

**ความหลากหลายของสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่สะสมไขมัน
ในกลุ่มแม่น้ำชีจังหวัดมหาสารคาม**
**Diversity of Bio-oil Freshwater Microalgae in Chi River Basin,
Maha Sarakham Province**

นุสรา คำแก้ว¹ วชิร กัลยาลัง² และ บังอร แถวโนนงิ้ว^{3*}
Nusara Khamkaew¹, Watcharee Kunyalung² and Bungorn Thaewnon-ngiwi^{3*}

บทคัดย่อ

ปัจจุบันความต้องการใช้น้ำมันเป็นแหล่งพลังงานเพิ่มมากขึ้นตามจำนวนประชากรมนุษย์สาหร่ายขนาดเล็กมีศักยภาพในการสะสมไขมันที่สูงกว่าพืชพลังงานเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ปลูก 1 หน่วยเอเคอร์เท่ากัน งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการแพร่กระจายเชิงชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กที่สะสมไขมันโดยสุ่มเก็บตัวอย่างสาหร่ายด้วยถุงพ्लอกก์ตอนขนาดตา 10 ไมโครเมตร จากกลุ่มแม่น้ำชีในพื้นที่ 3 อำเภอ คือ โกสุมพิสัย เมือง และกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม รวม 20 จุด ๆ ละ 3 ซ้ำ ในช่วงเดือนมิถุนายน 2561 นำมาตรวจสอบชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กที่สะสมไขมันและคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็ก 5 ชนิด เพื่อตรวจสอบการสะสมไขมันโดยวิธีไนล์เรด สาหร่ายที่เหลือนำมาตรวจสอบการสะสมไขมันโดยเทียบเคียงกับผลงานวิจัยต่าง ๆ พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กที่สะสมไขมันทั้งหมด 4 ดิวิชัน โดย Chlorophyta พบมากที่สุดร้อยละ 57.14 รองลงมาคือ Cyanophyta พบร้อยละ 20.00 Bacillariophyta พบร้อยละ 17.14 และ Euglenophyta พบร้อยละ 5.71 จำนวนทั้งหมด 35 ชนิด ผลการตรวจสอบการสะสมไขมันโดยวิธีไนล์เรด พบสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กสะสมไขมันชนิด *Botryococcus braunii* มีปริมาณน้ำมันในเซลล์มากที่สุดเพราะมีการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์เป็นสีเหลืองเกือบเต็มเซลล์ ซึ่งพบจาก 3 จุด คือจุดที่ 1 ห้วยคเคาง ไกลวัดปาวังน้ำเย็น ตำบลเกิ้ง อำเภอเมือง จุดที่ 12 แหล่งน้ำหนองคู บ้านดอนหนอง ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย และจุดที่ 20 ห้วยบ้านแพน ตำบลบ้านแพน อำเภอโกสุมพิสัย ส่วนจุดที่ 6 ห้วยคเคางวัดป่าศุภมิตร ตำบลตลาด อำเภอเมือง พบสาหร่ายขนาดเล็กที่สะสมไขมันจำนวนมากชนิดที่สุด คือ 12 ชนิด ส่วนจุดที่ 2 วังมัจฉา ตำบลเกิ้ง อำเภอเมือง พบเพียง 1 ชนิด งานวิจัยนี้เป็นข้อมูลใหม่เกี่ยวกับสาหร่ายน้ำมันซึ่งไม่มีการศึกษามาก่อนเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำไปเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ต่อไป

คำสำคัญ: การย้อมสีไนล์เรด สาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กสะสมไขมัน กลุ่มแม่น้ำชี มหาสารคาม

¹ สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

² สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

³ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

* Corresponding author e-mail: ttbungorn@hotmail.com

Received: 12 September 2019, Revised: 28 October 2019, Accepted: 25 December 2019

Abstract

At present, the demand for oil is a huge source of energy according to the human population. Freshwater microalgae have the potential to produce oil better than oil plants per equal area of 1 hectare. This research aimed to determine species diversity of bio-oil freshwater microalgae from twenty stations of Chi river basin in three districts (Kantharawichai, Mueang Maha Sarakham and Kosum Phisai), Maha Sarakham province in June 2019. The three random sampling of microalgae used a 10 micrometer plankton net and then took microalgae to identify species and selected five species for bio-oil determination using Nile Red staining technique and the remaining microalgae comparable to other research. Each experiment had 3 replications. The results found 35 bio-oil microalgae species from 4 divisions and the value of percentage of bio-oil microalgae showed 57.14, 20.00, 17.14, 5.71 and 0.00 percentage of all bio-oil microalgae in Chlorophyta, Cyanophyta, Bacillariophyta, Euglenophyta and Chrysophyta, respectively. *Botryococcus braunii* showed the most amount of bio-oil from Nile Red staining because fluorescent in full-cell color and this species could find at station 1: Huai Khakang, near the Wang Nam Yen Temple, Koeng Subdistrict, Mueang District, station 12: Nong Khu Water Source, Ban Don Nhong, Kham Rieng Subdistrict, Kantharawichai District, and the station 20: Huai Ban Phaeng, Ban Phaeng Subdistrict, Kosum Phisai District. In addition, the maximum and minimum numbers of bio-oil microalgae species were 12 and 1 species which found at station 6 :Huai Khakang, Wat Pa Suphamit, Talad Subdistrict, Muang District, and Wang Matcha, Koeng Subdistrict, Mueang District. These algae has never been reported. Therefore, it is useful for the source of oil microalgae culture for commercial purposes.

Keywords: Nile red staining, Bio-oil microalgae, Chi river basin, Maha Sarakham

บทนำ

ปัจจุบันประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกกำลังประสบปัญหาการขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงทำให้น้ำมันเชื้อเพลิงที่มีราคาสูง ซึ่งส่งผลกระทบต่อการพัฒนาทางเศรษฐกิจของหลายประเทศ โดยเฉพาะประเทศที่ต้องนำเข้าน้ำมัน เช่น ประเทศไทย จากปัญหาดังกล่าวได้มีการวิจัยเพื่อหาพลังงานทดแทนหรือพลังงานในรูปแบบใหม่อย่างมากมายและหนึ่งในพลังงานทางเลือกดังกล่าวคือ ไบโอดีเซล ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่ได้จากชีวมวล (biomass) โดยการนำเอาน้ำมันจากพืชหรือจากสัตว์ ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทไตรกลีเซอไรด์มาผ่านกระบวนการทางเคมีโดยทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ และมีด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้ผลผลิตเป็นเอสเทอร์ และผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้เป็น

กลีเซอรอล การนำเอาน้ำมันจากพืชหรือจากสัตว์ เช่น น้ำมันปาล์ม สบู่ดำ มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานทดแทนก่อให้เกิดการแข่งขันด้านราคาและส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางด้านอาหารและปัจจัยการผลิต เนื่องจากต้องใช้พื้นที่เพาะปลูกเป็นจำนวนมากและใช้ระยะเวลานานในการเจริญเติบโต สำหรับขนาดเล็กมีความรวดเร็วในการสะสมพลังงานในเซลล์ สามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่าพืชทั่วไป โดยใช้เวลาเพาะเลี้ยง 7-14 วันก็สามารถนำมาสกัดน้ำมันเพื่อผลิตไบโอดีเซลได้ (ศิวคุปต์ และคณะ, 2556) สำหรับขนาดเล็กมีผนังเซลล์ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลสสามารถผลิตน้ำมันได้ (ยุวดี, 2556) นอกจากนี้สาหร่ายยังเก็บสะสมสารอาหารไว้ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ได้อีกด้วย ดังนั้นสาหร่ายขนาดเล็กจึงมีศักยภาพในการสะสมไขมันที่สูงกว่าพืชพลังงานทุกชนิดเมื่อเปรียบเทียบในพื้นที่เท่ากัน โดยพืชน้ำมันต่อพื้นที่ปลูก 1 หน่วยเฮกตาร์ (1 เฮกตาร์ เท่ากับ 10,000 ตารางเมตร) ทานตะวันได้น้ำมัน 952 ลิตร ปาล์มได้น้ำมัน 5,950 ลิตร มะพร้าวได้น้ำมัน 2,689 ลิตร สำหรับสาหร่ายได้น้ำมันสูงถึง 100,000 ลิตร (Magdalena *et al.*, 2010) สาหร่ายขนาดเล็กจึงเป็นสิ่งมีชีวิตทางเลือกใหม่ของแหล่งผลิตพลังงานสามารถเจริญได้ดีตลอดปีในภูมิอากาศร้อน จึงมีการศึกษาวิจัยเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนเพื่อแก้ไขปัญหาการลดลงอย่างรวดเร็วของน้ำมันและถ่านหินในทุกภูมิภาคของโลก ซึ่งสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้เป็นความหวังของมนุษยชาติที่จะใช้เป็นพลังงานชีวภาพอย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต (สถาบันวิจัยและพัฒนาพลังงานนครพิงค์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2554) การตรวจสอบปริมาณน้ำมันในสาหร่ายสามารถทำได้หลายวิธีโดยการย้อมสีในไลต์เรดซึ่งจะเรืองแสงสีเหลืองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เป็นวิธีที่สะดวก ง่าย รวดเร็วและเสียค่าใช้จ่ายน้อย (Rattanapoltee and Kaewkannetra, 2013) การสำรวจหาสาหร่ายที่สามารถสะสมไขมันได้จึงมีความสำคัญในการหาแหล่งผลิตพลังงานทดแทนที่อาจเป็นไปได้ในอนาคตและยังลดภาวะโลกร้อนได้ด้วย รวมทั้งไม่เกิดปัญหาในการแย่งส่วนแบ่งทางอาหารจากพืชน้ำมันได้

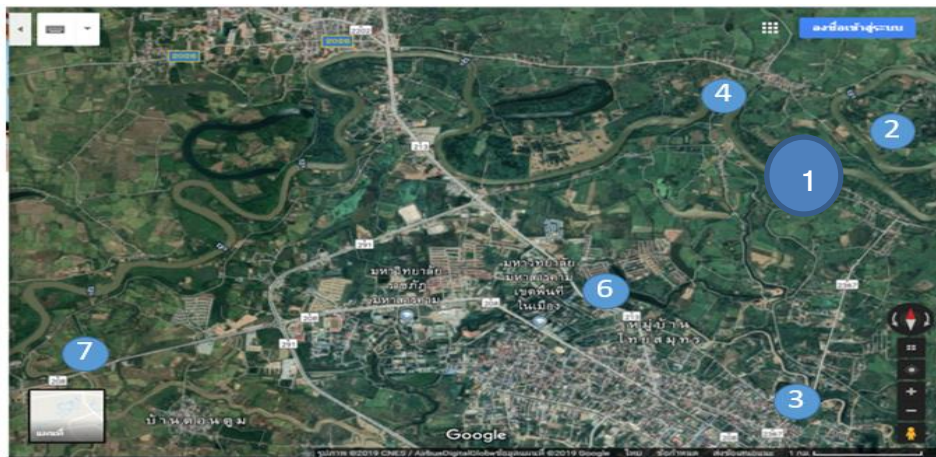
ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายน้ำมันขนาดเล็กในกลุ่มแม่น้ำชีเขตพื้นที่จังหวัดมหาสารคามเนื่องจากยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับสาหร่ายน้ำมันในแหล่งน้ำนี้มาก่อน รวมทั้งแม่น้ำชีเป็นแม่น้ำสายหลักของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีสาขาหลัก 5 ลำน้ำ ซึ่งประกอบด้วย ลำน้ำพอง ลำน้ำปาว ลำน้ำเซิน ลำน้ำพรม และลำน้ำยัง แม่น้ำชีถือว่าเป็นแม่น้ำที่มีความยาวมากที่สุดในประเทศไทย มีความยาวมากที่สุด 765 กิโลเมตร ไหลผ่านหลายจังหวัดรวมทั้งจังหวัดมหาสารคาม ซึ่งมีความสำคัญทั้งทางด้านการเกษตรและใช้สำหรับอุปโภคของประชาชนในจังหวัดนี้ งานวิจัยนี้จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับสาหร่ายน้ำมันขนาดเล็กเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ในการสะสมไขมันต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

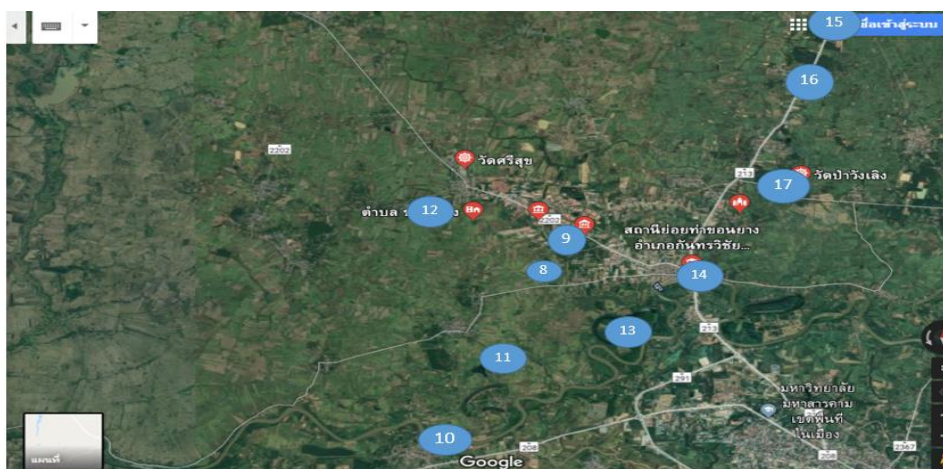
1. การเก็บตัวอย่างสาหร่าย

สุ่มเก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้ถุงพลาสติกตอนขนาดตา 10 ไมโครเมตร ลากในแนวเฉียงจากระดับความลึกจากผิวน้ำ 50 เซนติเมตร ในกลุ่มแม่น้ำชีในเขตพื้นที่ 3 อำเภอของจังหวัดมหาสารคาม ได้แก่ อำเภอกันทรวิชัย 10 จุด อำเภอเมือง 7 จุด อำเภอโกสุม 3 จุด รวมทั้งหมด 20 จุด

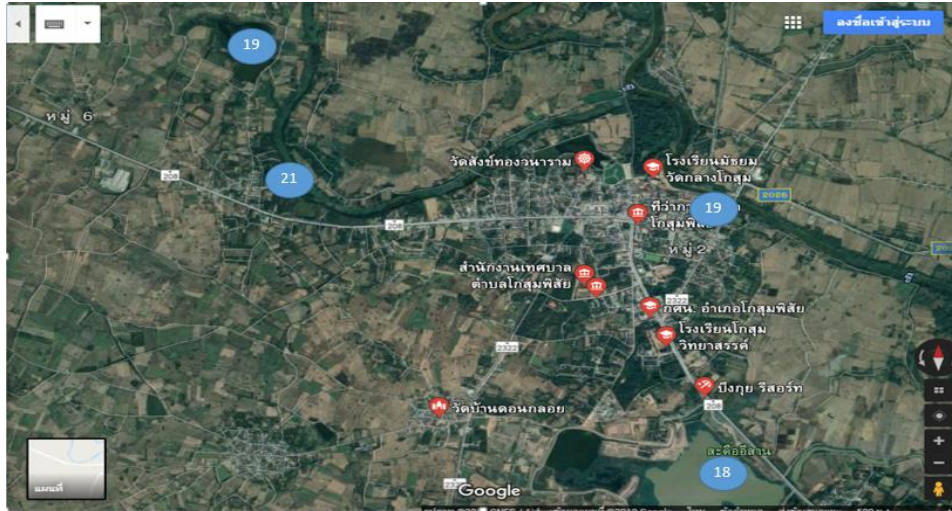
ดั่งภาพที่ 1-3 โดยเก็บตัวอย่างจุดละ 3 ครั้ง ในช่วงเดือนมิถุนายน 2561 เวลาในการเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่ 08.00-12.00 น. จากนั้นเทตัวอย่างใส่ขวดพลาสติกใสเพื่อนำไปตรวจสอบชนิดต่อไป



ภาพที่ 1 พื้นที่เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กในลุ่มแม่น้ำชี อำเภอมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม



ภาพที่ 2 พื้นที่เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กในลุ่มแม่น้ำชี อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม



ภาพที่ 3 พื้นที่เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กในลุ่มแม่น้ำชี อำเภอโกสุมพิสัย จังหวัดมหาสารคาม

- จุดที่ 1 ห้วยคะคางวัดป่าวังน้ำเย็น ตำบลเกิ้ง อำเภอเมือง
- จุดที่ 2 วังมัจฉา ตำบลเกิ้ง อำเภอเมือง
- จุดที่ 3 ห้วยคะคางหอพักวิทยาลัยพยาบาล ตำบลเกิ้ง อำเภอเมือง
- จุดที่ 4 แม่น้ำชีวัดบ้านเกิ้งเหนือ ตำบลเกิ้ง อำเภอเมือง
- จุดที่ 5 คลองกุดนางไย ตำบลตลาด อำเภอเมือง
- จุดที่ 6 ห้วยคะคางวัดป่าศุภมิตร ตำบลตลาด อำเภอเมือง
- จุดที่ 7 แก่งเลิงจาน ตำบลแก่งเลิงจาน อำเภอเมือง
- จุดที่ 8 ตึกอาร์เอ็น มมส ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย
- จุดที่ 9 คลองน้ำหน้าคอนโตอาจารย์ ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย
- จุดที่ 10 บ้านท่าสองคอน ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย
- จุดที่ 11 บ้านแกะแก้ว ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย
- จุดที่ 12 คลองคูบ้านดอนหนอง ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย
- จุดที่ 13 ห้วยหน้าวัดดอนหนาด ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย
- จุดที่ 14 วัดเจริญผล ตำบลท่าขอนยาง อำเภอกันทรวิชัย
- จุดที่ 15 อ่างเก็บน้ำหนองบัว ตำบลโคกพระ อำเภอกันทรวิชัย
- จุดที่ 16 บ้านหัวขัว ตำบลหัวขัว อำเภอกันทรวิชัย
- จุดที่ 17 ห้วยหลังวัดป่าวังเลิง ตำบลหัวขัว อำเภอกันทรวิชัย
- จุดที่ 18 บึงกุย ตำบลหัวขวาง อำเภอโกสุมพิสัย
- จุดที่ 19 แม่น้ำชีวัดโกสุมใต้ ตำบลแพง อำเภอโกสุมพิสัย
- จุดที่ 20 ห้วยบ้านแพง ตำบลแพง อำเภอโกสุมพิสัย

2. การศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายขนาดเล็กที่สะสมไขมัน

ตรวจสอบลักษณะสัณฐานของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยการเตรียมสไลด์สดและศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยี่ห้อ Olympus รุ่น BX53F และบันทึกภาพ เพื่อจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายตามวิธีของยูวตี (2556), ลัดดา (2540), Graham and Wilcox (2009) และ Bold and Wynne (1978) จากนั้นนำสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละชนิดมาตรวจสอบการสะสมไขมันโดยเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยของ Magdalena *et al.* (2010) Becker (1994) และ Chisti, (2007)

3. การตรวจสอบการสะสมไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเทคนิคการย้อมสีไนล์เรด (Nile red staining) โดยดัดแปลงจาก Chen *et al.* (2009)

3.1 คัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเทคนิคการล้างเซลล์ด้วยไมโครปิเปต (micropipette washing) ตามวิธีของลัดดา (2540) แล้วนำไปเลี้ยงอาหารเหลวสูตร BG-11 เป็นเวลา 45 วัน

3.2 คัดเลือกเซลล์สาหร่ายมา 5 ชนิด คือ *Botryococcus braunii*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. และ *Chlamydomonas* sp. มาตรวจสอบการสะสมไขมันในเซลล์ โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 การเตรียมสารละลายไนล์เรด โดยชั่งสารไนล์เรดปริมาณ 1 มิลลิกรัม ผสมลงในตัวทำละลายอะซิโตน (acetone) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.2.2 การเตรียม DMSO (dimethyl sulfoxide) ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปิเปต DMSO ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 75 มิลลิลิตร ปิเปตดูดสาหร่าย 5 ไมโครลิตร ผสมกับ DMSO ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ 100 ไมโครลิตร และสีไนล์เรด 10 ไมโครลิตร ใช้ไม้จิ้มฟันผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายที่ย้อมแล้วไปเตรียมเป็นสไลด์สดเพื่อนำไปตรวจสอบความสามารถในการสะสมไขมันด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ถ้าสะสมไขมันจะเห็นการเรืองแสงสีเหลือง ถ้าไม่มีไขมันจะเป็นสีแดง แล้วบันทึกภาพ

ผลการวิจัย

1. ความหลากหลายของสาหร่ายขนาดเล็กที่สะสมไขมัน

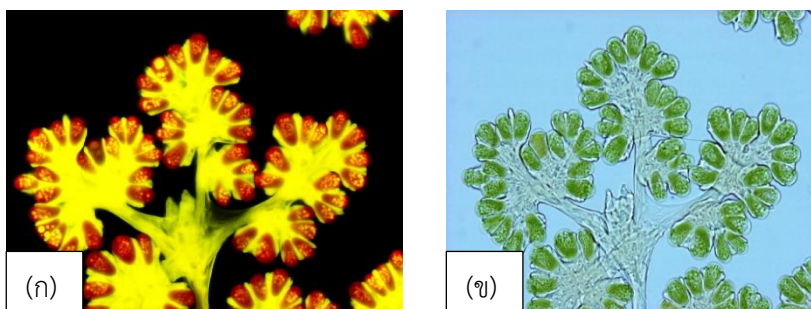
ผลการนำสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละชนิดมาตรวจสอบการสะสมไขมันโดยเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยของ Magdalena *et al.* (2010) Becker (1994) และ Chisti (2007) พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถสะสมไขมันได้ทั้งหมด มี 4 ดิวิชัน คือ ดิวิชัน Cyanophyta พบ 7 ชนิด ดิวิชัน Chlorophyta พบ 20 ชนิด ดิวิชัน Bacillariophyta พบ 6 ชนิด และดิวิชัน Euglenophyta พบ 2 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สหราชอาณาจักรขนาดเล็กสะสมไขมันที่พบจากกลุ่มแม่น้ำชีในเขตพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม

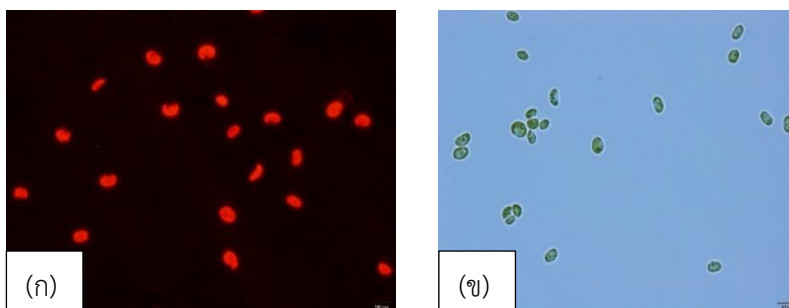
ดิวิชัน	ชนิด	จุดที่สำรวจพบ
Cyanophyta	<i>Coelomonon</i> sp.	6, 8, 12, 14
	<i>Microcystis novacekii</i>	8
	<i>Microcystis</i> sp.	1, 6, 14, 16, 17
	<i>Oscillatoria</i> sp.	1, 5, 6, 7, 15, 16, 18, 19
	<i>O. tenuis</i>	13
	<i>Spirulina</i> sp.	13, 15
	<i>Synechococcus</i> sp.	6
Bacillariophyta	<i>Cyclotella</i> sp.	11
	<i>C. meghiniana</i>	20
	<i>Diatoma</i> sp.	4, 18
	<i>Navicula</i> sp.	1, 5, 6, 8, 11, 12, 14
	<i>Nitzschia</i> sp.	8, 15
	<i>N. improvisa</i>	1
Euglenophyta	<i>Euglena acus</i>	16
	<i>Euglena</i> sp.	5, 6, 7, 17
Chlorophyta	<i>Ankistrodesmus</i> sp.	20
	<i>Botryococcus</i> sp.	1, 12
	<i>B. braunii</i>	20
	<i>Chlamydomonas</i> sp.	6
	<i>Chlorella</i> sp.	3, 5, 6, 10, 11
	<i>Closterium cornu</i>	12
	<i>C. acutum</i>	9
	<i>Closterium</i> sp.	4, 16, 17
	<i>C. parvulum</i>	20
	<i>Haematococcus</i> sp.	6
	<i>Kirchneriella lunaris</i>	11
	<i>Kirchneriella</i> sp.	9, 12
	<i>Monoraphidium</i> sp.	6
	<i>Micrasterias truncata</i>	9
	<i>M. foliacea</i>	15
	<i>Pediastrum simplex</i>	8
	<i>Pediastrum</i> sp.	2, 4, 6, 17, 19
	<i>Scenedesmus</i> sp.	3, 5, 6, 9, 12, 14, 17, 19
	<i>Spirogyra</i> sp.	7, 10
	<i>Volvox</i> sp.	13, 20

2. การตรวจสอบการสะสมไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเทคนิคการย้อมสีไนล์เรด โดยดัดแปลงจาก Chen et al. (2009)

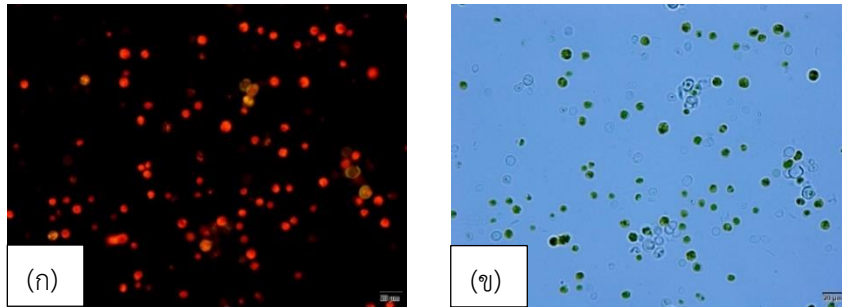
ผลการตรวจสอบการสะสมไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเทคนิคการย้อมสีไนล์เรด พบว่าเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *B. braunii* มีการเรืองแสงสีเหลืองมากที่สุดเกือบเต็มเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 4 5 และ 6 คือ ชนิด *Chlamydomonas* sp. และ *Chlorella* sp. ตามลำดับ และภาพที่ 8 คือ *Scenedesmus* sp. เซลล์มีสีแดงอมส้ม ส่วนภาพที่ 7 ชนิด *Monoraphidium* sp. มีการเรืองแสงสีเหลืองสลับกับสีแดง สังเกตเห็นได้ชัดเจนจากภาพ ซึ่งในสาหร่ายทุกชนิดก่อนย้อมสีไนล์เรดสามารถมองเห็นคลอโรพลาสต์ในเซลล์ได้อย่างชัดเจน หลังการย้อมสีไนล์เรดจะปรากฏการเรืองแสงสีเหลืองซึ่งเป็นบริเวณที่มีการสะสมไขมัน ส่วนบริเวณสีแดงประกอบด้วยคลอโรพลาสต์และสารอื่น ๆ ที่เซลล์สร้างขึ้น



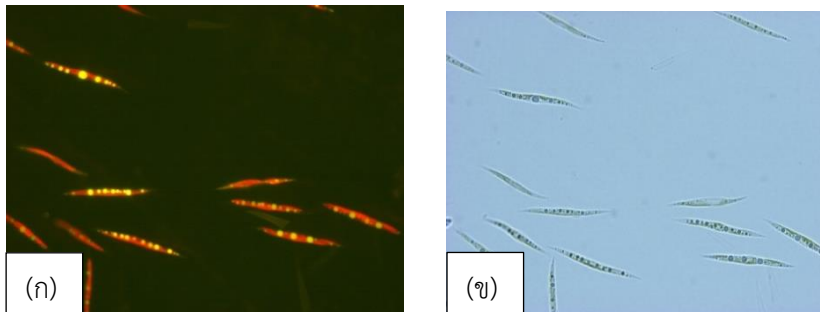
ภาพที่ 4 การตรวจสอบน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *B. braunii* โดยเทคนิคการย้อมสีไนล์เรด (ก) หลังการย้อมสีไนล์เรด (ข) ก่อนย้อมสีไนล์เรด



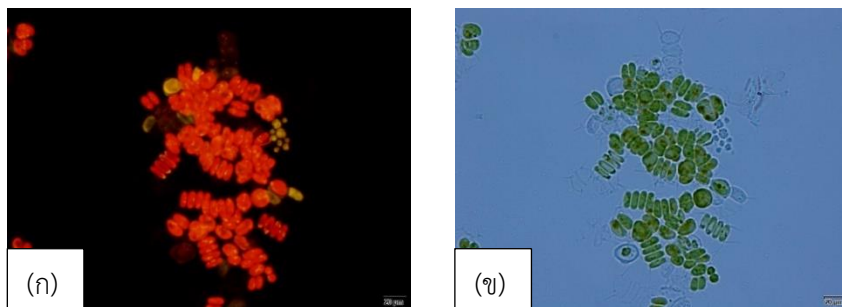
ภาพที่ 5 การตรวจสอบน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlamydomonas* sp. โดยเทคนิคการย้อมสีไนล์เรด (ก) หลังการย้อมสีไนล์เรด (ข) ก่อนย้อมสีไนล์เรด



ภาพที่ 6 การตรวจสอบน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. โดยเทคนิคการย้อมสีไนล์เรด
(ก) หลังการย้อมสีไนล์เรด (ข) ก่อนย้อมสีไนล์เรด



ภาพที่ 7 การตรวจสอบน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *Monoraphidium* sp. โดยเทคนิคการย้อมสีไนล์เรด (ก) หลังการย้อมสีไนล์เรด (ข) ก่อนย้อมสีไนล์เรด



ภาพที่ 8 การตรวจสอบน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus* sp. โดยเทคนิคการย้อมสีไนล์เรด
(ก) หลังการย้อมสีไนล์เรด (ข) ก่อนย้อมสีไนล์เรด

อภิปรายผลการวิจัย

สาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่สะสมไขมันจากกลุ่มแม่น้ำชีในเขตพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม ทั้งหมด 20 จุด ในเขตพื้นที่ 3 อำเภอ คือ อำเภอกันทรวิชัย อำเภอเมือง และอำเภอโกสุมพิสัย ในเดือนมิถุนายน 2561 พบทั้งหมด 4 ดิวิชัน ได้แก่ Bacillariophyta Chlorophyta Cyanophyta และ Euglenophyta การตรวจสอบน้ำมันในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีการย้อมสีไนล์เรดเป็นวิธีการที่สามารถตรวจสอบน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็กได้สะดวกและรวดเร็ว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ในการทดลองนี้ศึกษาการสะสมไขมันในสาหร่ายบางชนิดเท่านั้น เนื่องจากต้องใช้ความชำนาญ

อย่างสูงในการคัดเลือกเซลล์สาหร่ายให้ได้เซลล์เพียงชนิดเดียวแล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงในสารอาหาร BG-11 ทำการเลี้ยงไปเรื่อย ๆ จนอาหารที่เลี้ยงลดลงเกือบหมดใช้เวลา 45 วัน จากนั้นนำไปย้อมด้วย สีนไอร์แลนด์ที่เตรียมไว้

ในการศึกษานี้ได้ทำการแยกสาหร่ายด้วยไมโครปิเปต แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร BG-11 เพื่อทำการตรวจสอบการสะสมไขมันด้วยเทคนิคการย้อมสีไนล์เรด และเมื่อพบไขมันใน เซลล์จะเรืองแสงสีเหลืองเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Rattanapoltee *et al.*, 2013; Gusbeth *et al.*, 2016) ในงานวิจัยนี้เห็นสีเหลืองชัดเจนมากที่สุดในสาหร่ายชนิด *B. braunii* ที่เก็บได้จาก 3 จุด คือจุดที่ 1 ห้วยคเคางใกล้วัดป่าวังน้ำเย็น ตำบลเก็ง อำเภอมือง จุดที่ 12 คูคลอง บ้านดอนหนอง ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย และจุดที่ 20 ห้วยบ้านแพง ตำบลบ้านแพง อำเภอกอสน์พิสัย จังหวัดมหาสารคาม ซึ่งสาหร่ายชนิดนี้มีรายงานว่าพบน้ำมันในเซลล์ประมาณ 29-75 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง มีน้ำมันมากอันดับสองรองจากสาหร่ายชนิด *Schizochytrium* sp. มีน้ำมันมากที่สุดคือ 50-77 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Abishek *et al.*, 2014) (Metzger and Largeau, 2005) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ สุรินทร์ และคณะ (2555) ได้ทำการคัดเลือก สาหร่ายเพื่อสะสมไขมันไปโอดีเซลพบว่า *B. braunii* มีไขมันมากที่สุด 13.2 ± 0.2 เปอร์เซ็นต์ และกรด ไขมันที่มีปริมาณมากที่สุดคือ กรดปาล์มิติก Prasertsin and Peerapornpisal (2018) ทำการคัด แยกและตรวจสอบความสามารถในการสะสมไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำจืดในภาคเหนือ ของประเทศไทย พบว่า *B. braunii* มีปริมาณน้ำมันมากที่สุด 39.25 ± 0.32 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก แห้ง Boni *et al.* (2018) ศึกษาไขมันจาก *B. braunii* เพื่อศึกษาภาพในการผลิตไบโอดีเซล ด้วยวิธีการ สกัดแบบซอกซ์เล็ท (soxhlet) นอกจากนี้ Dilia and Leila (2018) พบว่า *B. braunii* มีปริมาณของ กรดโอเลอิกอยู่ระหว่าง 15.65-35.85 เปอร์เซ็นต์ กรดไลโนเลอิก 3.05-23.15 เปอร์เซ็นต์ กรดปาล์มิติก 4.03-22.13 เปอร์เซ็นต์ และกรดสเตียริก 0.48-15.41 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นตัวแปรในการเลือกน้ำมันจาก สาหร่ายชนิดนี้ในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากอัตราส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวไม่แตกต่างกันมาก นอกจากนี้มีการใช้ประโยชน์จากน้ำมันสาหร่ายในการผลิตเชื้อเพลิงเครื่องบิน ซึ่งผลิตโดยโรง กลั่นน้ำมันเชื้อเพลิงสาหร่ายแห่งแรกในญี่ปุ่น โดยจะนำไปใช้กับเครื่องบินเจ็ทในปริมาณ 33,000 แกลลอนต่อปี ซึ่งแสดงถึงแนวโน้มความสำเร็จในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายในอนาคต

งานวิจัยนี้คัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กมา 5 ชนิด เพื่อตรวจสอบการสะสมไขมันได้แก่ *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp., *B. braunii* และ *Monoraphidium* sp. ส่วนสาหร่ายที่ไม่ได้ทดสอบย้อมสีไนล์เรดสามารถตัดสินว่าสะสมไขมันได้ค่อนข้างสูงจาก บทความวิจัยหนังสือและรายงานการวิจัยต่าง ๆ อาทิเช่น *Monoraphidium* sp., *Ankistrodesmus* sp., *Coelomonas* sp., *Oscillatoria* sp., *O. tenuis*, *Microcystis* sp., *M. novacekii*, *Spirulina* sp., *Synechococcus* sp., *Closterium* sp., *C. parvulum*, *C. actum*, *C. cornu*, *Kirchneriella* sp., *K. lunaris*, *Botryococcus* sp., *B. braunii*, *M. foliacea*, *M. truncata*, *Pediastrum* sp., *P. simplex*, *Volvox* sp., *Haematococcus* sp., *Spirogyra* sp., *Navicula* sp., *Cyclotella* sp., *C. meghiniana*, *Diatom* sp., *Nitzschia* sp., *N. improvisa*, *Euglena* sp. และ *E. acus* (Abishek *et al.*, 2014; Metzger and Largeau, 2005; Becker, 1994; Patel *et al.*, 2017; Dehaghani and Pirouzfar, 2018) และได้มีงานวิจัยอื่น ๆ ที่สนับสนุนการสะสมไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก อาทิเช่น อรพรรณ และรัฐ

ภูมิ (2556) ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันชีวภาพที่สกัดด้วยเอกเซนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่า *Spirogyra* sp. มีปริมาณน้ำมันมากที่สุด 14.05 ± 3.00 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักน้ำมันต่อน้ำหนักสาหร่ายแห้ง) รองลงมาคือ *Microcystis* sp. 13.35 ± 3.00 เปอร์เซ็นต์ และน้อยที่สุดใน *Cladophora* sp. 5.84 ± 0.10 เปอร์เซ็นต์ และผลการวิเคราะห์ดังกล่าวนี้สามารถนำมาพัฒนาในการผลิตพลังงานทดแทนในรูปแบบของน้ำมันไบโอดีเซลได้ ภาวนี และคณะ (2559) ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญและการสะสมไขมันในเซลล์เปือกของสาหร่ายขนาดเล็กพบว่า *Chlorella* sp. ให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 32.814 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก และเมื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณไขมันพบว่ามีเหมาะสมในการสะสมไขมันไบโอดีเซล Abdo *et al.* (2014) ตรวจสอบองค์ประกอบของกรดไขมันและปริมาณน้ำมันทั้งหมดของสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 19 สายพันธุ์ ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างจากแม่น้ำไนล์ของอียิปต์ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร BG-11 ก่อนทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตและตรวจสอบปริมาณน้ำมันพบว่า *M. aeruginosa* มีปริมาณน้ำมันสูงที่สุดคือ 30 เปอร์เซ็นต์ Nascimento *et al.* (2014) วิเคราะห์ไบโอดีเซลจากน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็กเปรียบเทียบกับน้ำมันจากพืช พบว่าน้ำมันจากสาหร่าย 6 สายพันธุ์ มีผลผลิตของน้ำมันที่สูงกว่า 40 มิลลิลิตร และ *B. braunii* มีปริมาณน้ำมัน 45.0 ± 3.6 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักแห้ง Abdo *et al.* (2014) ทำการแยกสาหร่ายสะสมไขมันเพื่อเป็นกุญแจสำคัญในการสะสมไขมันไบโอดีเซล โดยตรวจสอบการสะสมไขมันด้วยเทคนิคการย้อมสีไนล์เรด และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ที่ค่า excitation 450-490 นาโนเมตร และค่า emission 515 นาโนเมตร โดยนิวทรีลลิฟิดหรือไตรกลีเซอไรด์จะปรากฏจุดสีเหลือง และพบว่า *M. aeruginosa* ปรากฏสีเหลืองชัดเจนและมีปริมาณไขมันสูงถึง 30 ± 0.3 เปอร์เซ็นต์ Patel *et al.* (2017) ศึกษาผลจากการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 7 สายพันธุ์ เพื่อใช้สำหรับเป็นแหล่งผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ โดยวัดการเจริญเติบโต ชีวมวล คาร์โบไฮเดรตและ ไขมัน พบว่า *Oscillatoria* sp. มีปริมาณไขมัน 8.9 เปอร์เซ็นต์ Prasertsin and Peerapornpisal (2018) ทำการคัดแยกและตรวจสอบความสามารถในการสะสมไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำจืดในภาคเหนือของประเทศไทย พบว่า *B. braunii* มีปริมาณน้ำมันมากที่สุด 39.25 ± 0.32 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง และสาหร่ายขนาดเล็กอื่น ๆ ที่พบน้ำมันได้แก่ *K. lunaris*, *P. duplex*, *C. pusillum*, *M. foliacea* และ *C. raciborskii* มีปริมาณน้ำมัน 24.30 ± 0.34 14.50 ± 0.20 10.73 ± 0.25 10.45 ± 0.07 และ 8.24 ± 0.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Unpaprom *et al.* (2015) รายงานการวิจัยการพัฒนาและศึกษาวิธีการนำน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็กมาใช้ในการผลิตพลังงานชีวภาพ โดยได้ทำการเพาะเลี้ยง *S. acuminatus* ในน้ำทิ้งจากโรงเลี้ยงสุกร เพื่อการบำบัดของเสียคู่กับการผลิตไบโอดีเซล พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะผลิตไบโอดีเซลจากชีวมวลของสาหร่ายเปือกโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการอบแห้ง Dehaghani and Pirouzfar (2018) ศึกษาสาหร่ายขนาดเล็กระหว่าง *Chlorella* sp. และ *S. platensis* พบว่า *Chlorella* sp. มีความเหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลมากกว่าเนื่องจากเจริญเติบโตเร็ว ผลผลิตชีวมวลสูง มีปริมาณและชนิดของกรดไขมันที่เหมาะสม (C14:0, C16:0 และ C18:0) ซึ่งเป็นสารประกอบของกรดไขมันทั่วไปในไบโอดีเซล

เมื่อวิเคราะห์ผลการตรวจสอบจากตัวอย่างทั้งหมด 4 ดิวิชัน พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กที่สะสมไขมันได้ทั้งหมด 35 ชนิด โดยดิวิชัน Chlorophyta พบมากที่สุด 57.14 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา

คือ Cyanophyta 20.00 เปอร์เซ็นต์ Bacillariophyta 17.14 เปอร์เซ็นต์ Euglenophyta 5.71 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าดิวซี้น Cyanophyta พบสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถสะสมไขมันได้ค่อนข้างสูง 7 ชนิด ได้แก่ *Coelomonon* sp., *Oscillatoria* sp., *O. tenuis*, *Microcystis* sp., *M. novacekii*, *Spirulina* sp. และ *Synechococcus* sp. ดิวซี้น Chlorophyta พบสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถสะสมไขมันได้ 20 ชนิด ได้แก่ *Monoraphidium* sp., *Ankistrodesmus* sp., *Closterium* sp., *C. parvulum*, *C. actum*, *C. comu*, *Kirchneriella* sp., *K. lunaris*, *Botryococcus* sp., *B. braunii*, *M. foliacea*, *M. truncata*, *Pediastrum* sp., *P. simplex*, *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., *Volvox* sp., *Chlamydomonas* sp., *Haematococcus* sp. และ *Spirogyra* sp. ดิวซี้น Bacillariophyta 6 ชนิด ได้แก่ *Navicula* sp., *Cyclotella* sp., *C. meghiniana*, *Diatom* sp., *Nitzschia* sp., *N. improvisa* และ Euglenophyta 2 ชนิด ได้แก่ *Euglena* sp. และ *E. acus* ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบจำนวนชนิดสาหร่ายน้ำมันมากกว่าหนองเบี้ยและหนองควายตก อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ที่สำรวจพบสาหร่ายทั้งหมดเพียง 10 และ 11 ชนิด ตามลำดับ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2554) รวมทั้งมากกว่าจำนวนชนิดของสาหร่ายทั้งหมดที่พบที่อ่างเก็บน้ำห้วยถ้ำแซ่ อำเภอตระการพืชผล จังหวัดอุบลราชธานี ที่พบสาหร่ายทั้งหมดเพียง 20 เท่านั้น (ปริญา, 2559)

สรุปผลการวิจัย

ผลการตรวจสอบสาหร่ายน้ำมันขนาดเล็กในกลุ่มแม่น้ำชีในพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม พบว่าสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่สะสมไขมันได้ทั้งหมด 35 ชนิด โดยดิวซี้น Chlorophyta พบมากที่สุด รองลงมาคือ Cyanophyta Bacillariophyta และ Euglenophyta ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบโดยการย้อมสีในสไลด์พบ *B. braunii* เซลล์มีสีเหลืองมากที่สุดสังเกตเห็นได้ชัดเจน สาหร่ายชนิดนี้พบได้ที่จุดที่ 1 ห้วยคเคางใกล้วัดป่าวังน้ำเย็น ตำบลเก็ง อำเภอเมือง จุดที่ 12 แหล่งน้ำหนองคู บ้านดอนหนอง ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย และจุดที่ 20 ห้วยบ้านแพง ตำบลบ้านแพง อำเภอโกสุมพิสัย จังหวัดมหาสารคาม สาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่สะสมไขมันพบว่ามีการแพร่กระจายเชิงชนิดจำนวนมากที่สุด ณ จุดที่ 6 คือห้วยคเคางวัดป่าศุภมิตร ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม มีจำนวน 12 ชนิด ส่วนจุดที่ 2 วังมัจฉา ตำบลเก็ง อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม พบมีการแพร่กระจายเชิงชนิดจำนวนน้อยที่สุด โดยพบเพียง 1 ชนิด ข้อมูลจากงานวิจัยนี้ถือว่าเป็นรายงานครั้งแรกในการศึกษาเกี่ยวกับแหล่งที่พบสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กสะสมไขมันในลุ่มน้ำชี จังหวัดมหาสารคาม เพื่อใช้เป็นแหล่งเก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กในการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิริวิชญ์ เพชรจุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรพร กิตติศาสตร์ และดร.เอกพจน์ ศรีฟ้า ที่ให้คำแนะนำและเจ้าหน้าที่ทุกท่าน จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการถ่ายภาพและการย้อมสี ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยในครั้งนี้จนบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

- ปริญญามูลสิน. (2559). ความหลากหลายของสาหร่ายขนาดใหญ่และคุณภาพน้ำบางประการ ในอ่างเก็บน้ำห้วยถ้ำแซ อำเภอดุสิต จังหวัดอุบลราชธานี. *วารสารวิจัยและพัฒนา มจร.*, 39(1).
- ภาณินี จรุงศิริวิมล จารุวรรณ ชลสงคราม วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย สมัลลิกา โมลากุล และ ประมุข ภาระกุลสุขสถิต. (2559). การเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตลิพิดระหว่าง *Ankistrodesmus* sp. IFRPD No. 1061 และ *Chlorella* sp. IFRPD No. 1092 ในบ่อเปิดแบบรางคู่. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 54* (หน้า 1004-1011). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ยุวดี พิรพรพิศาล. (2556). *สาหร่ายน้ำจืดในประเทศไทย*. (พิมพ์ครั้งที่ 2). เชียงใหม่: โชตนาพรินท์ จำกัด.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. (2540). *คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน*. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิวคุปต์ ัญญเจริญรัตน์ รัตนชัย ไพรินทร์ และทรงพล ชื่นคำ. (2556). การศึกษาการสกัดน้ำมันจากสาหร่าย *Spirogyra* sp. ผลิตเป็นไบโอดีเซลเพื่อเป็นพลังงานทดแทน. *วิทยาศาสตร์เกษตร*, 44(2 พิเศษ), 349-352.
- สถาบันวิจัยและพัฒนาพลังงานนครพิงค์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. (2554). *สาหร่ายน้ำมัน: น้ำมันในอนาคต!*. สืบค้นเมื่อ 24 สิงหาคม 2562, จาก: <http://www.erd.cmu.ac.th/index.php/article/515?category=14>.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.). (2554). *โครงการสำรวจสถานภาพพื้นที่ชุ่มน้ำประเภทหนองบึงน้ำจืดของประเทศไทย*. กรุงเทพฯ.
- สุนิรัตน์ เรืองสมบูรณ์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ ปวีณา ทวีกิจการ และมณฑล แก่นมณี. (2555). *การคัดเลือกสายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีไขมันสูงแบบหมวมวลเพื่อความเป็นไปได้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ*. ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- อรพรรณ พรหมธนพันธ์ และรัฐภูมิ พรหมณะ. (2556). น้ำมันชีวภาพที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวบางชนิดที่พบในจังหวัดพะเยาและจังหวัดน่าน. *นเรศวรพะเยา*, 6(2), 96-99.
- Abdo, S.M., Ahmed, E., El-Enin, S.A., El Din, R.S., Diwani, G.E. and Ali, G. (2014). Qualitative and quantitative determination of lipid content in microalgae for biofuel production. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 5(3), 223-228.
- Abishek, M.P., Patel, J. and Pajin, A.P. (2014). Algae oil: a sustainable renewable fuel of future, *Biotechnology Research International*, 2014.,(1)1-8
- Becker, E.W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. *Experimental Agriculture*. London: Cambridge University Press.

- Bold, H.C. and Wynne, M.J. (1978). *Introduction to the algae. Structure and reproduction*. New Delhi: Prentice hall of india private limited.
- Boni, J., Aida, S. and Leila, K. (2018). Lipid extraction method from microalgae *Botryococcus braunii* as raw material to make biodiesel with soxhlet extraction. *Journal of Physics*, 1095(1). 012004.
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M. and Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 2009(77), 41-47.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 2007(25), 294-306.
- Dehaghani, A.H.S. and Pirouzfard, V. (2018). Investigation on the effect of microalgae *Chlorella* sp. and *Spirulina* on biodiesel production. *Petroleum Chemistry*, 58(8), 702-708.
- Dilia, P. and Leila, K. (2018). Fatty acids from microalgae *Botryococcus braunii* for raw material of biodiesel. *Journal of Physics*, 1095(1). 012010.
- Graham, L.E., Graham J. M. and Wilcox, L.W. (2009). *Algae*. (2nd ed). California, USA: Benjamin Cummings.
- Gusbeth, C.A., Eing, C., Göttel, M., Sträßner, R. and Frey, W. (2016). Fluorescence diagnostics for lipid status monitoring of microalgae during cultivation. *Journal of Renewable Energy & Biofuels*, 2016(1), 1-12.
- Magdalena, F., Stefania, J. and Tys, J. (2010). Microalgae for biofuel production and environmental applications: a review. *African Journal of Biotechnology*, 9(54), 9227-9326.
- Metzger, P. and Largeau, C. (2005). *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66(5), 486-496.
- Nascimento, A.I., Marques, S.S.I., Cabanelas, I.T.D., Carvalho, G.C., Nascimento, M.A., Souza, C.O., Druzian, J.I., Hussain, J. and Liao, W. (2014). Microalgae versus land crops as feedstock for biodiesel: productivity, quality, and standard compliance. *BioEnergy Research*, 7(3), 1002-1003.
- Patel, V.K., Sundaram, S., Patel, A.K. and Kalra, A. (2017). Characterization of seven species of cyanobacteria for high-quality biomass production. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(1), 109-121.
- Prasertsin, T. and Peerapornpisal, Y. (2018). Distribution and isolation of microalgae for lipid production in selected freshwater reservoirs of northern Thailand. *Biodiversitas*, 19(1), 343-350.

- Rattapoltee, P. and Kaewkannetra, P. (2013). Nile red, an alternative fluorescence method for quantification of neutral lipids in microalgae. *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 7(9), 889-893.
- Unpaprom, Y., Tipnee, S. and Rameshprabu, R. (2015). Biodiesel from green alga *Scenedesmus acuminatus*. *International Journal of Sustainable and Green Energy*, 4(1-1), 1-6.