate (day^{-1})			
	Day 3-17	Day 17-23	Day 23-29	Day 29-31
1	0.52±0.003	0.69±0.003	0.95±0.001	1.07±0.002
2	0.74±0.03	0.98±0.01	1.30±0.01	1.48±0.03
3	0.97±0.05	1.28±0.05	1.74±0.02	1.97±0.06

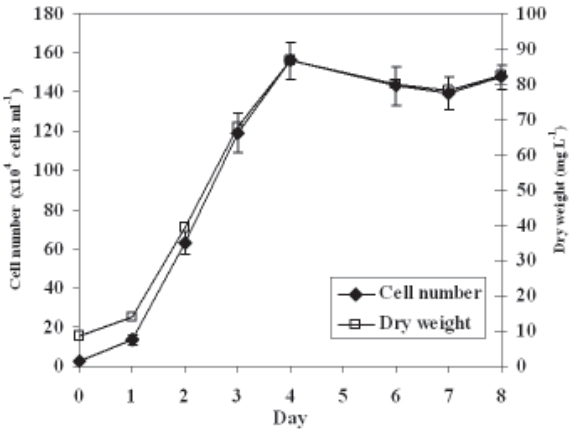


Figure 2. Batch culture of a marine diatom *C. calcitrans* in flat-panel photobioreactor.

ห้องขณะทดลองมีค่าเฉลี่ย 31±3ºC ความเข้มแสงภายในถังปฏิกรณ์ 16 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ (ประมาณ 800 ลักซ์) ตรวจวัดการเติบโตของไดอะตอมด้วยวิธีการนับเซลล์ และตรวจวัดน้ำหนักแห้งโดยการกรองสาหร่ายปริมาตร 20 มล. ด้วยแผ่นกรอง GF/C ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนและนำไปอบแห้งที่ 80ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำน้ำหนักสาหร่ายแห้งลบออกจากน้ำหนักของแผ่นกรอง และนำข้อมูลมาคำนวณอัตราผลผลิตของเซลล์ไดอะตอมในหน่วย มิลลิกรัมเซลล์แห้ง ลิตร$^{-1}$ วัน$^{-1}$

4.2 ผลของความเข้มแสงและอัตราการเจือจางต่อการเติบโตของไดอะตอม *C. calcitrans* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบน

ทำการทดลองในระบบถังปฏิกรณ์และสภาพแวดล้อมเช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อ 4.1 แต่มีการปรับเปลี่ยนความเข้มแสง 3 ระดับ คือ 16, 25 และ 40 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ (ประมาณ 800, 1250 และ 2000 ลักซ์) ทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์แบบต่อเนื่องโดยใช้อัตราการเจือจางเริ่มต้น 0.60 วัน$^{-1}$ หลังจากที่เซลล์อยู่ในภาวะคงที่จึงทำการเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นเป็น 0.92 และ 1.33 วัน$^{-1}$ ตามลำดับ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเติบโตของไดอะตอม *C. calcitrans* ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบน

ผลการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีอาหารเพาะเชื้อสาหร่ายปริมาตร 5.5 ลิตร ในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 160x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง หรือเท่ากับ 86 มก.เซลล์แห้ง ลิตร$^{-1}$ และไดอะตอมมีอัตราการเติบโตจำเพาะในช่วงวันที่ 0-4 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 1.03 วัน$^{-1}$ (Figure 2) โดยในระหว่างการทดลองมีอุณหภูมิเฉลี่ยของห้องปฏิบัติการ

เท่ากับ 31±3ºC (ต่ำสุด 26ºC และสูงสุด 38ºC) ซึ่งความหนาแน่นของไดอะตอมที่ได้จากการทดลองนี้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานไว้ในสภาวะการเลี้ยงของประเทศไทย เช่น ในการศึกษาของ ธิดาและประกิต (2527) ที่เพาะเลี้ยง *Chaetoceros* ได้ความหนาแน่นสูงสุด 104x 10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ ในสภาวะห้องปฏิบัติการ และการศึกษาของ โชติมา และคณะ (2533) ที่เพาะเลี้ยง *Chaetoceros* ในโหลแก้วขนาด 10 ลิตร ได้ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย 132x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ อย่างไรก็ตามการเติบโตและความหนาแน่นของไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบนโดยใช้การพ่นอากาศธรรมดาในการศึกษานี้มีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้รายงานไปแล้วในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยก (Krichnavaruk *et al*., 2005) ซึ่งได้ความหนาแน่นสูงกว่า 408x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ เนื่องจากการทดลองดังกล่าวเป็นการใช้อากาศที่มีส่วนผสมของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1% ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายได้มาก

2. ผลของอัตราการเจือจางต่อการเติบโตของไดอะตอม *C. calcitrans* ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบน

การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *C. calcitrans* แบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบนเป็นเวลา 31 วัน ผลการทดลองพบว่าหลังจากที่เลี้ยงแบบแบตช์เป็นเวลา 2 วัน ไดอะตอมมีการเติบโตเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ ดังนั้นจึงเริ่มทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยทดลองแปรผันอัตราการเจือจาง 4 ระดับ เริ่มต้นจากการใช้อัตราการเจือจาง 0.52 วัน$^{-1}$ ในช่วงวันที่ 5-16 พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย 193x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ หลังจากนั้นจึงได้เพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นเป็น 0.69, 0.95 และ 1.07 วัน$^{-1}$ ส่งผลให้ความหนาแน่นเฉลี่ยของเซลล์ในช่วงที่มีการเติบโตแบบต่อเนื่องลดลงเหลือ 170x10^4, 90x 10^4 และ 50x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ ตามลำดับ (Figure 3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติบโตของไดอะตอมภายในถังปฏิกรณ์เป็นไปตามรูปแบบของ chemostat culture ซึ่งเซลล์จะมีการเติบโตในระยะทวีคูณตลอดเวลา และความเข้มข้นของสารอาหารจะเป็นปัจจัยที่จำกัดอัตราการเติบโต ซึ่งในสภาวะดังกล่าวความหนาแน่นเซลล์จะแปรผกผันกับอัตราการเจือจาง (Bailey and Ollis, 1986)

ผลการเพาะเลี้ยง *C. calcitrans* แบบต่อเนื่องโดยใช้ถังปฏิกรณ์รูปแผ่นแบนจำนวน 3 ชุด โดยที่แต่ละถังปฏิกรณ์มีการแปรผันอัตราการเจือจาง 4 ระดับ (Table 1) ทำให้มีอัตราการเจือจางทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 12 ระดับ เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาประมวลเข้าด้วยกันจะได้ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 4 พบว่าการเพิ่มอัตราการเจือจางส่งผลให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลง และที่อัตราการเจือจาง 1.97 วัน$^{-1}$ เหลือความหนาแน่นเซลล์เพียง 6x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ ซึ่งหากเพิ่มอัตราการเจือจางให้สูงกว่านี้ก็จะ

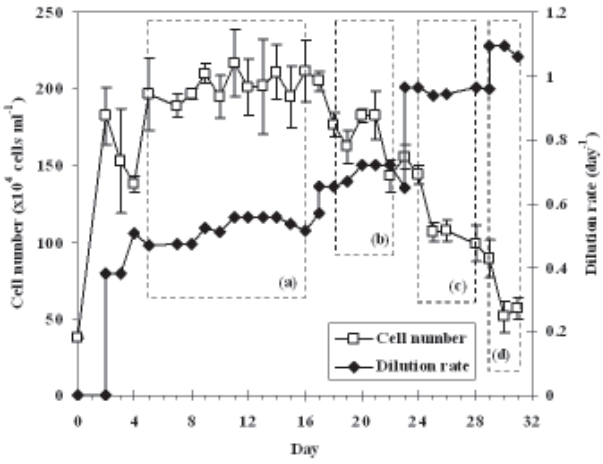


Figure 3. Concentration of *C. calcitrans* in flat-panel photobioreactor at various dilution rates (a = 0.52, b = 0.69, c = 0.95 and d = 1.07 day^{-1}, respectively).

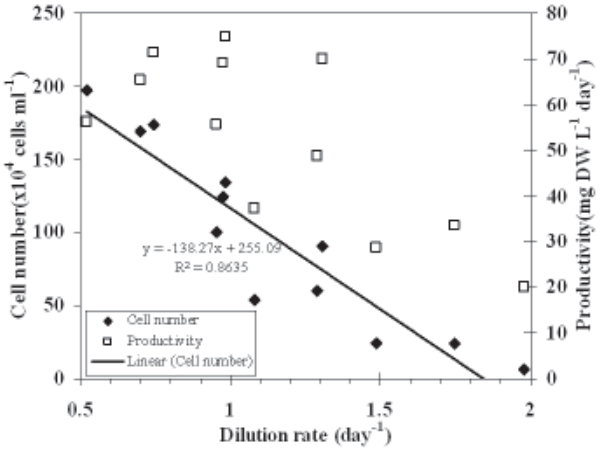


Figure 4. Cell density and productivity of *C. calcitrans* during continuous culture in flat-panel photobioreactor.

เกิดปรากฏการณ์ที่เซลล์ถูกชะออกจากระบบเพาะเลี้ยงจนหมด (washed out) โดยผลของอัตราการเจือจางกับความหนาแน่นเซลล์นี้มีลักษณะเช่นเดียวกันกับผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Amphora delicatissima* ของมะลิวัลย์ และคณะ (2547) ที่พบว่าการเพิ่มอัตราการเจือจางจาก 0.17 เป็น 0.81 วัน$^{-1}$ ส่งผลให้ความหนาแน่นเซลล์ของ *A. delicatissima* ลดลงจาก 300x10^4 เหลือ 90x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ เมื่อคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางและความหนาแน่นเซลล์ของ *C. calcitrans* พบว่าความหนาแน่นเซลล์จะแปรผกผันกับอัตราการเจือจางของระบบในลักษณะที่อธิบายได้ด้วยสมการเส้นตรง ซึ่งผลจากการคำนวณจากสมการจะมีความแม่นยำประมาณ 86% (R^2 = 0.86) เมื่อเทียบกับค่าที่วัดได้จริง ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองทำในห้องที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิเพื่อให้มีสภาวะแวดล้อมใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยทั่วไป ทำให้สภาวะแวดล้อมโดยเฉพาะอุณหภูมิในแต่ละช่วงของการทดลองมีความแตกต่างกันได้ ส่งผลให้เกิดการแปรผันของผลการทดลองขึ้นได้ค่อนข้างมาก

การชะล้างเซลล์ออกจากระบบจะเกิดขึ้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจางสูงกว่าอัตราการเติบโตสูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ไม่สามารถเติบโตแบ่งตัวได้ทันกับอัตราการเจือจางซึ่งเป็นการกำจัดเซลล์ออกจากถังเลี้ยง (Bailey and Ollis, 1986) ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจาง 1.48-1.97 วัน$^{-1}$ (Figure 4) ซึ่งเป็นอัตราการเจือจางที่สูงกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ซึ่งเท่ากับ 1.03 วัน$^{-1}$ (Figure 2) ส่งผลให้ความหนาแน่นเซลล์ในถังปฏิกรณ์ลดลงอย่างมาก โดย Wen และ Chen (2001) ก็ได้รายงานไว้ว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Nitzchia lavis* ด้วยอัตราการเจือจาง 1.0 วัน$^{-1}$ ซึ่งเป็นอัตราการเจือจางที่สูงกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ออกจากระบบจนหมด และหากต้องการเซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงก็ควรจะใช้อัตราการเจือจางที่มีค่าต่ำ

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.52 วัน$^{-1}$ จะให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 196x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ แต่อัตราผลผลิต (productivity) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Chaetoceros* ในงานวิจัยนี้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 132x10^4 เซลล์ มล.$^{-1}$ วัน$^{-1}$ หรือเท่ากับ 74.7 มก.เซลล์แห้ง ลิตร$^{-1}$ วัน$^{-1}$ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจาง 0.98 วัน$^{-1}$ (Figure 4) เนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางและอัตราผลผลิตเซลล์ของระบบการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องโดยทั่วไปมีแนวโน้มความสัมพันธ์เป็นแบบโพลีโนเมียล (Bailey and Ollis, 1986) ผลจากการทดลองนี้พบว่าสาหร่ายมีอัตราผลผลิตสูงเมื่อทำการเลี้ยง

แบบต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจางระหว่าง 0.5-1.3 วัน$^{-1}$ แม้ว่าในระหว่างการทดลองจะมีความแปรผันของอุณหภูมิในช่วงกว้างก็ตาม และอัตราการเจือจางที่ควรนำมาใช้สำหรับระบบการผลิต *Chaetoceros* แบบต่อเนื่องมีค่าประมาณ 0.8 วัน$^{-1}$ เพราะจะให้ทั้งอัตราผลผลิตต่อวันที่สูงและความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายที่ผลิตได้ก็มีค่าสูงด้วย แต่ในความเป็นจริงการเลือกปรับอัตราการเจือจางที่เหมาะสมจะต้องขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำสาหร่ายไปใช้ประโยชน์ ตัวอย่างเช่น การปรับอัตราการเจือจางสูงจะทำให้ไดอะตอมมีอัตราการแบ่งเซลล์เร็วและมีแนวโน้มที่จะได้เซลล์ที่มีขนาดเล็กและสม่ำเสมอ ซึ่งจะมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้เลี้ยงลูกกุ้งระยะ Zoea มากกว่าไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยอัตราการเจือจางต่ำ เนื่องจากลูกกุ้งระยะ Zoea ซึ่งเป็นระยะที่กินจุลสาหร่ายเป็นอาหาร มีขนาดของปากที่เล็กมาก

3. ผลของความเข้มแสงต่อการเติบโตของไดอะตอม *C. calcitrans* ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบน

ผลจากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ระดับความเข้มแสง 3 ระดับคือ 16, 25 และ 40 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 40 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ ส่งผลให้เซลล์มีความหนาแน่นและมีอัตราผลผลิตสูงที่สุด (Figure 5) ทั้งนี้การออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบนในงานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายเพื่อช่วยลดข้อจำกัดของการใช้แสงของไดอะตอม ทั้งนี้เนื่องจากถังปฏิกรณ์ที่สร้างขึ้นมีความหนาเพียง 5 ซม. และมีการผสมของมวลน้ำอย่างทั่วถึงด้วยระบบอากาศยก ทำให้แสงส่องผ่านได้ดีและเซลล์มีการหมุนเวียนทำให้ได้รับแสงอย่างทั่วถึง ซึ่ง Hu และคณะ (1998) ได้ชี้ให้เห็นว่า ความบางของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบนช่วยลดข้อจำกัดเรื่องแสงได้ดีกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบท่อยาวมักพบปัญหาเรื่องการบดบังแสงกันเอง (self shading) เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในบ่อหรือในถังขนาดใหญ่ที่เซลล์ที่อยู่ด้านในหรือด้านล่างของถังปฏิกรณ์ได้รับแสงน้อยกว่าเซลล์ด้านนอก ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและการเติบโตของสาหร่ายภายในถังปฏิกรณ์ (Chen, 1996) ผลการทดลองใน Figure 5 แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจางสูง 1.33 วัน$^{-1}$ จะมีความหนาแน่นของเซลล์ต่ำ ทำให้เซลล์สาหร่ายในถังปฏิกรณ์ไม่ได้รับผลกระทบจากการบังแสงกันเองมากนัก ความหนาแน่นของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยความเข้มแสง 25 และ 40 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ จึงมีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่ความเข้มแสงจะมีผลต่อการเติบโตอย่างมากเมื่อทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอัตราการเจือจางต่ำ ทั้งนี้

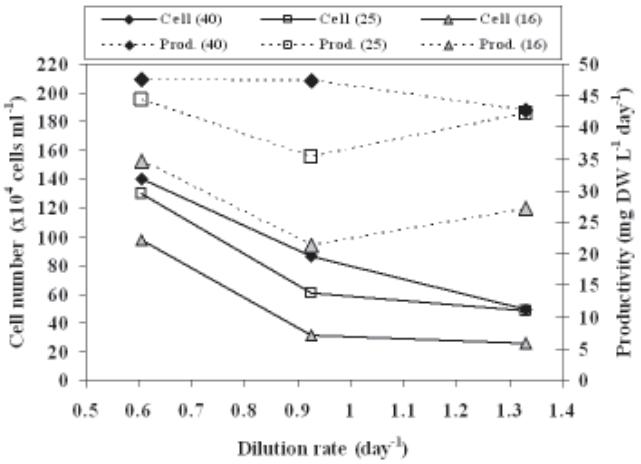


Figure 5. Cell number (Cell) and productivity (Prod.) at steady stage growth of *C. calcitrans* cultured under various light intensities (40, 25, 16 μmol Photon m^{-2} s^{-1}) in flat-panel photobioreactors.

เพราะการเลี้ยงด้วยอัตราการเจือจางต่ำ 0.6 วัน$^{-1}$ ทำให้ได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงทำให้เกิดการจำกัดปริมาณแสงขึ้นภายในถังปฏิกรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไดอะตอมในถังปฏิกรณ์ที่ได้รับแสงความเข้มต่ำ 16 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ จะมีความหนาแน่นเซลล์และอัตราผลผลิตที่ต่ำกว่าไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยความเข้มแสง 16 และ 25 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ อย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามการทดลองนี้จำเป็นต้องจำกัดความเข้มแสงสูงสุดไว้ที่ 40 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ เนื่องจากอุณหภูมิของห้องทดลองในช่วงบ่ายสูงถึง 38°C การให้แสงความเข้มสูงกว่านี้ความร้อนจากหลอดไฟจะทำให้ถังปฏิกรณ์มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นมากจนอาจส่งผลกระทบต่อเซลล์ไดอะตอมได้

สรุป

การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *C. calcitrans* แบบแบตช์ด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นแบนภายในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 160x10^{4} เซลล์ มล.$^{-1}$ (86 มก.เซลล์แห้ง ลิตร$^{-1}$) ส่วนในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่องพบว่าที่อัตราการเจือจางต่ำไดอะตอมจะมีความหนาแน่นเซลล์สูงและการเพิ่มอัตราการเจือจางส่งผลให้ความหนาแน่นเซลล์ลดลง โดยในการทดลองนี้อัตราการเจือจางที่ 0.52 วัน$^{-1}$ เป็นอัตราที่ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดคือ 196x10^{4} เซลล์ มล.$^{-1}$ ในขณะที่อัตราการเจือจาง 0.98 วัน$^{-1}$ จะให้อัตราผลผลิตเซลล์สูงสุด 132x10^{4} เซลล์ มล.$^{-1}$ วัน$^{-1}$ และการเพิ่มความเข้มแสงจาก 16 เป็น 40 ไมโครโมลโฟตอน เมตร$^{-2}$ วินาที$^{-1}$ จะทำให้ความหนาแน่นเซลล์และอัตราผลผลิตของไดอะตอมสูงขึ้นเนื่องจากความเข้มแสงสูงจะช่วยลดปัญหาการลดลงของแสงในถังปฏิกรณ์ที่เป็นผลมาจากการบังแสงกันเองของเซลล์ทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของไดอะตอมภายในถังปฏิกรณ์เพิ่มขึ้นได้ ผลจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าอัตราการเจือจางที่ควรใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย *C. calcitrans* แบบต่อเนื่องคือประมาณ 0.8 วัน$^{-1}$ ซึ่งจะให้อัตราผลผลิตเซลล์ประมาณ 112x10^{4} เซลล์ มล.$^{-1}$ วัน$^{-1}$ หรือคิดอัตราผลผลิตน้ำหนักแห้ง 64 มก. ลิตร$^{-1}$ วัน$^{-1}$ โดยการเพิ่มอัตราการเจือจางสูงเกินไปจะทำให้ความหนาแน่นและอัตราผลผลิตของเซลล์ลดลง และการเพิ่มความเข้มแสงจะช่วยเพิ่มอัตราผลผลิตสาหร่ายได้มากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอัตราการเจือจางต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถทำการเลี้ยง *C. calcitrans* แบบต่อเนื่องได้เป็นเวลานานหลายเดือน ซึ่งมีความเหมาะสมมากต่อการนำไปใช้ในระบบผลิตสาหร่ายเพื่อการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนร่วมสนับสนุนโครงการวิจัย ได้แก่ รศ.ดร.ประเสริฐ ภวสันต์ รศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล และ ศ.ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย พัฒนา และวิศวกรรมจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการวิจัยระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดสำหรับการอนุบาลลูกกุ้งวัยอ่อน

เอกสารอ้างอิง

โชติมา วนโกสุม, ครรชิต เพ็ชรจำรัส, สุชาติ พิลาเดช และจารุรินทร์ กุลทนันท์. 2533. การผลิตแพลงก์ตอนเพื่อการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนในสถานีประมงน้ำกร่อย จังหวัดระยอง. รายงานการวิจัยสถานีประมงน้ำกร่อย จังหวัดระยอง กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง. 20 หน้า.

ธิดา เพชรมณี และประกิต ไกรสิงห์เดชา. 2527. อิทธิพลของอุณหภูมิ แสงและความเค็มของน้ำต่อการเติบโตของ *Chaetoceros* sp. รายงานการวิจัยสถาบันเพาะเลี้ยงชายฝั่งจังหวัดสงขลา. 13 หน้า.

มะลิวัลย์ คุตะโค, สรวิศ เผ่าทองศุข และสรัญญา พันธุ์พฤกษ์. 2547. การเพาะเลี้ยงไดอะตอมน้ำเค็ม *Amphora delicatissima* AM9901 แบบกะและแบบต่อเนื่องในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิค. ว. วิจัยวิทยาศาสตร์ (Section T) 3(1): 309-321.

Bailey, J.E. and Ollis, D.F. 1986. Biochemical Engineering Fundamental. 2nd ed. Singapore. Mc Graw-Hill. 965 p.

Chaumont, D. 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of system for outdoor mass culture. J. Appl. Phycol. 5: 593-604.

Chen, F. 1996. High cells density culture of microalgae in heterotrophic growth. Trends Biotechnol. 14: 421-426.

Chrismadha, T. and Borowitzka, M.A. 1994. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* growth in a tubular photobioreactor. J. Appl. Phycol. 6: 67-74.

Enright, C., newkirk, G.F., Craigie, J.S. and Castell, J.D. 1986. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schutt of varied chemical composition. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 96: 15-26.

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.

Hu, Q., Guterman, H. amd Richmond, A. 1996. Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (Cyanabacteria) cultured at ultrahigh cell densities. J. Phycol. 32: 1066-1073.

Hu, Q., Kurano, N., Kawachi, M., Iwasaki, I. And Miyachi, S. 1998. Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 655-662.

Krichnavaruk, S., Loataweesup, W., Powtongsook, S. and Pavasant, P. 2005. Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactor. Chem. Eng. J. 105: 91-98.

Rebolloso Fuentes, M.M., Garcia Sanchez, J.L., Fernandez Sevilla, J.M., Acien Fernandez, F.G., Sanchez Perez, J.A. and Molina Grima, E. 1999. Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. J. Biotechnol. 70: 271-288.

Richmond, A. 1996. Efficient utilization of high irradiance for production of photoautotrophic cell mass: a survey. J. Appl. Phycol. 8: 382-387.

Richmond, A. and Cheng-Wu, Z. 2001. Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors. J. Biotechnol. 85: 259-269.

Wen, Z.Y. and Chen, F. 2001. A perfusion-cell bleeding culture strategy for enhancing the productivity of eicosapentaenoic acid by *Nitzschia laevis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 316-322.

Whyte, J.N.C. 1984. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture. 60: 231-241.

Zhu, C.J., Lee, Y.K., Chao, T.M. and Lim, S.H. 1997. Diurnal changes in gross chemical composition and fatty acid profiles of *Isochrysis galbana* TK1 in outdoor closed tubular photobioreactors. J. Mar. Biotechnol. 5: 153-157.