

# การคัดเลือกและการหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตด้วยสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตอาหารสำเร็จรูป

Isolation and optimization of nitrate and phosphate removal by green algae isolated from wastewater of food industrial

สามารถ ต่ายขาว<sup>1\*</sup>

Samart Taikhao<sup>1\*</sup>

## บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตออกจากน้ำเสีย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกสาหร่ายสีเขียวจากน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตอาหารสำเร็จรูปในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่มีความสามารถสูงในการกำจัดไนเตรท และฟอสเฟตในน้ำเสีย จากการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกสาหร่ายสีเขียวได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลท จากนั้นนำสาหร่ายสีเขียวทุกไอโซเลทมาเพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (พีเอช 7) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน และเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 วัน ก่อนที่จะวัดคุณลักษณะต่างๆ ทางเคมีของน้ำเสียหลังการเพาะเลี้ยง จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท FPI 18 มีความสามารถมากที่สุดในในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟต และยังสามารถสูงที่สุดในการกำจัดค่าบีโอดี และซีโอดี เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียวไอโซเลทอื่นๆ จากการจำแนกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท FPI 18 โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rDNA และศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการ พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท FPI 18 มีความคล้ายคลึงและใกล้ชิดกับสาหร่ายสีเขียวในจีนัส *Tetraspora* จึงตั้งชื่อสาหร่ายชนิดนี้ว่า *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 การศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 ไมโครเมตร นอกจากนี้เซลล์มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม 3-4 เซลล์ภายใต้ซีทหุ้มที่โปร่งแสง ยิ่งไปกว่านั้นยังมีการตรวจสอบพารามิเตอร์บางประการที่ส่งผลในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตออกจากน้ำเสียโดยสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์นี้ เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มแสง จากการศึกษาพบว่า สภาวะที่ดีที่สุดในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟต คือ น้ำเสียมีค่าพีเอชเริ่มต้น 8 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 30 องศาเซลเซียส และความเข้มแสง 50 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน นอกจากนี้การลดลงของไนเตรทและฟอสเฟต ในสภาวะดังกล่าวยังสอดคล้องกับผลของชีวมวลของ *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 ที่สูงขึ้นอีกด้วย เมื่อนำสภาวะที่ดีที่สุดทุกสภาวะ มารวมกันตั้งชื่อว่า “สภาวะที่เหมาะสม” โดยนำสภาวะที่เหมาะสมมาทดลองเพาะเลี้ยง *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 เทียบกับ สภาวะเพาะปกติ (น้ำเสียพีเอชเริ่มต้น 8 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน) ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora*

<sup>1</sup> คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์นนทบุรี

<sup>1</sup> Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Nonthaburi Campus

\* Corresponding author. E-mail: samart.ta@rmutsb.ac.th

sp. Rmutsb FPI 18 มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตออกจากน้ำเสียได้ถึงร้อยละ 93.65 และ 96.65 ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสม

**คำสำคัญ:** สาหร่ายสีเขียว การบำบัดน้ำเสีย ไนเตรท ฟอสเฟต น้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมผลิตอาหารสำเร็จรูป

### Abstract

Green algae are able to remove inorganic nitrogen and phosphorus from wastewater. This work aimed to isolate green algae from food processing industrial wastewater in Phra Nakhon Si Ayutthaya province that has highly efficient removal of nitrate and phosphate from wastewater. It was found that twenty-one green algae strains were isolated from wastewater samples. All green algal isolates were grown in sterile wastewater (pH 7) at 30 °C under light intensity of 30  $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2/\text{s}$  for 18 h per day and shaking at 120 rpm for 5 days before measuring chemical characteristics of wastewater after cultivation. The results revealed that isolate FPI 18 showed the highest nitrate and phosphate removal and also showed the lowest BOD and COD when compared with other green algae isolates. The genetics characterization of green algal isolate FPI 18 was classified by using 18S rDNA sequence and phylogenetics tree analysis. The results indicated that green algae isolate FPI 18 showed their similarities comparing to the green alga in the genus of *Tetraspora*. Thereby, this strain was named *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18. In morphological characterization under light microscope, *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 has an oval shape and 5-6  $\mu\text{m}$  of diameter. In addition, single cells and 3-4 cells surrounded by transparent sheath can be observed. Furthermore, some parameters for nitrate and phosphate removal by this strain such as pH, temperature and light intensity were also examined. The results showed that the best condition for nitrate and phosphate removal from wastewater by *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 were initial pH 8, temperature at 30 °C and light intensity of 50  $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2/\text{s}$  for 18 h per day. In addition, the reduction of nitrate and phosphate under these conditions corresponded to the increasing of *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 biomass. The best of each condition was combined and designated as "optimal condition". The optimal condition in wastewater was used for cultivation of *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 and compared with control condition (wastewater initial pH 7, 25 °C and 30  $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2/\text{s}$  for 18 h per day). The results revealed that *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 showed high capability to remove nitrate and phosphate from wastewater with removal efficiency of 93.65 and 96.65%, respectively under cultivated cell in optimal condition.

**Keywords:** green algae, wastewater treatment, nitrate, phosphate, food processing industrial wastewater

### บทนำ

ปัจจุบันปัญหาโทรฟิคเคชัน (Eutrophication) เป็นปัญหามลพิษทางน้ำปัญหาหนึ่งที่มีในทุกทวีปทั่วโลก (Walker, 1983) โดยทำให้เกิดการบลูม (bloom) ของแพลงก์ตอนพืชในแหล่งน้ำต่างๆ เช่น หนอง คลอง บึง ทะเลสาบ และ อ่างเก็บน้ำ ซึ่งสาเหตุดังกล่าวเกิดจาก

ในแหล่งน้ำมีสารประกอบไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในปริมาณมาก โดยธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส อาจเกิดจากกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ เช่น การเกษตร อุตสาหกรรม น้ำเสียจากบ้านเรือนประชาชน และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น โดยสารประกอบไนโตรเจนที่พบในแหล่งน้ำ เช่น ไนเตรท ( $\text{NO}_3^-$ ) ไนไตรท์ ( $\text{NO}_2^-$ )

และแอมโมเนีย ( $\text{NH}_4^+$ ) ส่วนสารประกอบฟอสฟอรัสที่สามารถพบได้ เช่น ฟอสเฟต ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) หรือ โอโทฟอสเฟต (Orthophosphate) (Abdel-Raouf, Al-Homaidan, & Ibraheem, 2012) เป็นต้น ซึ่งสารประกอบดังกล่าว แพลงค์ตอนพืชจะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้แหล่งน้ำนั้นไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ อีกทั้งยังก่อให้เกิดการเน่าเสีย เนื่องจากแหล่งน้ำจะขาดออกซิเจน รวมทั้งแพลงค์ตอนพืชและไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Microcystis* sp. ยังสร้างสารพิษในแหล่งน้ำซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้อีกด้วย (Florczyk, Lakomik, Woëny, & Brzuzan, 2014) ถึงแม้ว่าน้ำเสียจากแหล่งชุมชนหรือน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม จะมีการบำบัดน้ำเสียโดยสามารถลดสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ในน้ำเสียแล้ว แต่ยังมีธาตุอาหาร เช่น ไนโตรเจน และฟอสเฟตหลงเหลืออยู่ ดังนั้นถ้ามีการปล่อยน้ำเสียดังกล่าวลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติก็อาจจะเกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชันได้ (Taziki, Ahmadzadeh, Murry, & Lyon, 2015) การกำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟตในแหล่งน้ำสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ทางเคมี ทางกายภาพ/เคมี และทางชีวภาพ โดยใช้สิ่งมีชีวิต เช่น ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสอินทรีย์ในน้ำเสียได้เป็นอย่างดี (Boelee, Temmink, Janssen, Buisman, & Wijffels, 2011; Abinandan, & Shanthakumar, 2015) ซึ่งการกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสดังกล่าวเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Shi, Podola, & Melkonian, 2007; Christenson, & Sims, 2011) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในน้ำเสียนอกจากจะสามารถกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้แล้ว ยังลดค่าบีโอดี (BOD: biochemical oxygen demand) ซีโอดี (COD; chemical oxygen

demand) เพิ่มดีไอ (DO; dissolved oxygen) และลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้อีกด้วย (Oswald, & Golueke, 1960) ยิ่งไปกว่านั้นชีวมวลที่ได้จากสาหร่ายสีเขียวสามารถนำไปเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจได้ เช่น อาหารเสริม อาหารสัตว์ เครื่องสำอางค์ และเชื้อเพลิงชีวภาพ รวมถึงก๊าซมีเทนที่ผ่านการย่อยสลายโดยแบคทีเรียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Spolaore, Joannis-Cassan, Duran, & Isambert, 2006; Ometto et al., 2014) ได้มีรายงานการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวจากน้ำเสียในแหล่งต่างๆ เช่น น้ำเสียจากฟาร์มสุกร โดยสามารถคัดแยกสาหร่าย *Oocystis* sp. (Riaño, Molinuevo, & García-González, 2011) และ *Chlorella vulgaris* YSW-04 (Ji et al., 2013) น้ำเสียโรงงานสุรา สามารถคัดแยกสาหร่าย *Chlorella* sp. (Farooq et al., 2013) และน้ำเสียจากเทศบาล สามารถคัดแยกสาหร่าย *Micractinium reisseri* และ *Scenedesmus obliquus* (Abou-Shanab et al., 2014) โดยมีความคาดหวังว่าจะนำสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้มาใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น การบำบัดน้ำเสีย อาหารสัตว์ และเป็นพลังงานทดแทน

สาหร่ายสีเขียวแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการเจริญและกำจัดไนโตรเจน และฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำเสีย ได้แตกต่างกัน อีกทั้งสภาวะแวดล้อมต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มแสง ยังส่งผลต่อการเจริญและการกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำเสียอีกด้วย (Taziki, Ahmadzadeh, Murry, & Lyon, 2015) ได้มีรายงานการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในสาหร่ายสีเขียวหลากหลายสายพันธุ์ เช่น สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* สามารถกำจัดไนโตรเจน และฟอสเฟตได้ถึงร้อยละ 85 และ 77 ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงใน

น้ำเสียที่มีค่าพีเอช 2 อุณหภูมิ 26.3 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 2 วัน (Sabeti, Hejazi, & Karimi, 2019) และ สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* สามารถกำจัด ไนเตรท และฟอสฟอรัสรวมได้ถึงร้อยละ 100 และ 60 ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 152 ไมโครโมลโฟตอนต่อ ตารางเมตรต่อวินาที ที่ระยะเวลา 2.1 วัน (Ruiz-Marin, Mendoza-Espinosa, & Stephenson, 2010) เป็นต้น

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกสาหร่าย สีเขียวจากน้ำเสียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดไนเตรท และฟอสเฟตจากน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม อาหารสำเร็จรูป ซึ่งมีปริมาณไนเตรทและฟอสเฟตใน น้ำเสียปริมาณสูง นอกจากนี้จะทำการ จำแนกสายพันธุ์ และระบุสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพ ดังกล่าว ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rDNA และการทำแผนภูมิวิวัฒนาการ และหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ค่าพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มแสง ในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตในน้ำเสียโดยสาหร่าย สีเขียวที่คัดเลือก

### วิธีการศึกษา

การคัดแยกสาหร่ายสีเขียวจากน้ำเสีย การเพาะเลี้ยง และการวัดน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียว

เก็บตัวอย่างน้ำเสียในโรงงานผลิตอาหารสำเร็จรูป จากบ่อเปิดพักน้ำในกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยเก็บจากบ่อตกตะกอน (sedimentation tank) ที่พักน้ำมาแล้ว 3 วัน โดยเก็บ ตัวอย่าง น้ำเสียใส่ขวดเก็บตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้ม 30 ไมโครโมล-โฟตอนต่อตารางเมตร ต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น

คัดแยกสาหร่ายโดยใช้เทคนิค single cell isolation technique บนอาหารแข็ง BG11 (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman, & Stanier, 1979) เมื่อได้สาหร่ายสีเขียวที่ บริสุทธิ์แล้ว นำมาเพาะเลี้ยงในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว tris-acetate-phosphate (TAP) (Harris, 1989) 100 มิลลิตร โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอน ต่อตารางเมตร ต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 วัน จากนั้น ศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, BX51, Japan) สำหรับการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง ดำเนินการโดยกรองเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวปริมาตร 10 มิลลิตร ผ่านกระดาษกรอง GF/C (เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร) (Whatman, UK) นำไปอบที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และนำไปวางไว้ในโถดูดความชื้น 1 ซึ่งเมื่อก่อนนำมาชั่งน้ำหนัก (Taikhao, & Phunpruch, 2017)

### การวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำเสีย

เก็บตัวอย่างน้ำเสียก่อนบำบัดจากโรงงาน อุตสาหกรรมผลิตอาหารสำเร็จรูป จังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยทำการวัดค่าออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen, DO) และอุณหภูมิด้วยเครื่อง dissolved oxygen meter (Digicon, DO-552SD, Japan) และวัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter (Mettler Toledo, FiveEasy, Switzerland) จากนั้นนำน้ำเสียมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร) (Whatman, UK) จากนั้นนำน้ำเสียมาปรับพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับ 7.0 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 6.0 โมลาร์ และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อ เพื่อนำไปทดสอบการบำบัดน้ำเสียด้วยสาหร่ายสีเขียว โดยฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำน้ำเสียที่ปราศจากเชื้อมาวัดค่าบีโอดี

(biochemical oxygen demand, BOD) ด้วยเครื่อง BOD analyzer (Lovibond, Oxi-Direct, Germany) ตามวิธีการของ Taikhao, & Phunpruch (2017) วัดค่าซีไอดี (chemical oxygen demand, COD) ตามวิธีการของ American Public Health Association (APHA) 5220 C (1998) วัดปริมาณไนเตรทและฟอสเฟตด้วยเครื่อง ion chromatograph (IC) (Thermo Fisher Scientific, Dionex ICS-5000+DP, USA) ตามวิธีการของ Taikhao, & Phunpruch (2017)

#### การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในน้ำเสีย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (พีเอช 7.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (Griffiths, Garcin, van Hille, & Harrison, 2014) เท่ากับ 0.1 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน ทดสอบการบำบัดน้ำเสียด้วยสาหร่ายสีเขียว โดยกรองเซลล์สาหร่ายสีเขียวออกจากน้ำเสียด้วยกระดาษกรอง GF/C และนำน้ำเสียที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ ค่าพีเอช ดีไอบีไอดี ซีไอดี ไนเตรท และฟอสเฟต จากนั้นคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตมาศึกษาสายพันธุ์ และทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตต่อไป

การจำแนกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rDNA

การจำแนกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกได้ โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rDNA โดยเริ่มจากขั้นตอนการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ

สาหร่ายสีเขียวด้วยชุดสกัด DNA wizard SV genomic DNA purification system (Promega, USA) จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ forward ไพรมเมอร์ คือ F-18S rDNA Green algae 5' CTGCGAATGGCTCATTAATC-3' และ reverse ไพรมเมอร์ คือ R-18S rDNA green algae 5'-AAGGCC AGGGACGTAATCAA-3' ปฏิกิริยาพีซีอาร์ และสภาวะที่ใช้ดำเนินการตามวิธีการของ Phunpruch, Taikhao, & Incharoensakdi (2016) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของอะกาโรสร้อยละ 0.80 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GenepHlow™ Gel/PCR (Geneaid, Taiwan) จากนั้นส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (1st Base, Singapore) โดยใช้ไพรมเมอร์ที่จำเพาะในทิศทาง 5' คือ F-18S rDNA green algae 5'-CTGCGAATGGCTCATTAATC-3' จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบในฐานข้อมูล National Center for biotechnology information (NCBI) ด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool nucleotide (BLASTN) และศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี neighbor-joining โดยใช้ โปรแกรม MEGA 7 (Choi et al., 2018)

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตโดยสาหร่ายสีเขียว

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในกรณีการแปรผันค่าพีเอชในน้ำเสีย ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นในน้ำเสียด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6.0 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6.0 โมลาร์ เพื่อให้ค่าพีเอชมีค่าเท่ากับ

4, 5, 6, 7, 8 และ 9 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในกรณีการแปรผันอุณหภูมิให้แปรผัน อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 7 และความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ในกรณีการแปรผันความเข้มแสง ให้แปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 15, 30, 50, 100 และ 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ในสภาวะที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 25 องศาเซลเซียส เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในสภาวะต่างๆ เป็นระยะเวลา 5 วัน วัดปริมาณชีวมวลโดยการวัดน้ำหนักเซลล์แห้งและนำน้ำเสียที่ได้จากการกรองเซลล์ออกมาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและฟอสเฟตที่เหลืออยู่ในน้ำเสีย โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 13.0 (SPSS Inc.) โดยใช้ one-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan (alpha=0.05)

### ผลการศึกษาและอภิปรายผล

ผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟต

จากการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวจากน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตอาหารสำเร็จรูป จังหวัดพระนครศรีอยุธยา สามารถคัดแยกสาหร่ายสีเขียวได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลท โดยส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม แต่จะมีขนาดที่แตกต่างกันออกไป ตั้งแต่ขนาด 4 ถึง 16 ไมโครเมตร (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ได้มีรายงานการคัดแยกสาหร่ายสีเขียว

จากน้ำเสียในแหล่งต่างๆ เช่น สาหร่ายสีเขียว *Oocystis* sp. และ *Chlorella vulgaris* YSW-04 คัดแยกได้จากน้ำเสียจากฟาร์มสุกร (Riaño, Molinuevo, & García-González, 2011; Ji et al., 2013) *Chlorella* sp. คัดแยกจากน้ำเสียโรงงานสุรา (Farooq et al., 2013) *Micractinium reisseri* และ *Scenedesmus obliquus* คัดแยกได้จากน้ำเสียเทศบาล (Abou-Shanab et al., 2014) โดยสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้นั้นถูกนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนอาหารสัตว์ และนำไปบำบัดน้ำเสียได้ โดยการศึกษาในครั้งนี้สามารถคัดแยกสาหร่ายสีเขียวได้หลากหลายชนิด ดังนั้นอาจมีความเป็นไปได้ว่าจะมีสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการกำจัด ไนโตรเจน และฟอสเฟตในน้ำเสียได้ นอกจากนี้ในการทดลองยังได้มีการวิเคราะห์น้ำเสียเบื้องต้นจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตอาหารสำเร็จรูป ก่อนที่จะนำมาทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย ผลการทดลองพบว่าในน้ำเสียมีอุณหภูมิเท่ากับ  $31.00 \pm 0.30$  องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ  $5.66 \pm 0.05$  ค่าดีไอเท่ากับ  $0.12 \pm 0.01$  มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร ค่าบีโอดีเท่ากับ  $318.00 \pm 48.21$  มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร ค่าซีโอดีเท่ากับ  $1,813.00 \pm 36.95$  มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร ไนโตรเจน เท่ากับ  $2,566.65 \pm 15.89$  ไมโครกรัมต่อลิตร และฟอสเฟตเท่ากับ  $963.95 \pm 9.23$  ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นนำน้ำเสีย ดังกล่าวมาทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 21 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้ เทียบกับน้ำเสียที่ปราศจากการเติมสาหร่าย (control) เป็นระยะเวลา 5 วัน เพื่อที่จะคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดไนโตรเจน และฟอสเฟต ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท FPI 18 สามารถลดค่าไนโตรเจนและฟอสเฟตได้สูงที่สุด โดยสามารถลดค่าไนโตรเจนและฟอสเฟตในน้ำเสียได้ถึงร้อยละ 62.82 และ 69.52

ตามลำดับ (Table 1) และเมื่อตรวจสอบน้ำเสียที่ปราศจากการเติมสาหร่ายสีเขียว พบว่าค่าไนเตรทและฟอสเฟตลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Table 1) เป็นการแสดงให้เห็นว่าค่าไนเตรทและฟอสเฟตที่ลดลงเป็นผลมาจากการเจริญของสาหร่ายสีเขียว

นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวไฮโซเลท FPI 18 ยังสามารถลดค่าบีโอดี และซีโอดีได้สูงที่สุด และสามารถเพิ่มค่าดีไอให้น้ำอีกด้วย (Table 1) จึงนำสาหร่ายสีเขียวไฮโซเลท FPI 18 ไปศึกษาสายพันธุ์และหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดไนเตรท และฟอสเฟตต่อไป

**Table 1** Chemical characteristics of wastewater after cultivation 21 green algal strains for 5 days.

| green algal isolate  | chemical characteristics |                          |                           |                           |                                     |                                      |                                          |                                           |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                      | pH                       | DO (mgO <sub>2</sub> /L) | BOD (mgO <sub>2</sub> /L) | COD (mgO <sub>2</sub> /L) | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (µg/L) | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (µg/L) | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> removal (%) | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> removal (%) |
| control <sup>*</sup> | 5.82±0.04                | 1.23±0.05                | 315.00±27.11              | 1803.00±23.12             | 2560.16±11.72                       | 959.15±8.12                          | 0.25                                     | 0.49                                      |
| FPI 1                | 8.42±0.14                | 9.53±0.35                | 77.66±2.30                | 1734.00±12.20             | 2403.86±11.20                       | 484.80±6.52                          | 6.34                                     | 49.71                                     |
| FPI 2                | 7.87±1.00                | 9.74±0.46                | 72.30±45.20               | 970.00±36.95              | 2354.12±10.80                       | 634.38±7.34                          | 8.28                                     | 34.19                                     |
| FPI 3                | 8.45±0.06                | 8.26±0.25                | 51.30±0.00                | 1261.00±18.47             | 2161.97±9.15                        | 650.03±8.11                          | 15.77                                    | 32.57                                     |
| FPI 4                | 9.02±0.11                | 9.73±0.34                | 76.30±3.05                | 1400.00±0.00              | 2108.76±13.45                       | 540.38±6.45                          | 17.84                                    | 43.94                                     |
| FPI 5                | 7.88±0.16                | 9.12±0.42                | 83.00±28.79               | 864.00±32.00              | 2055.45±10.81                       | 692.98±4.56                          | 19.92                                    | 28.11                                     |
| FPI 6                | 7.93±0.19                | 6.91±0.02                | 90.00±34.77               | 1,002.00±18.47            | 2038.68±19.76                       | 494.54±3.89                          | 20.57                                    | 48.70                                     |
| FPI 7                | 8.46±0.10                | 9.45±0.78                | 55.66±7.09                | 1397.30±18.47             | 2025.16±14.12                       | 579.31±4.11                          | 21.10                                    | 39.90                                     |
| FPI 8                | 8.52±0.14                | 9.46±0.52                | 63.00±6.08                | 789.33±48.80              | 2071.12±19.45                       | 451.15±5.98                          | 19.31                                    | 53.20                                     |
| FPI 12               | 7.76±0.12                | 9.04±0.44                | 33.60±8.73                | 1034.00±18.47             | 1786.14±12.45                       | 554.17±6.15                          | 30.41                                    | 42.51                                     |
| FPI 15               | 8.16±0.08                | 8.70±0.24                | 69.30±5.85                | 972.00±18.48              | 2116.23±21.49                       | 657.15±7.32                          | 17.55                                    | 31.83                                     |
| FPI 17               | 8.00±0.46                | 9.38±0.23                | 54.70±37.81               | 981.00±48.88              | 1908.19±12.65                       | 697.17±3.47                          | 25.65                                    | 27.68                                     |
| FPI 18               | 8.50±0.34                | 9.57±0.09                | 26.30±1.52                | 405.00±18.47              | 954.29±8.41                         | 293.77±1.22                          | 62.82                                    | 69.52                                     |
| FPI 21               | 8.31±0.18                | 8.97±0.00                | 45.66±0.57                | 725.00±22.00              | 2149.85±19.11                       | 764.12±3.45                          | 16.24                                    | 20.73                                     |
| FPI 24               | 8.35±0.15                | 8.35±0.19                | 65.00±2.00                | 1376.00±32.00             | 1894.56±15.23                       | 786.15±6.54                          | 26.19                                    | 18.44                                     |
| FPI 26               | 8.34±0.21                | 8.61±0.16                | 152.30±9.00               | 810.00±36.95              | 2184.60±19.23                       | 765.76±6.42                          | 14.89                                    | 20.56                                     |
| FPI 27               | 8.36±0.07                | 8.13±0.18                | 114.60±8.14               | 1525.00±36.95             | 2237.66±11.21                       | 729.81±7.43                          | 12.82                                    | 24.29                                     |
| FPI 29               | 9.32±0.26                | 9.32±0.14                | 42.30±5.50                | 1013.00±66.61             | 1921.96±12.18                       | 454.12±6.87                          | 25.12                                    | 52.89                                     |
| FPI 30               | 8.18±0.26                | 8.42±0.18                | 33.30±4.16                | 1098.00±48.88             | 2094.35±17.45                       | 524.56±5.67                          | 18.40                                    | 45.58                                     |
| FPI 31               | 8.30±0.51                | 8.85±1.29                | 72.00±6.65                | 1098.00±48.88             | 2184.68±15.14                       | 689.76±4.98                          | 14.88                                    | 28.44                                     |
| FPI 32               | 8.30±0.09                | 9.70±0.06                | 48.00±6.08                | 853.00±36.95              | 2317.80±15.34                       | 665.67±5.34                          | 9.70                                     | 30.94                                     |
| FPI 34               | 8.84±0.09                | 7.71±0.14                | 78.30±7.50                | 725.00±18.47              | 2201.64±12.13                       | 698.97±6.51                          | 14.22                                    | 27.49                                     |

<sup>\*</sup> Control is wastewater without green algae.

ผลการศึกษายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวไฮโซเลท FPI 18

จากการศึกษายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวไฮโซเลท FPI 18 โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S

rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส และนำมา รันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ผลการทดลองพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ พีซีอาร์ ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาด ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่คาดหวังไว้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) จากนั้น

นำผลดิบทันท์ พีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ และส่งวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ forward ไพรมเมอร์ ผลจากการ ส่งวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1,048 นิวคลีโอไทด์ โดยจากการทดลองได้ลำดับ นิวคลีโอไทด์เพียงบางส่วนเท่านั้น ซึ่งยังไม่ครบตามจำนวน ผู้วิจัยจึงยังไม่ได้ขอเลข accession number จากฐานข้อมูล NCBI โดยในอนาคตผู้วิจัยได้วางแผนที่จะส่งวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการใช้ reverse ไพรมเมอร์ เพื่อให้ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ และขอเลข accession number ต่อไป และจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยใช้ โปรแกรม BLASTN ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว FPI 18 มีลักษณะใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 (KT984853.1) มากที่สุดถึงร้อยละ 98.93 ใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียว *Coelastrum astroideum* var. *rugosum* strain UTEX2442 (GQ375393.0) และ *Asterarcys* sp. YACCYB527 (MH683929.1) ร้อยละ 98.73 อย่างไรก็ตามเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทำ แผนภูมิวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree (ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 replicates) โดยคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวจากฐานข้อมูล NCBI โดยใช้ จินัสของสาหร่ายสีเขียว ที่มีความหลากหลาย และมี ร้อยละความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเทียบกับไฮโซเลท FPI 18 จากตาราง BLASTN อยู่ในช่วงร้อยละ 98.54 ขึ้นไป โดยใช้สาหร่ายสีเขียว *Catena variidis* clone KR 914 เป็น out group จากการทดลองพบว่า สาหร่าย สีเขียว FPI 18 แยกกลุ่มออกมาจากสาหร่ายสีเขียว จินัสอื่นๆ อย่างชัดเจน (Figure 1) อย่างไรก็ตามลำดับ นิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสีเขียว FPI 18 ที่นำมาทำแผนภูมิ วิวัฒนาการเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงบางส่วนเท่านั้น

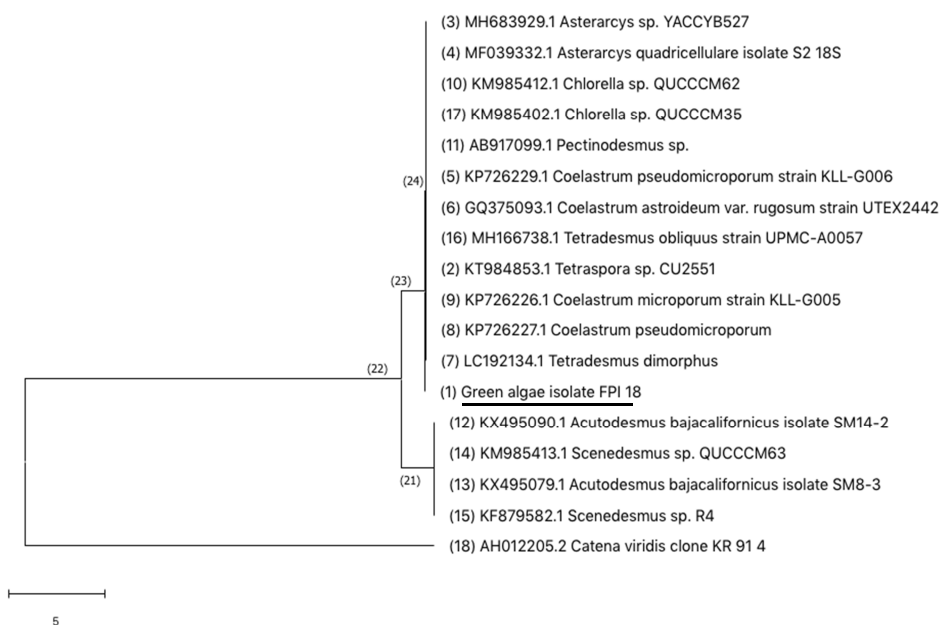
ดังนั้นถ้าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์มากกว่านี้ อาจทำให้การจัดกลุ่มของสาหร่ายทำได้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้เมื่อศึกษาฐานฐานวิทยายาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสาหร่ายสีเขียว FPI 18 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Tetraspora* sp. CU2551 (Maneeruttanarungroj, Lindblad, & Incharoensakdi, 2010) แต่เซลล์มีขนาดเล็กกว่า (Figure 2A และ 2B) โดยสาหร่ายสีเขียว FPI 18 มีรูปร่างกลม ขนาดประมาณ 5-6 ไมโครเมตร โดยจะเห็น เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเห็นเป็น 3 และ 4 เซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Figure 2) ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของ สาหร่ายสีเขียวในจินัสนี้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งชื่อสาหร่าย สีเขียวไฮโซเลท FPI 18 นี้ว่า *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 และนำสาหร่ายสายพันธุ์นี้ไปศึกษาสภาวะที่ เหมาะสมในการกำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟตในน้ำเสียต่อไป

#### ผลของค่าพีเอชต่อการกำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟต

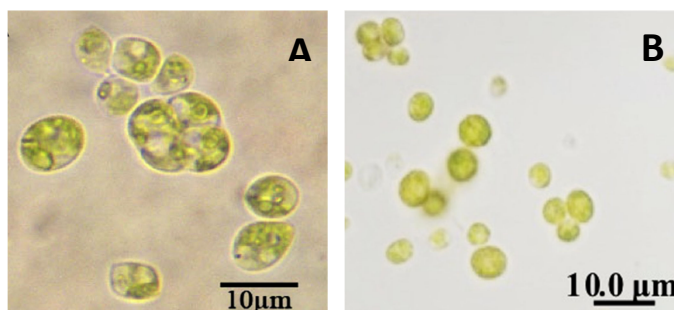
ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 จากการ เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 ในน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และแปรผันค่าพีเอช ในน้ำเสียเท่ากับ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 เพาะเลี้ยงเป็น ระยะเวลา 5 วัน ผลการทดลองพบว่า ในน้ำเสียที่มีค่า พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 ให้ค่าการกำจัดไนโตรเจนและ ฟอสเฟตดีที่สุดและแตกต่างจากค่าพีเอชอื่นๆ อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ โดย *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 สามารถกำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟตได้ร้อยละ 79.74 และ 80.32 ตามลำดับ (Table 2) จากผลการทดลองที่ ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sabeti, Hejazi, & Karimi (2019) ที่สภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดไนโตรเจนและ ฟอสเฟตในน้ำเสียโดยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ให้ค่ากำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟตสูงสุดในน้ำเสียที่มีค่า พีเอชเท่ากับ 8 นอกจากนี้ผลของการลดลงของไนโตรเจน

และฟอสเฟตยังสอดคล้องกับชีวมวล (วัดจากน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เพิ่มขึ้น โดยที่ค่าพีเอช 8 ให้ค่าชีวมวลสูงสุด และแตกต่างจากค่าพีเอชอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าชีวมวลเท่ากับ  $0.693 \pm 0.045$  กรัมต่อลิตร (Table 2) นอกจากนี้ที่ค่าพีเอช 8 ในการทดลองของ Li, Horsman, Wang, Wu, & Lan (2008) ทำให้สาหร่ายสีเขียว *Neochloris oleoabundans* มีการสะสมชีวมวลสูงสุด และสามารถกำจัดไนโตรเจนได้มากที่สุดอีกด้วย โดยทั่วไปแล้วค่าพีเอชมีผลต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียว โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญจะอยู่ในช่วง 6-8 (Larsdutter, 2006) ค่าพีเอชที่สูงหรือต่ำเกินไปอาจส่งผลต่อการ เจริญเติบโต การทำงานของ ออร์แกเนลล์ เอนไซม์ และโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว (Jia, & Yuan, 2306) นอกจากนี้

ค่าพีเอชยังส่งผลต่อการดูดซึมสารอาหาร เช่น แอมโมเนีย ไนเตรทและฟอสเฟตในแหล่งน้ำได้อีกด้วย โดยปกติเมื่อสาหร่ายมีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ จะมีการผลิต  $\text{OH}^-$  ส่งผลทำให้ค่าพีเอชในแหล่งน้ำสูงขึ้น ซึ่งค่าพีเอชที่สูงขึ้นมีแนวโน้มต่อการเพิ่มการดูดซึมไนเตรทและฟอสเฟต ทำให้ปริมาณไนเตรทและฟอสเฟตในแหล่งน้ำลดลงได้ (Sayadi, Ahmadpour, Capoorchali, & Rezaei, 2016) ในการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าค่าพีเอชเท่ากับ 8 เป็นค่าที่เหมาะสมในการเจริญและการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตของสาหร่ายสีเขียว *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 เป็นไปได้ว่าที่ค่าพีเอชดังกล่าว ทำให้สาหร่ายมีการดูดซึมไนเตรทและฟอสเฟตไปใช้ในการเจริญเติบโตมากขึ้น ทำให้น้ำมีไนเตรทและฟอสเฟตลดลงมากที่สุด



**Figure 1** Phylogenetic tree using the obtained 18S rDNA sequence of green algae isolate FPI 13 (underlined) and 17 other green algae species. The accession number available in the NCBI database shows in front of each name.



**Figure 2** Morphological characterization of *Tatrastora* sp. CU2551 (A) (Maneeruttanarungroj, Lindblad, & Incharoensakdi, 2010) and *Tatrastora* sp. Rmutsb FPI 18 (B) under light microscope.

**Table 2** Effect of initial pH on nitrate removal, phosphate removal and biomass under cultivated cell of *Tatrastora* sp. Rmutsb FPI 18 in wastewater for 5 days.

| pH | nitrate ( $\text{NO}_3^-$ )                          |                                | phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ )                        |                                   | biomass<br>(g/L)               |
|----|------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
|    | $\text{NO}_3^-$ concentration<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | $\text{NO}_3^-$ removal<br>(%) | $\text{PO}_4^{3-}$ concentration<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | $\text{PO}_4^{3-}$ removal<br>(%) |                                |
| 4  | 1186.87 $\pm$ 6.56                                   | 53.76 <sup>d</sup>             | 489.45 $\pm$ 3.45                                       | 49.22 <sup>d</sup>                | 0.273 <sup>e</sup> $\pm$ 0.128 |
| 5  | 1045.36 $\pm$ 8.83                                   | 59.27 <sup>c</sup>             | 402.18 $\pm$ 2.69                                       | 58.28 <sup>c</sup>                | 0.347 <sup>d</sup> $\pm$ 0.005 |
| 6  | 997.98 $\pm$ 9.39                                    | 61.12 <sup>c</sup>             | 376.78 $\pm$ 3.90                                       | 60.91 <sup>c</sup>                | 0.435 <sup>c</sup> $\pm$ 0.017 |
| 7  | 954.29 $\pm$ 8.41                                    | 62.82 <sup>c</sup>             | 293.77 $\pm$ 1.22                                       | 69.52 <sup>b</sup>                | 0.517 <sup>b</sup> $\pm$ 0.011 |
| 8  | 520.12 $\pm$ 5.12                                    | 79.74 <sup>a</sup>             | 189.75 $\pm$ 2.23                                       | 80.32 <sup>a</sup>                | 0.693 <sup>a</sup> $\pm$ 0.045 |
| 9  | 852.12 $\pm$ 6.09                                    | 66.80 <sup>b</sup>             | 389.52 $\pm$ 2.19                                       | 59.59 <sup>c</sup>                | 0.491 <sup>c</sup> $\pm$ 0.037 |

The lowercase letters in the same column represent significant differences according to Duncan's test ( $\alpha = 0.05$ ).

ผลของอุณหภูมิต่อการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตในสาหร่ายสีเขียว *Tatrastora* sp. Rmutsb FPI 18

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tatrastora* sp. Rmutsb FPI 18 ในน้ำเลี้ยงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และ แปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน ผลการทดลองพบว่า ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่าการกำจัดไนเตรท

และฟอสเฟตดีที่สุด และแตกต่างจากอุณหภูมิอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *Tatrastora* sp. Rmutsb FPI 18 สามารถกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตได้ร้อยละ 88.62 และ 89.08 ตามลำดับ (Table 3) นอกจากนี้ ยังสอดคล้องกับชีวมวลที่มีการสะสมมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยง *Tatrastora* sp. Rmutsb FPI 18 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้ค่าชีวมวลเท่ากับ 0.858 $\pm$ 0.004 กรัมต่อลิตร (Table 3) การกำจัดไนเตรทและฟอสเฟต

ได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Martinez, Sánchez, Jiménez, Yousfi, & Muñoz (2000) ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ในน้ำเสียชุมชน และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ogbonna, Yoshizawa, & Tanaka (2000) ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sorokiniana* และไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis* ในน้ำเสียที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถกำจัด ไนเตรทได้ถึงร้อยละ 45.4 และ 100 ตามลำดับ โดยทั่วไปอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ และมีผลต่อเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ (Taziki, Ahmadzadeh, Murry, & Lyon, 2015) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายในเขตร้อนชื้นจะอยู่ที่ประมาณ

25 องศาเซลเซียส (Renaud, Thinh, Lambrinidis, & Parry, 2002) สาหร่ายสีเขียวบางสายพันธุ์เมื่ออุณหภูมิในน้ำสูงขึ้น อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงจะสูงขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการดูดซึมสารอาหาร รวมถึงการนำไนเตรทและฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น (Jiménez, & Niell, 1991) โดยในการศึกษารั้วนี้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สาหร่ายสีเขียว *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 สามารถกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตได้สูงกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็น 35 และ 40 องศาเซลเซียส การกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตกลับลดลง แสดงให้เห็นว่าสภาวะดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และ/หรือการสังเคราะห์ด้วยแสงในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์นี้

**Table 3** Effect of temperature on nitrate removal, phosphate removal and biomass under cultivated cell of *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 in wastewater for 5 days.

| temperature (°C) | nitrate ( $\text{NO}_3^-$ )                       |                             | phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ )                     |                                | biomass (g/L)             |
|------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
|                  | $\text{NO}_3^-$ concentration ( $\mu\text{g/L}$ ) | $\text{NO}_3^-$ removal (%) | $\text{PO}_4^{3-}$ concentration ( $\mu\text{g/L}$ ) | $\text{PO}_4^{3-}$ removal (%) |                           |
| 25               | 954.29±8.41                                       | 62.82 <sup>d</sup>          | 293.77±1.22                                          | 69.52 <sup>c</sup>             | 0.517 <sup>c</sup> ±0.011 |
| 30               | 292.11±2.99                                       | 88.62 <sup>a</sup>          | 105.23±1.33                                          | 89.08 <sup>a</sup>             | 0.858 <sup>a</sup> ±0.004 |
| 35               | 498.12±3.12                                       | 80.59 <sup>b</sup>          | 250.12±2.14                                          | 74.05 <sup>b</sup>             | 0.629 <sup>b</sup> ±0.045 |
| 40               | 692.15±3.43                                       | 73.03 <sup>c</sup>          | 298.14±2.18                                          | 69.07 <sup>c</sup>             | 0.522 <sup>c</sup> ±0.017 |

The lowercase letters in the same column represent significant differences according to Duncan's test (alpha = 0.05).

ผลของความเข้มแสงต่อการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตในสาหร่ายสีเขียว *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 ในน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และแปรผันความเข้มแสงในการ

เพาะเลี้ยงเท่ากับ 15, 30, 50, 100 และ 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน ผลการทดลองพบว่าในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 50 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้ค่าการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตดีที่สุด

และแตกต่างจากความเข้มแสงอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 สามารถกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตได้ร้อยละ 77.40 และ 83.39 ตามลำดับ (Table 4) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับชีวมวลที่มีการสะสมมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยง *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 ที่ความเข้มแสงดังกล่าว โดยให้ค่าชีวมวลเท่ากับ  $0.667 \pm 0.040$  กรัมต่อลิตร (Table 4) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ในสาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis* (Kang, An, Park, & Sim, 2006) และ *Scenedesmus accutus* pvuw02 (Doria et al., 2012) ซึ่งสามารถกำจัดไนเตรทได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 50 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และใกล้เคียงกับการรายงานในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่สามารถกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตจากน้ำเสียได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มแสง 58 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (Lau, Tam, & Wong, 1995) โดยทั่วไปแล้วแสงเป็นที่ปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียว ซึ่งทำให้สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มชีวมวล อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดสารอาหารในน้ำเสีย โดยการเพิ่มความเข้มแสงจะทำให้สาหร่ายสีเขียวมีการนำไนเตรทและฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์มากขึ้น ส่งผลให้ไนเตรทและฟอสเฟตในแหล่งน้ำลดลงได้ (Taziki, Ahmadzadeh, Murry, & Lyon, 2015) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ เมื่อเพิ่มความเข้มแสง (15-50 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) การกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตของสาหร่ายสีเขียว *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความ

เข้มแสงให้มากขึ้นเป็น 100-200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที การกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตลดลง อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อความเข้มแสงสูงขึ้น เซลล์อาจเกิดกระบวนการ photoinhibition ซึ่งทำให้การเจริญเติบโต และการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ลดลง ส่งผลให้การกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตลดลง (Markou, & Georgakakis, 2011)

จากการทดลองแปรผันค่าพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มแสง ทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย จึงนำสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยมารวมกันเพื่อศึกษาการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตโดยสาหร่ายสีเขียว *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 โดยสภาวะที่เหมาะสมประกอบด้วย ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงเท่ากับ 50 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เรียกสภาวะดังกล่าวว่า “สภาวะที่เหมาะสม” หรือ “optimal condition” โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับสภาวะปกติที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ ค่าพีเอชเริ่มต้น 7 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เรียกสภาวะดังกล่าวว่า “สภาวะควบคุม” หรือ “control condition” ผลการทดลองแสดงดัง (Figure 3) ซึ่งพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 ในน้ำเสียสภาวะที่เหมาะสม ให้ค่าการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตสูงกว่าสภาวะควบคุม โดยสามารถกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตได้ถึงร้อยละ 93.65 และ 95.65 ตามลำดับ (Figure 3) โดยเมื่อเปรียบเทียบการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตของ *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 กับสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ต่างๆ

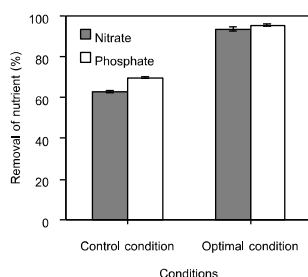
ที่มีพื้นฐานข้อมูล (Table 5) พบว่า *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 มีประสิทธิภาพในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียวที่มีรายงานและยังมีประสิทธิภาพในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตได้ดีกว่าสาหร่ายสีเขียวบางสายพันธุ์ เช่น *Chlorella sorokiniana* (Ogbonna, Yoshizawa, & Tanaka, 2000) และ *Chlorella vulgaris* (González, Cañizares, & Baena, 1997; Ruiz-Marin, Mendoza-Espinosa, & Stephenson, 2010; Sabeti, Hejazi, & Karimi, 2019) เป็นต้น เป็นการแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียว *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 มีประสิทธิภาพในการกำจัดไนเตรทและฟอสเฟตจากน้ำเสียได้ นอกจากนี้ผลพลอยได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 ในน้ำเสียคือชีวมวล ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้ เช่น พลังงานทดแทน อาหารเสริมและอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ไม่ได้วัดค่า total Kjeldahl nitrogen (TKN) และ

total phosphorus ซึ่งเป็นค่าพารามิเตอร์ที่กำหนดโดยกรมโรงงานอุตสาหกรรมและกรมควบคุมมลพิษ จึงไม่สามารถกล่าวได้ว่าน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดโดยสาหร่ายสีเขียวนั้น ผ่านเกณฑ์มาตรฐานน้ำเสียตามที่กรมโรงงานอุตสาหกรรมและกรมควบคุมมลพิษกำหนดไว้หรือไม่ นอกจากนี้ น้ำเสียที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วซึ่งเมื่อนำไปใช้จริงอาจมีปัญหาจากการปนเปื้อนแบคทีเรียและเชื้ออื่นๆ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ ดังนั้นในการทดลองครั้งถัดไปผู้วิจัยได้วางแผนที่จะทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 ในน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และวัดค่า TKN และ total phosphorus เพิ่มเติม เพื่อที่จะจำลองสถานการณ์ให้ใกล้เคียงกับความเป็นจริง และเทียบเกณฑ์มาตรฐานน้ำเสียกับกรมโรงงานอุตสาหกรรมและกรมควบคุมมลพิษในการบำบัดน้ำเสียต่อไป

**Table 4** Effect of light intensity on nitrate removal, phosphate removal and biomass under cultivated cell of *Tatraspora* sp. Rmutsb FPI 18 in wastewater for 5 days.

| light intensity<br>( $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ ) | nitrate ( $\text{NO}_3^-$ )   |                         | phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) |                            | biomass<br>(g/L)               |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
|                                                            | $\text{NO}_3^-$ concentration | $\text{NO}_3^-$ removal | $\text{PO}_4^{3-}$ concentration | $\text{PO}_4^{3-}$ removal |                                |
|                                                            | ( $\mu\text{g/L}$ )           | (%)                     | ( $\mu\text{g/L}$ )              | (%)                        |                                |
| 15                                                         | 1098.87 $\pm$ 12.36           | 57.19 <sup>d</sup>      | 389.12 $\pm$ 2.33                | 59.63 <sup>d</sup>         | 0.326 <sup>d</sup> $\pm$ 0.023 |
| 30                                                         | 954.29 $\pm$ 8.41             | 62.82 <sup>c</sup>      | 293.77 $\pm$ 1.22                | 69.52 <sup>c</sup>         | 0.517 <sup>c</sup> $\pm$ 0.011 |
| 50                                                         | 580.15 $\pm$ 9.15             | 77.40 <sup>a</sup>      | 160.11 $\pm$ 1.14                | 83.39 <sup>a</sup>         | 0.667 <sup>a</sup> $\pm$ 0.040 |
| 100                                                        | 750.22 $\pm$ 6.71             | 70.77 <sup>b</sup>      | 256.65 $\pm$ 2.59                | 73.38 <sup>b</sup>         | 0.598 <sup>b</sup> $\pm$ 0.012 |
| 200                                                        | 940.15 $\pm$ 5.82             | 63.37 <sup>c</sup>      | 390.11 $\pm$ 2.45                | 59.53 <sup>d</sup>         | 0.413 <sup>c</sup> $\pm$ 0.015 |

The lowercase letters in the same column represent significant differences according to Duncan's test ( $\alpha = 0.05$ ).



**Figure 3** Nitrate and phosphate removal by *Tatra sp.* Rmutsb FPI 18 under cultivated cell in control and optimal conditions.

**Table 5** Nitrate and phosphate removal from wastewater by *Tatra sp.* Rmutsb FPI 18 compared with other green algal strains.

| green algae                    | condition                                                                                         | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> removal (%) | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> removal (%) | references                                        |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <i>Tatra sp.</i> Rmutsb FPI 18 | food processing industrial wastewater, pH 8, 30 °C and 50 µmolphoton/m <sup>2</sup> /s for 5 days | 93.65                                    | 96.65                                     | this study                                        |
| <i>Chlorella sorokiniana</i>   | high strength organic wastewater, pH 6, 30 °C and 100 µmolphoton/m <sup>2</sup> /s for 3 days     | 45.50                                    | -                                         | Ogbonna, Yoshizawa, & Tanaka (2000)               |
| <i>Chlorella vulgaris</i>      | wastewater effluent, 25 °C and 135 µmolphoton/m <sup>2</sup> /s for 2 days                        | 74.3 <sup>1/</sup>                       | 70.2                                      | Ruiz-Marin, Mendoza-Espinosa, & Stephenson (2010) |
| <i>Chlorella vulgaris</i>      | wastewater, pH 8 and 26.3 °C for 2 days                                                           | 85                                       | 77                                        | Sabeti, Hejazi, & Karimi (2019)                   |
| <i>Chlorella vulgaris</i>      | agro-industrial wastewater, 20 °C and 60 µmolphoton/m <sup>2</sup> /s for 9 days                  | -                                        | 55                                        | González, Cañizares, & Baena (1997)               |
| <i>Haematococcus pluvialis</i> | primary treated wastewater, pH 7.5, 23 °C and 50 µmolphoton /m <sup>2</sup> /s for 5 days         | 100                                      | -                                         | Kang, An, Park, & Sim (2006)                      |
| <i>Scenedesmus obliquus</i>    | wastewater effluent, 25 °C and 152 µmolphoton/m <sup>2</sup> /s for 2.1 days                      | 100                                      | 60 <sup>2/</sup>                          | Ruiz-Marin, Mendoza-Espinosa, & Stephenson (2010) |

<sup>1/</sup> Ammonium ion (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)

<sup>2/</sup> Total phosphorus

## สรุป

จากการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตอาหารสำเร็จรูป จังหวัดพระนครศรีอยุธยา สามารถคัดแยกสาหร่ายสีเขียวได้ 21 ไอโซเลท จากนั้นนำทั้ง 21 ไอโซเลทมาศึกษาการกำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟต ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท FPI 18 มีความสามารถมากที่สุดในกำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟต และจากศึกษาสายพันธุ์ โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rDNA และศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท FPI 18 พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท FPI 18 มีความใกล้เคียงและจัดอยู่ในจีแนส *Tetraspora* sp. จึงตั้งชื่อสาหร่ายชนิดนี้ว่า *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 โดย *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 มีรูปร่างกลม ขนาด 5-6 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม 3-4 เซลล์ภายใต้ซีทที่โปร่งแสง จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟต พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ค่าพีเอชเริ่มต้นในน้ำเสียมีค่าเท่ากับ 8 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงคือ 30 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสงที่ 50 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน และเมื่อนาสภาวะดังกล่าวทุกสภาวะมารวมกัน พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 สามารถกำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟตได้ถึงร้อยละ 93.65 และ 96.65 ตามลำดับ และสูงกว่าสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงปกติ (พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน) ที่ระยะเวลา 5 วัน และเมื่อนำค่าการกำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 ไปเทียบกับสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์

อื่นๆ ในฐานข้อมูล พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 มีความสามารถสูงในการกำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟตใกล้เคียงกับสาหร่ายที่เคยมีรายงานไว้ เป็นการแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. Rmutsb FPI 18 มีประสิทธิภาพการกำจัดไนโตรเจนและฟอสเฟตออกจากน้ำเสียได้อีกทั้งยังสามารถนำชีวมวลของสาหร่ายสีเขียวที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น พลังงานทดแทน อาหารเสริมและอาหารสัตว์ เป็นต้น

## คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ศูนย์พระนครศรีอยุธยา หันตรา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณโรงงานอุตสาหกรรมผลิตอาหารสำเร็จรูป จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเข้าไปเก็บตัวอย่างน้ำเสียมาทำงานวิจัยในครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Science*, 19, 257-275.
- Abou-Shanab, R. A. I., El-Dalatony, M. M., EL-Sheekh, M. M., Ji, M. K., Salama, E. S., Kabra, A. N., & Jeon, B. H. (2014). Cultivation of a new microalga, *Micractinium reisseri*, in municipal wastewater for nutrient removal, biomass, lipid, and fatty acid production. *Biotechnology Bioengineering*, 19, 510-518.

- Abinandan, S., & Shanthakumar, S. (2015). Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: a review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 52, 123-132.
- American Public Health Association (APHA). (1998). *Methods for biomass production. In Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Baltimore MD: American Public Health Association.
- Boelee, N. C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C. J. N., & Wijffels, R. H. (2011). Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms. *Water Research*, 45(18), 5925-5933.
- Choi, H. J., Joo, J. H., Kim, J. H., Wang, P., Ki, J. S., & Han, M. S. (2018). Morphological characterization and molecular phylogenetic analysis of *Dolichospermum hangangense* (Nostocales, Cyanobacteria) sp. nov. from Han River, Korea. *Algae*, 33(2), 143-156.
- Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29(6), 686-702.
- Doria, E., Longoni, P., Scibilia, L., Iazzi, N., Cella, R., & Nielsen, E. (2012). Isolation and characterization of a *Scenedesmus acutus* strain to be used for bioremediation of urban wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 24(3), 375-83.
- Farooq, W., Lee, Y. C., Ryu, B. G., Kim, B. H., Kim, H. S., Choi, Y. E., & Yang, J. W. (2013). Two stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. *Bioresource Technology*, 132, 230 -238.
- Florczyk, M., Lakomik, A., Woény, M., & Brzuzan, P. (2014). Neurotoxicity of cyanobacterial toxins. *Environmental Biotechnology*, 10(1), 26-43.
- González, L. E., Cañizares, R. O., & Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, 60(3), 259-262.
- Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85, 119-23.
- Ji, M. K., Abou-Shanab, R. A. I., Kim, S. H., Salama, E. S., Lee, S. H., Kabra, N. A., Lee, Y. S., Hongf, S., & Jeon, B. H. (2013). Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO<sub>2</sub> for nutrient removal and biomass production. *Ecological Engineering*, 58, 142 -148.
- Jia, H., & Yuan, Q. (2016). Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae–bacteria consortia. *Cogent Environmental Science*, 2, 1-15.
- Jiménez, C., & Niell, F. X. (1991) Growth of *Dunaliella viridis* teodoresco: effect of salinity, temperature and nitrogen concentration. *Journal of Applied Phycology*, 3(4), 319-327.
- Kang, C. D., An, J. Y., Park, T. H., & Sim, S. J. (2006). Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary treated wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 31(3), 234-238.
- Larsdotter, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae: a literature review. *Journal of Water Management and Research (Vatten)*, 62, 31-38.

- Lau, P. S., Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution*, 89(1), 59-66.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C.Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 629-36.
- Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P., & Incharoensakdi, A. (2010). A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 13193-13199.
- Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88(10), 3389-3401.
- Martínez, M. E., Sánchez, S., Jiménez, J. M. E. I., Yousfi, F., & Muñoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73(3), 263-272.
- Ogbonna, J. C., Yoshizawa, H., & Tanaka, H. (2000). Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 277-284.
- Ometto, F., Pozza, C., Whitton R., Smyth, B., Torres, A. G., Henderson, R. K., Jarvis, P., Jefferson, B., & Villa, R. (2014). The impacts of replacing air bubbles with microspheres for the clarification of algae from low cell-density culture. *Water Research*, 53, 168-179.
- Oswald, W. J., & Golueke, C. G. (1960). Biological transformation of solar energy. *Advances in Applied Microbiology*, 2, 223-262.
- Phunpruch, S., Taikhao, S., & Incharoensakdi, A. (2016). Identification of bidirectional hydrogenase genes and their co-transcription in unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Journal of Applied Phycology*, 28, 967-978.
- Renaud, S. M., Thinh, L. V., Lambrinidis, G., & Parry, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211(1), 195-214.
- Riaño, B., Molinuevo, B., & García-González, M. C. (2011). Treatment of fish processing wastewater with microalgae-containing microbiota. *Bioresource Technology*, 102, 10829 -10833.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111, 1-61.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L. G., & Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101(1), 58-64.
- Sabeti, M. B., Hejazi, M. A., & Karimi, A. (2019). Enhanced removal of nitrate and phosphate from wastewater by *Chlorella vulgaris*: Multi-objective optimization and CFD simulation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 27(3), 639-648.
- Sayadi, M. H., Ahmadvpour, N., Capoorchali, M. F., & Rezaei M. R. (2016). Removal of nitrate and phosphate from aqueous solutions by microalgae:

- An experimental study. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 2(3), 257-264.
- Shi, J., Podola, B., & Melkonian, M. (2007). Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 417-423.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Taikhao, S., & Phunpruch S. (2017). Biomass and biohydrogen production of unicellular green alga *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 in Frozen Food Industrial. In *The 7<sup>th</sup> International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products and The 12<sup>th</sup> Asian Biohydrogen & Biorefinery Symposium* (pp. 18-25). Khon Kaen: Khon Kaen University.
- Taziki, M., Ahmadzadeh, H., Murry, M. A., & Lyon, S. R. (2015). Nitrate and nitrite removal from wastewater using algae. *Current Biotechnology*, 4, 1-15.
- Walker, W. W., Jr. (1983). Significance of eutrophication in water supply reservoir. *Journal of American Water Work Association*, 75(1), 38-42.