

การเพิ่มการเติบโตของไดอะตอมทะเล *Amphora subtropica* BUUC1502 โดยเติมฟอสเฟตและซิลิเกตในระหว่างการเลี้ยง

Growth Improvement of a Marine Diatom *Amphora subtropica* BUUC1502 by Adding Phosphate and Silicate during the Cultivation

สุพรรณิ นวลโกฏ¹ สรวิต เพ้าทองสุข^{2,3} และ มะลิวัลย์ กุตะโก^{1*}

Supanee Nualkot¹, Sorawit Powtongsook^{2,3} and Maliwan Kutako^{1*}

Received: 25 May 2022, Revised: 12 October 2022, Accepted: 10 March 2023

บทคัดย่อ

ในอาหารเพาะเชื้อไดอะตอมมีไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิเกตเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับการเติบโต งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเติบโตของไดอะตอมทะเล *Amphora subtropica* BUUC1502 ที่เลี้ยงโดยมีการเติมสารอาหารเพิ่มในระหว่างการเลี้ยง การทดลองแรกได้ศึกษาการเติบโตและการใช้สารอาหารของไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน F/2 ความเค็ม 30 พีเอสยู พบว่าในระหว่างการเลี้ยงมีการลดลงของไนเตรท แต่ยังคงมีปริมาณเพียงพอ (> 8 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) ในขณะที่ฟอสเฟตและซิลิเกตลดลงอย่างรวดเร็วจนเกือบหมดในเวลา 5 วัน การทดลองที่สองได้ทดลองเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารสูตร F/2 ที่มีการเติมฟอสเฟตและซิลิเกตแตกต่างกัน 6 ชุดการทดลอง ได้แก่ [1] อาหารสูตร F/2 [2] อาหารสูตร F/2 ที่ไม่เติมฟอสเฟต (F/2-P) [3] อาหารสูตร F/2 ที่ไม่เติมซิลิเกต (F/2-Si) [4] อาหารสูตร F/2 ที่มีการเติมสารละลายฟอสเฟตเพิ่มในระหว่างการเลี้ยง (F/2+P) [5] อาหารสูตร F/2 ที่มีการเติมซิลิเกตเพิ่มในระหว่างการเลี้ยง (F/2+Si) และ [6] อาหารสูตร F/2 ที่เติมทั้งฟอสเฟตและซิลิเกตเพิ่มในระหว่างการเลี้ยง (F/2+P+Si) สารอาหารถูกเติมเพิ่มลงในขวดเลี้ยงระหว่างวันที่ 2-13 และมีการเพิ่มความเข้มข้นของ

¹ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี 22170

¹ Faculty of Marine Technology, Burapha University, Chanthaburi Campus, Tha Mai, Chanthaburi 22170, Thailand.

² ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

² Center of Excellence for Marine Biotechnology (CEMB), Marine Science Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand.

³ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อำเภอลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

³ National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand.

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): maliwan@buu.ac.th

การเติมสารอาหารขึ้นอีกในระหว่างวันที่ 14-19 เพื่อตอบสนองต่อปริมาณเซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงขึ้น ผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่มีการเติมฟอสเฟตและซิลิเกตเพิ่มในระหว่างการเลี้ยง สามารถเพิ่มการเติบโตของไดอะตอมได้สูงกว่าอาหารสูตร F/2 โดยมีความหนาแน่นสูงสุด 609.44×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ในขณะที่การเลี้ยงด้วยอาหารสูตร F/2 ไดอะตอมมีความหนาแน่นสูงสุด 318.33×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม การเพิ่มสารอาหารด้วยความเข้มข้นสูงขึ้นในช่วงท้ายของการทดลอง (วันที่ 14-19) ไม่ช่วยให้เซลล์เพิ่มความหนาแน่นขึ้นได้

คำสำคัญ: การเติมสารอาหาร, ฟอสเฟต, ซิลิเกต, ไดอะตอมทะเล, *Amphora subtropica* BUUC1502

ABSTRACT

Nitrate, phosphate, and silicate are important nutrients in the culture medium for diatom cultivation. This study investigated the growth of a marine diatom *Amphora subtropica* BUUC1502 cultured with an addition of nutrients alongside the culture period. The first experiment was to evaluate the growth and nutrient consumption of the diatom when cultured in the standard F/2 medium at 30 PSU salinity. The results showed that a decrease in nitrate concentration was found but the total concentration was still sufficient for the diatom cultivation (>8 mg-N/L). On the other hand, phosphate and silicate were substantially decreased to almost zero within 5 days. The second experiment was to investigate the effect of an addition of nitrate and phosphate during cultivation on the growth of diatom by cultivation of diatom in 6 different treatments including 1) standard F/2 medium, 2) F/2 medium without phosphate (F/2-P), 3) F/2 medium without silicate (F/2-Si), 4) F/2 medium with phosphate addition alongside the culture (F/2+P), 5) F/2 medium with silicate addition alongside the culture (F/2+Si), and 6) F/2 medium with phosphate and silicate addition alongside the culture (F/2+P+Si). The nutrient addition was performed during days 2-13 and the nutrient concentration was increased between days 14-19 to compensate higher cells density. It was found that an addition of both phosphate and silicate alongside the cultivation could enhance the growth of the diatom with the highest density of 609.44×10^4 cells/ml whereas culturing with F/2 medium alone resulted in a maximum cell density of 318.33×10^4 cells/ml. However, an increment in nutrient addition during the final period (days 14-19) did not provide further growth of the diatom.

Key words: nutrient addition, phosphate, silicate, marine diatom, *Amphora subtropica* BUUC1502

บทนำ

ไดอะตอมเป็นแพลงก์ตอนพืชที่มีบทบาทสำคัญในฐานะผู้ผลิตเบื้องต้นของระบบนิเวศทางน้ำ (Scala and Bowler, 2001) และมวลชีวภาพของ

ไดอะตอมยังมีประโยชน์ด้านพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพ ยา อาหารเพื่อสุขภาพ วัสดุที่เกี่ยวข้องกับนาโนเทคโนโลยี และการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนสัตว์และสัตว์น้ำ รวมถึงใช้บำบัดน้ำเสียบางประเภท เป็นต้น

(Bozarth *et al.*, 2009) การเพิ่มผลผลิตมวลชีวภาพของไคอะตอมเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านที่กล่าวในข้างต้น จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตของไคอะตอม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปัจจัยทางด้านสารอาหารที่เป็นปัจจัยจำกัดต่อผลผลิตของผู้ผลิตเบื้องต้นในทะเลซึ่งรวมถึงไคอะตอม คือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซิลิกา (Brembu *et al.*, 2017) ไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารประกอบทางชีวภาพที่สำคัญในเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) โปรตีนและคลอโรฟิลล์ (Govindan *et al.*, 2021) ฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate, ATP) และฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ที่เชื่อมหุ้มเซลล์ (cell membrane) แหล่งฟอสฟอรัสหลักที่ไคอะตอมนำมาใช้ในการเติบโตจะอยู่ในรูปสารอนินทรีย์ออร์โธฟอสเฟต (orthophosphate, PO_4^{2-}) และซิลิกาเป็นสารอาหารที่สำคัญที่สุดสำหรับไคอะตอมเพราะเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (frustule) และเมื่อไคอะตอมตายจะทำให้เกิดการทับถมเป็นไคอะตอมไมท์ (diatomite) ที่มีซิลิกาออกไซด์เป็นองค์ประกอบหลักมากถึง 95% โดยน้ำหนัก (Trainor, 1978; Lee, 1999) การเพิ่มสารอาหารที่สำคัญที่กล่าวในข้างต้นจึงเป็นแนวทางสำหรับการเลี้ยงไคอะตอมเพื่อให้ได้มวลชีวภาพเพิ่มขึ้น เช่น ไคอะตอม *Entomoneis* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 ที่เพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน เป็น 5 เท่า และฟอสฟอรัส 2 เท่า ของอาหารสูตร F/2 ร่วมกับการเติมซิลิกา 3.97 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร เป็นประจำทุกวัน ไคอะตอมมีการเติบโตเพิ่มขึ้น 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร F/2 (Viriyayingsiri, 2009) และการเติมซิลิกาและฟอสเฟตปริมาณ 30 และ 7.5 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับในการเลี้ยงไคอะตอม *Chaetoceros muelleri* ส่งผลให้ไคอะตอมมีผลผลิตมวลชีวภาพมากกว่าการเลี้ยง

ด้วยอาหารสูตร F/2 ถึง 3.22 เท่า (Kumaran *et al.*, 2017) นอกจากนี้มีรายงานว่าอาหารเพาะเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงไคอะตอม *Chaetoceros* sp. มาแล้ว สามารถนำกลับมาเลี้ยงไคอะตอมได้อีก โดยเติมเพียงซิลิกา 12.49 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร เท่านั้น ก็สามารถทำให้ไคอะตอมเติบโตได้เป็น 2.6 เท่า ของการเลี้ยงด้วยอาหารสูตร F/2 ที่เตรียมจากน้ำใหม่ แสดงให้เห็นว่าในอาหารเพาะเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงไคอะตอม ยังคงมีปริมาณสารอาหารอื่นที่เพียงพอสำหรับใช้เลี้ยงไคอะตอมได้อีกรอบ แต่ปริมาณซิลิกาไม่เพียงพอจึงจำเป็นต้องเติมซิลิกาลงในอาหารเพาะเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงไคอะตอมก่อนที่จะนำอาหารเพาะเชื้อดังกล่าวไปเลี้ยงไคอะตอมอีกครั้ง (Kutako *et al.*, 2014)

ไคอะตอมทะเล *Amphora* เป็นไคอะตอมท้องน้ำ (benthic diatom) ที่พบได้ทั่วไปในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และสามารถนำมาเลี้ยงได้ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ซึ่งไคอะตอมเติบโตได้ดีและอุดมไปด้วยสารประกอบทางชีวภาพที่มีประโยชน์ เช่น มีปริมาณโปรตีนและไขมันในช่วง 430-490 และ 230-260 กรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Khatoon *et al.*, 2009) อีกทั้งยังมีสารประกอบทางชีวภาพที่มีมูลค่าสูง เช่น ฟูโคแซนทีน (Fucoxanthin) ที่มีถึง 32.98 มิลลิกรัม/ลิตร (Prasopwong *et al.*, 2020) กรดไขมันไม่อิ่มตัวมากถึง 55.1% ของกรดไขมันทั้งหมด และชนิดที่พบมาก คือ กรดพาลมิโตเลอิก (Palmitoleic acid, C16:1 ω 3) และกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (Eicosapentaenoic acid, C20: ω 3) (Govindan *et al.*, 2021; Hogan *et al.*, 2021) ซึ่งกรดไขมันดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในด้านการแพทย์และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีความสำคัญและจำเป็นต่อการเติบโตของสัตว์น้ำ เช่น ปลาทะเล เพราะปลาทะเลไม่สามารถสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ จึงต้องได้รับกรดไขมันดังกล่าวจาก

อาหารเท่านั้น (Frigolet and Gutiérrez-Aguilar, 2017; Tiwari *et al.*, 2021; Sargent *et al.*, 1999)

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของการเติมฟอสเฟต และซิลิเกตระหว่างการเลี้ยงต่อการเติบโตของ ไดอะตอมทะเล *Amphora subtropica* BUUC1502 โดยทดลองเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 (Guillard's medium) อาหารสูตร F/2 ที่ไม่เติม ฟอสเฟตและซิลิเกต และอาหารสูตร F/2 ที่เติม ฟอสเฟตหรือซิลิเกต และเติมฟอสเฟตร่วมกับ ซิลิเกตระหว่างการเลี้ยง โดยมีการปรับความเข้มข้น ของสารอาหารที่เติมในระหว่างการทดลองร่วมด้วย เพื่อพัฒนาวิธีการเลี้ยงไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ให้ไดอะตอมมีการเติบโตมากกว่าการ เลี้ยงแบบแบทช์ (batch culture) ที่เลี้ยงด้วยอาหาร สูตร F/2 ซึ่งสามารถให้ผลผลิตไดอะตอมเพื่อเป็นอาหาร สัตว์น้ำ หรือใช้ประโยชน์ในด้านที่เกี่ยวข้องใน อนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ไดอะตอมที่ใช้ในการทดลอง

ไดอะตอมทะเล *A. subtropica* BUUC1502 แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งขาว (Chenchankhan, 2015) และเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ ณ หน่วยปฏิบัติการ เทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

2. อาหารสำหรับเลี้ยงไดอะตอม

การทดลองนี้ได้ใช้อาหารเพาะเชื้อสูตร F/2 (Guillard *et al.*, 1973) ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยู โดยอาหารปริมาตร 1 ลิตร ต้องเติม สารละลายเข้มข้น 5 ชนิด ซึ่งสารละลายชนิดที่ 1-4 เติม 1 มิลลิลิตร ส่วนชนิดที่ 5 เติม 0.5 มิลลิลิตร สารละลายเข้มข้นดังกล่าวข้างต้น ประกอบด้วย (1) สารละลายไนเตรต ที่มี NaNO_3 75 กรัม/ลิตร (2) สารละลายฟอสเฟต ที่มี $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5 กรัม/ลิตร

(3) สารละลายซิลิเกต ที่มี $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 30 กรัม/ ลิตร (4) สารละลาย trace elements ประกอบด้วย Na_2EDTA , $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.436, 0.315, 0.010, 0.022, 0.010 และ 0.006 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และ (5) สารละลายวิตามิน ประกอบด้วย Thiamine-HCl, Biotin และ Cyanocobalamin 0.2, 1 และ 1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

3. การเตรียมหัวเชื้อไดอะตอมเพื่อใช้ในการทดลอง

เลี้ยงหัวเชื้อไดอะตอมในขวดรูปชมพู่ที่ บรรจุน้ำทะเล 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย หม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายเข้มข้นของ อาหารสูตร F/2 (Guillard *et al.*, 1973) และหัวเชื้อ ไดอะตอม 10% ของปริมาตรการเลี้ยง วางขวดเลี้ยง ไดอะตอมบนชั้นเขย่า (Shaker) ในห้องปฏิบัติการที่ ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent lamp) ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ และควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตลอด 24 ชั่วโมง เมื่อไดอะตอมเติบโต ในระยะทวีคูณ (log phase) จึงใช้เป็นหัวเชื้อในการ ทดลอง

4. การเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารอาหารใน ระหว่างการเลี้ยงไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502

การทดลองนี้ได้เลี้ยงไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 แบบปลอดเชื้อ ในขวดแก้ว ที่บรรจุอาหาร F/2 ปริมาตร 2 ลิตร ที่มีหัวเชื้อ ไดอะตอม 10% ของปริมาตรการเลี้ยง ทำการทดลอง 3 ข้าง ไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ย 22.78×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร วางขวดเลี้ยงไดอะตอม ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 5,000 ลักซ์ และเติม อากาศที่ผ่านการกรองด้วยตัวกรองที่มีขนาดรูพรุน

0.22 ไมครอน ตลอดระยะเวลา 6 วัน ที่ทำการทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างจากขวดเลี้ยงไคอะตอม ขวดละ 20 มิลลิลิตร เป็นประจำทุกวัน เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์ วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดปริมาณไนเตรท ฟอสเฟต และซิลิเกตในอาหารเลี้ยงไคอะตอม รวมทั้ง ติดตามความเข้มแสงโดยใช้เครื่องวัดแสง (Lux Meter) (840006, Sper Scientific, USA) และ pH ด้วย pH meter (EcoSense, YSI, CHINA)

5. การศึกษาผลของการปรับความเข้มข้นฟอสเฟต และซิลิเกตต่อการเติบโตของไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502

เลี้ยงไคอะตอมในขวดแก้วปริมาตร 2 ลิตร ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ย เท่ากับ $2.50 \pm 0.35 \times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร และวางขวดเลี้ยงไคอะตอม ภายใต้สภาวะเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ได้กล่าวมา

ในช่วงต้น แบ่งเป็น 6 ชุดทดลอง คือ [1] อาหารสูตร F/2 [2] อาหารสูตร F/2 ที่ไม่เติมฟอสเฟต (F/2-P) [3] อาหารสูตร F/2 ที่ไม่เติมซิลิเกต (F/2-Si) [4] อาหารสูตร F/2 ที่มีการเติมสารละลายฟอสเฟตเพิ่มในระหว่างการเลี้ยง (F/2+P) [5] อาหารสูตร F/2 ที่มีการเติมซิลิเกตเพิ่มในระหว่างการเลี้ยง (F/2+Si) และ [6] อาหารสูตร F/2 ที่เติมทั้งฟอสเฟตและซิลิเกตเพิ่มในระหว่างการเลี้ยง (F/2+P+Si) โดยสารอาหารถูกเติมเพิ่มลงในขวดเลี้ยงระหว่างวันที่ 2-13 และมีการเพิ่มความเข้มข้นของการเติมสารอาหารขึ้นอีกในระหว่างวันที่ 14-19 ทำการทดลองชุดทดลองละ 3 ซ้ำ (รายละเอียดแต่ละชุดทดลองแสดงในตารางที่ 1) ติดตามการเติบโตของไคอะตอม ตรวจวัดปริมาณไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิเกต ตลอดระยะเวลาการทดลอง 19 วัน

ตารางที่ 1 รายละเอียดการทดลองผลของการปรับความเข้มข้นฟอสเฟตและซิลิเกตต่อการเติบโตของไคอะตอม

A. subtropica BUUC1502 ที่เลี้ยงในขวดแก้ว 2 ลิตร

ชุดทดลอง	รายละเอียดในการทดลอง
F/2	เลี้ยงไคอะตอมด้วยอาหารสูตร F/2
F/2-P	เลี้ยงไคอะตอมด้วยอาหารสูตร F/2 ที่ไม่เติมสารละลายฟอสเฟต
F/2-Si	เลี้ยงไคอะตอมด้วยอาหารสูตร F/2 ที่ไม่เติมสารละลายซิลิเกต
F/2+P	ช่วงที่ 1 (วันที่ 0-1 ของการทดลอง) ใช้อาหารสูตร F/2 จากนั้นช่วงที่ 2 (วันที่ 2-13) เติมสารละลายฟอสเฟต 0.23 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร (หรือ 25% ของอาหาร F/2) และช่วงที่ 3 (วันที่ 14-19) เติมฟอสเฟต 0.97 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร (100% ของอาหาร F/2) วันละ 1 ครั้ง
F/2+Si	ช่วงที่ 1 (วันที่ 0-1 ของการทดลอง) ใช้อาหารสูตร F/2 จากนั้นช่วงที่ 2 (วันที่ 2-13) เปลี่ยนเป็นเติมสารละลายซิลิเกต 0.81 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร (25% ของอาหาร F/2) และช่วงที่ 3 (วันที่ 14-19) เติมเพิ่มเป็น 3.23 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร หรือ 100% ของอาหาร F/2 วันละ 1 ครั้ง
F/2+P+Si	ช่วงที่ 1 (วันที่ 0-1 ของการทดลอง) เลี้ยงไคอะตอมในอาหารสูตร F/2 จากนั้นช่วงที่ 2 (วันที่ 2-13) เติมสารละลายฟอสเฟต 0.23 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และสารละลายซิลิเกต 0.81 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร (25% ของอาหาร F/2) และช่วงที่ 3 (วันที่ 14-19) ปรับการเติมสารละลายฟอสเฟตเป็น 0.97 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และสารละลายซิลิเกตเป็น 3.23 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร หรือ 100% ของอาหารสูตร F/2 วันละ 1 ครั้ง

6. วิธีการวิเคราะห์

6.1 การนับเซลล์และผลผลิตไคอะตอม

เก็บตัวอย่างไคอะตอมและวางใน Ultrasonic bath นาน 5 นาที นับจำนวนไคอะตอมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยหยดไคอะตอมลงบน Haemocytometer ที่มีความลึกของ chamber เท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร จากนั้นคำนวณความหนาแน่นของเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร) และอัตราการเติบโตจำเพาะของไคอะตอม (ต่อวัน) (Guillard and Sieracki, 2005)

6.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักรวม

กรองน้ำเลี้ยงไคอะตอมผ่านกระดาษกรอง GF/C (อบจนน้ำหนักคงที่) ล้างเซลล์บนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักคงที่ และคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) (Parsons *et al.*, 1984)

6.3 วิเคราะห์ไนโตรเจน

ใช้วิธี UV-Visible screening method (APHA, 1992) โดยนำน้ำที่ผ่านการกรองมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (SP-8001, Metertech, TAIWAN) ที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร

6.4 วิเคราะห์ฟอสเฟต

ใช้วิธี Ascorbic acid method (Strickland and Parsons, 1972) นำน้ำที่ผ่านการกรอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ Mixed reagent 0.1 มิลลิลิตร (Mixed Reagent ประกอบด้วย Ammonium molybdate solution, Sulfuric acid solution, Ascorbic acid solution และ Potassium antimonyl-tartrate solution อัตราส่วน 2:5:2:1 ตามลำดับ) เขย่าและวางไว้ 10 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร

6.5 วิเคราะห์ซิลิเกต

ใช้วิธี Molybdosilicate method (Strickland and Parsons, 1972) โดยใช้ น้ำเลี้ยงไคอะตอมที่ผ่านการกรอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ Molybdate

solution 0.4 มิลลิลิตร เขย่าและวางไว้ 10 นาที เติมน้ำ Mixed Reagent 0.6 มิลลิลิตร (Mixed reagent ประกอบด้วยสารละลาย Metol-sulphite: Oxalic acid:Sulfuric acid เข้มข้น 50% อัตราส่วน 10:6:6 ตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) เป็น 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และวางไว้ 2 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 810 นาโนเมตร

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel และวิเคราะห์ความแปรปรวนและความแตกต่างของข้อมูลในระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ด้วยวิธี One-Way ANOVA และ Tukey HSD ตามลำดับ โดยใช้โปรแกรมสถิติ R (R Core Team, 2020)

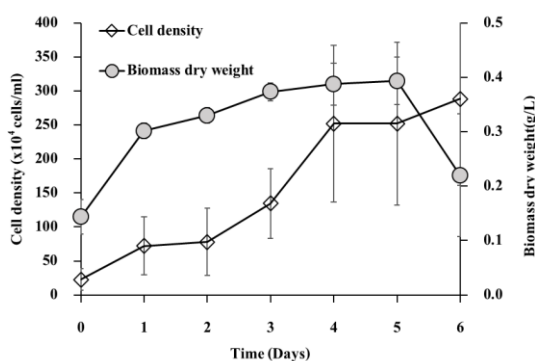
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารอาหารในระหว่างการเลี้ยงไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502

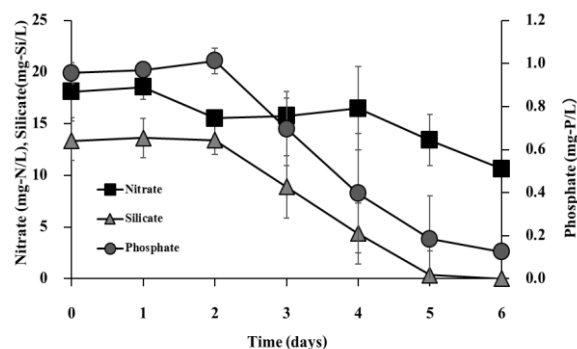
จากการเลี้ยงไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ในขวดแก้วขนาด 2 ลิตร ด้วยอาหาร F/2 เป็นเวลา 6 วัน พบว่าไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ $22.78 \pm 16.17 \times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นไคอะตอมมีการเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้น และในวันที่ 6 ของการทดลอง ไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 288.61×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร (ภาพที่ 1A) ซึ่งไคอะตอมมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.95 ต่อวัน (วันที่ 2-4 ของการทดลอง) มีผลผลิตเซลล์เท่ากับ 64.65×10^7 เซลล์/ลิตร/วัน หรือ 0.05 กรัม/ลิตร/วัน ทั้งนี้ตลอดระยะเวลาที่ทดลอง พบว่า pH ของน้ำเลี้ยงไคอะตอมมีค่าในช่วง 7.5-8.2 ส่วนปริมาณไนโตรเจน ฟอสเฟตและซิลิเกต ในวันแรกมีค่า

เท่ากับ 18.10, 0.96 และ 13.36 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และวันสุดท้ายของการทดลองพบว่า สารอาหารดังกล่าวลดลง โดยมีไนโตรเจนเหลือในน้ำเลี้ยงมากถึง 8.92 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร แต่ฟอสเฟตเหลืออยู่เพียง 0.11 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร ส่วนซิลิเกตได้หมดจากขวดเลี้ยงไคอะตอมตั้งแต่วันที่ 5 ของการทดลอง (ภาพที่ 1B) โดยในช่วงวันที่ 0-2 เห็นได้ชัดเจนว่า สารอาหารทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากไคอะตอมยังเพิ่มจำนวนเซลล์ได้น้อย (อยู่ระหว่าง 22.78×10^4 - 78.06×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร) และวันที่ 2-5 พบว่าสารอาหารฟอสเฟตและซิลิเกตลดลงอย่างรวดเร็ว เพราะไคอะตอมมีการใช้ฟอสเฟตและซิลิเกตในการสร้างเซลล์ใหม่ จึงส่งผลให้ไคอะตอมเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างต่อเนื่อง จาก 22.78×10^4 เป็น 263.06×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งฟอสฟอรัสจำเป็นต่อไคอะตอมเพราะเป็นส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก อะดีโนซีนไตรฟอสเฟตและฟอสโพลิพิด ส่วนซิลิกาเป็นสารอาหาร

ที่สำคัญในการสร้างผนังเซลล์ (Trainor, 1978; Lee, 1999) เมื่อสารอาหารเริ่มลดลงในวันที่ 4 ของการทดลอง ไคอะตอมจึงเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) และระยะตาย (death phase) ตามลำดับ เมื่อประเมินแล้วพบว่า ไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 มีอัตราการใช้ไนโตรเจน ฟอสเฟตและซิลิเกต เท่ากับ 1.31, 0.12 และ 1.91 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน ตามลำดับ ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าในช่วงวันที่ 2-5 ปริมาณซิลิเกตและฟอสเฟตลดลงจากปริมาณเริ่มต้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งปริมาณที่เหลืออยู่อาจไม่เพียงพอต่อการเติบโตของไคอะตอม ในขณะที่ไนโตรเจนยังมีเหลือในน้ำเลี้ยง ดังนั้น ในการทดลองลำดับต่อไปจึงได้ทดลองเติมฟอสเฟต ซิลิเกต และเติมฟอสเฟตร่วมกับซิลิเกต ทั้งนี้เพื่อเป็นการทดลองว่าการเติมสารอาหารดังกล่าวในช่วงเวลาที่สารอาหารลดลง สามารถช่วยเพิ่มการเติบโตของไคอะตอมได้หรือไม่



(A)



(B)

ภาพที่ 1 ความหนาแน่นเซลล์และน้ำหนักแห้งไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 (A) ปริมาณไนโตรเจน ฟอสเฟต และซิลิเกต (B) ในระหว่างที่เลี้ยงไคอะตอมด้วยอาหารสูตร F/2

2. ผลของการปรับความเข้มข้นฟอสเฟตและซิลิเกตต่อการเติบโตของไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502

จากการทดลองเลี้ยงไคอะตอมในอาหารสูตร F/2 พบว่าได้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 242.78×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ส่วนอาหาร F/2 ที่ไม่เติมฟอสเฟต (F/2-P) และอาหาร F/2 ที่ไม่เติมซิลิเกต

(F/2-Si) ไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 290.00×10^4 และ 217.22×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ ระหว่างการเลี้ยงสังเกตพบว่าไคอะตอมที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร F/2 ของช่วงวันที่ 14-18 มีความหนาแน่นเซลล์มากกว่าการเลี้ยงไคอะตอมที่เลี้ยงในสูตรอาหาร F/2-Si และ F/2-P (ภาพที่ 2A) อาจเป็นผลเนื่องจากสารอาหารทั้งฟอสเฟตและซิลิเกตในขวดเลี้ยงไคอะตอมหมดลง (ภาพที่ 3) ทำให้ไคอะตอมไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้และเข้าสู่ระยะตาย เพราะฟอสเฟตและซิลิเกตเป็นสารอาหารหลักที่จำเป็นสำหรับไคอะตอม และเมื่อขาดฟอสเฟตจะทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงของไคอะตอมลดลง (Alipanah *et al.*, 2018) อีกทั้งจากผลการทดลองพบว่าไคอะตอมที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2-Si และ F/2-P มีจำนวนเซลล์ลดลงถึง 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงด้วยอาหารสูตร F/2 (ภาพที่ 2A) และในช่วงที่ 2 (วันที่ 2-13) สามารถคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะของทุกชุดทดลองได้ โดยไคอะตอมที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร F/2, F/2-P, F/2-Si, F/2+P, F/2+Si และ F/2+P+Si มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.24, 0.26, 0.21, 0.31, 0.14 และ 0.22 ต่อวันตามลำดับ และพบว่าอัตราการเติบโตจำเพาะของทุกชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน ($p > 0.05$) ส่วนอัตราการเติบโตจำเพาะของไคอะตอมในช่วงที่ 3 ของการทดลอง ไม่สามารถคำนวณได้เนื่องจากไคอะตอมมีการเติบโตอยู่ในระยะคงที่ (stationary phase)

การเลี้ยงไคอะตอมในช่วงที่ 1 (วันที่ 0-1) เป็นเทคนิคการเลี้ยงสาหร่ายแบบแบทช์ โดยทั่วไปจะนิยมเติมหัวเชื้อสาหร่ายในอาหารเลี้ยงสาหร่ายและเมื่อสาหร่ายเติบโตจึงเก็บเซลล์ทั้งหมด ซึ่งจากการทดลองเรื่องการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารอาหารในระหว่างการเลี้ยงไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ทำให้ทราบว่าปริมาณสารอาหารฟอสเฟตและซิลิเกตในอาหารที่ลดลง และ

อาจไม่เพียงพอต่อการเติบโตของไคอะตอม จึงได้ทดลองเลี้ยงสาหร่ายโดยเติมสารอาหารบางชนิดลงไป ในอาหารเพาะเชื้อไคอะตอม ซึ่งช่วยให้ไคอะตอมสามารถเติบโตได้ดีขึ้น เช่นเดียวกับการเลี้ยงไคอะตอม *Pseudo-nitzschia multiseries* ในอาหารที่มีความเข้มข้นซิลิเกต 190.5, 95.3 และ 60.9 μM พบว่าการเติมซิลิเกตให้เข้มข้น 190.5 μM ทำให้ไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 18.7×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (95.3 μM) และชุดที่เติมซิลิเกตในปริมาณที่ต่ำ (60.9 μM) (Pan *et al.*, 1996) ทั้งนี้ผลจากการทดลองในวันที่ 6 ของการเลี้ยง *A. subtropica* BUUC1502 พบว่าฟอสเฟตและซิลิเกตลดลงเหลือ 0.12 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และซิลิเกตหมดลง (ผลจากการทดลองที่ 1) ดังนั้นจึงได้ทดลองเติมฟอสเฟตและซิลิเกตเพิ่มในอาหารเลี้ยงไคอะตอมเป็นประจำทุกวัน โดยในช่วงที่ 2 (วันที่ 2-13) ได้เติมสารละลายฟอสเฟต (F/2+P) หรือซิลิเกตเพียงชนิดเดียว (F/2+Si) หรือเติมฟอสเฟตและซิลิเกตร่วมกัน (F/2+P+Si) ด้วยปริมาตรที่ปรับความเข้มข้นของสารอาหารเป็น 0.23 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และ 0.81 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร (25% ของอาหาร F/2) พบว่าไคอะตอมที่เลี้ยงด้วยอาหาร F/2+Si และ F/2+P+Si มีการเติบโตเพิ่มขึ้นและสูงสุดในวันที่ 12 ของการทดลอง (ภาพที่ 2B) โดยไคอะตอมมีจำนวนเซลล์สูงสุดมากกว่าอาหารสูตร F/2 ในขณะที่การเลี้ยงไคอะตอมในอาหารสูตร F/2+P+Si (0.23 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และ 0.81 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร หรือ 25% ของอาหารสูตร F/2) มีความหนาแน่นเซลล์มากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 532.78×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร (ตารางที่ 2) ซึ่งมากกว่าอาหารสูตร F/2, F/2-P และ F/2-Si ผลการทดลองนี้แตกต่างจาก Viriyayingisiri (2009) ที่รายงานว่า การเลี้ยงไคอะตอม *Entomoneis* sp. โดยเติมสารละลาย

ฟอสเฟตเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และ ซิลิกเกตเข้มข้น 3.97 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร ร่วมกันทุกวัน ส่งผลให้ไคอะตอมมีการเติบโตน้อยกว่าการเติมซิลิกเกตเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเพราะความต้องการสารอาหารของไคอะตอมจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของไคอะตอม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสัดส่วนซิลิกเกตต่อฟอสเฟต (Si:P) ก็มีผลต่อการเติบโตของไคอะตอมอีกด้วย โดยอัตราส่วน Si:P ที่ส่งเสริมการเติบโตของไคอะตอม คือ 80:1 เนื่องจากซิลิกเกตและฟอสเฟตเป็นสารอาหารที่เป็นปัจจัยสำคัญในการเติบโตของไคอะตอม (Grover, 1989) เพราะซิลิกเกตเป็นแหล่งซิลิกาที่ไคอะตอมใช้สร้างผนังเซลล์หรือเปลือก ดังนั้น ซิลิกาจึงจำเป็นมากสำหรับกระบวนการแบ่งเซลล์ เพราะเซลล์ของไคอะตอมต้องใช้ในการสร้างเปลือก ส่วนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัส ซึ่งไคอะตอมใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญของกรดนิวคลีอิก อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต และฟอสโฟลิพิด (Trainor, 1978; Lee, 1999; Lebeau and Robert, 2003)

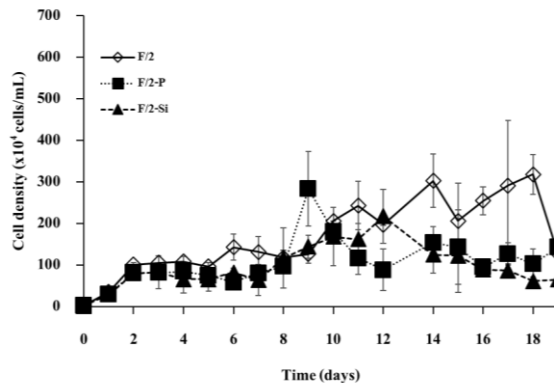
ไคอะตอมที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2+P+Si มีความหนาแน่นเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยวันที่ 12 ของการทดลอง มีค่าเท่ากับ 532.78×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อเข้าสู่ในช่วงที่ 3 ของการเลี้ยง คือ ช่วงวันที่ 14-19 จึงเพิ่มปริมาณการเติมฟอสเฟตและซิลิกเกตเป็นชนิดละ 1 มิลลิกรัม/ลิตร (0.97 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และ 3.23 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร หรือ 100% ของอาหาร F/2) ลงในอาหารเพาะเชื้อไคอะตอมเป็นประจำทุกวัน พบว่าการเติมฟอสเฟตและซิลิกเกตในช่วงที่ 3 ไม่สามารถเพิ่มความหนาแน่นเซลล์ไคอะตอมได้อีก อาจเนื่องจากไคอะตอมมีความหนาแน่นสูงในระบบเพาะเลี้ยง เซลล์เกิดการบดบังแสงกันเอง (self-shading) ทำให้ตัวเซลล์ได้รับแสงไม่เพียงพอ ซึ่งในประเด็นนี้เป็นประเด็นที่น่าสนใจและควรมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยอาจเพิ่มความเข้ม

แสงในช่วงที่เซลล์มีความหนาแน่นสูง ($377.22 \times 10^4 - 609.44 \times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างชุดทดลองที่มีการเติมสารละลายเข้มข้นฟอสเฟตและซิลิกเกต 25% กับชุดทดลองที่มีการเติม 100% ของอาหารสูตร F/2 พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเพิ่มขึ้น ซึ่งเห็นได้จากการเพิ่มความเข้มข้นฟอสเฟตและซิลิกเกตร่วมกันเป็น 100% ของอาหารสูตร F/2 ช่วยให้ไคอะตอมเพิ่มจำนวนได้จาก 532.78×10^4 เป็น 609.44×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร หรือเพิ่มขึ้นเป็น 1.14 เท่า และน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นจาก 0.43 เป็น 0.54 กรัม/ลิตร หรือเพิ่มขึ้นเป็น 1.26 เท่า ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มปริมาณการเติมซิลิกเกตเพียงอย่างเดียวเพื่อให้มีซิลิกเกตมากขึ้นเป็น 100% ของอาหารสูตร F/2 ทำให้ไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์ใกล้เคียงกับการเติมฟอสเฟตเพียงชนิดเดียว อาจเนื่องจากทั้งซิลิกเกตและฟอสเฟตจำเป็นต่อการเติบโตของไคอะตอม โดยไคอะตอมใช้ซิลิกาเป็นองค์ประกอบหลักของเปลือก และมีรายงานว่าหากไคอะตอมอยู่ในสถานะที่มีปริมาณซิลิกาจำกัดจะส่งผลให้ไคอะตอมมีประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง (Lippemeier *et al.*, 1999) และไคอะตอมใช้ฟอสฟอรัสเพื่อเป็นส่วนประกอบของสารพันธุกรรม ฟอสโฟลิพิดและน้ำตาลฟอสเฟต (phosphate sugar) เมื่อไคอะตอมขาดฟอสฟอรัสจะส่งผลให้ปริมาณโปรตีน คลอโรฟิลล์ และสารพันธุกรรมลดลง (Brembu *et al.*, 2017)

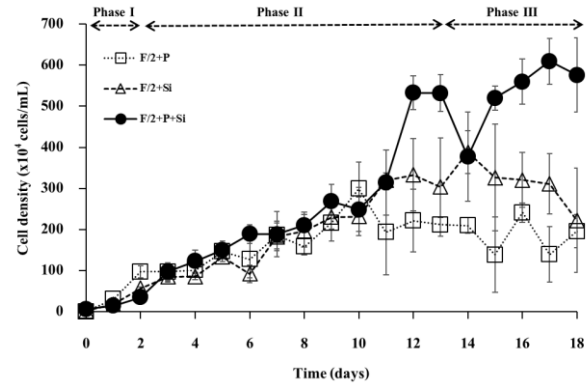
จากผลจากการทดลองการปรับความเข้มข้นฟอสเฟตและซิลิกเกตต่อการเติบโตของไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 แสดงให้เห็นว่าความถี่ในการเติมฟอสเฟตหรือซิลิกเกตเพียงชนิดเดียวเป็นประจำทุกวัน ทั้งการปรับเติมเพื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 25% และ 100% ของสูตรอาหาร F/2 ไม่ได้ช่วยส่งเสริมให้ไคอะตอมมีจำนวนเพิ่มขึ้นมากกว่าการ

เลี้ยงด้วยอาหารสูตร F/2 (เติมผสมฟอสเฟตและซิลิเกตเพียงครั้งเดียวลงในอาหาร) แต่การเติมทั้งฟอสเฟตร่วมกับซิลิเกต โดยปรับเพิ่มฟอสเฟตร่วมกับซิลิเกตให้มีความเข้มข้นเป็น 25% และ 100% ของอาหารสูตร F/2 สามารถทำให้ไคอะตอมเติบโตและเพิ่มจำนวนได้มากกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารสูตร F/2

ถึง 2.18 เท่า และ 1.73 เท่า ตามลำดับ ซึ่งการเติมฟอสเฟตร่วมกับซิลิเกตให้มีความเข้มข้นเป็น 25% ของอาหารสูตร F/2 และปรับเพิ่มเป็น 100% ของอาหารสูตร F/2 ไม่ได้ช่วยส่งเสริมให้ไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้น



(A)



(B)

ภาพที่ 2 การเติบโตของไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร F/2, F/2-P และ F/2-Si (A) และอาหาร F/2+P, F/2+Si และ F/2+P+Si ที่เริ่มเติมสารอาหารระหว่างการเลี้ยงในช่วงที่ 2 (Phase II) โดยเติมสารละลายฟอสเฟต หรือซิลิเกต หรือฟอสเฟตผสมกับซิลิเกต เทียบเท่ากับ 25% ของอาหารสูตร F/2 เป็นประจำทุกวัน และช่วงที่ 3 (Phase III) ได้ปรับเพิ่มสารละลายเข้มข้นดังกล่าวเป็น 100% ของอาหารสูตร F/2 เป็นประจำทุกวัน (B)

ตารางที่ 2 ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดของไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร F/2, F/2-P, F/2-Si F/2+P, F/2+Si และ F/2+P+Si

ชุดทดลอง	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ($\times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัม/ลิตร)
ช่วงที่ 2 (วันที่ 2-13)		
F/2	242.78 $\pm$ 58.56 ^b (วันที่ 11)	0.34 $\pm$ 0.06 ^{ac}
F/2-P	290.00 $\pm$ 10.14 ^b (วันที่ 9)	0.26 $\pm$ 0.04 ^{cd}
F/2-Si	217.22 $\pm$ 65.52 ^b (วันที่ 12)	0.20 $\pm$ 0.02 ^d
F/2+P ^{II}	299.44 $\pm$ 64.56 ^b (วันที่ 10)	0.29 $\pm$ 0.01 ^{bcd}
F/2+Si ^{II}	333.11 $\pm$ 87.68 ^b (วันที่ 12)	0.38 $\pm$ 0.03 ^{ab}
F/2+P+Si ^{II}	532.78 $\pm$ 41.31 ^a (วันที่ 12)	0.43 $\pm$ 0.03 ^a

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชุดทดลอง	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ($\times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัม/ลิตร)
ช่วงที่ 3 (วันที่ 14-19)		
F/2	318.33 $\pm$ 47.52 ^{bc} (วันที่ 18)	0.40 $\pm$ 0.13 ^{ab}
F/2-P	142.78 $\pm$ 21.21 ^c (วันที่ 14)	0.25 $\pm$ 0.00 ^b
F/2-Si	122.78 $\pm$ 44.78 ^c (วันที่ 14)	0.26 $\pm$ 0.05 ^b
F/2+P ^{III}	241.11 $\pm$ 23.82 ^{bc} (วันที่ 16)	0.30 $\pm$ 0.02 ^b
F/2+Si ^{III}	388.33 $\pm$ 52.52 ^b (วันที่ 14)	0.38 $\pm$ 0.02 ^{ab}
F/2+P+Si ^{III}	609.44 $\pm$ 55.54 ^a (วันที่ 17)	0.54 $\pm$ 0.01 ^a

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) และตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวตั้งของตาราง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

^{II} คือ เติมสารละลายเข้มข้นฟอสเฟต หรือซิลิเกต หรือฟอสเฟตร่วมกับซิลิเกต เทียบเท่า 25% ของอาหารสูตร F/2 เป็นประจำทุกวัน

^{III} คือ เติมสารละลายเข้มข้นฟอสเฟต หรือซิลิเกต หรือฟอสเฟตร่วมกับซิลิเกต เทียบเท่า 100% ของอาหารสูตร F/2 เป็นประจำทุกวัน

การเลี้ยงไคอะตอมด้วยอาหาร F/2-P พบฟอสเฟต 0.13 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และหมดลงในวันที่ 7 ส่วนอาหารสูตร F/2-Si พบซิลิเกต 10.62 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร และหมดลงในวันที่ 6 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งสารอาหารดังกล่าวอาจมาจากหัวเชื้อไคอะตอม ส่วนอาหาร F/2 มีฟอสเฟตและซิลิเกตเริ่มต้นที่ 1.10 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และ 15.54 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับสารอาหารเริ่มต้นในทุกการทดลองที่เติมฟอสเฟตหรือซิลิเกต และสารอาหารฟอสเฟตเริ่มหมดไปจากขวดเลี้ยงไคอะตอมในวันที่ 7-19 ของการทดลอง

ในช่วงที่ 2 ของการเลี้ยงไคอะตอมด้วยอาหารสูตร F/2+P และ F/2+Si ที่เติมสารละลายเข้มข้นฟอสเฟตหรือซิลิเกต ปริมาตร 0.23 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และ 0.81 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร (25% ของอาหารสูตร F/2) เป็นประจำทุกวัน เริ่มจากในวันที่ 2 จากที่มีฟอสเฟต 0.83 มิลลิกรัม-

ฟอสฟอรัส/ลิตร เมื่อเติมเพียงสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น ทำให้ฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเป็น 1.03 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร (ภาพที่ 3B) และพบว่าไคอะตอมมีจำนวนเซลล์ สูงสุดในวันที่ 10 ของการทดลองเท่ากับ 299.44×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งในช่วงวันที่ 4-19 ของการทดลอง พบว่าในแต่ละวันมีฟอสเฟตน้อยกว่า 1 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร (ภาพที่ 3B) และในช่วงที่ 3 ของการเลี้ยงไคอะตอม ที่มีการเติมสารละลายฟอสเฟตเข้มข้นเพิ่มเป็น 0.97 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร (100% ของอาหารสูตร F/2) (ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง) ซึ่งก่อนเดิมนั้นไม่มีฟอสเฟตเหลือในขวดเลี้ยงไคอะตอม เมื่อเติมสารละลายฟอสเฟตทำให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น 0.10 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร (วันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง) และมีจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 16 เท่ากับ 241.11×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ใกล้เคียงกับรายงานของ Tapaneeyaworawong *et al.* (2018) ที่

เลี้ยงไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ในอาหารสูตร F/2 และไม่มีการเติมฟอสเฟตเพิ่มระหว่างเลี้ยง พบว่าไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 204.72×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าการเติมสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 25% และ 100% ของอาหารสูตร F/2 ไม่ช่วยให้ไคอะตอมเติบโตเพิ่มจำนวนได้ดีขึ้น เนื่องจากมีจำนวนไคอะตอมสูงสุดใกล้เคียงกับอาหารสูตร F/2 ซึ่งสอดคล้องกับ Li *et al.* (2017) ที่พบว่าซิลิเกตมีอิทธิพลสูงสุดต่อการเติบโตของไคอะตอม ลำดับรองลงมา คือ ฟอสเฟตและเหล็ก

ซิลิกาในน้ำมี 2 รูปแบบ คือ แบบที่ละลายในน้ำ และแบบที่ไม่ละลายน้ำหรือเป็นสารแขวนลอย ไคอะตอมสามารถใช้ซิลิกาแบบที่ละลายน้ำ คือ ออโรซิลิเกต (SiO_2^{-3}) เพื่อการเติบโต และโดยทั่วไปไคอะตอมจะมีซิลิกาเป็นองค์ประกอบ 95% ของน้ำหนักเซลล์ (Trainor, 1978; Lee, 1999) ซึ่งอาหารสูตร F/2 ที่ใช้เลี้ยงไคอะตอมมีซิลิเกตประมาณ 3.23 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร ดังนั้น การเลี้ยงไคอะตอมในอาหารสูตร F/2+Si ช่วยให้เซลล์ไคอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด เท่ากับ 333.11×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร (ในวันที่ 12) และเมื่อเพิ่มปริมาณการเติมสารละลายซิลิเกตเข้มข้นเป็น 3.23 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร ในวันที่ 14 ซึ่งก่อนเดิมซิลิเกตในขวดเลี้ยงไคอะตอมพบว่ามีซิลิเกตเพียง 0.13 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร และหลังจากที่เติมสารละลายซิลิเกตเข้มข้น ส่งผลให้มีซิลิเกตในขวดเลี้ยงไคอะตอมเพิ่มขึ้นเป็น 2.54 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร ซึ่งอาหาร F/2 มีซิลิเกตประมาณ 11.14 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร จึงสังเกตได้ว่าการเติมสารละลายซิลิเกตเข้มข้นลงในขวดเลี้ยงไคอะตอมไม่สามารถปรับความเข้มข้นของซิลิเกตให้เพิ่มขึ้นได้ใกล้เคียงกับปริมาณซิลิเกตที่มีในอาหารสูตร F/2 อาจเนื่องมาจากสารละลายซิลิเกตที่เติมลงไปอาจจะเปลี่ยนรูปเป็นแบบที่ไม่ละลายน้ำ อย่างไรก็ตาม การ

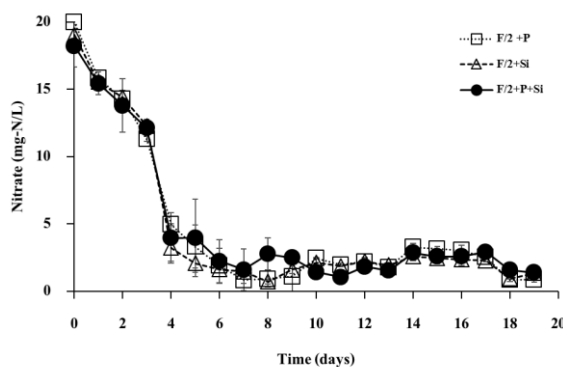
เติมซิลิเกตลงในอาหารระหว่างที่เลี้ยงไคอะตอมสามารถทำให้ไคอะตอมเติบโตได้ดีกว่าสูตรอาหาร F/2 เพราะไคอะตอมจะนำซิลิเกตไปสร้างเปลือกหรือผนังเซลล์ (Martin-Jézéquel *et al.*, 2000)

ในวันที่ 2 ของการทดลอง ไคอะตอมที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร F/2+P+Si มีฟอสเฟตและซิลิเกตคงเหลือ 0.85 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และ 6.36 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร ตามลำดับ และเมื่อเติมสารละลายฟอสเฟตและซิลิเกตเข้มข้น 0.23 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และ 0.81 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร (25% ของอาหารสูตร F/2) ทำให้มีฟอสเฟตและซิลิเกตเพิ่มขึ้น 0.99 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และ 11.30 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร (ภาพที่ 3C) ซึ่งในวันที่ 12 ของการทดลอง ไคอะตอมมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 532.78×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร และในวันที่ 13 จำนวนไคอะตอมมีแนวโน้มคงที่ และสังเกตพบว่าซิลิเกตและฟอสเฟตที่เหลือในขวดเลี้ยงยังคงมีปริมาณน้อย (ภาพที่ 3B และ 3C) ดังนั้นจึงเพิ่มปริมาณการเติมสารละลายเข้มข้นฟอสเฟตและซิลิเกตเป็น 0.97 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และ 3.23 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร (100% ของอาหารสูตร F/2) เป็นประจำทุกวัน ในช่วงวันที่ 14 ที่ปรับเต็มสารอาหารฟอสเฟตและซิลิเกตเป็น 100% พบว่าหลังจากที่เติมสารอาหารฟอสเฟตและซิลิเกต ในวันที่ 14 ของการทดลอง ส่งผลทำให้ฟอสเฟตและซิลิเกตในขวดเลี้ยงไคอะตอมเพิ่มขึ้นเป็น 0.15 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และ 1.83 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร ตามลำดับ ทำให้ไคอะตอมเพิ่มจำนวนเซลล์โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในวันที่ 17 เท่ากับ 609.44×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร (ตารางที่ 2) แต่เนื่องจากไคอะตอมเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่แล้ว ทำให้ความหนาแน่นเซลล์ไม่ได้เพิ่มขึ้นมากเมื่อเปรียบเทียบกับกรเพิ่มอาหารในช่วงที่ 2 ของการทดลอง หากเพิ่มสารอาหารเป็น 100% ของอาหาร

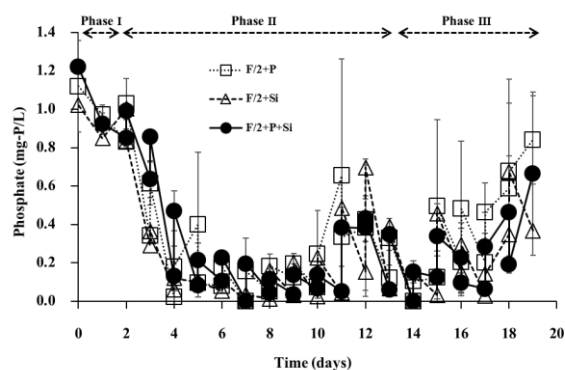
สูตร F/2 ตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดลอง อาจทำให้ได้ความหนาแน่นเซลล์ที่มากขึ้น เพราะปริมาณสารอาหารที่เติมเพิ่ม 25% ของอาหารสูตร F/2 ยังไม่เพียงพอสำหรับไคอะตอม (ภาพที่ 3) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการใช้อาหารสูตร F/2+P+Si ที่เติมสารละลายฟอสเฟตร่วมกับซิลิเกตเข้มข้น 100% ของอาหารสูตร F/2 เป็นประจำทุกวัน ไม่ช่วยให้ไคอะตอมเพิ่มความหนาแน่นได้อีก

ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงไคอะตอมแบบที่ต้องมีการเติมสารอาหารเป็นประจำทุกวัน อาจมีข้อเสีย

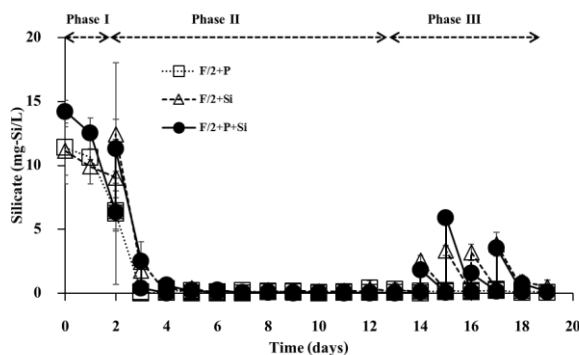
คือต้นทุนอาหารเพิ่มขึ้น แต่ผลจากการทดลองนี้พบว่า การเลี้ยงไคอะตอมด้วยเทคนิคดังกล่าวทำให้ได้ผลผลิตไคอะตอมที่มากขึ้นกว่าเทคนิคแบบปกติที่เลี้ยงไคอะตอมด้วยอาหารสูตร F/2 ที่ไม่มีการเติมสารอาหารเพิ่มเติมในระหว่างการเลี้ยง ซึ่งไคอะตอมสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตสารที่มีมูลค่าสูง เช่น พุโคแซนทิน ที่สามารถใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หรืออาหารเสริมสุขภาพได้ (Frigolet and Gutiérrez-Aguilar, 2017; Tiwari *et al.*, 2021)



(A)



(B)



(C)

ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรท (A) ฟอสเฟต (B) และซิลิเกต (C) ในระหว่างการเลี้ยงไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ในอาหารสูตร F/2 ที่เติมสารละลายฟอสเฟตหรือซิลิเกต และฟอสเฟตร่วมกับซิลิเกตเข้มข้นเทียบเท่า 25% ของอาหารสูตร F/2 (Phase II) และ 100% ของอาหารสูตร F/2 (Phase III)

สรุป

การเลี้ยงไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ด้วยอาหารสูตร F/2 พบว่าปริมาณฟอสเฟตและซิลิเกตลดลงอย่างรวดเร็ว ในช่วงที่ไคอะตอมเติบโตแบบทวีคูณ และเมื่อไคอะตอมเติบโตคงที่ (ให้เซลล์สูงสุด 242.78×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร) พบว่ามีฟอสเฟตเหลืออยู่ในระบบ 0.11 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และซิลิเกตไม่เหลือในระบบ ส่วนไนโตรเจนยังคงมีปริมาณมากถึง 8.92 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร แสดงให้เห็นชัดเจนว่าฟอสเฟตและซิลิเกตอาจไม่เพียงพอต่อการเติบโตของไคอะตอม เมื่อทดลองเลี้ยงไคอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ด้วยอาหารสูตร F/2+P+Si ที่มีการเติมฟอสเฟตร่วมกับซิลิเกตลงในอาหารเลี้ยงไคอะตอมเป็นประจำทุกวัน ส่งผลให้ไคอะตอมเติบโตได้ดีกว่าการไม่เติมสารอาหารเพิ่ม หรือการเติมฟอสเฟตหรือซิลิเกตเพียงชนิดเดียว ซึ่งการเติมฟอสเฟตร่วมกับซิลิเกตในอาหารให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.23 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร และ 0.81 มิลลิกรัม-ซิลิกา/ลิตร (หรือ 25% ของอาหารสูตร F/2) ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 532.78×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร และการเติมฟอสเฟตและซิลิเกตในช่วงท้ายของการเลี้ยงไคอะตอม ไม่ช่วยส่งเสริมให้ไคอะตอมเพิ่มความหนาแน่นเซลล์ได้อีก ฉะนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตของไคอะตอมจึงควรเติมฟอสเฟตและซิลิเกตเพิ่มระหว่างการเพาะเลี้ยงในช่วงวันเริ่มต้นของการเลี้ยง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อำนวยความสะดวกด้านสถานที่ในการทดลองและเครื่องมือสำหรับการตรวจวิเคราะห์ และ อ.ดร.เมธิณี จามกระโทก คณะวิทยาศาสตร์และ

ศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่อง Spectrophotometer

เอกสารอ้างอิง

- Alipanah, L., Winge, P., Rohloff, J., Najafi, J., Brembu, T. and Bones, A. M. 2018. Molecular adaptations to phosphorus deprivation and comparison with nitrogen deprivation responses in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **PloS one** 13(2): e0193335.
- APHA. 1992. **Standard for examination of water and wastewater**. Victor Graphics, Maryland.
- Bozarth, A., Maier, U. G. and Zauner, S. 2009. Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology** 82(2): 195-201.
- Brembu, T., Mühlroth, A., Alipanah, L. and Bones, A. M. 2017. The effects of phosphorus limitation on carbon metabolism in diatoms. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 372(1728): 20160406.
- Chenchankhan, P. 2015. Isolation of culturable marine microalgae from aquaculture ponds, Chanthaburi province. Bachelor of science, Burapha University. (in Thai)
- Frigolet, M. E. and Gutiérrez-Aguilar, R. 2017. The role of the novel lipokine palmitoleic acid in health and disease. **Advances in Nutrition** 8(1): 173S-181S.
- Govindan, N., Maniam, G. P., Sulaiman, A. Z., Ajit, A., Chatsungnoen, T. and Chisti, Y. 2021. Production of renewable lipids by the

- diatom *Amphora copulate*. **Fermentation** 7(1): 37.
- Grover, J.P. 1989. Effects of Si: P supply ratio, supply variability, and selective grazing in the plankton: An experiment with a natural algal and protistan assemblage. **Limnology and Oceanography** 34(2): 349-367.
- Guillard, R. R., Kilham, P. and Jackson, T. A. 1973. Kinetics of silicon limited growth in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* hasle and heimdal (= *Cyclotella nana* Hustedt) 1, 2. **Journal of Phycology** 9(3): 233-237.
- Guillard, R.R. and Sieracki, M.S. 2005. Counting cells in cultures with the light microscope, pp. 239-252. In Andersen, R.A., eds. **Algal culturing techniques**. Elsevier, UK.
- Hogan, P., Otero, P., Murray, P. and Saha, S.K. 2021. Effect of biomass pre-treatment on supercritical CO₂ extraction of lipids from marine diatom *Amphora* sp. and its biomass evaluation as bioethanol feedstock. **Heliyon** 7(1): e05995.
- Khatoon, H., Banerjee, S., Yusoff, F. and Shariff, M. 2009. Evaluation of indigenous marine periphytic *Amphora*, *Navicula* and *Cymbella* grown on substrate as feed supplement in *Penaeus monodon* postlarval hatchery system. **Aquaculture Nutrition** 15(2): 186-193.
- Kumaran, J., Jose, B., Joseph, V. and Bright Singh, I.S. 2017. Optimization of growth requirements of marine diatom *Chaetoceros muelleri* using Response Surface Methodology. **Aquaculture research** 48(4): 1513-1524.
- Kutako, M., Khamtongdee, S., Setthamongkol, P., Jamkratoke, M. and Yuvanatemiya, V. 2014. The effect of nutrients on growth of a marine diatom, *Chaetoceros* sp., in recycled diatom cultured water. **Journal of Fisheries Technology Research** 8(1): 74-83. (in Thai)
- Lebeau, T. and Robert, J. M. 2003. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. **Applied Microbiology and Biotechnology** 60(6): 612-623.
- Lee, R.E. 1999. **Phycology**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Li, X. L., Marella, T.K., Tao, L., Li, R., Tiwari, A. and Li, G. 2017. Optimization of growth conditions and fatty acid analysis for three freshwater diatom isolates. **Phycological Research** 65(3): 177-187.
- Lippemeier, S., Hartig, P. and Colijn, F. 1999. Direct impact of silicate on the photosynthetic performance of the diatom *Thalassiosira weissflogii* assessed by on- and off- line PAM fluorescence measurements. **Journal of Plankton Research** 21(2): 269-283.
- Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M. and Brzezinski, M.A. 2000. Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. **Journal of Phycology** 36(5): 821-840.
- Pan, Y., DV, S. R., Mann, K., Brown, R. and Pocklington, R. 1996. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. I. Batch culture studies. **Marine Ecology Progress Series** 131: 225-233.

- Parsons, T.R., Maita, Y. and Lalli, C.M. 1984. **A manual of chemical and biological methods for seawater analysis**. Pergamon Press, Oxford.
- Prasopwong, A., Nootong, K. and Kutako, M. 2020. Effect of water from shrimp pond on growth and fucoxanthin production of a diatom *Amphora subtropica* BUUC1502. **Khon Kaen Agriculture Journal** 48(1): 123-128. (in Thai)
- R Core Team. 2020. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. and Tocher, D. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. **Aquaculture** 179(1-4): 217-229.
- Scala, S. and Bowler, C. 2001. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS** 58(11): 1666-1673.
- Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R. 1972. **A Practical Handbook of Seawater Analysis**. Fisheries Research Board of Canada Bulletin, Ottawa.
- Tiwari, A., Melchor-Martínez, E.M., Saxena, A., Kapoor, N., Singh, K.J., Saldarriaga-Hernández, S., Iqbal, H.M. 2021. Therapeutic attributes and applied aspects of biological macromolecules (polypeptides, fucoxanthin, sterols, fatty acids, polysaccharides, and polyphenols) from diatoms-A review. **International Journal of Biological Macromolecules** 171: 398-413.
- Trainor, F.R. 1978. **Introductory Phycology**. John Wiley and Sons, New York.
- Tapaneeyaworawong, P., Pantong, P., Chumtong, P., Kutako, M., Hiransuchalert, R., Paibulkichakul, C. and Powtongsook, S. 2018. Batch and continuous cultures of marine benthic diatom *Amphora subtropica* BUUC1502 isolated from Pacific white shrimp pond. **Walailak Procedia** 2(13): 1-8. (in Thai)
- Viriyayingsiri, T. 2009. Optimal conditions for diatom *Entomoneis* sp. cultivation in batch and continuous cultures. Master's thesis, Chulalongkorn University. (in Thai)