บทความวิจัย

ผลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณไฮโดรคาร์บอนในเซลล์สาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปอาหารทะเล

ชมพูนุท ชัยรัตนะ*

บทคัดย่อ

การศึกษาการใช้น้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัด นำมาเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เก็บมาจากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี โดยใช้น้ำทิ้งความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100% (v/v) และชุดควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG 11 ผลการศึกษาพบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำทิ้งทุกความเข้มข้น เมื่อเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยให้แสงสว่าง 67.5 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ช่วงมืด : ช่วงสว่าง เท่ากับ 12 : 12 ชั่วโมง และสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) โดยมีน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 1.143 ± 0.005 กรัม/ลิตร ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งไม่เจือจางและชุดควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG 11 มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.664 กรัม/ลิตร

การศึกษาผลของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (ที่ความเข้มข้น 0 (อากาศปกติ) 1 1.5 2 2.5 และ 5% (v/v)) ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60 %(v/v) พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เมื่อพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 %(v/v) โดยพบน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 3.301 ± 0.042 กรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าที่พ่นอากาศปกติ 2.91 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าการพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อปริมาณไฮโดรคาร์บอนในสาหร่าย *Botryococcus* sp. โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (v/v) มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เท่ากับ 0.24 ± 0.02 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง

คำสำคัญ: *Botryococcus* sp. คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรคาร์บอน

สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน e-mail: chairattanac@gmail.com

Effect of CO_2 Concentration on Growth and Hydrocarbon Content of *Botryococcus* sp. from Culture using Seafood Processing Wastewater

Chompunut Chairattana*

ABSTRACT

To investigate the potential of using untreated seafood processing wastewater (SPWW) from short necked clam meat cleaning process for *Botryococcus* sp. (from the Reservoir in Suratthani Rajabhat University) production, growth of *Botryococcus* sp. in various SPWW concentration (20, 40, 60, 80 and 100% (v/v)) and in BG 11 (control) were measured. The result showed that *Botryococcus* sp. can grow in every SPWW concentration with 67.5 μmol/m^2/s illumination (light : dark = 12 : 12) and the significantly maximum cell dried weight of 1.143 ± 0.005 g/L was found with 60% (v/v) SPWW ($p \leq 0.01$), while the control and non diluted SPWW were produced similar cell dried weight of 0.664 g/L.

The effect of CO_2 concentration ($0_{pure\ air}$, 1, 1.5, 2, 2.5 and 5% (v/v)) on growth of *Botryococcus* sp. in 60% (v/v) SPWW was determined. The appropriate CO_2 concentration for *Botryococcus* sp. growth in this study was 1% (v/v), it was confirmed by maximum *Botryococcus* sp. production of 3.301 ± 0.042 g/L (2.91 times of control) ($p \leq 0.01$). In addition, CO_2 aeration was affected on hydrocarbon content of *Botryococcus* sp. The study indicated the highest hydrocarbon content of 0.24 ± 0.02 g/g dry weight was found with *Botryococcus* sp. cultured in 60% (v/v) SPWW with 1 %(v/v) CO_2 aeration ($p \leq 0.01$).

Keywords: *Botryococcus* sp., CO_2, hydrocarbon

Department of Aquaculture Technology, Faculty Science and Technology, Suratthani Rajabhat University
*Corresponding author, e-mail: chairattanac@gmail.com

บทนำ

สาหร่าย *Botryococcus* sp. เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวจัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว พบทั่วไปในแหล่งน้ำจืด ทะเลสาบน้ำกร่อย อ่างเก็บน้ำ และแอ่งน้ำไม่ถาวร พบทั้งในเขตอบอุ่น บนเทือกเขาและเขตร้อน [1 อ้างโดย 2] *Botryococcus* sp. สามารถสร้างและสะสมน้ำมันในเซลล์ได้หลายรูปแบบรวมถึงไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี สาหร่าย *Botryococcus* sp. จึงสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานชีวภาพได้ [2] ในภาวะวิกฤตพลังงานเช่นในปัจจุบันจึงมีผู้สนใจจำนวนมากที่ศึกษาวิธีการเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตมวลชีวภาพมากเพียงพอกับความต้องการ และนำผลผลิตสาหร่ายมาสกัดน้ำมันเพื่อใช้ประโยชน์ และนอกจากนี้สาหร่าย *Botryococcus* sp. ยังสามารถใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่น เป็นแหล่งสารสี โดยเฉพาะคาโรทีนอยด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมทางด้านอาหารและยารักษาโรค [3] และการใช้สาหร่าย *Botryococcus* sp. ในการบำบัดน้ำเสียจากฟาร์มปศุสัตว์ [4]

ปัจจุบันการศึกษาการเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus* sp. จะใช้อาหารเลี้ยงที่เตรียมจากสารเคมีหลายชนิด ทำให้การผลิตสาหร่าย *Botryococcus* sp. มีต้นทุนสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้น้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปอาหารทะเลซึ่งเป็นน้ำจากกระบวนการทำความสะอาดเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัดทดแทนอาหารเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งเป็นแนวทางการลดต้นทุนการผลิตสาหร่าย *Botryococcus* sp. และเป็นการใช้ประโยชน์จากของเสีย ช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปอาหารทะเลนั้นมีองค์ประกอบของธาตุอาหารโดยเฉพาะไนโตรเจน [5] ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักที่สาหร่ายใช้ในการเจริญเติบโต หากไม่มีการนำน้ำทิ้งมาบำบัดหรือนำมาใช้ประโยชน์และปล่อยน้ำทิ้งลงแหล่งน้ำธรรมชาติย่อมก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม และนอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณไฮโดรคาร์บอนในเซลล์สาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้งนี้เนื่องจากในปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายเซลล์เดียวมีอยู่อย่างกว้างขวางทั้งสาหร่าย *Botryococcus* sp. และสาหร่ายชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงมีความต้องการผลผลิตสาหร่ายเซลล์เดียวเป็นจำนวนมาก โดยมีการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว โดยเฉพาะการทดลองเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์สูงกว่าในอากาศปกติเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและกระตุ้นการสร้างสารชีวเคมีบางชนิดในเซลล์สาหร่ายให้สูงขึ้น เช่นการศึกษาในสาหร่าย *Chlorella* sp. KR-1 [6] *Monoraphidium minutum* [7] *Isochrysis galbana* [8] *Chroococcidiopsis* sp. [9] และ *Botryococcus* braunii LB572 [10] ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่าย แต่ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูงเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย อย่างไรก็ดีระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะแตกต่างกันในสาหร่ายแต่ละชนิด

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพการใช้น้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัดในการเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทดแทนอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรมาตรฐาน และเพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไฮโดรคาร์บอนในสาหร่าย *Botryococcus* sp.

วิธีการทดลอง

การคัดแยกเซลล์สาหร่าย *Botryococcus* sp. และเตรียมหัวเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง

เก็บตัวอย่างน้ำจากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานีกรองน้ำด้วยถุงกรองแพลงก์ตอนพืช ขนาดตา 20 ไมครอน คัดแยกสาหร่าย *Botryococcus* sp. ด้วยเทคนิคการล้างเซลล์ด้วยไมโครปิเปต (Micropipette washing) นำเซลล์สาหร่ายที่คัดแยกและผ่านการล้างเซลล์แล้วลงเลี้ยงในถาดหลุมสำหรับเลี้ยงเชื้อ (tissue culture plate) บรรจุอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 [3, 10] ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว วางถาดหลุมบนชั้นเลี้ยงสาหร่ายที่ให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์แบบ Day Light ความเข้มแสง 67.5 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ช่วงมืด:ช่วงสว่าง เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง เมื่อพบการเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายในถาดหลุม จึงถ่ายเชื้อจากถาดหลุมลงในหลอดทดลองและขวดรูปชมพู่ บรรจุอาหารสูตร BG 11 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตรที่มากขึ้นตามลำดับเพื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อสาหร่ายให้เพียงพอกับการทดลอง

การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ความเข้มข้นต่างๆ

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัด มีลักษณะขาวขุ่นเล็กน้อย ไม่มีตะกอน นำไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ด้วยวิธี Kjeldahl method (VAPODEST 45S Gerhardt, Germany และ Digestion Unit Kjeldahl KBL 8S Gerhardt, Germany) วิเคราะห์ฟอสฟอรัส ด้วยวิธี Photometric Method และวิเคราะห์โพแทสเซียมด้วยเครื่อง ICP-OES Optima 4300 DV Perkin Elmer, USA

เลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus* sp. ในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสด ความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100% (v/v) และในชุดควบคุมเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG 11 แต่ละชุดการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยเลี้ยงในขวดแก้วใสบรรจุอาหารสูตร BG 11 หรือน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เติมหัวเชื้อสาหร่าย 50 มิลลิลิตร เลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์แบบ Day light ความเข้มแสง 67.5 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ช่วงมืด:ช่วงสว่าง เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง พ่นอากาศตลอดเวลา ประเมินการเจริญเติบโตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร [4] และหาความสัมพันธ์กับน้ำหนักแห้งของสาหร่าย วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Dunca's Multiple Range test (DMRT)

การศึกษาผลของความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสด

เลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus* sp. ในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัดที่ความเข้มข้น 60% (v/v) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดจากการทดลองข้างต้น และพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 1 1.5 2 2.5 และ 5% (v/v) โดยชุดควบคุมพ่นอากาศปกติ แต่ละชุดการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง เตรียมการทดลองโดยเติมน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) ลงในขวดเลี้ยงสาหร่าย 900 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เติมหัวเชื้อสาหร่าย 50 มิลลิลิตร เตรียมระบบลมโดยผสมอากาศกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้คาร์บอนไดออกไซด์มีความเข้มข้น 1 1.5 2 2.5 และ 5% (v/v) แล้วพ่นลงในขวดเลี้ยงสาหร่าย ชุดควบคุมพ่นลมจากเครื่องให้อากาศโดยไม่ผสมคาร์บอนไดออกไซด์ ทุกชุดการทดลองเลี้ยงโดยให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์แบบ Day light ความเข้มแสง 67.5 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ช่วงมืด : ช่วงสว่าง เท่ากับ 12 : 12 ชั่วโมง ประเมินการเจริญเติบโตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร และหาความสัมพันธ์กับน้ำหนักแห้งของสาหร่าย วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range test (DMRT)

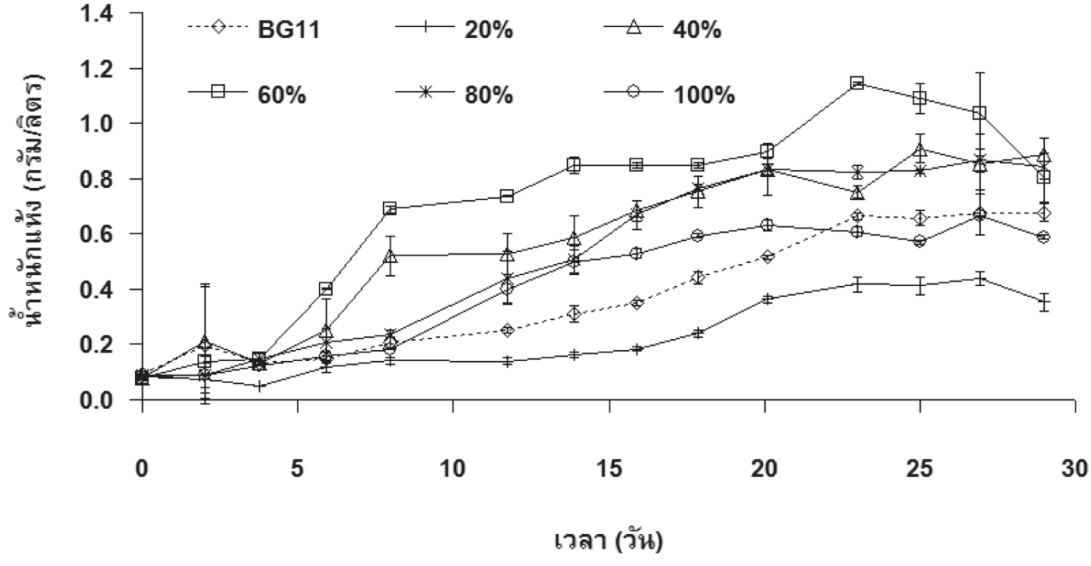
การศึกษาปริมาณไฮโดรคาร์บอนในเซลล์สาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 เปรียบเทียบกับการเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัด ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า *Botryococcus* sp. มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60 %(v/v) และเมื่อทดลองเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดเมื่อพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (v/v) ดังนั้นจึงได้ศึกษาปริมาณไฮโดรคาร์บอนในเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) พ่นอากาศปกติ และพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (v/v) ส่วนชุดควบคุมได้แก่สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG 11 พ่นอากาศปกติ แต่ละชุดการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ n-hexane และการวิเคราะห์โดยน้ำหนัก (Gravimetric method) [13] วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range test (DMRT)

ผลการทดลอง

การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ความเข้มข้นต่างๆ

การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัดที่ความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100% (v/v) และเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร BG 11 เป็นชุดควบคุม ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตในทุกชุดการทดลอง ชุดที่มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) ได้แก่สาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) (รูปที่ 1) มีน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 1.143 ± 0.005 กรัม/ลิตร ในวันที่ 23 ของการเลี้ยง รองลงมาคือชุดการทดลองที่เลี้ยงสาหร่ายด้วยน้ำทิ้งความเข้มข้น 40 80 100 และ 20% (v/v) ตามลำดับ น้ำหนักแห้งที่พบมีค่าเท่ากับ 0.908 ± 0.052 0.866 ± 0.04 0.664 ± 0.004 และ 0.438 ± 0.025 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งวันที่พบน้ำหนักแห้งสูงสุดในชุดการทดลองที่เลี้ยงสาหร่ายด้วยน้ำทิ้งความเข้มข้น 40% (v/v) ได้แก่วันที่ 25 ของการเลี้ยง ส่วนชุดการทดลองที่เลี้ยงสาหร่ายด้วยน้ำทิ้งความเข้มข้น 20 80 และ 100% (v/v) พบน้ำหนักแห้งสูงสุดในวันที่ 27 ของการเลี้ยง ในขณะที่ชุดควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 มีน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.664 ± 0.012 กรัม/ลิตร ในวันที่ 23 ของการเลี้ยง ซึ่งมีค่าเท่ากับชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งที่ไม่เจือจาง (ตารางที่ 1)



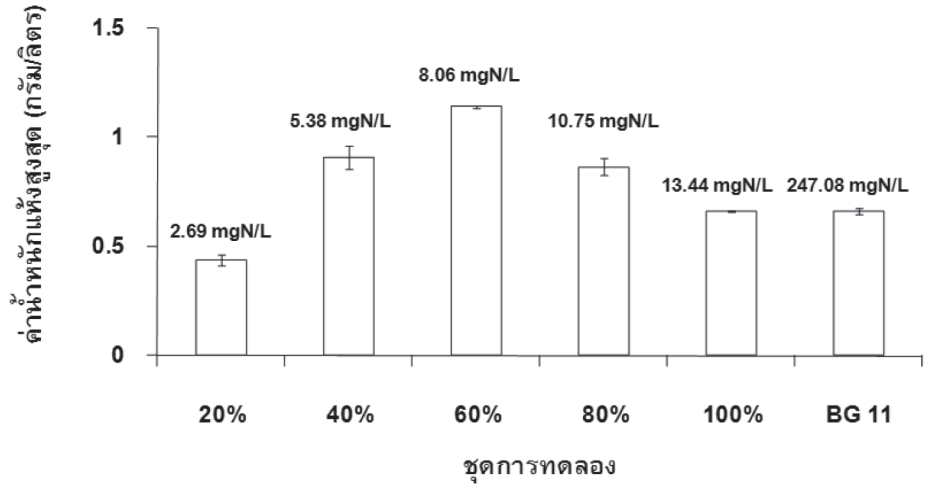
รูปที่ 1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยสด ระดับความเข้มข้น 20% (+) 40% (△) 60% (□) 80% (∗) 100% (v/v)(○) และชุดควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11(◇)

ตารางที่ 1 น้ำหนักแห้งสูงสุดของสาหร่าย *Botrycoccus* sp. ที่พบในแต่ละชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	น้ำหนักแห้งสูงสุด (กรัม/ลิตร)	วันที่มีน้ำหนักแห้งสูงสุด
BG 11	0.664 ± 0.012^{b}	23
น้ำทิ้ง 20% (v/v)	0.438 ± 0.025^{a}	27
น้ำทิ้ง 40% (v/v)	0.908 ± 0.052^{c}	25
น้ำทิ้ง 60% (v/v)	1.143 ± 0.005^{d}	23
น้ำทิ้ง 80% (v/v)	0.866 ± 0.04^{c}	27
น้ำทิ้ง 100% (v/v)	0.664 ± 0.004^{b}	27

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือข้อมูลที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

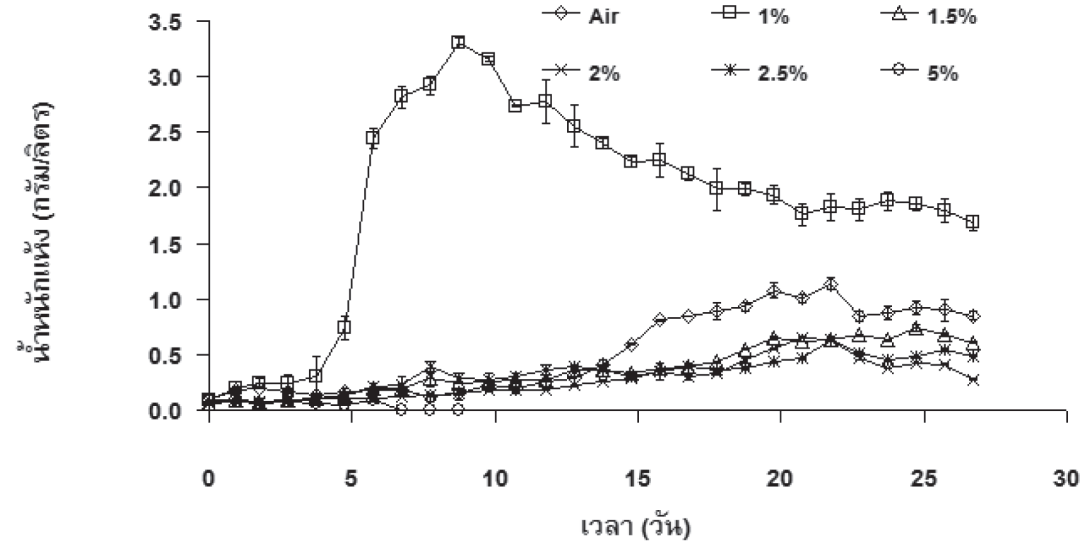
จากการศึกษาปริมาณธาตุอาหารในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัด พบว่ามีไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม เท่ากับ 13.44 5.81 และ 4.75 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อนำน้ำทิ้งมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีระดับความเข้มข้น 20 40 60 และ 80% (v/v) จะมีไนโตรเจนรวมเท่ากับ 2.69 5.38 8.06 และ 10.75 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 เท่ากับ 247.08 มิลลิกรัม/ลิตร และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนรวมในน้ำทิ้งและการเจริญเติบโตของ *Botryococcus* sp. พบว่าปริมาณไนโตรเจนรวมในน้ำทิ้งมีผลต่อน้ำหนักแห้งสูงสุดของสาหร่าย โดยเมื่อปริมาณไนโตรเจนรวมในน้ำทิ้งมากขึ้นมีผลให้น้ำหนักแห้งสูงขึ้น ซึ่งพบความสัมพันธ์ดังกล่าวเมื่อเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus* sp. ในน้ำทิ้งระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20 40 และ 60% (v/v) ที่มีปริมาณไนโตรเจนรวมเท่ากับ 2.69 5.38 และ 8.06 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ พบว่าสาหร่ายมีน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.438 ± 0.025 0.908 ± 0.052 และ 1.143 ± 0.005 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การเลี้ยง *Botryococcus* sp. ในน้ำทิ้งความเข้มข้น 80 และ 100% (v/v) ที่มีปริมาณไนโตรเจนรวมเท่ากับ 10.75 และ 13.44 ซึ่งมีค่าสูงกว่าปริมาณไนโตรเจนในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) พบว่าน้ำหนักแห้งสูงสุดมีค่าต่ำกว่าชุดที่เลี้ยงในน้ำทิ้งเข้มข้น 6% (v/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 น้ำหนักแห้งสูงสุดของสาหร่าย *Botryococcus* sp. และปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงสาหร่ายในแต่ละชุดการทดลอง

การศึกษาผลของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสด

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัดความเข้มข้น 60% (v/v) มีการเจริญเติบโตสูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นอื่นๆ รวมทั้งให้ผลการเจริญเติบโตดีกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 1.5 2 2.5 และ 5% (v/v) และอากาศปกติ (ชุดควบคุม) ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) ปรากฏว่าชุดการทดลองที่มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) ได้แก่ชุดการทดลองที่เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) และพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (v/v) ซึ่งมีน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 3.301 ± 0.042 กรัม/ลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง (รูปที่ 3) รองลงมาคือชุดการทดลองที่พ่นอากาศปกติ มีน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 1.133 ± 0.054 กรัม/ลิตร ในวันที่ 22 ของการเลี้ยง รองลงมาคือชุดการทดลองที่พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1.5 2 และ 2.5% (v/v) ตามลำดับ มีน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.742 ± 0.027 0.654 ± 0.012 และ 0.629 ± 0.007 กรัม/ลิตร และพบน้ำหนักแห้งสูงสุดในวันที่ 25 21 และ 22 ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (v/v) พบการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายในวันที่ 1 และจากนั้นมีจำนวนลดลงเรื่อยๆ โดยพบน้ำหนักแห้งสูงสุดในวันที่ 1 ของการเลี้ยง มีค่าเท่ากับ 0.097 ± 0.01 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 2) ซึ่งมีค่าต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ



รูปที่ 3 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสด ความเข้มข้น 60% (v/v) พ่นอากาศปกติ (◇) อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (□) 1.5% (△) 2% (×) 2.5% (∗) และ 5% (v/v)(○)

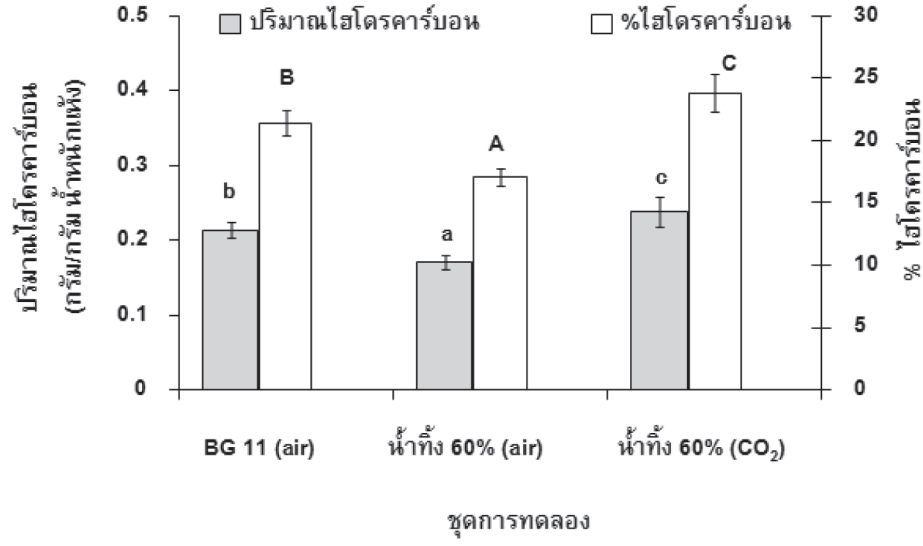
ตารางที่ 2 น้ำหนักแห้งสูงสุดของสาหร่าย *Botrycoccus* sp. ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดความเข้มข้น 60% (v/v) พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชุดการทดลอง	น้ำหนักแห้งสูงสุด (กรัม/ลิตร)	วันที่มีน้ำหนักแห้งสูงสุด
อากาศ	1.133 ± 0.054^{d}	22
อากาศ + 1% (v/v) CO_2	3.301 ± 0.042^{e}	9
อากาศ + 1.5% (v/v) CO_2	0.742 ± 0.027^{c}	25
อากาศ + 2% (v/v) CO_2	0.654 ± 0.012^{b}	21
อากาศ + 2.5% (v/v) CO_2	0.629 ± 0.007^{b}	22
อากาศ + 5% (v/v) CO_2	0.097 ± 0.01^{a}	1

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือข้อมูลที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

การศึกษาปริมาณไฮโดรคาร์บอนในสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ในการทดลองข้างต้นพบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัดความเข้มข้น 60% (v/v) และสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงขึ้นเมื่อพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (v/v) ดังนั้นจึงได้ศึกษาปริมาณไฮโดรคาร์บอนในสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) พ่นอากาศปกติและพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (v/v) โดยชุดควบคุมได้แก่สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 พ่นอากาศปกติ ผลการศึกษาพบว่าสาหร่าย *Botryococcus* sp. มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เท่ากับ 0.24 ± 0.02 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง หรือคิดเป็น 23.8% ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (v/v) (รูปที่ 4) รองลงมาคือสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG 11 พ่นอากาศปกติ (ชุดควบคุม) โดยมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 0.21 ± 0.01 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง หรือคิดเป็น 21.39% ของน้ำหนักแห้ง และสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปอาหารทะเลความเข้มข้น 60% (v/v) พ่นอากาศปกติ มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 0.1 ± 0.01 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง หรือคิดเป็น 17.09% ของน้ำหนักแห้ง



รูปที่ 4 ปริมาณและร้อยละของไฮโดรคาร์บอนในสาหร่าย *Botryococcus* sp. ในแต่ละชุดการทดลอง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือแผนภูมิแท่งที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) อักษรตัวพิมพ์เล็ก และตัวพิมพ์ใหญ่ใช้เปรียบเทียบปริมาณและร้อยละของไฮโดรคาร์บอนในสาหร่าย *Botryococcus* sp. ตามลำดับ)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สาหร่าย *Botryococcus* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัด เช่นเดียวกับการศึกษาของกรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ [14] ที่สามารถเลี้ยงสาหร่าย Chlorella sp. T9 ในน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปอาหารทะเล เนื่องจากน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปอาหารทะเลมีองค์ประกอบของธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยเฉพาะไนโตรเจน โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด เมื่อพิจารณาองค์ประกอบในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) พบว่ามีไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสซียม เท่ากับ 8.06 3.49 และ 2.85 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 (ชุดควบคุม) มีการเจริญเติบโตต่ำกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) แม้ว่าในอาหารเลี้ยงสูตร BG 11 จะมีไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสซียม เท่ากับ 247.09 4.13 และ 10.42 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ [15] ซึ่งสูงกว่าน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) และพบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำทิ้งเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งความเข้มข้น 80 และ 100% (v/v) พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตต่ำ เนื่องจากน้ำทิ้งที่ไม่เจือจางมีความขุ่นเล็กน้อยจึงเป็นอุปสรรคในการรับพลังงานจากแสงเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย

การพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ลงในขวดเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่ใช้น้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัดความเข้มข้น 60% (v/v) ทดแทนอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 มีผลให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายสูงกว่าการเลี้ยงโดยการพ่นอากาศปกติ เนื่องจากสาหร่ายต้องการคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง แต่การเลี้ยงสาหร่ายโดยพ่นอากาศนั้นสาหร่ายจะได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นต่ำ เพราะอากาศปกติมีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบเพียง 0.035% [16] ดังนั้นการพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์จึงทำให้สาหร่ายได้รับคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น เกิดการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้นส่งผลให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายเพิ่มขึ้น การกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวโดยการพ่นคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นสูงลงในระบบเลี้ยงนั้นได้มีการศึกษาในสาหร่ายหลายชนิด เช่น *Chlorococcum* sp. *Scenedesmus* sp. [17] *Thalassiosira weissflogii* [18] *Chlorella vulgaris* UTEX259 [19] และ *Chlorella kessleri* [20] ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในแนวทางเดียวกันคือคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว แต่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมนั้นแตกต่างกันตามชนิดของสาหร่าย ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปมีผลทำให้เกิดความเครียดซึ่งประเมินได้จากประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและการเจริญเติบโตที่ลดลง [8]

Ge และคณะ [21] ได้ทดลองเลี้ยง *Botryococcus* sp. ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 2 5 10 และ 20% (v/v) และพบว่าสาหร่ายมีน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 2.31 กรัม/ลิตร ในวันที่ 25 ของการเลี้ยง เมื่อพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 20% (v/v) ในขณะที่การศึกษาครั้งนี้พบน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 3.301 ± 0.042 กรัม/ลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง เมื่อพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (v/v) แสดงให้เห็นว่าการศึกษาครั้งนี้ผลิตสาหร่ายได้มากกว่าโดยใช้เวลาในการเลี้ยงและความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำกว่าการศึกษาของ Ge และคณะ [21]

การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนของ *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัดความเข้มข้น 60% (v/v) พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (v/v) เปรียบเทียบกับสาหร่ายที่พ่นอากาศปกติ และสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 พ่นอากาศปกติ พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้ง 60% (v/v) พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (v/v) มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนสูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทิ้ง 60% (v/v) พ่นอากาศปกติ เช่นเดียวกับการทดลองของ Ge และคณะ [21] และ Ranga Rao และคณะ [10] ที่พบว่าการเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์มีผลทำให้ไฮโดรคาร์บอนในสาหร่าย *Botryococcus* sp. เพิ่มขึ้น โดยการทดลองของ Ranga Rao และคณะ [10] พบว่า *Botryococcus* sp. มีไฮโดรคาร์บอนอยู่ระหว่าง 14-28% เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร Chu 13 พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 0.5 1 และ 2% (v/v) ชุดที่มีไฮโดรคาร์บอนสูงสุดเท่ากับ 28% (v/v) ได้แก่ชุดที่พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 2% (v/v) ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ที่มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนสูงสุด 23.8% เมื่อพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 1% (v/v) ในขณะที่การทดลองของ Ge และคณะ [21] พบว่า *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG 11 พ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 2 5 10 และ 20% (v/v) มีไฮโดรคาร์บอนอยู่ระหว่าง 16.43-25.45% และการพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 20% (v/v) ทำให้สาหร่ายมีไฮโดรคาร์บอนสูงสุด อย่างไรก็ดีปริมาณไฮโดรคาร์บอนและปริมาณน้ำมันในเซลล์สาหร่าย *Botryococcus* sp. นั้น นอกจากขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่สาหร่ายได้รับแล้วยังเป็นผลมาจากปัจจัยหลายประการ เช่น ปริมาณไนโตรเจน [22] และฟอสเฟต [23] ในอาหาร รวมทั้งความเค็มของน้ำเลี้ยงสาหร่ายอีกด้วย [24]

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเนื้อหอยลายสดที่ไม่ผ่านการบำบัดนั้นสามารถใช้เลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทดแทนการใช้อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 ซึ่งช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมโดยการนำน้ำทิ้งมาใช้ประโยชน์และช่วยลดต้นทุนการผลิตสาหร่าย และการพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (v/v) มีผลให้การเจริญเติบโตและปริมาณไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งความเข้มข้น 60% (v/v) สูงขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ประจำปี 2556 ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานีที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการวิจัย และขอขอบคุณ ผศ.สุธน ช่วยเกิด ผศ.ดร.จิตเกษม หลำสะอาด ผศ.ดร.มาริสา อินทวงศ์ และดร.สรายุทธ อ่อนสนิท ที่ให้คำแนะนำและช่วยแก้ไขบทความให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Wake, L.V. and Hillen, L.W. 1980. Study of a Bloom of the Oil-rich Alga *Botryococcus braunii* in the Darwin River Reservoir. *Biotechnology and Bioengineering* 22: 1637-1656.
2. Metzger, P. and Largeau, C. 2005. *Botryococcus braunii* : A Rich Source for Hydrocarbons and Related Ether Lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66: 486-496.
3. Ambati, R.R., Ravi, S. and Aswathanarayana, R.G. 2010. Enhancement of Carotenoids in Green Alga *Botryococcus braunii* in Various Autotrophic Media Under Stress Conditions. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 4(2): 87-92.
4. An, J., Sim, S., Lee, J. and Kim, B.W. 2003. Hydrocarbon Production from Secondarily Treated Piggery Wastewater by the Green Alga *Botryococcus braunii. Journal of Applied Phycology* 15: 185-191.
5. Chevakidagarn, P., Wanaglad, O and Chiayvareesajja, S. 2012. Optimum Carbon/Nitrogen Ratio for Upgrading Single-Stage Activated Sludge Process in the Frozen Seafood Industry. *Thammasat International Journal of Science and Technology* 17(4): 11-21.
6. Chiu, S., Kao, C., Chen, C., Kuan, T., Ong, S. and Lin, C. 2008. Reduction of CO_2 by a High-density Culture of *Chlorella* sp. in a Semicontinuous Photobioreactor. *Bioresource Technology* 99(9): 3389-3396.
7. Brown, L.M. 1996. Uptake of Carbon Dioxide from Flue Gas by Microalgae. *Energy Conversion and Management* 37 (6-8): 1363-1367.
8. Chairattana, C. 2012. *Efficiency of Carbon Deposition by Carbon Dioxide Assimilation of Microalgae and Bivalve.* Doctor of Philosophy Degree Dissertation, Marine Science, Department Faculty of Science, Chulalongkorn University.
9. Hayashi, N.R., Ishida, T., Peerapornpaisal, Y., Igarashi, Y. and Kodama, T. 1995. Effect of Carbon Dioxide Concentration on the Growth and Rubisco Activity of a Thermophilic Cyanobacterium, *Chroococcidiopsis* sp. strain TS-821. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80(5): 507-509.
10. Ranga Rao, A., Sarada, R. and Ravishankar, G.A. 2007. Influence of CO_2 on Growth and Hydrocarbon Production in *Botryococcus braunii. Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(3):414-419.
11. Rani, H. V., Kumar, K. T. V. and Eswarappa, V. 2011. Effect of Nitrogen Source on the Growth and Lipid Production of Microalgae. *Current Biotica* 4(4): 426-433.
12. Sawayama, S., Inoue, S. and Yokoyama, S. 1994. Continuous Culture of Hydrocarbon-Rich Microalga *Botryococcus braunii* in Secondarily Treated Sewage. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41: 729-731.

13. Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R. and Ravishankar, G.A. 2006. Influence of Nitrogen Sources on Growth, Hydrocarbon and Fatty Acid Production by *Botryococcus braunii. Asian Journal of Plant Sciences* 5(5): 799-804.
14. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์. 2536. การเลี้ยง *Chlorella* sp. *T9* ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
15. Hu, Q. 2004. Environmental Effects on Cell Composition. In: Richmond, A. Editor. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology.* Oxford. Blackwell Publishing p. 103.
16. Sung, K., Lee, J., Shin, C., and Park, S. 1998. Isolation of New Highly CO_2 Tolerant Fresh Water Microalga *Chloralla* sp. KR-1. *Korean Journal of Chemical Engineering* 15(4): 449-450.
17. Hanagata, N., Takeuchi, T., Fukuju, Y., Barnes, D. J., and Karube, I. 1992. Tolerance of Microalgae to High CO_2 and High Temperature. *Phytochemistry* 31(10): 3345-3348.
18. Ishida, Y., Hiragushi, N., Kitaguchi, H., Mitsutani, A., Nagai, S., and Yoshimura, M. 2000. A Highly CO_2-Tolerant Diatom *Thalassiosira weissflogii* H1 Enriched from Coastal Sea, and Its Fatty Acid Composition. *Fisheries Science* 66: 655-659.
19. Yun, Y., Lee, S., Park, J., Lee, C., and Yang, J. 1997. Carbon Dioxide Fixation by Algal Cultivation using Wastewater Nutrients. *Journal of Chemical Technology Biotechnology* 69: 451-455.
20. Izumo, A., Fujiwara, S., Oyama, Y., Satoh, A., Fujita, N., Nakamura, Y., and Tsuzuki, M. 2007. Physicochemical Properties of Starch in Chlorella Change Depending on the CO_2 Concentration During Growth: Comparison of Structure and Properties of Pyrenoid and Stroma Starch. *Plant Science* 172: 1138-1147.
21. Ge, Y., Liu, J., and Tian G. 2011. Growth Characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under High CO_2 Concentration in Photobioreactor. *Bioresource Technology* 102: 130-134.
22. Li Y, Horsman M., Wu., N., Lan, C.Q., and Dubois-Calero, N. 2008. Biofuels from Microalgae. *Biotechnology Progress* 24: 815-820.
23. Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., and Olsen, Y. 1994. Effect of Nutrient Limitation on Fatty Acid and Lipid Content of Marine Microalgae. *Journal of Phycology* 30: 972-979.
24. Ranga Rao, A., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R., and Ravishanka, G.A. 2007. Effect of Salinity on Growth of Green Alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology* 98: 560-564.

ได้รับบทความวันที่ 25 กรกฎาคม 2557
ยอมรับการตีพิมพ์วันที่ 5 กันยายน 2557